

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07735

研究課題名(和文) 生体に吸収されるコラーゲンペプチドの線維芽細胞への作用メカニズム解明

研究課題名(英文) Study on mechanism for enhancement of growth of fibroblasts by food-derived collagen peptides in blood

研究代表者

佐藤 健司 (Sato, Kenji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：00202094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食肉中のコラーゲンを摂取してもヒト血漿中にPro-Hypが増加することを見出した。Pro-Hypはマウス創傷治癒部位に増加し、創傷治癒を促進することを見出した。またマウス皮膚から遊走してくる線維芽細胞は、初期には間葉性幹細胞マーカーであるp75NTRを持つが、増殖後p75NTRを失うことを発見した。Pro-Hypはp75NTR陽性の線維芽細胞に特異的に取り込まれ、増殖を促進するが、増殖を繰り返してp75NTRを失った線維芽細胞には増殖促進効果がないことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲンペプチドの摂取により創傷治癒が促進されることが知られている。我々はヒト血中に見いだされていたPro-Hypは線維芽細胞を増殖させることを見出してきたが、なぜProHypが正常組織の線維芽細胞を増殖させずにダメージを持つ組織の線維芽細胞を増殖させるかが不明であった。本研究により創傷部位に集積するp75NTR陽性線維芽細胞を特異的にPro-Hypが増殖促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrates that Pro-Hyp increases after ingestion of meat containing collagen in addition to collagen peptide. Pro-Hyp enhances wound healing of mouse skin. The fibroblasts migrated from mouse skin have somatic stem cell marker, p75NTR, at early stage but lose p75NTR after growth. Pro-Hyp is incorporated into the fibroblasts with p75NTR and enhances growth of these cells, while fibroblasts without p75NTR do not respond.

研究分野：食品機能学

キーワード：コラーゲンペプチド 創傷治癒 Pro-Hyp 線維芽細胞 p75NTR 間葉系幹細胞 コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) コラーゲンを加熱変性させたゼラチンの酵素分解物(コラーゲンペプチド)の経口摂取により褥瘡の治癒促進、皮膚のバリア機能の改善等の有益な機能がプラセボコントロールを用いたヒト試験で示されている。

(2) コラーゲンペプチドを摂取したヒト末梢血中にプロリルヒドロキシプロリン (Pro-Hyp) を主とするコラーゲンジ、トリペプチドが数十 μM 程度存在することが明らかになっている。またコラーゲンゲルに接着したマウス皮膚由来の線維芽細胞に対して Pro-Hyp の増殖促進を見出してきた。このジペプチドの機能がコラーゲンペプチドを摂取した際の有益な作用に関係することが示唆されているが、そのメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

(1) Pro-Hyp がどのようなメカニズムで線維芽細胞の増殖を促進するかを明らかにすることを目的とする。またコラーゲンペプチド以外の動物性食品の摂取によっても Pro-Hyp の血中での増加を確認する。

3. 研究の方法

(1) 日本食一食分の魚肉・蓄肉中のコラーゲン含量の測定と摂取後の Pro-Hyp の血中移行を LC-MS/MS で測定した。

(2) 当初は線維芽細胞への Pro-Hyp の取り込みを直接液体クロマトグラフィー質量分析系計 (LC-MS/MS) で測定し、その際に生じる細胞内情報伝達を解析する予定であった。しかし、コラーゲンゲルに接着している線維芽細胞は Pro-Hyp 存在下でも増殖は遅く、細胞内シグナル伝達試験に用いることが出来る細胞量を得ることが困難であった。そこでコラーゲンゲル上の線維芽細胞を各種抗体で蛍光染色し、蛍光を顕微鏡下で観察する手法を用いた。また Pro-Hyp の細胞内への取り込みも FITC で蛍光標識した Pro-Hyp の取り込みを顕微鏡下で観察することで評価した。

(3) マウスに皮膚欠損部を作成し、創傷治癒により生じる肉芽組織中のコラーゲンペプチドの生成を LC-MS/MS で測定した。また創傷部位に直接 Pro-Hyp を滴下し、肉芽形成への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 日本食で食される1食あたりのほとんどの魚肉・蓄肉中に1-3g程度のコラーゲンが含まれることが明らかになった。牛すじ肉、ウナギ、ヨシキリザメ尾の肉には10g程度のコラーゲンが含まれていた。約13gのコラーゲンを含むヨシキリザメ尾の肉を摂取したヒト末梢血中にもコラーゲンペプチド摂取時の約30%のPro-Hypが存在することを見出した。そのため、通常の食事からもPro-Hypの血中での増加が生じることが確認された。

