

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500672

研究課題名（和文） 加齢・老化・酸化ストレス負荷による脳内ビタミンC動態と神経変性障害防御効果の証明

研究課題名（英文） Evaluation of vitamin C dynamics in the brain and its protection effect on neural cell system under the aging and oxidative stress load

研究代表者

武藤 徳男（MUTO NORIO）

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30112642

研究成果の概要（和文）：ヒトモデルとなるビタミンC生合成不能ラット（ODSラット）を用いて、脳内ビタミンC動態と神経細胞に対する作用を解析した。加齢・老化・酸化ストレス負荷を反映するビタミンC半欠乏群（潜在的ビタミンC欠乏群）では、血液や臓器中のビタミンC濃度は顕著に減少したが、脳内のビタミンC濃度は減少傾向のみであった。このことから脳内におけるビタミンC保持機構の存在が示唆された。またビタミンCは未分化神経細胞の神経分化を有意に促進し、また酸化障害に対しても防御効果を示した。以上のことから、ビタミンCは脳内に特異的に保持され、神経細胞の維持・再生に寄与する必須栄養成分であることが実証された。

研究成果の概要（英文）：By using ODS rats having no ability of vitamin C biosynthesis as a human model, the vitamin C dynamics in the brain and its role on the neural cells were evaluated. In the vitamin C-deficient group which mimics the physiological state of aging and oxidative stress, the levels of vitamin C in the serum and peripheral tissues significantly decreased, whereas that in the brain only tended to decrease. This indicates that vitamin C in the brain is retained by the specific mechanism distinct from that in other tissues. Vitamin C is proved to have both a promotion effect on the neural differentiation of PC12 cells and a protection effect on the oxidative stress-induced cell damage. Taken together, it is clearly demonstrated that vitamin C is an essential nutritional factor for regenerating and protecting the neural cells from the aging and oxidative stresses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：加齢・老化・ビタミンC・脳・神経細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進行とともに罹患者数が増加しているアルツハイマー型認知症を始めとする神経変性疾患は高齢者に多発する脳の神経細胞死や機能異常によるものであり、その介護は重大な社会的問題になっている。アルツハイマー型認知症の発症要因の科学的追究や基礎研究が進展するものの、その治療方法は我が国で開発されたコリンエステラーゼ阻害剤を主とする対処療法（進行遅延）のみで、根本的な治療方法（回復・改善効果）は未だ見出されていない。新たな有望な治療薬の開発はもとより、抗体療法やホルモン療法、再生医療や遺伝子治療など最新の生命科学に基づく治療方法の開発も国内外で活発に展開されているが、いずれも有効な治療法としては程遠い状況である。一方、申請者らの研究を始め、脳内に残存する未分化神経細胞（神経幹細胞を想定）の分化を促進する有用成分の探索を通して根本治療の可能性を探る研究（Kuroyanagiら、2008）も活発に行なわれている。著者は未分化神経細胞株PC12細胞を用いて、ビタミンCが神経分化（突起形成）を増強し、神経回路網様構造を誘導する作用を有することを見出した（Haramotoら、2008）。生体内の第一義的な抗酸化物質であるビタミンCが神経細胞の維持・再生に関与するという報告は大きなインパクトを与えた。最近では、加齢・老化・酸化ストレスに伴うビタミンC濃度の低下が潜在的なビタミンC欠乏状態を呈していると指摘され、その状態におけるビタミンCの脳内挙動や神経維持・再生系へのかかわりは、神経変性疾患に対する新たな治療または予防の可能性を開くものと期待される。ビタミンCの生合成能を欠くヒトの脳内における生理的役割については現在においても殆ど未解明である。健康な加齢・老化を迎え、かつ送るためのビタミンCの脳神経系および免疫系に及ぼす作用の解明は世界の研究者に先駆けて取り組む価値ある研究領域となる。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に以下の点を明らかにする。

- (1) ビタミンCの脳における特異的局在について解明する。ビタミンC生合成能を有するWistar系ラットや合成不能なOsteogenic Disorder Shionogi (ODS) ラット（ヒト型モデルとして使用）を用いて、ビタミンCの体内動態（中枢や末梢臓器）

