

コラーゲンジペプチド (Pro-Hyp, Hyp-Gly) による
マウス骨代謝に対する効果

関 勇哉

明海大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導: 片山 直 教授)

**Effect of Collagen Dipeptides (Pro-Hyp, Hyp-Gly)
on Mouse Bone Metabolism**

Yuya SEKI

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Tadashi KATAYAMA)

Abstract

Denatured collagen protein is known as gelatin, and gelatin hydrolysate known as collagen peptide is used as a functional food material. In humans and rats, dipeptides of collagen origin, particularly Pro-Hyp (PO) and Hyp-Gly (OG), can be detected in blood after oral intake of collagen peptide. There are many PO and OG sequences in one single chain of human type I collagen and these collagen dipeptides have been brought to attention as a physiologically activated substances. In the present study, we examined the influence of PO and OG on bone metabolism and bone structure organization in mice with phosphorus-induced osteogenic disorder bone loss. In addition, we investigated the effect of PO and OG in vitro on the bone metabolism by use of both primary mouse bone marrow-derived osteoclasts and osteoblastic cell line MC3T3-E1. PO and OG appeared to have little influence on mineral concentration or bone metabolism markers, in terms of the blood levels of bone metabolism-related hormones in mouse blood. However, PO increased the bone density of primary joint subchondral bone and first cancellous bone, while OG increased that of secondary cancellous bone in addition of all of these bones. The bone strength which declined with the surplus Pi intake, recovered by the PO and OG intake. PO and OG induced the hyperplasia of bone trabeculae. On the other hand, PO increased the number of the TRAP positive multinucleated cell derived from the mouse bone-marrow-cell , but OG was not. Furthermore, PO and OG promoted both the differentiation and the

calcification of the cultivated osteoblasts. The present study demonstrated the possible mechanism whereby the collagen dipeptides PO and OG exert a protective effect against jawbone loss in mice, suggesting that these bioactive collagen dipeptides may be useful for the prevention and amelioration of bone diseases.

Key words: gelatin(ゼラチン), collagen dipeptide(コラーゲンジペプチド), bone metabolism(骨代謝), osteoclast(破骨細胞), osteoblast(骨芽細胞)

要旨

コラーゲンの変性タンパク質がゼラチンであり、これを酵素などで加水分解したゼラチン加水分解物がコラーゲンペプチドと呼ばれ、機能性食品素材として用いられている。ヒトやラットにおいてコラーゲンペプチドを摂取すると、血中に複数のコラーゲン由来のジペプチドが検出される。I型コラーゲンにはPro-Hyp (P0)とHyp-Gly (OG)配列ともに多く存在し、この成分が生理活性物質として注目されている。そこで本研究では無機リン(Pi)を過剰摂取させ骨形成不良状態を人為的に誘導した高Pi食誘導性硬組織障害モデルマウスを用いた *in vivo* 実験系でP0, OGの骨代謝および骨組織に与える影響について検討した。さらに正常マウス骨髄細胞由来破骨細胞, 培養骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いた *in vitro* 実験系で骨吸収, 骨形成に対するP0, OGの効果について検討した。本モデルマウス血中骨代謝マーカーの測定結果から血中のミネラル濃度や骨代謝ホルモン濃度にP0, OGは大きな影響を示さなかった。しかし、骨密度を測定した結果、P0は海綿骨(関節軟骨下骨, 一次海綿骨)を増加させ、OGはすべての骨密度を増加させていた。また、Pi過剰摂取で低下していた骨強度もP0, OG摂取により増加していた。さらに、骨梁の肥厚が、P0, OG摂取により認められた。一方、正常マウス骨髄細胞由来細胞のTRAP陽性多核細胞数は、P0添加で増加し、逆にOG添加では減少した。また、P0, OGは培養骨芽細胞株 MC3T3-E1の分化と石灰化を促進した。以上の結果よりP0, OGが骨組織の維持に重要な役割を演ずる可能性を示すことから、コラーゲンジペプチドのP0, OGは骨を保護する新たな生理活性物質である可能性が示唆された。

緒言

コラーゲンは体内のタンパク質の約 30%を占め、全身に分布している。生体内で線維を形成している I 型コラーゲン分子は三重らせん構造をしており、分子量は約 30 万である¹⁾。これを加熱変性させて抽出したゼラチンは部分的な加水分解を受けているため、分子量が数万から数十万と幅広く不均一である¹⁾。このゼラチンをタンパク質分解酵素によって更に加水分解し、分子量数百から数千としたものがコラーゲンペプチドと呼ばれ機能性食品素材として用いられている¹⁾。コラーゲンペプチドは特定のアミノ酸配列の 1 分子を示すものではなく、ゼラチン原材料や低分子化処理する酵素の相異により、様々なアミノ酸配列のペプチド分子を含んだ混合物として形成される。また、コラーゲンペプチドは生体内においても、骨代謝の過程で matrix metalloproteinase (MMP) や cathepsin K (Ctsk) などの作用によって体内のコラーゲンから分解・生成されている^{2,3)}。これらのうち、特定のジペプチドに注目すると骨、腱、皮膚組織に多く含まれる I 型コラーゲンの 1 次配列には prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp; P0) 配列と hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly; OG) 配列ともに多く存在し、このジペプチドが生理活性物質として予想されている⁴⁾。

翻訳後修飾で生成する hydroxyproline (Hyp) はコラーゲン特有のアミノ酸である。Hyp を含むペプチド結合は特殊な構造のため、タンパク質分解酵素が作用しにくく、ペプチドのまま吸収され血液中に長時間存在すると考えられている⁵⁾。また、コラーゲンペプチドは小腸においてアミノ酸の形態のみならず、Hyp を含むジペプチドおよびトリペプチドとして吸収されることも明らかとなっている⁵⁾。さらに、コラーゲンペプチド経口摂取後のヒト末梢血で検出されたペプチドの主要構成成分は P0 であることも報告されている⁶⁾。ま

た, Shigemura ら⁷⁾はゼラチン加水分解物を経口摂取後に新しい食品由来コラーゲンペプチドである OG が血液中に高い濃度で出現することを報告した。さらに, Sugihara ら⁸⁾は健常ボランティア被験者におけるコラーゲン加水分解物の経口摂取後の血漿中の食事由来 OG の定量化に世界で初めて成功している。これらの知見は食事由来の PO, OG が人体において何らかの役割を演じている可能性を示唆している。

最近, Nakatani ら⁹⁾はマウス培養前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いて, コラーゲンジペプチドである PO が軟骨細胞の分化を調節することを明らかにした。一方, 老化を抑制する Klotho 遺伝子に変異したマウスはヒトの老化に類似した症状を示す¹⁰⁾。その Klotho 遺伝子を変異させたマウスに, 通常の飼料に含まれる無機リン(Pi)濃度を半分以下にした低 Pi 食を与えたところ, 老化症状の1つである骨粗鬆症, 関節異常を抑制したとの報告がされている¹¹⁾。逆に Nakatani ら⁹⁾は高 Pi 食誘導性硬組織障害モデルマウスを用い, 関節軟骨下骨の骨梁が変化したことを報告した。このモデルマウスに PO を摂取させたところ, 関節軟骨の変性を抑制し, 関節軟骨下骨の骨梁構造も維持されることを証明した⁹⁾。この結果は骨代謝における PO の新たな機能的役割を示唆している。しかしながら, コラーゲンジペプチドがどのようなメカニズムにより骨代謝制御に関与しているかについては明らかにはなっていない。

骨代謝を維持するためには十分なカルシウムの摂取だけでなく, Pi の適正摂取が必要とされている¹²⁾。Pi の過剰摂取が骨代謝に及ぼす影響については, ヒトにおいて高 Pi 食摂取によりの尿中への排泄増加¹²⁾, 幼弱ラットでの尿中への I 型コラーゲン C 末端テロペプチドの排泄増加¹³⁾, 腎臓におけるオステオポンチン発現上昇¹⁴⁾, ナトリウム依存性リン酸トランスポーター IIa の発現低下¹⁵⁾, 大腿骨における receptor activator of nuclear

factor- κ B ligand (RANKL) の発現上昇¹⁶⁾ などがあり, 結果的に骨生成不良や骨粗鬆症を引き起こす。今回の研究では高 Pi 食誘導性硬組織障害モデルマウスを用い, 骨形成不良状態を人為的に作り出し, *in vivo* におけるコラーゲンジペプチドの骨代謝制御における役割について検討した。また, マウス骨髄細胞由来破骨細胞およびマウス頭蓋冠由来培養骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いた *in vitro* 実験系で P0, 0G の破骨細胞および骨芽細胞に与える影響についても検討した。

材料と方法

1. 実験動物

C57BL/6J 雄性マウスは 10 週齢以降になると成長に伴う体重増加および骨成長が終了する¹⁷⁾。そこで本研究は急激な体重増加および骨成長が終了した, C57BL/6J 雄性マウス(東京実験動物, 東京)10 週齢に Pi を 1.5 g /Pi/100g 飼料で過剰摂取させた, 高 Pi 食誘導性硬組織障害モデルマウスを用いた⁹⁾。本研究で用いた Pi 添加食は AIN93-G 組成¹⁸⁾を基に, Morishita ら¹⁹⁾の論文を参考に作製した。Pi 源としてリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)を用いて各飼料に添加し, コンスターチの一部と置換した(Table 1)。実験群は, Pi を過剰摂取させていない Normal 群(0.15% Pi), Pi を過剰摂取させた Control 群(1.5% Pi), Pi を過剰摂取させるとともに P0 を摂取させた P0 群(1.5% Pi+0.3% Pro-Hyp), Pi を過剰摂取させるとともに OG を摂取させた OG 群(1.5% Pi+0.3% Hyp-Gly)の 4 群として 3 週間飼育した。また, 各群すべてのマウスは飼育開始時と飼育終了時に体重測定をした。本研究は明海大学歯学部動物倫理委員会 (B1106, A1231) ならびに城西大学動物実験管理委員会 (H24072) より承認され, 実験動物は明海大学歯学部ならびに城西大学動物実験ガイドラインに従い飼育した。

2. 血中骨代謝マーカーの測定

飼育終了後, 各群 5 匹のマウスをエーテル麻酔し, 下腹部静脈より血液採取し, 室温で 30 分放置後, 室温下で $5,000 \times g$, 10 分間, 遠心分離した上清をさらに $10,000 \times g$, 15 分間遠心分離した上清を血液サンプルとして用いた。得られた血液サンプルを用い, カルシウム (Ca)

濃度はカルシウム E テストワコー (和光純薬工業, 大阪), Pi 濃度はホスファ C テストワコー (和光純薬工業), alkaline phosphatase (ALP) 活性はラボアッセイ ALP (和光純薬工業), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性はラボアッセイ ALP (和光純薬工業) の基質溶解液を 2 mM 酒石酸含有 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液に置き換え²⁰⁾, parathyroid hormone (PTH) 濃度は Mouse Intact PTH ELISA Kit (Immutopics, San Clemente, CA, USA) を各々用いて測定した。

3. マウス大腿骨の骨密度測定

骨密度測定のために, 上記 4 群 (Normal 群, Control 群, P0 群, OG 群) を 3 週間飼育した後, 大腿骨および脛骨を摘出した。摘出後, 70% エタノールで固定した左後脚大腿骨を一晩乾燥させた後, peripheral quantitative CT (p-QCT) で骨密度の測定をした。p-QCT は Latheta (ALOKA, 東京) を用い, 大腿骨遠位部骨端から 0.05 mm 幅, 80 スライス of 海綿骨骨密度および皮質骨骨密度を測定した。海綿骨骨密度において 17 スライス目を関節軟骨下骨, 25 スライス目を一次海綿骨, 37 スライス目を二次海綿骨とし, 3 つに分けて比較を行った。皮質骨骨密度も海綿骨同様に測定を行い, 17 スライス目を関節軟骨下骨, 25 スライス目を骨端皮質骨, 37 スライス目を骨幹皮質骨とし, 3 つに分けて比較を行った。

4. マウス大腿骨の三点折り曲げ試験

p-QCT で使用した左後肢大腿骨を用い, 両端を固定し, 物性評価試験装置 EZ-S (島津製作所, 京都) で骨強度を測定した。測定方法は大腿骨の midpoint に対して一定のスピードで荷重を

かけて骨を破断させる三点折り曲げ試験を行い、力学的特性を測定し、最大破断点および破断エネルギーの解析を行った。

5. マイクロ(μ)CTによるマウス脛骨の形態学的解析

飼育終了後に右後脚を摘出し、ホルマリン固定を行った。風乾後、卓上型 μ CT スキャナ (SKYSCAN1172, SKYSCAN, Kontich, Belgium)を用いて、撮影を行った。撮影条件は管電圧 61 kV, 管電流 172 μ A, ステージ回転ピッチ 0.5 とした。 μ CTにより得られた断層画像より、画像再構築ソフトウェア (NRecon, SKYSCAN) を用いて画像の再構築後、画像解析ソフトウェア (CT-analyzer, SKYSCAN)を用い矢状断面図を構築した。