(2) マウス皮膚を培養し、遊走してくる線維芽細胞を創傷治癒部位で発現の増加する間葉系幹細胞マーカーである低親和性神経増殖因子受容体 (p75NTR) および血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) で染色した。その結果、図1に示すように、培養1日後に遊走してきた線維芽細胞はp75NTR陽性であった。一方、培養を2週間まで継続すると線維芽細胞は増殖するがp75NTR陽性細胞は1%程度にまで減少し、4週間後にはほぼp75NTR陽性細胞は認められなかった。

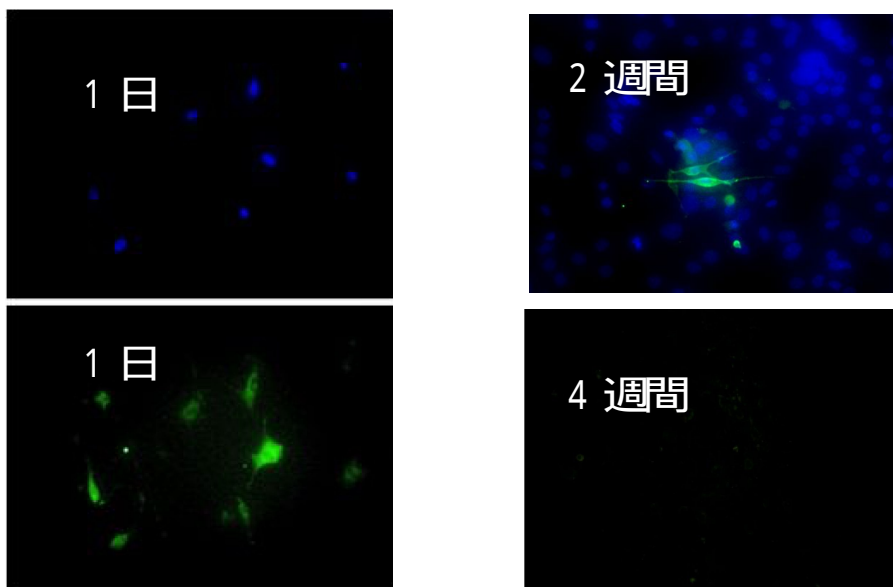


図1 皮膚培養1日、2週間および4週間後の線維芽細胞をp75NTR抗体で染色 緑色はp75NTR陽性細胞、青はDAPIによる核染色(1日、2週間)

3) これらの細胞をコラーゲンゲル上で培養したところ皮膚を 2 週間培養した後には得られる p75NTR 陽性細胞が存在する場合は Pro-Hyp により細胞はコラーゲンゲルのみではなくプラスチックプレート上でも増殖が促進され(図 2)、コラーゲンゲル上で p75NTR 陽性細胞の割合も増加した(図3)。一方、皮膚を 4 週間培養し p75NTR 陽性細胞が存在しない場合には Pro-Hyp の増殖効果は見られなくなった(図 4)。PGDFR についても同様の結果が得られた。これらの結果はすべての線維芽細胞に Pro-Hyp により増殖刺激が生じるのではなく、p75NTR 陽性細胞のみが増殖することが明らかとなった。

