

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02911

研究課題名(和文) コラーゲンジペプチドによる間葉系成体幹細胞増殖に関する研究

研究課題名(英文) Study on collagen dipeptides on growth of mesenchymal stem cells

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) 9,500,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンペプチドの摂取によりPro-Hypが増加することが知られていた。マウス皮膚から遊走してきた初代培養線維芽細胞は培養初期には間葉系幹細胞のマーカーでp75NTRを発現したが、培養を重ねるとp75NTRの発現を失った。FITC-Pro-Hypはp75NTR陽性線維芽細胞に特異的に取り込まれた。またPro-Hypはp75NTR陽性線維芽細胞を増殖させたが、陰性細胞には作用しなかった。これらの結果からPro-Hypは創傷治癒部位に集積する線維芽細胞の増殖を促進するが、正常組織中の線維芽細胞には作用しないことが明らかになった。動物においてもPro-Hypは創傷治癒を促進し、瘢痕化を抑制した。

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血中で増加するPro-Hypは正常組織の成熟した線維芽細胞には影響することなく、創傷治癒部位に集積する分化直後の線維芽細胞の増殖を促進することが明らかにした。この結果は、コラーゲンペプチドの摂取は正常組織に過剰な線維化を起こすことなく、創傷治癒を促進することを説明できる。さらに動物モデルにおいてもコラーゲンペプチド由来のPro-Hypは真皮の創傷治癒を促進することを確認した。さらに筋膜切除後の治癒においての瘢痕化も抑制した。

研究成果の概要(英文)：Pro-Hyp increases in human blood after oral administration of collagen peptide. The present study revealed that primary cultured fibroblasts migrated from mouse skin expressed mesenchymal stem cell marker (p75NTR) at first day but its expression decreased after growth. Fluorophore (FITC)-labeled Pro-Hyp was specifically incorporated into p75NTR-positive fibroblasts but not into the p75NTR negative ones. Pro-Hyp enhanced growth of the p75NTR-positive fibroblasts but not the p75NTR-negative ones. These facts indicate that food-derived Pro-Hyp can enhance growth of the p75NTR positive fibroblasts accumulating to wound healing sites but exert little effect on resident fibroblasts in normal tissues. In animal models, Pro-Hyp can enhance wound healing and suppress scarring.

研究分野：食品科学

キーワード：コラーゲン 線維芽細胞 Pro-Hyp 創傷治癒 瘢痕化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) コラーゲンペプチドを経口摂取してもアミノ酸にまで分解すると考えられていたが 2005 年に申請者のグループがコラーゲンペプチドを経口摂取したヒトの末梢血中に Pro-Hyp などのジペプチド、Pro-Hyp-Gly などのトリペプチドがかなりの量で存在することを示してきた<sup>1)</sup>。そのため、食品中のペプチドのうちペプチドの形で吸収されるものがあることが明らかになった。

(2) マウスの創傷治癒部位、炎症部位においても Pro-Hyp が生成することが示されている<sup>2)</sup>。

(3) Pro-Hyp の線維芽細胞の増殖への影響が調べられてきた。株化された線維芽細胞では継代により Pro-Hyp への反応が異なった。そのため初代培養線維芽細胞が用いられ、Pro-Hyp がコラーゲン繊維に接着した線維芽細胞の増殖を促進することが見出された<sup>3)</sup>。しかし、再現しない場合が存在した<sup>4)</sup>。

