

〈原著〉

生理的最適濃度のL-アスコルビン酸が単球分化に及ぼす効果

辻井 真理¹⁾、熊取 厚志^{1)*}

L-ascorbic acid at optimal physiological concentration influences monocyte differentiation

Mari Tsujii¹⁾ and Atsushi Kumatori^{1)*}

Summary L-ascorbic acid (vitamin C, AA) is considered important for cell differentiation. However, effects of AA at optimal physiological concentration (50 μ mol/L) on monocyte differentiation are not known. Here, we studied the effect of AA at this concentration on 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (VD₃)-induced monocyte differentiation of HL60 cells by focusing on the expression of a monocytic and a phagocytic marker viz., CD14 and CD11b, respectively. AA promoted the expression of CD14 but not CD11b in VD₃-induced cells. We did not detect significant concentration-dependent difference in the effects of AA on CD14 expression at 25, 50, and 100 μ mol/L. Furthermore, in the presence of TGF- β , an accelerator of monocyte differentiation in the bone marrow, AA promoted CD14 expression but not that of CD11b in VD₃-induced cells. Thus, intake of AA is recommended to maintain the optimal physiological concentration to promote CD14 expression for monocyte differentiation.

Key words: CD14, L-ascorbic acid, monocyte differentiation, optimal physiological concentration, Transforming Growth Factor- β 1

I. 緒言

L-アスコルビン酸（ビタミンC、AA）は、結合組織の主要成分として皮膚や骨、血管などに多く存在するコラーゲンの合成に必須であり、長期間重度に欠乏すると毛細血管の脆弱化により歯茎や消化管などの臓器・組織で出血傾向を示し、最終的には死に至る壊血病を引き起こす¹⁾。

また、抗酸化作用を有し、ビタミンEと共に細胞を酸化障害から保護している²⁾。さらに近年、AAはエピジェネティックな遺伝子発現調節に関わることにより、さまざまな細胞の分化制御において重要な働きを担っていることが示され注目されている^{1,3,4)}。

ヒトやサルなどの霊長類やモルモットなどAA合成酵素を持たない哺乳動物は、欠乏症を

¹⁾ 鈴鹿医療科学大学大学院 医療科学研究科
医療科学専攻

〒510-0293 三重県鈴鹿市岸岡町1001番地1
TEL : 059-383-8991

FAX : 059-383-9666

*E-mail : kumatori@suzuka-u.ac.jp

¹⁾ Graduate School of Health Science, Suzuka University
of Medical Science

1001-1, Kishioka, Suzuka-city, Mie, 510-0293, JAPAN

受付日 : 2019年9月4日

採択日 : 2019年9月25日

防ぐためにAAを食事から摂取する必要がある。壊血病は、成人では1日あたり6～12 mgのAAの摂取で回避できる^{5,6)}。しかし、心臓血管系の疾病予防効果や抗酸化作用効果を期待するためには、血漿AA濃度を50 $\mu\text{mol/L}$ に維持する必要がある⁷⁻⁸⁾。そして、日本人食事摂取基準2015年版において、この血漿濃度を維持するためにAAの推奨量を18歳以上で100 mg/日としており⁹⁾、この血漿濃度50 $\mu\text{mol/L}$ が生理的最適濃度として健康維持の基準となる。

単球は、骨髄中の造血幹細胞から骨髓系前駆細胞を経て分化し血中へ放出された後、さらに組織へ出てマクロファージへと分化する¹⁰⁾。単球・好中球前駆細胞の一つであるHL60細胞は、活性化ビタミンD₃ (1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃: VD₃)によって単球へ分化することが知られており、この系は多くの単球分化誘導実験で用いられている¹¹⁾。このVD₃による単球分化において200 $\mu\text{mol/L}$ におけるAAの効果は報告されているが¹²⁾、生理的最適濃度 (50 $\mu\text{mol/L}$)での効果は十分に明らかとなっていない。

