

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05927

研究課題名(和文) コラーゲン由来ペプチドの脳神経調節作用のメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanism of neuromodulatory effects by collagen peptides

研究代表者

水重 貴文 (Mizushige, Takafumi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：70571008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、コラーゲン分解物によりうつ様行動が減少することを見出した。また、コラーゲン分解物を摂取した際に体内を循環する主なペプチドであるプロリルヒドロキシプロリン(P0)によりうつ様行動が減少した。本研究では、P0が海馬神経新生を促進することを動物や培養初代細胞を用いて明らかにした。コラーゲン分解物により海馬ドーパミン量が増加したことに加え、コラーゲン分解物の抗うつ作用はD1受容体阻害剤投与により消失した。社会的敗北ストレス負荷や神経炎症活性化によるうつモデルにおいてもコラーゲン分解物は有効であった。本研究成果として、新規抗うつペプチドを発見し、その抗うつメカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、うつ様行動を減少させる新規コラーゲン由来ジペプチドとしてプロリルヒドロキシプロリンを見出した。食品レベルやペプチド創薬レベルで、脳機能向上素材としての応用が期待される。コラーゲンは、哺乳類の生体内で最も多いタンパク質であり食品廃棄物の中にも多いとされ、食品廃棄物の削減につながる可能性もある。当該ペプチドは脳に移行し、脳内で直接的にドーパミン神経系の活性化、海馬神経新生の促進、神経炎症の抑制を介して抗うつ作用を発揮すると考えられた。本研究により、コラーゲン分解物の活性成分の同定とそのメカニズムの一端が明らかとなり、食品-神経相互作用の生理的意義解明につながる重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that collagen hydrolysate exhibited antidepressant-like activity. We also found that prolyl hydroxyproline (P0), which has circulated in the blood after ingestion of collagen hydrolysate, have exhibited antidepressant-like activity. In this study, we have shown that P0 promotes hippocampal neurogenesis in mice and primary hippocampal neural progenitor cells. Collagen hydrolysate has increased hippocampal dopamine levels. In addition, the antidepressant-like activity of collagen hydrolysate has been disappeared with the injection of D1 receptor antagonists. In social defeat stress and neuroinflammatory activation models, collagen hydrolysate was also effective in depressive behavior. In summary, we found a novel antidepressant peptide from collagen hydrolysate and elucidated a part of mechanism in its antidepressant-like activity.

研究分野：生物化学

キーワード：コラーゲンペプチド うつ様行動 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは、食品由来ペプチドの中に医薬品に匹敵する低用量で抗うつ様作用を示すものが存在することを見出し、潜在的な食品成分と脳神経系の相互作用を明らかにしてきた。その中で、コラーゲン分解物が経口摂取で有効かつ強力な抗うつ様作用を示すことを見出した。本研究では、コラーゲン分解物のうつ行動制御メカニズムを解明することを目的とする。コラーゲン由来成分とうつ行動制御の有力な仮説であるモノアミン仮説、ストレス応答仮説、神経新生仮説、神経炎症仮説との関連を検証する。コラーゲン由来成分の摂取時において、モノアミン関連分子、脳内炎症関連分子などのタンパク質分泌およびRNA発現の解析や、脳神経系の細胞の増殖分化や生存などを調べる。次に、コラーゲン由来抗うつ成分を同定し、作用部位を決定する。これらの研究成果を応用することで、食品由来ペプチド、特に低分子のジペプチドやトリペプチドが脳神経系で機能する生理的意義の解明および機能素材としての利用が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が見出したコラーゲン分解物やコラーゲン由来低分子ペプチドの抗うつ様作用のメカニズムを解明することを目的とする。コラーゲン由来成分のモノアミン代謝やストレス応答に対する影響、脳神経細胞の増殖・分化・生存・アポトーシスに対する作用を検証し、コラーゲン由来ペプチドの抗うつ作用が従来のモノアミン仮説やストレス応答仮説に關与するかどうかに加え、最近提唱され有力な神経新生仮説や神経炎症仮説への關与も検証し、コラーゲン由来ペプチドの抗うつ様作用のメカニズムを解明する。近年、食品由来低分子ペプチドが強力な情動調節作用を示す例が見出されている。しかし、これらの低分子ペプチドの作用点、シグナル伝達経路などの詳細は不明な点が多い。本研究において、我々が抗うつ様作用を示すことを見出したコラーゲンを素材とし、抗うつ活性ペプチド候補を挙げ、体内動態、作用点を検討し、どの部位のどの生体系に影響しうつ行動の変化に影響しているか明らかにすることを試みる。これらの検討により、低分子ペプチドの新規リガンドおよび情動調節の新規分子機構の発見に結びつく可能性がある。本研究成果は、経口摂取が可能で安全な精神疾患治療素材の開発に応用でき、食品-神経相互作用の生理的意義が明らかにされることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 抗うつ作用を有する Pro-Hyp の脳内移行に関する検証

