

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450163

研究課題名(和文) 老化に伴うビタミンC必要性の変化と輸送制御機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Study on cellular senescence-induced changes in vitamin C transport/accumulation activity and its regulation mechanism

研究代表者

斉藤 靖和 (Saitoh, Yasukazu)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：90405514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンC(VC)は組織・細胞内へ輸送・蓄積され様々な生理作用を發揮しているが、細胞老化に伴う細胞内VC輸送・蓄積能の変化は不明な部分が多い。本研究では、細胞老化に伴いVC輸送担体の発現上昇を介した細胞内AsA取り込み量が増加すること、老化細胞で増加した活性酸素の除去にVCが有効であることを見出した。また、レスベラトロールがVCの輸送調節に関与している可能性も新たに見出した。これらの結果は、老化細胞におけるVCの必要性和VC輸送の新たな調節因子の発見を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Vitamin C (VC) is transported and accumulated into human cells and plays various physiological roles, but the relationship between the intracellular vitamin C transport/accumulation activity and cellular senescence has not been fully understood yet. In this study, we demonstrated that both VC transport/accumulation activity and the expression of VC-transporter were increased in old cells compared with young cells, and VC was effective in decreasing intracellular oxidative stress especially in senescent cells. Furthermore, we also found the possibility that resveratrol was involved in the regulation VC transport/accumulation activity. From these results, we show the importance of VC supplementation in senescent cells, and identified the new regulating factor for the VC transport/accumulation.

研究分野：農芸化学

キーワード：ビタミンC アスコルビン酸 細胞老化 活性酸素 細胞内輸送 細胞内蓄積 線維芽細胞 レスベラトロール

1. 研究開始当初の背景

ビタミン C (VC:L-ascorbic acid) は、水相における活性酸素を捕捉する"迅速性"に秀れ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。

老化と VC の関連性については、これまでに老化に伴い VC の血中濃度、組織含量が減少することや長期的 VC 不足による寿命の短縮、VC やその誘導体投与による細胞分裂寿命の延長効果などが報告されており、VC には抗老化作用があると考えられている。また、VC 合成能を欠く SMP30/GNL ノックアウトマウスが非常に短命であることや脳内活性酸素が増加していること、ラットで老化に伴い VC 取込みおよび VC 特異的な輸送蛋白である SVCT の mRNA 発現が低下することなども報告されており、VC 輸送を司る SVCT が加齢に伴って減少することにより VC 輸送・蓄積能の低下が生じ、活性酸素が組織・細胞内で増加し、老化が促進されていることが示唆されている。しかしながら、VC 合成能を欠くヒトにおける老化と VC の関連性やその輸送制御機構については、未解明な点が多く残されている。

これまでに申請者らは、VC の抗酸化能と細胞内への取り込み機構に注目し、血管内皮細胞における VC 輸送メカニズムの解析(Saitoh et al., Mol Cell Biochem.1997)や VC 誘導体を用いた酸化ストレス誘導性細胞死の抑制 (Xiao, Saitoh et al., J Cell Biochem.2009, Sugimoto, Saitoh et al., Mol Med Rep.2009, 斉藤ら Cosmetic Stage.2010)、VC 酸化体を還元する酵素デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ遺伝子の導入による細胞死防御(Saitoh et al., Gene Ther Mol Biol.2007)、細胞死抑制蛋白質 Bcl-2 とのクロストーク(Saitoh et al., J Cell Biochem.2003, Yanada, Saitoh et al.,

J Cell Biochem.2004, Yanada, Saitoh et al., Organ biology.2009)など多面的に VC に関する研究に取り組んできた。さらに近年、老化と VC との関係に着目し、老化に伴い VC の要求性が亢進しているという新たな知見も報告しているが (Saitoh et al., Mol Cell Biochem. 2013)、その分子メカニズムや VC の生理機能との関連性についてはまだよく分かっていない。また、ヒト細胞での知見は動物を用いた先行研究の結果とは一部異なることも分かっており、老化と VC の関連性を解明し、ヒトの QOL 向上へと応用していくためには、これまでの動物モデルでの知見だけでは限界があり、ヒト細胞等を用いた検証を進めていく必要がある。

