

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02376

研究課題名(和文) 恒常性維持の面からみたコラーゲン由来機能性ペプチド

研究課題名(英文) Functional properties of collagen peptides on the extracellular matrix homeostasis

研究代表者

神山 伸 (Shin, Kamiyama)

新潟県立大学・人間生活学部・教授

研究者番号：70525401

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)：コラーゲン由来ペプチドの新たな機能性として、高脂肪食誘導性肥満マウスで内臓脂肪蓄積抑制作用を持つことを明らかにした。また、肺胞由来の細胞株であるA549細胞を線維化モデル細胞として用い、線維化誘導条件ではコラーゲン由来ジペプチドがその筋線維芽細胞への分化と線維化を抑制する可能性を示した。さらに、ブレオマイシン投与による線維症モデルマウスを用いて、コラーゲンペプチドが間質性肺炎による肺重量増加と肺胞構造の破壊を抑制することを示した。ただし、その作用はコラーゲン合成の抑制ではなく、炎症を軽減することにより間質性肺炎の発症と線維化を抑制しているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、コラーゲンペプチドが線維化の抑制効果を持つことを示すと同時に、「恒常性維持」という疾患予防の根幹となる面からコラーゲンペプチドの作用を明らかにした。さまざまな臓器の機能低下に繋がる線維化はコラーゲンの過剰合成が原因であるが、これまでのコラーゲンペプチドに関する研究は、コラーゲンを含む細胞外マトリックス成分の材料補給による合成促進効果が中心であった。本研究の成果により、コラーゲンペプチドの新たな生理活性が明らかにされたとともに、その機能性ペプチドとしての有効性に科学的な根拠が付け加えられたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：New functional properties of collagen peptides (CPs) were investigated. The administration of CP reduced visceral fat accumulation in high-fat diet-induced obese mice. Under fibrosis-inducing conditions, collagen-derived dipeptides inhibited differentiation of lung pneumocyte-derived A549 cells into myofibroblasts and their fibrotic responses. Additionally, the efficacy of CP administration on pulmonary fibrosis was evaluated using bleomycin-induced fibrosis mice. Supplementation with CP successively suppressed lung weight increase and disruption of lung architecture observed in bleomycin-treated mice. CP may prevent the development of interstitial pneumonia and progression of pulmonary fibrosis through its anti-inflammatory action rather than by inhibiting collagen synthesis.

研究分野：栄養学、食品学

キーワード：コラーゲンペプチド 線維化抑制作用 抗炎症作用 内臓脂肪蓄積抑制作用 上皮間葉転換 ブレオマイシン 細胞外マトリックス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

1980年代に非変性コラーゲンの経口摂取が関節症状を改善するという報告がなされて以来、コラーゲン及びコラーゲンペプチド (CP) の摂取に関する多くの報告がなされてきたが、その作用機構については不明点が多い。特に、コラーゲンの加水分解物である CP に関する研究は、体内コラーゲン合成のための原料補給としての面が強調されており、その有効性が曖昧になっていた。近年、CP が体内にペプチド態で吸収されて生理活性を示すことが報告されてから、その「機能性ペプチド」としての作用が注目されている。

当初の CP の作用に関する研究は、変形性関節炎やリウマチ関節炎などの関節疾患や、骨代謝、皮膚線維芽細胞の増殖などへの作用が中心であったが、近年では糖代謝改善、血圧効果作用、脂質代謝改善作用など、生活習慣病を含めた多くの疾患への作用が報告されるようになった。

リウマチ関節炎における軟骨破壊などでは、炎症性サイトカインの増加による細胞外マトリックスの合成と分解のバランス異常が疾患の原因となっているが、CP の効果に関するこれまでの研究は主にその症状軽減作用に関するものであり、生体におけるコラーゲンの合成と分解の恒常性維持にどのように寄与するかに関する研究はほとんどなされていなかった。また、コラーゲンの合成・分解のバランス異常による疾患としては、さまざまな臓器の機能低下に繋がる線維化疾患が知られているが、それに対する CP の有効性も検討されていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、生体組織を構成する細胞外マトリックスの合成と分解に CP がどのように作用するかを明らかにすることを目的として行った。まず、軟骨分化と線維化のモデル細胞を実験系として用い、細胞外マトリックスの合成と分解を制御しているトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) シグナルを中心に CP の恒常性維持作用について検討を行った。さらに、コラーゲン合成・分解の恒常性が破綻した線維症モデル動物を用いて、生体において CP が細胞外マトリックスの恒常性に作用するかどうかについて検証した。それとともに、CP による生活習慣病予防作用として、エネルギー摂取過剰状態における摂食調節と脂肪蓄積にどのように影響するかについても併せて確認した。これらの検討により、「恒常性維持」という新しい面から、機能性ペプチドとしてのコラーゲンペプチドの作用について総合的に解析を行った。

