

魚由来コラーゲンペプチド摂取によるヒト皮膚状態改善作用およびその作用機構解明

小泉 聖子

皮膚の老化は、加齢による生理的老化と、紫外線や活性酸素などの外的要因による光老化の 2 つに大別される。生理的老化では、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックス (ECM) の減少により、皮膚の保水力や弾力が低下し、たるみやシワが生じる。また、表皮のターンオーバーが遅延し、角層が厚くなることで、皮膚の透明感が失われる。さらに、タンパク質と糖が非酵素的に反応して生成される最終糖化産物 (AGEs) は、コラーゲン線維やエラスチン線維と架橋結合し、線維の分解・変性を引き起こす。その結果、皮膚の弾力低下、シワの増加、くすみなどが生じると考えられている。

光老化では、紫外線によって活性酸素が生成され、活性酸素の刺激を受けた表皮角化細胞から、メラノサイトを刺激するエンドセリン-1 (ET-1) などが分泌される。これによりメラノサイトが活性化し、チロシナーゼやドーパクロムトートメラーゼ (DCT) などの酵素が活性化することで、ユウメラニン色素の生成が増加し、シミ、くすみ、色素沈着が生じる。さらに、真皮のコラーゲン線維やエラスチン線維も紫外線によって損傷を受け、線維構造の破壊によりシワ、たるみ、弾力低下が生じる。

一方、コラーゲンは、水に難溶性の三重らせん構造を持つ構造タンパク質であり、体内タンパク質の約 30% を占める。その一次構造は、グリシン (Gly) を起点とする Gly-X-Y (X, Y はアミノ酸) のトリペプチドが繰り返し配列した構造である。X の位置にはプロリン (Pro)、Y の位置には、コラーゲンに特異的な水酸化されたプロリンであるヒドロキシプロリン (Hyp) が高頻度で存在する。コラーゲンペプチド (CP) は、牛、豚、魚などのコラーゲン原料から抽出されたゼラチンを酵素分解して得られた、低分子化されたコラーゲン分解物である。原料部位によって臭気などに違いがあり、魚皮由来 CP は臭気が強いとされるが、魚鱗 CP と同等の機能性が確認できれば、魚皮の有効活用につながる。

CP は経口摂取により吸収され、様々な生理機能を示すことが知られている。特に、皮膚の保湿性、弾力性、シワ改善効果が報告されているものの、包括的な皮膚状態改善効果については不明な点があった。CP 摂取により、Pro-Hyp および Hyp-Gly が血中に多く移行することが知られており、これらのペプチドが真皮の線維芽細胞を刺激し、ヒアルロン酸合成遺伝子の促進や細胞遊走性の向上などを通して皮膚に作用すると考えられている。また、動物種別での比較はあるものの、原料部位によるヒト皮膚への効果の違いや、詳細な作用機構については、これまで十分に解明されていなかった。また、2 種類の製造方法により得られた Hyp 含有のジ・トリペプチド量を 8,000 ppm 以上含む di- and tripeptide High containing Collagen Peptides (HCP, 平均分子量約 800 Da) と、このジ・トリペプチド量が約 50 ppm である di- and tripeptide Low containing Collagen Peptides (LCP, 平均分子量約 6,000 Da) を比較し、Hyp 含有ジ・トリペプチド量の違いによる皮膚細胞への作用に関する報告はない。

本研究は、第 1 章から第 4 章で構成されており、第 1 章では、魚鱗 CP 摂取による皮膚への包括的な効果を臨床試験により検証した。第 2 章では、魚鱗 CP と魚皮 CP の原料部位によるヒト皮膚状態への影響の違いを臨床試験により検証した。第 3 章では、魚鱗 CP 摂取による皮膚中最終糖化産物 (AGEs) への影響を臨床試験により評価した。第 4 章では、Hyp 含有ジ・トリペプチド量別 CP によると皮膚への作用機構を *in vitro* 試験において検討した。

第 1 章では、臨床試験により、3g/日、12 週間の魚鱗 CP 摂取による皮膚のシワ、水分量、弾力性の包括的な改善効果を明らかにした。有害事象の報告はなく、安全性が高いことも示された[1]。第 2 章では、原料部位が異

