

ミニレビュー

ビタミンCの抗がん剤としての有効性 —がん細胞におけるアスコルビン酸の毒性作用機序—

Effectiveness of vitamin C as an anticancer agent —a mechanism for the toxic action of ascorbic acid on cancer cells—

アスコルビン酸の酸化促進作用

アスコルビン酸(ビタミンC)は補酵素としての機能のほか抗酸化物質の一つとして知られ、スーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)、過酸化水素(H_2O_2)といった活性酸素種(ROS)を除去して、がんなど細胞障害の原因となる酸化ストレスを防ぐ優れた性質を持っている¹⁾。一方でアスコルビン酸濃度を高めると酸化促進作用を示すことも知られている。その予想されるメカニズムを図1に示す。血液中のアスコルビン酸が高濃度の状態で維持されると、NADHを補酵素とするモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼの働きでアスコルビン酸がモノデヒドロアスコルビン酸ラジカルに酸化され、それに伴って放出された電子が金属タンパク質中の Fe^{3+} などを還元する。この反応に関与する金属タンパク質は同定されていないが、そのタンパク質の大きさは10~30 kDaであると報告されている²⁾³⁾。そして、還元された Fe^{2+} などは酸素へ電子を渡して $O_2^{\cdot-}$ を生成する。この生成した $O_2^{\cdot-}$ は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)により H_2O_2 と酸素に変換される。この反応が血液中

で起こった場合、SODによって生成した H_2O_2 はカタラーゼにより安全な水と酸素に分解され、またグルタチオンペルオキシダーゼにより還元型グルタチオン(GSH)から酸化型グルタチオン(GSSG)への変化を伴って水に分解される。細胞外の間質液へも同様にアスコルビン酸から H_2O_2 がつくられ、その一部は細胞膜を透過して細胞内へ移動する⁴⁾。正常細胞に入った H_2O_2 も血液中と同様に分解されるが、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¹⁾⁵⁾。以上のことから、がん細胞では抗酸化能が低いため、高濃度のアスコルビン酸を投与すると、生成するROSをうまく除去できず蓄積すると考えられている⁶⁾。

さらに、NIHのMark Levineら⁶⁾はアスコルビン酸投与ががん細胞のATPを枯渇させることを明らかにしており、そのメカニズムとして3つの仮説を提唱している。一つ目は、アスコルビン酸の酸化により発生した H_2O_2 によってDNAが損傷し、それによりpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)が活性化する。活性化したPARPはNADを消費し、それを補うためにATPが消費されて枯渇を招く⁷⁾⁸⁾。二つ目は、 H_2O_2 除去の

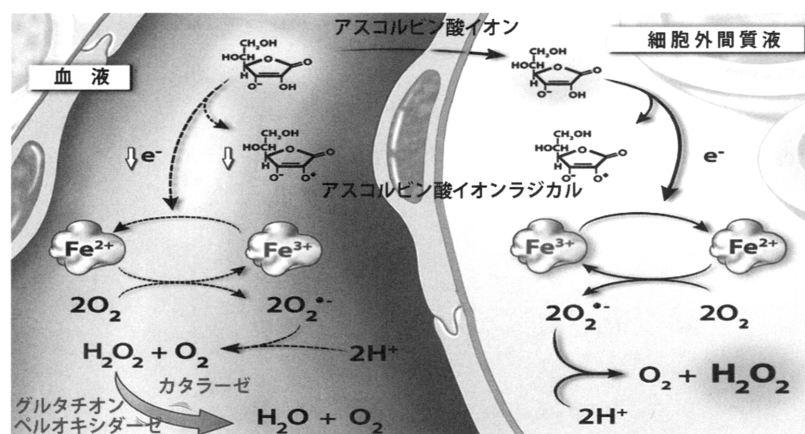


図1 高濃度アスコルビン酸の酸化促進作用のメカニズム (Chen et al., 2007 改編)

