

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15794

研究課題名（和文）コラーゲンペプチドによる骨芽細胞の分化制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）To evaluate the regulatory effects of collagen-derived peptides on osteoblast differentiation

研究代表者

君羅 好史（Kimira, Yoshifumi）

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：00635443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨格系疾患は要介護者の増加と健康寿命の縮小に関連し、予防が求められている。コラーゲンペプチドは骨格系疾患の予防に有効との報告があるが、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、骨芽細胞での作用に関与するFoxファミリー転写因子とコラーゲンペプチドの相互作用に着目し、骨芽細胞の分化を促進するメカニズムの解明に取り組んだ。

コラーゲンペプチドのPro-HypはFoxg1、Foxo1、およびRunx2タンパク質と相互作用し、骨芽細胞分化のマスター転写因子Runx2の転写を誘導した。以上より、コラーゲンペプチドは核内転写因子を介して骨芽細胞の分化を促進し、これが骨形成の促進につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、コラーゲンペプチドが骨芽細胞の分化を調節するための共通のキーとなる分子を特定し、その骨格系における作用メカニズムを解明することを目標とした。本研究により、コラーゲンペプチドの一つPro-Hypが結合し、相互作用する分子を特定できた。食品として摂取される生理活性ペプチドが転写因子と相互作用して骨芽細胞の分化を亢進し骨形成を調節することが理解されることで、機能性食品摂取が骨格系疾患の改善や予防に寄与する可能性が広がり、社会的に重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Skeletal disorders are associated with an increase in individuals requiring caregiving and a reduction in healthy life expectancy, highlighting the need for prevention. Collagen peptides have been reported to be effective in preventing skeletal disorders, but their mechanism of action remains unclear. Therefore, we focused on the interaction between collagen peptides and Fox family transcription factors, which are involved in the function of osteoblasts, to elucidate the mechanism underlying the promotion of osteoblast differentiation. We found that the Pro-Hyp component of collagen peptides interacts with Foxg1, Foxo1, and Runx2 proteins, inducing the transcription of Runx2, the master transcription factor for osteoblast differentiation. Based on these findings, collagen peptides are believed to promote osteoblast differentiation through interaction with nuclear transcription factors, ultimately enhancing bone formation.

研究分野：食品機能学

キーワード：コラーゲンペプチド 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会である我が国では健康寿命の延伸が求められている。健康寿命を縮める原因の一つに骨格系疾患を原因とする要介護者の増加が挙げられることから、骨格系疾患改善と予防は社会的に必須といえる。そこで骨格系疾患に対し改善・予防効果を示す食品成分の一つである「コラーゲンペプチド」に着目した。コラーゲンが多く含有される骨や皮膚ではその代謝においてコラーゲンの分解産物が組織液や血中に放出される。この分解産物が「コラーゲンペプチド」である。またコラーゲンは、古くから食品としても利用されてきた。コラーゲンを加熱変性させた食品素材がゼラチンであり、そのゼラチンを酵素処理し低分子化した機能性食品素材が「コラーゲンペプチド」である。

コラーゲン(ゼラチン)加水分解物を摂取したヒト血中にコラーゲン由来のペプチドが検出されることが報告(Iwai et al., 2005)され、変形性膝関節症患者の膝の痛み改善作用(T. E. McAlindon et al., 2011)や骨粗鬆症患者の骨密度改善作用(D. König et al., 2018)が報告されている。また軟骨細胞の分化調節作用(Nakatani et al., 2010)、筋芽細胞の分化促進作用(Kitakaze et al., 2016)が報告されており、コラーゲンペプチドは骨格組織の構成細胞の分化遺伝子発現調節を有していると考えられている。

これまでに申請者は、コラーゲンペプチドの一つである Pro-Hyp について、骨芽細胞分化促進作用を有することを報告している(Kimira et al., 2014)。近年では、コラーゲンペプチドによる骨芽細胞の分化調節作用メカニズムの一部に核内転写因子である Foxg1 が関与することを報告(Kimira et al., 2017)し、コラーゲンペプチドの作用は細胞分化を転写レベルで調節している可能性について言及している。しかしながら、コラーゲンペプチドの細胞分化調節に関する詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者は骨芽細胞におけるコラーゲンペプチドの分化促進作用について報告してきた。コラーゲンペプチドが骨芽細胞内に取り込まれ遺伝子発現を調節するためには相互作用する分子が必要であると考え、コラーゲンペプチドによる骨芽細胞の分化調節作用メカニズムの一部に核内転写因子である Foxg1 が関与することを報告(Kimira et al., 2017)している。

しかし、コラーゲンペプチドと分化関連転写因子とが相互作用し、骨芽細胞の分化に関与しているかは不明である。本研究では、コラーゲンペプチドの骨芽細胞での作用発現機構に Runx2 プロモータ領域への結合能を有する Fox ファミリー転写因子が関与すると考え、コラーゲンペプチドと Fox ファミリー転写因子が相互作用し、骨芽細胞の分化亢進作用をもたらすメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨芽細胞分化シグナリングに与えるコラーゲンペプチドの影響

