

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591759  
 研究課題名（和文） 糖尿病における AGEs 蓄積が軟骨変性に及ぼす影響に関する研究  
 研究課題名（英文） Accumulation of advanced glycation end products in diabetic joint tissues and cartilage degeneration  
 研究代表者  
 廣瀬 隼（HIROSE JUN）  
 熊本大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：40433007

## 研究成果の概要（和文）：

変形性関節症（OA）と糖尿病（DM）の関連性を両疾患の病態に關与するとされている糖化最終産物（advanced glycation end products, AGEs）に着目して解析した。DM ラットと正常ラットの比較において、膝関節内の AGEs 蓄積と軟骨変性に關連する遺伝子および蛋白発現には差がなく、軟骨細胞を高血糖状態で培養しても軟骨細胞への AGEs 蓄積は増加しなかった。膝前十字靭帯切離による OA モデルでは DM ラットの軟骨変性がわずかに高い傾向を示したが、DM では関節内に蓄積した AGEs が軟骨変性に關連するとした仮説は実証されなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

To clarify the molecular based relationship of osteoarthritis (OA) and diabetes mellitus (DM), we evaluated accumulations of advanced glycation end products (AGEs) in joint tissues. DM rats showed similar AGE accumulations and the expression of mRNA and proteins related with OA on both cartilage and synovium compared with normal rats. There was also no difference of AGE accumulations among cultured chondrocytes treated with various concentrations of glucose. Moreover, susceptibility of OA induced by knee ligament resection was similar between DM and normal rats. These results indicate indistinguishable associations with OA and DM from the point of view of AGEs.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 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：変形性関節症、糖尿病、糖化最終産物

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症（OA）は関節軟骨と関節構成体

の退行変性を基盤とする疾患で、その発症には加齢現象が特に深く關与している。近年、

加齢と OA を結びつける key factor として、糖化最終産物 (advanced glycation end products, AGEs) が注目されており、AGEs の蓄積は、細胞外マトリックスの架橋形成による組織構造の変化をもたらすのみならず、AGEs の受容体である receptor for AGEs (RAGE) を介したアポトーシス誘導、炎症性サイトカインや活性酸素種の産生増加による組織傷害を惹起する。一方、AGEs は糖尿病 (DM) 患者の循環血液中や組織に蓄積し、DM 合併症の発症要因となることが確認されている。さらに DM と OA との関連性は疫学調査や動物実験により報告されているが、両疾患の病態がどのように関連しているかは不明であり、原因分子も同定されていない。

## 2. 研究の目的

OA と DM の関係を AGEs に注目して分子レベルで評価することが当該研究の目的である。そのためにラット DM モデルと軟骨細胞培養系を用いて、高血糖状態における関節内 AGEs の蓄積と RAGE の発現、およびそれらの軟骨基質代謝に及ぼす影響を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) DM ラットにおける関節内 AGEs 蓄積と軟骨・滑膜組織の変化

5 週齢と 20 週齢雄の GK ラット (自然発症 DM ラット) と Wistar ラット (正常群) を使用し、採血後に腎臓と両膝関節を摘出して以下の検討を行った。

① 血液生化学的検討:血清を分離し、Glucose、HDL、LDL、T-CHO、TG を計測した。

② 腎臓の AGEs 蓄積評価:20 週齢ラットの腎臓のパラフィン標本作製し、代表的な AGEs である pentosidine と CML の特異抗体を用いて免疫染色を行った。

③ 関節軟骨の組織学的検討:採取した左膝関節をホルマリン固定し、脱灰後にパラフィン標本作製した。関節組織の形態を HE 染色で、軟骨変性の程度を Safranin-O 染色で評価した。また、pentosidine、CML、RAGE、軟骨基質分解酵素 (MMP-13)、軟骨変性関連遺伝子 (Asporin、CILP) の特異抗体を用いて免疫染色を行った。

④ 関節軟骨の蛋白発現解析:右膝関節の軟骨組織より蛋白を抽出し、pentosidine、CML、RAGE、Asporin、CILP の発現量を Western Blotting で評価した。また、pentosidine は HPLC でも定量した。

⑤ 滑膜組織の mRNA と蛋白発現解析:20 週齢ラットの右膝関節より採取した滑膜組織から mRNA と蛋白を抽出した。RAGE と MMP-13 の mRNA 発現量を定量 RT-PCR で、pentosidine、CML、RAGE、MMP-13 の蛋白発現量を Western Blotting で評価した。

