

日光老化モデルにおける
コラーゲン分解産物プロリルヒドロキシプロリンの効果
— 線維芽細胞に対する保護効果からの検討 —

森本 紗貴子^{*1} 西田 昌司^{*2}

The Protective Effect of Prolyl-hydroxyproline, a Degradation Product of Collagen,
on Epidermal Fibroblasts in a Photoaging Model of Skin

MORIMOTO Sakiko^{*1} NISHIDA Masashi^{*2}

*1 神戸女学院大学大学院 人間科学研究科 修了生

*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

連絡先：西田昌司 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

線維芽細胞と細胞外基質からなる真皮組織は、皮膚の構造と機能を維持している。コラーゲンは細胞外基質に最も豊富に存在する蛋白質で、細胞表面に在るコラーゲンの受容体であるインテグリンと結合し、真皮の線維芽細胞を活性化する。しかし、真皮のコラーゲン量は加齢とともに減少し、シワやたるみのような皮膚の構造と機能の破壊をもたらす。老化した真皮に、経皮的、経口的にコラーゲンを補うことは、分子の大きさのために不可能であるが、コラーゲン由来のジペプチドで、食後に血中に出現して皮膚に移行するプロリルヒドロキシプロリン (PHP) が同様に線維芽細胞を活性化し、老化した皮膚を健康な状態に保つのではないかと考えた。

マウス線維芽細胞 (3T6) に過酸化水素 (0.5mM) を負荷して日光老化を模擬すると、ミトコンドリアの好氣的代謝と膜電位が低下するとともに、細胞増殖が減少し、アポトーシスによる細胞死が増加した。このモデルにおいて、PHP (0~2mM) は、ミトコンドリアの代謝能と細胞増殖能には変化を与えなかったが、用量依存性に膜電位を増加し、細胞死を減少させた。PHP と同じくコラーゲン中に存在するジペプチドのグリシルプロリンは、過酸化水素暴露による 3T6 障害を変化させなかった。これらの結果は、PHP がインテグリンと立体特的に結合してミトコンドリアを部分的に活性化することにより、真皮の構造と機能を改善し、皮膚の光老化の代替治療に有効であることを示唆している。

キーワード：日光老化、線維芽細胞、コラーゲン、プロリルヒドロキシプロリン、ミトコンドリア、アポトーシス

Summary

Epidermal tissue, which consists of fibroblasts and extracellular matrix, supports skin structure and maintains its functions. Collagen is the most abundant protein in extracellular matrix, and activates fibroblasts in epidermis by binding with integrins, cell surface receptors of collagen. However, the amount of collagen decreases upon aging, resulting in the degradation of skin structure and functions such as wrinkles and the slack of skin. It is difficult to supplement collagen directly to aged epidermis, because the size of collagen is large to deliver orally or percutaneously. We hypothesized that a collagen-derived dipeptide, prolyl-hydroxyproline (PHP), which appears in blood stream after digestion and transfers to epidermis, could activate fibroblasts and maintain aged skin in healthy status.

After exposure to hydrogen peroxide (0.5mM) to mimic photoaging, mouse fibroblast cells (3T6) showed decrease in mitochondrial aerobic metabolism and membrane potential together with reduced cellular proliferation and increased cell death by apoptosis. In this model, PHP (0~2mM) increased mitochondrial membrane potential and decreased apoptotic cell death dose-dependently, although it showed no significant effects on mitochondrial metabolism and cellular proliferation. Glycyl-proline, a dipeptide also seen in collagen, did not alter 3T6 damages due to the exposure to hydrogen peroxide. These results suggest that PHP improve epidermal structure and functions via the stereospecific binding to integrins and the partial activation of mitochondria, and is useful for the substitution therapy of skin photoaging.

