



## Evaluation of apocynin in vitro on high glucose-induced oxidative stress on tenocytes

Kurosawa, Takashi

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2020-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7719号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007719>

※ 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

### Evaluation of apocynin *in vitro* on high glucose-induced oxidative stress on tenocytes

高血糖ストレスモデルを用いたラット腱細胞におけるアポシニンの抗酸化作用の検討

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)

黒澤 兜

#### 【緒言】

糖尿病は様々な筋骨格系障害との関連性が報告されているが、近年、腱障害との関連性が注目されている。具体的には腱炎や肩腱板損傷、腱の治癒障害などが挙げられ、糖尿病患者においては非糖尿病患者と比べて手や肩の腱障害が多いことも示唆されている。その機序としては高血糖に起因する酸化ストレスの亢進が関与していると考えられ、酸化ストレスの主体をなすのは活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) である。ROS はニコチニアミドアデニジヌクレオチドリン酸オキシダーゼ (NOX: NADPH oxidase) を介して生成され、生体内では特に NOX-1、NOX-4 が重要な役割を持つことが知られている。我々は過去に腱細胞に対して糖負荷を行うことで、NOX および ROS 産生の増加とそれに伴う炎症性サイトカインの上昇を確認し、高血糖状態が腱障害の一因となり得る過程を報告している。したがって、抗酸化剤を投与することで酸化ストレスを抑制し、将来的には腱障害の予防に応用できると考えた。抗酸化剤の 1 つであるアポシニンは NOX 阻害剤であり、効果的に ROS の産生を低下させることができると報告されているが、腱細胞に対しての使用報告は過去にない。本研究の目的は、*in vitro* においてラット腱細胞に対して糖負荷による酸化ストレスを加え、アポシニンを投与し、その影響について検討を行うことである。

#### 【材料と方法】

8 週齢の正常 SD ラットからアキレス腱を採取し、腱細胞を分離・培養した。培養液の糖濃度が 12 mM を regular-glucose 群 (RG 群)、25 mM を high-glucose 群 (HG 群) として培養を行った後にアポシニンを投与し、以下の 4 群を設定した。(1) RG apo- (コントロール) 群、(2) RG apo+群 (RG 群にアポシニン投与)、(3) HG apo-群 (HG 群にアポシニン非投与)、(4) HG apo+群 (HG 群にアポシニン投与)。アポシニン投与後 48 時間で Real-time PCR 法によって NOX-1、NOX-4、IL-6 の遺伝子発現を検証し、投与後の酸化ストレス応答を評価した。また、WST-assay で細胞増殖活性を、TUNEL 法でアポトーシス発現を、蛍光免疫染色で ROS 産生を評価した。

#### 【結果】

Real-time PCR 法では HG apo-群では RG 群と比較して、有意に NOX-1、NOX-4、IL-6 の上昇を認めた。HG 群間での比較においては HG apo+群では有意に NOX-1、NOX-4、IL-6 の発現は抑制された。WST-assay では RG 群間での比較において RG apo+群で有意に細胞増殖活性の上昇を認めた。HG 群間での比較においては HG apo+群で有意に細胞増殖活性の上昇を認めた。TUNEL 法では HG apo-群で RG 群と比較して、有意に発現の上昇を認めた。HG 群間での比較においては HG apo+群では有意に発現が低下した。蛍光免疫染色では、HG apo-群では RG 群と比較して有意に ROS 産生の増加を認めたが、HG 群間での比較においては HG apo+群で有意に ROS 産生は減少した。

### 【討論】

腱細胞においては糖負荷によって細胞外マトリックスの分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs; matrix metalloproteinases) の発現が亢進することが知られている。高血糖状態が腱細胞での MMPs 発現と細胞外マトリックスの分解を亢進させることで腱付着部症や腱損傷といった腱障害を引き起こすと考えられている。また、糖尿病患者のアキレス腱では非糖尿病患者との比較で、免疫染色において I 型コラーゲンの密度や血管内皮増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) および核内因子 κ B (NF κ B; nuclear factor kappa B) の発現が増加していることが報告されており、高血糖状態は腱での炎症反応を惹起することも腱障害の要因であると言える。

高血糖状態ではプロテインキナーゼ C (PKC; protein kinase C) の活性化を経て NOX が活性化されることで ROS が產生され、組織障害を引き起こすことは腎臓や心血管系など多臓器において報告されており、我々も過去に腱細胞に対して糖負荷を行うことで、NOX や IL-6 の発現上昇や ROS 產生の増加を認めたことを報告している。

抗酸化剤であるアボシニンは NOX 阻害剤であり、ROS 產生のダウンレギュレーターとしての有効性は腎血管内皮細胞や心筋細胞などで報告されているが、これまでに腱細胞での使用報告はない。本研究ではアボシニンが腱細胞においても糖負荷による酸化ストレスモデルに対して NOX1 と NOX4 の発現を抑制し、ROS 产生を低下させた。また、アボシニンの投与によって IL-6 やアポトーシスの発現が低下したことは、ROS 产生の低下に伴う抗炎症効果やアポトーシス抑制効果の影響であり、その結果として細胞増殖活性の増加を認めたものと考えられた。

