

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580183

研究課題名(和文) グルコサミンの新たな生体内高次機能の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the new high dimension function of glucosamine.

研究代表者

五十嵐 庸 (Igarashi, Mamoru)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00277815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞に対するグルコサミン(GlcN)の効果を検討したところ、石灰化が亢進した。また、その効果は、骨芽細胞の中期以降の分化を亢進することで、石灰化を亢進するものと考えられた。また、軟骨細胞におけるGlcNの標的遺伝子を探索したところ、サーチュイン(SIRT)1遺伝子が同定された。また、他の細胞では発現が変化しないことから、軟骨細胞特異的な標的遺伝子であることが示唆された。さらに、GlcN添加によりいくつかの下流遺伝子において発現の変化が認められ、これはSIRT1の発現上昇を介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：GlcN may have a potential not only to induce the osteoblastic cell differentiation especially at middle-late stages, but also to suppress the osteoclastic cell differentiation, thereby possibly increasing bone matrix deposition and decreasing bone resorption, and eventually modulate bone metabolism in OA.

Next, we searched the target genes in chondrocyte cell line by incubating in the presence of GlcN. RT-PCR analyses revealed that GlcN significantly increased the sirtuin (SIRT) 1 mRNA expression levels. Furthermore, western blot analyses revealed that GlcN significantly increased the protein level of SIRT1. Moreover, GlcN did not essentially affect the SIRT1 expression levels in osteoblastic cells. GlcN is able to upregulate the mRNA and protein levels of SIRT1 in chondrocytes, thereby possibly exhibiting the protective action on OA.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：グルコサミン 骨芽細胞 軟骨細胞 サーチュイン

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、我が国でも一千万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。近年、軟骨基質成分であるGlcNが注目され、ヨーロッパでは治療薬として、我が国ではサプリメントとして使用されている。

一方、OAの発症・進行には軟骨の下に存在する軟骨下骨の関与が示唆されており、非生理的な荷重を受けた軟骨下骨の硬度が不均一となり、軟骨の破綻を招く(Radin et al. Clin Orthop Relat Res 213: 34, 1986)。また、その部分で骨リモデリングが起こるため、OAの進行に伴って骨吸収マーカーが上昇することが知られている(Bettica et al. Arthritis Rheum 46: 3178, 2002)。このように、OAにおける軟骨代謝の破綻が骨代謝の破綻によってもたらされていると考えられる。しかしながら、OAに対しサプリメントとして用いられているGlcNの骨代謝に対する作用はほとんど研究されてはいない。例えば、野生型雌マウスにGlcNを投与すると、対照群に対して大腿骨の骨密度が増加すると報告されている(Yamazaki et al. Glucosamine Research 3: 1, 2007)が、それ以上の詳しい解析はなされていない。また、ヒト骨芽細胞培養細胞株にGlcNを添加すると、alkaline phosphatase (ALP)の発現量や osteocalcin (OCN)量が増加すると報告されている(Matsunaga et al. J Biomed Mater Res A 76: 711, 2006, Kim et al. Bioorg Med Chem Lett 17: 1938, 2006)が、コラーゲン量が減少するなど矛盾点も存在する。このように、GlcNの硬組織における機能はほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで本研究では、骨代謝とそれに影響を及ぼす軟骨代謝におけるGlcNの新たな機能の解析を行う。

骨組織は、軟骨内骨化により成長し、成長後もダイナミックに骨吸収と骨形成を繰り返し、再構築され、形態や機能を維持している。この再構築により維持される骨組織の質および量は、骨吸収と骨形成との平衡関係の破綻により障害される。その平衡関係に破綻を来す疾患の典型的な物が、女性の閉経に基づく閉経後骨粗鬆症であり、人類にとって不可避な老化に基づく老人性骨粗鬆症である。また、骨折などの損傷を受けると、骨の再生プログラムが起動し、損傷は修復される。これらの過程は、骨形成を担う骨芽細胞および骨吸収を担う破骨細胞からなるおもに二つの細胞系の機能的分業により制御されている。

