



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	RAW264.7細胞におけるcalcitriol の影響に関する研究
Author(s)	笠井, 満知子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15934号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15934
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96001
Type	doctoral thesis
File Information	Machiko_Kasai.pdf



博士論文

RAW264.7 細胞における calcitriol の影響に関する 研究

令和6年3月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

笠井満知子

要旨

目的

ビタミン D は体内で骨やミネラル代謝、細胞分化、免疫の調節に影響を与えることが知られており、さらに疫学的データによりビタミン D ががんの発生率や死亡率にも関与している可能性が示唆されている。また活性型ビタミン D である calcitriol はがん細胞において分化や抗増殖作用、アポトーシスを誘導することが分かっており、これは calcitriol ががん細胞の悪性化に対して抑制的に作用することを示している。しかし反対に calcitriol ががん細胞に対して細胞死を抑制する作用があることも報告されており、細胞によって calcitriol による影響は様々であると考えられる。そこで本研究ではマウス白血病単球由来マクロファージ様細胞（RAW264.7 細胞）における calcitriol 刺激の影響および細胞死の経路を明らかにし、ビタミン D ががん治療に適用される一助となることを目的とした。

材料と方法

RAW264.7 細胞を calcitriol で刺激し、位相差顕微鏡での観察、乳酸脱水素酵素（LDH）測定および Annexin V-FITC/PI 染色により細胞死の測定を行った。また Western blot 法にてアポトーシス関連タンパク質である caspase 8 および cleaved caspase 3 の発現レベルを測定した。さらに ELISA による calcitriol 刺激

した細胞培養上清中の IL-1 β の測定や、汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK またはネクロプトーシス阻害剤である Necrostatin-1 処理後に calcitriol 刺激を行うことで細胞死の経路を検討した。

結果

calcitriol (10 μ M) で 3 時間刺激すると RAW264.7 細胞の形態が変化することが位相差顕微鏡によって観察された。また calcitriol 刺激により濃度依存的、時間依存的に細胞培養上清中の LDH が増加した。さらに Annexin V-FITC/PI 染色では calcitriol 刺激によりコントロールと比較して Annexin V および PI で染色される細胞が増加した。これらのことから calcitriol が RAW264.7 細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。また、calcitriol 刺激により caspase 8 が減少し、cleaved caspase 3 が増加した。さらに calcitriol によるこれらの変化は Z-VAD-FMK の前処理により抑制されたため、calcitriol による細胞死はアポトーシス経路の関与が示唆された。

ELISA では calcitriol による 12 時間刺激後の細胞培養上清からは IL-1 β は検出されなかったため calcitriol 刺激により RAW264.7 細胞がパイロトーシスを起こしている可能性は低いことが示唆された。Necrostatin-1 の前処理では calcitriol 刺激による細胞培養上清中の LDH の増加が抑制されなかったことから RAW264.7 細胞が calcitriol 刺激によりネクロプトーシスを起こしている可能

性も低いことが示唆された。

結論

calcitriol は RAW264.7 細胞において細胞死を引き起こし、それにはアポトーシス経路が関与していることが示唆された。calcitriol による RAW264.7 細胞の細胞死経路の一部を明らかにしたことはビタミン D を抗がん剤として適用するための一助となる可能性がある。

キーワード：RAW264.7 細胞、calcitriol、ビタミン D、細胞死、アポトーシス

1、緒言

ヒトはビタミン D を日光を浴びることで生成したり、食事やサプリメントから摂取したりすることで得る(1-3)。ビタミン D は体内で水酸化酵素により活性型の 1,25-ジヒドロキシビタミン D (1,25(OH)₂D) すなわち calcitriol に代謝される。calcitriol は、核内のビタミン D 受容体 (VDR) に結合し、レチノイド X 受容体およびそのリガンド (9 シス-レチノイン酸) とヘテロ二量体を形成する。この二量体は DNA 上の特定の結合部位 (ビタミン D 応答配列) に結合し、他の転写因子と連携してビタミン D 応答遺伝子の転写を誘導、調節することにより標的組織で生理的機能を発揮する(1,4,5)。具体的には、calcitriol は、小腸、腎臓および骨に作用して、カルシウムとリン酸のホメオスタシスを調節している(1)。また calcitriol は、炎症、分化、アポトーシス、増殖、細胞周期、血管新生などに関わる複数のシグナル伝達経路を制御することもわかっており(4,5)、したがって免疫、がんの発生や増殖に影響を与える可能性がある。

1980 年代にヒト急性骨髄性白血病細胞の HL-60 を calcitriol が分化させるということが発見され(6)、さらに calcitriol が HL-60 の貪食能力を増強し増殖を抑制することも明らかになった(7,8)。その後ほかの骨髄系細胞株も calcitriol によって増殖能力の低下や細胞の分化を示すことが明らかにされた(9-12)。このことは calcitriol ががん細胞の悪性化に対して抑制的に作用することを示して

いる。

またcalcitriolは大腸癌(13)、乳癌(14,15)、悪性黒色腫(16)などのさまざまながん細胞に対しても増殖抑制や分化誘導、抗血管新生、細胞周期の停止、アポトーシスやオートファジーの誘導などをすることが報告されている。

一方、HL-60やほかの急性骨髄性白血病細胞に対してcalcitriolが抗アポトーシス作用を示すという報告もあり(17,18)、calcitriolがアポトーシスに及ぼす影響やその機序は細胞の種類によって様々であると示唆され、明らかになっていない部分も多い。

マウス白血病単球由来マクロファージ様細胞（RAW264.7 細胞）におけるcalcitriol刺激の影響および細胞死の経路はまだ明らかにされていないことから、本研究では RAW264.7 細胞における calcitriol の影響を明らかにしビタミン D ががん治療に適用される一助となることを目的とした。

