



Intra-articular site-specific distribution of advanced glycation end products in the shoulder of patients with diabetes mellitus having rotator cuff tears

加藤, 達雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9061号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496342>

※ 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

Intra-articular site-specific distribution of advanced glycation
end products in the shoulder of patients with diabetes mellitus
having rotator cuff tears

糖尿病を伴う肩腱板断裂における糖化最終産物の
肩関節内部位特異的分布

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)

加藤 達雄

【背景】

糖化最終産物（Advanced Glycation End Products； AGEs）は、加齢や糖尿病によって形成される化合物で、非酵素的な糖化反応（メイラード反応）により生成される。AGEs はその受容体（Receptor for Advanced Glycation End Products； RAGE）と結合することで NADPH オキシダーゼ（NOX）を活性化し、活性酸素種（Reactive Oxygen Species； ROS）の産生を増加させ、酸化ストレスを引き起こす。この酸化ストレスは、DNA 損傷、細胞死、組織線維化の原因となり、AGEs は皮膚や内臓、骨、軟骨など多くの組織の老化に寄与するとされている。AGEs はコラーゲンに蓄積しやすく、コラーゲ配列に異常架橋を生じることで組織脆弱性の原因に繋がるとされており、腱板もコラーゲンの豊富な組織であり、糖尿病や加齢の影響を受けやすいと考えられている。腱板と AGEs の関連について、老化モデルのラットで酸化ストレスの上昇によるアポトーシスの増加細胞活性の低下と腱板強度の低下に繋がることや、ヒトの腱板由来細胞への AGEs の投与で細胞活性の低下や ROS を介したアポトーシスの誘導、腱板強度の低下が生じることが報告されている。臨床では腱板断裂に関節拘縮や滑膜炎が合併するが、これまでに AGEs が肩関節の特定の組織（腱板、滑膜、関節包）に及ぼす影響を直接評価した研究はほとんどない。本研究では、AGEs 蓄積のリスク因子とされる糖尿病患者において、

AGEs の蓄積が腱板断裂、関節拘縮、滑膜炎に関与しているという仮説をもとに、腱板断裂と肩関節拘縮を伴う肩関節内組織における AGEs の分布や影響を評価した。

【方法】

腱板断裂に対して鏡視下腱板修復術を施行したうち前方挙上 120°以下、外旋 40°以下の可動域制限を有する例で、糖尿病に関しては WHO の基準をもとに HbA1c が 6.5 以上の症例を対象とした。男性 5 例、女性 3 例の計 8 例で平均年齢は 64.6 歳であった。外傷性腱板断裂や石灰沈着性腱板炎、凍結肩（腱板断裂を伴わないもの）、関節リウマチ、関節炎、または糖尿病がコントロールされている患者（HbA1c < 6.5%）は除外した。

鏡視下腱板修復術の際に採取した肩関節の組織（腱板、滑膜、関節包）を用いて、組織学的評価と細胞評価を行った。組織学的評価はヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色と、AGEs および RAGE の免疫染色を行った。細胞評価は water-soluble tetrazolium salt (WST) assay を用いて細胞活性を評価し、また、ROS とアポトーシスの割合（ROS 陽性核 / DAPI 陽性核）、（アポトーシス陽性核 / DAPI 陽性核）を免疫蛍光染色により評価した。さらに、定量リアルタイム PCR（qPCR）を用いて、NOX、RAGE、IL-6、IL-1 β 、I型およびIII型コラーゲンの遺伝子発現量を評価した。すべての結果は腱板、滑膜、関節包の 3 部

位で比較し、3群間の有意差は Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

組織染色では HE 染色で腱板のコラーゲン配列の乱れを認め、滑膜では重層化した滑膜細胞を認めた。関節包では密集したコラーゲン線維と濃青色に染まり紡錘形の核を持つ、線維芽細胞の増殖を認めた。免疫染色は Image J を用いて定量評価し、AGEs および RAGE の染色性は腱板 > 関節包 > 滑膜の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。WST assay による細胞活性は滑膜で優位に活性が高く腱板と関節包では低値を示した ($p < 0.05$)。ROS 染色、アポトーシスの割合は、腱板 > 関節包 > 滑膜の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。qPCR では、I型およびIII型コラーゲン、RAGE、NOX の発現量は腱板 > 関節包 > 滑膜の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。しかし、炎症性サイトカイン (IL-6 および IL-1 β) の発現量は滑膜で最も高く、腱板や関節包よりも顕著だった ($p < 0.05$)。

