

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05479

研究課題名(和文) 機能性食品素材であるアセチルグルコサミンの抗炎症作用に関する分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the anti-inflammatory effect of acetylglucosamine

研究代表者

染谷 明正 (Someya, Akimasa)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：90167479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アセチルグルコサミン(NAG)の炎症抑制メカニズムについて、グルコサミン(GlcN)と比較しながら検討した。その結果、GlcNのみが短期間(16時間)処理で炎症性サイトカイン産生や炎症関連シグナル分子の活性化を抑制した。一方、弱い炎症状態でNAGまたはGlcNを長期間(3週間)処理すると両成分とも炎症性サイトカイン産生を抑制した。一方で炎症関連シグナル分子の活性化に対する影響は、両成分で異なっていた。したがってNAGとGlcNは、それぞれ異なる炎症抑制作用メカニズムを介して慢性的炎症に対し抑制的に作用する可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症は加齢性疾患をはじめ様々な病態の発症基盤と考えられている。したがって慢性炎症を抑制・制御することは、加齢とともに進む様々な身体異変の予防等に有効と考えられている。機能性表示食品であるNAGやGlcNは、予防的利用が可能で長期利用可能な成分である。したがってNAGやGlcNは老化とともに進行する様々な身体的不調の予防に使い、Quality of lifeの向上に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of the anti-inflammatory action of acetylglucosamine (NAG) was investigated by comparing it with glucosamine (GlcN). GlcN suppressed the production of inflammatory cytokines and the activation of inflammation-related signaling molecules after a short (16 h) administration, but not NAG. Long-term (3 weeks) administration of NAG or GlcN under weak inflammatory conditions suppressed inflammatory cytokine production in both NAG and GlcN. In contrast, the effects on activation of inflammation-related signaling molecules differed between NAG and GlcN. Therefore, we speculate that NAG and GlcN may act in an inhibitory manner against long-term inflammation via different anti-inflammatory mechanisms.

研究分野：生化学

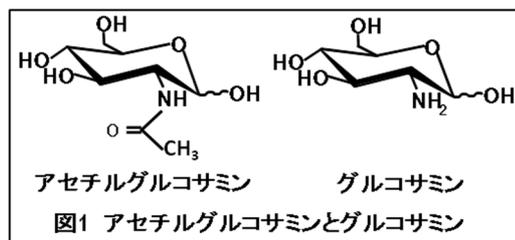
キーワード：アセチルグルコサミン グルコサミン 機能性食品成分 炎症 細胞内シグナル伝達 滑膜細胞

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、関節軟骨の変性・摩耗とともに滑膜炎が起き、関節の疼痛や機能障害が起こる。グルコサミン(GlcN, 図1)は、関節症状を緩和することから国内外で医薬品やサプリメントとして使用され、また関節の動きをサポートする成分として、機能性表示食品に届出られている。その作用は、軟骨保護作用や抗炎症作用によるものと考えられている。一方、アセチルグルコサミン(NAG, グルコサミンの類似体, 図1)も関節症状の緩和のためのサプリメントとして使用されている。しかしその分子メカニズムはグルコサミンと比較してわかっていないため、膝や関節をサポートする機能性表示食品の成分として、届出られていない。

これまでの申請者らの研究で、NAGは、GlcNと異なる分子メカニズムで抗炎症作用を発揮することが推測されているが、NAGの抗炎症作用発揮のための分子メカニズムは調べられていない。



2. 研究の目的

本研究では、まだわかっていないアセチルグルコサミンの抗炎症作用の分子メカニズムを解明し、グルコサミンの作用機序との違いを明らかにすることを目的とする。本研究が達成されることにより、アセチルグルコサミンの抗炎症作用メカニズムを解明できるとともに、関節機能に有効な機能性表示食品の素材として新たな位置づけができる。さらに、本研究で得られる結果は、新しい発想の機能性食品や抗炎症薬の開発や、新たな炎症調節機構の発見や考え方を提供できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：ヒト滑膜細胞株 MH7A を用いて in Vitro 実験を行った。MH7A を 10%ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地中で培養した。

(2) アセチルグルコサミン、グルコサミンの処理法：様々な条件検討を行い、以下に示す細胞処理法を確立した。

短期処理：細胞を GlcN または NAG で 16 時間処理後、インターロイキン(IL)-1 (200 pg/ml) で刺激し、培養上清および細胞を回収した。



長期処理：細胞を GlcN または NAG と 7 日間処理後、さらに IL-1 (20 pg/ml) を追加して 2 週間処理した。GlcN, NAG, IL-1 を最終交換後 24 時間の培養上清と細胞を回収した。



(3) 炎症性サイトカインの測定

炎症性サイトカインとして IL-6、IL-8 を、抗炎症性サイトカインとして Transforming growth factor (TGF)- 1 を Enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) で測定した。

