

## コラーゲン由来ジペプチドが ATDC5 細胞の軟骨分化と糖鎖合成に及ぼす影響

神山 伸, 野口 悠希, 中嶋 祐里, 白井 麻由,  
永田 穂乃花, 塩沢 浩太, 曾根 英行

(新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科\*)

(受付 2017 年 8 月 31 日, 受理 2017 年 9 月 29 日)

### The effects of collagen dipeptides on chondrogenesis of ATDC5 cells and expression of genes involved in the synthesis of extracellular matrix.

Shin KAMIYAMA, Yuki NOGUCHI, Yuri NAKAJIMA, Mayu SHIRAI, Honoka NAGATA,

Kota SHIOZAWA and Hideyuki SONE

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

#### Summary

Collagen dipeptides are known to exert various biological activities, including chondroprotective effects in articular cartilage. In the present study, we investigated the effects of two typical collagen dipeptides, namely prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp) and hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly), on the differentiation of ATDC5 cells and the expression of genes involved in the synthesis of extracellular matrix. The content of collagen fibers in the early stage of chondrogenesis of ATDC5 cells was significantly increased by the treatment with 1 mM Pro-Hyp. The Col2a1 gene expression was also increased in the cells treated with 1 mM Pro-Hyp, while the treatment with Hyp-Gly significantly decreased the Col10a1 gene expression. The expressions of Aggrecan, Chsy1, and Chpf genes in the cells were also significantly increased by the treatment with 1 mM Pro-Hyp. Further, either treatment with Pro-Hyp or Hyp-Gly increased the expression of Sox9 gene, which is an early chondrogenic marker. These results indicate that Pro-Hyp and Hyp-Gly increase the expression of type II collagen and chondroitin sulfate proteoglycan and promote early chondrogenesis in ATDC5 cells.

関節軟骨のおよそ 98% は軟骨基質（Ⅱ型コラーゲン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などで構成される細胞外マトリックス）が占めており、2% の軟骨細胞がそれを産生している。軟骨基質の主要コラーゲンはⅡ型コラーゲンであり、コラーゲン線維がネットワークを形成して基本骨格を形成する傍ら、保水性の高いプロテオグリカンが線維間に付着して水分子を保持することにより、軟骨に独特の硝子様形態と弾力性がもたらされる。

軟骨形成の過程は大きく二段階にわけられ、未分化細胞が軟骨細胞に分化して増殖を停止するまでが初期軟骨分化であり、細胞体の肥大化を経て、軟骨基質の石灰化に至るまでが後期軟骨分化と呼ばれる。初期軟骨分化においては、中胚葉由来の未分化の間葉系細胞が軟骨原基を形成し、Ⅱ型コラーゲンやコンドロイチン硫酸（アグリカン）を含む軟骨基質を形成しながら増殖することにより、その中心部が軟骨細胞へ分化する。一方、後期軟骨分化ではⅡ型コラーゲンの発現が減少するとともにⅩ型コラーゲンの発

現が増加し、軟骨基質が石灰化され肥大軟骨細胞へと成熟する。正常な関節軟骨は静止軟骨細胞としてⅡ型コラーゲンや細胞外マトリックスを発現しているが、変形性関節症では軟骨基質の石灰化によって内軟骨性骨化が進行し、骨棘が形成されることとなる<sup>1)</sup>。

変形性関節症やリウマチ関節炎などの関節症状の緩和を目的に、コラーゲン及びその酵素加水分解物（コラーゲンペプチド）が多く用いられてきた。コラーゲン分子は生体内では三重らせん構造と架橋による線維を形成しており、巨大分子であるため未変性状態では水に難溶であり消化吸収もされにくい。これを熱変性させたゼラチンは部分的な加水分解を受けるため多様な分子量を持ち、熱水に溶解して冷えるとゲル化する性質を持つ。このゼラチンを酵素分解して数百～数千の分子量にしたものがコラーゲンペプチドであり、冷水にも溶ける性質を持つため、近年の健康食品市場ではコラーゲンペプチドが多く用いられている。関節症状に対するコラーゲン摂取の有効性には疑問点も出

