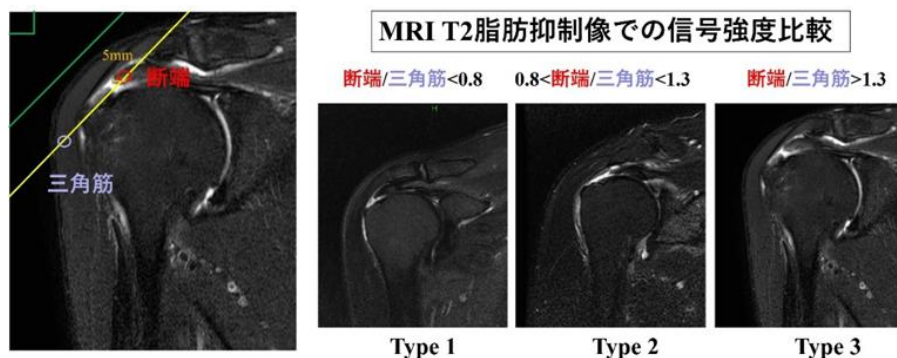


「腱板変性に対応した肩腱板断裂に対するハイブリッド細胞治療の開発」  
 神戸大学医学部附属病院 美船 泰

1 研究の背景と目的

近年、老化の原因として糖化ストレスと酸化ストレスが注目されており、様々な研究が進む中で糖尿病や高脂血症などの生活習慣病と、ロコモティブシンドロームや骨粗鬆症など老化に伴う多くの運動器疾患にも関連があることが分かってきている。その中で、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。事実、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)。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糖化最終生成物(Advanced Glycation End Products; AGEs)発現を調べた。その結果、免疫組織染色により腱板組織における AGEs 沈着および AGEs 受容体である RAGE 発現は確認している(7)。また *in vitro* 実験において AGEs が腱板細胞の活性を低下させ、活性酸素 (Reactive Oxygen Species; ROS) 発現の増強を介して apoptosis を誘導することを確認した(8)。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(9)。さらに、糖化ストレスを受けた腱板細胞に様々な抗酸化薬を投与することで ROS の発現や apoptosis が減少することも報告した(10-13)。また一方で、我々は腱板断裂断端部の組織から腱板由来幹細胞の分離・同定を行い報告してきた(14)。また、この幹細胞を腱板修復部に移植することで、腱板治癒促進効果が得られることも報告した(15)。

近年、MRI 検査における肩腱板断裂部の輝度変化の違いが、腱板修復術後の再断裂のリスクファクターであることが報告された(16)。三角筋の輝度を基準とし、腱板断裂断端の輝度が低いものを Type1、輝度が同等であるものを Type2、輝度が高いものを Type3 と分類し、Type3 に術後再断裂が有意に多いことが報告された (Stump 分類)。そこで、今回は、修復すべき腱板組織の脆弱性のメカニズムと解明するために、この MRI における腱板断端部の輝度レベルの違いにより、術中に採取したヒト腱板組織を 3 つのグループに分け、肩腱板由来細胞を分離・培養し、細胞活性や分化能の差、表面抗原マーカーの発現差などを検討し、Stump 分類による腱板由来幹細胞の特徴を明らかにすることが第 1 の目的である。次に高輝度腱板由来の細胞に、我々がこれまでに報告してきた抗酸化薬を投与し、その変化を確認することが第 2 の目的である。



