

博士論文

畜産物由来のシステインの
抗酸化・抗毒性及び抗肥満効果

平成27年度
(2015年3月)

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻

李スルキ

Doctor' s thesis

The effect of dietary L-cysteine on
antioxidative, anti-toxicity and
anti-obesity

March 2015

Lee SeulKi

The united graduate school of
Agricultural sciences, Iwate University

目次

<第1章>

緒論・・・ 3

<第2章> L-システイン摂取が正常ラットの抗酸化能および脂質代謝に与える影響

緒言・・・ 8

実験方法・・・ 10

- 1 実験動物および飼育条件
- 2 実験食
- 3 投与実験
- 4 分析試料採取、体重および摂食量の測定
- 5 解剖
- 6 血清の生化学的成分の分析
- 7 肝臓中性脂肪の定量
- 8 肝臓中過酸化脂質量の定量
- 9 肝臓中グルタチオンの定量
- 10 肝臓中抗酸化酵素の定量

実験結果・・・ 17

- 1 体重、摂食量、組織重量 および肝臓中中性脂質レベル
- 2 血清脂質およびグルコース濃度
- 3 肝臓中過酸化脂質およびグルタチオン量
- 4 肝臓中抗酸化酵素活性

考察・・・ 25

〈第3章〉 L-システイン摂取がガラクトサミン (GalN) 誘発肝障害ラットにおける肝障害抑制および抗酸化能に与える影響

緒言 30

実験方法 32

- 1 実験動物および飼育条件
- 2 実験食
- 3 投与実験
- 4 分析試料採取、体重および摂食量の測定
- 5 解剖
- 6 血清の生化学的成分の分析
- 7 肝臓中性脂肪の定量
- 8 肝臓中抗酸化酵素活性の測定
- 9 肝臓中過酸化脂質量の定量
- 10 肝臓中グルタチオン量
- 11 血清過酸化脂質量の定量
- 12 血清グルタチオン量の定量

実験結果 39

- 1 体重、摂食量、組織重量および肝臓、血清中性脂質レベル
- 2 血清酵素活性
- 3 肝臓内抗酸化酵素活性
- 4 肝臓内過酸化脂質およびグルタチオン量
- 5 血清中過酸化脂質およびグルタチオン量

考察 48

〈第4章〉 L-システインの投与が3T3-L1脂肪細胞の脂肪蓄積に与える影響を及ぼす

緒言 53

実験方法 55

- 1 細胞培地および脂肪細胞への分化
- 2 TG 蓄積量
- 3 GPDH 活性

- 4 DNA 量
- 5 アディポサイトカインの定量
- 6 細胞生存率測定
- 7 遺伝子発現量の定量

実験結果 65

- 1 TG 含量, GPDH 活性および MTT 活性
- 2 細胞内サイトカインレベル測定
- 3 3T3-L1 細胞内 mRNA 発現レベル測定

考察 80

<第5章>

総合考察 84

要約 89

参考文献 91

第1章

結論

酸化ストレスとは生体内で活性酸素の生成と抗酸化剤による消去の均衡が崩れて活性酸素種が過剰になる状態をいう^{1,2)}。体内に存在する数々の分子は非共有電子を持つ、これらをフリーラジカルと呼ぶ。フリーラジカルは非共有電子がほかの電子と強力に結合しようとする性質を持ち、そのため不安定な状態で存在する。体内で酸素分子は代謝作用でフリーラジカルを生成し、正常の酸素分子より反応性の高い物質に変化したものを活性酸素種と呼ぶ。このような活性酸素種には Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Hydroxyl radical (HO^{\cdot}), Hydroperoxyl radical (HO_2^{\cdot}), Nitric oxide (NO^{\cdot}), Alkylhydroperoxide (LOOH), Alkylperoxyl radical (LOO^{\cdot}), Alkoxy radical (LO^{\cdot})などが存在する³⁾。活性酸素は不安定な状態を安定させるため細胞膜の構成成分である脂質タンパクや細胞内 DNA を直接また間接的に攻撃し、細胞の損傷、細胞死および臓器損傷が起こる。これらの結果は人のような哺乳動物での酸化ストレスは心血管系疾患、肥満、アテローム性動脈硬化症、高血糖症、癌および糖尿病のような様々な疾病の発病と老化の病理過程で関与することでよく知られている^{2, 4-6)}。高血糖の状態では細胞内グルコースが増加すると ATP を生成するためミトコンドリアの電子伝達系が活性化され副産物として活性酸素種 ($\cdot O_2$) が過剰生産される⁷⁾。また糖尿病の時には酸化ストレスが脂肪で糖の吸収を妨害し膵臓でインスリン分泌を減少させる⁸⁾。また様々なサイトカインにより生成される酸化ストレスは血管細胞および免疫細胞の相互作用により炎症を誘発し動脈硬化を起こす⁹⁾。したがって代謝疾患状態で活性酸素種の生成増加と酸化ストレス状態を理解し、予防するのは重要と考えられる。

遺伝、代謝、栄養因子および体内でエネルギー取得により脂肪細胞内に過剰なトリグリセリド蓄積による脂肪細胞の大きさの増加は主に白色脂肪組織に大きい肥満

度指数を示し、このような現象を肥満と呼ぶ。World Health Organization (WHO) では肥満を body mass index (BMI) が30異常、もしくは BMI が25であり過体重である状態と定義した¹⁰⁾。肥満、特に内臓脂肪は2型糖尿病、高血圧、高脂血症、心臓病および癌のような様々な疾病と関連しているのがよく知られている¹¹⁾。脂肪組織、特に白色脂肪細胞は単脂肪は単純にトリグリセリドの貯蔵器官だけではなくアディポサイトカインという生理活性物質を分泌し体内恒常性を維持する役割もする¹⁰⁾。肥満時、脂肪細胞に過量のトリグリセリド蓄積で脂肪細胞の肥大化が起こり、脂肪組織へ大量のマクロファージが存在し、活性化したマクロファージは炎症と酸化ストレスを引き起こす¹²⁾。したがって酸化ストレスは肥満と BMI、体脂肪のパーセントおよびトリグリセリドのレベルと関連している¹³⁾。肥大化された脂肪細胞では炎症反応と関連する TNF- α や IL-6などが大量に分泌され、炎症から保護機能があるアディポネクチンの分泌減少が見られる。また炎症関連アディポサイトカインである PAI-1は血栓を形成するフィブリノーゲンと関連があり、肥満状態で多量分泌された時動脈硬化が起こる^{14, 15)}。肥大化された脂肪細胞から放出された多量の FFA はミトコンドリアで NADPH 酸化剤を活性化させ酸化され活性酸素を生成する¹⁶⁾。これらのような炎症反応と活性酸素生成を減少させるため脂肪細胞の肥大化と脂肪細胞への分化を調節し理解するのは重要に考えられる。

生体は活性酸素種を消去する抗酸化機能を有している。抗酸化酵素および抗酸化物質には catalase、superoxide dismutase、glutathione peroxidase (GPx) のような酵素および glutathione (GSH)、vitamin E、uric acid、sulfhydryl amino acid などの非酵素的抗酸化剤が存在する¹⁷⁾。自然界で sulfhydryl amino acid である cysteine は豚肉、鶏肉、卵などの動物性の高タンパク質源に存在し玉ねぎ、にんにく、オーツ麦などの植物性供給源にも存在する。しかし自然状態での存在量は少量でありサプリメントや薬品などに利用するためには人の髪や家畜の羽、毛などを工業的に加水分解して得た L-cysteine を主に使用する¹⁸⁾。今回実験で使用した L-cysteine は廃鶏の羽

毛から加水分解して抽出ものを用いた。北海道では毎年3705千万匹の廃鶏が発生し、骨や羽毛、内臓、脂肪などの副産物が発生する¹⁹⁾。その中羽毛は鶏1匹当たり約20%程度破棄される。羽毛には約91%の高純度の天然タンパク質、特にケラチンが主な構成成分として含まれている。羽毛のケラチンには主に cysteine や glycin、alanin などのアミノ酸が長く繋がった形で存在している。特に cysteine や cystine のような合流アミノ酸が豊富に含まれている²⁰⁾。タンパク質の合成材料となり cysteine そのものあるいはシステイン代謝物質が生体内で様々な役割を果たす。システインは20個の基本アミノ酸の中で唯一側鎖にチオール基を有し酸化還元反応をすることから抗酸化能力を持つ²¹⁾。また過酸化脂質を形成する Cu^{2+} に結合することより LDL の酸化を抑制する²²⁾。L-cysteine を材料として合成されるトリペプチドであるグルタチオン(GSH)は生体内の酸化還元システムで重要な役割と毒性異物に対して解毒作用をする²³⁾。グルタチオンの生理的機能は大きく二つに分類でき、一つは GPx を触媒として活性酸素種や過酸化脂質を分解する作用である。この際、GSH は酸化型グルタチオン(GSSG) に変わり、GSSG はグルタチオンリダクターゼ (GR) と NADPH により再び GSH に変換される。またグルタチオンはチオール基に毒物や抗生物質を結合させ、細胞外に排出する。グルタチオン S-トランスフェラーゼはこの結合反応を触媒する²⁴⁾。しかし、細胞内グルタチオンの濃度は絶食や老化および薬物乱用などにより減少され、これは酸化ストレスと毒性損傷の原因になる^{7, 25-27)}。このようなグルタチオンは経口投与では吸収率が低いため効果的に体内でグルタチオンレベルを増加させるためには前駆体である L-cysteine の摂取が必要である²⁸⁾。L-cysteine はグルタチオンの合成でチオール(SH)基を提供する主要要素であるといえる²⁹⁾。Cysteine は不安定なためチオール基が酸化され cystine を形成する。Cystine は消化管や血液中を移動して細胞に吸収され、二つの cysteine に分解され、グルタチオンの合成に利用される。Cystine のジスルフィド結合によりタンパク質の立体構造と機能を持つ重要な役割をする²¹⁾。合流アミノ酸は脂質代謝へ影響することが知られている。Cystine は血清

中のコレステロール濃度に影響を与える効果があり、悪玉コレステロールである超低密度アポリポタンパク質コレステロール (VLDL コレステロール)、低密度アポリポタンパク質コレステロール (LDL コレステロール) の濃度を低下させ、特に LDL コレステロールを低下させる作用を持つ³⁰⁾。

今回の実験では廃鶏の羽毛から分離した L-cysteine を用いて L-cystein の抗酸化、解毒作用および抗肥満効果に及ぼす影響を *in vivo* と *in vitro* 実験を行って検討した。第2章では L-cysteine を正常食のラットへ食べさせ L-cysteine によるグルタチオン合成などを検討し抗酸化効果および血清脂質レベル、組織重量を検討した。第3章では L-cysteine をガラクトサミン投与により急性肝毒性を引き起こしたラットへ食べさせ肝毒性指標を調べ、L-cysteine の解毒作用および抗酸化効果を調べ、第1章と同じく血清脂質レベルおよび組織重量を検討した。第4章では第2章と第3章の血清脂質および脂肪組織重量の結果から *in vitro* 実験を行い3T3-L1脂肪細胞を用いて抗肥満効果を検討した。

第2章

L-システイン摂取が正常ラットの
抗酸化能および脂質代謝に与える影響

緒言

酸化ストレスは心血管系疾患、動脈硬化症、高血糖症、癌および糖尿病のような病理学的条件の開発に関与する⁴⁻⁶⁾。生体は活性酸素種を消去する抗酸化機能を有している。様々な抗酸化酵素と非酵素抗酸化剤は活性酸素種 (ROS) および自由ラジカルを掃除することにより DNA の螺旋結合の崩壊から DNA を保護し、酸化ストレスによる損傷から細胞を保護する役割をする³¹⁾。抗酸化物質には抗酸化酵素およびグルタチオン (GSH)、sulfhydryl amino acid などの非酵素的抗酸化剤が存在する⁷⁾。

特にグルタチオンは生体内で酸化還元システム主な抗酸化剤として役割をし、絶食や薬物乱用などにより起こる細胞内グルタチオンの濃度の減少は酸化ストレスを引き起こす原因になる^{7, 25-27)}。このことより動物や人を中心にグルタチオンをサプリメントとして使用し、細胞内グルタチオン濃度を増加させるための研究が行われてきた^{32, 33)}。しかし、最大 3g のグルタチオンを経口投与しても臨床的に有益な効果が見られるほどのグルタチオン循環は増加せず³⁴⁾、自由グルタチオンは有意的に細胞への吸収は見られなかった²⁸⁾。グルタチオンを構成する材料の一つである黄含有アミノ酸 L-cysteine や N-acetylcysteine (NAC) は、体内でグルタチオンの合成に主な速度制限要素³⁵⁾で利用されることが知られており、体内でグルタチオン貯蔵濃度を一定に維持するため必要³⁶⁾である。

最近の研究では L-cysteine の摂食は積極的に糖尿病による心臓異常と脂質代謝の改善に影響することが明らかになった³⁷⁾。また、cysteine 含有化合物は apoE-欠乏マウスに動脈硬化病変の石灰化の減少が見られた³⁰⁾。Cysteine の抗動脈硬化効果は血清中 homocysteine 濃度減少によることが示され^{38, 39)}、L-cysteine による効果は疾病や非生理的条件と関連しており^{30, 37, 38)}、これらの効果は直接的に自由ラジカルを除去しグルタチオン濃度を維持させ抗酸化効果を向上させることによると考えられる⁴⁰⁾。しかし、異常状態ではない正常状態の時に L-cysteine 供給による抗酸化システムと脂質代謝への効果はまだ明らかになってない。

今回の研究では正常食餌で異なるレベルの L-cysteine (1% および 2%) をラットに供給させ脂質代謝および抗酸化システムに及ぼす影響について調べた。L-Cysteine は一般的に人の髪を加水分解または合成物により工業的に得られることができるが、本研究では廃鶏の羽から L-cysteine を得たものを使用した。

実験方法

1. 実験動物および飼育条件

実験動物は8週齢のF344/DuCrj雄ラット15匹を日本チャールズ・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から購入し準備した。飼育条件は室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ とし、12時間の明暗周期 (明07:00/暗19:00) とした。ラットはプラスチックケースを用いて1匹ずつ飼育した。ラットの取り扱いは、Guide of the Care and Use of Laboratory Animalsに従って行った⁴¹⁾。

2. 実験食

L-Cysteine (純度100%)は Tomo Chemical Co. (Tokyo, Japan) から提供された物を使用し、鶏の生成工程の副産物から得られたものを使用した。基準食はAIN93Gを使用した。実験食はオリエンタル酵母株式会社で調製したものを使用した。実験食にはAIN93G基準食のみを与えた対照群 (CN)、L-システインを1%添加した投与群 (L1)、L-システインを2%添加した投与群 (L2) の3群とした。L1とL2群は基準食の α -コンスターチからそれぞれ1%および2%に変えて飼料調整した。実験食は酸化を防ぐために -30°C で保存した。実験食の成分組成はTable1に示した。

Table 1. Composition of Experimental Diets

| | CN | Cys1 | Cys2 |
|-----------------------|---------|---------|---------|
| Casein | 20 | 20 | 20 |
| L-Cystine | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Soybean oil | 5 | 5 | 5 |
| Mineral mixture | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mixture | 1 | 1 | 1 |
| Choline bitartrate | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 3-Buthyl hydroquinone | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |
| Sucrose | 10 | 10 | 10 |
| Cellulose powder | 5 | 5 | 5 |
| Cysteine | - | 1 | 2 |
| Comstarch | 54.9486 | 53.9486 | 52.9486 |

CN, normal diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; Cys2, normal diet +2% L-cysteine

3. 投与実験

7週齢のF344/DuCrj雄ラット15匹に市販の粉末飼料を与えて1週間の予備飼育後、各投与群間で体重に有意差がないように5匹ずつ3群の投与群に群分けを行った。投与群はコントロール食群(CN)、1%L-Cysteine添加のL-Cysteine1%投与区(L1)、2%L-Cysteine添加のL-Cysteine2%投与区(L2)とした。1匹のラットに1日25gの給餌を行い、投与期間は4週間とし食餌と水は自由摂取とした。

4. 分析試料採取、体重および摂食量の測定

1週毎に体重および摂食量の計測を行った。摂食量は給与量と24時間後の残量の差から算出した。また各週に測定した摂食量を7日分に換算した和を実験期間中の総摂食量とした。毎週9:00から10:00の間に頸静脈採血(1mL)を行った。血中成分のばらつきを低くするため、採血前の12時間はラットを絶食した。採血した血液は1.5mLのエッペンチューブに入れて2時間室温で放置した後15分間7000rpmで遠心分離(CFA12、Iwaki)を行い、上澄みを血清とした。得られた血清は生化学分析まで -30°C で保存した。

5. 解剖

4週間の投与期間終了後、ラットにネンブタール(sodium pentobarbital, 40 mg/kg of body weight; Abbott Laboratories, Irving, TX, USA)腹腔内注射による麻酔をかけ解剖、心臓採血、肝臓および盲腸の摘出を行った。摘出した肝臓・盲腸は冷生理食塩水(9gNaCl/L)で洗浄し、乾燥した濾紙で水分を除去してから重量を測定した。その後液体窒素で冷凍し分析に用いるまで肝臓は -80°C 、盲腸は -30°C で保存した。

6. 血清の生化学的成分の分析

総コレステロール(Total-cholesterol)、高密度アポリポタンパク質コレステロー

ル (HDL - cholesterol)、中性脂肪(TG)濃度の測定は酵素法によりTBA-120FR autoanalyzer (Toshiba Medical Systems Corp., Tochigi, Japan)を用いて行った。総コレステロール濃度と高密度アポリポタンパク質コレステロール濃度の差を超低密度アポリポタンパク質コレステロール+中密度アポリポタンパク質コレステロール+低密度アポリポタンパク質コレステロール (VLDL+IDL+LDLコレステロール) 濃度とした。

7. 肝臓中性脂肪の定量

約100mgの肝臓をソビレルチューブ (φ18) に測り取り、凍結乾燥後クロロホルムを1ml加えた。これを30分超音波処理し、クロロホルムに脂質を溶出させ、別のソビレルチューブに移した。これと同様の操作を2回繰り返し得られた溶液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して全脂質を得た⁴²⁾。イソプロパノールを1ml加え、総脂質中に含まれている中性脂質レベルをTriglyceride-E-test kit (Wako, Osaka, Japan)を用いてGPO・DAOS法によって測定した。

8. 肝臓中過酸化脂質量の定量

肝臓中過酸化脂質はthe thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay⁴³⁾で測定した。肝臓0.5gにDPBS (GIBCO Life Technologies, Japan) を4.5mL加えて、1000rpmで氷中にて冷却しながらホモジナイズした。ホモジネートは200μLをソビレルチューブにとり、0.8%SDSを200μL加えた。攪拌し、ソビレルチューブの上にガラス球を置き、沸騰水浴中で60分間加熱した後、氷上で冷却した。n-ブタノールを5mL加え、共栓を付けよく混合し、抽出した。3000rpm、10分間で遠心分離した。上層のn-ブタノール層について蛍光測定を行った。分光蛍光光度計 (FP-6200;Nihonbunkou, Jasco, Tokyo, Japan) を使用し、励起波長515nm、蛍光波長553nmで測定した。

タンパク質量はBIO-RED (Tokyo, Japan) のDCプロテインアッセイ測定キットを用い

て、Lowry法で測定した。ウシ血清アルブミン (SIGMA)、濃度mg/mLのスタンダードを作った。ホモジネートをDPBSを用いて30倍希釈して測定した。

9. 肝臓中グルタチオンの定量

肝臓中グルタチオンの量はCohnとLyeの方法により測定した⁴⁴⁾。

0.2nM GSH(SIGMA)、0.1M EDTA、0.4M Tris-HCl in 0.01M EDTA (pH8.9)、100%TCA(SIGMA)を用いて、濃度が0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0nmol/mlとなるようにスタンダードを作った。肝臓は5%TCA(trichloroacetic acid) in 0.01M EDTAを用いて約0.2gをホモジナイズした。ホモジネートを3000rpm、10分間遠心分離した。上層100 μ Lを0.4M Tris-HCl in 0.01M EDTA (pH8.9)で15倍希釈し、攪拌した。サンプル、スタンダードそれぞれ200 μ Lずつソビレルチューブに取り、0.4M Tris-HCl in 0.01M EDTA (pH8.9)を5mL加えた。1%OPT(*O*-phthalaldehyde)を250 μ L加え攪拌後、10分以内に蛍光測定を行った。FP-6200 fluorescence spectrophotometer分光蛍光光度計を使用し、励起波長342nm、蛍光波長428nmで測定した。

10. 肝臓中抗酸化酵素の定量

1) 肝臓細胞質の抽出

肝臓0.2gに0.25M Sucrose solutionを加えて、1000rpmで水中にて冷却しながらホモジナイズした。これを105000rpm、60分間、4°Cで超遠心分離し (Beckman, Palo Alto, CA, USA)、上層を1.5mlエッペンチューブに移し取り、各活性を測定まで-80°Cで保存した。

2) カタラーゼ活性の測定

Aebiの方法により測定した⁴⁵⁾。1)の液をDPBSで25倍に希釈した。1サンプルにつき1M Tris-HCl in 5mM EDTA (pH8.0)が50 μ l、10mM H₂O₂が900 μ l、超純水が30 μ lとなるよう

に反応液を調整し、37°Cで10分間置いた。この反応液にサンプル20 μ l加えてすぐに240nmでの吸光度の変化を測定した。

3) グルタチオンリダクターゼ (GR) 活性の測定

WorthingtonとRosemeyerの方法により測定した⁴⁶⁾。1)の液をDPBSで2倍に希釈した。1サンプルにつき、200mMリン酸緩衝液 (pH7.0) が500 μ l、0.2M KClが100 μ l、10mM EDTAが100 μ l、超純水が100 μ lとなるように反応液を調整し、37°Cで5分間置いた。この反応液とサンプル100 μ lを混ぜ、20mM GSSG (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 50 μ lと2mM β -NADPH (SIGMA) を50 μ l加えてすぐに340nmでの吸光度の変化を測定した。

4) グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性の測定

LawrenceとBurkの方法により測定した⁴⁷⁾。1)の液を5倍に希釈した。1サンプルにつき、500mMリン酸緩衝液 (pH7.0) が100 μ l、10mM EDTAが100 μ l、2mM β -NADPHが100 μ l、超純水が200 μ lとなるように反応液を調整し、37°Cで5分間置いた。この反応液とサンプル100 μ lを混ぜ、15mM Cumene (Katayama, Osaka, Japan) を100 μ l加えてすぐに340nmでの吸光度の変化を測定した。

5) グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 活性の測定

1)の液を200mMリン酸緩衝液 (pH6.5) で5倍に希釈した。1サンプルにつき200mMリン酸緩衝液が500 μ l、10mM GSHが100 μ l、超純水が200 μ l、10mM CDNB(1-chloro-2, 4-dinitrobenzene)が100 μ lとなるように反応液を調整した。この反応液にサンプル100 μ lを加えてすぐに340nmでの吸光度の変化を測定した。

6) タンパク質の定量

タンパク質量はDCプロテインアッセイ測定キット

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて、Lowry法で測定した。ウシ血清アルブミン(SIGMA)を用いて、濃度0、0.142、0.355、0.710、1.42mg/mlのスタンダードを作った。1)の液をDPBSで15倍に希釈して測定した。

11. 統計処理

それぞれのデータは平均値±標準偏差で示した。グループ間のデータの有意差はANOVA with the Tukey-Kramer test ($p < 0.05$)で示した。分析はEnterprise 3.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。

結果

1. 体重、摂食量、組織重量 および肝臓中中性脂質レベル

Table 2に摂食量、体重および組織重量を示した。

摂食量はコントロールと比較してCys1群で減少傾向が見られ、Cys2群で有意的に低い値($p < 0.05$)を示した。摂食効率ではCys1群はコントロール群と有意な差は見られなかったが、Cys2群は有意に低い値($p < 0.05$)を示した。

体重の結果cysteine投与群で両方ともコントロール群より有意に($p < 0.05$)低い値を示し、特にCys2群で有意的に体重が減少した。

精巣周囲脂肪重量はコントロール群と比べて Cys1群で減少傾向が見られ、Cys2群で有意に低い値($p < 0.05$)を示した。腎周囲脂肪重量はcysteine投与群でコントロール群より有意な($p < 0.05$)減少が見られた。

肝臓重量は実験群間で有意な差は見られなかった。

肝臓中中性脂質はコントロール群に比べてcysteine投与群で両方とも有意に低い値を示し、特にCys2群で顕著な減少が見られた。

2. 血清脂質およびグルコース濃度

Fig1、Fig2に血清中total cholesterol、HDL cholesterol、LDL cholesterol、non-HDL cholesterol、triglycerideおよび glucose濃度を示した。

Total cholesterol、LDL cholesterol、non-HDL cholesterol濃度はコントロールと比較してcysteine投与群と有意な差は見られなかった。

血清中性脂質濃度ではコントロール群と比べてCys2群で有意に($p < 0.05$)低い値を示した。Cys1群はコントロール群と比較して低下傾向が見られた。

血清グルコース濃度はCys1群とコントロール群間で有意差は見られなかったが、Cys2群は有意的($p < 0.05$)に低い値を示した。

3. 肝臓中過酸化脂質およびグルタチオン量

Figure3に肝臓中過酸化脂質およびグルタチオン量を示した。過酸化脂質とグルタチオン量はコントロール群と比較してcysteine投与群いずれにおいても有意差は見られなかった。

4. 肝臓中抗酸化酵素活性

Figure 4にカタラーゼ、グルタチオンリダクターゼ (GR) の活性を示した。

カタラーゼ活性はコントロール群と比べてCys1gunn で増加傾向が見られ、Cys2群で有意な($p<0.05$)増加が見られた。

GR活性はコントロール群と比較してCys2投与群で有意に($p<0.05$)高い値を示した。Table5およびFigure 5にグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性を示した。GPx活性ではコントロール群と比べてCys2群で増加傾向が見られ、GST活性ではコントロール群とcysteine群間で有意な差は見られなかった。

Table 2. Body Weight, Food Intake, Tissue Weight, and Hepatic TG Concentration of the Rats for 4 Weeks

| | CN | | | Cys1 | | | Cys2 | | |
|-------------------------------|------|---|-------------------|------|---|--------------------|------|---|-------------------|
| Initial body weight (g) | 166 | ± | 5 | 166 | ± | 4 | 168 | ± | 3 |
| Final body weight (g) | 233 | ± | 7 ^a | 221 | ± | 9 ^b | 203 | ± | 8 ^c |
| Body weight gain (g/4 weeks) | 67.3 | ± | 5.0 ^a | 54.5 | ± | 7.3 ^b | 35.8 | ± | 5.9 ^c |
| Food intake (g/4 weeks) | 466 | ± | 37 ^a | 420 | ± | 18 ^{ab} | 410 | ± | 26 ^b |
| Feed efficiency | 0.14 | ± | 0.01 ^a | 0.13 | ± | 0.01 ^a | 0.09 | ± | 0.01 ^b |
| Adipose tissue | | | | | | | | | |
| Perirenal fat weight (wet g) | 4.14 | ± | 0.91 ^a | 3.27 | ± | 0.51 ^b | 2.44 | ± | 0.40 ^b |
| Epididymal fat weight (wet g) | 4.78 | ± | 0.80 ^a | 3.40 | ± | 0.44 ^{ab} | 2.99 | ± | 0.50 ^b |
| Liver | | | | | | | | | |
| weight (g) | 5.52 | ± | 0.20 | 5.40 | ± | 0.29 | 5.14 | ± | 0.36 |
| Triglyceride (mg/wet g) | 90.4 | ± | 10.7 ^a | 41.4 | ± | 8.47 ^b | 37.8 | ± | 10.9 ^c |

Feed efficiency = Body weight gain/Food intake. ^{a,b,c} Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). CN, normal diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; Cys2, normal diet +2% L-cysteine. Each values represents the means and standard deviation for five rats per group.