Keywords: photoaging, fibroblast, collagen, prolyl-hydroxyproline, mitochondria, apoptosis

1 背景

1.1 皮膚の構造と機能

皮膚は最大の面積を持つ臓器であり、人間の内部と外界とを隔てる位置に存在することから、人体を保護し恒常性を保つ様々な機能を持つ。第一に、皮膚は外界からの有害物質や病原菌・ウイルスなどの侵入を防ぐ。第二に、外部からの衝撃など物理的障害から身体を保護する働きを持つ。第三に、外界の温度変化や体内の熱産生に応じて体温を調節する機能も有している。第四に、身体の内側から水分やタンパク質などが喪失するのを防ぐ^{1),2)}。

効率よくこれらの働きをなすために、皮膚は表皮と真皮から出来ており、それぞれ独自の構造と機能を持っている。表皮の大部分を占める角化細胞は上皮組織に属し、細胞間の強い接着によってシートを形成して、外界とのバリアーとなっている。また、盛んに細胞分裂を行い、最深部の基底層から有棘層、顆粒層、最表部の角質層に至る四層構造を持つ重層扁平上皮組織となり、より強固なバリアーを形成している³⁾。一方、真皮には血管が豊富に存在する。血管を持たない表皮に栄養を補給してバリアーを支えたとともに、血流量の増減によって熱の放散を調節し、体温調節機能を担っている^{2),4)}。

また、真皮の線維芽細胞は、細胞外基質と呼ばれる高分子化合物を産生し、放出している。このような血管と細胞外基質に富んだ組織は結合組織と呼ばれ、外部からの張力に抗して強度を与えたり、細胞成分のまわりを囲む線維性のネットワークを形成したりして、組織を支える骨格や細胞の足場となって臓器を維持する働きをしている⁵⁾。

1.2 コラーゲンの構造と機能

細胞外基質の中で最も豊富に存在するコラーゲンは、約1000個のアミノ酸が連なったコラーゲンペプチドが基本構造となっており、G(グリシン)-X-Yという特徴的な繰り返し構造を持つアミノ酸配列で出来ている。Xにはプロリン、Yにはヒドロキシプロリンが相当することが多い。コラーゲンは、コラーゲンペプチドが三本より合わさったプロコラーゲンとして細胞外に放出され、最終的に高度に重合したコラーゲン原線維、コラーゲン線維となって細胞外基質を作る⁶⁾。

細胞外基質としてのコラーゲンは、細胞外の骨格として組織の枠組みを決め、その中に線維芽細胞を保つことで、真皮の構造を決定し、皮膚を支持する役割を果たすことが知られている⁵⁾。しかし近年、コラーゲンは細胞を入れる容器となるだけでなく、線維芽細胞の表面に存在する膜貫通タンパク質のインテグリンに結合することで、細胞活性化因子として働くことも明らかとなってきた。コラーゲンがインテグリンに結合すると、細胞内では様々な情報伝達系が活性化される。特に、ミトコンドリアの構造や機能の活性化に重要な役割を果たしており、好気的なエネルギー産生を活性化させることによってタンパク質合成や細胞分裂能を亢進し、正常な膜構造を保つことによってアポトーシスによる細胞死を防ぐ可能性が示唆されている⁷⁾。

1.3 コラーゲン減少と皮膚老化

一方、真皮が老化すると、皮膚の強度や弾力、張りが失われてシワやたるみが生じるとともに、表皮を支持できなくなることから生体防御にも様々な障害が生じる。真皮の老化では、組織の骨格となるコラーゲン線維が減少して結合組織の構造が保てなくなるとともに、コラーゲンに囲まれた線維芽細胞が減少している。

このような真皮の老化の原因としては、加齢に伴うコラーゲン線維産生能の低下と日光に含まれる紫外線による障害の蓄積（日光老化）の二つがあげられる。コラーゲン線維の減少は骨格としての細胞外基質の不足を招くとともに、細胞活性化因子としてのコラーゲンが不足することから、紫外線による線維芽細胞の障害に対する抵抗性が低下し、増殖能の抑制や細胞死の増加をきたすこととなる¹⁾。

