

2007

グルコサミン研究 3

Glucosamine Research

世界をリードする研究

編集

グルコサミン研究会

長岡 功
中村 洋
野村 義宏
南 三郎
和田 政裕

Glucosamine

Glucosamine

Glucosamine

Glucosamine

グルコサミン研究会

グルコサミンの細胞機能	74
長岡 功	
グルコサミンと関節疾患	80
中村 洋	
コンドロイチン硫酸の生理機能	87
西川正純	
グルコサミン研究会会則	92
研究会・賛助会の活動記録	94
平成18年度収支決算書	95
賛助会員一覧	95
「グルコサミン研究」執筆要項	96

グルコサミン研究 3

Glucosamine Research

2007年9月1日発行

編集・発行者 グルコサミン研究会
会長 黒澤 尚
編集委員 長岡 功
中村 洋
野村義宏
南 三郎
和田政裕

事務局 〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1
順天堂大学医学部整形外科学教室 内
TEL 03-3813-3111(代) FAX 03-3813-3428
URL <http://www.glucosamine.jp/>
E-mail glen-res@med.juntendo.ac.jp

制作 有限会社エイド出版
〒113-0021 東京都文京区本駒込6-24-5-404
TEL 03-3943-7529(代) FAX 03-3943-7561
E-mail info@aid-syuppan.co.jp

印刷所 垂細垂印刷株式会社

製本所 神保製本株式会社

定価 2,000円(本体+)

グルコサミン塩酸塩がマウス硬組織に与える影響

The Intake of Glucosamine Increased Bone Mass by pQCT in ddy Mice

山崎恭枝, 真野 博, 中谷祥恵, 和田政裕

Hisae YAMAZAKI, Hiroshi MANO, Sachie NAKATANI, Masahiro WADA

要旨

われわれはこれまでに、グルコサミン (GlcN) が *in vitro* の実験系において軟骨細胞の石灰化への分化を抑制し、細胞外基質のコンドロイチン硫酸量を増加させることを報告した。さらに、グルコサミンの分化調節メカニズムとして、転写調節因子である Smad 2 および Smad 4 が関与していることも明らかにした。この結果は、グルコサミンが軟骨細胞にシグナル分子として認識され、細胞機能を調節する機能性糖として作用する可能性を示唆している。

骨粗鬆症および変形性関節症 (OA) は、高齢社会において解決すべき重要な課題となっている。骨粗鬆症は骨塩量の減少に起因する骨の物理的強度と機能低下をもたらす疾患である。一方、変形性関節症は、関節軟骨の細胞外基質が異所石灰化することが原因のひとつと考えられている。これら骨粗鬆症と異所石灰化は、互いに密接な相関関係があることが示唆されている。そこで本研究では、現在、関節症の症状改善を目的に摂取されているグルコサミンが骨代謝に与える影響を検討した。

ddY 系雌マウスに偽手術 (Sham) あるいは卵巣摘出手術 (Ovx) を施した。Sham 群および Ovx 群に、グルコサミンおよびグルコース (Glc) を添加した飼料を摂取させ、血中の骨代謝マーカーおよび pQCT 法を用いた骨密度の測定を行った。その結果、Sham-Glc 群、Sham-GlcN 群、Ovx-Glc 群、Ovx-GlcN 群の 4 群において血清中のカルシウム、マグネシウム、リンおよびアルカリフォスファターゼ (ALP) 濃度に有意な差は生じなかった。pQCT 法を用いて骨密度を測定した結果、Sham-GlcN 群の全骨密度は、Sham-Glc 群の全骨密度と比較して有意に増加した。一方、Ovx-Glc 群と Ovx-GlcN 群の全骨密度は有意な差がなかった。

本実験の結果、グルコサミンはエストロゲン存在下において骨密度を増加させる可能性が示唆された。今後、詳細なメカニズムを検討することが必要である。

グルコサミン研究 3 : 1-6, 2007

keywords

グルコサミン, 骨密度, pQCT 法, 卵巣摘出 (Ovx)

