

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34441

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560270

研究課題名(和文) 糖尿病患者に生じる腱障害・損傷の機序解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of diabetic tendinopathy: an experimental study using type 2 diabetes rat.

研究代表者

横田 淳司 (YOKOTA, ATSUSHI)

藍野大学・再生医療研究所・客員研究員

研究者番号：10449564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病では糖化最終生成物(AGEs)の蓄積と、その受容体(RAGE)の相互作用が組織障害を来すとされているが、糖尿病性腱障害の病態は未だ解明されておらず、運動が糖尿病腱に及ぼす影響も不明である。そこで型糖尿病を自然発症するSDT fatty ラットで解析を行った。ケージ飼育したSDT Fattyラット棘上筋腱ではAGEsのひとつペンチジンとRAGEの発現が増強していたが16週の運動負荷後、棘上筋腱におけるRAGE遺伝子発現はケージ飼育の約50%に低下していた。以上よりペンチジン沈着とRAGEの発現増加が糖尿病に合併する腱障害の病態の一つであり、運動療法は腱障害を予防しうる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although the glycation due to accumulation of advanced glycation end products (AGEs) and the interaction between AGEs and the receptors for AGEs (RAGE) appears to be the major cause of diabetic complications, the pathophysiology of diabetic tendinopathy has not been elucidated. Furthermore, the effect of exercise on diabetic tendon is still unknown. Therefore, we utilized the SDT fatty rat, a novel rat model which mimics type 2 diabetes mellitus, to analyze the expression of AGEs and RAGE in the supraspinatus tendon. Histologically, the expression of pentosidine, one of the types of AGEs, and RAGE was increased in the caging SDT Fatty rat. After 16 weeks of exercise by the treadmill, the gene expression of RAGE decreased to 50% compared to that of the caging SDT fatty rats. Those results indicate that one of the primary pathophysiology of the diabetic tendinopathy is the accumulation of pentosidine and RAGE, and that exercise seems to have a prophylactic effect against this disorder.

研究分野：整形外科学

キーワード：糖尿病 腱障害 ラット 腱板 糖化最終生成物(AGEs) 運動 AGE受容体(RAGE)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は、我が国の5大疾患のひとつで、厚生労働省の2008年の調査によるといわれる“予備軍”も含めた患者数は約2210万人に上ると推定され、近年増加傾向にある。そのうち、以前はインスリン非依存性糖尿病と呼ばれていた型糖尿病が、全体の約95%を占めている。

(2) 糖尿病は高血糖と様々な全身合併症を呈する症候群ととらえることもできる。糖尿病合併症の病態は、持続する高血糖・脂質異常を含む代謝異常と高血圧などの血管障害因子によって起こる血管病変を基盤とした組織障害と考えられている。高頻度に認められる合併症は細小血管症である神経障害、腎症、網膜症である。大血管症である冠動脈疾患、脳血管障害および末梢動脈疾患も患者のQOLや生命予後に直結する重大な合併症であるが、糖尿病による組織障害は全身のあらゆる臓器に起こりうる。

(3) 糖尿病と整形外科疾患との関連について、は、特に腱の脆弱化や断裂が糖尿病患者に多く発生することが知られているが、その機序や病態については、未だ十分に解明されていない。腎臓など他の臓器では近年、糖尿病や加齢で促進的に生成される終末糖化産物(Advanced glycation end-products; AGEs)が組織に沈着し、直接的に組織障害を惹起、あるいはAGEsの受容体であるRAGE(receptor for AGEs)との相互作用により組織障害を引き起こすことが報告されているが、腱組織においてAGEs、RAGEが腱障害に関与しているかについてはこれまで報告されていない。

(4) 運動療法は糖尿病の治療法の重要な柱である。運動療法の目的は糖尿病の主要な病態であるインスリン抵抗性の改善と考えられているが、組織障害を来した腱に対する運動負荷の影響、負荷による腱損傷のリスクなどについても涉猟しえた限り報告はない。

(5) 糖尿病性腱損傷の機序や、運動が腱障

害に及ぼす影響を解明するためには動物モデルを用いた研究が望ましいが、過去の報告では薬物中毒(ストレプトゾトシン注射)による糖尿病動物モデルが多く用いられており、多数を占める型糖尿病の病態を反映しているとは言い難い。一方、型糖尿病動物モデルにはGKラット、OLETFラット、SDTラットがあるが、GKラットは血糖上昇が軽度で肥満を伴わない、OLETFラット、SDTラットは肥満を伴うが、確実に糖尿病を発症するまでそれぞれ25-40週を要するため、運動負荷を加えるには適当ではないと思われた。

