

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791545

研究課題名(和文)糖化ストレス抑制による高齢者における非外傷性肩腱板断裂予防の可能性

研究課題名(英文)Prevention of Rotator cuff degeneration by suppressing glycation stress

研究代表者

美船 泰(MIFUNE, Yutaka)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腱板組織の免疫組織染色により腱板組織への糖化最終生成物沈着およびその受容体の発現を確認した。またin vitro実験においてAGEsが腱板細胞の細胞活性を低下させ、VEGF分泌を増加し、また容量依存性にHIF-1及び活性酸素の発現を増加させ、apoptosis率も増加することがわかった。ラット健常肩腱板組織においても、AGEs量を計測し、組織学的検討により腱板組織の脂肪変性および引っ張り試験による最大破断強度と弾性率を計測し、組織AGEs沈着量との相関についても検討し、高い相関があることも確認できた。以上より、AGEsが加齢による肩腱板変性断裂の原因の一つになっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In our examinations, the expressions of Advanced glycation end-products (AGEs) and its receptor were confirmed in human rotator cuff tissue. The in vitro examination revealed that AGEs could reduce cell viability and enhance VEGF secretion from rotator cuff cells, and that AGEs also promoted the expressions of HIF-1 and ROS resulting in increase of cell apoptosis. In the animal models, a negative correlation between the amount of AGEs and the result of tensile strength test was observed. These results in our study indicated that AGEs could cause age-related degenerative changes of rotator cuff, and the reduction of AGEs might prevent rotator cuff from degenerating by senescence.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：糖化最終生成物 腱板断裂 糖化ストレス 老化

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の国内・国外の研究動向及び位置づけ

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。実際、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⁽¹⁾、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⁽¹⁻³⁾。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⁽⁴⁻⁶⁾。しかし、加齢により腱板が変性し、断裂が増加するメカニズムについてはまだ明らかにされていない。

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

我々はこれまで、断裂した腱板をどのように再生するか、という観点から生体吸収性材料を用いた腱板再生治療の開発や⁽⁷⁾、腱板断裂断端の組織から幹細胞を分離・同定することに成功し⁽⁸⁾、その成果を報告してきた。しかし、加齢により変性した腱板は脆弱化しており、人工材料を使った再建手術においても縫着する組織自体の脆弱性の問題や、組織より分離した細胞活性の低下、幹細胞性(stemness)の低下などを認めることも多く、実際の臨床応用までにクリアすべき課題も多い。

そこで、近年アンチエイジング研究に注目が集まる中、肩腱板が自然に断裂するという加齢現象を防ぐことができないかと考えた。中でも、皮膚や内臓、骨・軟骨、眼水晶体の老化の主原因とされ、主にコラーゲンに蓄積すると言われている「糖化最終生成物(advanced glycation end products; AGEs)」に着目した。肩腱板の主成分はコラーゲンであり、コラーゲ

ンは常に血糖に曝されている細胞外タンパク質であるうえに、代謝回転がきわめて遅いためAGEsが加齢に伴い、顕著に増加することが報告されている⁽⁹⁾。本研究では、このAGEsと加齢による腱板脆弱性との関係性について明らかにすることが目的である。

<参考文献>

- (1) Yamamoto A, et al. Factors involved in the presence of symptoms associated with rotator cuff tears: a comparison of asymptomatic and symptomatic rotator cuff tears in the general population. *J Shoulder Elbow Surg.* Oct;20(7):1133-7. 2011.
- (2) Ozaki J, et al. Tears of the rotator cuff of the shoulder associated with pathological changes in the acromion. A study in cadavera. *J Bone Joint Surg Am.* 70(8):1224-30. 1988.
- (3) Petersson CJ, et al. The subacromial space in normal shoulder radiographs. *Acta Orthop Scand.* 55(1):57-8. 1984.
- (4) Roquelaure Y, et al. Personal, biomechanical, and psychosocial risk factors for rotator cuff syndrome in a working population. *Scand J Work Environ Health.* Jun 24. 2011[Epub ahead of print].
- (5) Kang JH, et al. Comparison of ultrasonographic findings of the rotator cuff between diabetic and nondiabetic patients with chronic shoulder pain: a retrospective study. *Ultrasound in Med & Biol.* 36(11):1792-6. 2010.
- (6) Abboud JA, et al. The Effect of Hypercholesterolemia on Tendons. *Clin Orthop Relat Res.* Dec. 2010[Epub ahead of print].
- (7) Inui A, et al. Regeneration of rotator cuff tear using electrospun poly(D-L-lactide-co-glycolide)(PLG) scaffolds in a rabbit model. The 56th the orthopaedic research society.
- (8) Nagura I, et al. Analysis of human rotator cuff derived cells with multilineage differentiation potential. The 57th the orthopaedic research society.
- (9) Ichihashi M, et al. Glycation Stress and Photo-Aging in Skin. *Anti-Aging Medicine*

