

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14419

研究課題名（和文）ビタミンC代謝物の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Clarifying the biological role of vitaminC metabolites

研究代表者

宮澤 大樹（Miyazawa, Taiki）

東北大学・未来科学技術共同研究センター・准教授

研究者番号：80814243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：微量であるため、定量の検討があまりされてこなかった細胞内のアスコルビン酸を定量することができる分析法を開発した。この分析法を用いることで、アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸の細胞への取り込まれ方の違いを確認した。更に、細胞内のアスコルビン酸の蓄積の経時的な変化が細胞種ごとの細胞死の違いと関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPLC-MS/MSを分析機器として用い、細胞内のアスコルビン酸の濃度を定量可能な分析法を確立した。アスコルビン酸の生理機能は細胞の種類によって異なるはずであり、近年のメタボロミクスや食品学、医薬研究において関心が高まっている。本法により、細胞内のアスコルビン酸の未知なる機能の定量的解明が促進されることが期待される。また、本研究では細胞の細胞死と細胞内の経時的なアスコルビン酸の蓄積に関係があることを見出され、ビタミンCの新たな機能の発見へと繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：Analytical method was developed to quantify intracellular ascorbic acid, which has not been studied for quantification due to its trace amount. By using this analytical method, different cellular uptake of ascorbic acid and dehydroascorbic acid was confirmed. Furthermore, changes over time in the accumulation of ascorbic acid in cells were found to be involved in the different cell deaths of different cell types.

研究分野：農芸化学

キーワード：アスコルビン酸 ビタミン 細胞 分析化学 質量分析 デヒドロアスコルビン酸 がん細胞 抗酸化物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

日本人の老年人口(65歳以上)は、平成28年度の総務省の調査によると、総人口の27.3%という世界で最も高い割合である(総務省統計局, 総務省研究報告 統計トピックス No.97, 平成28年)。このような高齢社会において、罹患者の増加が続くがんや認知症の予防や治療に、ビタミンをはじめとする有益な生理活性を持つ栄養成分を利用することへの関心が、今なお高まってきている。ビタミンのなかでも、ビタミンCは生体内に最も高濃度で存在し、1933年にその化学構造が同定されて以来、長年にわたって研究対象とされてきた。ビタミンCの中で最も広く認知されている形態は、アスコルビン酸(図1A、ASC)であり、アミノ酸代謝の活性化、抗がん作用、コラーゲンの合成、細胞膜ビタミンEのリサイクル、シトクロムP450の活性化、脂肪燃焼の活性化といった生理作用を示すことが多数報告されている。一方で、ヒト血液中のビタミンCは、主にASCとデヒドロアスコルビン酸(図1B、DHA)が存在し、その比は生体内恒常性によって健常者では一定の比に保たれている。近年、このDHAが「単なる不活性なASCの酸化物」ではなく、「ASCが持たない有用な生理作用を持つ物質」である可能性が示唆され、にわかに注目を集めている。例えば、今まで認知されてきたビタミンCが発揮する抗がん作用の機構は、細胞外でASCがアスコルビン酸ラジカルに変換されることで生じる過酸化水素(H₂O₂)が、細胞に抗がん作用を与えているという説が有力だった(引用文献1)。一方、最近、YunらがKRASとBRAF変異性の大腸癌細胞において、DHAがグルコーストランスポーター(GLUT)特異的に細胞内に取り込まれ、通常の還元型のASCに還元される際に、細胞内還元酵素であるGlutathione(GSH)やニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)が細胞内で消費されて枯渇し、細胞内部での活性酸素種(ROS)が増加することで細胞死が導かれる(レドックスステータスの崩壊)ことを、Scienceに報告した(引用文献2)。このような機構が報告されて以来、In vitroやin vivoの研究において、酸素や過酸化水素の存在下では、アスコルビン酸の一部はデヒドロアスコルビン酸に変換され、常に一定の量が存在しているために、デヒドロアスコルビン酸の生理的意義の解明が世界中で始められている(引用文献3, 4)。