(6) これらの問題を解決するため、近年開発されたSDT.Cg-Lepr<sup>fa</sup>/JttJclラット(SDT fattyラット)を用いて研究を行った。SDT fattyラットの特徴は肥満を伴い生後6-8週よりほぼ100%高血糖を来し、腎障害、白内障など眼病変、骨病変を高頻度に合併することである(図1)。



図1 SDT fatty ラット(24週)白内障を認める。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、自然発症型糖尿病ラットであるSDT fattyラットを用いて

(1) 糖尿病腱障害におけるAGEs、RAGEの関与を明らかにすること

(2) 運動負荷が糖尿病性腱障害の病態に及ぼす影響を明らかにすること

の2点である。

## 3. 研究の方法

(1) 6週齢の雄SDT fattyラット(日本クレア、東京)24匹、対照群として同週齢の

SD ラット 8 匹を用いた。本研究は藍野大学動物実験倫理委員会の審査と承認を得て行った。ラットは藍野大学再生医療研究所内の動物舎で通常の食餌、水を用いて飼育された。

(2) SDT fatty ラットはケージ内飼育群(C群:8匹)と16週間の運動負荷を行う群に分けた。運動はトレッドミルを用いて、2週間の訓練後、1日1回、分速5m、連日1時間行う歩行を模倣した群(W群:8匹)と1日1回、分速10m、連日30分間行うランニングを模倣した群(R群:8匹)を設定した。SD ラットはケージ内飼育を行った(N群)。

(3) 糖尿病の病勢を評価するため、SDT fatty ラットは8週齢より2週毎に尾静脈を穿刺、臨床用簡易血糖測定器(グルコカードマイダイア、アークレイ、京都)を用いて随時血糖を測定した。運動負荷の影響を考慮し、各運動群は運動終了の8時間後に測定した。C群のうち4匹は対して8週時に、また全SDT fatty ラットに対し標本採取時に心臓穿刺により採血を行い、生化学検査としてHbA1c、尿素窒素(BUN)、クレアチニン、ケトン体、中性脂肪(TG)、総コレステロール(T-CHO)値を、加えて Enzyme-linked immunosorbent assay analyses (ELISA)法を用いて血中インスリン値を測定した。

(4) C群、N群のラットは24週時に全身麻酔下に右肩棘上筋腱を採取し4%パラホルムアルデヒドで24時間固定、包埋後厚さ7 $\mu$ mの凍結切片を作成し、HE染色、マッソントリクローム(MT)染色および抗AGEs、ペントシジン及びRAGE抗体による免疫染色を行い観察した。400倍、任意の5視野でRAGE陽性細胞数をカウントし、両群間で比較した。

(5) 各群のラットは24週時に全身麻酔下に左肩棘上筋腱を採取し直ちに液体窒素を用いて凍結、標本を破碎しRNAを抽出しcDNAを作成、リアルタイムRT-PCR法でRAGEの遺伝子発現量を定量し、Ct法を用いて各群間で比較した。

(6) 統計学的処理にはt検定および分散分析を用い、有意水準は5%未満とした。

#### 4. 研究成果

(1) 実験群ラットの脱落 自然発症糖尿病ラットは健常ラットと比較し易感染性であり、C群で8匹中1匹が呼吸器感染で脱落した。運動負荷に対する忍容性も低く、W群で8匹中1匹(12.5%)、R群では8匹中3匹(37.5%)が脱落した。

(2) 採血結果 SDT fatty ラット各群の血糖値は8週齢で300mg/dl以上の高値を示し、以後18週齢まで増加したがその後は横ばいあるいはやや低下した。統計学的には各群間で有意な差を認めなかったが、R群では他の群と比較し低い傾向にあった(図2)。

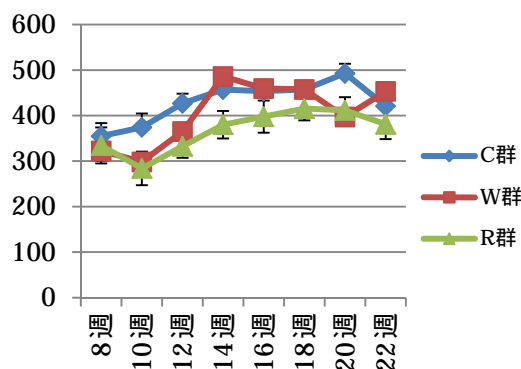


図2 SDT fatty ラット各群の血糖値(mg/dl)