- (10) Jin WL, Azuma K, Mita T, et al. Repetitive hypoglycaemia increases serum adrenaline and induces monocyte adhesion to the endothelium in rat thoracic aorta. *Diabetologia*. 54(7):1921-9. 2011.

2 . 研究の目的

(1) まず最初に in vitro 環境において腱板への AGEs の影響を調べるために、AGEs を細胞培養液中に添加し、その影響を調べた。ヒト血清中の AGEs 濃度が 100-400ug/ml であることより添加する AGEs 濃度を設定し、各群での cell viability assay や cell apoptosis 率を調べる。

(2) 加齢により AGEs の肩腱板組織への沈着が増加しているのかを確認する必要がある。我々はこれまでも腱板修復手術時に、患者同意の元、トリミング操作により切除・破棄される腱板組織を採取し、その組織より腱板由来細胞の分離を行ってきた。同様に、患者同意の元、腱板修復手術時に腱板組織を採取し、免疫染色法により腱板組織への AGEs 沈着を調査し、患者年齢・罹患期間・腱板の脂肪変性（脆弱化）と AGEs 沈着量との相関を調べる。この際、糖尿病患者ではより多くの AGEs 沈着が予想されるため、糖尿病患者は除外する必要があると考える。

(3) ここで問題点として、採取できるヒト腱板組織は断裂した腱板組織に限られており、加齢と AGEs 沈着量の関係性を真に明らかにするためには、健全腱板組織が必要となる。そこで、肩腱板実験モデルとして汎用されているラットを用いて加齢と健全腱板組織における AGEs 沈着量との関係性を明らかにする。また同時に、ラット棘上筋・棘下筋・肩甲下筋を採取し、組織学的検討により腱板組織の脂肪変性を調べ、AGEs 沈着量との関係性も検討する。さらに、AGEs 沈着と腱板脆弱性との関係を明らかにするために、引っ張り試験により各腱板組織の最大破断強度や弾性率を計測し、組織 AGEs 沈着量との相

関に関しても検討する。

3 . 研究の方法

(1) In vitro における AGEs の影響

手術時に採取したヒト腱板組織より腱板由来細胞を分離し、次の 3 群の条件下で培養を行った。(1)regular medium + 500 µg/ml AGEs (High AGEs 群)、(2)regular medium + 100 µg/ml AGEs (Low AGEs 群)、(3)regular medium のみ (Control 群)。3 日間培養後に WST 染色による cell viability assay、ELISA による培養液中の VEGF 量、蛍光免疫染色による HIF-1 α 及び活性酸素(ROS)の発現と cell apoptosis 率を検討した。

(2) ヒト肩腱板組織（断裂腱板）を用いた AGEs と年齢・脂肪変性の検討

患者同意の元、腱板修復手術時にトリミング操作により切除・破棄される腱板の断端組織を採取する。そして、免疫組織染色により腱板組織への AGEs 沈着量・AGEs 受容体 (RAGE)発現量を計測すると同時に Oil red O 染色により脂肪変性に関しても同様に調査する。同時に、組織蛍光免疫染色でも AGEs および RAGE の発現量を定量評価し、患者年齢・罹患期間・腱板の脂肪変性（脆弱化）と AGEs 沈着量、RAGE 発現量との相関を調べる。この際、糖尿病患者ではより多くの AGEs 沈着、RAGE 発現が予想されるため、糖尿病患者は除外する必要があると考える。