3. 研究の方法

3.1. CP が高脂肪食誘発性肥満マウスの脂肪蓄積に及ぼす影響

本項目では、高脂肪食により肥満状態を誘発させたマウスに CP を含む実験食を摂取させ、その脂肪蓄積状態に及ぼす影響を検討した。

実験動物として ddY マウス (雄、5 週齢) 20 匹を用いた。1 週間の予備飼育後、これを通常食群 (n=10) と高脂肪食群 (n=10) の 2 群に分け、高脂肪食群で肥満を誘発させるために、それぞれ通常飼料 (マウス・ラット用飼料 CE-2、日本クレア製) と高脂肪飼料 (高脂肪含有飼料 HFD32、日本クレア製) で 3 週間飼育した。その後、通常食群を (1) 通常飼料-カゼイン添加食 (NCS) 群と (2) 通常飼料-CP 添加食 (NCP) 群、高脂肪食群を (3) 高脂肪飼料-カゼイン添加食 (FCS) 群と (4) 高脂肪飼料-CP 添加食 (FCP) 群に分け、それぞれの実験食で 3 週間飼育した。実験食は、通常飼料あるいは高脂肪飼料 1g あたりに、(1)NCS 群と (3)FCS 群には 25mg の乳タンパク質 (カゼイン) を、(2)NCP 群と (4)FCP 群には 25mg のニワトリ脚由来 CP を添加したものをを用いた。実験期間終了後、肝臓、腎臓、腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪を採取し、その重量を測定するとともに、血糖および血中脂質濃度を測定した。また、採取した視床下部と精巣周囲脂肪から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いた定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) 法により、視床下部における食欲調節関連因子の遺伝子発現量と、精巣周囲脂肪における脂肪酸合成関連因子および脂肪分解関連因子の遺伝子発現量を測定した。

3.2. CP が軟骨分化に及ぼす影響 (ATDC5 細胞を用いた検討)

軟骨前駆細胞株として ATDC5 細胞を用い、5% ウシ胎児血清を含む D-MEM/F12 培地で培養を行った。ATDC5 細胞は未分化状態では線維芽細胞様であるが、過密状態でインスリンの存在下培養すると軟骨細胞へ分化する。この分化誘導培地にエストロゲン的一种であるエストラジオール (E2) を 10 μ M の濃度で添加したものと、E2 と共に CP 由来ジペプチドであるプロリン-ヒドロキシプロリン (Pro-Hyp) あるいはヒドロキシプロリン-グリシン (Hyp-Gly) を 1 mM の濃度で添加したものをを用いて 7 日間培養することにより、それぞれが軟骨初期分化に及ぼす影響を検討した。分化の状態は、シリウスレッド染色を用いたコラーゲン量の測定と、アルザンブルー染色によるプロテオグリカン量の測定により軟骨化を評価するとともに、アリザリンレッド染色によりカルシウム沈着量を測定した。また、qRT-PCR 法で軟骨細胞の分化マーカー遺伝子と細胞外マトリックス合成関連遺伝子群の発現状態を解析することにより、E2 と CP の作用機構について検討した。

3.3. CPが線維化に及ぼす影響 (A549細胞を用いた検討)

本項目では、コラーゲン過剰合成状態の細胞でCPがどのように作用するかを確認するためにTGF- β で刺激した肺由来細胞株を線維化モデル細胞として用い、CPの作用を確認した。

ヒト非小細胞肺癌(肺線がん)細胞株であるA549細胞を用い、10%ウシ胎児血清を含むD-MEM/F-12培地で培養を行った。24時間の培養後、10 ng/mLのTGF- β を含む無血清培地に交換し、Pro-HypあるいはHyp-Glyを1 mMの濃度で添加した条件で線維化を誘導した。48時間後の細胞における線維化関連分子の発現状態と、筋線維芽細胞のマーカー分子である平滑筋アクチン(α -SMA)の発現状態を細胞免疫染色およびqRT-PCR法で確認するとともに、細胞外マトリックスのコラーゲン線維量をシリウスレッド染色による定量で測定した。