(5) ヒト試験によりコラーゲンペプチドの摂取により褥瘡の治癒促進が認められている。

(6) 皮膚の創傷治癒に集積する線維芽細胞は真皮中の線維芽細胞ではなく皮下の間葉系幹細胞由来の線維芽細胞であることが示されている<sup>5)</sup>。

### 2. 研究の目的

初代培養線維芽細胞を用いても、Pro-Hyp の影響に関して再現性のない結果となる場合があり、その原因を解明することをまず目指した。さらに創傷治癒部位で内因性 Pro-Hyp が生じ、線維芽細胞の増殖を引き起こすことは理解できるが、コラーゲンペプチドを摂取した場合には Pro-Hyp が血流に乗って全身をめぐるため、なぜ正常組織では線維芽細胞の増殖が生じず、創傷部位では線維芽細胞の増殖が生じるのかが不明であった。この問題を解決することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 初代培養線維芽細胞を用いても培養に用いる牛胎児血清 (FBS) を変えると結果が一定しなかった。そのため異なるブランド、ロットの FBS 中の Hyp ペプチド含量を調べた。

(2) マウス皮膚から遊走してきた線維芽細胞の間葉系幹細胞のマーカーである低親和性神経増殖因子 (p75NTR) の発現を抗体染色により確認した。また蛍光団 (FITC)-ラベル Pro-Hyp の取り込みと p75NTR の発現を比較した。

(3) マウスの真皮を直径 1 cm で切りとり、皮膚の収縮による治癒を抑制した条件で Pro-Hyp の肉芽形成に及ぼす影響を調べた。また腹部を筋膜まで切断し、瘢痕化が生じるマウスモデル<sup>6)</sup>を用いてコラーゲンペプチドの経口摂取、Pro-Hyp の注入による創傷治癒と瘢痕化への影響を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 市販の FBS 中にかなりの量のペプチド型 Hyp が存在した (図 1)<sup>4)</sup>。またその含量はブランドによっても異なり、ロットによっても異なった。FBS 中のペプチド型 Hyp の主要なペプチドは Pro-Hyp であった。ある FBS を用いると図 2A に示すように、コラーゲン繊維に接着させた初代培養線維芽細胞も Pro-Hyp を添加しなくても増殖し、Pro-Hyp の影響は認められなかった<sup>4)</sup>。一方、この FBS から低分子成分をサイズ排除カラムにより除くと、増殖は止まり、Pro-Hyp の添加で増殖が促進された (図 2B)。そのため Pro-Hyp の線維芽細胞増殖に対する再現性が得られなかったのは FBS 中に異なる濃度の Pro-Hyp が存在したからであると結論した。

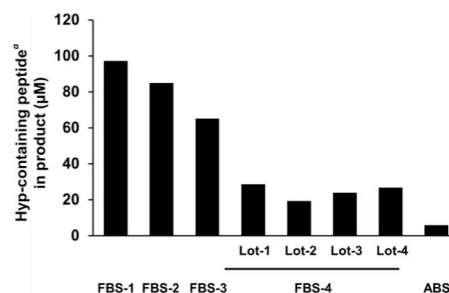


図 1. 市販 FBS 中のペプチド型 Hyp 含量.

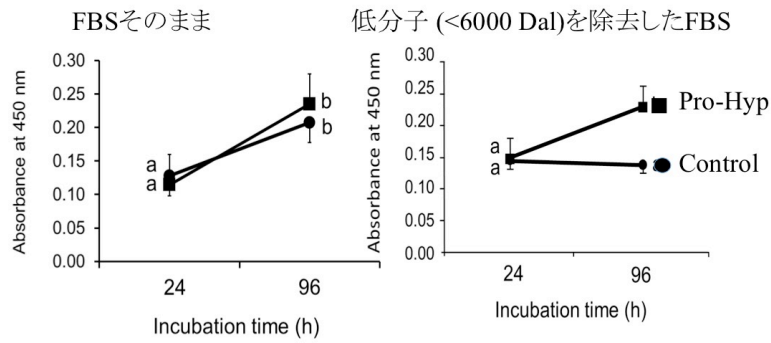


図 2. 市販 FBS および低分子除去 FBS を用いたコラーゲン接着線維芽細胞の増殖におよぼす Pro-Hyp の影響.