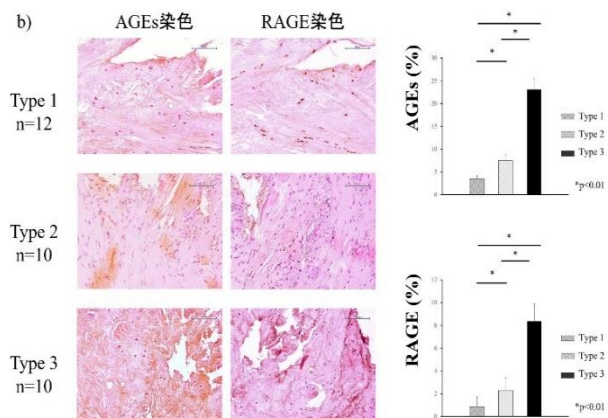
## 2 研究方法・研究内容

① 当院で腱板断裂に対して鏡視下腱板修復術を施行し、研究への参加に同意の得られた患者 30 例(stump type1; 11 例、type2; 9 例、type3 ; 10 例)を対象とした。手術加療は、3ヶ月以上の保存的治療（NSAIDs 投与，ステロイド局所注射，理学療法）に抵抗性を示した患者に施行した。外傷性断裂やリウマチ性関節症及び再断裂例は対象から除外した。採取した組織の一部は組織評価のため 4% パラホルムアルデヒドで固定した。固定した標本は標準のプロトコルに従い、Hematoxylin-eosin 染色にて組織学的評価を行った。また AGEs と RAGE の発現量を蛍光免疫染色法で評価した。染色した切片は BZ-8000 confocal microscope で観察し、染色割合を Image J (ver.1.52.)を用いて定量的に評価し、3 群間で比較した。残りの組織は約 1mm<sup>2</sup> の大きさに mincing し 10%の FBS を含む DMEM 培地で培養した。それぞれ 2-4 継代培養を行ない、48 時間後に次の各項目について検討した。細胞活性の評価には Cell Counting Kit-8 を用いた Water Soluble Tetrazolium salt(WST)assay を使用した。酸化ストレスマーカーとしての ROS 評価には過去の報告をもとに Total ROS/Superoxide Detection Kit を用いた Carboxy-H2-DCFDA 染色を行い、BZ-8000 confocal microscope で観察した。DAPI 陽性細胞に対する ROS 陽性細胞の比率を算出し、無作為に選んだ 4 視野の平均を 3 群間で比較した。また Apoptosis の評価として APO-DIRECT kit(を用いて TUNEL 染色を行い、ROS 評価と同様に apoptosis の割合を半定量した。遺伝子発現に関しては腱板由来細胞の RNA を RNeasy® Mini Kit を用いて抽出し、High Capacity cDNA Transcription Kit を用いて cDNA 化した。Quantitative PCR (qPCR)には、SYBR® Green Master Mix 試薬を使用した real-time PCR により、ROS 産生に関与する NOX 1、NOX 4、AGEs の受容体の RAGE、腱板組織の主要構成成分である 1 型コラーゲン (COL 1)、癒傷や修復過程で発現する 3 型コラーゲン (COL 3)、及び炎症性サイトカインの Interleukin (IL) 6、IL 1β の遺伝子発現量を 3 群間で比較した。統計学的解析には Kruskal-Wallis 検定を用い、Steel-Dwass 法による多重比較検定を行った。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

② 次に高輝度腱板 (Type3) 由来の細胞に抗酸化薬 (GLS1) を投与し、細胞活性や酸化・糖化ストレス、炎症系サイトカインの発現、apoptosis など変化を確認した。対象は腱板断裂に対して当院で手術加療を施行した患者 12 例、Type1: 6 例、Type3: 6 例。関節鏡下腱板修復術時に腱板断端部より組織を採取し、組織評価、細胞評価を行った。組織評価は GLS1 の mRNA 発現量を real-time PCR(qPCR)により定量評価し、また免疫染色を行った。細胞評価は腱板由来細胞を分離・培養後、Type1、3 に GLS1 阻害薬投与の有無で 4 群を設定し、投与後 48 時間で細胞活性を WST assay、mRNA 発現量を qPCR により定量評価した。

