

氏名（本籍）	西 田 崇（愛知県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第 1066 号
学位授与日付	平成 30 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Protective effects of fluoroquinolones on UV-induced damage of cultured ocular cell lines
審 査 委 員	（主査）教授 千田 隆夫 （副査）教授 清島 眞理子 教授 鈴木 康之

論文内容の要旨

【目的】

フルオロキノロン系薬は広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を有し、今日の眼感染症の治療に欠かせない抗菌薬である。一方、フルオロキノロン系薬は網膜剥離や光毒性のリスクを高める副作用を持つことが知られているが、その発症機序については全く解明されていない。前段階の実験として、網膜培養細胞にフルオロキノロン系薬添加を行い、紫外線照射を行った。その結果は、フルオロキノロン系薬が光照射による細胞障害を増強させるだろうとの予想に反し、フルオロキノロン系薬を添加することによって、逆に細胞保護作用が認められた。そこで本研究では、フルオロキノロン系薬の光照射後細胞障害への影響について、眼球由来の各種培養細胞を用いて検討した。

【方法】

培養細胞には、株化培養細胞として、ヒト角膜上皮細胞（HCECs）、網膜神経節細胞株（RGC-5）、マウス視細胞（661W）、ヒト網膜色素上皮細胞（ARPE-19）、および初代培養細胞として、マウス網膜初代細胞およびヒト網膜色素上皮初代細胞（hRPE）を用いた。フルオロキノロン系薬として levofloxacin（LVFX）、ciprofloxacin（CPFX）および clinafloxacin を、vehicle として PBS を、培地には DMEM/F12 培地を用いた。①96 well plate に HCECs, RGC-5, 661W, ARPE-19 をそれぞれ 1000 cells/well, 3000 cells/well, 3000 cells/well, 15000 cells/well で播種し、24 時間後に培地交換と試薬添加を行い、その 1 時間後から紫外線照射を行い、その後核染色による死細胞率測定を行った。②ARPE-19 を 96 well plate に 15000 cells/well で播種し、24 時間後に培地交換と試薬添加を行い、その 1 時間後から 5J の紫外線照射を行い、その後 Cell-Counting Kit-8 を用いた細胞生存性の評価、活性酸素種（ROS）産生量の評価、JC-1 色素を用いたミトコンドリア膜電位の評価、caspase-3/7 活性の測定を行った。③マウス網膜初代細胞を ddY マウスから作製し、24 時間後に培地交換と試薬添加を行い、5J の紫外線照射を行い、その後 cleaved caspase3 を染色し死細胞率評価を行った。④hRPE を 96 well plate に 2000 cells/well で播種し、24 時間後に培地交換と試薬添加を行い、その 1 時間後から 5J の紫外線照射を行い、その後 Cell-Counting Kit-8 を用い細胞生存性の評価を行った。

【結果】

1) 株化培養細胞への影響

- ①死細胞率：HCECs, RGC-5, 661W, ARPE-19 の全てにおいて LVFX（0.1 μ g/mL）、CPFX（0.1 μ g/mL）、および clinafloxacin（0.1 μ g/mL）添加により細胞死の抑制を認めた（ $p < 0.01$ ）。
- ②細胞生存性：LVFX（0.1 μ g/mL）、CPFX（0.1 μ g/mL）、および clinafloxacin（0.1 μ g/mL）添加

により,細胞生存性の増加を認めた($p<0.05$)。

③ROS : LVFX (0.1 μ g/mL) および CPFX (0.1 μ g/mL) 添加により,ROS 産生量の低下を認めた($p<0.05$)。

④ミトコンドリア膜電位 : UV 照射群では緑色/赤色の蛍光の割合が増加し(膜電位の低下), LVFX (0.1 μ g/mL) , CPFX (0.1 μ g/mL) , および ciprofloxacin (0.1 μ g/mL) の添加により,膜電位の低下が改善した($p<0.05$)。

⑤caspase-3/7 活性 : LVFX (0.1 および 1 μ g/mL), CPFX (0.1 および 1 μ g/mL), および ciprofloxacin (0.1 および 1 μ g/mL) で caspase-3/7 活性の減少を認めた($p<0.01$)。

2) 初代培養細胞への影響

⑥LVFX (0.1 μ g/mL) 添加により,マウス網膜初代細胞の死細胞率の低下を認めた($p<0.01$)。

⑦LVFX (0.1 μ g/mL) 添加により, hRPE の細胞生存性の増加を認めた($p<0.01$)。

【考察】

紫外線暴露に伴うアポトーシスは,ミトコンドリア機能障害によりミトコンドリア膜電位を低下させ,シトクロム c 放出を伴う細胞内 ROS の形成によって開始される核 DNA 損傷によって引き起こされる。また, Caspase-3/7 は細胞のアポトーシス経路に関わっていることが報告されている。今回の実験で,紫外線曝露によるミトコンドリア膜電位の障害は Caspase-3/7 の活性化に起因することが示唆された。

今まで報告されているように,一般に高濃度(10 μ g/mL)のフルオロキノロン系薬は細胞障害性を示す。一方,本研究の結果より,低濃度(0.1~1 μ g/mL)フルオロキノロンは ROS の産生を抑制し,酸化ストレスを低下させることで,アポトーシスを抑制することが示された。なお,点眼投与後のレボフロキサシンの平均濃度は,前房水で 1.00 ± 0.48 μ g/mL,硝子体では検出されず,また,シプロフロキサシンの平均濃度は,前房水で 0.44 ± 0.07 μ g/mL,硝子体で 0.22 ± 0.04 μ g/mL であると報告されており,一般に臨床で用いられる程度の濃度でも細胞保護作用がある可能性が示唆された。

【結論】

低濃度フルオロキノロン系抗菌薬添加において細胞保護作用が認められた。低濃度フルオロキノロン系薬は酸化ストレスを減少させ,アポトーシスを抑制することによって細胞保護作用を有することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 西田 崇は,低濃度フルオロキノロン系抗菌薬添加によって,眼球由来の各種培養細胞(ヒト角膜上皮細胞,網膜神経節細胞株,マウス視細胞,ヒト網膜色素上皮細胞,マウス網膜初代細胞およびヒト網膜色素上皮初代細胞)の紫外線照射による細胞死が抑制され,細胞生存率が増加することを明らかにした。高濃度のフルオロキノロン系抗菌薬は細胞障害性を示すことが知られているが,本研究の結果より,低濃度フルオロキノロンは,活性酸素種の産生を抑制し酸化ストレスを低下させてアポトーシスを抑制することで細胞保護作用を示すことが示唆された。本研究の成果は,眼科学の発展に少なからず貢献するものと認められる。

[主論文公表誌]

Takashi Nishida, Yoshiki Kuse, Kiyofumi Mochizuki, Masamitsu Shimazawa, Tetsuya Yamamoto , Hideaki Hara : Protective effects of fluoroquinolones on UV-induced damage of cultured ocular cell lines .

European Journal of Pharmacology 806(5), 59-66 (2017).