

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500966

研究課題名(和文)皮膚の損傷箇所における内因性および食事由来コラーゲンペプチドの構造と機能

研究課題名(英文)Function and structure of food-derived and endogenous collagen peptide in damaged regions of skin

研究代表者

佐藤 健司(SATO, KENJI)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：00202094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンペプチドを経口摂取した場合にヒト抹消血中に出現するPro-Hypが、マウスの炎症部位・創傷治癒部で増加することを見いだした。またマウス皮膚初代培養線維芽細胞は間葉系幹細胞マーカー(p75NTR)、各種ペプチドトランスポーターを発現し、Pro-Hypを取り込み、コラーゲンゲル上での増殖が促進され、継代によりこの能力が失われることを明らかにした。本研究により創傷治癒におけるPro-Hypの重要性を示し、さらにコラーゲンペプチド摂取が創傷治癒を促進する機構の一部を解明した。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrates that occurrence of Pro-Hyp in the inflammatory and wound healing regions of mice. Pro-Hyp has been demonstrated to be present human blood after ingestion of collagen peptide. In addition, primary cultured fibroblast from mouse skin expressed mesenchymal stem cell marker (p75NTR) and peptide transporters and incorporated Pro-Hyp and started to grow on collagen gel, which were extensively decreased after passage. The present study demonstrates the significant role of Pro-Hyp in wound healing process and explores mechanism for enhance meant of wound healing by ingestion of collagen peptide.

研究分野：生活科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：コラーゲン ペプチド 線維芽細胞 創傷治癒 皮膚 Pro-Hyp

1. 研究開始当初の背景

我々の申請前の研究において、5-20 g のコラーゲンペプチドの摂取によりヒトの抹消血に 10-100 μM のコラーゲンペプチドが存在する事、その主成分が prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) および hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly)である事を報告してきた¹⁻⁴⁾。さらに Pro-Hyp, Hyp-Gly はコラーゲンゲル上で線維芽細胞の増殖を促進する事を報告してきた^{4,5)}。これらの現象はコラーゲンペプチドを経口摂取した場合、血中に移行した Pro-Hyp が線維芽細胞の増殖を促進し、コラーゲンの合成を行い、真皮の再生により、創傷治癒を促進する事が示唆されている。

1. Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., Ohtsuki, K. (2005) Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. J. Agric. Food Chem., 53, 6531-6536.

2. Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., Sato, K. (2007) Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. J. Agric. Food Chem., 55, 1532-1535.

3. Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., Sato, K. (2010) Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. Int. J. Food Sci. Nutri. 61, 52-60.

4. Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., Sato, K. (2010) Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. Int. J. Food Sci. Nutri. 61, 52-60.

5. Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park E.-Y. Nakamura, Y., Sato, K. (2011) Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. Food Chemistry

129, 1019-1024.

6. Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C. Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., Sato, K. (2009) Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. J. Agric. Food Chem., 57 (2), 444-449.

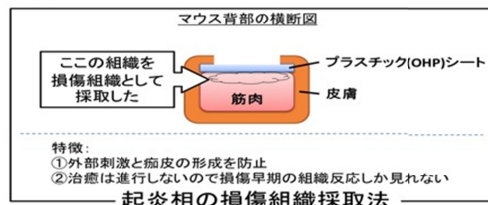
2. 研究の目的

コラーゲンペプチドは内因性のコラーゲンの分解からも生じうるため、創傷治癒部位においてコラーゲンペプチドが生じ、同創傷治癒を引き起こしている可能性がある。そのため、創傷部位、または炎症部位において Pro-Hyp 等のコラーゲンペプチドが生成している可能性を検証する事を第1の目的とした。さらに、どのようなメカニズムで Pro-Hyp により線維芽細胞の増殖が促進するかを明らかにする事を第2の目的とした。

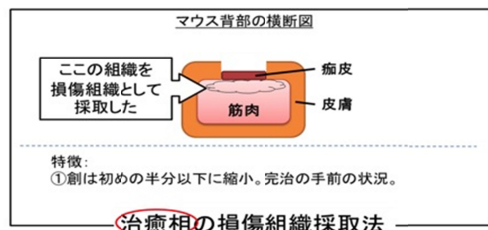
3. 研究の方法

マウスの背中に図1に示す創を作製した。7日目までは痂皮の形成を防ぐため、フィルムを貼付けた。その後はフィルムをのぞき、痂皮の形成を経て、真皮を再生させた。サンプリング部位を図1に示す。

