

<研究課題>

糖化ストレス抑制による高齢者における変性肩腱板断裂予防の可能性

研究代表者 神戸大学医学部附属病院 特定助教 美船 泰
共同研究者 神戸大学医学部附属病院 講師 国分 毅
神戸大学医学部附属病院 リハビリ部 医員 乾 淳幸
神戸大学大学院 大学院生 原田 義文

<まとめ>

今回我々は、肩腱板組織の変性により起こる高齢者の肩腱板断裂と糖化最終生成物(AGEs)の関係性を究明し、AGEs抑制により、変性肩腱板断裂が予防できる可能性を探った。AGEsにより腱板由来細胞はHIF-1およびROSの発現の増強を介して、cell apoptosis率が増加することがわかった。今後はAGEsの沈着抑制や、沈着後の分解促進の可能性を研究し、新しい治療法の開発に繋がることを考えている。

1. 研究の目的

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。

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。

(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ている。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する検討も行う。

<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* 8 (3) : 23-29, 2011.
- (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. 研究の方法と経過

(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。

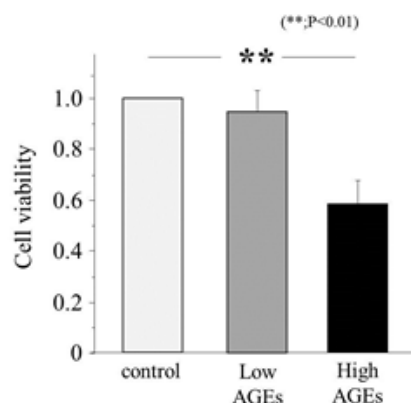
(3) ラット肩腱板組織（非断裂腱板）を用いた AGEs と年齢・脂肪変性・機能的強度の検討

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。

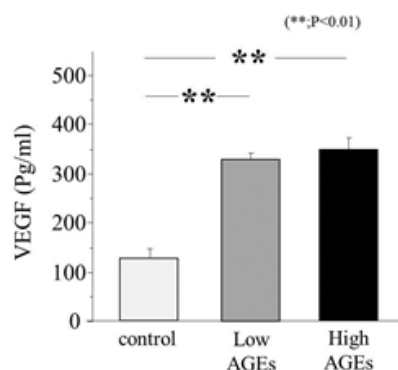
各年齢群（3M、6M、12M、24M）の SD ラットを各群 15 匹（15 匹 30 肩 x 4 群=60 匹 120 肩）用意し、肩腱板組織として棘上筋・棘下筋・肩甲下筋の 3 つの筋を採取し、組織学的免疫染色により腱板組織への AGEs 沈着量・RAGE 発現量を計測すると同時に Oil red O 染色により脂肪変性に関しても調査する（n=10 肩）。また、組織免疫染色でも AGEs/RAGE 発現を定量評価し、各年齢群・腱板の脂肪変性と AGEs 沈着量、RAGE 発現量との相関を調べる（n=10 肩）。そして、ラットでは腱板付着部である上腕骨も含めて採取可能であることから、引っ張り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

3. 研究の成果

(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。

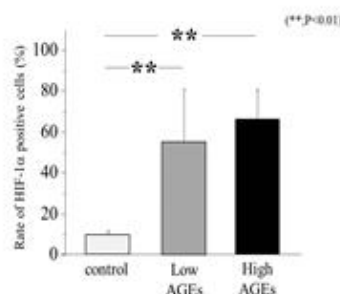
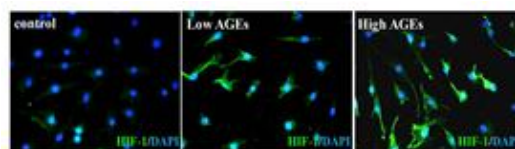


ELISA による培養液中の VEGF 量は High および Low AGEs 群では Control 群に比して有意に高い値を示した。

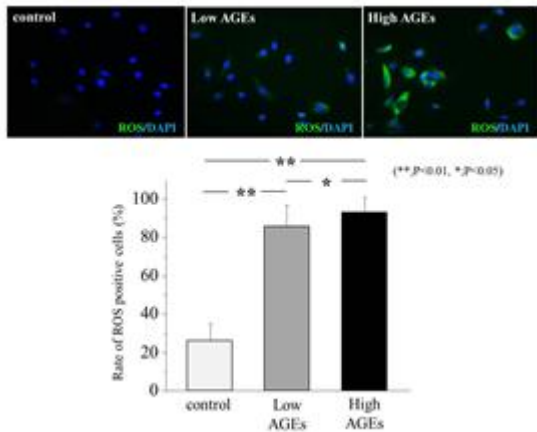


HIF-1a および ROS の発現と cell apoptosis 率に関しては、High AGEs 群では他の 2 群に比して有意に高い値を示し、また Low AGEs 群は Control 群に比して有意に高い値を示した。

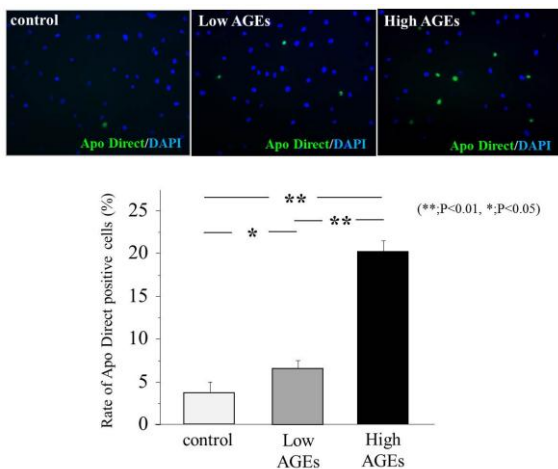
<HIF-1a>



<ROS>

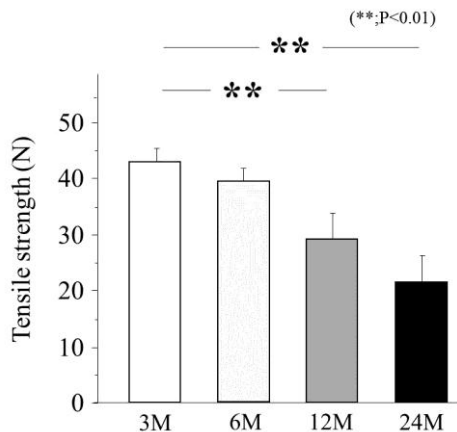


<Apoptosis>



(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。

4. 今後の課題

現在はヒト腱板組織での AGEs 沈着や RAGE 発現の量に関して検討しており、また今後は AGEs の沈着抑制や、沈着後の分解促進の可能性を研究し、新しい治療法の開発に繋がることを考えている。

5. 研究成果の公表方法

我々は既に下記に示す通り国内外において2件の学会発表を行い、現在作成中の論文は Journal of Shoulder and Elbow Surgery に投稿予定である。

- ①第41回日本肩関節学会 2014.10.24-25
糖化最終生成物が腱板由来細胞に与える影響
美船泰、乾淳幸、無藤智之、原田義文、高瀬史明、植田安洋、黒坂昌弘、国分毅
- ②8th the Academic Congress of the Asian Shoulder Association 2014.11.25-26
Influence of Advanced Glycation End Products on Rotator Cuff Derived Cells
Yutaka Mifune, Atsuyuki Inui, Tomoyuki Muto, Yoshifumi Harada, Fumiaki Takase, Masahiro Kurosaka, Takeshi Kokubu