なるが製造方法は同じである魚鱗 CP と魚皮 CP の比較臨床試験を行い、両者のヒト皮膚に対する水分量、弾力性、シワ、透明感、滑らかさへの改善効果が同等であることを示した[2]。これは、魚皮の有効活用に繋がる知見である。第 3 章では、5g/日、12 週間の魚鱗 CP 摂取による皮膚中 AGEs レベルの有意な低下を、健常者において確認した[3]。この結果は、第 1、2 章の結果と合わせて、魚鱗 CP による皮膚状態改善効果のメカニズムの一端を解明する上で重要な知見となる。第 4 章では、in vitro 試験により、Hyp 含有ジ・トリペプチド量の多い HCP ほど皮膚への効果が高いことを示し、その作用機構の一端を解明した。具体的には、真皮では UV 照射の有無に限らずコラーゲンやヒアルロン酸、エラスチンなどの ECM 産生促進による皮膚のハリや弾力の改善に寄与している可能性を示した。表皮ではアクアポリン 3 やフィラグリン、フィラグリンを分解するブレオマイシン水酸化酵素遺伝子発現促進によって、ヒト皮膚の保湿向上に寄与すること、ケラチン 10、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ 1 などの表皮ターンオーバー関連遺伝子発現促進、SOD 様活性など抗酸化作用によるヒト皮膚の荒れ抑制、滑らかさ、透明感などの向上へ寄与する可能性示された。さらに *ET-1* 遺伝子および *DCT* 遺伝子発現を抑制によるヒト皮膚の色素沈着抑制効果なども示唆された。

CP は、エビデンス重視の消費者ニーズの高まりを受け、その機能性に関する科学的根拠の提示が重要になっている。本研究は、魚由来 CP 摂取による皮膚状態改善効果というエビデンスを提供し、消費者の理解促進に貢献する。さらに、効果的なスキンケアは、消費者のクオリティーオブライフ (QOL) 向上に繋がることから、本研究成果は消費者の QOL 向上、ひいては社会貢献にも繋がる。加えて、魚皮 CP の有効活用という点からも、SDGs やサステナビリティの観点から社会に貢献できる可能性を示唆している。これらのことから、CP の摂取は、世界的な社会貢献の一助になると期待される。

[1] S. Koizumi, N. Inoue, M. Shimizu, C.-j. Kwon, H.-y. Kim, K.S. Park, Effects of dietary supplementation with fish scales-derived collagen peptides on skin parameters and condition: a randomized, placebo-controlled, double-blind study, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 24 (2018) 397-402.

[2] S. Koizumi, N. Inoue, F. Sugihara, X. Wang, The effects of collagen hydrolysates derived from tilapia scales or skin on human facial skin-a randomized double-blind placebo-controlled clinical study-, *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 47 (2019) 57-63.

[3] S. Koizumi, Y. Okada, S. Miura, Y. Imai, K. Igase, Y. Ohyagi, M. Igase, Ingestion of a collagen peptide containing high concentrations of prolyl-hydroxyproline and hydroxyprolyl-glycine reduces advanced glycation end products levels in the skin and subcutaneous blood vessel walls: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 87 (2023) 883-889.

Improvement Effects on Human Skin Condition and Elucidation of Its Mechanism Through the Intake of Fish-Derived Collagen Peptides

Seiko Koizumi

There are two prominent types of skin aging: physiological aging caused by aging and photoaging caused by external factors such as UV rays and reactive oxygen species. Physiological aging is caused by a reduction in water retention and elasticity of the skin caused by a reduction in the extracellular matrices (ECM), such as collagen, elastin, and hyaluronic acid, and causes sagging and wrinkles. In addition, delayed epidermal turnover and thickening of the stratum corneum results in the loss of skin transparency. In addition, the final glycation products (AGEs) generated by the nonenzymatic reaction of proteins and sugars cross-link and bind to collagen and elastin fibers, thereby causing fiber degradation and degeneration. As a result, skin elasticity decreases, wrinkles increase, and makes the skin dull.

In photoaging, UV rays produce reactive oxygen species, which in turn stimulates epidermal keratinocytes and secrete endothelin-1 (ET-1) and other substances that further stimulate and activate melanocytes. The activation of melanocytes activates enzymes such as tyrosinase and dopachrome tautomerase (DCT), resulting in an increased production of eumelanin pigment, which causes spots, dullness, and pigmentation. In addition, UV rays also damage the collagen and elastin fibers in the dermis, causing wrinkles, sagging, and loss of elasticity due to the destruction of the fiber structure.