1-7日目



13日目



27日目 完全に治癒

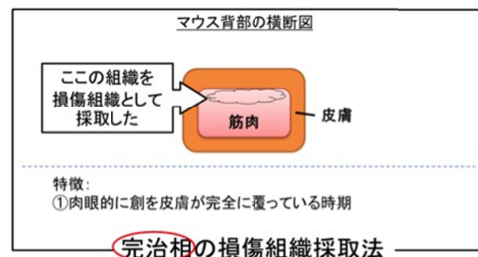


図1. マウスへの創傷形成とサンプリング

また BALB/cAJcl マウスの右耳に 10 μ L の 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) のアセトン 0.2% 溶液を 3 日おきに塗布し、DNFB 誘発慢性接触皮膚炎を生じさせた。コントロールではアセトンのみを塗布した。左耳は何も塗布せず放置した。急性炎症期の 9 日目と慢性炎症期の 18 日目で、ジエチルエーテル麻酔下で安楽死後、耳を切り取り、重量測定後、以下の実験に用いた。

各サンプルは 3 倍量のエタノールを加え、Biomasher (Nippi) 中で磨砕した。遠心分離後上清をサンプルとして用いた。

Pro-Hyp, HypGly の定量は液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS: 3200QTRAP, AB Sciex) により multi reaction monitoring (MRM) により行った。サンプルとそのまま、逆相 HPLC で分離し、MRM で定量するか、6-aminoquinolyl-N-hydroxy succinimidil carbamate (AccQ) 試薬で誘導化後、逆相 HPLC により分離した。

BalbC マウス皮膚から遊走してきた線維芽細胞を重村の方法 (Shigemura et al., 2009) により集め、プラスチックシャーレ上で培養した。その際、Pro-Hyp を一定の濃度で加えた。培養後細胞をトリプシン処理により回収し、Pro-Hyp を含まない PBS により十分洗浄した。その後終濃度 75% のエタノール中で磨砕した。遠心分離により得た上清中の Pro-Hyp を LC-MS/MS により定量した。

マウス皮膚より遊走してきた線維芽細胞をそのまま、またはプラスチックシャーレ上で経代培養した線維芽細胞を、重村らの方法 (Shigemura et al., 2009) に従ってコラーゲンゲル上に播種し、Pro-Hyp, Hyp-Gly の存在・非存在下で培養を行った。細胞数を MTT 法により評価した。

マウス皮膚より遊走してきた初代培養細胞および、プラスチックシャーレ上で経代培養した線維芽細胞より RNA を回収し、RT-PCR 法によりペプチドトランスポーター (PEPT1, PEPT2, PHT1, Ci1), V 型コラーゲン $\alpha 3(V)$ (Col5a3)、間性幹細胞マーカーである p75NTR の発現を調べた。GAPDH をハウスキープ遺伝子として用いた。

4. 研究成果

内因性 Pro-Hyp の生成

マウス皮膚創傷治癒時の Pro-Hyp と Hyp-Gly の生成を図 2 に示す。Hyp-Gly は創傷治癒の全期間を通じてほとんど値は変化しなかった。また非創傷部位と比べても有意な差は認められなかった。一方、Pro-Hyp は創傷部位において起炎症時の 3 および 5 日目及び治癒時の 13 日目に正常部位と比べ有意に高値を示し、創傷治癒に伴い生成する事が明らかとなった。

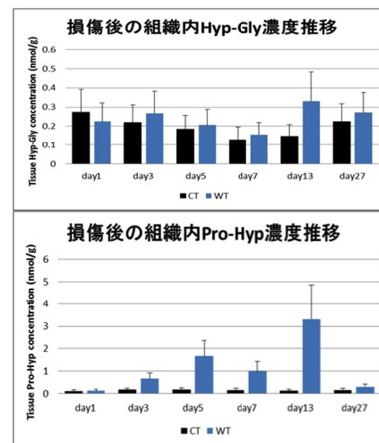


図 2 マウス皮膚創傷治癒部位 (WT) および同一個体の正常部位(CT)における Hyp-Gly および Pro-Hyp の生成

マウスの耳に DNFB を塗布する事により、図 3 に示す様に、耳の重量が増加し、接触皮膚炎による炎症が生じた。9 日目は急性炎症時であり、18 日目は慢性炎症時に相当する。慢性炎症時にはコラーゲン繊維の再生と崩壊が生じている事が報告されている。図 4 に示す様に炎症期において Pro-Hyp の生成が認められる。一方、DNFB を右耳に塗布したマウスの左耳には有意な Pro-Hyp の生成は認められていない。またピークルを塗布した場合は Pro-Hyp の生成は認められなかった。

