

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10859

研究課題名(和文)糖化および酸化ストレス抑制による肩腱板変性断裂の予防

研究課題名(英文)Prevention of rotator cuff tear via suppression of glycation and oxidantative stress

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：AGE/ROS発現増強ラットモデルとして糖尿病マウスを作成し、肩腱板におけるAGEsとROSの発現増強を確認した。また、正常SDラットからアキレス腱を採取し、腱細胞を分離し、高濃度グルコース条件下に培養を行い、アポシニンを投与したところ、NOX-1、NOX-4、IL-6の発現の抑制が確認され、ROS陽性細胞数とアポトーシス発現についても有意に減少した。in vivo実験では、糖尿病ラットのアキレス腱にコラゲナーゼを注射して急性腱炎モデルとし、アポシニンを隔日で腹腔内投与したところ、NOX、TNF- α 、IL-6の遺伝子発現量はいずれもアポシニン投与群で有意に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、肩腱板断裂における研究はバイオメカニカルな研究が主眼であることが多く、修復に難渋するような広範囲な断裂に対しては、人工材料の研究や幹細胞を用いた腱板再生医療など、バイオロジカルなアプローチが検討されている。しかし、これらは全て断裂した腱板をどのように修復するかという観点でしか検討されていない。今回の我々の研究は、肩腱板の断裂をいかにして予防するか、という予防医学的な観点での発想であり、これまでの研究とは全く異っており、今回の研究結果も踏まえて、将来的にAGEs/ROS阻害薬により加齢による肩腱板組織の変性断裂を予防できる新しい治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We successfully developed a mouse model with enhanced expression of AGEs/ROS. Then, in the in vitro study, it was confirmed that apocynin could decrease the expressions of NOX-1, NOX-4 and IL-6 in a high glucose condition, and we also proved that apocynin could inhibit an enhancement of ROS accumulation and apoptosis induced by high glucose. In the in vivo study, we injected collagenase in the Achilles tendon of DM rats to make an acute inflammation tendinitis model. Then, apocynin was injected to the rats in the treated group, resulting that the expressions of NOX, TNF- α , IL-6 were significantly decreased in the treated group when compared with the control group.

研究分野：整形外科

キーワード：糖化最終生成物 活性酸素 肩腱板断裂

1. 研究開始当初の背景

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。

本研究に着手するまでは、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)の低下を認めることも多く、臨床応用までにクリアするべき課題も多い。

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に 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)。AGEs は細胞表面受容体である AGE 受容体 (Receptor for AGEs; RAGE) によって認識され、ROS による酸化ストレスや炎症反応を惹起させ組織傷害を促進すると考えられている。これより本研究では、この AGEs および ROS の発現と腱板脆弱性との関係性を明らかにすることを目的とし、AGEs および ROS の発現を抑制することで腱板の脆弱化を予防・修復することができるかを検証する。

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。免疫組織染色により腱板組織における AGEs 沈着および RAGE 発現は確認された。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、報告した(10)。

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(10)。

<参考文献>

<1>Yamamoto A, et al. J Shoulder Elbow Surg. Oct;20(7):1133-7. 2011. <2>Ozaki J, et al. 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. Scand J Work Environ Health. Jun 24. 2011. <5>Kang JH, et al. Ultrasound in Med & Biol. 36(11):1792-6. 2010. <6>Abboud JA, et al. The Effect of Clin Orthop Relat Res. Dec. 2010. <7>Inui A, et al. The 56th the orthopaedic research society. <8>Nagura I, et al. The 57th the orthopaedic research society. <9>Ichihashi M, et al. Anti-Aging Medicine 8 (3): 23-29, 2011. <10>Mifune Y, et al. International society of shoulder and elbow surgery 2015

2. 研究の目的

これらの結果を踏まえて、今回は臨床応用、創薬研究につながる実験として、AGEs や ROS を抑制することで腱板の脆弱化を予防または修復できるかについて検討する。

