

令和元年6月13日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00844

研究課題名(和文) 機能性食品であるグルコサミンの抗炎症作用の分子メカニズム

研究課題名(英文) molecular mechanisms of glucosamine for anti-inflammatory action

研究代表者

染谷 明正 (SOMEYA, AKIMASA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90167479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：グルコサミンが抗炎症作用を発揮するための分子メカニズムについて関節滑膜細胞を用いて検討した。そして炎症を引き起こす分子の産生に関わる転写因子nuclear-factor of κ B (NF- κ B)や、NF- κ Bの活性化に関わるinhibitor of κ B kinase (IKK)を抑制することが分かった。そして、その抑制には翻訳後修飾のひとつ、糖化修飾[O-N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾]が関与していることが分かった。従ってグルコサミンがNF- κ BやIKKのO-GlcNAc修飾を起こすことで、炎症誘発分子の産生を抑制し、抗炎症作用を発揮することが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症は老化とともに起こる様々な疾患や、生活習慣病、がんなどの多彩な疾患の基盤病態と考えられている。したがって慢性炎症を制御することが、これら疾患の予防につながる。本研究成果は、炎症抑制効果をもち長期服用可能なグルコサミンがサプリメントとして慢性炎症の予防に有効である可能性を示している。さらに新しい抗炎症薬の開発にO-GlcNAc修飾がターゲットとなりうることを示した点で意義がある研究成果と思われる。

研究成果の概要(英文)：Glucosamine (GlcN), a natural amino monosaccharide, is used as a nutritional supplement for 'joint health', and anti-inflammatory action of GlcN is involved in its protective action of joint disorder. In this study, we examined the molecular mechanisms of GlcN for exerting the anti-inflammatory action.

GlcN inhibited the nuclear-factor of κ B (NF- κ B), an important transcription factor for the production of inflammatory mediators, and the inhibitor of κ B kinase (IKK), an upstream regulator of NF- κ B. GlcN induced the O-linked-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of NF- κ B and IKK. O-GlcNAc modification was involved in the regulation of NF- κ B and IKK functions. From these results, GlcN is inferred to inhibit the expression of inflammatory mediators via the O-GlcNAc modification of NF- κ B and IKK.

研究分野：生化学

キーワード：グルコサミン 抗炎症 O-GlcNAc修飾 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに増加するロコモティブシンドローム(運動器症候群)や、がん、動脈硬化、肥満、アルツハイマー病など、種々の疾患の発症や進展には慢性炎症が関わりと考えられている。したがって慢性炎症を制御することが、これら疾患の予防につながり、そのための方法のひとつとして機能性食品が考えられている。近年、機能性食品が注目され、それには2015年から始まった機能性表示食品制度が関わっている。すなわち、この制度により科学的根拠があれば届け出により機能性を表示でき、短期間で機能性食品として世の中に供給できるようになったためである。

グルコサミンは関節の痛みや違和感など、歩行に支障をきたす症状を緩和することを期待し、サプリメントとして使用されている。さらにグルコサミンには、抗動脈硬化効果や美肌効果、抗老化効果があると考えられ、健康に役立つ成分として期待される。そしてこれらグルコサミンの効果には、抗炎症作用が関与していると考えられる。