過程で生じた GSSG がグルタチオンレダクターゼにより GSH に戻るとき NADPH が多量に消費されるので、それを補うため解糖系中間体のグルコース 6-リン酸がペントースリン酸経路に流れて NADPH の生成に使われ、その結果、ATP 産生が減少する¹⁾⁹⁾⁻¹²⁾。三つ目は、H₂O₂ が直接ミトコンドリアに傷害を与え、その結果 ATP 産生が減少する¹⁾¹³⁾¹⁴⁾ (図 2)。

高濃度ビタミン C 点滴療法とは

近年、前述の研究に基づいた、アスコルビン酸を大量に投与する“高濃度ビタミン C 点滴療法”が、がん治療法の一つとして注目されている¹⁵⁾¹⁶⁾。この治療法は、米国では既に臨床試験が行われており、日本国内においても一部の診療所などで臨床として用いられている¹⁷⁾。適応可能ながん種としては、乳がん、前立腺がん、肺がん、悪性リンパ腫、肝臓がん、胃がん、腎臓がんなどが報告されており、婦人科悪性腫瘍(卵巣がん、子宮がん、子宮頸がんなど)、膵臓がん、再発悪性リンパ腫、非小細胞性肺がんなどでは化学療法と併用することで増強効果がみられ、さらに進行固形がんにおいても有効であるという臨床試験結果が得られている¹⁸⁾。一般的な治療方法としては、アスコルビン酸を点滴して効果を発揮する血中濃度(400 mg/dL 以上、健常者(約 1.2 mg/dL)の 300 倍以上に相当)へと上げていく。その後は血中のアスコルビン酸濃度をモニタリングしながらがん患者ごとに病状によって投与量や頻度を決定していく¹⁷⁾。

しかしながら、この治療法はまだ不明な点も多く発展途上の段階である。上述のメカニズム以外にも、アスコルビン酸がトランスフェリンレセプターの発現量を抑制して鉄イオン不足を導き、細胞死を誘導する¹⁹⁾といった説もあり、この治療法の詳細な作用機序は解

明されていない。さらにアスコルビン酸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が明らかとなっている²⁰⁾。著者らも 5 種のヒトがん細胞株、すなわち、扁平上皮がん細胞株(A431)、膵臓がん細胞株(Panc-1)、子宮頸がん細胞株(HeLa)、結腸がん細胞株(HT29)および乳がん細胞株(MCF7)を用いて細胞生存率を調べたところ、細胞株間で高濃度のアスコルビン酸に対し極端な感受性の違いがみられた(上瀧ら 2011 年第 34 回日本分子生物学会にて発表)。以上のことから、アスコルビン酸による抗がんメカニズムはがん種や細胞株によって異なるのかもしれない。

アスコルビン酸とがん研究の歴史

がんとアスコルビン酸の関係に最初に注目したのは、ノーベル賞を受賞した Linus Pauling と Ewan Cameron であった。彼らは、末期がん患者に対しアスコルビン酸を投与したところ、従来の化学療法を行った末期がん患者と比べ約 4.2 倍も生存期間が延長したと報告している²¹⁾。さらに 1978 年にも再度臨床試験を行い、アスコルビン酸の有効性を確認している²²⁾。

しかし、メイヨー・クリニックの Charles G. Moertel ら²³⁾は Pauling らの提唱したアスコルビン酸の抗がん作用に疑問を抱き、患者グループを二つに分け、アスコルビン酸摂取群には 10 g のアスコルビン酸を、対照群には偽薬を摂取させ、アスコルビン酸の抗がん作用を調べ、アスコルビン酸摂取群の 25%には食欲改善がみられたが、生存期間に差はみられなかったと報告した。これによって Pauling らが提唱していた仮説は否定されたが、彼らの実験方法は Pauling らの場合とは大きく異なっていた、というのは、Pauling らの患者は化学療法を受けていなかったのに対し、メイヨー・

