

# 培養神経細胞における炎症性サイトカイン誘発性活性酸素 に対するビタミンCの効果

永野忠聖<sup>1\*</sup>、砂田珠里<sup>1</sup>、室橋佳澄<sup>1</sup>

ビタミンC(アスコルビン酸)は、ヒトの生体内では作ることができない必須な栄養素である。しかし、脳を含む生体内において、ビタミンCは豊富であるにも関わらず、全身に行き渡される機構については不明な点が多い。特に脳は、血液脳関門に代表されるバリア機構により、水溶性物質の通過が困難であるため、ビタミンCの輸送機構については解明が待たれている。最近、細胞横断型ビタミンC輸送体の存在が報告された。また、他臓器に比較しても高濃度に維持されているビタミンCの脳における抗酸化性に我々は着目した。我々は、炎症性サイトカイン投与による活性酸素生成に対する抗酸化剤の効果について、主に脂溶性の抗酸化物質を用いて検討をおこなってきたが、本研究においては、サイトカイン誘発性の活性酸素生成に対して、水溶性ビタミンであるL-アスコルビン酸を用いて検討をおこなった。活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)は、生理的状況下において生成され、生体防御のためにも体内でも活発に産生される。しかし、過剰な活性酸素は体内の様々な成分と反応し、細胞を傷害する。我々は、炎症シグナルによって培養神経細胞において誘発される活性酸素に対して、L-アスコルビン酸がどのような影響を与えるか検討をおこない、上皮成長因子、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6および腫瘍壊死因子- $\alpha$ が誘導するROS産生に対して、弱い、もしくは部分的な減弱効果を及ぼしたことを報告する。

**キーワード:** ビタミンC、培養神経細胞、サイトカイン

## はじめに

ビタミンC(アスコルビン酸)は、その強力な抗酸化特性により、活性酸素を中和し、生体を酸化ストレスから保護することがよく知られている。不十分なビタミンC摂取は、内因的にビタミンCを合成できないヒトにおいて、血漿ビタミンC濃度が $11\mu\text{mol/L}$ 未満で壊血病を発症する可能性がある<sup>1)</sup>。神経組織では、ビタミンCレベルの低下、またはビタミンC欠乏の長期化は、神経伝達障害のリスク増加と関連しており、脳機能の調節不全につながる<sup>2)</sup>。また、ヒトの生体内では、ビタミンCの濃度は脳において、高い濃度が維持されており<sup>3,4)</sup>、ビタミンC

欠乏により、神経障害が生じる可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。

必要な栄養素であるにもかかわらず、体内でビタミンCが組織に輸送される機構については不明な点が多い。ビタミン輸送メカニズムについては、血漿中からビタミンCを取り込む輸送体の存在は知られていたが<sup>6)</sup>、最近、細胞内横断型輸送体の存在が報告された<sup>7)</sup>。本研究室では、炎症性サイトカイン投与による、活性酸素生成および、抗酸化剤の効果について、主に脂溶性の抗酸化物質を用いて検討をしてきた<sup>8)</sup>。活性酸素種は、生理的状況下において生成され、生体防御のために体内でも活発に生成される。しかし、過剰な活性酸素は体内の様々な成分と

<sup>1</sup> 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

\* 責任著者 連絡先: [tnagano@unii.ac.jp](mailto:tnagano@unii.ac.jp)

利益相反: なし

反応し、細胞に傷害をもたらす。神経変性に対する活性酸素の影響については、それが主な原因であるのか、それとも神経変性プロセスの下流の結果なのかは、なお議論がなされている<sup>9)</sup>。サイトカイン誘発性の活性酸素生成に対するビタミンCの抗酸化性を検討するために、我々は、ROSの蛍光プローブであるジヒドロエチジウムを用いた。

## 方法

### 1. ラット胎児初代培養神経細胞の調製

ラット脳組織の採取にあたって、新潟県立大学の動物実験委員会の承認を受け、動物実験ガイドラインを遵守して行った。麻酔したSDラットより胎生17日の胎児を取り出し、氷冷したL-15メディウムをいれた滅菌シャーレ中で脳軟膜を丁寧に剥ぎ、大脳皮質を取り分けた。以下の作業からクリーンベンチに移動し、L-15メディウムで2回洗った。10%牛血清入りダルベッコ改変イーグル培地を入れ、ピペット操作で機械的に細胞を分散した。分散した神経細胞を10%牛胎児血清入りダルベッコ改変イーグル培地に400~500個毎平方ミリメートルの密度になるように希釈した。分散した大脳皮質神経細胞はあらかじめポリリジンでコートした滅菌プラスチックディッシュに播いた。CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、1時間後に再び、無血清N2添加ダルベッコ改変イーグル培地(N2サプリメント:富士フイルム和光純薬)にメディウム交換をおこなった。実験には7日間培養したものをを用いた。

