

DBA/1J マウスにおける I 型コラーゲン構成アミノ酸による コラーゲン誘導性関節炎の誘発促進

神山 伸^{†*}、中嶋祐里[†]、野口悠希[†]、白井麻由、永田穂乃花、曾根英行^{**}

関節リウマチを含む関節炎の症状改善を目的にコラーゲンペプチドが用いられているが、その有効性については未だ明確にされていない。消化されたコラーゲンペプチドの一部はペプチド態のまま血中に移行することから、本研究では、コラーゲン誘導性関節炎モデルである DBA/1J マウスにニワトリ I 型コラーゲン由来のコラーゲンペプチドあるいはそれと同組成のアミノ酸を摂取させて比較検討することにより、ペプチド態としてのコラーゲンペプチドの有効性を検討した。1 日あたり 100 mg の I 型コラーゲンペプチドあるいはそれと同じ組成のアミノ酸を経口投与することにより、関節での炎症がより強く生じた。関節炎スコア評価ではコラーゲンペプチドの関節炎軽減作用はみられず、関節軟骨におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 3 (MMP3) 遺伝子発現量の比較でもコラーゲンペプチド投与による有意な変化はみられなかった。一方、アミノ酸投与群では比較的早期から関節炎を発症した上に、マトリックス分解酵素である MMP13 の発現量が有意に増加しており、コラーゲンペプチドと同組成のアミノ酸の投与により重症化する可能性が示唆された。I 型コラーゲンペプチド配合の健康食品は多く販売されているが、場合によってはその摂取が逆効果となる可能性があり、注意が必要であるものと考えられる。

キーワード：コラーゲンペプチド、I 型コラーゲン、生理活性ペプチド、
関節リウマチ、炎症

はじめに

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis) は自己免疫に起因する全身性疾患であり、膠原病の中で最も頻度が高く、国内人口のうち 30 歳以上の約 1%が罹患していると考えられている。関節炎が主な病変であり、最初は手足の指の関節にこわばり感や、疼痛、膨張などが見られるが、進行すると手首や膝などの関節にも病変がみられるようになる。疲労・倦怠感や微熱などの全身症状がみられることも多く、血管やさまざまな臓器に関節外症状が生じることもある。

自己免疫によるリウマチ発症の原因は不明点が多いが、制御性 T 細胞とヘルパー T 細胞のバランスが関与しており、遺伝的素因に加えて感染などの環境因子も発症に関わっていると考

えられている。関節における病態は慢性の増殖性滑膜炎が中心であり、滑膜内への好中球やマクロファージ、T 細胞、B 細胞などの免疫細胞の浸潤とともに炎症性サイトカインの刺激による滑膜表層の異常増殖がみられる。炎症が進行すると軟骨基質 (細胞外マトリックス) の分解が亢進することにより、軟骨や周辺組織、骨の破壊を起こし、最終的には関節の変形と機能障害を招く。

関節軟骨における細胞外マトリックスの主要構成成分は II 型コラーゲン線維とコンドロイチン硫酸 (アグリカン) を中心とするプロテオグリカンであり、そこにグリコサミノグリカン糖鎖の一種であるヒアルロン酸が結合して凝集体を形成することにより、硝子軟骨のゲル状構造と高いクッション性を生み出している。関節

新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

責任著者 連絡先：*kammy@unii.ac.jp **sone@unii.ac.jp †共同筆頭著者

利益相反：なし

リウマチにおいては、異常増殖した滑膜細胞により産生されるマトリックスメタロプロテアーゼ 3 (MMP3) などのタンパク分解酵素が細胞外マトリックスを分解することによりプロテオグリカンが減少し、さらにコラーゲン線維の消失により軟骨基質が破壊される。また、細胞外マトリックスを産生している軟骨細胞が減少することにより、細胞外マトリックスの合成自体も低下する。

関節リウマチ患者の血清中には、リウマトイド因子と呼ばれる免疫グロブリンGに対する自己抗体¹⁾や関節軟骨のII型コラーゲンに対する自己抗体²⁾が検出されることから、II型コラーゲンの経口投与により、経口免疫寛容を利用してリウマチ性関節炎の予防・治療効果が期待できる可能性が報告されている。1993年にTrenthamらは、関節リウマチ患者60人を対象とした臨床試験で、ニワトリ由来の未変性II型コラーゲン0.1mgを1ヵ月、0.5mgを2ヵ月投与することにより、コラーゲンの経口投与が関節リウマチの症状を改善する可能性を報告した³⁾。しかし、その後の同様のデザインの臨床研究では、効果に否定的なものも多く報告されており、効果は疑問視もされている。より近年では、1日10g程度の変性コラーゲンあるいはコラーゲンペプチドを摂取することにより、関節リウマチを改善するという報告がいくつかなされている⁴⁻⁶⁾。しかし、その作用機序には不明点が多く、コラーゲンペプチドの有効性についても明確にされていない。

