

ニコチン酸関連化合物による動物培養細胞の増殖阻害

田口 寛・上田 聡・西藤 泰昌

奥村 克純・嶋林 幸英

三重大学生物資源学部

Growth Inhibition of Cultured Animal Cells with Nicotinic Acid Related Compounds

Hiroshi TAGUCHI, Satoshi UEDA, Yasumasa NISHITO, Katsuzumi OKUMURA

and Yoshihide SHIMABAYASHI

Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

Effect of nicotinic acid related compounds on the growth of cultured animal cells was investigated. Each compound was added at various concentrations ($1 \mu\text{M}$ – 0.1 M) to the culture medium of murine myeloid cells (P3X63-Ag8.653), syrian hamster kidney cells (BHK-21 clone-13) and human leukemia cells (K-562). All of the compounds tested were more or less inhibitory to every cells. When compared at 10 mM , it can be summarized as below:

In murine myeloid cells, trigonelline had no effect; nicotinic acid *N*-oxide and cinchomeric acid were very weak inhibitors; nicotinic acid, 6-hydroxynicotinic acid, quinolinic acid, etc. were weak inhibitors; nicotinamide, isonicotinic acid hydrazide, picolinamide, pyridoxamine, *N*¹-methylnicotinamide, pyridoxine, etc. were strong inhibitors; picolinic acid, dipicolinic acid, pyridoxal and pyridoxal 5'-phosphate were strongest inhibitors (no living cell was detectable). The apparent inhibition with nicotinamide at 5 mM was recovered when the compound was removed from the medium after 48 hr incubation. On the contrary, large amount of cells were killed with other potent inhibitors at 5 mM after 48 hr incubation.

In syrian hamster kidney cells, the effect of above inhibitors were generally weaker than those in murine myeloid cells. In human leukemia cells, the inhibition pattern was similar to that in murine myeloid cells with the exception of trigonelline.

Key words: Growth Inhibition, Cultured Animal Cells, Nicotinic Acid, Trigonelline, Nicotinamide

緒 言

ニコチン酸関連化合物のいくつかのものにおいて、下記のような生理作用や薬理作用が知られている。ニコチンアミド（以下 *NAm* と略す）は、ペラグラ予防因子と

呼ばれていたもので、その後イヌの黒舌病に有効な成分として肝臓から抽出・精製された¹⁾。ニコチン酸（以下 *NiA* と略す）もまたペラグラに対しては同等に有効である。*NAm* は生体内で *NAD* や *NADP* となり、脱水素酵素の補酵素として種々の重要な生化学反応に関与していることは古くからよく知られている。*NiA* の薬理作用のうち、特に顕著なものは血管に対する作用で、静注また

は経口投与すると、脳血管・脊髄血管、網膜血管などを拡張させ、また心臓に対しても冠状血行をよくする。しかし NiA は、皮膚温の上昇・皮膚紅潮、発汗、吐き気など一過性の副作用を示すことがあり、これらの症状は Flushing と呼ばれており、約30分から2時間以内に消失する。しかし、NAm にはこのような作用はない²⁾。ピコリン酸にはキレート作用があり、ラットに経口的に投与すると体重増加や肝臓の重量増加が起こる³⁾。ジピコリン酸は、カルシウムやマグネシウムに対する特異的なキレート剤であり、*Bacillus* 属の細菌の胞子中でカルシウムとキレートして広く存在している⁴⁾他に、グルコースデヒドロゲナーゼの活性化の阻害剤としても働く⁵⁾。トリゴネリンは、植物や下等動物における NiA の代謝産物または排泄形と考えられている⁶⁾。また、豆科植物の細胞分裂を G2 期で停止させる作用⁷⁾やヒドロ虫類の変態調節ホルモンとしての作用⁸⁾を有する。キノリン酸は、NAD の *de novo* 生合成経路における中間体であることはよく知られているが、さらに最近では、けいれん発現作用のあることが見い出されている⁹⁾。

NiA と同様にピリジン骨格を有するビタミンであるピリドキサール、ピリドキサミンおよびピリドキシンは、総称してビタミン B₆ と呼ばれ、アミノ酸等の合成や分解に関与する多数の酵素系の補酵素となっていることから、細胞の成長にも重要な影響を与えると考えられる。事実 B₆ 欠乏動物においては、各種の移植癌の発育が抑制され、B₆ 拮抗剤でも腫瘍の抑制がみられるが、この作用は B₆ の関与によって生成する増殖因子の欠乏によるものとされている²⁾。