Collagen is a structural protein with a triple helical structure that is insoluble in water and accounts for about 30% of the proteins in the body. The primary structure of collagen consists of a repeating sequence of Gly-X-Y (X and Y are amino acids) tripeptides starting with glycine (Gly) and having proline (Pro) at the X position and hydroxyproline (Hyp), a hydroxylated proline specific to collagen, at the Y position. Collagen peptide (CP) is a low-molecular-weight collagen degradation product obtained by the enzymatic degradation of gelatin extracted from bovine, porcine, fish, and other collagen sources. CP varies with regards to odor and other characteristics depending on the source. CP derived from fish skin is said to possess a strong odor. However, if the functionality of the CP can be confirmed to be equivalent to that of the fish scale, it can be termed as an effective use of fish skin.

CP is absorbed by oral intake and exhibits several physiological functions. The effects of CP on skin moisturizing, elasticity, and wrinkle improvement have previously been reported; however, its comprehensive effects on skin condition remain unclear. These peptides are predicted to act on the skin and stimulate dermal fibroblasts by promoting the genes responsible for synthesizing hyaluronic acid and enhancing cell migration. Despite comparisons having been made between animal species, the differences in the effects of CP on human skin based on the source and the detailed mechanisms of action have not been completely elucidated. In addition, there have been no reports regarding the effect of differences in the amount of Hyp-containing di- and tripeptide on dermal and epidermal cells. This study compared CPs with different concentrations of Hyp-containing di- and tripeptides, specifically HCP (high-content CP, average molecular weight approximately 800 Da), which contains >8,000 ppm of Hyp-containing di- and tripeptides, and LCP (low-content CP, average molecular weight approximately 6,000 Da), which contains approximately 50 ppm of these di- and tripeptides. The CPs were manufactured using two different methods.

This study is composed of Chapters 1 through 4. Chapter 1 discusses the verification of the comprehensive effects of fish scale CP ingestion on the skin through clinical trials. Chapter 2, consists of the examination of the differences in the effects of CP obtained from fish scales and that obtained from fish skin on human skin based on the site of the raw material by clinical trials. Chapter 3 discusses the evaluation of the effects of intake of fish scale CP on advanced glycation end products (AGEs) in the skin through clinical trials. Chapter 4 evaluates the mechanism of action of CP on the skin based on the amounts of di- and tripeptides containing Hyp through an *in vitro* study.

In Chapter 1, a clinical trial revealed that after 12 weeks of 3 g/day fish scale CP ingestion, a comprehensive

improvement was observed in skin wrinkles, water content, and elasticity. The product was demonstrated to be safe and no adverse effects were reported [1]. In Chapter 2, the clinical study comparing fish scale CP and fish skin CP, which had different raw material parts but an identical manufacturing method, demonstrated that the improvement effects exerted by both products on skin moisture content, elasticity, wrinkles, transparency, and smoothness were equivalent [2]. This finding can lead to the effective use of fish skin. In Chapter 3, the significant reduction in AGE related effects on the skin caused by the ingestion of 5 g/day of fish scale CP for 12 weeks was confirmed in healthy subjects [3]. These results, in conjunction with the outcomes presented in Chapters 1 and 2, are significant findings in understanding part of the mechanism of the skin condition-improving effect of fish-derived CP. In Chapter 4, CP with higher amounts of Hyp-containing di/tripeptide (HCP) was demonstrated to be more effective in *in vitro* studies, and part of the mechanism of action was elucidated. Specifically, this study demonstrated that with or without UV irradiation, CP may contribute to the improvement of skin firmness and elasticity by promoting the ECM production of collagen, hyaluronic acid, and elastin in the dermis. In the epidermis, CP contributes to enhanced moisture retention in human skin by promoting the expression of the bleomycin hydroxylase gene that degrades filaggrin, aquaporin 3, and filaggrin genes; promoting the expression of epidermal turnover-related genes including keratin 10, involucrin, and transglutaminase 1; and promoting antioxidative activities, such as SOD-like activity. The results of this study demonstrated that the contribution of CP improved the expression of those genes, leading to enhanced skin moisture retention, reduced roughness, and improved smoothness and transparency. In addition, the findings of the study indicated that the suppression of the *ET-1* gene and *DCT* gene expression could possibly inhibit the hyperpigmentation of human skin.

CP is rapidly gaining importance due to the scientific evidence of its functionality in response to growing evidence-oriented consumer needs. This study demonstrates the effectiveness of fish-derived CP ingestion in improving skin conditions and contributes to consumer understanding. Furthermore, effective skin care improves consumers' quality of life (QOL); therefore, the results of this study will play a role in improving the consumers' QOL and, ultimately, benefit society. In addition, the effective utilization of fish skin CP indicates the possibility of contributing to society in terms of SDGs and sustainability. Based on these findings, CP consumption is expected to contribute to the global social contribution.