コラーゲンペプチドを骨芽細胞に作用させると分化マスター転写因子である Runx2 の mRNA 発現量を上昇させる。Runx2 の転写調節には、その上流のシグナル伝達機構として MAPK カスケード、Akt シグナルが活性化されることが報告されている。これらシグナル伝達経路を介してコラーゲンペプチドが遺伝子発現調節に関与している可能性を考え、骨芽細胞分化シグナリングに与える影響について検討した。

### (2) コラーゲンペプチドと Fox ファミリータンパク質の相互作用の解析

Pro-Hyp による Runx2 の転写制御機構を解明するには、Foxg1, Foxo1 そして Runx2 転写調節因子の相互作用を Pro-Hyp が調整するかを明らかにすることが重要であると考え、Foxo1 と Runx2 のタンパク質の相互作用に Pro-Hyp が影響を及ぼすか、また Pro-Hyp が Foxg1 と Runx2 の相互作用に影響を与えるか検討した。

### (3) Fox ファミリータンパク質を介したコラーゲンペプチドの Runx2 プロモーター転写活性機構の解明

骨芽細胞における Pro-Hyp の Runx2 発現制御機構を明らかにするため、マウス Runx2 P1 プロモータープラスミドを確立し、Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp 応答領域を同定した。同定した Pro-Hyp 応答領域に Pro-Hyp 依存的に結合する転写調節因子の同定を行い、Foxg1, Foxo1 および Runx2 を介した Runx2 転写活性機構の解明を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 骨芽細胞分化シグナリングに与えるコラーゲンペプチドの影響

骨芽細胞分化マスター転写因子である Runx2 の mRNA 発現量をコラーゲンペプチドが上昇させるシグナル伝達への影響を明らかにするために Erk1/2、Akt シグナルのリン酸化に対する Pro-Hyp の影響を検討した。骨芽細胞への Pro-Hyp の添加は Erk1/2、Akt のリン酸化を促進した。ま

た Pro-Hyp による Runx2 の mRNA 発現量増加作用は、Erk1/2、および Akt リン酸化阻害剤により消失したことから Pro-Hyp は Erk1/2、および Akt シグナル経路を介して骨芽細胞分化を促進していることが示された。

## (2) コラーゲンペプチドと Fox ファミリータンパク質の相互作用の解析

Foxo1-Runx2 の相互作用と Pro-Hyp の影響について調べた。Foxo1 は Pro-Hyp が非存在下では、Runx2 と弱い結合を示し、Pro-Hyp 存在下では Foxo1 と Runx2 の結合が増強した。次に、Pro-Hyp が Foxo1 と Runx2 の相互作用に影響を与えるか検討したところ、Pro-Hyp が存在しない場合、Runx2 は Foxo1 と弱い結合を示し、Pro-Hyp 存在下では、Foxo1 と Runx2 の結合が増強した。

Pro-Hyp が Foxg1 と Runx2 の相互作用に影響を与えるか検討したところ、Pro-Hyp 非存在下において、Runx2 と Foxg1 は強く結合し、Pro-Hyp 存在下では、Foxg1 と Runx2 の結合は減弱した。以上より、Pro-Hyp は Foxg1 と Runx2 の結合を抑制し、反対に Foxo1 と Runx2 の結合を促進することを明らかにした。これらの結果から、(Pro-Hyp)-Foxg1、(Pro-Hyp)-Foxo1 および (Pro-Hyp)-Foxo1-Runx2 が骨芽細胞内で形成されていることが予想された。

## (3) Fox ファミリータンパク質を介したコラーゲンペプチドの Runx2 プロモーター転写活性機構の解明

前項で見出された Pro-Hyp と Fox ファミリータンパク質および Runx2 の複合体が Runx2 の転写に関与していると考え、マウス Runx2 P1 プロモータープラスミドを確立し、Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp レスポンス領域の同定を試みた。Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から -332 を Pro-Hyp 応答領域として同定し、この領域には、Runx2 結合部位と Fox コア配列が含まれることが明らかとなった。Runx2 結合部位には Runx2 が結合し、転写を抑制することが報告されていることから、Pro-Hyp が Runx2 と Runx2 P1 プロモーターの結合を阻害していると予想し、次に Pro-Hyp 依存的に Pro-Hyp 応答領域に結合する転写因子を同定した。結果、Pro-Hyp の非存在下では Runx2 は、Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp 応答部位に結合しており、この結合は Pro-Hyp により阻害された。一方で、Pro-Hyp 存在下において Foxg1 と Foxo1 は Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答部位に結合することを明らかにした。