の詳細解明と加齢・老化時のモデルとしての潜在的ビタミンC欠乏時の脳内動態ならびに脳における特異的保持機構の存在の可能性に関する解明を行う。

- (2) ビタミンCの神経細胞保護作用や突起伸展促進作用、さらに幹細胞の分化誘導・再生作用を分子レベルで解析し、神経回路網の構築や再生への働きを解明する。未分化神経細胞を用いて、酸化障害に対する防御効果や神経突起の伸展作用を分子レベル（タンパク分子誘導やタンパクリン酸化、等）で解析する。
- (3) ラジカル・活性酸素種や炎症の関与する脳・神経疾患に対するビタミンCの有効性を評価し、アンチエイジングファクターとしての有用性を解明する。酸化障害を惹起する化学物質を用いて培養神経細胞の障害または個体レベルの実験的障害モデルを作成して、それに対するビタミンC投与による障害の回復を評価し、老化も含めた生理現象におけるアンチエイジング効果を検討する。さらに、アルツハイマー型認知症などの神経変性疾患の発症を根本的に予防・治療するためのビタミンCの活用方法の確立に向けた基礎研究を行う。脳機能改善効果の高いビタミンC誘導体の有効性や安全性研究を基に神経変性疾患への予防効果や治療効果を評価する基礎研究を行う。

3. 研究の方法

- (1) ビタミンCの脳における特異的局在の解明

ビタミンC生合成能を有する実験動物（正常ラット）および生合成不能 ODS ラットを用いて潜在的ビタミンC欠乏状態時の血中濃度と脳内濃度の変化を解析する。脳におけるビタミンC特異的な輸送・保持機構はいまだ解明されていないため、免疫細胞における取り込み機構と比較しながら輸送タンパクの組織特異的発現の差異を分子レベルで明らかにする。

また、ODS ラットを用いて加齢・老化時のビタミンC取り込みや代謝などが低下した状態のモデルを作成し、潜在的欠乏状態時の脳における特異的保持・再生機構の存在を証明し、さらに保持・再生に関わるタンパク質の解析を行う。これには二次元電気泳動、ウエスタンブロッティング、組織免疫染色等を用いて行う。この研究においては、好感度分析が可能なケミルミ検出装置を導入して実験を行う。この結果をふまえて加齢・老化時の潜在的欠乏状態の起こる仕組みやその防護法についても研究する。

- (2) ビタミンCの神経細胞保護作用や突起伸展促進作用

未分化神経細胞を用いて、安定型ビタミンC誘導体の添加培養下に神経栄養因子の神経突起伸張作用の増強や酸化障害に対する防御作用について解析する。用いる細胞はラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞であり、安定型アスコルビン酸 2-グルコシド (AA-2G) 共存下での神経栄養因子による突起伸張を顕微鏡下に測定し、神経再生能として評価する。また、神経細胞の維持、再生、分化時の細胞内へのビタミンCの輸送や取り込みについても解析する。細胞内ビタミンC量の定量は、多検体同時処理が可能な蛍光・生物/化学発光対応のプレートリーダーを用いて行う。

(3) ラジカル・活性酸素種や炎症の関与する脳・神経疾患に対するビタミンCの有効性評価

酸化障害を惹起する物質(過酸化物質やアミロイドペプチド、起炎性薬物など)を用いて培養神経細胞の障害に対するビタミンC共存による障害の予防や回復効果さらには個体レベルでの実験的障害モデルに対する効果を評価する。未分化神経細胞株(ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞)を用いて、安定型ビタミンC誘導体の添加培養下に酸化障害に対する防御作用の増強の有無についてさらに詳細に解析する。特に、アミロイドβ1-40/1-42 やアミロイドβ25-35 による酸化障害に対する神経細胞の生存維持について測定し、ビタミンCの細胞防御効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 脳におけるビタミンCの特異的局在

各種組織におけるビタミンC動態の解析から、脳特異的な局在および保持・再生機構の存在の可能性について研究した。ビタミンC合成不能 ODS ラットおよびその正常動物を用いて、潜在的ビタミンC欠乏状態が惹起されるビタミンC投与量を設定し、その時の血中濃度(図1)と臓器内濃度(図2)の変化を解析した。ODS ラット Control 群(ビタミンC10 mg/ml 添加水摂取)の臓器中ビタミンC量(平均値)は、肝臓 183.5 ·g/g, 脳 302.0 ·g/g, 脾臓 244.3 ·g/g, 小腸 328.5 ·g/g であり、欠乏群では、肝臓 4.3 ·g/g, 脳 50.6 ·g/g, 脾臓 0.8 ·g/g, 小腸 3.4 ·g/g と顕著に低い値を示した。しかし脳においては他の臓器と比較してビタミンCが保持されており、その残存率は Control 群の約 17%であった。これと比較して肝臓や脾臓、また小腸ではビタミンCがほとんど検出されず、残存率は Control 群の約 1%にまで低下していた。潜在的ビタミンC欠乏モデルである半欠乏群(ビタミンC0.75 mg/ml 添加水摂取)では肝臓 98.6 ·g/g, 脳 278.5