はじめに

グルコサミン (GlcN) は、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸など、グリコサミノグリカン (GAG) の基本構成糖である。軟骨は細胞外基質に GAG が豊富に存在している。したがって、関節機能障害の改善

を目的として、グルコサミンは広く健康食品などとして利用されている。グルコサミン摂取による変形性関節症 (OA) の症状改善効果は臨床レベルでは報告されており、また、*in vivo* および *in vitro* の研究において、グルコサミンが N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) や GalcNAc に変換された後、GAG に代謝されるこ

とが報告されている¹⁻⁵⁾。さらに、最近の報告では、グルコサミン誘導体であるGlcNAcの経口摂取は、腱の損傷を修復することが*in vivo*の実験において報告されている⁶⁾。また、ヒト末梢血好中球を用いた実験において、グルコサミンが好中球の活性酸素生成を抑制することが明らかとなっている⁷⁾。これらの報告は、グルコサミンが軟骨組織の細胞外基質におけるGAG量を調節するのみならず、さまざまな組織に作用する可能性を示唆している。

われわれは、前駆軟骨細胞株ATDC5を用いた*in vitro*実験系において、グルコサミンは軟骨細胞の石灰化への分化を抑制し、細胞外基質におけるコンドロイチン硫酸など硫酸基特異的GAG量を増加させることを明らかにした。さらに、グルコサミンの軟骨分化調節メカニズムとして、転写調節因子であるSmad2およびSmad4が関与していることを明らかにした⁸⁾。この結果は、グルコサミンが軟骨組織においてGAGの構成糖として取り込まれるのみならず、軟骨細胞にシグナル分子として認識され、軟骨分化を調節している可能性を示唆している。すなわち、われわれはグルコサミンが、生体内において機能性糖として作用する可能性を明らかにした。

変形性関節症では、関節軟骨細胞外基質が異所石灰化をすることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。一方、骨粗鬆症は、骨塩量の減少によって骨微細構造の破綻をきたし骨強度が低下し骨折に対するリスクが高まった全身性疾患である¹²⁾。最近の報告において、異所石灰化と骨粗鬆症は相関があることが示唆されている¹³⁾。

本研究は、軟骨細胞の石灰化を抑制したグルコサミンが、骨代謝に影響を与える可能性を明らかにすることを目的に実験を行った。近年、骨密度測定法

のなかで、迅速簡便に測定ができるCTを用いた報告が増加している^{14, 15)}。本研究では、定量的コンピュータ断層法(peripheral quantitative computed tomography, pQCT)を用いて、グルコサミンが*in vivo*においてマウス大腿骨密度に及ぼす影響を検討した。卵巣摘出手術を施したマウスと偽手術を施したマウスを用いて、グルコサミン経口摂取が骨密度に与える影響を、正常時およびエストロゲン欠乏の2つの条件下において検討を行ったので報告する。

I. 材料および方法

1 | 卵巣摘出マウス

8週齢 ddY 系雌マウス(日本クレア社)を、全身麻酔下にて卵管を含んだ卵巣摘出手術を施した。1群4匹の計4群に分け、2群は背部より卵巣を摘出し、2群は偽手術を施した。卵巣摘出後、2日間の観察飼育を行い、卵巣摘出群(Ovx)、偽手術群(Sham)を各々、グルコース添加食群とグルコサミン添加食群に群分けを行った。本実験で用いた飼料は、AIN-93G組成をもとに、グルコサミン源としてグルコサミン塩酸塩(SIGMA社製)、ネガティブコントロールとしてグルコース(SIGMA社製)を用いた。グルコースおよびグルコサミンは、飼料組成中のコーンスターチと各々置換した。飼料組成を表1に示した。各飼料を4週間自由摂取させたのち、実験に供した。

マウスは恒温恒湿度(室温 $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度45~50%)、12時間明暗サイクル(明期:8:00~20:00)の環境下で飼育を行った。また本実験は、城西大学実験動物倫理委員会の承認を得て実施された。

