

論文の内容の要旨

氏名：山本 祥子

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名： コラーゲントリペプチドの吸収・代謝および体内動態の検討と変形性膝関節症ならびに動脈硬化症の症状改善効果に関する基礎的検討

序論

コラーゲンは、皮膚や腱などの結合組織、骨や軟骨組織に存在して臓器・組織の構造と機能の保持に重要な役割を果たす不溶性タンパク質で、生体内タンパク質の約 30%を占める主要成分であり、3 残基ごとにグリシンが現れる繰り返し配列(Gly-X-Y)_n を特徴とする。最多配列は Gly-Pro-Hyp で、Gly-Pro-Ala、Gly-Ala-Hyp が続く。コラーゲン加水分解物を経口摂取すると生物活性を有するオリゴペプチドが血中に出現する。Gly-Pro-Hyp には血液凝固抑制作用や DPP-IV 阻害作用、Pro-Hyp にはヒアルロン酸合成促進作用、Gly-Pro には血圧低下作用等が報告されている。コラーゲン加水分解物摂取で観られる関節痛改善効果や血管保護作用等は、オリゴペプチドの生物活性と密接に関連しているが、従来のコラーゲン加水分解物の吸収では、特定のオリゴペプチドの選択的血中濃度上昇は期待できない。

コラーゲン・トリペプチド(CTP)は、ブタや魚皮のコラーゲンを精製エンドプロテアーゼで処理した加水分解物であり、酵素の基質特異性から含まれるトリペプチドの配列は Gly-X-Y で、その含有率は 15-50% で、平均分子量は 600~1,500 Da である。含まれるトリペプチドは Gly-Pro-Hyp が最も多く、原料の一次構造を反映している。CTP の生物学的効果については、骨折治癒促進、皮膚の光老化抑制・掻痒抑制、ヒアルロン酸合成促進等の効果や動脈硬化プラーク数の減少効果等も観察されている。

本論文では、CTP の血中ならびに組織への移行性に関する動態学的検討結果および変形性膝関節症ならびに動脈硬化症に関する基礎的な検討結果を詳述する。

1. ラットを用いたコラーゲントリペプチド(CTP)の血中移行性と体内動態の検討¹⁾

まず、LC-MS/MS を用いたオリゴペプチドの高感度測定系を構築した。定量限界値は数 nM 以下で、測定値の相関係数は 0.98 以上であった。本法を用いて測定したラット血清中オリゴペプチド濃度は、Pro-Hyp が 3 μM、Gly-Pro-Hyp は 0.5 μM、Gly-Pro は 0.2 μM であり、他は、0.03 μM 以下であった。

次いで、コラーゲントリペプチドを経口投与した時の血中オリゴペプチド濃度の推移を検討した(図 1)。

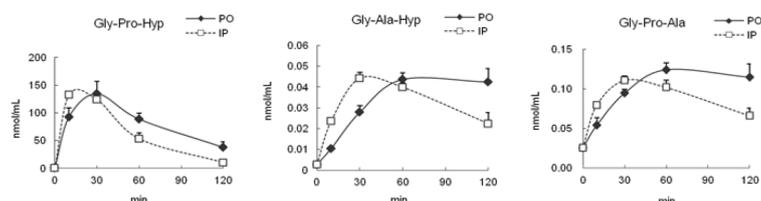


図 1. CTP-100 投与後の血中トリペプチド濃度の推移

シンボル◆：経口投与群、□：腹腔内投与群。図中のエラーバーは、標準誤差 (n=5)。

この検討で用いた CTP-100 は、平均分子量が約 300 Da の混合物でトリペプチド含有率は 91.8%、各トリペプチドの含有率は、Gly-Pro-Hyp が 34%、Gly-Pro-Ala が 15%、が Gly-Ala-Hyp 4%で、テトラペプチド以上のペプチドは含まれていなかった。Gly-Pro-Hyp の血中濃度は経口投与後 10 分時には急激に上昇し、30 分時点で C_{max} に達し、120 分時にはその 1/3 程度にまで減少した。一方、腹腔内に投与すると、Gly-Pro-Hyp の血中濃度は投与後 10 分時には C_{max} 付近に達し、120 分時には基礎値程度の値となった。C_{max} は経口投与も腹腔内投与もほぼ同等であり、その値は 130 μM 以上と投与前の 300 倍近い高い濃度であった。Gly-Pro-Hyp の腸管からの体内移行は速く、AUC 値を觀ても移行量や代謝速度も両投与形態間

で差異は認められなかった。また、Gly-Ala-Hyp、Gly-Pro-Ala においても投与形態間で有意差はなかった。

体内に取り込まれたトリペプチドは、*N*末端側あるいは *C*末端側から加水分解され、ジペプチドとなるものと考えられる。そこで、分解の指標として Pro-Hyp、Pro-Ala、Ala-Hyp、Gly-Pro の血中濃度を測定し、その動態を解析した(図 2)。