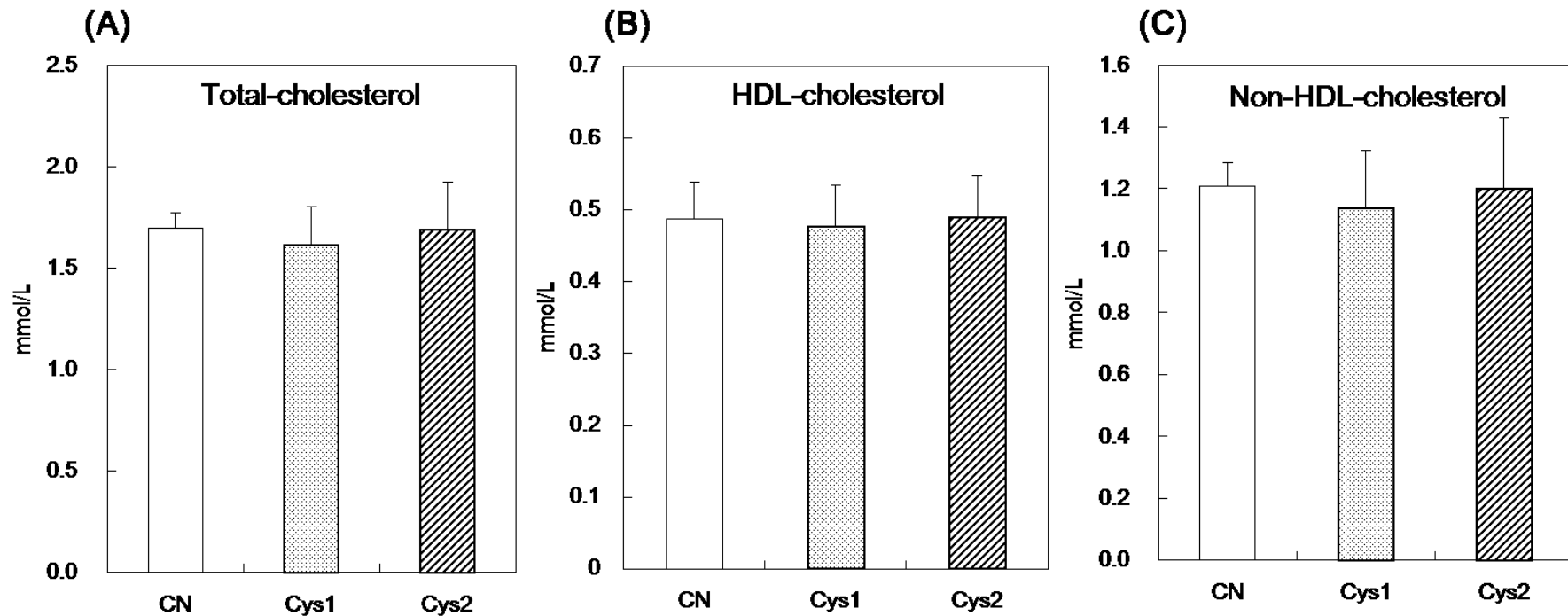


Fig. 1. Serum Total-cholesterol (A), HDL-cholesterol (B) and Non-HDL-cholesterol (C) Concentrations in Rats Fed a Normal Diet or with L-Cysteine (1% and 2%) on Day 28. Values are presented as the mean and standard deviation for five rats per group. Mean values were significantly different ($p < 0.05$). CN, control diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; and Cys2, normal diet + 2% L-cysteine.

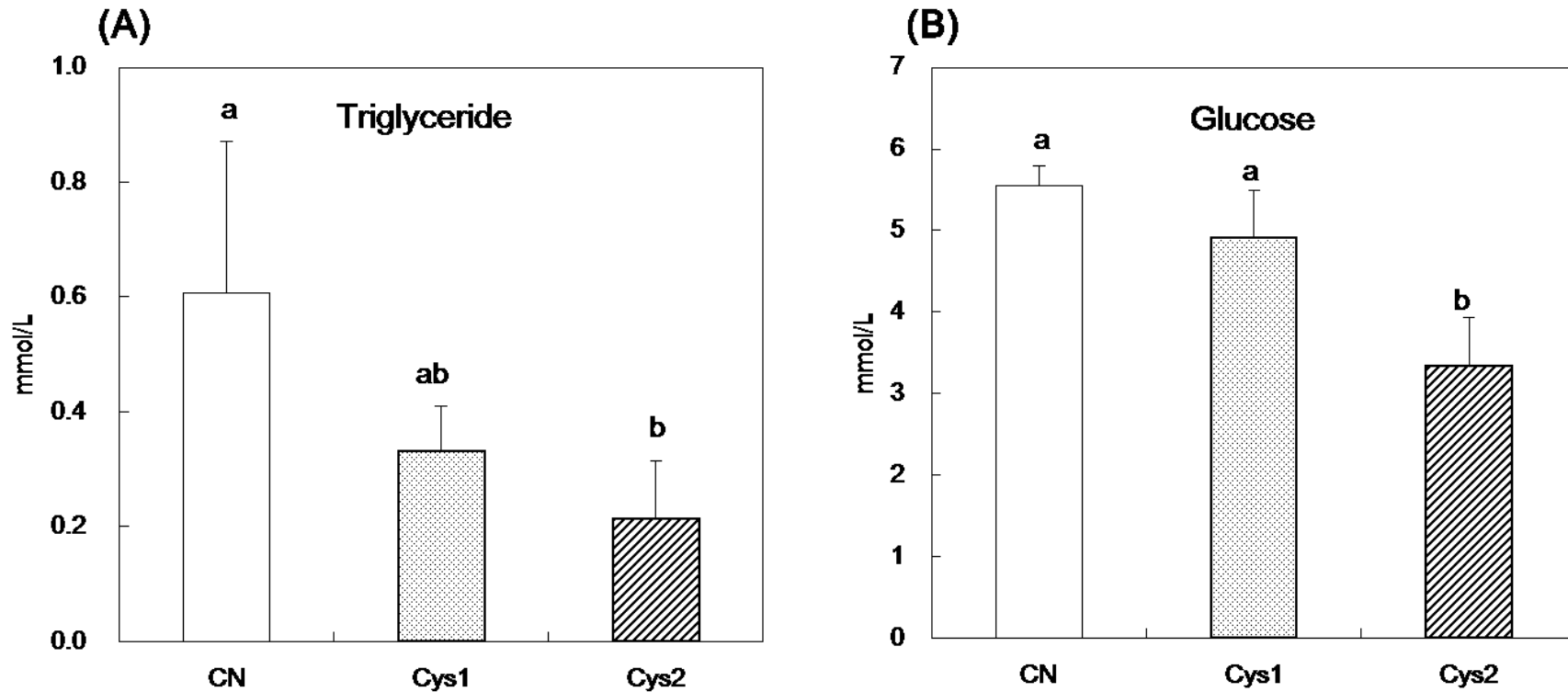


Fig. 2. Serum Triglyceride (A) and Glucose (B) Concentrations in Rats Fed a Normal Diet or with L-Cysteine (1% and 2%) on Day 28.

Values are presented as the mean and standard deviation for five rats per group. Mean values were significantly different ($p < 0.05$). CN, control diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; and Cys2, normal diet + 2% L-cysteine.

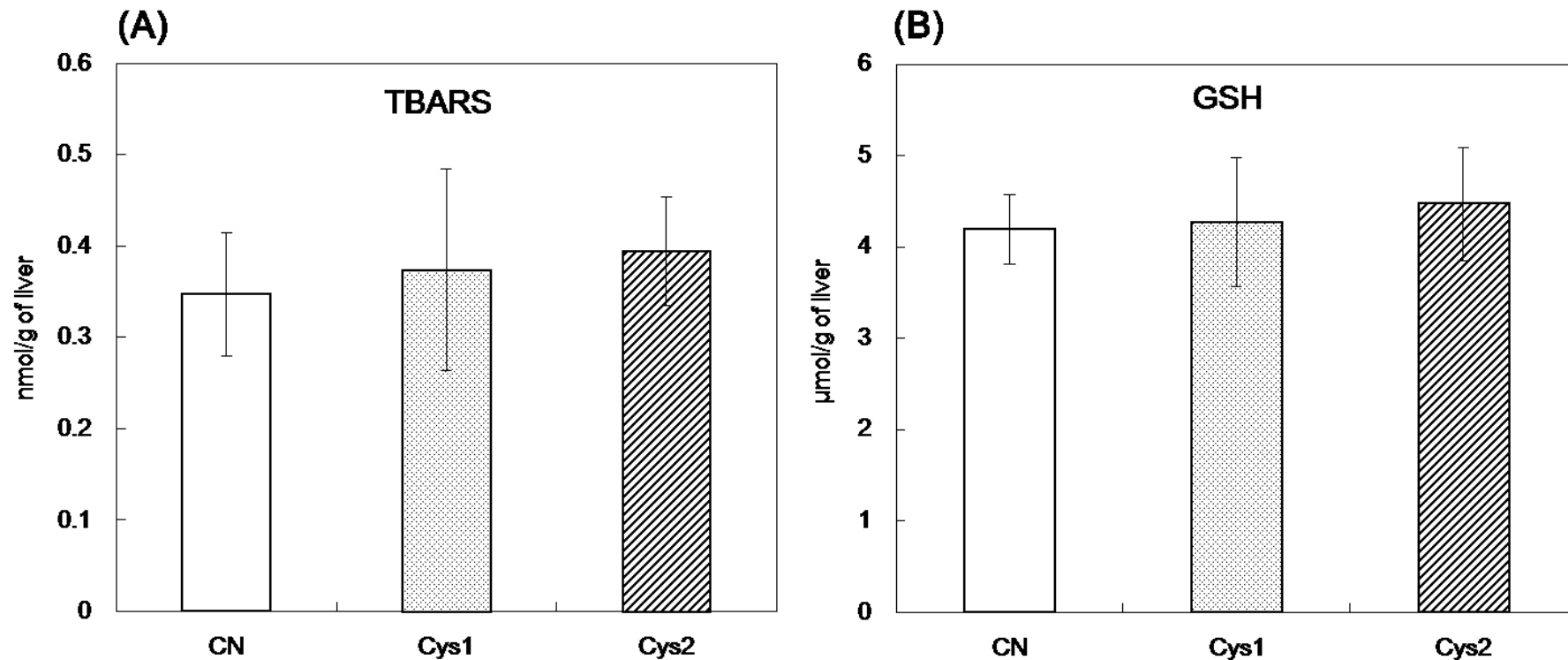


Fig. 3. Hepatic TBARS (A) and GSH (B) Concentrations in Rats Fed a Normal Diet or with L-Cysteine (1% and 2%).

Values are presented as the mean and standard deviation for five rats per group. Mean values were significantly different ($p < 0.05$). CN, control diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; and Cys2, normal diet + 2% L-cysteine.

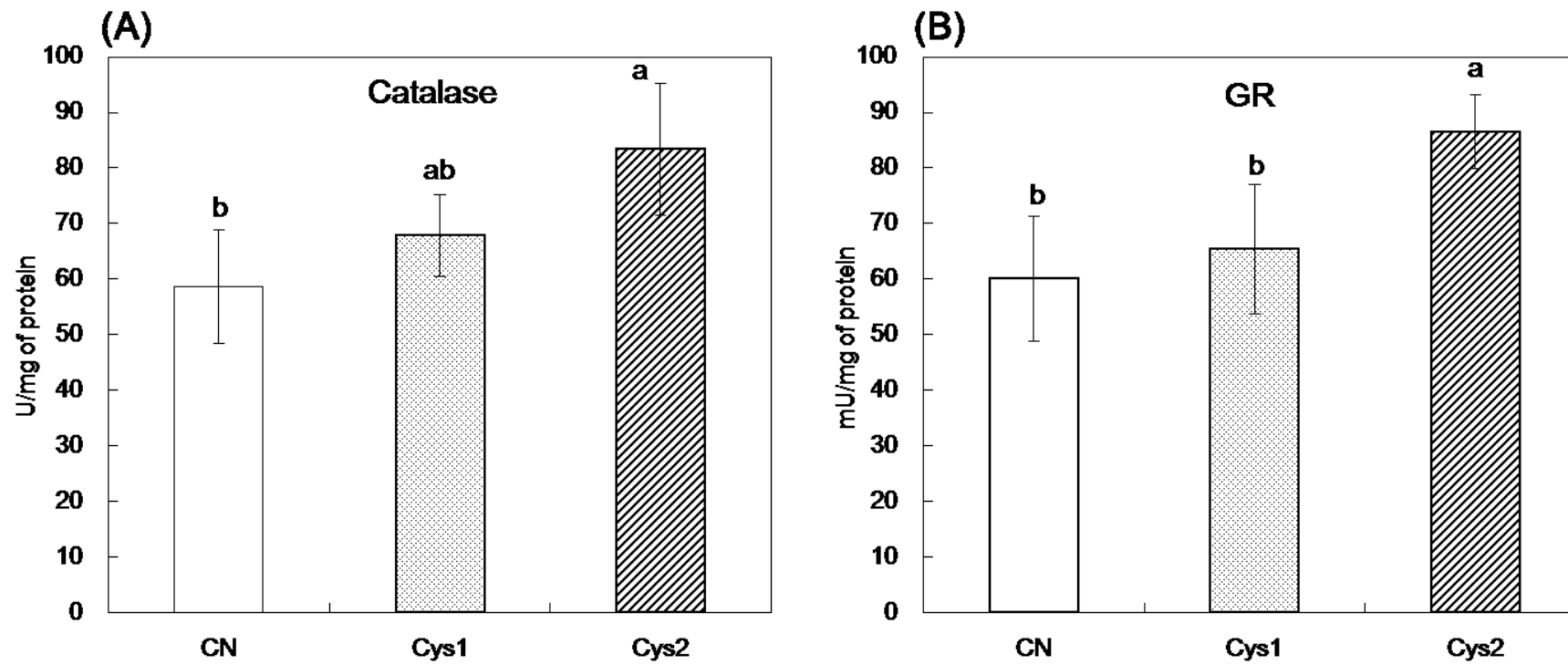


Fig. 4. Hepatic Catalase (A) and GR (B) Activities in Rats Fed a Normal Diet or with L-Cysteine (1% and 2%).

Values are presented as the mean and standard deviation for five rats per group. Mean values were significantly different ($p < 0.05$). CN, control diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; and Cys2, normal diet + 2% L-cysteine.

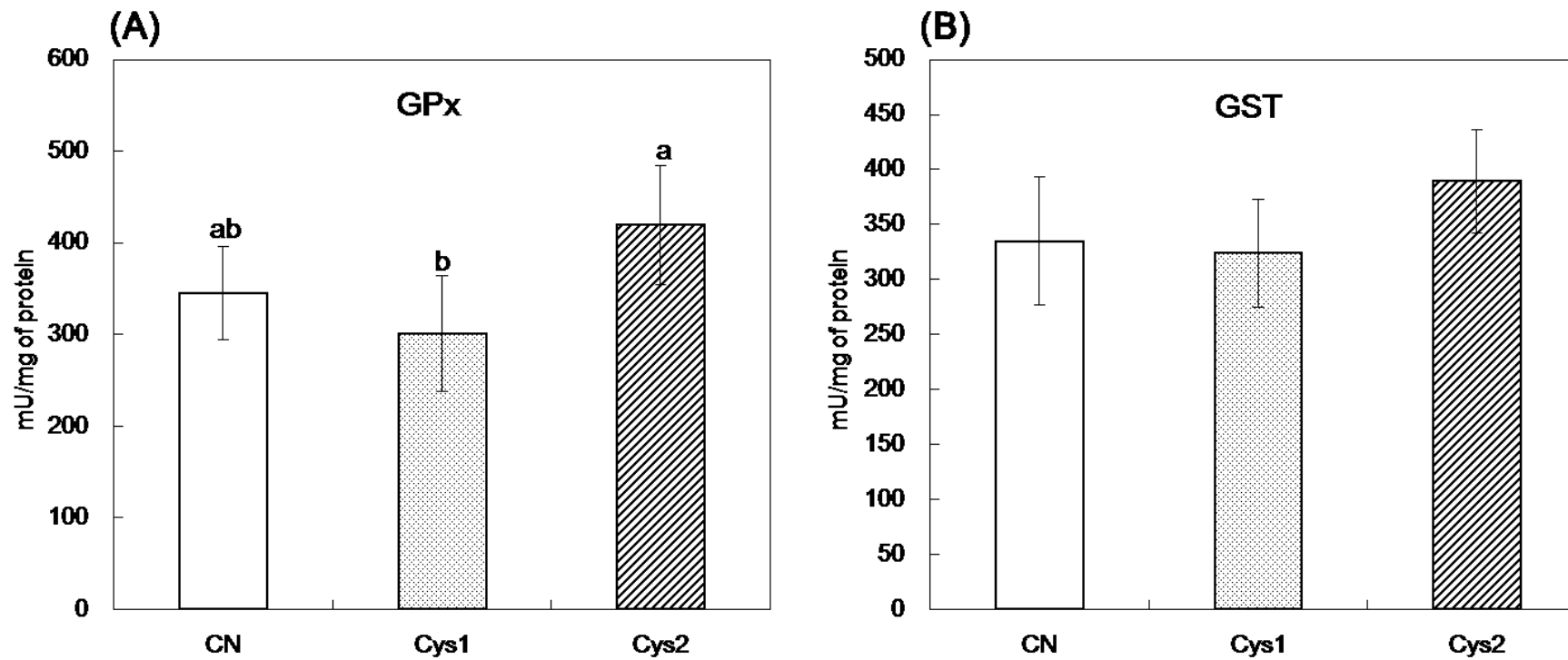


Fig. 5. Hepatic GPx (A) and GST (B) Activities in Rats Fed a Normal Diet or with L-Cysteine (1% and 2%).

Values are presented as the mean and standard deviation for five rats per group. Mean values were significantly different ($p < 0.05$). CN, control diet; Cys1, normal diet + 1% L-cysteine; and Cys2, normal diet + 2% L-cysteine.

考察

酸化ストレスが発生すると細胞中脂質過酸化の増加および活性酸素の増加により細胞が傷つくことになる⁴⁷⁾。L-cysteine および NACのようなチオール基含有物はグルタチオンの前駆体としてよく知られており、細胞内グルタチオンレベルを増加させる役割をする^{24, 48)}。NACはアセチル基を持つ、体内で吸収および利用しやすいが、自然界や食べ物の中にほぼ存在してないためサプリメントとして作られ利用されている。このようなNACは活性酸素に結合し正常状態と非正常状態どちらにおいても酸化ストレスを除去する^{24, 32)}。しかし、L-cysteineによるポジティブ効果はほとんど病気や非生理的条件のような非正常状態でよく観察される^{48, 49)}。L-cysteine食餌は砒素により酸化ストレスが増加したラットで肝臓中脂質過酸化物の濃度を減少させたという報告がある⁵⁰⁾。またBlouetら⁴⁹⁾は、ラットでcysteineが豊富に含まれているタンパク質を摂取は酸化ストレスの減少と血清および肝臓中グルタチオン濃度の増加が観察されたと報告した。このようなL-cysteineの効果は直接的にフリーラジカルに結合し、またグルタチオンの保存をすることから抗酸化能を向上させることにより改善すると考えられる⁴⁰⁾。一方、cysteineの過剰摂取は酸化ストレスの原因になるという報告も知られている^{51, 52)}。極端な過剰の含硫アミノ酸の摂取は、ラットの死亡率を増加させる原因になるという報告がある⁵²⁾。また、正常食および高脂肪食を与えたラットで低濃度のL-cysteineは肝臓のグルタチオン濃度増加が見られたものの酸化ストレスに関して悪影響があった⁵³⁾。一方、今回の実験ではコントロールとcysteine投与群どちらでも肝臓中TBARS濃度に有意な差は見られなかった。この結果はYangら⁵⁴⁾の実験とも同様の結果であった。血中cysteine濃度の増加は酸化ストレスの予防と関連している。今回の実験で血中cysteine濃度は実験群間で有意差を示してなかったことから摂取したcysteineがグルタチオンの合成などに使用されたと考えられる(データは示してない)。しかし、肝臓中グルタチオン量では有意な差は見られなく、これはWeisse³⁰⁾らの報告と一致した結果になった。しかし、今回の実験でCys2投与群で肝臓

内カタラーゼおよびGR活性の増加が見られた。この結果、正常食ラットでL-cysteineの摂取は酸化ストレスによる損傷を増加させる可能性も考えられるが、アミノ酸供給によりグルタチオン量も増加され、結果的に酸化ストレスを抑制する可能性があることが示唆された。活性酸素を除去することによりグルタチオンの減少と酸化型グルタチオン(GSSG)の増加が見られ、GSH/GSSG比率は酸化ストレスのマーカーとして使われる。今回の実験でGRレベルの増加が見られたことからGSSGからグルタチオンへ還元され、GSH/GSSG比率の減少可能性を考えられる。肝臓内TBARSおよびグルタチオン量は実験群間で有意な差は見られなかった。今回の実験で2% L-cysteineの摂取はカタラーゼやGRなどの抗酸化酵素をある程度まで回復することを示した。Nandiら⁵⁰⁾による研究でも砒素により酸化ストレスが増加したラットでL-cysteineは肝臓内カタラーゼ活性を増加させることが報告されており、今回の実験と同様の結果を示した。

今回の実験で我々は正常食を摂取したラットでL-cysteineの摂取は血清中コレステロールでは実験群間で差は見られなかったが、血清中性脂質レベルの効果的な減少を示した。また肝臓内中性脂質レベルはL-cysteine濃度依存的に減少した。BetzlichらはL-cysteineの処理することで見られるHepG2細胞内中性脂質濃度の減少効果はsterol response element-binding protein遺伝子発現の規制やfatty acid synthaseおよびstearoyl-coenzymeA desaturase-1などの遺伝子発現を抑制することによって脂肪酸合成過程に関与していることを示すと報告している⁵⁵⁾。このような変化はL-cysteineを食べさせたラットの脂肪重量減少を伴うことが見られた⁵⁶⁾。したがって、このような有利な効果はおそらく肝臓と脂肪組織での脂質生成の減少によることだと考えられるがまだ明らかになっていない。

本実験で4週間ラットに1%および2% L-cysteineを食べさせた結果、体重増加量と体内脂肪重量が濃度依存的に減少した。Elshorbagyら⁵⁶⁾はメチオニン制限食餌に0.5%のL-cysteineを摂取させたラットでは抗肥満効果が見られないことを示した。しかし、同じレベルのL-cysteineをコントロール食餌に添加した際、摂取量と脂肪組織重

