

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09622

研究課題名(和文) 抗酸化物質を用いた肩腱板変性断裂に対する予防的治療の開発

研究課題名(英文) Development of prophylactic treatment for rotator cuff degenerative rupture using antioxidants

研究代表者

美船 泰 (Mifune, Yutaka)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80608464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、加齢性の運動器障害の1つである「非外傷性(変性)肩腱板断裂」が「酸化・糖化ストレス」と関連があることを報告してきた。今回は種々の抗酸化物質(アポシニン、ニコチンアミドモノヌクレオチド; NMN、デヒドロエピアンドロステロン; DHEA)を用いて、変性を主因とする肩腱板断裂に対する予防的治療法の開発を目的とした。まずラットアキレス腱細胞にAGEsを添加して糖化ストレスをかけ、それぞれの抗酸化薬を投与し、その抗糖化・抗酸化作用を確認した。また、動物実験においてもラットのアキレス腱変性または炎症モデルを作成し、そこにそれぞれの抗酸化薬を投与し、変性または炎症の抑制効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果から、肩腱板の変性の原因である糖化および酸化ストレスに対する治療薬として、アポシニン、NMN、DHEAが可能性のある薬剤であることが示唆され、今後の治療薬開発に対する一助になることが期待される。これにより、加齢とともに罹患率が上昇する肩腱板断裂の発生を抑えられることが期待される。しかし、現段階では、薬剤の投与方法が全身投与であることや、薬剤の副作用(全身に対する影響、局所に対する影響)に関して、まだ議論が必要であり、今後さらなる研究を進めることが必要である。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that one of the age-related locomotor disorders, "non-traumatic (degenerative) rotator cuff tear," is associated with "oxidative and saccharification stress." This time, we aimed to develop a preventive treatment for rotator cuff tear mainly caused by degeneration using various antioxidants (apoinine, nicotinamide mononucleotide; NMN, dehydroepiandrosterone; DHEA). First, AGEs were added to rat Achilles tendon cells to apply glycation stress, and each antioxidant was administered, and its anti-glycation and antioxidant effects were confirmed. Also, in animal experiments, a rat Achilles tendon degeneration or inflammation model was created, and each antioxidant was administered to the model, and the degeneration or inflammation inhibitory effect was confirmed.

研究分野：整形外科学

キーワード：肩腱板断裂 抗酸化物質 アポシニン DHEA NMN

1. 研究開始当初の背景

近年、老化の原因として糖化ストレスと酸化ストレスが注目されており、様々な研究が進む中で糖尿病や高脂血症などの生活習慣病と、ロコモティブシンドロームや骨粗鬆症など老化に伴う多くの運動器疾患にも関連があることが分かっている。その中で、肩腱板断裂の原因には大きく外傷性と非外傷性とに分別されるが、肩腱板断裂の多くは非外傷性の加齢による腱板変性により起こることが多いとされている。事実、腱板断裂の疫学調査において外傷の既往があったのが約 10%以下であったという報告もあり、また年齢が増すごとに有病率が増加するという点も様々な報告において一致している。腱板断裂を起こすリスクファクターを調べた研究では、加齢・男性・重労働・糖尿病・高コレステロール血症などが報告されている。我々はこれまでに、腱板修復手術時に研究参加に同意の得られた患者から腱板組織の断端部を一部採取し、ヒト腱板組織における AGEs 発現を調べた。その結果、免疫組織染色により腱板組織における AGEs 沈着および RAGE 発現は確認している。また *in vitro* 実験において AGEs が腱板細胞の活性を低下させ、ROS 発現の増強を介して apoptosis を誘導することを確認した。また動物実験として 3、6、12、24 か月の各月齢のラットを用いて、健常肩腱板組織における各月齢での腱板組織の変化や AGEs 沈着量、RAGE 発現量などを検討し、引っ張り試験による最大破断強度と弾性率も計測し、組織 AGEs 沈着量と最大破断強度には負の相関を認めることを確認している。

2. 研究の目的

年齢とともに肩腱板組織内では AGEs および ROS 発現量は増加しており、これが腱板の脆弱化と関連している。そこで本研究の目的は、AGEs や ROS を抑制することで腱板の脆弱化を予防できるかについて検討することとした。AGEs および ROS の抑制物質としては下記の 3 つを使用する。①アポシニン:天然ハーブより抽出される物質で、AGEs は特異的受容体である receptors for AGEs(RAGE)と結合して NADPH オキシダーゼ (NOX) を活性化し、ROS を生成が、アポシニンは ROS 産生を抑制することで抗酸化作用を示す。②ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) : これはすべての生物種に存在する補酵素である NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide+) の中間生成物であり、NAD⁺は長寿遺伝子として知られる Sirtuin を活性化することで抗酸化作用を示し、生体内臓器における加齢性変化を制御する因子として近年注目されている。③デヒドロエピアンドロステロン(DHEA) : これは副腎皮質で産生されるステロイドホルモンであり、近年その抗老化・抗酸化作用が注目されている。DHEA はすでに骨粗鬆症、動脈硬化、アルツハイマー病、副腎不全、糖尿病などに効果があると報告されているが、腱板細胞に対する効果は明らかにされていない。以上、この 3 つの抗酸化薬を用いて、腱板細胞・組織に対する抗糖化・酸化作用を検討する。

