サケ由来コラーゲンペプチドとエラスチンペプチドのヒト皮膚正常繊維芽細胞（SF-TY）におけるヒアルロン酸産生促進および細胞増殖への相乗効果

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	本村,亜矢子 秋田,涼子 多田,元比古 高橋,義宣 江成,宏之
発行元	日本水産學會
巻/号	75巻1号
掲載ページ	p. 86-88
発行年月	2009年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

Nippon Suisan Gakkaishi 75(1), 86–88 (2009)

短　　報

サケ由来コラーゲンペプチドとエラスチンペプチドのヒト皮膚正常繊維芽細胞（SF-TY）におけるヒアルロン酸産生促進および細胞増殖への相乗効果

本村亜矢子，秋田　涼子，多田元比古，
髙橋　義宣，* 江成　宏之

（2008年3月31日受付，2008年5月16日受理）

㈱ニチロ中央研究所

Synergistic effect of collagen peptide and elastin peptide derived from salmon on promoting hyaluronic acid production and cell growth of normal human dermal fibroblast cells (SF-TY)

AYAKO HONMURA, RYOKO AKITA,
MOTOHIKO TADA, YOSHINORI TAKAHASHI
AND HIROYUKI ENARI

Central Research Laboratory, NICHIRO CORPORATION, Kawasaki, Kanagawa 215-0033, Japan

キーワード：エラスチンペプチド，コラーゲンペプチド，サケ皮，サケ心臓

コラーゲンやヒアルロン酸は大量の水分を保持する性質を持ち，またエラスチンは伸縮性，弾力性に富むことから，相俟って肌組織に潤いと張り，柔軟性を与える。これらの物質は真皮の繊維芽細胞により作り出されるが，不足するとタルミやシワの原因となる。従って，肌繊維芽細胞の賦活は，肌機能の維持，改善など，美肌効果が期待できる。コラーゲンやエラスチンは，経皮吸収や経口摂取時の消化・腸管吸収を考慮し，低分子化したものが化粧品や機能性食品などに多く利用され注目度の高い素材である。また，従来，哺乳動物由来の原料が利用されていたが，BSE問題から海洋性由来の素材に注目が集まり，コラーゲン原料として魚類の皮が，エラスチン原料として魚類の心臓が利用されつつある。[1-3]

本研究では，サケ皮よりコラーゲンペプチド（Collagen peptide：以下CPと略す）を，またサケ心臓動脈球よりエラスチンペプチド（Elastin peptide：以下EPと略す）を調製し，CPおよびEPの美肌効果の探索を目的に，ヒト皮膚正常繊維芽細胞（SF-TY：ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手，以下繊維芽細胞と略す）に対する効果を検証した。そこで両者の相乗的な作用を確認したので，これを報告する。

まず，繊維芽細胞に対するCPのヒアルロン酸産生促進能の評価を実施した。[1,2] ヒアルロン酸は，コラーゲンやエラスチン等とともに細胞外マトリックスを形成するムコ多糖の一種であり，保水性に優れていることから，肌の水分，弾力，張りの保持に寄与している。被験試料として，サケ皮由来CP（平均分子量Mw 1,900，ニチロ），サメ皮由来CP（Mw 3,400，ゼライス），スズキ鱗由来CP（Mw 2,500）の3種を用いて評価した。なお，平均分子量は，TSKgel G3000PWカラム（TOSOH）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した。[4,5]

24穴プレートの各ウェルに3.6×10^4 cells/mLの繊維芽細胞を1 mL播種し，5%FBS（牛胎児血清）含有イーグルMEM培地中で，37℃，5%CO_2の条件下にて3日間培養した。続いて，被験試料を100 μg/mLとなるように添加した0.5%FBS含有イーグルMEM培地に置換した。24時間後の培養上清中のヒアルロン酸量を，Hyaluronan Assay Kit（生化学工業）を用いて定量した。各試料のヒアルロン酸産生促進率は，試料無添加区のヒアルロン酸産生量を100%として算出した。

本試験において，サメ皮由来CPおよびスズキ鱗由来CPのヒアルロン酸産生促進率は，試料無添加区と比較してほぼ同程度であったのに対し，サケ皮由来CPでは122%と促進した（Table 1）。これらの結果は，サケ皮由来CPが持つ特有のアミノ酸配列が影響している可能性，もしくは，サケ皮由来CPの平均分子量が他と比較して小さいため，細胞に対して効果的に作用している可能性が考えられた。

次に，同様の評価手法でEPのヒアルロン酸産生促進能について検証した。EPはサケ心臓（100 g）の動脈球を分離し，これをアルカリ処理した後，残留物を酵素

Table 1 The promoting effect of CP on hyaluronic acid production

Source	Promoting rate (%)
Salmon skin	122 ± 7^{a}
Shark skin	98 ± 6^{ab}
Sea perch scale	84 ± 7^{b}

CP concentration: 100 μg/mL.
Each value is mean ± S.E.
The different letters were significantly different ($p<0.05$, Tukey-Kramer test).

