

## Original article

**Development of anti-glycation assay kits for assessment of bone and cartilage collagen modification**

Shizuko Sekiguchi<sup>1)</sup>, Toshio Taira<sup>1)</sup>, Keitaro Nomoto<sup>2)</sup>, Wakako Takabe<sup>2)</sup>,  
Parengkuan Lanny<sup>2)</sup>, A. N. M. Mamun Or Rashid<sup>2)</sup>, Masayuki Yagi<sup>2)</sup>, Yoshikazu Yonei<sup>2)</sup>

1) Primary Cell Division, Cosmo Bio Co., Ltd., Sapporo, Hokkaido, Japan

2) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences,  
Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2016; 3 (2): 74-80

(c) Society for Glycative Stress Research

## (原著論文)

**骨及び軟骨の糖化抑制評価キットの試作**

関口志津子<sup>1)</sup>、平 敏夫<sup>1)</sup>、桒本慶太郎<sup>2)</sup>、高部稚子<sup>2)</sup>、Parengkuan Lanny<sup>2)</sup>、  
A. N. M. Mamun Or Rashid<sup>2)</sup>、八木雅之<sup>2)</sup>、米井嘉一<sup>2)</sup>

1) コスモ・バイオ株式会社プライマリーセル事業部、札幌

2) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター、京都

**抄録**

**【目的】** これまでに皮膚由来のコラーゲンをを用いたコラーゲン抗糖化アッセイキットは市販されているが骨由来のものはない。骨由来のコラーゲンなどで糖化反応抑制作用を検証できれば、骨密度低下、骨質低下など運動器の機能低下予防に役立つ素材開発に貢献できる。そこで、本研究では骨、軟骨由来のコラーゲン、さらに象牙質切片を用いて、新規コラーゲン抗糖化アッセイキットの試作を行った。

**【方法】** 皮膚コラーゲン (Skin-Col)、軟骨コラーゲン (Cartilage-Col)、骨コラーゲン (Bone-Col) モデルを作成し、モデルサンプル中のコラーゲン濃度測定、ゲル化の程度評価のため波長 400 nm における吸光度測定、分子構造解析として SDS (Sodium dodecyl sulfate) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 電気泳動を行った。さらに、糖化度測定のため各サンプルを一晩 37°C で加温しゲル化させ、糖化反応抑制剤であるアミノグアニジン (aminoguanidine: AG) 0 ~ 20 mM、500 mM グリセルアルデヒド (glyceraldehyde: GA) を添加し 37 度で 24 時間糖化させたサンプルの AGEs 蛍光強度 (励起光 370 nm、蛍光 440 nm) 測定した。骨質評価モデルサンプルの褐変変化評価には、象牙質切片に GA (100 ~ 250 mM) を添加し 37°C、1 日間インキュベーションし目視により確認した。

**【結果】** コラーゲン濃度の測定において、Skin-Col (1%) は高く、Cartilage-Col (1%) 及び濃縮した Bone-Col は同程度のコラーゲンを含んでいた。濁度は Skin-Col、Bone-Col、Cartilage-Col の順に高く、Bone-Col、Cartilage-

Col は同程度であった。分子構造解析の結果、Cartilage-Col は Skin-Col と比較して  $\alpha 1$  鎖一本で形成された典型的な 2 型コラーゲンであることがわかった。さらに Skin-Col と Cartilage-Col は  $\alpha$  鎖以下の低分子にあまりバンドが出ていないことから分解物などが少ないサンプルになっていることがわかった。AGEs 蛍光強度は、Skin-Col、Cartilage-Col、Bone-Col の順に強く、いずれのサンプルも AG の濃度依存的に蛍光強度が低下した。

【結語】本研究の結果、軟骨由来コラーゲン及び骨由来コラーゲンは、皮膚由来コラーゲンと同様の実験結果が示されたため、今後、各部位のコラーゲン抗糖化アッセイキット作製に利用できる可能性が認められた。