紫外線による線維芽細胞の機能異常は、紫外線によって発生する活性酸素がミトコンドリアを障害することによって生じると考えられる。ミトコンドリアのエネルギー産生が低下すると、最もエネルギーが必要な細胞分裂やタンパク質合成の抑制が起こる。またミトコンドリアは細胞死の調節でも重要な役割を担っており、ミトコンドリア膜の電位が低下するとアポトーシスが促進され、細胞死が増加する⁸⁾。従って、細胞外基質のコラーゲンはインテグリンとの結合を介してミトコンドリアを活性化することにより、真皮の老化を防いでいる可能性がある。

1.4 コラーゲンの補充

減少したコラーゲンを補充してこれらの病態を予防・治療する試みがなされているが、コラーゲン線維は分子量が大きく、皮膚へ塗布してもバリアー機能によって浸透できない。また、経口摂取をしても消化管で分解されてしまうため、線維のコラーゲンを直接、臓器に補充するのは困難である。

そこで、近年、注目されているのがコラーゲン分解産物のプロリルヒドロキシプロリン（PHP）である。PHPはコラーゲンに特有のアミノ酸配列 G-X-Y の X、Y に多いプロリンとヒドロキシプロリンが結合したジペプチドであること、さらにヒドロキシプロリンは他のタンパク質と比較してコラーゲンに大量に含まれるアミノ酸であることから、PHPは摂取したコラーゲンが分解され吸収された特異的なジペプチドと考えられる。

さらに、プロリンやヒドロキシプロリンと結合したペプチドは消化酵素に対して高い抵抗性を示すことが知られており、アミノ酸まで分解されず、ジペプチドのまま小腸細胞へ取り込まれる。そのため、PHPの血液濃度が高く、組織にも移行しやすいと考えられる^{9),10)}。実際、PHPは、線維芽細胞のヒアルロン酸合成能を促進したり、STAT3などの情報伝達系を活性化することが確認されている¹¹⁾。

このように、PHPは食事由来のコラーゲンの分解により生成すること、血液中に吸収されて全身に分布すること、さらに細胞の活性化を起こすことから、皮膚老化の改善には、細胞外基質の骨格としてのコラーゲン線維を補わなくても、PHPによる線維芽細胞の活性化が有効なのではないかと考えられる。

2 目的

本研究では、真皮に到達可能なコラーゲン由来の PHP が、コラーゲンと同様にインテグリンとの結合を介して細胞内シグナル伝達系を活性化し、皮膚老化を改善できるか否かを検討した。

そのために、1) 線維芽細胞の過酸化水素負荷による日光老化モデルを作製し、2) 細胞老化のメカニズムとしてのミトコンドリア機能障害との関連から、3) 細胞増殖と細胞死に対する PHP の効果を検証した。

3 方法

3.1 日光老化モデルの作製

環境要因による皮膚老化の主な原因として、日光に含まれる紫外線があげられる。紫外線は生体に到達すると、細胞内外の水と反応して活性酸素を産生するため、本研究では活性酸素を用いて日光老化モデルを作製した。真皮線維芽細胞としてはマウス胎児由来線維芽細胞 3T6 (JCRB 細胞バンク)、活性酸素としては過酸化水素水 (和光純薬工業) を用い、DMEM で 0~0.5mM に希釈して培養細胞に添加した。

3.2 ミトコンドリア機能の検討

好氣的代謝能の測定には WST-1 法を用いた。WST-1 (TaKaRa) はミトコンドリア呼吸鎖に存在する酵素と反応し、ホルマザン色素に変換される試薬であるため、ミトコンドリアの好氣的代謝活性を測定できる。3T6 を 1×10^4 個/ml で播種し、24時間培養した後に過酸化水素 (0~0.5mM) を添加した。72時間反応させた後に $10 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ WST-1 試薬を添加し、30分反応させ、450nm の吸光度を測定した。

