

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

品川 文乃

専攻分野：小児科学

コース：

指導教授：山本 仁

主論文の題目：

幼若ラットにおけるキノロン系抗菌薬シプロフロキサシン
による関節障害の分子メカニズム

共著者：

皆川 貴美乃、西川 裕之、油井 直子、大沼 繁子、佐々
木 千鶴子、高木 正之、山本 仁、熊井 俊夫

緒言

シプロフロキサシンは、良好な抗菌活性と組織移行性を有する第二世代フルオロキノロン系抗菌薬である。キノロン系抗菌薬は、幼若動物において関節障害が起こることが報告されており、小児への投与は制限されている。しかしキノロン系抗菌薬による関節障害の発症機序については未解明な部分が多い。本研究では、シプロフロキサシンによる新たな関節障害メカニズムの解明を目的として、幼若ラットにシプロフロキサ

シンを反復経口投与することで作製した関節障害モデルラットの関節軟骨を用いて、組織学的検討及び液体クロマトグラフ質量分析法を用いたショットガンプロテオミクス解析により、網羅的なタンパク質発現解析を行った。

方法・対象

3週齢雄SD系ラットを6匹ずつ3群に分け、それぞれ600 mg/kg シプロフロキサシン、1200 mg/kg シプロフロキサシン、対照群として0.5%メチルセルロースを、1日1回10日間経口投与した。投与終了翌日に採取した各群の膝関節軟骨を用いて、hematoxylin eosin 染色およびSafranin-O 染色を行い、さらに電子顕微鏡を用いて組織学的検討を行った。また、液体クロマトグラフ質量分析によるショットガンプロテオミクス解析には、対照群と1200 mg/kg シプロフロキサシン投与群の膝関節軟骨組織を用いた。更に、ウエスタンブロット法により、3群の膝関節軟骨組織におけるタンパク質発現解析を行った。統計学的解析にはTukey-Kramer 法を用いた。なお本研究は、聖マリアンナ医科大学実験動物委員会の承認（番号：1602031）を得て行った。

結果

軟骨組織における組織学的検討の結果、軟骨の厚さは、対照群と比較して、1200 mg/kg シプロフロキサシン投与群において表層では変化が

なく、中間層と深部層で有意な菲薄化が認められた ($P < 0.05$)。Safranin-O 染色を行った結果、1200 mg/kg シプロフロキサシン群の細胞間基質の染色の平均強度は、対照群及び 600 mg/kg シプロフロキサシン投与群と比較し有意に低下していた ($P < 0.01$)。1200 mg/kg シプロフロキサシン投与群の軟骨細胞では細胞小器官が減少し、小胞体は変性拡張していた。さらに一部の細胞ではアポトーシス像も観察された。ショットガンプロテオミクス解析により、1200 mg/kg シプロフロキサシン投与群の関節軟骨組織において特異的に同定されたタンパク質の中に、小胞体ストレスに関与する 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) があった。続いて、GRP78 とストレス誘導性アポトーシスに関わる転写因子である C/EBP homologous protein (CHOP) について、ウエスタンブロット法を用いてタンパク質発現解析を行った。その結果、GRP78 の発現については各群間で有意差は認められず、CHOP は 1200 mg/kg シプロフロキサシン投与群で、対照群と比較して 2.2 ± 0.32 倍の有意なタンパク質発現増加 ($P < 0.01$)、600 mg/kg シプロフロキサシン投与群と比較して 2.1 ± 0.25 倍のタンパク質発現増加 ($P < 0.05$) が認められた。

考察

3 週齢の幼若ラットに 1200 mg/kg シプロフロキサシンを投与することで、膝関節組織の軟骨厚は減少し、基質中のプロテオグリカンも減少

していた。またアポトーシス像や小胞体の変性像が観察された事と、ショットガンプロテオミクス解析により同定されたタンパク質の中で、小胞体ストレスに関与する GRP78 が同定された事から、シプロフロキサシンによる軟骨障害において小胞体ストレスの関与が示唆された。そこで、小胞体ストレスによる細胞障害時に誘導される CHOP のタンパク質発現を検討した結果、1200 mg/kg シプロフロキサシン投与群で、対照群および 600 mg/kg シプロフロキサシン投与群と比較して発現増加が認められた。この結果から、シプロフロキサシン投与による細胞障害には CHOP の発現を介する事が示唆された。また GRP78 のタンパク質発現について、各群間で有意差は認められなかった。これは、組織学的検討から対照群では分化過程の軟骨細胞における生理的な小胞体ストレスが生じている事が示唆されており、各群の軟骨組織で生じている小胞体ストレスにより GRP78 が発現誘導された可能性が考えられる。本研究では、シプロフロキサシン投与により幼若ラットの軟骨細胞において CHOP の発現を介した小胞体ストレス誘導性アポトーシスが惹起されることで、関節障害が引き起こされる可能性を明らかにした。今後は、CHOP 発現に関わる主要経路の検討および軟骨細胞がアポトーシスに至るメカニズムを検討したい。