

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791840

研究課題名（和文）：生理機能性ペプチドの精製・分離及びその骨再生に及ぼす影響に関する分析

研究課題名（英文）：Effects of Purified Bioactive Peptides on Bone Regeneration

研究代表者

山田 志津香 (YAMADA SHIZUKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00363458

研究成果の概要（和文）：

牛海綿状脳症(BSE)の発生以来、魚由来コラーゲン(Fish Collagen Peptides: FCP)が注目されており、近年、栄養補助食品や食品添加剤として多用されている。しかし、その細胞機能に対する効果については、未だ解明されていない。コラーゲンの合成、質ならびに石灰化に対する FCP の効果について、マウス頭蓋骨由来前骨芽細胞(MC3T3-E1 細胞)を用いて検討した結果、FCP を総濃度が 0.2%(w/v)となるように添加した培地で、前述の細胞を 48 時間培養後、コラーゲン翻訳後修飾関連遺伝子であるリシルヒドロキシラーゼ(LH)1-3、リシルオキシダーゼ類似(LOXL)2-4 ならびにグリコシルトランスフェラーゼ 25 ドメインコンテイニング 1(GLT25D1)遺伝子発現が、FCP を添加しない培地で培養した対照群と比較して有意に増強していた。さらに、14 日間の培養で産生されたコラーゲンがアミノ酸分析器と架橋測定器で分析された時、FCP 処理群は、対照群と比較して、コラーゲン合成量、ヒドロキシリシン(Hyl)量、Hyl アルデヒド由来架橋量が有意に増加しており、コラーゲン成熟も促進していた。その上、von Kossa 染色により、基質石灰化を促進することも実証した。

研究成果の概要（英文）：

Collagen is one of the most widely used biomaterials in the fields of tissue engineering, cosmetics and functional foods. Recently, fish collagen peptides (FCP) have been used as a dietary supplement, but its effects on cellular functions are poorly understood. In this study, the effects of FCP on the collagen synthesis and quality were investigated using an osteoblastic MC3T3-E1 cell culture system. When cells were treated with 0.2% (w/v) FCP, gene expression levels of collagen modifying enzymes, i.e. lysyl hydroxylases (LH1-3), lysyl oxidases (LOX and LOXL1-4) and glycosyltransferase 25 domain containing 1 (GLT25D1) were all, except LOX and LOXL1, significantly upregulated at 48 hrs of culture. In addition, when collagen deposited at 14 days of culture was analyzed, the FCP treated group showed significantly higher collagen content, a greater extent of lysine hydroxylation (Hyl), higher levels of Hyl-aldehyde derived cross-links and accelerated cross-link maturation, in comparison to the untreated group. Furthermore, it was found that FCP treatment accelerated the matrix mineralization in the cultures. These results indicate that FCP exerts positive effects on collagen synthesis, collagen quality and mineralization in an osteoblastic cell culture system, suggesting the potential utility of FCP for bone tissue engineering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来により骨粗鬆症の増加することが予想される。したがって、高齢者においては、骨折や骨欠損後の創傷治癒遅延が生じやすいと考えられるので、治癒の遅れを回復させるために骨再生剤の開発は重要である。また、歯科領域においてはインプラントが盛んに行われているが、高齢者においてはインプラント埋入部の骨の厚みや強度が不十分な場合がある。このような場合、腰骨など他部位から骨を採取し補強する方法もあるが、患者への負担は大きい。そこで、歯科領域においても優秀な骨再生剤が求められている。コラーゲンは、真皮、靭帯、腱、軟骨、骨などを構成する主要なタンパク質で、ヒトにおいては全タンパク質の約 30%を占めるといわれている。コラーゲンの主な機能・効果として、コラーゲン合成を促進、皮膚角質層の代謝促進、創傷治癒促進、潰瘍形成の抑制、血圧上昇の抑制、変形性関節症や慢性関節リウマチの予防・改善、骨強度の向上などがあげられる。これまで、牛由来のコラーゲンは医薬品、医薬部外品に多用されていた。しかし、1980年代後半から BSE の発症が世界的に大きな社会問題となった。これまで骨再生の目的で検討されていたのは、主として牛由来コラーゲンであったが、この狂牛病の危険性のため医療用素材として牛由来コラーゲンの使用が禁止されている。魚の骨、皮、鱗から抽出、精製されたコラーゲンは BSE の心配がなく、加工技術も向上しており低分子化が可能なることから、近年、その利用が注目されている。骨に対するフィッシュコラーゲンの影響に関する研究においては、フィッシュコラーゲンシート上で培養された骨芽細胞の増殖が促進され、生体親和性を有することが報告されている。しかし、実際は、その変性温度の低さから未だヒトへの臨床応用には至っていない。また、哺乳類由来コラーゲンのアミノ酸組成や分子量の相違による骨への影響に関する報告はほとん