当研究室では、無菌的に培養した植物（アオウキクサ：*Lemna paucicostata* 151）を用いて、NiA 関連化合物の生理作用や薬理作用について研究してきた。その結果、NiA、NAm およびピコリン酸は、生育抑制と開花誘導効果を示し、シンコメロン酸、トリゴネリンおよびジピコリン酸は、生育促進効果を示すことが明らかになった¹⁰⁾。

上記のように、ニコチン酸関連化合物は *in vivo* で種々の生理・薬理作用を示し、細胞増殖や分化という観点からも非常に興味深い。そこで今回は、『ニコチン酸関連化合物の各種生物に対する生理作用と薬理作用に関する研究』の一環として、各種 NiA 関連化合物とビタミン B₆ 同族体が、動物の培養細胞である 653（マウス骨髄腫細胞）、BHK-21（シリアンハムスター仔腎細胞）

および K-562（ヒト骨髄性白血病細胞）の増殖に及ぼす影響について検討した。K-562 は分化誘導を検定できる細胞、また BHK-21 は遺伝子組換えタンパク質の動物細胞での生産に用いられる細胞であり、こうした観点からのニコチン酸関連化合物の作用についても、今後検討可能である。

なお、BHK-21 細胞では、ピコリン酸を投与すると、48時間後に細胞周期の G1 期と G2 期の両方で増殖の停止が見られるとの報告が出ている¹¹⁾。

実験方法

1. 培地と培養器具および培養細胞株

RPMI 1640 培地は日水製薬（株）より、Ca・Mg 不含ハンクス液に溶解した2.5%トリプシン液（Lot No. 9040352）、トリプトブリン酸ブロス液（29.5 g/l）、仔ウシ血清（Lot No. 29131881）、トリパンブルー染色液は日本フロウラボラトリーズ（株）より、BME（Basal Medium Eagle）はギブコオリエンタル（株）より、ウシ胎児血清（Lot No. 9M0044）は Whittaker M. A. Bioproducts, Inc. よりそれぞれ購入した。T-フラスコは日本インターメッド（株）より、細胞培養用プラスチックディッシュ（直径 30 mm）はグライナー社より購入した。

本実験に用いた細胞株は、マウス骨髄腫細胞 P3X63-Ag8.653、シリアンハムスター仔腎細胞 BHK-21 clone-13 およびヒト骨髄性白血病細胞 K-562 細胞である。

2. NiA 関連化合物

N¹-メチルニコチンアミド、N¹-メチルニコチンアミドおよびピリドキサールはシグマ社から、イソニコチン酸ヒドラジド、イソニコチンアミド、3-アミノピリジン、トリゴネリン、シンコメロン酸およびイソシンコメロン酸は東京化成工業（株）から、ピリジン-3、5-ジカルボン酸、ピラジンアミド、ピラジン-2-カルボン酸、キノリン酸、ニコチン酸 N-オキシド、6-ヒドロキシニコチン酸、ニコチン酸メチル、ピコリン酸、ピコリンアミドおよびその他の一般的な試薬類は最高純度のものを（株）ナカライテスクから、それぞれ購入した。

3. 細胞培養法

(1) 細胞の培養

653細胞と K-562 細胞の培養には、ウシ胎児血清を10%添加した。RPMI 1640 培地（以下 RPMI (+) 培地と略す）を用いた。BHK-21 細胞の培養には、仔牛血清を10%およびトリプトブリン酸ブロス液を10%添加した BME 培地（以下 BME (+) 培地と略す）を用いた。なお、これらの培地中には NAm とピリドキシンがそれぞれ 1.0 mg/l の終濃度で最初から含まれており、それは NAm で約 8 μ M、ピリドキシンの約 5 μ M と低濃度ではあるが、これらが存在しないと動物細胞は増殖することができない。したがって、今回の実験では、これら低濃度の NAm とピリドキシンの NiA 関連化合物を上乗せして添加し、その影響を検討したことになる。各細胞は、上記の培地を用いて、CO₂ 5%、湿潤状態において 37°C で培養し、実験には常に対数増殖期にある細胞を用いた。

(2) 細胞染色法

生細胞と死細胞を区別するために、トリパンブルー染色液で染色した。染色法は、細胞浮遊培養液に等量のトリパンブルー染色液を加えて3分間静置してから再び懸濁し、20分以内にトーマ血球算定盤を用いて算定した。なお、コントロールにおける生細胞数と各種化合物を添加したときの生細胞数の比率 (%) を、ここでは生細胞比 (Living Cell Rate) と表現している。