\*所在地：新潟県新潟市東区海老ヶ瀬471（〒950-8680）

されているが、近年、コラーゲン由来ペプチドに種々の生理作用があることが示され、その機能性が再び注目されている。コラーゲンのアミノ酸組成は、グリシン (Gly) が約 1/3 であり、その他にプロリン (Pro)、アラニン (Ala)、ヒドロキシプロリン (Hyp) などが多く含まれる。Hyp はコラーゲンに特徴的に含まれるアミノ酸であり、生体内で Pro が水酸化酵素によって水酸化されることにより生成する。コラーゲンの三重らせん領域では、Gly-X-Y (X, Y: 任意のアミノ酸) のトリプレットの繰り返し構造が多く見られ、X の位置には Pro が、Y の位置には Hyp が来ることが多いため、Gly-Pro-Hyp の配列が多く含まれる。摂取されたコラーゲンペプチドは消化吸収を受けるが、その一部はオリゴペプチドのまま血液中に移行することが報告されている<sup>2,3)</sup>。特に、コラーゲン配列中に高い頻度でみられる Pro-Hyp や 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<sup>4)</sup>、骨芽細胞の分化促進<sup>5)</sup>、軟骨生産細胞の増殖促進<sup>6)</sup>、ヒアルロン酸およびグリコサミノグリカンの合成増加<sup>7)</sup> 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ことが報告されている。

軟骨の分化モデルとしては初代細胞培養を含む種々の培養系が用いられてきたが、肥大軟骨細胞まで分化させることは困難であり、初期軟骨分化から後期軟骨分化までのそれぞれの段階を再現できないなどの問題があった。近年、マウス胎生期がん (embryonal carcinoma) 由来細胞のクローン化細胞株である ATDC5 細胞が樹立され、軟骨分化の全分化段階を解析できるようになった<sup>8)</sup>。ATDC5 細胞は通常状態では線維芽細胞の形態を示すが、インスリン存在下で培養すると軟骨基質を構成する細胞外マトリックスの発現が上昇して初期軟骨細胞へと分化し、さらに培養を続けると後期軟骨分化をへて軟骨基質の石灰化が生じ、肥大軟骨細胞へと分化する<sup>9)</sup>。この ATDC5 を用いて Nakatani らは、Pro-Hyp が分化に関連する遺伝子の発現を変化させて軟骨細胞の石灰化を阻害するとともに、Hyp-Gly が破骨細胞に作用して骨吸収を抑制することを報告している<sup>6)</sup>。本研究では、これらの代表的なコラーゲン由来ジペプチドが、軟骨細胞の初期分化と細胞外マトリッ

クスを構成する糖鎖の発現にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的として行った。

## 実験方法

### 細胞培養

ATDC5 細胞は RIKEN 細胞バンクより分譲されたものを用いた。細胞は DMEM/Ham's F12 1:1 培地 (和光純薬工業) にウシ胎児血清 (FBS, オーストラリア産, Biowest 社) を 5% 添加した培地を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、3 日あるいは 4 日に一度継代培養した。軟骨細胞への分化誘導は、24well プレートに細胞を播種してコンフルエントになるまで培養した後、ITS (Insulin, Transferrin and Selenium, Thermo Fisher Scientific 社) を 20 µg/ml インスリンとなるように添加して行った。コラーゲンペプチドによる刺激は、H-Pro-Hyp-OH あるいは H-Hyp-Gly-OH (いずれも Bachem AG 社製) を 0.5 mM あるいは 1.0 mM の濃度で添加し、2~3 日毎にそれぞれ培地交換を行いながら 7 日間培養した。

### Real-time PCR による遺伝子発現測定

遺伝子の発現状態は SYBR 法による real-time PCR を用いて解析した。増幅に利用したプライマーはそれぞれの 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 (Table 1)。発現補正用のコントロール遺伝子としては  $\beta$ -actin 遺伝子を用いた。細胞より抽出した RNA は、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°C 30 秒の熱変性のあと、(95°C 5 秒 → 60°C 30 秒) の 40 サイクル反応で行い、その後 60°C から 95°C の融解曲線測定より反応産物の特異性を解析した。

**Table 1** Primers used in this study.

Gene	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Accession number
$\beta$ -actin	cttgggtatggaatcctgtgg	gtacttgcgctcaggaggag	NM_007393
Sox9	aggaagctggcagaccagta	gtccgtcttcaccgacttc	NM_011448
Runx2	gccgggaatgatgagaacta	ggaccgtccactgtcacttt	NM_001146038
Col2a1	ggctcccagaacatcaccta	gcccaactaccagtgtgtt	NM_031163
Col10a1	atgccctgtctgcttttac	tgagtccctttcacatgcac	NM_009925
Aggrecan	ggtcactgttaccgccactt	gccagatcatcaccacacag	NM_007424
Chpf	caacgacatcgtcagtgtc	aaaagctttgtgcagctggt	NM_001001566
Chs1	caagtgtctccgggaaatgt	ctggtacggtgggtttttgt	NM_001081163
Ext1	agcacaagattctcgtgt	cacttcggagaatggcaact	NM_010162
Ext2	atccatagcagccatctcc	accagcagcttgacagact	NM_010163