どなく、コラーゲン翻訳後修飾の分析は、フィッシュコラーゲンを用いた骨再生に対する機序の解明に一石を投じるものとする。

2. 研究の目的

フィッシュコラーゲンは、化学薬品と異なり、魚類を原料とするため、高齢者の身体への負担が少なく、また高い産出量で資源枯渇の可能性が低く、比較的安価で安定した供給が得られる。一方、哺乳類由来コラーゲンのアミノ酸組成や分子量の相違による骨影響に関する報告はほとんどない。本研究の目的は、高速液体クロマトグラフィーを用いた詳細なアミノ酸ならびにコラーゲン翻訳後修飾の生化学的分析によりフィッシュコラーゲンの骨再生剤としての有効性を科学的に証明することである。

3. 研究の方法

(1)フィッシュコラーゲンペプチド(FCP)のアミノ酸分析

FCP 粉末を 6N 塩酸で加水分解後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてアミノ酸分析を行った。

(2)リアルタイムPCR分析

マウス頭蓋骨由来前骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いて、総濃度が 0.05, 0.1, 0.2, 0.5%(w/v)となるように予め調整した 5% FCP 溶液を培地に添加し、48 時間培養後、細胞を回収、AGPC 法による総 RNA 抽出、cDNA 合成を行った。FCP 溶液を含まない培地で培養を行った細胞を対照群とした。type I collagen $\alpha 2$ chain(COL1a2)とコラーゲン修飾酵素である lysyl hydroxylase (LH)1-3, lysyl oxidase (LOX), LOX-like protein (LOXL)1-4 and glycosyltransferase 25 domain containing 1 (GLT25D1)の遺伝子発現を分析し、対照群と比較して最も高い発現を示した FCP 濃度を至適濃度と決定した。

(3)細胞増殖試験

上記細胞をFCP添加と不含培地で培養後2, 5, 7, 10, 14日目に血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

(4)細胞基質のアミノ酸ならびにコラーゲン架橋分析

上記細胞を14日間培養後、回収・洗浄、凍結乾燥を行った。その後 NaB^3H_4 による還元、6N塩酸による加水分解後、HPLCを用いてアミノ酸ならびにコラーゲン架橋分析を行った。

(5)in vitro石灰化試験

上記細胞を21日間培養後、アリザリンレッドS染色を行った。その後、染色された細胞層がGregoryらが以前報告した方法により、半定量された。

4. 研究成果

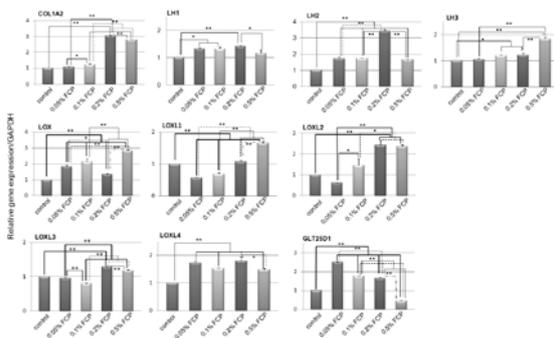
(1)FCPのアミノ酸分析

実験に用いた焼津水産科学から供与されたFCPはヒドロキシプロリン量が約5%であり、哺乳類由来コラーゲンと比較して約半分と少なかった。

(2)リアルタイムPCR分析

結果を図1に示す。LOXとLOXL-1を除く全てのコラーゲン修飾酵素ならびにタイプIコラーゲンの遺伝子発現が増強していた0.2%(w/v)FCPを至適濃度と決定した。

図1 リアルタイムPCR分析結果



(3)細胞増殖試験

細胞数計測結果を図2に示す。対照群、実験群ともに同様の増殖曲線を示した。培養5日目以外、細胞数に有意差を認めなかった。

(4)細胞基質のアミノ酸ならびにコラーゲン架橋分析

コラーゲン架橋と前駆体アルデヒドの代表的なクロマトグラフ(図3-A)、2つの主要還元性架橋(DHLNLとHLNL)の比(図3-B)、アルデヒド総数(図3-C)ならびにコラーゲン架橋の成熟結果(図3-D)を以下に示す。

