慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	がん細胞におけるビタミンCが引き起こす細胞内代謝変動
Sub Title	Intracellular metabolic changes induced by vitamin C in cancer cells
Author	上瀧, 萌(Uetaki, Moe) 冨田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012-04
Jtitle	研究会優秀論文
JaLC DOI	
Abstract	生体内で様々な作用をもたらすビタミンCは, 抗酸化物質として広く知られており, ミトコンドリア内に取り込まれたビタミンCは細胞内のレドックス制御によって酸化ストレスを除去しミトコンドリアの脱分極を防ぐと言われている. 一方でビタミンCは酸化ストレスを発生させる酸化促進作用も兼ね備えていることも分かっている. 近年この特性を利用したビタミンC点滴療法というがん治療が注目を浴びており, この酸化促進作用ががん細胞に選択的に毒性をもたらすと推察されているが, 十分に明らかとはなっておらず諸説提唱されている. またビタミンCの抗がん作用機序の解明に向けて培養細胞を用いた研究が行われる中, ビタミンCが及ぼす細胞の代謝応答を包括的に見た報告は未だない. そこで本研究ではビタミンCがガン細胞に及ぼす細胞毒性をメタボロミクスの観点から明らかにすべく, ビタミンCに対し高感受性を示したMCF7(ヒト乳がん細胞株)および低感受性を示した田'29(ヒト結腸がん細胞株)を用い, CE-TOFMSによる経時的なメタボローム解析を行った. 本研究では, 全時系列において両細胞とも非毒性濃度のビタミンCでは大きな代謝変化は見らない一方で毒性濃度域では両細胞で類似の代謝変化溺見られた. このことから, ビタミンCが両細胞にっいて及ぼすアミノ酸代謝についても調査したところ, 毒性を発揮する濃度域で代謝変化を誘導することが推察された. 今後更なるがん選択的な細胞毒性メカニズムの検証のため, 正常細胞との比較も検討していきたい.
Notes	先端生命科学プロジェクト 冨田勝研究会2011年度秋学期
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0658

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

SFC-SWP 2012-001

研究会優秀論文

がん細胞におけるビタミンCが引き起こす細胞内代謝変動

2011年度　秋学期
AUTUMN

上瀧　萌　環境情報学部 3年

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

Keio SFC Academic Society

推薦のことば

大量のビタミンＣを，点滴によりがん患者の血中に直接投与する「高濃度ビタミンＣ点滴療法」は画期的な治療法として近年注目を集めている。すでに米国や日本では臨床的に用いられ，様々ながん種においてその治療効果が認められている。しかしながら，ビタミンＣが，どのような作用機序によってがん細胞を選択的に死滅させるのかについてはいまだに明らかでない。そこで本研究は，ビタミンＣのがん細胞に対する毒性作用メカニズムを解明することを目指して，細胞内代謝物質の網羅的解析（メタボローム解析）を行い考察したものである。本研究の成果は将来的により効率的かつ信頼性の高いビタミンＣ療法の開発と普及に貢献できる可能性があるため，研究会優秀論文として推薦する。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
冨田　勝

Intracellular metabolic changes induced by vitamin C in cancer cells

がん細胞におけるビタミンCが引き起こす細胞内代謝変動

環境情報学部3年

上瀧 萌

要旨

生体内で様々な作用をもたらすビタミンCは，抗酸化物質として広く知られており，ミトコンドリア内に取り込まれたビタミンCは細胞内のレドックス制御によって酸化ストレスを除去しミトコンドリアの脱分極を防ぐと言われている．一方でビタミンCは酸化ストレスを発生させる酸化促進作用も兼ね備えていることも分かっている．近年この特性を利用したビタミンC点滴療法というがん治療が注目を浴びており，この酸化促進作用ががん細胞に選択的に毒性をもたらすと推察されているが，十分に明らかとはなっておらず諸説提唱されている．またビタミンCの抗がん作用機序の解明に向けて培養細胞を用いた研究が行われる中，ビタミンCが及ぼす細胞の代謝応答を包括的に見た報告は未だない．
そこで本研究ではビタミンCがん細胞に及ぼす細胞毒性をメタボロミクスの観点から明らかにすべく，ビタミンCに対し高感受性を示したMCF7（ヒト乳がん細胞株）および低感受性を示したHT29（ヒト結腸がん細胞株）を用い，CE-TOFMSによる経時的なメタボローム解析を行った．本研究では，全時系列において両細胞とも非毒性濃度のビタミンCでは大きな代謝変化は見らない一方で毒性濃度域では両細胞で類似の代謝変化が見られた．このことから，ビタミンCが両細胞について及ぼすアミノ酸代謝についても調査したところ，毒性を発揮する濃度域で代謝変化を誘導することが推察された．今後更なるがん選択的な細胞毒性メカニズムの検証のため，正常細胞との比較も検討していきたい．