ミトコンドリア膜電位の測定には、ミトコンドリアの膜電位に応じて赤色蛍光を発生する JC-1 (Cayman) を用いた。3T6 を 5×10^5 個/ml で播種し、24時間後に過酸化水素 (0.5mM) を加えた。過酸化水素負荷の 0~30分に JC-1 を DMEM で溶解後、培養細胞系に $10 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加し、蛍光プレートリーダーを用いて、励起波長 544nm、蛍光波長 590nm でミトコンドリア膜電位の変化を定量した。

3.3 細胞増殖能の検討

細胞増殖能は、細胞数を DNA 結合性の蛍光色素 Hoechst33342 (同仁化学研究所) を用いて測定することによって検討した。3T6 を 1×10^4 個/ml、 5×10^4 個/ml、 1×10^5 個/ml で播種して 24時間培養した後、過酸化水素 (0mM、0.1mM、0.5mM) を添加した。72時間反応させた後に Hoechst33342 を培養液に添加し、蛍光顕微鏡 (EVOS FL Auto : Life technologies) を用いて励起波長 355nm、蛍光波長 465nm で観察し、可視化した核を計測して細胞数を定量した。

3.4 細胞死の検討

細胞死は、アポトーシスによる細胞死を DNA 断片化によって測定することによって検討した。3T6 を 1×10^5 個/ml で播種し、24 時間後に過酸化水素 (0~10 mM) を添加した。72 時間反応させた後に、ヘキスト溶液を添加して細胞核の形態学的変化を観察した。

DNA 断片化は、3T6 を 5×10^5 個/ml で播種した細胞から Apoptosis Ladder kit (TaKaRa) を用いて培養細胞から断片化した DNA を抽出した後、DNA に特異的に結合する SYBR Green (TaKaRa) を結合させ、蛍光プレートリーダー (励起波長 485 nm、蛍光波長 538 nm) を用いて定量した。

3.5 PHP の添加

PHP (Bachem) を DMEM で希釈し、0~2000 μ M の濃度で培養細胞系に添加し、24 時間培養した。また、対照として、コラーゲンに含まれるジペプチドのグリシルプロリン (GP、株式会社ペプチド研究所) も同様に調整して使用した。

4 結果

4.1 好氣的代謝の検討

3T6 を 1×10^4 個/ml で播種し、24 時間培養した後に過酸化水素 (0~0.5 mM) を添加した。72 時間反応させた後に 10μ l/well ずつ添加し、30 分反応させ、450 nm の吸光度を測定した。その結果、ミトコンドリアの好氣的代謝能を示す吸光度を、過酸化水素 0 mM と比較して、過酸化水素の用量依存性に減少させた。(図 1)

また、3T6 播種時に PHP (0~2000 μ M) を添加し、上記と同様の方法で過酸化水素を負荷し、好氣的代謝能を測定した。その結果、過酸化水素濃度の依存性に吸光度が減少したが、PHP (20 μ M~2000 μ M) の添加は吸光度の減少に変化を及ぼさなかった。(図 2)

