

氏名	いなだ こうしゅん 稲田 紘舜		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1989 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	Adverse effects of fluoroquinolone antibiotics on onset and exacerbation of aortic aneurysm and dissection （フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症増悪の有害作用）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	山内 淳史
	（副査） 福岡大学	教授	道具 伸也
	福岡大学	准教授	古賀 允久

内容の要旨

【緒言】

フルオロキノロン系抗菌薬は、最も一般的に処方されている抗菌薬であり、DNA ジャイレースの阻害や DNA トポイソメラーゼIVを阻害することで殺菌的に作用する。抗菌スペクトルが広域であるため、尿路感染症や呼吸器感染症をはじめとした多くの感染症に頻用されている。また、フルオロキノロン系抗菌薬の使用は心血管死亡リスクの増加と関連しており、モキシフロキサシン (moxifloxacin; MFLX)はそのリスクが最も高く、2~3 倍に増加することが報告されている (E. Gorelik et al., 2019)。さらに、臨床研究やメタアナリシス研究においてフルオロキノロン系抗菌薬の服用により大動脈瘤・大動脈解離 (Aortic aneurysm and dissection; AAD)のリスクが増大することが報告されている (C.C. Lee et al., 2015, S. Singh et al., 2017)。なかでも MFLX、シプロフロキサシン (ciprofloxacin; CPFX)及びレボフロキサシン (levofloxacin; LVFX)の 3 剤は AAD の有害作用と強く関連している。さらに 2019 年 1 月 10 日に厚生労働省は全てのフルオロキノロン系抗菌薬の重大な副作用に「大動脈瘤、大動脈解離を引き起こすことがある」と追記するように製薬会社に添付文書の改訂を指示しており、大動脈瘤および大動脈解離を合併している患者を「慎重投与」の対象とした。

現在、AAD の進行を抑制、さらに退縮させる効果的な治療法は存在しない。また腹部大動脈瘤 (Abdominal aortic aneurysm; AAA)はほとんどの場合、無症候性であり、破裂後の死亡率は 85~90%である (S. Singh et al., 2017)。細胞外マトリックスの分解、血管平滑筋細胞の減少及び中膜・外膜への炎症性細胞の浸潤が病理学的特徴として挙げられる。

オステオポンチン(osteopontin; OPN)はマクロファージ、血管平滑筋細胞、活性化 T 細胞より分泌され、炎症に関与している糖リン酸化タンパク質である。AAA 患者におい

て、OPN が血中および AAA 病変部で増加し、「OPN の血中濃度と AAA 増悪」に正の相関があるとの報告がある(Jonathan Golledge et al., 2007)。さらに、AAA モデル動物の AAA 病変で増加した OPN が、MMPs 発現を増加させ、細胞外基質を分解することで、AAA を発症・増悪させるとの報告もある(Jun LI et al., 2016)。

このように幅広い感染症に有効とされるフルオロキノロン系抗菌薬が頻用されているにも関わらず、重篤な有害作用である大動脈瘤・解離のリスクを上昇させることは、極めて問題である。しかし、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症機序は不明である。そこで本研究では、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の有害作用回避対策を構築するため、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症機序を解明し、フルオロキノロン系抗菌薬間でのリスクの相違を検討した。

【結果】

1. 中等度 AAD モデルマウスにおいて MFLX はオステオポンチン発現を増加させ、AAD を誘発する

4 週齢時の C57BL/6J マウスに高脂肪食の負荷を開始し、8 週齢時に浸透圧ミニポンプを皮下移植し、angiotensin II を 4 週間持続注入することで中等度 AAD モデルマウスを作成する。9 週齢時から水に溶解した MFLX (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹)を 3 週間連続で経口投与した。12 週齢時に腹部大動脈を評価した。

MFLX 投与群 (100 mg kg⁻¹ day⁻¹)は中等度 AAD モデルマウスにおいて腹部大動脈に AAD を誘発させた(図 1)。次に Hematoxylin and eosin (H&E) 及び elastica-van Gieson (EVG) 染色で組織学的に評価を行った。その結果、MFLX による血管径の拡大、破壊及びエラスチンの分解が観察された(図 2)。