**KEY WORDS:** Quantitative Kit, glycation, bone, cartilage, collagen,

## はじめに

糖類は生命活動において不可欠な栄養素であるが、生体内の蛋白と共存すると、蛋白内のリジンやアルギニン残基を修飾し架橋形成し蛋白の立体構造を変え活性や物性に大きく影響を及ぼす<sup>1, 2)</sup>。この反応は糖化反応 (Glycation) もしくはメイラード反応と呼ばれ、アマドリ転移物が生成する前期反応と、酸化、脱水、縮合などの反応を経て糖化反応後期生成物 (advanced glycation endproducts: AGEs) に至る後期反応に分けられる<sup>1, 2)</sup>。皮膚<sup>2, 3)</sup>、骨<sup>4, 5)</sup>、軟骨<sup>6, 7)</sup> などあらゆる臓器を形作る構造蛋白であるコラーゲンも例外ではなく糖化による修飾を受ける。

近年、無細胞及び非酵素的にコラーゲン<sup>8)</sup>、エラスチン<sup>9)</sup> の糖化反応進行度を評価できるキットにて、コラーゲンの糖化反応を阻害する物質のスクリーニングを容易に行うことができるようになった。同キットを用いて、機能性食品及び化粧品開発における抗糖化素材評価が行われている。しかしながら、これまでに皮膚由来のコラーゲンを用いたコラーゲン抗糖化アッセイキットは市販されているが骨由来のものはない。骨由来のコラーゲンで糖化反応抑制作用を検証できれば、骨密度低下、骨質低下など運動器の機能低下予防に役立つ素材開発に貢献できる。そこで、本研究では骨及び軟骨由来のコラーゲン、さらに象牙質切片を用いて、新規コラーゲン抗糖化アッセイキットの試作を実施した。

## 方法

### コラーゲン溶液の調製

皮膚コラーゲンモデル (Skin-Col) は、ブタ皮膚製 1 型コラーゲン溶液 (日本ハム株式会社、大阪) (1%) に等量の 2 倍濃度リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline: PBS) を添加し 4°C で攪拌し調製した。軟骨コラーゲンモデル (Cartilage-Col) には、ブタ軟骨製コラーゲン (2 型コラーゲン凍結乾燥品; 日本ハム株式会社、大阪) 0.1 g に 9.9 mL の超純水を加え 4°C で攪拌し調製した。骨コラーゲンモデル (Bone-Col) にはウシ骨コラーゲン (1 型コラーゲン凍結乾燥品; コスモ・バイオ株式会社、東京) 2.2 g に 200 mL の超純水を加え 4°C で攪拌し 12,000 G の遠心上清を用いた。

### コラーゲン濃度測定

サンプル中のコラーゲン濃度をコラーゲン定量キット (Collagen Quantitative Kit; コスモ・バイオ株式会社) で測定した。

### 濁度測定

2 倍濃度の PBS と等量混合したコラーゲンサンプルをそれぞれ 96 well Black Plate に分注し 37°C、湿潤状態でコラーゲンをゲル化させた (Fig. 1)。ゲル化 (コラーゲンの繊維化) の指標として波長 400 nm における吸光度を測定した。

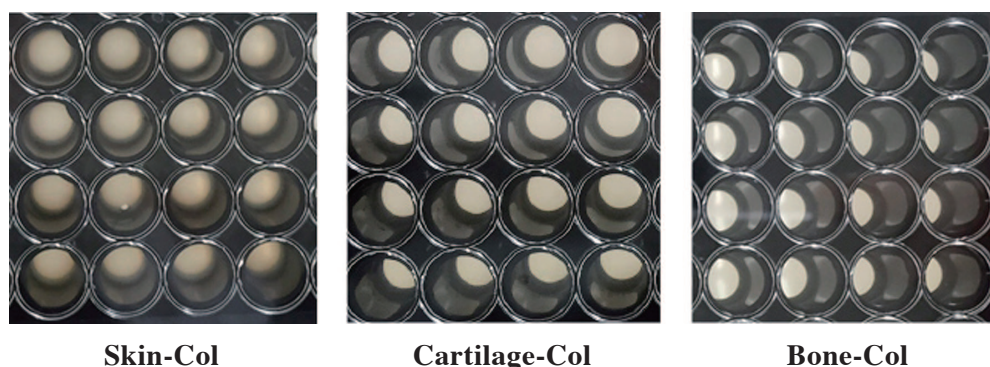


Fig. 1. Each sample of collagen gel.