### 2. 添加試薬

L-アスコルビン酸(富士フイルム和光純薬)は滅菌水に溶解して、最終濃度が10 $\mu$ M、30 $\mu$ M、100 $\mu$ Mになるように添加した。ジヒドロエチジウムはDMSOに30mMの濃度で溶解して、培養液には3 $\mu$ Mの濃度になるように添加した。各種サイトカインは、上皮成長因子(Epidermal growth factor: EGF): 20ng/mL, インターロイキン-6(Interleukin-6: IL-6): 10ng/mL, 腫瘍壊死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor: TNF- $\alpha$ ): 10ng/mLの濃度で添加した。

### 3. ジヒドロエチジウムによる活性酸素計測

CO<sub>2</sub>インキュベーターから初代培養神経細胞を取り出し、各種サイトカイン、L-アスコルビン酸、および活性酸素インジケーターであるジヒドロエチジウムを同時に添加し、再度CO<sub>2</sub>インキュベーター内に保持した。20分後、CO<sub>2</sub>インキュベーターから取り出し、リン酸緩衝液で2回洗浄してから4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液で細胞を固定した。ジヒドロエチジウムの酸化型は、赤色蛍光を発するため、蛍光顕微鏡により撮影し、画像解析をおこなった。

### 4. 顕微鏡観察

観察には蛍光顕微鏡(BX50:オリンパス)を用いた。ジヒドロエチジウムを発光させるために蛍光励起フィルターにはWIGフィルターを使用した。視野をランダムに移動させ、デジタルカメラ(Pixera600ES: Pixera)を用いて、露出時間、感度は同一にして撮影した。独立した2皿以上のカルチャーディッシュから、それぞれ2枚以上の写真を撮影した。解析に用いた細胞は撮影画像内からランダムに選択し、解析に用いた。各細胞の染色像強度は、Photoshop(アドビ社)により細胞画像を切り出し、ImageJ(U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)を用いて数値化したものをピクセル強度(a.u.: arbitrary unit)として示した。

### 5. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準偏差により示した。t検定をおこない、P値が0.05以下のときに有意とした。

## 結果

培養神経細胞を7日培養し、各種サイトカインで刺激した結果、有意にジヒドロエチジウムの染色強度が増加していた(図.1A-D、図.2A)。コントロール 8714 $\pm$ 2696 au に対して、上皮成長因子(EGF)添加 9987 $\pm$ 2605 au、インターロイキン-6(IL-6)添加 10322 $\pm$ 3020 au、腫瘍壊死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )添加 11334 $\pm$ 4492 auであった。サイトカイン添加と同時にアスコルビン酸で処理した

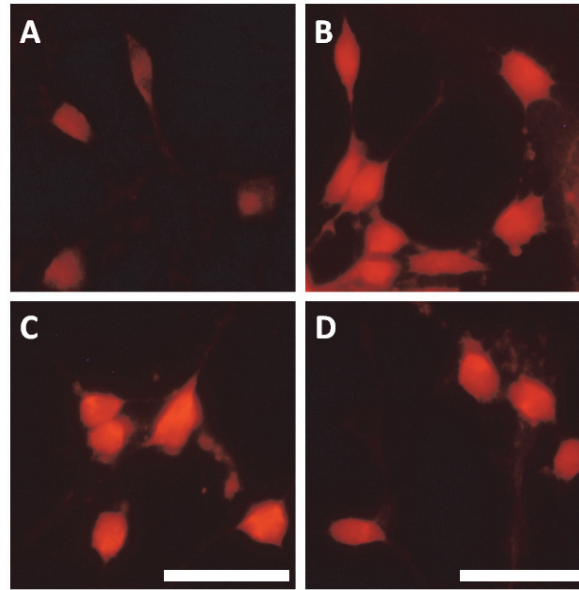


図.1 ジヒドロエチジウム染色の蛍光画像.

(A-D) 培養 7 日目の培養神経細胞.