(3) 各種 NiA 関連化合物の653細胞と K-562 細胞の増殖に及ぼす影響

培養した細胞を 1000×g で3分間遠心分離し、細胞数が 20~40×10⁴ Cells/ml となるように RPMI 1640 (+) 培地に懸濁した。この懸濁液をマイクロディッシュに蒔き、Ca・Mg 不含 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 培地（以下単に DPBS 培地と略す）で各濃度に調製した各種化合物の溶液を添加して培養した。培養72時間目にトリパンブルーで染色して生細胞数を算定し、その6連の平均値を求めた。以下の実験においても、これとほぼ同様に行った。

(4) NAm の653細胞増殖に及ぼす影響

NAm の濃度が 5 mM となるように培地に添加して48時間培養し、遠心分離 (1000×g, 3 min) して細胞を集め、DPBS 培地で2回洗浄後、化合物無添加の RPMI (+) 培地と交換して再び培養し細胞増殖を検討した。

(5) 653細胞の生育阻害剤の BHK-21 細胞増殖に及ぼす影響

浮遊培養で増殖する653細胞の増殖を阻害した多くの化合物のうち、ピコリン酸、3-アミノピリジン、ピリドキサール、ピリドキサール 5'-リン酸、ピリドキサミンおよびピリドキシンについては、BHK-21 細胞を用いて各化合物の添加濃度を 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mM にして、付着細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。この細胞は、上記の培地においては、培養器具に付着して増殖する性質があるので、実験に用いる際には、器具に付着している細胞を 0.25% トリプシン溶液で処理して培養容器からはがした後、細胞数を算定し、その密度が 20~40×10⁴ Cells/ml となるように新鮮な BME (+) 培地で希釈し、マイクロディッシュに蒔いた。これを通常の条件で12時間培養した後、各化合物を溶解した DPBS 培地を添加して72時間培養し、再びトリプシンによる処理を行い、細胞を培養容器からはがした後、生細胞数を算定した。

結果と考察

1. 各種 NiA 関連化合物の653細胞増殖に及ぼす影響

各化合物を培地中の終濃度が 1 mM および 10 mM となるように添加したときの生細胞比を Table 1 に示した。化合物の添加濃度が 10 mM ではトリゴネリン、ニコチン酸 N-オキシド及びシンコメロン酸は他の化合物の場合と比べて強い増殖阻害は見られなかった (生細胞比 > 80%)。特にトリゴネリンは、ほとんど影響がなかったので、さらに高い濃度についても検討した。化合物の添加濃度が 1 mM において、イソニコチン酸ヒドラジド、3-アミノピリジン、ピリドキサミン、ピリドキシン、ピコリン酸、ジピコリン酸、ピリドキサール、ピリドキサール 5'-リン酸などの化合物は強い増殖阻害を示した (生細胞比 < 55%)。イソニコチン酸ヒドラジドと 3-アミノピリジンの場合、培養2日目までは、あまり死細胞は見られなかったが、3日目からは急に増加した。ピコリン酸やジピコリン酸による増殖阻害は、それらのキレート作用によるものではないかと考えられる。

2. ピコリン酸の653細胞増殖に及ぼす影響

ピコリン酸の添加濃度が 0, 0.5, 1, 5 mM のときの細

Table 1. Effect of nicotinic acid related compounds on the growth of murine myeloid cell P3X63-Ag8.653

Compound	Living cell rate (%) [*] at	
	1 mM	10 mM
Trigonelline	99	98
Nicotinic acid <i>N</i> -oxide	97	89
Cinchomeric acid	92	85
Nicotinic acid	98	77
6-Hydroxynicotinic acid	105	74
Isocinchomeric acid	79	73
Pyridine-3,5-dicarboxylic acid	93	62
Pyrazine-2-carboxylic acid	67	57
Quinolinic acid	99	56
Nicotinamide	75	41
Nethylnicotinate	92	35
Isonicotinic acid hydrazide	53	33
Picolinamide	40	28
3-Aminopyridine	28	25
Pyrazinamide	80	20
Pyridoxamine	48	18
<i>N</i> ² -Methylnicotinamide	85	14
<i>N</i> ¹ -Methylnicotinamide	95	13
Pyridoxine	36	10
Picolinic acid	20	0
Dipicolinic acid	18	0
Pyridoxal	16	0
Pyridoxal 5'-phosphate	0	0

* Living cell rate (%) =

$$\frac{\text{Living cell number (with compound)}}{\text{Living cell number (control)}} \times 100$$

Incubation was carried out for 72 hr at 37°C.

