

臨床ビッグデータ解析と薬理学的実証の統合による
腱障害予防法の探索

2022

古田 晴香

目次

緒言	1
第 1 章 臨床ビッグデータ解析による腱障害予防薬の探索	3
方法	4
結果	8
第 1 節 有害事象自発報告データベース解析による腱障害リスクの高い薬物の探索	8
第 2 節 有害事象自発報告データベース解析によるフルオロキノロン誘発腱障害抑制薬の探索	9
第 3 節 IBM MarketScan データにおけるフルオロキノロン誘発腱障害および加齢性腱障害の発生率に対するデキサメタゾンの効果	12
考察	22
第 2 章 薬理学的実験による腱障害予防メカニズムの探索	24
方法	25
結果	29
第 1 節 フルオロキノロン誘発腱障害モデルラットへのデキサメタゾンの影響	29
第 2 節 フルオロキノロン誘発腱障害に対するデキサメタゾンの効果の分子機序の推定 ..	31
第 3 節 ラット初代培養腱細胞におけるフルオロキノロン誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対するデキサメタゾンの影響	34
第 4 節 ラット初代培養腱細胞におけるフルオロキノロン誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対する GPX3 の影響	37
考察	40
総括および結論	42
謝辞	43
発表論文目録	43
参考文献	44

緒言

腱は筋肉と骨格を結合し、筋肉の動作を骨格へ伝導する運動器である。腱障害とは腱組織が脆弱化し疼痛や断裂が生じる病態であり、運動器障害の30%を占めている。腱は他の運動器と比較して血流に乏しく代謝が遅いため、障害された腱の強度はある程度回復しても元の強度には決して戻らない。過去の研究から腱障害には加齢やフルオロキノロン系抗菌薬など様々な内的・外的要素がリスク因子として明らかにされてきたがその詳細な発症メカニズムは解明されておらず、有効な治療法や予防法は存在しない。そこで、近年医療や創薬への活用が期待されている有害事象自発報告データベースやレセプトデータベースといった臨床ビッグデータに注目した。著者は薬剤性腱障害であるフルオロキノロン誘発腱障害、自然発症の腱障害である加齢性腱障害に着目し、それぞれを予防しうる既存薬について、前者は有害事象データベースでの交絡因子として、後者はレセプトデータベースでの交絡因子として同定可能であると考えた。そこで臨床ビッグデータ解析からフルオロキノロン誘発腱障害および加齢性腱障害の予防薬の導出を行った。そして、その薬物を鍵に薬理学的実験を展開し、腱障害の創薬標的を探索することによって、以下の新知見を得た。

第1章では、3種類の有害事象自発報告データベースと1種類のレセプトデータベースを解析し、副腎皮質ステロイドであるデキサメタゾンがフルオロキノロン誘発腱障害および加齢性腱障害を抑制しうる可能性を見出した。

第2章では、*in vivo* 実験および *in vitro* 実験による薬理学的検証を行い、デキサメタゾンが抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ 3 の発現を増加させることで酸化ストレスを抑制し、腱障害を予防しうる可能性を明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ATC	Anatomical Therapeutic Chemical
CAT	catalase
cDNA	complementary DNA
CI	confidence interval
Coll1a1	collagen type 1a1
CVARD	Canada Vigilance Adverse Reaction Online Database
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
FAERS	FDA Adverse Event Reporting System
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FQ	fluoroquinolone
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEO	Gene Expression Omnibus
GPX	glutathione peroxidase
HE	hematoxylin & eosin
ICD-10	International Classification of Disease 10
IQR	interquartile range
JADER	Japanese Drug Adverse Event Report
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
PRDX	peroxiredoxin
PVDF	poly vinylidene fluoride
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
ROS	reactive oxygen species
ROR	reporting odds ratio
SA- β -gal	senescence-associated β -galactosidase
SMQ	standardized MedDRA queries
SOD	superoxide dismutase
TPM	transcripts per million
γ H2AX	phospho-histone H2A.X

第1章 臨床ビッグデータ解析による腱障害予防薬の探索

腱は筋肉と骨格を連結させる線維性結合組織であり、筋肉の収縮を骨格に伝達することで関節の運動を可能にする役割を担う。腱障害とは、腱組織の痛み、脆弱化、または断裂を特徴とする疾患であり、一般診療における筋骨格系疾患の約30%を占めており、成人の下肢腱障害の罹患率は1-2%である(1、2)。腱組織は血流に乏しく恒常的に低栄養・低酸素状態であり代謝も低いため(3、4)、再生力が非常に弱く損傷した腱組織が元の強度に完全に戻ることはない(5)。腱障害を予防することは現時点では困難であり、治療法も対症療法に留まっていることから治癒率100%を満たすものは存在しない(2、6)。

腱障害の発症には複数の内因性・外因性因子が関与している。内因性因子の代表例として加齢が挙げられ、実際70代の約50%が腱障害に罹患していると推定されている(7)。腱の強度だけでなく、代謝や組織再生能力も加齢に伴い低下するため、組織損傷の影響が長期化する結果、腱障害は高齢者の運動機能低下へ繋がると考えられている(8-10)。一方、外的因子としてはフルオロキノロン系抗菌薬(FQ)が知られており(11-13)、2008年には米国食品医薬品局(FDA)は全てのFQに対して腱障害リスクに関する黒枠警告を追加した(14)。これまでに様々なリスク因子は明らかにされてきたものの、腱障害の病態生理や発症メカニズムは未だに不明な点が数多く残されている。

そこで、新たな治療戦略を見出すためのアプローチとして近年注目を集めている臨床ビッグデータに着目した。FDA Adverse Event Reporting System (FAERS)・Japanese Drug Adverse Event Report (JADER)・Canada Vigilance Adverse Reaction Online Database (CVARD)は無償で利用できる有害事象自発報告データベースであり、それぞれ約1100万件、70万件、90万件的症例が蓄積されている。これらのデータベースに登録されている症例の約半数は多剤併用例であるため、そこには未知の薬物相互作用が含まれている可能性があり、実際にこれらのデータベース解析から新規の薬物相互作用が発見されている(15-17)。しかし、上記の有害事象自発報告データベースの欠点として、時系列情報の欠損のために因果関係を推定できないことが挙げられる。そこで著者は米国レセプトデータベース IBM® MarketScan® Research Databases を用いた時系列解析を組み合わせた。IBM MarketScan Research Databasesには、米国のMedicare Advantage Plans、高齢者の企業保険、Medicare Supplemental Insuranceに加入している約4400万人の患者の診断、治療、処方に関する医療記録が日単位で記録されている。

まず著者は、FAERS・JADER・CVARDを解析し、FQ誘発腱障害の発生に対して負の交絡因子となる薬物を探索した。その後、その薬物がFQ誘発腱障害の発生率に与える影響をIBM MarketScanデータの時系列解析を用いて検討し、さらに、その薬物の加齢性腱障害の発生率に対する影響も評価した。

方法

有害事象自発報告データベース解析

FAERS データに関しては、2004 年から 2019 年までの有害事象報告を FDA のウェブサイト (<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-adverse-event-reporting-system-faers>) から入手した。重複した報告は既報の通り排除し (18)、残りの 11,438,031 件の報告を解析した。JADER データについては 2004 年から 2021 年までの有害事象報告を PMDA のウェブサイト (<https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/adr-info/suspected-adr/0003.html>) から入手し、693,295 件の報告を解析した。CVARD データは 1965 年から 2021 年までの有害事象報告をカナダ保健省のウェブサイト (<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/medeffect-canada/adverse-reaction-database.html>) から入手し、880,353 件の報告を解析した。

上記のデータベースに登録されている薬物名はライフサイエンス辞書シソーラスを用いたテキストマイニングにより薬物名を一般名に統一した。腱障害の報告は、MedDRA (バージョン 23.0) の狭義の SMQ “tendinopathies and ligament disorders” で定義した。各データの解析は既報に従い行い (15)、全ての解析に Haldane-Anscombe 補正を適用した。ボルケーノプロットでは、 p 値の代わりに Z スコアを使用した。

図 1 における算出方法を下記に示す。各データに報告されている患者を以下の 4 つの群に分けた：(a) 対象薬物 (薬物 A) が投与され、かつ腱障害を発症した人、(b) 薬物 A が投与され、かつ腱障害を発症しなかった人、(c) 薬物 A は投与されず、かつ腱障害を発症した人、(d) 薬物 A は投与されず、かつ腱障害を発症しなかった人。95%信頼区間 (CI) 付きの報告オッズ比 (ROR) および Z スコアは、以下の式に従って算出した。

$$\text{ROR} = \frac{a/b}{c/d} \dots \dots \dots (1)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right\} \dots \dots \dots (2)$$

$$Z \text{ score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}} \dots \dots \dots (3)$$

なお、 a 、 b 、 c 、 d は各群の例数を示す。

図 2 における算出方法を下記に示す。FQ が投与された患者を以下の 4 つの群に分けた：(a1) 併用薬 (薬物 B) が投与され、かつ腱障害を発症した人、(b1) 薬物 B が投与され、かつ腱障害を発症しなかった人、(c1) 薬物 B は投与されず、かつ腱障害を発症した人、(d1) 薬物 B は投与されず、かつ腱障害を発症しなかった人。FQ による腱障害の 95% CI 付きの ROR と Z スコアを以下の式に従って算出した。

$$\text{ROR} = \frac{a1/b1}{c1/d1} \dots \dots \dots (4)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a_1} + \frac{1}{b_1} + \frac{1}{c_1} + \frac{1}{d_1}} \right\} \dots\dots\dots (5)$$

$$\text{Z score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\frac{1}{a_1} + \frac{1}{b_1} + \frac{1}{c_1} + \frac{1}{d_1}}} \dots\dots\dots (6)$$

なお、a1、b1、c1、d1 は各群の例数を示す。

IBM MarketScan Research Databases 解析

2017年1月から2019年12月までの保険請求データを IBM® Watson Health®から購入した。このデータセットには、米国の企業保険または Medicare に加入している 43,723,094 人の従業員、退職者、その配偶者、扶養家族の医療診断と処方箋の請求が含まれている。

疾患の診断名は、国際疾病分類第 10 版 (ICD-10) に基づいて定義した。腱障害の定義および傾向スコアマッチングで共変量として指定した疾患の定義は表 1-1 に記載した。薬物名に関しては、FQ は ATC コード J01MA、デキサメタゾン は ATC コード H02AB02 で定義し、内服薬および注射薬を処方された患者を対象とし、外用剤のみ処方された患者は除外した。傾向スコアマッチングにおいては、共変量にスタチン系薬剤とアロマトラーゼ阻害薬を含めており、いずれの定義も表 1-1 に記載した。

IBM MarketScan データへの登録前に既に腱障害に罹患もしくは FQ やデキサメタゾンを処方された患者を除外し、新規罹患患者・新規処方患者に解析対象を限定するために IBM MarketScan データへの登録後の最初のイベントの時間分布を調べ Run in period (Wash-out 期間) を設定した。FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害の発生率は発生率比 (IRR)、95%CI、Z スコアを用いて評価した。FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害に対するデキサメタゾンの影響を検討するために各コホートを 2 群 (デキサメタゾン服用群と非服用群) に分け、そして腱障害おける既知の交絡因子の影響を除去するために、年齢、性別、併存疾患、処方薬、入院歴などを共変量に設定し (表 1-5a、表 1-6a)、1:1 傾向スコアマッチングを実施した。FQ コホートと高齢者コホートの両者において傾向スコアマッチングのペアは、0.2 のキャリパー幅で最近傍法を用いて 2 群をマッチングさせることで作成した。併存疾患の比較にはカイ二乗検定を、年齢の比較には Wilcoxon の順位和検定または Welch の t 検定を用いた。マッチング後に得られたコホートペアを用いて、FQ やデキサメタゾンの 1 日あたりの投与量、累積投与量、投与期間を算出した。腱障害の累積発生率をデキサメタゾン投与群と非投与群で比較し、生存曲線をカプラン・マイヤープロットで表した (19)。統計的有意性は、ログランク検定と Cox 比例ハザードモデルを用いてハザード比を算出することで評価した。Number at risk は、その時点で腱障害を発症する可能性のある患者数を示している。

IBM MarketScan データの生存時間解析には、R v4.1.0 および R studio 2022.02.3 ソフトウェア (R Foundation for Statistical Computing) の環境下で R パッケージの survival を用いた。傾向スコアマッチングには SAS OnDemand for Academics を用いた。

表 1-1 IBM MarketScan データ解析における各用語の定義

Diseases	
Tendinopathy	M654, M658, M659, M662, M663, M668, M669, M751, M752, M754, M760, M761, M765, M766, M767, M768, M769, M771, M775, M778, M779, S860
Renal failure	N17, N18, N19
Obesity	E65, E66
Diabetes	E10, E11, E12, E13, E14
Rheumatoid arthritis	M05, M06
Gout	M10
Cancer	C00, C01, C02, C03, C04M, C05, C06, C07, C08, C09, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C30, C31, C32, C33, C34, C37, C38, C39, C40, C41, C43, C44, C45, C46, C47, C48, C49, C4A, C50, C51, C52, C53, C54, C55, C56, C57, C58, C60, C61, C62, C63, C64, C65, C66, C67, C68, C69, C70, C71, C72, C73, C74, C75, C76, C77, C78, C79, C7A, C7B, C80, C81, C82, C83, C84, C85, C86, C88, C90, C91, C92, C93, C94, C95, C96, D00, D01, D02, D03, D04, D05, D06, D07, D09
Liver disease	K70, K71, K72, K73, K74, K75, K76, K77
Hyperthyroidism	E05
Musculoskeletal disease	M00, M01, M02, M04, M05, M06, M07, M08, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M1A, M20, M21, M22, M23, M24, M25, M26, M27, M30, M31, M32, M33, M34, M35, M36, M40, M41, M42, M43, M45, M46, M47, M48, M49, M50, M51, M53, M54, M60, M61, M62, M63, M67, M70, M71, M72, M79, M80, M81, M83, M84, M85, M86, M87, M88, M89, M90, M91, M92, M93, M94, M95, M96, M97, M99, M650, M651, M652, M653, M660, M661, M753, M762, M763, M764, M772, M773, M774
Heart disease	I05, I06, I07, I08, I09, I20, I21, I22, I23, I24, I25, I26, I27, I28, I34, I35, I36, I37, I38, I39, I42, I43, I44, I45, I47, I48, I49, I50, I51, I52, Q20, Q21, Q22, Q23, Q24
Lipid disorder	E38
Drugs	
Fluoroquinolone	Alatrofloxacin Mesylate, Ciprofloxacin, Ciprofloxacin Hydrochloride, Ciprofloxacin/Ciprofloxacin Hydrochloride, Delafloxacin, Dextrose/Levofloxacin, Enoxacin, Gatifloxacin, Gemifloxacin Mesylate, Grepafloxacin Hydrochloride, Levofloxacin, Lomefloxacin Hydrochloride, Moxifloxacin Hydrochloride, Norfloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin Mesylate