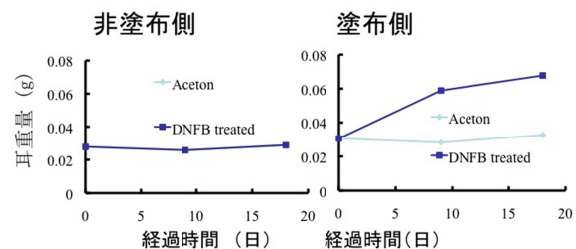


図 3 DNFB 塗布および非塗布側の耳の重量 アセトンをピークルとして使用

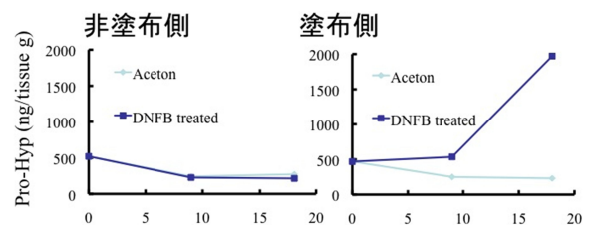


図 4 DNFB 非塗布側、および塗布側の Pro-Hyp 含量 アセトンをピークルとして使用

これらの結果はマウスにおいて炎症箇所比較的局所的に Pro-Hyp が生成してい

ることを示す。一方、コラーゲンペプチドを摂取したヒトの抹消血中に Pro-Hyp と共に存在した Hyp-Gly は炎症部位にはほとんど見られなかった。マウスにおいては Hyp-Gly が生成しない可能性がある。一方、Hyp-Gly は動物モデルで生理活性が報告されているため、炎症時に生成するが速かに他の成分に代謝される事が考えられる。これらの点を明らかにするため、炎症箇所の他の成分の消長も網羅的に調べる必要がある。いずれにせよ創傷治癒・慢性炎症により線維芽細胞の増殖促進作用をもつ Pro-Hyp が生成している事が明らかとなった。これらの事実は Pro-Hyp が線維芽細胞増殖促進によりコラーゲンの産生を促進し、創傷治癒に積極的に関与している事を示す。炎症部位には血液中の液成分が血管から漏れだす事が知られているため、血中の食事由来の Pro-Hyp が炎症部位において、内因性の Pro-Hyp とともに創傷治癒を促進している事が示唆される。事実、コラーゲンペプチドの摂取により褥瘡の治癒が促進されるという報告がある。

本研究によりコラーゲンペプチドを摂取により血中に移行する Pro-Hyp は創傷治癒・炎症時に生体でも生じ、これらの反応時に線維芽細胞に対して作用しうる事が明らかとなった。

Pro-Hyp の線維芽細胞への取り込み

Pro-Hyp がコラーゲンゲル上で線維芽細胞の増殖を促進する事が知られているが、そのメカニズムは不明である。一般に生理活性ペプチドは細胞表面の受容体に結合する事により情報を伝達するが、Pro-Hyp はコラーゲンペプチド摂取後、または炎症部位においてかなりの時間にわたり比較的高濃度で存在する事が知られている。そのため、従来知られている受容体結合では情報伝達のコントロールが困難であると考えられる。そこで細胞に直接取り込まれ、内部の酵素系に直接作用する可能性を検討した。

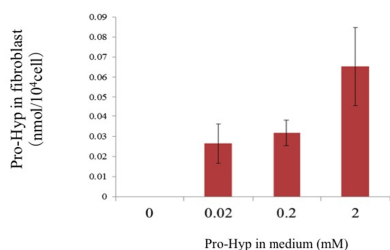


図5. 初代培養線維芽細胞の Pro-Hyp の取り込み

図5に示す様に培地に添加した、Pro-Hyp 含量に依存して細胞に Pro-Hyp が取り込まれる事が明らかとなった。一般に線維芽細胞にはペプチドトランスポーターは発現していないと考えられていたが、初代培養線維芽細胞