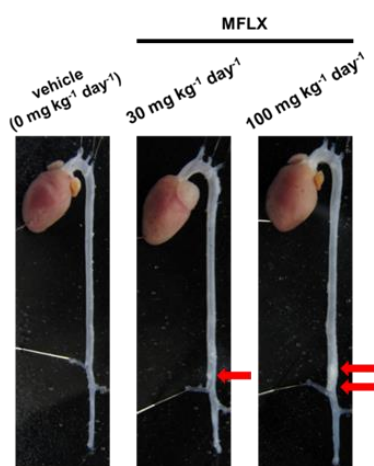


図1 MFLXによる中等度AADモデルマウスにおけるAAD誘発

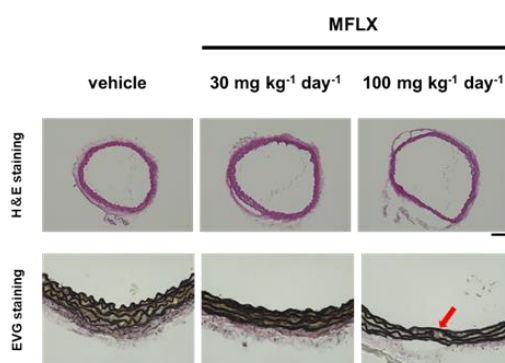


図2 MFLXによる血管径拡大およびエラスチン分解

免疫化学組織染色およびウエスタンブロット法により、中等度 AAD モデルマウスの大動脈組織における OPN 発現に対する MFLX の影響を評価した。MFLX 投与群 (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹) は vehicle 群と比較して、大動脈組織中の OPN 発現増加が免疫化学組織染色によって観察された(図 3)。さらに、MFLX 投与群 (30 and 100 mg kg⁻¹ day⁻¹) は vehicle 群と比較して大動脈組織における OPN タンパク発現を顕著に増加させた(図 4)。したがって、MFLX は大動脈組織における OPN 発現を増加させ、AAD の発症を誘発する可能性が示唆された。

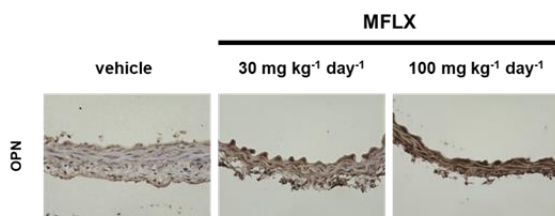


図3 MFLXによる大動脈血管壁におけるOPN発現増加

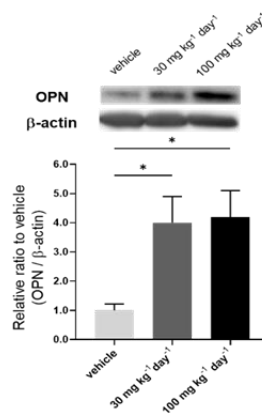


図4 MFLXによる大動脈組織におけるOPN発現増加

2. MFLX は RAW264.7 細胞において OPN 発現を増加させる

マクロファージは AAD の誘発及び増悪に重要な役割を果たしている。そこで培養マクロファージである RAW264.7 細胞を用いて MFLX による OPN タンパク発現変化を検討した。その結果、RAW264.7 細胞において MFLX は用量 (0~300 μM) 及び時間 (0~24 hours) 依存的に OPN タンパク発現を増加させ、300 μM, 24 時間で最も増加させた。次に OPN 発現の調節に関与している ERK1/2 及び JNK シグナルのリン酸化を評価した。その結果、MFLX は ERK1/2 及び JNK シグナルを 1 時間及び 8 時間で顕著に活性化させた。さらに、MFLX と ERK1/2 阻害剤である PD98059(図 5A) および JNK 阻害剤である SP600125(図 5B) の併用により MFLX による OPN タンパク発現増加を抑制させた。したがって、MFLX は RAW264.7 細胞において ERK1/2 および JNK シグナル経路を介して OPN タンパク発現を増加させることが示唆された。

