

有色モルモットを用いた紫外線誘発性色素沈着に対するL-システインの作用 — メタボロミクスによるアプローチ —

¹エスエス製薬(株) 成田研、²(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研 ○並木 千晶¹、猪田 利夫¹、真木 猛¹、山田 恭史²、川瀬 一朗¹、西村 忠洋¹

目的

L-システインを有色モルモットに経口投与し、紫外線誘発性色素沈着モデルに対する色素沈着抑制効果の検討の一環として、モルモット皮膚のメタボローム解析および皮膚組織標本の評価を実施した。

試験方法

使用動物

Kw1:A-1系有色モルモット(雌性、7週齢)、3匹×3群

色素沈着モデルの作成

有色モルモットの背部皮膚の左右どちらか1ヵ所に、SEランプ(波長250~350nm)を用いて最小紅斑量の紫外線を1日おきに3回照射して色素沈着を誘発

試験群

無処置群: 注射用水(剪毛及び剃毛のみ、紫外線非照射)

媒体対照群: 注射用水

L-システイン投与群: L-システイン(L-システイン 240mg/kg/day)

投与は初回紫外線照射日から上記用量を1日3回に分けて21日間反復経口投与

評価法

色彩色差計による皮膚の明度(ΔL値)の比較: 照射前、初回投与後14日および21日

皮膚組織切片

H-E染色、PCNA染色(Invitrogen PCNA STAINING KIT)

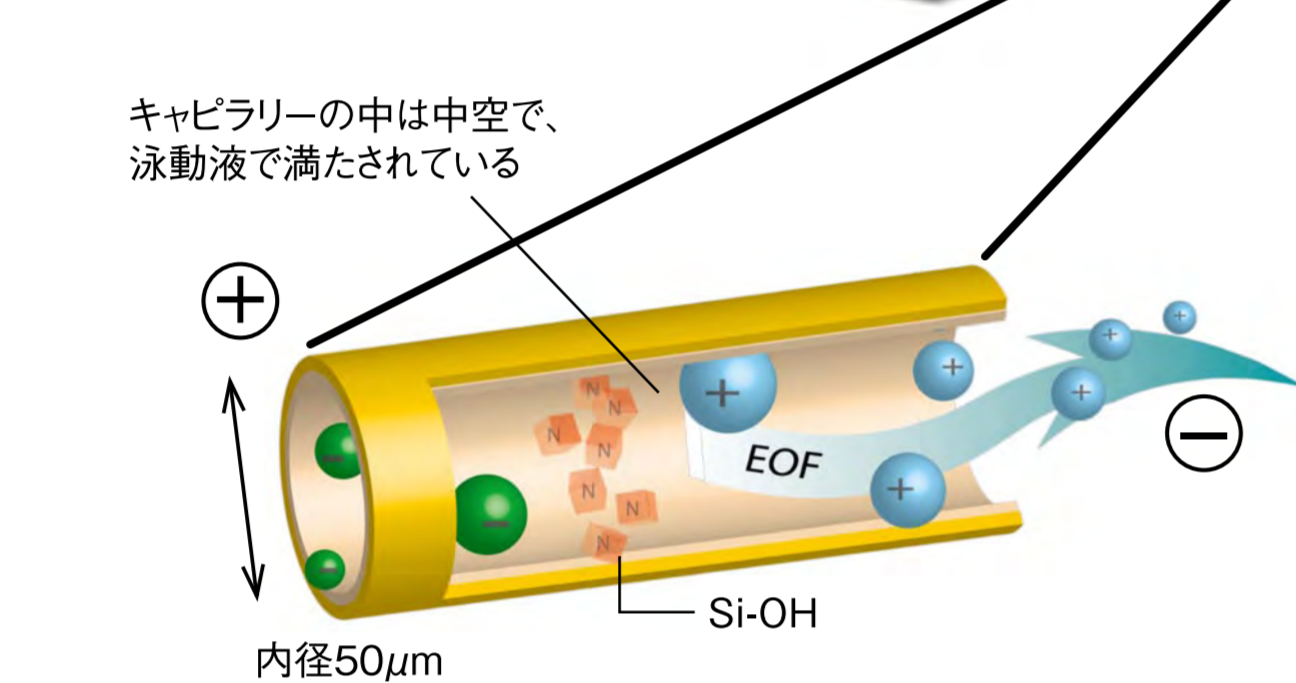
メタボローム解析(ヒューマンメタボローム・テクノロジー株式会社で実施)