通常、摂取したタンパク質は消化吸収を受けてアミノ酸まで分解されるが、コラーゲン繊維は水に不溶であるため、消化吸収を受けにくい。一方、コラーゲンを変性させたゼラチンや、ゼラチンをプロテアーゼで加水分解して低分子化することにより溶解性を向上させたコラーゲンペプチドは他のタンパク質と同様に消化吸収されるが、コラーゲンはヒドロキシプロリン(Hyp)やヒドロキシリジン(Hyl)のような特徴的な水酸化アミノ酸を含むため、一部分解されないままのペプチド態で血中に移行することが報告されている^{7,8)}。特に、コラーゲン配列中に高い頻度で見られるプロリン-ヒドロキシプロリン(Pro-Hyp)やヒドロキシプロリン-グリシン

(Hyp-Gly)などのジペプチドは生理活性ペプチドとして、皮膚線維芽細胞の増殖・遊走の促進⁹⁾、骨芽細胞の分化促進¹⁰⁾、軟骨生産細胞の増殖促進¹¹⁾、ヒアルロン酸およびグリコサミノグリカンの合成増加¹²⁾など、コラーゲンペプチドのさまざまな機能性に寄与していると考えられている。

ヒト関節リウマチのモデル動物として、アジュバント関節炎ラットが古くから用いられてきたが、血清中にリウマトイド因子の増加がみられないなどヒトの関節リウマチとは異なる点も多い。1977年にラットにII型コラーゲンを皮下投与するとヒトのリウマチと類似した慢性多発性関節炎がみられることが報告され¹³⁾、コラーゲン誘導性関節炎モデル(Collagen Induced Arthritis, CIA)が用いられるようになった。マウスにおいてはDBA/1系統がCIAによるリウマチ関節炎モデルとして用いられており、コラーゲンを皮下投与することにより、ヒト関節リウマチと類似した自己免疫性関節炎を発症する。本研究では、コラーゲンペプチドがペプチドとして吸収されて有効性を発揮するかどうかを確認するために、DBA/1Jマウスを用いたCIAモデルにI型コラーゲンペプチドあるいはそれと同組成のアミノ酸投与と比較検討することにより、コラーゲンペプチド摂取が関節炎に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行った。

方法

実験動物

DBA/1J Jms Slc マウス(日本エスエルシー株式会社)8週齢、雄を用いた。動物実験は、新潟県立大学の動物実験委員会の承認を受け、動物実験ガイドラインを遵守して行った。

DBA/1Jマウス15匹のそれぞれに未変性II型コラーゲン(ウシ関節軟骨II型コラーゲン0.3%含有液、コラーゲン技術研修会製)をアジュバントでエマルジョン化したもの100μgを尾根部に投与することにより感作させ、その2週間に再度同量の未変性II型コラーゲンを追加免疫することにより関節炎を誘発させた。

試験食および試験期間

感作させたマウスを体重によりコントロー

ル群、コラーゲンペプチド群、アミノ酸群、の 3 群にわけ、無処置のマウス（ネガティブ群）の 1 群と合わせて合計 4 群（1 群 4 匹）とした。実験食として、ネガティブ群とコントロール群は市販粉末飼料（CLEA Rodent Diet CE-2 粉末、日本クレア株式会社）に 6:4 の割合で水を加えて成形したものを用いた。コラーゲンペプチド群とアミノ酸群には、上記の実験食にそれぞれコラーゲンペプチドあるいはそれと同じ組成のアミノ酸を 1 g あたり 100 mg 添加したものを用いた。コラーゲンペプチドはニワトリ足由来の I 型コラーゲンペプチド（C-LAP、日本ハム）を使用し、C-LAP のアミノ酸組成をもとにアミノ酸群のアミノ酸配合割合を決定した（表 1）。

追加免疫後 5 週間にわたり、昼 12 時から夕方 18 時までの間、実験食 1 g を制限給餌により経口摂取させた。制限時間外は市販の固形試料（CLEA Rodent Diet CE-2 固形、日本クレア株式会社）を自由摂取させた。摂食量を毎日計測するとともに、週に 1 度体重と関節炎スコアを測定した。

関節炎スコアの測定

追加免疫後、週に 1 回関節炎スコア測定を行った。関節炎スコアの判定には以下の基準を用いた。

- Score 0 : 正常
 Score 1 : 小関節（指）1 本に発赤・腫脹を認める
 Score 2 : 小関節 2 本以上が発赤・腫脹するか、大関節（手首や足首）に発赤を認める
 Score 3 : 前肢あるいは後肢全体が発赤・膨張する

表 1 アミノ酸群実験食のアミノ酸配合割合

アミノ酸	割合 (%)
グリシン	21.3
ヒドロキシプロリン	12.4
プロリン	12.0
アラニン	8.9
アルギニン	8.8
グルタミン酸	11.1
リシン	3.5
アスパラギン酸	5.7
ロイシン	3.0
セリン	2.5
フェニルアラニン	2.2
スレオニン	2.0
バリン	1.9
イソロイシン	1.3
ハイドロキシリシン	1.2
メチオニン	0.9
ヒスチジン	0.8
チロシン	0.5

