

ラット卵巢摘出モデルを使用した更年期障害における腱鞘炎発症の分子メカニズムの解明

The effect of estrogen deficiency in rat Achilles tendinitis model

————— 西本華子^{1,2)}・乾淳幸²⁾・上羽岳志³⁾・国分毅²⁾・黒坂昌弘²⁾・酒井良忠^{1,3)}

腱鞘炎は重労働や手の使いすぎで発症することが多く、中でも中高年の女性に多く見られ、女性ホルモンバランスの変化がその発症の一因であると考えられている。本研究はエストロゲン欠乏の代表的実験モデルである卵巢摘出 (OVX) ラットを使用し、腱に炎症刺激を加え、腱鞘炎の生じるメカニズムを明らかにすることを目的とした。SD-rat、14週齢32匹(2群、N=16)を使用、Control群に対しては、右アキレス腱にCollagenase (0.5mg/Tendon)を注射し、OVX群に対しては、OVX処置後、同様に注射した。評価時期は2, 4週にsacrificeし組織学的評価、遺伝子学的評価を行った。2週時点のOVX群において、Control群では見られない注入部位を中心とした膠原線維様の組織の配列の乱れ・断裂が見られ、炎症細胞様細胞が浸潤し、変性過程で生じる軟骨化生が見られた。炎症マーカーであるIL-6の発現が、有意に上昇していた。卵巢摘出したRatの腱鞘炎モデルでは炎症が強く見られ、炎症が遷延化する傾向があった。エストロゲン補充が腱鞘炎の予防・治療に有効である可能性が示唆された。

Introduction: Tendinitis in elbow or forearm highly affects female population in middle age. Estrogen is the primary female sex hormone that is responsible for the development and regulation of the female reproductive system as well as metabolism of other organs. Estrogen deficiency affected the mechanical property of tendon. However, the molecular change of tendon tissue after estrogen deficiency has not been fully understood. In present study, we used an ovariectomized (OVX) rat and assessed its effect on tendinitis tissue.

Methods: OVX rat which is widely known as osteoporosis model was used as animal model. Fourteen weeks old animal was used for the study, and divided into two groups, control group and OVX group. Under general anesthesia, bilateral ovariectomy was performed in OVX group. To induce tendinitis, collagenase was injected into right Achilles tendon. Achilles tendons were harvested and analyzed at 2 and 4 weeks after the surgery.

Results: Attenuation of collagen fibers with misalignment of nucleus were observed 2 weeks after the treatment. These findings became to normal appearance at 4 weeks. Gene expression of IL-6 was higher in OVX group at 2 weeks after the treatment.

Discussion: Estrogen deficiency might cause inflammation and tendon degeneration.

Key words: estrogen deficiency, ovariectomized (OVX) rat, tendinitis

Hanako Nishimoto^{1,2)}, Atsuyuki Inui²⁾, Takeshi Ueha³⁾, Takeshi Kokubu²⁾, Masahiro Kurosaka²⁾, Yoshitada Sakai^{1,3)}

1)神戸大学医学部附属病院リハビリテーション部 2)神戸大学大学院医学研究科整形外科学 3)神戸大学大学院医学研究科リハビリテーション機能回復学

1)Department of Rehabilitation Medicine, Kobe University Hospital, 2)Department of Orthopedic Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, 3)Division of Rehabilitation Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

1. はじめに

腱鞘炎は重労働や手の使いすぎで発症することが多く、整形外科を受診する非常に頻度の高い疾患のうちの一つである。病理学的には繰り返されるストレスにて腱の微細断裂が発症し、そこに炎症細胞が侵入、炎症性サイトカインを放出し、その結果、コラーゲンを中心とした細胞外マトリクスが変性するとされている。