そこで今回は、HL60細胞を用い生理的最適濃度でのAAがVD₃による単球分化に及ぼす効果を検討したので報告する。さらに、単球分化の場である骨髓微小環境から産生され、単球を含む多くの細胞の増殖・分化に関与することで知られるTransforming Growth Factor- β 1 (TGF- β)¹³⁾を共に添加することで、より生体内の分化環境に近づけた際のAAの効果も解析したので報告する。

II. 方法と材料

1. 試薬

単球分化誘導剤であるVD₃ (Cayman Chemical Company, USA) は、エタノール (99.5%)に溶かしストック溶液として10⁻³ mol/Lを作製した。単球分化促進剤であるTGF- β (PEPRO TECH, USA) は、フィルター滅菌した0.1% BSA (Bovine Serum Albumin) に溶かしストック溶液として1 $\mu\text{g/mL}$ で作製した。AA (L-ascorbic acid, 富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) は、注射用蒸留水 (大塚製薬株式会社、東京) に溶かしストック溶液として100 mmol/Lになるように作製した。

2. 細胞培養

HL60細胞 (前骨髓球性白血病細胞; RCB0041、理化学研究所) を10%非働化FBS (Thermo Fisher Scientific, USA) 加RPMI1640培地 (シグマアルドリッチ ジャパン合同会社、東京) で懸濁し、CO₂ インキューベーター (CPS-2902型、ヒラサワ株式会社) を用いて37°C・5%条件下で培養した。0.5×10⁵個/mLの細胞は、環境を整えるために一晚培養した。10⁵個の細胞を12ウェルプレートに播種し、VD₃単独もしくはTGF- β との共刺激により分化誘導を行った。試薬添加日を0日目とし3日間培養した。AAは、分化誘導・促進剤添加30分前に処理した。無刺激細胞 (None) を懸濁したウェルにVD₃を溶かしたエタノールを終濃度0.1%になるように添加したものをコントロールとした。加えたエタノール濃度では毒性を示さず分化にも影響は与えないことを確認している。

3. 細胞表面抗原の解析

HL60細胞を10⁵個含む細胞懸濁液を採取し、572×g、2分、4°Cで遠心した。上清を捨て、軽く沈殿をほぐし、FITCで標識した抗CD14抗体 (Clone: 61D3, Thermo Fisher Scientific) またはPEcy5で標識した抗CD11b抗体 (Clone: ICRF44, Thermo Fisher Scientific,) と混和したPBS溶液を加え20分間遮光し氷上に置いた。その後、フローサイトメーター (MACSQuant Analyzer, ミルテニーバイオテック) を用いてCD14抗原及びCD11b抗原の発現を解析した。

4. 統計処理

結果は、平均±標準誤差で表す。対照群との濃度比較及び経時的変化に関する有意差検定は、一元配置分散分析後、Tukey検定を用いて行った。有意水準5%未満を有意差ありとした。

III. 結果

1. VD₃による単球分化に及ぼすAAの影響の解析
25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ AA共存下におけるVD₃によるCD14抗原の発現を解析した。その結果をFig. 1に示す。VD₃単独刺激群では、CD14陽性細胞の割合が1日目は2%、2日目は10%、3日目は17%と経時的に増大した。25、50、100

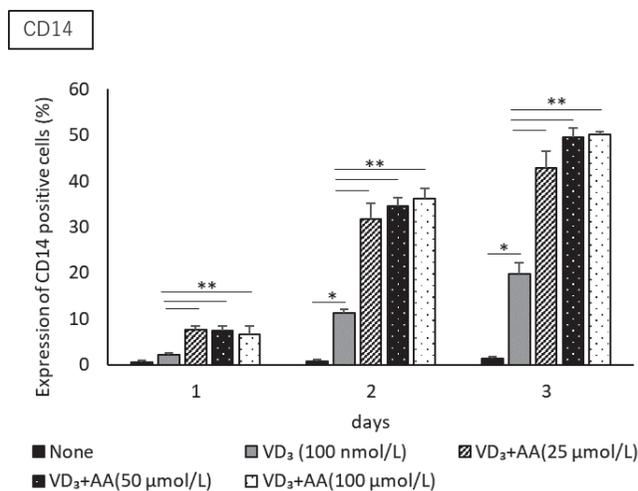


Fig. 1 Effect of L-ascorbic acid (AA) on the expression of CD14 antigen in VD₃-induced HL60 cells. HL60 cells were treated with 100 nmol/L VD₃ alone or in combination with various concentrations of AA for 3 days. The same volume of ethanol was added the control culture. The results are represented as the mean ± SEM (n=3).