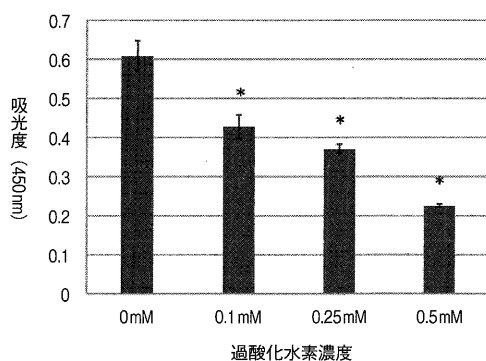


図 1 3T6 のエネルギー産生におよぼす H_2O_2 の効果
* : $p < 0.05$ vs 0mM

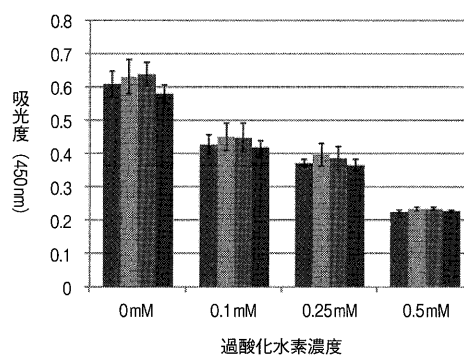


図 2 3T6 のエネルギー産生におよぼす PHP の効果
■ : 0 μ M ■ : 20 μ M
■ : 200 μ M ■ : 2000 μ M

4.2 細胞数の検討

3T6 を 1×10^4 個/ml、 5×10^4 個/ml、 1×10^5 個/ml で播種して24時間培養した後、過酸化水素 (0mM、0.1mM、0.5mM) を添加した。72時間反応させた後にヘキスト溶液を加え、細胞数を測定した。その結果、過酸化水素は、どの播種濃度においても、過酸化水素 0mM と比較して用量依存性に細胞数を減少させた。(図3)

また、PHP の効果の検討として、細胞播種時に PHP (0~2000 μ M) を添加し、同様の方法で過酸化水素を負荷して細胞数を測定した。その結果、細胞播種濃度に依存して細胞数が増加した。しかし PHP は、0 μ M~2000 μ M の添加では細胞数の減少を変化させなかった。(図4)

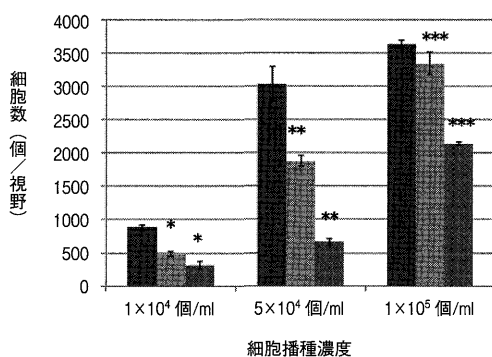


図3 3T6の細胞数におよぼす H₂O₂ の効果

- : 0mM ▨ : 0.1mM ■ : 0.5mM
- * : p < 0.05 vs 0mM (1×10^4 個/ml)
- ** : p < 0.05 vs 0mM (5×10^4 個/ml)
- *** : p < 0.05 vs 0mM (1×10^5 個/ml)

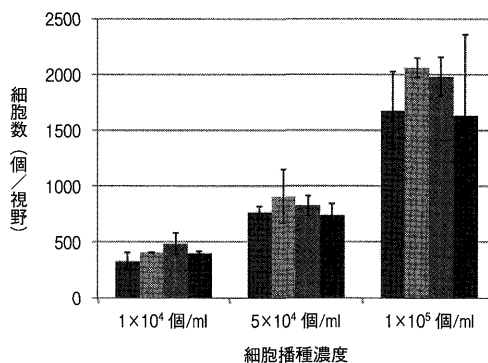


図4 3T6の細胞数におよぼす PHP の効果

- : 0 μ M ▨ : 200 μ M
- : 2000 μ M ■ : 2000 μ M

4.3 ミトコンドリア膜電位の検討

細胞を 5×10^5 個/ml で播種し、24時間後に過酸化水素を添加して JC-1 試薬を用いてミトコンドリア膜電位の測定を行った。その結果、過酸化水素は、無添加群と比較して、時間依存性にミトコンドリアの膜電位を低下させた。(図5)

しかし、同様に PHP の効果の検討を行ったところ、PHP は用量依存性にミトコンドリア膜電位が低下する傾向にあり、特に、2000 μ M では有意な低下が見られた。さらに、GP を用いて同様の検討をしたところ、GP は膜電位の低下を抑制しなかった。(図6)

