

「糖化ストレス抑制による高齢者における肩腱板変性断裂予防の可能性」

神戸大学医学部附属病院 整形外科 美船 泰

1 研究の背景と目的

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。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。

我々はこれまでに、腱板修復手術時に腱板の断端組織を採取し、免疫組織染色により腱板組織へのAGEs 沈着およびRAGE 発現は確認している。また *in vitro* 実験においてAGEs が腱板細胞の活性を低下させ、apoptosis を誘導することを既に確認している。

またラット健常肩腱板組織においても、各年齢において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 沈着量との相関に関する検討し、高い相関があることも確認している。

本研究では変性腱板断裂とAGEs の関係性を明らかにするために、高AGEs ラットモデルを作成し、腱板組織におけるAGEs 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。また、AGE 抑制実験として、AGE により増加する活性酸素の阻害剤であるアポシニンを投与することで、AGE による細胞傷害性が抑制されるかを確認する。

2 研究方法・研究内容

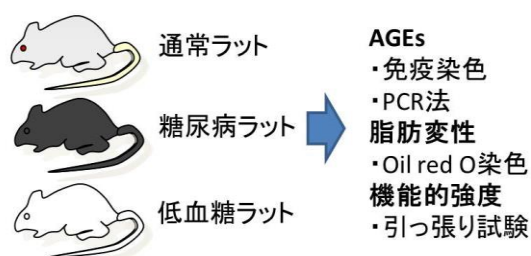
①高/低AGEs ラットモデルの作成

AGEs と腱板脆弱性の関係性をより明らかにするために、AGEs を増強することで腱板の脆弱化促進につながるか否かを実験する。AGEs 沈着増強には高血糖状態であればよいので、糖尿病ラットモデルを作製する。AGEs 沈着を抑制する薬剤としては、アミノグアニジン投与を行ったが、安定したモデル作成が困難であったので、今回は糖尿病モデルの相反モデルとして反復性低血糖ラットモデルを用いる。SD ラットに対してインスリンを3日おきに5週間投与する。インスリン投与前、インスリン投与後30分、1時間、2時間と血糖を測定し、低血糖が起きていることを確認する。5週間投与後に腱板組織を採取し、免疫組織学的にAGEs 沈着量およびAGEs 受容体 (RAGE) 発現量を定量し、同月齢のSD ラットの腱板組織の結果と比較し、低AGEs ラットモデルの完成を確認する。

②高/低AGEs ラットモデルによる腱板脆弱性に関する実験

まずそれぞれのモデルにおいて腱板組織のAGEs 沈着量およびRAGEが無投薬のコントロール群と比べて増強/減少していることを免疫染色またはPCR法に

高/低AGEsラットモデルにおける腱板組織の評価



より確認する。また、腱板の脂肪変性も脆弱性に関与するので、それぞれのグループにおいて Oil red O 染色により脂肪変性の程度についても確認し、AGEs 沈着量との関連についても検討する。最後に、腱板組織を上腕骨への付着部を含めて切除し、毛腱板—上腕骨複合体として採取し、腱板付着部の力学的強度の検討として引っ張り試験を行い、同年齢の通常ラット腱板組織（コントロール群）を含めた3群間での腱板脆弱性（最大破断強度）を比較検討する。

③腱板細胞に対する AGEs 負荷と酸化阻害薬の効果

次に、より臨床に則した治療法の開発を目指して、AGE 抑制実験を行った。AGE により増加する活性酸素の阻害剤であるアポシニンを投与することで、AGE による細胞傷害性が抑制されるかを確認する。

まずヒト腱板組織より、腱板由来細胞を分離・培養し、そこに AGEs 投与群と非投与群の2群に分ける。さらにアポシニン投与群と非投与群の2群に分けて、①AGEs+アポシニン、②AGEsのみ、③アポシニンのみ、④コントロールの4群に分けて3日間培養し、その後、ROSの発現と apoptosis の発現を半定量して、比較・検討する。