3.4. 線維症モデルマウスにおけるCP摂取の有効性確認

ブレオマイシン(BLM)のような抗がん性抗生物質は重篤な副作用として間質性肺炎を招き、皮膚や肺で線維化を起こすことが知られている。本項目ではこのBLM投与による線維症モデルマウスを用いて、その線維化の状態にCPの投与がどのように影響するかを検討した。

C57BL/6JJmsSlcマウス(オス、8週齢)に10 mg/kgのBLMを週5回の頻度で2週間皮下投与することにより、線維症を誘発させた。コントロール(Ctrl)群7匹には同量の生理食塩水を投与した。その後、BLMを投与したマウス16匹をカゼイン群(BLM-CS)8匹とCP投与群(BLM-CP)8匹に分け、Ctrl群とBLM-CS群には1gあたり25 mgのカゼインを添加した実験飼料、BLM-CP群には同量のCPを添加した実験飼料を3週間摂取させた。実験期間終了後解剖し、臓器重量と皮膚厚を測定した。また肺を採取し、ヒドロキシプロリン量を定量することによりそのコラーゲン含量を測定するとともに、qRT-PCR法で肺組織における線維化に関連する遺伝子の発現量を測定した。また、もう一方の肺を採取後直ちに4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、脱水後パラフィンに包埋し、ミクロトームにより組織切片を作成した。組織切片について、ヘマトキシリン・エオジン染色とコラーゲン線維を染色するシリウスレッド染色を行い、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

4.1. CPが高脂肪食誘発性肥満マウスの脂肪蓄積に及ぼす影響

機能性ペプチドとしてのCPの作用について、まず高脂肪食肥満マウスにおける食欲調節と肥満状態に及ぼす影響を検討した。運動を負荷しない状態では、以前の研究において運動とCPの併用で認められたような食欲抑制作用はみられず、視床下部における食欲調節遺伝子(POMC, AgRP, NPY)の発現状態も変化しなかった。また、体重と血液の脂質成分濃度に関しても、CPによる有意な変化は見られなかったが、CPを摂取させた高脂肪食群(FCP群)で精巣周囲脂肪量が有意に減少しており、CPによる内臓脂肪の減少作用が示された(図1)。さらに、脂肪細胞における炎症性サイトカインの発現減少傾向がみられ、CPが脂肪蓄積による炎症の抑制に働く可能性が示唆された。

以上の結果より、CPの継続的な投与が内臓脂肪量の減少に寄与する可能性が示唆された。一方、運動負荷のない状態でのCP摂取は食欲抑制効果を示さなかったことから、CP摂取による食欲抑制には運動負荷の併用が必要であるものと推察される。