量の減少が見られた。今回の実験で見られた脂肪重量の減少はL-cysteineによる食餌摂取量の減少による影響があると考えられ、その結果血清と肝臓中中性脂質の有利な変化にも影響したと考えられた。今回の実験結果による摂食量の減少理由は明らかになってない。考えられる理由の一つとして、L-cysteineは苦い味を持つことが知られているため好ましくない味を考えられる⁵⁷⁾。一方、数々のタンパク質とアミノ酸は満腹感をあたえる効果がある⁵⁸⁾。タンパク質によるこの効果は特にL-細胞から分泌されるcholecystokinin、GLP-1(glucagon-like peptide-1)やpeptide YYのような消化管ホルモンを調節することによる⁵⁸⁾。特にGLP-1を多く分泌するL-細胞の大部分は回腸末端もしくは大腸から見られると知られているが、一部のL-細胞は小腸全体にかけて存在している⁵⁹⁾。実際にGLP-1はグルコース恒常性だけではなく食欲調節に重要な役割を有することがよく知られている⁶⁰⁾。Tappiaら³⁷⁾は最近cysteineを処理した糖尿病モデルラットで血清インスリンレベルが有意に増加することを示した。Blouetら⁴⁹⁾は食餌cysteineは高コレステロール食餌を摂取したラットで食後血糖値の制御を緩和すると報告した。今回の研究で2% L-cysteineはコントロール群に比べ血清中グルコースレベルを減少させた。したがってL-cysteineによる摂取量の減少はこのようなホルモンと関連していると考えられ、特に膵臓 β -cell機能と満腹感に関連しているGLP-1と連関していると考えられる⁶⁰⁾。しかし、このホルモンに関する食餌L-cysteineの効果は更なる研究が必要である。

Cysteineの酸化形態であるL-cysteineは肝臓がんモデルラットで胆汁酸の排出を増加させ血清中コレステロールレベルを減少させるという報告がある³⁰⁾。Cysteineは細胞の基質では不安定なため酸化した形態でcysteineが2分子結合しcystineの形で存在する⁶¹⁾。このことから今回の研究で血清中コレステロールレベルの低下効果を期待したが、実験群間で有意な差は見られなかった。Yangら⁵⁴⁾は本研究と同じ濃度である2%のL-cysteineをラットに摂取させた結果L-cysteineは血清中コレステロールレベルに影響が無く、本研究と同様の結果を示した。食餌cysteineとcystineで違う

効果が見られるのは代謝反応の差があると考えられる⁵⁴⁾。

廃鶏の羽から抽出したL-cysteineは正常食のラットで摂食量の減少とともに濃度依存的に肝臓内カタラーゼとGR活性へ影響を伝え、血清および肝臓内中性脂質濃度低下を示した。しかしL-cysteineの脂質代謝へ及ぼす影響について更なる研究が必要である。

第3章

L-システイン摂取がガラクトサミン (GalN)
誘発肝障害ラットにおける
肝障害抑制および抗酸化能に与える影響

緒言

生体内で酸素を利用する過程で活性酸素種 (ROS) の過剰な生成と消去のバランスが乱れ、様々な疾病の発生に関与する²⁾。ヒドロキシルラジカルのような活性酸素種は肝臓内ミクロソームとミトコンドリアでフリーラジカル反応により過酸化脂質を発生させる主な原因になる。体内臓器の中でも肝臓は全身の栄養代謝で代謝に中心的役割を果たすためその機能不全は生命を脅かす重篤なものとなる。したがって活性酸素種とフリーラジカルによる酸化損傷に対抗し肝細胞を保護するため様々な抗酸化酵素と低分子抗酸化物質が存在する³¹⁾。

肝細胞膜には抗酸化剤であるグルタチオンを放出するための輸送系が存在し、炎症が発生し細胞や組織に損傷がある場合、血漿タンパク質を酸化障害から保護するため肝臓内グルタチオンが血中に分泌され全身の組織へチオール基が分配される²³⁾。したがってグルタチオンレベルを維持または増加させるためデノボ合成や直接・間接的でグルタチオンを提供することは組織や細胞保護のため重要であるといえる。

Cysteine自体も肝保護活性を持つことが報告されている⁶²⁾。様々な研究でcysteineとcystineは血清中コレステロールの減少効果を持ち³⁰⁾、脂質合成酵素遺伝子の発現減少による脂肪酸合成を抑制する効果を持つと報告されている⁵⁵⁾。しかし、L-cysteineの過剰摂取はラットで酸化ストレスと死亡率へ影響する原因になるという報告がある⁵²⁾。一方、cysteineと NAC(N-acetyl cysteine)のような含硫含有アミノ酸の摂取はグルタチオンレベルの調節だけでは活性酸素種から細胞を保護する重要な役割をする^{40, 63)}。第2章⁶⁴⁾ではラットに対し1%また2%濃度のL-cysteineの投与では過剰の酸化ストレスを発生させないことが明らかとなった。また、L-cysteineは脂肪蓄積を減少させ、血清および肝臓中中性脂質の減少、および抗酸化酵素の増加効果を示した。

今回の研究ではラットで異なる濃度のL-cysteine(1%および2%)の摂取が肝障害を起こすもしくは起こしていない状態で肝保護効果および脂質代謝へ及ぼす影響について検討した。ラットに対しガラクトサミンを投与することで肝細胞のネクロシスを

引き起こし、人間のウイルス性肝炎と同様の肝障害を誘導することで評価を行った

65)。

実験方法

1. 実験動物および飼育条件

実験動物は7週齢のF344/DuCr1Cr1j (Fischer) 雄ラット20匹を日本チャールズ・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から購入して準備した。温度、湿度、明暗周期の飼育条件は実験1と同様に実行した。ラットはプラスチックケースを用いて1匹ずつ飼育した。実験計画はAnimal Experiment Committee of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicineにより従った。ラットの取扱いは、Guide of the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, <http://newton.nap.edu/html/labrats/>) に従って行った⁴¹⁾。

2. 実験食

実験に使用したL-cysteineおよび基準食は実験1と同様のものを使用した。実験食はオリエンタル酵母株式会社で調製したものを使用した。実験対照区として、基準食の α -コンスターチの代わりにL-システインを1%添加した食事、同様にL-システインを2%添加した食事を与えて実験を行った。実験食は酸化を防ぐために -30°C で保存した。実験食の成分組成はTable6に示した。

Table 6. Composition of Experimental Diets

| | CN | Cys1G | Cys2G |
|-----------------------|---------|---------|---------|
| Casein | 20 | 20 | 20 |
| L-Cystine | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Soybean oil | 5 | 5 | 5 |
| Mineral mixture | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mixture | 1 | 1 | 1 |
| Choline bitartrate | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 3-Buthyl hydroquinone | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |
| Sucrose | 10 | 10 | 10 |
| Cellulose powder | 5 | 5 | 5 |
| Cysteine | - | 1 | 2 |
| Comstarch | 54.9486 | 53.9486 | 52.9486 |

CN, normal diet; Cys1G, normal diet + 1% L-cysteine + galactosamine; Cys2G, normal diet +2% L-cysteine + galactosamine

3. 投与実験

7週齢のF344/DuCr1Cr1j (Fischer) 雄ラット20匹に市販の粉末飼料を与えて1週間の予備飼育後、各投与群間で体重に有意差がないように5匹ずつ4群の投与群に群分けを行った。投与群はAIN93G基準食投与群(CN)、AIN93G基準食とD-GalN投与で急性肝毒性を引き起こした群(CG)、L-システイン1%添加食+GalN投与(Cys1G)群、L-システイン2%添加食+GalN投与(Cys2G)群の計4群に分けられた。1匹のラットに与える餌の量は実験1と同量にし、投与期間は2週間とし食餌と水は自由摂取とした。

4. 分析試料採取、体重および摂食量の測定

実験期間は2週間とし、7日ごとに体重を計測した。摂食量は給与量と残食の差から毎日算出した。また各週に測定した摂食量を7日分に換算した和を総摂食量とした。

5. 解剖

ガラクトサミン投与群には解剖22時間前にガラクトサミン(400mg/kg bw, Sigma, St. Louis, MO)の腹腔内投与をおこなった。投与期間終了後、ラットの腹腔内にネンブタール(sodium pentobarbital, 40 mg/kg of body weight; Abbott Laboratories, Irving, TX, USA)注射による麻酔をかけ解剖、心臓採血、肝臓、盲腸、腎臓周囲の脂肪および精巣周囲の脂肪を摘出した。摘出した肝臓、盲腸、腎臓周囲の脂肪および精巣周囲の脂肪は冷生理食塩水(9gNaCl/L)で洗浄し、乾燥した濾紙で水分を除去してから重量を測定した。その後液体窒素で冷凍し分析に用いるまで -80°C 、盲腸は -30°C で保存した。得られた血液はそれぞれ、エッペンチューブに入れ、2時間室温で放置し、7000rpm、15分間遠心分離し、上澄みを血清とし、 -80°C で凍結保存した。

6. 血清の生化学的成分の分析

血清中の成分は中性脂肪(TG)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリホスファターゼ (ALP) 濃度を酵素法により TBA-120FR autoanalyzer (Toshiba Medical Systems Corp., Tochigi, Japan) を用いて測定を行った。

7. 肝臓中性脂肪の定量

肝臓中中性脂肪は実験1と同様に行った。凍結乾燥した肝臓をクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を加え、全脂質を得た。総脂質に含まれた中性脂質レベルは Triglyceride-E-test kit (Wako, Osaka, Japan) を用いて GPO•DAOS 法によって測定した。

8. 肝臓中抗酸化酵素活性の測定

1) 肝臓細胞質の抽出

肝臓に 0.25M Sucrose solution を加えて、1000rpm で氷中にて冷却しながらホモジナイズした。これを 1050000rpm、60分間、4°C で超遠心分離し (Beckman, Palo Alto, CA, USA)、上層を各活性を測定まで -80°C で保存した。

2) カタラーゼ活性の測定

Aebi の方法により測定した⁴⁵⁾。1) の液を DPBS で 25 倍に希釈した。各サンプルの Catalase 活性は反応液 (1 M Tris-HCl in 5 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM H₂O₂) を添加し、37°C で 10 分間置いた。240 nm での吸光度の変化を測定した。

3) グルタチオンリダクターゼ (GR) 活性の測定

Worthington と Rosemeyer の方法により測定した⁴⁶⁾。1) の液を DPBS で 2 倍に希釈した。反応液 (200 mM phosphate buffer solution (pH 7.0), 0.2 M KCl, 10 mM EDTA) とサンプル 100μl を混ぜて希釈した後、20mM GSSG (Sigma, St. Louis, MO) と β-NADPH (Sigma) を添加し、340nm での吸光度の変化を測定した。

4) グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性の測定

LawrenceとBurkの方法により測定した⁴⁷⁾。1)の液を5倍に希釈した。各サンプルにcumene hydroperoxide (Katayama, Osaka, Japan)と reaction solution (500 mM phosphate buffer solution (pH 7.0), 10 mM EDTA、2 mM β -NADPH、超純水)を添加し37°Cで5分間置いた。15mM Cumene (Katayama, Osaka, Japan)を100 μ l加えて340nmでの吸光度の変化を測定した。

5) グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 活性の測定

1)の液を200mMリン酸緩衝液 (pH6.5) で5倍に希釈した。各サンプル100 μ lに反応液 (200mM phosphate buffer solution, 10mM GSH, 10 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene、超純水)を添加し、すぐに340nmでの吸光度の時間変化を測定した。

6) タンパク質の定量

タンパク質量はDCプロテインアッセイ測定キット (DC protein assay test; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を用いて、Lowry法で測定した。ウシ血清アルブミン (SIGMA)を用いて、濃度0、0.142、0.355、0.710、1.42mg/mlのスタンダードを作った。1)の液をDPBSで15倍に希釈して測定した。

9. 肝臓中過酸化脂質量の定量

肝臓中過酸化脂質は実験1と同様にthe thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) 法⁴³⁾で測定した。肝臓0.5gは1000rpmで冷却しながらホモジナイズしthiobarbituric acidで希釈した後90°C沸騰水浴中で60分間加熱した後、氷上で冷却した。n-ブタノールを5mL加え、共栓を付けよく混合し、遠心分離して上層のn-ブタノール層について分光光度計 (FP-6200; Nihonbunkou, Jasco, Tokyo, Japan)を使用し、励起波長515nm、蛍光波長553nmで測定した。

タンパク質量はBIO-RED (Tokyo, Japan) のDCプロテインアッセイ測定キットを用いて、Lowry法で測定した。

10. 肝臓中グルタチオン量

肝臓中グルタチオン量は実験1と同様にCohnとLyeの方法により測定した⁴⁴⁾。濃度が0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0nmolとなるようにスタンダードを作った。肝臓サンプルは5% trichloroacetic acid in 0.01M EDTAを用いて約0.2gをホモジナイズした後、3000rpmで10分間遠心分離を行った。その後上層100 μ Lを0.4M Tris-HCl in 0.01M EDTA (pH8.9) で15倍希釈し、0.4 M Tris-HCl in 0.01M EDTA (pH 8.9) 5mL and 1% phthalaldehyde 250 μ Lを上澄みに添加し攪拌後、10分以内にFP-6200 fluorescence spectrophotometer分光蛍光光度計を使用し、励起波長342nm、蛍光波長428nmで測定した。

11. 血清過酸化脂質量の定量

和光純薬工業株式会社のラボアッセイ過酸化脂質測定キットを使用した。血清100 μ lに0.85%生理食塩水900 μ lを加え、穏やかに攪拌し、3000rpm、10分間遠心分離(Kubota, Tokyo, Japan)した。上層500 μ lを取り、1/12N 硫酸溶液を4ml加えた。よく混合し、10%リンタングステン酸水溶液500 μ lを加えた。よく攪拌し、室温に5分間静置後、3000rpm、10分間遠心分離した。沈殿のみを残して上層はアスピレーターで吸引し、1/12N 硫酸溶液2mlと10%リンタングステン酸水溶液300 μ lを加えた。沈殿をよく懸濁させ、3000rpm、10分間遠心分離した。沈殿のみ残して上層はアスピレーターで吸引し、超純水4mlを加え、沈殿をよく懸濁させた。その後、TBA試薬を用いて肝臓中過酸化脂質の測定方法と同様にthe thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) 法⁴³⁾で測定した。分光蛍光光度計 (EP-6200;Nihonbunkou) を使用し、励起波長515nm、蛍光波長553nmで測定した。

12. 血清グルタチオン(GSH)量の定量

肝臓中グルタチオン量測定と同様にCohnとLyeの方法により測定した⁴⁴⁾。血清サンプルは5% trichloroacetic acid in 0.01M EDTAを用いて希釈、攪拌した後遠心分離を行った。その後1% *o*-phthalaldehyde and 0.4 M Tris-HCl in 0.01M EDTA (pH 8.9)を上澄みに添加し、10分以内にFP-6200 fluorescence spectrophotometer分光蛍光光度計を使用し、励起波長342nm、蛍光波長428nmで測定した。

13. 統計処理

それぞれのデータは平均値±標準偏差で示した。群間のデータの有意差はANOVA with the Tukey-Kramer test ($p < 0.05$)で示した。分析はEnterprise 3.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を利用した。

結果

1. 体重、摂食量、組織重量および肝臓、血清中性脂質レベル

Table7に投与期間中のラットの体重増加量、総摂食量、組織重量および肝臓と血清中中性脂質レベルを示した。実験群で総摂食量においては有意な差は見られなかったが、体重増加量はCN群と比較してガラクトサミンを投与した1%および2%L-cysteine投与群が濃度依存的に有意な($p < 0.05$)低下を示した。腎臓周囲の脂肪組織重量はCN群と比較しCG群では有意な差は見られず、Cys1G群で20.7%低い値を示し、Cys2G群で有意に低い値を示した。精巣周囲の脂肪組織重量はCN群と比較しCG群では有意な差はみられず、L-cysteine投与群で濃度依存的に有意な減少が見られた。肝臓重量および肝臓内中性脂質レベルで実験群間での有意な差は見られなかった。血清の中性脂質レベルはコントロール群と比較してCG群で有意的に低い値を示し、L-cysteine投与群で濃度依存的に有意な減少を示した。

2. 血清酵素活性

Figure6に血清ASTおよびALTの活性を示した。ASTとALTはいずれもCG群でCN群より有意的に高い活性を示した。一方、Cys1G群ではCG群と有意な差は見られなかったが、Cys2G群でCG群より顕著な有意な減少が見られた。

Figure7に血清中ALPおよびLDH活性を示した。CG群はコントロール群と比べてALPとLDH両方とも有意的に高い値を示した。ALP活性ではCG群と比較してCys1G群は有意に高い値を示し、Cys2G群は有意な差は見られなかった。LDH活性ではCG群と比較してCys1G群では変化が認められなかったが、Cys2G群では有意な減少が見られた。

3. 肝臓内抗酸化酵素活性

Figure8 において肝臓内カタラーゼおよび GR の活性を示した。カタラーゼ活性で CN 群と CG 群間で有意な差は見られなかった。1%および 2% L-cysteine 投与群は CG 群より有意的に高い値を示した。GR 活性結果ではコントロール群と比較して CG 群で有意に低い値を示した。Cys1G 群は CG 群と有意な差は見られなかったが、Cys2G 群で 7.5%高い値を示した。

Figure9 に肝臓内 GPx および GST 活性を示した。GPx および GST 活性ではいずれでも CG 群は CN 群より有意に低い値を示した。一方、L-cysteine 投与群 CG 群と有意な差は見られなかった。

4. 肝臓内過酸化脂質およびグルタチオン量

Figure9 に肝臓内過酸化脂質およびグルタチオン量を示した。肝臓内過酸化脂質の結果 CG 群は CN 群に比べ有意的に増加した。1%および 2% L-cysteine 投与群は両方とも CG 群より有意に低い値を示した。

肝臓内グルタチオン量の結果 CN 群と比較して CG 群で有意な減少が見られた。一方、L-cysteine 投与群と CG 群間で有意な差は見られなかった。

5. 血清中過酸化脂質およびグルタチオン量

Figure11 に血清中過酸化脂質およびグルタチオン量を示した。血清中過酸化脂質の結果で CN 群に比べ CG 群で有意的に低い値が見られた。Cys1G 群は CG 群と比較して有意な差は見られなかったが Cys2G 群は CG 群より有意な減少が見られた。

血清中グルタチオン量の結果、CG 群は CN 群より有意に減少した。Cys1G 群は CG 群より 33.9%高い値を示し、Cys2G 群で有意な増加が見られた。

Table 7. Body weight, food intake, liver weights, liver and serum triglyceride of rats for 2 weeks.

| | CN | | | CG | | | Cys1G | | | Cys2G | | |
|-------------------------------|------|---|-------------------|-------|---|--------------------|-------|---|--------------------|-------|---|-------------------|
| Initial body weight (g) | 171 | ± | 6 | 170 | ± | 2 | 171 | ± | 5 | 171 | ± | 6 |
| Final body weight (g) | 211 | ± | 5 ^a | 206 | ± | 3 ^{ab} | 199 | ± | 9 ^{bc} | 191 | ± | 4 ^c |
| Body weight gain (g/2 weeks) | 51.5 | ± | 2.8 ^a | 47.8 | ± | 2.2 ^{ab} | 42.6 | ± | 4.8 ^b | 34.1 | ± | 2.2 ^c |
| Food intake (g/2 weeks) | 223 | ± | 11 | 226 | ± | 13 | 206 | ± | 19 | 204 | ± | 23 |
| Feed efficiency | 0.23 | ± | 0.01 ^a | 0.21 | ± | 0.01 ^a | 0.21 | ± | 0.02 ^a | 0.17 | ± | 0.02 ^b |
| Adipose tissue | | | | | | | | | | | | |
| Perirenal fat weight (wet g) | 2.71 | ± | 0.50 ^a | 2.58 | ± | 0.58 ^a | 2.15 | ± | 0.23 ^{ab} | 1.63 | ± | 0.19 ^b |
| Epididymal fat weight (wet g) | 4.03 | ± | 0.47 ^a | 3.72 | ± | 0.41 ^{ab} | 3.26 | ± | 0.28 ^{bc} | 3.00 | ± | 0.16 ^c |
| Liver | | | | | | | | | | | | |
| weight (g) | 6.37 | ± | 0.18 | 6.86 | ± | 0.39 | 6.62 | ± | 0.59 | 6.47 | ± | 0.51 |
| Triglyceride (mg/wet g) | 94.4 | ± | 36.7 | 155.3 | ± | 72.5 | 154.1 | ± | 26.1 | 139.1 | ± | 19.3 |
| Serum triglyceride(mmol/l) | 1.11 | ± | 0.16 ^a | 0.76 | ± | 0.13 ^b | 0.51 | ± | 0.11 ^c | 0.25 | ± | 0.08 ^d |

Feed efficiency = Body weight gain/Food intake. ^{a,b,c} Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

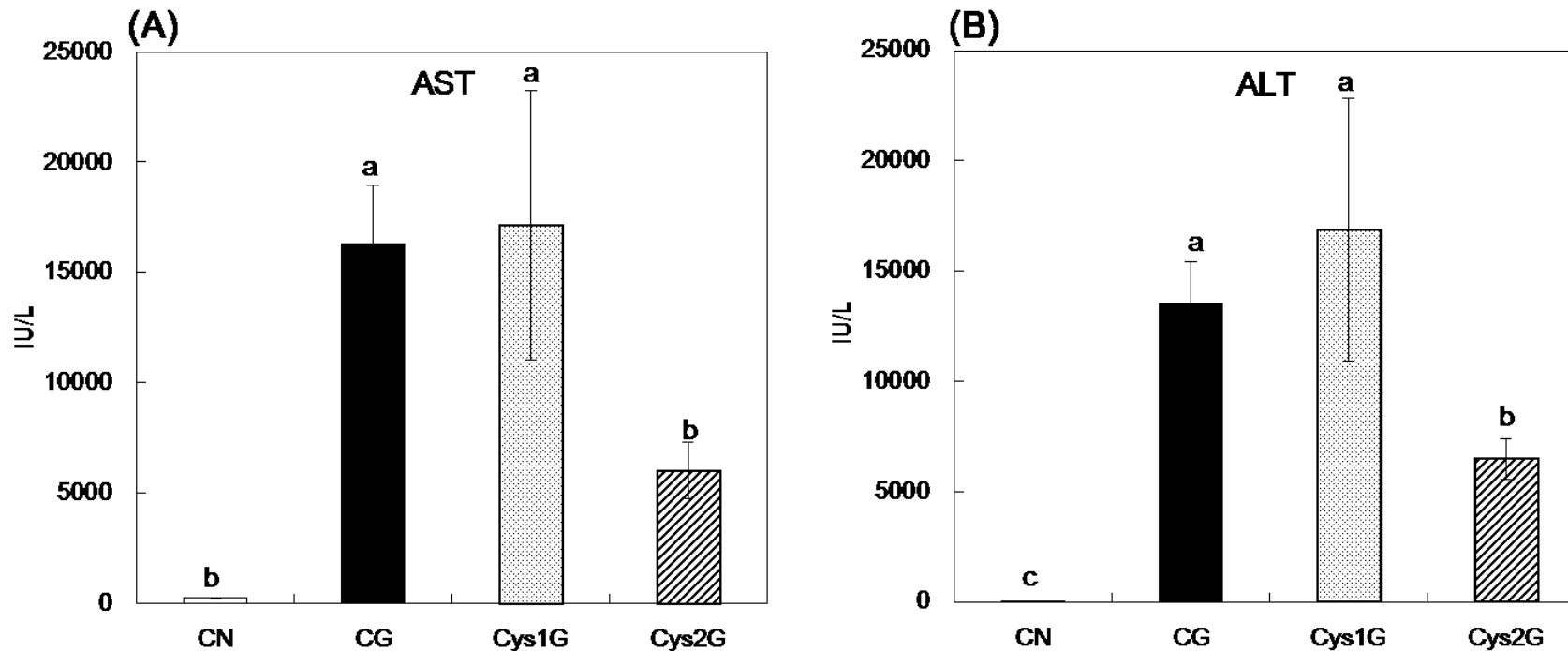


Fig. 6 Serum AST (A) and ALT (B) concentration in rats on Day 14.

a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+ galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

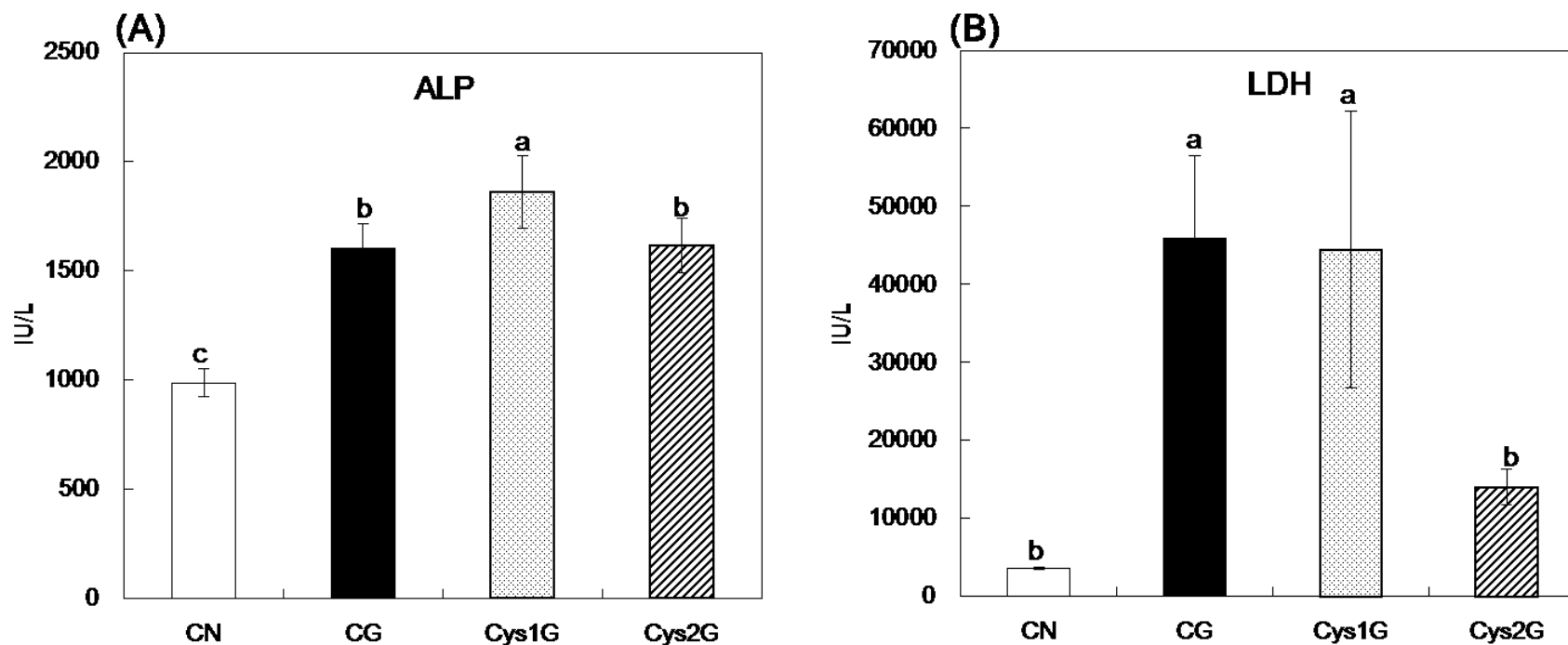


Fig. 7 Serum ALP (A) and LDH (B) concentration in rats on Day 14.