表1 飼料組成

群	0.2% グルコース群 (Glc) (g)	0.2% グルコサミン群 (GlcN) (g)
コーンスターチ	532	532
カゼイン	200	200
スクロース	98	98
コーン油	70	70
セルロース	50	50
AIN 93G-ミネラル混合	35	35
AIN 93G-ビタミン混合	10	10
L-シスチン	3	3
グルコース	2	—
グルコサミン	—	2
計	1,000	1,000

2 | 血液成分

マウスをジエチルエーテル下で麻酔し、心臓採血により血液を採取した。採取した血液は、室温で1時間静置後、2,000 Gで20分間遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして使用時まで-20℃で保存した。血清中のカルシウム濃度はカルシウム E test WAKO (和光純薬製)、血清中の無機リン濃度は Phosphor C test WAKO (和光純薬製)、血清中のマグネシウム濃度は、Magnesium C test WAKO (和光純薬製)、血清中のアルカリフォスファターゼ (ALP) 濃度はラボアッセイ™ALP (和光純薬製) を各々用いて測定した。

3 | QCT 法

実験動物用 X 線 CT を用いて QCT を行い、骨密度を計測した。測定部位は、マウス後肢大腿骨を用いた。CT 装置は LA Theta LCT-100A (ALOKA 社製) を用いた。測定条件は、管電圧 50 kV、管電流 1 mA とした。スキャンピッチを 1 mm に設定し、大腿骨全長の断層撮影を行った。断層撮影後、LA Theta LCT-100A 付属ソフトウェアを用いた骨密度計測機能を用い、海綿骨密度および、良質骨と海綿骨の領域を測定した全骨密度を計測した。

4 | 統計処理

結果はすべて、4匹のマウスの平均値 ± 標準偏差で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3ソフトウェア (ATMS) を用いて、t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

II. 結果

1 | 卵巣摘出マウスの体重変化および子宮重量に及ぼす影響

本飼育開始前と開始後における体重および体重増加量を表 2 に示した。Ovx-Glc 群、Ovx-GlcN 群、Sham-Glc 群、Sham-GlcN 群の 4 群間に、有意な体重の差は生じなかった。

本飼育終了後の各群マウスの子宮重量平均値を表 3 に示した。Ovx-Glc 群の子宮重量は Sham-Glc 群と比較して約 1/4 に有意に減少した。また、Ovx-GlcN 群の子宮重量は Sham-GlcN 群と比較して、約 1/3 に有意に減少した。

2 | グルコサミン摂取がマウスの血清中骨代謝マーカーに及ぼす影響

グルコサミン摂取が、血清中の骨代謝マーカーであるカルシウム、リン、マグネシウム、アルカリフォスファターゼ (ALP) 濃度に与える影響を検討した。その結果、測定した上記 4 種類の骨代謝マーカーは、Ovx-Glc 群、Ovx-GlcN 群、Sham-Glc 群、Sham-GlcN 群の 4 群間に有意な差がなかった (図 1)。

3 | グルコサミン摂取がマウスの大腿骨密度に及ぼす影響

グルコサミン (GlcN) が Sham 群の大腿骨密度に与える影響を検討した。その結果、GlcN 群はグルコース (Glc) 群と比較して、海綿骨密度が増加傾向であったが、有意な差はみられなかった。一方、全骨密度を比較した結果、GlcN 群は Glc 群と比較して、全骨密度が有意に増加した ($p < 0.05$) (図 2)。

本実験で作製した Ovx 群は、Sham 群と比較し

表 2 Ovx および Sham 群の体重変化

	Sham		Ovx	
	Glc (g)	GlcN (g)	Glc (g)	GlcN (g)
0 日目	29.37 ± 0.71	29.42 ± 0.86	30.12 ± 1.19	30.37 ± 0.75
28 日目	36.86 ± 1.56	35.31 ± 4.25	36.80 ± 2.45	39.56 ± 6.34
体重増加量	7.97 ± 1.21	7.22 ± 4.02	6.90 ± 2.32	9.83 ± 6.82

表 3 Ovx および Sham 群の子宮重量

	Sham		Ovx	
	Glc (mg)	GlcN (mg)	Glc (mg)	GlcN (mg)
28 日目	122.90 ± 19.12	116.80 ± 10.88	27.05 ± 5.35*	35.70 ± 3.77**