Dexamethasone	Dexamethasone, Dexamethasone Acetate, Dexamethasone Sodium Phosphate, Dexamethasone Sodium Phosphate/Dextrose, Dexamethasone Sodium Phosphate/Sodium Chloride
Statin	Amlodipine Besylate/Atorvastatin Calcium, Aspirin;Pravastatin Sodium, Atorvastatin Calcium, Atorvastatin Calcium/Ezetimibe, Cerivastatin Sodium, Ezetimibe/Simvastatin, Fluvastatin Sodium, Lovastatin, Lovastatin/Niacin, Niacin/Simvastatin, Pitavastatin, Pitavastatin Calcium, Pravastatin Sodium, Rosuvastatin Calcium, Simvastatin, Simvastatin/Sitagliptin Phosphate
Aromatase inhibitor	Aminoglutethimide, Anastrozole, Exemestane, Letrozole, Letrozole;Ribociclib, Testolactone

結果

第1節 有害事象自発報告データベース解析による腱障害リスクの高い薬物の探索

まず、FAERS、CVARD、JADERにおいて、不均衡解析を用いて各RORとそのZスコアを算出し、薬物の使用と腱障害発症との関連性を調べた。これらのデータには報告バイアスがあること、さらに自発報告であるため母数不明であることから、これらの値は実際の発生率を反映していない可能性がある。しかし、5種類以上のFQはRORとZスコアが高く、腱障害の発生と強い正の相関を示した。(図1、A-C)。このことから、FQ服用による腱障害リスク増加がこれらのデータに反映されていることが確認された。

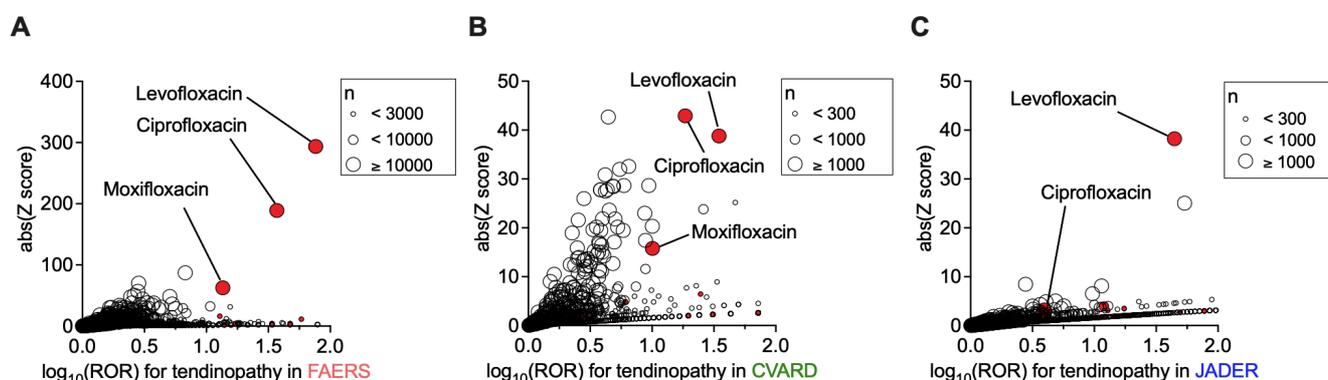


図 1-1 FAERS・CVARD・JADER における薬物の使用と腱障害の発症との関連性

FAERS (A)、CVARD (B)、JADER (C) における ROR の対数スケールおよび統計的有意差 (Z スコアの絶対値) を示す。各プロットは個々の薬剤を示し、プロットの大きさはその薬物を服用している患者数を反映している。

第 2 節 有害事象自発報告データベース解析によるフルオロキノロン誘発腱障害抑制薬の探索

FAERS、JADER、CVARD で FQ を服用した患者集団において、全ての薬物の組み合わせによる腱障害の ROR に対する交絡効果を評価したところ、多くの併用薬が FQ 誘発腱障害の ROR に影響を与えることが明らかになった（図 2、A-C）。そこで著者は FQ 誘発腱障害と強い負の相関を示す薬物は 3 種類のデータいずれにおいても ROR 値を有意に減少させる薬物の中に含まれる可能性が高いと考えた。この条件を満たす薬物は 6 種類見出され、その中でもデキサメタゾン（Dexamethasone）は全てのデータセットにおいて特に低い ROR 値を示していた（表 1-2）。他の内服・注射グルココルチコイドについても検討したところ、その多くが腱障害の ROR を減少させるか、あるいは変化させないことが示された。（表 1-3）。

しかし、FDA は 2008 年にステロイドは FQ による腱障害のリスクを増加させると警告している（14）。上記の解析で得た知見は FDA の警告と正反対であったため、ステロイドの効果に関するこの矛盾した知見について、特にデキサメタゾンに焦点を当ててさらに検討することとした。

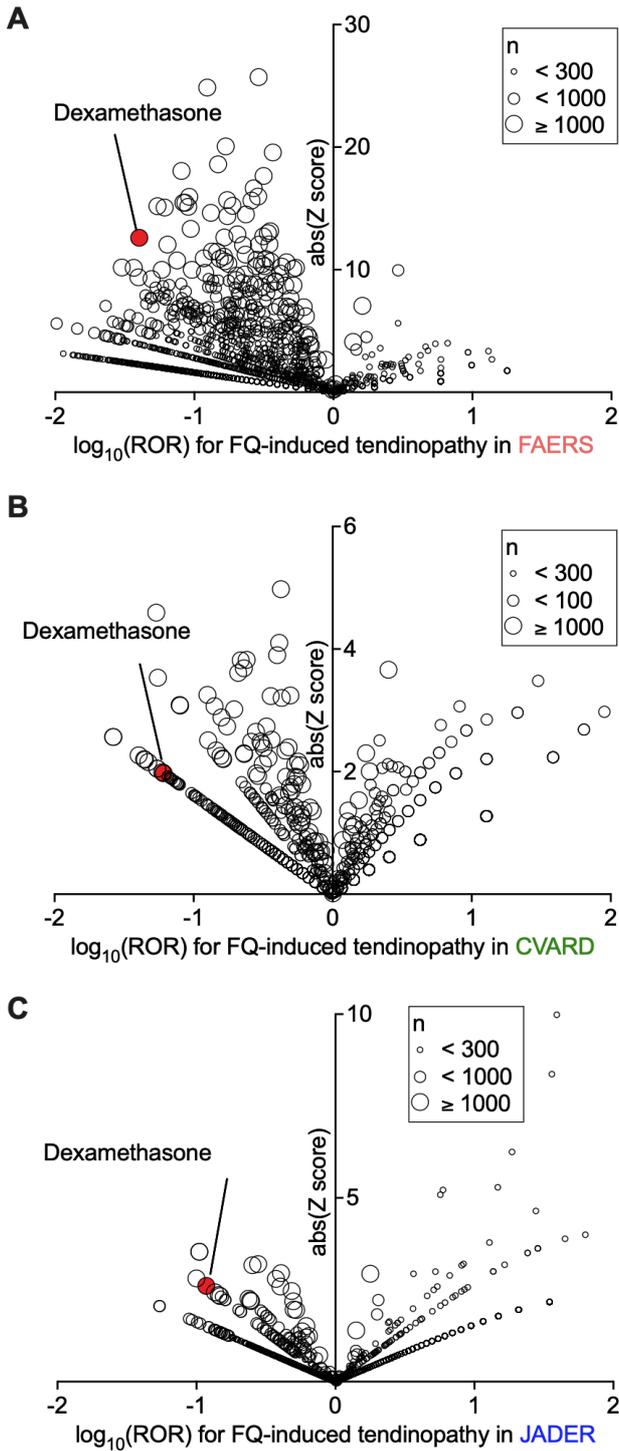


図 1-2 FAERS・CVARD・JADER データにおけるフルオロキノロン系抗菌薬誘発腱障害に併用薬の交絡効果

腱障害 ROR に対する全薬物の組合せの交絡効果を算出した。FAERS (A)、CVARD (B)、JADER (C) の ROR とその統計的有意性 (Z 値の絶対値) を可視化したボルケーノプロットを示す。

表 1-2 FAERS、CVARD、JADER データの全てにおいてフルオロキノロン誘発腱障害の報告オッズ比 (ROR) を有意に低下させた薬物の ROR と Z スコア

	FAERS		CVARD		JADER	
	ROR (95% CI)	Z score	ROR (95% CI)	Z score	ROR (95% CI)	Z score
Dexamethasone	0.040 (0.024–0.066)	– 12.61	0.061 (0.004–0.978)	– 1.98	0.118 (0.023–0.588)	– 2.61
Vancomycin	0.061 (0.043–0.088)	– 15.07	0.026 (0.002–0.425)	– 2.56	0.244 (0.070–0.851)	– 2.21
Piperacillin	0.086 (0.063–0.117)	– 15.46	0.044 (0.003–0.709)	– 2.20	0.237 (0.068–0.827)	– 2.26
Sulfamethoxazole	0.081 (0.061–0.106)	– 18.05	0.307 (0.120–0.788)	– 2.46	0.105 (0.030–0.366)	– 3.54
Furosemide	0.124 (0.105–0.146)	– 24.87	0.413 (0.270–0.630)	– 4.1	0.402 (0.202–0.802)	– 2.59
Trimethoprim	0.148 (0.121–0.181)	– 18.6	0.302 (0.118–0.775)	– 2.49	0.105 (0.030–0.367)	– 3.53
Acetaminophen	0.290 (0.264–0.319)	– 25.71	0.425 (0.303–0.595)	– 4.98	0.278 (0.127–0.609)	– 3.20

表 1-3 FAERS、CVARD、JADER データにおけるフルオロキノロン誘発腱障害に対するデキサメタゾン以外のグルココルチコイドの影響

外用ステロイドは解析から除外した。

	FAERS		CVARD		JADER	
	ROR (95% CI)	Z score	ROR (95% CI)	Z score	ROR (95% CI)	Z score
Methylprednisolone	0.38 (0.31–0.47)	–9.06	0.26 (0.09–0.75)	–2.49	0.95 (0.45–1.97)	–0.15
Prednisolone	0.49 (0.41–0.59)	–7.65	4.93 (1.14–21.3)	2.14	1.78 (1.21–2.63)	2.94
Prednisone	0.61 (0.53–0.70)	–6.94	0.58 (0.35–0.96)	–2.11	104.2 (2.06–5267)	2.32
Hydrocortisone	0.11 (0.05–0.20)	–6.88	0.06 (0.003–0.96)	–1.99	0.47 (0.14–1.65)	–1.17
Betamethasone	0.23 (0.10–0.53)	–3.42	1.42 (0.08–26.4)	0.23	0.37 (0.07–1.86)	–1.20
Triamcinolone	0.45 (0.15–1.32)	–1.46	12.8 (0.25–645)	1.27	3.35 (0.20–56.3)	0.84
Deflazacort	0.22 (0.01–3.69)	–1.05	12.8 (0.25–645)	1.27	104.2 (2.06–5267)	2.32
Meprednisone	0.66 (0.04–12.2)	–0.28	12.8 (0.25–645)	1.27	104.2 (2.06–5267)	2.32
Cortisone	0.88 (0.29–2.71)	–0.22	0.75 (0.04–13.0)	–0.20	34.7 (1.41–856)	2.17
Fluocortolone	5.92 (0.11–298)	0.89	12.8 (0.25–645)	1.27	104.2 (2.06–5267)	2.32

第3節 IBM MarketScan データにおけるフルオロキノロン誘発腱障害および加齢性腱障害の発生率に対するデキサメタゾンの効果

次に、FQ と腱障害発生との因果関係を調べるために、米国レセプトデータベース IBM MarketScan データベースを解析した。IBM MarketScan データベース登録後の初回イベント発生の時間分布を評価したところ、最初に腱障害と診断された、もしくはFQまたはデキサメタゾンが処方された患者の数は、最初の5ヶ月間が多く、6ヶ月目以降は安定していた(図1-3)。これらの結果から、相当数の患者が登録前または登録直後に腱障害と診断され、もしくはFQやデキサメタゾンを処方されたことを示唆している。したがって、腱障害の時系列解析を行うために、登録から0-5ヶ月の間に腱障害と診断された患者、またはFQやデキサメタゾンの処方を受けた患者は除外された。

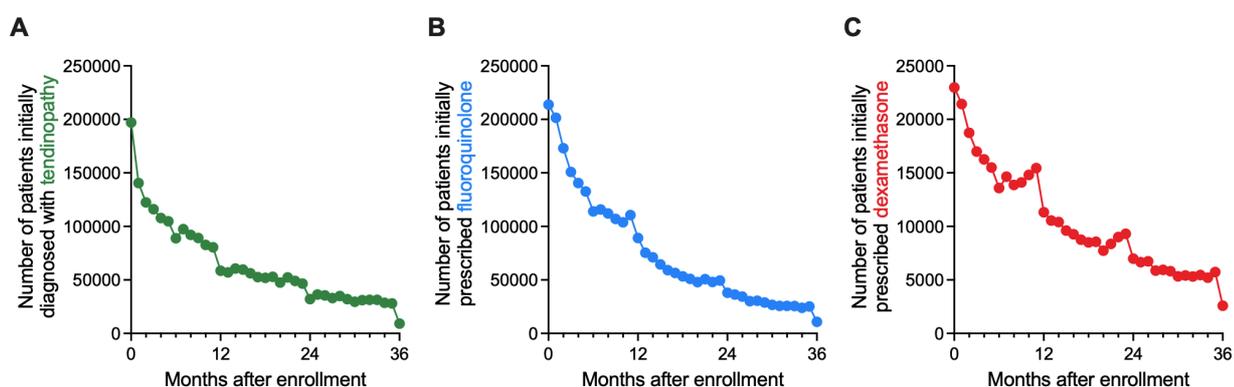


図1-3 IBM MarketScan データにおける登録後から最初のイベントまでの時間分布

患者のデータ登録から腱障害の初回診断 (A)、フルオロキノロン系抗菌薬の初回処方 (B)、デキサメタゾンの初回処方 (C) の期間。患者数を月単位で表示している。

初めに FQ 誘発腱障害に関して検討した。まず、FQ の使用と腱障害発生との関連性を、腱障害の発生率比を推定することで評価した。その結果、IBM MarketScan データにおいて FQ は高い発生率比を示した (表 1-4)。

表 1-4 IBM MarketScan データにおける FQ 誘発腱障害の発生率比

	Tendinopathy		Incidence rate (%/person-year)	Incidence rate ratio (95% CI)	Z score
	(+)	(-)			
FQ	(+)	15,142	6.13	1.89 (1.86-1.93)	75.42
	(-)	175,449	3.24		