6. マウス脛骨の脱灰切片標本による組織学的評価

各群5匹のマウスの左後肢脛骨を脱灰後、通法に従いパラフィン切片を作製し、HE染色を行った標本を光学顕微鏡下にて観察した。また、顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin 600CL(ピクセラコーポレーション, 大阪)を用いて組織画像を取り込み、上記システム専用ソフトウェアである In Studio(ピクセラコーポレーション)を用いて組織学的評価を行った。

7. 軟X線撮影による歯槽骨の石灰化度

軟X線撮影装置(ビーナスアルファ, ヨシダ, 東京)を用いて、ホルマリン固定した下顎骨を風乾後、撮影を行った。撮影条件は管電圧 30 kV, 管電流 10 mA とした。軟X線撮影によ

り得られた画像より,画像処理ソフトウェア(ImageJ,NIH, Bethesda, Maryland, USA)を用いて,石灰化度に最も変化を認めた前臼歯根分岐部域における歯槽骨の石灰化度(点線内)を数値化することで測定した (Fig 7a)。

8. μ CT による歯槽骨の形態学的解析

SKYSCAN1172 を用いて,ホルマリン固定した下顎骨を風乾後,撮影を行った。撮影条件は管電圧 59 kV,管電流 167 μ A,ステージ回転ピッチ 0.5 とした。 μ CT により得られた断層画像より,NRecon を用いて画像の再構築後,CT-analyzer を用い矢状断面図を構築し,軟 X 線撮影で最も変化を認めた前臼歯根分岐部域における骨梁構造の比較検討を行った。

9. マウス下顎骨の脱灰切片標本による組織学的評価

各群 5 匹のマウスから下顎骨の軟 X 線画像解析結果が平均値に近い 3 匹のマウスの下顎骨を脱灰後,通法に従いパラフィン切片を作製し,HE 染色を行った標本を光学顕微鏡下に観察した。また,顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin 600CL を用いて組織画像を取り込み,上記システム専用ソフトウェアである In Studio を用いて組織学的評価を行った。

10. DNA マイクロアレイ解析

同一条件下で飼育した C57BL/6J 雄性マウスから大腿骨を摘出し,total RNA 抽出のための資料とした。摘出した大腿骨を液体窒素で凍結後,ステンレスプレートの上でハンマーで粉碎し,粉末状にした。その後,トリゾールを加えポリトロン型のホモゲナイザーでホモジネ

ート後, 1000×g, 10分で遠心分離し, 骨片を除去し上清をそのままトリゾール溶液として RNA を抽出した。DNA マイクロアレイ解析は Sure Print G3 Mouse miRNA マイクロアレイ キット 8×60K Rel. 16.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用し, 実験操作に関しては操作マニュアルに従って行った。実験で得られた複数のアレイデータを相互比較する為に Normalization を行い, Subio Platform (Subio, 東京) を用いて解析をした。Processed Signal 値を用いて, Control 群を 1 とし, 他群とのシグナル強度の比較を Fold Change として示した。Fold Change が 1.5 倍以上を発現上昇, 0.75 倍以下を発現低下とした。

11. マウス骨髄細胞由来細胞の調整

破骨細胞はマウス骨髄細胞の初代培養法による形成系で解析をした。4 週齢の雄性 ddY マウスの大腿骨および脛骨を摘出し骨髄細胞を得た。骨髄細胞の培地は alpha modified Eagle's Minimum Essential Medium: 炭酸水素ナトリウム (α -MEM 5.125 g / 500 mL : NaHCO₃ 0.9 g / 500 mL) に 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 万 U/L ペニシリン G カリウム (明治製菓, 東京) を添加したものをを用いた。骨髄細胞は 1000 U/mL のロイコプロール (協和発酵, 東京) を添加し, 37 °C, 5 % CO₂ の条件下で培養した。3 日後, トリプシン EDTA により細胞を剥離回収した。洗浄後, 2000×g, 4 分間遠心し, 実験に用いる培地へ交換を行い, 培養を開始した。培地交換は 2 日後に行った。

12. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

マウス骨髄細胞由来細胞は 1×10^4 cells/well ずつ 96 well 細胞培養プレートに播種し (n=4), 各々 20 ng/mL の macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, R&D, Minneapolis, MN, USA) および 10 ng/mL の RANKL (R&D) を添加した。2 時間後, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後に 1 mM の各コラーゲンジペプチドを添加し, 全て 84 時間後にメタノールで固相化した。TRAP 染色は Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて酒石酸溶液を 0.335 M, pH 4.9 に変更し染色を行った。固相化プレートを 3 回水洗後, TRAP 染色試液と 37 °C で 5 分間反応させ, 光学顕微鏡下で観察した。TRAP 陽性多核細胞形成および数を測定した後, Penguin 600CL を用いて, 染色細胞像を取り込み In Studio を用いて画像解析を行った。

13. 骨芽細胞株 MC3T3-E1 の培養

骨芽細胞株はマウス頭蓋冠由来の培養骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いた²¹⁾。MC3T3-E1 の培地は α -MEM: 炭酸水素ナトリウム (α -MEM 5.125 g/500 ml: NaHCO₃ 0.9 g/500 ml) に 10 % FBS, 10 万 U/L ペニシリン G カリウム (明治製菓) を添加したものをを用いた。MC3T3-E1 は 37 °C, 5 % CO₂ の条件下で培養した。継代は 2~3 日毎に 0.25 % トリプシン-EDTA 溶液 (Sigma Aldrich) により細胞を剥離採取し, 洗浄後, 2,000 $\times g$, 4 分間遠心し, 実験に用いる培地へ交換を行い, 培養を行なった。

14. 細胞傷害性試験

MC3T3-E1 は 3×10^3 cells/well ずつ, 96 well 細胞培養用プレートに播種し, 3 時間後, P0

あるいは OG を 10 % FBS 添加 α -MEM 培地にそれぞれ 0.01 mM 添加し 3 日間培養した。生細胞数は Cell Counting Kit-HS (DOJINDO, 熊本) 試薬を培地の 1/10 量添加し, 1 時間 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で静置し, プレートリーダー Wallac 1420 ARVO. SX multilabel counter (Wallac Finland Oy, Turku, Finland) を用いて波長 450 nm で測定し, 各測定値は通常培地で培養した MC3T3-E1 の測定値で除し, 相対値を算出し比較した。

15. Alkaline phosphatase (ALP) 染色

MC3T3-E1 細胞は 3×10^3 cells/well ずつ 96 well 細胞培養用プレートに播種し, 3 日間培養した。その後, PO あるいは OG を 10 % FBS 添加 α -MEM 培地にそれぞれ 0.01 mM 添加し 7 日間培養した。ALP 活性は培養後, 20 %ホルマリンを用いて 10 分間固定し, 2 回水洗した細胞を透過液(エタノール:アセトン=1:1)にて 1 分間氷上で静置した。透過処理後, 2 回水洗した細胞を ALP 染色液[(10 mM naphthol AS-BI Phosphate(Sigma Aldrich)および 1 mM Fastred Violet LB Salt(Sigma Aldrich) in 0.05 M 2-amino-2-methyl-1-propanol (pH 9.8) (AMP Buffer)]を用いて 37 °Cインキュベーター内で 10~15 分反応させ 5 回水洗した。染色後, フラットヘッドスキャナーを用いて 96 well 細胞培養用プレートの染色画像を取り込み, ImageJ を用いて染色強度を数値化した。

16. Von Kossa 染色

MC3T3-E1 細胞は 3×10^3 cells/100 μ l ずつ 6 well 細胞培養用プレートに播種し, 3 日間培養した。その後, 5 mM β グリセロールリン酸, 0.1 nM のデキサメサゾン, 100 μ g/mL アスコ

ルビン酸を添加した培地に交換し P0 あるいは OG をそれぞれ 0.01 mM 添加し 14 日間培養した。培養終了後, Von Kossa 染色にて細胞数を測定した (n=4)。細胞は 20 %ホルマリンを用いて 10 分間固定し, 2 回水洗した細胞を透過液(エタノール : アセトン=1 : 1)にて 1 分間氷上で静置した。透過処理後, 2 回水洗した細胞をマイヤーヘマトキシリン溶液(和光純薬工業)にて 5 分静置し 5 回洗浄した。ヘマトキシリン染色後, 反応液(5 %硝酸銀水溶液)を加え, 紫外線光下にて 15 時間静置した。反応後, 2 回水洗し, 停止液(5 %チオ硫酸ナトリウム水溶液)を用いて 5 分静置した。反応停止後, 2 回水洗し, フラットヘッドスキャナーを用いて, 6 well 細胞培養用プレートの染色画像を取り込み, ImageJ を用いて染色画像の石灰化結節の数と石灰化結節の面積を測定した。

17. 統計処理

結果は表および図中に示したマウス匹数の平均値±SD で示した。統計学的評価は Stat Mate 3 ソフトウェア (ATMS, 神奈川) を使用し, t 検定を用いて有意差検定を行い, 有意水準を $p < 0.05$ とした。軟 X 線, μ CT および組織切片の画像は各群の中から典型的な像を示した。

結果

1. マウスの体重および血中骨代謝マーカーに及ぼす P0, OG の影響

マウス体重測定の結果を Table 2 に示す。飼育開始時は Normal 群, Control 群, P0 群, OG 群で差を認めなかったが, 飼育終了時に Normal 群と比較し Control 群, P0 群, OG 群では体重減少を認めた。

血中骨代謝マーカーの値を Fig 1 に示す。飼育終了時の Ca 濃度, 骨吸収マーカーである TRAP 活性は各群間で差は認めなかった。Pi 濃度は Normal 群と比較し Control 群で有意に減少していた (Fig 1b) が, P0 群, OG 群で差は認めなかった。骨形成マーカーである ALP 活性は Normal 群と比較し Control 群で有意に増加していたが (Fig 1c), P0 群, OG 群で差は認めなかった。PTH 濃度は Normal 群と比較し Control 群で有意に増加していたが (Fig 1e), P0 群, OG 群で差は認めなかった。

2. マウスの長管骨の骨密度に及ぼす P0, OG の影響

p-QCT の結果を Fig 2, 3 に示す。海綿骨における関節軟骨下骨, 一次海綿骨, 二次海綿骨において, Normal 群と比較して, Control 群, P0 群では有意に減少していたが, Control 群と比較して, 一次海綿骨の P0 群では骨密度の改善傾向を認めた (Fig 2b)。とりわけ OG 群では関節軟骨下骨, 一次海綿骨, 二次海綿骨において骨密度の改善を認めた (Fig 2b, c, d)。一方, 皮質骨における関節軟骨下骨において, Normal 群と比較して, Control 群, P0 群, OG 群では有意に減少していたが, Control 群と比較して, P0 群, OG 群の改善傾向を認めた。また, 骨端皮

質骨, 骨幹皮質骨において, Normal 群と比較して, Control 群, P0 群では有意に減少していたが, OG 群では骨密度の改善を認めた (Fig 3c, d)。

三点折り曲げ試験の結果を Fig 4 に示す。最大破断点において, Normal 群と比較して, Control 群, P0 群, OG 群では有意に減少していたが, Control 群と比較して, P0 群, OG 群では改善傾向を認めた。一方, 破断エネルギーにおいて, Normal 群と比較して, Control 群では有意に減少していたが, P0 群, OG 群では改善を認めた。

μ CT による脛骨の画像を Fig 5 に示す。Control 群に比べ P0 群では関節軟骨下骨で骨梁の増加を認め, OG 群では関節軟骨下骨, 一次海綿骨, 二次海綿骨において骨梁の増加を認めた。

脛骨の脱灰切片画像を Fig 6 に示す。Control 群と比べ P0 群では関節軟骨下骨, 一次海綿骨ともに海綿骨腔の開大を認め, 一部骨梁幅の肥厚を認めた。OG 群では関節軟骨下骨, 一次海綿骨ともに骨梁幅の肥厚を認めた。

3. マウスの歯槽骨に及ぼす P0, OG の影響

軟 X 線画像解析の結果を Fig 7 に示す。(a) は軟 X 線画像を示し, 点線内を数値化したグラフを (b) に示した。Normal 群に比べ Control 群では前臼歯根分岐部領域において著しい透過性の亢進を認めた。一方, Control 群に比べ P0 群, OG 群では前臼歯根分岐部領域において不透過性の亢進を認めた (Fig 7a)。また, 前臼歯根分岐部域 (点線内) における歯槽骨の石灰化度の測定結果より, Normal 群に比べ Control 群では前臼歯根分岐部領域において石灰化