モルモット皮膚をホモジナイズし、脱脂、限外濾過したものを測定試料とした。CE-TOFMSのカチオンモード、アニオンモードにより測定した結果、252(カチオン133、アニオン119)のピークが検出され、これらの物質を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に描出し、解析を行った。

CE-MSによる分析

キャピラリー電気泳動装置(CE)

キャピラリー電気泳動は物質の電荷、大きさなど物性の違いから生じる移動速度の差により分離する手法で、代謝物質に多くみられる異性体(本法では鏡像異性体を除く)も分離することができる。



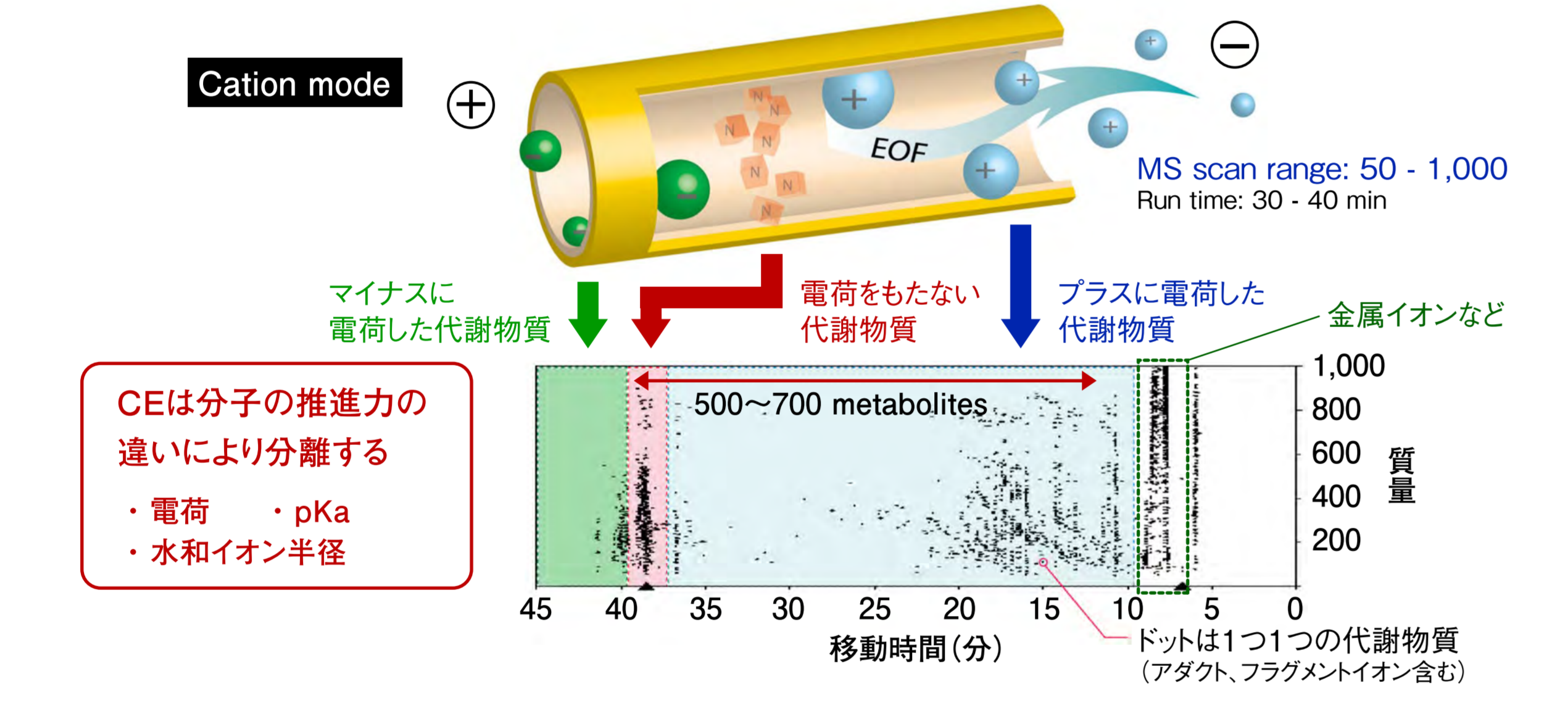
質量分析計(MS)