2. 研究の目的

老化と VC の関連性については上述したように、これまで老化に伴い VC の要求性が亢進する可能性を見出しているが、この現象が特定の細胞のみで確認される現象なのか、他の細胞種でも確認される現象なのかは不明であり、我々が見出した現象の普遍性を訴えていく上ではまだエビデンスが弱い。そこで本研究では、これまでの研究成果を他の細胞でも確認すると共に、若い細胞と老化した細胞の間で VC が与える影響が異なるかどうか検討する。また、VC 輸送制御機構の解明に迫ることを狙いとし、主として以下の3点について明らかにすることを目的とした。

(1) VC 細胞内輸送・蓄積能と細胞老化との関連性の検証:

これまでの検討とは異なるヒト由来細胞を用いて、老化に伴う VC 細胞輸送・蓄積能の変化、SVCT の発現量の変化を検討し、VC 細胞内輸送・蓄積能と細胞老化との関連性について検証する。

(2) 老化細胞に対する VC の影響:

VC の生理的作用についてはこれまで多く

の報告があるが、細胞の老化によってその影響に変化が生じるかどうかについては良く分かっていない。そこで、老化の原因の一つであり、VC の代表的生理機能も関わる細胞内酸化ストレスレベルについて解析する。また、VC 添加が老若細胞の遺伝子発現に与える影響の違いについても検討を行う。

(3) VC 輸送制御機構の解明と VC 輸送調節因子の探索：

老化に関わるとされる様々なストレス刺激や物質を与えて VC 輸送能の変化を検証し、VC 輸送制御に関わる刺激や物質を調査する。特に VC 輸送を正に調節する因子を見出し、その制御メカニズムについて検証する。

3. 研究の方法

(1) VC 細胞内輸送・蓄積能と老化との関連性の検証：

継代培養を繰り返すことにより細胞老化を引き起こすヒト肺由来線維芽細胞 TIG-1 およびヒト皮膚由来線維芽細胞 NB1RGB を用いて検討を行った。

正常細胞を若い段階で凍結ストックすると並行して、細胞が老化するまで継続的に培養し続け、老化細胞を得た。細胞老化の確認は、顕微鏡観察による細胞形態の変化、粒度分析装置を用いた細胞径の変化、老化マーカーの一つである senescence-associated galactosidase (SA-β-gal) の活性評価などを併用して行った。次に、ヒト線維芽細胞の若い細胞(以下 Young 細胞)と老化した細胞(以下 Old 細胞)を用いて、以下の検討を行った。

老若細胞間における還元型 VC(アスコルビン酸: AsA) もしくは酸化型 VC(デヒドロアスコルビン酸: DehAsA) 添加後の細胞内 AsA 量の変化を HPLC-ECD 法を用いて測定した。

老若細胞間における AsA および DehAsA の輸送体である SVCT1、SVCT2 および GLUT1、

GLUT3、GLUT4 遺伝子発現の違いを RT-PCR を用いて検討した。

老若細胞間における SVCT2 タンパク質発現の違いについて、ウエスタンブロットあるいは免疫染色を用いて検討した。

(2) 老化細胞に対する VC の影響：

老若細胞内の酸化ストレスレベルに対する VC の影響を調べるため、細胞内活性酸素(ROS) 量の違いを Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 法、6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (CDCFH-DA) フルオロメトリー法を用いてそれぞれ検討を行った。また、細胞老化に伴う発現遺伝子の変化と VC による影響について GeneChip を用いた網羅的な解析あるいは RT-PCR による検討を行った。

(3) VC 輸送制御機構の解明と VC 輸送調節因子の探索：

ヒト皮膚角化細胞(HaCaT) およびヒト線維芽細胞(OUMS-36)をそれぞれ培養し、紫外線 A 波(UVA)あるいは B 波(UVB)を照射、H₂O₂ 曝露刺激を与える、あるいは亜鉛(ZnCl₂) もしくはレスベラトロール(RSV) 処理(24 時間)後、WST-1 法にて細胞への毒性を評価し、細胞毒性を引き起こさない強度・濃度を求めた。次に、UVA、UVB、H₂O₂ 曝露、ZnCl₂ あるいは RSV 処理後、それぞれの条件において細胞内への AsA 取り込み量を HPLC-ECD 法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) VC 細胞内輸送・蓄積能と細胞老化との関連性の検証：

