

Title	メタボローム解析によるビタミンCの抗がん作用の解明
Sub Title	
Author	上瀧, 萌
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.107- 114
JaLC DOI	
Abstract	<p>近年、副作用の少ないがんの代替療法として高濃度ビタミンC点滴療法が注目を集めている。一般的に抗酸化物質として知られるビタミンCが、むしろ酸化促進作用を発揮することでがん細胞に選択的な毒性をもたらすと示唆されているが、その作用機序は未だ明らかになっていない。さらにビタミンCに対する感受性は一様ではなく、同じがん種由来でも細胞株間で顕著な差があることも確認されている。本研究では、ビタミンCの毒性作用機序をメタボロミクスの観点から解明することを目的とし、まずはビタミン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、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)による経時的なメタボローム解析を行った。結果、それぞれの細胞において細胞毒性が生じるビタミンC濃度条件では、プロファイルの変動が類似しており、加えてエネルギー生成の低下が示唆され、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。さらに、抗酸化物質をビタミンCと共添加することにより両細胞株における細胞死が顕著に回避され、ビタミンCによる毒性が緩和されたことから、ビタミンCによる細胞毒性が主にROSの発生によるものであることが示唆された。したがって、ビタミンCによる細胞毒性がエネルギー代謝に顕著な影響を与え、さらにビタミンCによる細胞毒性がROSと密接な関係をもつことを浮き彫りにした。一方、正常細胞に対するビタミンCの毒性の低さを検証すべく、まず正常細胞とがん細胞のビタミンCに対する感受性を比較したところ、4種の正常細胞のうち3種において、がん細胞に対する毒性と同程度の毒性が生じ、ビタミンCのがん細胞選択的毒性がこれまでに考えられていたよりも不完全なものであることも示唆された。今後、ビタミンCを投与した正常細胞におけるメタボロームデータとの比較解析を行うことで、高濃度ビタミンC療法の有効性を高め、さらに副作用の可能性についても洞察を深めることができると考える。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0107

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.

メタボローム解析によるビタミンCの抗がん作用の解明

慶應義塾大学 環境情報学部

上瀧 萌

要旨

近年、副作用の少ないがんの代替療法として高濃度ビタミンC点滴療法が注目を集めている。一般的に抗酸化物質として知られるビタミンCが、むしろ酸化促進作用を発揮することでがん細胞に選択的な毒性をもたらすと示唆されているが、その作用機序は未だ明らかになっていない。さらにビタミンCに対する感受性は一様ではなく、同じがん種由来でも細胞株間で顕著な差があることも確認されている。本研究では、ビタミンCの毒性作用機序をメタボロミクスの観点から解明することを目的とし、まずはビタミン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、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)による経時的なメタボローム解析を行った。結果、それぞれの細胞において細胞毒性が生じるビタミンC濃度条件では、プロファイルの変動が類似しており、加えてエネルギー生成の低下が示唆され、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。さらに、抗酸化物質をビタミンCと共添加することにより両細胞株における細胞死が顕著に回避され、ビタミンCによる毒性が緩和されたことから、ビタミンCによる細胞毒性が主にROSの発生によるものであることが示唆された。したがって、ビタミンCによる細胞毒性がエネルギー代謝に顕著な影響を与え、さらにビタミンCによる細胞毒性がROSと密接な関係をもつことを浮き彫りにした。一方、正常細胞に対するビタミンCの毒性の低さを検証すべく、まず正常細胞とがん細胞のビタミンCに対する感受性を比較したところ、4種の正常細胞のうち3種において、がん細胞に対する毒性と同程度の毒性が生じ、ビタミンCのがん細胞選択的毒性がこれまでに考えられていたよりも不完全なものであることも示唆された。今後、ビタミンCを投与した正常細胞におけるメタボロームデータとの比較解析を行うことで、高濃度ビタミンC療法の有効性を高め、さらに副作用の可能性についても洞察を深めることができると考える。