(2) 軟骨細胞の高血糖状態に対する反応性  
5 週齢の雄 Wistar ラットから単離培養した軟骨細胞を、glucose 濃度 5mM、10mM、20mM、30mM で 1 週、2 週、または 4 週間培養した。

① 免疫染色: culture slide 上の培養細胞を抗 AGEs 抗体 (6D12) を用いて免疫染色した。

② 軟骨細胞の mRNA 発現解析:培養軟骨細胞から mRNA を抽出し、II 型コラーゲン (Co12)、アグリカン (ACAN)、RAGE、小胞体ストレスマーカー (CHOP、XBP1) の発現を RT-PCR で評価した。

③ 軟骨細胞の蛋白発現解析:軟骨細胞の cell lysate から蛋白を抽出し、pentosidine、CML、CEL、RAGE、小胞体ストレスマーカー (ユビキチン) の発現を Western Blotting で評価した。

(3) DM 軟骨細胞の反応性

5 週齢と 20 週齢の GK ラットと Wistar ラットの膝関節から軟骨を採取し、軟骨細胞を単離培養した。各群より採取した培養軟骨細胞を AGE (CML-BSA)、AGE+抗 RAGE 抗体、あるいは炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ ) を添加して 24 時間培養した。

① 軟骨細胞の mRNA 発現解析:培養軟骨細胞から mRNA を抽出し、RAGE、MMP-13、Asporin、CILP の発現を評価した。

② 軟骨細胞の蛋白発現解析:細胞培養液から蛋白を抽出し、pentosidine、CML、AGEs (6D12) RAGE、MMP-13、Asporin、CILP の発現量を Western Blotting で評価した。

(4) 膝 OA モデルにおける DM の軟骨変性に及ぼす影響の評価

20 週齢雄の GK ラットと Wistar ラットの右膝関節の前十字靭帯切離 (ACLT) による OA モデルを作成した。術後 2 週、3 週、4 週目 (各群 5 匹) にラットを屠殺し、両膝関節を採取して、パラフィン標本作製後に組織学的検討を行った。

① 軟骨変性の評価:関節軟骨を Safranin-O で染色し、Mankin スコアで評価した。

② 滑膜組織の変化:HE 染色により ACLT 後の経時的な滑膜変化を評価した。

③ 関節組織の免疫染色: pentosidine、CML、RAGE、MMP-13 の特異抗体を用いて免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

(1) ラット DM モデルにおける関節内 AGEs 蓄積と軟骨・滑膜組織の変化

① 血液生化学的検討:GK ラットの血糖値は 5 週齢で 302mg/dl と中程度の DM を呈し、20 週齢で 321mg/dl と高血糖状態が持続した。20 週齢の GK ラットは Wistar ラットと比較して脂質代謝マーカーに有意差を認めしたが、肥満と脂質代謝異常はなかった (表 1)。

表 1. 体重と血液生化学的評価

	5W		P値	20W		P値
	Wistar n=8	GK n=8		Wistar n=13	GK n=13	
体重	100.0	79.7	<0.05	360.5	384.1	0.2
Glucose	174.6	302.5	0.001	148.8	321.2	<0.001
HDL	24.9	26.9	<0.05	26.2	31.5	<0.001
LDL	13.6	11.6	ns	7.9	9.9	<0.001
T-CHO	78.5	81.5	ns	69.6	95.5	<0.001
TG	35.9	39.3	ns	220.1	86.5	<0.001

② 腎臓の AGEs 蓄積評価： GK ラットの腎臓は Wistar ラットに比べて pentosidine、CML とともに強い染色性を示し、AGEs 蓄積の増加が確認された (図 1)。

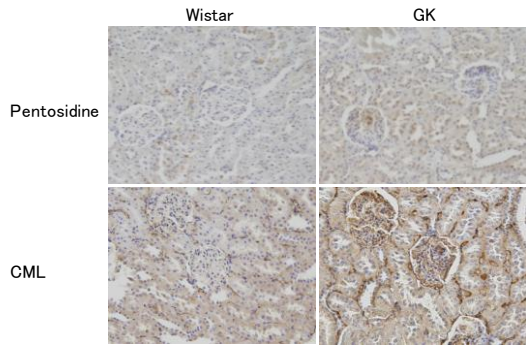


図 1. 20 週齢ラット腎臓の免疫染色 (×40)