a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+ galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

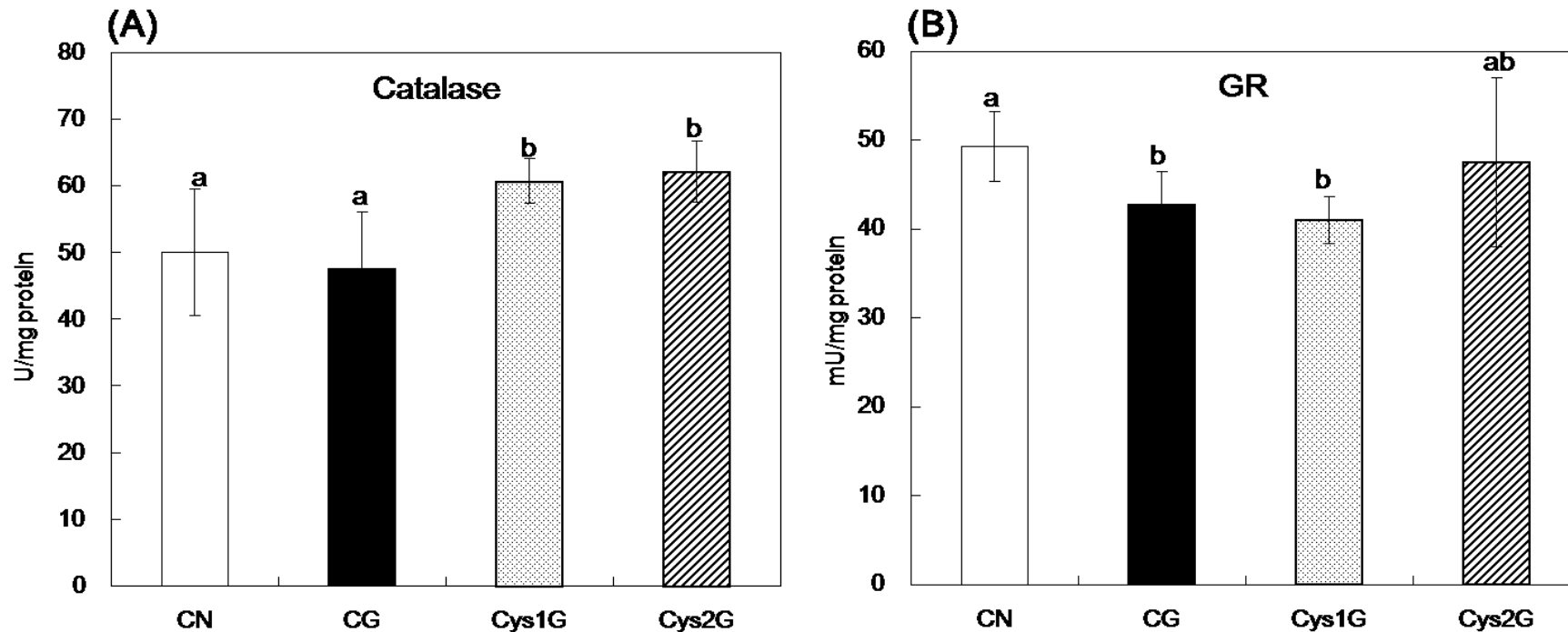


Fig. 8 Liver Catalase (A) and GR (B) concentration in rats on Day 14.

a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+ galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

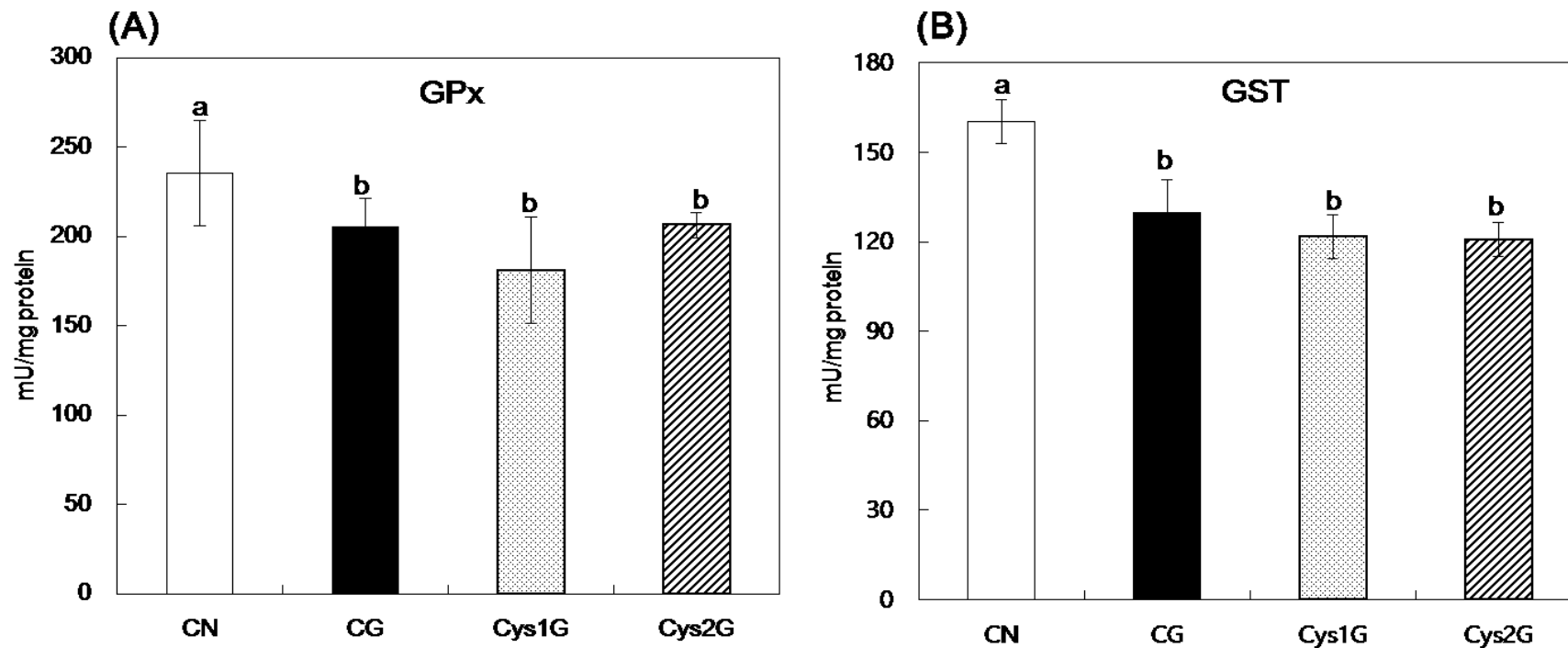


Fig. 9 Liver GPx (A) and GST (B) concentration in rats on Day 14.

a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+ galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

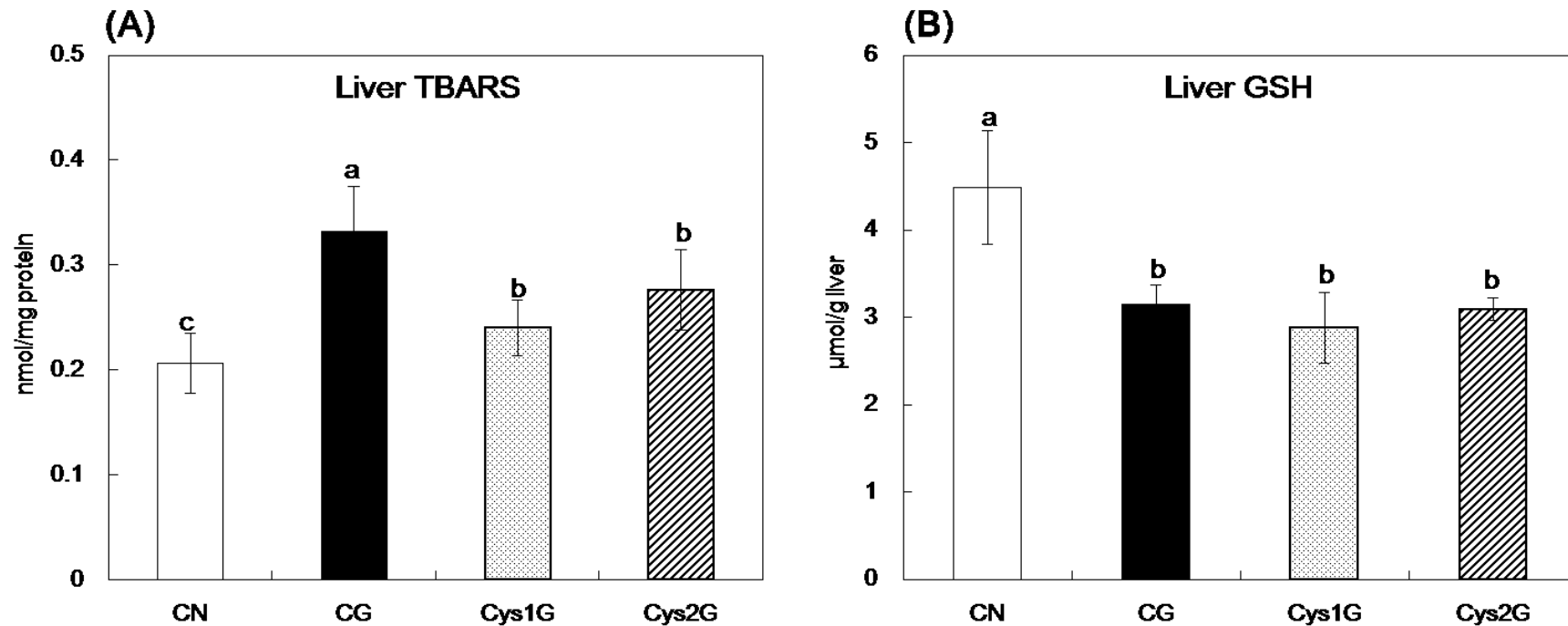


Fig. 10 Liver TBARS (A) and GSH (B) concentration in rats on Day 14.

a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different (P<0.05).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+ galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

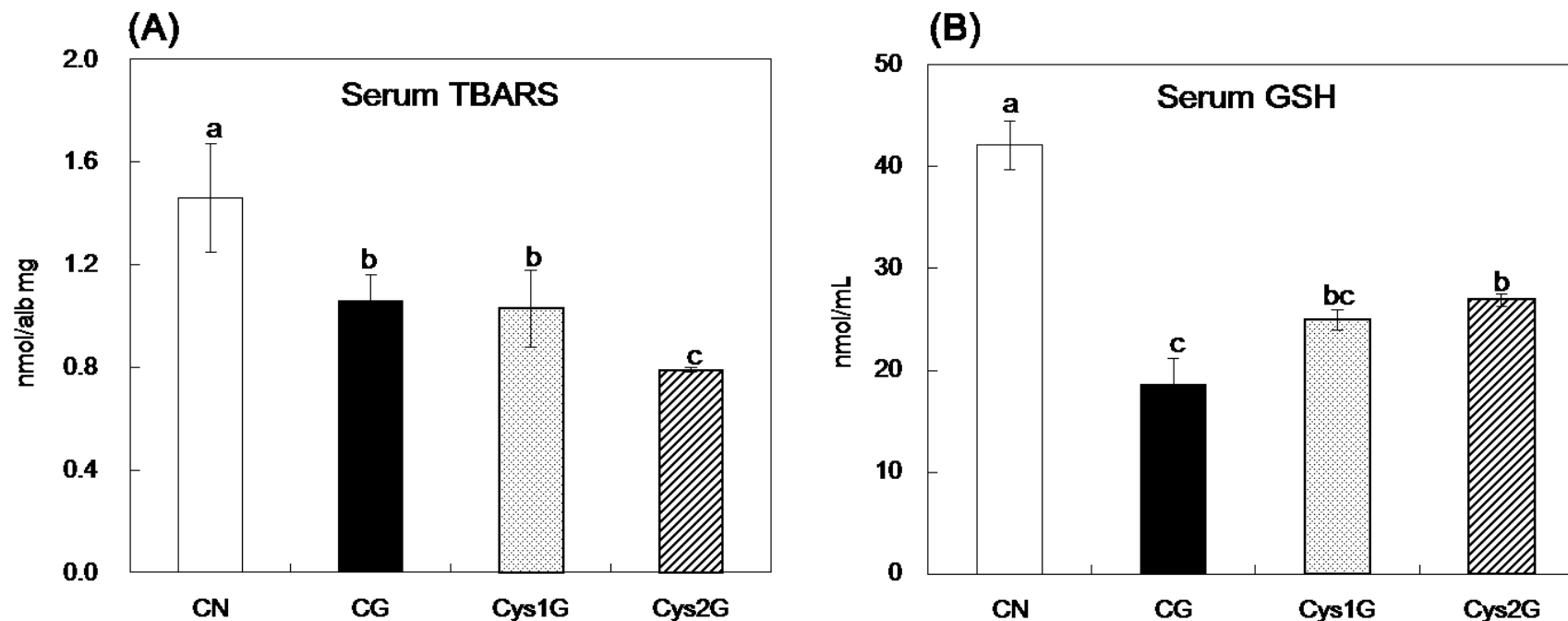


Fig.11 Serum TBARS (A) and GSH (B) concentration in rats on Day 14.

a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

CN: Normal diet, CG: Normal diet + galactosamine, Cys1G: Normal diet + 1% L-cysteine+galactosamine, Cys2G: Normal diet +2% L-cysteine+ galactosamine. Values are means and their standard deviations for five rats per group.

考察

本実験では、基準食に L-システインを 1%、2% 添加した食餌をそれぞれ自由摂食とし与え、2 週間投与実験を行った。実験期間最終日の解剖 22 時間前にガラクトサミン(D-GalN, 400mg/kg bw)を投与し、L-システインの肝毒性・酸化抑制効果を検討した。ガラクトサミンは肝毒性の原因になる肝細胞のネクロシスを誘導することで知られている。様々な研究でガラクトサミン投与はラットで肝臓内グルタチオン濃度の有意な減少を誘導し⁶⁶⁾、活性酸素種による malondialdehyde (MDA) レベルを増加させる^{67, 68)}と報告した。これによって肝臓内ウリジンヌクレオチド濃度が減少され、タンパク質や mRNA 合成の抑制を引き起こし、細胞小器官に損傷を受け、最終的に壊死後性肝硬変を引き起こす⁶⁹⁾。肝損傷の状態で今回の実験結果、コントロール群と比較して CG 群で様々な肝損傷を示すマーカー酵素の増加が見られた。一方、肝臓内 AST, ALT および LDH 活性は 2% L-cysteine 投与群で有意な減少が見られた。この酵素は肝細胞で主に発見されるため、活性酸素種などにより肝細胞が損傷を受けるとこの酵素が血液中に放出され血清中酵素レベルが異常に高くなる^{70, 71)}。ガラクトサミン投与による肝損傷が起こると血清中 AST および ALT 活性が増加し⁷²⁾、24 時間後にもつづいて増加し約 4 日間高い濃度で維持される^{70, 71)}。したがって肝細胞の急性損傷は AST や ALT などのマーカー酵素の活性を測定したり MDA の濃度を測定することにより推測することができる。Mourella ら⁷³⁾はガラクトサミンの投与は肝臓と腎臓で過酸化脂質量を増加させると報告した。今回の実験で肝臓内過酸化脂質量はコントロール群と比べガラクトサミンを投与した群で高い値を示した。一方、1%および 2% L-cysteine 投与群はどちらも CG 群と比べて有意な減少を示した。この結果は L-cysteine の投与はガラクトサミンにより起こる損傷から肝細胞を保護することを示した。Lee ら⁷⁴⁾は肝毒性を引き起こす 1-bromopropane による血清 AST, ALT および MDA レベルの増加を N-Acetyl-cysteine (NAC) 投与により予防したと報告した。また、血清中過酸化脂質量は CG 群と比較して 2% L-cysteine 処理群で有意的に減少した。

Patterson ら²²⁾は *in vitro* 実験で L-cysteine は LDL と結合し脂質過酸化物の形成を誘導する Cu^{2+} を Cu^+ へ還元させることにより LDL の酸化を抑制すると報告した。したがって、L-cysteine の摂取は酸化ストレスによる脂質酸化と細胞損傷を予防すると考えられる。今回の実験で 2% L-cysteine が効果的に肝障害を抑制したと考えられる。

グルタチオンと様々な抗酸化酵素はガラクトサミン投与により誘導された脂質過酸化を予防する役割を持つ^{67, 68)}。肝臓のカタラーゼレベルはコントロール群と CG 群が同様の値を示し、肝臓の GR、GP x および GST レベルは CG 群がコントロール群より有意に低い値を示した。カタラーゼは過酸化水素と過酸化脂質を水とアルコールへ分解し減少させる役割をすることがよく知られている⁷⁵⁾。数々の研究ではカタラーゼ活性レベルは腫瘍と癌細胞⁷⁶⁾、ガラクトサミン処理ラットで⁷⁷⁾低下すると報告されている。一方 L-cysteine 投与群は CG 群より有意的に高いカタラーゼ活性を示した。Nandi ら⁵⁰⁾は砒素モデルラットで L-cysteine 投与は肝臓内カタラーゼ活性の増加が見られたと報告し、今回の実験と同様の結果を示した。抗酸化酵素 GR は酸化型グルタチオン (GSSG) をまた還元させ減少した還元型グルタチオン (GSH) を回復させる⁷⁸⁾。肝臓の GR 活性は 2% L-cysteine 投与群で CG 群より 7.5% 高い値を示し、CN 群と同様の値を示した。これらの結果は実験 1 と同様の結果になった。L-cysteine 投与による抗酸化効果を調べるため肝細胞と血清中のグルタチオン濃度を測定した。グルタチオンは抗酸化システムで重要な役割をし、枯渇したグルタチオン量は酸化ストレスを反映する⁶⁶⁾。本研究ではガラクトサミン投与群はコントロール群と比較して低い値を示し、Seçkin ら⁷²⁾の研究と同様の結果を示した。一般的に cysteine のような合流アミノ酸の摂取はグルタチオン合成を促進させ肝保護効果を持っている。Tateishi ら (1977) は無タンパク質食と無 cysteine 食に L-cysteine を添加しラットに投与した結果、肝臓内グルタチオンレベルの増加を観察したと報告した。一方、今回の研究では肝臓内グルタチオンレベルは CG 群と L-cysteine 投与群間で有意差が見られなかった。おそらくガラクトサミン投与により誘導された活性酸素種によりグルタチオンが

消費されたのが原因であると考えられる。また他の可能性はガラクトサミンにより肝細胞のネクロシス⁷⁹⁾、グルタチオン合成抑制⁸⁰⁾、または肝臓内グルタチオンの血液への流出促進と関連している可能性がある。今回の研究では血清中グルタチオン量はCG群と比較して1% L-cysteine群で33.9%増加し、2% L-cysteine群で有意的に高い値を示した。Cysteine 豊富タンパク質の摂取は血清中グルタチオン量を増加させ酸化ストレスを減少させるという報告がある⁴⁹⁾。また NAC の摂取は血清中フリーcysteine を増加させ、過剰のアセトアミノフェンによるグルタチオン量の増加が必要な時グルタチオン合成を促進させるという報告がある³²⁾。これらの結果L-cysteine は抗酸化酵素とグルタチオン合成を促進させ活性酸素種と酸化ストレスによる損傷を減少させると考えられる。

ガラクトサミンの投与は血清脂質レベルの減少を引き起こし、脂質タンパク質代謝の混乱により血清中性脂質レベルを減少させる⁸¹⁾。本実験でL-cysteine 摂取は濃度依存的に血清中中性脂質レベルを減少させ、実験1と同様の結果を示した。肝細胞がんラットでL-cysteine の摂取はリポタンパク質リパーゼを促進させ血清中性脂質レベルを減少させ高中性脂質血症を改善させたという報告がある⁸²⁾。また、HepG2細胞へのL-cysteine の添加は脂肪酸合成と stearoyl-coenzymeA desaturase-1 の遺伝子発現を抑制させ、中性脂質の量の低下を誘導する⁵⁵⁾。したがってL-cysteine による脂肪組織重量の減少効果が期待でき、本研究で体内脂肪組織重量と体重増加量の減少がL-cysteine 濃度依存的に見られた。肝臓重量で実験群間で有意な差は見られなかった。したがってL-cysteine は先に内臓脂肪へ影響すると考えられる。Kimら⁸³⁾はNACの投与はラットの内臓脂肪の減容による体重減少を伴い、また3T3-L1脂肪細胞で脂肪量の減少を引き起こすと報告した。これらの結果はL-cysteine の投与は脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制することと関連していると考えられる。

今回の研究ではL-cysteine がカタラーゼおよびGR活性とグルタチオン濃度上昇による酸化ストレスを減少させることで肝損傷を予防し、肝機能を維持する効果を示し

た。また、食餌中の L-cysteine は効果的に血清中性脂質レベルを抑制させた。この効果は特に 2% L-cysteine 投与で更に強い効果が示された。しかし、L-cysteine の肝損傷および脂質代謝障害を改善させるメカニズムは不明であることから更なる研究が必要である。

第4章

L-システインの投与が 3T3-L1 脂肪細胞の
脂肪蓄積に与える影響を及ぼす

緒言

肥満状態では肥大な脂肪細胞の肥大化及び、炎症反応およびアディポカインの分泌変化などが生じる。これらの変化は高脂血症や2型糖尿病のような様々な有害な病気と関連しており、全世界的に問題となっている¹¹⁾。特に異常脂血症の一つである高中性脂質血症 (hypertriglyceridaemia) は脂肪細胞組織に脂肪蓄積を促進させる危険な原因であり脂肪細胞の肥大化をもたらす⁸⁴⁾。脂肪細胞が肥大化していくことによりマクロファージが浸透しPAI-1、IL-6およびMCP-1のような炎症系などのアディポサイトカインの発現および分泌異常がおこる。そして、この異常がインスリン抵抗性や動脈硬化等の疾患につながるということが知られている⁸⁵⁾。そのため脂肪細胞の肥大化を阻害することは肥満の抑制はもちろん、脂肪細胞の機能を正常な状態に維持させることは疾患予防の上で重要である。

Murine前脂肪細胞の細胞系である3T3-L1細胞はdexamethasone、IBMXおよびインスリンのような脂肪分化誘導物質を使用し成熟脂肪細胞へ分化し、主な転写因子および転写活性過程のような脂質生成のメカニズムを研究するためのモデルとして多く使用される⁸⁶⁾。成熟脂肪細胞への分化はCCAAT/enhancer-binding protein (C/ebp) familyにより調節される。脂肪細胞分化の主要調節因子であるC/EBP α (CCAAT/enhancerbinding protein α)とPPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)を誘導するC/EBP β により開始される。C/EBP α とPPAR γ は一度発現され始めると相互に作用し、脂肪細胞の末端分化過程で分化を誘導する⁸⁷⁾。この分化因子は脂肪酸結合タンパク質、アディポネクチンおよびレプチンのような脂肪細胞特異遺伝子の発現を活性化させ、インスリンに反応するGLUT4(グルコース輸送体)の発現により細胞内グルコースを流入させ脂質蓄積を増加させる^{88, 89)}。したがってこのような転写活性因子に影響を及ぼす物質は分化抑制および脂質蓄積に効果があると考えられる。

L-cysteineの酸化型であるL-cystineは体内血中コレステロール濃度を減少させ脂質代謝に影響する効果³⁰⁾が知られていることから、L-cysteineも脂質代謝へ影響する

可能性を考えられる。実験 1 および実験 2 で廃鶏の羽から抽出したL-cysteineをラットに食べさせた結果、脂肪組織重量の減少および血中トリグリセリド濃度の低下が見られた。したがってL-cysteineは体内の脂肪組織の脂質蓄積に影響する可能性を考えられる。

本研究ではin vitro実験を行い、murine 3T3-L1 細胞でトリグリセリド蓄積、GPDH活性、アディポサイトカイン分泌および脂肪細胞特異遺伝子の分析を行い、L-cysteineの脂質蓄積および脂肪細胞の分化へ及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. 細胞培地および脂肪細胞への分化