表 2 使用したプライマーの配列

遺伝子名	上流プライマー (5' - 3')	下流プライマー (5' - 3')	GenBank 配列番号
β-actin	cttgggtatggaatcctgtgg	gtacttgcgctcaggaggag	NM_007393
Aggrecan	ggctcactgttaccgccactt	gccagatcatcaccacacag	NM_007424
ChPF	caacgacatcgtcagtgctc	aaaagctttgtgcagctggt	NM_001001566
ChSy1	caagtgtctccgggaaatgt	ctggtacggtgggtttttgt	NM_001081163
Col2a1	ggctcccagaacatcaccta	gccccacttaccagtgtgtt	NM_031163
Col10a1	atgcccggtctctgttttac	tgagtcctttcacatgcac	NM_009925
EXT1	agcacaaggattctcgtctgt	cacttcggagaatggcaact	NM_010162
EXT2	atccatcagcagccatctcc	accagcagcttggacagact	NM_010163
HAS1	ttagacaggacatgccaaag	ctaggtgtgcgctgaggat	NM_008215
HAS2	gcctcatctgtggagatggt	attcccagaggaccgttat	NM_008216
HAS3	tcccgaagtaggaggtgttg	aatcctccaggaactgtga	NM_008217
MMP3	ctgaccaggggattaatgga	gagagatggaaacgggacaa	NM_010809
MMP13	tttattgttctgccccatga	ctctggtgttttgggatgct	NM_008607
Sox9	aggaagctggcagaccagta	gtccgttcttcaccgacttc	NM_011448
Runx2	gccgggaatgatgagaacta	ggaccgtccactgtcacttt	NM_001146038

Score 4：前肢あるいは後肢全体に重度の発赤・膨張がみられるか、関節の変形が見られる

マウスの前肢と後肢について、各個体における4肢の関節全てについて関節炎スコアを評価し、その平均スコアを算定した（最高4）。

試料採取とRNAの調製

実験期間終了後解剖を行い、肝臓、腎臓、脾臓の重量を測定するとともに、後肢膝関節部分の軟骨組織を採取し、直ちに-80℃で凍結保存した。軟骨組織からのRNAの調製は、Trizol試薬（Invitrogen）を用いて行った。

リアルタイムPCRによる発現量測定

遺伝子の発現状態はSYBR法によるreal-time PCRにより解析した。増幅に利用したプライマー（表2）はそれぞれNCBI Reference Sequenceの配列をもとに、エキソジャンクションを含む配列を増幅部位とする上流及び下流プライマーをprimer 3を用いて設計した。発現補正用のコントロール遺伝子としてβ-actin遺伝子を用いた。組織より抽出したRNAから、PrimeScript RT Master mix（タカラバイオ社）を用いた逆転写反応によってcDNAを合成した。それぞれのcDNAに含まれる目的遺伝子産物の量をSYBR premix Ex taq II（タカラバイオ社）とPikoreal real-time PCR system（Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した。増幅サイクルは、90℃30秒の熱変性のあと、（95℃、5秒→60℃、30秒）の40サイクル反応で行い、その後60℃から95℃の融解曲線測定より反応産物の特異性を解析した。

統計処理

数値は全て平均値と標準誤差で表した。統計処理として、群間の平均値の差について一元配置分散分析とTukey-Kramer法による多重比較で有意差検定を行った。解析は、Rプログラム（v3.1.3）を用いて行った。

結果

関節炎誘発マウスにおける関節炎スコアの変動

DBA/1JマウスはCIAモデル動物として汎用

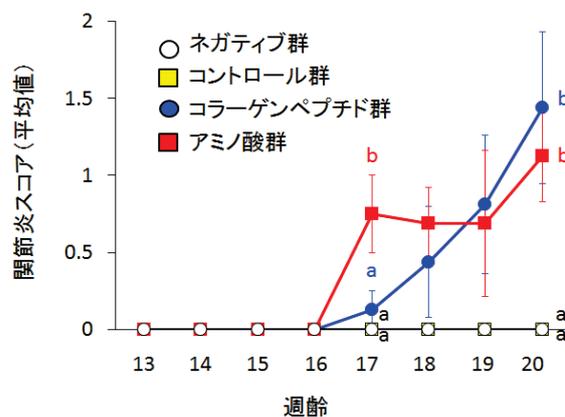


図1 実験期間における各群の関節炎スコアの変動

（上）DBA/1Jマウスにおける後肢関節の関節炎発症部位（左）と非発症部位（右）の写真を示した。

（下）関節炎スコアは初回免疫（13週齢）より週に1度評価した。スコアは4肢の関節全てについて評価し、1肢あたりの平均スコアとして表した。異なる記号はその週齢における有意差を表す（ $p < 0.05$ ）。

されており、非変性コラーゲンを皮下投与することにより、ヒト関節リウマチと類似した自己免疫性関節炎を発症する。発症においては、四肢の指関節部分に膨張がまず見られ、発症が進展するとともに肢関節部分にも膨張と変形が生じた（図1写真）。

各群の実験期間中の関節炎スコアの変動を図1に示した。初回免疫から3週目以後、関節炎を発症する動物がみられ、時間に応じてスコアが増加した。ここで、感作動物のうちアミノ酸群とコラーゲンペプチド群は関節リウマチを発症したが、コントロール群では発症がみられなかった。コントロール群で関節炎を発症しなかった理由は明確ではないが、接種部位（尾根部）付近で強い炎症が生じたなどの理由により関節での炎症が誘導できなかったものと考えられる。一方、アミノ酸群はコラーゲンペプチド