·g/g, 脾臓 179.6 ·g/g, 小腸 84.0 ·g/g となり、脳と脾臓においては Control 群と比較するとその残存率はそれぞれ 92%と 73%であり、また肝臓では 54%、小腸では 12%となり、半欠乏状態のビタミンC水供給でも脳においては高いビタミンC濃度を維持する機構が存在することが証明された。

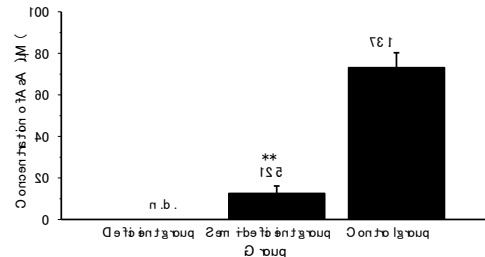


図1. 血漿中ビタミンC濃度(ビタミンC欠乏、半欠乏、正常 ODS ラット、処置 30 日目)

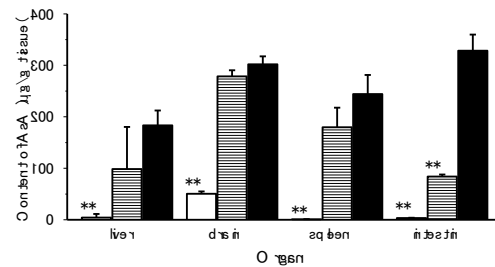


図2. 臓器中ビタミンC濃度(ビタミンC欠乏、半欠乏、正常 ODS ラット、処置 30 日目)

また、脳には特異的な輸送・保持機構が存在することを確認するため、免疫細胞における取り込み機構(論文発表済み)と比較しながら、それぞれの摂取状態における輸送タンパクの組織特異的発現の差異をウエスタンブロッティング法およびケミルミ検出装置を用いて分子レベルで解析した。ODS ラットに0、0.75、10 mg/ml のビタミンC添加水を与えて3週間飼育し、脾臓の9,000×g上清について解析した。ビタミンCの特異的トランスポーターはNa⁺依存性能動輸送体であり、SVCT (Sodium-dependent Vitamin C transporter) と呼ばれている。SVCTには2種類(SVCT1, SVCT2)存在するが、本実験では脾臓に発現するSVCT2に注目した。ウエスタンブロッティングを行った結果、完全欠乏群のSVCT2発現は半欠乏群(潜在的欠乏群)およびControl群(正常群)に比べて傾向を示した(図3)。一方、半欠乏群におけるSVCT2の発現はControl群とほぼ同等であった。

また、ビタミンC欠乏にともなう肝臓中のチトクロム P450 や血漿中アルカリホスファ

ターゼの発現についても解析し、いずれも完全欠乏群で顕著に減少すること、半欠乏群（潜在的欠乏群）で減少傾向を示すことを確認した。このように、ビタミンCの欠乏は各種のタンパク発現に大きく影響し、潜在的ビタミンC欠乏状態は正常な状態からは生態が脆弱化している状態であることを示唆するものである。

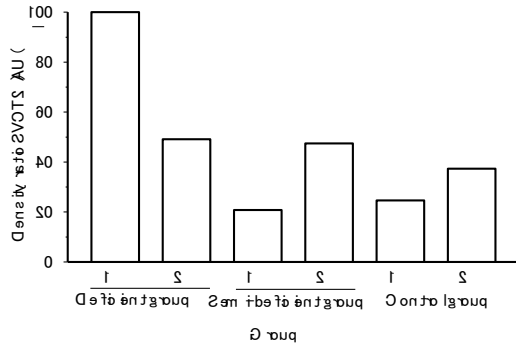


図3. ビタミンC欠乏に伴う脾臓 SVCT2 発現の増強

さらに、潜在的ビタミンC欠乏状態になると、脳内のビタミンC濃度は特異なメカニズムで維持されるのに反して、他の臓器では容易に消失、減少し、生体影響が現れやすくなることを示唆している。

(2) ビタミンCの神経細胞保護作用や突起伸長促進作用

ビタミンCの神経突起伸長促進作用や神経細胞保護作用を細胞レベルで解析し、神経回路網の構築や再生への働きについて研究した。未分化神経細胞（ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞）を用いて、神経栄養因子による突起伸長率を測定し、神経再生賦活や細胞障害について評価した。その結果、安定型ビタミンC誘導体の添加により神経栄養因子の神経突起伸長作用が増強されること（図4）が証明された。AA-2G 添加実験では、生理的な血中濃度である 0.1 mM で有意な突起形成の促進作用が認められ、さらにこの作用は高濃度 5 mM においても維持され、その神経ネットワークも顕著に形成されていた（写真）。

