

研究報告

**マクロファージのNO産生に及ぼすグルコサミンおよび
レスベラトロールの影響**

Effects of glucosamine and resveratrol on NO production from the RAW264.7 macrophage cell line

碓井之雄 細田明美 清水雅富

Yukio USUI, Akemi HOSODA, Masatomi SHIMIZU



東京医療保健大学
TOKYO HEALTHCARE UNIVERSITY

〈研究報告〉

マクロファージのNO産生に及ぼすグルコサミンおよびレスベラトロールの影響

Effects of glucosamine and resveratrol on NO production from the RAW264.7 macrophage cell line

碓井之雄 細田明美 清水雅富

東京医療保健大学 医療保健学部 医療栄養学科

Yukio USUI, Akemi HOSODA, Masatomi SHIMIZU

Division of Medical Nutrition, Tokyo Healthcare University, Tokyo, Japan

要 旨： GlcNとResをマクロファージのリポ多糖体刺激系に作用させ、両者の同時添加による一酸化窒素（NO）産生に及ぼす効果について検討を行った。GlcNはマクロファージのLPS刺激時のNO産生を濃度依存的に抑制することが示された。さらにLPS刺激時のNO産生を2 mM GlcN単独では68%の有意な阻害、10 μ M Res単独では22%の有意な阻害に対して、10 μ M Resと2 mM GlcNを同時に作用させたときは、LPS刺激時のNO産生を83%有意に阻害し、この結果は20 μ M Resにおいても同様（84%の有意な阻害）であった。したがって、GlcNとResの同時摂取は変形性関節症に有効であることが期待される。

Keywords： glucosamine, resveratrol, nitric oxide, macrophage, osteoarthritis

キーワード： グルコサミン、レスベラトロール、一酸化窒素、マクロファージ、変形性関節症

受付：2012年3月30日

受理：2012年9月20日

はじめに

変形性関節症は、加齢とともに関節軟骨が摩耗し、骨の変形と関節炎を来す疾患で、関節の運動時痛、安静時痛、運動時の礫音、関節可動域制限などの臨床症状を呈する。また、変形性関節症は高齢者の健康寿命に大きく影響し、そのうえ要介護状態への大きなリスク要因として注目されている。その変形性関節症の中で変形性膝関節症は、2009年の時点で患者数は2530万人（男性860万人、女性1,670万人）、また変形性腰椎症においては、患者数3,790万人（男性1,890万人、女性1,900万人）と推定されている¹⁾。

グルコサミン（GlcN）はアミノ糖の一種で、グリコサミノグリカン（ムコ多糖）の構成成分として自然界に広く分布（Fig.1.）し、動物体内では、結合組織や軟骨組織に多く存在し、各器官の強度、柔軟性、弾力性を維持することに寄与している。GlcNは関節軟骨の成分でもあることから、以前より、変形性関節症の症状の軽減の目的で、医薬品または栄養補助食品として広く使用されている。しかしながら、その効果には有効

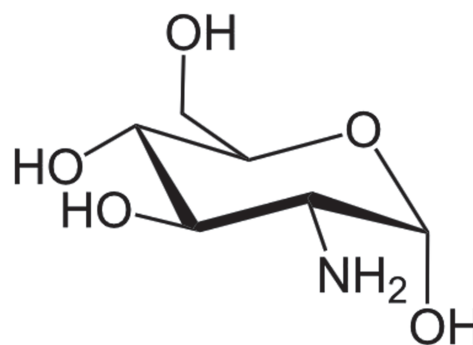


Fig.1. Chemical structure of glucosamine

^{2,4)} あるいは無効⁵⁾ の発表が2分しているが、GlcNにはアセトアミノフェンのような非ステロイド性消炎鎮痛剤（NSAID）に見られるような様々な副作用^{6,7)} があまり無く、長期間の摂取においても高い安全性があることから広く使用されている状況である⁸⁾。

そのGlcNの有効性に関する研究には、関節軟骨におけるグリコサミノグリカンの合成を亢進すること⁹⁾、関節炎の病態に関与すると考えられている一酸化窒素（nitric oxide：NO）や炎症性サイトカインの合成を抑

制すること¹⁰⁾などが報告されている。

また、レスベラトロール (Res)¹¹⁾ は、ブドウの果皮などに含まれ、自然界に存在する数少ないスチルベン骨格を持つポリフェノール類として知られ、その作用は、抗酸化作用¹²⁾、抗がん作用¹³⁾、寿命延伸効果¹⁴⁾など多様な機能が報告されており、我々はResの抗炎症作用について報告した¹⁵⁾。

誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は、変形性関節症において軟骨、滑膜に強く発現しており、合成される一酸化窒素 (NO) は炎症性メディエーターとして作用し、過剰産生されたNOは組織細胞障害性に働いていると考えられている¹⁶⁾。前述したように、GlcNは、NOや炎症性サイトカイン産生に作用し、関節炎を抑制する働きを持つことが知られており、Resは、強い抗酸化作用と抗炎症作用を有することが知られている¹²⁾。しかしながら、GlcNとResを同時にマクロファージのリポ多糖体刺激系に作用させた報告は見当たらない。そこで、本研究では、GlcNとResの関節炎に対する有用性を明らかにすることを目的に、両者の同時投与による抗炎症効果について検討を行った。

方 法

(1) 細胞培養法

RAW264.7細胞を10% fetal bovine serum(株式会社ハナ・ネスコバイオ)、100 U/mL penicillinG (Sigma)、100 µg/mL streptomycin sulfate (Sigma) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) で、5%CO₂下、37℃で継代培養した。細胞を4 × 10⁵ cells/ml に調製し、12穴プレートデッシュに細胞懸濁液2.0 mL 加え、5%CO₂、37℃で24時間培養し、各濃度のグルコサミン (Sigma) およびレスベラトロール (Sigma) とLPS (*Escherichia coli*, O55:B5, Sigma, 10 ng/mL) を添加し培養した。グルコサミンは、滅菌水に、レスベラトロールはdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、フィルターにて濾過滅菌後、各濃度となるように調製し細胞に添加した。また、各群n=3とした。培養上清は、NO測定およびTNF-α測定に供した。

(2) NO産生量の測定

RAW264.7細胞にLPSを添加して24時間培養した後、培養上清を回収し、NO産生量の測定に供した。測定は、グリース法に準じて行った¹⁷⁾。上述の培養上清250 mLに、グリース試薬Ⅰ (5% H₃PO₄、1% sulfanilic acid) 250 mL、グリース試薬Ⅱ (0.1%N-(1-naphthyl)-ethylenediamine) 250 mL、H₂O 250 mLを加え混合した後、554 nmにおける吸光度を測定した。

(3) 統計処理

各実験結果における値は平均値±標準偏差で表示した。統計処理には、GraphPad Prism 4 (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA)を使用した。分散分析後、多重比較検定として、Dunnett法を用い、LPS単独処理群を対照として各群との有意差検定を行った。いずれも危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

RAW264.7細胞にLPS添加で培養すると、無添加時には0.33 nmol/mLに対して14.5 nmol/mLの著しいNO産生の亢進が観察された。10 µMまたは20 µM濃度のResをLPSと同時に添加すると、10 µMにおいては11.3 nmol/mL (22%阻害)、20 µMにおいては9.9 nmol/mL (32%阻害) となり、濃度依存的にLPS刺激で亢進したNO産生を有意に抑制した。また、0.1 mM、1 mM、2 mM濃度のGlcNをLPSと同時に添加すると、0.1 mMでは有意なNO産生の抑制は見られなかったが、1 mMでは9.5 nmol/mL (35%阻害)、2 mMでは4.7 nmol/mL (68%阻害) のNO産生量を示し、GlcN高濃度添加群において、NO産生亢進が有意に抑制された (Fig.2.)。

次に、ResとGlcNグルコサミンを同時にマクロファージに作用させ、LPS刺激によるNO産生亢進に影響を及ぼすかどうかについて検討を行った。その結果、1 mM GlcNと10 µM Resの同時添加群 (29%の有意な阻害)、あるいは1 mM GlcNと20 µM Resの同時添加群 (40%の有意な阻害) では、いずれも1 mM GlcNの単独添加群 (35%の有意な阻害) とほぼ同程度の抑制効果であった。しかし、2 mM GlcNと10 µM Resの同時添加群においてNO産生は2.41 nmol/mL (83%の有意な阻害)、また、2 mM GlcNと20 µM Resの同時添加群においてNO産生は2.38 nmol/mL (84%の有意な阻害) という結果が得られた (Fig.2.)。

考 察

以上の結果から、従来報告されている¹⁰⁾ようにGlcNはマクロファージのLPS刺激時のNO産生を濃度依存的抑制することが確認された (Fig.2.)。さらに、NO産生を2 mM GlcN単独では68%の有意な阻害、10 µM Res単独では22%の有意な阻害に対して、2 mM GlcNと10 µM Resを同時に作用させたときは、NO産生を83%の有意な阻害をし、この結果は20 µM Resにおいても同様 (84%の有意な阻害) であったことから、GlcNとResの同時摂取は炎症を相加的に抑制することが期待される。原ら¹⁸⁾は、膝関節痛自覚者を対象として、