This footnote is also applicable to Tables 2 and 3.

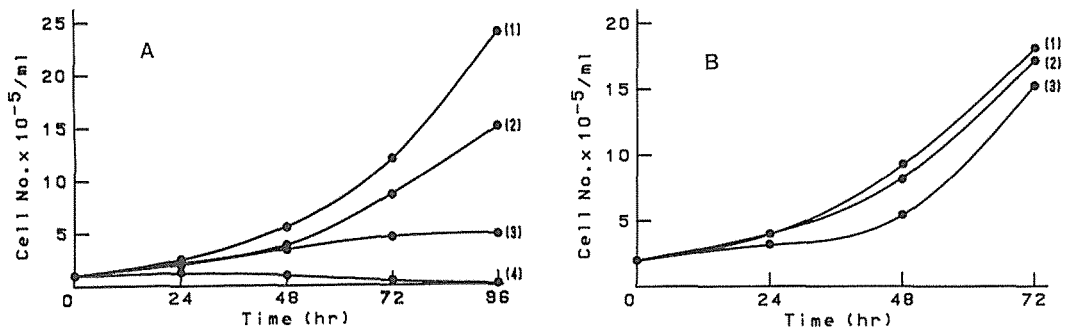


Fig. 1. Effect of Picolinic Acid and Trigonelline on the Cell Growth of Murine Myeloid Cell P3X63-Ag8.653. A: picolinic acid, (1) none, (2) 0.5 mM, (3) 1 mM, (4) 5 mM. B: trigonelline, (1) none, (2) 10 mM, (3) 100 mM.

胞の増殖曲線を Fig. 1-A に示した。化合物の添加濃度が 0.5 mM 以上では明らかに細胞の増殖が阻害されている。しかし、データは示していないが、添加濃度が 0.01 mM 以下では、増殖に及ぼす影響は全くみられなかった。ピコリン酸はキレート剤としての作用を持つ他、ADP-リボシル化の阻害剤でもあるため、これらの作用がなんらかの形で上記の阻害に関与しているのではないかと思われるが、今後この面からの検討も必要である。このキレート剤としての作用により、正常ラット腎細胞の 28S rRNA のプロセッシングが阻害される。このために 60S リボソームサブユニットの前駆体粒子は成熟できず、未成熟のまま細胞内に蓄積されることが示唆されている^{11,12)}。他のキレート剤の作用として、1, 10-フェナンスロリンは、酵母の rRNA プロセッシングを阻害する¹³⁾。タンパク合成には、リボソーム前駆体粒子の形成と RNA の成熟が必要であり、ピコリン酸処理した細胞では、タンパク合成が約 50% 阻害されることなどから考えれば、タンパク合成の阻害は rRNA 合成におけるピコリン酸の効果が原因の一つと考えられると報告されている¹²⁾。

3. トリゴネリンの 653 細胞増殖に及ぼす影響

トリゴネリンの添加濃度が 0, 10, 100 mM のときの培養 3 日目の細胞を用いた増殖曲線を Fig. 1-B に示した。図からわかるように、添加濃度が 100 mM という非常に高濃度な条件下で培養しても、細胞の増殖能はわずかに低下しなかったのが特徴的であり、他の化合物と比較すると、とても興味深い結果である。

4. NAM の653細胞増殖に及ぼす影響

この実験結果は、Fig. 2 に示した。化合物を添加していない培地と交換した後では、明らかに細胞の増殖能が回復している。このことから、少なくとも NAM は細胞の増殖を何らかの作用で停止させるが、それは可逆的であることがわかる。

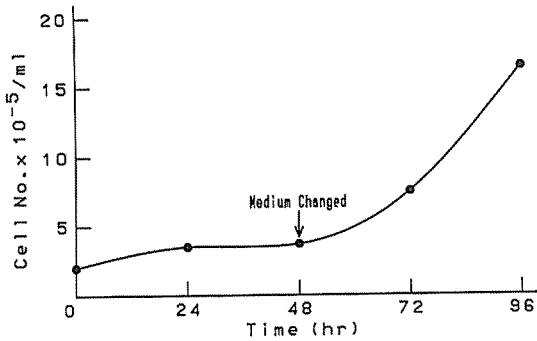


Fig. 2. Effect of Nicotinamide on the Cell Growth of Murine Myeloid Cell P3X63-Ag8.653. The cell was incubated with the medium containing 5 mM nicotinamide for 48 hr and then nicotinamide was removed by washing the cell and re-incubated with the medium without nicotinamide. When nicotinamide was not removed, the growth was stopped but the cell was still alive.