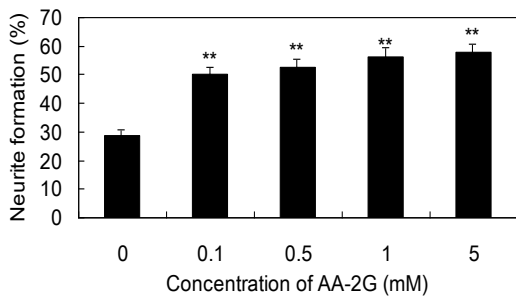


図4. PC12 細胞の神経分化に対するビタミンC誘導体（AA-2G）の突起進展増強作用

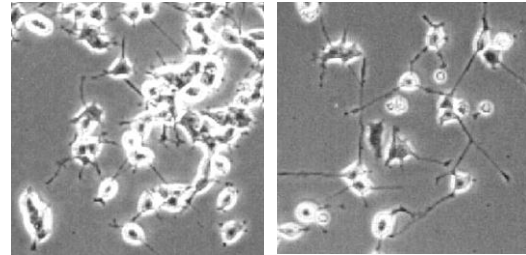


写真. (左) 図4中の濃度 0 mM 処理時の細胞像；(右) 図4中の濃度 5 mM 処理時の細胞像

(3) ラジカル・活性酸素種や炎症の関与する脳・神経疾患に対するビタミンCの有効性評価

ビタミンCの神経細胞保護作用については、未分化神経細胞（ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞）を用いて、神経栄養因子による突起伸長や神経再生賦活、また活性酸素による神経細胞障害の面で解析した。その結果、過酸化物質（過酸化水素等）による神経細胞の酸化障害が抑制されることが認められた。これにより、神経細胞の各種酸化障害に対するビタミンCの防御効果が確認され、第一義的抗酸化物質としての重要性が実証された。

細胞や組織が虚血に陥った場合には細胞や組織はダメージを受け細胞死に至る。また、一定期間の虚血の後に再灌流により急激に酸素負荷が加わった場合は虚血組織にさらなる障害を惹起する。このような虚血後に再灌流を伴い細胞や組織が障害を引き起こすことを虚血再灌流障害と言う。特に、脳内においては毛細血管に発生する血栓等により脳内微小環境に虚血状態が誘導され、それが顕在化する場合と血栓の除去にともなう再灌流が生じる場合がある。いずれの場合とも神経細胞には重大な障害がもたらされることになる。この障害の発生に対して脳内特異的な分布挙動を示すビタミンCは第一義的な抗酸化物質として機能することが推察される。ここでは、老化や酸化ストレスによる組織障害に対するビタミンCの作用を、虚血再灌流障害により発生する筋萎縮をモデルにして、ビタミンCの防御効果を評価した。

結果として「無投与群」に比較して抗酸化物質を投与した「ビタミンC群」は「ビタミンE群」と同様にヒラメ筋相対体重比、ヒラメ筋線維横断面短径ともに駆血再灌流 72 時間後に有意に大きかった（表 1）。このこと

は抗酸化物質の投与により虚血再灌流後に発生する酸化ストレス障害に起因する筋萎縮を予防できたことを示している。神経細胞そのものの防御を示す結果ではないが、老化や酸化ストレスにともなう神経細胞傷害に対してもビタミンCが効果的に作用する防御分子であることは十分に示唆される。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 徳男 (MUTO NORIO)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30112642

表 抗酸化物質投与による骨格筋の状態

処置群	ヒラメ筋相 対 体重比 (mg/g)	ヒラメ筋線維 横断面短径 (・m)
無投与群	0.43±0.12	37.73±1.70
ビタミンC群	0.51±0.29 ^a	44.49±2.94 ^b
ビタミンE群	0.51±0.32 ^a	44.18±3.11 ^b

^a: 「無投与群」との有意差あり p<0.01

^b: 「無投与群」との有意差あり p<0.05

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Umei N, Ono T, Oki S, Otsuka A, Otao H, Muto N: Preventive effects of antioxidants on muscle atrophy induced by ischemic reperfusion, J. Phy. Ther. Sci, 23, 565-567 (2011)

[学会発表] (計3件)

- ① 武藤徳男、ビタミンC欠乏による組織中ビタミンC濃度変動と免疫応答への影響、日本ビタミン学会 (第62回大会)、2010年6月12-13日、アイーナいわて県民情報交流センター (盛岡市)
- ② 武藤徳男(代表)、潜在的ビタミンC欠乏時の生体機能の評価、日本ビタミン学会 (第63回大会)、2011年6月4-5日、安田女子大学 (広島市)
- ③ 武藤徳男(代表)、ビタミンC及びポリフェノールの吸収動態解析ならびに抗酸化活性への関与、日本ビタミン学会 (第65回大会)、2013年5月17-18日、一橋大学・一橋講堂 (東京都)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