度の低下を認めた。一方, Control 群に比べ PO 群, OG 群では前臼歯根分岐部領域において石灰化度の改善を認めた (Fig 7b)。

μ CT による歯槽骨の画像を Fig 8 に示す。Normal 群に比べ Control 群では前臼歯根分岐部領域において骨梁の減少を認めた。一方, Control 群に比べ PO 群, OG 群では前臼歯根分岐部領域において骨梁の改善を認めた (Fig 8)。

下顎骨の脱灰切片画像を Fig 9 に示す。Normal 群に比べ Control 群では歯槽骨骨梁の厚さの減少を認めた。一方, Control 群に比べ PO 群, OG 群では歯槽骨骨梁の厚さの改善を認めた。

4. DNA マイクロアレイ解析

C57BL/6J 雄性マウス大腿骨における DNA マイクロアレイ解析の結果を示す (Table 3)。

Normal 群と比較し Control 群で発現が上昇した遺伝子の内, PO 群 and/or OG 群で発現量が減少した遺伝子, Normal 群と比較し Control 群で発現が減少した遺伝子の内, PO 群 and/or OG 群で発現量が上昇した遺伝子を解析した。PO 群で発現上昇した遺伝子にセロトニン受容体 (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B; *Htr2b*) があった。PO 群, OG 群で発現上昇した遺伝子に線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor 2; *Fgf2*), ホメオボックス遺伝子 (homeobox, msh-like 1; *Msx1*), ヒアルロン酸合成酵素 (hyaluronan synthase 3; *Has3*) があった。PO 群, OG 群で発現減少した遺伝子にビタミン D 受容体 (vitamin D receptor; *Vdr*), 破骨細胞分化因子 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; *Rankl*) があった。OG 群で発現減少した遺伝子にエストロゲン受容体 (estrogen receptor 1

； *Esr1*), Rankl 受容体 (receptor activator of nuclear factor- κ B; *Rank*), 骨形成因子 (bone morphogenetic protein; *Bmp2*), タンパク質分解酵素 (cathepsin K; *Ctsk*) があつた。

5. 骨髄細胞由来破骨細胞に及ぼす PO, OG の影響

マウス骨髄由来細胞の TRAP 染色の結果を Fig 10 に示す。骨髄細胞播種 2 時間後に PO を添加した群では TRAP (+) 多核細胞数が Control 群と比較して, 約 1.3 倍に増加した。一方, OG 添加では細胞数は約 0.35 倍に減少した。また, 骨髄細胞播種から 24 時間後以降のカラーゲンジペプチド添加では差は認められなかった (Fig 10a)。破骨細胞面積において, 骨髄細胞播種 2 時間後に PO を添加した群では約 1.28 倍に増加した。一方, OG 添加では細胞面積は約 0.2 倍に減少した。また, 骨髄細胞播種から 24 時間後以降では細胞数と同様にカラーゲンジペプチド添加による差は認めなかった (Fig 10b)。顕微鏡画像では OG 添加により, 多核細胞形成の抑制が認められた (Fig 10c)。

6. 培養骨芽細胞株 MC3T3-E1 に及ぼす PO, OG の効果

細胞傷害性試験の結果を Fig 11a に示す。PO, OG は MC3T3-E1 に細胞傷害性を示さなかった。

ALP 染色の結果を Fig 11b に示す。0.01 mM の PO, OG は MC3T3-E1 の ALP 染色強度を約 2 倍程度増加させた。

Von Kossa 染色の結果を Fig 12 に示す。0.01 mM の PO, OG 添加により石灰化結節の面積/石灰化結節の数が約 2 倍程度増加した。

考察

コラーゲンは動物の骨, 軟骨, 腱, 皮膚などに多く存在する細胞外基質タンパク質の 1 つである。コラーゲンは多数の分子種からなるスーパーファミリーを構成している^{22, 23)}。その中で I 型は骨, 腱, 皮膚などに多く存在している。I 型コラーゲンは 3 本鎖らせんの立体構造(スーパーヘリックス)を形成し, そのアミノ酸配列は 3 つのアミノ酸ごとにグリシン(Gly)を含む Gly-X-Y の繰り返し配列をしている。X にはプロリン(Pro), Y には Pro がヒドロキシル化された Hyp の [Gly-Pro-Hyp] の繰り返し配列を多く含んでいることが特徴である^{24, 25)}。例えばヒト I 型コラーゲンポリペプチド鎖 1 本分に Gly-X-Y が 360 ヶ所あり, その内 P0 配列は 49 ヶ所, OG 配列は 127 ヶ所存在する。また, コラーゲンは細胞外基質タンパク質として細胞と細胞の隙間に存在し, 組織の形態維持および組織間の境界を形成するのみならず, 細胞接着因子を介した細胞シグナルにも関与している²⁶⁻²⁹⁾。

そこで本研究では体内に多く存在し, 骨代謝のタンパク質分解過程において生体内でも生成すると考えられるコラーゲンジペプチドである P0 および OG に着目した。これまでに先行実験として Nakatani ら⁷⁾はマウス培養前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用い P0 が軟骨細胞の分化を調節すること, さらに Pi を過剰摂取させたマウスに P0 を摂取すると, 関節軟骨の変性を抑制し, 関節軟骨下骨の骨梁構造が維持されることを報告した⁹⁾。この中で Nakatani らは P0 が軟骨細胞に直接働きかけてヒアルロン酸合成を促進し, 軟骨細胞の変性の進行を抑制し, さらに骨の細胞にも作用している可能性を示唆している⁹⁾。また, いくつかの研究では OG が皮膚の創傷治癒を促進する可能性やラット腸管吸収過程での OG 分解に抵抗性が高いことが報告されている^{8, 30)}。このようにコラーゲンの分解物であるコラーゲンペプチ

ドに関してはアミノ酸の機能ではなく、特異的ペプチド配列がシグナル伝達分子として、特異的な生理機能を有している可能性が高いことが明らかとなってきた。そこで今回、これらの分子が骨の代謝機構にシグナル分子として作用する可能性について検討した。

Pi を過剰摂取すると、PTH の分泌が亢進して尿中への Pi 排泄により血中の Pi 濃度を正常範囲に維持する代謝が成立する³¹⁾。そこで初めにマウスにおいて Pi 過剰摂取条件下での血中骨代謝マーカーを測定した。その結果、Normal 群と比較して Pi 過剰摂取の Control 群では血中 PTH 濃度の上昇が認められた。一方、Control 群、PO 群、OG 群での血清 Ca 濃度、血清 Pi 濃度、ALP 活性、PTH 濃度に顕著な差は認めなかった (Fig 1)。このことは、血中の Ca 濃度や Pi 濃度、PTH などの骨代謝調整ホルモン濃度に影響を与えることなく PO、OG が標的組織や標的細胞に直接影響を及ぼしている可能性を示唆している。高 Pi 食誘導性硬組織障害モデルマウスを用いた実験系において、PO、OG は同マウスの低下した骨密度、骨強度の改善と骨脆弱化の進行抑制等の骨代謝改善効果を示した (Fig 2~6)。また、Pi 過剰摂取による前臼歯歯根分岐部の石灰化度の低下や骨梁の減少による骨構造の脆弱化は PO、OG の摂取により有意に改善したことがマウス下顎骨を用いた軟 X 線や μ CT の解析より判明した (Fig 7, 8)。さらに、下顎骨の脱灰切片標本は組織学的評価により Pi 過剰条件下では歯槽骨の厚みが減少するが、PO、OG の摂取により改善する結果が得られた (Fig 9)。この結果は PO、OG が骨組織ならびに骨組織周囲の細胞を活性化させ骨のリモデリングを誘導している可能性が示唆された。

一方、PO、OG によるマウスの骨代謝調節に及ぼす骨代謝関連遺伝子の発現についてはあまりよくわかっていない。そこで次に我々は PO、OG を摂取させた C57BL/6J 雄性マウスの大

腿骨骨髓細胞から RNA を回収し, DNA マイクロアレーを用いて, 骨代謝に関連する遺伝子について総覧した。その結果, Table 3 に示すように, P0 と OG は *Fgf2* や *Msx1*, *Has3* などの発現を増強したが, *Vdr*, *Rank1* 等の発現を抑制した。OG はさらに *Esr1*, *Rank*, *Bmp2*, *Ctsk* などを抑制した。この結果は P0 と OG が骨芽細胞および破骨細胞の分化調節に機能的役割を演じる重要な因子である可能性を示唆している。そこでさらに我々はマウス大腿骨および脛骨から破骨細胞を調整し, *in vitro* の実験系にて P0 と OG の作用を検討した。その結果, P0 は骨髓由来細胞の TRAP 活性を促進したが, OG は抑制した (Fig 10)。この結果は P0 が破骨細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性を細胞レベルで証明したものと考える。一方, 骨芽細胞機能に及ぼすこれらのコラーゲンジペプチドの効果を検証するために, 培養骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を実験に供し, 細胞障害性, ALP 活性, 石灰化活性について検討した。その結果, P0 と OG は MC3T3-E1 細胞に対して細胞障害性や細胞増殖を示さなかったが, ALP 活性の増強や石灰化活性を示すことが証明された (Fig 11, 12)。これは P0 と OG が MC3T3-E1 の石灰化への分化過程を促進することを示唆している。以上の結果から, コラーゲンジペプチドである P0 は前駆破骨細胞と前駆骨芽細胞の細胞分化促進作用, OG はこれらの細胞の破骨細胞分化への抑制作用と骨芽細胞分化促進作用によって骨代謝を調節し骨組織の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

最近の研究から、骨芽細胞のアポトーシスや破骨細胞による骨吸収に酸化ストレスが関与していることが明らかになってきた³⁴⁻³⁶⁾。従って、抗酸化特性を持つタンパク質加水分解物は、破骨細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化を亢進することにより、酸化ストレスの損傷効果を低減する可能性が考えられる。最近、ブタ皮膚由来コラーゲン加水分解産物中の

Hyp や Pro, Gly に抗酸化効果が認められることが報告された³⁷⁾。この結果は PO, OG の骨代謝調節機構の一部がレドックスメカニズムに関与している可能性が考えられた。それゆえ、近い将来に骨代謝における PO, OG の抗酸化作用を調べることは興味がある。

Moskowitz³⁸⁾は製薬レベルに精製したコラーゲン加水分解物を経口摂取した変形性関節炎や骨粗鬆症患者の臨床試験の結果を調査したところ、プロリン単独を摂取するよりも加水分解物が軟骨に蓄積しやすいことや骨コラーゲンの破壊が少ないことを報告している。また、Wuら³⁹⁾はCa 欠乏状態におけるコラーゲンペプチドの経口摂取が骨代謝において有利な効果を示すことを報告している。これらの知見はコラーゲンペプチドが骨代謝において機能的役割を演じ、骨格性疾患の予防と改善に寄与する可能性を示している。

一方、歯科医療において骨代謝調節は顎骨骨折や顎変形症における創傷治癒や歯周外科での骨再生誘導法などの再生医療に密接に関与している。しかしながら、これらの治療法は治癒までに数ヶ月～数年を要することが知られている。コラーゲンは骨、腱、皮膚組織などの細胞外基質の主要成分のひとつであり、この分子から生じたコラーゲンジペプチドは生体への有害作用が少なく安全に使用できる可能性が考えられる。現在、我々は PO, OG の骨代謝関連遺伝子発現制御や骨芽細胞、破骨細胞への直接作用などの基礎実験のみならず臨床応用に向けた異なるモデル動物を用いた実験を進めている。これまで歯科領域では利用されることがなかった PO, OG が経口摂取により骨疾患の予防法あるいは治療法の開発へ繋がることが期待される。

結論

コラーゲンジペプチドの骨代謝および骨組織に与える影響について明らかにするために、Pi を過剰摂取させた *in vivo* マウスモデルおよび *in vitro* におけるマウス骨髄由来破骨細胞, 培養骨芽細胞に対する PO と OG の効果について検討し, 以下の結果を得た。

1. PO, OG 摂取マウスの血中骨代謝マーカーである Ca 濃度や TRAP 活性に差は認めなかった。
2. PO, OG 摂取マウスの長管骨は Control 群に比較して骨密度や骨梁の増加を認めた。3 点折り曲げ試験では Control 群に比較して PO と OG の両方で最大破断点, 破断エネルギーの改善を認めた。
3. C57BL/6J マウス歯槽骨はエックス線画像上で Normal 群に比べて Control 群で前臼歯根分岐部域の透過性の亢進や石灰化度の低下, 脱灰切片上で骨梁の菲薄化を認めた。PO と OG はそれらを改善した。
4. C57BL/6J マウス大腿骨骨髄細胞における DNA マイクロアレー解析で PO は *Htr2b* の発現を促進した。PO と OG は *Fgf2* や *Msx1*, *Has3* の発現を促進したが, *Vdr*, *Rank1* を抑制した。OG はさらに *Esr1*, *Rank*, *Bmp2*, *Ctsk* を抑制した。
5. ddY マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系で PO は TRAP 陽性多核細胞数と破骨細胞面積を増加させた。しかし, OG はそれらを減少させた。
6. マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において, PO と OG は MC3T3-E1 の ALP 活性と石灰化結節の面積/石灰化結節の数を増加させた。