Keywords: ビタミンC, がん, メタボロミクス, 酸化促進作用

1. 背景

ビタミンC(アスコルビン酸)は抗酸化物質の一つとして知られ、酸化ストレスを発生させるスーパーオキシドラジカル(O_2^-)、ヒドロキシラジカル(OH^-)、過酸化水素(H_2O_2)などの活性酸素種(ROS)を除去するという優れた性質を持っている(Ahmad *et al.*, 2005). 一方、高濃度のビタミンCが血中に投与され酸化されると、副産物として H_2O_2 を発生させることも知られている。つまりビタミンCは抗酸化物質である反面、活性酸素を発生させる酸化促進剤(プロオキシダント)であるとも言える(Li *et al.*, 2007). 近年、このビタミンCに選択的な抗腫瘍効果が確認され、ビタミンCを大量に投与する高濃度ビタミンC点滴療法が、副作用の少ないがんの代替療法として注目されている(Hoffer *et al.*, 2008, Ohno *et al.*, 2009). 43種のがん細胞株および5種の正常細胞に対しビタミンCを添加したところ、正常細胞では20 mM以上のビタミンC濃度においても毒性が見られなかったが、がん細胞株の75%に対し10 mM以下の濃度で顕著な毒性を示した(Chen *et al.*, 2008). 血液中のビタミンCが高濃度の状態で維持されると、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(NADH)の働きでモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル(AA $^{\cdot}$)に酸化され、それに伴って放出された電子は金属タンパク質中の Fe^{3+} などを還元する(Chen *et al.*, 2005, Levine *et al.*, 2011). 続いて還元された Fe^{2+} などは O_2^- を生成する。この O_2^- は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)により H_2O_2 に変換される。この反応が血液中で起こった場合、 H_2O_2 はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素により安全な水と酸素に分解される。細胞外の間質液へも同様にビタミンCから H_2O_2 が作られ、その一部は細胞膜を透過して細胞内へ移動する(Antunes *et al.*, 2000). 正常細胞に入った H_2O_2 は血液中と同様に分解される一方、多くのがん細胞では抗酸化酵素(SODとカタラーゼ)の発現量が少ないことが知られている(Ahmad *et al.*, 2005, Oberley *et al.*, 1979). 以上のことからがん細胞では抗酸化能が低いため、高濃度のビタミンCを投与するとROSをうまく除去できず蓄積し、ミトコンドリアがダメージを受けATP産生に支障をきたし、細胞死に至るという説(Chen *et al.*, 2007)が有力であるが、ビタミンCががん細胞に対してもたまたま毒性作用の詳細なメカニズムは諸説あり(Carosio *et al.*, 2007), 未だ明確なことは分かっていない。また培養細胞レベルでは全てのがん種に一樣に効果があるわけではないことも明らかとなっており(Chen *et al.*, 2008), ビタミンCに対する感受性には細胞株間で顕著な差があり、またビタミンCによるがんの治療法は発展途上段階にある。また、ビタミンCによる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についても未だ不明な部分が多い。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、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。また、ビタミンCの酸化促進作用により発生するとされるROSによって選択的毒性が発揮されている可能性が考えられているが、これを検証する目的で、がん細胞に抗酸化物質をビタミンCと共添加することで毒性濃度域において見られた細胞死が顕著に回避されるかを調査した。更に、高濃度ビタミンCの投与による毒性が低いとされる正常細胞においてどのような代謝変動が生じているのかを確かめるための予備実験として、まず正常細胞とがん細胞のビタミンCに対する感受性を比較した。

2. 対象と手法

2.1 ビタミンC感受性株と低感受性株を用いたメタボローム解析

2.1.1 メタボローム実験に用いた対象と実験条件

がん細胞においてビタミンCに対して感受性差のある細胞株を選定するため、A431(ヒト扁平上皮癌細胞株), Panc-1(ヒト膵臓癌細胞株), HeLa(ヒト子宮頸癌細胞株), HT29, MCF7を用いて様々なビタミンC濃度条件における細胞生存率を調べた結果、ビタミンCに対して高感受性を示したMCF7と低感受性を示した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。

