

ラット皮膚創傷回復に対するゼラチン酵素水解物摂取の効能

生物生産科学科 応用生物化学コース
燕山由己人、堀内恵美子、田中秀幸

Effect of gelatin-hydrolysate on wound healing process in model rats.

Yukihito Kabuyama, Emiko Horiuchi, Hideyuki Tanaka

Résumé

Recent progress in collagen research has revealed that collagen regulates many biological process through the regulation of signal transduction systems in target cells. Peptides derived from collagen in food stuffs are expected to have biological activities, such as improvement of skin function. In this study, we analyzed the effect of ingestion of geletin-hydrolysate on skin wound healing process in model rats. Our results showed that geletin-hydrolysates possibly activate MMP2/9 expression in wounded skin, demonstrating the validity of collagen as functional foods.

緒言

コラーゲンは動物体内において最も多量に存在するタンパク質であり、全タンパク質の約 25% を占める。不溶性繊維状タンパク質として皮膚、骨、軟骨、血管などに広く分布し、細胞外スペースにおいて組織に力学的強度や柔軟性を与えるのが主要な機能である。コラーゲン分子は、分子量約 100kDa のポリペプチド鎖 (=アミノ酸がペプチド結合で結合したもの) 3 本がより合わさりながららせん構造をとるのが大きな特徴である。この構造により酵素などによる分解を受けづらく、構造タンパクとして安定な性質を持つと考えられてきた⁽¹⁾。

近年、コラーゲンには構造タンパク質としての機能以外にも、コラーゲンと接触する細胞に対して、細胞内シグナル伝達経路の活性化を促す機能があることが明らかになってきた⁽²⁾。これにより、細胞の増殖や運動性を制御し、組織全体の極性や機能を大きく決定していると考えられる。このような背景から、機能性食品やサプリメントとしての効能が期待され、いわゆるコラーゲンペプチドと呼ばれる商品が多く販売されている。このコラーゲンペプチドは、ゼラチン (加熱変性させ水溶性を高めたコラーゲン加工産物) を材料として、酵素処理によって低分子化を行い、消化吸収性を高めた加工物である。化学的には複数種のペプチド (アミノ酸が複数個結合したもの) の混合物であるが、その組成や、機能性ペプチドを

科学的に同定している例は非常に少ない。さらに、経口摂取したコラーゲンペプチドが実際に体内に吸収されるか、どの様な細胞に影響を及ぼすかなど、基本的な動態や生理機能についても不明な点が多く残されている。我々は、このような背景より、コラーゲンの消化吸收形態を実験動物モデルにより解析した。その結果、コラーゲンの消化吸收形態は、他のタンパク性食品と大きくことなり、主にペプチドとして小腸で吸収されることが判明した⁽³⁾。この結果は、吸収された特定のペプチドが体内の細胞に対して生理作用を持ちうることを示唆する。

コラーゲンは、食肉や魚の加工処理において不可食部として処理され、産業廃棄物として大量に排出されているのが現状である。このような産廃物を原材料として、科学的に信頼性の高い機能性食品やサプリメントを開発することは、社会的な意義が高いと考える。このような背景から、本研究では、コラーゲンペプチドを摂取させた実験動物を用い、皮膚の再生過程に対してどの様な影響が現れるか検証した。評価の指標として、皮膚再生の際に機能することが知られている、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性を測定した。また、皮膚を構成するタンパク質の再合成、即ち再生の強度を評価する一助として、コラーゲンの新規合成量を測定した。

実験材料および方法

1 実験動物と皮膚創傷回復実験

すべての動物実験は、宇都宮大学動物実験委員会の許可を得た後に行った。実験動物は、Wistar 系雄ラット (5 週齢) を日本チャールズリバー株式会社より購入し用いた。予備飼育は、22°C ±2°C、12 時間の明暗サイクル (明期 5:00 ~ 17:00) の環境下で行った。水道水と餌 (MF; オリエンタル社) を 3 日間以上自由摂取させた。皮膚創傷回復実験は以下の手順で行った。