腱鞘炎の発症は女性に多く、妊娠・出産を契機とした発症や、更年期にも好発する事から女性ホルモンバランスの変化がその発生に関係すると考えられている。更年期女性の代表的愁訴に手足の痛みが挙げられる。多くの症例では腱や靭帯付着部に圧痛を認める以外に有意な所見がなく、診断や治療に難渋する事が少なくない。また、女性では腱の脆弱性があり、手の過度の使用で損傷を受けやすいとも言われている¹⁾。

整形外科では腱鞘炎の治療として、局所の安静や鎮痛剤の内服、局所へのステロイド剤の投与が行われ、これらが無効の場合、外科的治療として腱にかかる圧力軽減を目的に腱鞘切開術・滑膜切除が行われることもある。

腱鞘炎と女性ホルモンの関連性についてはいくつかの報告があり、腱にはエストロゲン受容体が発現しているとの報告²⁾や、エストロゲン補充療法中の女性のコラーゲン合成能は高いとの報告³⁾、乳がん患者の治療としてエストロゲン合成酵素阻害剤であるアロマターゼ阻害剤を投与すると、腱鞘炎や関節炎を好発することが報告⁴⁾されているが、その詳しいメカニズムについては解明されていない。閉経に伴うエストロゲン欠乏が骨代謝を変化

させ、骨粗鬆症を生じることが広く一般に知られている。また、骨以外の運動器を構成する細胞の代謝にも影響を与える事は報告されているが、腱付着部における炎症メカニズムについて直接的に研究した報告はいままでにない。

本研究ではエストロゲン欠乏の代表的実験モデルである卵巣摘出 (OVX) ラットの腱に炎症刺激を加えた OVX+ 腱付着部炎モデルを使用した。性ホルモンバランスの変化が腱付着部における脆弱性や炎症性サイトカインの発現を生じているとの仮説に基づいて、腱付着部の組織学的・分子生物学的解析を行った。

2. 方法

SD ラット、14 週齢 32 匹 (2 群、N=16) を使用した。control 群と、両側卵巣摘出群 (OVX 群) (各々 16 匹) に分けた。全身麻酔下にて、OVX 群に対して、両側卵巣摘出術を施行した。腱鞘炎モデルとするために両群ともに右アキレス腱に Collagenase (0.5mg/Tendon) を注射し Cage 内では、自由に行動させたのちに評価時期として 2, 4 週に sacrifice し、腱組織を採取した。組織学的評価は H-E 染色、Safranin-O 染色を行った。遺伝子発現解析は Real time PCR を用いて、腱組織においては炎症のマーカーとなりうる MMP-2, 9, IL-6 について発現を検討した。

3. 結果

組織学的評価 HE 染色 (図 1)