そこで、NADPH オキシダーゼ (NOX) 阻害薬である「アポシニン」に注目し、これは ROS 産生を低下させることが知られており、今回、ROS 低下させることで腱板脆弱化を抑制できるかを検討する。

まず、AGEs 発現増強/抑制試験のために高/低 AGEs ラットモデルを作成し、腱板組織における AGEs および ROS 発現量と腱板強度を、同年齢の通常ラット腱板組織と比較検討を行う。次に、AGEs/ROS 抑制物質を高 AGEs ラットに投与することで、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。この裏付け実験として、in vitro 実験において、ラット腱板細胞の培養液に高血糖負荷を加えて、炎症マーカーや細胞活性、ROS 発現やアポトーシス発現の変化について確認する。そこに AGEs/ROS 抑制物質を投与することで得られる変化を検討する。

3. 研究の方法

1. AGEs/ROS 発現増強/抑制モデルの作成

AGEs/ROS 発現と腱板脆弱化の関係性を明らかにするために、AGEs/ROS 発現を増強もしくは抑制することで腱板の脆弱化促進もしくは防止につながるか否かを実験する。糖尿病ラットにおいて AGEs 沈着および ROS 発現が増加することは既に報告されているので、SD ラットにストレプトゾトシン 30mg/kg を単回投与して糖尿病ラットモデルを作成し、1 か月後において肩腱板組織への AGEs 沈着増加を確認する。AGEs/ROS 発現抑制モデルとしては、12 か月齢もしくは 24 か月齢の SD ラットにインスリンを 3 日おきに 5 週間投与し、反復性低血糖ラットモデルを作成し、まずこのモデルにおいて腱板組織の AGEs 沈着量、ROS 発現量が減少していることを確認する (n=10 肩)。

2. AGEs/ROS 発現増強/抑制試験

AGEs/ROS 発現増強/抑制モデルが確立されれば、肩腱板組織を採取し、AGEs 沈着量、RAGE 発現量、ROS 発現量、細胞老化マーカーである老化関連 β ガラクトシダーゼ (senescence associated beta-galactosidase; SABG) の発現を免疫染色および PCR 法にて確認する。また炎症反応のマーカーとして、トランスフォーミング増殖因子 β 1 (TGF- β 1) と単球走化性蛋白質-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) の発現量も免疫染色および PCR 法にて検討する。オイルレッド O 染色および PPAR γ の遺伝子発現量を PCR 法にて測定し、脂肪変性度合についても検討する。さらに AGEs/ROS 発現増強/抑制モデルから腱板組織を上腕骨への付着部を含めて採取して引っ張り試験を行い、同年齢の通常ラット腱板組織との腱板強度を比較する。

3. AGEs/ROS 発現増強モデルに対する AGEs/ROS 分解剤の投与

より臨床に則した治療法の開発を目指して、一度沈着した AGEs を分解することで、腱板組織の変性の改善や、腱板脆弱性の改善が得られるか否かを検討する。実験モデルとしては、糖尿病ラットに AGEs 分解剤を投与することで、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。AGEs 分解剤は、現在、臨床で使用可能な薬品は存在しなかったため、ROS 産生を抑制する物質としてその効果が注目されており、かつヒトにも使用可能である「アポシニン」を使用した。まず、*in vitro* 環境下でのアポシニンの効果を確認するために、ラット腱板細胞を高グルコース下で培養し、糖負荷を与え、そこにアポシニンを投与することで細胞の変化を評価する。次に、*in vivo* において AGEs/ROS 発現増強モデルに対して腹腔内に投与することで、腱板組織の AGEs 沈着が減少することを免疫染色および PCR 法で確認し、先の実験と同様に ROS、SABG、TGF- β 1、MCP-1 の発現量免疫染色および PCR 法にて検討する。同時に脂肪変性に関しても Oil red O 染色で確認する。また引っ張り試験による腱板強度も各群間で比較検討する。