## SDS-PAGE

分子構造解析として SDS (Sodium dodecyl sulfate)-ポリ  
アクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。コラー  
ゲンサンプルを 50  $\mu$ L とり、等量の 2 倍濃度の SDS-PAGE  
サンプルバッファーを加えて攪拌後、80  $^{\circ}$ C で 2 分間加温  
し電気泳動用試料溶液とした。ゲル濃度 7.5% のプレキャ  
ストゲル (マルチゲル II ミニ 7.5 (13W); コスモ・バイオ  
株式会社) を用いて、それぞれのサンプルを well にチャージし、30 mA で 55 分間泳動、Coomassie Brilliant Blue (CBB)  
染色液で 1 時間染色し一晩脱色した。

## 糖化試験

サンプルに等量の 2 倍濃度 PBS を低温条件下で加えて  
中和液を作成した。この溶液を 96 well ブラックプレート  
に 50  $\mu$ L 分注し 一晚 37  $^{\circ}$ C で加温しコラーゲン溶液をゲル  
化させた。このコラーゲンゲル上に糖化反応抑制剤で  
あるアミノグアニジン (aminoguanidine: AG) 0 ~ 20 mM  
を添加した。すべての well に 500 mM グリセルアルデヒド  
(glyceraldehyde: GA) を添加し 37 度で 24 時間糖化させ  
た<sup>10)</sup>。糖化度は AGEs 蛍光強度 (励起光 370 nm、蛍光  
440 nm) を蛍光プレートリーダー (インフィニット M200  
PRO; Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) にて測定  
した<sup>10,11)</sup>。

## 骨質評価モデルの作製

象牙質切片 (厚み: 300  $\mu$ m、直径 6 mm) (コスモ・バイ  
オ株式会社) を 96 ウェルブラックプレートに入れ、PBS  
または AG (0 ~ 10 mM) 及び GA (100 ~ 250 mM) 溶液を  
添加した。サンプルを糖化反応させるため 37  $^{\circ}$ C、1 日間イ  
ンキュベーションした。糖化反応の程度をサンプルの褐変  
化により確認した<sup>12)</sup>。

## 結果

### コラーゲン濃度定量

Skin-Col のコラーゲン濃度は 5.58 mg/mL、Cartilage-Col  
は 3.73 mg/mL、Bone-Col は濃縮前 0.2 mg/mL、濃縮後 3.05  
mg/mL であった (Table 1)。

### コラーゲンゲルの濁度測定

ブタ皮膚製コラーゲンのゲルの濁度は  $0.459863 \pm 0.017977$ 、ブタ軟骨中和コラーゲンは  $0.086663 \pm 0.008986$ 、ウシ骨中和コラーゲンは  $0.101388 \pm 0.027583$   
であった (Fig. 2)。

Table 1. Collagen concentration in each sample

| Collagen sample | [mg/mL] |
|-----------------|---------|
| Skin-Col        | 5.58    |
| Cartilage-Col   | 3.37    |
| Bone-Col        | 3.05    |

Skin-Col, porcine skin collagen type 1 model; Cartilage-Col, porcine cartilage collagen type 2 model;  
Bone-Col, bovine bone collagen type 1 model. Each sample was diluted 100-fold.

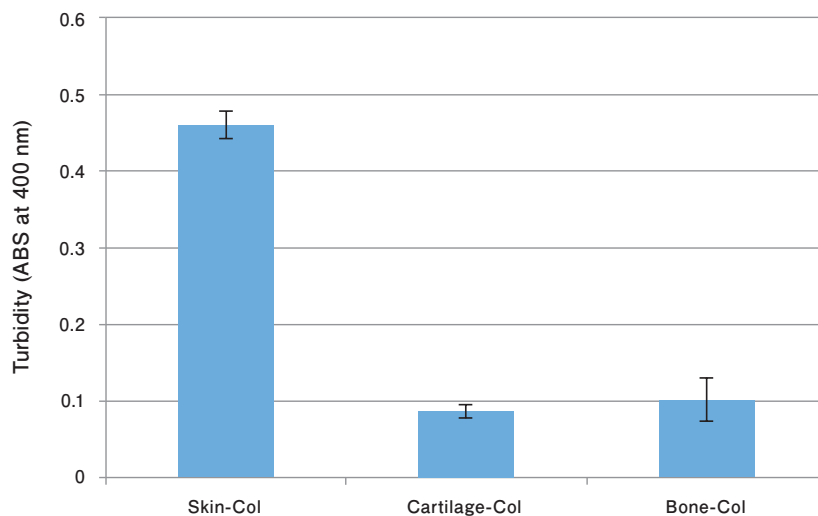


Fig. 2. Turbidity of each collagen sample.