**実験1**：コラーゲン分解物（GDCH）を経口投与したマウスから脳脊髄液と海馬を採取し、HPLC/MS を用いてコラーゲン関連のペプチドを検出し定量した。

**実験2**：血液脳関門（BBB）の細胞モデルである BBB キット（ファーマコセル社）を用い、各種ペプチドの透過性を調べた。血液側ウェルにペプチドを添加し、30分後に脳側ウェルから培地を回収した。HPLC/MS を用いてコラーゲン関連のペプチドを検出し定量した。

(2) 抗うつメカニズムの検証: マウスにコラーゲン分解物およびコラーゲン由来低分子ペプチドを経口投与し、うつ行動制御に関わるとされるモノアミン、神経新生、神経炎症の変化を調べる。

**実験3:** コラーゲン成分を経口投与したマウスにおいて、うつ行動に関連のある海馬および前頭前野のモノアミン解析を行う。海馬および前頭前野を採取し、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、およびそれらの代謝産物を HPLC-ECD で定量するとともに、モノアミンの受容体やトランスポーターの遺伝子発現量を測定する。ドーパミン作動性神経 (TH) を染色し産生細胞の数や分化機能を評価する。

**実験4:** うつ行動に関連のある海馬神経幹細胞の増殖・分化への影響を調べる。マウスにコラーゲン分解物や PO を 3 日間経口投与し、マウスを固定し、脳を摘出した。海馬切片を作製し増殖期に発現する ki67 を免疫染色した。海馬における ki67 陽性細胞の数をカウントした。マウスの海馬において、細胞増殖マーカーの蛍光染色を行い、増殖細胞数を計測する。また、培養神経幹細胞を用いて増殖や分化の評価を行う。マウス海馬において、神経幹細胞の増殖分化、神経細胞の生存維持に機能する神経栄養因子の遺伝子発現量を測定する。

(3) うつモデルに対する効果の検証

**実験5:** 抗うつ薬様作用は、強制水泳試験を用いて評価した。動物は、C57BL マウス (雄、5 週齢) と ICR マウス (雄、10 週齢) を用いた。MF (オリエンタル酵母) および水道水を自由摂取させた。国立大学法人宇都宮大学動物管理等規程に基づき、本学動物実験委員会に認可された後、実験を行った。C57BL マウスに社会的敗北ストレスを 10 日間負荷した。コラーゲン分解物、PO、または生理食塩水を経口投与し、3 時間後に強制水泳試験を行った。強制水泳試験では、高さ 20 cm のピーカーに 12 cm まで水 (25 °C) を入れ、マウスを強制的に 6 分間遊泳させ、その間の無動時間を計測した。無動時間が増加した場合に抗うつ作用ありと判定した。

**実験6:** ddY マウス (雄、5 週齢) にリポ多糖 (LPS) を腹腔内投与し神経炎症を活性化した。実験 1 と同様に、コラーゲン分解物と PO を投与し、強制水泳試験を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 新しい抗うつジペプチド PO の脳内移行  
コラーゲン分解物をマウスに経口投与し、脳脊髄液中の PO 量を調べたところ、投与 60 分後をピークとし、3 時間後まで検出された (図 1)。血液脳関門の細胞モデルを用いて、PO の血液脳関門透過性を調べたところ、血液脳関門は透