* : $p < 0.05$ compare to Sham-Glc

** : $p < 0.05$ compare to Sham-GlcN

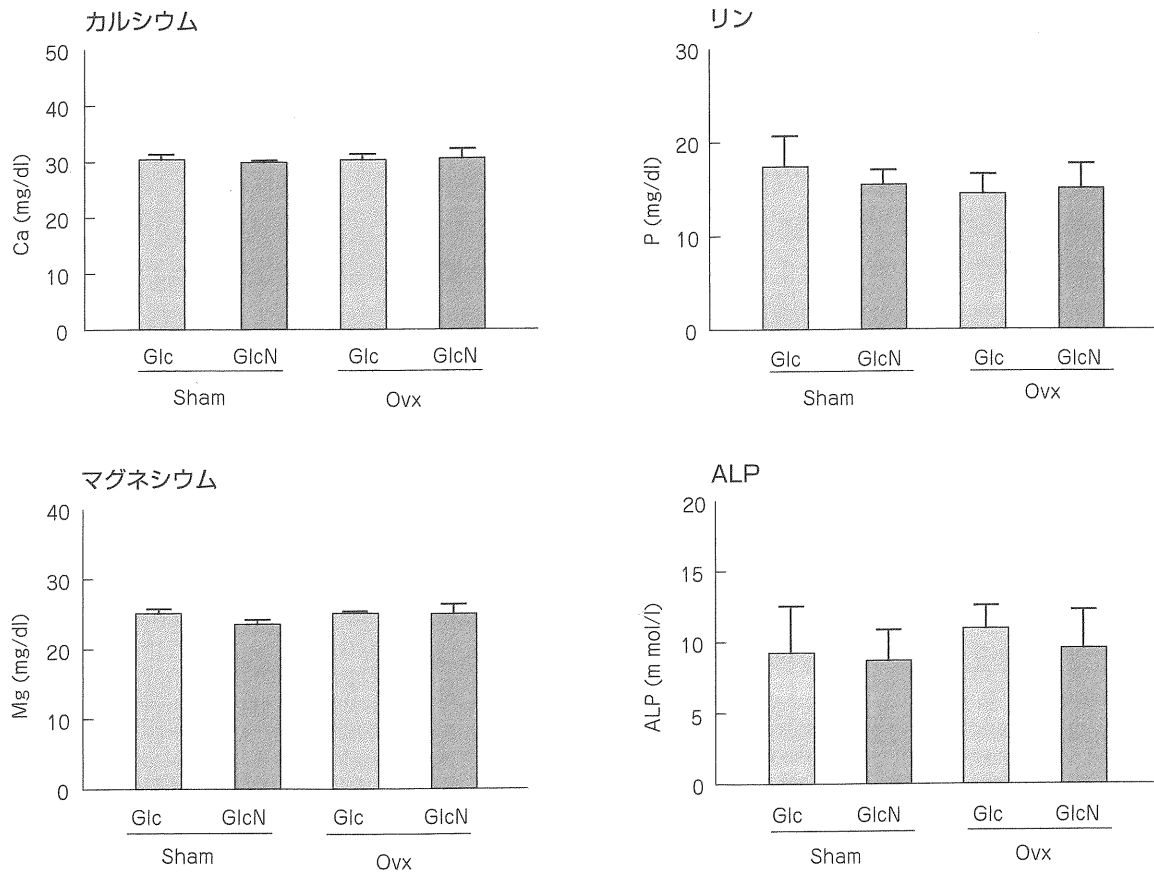


図1 血清中骨代謝マーカー

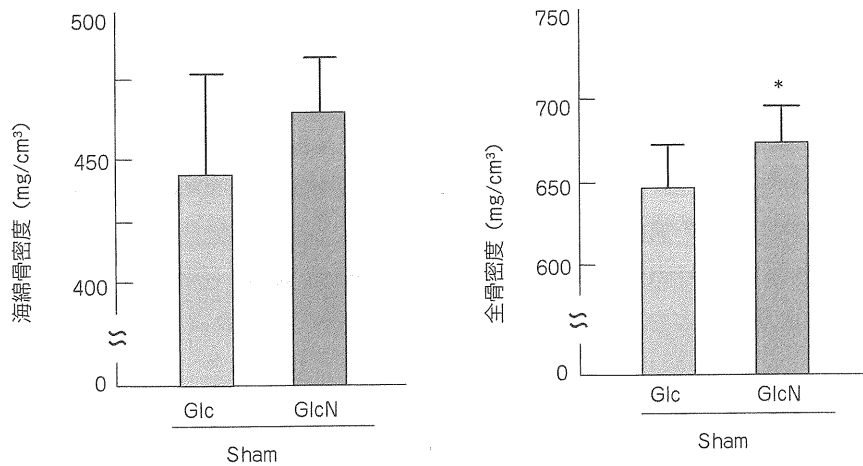


図2 Sham群におけるGlcおよびGlcNが大腿骨密度に与える影響

*: $p < 0.05$

て骨密度が低下していた。グルコサミンが、Ovx群の大腿骨密度に与える影響を検討した。その結果、GlcN群はGlc群と比較して、海綿骨密度および全骨密度に有意な差は生じなかった(図3)。

Ⅲ. 考察

骨粗鬆症は、骨塩量の減少によって骨微細構造の破綻をきたし骨強度が低下し骨折に対するリスクが高まった全身性疾患である¹²⁾。退行期骨粗鬆症は、閉経後骨粗鬆症と老人性骨粗鬆症に分類されている。閉経後骨粗鬆症は、閉経後エストロゲンの欠乏によって骨の代謝回転が亢進し、骨吸収が骨形成を上回る結果、

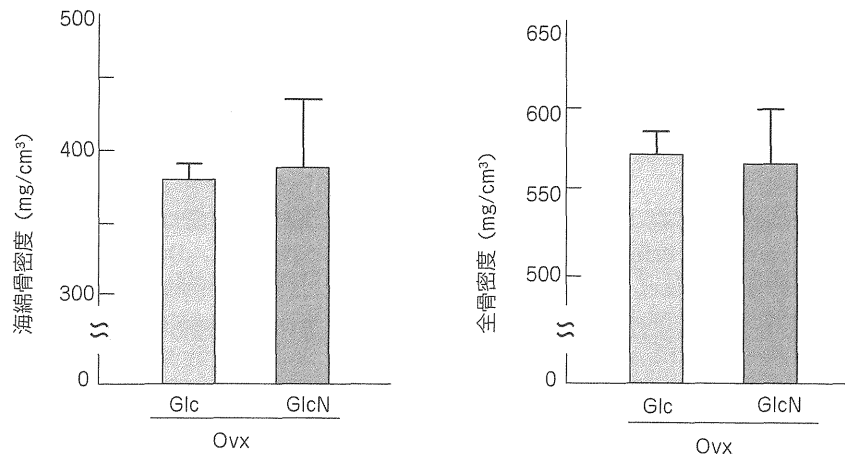


図3 OvX群におけるGlcおよびGlcNが大腸骨密度に与える影響

骨量が減少する疾患である¹⁶⁾。一方、老人性骨粗鬆症は、老化に伴って骨の代謝回転が低下し、骨形成の低下が骨吸収の低下より優位になって骨量が減少する疾患である¹⁷⁾。