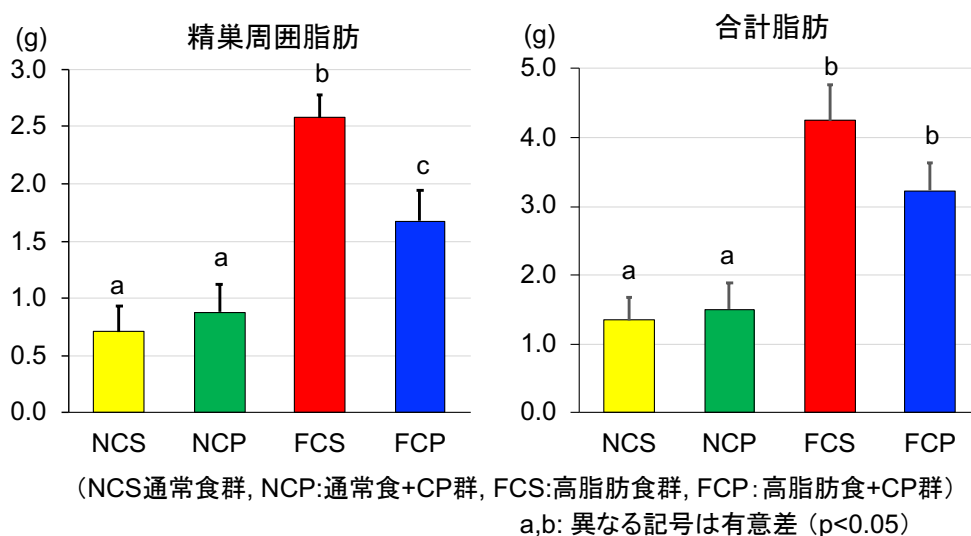


図1 高脂肪食誘導性肥満マウスにおけるCP摂取の内臓脂肪減少作用

4.2. CPが軟骨分化に及ぼす影響 (ATDC5細胞を用いた検討)

軟骨前駆細胞である ATDC5 細胞の分化を女性ホルモンであるエストロゲンで抑制したモデル系において、CPがその軟骨分化と細胞外マトリックス産生にどのように作用するかを検討した。10 μM の E2 で処理した細胞ではコラーゲン量とプロテオグリカン量、カルシウム沈着量のいずれも有意に低下したが、1 mM の Hyp-Gly を添加することによりコラーゲン合成量が有意に増加した。しかし、プロテオグリカン量とカルシウム沈着量に対する影響は認められず、軟骨化関連遺伝子の発現量にも変化が認められなかったことから、CPはエストロゲンによる軟骨分化抑制作用自体を救済できない可能性が示された。

4.3. CPが線維化に及ぼす影響 (A549細胞を用いた検討)

コラーゲン由来機能性ペプチドであるコラーゲンペプチドには、骨形成促進や皮膚線維芽細胞の増殖促進などさまざまな作用が報告されているが、コラーゲンの合成が過剰となる線維化にどのような影響を持つかについては明らかにされていない。そこで、TGF- β で刺激した肺胞由来細胞を線維化モデルとして用い、CPがその線維化にどのような影響を持つかを検討した。

その結果、TGF- β で刺激した A549 細胞ではコラーゲン量の増加が見られたが、CP由来ジペプチドである Hyp-Gly の添加により有意に抑制された (図2左)。さらに、TGF- β 刺激により上皮細胞のマーカー分子である E-cadherin の発現が減少し、間葉系細胞のマーカー分子である α -SMA の発現が大きく上昇したが、Pro-Hyp あるいは Hyp-Gly に添加により発現量が大きく低下した (図2右)。これらのことから、これらの CP は A549 細胞の TGF- β 誘導性の上皮間葉転換による線維化を抑制するとともに、その運動性を抑制する可能性が示唆された。

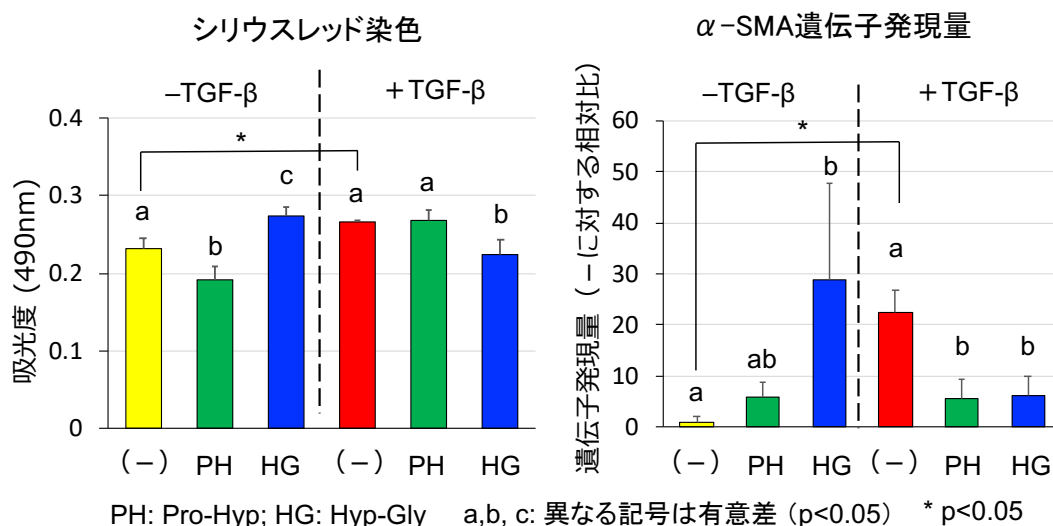


図2 TGF- β 刺激によるA549細胞の線維化にCPが及ぼす影響

4.4. 線維症モデルマウスにおける CP 摂取の有効性確認

線維化は間質性肺炎による肺線維症や肝硬変などの疾患で起こるのみならず、心臓や血管、肺、腎臓などの臓器の加齢に伴う機能低下にも関与している。前項目でCPが線維化の抑制に機能する可能性が示されたことから、BLM誘発性線維症モデルマウスにCPを摂取させ、CPが生体内でも線維化の抑制作用を持つかどうかについて確認した。