まず試験一日目では、ラットにネンプタール (100g 体重あたり 80μl、ペントバルビタールナトリウムとして 4mg) を腹腔内に投与し麻酔した。その後、腹部をバリカンで除毛

後、市販の除毛剤 (epilat 除毛クリーム、カネボウ社) を塗布した。5 分間放置後、剃刀で除毛部位を丁寧に剃り、皮膚を創傷させた。この日より、実験用ラットを群分けし、与える食餌を変更した。対照として、タンパク源を 15% のミルクカゼイン (乾燥重量) としたカゼイン食群を設定した。試験群としてはタンパク源として、10% のミルクカゼインに 5% のゼラチン酵素水解物を加えた、コラーゲン食群を設定した。タンパク源以外の餌料組成は、乾燥重量として、 α -コーンスターチ 73.5%、セルロース 2%、コーンオイル 5%、混合ミネラル (AIN93G) 3.5%、混合ビタミン (AIN93) 1% である。混合したコラーゲン水解物は、SCP-9 (新田ゼラチン株式会社より供与) である。

試験二日目、三日目は、除毛部にクリームを再度塗布し、一日目と同様剃刀で創傷を施した。三日間の処理の翌日を回復 0 日目とし、以降各群より経時的に皮膚を採取した。皮膚採取は、ラットを斬首放血した後行った。創傷部皮膚調製は、腹膜と腹壁をメスを用いて切り離した後、皮下脂肪と筋肉を取り除き、行った。目視により調整した試料がほぼ均一に表皮と真皮より構成される事を確認し、以降皮膚試料として用いた。採取した皮膚は直ちに氷冷し実験に用いた。

2 実験材料

緩衝液調整用試薬 (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄)、電気泳動用試薬 (アクリルアミド、ビスアクリルアミド、過硫酸アンモニウム、N, N, N, N テトラエチレンジアミン) はいずれも和光純薬工業より購入した。I 型コラーゲンは Sigma 社より購入した。

3 実験方法

(1) MMP 活性測定

MMP の活性は、ゼラチンザイモグラフィ法⁽⁴⁾を用いて評価した。採取した皮膚組織を洗浄液 [150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.4)] で 3 回洗浄し、60°C に温めたリン酸緩衝液 [10mM Phosphate buffer (pH7.4)] を加え、約 10 秒間保温した。その後、組織約 300mg を組織破砕用緩衝液 [200mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.1% TritonX-100, 50mM Tris-HCl (pH7.4)] に浸し、ポリトロン破砕機 (Polytron PT3100, Kinematica 社製) で破砕抽出を行った。得られた抽出液は 8000 x g、20 分間、4°C の遠心分離により未破砕部を取り除き、最終抽出液とした。抽出液のタンパク質量は Lowry 法⁽⁵⁾により測定した。抽出液を調製後、タンパク量として 0.2 μ g を電気泳動し、ゼラチンザイモグラフィにより活性バンドを検出した。電気泳動像を画像解析ソフト Image J (NIH) により解析し、各活性バンドの強度を測定した。

(2) 新規コラーゲン合成測定

新規コラーゲン合成量は、組織より塩化ナトリウム可溶性コラーゲン (合成段階にあるコラーゲン、文献 6) を分取した後、塩酸分解により遊離してくるアミノ酸のうち、コラーゲンに特異的に存在するヒドロキシプロリンを定量し評価した。採取した皮膚組織より脂肪細胞を取り除いた。450mM NaCl 溶液を加え、ポリトロン破砕機で組織を破壊した。その後、一晚回転攪拌器を用いて抽出作業を行った。翌日抽出液を 20000 x g、20 分間の遠心分離により未破砕部を取り除き、最終抽出液とした。沈殿部は不溶性コラーゲン画分とした。各画分は 6M HCl を加えて 24 時間加水分解を行い、アミノ酸に分解した。加水分解物中のヒドロキシプロリン量は、Firshein らの方法により比色定量した⁽⁷⁾。即ち、2-ブプロパノールを試料に加え攪拌後、クロラミン T 溶液、エーリッヒ試薬を順に添加した。沸騰水浴中で正確に 2 分間処理し、その後直ちに冷却し、室温に一時間おいた後、575nm における吸光度を測定した。