我々は、グルコサミンの抗炎症作用について研究を進めている。これまでにグルコサミンがラットの関節炎や大腸炎を抑制することを明らかにしている(文献1,2)。またグルコサミンは、炎症惹起に関わる細胞内シグナル分子、nuclear factor- κ B(NF- κ B)や p38 mitogen-activated protein kinase(p38MAPK)を抑制することを報告している(文献3,4)。さらにヒト関節滑膜細胞株を用いた実験で、グルコサミンが炎症性サイトカイン産生をタンパク質の糖化修飾[*O*-N-アセチルグルコサミン(*O*-GlcNAc)修飾]を介して抑制することを報告している(文献5)。*O*-GlcNAc修飾は様々な細胞機能の調節に関わる翻訳後修飾であり、これまでに多くのタンパク質が報告されている。NF- κ Bも*O*-GlcNAc修飾を受けることで機能が調節されると考えられている。しかしグルコサミンがどのようなタンパク質の*O*-GlcNAc修飾を介して抗炎症作用を発揮するのか、その標的となるタンパク質や詳細な作用機序は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究ではグルコサミンの炎症抑制メカニズムを調べる。そのため炎症の惹起に関わるNF- κ Bを中心としたシグナル分子に対して、グルコサミンがどのような影響をおよぼすのか、またグルコサミンの炎症抑制作用に対してどのように*O*-GlcNAc修飾が関わっているのかを検討する。このようにしてグルコサミンが抗炎症効果を発揮するメカニズムを調べることで、グルコサミンの機能性(すなわち抗炎症作用)の科学的根拠を明らかにする。さらに、新しい抗炎症薬や機能性食品を開発するためのターゲットとしての*O*-GlcNAc修飾の有効性を調べる。

3. 研究の方法

(1) 細胞とその処理

ヒト関節滑膜細胞株 MH7A は、10% ウシ胎児血清(FBS)、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地(11.1mM グルコースを含む)で継代・維持した。実験に用いるときは、培地を 5% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 (1.5mM グルコースを含む)に変えて行った。予備試験で MH7A 細胞を 5 mM グルコサミンで 17 時間処理すると、多くのタンパク質の*O*-GlcNAc修飾が上昇することを確認した。そこでサイトカイン産生と*O*-GlcNAc修飾を調べるときは、MH7A をグルコサミン(5mM)と 3 時間処理後、IL-1 β (20pg/ml)で 14 時間刺激し、上清と細胞を回収した。一方、タンパク質のリン酸化と細胞内移行を調べるときは、MH7A をグルコサミンで 17 時間処理後、IL-1 β (200pg/ml)で 15,30,60 分刺激し細胞を回収した。なお阻害剤の効果を調べるときは、グルコサミン添加 30 分前に加えた。

(2) 質量分析

グルコサミンで処理した細胞から Cell lysates を調整し、抗 p65 抗体を結合させたアガロースビーズで免疫沈降しサンプルを調整した。そして、プロテアーゼで断片化した後、質量分析により p65 と相互作用するタンパク質を同定した。

(3) ウェスタンブロットによる解析

p65 と相互作用するタンパク質の解析は、抗 p65 抗体で免疫沈降した後、p65 と共沈する p50, I κ B α , I κ B β および I κ B ϵ をそれぞれ抗体で検出した。p65、p38MAPK、I κ B α および IKK β の*O*-GlcNAc修飾状態の検討は、それぞれのタンパク質に対する抗体で免疫沈降したのち*O*-GlcNAc修飾抗体で行った。p65、I κ B α および IKK β のリン酸化はそれぞれの特異的抗体で検出した。NF- κ B の核移行は核画分を調製し、核内の p65、p50 を抗体で検出した。

(4) サイトカイン産生

細胞培養上清の IL-8 産生は enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) で定量した。

(5) 変異体の発現による解析

IKK β の*O*-GlcNAc修飾部位を変異させたタンパク質を発現させるベクターと、内在性 IKK β をノックダウンさせるための siRNA を同時に細胞内に導入した。そして細胞培養上清および cell lysate を調整し、培養上清中の IL-8 産生を ELISA で、また cell lysate 中の IKK β の*O*-GlcNAc修飾とリン酸化をウェスタンブロットで調べた。

4. 研究成果

最初に複数の細胞株を用いて、グルコサミンの効果を IL-8 産生の抑制と、タンパク

O-GlcNAc 修飾の増加を指標に検討した。この時、培地中の FBS 濃度とグルコース濃度がグルコサミンの効果に影響を及ぼしたので、それぞれの濃度の検討を行い、グルコサミンで影響を受けやすい濃度である 5% FBS と 1.5 mM グルコースで実験を行うことにした。また予備試験の結果から、ヒト滑膜細胞株 MH7A がグルコサミンによる影響を調べるのに適切な細胞であると判断し実験に使用した。