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, n = 3. Skin-Col, porcine skin collagen type 1 model;  
Cartilage-Col, porcine cartilage collagen type 2 model; Bone-Col, bovine bone collagen type 1 model.

## SDS 電気泳動による分析

Skin-Col は 100 kDa 付近に 2 本、200 kDa 付近に 1 本のバンドが出現した (Fig. 3)。Cartilage-Col は 100 kDa 付近に 1 本のバンドが出現した (Fig. 3)。また、Skin-Col と Cartilage-Col は  $\alpha$  鎖以下の低分子にほとんどバンドが出現しなかった。一方、Bone-Col は溶解性も低く、溶解したコラーゲンも  $\alpha$  鎖以下の低分子に帯状の分解産物が出現した。

## AGEs 蛍光強度

Cartilage-Col 及び Bone-Col も Skin-Col と同様に、GA による AGEs 由来蛍光が認められた。また、AG 濃度依存的に抑制された (Fig. 4)。蛍光強度は Skin-Col が最も高く Cartilage-Col は及び Bone-Col は同等の値であった。

## 骨質低下モデルの作製

GA 無添加 (0 mM) の象牙質切片サンプルは褐変化されず、250 mM GA では全てのサンプルで褐変化が認められたものの、AG による糖化反応阻害は認められなかった (Fig. 5)。一方、100 mM GA では AG 濃度に依存してサンプルの褐変化が抑制された (Fig. 6)。

本研究では、骨及び軟骨由来のコラーゲン、さらに象牙質切片を用いて新規コラーゲン抗糖化アッセイキットを試作した。Fig. 7 はアッセイキットのプロトタイプである。

## 軟骨及び骨由来のコラーゲン

今回、Cartilage-Col と Bone-Col を用いて Skin-Col と同様の抗糖化アッセイが可能であるか検討するため、各サンプルのコラーゲン濃度、濁度、分子構造解析、さらに AGEs 蛍光強度の測定のため糖化試験を実施した。

コラーゲン濃度の測定において、Skin-Col 及び Cartilage-Col と同様、Bone-Col を 1% に調製して測定を試みたが、溶解するコラーゲン濃度が低かった (データ未掲載)。しかしながら、濃縮した Bone-Col では、Cartilage-Col と同程度のコラーゲンを含んでいることがわかる (Table 1)。濁度は Skin-Col、Bone-Col、Cartilage-Col の順に高く、Bone-Col、Cartilage-Col は同程度である (Fig. 2)。

分子構造解析の結果、Cartilage-Col は Skin-Col と比較して  $\alpha 1$  鎖一本で形成された典型的な 2 型コラーゲンであることがわかる (Fig. 3)。さらに Skin-Col と Cartilage-Col は  $\alpha$  鎖以下の低分子にあまりバンドが出ていないこと