ヒト肺由来線維芽細胞 TIG-1 を用いた検討

TIG-1 細胞の継代培養を繰り返すことによって老化細胞を取得した。累積分裂回数

(Population Doubling Level:PDL)の増加に伴い、1日あたりの分裂回数は0.54回(PDL27.9)から0.14回(PDL61.1)へと増殖速度の低下(約74%)が認められた。細胞平均径は16.1 μm (PDL26.3)から22.8 μm (PDL61.1)へと細胞のサイズの増大(約42%)が認められた。また、PDLの増加に伴いSA- β -gal陽性率も3.2%から58.3%へと有意に上昇しており、細胞が老化していることを確認した。これらの結果から、累積細胞分裂回数の比較的少ないTIG-1細胞を若い細胞(以下Young細胞:PDL30以下)、細胞分裂を繰り返し老化したTIG-1細胞を老化細胞(以下Old細胞:PDL55以上)とし、老若細胞間におけるAsAもしくはDehAsA添加(それぞれ100 μM)後の細胞内AsA量の変化について検討を行った。その結果、AsAを添加したところ、Young細胞と比べOld細胞において細胞内AsA及びDehAsA量の有意な増加が認められた。また、DehAsA添加では、Young細胞と比較してOld細胞でAsA量の有意な増加が認められた。次に、AsA及びDehAsAの輸送体SVCT1、2、GLUT1、3、4遺伝子発現の違いを検討したところ、TIG-1細胞ではSVCT2の発現が主であり、Young細胞と比較してOld細胞でSVCT2、GLUT3の発現量の増加が確認された。また、タンパク質レベルにおいてもYoung細胞と比較してOld細胞でSVCT2発現量の増加がみられた。つまり、ヒト線維芽細胞(TIG-1)の細胞老化に伴い、SVCT2の発現上昇を介した細胞内AsA輸送・蓄積量の増加が示唆された。

ヒト皮膚由来線維芽細胞 NB1RGB を用いた検討

NB1RGB細胞の継代培養を繰り返すことによって老化細胞を取得した。PDLの増加に伴い、1日あたりの分裂回数は0.8回(PDL22.4)から0.4回(PDL63.9)へと増殖速度の低下(約50%)が認められた。細胞平均径は17.3

μm (PDL22.4)から22.1 μm (PDL62.3)へと細胞のサイズの増大(約78%)が認められた。また、PDLの増加に伴いSA- β -gal陽性率も2.7%から78.7%へと有意に上昇しており、細胞が老化していることを確認した。若細胞間におけるAsA添加後の細胞内AsA量を比較したところ、Youngと比べOldの方が有意に高いことが認められた。また、NB1RGB細胞ではSVCT2の発現が主であり、Young細胞と比較してOld細胞でGLUT4の発現量の増加が確認された。これらの結果から、ヒト線維芽細胞(NB1RGB)の細胞老化に伴い、細胞内AsA輸送・蓄積量の増加が示唆された。一方で、細胞の組織由来によってそのメカニズムに違いがある可能性も示唆された。

(2) 老化細胞に対するVCの影響:

老若細胞内の酸化ストレスレベルに対するVCの影響

TIG-1細胞、NB1RGB細胞において細胞老化に伴い、細胞内活性酸素レベルが増加することをNBT法あるいはCDCFH-DA法で確認した。これらの結果より、細胞老化に伴う細胞内AsA輸送・蓄積量の増加は、老化細胞内で増加した細胞内活性酸素に対する適応性変化の一つではないかと考えた。一方、細胞内酸化ストレスに対するVCの影響については、Young細胞に比べ、Old細胞の方がVCの投与による細胞内酸化ストレスの抑制効果が大きいことをTIG-1細胞で見出した。

細胞老化に伴う発現遺伝子の変化とVCによる影響について

- 1: GeneChipを用いた網羅的な解析

TIG-1細胞の老若細胞にVCを与え、遺伝子発現の変化の違いをGeneChipで解析を行った。得られた結果に対してKEGG Pathwayを用いた解析を行い、老化細胞に対してVCが積極的に働く可能性があるいくつかの経路を見出しつつある(解析継続中)。

