

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592232

研究課題名(和文) 滑膜細胞におけるグルコサミンのターゲット分子の同定とその分子メカニズム

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanisms of GlcN for antiinflammatory action in synovial cells.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グルコサミン(GlcN)は、変形性関節症の症状緩和のためサプリメントとして使用され、それには滑膜炎の抑制が関与すると考えられている。本研究では、GlcNの炎症抑制メカニズムについて検討した。GlcNは炎症性サイトカインIL-8の産生を抑制し、それには転写因子Sp1のO-N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾が関与することがわかった。そして、GlcNはSp1をO-GlcNAcすることで、その転写活性を低下し、また核内量を減少させる結果が得られた。したがってGlcNは、Sp1のO-GlcNAc修飾を介してIL-8産生を抑制することで抗炎症作用を発揮している可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：Glucosamine (GlcN) is widely used as a dietary supplement to treat osteoarthritis (OA) in humans. An anti-inflammatory action of GlcN is speculated to be involved in its protective actions on OA. However, its precise mechanism is not clear. In this research project, we examined the molecular mechanisms of GlcN for anti-inflammatory action in synovial cells. GlcN induced the O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of cellular proteins, and transcription factor Sp1 was identified as O-GlcNAc modified protein by GlcN. Sp1 was involved in the regulation of IL-8 production. Furthermore, GlcN moderated transcription activity of Sp1 and intranuclear amount of Sp1 via the O-GlcNAc modification. Together these observations suggest that GlcN alleviates synovial inflammation by the suppression of proinflammatory cytokines, such as IL-8, via O-GlcNAc modification of Sp1.

研究分野：生化学

キーワード：グルコサミン 抗炎症 滑膜細胞 O-GlcNAc修飾 機能性食品

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、加齢による関節構成要素の退行変性を基盤として、物理的負荷、外傷、形態異常、関節炎、リウマチ等が原因で発症する。その結果、関節軟骨の変性・摩耗とともに、滑膜炎・増殖が起る病状が悪化していく。現在、日本国内だけでも1千万人以上のOA患者がいると推定され、その治療として、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)の投与、関節内ヒアルロン酸注入、運動療法、装具療法、物理療法および人工関節置換術等が行われている。

グルコサミン(以下GlcN)は、OAや関節炎などの関節疾患の症状を緩和することが知られ、サプリメントとして各国で使用されている。このGlcNのOAに対する効果は、生体内でヒアルロン酸等のグルコサミノグリカンに変換されることで、結合・軟骨組織の強度、柔軟性、弾力性の維持に働いているためと推測されている。

一方、OAでは滑膜炎が併発し、その症状の進展・悪化には滑膜炎が関わっていることが知られている。そして申請者は、これまでにGlcNには抗炎症作用があることを明らかにしている。また、GlcNが関節炎や滑膜細胞の増殖を抑制することや、滑膜細胞からの炎症性メディエーターの産生を抑制することを報告している。したがって、GlcNは滑膜炎を抑制することでOA改善に働くのではないかと考えられる。さらに、GlcNは、さまざまなタンパク質に糖鎖を付加する作用 [O-N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾]があり、申請者はGlcNによるO-GlcNAc修飾が、炎症性サイトカインの産生抑制に関与することを見出した。したがって、これらの結果を考え合わせると、GlcNはタンパク質のO-GlcNAc修飾を介して炎症性サイトカイン産生や滑膜細胞増殖を阻害し、その結果、滑膜炎を抑制することがOAの症状緩和につながるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究課題では、GlcNによるOA症状緩和の作用メカニズムを、GlcNで引き起こされるタンパク質のO-GlcNAc修飾に着目し、解明することを目的とする。そのため(1)滑膜細胞から、GlcNのO-GlcNAc修飾によって発現が変動する遺伝子や、GlcNでO-GlcNAc修飾が影響されるタンパク質同定し、(2)GlcNのターゲット遺伝子やタンパク質のなかで、滑膜炎の抑制に関わる分子を決定し、(3)その炎症抑制のための分子メカニズムを探る。

3. 研究の方法

(1) 細胞および処理法

細胞はヒト関節滑膜細胞株MH7Aを用いた。細胞は、10% FBSを含むRPMI1640培地で培養・維持した。5 mM GlcN(D-グルコサミ

N塩酸塩を使用)で2.5時間処理した後、炎症惹起物質として知られるIL-1 β (15pg/ml)を用いて13時間刺激することで炎症を模倣した。その後、細胞および培養上清を回収し、以下の実験に使用した。なお阻害剤等はGlcN処理30分前に添加することで、その効果を調べた。

(2) 遺伝子発現変動の網羅的解析

GlcNによる遺伝子発現の変動をDNAマイクロアレイ法で網羅的に解析した。すなわちGlcN処理した細胞からtotal RNAを調製した。そしてRNAからcDNAを合成し、断片化、ビオチンラベル化した。このようにして得られたサンプルと、DNAマイクロアレイ(Affymetrix社製GeneChip Human Gene 1.0 ST)をハイブリダイゼーションした。そして蛍光染色後、アレイをスキャンし、得られたデータをGeneSpringソフトウェア(Agilent Technologies社)で解析した。また、DNAマイクロアレイの結果から、GlcNにより変動が認められたいくつかの遺伝子について、SYBR greenを用いたリアルタイム-PCR法で、マイクロアレイで得られた結果を確認した。