(4) Western blot によるタンパク質解析

炎症性サイトカイン産生にかかわる代表的細胞内シグナル分子である Nuclear factor (NF)-B p65 サブユニット、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) p38 Mitogen-activated kinase (MAPK) をはじめ様々な炎症関連シグナル分子のタンパク質発現、およびそれぞれの活性状態(リン酸化状態)を western blot 法で解析した。

4. 研究成果

(1) NAGおよびGlcNの短期間(18時間)処理した時の影響。

これまでの実験で、方法に示した条件でGlcNを処理すると、細胞からの炎症性サイトカインおよびサイトカイン産生において中心的役割を担っているNF- B (p65, p50のサブユニットから

構成されている)の活性化(リン酸化)が抑制されることを明らかにしている。そこでまずNAGが同じ条件で同じような炎症抑制作用を示すかを調べた。その結果、GlcNはIL-6、およびIL-8の産生を有意に抑制したが、NAGはこれらサイトカイン産生に影響を及ぼさなかった(図2)。

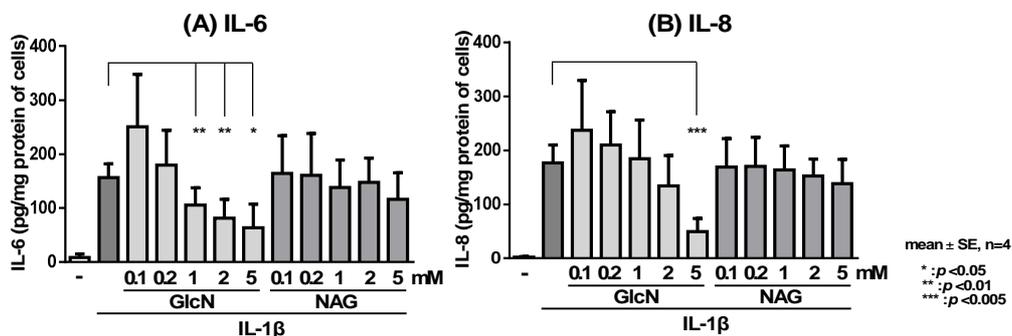


図2 NAGまたはGlcNの短期処理による炎症性サイトカイン産生への影響

また、NF- κ B p65サブユニットの活性化を調べると、GlcNは2 mMで有意な活性化抑制効果を示したが、NAGはそのような効果はなかった(図3)。このようにNAGは短期処理では抗炎症効果を示さなかった。

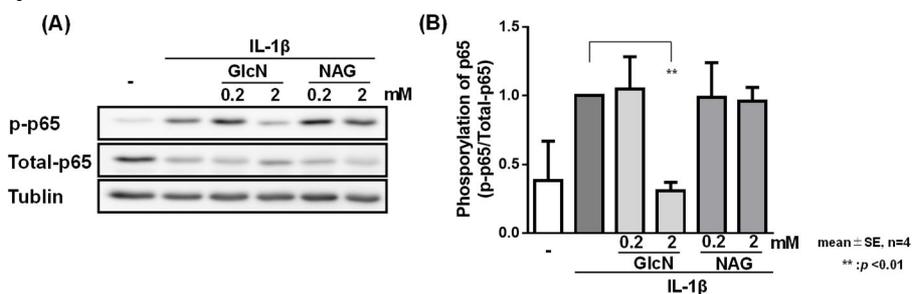


図3 NAGまたはGlcNの短期処理によるNF- κ B p65リン酸化への影響

(2) NAGおよびGlcNを長期間処理した時の影響。

次に、慢性炎症状態におけるNAGおよびGlcNの効果を調べるため、長期(3週間)処理と、弱い炎症刺激を併用させたときのNAGおよびGlcNの効果を調べた。その結果、NAGおよびGlcNは長期処理によりIL-6やIL-8の産生を短期処理と比べて、より低濃度から抑制することが分かった。また抗炎症性サイトカインであるTGF- β 1産生量は、NAG、GlcNにより上昇する傾向が認められた(図4)

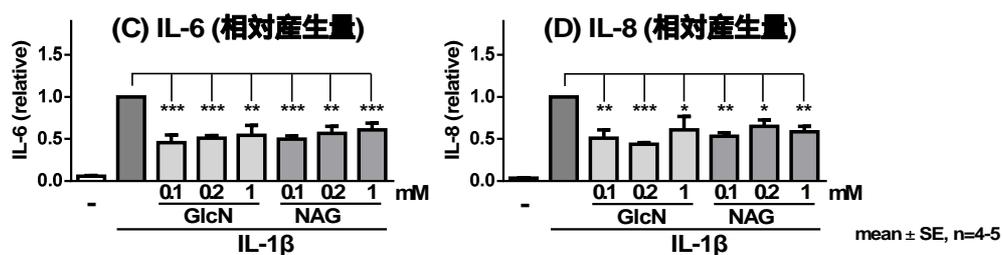


図4 NAGまたはGlcNの長期処理による炎症性サイトカイン産生への影響

シグナル伝達分子の活性化について調べると、NF- κ B p65を調べると総p65量に対するリン酸化の程度や、総リン酸化p65量はNAGのほうがGlcNよりもより強く抑制した(図5)。