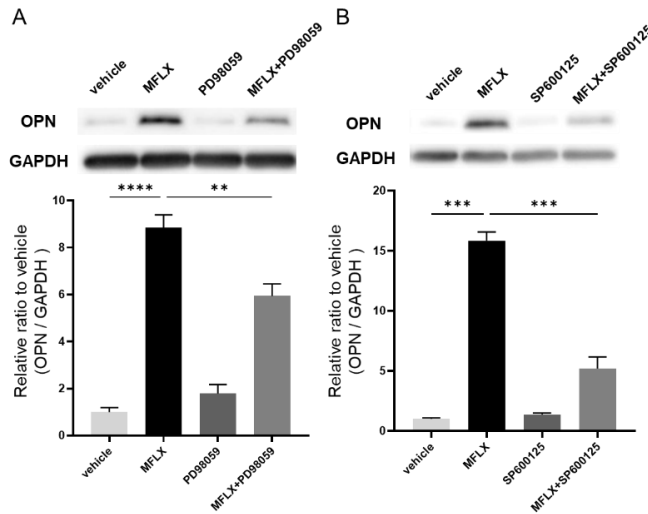


図5 ERK1/2およびJNKを介したMFLXによるOPN発現

3. フルオロキノロン系抗菌薬は血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を減少させる

MFLX、CPFVX 及び LVFX の 3 剤間で AAA 誘発及び増悪のリスクの相違を評価するため、血管平滑筋細胞における血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー (α -smooth muscle actin; α -SMA, smooth muscle protein 22 α ; SM22 α , smooth muscle myosin heavy chains; SMMHCs, and caldesmon) の発現を比較・検討した。

ラット大動脈血管平滑筋細胞 (rat aortic smooth muscle cells; RASMCs)において CPFVX、LVFX および MFLX は 300 μ M、96 時間処理により vehicle と比較して SM22 α , SMMHCs, caldesmon のタンパク発現を顕著に減少させた。一方、CPFVX および MFLX は vehicle と比較して α -SMA のタンパク発現を顕著に減少させたが、LVFX は減少させなかった (図 6)。

RASMCs において CPFVX および MFLX (300 μ M、96 時間)は vehicle と比較して SM22 α , α -SMA, SMMHCs, caldesmon の mRNA 発現を顕著に減少させた。一方、LVFX は、SM22 α , α -SMA, SMMHCs, caldesmon の mRNA 発現を減少させなかった (図 7)。

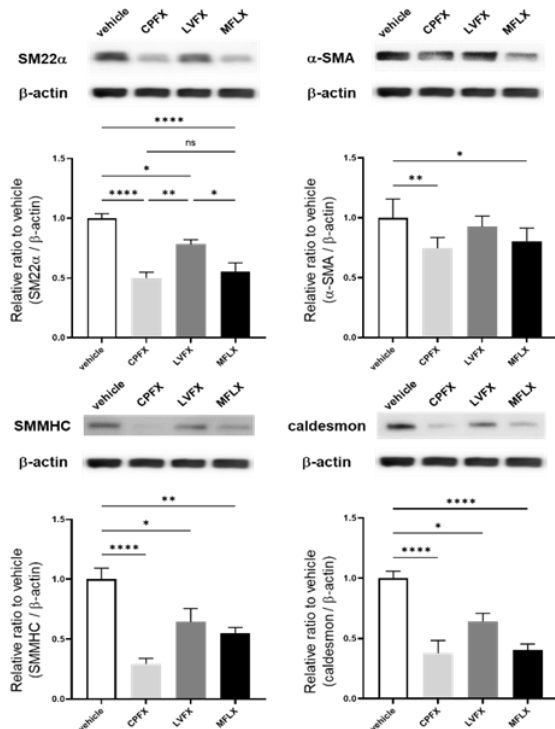


図6 フルオロキノロン系抗菌薬による血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカーのタンパク発現変化