質量分析計は物質の質量を分析する装置で、CEを接続することによりキャピラリーの末端に到達した代謝物質を測定。HMTでは質量ごとの飛行時間の違いを利用し、小数点以下3桁の違いまで見分けられるTOF MSを使用している。

- ・キャピラリーに電気を通すと流れが発生する。
- ・電荷や分子の大きさによって検出時間に差が出る。
- ・質量分析計で質量により分離する。
- ・質量分析計に接続することで感度向上。

イオン性の代謝物の網羅測定を可能にした。

CE-MSによる代謝物質の分離



L-システイン投与による皮膚の明度(ΔL値)の比較

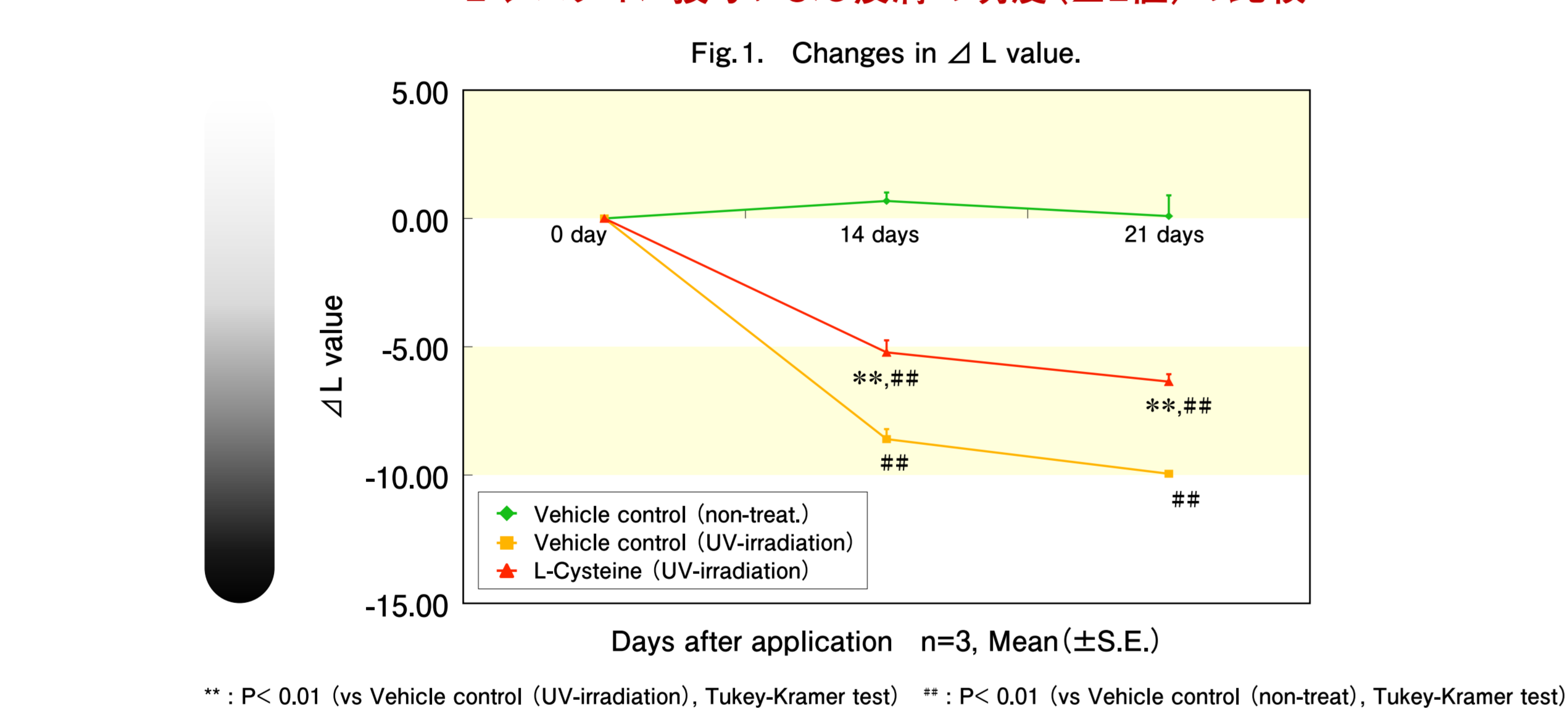
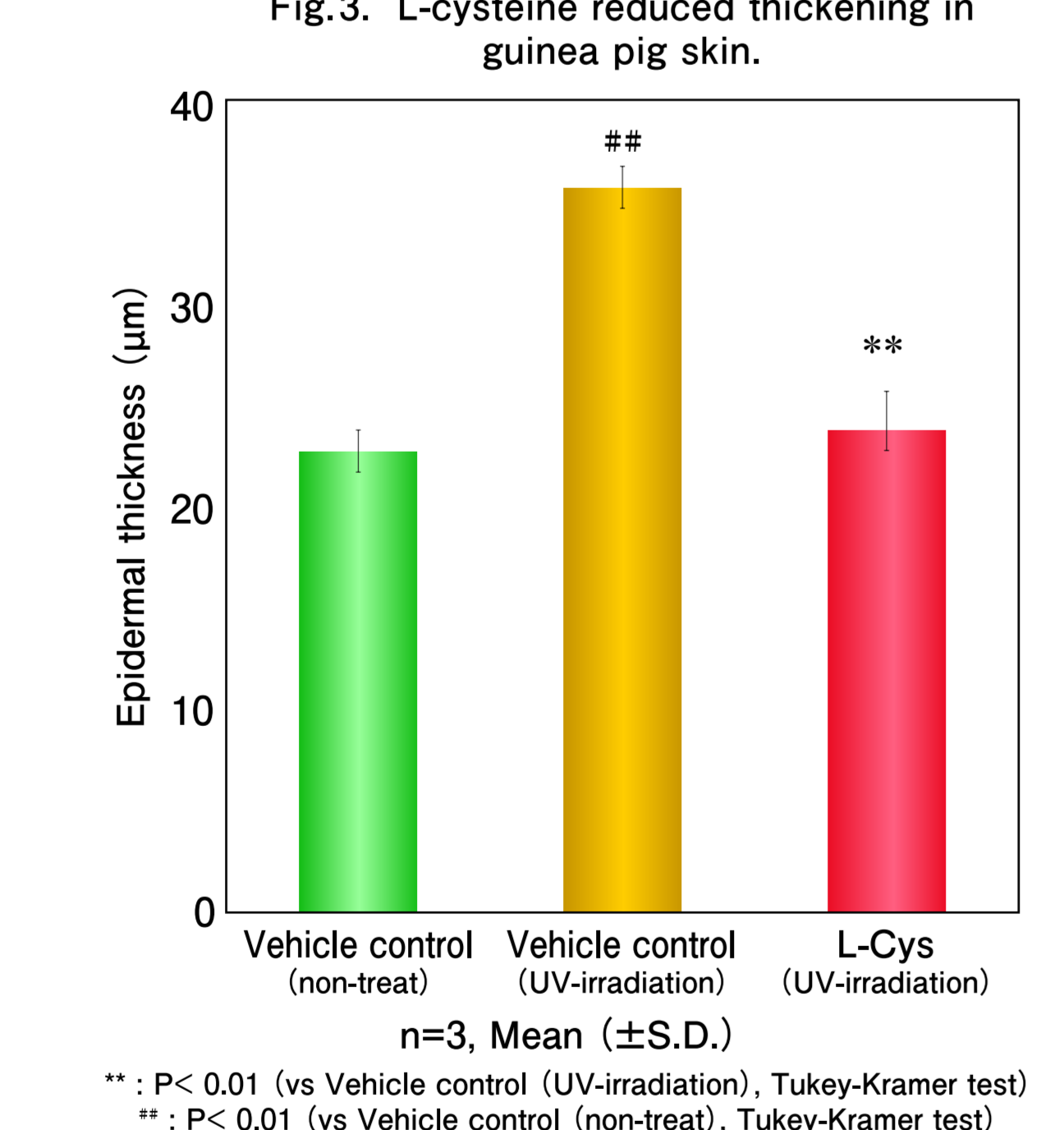