本実験では、グルコサミンが正常マウスの骨密度に与える影響を検討した。さらに、閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作製し、グルコサミンがエストロゲン欠乏下におけるマウス骨密度に与える影響も検討した。エストロゲンの欠乏においては、子宮が萎縮することが知られている。本実験では、Sham群と比較してOvx群は、子宮重量が有意に低下していた。したがって、Ovxによるエストロゲン欠乏マウスが作製できていることが確認できた。pQCT法を用いてマウス後肢骨密度を測定した結果、Sham-GlcN群はSham-Glc群と比較して海綿骨密度が増加傾向を示した。また、皮質骨および海綿骨の領域を測定した全骨密度を測定した結果、Sham-GlcN群はSham-Glc群と比較して有意に全骨密度が増加した。一方、Ovx群においては、グルコサミンの摂取はマウス後肢骨密度に影響を与えなかった。この結果から、グルコサミンがエストロゲン存在下において骨密度を増加させる可能性が示唆された。また、本実験において血中の骨代謝マーカーであるカルシウム、リン、マグネシウム、ALP濃度は、グルコサミン摂取によって、有意な差は生じなかった。したがって、グルコサミンはミネラル代謝には直接影響を与えない可能性が示唆された。本実験は、CT装置によるpQCT法を用いた測定結果であるため、今後、骨部位ごとの詳細な組織学的検討が必要である。