5. ピリドキサルとピリドキサミンの653細胞増殖に及ぼす影響

癌細胞の増殖因子生成に関与すると言われている B₆ のうち、ピリドキサルおよびピリドキサミンを、細胞が死滅しない程度に過剰添加して培養したが、今回の実験結果からは、B₆ と *in vitro* における増殖因子生成との関係付けはできなかった。

6. 653細胞の増殖阻害剤が BHK-21 細胞増殖に及ぼす影響

653細胞で増殖を阻害した化合物のうち、ピコリン酸、3-アミノピリジン、ピリドキサル、ピリドキサル 5'-リン酸、ピリドキサミンおよびピリドキシンについて、BHK-21 細胞で検討した実験結果を Table 2 に示した。653細胞を用いた実験と比較してみると、全体的に BHK-21 細胞の方が阻害を受けにくい傾向にあることがわかる。しかしピリドキサルを添加した場合のみ、0.1 mM においても生細胞比は76%と比較的低いことが

Table 2. Effect of nicotinic acid related compounds at various concentrations on the growth of syrian hamster normal kidney cell BHK-21 clone-13

Compound	Concentration (mM)	Living cell rate (%)
Picolinic Acid	0.1	97
	0.5	98
	1.0	102
	5.0	76
	10.0	55
3-Aminopyridine	0.1	100
	0.5	94
	1.0	102
	5.0	85
	10.0	73
Pyridoxal	0.1	76
	0.5	59
	1.0	55
	5.0	46
	10.0	35
Pyridoxal 5'-phosphate	0.1	93
	0.5	76
	1.0	71
	5.0	36
	10.0	29
Pyridoxine	0.1	97
	0.5	96
	1.0	98
	5.0	104
	10.0	47
Pyridoxamine	0.1	93
	0.5	70
	1.0	60
	5.0	20
	10.0	0

認められた。

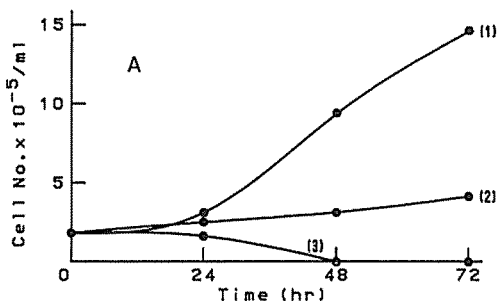
7. NiA 関連化合物の K-562 細胞増殖に及ぼす影響

各化合物の培地中の濃度が 1 mM および 5 mM となるように添加した場合の生細胞比を Table 3 に示した。5 mM の濃度では、かなりの種類の化合物において増殖阻害が見られた。653細胞においては、10 mM においてもほとんど阻害を示さなかったトリゴネリンが、K-562 細胞では少し阻害されたのが対照的である。ピリドキ

Table 3. Effect of nicotinic acid related compounds on the growth of human leukemia cell K-562

Compound	Living cell rate (%) at	
	1 mM	5 mM
Pyridine-3,5-dicarboxylic acid	75	91
Pyrazinamide	80	87
Cinchomeric acid	69	87
Pyrazine-2-carboxylic acid	96	83
Methylnicotinate	80	82
Nicotinic acid <i>N</i> -oxide	64	82
Nicotinic acid	86	80
<i>N</i> '-Methylnicotinamide	93	77
6-Hydroxynicotinic acid	88	77
Nicotinamide	94	75
Trigonelline	66	75
Pyridoxamine	95	73
Isochinomeric acid	83	73
<i>N</i> ¹ -Methylnicotinamide	86	35
Quinolinic acid	72	47
Pyridoxine	95	22
3-Aminopyridine	20	20
Isonicotinic acid hydrazide	37	10
Pyridoxal 5'-phosphate	24	9
Picolinic acid	28	8
Dipicolinic acid	24	2
Pyridoxal	28	0

サルとキノリン酸の結果を、それぞれ Fig. 3-A と Fig. 3-B に示した。前者の阻害は非常に強力であった。キノリン酸の場合には、3日目から増殖が始まったが、これはキノリン酸が代謝されて抑制作用が解除されたためではないかと考えている。また、ピコリン酸は、K-