そこで、骨芽細胞や軟骨細胞に対しGlcNを添加しその効果を検討すれば、骨代謝やそれに影響を及ぼす軟骨代謝におけるGlcNの新たな機能が解析できると考えられる。以上

のように、本研究の全体構想は、骨芽細胞および軟骨細胞におけるGlcNの新たな高次機能の解明にある。

2. 研究の目的

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、我が国でも一千万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。近年、軟骨基質成分であるGlcNが注目され、ヨーロッパでは治療薬として、我が国ではサプリメントとして使用されている。

一方、OAの発症・進行には軟骨の下に存在する軟骨下骨の関与が示唆されており、OAにおける軟骨代謝の破綻が骨代謝の破綻によってもたらされていると考えられている。しかしながら、GlcNの硬組織における機能はほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで本研究では、骨代謝とそれに影響を及ぼす軟骨代謝におけるGlcNの新たな機能の解析を行う。

そこで、骨芽細胞や軟骨細胞に対しGlcNを添加しその効果を検討し骨代謝や軟骨代謝に与える影響を解析すれば、骨代謝や軟骨代謝におけるGlcNの新たな機能が解析できると考えられる。以上のように、本研究の目的は、骨代謝および軟骨代謝におけるGlcNの新たな高次機能の解明にある。

3. 研究の方法

(1)GlcNの骨芽細胞および破骨細胞に対する効果の検討

骨芽細胞培養細胞株を用いて以下の実験を行う。

a. GlcN添加による骨芽細胞石灰化能の変化を検討する。

b. GlcN添加による骨芽細胞分化マーカーの一つであるアルカリホスファターゼ(ALP)の活性変化を細胞染色やアッセイにより検討する。

c. GlcN添加による骨芽細胞分化マーカーの発現量変化を検討し、骨芽細胞分化に対する効果を解析する。

d. GlcN添加による骨芽細胞に発現する破骨細胞分化誘導因子 Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の発現変化について検討し、破骨細胞分化に対するGlcNの効果を間接的に解析する。

(2)GlcNの軟骨細胞における新たな標的遺伝子の検討

軟骨細胞培養細胞株を用いて以下の実験を行う。

a. GlcN添加による発現変動のある遺伝子を探索する。また、その際GlcNと同様にサプリメントとして用いられているN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を用いて、その効果

について比較検討する。

b. 前項により同定された遺伝子について、その上流や下流の遺伝子発現プロファイルが GlcN 添加によりどう変化するのかを検討する。

4. 研究成果

(1) GlcN の骨芽細胞および破骨細胞に対する効果の検討

マウス骨芽細胞様培養細胞株に対し、デキサメサゾン、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸を含む培地で培養し、骨芽細胞への分化誘導を行った。また、同時に GlcN を添加した。培養後、alizarin red-S (AR-S) 染色を行い石灰化能を、RT-PCR 法にて骨芽細胞分化マーカーの発現量を評価した。

まず、AR-S 染色により分化後期に見られる石灰化を検討したところ、GlcN により石灰化が亢進した。(図 1)

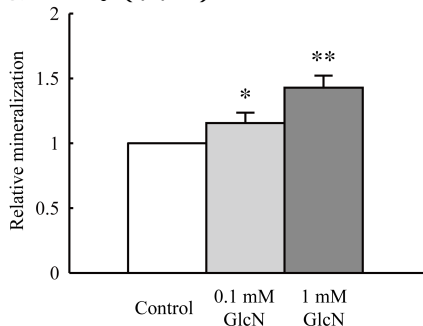


図 1. 骨芽細胞の石灰化に対する GlcN の効果

また、初期分化マーカーである type I collagen と ALP の発現は GlcN によりほとんど変化がなかったものの、中期～後期の分化マーカーである osteopontin と osteocalcin の発現が亢進した。

さらに、骨芽細胞に発現する破骨細胞分化誘導因子 RANKL の発現は GlcN により有意に抑制された(図 2)