(3) O-GlcNAc修飾タンパク質の同定

免疫沈降と質量分析を組み合わせることで、O-GlcNAc修飾タンパク質を同定した。まず細胞破砕液を調製し、抗O-GlcNAc抗体(RL2)を用いてO-GlcNAc修飾タンパク質を免疫沈降させ、SDS-PAGE/銀染色で分離・検出した。そしてGlcN処理することで沈降量が増加したタンパク質について、ゲルから切り出しトリプシン消化した後、液体クロマトグラフ/質量分析にて同定した。

(4) 転写因子Sp1の解析

Sp1のO-GlcNAc修飾状態は、抗Sp1抗体でSp1を免疫沈降した後、SDS-PAGE/ウェスタンブロット法でO-GlcNAc修飾を検出することで調べた。IL-8産生はELISA法(R&D Systems社)で測定した。Sp1の転写活性は、Signal reporter assay kit(Qiagen社)を用いたルシフェラーゼ法で測定した。

Sp1の局在は、核および細胞質画分を調製したのち、SDS-PAGE/ウェスタンブロット法で調べた。

4. 研究成果

(1) GlcNのMH7A細胞に対する作用の検討

ヒト滑膜細胞株MH7Aは、IL-1 β 刺激により炎症性サイトカインIL-8を産生したが、GlcNはこのIL-8産生を抑制した。また、GlcN修飾することでタンパク質のO-GlcNAc修飾が増加した。これらグルコサミンによるIL-8産生の抑制とO-GlcNAc修飾の増加は、アロキサン(O-GlcNAc転移酵素阻害剤)によりO-GlcNAc修飾を低下させることでブロックされた。これらの結果から、GlcNによるIL-8産生抑制にはタンパク質のO-GlcNAc修飾が関与していることが推測された。

(2) グルコサミンによる遺伝子発現の変動

次に、GlcN により発現が変動する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、グルコサミン処理により発現が 1.5 分の 1 以下に低下した遺伝子は 187 種類、その中で 2 分の 1 以下に低下したものは 40 種類であった(表 1)。一方、グルコサミン処理により発現が 1.5 倍以上上昇した遺伝子は 194 種類、その中で 2 倍以上上昇したものは 53 種類であった。(表 1)。

表1 グルコサミンで発現が変動した遺伝子

発現が低下した遺伝子	遺伝子数
1/1.5 (GlcN/Control ≤ 1/1.5) 以下	187
1/2 (GlcN/Control ≤ 1/2) 以下	40
発現が上昇した遺伝子	遺伝子数
1.5 (GlcN/Control ≥ 1.5) 以上	194
2 (GlcN/Control ≥ 2) 以上	53

さらに、GlcN による遺伝子発現の変動に対するアロキサンを調べたところ、GlcN により発現が低下した遺伝子の 53.4% (100 遺伝子)が、また GlcN で発現が上昇した遺伝子の 71.6% (139 遺伝子)が、それぞれアロキサン処理することで、GlcN による変化が抑制された。さらに炎症性サイトカインの遺伝子発現に着目すると、TNF- α 、IL-6、IL-8 および IL-24 の遺伝子発現が、GlcN により低下した。そしてこれらサイトカインのなかで TNF- α 、IL-8 の遺伝子発現低下はアロキサンで回復したが、IL-6 および IL-24 遺伝子発現はアロキサンで回復しなかった。このようにグルコサミンは炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制するが、その機構のひとつとして GlcN によるタンパク質の O-GlcNAc 修飾が関与していることが推測された。

(3) O-GlcNAc 修飾タンパク質の同定

次に、GlcN により O-GlcNAc 修飾が促進されるタンパク質を免疫沈降/質量分析法で調べた。その結果、GlcN 処理することで、多くのタンパク質の免疫沈降量が増加した。そして、そのなかのひとつとして転写因子 Sp1 が同定された(図 1)。

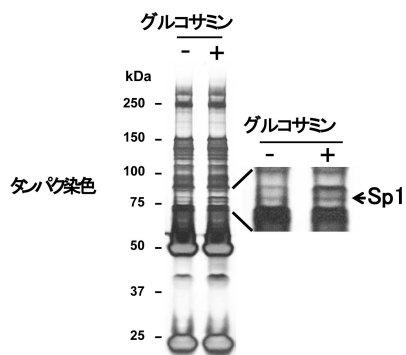


図1 グルコサミンによりO-GlcNAc修飾されるタンパク質の同定 (O-GlcNAc修飾抗体を用いた免疫沈降)

また、DNA マイクロアレイの結果を解析することで、GlcN により影響を受ける転写因子を予測すると、Sp1 によって転写調節を受ける遺伝子の発現が最も多く GlcN で変動した。したがって、遺伝子発現解析の結果からも GlcN が Sp1 の作用に影響している可能性が支持された。