③ 関節軟骨の組織学的検討： GK 関節軟骨に異常所見はなく、pentosidine、CML、RAGE、MMP-13、Asporin、CILP の免疫染色において、GK ラットと Wistar ラットで明らかな差はなかった (図 2)。

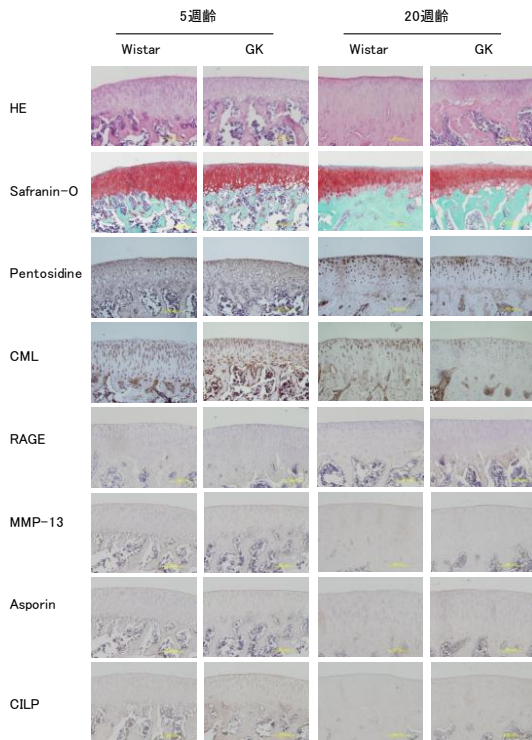


図 2. 関節軟骨の組織学的検討 (×40)

④ 関節組織の蛋白発現解析： Western Blotting では pentosidine の発現がわずかに確認されたが、CML、RAGE、Asporin、CILP の蛋白発現はみられなかった (図 3)。HPLC では GK ラットの pentosidine が 5 週齢で 48ng、20 週齢で 184ng 検出され、Wistar ラットの 5 週齢 52ng、20 週齢 191ng と差がなかった。

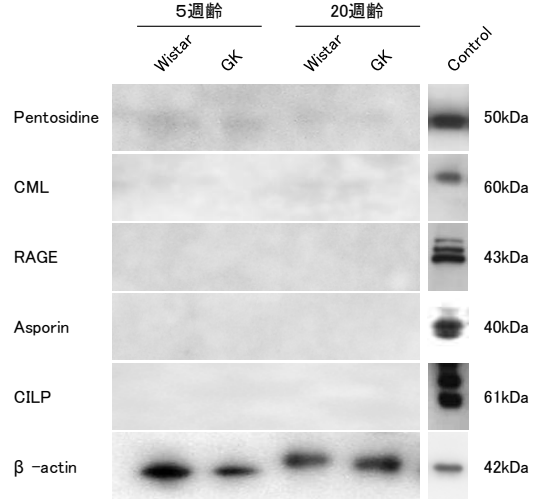


図 3. 軟骨組織の蛋白発現

⑤ 滑膜組織の mRNA と蛋白発現解析： RAGE と MMP-13 の mRNA 発現は GK ラットと Wistar ラットで差がなかった (表 2)。Pentosidine、CML、RAGE および MMP-13 の蛋白発現も両群ラット間で明らかな差はなかった (図 4)。

表 2. 20 週齢ラット滑膜の mRNA 発現

	Wistar n=6	GK n=6	P値
RAGE(%GAPDH)	23.1	21.8	ns
MMP-13(%GAPDH)	0.052	0.070	ns

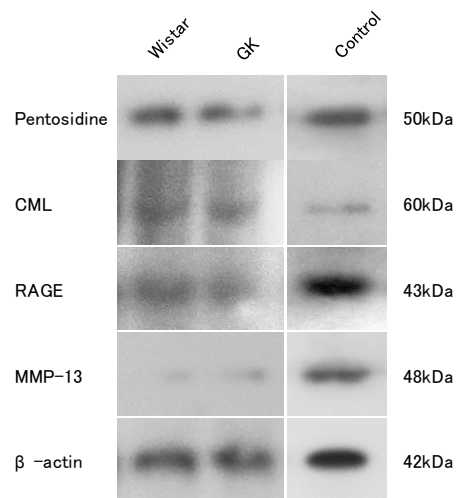


図 4. 20 週齢ラット滑膜の蛋白発現

以上の結果より、GK ラットはすでに 5 週齢で高血糖を呈し、20 週齢では腎臓に AGEs 蓄積増加を認めた。一方、関節内組織の軟骨と滑膜では Wistar ラットと比較して AGEs の蓄積増加はなかった。また、軟骨変性の関連遺伝子や蛋白の発現にも明らかな差はみられなかった。