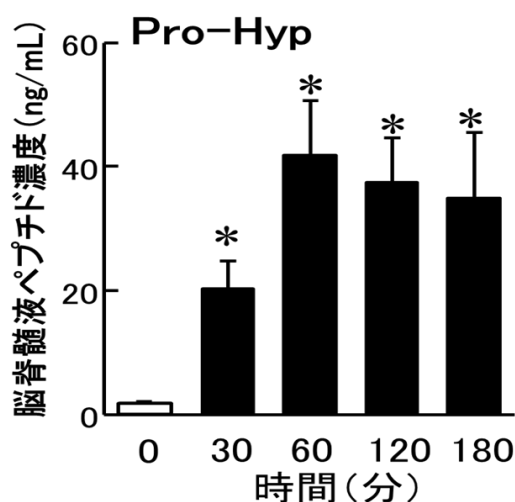


図 1 コラーゲン分解物の 経口投与時における脳脊髄液中の Pro-Hyp 濃度  
Mean  $\pm$  SEM (n=5-9). \*p<0.05, Tukey-Kramer test.

過しなかった。

これらの結果より、抗うつ作用を有する PO が血液脳関門を介さない経路で脳内に移行していることが示唆された。

## (2) 抗うつメカニズムの検証

コラーゲン分解物や PO をマウスに経口投与し、海馬神経前駆細胞の増殖を調べた。その結果、コラーゲン分解物の経口投与により、海馬の ki67 陽性細胞数が有意に増加した。PO の経口投与によっても、同様に海馬の増殖細胞数が有意に増加した。また、生後 1 日齢の ddY マウスから採取した神経前駆細胞に対して PO を添加したところ、神経前駆細胞の増殖が促進した。以上の結果より、コラーゲン分解物の経口投与は海馬神経新生を促進することとその活性成分が PO であることが示唆された。さらに、コラーゲン分解物の経口投与により、海馬の脳由来神経栄養因子 (BDNF) と神経成長因子 (NGF) の mRNA 発現量が有意に増加した。このことから、海馬神経新生の促進には、増殖や分化に影響するタンパク質の合成と分泌の促進が関わっていることが示唆された。

次に、海馬のモノアミン量を調べた。その結果、コラーゲン分解物の経口投与により、海馬のドーパミン濃度が有意に増加した (図 2)。セロトニンとノルアドレナリンの濃度はコラーゲン分解物投与による変化が認められなかった。また、コラーゲン分解物の抗うつ作用はドーパミン D1 受容体アンタゴニストである SCH23390 の腹腔内投与により消失した (図 2)。一方、ドーパミン D2 受容体アンタゴニストであるスルピライドの腹腔内投与時において、コラーゲン分解物の抗うつ作用が認められた。以上の結果より、コラーゲン分解物の経口投与は海馬でのドーパミン遊離を促進し、D1 受容体を介して、抗うつ作用を惹起することが示唆された。さらに、海馬 TH 陽性細胞数の増加が確認された。

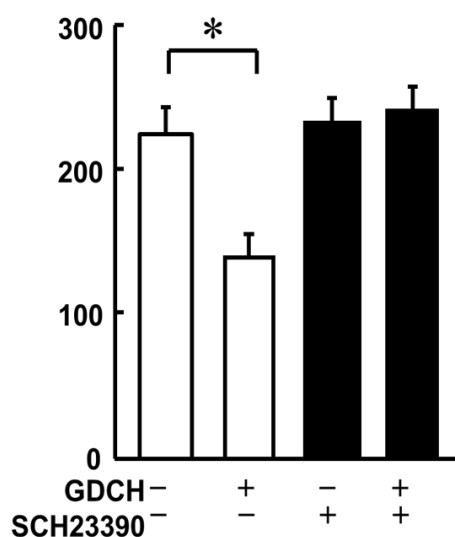


図 2 コラーゲン分解物の抗うつ作用に対する海馬ドーパミンの関与 (D1受容体アンタゴニスト投与時の強制水泳試験による無動時間)  
Mean ± SEM (n=5-7). \*p<0.05, Tukey-Kramer test.