アスコルビン酸イオン

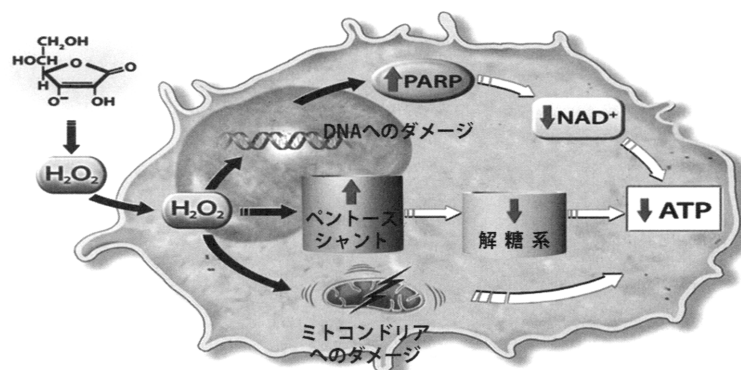


図 2 高濃度アスコルビン酸投与による選択的毒性メカニズム(仮説)(Chen et al., 2007 改編)

クリニックの患者の多くが実験前に抗がん剤による化学療法を受けていたのであった。

これ以降、Pauling らの画期的な発見は脚光を浴びることなく長期にわたり放置されていたが、2005年、Levine らによってアスコルビン酸の抗がん作用を証明する論文を発表したことで Pauling の主張が再び注目を集めることとなった²⁾。

Mark Levine らによるアスコルビン酸の毒性検証実験

Mark Levine と Michael Graham Espey らの行ったアスコルビン酸の毒性検証実験は以下の通りである。ヒト、ラット、マウスに由来する43種のがん細胞株と5種の正常細胞にアスコルビン酸を作用させたところ、正常細胞では20 mM 以上でも毒性がみられなかったが、がん細胞株の75% (33種) に対しては10 mM 以下で顕著な毒性を示した²⁰⁾。また、彼らはマウスの腹腔内に子宮がん、膵臓がん、脳腫瘍の細胞をそれぞれ移植し、高濃度のアスコルビン酸を腹腔投与したところ、アスコルビン酸投与群では12～30日後には対照群と比べて腫瘍が41～53%抑制されることを報告した²⁰⁾。

膵臓がん細胞におけるアスコルビン酸の細胞毒性

その他にも培養細胞レベルでアスコルビン酸が抗がん作用を発揮したという報告は数多くある。

5年生存率が3%以下とされ、非常に悪性度が高い膵臓がんにおいてもビタミンC療法がもたらす抗がん効果を示すべく、Joseph J. Cullen らは膵臓がん細胞をアスコルビン酸(0, 5, 10 mM)で1時間処理し、その後の生存率と増殖能を調べる実験を行った。その結果、H₂O₂の産生量はアスコルビン酸濃度と処理後の培養時間に依存し、生存率は調べた膵臓がん細胞株すべてで減少した。膵管上皮細胞にK-ras 遺伝子を発現させ癌化させた細胞株においても同様にアスコルビン酸処理により生存率の減少がみられたのに対し、K-ras 遺伝子を発現していない膵管上皮細胞株では生存率は変化せず、全くアスコルビン酸の毒性作用がみられなかった。アスコルビン酸がどのような細胞死パターンを引き起こすのかを調べた結果、ネクローシスの可能性は低く、カパーゼ非依存的なオートファジーが引き起こされることが示唆された²⁴⁾。また、ヌードマウスの側腹部へ皮下注射で膵臓腫瘍細胞を植え付け、アスコルビン酸を腹腔内へ2週間に投与したところ、腫瘍増殖が抑制され、*in vivo* レベルでもアスコルビン酸投与