(3) 統計解析

MMP 発現量の統計解析は、Tukey-Kramer の多重検定により行い、 $p < 0.05$ で有意差があるとした。塩化ナトリウム可溶性コラーゲンに含まれるヒドロキシプロリン量の統計解析は、Student's t-test を対照群との間で行い、 $p < 0.05$ で有意差があるとした。

実験結果および考察

(1) コラーゲン摂取が皮膚内マトリックスプロテアーゼ活性に与える影響

ゼラチンザイモグラフィによる解析では、主に分子量 92kDa, 82kDa, 72kDa, 62kDa の位置にゼラチン分解活性を有するバンドが認められた。これらは、これまでの分子量に関する報告からそれぞれ、MMP9, 活性型 MMP9, MMP2, 活性型 MMP2 であると考えられた (図 1)。泳動像をスキャンし、Image J により、これらのタンパクバンドの強度を測定し、創傷回復時における各タンパク質の挙動を示したもの

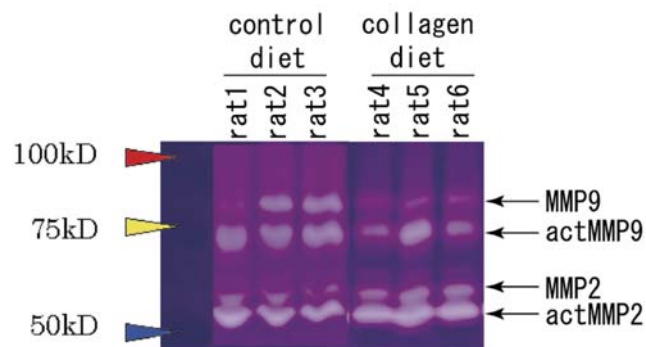


図 1 回復一日目における皮膚の MMP 発現量 (ゼラチンザイモグラフィ)

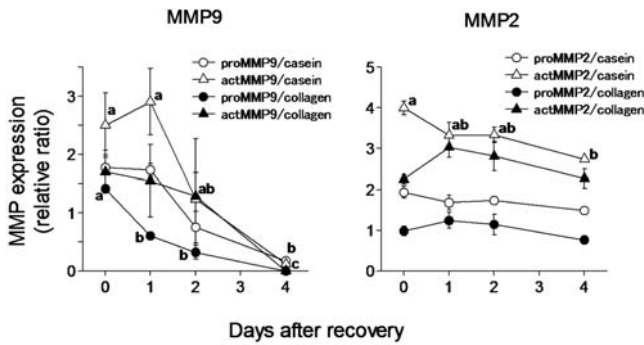


図2 回復過程における MMP 発現量の経時変化（ゼラチンザイモグラフィの結果を定量化）
データは平均値 ± 標準誤差として示してある (n=3)。統計解析は Tukey-Kramer の多重検定により行い、 $P < 0.05$ で有意義があるとした。異符号間に有意差が有る。

が、図2である。非常に興味深いことに、コラーゲン食を与えた群では、活性型 MMP9 の発現量は、回復二日目に至っても初日と同程度に高く維持される傾向が認められた。一方、MMP2 も、コラーゲン食を与えた群で回復一日目に発現量が増加する傾向が認められた。これらの結果は、皮膚が創傷した後の再生過程において、コラーゲンペプチドが直接あるいは間接的に再生過程にある皮膚細胞に対して影響を及ぼすことを示唆している。例えば、摂取したコラーゲンペプチドが直接皮膚細胞まで到達し、MMP2/9 を産生する細胞を活性化する可能性や、血中において免疫反応や炎症反応に関与する細胞の活性化を促し、MMP2/9 産生を促す効果のある炎症性サイトカインの産生を促進させる可能性が考えられる。今後コラーゲン食を与えたラットより皮膚細胞や免疫細胞などを単離し、それらの性状を詳細に検討する必要がある。また、ゼラチンザイモグラフィは簡便ではあるものの、定量性に乏しい解析手法である。今後ウェスタンブロットなど、定量性の高い解析を行うことで、コラーゲン摂取の影響はより明確に示されると期待される。

