Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Influence of Diabetes-Induced Glycation and Oxidative Stress on the Human Rotator Cuff

吉川, 智也

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2023-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8508号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482256

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Influence of Diabetes-Induced Glycation and Oxidative Stress on the Human Rotator Cuff

糖尿病による糖化・酸化ストレスがヒト腱板に及ぼす影響

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒田　良祐教授）

吉川　智也

【目的】

肩腱板断裂の原因は外傷性と非外傷性に大別されるが、非外傷性の加齢による腱板変性によって生じるものが多いとされ、糖化反応や酸化ストレスの要因となる高血糖はリスクファクターの 1 つと言われている。また、高血糖が誘発する過剰な酸化ストレスは組織障害や臓器機能障害を引き起こし得る。酸化ストレスの主要因となる細胞内の活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）の濃度は、高血糖条件下で増加し、ROS の増加は DNA や RNA、タンパク質の損傷や抗酸化酵素レベルの変化を引き起こし、最終的に細胞や組織に障害を与える。これまでの報告では、高血糖による ROS 産生の主な原因は nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase（NOX）であり、その活性化が ROS の産生を高めることが明らかにされている。また、タンパク質の糖化は、高血糖状態における酸化ストレスのメカニズムに関与している。タンパク質のアミノ基への不可逆的なグルコース結合である糖化反応は、終末糖化産物（advanced glycation end-products: AGEs）を生成する。AGEs は AGEs 受容体（receptor for AGEs: RAGE）と結合して NOX を活性化し、酸化ストレスの発生や炎症状態を引き起こす。AGEs の蓄積は加齢や糖尿病患者において増加し、組織障害と関連し、糖尿病合併症の発症につながり、さらに AGEs は加齢に伴う腱板変性にも関与していることがわかっている。

糖尿病患者の筋骨格系疾患発症リスクは高く、肩疾患の有病率の増加とも関連しており、肩の痛み、腱板腱障害、腱板炎を含む肩の障害は、糖尿病患者において 5 倍多く見られると報告されている。糖尿病は、潜在的な機能的変化やコラーゲンの無秩序化、肥厚、石灰化などの構造的異常を伴う腱炎のリスク増大にも関連し、これらはすべて腱断裂のリスク増大の一因となり得る。しかし、糖尿病の重症度や罹病期間が腱板断裂の重症度に影響を与えるかどうかは、まだ明らかにされていない。さらに、高血糖によって引き起こされる糖化反応や酸化ストレスが、腱板由来の細胞や腱板組織に及ぼす影響も不明なままである。そこで本研究の目的は、非外傷性腱板断裂患者において糖尿病による糖化・酸化ストレスが腱板に及ぼす影響を解明することとした。

【方法】

肩腱板断裂に対して鏡視下腱板修復術を施行した 50 歳以上の患者 32 人のうち、再手術、外傷、関節リウマチの患者、50 歳未満の患者を除外した 20 人を対象とした。糖尿病治療歴のある患者または術前 HbA1c≧6.5%の患者を糖尿病群、それ以外を非糖尿病群に割り付け、各群それぞれ 10 人であった。

患者背景は、年齢、性別、HbA1c 値、高血圧の有病率、BMI、腱板断裂サイズ、腱板の脂肪変性について両群間で比較した。腱板断裂サイズは MRI による Cofield 分類、腱板の脂肪変性は MRI による Goutallier 分類に基づいて分類した。HbA1c 値、糖尿病罹病期間と腱板断裂の大きさや脂肪変性の程度との相関は、糖尿病群内でサブ解析した。

鏡視下腱板修復術の際に棘上筋腱の断裂断端から採取したヒト腱板組織から腱板由来細胞を分離・培養し、water-soluble tetrazolium salt（WST）assay にて細胞活性を評価し、NOX1、NOX4、interleukin 6 (IL6)、RAGE、type I collagen、type III collagen、matrix metalloproteinase