(2) マウスの皮膚を培養して遊走してきた線維芽細胞を抗 p75NTR 抗体で染色した。1 日の培養後はほぼすべての線維芽細胞が p75NTR を発現していた (図 3A, B)<sup>7)</sup>。さらに 2 週間培養すると遊走してきた線維芽細胞が増殖したが、一部の細胞のみが p75NTR 陽性であった (図 3C) 4 週間後には陽性細胞は消えた (図 3D)。皮膚中には毛根周辺と皮下脂肪周辺に p75NTR 陽性細胞が存在した (図 4)。そのため皮下脂肪細胞周辺の p75NTR 陽性細胞が分化し皮膚の外に遊走してきたと考えられる。皮下脂肪周囲の間葉系幹細胞由来の線維芽細胞が創傷治癒に参加するため<sup>5)</sup>、マウス皮膚から遊走してきた p75NTR 陽性細胞が創傷治癒に関係する線維芽細胞であると考えられる。培養 4 日目の線維芽細胞に FITC-標識 Pro-Hyp を投与すると p75NTR 陽性細胞のみが FITC-Pro-Hyp を取り込んだ (図 5)。コラーゲン繊維上で培養した線維芽細胞中の p75NTR 陽性細胞は Pro-Hyp の添加で有意に増加した (図 6)。一方、p75NTR 陽性細胞をもたない 4 週間培養後の線維芽細胞は Pro-Hyp の添加によってもコラーゲン繊維に接着した状態では増殖しなかった (図 7)。ES 細胞の維持に有効であるラミニンは p75NTR 陽性細胞の維持には効果が見られなかった。すなわち Pro-Hyp は分化直後の間葉系幹細胞マーカー p75NTR 陽性線維芽細胞にのみ取り込まれ、増殖するが、正常組織に存在する分化した線維芽細胞の増殖を促進しないことを示す。これらの結果により、コラーゲンペプチドの摂取により増加した Pro-Hyp は正常組織での異常な線維芽細胞の増殖を引き起こすことなく、褥瘡などの創傷治癒を促進することが説明可能となった。

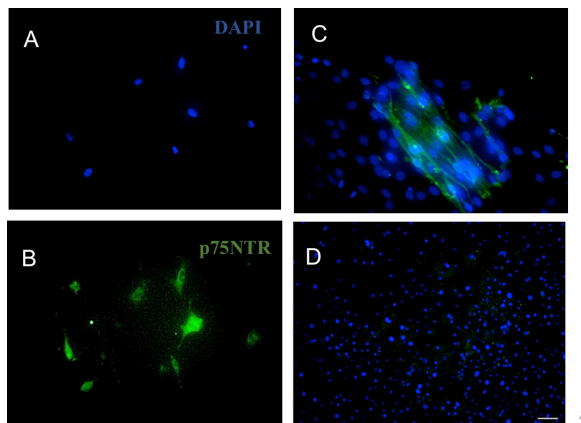


図 3. マウス皮膚培養 1 日目 (A, B), 2 週間 (C), および 4 週間 (D) 後の線維芽細胞の p75NTR 発現. C, D は Dapi と p75NTR の共染色. 論文 6 から引用

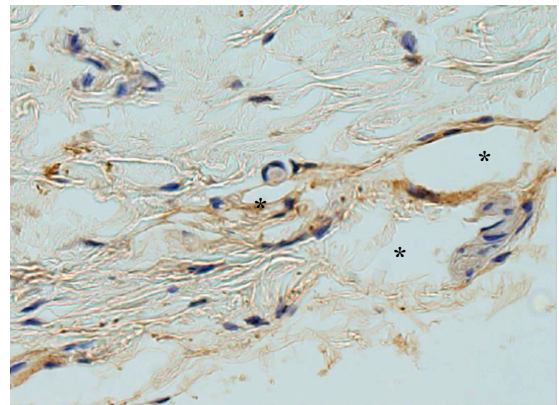


図 4. マウス皮膚の抗 p75NTR 染色. 皮下脂肪細胞 (\*) 周辺の細胞が染色されている.