キーワード：ビタミンC，CE-TOFMS

1. 序論

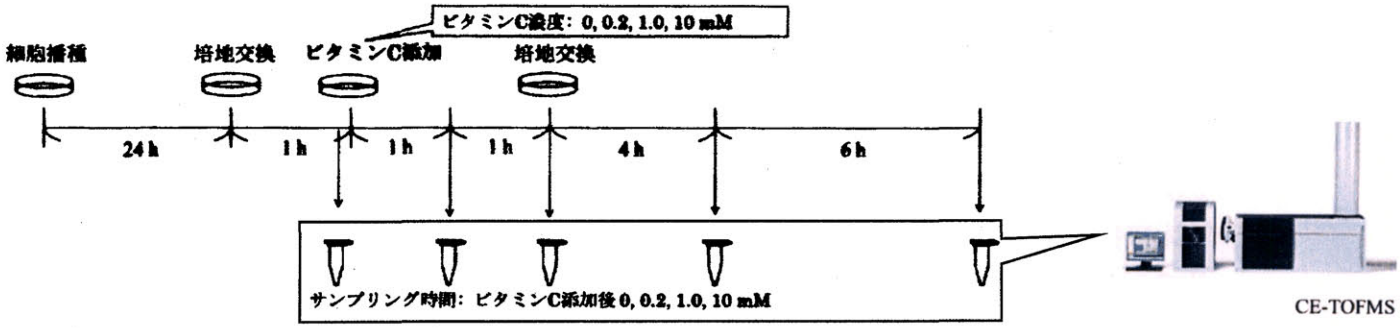
高濃度ビタミンC点滴療法は副作用の少ない癌の代替療法として近年注目されている．あらゆるがん治療が開発される中，現在副作用が少ない画期的な治療の一つに高濃度ビタミンC点滴療法がある．1970年にライナス・ポーリング氏によってビタミンCの抗がん作用が発見され，その後あらゆる研究がなされ治療法の確立に至った．一般にビタミンCは抗酸化物質としてよく知られるが，近年の研究成果では高濃度ビタミンCはむしろ酸化促進的に働くことにより，がん細胞に選択的に作用することが推察されている（Li *et al.*, 2007）．しかしその作用機序の詳細はいまだ明らかでない．もちろん，がん細胞や正常細胞に対するメタボロームレベルでの影響や，各細胞の抗酸化能との関連性などについては未だ不明な部分も多い．

また，この高濃度ビタミンC点滴療法の臨床的な効果は，現在までのところ大腸がんや肺がん，膵臓がん，乳がんなど様々ながん種に対して利用されその効果が報告されているが，Chenらの研究結果においては全てのがん種において毒性が見られたわけではなく，また毒性の見られたがんでもそれぞれ細胞生存率にはばらつきあり，細胞株によってビタミンCに対する感受性には顕著な差があることが分かっており（Chen *et al.*, 2005，Chen *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2008），ビタミンCによるがんの治療法には未だ検討すべき点は多い．そこで本研究では，ビタミンCの投与による代謝応答，および感受性の異なる細胞株におけるその代謝応答の違いをメタボロームレベルで明らかにすることを目的とし，さらに感受性を示す代謝マーカーの探索を目指した．先学期ではCE-TOFMSを用いてビタミンCを投与したビタミンC感受性の異なる培養細胞のメタボローム実験及びその解析を行った．夏プロジェクトまでの成果として，細胞毒性が生じるビタミンC濃度条件では（MCF7で1 mM以上，HT29で10 mM以上），プロファイルの変動が類似しており，ATPやGTPの顕著な低下と共にAMPやGMPの増加が確認されたことから，エネルギー生成の低下が示唆された．また，NAD，NADHの低下に伴い，解糖系上流およびTCA回路上流に位置する物質濃度が増加したことから，NADの分解に起因するエネルギー代謝全体の停滞が示された．細胞内代謝でも特に解糖系，TCA回路やエネルギー代謝についてビタミンCに対する感受性において議論を行ってきた．しかしながら，いずれの細胞も非毒性濃度域のビタミンC濃度条件では大きな代謝変化は見られず，一方で毒性濃度域では両細胞で類似の代謝変化が確認され，それぞれ感受性の違いによる特異的な代謝変動は見られなかった．そのため，本研究では特にアミノ酸代謝に焦点を当て，ビタミンC感受性差による代謝変動の差を追究した．

2. 対象と手法

2.1メタボローム実験に用いた対象と実験条件

本研究では，先学期同様にビタミンCに対して高感受性株であったヒト乳癌細胞株（MCF7）と低感受性株であったヒト結腸癌細胞株（HT29）を用いて，比較メタボローム解析を行った．また添加するビタミンC濃度は0, 0.2, 1.0, 10 mMとし，処理時間はビタミンC添加直前を0 hとし，添加後1, 2, 6, 12 hに設定した．



2.2 手法

2.2.1 メタボローム実験

6穴プレートにHT29またはMCF7細胞をそれぞれ2×10^5 cells/mLで1 wellに対して2 mLずつ播種し，Glucose (1.0 g/L)，Glutamine (0.584 g/L)，Pyruvate (0.11 g/L) 含有DMEM培地（Sigma, D2902）にて24時間前培養を行った．次に，ビタミンC添加1時間前にこのDMEM培地にて培地交換を行った．その後，ビタミンCを1 well毎に10%添加し2時間曝露した．また，ビタミンCは非常に分解しやすい物質であることから，添加する直前に用時調製し，PBSで希釈し吸光度を測定することでビタミンC濃度の定量を行った．コントロールとしてビタミンC添加直前を0 hとし，ビタミンC添加後，1, 2, 6, 12 h後にそれぞれのサンプルを採取した．サンプル数は一条件につき，n = 3とした．また，メタボローム解析で細胞内代謝物質濃度を細胞数で正規化する必要があるため，トリパンブルー試薬を用いてマイクロプレートリーダーで測定を行うことで，各時系列点における生細胞数を調べた．

2.2.2 サンプルの前処理

5%マンニトールを1 wellに対して1 mL添加し2度洗浄した．25 μMのL-methionine sulfone，MES，CSA (IS1) を含むMeOHを，1 wellに対し600 μL添加した．その後，4℃にて10分間静置後，400 μLのサンプル溶液に対し400 μL のCHCl$_3$と200 μLのMilli-Qを加え十分に攪拌し，9,000 × g，4℃にて15分間遠心分離を行った後，水層360 μLをMillipore製限外ろ過フィルターに移し，再度9,000 × g，4℃にて2時間以上遠心分離を行った．その後，ろ液を40℃で240分間遠心乾固させ，100 μMの3-Aminopyrrolidine，Trimesate (IS2) を含む25 μLのMilli-Qにより可溶化し，CE-TOFMSによるメタボローム測定を行った．