これらの結果から、骨芽細胞における Pro-Hyp の Runx2 レポーター応答のメカニズムとして Pro-Hyp がサプレッサーとして Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から -332 の領域に結合している Runx2 を解離することにより、転写抑制を阻害する。さらに、Pro-Hyp は Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から -332 の領域に存在する Fox コア配列へ、Foxg1、Foxo1 を結合させることで Runx2 レポーター応答を活性化することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osawa Yoshihiro, Nomura Kaho, Kimira Yoshifumi, Kushibe Seiji, Takeyama Ken-ichi, Nagao Masashi, Kataoka-Matsushita Aya, Koizumi Seiko, Mano Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Monitoring urinary collagen metabolite changes following collagen peptide ingestion and physical activity using ELISA with anti active collagen oligopeptide antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13527-13527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92934-1	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 Nomura Kaho, Kimira Yoshifumi, Osawa Yoshihiro, Kataoka-Matsushita Aya, Takao Koichi, Sugita Yoshiaki, Shimizu Jun, Wada Masahiro, Mano Hiroshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Stimulation of the Runx2 P1 promoter by collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline bound to Foxg1 and Foxo1 in osteoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20210304	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 Nomura Kaho, Kimira Yoshifumi, Osawa Yoshihiro, Shimizu Jun, Kataoka-Matsushita Aya, Mano Hiroshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Collagen-derived dipeptide prolyl hydroxyproline directly binds to Foxg1 to change its conformation and inhibit the interaction with Runx2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2027 ~ 2033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1642099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 君羅好史、大澤吉弘、真野博	4. 巻 14
2. 論文標題 運動器におけるコラーゲンペプチドの機能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養	6. 最初と最後の頁 1 - 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 君羅好史、大澤吉弘、野村佳歩、真野 博	4. 巻 24
2. 論文標題 最新のニュートリションを考える ~東京オリンピック・パラリンピック カウントダウン編~ 第5回 駅伝選手の膝の健康状態に寄与するコラーゲンペプチド摂取の効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FOOD Style21	6. 最初と最後の頁 22-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshifumi Kimira , Masafumi Saito , Seiji Kushibe , Kaho Nomura , Yoshihiro Osawa , Yusuke Sekiguchi , Jun Shimizu , Sachie Nakatani , Seiko Koizumi , Naoki Inoue , Yoshihisa Mori , Jun Kobayashi , Hiroshi Mano	4. 巻 47
2. 論文標題 The Effects of Collagen Peptide Supplementation on Knee Joint Health A Double blind, Placebo controlled, Randomized Trial in Healthy University Students Belonging to a Running Club	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 1455-1462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 君羅好史、大澤吉弘、野村佳歩、真野博	4. 巻 39
2. 論文標題 運動器に対するコラーゲンペプチド の効果とその作用メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 食品加工技術	6. 最初と最後の頁 31 - 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 塩原由菜 , 野村佳歩 , 君羅好史 , 大澤吉弘 , 松下綾 , 真野博
2. 発表標題 褐色脂肪細胞分化マスター遺伝子PGC-1 プロモーターにおけるコラーゲン由来ジペプチドPro-Hypレスポンスエレメントの探索
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚 宥哉、君羅 好史、大澤 吉弘、松下 綾、小泉 聖子、真野博
2. 発表標題 コラーゲン由来ジペプチド Pro-Hypは筋芽細胞株C2C12の筋芽細胞分化を促進する
3. 学会等名 ファンクショナルフード学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤 吉弘 , 野村 佳歩 , 君羅 好史 , 櫛部 静二 , 武山 健一 , 長尾 雅史 , 松下 綾 , 小泉 聖子 , 真野 博
2. 発表標題 新規ELISA法を用いた尿中活性型コラーゲンオリゴペプチド(ACOP)測定によるアスリートのコラーゲン代謝の変動
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 君羅 好史 , 野村 佳歩 , 大澤 吉弘 , 清水 純 , 松下 綾 , 真野 博
2. 発表標題 活性型コラーゲンペプチドPro-HypのERK経路を介した骨芽細胞分化促進メカニズム
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 野村 佳歩, 君羅 好史, 大澤 吉弘, 松下 綾, 真野 博
2. 発表標題 骨形成マスター遺伝子Runx2プロモーターにおけるコラーゲン由来ジペプチドPro-Hypレスポンスエレメントの解析
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 小林 亮介 , 君羅 好史 , 野村 佳歩 , 小泉 聖子 , 真野 博
2. 発表標題 コラーゲン由来ジペプチドProlyl hydroxyproline(Pro-Hyp)は間葉系幹細胞株C3H10T1/2の褐色脂肪細胞分化を加速する
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 佳歩 , 君羅 好史 , 真野 博
2. 発表標題 Pro-HypはFoxG1と結合することによりFoxG1とRunx2の相互作用を抑制する
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshifumi Kimira, Yoshihiro Osawa, Kaho Nomura, Aya Matsushita, Naoki Inoue, Sachie Nakatani, Jun Shimizu, Masahiro Wada, Hiroshi Mano
2. 発表標題 Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells
3. 学会等名 ICoFF2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大澤吉弘、君羅好史、真野博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 271
3. 書名 フードテックの最新動向	

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------