(1) グルコサミンが NF- κ B や p38MAPK の活性化を阻害することを報告している。まず、これらタンパク質の O-GlcNAc 修飾に及ぼすグルコサミンの影響を調べた。その結果、NF- κ B (p65,p50 のヘテロダイマー) の p65 サブユニットはグルコサミンで O-GlcNAc 修飾されることが分かった(図 1)。

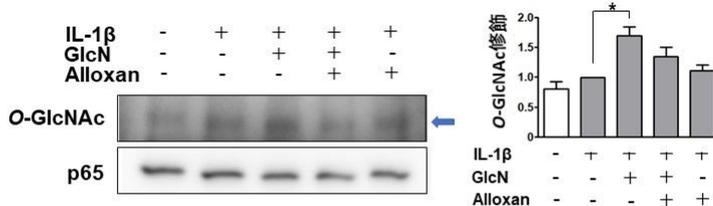


図1 グルコサミンによるNF- κ B p65のO-GlcNAc修飾

1)、一方、p38MAPK の O-GlcNAc 修飾はグルコサミンの有無に関係なく確認できなかった。次にグルコサミンで O-GlcNAc 修飾を受ける NF- κ B について、活性化に必要な p65 サブユニットのリン酸化や核移行に及ぼすグルコサミンの影響を調べた。IL-1 β 刺激後、経時的に調べたところ、リン酸化は刺激後 15 分から、また核移行は刺激後 30 分で観察され、これらは刺激後 60 分まで続いた。グルコサミンはこれらリン酸化や核移行を抑制した(図 2)。さらにグルコサミンによるこれら抑制効果は、O-GlcNAc 修飾酵素 (O-GlcNAc transferase, OGA) を阻害するアロキサンで O-GlcNAc 修飾を抑制することで消失した (図 2)。

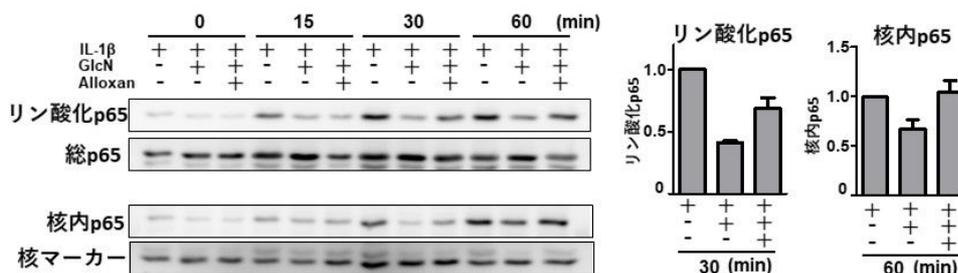


図2 NF- κ B p65のリン酸化と核移行に及ぼすグルコサミンの影響

従ってグルコサミンは p65 サブユニットの O-GlcNAc 修飾を介して、p65 のリン酸化や核移行を抑制している可能性が考えられた。

(2) 次に NF- κ B と他のタンパク質との相互作用に及ぼすグルコサミンの影響を調べるため、p65 抗体を用いて p65 と相互作用するタンパク質を免疫沈降させ、質量分析で網羅的に解析した。その結果、コントロール細胞 (グルコサミン未処理) では 323 種のタンパク質が同定された。その中には p50 (p65 とヘテロダイマーを形成している) と、NF- κ B 阻害タンパク質である inhibitor of κ B (I κ B) β および I κ B ϵ が含まれていた。一方、グルコサミンで処理すると 332 種類のタンパクが同定され、コントロール細胞で同定された p50, I κ B β , I κ B ϵ に加え、新たに I κ B α が同定された。従って、グルコサミンは p65 と I κ B α との intereaction の調節に関与している可能性が考えられた。