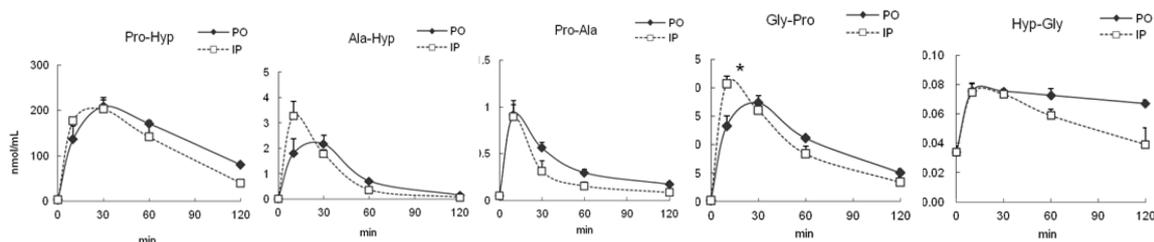


図 2. CTP-100 投与後の血中ジペプチド濃度の推移

シンボル◆：経口投与群、□：腹腔内投与群。図中のエラーバーは、標準誤差 (n=5)。

Pro-Hyp が最も濃度が高く、Cmax(30 分時)の値は約 200 μ M と基礎値の 67 倍であった。なお、Pro-Hyp、Pro-Ala、Ala-Hyp の 3 成分は Cmax、Tmax、AUC 値に投与形態間での差異はなく、Gly-Pro のみで腹腔内投与時の Cmax が優位に高値であったが、Tmax および AUC 値には有意な差異は認められなかった。

また、CTP-100 の主要トリペプチド成分である Gly-Pro-Hyp 経口投与時の体内分布を、全身オートラジオグラフィーを用いて検討した(図 3)。

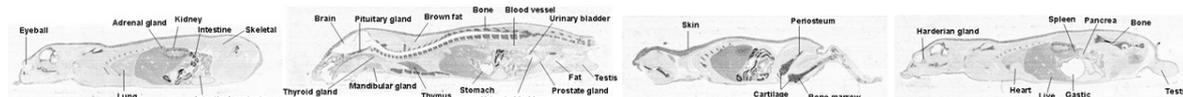


図 3. Gly-[³H]Pro-Hyp の投与 24 時間後の全身オートラジオグラム

Gly-[³H]Pro-Hyp 由来の放射性物質が、皮膚、骨、骨髄、骨膜、胸腺、関節軟骨、血管等を中心に幅広く分布していることが明らかとなった。中でも、結合組織に多く分布する傾向が観察された。

2. コラーゲン加水分解物摂取時のトリペプチドおよびジペプチドのヒトにおける体内動態²⁾

前述の CTP-100 と CTP-50 (約 600 Da、トリペプチド含有率:約 51%)および従来型のコラーゲン加水分解物(CP)(5,000 Da)を用いた。CTP-50 には(Gly-X-Y)_n で表されるヘキサペプチドおよびノナペプチドも少量共存する。なお、各試料中の Gly-Pro-Hyp 含量は、CTP-100 は 34%、CTP-50 は 7%、CP は 0%である。また、全ての試料に Pro-Hyp、Gly-Pro、Hyp-Gly が少量混在する。試料摂取後のオリゴペプチドの血中濃度変化を図 4 に示した。

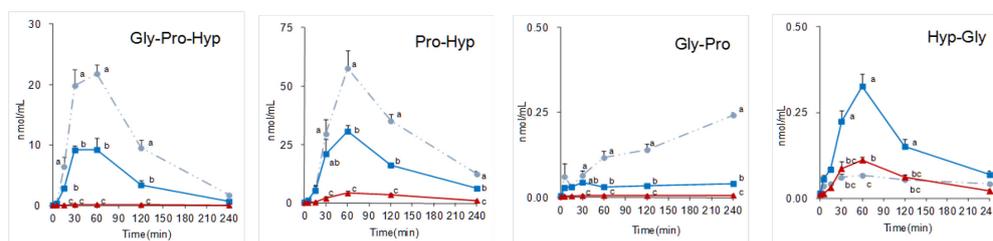


図 4. 試験食摂取後の血漿中ペプチド濃度の推移

図中のシンボル●は CTP-100、■は CTP-50、▲は CP を、誤差線は標準誤差を示す(n=4)。

a, b, c はその測定ポイントにおいて、異なる文字間で有意な差があることを示す(p<0.05)。

Gly-Pro-Hyp 濃度は、CTP-100 と CTP-50 では摂取直後から急激に上昇し、30~60 分時に Cmax を迎え、240 分時にはほぼ非摂取時のレベルにまで低下した。一方、CP の摂取では血中濃度の有意な上昇は観察されなかった。血中 Pro-Hyp 濃度の上昇も観察され、Tmax は 60 分時であった。なお、Gly-Pro の濃度は Pro-Hyp の 1/100 以下であり、*N*末端側の加水分解が *C*末端加水分解に優先する傾向が認められた。試料摂取後の尿中排泄量(12 時間尿)は、Pro-Hyp が最も多く、その濃度は CTP-50 摂取時では CTP-100 の 1/3 程度、CP は 1/10 未満であった。Gly-Pro-Hyp でも同様の傾向が観られ、CTP-50 摂取時の排泄量は CTP-100