次に、FQ 誘発腱障害に対するデキサメタゾンの影響を検討した。デキサメタゾンの投与期間と FQ 誘発腱障害のリスク期間を重複させるために、まず FQ 処方の前に処方されたデキサメタゾンに関して調査した。その結果、デキサメタゾンの 1 処方あたりの処方期間の中央値は 5 日（四分位範囲：3-12 日）であった。さらにデキサメタゾンの生物学的半減期は 36-54 時間であることから、FQ 処方前 7 日間以内に処方されたデキサメタゾンは併用処方とみなした。さらに、既報において、FQ 誘発腱障害患者の 85%は FQ 服用後 1 ヶ月以内に発症しており、さらに FQ 誘発腱障害患者の 41-50%は FQ 服用終了後に腱障害の症状を呈したと報告されている (13)。ゆえに腱障害のリスク期間を FQ 処方後 30 日以内とし、そのリスク期間内に処方されたデキサメタゾンも併用処方とみなした。つまり、FQ の処方前 7 日から処方後 30 日の期間中に処方されたデキサメタゾンを併用と定義した。この定義に従って、FQ 服用患者コホートをデキサメタゾン併用群 (n=5,063) と非併用群 (n=1,562,000) の 2 群に分けた。その後、腱障害の発生に影響を及ぼす可能性のある交絡因子 (6、20-22) の影響を排除し、且つ、服用された FQ の種類を調整するために、1:1 傾向スコアマッチングを行った。その結果、マッチングにより 2 群間で各交絡因子は適切なバランスを取ることができた (表 1-5a)。マッチング後の 2 群間において、FQ の処方量や処方日数で顕著な差は認められず、また、デキサメタゾン併用群のデキサメタゾンの処方期間の中央値は 12 日であり比較的短期間の処方であった (表 1-5b)。デキサメタゾン併用群のデキサメタゾン処方時の主な病名は、がんであったことからデキサメタゾンが抗がん剤誘発悪心嘔吐に対する制吐薬として使用されていることが示唆された (表 1-5c)。患者の追跡は FQ 処方後 60 日間、即ち FQ 誘発腱障害のリスク期間の 2 倍の期間、実施した。 Kaplan-Meier 法および Cox 比例ハザードモデリングの結果、ハザード比は 0.58 (95%CI : 0.34-0.98、ログランク検定 $p = 0.04$) であり、デキサメタゾンは FQ 誘発腱障害の累積発生率を有意に低下させた (図 3A)。腱障害発症者の病名をより詳細に検討したところ、デキサメタゾン非併用群の 5 人の患者では、腱の断裂を伴うより重篤な症状が観察され、また、腱障害全体の発生率はデキサメタゾンにより 0.75%から 0.43%に低下した (表 1-5d)。

表 1-5 IBM MarketScan データにおける FQ 服用コホートの傾向スコアマッチング、デキサメタゾン処方時の診断名、各薬物の処方情報、腱障害の病名ごとの分類

(a) 傾向スコアマッチング前後での各交絡因子の患者数を示した。(b) デキサメタゾン処方時の診断病名を ICD-10 小分類で分類し、その患者数および各 ICD-10 小分類の総患者数に対する割合を示した。患者数が 10 人以上の病名のみ抽出し、割合の高い上位 10 種類を示した。(c) FQ の 1 日処方量の算出には DDD (Defined Daily Dose) を使用した。各群の処方量および処方日数は中央値と四分位範囲 (IQR) を示した。(d) 患者数およびコホート内の総数に対する割合を ICD-10 小分類ごとに示した。

(a)

Population with fluoroquinolone	Before matching			After matching		
	Without dexamethasone	With dexamethasone	<i>p</i> value	Without dexamethasone	With dexamethasone	<i>p</i> value
Total	1,562,000	5,063	–	5,063	5,063	–
Median age (IQR)	49 (36–59)	51 (39–59)	<0.0001	51 (39–59)	52 (39–59)	0.49
Female	963,807	3,175	0.14	3,170	3,175	0.92
Renal Failure	97,810	463	<0.0001	445	463	0.53
Obesity	365,025	1,242	0.051	1,227	1,242	0.73
Diabetes	270,264	900	0.37	914	900	0.72
Rheumatoid arthritis	34,860	117	0.70	114	117	0.84
Gout	39,367	125	0.82	118	125	0.65
Cancer	196,670	2,484	<0.0001	2,493	2,484	0.86
Liver disease	135,291	783	<0.0001	786	783	0.93
hyperthyroidism	21,562	118	<0.0001	99	118	0.19
Musculoskeletal disease	1,070,527	3,867	<0.0001	3,897	3,867	0.48
Heart disease	325,223	1,607	<0.0001	1,599	1,607	0.86
Lipid disorder	670,022	2,255	0.018	2,259	2,255	0.94
History of hospitalization	311,613	2,201	<0.0001	2,215	2,201	0.78
Statins	415,977	1,346	0.94	1,342	1,346	0.93
Aromatase inhibitors	18,522	324	<0.0001	311	324	0.59
Levofloxacin	509,511	2,705	<0.0001	2,716	2,705	0.83
Ciprofloxacin	1,035,559	2,287	<0.0001	2,280	2,287	0.89

(b)

Matched fluoroquinolone cohort with dexamethasone	Number of patients	Proportion (%)
C34 (Malignant neoplasm of bronchus and lung)	225	0.38
C25 (Malignant neoplasm of pancreas)	60	0.37
C90 (Multiple myeloma and malignant plasma cell neoplasms)	78	0.34
C15 (Malignant neoplasm of esophagus)	21	0.25
C79 (Secondary malignant neoplasm of other and unspecified sites)	225	0.24
C16 (Malignant neoplasm of stomach)	21	0.21
C78 (Secondary malignant neoplasm of respiratory and digestive organs)	142	0.20
C50 (Malignant neoplasm of breast)	483	0.17
Z17 (Estrogen receptor status)	242	0.16
C56 (Malignant neoplasm of ovary)	38	0.15

(c)

Matched fluoroquinolone cohort	Without dexamethasone	With dexamethasone	
	Fluoroquinolone	Fluoroquinolone	Dexamethasone
Daily dose*	1 (1–1)	1 (1–1)	6.67 (4–10)
Cumulative dose (mg)	6,000 (3,750–10,000)	10,000 (5,250–20,000)	80 (24–240)
Administration period (day)	10 (7–13)	14 (8–24)	12 (5–30)

(d)

Matched fluoroquinolone cohort (each $n = 5,063$)	Without	With
	dexamethasone	dexamethasone
Number of tendinopathy cases in 60 days (%)	38 (0.75%)	22 (0.43%)
M654 (Radial styloid tenosynovitis)	2 (0.04%)	1 (0.02%)
M658 (Other synovitis and tenosynovitis)	4 (0.08%)	0
M659 (Synovitis and tenosynovitis, unspecified)	3 (0.06%)	1 (0.02%)
M662 (Spontaneous rupture of extensor tendons)	1 (0.02%)	0
M751 (Rotator cuff tear or rupture, not specified as traumatic)	4 (0.08%)	0
M752 (Bicipital tendinitis)	2 (0.04%)	1 (0.02%)
M754 (Impingement syndrome of shoulder)	9 (0.18%)	6 (0.12%)
M758 (Other shoulder lesions)	2 (0.04%)	0
M760 (Gluteal tendinitis)	0	1 (0.02%)
M765 (Patellar tendinitis)	0	2 (0.04%)
M766 (Achilles tendinitis)	2 (0.04%)	1 (0.02%)
M767 (Peroneal tendinitis)	1 (0.02%)	1 (0.02%)
M768 (Other specified enthesopathies of lower limb, excluding foot)	0	2 (0.04%)
M771 (Lateral epicondylitis)	4 (0.08%)	4 (0.08%)
M775 (Other enthesopathy of foot and ankle)	2 (0.04%)	0
M778 (Other enthesopathies, not elsewhere classified)	1 (0.02%)	1 (0.02%)
M779 (Enthesopathy, unspecified)	1 (0.02%)	1 (0.02%)
S860 (Injury of Achilles tendon)	1 (0.02%)	0

次に、加齢性腱障害に関して検討した。まず、65歳以上を加齢と定義し、加齢と腱障害発生との関連性を、腱障害の発生率比を推定することで評価した。その結果、IBM MarketScan データにおいて加齢による高い腱障害発生率比が示された（表 1-6）。

表 1-6 IBM MarketScan データにおける加齢性腱障害の発生率比

		Tendinopathy		Incidence rate (%/person-year)	Incidence rate ratio (95% CI)	Z score
		(+)	(-)			
Age ≥ 65	(+)	40,863	1,510,614	5.54	1.78 (1.77–1.80)	112.4
	(-)	489,726	34,471,861	3.11		

そこで加齢性腱障害に対するデキサメタゾンの影響を評価した。IBM MarketScan データに登録されている 65 歳以上の患者を、デキサメタゾン投与群 (n=5,232) と非投与群 (n=1,538,993) の 2 群に分け、腱障害の既知の交絡因子を除去するために 1:1 傾向スコアマッチングを行った (表 1-7a)。患者は IBM MarketScan データへの登録 6 ヶ月後から 180 日間観察し、 Kaplan-Meier 法と Cox 比例ハザードモデリングを用いて 2 つのコホートを比較したところ、ハザード比 0.72 (95%CI: 0.53–0.98、ログランク検定 $p=0.03$) であったことから加齢性腱障害の累積発生率がデキサメタゾンにより低下することが明らかになった (図 3B)。デキサメタゾン投与群におけるデキサメタゾン処方時の病名を調査した結果、デキサメタゾンは抗がん剤誘発悪心嘔吐に対する制吐薬として処方されている可能性が示された (表 1-7b)。また、デキサメタゾン処方期間の中央値は約 10 日であり、比較的短期であった (表 1-7c)。また、腱障害を ICD-10 の種類ごとに調査したところ、デキサメタゾンはその種類の半分以上で腱障害発症率を低下させており、腱障害全体の発症率は 2.14% から 1.45% に低下した (表 1-7d)。

これらの IBM MarketScan データの解析結果から、デキサメタゾンは FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害の発症を抑制することが示唆された。

表 1-7 IBM MarketScan データにおける高齢者コホートの傾向スコアマッチング、デキサメタゾン処方時の診断名、各薬物の処方情報、臍障害の病名ごとの分類

IBM MarketScan データ登録時の年齢が 65 歳以上の場合、高齢者とみなした。(a) 傾向スコアマッチング前後での各交絡因子の患者数を示した。(b) デキサメタゾン処方時の診断病名を ICD-10 小分類で分類し、その患者数および各 ICD-10 小分類の総患者数に対する割合を示した。患者数が 10 人以上の病名のみ抽出し、割合の高い上位 10 種類を示した。(c) デキサメタゾン投与群のデキサメタゾン処方量・処方日数の中央値および四分位範囲 (IQR) を示した。(d) 患者数およびコホート内の総数に対する割合を ICD-10 小分類ごとに示した。

(a)

Population aged ≥65	Before matching			After matching		
	Without dexamethasone	With dexamethasone	<i>p</i> value	Without dexamethasone	With dexamethasone	<i>p</i> value
Total	1,538,993	5,232	–	5,232	5,232	–
Median age (IQR)	73 (68–80)	73 (68–78)	<0.0001	73 (68–78)	73 (68–78)	0.74
Female	850,048	2,957	0.11	2,943	2,957	0.94
Renal Failure	241,732	1,062	<0.0001	1,021	1,062	0.32
Obesity	246,523	923	0.0014	902	923	0.59
Diabetes	429,765	1,541	0.014	1,515	1,541	0.58
Rheumatoid arthritis	40,105	181	0.0001	165	181	0.38
Gout	60,197	201	0.67	175	201	0.17
Cancer	363,457	3,219	<0.0001	3,215	3,219	0.94
Liver disease	83,810	739	<0.0001	698	739	0.24
hyperthyroidism	18,323	87	0.0017	69	87	0.15
Musculoskeletal disease	1,088,700	4,321	<0.0001	4,328	4,321	0.84
Heart disease	687,192	3,009	<0.0001	3,025	3,009	0.75
Lipid disorder	998,658	3,503	0.0018	3,526	3,503	0.63
Hospitalization	359,758	2,848	<0.0001	2,850	2,848	0.97
Statins	795,599	2,927	<0.0001	2,937	2,927	0.84
Aromatase inhibitors	20,164	218	<0.0001	218	218	1.00
Fluoroquinolones	291,181	1,865	<0.0001	1,862	1,865	0.95

(b)

Matched older adult cohort with dexamethasone	Number of patients	Proportion (%)
C45 (Mesothelioma)	17	1.44
C90 (Multiple myeloma and malignant plasma cell neoplasms)	196	0.86
C34 (Malignant neoplasm of bronchus and lung)	366	0.62
C79 (Secondary malignant neoplasm of other and unspecified sites)	330	0.36
C25 (Malignant neoplasm of pancreas)	57	0.35
C57 (Malignant neoplasm of other and unspecified female genital organs)	11	0.25
C16 (Malignant neoplasm of stomach)	24	0.24
C56 (Malignant neoplasm of ovary)	58	0.24
C15 (Malignant neoplasm of esophagus)	19	0.23
C78 (Secondary malignant neoplasm of respiratory and digestive organs)	126	0.18

(c)

Matched older adult cohort with dexamethasone	Dexamethasone
Daily dose (mg)	6 (3–10)
Cumulative dose (mg)	72 (20–200)
Administration period (day)	10 (4–30)

(d)

Matched older adult cohort (each $n = 5,232$)	Without dexamethasone	With dexamethasone
Number of tendinopathy cases in 180 days (%)	112 (2.14%)	76 (1.45%)
M654 (Radial styloid tenosynovitis)	5 (0.10%)	2 (0.04%)
M658 (Other synovitis and tenosynovitis)	10 (0.19%)	5 (0.10%)
M659 (Synovitis and tenosynovitis, unspecified)	2 (0.04%)	1 (0.02%)
M662 (Spontaneous rupture of extensor tendons)	1 (0.02%)	0
M663 (Spontaneous rupture of flexor tendons)	1 (0.02%)	0
M668 (Spontaneous rupture of other tendons)	0	1 (0.02%)
M751 (Rotator cuff tear or rupture, not specified as traumatic)	18 (0.34%)	15 (0.27%)
M752 (Bicipital tendinitis)	8 (0.15%)	1 (0.02%)
M754 (Impingement syndrome of shoulder)	14 (0.28%)	12 (0.23%)
M758 (Other shoulder lesions)	9 (0.17%)	7 (0.13%)
M759 (Shoulder lesion, unspecified)	1 (0.02%)	0
M760 (Gluteal tendinitis)	3 (0.06%)	3 (0.06%)
M765 (Patellar tendinitis)	2 (0.04%)	1 (0.02%)
M766 (Achilles tendinitis)	5 (0.10%)	1 (0.02%)
M767 (Peroneal tendinitis)	3 (0.06%)	4 (0.08%)
M768 (Other specified enthesopathies of lower limb, excluding foot)	10 (0.19%)	5 (0.10%)
M769 (Unspecified enthesopathy, lower limb, excluding foot)	1 (0.02%)	0
M771 (Lateral epicondylitis)	3 (0.06%)	3 (0.06%)
M775 (Other enthesopathy of foot and ankle)	5 (0.10%)	9 (0.17%)
M778 (Other enthesopathies, not elsewhere classified)	3 (0.06%)	0
M779 (Enthesopathy, unspecified)	8 (0.15%)	2 (0.04%)
S860 (Injury of Achilles tendon)	0	4 (0.08%)