I κ B ファミリータンパクは炎症刺激によりリン酸化され、プロテアソームで分解される。その結果 NF- κ B は核に移行し、炎症性サイトカイン遺伝子の転写を開始する。次に I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ の IL-1 β 刺激による分解を調べた。その結果 I κ B α の分解が最も早く、IL-1 β 刺激後 30 分で明らかな分解 (60% 程度の分解) が起こり、グルコサミンはその分解を抑制した (図 3)。そして、アロキサンはグルコサミンによる I κ B α の分解抑制を消失させた。I κ B β , I κ B ϵ の分解は I κ B α の分解と比較して遅かった (それぞれ 60 分刺激で 30-40% 程度が分解された)。また、IL-1 β 刺激により I κ B α はリン酸化されたが、グルコサミンはこのリン酸化を抑制し、アロキサンはグルコサミンによるリン酸化の抑制効果を消失した(図 3)。

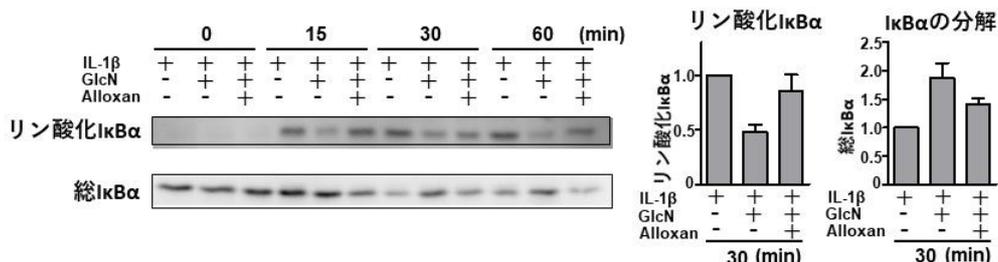


図3 I κ B α のリン酸化と分解に及ぼすグルコサミンの影響

これらの結果から、グルコサミンは I κ B α リン酸化を O-GlcNAc 修飾を介して抑制することで、プロテアソームによる分解を低下させていると考えられた。我々は I κ B α がグルコサミンで O-GlcNAc 修飾を受けるかを調べたが、グルコサミンの有無にかかわらず O-GlcNAc 修飾は確認できなかった。

(3) さらに I κ B のリン酸化酵素である I κ B kinase (IKK β) について調べた。まず IKK β はグルコサミンにより O-GlcNAc 修飾の増加が見られた (図 4)。また IKK β の活性化に必要なリン酸化を調べると、IL-1 β で 30 分刺激することでおこるリン酸化がグルコサミンで抑制され、アロキサンはグルコサミンによるリン酸化抑制効果を消失した (図 4)。これらの結果から、グルコサミンは IKK β リン酸化を O-GlcNAc 修飾を介して抑制すると考えられる。

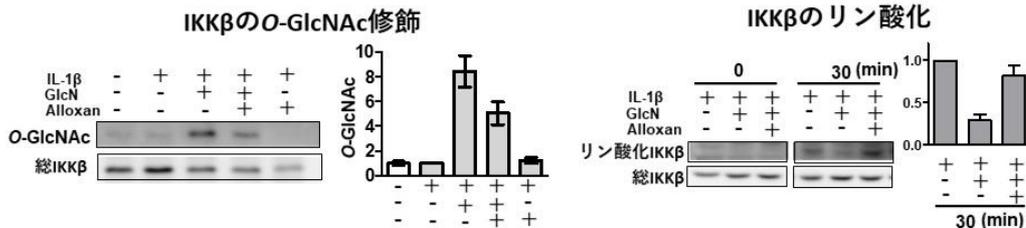


図4 IKK β の O-GlcNAc 修飾とリン酸化に及ぼすグルコサミンの影響

さらに IKK β の役割を解析するため、O-GlcNAc 修飾部位と考えられている 733 番目および 750 番目のセリン残基(S)をグルタミン酸(E)に変えた変異体 (S733E, S750E) を発現させた。するとグルコサミンでおこるリン酸化の抑制が、S750E を発現させた細胞では起こらなかった (図 5) さらにグルコサミンは IL-1 β 刺激で起こる IL-8 産生を抑制するが、その抑制効果も S750E 変異体を発現させることで弱くなった (図 5)。これらの結果は、グルコサミンのターゲット分子の一つとして IKK β が考えられ、グルコサミンが IKK β の 750 番目のセリン残基を O-GlcNAc 修飾することでリン酸化 (活性化) を抑制し、IL-8 産生を抑えている可能性が考えられた。