2、材料と方法

2.1 細胞株

細胞はマウス白血病単球由来マクロファージ様細胞（RAW264.7 細胞）を用いた。100U/ml のペニシリン G、100 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシン、非働化 10% ウシ胎仔血清（FBS）を添加した Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640 培地を用いて 37°C 5% CO₂ インキュベーターで培養した。

実験に用いた細胞は 6well plate に 2.0×10^6 個/well または 24well plate に 5.0×10^5 個/well で 12 時間以上培養したものを使用した。

calcitriol やほかの物質で細胞を刺激する際は FBS およびペニシリン G、硫酸ストレプトマイシンの含まれていない RPMI 1640 培地に入れ替えてから行った。

2.2 calcitriol と汎カスパーゼ阻害剤

calcitriol（富士フィルム和光製薬株式会社、大阪/Toronto Research Chemicals Inc.、カナダ）はエタノールに溶解し使用するまで -80°C で保存した。

汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK（ペプチド研究所、大阪）はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し -20°C で保存した。

calcitriol または Z-VAD-FMK により細胞を刺激する際はそれぞれエタノール

または DMSO で目的の濃度に希釈してから培地に加えて細胞を刺激した。

calcitriol 刺激のコントロールとして同濃度のエタノール、Z-VAD-FMK 処理のコントロールとして同濃度の DMSO を用いた。

2.3 位相差顕微鏡での細胞形態観察

Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理した後、calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激した細胞の形態変化を位相差顕微鏡で $\times 10$ の拡大率で観察した。

細胞の位相差顕微鏡像は DIGITAL MICROSCOPE IMAGER (CELESTRON, US) と S-Viewer V1.18.7.27 (CELESTRON) を用いて撮影した。

2.4 乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定

calcitriol による細胞死誘導活性を測定するため、Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理した後、calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激した細胞培養上清中の LDH を細胞毒性測定キット (Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST) (同仁化学研究所、熊本) を用いて、製造業者の指示に従い分光光度法によって 490nm の吸光度で測定した。また calcitriol の濃度 (1、5、10、 $50\mu\text{M}$) を変えて 3 時間刺激した細胞培養上清中の LDH、または calcitriol ($10\mu\text{M}$) で時間 (1、3、6、9、12 時間) を変えて刺激した細胞培養上清中の LDH の測定を行った。

2.5 Annexin V-FITC/PI 染色

細胞を Annexin V-fluorescein isothiocyanate(FITC)およびヨウ化プロピジウム(PI)で染色し NovoCyte® Flow Cytometer (Agilent Technologies、US) で分析することにより細胞死の種類（アポトーシス、ネクローシス）を評価した。

Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理した後、calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激した細胞を Trypsin 処理によって回収し PBS で洗浄した。MEBCYTO-Apoptosis Kit (株式会社 医学生物学研究所、長野) を用いて製造業者の指示に従い Annexin V-FITC/PI 染色を行った。続いて NovoCyte® Flow Cytometer で細胞を分析した。細胞の分布は NovoExpress Software (Agilent Technologies) により計算され、初期アポトーシス (Annexin V 陽性、PI 陰性)、後期アポトーシス/ネクローシス (Annexin V 陽性、PI 陽性)、生存 (Annexin V 陰性、PI 陰性) に分類された。

2.6 Western blotting

Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理した後、calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激した細胞をスクレーパーによって回収し PBS で洗浄した。RIPA Buffer (Cell Signaling, US) を用いて細胞からタンパク質を抽出し、Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent (Bio-RAD、US) を用いて Bradford 法によりタンパク質濃度を測定した。

SDS-PAGE により分離されたタンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。続いて PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む 0.1% Tween20 含有 トリス緩衝生理食塩水 (TBST) 中で 1 時間ブロッキングし、Can Get Signal Solution 1 (東洋紡、大阪) に希釈した 1 次抗体と室温で 2 時間反応させた。1 次抗体は anti cleaved caspase 3(Asp175)(5A1E) rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)、anti caspase 8 rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling) を 1 : 1000 の希釈率で、anti β actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich-MERCK、ドイツ) を 1 : 10000 の希釈率で用いた。洗浄後、5% スキムミルクを含む TBST 中に 2 次抗体を希釈し室温で 1 時間反応させた。2 次抗体は HRP donkey anti-rabbit IgG antibody (BioLegend、US) または HRP goat anti-mouse IgG antibody (BioLegend) を 1 : 10000 の希釈率で用いた。化学発光試薬を用いて目的のタンパク質を検出した。

2.7 IL-1 β の検出

Z-VAD-FMK (50 μ M) で 2 時間処理した後、calcitriol (10 μ M) で 12 時間刺激した細胞培養上清を回収し、ELISA MAXTM Standard SET Mouse IL-1 β (BioLegend) を用いて製造業者の指示に従って分光光度計により 450nm の吸光度で IL-1 β の濃度を測定した。

2.8 ネクロプトーシス阻害剤

ネクロプトーシス阻害剤である Necrostatin-1 (MedChemExpress、US) は DMSO に溶解されているものを、使用するまで-20°Cで保存した。

Necrostatin-1 (12.5、25.0、50.0、100.0 μ M) で 2 時間前処理し、続いて calcitriol (10 μ M) で 3 時間刺激した細胞培養上清中の LDH の測定を行った。

2.9 統計解析

実験はすべて 3 連で行われ、データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表された。データの解析は R (ver. 4.2.1) を用いて解析され、群間の差は Turkey's HSD Test によって評価された。グラフに示された有意差は以下のとおりである。