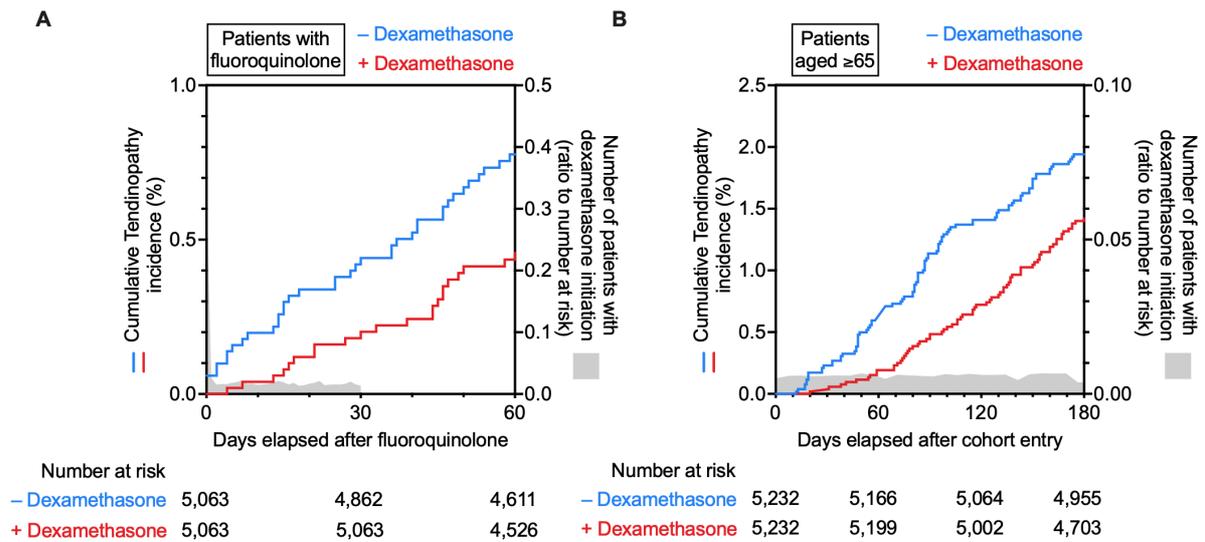


図 1-5 IBM MarketScan データにおける FQ コホートまたは高齢者コホートにおける腱障害発生率の時間推移

フルオロキノロン服用患者 (A) または 65 歳以上の高齢患者 (B) における腱障害の累積発生率比のカプラン・マイヤー曲線を、デキサメタゾン非併用群 (青線) と併用群 (赤線) で示した。下部には各時点におけるリスクのある患者数 (Number at risk) を示した。デキサメタゾンを開始した患者数は、Number at risk に対する比率として灰色で示した。

考察

本研究は、副腎皮質ステロイドであるデキサメタゾンが、ヒトにおいて FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害を抑制できることを示した最初の研究である。これらの知見は、4 つの独立した臨床ビッグデータ解析で強く裏付けられた。

FAERS、JADER、CVARD という 3 種類の有害事象自発報告データベースのデータマイニングから、これら全てにおいて FQ の使用と腱障害の間に強い正の相関があることが示された。いずれのデータセットもサイズが十分に大きかったため、これらのシグナルは臨床状況の多様性に関係なく頑強なものであると考えられた。デキサメタゾンは、3 種類のデータベース全てにおいて FQ 誘発腱障害の ROR 値を有意に低下させた薬物の中で特にその低減効果が高かったため、著者はデキサメタゾンに焦点を当てた。

有害事象自発報告データベース解析から得られた仮説は、IBM MarketScan データを用いた時系列解析によってさらに検証された。その結果、FQ により腱障害の発症率が増加することが確かめられ、デキサメタゾンはその発症率を低下させることが示された。そして興味深いことにデキサメタゾンは加齢性腱障害の発症率も低下させていた。デキサメタゾンの腱障害抑制効果は、FQ 誘発腱障害と比較して加齢性腱障害では弱かったが、これは年齢差によるものと考えられる。アキレス腱に代表される腱は日常生活において恒常的に機械的ストレスを受けており、反復的な力学的負荷による微小損傷が腱組織に蓄積し、それが腱障害の発症リスク増加に繋がる (23)。さらに、腱組織の治癒能力は年齢とともに低下するため (8)、高齢者の腱には若年者の腱よりも多くの微小損傷が存在する可能性がある。今回の解析では、FQ コホートの年齢の中央値は 51-52 歳であったのに対し、高齢者コホートの年齢の中央値は 73 歳であった。この大きな年齢差により、デキサメタゾンの腱障害抑制効果は、高齢者コホートでは減弱されてしまった可能性がある。

過去の後ろ向き研究ではステロイドの使用は腱障害リスクを高めることが示されてきており (24-26)、FDA はステロイド服用者では FQ 誘発腱障害の発症リスクが高いと警告している (14)。しかし、本研究の臨床ビッグデータ解析では、デキサメタゾンは FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害を抑制するという従来の見解とは異なる結果が得られた。この相違は、デキサメタゾンの投与期間の長さ起因している可能性がある。既報では、少なくとも 3 ヶ月間デキサメタゾンが投与された関節リウマチ患者のアキレス腱において 1 型コラーゲンが減少していたことが報告されている (24)。さらに、腱細胞を用いた *in vitro* 実験においては、デキサメタゾンが 1 型コラーゲンの遺伝子発現、コラーゲン合成および腱細胞の増殖を低下させることが示されている (25、26)。ゆえに、デキサメタゾンの長期投与は、コラーゲン産生を低下させ腱障害リスクを増加させる可能性がある。一方で、ステロイドを短期間投与した場合の腱組織への影響はこれまで不明であった。過去の症例対照研究では、ステロイドを連続的に服用した場合と断続的 (3 ヶ月に 1 回程度の処方) に服用した場合を比較した時、オッズ比は断続的に服用した場合の方が小さかったが、どちらの場合も腱障害のオッズ比が増加したことが示された (27)。一方、近年の研究において、ステロイドの腱組織への断続的な局所注射 (4 週間間隔で最大 3 回まで) と運動療法の併用は、プラセボ注射と運

動療法と比較すると腱障害治療開始 6 ヶ月後の時点で治療成績が良好であったという結果が臨床試験で得られたことや (28)、ラットのアキレス腱損傷モデルにおいてデキサメタゾンを 5 日間投与すると、腱の治癒が促進され腱の力学的特性が改善したことが報告されている (29)。そして、本研究の IBM MarketScan データを用いた FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害の解析では、デキサメタゾンの処方期間の中央値は FQ コホートで 12 日、高齢者コホートで 10 日であり、いずれも比較的短期であった。したがって、デキサメタゾンの投与が短期間の場合は腱障害リスクを腱障害改善作用が上回る可能性が示された。よって、デキサメタゾンの腱組織に対する影響の良悪はその投与期間の長さに依存すると考えられる。

以上、本章において著者は、デキサメタゾンが FQ 誘発腱障害と加齢性腱障害を抑制する可能性を明らかにした。

第2章 薬理学的実験による腱障害予防メカニズムの探索

第1章では有害事象自発報告データを解析しFQ誘発腱障害を抑制しうる薬物として副腎皮質ステロイドであるデキサメタゾンを導出した。さらに、レセプトデータを用いた時系列解析からデキサメタゾンの短期間投与によりFQ誘発腱障害および加齢性腱障害の発生率が低下することを明らかにした。よって、デキサメタゾンがFQ誘発腱障害と加齢性腱障害を抑制する可能性が患者レベルで示された。しかしながら、デキサメタゾンには骨粗鬆症や高血糖、消化性潰瘍などの副作用があるためデキサメタゾンを腱障害の抑制薬として用いるのは困難だと考えられる。ゆえに、デキサメタゾンが腱障害を抑制するメカニズムを明らかにし、創薬標的となりうる分子を見出す必要がある。そのためにはリバーストランスレーショナルリサーチ、即ち、患者レベルで得られた知見をもとに *in vivo/in vitro* 実験を展開することが求められる。実際に過去の研究においても臨床ビッグデータベース解析から得られた仮説を基盤に薬理学的実験を行うことで副作用を予防あるいは治療するための創薬標的が見出されている (16, 17)。

腱組織の約7割は1型コラーゲンが占めており、コラーゲン線維が平行に配列することで腱組織の強靱な弾性力が生み出されている (30)。コラーゲン線維の周囲にはエラスチンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスが存在し、コラーゲンや細胞外マトリックスの産生・代謝は腱細胞によって行われている。

本章ではラットを用いた *in vivo* 実験および腱細胞を用いた *in vitro* 実験による薬理的検証を行い、デキサメタゾンがFQ誘発腱障害および加齢性腱障害を抑制するメカニズムを検討し、その作用点を探索した。

実験方法

試薬

ペフロキサシンは LKT Laboratories から、デキサメタゾン、ペニシリン・ストレプトマイシン、過酸化水素はナカライテスクから、DMEM、FBS、亜セレン酸ナトリウムは Sigma-Aldrich から購入した。

動物

全ての動物実験は、京都大学動物実験委員会の倫理指針に基づき行った(番号 19-38)。雄性 Wistar ST ラット (*in vivo* 実験用: 10 週齢、*in vitro* 実験用: 6-8 週齢) は日本 SLC から購入した。全ての動物は室温が $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。ペフロキサシン (900 mg/kg/日) およびデキサメタゾン (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) は 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、ラットに経口投与した。

生体力学的試験

生体力学的試験は、引張試験機 (MODEL-1310VRW、アイコーエンジニアリング) を用いて行った。ラットアキレス腱を金属クランプで固定し、装置に接続した。50mm/min の速度でアキレス腱を伸長させその破断点をモニターし、記録した。試験終了後、強度-伸長度グラフを取得した。アキレス腱の直径はノギスで測定し、これらの試験結果から最大応力を算出した。

ヘマトキシリン・エオジン染色

回収したアキレス腱を 4%パラホルムアルデヒド (PFA; ナカライテスク) で 48 時間固定し、脱水したのちにパラフィンで包埋した。5 μm の厚さに切ったパラフィン切片をヘマトキシリンとエオジンで染色した。核は紫色に染められるが、短径が 4 μm 以上の核を、丸みを帯びた核として定量した。

RNA シーケンス

ISOGEN (ニッポンジーン) を用いてラットアキレス腱から RNA を単離した。RNA シーケンス解析のため、RNA から poly(A)⁺ RNA を抽出し、DNBseq (BGI) を用いて塩基配列を決定した。シーケンスリードをラットのリファレンスゲノム配列 GCF_000001895.5_Rnor_6.0 にマッピングし、リファレンス配列へのマッピングには HISAT version 2.0.4 (31) と Bowtie2 version 2.2.5 (32) を用いた。遺伝子発現量は RSEM version 1.2.8 (33) を用いて算出し、その後、対数変換した (例: 8 (=2³) の発現レベルは 3、128 (=2⁷) の発現レベルは 7)。腱障害に関連する生物学的プロセスを明らかにするために、Gene Ontology 解析を適用した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。Vehicle 群で TPM (Transcripts per million) ≥ 100 であり、ペフロキサシン投与群での発現量が Vehicle

群での発現量と比較して有意に増加し、ペフロキサシン+デキサメタゾン投与群での発現量がペフロキサシン投与群での発現量と比較して有意に減少した遺伝子を抽出し、それらの遺伝子を DAVID v6.8 を用いて解析した。4 群間の Z スコアは、Prism v9.4.0 を用いてヒートマップとして可視化した。RNA シーケンスから得たデータセットは、GEO アクセションコード GSE212344 に登録されている。

GEO データベースの解析

腱障害患者の腱障害部位と正常部位の腱組織の遺伝子発現データセットを GEO アクセションコード GSE26051 から取得した (34)。このデータセットには 23 人の腱障害患者の腱障害部位と正常部位の腱組織の遺伝子発現データが含まれていた。

免疫染色法

in vivo 実験では、回収したアキレス腱を 4%PFA で固定し、その後、Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek) に包埋して凍結し、 -80°C で保存した。その後クリオスタット (Leica CM1950; Leica Biosystems) で $14\ \mu\text{m}$ 厚の切片に切り出し、 -80°C で保存した。切片は 0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水に浸して透過処理を行い、ウサギポリクローナル抗 γH2AX 抗体 (1:300; #2577, Cell Signaling Technology) を用いて 4°C で一晩インキュベートし、続いて Alexa Fluor 594 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:300; A21207, Thermo Fisher Scientific) を暗所で室温 2 時間インキュベートした。核は DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) で染色した。

in vitro 実験では、細胞を 4%PFA で固定し、次に、0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水に浸して透過処理し、上記と同様にウサギポリクローナル抗 γH2AX 抗体 (1:300; #2577, Cell Signaling Technology) を用いて 4°C で一晩、続いて Alexa Fluor 594 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:300; A21207, Thermo Fisher Scientific) を用いて暗室で 2 時間インキュベートした。核は DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) で染色した。

サンプルは共焦点蛍光顕微鏡 (FluoView FV10i; Olympus) を用いて観察、撮影した。 γH2AX^+ 細胞の数は、*in vivo* 実験では $0.045\ \text{mm}^2$ の範囲で、*in vitro* 実験では $0.10\ \text{mm}^2$ の範囲で定量した。

腱細胞の培養

雄性 Wistar ST ラット (6–8 週) から採取したアキレス腱を約 $1\ \text{mm}^3$ の断片にした。これらの断片を、10%FBS・100U/mL ペニシリン・100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加した DMEM (D5796) で培養した。培養は、5% CO_2 ・ 37°C で行った。7–21 日後に腱細胞が観察され、90%コンフルエンスに達するまで培養した。この得られた腱細胞を再播種し、継代数 3–10 の腱細胞を実験に使用した。薬物処置のために細胞を再播種した後、酸素濃度が比較的低い腱組織の環境を模倣するために、5% CO_2 ・2% O_2 ・ 37°C の環境下で細胞を培養した。播種 48 時間後に無血清の DMEM (D6046) に変更し、GPX3 の発現を維持するため亜セレン酸ナトリウム (100 nM) を同時添加した。

RNA 回収および qRT-PCR

ISOGEN を用いて臍細胞の RNA を回収し、そして ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡) を用いて cDNA に逆転写した。StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を実施した。PCR の増幅は 95°C で 10 分間の熱活性化の後に、95°C で 15 秒間・60°C で 1 分間のサイクルを 40 回行った。使用したプライマーは表 2-1 に示した。

活性酸素種の定量

CellROX Deep Red Reagent (C10422, Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造者のプロトコルに従って臍細胞内の活性酸素種 (ROS) を染色した。核は DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) で染色した。サンプルは共焦点蛍光顕微鏡 (FluoView FV10i; Olympus) を用いて観察、撮影した。0.18 mm² の視野における細胞の平均蛍光強度を ImageJ (National Institutes of Health) を用いて定量した。

老化関連酸性 β-ガラクトシダーゼ染色

老化関連酸性β-ガラクトシダーゼ (SA-β-gal) 染色は、製造者のプロトコルに従って行った (#9860, Cell Signaling Technology)。薬物処置後、臍細胞をキット付属の染色液で 37°C、約 16 時間インキュベートした。0.14 mm² の視野における SA-β-gal⁺細胞の割合を算出した。

ウイルスベクターの作製

pCSII-CAG-Venus-WPRE は、CAG 断片を PCR により増幅し、pCSII-EF-Venus-WPRE (理化学研究所の三好浩之先生および宮脇敦史先生からの提供) に結合させた (35)。pCSII-CAG-GPX3-WPRE の構築には、pCSII-CAG-Venus-WPRE に、ラットアキレス腱の cDNA から PCR で増幅した GPX3 断片をライゲーションさせた。PCR は Q5 DNA polymerase (New England Biolabs) を用いて行った。ライゲーション反応は全て Ligation high Ver.2 (東洋紡) を用いて行った。ウイルスベクターの配列はサンガーシーケンス (Eurofins Genomics) により確認した。PCR に使用したプライマーは表 2-1 に示した。