使用した 3T3-L1 マウス由来前脂肪細胞は DS ファーマバイオメディカル(株)より購入しものを使用した(大阪, Japan)。前脂肪細胞は Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM ; Gibco - Life Technologies)培地へ培地 100ml あたり 1ml の 200mM L-グルタミン酸(Sigma-Aldrich Co., Japan Lid)と 10% calf serum(CS ; MP Biomedicals, Thermo Fisher Scientific Inc.)を添加した培養培地を用いて CO₂ インキュベータ(株 ASTEC SCA-(65DRS))で定法に従い室温 37 °C、湿度 95 %、CO₂ 5%条件で細胞が 70~80%程度 confluency 状態になるよう約 3 日間 75cm² フラスコ(Thermo Fisher Scientific Inc., Japan)を用いて培養を行った。培養した 3T3-L1 マウス由来前脂肪細胞はフラスコで収去した後、あらかじめ作成した分化培地(10% fetal bovine serum(FBS ; Japan Bioserum Co Ltd.), 5 μM Dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5mM isobutyl-1-methylxanthine(Wako Pure Chemical Industries) および 1 μg/ml Insulin(Wako Pure Chemical Industries)を加えた DMEM 培地を用いて 24 ウェルプラスチックプレート(旭硝子株式会社 IWAKI)で分化を開始した(5 x 10⁴ cells/cm²)。培養 2 日後分化培地を消去し 10%FBS を加えた DMEM 培地に 1 μg/ml Insulin だけを添加して 2 日間また培養を行った。培養後 10%FBS が入った DMEM 培地を用いて毎 2 日ごとに培地交換を行った。分化誘導後 6 日目および 8 日目に異なる濃度の L-cysteine(200, 20, 2 および 0.2 μM ; Tomo Chemical Co.)を培地に加えた。L-cysteine の濃度は in vivo 実験から計算して決めた。コントロール群は L-cysteine を加えてない培地で培養した。細胞は 37°C、5%CO₂ 条件それぞれ 2 日および 4 日培養を行い Day8 と Day10 に培養を止めた。培養後培地は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)分析のため回収し分析するまで-80°Cに保管した。細胞は phosphate-buffered saline (PBS)を用いて 2 回洗浄した後、各項目の分析に使用した。

2. TG 蓄積量

培養した後 PBS で 2 回洗浄した後脂肪細胞にまた 400 μ l の PBS バッファーを加え、超音波処理機(ダイテック(株)超音波式ホモジナイザー-ULTRASONIC HOMOGENAIZER VP-050)を用いて 90 秒間 80%output 条件で氷の上で細胞を磨砕した。磨砕した脂肪細胞のトリグリセライドの定量はトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業(株)) を使用し、添付の使用説明書の方法に従って定量を行った。実験を行う前すなわち、試薬は発色剤 1 瓶を緩衝液 1 瓶で溶解して準備しておいた。各濃度の L-cysteine サンプルとスタンダード 150 μ l に発色試薬 3ml を加えよく混合しウォーターバスで 37°C、5 分間保温したものを分光光度計 (FP-6200;Nihonbunkou, Jasco, Tokyo, Japan) を使用し 600nm の吸光度で測定した。計算は以下の通りに行った。

$$\text{トリグリセライド濃度 (mg/dl)} = \frac{\text{検体吸光度}}{\text{スタンダード吸光度}} \times 300$$

この値を DNA 量で補正したものを TG 蓄積量とした。

3. GPDH 活性

GPDH 活性の測定は GPDH Assay Kit (プライマリーセル(株) Sapporo, Japan) を使用し、添付の使用説明書の方法に従って定量を行った。実験の前にすなわち、反応基質溶液は、反応基質のバイアル 1 本に対し精製水 4.2ml で溶解した。酵素抽出溶液は酵素抽出試薬を精製水 200 ml で溶解した。反応基質溶液と酵素抽出溶液は実験する間に氷の上で保管した。培養後、PBS を用いて 2 回洗浄した後脂肪細胞にまた 1well あたり 0.5~1.0ml の酵素抽出溶液を加えた。このプレートを超音波処理機を用いて氷の上で細胞を磨砕した溶液を回収し、冷却遠心分離機(KUBOTA テーブルトップ冷却遠心分離機 3500)を用いて 4°C、12800 g、5 分間分離した上清を検体として使用した。反応基質溶液を 400 μ l エッペンチューブに入れ 25 °C に 5 分間加温した。その後、検体を 200 μ l 入れよく攪拌した後、波長 340 nm における吸光度減少率を経時測定し、

1 分間あたりの吸光度の変化量 ($\Delta O. D.$) を分光光度計 (FP-6200; Nihonbunkou, Jasco, Tokyo, Japan) を使用し 10 分間求めた。計算方法は以下の通りである。

光路長 (cm) = 反応総量 (ml) / プレーートのウェル底面積 (cm^2) = $0.12 / 0.25 = 0.48$

GPDH 活性 (U/ml) = ($\Delta O. D.$ / NADH のミリモル分子吸光係数) \times (反応総量 ml / 検体量 ml) \times (検体希釈率 / 光路長 cm)

= ($\Delta O. D.$ / 6.22) \times (0.12 / 0.04) \times (5 / 0.48)

この値を DNA 量で補正したものを GPDH 活性値とした。

4. DNA 量

DNA 量を測定は DNA kit (プライマリーセル (株) Sapporo, Japan) を用いて測定した。すなわち、TG 蓄積量の定量で使用した細胞を磨砕したバッファー液 $50 \mu l$ に緩衝液 1ml を加えよく攪拌した後、発色液 $50 \mu l$ を添加した。その後励起フィルター 356nm, 蛍光フィルター 458nm 測定した。

5. アディポサイトカインの定量

アディポサイトカインは ELISA 法を用いて定量を行った。培養した後細胞を破碎し、14000 rpm で 5 分間遠心分離し、分離した上清を $-80^\circ C$ で保存したものを使用した。

5-1. MCP-1 測定

細胞内 MCP-1 は MCP-1 ELISA Kit (RayBiotech, Inc.) を用いて定量を行った。キットに添付されている使用説明書の方法に従って定量を行った。あらかじめ室温に準備しておいた検体およびスタンダードを $100 \mu l$ ずつ抗体プレートに添加し 2.5 時間室温で反応させた。その後、洗浄液で洗浄行い $100 \mu l$ ずつ抗体を添加し室温で 1 時間反応させた。また洗浄液で洗浄した後、 $100 \mu l$ prepared streptavidin solution を

添加し室温で45分反応した後、洗浄後50 μ l 停止液を入れすぐ450nm 吸光度でマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

5-2. IL-6 測定

細胞内 IL-6 は IL-6 ELISA Kit (R&D systems, INC.) を用いて定量を行った。キットに添付されている使用説明書の方法に従って定量を行った。室温に置いたスタンダードと検体をそれぞれ50 μ l ずつ抗体プレート well に入れ100 μ l の IL-6 conjugate を well に入れ室温で2時間培養を行った。洗浄液で洗浄後100 μ l substrate solution を添加して30分間暗室で培養を行い、100 μ l の停止液を添加した。その後で30分以内に450nm マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

5-3. PAI-1 測定

細胞内 PAI-1 測定は PAI-1 ELISA Kit (Innovative Research, Inc.) を用いて定量を行った。キットに添付されている使用説明書の方法に従って定量を行った。室温においたスタンダードと検体を100 μ l ずつ抗体プレート well に入れあらかじめ blocking buffer で溶かした primary antibody を100 μ l ずつ well に添加した。30分間反応した後洗浄液で3回洗浄を行った。その後あらかじめ blocking buffer で希釈した secondary antibody を100 μ l 添加し30分間反応させた後洗浄を行った。その後100 μ l の TMB substrate を入れ5分間反応し、停止液を入れゆっくり攪拌した。攪拌したプレートは450nm で吸光度を測定した。

5-4. Resistin 測定

細胞内 resistin は Resistin ELISA Kit (R&D Systems Inc.) を用いて定量を行った。キットに添付されている使用説明書の方法に従って定量を行った。あらかじめ室温の状態にしたスタンダードと検体を50 μ l ずつ抗体プレートに添加し100 μ l の

resistin conjugate を入れ 2 時間室温で反応させた。反応した後、洗浄液で洗浄し 100 μ l の substrate solution を添加して 30 分間暗室で反応を行い 100 μ l の停止液を入れゆっくり攪拌した。その後 30 分以内に 450nm でマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

6. 細胞生存率測定

細胞生存率は MTT assay 法で測定した。3T3-L1 脂肪細胞は 96 well plate で培養を行い最終濃度が 0.5mg/ml になるように 5g/ml の MTT solution を添加した。37°C、5%CO₂ 条件の培養器で 4 時間の間反応させた。その後 MTT solution を除去し、室温の DMSO を 150 μ l 添加した後、暗室で攪拌しながら 30 分間反応した。反応後にマイクロプレートリーダーと用いて 570nm で吸光度を測定した。MTT assay の結果は以下の通りに計算した。

$$\text{Cell proliferation (\%)} = \text{A570nm(sample)} / \text{A570nm(control)} * 100$$

7. 遺伝子発現量の定量

7-1. Total RNA 抽出

培養が終わった脂肪細胞の培地を除去し PBS で洗浄した後、1well あたり ISOGEN (Nippon Gene、Tokyo、Japan) を 0.4ml 加え、細胞と ISOGEN を一緒に RNA 除去処理した 1.5ml エッペンチューブに取り入れ、ホモジナイザーで氷中にて冷却しながらホモジナイズした。ホモジネートに 100 μ l の冷クロロホルムを加え攪拌した後、15000rpm、4°C で 15 分間遠心分離し、RNA を含む水層を別の 1.5ml エッペンチューブに移し取った。この RNA 溶液にイソプロパノールを 250 μ l 加え混合した後、15000rpm、4°C で 30 分遠心分離し RNA の沈殿物を得た。上澄みは除去し、RNA 沈殿物から水を吸着させるため 80% エタノールを 1ml 加え、混合した後 15000rpm、4°C で 30 分遠心分離した。同様に上澄みを除去し、滅菌超純水を 50 μ l 加えピペッティングで溶解し、-80°C で保存した。

抽出したRNA溶液中の核酸を決定するため、1.5mlエッペンチューブに溶解したRNA溶液5 μ lを取り移し、495 μ lのTE Bufferを加え混合した。この全量を石英セルに移し、分光光度計(UV-1600 ; Shimadzu)を用いて260nmにて核酸、280nmにてタンパク質の吸光度を測定した。ブランクには滅菌超純水を用いた。核酸およびタンパク質の濃度は吸光度が1.0で4 μ g/mlとして計算した。また、260nmと280nmの吸光度の比を取り、この値が1.9–2.3の範囲であることを確認してから実験を行った。

7-2. RNA試料中のDNA分解

7-1の操作で濃度を決定したRNAは超純水と混合し、総42 μ l溶液中RNAが20 μ g存在するように計算し、0.5mlのチューブに移した。また、RQ1 DNase (1U/ μ l、PROMEGA)を1 μ l、RNase Inhibitor (40U/ μ l)を2 μ l、10X DNase Buffer (400mM Tris-Hcl pH7.5、60mM MgCl₂、100mM NaCl、100mM DTT、620 μ l DDW)を5 μ l混合したBuffer Mixを8 μ lずつ加え攪拌した。これを37°C、45分間酵素反応させてDNAを分解した。反応後滅菌超純水50 μ l、およびフェノールクロロホルム–イソアミルアルコール(25:24:1、v/v/v;GIBCO BRL)100 μ lを加え攪拌し、15000rpm、4°Cで遠心分離を行った。RNAである上層を別のチューブに移し、再びフェノールクロロホルム–イソアミルアルコールを100 μ l加え操作を繰り返した。再度上層を別のチューブに移し、3M NaOAcを10 μ l、ペレットペイント(ピンク)を1 μ l混合したMix溶液を11 μ l加え攪拌した後、100%エタノール(冷)を300 μ l加え攪拌した。これを15000rpm、4°Cで30分間遠心分離し上澄みを除去した。80%エタノール(冷)を150 μ lを添加した後、15000rpm、4°Cで30分間遠心分離し同様に上澄みを除去した。得られたRNA沈殿物に28 μ lの滅菌超純水を加え、ピペティングで完全に溶解し、-80°Cで保存した。

7-3. 逆転写反応

7-2でDNAを分解、除去し滅菌超純水に溶解したRNAの7 μ lを0.5mlエッペンチューブ

に移した。これにOligo (dt) Primer(Invitrogen、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)を1 μl 加え70 $^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベーションした後氷に急冷した。その後RNase Inhibitor(TaKaRa)を1 μl 、0.1M Dithiothreitol(DTT ; Invitrogen)を2 μl 、2.5mM dNTP Mixture(TaKaRa) 4 μl 、5x1st Stand Buffer 4 μl (Invitrogen、containing 15mM MgCl₂)を混合したMix溶液を11 μl ずつ加え、42 $^{\circ}\text{C}$ で5分プレインキュベーションした。これにMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RTase ; Invitrogen)を1 μl 加え42 $^{\circ}\text{C}$ で50分間インキュベーションし、続いて70 $^{\circ}\text{C}$ で15分間インキュベーションを行うことで逆転写によるcDNAを合成した。この後氷中に急冷しRNAとcDNAの分離を行った。またRNase H(Invitrogen、2U/ μl)を1 μl 加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で20分間インキュベーションしてRNAを分解した。得られたcDNAは-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

7-4. Real time RT-PCR

各アディポサイトカインの mRNA の発現量の測定は Step One Plus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems)を用いて Real Time PCR 法にて行った。使用した各アディポサイトカインのプライマー(sigma Aldrich japan) 塩基配列と必要なプローブは Table16, Table17 に示した。

Table 16. Primer Sequences for quantitative PCR.

| Gene Name | Forward Primer | Reverse Primer |
|----------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Ppar γ | 5'-TCTGCTCCACACTATGAAGAAGACATTC-3' | 5'-GGTTCTACTTTGATCGCACTTTGG-3' |
| C/ebp α | 5'-CAACGTGGAGACGCAACAGA-3' | 5'-GTGTCCAGTTCACGGCTCAG-3' |
| HSL | 5'-CCTGGA ACTAAGTGGACGCAA-3' | 5'-CTGCCTCAGACACACTCCTG-3' |
| FAS | 5'-GAAGGTGGCAGAGGTGCTG-3' | 5'-GGTGGCTGTGTATTCCAGTTGTA-3' |
| aP2 | 5'-TTGTCTCCAGTGAAA ACTTCGATG-3' | 5'-GCCATGCCTGCCACTTTCC-3' |
| Adiponectin | 5'-TGGCACTCCTGGAGAGAAGG-3' | 5'-TCCTGTCATTCCAACATCTCCTG-3' |
| β -Actin | 5'-CGCGAGCACAGCTTCTTTG-3' | 5'-CATGCCGGAGCCGTTGTC-3' |

Ppar γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, C/ebp α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha, HSL : Hormone sensitive lipase, LPL : Lipoprotein lipase, FAS : Fatty acid synthase, aP2 : Adipocyte protein 2

Table 17. Probe Sequences for quantitative PCR.

| Gene Name | |
|----------------|-------------------------------------|
| Ppar γ | 5'-TCACAAGAGCTGACCCAATGGTTGCTGA-3' |
| C/ebp α | 5'-AGTTGACCAGTGACAATGACCGCCTGC-3' |
| HSL | 5'-AAGACCACATCGCCCACAGCAGAGTC-3' |
| FAS | 5'-AGAAGGCCACTTGTATTCCCGAATCCCG-3' |
| aP2 | 5'-TGGCAAAGCCCACTCCCACTTCTTTCAT-3' |
| Adiponectin | 5'-CTCACCCCTTAGGACCAAGAAGACCTGCA-3' |
| β -Actin | 5'-CACACCCGCCACCAGTTCGCCATG-3' |

Ppar γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, C/ebp α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha, HSL : Hormone sensitive lipase, LPL : Lipoprotein lipase, FAS : Fatty acid synthase, aP2 : Adipocyte protein 2

96-well Optical Reaction plate (Applied Biosystems) に1 well あたり TaqMan Universal PCR Master Mix (Roche) 12.5 μ l、Forward Primer (2.5 μ M) 1.0 μ l、Reverse Primer (2.5 μ M) 1.0 μ l、TaqMan Probe (2.5 μ M) 1.0 μ l を入れ、その上 cDNA (50 ng/ μ l) を1.0 μ l 入れよく攪拌し、tep One Plus リアルタイムPCRシステムにて Real Time PCR 反応を行った。Real Time PCR の反応条件は Roche Applied Science の Universal Probe Library Probes に添付の説明書に従い設定した。すなわち、95°C で10分間の前反応後、95°C 15秒間、60°C で1分間のPCR反応を40サイクル行った。得られた結果は β -actin で内部補正し、 $\Delta\Delta$ Ct法にて算出した。

8. 統計分析

それぞれのデータは平均及び標準誤差を算出した。データ間の有意差検定は、一元分散分析の後ANOVAのTurkey-Kramer testで事後比較を行った。有意水準は $P < 0.05$ としSPSSソフトウェアを用いて解析を行った。

結果

1. TG含量, GPDH活性およびMTT活性

Figure12 に day 8 の時 3T3-L1 脂肪細胞ない TG 蓄積量および GPDH 活性について示した。TG 含量はコントロール群と比較して Cys200 群で有意な減少が見られ、Cys20 および Cys2 群で減少傾向が見られた。

GPDH 活性ではコントロール群に比べすべての L-cysteine 投与群で有意な減少を示し、特に Cys200 および Cys2 群で有意な減少が見られた。

Figure13 に day 10 の時 3T3-L1 脂肪細胞ない TG 蓄積量および GPDH 活性について示した。TG 含量はコントロール群に比べて Cys200、Cys20 および Cys0.2 群で有意な減少を示し、特に Cys200 群で顕著に低い値を示した。

GPDH 活性ではコントロール群に比べて Cys20 および Cys0.2 群で減少傾向が見られ、Cys200 群および Cys2 群で有意に低い値を示した。

また、データでは示さないが MTT 活性を測定した結果、L-cysteine 投与群間で有意な差は見られなかった。

2. 細胞内サイトカインレベル測定

Figure14 に MCP-1 の発現レベルを示した。Day 8 の時 MCP-1 レベルはコントロール群と L-cysteine 投与群間で有意な差は見られなかった。Day 10 の時コントロール群に比べ Cys20 および Cys0.2 群で減少傾向が見られ Cys200 および Cys2 群で有意な減少が見られた。

Figure15 に IL-6 の発現レベルを示した。IL-6 レベルは day 8 と day 10 どちらもコントロール群と比較してすべての L-cysteine 投与群で有意に低い値を示した。

Figure16 に PAI-1 の発現レベルを示した。Day 8 で発現レベルはコントロール群 L-cysteine 投与群間で有意な差は見られなかった。Day 10 ではコントロール群と比

較して L-cysteine 投与群の減少傾向 (Cys200、Cys20) および有意な減少 (Cys2、Cys0.2) が見られた。

Figure17 に resistin の発現レベルを示した。Day 8 で resistin のレベルはコントロール群と比較してすべての L-cysteine 投与群で有意な減少が見られた。Day 10 では Cys200 群で有意に低い値を示し、Cys20、Cys2 および Cys0.2 群で減少傾向が見られた。

3. 3T3-L1 細胞内 mRNA 発現レベル測定

Figure18 に PPAR γ の mRNA 発現レベルを示した。Day 8 の PPAR γ は Cys200 群および Cys20 群で有意に減少し特に Cys20 で顕著に減少した。Day 10 の PPAR γ レベルはコントロール群と比べてすべての L-cysteine 投与群で有意に低い値を示した。

Figure19 に C/ebp α の mRNA 発現レベルを示した。C/ebp α の mRNA 発現レベルは Day 8 と Day 10 両方ともコントロール群と比べてすべての L-cysteine 投与群で有意な減少が見られた。

Figure 20 に HSL の mRNA 発現レベルを示した。Day 8 の HSL mRNA 発現はコントロール群に比較して Cys200 群で増加傾向が見られ、Cys2 群で有意に高い値を示した。Day 10 の HSL mRNA 発現はコントロール群に比べて Cys200 群が有意に高い値を示した。

Figure21 に aP2 の mRNA 発現レベルを示した。Day 8 の aP2 の mRNA 発現レベルは Cys200 群および Cys0.2 群でコントロール群より有意な低下が見られた。Day 10 の aP2 の mRNA 発現レベルはコントロール群に比較してすべての L-cysteine 投与群で有意に低い値を示した。

Figure 22 に FAS の mRNA 発現レベルを示した。Day 8 の FAS mRNA 発現はコントロール群と比べてすべての L-cysteine 投与群で有意な減少が見られた。Day 10 では Cys200 群で有意な減少、Cys20 群で減少傾向が見られ濃度依存的な結果が見られた。

Figure23 にアディポネクチンの mRNA 発現レベルを示した。Day 8 のアディポネクチン mRNA 発現レベルは Cys20 群および Cys0.2 群で有意な増加が見られた。Day 10 のアディポネクチン mRNA 発現レベル結果ではすべての L-cysteine 投与群でコントロール群より有意に高い値を示した。

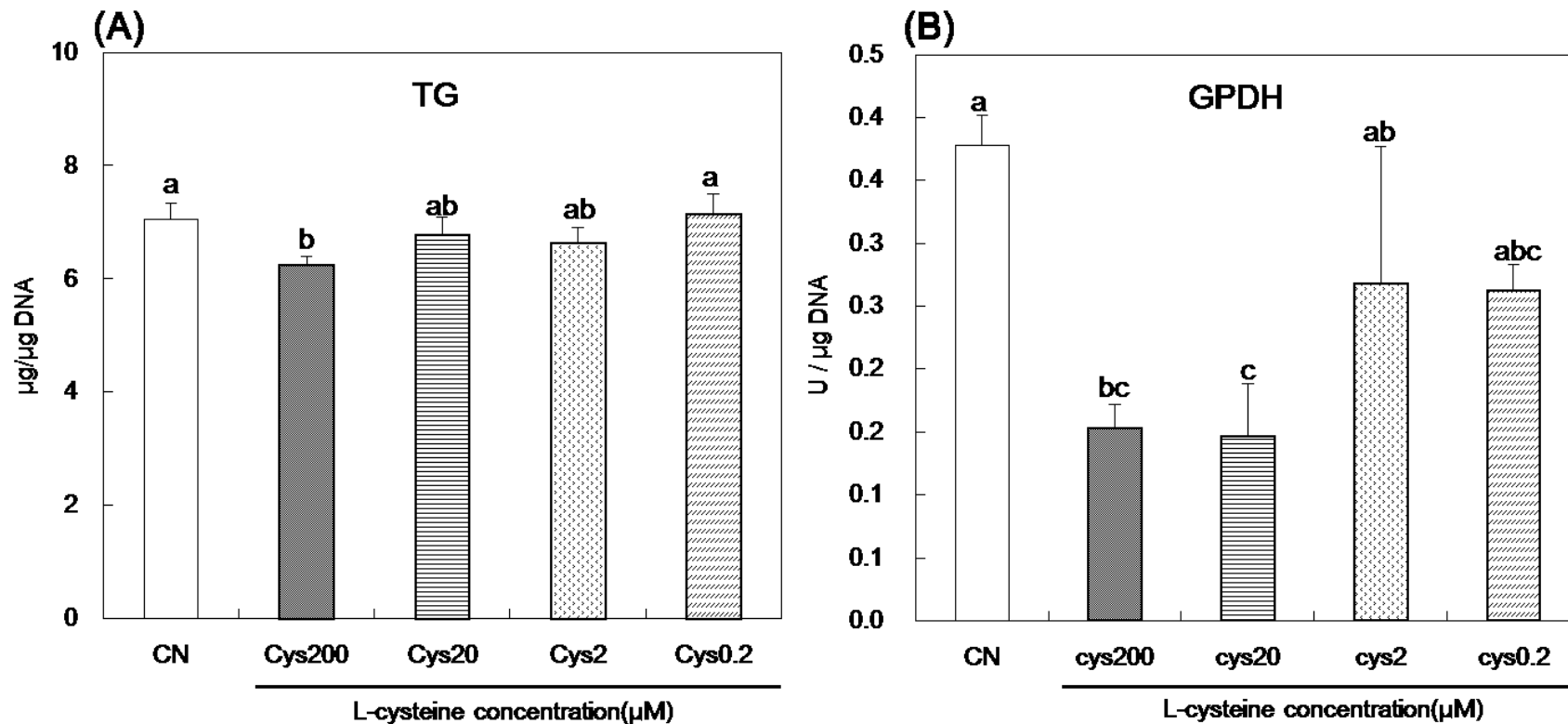


Fig.12 Effect of L-cysteine on TG (Triglyceride) content and GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) activity in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 µM of L-cysteine. On day 8 after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells, TG content(A) and GPDH activity(B) were determined using and ELISA kit. a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different (P<0.05). Values are means and their standard deviations for four replicated cultures.