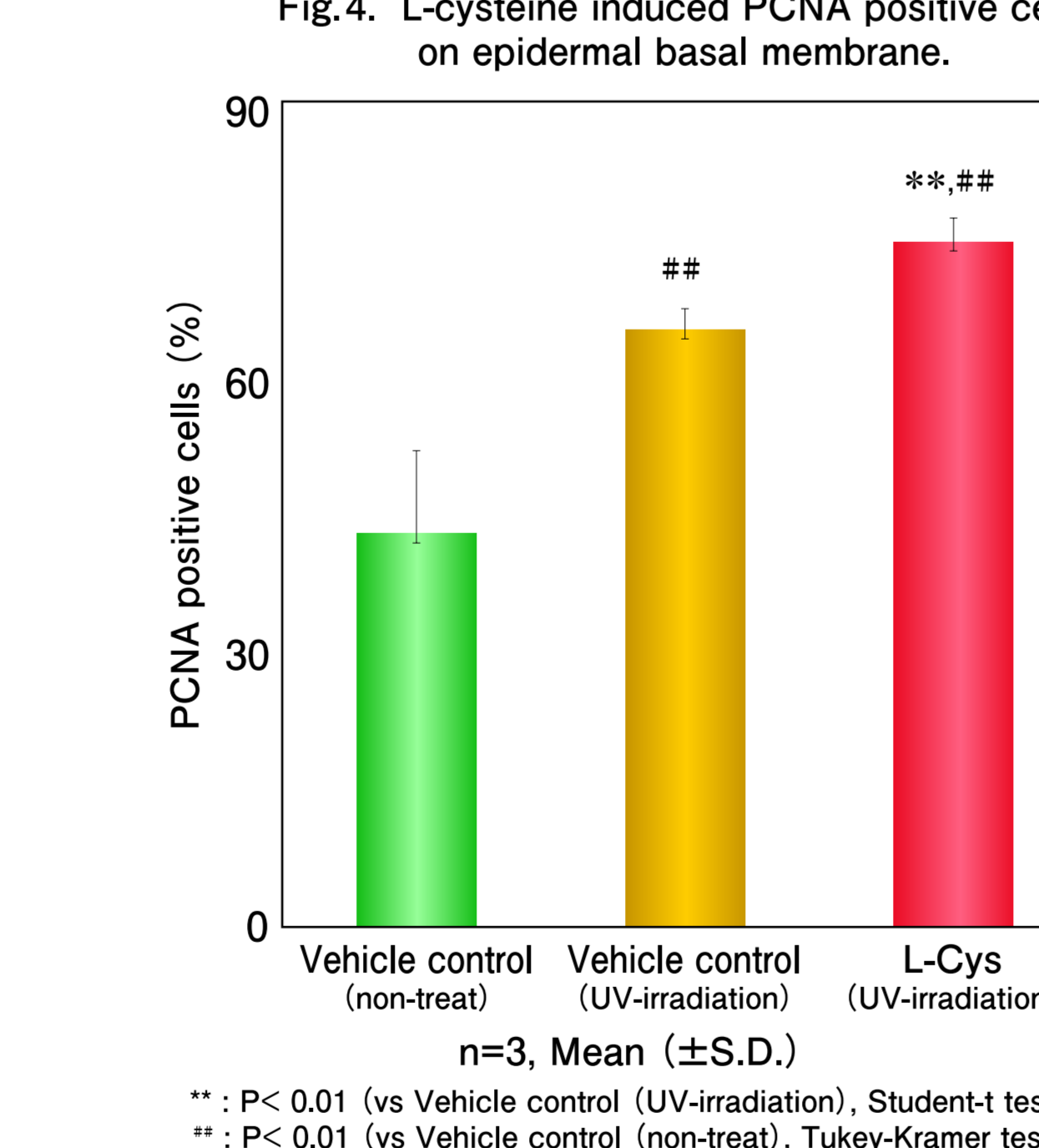
Fig. 1. Changes in ΔL value. ** : P<0.01 (vs Vehicle control (UV-irradiation), Tukey-Kramer test) *** : P<0.001 (vs Vehicle control (non-treat), Tukey-Kramer test)

Fig. 3. L-cysteine reduced thickening in guinea pig skin.