の 1/5、CP は 1/250 未満であった。血中 Gly-Pro-Hyp と Pro-Hyp の AUC 値は共に CTP-50 摂取時では CTP-100 の 1/2 であったこと、CTP-50 の平均分子量が 600 Da であること、また Gly-Pro-Hyp の含有率が 7% と CTP-100 の 1/5 程度であることを考慮すると、これらの結果は、CTP-50 に多く存在する (Gly-X-Y)_n が消化管内で速やかにトリペプチドに変換され吸収されることを示唆している。一方、CTP-100 摂取時の Gly-Pro-Hyp の尿中排泄量は Pro-Hyp の 1/9 量であり、血中 Gly-Pro-Hyp の AUC 値が同 Pro-Hyp の AUC 値の 1/3 であることから考えると、腎組織中等でも Gly-Pro-Hyp は加水分解を受けて Pro-Hyp となり尿中排泄時の量比が変化したものと考えられる。

3. コラーゲントリペプチド (CTP) の臨床応用を目指した基礎的検討

3-1. コラーゲントリペプチドの変形性膝関節症の治癒に対する効果³⁾

まず、変形性膝関節症ウサギモデルに対する治癒効果を検討した。試料には、共に平均分子量 1,500 Da でトリペプチド含有量が 15% の豚皮由来の CTP-pig と魚鱗由来の CTP-fish およびトリペプチドを含まない豚皮由来 CP (5,000 Da) を用いた。試料投与期間(術前 1 週間と術後 4 週間)終了日の翌日に摘出した左脛骨部の組織染色画像を図 5 に示した。なお、赤色部は軟骨である。

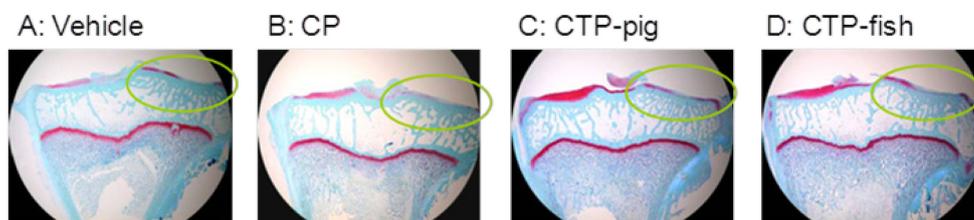


図 5. 脛骨軟骨部の組織染色画像(サフランin O およびファストグリーン染色と鉄ヘマトキシリン染色の二重染色)

画像 A は対照群、画像 B は CP 投与群、画像 C は CTP-pig 投与群、画像 D は CTP-fish 投与群。

緑色のサークルは施術部位。

対照群(画像 A)では半月板切除部位の軟骨量が減少し、CTP-pig あるいは CTP-fish の投与群では同部位の軟骨量が有意に多い(画像 C と D)が、CP の投与では治癒効果はなかった(画像 B)。さらに対照群や CP 投与群では非施術部(画像中左側)の軟骨組織も損傷部からの負荷で磨耗・消失した。一方、CTP-pig および CTP-fish 投与群ではその磨耗の程度が軽減され、コラーゲントリペプチドの軟骨組織保護効果が確認され

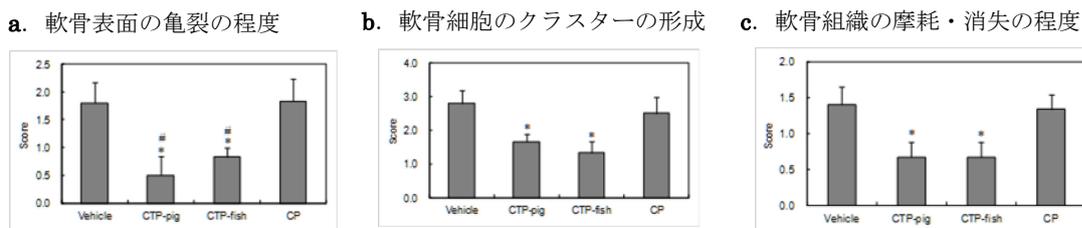


図 6. 組織のダメージスコア

図中の誤差範囲は標準誤差 (n=6)。* : p < 0.05 vs 対照群。# : p < 0.05 vs CP 投与群

た。施術部位のダメージをスコア化した(図 6)。

CTP-pig および CTP-fish 投与群では軟骨表面の亀裂の程度(図 a)、軟骨細胞のクラスター形成(図 b)および磨耗・消失の程度(図 c)が対照群より有意に低値であった。なお、CTP-pig 投与群と CTP-fish 投与群の間ではいずれの評価項目においても差は認められなかった。

