

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592875

研究課題名(和文)天然生理活性ペプチド画分の前骨芽細胞系におけるコラーゲン翻訳後修飾制御の解析

研究課題名(英文)Control analysis of collagen post-translational modifications on natural bioactive peptide fractions in a preosteoblastic cell culture system

研究代表者

山田 志津香(YAMADA, Shizuka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：00363458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：魚由来コラーゲンペプチド(FCP)の分子量の違いによる前骨芽細胞のコラーゲン修飾酵素への影響を検討するため、SECを用いてペプチド画分をⅠ～Ⅲに分類した。TOF-MSで、画分Ⅰは2.9k~3.2kDa、画分Ⅱは2.4~2.8kDa、画分Ⅲは1.8k~2.3kDaであることが判明した。次に細胞数計測、LH1、2、LOXの遺伝子発現解析を行った。細胞増殖試験では画分Ⅲが最も増殖率が低かったが実験終期では対照群、画分間で有意差は見られなかった。LH2は群間で有意差はなかったがLH1とLOXは画分Ⅲでの発現が有意に高かった。以上により低分子量のFCPがコラーゲン架橋に良い影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fish collagen peptides (FCP) were distributed into fractions I~III using the molecular sieve chromatography to investigate the effects on collagen post-translational modification-related enzymes in preosteoblasts by the difference between a molecular weight (MW) of FCP. In TOF-MS, MWs of fractions I, II and III were proved to be 2.9k~3.2kDa, 2.4~2.8kDa and 1.8k~2.3kDa, respectively. Although a cell number of fraction III group was significantly lower than that of a control group in the 2, 5, 7 days of cell culture, there was no difference between each group in 10 and 14 days of cell culture. LH2 mRNA expression did not have a significant difference between each group. However, LH1 and LOX mRNA expressions in fraction III group were significantly higher than those in other groups ($p < 0.01$). These results suggested that a smaller MW of FCP could have a positive effect on the collagen cross-linking in preosteoblasts.

研究分野：歯科保存学

キーワード：魚由来コラーゲンペプチド MC3T3-E1細胞 コラーゲン翻訳後修飾 LOX LH1 LH2 MALDI-TOF リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

生体親和性が良好であることからコラーゲンが医療用材料として多用されてきたが、そのコラーゲンは主にウシやブタを原料としたものがほとんどである。ウシやブタは牛海綿状脳症(BSE)や口蹄疫(FMD)などの人畜共通感染症のリスクがあり、厚労省は医療材料としての使用を控えるよう通知している。そのため、近年では、魚由来のコラーゲンを用いた研究がさかんに行われている。魚の骨、皮、鱗から抽出、精製されたコラーゲンは BSE や FMD 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。当教室において、これまでのラットを用いた動物実験により、魚由来コラーゲンペプチド(FCP)が、一部欠損した顎骨の再生を促進させる作用を有することが判明しており、2007年に「骨再生剤及び骨を再生する方法」として特許登録を行った(特許第5229937号)。コラーゲンは石灰化における三次元的テンプレートとして重要な役割を果たしており、コラーゲンの質の変化を介して FCP の骨再生促進機構を解明することは、化学薬品と異なり、安全性が高く、安価で安定した供給の得られる医用活性素材の開発につながる。これまで、研究代表者は、FCP を用いて、前骨芽細胞(MC3T3-E1 細胞)におけるコラーゲンの合成、コラーゲン翻訳後修飾関連酵素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(LOX)、LOXL1~4、グリコシルトランスフェラーゼ 25 ドメイン1(GLT25D1)に対する影響を生化学的手法により調査してきた。その結果、FCP は 0.2%(w/v)の濃度で、最もコラーゲンの合成を増加させ、LH1~3、LOXL2~4 および GLT25D1 の遺伝子発現増加を介してコラーゲン架橋を促進することが判明した。しかし、この FCP は分子量が~2k から~8kDa の集合体であることから、分子量の差異による MC3T3-E1 細胞への影響の相違が不明であった。

2. 研究の目的

分子ふるいクロマトグラフィーで FCP をフラクションコレクター中のバイアルに採取し、クロマトグラムの結果を参考に、分子量の違いによりフラクション ~ の3つに分類する。本研究目的は、その3種類のフラクションをマウス頭蓋骨由来前骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に作用させ、各フラクションのコラーゲン翻訳後修飾酵素(LOX, LH1, 2)に対する影響を分子生物学的に検討することだった。

3. 研究の方法

(1) FCP の分画

この研究で使用した FCP 粉末は、焼津水産化学工業株式会社から供与された。分子ふるいクロマトグラフィー(Prominence[®], 島津製作所)を用いて、流速 0.75mL/分で2分おきに、