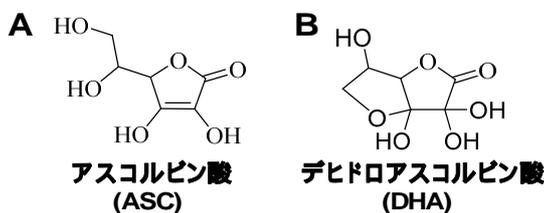


図1 A: アスコルビン酸(ASC)と、B: デヒドロアスコルビン酸(DHA)の水溶液中の化学構造

ASC)であり、アミノ酸代謝の活性化、抗がん作用、コラーゲンの合成、細胞膜ビタミンEのリサイクル、シトクロムP450の活性化、脂肪燃焼の活性化といった生理作用を示すことが多数報告されている。一方で、ヒト血液中のビタミンCは、主にASCとデヒドロアスコルビン酸(図1B、DHA)が存在し、その比は生体内恒常性によって健常者では一定の比に保たれている。近年、このDHAが「単なる不活性なASCの酸化物」ではなく、「ASCが持たない有用な生理作用を持つ物質」である可能性が示唆され、にわかに注目を集めている。例えば、今まで認知されてきたビタミンCが発揮する抗がん作用の機構は、細胞外でASCがアスコルビン酸ラジカルに変換されることで生じる過酸化水素(H₂O₂)が、細胞に抗がん作用を与えているという説が有力だった(引用文献1)。一方、最近、YunらがKRASとBRAF変異性の大腸癌細胞において、DHAがグルコーストランスポーター(GLUT)特異的に細胞内に取り込まれ、通常の還元型のASCに還元される際に、細胞内還元酵素であるGlutathione(GSH)やニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)が細胞内で消費されて枯渇し、細胞内部での活性酸素種(ROS)が増加することで細胞死が導かれる(レドックスステータスの崩壊)ことを、Scienceに報告した(引用文献2)。このような機構が報告されて以来、In vitroやin vivoの研究において、酸素や過酸化水素の存在下では、アスコルビン酸の一部はデヒドロアスコルビン酸に変換され、常に一定の量が存在しているために、デヒドロアスコルビン酸の生理的意義の解明が世界中で始められている(引用文献3, 4)。

2. 研究の目的

今まで報告されてきたASCやDHAの生理作用に関して、例えば抗がん作用に着目すると、In vitroやin vivoのいずれの研究においても効果があるという説や無いという説の諸説がある(引用文献5)。この原因として、ASCとDHAの安定性や生成する代謝物の違いが大きく影響していると推察された。なぜなら、DHAは一般にASCと比較して不安定であるといわれているにもかかわらず、その代謝について焦点を当てた研究は殆どされていないからである。このような現象に興味を抱き、その生理作用発現のメカニズムを代謝という視点から明らかにすることを考えた。そのためには、細胞レベルの濃度のASCを高選択的かつ高感度に定量できる方法の開発が必要であり、その手法の開発も行う。

3. 研究の方法

細胞内のASCを定量するための方法を開発しようとし、まずは分析条件の確立を目的とした。本研究ではHPLC-MS/MS(QTRAP® 6500+ mass spectrometer with an ESI source, Sciex)を分析装置として用いた。この装置を用い、ASCの標準品でのMRM条件、およびイオン源の最適化を行った。続いて、ASCの標準品を分離するためのHPLCのグラジエントや移動相の条件を最適化した。検出限界(limit of detection)および定量限界(limit of quantitation)は、それぞれS/N比を3および10で算出した。精度、正確さ、マトリックス効果の影響の評価は、Shuangらの報告(引用文献6)と同様に行った。すなわち、サンプルにASC標準品をスパイクした濃度(50 ng/mLと100 ng/mL, n=3)に対するASCの測定濃度を算出した。また、マトリックス効果(%)は以下の式で評価した: マトリックス効果(%) = {(細胞内の検量線の傾き / 溶媒内の検量線の傾き) - 1} × 100。

その後、確立したASCの分析法を用いて、細胞内のASCの定量を試みた。本研究では、ASC、DHAを細胞に添加してどの位のASCが細胞に取り込まれるのか、およびDHAが還元されて生成したASCが検出されるかどうかを評価するために、細胞実験で広く用いられているHepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞株)とTHP-1細胞(ヒト単球性白血病細胞株)を用いた。いずれの細胞も