* p < 0.05, relative to None, ** p < 0.05, relative to a group treated with VD₃

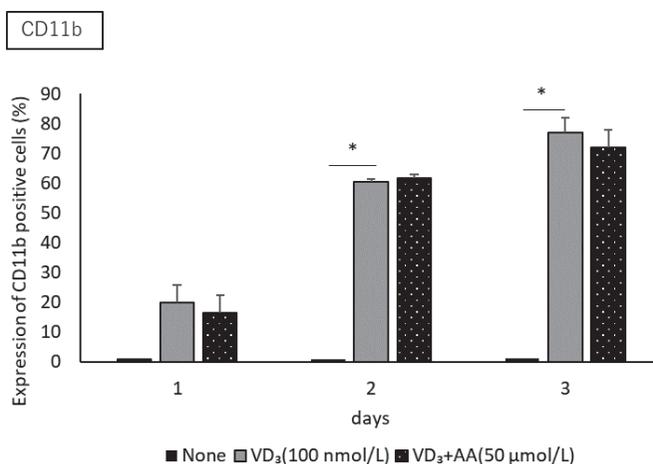


Fig. 2 Effect of AA on the expression of CD11b antigen in VD₃-induced HL60 cells.

HL60 cells were treated for 3 days with 100 nmol/L VD₃, or 50 μmol/L AA in combination with 100 nmol/L VD₃. The percentage of CD11b antigen-positive cells in the HL60 cells were determined using flow cytometry. The data are expressed as mean ± SEM (n=3), and differences between groups were analyzed with one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

* p < 0.05, relative to None

μmol/L AA添加群は、いずれにおいてもVD₃単独刺激よりも1日目から有意にCD14抗原の発現を増大し、その増加割合は25 μmol/L AA添加群で1日目3.5倍、2日目3.0倍、3日目2.3倍であった。25、50、100 μmol/L AA添加群間における有意差は認められなかった。以後、AAの濃

度は生理的最適濃度である50 μmol/Lとして解析した。

Fig. 2に示すように、VD₃単独刺激によりCD11b陽性細胞の割合が、1日目19%、2日目60%、3日目76%と経時的に増大した。この発現に対してAAは、影響を及ぼさなかった。

2. VD₃+TGF-βによる単球分化に及ぼすAAの影響の解析

Fig. 3Aで示すように、VD₃+TGF-β群では、CD14陽性細胞の割合が1日目は48%、2日目は68%、3日目は86%と継時的に増大した。AAはVD₃+TGF-βによる割合をさらに1日目1.4倍、2日目1.3倍、3日目1.1倍と有意に増大した。

一方、CD11b陽性細胞の割合は、VD₃+TGF-β群で1日目39%、2日目81%と増大し、3日目は96%の細胞がCD11b抗原を発現した (Fig. 3B)。その発現に対しAAは、3日間とも影響を及ぼさなかった (Fig. 3B)。

IV. 考察

本研究は、AAはVD₃による単球分化において食細胞共通マーカーであるCD11bの発現誘導には影響しないが、単球特異的マーカーであるCD14の発現誘導を顕著に促進することを生理的最適濃度である50 μmol/Lにおいて初めて明らかにした。この結果は、健常人が食事により100 mg/日のAAを摂取した時に維持できる95パーセントのAA血漿濃度 (86 μmol/L) の倍以上の濃度 (200 μmol/L) で行われた結果¹²⁾と傾向は一致している。この生理的最適濃度におけるAAの分化促進効果に関しては、安定型AA誘導体 (L-Ascorbic acid 2-phosphate) が、