フラクションコレクター中のバイアルに 0.05M 炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解した FCP を分画した。カラムは、HiLoad 16/600 Superdex[®] 75pg (GE Healthcare Life Science)を用いた。LCsolution[®] (島津製作所)で解析したクロマトグラムを参考に、再現性の高い 65~155 分間に採取した 45 本のサンプルを回収し、凍結乾燥を行った。その後、分子量の大きい方から順にフラクション (バイアル#0~21)、(バイアル#22~30)、(バイアル#31~45) の3つに分類した。

(2) フラクション ~ の分子量確認

蒸留水で溶解したフラクション ~ の分子量を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化時間飛行型(MALDI-TOF)質量分析装置 (AXIMA[®] Resonance, 島津製作所)を用いて評価した。外部標準としてインシュリンが、マトリックスとしてシナピン酸が使用された。

(3) 細胞増殖試験

American Type Culture Collection (CRL-2593) から購入されたマウス頭蓋骨由来前骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞 サブクローン 4)がこの実験に用いられた。

フラクション ~ をそれぞれ、 α -MEM (Gibco[®], Life technologies) に溶解し、5%(w/v)FCP 溶液を作製後、0.22 μ m フィルターで過滅菌を行った。この 5%(w/v)FCP 溶液を 10%FBS + 1%ペニシリンストレプトマイシン含有 α -MEM に、総濃度 0.2%となるように添加し、24 well に 2×10^4 個の MC3T3-E1 細胞を播種した。また、培地には、LH の活性に必須であるアスコルビン酸 (L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム n 水和物、和光純薬工業株式会社)を総濃度 0.1mM となるように添加し、5%CO₂、37 °C で培養された。アスコルビン酸のみを培地に添加し、実験群と同数の MC3T3-E1 細胞を播種したものをコントロール群とした。培地は3日おきに交換を行った。培養後 2, 5, 7, 10, 14 日目に細胞を回収し、トリプシン EDTA で処理後、トリパンブルー染色を行い、生細胞のみ血球計算盤を用いて計測した。

(4) コラーゲン修飾酵素の遺伝子発現解析

(3) で作製した各フラクションの 5%(w/v) FCP 溶液を、0.1mM アスコルビン酸 + 10%FBS + 1%ペニシリンストレプトマイシン含有 α -MEM に、総濃度 0.2%となるよう添加し、35mm 皿に 2×10^5 個の MC3T3-E1 細胞を播種した。FCP 溶液を含有しない培地で培養したものをコントロール群とした。(3)と同環境下で培養した3日後に、細胞を PBS(-)で洗浄後、TRIzol[®] 試薬 (Invitrogen[™])を用いて、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法により RNA を抽出した。その後、SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR キット (Invitrogen[™])により、cDNA を合成した。

コラーゲン翻訳後修飾酵素である LOX、LH1、2 の遺伝子発現を Mx3000P qPCR システム (Agilent Technologies) を用いて、リアルタイム PCR 解析により以下の条件で検討した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用いた。

熱変性 : 95 , 1 分
 アニーリング : 63 , 1 分 (LOX)
 61 , 1 分 (LH1, 2)
 伸長反応 : 72 , 1 分
 以上の反応を 40 サイクル行った。

リアルタイム PCR 解析に使用したプライマーを図 1 に示す。

遺伝子		プライマー配列 (5'→3')
リシルオキシダーゼ (LOX)	Forward	GGCGCCAGACAATCCAATGGGAG
	Reverse	GCCTGGATGTAGTAGGGATCGGG
リシルヒドロキシラーゼ (LH) 1	Forward	TACCTTCACCGTCAACATAGCC
	Reverse	TCCTTGAAGATGAGCGTTACCAT
LH2	Forward	TACTAIGCTCGCTCTGAAGATTAGC
	Reverse	GGACATTTTCATAACCACCCGATAT
GAPDH	Forward	GGGTGGAGCCAAACGGGT
	Reverse	GGAGTTGCTGTTGAAGCA

図1. リアルタイムPCR解析で用いたプライマー配列

(5) 統計学的評価

細胞増殖試験とコラーゲン修飾酵素の遺伝子発現実験は、one-way ANOVA で検討後、Fisher's PLSD テストにより多重比較検定を行った。有意水準は、0.05 (細胞増殖試験)、0.01 (遺伝子発現試験)とした。