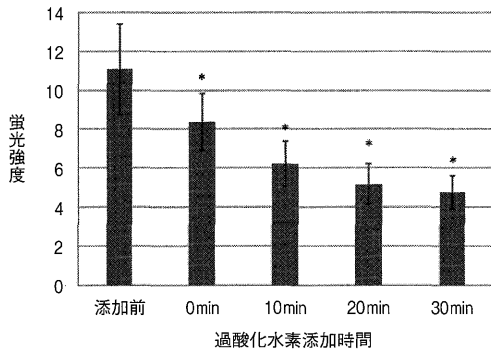


図5 3T6のミトコンドリア膜電位におよぼす H₂O₂ の効果
* : p < 0.05 vs 添加前
励起波長 : 544 nm、蛍光波長 : 590 nm

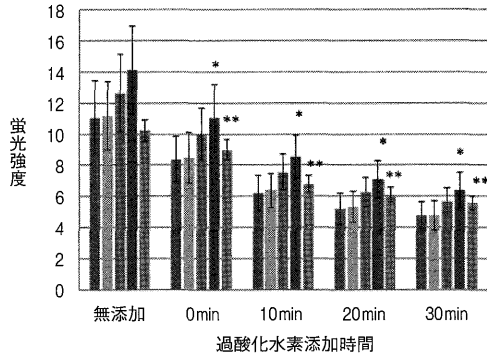


図6 3T6のミトコンドリア膜電位におよぼす PHP の効果
■ : 0 μM ■ : 20 μM ■ : 200 μM
■ : 2000 μM ■ : GP
* : p < 0.05 vs 0 μM、** : n.s. vs 0 μM
励起波長 : 544 nm、蛍光波長 : 590 nm

4.4 細胞死の検討

3T6を播種し、24時間後に過酸化水素 (0~10mM) を添加した。72時間反応させた後に、ヘキスト溶液を添加して細胞核を観察した。その結果、過酸化水素を添加しない細胞では、レース状に広がった正常な核形状 (図 7 a) を示したが、過酸化水素負荷では核の形態学的変化がみられるようになった。(図 7 b) また、形態の変化は曝露濃度依存性に増加した。

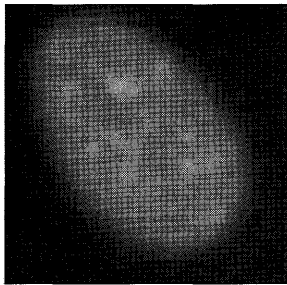


図 7a 3T6 の核形態 (H₂O₂ 0mM)

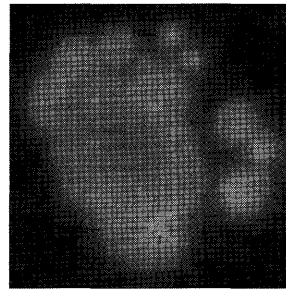


図 7b 3T6 の核形態 (H₂O₂ 0.5mM)

PHP の効果の検討のために、細胞を播種し、同時に PHP 0~2000 μM と GP2000 μM を添加した後、24時間後、過酸化水素0.5mM と PHP を再び添加し、72時間後に断片化された DNA を抽出し、SYBR Green を用いて断片化 DNA 量を定量した。その結果、過酸化水素無添加群と比較して、PHP は濃度依存的に蛍光強度を減少させる傾向にあり、特に2000 μM では有意な減少が見られた。しかし、同様に GP で検討を行ったところ、蛍光強度の減少は見られなかった。(図 8)

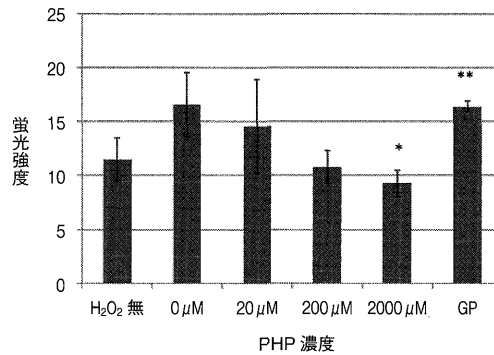


図8 3T6のDNA断片化におよぼすPHPの効果

* : $p < 0.05$ vs $0\mu\text{M}$ 、** : $p < \text{n.s.}$ vs $0\mu\text{M}$

励起波長 : 485nm、蛍光波長 : 538nm

5 考察

5.1 日光老化モデルの作製

従来、過酸化水素は様々な細胞モデルにおいて、酸化障害を与えるストレスラーとして用いられており、紫外線の代替としても用いられている^{12),13)}。通常0.1mM から10mM の範囲で細胞での実験に用いられており、本実験で細胞傷害に用いた0.1mM から0.5mM の過酸化水素は妥当な範囲と考えられる。この範囲内の過酸化水素負荷によって、線維芽細胞の細胞増殖能が低下し細胞死が促進したことから、日光老化モデルが作製できたと考えられる。