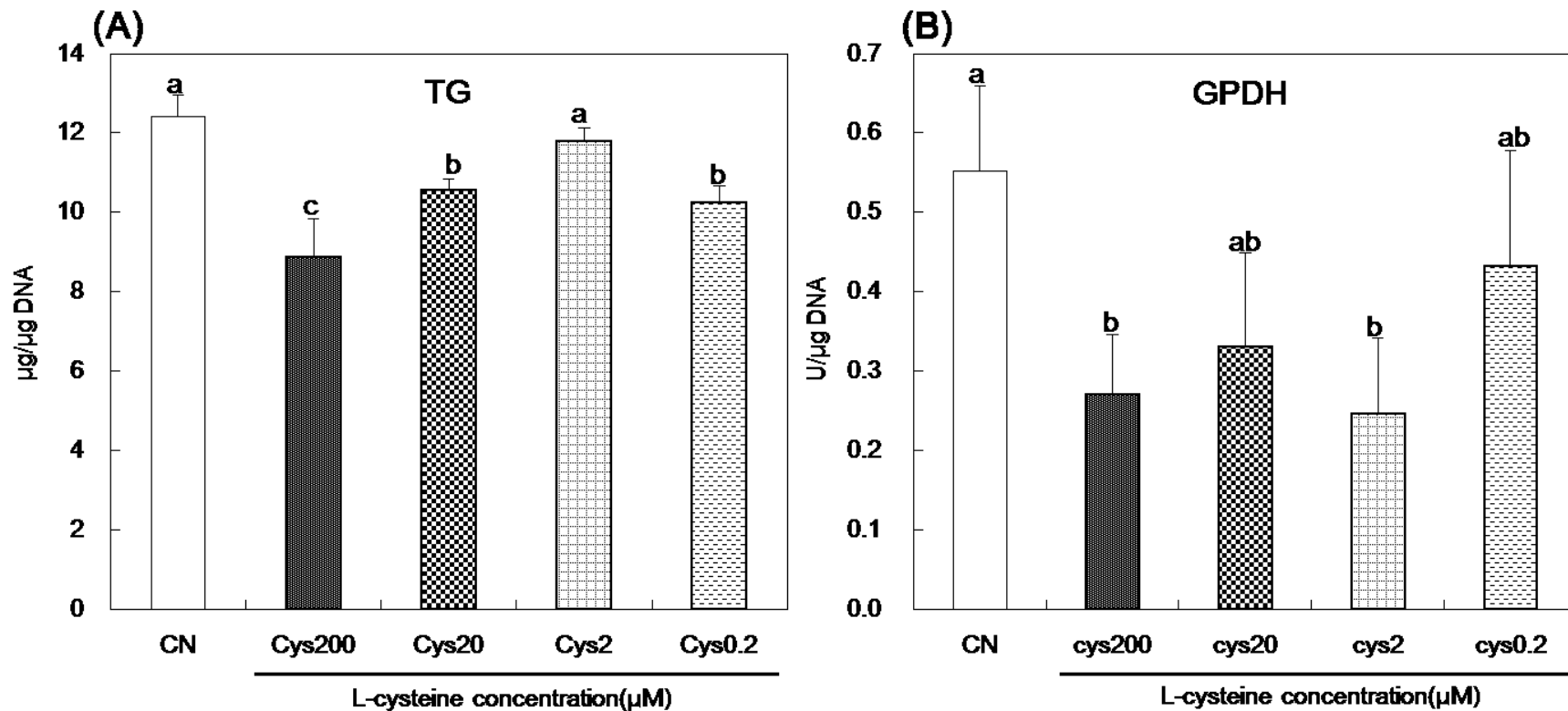


Fig.13 Effect of L-cysteine on TG (Triglyceride) content and GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) activity in 3T3-L1 adipocytes.

Cells were treated with 0.2-200 µM of L-cysteine. On day 10 after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells, TG content(A) and GPDH activity(B) were determined using and ELISA kit. a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different (P<0.05). Values are means and their standard deviations for four replicated cultures.

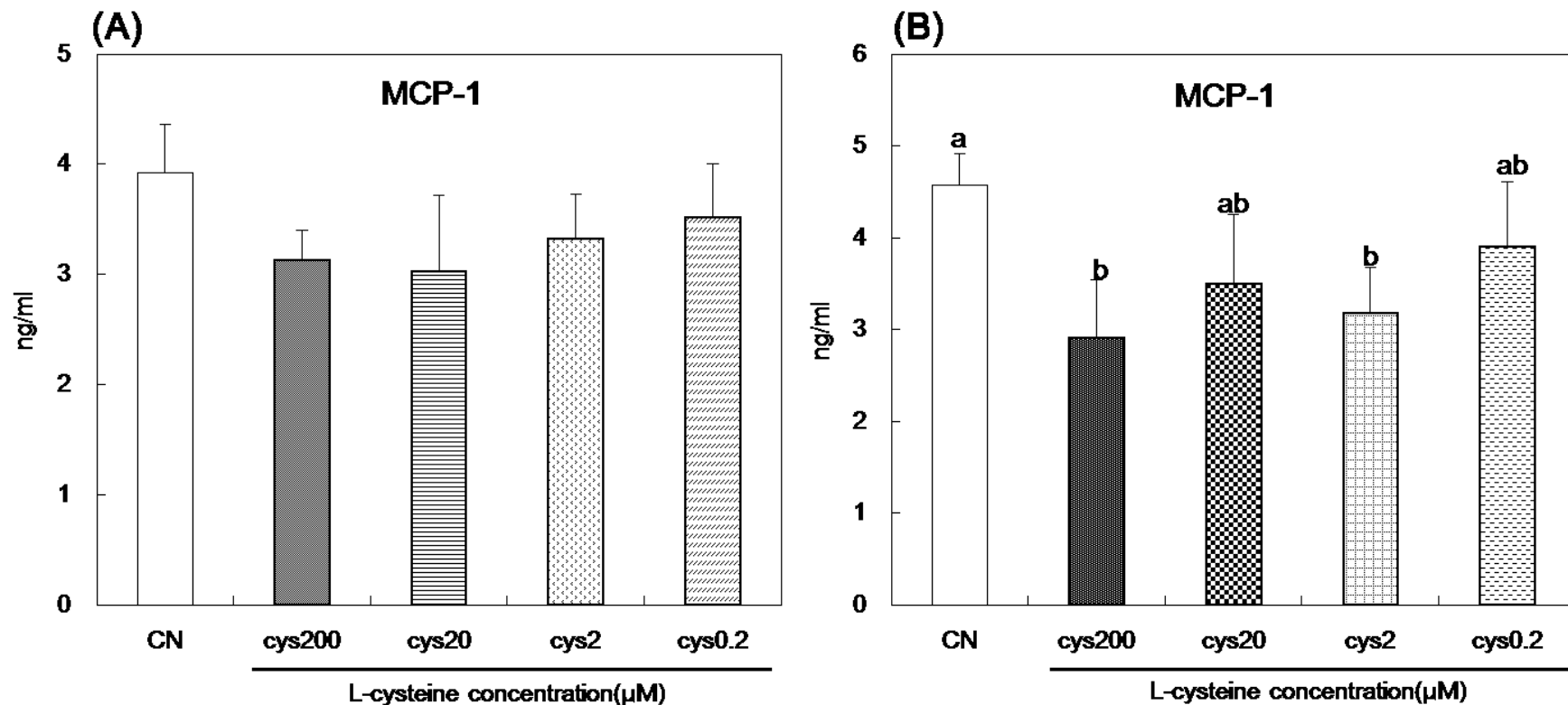


Fig.14 Effect of L-cysteine on expression level of MCP-1 in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μM of L-cysteine. On day 8(A) and day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined using and ELISA kit. a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Values are means and their standard deviations for four replicated cultures.

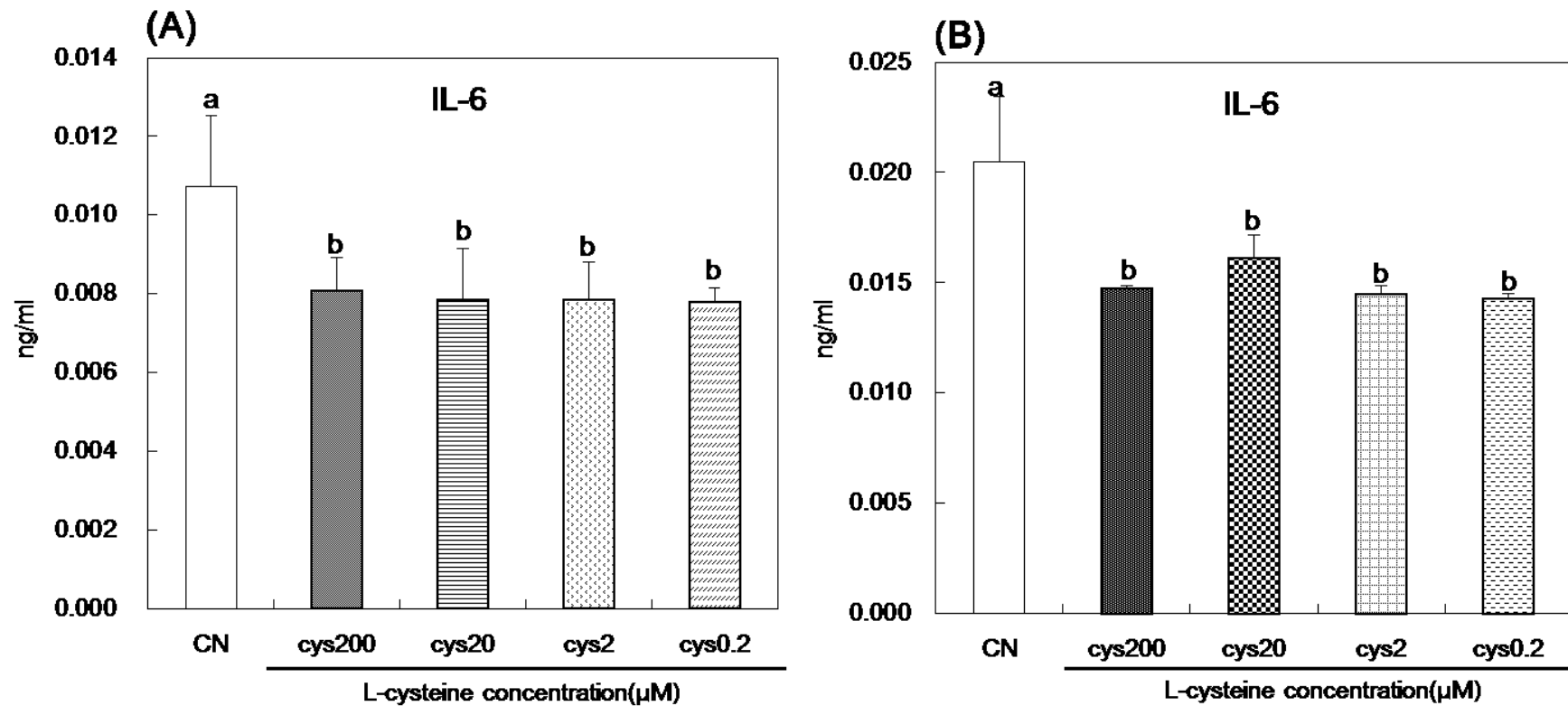


Fig.15 Effect of L-cysteine on expression level of IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μM of L-cysteine. On day 8(A) and day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined using and ELISA kit. a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Values are means and their standard deviations for four replicated cultures.

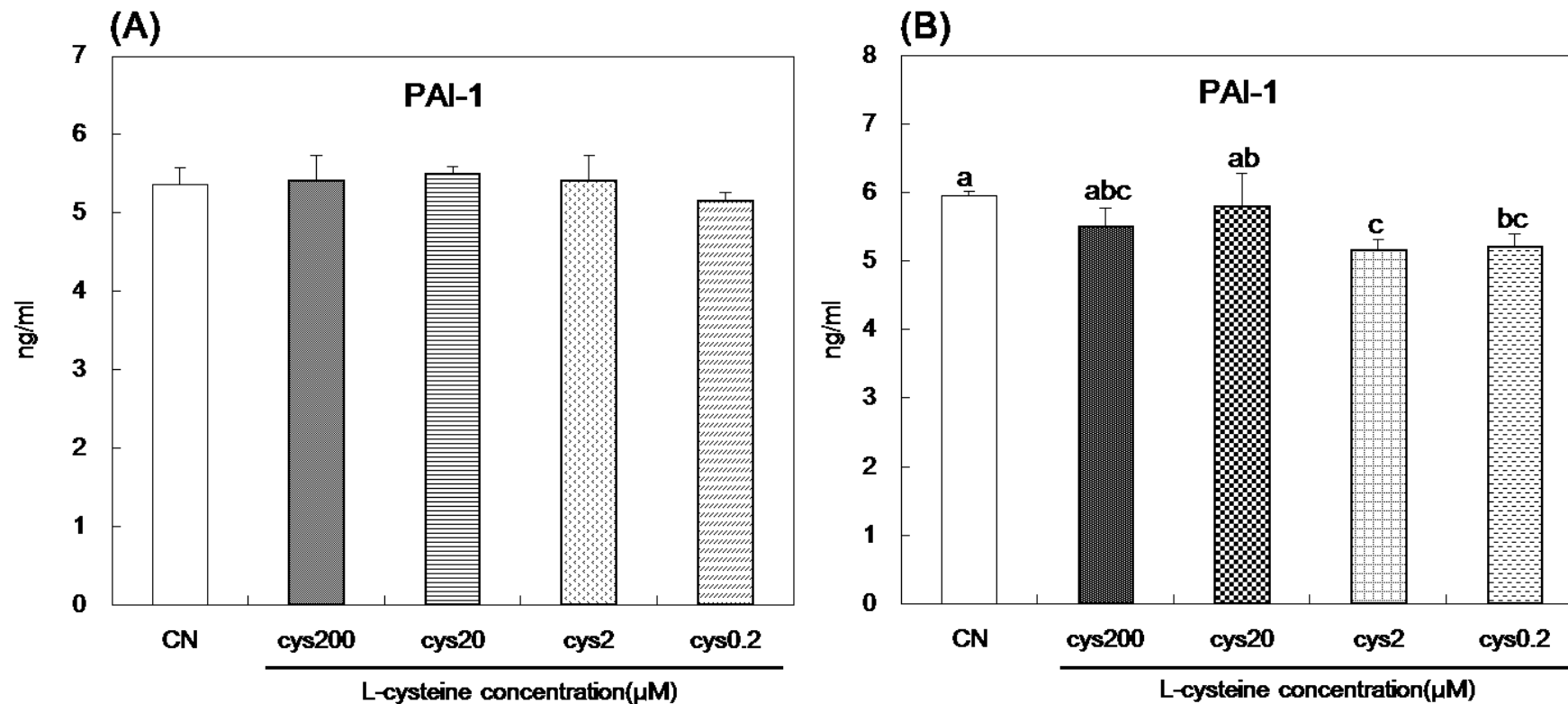


Fig.16 Effect of L-cysteine on expression level of PAI-1 in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μM of L-cysteine. On day 8(A) and day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined using and ELISA kit. a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Values are means and their standard deviations for four replicated cultures.

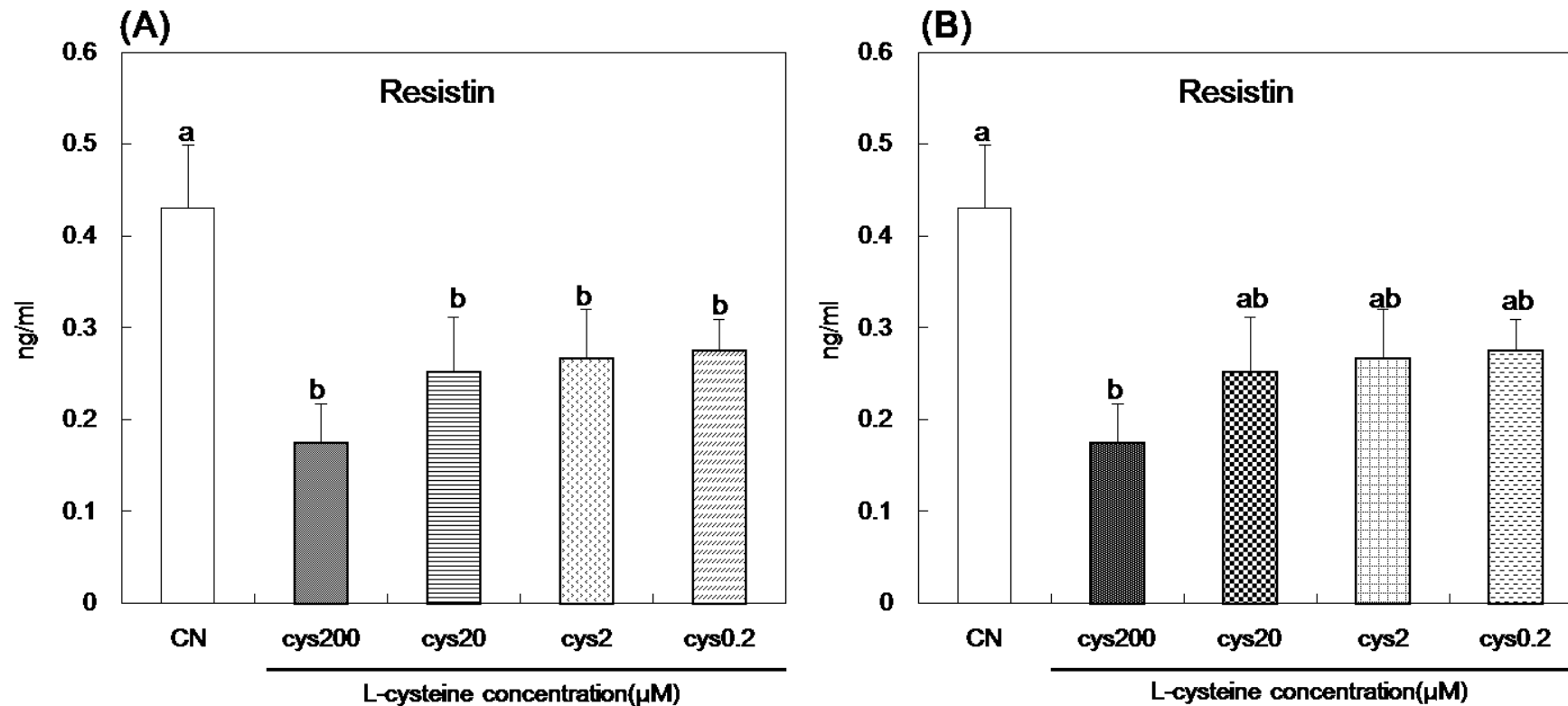


Fig.17 Effect of L-cysteine on expression level of Resistin in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μM of L-cysteine. On day 8(A) and day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined using and ELISA kit. a,b,c Means within the same rows bearing different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Values are means and their standard deviations for four replicated cultures.

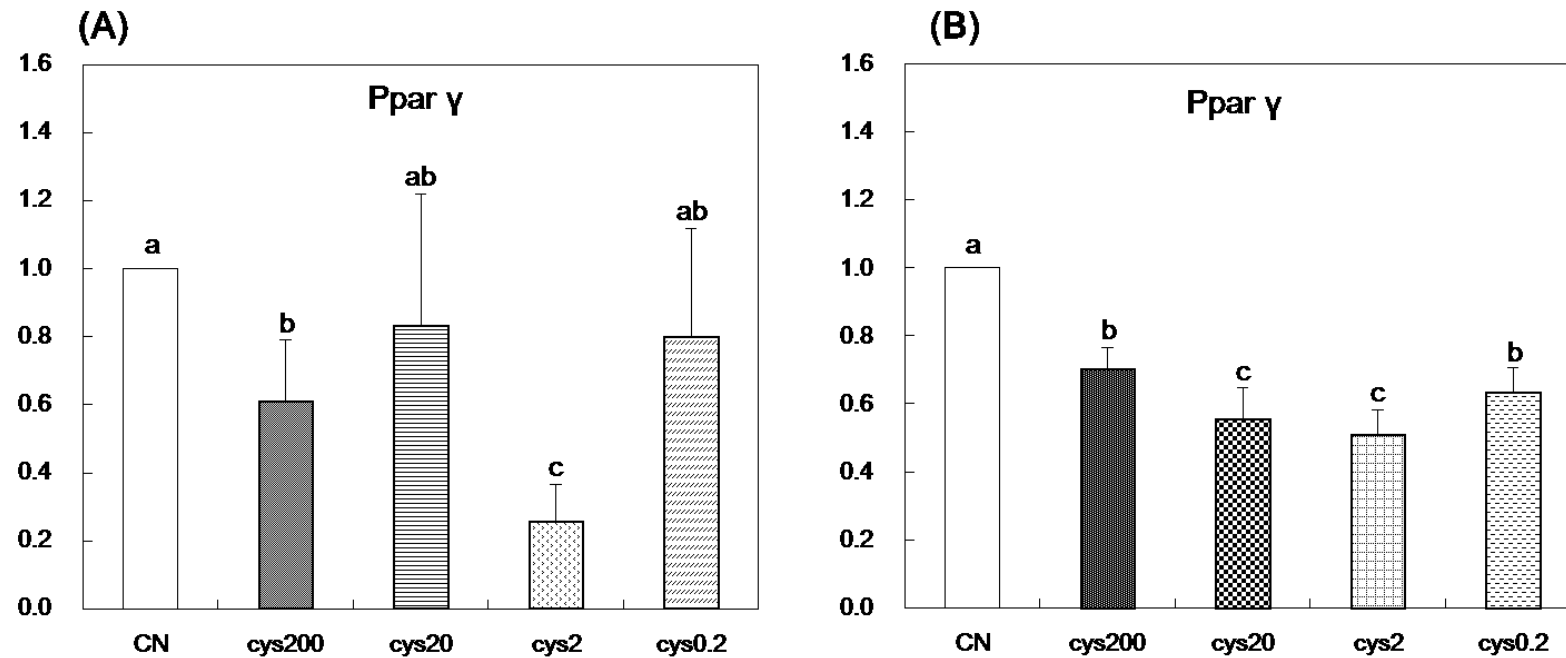


Fig.18 Effect of L-cysteine on mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μ M of L-cysteine. PPAR γ on day 8(A) and on day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined quantitative real time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels(n=6). $p < 0.05$.

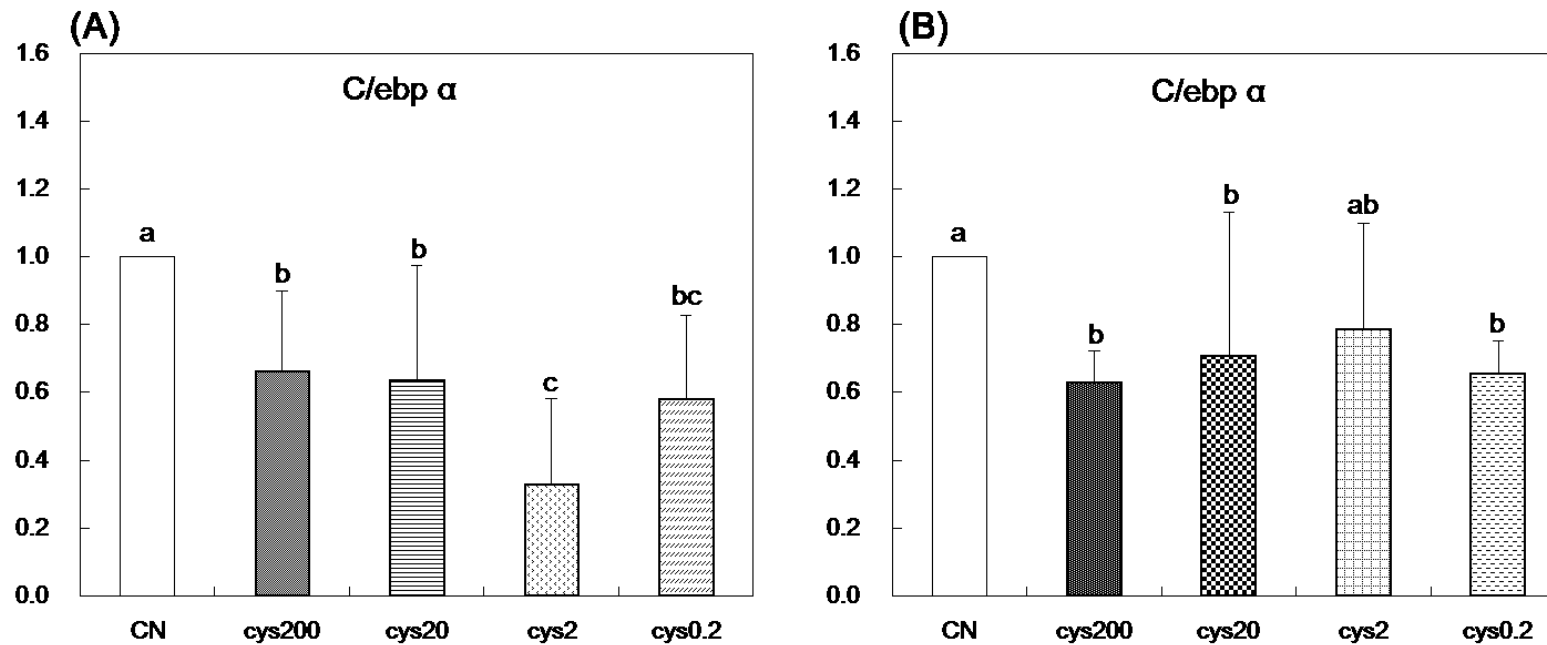


Fig.19 Effect of L-cysteine on mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μ M of L-cysteine. C/ebp α on day 8(A) and on day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined quantitative real time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels(n=6). $p < 0.05$.