その結果、BLMを投与したマウス (BLM-CS群) で肺重量が有意に増加するとともに、肺組織での肺胞の破壊と間質の増加が見られたが、これらはCPを摂取させたBLM-CP群では軽減されていた (図3)。

肺組織の炎症関連因子と線維化関連因子の遺伝子発現量を測定したところ、炎症性サイトカインであるインターロイキン6 (IL-6) と、間質性肺炎のマーカーである MCP-1、線維化分子であるフィブロネクチンの発現量がBLM投与により増加したが、CPの摂取により抑制された (図4)。一方、線維化の主要な因子であるコラーゲン線維に関しては、BLM投与動物で肺組織におけるコラーゲン含量と、I型およびIII型コラーゲンサブユニット遺伝子の発現量増加が認められたが、これらはCPの摂取により抑制されなかった (図5)。したがって、CPはコラーゲンの合成を抑制するのではなく、炎症を軽減することにより間質性肺炎の発症を抑制するものと考えられる。

これらのことから、BLMの皮下投与によって生じた間質性肺炎と肺線維化は、CPの摂取によりその発症を抑制できる可能性が示された。ただし、この線維化の抑制は、線維化そのものを阻害しているのではなく、炎症抑制により機能しているものと考えられる。

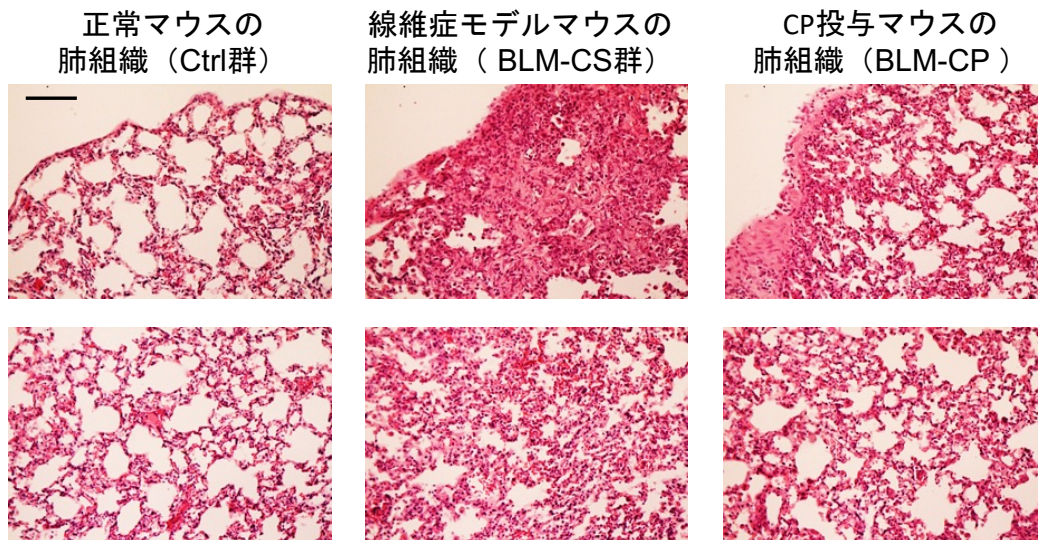
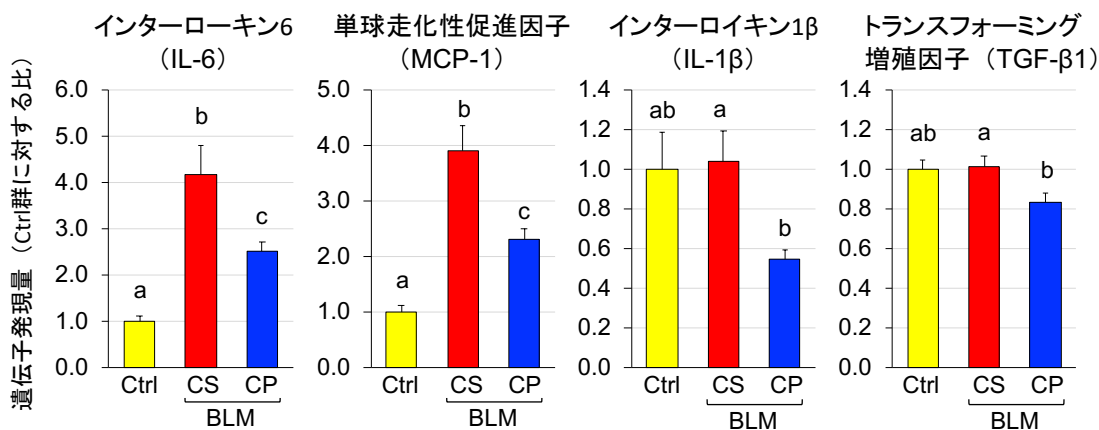


