

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	浅井 智子
論文題目	Contents, structure, and functions of collagen-derived peptides in human blood after ingestion of collagen hydrolysate and gelatin (コラーゲン加水分解物あるいはゼラチン摂取後のヒト血中コラーゲン由来ペプチドの含量、構造とその機能)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンは、熱処理により三重らせん構造が崩壊し、ゼラチンとなる。このゼラチンをさらにプロテアーゼにより部分分解したものが、コラーゲン加水分解物あるいはコラーゲンペプチドと呼ばれとサプリメントとして市販されている。近年、プラセボコントロール二重盲検比較試験により、2.5 g 以上のコラーゲン加水分解物摂取は肌や関節の状態を改善することが実証されている。また、コラーゲン加水分解物摂取時の血中には、コラーゲン由来のジ・トリペプチドが増加することが明らかとなっており、このペプチドの持つ線維芽細胞の増殖促進効果がコラーゲン加水分解物摂取による有益な作用に関与していると考えられている。しかし、ゼラチンを含む調理肉を摂取した場合の血中 prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) 等のコラーゲン由来ペプチドの増加に関しては報告例がない。また細胞培養条件により線維芽細胞が Pro-Hyp に応答しない結果も得られている。本研究では、調理肉摂取時に血中に移行するコラーゲン由来ペプチドの含量と構造を明らかにするとともに、血中コラーゲン由来ペプチドの主成分である Pro-Hyp に対する線維芽細胞の応答の差の原因を明らかにすることを試みたものであり、以下のように要約される。</p>			
<p>1. 調理の専門家が調製した日本食の一食分の食肉・魚肉中のコラーゲン量は、ほとんどが、0.5-2 g 程度であった。一方、牛すじ肉、ウナギ（皮付き）、ヨシキリザメ尾部肉などにはコラーゲンは10 g 以上含まれていた。コラーゲン含量の多い（13 g）ヨシキリザメ尾部の調理肉摂取時の血中コラーゲン由来ペプチドのAUC（曲線下面積）は、同量のコラーゲン加水分解物摂取時の約1/3であった。ヨシキリザメ尾部調理肉中のコラーゲンはペプシン・パンクレアチン処理により約1/3が可溶化した。この可溶化したコラーゲンをさらにペプチダーゼ処理したコラーゲンの分子量分布は、ペプチダーゼ処理後のコラーゲン加水分解物の分子量分布と同様であった。これらの結果から、調理肉中コラーゲンのうちエンド型プロテイナーゼにより生じた可溶化コラーゲンペプチドがエキソ型ペプチダーゼでさらに分解され血中へと吸収されることが示めされた。</p>			
<p>2. 線維芽細胞は、プラスチック上ではコンフルエントになるまで増殖するが、コラーゲングル接着時には FBS（ウシ胎児血清）存在下においても増殖が停止する。Pro-Hyp はコラーゲングル上で増殖を停止した線維芽細胞の増殖を引き起こすことが明らかにされている。しかし、異なる FBS 調製物によっては、コラーゲングル上においても線維芽細胞の増殖が停止しない場合があった。この原因として FBS 中にコラーゲン由来ペプチドの存在を予想したところ、調製物により 20-100 μM のヒドロキシプロリン（Hyp）を持つコラーゲン由来ペプチドが存在することが明らかとなった。FBS中の低分子画分の除去により、コラーゲングル上では細胞増殖が抑制され、Pro-Hypの添加により増殖を再開させる先行研究と一致する結果が得られた。</p>			

3. 前述の結果からも Pro-Hyp はマウス皮膚由来線維芽細胞の成長を促進させることが明らかとなった。コラーゲン加水分解物摂取後には血中にPro-Hypが増加し、全身に巡るが、コラーゲン加水分解物摂取による過剰な線維芽細胞の増殖等の副作用は報告がない。そのため、生体内に存在するすべての線維芽細胞がPro-Hypに応答するとは考えにくい。そこでマウス創傷部位に観察され創傷治癒後に消失すると報告されている間葉系幹細胞マーカーである低親和性神経増殖因子受容体(p75NTR)を特異抗体により検出し、Pro-Hyp との応答との関係を検討した。その結果、マウス皮膚培養初期に皮膚から遊走してきた線維芽細胞はほとんどが p75NTR 陽性であるが、培養日数の経過に従い陽性細胞は減少し、4週間の培養により消失した。Pro-Hyp は、p75NTR 陽性細胞が存在する細胞群ではコラーゲングル上で細胞増殖を促進させ、p75NTR 陽性細胞の存在割合も増加させたが、p75NTR 陰性細胞は増殖させなかった。さらに FITCラベル Pro-Hyp は p75NTR 陽性細胞にのみ取り込まれたが陰性細胞には取り込まれなかった。これらの結果から、p75NTR陽性線維芽細胞は Pro-Hyp に応答し増殖するが、p75NTR 陰性線維芽細胞は応答しないことが明らかとなった。

本論文では、コラーゲン加水分解物のみではなく食肉中のゼラチンを摂取しても血中コラーゲン由来ペプチドを増加させることを明らかにした。さらに、血中コラーゲン由来ペプチドの主成分である Pro-Hyp は p75NTR 陽性線維芽細胞に特異的に取り込まれ細胞を増殖させるため、通常線維芽細胞には影響しないことを明らかにした。本発見は、コラーゲン加水分解物摂取による創傷治癒促進作用を説明でき、かつ創傷治癒プロセスの理解にも大きく寄与すると考えられる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

コラーゲン加水分解物摂取による有益な作用は多くのヒト臨床試験で示されているが、通常の食事からのコラーゲンペプチドのヒト体内への取り込みはほとんど検証されていなかった。またコラーゲン加水分解物摂取によりヒト血中に移行する **Pro-Hyp** が線維芽細胞を増殖させることは知られているが、コラーゲン加水分解物の摂取により全身の線維芽細胞の増殖は生じないことが説明できなかった。本論文では典型的な日本食の摂取で摂取されるコラーゲン量と、その摂取によるコラーゲンペプチドの血中移行を明らかにし、さらに **Pro-Hyp** に反応する線維芽細胞と反応しない線維芽細胞の存在を明らかにしたものである。成果として評価できる点は以下の通りである。

1. 調理の専門家が調製した日本食の一食分の食肉・魚肉中のコラーゲン量を明らかにし、コラーゲン含量の多い調理肉摂取によってもコラーゲンペプチドが血中移行することを見出した。さらに調理肉中のコラーゲンのうちエンド型プロテイナーゼにより生じた可溶性コラーゲンペプチドがエキソ型ペプチダーゼでさらにジ・トリペプチドに分解され血中へと吸収されることを明らかにした。
2. 細胞培養に用いる牛胎児血清 (FBS) 中に高濃度 (約100 μM) の**Pro-Hyp** 等のコラーゲンペプチドが存在することを見出し、細胞培養によりコラーゲンペプチドの機能を評価するためにはFBS中のコラーゲンペプチドを除去する必要があることを示した。
3. マウス皮膚から遊走してきた線維芽細胞は初期には間葉系幹細胞マーカーである p75NTR を発現しているが、増殖を繰り返すと p75NTR を失うことを見出した。また p75NTR 陽性細胞のみが **Pro-Hyp** を取り込みコラーゲンゲル上で増殖することを明らかにした。

以上のように、本研究は海洋生物機能学、食品科学、細胞生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)