$p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

3、結果

3.1 calcitriol 刺激後の細胞形態変化

calcitriol 刺激による RAW264.7 細胞の細胞形態の変化を位相差顕微鏡により $\times 10$ の拡大率で観察した。コントロール (図 1A) と比較して calcitriol (図 1B) で刺激した細胞は形態学的な変化を示した。コントロールでは円形または細長い形の RAW264.7 細胞が calcitriol で刺激することにより辺縁が凸凹とした形となった。

一方、Z-VAD-FMK で前処理を行うと calcitriol 刺激による形態変化は抑制された (図 1C)。

calcitriol 刺激による細胞形態の変化は細胞死を示唆し、また Z-VAD-FMK でカスパーゼを阻害することによりその細胞死が抑制されることが示唆された。

3.2 calcitriol 刺激による RAW264.7 細胞上清中の LDH 量変化

RAW264.7 細胞を calcitriol で刺激した際の細胞培養上清の LDH を測定した。calcitriol 刺激は濃度依存的に細胞培養上清中の LDH 増加を誘導し、コントロールに対して $10\mu\text{M}$ および $50\mu\text{M}$ で統計的に有意な差を示した (図 2A)。また calcitriol 刺激は時間依存的に LDH 増加を誘導し、コントロールに対して 3, 6, 9, 12 時間で統計的に有意な差を認めた (図 2B)。

さらに Z-VAD-FMK で 2 時間の前処理を行うと calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激した際の LDH が有意に抑制された (図 2C)。

calcitriol は RAW264.7 細胞に対して細胞死を引き起こし、Z-VAD-FMK の前処理によりカスパーゼを阻害することで、calcitriol による細胞死誘導が抑制されることが示唆された。

3.3 calcitriol 刺激による RAW264.7 細胞の初期アポトーシス細胞、後期アポトーシス/ネクローシス細胞誘導

calcitriol で刺激した細胞を Annexin V-FITC/PI 染色しフローサイトメトリーで測定した。

コントロールと比較して RAW264.7 細胞の calcitriol 刺激により初期アポトーシス細胞と後期アポトーシス/ネクローシス細胞がともに増加した (図 3 A a, b)。また Z-VAD-FMK による前処理後に calcitriol 刺激を行うと、calcitriol 単独刺激と比較して初期アポトーシス細胞は減少し、生存細胞が増加した (図 3A b, c)。

初期アポトーシス細胞はコントロールと比較して calcitriol 単独刺激および、Z-VAD-FMK 前処理後の calcitriol 刺激の両方において有意に増加した。また calcitriol 単独刺激と比較して Z-VAD-FMK 前処理後の calcitriol 刺激では有意

に減少した（図 3B）。

後期アポトーシス/ネクローシス細胞はコントロールと比較して calcitriol 単独刺激および Z-VAD-FMK 前処理後の calcitriol 刺激で有意に増加した。また calcitriol 単独刺激に対して Z-VAD-FMK 前処理後の calcitriol 刺激ではわずかに減少したが有意差は認められなかった（図 3C）。

以上のことから calcitriol 刺激が RAW264.7 細胞においてアポトーシスを含む細胞死を引き起こし、その細胞死の一部にはカスパーゼ依存的な経路が関わっていることが示された。

3.4 calcitriol 刺激によるカスパーゼの発現変化

コントロールと比較して calcitriol 刺激により RAW264.7 細胞のアポトーシス関連タンパク質の発現は、caspase 8 が減少し、cleaved caspase 3 は増加した。calcitriol 刺激前に Z-VAD-FMK 処理を行うと、calcitriol による caspase 8 の減少と cleaved caspase 3 の増加はそれぞれ抑制された（図 4）。

したがって、calcitriol は RAW264.7 細胞においてアポトーシス経路を活性化することが示唆された。

3.5 calcitriol 刺激による RAW264.7 細胞の IL-1 β の産生誘導

calcitriol (10 μ M) で 12 時間の刺激はコントロールと比較して RAW264.7 細胞培養上清中の IL-1 β を有意に変化させなかった。また Z-VAD-FMK の前処理後の calcitriol の刺激でも IL-1 β の量は有意に変化しなかった (図 5)。

calcitriol 刺激では細胞培養上清中の IL-1 β の量が有意に変化しなかったことから、パイロトーシスを起こしている可能性は低いことが示唆された。

3.6 calcitriol 刺激による細胞死誘導に及ぼす Necrostatin-1 の影響

calcitriol(10 μ M)で 3 時間刺激した細胞培養上清中の LDH はコントロールと比較して有意に増加した。また 12.5 μ M、25.0 μ M、50 μ M、100 μ M の Necrostatin-1 での 2 時間の前処理はその後の calcitriol (10 μ M) で 3 時間の刺激による LDH の増加を抑制しなかった (図 6)。

ネクロプトーシス阻害剤である Necrostatin-1 が calcitriol による LDH の増加を抑制しなかったことから calcitriol が RAW264.7 細胞にネクロプトーシスを誘導している可能性は低いと考えられた。

4、考察

本研究では calcitriol が RAW264.7 細胞に細胞死を引き起こし、そのメカニズムにはアポトーシスが関与していることを示した。

ほかのがん細胞では calcitriol が細胞死の抑制をすることも報告されているが (17,18)、今回 RAW264.7 細胞において calcitriol が細胞死を誘導したのは細胞の種類の違いによるものと考えられた。

10 μ M の calcitriol で RAW264.7 細胞を 3 時間刺激すると、コントロールと比較して細胞形態が変化したことから細胞死が示唆された。また calcitriol 刺激後の細胞培養上清中の LDH を測定したところ、LDH の増加が認められたことから calcitriol が細胞死を誘導していることが示唆された。細胞死の経路を探索するために Annexin V-FITC/PI 染色のフローサイトメトリーを行ったところ初期アポトーシス細胞および後期アポトーシス/ネクローシス細胞が増加し、アポトーシスを含む細胞死を起こしていることが示唆された。またアポトーシス関連タンパク質を western blotting で検出したところ cleaved caspase 3 は増加し caspase 8 は減少した。