- 2 : RT-PCR による検討

NB1RGB 細胞の細胞老化に伴い発現が変化
する遺伝子をいくつか見出した。また、VC 添
加が遺伝子発現に与える影響を検討し、
Young 細胞と Old 細胞で VC 添加の影響を受け
て変動する遺伝子を複数見出すと共に、老若
細胞間で VC による影響に違いがある遺伝子
が存在することを見出した（解析継続中）。

(3) VC 輸送制御機構の解明と VC 輸送調節因 子の探索 :

ヒト表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) を用い、AsA、
H₂O₂、UVA、UVB 及び ZnCl₂ もしくは RSV が AsA
輸送・蓄積に影響を与えるかどうか検討を行
った。細胞毒性のない条件で AsA、H₂O₂、UVA、
UVB、ZnCl₂、RSV 事前処理による AsA あるいは
DehAsA (それぞれ 100 μM) 添加後の細胞内
AsA 量の変化に対する影響を検討したところ、
H₂O₂、UVA、UVB については AsA 輸送・蓄積へ
の影響は認められなかった。一方、AsA、ZnCl₂
では AsA 輸送・蓄積の抑制が、RSV では AsA
輸送・蓄積の促進がみられ、それぞれ VC 輸
送調節因子である可能性を見出した。さらに、
ZnCl₂ と RSV については HaCaT 細胞とヒト線維
芽細胞 OUMS-36 で AsA 輸送・蓄積能の違いに
ついて比較を行ったところ、OUMS-36 細胞の
場合、ZnCl₂、RSV 共に AsA 輸送・蓄積を増加
させた。これらの結果より、ZnCl₂ および RSV
は細胞の AsA 輸送に影響を与えることが示さ
れたものの、ZnCl₂ は AsA 輸送を上皮細胞では
負に、線維芽細胞では正に制御していたこと
から細胞の種類によって影響が異なること
が示唆された。また、RSV は両細胞の AsA 輸
送・蓄積を正に制御することから、共通のメ
カニズムの存在が示唆された。さらに、RSV
による SVCT、GLUT、DehAsA 還元能を有する
グルタチオン S トランスフェラーゼオメガ
(GSTO)、チオレドキシンレダクターゼ
(TXNRD) 遺伝子発現に対する影響を検討した

ところ、SVCT2、GLUT3、TXNRD2、TXNRD3 の増
加が見られた。さらに、RSV による細胞内 AsA
量増加の原因を解明するため、サイトカラシ
ン B (CytB) による影響を検討したところ、
CytB と AsA を同時添加で細胞内 AsA 量が減少
したことから、細胞内 AsA の一部は輸送され
た DehAsA 由来であると考えられた。以上の
結果から、RSV は SVCT2、GLUT3 や TXNRDs の
発現上昇を介して、細胞内 AsA を増加させる
可能性を見出した。

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)

齊藤 靖和、森下 愛子、水戸 智美、辻屋 翼、
三羽 信比古、ヒト線維芽細胞の老化に伴う
細胞内酸化ストレスの増加とアスコルビン
酸必要性の亢進、ビタミン、査読無、88(5-6)、
2014、pp. 287-288.

[学会発表] (計 4 件)

齊藤 靖和 他、ヒト細胞老化に伴う細胞
内ビタミン C 輸送・蓄積能の変化とそのメカ
ニズム 日本薬学会第 137 年会 (宮城・仙台)
2017.3.26

齊藤 靖和 他、ヒト細胞老化に伴う細胞
内ビタミン C 量の違いとそのメカニズム 第
16 回日本抗加齢医学会総会 (神奈川・横浜)
2016.6.11

齊藤 靖和 他、ヒト上皮細胞と線維芽細
胞におけるビタミン C 輸送特性の違い 日本
薬学会第 136 年会 (神奈川・横浜) 2016.3.29

齊藤 靖和 他、亜鉛およびレスベラトロ
ールがビタミン C 輸送に与える影響 日本ビ
タミン学会第 66 回大会 (兵庫・姫路)
2014.6.13

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pu-hiroshima.ac.jp/~ysaito/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

齊藤 靖和 (SAITOH, YASUKAZU)

県立広島大学・生命環境学部・生命科学科・
教授

研究者番号：90405514