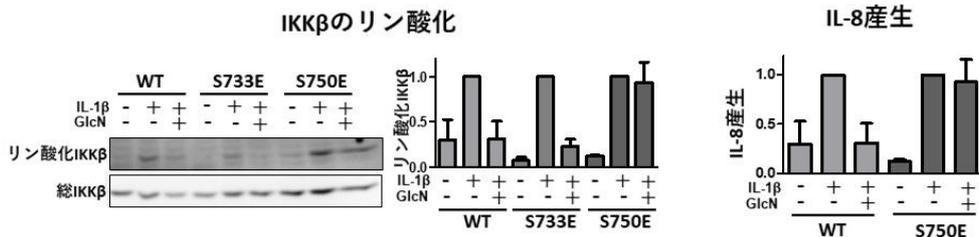


図5 グルコサミンの阻害効果に及ぼすIKK β 変異体発現の影響

(4) 本研究で得られた結果をまとめると、グルコサミンは、NF- κ B の p65 サブユニットや IKK β を直接 O-GlcNAc 修飾することが分かった。そしてグルコサミンは、NF- κ B のリン酸化や核移行を抑制し、その上流タンパク質である I κ B α のリン酸化や分解、さらに IKK β のリン酸化 (活性化) をそれぞれ O-GlcNAc 修飾依存的に抑制することが分かった (図 6)。

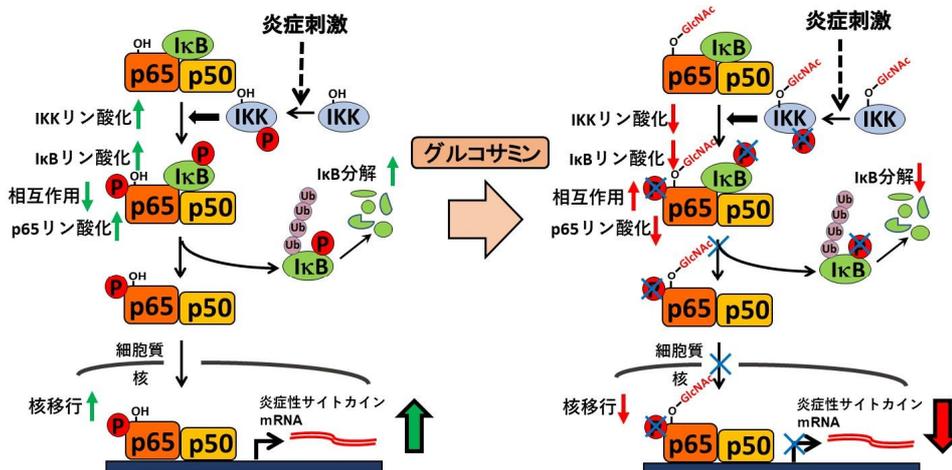


図6 グルコサミンによる炎症性サイトカイン発現抑制メカニズム

IKK β の変異体を用いた発現実験から、グルコサミンがIKK β を直接O-GlcNAc修飾することで炎症性サイトカインIL-8の産生を抑制することが推測された。従って、IKK β のO-GlcNAc修飾増加が、抗炎症薬を開発するためのターゲットの一つとなりうる可能性がある。一方、NF- κ B p65のO-GlcNAc修飾が、直接NF- κ Bの機能を阻害するのかは明らかではなく、上流タンパク質であるIKK β の活性低下が、NF- κ Bの機能抑制を起こしているのかもしれない。また、IKK β が直接NF- κ B p65をリン酸化・活性化することも報告されている。我々は、p65とIKK β との相互作用を免疫沈降法で調べたが、両タンパクの結合は確認できなかった。今後、グルコサミンによるNF- κ Bシグナル伝達系の抑制メカニズムについて、さらに多角的に研究する必要がある。