アポトーシスの経路には内因性経路と外因性経路が知られている。内因性経路は主に細胞内部の DNA の損傷による細胞内恒常性の調節障害や不均衡が引き金となりミトコンドリア外膜の透過とそれに伴うシトクロム c の放出に続い

て起こる(19)。それに対して外因性経路は細胞表面のデスレプターの活性化に続いて caspase 8 が活性化され引き起こされる(20-22)。

今回 Western blot 法により検出された cleaved caspase 3 はアポトーシス実行タンパク質であり内因性経路と外因性経路の両方で最終的に活性化される(20)。一方 caspase 8 はアポトーシスの外因性経路で活性化され、外因性経路に必須のタンパク質である(20,23,24)。cleaved caspase 3 とともに caspase 8 の発現量が増加したことから、RAW264.7 細胞において calcitriol により外因性のアポトーシスが起こっている可能性が示唆された。

caspase 8 が活性化されるとプロアポトーシスタンパク質である Bid を切断し内因性経路も活性化することができる(23)。内因性経路は Bak や Bax、Bcl-2 といったタンパク質が関係する(20)。calcitriol によるがん細胞のアポトーシスは抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 と Bcl-XL のダウンレギュレーションとプロアポトーシスタンパク質である Bax、Bak、Bad95 のアップレギュレーションによって媒介されるという報告(12,15,25,26)と、カスパーゼのアップレギュレーションによるという報告(16)があるため、今回の RAW264.7 細胞のアポトーシスにもカスパーゼだけでなく、Bax や Bcl-2 といったタンパク質も関連している可能性がある。内因性経路に関わるタンパク質の発現についてはさらなる研究が必要である。

汎カスパーゼ阻害剤の Z-VAD-FMK で前処理すると RAW264.7 細胞における calcitriol 刺激による変化は抑制された。しかし Annexin V-FITC/PI 染色のフローサイトメトリーにおいて calcitriol による初期アポトーシス細胞と後期アポトーシス/ネクローシス細胞の増加は Z-VAD-FMK による前処理では完全には抑制されなかったこと、また calcitriol 刺激で初期アポトーシス細胞だけでなく後期アポトーシス/ネクローシス細胞も増加することから、アポトーシス以外の細胞死が起こっている可能性も考えられた。

アポトーシス以外の細胞死の一つとしてパイロトーシスが誘導されている可能性を考え、calcitriol 刺激後の細胞培養上清中の IL-1 β を測定した。パイロトーシスは炎症に関連するインフラマソームの活性化を介在し IL-1 β 放出を伴う細胞溶解型の制御された細胞死として知られている(19)。calcitriol 刺激細胞の培養上清中では IL-1 β の量が有意に増加しなかったことからパイロトーシスを起こしている可能性は低いことが示唆された。

またネクロプトーシス阻害剤の Necrostatin-1 を用いてネクロプトーシスによる細胞死が阻害されるかを、細胞培養上清中の LDH を測定することにより確認した。ネクロプトーシスは細胞の膨張や破裂といった壊死の形態をとるが、receptor-interacting serine-threonine kinase 1(RIPK1)、RIPK 3、mixed lineage kinase domain-like protein が関与し、決められたシグナル経路をたどる制御さ

れた細胞死の一つとして知られている(19,27)。Necrostatin-1 は RIPK1 活性を阻害することによってネクロプトーシスを阻害することが知られており(28)、本研究において Necrostatin-1 は calcitriol 刺激による LDH の増加を抑制しなかったことから RIPK1 が関与するネクロプトーシスを起こしている可能性は低いことが示唆された。

しかしアポトーシスとネクロプトーシスは相互に関連して起こっていることがあり(19)、詳しいネクロプトーシスの経路についてはさらなる研究の必要がある。

以前より疫学的なデータからビタミン D ががんの発生、進行に関与している可能性があることが示唆されてきた。Apperly は 1941 年、北米における、北部で高く、南部で低いという総がん死亡率が、緯度の違いによる日射量の差と相関していることを初めて示唆した(29)。日本では溝上が 2004 年、日射量と消化器官のがんの死亡率に逆相関があることを報告している(30)。多くの疫学的研究が様々ながんに対する日光とビタミン D の抑制効果を裏付けている(4,31–35)。

また Giovannucci らは 2006 年、血清 25(OH)D 値の推定方法を開発し、血清 25(OH)D の 25 nmol/L の増加は、総がん発生率の 17% 減少、死亡率の 29% 減少、消化器系がんの発生率の 43% の減少および死亡率の 45% の減少に関連していたことを報告した(36)。

他にも血清ビタミン D 濃度と、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、肺癌、大腸癌、
卵巣癌、腎臓癌、食道癌、胃癌、非ホジキンリンパ腫などいくつかのがんの発生
率と死亡率の間に関連があることが確認されており(4,31,35,37,38)、血清ビタミン
D 濃度が高いほどがんのリスクが低いという仮説が支持されている。

上記のようにビタミン D ががんに対して抑制的に働くという報告は多くある
が、calcitriol を抗がん剤として直接使用することは高カルシウム血症などの副
作用のために未だ実用化には至っていない。しかしビタミン D を用いた臨床試
験はいくつかのがんに対して行われている(39-41)。また臨床試験は急性骨髄性
白血病に対しても行われており、ヒトに対する試験ではほかの化学療法剤との
組み合わせで有益な反応を示したという報告がある(42)。さらに高カルシウム
血症を起こさないようなビタミン D の類似体も開発されており(7,25,43,44)、今
後のがん治療にビタミン D が適用される可能性を示唆している。本研究におい
て calcitriol による RAW264.7 細胞の細胞死経路の一部を明らかにしたことはビ
タミン D を抗がん剤として適用するための一助となる可能性がある。