初代培養神経細胞の培養 7 日目に各種サイトカイン、ジヒドロエチジウムおよびアスコルビン酸を添加し、染色後にホルマリン固定した. コントロール (A). 上皮成長因子(EGF)添加 (B). インターロイキン-6 (IL-6)添加 (C). 腫瘍壊死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )添加 (D). スケールバー:20 $\mu$ m. (C, D)

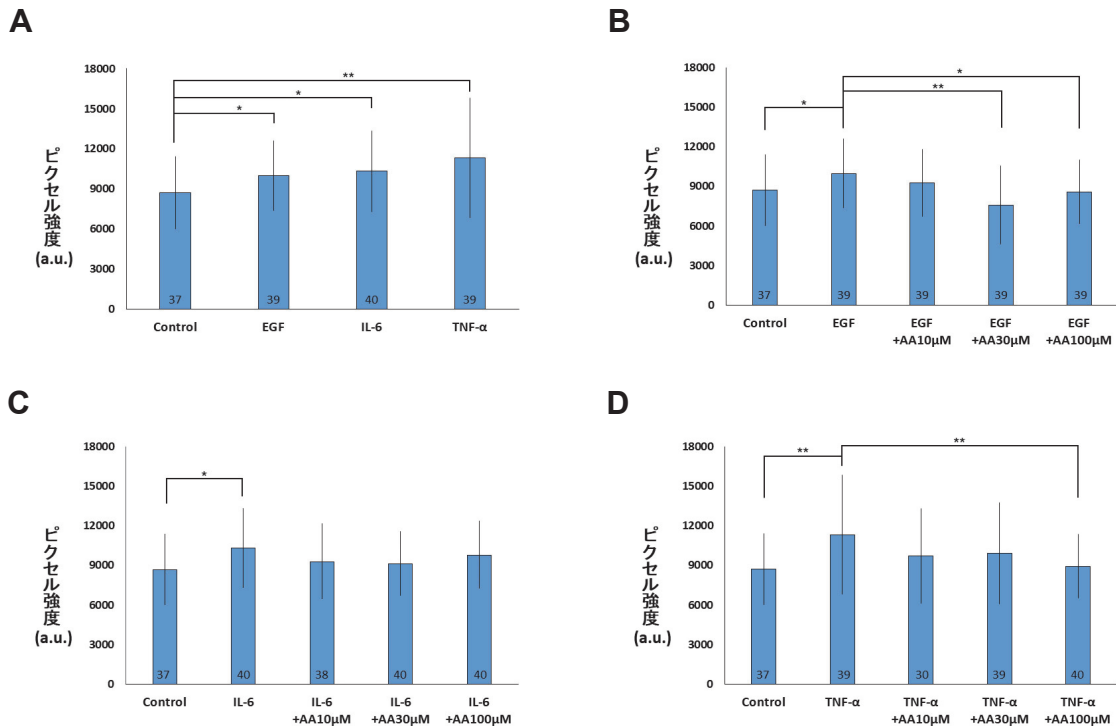


図.2 サイトカインが誘発する活性酸素生成に対する L-アスコルビン酸 (AA: ascorbic acid) の効果.

コントロールおよび各種サイトカイン添加での DHE 染色強度 (A). EGF 添加に対するアスコルビン酸の共投与の効果 (B). IL-6 添加に対するアスコルビン酸共投与の効果 (C). TNF- $\alpha$  添加に対するアスコルビン酸共投与の効果 (D). データは平均値 $\pm$ SD. 各バー内の数値は各条件で数値化に用いた細胞数. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01

際、EGF 添加群では、アスコルビン酸 30 $\mu$ M および 100 $\mu$ M 共投与により、それぞれ、EGF の単独投与に対して、約 24%、15%の有意な DHE 染色強度の減少が見られた。IL-6 添加群では、アスコルビン酸共投与による DHE 染色強度の減少傾向が見られたものの、いずれのアスコルビン酸濃度においても有意差はなかった。TNF- $\alpha$  添加群では、アスコルビン酸 100 $\mu$ M 共投与により、約 22%の DHE 染色強度の有意な減少が見られた (図.2B-D)。

## 考察

短時間の各種サイトカイン投与が、ジヒドロエチジウムの染色強度を有意に増加させていたことは、これらのサイトカインによる遺伝子転写活性への修飾が、活性酸素生成に働く可能性が示唆されるが、実際の作用メカニズムについては不明な点が多い<sup>8)</sup>。ビタミン C は脳内での濃度は高く維持されていることが知られており、脳内への輸送機構については、取り込み型輸送体の存在は知られていたが、最近、細胞内横断型輸送メカニズムが明らかとなった<sup>7)</sup>。今回、実験に用いた L-アスコルビン酸の濃度は 10~100 $\mu$ M の範囲で、ヒト生体内でのビタミン C 血漿濃度に近い<sup>4)</sup>。しかし、末梢のビタミン C 濃度が直ちに反映されるかは明らかではない<sup>10)</sup>。今回の実験から、L-アスコルビン酸が、サイトカイン誘発性の活性酸素生成に対して、部分的な抗酸化作用を有する可能性は示唆されたが、ビタミン C は遷移金属存在下においては酸化剤として機能することが知られており<sup>11)</sup>、脳内炎症に対するビタミン C の効果については、今後さらなる検討が必要である。