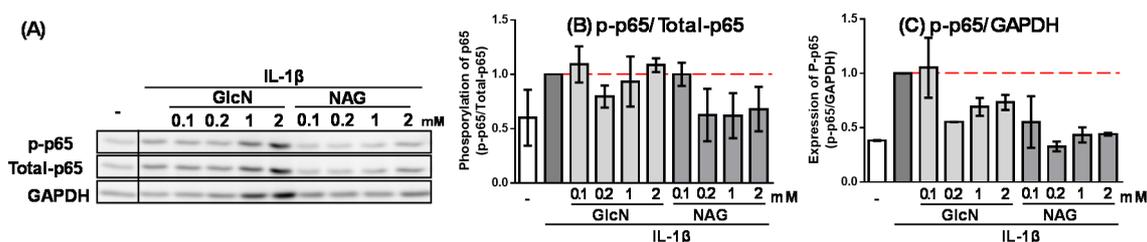


図5 NAGまたはGlcNの長期処理によるNF- κ B p65リン酸化への影響

申請者らはヒト試験において、NAG が GlcN の 1/3 の用量 (500 mg/日) で、軟骨保護作用を發揮した (引用文献 1)、また OA モデル動物での実験で、NAG が GlcN と同じく、抗炎症作用を介して関節症状の緩和に働いていることも報告している (引用文献 2)。しかし細胞を用いた *in vitro* 実験では、炎症関連分子の産生や、炎症に関わるシグナル伝達分子の活性化に対して効果に差がある結果を得ている。本研究の結果から、NAG は長期間処理することで、GlcN と同様に炎症性サイトカイン産生を抑制することが分かった。したがって NAG は長期間処理することで持続的な炎症を抑制したことから、GlcN とともに慢性炎症に対して抑制的に作用する可能性があることが推測された。その一方で、NF- κ B p65 サブユニットの活性化抑制効果や Erk の活性化抑制効果が NAG と GlcN で異なることから、各成分が炎症を抑制するためのターゲット分子や感受性が異なることが推測される。今後、タンパク質発現や遺伝子発現の網羅的解析を進めており、さらに抑制メカニズムを明らかにしたい。

<引用文献>

Tomonaga A et al: Evaluation of the effect of N-acetyl-glucosamine administration on biomarkers for cartilage metabolism in healthy individuals without symptoms of arthritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical study., *Exp Ther Med* 12: 1481-9, 2016.

Kubomura D et al: Evaluation of the chondroprotective action of N-acetylglucosamine in a rat experimental osteoarthritis model., *Exp Ther Med* 14: 3137-44, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamagishi Y, Someya A, Nagaoka I	4. 巻 13
2. 論文標題 Citrulline cooperatively exerts an anti-inflammatory effect on synovial cells with glucosamine and N-acetylglucosamine.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2020.1304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長岡 功, 染谷明正, 五十嵐 庸	4. 巻 24
2. 論文標題 機能性食品素材であるグルコサミンの軟骨保護作用 -抗炎症作用とオートファジー誘導作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FOOD Style 21	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長岡 功, 染谷明正	4. 巻 23
2. 論文標題 アスリートにおいて抗炎症作用を発揮する機能性食品素材	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FOOD Style 21	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功	4. 巻 25
2. 論文標題 グルコサミンの抗炎症作用についてのメカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 キチン・キトサン研究	6. 最初と最後の頁 31-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功	4. 巻 15
2. 論文標題 滑膜細胞におけるグルコサミンの転写因子NF- Bの制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Functional food research	6. 最初と最後の頁 67-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 染谷明正, 洲崎悦生, 長岡 功
2. 発表標題 N-アセチルグルコサミンによる炎症性サイトカイン産生の抑制 -グルコサミンとの比較-
3. 学会等名 第28回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功
2. 発表標題 グルコサミンによるNF- Bシグナリングの抑制メカニズム
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功
2. 発表標題 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- B阻害タンパク質I B の制御機構
3. 学会等名 第34回キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功
2. 発表標題 滑膜細胞におけるグルコサミンの転写因子NF- Bの制御機構
3. 学会等名 第15回ファンクショナルフード学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功
2. 発表標題 グルコサミンはO-N-アセチルグルコサミン修飾を介してI B 分解を抑制しNF- B作用を阻害する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功
2. 発表標題 グルコサミンによるNF- B抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第26回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功
2. 発表標題 グルコサミンによるIKK の活性抑制を介したNF- Bの制御
3. 学会等名 第17回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Someya A, Sakamoto K, Nagaoka I.
2. 発表標題 Glucosamine modulates the activation of NF- B via the O-linked-N-acetylglucosamine modification in synovial cells
3. 学会等名 14th International Chitin and Chitosan Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長岡 功 (Nagaoka Isao) (60164399)	順天堂大学・医療科学部・特任教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------