5.2 日光老化の障害機構

日光老化では、酸化ストレスによって細胞を構成する高分子が障害され、核酸やタンパク質の変性などが起こる¹⁴⁾。ミトコンドリアも細胞の存在にとって不可欠な作用を担っており、その障害は細胞にとって重大な結果をもたらす。ミトコンドリアには細胞死を促進させるシトクロム c が存在し、通常はミトコンドリア膜電位が保たれることでミトコンドリア内に留まっている。しかし、過酸化水素負荷などの刺激によってミトコンドリア膜電位が低下することで、シトクロム c は放出され、アポトーシスが促進されてしまう⁸⁾。

今回の実験では、過酸化水素負荷がミトコンドリア機能としての好氣的代謝と膜電位に影響を与え、それぞれがエネルギーを最も必要とする細胞増殖とアポトーシスによる細胞死と関連していることが明らかとなった。従って、ミトコンドリアが、日光老化の標的となっていることが示唆される。

5.3 PHP の作用機構

今回の検討で、PHP は過酸化水素負荷によるミトコンドリアの膜電位低下とアポトーシスによる細胞死を抑制した。コラーゲンがインテグリンと結合して細胞を活性化することから、コラーゲンに特異的に存在する PHP もインテグリンと結合して作用を発揮すると考えられ

る。通常、受容体に対するアミノ酸の構造特異性はトリペプチドを中心に検討されている¹⁵⁾。従って、ジペプチドの PHP の特異性は低く、さらに PHP を含むトリペプチドの検索が必要とも考えられる。しかし、PHP と同等にコラーゲン中に存在し、G-X-Y 構造の中で PHP と隣接して存在すると考えられる GP が同様の効果を発揮しなかったことから、PHP はインテグリンと特異的に結合し、機能を発揮している可能性が高い。

5.4 インテグリンの作用機構

インテグリンが細胞外基質と結合すると、細胞内では接着斑キナーゼ (FAK) が活性化される。FAK の下流には ERK-MAPK 経路が存在し、活性化によって細胞増殖が起こる¹⁶⁾。今回の過酸化水素負荷モデルでは細胞増殖活性に効果を示さなかったが、PHP はコラーゲンゲル上での線維芽細胞の増殖を促進することが報告されている¹⁷⁾。また、インテグリンは PI3K-Akt 経路との協働も知られ、Akt はアポトーシスによる細胞生存の調節を行っている。

一方、インテグリンにはインサイド-アウトシグナル伝達とアウトサイド-インシグナル伝達の二つの作用様式があり、同一のインテグリンであっても環境やホルモンによる細胞の状態により活性化されるシグナル伝達が異なることが知られている^{18),19)}。過酸化水素による細胞増殖能の低下に PHP が影響を与えなかった原因として、細胞がインテグリンの活性化によって細胞増殖を始める環境になかったことが考えられる。

5.5 ミトコンドリアとインテグリンの関連

本実験で用いた日光老化モデルでは、ミトコンドリアが細胞の増殖や生存において重要な制御部位となっていた。またそれらの細胞機能と細胞外基質によるインテグリンの活性化とが、密接に関連していることも示された。しかし、従来、インテグリンとミトコンドリアを直接結ぶシグナル伝達系が存在することは示されていない。