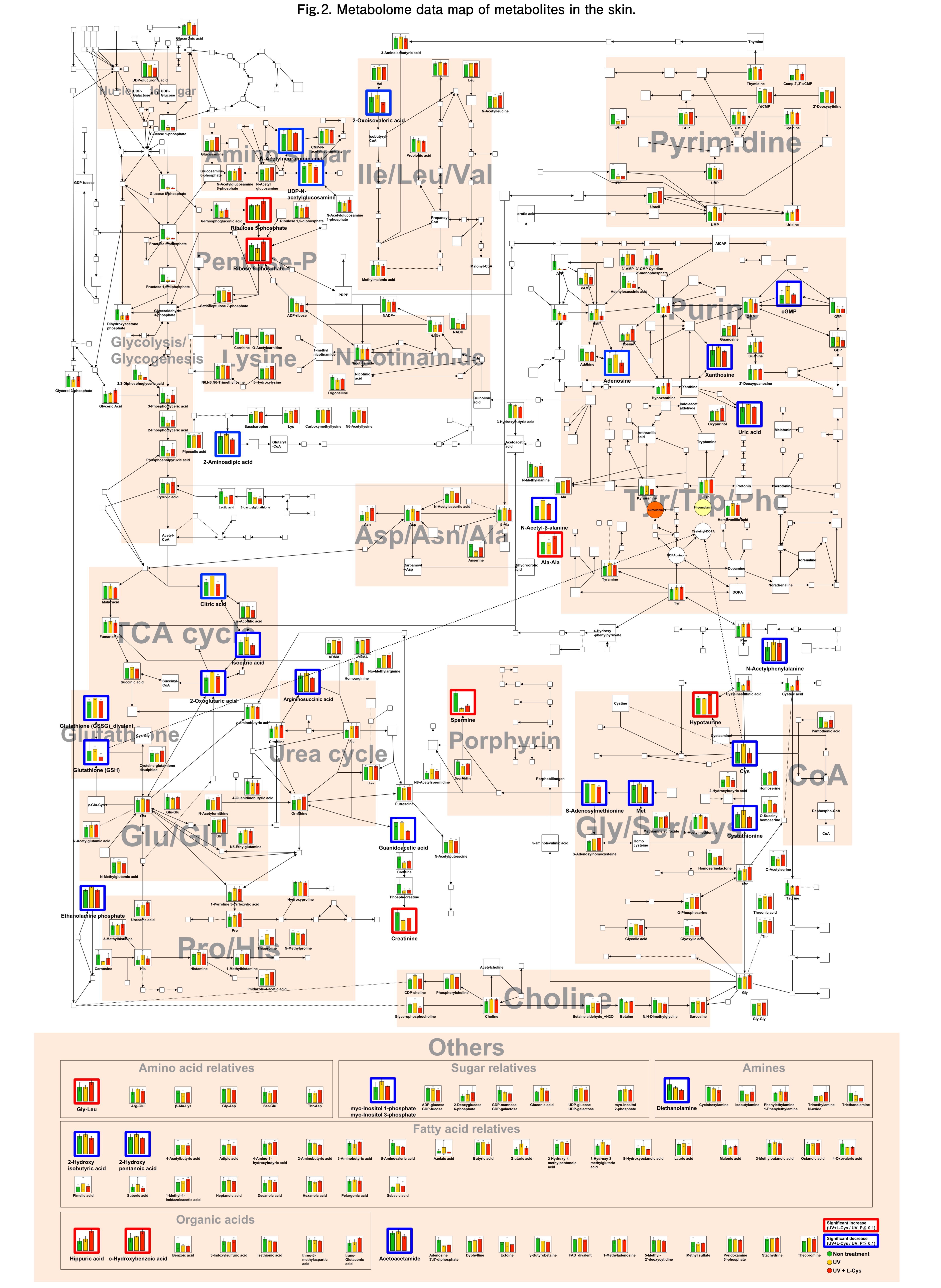


** : P<0.01 (vs Vehicle control (UV-irradiation), Tukey-Kramer test) *** : P<0.001 (vs Vehicle control (non-treat), Tukey-Kramer test)

Fig. 4. L-cysteine induced PCNA positive cells on epidermal basal membrane.