によって腫瘍増殖が抑制され、生存期間が延長されることが確認された²⁴⁾。

中皮腫におけるアスコルビン酸の細胞毒性

アスベスト(石綿)の曝露が原因となって引き起こされ、現在効果的な治療がないとされる悪性中皮腫においても、ビタミンC療法が毒性効果をもたらすのか検証されている²⁵⁾。その検証実験では、4種類の中皮腫細胞株が比較的低濃度のアスコルビン酸(50～100 μM)と高濃度のアスコルビン酸(1, 10, 100 mM)含有培養液中でそれぞれ24時間と1時間培養された。その結果、程度の違いがみられるものの、どちらの条件下でもアスコルビン酸濃度依存的に細胞増殖が阻害され、細胞死が引き起こされることが明らかとなった。さらに、アスコルビン酸による細胞増殖抑制の過程でDNAの断片化やBcl-2/Bax 発現の抑制がみられることから、調べた4種類の中皮腫細胞においては、上述の膵臓がん細胞の場合とは異なり、アスコルビン酸によってアポトーシスが誘導されていることが示唆された。

以上のことは*in vivo* でも検証されており、中皮腫を移植したSCIDマウス(重症複合免疫不全マウス)にアスコルビン酸を経静脈投与した結果、腫瘍増殖の抑制が膵臓がんの場合と同様にみられた。したがって、中皮腫においてもアスコルビン酸の抗がん作用が認められる結果となった²⁵⁾。

化学療法とビタミンC療法の併用実験

高濃度ビタミンC点滴治療のメリットは、副作用が少ないことに加えて一部の化学療法と併用できることである。シスプラチン(CDDP)は化学療法として広く利用されている。CDDPはDNAを架橋して抗がん作用を示す薬剤であるが、同時にアポトーシスを誘導するp53遺伝子の発現も増強する²⁶⁾。アポトーシス経路を標的とした化学療法薬に抵抗性のある場合、ビタミンC療法が有効かどうかよく分かっていない²⁷⁾。そこで、CDDP抵抗性のヒト大腸がん細胞株を用い、CDDPとアスコルビン酸の併用がp53の発現レベルに影響を与えるか否かを調べた結果、併用した条件下ではコントロールまたはCDDP単独投与と比べて顕著にp53が活性化し、アポトーシスが誘導された。これらの結果より、アスコルビン酸はCDDP抵抗性がんにおいても抗がん作用を発揮し、CDDP感受性を増強することが示唆された²⁸⁾。

また、アスコルビン酸投与は放射線治療とも併用可能であることも実証された。ヒト白血病細胞において

も、アスコルビン酸投与単独や放射線照射単独よりも両者を併用することで細胞数が減少し、カスパーゼ-3, 8, 9の活性が上昇することが明らかとなっている²⁹⁾。

まとめ

現在日本人の3人に1人ががんで死亡している³⁰⁾という現状の中で、数多くの抗がん剤が開発されているが、未だ完治できる治療薬は登場していない。また、肉体的にも精神的にも衰弱しているがん患者にとって抗がん剤の副作用はつらいものであり、それに耐えきれずに亡くなる患者も少なくない。ビタミンCの抗がん効果は*in vitro*だけではなく、*in vivo*でも検証されているものの、有効性が十分実証されていないため、より効果的な治療法として高濃度ビタミンC点滴療法が確立される必要がある。今後さらなるアスコルビン酸の抗がん作用機序を解明することで、高濃度ビタミンC点滴療法が高い信頼に裏付けられた第一のがん治療法として普及するよう期待する。なお、ビタミンCの抗がん作用に関しては、既に本誌のトピックス欄に天野と石神³¹⁾によって紹介されている。著者らは、この紹介を踏まえ、さらなる最近の知見をもとにビタミンCの抗がん剤としての有効性についてミニレビューとしてまとめた。

(平成 24.11.2 受付)

Key Words : vitamin C, cancer, anticancer therapy, pro-oxidant, reactive oxygen species (ROS)