【考察】

AGEs 蓄積の危険因子として、多くの研究で加齢と糖尿病が報告されている。高血糖の持続は AGEs の蓄積に関与しており、さらに、代謝の遅い AGEs

は糖尿病患者で蓄積しやすい傾向がある。組織ではコラーゲンに AGEs が蓄積されやすく、異常架橋を引き起こし、炎症や組織の線維化を引き起こす。

さらに、AGEs はその受容体である RAGE と結合し、NOX を活性化することで ROS の産生を引き起こす。ROS の増加は、NFκB の活性化を通じて炎症性サイトカインの産生増加を引き起こし、また、ミトコンドリア DNA の損傷を誘発し、アポトーシスを誘導する。それらの結果、組織の線維化と脆弱化につながるとされている。

本研究では、腱板断裂および肩関節拘縮を有する糖尿病患者の肩関節の腱板、関節包、滑膜における AGEs の蓄積、細胞活性、ROS 産生、アポトーシス、遺伝子発現 (NOX、RAGE、炎症性サイトカイン、コラーゲン) について検討した。過去の肩関節内の各部位 (滑膜、肩峰下滑液包、腱板、腱附着部) の検討では、細胞活性や分化能を比較検討しており、滑膜細胞の活性と分化能が高いことが報告されている。本研究でも同様に細胞活性は滑膜で高かったが、その要因として滑膜は疎性結合組織からなり、細胞数が多く、AGEs の蓄積が少ないことが考えられる。また、滑膜では IL-6 と IL-1β の発現が有意に高かったことから、滑膜は AGEs の直接的な影響を受けにくい、炎症の主要部位である可能性が示唆された。

一方、本研究では AGEs、ROS、アポトーシスは腱板、関節包で高かった。

AGEs と肩関節組織の検討では凍結肩での関節包への AGEs の蓄積が報告されており、凍結肩では不安定肩関節症や腱板断裂の患者と比較して関節包への AGEs の蓄積が多いとの結果であり、凍結肩の原因として AGEs 発現増加による線維芽細胞の増殖とコラーゲンの線維化が報告されている。本研究の考察として、AGEs はコラーゲンを多く含む腱板と関節包に特に蓄積しやすく、NOX を介した ROS の過剰産生を引き起こし、酸化ストレスによるアポトーシスを引き起こし、組織の線維化や脆弱化を招く可能性が示された。これにより、糖尿病患者では腱板が断裂しやすく、関節包が拘縮を起こしやすいことが考えられる。

本研究は、腱板断裂および肩関節拘縮を有する糖尿病患者において、肩関節の各組織（腱板、滑膜、関節包）に対する AGEs の影響を評価した最初の研究である。糖尿病患者では、AGEs は腱板や関節包に沈着する傾向があり、腱板の脆弱化や関節包の線維化を助長し、腱板断裂や肩関節拘縮を引き起こすと考えられる。一方、糖尿病患者では、滑膜炎という合併症に遭遇することが多いが、本研究では、滑膜は AGEs の影響を受けにくく、滑膜炎は腱板断裂等の二次的なものであることを示唆している。

本研究では対象となった患者数が少なく、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、ステロイドの投与は、腱における基礎的な

生物学的事象に影響を与える可能性があり、手術前 1 ヶ月以内にステロイド注射を受けた患者はいなかったことを確認しているが、それ以前のステロイド注射歴は不明であり、本研究の結果を確認するためには、さらなる研究が必要である。

【結論】

腱板断裂および肩関節拘縮を有する糖尿病患者の肩関節における AGEs の蓄積は、腱板と関節包で顕著であり、これが組織の脆弱性や拘縮に関連している可能性がある。滑膜は AGEs の影響を受けにくいものの、炎症の中心として機能している可能性が示された。AGEs が蓄積する肩関節内の部位を特定することで、糖尿病に関連した肩関節疾患の病態生理をより深く理解することができる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第3440号	氏名	加藤 達雄
論文題目 Title of Dissertation	<p>Intra-articular site-specific distribution of advanced glycation end products in the shoulder of patients with diabetes mellitus having rotator cuff tears</p> <p>糖尿病を伴う肩腱板断裂における糖化最終産物の肩関節内部位特異的分布</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 Chief Examiner</p> <p>副 査 Vice-examiner</p> <p>副 査 Vice-examiner</p>	<p>篠山 隆司</p> <p>小川 渉</p> <p>尾藤 祐子</p>	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景】