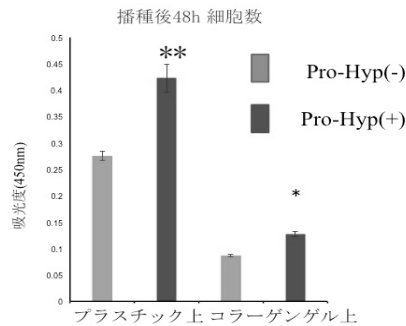


図2 皮膚培養 2 週間後の線維芽細胞に対する Pro-Hyp (200 μ M) の影響

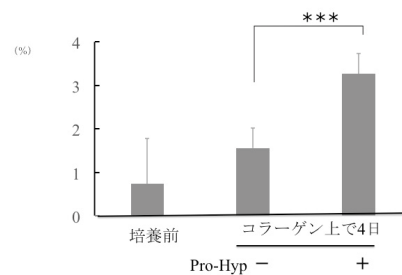


図3 皮膚培養 2 週間後の線維芽細胞中の p75NTR 陽性細胞の割合に対する Pro-Hyp の影響

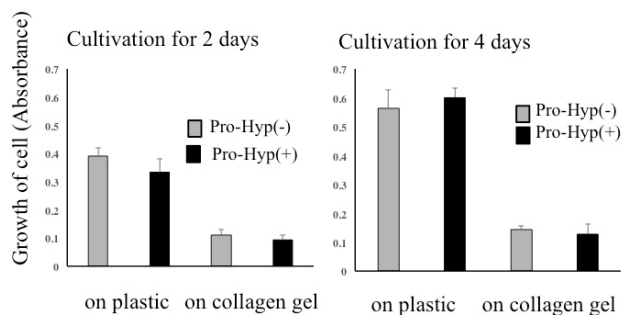


図4 皮膚培養 4 週間後の線維芽細胞増殖に対する Pro-Hyp の影響

(4) マウ皮膚を円形に切除し、創傷治癒モデルを作成した。創傷治癒により生じる肉芽組織と正常皮膚中のコラーゲンペプチドを測定したところ肉芽組織で Pro-Hyp の有意な増加が認められたが、正常皮膚では増加しなかった。また創傷部位に Pro-Hyp を滴下したところ肉芽組織の生成が促進された。これらの結果は Pro-Hyp が創傷治癒を促進する直接の結果であり、また内因性の Pro-Hyp が創傷治癒に関与していることを示す。

(5) 皮膚を2週間培養した後に皮膚から遊走してきた線維芽細胞を回収し、プラスチック上に播種し、Pro-Hyp を添加した。回収した線維芽細胞内に Pro-Hyp が取り込まれていた。さらに、1日、4日皮膚を培養した線維芽細胞に FITC で標識した Pro-Hyp を添加したところ、p75NTR 陽性細胞が選択的に Pro-Hyp を取り込んでいることが明らかとなった。

p75NTR 陽性細胞は創傷治癒部位に集積することが知られている。また正常組織、治癒後の組織での発現は少ないことが示されている。そのため、創傷治癒部位の p75NTR 陽性線維芽細胞は Pro-Hyp を取り込み増殖が促進されるが、正常組織および治癒後の組織では p75NTR 陽性細胞がほとんど消失するため Pro-Hyp により細胞増殖が促進されないと考えられる。そのため、コラーゲンペプチドの摂取により創傷治癒は促進されるが、正常組織での異常な線維芽細胞の増殖が生じない理由が説明できる。

5 . 主な発表論文等

5-1. [雑誌論文](計4件)

Asai Tomoko, Takahashi Akira, Ito Kumie, Uetake Tatsuo, Matsumura Yasuki, Ikeda Kaori, Inagaki Nobuya, Nakata Masahiro, Imanishi Yoshiharu, Sato Kenji, Amount of Collagen in the Meat Contained in Japanese Daily Dishes and the Collagen Peptide Content in Human Blood after Ingestion of Cooked Fish Meat, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 査読有、67、2019、2831-2838、<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b06896>

Kenji Sato, Structure, Content, and Bioactivity of Food-Derived Peptides in the Body, Journal of Agricultural and Food Chemistry、査読有、66、2018、3082-3085、<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b00390>

Jimi Shiro, Kenji Sato, Masahiko Kimura, Junji Suzumiya, Shuuji Hara, Francesco De Francesco, Hiroyuki Ohjimi、G-CSF Administration Accelerates Cutaneous Wound Healing Accompanied With Increased Pro-Hyp Production in db/db Mice, Journal of Clinical Research in Dermatology、査読有、4、2017、1-9、<http://dx.doi.org/10.15226/2378-1726/4/2/00155>

Kenji Sato, The presence of food-derived collagen peptides in human body-structure and biological activity、Food Function、査読有、8、2017、4325-4330、<https://pubs.rsc.org/10.1039/c7fo01275f>

5-2. 学会発表](計7件)

Kenji Sato, Food-Derived Collagen Peptide in Human Blood; Structure and Bioactivity, Pure and Applied Chemistry International Conference 2019.(招待講演)(国際学会)、2019

Kenji Sato, Food-derived and endogenous collagen peptide, Pro-Hyp, specifically stimulates growth of fibroblast with somatic stem cell marker, p75NTR、NAPA(招待講演)(国際学会) 2018

吉川 和伸、浅井 智子、佐藤 健司、Pro-Hyp 添加によるコラーゲンゲル上マウス由来皮膚遊走細胞への影響、栄養・食糧学会、2019

浅井 智子、吉川 和伸、佐藤 健司、培養マウス皮膚からの遊走細胞に対する Pro-Hyp 添加の影響、栄養・食糧学会、2018

佐藤 健司、皮膚線維芽細胞の増殖制御 -増殖因子・基質・分化とコラーゲンペプチド、美容皮膚学会(招待講演)、2017

Kenji Sato、Impact of Collagen Peptides on Wound Healing、West China Clinical Nutrition International Forum(招待講演)(国際学会)、2017

佐藤 健司、コラーゲン・エラスチンサプリメント効果とメカニズム、日本抗加齢医学会(招待講演)、2017

5-3. [図書](計0件)

5-4. [産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

5-5. [その他]

ホームページ等

京都大学学術情報レポジトリ <https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：自見 至朗

ローマ字氏名：Jimi Shiro

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：30226360

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。