### (3) うつモデルに対する効果の検証

社会的敗北ストレス負荷やコルチコステロン投与による軽度ストレス条件によるうつモデルでの評価系を構築した。社会的敗北ストレス負荷やコルチコステロン投与により、強制水泳試験での無動時間が有意に減少した(図3)。コラーゲン分解物の経口投与により、その軽度ストレス負荷によるうつ様状態が改善することが明らかとなった。また、社会的敗北ストレス負荷時において、海馬の神経炎症を調べた。その結果、社会的敗北ストレス負荷により、神経免疫細胞であるミクログリアやアストロサイトが活性化し、炎症性サイトカインの分泌が促進された。コラーゲン分解物の経口投与により、社会的敗北ストレス負荷による神経炎症の活性化が抑制された。これらの結果より、コラーゲン分解物は軽度な日常のストレスで誘発するうつ状態を予防や改善する可能性が示された。また、近年、うつ状態との関連が指摘されている神経炎症に対して、コラーゲンペプチドがその抑制に有効であることが示唆された。

以上をまとめると、本研究において、POが抗うつ薬様作用を有することが明らかとなった。アミノ酸ではなく、ペプチド態での摂取がその効果に必要であった。POは海馬神経新生を促進し、抗うつ作用に関与するメカニズムの1つとして考えられた。また、ドーパミンD1受容体経路の活性化と海馬神経炎症の抑制がコラーゲンペプチドの抗うつ作用に関与していることが示された。本研究成果は、新たな食品由来抗うつペプチドの発見につながり、コロナ禍も影響し、世界で問題となっている精神疾患の予防や治療に利用可能な機能性素材として期待できる。