562細胞においても653細胞のときと同様に (Fig. 1-A 参照) 強い増殖阻害を示したが、これはキレート剤としての作用によるものではないかと思われる。他の化合物による阻害機構については、現在のところすべて不明であり、特に高濃度のビタミン類による阻害は興味深く、今後の検討課題である。

以上のように、今回用いた NiA 関連化合物のなかには、植物の場合とは異なり¹⁰⁾、動物培養細胞の増殖を促進するものは全く見つからず、そのほとんどのものが阻害的であり、その作用が強力なものもあった。本研究では、特に細胞増殖という観点からのみ NiA 関連化合物の作用を検討し、細胞分化や細胞のタンパク質生産性については検討しなかった。細胞増殖の阻害は、細胞分化の誘導を意味する場合もあり、増殖阻害の強い化合物については分化誘導について、また、増殖阻害の低い化合物については、ハイブリドーマのモノクローナル抗体生産性への効果や遺伝子組替えタンパク質生産性の効果について、今後検討していく予定である。

謝辞 本研究で使用した動物培養細胞を提供下さった雪印乳業(株)生物科学研究所に深謝する。また、本研究の一部は、文部省科学研究費(課題番号02660089)で行ったものであり、関係各位に謝意を表する。

引用文献

- 1) ELVEHJEM, C. A., MADDEN, R. J., STRONG, F. M. and WOOLLEY, D. M. Relation of nicotinic acid and nicotinic acid amide to canine black tongue, *J. Am. Chem. Soc.*, 59: 1767-1768 (1937).

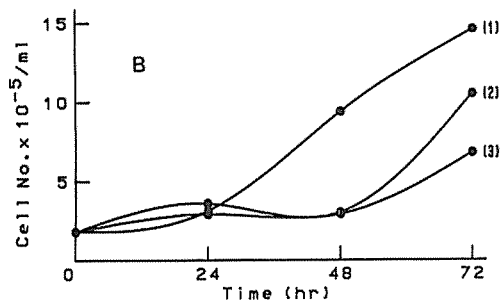


Fig. 3. Effect of Pyridoxal and Quinolinic Acid on the Cell Growth of Human Leukemia Cell K-562. A: pyridoxal, B: quinolinic acid. Concentrations of each compound: (1) none, (2) 1 mM, (3) 5 mM.

- 2) SVEDMYR, N., HARTHON, L. and LUNDHOLM, L. Relation between the plasma concentration of free nicotinic acid and some of its pharmacologic effects in man, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **10**: 559-570 (1969).
- 3) EVANS, G. W. and JOHNSON, E. C. Growth stimulating effect of picolinic acid added to rat diets, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **165**: 457-461 (1980).
- 4) WARTH, A. D. Determination of dipicolinic acid in bacterial spores by derivative spectroscopy, *Anal. Biochem.* **130**: 502-505 (1983).
- 5) TOCHIKURA, K., YASUDA, Y. and KOZUKA, S. Inhibitory action of dipicolinic acid on the activation of inactive glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* spores, *Microbiol. Immunol.*, **31**: 95-100 (1987).
- 6) 田口 寛. トリゴネリンの生合成と代謝並びにその生理作用. *ビタミン*. **62**: 549-557 (1988).
- 7) EVANS, L. S., ALMEIDA, M. S., LYNN, D. G. and NAKANISHI, K. Chemical characterization of a hormone that promotes cell arrest in G₂ in complex tissues, *Science*, **203**: 1122-1123 (1979).
- 8) BERKING, S. Transmethylation and control of pattern formation in Hydrozoa, *Differentiation*, **32**: 10-16 (1986).
- 9) PERKINGS, M. N. and STONE, T. W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid, *Brain Res.*, **247**: 184-187 (1982).
- 10) TAGUCHI, H., KASHIMOTO, A., NISHITANI, H., SHIMABAYASHI, Y. and IWAI, K. The effects of pyridine and pyrazine carboxylic acids derivatives on the growth of *Lemna paucicostata* 151, *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 85-89 (1988).
- 11) FERNANDZ-POL, J. A., BONO, V. H., Jr. and JOHNSON, G. S. Control of growth by picolinic acid: differential response of normal and transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 2889-2893 (1977).
- 12) COSTANTINI, M. G. and JOHNSON, G. S. Disproportionate accumulation of 18S and 28S ribosomal RNA in cultured normal rat kidney cells treated with picolinic acid or 5-methylnicotinamide, *Exp. Cell Res.*, **132**: 443-451 (1981).
- 13) JOHNSTON, G. C. and SINGER, R. A. RNA synthesis and control of cell division in the yeast *S. cerevisiae*