以上の結果から, コラーゲンジペプチドである PO は破骨細胞, 骨芽細胞の分化促進作用, OG は破骨細胞の分化抑制作用と骨芽細胞分化促進作用によって骨代謝を調節し, 骨組

織の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

謝辞

稿を終わるにあたり, 終始御指導, 御校閲を賜りました病態診断治療学講座総合口腔診断学分野・片山 直教授および城西大学大学院医療栄養学専攻食品機能学講座・真野 博教授に深甚なる謝意を表します。また, 御校閲を賜りました口腔生物再生医工学講座生化学分野・友村明人教授, 病態診断治療学講座薬理学分野・坂上 宏教授, 口腔生物再生医工学講座微生物学分野・大森喜弘教授ならびに病態診断治療学講座総合口腔診断学分野・町野 守前教授に深謝いたします。また, 種々の面にわたりご援助いただきました病態診断治療学講座総合口腔診断学分野の各位に厚く御礼申し上げます。

尚, 本研究は 2012 年度宮田奨励金 E の助成を受けた。

引用文献

- 1) Koyama Y. : Functional aspects of collagen. hikaku kagaku 56, 71-79, 2010
- 2) Delaisse J.M., Andersen T.L., Engsig M.T., Henriksen K., Troen T. and Blavier L. : Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. Microsc Res Tech 61, 504-513, 2003
- 3) Goto T., Yamaza T. and Tanaka T. : Cathepsins in the osteoclast. J Electron Microsc (Tokyo) 52, 551-558, 2003
- 4) Iwai K., Hasegawa T., Taguchi Y., Morimatsu F., Sato K., Nakamura Y., Higashi A., Kido Y., Nakabo Y. and Ohtsuki K. : Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. J Agric Food Chem 53, 6531-6536, 2005
- 5) Aito-Inoue M., Lackyram D., Fan M. Z., Sato K. and Mine Y. : Transport of a tripeptide, Gly-Pro-Hyp, across the porcine intestinal brush-border membrane. J Pept Sci 13, 468-474, 2007
- 6) Ohara H., Matsumoto H., Itoh K., Iwai K. and Sato K. : Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. J Agric Food Chem 55, 1532-1535, 2007
- 7) Shigemura Y., Akaba S., Kawashima E., Park E.Y., Nakamura Y. and Sato K. : Identification of a novel food-derived collagen peptide, Hydroxyprolyl-Glycine, in

human peripheral blood by pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. *Food Chemistry* 129, 1019–1024, 2011

8) Sugihara F., Inoue N., Kuwamori M. and Taniguchi M. : Quantification of hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) in human blood after ingestion of collagen hydrolysate. *J Biosci Bioeng* 113, 202–203, 2012

9) Nakatani S., Mano H., Sampei C., Shimizu J. and Wada M. : Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1620–1627, 2009

10) Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohshima Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R. and Nabeshima Y. I. : Mutation of the mouse *Klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51, 1997

11) Morishita K., Shirai A., Kubota M., Katakura Y., Nabeshima Y., Takeshige K. and Kamiya T. : The progression of aging in *Klotho* mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr* 131, 3182–3188, 2001

12) Bell R. R., Draper H. H., Tzeng D. Y., Shin H. K. and Schmidt G. R. : Physiological responses of human adults to foods containing phosphate additives. *J Nutr* 107, 42–50, 1977

- 13) Katsumata S., Masuyama R., Koshihara M., Matsusaki H., Uehara M. and Suzuki K. :
High phosphorus diet changes phosphorus metabolism regardless of PTH action in rats.
Biosci Biotechnol Biochemi 68, 243-246, 2004
- 14) Matsuzaki H., Katsumata S., Uehara M., Suzuki K. and Miwa M. : High-phosphorus diet
induces osteopontin expression of renal tubules in rats. J Clin Biochem Nutr
41, 179-183, 2007
- 15) Tani Y., Sato T., Yamanaka-Okumura H., Yamamoto H., Arai H., Sawada N., Genjida
K, Taketani Y and Takeda E: Effects of prolonged high phosphorus diet on phosphorus
and calcium balance in rats. J Clin Biochem Nutr 40, 221-228, 2007
- 16) Katsumata S., Masuyama R., Uehara M. and Suzuki K. : High-phosphorus diet
stimulates receptor activator of nuclear factor- κ B ligand mRNA expression by
increasing parathyroid hormone secretion in rats. Br J Nutr 94, 666-674, 2005
- 17) Glatt V., Canalis E., Stadmeier L. and Bouxsein M.L. : Age-related changes in
trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. J Bone Miner Res
22, 1197-1207, 2007
- 18) Reeves P. G., Nielsen F. H. and Fahey Jr. G. C. : AIN-93 purified diets for laboratory
rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee
on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 123, 1939-1951, 1993

- 19) Morishita K., Shirai A., Kubota M., Katakura Y., Nabeshima Y., Takeshige K. and Kamiya T. : The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr* 131, 3182-3188, 2001
- 20) Kido S. and Kiyomura M. : Suppressive effect of caldecrin, a Serum calcium-decreasing factor, on osteoclastic differentiation: *J Meikai Dent Med* 35, 86-97, 2006
- 21) Shiokawa-Sawada M., Mano H., Hanada K., Kakudo S., Kameda T., Miyazawa K., Nakamaru Y., Yuasa T., Mori Y., Kumegawa M. and Hakeda Y. : Down-regulation of gap junctional intercellular communication between osteoblastic MC3T3-E1 cells by basic fibroblast growth factor and a phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). *J Bone Miner Res* 12, 1165-1173, 1997
- 22) Van der Rest M. and Garrone R. : Collagen family of proteins. *FASEB J* 5, 2814-2823, 1991
- 23) Cremer M.A., Rosloniec E.F. and Kang A.H. : The cartilage collagens. *J Mol Med* 76, 275-288, 1998
- 24) Park S., Radmer R. J., Klein T.E. and Pande V. S. : A new set of molecular mechanics parameters for hydroxyprolin and its use in molecular dynamics simulations of collagen-like peptides. *J Comput Chem* 26, 1612-1616, 2005
- 25) Eyre D.R., Weis M.A. and Wu J.J. : Articular cartilage collagen. *European Cells and Materials* 12, 57-63, 2006

- 26) Staatz W.D., Fok K.F., Zutter M.M., Adams S.P., Rodriguez B.A. and Santro S.A. :
Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha 2 \beta 1$ integrin in
collagen. J Biol Chem 226, 7363–7367, 1991
- 27) Takeuchi Y., Nakayama K. and Matsumoto T. : Differentiation and cell surface
expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction
with matrix collagen in murine osteoblastic cells. J Biol Chem 271, 3938–3944, 1996
- 28) Takeuchi Y., Suzawa M., Kikuchi T., Nisida E., Fujita T. and Matsumoto T. :
Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by
collagen- $\alpha 2 \beta 1$ integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its
downstream signals in murine osteoblastic cells. J Biol Chem 272, 29309–29316, 1997
- 29) Suzawa M., Takeuchi Y., Fukumoto S., Kato S., Ueno N., Miyazono K., Matsumoto
T. and Fujita T. : Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are
essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. Endocrinology
140, 2125–2133, 1999
- 30) Liu C., Sugita K., Nihei K., Yoneyama K. and Tanaka H. : Absorption of
hydroxyproline-containing peptides in vascularly perfused rat small intestine in
situ. Biosci Biotechnol Biochem 73, 1741–1747, 2009
- 31) Masuyama R., Kajita Y., Odachi J., Uehara M., Shigematsu T., Suzuki K. and Goto
S. : Chronic phosphorus supplementation decreases the expression of renal PTH/PTHrP
receptor mRNA in rats. Am J Nephrol 20, 491–495, 2000

- 32) Chung U. I. : Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr J* 51, 19-24, 2004
- 33) Byers B.A., Pavlath G.K., Murphy T.J., Karsenty G. and Garcia A.J. : Cell-type-dependent up-regulation of in vitro mineralization after overexpression of the osteoblast-specific transcription factor Runx2/Cbfa1. *J Bone Miner Res* 17, 1931-1944, 2002
- 34) Almeida M., Han L., Martin-Millan M., Brien C.A. and Manolagas S.C. : Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 282, 27298-27305, 2007
- 35) Jilka R.L., Weinstein R.S., Parfitt A.M. and Manolagas S.C. : Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *J Bone Miner Res* 22, 1492-1501, 2007
- 36) Garrett I.R., Boyce B.F., Oreffo R.O.C., Bonewald L.F., Poser J. and Mundy G.R. : Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85, 632-639, 1990
- 37) Ao J. and Li B. : Amino acid composition and antioxidant activities of hydrolysates and peptide fractions from porcine collagen. *Food Sci Technol Int* 18, 425-34, 2012
- 38) Moskowitz R.W. : Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 30, 87-99, 2000

39) Wu J., Fujioka M., Sugimoto K., Mu G. and Ishimi Y. : Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. J Bone Miner Metab 22, 547-553, 2004

Figure Legends

Fig 1. Effect of oral administration with Pro-Hyp(P0), Hyp-Gly(OG) on bone metabolism markers in mice. Mice were fed with normal diet (normal) or Pi excess diet containing none (control) or 0.3 % Pro-Hyp(P0) or 0.3 % Hyp-Gly(OG) for 3 weeks. Thereafter, the venous blood was collected and measured serum Ca concentration(a), serum P concentration(b), serum biochemistry ALP activity(c), serum TRAP activity(d), serum PTH concentration(e). Each bar is presented as the means \pm SD for each group of five mice. * $p < 0.05$ (vs Normal) using Student' s t-test.

Fig 2. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on mouse femoral bone density. Mice were fed and treated as described in Fig 1, and the bone density of the selected slice specimens(spongy BMD 80 slices line chart(a), subchondral bone(17 slice) (b), primary spongy bone(25 slice) (c), secondary spongy bone(37 slice) (d)) were measured by use of peripheral quantitative computed tomography. Each bar is presented as the means \pm SD for each group of four mice. * $p < 0.05$ (vs Normal) using Student' s t-test.

Fig 3. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on cortical bone density in the mouse femoral bone. Mice were fed with diets containing either 0.3 % Pro-Hyp(P0) or 0.3 % Hyp-Gly(OG) for 3 weeks. Thereafter, their femoral bones were collected and sliced.

Then, the each cortical bone density of the selected slice specimens(cortical BMD 80 slices line chart (a), subchondral bone (17 slice) (b), epiphyseal cortical bone (25 slice) (c), shaft cortical bone (37 slice) (d)) were measured by use of quantitative computed tomography. Each bar is presented as the means \pm SD for each group of four mices.*p<0.05 (vs Normal) using Student' s t-test.

Fig 4. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on bone strength in the mouse femoral bone. Mice were fed with diets containing either 0.3 % Pro-Hyp(P0) or 0.3 % Hyp-Gly(OG) for 3 weeks. Thereafter, their femoral bones were collected, and then, the bone strengths peak point(a), yield energy(b) were measured by use of performance evaluation test device. Mice were fed with diets containing either 0.3 % Pro-Hyp(P0) or 0.3% Hyp-Gly(OG) for 3 weeks. Each bar is presented as the means \pm SD for each group of four mices.*p<0.05 (vs Normal) using Student' s t-test.

Fig 5. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on mouse trabecular bone structure. Mice were fed with diets containing either 0.3 % Pro-Hyp(P0) or 0.3 % Hyp-Gly(OG) for 3 weeks. Thereafter, the tibial bones were collected, and then, these bones were fixed, dried, and examined the three-dimensional images by benchtop μ -CT scanner. Photographs representative of the typical results found for each group (n=5) are shown.

Fig 6. Histological findings of the proximal tibiae on the Pro-Hyp (P0) and Hyp-Gly (OG) treated phosphorus-induced bone loss mice.

Mice were fed diets containing either 0.3 % Pro-Hyp (P0) or 0.3 % Hyp-Gly (OG) for 3 weeks. Thereafter, the tibial bones were collected, created a paraffin section, and stained by Hematoxylin-Eosin. Photographs representative of the typical results found for each group (n=5) are shown.

Fig 7. Effect of Pro-Hyp (P0) and Hyp-Gly (OG) on calcification of jawbone in the phosphorus-induced bone loss mice. Mice were fed diets containing either 0.3 % Pro-Hyp (P0) or 0.3 % Hyp-Gly (OG) for 3 weeks. Thereafter, the jawbones were collected, and then, these bones were fixed, dried, and analysed by soft X-ray imaging. Premolar root bifurcation area shown by a dotted line in an X-ray image of the mouse jawbone (a). The graph was made inside the dotted line based on numerical values obtained using Image J (b). Photographs representative of typical results for each group (n=5) are shown.