[1] S. Koizumi, N. Inoue, M. Shimizu, C.-j. Kwon, H.-y. Kim, K.S. Park, Effects of dietary supplementation with fish scales-derived collagen peptides on skin parameters and condition: a randomized, placebo-controlled, double-blind study, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 24 (2018) 397-402.

[2] S. Koizumi, N. Inoue, F. Sugihara, X. Wang, The effects of collagen hydrolysates derived from tilapia scales or skin on human facial skin-a randomized double-blind placebo-controlled clinical study-, *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 47 (2019) 57-63.

[3] S. Koizumi, Y. Okada, S. Miura, Y. Imai, K. Igase, Y. Ohyagi, M. Igase, Ingestion of a collagen peptide containing high concentrations of prolyl-hydroxyproline and hydroxyprolyl-glycine reduces advanced glycation end products levels in the skin and subcutaneous blood vessel walls: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 87 (2023) 883-889.

論文審査の結果の要旨

我が国は人口の超高齢化に直面するとともに、健康寿命の延伸が世界的な課題となっている。同時に、高齢化に伴う心身の変化に対する意識から、人生の QOL を高めるため、皮膚（肌）の状態を良好に保つための意識が高まりつつある。化粧品等により外用的に補正することも可能であるが、現在では食品成分により、体の内的環境から改善を図ろうとする試みへの期待が高まっている。なかでもコラーゲンの酵素加水分解物であるコラーゲンペプチド（collagen peptide, CP）は現在、多用されている食品素材である。量的確保ができるコラーゲンは、すでに皮膚状態の改善や、膝関節などの健康を保つ効果の報告があり、広く使用されている機能性食品成分の一つである。また、近年では変形性膝関節症の痛みの軽減や動きの改善、褥瘡の改善と予防につながる食品成分となる報告があり、医薬品と同様の効果も期待されている。

コラーゲンの一次構造はグリシン（Gly）から始まる Gly-X-Y（X,Y はアミノ酸）のトリペプチドが繰り返した構造をもつ。アミノ酸 X の位置には、プロリン、アミノ酸 Y の位置には、コラーゲンに特異的な水酸化されたプロリンであるヒドロキシプロリン（hydroxyproline, Hyp）が高頻度で存在する。ヒトが CP を経口摂取すると、数時間後の血中には Hyp を含むジ・トリペプチドが高濃度で認められるため、Hyp を含むペプチドが機能の中心的な役割を担っていると推定されている。

これまで、CP の原料としては、牛骨や豚皮を用いた報告がほとんどであった。しかし、資源の有効活用や、世界各地域での普遍的利用の観点から、養殖魚由来の原料（鱗、皮）が注目されている。この魚由来の原料の機能性、安全性などについて、従来の原料との比較や関連情報は少なく、有効利用による環境面への負担減少を含め、持続可能な未来のためにも CP としての機能性の評価を行い、利用を拡大することは十分に意義があるものと考えられる。

このような背景のもと、小泉 聖子氏の研究は、大量に生産されるものの、副産物が廃棄されていた養殖魚に着目し、コラーゲンを豊富に含む鱗の CP に注目したものである。従来のほ乳類の原料と同様に、魚由来の CP を経口摂取したとき、皮膚状態の改善についてヒト試験を行うとともに、その効果機序の解明のため、培養細胞を中心とした詳細な試験を実施し、検討、評価したものである。第 1 章では魚鱗 CP のヒト皮膚への包括的な影響、第 2 章では魚の部位別 CP によるヒト皮膚への影響、第 3 章では魚鱗 CP 摂取による最終糖化産物（advanced glycation end products, AGEs）に与える影響、第 4 章では培養細胞を用い、CP の機能発現機構に多角的方面から解明を検討する、全 4 章から構成されている。以下、各章別に申請者の成果概要を示す。

第 1 章では、魚鱗 CP 摂取による皮膚への効果を明らかにするため、12 週間のランダム化ヒト比較試験により評価している。本試験では食用に養殖されている淡水魚のティラピア（tilapia, *Oreochromis mossambicus*）を原料とし、魚鱗をプロテアーゼで分解した CP を被検試料とした。その結果、魚鱗 CP はプラセボに比べ、眼周囲の皮膚の粗さ評価値と、しわ容積の有意な減少、皮膚水分量と弾力性の有意な増加を、それぞれ認め、皮膚状態を改善することを明らかにした。また、血液の生化学的検査の結果から、試験前後で有害事象は見られず、魚鱗 CP の経口摂取による安全性も確認できた。