* Tel：81-29-864-6708. Fax：81-29-864-6964. Email：yo-takahashi@maruha-nichiro.co.jp
現㈱マルハニチロホールディングス中央研究所　〒300-4295 茨城県つくば市和台16-2

Table 2 The promoting effect of EP on hyaluronic acid production

Concentration (μg/mL)	Promoting rate (%)
0.05	132±12
0.25	130±11

Each value is mean±S.E.

Table 3 The promoting effect of CP/EP mixture*1 on hyaluronic acid production

Sample	Promoting rate (%)	*p* value*2
CP	122±7	0.08
CP/EP mixture*1	146±10	

CP concentration: 100 μg/mL.
Each value of promoting rate (%) is mean±S.E.
*1 The rate of CP/EP was 1000/1.
*2 *p* value was calculated by *t*-test.

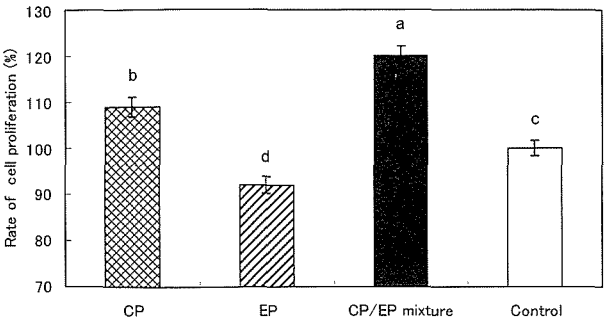

Fig. 1 The effect of CP, EP and CP/EP mixture on the growth of SF-TY cells. Values are means±S.E. (n=8). ▨ indicated CP (0.8 mg/mL), ▨ indicated EP (0.8 μg/mL), ■ indicated CP/EP mixture (0.8 mg/mL) and □ indicated control. The rate of CP/EP was 1000/1. The different letters were significantly different (p<0.05, Tukey-Kramer test).

分解，ろ過，減圧濃縮を行い噴霧乾燥して調製した(0.8 g, Mw 1,600)。EPの濃度を0.05および0.25 μg/mLとしてヒアルロン酸産生促進能を評価した結果，それぞれ132%および130%であり（Table 2），EPはCPと比較して低濃度で高い活性を示した。

続いてCPとEPの相乗効果を確認するため，CP/EP混合物について100 μg/mLの濃度で評価した。なお，EPは単独での評価時に低濃度でヒアルロン酸産生を促進すること，また混合物中におけるEPの検出限界を考慮し，CPに対するEPの配合比を0.1%と設定した。その結果，CPおよびEPを単独で添加した場合と比較して，CP/EP混合物ではヒアルロン酸産生促進率が向上する傾向が見られた（Table 3）。

さらに，CP, EPおよびCP/EP混合物の繊維芽細胞に対するヒアルロン酸産生促進メカニズムを追究するため，ヒアルロン酸産生との関与が知られている4種の受容体（Epidermal Growth Factor [EGF],[6-8] Interleukin [IL-1],[9,10] Platelet-Derived Growth Factor [PDGF],[11,12] Transforming Growth Factor-β [TGF-β][6,13]）に対する親和性を評価した。しかし，いずれの項目においても顕著な活性を示さず，作用機序解明には，更に詳細な解析を行う必要がある。

次に，CPおよびEPの繊維芽細胞増殖に対する効果について検証した。繊維芽細胞の機能低下は，コラーゲンやエラスチン等の細胞外マトリックスの減少や変性を引き起こし，皮膚弾性の低下，タルミやシワの発生につながる。そのため，繊維芽細胞の活性化は皮膚の老化防止・改善に重要であると考えられる。

96穴プレートの各ウェルに，1.0×10^4 cells/mLの繊維芽細胞を100 μLずつ播種し，1%FBS含有イーグルMEM培地中で，37℃, 5%CO_2の条件下にて24時間培養した。続いて，被験試料を目的濃度となるように添加した0.5%FBS含有イーグルMEM培地に置換した。さらに7日間培養後，MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide，東京化成工業）アッセイ[14,15]を実施して細胞数を測定した。すなわち，各ウェルに0.5%MTT溶液（11 μL）を添加し，37℃, 5%CO_2の条件下で2時間静置した後，遠心分離を行い上清部を除去した。各ウェルにDMSO（和光純薬）を100 μLずつ添加して沈殿物を溶解し，590 nmの吸光度を測定した。各試料の細胞増殖率（%）は，試料無添加区の吸光度を100%として算出した。