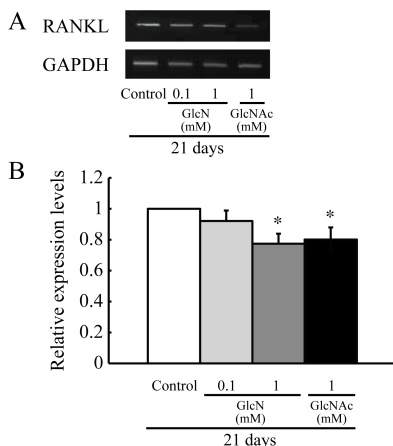


図 2. 破骨細胞誘導因子 RANKL に対する GlcN の効果

以上より、GlcN は、骨芽細胞の中期以降の分化を亢進することで、石灰化を亢進するものと考えられた。また、生体内においては、破骨細胞の分化を抑制することで骨吸収を抑制する可能性が示唆された。

(2) GlcN の軟骨細胞における新たな標的遺伝子の検討

ヒト軟骨細胞培養細胞株に対し GlcN を添加し、発現に変動のある遺伝子を検討したところ、サーチユン (SIRT) 1 遺伝子の発現が亢進することが明らかとなった。ヒトでは SIRT 遺伝子は、SIRT1~7 の 7 種類存在しているため、他の遺伝子も検討したところ、SIRT1 遺伝子以外に、SIRT5 遺伝子も GlcN 添加により発現の増加が認められた。しかしながら、SIRT5 に対する効果は SIRT1 よりも弱いものであった。

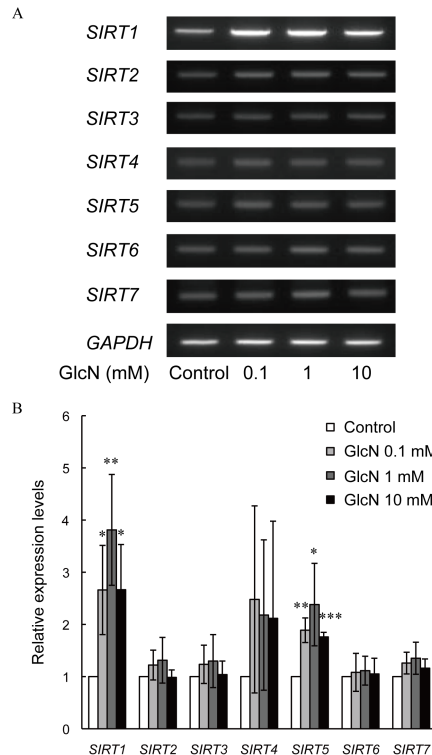


図 3. 軟骨細胞における SIRT 遺伝子発現に対する GlcN の効果

そこでタンパク質量を検討したところ、SIRT5 タンパク質の有意な上昇は確認されなかったが、SIRT1 タンパク質量は GlcN 添加により有意に増加した。また、骨芽細胞を用いて同様の検討を行ったところ、SIRT1 遺伝子発現量に変化は認められなかった。さらに、軟骨細胞において GlcNAc の効果を検討したところ、GlcNAc は SIRT1 遺伝子の発現は増加させるものの、SIRT1 タンパク質量には影響しないことが明らかとなった。さらに、GlcN による SIRT1 の発現上昇が、骨芽細胞など他の細胞株では見られないことから、この現象が軟骨細胞特異的な減少であることが示唆された。

また、軟骨細胞において SIRT1 遺伝子の上流および下流の遺伝子の発現変化を検討したところ、GlcN 添加によりいくつかの下流遺伝子の発現変動が認められた。これら下流遺伝子の GlcN 添加による発現変化は、SIRT1 の発現上昇を介していることが示唆された。

OA 患者の軟骨細胞では健常人と比較して

SIRT1 のタンパク質量が減少していることが知られている (Dvir-Ginzberg et al. J Biol Chem 283: 36300, 2008)。さらに、Sirt1 遺伝子ヘテロ欠損マウスは、野生型と比較して、加齢とともに OA が重症化すると報告されている (Gabay et al. Ann Rheum Dis 71: 613, 2012)。これらの報告例をあわせると、GlcN は軟骨細胞において、SIRT1 遺伝子の発現を亢進することにより、軟骨保護作用を発揮する可能性が示唆された。また、それには SIRT1 遺伝子の下流遺伝子の発現を制御することにより、その効果を発揮している可能性が示唆された。

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1件)

Igarashi M, Sakamoto K, Nagaoka I: Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. International Journal of Molecular Medicine, 査読有, Vol. 28, No. 3, 2011, pp.373-379.
DOI: 10.3892/ijmm.2011686.