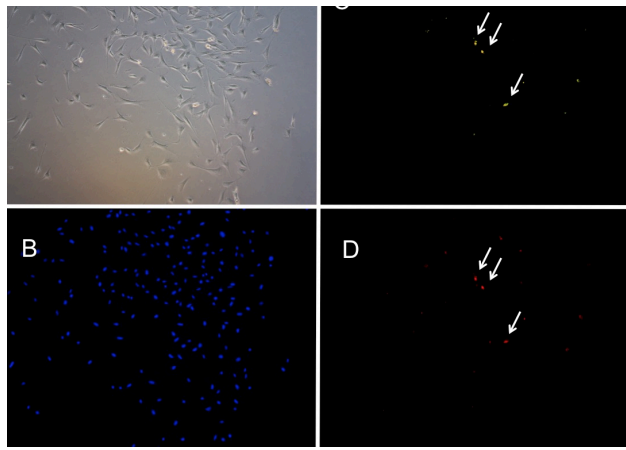


図5. 培養4日目の線維芽細胞. A: 位相差像、B: DAPI 染色、C: FITC-Pro-Hyp の投与、D: 抗 p75NTR 抗体で染色.

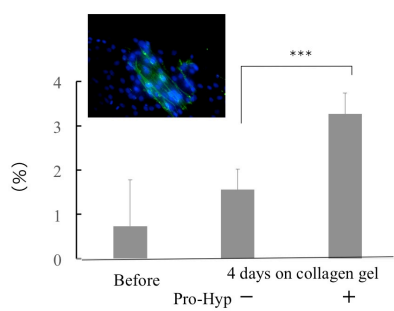


図6. Pro-Hyp の p75NTR 陽性細胞の増殖への影響.  
2週間培養した線維芽細胞をコラーゲンゲル上に播種し、200  $\mu$ M Pro-Hyp 存在、非存在下で4日間培養

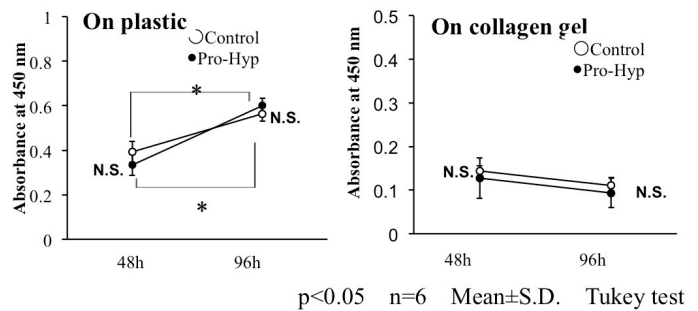


図7. Pro-Hyp の4週間培養し p75NTR 陽性細胞をもたない線維芽細胞増殖への影響.  
プラスチック上、コラーゲンゲル上のいずれにおいても Pro-Hyp の影響は認められない.

(3) マウスの皮膚に直径1 cmで真皮を除去し、皮膚の収縮による治癒を抑制するため円形のリングで傷口を固定し、ヒトと同じ肉芽の形成による治癒を観察した。その結果、図8に示すように、創傷部位への Pro-Hyp の直接塗布 (500 nmol) により、有意に肉芽形成が促進された。In vivo モデルによっても Pro-Hyp による創傷治癒促進が確認できた。

マウスの腹部を筋膜まで切除するモデルによる創傷治癒を観察した結果、21日目においてコラーゲンペプチドの経口摂取 (図9)、または Pro-Hyp の投与によりコラーゲンの蓄積が有意に減少し、筋細胞の肉芽組織への侵入が有意に増加した (図10)。その結果癒着化が抑制されることが明らかになった<sup>6)</sup>。

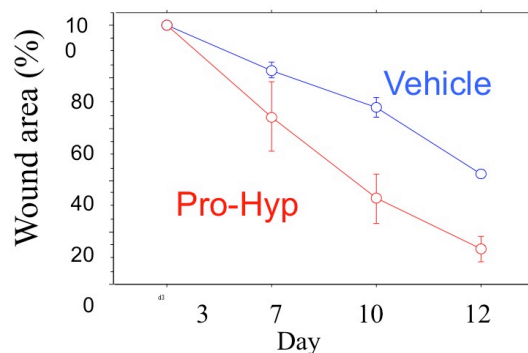


図8. Pro-Hyp のマウス皮膚切除部位(1 cm 直径)での肉芽形成への影響.  
500 nmol の Pro-Hyp を直接投与した.

