

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K00880

研究課題名(和文)機能性食品であるグルコサミンのオートファジーに対する新規作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of A new functional effect of glucosamine, as a functional food, on autophagy.

研究代表者

五十嵐 庸 (Igarashi, Mamoru)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：00277815

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)：軟骨細胞におけるグルコサミンのオートファジーに対する効果を検討するため、まずヒト軟骨肉腫由来培養細胞株を用いて、その評価系を構築した。その後、グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジーに対する効果を検討したところ、グルコサミンがオートファジーを活性化する可能性が示唆された。さらに、mammalian target of rapamycin (mTOR) 非依存的な経路により活性化されている可能性が示唆された。また、オートファジー活性化の上流に位置していると思われるサーチュイン(SIRT)1の発現も検討したところ、グルコサミンがSIRT1を介してオートファジーを誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨細胞において、グルコサミンがオートファジーを誘導するという新規機能を解明した。さらに、その誘導経路がmTOR非依存的な経路であることも示した。このことは、グルコサミンの新規機能を明らかにしただけでなく、軟骨を標的とした今後の新薬の発見にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Glucosamine (GlcN), a naturally occurring amino monosaccharide, has been widely used to treat osteoarthritis (OA) in humans. However, the effects of GlcN on autophagy in chondrocyte are still unknown. In this study, to elucidate the chondroprotective action of GlcN via autophagy, we evaluated the effect of GlcN on the expression of autophagy-related molecules (LC3-II, Beclin-1, ATG5 and ATG7) using a human chondrocyte. GlcN significantly increased protein level of LC3-II and mRNA expression of Beclin-1, ATG5 and ATG7. Moreover, GlcN significantly increased the protein level of SIRT1. Importantly, the GlcN-induced increase of LC3-II protein was inhibited by EX527 (a SIRT1 inhibitor). Moreover, GlcN did not effect the S6K phosphorylation, as a target of mammalian target of rapamycin (mTOR). Together these observations suggest that GlcN increases the expression of SIRT1 and possibly induces autophagy in chondrocytes independent of mTOR, thereby exhibiting the chondroprotective action.

研究分野：食品機能学

キーワード：グルコサミン 軟骨細胞 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、関節軟骨が様々な要因により破綻し、関節の変形を生じて疼痛や機能障害などが起こる疾患で、加齢とともに増加し、我が国でも 1,000 万人以上の患者がいると推定されている。現在、OA の保存的療法としては非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)による薬物療法と運動療法が行われている。

一方、グルコサミン(GlcN)は軟骨グリコサミノグリカンの前駆物質であることから、変形性関節症への予防・治療を目的として、我が国やアメリカではサプリメントとして、ヨーロッパでは治療薬として使用され、その有効性が認められている(Crolle et al., *Curr Med Res Opin* 7: 104, 1980)。そのため、関節軟骨の修復に対する効果を中心に GlcN の研究が進められ、申請者も GlcN が軟骨細胞や滑膜細胞からのヒアルロン酸産生を増加させることを明らかにした(Igarashi et al., *Int J Mol Med* 27: 821, 2011)。また、GlcN の骨芽細胞に作用して骨代謝を改善するという、GlcN の新たな機能を明らかにした(Igarashi et al., *Int J Mol Med* 28: 373, 2011)。

その一方で、近年 OA とオートファジーとの関連が注目されている。たとえば、軟骨細胞特異的にオートファジーを活性化したマウスでは、OA に対して保護的に作用すること(Zhang et al., *Ann Rheum Dis* 74: 1432, 2015)や、軟骨細胞特異的にオートファジーが阻害されたマウスでは OA が重症化すること(Bouderlique et al., *Ann Rheum Dis* 75: 627, 2016)が報告されている。また、ヒト大腸ガン細胞において SIRT1 を活性化するとオートファジーが誘導されることが報告されている(Morselli et al., *J Cell Biol* 192: 615, 2011 など)。さらに、マウス胎児線維芽細胞やヒト子宮上皮細胞において、GlcN がオートファジーを誘導すると報告されている(Cheong et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11121, 2011 など)。加えて、申請者らは、軟骨細胞に GlcN を添加すると、サーチュイン(SIRT)1 の発現が亢進することをすでに明らかにしている(Igarashi et al., *Functional Food Res* 12: 26, 2016)。以上より、軟骨細胞において GlcN が SIRT1 を介してオートファジーを誘導し軟骨保護的に作用する可能性があると考えられる。