Fig 8. Effects of Pro-Hyp (P0) and Hyp-Gly (OG) on mouse jawbone structure.

Mice were fed diets containing either 0.3 % Pro-Hyp (P0) or 0.3 % Hyp-Gly (OG) for 3 weeks. Thereafter, the jawbones were collected, and then, these bones were fixed, dried, and examined three-dimensional trabecular bone structure imaging by benchtop

μ -CT scanner. Photographs representative of the typical results for each group (n=5) are shown.

Fig 9. Histological evaluation of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on mouse jawbone structure. Mice were fed diets containing either 0.3 % Pro-Hyp(P0) or 0.3 % Hyp-Gly(OG) for 3 weeks. Thereafter, their jawbone were collected, created a paraffin section, and stained by Hematoxilin-Eosin. The specimens were observed by optical microscope. Photographs representative of the typical results for each group (n=3) are shown.

Fig 10. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on the number of multinuclear TRAP-positive osteoclast. Bone marrow cells were first pre-treated with RANKL(10 ng/mL) for the indicated hours, and then treated without or with 1 mM Pro-Hyp(P0) or Hyp-Gly(OG) until 84 h after the start of RANKL addition. The cells were fixed and stained. TRAP positive multinucleated cells were counted under optical microscope. The data were expressed the number of osteoclast(a), mesh of osteoclast and(b), and microscopical image of osteoclasts(c).

Fig 11. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on the growth and ALP activity of MC3T3-E1 cells. Cells were treated for 3 days without or with 0.1 mM Pro-Hyp(P0) or

Hyp-Gly(OG), and then viable cell number were accessed by cell counting kit(a). ALP stain(b) and microscope image of the ALP stain(c) were performed according to the materials and methods.

Fig 12. Effect of Pro-Hyp(P0) and Hyp-Gly(OG) on the calcification activity of MC3T3-E1. The cells were treated with or without either 0.01 mM Pro-Hyp(P0) or Hyp-Gly(OG) for 14 days, and Von Kossa stain(a) and microscope image of the Von Kossa stain(b) were performed according to the materials and methods.

Table 1. Composition of the experimental diets

	Normal	Control	PO	OG
Casein15%	15.00	15.00	15.00	15.00
Gluten5%	5.00	5.00	4.70	4.70
Lard	5.83	5.83	5.83	5.83
Corn oil	1.17	1.17	1.17	1.17
AIN-93G Mineral mix	3.50	3.50	3.50	3.50
AIN-93 Vitamin mix	1.00	1.00	1.00	1.00
Sucrose	10.00	10.00	10.00	10.00
Cornstarch	53.20	47.30	47.30	47.30
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00
L-Cystine	0.30	0.30	0.30	0.30
KH ₂ PO ₄	—	5.90	5.90	5.90
Pro-Hyp (PO)	—	—	0.30	—
Hyp-Gly (OG)	—	—	—	0.30
Amount of the total phosphorus				
Pi	0.15	1.5	1.5	1.5

g / 100g

Table 2. Effect of Pro-Hyp, Hyp-Gly on initial and final body weight in mice

	Normal	Control	PO	OG
Body weight (g)				
Initial	25.6±0.4	25.4±0.5	25.3±0.5	25.2±0.6
Final	27.2±2.0	24.7±1.0*	24.4±1.0*	24.5±0.9*

Data are expressed as means±SD (n=5). * $p < 0.05$

Table 3. Differentially regulated genes by Pro-Hyp and Hyp-Gly in mice

Symbol	Name	Fold change		
		C/N	PO/C	OG/C
<i>Vdr</i>	vitamin D receptor	2.2	0.7	0.3
<i>Runkl</i>	receptor activator of nuclear factor- κ B ligand	1.7	0.7	0.5
<i>Esr1</i>	estrogen receptor 1	1.6	0.8	0.7
<i>Runk</i>	receptor activator of nuclear factor- κ B	1.9	0.8	0.3
<i>Bmp2</i>	bone morphogenetic protein 2	2.0	0.8	0.3
<i>Ctsk</i>	cathepsin K	3.1	0.8	0.3
<i>Fgf2</i>	fibroblast growth factor 2	0.2	4.1	9.1
<i>Has3</i>	hyaluronan synthase 3	0.2	2.3	2.3
<i>Msx1</i>	homeo box, msh-like 1	0.7	2.8	4.0
<i>Htr2b</i>	5-hydroxytryptamine(serotonin)receptor 2B	0.6	1.8	0.9

Figure 1

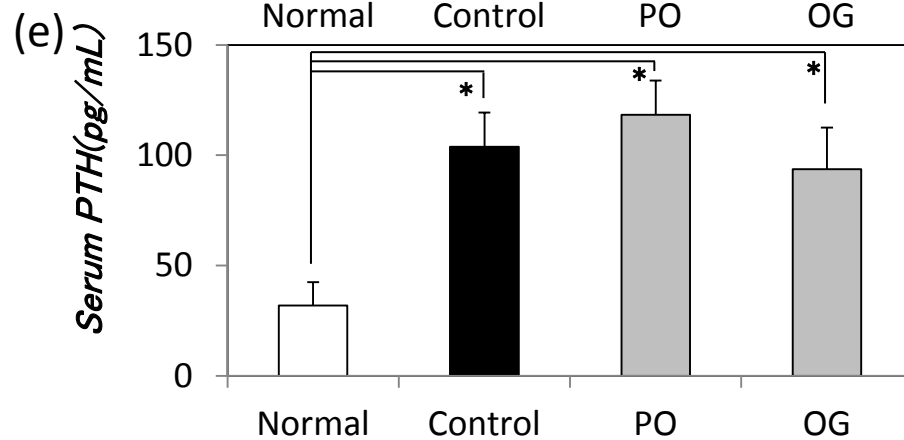
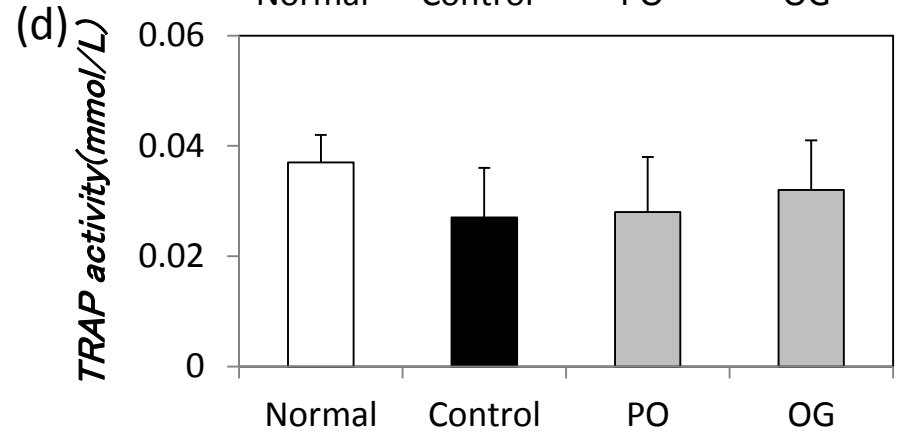
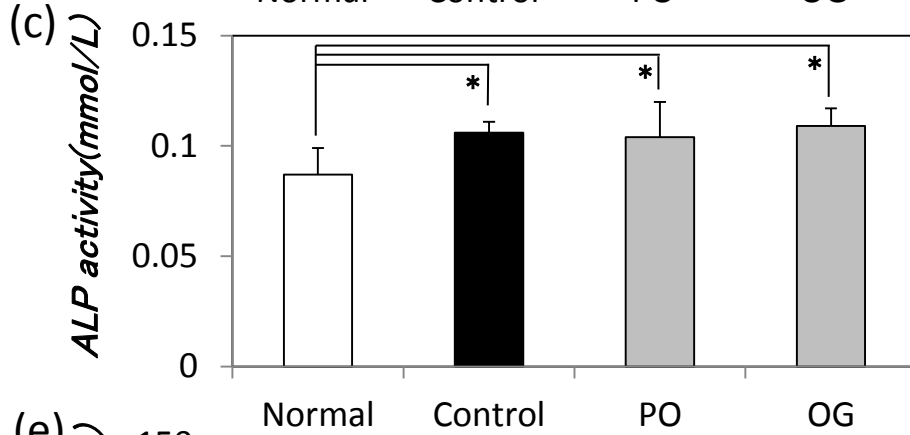
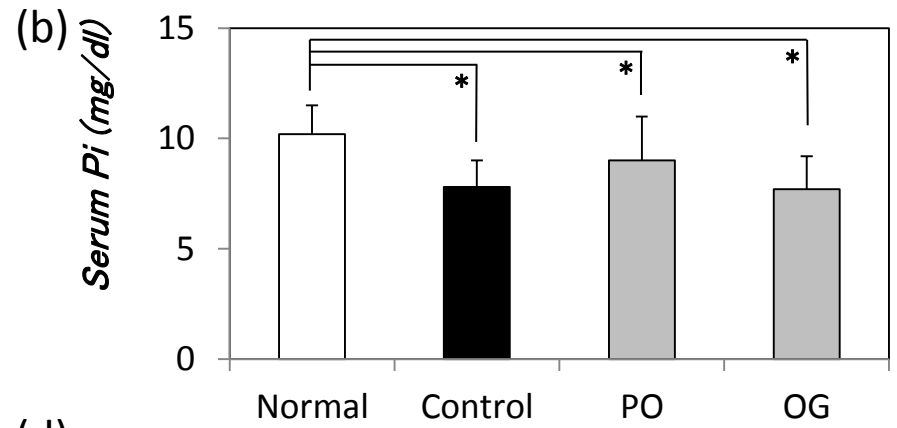
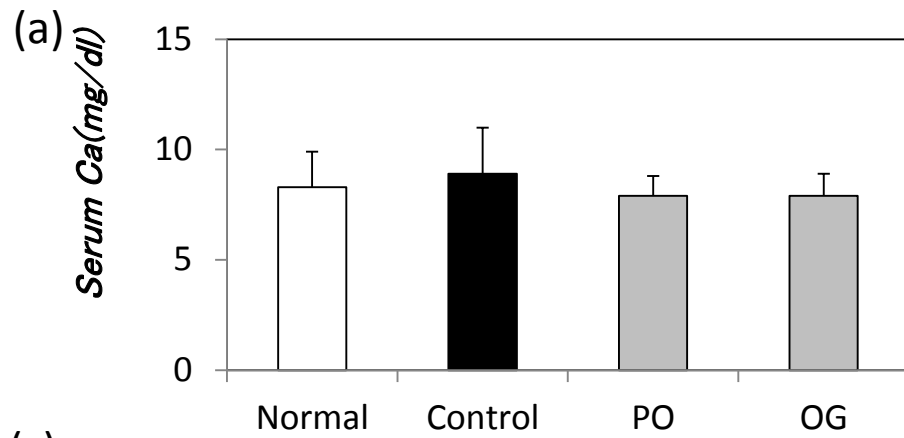
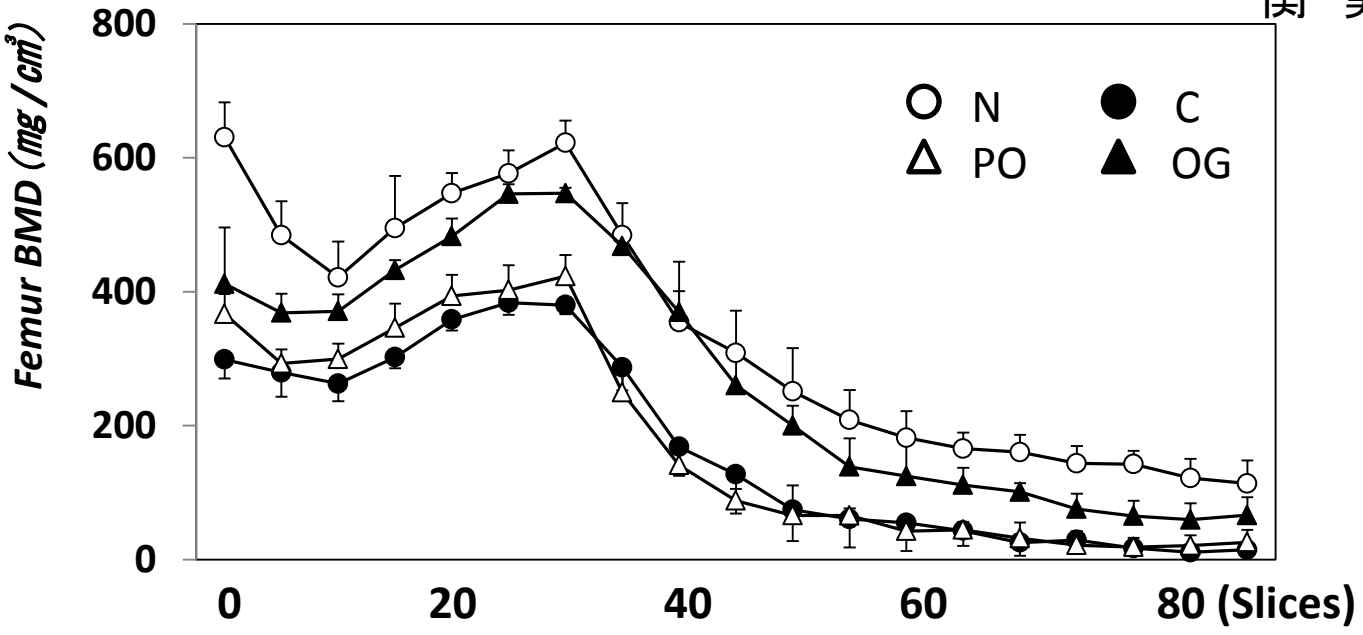
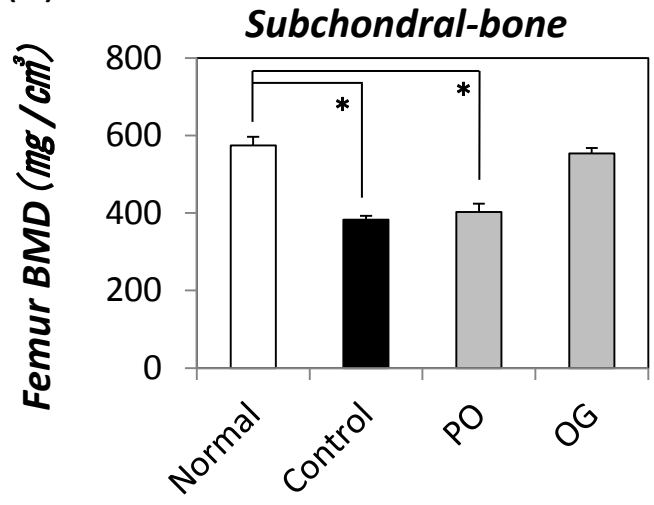