(3) ラット肩腱板組織（非断裂腱板）を用いた AGEs と年齢・脂肪変性・機能的強度の検討

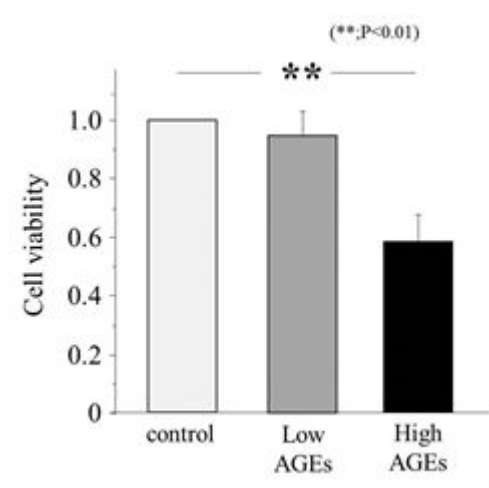
ヒトから採取できる腱板組織は断裂した腱板組織に限られ、健全な肩腱板組織をヒトから採取することは困難である。しかし、加齢と AGEs 沈着量の関係性を真に明らかにするためには、断裂していない肩腱板組織での実験が必要となる。そこで、肩腱板断裂の実験モデルとして汎用されている「ラット」を用いて加齢と健全腱板組織における AGEs 沈

着量との関係性を明らかにする。

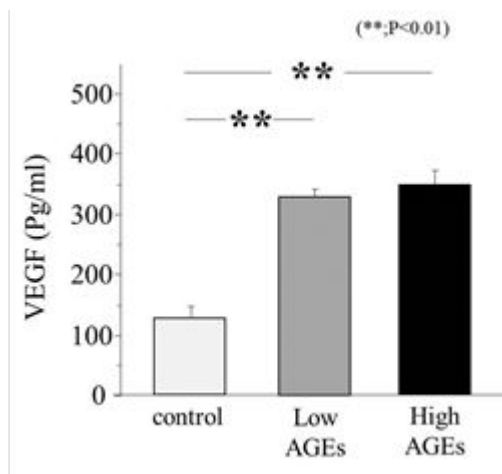
各年齢群 (3M、6M、12M、24M) のSDラットを各群 15 匹 (15 匹 30 肩 × 4 群 = 60 匹 120 肩) 用意し、肩腱板組織として棘上筋・棘下筋・肩甲下筋の 3 つの筋を採取し、組織学的免疫染色により腱板組織への AGEs 沈着量・RAGE 発現量を計測すると同時に Oil red O 染色により脂肪変性についても調査する (n=10 肩)。また、組織免疫染色でも AGEs/RAGE 発現を定量評価し、各年齢群・腱板の脂肪変性と AGEs 沈着量、RAGE 発現量との相関を調べる (n=10 肩)。そして、ラットでは腱板付着部である上腕骨も含めて採取可能であることから、引っ張り試験により最大破断強度と弾性率を計測し、組織 AGEs 沈着量、RAGE 発現量との相関についても検討する (n=10 肩)。

4. 研究成果

(1) まず in vitro での実験では、cell viability assay において、High AGEs 群では Control 群と比して有意な低下を示したが、Low AGEs 群と Control 群には有意差は認めなかった。