## 3 研究成果

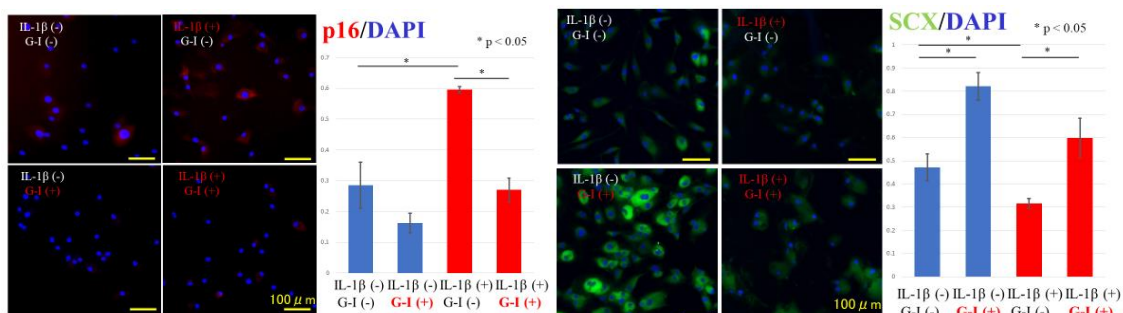
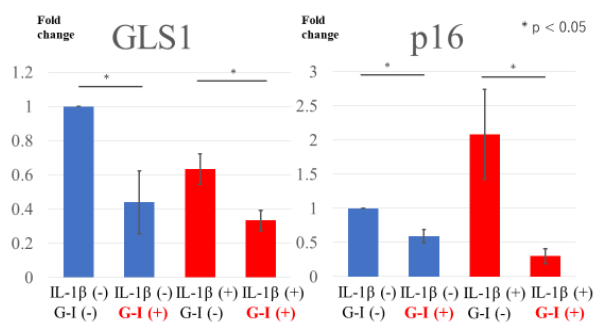
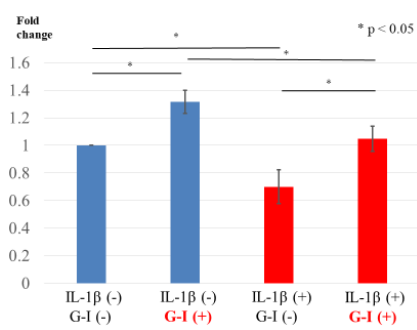
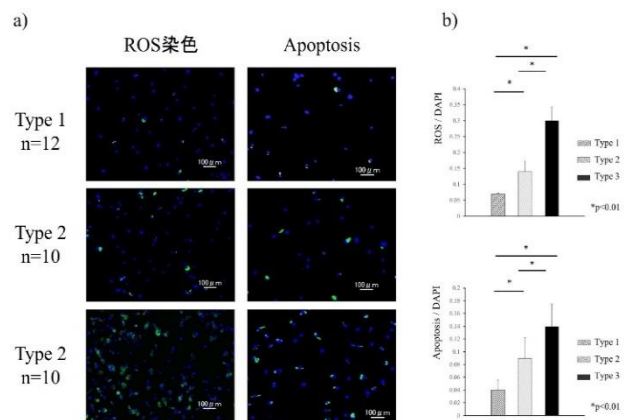
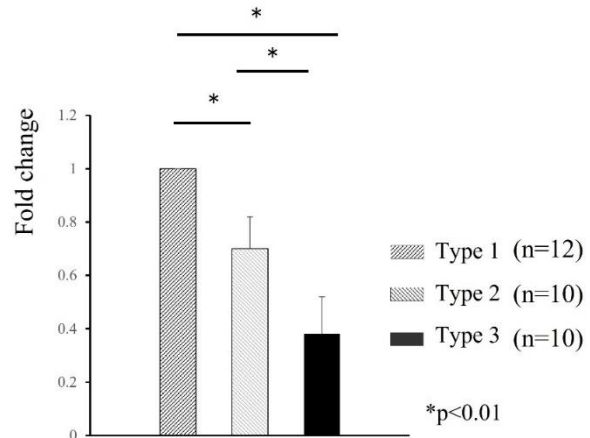
① 当院で腱板変性断裂に対して鏡視下腱板修復術を施行した 32 例(男性 15 例、女性 17 例、平均年齢 63.8 歳)に対して評価を行った。Stump 分類別には type1 が 12 例(男性 6 例、女性 6 例、平均年齢 64.2 歳)、type2 が 10 例(男性 4 例、女性 6 例、平均年齢 62.5 歳)、type3 が 10 例(男性 5 例、女性 5 例、平均年齢 62.8 歳)であった。組織評価では、HE 染色において type1、type2 は腱板のコラーゲン配列がほぼ平行に

