

3F-01p 前駆軟骨細胞に及ぼす コラーゲン由来トリペプチド (Glu-Hyp-Gly) の作用

○清水 美好¹⁾、君羅 好史¹⁾、片岡 綾²⁾、杉原 富人²⁾、井上 直樹²⁾、真野 博¹⁾

1) 城西大大学院・薬・医療栄養学専攻、2) 新田ゼラチン(株)

[目的]食事由来のコラーゲンは、消化管の作用によってその一部はコラーゲン由来のジペプチドやトリペプチドとして吸収される。その中でもPro-Hyp(PO)やHyp-Gly(OG)などのジペプチドは血中に比較的高濃度で存在し骨や皮膚の細胞に作用することが報告されている。今回、我々はコラーゲン摂取後のマウス血中から新規のコラーゲン由来トリペプチドであるGlu-Hyp-Gly(EOG)を見出したので、EOGが前駆軟骨細胞に及ぼす影響を検討した。

[方法]前駆軟骨細胞(ATDC5)を用いてEOGを終濃度0.001、0.01、0.1、1 mMとなるよう培地に添加し培養した。細胞増殖はWST-1キットを用いて吸光度を測定し評価した。3日間培養した細胞をALP染色し初期分化の指標とした。7日間培養した細胞をAB染色、サフラニンO染色を行い、後期分化の指標とした。14日間培養した細胞をvon Kossa染色し、石灰化を評価した。

[結果・考察]ATDC5にEOGを任意の濃度で作用させたところ、細胞増殖には変化がみられなかった。ALP染色及びAB染色、サフラニンO染色はコントロールと比較してEOG濃度0.01 mMで顕著に染色強度が増加した。von Kossa染色でもコントロールと比較して染色強度が増加した。以上の結果から、EOGは前駆軟骨細胞の増殖には影響を与えないが、初期及び後期分化、石灰化を促進させる新規のコラーゲン由来トリペプチドである可能性が考えられた。

そして現在、前駆軟骨細胞におけるEOGの分子作用メカニズムを明らかにするため、細胞膜に存在するであろうEOG結合タンパク質を検索している。ATDC5細胞膜抽出液と(EOG)5磁気ビーズを用いbinding assayを行い二次元電気泳動を行った。その結果、EOG結合タンパク質を複数見出した。今後、ペプチドフィンガープリント法を用いてこのEOG結合タンパク質の解析を進める。

3F-07a 培養骨芽細胞におけるFOXG1とコラーゲンジペプチドPro-Hyp(PO)の作用

○大平はる香¹⁾、谷内 友梨¹⁾、井上 直樹²⁾、君羅 好史¹⁾、真野 博¹⁾

1) 城西大学大学院 薬学研究科 医療栄養学専攻、
2) 新田ゼラチン株式会社

FOXファミリー遺伝子は多くの研究が報告されている。FOXO1は骨芽細胞の分化を誘導し、増殖を抑制する。FOXC2は骨芽細胞の増殖、分化、生存を促進することが報告されている。しかし、骨芽細胞におけるFOXG1の機能はまだ報告はない。一方、我々は免疫染色法でFOXG1が骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1に発現することを確認していた。そこで、FOXG1のMC3T3-E1に対する作用を調べるため、FOXG1をsiRNA法でノックダウンし影響を調べた。MC3T3-E1を用い、FOXG1をノックダウンした。通常の培地のみのものをノーマル、control siRNAを導入したものをコントロールとした。細胞播種から48h、72h後にWST-1キットによる細胞増殖の評価を行った。その結果、FOXG1をノックダウンしたものはコントロールと比較して差はなかった。このことから、FOXG1はMC3T3-E1の増殖には影響を与えないと判断した。さらに、細胞播種から5日後にアルカリホスファターゼ(ALP)活性染色で分化を評価した。その結果、ALP活性染色強度はコントロールと比較して低値を示した。このことから、FOXG1はMC3T3-E1の分化を正に制御する因子である可能性が考えられた。また、本研究室ではコラーゲンペプチドに関する研究を行っている。コラーゲンジペプチドのPOはMC3T3-E1において、ALP活性を増加させることを明らかにしている。そこで、FOXG1ノックダウンと同時にPOを終濃度0.1mMとなるよう培地に添加し培養した。細胞播種から5日後にALP活性染色による分化の評価を行った。その結果、ALP染色強度は、FOXG1ノックダウンではPOの有無による差はなかった。しかし、ノーマル、コントロールのALPは、PO添加で増加していた。このことから、MC3T3-E1におけるPOのALP誘導にFOXG1が関与している可能性が考えられた。以上、骨芽細胞の分化にFOXG1が関与し、また、骨芽細胞におけるコラーゲンペプチドの作用発現調節機構の一部に、FOXG1が関与している可能性を示した。