(2) 軟骨細胞の高血糖状態に対する反応性

① 免疫染色：すべての群で軟骨細胞に AGEs 蓄積は確認されなかった (図 5)。

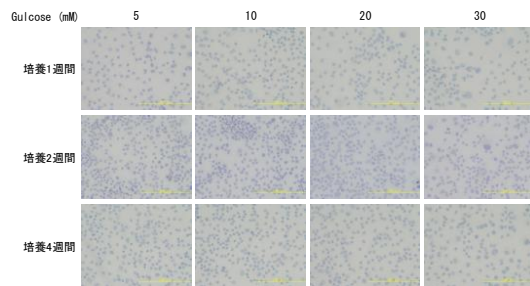


図 5. Glucose 濃度の違いによる軟骨細胞の AGEs に対する免疫染色

② 軟骨細胞の mRNA 発現解析：4 週培養された軟骨細胞では 2 週培養に比べて各 mRNA の発現は強く、特に RAGE と CHOP の発現は著明に増強した。しかし、glucose 濃度の違いによる各 mRNA の発現量に差はなかった (図 6)。

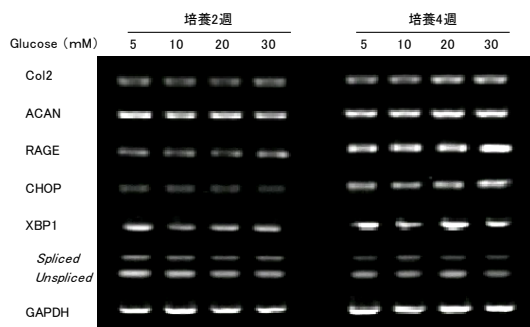


図 6. Glucose 濃度の違いによる mRNA 発現の変化

③ 軟骨細胞の蛋白発現解析：軟骨細胞の cell lysate を用いた Western blotting で、4 週間培養した細胞では 2 週培養に比べて pentosidine と CML の蓄積が増加し、RAGE とユビキチンの発現が増強した。しかし、glucose 濃度による蛋白発現に差はなかった (図 7)。

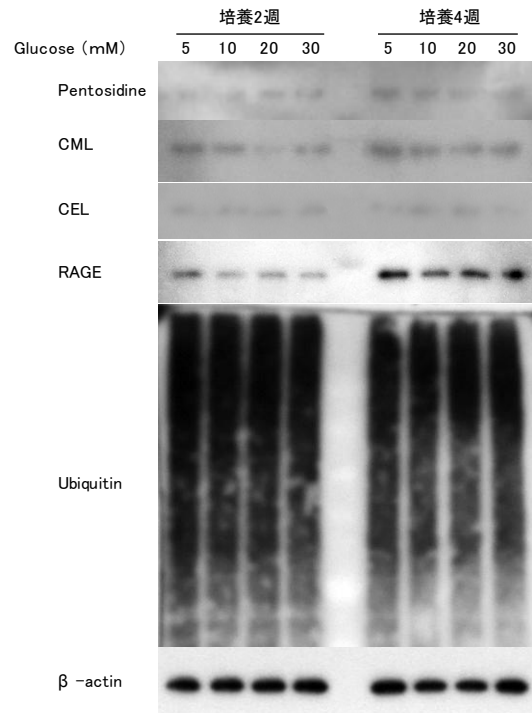


図 7. Glucose 濃度の違いによる蛋白発現の変化

正常軟骨細胞は培養期間が長期化すれば、AGEs 蓄積や小胞体ストレス応答および軟骨基質産生に関連する mRNA と蛋白の発現は増加したが、これらの変化は glucose 濃度の影響はなかった。つまり軟骨細胞培養系においても、500mg/dl 程の高血糖状態では軟骨細胞に AGEs の蓄積増加は確認されなかった。

(3) DM 軟骨細胞の反応性

① 軟骨細胞の mRNA 発現解析：GK ラットと Wistar ラットから抽出した培養軟骨細胞の RAGE と MMP-13 の発現は、GK ラットが Wistar ラットより亢進してしており、20 週齢でその差が大きかった (図 8)。Asporin と CILP の発現は両群で差がなかった。各種刺激に対する軟骨細胞の反応性は、AGE や抗 RAGE 抗体により GK ラットでは CILP の mRNA 発現が亢進した。IL-1 $\beta$  の刺激では、GK ラットと Wistar ラットともに RAGE と MMP-13 は発現が亢進したが、Asporin と CILP は抑制された。これらの発現変化は両群ラットで差はなかった (図 9)。