(2) コラーゲン摂取が新規コラーゲン合成に与える影響

回復過程にある組織中における塩化ナトリウム可溶性コラーゲンの比率を、ヒドロキシプロリンの定量結果により表

	control	collagen diet
day0	1.9% ± 0.1%	2.1% ± 0.2%
day1	2.4% ± 0.3%	3.4% ± 0.3% ※
day2	3.4% ± 0.2%	3.4% ± 0.6%
day4	5.3% ± 0.1%	3.9% ± 0.2% ※

同日の対照区とコラーゲン摂取区を Student's t-test により統計解析した。※ < 0.05

表1 塩化ナトリウム可溶性コラーゲンに含まれるヒドロキシプロリン量（皮膚総ヒドロキシプロリン量に対する総対比で評価）

したものが、表1である。非常に興味深いことに、回復一日後に、コラーゲン食を与えた群では塩化ナトリウム可溶性のコラーゲンの有意な上昇が見られた。この結果は、コラーゲンを摂取することで、コラーゲンを産生する機能を持つ皮膚繊維芽細胞が活性化していることを示唆する。MMP9 の活性維持効果も回復一日目から二日目において認められているため、摂取したコラーゲンの効果はこの時期に顕著に現れている。一般に摂取した栄養素などが末梢組織に到達する時間を考慮すると⁽⁸⁾、作用発現に要する時間としては妥当なものであり、摂取コラーゲンが直接あるいは間接的に皮膚細胞に対して活性化効果を与えることを強く支持している。

本研究により、コラーゲン水解物を摂取することにより、皮膚再生過程に関与する制御因子に対して有意な影響が出ることが始めて明らかになった。我々のこれまでの結果と合わせて考えると、吸収されたコラーゲン由来のペプチドが生理活性を有し、再生プロセスに関与する細胞群に大きな影響を与えている可能性が高い。今後、培養細胞を用いた解析で、具体的な標的細胞や、機能性ペプチドの同定を行うことが課題である。また、細胞の運動性や増殖を指標として具体的な生理効果を詳細に明らかにしたい。

謝辞

本研究は、新田ゼラチン株式会社よりの研究助成により行なった。

引用文献

- (1) 野田春彦、永井裕、藤本大三郎；コラーゲン、南江堂 (1975).
- (2) Joni D Motto and zena Werb; Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Current opinion in cell biology, 16,558 (2004)
- (3) Chinfang Liu, Kazuko Sugita, Ken-ichi Nihei, Koichi Yoneyama and Hideyuki Tanaka; Absorption of Hydroxyproline-Containing Peptides in Vascularly Perfused Rat Small Intestine *in Situ*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 1741 (2009)
- (4) Linda Troeberg; Zymography of Metalloproteinases Current protocol in protein measurement with the folin phenol reagent J.Biol. Chem, 193,265 (1951)
- (5) Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, and Rose J Randall; Protein measurement with the folin phenol reagent J. Biol. Chem, 193, 265 (1951)
- (6) Jerome Gross; Studies on the formation of collagen: IV. Effect of vitamin C deficiency on the neutral salt-extractible collagen of skin J Exp Med, 109, 557 (1959)

- (7) H. E. Firschein, Jonathan P. Shill; The determination of total hydroxyproline in urine and bone extracts *Analytical Biochemistry*, 14,296 (1966)
- (8) 大和留美子 コラーゲン・トリペプチド「HACP」の骨に対する効果 *食品と開発*, 39,54 (2004)