10mL ディッシュで 1.0×10^5 cells/mL の密度で播種し、培養した。細胞への取り込み試験の評価の際には6ウェルプレートに 2.0×10^4 cells/well の密度で細胞を播種し、2日毎に培地交換をしながらコンフルエントになるまで培養した。HepG2 細胞および THP-1 細胞を、DMEM または RPMI1640 培地中で ASC (1mM) または DHA (1mM) と 0、15、60、120 分間インキュベートした後、各時点で抽出を行った。抽出液はマイクロチューブに採取し、ホモジナイザーで均質化した後、遠心分離 (16000 g、3分、4) を行い得られた上清は、HPLC-MS/MS 分析まで -80°C で保存した。また、各細胞 (HepG2 細胞および THP-1 細胞) を、培地中で、10、50、100、500、1000 μM の濃度範囲で DHA と 60 分間共培養し、各細胞型における細胞内の ASC 量に対する DHA の用量依存性の検討も行った。細胞内タンパク質濃度は、BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。HepG2 細胞および THP-1 細胞に対する DHA の細胞毒性はトリパンプルー染色で細胞生存率として算出し、評価した。細胞生存率で広く用いられている MTT アッセイでは、黄色テトラゾリウム塩と ASC が直接反応して紫色ホルマゼン結晶が生成してしまい実験結果に大きく影響してしまったため、今回は使用しなかった。

4. 研究成果

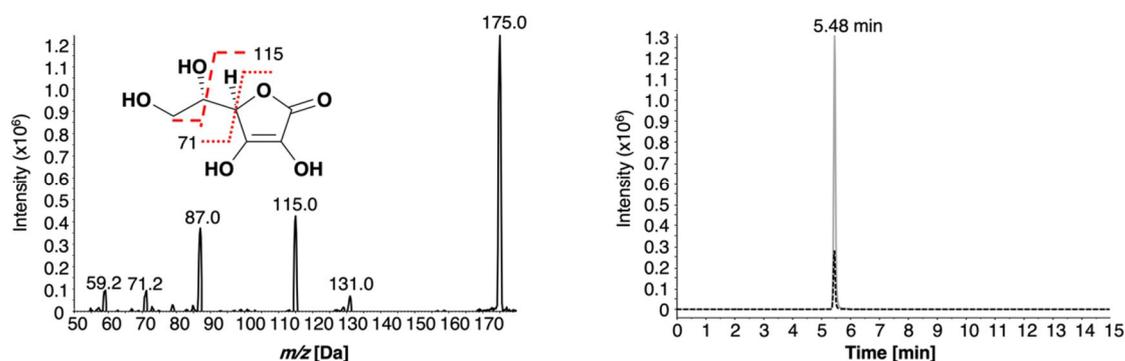


図 2 ASC の LC-MS/MS 分析におけるフルスキャンマススペクトルと抽出イオンクロマトグラム (m/z 175>71)。

調製した ASC 標準溶液を用いて、MSn を検出するためのパラメータを最適化した結果を図 2 (左) に示した。MRM 条件の検討において ASC は、 m/z 175 のプリカーサーイオン [M-H]⁻ から 2 つのフラグメントイオン (m/z 115 および 71) が生成することを確認した。そして、 m/z 175>71 の MRM を選択することにより、HPLC-MS/MS で ASC の定量的なピークが検出された (図 2 (左))。更に、検量線は 0.5 ng/mL-500 ng/mL の範囲で得られた ($r>0.997$)。検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) はそれぞれ 1 pg と 2.5 pg であり、これは我々の知る限り、これまでに報告された中で最も低い値である。

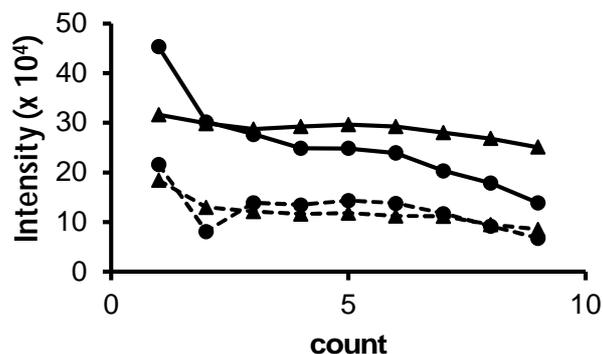


図 3 ガラス製バイアルとポリプロピレン製バイアルを用いた ASC の HPLC-MS/MS 分析の繰り返しの検出における、ASC ピークの強度の比較。ガラスバイアル：○、ポリプロピレンカップ：△、10 ng/mL の ASC 標準品：実線、5 ng/mL の ASC 標準品：点線。

HPLC-MS/MS 分析の際に、ASC の標準品をガラス製バイアルに入れて分析にかけたところ、ガラスの界面に ASC が吸着し、ピーク再現性がとれないという問題が生じた。この問題を解消するためにポリプロピレン製のバイアルに変更したところ、安定性が改善することを見出した (図 3)。