2.1.2 メタボローム実験手法

6穴プレートにHT29またはMCF7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。

2.1.3 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 μ MのL-methionine sulfone, MES, CSA (IS1) を含むMeOHを、1 wellに対し600 μ L添加した。その後、4°Cにて10分間静置後、400 μ Lのサンプル溶液に対し400 μ LのCHCl₃と200 μ LのMilli-Qを加え十分に攪拌し、9,000 \times g, 4°Cにて15分間遠心分離を行った後、水層360 μ LをMillipore製限外ろ過フィルターに移し、再度9,000 \times g, 4°Cにて2時間以上遠心分離を行った。その後、ろ液を40°Cで240分間遠心乾固させ、100 μ Mの3-Aminopyrrolidine, Trimesate (IS2) を含む25 μ L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。

2.1.4 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。

2.2 ビタミンCと抗酸化剤の共添加時の細胞数測定

MCF7およびHT29を 2×10^5 cells/mLで48 wellプレートにそれぞれ250 μ Lにて播種した。ビタミンCの処理濃度はそれぞれ細胞死が観察されるよう、MCF7においては0, 3, 10 mM, HT29においては0, 10, 30 mMで添加した。また、ビタミンC処理の1時間前に、ROSを無毒化することにより抗酸化剤として機能するGSH (10 mM), N-acetylcysteine (NAC; 3, 10 mM) およびPyruvate (3, 10 mM) を培地中に添加し、さらにビタミンC添加2時間後の培地交換後に同濃度で再添加した。その後、ビタミンC添加48時間後にトリパンブルー試薬により染色を行い、それぞれの条件下での細胞生存率を算出した。

2.3 正常細胞およびがん細胞におけるビタミンCに対する感受性比較

TIG-1 (ヒト胎児肺繊維芽細胞), HRE (正常ヒト腎上皮細胞), 293-T (ヒト胎児腎細胞亜種) の3種の正常細胞とMCF7, Caki-1 (ヒト腎明細癌細胞), Caki-2 (ヒト腎明細癌細胞), 769-P (ヒト腎癌細胞), 786-O (ヒト腎癌細胞), HT29の6種のがん細胞を用いて、ビタミンCに対する感受性を比較した。96 wellプレートにTIG-1 (4×10^4 cells/mL), HRE (2×10^4 cells/mL), 293-T (5×10^4 cells/mL), HMEC (10×10^4 cells/mL) の4種の正常細胞とMCF7 (4×10^4 cells/mL), Caki-1 (2×10^4 cells/mL), Caki-2 (3×10^4 cells/mL), 769-P (2×10^4 cells/mL), 786-O (1×10^4 cells/mL), HT29 (5×10^4 cells/mL) の6種のがん細胞をそれぞれ括弧内に明記した濃度にて播種した。1 wellあたり150 μ Lずつ播種し、DMEM培地にて24時間前培養を行った。次に、ビタミンC添加1時間前にDMEM培地にて培地交換を行い、その後、ビタミンCを1 well毎に10%添加し2時間曝露した。添加するビタミンC濃度は0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10 mM (HMECのみ5.0 mM条件を除く。)とし、ビタミンC添加48時間後にMTT assayにより、生細胞数を確認した。