第 2 章では、原料部位による違いがあるかどうかを明らかにするため、魚鱗由来 CP と魚皮由来 CP、及びプラセボの 3 グループからなる 8 週間のランダム化ヒト比較試験を実施した。その結果、魚鱗、魚皮ともに摂取前と比較して、頬と目尻の水分量、弾力性、目尻のしわの数、面積、深さ、皮膚の荒れおよび滑らかさに関して、改善効果が示された。同様に、目尻と頬の皮膚状態スコアも改善が認め

られた。これらのことから部位が異なる魚由来の CP を用いても、皮膚状態改善に対する影響は同等であることを明らかにした。

第 3 章では、上述の作用機構を解明するため、しわ、シミなど皮膚の老化原因の一つとされる AGEs に着目した。糖代謝が正常な被験者を対象に 12 週間の臨床試験を実施し、魚鱗 CP が皮膚中 AGEs レベルに与える影響を調べた。その結果、魚鱗 CP の摂取により、AGEs の試験前後における変化率がプラセボ群に比べ有意に低下することを見だし、AGEs の変化を通じて CP が老化に関わることを明らかにした。

第 4 章では、CP の詳細な作用機序の解明を目的として、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) と、ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を用いた試験を行った。サンプルとして魚鱗を原料とし、2 種類の製造方法により得られた Hyp 含有のジ・トリペプチド量を 8,000 ppm 以上含む di- and tripeptide High containing Collagen Peptides (HCP, 平均分子量約 800 Da) と、このジ・トリペプチド量が約 50 ppm である di- and tripeptide Low containing Collagen Peptides (LCP, 平均分子量約 6,000 Da) を用いた。

第 4 章第 1 節では、NHDF を用いた検討から、LCP および HCP とともにコラーゲンとヒアルロン酸の合成を促進することがわかった。次に第 2 節では、NHDF に、傷害因子として細胞に UVB を照射し、コラーゲン合成、ヒアルロン酸合成、エラスチン合成遺伝子の発現量を測定した。その結果、HCP は LCP に比べ発現量が高く、UV 照射により減少する真皮のコラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン合成の遺伝子発現量の減少を抑制し、その作用は Hyp 含有ジ・トリペプチド量に依存することが示唆された。

また、第 3 節では、表皮への影響を見るため、NHEK を用いて LCP と HCP についてフィラグリン、ブレオマイシンヒドロラーゼ、アクアポリン 3 の遺伝子発現量への影響を検討した。その結果、HCP は対照及び LCP に比べ高値を示し、これら表皮の保湿性に関わる因子に Hyp 含有ジ・トリペプチド量に関与することを明らかにした。さらに第 4 節では、NHEK を用いた皮膚ターンオーバーに関わる因子であるケラチン 10、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ 1 の遺伝子発現量について検討し、HCP は LCP に比べ高値であることを示し、Hyp 含有ジ・トリペプチド量が各種の機能を発揮する重要な鍵となる役割を担っていることを見いだした。第 5 節では、酸化ストレスによる皮膚老化への関与を明らかにするため、抗酸化作用を有するスーパーオキシドジスムターゼ活性の測定を行い、HCP が LCP に比べ、約 3 倍の活性を持つことを見いだした。第 6~8 節では、皮膚表皮細胞におけるシミ生成への CP への影響を評価した。メラノサイトを刺激するエンドセリン 1 遺伝子発現量では、HCP は LCP よりも抑制し、シミ生成の減弱効果を明らかにした。しかし、チロシナーゼ活性を評価したところ、LCP、HCP 共に上昇させ、色素沈着抑制効果は認められなかった。さらに B16 メラノーマ細胞におけるドーパクロムトートメラーゼ遺伝子発現量を評価したところ、HCP に抑制効果が認められ、黒褐色のユウメラニン生成を抑制している可能性を見いだした。

以上、本論文により魚由来 CP、特に Hyp を含有するジ・トリペプチドの摂取が、皮膚状態の改善に対して有効にはたらくとともに、ペプチドの分子量などが有効性に影響する可能性を示したものである。これは学術的な成果が得られただけでは無く、ヒトの QOL 向上に寄与する可能性を見いだすとともに、世界的環境問題の観点から持続可能な社会の実現において、将来、重要となる新規の知見が得られており、特筆に値するものである。

本研究による成果は、機能性食品の開発や創薬の分野において極めて意義深く、内容も新規性および創造性に富んでいると判断される。以上を総合的に考慮した結果、本論文は本研究科課程によらない博士 (薬科学) の論文に十分値するものと判断した。