では取り込みが認められた。そこで、継代培養による取り込み能の変化を検討した。図6に示す様に、継代すると Pro-Hyp の取り込み能は急激に減少した。これらの現象を更に詳しく解明するために、ペプチドトランスポーターの発現を調べた。

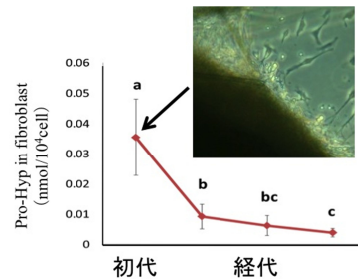


図6 継代に伴う線維芽細胞の Pro-Hyp の取り込み

GAPDH・PEPT1



図7 初代培養 (Ogc) および、継代1代目 (Sub) の線維芽細胞の GAPDH および PEPT1 の RT-PCR

PEPT2・PHT1



図8 初代培養 (Ogc) および、継代1代目 (Sub) の線維芽細胞の PEPT2 および PHT1 の RT-PCR

Ci1・Col5a3

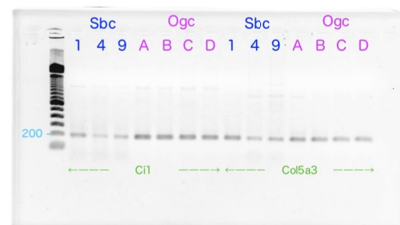


図9 初代培養 (Ogc) および、継代1代目 (Sub) の線維芽細胞の Ci1 および Col5a3 の RT-PCR

図 7-9 に示す様に、代表的なペプチドトランスポーターである PEPT1, PEPT2, Ci1 は初代培養細胞でのみ発現しており、継代細胞ではほとんどシグナルが観察されない。この現象は図 6 で示す Pro-Hyp の取り込み能の変化と良く一致する。一方、PHT1 の発現には継代による大きな変化はなかった。PHT1 はペプチドの他 His 等のアミノ酸の取り込みに関与するため大きな変化が無いと考えられる。

初代培養細胞のみがペプチドトランスポーターを高発現しているため、線維芽細胞は培養により形質が大きく変化する事が考えられる。この点を明らかにするために体性幹細胞マーカー p75NTR の発現を同様に調べた。

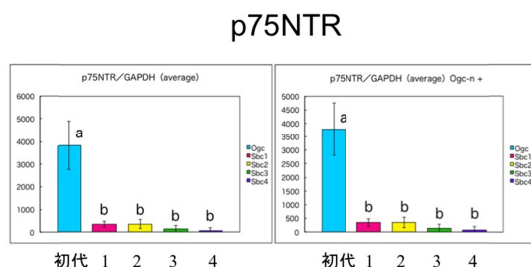


図 10 継代による体性幹細胞マーカー p75NTR の発現変化

図 10 に示す様に p75NTR も継代により急激に発現が減少した。そのため、皮膚より遊走してきた線維芽細胞（初代培養株）は体性幹細胞から分化したばかりの細胞である可能性が高い。

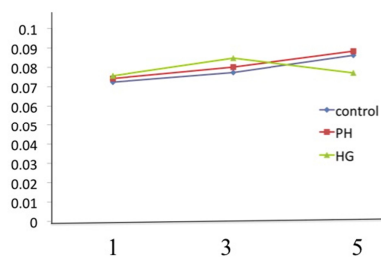


図 11 継代代目の線維芽細胞のコラーゲン上での増殖 Pro-Hyp, Hyp-Gly による増殖刺激を受けない

分化直後においてもコラーゲンの産生は生じているため創傷の治癒には寄与していると考えられる。分化直後では創傷部位または炎症部位で生じた Pro-Hyp を取り込み、増殖が促進され、迅速な創傷治癒をおこし、一定の増殖後はトランスポーター等の発現を抑制し、Pro-Hyp による増殖促進を受けない細胞に変化して、過剰なコラーゲン産生を抑制していると考えられる。