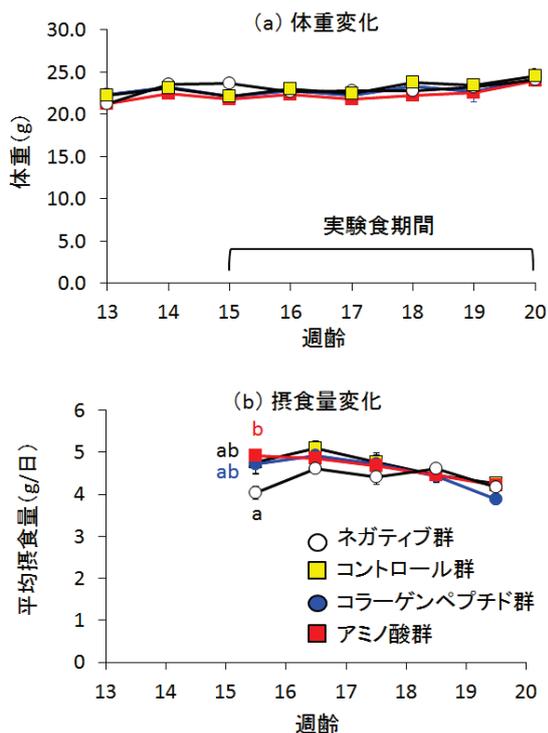


図 2 実験期間における各群の体重と摂食量の変動

(a) 実験期間における体重変化。初回免疫（13週齢）より2週間後（15週齢）から実験食を開始した。

(b) 実験食期間（15～20週齢）における摂食量変化。値は各群のその週における1日あたりの平均摂食量（g）として表した。異なる記号はその週齢における有意差を表す（ $p < 0.05$ ）。

群よりも早期で重症化したことから、コラーゲンを構成するアミノ酸自体が関節炎の誘導に働いたものと考えられる。このことから、コラーゲンペプチドあるいはそれを構成するアミノ酸の経口投与は、場合によっては関節炎の発症を誘導する可能性が示された。

体重および臓器重量

実験期間を通して、ネガティブ群を含む全ての群で体重に有意差はみられなかった（図 2 a）。実験食期間（15～20週齢）における各群の摂食量は、実験食開始後最初の週（15～16週齢）のみネガティブ群とアミノ酸群との間で有意差が見られたが（ $p < 0.05$ ）、それ以降では全ての群で有意差は認められなかった（図 2 b）。

実験終了時における体重と臓器の重量を表 3 に示したが、体重、肝臓重量ともに全群で有意差が認められなかったことから、栄養状態に差はないものと考えられる。一方、脾臓重量はネガティブ群に対して感作動物の全ての群で有意に増加していた。脾臓は免疫に機能しているため、感作マウスでは炎症が誘発されたことにより、感作動物では免疫活性化によって脾臓に負担がかかり肥大化したものと考えられる。腎臓重量はコラーゲンペプチド群のみコントロール群に対して有意に増加しており、コラーゲンペプチド摂取による腎臓肥大が示唆された。

関節軟骨における炎症マーカーの発現状態

関節リウマチ発症において、滑膜細胞で産生されるマトリックスメタプロテアーゼ（MMP）が軟骨基質を構成するプロテオグリカンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解することにより、関節軟骨の破壊に主要な役割を果たすと考えられている。特に、MMPメンバーの一つである MMP3 は関節リウマチで早期から上昇する骨破壊マーカーであり、おもに滑膜細胞から分泌されて軟骨の破壊を進行させる。また、MMP13 は関節を構成する II 型コラーゲンに対して高い分解活性を有しているのみならず、他のタイプのコラーゲンやアグリカンなど、多くの軟骨基質タンパク質に対して分解活性を有

表 3 実験終了時における各群の体重と臓器重量

群	体重 (g)	肝臓重量 (g/体重 1g)	腎臓重量 (g/体重 1g)	脾臓重量 (g/体重 1g)
ネガティブ群	24.1±0.37	0.047±0.000	0.020±0.000 ^{ab}	0.0020±0.000 ^a
コントロール群	24.5±0.95	0.046±0.001	0.019±0.000 ^a	0.0032±0.000 ^b
コラーゲンペプチド群	24.2±0.51	0.049±0.002	0.021±0.001 ^b	0.0030±0.000 ^b
アミノ酸群	24.0±0.33	0.048±0.001	0.020±0.000 ^{ab}	0.0031±0.000 ^b

数値は平均値±標準誤差で表した。同一列の異なる文字は有意差（ $p < 0.05$ ）を表す。

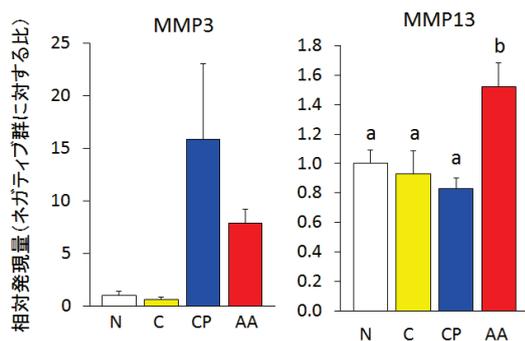


図 3 後肢関節軟骨におけるマトリックス分解酵素の発現状態
 遺伝子発現状態はβアクチンの発現量で補正し、ネガティブ群の発現量を1として表した。
 N: ネガティブ群、C: コントロール群、CP: コラーゲンペプチド群、AA: アミノ酸群。異なる記号は有意差を表す (p<0.05)。

