

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11025

研究課題名(和文) コラーゲン由来生体活性ペプチドの軟骨分化調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of chondrogenic differentiation by collagen-derived bioactive peptides

研究代表者

中谷 祥恵 (Nakatani, Sachie)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：20453425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は、骨髄組織など身体の様々な組織に未分化な状態で存在し、必要に応じて骨、脂肪細胞などに分化し、生体の恒常性を維持している。近年、加齢や疾患に伴い体性幹細胞も増殖能や分化能が低下することが報告されている。本研究で、申請者はジペプチドであるプロリルヒドロキシプロリン(PO)はMSCのBone morphogenetic protein 2(BMP2)を誘導し、Gremlin2(Grem2)を抑制することを見出した。POは骨形成タンパク質であるBMP2およびそのアンタゴニストであるGrem2を介してMSCから骨芽細胞への誘導を促進させる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた日本では、寿命と健康寿命の差を縮小し、高齢者も自分らしく自立して生きられるようになることが重要である。骨粗鬆症と変形性関節症は要介護になる要因の約2割を占めるため、骨粗鬆症および変形性関節症の新たな予防法や治療法を確立することが急務である。

近年、コラーゲン加水分解物中に含まれるジペプチド、プロリルヒドロキシプロリンが生体内で生体活性を有することが明らかになっている。本研究において、プロリルヒドロキシプロリンは間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制し、骨細胞への分化を促進させる可能性を見出した。

本研究を応用することで、高齢者の骨粗鬆症を抑制する新たな予防法を見出せる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) exist in an undifferentiated state in various tissues of the body, such as bone marrow tissue, and maintain homeostasis by differentiating into bone, fat cells, etc. as needed. Recently, it has been reported that somatic stem cells also lose their proliferative and differentiation potential with aging and disease. In this study, the dipeptide prolylhydroxyproline (PO) induced bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and inhibited Gremlin2 (Grem2) in MSCs. We found that PO may promote the induction of MSCs to osteoblasts via the osteogenic protein BMP2 and its antagonist Grem2.

研究分野：骨・軟骨代謝、老化、機能性食品科学

キーワード：間葉系幹細胞 骨芽細胞 脂肪 MSC DNAマイクロアレイ グレムリン ジペプチド コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は弾力性を持つ結合組織で、軟骨細胞と細胞自身が産生した細胞外基質 (ECM) で構成されている。軟骨の主要な ECM は Ⅱ型コラーゲン、ヒアルロン酸、アグリカンで、これらの複合的な働きによって関節の特徴である弾力性が維持されている。Ⅱ型コラーゲンは三重らせん構造を持つため酵素が作用し難く、関節軟骨のコラーゲン半減期は約 100 年と報告されている (Verzili et al., *J Biol Chem.*, 275 (2000))。しかし、外傷やメカニカルストレスなどの物理的な破壊でコラーゲンの三重らせん構造が崩れると、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの分解酵素が作用し、コラーゲンはペプチドもしくはアミノ酸に代謝される。

申請者はコラーゲン分解物のプロリル ヒドロキシプロリン (P0) が、アグリカンの産生を促進し、軟骨細胞の石灰化を抑制することで関節機能を維持させることを見出した。この実験において、軟骨細胞にもペプチドトランスポーター 1 (PEPT1) が発現していることを確認した。また、アミノ酸やプロリル ヒドロキシプロリン グリシンのトリペプチドは軟骨細胞に影響を与えなかった。さらに P0 が軟骨細胞の分化に与える詳細なメカニズムを、内軟骨性骨化モデル細胞である ATDC5 を用いて検討した。トランスクリプトーム解析を行った結果、P0 は前駆軟骨細胞から増殖軟骨細胞への分化過程で、四肢形態形成に關与する Wnt ファミリーの遺伝子発現を抑制する可能性が示された。以上のことから、コラーゲン加水分解物には生理活性を持つペプチドが含まれ、前駆軟骨細胞および増殖軟骨細胞の遺伝子発現を介して軟骨分化および ECM 産生を調節することが明らかになった。

2. 研究の目的

外傷や加齢などに伴う慢性炎症などの関節損傷時に ECM が分解されると、分解物がシグナル物質として働き、軟骨細胞に細胞外環境の破壊を認識させることで、細胞環境再構築へのフィードバックが働くと申請者は仮説した。ECM の分解物が軟骨修復シグナルとして作用する場合、1) 正常状態での生成量は少ないが、基質損傷時に生成されやすい、2) 安定した構造を有しているの条件を満たすものが候補と考えられた。コラーゲン分解物である 0 含有ペプチドは上記 2 条件を満たすことから、申請者は軟骨修復シグナルとなる物質候補として、0 含有ペプチドの研究から着手することとした。本研究の仮説と目的を下図に示した。