2.3 解析手法

2.3.1 メタボローム解析

本研究ではCE-TOFMSにより計測された陽イオン性・陰イオン性物質全てのサンプルデータを用いてメタボローム解析を行った．CE-TOFMS により得られた全データをMasterHands2 を用いて積分によるピーク検出を行い，各物質の精密質量や，標準物質の濃度を元に各代謝物濃度の計算を行った．また前回MCF7細胞においてG1P，G6P，F6Pの各ピークにおいて複数ピークが重なり検出されていたが，夏プロジェクトにおいて再度メタボローム測定を行った結果 3 物質それぞれを同定することに成功したため，その数値を用いて解析を進めた．

2.3.2統計解析

本研究で用いた統計解析としては，両細胞でのアミノ酸の代謝変動を捉えるべく，経時的変化を調べた結果，Lysine，Arginine の挙動が類似していたため，その相関関係を調べるべくJMPという統計解析を行うソフトウェアで多変量解析を行った．さらにこれらの物質とアミノ酸以外にも類似した挙動を示す代謝物質があるか同時に解析を行った．

3. 結果

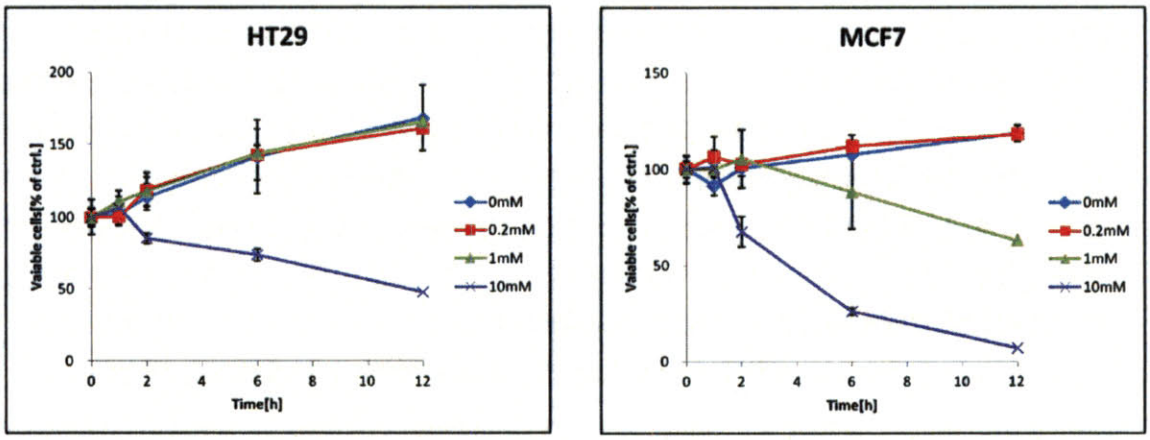
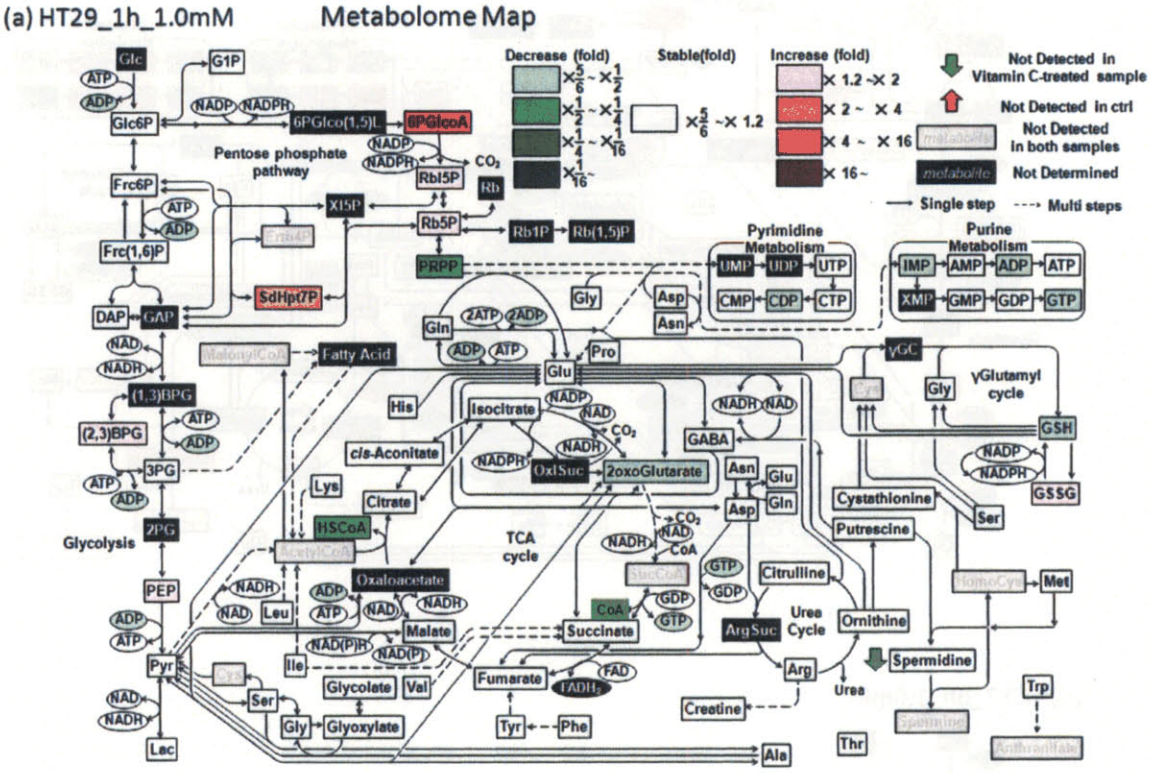