する。後肢関節軟骨における、これらの遺伝子の発現状態をリアルタイムPCRを用いた定量的RT-PCR法により測定した。

II型コラーゲンに感作させた動物のうち、発症動物 (n=7) と非発症動物 (n=5) とを比較した場合では、MMP13の発現量に差はみられなかったが (非発症動物平均 0.9±0.1、発症動物平均 1.3±0.2)、MMP3の発現量はおよそ15倍に増えており (非発症動物平均 0.9±0.2、発症動物平均 13.5±4.8、p<0.05)、軟骨基質の分解増加が示唆された。群間の比較では、ネガティブ群とコントロール群に対してコラーゲンペプチド群とアミノ酸投与群でMMP3の発現量が増加していたが、個体差が大きく有意差は認められなかった (図3)。一方、MMP13の発現量はアミノ酸群のみ有意に増加しており、コラーゲン構成アミノ酸により関節の軟骨破壊が進展していることが示唆された。

軟骨基質コラーゲンの発現状態

コラーゲンは、体を構成する全タンパク質の約30%を占めており、コラーゲン線維を形成することにより皮膚、骨、軟骨、血管や内臓など全身に広く分布している。皮膚や腱、骨などのコラーゲンが主にI型コラーゲンであるのに対

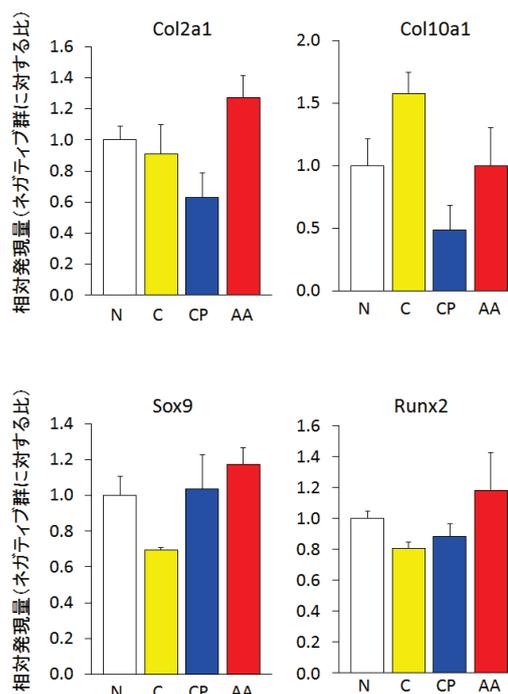


図 4 後肢関節軟骨におけるコラーゲンサブユニット及び軟骨分化因子の発現状態
 遺伝子発現状態はβアクチンの発現量で補正し、ネガティブ群の発現量を1として表した。
 N: ネガティブ群、C: コントロール群、CP: コラーゲンペプチド群、AA: アミノ酸群。

し、軟骨ではII型コラーゲンが基質タンパク質の構成成分として重要な役割を果たしている。

軟骨を構成するコラーゲンとして、軟骨基質を形成するII型コラーゲンのサブユニットをコードするCol2a1と、軟骨の成熟化・骨化時に発現するCol10a1の遺伝子発現量を図4に示した。Col2a1、Col10a1ともに、コラーゲンペプチド群で減少傾向がみられたが、いずれに関しても群間で有意差はみられなかった。軟骨分化に関わる転写因子として、軟骨初期分化時に発現し軟骨基質の合成に関わるSox9と、軟骨後期分化時に発現し軟骨の成熟化・骨化に関わるRunx2の発現量も測定したが、いずれも群間で差が認められなかった (図4)。これらの因子のいずれにおいても、発症動物と非発症動物との間の比較でも差が認められなかったことから、コラーゲン軟骨基質を構成するコラーゲンの合成に関して大きな影響はないものと考えられる。

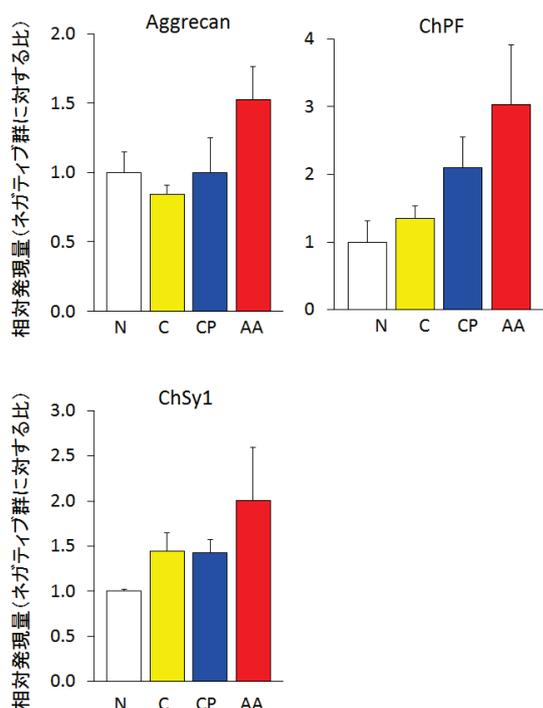


図 5 後肢関節軟骨におけるコンドロイチン硫酸合成因子の発現状態

遺伝子発現状態はβアクチンの発現量で補正し、ネガティブ群の発現量を1として表した。N: ネガティブ群、C: コントロール群、CP: コラーゲンペプチド群、AA: アミノ酸群。