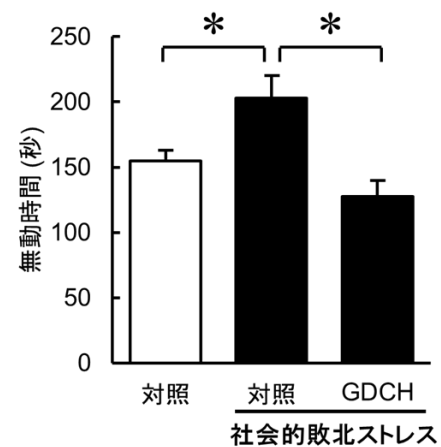


図3 社会的敗北ストレス負荷時におけるコラーゲン分解物の経口投与による抗うつ作用  
Mean ± SEM (n=8). \*p<0.05, Tukey-Kramer test.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizushige T, Nogimura D, Nagai A, Mitsuhashi H, Taga Y, Kusubata M, Hattori S, Kabuyama Y.	4. 巻 65
2. 論文標題 Ginger-Degraded Collagen Hydrolysate Exhibits Antidepressant Activity in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 251-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.251.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagai A, Mizushige T, Matsumura S, Inoue K, Ohinata K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Orally administered milk-derived tripeptide improved cognitive decline in mice fed a high-fat diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 14095-14102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900621R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizushige T, Uchida T, Ohinata K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dipeptide tyrosyl-leucine exhibits antidepressant-like activity in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59039-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nogimura D, Mizushige T, Taga Y, Nagai A, Shoji S, Azuma N, Kusubata M, Adachi SI, Yoshizawa F, Kabuyama Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Prolyl-hydroxyproline, a collagen-derived dipeptide, enhances hippocampal cell proliferation, which leads to antidepressant-like effects in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 5715-5723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902871R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 史佳, 水重 貴文, 田村 由自, 野木村 大, 金野 尚武, 吉澤 史昭, 前田 勇, 羽生 直人, 蕪山 由己人
2. 発表標題 そば摂取がうつ様行動に及ぼす影響とそのメカニズム解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿久津 歩夢, 篠原 日菜子, 多賀 祐喜, 楠畑 雅, 水重 貴文, 蕪山 由己人
2. 発表標題 環状ペプチドを含むコラーゲン加水分解物の皮膚光老化に対する影響解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小石川 眞紀, 三浦 亮太郎, 水重 貴文, 蕪山 由己人
2. 発表標題 メラノーマ皮膚癌細胞の増殖に対するアミノ酸栄養及び温度の影響評価
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 圭佑, 森笹 瑞季, 水重 貴文, 蕪山 由己人, 唐澤 陸央, 金丸 千夏, 内田 健志, 吉田 恵里子, 森 司, 井上 菜穂子
2. 発表標題 廃用性筋萎縮の回復時においてスケソウダラ由来タンパク質配合餌の摂取が骨格筋肥大に与える影響の解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯塚 真理乃, 水重 貴文, 多賀 祐喜, 野木村 大, 岩井 ミチ, 楠畑 雅, 蕪山 由己人
2. 発表標題 コラーゲン由来環化ペプチドは経口投与後海馬に移行し, 認知機能を向上させる
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野木村 大, 水重 貴文, 多賀 祐喜, 楠畑 雅, 吉澤 史昭, 蕪山 由己人
2. 発表標題 コラーゲン分解物は社会的敗北ストレスにより誘導される神経炎症を抑制する
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水重 貴文
2. 発表標題 食品由来ペプチドの脳神経調節作用に関する研究
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 佳菜, 水重 貴文, 多賀 祐喜, 楠畑 雅, 蕪山 由己人
2. 発表標題 コラーゲン由来ペプチドの脳内移行
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第14回学術大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 佐藤 史佳、水重 貴文、田村 由白、茗花 美幸、金野 尚武、前田 勇、羽生 直人、蕪山 由己人
2. 発表標題 そばタンパク質の抗うつ作用と そのメカニズム
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第14回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯塚 真理乃、水重 貴文、多賀 祐喜、楠畑 雅、蕪山 由己人
2. 発表標題 熱処理コラーゲン分解物由来 ペプチドの体内動態および 認知機能向上作用
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第14回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 圭佑、森笹 瑞季、水重 貴文、蕪山 由己人、早坂 孝宏、吉田 恵里子、内田 健志、森 司、井上 菜穂子
2. 発表標題 関節固定による筋萎縮時の脂質代謝動態
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森笹 瑞季、木村 圭佑、水重 貴文、蕪山 由己人、内田 健志、吉田 恵里子、森 司、井上 菜穂子
2. 発表標題 不運動・軽運動モデルに対する魚肉タンパク質の効果の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 唐澤陸央, 金丸千夏, 木村圭佑, 森笹瑞季, 内田健志, 吉田恵里子, 井上菜穂子, 森司, 水重貴文, 蕪山由己人
2. 発表標題 魚肉タンパク質摂取の廃用性筋萎縮の回復に対する影響
3. 学会等名 日本アミノ酸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野木村大, 多賀祐喜, 楠畑雅, 安達真一, 吉澤史昭, 水重貴文, 蕪山由己人
2. 発表標題 コラーゲン分解物が海馬モノアミン代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本アミノ酸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯塚真理乃, 野木村大, 多賀祐喜, 岩井ミチ, 楠畑雅, 水重貴文, 蕪山由己人
2. 発表標題 コラーゲン分解物の認知機能向上作用とその活性成分の同定
3. 学会等名 日本アミノ酸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川太一, 永井研迅, 水重貴文, 松村成暢, 井上和生, 大日向耕作
2. 発表標題 高脂肪食摂取による認知機能低下に対する牛乳由来ペプチドの改善機構
3. 学会等名 日本アミノ酸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野木村大、水重貴文、多賀祐喜、楠畑雅、蕪山由己人
2. 発表標題 社会的敗北ストレスモデルにおけるコラーゲン分解物の抗うつ作用と神経炎症への影響
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀優希、二瓶賢一、水重貴文、蕪山由己人
2. 発表標題 ジヒドロキシプロリン含有ペプチドの有機合成とその生理活性について
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ソバ由来成分を含有する抗うつ性組成物	発明者 田村由自、水重貴文、佐藤史佳、金野尚武、羽生直人、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開 2021-161080	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------