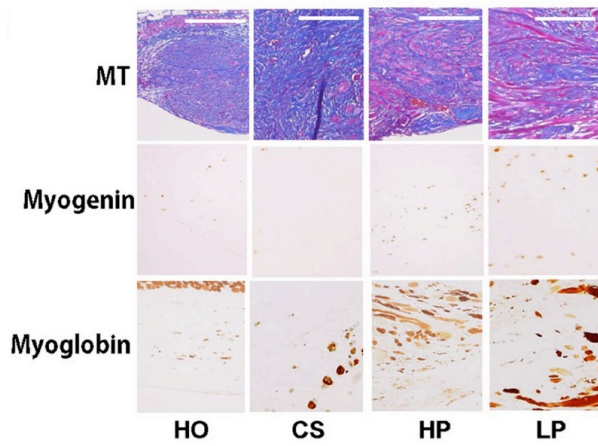


図 9. コラーゲンペプチド摂取のマウス筋膜切除部位での筋再生と繊維化抑制。  
 HO:水コントロール、CS カゼイン、HP: 高分子コラーゲンペプチド、LP: 低分子コラーゲンペプチド群。  
 21 日目。MT 染色でコラーゲンは青く染まる。

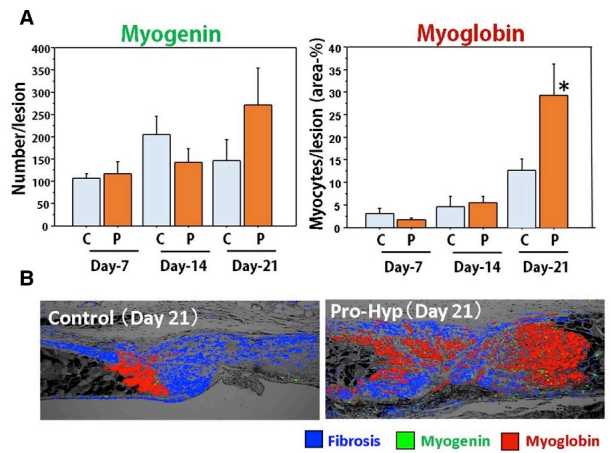


図 10 Pro-Hyp 注入のマウス筋膜切除部位での筋再生と繊維化抑制。  
 C: コントロール、P: Pro-Hyp。  
 B: コラーゲン線維 (fibrosis) は青く染めている。