## コラーゲン量の測定

コラーゲン量の測定は中林ら<sup>10)</sup>の方法を改変したシリウスレッド染色を用いて行った。培養後の細胞を蒸留水で洗浄したあと0.1%シリウスレッド飽和ピクリン酸溶液を加え一晩染色し、蒸留水で洗浄した後0.01 M HClを加えて15分間脱色させた。脱色液を除き細胞を乾燥させたあと、0.1 M NaOH無水メタノール等量混合液を加え6時間静置して色素を溶出させた。溶出液の吸光度をマイクロプレートリーダー (Vmax, Molecular Devices 製) を用いて490 nm 波長 (参照波長 650 nm) で測定した。

## プロテオグリカン量の測定

プロテオグリカン量の測定は、硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖を染色するアルシャンプルー染色<sup>11)</sup>を用いて行った。培養後の細胞を蒸留水で洗浄したあと0.5%アルシャンプルー 8GX 1 M 塩酸溶液を加えて一晩染色した。染色溶液を除いて蒸留水で洗浄した後、6 M グアニジン塩酸を加えて6時間静置し、色素を溶出させた。溶出液の吸光度はマイクロプレートリーダーを用いて650 nm 波長 (参照波長 450 nm) で測定した。

## 統計学的解析

全ての測定値は、平均値±標準偏差 (SD) で示した。測定値統計解析は、Rプログラム (v 3.1.3) を用いて行った。検定は一元配置分散分析とともに、Dunnett法による多重比較で行った。全ての検定において、有意水準はP値<0.05とした。

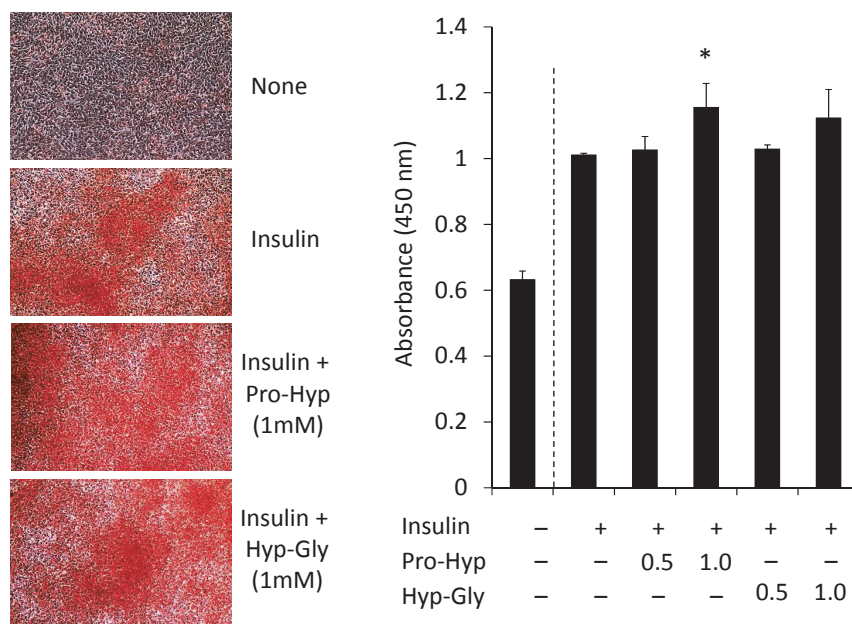
## 結果と考察

### 軟骨初期分化のコラーゲン量に及ぼす影響

軟骨細胞の初期分化モデルとしてATDC5細胞を用いた。インスリン添加による分化誘導後1週間の初期分化では、細胞外マトリックスの発現が増加し、プロテオグリカンとII型コラーゲンの合成が増加する。そこで、軟骨初期分化時に代表的なコラーゲン由来ジペプチドであるPro-HypあるいはHyp-Glyを添加することにより、軟骨細胞への初期分化におけるコラーゲン合成量に影響が見られるかどうかを、コラーゲン線維を特異的に染色するシリウスレッド染色を用いて検討した。染色後の細胞像と、溶出させた色素の吸光度測定結果をFig. 1に示した。未分化状態に比べ、インスリン添加による分化細胞でシリウスレッドにより明確に染色されており、溶出色素の吸光度は1.7倍に増加していた。さらに、インスリン添加のみに比べてPro-Hypを1.0 mM添加した場合で有意に増加していた。これらの結果から、軟骨初期分化におけるコラーゲン合成はコラーゲン由来ジペプチドであるPro-Hypにより増加する可能性が示された。