5、結論

本研究では calcitriol の刺激が RAW264.7 細胞のアポトーシスを誘導することを示した。calcitriol による RAW264.7 細胞の細胞死経路の一部を明らかにしたことはビタミン D を抗がん剤として適用するための一助となる可能性がある。

謝辞

本研究を遂行し、論文を執筆するにあたり多大なるご指導をいただきました、北海道大学口腔分子微生物学教室 長谷部 晃教授に深く感謝いたします。また本研究にご協力いただきました口腔分子微生物学教室 教室員各位並びに歯科矯正学教室 佐藤 嘉晃教授をはじめ教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. Vol. 12, *Nutrients*.2020. 1–28.
2. Holick MF. Vitamin D Deficiency. Vol. 357, *N Engl J Med*. 2007. 266-81.
3. Charoenngam N, Shirvani A, Holick MF. Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. Vol. 10, *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*.2019.1082-93.
4. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. Vol. 3, *Frontiers in Endocrinology*. 2012.1-13.
5. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: Considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. Vol. 16, *Cancer Journal*. 2010.1–9.
6. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, NISHII Y, et al. 1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). Vol. 204, *Biochem.J*.1982.713-9.
7. Nakagawa K, Kurobe M, Konno K, Fujishima T, Takayama H, Okano T. Structure-Specific Control of Differentiation and Apoptosis of

Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) Cells by A-ring Diastereomers of 2-Methyl-1,25-dihydroxyvitamin D₃ and Its 20-Epimer. Vol.60, Biochem Pharmacol. 2000.1937–47.

8. Miyaura C, Abe E, Kuribayashi T, Tanaka H, Konno K, Nishii Y, et al.

1 α , 25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ INDUCES DIFFERENTIATION OF HUMAN MYELOID LEUKEMIA CELLS.

Vol. 102, Biochemical and Biophysical Research Communications.1981.937-43.

9. Frankenberger M, Hofmann B, Emmerich B, Nerl C, Schwendener

RA, Ziegler-Heitbrock HWL. Liposomal 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ compounds block proliferation and induce differentiation in myelomonocytic leukaemia cells. Vol.98, Br J Haematol. 1997.186–94.

10. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, et

al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α , 25-dihydroxyvitamin' D₃. Vol. 78, Cell Biology. 1981.4990-8.

11. James SY, Williams MA, Newland AC, Colston KW. Leukemia Cell

Differentiation: Cellular and Molecular Interactions of Retinoids and Vitamin D.Vol.32, Gen Pharmac. 1999. 143–54.

12. Kizildag S, Ates H, Kizildag S. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. Vol.89, Ann Hematol. 2010.1–7.
13. Pálmer HG, Sánchez-Carbayo M, Ordóñez-Morán P, Jesús Larriba M, Cerdón-Cardó C, Muñoz A. Genetic Signatures of Differentiation Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Human Colon Cancer Cells.Vol.63, CANCER RESEARCH.2003.7799-806.
14. Welsh JE. Vitamin D and breast cancer: Past and present. Vol. 177, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2018.15–20.
15. Narvaez CJ, Welsh JE. Role of Mitochondria and Caspases in Vitamin D-mediated Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. receptor-interacting serine-threonine kinase 1ol.276, Journal of Biological Chemistry. 2001.9101–7.
16. Sutedja EK, Amarassaphira D, Goenawan H, Susanti Pratiwi Y, Sylviana N, Setiabudiawan B, et al. Calcitriol Inhibits Proliferation and Potentially Induces Apoptosis in B16-F10 Cells.Vol.28, Med Sci Monit Basic Res. 2022.e935139.

17. Wang X, Studzinski GP. Antiapoptotic Action of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is Associated with Increased Mitochondrial MCL-1 and RAF-1 Proteins and Reduced Release of Cytochrome c. Vol. 235, EXPERIMENTAL CELL RESEARCH. 1997.210-7.
18. Antony R, Sheng X, Ehsanipour EA, Ng E, Pramanik R, Klemm L, et al. Vitamin D protects acute lymphoblastic leukemia cells from dexamethasone. Vol.36, Leuk Res. 2012.591-3.
19. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. Vol. 18, Cellular and Molecular Immunology. 2021.1106-21.
20. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? Vol. 28, Trends in Cell Biology. 2018. 475-93.
21. Nagata S. FAS LIGAND-INDUCED APOPTOSIS. Vol.33, Annu.REV.Genet.1999.29-55.
22. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. Vol. 66, Cell. 1991. 233-43.

23. Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. Vol.45, Cell Prolif. 2012.217–24.
24. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. Vol.8, Current Biology.1998.1001-8.
25. Darío Díaz G, Paraskeva C, Thomas MG, Binderup L, Hague A. Apoptosis Is Induced by the Active Metabolite of Vitamin D 3 and Its Analogue EB1089 in Colorectal Adenoma and Carcinoma Cells: Possible Implications for Prevention and Therapy. Vol. 60, CANCER RESEARCH. 2000.2304-12.
26. Flynn G, Chung I, Yu WD, Romano M, Modzelewski RA, Johnson CS, et al. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) selectively inhibits proliferation of freshly isolated tumor-derived endothelial cells and induces apoptosis. Vol.70, Oncology. 2007.447–57.
27. Cao L, Mu W. Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. Vol. 163, Pharmacological Research. 2021.105297.

28. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. Vol.4, Nat Chem Biol. 2008.313–21.
29. Apperly FL. The Relation of Solar Radiation to Cancer Mortality in North America. Vol.1, Cancer Res.1941.191-5.
30. Mizoue T. ECOLOGICAL STUDY OF SOLAR RADIATION AND CANCER MORTALITY IN JAPAN. Vol.87, Health Phys.2004. 532-8.
31. Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Liu Z, Qin H. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: A systematic review of prospective studies. Vol.29, Journal of Clinical Oncology. 2011.3775–82.
32. Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. Geographic Variation in Breast Cancer Mortality in the United States: A Hypothesis Involving Exposure to Solar Radiation. Vol. 19, PREVENTIVE MEDICINE. 1990. 614-22.
33. Grant WB. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation. Vol.94, Cancer.

2002.1867–75.

34. Grant WB, Garland CF. The Association of Solar Ultraviolet B (UVB) with Reducing Risk of Cancer: Multifactorial Ecologic Analysis of Geographic Variation in Age-adjusted Cancer Mortality Rates.Vol.26, ANTICANCER RESEARCH.2006.2687-700.
35. Porojnicu AC, Robsahm TE, Dahlback A, Berg JP, Christiani D, Bruland ØS, et al. Seasonal and geographical variations in lung cancer prognosis in Norway. Does Vitamin D from the sun play a role? Vol.55, Lung Cancer. 2007.263–70.
36. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men.Vol.98, J Natl Cancer Inst. 2006.451–9.
37. Wu K, Feskanich D, Fuchs CS, Willett WC, Hollis BW, Giovannucci EL. A nested case-control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer.Vol.99, J Natl Cancer Inst. 2007.1120–9.
38. Arayici ME, Basbinar Y, Ellidokuz H. Vitamin D Intake, Serum 25-

Hydroxyvitamin-D (25(OH)D) Levels, and Cancer Risk: A Comprehensive Meta-Meta-Analysis Including Meta-Analyses of Randomized Controlled Trials and Observational Epidemiological Studies.Vol.15, Nutrients. 2023.2722.

39. Fakih MG, Trump DL, Muindi JR, Black JD, Bernardi RJ, Creaven PJ, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors.Vol.13, Clinical Cancer Research. 2007.1216–23.
40. Beer TM, Lemmon D, Lowe BA, Henner WD. High-dose weekly oral calcitriol in patients with a rising PSA after prostatectomy or radiation for prostate carcinoma.Vol.97, Cancer. 2003.1217–24.
41. Lathers DMR, Clark JI, Achille NJ, Rita M, Young I. Phase IB Study of 25-Hydroxyvitamin D₃ Treatment to Diminish Suppressor Cells in Head and Neck Cancer Patients. Vol. 62, Human Immunology. 2001.1282-93.
42. Slapak CA, Desforges JF, Fogaren T, Miller KB. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low - dose cytarabine,

hydroxyurea, and calcitriol.Vol.41, Am J Hematol. 1992.178–83.

43. Asou H, Koike M, Elstner E, Cambell M, Le J, Uskokovic MR, et al.

9-nor Vitamin-D Analogs: A New Class of Potent Inhibitors of Proliferation and Inducers of Differentiation of Human Myeloid Leukemia Cell Lines.Vol.92, Blood.1998.2441-9.

44. Hisatake JI, O'Kelly J, Uskokovic MR, Tomoyasu S, Koeffler HP.

Novel vitamin D₃ analog, 21-(3-methyl-3-hydroxy-butyl)-19-nor D₃, that modulates cell growth, differentiation, apoptosis, cell cycle, and induction of PTEN in leukemic cells.Vol.97, Blood.2001.2427-33.

図の説明

図1 calcitriol 刺激による RAW264.7 細胞の細胞形態の変化(位相差顕微鏡像)

- (A) コントロール (DMSO で 2 時間処理後エタノールで 3 時間処理)。
- (B) DMSO で 2 時間処理後、calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激。
- (C) Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理後の calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激。

図2 calcitriol 刺激による RAW264.7 細胞培養上清中の LDH の測定

- (A) calcitriol (0, 1, 5, 10, $50\mu\text{M}$) で 3 時間刺激。
- (B) calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 1, 3, 6, 9, 12 時間刺激。コントロールはエタノールで 12 時間処理。
- (C) Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理後、calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激。

図3 フローサイトメトリーによる Annexin V-FITC/PI 染色された RAW264.7

細胞の解析

(A) (a)コントロール (DMSO で 2 時間処理後エタノールで 3 時間処理)。

(b)DMSO で 2 時間処理後 calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激。

(c) Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時間処理後、calcitriol ($10\mu\text{M}$)

で 3 時間刺激

結果は 3 回の独立した実験の代表。

(B) フローサイトメトリーにより測定された初期アポトーシス細胞 (Annexin

V 陽性/PI 陰性) の割合

(C) フローサイトメトリーにより測定された後期アポトーシス/ネクローシ

ス細胞 (Annexin V 陽性/PI 陽性) の割合

図4 calcitriol 刺激した RAW264.7 細胞におけるカスパーゼの発現

コントロール (DMSO で 2 時間処理後エタノールで 3 時間処理)、DMSO で

2 時間処理後 calcitriol ($10\mu\text{M}$) で 3 時間刺激、Z-VAD-FMK ($50\mu\text{M}$) で 2 時

間処理後 $10\mu\text{M}$ の calcitriol で 3 時間刺激。

結果は 3 回の独立した実験の代表。

図5 calcitriol 刺激した RAW264.7 細胞培養上清中の IL-1 β 量

コントロール (DMSO で 2 時間処理後エタノールで 12 時間処理)、DMSO で 2 時間処理後 calcitriol (10 μ M) で 12 時間刺激、Z-VAD-FMK (50 μ M) で 2 時間処理後 calcitriol (10 μ M) で 12 時間刺激。