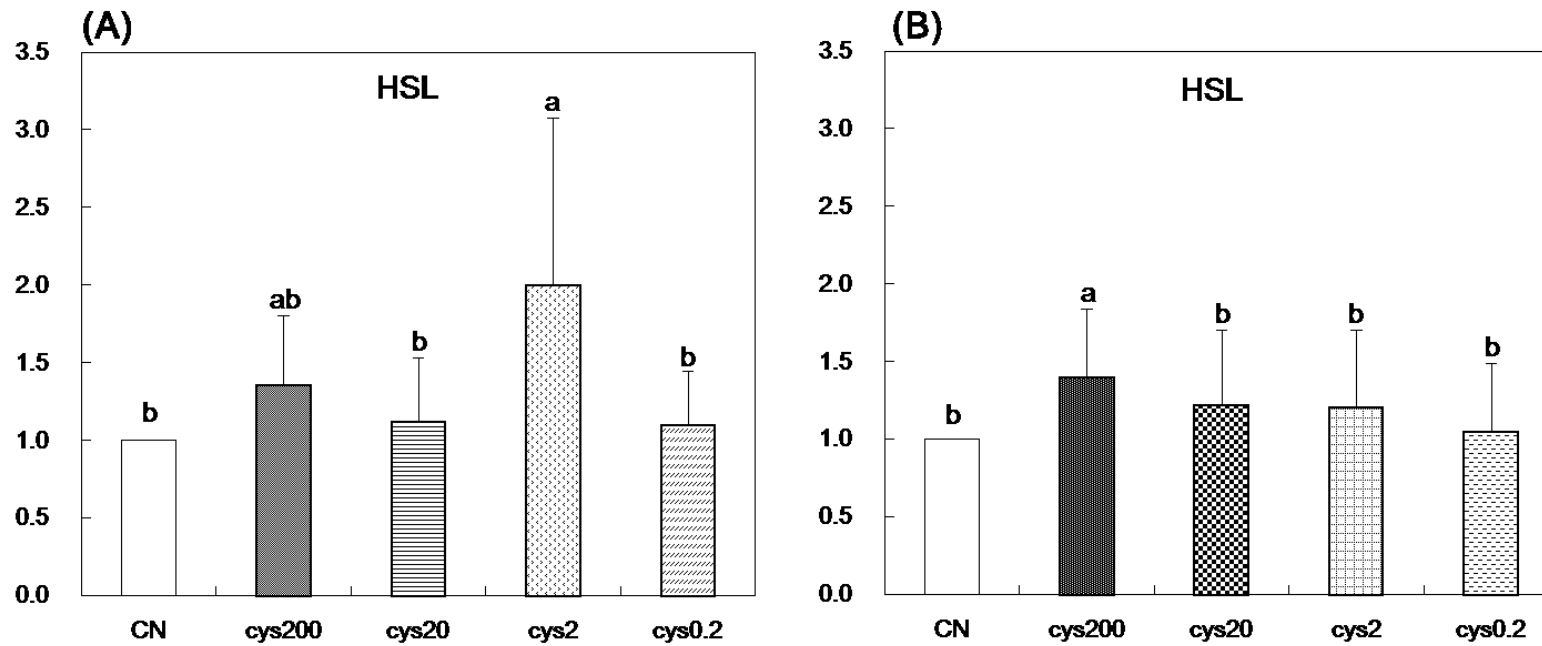


Fig.20 Effect of L-cysteine on mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μ M of L-cysteine. HSL on day 8(A) and on day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined quantitative real time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels(n=6). $p < 0.05$.

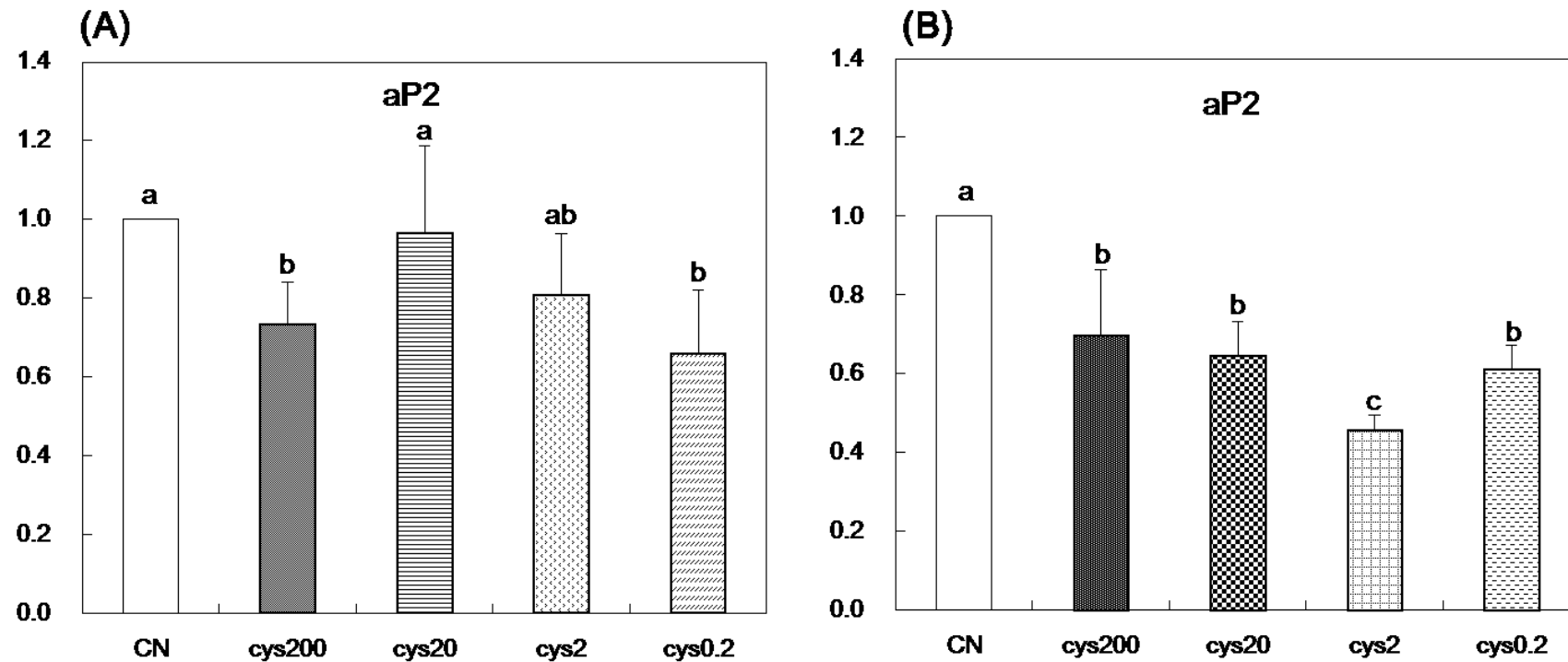


Fig.21 Effect of L-cysteine on mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μ M of L-cysteine. aP2 on day 8(A) and on day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined quantitative real time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels(n=6). $p < 0.05$.

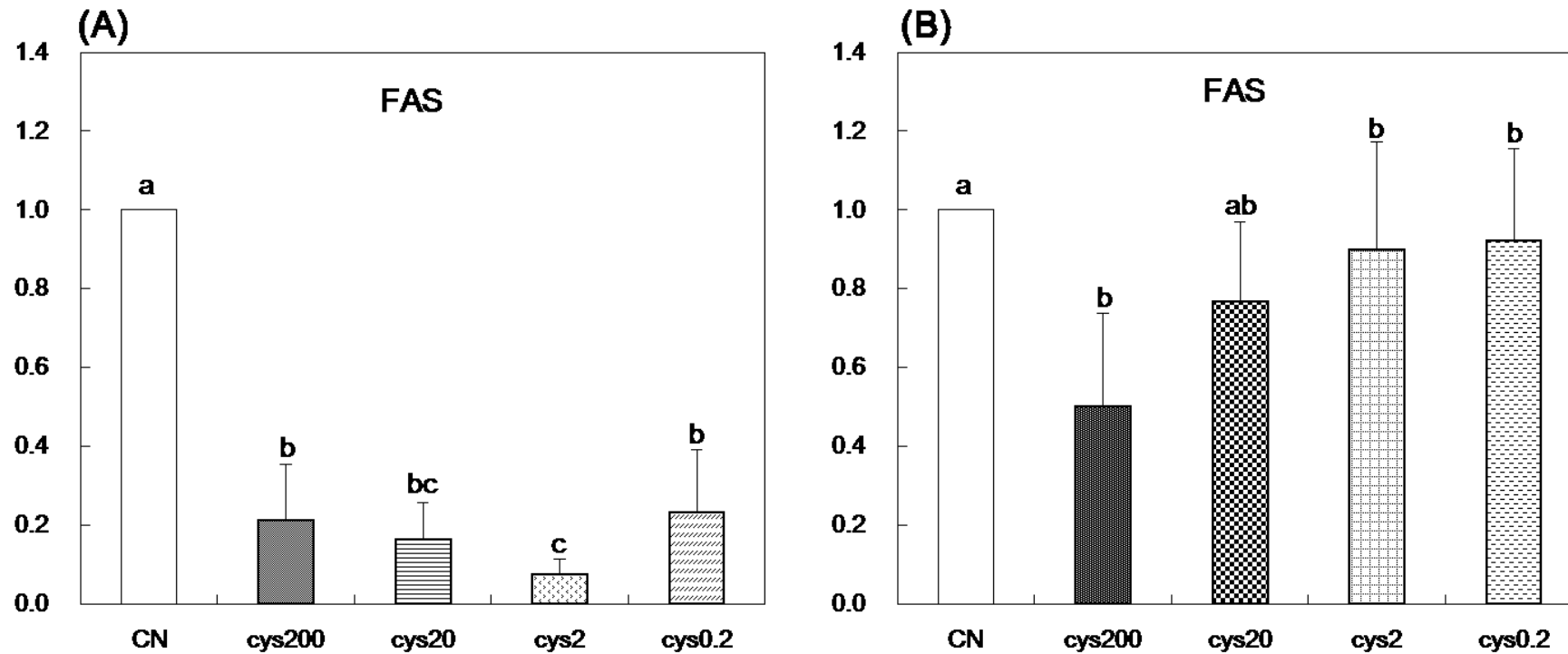


Fig.22 Effect of L-cysteine on mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μ M of L-cysteine. FAS on day 8(A) and on day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined quantitative real time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels(n=6). $p < 0.05$.

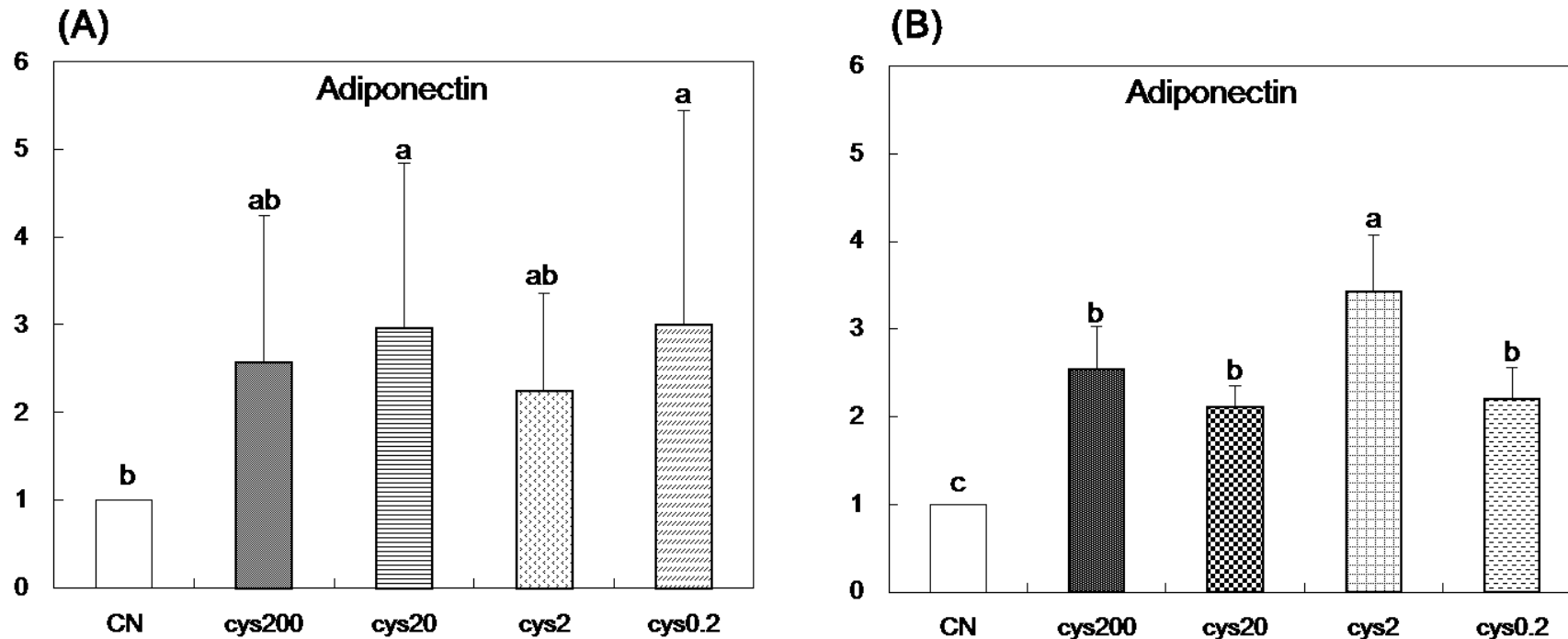


Fig.23 Effect of L-cysteine on mRNA expression level in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with 0.2-200 μ M of L-cysteine. Adiponectin on day 8(A) and on day 10(B) after inducing differentiation of the 3T3-L1 cells were determined quantitative real time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA levels(n=6). $p < 0.05$.

考察

今回の実験では異なる濃度の L-cysteine を投与した結果 3T3-L1 脂肪細胞で脂肪蓄積抑制効果について検討した。細胞生存率実験の結果、実験群間で有意な差は見られなかったことから異なる濃度の L-cysteine による細胞死滅はないことを確認した。L-cysteine の投与結果 day 8 と day10 どちらでも GPDH の抑制が見られ 3T3-L1 の脂肪細胞への分化時脂肪球を減少させトリグリセリド蓄積の抑制を示した。その効果は濃度が高い Cys200 群でもっとも効果的であった。GPDH は成熟脂肪細胞で活発に発現し、脂肪細胞で脂肪酸と中性脂質合成の重要な酵素であるため脂肪細胞の分化マーカーとして利用される⁹⁰⁾。L-cysteine は中性脂質の合成を妨害し、脂肪細胞内へ脂質蓄積を抑制させることを示した。L-cysteine のアセチル化形である NAC (n-acetyl cysteine) を 3T3-L1 細胞に細胞分化初期から投与した結果脂肪細胞内の脂質量の顕著な減少が見られた報告がある⁹¹⁾。しかし本実験では分化後期に L-cysteine を投与したことにも関わらず脂質蓄積の低下が見られ、脂肪細胞の脂質蓄積が進行した状態でも L-cysteine は細胞内脂質量を減少させる効果があると考えられる。

また、脂肪細胞から特異的に分泌されるアディポサイトカインの分泌・発現量の変動が見られた。前炎症性サイトカイン (PAI-1, IL-6, MCP-1) の検討結果、サイトカインの発現レベルが有意に減少し、特に day10 の時もっとも有意な効果が見られた。肥大化した脂肪組織は慢性的な炎症状態にあり、これがアディポサイトカインの異常を引き起こすことが知られており、肥満誘導代謝を促進させる^{92, 93)}。脂肪蓄積によるアディポサイトカインの発現・分泌異常の正常化は脂肪細胞の機能を維持し、メタボリックシンドロームを治療、予防する重要な標的の一つと考えられる。今回の実験で day8 と day10 両方とも IL-6 発現量で大きな効果が見られた。IL-6 は特に비대한脂肪細胞일수록で主に発現し、脂肪分解を誘発し、in vivo 実験でも肝臓内中性脂質の分泌を促進させる報告がある⁹⁴⁾。したがって、GPDH 活性減少とそれによる細胞内の脂肪蓄積の減少により脂肪細胞の肥大化の抑制は IL-6 の分泌減少と関連すると考えら

れる。また、肥大化した脂肪細胞ではマクロファージのマーカーである CD68 の発現が増強し、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生が増加していることが報告されている⁹⁴⁾。今回 L-cysteine 投与群の脂質蓄積減少および IL-6 の減少が見られたことから脂肪細胞の炎症を抑制させたと考えられる。もう一つの炎症性サイトカインである MCP-1 は Chemokine family の一つであり、脂肪組織で過剰発現される⁹⁵⁾。今回の実験結果、day 10 で L-cysteine 投与群で有意な減少が見られ、day8 では L-cysteine 投与群で約 10~20%の減少が見られた。Kanada ら⁹⁶⁾は MCP-1 が欠如されたラットの脂肪組織で炎症性マクロファージの減少が見られたと報告した。今回見られた IL-6 および MCP-1 発現の減少は L-cysteine による肥大化した脂肪細胞内で起こる炎症抑制の可能性を示唆した。MCP-1 は分化された脂肪細胞でインスリン抵抗性を促進させ肥満ラットでもっと発現の増加が見られる⁹⁵⁾。またインスリン抵抗性モデルラットでレジスチンのレベルが増加し、抗レジスチン抗体はラットとマウス脂肪細胞でインスリン感受性を向上させる⁹⁷⁾。今回の実験でレジスチンは day8 と day10 どちらも有意な減少が見られ、特に Cys200 群で最も減少が見られた。L-cysteine 投与で MCP-1 およびレジスチンの減少が見られ肥満で現れるインスリン抵抗性と 2 型糖尿病を予防できると考えられる。PAI-1 は day8 で有意差は見れなかったが day10 で有意な減少が見られた。PAI-1 は主に脂肪細胞で発現される⁹⁸⁾。Coller ら⁹⁹⁾によって PAI-1 は血管内皮細胞の培養上清中に見いだされたプラスミノゲン・アクチベーター (PA) の阻害因子 (PAI) で血液凝固作用を持つ。したがって高血圧の発症と PAI-1 の上昇の関係が報告されている¹⁰⁰⁾。ラットで高血圧を誘発する原因の一つとしてグルタチオンの欠乏による酸化ストレスが知られている¹⁰¹⁾。グルタチオンを回復させるためビタミン E を投与した結果酸化ストレスの減少および高血圧の低下が見られた報告がある¹⁰¹⁾。したがって L-cysteine によるグルタチオンの回復は抗酸化効果だけではなく血栓減少および高血圧の減少へ影響させると考えられ、これらは今回 in vitro 実験で見られた PAI-1 分泌の減少と関連する可能性があると考えられる。

PAI-1 はまたインスリン作用を損傷させるという報告があり⁸⁵⁾、L-cysteine 投与による PAI-1 の減少は高血圧およびインスリン抵抗性の予防効果がある可能性を考えられる。

抗肥満メカニズムは脂肪蓄積および脂肪酸合成を抑制させることで作用する。PPAR γ と C/ebp α は主に分化後期へ発現されお互い相互作用しながら脂肪細胞の分化を誘導する¹⁰²⁾。L-cysteine の投与は脂肪細胞の分化で主要調節因子である PPAR γ と C/ebp α の発現を抑制させた。3T3-L1 脂肪細胞の分化過程で PPAR γ と C/ebp α の増加とともにレジスチンの増加も見られるという報告^{103, 104)}があり、今回のレジスチンの結果と一致した。PPAR γ と C/ebp α は脂質代謝に関与する FAS、aP2 の遺伝子発現を調節する¹⁰⁵⁾。aP2 は脂肪細胞分化の後期マーカーとして使われインスリン感受性および免疫反応を調節することから動脈硬化および代謝症候群を防止させる¹⁰⁶⁾。FAS は脂肪酸代謝を調節する重要な役割をする。脂肪細胞分化の末期マーカーである FAS は PPAR γ および SREBP1 によって活性化させる¹⁰⁷⁾。FAS と aP2 両方とも L-cysteine 投与群で有意に減少し、特に FAS で濃度依存的な結果が見られた。L-cysteine の処理はまた HSL の有意な増加または増加傾向が見られた。HSL は脂肪細胞内に蓄積されているトリグリセリドを脂肪酸とグリセロールへ分解する脂肪分解作用する酵素である¹⁰⁶⁾。脂肪細胞分解で HSL 発現を確認することにより脂肪分解レベルが確認できる。一方、脂肪細胞で特異的に発現するアディポネクチンは脂肪細胞から分泌され血中存在し肥満およびインスリン抵抗性がある場合減少する^{108, 109)}。特にアディポネクチンは体内脂肪量と関連しており、脂肪量が増加するほどアディポネクチンの濃度が減少することが知られているがそのメカニズムについてはまだ明らかになっていない¹¹⁰⁾。今までの結果によると L-cysteine 投与により aP2、FAS を規制して脂肪酸合成および脂肪細胞分化を減少させ、その結果脂肪形成抑制および HSL による脂質蓄積抑制効果を考えられる。

本実験ではL-cysteineの投与結果3T3-L1前脂肪細胞から脂肪細胞への分化末期を担当するPPAR γ , C/EBP α 遺伝子を抑制し、それによる脂質合成および蓄積を調節する遺伝子の減少が見られた。また脂肪細胞内トリグリセリドを蓄積させるGPDHの活性も減少させた。したがって、L-cysteineの投与は細胞分化抑制および脂肪形成抑制による脂質蓄積抑制効果があることが見られた。また、肥大化した脂肪細胞からよく発現される炎症性アディポサイトカインの減少により肥満の状態で見られる炎症反応を抑制する可能性を示した。このような効果はCys200で最も効果的であった。これらの結果からL-cysteineは抗肥満効果をもたらすと考えられる。

〈第5章〉

総合考察

L-cysteine のチオール(SH)基を持つ構造的な特性により抗酸化効果があることがよく知られており、L-cysteine 1%および2%の投与はグルタチオン増加と抗酸化酵素の変化による抗酸化効果をもたらすと予想した。その結果を Fig4で示したように Cys1 および Cys2群でカタラーゼと GR の増加により確認され、ガラクトサミン投与条件である結果 (Fig8) でも同様の抗酸化酵素の増加が見られた。抗酸化酵素 GR は酸化型グルタチオン(GSSG)を再び還元させ、減少された還元型グルタチオン(GSH)を回復させる役割をする⁷⁸⁾。L-cysteine はグルタチオン前駆体として知られているだけではなく、グルタチオン還元酵素の増加の結果により L-cysteine 投与はグルタチオンを増加させることを予想した。しかし肝臓内グルタチオン濃度の変化は見られなかった。第2章で過酸化脂質の濃度変化も見られなかったことから酸化ストレスはなかったと考えられる。反面、抗酸化酵素の増加が見られたことからラットの体内で酸化ストレスが発生したが抗酸化酵素の増加および生成されたグルタチオンの消費により抑制され、これらのことによりグルタチオン濃度の差が見られなかったことでも考えられる⁶⁶⁾。これは第3章の肝毒性状態の肝臓内グルタチオン濃度についても同様に考えられる。もしくはガラクトサミン投与による損傷から、肝細胞から血液中へグルタチオン放出を促進させた可能性も考えられる⁴⁹⁾。これは血清グルタチオン濃度がガラクトサミン投与群より濃度依存的に L-cysteine 投与群で増加したことから証明できる。また肝臓および血清中の過酸化脂質レベルの減少も確認された。L-cysteine は LDL に結合して酸化させる Cu^{2+} を Cu^+ へ還元することにより LDL 酸化抑制と関連している⁴²⁾。

L-cysteine はグルタチオン合成と抗酸化酵素増加による抗酸化効果を持つことが示唆され、特に砒素モデルラットを用いた実験や paracetamol のような他の毒性物

質を使用した実験のように酸化ストレスが過剰に発生した条件ではより顕著な効果を示した^{32, 50}。ガラクトサミン投与による肝毒性は毒性マーカー酵素の変化を通じて確認できる。肝毒性による酸化ストレスは過酸化脂質の増加だけではなく肝毒性マーカー酵素の増加も見られる⁷²。Fig6、Fig7に示したガラクトサミン投与群で過剰に増加したAST、ALT およびLDH 肝毒性指標と比較すると2%L-cysteine 投与群で確実に減少が見られた。本研究で調査した肝毒性指標酵素は肝細胞で主に発見されるため血液へ放出された酵素濃度が正常レベルより高く存在する場合肝細胞の損傷を意味する^{70, 71}。また、ガラクトサミン投与は肝臓内過酸化脂質の濃度も急激に増加させる⁷³。このようなガラクトサミン群と比べた時、2% L-cysteine 投与群で見られた急激な減少および Fig10で見られた L-cysteine 投与による過酸化脂質の減少は肝細胞の損傷を予防する効果があることが示唆された。

Cysteine2分子がジスルフィド結合をした cystine は血清コレステロールへ影響を与え、特に血清中悪玉コレステロールである VLDL や LDL コレステロールレベルを低下させる効果が知られている³⁰。本実験で L-cysteine 投与は血中コレステロールレベルに差が見られなかったが、一方血中中性脂質レベルでは変化が見られ、1%L-cysteine および2%L-cysteine 投与群で濃度依存的に減少していた。したがって、脂肪組織重量の減少が期待され、Table2およびTable7で示したように L-cysteine 投与群の脂肪組織重量の減少効果を確認した。肝臓重量では変化が見られなかったことから L-cysteine は内臓脂肪組織へ優先的に影響すると考えられる。L-cysteine の細胞内で脂肪酸合成遺伝子および stearoyl-coenzymeA desaturase-1遺伝子の発現減少⁵⁵や L-cysteine のアセチル化である NAC でもラットの内臓脂肪重量の減少および脂肪細胞内脂肪蓄積減少などの効果⁸³を示すことが知られており、L-cysteine は体脂肪に影響を与える可能性を考えられる。しかし第2章で4週間の実験結果から L-cysteine は摂食量の減少も示した。第2章で見られた脂肪組織重量の減少は摂食量の減少による可能性も考えられる。このような摂食量の減少は L-cysteine の苦味か