### 軟骨初期分化のグリコサミノグリカン量に及ぼす影響

プロテオグリカン及びその糖鎖成分であるグリコサミノグリカンはII型コラーゲンとともに軟骨における細胞外マトリックスを構成する主要成分である。関節軟骨を構成する硝子様軟骨では、コラーゲン線維が組織の基本骨格を構築するとともに、ヒアルロン酸とプロテオグリカンがその強力な保水作用により軟骨にクッション性を与える。Pro-

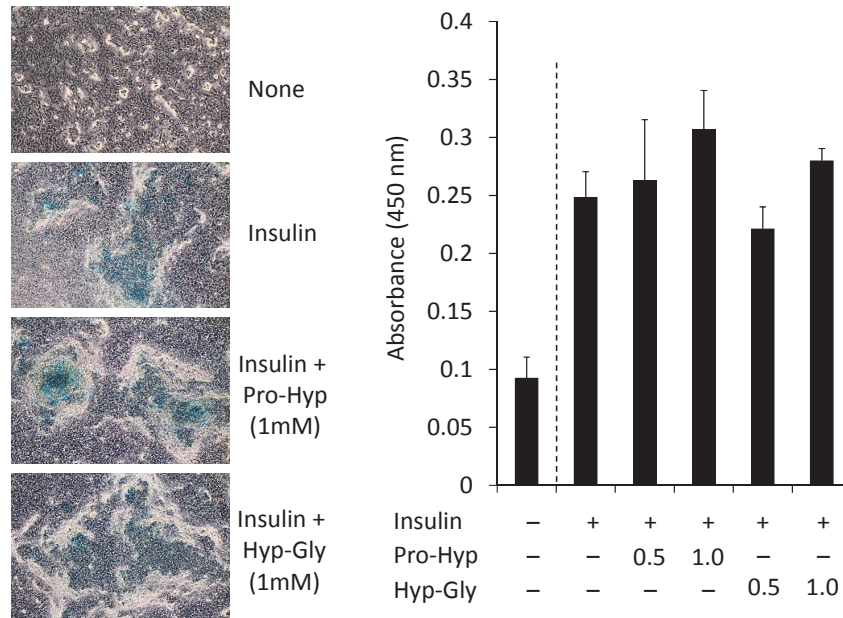


**Fig. 1** Effects of collagen dipeptides on Sirius Red staining of ATDC5 cells at the early stage of chondrogenesis.

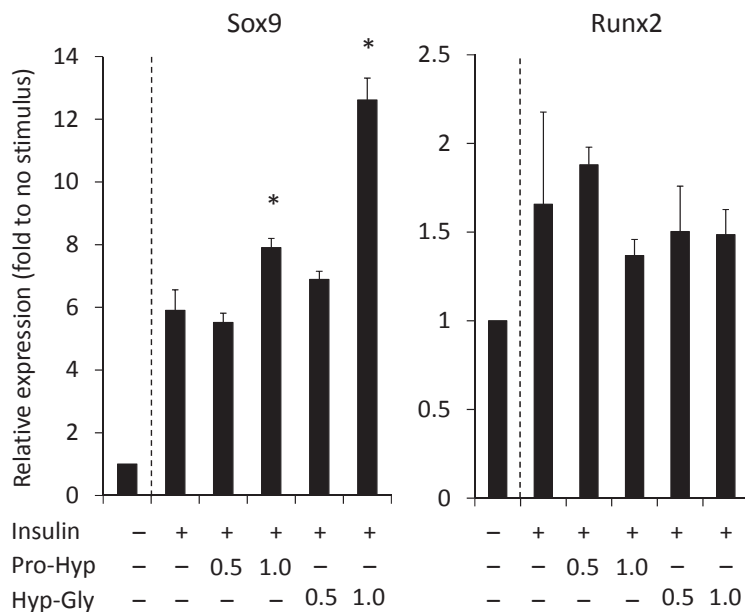
Left panels. Cells were seeded onto a 24-well plate and treated with indicated stimuli for a week. The cells were stained with Sirius Red to detect collagen fibers (red area). Right panel. The pigment was extracted from the stained cells by the addition of 0.1 M NaOH in 50% methanol, and the absorbance was measured at 450 nm. Values shown are means ± SD obtained from three experiments. Asterisk indicates significant difference against control (i.e., cells treated with insulin alone).

Hyp および Hyp-Gly が軟骨初期分化におけるプロテオグリカンの合成量に与える影響は、硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖を染色するアルシアンブルー染色を用いて検討した。アルシアンブルーは、pH 2.5 の酸性下では硫酸基とカルボキシル基の両方を染色するが、pH 1.0 の強酸性では硫酸基のみを染色するため、硫酸化グリコサミノグリカ

ンを特異的に染色することができる。染色後の細胞像と、溶出させた色素の吸光度測定結果を Fig. 2 に示した。分化後の細胞は立体構造の形成が始まっていたが、その部分が特にアルシアンブルーで染色されていた。溶出色素の吸光度により測定したグリコサミノグリカン量は、コラーゲン合成量と同様に Pro-Hyp を 1.0 mM 添加した場合で有意



**Fig. 2** Effects of collagen dipeptides on Alcian Blue staining of ATDC5 cells at the early stage of chondrogenesis. Left panels. Cells were seeded onto a 24-well plate and treated with indicated stimuli for a week. The cells were stained with Alcian Blue to detect sulfated glycosaminoglycan (blue area). Right panel. The pigment was extracted from the stained cells by the addition of 6 M guanidine hydrochloride, and the absorbance was measured at 650 nm. Values shown are means  $\pm$  SD obtained from three experiments.



**Fig. 3** Effects of collagen dipeptides on Sox9 and Runx2 expressions in ATDC5 cells. Cells were seeded onto a 24-well plate and treated with indicated stimuli for a week. The expressions of Sox9 and Runx2 in the cells were determined by using real-time PCR. Values shown are means  $\pm$  SD obtained from three experiments. Asterisks indicate significant differences against control (i.e., cells treated with insulin alone).

ではないものの吸光度に増加傾向が見られ、Pro-Hyp によるプロテオグリカン合成の増加が示唆された。

#### 軟骨細胞の分化マーカー遺伝子発現に及ぼす影響

軟骨細胞の発生・分化にはマスター遺伝子として Sox9 の発現が必須であり、この Sox9 は軟骨前駆細胞への細胞系譜の決定に重要な役割を果たしている<sup>12)</sup>。一方、Runx2 は骨芽細胞分化のマスター遺伝子であり、軟骨細胞の成熟に必須な因子であることが明らかにされている<sup>13)</sup>。そこで、コラーゲン由来ジペプチドの添加がこれらの軟骨細胞への分化に関わる Sox9 及び Runx2 の遺伝子発現量にどのような影響を与えるかを検討した。

分化誘導後 7 日間培養した細胞の RNA を抽出し、それぞれの遺伝子発現量を real-time PCR により検討した結果を Fig. 3 に示した。Sox9 遺伝子の発現量は、未分化状態に比べインスリン添加による軟骨初期分化細胞で 6 倍程度に大きく増加していた。さらに Pro-Hyp あるいは Hyp-Gly を 1.0 mM 添加した場合で、インスリン添加のみに比べ発現量が有意に増加していた。

一方、Runx2 の遺伝子量では、初期分化細胞では未分化細胞の 1.5 倍程度に増加していたが、Pro-Hyp あるいは Hyp-Gly の添加による遺伝子発現量の差は認められなかった。軟骨初期分化に関わる Sox9 と異なり、Runx2 は軟骨後期分化に関わるため、分化開始後 7 日目の初期分化状態では大きな影響が認められなかったものと考えられる。

#### コラーゲン構成分子の遺伝子発現に及ぼす影響

軟骨初期分化の指標となる II 型コラーゲンの構成タンパク質遺伝子である Col2a1 と、軟骨後期分化の指標となる

X 型コラーゲンの構成タンパク質遺伝子である Col10a1 の遺伝子発現量を測定した。軟骨細胞初期分化では、未分化細胞からの分化に伴い細胞が増殖するとともに、II 型コラーゲンとプロテオグリカンの合成が増加して細胞外マトリックスを形成する。一方、軟骨後期分化においては II 型コラーゲンが低下する代わりに X 型コラーゲンが増加し、軟骨細胞の肥大化と細胞外マトリックスの石灰化を招く。

Fig. 4 に示したように、Pro-Hyp の添加により Col2a1 の遺伝子発現量が有意に増加することが確認され、Pro-Hyp による II 型コラーゲンの合成の促進が確認された。シリウスレッド染色でみたコラーゲン線維量 (Fig. 1) も同様に Pro-Hyp の添加により増加していたが、これは II 型コラーゲンの合成増加によるものと考えられる。一方、Col10a1 の遺伝子発現量は Hyp-Gly の添加により有意に低下しており、Hyp-Gly が X 型コラーゲンの合成を抑制させる可能性が示された。正常な関節軟骨は、II 型コラーゲンやプロテオグリカンを発現する軟骨初期分化状態の静止軟骨細胞で占められているが、軟骨細胞の分化が異常亢進すると成熟・肥大化して X 型コラーゲンを発現し、細胞外マトリックスが石灰化する。石灰化した軟骨組織が骨組織へ置換されて内軟骨の骨化が進行すると骨棘が形成され、変形性関節症に至る一因となる。これらのことから、コラーゲン由来ジペプチドは軟骨初期分化における II 型コラーゲン合成を増加させるとともに、X 型コラーゲンの合成を抑制して後期分化と骨化を抑制する可能性が示された。

#### アグリカンおよびグリコサミノグリカン合成酵素の遺伝子発現に及ぼす影響

軟骨におけるプロテオグリカンの大部分はコンドロイチ

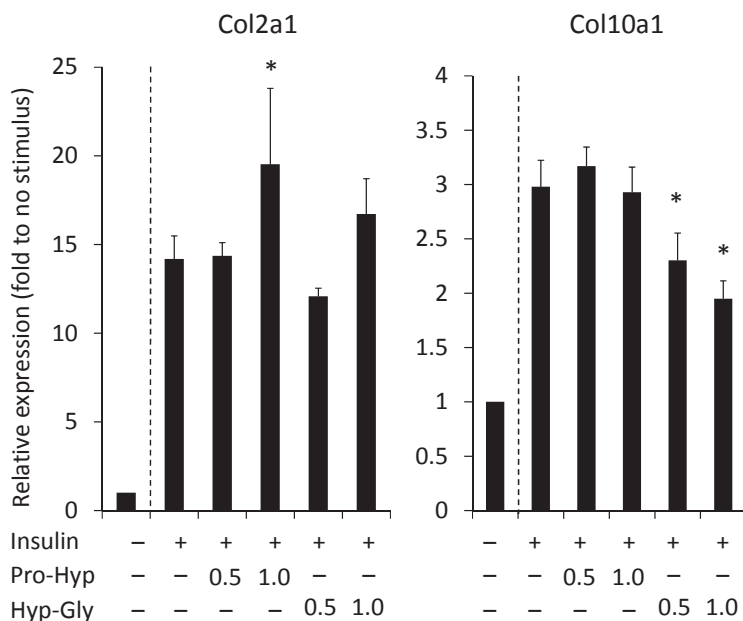
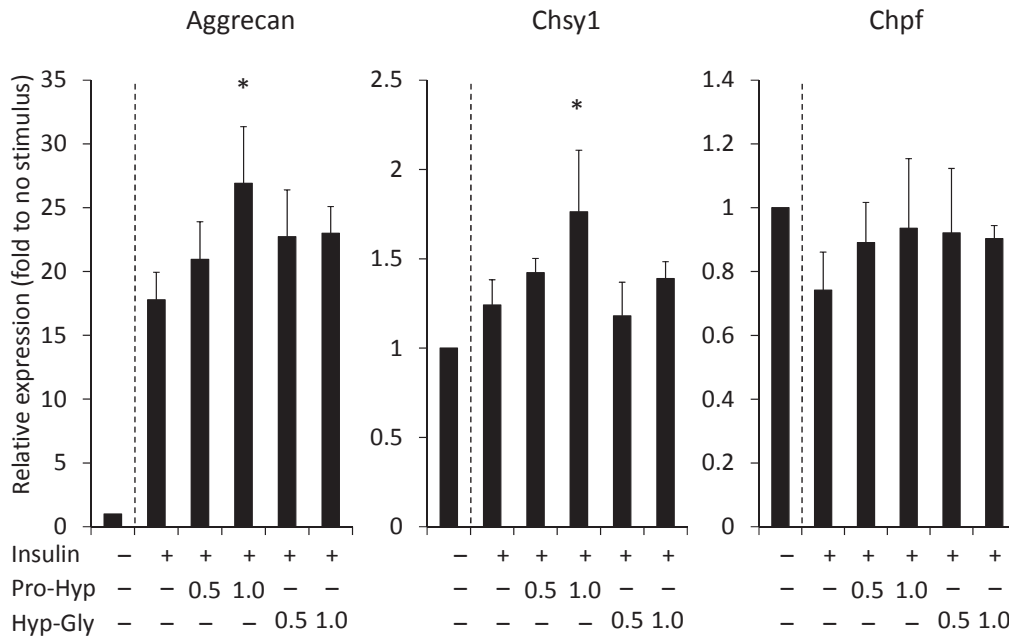


Fig. 4 Effects of collagen dipeptides on Col2a1 and Col10a1 expressions in ATDC5 cells.

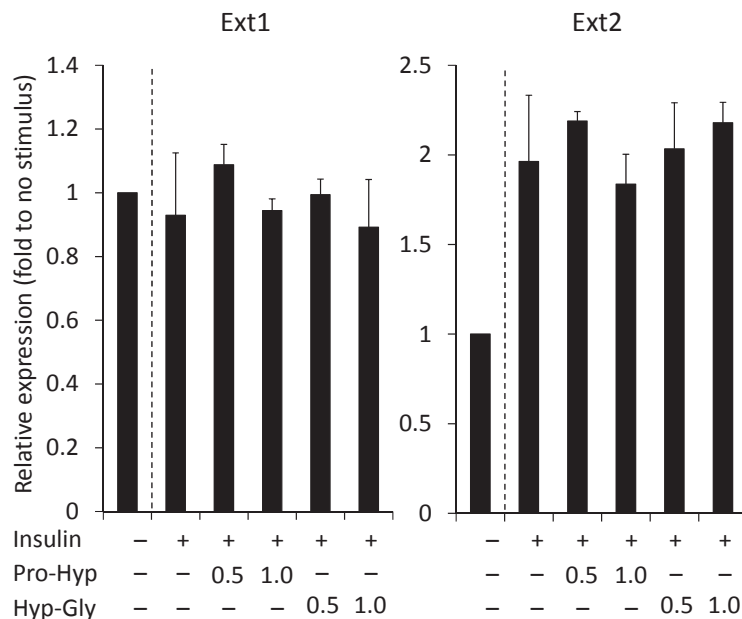
Cells were seeded onto a 24-well plate and treated with indicated stimuli for a week. The expressions of Col2a1 and Col10a1 in the cells were determined by using real-time PCR. Values shown are means  $\pm$  SD obtained from three experiments. Asterisks indicate significant differences against control (i.e., cells treated with insulin alone).

ン硫酸であり、アグリカンをコアタンパク質として分子内に大量のグリコサミノグリカン糖鎖を持つことにより軟骨細胞の保水性を保っている。コンドロイチン硫酸のグリコサミノグリカン糖鎖の伸長には6種類の酵素が関与しており、このうちのChsy1とChpfは複合体を形成してN-アセチルガラクトサミンとグルクロン酸の二糖繰り返し構造の伸長に関与している<sup>14, 15)</sup>。

アグリカン遺伝子の発現量は、未分化状態に比べインスリン添加による軟骨分化初期細胞で15倍以上に増加しており、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの合成増加が示された。Pro-Hypを1.0 mM添加した場合には、インスリン添加のみに比べ発現量が有意に増加しており、Pro-Hypによるコンドロイチン硫酸コアタンパク質の合成を促進が示された。また、コンドロイチン硫酸合成酵素の発



**Fig. 5** Effects of collagen dipeptides on Aggrecan, Chsy1 and Chpf expressions in ATDC5 cells. Cells were seeded onto a 24-well plate and treated with indicated stimuli for a week. The expressions of Aggrecan, Chsy1 and Chpf in the cells were determined by using real-time PCR. Values shown are means  $\pm$  SD obtained from three experiments. Asterisks indicate significant differences against control (i.e., cells treated with insulin alone).



**Fig. 6** Effects of collagen-derived dipeptides on Ext1 and Ext2 expressions in ATDC5 cells. Cells were seeded onto a 24-well plate and treated with indicated stimuli for a week. The expressions of Ext1 and Ext2 in the cells were determined by using real-time PCR. Values shown are means  $\pm$  SD obtained from three experiments.