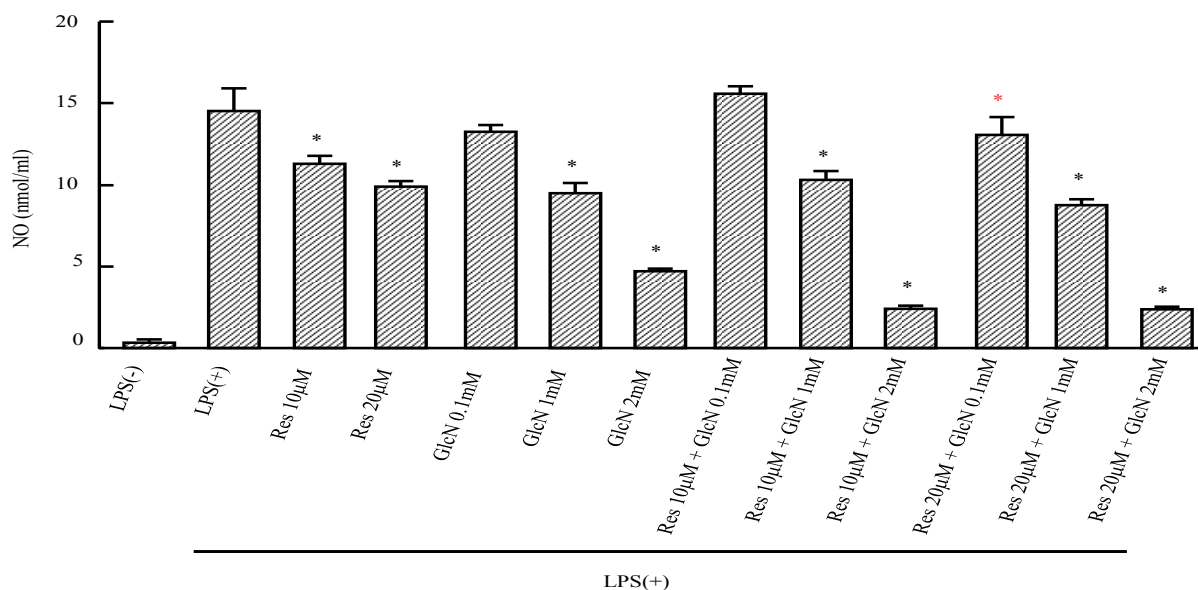


Fig.2. The effects of resveratrol and glucosamine on LPS-induced NO production from RAW264.7 cells.

Values (mean $\pm$ SD) are representative of 3 independent experiments.Statistical analyses were performed by ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$ compared with the LPS only group.

ペラハーブリン配合TM発酵グルコサミン食品を摂取した時の膝関節痛の低減効果を検討したところ、発酵グルコサミン単独に比べて有意に膝関節痛の改善が認められたと報告している。このペラハーブリンは、オオイタドリスプラウト抽出物であり、その成分の1つとしてResを含んでいと記載されている¹⁸⁾。このことから、ペラハーブリン配合TM発酵グルコサミン食品の効果はGlcNとRes両者の抗炎症作用の相乗効果に関わっている可能性が考えられる。

一方、実験結果には示していないが、炎症性サイトカインであるTNF- α においては、GlcNは2mM濃度においても抑制作用は見られず、むしろTNF- α 産生が上昇傾向であった。また、Resの同時添加によっても抑制効果は見られずGlcN単独の作用と変わらない傾向が見られた。Rajapakseら¹⁹⁾は、本研究と同様の系での実験から、LPS刺激RAW264.7細胞からのNO産生とTNF- α 産生の両方を化学修飾されたカルボキシチルグルコサミン (CGlcN) が有意に抑制することを報告している。しかしながら、詳細に実験系を比較すると、用いたLPSの量や化学修飾されたGlcNを用いている点異なる。特に異なる点は、彼らは化学修飾GlcNをLPS添加の1時間前に細胞に添加していることである。以前、我々が今回と同様の実験系を用いてResの抗炎症作用を検討した際に、LPS添加する3および6時間前にRESを細胞に処理しても、LPSとRESの同時投与よりもNOやTNF- α 産生は抑制が弱かったことが観察されている¹⁵⁾。今後、この違いについて詳細に検討する予定である。