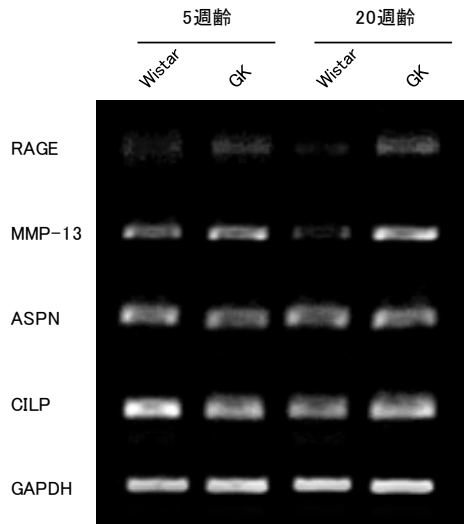


図 8. 軟骨細胞の mRNA 発現

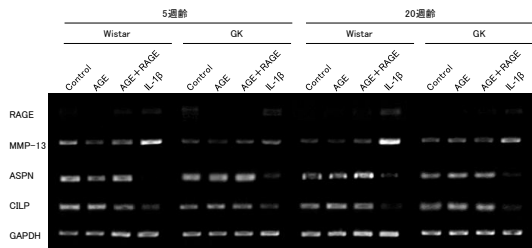


図 9. 軟骨細胞刺激による mRNA 発現の変化

② 軟骨細胞の蛋白発現解析:細胞培養液の蛋白は AGE と抗 RAGE 抗体の刺激により、両群ラットで pentosidine、CML、RAGE、MMP-13、Asporin、CILP の発現量が増加した。刺激に対する反応性は 5 週齢では両群ラットで差がなかったのに対して、20 週齢では GK ラット軟骨細胞の pentosidine、RAGE、MMP-13、Asporin、CILP の発現が Wistar ラットに比べて低かった (図 10)。

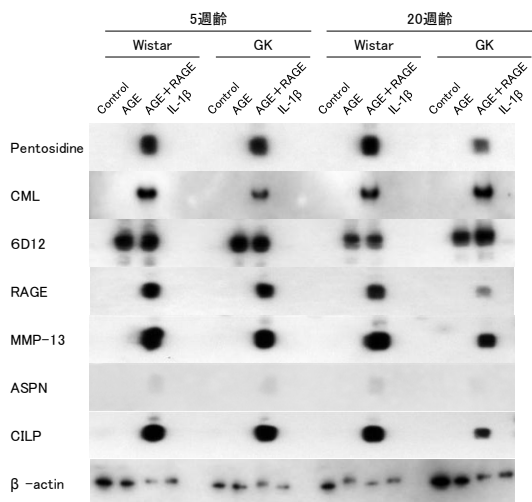


図 10. 軟骨細胞刺激による蛋白発現 (培養液)

GK ラットと Wistar ラットから抽出した軟骨細胞の培養実験で、GK ラット由来の軟骨細胞の方が RAGE と MMP-13 の mRNA 発現が強かった。さらに抗 RAGE 抗体で AGEs と RAGE との反応を抑制して AGE を投与すると、調査した全ての蛋白発現が亢進した。これらの変化は 5 週齢のラットから採取した軟骨細胞間では差がなかったが、20 週齢ラットからの軟骨細胞では GK ラット由来と Wistar ラット由来で反応性が異なった。

#### (4) ラット OA モデルの評価

① 軟骨変性の評価: ACLT 3 週後の大腿骨軟骨が GK ラットでより強い変性を呈したが、その他の週数または脛骨においては、GK ラットと Wistar ラット間で軟骨変性の程度に差がなかった (図 11, 12)。

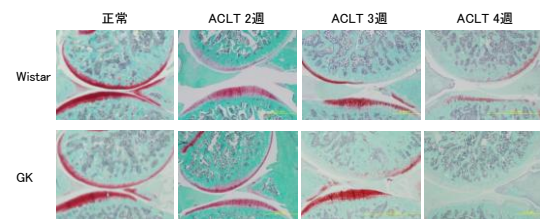


図 11. ACLT 後の膝関節軟骨の経時的変化 (Safranin-O 染色×40)