## 文献

- 1) Pearson JF, Pullar JM, Wilson R, et al. Vitamin C Status Correlates with Markers of Metabolic and Cognitive Health in 50-Year-Olds: Findings of the CHALICE Cohort Study. *Nutrients*. 2017; 9(8):831. doi: 10.3390/nu9080831. PMID: 28771190; PMCID: PMC5579624.
- 2) Coker SJ, Smith-Díaz CC, Dyson RM, et al. The Epigenetic Role of Vitamin C in Neurodevelopment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(3):1208. <https://doi.org/10.3390/ijms23031208>.
- 3) Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. The Pharmacokinetics of Vitamin C. *Nutrients*. 2019; 11(10):2412. <https://doi.org/10.3390/nu11102412>.
- 4) Lindblad M, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J, et al. Regulation of Vitamin C Homeostasis during Deficiency. *Nutrients*. 2013; 5(8):2860-79. <https://doi.org/10.3390/nu5082860>.
- 5) Dixit S, Bernardo A, Walker JM, et al. Vitamin C deficiency in the brain impairs cognition, increases amyloid accumulation and deposition, and oxidative stress in APP/PSEN1 and normally aging mice. *ACS Chem Neurosci*. 2015; 6(4):570-81. doi: 10.1021/cn500308h. Epub 2015 Feb 12. PMID: 25642732; PMCID: PMC4476071.
- 6) Savini I, Rossi A, Pierro C, et al. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*. 2008; 34(3):347-55. doi: 10.1007/s00726-007-0555-7. Epub 2007 Jun 1. PMID: 17541511.
- 7) Miyata H, Toyoda Y, Takada T, et al. Identification of an exporter that regulates vitamin C supply from blood to the brain. *iScience*. 2022; 25(1):103642. doi: 10.1016/j.isci.2021.103642. PMID: 35106468; PMCID: PMC8786643.
- 8) Nagano T, Mizuno M, Morita K, et al. Pathological Implications of Oxidative Stress in Patients and Animal Models with Schizophrenia: The Role of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Curr Top Behav Neurosci*. 2016; 29:429-46. doi: 10.1007/7854\_2015\_399. PMID: 26475158.
- 9) Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 2004 Jul;10; Suppl:S18-25. doi: 10.1038/nrn1434. PMID: 15298006.

- 10) Meredith ME, Harrison FE, May JM.  
Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 414(4):737-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.146.  
Epub 2011 Oct 6. PMID: 22001929; PMCID: PMC3210393.
- 11) Carr A, Frei B.  
Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1999; 13(9):1007-24. doi: 10.1096/fasebj.13.9.1007. PMID: 10336883.

## ABSTRACT

### Partial Effects of Ascorbic Acid on Cytokine-Induced Oxidation Stress in Cultured Neurons.

Tadasato Nagano<sup>1\*</sup>, Juri Sunada<sup>1</sup>, Kasumi Murohashi<sup>1</sup>

Vitamin C (ascorbic acid) is an essential nutrient that cannot be synthesized in the human body. Although vitamin C is abundant in the body, including the brain, the mechanism by which it is distributed throughout the body is not fully understood. In particular, the brain has barrier mechanisms such as the blood-brain barrier that makes it difficult for water-soluble substances to pass through blood vessel in the brain, so elucidation of the transport mechanism of vitamin C is still awaited. Recently, the existence of a traverse cellular vitamin C transporter has been reported. We therefore focused on the antioxidant effects of vitamin C in the brain, since the brain maintains a relatively high level of vitamin C compared with other organs. We have investigated the production of reactive oxygen species (ROS) by administration of inflammatory cytokines and mainly the effects of fat-soluble antioxidants. In this study, we investigated the inhibition of reactive oxygen species induced by inflammatory cytokines using L-ascorbic acid, a water-soluble vitamin. ROS are produced in physiological conditions and are also actively generated in the body for biological defense. However, excessive ROS cause damage to cellular components in the body. We investigated how L-ascorbic acid affects ROS induced in cultured neurons by inflammatory cytokines, and found that L-ascorbic had either weak or partial effects on ROS production induced by several inflammatory cytokines.

<sup>1</sup>Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Science, University of Niigata Prefecture

\* Correspondence, [tnagano@unii.ac.jp](mailto:tnagano@unii.ac.jp)

Conflict of interest: None declared

**Key Words:** reactive oxygen species, cultured neuron, ascorbic acid