** : P<0.01 (vs Vehicle control (UV-irradiation), Student's t test) *** : P<0.001 (vs Vehicle control (non-treat), Tukey-Kramer test)



Histological changes by L-cysteine in the UV induced hyperpigmented skin of brownish guinea pigs(H-E staining and PCNA immuno-staining).

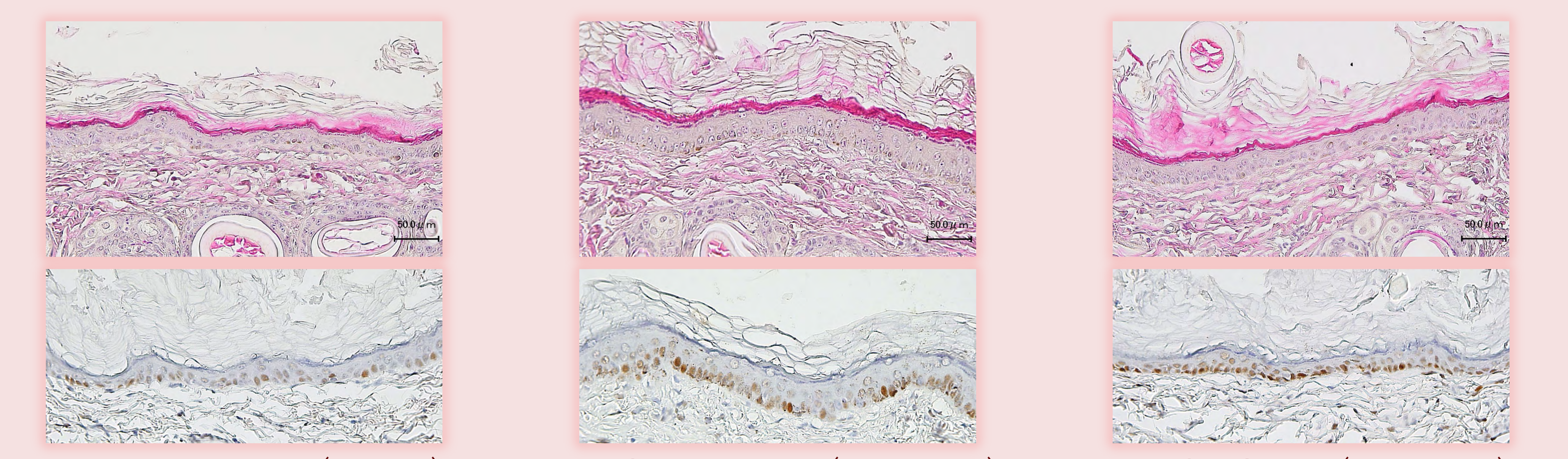


Photo 1. Vehicle control (non-treat.) Photo 2. Vehicle control (UV-irradiation) Photo 3. L-Cysteine (UV-irradiation)

総括

有色モルモットを用いた紫外線誘発性色素沈着モデルにおいて、L-システイン投与群は、媒体対照群と比較して有意な色素沈着抑制効果を示した。モルモット皮膚のメタボローム解析では、皮膚中のイオン性代謝物質のうち、フェオメラニン合成に関わるCys、GSH、GSSG、Met等は媒体対照群に比べて減少した。また、Cys、GSSG、Metのほか、cGMP、uric acid、xanthosine、citric acid等は無処置群(紫外線非照射)と同様の値であった。紫外線照射により、エネルギー代謝に重要である解糖系/糖新生やペントースリン酸経路の代謝物は無処置群と比べて低下したが、L-システイン投与により上昇しており、システインが抗酸化物質のグルタチオンの材料として、細胞内の酸化ストレス抑制系に寄与していると考えられた。皮膚の組織学的検査では、L-システイン投与により、紫外線照射部皮膚において見られる表皮の肥厚は抑制され、表皮基底細胞の増殖活性は、むしろ媒体対照群よりも増加していた。これらのことから、L-システインは、皮膚のターンオーバーを促進し、皮膚を正常な状態に近づけることで、色素の沈着を抑制する可能性が考えられた。