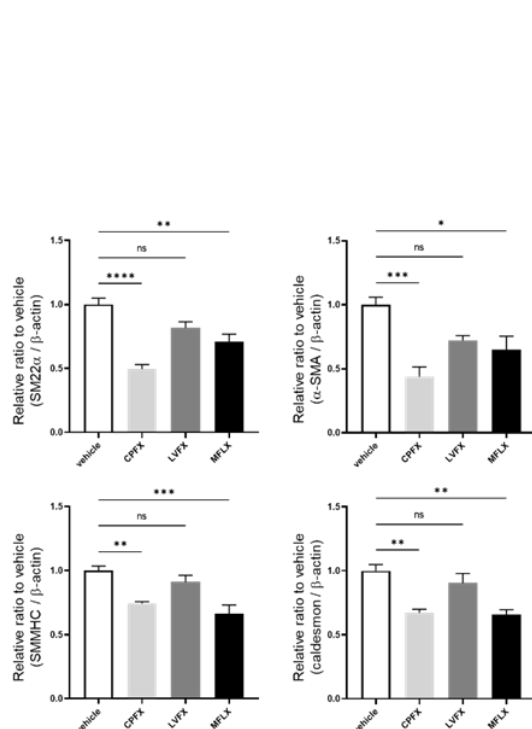


図7 フルオロキノロン系抗菌薬による血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカーのmRNA発現変化

【総括】

フルオロキノロン系抗菌薬の幅広い感染症に対する有用性や頻用度を考慮すれば、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の予防・軽減・回避対策の構築が急務である。しかし、その発症機序に関する基盤研究は殆どないのが現状である。

そこで本研究では、MFLX が中等度 AAD モデルマウスにおいて AAD 誘発に及ぼす影響を検討した。その結果、MFLX が OPN 発現を増加させることにより AAD を誘発させる可能性が示唆された。次に、マクロファージにおいて MFLX が OPN タンパク発現に及ぼす影響を検討した。その結果、RAW264.7 細胞において MFLX は ERK1/2 及び JNK シグナル経路を介して OPN タンパク発現を増加させることが示唆された。最後に AAD において血管の脆弱化に関与する血管平滑筋細胞に着目し、フルオロキノロン系抗菌薬間での AAD リスクの相違について検討した。RASMCs において CPF、LVF および MFLX は血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を顕著に減少させたことから、フルオロキノロン系抗菌薬は大動脈中膜を脆弱化させることにより AAD を誘発及び増悪させる可能性が示唆された。さらに LVF は CPF および MFLX と同程度に血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を減少させなかったため、3 剤の中では LVF が AAD を誘発及び増悪させるリスクが低い可能性が示唆された。

本研究の成果より、フルオロキノロン系抗菌薬の有害作用に関する予測・軽減・回避対策の構築が可能となり、本薬物の安全性と有効性のさらなる向上が期待できる。さらにはAAD患者及びAAD発症リスクの高い患者において、フルオロキノロン系抗菌薬の使用を避け、その他の抗菌薬の使用を選択することが可能となる。フルオロキノロン系抗菌薬を使用しなければいけない場合は、治療上の有益性を考慮した上でリスクの低いLVFXを選択するなど、患者背景に沿って慎重に選択すべきである。

【参考文献】

- E. Gorelik et al., Drug Saf 42 (2019) 529-538.
- C.C. Lee et al., JAMA Intern Med 175 (2015) 1839-1847.
- S. Singh., Am J Med 130 (2017) 1449-1457.e1449.
- Jonathan Golledge et al., Arterioscler Thromb Vasc Bio 27 (2007) 655-660.
- Jun LI et al., Exp Ther Med 12 (2016) 4007-4011.

審査の結果の要旨

フルオロキノロン系抗菌薬 (FQ) は、抗菌スペクトルが広域であるため、尿路感染症や呼吸器感染症など多くの感染症に頻用されている。近年の臨床研究やメタアナリシスにおいて、FQ による大動脈瘤・大動脈解離 (AAD) 発症リスク増大が報告されている。AAD は一般的に無症状で病状が進行し、破裂した場合の死亡率が非常に高い疾患であることから、海外および本邦において FQ 使用時の注意喚起がなされている。しかし、AAD 発症リスクに関する臨床でのエビデンスはあるものの、その発症機序は不明である。本学位論文は、マウス中等度 AAD モデルおよび細胞培養系を用いて、AAD 発症における FQ の作用部位ならびに関連分子を明らかにすることを目的として実施された。