3. 結果と考察

3.1 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

3.1.1 がん細胞におけるビタミンCに対する感受性比較

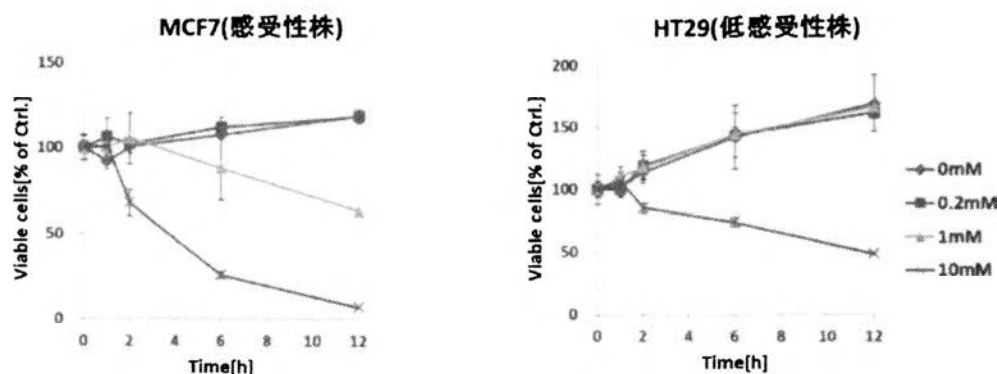


Fig. 1 異なるビタミンC濃度条件におけるHT29およびMCF7の生存率の変化。
縦軸は生細胞数 [%] (0 hにおける生存細胞数に対する各濃度での生存細胞数の割合), 横軸は培養時間 [h] を示す。

まずビタミンCに対して最も感受性に違いのある細胞を選択するために、5種のがん細胞株 (A431, Panc-1, HeLa, HT29, MCF7) におけるビタミンC濃度と細胞生存率の関係を調べた結果、MCF7が最もビタミンCに対して感受性を示し、HT29が最も低感受性を示した。よってMCF7を感受性株、HT29を低感受性株とし、様々なビタミンC濃度条件におけるこれらの細胞株の生存率の時間変化についてさらに比較を行った (Fig. 1)。

Fig. 1より、HT29とMCF7におけるビタミンC濃度と細胞生存率の関係を調べた結果、HT29では、ビタミンC濃度10 mM条件においてのみ細胞毒性が観察され、ビタミンC添加12時間後に生存細胞数が半減したのに対し、MCF7では、ビタミンC濃度1 mM条件において細胞数が半減し、さらに10 mM条件では12時間で細胞がほぼ死滅した。したがって、MCF7では1 mM以上、HT29では10 mMのビタミンC濃度でそれぞれ毒性が見られた。

3.1.2 がん細胞内におけるビタミンC添加による代謝変動マップ

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。それぞれの細胞に対し1 mM及び10 mMのビタミンCを添加した1時間後の細胞内代謝マップを描画した。