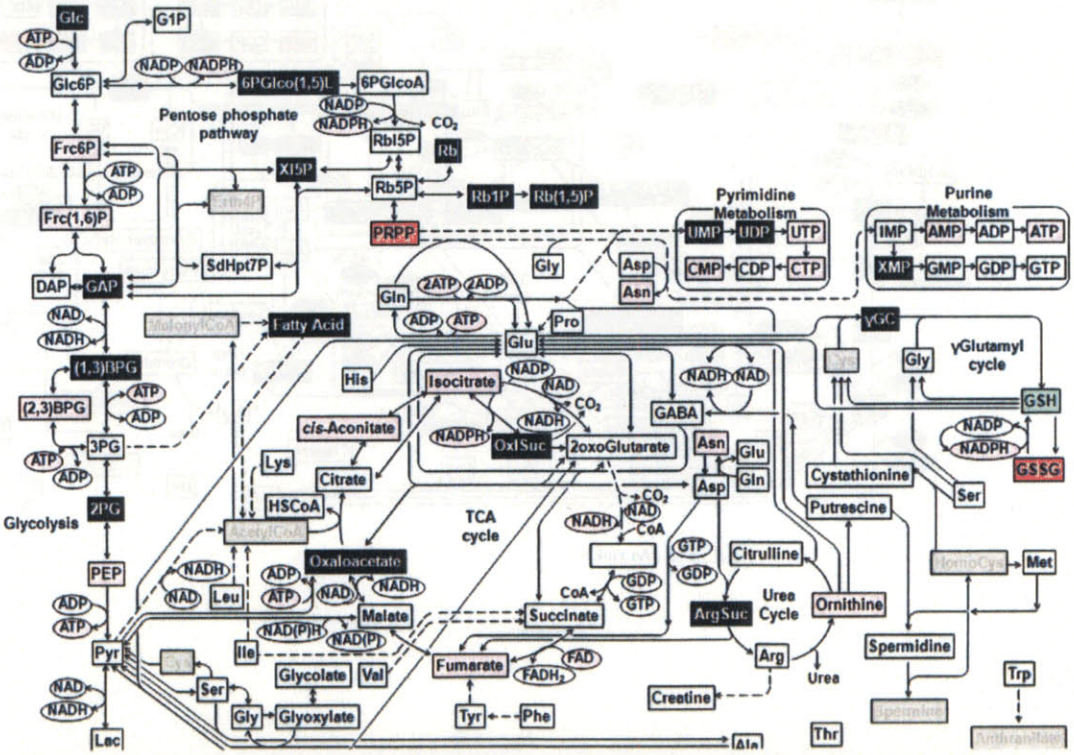
Fig. 1 異なるビタミンC濃度条件におけるHT29細胞およびMCF7細胞の生存率の変化．
縦軸は生細胞数 [%] (0 hにおける生存細胞数に対する各濃度での生存細胞数の割合)，横軸は培養時間 [h] を示す．

まず夏プロでは全代謝物質データを用い，メタボローム解析を行った．ビタミンC濃度0 mM時に対してビタミンCを添加した条件での細胞内代謝がどのように変動するかを調べた結果，最も代謝変動が激しく示されたビタミンC添加1時間後と，Fig. 1よりビタミンCに対する感受性の差がよく見られた1 mMビタミンCを添加した6時間後の細胞内の代謝マップを描画した．