3. 研究の方法

まず *in vitro* 実験では、研究の参加に同意を得られた患者から肩腱板修復手術を中に、通常廃棄される肩腱板組織を採取・保存し、これより肩腱板由来細胞を分離・培養する。この肩腱板由来細胞に対して AGEs または高血糖負荷による糖化・酸化ストレスを加えるとともに、抗酸化物質 (アポシニン、NMN、DHEA) を投与し、その効果について検討を行う。これまでの実験結果より、負荷する AGEs 濃度は 100 μ g/ml、糖濃度は 33mM とする。抗酸化物質の濃度は、過去の文献よりアポシニンは 100・500 μ M、NMN は 100・500mM、DHEA は 1・5・10 μ M と設定する。それぞれを 48~72 時間培養後、real-time PCR により NOX-1/4、IL-6、RAGE 遺伝子の発現を評価し、免疫染色で ROS とアポトーシスの発現量を評価する。また WST assay により細胞活性についても評価する。

次に *in vivo* 実験では、AGEs/ROS 発現増強モデルとして糖尿病ラットを用い、抗酸化物質を投与することで、腱板強度の増加が得られるかを検討し、加齢による変性腱板断裂を予防することが可能であるかを検討する。抗酸化物質投与後 2・4・8 週後に肩腱板組織を採取し、real-time PCR による NOX-1/4、IL-6、RAGE 遺伝子の発現の評価、HE 染色による腱配列の評価、免疫染色による ROS とアポトーシスの発現量の評価と、引っ張り試験による腱板強度の評価も行う。最後に、糖尿病ラットに肩腱板修復術を行い、同様に抗酸化物質を投与することで、肩腱板修復術後の治癒過程への影響に関しても検討する。

4. 研究成果

まず *in vitro* の実験において、まずラット腱由来細胞を高糖度条件下に培養し、そこにアポシニン、NMN、DHEA を添加した。まず、アポシニンの効果であるが、高糖度ストレスによって増加した NOX-1、NOX-4、IL-6、RAGE の発現上昇が、アポシニン投与によって有意に低下することがわかった。また ROS 陽性細胞数、アポトーシス発現数もコントロール群と比べて、アポシニン投与群において有意に減少することがわかった。細胞活性においても、糖負荷により減少するところを、アポシニン投与によって有意な上昇を認めた。これらより、ラット腱由来細胞において、アポトーシスは NOX を阻害することで ROS 産生を低下させ、抗酸化作用を示すこと

がわかった。また ROS 産生の低下に伴い、抗炎症効果やアポトーシス抑制効果、細胞活性上昇効果も認めた。同様に、NMN(Nicotinamide Mononucleotide)の実験も、NMN 投与群では NOX-1、NOX-4、IL-6 の発現減少、SIRT1、SIRT6 の発現増加を有意に認め、ROS 産生、アポトーシスも有意に減少することがわかった。これらの結果より、NMN の投与により SIRT1、SIRT6 の発現は増加し ROS 産生、アポトーシスを抑制した可能性が示唆された。

同様に、*in vitro* の実験において、まずラット腱由来細胞を高糖度条件下に培養し、そこに抗酸化物質である DHEA を添加した。高糖度ストレスによって増加した NOX-1、NOX-4、IL-6、RAGE の発現上昇が、DHEA 投与によって有意に低下していた。また ROS 陽性細胞数、アポトーシス発現数もコントロール群と比べて、DHEA 投与群において有意に減少することがわかった。細胞活性においても、糖負荷により減少するところを、DHEA 投与によって有意な上昇を認めた。これらより、ラット腱由来細胞において、DHEA は NOX を阻害することで ROS 産生を低下させ、抗酸化作用を示すことがわかった。また ROS 産生の低下に伴い、抗炎症効果やアポトーシス抑制効果、細胞活性上昇効果も認めた。DHEA に関する *in vivo* 実験では、まず通常ラットにストレプトゾシンを注射し、糖尿病ラットを作成した。次に、DHEA 投与群では 2 日に 1 回 DHEA の腹腔内注射を 4 週間行った。その後、アキレス腱を採取、分析し、DHEA 注射を行わないコントロール群でも同様にアキレス腱検体を採取し、2 群間での比較を行った。HE 染色では 2 群間で明らかな差異は認めなかったが、NOX-1 の免疫染色では、DHEA 群において有意な発現の減少を認めた。また、組織より抽出した RNA による PCR では、NOX-1 だけでなく、*type III collagen*、TIMP-2、IL-6 の発現の減少も認めた。これより、*in vivo* 環境下でも DHEA は高血糖による腱の変性を抑制する可能性が示唆された。