CPおよびEPを単独で評価した場合，CP添加時（800 μg/mL）には増殖率が109%に向上することが確認されたが，EP添加時（0.8 μg/mL）では増殖率が92%となり，試料無添加と比較して低下した。一方，CP/EP混合物（EPの配合比は0.1%）の添加時（800 μg/mL）では120%となり，CPおよびEPを単独で添加した場合よりも有意に繊維芽細胞の増殖率が向上することが確認された（p<0.05, Tukey-Kramer法）(Fig. 1)。このことから，CPとEPとが相乗的に作用して，繊維芽細胞の増殖に関与していることが示された。

以上の結果より，繊維芽細胞を用いた評価にて，サケ皮由来CPは，サメ皮由来CPおよびスズキ鱗由来CPと比較して，高いヒアルロン酸産生促進活性を有することが示された。また，繊維芽細胞の細胞増殖評価においては，CP/EPの混合物で相乗的な増殖促進効果を示すことが明らかとなった。また，田中，長谷川[16]は，皮膚浸透試験（Yucatan Micropig皮膚切片使用）において，平均分子量が460および3,500のCPと比較して平均分子量が950のCPは，表皮層から真皮層，さらには皮下組織へと効果的に浸透すると報告している。今回用いたサケ皮由来CPの平均分子量は1,900であり，浸透

性や効果の高い平均分子量1,000前後のCPも多く含まれていると考えられる。したがって，ヒトの皮膚への塗布時には皮膚の弾力や張りに効果的に寄与すると考えられ，繊維芽細胞に対して相乗的に効果が認められるCP/EP混合物は化粧品への利用が期待される。

文　献

1) 菊田達也，津田友香，小島弘之，酒井康夫．高機能性コラーゲン・トリペプチド（魚由来）の開発．フレグランスジャーナル 2003; **31**: 61–67.
2) 酒井康夫，菊田達也，津田友香，小島弘之．浸透性コラーゲン・トリペプチド（魚皮由来）の化粧品への応用．フレグランスジャーナル 2006; **34**: 54–60.
3) 清木雅雄．カツオ動脈球由来エラスチンペプチド（カツオエラスチン）の特徴及びヒト肌への有用性について．食品と開発 2007; **42**: 70–72.
4) Swergold GD, Rosen OM, Rubin CS. Hormonal regulation of the phosphorylation of ATP citrate lyase in 3T3–L1 adipocytes. Effects of insulin and isoproterenol. *J. Biol. Chem.* 1982; **257**: 4207–4215.
5) Swergold GD, Rubin CS. High-performance gel-permeation chromatography of polypeptides in a volatile solvent: rapid resolution and molecular weight estimations of proteins and peptides on a column of TSK–G3000–PW. *Anal. Biochem.* 1983; **131**: 295–300.
6) Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta 1). *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 4787–4794.
7) Dittadi R, Gion M, Brazzale A, Bruscagnin G. Radioligand binding assay of epidermal growth factor receptor: causes of variability and standardization of the assay. *Clin. Chem.* 1990; **36**: 849–854.
8) Massague J. Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells. *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 13614–13620.
9) Itano N, Kimata K. Molecular cloning of human hyaluronan synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; **222**: 816–820.
10) Chin J, Cameron PM, Rupp E, Schmidt JA. Identification of a high-affinity receptor for native human interleukin–1 beta and interleukin–1 alpha on normal human lung fibroblasts. *J. Exp. Med.* 1987; **165**: 70–86.
11) Suzuki M, Asplund T, Yamashita H, Heldin CH, Heldin P. Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor–BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C. *Biochem. J.* 1995; **307**: 817–821.
12) Williams LT, Tremble PM, Lavin MF, Sunday ME. Platelet-derived growth factor receptors form a high affinity state in membrane preparations. Kinetics and affinity cross-linking studies. *J. Biol. Chem.* 1984; **259**: 5287–5294.
13) Massague J. Identification of receptors for type-beta transforming growth factor. *Methods Enzymol.* 1987; **146**: 174–195.
14) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983; **65**: 55–63.
15) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; **89**: 271–277.
16) 田中　浩，長谷川靖司．皮膚に浸透し光老化にともなうシワを防ぐコラーゲンペプチド．バイオインダストリー 2005; **22**: 18–23.