(引用文献>

- ① Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., Ohtsuki, K. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, 6531-6536.
- ② Sato, K., Jimi, S., Kusubata, M. Generation of bioactive prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) by oral administration of collagen hydrolysate and degradation of endogenous collagen. *Int. J. Food Sci. Tech.* 54, 2019, 1976-1980.
- ③ Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C. Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., Sato, K. 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), 2009, 444-449.
- ④ Asai, T., Oikawa, F., Yoshikawa, K., Inoue, N., Sato, K. Food-derived collagen peptides, prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), and hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) enhance growth of primary cultured mouse skin fibroblast using fetal bovine serum free from hydroxyprolyl peptide. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 2020, 229; doi:10.3390/ijms21010229.
- ⑤ Rossio-Pasquier, P., Casanova, D., Jomard, A., and Démarchez, M. Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse after a superficial excisional injury: human dermal reconstruction is achieved in several steps by two different fibroblast subpopulations. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 1999, 591-599. doi: 10.1007/s004030050460.
- ⑥ Jimi, S., Koizumi, S., Sato, K., Miyazaki, M., Saporov, A. Collagen-derived dipeptide ProHyp administration accelerates muscle regenerative healing accompanied by less scarring after wounding on the abdominal wall in mice. *Sci. Rep.* 11, 2021, 18750.
- ⑦ Asai, T., T., Yoshikawa, K., Sawada, K., Fukamizu, K., Koyama, Y., Shigemura, Y., Jimi, S., Sato, K.. Mouse skin fibroblasts with mesenchymal stem cell marker p75 neurotrophin receptor proliferate in response to prolyl-hydroxyproline. *J. Func. Foods*, doi.org/10.1016/j.jff.2020.103792.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Sato Kenji, Asai Tomoko T., Jimi Shiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Collagen-Derived Di-Peptide, Prolylhydroxyproline (Pro-Hyp): A New Low Molecular Weight Growth-Initiating Factor for Specific Fibroblasts Associated With Wound Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.548975	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 Asai, T., Oikawa, F., Yoshikawa, K., Inoue, N., Sato, K.	4. 巻 21, 229
2. 論文標題 Food-derived collagen peptides, prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), and hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) enhance growth of primary cultured mouse skin fibroblast using fetal bovine serum free from hydroxyprolyl peptide.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	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） 10.3390/ijms21010229	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 Asaia, T., T., Yoshikawa, K., Sawada, K., Fukamizu, K., Koyama, Y., Shigemura, Y., Jimi, S., Sato, K	4. 巻 66
2. 論文標題 Mouse skin fibroblasts with mesenchymal stem cell marker p75 neurotrophin receptor proliferate in response to prolyl-hydroxyproline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Func. Foods	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） 10.1016/j.jff.2020.103792.	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 Asai Tomoko, Takahashi Akira, Ito Kumie, Uetake Tatsuo, Matsumura Yasuki, Ikeda Kaori, Inagaki Nobuya, Nakata Masahiro, Imanishi Yoshiharu, Sato Kenji	4. 巻 67
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 2831 ~ 2838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.8b06896	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 Jimi Shiro, Koizumi Seiko, Sato Kenji, Miyazaki Motoyasu, Saparov Arman	4. 巻 11
2. 論文標題 Collagen-derived dipeptide Pro-Hyp administration accelerates muscle regenerative healing accompanied by less scarring after wounding on the abdominal wall in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific 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) 10.1038/s41598-021-98407-9	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 Kenji Sato	4. 巻 3
2. 論文標題 Food for skin health: Collagen peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 344-348
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6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤健司
2. 発表標題 コラーゲン・エラスチンペプチド摂取による効果とその活性成分
3. 学会等名 第84回日本皮膚科学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤健司
2. 発表標題 コラーゲンペプチドの効果のメカニズム
3. 学会等名 日本香粧学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato, K.
2. 発表標題 Food-derived and endogenous collagen peptide, Pro-Hyp -Function and target cell-
3. 学会等名 International Conference of Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asai, T.
2. 発表標題 Pro-Hyp, food-derived collagen peptide in blood, enhances growth of fibroblasts expressing p75NTR, somatic stem cell marker
3. 学会等名 2nd International Symposium on Bioactive Peptides (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤健司
2. 発表標題 コラーゲンペプチドの線維芽細胞への働き
3. 学会等名 美容皮膚学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤健司
2. 発表標題 肌のサプリメント
3. 学会等名 見た目の美容学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤健司・重村泰毅	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社インプレス	5. 総ページ数 7
3. 書名 コラーゲン 基礎から応用 第11章 消化と吸収	

〔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
研究分担者	重村 泰毅 (Shigemura Yasutaka)  (20373178)	東京家政大学短期大学部・短期大学部・准教授  (42681)	
研究分担者	自見 至郎 (Jimi Shiro)  (30226360)	福岡大学・公私立大学の部局等・研究特任教授  (37111)	
研究分担者	浅井 智子 (Asai Tomoko)  (50832036)	奈良女子大学・生活環境科学系・助教  (14602)	

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