レンチウイルスの作製と感染

自己不活化型レンチウイルスベクター (36) を調製し、精製した。Lenti-X 293T 細胞 (Clontech) を 60–70%コンフルエンスまで増殖させ、パッケージングベクターとシャトルコンストラクトをポリエチレンイミン (Polysciences) でトランスフェクションさせた。16–18 時間培養後、上清を吸引除去し、新たに培地を加えた。30 時間培養後、上清を回収し、孔径 0.45 μm の PVDF 膜 (Millex-HV, Merck Millipore) でろ過し、これを用いて臍細胞へレンチウイルスを感染させた。

統計解析

統計解析には Prism v9.4.0 (GraphPad) を用いた。Post-hoc テストには Sidak の多重比較検定を使用した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。データは平均値 \pm SEM で示した。

表 2-1 qRT-PCR およびウイルスベクター作製に用いたプライマー

For qRT-PCR	
<i>Gapdh</i>	5'-GTG CCA GCC TCG TCT CAT AG-3' 5'-AGA GAA GGC AGC CCT GGT AA-3'
<i>Gpx1</i>	5'-AGT TCG GAC ATC AGG AGAATG G-3' 5'-AAA GAG CGG GTG AGC CTT C-3'
<i>Gpx3</i>	5'-ATT CGG CCT GGT CAT TCT GG-3' 5'-CCC GGT CGA ACG TAC TTG AG-3'
<i>Gpx7</i>	5'-AAG TAC CGC GGC TCG GTT T-3' 5'-TGC AAG GCT CGG TAG TTC TG-3'
<i>Gpx8</i>	5'-TGA AGG ATG CCA AAG GAA GGA-3' 5'-ACG TTT ACA ACT AGG GAA GCT TTG-3'
<i>Sod1</i>	5'-CTT CTG TCG TCT CCT TGC TT-3' 5'-TTC ACC GCT TGC CCT TCT G-3'
<i>Sod2</i>	5'-GGA GCA AGG TCG CTT ACA GA-3' 5'-AGC AGT GGA ATA AGG CCT GTG-3'
<i>Sod3</i>	5'-GCT GGG TCT GTC CTG TAC TT-3' 5'-CTG AGG TTC CAC ACC TGA CAA G-3'
<i>Cat</i>	5'-ATG GCT ATG GCT CAC ACA CC-3' 5'-TTG ATG CCC TGG TCA GTC TTG-3'
<i>Prdx1</i>	5'-CTG TAG CTC GAC TCT GCT GA T-3' 5'-TTG AAG CTG GGA GCA GGA TG-3'
<i>Prdx4</i>	5'-TGA GAC ACT GCG TTT GGT TC-3' 5'-GTT TCA CTA CCA GGT TTC CAG-3'
<i>Prdx6</i>	5'-TGC CTG GAG CAA GGA CAT CAA-3' 5'-CCC AAC AGG ATG GCA AGG TC-3'
<i>Col1a1</i>	5'-GTG CCA GCC TCG TCT CAT AG-3' 5'-AGA GAA GGC AGC CCT GGT AA-3'
For vector construction	
<i>Cag</i>	5'-AAT GCT AGC TAT TAA TAG TAA TCA ATT AC-3' 5'-ATT GCG GCC GCT TTG CCA AAA TGA TGA GAC A-3'
<i>Gpx3</i>	5'-AAT GCG GCC GCA TGG CCC GGA TCC TTC GGG C-3' 5'-TTA GAA TTC TTA CTT CCC TCT GGC CCC CA-3'

実験結果

第1節 フルオロキノロン誘発腱障害モデルラットへのデキサメタゾンの影響

まず初めに FQ 誘発腱障害に着目し、FQ の一種であるペフロキサシンをラットに慢性的に経口投与 (900mg/kg/日、5 日/週、4 週間、その後 1 週間休薬) し、腱障害モデルラットを作製した。過去の研究で、ペフロキサシン (900 mg/kg/日) をラットに 2 週間連続投与したところ、アキレス腱に丸みを帯びた核を有する腱細胞数が増加したという報告があり (37)、そのような細胞数の増加は実際の腱障害患者のアキレス腱においても認められている (38)。しかしこの既報では腱組織の力学的評価は行われていなかったため腱の脆弱化に関しては不明であった。そこで著者は、アキレス腱の機械的脆弱性を惹起させるためにペフロキサシン投与期間をより長期化した。デキサメタゾンはペフロキサシンと併用して経口投与 (50 μ g/kg/日、3 日/週、5 週間) した (図 4A)。デキサメタゾンの生物学的半減期は 36–54 時間であるためデキサメタゾンの投与は 2–3 日に 1 回行った。

アキレス腱の力学的強度を評価するために伸長試験を行った。アキレス腱の最大応力はペフロキサシンの慢性投与により減少する傾向にあり、デキサメタゾン併用はそれに対して拮抗作用を示した (図 4C)。また、デキサメタゾン単独投与群において最大応力の減少は認められなかった。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による組織学的検討では、ペフロキサシン慢性投与により丸みを帯びた (短径 4 μ m 以上) 核を有する細胞の割合が増加し、これはデキサメタゾンの共投与により抑制された。なお、炎症細胞の浸潤は観察されなかった (図 4、D・E)。過去の研究から、腱障害のリスク因子である FQ の使用 (39)、運動過多 (40)、加齢 (41) によって DNA 損傷が起こることという知見が得られている。そこで、ラットアキレス腱の DNA 損傷を、DNA 損傷の高感度検出指標として用いられている γ H2AX の免疫染色により調べた。DNA 損傷は 1 日は持続するものの 3 日以内に修復される可能性が高いため (42)、DNA 損傷の評価はペフロキサシンの休薬 1 週間後ではなく、投与 3 週間終了後の翌日に回収したアキレス腱で実施した。その結果、ペフロキサシン投与ラットのアキレス腱では γ H2AX⁺細胞の割合が増加し、デキサメタゾン併用によりその増加は抑制された (図 4、F および G)。デキサメタゾン単独では γ H2AX⁺細胞の割合の増加は認められなかった。

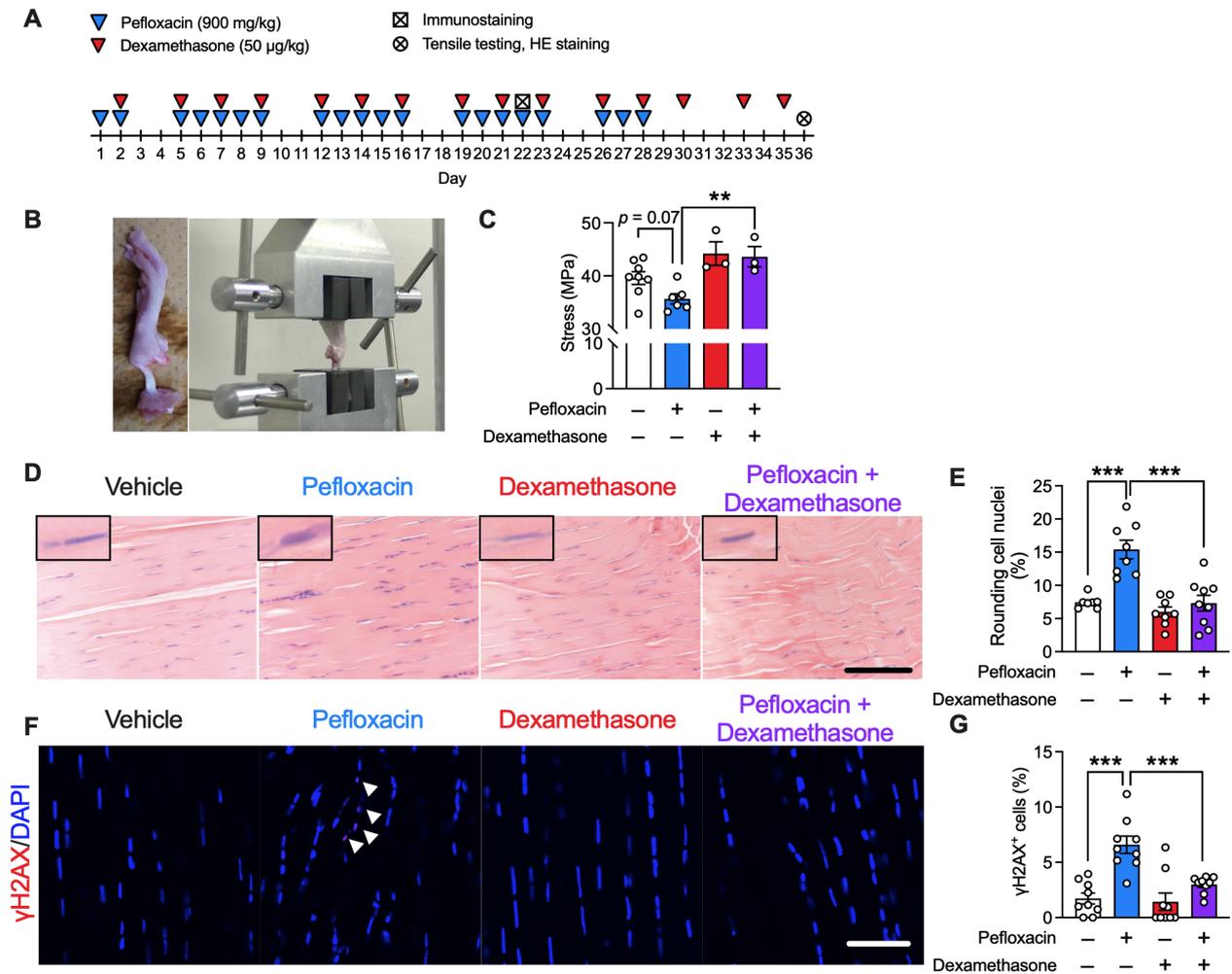


図 2-1 ラットのペフロキサシン誘発腱障害モデルに対するデキサメタゾンの効果

(A) ラットにペフロキサシン (900 mg/kg/日、5 日/週、4 週間)、デキサメタゾン (50 µg/kg/日、3 日/週、5 週間) または両薬物を投与し、3 週間投与終了の翌日に免疫染色、5 週間投与終了の翌日に伸張試験とヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。(B) 伸張試験の様子。左写真: ラットの後肢。白色部がアキレス腱である。右写真: 伸張試験のためにサンプルを装置に取り付けた様子。

(C) 薬物投与ラットからアキレス腱を採取した後に力学的評価を行った (n=3-8)。試験結果から最大応力を算出した。(D および E) HE 染色の代表画像 (n=7-9)。各画像の左上に代表的な核を示し、丸みを帯びた (短径 4 µm 以上) 核を有する細胞の割合を示した。スケールバー: 0.1 mm。(F および G) γH2AX の免疫染色を行った (n=9)。γH2AX⁺細胞 (白矢尻) の数を、全細胞数に対する百分率で示した。スケールバー: 50 µm。データは平均値±SEM で示した。統計的有意性は、two-way ANOVA と Post-hoc multiple comparison test を用いて評価した; ***p* < 0.01、****p* < 0.001。

第2節 フルオロキノロン誘発腱障害に対するデキサメタゾンの効果の分子機序の推定

第1節でペフロキサシンによる腱組織の脆弱化や組織学的変化がデキサメタゾンの共投与により抑制されることが示された。その分子メカニズムを検討するために、薬物投与ラットのアキレス腱を用いて RNA-seq を実施した。ペフロキサシンによって発現量が増加し、デキサメタゾンの併用によってその発現増加が抑制される遺伝子に着目して DAVID を用いた Gene Ontology 解析を行ったところ、“Response to hydrogen peroxide” や “Hydrogen peroxide catabolic process” など酸化ストレスに関連するいくつかのパスウェイが濃縮されていた (図 2-2A)。なお、この解析では炎症に関連するパスウェイは濃縮されていなかった。また興味深いことに、“Aging” も濃縮されていた。この結果より、ペフロキサシンによって酸化ストレスが増加し、デキサメタゾンの併用によって酸化ストレスが抑制されることが示唆された。また、ペフロキサシンによっていくつかの加齢関連分子の発現レベルが上昇し、それがデキサメタゾンによって抑制される可能性も示された。

酸化ストレスの主な原因は活性酸素種 (ROS) であり、そのレベルを主に調節している抗酸化酵素であるため、次に著者は抗酸化酵素に着目した。Vehicle 投与ラットのアキレス腱における全抗酸化酵素の遺伝子発現量を調べたところ、一部のグルタチオンペルオキシダーゼ (*Gpx1*, *Gpx3*, *Gpx4*) およびスーパーオキシドジスムターゼ 3 (*Sod3*) が比較的高い発現を示すことが明らかになった (図 2-2B)。次に、薬物投与による遺伝子発現量の変化について検討した。ペフロキサシン投与により、*Gpx3*, *Gpx4*, *Sod2*, *Sod3*, ペルオキシレドキシン 3 (*Prdx3*) などいくつかの抗酸化酵素の遺伝子発現が低下し、その一部はデキサメタゾンの併用によりその低下が抑制された。これらの解析より、ラットアキレス腱の抗酸化酵素の中で最も発現量の高く、さらにペフロキサシンによりその発現量が減少しデキサメタゾンの併用が拮抗作用を示していた、GPX3 を腱障害の標的分子候補として見出した。