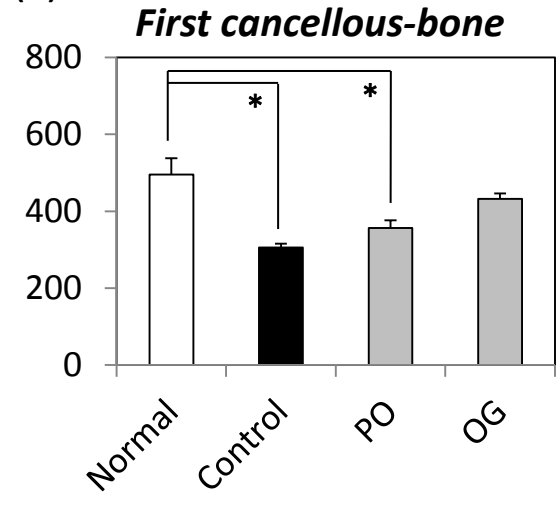
Figure 2 (a)



(b)



(c)



(d)

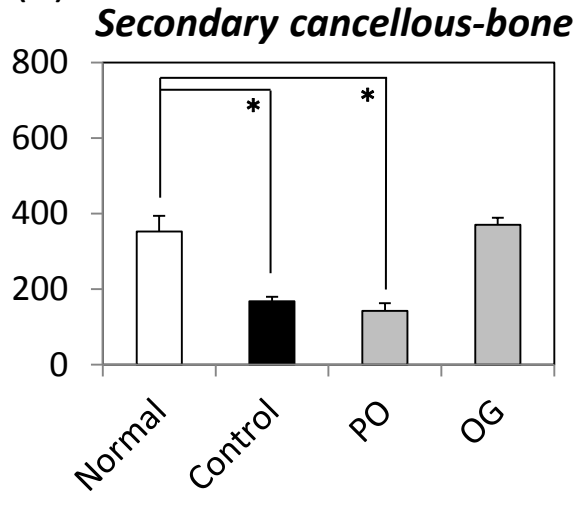
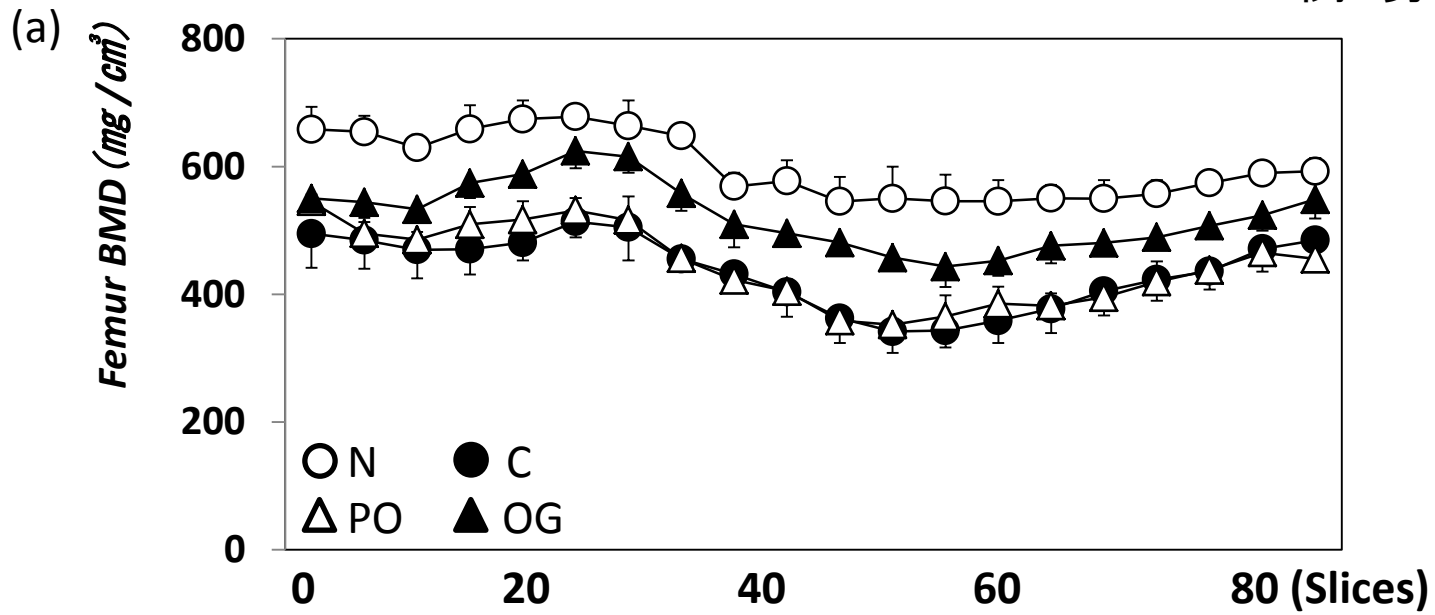
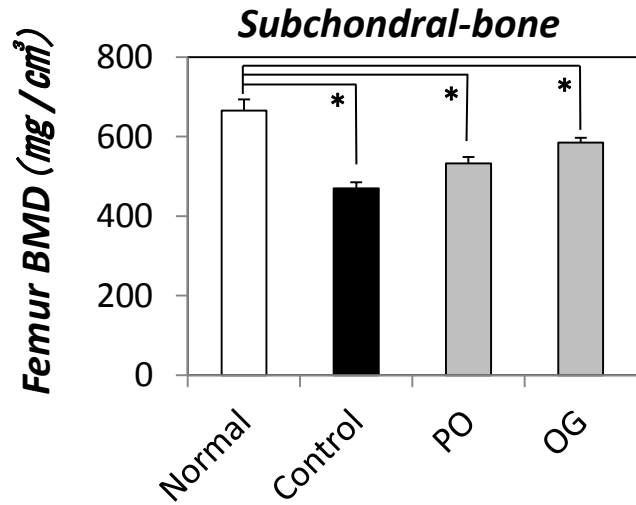


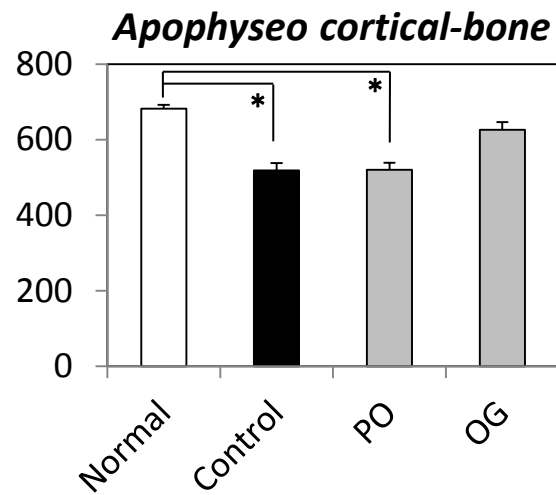
Figure 3



(b)



(c)



(d)