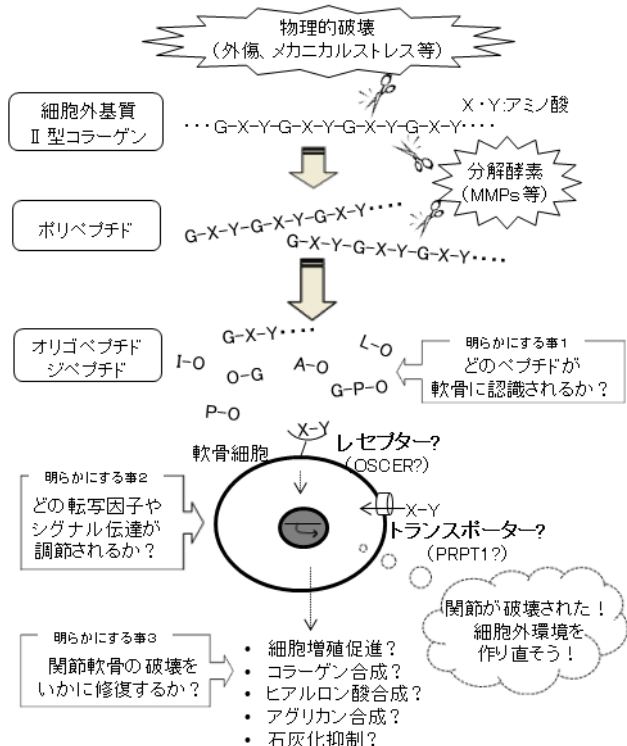


図1 背景と仮説および本研究で明らかにすること

3. 研究の方法

本研究では関節軟骨の修復に寄与する 0 含有ペプチドのスクリーニングと軟骨への作用メカニズムの解明を試みる。本研究では以下の項目順に研究を行う。

(1) 関節軟骨の修復に寄与する 0 含有ペプチドのスクリーニング

(2) 0 含有ペプチドの標的遺伝子の探索

(1)の項目に関して、すでに P0 が関節軟骨の維持に有用な分解物であることを見出しているため、P0 以外のコラーゲン分解物を培養軟骨細胞を用いてスクリーニングする。(2)では P0 を含めた 0 含有ペプチドが調節する転写因子もしくはシグナル伝達系をトランスクリプトーム解析等を用いて予測する。また、0 含有ペプチドが作用しやすい軟骨の分化段階を特定する。

4. 研究成果

0 含有ペプチドの標的遺伝子を探索した結果、前駆軟骨細胞よりも前の分化段階で P0 が作用する可能性が示唆された。そこで、マウスの骨髄液を α -MEM 培地中で培養し、接着細胞を確認後、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) として再播種し、P0 存在下で培養した。骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地、骨・脂肪両分化誘導培地で培養後、total RNA を抽出し、Whole Mouse Genome アレイスライド (アジレント社)を用いてマウス全遺伝子の mRNA 発現レベルを比較した。また、RT-PCR 法を用いてスクリーニングした遺伝子の mRNA 発現レベルを検討した。P0 で蛍光強度が増加した遺伝子として *Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)* と *Gremlin2 (Grem2)* をスクリーニングした。また、P0 は脂肪分化誘導剤および骨・脂肪両分化誘導剤存在下で *BMP2* mRNA 発現レベルを増加させ、*Grem2* の mRNA 発現レベルを減少させた。さらに、P0 は骨分化誘導剤存在下においても *Grem2* の mRNA 発現レベルを減少させた。P0 は骨形成タンパク質である *BMP2* およびそのアンタゴニストである *Grem2* を介して MSC から骨芽細胞への誘導を促進させる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 新井 翔、中谷 祥恵、古旗 賢二 |
| 2. 発表標題 コラーゲン加水分解物及び含有ジペプチドが骨髄由来間葉系幹細胞の分化に与える影響 |
| 3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 新井 翔、中谷 祥恵、古旗 賢二 |
| 2. 発表標題 コラーゲン加水分解物及び含有ジペプチドが骨髄由来間葉系幹細胞の分化に与える影響 |
| 3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|