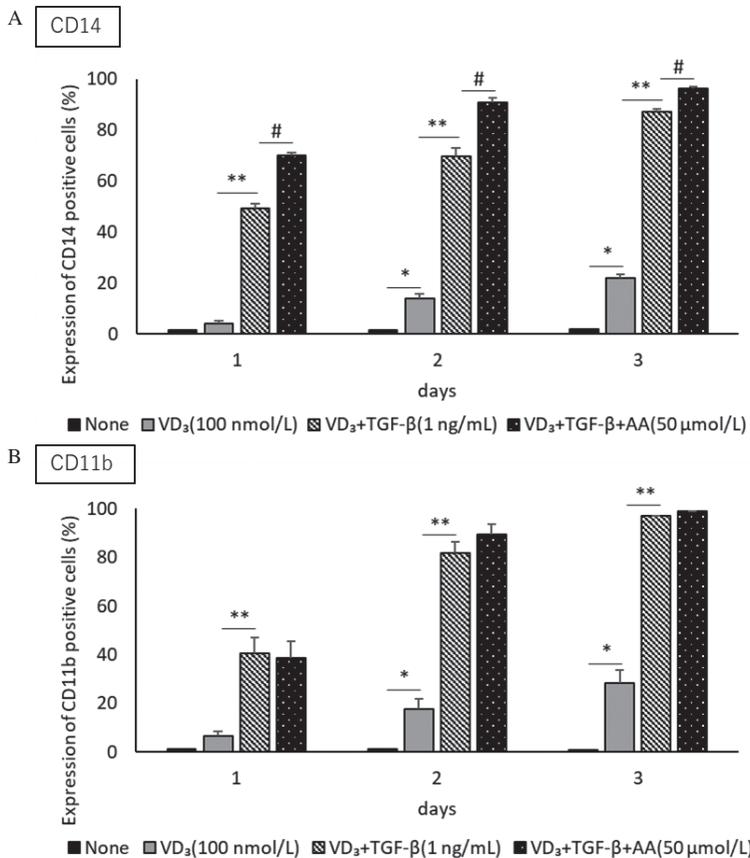


Fig. 3 Effect of AA on the expression of monocytic CD14 and CD11b antigen in VD₃+TGF-β-induced HL60 cells for 3 days.

The percentage of CD14 (A) and CD11b (B) positive cells were analyzed by MACSQuant analyzer. Data were expressed mean ± SEM (n=3).

* p < 0.05, relative to None, ** p < 0.05, relative to a group treated with VD₃, #p < 0.05, relative to a group treated with VD₃+TGF-β

3T3-L1脂肪細胞の分化を促進することが知られており¹⁴⁾、そのメカニズムとしてC/EBP β の発現促進が示唆されている¹⁴⁾。VD₃によるCD14の発現はC/EBP β の発現増大により誘導されることが報告されていることから¹⁵⁾、AAがVD₃によるC/EBP β の発現を増大することでCD14の発現を促進している可能性が考えられる。さらに、このAAのVD₃誘導性単球分化におけるCD14発現促進効果は25 μ mol/Lでも十分であることから、ヒトの潜在的なAA欠乏状態（血清濃度：11～28 μ mol/L¹⁶⁾）においても、単球分化は影響されない可能性が示唆される。

近年、AAはヒト白血病細胞においてTen-eleven translocation (Tet) 2の活性を高め、DNAの低メチル化を促進することが報告されている¹⁷⁻¹⁸⁾。VD₃による単球分化においてもAAはこのTet2の活性を増強することでCD14遺伝子発現調節部位の脱メチル化を引き起こし、VD₃を介した本遺伝子の発現を促進している可能性が考えられる。

本研究では、AAはVD₃単独時だけでなく、単球分化の場である骨髓微小環境において単球分化誘導を促進するTGF- β ¹³⁾との共存下においてもCD14の発現促進効果を示した。このことから、AAは、骨髓においてTGF- β と協調して単球形成効果をより高める環境を構築している可能性が考えられている。