2 (MMP2)、tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1)、TIMP2 の遺伝子発現量を real-time PCR 法で定量評価した。さらに、細胞蛍光染色で ROS 陽性細胞と apoptosis 陽性細胞の発現をそれぞれ陽性細胞の割合（ROS 陽性核／DAPI 陽性核）、（apoptosis 陽性核／DAPI 陽性核）で評価した。また、腱板組織を H-E 染色による腱組織病理スコアに基づいて半定量評価し、さらに AGEs、RAGE の発現を免疫染色で評価した。すべての結果は、糖尿病群と非糖尿病群間で比較し、2 群間の有意差は independent t 検定およびカイ 2 乗検定を用いて評価した。有意水準は $p<0.05$ とした。

【結果】

平均年齢は非糖尿病群 62.2±6.4 歳、糖尿病群 65.3±5.5 歳で 2 群間に有意差を認めなかった。HbA1c 値は非糖尿病群 5.7±0.26%、糖尿病群 6.9±0.5%と糖尿病群で有意に高値であった（$p<0.001$）。その他の患者背景因子（性別、高血圧の有病率、BMI、腱板断裂サイズ、腱板の脂肪変性）に関しては、2 群間に有意差を認めなかった。さらに、糖尿病群内で HbA1c 値、糖尿病罹病期間と腱板断裂の大きさや脂肪変性の程度との有意な相関は認めなかった。

WST assay による細胞活性は、糖尿病群において非糖尿病群と比較して有意に低かった（$p<0.001$）。

real-time PCR 法による mRNA 発現量は、糖尿病群において NOX1、NOX4、IL-6、RAGE、type III collagen、MMP-2、TIMP-1、TIMP-2 の発現が有意に高く（$p<0.05$）、type I collagen の発現が有意に低かった（$p<0.001$）。

また、細胞蛍光染色による ROS 陽性細胞数、apoptosis 陽性細胞数の割合は、糖尿病群において有意に高値であった（$p<0.001$）。

腱板組織の H-E 染色では、糖尿病群でコラーゲン配列の乱れを認め、腱組織病理スコアの有意な低下を認めた（$p<0.001$）。免疫染色は ImageJ を用いて定量評価し、糖尿病群において AGEs および RAGE の発現は有意に高かった（$p<0.001$）。

【考察】

本研究では、非外傷性肩腱板断裂の患者を対象に腱板を調査し、糖尿病による高血糖が RAGE の mRNA 発現量、AGEs と RAGE の蛋白質量を増加させることが明らかになった。さらに、糖尿病患者の腱板由来細胞では、ROS、apoptosis、NOX の mRNA 発現が亢進し、細胞活性が低下していた。これらの結果より、ヒト腱板における糖尿病による糖化および酸化ストレスの影響を明らかにした。本研究は、糖尿病患者の腱板に対する糖化・酸化ストレスの影響を明らかにした初めての研究である。

糖尿病は、一般的な肩疾患の有病率の増加と関連していると言われているが、腱板肥厚と石灰性腱板炎を含む腱板障害が、糖尿病患者で 2 倍多く発生することが証明されている。糖尿病患者のコラーゲン組織における AGEs の蓄積は、組織機能障害の主な要因の一つと考えられており、腎症、網膜症、白内障などの糖尿病合併症の発症機序として示唆されている。また、非糖尿

病患者の腱板においても、AGEs が加齢に伴う変性変化を引き起こすことが報告されている。本研究では、糖尿病患者の腱板では AGEs と RAGE の発現量が有意に増加していることが判明した。また、in vitro における腱板由来細胞の過去の報告と同様に、AGEs の発現が高い糖尿病群では、腱板由来細胞の増殖が有意に低下していた。