らの影響⁵⁷⁾やアミノ酸およびタンパク質が持つ満腹感を引き起こす効果⁴⁰⁾などが原因として考えられる。タンパク質の満腹感は消化管ホルモンである GLP-1 による効果であり、GLP-1 はグルコース恒常性だけではなく食欲調節にも重要な役割を果たす^{58、60)}。Cysteine は糖尿病モデルラットで血清インスリン濃度を増加させ³⁷⁾、食後の血糖値を調節する⁴⁹⁾という報告がある。Fig2 に示したように L-cysteine による血中グルコース濃度の減少はこれらのホルモンと関連している可能性があると考えられ、ホルモンへの影響に関するさらなる研究が必要である。

第2章と第3章で見られた L-cysteine の血中 TG 減少および脂肪重量の減少により L-cysteine は内臓脂肪の蓄積へ影響を与え抗肥満効果を示すと考えられる。マウス 3T3-L1 脂肪細胞は脂肪細胞への分化過程のメカニズム研究およびインスリン信号研究、アディポサイトカイン分泌、脂肪合成および分解過程など分子生物学的に研究のため多く使用される細胞モデルである。本試験で異なる濃度の L-cysteine を分化させた 3T3-L1 脂肪細胞に投与した結果、グルコースを中性脂肪へ合成・蓄積させる GPDH の減少と TG 蓄積量の減少を確認した。脂肪細胞分化マーカーとして使われる GPDH の減少により細胞分化末期の転写因子である PPAR γ と C/ebp α の研究結果でも L-cysteine による減少を示した。抗肥満メカニズムは脂肪蓄積および脂肪酸合成を抑制させることにより作用する。PPAR γ と C/ebp α 転写因子は脂質代謝に関与する FAS、aP2 遺伝子発現を調節する¹⁰⁵⁾。本実験では特に FAS レベルの濃度依存的に顕著な減少を示し、L-cysteine の投与は脂肪酸合成および代謝調節へ影響を与え、それによる in vivo での内臓脂肪量へ影響を与えることを期待できる。内臓脂肪の減少のもう一つの影響は HSL による脂肪分解レベルによることを考えられる。細胞内中性脂肪をグリセロールと FFA へ分解する HSL¹⁰⁶⁾ は L-cysteine 投与による増加が見られ蓄積された脂肪の分解が行われたことが考えられる。これらの結果から L-cysteine の投与は中性脂肪の過量蓄積による脂肪細胞の肥大化を予防したと考えられる。

酸化ストレスおよび肥満のような状態では炎症性アディポサイトカインが脂肪細胞で分泌される。肥大化された脂肪細胞はマクロファージのマーカである CD668 の発現を増加させ、マクロファージが浸透し炎症性サイトカインの発現および炎症反応によって代謝症候群が誘導される⁹⁴⁾。代表的炎症性サイトカインである PAI-1、IL-6 および MCP-1 は L-cysteine の投与によりすべて発現量の減少が見られた。特に最も発現が抑制された IL-6 は脂肪細胞から分泌され肝臓で中性脂肪の合成及び分泌を促進させ、インスリン恒常性のマーカーとして知られている⁹⁴⁾。また他のインスリン抵抗性を促進させる MCP-1 とレジスチンも脂肪細胞とマクロファージの発現が向上される^{95、97)}。このような炎症性サイトカインの減少はインスリン抵抗性および脂肪蓄積量と負の相関関係を持つアディポネクチンの増加と関連しており¹⁰⁸⁾、今回の実験でアディポネクチン遺伝子の増加を観察した。L-cysteine は脂肪細胞の分化末期を抑制し中性脂肪の蓄積減少による脂肪細胞の肥大化を予防し、それによる炎症性サイトカインを減少させることをしめした。

本実験で得られた結果から L-cysteine は抗酸化酵素の増加および抗酸化物質であるグルタチオンの増加を誘導し酸化ストレスにより発生する過酸化脂質を減少させた。その結果 L-cysteine の抗酸化効果が明らかとなった。またガラクトサミンによる肝損傷を予防し肝機能を維持するため L-cysteine の肝保護効果についても明らかとなった。L-cysteine は *in vivo* で血清中性脂質および内蔵脂肪重量の減少効果を示した。この作用機序を検討するため *in vitro* 実験で 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪蓄積と関連遺伝子について検討した。L-cysteine の投与は TG 蓄積量と脂肪細胞への分化転写因子の発現量を減少させた。分化転写因子から調節される脂肪酸合成および脂質代謝関連遺伝子発現の減少も見られた。また肥大化した脂肪細胞で観察される炎症性サイトカイン分泌の減少がみられた。これらの結果から L-cysteine は脂肪細胞

への分化を抑制させ、脂肪酸合成および中性脂肪の蓄積を抑制し、炎症反応の抑制と肥満予防効果が明らかとなった。

要旨

本研究では異なる濃度の L-cysteine を用いて *in vivo* と *in vitro* の実験を行った。*In vivo* では L-cysteine の摂取による抗酸化効果を抗酸化酵素および抗酸化物質であるグルタチオン量を測定して研究を行った。また L-cysteine の摂取により脂肪組織重量と血中トリグリセリド濃度の減少が見られたことから肥満関連研究を *in vitro* で行った。3T3-L1 脂肪細胞を用いて L-cysteine 投与によるトリグリセリド蓄積、炎症性サイトカインレベルおよび脂肪細胞特異遺伝子の発現量を調べた。

L-cysteine は唯一チオール基を持つ含硫アミノ酸で酸化還元反応をすることから抗酸化能力を持つ。L-cysteine は不安定なためチオール基が酸化され L-cystine を形成する。L-cystine は体内で血清中のコレステロール濃度に影響を与える効果があり、悪玉コレステロールである超低密度アポリポタンパク質コレステロール (VLDL コレステロール)、低密度アポリポタンパク質コレステロール (LDL コレステロール) の濃度を低下させる作用を持つ。また L-cysteine はグルタチオンの前駆物質である。グルタチオンは酸化還元機能を持っていることから抗酸化剤として使われ、化学的に細胞毒性の評価指標として使用されるなど重要な働きがある。

L-cysteine を正常ラットへ食べさせた結果、抗酸化酵素であるカタラーゼと GR の増加が濃度依存的に見られ、抗酸化効果を持つ可能性を示した。また L-cystine の血中コレステロール濃度の減少効果から、その還元型である L-cysteine でもコレステロール減少効果を期待したが、血中コレステロール濃度では有意差が見られなかった。一方、L-cysteine は血中のトリグリセリド濃度を濃度依存的に顕著に減少させ、脂肪組織重量でも有意な減少が見られた。(第 1 章)

正常状態で効果検討した後、L-cysteine を急性肝毒性が起こった異常状態のラットへ食べさせた。その結果肝損傷指標 (AST、ALT、LDH) の有意な減少が見られ肝障害の抑制効果を示した。また第 1 章と同様に抗酸化酵素であるカタラーゼと GR の増加が見られ、さらに過酸化脂質の減少および血中グルタチオンの増加が見られた。

L-cysteine による抗酸化効果が見られ、肝損傷を予防し肝機能を維持するための L-cysteine の潜在的な肝保護効果を示した。また第 1 章と同様に血中のトリグリセリド濃度および脂肪組織重量の有意な減少が見られた。この結果から L-cysteine は脂肪蓄積へ影響すると考えられる。(第 2 章)

In vivo の実験で L-cysteine による脂質蓄積への影響が見られたことから更に検討するため 3T3-L1 脂肪細胞を用いて in vitro 実験を行った。異なる濃度の L-cysteine 投与は脂肪細胞内トリグリセリド量および GPDH 活性を減少させることが見られた。これは成熟脂肪細胞へ分化させる分化因子(PPAR γ , C / EBP α)の減少、脂質合成と関連する FAS の減少および脂質分解と関連する HSL の増加などにより説明できる。また肥大化された脂肪細胞からよく現れる炎症性サイトカインレベルの減少も見られた。(第 3 章)

以上のことから L-cysteine は抗酸化酵素、グルタチオンの増加による抗酸化効果、肝保護効果、および脂質蓄積抑制による抗肥満効果があることが明らかになった。

参考文献

- 1) Betteridge DJ, (2000), What is oxidative stress?. *Metabolism*, 49, 3-8.
- 2) Salmon AB, Richardson A, and Pérez VI, (2010), Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging. *Free. Radic. Biol. Med.*, 48, 642-655.
- 3) Yoshikawa T and Naito Y, (2002), What Is Oxidative Stress?. *Oxidative stress*, 45, 271-276.
- 4) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, and Harman D, (1987), Oxygen radicals and human disease, *Ann. Intern. Med.*, 107, 526-545.
- 5) Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, and Singal PK, (1995), Oxidative stress and heart failure, *Mol. Cell. Biochem.*, 147, 77-81.
- 6) Du Y, Miller CM, and Kern TS, (2003), Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 35, 1491-1499.
- 7) Thannickal VJ, Fanburg BL., (2000), Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 279, L1005-28.
- 8) Maddux BA, See W, Lawrence JC Jr, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL, (2001), Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, 50, 404-10.
- 9) Taniyama Y and Griendling KK, (2003), Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42, 1075-81.
- 10) Sikaris K, (2004), The clinical biochemistry of obesity. *Clin. Biochem. Rev.*, 25, 165-181.

- 11) Nagao K and Yanagita T, (2008), Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog. Lipid. Res.*, 47, 127-146.
- 12) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante A W Jr. (2003), Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 112, 1796-808.
- 13) Pihl E, Zilmer K, Kullisaar T, Kairane C, Magi A and Zilmer M, (2006), Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int. J. Obesity.*, 30, 141-146.
- 14) Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ and Burrell MA, (2001), The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 280, E827-47.
- 15) Sikaris K, (2004), The clinical biochemistry of obesity. *Clin. Biochem. Rev.*, 25, 165-181.
- 16) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M and Imamura M, (2000), High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49, 1939-1945.
- 17) Sies H, (1997), Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.*, 82, 291-295.
- 18) Youn SH, Park HW and Shinm CS, (2012), Enhanced dissolution of the substrate D,L-2-amino-2-thiazoline-4-carboxylic acid and enzymatic production of L-cysteine at high concentrations. *Life. Sci.*, 12, 1-41.
- 19) 農林水産省 (2011) 農林水産統計報告, www.e-stat.go.jp/SG1/estat/estattoportaldo)

- 20) Cherry JP, Young CT and Shewfelt AL, (1975), Characterization of protein isolates from keratinous material of poultry feathers. *J. Food. Sci.*, 40, 331-335.
- 21) Pravina Piste, (2013), CYSTEINE -MASTER ANTIOXIDANT. *IJPCBS*, 3, 143-149.
- 22) Patterson RA, Lamb DJ, and Leake DS., (2003), Mechanisms by which cysteine can inhibit or promote the oxidation of low density lipoprotein by copper. *Atherosclerosis*, 169, 87-94.
- 23) O'Donovan DJ, and Fernandes CJ., (2000), Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. *Mol. Genet. Metab.*, 71, 352-358.
- 24) Griffith OW, (1999), Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free. Radic. Biol. Med.*, 27, 922-935.
- 25) Meredith MJ and Reed DJ, (1983), Depletion in vivo of mitochondrial glutathione in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by Adriamycin and 1,2-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCUN), *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1383-1388.
- 26) Younes M and Siegers CP, (1981), Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo, *Chem. Biol. Interact.*, 34, 257-266.
- 27) Maellaro E, Casini AF, Del-Bello B, and Comporti M, (1990), Comporti Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depleting agents, *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1513-1521.
- 28) Meister A, (1991), Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal; applications in research and therapy, *Pharmacol. Ther.*, 51, 155-194.

- 29) Han D, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Tritschler HJ, and Packer L, (1997), Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am. J. Physiol.*, 273, R1771-8.
- 30) Weisse K, Brandsch C, Hirche F, Eder K, and Stangl GI, (2010), Lupin protein isolate and cysteine-supplemented casein reduce calcification of atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice, *Br. J. Nutr.*, 103, 180-188.
- 31) Martins EA, Chubatsu LS, and Meneghini R, (1991), Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress, *Mutat. Res.*, 250, 95-101.
- 32) Burgunder JM, Varriale A, and Lauterburg BH, (1989), Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 36, 127-131.
- 33) Hagen TM, Wierzbicka GT, Sillau AH, Bowman BB, and Jones DP, (1990), Bioavailability of dietary glutathione: effect on plasma concentration, *Am. J. Physiol.*, 259, G524-529.
- 34) Witschi A, Reddy S, Stofer B, and Lauterburg BH, (1992), The systemic availability of oral glutathione, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 43, 667-669.
- 35) Lu SC, (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies, *FASEB J.*, 13, 1169-1183.
- 36) Meister A and Anderson ME, (1993), Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711-760.
- 37) Tappia PS, Xu YJ, Rodriguez-Leyva D, Aroutiounova N, and Dhalla NS, (2012), Acute cardioprotective effects of cysteine alone or in combination with taurine in diabetes, *Physiol. Res.*, 13, [Epub ahead of print].
- 38) Okawa H, Morita T, and Sugiyama K, (2007), Cysteine supplementation dec

- reases plasma homocysteine concentration in rats fed on a low-casein diet in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 91-97.
- 39) Kawakami Y, Ohuchi S, Morita T, and Sugiyama K, (2009), Hypohomocysteinemic effect of cysteine is associated with increased plasma cysteine concentration in rats fed diets low in protein and methionine levels, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 66-74.
- 40) Shackebaei D, King N, Shukla B, and Suleiman MS, (2005), Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine, *Mol. Cell. Biochem.*, 277, 27-31.
- 41) National Research Council (1996), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, <http://newton.nap.edu/html/labrats/>
- 42) Folch J, Lees M, and Sloane-Stanley JH, (1957), A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- 43) Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K, (1979), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.
- 44) Cohn VH and Lyle J, (1966), A fluorometric assay for glutathione, *Anal. Biochem.*, 14, 434-440.
- 45) Aebi H, (1974), "Methods of Enzymatic Analysis," Academic Press, New York, pp. 673-684.
- 46) Worthington DJ and Rosemeyer MA, (1974), Human Glutathione Reductase: Purification of the Crystalline Enzyme from Erythrocytes, *Eur. J. Biochem.*, 48, 167-177.
- 47) Catala A, *Int. J. Biochem.*, (2006), An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence

- assay, *Cell Biol.*, 38, 1482-1495.
- 47) Lawrence RA and Burk RF, (1977), Glutathione peroxidase activity in seleniumdeficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 952-958.
- 48) Atmaca G, (2004), Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids, *Yonsei Med. J.*, 31, 776-788.
- 49) Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathé V, Mikogami T, Tomé D, and Huneau JF, (2007), Diets that promote oxidative stress favor impairment in glucose homeostasis, *Free Radic. Biol. Med.*, 42, 1089-1097.
- 50) Nandi D, Patra RC, and Swarup D, (2005), Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats, *Toxicology*, 211, 26-35.
- 51) Dilger RN and Baker DH, (2008), Excess Dietary L-Cysteine Causes Lethal Metabolic Acidosis in Chicks, *J. Nutr.*, 138, 1628-1633.
- 52) Dilger RN, Toue S, Kimura T, Sakai R, and Baker DH, (2007), Excess dietary L-cysteine, but not L-cystine, is lethal for chicks but not for rats or pigs, *J. Nutr.*, 137, 331-338.
- 53) Lin CC and Yin MC, (2008), Effect of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet, *Br. J. Nutr.*, 99, 37-43.
- 54) Yang BS, Wan Q, and kato N, (1994), Differential effects of dietary excessive cystine and cysteine on plasma ceruloplasmin and cholesterol in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1177-1178.
- 55) Bettzieche A, Brandsch C, Hirche F, Eder K, and Stangl GI, (2008), L-cysteine down-regulates SREBP-1c-regulated lipogenic enzymes expression via

- glutathione in HepG2 cells, *Ann. Nutr. Metab.*, 52, 196-203.
- 56) Elshorbagy AK, Valdivia Garcia M, Mattocks DA, Plummer JD, Smith AD, Drevon CA, Refsum H, and Perrone CE, (2011), Cysteine supplementation reverses methionine restriction effects on rat adiposity: significance of stearyl-coenzyme A desaturase, *J. Lipid Res.*, 52, 104-112.
- 57) Kawai M, Sekine-Hayakawa Y, Okiyama A, and Ninomiya Y, (2012), Gustatory sensation of L- and D- amino acids in humans, *Amino Acids*, 43, 2349-2358.
- 58) Fromentin G, Darcel N, Chaumontet C, Marsset-Baglieri A, Nadkarni N, and Tomé D, (2012), Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins, *Nutr. Res. Rev.*, 25, 29-39.
- 59) Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, and Göke B, (1992), Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man, *Eur. J. Clin. Invest.*, 22, 283-291.
- 60) Meloni AR, DeYoung MB, Lowe C, and Parkes DG, (2013), GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β -cells: mechanism and glucose dependence, *Diabetes Obes. Metab.*, 15, 15-27.
- 61) Zhu J, Li S, Marshall ZM, and Whorton AR, (2008), A cystine-cysteine shuttle mediated by xCT facilitates cellular responses to S-nitrosoalbumin, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 294, 1012-1020.
- 62) Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakishima K, Shiozaki H and Sakamoto Y, (1977), Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr*, 107, 51-60.
- 63) Kim YG, Kim SK, Kwon JW, Park OJ, Kim SG, Kim YC, and Lee MG., (2003), Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme

- activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sciences*, 72, 1171-1181.
- 64) Lee S, Han KH, Nakamura Y, Kawakami S, Shimada K, Hayakawa T, Onoue H, and Fukushima M., (2013), Dietary L-cysteine improves the antioxidative potential and lipid metabolism in rats fed a normal diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 1430-1434.
- 65) Keppler D, Lesch R, Reutter W, and Decker K, (1968), Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.*, 9, 279-290.
- 66) Ohta Y, Matsura T, Kitagawa A, Tokunaga K, and Yamada K, (2007), Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species contribute to the development of D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Free. Radical. Research.*, 41, 135-144.
- 67) Hu HL, and Chen RD, (1992), Changes in free radicals, trace elements, and neurophysiological function in rats with liver damage induced by D-galactosamine. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 34, 19-25.
- 68) Kim SH, Heo JH, Kim YS, Kang SS, Choi JS, and Lee SM, (2009), Protective effect of daidzin against D-galactosamine and lipopolysaccharide induced hepatic failure in mice. *Phytother. Res.*, 23, 701-706.
- 69) Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, and Kojo S, (2003), Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 101-107.
- 70) Jensen JE, and Freese D, (2009), Liver Function Tests. Colorado Center for Digestive Disorders 205s. Suite A Longmont Co. 80501. Pp. 151-163
- 71) Tietz NW., (1991), Fundamental of Clinical Chemistry (3rd Edition). W.B. Sanders Co., Philadelphia, pp.391-395.

- 72) Seçkin S, Alsancak S, Basaran Küçükergin C, and Aydın M, (2008), Effect of D-galactosamine on oxidative stress and apoptosis in the liver of rats. *J. Fac. Med.*, 71, 29-32.
- 73) Mourella M, and Meza MA., (1989), Colchicine prevents D-galactosamine-induced hepatitis. *J. Hepatol.*, 8, 165-172.
- 74) Lee SK, Kang MJ, Jeon T Won, and Jeong TC, (2010), Effects of N-acetyl cysteine and silymarin on 1-bromopropane-induced hepatotoxicity in mice. *Yakhak Hoeji*, 54, 97~101.
- 75) Forsberg L, de Faire U, and Morgenstern R, (1999), Low yield of polymorphisms from EST blast searching: analysis of genes related to oxidative stress and verification of the P197L polymorphism in GPX1. *Hum. Mutat.*, 13, 294-300.
- 76) Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, Oberley LW, Yan T, Zhong W, Jiang X, and Oberley TD, (2000), Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*, 89, 123-134.
- 77) Vimal V, and Devaki T, (2004), Hepatoprotective effect of allicin on tissue defense system in galactosamine/endotoxin challenged rats. *J. Ethnopharmacol.*, 90, 151-154.
- 78) Huang YS, and Sultatos LG, (1993), Glutathione-dependent biotransformation of methyl parathion by mouse in vitro. *Toxicol. Lett.*, 68, 275-284.
- 79) Tsutsu S, Hirasawa K, Takeda M, Itagaki S, Kawamura S, and Maeda K, (1997), Apoptosis of murine hepatocytes induced by high doses of galactosamine. *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 785-790.
- 80) McMillan JM, and Jollow DJ., (1992), Galactosamine hepatotoxicity: effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte

- cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 234-240.
- 81) Coen M, Want EJ, Clayton TA, Rhode CM, Hong YS, Keun HC, Cantor GH, Metz AL, Robertson DG, Reily MD, Holmes E, Lindon JC, and Nicholson JK, (2009), Mechanistic aspects and novel biomarkers of responder and non-responder phenotypes in galactosamine-induced hepatitis. *J. Proteome. Res.*, 8, 5175-5187.
- 82) Kawasaki M, Miura Y, Funabiki R, and Yagasaki K, (2010), Comparison of the effects on lipid metabolism of dietary methionine and cystine between hepatoma-bearing and normal rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 158-167.
- 83) Kim JR, Ryu HH, Chung HJ, Lee JH, Kim SW, Kwun WH, Baek SH, and Kim JH., (2006), Association of anti-obesity activity of N-acetylcysteine with metallothionein-II down-regulation. *Exp. Mol. Med.*, 38, 162-172.
- 84) Trayhurn P and Wood IS, (2004), Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.*, 92, 347-355.
- 85) Rasouli N and Kern PA, (2008), Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, s64-73.
- 86) Frost SC and Lane MD, (1985), Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 260, 2646-2652.
- 87) Cao Z, Umek RM and McKnight SL, (1991), Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes. Dev.*, 5, 1538-52.
- 88) Farmer SR, (2006), Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell . Metab.*, 4, 263-73.
- 89) Mac Dougald O. and Lane MD., (1995), Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Ann. Rev. Biochem.*, 64, 345-

373.

- 90) Sottile V and Seuwen K., (2001), A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal. Biochem.*, 293, 124-128.
- 91) Pablo Calzadilla, Daiana Sapochnik, Soledad Cosentino, Virginia Diz, Lelia Dicelio, Juan Carlos Calvo and Liliana N. Guerra, (2011), N-Acetylcysteine Reduces Markers of Differentiation in 3T3-L1 Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 6936-6951.
- 92) 下村 伊一郎、船橋 徹、松澤 佑次, (2002), 代謝異常症候群における脂肪組織の意義: アディポサイトカイン概念の実証 . 蛋白質・核酸・酵素, 47, 1896-1903
- 93) Ouchi N, Ohashi K, Shibata R and Murohara T., Adipocytokines and obesity-linked disorders. (2012), *Nagoya. J. Med. Sci.*, 74, 19-30.
- 94) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante AW, (2003), Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 112, 1796-1807.
- 95) Sartipy P and Loskutoff DJ, (2003), Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 7265-7270.
- 96) Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K and Kasuga M, (2006), MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.*, 116, 1494-1505.
- 97) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA, (2001), The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409, 307-312.
- 98) Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der Planken M, Ruige JB and Van

- Gaal LF, (2006), Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int. J. Obes.*, 30, 1308-1314.
- 99) Collier B, Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J., (1988), Type 1 plasminogen activator inhibitor, Progress in hemostasis and thrombosis, ed Collier B. (WB Saunders, Philadelphia), 87-115.
- 100) Thomas J. Wang, Philimon Gona, Martin G. Larson, Daniel Levy, Emelia J. Benjamin, Geoffrey H. Tofler, Paul F. Jacques, James B. Meigs, Nader Rifai, Jacob Selhub, Sander J. Robins, Christopher Newton-Cheh, Ramachandran S. Vasan, (2007), Multiple Biomarkers and the Risk of Incident Hypertension. *Hypertension.*, 49, 432-438.
- 101) Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F and Rad B., (2000), Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension.*, 36, 142-146.
- 102) Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ and Spiegelman BM. (1999), Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.*, 3, 151-158.
- 103) Stepan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD and Lazar MA, (2001) A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 502-506.
- 104) Gong H, Ni Y, Guo X, Fei L, Pan X, Guo M and Chen R., (2004), Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur. J. Endocrinol.*, 150, 885-892.
- 105) Szatmari I, Rajnavolgyi E and Nagy L., (2006), PPAR γ , a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann. N Y. Acad. Sci.*, 1088, 207-218.

- 106) Makowski L and Hotamisligil GS., (2004), Fatty acid binding proteins—the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J. Nutr.*, 134, 2464S– 2468S.
- 107) Kong CS, Kim JA, Ahn BN, Vo TS, Yoon NY and Kim SK., (2010), 1-(3',5'-dihydroxyphenoxy)-7-(2'',4'',6-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Mar. Biotechnol. (NY)*.,12, 299–307.
- 108) Ardévol A, Bladé C, Salvadó MJ and Arola L., (2000), Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24, 319–324.
- 109) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T and Matsuzawa Y, (2000), Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*, 20, 1595–1599.
- 110) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I and Matsuzawa Y, (2001), PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.*, 50, 2094–2099.