¹Institute for Advanced Biosciences, Keio University

²Faculty of Environment and Information Studies, Keio University

Megumi Uetaki^{1,2}, Dan Sato¹, Masaru Tomita^{1,2}

¹慶應義塾大学先端生命科学研究所

²慶應義塾大学環境情報学部

上瀧 萌^{1,2}, 佐藤 暖¹, 富田 勝^{1,2}

文 献

- Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE, Walsh SA, Higashikubo R, Buettner GR, Venkataraman S, Mackey MA, Flanagan SW, Oberley LW, Spitz DR (2005) Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem* **280**, 4254-4263.
- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M (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.
- Levine M, Padayatty SJ, Espey MG (2011) Vitamin C: A concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Adv Nutr* **2**, 78-88.
- Antunes F, Cadenas E (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* **475**, 121-126.
- Oberley LW, Buettner GR (1979) Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res* **39**, 1141-1149.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL, Buettner GR, Levine M (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.
- Lee YJ, Shacter E (1999) Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* **274**, 19792-19798.
- Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG (1986) Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* **77**, 1312-1320.
- Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG (1985) Glutathione cycle activity and pyridine nucleotide levels in oxidant-induced injury of cells. *J Clin Invest* **76**, 1131-1139.
- Brand KA, Hermfisse U (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: A protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* **11**, 388-395.
- Dang CV, Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**, 68-72.
- Kroemer G (2006) Mitochondria in cancer. *Oncogene* **25**, 4630-4632.
- Comelli M, Di Pancrazio F, Mavelli I (2003) Apoptosis is induced by decline of mitochondrial atp synthesis in erythroleukemia cells. *Free Radic Biol Med* **34**, 1190-1199.
- Nath KA, Ngo EO, Hebbel RP, Croatt AJ, Zhou B, Nutter LM (1995) Alpha-ketoacids scavenge H₂O₂ *in vitro* and *in vivo* and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *Am J Physiol* **268**, C227-236.
- Hoffer LJ, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Padayatty SJ, Rosadiuk K, Rousseau C, Robitaille L, Miller WH, Jr. (2008) Phase I clinical trial of i.v. Ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol* **19**, 1969-1974.
- Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M (2009) High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res* **29**, 809-815.
- 生田哲 (2010) ビタミンCの大量摂取がカゼを防ぎ、がんに効く。講談社、東京
- Clinicaltrials.Gov: <http://www.clinicaltrials.gov/>

- 19) Carosio R, Zuccari G, Orienti I, Mangraviti S, Montaldo PG (2007) Sodium ascorbate induces apoptosis in neuroblastoma cell lines by interfering with iron uptake. *Mol Cancer* **6**, 55.
- 20) Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M (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.
- 21) Cameron E, Pauling L (1976) Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3685-3689.
- 22) Cameron E, Pauling L (1978) Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4538-4542.
- 23) Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, Schutt AJ, O'Connell MJ, Rubin J, Frytak S (1979) Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *N Engl J Med* **301**, 687-690.
- 24) Du J, Martin SM, Levine M, Wagner BA, Buettner GR, Wang SH, Taghiyev AF, Du C, Knudson CM, Cullen JJ (2010) Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 509-520.
- 25) Takemura Y, Satoh M, Satoh K, Hamada H, Sekido Y, Kubota S (2010) High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 249-253.
- 26) Jiang M, Wang CY, Huang S, Yang T, Dong Z (2009) Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F983-993.
- 27) Millan A, Huerta S (2009) Apoptosis-inducing factor and colon cancer. *J Surg Res* **151**, 163-170.
- 28) An SH, Kang JH, Kim DH, Lee MS (2011) Vitamin c increases the apoptosis via up-regulation p53 during cisplatin treatment in human colon cancer cells. *BMB reports* **44**, 211-216.
- 29) Shinozaki K, Hosokawa Y, Hazawa M, Kashiwakura I, Okumura K, Kaku T, Nakayama E (2011) Ascorbic acid enhances radiation-induced apoptosis in an hl60 human leukemia cell line. *J Radiat Res* **52**, 229-237.
- 30) 人口動態統計(厚生労働省大臣官房統計情報部編)(2011)
- 31) 天野昌子, 石神昭人(2009) ビタミンCの抗がん作用. *ビタミン* **81**, 24-26.