第 1 章第 1 節では、高脂肪食負荷および angiotensin II 持続注入による中等度 AAD モデルマウスを作製し、FQ の大動脈組織病変化への影響を調べた。モデル薬物は、最もリスクが高いと報告のあるモキシフロキサシン (MFLX) を用いた。MFLX 投与群 ($100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) は中等度 AAD モデルマウスにおいて腹部大動脈に AAD を誘発させた。組織学的な評価では、血管径の拡大および弾性繊維エラスチンの分解が観察された。AAD を誘発する分子機構として、申請者はオステオポンチン (OPN) を起点とする細胞外基質の分解経路に着目して解析を進めた。MFLX 投与群 ($30, 100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) により、組織学的には血管中膜の脆弱化と OPN 発現増加が認められた。また、大動脈組織中の OPN タンパク発現量は顕著に増加していた。以上、本節で確立したマウス実験モデルにおいて臨床報告と同様に、MFLX によって AAD の発症が誘発された。マウスモデルでの基礎研究は報告されておらず、本研究における動物モデルの確立および AAD 発症の再現は意義深い。さらに、発症機序として OPN の増加による細胞外基質の変化を明らかにした点は、本有害作用の予測回避法を考案する上で重要な知見である。

第 1 章第 2 節では、大動脈組織での OPN 発現上昇を惹起する標的細胞としてマクロファージに着目し、細胞培養系を用いて MFLX の作用を検討した。MFLX は用量依存、時間依存的にマクロファージでの OPN タンパク発現量を増加させることが分かった。第 1 節での OPN 発現上昇は大動脈組織中のマクロファージから産生されたものである可能性が示唆された。さらに OPN 発現に関与するシグナル伝達経路として、ERK1/2 および JNK シグナルのリン酸化を評価した結果、それぞれの阻害剤は OPN 発現増加を有意に抑制した。以上、本節の結果は、MFLX による AAD 発症の標的細胞がマクロファージである可能性を示した点、OPN 発現の調節機構として ERK1/2 および JNK シグナルが関与している点を初めて明らかとしており、FQ の AAD 発症機序の解明を前進させる成果として高く評価できる。

第 2 章は、AAD 発症に重要な影響を及ぼす血管平滑筋の「表現型スイッチ」に対す

る FQ の影響を、MFLX、シプロフロキサシン (CPFX)、レボフロキサシン (LVFX) を対象に検討した。ラット大動脈血管平滑筋細胞に対して 3 剤それぞれ 300 μ M、96 時間処理を行うと、収縮表現型マーカー (α -SMA, SM22 α , SMMHC, caldesmon) が有意に減少した。また、この作用は LVFX で他の 2 剤と比較して弱かった。以上、本章の結果は、FQ が血管平滑筋の表現型を収縮型 (分化型) から増殖型 (脱分化型) へ変化させて AAD 発症を惹起している可能性を示唆するものである。また、血管平滑筋の表現型は血管恒常性に重要で様々な疾患に関わることから、FQ が血管平滑筋の表現型スイッチングに影響を及ぼす可能性を見出した本研究は大変興味深く、今後、多領域への研究拡大が期待できる。

本学位論文は、抗菌薬として広く使用される FQ の重篤な有害作用である AAD の発症とその機序を、基礎実験で明らかにすることを試みた研究である。研究では、FQ の標的部位が大動脈組織内マクロファージおよび血管平滑筋である可能性を指摘し、さらに発症機序としてそれぞれ OPN 発現、平滑筋細胞表現型の変容を明らかとした。これらの成果は、FQ による AAD 発症有害作用の予測・回避法の構築にあたり有用な基礎実験証拠を提示するとともに、FQ の作用に関して新たな視点を提起する、新規性および独創性を有した優れたものであり、博士学位論文として十分な内容であると判定した。併せて、公聴会審査における申請者の発表および質疑応答を鑑み、学位を授与するに応分の能力を有すると結論した。