プロテオグリカン合成に関わる因子の発現状態

軟骨基質は主にII型コラーゲン線維とプロテオグリカンから構成されている。軟骨のプロテオグリカンの大部分はコンドロイチン硫酸であり、コアタンパク質であるアグリカンにグリコサミノグリカン糖鎖が多数結合している。ここで、コンドロイチン硫酸合成酵素であるコンドロイチン硫酸合成酵素1 (ChSy1) とコンドロイチン硫酸重合化因子 (ChPF) は複合体を形成してコンドロイチン硫酸の糖鎖部分の伸長に関与している。

図5に示したように、アグリカン、ChSy1、ChPFのいずれについてもアミノ酸群で増加傾向がみられたが、群間で有意差は認められなかった。また、異なるクラスのプロテオグリカンであるヘパラン硫酸の伸長酵素 (EXT1 及び EXT2) に関しても同様に、群間で発現状態に有意差はみられなかった (図6)。これらの遺伝子

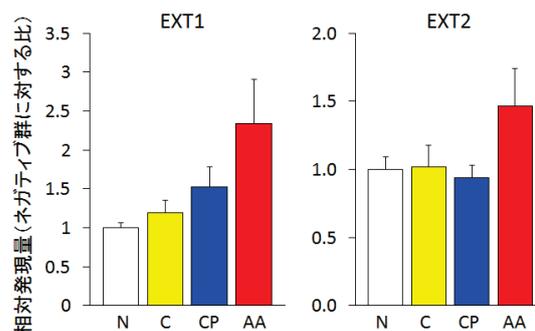


図 6 後肢関節軟骨におけるヘパラン硫酸合成因子の発現状態

遺伝子発現状態はβアクチンの発現量で補正し、ネガティブ群の発現量を1として表した。N: ネガティブ群、C: コントロール群、CP: コラーゲンペプチド群、AA: アミノ酸群。

発現に関しては、発症動物と非発症動物との間の比較でも有意差は認められなかったことから、DBA マウスにおけるリウマチ関節炎においてはプロテオグリカン合成因子の発現変動は関与していないものと考えられる。

ヒアルロン酸合成因子の発現状態

ヒアルロン酸はコアタンパク質をもたないグリコサミノグリカン糖鎖であり、軟骨基質ではコンドロイチン硫酸に結合して存在し、硝子軟骨のゲル様構造の形成に寄与している。ヒアルロン酸合成酵素のうち、HAS1 および HAS2 が比較的高分子のヒアルロン酸を合成するのに対し、HAS3 は主に低分子のヒアルロン酸を合成する。これらのヒアルロン酸合成酵素の発現状態を図7に示した。いずれの合成酵素においても群間で有意差はみられなかったが、HAS1 の発現量はコントロール群に対しコラーゲンペプチド群とアミノ酸群で2倍以上に増加していた。ただし、HAS1 の発現量は発症動物と非発症動物との間で有意差がみられた一方 (それぞれ 0.8 ± 0.2 と 2.8 ± 0.5 , $p < 0.05$)、群間の比較では個体差が大きく有意差が認められなかったことから、これらの発現変動はコラーゲンペプチドあるいはアミノ酸によるものではなく、主に炎症に伴う関節の膨潤化が関係しているものと考えられる。

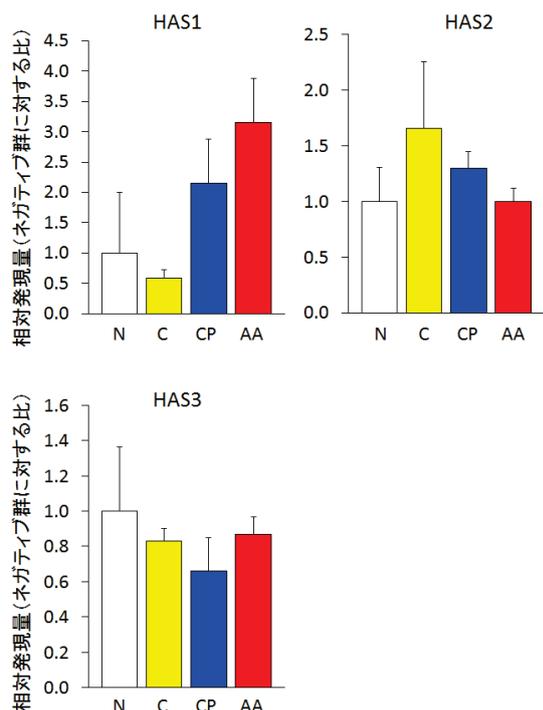


図 7 後肢関節軟骨におけるヒアルロン酸合成因子の発現状態

遺伝子発現状態はβアクチンの発現量で補正し、ネガティブ群の発現量を1として表した。N: ネガティブ群、C: コントロール群、CP: コラーゲンペプチド群、AA: アミノ酸群。