HbA1c 値は図3に示す通り、各群間に有意差を認めなかったがC群が両運動群より高く、最も運動負荷が大きいR群が低い傾向にあった。

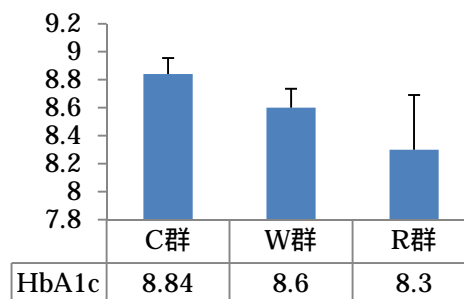


図3 SDT fatty ラット各群の血中 HbA1c 値 (%)

血中インスリン値は図4に示す通り、各群間

に有意差を認めなかったがC群が両運動群より低く、最も運動負荷が大きいR群が高い傾向にあった。

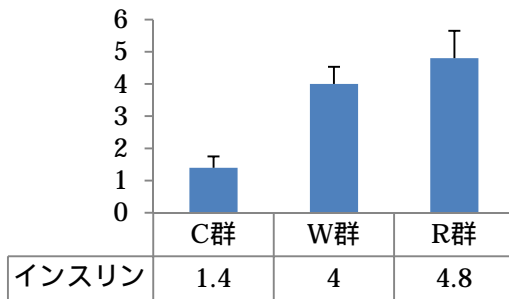


図4 SDT fatty ラット各群の血中インスリン値(ng/ml)

一方、血中TG値は図5に示す通り、運動群の血中TG値はC群と比較し、有意に低値を示した( $p=0.012, 0.016$ )。

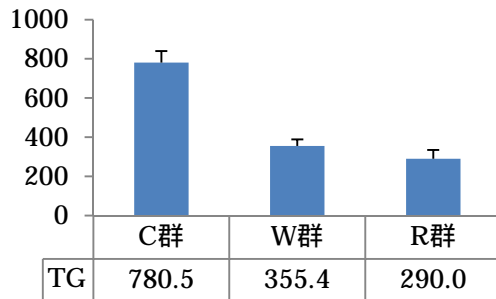


図5 SDT fatty ラット各群の血中TG値(mg/dl)

同様に血中ケトン体も図6に示す通り、運動群の血中TG値はC群と比較し、有意に低値を示した( $p=0.008, 0.032$ )。

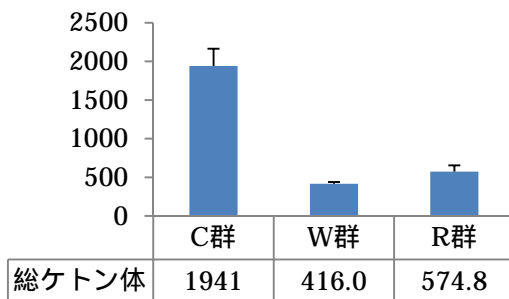


図6 SDT fatty ラット各群の血中総ケトン体値( $\mu\text{mol/l}$ )

なお、BUN、クレアチニン、T-CHO値はSDT

fatty ラット各群間に有意な差を認めなかった。

(3) 組織学的検討 HE染色、MT染色では細胞数や膠原線維の染色は両群同様の所見であった。AGEs、ペントシジン、RAGEの発現はN群、C群共に認められ、AGEとペントシジンは腱組織全体に、RAGEは腱細胞と思われる紡錘型の細胞と滑膜細胞に発現を認めた。AGEsの発現はC群はN群より若干上昇しており、ペントシジンの発現はC群において明らかに上昇していた(図7)。