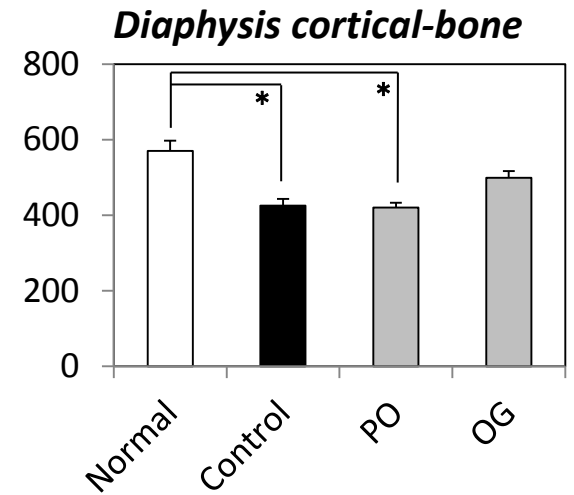


Figure 4

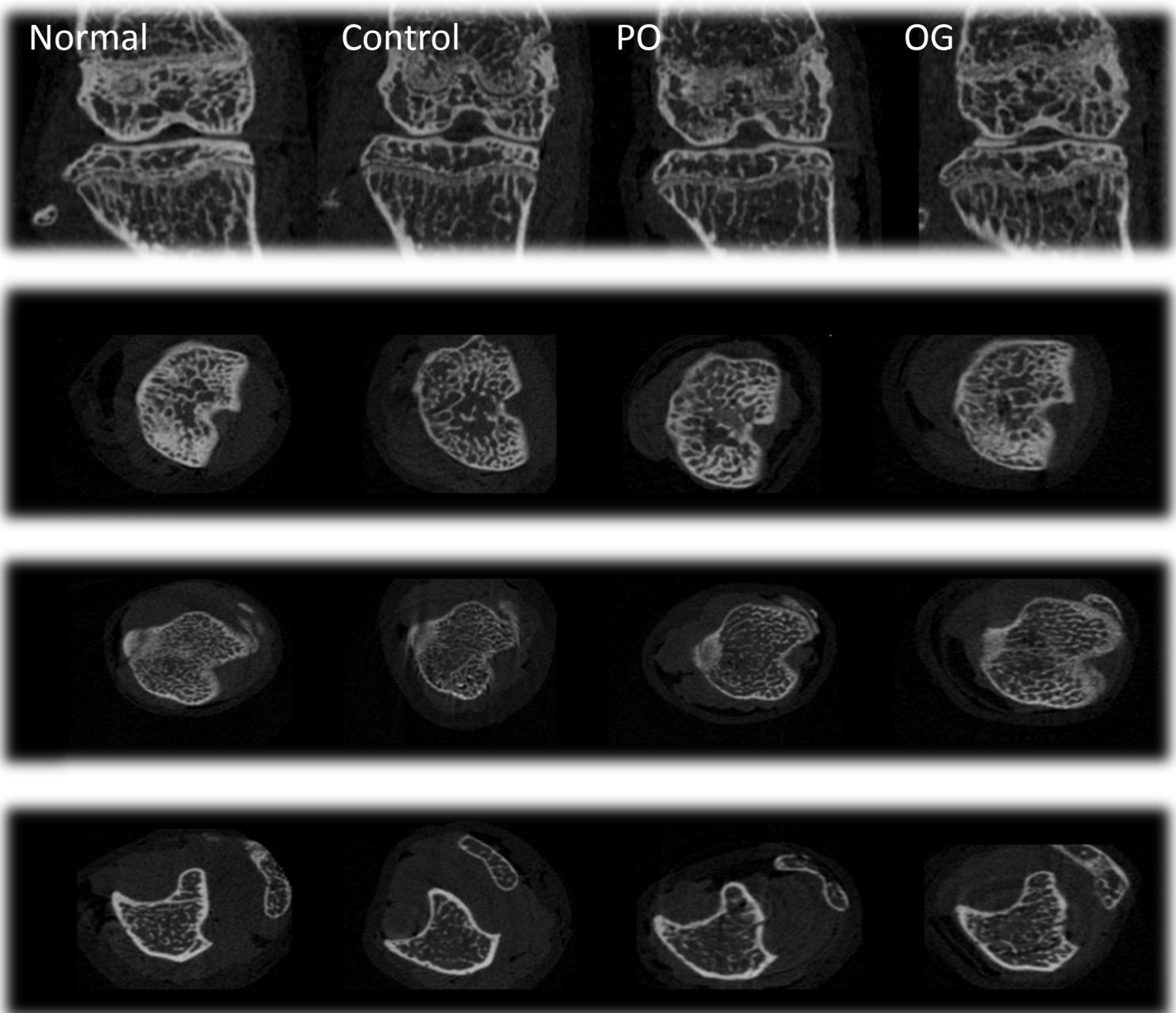
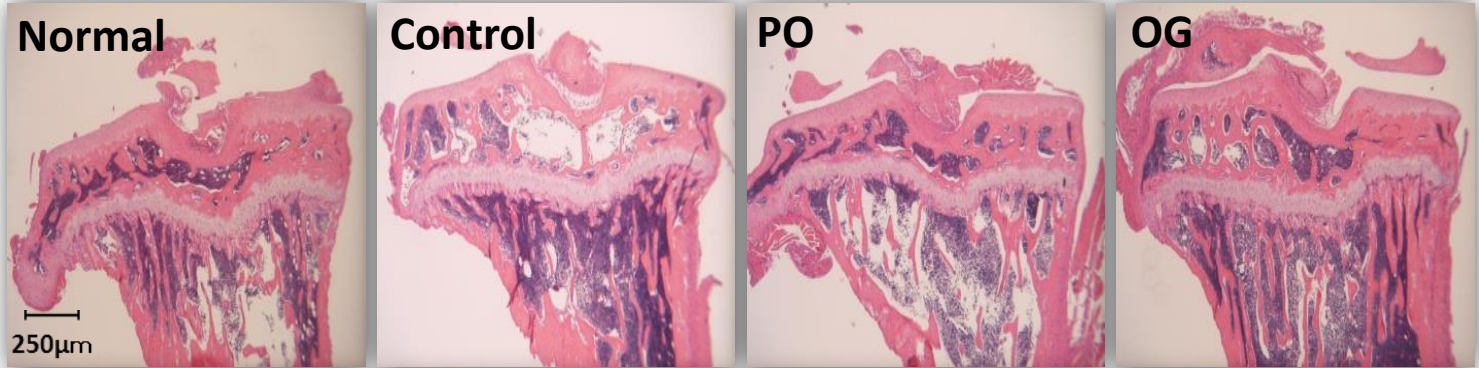
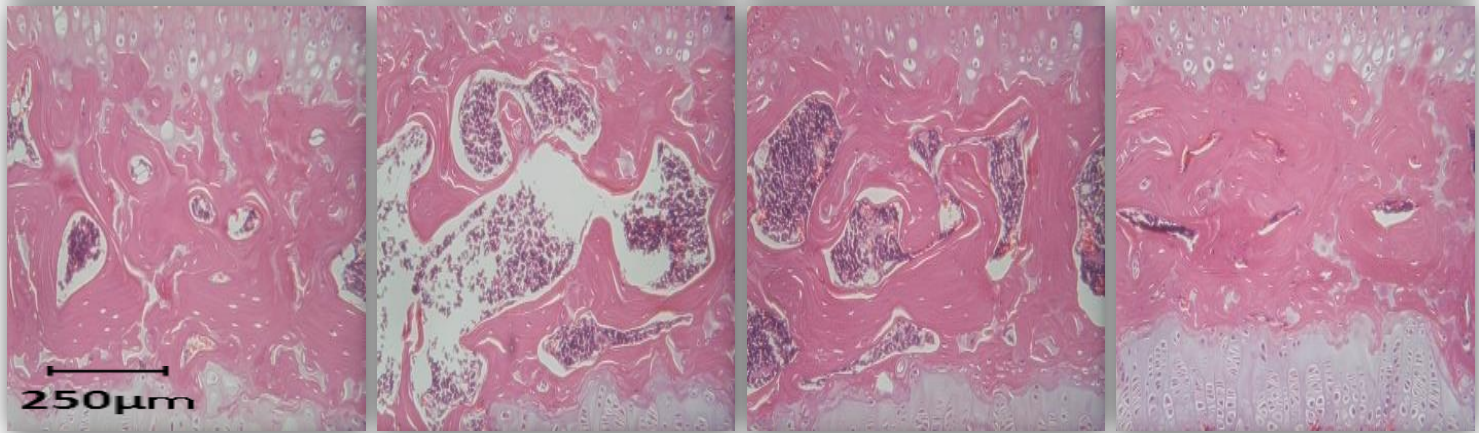


Figure 5

Joint



*Subchondral-
bone*



*Secondary
cancellous-
bone*

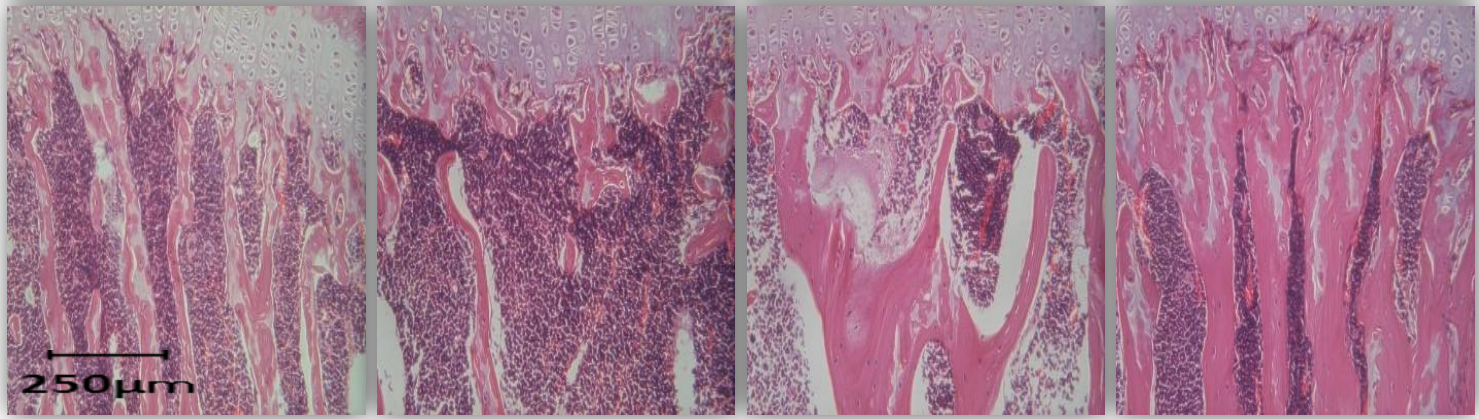
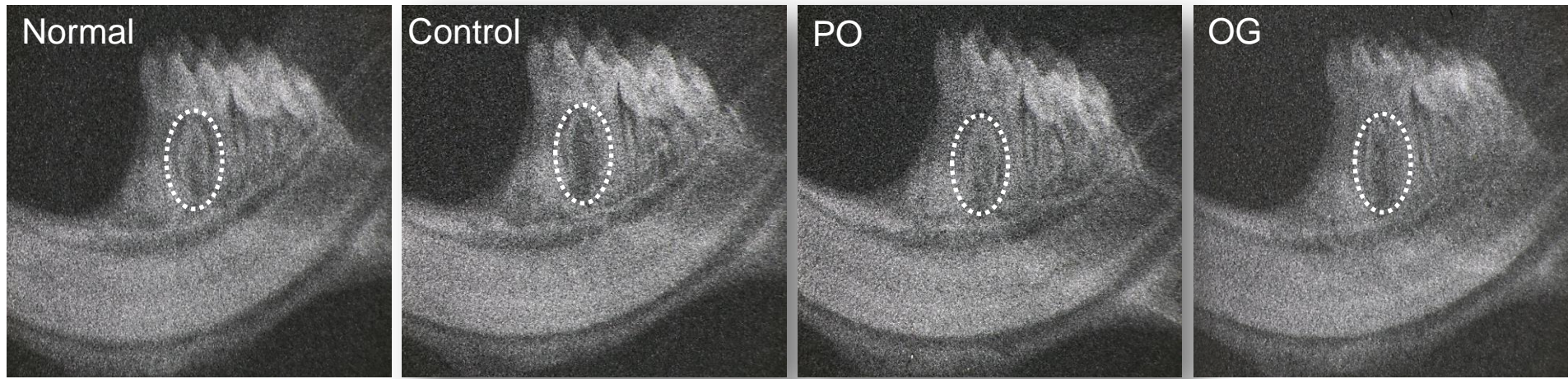


Figure 6

(a)



(b)