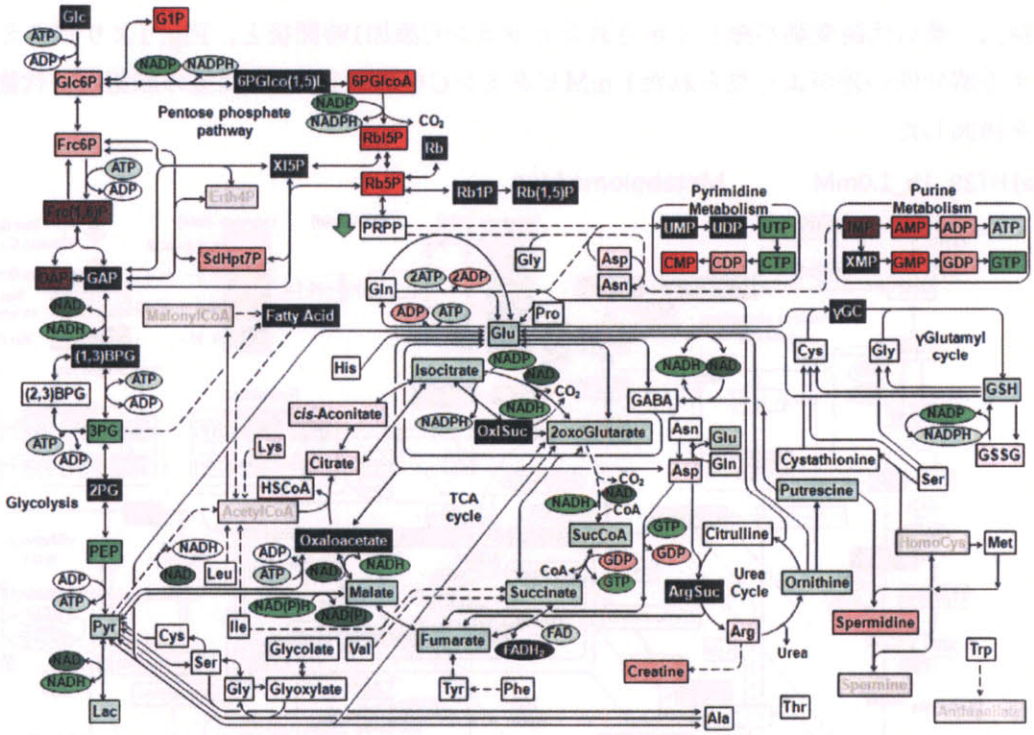
(a) HT29_1h_1.0mM



(b) HT29_6h_1.0mM



(c) MCF7_1h_1.0mM



(d)MCF7_6h_1.0mM

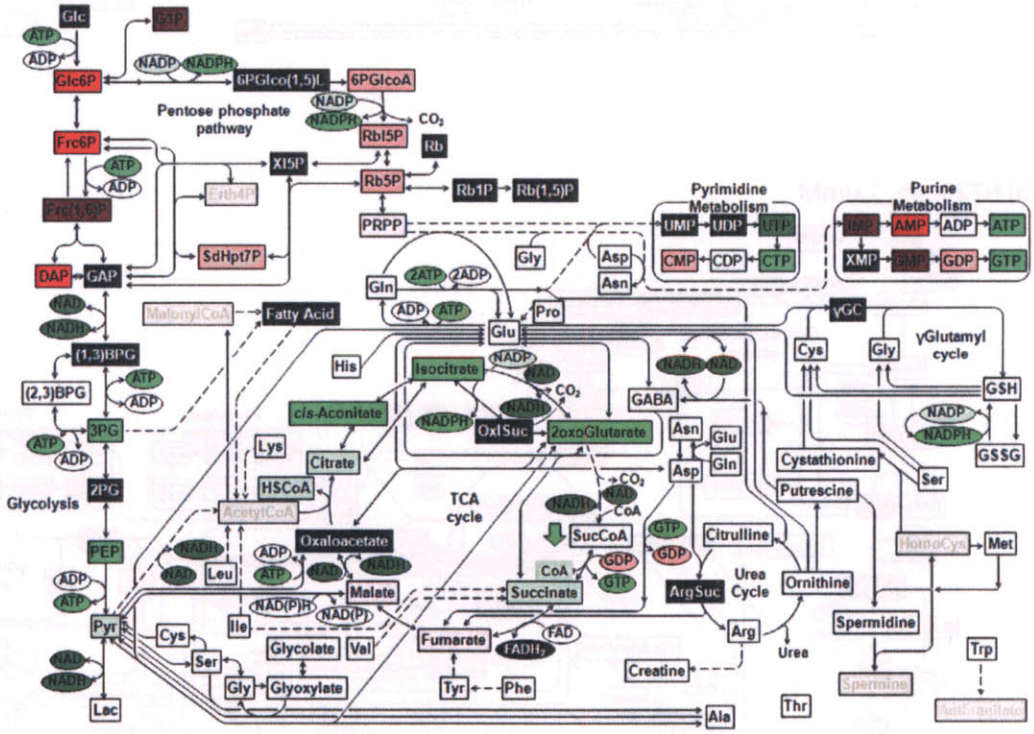


Fig. 2 主なエネルギー代謝経路上に図示した 1 mM ビタミン C 投与 1 時間後の HT29 細胞 (a)，および MCF7 細胞 (c)，同じく投与 6 時間後の HT29 細胞 (b)，および MCF7 細胞 (d) のメタボローム変化．各物質毎に，各投与時間の 0 mM 条件における定量値に対する 1 mM ビタミン C 条件における定量値の比率を算出しカラーコードに従い色付けした．

Fig. 2 より，HT29 細胞のビタミン C 濃度 1 mM 条件では，ビタミン C 投与 1 時間後，および 6 時間後ではグルタチオンの代謝変動は見られたが，それ以外の代謝経路中での変動は見られなかった．一方 MCF7 細胞ではすでにビタミン C 投与 1 時間後に解糖系上流の代謝物が増加し，下流では減少していた．さらに TCA 回路においても上流の代謝物の増加，下流の代謝物の減少が見られた．また，ATP，GTP などのヌクレオチド 3 リン酸が低下するとともに，AMP，GMP などのヌクレオチド 1 リン酸の濃度が上昇していた．

また MCF7 細胞において最も激しい代謝変動が確認された 10 mM ビタミン C 添加後 1 時間条件の代謝変動を Fig. 2 と同様のマップに載せて代謝濃度の変化に従って色づけを行った．