本研究はあくまでも実験レベルの枠を超えるものではないことを強調しなければならない。臨床使用に関しては今後さらなる研究が必要である。特に本研究は細胞での研究であり、アボシニンが生体内で同様の抗酸化作用を示すかどうかについては動物実験での評価は当然ながら必要である。さらにアボシニンの作用機序をより明らかにするために、アボシニンの拮抗薬を用いた研究も必要となるかもしれない。

### 【結論】

本研究では糖負荷による酸化ストレスモデルに対してアボシニンは腱細胞で NOX を阻害し、ROS 产生を低下させた。また、ROS 产生の低下に伴い、抗炎症効果やアポトーシス抑制効果を示し、細胞増殖活性も増加させることが示唆された。アボシニンの抗酸化作用は糖尿病性腱障害の治療薬としての可能性が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2936号	氏名	黒澤 兜
論文題目 Title of Dissertation	Evaluation of apocynin in vitro on high glucose-induced oxidative stress on tenocytes  高血糖ストレスモデルを用いたラット腱細胞におけるアポシニンの抗酸化作用の検討		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	辻 仁昌也	
	副査 Vice-examiner	寺谷 浩人	
	副査 Vice-examiner	藤井 郁夫	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

糖尿病は様々な筋骨格系障害との関連性が報告されており、臨床の現場において遭遇することは少なくない。特に上肢領域では肩の腱板損傷や手指の腱障害が ADL 障害の原因となることが多い、近年、糖尿病性腱障害として注目されている。高血糖状態はニコチンアミドアデニジヌクリオチドリン酸オキシダーゼ (NOX: NADPH oxidase) を介して活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) を産生し、組織障害を引き起こすことがすでに知られているが、研究者らのグループは過去に腱細胞に対して糖負荷を行うことで、NOX の発現と ROS の産生が増加することを確認し、高血糖状態が腱障害の一因となり得る過程を報告している。今回、研究者らは ROS の産生を抑制することにより糖尿病性腱障害の治療に応用することが可能であると考え、糖負荷による酸化ストレスモデルを用い、腱細胞におけるアポシニンの抗酸化作用の影響について検討した。

## 【材料と方法】

8 週齢の正常 SD ラットからアキレス腱を採取し、腱細胞を分離・培養した。培養液の糖濃度が 12 mM を regular-glucose 群 (RG 群)、33 mM を high-glucose 群 (HG 群) とし、培養後にアポシニン 100 μM を投与し、以下の 4 群を設定した。(1) RG apo- (コントロール) 群、(2) RG apo+群 (RG 群にアポシニン投与)、(3) HG apo- 群 (HG 群にアポシニン非投与)、(4) HG apo+群 (HG 群にアポシニン投与)。投与後 48 時間で Real-time qPCR 法で NOX-1、NOX-4、Interleukn-6 (IL-6) の遺伝子発現を、WST-assay で細胞増殖活性を、TUNEL 法でアポトーシスの発現を、蛍光免疫染色で ROS の産生を評価した。統計学的解析として一元配置分散分析を行い、事後解析にはフィッシャーの最小有意差法を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とした。

## 【結果】

Real-time qPCR 法では HG apo- 群では RG 群と比較して、有意に NOX-1、NOX-4、IL-6 の上昇を認めた (p<0.05, p<0.05, p<0.05)。HG 群間での比較においては HG apo+群では有意に NOX-1、NOX-4、IL-6 の遺伝子発現は抑制された (p<0.05, p<0.05, p<0.05)。WST-assay では RG 群間での比較において RG apo+群で有意に細胞増殖活性の上昇を認めた (p<0.05)。HG 群間での比較においては HG apo+群で有意に細胞増殖活性の上昇を認めた (p<0.05)。TUNEL 法では HG apo- 群で RG 群と比較して、有意にアポトーシスの発現は上昇した (p<0.05)。HG 群間での比較においては HG apo+群で有意にアポトーシスの発現は低下した (p<0.05)。蛍光免疫染色では、HG apo- 群では RG 群と比較して有意に ROS 産生の増加を認めたが (p<0.05)、HG 群間での比較においては HG apo+群で有意に ROS 産生は減少した (p<0.05)。

**【考察ならびに結論】**

アボシニンは過去に腎血管内皮細胞や心筋細胞などでの使用報告はあるが、腱細胞での使用報告はなく、研究者らは今回初めて腱細胞に対して使用した。本研究ではアボシニンが腱細胞においても糖負荷による酸化ストレスに対して NOX-1 と NOX-4 の発現を抑制し、効果的に ROS の産生を抑制した。また、IL-6 の発現やアポトーシスの発現も抑制したことより ROS の産生が低下することにより、抗炎症効果やアポトーシス抑制効果を示し、その結果、細胞増殖活性の増加を認めたと考えられた。臨床応用については動物実験をはじめとして更なる研究が必要ではあるが、今回の研究によりアボシニンの抗酸化作用は糖尿病性腱障害の治療薬として有用である可能性が考えられた。

本研究は、糖負荷による酸化ストレスモデルに対するアボシニンの抗酸化作用を研究したものであるが、従来行われていなかった腱細胞に対するアボシニンの抗酸化効果を初めて証明した報告であり、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。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。