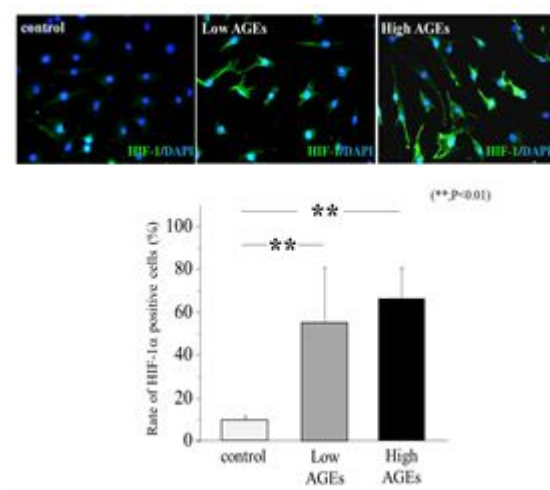


ELISA による培養液中の VEGF 量は High および Low AGEs 群では Control 群に比して有意に高い値を示した。

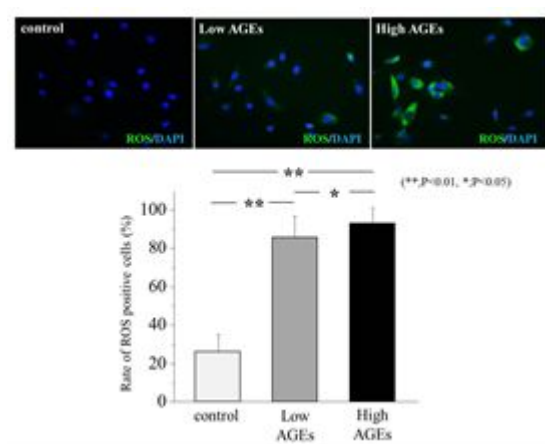


HIF-1a および ROS の発現と cell apoptosis 率に関しては、High AGEs 群では他の 2 群に比して有意に高い値を示し、また Low AGEs 群は Control 群に比して有意に高い値を示した。

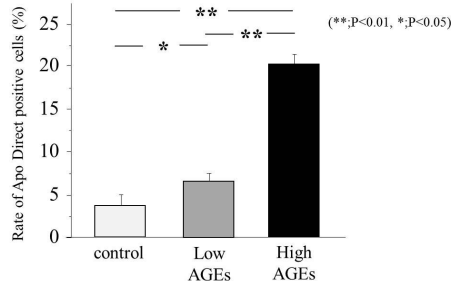
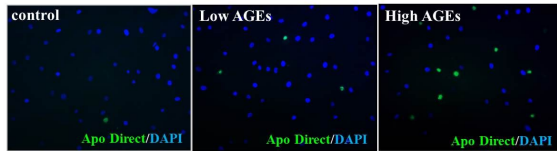
< HIF-1a >



< ROS >

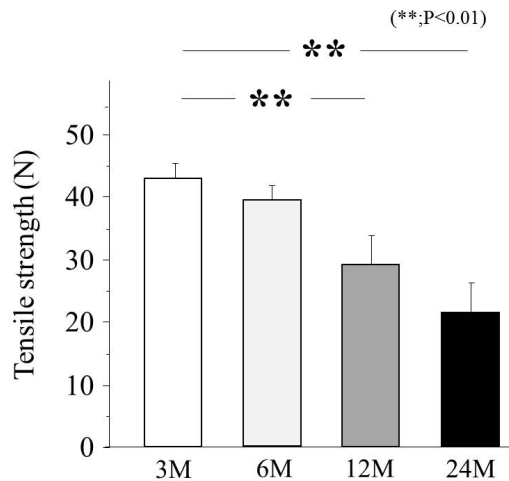


< Apoptosis >



(2) ラット健常肩腱板組織において、各年齢(3M、6M、12M、24M)別に蛍光免疫染色により AGEs 量を計測したところ、経年齢的に AGEs 沈着が増量することが確認された。

また、引っ張り試験による最大破断強度と弾性率を計測したところ、こちらは経年齢的に最大破断強度および弾性率が低下することがわかった。



この2つのデータの関係性をピアソンの相関係数を算出すると、 $r = 0.8614$ ($P < 0.01$) と高い相関を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

美船泰、乾淳幸、無藤智之、原田義文、高瀬史明、黒坂昌弘、国分毅「Platelet rich plasma による腱板由来細胞の脂肪分化への影響抑制」第40回日本肩関節学会 平成25年9月27-28日 京都

美船泰、乾淳幸、無藤智之、原田義文、高瀬史明、黒坂昌弘、国分毅「Platelet rich plasma による腱板由来細胞の脂肪分化への影響」第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 平成25年6月20-21日 札幌

美船泰、乾淳幸、無藤智之、原田義文、高瀬史明、黒坂昌弘、国分毅「糖化最終生成物が腱板由来細胞に与える影響に関する検討」第86回日本整形外科学会総会 平成25年5月23-26日 広島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

美船 泰 (MIFUNE, Yutaka)
神戸大学・医学部附属病院・特命助教
研究者番号：80608464