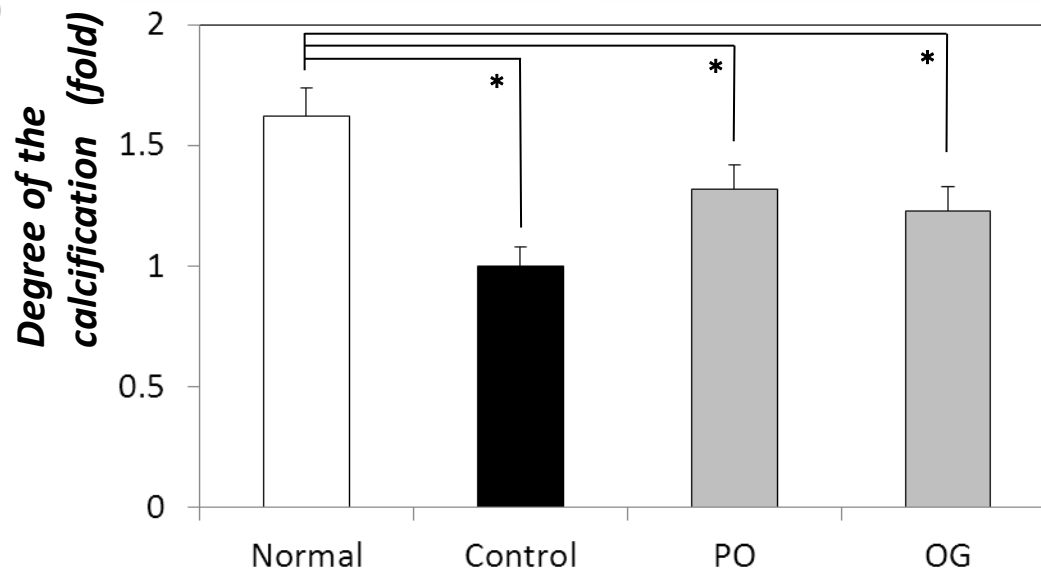


Figure 7

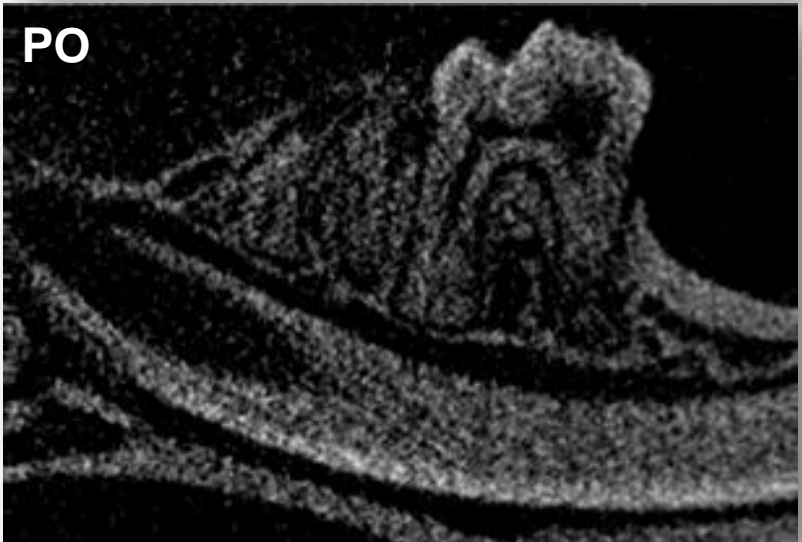
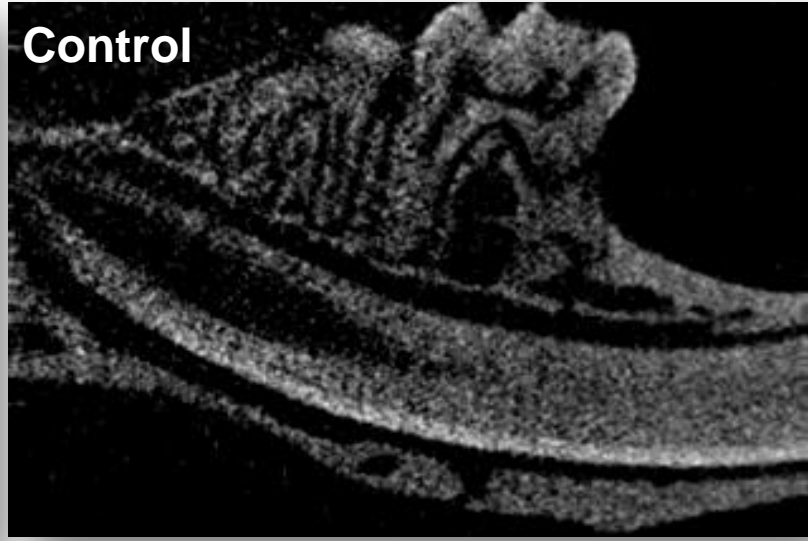
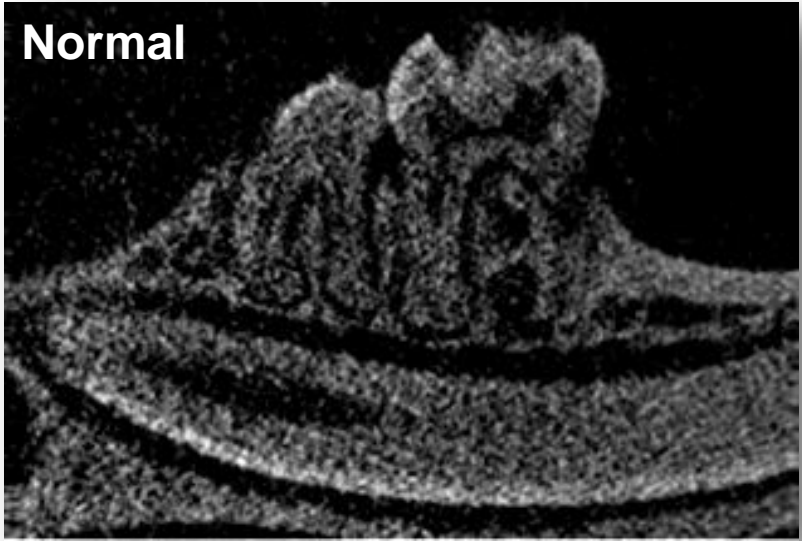


Figure 8

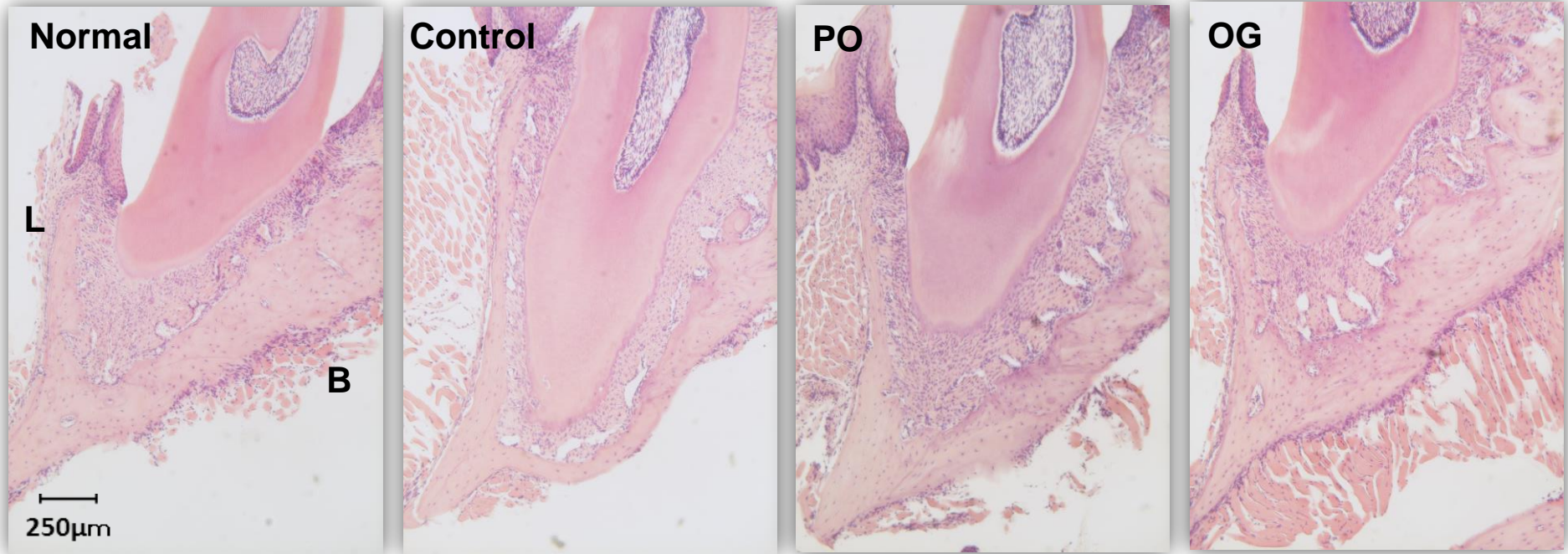


Figure 9

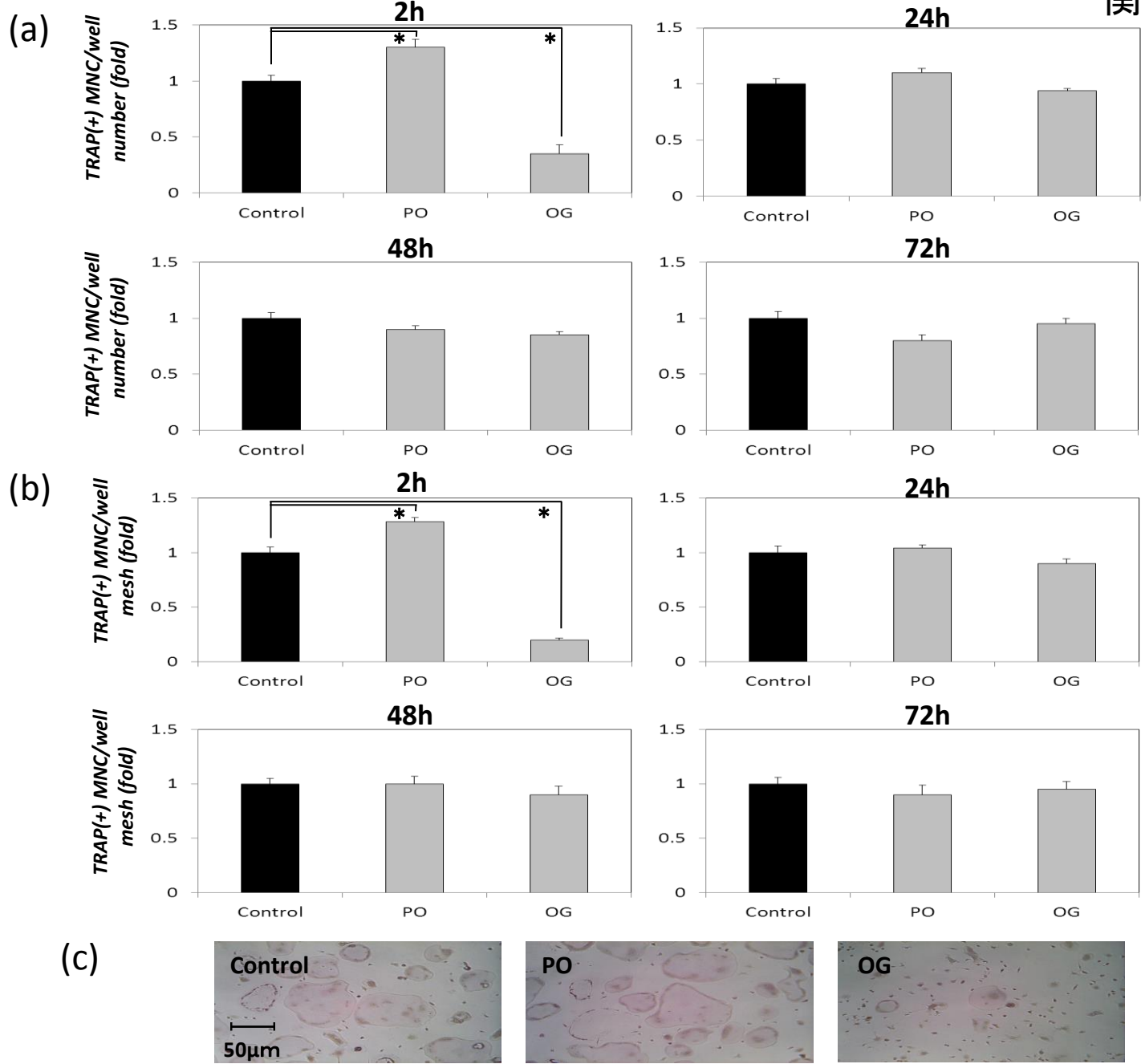


Figure 10

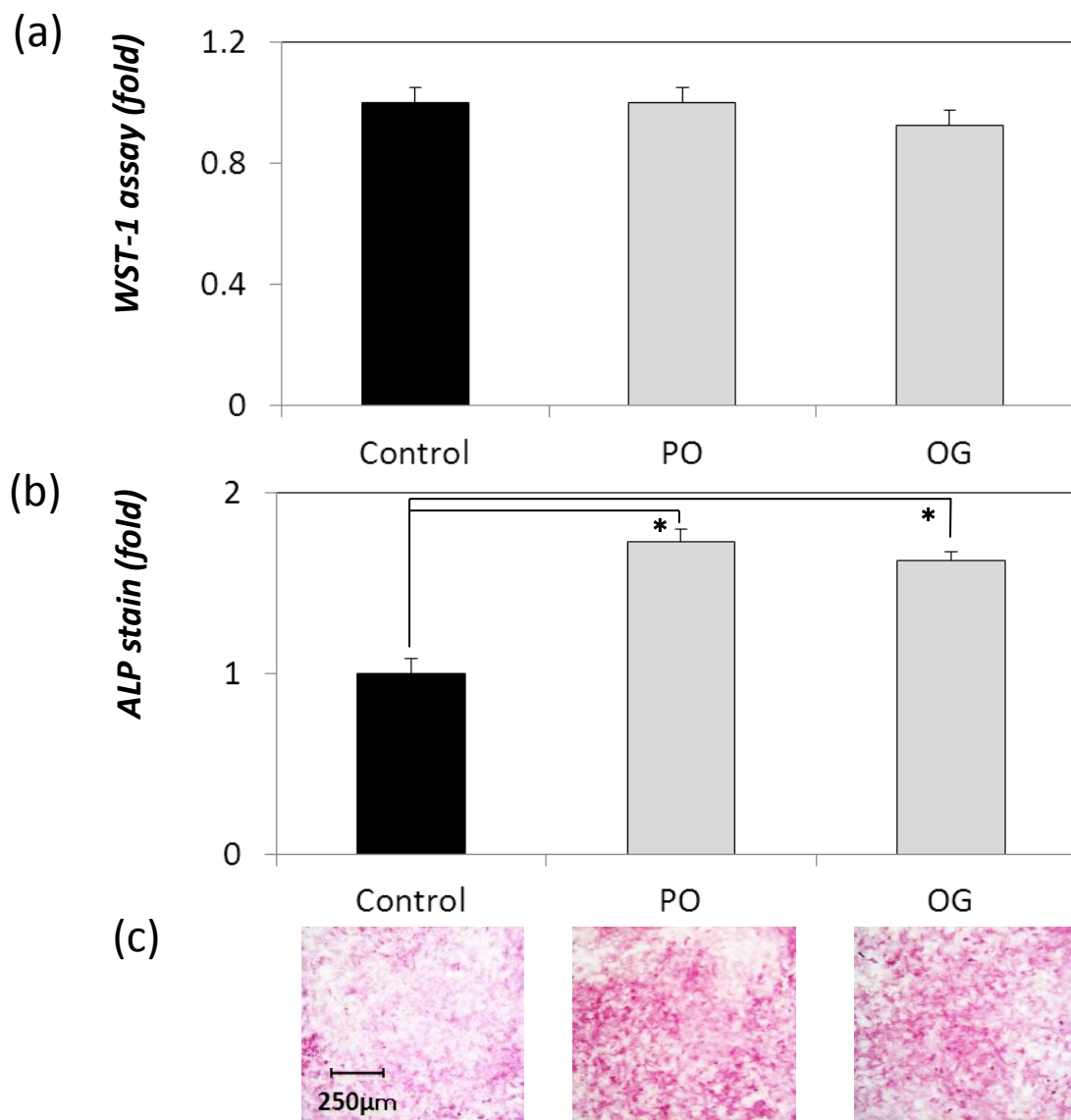


Figure 11