図6 Necrostatin-1 による処理後 calcitriol で刺激した RAW264.7 細胞培養上清中の LDH の測定

コントロール (DMSO で 2 時間処理後エタノールで 3 時間処理)、DMSO で 2 時間処理後 calcitriol (10 μ M) で 3 時間刺激、Necrostatin-1 (12.5、25、50 μ M、100 μ M) で 2 時間処理後 calcitriol (10 μ M) 刺激で 3 時間刺激。

図 1

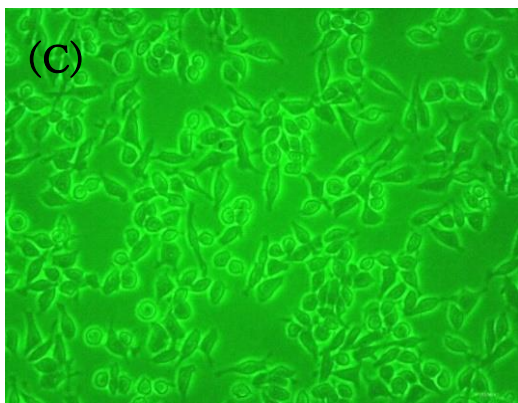
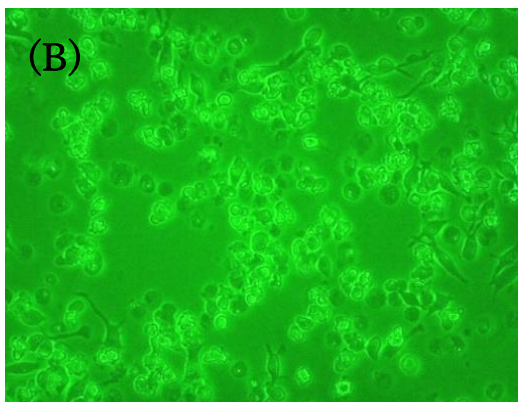
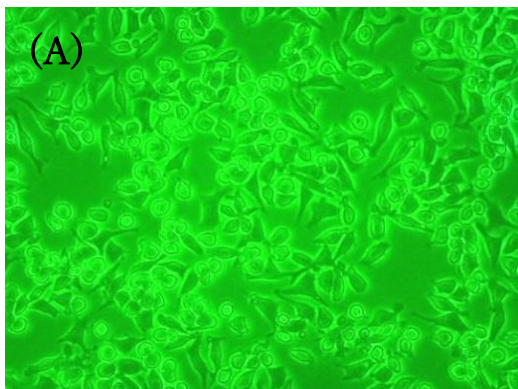
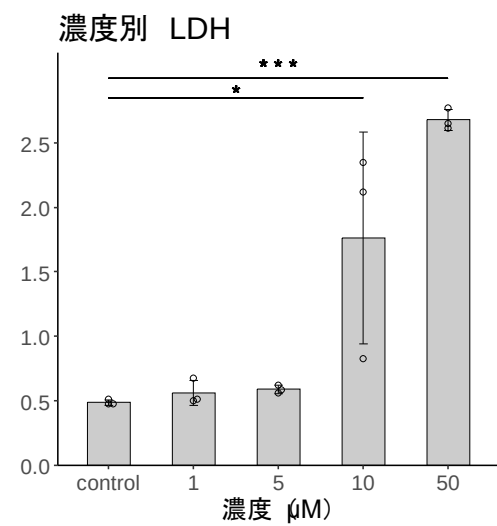
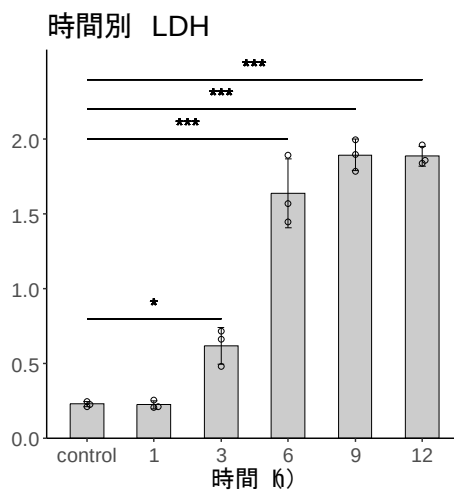


図 2

(A)



(B)



(C)