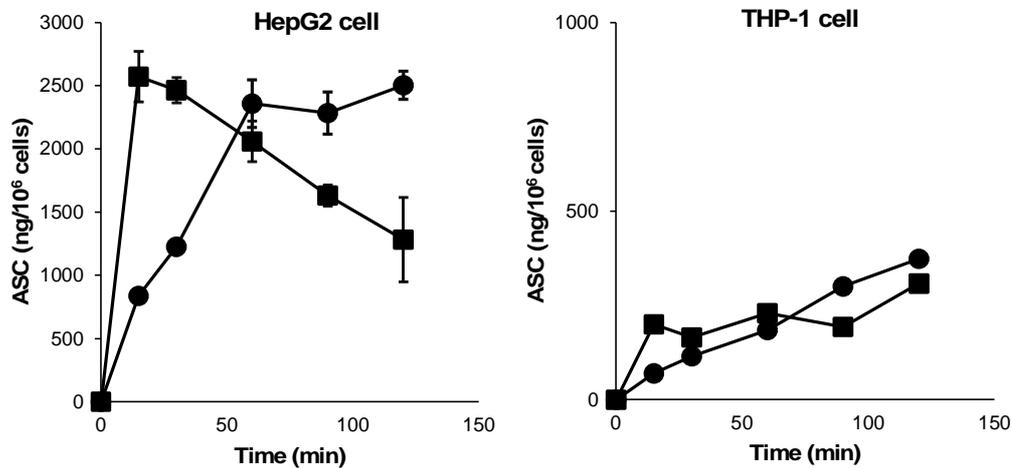


図4 HepG2細胞とTHP-1細胞に、それぞれASC(●)とDHA(■)を添加した時の時間経過に伴う細胞内ASC量の変化(n=3)。

ASCとDHAをHepG2細胞とTHP-1細胞にそれぞれ添加すると、HepG2細胞の細胞内ASC量はTHP-1細胞よりも明らかに多く、生体内のASCが肝臓に比較的高濃度で蓄積することを報告する既報と一致した(図4)(引用文献7)。ASCとDHAのいずれの添加でも、細胞内のASC濃度はインキュベーション時間とともに増加した。一方で、細胞への取り込みの速度は、DHA処理群では細胞内への取り込み率がより高い傾向があった。これは、DHAとASCをそれぞれ細胞内に取り込むトランスポーターの違いが原因であると考えられる。また、HepG2細胞では、細胞内のASC量がDHA添加群では15分間のインキュベーションで最大値に達した後に、急に減少したことは想定外の現象だった。

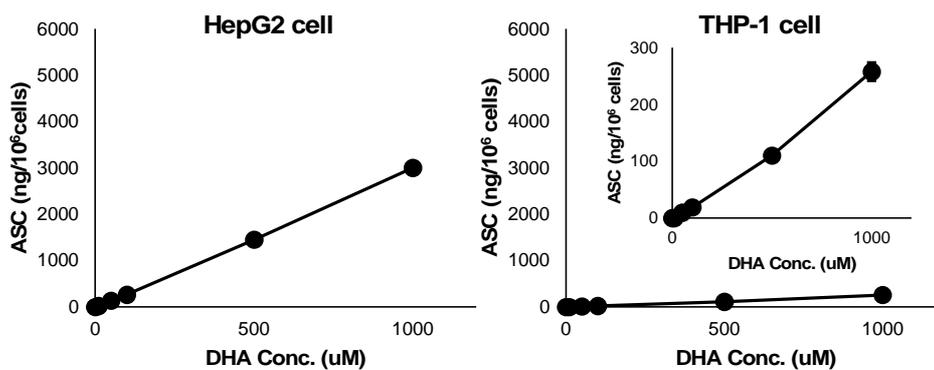


図5 HepG2細胞およびTHP-1細胞におけるDHAの用量依存性。様々なDHA濃度(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1mM)で1時間インキュベートした後の細胞内ASC量(ng/10⁶細胞)を示した(n=3)。

DHAの細胞内ASC量(10μM-1mM)に対する用量依存性を調べたところ(図5)HepG2細胞とTHP-1細胞の両方とも線形に相関し、その取り込み速度は著しく異なることがわかった。