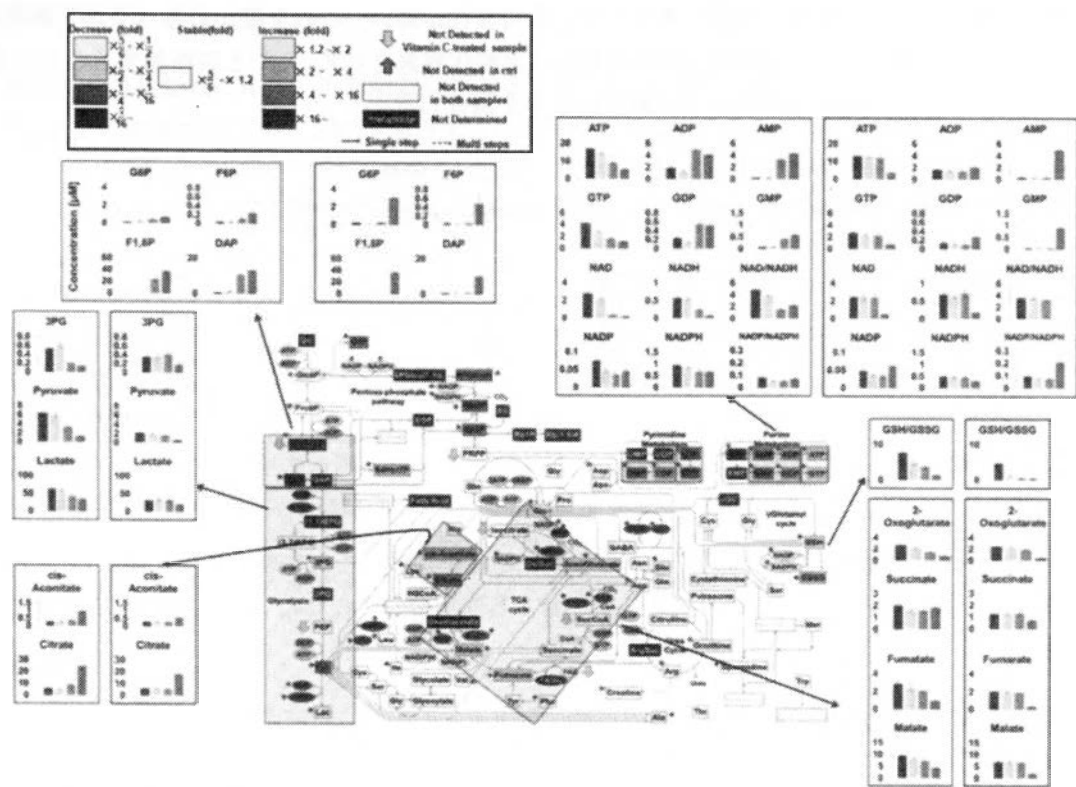


Fig. 2 10 mMビタミンC添加1時間後のMCF7の濃度依存的代謝変動。

各物質毎に、各添加時間の0 mM条件における定量値に対する各条件時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。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, HT29における代謝物である。それぞれビタミンC添加1時間後のデータを示す。)。

その結果、MCF7において毒性を発揮する1 mMのビタミンCを添加した条件時ではATPやGTPなどのヌクレオチド3リン酸の顕著な低下と共に、AMPやGMPなどのヌクレオチド1リン酸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。さらに10 mMのビタミンCを添加した条件時ではそれらの代謝物が激しく変動していることが明らかとなった (Fig. 2)。一方HT29で毒性が見られる10 mMのビタミンCを添加した条件時ではMCF7と同様の変動が見られるが、毒性が発揮されない1 mMのビタミンCを添加した条件時では目立った代謝変動は見られなかった (Fig. 2)。

またビタミンC添加1時間後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、すでに活発な代謝変動が起こっていることが明らかとなった (Fig.1, 2)。

したがって、両細胞とも非毒性濃度域 (MCF7では1 mM未満, HT29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 (MCF7では1 mM以上, HT29では10 mM以上を指す。) では両細胞で代謝プロファイルの変動が類似していたことから、ビタミンCはがん細胞において毒性を発揮する濃度域でエネルギー代謝全般に変動を及ぼし細胞死を誘導することが推察された。

3.2 ROSによる細胞死

次に、これまでの結果において、GSHおよびGSSGの比など酸化ストレスに関連する代謝が変動していたため、先行研究で示唆されている通りビタミンCの添加により生じるROSとそれを無毒化する細胞の

抗酸化機構が選択的毒性に重要な役割を果たしている可能性が高い。これを確かめるべく、これまでメタボローム解析で比較を行ったHT29とMCF7を用いて抗酸化物質をビタミンCと共添加することで毒性濃度域において見られた細胞死が顕著に回避されるかを調査した。