VD₃の単球分化誘導能は、白血病の分化治療へ応用されようとしている¹⁹⁾。しかしVD₃は高濃度になると高カルシウム血症を引き起こす副作用がある。そのため、VD₃を副作用が引き起こされない程度の濃度に抑え、VD₃の分化誘導能を促進する自然化合物の探索が求められる²⁰⁾。本研究結果から、AAの生理的最適血漿濃度の維持は、円滑に単球分化を促進する一助になるのではないかと考えられる。しかし、CD11bに関してはAAによって促進されることはなかったため、これを補う因子の発見が必要であると考えられる。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反：なし

文献

- 1) Carr AC, Maggini S: Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, 9: E1211, 2017.
- 2) Villacorta L, Azzi A, Zingg JM: Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. *Mol Aspects Med*, 28: 507-537, 2007.
- 3) Manning J, Mitchell B, Appadurai DA, Shakya A, Pierce LJ, Wang H, Nganga V, Swanson PC, May JM, Tantin D, Spangrude GJ: Vitamin C promotes maturation of T-cells. *Antioxid Redox Signal*, 19: 2054-2067, 2013.
- 4) Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird DJ, Hirst M, Rao A, Lorincz MC, Ramalho-Santos M: Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 500: 222-226, 2013.
- 5) Grandon JH, Lund CC, Dill DB. Experimental human scurvy. *New Engl J Med*, 223: 353-369, 1940.
- 6) Hodges RE, Hood J, Canham JE, Sauberlich HE, Baker EM: Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am J Clin Nutr*, 24: 432-443, 1971.
- 7) Brubacher D, Moser U, Jordan P: Vitamin C concentrations in plasma as a function of intake: a meta-analysis. *Int J Vitam Nutr Res*, 70: 226-37, 2000.
- 8) Gey KF: Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors*, 7: 113-174, 1998.
- 9) 加藤 友昭: ビタミンC. 日本人食事摂取基準2015年版, 226-246, 第一出版, 東京 (2014)
- 10) Swirski FK, Hilgendorf I, Robbins CS: From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. *Semin Immunopathol*, 36: 134-148, 2014.
- 11) Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Shiina Y, Suda T: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 117: 86-92, 1983.
- 12) López-Lluch G, Burón MI, Alcaín FJ, Quesada JM, Navas P: Redox regulation of cAMP levels by ascorbate in 1,25-dihydroxyvitamin D3 induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem J*, 331: 21-27, 1998.
- 13) Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H: Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 147: 1146-58, 2011.

- 14) 松長 将志、河内 浩行、松井 徹：アスコルビン酸リン酸による3T3-L1脂肪前駆細胞の分化促進作用のメカニズムの検討. *Trace Nutrients Research*, 25: 61-64, 2008.
- 15) Zheng R, Wang X, Studzinski GP: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells by regulating C/EBP β expression through MEF2C. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 148: 132-137, 2015.
- 16) 筑紫 垣男; Carol S. Johnston: ビタミンC. 最新栄養学 第10版, 220-231, 建帛社, 東京 (2014)
- 17) 佐藤 安訓、石神 昭人：ビタミンCはエピジェネティクスによる制御を介して白血病の発症を防ぐ. *ビタミン*, 92: 389-393, 2018.
- 18) Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, Ng V, Xia B, Witkowski MT, Mitchell-Flack M, Grillo I, Bakogianni S, Ndiaye-Lobry D, Martin MT, Guillamot M, Banh RS, Xu M, Figueroa ME, Dickins RA, Abdel-Wahab O, Park CY, Tsirigos A, Neel BG, Aifantis I: Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*, 170: 1079-1095.e20, 2017.
- 19) Hughes PJ, Marcinkowska E, Gocek E, Studzinski GP, Brown G: Vitamin D₃-driven signals for myeloid cell differentiation--implications for differentiation therapy. *Leuk Res*, 34: 553-565, 2010.
- 20) Sak K and Everaus H: Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. *Current Genomics*, 18: 3-26, 2017.