## 考察

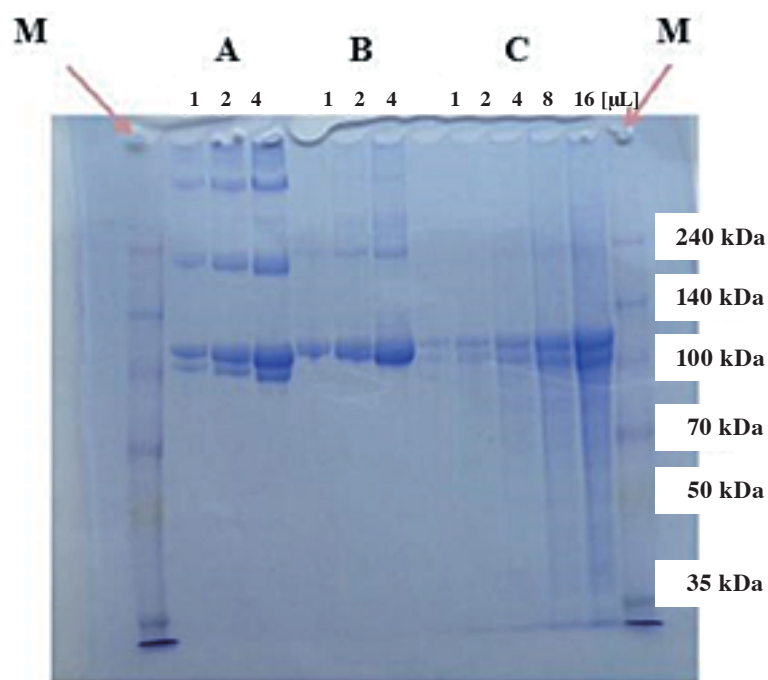
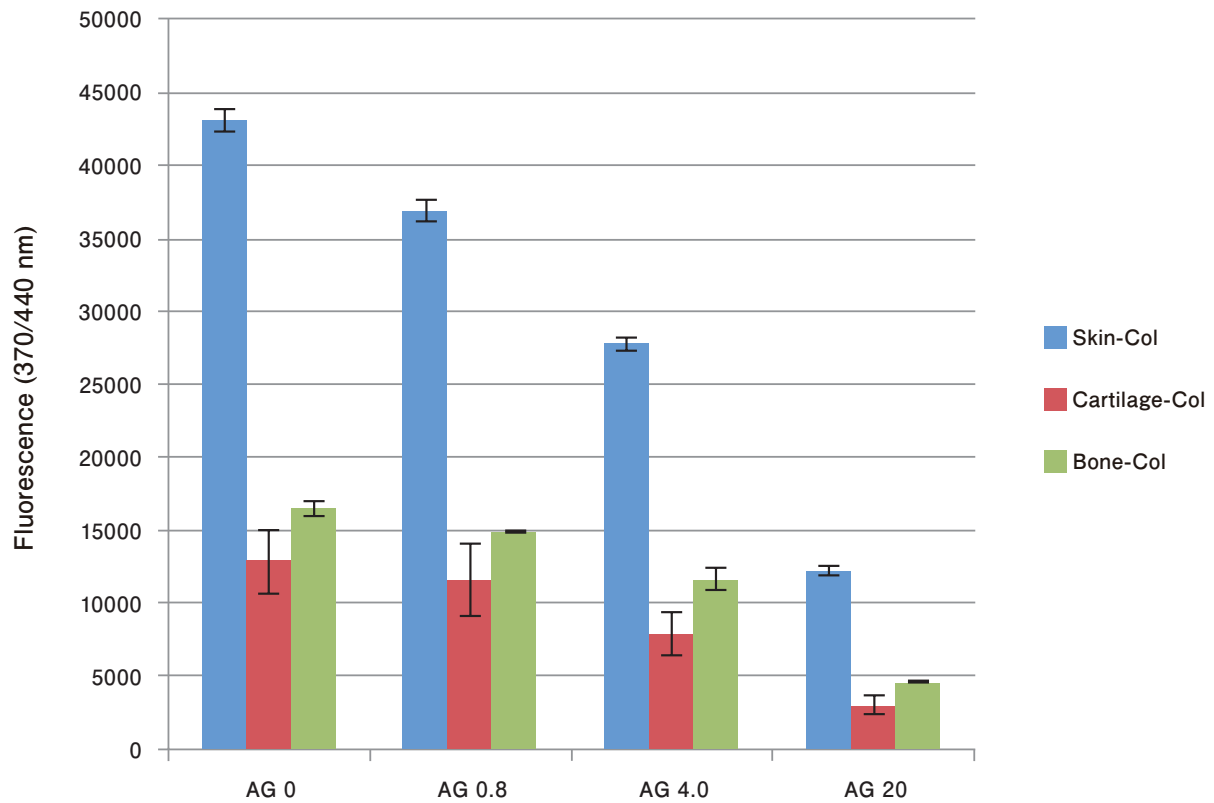


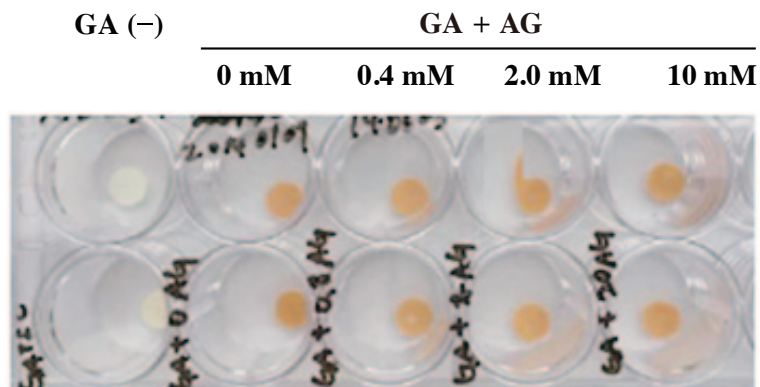
Fig. 3. SDS-PAGE

A: Skin-Col, B: Cartilage-Col, C: Bone-Col, M: molecular weight markers. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; Skin-Col, porcine skin collagen type 1 model; Cartilage-Col, porcine cartilage collagen type 2 model; Bone-Col, bovine bone collagen type 1 model.