結 論

RAW264.7細胞にLPS添加により著しいNO産生の亢進が観察された。このLPS刺激系によるNO産生を1mMおよび2mM濃度のGlcNはそれぞれ35%、68%濃度依存的に阻害した。次に、ResとGlcNグルコサミンを同時にマクロファージに作用させたところ、2mM GlcNと10 μ M Resの同時添加群においてNO産生は2.41 nmol/mL (83%阻害)、また、2mM GlcNと20 μ M Resの同時添加群においてNO産生は2.38 nmol/mL (84%阻害) という結果が得られた。以上の結果から、GlcNとResの同時摂取は炎症を相加的に抑制することが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究に従事した東京医療保健大学医療保健学部医療栄養学科 渡部良輔氏に心から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 吉村典子. 高齢者の運動器障害の疫学・現状・診断と治療. 2010; 98:1767-71.
- 2) Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O, et al. Long term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomized, placebo-controlled clinical trial. Lancet. 2001; 357: 251-6.

- 3) Drovanti A, Bignamini AA, Rovati AL. Therapeutic activity of oral glucosamine sulfate in osteoarthritis: a placebo-controlled double-blind investigation. *Clin. Ther.* 1980; 3: 260-72.
- 4) Houpt JB, McMilan R, Wein C, Paget-Dellio SD. Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 1999; 26: 2423-30.
- 5) Cibere J, Thorne A, Kopec JA, Singer J, Canvin J, Robinson DB et al. Glucosamine sulfate and cartilage type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis: randomized discontinuation trial results employing biomarkers. *J Rheumatol.* 2005; 32: 896-902.
- 6) Tramer MR, Moore RA, Reynolds DJ, McQuay HJ. Quantitative estimation of rare adverse events which follow a biological progression: a new model applied to chronic NSAID use. *Pain.* 2000; 85: 169-82
- 7) Johnson AG. NSAIDs and increased blood pressure. What is the clinical significance?. *Drug Saf.* 1997; 17: 277-89.
- 8) 福田佐千子、正能佳子、恩地ゆかり、野澤（石井）玲子、植沢芳広、毛利公則. 加齢に伴う膝・腰の痛みおよびサプリメントに関する意識調査ーコンドロイチン硫酸およびグルコサミンの摂取状況と効果を含めてー 日本医療薬学会講演要旨集. 2011. suppl.2, 310
- 9) Bassleer C, Rovati L, Franchimont P. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998; 6: 427-34.
- 10) Meininger CJ, Kelly KA, Li H, Haynes TE, and Wu G. Glucosamine inhibits inducible Nitric Oxide Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000; 279: 234-239.
- 11) Hain R, Bieseler B, Kindl H, Schroder G, Stocker R. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol Biol.* 1990; 15: 325-35.
- 12) Kawada N, Seki S, Inoue M, and Kuroki T. Effects of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 1998; 27: 1265-74.
- 13) Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, et al. The cancer preventive agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer.* 2002; 86: 774-8.
- 14) Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003; 425:191-6.
- 15) 細田明美、清水雅富、池田昌代、岡井康二、碓井之雄. マクロファージの炎症性メディエーター産生に対するレスベラトロールの制御機構. 東京医療保健大学紀要. 2009; 5: 7-13.
- 16) Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1998 ;10:263-8.
- 17) Stuehr DJ, Nathan CF, Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp. Med.* 1989; 169: 1543-55.
- 18) 原高明、角田直也、松山明正、八木雄三. 膝関節痛自覚者に対するベラハープリンTM配合発酵グルコサミン食品の臨床的効果. 新薬と臨床. 2011 ; 60 (5) : 1065-80.
- 19) Rajapakse N, Kim M-M, Mendis E, Kim S-K. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells by carboxybutyrylated glucosamine takes place via down-regulation of mitogen-activated protein kinase-mediated nuclear factor- κ B signaling. *Immunology.* 2008; 123: 348-57.

Abstract : Effects of glucosamine (GlcN) and resveratrol (Res) on the production of nitric oxide (NO) from the lipopolysaccharide(LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages cell line were investigated. The productions of NO from LPS-stimulated macrophages were inhibited dose-dependently by GlcN treatments. Furthermore, the treatments of 2 mM GlcN and 10 μ M Res at the same time were shown to inhibit the NO production from LPS-stimulated macrophages to the extent of 17% (83% inhibition) , compared to that of non-treatment control, suggesting that taking GlcN and Res simultaneously would be beneficial for the management of pain in osteoarthritis.