

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700838

研究課題名（和文） 加齢に伴うアスコルビン酸レベル低下機構と加齢性機能変化の関連性解明とその制御

研究課題名（英文） Elucidation of the relationships between senescence-associated decreases in ascorbic acid level and senescence-associated changes in cellular functions

研究代表者

斉藤 靖和 (SAITOH YASUKAZU)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：90405514

研究成果の概要（和文）：

正常ヒト線維芽細胞OUMS-36の細胞老化に伴うアスコルビン酸(AsA)取込み量の変化および老若細胞間での細胞内酸化ストレスレベルの違いとAsA投与による影響について検討し、AsA取込み能が老化細胞でおよそ2倍高いことを見出した。また、OUMS-36のメインアイソフォームはSVCT2であることを明らかにし、その発現レベルが老若細胞間で大差なかったことから、AsA取込み能の変化はSVCT発現量の変化とは異なる要因であることを明らかにした。次に、無刺激および酸化ストレス条件下における老若細胞間での細胞内酸化ストレスレベルとAsA投与による影響を検証した。その結果、無刺激条件においては、若い細胞の方が細胞内 $O_2\cdot^-$ レベルが高いのに対し、老化細胞では、ペルオキシドおよび過酸化水素などが増加していることを明らかにした。一方、酸化ストレス誘導剤 t -BuOOH曝露条件では細胞内 $O_2\cdot^-$ 量は老若細胞間で大差なかったが、細胞内ペルオキシドおよび過酸化水素などのレベルは増加し、特に老化細胞で顕著に増大していた。また、老化依存的な細胞内活性酸素の増加に対するAsA投与の影響を検討したところ、AsA投与は両条件下において、濃度依存的に、特に老化細胞の細胞内酸化ストレスを顕著に低下させた。これらの結果より、ヒト線維芽細胞OUMS-36では、細胞老化に伴ってペルオキシドや過酸化水素などの細胞内酸化ストレスが増大しており、その増加に対する細胞応答の1つとしてAsA取り込みが増大している可能性が示された。また、老化細胞において増加した細胞内酸化ストレスに対してAsA投与が有効であったことから、加齢に伴いAsA摂取の重要性が増していることが示唆された。今後、更に解析を進めていくことで、高齢者における適正なAsA摂取量を設定するための基礎的かつ有効なエビデンスが集積されると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Many studies have suggested that there is a close correlation among declines in internal ascorbic acid (AsA) levels, various disorders, and senescence. To clarify the relationships between age-associated changes in intracellular AsA levels and the effects of AsA administration on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, we investigated aging-related changes in AsA uptake, ROS levels, and the effects of AsA

administration on intracellular ROS levels in young and old (senescent) human fibroblasts. Our results demonstrated that AsA uptake was increased in old cells compared with young cells, although mRNA and protein expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 was barely altered between the young and old cells. We also demonstrated that the intracellular superoxide anion level was higher in young cells, whereas the level of intracellular peroxides was significantly increased in old cells under both normal and oxidative stress conditions. Moreover, AsA administration markedly decreased the augmentation of intracellular peroxides in old cells, whereas there was no effect of AsA treatment in young cells under both normal and oxidative stress conditions. Therefore, our results also indicate that AsA could play an important role in regulating the intracellular ROS levels in senescent cells and that the need for AsA is enhanced by cellular senescence. We hope further investigations will accumulate basic and efficient evidences to determinate the proper amount of AsA intake for elderly people.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、酸化ストレス、細胞死

1. 研究開始当初の背景

L-アスコルビン酸(L-ascorbic acid; AsA)は、その多彩な生理機能以外にも水相における活性酸素を捕捉する“迅速性”において秀逸した抗酸化物質として知られており、様々な酸化ストレス関連疾患における未病の段階での防御成分として重要な役割を果たしている。また、AsAは組織・細胞内に能動輸送によって高濃度蓄積されることが知られており、この細胞内高濃度蓄積がAsAのもつ様々な生理機能が発揮される上で非常に重要な因子であると考えられている。

一方、加齢とAsAの関連性については、AsAの血中濃度、組織含量が加齢に伴い減少することや長期的AsAの不足による寿命の短縮(Kondo Y et al., *FEBS Lett.* 2004)、AsA安定型誘導体による細胞分裂寿命の延長効果(Furumoto K et al., *Life Sci.* 1998)などが報告されており、加齢とAsA輸送・蓄積の間には何らかの因果関係があると推測される。また、これまでに、ラットにおいては加齢に伴い、AsA取り込みおよびSVCTmRNA発現が低下することが報告されていることから(Michels AJ et al., *Arch Biochem Biophys.* 2003)、AsA輸送を司るSVCTが加齢

に伴って減少することによりAsA輸送・蓄積能の低下が生じていることが示唆される。しかしながら、この結果はAsA合成能を有しているラットにおける評価であり、AsA合成能を欠くヒトにおける加齢とAsA輸送・蓄積能の関連性については未だ明らかされていない。

AsAの生理機能にとって細胞内への輸送および蓄積が重要なカギであると考えられるが、過去の論文においてAsAの生理機能と加齢との関係をAsAの輸送・蓄積の観点から体系的に研究された例はほとんどない。

2. 研究の目的

未だ明らかとなっていない“ヒトの加齢に伴うAsA輸送・蓄積能の変化と生理機能への影響”を解析することを目的とし、AsA輸送・蓄積能の加齢性変化に関する体系的な解析を試みる。