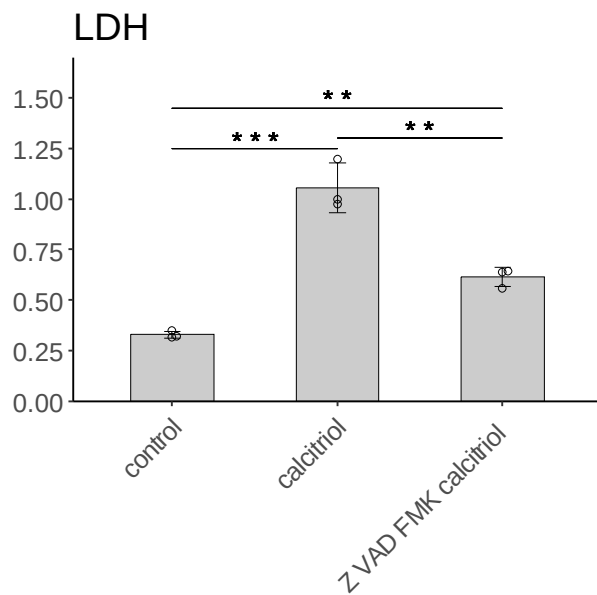
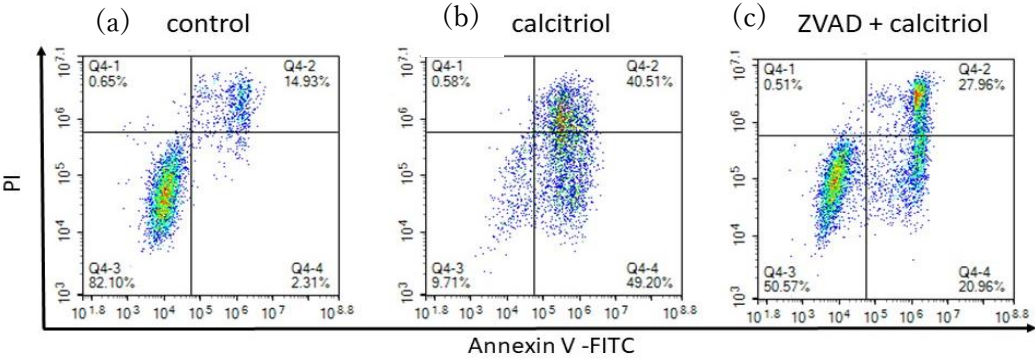
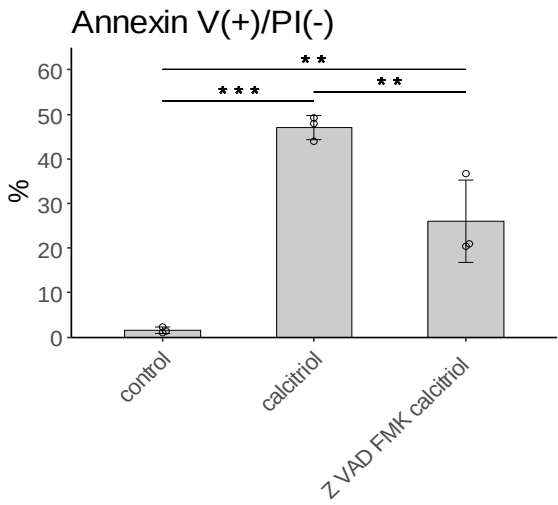


图 3

(A)



(B)



(C)

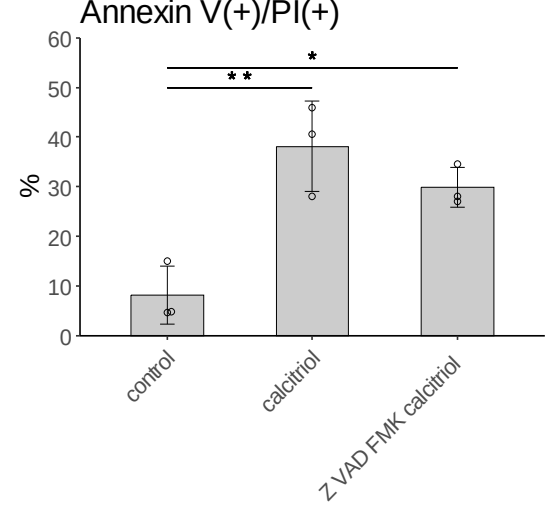


图 4

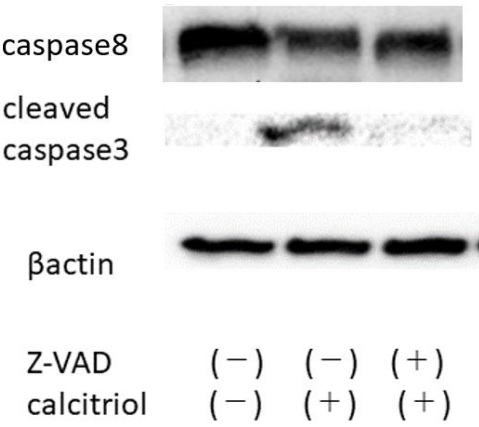


图 5

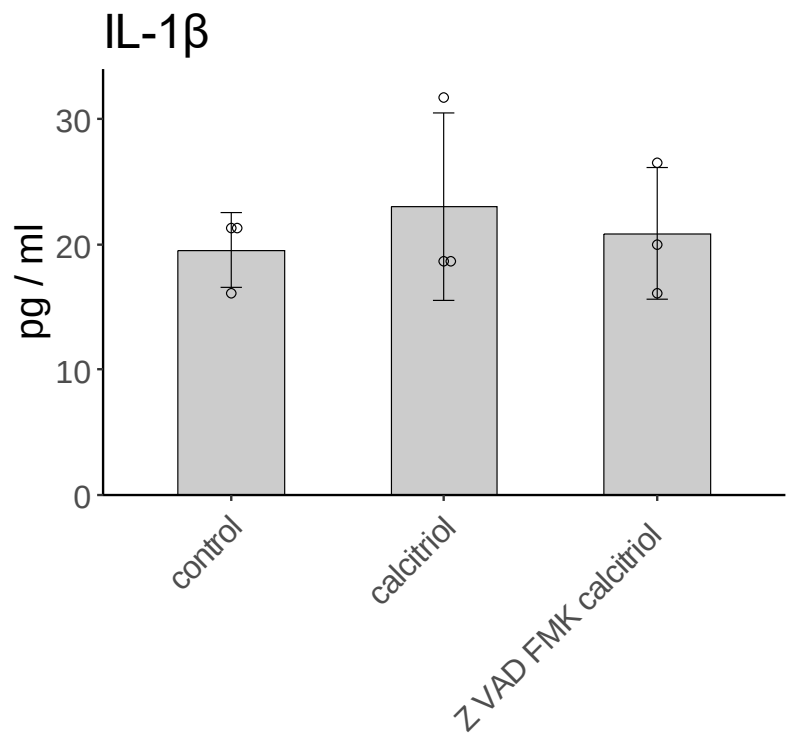


図 6