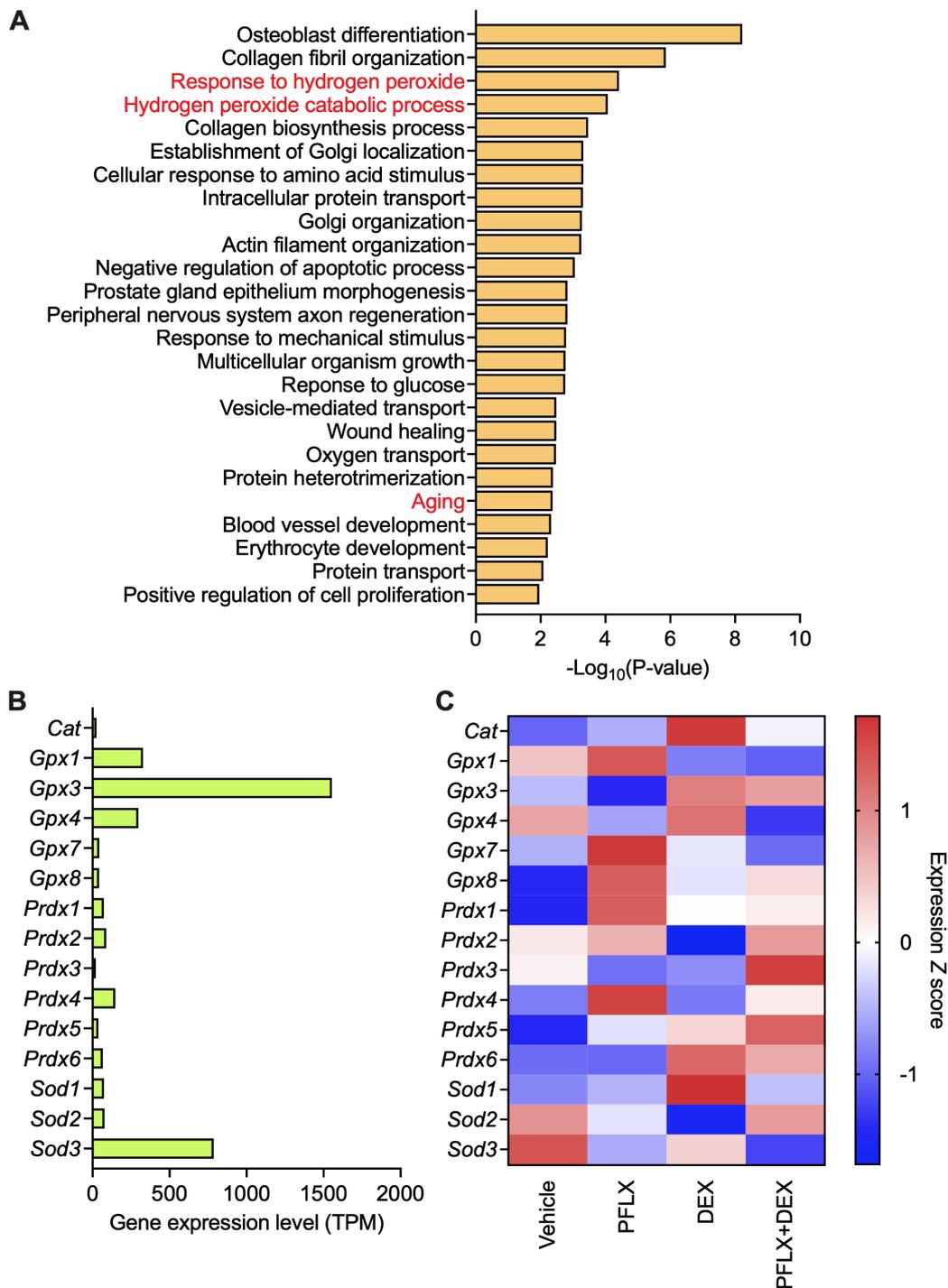


図 2-2 ペフロキサシンおよびデキサメタゾンを投与したラットアキレス腱組織における遺伝子発現 (A) Vehicle 群において TPM (Transcripts per million) ≥ 100 であり、ペフロキサシン群では Vehicle 群に比べて増加し、ペフロキサシン・デキサメタゾン併用群ではペフロキサシン群に比べて減少している遺伝子を抽出して Gene Ontology (GO) 解析を行った。有意に濃縮された上位 25 の GO タームを示した。(B) Vehicle 群のラットアキレス腱における抗酸化酵素の遺伝子発現量を TPM で示した。(C) Vehicle、ペフロキサシン (PFLX)、デキサメタゾン (DEX)、または両方 (PFLX+DEX) を投与したラットアキレス腱における抗酸化酵素の遺伝子発現をヒートマップで示した。赤色は Z score が大きいことを、青色は Z score が小さいことを表している。各群 n = 1。

そこで、GEO に登録された腱障害患者のデータセットを用いて、ヒトの腱における抗酸化酵素の発現量を解析した。その結果、ヒト腱組織においても *GPX3* の遺伝子発現量が他の抗酸化酵素よりも比較的高く、さらに腱障害部位ではその発現量が有意に低下していたことが明らかになり、これらの知見はいずれも上記で示したラットアキレス腱から得た知見を支持するものだった (図 2-3)。なお、*PRDX4* と *GPX7* の遺伝子発現量は腱障害部位で増加していたが、それらの発現量自体が低値であったため、その増加の影響は比較的小さいと推測された。

以上の結果より著者は *GPX3* に着目して以降の研究を進めた。

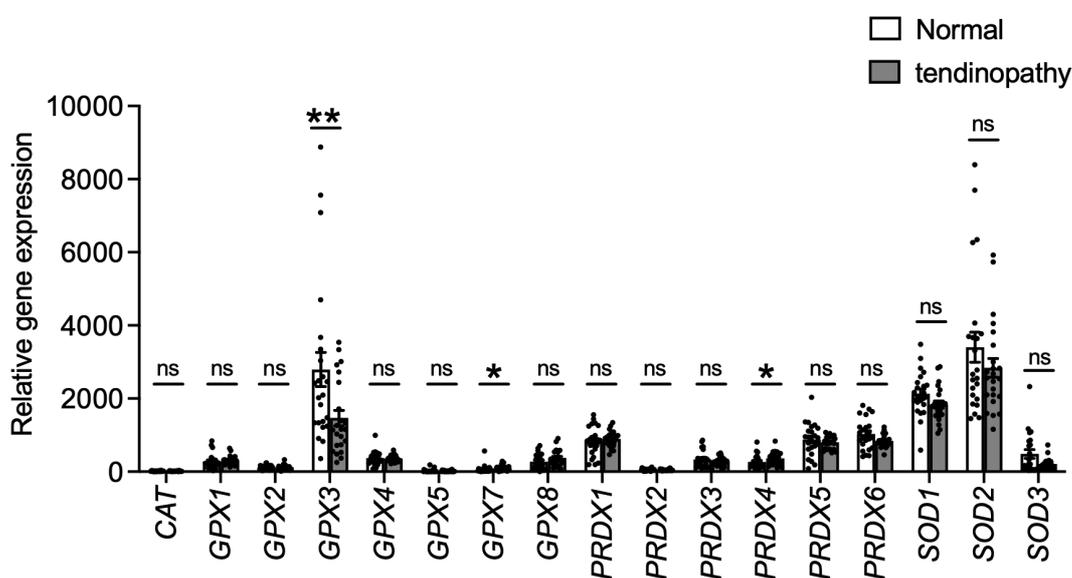


図 2-3 腱障害患者の腱組織における抗酸化酵素の発現量

Gene expression omnibus (GEO) データセットから得た、腱障害患者 (n=23) の腱組織の腱障害部位と正常部位から得られた抗酸化酵素の遺伝子発現量を示した。データは平均値±SEM で示した。各遺伝子における統計的有意性は、ratio paired t-test を用いて検定した ; * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$, ns: not significant。

第 3 節 ラット初代培養臍細胞におけるフルオロキノロン誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対するデキサメタゾンの影響

FQ 誘発臍障害における酸化ストレスの関与とデキサメタゾンの効果について、ラット初代培養臍細胞を用いた *in vitro* 実験でさらに検証した。デキサメタゾンはグルココルチコイド受容体に結合し、様々な遺伝子発現を調節することから、デキサメタゾンは遺伝子発現の変化を伴った予防効果を示すと推測し、著者はデキサメタゾンの前処置を実施した。ラット初代培養臍細胞に、デキサメタゾン (100 nM、前処置 24 時間+24 時間)、ペフロキサシン (100 μ M、24 時間)、またはその両方を処置した (図 2-4A)。RNA シーケンスの結果と同様に、デキサメタゾンは *Gpx3* の遺伝子発現量を大幅に増加させた (図 2-4B)。ペフロキサシンで処理した臍細胞は細胞内 ROS レベルの上昇を示したが、これはデキサメタゾンとの共処置によって抑制された (図 2-4、C および D)。さらに、ペフロキサシンによる γ H2AX⁺ 細胞の割合の増加もデキサメタゾンとの共処置によって抑制された (図 2-4、E および F)。この結果は *in vivo* データ (図 2-1、F および G) と一致するものであった。

次に、デキサメタゾンが加齢性臍障害を抑制するという第 1 章で得られた結果のメカニズムを調べるため、細胞老化に対するデキサメタゾンの影響を検討した。酸化ストレスは老化に関連しており、H₂O₂ は酸化ストレス誘発細胞老化モデルの作製に利用されている (43、44)。そこで、臍細胞に H₂O₂ (100 μ M、4 時間) を処置して細胞老化を誘導し、デキサメタゾン (100 nM、24 時間前処理+4 時間処理) を共処置した (図 2-5G)。デキサメタゾン処置により、H₂O₂ による細胞内 ROS レベルの上昇が抑制された (図 2-5、H および I)。SA- β -gal および γ H2AX は老化に伴い増加するため、老化マーカーとして使用されている (45)。そこで、SA- β -gal 染色および γ H2AX の免疫染色を行ったところ、デキサメタゾンにより SA- β -gal⁺細胞の比率はわずかに増加したものの、H₂O₂ による SA- β -gal⁺細胞および γ H2AX⁺細胞の割合の増加は、デキサメタゾンを共処置した細胞では認められなかった (図 2-5、J-M)。

ここで、デキサメタゾンによる *Gpx3* 遺伝子発現増加に対するグルココルチコイド受容体の関与を検討するために、グルココルチコイド受容体遮断薬であるミフェプリストンをデキサメタゾン処置 1 時間前に処置した。その結果、ミフェプリストンの前処置によりデキサメタゾンによる *Gpx3* 遺伝子発現増加が抑制された (図 2-6、A および B)。したがって、デキサメタゾンはグルココルチコイド受容体を介して *Gpx3* の遺伝子発現を増加させることが示唆された。

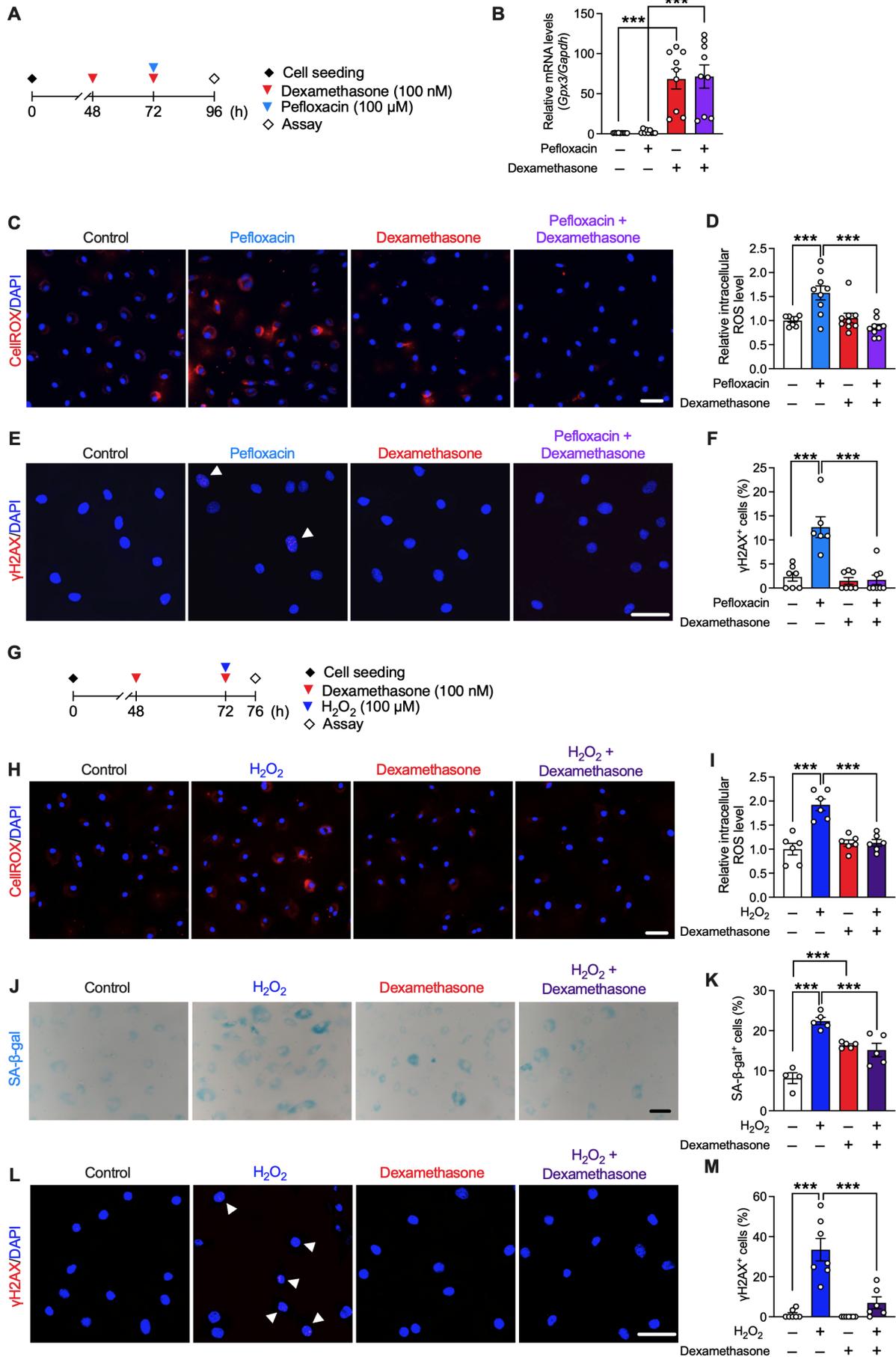


図 2-4 ラット初代培養腱細胞におけるペフロキサシン誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対するデキサメタゾンの効果

(A) ラットアキレス腱から得た初代培養腱細胞に、ペフロキサシン (100 μ M、24 時間)、デキサメタゾン (100nM、前処置 24 時間+24 時間)、またはその両方を処置した。(B) 薬物処置後の *Gpx3* の遺伝子発現量を qRT-PCR で定量し (n=9)、コントロール群に対する相対比で示した。(C および D) 活性酸素種 (ROS) レベルは、CellROX アッセイで評価した (n=8-9)。細胞は共焦点顕微鏡で撮影し、各細胞の蛍光強度を測定した。(E および F) 3 個以上の γ H2AX⁺シグナルを有する細胞数を計測し (白矢尻)、全細胞数に対する百分率で示した。(G) 初代培養腱細胞を H₂O₂ (100 μ M、4 時間) 処置し、細胞老化モデルを作製した。また、デキサメタゾン (100nM、前処置 24 時間+4 時間) も処置した。(H および I) 薬物処置後の ROS レベルを CellROX アッセイで評価した (n=6)。(J および K) 薬物処置後に老化関連- β ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 染色を行った (n=4-5)。SA- β -gal⁺細胞数を計測し、全細胞数に対する百分率を示した。(L および M) γ H2AX の免疫染色を行った (n=6-7)。3 つ以上の γ H2AX⁺シグナル (白矢尻) を有する細胞数を、全細胞数に対する百分率として示した。データは平均値 \pm SEM で示した。統計的有意性は、two-way ANOVA with multiple comparison test を用いて評価した ; *** p < 0.001。スケールバー : 50 μ m。

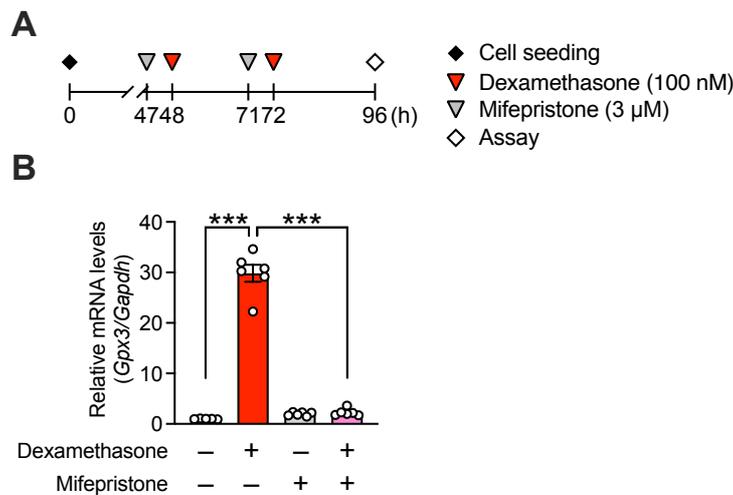


図 2-5 デキサメタゾンによる *Gpx3* 遺伝子発現増加へのグルコルチコイド受容体の関与

(A) ラット初代培養腱細胞に、ミフェプリストン (3 μ M、24 時間+25 時間) をデキサメタゾン (100 nM、24 時間+24 時間) 処置の 1 時間前に処置した。(B) 薬物処置後の *Gpx3* の遺伝子発現量を qRT-PCR で定量した。 *Gapdh* を内部標準とし、コントロール群に対する相対比で示した (n=6)。データは平均値 \pm SEM で示した。統計的有意性は two-way ANOVA with multiple comparison test を用いて評価した ; *** p < 0.001。