そこで、①軟骨細胞に対し GlcN を添加し、オートファジーを活性化するか否かを解明するとともに、②オートファジーの活性化により、軟骨保護的に作用する遺伝子の発現変化を解析し、③OA モデルマウスに GlcN を投与し、軟骨細胞におけるオートファジーの活性化状態と軟骨保護状態を個体レベルで解析することにより、OA における GlcN の新たな作用が解明できると考えられる。以上のように、本研究課題の全体構想は、軟骨細胞における GlcN のオートファジーに対する機能解明にある。

2. 研究の目的

申請者は、これまでサプリメントとして用いられているグルコサミン(GlcN)の作用に着目し、GlcN が軟骨細胞や滑膜細胞からのヒアルロン酸産生を増加させることを明らかにし、さらに GlcN が骨芽細胞に作用し骨代謝を改善することを明らかにした(*Int J Mol Med* 27: 821, 2011、*Int J Mol Med* 28: 373, 2011)。また申請者は、軟骨細胞に GlcN を添加すると、サーチュイン(SIRT)1 の発現が亢進することをすでに明らかにしている(*Functional Food Res* 12: 26, 2016)。一方、SIRT1 を活性化するとオートファジーが誘導されることが、オートファジーが軟骨保護的に作用することが報告されている。そこで本研究課題では、GlcN の新規作用の解明として、軟骨細胞において、SIRT1 を介してオートファジーを誘導し、軟骨保護作用を発揮するかどうかの解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題においては、①培養細胞を用いた *in vitro* 系における GlcN の軟骨細胞におけるオートファジーに対する効果の検討、②GlcN の軟骨細胞でのオートファジーにおけるシグナル伝達経路の解明を行う。具体的には、以下の通りである。

(1) *in vitro* 系における GlcN の軟骨細胞におけるオートファジーに対する効果の検討
近年、軟骨細胞特異的にオートファジーを活性化したマウスでは、OA に対して保護的に作用すること(Zhang et al., *Ann Rheum Dis* 74: 1432, 2015)などが報告され、OA とオートファジーとの関連が注目されている。また、申請者はすでにヒト軟骨細胞において、オートファジーの活性化を検出する方法を確立している(Igarashi et al., 未発表データ)。そこで、本研究ではまずヒト軟骨細胞を用いて以下の実験を行う。

・GlcN 添加によるオートファジーマーカーである LC3-II や Beclin 1 などのタンパク質量を計測する。その際、オートファジーマーカーである LC3-II はオートファジー自身で分解されてしまうため、クロロキニンやバフィロマイシンなどのさまざまなリソソーム阻害剤を同時に添加するなど、実験条件を検討する。さらに、Beclin 1 や Atg 5 などさまざまなオートファジー関連遺伝子の発現を検討する。

(2) *in vitro* 系における GlcN の軟骨細胞におけるオートファジーシグナル経路の検討
オートファジーのシグナル伝達経路に対する効果の検討については、主に mTOR 依存的な経路が研究されている。そこで、まずはこの経路について解析を行う。

- ・ mTOR の下流遺伝子の発現や標的タンパク質のリン酸化など GlcN により誘導されるオートファジーが mTOR 依存的であるのかを検討する。
- ・ mTOR の上流のシグナル経路は、PI3K/Akt 経路や MAPK/Erk 経路、AMPK 経路、p53 経路などさまざまな経路が知られている。そこで、この経路を解明するため、それぞれの経路の存在する鍵遺伝子の活性化状態を、real time RT-PCR 法や western blot 法などにより検討する。