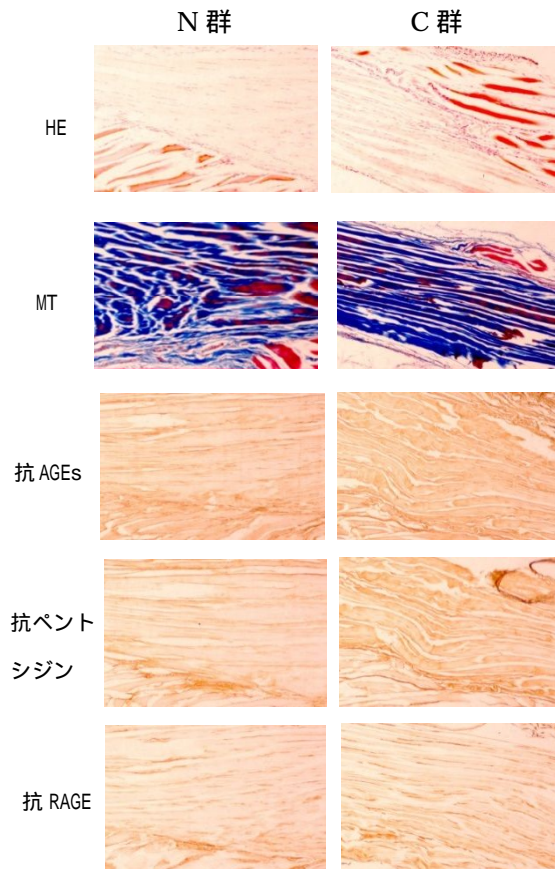


図7 N群、C群棘上筋腱の染色所見( $\times 10$ )

また、RAGE陽性細胞数はC群において有意に増加していた(図8,  $p=0.007$ )。

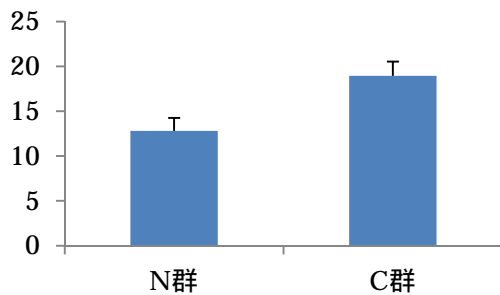


図 8 N 群、C 群の RAGE 陽性細胞数

(4) RAGE 遺伝子発現 N 群ラット棘上筋組織における RAGE 遺伝子発現量を 100% とすると、SDT fatty ラット各群の発現量は図 9 の通りであり、W, R 群における RAGE 発現量は C 群のそれぞれ 48%、50% に低下していた。

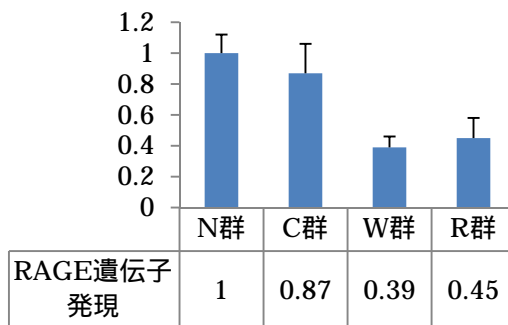


図 9 各群の RAGE 遺伝子発現比較 (N 群の発現量を 1 とした場合)

(5) 結論 自然発症 型糖尿病ラットを用いた本研究の結果、腱組織においても、ペントシジンの蓄積と RAGE の発現増加が認められ、他の臓器における組織障害のメカニズムと同様、AGEs の沈着による直接的な組織障害と AGEs-RAGE 系が 型糖尿病に合併する腱障害の病態のひとつであることが示唆された。また、採血結果より本研究における運動負荷は、ラットの好気性代謝を促進させ脂質代謝異常を改善させていたが、この運動条件下において腱における RAGE 遺伝子の発現がケージ飼育を行ったラットの 50% 程度に低下していたことから、糖尿病に対する運動はインスリン抵抗性の改善等に加え、腱組織の RAGE 発現を抑制することで AGEs-RAGE 系による腱障害の進行を予防しうることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 横田淳司、加藤洋、山本直宗 糖尿病に合併する腱障害の病態 - 自然発症 型糖尿病ラットによる検討 - 第 88 回日本整形外科学会学術総会 平成 27 年 5 月 24 日、神戸市
- (2) Yokota A, Katoh H, Yamamoto N. Accumulation of pentosidine and receptors for advanced glycation end products (RAGE) in the native tendon of type 2 diabetes rat. 61<sup>st</sup> Annual meeting of Orthopaedic Research Society, March 28-31<sup>th</sup>, 2015, Las Vegas, NV, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 淳司 (YOKOTA ATSUSHI)

研究者番号: 10449564

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