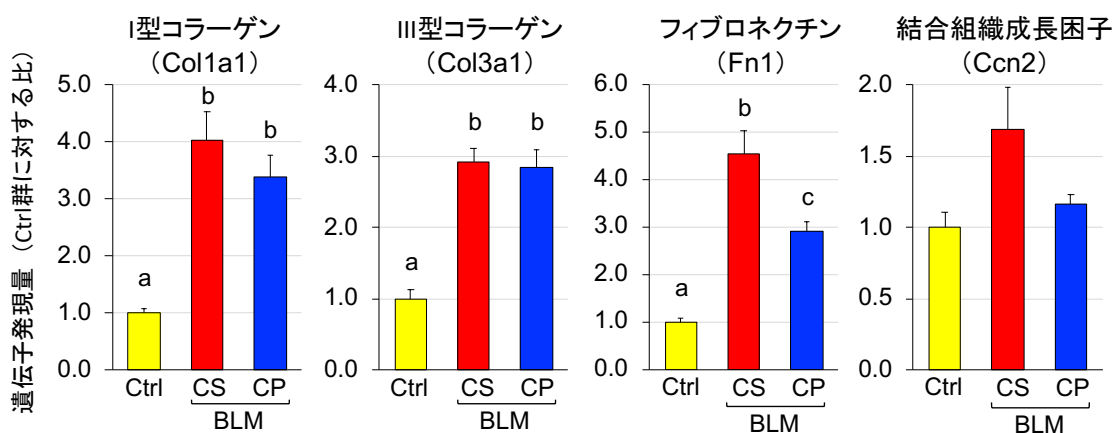
図3 ブレオマイシン(BLM)誘導性線維症マウスの肺組織とCP投与によるその軽減化



(Ctrl:コントロール群, BLM-CS:ブレオマイシン+カゼイン群, BLM-CP:ブレオマイシン+CP群)

a, b, c: 異なる記号は有意差 (p<0.05)

図4 BLM誘導性線維症マウスの肺における炎症性サイトカインの発現量



(Ctrl:コントロール群, BLM-CS:ブレオマイシン+カゼイン群, BLM-CP:ブレオマイシン+CP群)

a, b, c: 異なる記号は有意差 (p<0.05)

図5 BLM誘導性線維症マウスの肺における線維化関連因子の遺伝子発現量

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 2件）

1. 著者名 Kitagawa Aya, Yamaguchi Mana, Fujiwara Aki, Shimizu Muneshige, Takahashi Azusa, Sone Hideyuki, Kamiyama Shin	4. 巻 566
2. 論文標題 Genistein inhibits chondrogenic differentiation and mineralization of ATDC5 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 123 ~ 128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.101	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 WATANABE Ran, YAMAGUCHI Mana, WATANABE Kyosuke, SHIMIZU Muneshige, Azusa TAKAHASHI, SONE Hideyuki, KAMIYAMA Shin	4. 巻 67
2. 論文標題 Effects of Collagen Peptide Administration on Visceral Fat Content in High-Fat Diet-Induced Obese Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.67.57	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 Kashiuchi Shoko, Miyazawa Rikako, Nagata Honoka, Shirai Mayu, Shimizu Muneshige, Sone Hideyuki, Kamiyama Shin	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of administration of glucosamine and chicken cartilage hydrolysate on rheumatoid arthritis in SKG mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 5008 ~ 5017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9fo00981g	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 宮澤 理花子、榎内 祥子、清水 宗茂、曾根 英行、神山 伸	4. 巻 36
2. 論文標題 高脂肪食マウスにおける運動負荷とコラーゲンペプチド摂取の作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 微量栄養素研究	6. 最初と最後の頁 47 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51029/jtnrs.36.0_47	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------