考察

本研究では、DBA/1J マウスによる CIA モデルを用いて、コラーゲンペプチドを投与した場合とそれと同組成のアミノ酸を投与した場合の影響を比較することにより、コラーゲン摂取が関節炎に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。II 型コラーゲンに感作させた動物の全てで脾臓が増大していたことから、炎症が誘発されたことが示唆されるが、コントロール群では関節炎の発症は認められなかった。CIA モデル動物の作成においては、免疫部位に広範な炎症が起こると炎症性サイトカインを産生する免疫細胞がそこに集積するため、関節での炎症が起こりにくくなることが知られている。脾臓の肥大は関節炎発症動物のみならず、発症しなかったコントロール群でも認められたことから、コン

トロール群で非発症であったのは抗原量が不十分であったためではなく、上記の理由により、関節における炎症が弱かった可能性が考えられる。

一方、アミノ酸群とコラーゲンペプチド群ではその両方で重度の関節炎を発症したが、その最終的な関節炎スコアは同程度であり、ペプチド態での摂取による軽減作用は認められなかった(図1)。結果で記述したように、アミノ酸群はコラーゲンペプチド群よりも早期で重症化したことから、コラーゲンを構成するヒドロキシプロリンなどのアミノ酸自体が自己免疫を誘発したか、あるいは関節での炎症を促進させた可能性が考えられる。また、感作動物のうち、関節炎発症動物と非発症動物との間で比較した場合には、滑膜細胞で産生されるマトリックス分解酵素である MMP3 とヒアルロン酸合成酵素である HAS 1 が発症動物で高値を示していたことから、食餌組成に関わらず関節炎発症動物で軟骨の破壊と関節の膨潤化が進行していることが示されたが、いずれも関節炎スコアと同様にコラーゲンペプチド投与による軽減作用は認められなかった。これらのことから、今回の実験において I 型コラーゲンペプチドの摂取の影響はそれを構成するアミノ酸の摂取と同様であり、消化吸収率以外にペプチド態であることによる相違はなかったものと考えられる。

関節軟骨を構成しているコラーゲン線維は主に II コラーゲンであり、関節炎の軽減作用も II 型コラーゲン投与によるものが報告されている。一方、市販のコラーゲンあるいはコラーゲンペプチドは皮膚などの全身組織に分布している I 型コラーゲン由来のものが多く、本実験で用いたコラーゲンペプチド (C-LAP) もニワトリ足由来の I 型コラーゲンペプチドである。CIA モデルラットに I 型コラーゲン由来ペプチドと II 型コラーゲン由来ペプチドを投与して比較検討した研究では、II 型コラーゲン由来ペプチドと異なり I 型コラーゲン由来ペプチドに明確な関節炎軽減効果がみられなかったことが報告されている¹⁴⁾。分子種は異なるものの、I 型、II 型コラーゲンともにその摂取により一部はペプチド態のまま血中に移行することが報告されていることから^{7, 8)}、コラーゲンペプチドによる

効果は Pro-Hyp や Hyp-Gly のような生理活性ペプチドによるものではなく、自己免疫における T 細胞エピトープを含むコラーゲンペプチドの摂取が経口免疫寛容に機能しているものと考えられる。一方、アミノ酸群ではコンドロイチン硫酸合成酵素 (ChSy1、ChPF) 及びアグリカン、ヘパラン硫酸合成酵素 (EXT1、EXT2) のいずれも最も高い値を示したことから(図 5 及び 6)、コラーゲンペプチドを構成するアミノ酸の摂取はプロテオグリカン合成酵素の発現を増加させる可能性も示唆される。

本実験で用いたコラーゲンペプチドの投与量は 1 日あたり 100 mg であり、体重当たりではおよそ 5 g/kg であることから、ヒトでは 300 g (体重 60 kg として) 相当量に換算される。ヒトで有効性が報告されている量が 1 日あたり 5 ~ 10 g であることを考えると、これは明らかに過剰量であるが、摂食量から換算した 1 日あたりのたんぱく質摂取量がおおよそ 1.2 g であることから、コラーゲンペプチド (あるいはアミノ酸) と摂取たんぱく質量の比としては、ヒトがコラーゲンペプチドを 1 日に 5 g 摂取した場合とほぼ同程度である。事実、体重 (図 2) にも肝臓重量 (表 3) にも群間で有意差はみられず、たんぱく質の過剰摂取による影響はなかったものと考えられる。一方、腎臓重量はコラーゲンペプチド群のみコントロール群に対して有意に増加していた。腎臓ではジペプチド輸送体 (PEPT1¹⁵⁾ および PEPT2¹⁶⁾ がジペプチドやトリペプチドの再吸収に働いており、アミノ酸よりもコラーゲンペプチドの方が腎臓に多く取り込まれ蓄積されるという報告があることから⁸⁾、コラーゲンペプチド群では腎臓に負荷がかかり重量が増加した可能性も考えられる。このことから、多量のコラーゲンを摂取すると、腎臓に負担がかかる可能性が考えられ、腎機能の低下した人においては注意が必要であるものと考えられる。