本研究の結果、グルコサミンは軟骨のみならず、骨代謝にも影響を与える可能性が示唆された。本実験で

明らかにしたグルコサミンの骨密度増加作用のメカニズムを検討するために、今後、*in vitro*の実験系を用いてグルコサミンが骨芽細胞および破骨細胞に与える影響を検討する予定である。

◆参考文献

- 1) Theodosakis J : A randomized, double blind, placebo controlled trial of a topical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 31 : 826-827, 2004
- 2) Grove ML : A randomized, double blind, placebo controlled trial of a topical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 31 : 826-827, 2004
- 3) Silbert JE, Sugumaran G : Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 54 : 177-186, 2002
- 4) Mroz PJ, Silbert JE : Use of 3H-glucosamine and 35S-sulfate with cultured human chondrocytes to determine the effect of glucosamine concentration on formation of chondroitin sulfate. *Arthritis Rheum* 50 : 3574-3579, 2004
- 5) Kim JJ, Conrad HE : Effect of D-glucosamine concentration on the kinetics of mucopolysaccharide biosynthesis in cultured chick embryo vertebral cartilage. *J Biol Chem* 249 : 3091-3097, 1974
- 6) 南三郎, 衛藤展功, 岡村康彦, 岡本芳晴, 又平芳春 : N-アセチル-D-グルコサミンとフィッシュコラーゲンペプチド経口投与による損傷腱修復効果. *グルコサミン研究* 2 : 28-37, 2006
- 7) 長岡功, 華見, 勝呂栞, 坂本廣司 : グルコサミンの好中球機能抑制作用とそのメカニズム. *炎症・再生* 22 : 461-468, 2002
- 8) Nakatani S, Mano H, Ryanghyok IM, Shimizu

- J, Wada M : Glucosamine regulates differentiation of a chondrogenic cell line, ATDC5. *Biol Pharm Bull* 30 : 433-438, 2007
- 9) Shitama K : Calcification of aging articular cartilage in man. *Acta Orthop Scand* 50 : 613-619, 1979
- 10) Bundens WD Jr, Brighton CT, Weitzman G : Primary articular-cartilage calcification with arthritis (pseudogout syndrome). *J Bone Joint Surg Am* 47 : 111-122, 1965
- 11) Karpouzas GA, Terkeltaub RA : New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification. *Curr Rheumatol Rep* 1 : 121-127, 1999
- 12) Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement* 17 : 1-45, 2000
- 13) Danilevicius CF, Lopes JB, Pereira RM : Bone metabolism and vascular calcification. *Braz J Med Biol Res* 40 : 435-442, 2007
- 14) Numbenjapon N, Costin G, Gilsanz V, Pitukcheewanont P : Low cortical bone density measured by computed tomography in children and adolescents with untreated hyperthyroidism. *J Pediatr* 150 : 527-530, 2007
- 15) Neander G, Adolphson P, Hedstrom M, von Sivers K, Dahlborn M, Dalen N : Decrease in bone mineral density and muscle mass after femoral neck fracture. A quantitative computed tomography study in 25 patients. *Acta Orthop Scand* 68 : 451-455, 1997
- 16) Khosla S, Melton LJ 3rd, Riggs BL : Osteoporosis; gender differences and similarities. *Lupus* 8 : 393-396, 1999
- 17) Riggs BL, Melton LJ 3rd : Osteoporosis and age-related fracture syndromes. *Ciba Found Symp* 134 : 129-142, 1988