FCP群のDHLNL/HLNL比は対照群と比較して有意に高かった($p < 0.05$)。アルデヒド総数は両群で有意差はなかったが、FCP群の架橋成熟($\text{Pyr}/\text{DHLNL} \times 100$)は対照群よりも有意に高かった($p < 0.01$)

図2 細胞増殖試験結果

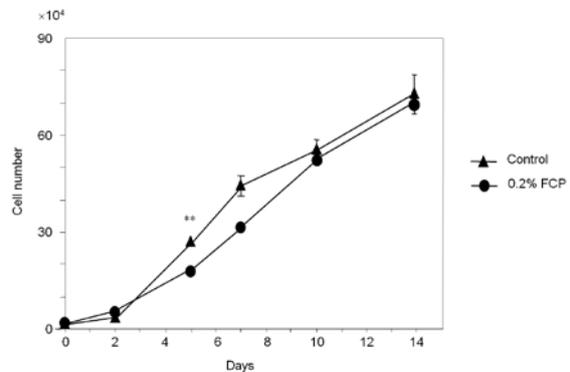
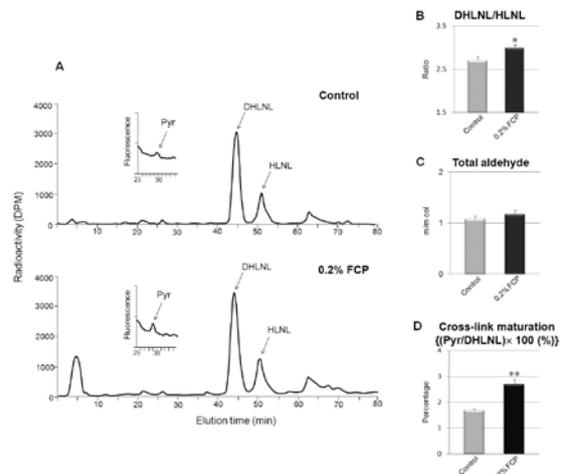


図3 細胞基質のコラーゲン架橋分析結果



(5)in vitro石灰化試験

培養21日目のアリザリンレッドS染色パターン(図4-A)と半定量分析結果を(図4-B)以下に示す。

両群とも、石灰化塊の形成は明らかであった。しかし、形成された石灰化塊の数は、FCP群の方が対照群よりも有意に多い様相を呈した。半定量分析においても、FCP群が対照群よりも有意に多い石灰化塊を示した($p < 0.05$)。

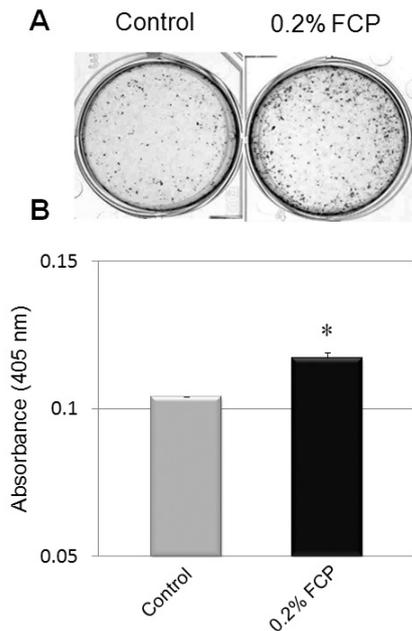


図 4

アリザリンレッド S 染色結果

以上の結果をまとめると、FCP 群により合成されたコラーゲンの生化学的所見（コラーゲン合成量の増加、リシンの水酸化の増大、高レベルのHyl^{ald}由来のコラーゲン架橋）は、遺伝子発現パターンの結果と一致していることが明らかとなった。また、FCPにおけるLH3とGLT25D1 遺伝子の上方制御は、この群で合成されたコラーゲンがより多く糖付加されている可能性を示唆している。

さらに、FCP によりコラーゲン架橋の成熟が促進されることが明らかとなった。

コラーゲン合成量の増加と質の改善が、基質石灰化に好都合な環境となり、その結果、石灰化塊の形成を促進したと考えられる。

これらの結果は、魚由来のコラーゲンは哺乳類由来のコラーゲンの代替材料として有効利用できる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 志津香 (YAMADA SHIZUKA)

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 00363458

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし