

〈シンポジウム〉

第45回日本香粧品学会(2020)・シンポジウム「皮膚, 体, 食事, 睡眠を知り, 美しく年を重ねる」

コラーゲンペプチドの効果のメカニズム

佐藤 健司*

Mechanism for Beneficial Effect of Collagen Peptide upon Ingestion

Kenji SATO*

Abstract

Collagen is a main protein of extracellular matrix and has triple helix structure. Heat treatment of collagen with water converts triple helix structure into globular structure. The denatured collagen, gelatin, can be digested with protease. The gelatin hydrolysate or collagen peptide has been prepared and used as food ingredient. Human trials and animal experiments have demonstrated that oral administration of collagen peptide improves skin condition and also enhances healing of pressure ulcers. After ingestion of 10 g of collagen peptides, hydroxyproline (Hyp)-containing peptide increases to approximately 10–40 μM in human peripheral blood. Hyp-containing peptide is also generated in cutaneous wound healing site by degradation of endogenous collagen. It has been demonstrated that Pro-Hyp, a main endogenous and food-derived collagen peptide in body, triggers growth of fibroblasts expressing mesenchymal stem cell marker, p75NTR, on collagen gel, while it does not initiate growth of fibroblasts without p75NTR. Fibroblasts from tissue stem cells distributing subcutaneous layer rather than those from healthy cutaneous tissues infiltrate wounds and play crucial role in wound healing. Thus, endogenous and food-derived Pro-Hyp can enhance growth of fibroblasts in wound healing site without affecting quiescent fibroblasts in healthy tissue.

Key words: collagen peptide, Pro-Hyp, fibroblast, mesenchymal stem cell, wound healing.

1. はじめに

コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な構成タンパク質であり、3本のサブユニットが3重らせん構造をとっている。コラーゲンは異なる遺伝子産物から構成されるファミリーを構成するが、量的に主要な分子種はI型コラーゲンと軟骨のコラーゲンの主成分であるII型コラーゲンである。組織中のコラーゲンを熱水で抽出すると3重らせん構造が崩壊し、球状構造に変化し可溶化する。この変性コラーゲンがゼラチンと呼ばれる。3重らせん構造をもつコラーゲンはほとんどのプロテアーゼに対して抵抗性を示すが、球状構造のゼラチンは消化酵素および食品加工に用いられるタンパク質分解酵素により消化されペプチドを生成する。このペプチドの混合物がゼラチン水解物またはコラーゲンペプチドと呼ばれている。コラーゲンペプチドはゼラチンの持つゲル形成能を失っている。また他のタンパク質の水解物が苦み等の望ましくない味を示すのに対して、ほとんど苦みを呈しない。そのため飲料等への添加が容易である。

コラーゲンを構成するアミノ酸はGlyがモル比で全体の1/3程度含まれている。またAla, Proにも富む。しかし、必須アミノ酸であるTyrは少なく、TrpはI, II型コラーゲンには含まれない。そのためアミノ酸価は0になる。一方、コラーゲンには翻訳後修飾により生じるヒドロキシプロリン(Hyp)、およびヒドロキシリジン(Hyl)が存在する。両修飾アミノ酸は一部の例外を除きコラーゲンにのみ分布している。コラーゲンの大部分をしめる3重らせん部位はGlyが3残基ごとに厳密に存在する。またX-Y-GlyのYの位置にHypが存在する場合が多い。Pro-Hyp-Glyのモチーフがコラーゲン中に多く存在する。

コラーゲンペプチドは当初スポーツ飲料に生体内でのアミノ酸源として添加されていた。2000年前後からコラーゲンペプチドの摂取により肌の状態が改善されるというエピソードが流布した。2003年には最初のプラセボを用いたヒト試験により、コラーゲンペプチドの摂取により表皮の水分の保持と皮膚の弾力が向上することが報告されている¹⁾。しかし、当時はペプチドを摂取してもアミノ酸に分解され特別な機能をもつとは考えられな

* Corresponding author: 京都大学大学院農学研究科, 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 (E-mail: sato.kenji.7x@kyoto-u.ac.jp)

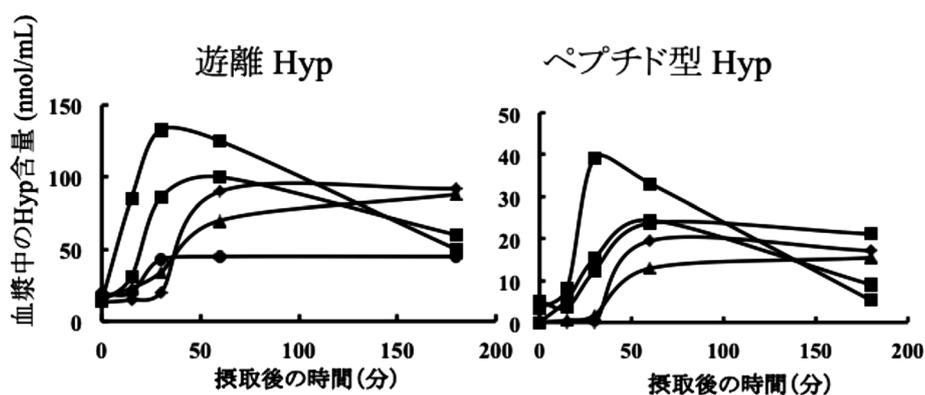


Fig. 1. コラーゲンペプチド摂取後のヒト末梢血中の遊離およびペプチド型ヒドロキシプロリン (Hyp) 含量. 10 g のコラーゲンペプチドを摂取した5名の値. 論文13より許可を得て改作.

いという考えが主流であり、この報告は学術雑誌には受理されず業界雑誌に掲載されている。その後、コラーゲンペプチドの体内への吸収が見いだされ、多くのヒト臨床試験が行われてきた。これまでに表皮の水分量の増加、表皮からの水分蒸散の抑制、皮膚の弾力の増加、目尻の皺の容積の減少などが報告されている²⁻⁶⁾。特に、ヒト試験でコラーゲンペプチドの摂取によりプラセボ対象と比べ皮膚のコラーゲンとエラスチン含量が増加していることが示されている⁶⁾。一方、若年の被験者では効果が見られないが、高齢の被験者で効果が見られるケースがあり^{2,6)}、すべての背景の被験者で有益な作用を示すわけではないとされている。また皮膚の状態は気温、湿度等に影響を受けるため、ヒト臨床試験の結果を比較する場合は試験の行われた季節等を考慮する必要がある。さらに動物実験ではコラーゲンペプチドの摂取により紫外線の照射による表皮の肥厚、炎症表皮のバリア機能の低下が抑制されることが報告されている⁷⁾。ヒト試験でもコラーゲンペプチドの摂取が紫外線誘発の紅斑を抑制することが示されている⁸⁾。

コラーゲンペプチド摂取の慢性創傷の治癒に及ぼす影響も調べられている。慢性創傷の一つである褥瘡は、寝たきりなどによって、体重で圧迫されている場所の血流が悪くなり、皮膚の一部がただれ、創傷が生じたものである。いくつかのヒト試験でプラセボ対象に比較し、有意に褥瘡の治癒が促進されていることが報告されている^{9,10)}。そのため褥瘡学会の治療ガイドラインにコラーゲンペプチドの使用が記載されている。また動物実験では糖尿病の創傷治癒促進にコラーゲンペプチドが有効であるとの報告がある¹¹⁾。

従来のタンパク質、ペプチドの消化吸収の考え方では、エンド型プロテイナーゼでタンパク質はペプチドに分解され、さらに消化管内のエクソ型ペプチダーゼによりアミノ酸、またはジ・トリペプチドに分解され、生じたジ・トリペプチドはペプチドトランスポーターによって吸収されるが、小腸上皮細胞内、または血中でアミノ酸に分解されるとされていた。アミノ酸に特別な機能は

考えにくく、前述のようにコラーゲンペプチド摂取による有益な作用が報告されているにもかかわらず、コラーゲンペプチドによる機能には懐疑的な意見が多かった。しかし、後述するように上記の消化吸収に関する概念は必ずしも正しくない。本総説では、コラーゲンペプチドを摂取した後に生体内に吸収されるペプチドの存在とその機能について最近の知見を紹介する。

2. 体内に吸収されるコラーゲンペプチド

コラーゲンペプチドに限らず、ペプチドを摂取しても消化吸収過程でアミノ酸に分解されてしまうと考えられていた。実際に特定保険用食品に認可されている血圧を低下させるペプチド (Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro) などは、経口摂取後のヒト末梢血濃度は数 nM レベルであり、ほとんどが代謝されて他の成分に変化していると考えられている¹²⁾。コラーゲンペプチド中には前述のように Hyp が特異的に存在する。そのためペプチド型の Hyp はコラーゲンペプチドと考えられる。ペプチド型 Hyp は血漿の除タンパク質画分の加水分解物中の Hyp から遊離の Hyp を差し引くことで求められる。すなわちアミノ酸分析によりコラーゲンペプチドの存在を検出することが可能になる。そこで10 g のコラーゲンペプチド (豚由来の食品用に調製されたもの) を摂取した後、末梢血中のペプチド型 Hyp を測定した。その結果、Fig. 1 に示すように、10~40 μ M 程度のペプチド型 Hyp が摂取後30分から1時間にかけて存在し、3時間後でも摂取前より有意に高い値を示した^{13,14)}。この値は従来見いだされていた食品由来ペプチドの数万倍に及ぶ濃度である¹²⁾。また全 Hyp に対するペプチド型 Hyp の割合は20~50%程度あり^{13,14)}、コラーゲンペプチドに関しては、摂取したペプチドの大部分はアミノ酸として吸収されるという考えは明らかに間違いである。血中のペプチド型 Hyp はコラーゲンペプチドの摂取量に依存して増加することも報告されている¹⁵⁾。25 g 程度のコラーゲンペプチドを摂取した場合血中のペプチド型 Hyp 含量は平均で100 μ M 程度存在し、最大値は200 μ M にも及び、血中の主要な

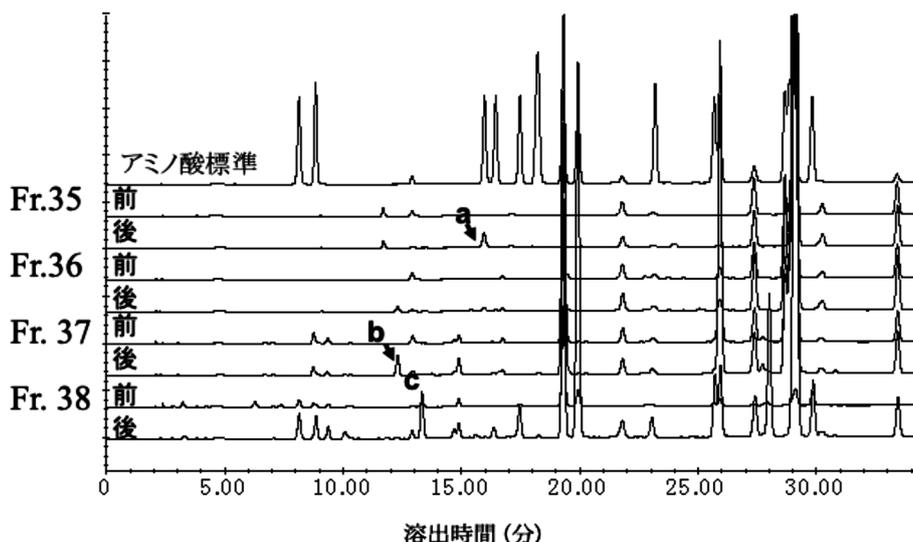


Fig. 2. ヒト末梢血中からのコラーゲンペプチドの同定。コラーゲンペプチド摂取前後の末梢血血漿の除タンパク質画分をサイズ排除クロマトグラフィーで分画後、フェニルイソチオシアネートで誘導化し逆相高性能液体クロマトグラフィーで分離。摂取前(前)、摂取後(後)。a; Pro-Hyp, b; Hyp-Gly, c; 遊離のHyp。論文16より許可を得て改作。

Table 1. コラーゲンペプチド摂取後にヒト末梢血に見いだされたコラーゲンペプチド。

Pro-Hyp
Ala-Hyp
Hyp-Gly
Leu-Hyp
Ile-Hyp
Phe-Hyp
Glu-Hyp
Ser-Hyp
Ser-Hyp-Gly
Ala-Hyp-Gly
Glu-Hyp-Gly
Gly-Pro-Hyp
Pro-Hyp-Gly

アミノ酸の含量と比べても遜色がない値である^{13,14)}。

血中に移行したコラーゲンペプチドの構造を調べるため逆相高性能液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いてペプチドの分離が試みられたが、非常に多くのピークが出現し、同定は困難であった¹³⁾。そのため、低分子用のサイズ排除クロマトグラフィーで分画後、さらに RP-HPLC での分離を改善するためペプチドをフェニルイソチオシアネート (phenylisothiocyanate; PITC) で誘導化し、誘導物を RP-HPLC で 254 nm の吸収で検出する方法が開発された。本法により Fig. 2 に示すように血中から Pro-Hyp, Hyp-Gly 等のコラーゲンペプチドが検出されている¹⁶⁾。PITC で誘導化したフェニルチオカルバミル (phenylthiocarbonyl; PTC) ペプチドはエンドマン分解の中間産物であるため、ペプチドシーケンサーで構造が同定できる。これらの手法により少なくとも 13 種類のコラーゲンペプチドが血中で同定されている (Table 1)。

構造が明らかになれば標準ペプチドの作成が可能となり、標準ペプチドを用いた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた多重反応モニタリング法による定量が可能となる。いずれのペプチドも標準ペプチドと溶出時間、プレカーサーイオンおよびプロダクトイオンのパターンが一致し、生体内での存在が証明されている。いずれの場合においてもコラーゲンペプチドを摂取した後の血漿中では Pro-Hyp が最も主要な構成成分であった。

3. 創傷部位・炎症部位に存在するコラーゲンペプチド

マウス (C57BL/6) 皮膚の皮膚を円形に切り取り、その後創傷治癒により生じた肉芽組織を採取し、その中のペプチドを分析した。その結果、肉芽組織において Pro-Hyp が生じていた。一方、創を持つ同じマウスの正常な皮膚ではほとんど Pro-Hyp の増加は認められなかった¹⁷⁾。一方、糖尿病モデルマウスである db/db マウスにおいても肉芽組織において Pro-Hyp は生成するが、その含量は野生型の C57BL/6 に比べ有意に少なくなっている。

BALB/c マウスに 2,4-dinitrofluorobenzene を塗布して作製した接触皮膚炎を持つ耳にも同様に正常な耳に比べ有意に高い濃度の Pro-Hyp が存在した¹⁸⁾。さらに安定同位体で標識した Pro を経口投与した 4 時間後に、接触皮膚炎を持つ耳のみで安定同位体を持つ Pro-Hyp が検出された¹⁸⁾。この結果は炎症組織においては、僅か 4 時間で経口摂取したアミノ酸からコラーゲンが合成され、それが分解され Pro-Hyp を生成していることになる。非常に早いコラーゲン合成と分解が炎症組織では生じていることになる。

これらの結果はコラーゲンペプチドを摂取した場合、炎症部位、創傷治癒部位において内因性のコラーゲンの分解で生じる Pro-Hyp が血中で増加することを示している。

4. Pro-Hyp の生理機能

創傷治癒部位、およびコラーゲンペプチドの摂取により Pro-Hyp 等のコラーゲン由来のジ・トリペプチドが生成することが明らかになった。コラーゲンペプチド摂取による有益な作用のメカニズムを解明するためこれらのペプチドの機能が調べられている。われわれはコラーゲンを合成する主要な細胞であり、また創傷治癒において、特に肉芽形成時に重要な役割を果たす線維芽細胞の増殖に及ぼす Pro-Hyp の影響を調べてきた。当初株化されたヒト線維芽細胞をプラスチックプレート上で培養し、Pro-Hyp を加えて増殖への影響を調べた。しかし、細胞の継代の差により一定の結果が得られなかった。そこで、マウスの皮膚を培養し、遊走してきた線維芽細胞を2週間培養し、増殖した線維芽細胞を用いて Pro-Hyp の影響を調べた。この初代培養線維芽細胞は、プラスチック上ではウシ胎児血清 (FBS) が存在するとよく増殖するが、コラーゲンゲルに接着させると増殖が止まった。この現象は Yoshisato *et al.* により最初に報告されていたが¹⁹⁾、コラーゲンゲル上でも線維芽細胞は増殖するという報告もあり、この現象は最近の総説等では言及されていない。われわれも特定の FBS 存在下において線維芽細胞がコラーゲンゲル上で増殖する場合としない場合を経験している²⁰⁾。この不一致は培養に用いる FBS 中の低分子画分を除去することで解決した²⁰⁾。サイズ排除クロマトグラフィーにより低分子を除いた FBS を用いても線維芽細胞はプラスチック上では増殖し、線維芽細胞の接着、増殖に必要なタンパク質は含まれていた。一方、低分子を除く前の FBS を用いると線維芽細胞はコラーゲンゲル上でも増殖したが、低分子を除くと増殖は止まった²⁰⁾。線維芽細胞の培養培地には低分子の通常の栄養成分は含まれているため、FBS 中に低分子の線維芽細胞の増殖にかかわる因子が存在することになる。生体内では線維芽細胞はコラーゲン線維に結合しているため、この現象は生体内で線維芽細胞がほとんど増殖しないことをよく説明できる。しかし、肉芽形成時には線維芽細胞は増殖することが知られている。そこで肉芽形成時に増加する Pro-Hyp を添加すると、コラーゲンゲル上でも線維芽細胞の増殖が認められた²⁰⁾。そのため、創傷治癒時においてコラーゲン線維に結合している線維芽細胞の増殖にはタンパク質性の増殖因子に加え、Pro-Hyp が必要であることが明らかとなった。そのため Pro-Hyp は低分子線維芽細胞増殖開始因子 (low molecular weight fibroblast growth-initiating factor: LM-FGIF) と呼ぶことを提案している²¹⁾。また前述の FBS の低分子画分には Pro-Hyp を含むかなりの量 (20~100 μ M) のペプチド型 Hyp が存在することが明らかになった。そのため、FBS のロット、製品によりコラーゲンゲル上での線維芽細胞の増殖に差が生じたと考えられる。コラーゲンペプチドの摂取により Pro-Hyp が組織中に増加すれば線維芽細胞

の増殖を促進し、創傷治癒の促進が生じると考えることができる。

そのほかにも Pro-Hyp は細胞培養系において線維芽細胞によるヒアルロン酸の合成促進作用が報告されている²²⁾。さらに軟骨細胞のグルコサミノグルカンの生成促進も報告されている²³⁾。そのため Pro-Hyp は僅か2アミノ酸残基をもつに過ぎないが、重要な生理機能をもつペプチドであると言える。この生理活性ペプチドが内因性コラーゲンの分解により生体内でも生成されると同時に、食品であるコラーゲンペプチドの摂取によっても体内に増加することは非常に興味深い。

5. 線維芽細胞の多様性

前述のように線維芽細胞は生体内ではコラーゲン線維に結合しており、増殖を止めているが、Pro-Hyp により増殖を開始する。この現象は創傷部位で生成した Pro-Hyp が線維芽細胞の増殖を開始し、創傷治癒が生じることを説明できる。正常な組織では Pro-Hyp の生成は僅かであり、線維芽細胞の増殖が止まっていることも説明できる。しかし、コラーゲンペプチドの経口摂取により生じる Pro-Hyp は血流により正常な組織にも届けられる。そのため全身の線維芽細胞の増殖が生じ、組織の線維化などの有害事象を起こす可能性が推定されるが、長期間のコラーゲンペプチドの摂取によってもそのような有害事象は報告されていない。また細胞培養系の実験においても初代培養線維芽細胞を長期間培養した後は Pro-Hyp の作用を受けにくくなることをわれわれは観察している。これらの結果は線維芽細胞が均一な性質を持つのではなく、異なる性質をもつ線維芽細胞の存在が示唆される。

創傷治癒にかかわる線維芽細胞の起源に関する興味深い研究がある。ヌードマウスにヒトの皮膚を移植し、生着後ヒトの皮膚に創を作成した。その後生じた肉芽組織中のコラーゲンを調べるとマウス由来のコラーゲンであった²⁴⁾。つまり肉芽を形成した線維芽細胞は創の周囲のヒトの皮膚中に存在する線維芽細胞ではなく、皮下組織の脂肪細胞周辺に存在する間葉系幹細胞から分化してきた線維芽細胞であると考えられる。そこで、マウス皮膚から遊走してくる線維芽細胞の間葉系幹細胞マーカーである低親和性神経増殖因子受容体 (neurotrophin receptor p75: p75NTR) の発現を調べた。Fig. 3A に示すようにマウス皮膚培養1日後に遊走してきた線維芽細胞は p75NTR を発現していたが、ケラチンサイトには発現はなかった²⁵⁾。培養2週間後には皮膚から遊走してきた線維芽細胞は増殖し、かなり数が増したが、一部の線維芽細胞のみが p75NTR を発現していた (Fig. 3B)。4週間後では、ほぼすべての線維芽細胞が p75NTR を発現していなかった (Fig. 3C)。p75NTR 陽性細胞をもつ2週間後の線維芽細胞をコラーゲンゲル上で培養したところ Pro-Hyp の添加により p75NTR 陽性細胞の増殖が認

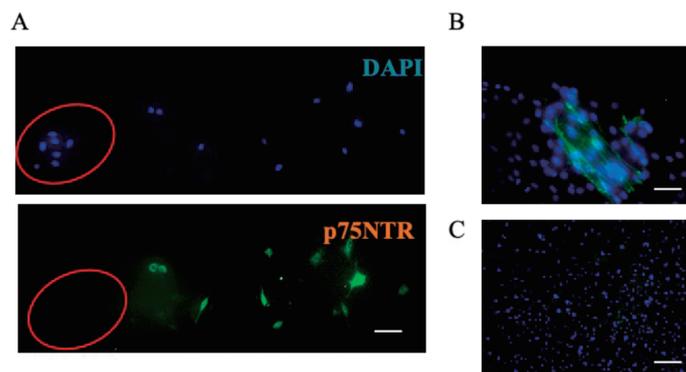


Fig. 3. マウス皮膚培養により遊走してきた線維芽細胞とケラチノサイトの p75NTR の発現. 皮膚を1日(A), 2週間(B), および4週間培養して遊走してきた細胞の核を DAPI(青)および p75NTR 抗体(緑)で染色. A の円で囲った細胞はケラチノサイト, 他は線維芽細胞. バーは 50 μm . 論文25 から許可を得て改作.

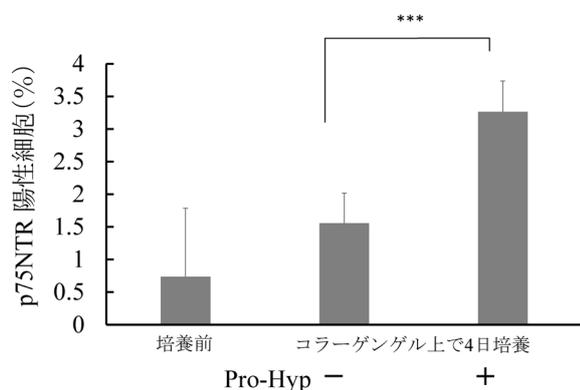


Fig. 4. コラーゲンゲル上で培養した線維芽細胞中の p75NTR 陽性細胞数に及ぼす Pro-Hyp の影響. 2週間培養した皮膚から遊走してきた線維芽細胞をコラーゲンゲル上で 200 μM の Pro-Hyp の非存在下(-), 存在下(+)で培養し, 全線維芽細胞中の p75NTR 陽性細胞数の割合を測定. 論文25 から許可を得て改作.

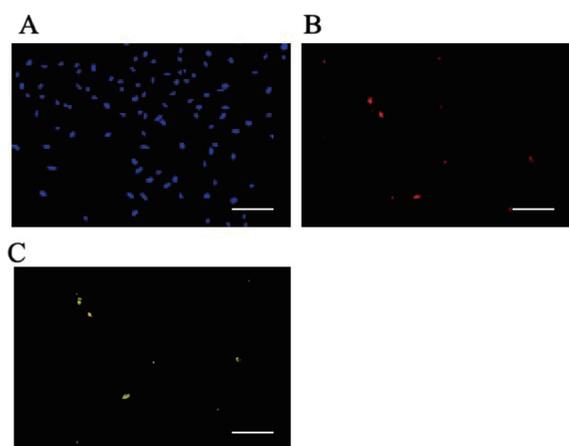


Fig. 5. マウス皮膚を4日間培養し, 遊走してきた線維芽細胞の DAPI(A), p75NTR 抗体(B) および FITC ラベル Pro-Hyp での染色. バーは 50 μm . 論文25 から許可を得て改作.

められた (Fig. 4)。一方, p75NTR 陽性細胞の存在しない4週間後の線維芽細胞は Pro-Hyp を加えても増殖しなかった。さらに培養4日目の線維芽細胞に蛍光色素である fluorescence isothiocyanate (FITC) で標識した Pro-Hyp を添加したところ p75NTR 陽性細胞にのみ蛍光が認められた²⁵⁾ (Fig. 5)。先行研究により, FITC 標識ジペプチドはジペプチドと同様にペプチドトランスポーターに対して親和性を持つことが知られている。これらの結果は p75NTR を発現している間葉系幹細胞から分化したばかりの線維芽細胞は, Pro-Hyp を取り込み, コラーゲン線維に接着しているにもかかわらず増殖するが, 増殖後は p75NTR およびペプチドトランスポーターの発現を失い, Pro-Hyp に反応しない線維芽細胞として存在すると考えられる。創傷治癒部位には p75NTR 陽性細胞が集積し, 創傷治癒後, また正常組織にはほとんど存在しないことが報告されている²⁶⁾。そのため, 内因性および食事由来の Pro-Hyp は創傷部位の p75NTR 陽性の線維芽細胞の増殖は促進するが, 正常組織の静止状態の線維芽細胞には作用しないと考えられる。

動物実験ではコラーゲンペプチドの経口投与が糖尿病の慢性創傷の治癒促進効果があることが示唆されている。実際に糖尿病モデルマウスでは創で生じる内因性 Pro-Hyp の含量が野生型のマウスに比べかなり少ないことも報告されている¹⁷⁾。糖尿病患者の慢性創の治癒促進にコラーゲンペプチドの投与が効果を示す可能性がある。

6. 展 望

われわれは創傷治癒部位に集積する p75NTR 陽性線維芽細胞に Pro-Hyp が取り込まれ増殖を促進することを見いだした。この現象はコラーゲンペプチドの摂取が創傷治癒の促進を行うことを少なくとも部分的には説明できる。一方, 比較的高齢者の表皮のバリア機能, 皮膚の弾力, 皺の容積の改善にコラーゲンペプチドの摂取が効果を示すことがプラセボを用いたヒト試験で示されている。加齢や紫外線照射, 乾燥等の環境刺激による皮膚のダメージが間葉系幹細胞の増殖や分化促進にどの程度影響するかは現在不明である。またこのような刺激により間葉系幹細胞が活性化され, 分化・活性化した線維芽細胞

胞が Pro-Hyp の作用を受けるのか、または Pro-Hyp が組織中の間葉系幹細胞の数や状態に影響するのも現状では不明である。これらの点を解決して経口摂取によるコラーゲンペプチドの作用メカニズム、また皮膚における内因性コラーゲンペプチドの機能の解明が待たれる。

参考文献

- 菊地数晃, 又平芳春: ヒトの乾燥肌および肌荒れに対する海洋性コラーゲンペプチド含有飲料の有用性. *Frangrance Journal*, 31: 97–102, 2003.
- Ohara, H., Ito, K., Iida, H., Matsumoto, H.: Improvement in the moisture content of the stratum corneum following 4 weeks of collagen hydrolysate ingestion. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 56: 137–145, 2009.
- Asserin, J., Lati, E., Shioya, T., Prawitt, J.: The effect of oral collagen supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an *ex vivo* model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *J. Cosmet. Dermatol.*, 14: 291–301, 2015.
- Inoue, N., Sugihara, F., Wang, X.: Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhances facial skin moisture and elasticity and reduce facial aging signs in a randomized double-blind placebo-controlled clinical study. *J. Sci. Food Agric.*, 96: 4077–4081, 2016.
- Proksch, E., Segger, D., Degwert, J., Schunck, M., Zague, V., Oesser, S.: Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: Double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 27: 47–55, 2014.
- Proksch, E., Schunck, M., Zague, V., Segger, D., Degwert, J., Oesser, S.: Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 27: 113–119, 2014.
- Oba, C., Ohara, H., Morifuji, M., Ito, K., Ichikawa, S., Kawahata, K., Koga, J.: Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 29: 204–211, 2013.
- Koyama, Y., Kuwaba, K., Kondo, S., Tsukada, Y.: Supplemental ingestion of collagen peptide suppresses ultraviolet-induced erythema—A randomized double-blind placebo controlled study. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 42: 781–790, 2014.
- Nakao, K., Hara, K., Kusubata, M., Igarashi, M., Yamazaki, N., Koyama, Y. I.: Effects of collagen peptide ingestion on healing of skin wound in a rat model of pressure ulcer. *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 41: 587–596, 2013.
- Sugihara, F., Inoue, N., Venkateswarathirukumara, S.: Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhanced pressure ulcer healing in a randomized double-blind placebo-controlled clinical study. *Sci. Rep.*, 8: 11403, 2018.
- Xiong, X., Liang, J., Xu, Y., Liu, J., Liu, Y.: The wound healing effects of the Tilapia collagen peptide mixture TY001 in streptozotocin diabetic mice. *J. Sci. Food Agric.*, 100: 2848–2858, 2020.
- Foltz, M., Meynen, E. E., Bianco, V., van Platerink, C., Konig, T. M. M. G., Kloek, J.: Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J. Nutr.*, 137: 953–958, 2007.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y., 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.
- Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., 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.
- Shigemura, Y., Kubomura, D., Sato, Y., Sato, K.: Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chem.*, 159: 328–332, 2014.
- Shigemura, Y., Suzuki, A., Kurokawa, M., Sato, Y., Sato, K.: Changes in composition and content of food-derived peptide in human blood after daily ingestion of collagen hydrolysate for 4 weeks. *J. Sci. Food Agric.*, 98: 1944–1950, 2018.
- Jimi, S., Sato, K., Kimura, M., Suzumiya, J., Hara, S., Francesco, D. F., Ohjimi, H.: G-CSF administration accelerates cutaneous wound healing accompanied with increased Pro-Hyp production in db/db mice. *Clin. Res. Dermatol.*, 4: 1–9, 2017.
- Kusubata, M., Koyama, Y., Tometsuka, C., Shigemura, Y., Sato, K.: Detection of endogenous and food-derived collagen dipeptide prolylhydroxyproline (Pro-Hyp) in allergic contact dermatitis-affected mouse ear. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79: 1356–1361, 2015.
- Yoshisato, K., Taira, T., Yamamoto, N.: Growth inhibition of human fibroblasts by reconstituted collagen fibrils. *Biomed. Res.*, 6: 61–71, 1985.
- Asai, T. T., Oikawa, F., Yoshikawa, K., Inoue, N., Sato, K.: Food-derived collagen peptides, prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), and hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) enhance growth of primary cultured mouse skin fibroblast using fetal bovine serum free from hydroxyprolyl peptide. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 229, 2020.
- Sato, K., Asai, T. T., Jimi, S.: Collagen-derived di-peptide, prolylhydroxyproline (Pro-Hyp): A new low molecular weight growth-initiating factor for specific fibroblasts associated with wound healing. *Front. Cell Dev. Biol.*
- Ohara, H., Ichikawa, S., Matsumoto, H., Akiyama, M., Fujimoto, N., Kobayashi, T., Tajima, S.: Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J. Dermatol.*, 37: 330–338, 2010.
- Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J., Wada, M.: Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolylhydroxyproline in mouse articular cartilage *in vitro* and *in vivo*. *Osteoarthritis Cartilage*, 17: 1620–1627, 2009.
- Rossio-Pasquier, P., Casanova, D., Jomard, A., Démarchez, M.: Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse after a superficial excisional injury: Human dermal reconstruction is achieved in several steps by two different fibroblast subpopulations. *Arch. Dermatol. Res.*, 291: 591–599, 1999.
- Asai, T. T., Yoshikawa, K., Sawada, K., Fukamizu, K., Koyama, Y., Shigemura, Y., Jimi, S., Sato, K.: Mouse skin fibroblasts with mesenchymal stem cell marker p75 neurotrophin receptor proliferate in response to prolyl-hydroxyproline. *J. Funct. Foods*, 66: 103792, 2020.
- Iwata, Y., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Takahashi, M., Yagami, A., Nakata, S., Matsunaga, K.: The epidermal integrin beta-1 and p75NTR positive cells proliferating and migrating during wound healing produce various growth factors, while the expression of p75NTR is decreased in patients with chronic skin ulcers. *J. Dermatol. Sci.*, 71: 122–129, 2013.