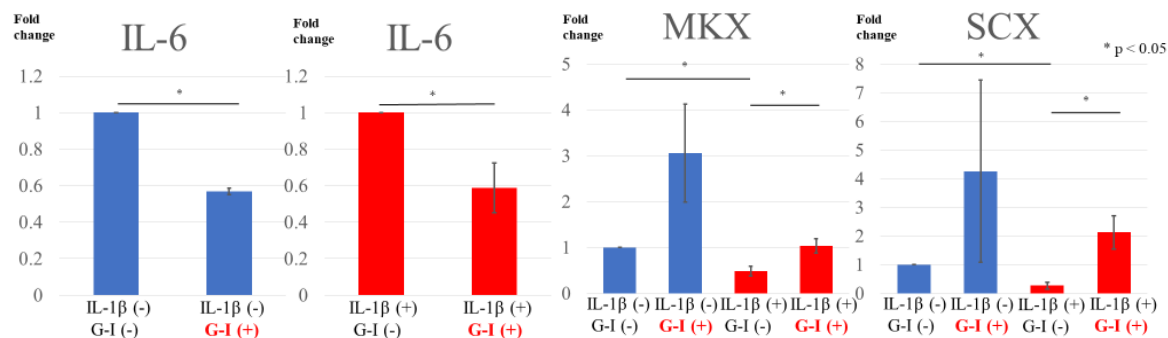


配列していたが、type3 ではコラーゲンの配向性が乱れているのが観察された。免疫組織化学染色では AGEs 染色は細胞外基質を中心に染色され、RAGE 染色は細胞の核周囲が染色された。

細胞活性は type1 が最も高く、type2, type3 の順でそれぞれに有意差を認めた。ROS の蛍光免疫染色では type3 での発現が最も高く、type2, type1 の順にそれぞれ有意差を認めた。Apoptosis の発現割合も同様に type3 で有意に高く、type2, type1 の順にそれぞれ有意差を認めた。qPCR では酸化ストレスに主に関与する NOX 1、NOX 4、AGEs の受容体である RAGE は type3, type2, type1 の順に発現が高く、それぞれに有意差を認めた。COL 1 は type1 で type2, type3 より有意に高く、COL 3 は type3 が type1 より有意に高かった。炎症性サイトカインでは、IL 6 は type3 が type1 と比較して有意に高く、IL 1β は type3, type2 が type1 に比較して有意に高かった。

② 組織評価は Type3 で GLS1 の mRNA 発現が有意に高く、GLS1 の免疫染色も Type3 で染色性を認めた。細胞評価は Type3 が Type1 より有意に細胞活性が低く、GLS1 阻害薬投与により Type3 で細胞活性の上昇を認めた。また Type3 で GLS1 阻害薬投与により GLS1、p16、IL-6 の mRNA 発現量が有意に低下した。





#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

肩関節疾患の中で腱板の変性断裂は平均 58 歳の約 21%に生じるとされ、疼痛や肩関節の機能障害を生じる。疼痛が遷延する場合や機能障害が残存する場合は鏡視下腱板修復術 (ARCR)が施行されるが ARCR 後の腱板再断裂は臨床における課題である。本研究により、腱板脆弱性の原因が解明され、新しい治療法の開発につながることは、大きな社会貢献になると考えられ、また再断裂を防ぐことは医療経済的にも大きな効果をもたらすと考える。

<参考文献>(1) Yamamoto A, et al. J Shoulder Elbow Surg. 2011. (2) Ozaki J, et al. J Bone Joint Surg Am. 1988. (3) Petersson CJ, et al. Acta Orthop Scand. 1984. (4) Roquelaure Y, et al. Scand J Work Environ Health. 2011. (5) Kang JH, et al. Ultrasound in Med & Biol. 2010. (6) Abboud JA, et al. Clin Orthop Relat Res. 2010. (7) Mifune Y, et al. 10th International Society of Arthroscopy Knee Orthopedic Sports medicine. 2015. (8) Mifune Y, et al. J Shoulder and Elbow Surgery. 2019. (9) Mifune Y, et al. 11th International Society of Arthroscopy Knee Orthopedic Sports medicine. 2017. (10) Kurosawa T, Mifune Y, et al. Bone Joint Res. 2020. (11) Yamaura K, Mifune Y, et al. BMC Musculoskelet Disord. 2021. (12) Mukohara S, Mifune Y, et al. BMC Musculoskelet Disord. 2021. (13) Yoshikawa T, Mifune Y, et al. BMC Musculoskelet Disord. 2022. (14) Nagura I, Mifune Y, et al. J Orthop Surg Res. 2016. (15) Harada Y, Mifune Y, et al. J Orthop Res 2016. (16) Ishitani E, et al. J Shoulder Elbow Surg. 2016.