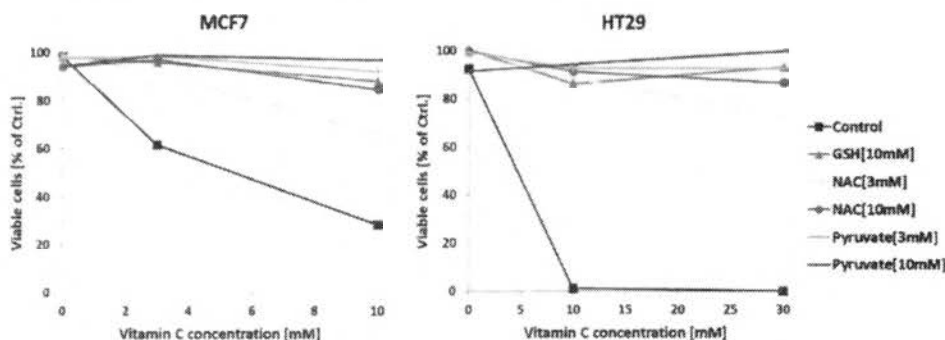


Fig. 3 異なるビタミンC濃度条件において種々の抗酸化物質を共添加し48時間培養したMCF7およびHT29の生存率。縦軸は各条件における全細胞数に対する生細胞の割合 [%]，横軸はビタミンC濃度 [mM]を示す。

その結果、GSH、NAC、Pyruvateのいずれの抗酸化物質を添加することによっても、ビタミンCの添加による細胞死が回避され、毒性が低下したことが明らかとなった (Fig. 3)。したがって、ROSの発生によってビタミンCの毒性が発揮されていることが示唆された。細胞株ごとに感受性が異なる原因として、発生するROS量の違いや、ROSを除去する能力の違いなどが考えられるが、これらについて、今後ビタミンC毒性に顕著な違いが見られた細胞株を用いて明らかにしていく必要がある。

3.3 正常細胞およびがん細胞におけるビタミンCの感受性比較

これまでの結果から、ビタミンCに対するがん細胞の感受性には顕著な差が見られることが明らかとなり、さらに感受性の異なるがん細胞株を用いたメタボローム解析結果から、毒性の生じる濃度条件では細胞内代謝変動が類似することも明らかとなった。一方、正常細胞に対するビタミンCの毒性は低いと言われてきたが、これを再確認する目的で、がん細胞と正常細胞を用いてビタミンCに対する感受性比較実験を行った。さらに、これまでの研究においてビタミンC感受性株として用いていたヒト乳がん細胞株であるMCF7と同一組織由来の正常細胞であるHMEC細胞におけるビタミンC添加時の細胞内代謝応答を調べるための予備実験として、その他の細胞種と同様にHMEC細胞のビタミンCに対する感受性を調査し比較した。

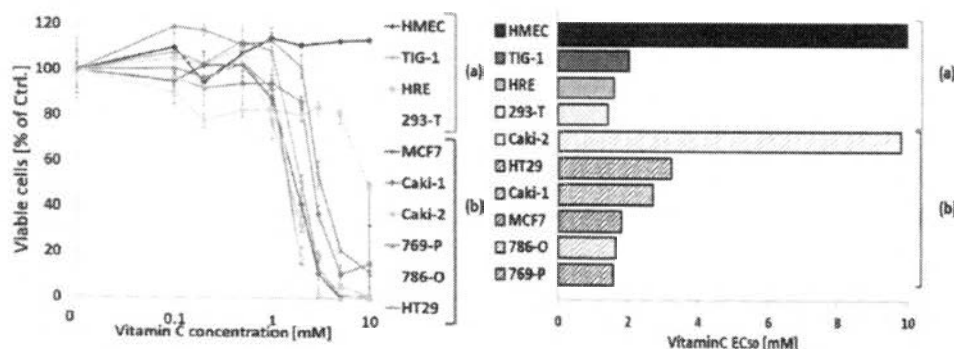


Fig. 4 異なるビタミンC濃度条件において48時間培養した正常細胞およびがん細胞の生存率 (縦軸は生細胞の割合 [%] (0 mM ビタミンC条件における生存細胞数に対する各濃度における生存細胞数の割合)，横軸はビタミンC濃度 [mM]を示す。左図)，正常細胞およびがん細胞におけるビタミンC添加時のEC₅₀の比較 (縦軸は細胞株，横軸はビタミンC添加時のEC₅₀を示す。右図)。また、(a)は正常細胞株，(b)はが