4. 研究成果

1. AGEs/ROS 発現増強/抑制モデルの作成

AGEs/ROS 発現増強/抑制モデルとして、糖尿病ラットにおいて AGEs 沈着および ROS 発現が増加することは既に報告されているので、SD ラットにストレプトゾトシン 30mg/kg を単回投与して糖尿病ラットモデルを作成し、1 か月後において肩腱板組織への AGEs 沈着増加を確認された。AGEs/ROS 発現抑制モデルとしては、12 か月齢もしくは 24 か月齢の SD ラットにインスリンを 3 日おきに 5 週間投与し、反復性低血糖ラットモデルを作成したが、同年齢の通常ラットと比べて、AGEs 沈着量、ROS 発現量ともに有意な発現低下は認められなかった。

2. AGEs/ROS 発現増強/抑制試験

AGEs/ROS 発現抑制モデルは作成できなかったので、AGEs/ROS 発現増強モデルのみで研究を進めた。肩腱板組織を採取し、AGEs 沈着量、RAGE 発現量、ROS 発現量の発現を免疫染色にて確認したところ、同年齢の通常ラットの肩腱板組織に比べて、有意に高い AGEs 沈着、RAGE 発現、ROS 発現を認めた。

3. AGEs/ROS 発現増強モデルに対する AGEs/ROS 分解剤の投与

8 週齢の正常 SD ラットからアキレス腱を採取し、腱細胞を分離・培養した。培養液の糖濃度が 12mM を regular glucose 群 (RG 群)、33mM を high glucose 群 (HG 群) として培養を行い、アポシニンを投与した。アポシニン投与後 48 時間で real-time PCR で NOX-1、NOX-4、IL-6 の発現を検証し、投与後の酸化ストレス応答を評価した。また細胞蛍光染色で ROS とアポトーシスの発現に及ぼす影響を評価した。HG 群では RG 群と比較して、有意に NOX-1、NOX-4、IL-6 の発現上昇を認めたが、アポシニン投与により、両群とも NOX-1、NOX-4、IL-6 の発現は抑制され、いずれも両群間での有意差を認めた。また ROS 陽性細胞数とアポトーシス発現についても real-time PCR の結果と同様に、HG 群では RG 群と比較して有意に多かったが、アポシニン

投与により両群とも減少し、有意差を認めた。

in vivo 実験では、8 週齢糖尿病ラットのアキレス腱にコラゲナーゼを腱内注射し、急性腱炎モデルとした。アポシニンを隔日で腹腔内投与し、4 週時に real-time PCR で NOX、TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量を評価したところ、NOX、TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量はいずれもアポシニン投与群で有意に低下した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

・Orthopaedic research Society annual meeting 2018. New Orleans. USA. Kurosawa T, Mifune Y, et al. In vitro evaluation of antioxidative effect of apocynin on rotator cuff derived cells with glycation stress induced by advanced glycation end-products.

・第 61 回日本手外科学会学術集会 東京 . 黒澤、美舩ら . 高血糖ストレスモデルを用いたラット腱細胞におけるアポシニンの抗酸化作用の検討 .

・第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 奈良 . 黒澤、美舩ら . アポシニンは肩腱板由来細胞において終末糖化産物による酸化ストレスに対して抑制効果を示す .

・ Orthopaedic research Society annual meeting 2019. Austin. USA. Kurosawa T, Mifune Y, Apocynin can exert inhibitory effects for AGEs-induced oxidative stress in rotator cuff derived cells

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：国分 毅

ローマ字氏名：(KOKUBU,takeshi)

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：医学研究員

研究者番号 (8 桁)：40403266

研究分担者氏名：乾 淳幸

ローマ字氏名：(INUI,atsuyuki)

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：特命助教

研究者番号 (8 桁)：70457092

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西本 華子
ローマ字氏名：(NISHIMOTO,hanako)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。