本研究において、DBA/1J を用いた CIA モデルマウスに I 型コラーゲンペプチドあるいはその構成アミノ酸を投与した場合、コントロール群のマウスに比べて関節炎の悪化がみられた (図 1)。一方、関節リウマチ自然発症マウスである SKG マウスに同量の I 型コラーゲンペプチ

ドを投与した場合には、関節炎の軽減作用は見られなかったものの、悪化作用も認められなかった (未発表データ)。このことから、本研究でみられたコラーゲンペプチドあるいはその構成アミノ酸による関節炎誘発作用は、あくまでも自己免疫誘導時における作用に限定している可能性もあり、その摂取により必ずしも関節炎が悪化するとは限らないことに留意すべきである。

結語

上述のように、DBA/1J 系統を用いた CIA によるリウマチ関節炎モデルマウスでは I 型コラーゲンペプチドあるいはそれと同じ組成のアミノ酸の経口投与により、関節での炎症がより強く生じた。関節炎スコア評価ではコラーゲンペプチドの関節炎軽減作用はみられず、関節軟骨における遺伝子発現量の比較でもコラーゲンペプチド投与による有意な変化はみられなかった。一方、アミノ酸投与群では比較的早期から関節炎を発症した上に、マトリックス分解酵素である MMP13 の発現量が有意に増加しており、コラーゲンペプチドと同組成のアミノ酸の投与により重症化する可能性も示唆された。コラーゲンペプチド配合の健康食品は多く販売されているが、場合によってはその摂取が逆効果となる可能性があり、注意が必要であるものと考えられる。

文献

- 1) Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ. et al. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1957; 105: 425-38.
- 2) Fujii K, Tsuji M, Kitamura A. et al. The diagnostic significance of anti-type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. *Int Orthop* 1992; 16: 272-6.
- 3) Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ. et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 1993; 261: 1727-30.
- 4) Benito-Ruiz P, Camacho-Zambrano MM, Carrillo-Arcentales JN. et al. A randomized

- controlled trial on the efficacy and safety of a food ingredient, collagen hydrolysate, for improving joint comfort. *Int J Food Sci Nutr* 2009; 60 Suppl 2: 99-113.
- 5) Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR. et al. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Curr Med Res Opin* 2008; 24: 1485-96.
- 6) Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 30: 87-99.
- 7) Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y. et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 6531-6.
- 8) Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S. et al. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 835-41.
- 9) Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F. et al. Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 444-9.
- 10) Kimira Y, Ogura K, Taniuchi Y. et al. Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453: 498-501.
- 11) Nakatani S, Mano H, Sampei C. et al. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 1620-7.
- 12) Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H. et al. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol* 2010; 37: 330-8.
- 13) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146: 857-68.
- 14) 田口靖希, 森松文毅. 素材としての畜産物 肉用鶏(ブロイラー)を利用した機能性食品素材の開発. *月刊フードケミカル* 2003; 19: 27-31.
- 15) Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S. et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 1994; 368: 563-6.
- 16) Liu W, Liang R, Ramamoorthy S. et al. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235: 461-6.

ABSTRACT

Administration of constituent amino acids of type I collagen stimulates collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.

Shin Kamiyama^{*,†}, Yuri Nakajima[†], Yuki Noguchi[†], Mayu Shirai, Honoka Nagata, Hideyuki Sone^{**}

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Studies, University of Niigata Prefecture

Correspondence: * kammy@unii.ac.jp, ** sone@unii.ac.jp

[†] These authors contributed equally to this article.

Supplementation of gelatin or collagen peptides has been used to reduce the symptoms of inflammatory arthritis including rheumatoid arthritis, but the efficacy remains uncertain. It is known that ingested collagen peptides are absorbed partly in the form of bioactive peptides. In the present study, we investigated whether the effects of collagen peptide on inflammatory arthritis are due to its bioactive peptide in comparison with its constituent amino acids using DBA/1J mice. Unexpectedly, administration of daily 100 mg of collagen peptide derived from chicken type I collagen (i.e., collagen peptide group) or its constituent amino acids (i.e., amino acid group) rather stimulated collagen-induced arthritis in the DBA/1J mice. No significant difference was observed between amino acid and collagen peptide groups regarding either arthritis score or gene expression of matrix metalloprotease 3 (MMP3), a marker of synovial inflammation. Further, mice in the amino acid group developed arthritis relatively early stage and showed significantly higher expression of MMP13 as compared to those in other group mice, indicating administration of collagen-constituent amino acids possibly promoted the onset of arthritis inflammation in the DBA/1J mice. Many supplements contain gelatin or collagen peptide derived from type I collagen. These results raise a possibility that type I collagen peptide or its constituent amino acid may worsen inflammatory arthritis under some conditions.

Key Words: Collagen peptide, type I collagen, bioactive peptide, rheumatoid arthritis, inflammation