3. 研究の方法

正常ヒト線維芽OUMS-36を用いて継代培養を繰り返すことにより、老化細胞を取得した。細胞老化については、細胞の分裂回数

(Population Doubling Level ; 細胞数の計測値から算出), 細胞形態 (ホフマンモジュレーション顕微鏡観察), 細胞サイズの変化 (粒度分析装置による計測), 老化マーカーである senescence-associated β galactosidase の活性評価, テロメア長測定 (Southern blotting) により確認した。細胞を若齢細胞と老化細胞の2群に分け, 各群におけるアスコルビン酸取り込み能の違いを HPLC/ECD 法により測定すると共に, AsA 特異的な輸送蛋白である SVCT(sodium-dependent vitamin C transporter)1,2 の発現をリアルタイム PCR とウエスタンブロッティングにより確認した。また, 細胞内酸化ストレスを酸化ストレス応答性蛍光プローブである CDCFH-DA 法および NBT 法で測定し, 通常条件ならびに酸化ストレス曝露条件下における細胞内酸化ストレスの老若細胞間での違いと AsA 投与による影響について検証した。

4. 研究成果

OUMS-36は継代培養に伴い各種老化マーカーの変化が認められ, PDLが20.5より低いものをYoung細胞群, 32.5より高いものをOld細胞群として検証を行った。その結果, AsA取込み能が老化細胞でおよそ2倍高いことを見出し (図1), OUMS-36のメインアイソフォームはSVCT2であることを明らかにした。しかしながら, SVCT2の発現レベルが老若細胞間で大差なかったことから, AsA取込み能の変化はSVCT発現量の変化とは異なる要因であることを明らかにした。次に, 無刺激および酸化ストレス条件下における老若細胞間での細胞内酸化ストレスレベルとAsA投与による影響を検証した結果, 無刺激条件においては, 若い細胞の方が細胞内 $O_2\cdot^-$ レベルが高いのに対し, 老化細胞では, ペルオキシドおよび過酸化水素などが増加していることを明らかにした。一方, 酸化ストレス誘導剤 *t*-BuOOH曝露条件下では細胞内 $O_2\cdot^-$ 量は老若細胞間で大差なかったが, 細胞内ペルオキシドおよび過酸化水素などのレベルは増加し, 特に老化細胞で顕著に増大していた。また, 老化依存的な細胞内活性酸素の増加に対するAsA投与の影響を検討したところ, AsA投与は両条件下において, 濃度依存的に, 特に老化細胞の細胞内酸化ストレスを顕著に低下させた (図2)。これらの結果より, ヒト線維芽細胞OUMS-36では, 細胞老化に伴ってペルオキシドや過酸化水素などの細胞内酸化ストレスが増大しており, その増加に対する細胞応答の1つとしてAsA取り込みが増大している可能性が示された。また, 老化細

胞において増加した細胞内酸化ストレスに対してAsA投与が有効であったことから, 加齢に伴いAsA摂取の重要性が増していることが示唆された。

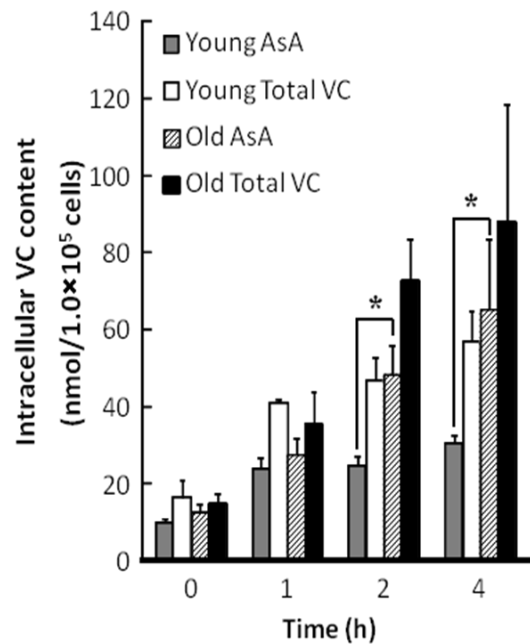


図1 老若細胞間における細胞内 AsA 取り込み量の違い

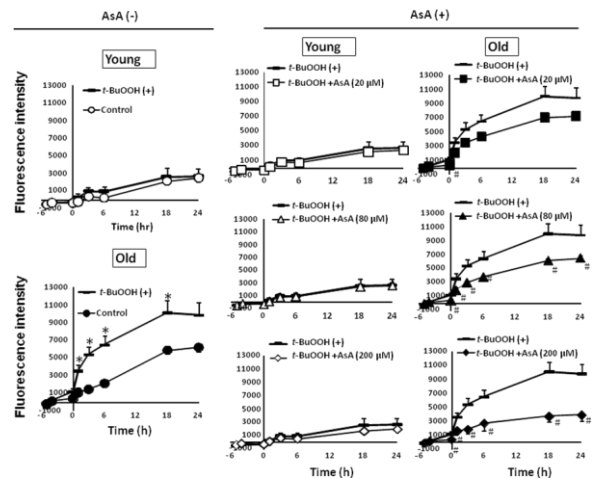


図2 老若細胞間における細胞内活性酸素レベルに対する AsA 投与の影響 (酸化ストレス曝露条件)

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)

Saitoh Y, Morishita A, Mito S, Tsujiya T, Miwa N. Senescence-induced increases in intracellular oxidative stress and enhancement of the need for ascorbic acid in human fibroblasts, *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013 Apr 24. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 1 件)

斉藤 靖和, 森下 愛子, 水戸 智美, 三羽 信比古, ヒト線維芽細胞 **OUMS-36** の細胞老化に伴う酸化ストレス応答性およびビタミン C 要求性の変化 日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012.3.30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 靖和 (SAITOH YASUKAZU)

研究者番号: 9 0 4 0 5 5 1 4