細胞外基質とインテグリンの結合によって活性化される細胞内の因子として接着斑キナーゼ (FAK) があり²⁰⁾、様々な情報伝達系を活性化し、細胞の機能発現を仲介している。一方、FAK はインテグリンのみならず、成長因子やサイトカインなどの液性因子が受容体に結合することによっても活性化される。これらの経路による FAK の活性化は mTOR と呼ばれるキナーゼの活性化により、ミトコンドリア機能を制御することが知られている²¹⁾。また、生存シグナル伝達経路に存在する Akt はミトコンドリア膜電位を抑制する働きをもち、さらに mTOR を活性化することも確認されている。

このことから、インテグリンによる直接の mTOR 活性化は報告されていないが、FAK を介する情報のクロストークが存在する可能性があり、本実験で用いた PHP が mTOR を介してミトコンドリア機能を制御する可能性が示唆される。

以上のように、本研究で用いた日光老化モデルにおいて、コラーゲン分解産物の PHP は、構造特異的に線維芽細胞を活性化することにより、ミトコンドリア膜電位の低下とその結果引き起こされるアポトーシス経路の活性化を共に抑制したと考えられる。従って、コラーゲンの

代替として PHP を補充することにより、加齢による日光老化の促進を予防しうる可能性が示された。

参考文献

- 1) 市橋正光 (1999) 健康と紫外線のはなし 紫外線が皮膚がんを起こす. DHC, 46-54
- 2) エレイン N. マリーブ (2011) 人体の構造と機能 第3版. 医学書院, 114-118
- 3) 西川武二 (1994) 標準皮膚科学. 医学書院, 7-18
- 4) 清水宏 (2009) 新しい皮膚科学 第2版. 中山書店, 13-15
- 5) 藤本大三郎 (2012) コラーゲン物語. 東京化学同人, 49-54
- 6) 大崎茂芳 (2007) コラーゲンの話. 中公新書, 21-38
- 7) 森亘、桶田理喜 (2005) ロビンス基礎病理. 廣川書店, 82-84
- 8) 内海耕鎧、井上正康 (2009) 新ミトコンドリア学. 共立出版, 242-245, 278-279
- 9) 小山洋一 (2010) 天然素材コラーゲンの機能性. 皮革科学, 56 : 71-79
- 10) Tomoaki Kawaguchi et al. (2012) Distribution of Prolylhydroxyproline and Its Metabolites after Oral Administration in Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 35: 422-427
- 11) Hiroki Ohara et al. (2010) Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J. Dermatol.*, 37: 330-338
- 12) Anne O. Oyewole et al. (2014) Comparing the effects of mitochondrial targeted and localized antioxidants with cellular antioxidants in human skin cells exposed to UVA and hydrogen peroxide. *FASEB. J.*, 28: 485-494
- 13) Shuwei Ma et al. (2014) Neuroprotective Effect of Ginkgolide K against H₂O₂-Induced PC12 Cell Cytotoxicity by Ameliorating Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Biol. Pharm. Bull.*, 37: 217-225
- 14) 西岡一 (2003) 活性酸素に負けない本. 講談社, 12-13
- 15) Michael V. Agrez (1991) Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblast: implications for wound healing. *Mol. Biol. Cell.*, 2: 1035-1044
- 16) 辻本賀英、三浦正幸 (2001) 実験医学 アポトーシス研究の新たな挑戦—シグナル伝達機構の解明と期待される医学応用—. 羊土社, 46-51
- 17) Yasutaka Shigemura et al. (2009) 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.*, 57: 444-449
- 18) Malgorzata Barczyk et al. (2010) Integrin. *Cell. Tissue. Res.*, 339: 269-280
- 19) 君羅好史、真野博 (2014) コラーゲンペプチドの食品機能性. 日本食生活学会誌, 25 : 5-8
- 20) 顧建国 (2008) N-結合型糖鎖による細胞接着分子インテグリンの機能調節. 東北薬科大学研究誌, 55 : 1-7
- 21) Arvind Ramanathan et al. (2009) Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106: 22229-22232

(原稿受理日 2016年2月19日)