糖尿病による高血糖は、酸化ストレスやサイトカイン産生を誘導し、様々な臓器で炎症や組織障害を引き起こすことが示されている。酸化ストレスとは、体内で有害な ROS が過剰に生成されることと定義されている。ROS は、成長因子やサイトカインの制御のもと、NOX をはじめとする様々な酵素やミトコンドリア電子伝達系によって生成される。RAGE と結合した AGEs も NOX を活性化し、酸化ストレスを引き起こす。また、ROS の過剰産生は apoptosis を促進し、酸化ストレスと apoptosis には重要な関係性があることが示されている。本研究では、糖尿病群のヒト腱板由来細胞において、ROS 産生および apoptosis 率が有意に増加し、NOX1、NOX4、IL6 の mRNA 発現量も有意に増加した。

糖尿病の腱の組織学的な分析ではコラーゲン量に変化はなく、組織化が不十分であったと報告されている。本研究においても、糖尿病群の腱板におけるコラーゲン線維の配列は有意に乱れていた。

I 型コラーゲンは正常な腱のコラーゲンの約 90%を占め、III 型コラーゲンは炎症時に多くなる。膝蓋腱の I 型コラーゲンの発現は高血糖により抑制されることが示されている。同様に、高血糖条件下のアキレス腱においても I 型コラーゲンの発現が減少し、III 型コラーゲンの発現が増加することが報告されている。本研究では、糖尿病群のヒト腱板において、I 型コラーゲンの発現が有意に減少し、III 型コラーゲンの発現が有意に増加した。

正常な腱の代謝活性は、MMP と TIMP の発現バランスによって制御されている。MMP は炎症によって損傷した間質コラーゲンを切断してリモデリングを行うが、TIMP は MMP の過剰な発現を抑制している。外膜線維芽細胞における MMP2 の産生は、高血糖条件下で増加するとされ、また、糖尿病ラットの腱において MMP2、TIMP1、TIMP2 の mRNA 発現量が増加することが明らかとなっている。本研究では、糖尿病によって、ヒト腱板における MMP2、TIMP1、TIMP2 の mRNA の発現が増加することを明らかにした。

本研究では、糖尿病の重症度や罹病期間と腱板断裂の大きさや脂肪変性の程度との間に有意な相関が認められなかったが、対象となった患者数が少なかったことに影響された可能性がある。HbA1c 値が高い糖尿病群では、腱板組織で糖化・酸化ストレスの増加が観察されたが、糖尿病の重症度と腱板断裂の相関を調べるためには、より多くの患者を対象としたさらなる研究が必要である。

また、本研究では、手術時に採取した腱板の状態を評価しているため、この状態が腱板断裂に与える実際の影響は不明である。しかし、糖尿病の有無によって、腱板由来細胞や腱板組織に糖化や酸化ストレスの影響の違いが生じることは本研究の結果から明らかであり、これが腱板断裂に影響を与えている可能性があると考える。

【結語】

糖尿病による高血糖がヒト腱板における AGEs および RAGE の発現を増加させ、その結果、NOX の発現、ROS の産生、apoptosis が増加することを明らかにした。これらの結果は、糖尿病患者の非外傷性腱板断裂が、糖化と酸化ストレスの影響を受けていることを示唆するものである。したがって、このような作用を抑制することで、非外傷性腱板断裂の予防治療法を見つけることが今後の課題である。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲　第３２５２号	氏　　名	吉川智也
論文題目 Title of Dissertation	Influence of Diabetes-Induced Glycation and Oxidative Stress on the Human Rotator Cuff 糖尿病による糖化・酸化ストレスがヒト腱板に及ぼす影響		
審査委員 Examiner	主　　査 Chief Examiner 松本理器 副　　査 Vice-examiner 佐々木正寛 副　　査 Vice-examiner 小川玲		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