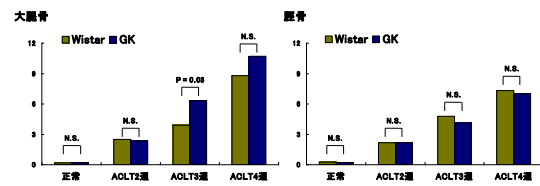


図 12. ACLT 後軟骨変性の経時的変化 (Mankin スコア)

② 滑膜組織の変化: ACLT 2 週後から滑膜の肥厚、血管増生、細胞浸潤、肉芽形成を認め、術後 3 週、4 週時にも同等の所見がみられた。これらの変化は GK ラットと Wistar ラットの両群で差がなかった (図 13)。

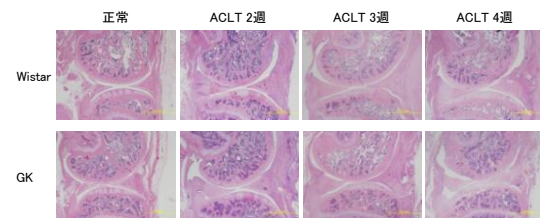


図 13. ACLT 後の膝関節の経時的変化 (HE 染色×12.5)

関節組織の免疫染色: pentosidine、CML および MMP-13 は強く染色されたが、RAGE の染色性はわずかだった (図 14)。それぞれの染色性は ACLT 後の経過による増強はなく、GK ラットと Wistar ラット間でも差がなかった。

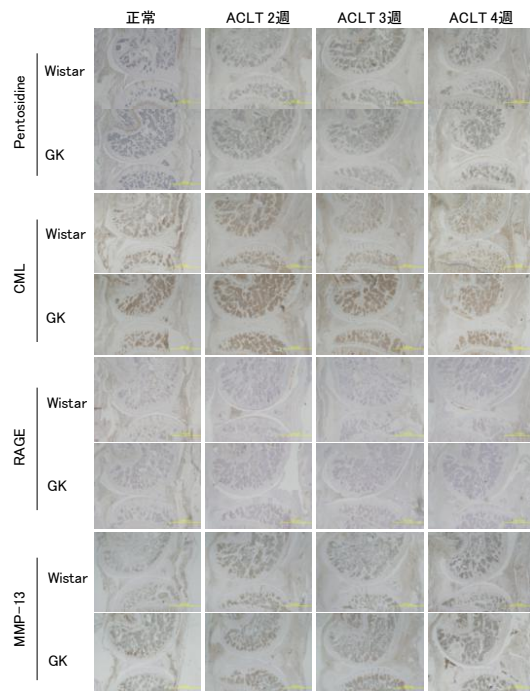


図 14. ACLT 後の膝関節の経時的変化 (免疫染色×12.5)

以上の結果より、軟骨組織の susceptibility は GK ラットがわずかに高い傾向にあったが、その要因として検討した AGEs 蓄積や RAGE および MMP-13 の発現は Wistar ラットと比べて違いはなかった。

#### (5) まとめ

DM では関節内組織に AGEs が蓄積して軟骨変性が誘導される仮説をたて、DM ラットと培養軟骨細胞を用いて当該研究を実施したが、高血糖状態における軟骨あるいは滑膜組織の AGEs 蓄積増加は確認できなかった。しかし、DM ラット由来の軟骨細胞に AGE を過剰負荷すると、正常軟骨細胞とは異なった反応性を示し、DM ラットに OA を誘発すると、軟骨変性の程度は正常ラットに比べて高い傾向を示したことから、DM 軟骨細胞は何らかの変化をきたしている可能性が示唆された。今後は OA と DM に共通する病態として、AGEs だけでなく酸化ストレスや小胞体ストレスなど他の要因を含めた総合的な検討が必要と考える。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 廣瀬隼、山部聡一郎、高田興志、水田博志、永井竜児: 糖尿病では軟骨変性が亢進する (糖化最終産物の軟骨内蓄積との関連)、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 6 日、横浜、パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

[http://kumadai-seikei.com/kennkyu/knkyu\\_gaiyou/](http://kumadai-seikei.com/kennkyu/knkyu_gaiyou/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣瀬 隼 (HIROSE JUN)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40433007

##### (2) 研究分担者

水田 博志 (MIZUTA HIROSI)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：60174025

鬼木 泰成 (ONIKI YASUNARI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20423684