本研究により、コラーゲンペプチド摂取時

にヒト抹消血に存在する Pro-Hyp が創傷治癒・炎症時に生成し、線維芽細胞の増殖に積極的に関与している事が示唆された。さらにマウス皮膚より遊走してきた線維芽細胞は分化マーカーの減少とともに、ペプチドトランスポーターの発現が減少し、Pro-Hyp による増殖促進効果が失われる事が明らかとなった。そのため、線維芽細胞の増殖はマトリックスとの接着、細胞増殖因子の他に Pro-Hyp 等のコラーゲン由来ペプチドと細胞の分化後の分裂回数により制御されている事が明らかとなった。食事由来のコラーゲンペプチドは通常のコラーゲンには作用せず、創傷部位で分化したての線維芽作用に作用し、線維芽細胞の増殖を通して創傷治癒の促進を行っていると考えられる。

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 4 件)

1. Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park E.-Y., Nakamura, Y., Sato, K. (2011) Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl-glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. 査読あり Food Chemistry, 129, 1019-1024.
2. 佐藤健司 (2011) 美容とアンチエイジングのための素材～コラーゲンペプチドを中心に～. 査読なし Food Style 21, 15, 34-37.
3. Shigemura, Y., Nakaba, M., Shiratsuchi, E., Suyama, M., Yamada, M., Kiyono, T. Fukamizu, K., Park, E. Y., Nakamura, Y., Sato, K. (2012) Identification of food-derived elastin peptide, prolyl-glycine (Pro-Gly), in human blood after ingestion of elastin hydrolysate. 査読あり J. Agric. Food Chem., 60, 5128-5133.
4. Shigemura, Y., Kubomura, D., Sato, Y., Sato, K. (2014) Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. 査読あり Food Chemistry 159, 328-332.

5.

(学会発表)(計 7 件)

1. 30) Sato, K. (2011) Impact of extracellular matrix protein hydrolysates on human health. 102nd AOCS Annual Meeting & Expo. Cincinnati, USA, May 1-4.
2. Sato, K. (2011) Food-derived collagen peptides in human blood-structure and biological functions. ICOFF 2011, Taipei, Chinese Taipei, November 20-23.
3. 佐藤 健司 (2012) 真皮コラーゲンの産生メカニズム 第 12 回抗加齢医学総会 横浜

- 6月22-25日
4. 佐藤 健司 (2013) 食事由来コラーゲンペプチドの真皮に及ぼす影響 第13回抗加齢医学総会 横浜 6月28-30日
 5. 佐藤 健司 (2013) ペプチドの機能 日本臨床栄養学会・日本臨床栄養協会 第11回連合大会 京都10月4-6日
 6. Satou, K. (2013) Incorporation of food-derived collagen peptides, Pro-Hyp and Hyp-Gly, into primary cultured fibroblast from mice skin – possible trigger for growth of fibroblast. ISNFF Annual Conference, Taipei, Nov. 5-9.
 7. 佐藤 健司 (2014) Pro-Hyp の皮膚線維芽細胞増殖促進効果 第14回抗加齢医学総会 大阪 6月6-8日

〔図書〕(計4件)

1. Sato, K. Proteins and peptides for complicated disease type. In “Bioactive Food Proteins and Peptides. Application in Human Health” Hettirarachchy, N. S., Sato, K., Marshall, M. R., Kannan, A. Edit. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. pp 237-253.
2. Sato, K., Shigemura, Y. (2012) Effect of marine collagen peptide on skin condition. In “Marine Cosmeceuticals Trends and Prospective” Kim, S.-K. Edit. CRC Press, New York, pp. 125-132.
3. Shiratsuchi, E., Nakaba, M., Shigemura, Y., Yamada, M., Sato, K. (2013) Fish-elastin hydrolysate. In “Marine Proteins and Peptides” Kim, S.-K. Edit. Wiley-Blackwell, pp. 467-486.
4. 佐藤健司、依田悠里 ペプチドの吸収「食品機能性成分の吸収・代謝機構」宮澤陽夫監修 シーエムシー出版 pp96-104.〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤健司(SATO, Kenji)

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00202094

(2)研究分担者

重村泰毅(SHIGEMURA Yasutaka)

東京家政大学短期大学部・講師

研究者番号：20373178

(3)連携研究者 なし