(4) 転写因子 Sp1 に対する GlcN の影響

Sp1 の機能に対する GlcN の影響と O-GlcNAc 修飾との関わりに焦点を絞り検討した。

まず、GlcN による Sp1 の O-GlcNAc 修飾を調べると、Sp1 は GlcN により O-GlcNAc 修飾が増加した、そしてその増加はアロキサンにより阻害されることが確認できた。次に IL-8 産生におよぼす Sp1 阻害剤(ミトラマイシン A)の影響を調べると、ミトラマイシン A は IL-1 β 刺激による IL-8 産生を抑制した。

つぎに GlcN による Sp1 の転写調節抑制メカニズムについて検討した。まず Sp1 の転写活性におよぼす GlcN の影響を調べると、GlcN は Sp1 の転写活性を低下させた。そして、この活性の低下は、O-GlcNAc 修飾を阻害するアロキサンにより部分的に回復した(図 2)。

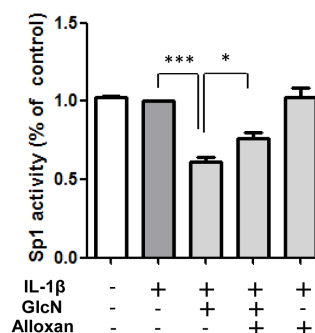


図2. Sp1の転写活性に対するグルコサミンとアロキサンの影響

さらに、Sp1 の発現に対する GlcN の影響を調べると、細胞内 Sp1 の総発現量は、GlcN およびアロキサンで影響されなかった。つぎに、Sp1 の細胞内分布を調べると、多くは核画分に存在していた。そして、GlcN は核画分に存在する Sp1 量を減少させ、さらにアロキサンは GlcN による核画分 Sp1 の減少作用を消失させた。

このように本研究の結果から、GlcN は滑膜培養細胞からの炎症性サイトカイン IL-8 の産生を抑制することがわかった。そして、この GlcN の抑制作用には、転写因子 Sp1 が O-GlcNAc 修飾されることによる転写活性の低下や、核内 Sp1 量の減少が関わると考えられた。このようなメカニズムにより、GlcN が IL-8 産生を抑制することで、OA の進展に関わる滑膜炎の抑制に寄与している可能

性が推測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. 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 2013, 9: 48-52. (査読無)
2. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, グルコサミンによる滑膜炎の分子制御メカニズム, 日本未病システム学会雑誌 2013, 19: 111-115. (査読有)
3. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, 滑膜細胞の遺伝子発現に対するグルコサミンの影響, グルコサミン研究 2012, 8: 24-32. (査読無)

[学会発表](計14件)

1. 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 の糖鎖修飾を介した IL-8 産生制御機構, 第12回機能性食品医学学会, 2014年12月13日, 国立京都国際会館, 京都
2. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, Molecular mechanism of glucosamine for the suppression of IL-8 production by synovial cells, 第87回日本生化学会大会, 2014年10月17日 国立京都国際会館
3. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, グルコサミンは転写因子 Sp1 の細胞内局在を O-N-アセチルグルコサミン修飾を介して調節する。第28回キチン・キトサンシンポジウム, 2014年8月7日, 順天堂大学, 東京
4. Someya A, Sakamoto K, Nagaoka I, Glucosamine suppresses IL-8 expression through the O-N-acetylglucosamine modification of transcription factor Sp1 in synovial cells. 10th Asia-pacific Chitin and chitosan Symposium, 2013年10月6日, コンベンションセンター, 米子
5. 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と IL-8 発現の抑制, 第34回日本炎症・再生医学会, 2013年7月2日, 国立京都国際会館, 京都
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の亢進, 第9回グルコサミン研究会学術集会, 2013年2月9日, 順天堂大学, 東京
7. 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遺伝子発現制御メカニズム, 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月15日, 福岡国際会議場, 福岡
8. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, グルコサミンによる滑膜炎の分子制御メカニズム, 第19回日本未病システム学会学術総会, 2012年10月28日, 金沢勤労者プラザ, 金沢

9. 染谷明正, 五十嵐 庸, 坂本廣司, 長岡 功, 滑膜細胞における遺伝子発現と O-N-アセチルグルコサミン修飾に及ぼすグルコサミンの網羅的解析, 第26回キチン・キトサンシンポジウム, 2012年7月13日, 北海道大学, 札幌

10. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, 滑膜細胞の遺伝子発現に及ぼすグルコサミンの影響と糖鎖修飾の関与, 第33回日本炎症・再生医学会, 2012年7月6日, ホテル日航福岡, 福岡

11. 染谷明正, 坂本廣司, 長岡 功, 滑膜細胞の遺伝子発現に対するグルコサミンの影響, 第8回グルコサミン研究会学術集会, 2012年1月21日城西大学, 東京

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/seikagaku_seitaibogyo/html/undergraduate_j.html

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

長岡 功 (NAGAOKA Isao)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60164399