肩腱板断裂の多くは加齢に伴う腱板変性によって生じるとされるが、糖尿病はリスクファクターの 1 つと言われている。高血糖条件下では nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(NOX)が活性化され、酸化ストレスの主因となる活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)が細胞内で増加する。またタンパク質の糖化反応は終末糖化産物(advanced glycation end-products: AGEs)を生成し、AGEs は AGEs 受容体(receptor for AGEs: RAGE)と結合して NOX を活性化し、酸化ストレスや炎症を引き起こすことがわかっている。しかし、高血糖が腱板由来細胞や腱板組織に及ぼす影響およびそのメカニズムは不明である。そこで今回研究者らは、非外傷性腱板断裂患者において糖尿病による糖化・酸化ストレスが腱板に及ぼす影響を検討した。

方法

肩腱板断裂に対して鏡視下腱板修復術を施行した 50 歳以上の患者 20 人を対象とした。糖尿病治療歴のある患者または術前 HbA1c≧6.5%の患者を糖尿病群、それ以外を非糖尿病群に割り付け、各群 10 人ずつであった。鏡視下腱板修復術の際に棘上筋腱の断裂断端から採取したヒト腱板組織から腱板由来細胞を分離・培養し、細胞活性、細胞蛍光染色(ROS、apoptosis)、NOX1、NOX4、interleukin 6 (IL6)、RAGE、type I collagen、type III collagen、matrix metalloproteinase 2 (MMP2)、tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1)、TIMP2 の遺伝子発現量を quantitative polymerase chain reaction (qPCR)で評価した。また、腱板組織を H-E 染色による腱組織病理スコアに基づいて半定量評価し、さらに AGEs、RAGE の発現を免疫染色で評価した。すべての結果は、糖尿病群と非糖尿病群間で比較し、2 群間の有意差は independent t 検定およびカイ 2 乗検定を用いて評価した。$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

結果

HbA1c 値は非糖尿病群 5.7±0.26%、糖尿病群 6.9±0.5%と糖尿病群で有意に高値であった（$p<0.001$）。細胞活性は、糖尿病群において非糖尿病群と比較して有意に低かった（$p<0.001$）。qPCR による mRNA 発現量は、糖尿病群において NOX1、NOX4、IL6、RAGE、type III collagen、MMP2、TIMP1、TIMP2 の発現が有意に高く（$p<0.05$）、type I collagen の発現が有意に低かった($p<0.001$)。また、細胞蛍光染色による ROS 陽性細胞数、apoptosis 陽性細胞数の割合は、糖尿病群において有意に高値であった（$p<0.001$）。腱板組織の H-E 染色では、糖尿病群でコラーゲン配列の乱れを認め、腱組織病理スコアの有意な低下を認めた（$p<0.001$）。免疫染色では、糖尿病群において AGEs および RAGE の発現が有意に高かった（$p<0.001$）。

考察および結論

糖尿病は、一般的な肩疾患の有病率増加と関連していると言われており、腱板障害についても糖尿病患者で約2倍多く発生することが報告されている。糖尿病患者のコラーゲン組織におけるAGEsの蓄積は、組織機能障害の主な要因の一つと考えられている。また糖尿病による高血糖は、酸化ストレスやサイトカイン産生を誘導し、様々な臓器で炎症や組織障害を引き起こすことが示されているが、糖尿病患者の腱板におけるこれらの病態解明は不十分である。今回研究者らは非外傷性腱板断裂患者の腱板を用いて、糖尿病による糖化・酸化ストレスの影響を初めて報告した。

今回の研究により、糖尿病による高血糖がヒト腱板におけるAGEsおよびRAGEの発現を増加させ、その結果NOX発現、ROS産生、apoptosisが増加し、細胞活性が低下することが明らかとなった。これらの結果は、糖尿病患者の腱板断裂が糖化と酸化ストレスの影響を受けていることを示唆するものと考えられた。

本研究は、肩腱板断裂のリスクファクターである糖尿病による糖化反応や酸化ストレスが腱板に及ぼす影響について、ヒト腱板を用いて初めて証明した報告である。このような糖化・酸化ストレスを抑制することで、非外傷性腱板断裂の新たな予防治療のアプローチと成り得る重要な知見を得たものとして価値ある業績であり、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。