上記実験はいずれも各群でトリPLICATEに実施された。

4. 研究成果

(1) FCP 分画

分子ふるいクロマトグラフィーを用いて、FCP を分画した時のクロマトグラムを図 2 に示す。

この結果に基づき、サンプル#0~21 をフラクション、サンプル#22~30 をフラクション、サンプル#31~45 をフラクション と分類した。

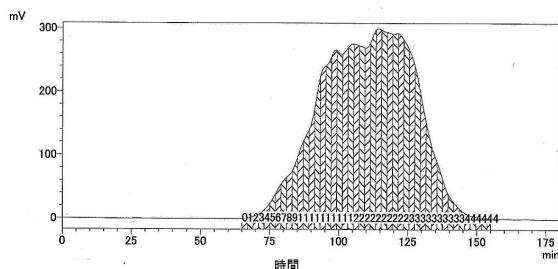


図2. FCP分画時のクロマトグラム

(2) フラクション ~ の分子量測定

分子ふるいクロマトグラフィーによる FCP 分画の際、解析されたクロマトグラムを参考に採取したサンプルを分子量別に 3 つに分類し、各フラクションの分子量を MALDI-TOF 質量分析装置により測定した結果、フラクション が 2.9k~3.2kDa、 が 2.4~2.8kDa、 が 1.8k~2.3kDa であることが判明した。

(3) 細胞増殖試験

FCP の細胞増殖に及ぼす影響を細胞数計測により検討した結果を図 3 に示す。培養 2 日目は、コントロール群と比較してフラクション群の細胞数が有意に ($p < 0.05$)、フラクション群と比較して群が有意に少なかった ($p < 0.01$)。培養 5 日目は、コントロール群と比較してフラクション と群は有意に少ない細胞数を認めた ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。培養 7 日目は、コントロール群よりも全フラクション群の細胞数が有意に少なかった ($p < 0.01$)。しかし、培養 10, 14 日目には各群に有意差は認められなかった。細胞形態については、各群間で相違は認めなかった。

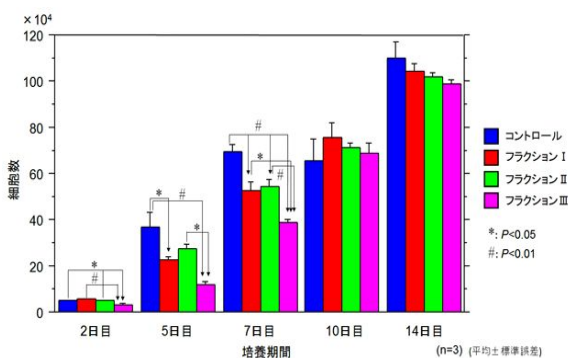


図3. 細胞増殖試験結果

(4) リアルタイム PCR 解析

今回は、コラーゲン翻訳後修飾関連酵素の中でもその役割が明らかとなっている LOX と LH1, 2 の遺伝子発現状況をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果を図 4 に示す。

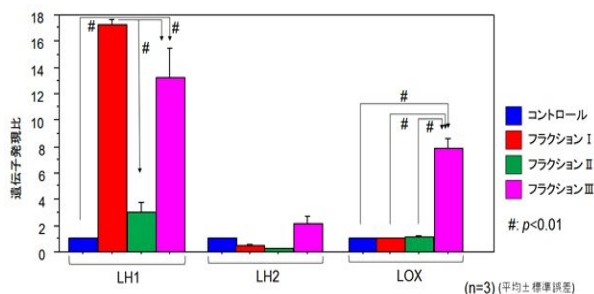


図4. リアルタイムPCR解析結果

コントロール群の遺伝子発現を 1 とした場合の各群の発現比 (平均 ± 標準誤差) は以下の通りである。

LH1

フラクション 群 : 17.2 ± 0.4
 フラクション 群 : 3.0 ± 0.7
 フラクション 群 : 13.2 ± 2.3

LH2

フラクション 群 : 0.4 ± 0.1
 フラクション 群 : 0.3 ± 0.03
 フラクション 群 : 2.1 ± 0.6

LOX

フラクション 群 : 1.0 ± 0.04
 フラクション 群 : 1.2 ± 0.1
 フラクション 群 : 7.9 ± 0.7

LH2 の発現は、各群間で有意差は見られなかったが、フラクション 群の発現が他の 3 群

よりも高かった。LH1では、フラクシオンと群がコントロール群と比較して有意に高い発現を示した ($p < 0.01$)。LOXにおいては、フラクシオン群が他の3群より有意に高く発現していた ($p < 0.01$)。

LH1は、型コラーゲン三重らせん構造のらせん部分にあるリシンをヒドロキシル化する酵素で、LH2は非らせん部(テロペプチド)にあるリシンをヒドロキシル化する酵素である。ヒドロキシリシンを起点に、LOXによりピリジノリンやデオキシピリジノリン等の架橋を形成することで、コラーゲンが成熟していく。