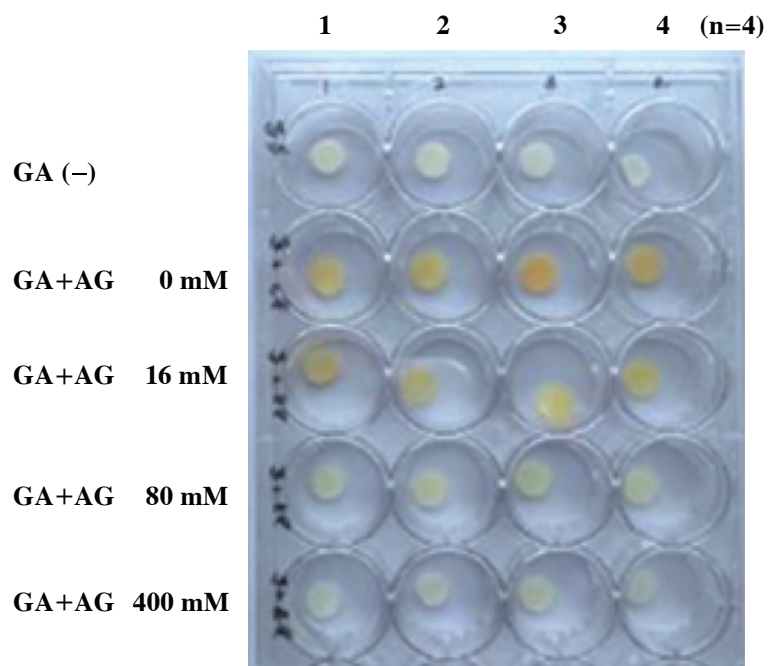
**Fig. 4. AGE fluorescence of each collagen sample.**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, n = 4. AGE, advanced glycation end products; AG, aminoguanidine (0 mM, 0.8 mM, 4.0 mM, 20 mM); Skin-Col, porcine skin collagen type 1 model; Cartilage-Col, porcine cartilage collagen type 2 model; Bone-Col, bovine bone collagen type 1 model.



**Fig. 5. Browning of dentinal samples.**

GA, glyceraldehyde; AG, aminoguanidine (0~10 mM).



**Fig. 6. Browning of dentinal samples II.**  
GA, glyceraldehyde; AG, aminoguanidine.



**Fig. 7. Prototype of Bone & Cartilage Glycation Assay Kit.**

から分解物などが少ないサンプルになっていることがわかる。一方、ウシ骨コラーゲンは溶解性も低く、わずかに溶解したコラーゲンも  $\alpha$  鎖以下の低分子に帯状の分解産物が認められ、分子内に多少の亀裂などが生じている可能性が示唆された。

AGEs 蛍光強度は、Skin-Col、Cartilage-Col、Bone-Col の順に強かった (**Fig. 4**)。また、いずれのサンプルも AG の濃度依存的に蛍光強度が低下した。これは、サンプル中のコラーゲン濃度が高いほど糖化蛋白が増えるためと考えられる<sup>10, 11</sup>。また、サンプルの蛍光強度に差が生じる原因としては、コラーゲン分子内の糖化を受けやすい部位（リジン、アルギニンなど）の量及び反応性の違いが考えられる。我々の先行研究では、HSA (human serum albumin)、BSA (bovine serum albumin)、I 型コラーゲン、ケラチン<sup>13</sup>、エラスチン、プロテオグリカンの AGEs 蛍光強度及びリジン、アルギニン濃度と AGEs 蛍光の相関関係を調べたところ、リジンを多く含む蛋白ほど、糖化反応により AGEs 蛍光強度が増加する傾向があった<sup>10</sup>。その他に、コラーゲンの由来組織による違い（タイプ別の違い）、中和条件での線維形成（ゲル化）の違いなどが考えられるが、今後の検討課題としたい。