2 週時点において、OVX 群は、コラゲナーゼ注入部位を中心に膠原線維様の組織の配列の乱れ、断裂が見られ、炎症細胞様の細胞の浸潤が著明に

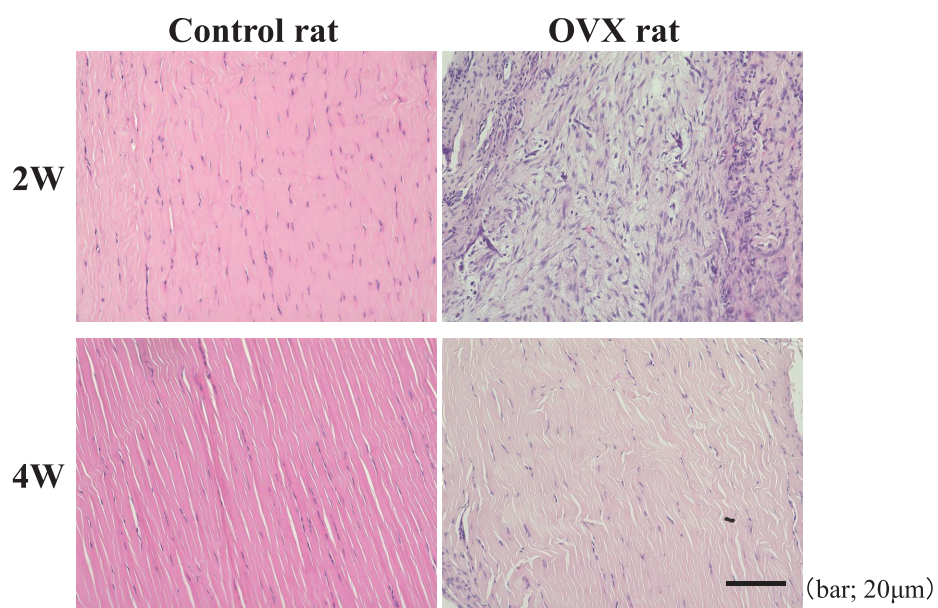


図1. 組織学的評価 HE 染色

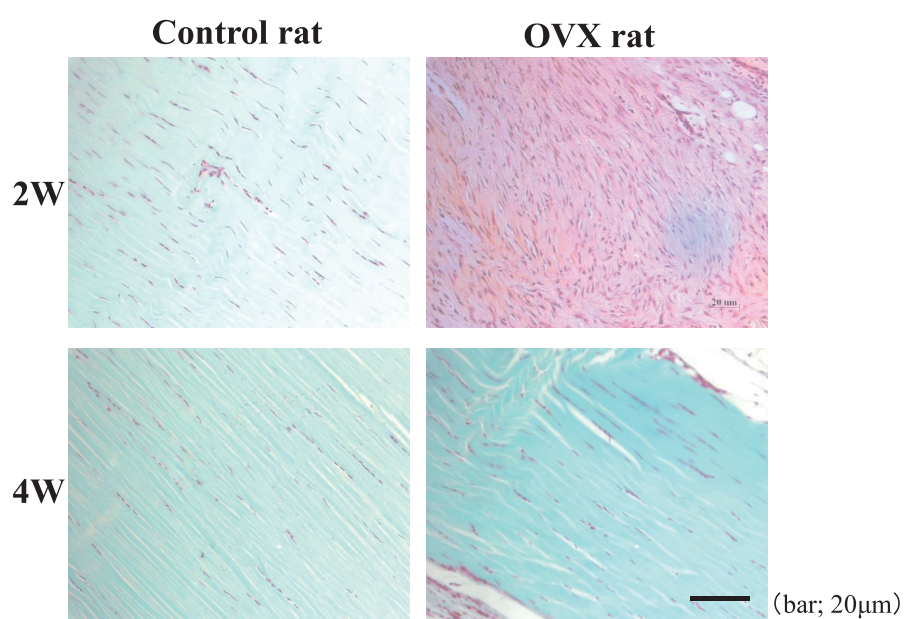


図2. 組織学的評価 サフラニン-O 染色

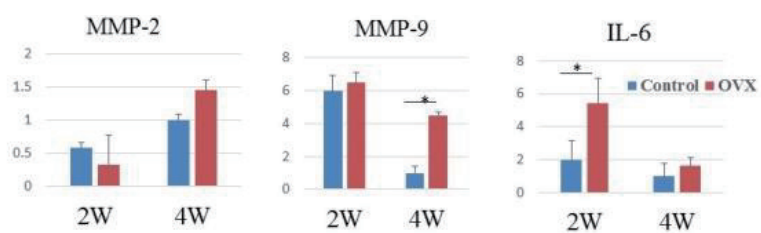


図3. Real time PCR

見られた。Control 群では、やや配列の乱れは見られるものの明らかな炎症細胞は見られなかった。4 週時点において、OVX 群は、膠原線維様の組織の配列の断裂は見られなくなり軽度の配列の乱れが見られるのみであった。Control 群では、ほぼ正常の腱組織と変わらなかった。

組織学的評価 サフラニン-O 染色 (図2)

2 週時点の OVX 群にて、腱鞘炎に伴うコラーゲンの断裂とその変性過程で見られるサフラニン-O で赤く染まる軟骨化生が見られた。その他の群では、この現象は見られなかった。