各動物実験は学内の動物実験倫理委員会の承認を得た上で、諸規則に則り動物愛護の精神を持って行う。

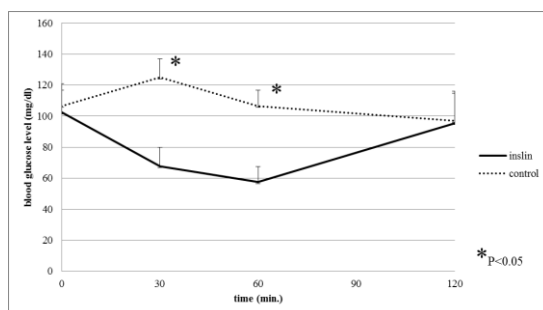
3 研究成果

①高/低 AGEs ラットモデルの作成

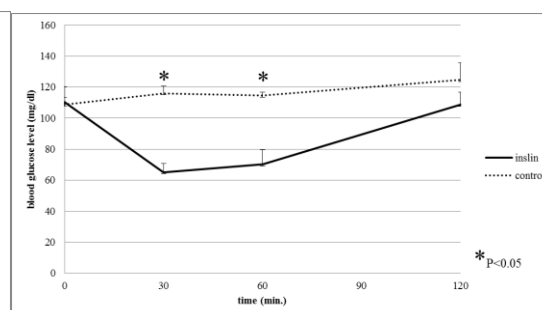
AGEs と腱板脆弱性の関係性をより明らかにするために、AGEs を増強もしくは抑制することで腱板の脆弱化促進もしくは防止につながるか否かを実験した。AGEs 沈着増強には高血糖状態であればよいので、糖尿病ラットモデルを用いることとし、まずストレプトゾシン投与による糖尿病ラットモデルを作成したが、作成できるモデルの血糖値や生命予後が不安定であったので、糖尿病ラットを購入し使用した。

AGEs 沈着を抑制する薬剤としては、アミノグアニジン投与を行ったが、安定したモデル作成が困難であったので、今回は糖尿病モデルの相反モデルとして反復性低血糖ラットモデルを用いた。SD ラットに対してインスリンを3日おきに5週間投与する。インスリン投与前、インスリン投与後30分、1時間、2時間と血糖を測定し、低血糖が起きていることを確認した（下グラフ）。

(投与2週目)



(投与5週目)