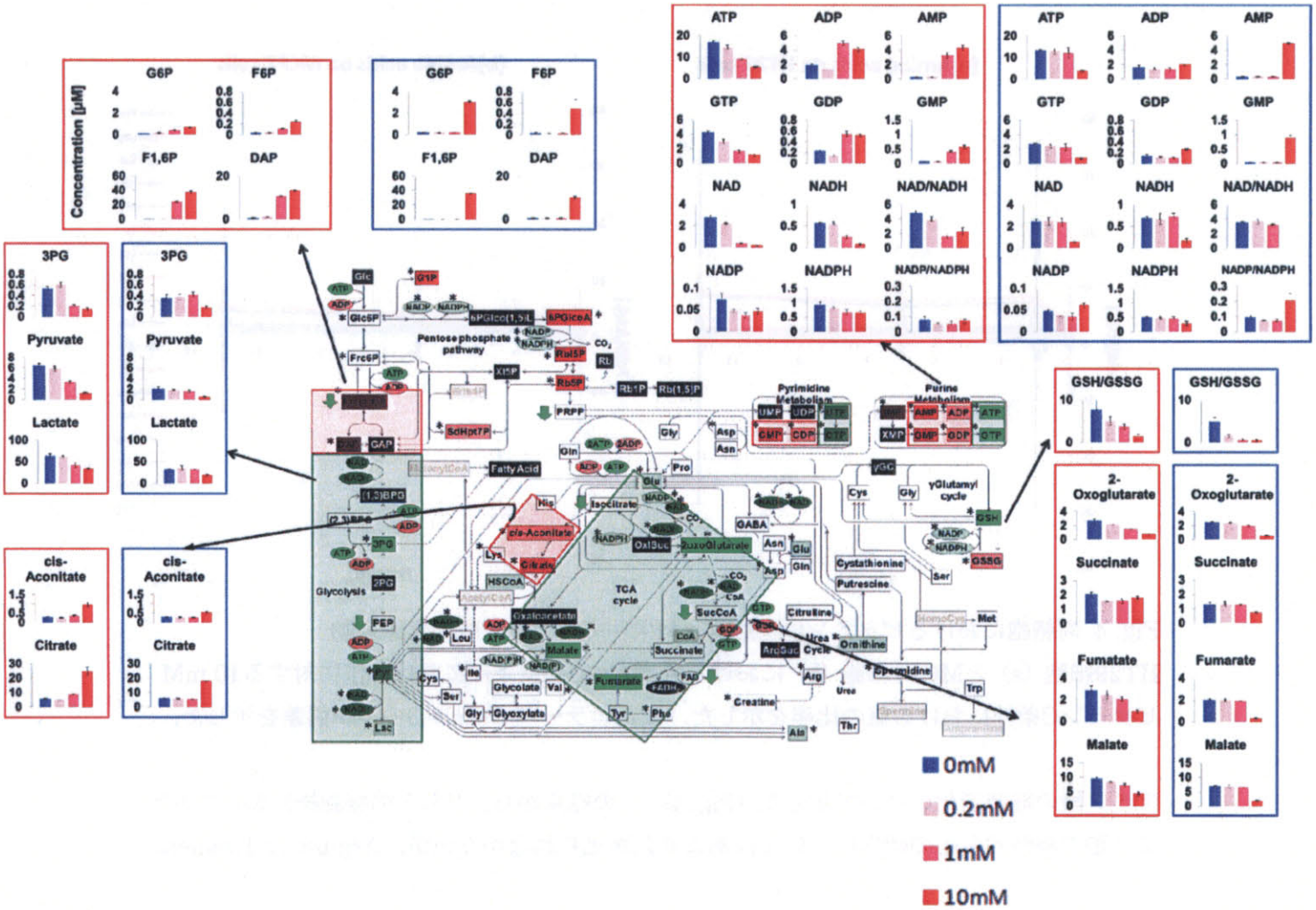


Fig. 3　10 mMビタミンC投与1時間後のMCF7細胞の濃度依存的代謝変動.
Fig. 2と同様に，各物質毎に，添加後1時間の0 mM条件における定量値に対する10 mMビタミンC条件における定量値の比率をFig. 2に描画されたカラーコードに従い色付けした．またエラーバーはn = 3の標準偏差を示し，“＊”は，0 mM条件における値に対する有意差があることを示す（$p < 0.05$）．また代謝マップの側部には0 mM条件時の定量値に対してそれぞれ顕著に差があった各物質を示した（縦軸: 単位細胞あたりの代謝物濃度[μM]，横軸: 左から順にビタミンC濃度0, 0.2, 1, 10 mM 条件，赤枠および青枠はそれぞれMCF7細胞，HT29細胞における代謝物である．）.

この結果，いずれの細胞も非毒性濃度のビタミンC条件下では大きな代謝変動は見られなかったが，一方で毒性濃度域では両細胞で類似の代謝変化が見られた．つまり，MCF7細胞では1 mMで，HT29細胞では10 mMで代謝物が変動することが分かった.

また今学期はアミノ酸について興味があり調べたかったため，アミノ酸代謝を中心に研究を進めた.

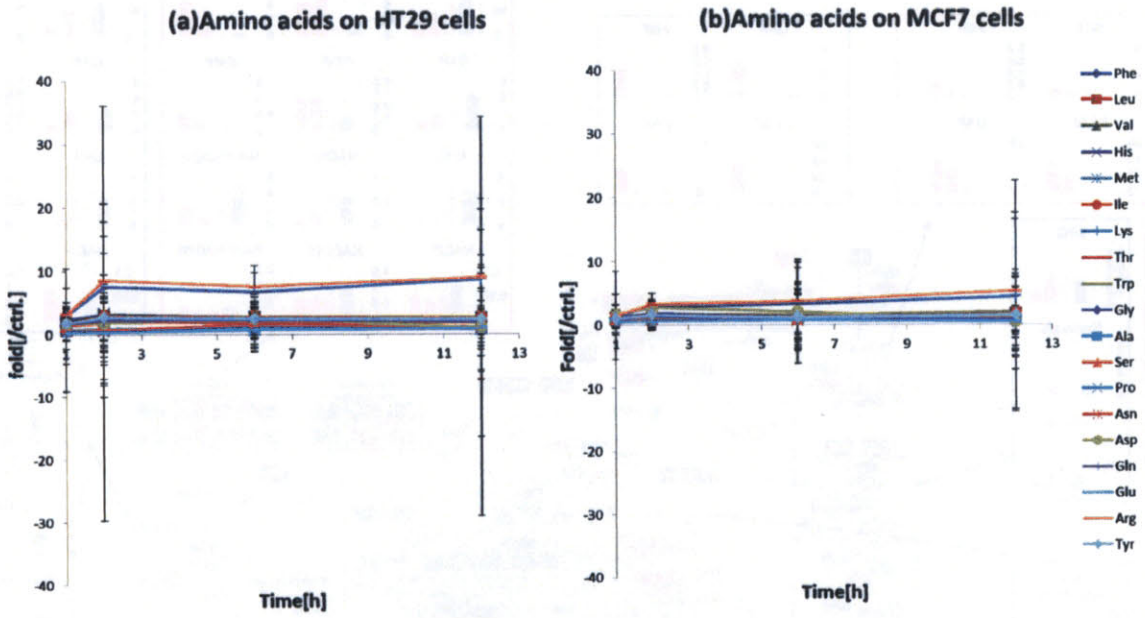
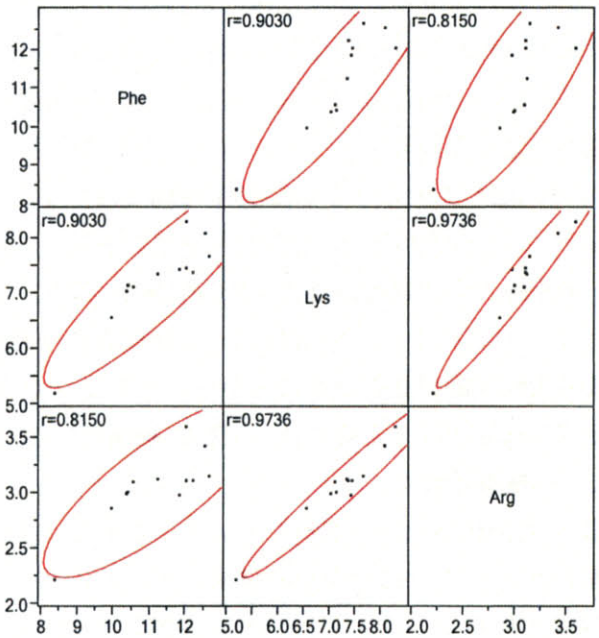