これまでに、お茶やハーブ<sup>11</sup>、スパイス<sup>14</sup>、野菜<sup>15</sup>、果実<sup>16</sup>などの成分のヒト血清アルブミンにおける抗糖化抑制作用が検証されている。また、皮膚由来のコラーゲンをを用いたコラーゲン抗糖化アッセイキットも使用されている。本研究の結果より、軟骨由来コラーゲン及び骨由来コラーゲンは、皮膚由来コラーゲンと同様の実験結果が示されたため、今後、先行研究のように様々な物質の抗糖化活性作用などの評価が可能となると期待される。

## 骨質低下モデル

骨の糖化現象を視覚化できるアッセイキットの作製を目的に、象牙質切片に GA を加えて加温し糖化反応させた。また、糖化阻害剤である AG を添加することで AG 濃度依存的に褐変を抑制することを見出した (**Fig. 5, 6**)。

生体内の様々な部位は、加齢または糖尿病により褐変化することが報告されている<sup>17, 18</sup>。また、我々の先行研究では牛皮を用いた糖化反応モデル及びヒトの皮膚の励起光 370 nm における蛍光スペクトルを測定したところ、糖化反応、加齢に伴い AGEs 蛍光（蛍光強度 440 nm）強度が増加し<sup>19</sup>、同波長領域近辺の蛍光強度は、暦年齢、血管年齢、生活習慣の乱れなどと正の相関関係を認めることを報告した<sup>20</sup>。これらのことから、本研究で褐変化の可視化に

成功した骨サンプルを用いることで、見た目でわかる抗糖化アッセイキットとしても有用であると考えられた。また、今回使用した象牙質切片サンプルは、破骨細胞の活性をみる目的などに用いられており、AGEs による破骨細胞への影響試験へも直接利用可能などともユニークな系となる可能性が示唆された。

## 結語

本研究の結果、軟骨由来コラーゲン及び骨由来コラーゲンは、皮膚由来コラーゲンと同様の実験結果が示されたため、今後、各部位のコラーゲン抗糖化アッセイキット作製に利用できると予想される。

## 謝辞

本研究の要旨は第9回糖化ストレス研究会（2015年9月5日）にて発表した。本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム研究課題番号 14533567）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）によって実施された。

## 利益相反申告

本研究の一部はコスモ・バイオ株式会社より支援を受けた。

## Reference

- 1) Sun W, Cleary P, aging-related disease. *Anti-Aging Medicine*. 2010; 7: 112-119.
- 2) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Medicine*. 2011; 8: 23-29.
- 3) Genuth S, Sun W, Cleary P, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-Year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: 3103-3111.
- 4) Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2010; 21: 195-214.
- 5) Saito M, Fujii K, Soshi S, et al. Reductions in degree of mineralization and enzymatic Collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int*. 2006; 17: 986-995.
- 6) DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, et al. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: The role of nonenzymatic glycation. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 1003-1009.
- 7) DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: 1207-1215.
- 8) Takino J, Kobayashi Y, Takeuchi M. The formation of intracellular glyseraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J Gastroenterol*. 2010; 45: 646-655.
- 9) Konova E, Baydanoff S, Atanasova M, et al. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Experimental Gerontology*. 2004; 39: 249-254.
- 10) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Medicine*. 2012; 9: 125-134.
- 11) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Medicine*. 2012; 9: 135-148.
- 12) Ichijo R, Yagi M, Chihaya Y, et al. Development of glycation model using bovine skin. *The Science and Engineering Review of Doshisha University*. 2012; 53: 67-70. (in Japanese)
- 13) Yonei Y, Takabe W, Yagi M. Photoaging and glycation of elastin: Effect on skin. *Glycative Stress Research*. 2015; 2: 182-190.
- 14) Moniruzzaman M, Parengkuan L, Yagi M, et al. Effect of proteins, sugars and extraction methods on the anti-glycation activity of spices. *Glycative Stress Research*. 2015; 2: 129-139.
- 15) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Research*. 2015; 2: 22-34.
- 16) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Medicine*. 2013; 10: 70-76.
- 17) Tessier FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris)*. 2010; 58: 214-219.
- 18) Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81: 583-587.
- 19) Nomoto K, Yagi M, Hamada U, et al. Identification of advanced glycation endproducts derived fluorescence spectrum *in vitro* and human skin. *Anti-Aging Medicine*. 2013; 10: 92-100.
- 20) Nomoto K, Yagi M, Takabe W, et al. Survey of fluorescence wavelength range reflecting human tissue aging. *Glycative Stress Research*. 2015; 2: 114-120.