糖化最終産物 (Advanced Glycation End Products ; AGEs) は、加齢や糖尿病によって形成される化合物で、受容体 (Receptor for Advanced Glycation End Products ; RAGE) と結合することで NADPH オキシダーゼ (NOX) を活性化し、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) の産生を増加させ、酸化ストレスを引き起こし、DNA 損傷、アポトーシス、組織線維化の原因となる。研究者らのグループは、腱板と AGEs の関連について、老化モデルのラットで AGEs の蓄積による酸化ストレスの上昇がアポトーシスの増加や細胞活性の低下、腱板強度の低下に繋がることや、ヒトの腱板由来細胞への AGEs の投与で細胞活性の低下や ROS を介したアポトーシスの誘導、腱板強度の低下が生じることを報告してきた。今回研究者らは、AGEs 蓄積のリスク因子とされる糖尿病患者において、腱板断裂と肩関節拘縮を伴う肩関節内組織における AGEs の分布や影響を評価した。

【方法】

腱板断裂に対して鏡視下腱板修復術を施行したうち肩関節拘縮 (前方挙上 120° 以下、外旋 40° 以下) を有し、HbA1c が 6.5 以上の症例を対象とした。男性 5 例、女性 3 例の計 8 例で平均年齢は 64.6 歳であった。手術の際に採取した肩関節の組織 (腱板、滑膜、関節包) を用いて、組織学的評価と細胞評価を行った。組織学的評価は H-E 染色と、AGEs および RAGE の免疫染色を行った。細胞評価は WST assay を用いて細胞活性を評価し、また、ROS とアポトーシスの割合を免疫蛍光染色により評価した。さらに、定量リアルタイム PCR (qPCR) を用いて、NOX、RAGE、IL-6、IL-1 β 、I 型および III 型コラーゲンの遺伝子発現量を評価した。すべての結果は腱板、滑膜、関節包の 3 部位で比較し、3 群間の有意差は Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて評価した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

・ 組織学的評価

HE 染色で腱板のコラーゲン配列の乱れを認め、滑膜では重層化した滑膜細胞を認めた。関節包では密集したコラーゲン線維と濃青色に染まり紡錘形の核を持つ、線維芽細胞の増殖を認めた。AGEs および RAGE の染色性は腱板 > 関節包 > 滑膜の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。

・ 細胞評価

WST assay による細胞活性は滑膜で優位に活性が高く腱板と関節包では低値を示した ($p < 0.05$)。ROS 染色、アポトーシスの割合は、腱板 > 関節包 > 滑膜の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。qPCR では、I 型および III 型コラーゲン、RAGE、NOX の発現量は腱板 > 関節包 > 滑膜の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。炎症性サイトカイン (IL-6 および IL-1 β) の発現量は滑膜で最も高く、腱板や関節包よりも顕著だった ($p < 0.05$)。

【考察および結論】

今回研究者らは、腱板断裂および肩関節拘縮を有する糖尿病患者において、肩関節の各組織 (腱板、滑膜、関節包) に対する AGEs の影響を評価し初めて報告した。組織では

コラーゲンに AGEs が蓄積されやすく、異常架橋を引き起こし、炎症や組織の線維化を引き起こすとされているが、本研究ではコラーゲンを多く含む腱板と関節包に AGEs は蓄積しやすく、NOX を介した ROS の産生、アポトーシスを引き起こし、組織の線維化や脆弱化を招く可能性が示された。一方、滑膜は AGEs の蓄積が少なく、AGEs の直接的な影響を受けにくいものの、炎症の中心として機能している可能性が示された。

今回の研究により、糖尿病患者では、AGEs は腱板や関節包に沈着する傾向があり、腱板の脆弱化や関節包の線維化を助長し、腱板断裂や肩関節拘縮を引き起こすと考えられた。

本研究は腱板断裂および肩関節拘縮の病態に対し手術加療を施行した糖尿病患者の肩関節内組織における AGEs の影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われていない腱板と滑膜と関節包の組織間での AGEs の蓄積、細胞活性、ROS 産生、アポトーシス、遺伝子発現 (NOX、RAGE、炎症性サイトカイン、コラーゲン) を比較評価した初めての報告である。糖尿病患者における腱板断裂や肩関節拘縮の病態生理について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。