ん細胞株である。

一般的に、がん細胞に比べ、正常細胞に対するビタミンCの毒性は低いと報告されていたが(Chen *et al.*, 2008), がん細胞だけでなくHMEC以外全ての正常細胞において高濃度ビタミンCによる毒性が見られた(Fig. 4)。これまでの報告では、ビタミンC添加による毒性は正常細胞において顕著に低く、その理由としてがん細胞に比べ正常細胞では抗酸化酵素を多く含み、抗酸化能が高いことが挙げられている(Chen *et al.*, 2008)。しかしながら、本実験においてはHMECを除く全ての正常細胞において高濃度のビタミンC添加による毒性が確認されたため、ビタミンCの選択毒性が、これまでの認識よりも不完全であることが示唆された。また興味深いことにEC₅₀に着目したところ、ビタミンCに対する感受性については細胞株毎に顕著な差が見られたものの、感受性に関してがん細胞株と正常細胞との間に明確な差は確認できなかった。したがって、先行研究で示唆された(Chen *et al.*, 2008)、正常細胞全般に対するがん細胞全般のビタミンCに対する高感受性を結論づけることは難しく、ビタミンC感受性は、正常あるいはがん細胞に拘わらず、各々の細胞株が持つ毒性除去もしくは耐性機構などに依存する可能性が高い。将来的に、ビタミンCに対する耐性の高い正常あるいはがん細胞の毒性回避機構を解明しそれを調節することで、ビタミンCの及ぼすがん細胞に対する毒性の選択性の向上につながると考える。

4. 結論

ビタミンCに対し高感受性を示したMCF7および低感受性を示したHT29を用い、CE-TOFMSによる経時的なメタボローム解析を行った結果、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、加えて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。さらに、抗酸化物質をビタミンCと共に添加することにより両細胞株における細胞死が顕著に回避され、ビタミンCによる毒性が緩和されたことから、ビタミンCによる細胞毒性が主にROSの発生によるものであることが示唆された。これらの結果は、ビタミンCによる細胞毒性がエネルギー代謝に顕著な影響を与え、さらにビタミンCによる細胞毒性がROSと密接な関係をもつことを浮き彫りにした。また、これまで正常細胞に対する高濃度ビタミンCによる毒性は、がん細胞のそれに比べ顕著に低いと報告されてきたが、本研究においてはHMECを除く全ての正常細胞において、がん細胞に対する毒性と同程度の毒性が生じた。よって、ビタミンCのがん細胞選択的毒性が、これまでに考えられていたよりも不完全なものであることが示唆された。

今後、ビタミンCを投与した正常細胞におけるメタボローム比較解析を行うことで、より効果的かつ選択的な高濃度ビタミンC点滴療法の開発に貢献できると考えられる

謝辞

本研究では紙健次郎氏には今までの研究はもちろん、学会発表に対しても貴重なアドバイスを頂き、さらに本研究においても多くの時間有意義な議論を行って頂きました。また北川光洋氏にはあらゆる実験の手法に対して丁寧で細やかなご指導して頂きました。この場を借りて深く感謝を申し上げます。またこのような理想的な学びのびと研究できる環境と機会を与えて下さった富田勝氏にも心よりお礼申し上げます。

参考文献

- Ahmad, I. M., Aykin-Burns, N., et al. (2005) Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 280, 4254-4263.
- Antunes F, Cadenas E (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475, 121-126.
- Carosio, R., Zuccari, G., et al. (2007) Sodium Ascorbate induces apoptosis in neuroblastoma cell lines by interfering with iron uptake. *Molecular cancer*, 6, 1-11.
- 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.
 - Hoffer, L. J., Levine, M., et al. (2008) Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann. Oncol.*, 19, 1969-1974.
 - Levine M, Padayatty SJ, Espey MG (2011) Vitamin C: A concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Adv Nutr* 2, 78-88.
 - Li, Y., Schellhorn, H. E., (2007) New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.* 137, 2171-2184.
 - Oberley LW, Buettner GR (1979) Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res* 39, 1141-1149.
 - Ohno, S., Ohno, Y., et al. (2009) High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res.*, 29, 809-815.