最後に、アポシニンおよび NMN に関する *in vivo* 実験を行った。まず通常ラットのアキレス腱にコラゲナーゼ注射を行い、アキレス腱炎モデルを作成した。2 群に分けて、治療群には NMN を 1 日おきに 2 週間腹腔内投与を行った。その後、各群のアキレス腱を採取・分析し、アポシニン注射を行わないコントロール群でも同様にアキレス腱検体を採取し、2 群間での比較を行った。HE 染色では 2 群間で明らかな差異は認めなかったが、蛍光免疫染色では NOX-1 および NOX-4 において、NMN 投与群で有意な上昇を認めていた。また PCR では、長寿遺伝子である SIRT1 および SIRT6 の発現が、NMN 群において認められ、炎症マーカーである IL-6 の発現は減少していた。また、酸化ストレスのマーカーである superoxide dismutase (SOD) activity では、NMN 群で有意に低下をしていた。これらの結果より、*in vivo* 環境下でも NMN は腱の変性を抑制する可能性が示唆された。アポシニンに関する *in vivo* 実験では、まず通常ラットにストレプトゾシンを注射し、糖尿病ラットを作成し、アポシニン投与群では 2 日に 1 回 DHEA の腹腔内注射を 4 週間行い、アキレス腱を採取、分析した。NOX-1 の免疫染色では、アポシニン群において有意な発現の減少を認め、PCR では NOX-1 だけでなく、*type III collagen*、TIMP-2、IL-6、ROS の発現の減少も認めた。これらの結果から、アポシニンに関しても、*in vitro* 環境下だけではなく、*in vivo* 環境においても抗糖化、抗酸化作用が認められ、肩腱板変性に対する治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurosawa Takashi, Mifune Yutaka, Inui Atsuyuki, Nishimoto Hanak, Ueda Yasuhiro, Kataoka Takeshi, Yamaura Kohei, Mukohara Shintaro, Kuroda Ryosuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of apocynin in vitro on high glucose-induced oxidative stress on tenocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone & Joint Research	6. 最初と最後の頁 23 ~ 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1302/2046-3758.991.BJR-2019-0074.R1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kurosawa T, Mifune Y, Inui A
2. 発表標題 Apocynin for AGEs-induced oxidative stress
3. 学会等名 2020 Annual meeting of Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaura K, Mifune Y, Inui A
2. 発表標題 Evaluation of Nicotinamide Mononucleotide, a Regulator of Aging for Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effect in Tendinopathy
3. 学会等名 2020 Annual meeting of Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mukohara S, Mifune Y, Inui A
2. 発表標題 Evaluation of Dehydroepiandrosterone in vitro for high glucose-induced oxidative stress on tenocytes
3. 学会等名 2020 Annual meeting of Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山裏耕平、美船泰、乾淳幸
2. 発表標題 老化制御因子NMN (Nicotinamide Mononucleotide)の腱炎に対する抗炎症・酸化作用の検討
3. 学会等名 第93回日本形成外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向原伸太郎、美船泰、乾淳幸
2. 発表標題 高血糖誘導酸化ストレスを与えた腱細胞に対するDHEAの効果
3. 学会等名 第93回日本形成外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤 堯、美船 泰
2. 発表標題 アポシニンは肩腱板由来細胞においてAdvanced glycation end-productsによる酸化ストレスに対して抑制効果を示す
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤 堯、美船 泰
2. 発表標題 終末糖化産物に対するアポシニンの抗酸化作用の検討
3. 学会等名 第46回 日本肩関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Kurosawa, Yutaka Mifune
2. 発表標題 Apocynin for AGEs-induced oxidative stress
3. 学会等名 2020 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	乾 淳幸 (Inui Atsuyuki) (70457092)	神戸大学・医学部附属病院・特命助教 (14501)	
研究分担者	西本 華子 (Nishimoto Hanako) (30707154)	神戸大学・医学部附属病院・特命助教 (14501)	
研究分担者	国分 毅 (Kokubu Takeshi) (40403266)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------