第 4 節 ラット初代培養臍細胞におけるフルオロキノロン誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対する GPX3 の影響

次に、観察されたデキサメタゾンの効果に対する GPX3 の十分性を検討した。GPX3 の過剰発現を誘導するために臍細胞にレンチウイルスを感染させ、ペフロキサシン (100 μM 、24 時間) を処置した (図 2-6A)。GPX3 過剰発現細胞では、*Gpx3* の遺伝子発現量が約 5 倍に増加したことが確認された (図 2-6B)。なお、GPX3 過剰発現による他の抗酸化酵素や 1 型コラーゲンの遺伝子発現の変化は認められなかった (図 2-7)。ペフロキサシンによる細胞内 ROS の増加および γH2AX^+ 細胞の割合の増加は GPX3 過剰発現細胞では認められなかった (図 2-6、C-F)。

また、先述と同様に H_2O_2 (100 μM 、4 時間) を処置することで細胞老化モデル作製し、細胞老化における GPX3 の影響を検討した (図 2-7G)。 H_2O_2 による細胞内 ROS の増加は GPX3 過剰発現によって抑制されたが、その作用はデキサメタゾンほど強い効果ではなく、これは GPX3 の発現レベルと相関していると考えられた (図 2-6、H および I)。 $\text{SA-}\beta\text{-gal}^+$ 細胞および γH2AX^+ 細胞の割合の増加は、GPX3 の過剰発現により一部抑制されることが示された (図 2-6、J-M)。

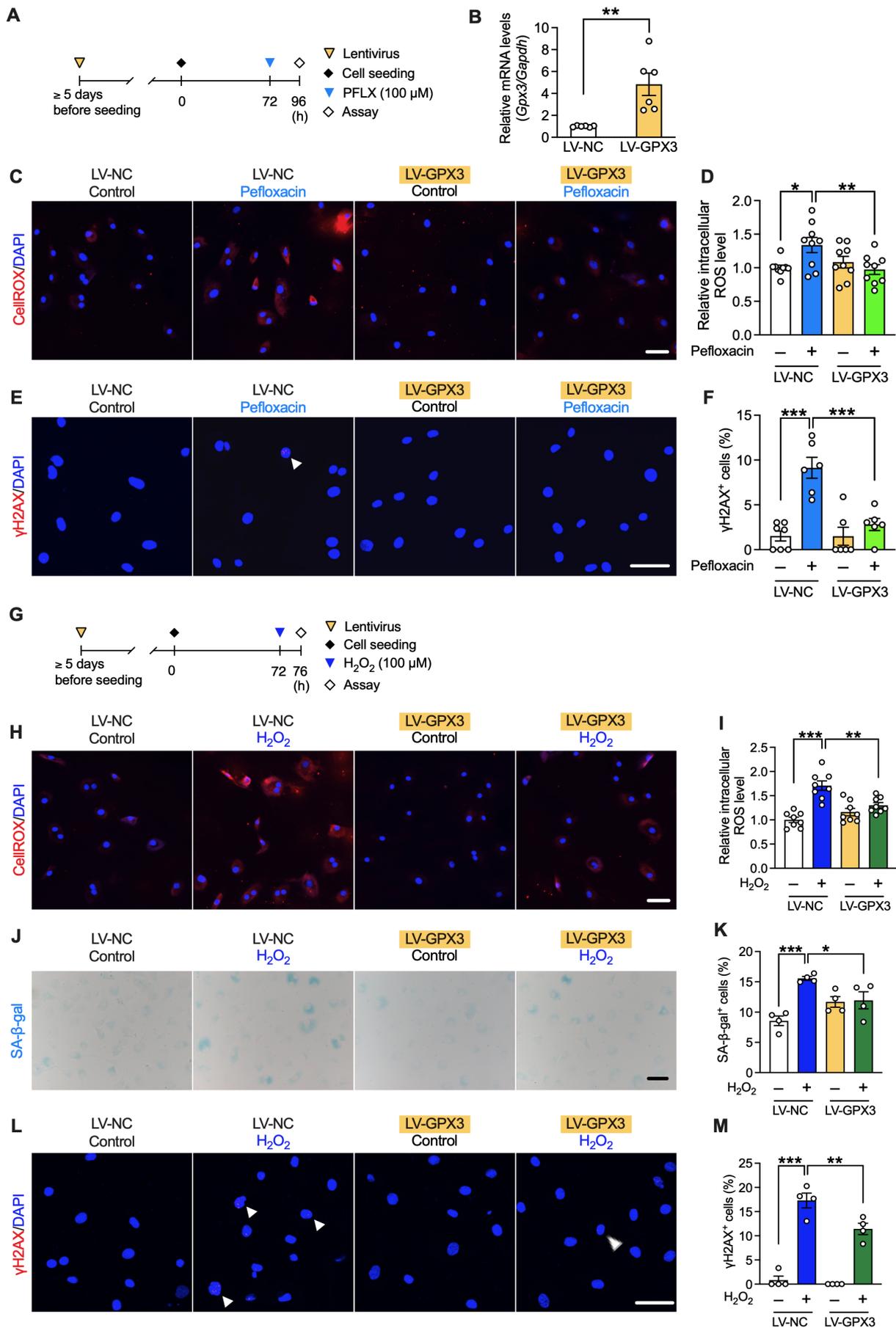


図 2-6 ラット初代培養腱細胞におけるペフロキサシン誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対する GPX3 の効果

(A) GPX3 過剰発現用レンチウイルス (LV-GPX3) またはネガティブコントロール用レンチウイルス (LV-NC) を腱細胞に感染させた。(B) レンチウイルス感染後の *Gpx3* の遺伝子発現量を qRT-PCR で測定し、LV-NC 群に対する相対比で表した (n = 6)。(C および D) 細胞内 ROS レベルは CellROX アッセイを行い、共焦点顕微鏡で細胞を観察し各細胞の蛍光強度を測定することで評価した (n = 9)。(E および F) 腱細胞を、抗 γ H2AX 抗体で染色した (n = 6-7)。3 個以上の γ H2AX⁺シグナル (白矢尻) を有する細胞数を、全細胞数に対する百分率で示した。(G) 酸化ストレス誘発細胞老化モデルを作製するために、腱細胞に H₂O₂ (100 μ M、4 時間) を処置した。(H および I) 細胞内 ROS のレベルは、CellROX アッセイで評価した (n = 8)。(J および K) SA- β -gal 染色を行い、SA- β -gal⁺細胞数を、全細胞数に対する百分率として表示した (n = 4)。(L および M) γ H2AX の免疫染色を行った (n = 4)。3 個以上の γ H2AX⁺シグナル (白矢尻) を有する細胞数を、全細胞数に対する百分率で示した。データは平均値 \pm SEM で示した。統計的有意性は、(A) は Student's t-test を、その他は two-way ANOVA with multiple comparison test を用いて評価した; **p* < 0.05、***p* < 0.01、****p* < 0.001。スケールバー : 50 μ m。

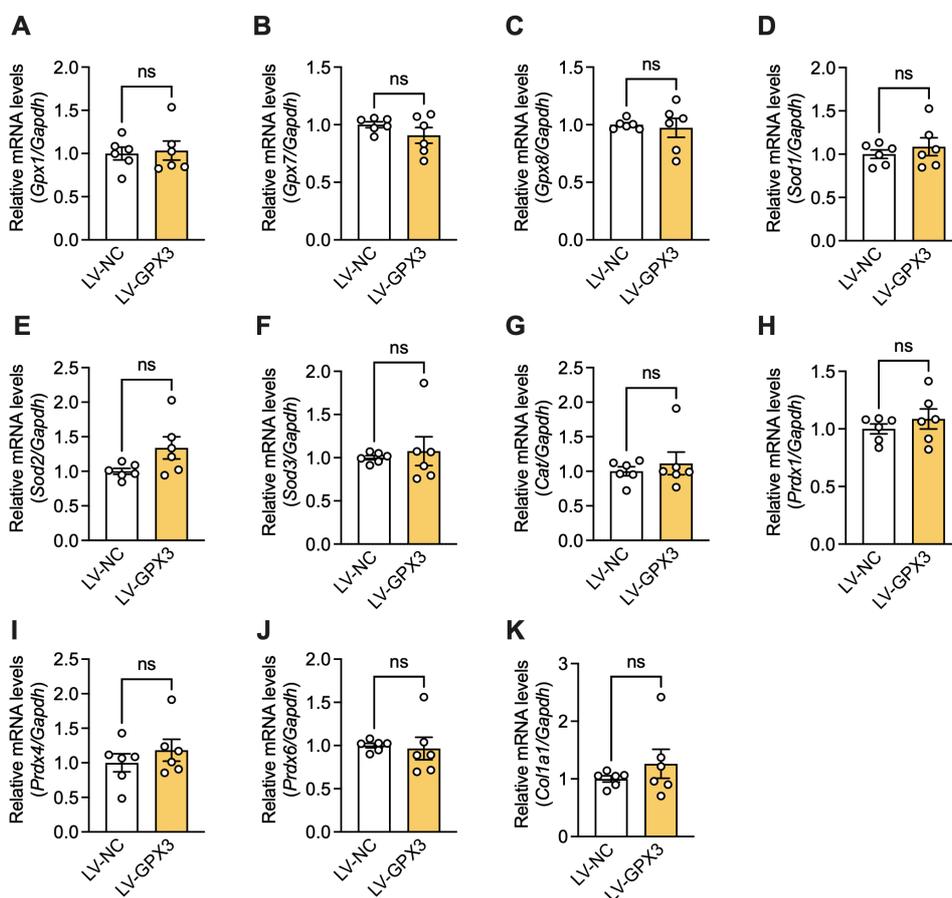


図 2-7 GPX3 の過剰発現が他の抗酸化酵素および 1 型コラーゲンの遺伝子発現に与える影響

ラット初代培養腱細胞に、図 2-7A に示すように GPX3 過剰発現 (LV-GPX3) またはネガティブコントロール (LV-NC) 用のレンチウイルスを感染させた。遺伝子発現量は qRT-PCR により定量した。*Gpx1* (A)、*Gpx7* (B)、*Gpx8* (C)、*Sod1* (D)、*Sod2* (E)、*Sod3* (F)、*Cat* (G)、*Prdx1* (H)、*Prdx4* (I)、*Prdx6* (J) および *Colla1* (K) の発現量は *Gapdh* を内部標準として正規化した (n = 6)。データは平均値 \pm SEM で示した。統計的有意性は Student's t-test を用いて検定した ; ns: not significant。

考察

本章では、第1章のリアルワールドデータ解析から導出された、デキサメタゾンが FQ 誘発性および加齢による腱障害を抑制するという仮説を動物および細胞実験を用いて検証した。その結果、デキサメタゾンが抗酸化酵素 GPX3 の遺伝子発現量を増加させることで酸化ストレスを抑制し、FQ 誘発腱障害や加齢性腱障害を予防する可能性が示された。

過去の研究からも腱障害への酸化ストレスが関与する可能性が示されてきた。実際、腱障害患者の障害部位において ROS レベルが上昇するという知見や (46)、ラット膝蓋腱への H₂O₂ 処置により腱障害が惹起されるという知見が得られている (47)。さらに FQ は腱細胞において酸化ストレスを引き起こすことも示されており (48、49)、既報では、ヒト腱細胞において FQ がミトコンドリア膜を損傷させることで ROS が生成され、ミトコンドリア特異的抗酸化剤である MitoQ によってその作用が軽減されたと報告されている (49)。さらに、FQ 服用患者では ROS レベルの上昇を示唆する過酸化脂質の増加および血漿中の抗酸化物質の減少が認められている (50)。酸化ストレスは加齢関連の諸症状にも関係しており、腱を含む様々な組織で加齢に伴う ROS 産生と酸化ストレス増加が報告されている (51、52)。実際に高齢者のアキレス腱では、酸化マーカーである反応性カルボニル誘導体が有意に増加していた (52)。本研究において薬物投与ラットのアキレス腱における遺伝子発現に関して Gene Ontology 解析を行った結果、過去の知見と同様に FQ 誘発腱障害に酸化ストレスが関与することが明らかとなった。また、老化に関連するパスウェイも濃縮されていたが、これは FQ と加齢の両者ともに酸化ストレスに関連するためだと考えられる。ROS は、コラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼの発現増加や (53)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) (54) や NF- κ B 経路 (55) を含む複数の生体パスウェイを活性化することが知られている。しかし、酸化ストレスが腱障害を引き起こすメカニズムの詳細に関しては、さらなる研究が必要である。

本研究ではデキサメタゾンはグルタチオンペルオキシダーゼファミリーに属する抗酸化物質 GPX3 の遺伝子発現を上昇させることを見出した。GPX3 は活性部位にセレノシステインを含むセレノプロテインであり、その主な役割はグルタチオンを触媒として H₂O₂ やヒドロペルオキシド、過酸化脂質を還元することである (56)。GPX3 は大部分が細胞外へ分泌されるため血漿中に豊富に存在するが、腎臓、心臓、肺、肝臓など様々な組織の細胞内にも存在する (57)。GPX3 遺伝子のプロモーター領域には、グルココルチコイド応答配列 (GRE) が含まれるため、本研究で観察されたデキサメタゾンによる GPX3 の遺伝子発現の増加は、デキサメタゾンと結合したグルココルチコイド受容体が GRE に結合して GPX3 遺伝子の転写を活性化した結果であると考えられる。また GPX3 プロモーター領域には、低酸素誘導因子-1 (HIF-1) の結合部位も存在する。腱組織は血流に乏しく低酸素圧下にあるため (58)、HIF-1 が常に活性化されており、それが GPX3 の転写活性化に繋がると推測される。実際にラットアキレス腱の RNA-seq と GEO に登録された腱障害患者データより、ラットとヒトの両方で、腱組織における GPX3 の遺伝子発現量が抗酸化酵素と比較して多いことが示された。過去に腱組織の GPX3 に着目した研究はほぼ行われていないが、他の筋骨格系組織では

その数は少ないものの研究されている。ヒトの筋細胞では、GPX3 は細胞生存率の維持に重要な役割を担っており (59)、さらに、GPX3 プロモーター領域のメチル化と GPX3 の発現減少が、変性骨関節障害である Kashin-Beck 病の患者で認められている (60)。腱および腱障害における GPX3 の役割に関しては、今後さらなる研究が必要である。