次に、ヒトを対象に CTP-pig の膝関節に対する保護作用を検討した。被験者(66 名)を層別ランダム化法にて割付け、CTP 4g、CTP 2g、プラセボ摂取の 3 群とした。水症では、CTP を摂取した 2 群でのみ摂取期間依存的な改善の傾向が観られ、圧痛では摂取量依存的な改善の傾向が観られた。軋音の改善は、摂取量依存的であった。なお、可動域制限と動揺性の改善は観られなかった。VAS 評価によると CTP の痛み軽減効果(I)は大きくはなかったが、膝の痛みやこわばり(II)、日常生活の状態(III)、ふだんの活動(IV)では

CTP の摂取量依存的に改善の傾向が観られた。健康状態(V)は、3 群間で差はないと結論した。II~V の結果を総合した JKOM スコアは、全ての群において「改善」との結論になった。なお、統計学的な有意差は認められなかったが、平均的には CTP 摂取量の多い試験群においてより改善の傾向が現れていた。以上の結果から、CTP-pig の経口投与は、膝の水症や軋轢音などの症状の改善に有効であり、膝関節痛により制限された QOL の改善にも寄与することが示唆された。

3-2. コラーゲントリペプチドの動脈硬化症の治癒に対する効果⁴⁾

そこで、健常人を対象に CTP 単一用量の経口摂取による 6 ヶ月間のオープン試験を実施し、動脈硬化の指標(血中脂質、TAGE 値、CAVI 値)の変化を追跡して動脈硬化の進展に与える CTP の影響を検討した。LDL-C/HDL-C 比および TAGE 値に及ぼす CTP の影響を図 7 および図 8 に示した。

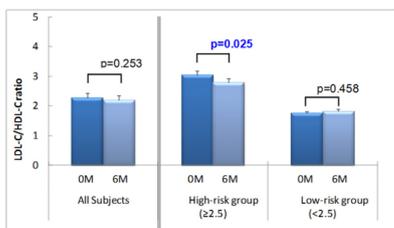


図 7. CTP 摂取前後の LDL-C/HDL-C 比の変化

図中の誤差範囲は標準誤差。

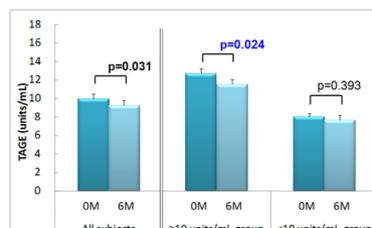


図 8. CTP 摂取前後の TAGE 値の変化

図中の誤差範囲は標準誤差。

LDL-C/HDL-C 比が 2.5 以上の心血管疾患の高リスク群では、CTP 摂取により数値が有意に低下しており、動脈硬化プラークが発生しやすい状態では CTP の摂取がその改善に有効になることが示唆された。また、TAGE 量も同様に高値群でのみ CTP 摂取により有意に低下したことから、血管の障害がよりおきやすい環境下では CTP は TAGE 量の低下作用を示すことが示唆された。CAVI 値は全被験者で CTP 摂取後に有意な低下が認められ、CTP 摂取による血管弾力性の回復が示唆された(図 9)。左右一方あるいは両側の CAVI 値の改善は全被験者 30 名中 20 名にのぼり、摂取前の程度を問わず CAVI 値の改善傾向が認められた。

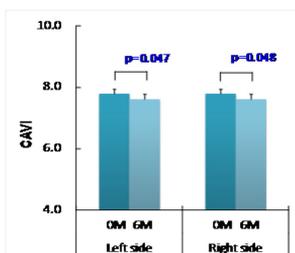


図 9. CTP 摂取後の CAVI 値の変化 (全被験者)

図中の誤差範囲は標準誤差

まとめ

以上、CTP は経口摂取でもオリゴペプチドの血中移行に適した食品素材であることが明らかになった。さらに、ウサギモデルを用いた検討で変形性膝関節症の改善効果が認められた。軽度の膝痛をもつ被験者では、CTP 摂取により有意に水症・軋轢音が改善した。また、動脈硬化に対する効果の検証では血管弾力性の改善が示唆された。これらの結果から、CTP はペプチド成分の吸収性に優れ、関節軟骨と血管の機能改善に有益な効果を示すことが明らかになった。