4. 研究成果

軟骨細胞におけるグルコサミンのオートファジーに対する効果を検討するため、まずヒト軟骨肉腫由来培養細胞株を用いて、その評価系を構築した。その後、グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジーに対する効果を検討したところ、グルコサミンが LC3-II や Beclin 1 などのオートファジーマーカーの発現を増加させたため、軟骨細胞においてオートファジーを活性化する可能性が示唆された。そこでオートファジー誘導を担うシグナル経路を検討したところ、mammalian target of rapamycin (mTOR) の下流タンパク質である S6 kinase (S6K) のリン酸化が、グルコサミン添加により変化しないことが明らかとなった。このことよりグルコサミンが、いままで報告例の少ない mTOR 非依存的な経路によりオートファジーを誘導することが示唆された。当初の予想に反して、mammalian target of rapamycin (mTOR) 非依存的な経路により活性化されている可能性が示唆された。この事は、いままで報告例の少ない mTOR 非依存的な経路による活性化経路を解明する必要があると考えられる。また、オートファジー活性化の上流に位置していると思われるサーチュイン (SIRT) 1 の発現も検討したところ、軟骨細胞において SIRT1 の発現もグルコサミンにより増加することが明らかとなった。そこで SIRT1 とオートファジーをつなぐシグナル経路を検討したところ、SIRT1 の標的分子である p53 の 382 番目のリジン残基のアセチル化がグルコサミン添加により減少することが明らかとなった。p53 は 382 番目のリジン残基のアセチル化により活性化されること、また、p53 はオートファジーを阻害することが明らかとなっている。この結果は、軟骨細胞においてグルコサミンにより SIRT1 の発現が増加し、p53 を脱アセチル化することによりその活性を減少させ、オートファジーを誘導している可能性を示唆するものである。

また、さらなるシグナル経路を検討したところ、免疫沈降法を用いることにより、オートファジー関連タンパク質である ATG7 のリジン残基のアセチル化がグルコサミン添加により減少することを見出した。ATG7 は、オートファジー誘導に重要な役割を果たしているだけでなく、脱アセチル化されることによりオートファジーを活性化させることが明らかとなっている、この結果は、軟骨細胞においてグルコサミンによりサーチュイン 1 の発現が増加し、ATG7 を脱アセチル化することによりその活性を増加させ、オートファジーを誘導している可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 五十嵐庸、和田政裕、長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンによるp53を介したオートファジー誘導に関する機能解析
3. 学会等名 第27回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐庸、和田政裕、長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンによるp53を介したオートファジー誘導に関する機能解析
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 2020年

1. 発表者名 五十嵐庸
2. 発表標題 キトサンモノマーであるグルコサミンの長寿遺伝子サーチュインを介した生理作用
3. 学会等名 第14回多糖の未来フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンのオートファジー誘導に関する機能解析
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンのオートファジー誘導に関する機能解析
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 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンによるオートファジー誘導に関する機能解析
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 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンによるオートファジー誘導に関する機能解析
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 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジーに対する機能解析
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Igarashi M, Nakamura K, Sakamoto K, Nagaoka I
2. 発表標題 Functional analysis of glucosamine in the induction of autophagy in chondrocytes.
3. 学会等名 14th ICCG/12th APCCS/32nd JSCCC (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐庸, 中村果歩, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジー誘導における機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐庸, 中村果歩, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 軟骨細胞におけるグルコサミンによるサーチュイン1を介したオートファジー誘導に関する機能解析
3. 学会等名 第25回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐庸, 中村果歩, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジー誘導に関する機能解析
3. 学会等名 第16回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐庸, 中村果歩, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジー誘導に関する機能解析
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 五十嵐庸, 中村果歩, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジーに対する機能解析
3. 学会等名 第14回ファンクショナルフード学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐庸, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジーに対する機能解析
3. 学会等名 第15回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五十嵐庸, 坂本廣司, 長岡功
2. 発表標題 グルコサミンの軟骨細胞におけるオートファジーに対する機能解析
3. 学会等名 第24回日本未病システム学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功	4. 発行年 2019年
2. 出版社 インフォノーツパブリッシング	5. 総ページ数 115
3. 書名 Functional Food Research 15 -健康寿命の延伸におけるファンクショナルフードの意義	

1. 著者名 五十嵐庸、中村果歩、坂本廣司、長岡功	4. 発行年 2018年
2. 出版社 インフォノーツパブリッシング	5. 総ページ数 115
3. 書名 Functional Food Research 14 -ファンクショナルフードの未来	

〔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・大学院医学研究科・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
---------	---------