Real time PCR (図3)

MMP-9 は、両群ともに、2 週で発現上昇したが、4 週時点で、Control 群では有意に発現が減少していた。OVX 群では炎症が遷延化する傾向にあった。

炎症のマーカーである、IL-6 が OVX 群の 2 週において、Control 群と比較して有意に発現の上昇が見られた。

4. 考察

閉経期におけるエストロゲン欠乏によって様々な症状がもたらされることが分かっている。特に骨、筋骨格系の疾患としては、骨粗鬆症、および、骨脆弱性による大腿骨近位部骨折などが良く報告されているが、アキレス腱の断裂の報告などにおいて、女性の腱断裂の年齢の分布は、閉経以後に偏っていることなどから、腱に対してもエストロゲンは作用している可能性が指摘される報告が見られる。

エストロゲン欠乏と腱に関しては、Torricelli らは、Rat において、若い個体に比較して、老化した個体および、OVX (卵巣摘出) 群では、有意に、tenocyte の細胞増殖能が低下していることを報告している⁵⁾。また、Aydin らは、エストロゲンの減少が、筋骨格系の細胞の apoptosis を誘導することを報告している⁶⁾。また、加齢の腱にもたらす影響として、老化したRatに運動負荷をさせたところ、Cellularity と Vascularity が増加した組織像が見られ、老化によって腱は運動負荷に対して炎症を起こしやすくなるということが報告されている⁷⁾。

腱は、さまざまな条件が重なり、腱鞘炎を引き起こす。腱鞘炎は、Early Inflammatory phase、Proliferative phase、Remodeling phase の過程で修復、治癒に至る。今回の実験結果から、OVX 群では、Early Inflammatory phase において炎症が強く見られ、更に炎症が遷延化する傾向にあると考えられた。エストロゲン欠乏状態の腱組織は、炎症に対する耐性が低いことにより腱鞘炎を発症しているのではないかと考えられた。

本実験より、卵巣摘出した Rat の腱鞘炎モデルでは炎症が強く見られ、炎症が遷延化する傾向があることが示唆された。従来の治療に加えて、エストロゲン補充が腱鞘炎の予防・治療に有効である可能性が示唆された。

[文献]

- 1) Robbins JL, Duscha BD, Bensimhon DR et al.: A sex-specific relationship between capillary density and anaerobic threshold, *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1181-6.
- 2) Hart DA, Archambault JM, Kydd A, Reno C, Frank CB, Herzog W. : Gender and neurogenic variables in tendon biology and repetitive motion disorders, *Clin Orthop Relat Res*.1998 Jun;(351):44-56.
- 3) Hansen M, Kongsgaard M, Holm L, et al.: Effect of estrogen on tendon collagen synthesis, tendon structural characteristics, and biomechanical properties in postmenopausal women, *J Appl Physiol* 2009;106: 1385-1393.
- 4) Briot K, Tubiana-Hulin M, Bastit L, Kloos I, Roux C. : Effect of a switch of aromatase inhibitors on musculoskeletal symptoms in postmenopausal women with hormone-receptor-positive breast cancer: the ATOLL (articular tolerance of letrozole) study, *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Feb;120(1):127-34.
- 5) Torricelli P, Veronesi F, Pagani S et al.: In vitro tenocyte metabolism in aging and

oestrogen deficiency, *Age (Dordr)*. 2013 Dec;35(6):2125-36.

- 6) Aydin A, Kenar H, Atmaca H et al.: The short- and long- term effects of estrogen deficiency on apoptosis in musculoskeletal tissues: an experimental animal model study, *Arch Iran Med*. 2013 May;16(5):271-6.
- 7) Kietrys DM, Barr-Gillespie AE, Amin M, Wade CK, Popoff SN, Barbe MF.: Aging contributes to inflammation in upper extremity tendons and declines in forelimb agility in a rat model of upper extremity overuse, *PLoS One*. 2012;7(10):e46954.