腱細胞を用いた *in vitro* 実験において、デキサメタゾンとペフロキサシン誘発酸化ストレスだけでなく、 H_2O_2 誘発細胞老化も抑制することが示された。しかし、SA- β -gal⁺細胞数はデキサメタゾン単独処置でやや増加しており、既報においてもデキサメタゾンの3日間処置による SA- β -gal⁺腱細胞数の増加が報告されている (61)。しかしながら、デキサメタゾン処置による ROS レベルの増加および γ H2AX⁺細胞数の増加は認められなかったため、デキサメタゾン単独による SA- β -gal⁺細胞数の増加は酸化ストレス以外の経路を介する可能性が考えられる。GPX3 過剰発現腱細胞では H_2O_2 による SA- β -gal⁺細胞の割合増加が認められず、 γ H2AX⁺細胞割合の増加幅も小さかったことから、GPX3 の過剰発現により細胞老化が抑制されることが明らかになった。血漿の GPX3 レベルは加齢に伴い減少するため (62)、高齢者における ROS レベルの上昇の一因である可能性が考えられる。本研究では、 H_2O_2 誘発細胞老化に対する GPX3 過剰発現の効果はデキサメタゾンほど強くなく、GPX3 の発現量と相関していた。腱障害の抑制に最適な GPX3 の発現量については、さらなる検討を要する。

以上、本章において著者は第1章で示された FQ 誘発腱障害および加齢性腱障害のデキサメタゾンによる抑制のメカニズムを *in vivo* 実験と *in vitro* 実験を用いて探索した結果、抗酸化酵素 GPX3 の発現増加による酸化ストレス抑制が腱障害を予防する可能性を示した。

総括および結論

本研究では、薬物誘発性の腱障害である FQ 誘発腱障害および自然発症病態である加齢性腱障害に着目し、これらの腱障害の抑制方法について、臨床ビッグデータ解析と薬理学的実験を組み合わせた検討を行い、以下の新知見を得た。

第 1 章では、まず 3 種類の有害事象報告データベース (FAERS・JADER・CVARD) を解析し、FQ 誘発腱障害を抑制しうる薬物としてデキサメタゾンを見出した。次に、レセプトデータベース (IBM MarketScan Research Databases) を用いた時系列解析を行ったところ、FQ 誘発腱障害だけでなく加齢性腱障害もデキサメタゾンによって抑制されることを見出した。

第 2 章では、第 1 章で得られた知見に基づき *in vivo* 実験を行い、FQ による腱組織の脆弱化がデキサメタゾンにより抑制されることを示した。さらに、*in vitro* 実験から FQ 誘発酸化ストレスおよび過酸化水素誘発細胞老化に対しデキサメタゾンが拮抗作用を示し、その作用が抗酸化酵素 GPX3 の遺伝子発現上昇によるものであることを明らかにした。

以上、本研究よりデキサメタゾンが GPX3 の発現増加を介して腱障害を抑制する可能性が明らかとなった。しかしながら、デキサメタゾンの長期使用は腱の主成分であるコラーゲンの発現低下など、腱に有害な影響を及ぼす可能性があり、また、骨粗鬆症や睡眠障害などの他の副作用も懸念される。したがって、グルココルチコイド受容体を介さずに GPX3 を選択的に発現増加もしくは活性化する新規分子が腱障害の抑制方法として望まれると考えられる。本研究は腱障害の予防方法の確立に向けて新たな知見をもたらすものである。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言をいただきました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言をいただきました京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長・准教授 中川貴之 先生、富山大学大学院総合医薬学研究科教授 久米利明 先生、神戸薬科大学薬学部講師 泉安彦 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、アキレス腱破断応力測定にご協力いただきました京都大学医学部附属病院整形外科学教授 松田秀一 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に多大なる御協力をいただきました、日本大学医学研究科助教 長島卓也 先生、山田麻莉 さん、長岡巧樹 博士、山本浩貴 学士、小林萌音 学士に心から感謝いたします。また、研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました大阪公立大学大学院医学研究科助教 河合洋幸 先生をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた大橋佳奈 修士、抱将史 学士、濫井紀宏 学士、矢野佑一 学士、永井佑菜 博士に心から御礼を述べると共に、勇昂一 博士、京都大学薬学研究科助教 三宅崇仁 先生、金沢大学医薬保健研究域助教 西谷直也 先生、宮之原遵 博士、京都大学大学院医学研究科助教 浅岡希美 先生、川原田宗一 博士、Soni Siswanto 博士、鈴木茉莉 学士、周子剣 修士、幡鎌輝 修士、戸田千尋 学士、栢沼玄 学士、岩井信太郎 君、鈴木崇英 君をはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました京都大学大学院教育支援プログラム、並びに藤多仁生奨学金をいただきました故藤多哲朗 先生、およびご遺族・関係者の方々に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださりました父、母、弟、および両祖父母に心から感謝いたします。

発表論文目録

- 1) 臨床ビッグデータ解析による腱障害予防薬の探索
Frontiers in Pharmacology に投稿中
- 2) 薬理学的実験による腱障害予防メカニズムの探索
Frontiers in Pharmacology に投稿中

参考文献

1. Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol.* (2008) 4:82–9.
2. Millar NL, Silbernagel KG, Thorborg K, et al. Tendinopathy. *Nat Rev Dis Primers.* (2021) 7:1.
3. Carr AJ, Norris SH. The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg Br.* (1989) 71:100–1.
4. Heinemeier KM, Schjerling P, Heinemeier J, Magnusson SP, Kjaer M. Lack of tissue renewal in human adult Achilles tendon is revealed by nuclear bomb (14)C. *FASEB J.* (2013) 27:2074–9.
5. Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H. Good clinical results but persisting side-to-side differences in calf muscle strength after surgical treatment of chronic Achilles tendinosis: a 5-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports.* (2001) 11:207–12.
6. Kaux JF, Forthomme B, Goff CL, Crielaard JM, Croisier JL. Current opinions on tendinopathy. *J Sports Sci Med,* 10(2011), pp. 238-253.
7. Kostrominova TY, Brooks SV. Age-related changes in structure and extracellular matrix protein expression levels in rat tendons. *Age (Dordr).* (2013) 35:2203–14.
8. Zhou B, Zhou Y, Tang K. An overview of structure, mechanical properties, and treatment for age-related tendinopathy. *J Nutr Health Aging.* (2014) 18:441–8.
9. Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford).* (2006) 45:508–21.
10. Minetto MA, Giannini A, McConnell R, Busso C, Torre G, Massazza G. Common Musculoskeletal Disorders in the Elderly: The Star Triad. *J Clin Med.* (2020) 9:1216.
11. Khaliq Y, Zhanel GG. Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. *Clin Infect Dis.* (2003) 36:1404–10.
12. Tsai WC, Yang YM. Fluoroquinolone-associated tendinopathy. *Chang Gung Med J.* (2011) 34:461–7.
13. Lewis T, Cook J. Fluoroquinolones and tendinopathy: a guide for athletes and sports clinicians and a systematic review of the literature. *J Athl Train.* (2014) 49:422–7.
14. Tanne JH. FDA adds "black box" warning label to fluoroquinolone antibiotics. *BMJ.* (2008) 337:a816.
15. Zhao S, Nishimura T, Chen Y, et al. Systems pharmacology of adverse event mitigation by drug combinations. *Sci Transl Med.* (2013) 5:206ra140.
16. Nagashima T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Prevention of antipsychotic-induced hyperglycaemia by vitamin D: a data mining prediction followed by experimental exploration of the molecular mechanism. *Sci Rep.* (2016) 6:26375.
17. Nagaoka K, Nagashima T, Asaoka N, et al. Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia. *JCI Insight.* (2021) 6:e145632.

18. Banda JM, Evans L, Vanguri RS, Tatonetti NP, Ryan PB, Shah NH. A curated and standardized adverse drug event resource to accelerate drug safety research. *Sci Data*. (2016) 3:160026.
19. Yokoyama S, Tanaka Y, Nakagita K, Hosomi K, Takada M. Bleeding risk of warfarin and direct oral anticoagulants in younger population: a historical cohort study using a Japanese claims database. *Int J Med Sci*. (2018) 15:1686–93.
20. Seeger JD, West WA, Fife D, Noel GJ, Johnson LN, Walker AM. Achilles tendon rupture and its association with fluoroquinolone antibiotics and other potential risk factors in a managed care population. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. (2006) 15:784–92.
21. Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration?. *Arthritis Res Ther*. (2009) 11:235.
22. Bolon B. Mini-review: toxic tendinopathy. *Toxicol Pathol*. (2017) 45:834–7.
23. Wu F, Nerlich M, Docheva D. Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Rev*. (2017) 2:332–42.
24. Ge Z, Tang H, Chen W, et al. Downregulation of type I collagen expression in the Achilles tendon by dexamethasone: a controlled laboratory study. *J Orthop Surg Res*. (2020) 15:70.
25. Wong MW, Tang YY, Lee SK, Fu BS, Chan BP, Chan CK. Effect of dexamethasone on cultured human tenocytes and its reversibility by platelet-derived growth factor. *J Bone Joint Surg Am*. (2003) 85:1914–20.
26. Zhang J, Keenan C, Wang JH. The effects of dexamethasone on human patellar tendon stem cells: implications for dexamethasone treatment of tendon injury. *J Orthop Res*. (2013) 31:105–10.
27. Spoendlin J, Meier C, Jick SS, Meier CR. Oral and inhaled glucocorticoid use and risk of Achilles or biceps tendon rupture: a population-based case-control study. *Ann Med*. (2015) 47:492–8.
28. Johannsen F, Olesen JL, Øhlenschläger TF, et al. Effect of Ultrasonography-guided corticosteroid injection vs placebo added to exercise therapy for Achilles tendinopathy: a randomized clinical trial. *JAMA Netw Open*. (2022) 5:e2219661.
29. Dietrich-Zagonel F, Aspenberg P, Eliasson P. Dexamethasone enhances Achilles tendon healing in an animal injury model, and the effects are dependent on dose, administration time, and mechanical loading stimulation. *Am J Sports Med*. (2022) 50:1306–16.
30. Riley G. Tendon and ligament biochemistry and pathology. *Soft tissue rheumatology* (2004) 2053: 3–39.
31. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. (2015) 12:357–60.
32. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. (2012) 9:357–9.
33. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. (2011) 12:323.
34. Jelinsky SA, Rodeo SA, Li J, Gulotta LV, Archambault JM, Seeherman HJ. Regulation of gene expression in human tendinopathy. *BMC Musculoskelet Disord*. (2011) 12:86.

35. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* (2002) 20:87-90.
36. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol.* (1998) 72:8150–7.
37. Kato M, Takada S, Kashida Y, Nomura M. Histological examination on Achilles tendon lesions induced by quinolone antibacterial agents in juvenile rats. *Toxicol Pathol.* (1995) 23:385–92.
38. de Mos M, Koevoet W, van Schie HT, et al. In vitro model to study chondrogenic differentiation in tendinopathy. *Am J Sports Med.* (2009) 37:1214–22.
39. Li Q, Peng S, Sheng Z, Wang Y. Ofloxacin induces oxidative damage to joint chondrocytes of juvenile rabbits: excessive production of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA damage. *Eur J Pharmacol.* (2010) 626:146–53.
40. Thirupathi A, Freitas S, Sorato HR, et al. Modulatory effects of taurine on metabolic and oxidative stress parameters in a mice model of muscle overuse. *Nutrition.* (2018) 54:158–64.
41. Yousefzadeh M, Henpita C, Vyas R, Soto-Palma C, Robbins P, Niedernhofer L. DNA damage-how and why we age?. *Elife.* (2021) 10:e62852.
42. Tryfidou DV, McClean C, Nikolaidis MG, Davison GW. DNA damage following acute aerobic exercise: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* (2020) 50:103–27.
43. Frippiat C, Chen QM, Remacle J, Toussaint O. Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol.* (2000) 35:733–45.
44. Wang Y, Jin S, Luo D, et al. Functional regeneration and repair of tendons using biomimetic scaffolds loaded with recombinant periostin. *Nat Commun.* (2021) 12:1293.
45. Wan M, Gray-Gaillard EF, Elisseeff JH. Cellular senescence in musculoskeletal homeostasis, diseases, and regeneration. *Bone Res.* (2021) 9:41.
46. Yoshida K, Itoigawa Y, Wada T, et al. Association of superoxide-induced oxidative stress with rotator cuff tears in human patients. *J Orthop Res.* (2020) 38:212–8.
47. Fu SC, Yeung MY, Rolf CG, Yung PS, Chan KM, Hung LK. Hydrogen peroxide induced tendinopathic changes in a rat model of patellar tendon injury. *J Orthop Res.* (2018) 36:3268–74.
48. Pouzaud F, Bernard-Beaubois K, Thevenin M, Warnet JM, Hayem G, Rat P. In vitro discrimination of fluoroquinolones toxicity on tendon cells: involvement of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* (2004) 308:394–402.
49. Lowes DA, Wallace C, Murphy MP, Webster NR, Galley HF. The mitochondria targeted antioxidant MitoQ protects against fluoroquinolone-induced oxidative stress and mitochondrial membrane damage in human Achilles tendon cells. *Free Radic Res.* (2009) 43:323–8.
50. Talla V, Veerareddy P. Oxidative stress induced by fluoroquinolones on treatment for complicated urinary tract infections in Indian patients. *J Young Pharm.* (2011) 3:304–9.
51. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free*

Radic Biol Med. (2000) 29:222–30.

52. Radák Z, Takahashi R, Kumiyama A, et al. Effect of aging and late onset dietary restriction on antioxidant enzymes and proteasome activities, and protein carbonylation of rat skeletal muscle and tendon. *Exp Gerontol.* (2002) 37:1423–30.
53. Wunderli SL, Blache U, Beretta Piccoli A, et al. Tendon response to matrix unloading is determined by the patho-physiological niche. *Matrix Biol.* (2020) 89:11–26.
54. Wang F, Murrell GA, Wang MX. Oxidative stress-induced c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation in tendon cells upregulates MMP1 mRNA and protein expression. *J Orthop Res.* (2007) 25:378–89.
55. Best KT, Nichols AEC, Knapp E, et al. NF- κ B activation persists into the remodeling phase of tendon healing and promotes myofibroblast survival. *Sci Signal.* (2020) 13:eabb7209.
56. Chang C, Worley BL, Phaëton R, Hempel N. Extracellular glutathione peroxidase GPx3 and its role in cancer. *Cancers (Basel).* (2020) 12:2197.
57. Nirgude S, Choudhary B. Insights into the role of GPX3, a highly efficient plasma antioxidant, in cancer. *Biochem Pharmacol.* (2021) 184:114365.
58. D’Ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone.* (2006) 39:513–22
59. El Haddad M, Jean E, Turki A, et al. Glutathione peroxidase 3, a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J Cell Sci.* (2012) 125:6147–56.
60. Han L, Yang X, Sun W, et al. The study of GPX3 methylation in patients with Kashin-Beck Disease and its mechanism in chondrocyte apoptosis. *Bone.* (2018) 117:15–22.
61. Poulsen RC, Watts AC, Murphy RJ, Snelling SJ, Carr AJ, Hulley PA. Glucocorticoids induce senescence in primary human tenocytes by inhibition of sirtuin 1 and activation of the p53/p21 pathway: in vivo and in vitro evidence. *Ann Rheum Dis.* (2014) 73:1405–13.
62. Pastori D, Pignatelli P, Farcomeni A, et al. Aging-related decline of glutathione peroxidase 3 and risk of cardiovascular events in patients with atrial fibrillation. *J Am Heart Assoc.* (2016) 5:e003682.