Fig. 4 両細胞におけるビタミンC濃度10 mM条件でのアミノ酸の代謝変動.
HT29細胞（a）とMCF7細胞（b）における各物質の0 mM条件における値に対する10 mMビタミンC条件における値の比率を示した．またエラーバーはn = 3の標準偏差を示した.

アミノ酸の経時変化について示した（Fig. 4）．この結果から，どちらの細胞株においてもアミノ酸の経時的変化の傾向についてはあまり差が見られなかったが，ArginineとLysineに

おいては両物質の濃度がビタミンC添加後1時間に上昇し，添加12時間後も減少することなく一定の濃度を保っていた．そこで次にArginine，Lysineと似た挙動を示す物質を調べるべく，多変量解析を行い相関がある物質をピックアップした．

(A)



(B)

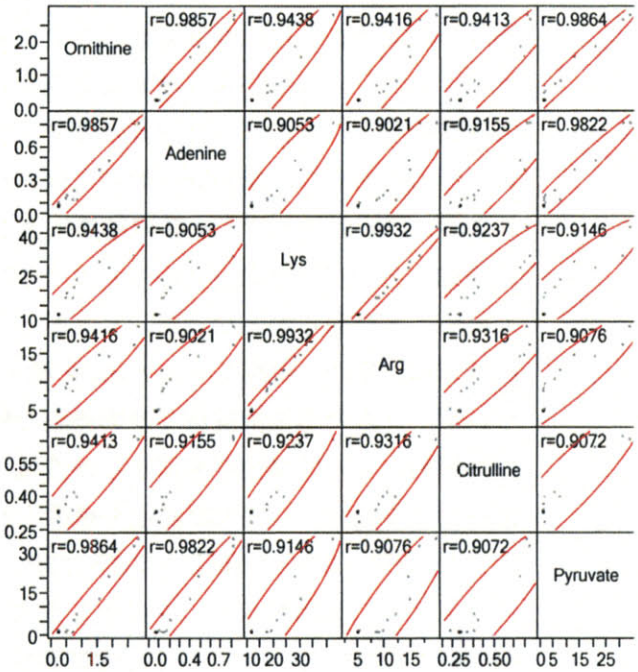


Fig. 5 MCF7細胞における多変量解析．ビタミンC濃度0 mM条件におけるLysineとArgininenと相関係数が0.90以上であった物質（A）と10 mM条件における両物質と相関係数が0.90以上であった物質（B）を示した（相関係数はグラフ内のrで示す．）．

Fig. 5より，ビタミンCを添加していない0 mM下ではLysineとArgininenと共通して相関がある代謝物はなく，Lysineと相関があったのはArginine以外ではPheだけであった．Argininenと相関があったのはLysineのみであった．また10 mM条件下では両物質と共通して相関があったのはOrnithine，Adenine，Citrulline，Pyruvateであった．

4. 考察

4.1.1 代謝変動マップを用いた感受性比較

本研究では両細胞において細胞数の差によりどのように代謝が変動したかを捉えるため，差があまり見られなかった 1 mM ビタミン C 添加 1 時間後と差が見られた 1 mM ビタミン C 投与 6 時間後のメタボロームプロファイルを比較し主なエネルギー代謝経路上にてコントロール（各時間のビタミン C 0 mM 条件の代謝物濃度）比により色付けを行い描画した（Fig. 3）. この結果より，細胞数の減少が見られなかった HT29 細胞では 1 mM ビタミン C 添加 1 時間後さらには 6 時間後においても代謝物には目立った変動は確認されなかったが，1 mM ビタミン C 添加後 6 時間で細胞生存率が約 80%に減少する MCF7 細胞では解糖系上流物質の増加，および下流物質の減少，加えて TCA 回路の上流物質の蓄積，および下流物質の停滞が見られ，細胞数の増減に伴い代謝が大きく変動しているのではないかと推察されたが，Fig. 1 および Fig. 3 の結果によると，10 mM ビタミン C 添加後 1 時間ではいずれの細胞においても細胞生存率はおよそ 100%であるにも関わらず，活発な代謝変動が起こっていることが明らかとなった．したがって，両細胞とも非毒性濃度域（MCF7 細胞では 1 mM 未満，HT29 細胞では 10 mM 未満を指す．）のビタミン C では目立った代謝変化は見られず，一方で毒性濃度域では両細胞で類似の代謝変動が見られたことから，ビタミン C は両細胞について毒性を発揮する濃度域（MCF7 細胞では 1 mM 以上，HT29 細胞では 10 mM 以上を指す．）で代謝変化を誘導することが推察された.