以前、多様な分子量を有するFCPを用いた研究では、FCPによりMC3T3-E1細胞中のLH1~3遺伝子発現が増加し、コラーゲン合成量ならびに架橋形成が促進することで、石灰化の三次元的テンプレートであるコラーゲンが成熟し、石灰化が促進されることを実証した。今回の低分子量FCPによるLH1遺伝子発現増加は、以前の研究結果を支持している。LH2に関しては、統計学的有意差はなかったが、低分子量FCPの遺伝子発現は他の3群よりも高かったことから、コラーゲン成熟にポジティブな影響を及ぼしていると考えられる。多様な分子量を有するFCPを用いた実験では、LOXの遺伝子発現に影響を及ぼさなかったが、今回の研究では低分子量のFCPにより有意に高い発現を示すことが明らかとなった。低分子量のFCPサンプルは、FCP中の含有量が他の2群より少なかったため、全分子量のFCPではLOXに積極的な影響を与えられなかったものと思われる。

以上をまとめると、低分子量のFCPは培養初期にコラーゲン翻訳後修飾に関連する酵素であるLH1、LOXに作用し、MC3T3-E1細胞の生成するコラーゲン架橋を増加させ、コラーゲンの成熟を促進させる可能性を示唆した。

<引用文献>

Mitsuru Saito, Shigeru Soshi and Katsuyuki Fujii: Effect of Hyper- and Microgravity on Collagen Post-Translational Controls of MC3T3-E1 Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 18, No. 9, 2003, pp. 1695-1705.

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 5 件)

Shizuka Yamada, Kohei Yamamoto, Takeshi Ikeda, Kajiro Yanagiguchi, and Yoshihiko Hayashi: Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine. *査読有*, *Biomed Res Int*. Vol. 2014, No. 2014, 2014, pp. 1-8
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/302932>
Hideaki Nagaoka, Masahiko Terajima,

Shizuka Yamada, Yoshiaki Azuma, Takayuki Chida, and Mitsuo Yamauchi: Alfacalcidol enhances collagen quality in ovariectomized rat bones. *査読有*, *J Orthop Res*. Vol. 32, No. 8, 2014, pp. 1030-1036.

DOI: [10.1002/jor.22642](http://dx.doi.org/10.1002/jor.22642)

Kohei Yamamoto, Kazunari Igawa, Kouji Sugimoto, Yuu Yoshizawa, Kajiro Yanagiguchi, Takeshi Ikeda, Shizuka Yamada, and Yoshihiko Hayashi: Biological safety of fish (tilapia) collagen. *査読有*, *Biomed Res Int*. Vol. 2014, No. 2014, 2014, pp. 1-9.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/630757>
Shizuka Yamada, Yuu Yoshizawa, Atsushi Kawakubo, Takeshi Ikeda, Kajiro Yanagiguchi, and Yoshihiko Hayashi.: Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. *査読有*, *Dent Mater J*. Vol. 32, No. 2, 2013, pp. 233-240

DOI: <http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2012-188>
Shizuka Yamada, Hideaki Nagaoka, Masahiko Terajima, Nobuaki Tsuda, Yoshihiko Hayashi, and Mitsuo Yamauchi.: Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *査読有*, *Dent Mater J*. Vol. 32, No. 1, 2013, pp. 88-95

DOI: <http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2012-188>

[学会発表](計 4 件)

吉澤 祐, 池田 毅, 山本 耕平, 杉本 浩司, 山田 志津香, 林 善彦: Fish collagenによる骨再生療法の有用性. *日歯保存誌* 61 巻, 秋季特別号, 2013 年 10 月 17~18 日, 秋田県秋田市, p. 196.

林 善彦, 山本 耕平, 池田 毅, 柳口 嘉治郎, 山田 志津香: 再生医療用足場材としての魚コラーゲンの安全性評価. *日歯保存誌* 61 巻, 秋季特別号, 2013 年 10 月 17~18 日, 秋田県秋田市, p. 197.

池田 毅, 吉澤 祐, 柳口 嘉治郎, 山本 耕平, 山田 志津香, 林 善彦: 足場材としての魚コラーゲンの安全性試験. *日歯保存誌* 60 巻, 春季特別号, 2013 年 6 月 27~28 日, 福岡県福岡市, p. 118.

山田 志津香, 林 善彦, 山内 三男, 他: 骨芽細胞培養系におけるフィッシュコラーゲンペプチドの質と石灰化に及ぼす影響. *日歯保存誌* 58 巻, 春季特別号, 2012 年 6 月 28~29 日, 沖縄県宜野湾市, p. 26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 志津香 (YAMADA, Shizuka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授
研究者番号: 00363458