現量では、Pro-Hyp の添加により Chsy1 の発現が有意に増加しており、Pro-Hyp がコンドロイチン硫酸のグリコサミノグリカン糖鎖繰り返し構造の合成を促進させる可能性が示された。

一方、主に細胞表面に発現しているプロテオグリカンであるヘパラン硫酸の伸長には5種類の酵素が関与しており、このうち、Ext1 および Ext2 は複合体を形成してヘパラン硫酸の N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸による二糖鎖繰り返し構造の合成に関与し<sup>16,17)</sup>、ともに遺伝性多発性外骨腫 (HME) の責任遺伝子となっている<sup>18,19)</sup>。Ext1, Ext2 とともに、インスリン添加 (+) のみと比べて、Pro-Hyp あるいは Hyp-Gly の添加による遺伝子発現量への影響は見られなかった。Pro-Hyp あるいは Hyp-Gly の添加は、Ext1 および Ext2 の遺伝子発現量に変化を与えないことが確認され、ヘパラン硫酸の合成には影響を与えないことが示唆された。

## 結 論

本研究は、コラーゲン由来ジペプチドの Pro-Hyp および Hyp-Gly が、軟骨細胞の初期分化及び細胞外マトリックスを構成する糖鎖の発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行った。

シリウスレッド染色により、Pro-Hyp が軟骨初期分化時のコラーゲン合成を増加させることが示された。また、Pro-Hyp はⅡ型コラーゲン構成タンパク質である Col2a1 遺伝子の発現を増加させるとともに、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質であるアグリカンや、そのグリコサミノグリカン糖鎖の合成遺伝子である Chsy1 の発現を増加させたことから、Pro-Hyp の添加により細胞外マトリックス形成が促進される可能性が示された。

一方、Hyp-Gly の添加はⅠ型コラーゲンの構成タンパク質である Col10a1 遺伝子の発現を抑制したことから、軟骨後期分化への移行と軟骨細胞の骨化を抑制する可能性が示された。軟骨初期分化のマーカーである Sox9 遺伝子の発現は、Pro-Hyp と Hyp-Gly のいずれの処理でも増加したことから、これらのジペプチドが軟骨細胞の初期分化を促進させる可能性が示された。

軟骨初期分化状態である静止軟骨細胞が後期分化に移行して成熟や肥大化が亢進すると、軟骨が減少するとともに骨棘が形成されて変形性関節症の一因となる。本研究により、Pro-Hyp と Hyp-Gly は軟骨細胞の初期分化を促進して後期分化を抑制することにより、軟骨を構成する静止軟骨細胞を増加させる可能性が示された。

## 謝 辞

本研究は JSPS 科研費 26350153 の助成を受けて行われた。

## 参考文献

- 1) Sandell LJ, Aigner T (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3: 107-113.
- 2) Iwai K, Hasegawa T, Taguchi Y, Morimatsu F, Sato K, Nakamura Y, Higashi A, Kido Y, Nakabo Y, Ohtsuki K (2005) Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 53: 6531-6536.
- 3) Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M (2010) Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem* 58: 835-841.
- 4) Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Mori T, Oda C, Taira T, Park EY, Nakamura Y, Sato K (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.
- 5) Kimira Y, Ogura K, Taniuchi Y, Kataoka A, Inoue N, Sugihara F, Nakatani S, Shimizu J, Wada M, Mano H (2014) Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 498-501.
- 6) Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M (2009) Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1620-1627.
- 7) Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, Tajima S (2010) Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol* 37: 330-338.
- 8) Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev* 30: 109-116.
- 9) Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y (1996) Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol* 133: 457-468.

- 10) 中林仁美, 高松正剛, 中野博 (1993) 線維染色標本の画像解析による肝内コラーゲン定量法. 肝臓 34 : 212-218.
- 11) Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV (1993) Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J Cell Biol* 123: 921-933.
- 12) de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 721-727.
- 13) Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ (2014) Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 28: 269-286.
- 14) Kitagawa H, Uyama T, Sugahara K (2001) Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase. *J Biol Chem* 276: 38721-38726.
- 15) Kitagawa H, Izumikawa T, Uyama T, Sugahara K (2003) Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization. *J Biol Chem* 278: 23666-23671.
- 16) Busse M, Kusche-Gullberg M (2003) In vitro polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins. *J Biol Chem* 278: 41333-41337.
- 17) Kim BT, Kitagawa H, Tanaka J, Tamura J, Sugahara K (2003) In vitro heparan sulfate polymerization: crucial roles of core protein moieties of primer substrates in addition to the EXT1-EXT2 interaction. *J Biol Chem* 278: 41618-41623.
- 18) Ahn J, Lüdecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, Wells DE (1995) Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 11: 137-143.
- 19) Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, Hecht JT, Lovett M, Evans GA (1996) The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet* 14: 25-32.