また ATP，ADP，AMP および GTP，GDP，GMP が大きく変動していることからミトコンドリアに支障をきたしていることが推察された．すでに生理学的濃度のアスコルビン酸は様々な病因の一つである活性酸素種が生成されるミトコンドリア内に蓄積されて，ミトコンドリアのゲノムと膜を保護することが知られている（K.C *et al.*, 2005）. しかしながら本研究結果により，薬理学的濃度のアスコルビン酸の投与ではこれらの仮説が十分に立証されず，むしろ高濃度のビタミン C を添加したことによってミトコンドリアに支障をきたした結果 ATP，GTP の減少と ADP，AMP，GDP，GMP の増加が見られたのではないかと推察される.

4.1.1 ビタミン C の及ぼすアミノ酸代謝変動

さらに本研究ではアミノ酸代謝において感受性の差による代謝変動の違いを探るべく解析を行ったところ，Fig. 4 より夏プロの結果と同様，アミノ酸においても両細胞で細胞数の変化が見られないビタミン C 添加後 1 時間ですでに Arginine や Lysine などで代謝変動が生じていることが明らかとなった．さらに両物質と相関がある物質を調べた結果，Arginine と同じ尿路回路上の代謝物質である Citrulline, Ornithine と相関がみられ，その他 Adenine や Pyruvate においても相関がみられた．この両物質は Ornithine とともに成長ホルモンの分泌を促進するアミノ酸であることが分かっており（Chromiak and Antonio., 2002），また

γ+LAT1という中性アミノ酸トランスポーターにより細胞内に取り込みが行われることが知られている（Kaneko *et al.*, 2007）．さらにLAT1はがん細胞で特に発現すると言われていることから（Kaira *et al.*, 2011），ビタミンCのがん細胞選択的に細胞毒性を与えるというメカニズムに何らかの影響を与えているのではないかと推察された．

この尿素回路上の代謝物が変動したことについて，高濃度のビタミンCを摂取することによりシュウ酸が発生し，これにより尿路結石が生じると言われており，本実験でも臨床で効果が見られる薬理学的濃度での実験であったため，この現象により尿素回路に何らかの刺激が働きビタミンCを添加していない0 mM時よりも高いArginineやOrnithine, Citrullineが検出されたと考えられる．

5. 結論

夏プロではビタミンCは感受性の異なる両細胞において非毒性領域では大きな代謝変動は見られないが，毒性濃度域ではそれぞれ類似した代謝変動を示すことが明らかとなった．さらに同様にアミノ酸でも毒性濃度域での代謝変動が明らかとなった．またアミノ酸のなかでもLysine, Arginineはその他のアミノ酸に比べ増加しており，γ + LAT1で同じく取り込まれるOrnithineとも相関がみられた．これら3物質の細胞内の代謝変動が高濃度のビタミンCががん細胞選択的に細胞毒性を与える重要な手がかりとなることが推察され，今後正常細胞と比較することによって調査を進めていきたい．

謝辞

本研究ではアドバイザーの紙健次郎氏には今期の学会の発表も含め，これまでの研究にも貴重なアドバイスを多く頂き，また統計解析処理においては飯野慧子氏や川上将人氏に多くの助言を頂いた．また北川光洋氏にはメタボローム実験では基礎から最後のデータ処理までについてもご指導して頂いた．この場を借りて感謝を申します．またこのような理想的なのびのびと研究できる環境を与えてくださった冨田勝氏にも深く感謝しております．ありがとうございました．

参考文献

・ 柳澤厚生（2007）ビタミンCががん細胞を殺す． pp35-37．角川新書

・ Chen, Q., Espey, M. G., et al. (2005) Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102, 13604-13609.

・ Chen, Q., Espey, M. G., et al. (2007) Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in

vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104, 8749-8754.

・ Chen, Q., Espey, M. G., et al. (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105, 11105-11109.

・Chromiak,J.A. and Antonio,J. (2002) Use of amino acids as growth hormone-releasing agents by athletes. *Nutrition*, 18, 657-661.

・Kaneko,S., Ando,A., et al. (2007) Ornithine transport via cationic amino acid transporter-1 is involved in ornithine cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 48, 464-471.

・KC,S., Carcamo,J.M., et al. (2005) Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. FASEB J., 19, 1657-1667.

・ Li, Y., Schellhorn, H. E., (2007) New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. J. Nutr. 137, 2171-2184.

・Kaira,K., Oriuchi,N., et al. (2011) L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) Expression in Malignant Pleural Mesothelioma. *Anticancer Res.*, 31, 4075-4082.

がん細胞におけるビタミンCが引き起こす
細胞内代謝変動

2012年4月20日　　初版発行

著者　上瀧萌

監修　先端生命科学研究会（冨田・曽我・板谷・金井・内藤・佐野）

発行　慶應義塾大学 湘南藤沢学会
〒252-0816　神奈川県藤沢市遠藤5322
TEL：0466-49-3437

Printed in Japan　　印刷・製本　　ワキプリントピア

SFC-SWP 2012-001

■本論文は研究会において優秀と認められ、出版されたものです。