グルコサミンは多くのタンパク質をO-GlcNAc修飾する(文献6)。平成23-26年度科研費助成事業(課題番号23592232)では、グルコサミンが転写因子specific protein 1(Sp1)をO-GlcNAc修飾することで、炎症性サイトカイン産生が抑制することを報告している(文献6)。今後、グルコサミンが抗炎症作用を発揮するためのメカニズムを総合的に理解するため、O-GlcNAc修飾タンパク質の解析はもちろんメタボロミクス解析なども行い、代謝系全体に及ぼす影響を含め検討していきたい。

<引用文献>

- 1) Hua J, Suguro S, Hirano S, Sakamoto K, Nagaoka I: Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Inflamm Res* 54: 127-132, 2005
- 2) Yomogida S, Kojima Y, Tsutsumi-Ishii Y, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I: Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Int J Mol Med* 22: 317-323, 2008
- 3) Yomogida S, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I: Glucosamine suppresses interleukin-8 production and ICAM-1 expression by TNF- α -stimulated human colonic epithelial HT-29 cells. *Int J Mol Med* 22, 205-211, 2008
- 4) Hua J, Sakamoto K, Kikukawa T, Abe C, Kurosawa H, Nagaoka I. Evaluation of the suppressive actions of glucosamine on the interleukin-1 β -mediated activation of synoviocytes. *Inflamm Res* 56: 432-438, 2007
- 5) Someya A, Ikegami T, Sakamoto K, Nagaoka I: Glucosamine Downregulates the IL-1 β -Induced Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in Human Synovial MH7A Cells by O-GlcNAc Modification-Dependent and -Independent Mechanisms. *PLoS One* 24, e0165158, 2016
- 6) 染谷明正、坂本廣司、長岡 功:グルコサミンによる転写因子 Sp1 の O-N-アセチルグルコサミン修飾. *グルコサミン研究* 9: 48-52, 2013

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- 1) 染谷明正、坂本廣司、長岡 功、O-N-アセチルグルコサミン修飾を介したグルコサミンのNF- κ B 制御作用、日本未病システム学会雑誌、査読有、25、2019. 印刷中
- 2) 染谷明正、坂本廣司、長岡 功、滑膜細胞におけるグルコサミンの転写因子 NF- κ B の制御機構、*Functional food research*、査読有、15、2019. 印刷中

[学会発表](計11件)

- 1) 染谷明正、滑膜細胞におけるグルコサミンの転写因子 NF- κ B の制御機構、第15回ファンクショナルフード学会学術集会、2019.
- 2) 染谷明正、グルコサミンによるNF- κ B 阻害タンパクであるI κ B α の制御、第16回日本機能性食品医学学会総会、2018.
- 3) 染谷明正、グルコサミンによるO-N-アセチルグルコサミン修飾を介したNF- κ B の機能制御、第25回日本未病システム学会学術総会、2018.
- 4) 染谷明正、グルコサミンはO-GlcNAc修飾を介してNF- κ B の活性化と核移行を抑制する、第91回日本生化学会大会、2018.
- 5) Someya Akimasa、Glucosamine modulates the activation of NF- κ B via the O-linked-N-acetylglucosamine modification in synovial cells、14th International Chitin and Chitosan Conference、2018.
- 6) 染谷明正、グルコサミンによる転写因子NF- κ B の活性化抑制の作用メカニズム、第18回日本抗加齢医学会総会、2018
- 7) 染谷明正、滑膜細胞におけるグルコサミンによるO-GlcNAc修飾を介した転写因子NF- κ B の抑制、第15回日本機能性食品医学学会総会、2017.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長岡 功

ローマ字氏名：(NAGAOKA, isao)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60164399

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。