[学会発表](計8件)

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: グルコサミンはサーチュイン1の遺伝子発現を亢進する。第14回日本加齢医学会総会、2014年6月6~8日、大阪国際会議場(大阪府)。

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: グルコサミンとN-アセチルグルコサミンは軟骨細胞においてサーチュイン1の遺伝子発現を亢進する。第10回グルコサミン研究会学術集会、2014年2月15日、国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都)。

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: サーチュイン1は軟骨細胞におけるグルコサミンの標的遺伝子である。第11回日本機能性食品医用学会総会、2013年12月7~8日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都)。

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: サーチュイン1は軟骨細胞におけるグルコサミンの標的遺伝子である。第20回日本未病システム学会学術集会、2013年11月9~10日、学術総合センター(東京都)。

Igarashi M, Suzuki K, Someya A, Sakamoto K, Nagaoka I: Sirtuin 1 is a target gene of glucosamine in chondrocyte. 10th Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium, 2013年10月4~8日、米子コンベンションセンター(鳥取県)。

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: サーチュイン1は軟骨細胞におけるグルコサミンの標的遺伝子である。第86回日本

生化学会大会 2013年9月11~13日、パシフィコ横浜(神奈川県)。

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: サーチュイン1は軟骨細胞におけるグルコサミンの標的遺伝子である。第9回グルコサミン研究会学術集会、2013年2月9日、順天堂大学医学部有山登記念館講堂(東京都)。

Igarashi M, Sakamoto K, Nagaoka I: Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. The 9th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. 2011年8月3~6日、Yasaka Saigon Nha Trang Hotel(ニャチャン、ベトナム社会主義共和国)。

[図書](計4件)

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: グルコサミンとN-アセチルグルコサミンは軟骨細胞においてサーチュイン1の遺伝子発現を亢進する。グルコサミン研究10。エイド出版、2014、出版決定

長岡 功, 五十嵐 庸: グルコサミンの関節に及ぼす効果と機能性食品開発。アンチ・エイジングシリーズ3 骨研究最前線~代謝・疾患のメカニズムから再生医療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開発まで~。pp393-401、株式会社エヌ・ティー・エス、2013。

五十嵐 庸, 鈴木 香, 坂本 廣司, 長岡 功: サーチュイン1は軟骨細胞におけるグルコサミンの標的遺伝子である。グルコサミン研究9-より多くの人達の関心を得るために。菅原 忍、岡本 芳晴、奥村 正裕、中村 洋、野村 義宏、和田 正裕、長岡 功編集、pp21-24、エイド出版、2013。

Igarashi M, Sakamoto K, Nagaoka I: Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. Proceedings of the 9th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium (Nha Trang, Vietnam, Aug 3-6, 2011), Edited by Ngo ND, Vårum KM, Nguyen DA, Trang TS. pp160-163, Agricultural Publishing House, Ho Chi Minh, 2012.

Nagaoka I, Igarashi M, Sakamoto K: Biological activities of glucosamine and its related substances. Advance in Food and Nutrition Research Vol. 65, Marine Medical Foods: Implications and Applications - Animals and Microbes. Edited by Kim, S-K. pp337-352, Elsevier, 2012.

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称：サーチユイン1遺伝子の発現増強剤
発明者：長岡 功、五十嵐 庸、坂本 廣司
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-262048
出願年月日：26年1月22日
国内外の別：国内

名称：サーチユイン1遺伝子の発現増強剤
発明者：長岡 功、五十嵐 庸、坂本 廣司
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-13933
出願年月日：25年1月29日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 庸 (IGARASHI, Mamoru)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00277815

(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