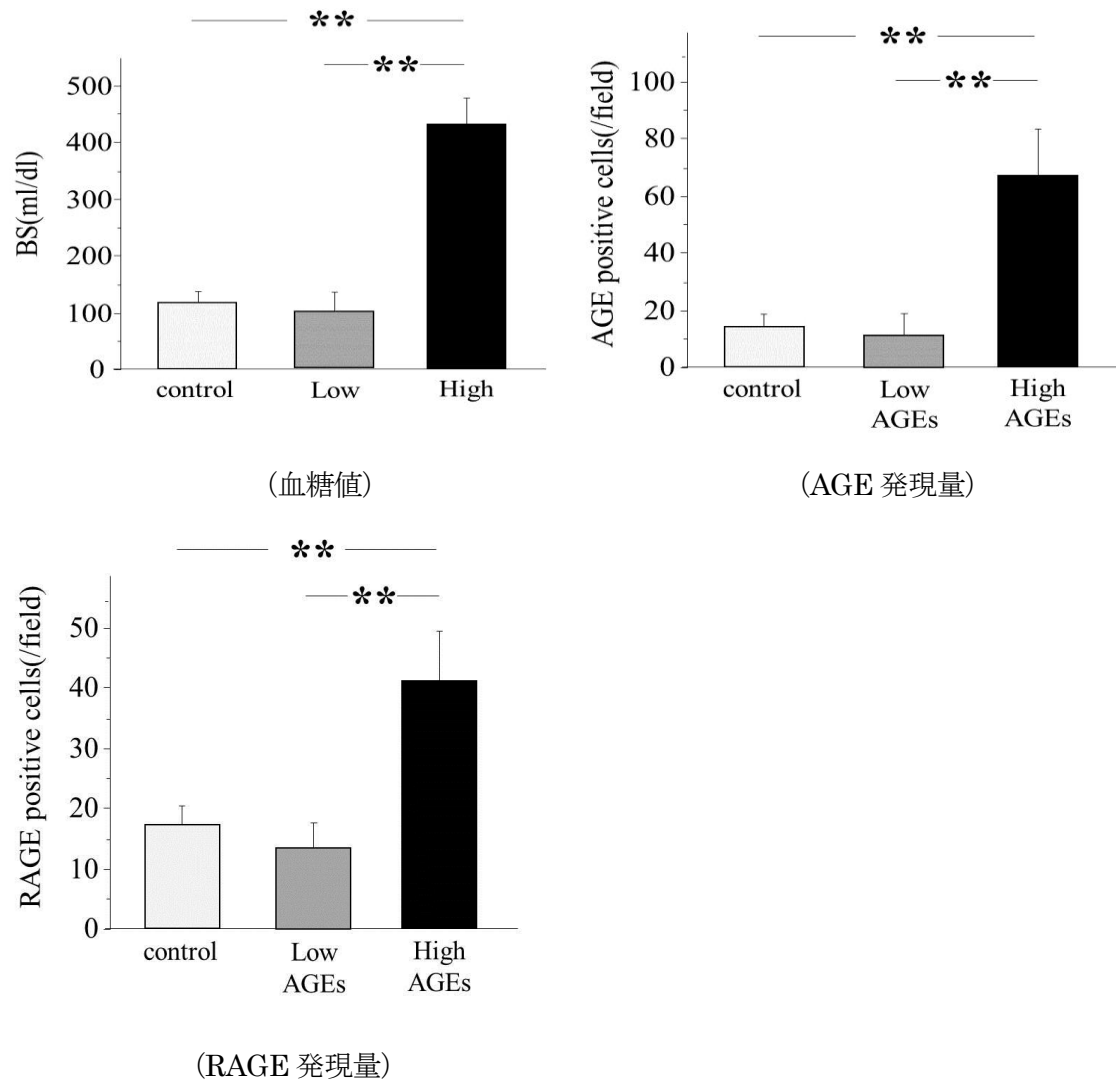


②高/低 AGEs ラットモデルによる腱板脆弱性に関する実験

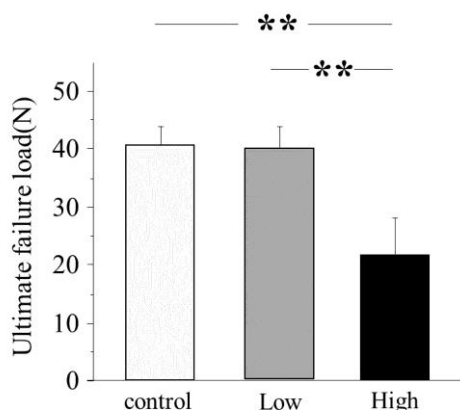
5週間投与後に腱板組織を採取し、免疫組織学的に AGEs 沈着量および AGEs 受容体 (RAGE)

発現量を定量し、同月齢のSDラットの腱板組織の結果と比較した。

肩腱板組織に発現しているAGEsとRAGEは、高AGEsモデルラットにおいて、有意に高かったが、低AGEsモデルラットとコントロールラットの間には有意差は認めなかった。



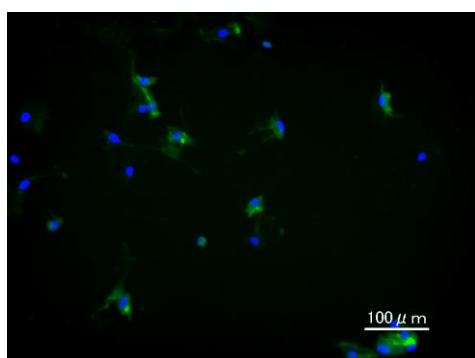
Oil red O 染色による腱板の脂肪変性に関しては、各グループ間で有意な差は認めなかった。最後に、腱板（棘下筋）—上腕骨複合体として採取し、腱板付着部の力学的強度の検討として引っ張り試験を行った。同年齢の通常ラット腱板組織（コントロール群）を含めた3群間での腱板脆弱性（最大破断強度）を比較検討したところ、コントロール群と低AGEsラットモデルの間には有意差は認めなかったが、高AGEsモデルでは有意に最大破断強度の低下を認めた。



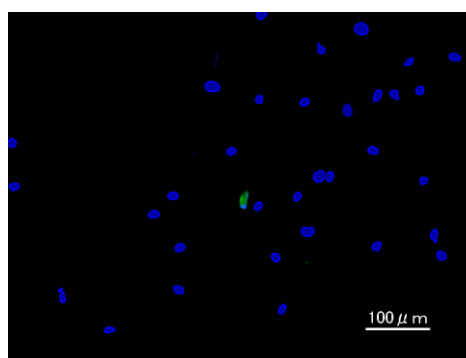
③ 腱板細胞に対する AGEs 負荷と酸化阻害薬の効果

ヒト腱板組織より、腱板由来細胞を分離・培養し、そこに AGEs 投与群と非投与群の 2 群に分けた。さらにアポシニン投与群と非投与群の 2 群に分けて、1) AGEs + アポシニン、2) AGEs のみ、3) アポシニンのみ、4) コントロールの 4 群に分けて 3 日間培養し、その後、ROS の発現と apoptosis の発現を半定量した。

AGEs のみ群では、多くの ROS ならびに Apoptosis の発現が見られたが、AGEs + アポシニン群では、ROS および Apoptosis の発現は有意に少なかった。



(AGEs のみ)



(AGEs + アポシニン)

4 研究がもたらす効果及び波及効果

無症候性の腱板断裂も含めると、70 歳以上の約 45%、50 歳以上でも約 25% で肩腱板断裂が認められたという報告もあり、今回の研究により、加齢による腱板断裂が予防できる可能性が明らかになれば、将来的に AGEs 阻害薬により加齢による肩腱板組織の自然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。

超高齢化社会を目前とした現在の状況を考えると、加齢による腱板断裂を罹患する患者数は増加の一途をたどると考えられ、その予防薬・予防法が確立できれば、これによる生活や産業への貢献度合いは大変大きいと考えている。