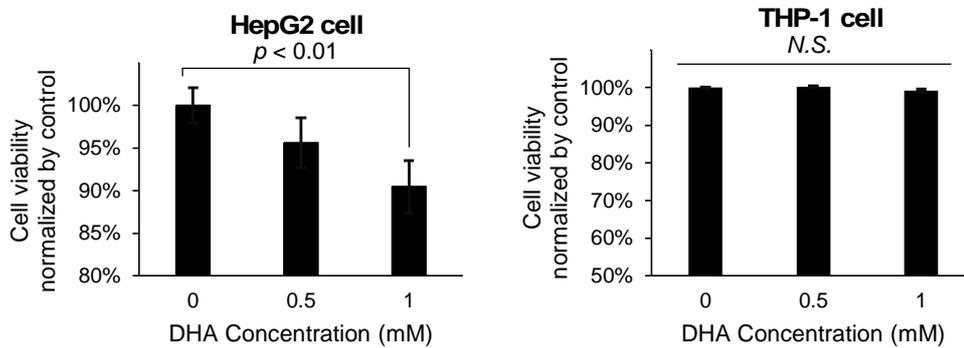


図 6 HepG2 細胞および THP-1 細胞における DHA 添加の 24 時間処理後の細胞生存率 (n=3)。

図 4 で確認した HepG2 細胞内 ASC 量の、DHA 添加群での 15 分間のインキュベーション以降の急な減少のメカニズムを明らかにするために、細胞生存率で評価した (図 6)。その結果、1 mM の DHA と 24 時間インキュベートすると、HepG2 細胞では細胞生存率が優位に低下したが、THP-1 細胞では確認されなかった。これは、ビタミン C による細胞死の過程で、ASC の貯蔵器官であるミトコンドリアが細胞外に放出され、その結果、細胞内 ASC が見かけ上減少したものなのかもしれない。以上の結果は、ビタミン C 由来のがん細胞の細胞死のメカニズムとして、細胞内グルタチオンの枯渇が関与する既報の仮説と一致した。

HPLC-MS/MS を分析機器として用い、細胞内の ASC 濃度を定量可能な分析法を確立した。ASC の生理機能は細胞の種類によって異なるはずであり、近年のメタボロミクスや食品学、医薬研究において関心が高まっている。本法により、細胞内の ASC の未知なる機能の定量的解明が促進されるものと期待される。

引用文献

- 1) Chen Q et.al., *PNAS*. 104:8749-8754 (2007)
- 2) Yun J et.al., *Science*. 350:1391-1396 (2015)
- 3) Kitt DQ, *Med Hypotheses*. 87:8-9. (2016)
- 4) Spector R, *Med Hypotheses*. 89:32-36 (2016)
- 5) Li F et.al., *Genes & Diseases*. 3:1-2 (2016)
- 6) Shuang Y et.al., *Food chem*. 345:128842 (2021)
- 7) Qin H. et.al., *Sci Rep*. 8:7928 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara	4. 巻 なし
2. 論文標題 Determination of Intra- and Extra-cellular Vitamin C Dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 G.I.T. Laboratory Journal	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taiki Miyazawa, Mayuko Itaya, Gregor C Burdeos, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 A Critical Review of the Use of Surfactant-Coated Nanoparticles in Nanomedicine and Food Nanotechnology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 3937 ~ 3999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJN.S298606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Chizumi Abe, Ohki Higuchi, Akira Matsumoto, Taiki Miyazawa	4. 巻 発刊前
2. 論文標題 Determination of intracellular ascorbic acid using tandem mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 発刊前
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1AN02160E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Ayano Mukaida, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Simplest and label-free determination of intra- and extra-cellular vitamin C dynamics by HPLC-DAD
3. 学会等名 4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayano Mukaida, Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara,
2. 発表標題 Elucidation of the anticancer mechanism of vitamin C
3. 学会等名 4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向田彩乃、宮澤大樹、松元亮、宮原裕二
2. 発表標題 抗がん作用に及ぼすビタミンC酸化体の存在意義の解明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤大樹
2. 発表標題 細胞内のビタミンCの酸化還元の関係性
3. 学会等名 第1回 東北大学&理化学研究所 連携シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤大樹
2. 発表標題 ビタミンCを用いた疾病の治療への取り組み
3. 学会等名 第25回次世代医工学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮澤大樹
2. 発表標題 細胞内外のビタミンCの代謝と生理作用の解明
3. 学会等名 第26回次世代医工学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Using nutrients and nanomaterials for therapeutic purpose
3. 学会等名 An International Conference on Colloid & Surface Science Celebrating the 70th Anniversary of the Divisional Meeting of Division of Colloid and Surface Chemistry (OKINAWA COLLOIDS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮澤大樹
2. 発表標題 疾病の治療に向けたビタミンCの活用の取り組み
3. 学会等名 Nanobio若手ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Determination of Vitamin C kinetics of cancer cells by HPLC-DAD
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------