

水溶性ビタミンであるニコチン酸およびその関連化合物による 生活習慣病の予防と治療を目的とする有効利用への試み

緒方 進・井田智恵利・田口 寛*

三重大学大学院生物資源学研究科

Investigation of effective uses for prevention and treatment of life style related disease by nicotinic acid and its related compounds

Shin OGATA, Chieri IDA, and Hiroshi TAGUCHI*

Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Graduate School of Bioresources,
Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Abstract

We have been trying investigations for effective uses of prevention and treatment of life style-related disease by nicotinic acid and its related compounds. For the use of prevention, we studied the effect of nicotinic acid and nicotinamide on the repair of damaged DNA in normal human lymphocytes. DNA repair was promoted by nicotinic acid. For the use of treatment, we investigated apoptosis- and differentiation- inducing abilities of 23 nicotinic acid-related compounds in human leukemia cell lines, HL-60. As the result, picolinic acid, dipicolinic acid, and isonicotinamide induced apoptosis. Differentiation to granulocyte like cells was induced by nicotinamide, nicotinamide *N*-oxide, and isonicotinic acid.

Key Words: nicotinic acid, nicotinamide, life style-related disease, DNA repair, apoptosis, differentiation

はじめに

水溶性ビタミン B 群に属するニコチン酸，ニコチンアミドは，その欠乏症であるペラグラの予防因子として同定され，長らく，その生理作用などについては，様々な研究が展開されてきた。主にその機能としては，生体内で，ニコチン酸，ニコチンアミドを前駆体とし多段階を経て NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) が合成され，酸化還元酵素の補酵素として，エネルギー獲得に

重要な役割を果たすことは，一般的によく知られている。それらに關与する化合物の構造式については，図 1 に示した。

しかしながら，ADP-リボシル化に代表されるように，およそ 50 年前に端を発し，NAD を基質とする種々の反応が見いだされつつある。その概略は図 2 に示した。なお，それらが様々な生命現象の調節に關与することは，先回の本稿トピックスにて概説させて頂いた¹⁾。

一方，ニコチン酸およびその関連化合物は，単

独でもしくはNADを介して、生物に対し様々な作用を有することが報告されている。それら関連化合物について、代表的なものを図3に示した。その中でも動物に対するニコチン酸の血清コレステロール低下作用²⁾は、特に知られており、ニコチン酸またはその誘導体が血流促進、脂質代謝改善、高脂血症や動脈硬化症の改善などの目的で、医薬品としてすでに使われている。なお、その副作用として、ニコチン酸には激しいかゆみや、ほてりを伴う「Flushing」がある。これは、血中のニコチン酸が血管壁におけるプロスタグランジンの生合成を促進し、それによってcyclic-AMPレベルが上昇して血管壁や血液量の増加が起きるた

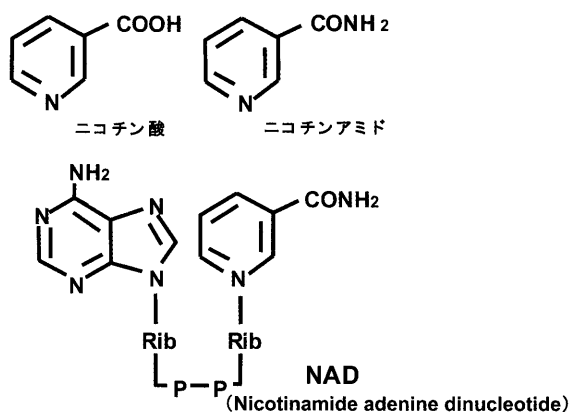


図1. ニコチン酸, ニコチンアミドおよびNADの構造式

めと考えられている。また、植物において、ニコチンアミドはイネのみみ中に含まれる生長促進物質として抽出され、他の野菜類、畑作物についても初期生育を促進することが知られている³⁾。この作用は、光合成に関与するリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ活性を増加させ、光合成を促進して、葉面積の拡大をもたらす、硝酸還元酵素活性の増加に伴うタンパク質合成能の増大と葉緑体形成の促進のためと考えられている。当研究室でもレムナ (アオウキクサ) やダイコン幼植物などを用いて、植物におけるニコチン酸関連化合物の生理作用および薬理作用やNAD代謝について詳しく検討がなされてきた⁴⁾。特にニコチンアミドを始めとする、いくつかの関連化合物が、レムナの開花誘導を引き起こす実験結果については、これら化合物による遺伝子発現制御機構への関与が示唆される。

以上のように、ニコチン酸、ニコチンアミドは、従来のビタミンという単なる栄養素という枠組みを超えて、種々の生命現象における重要な制御因子として、その役割の一面を担っている事が示唆される研究報告が多々なされつつある。我々はかねてより、このビタミンの重要性にいち早く着目し、主に新規生理作用の検索、ならびに生活習慣病の予防や治療を目的とした検討、すなわち、予防面としては、がんの初期において、その主な原

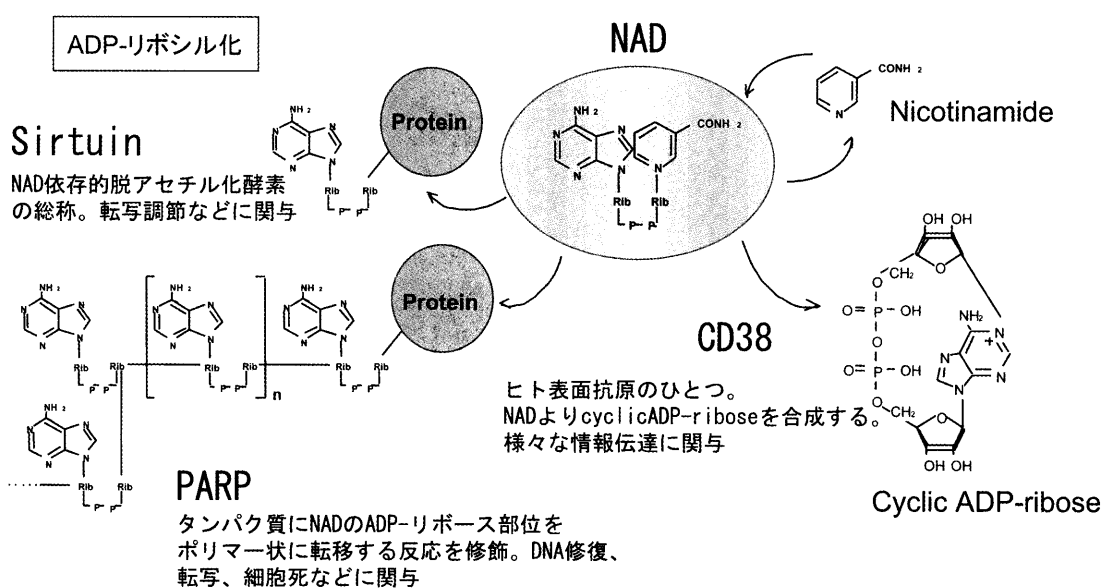


図2. NADを基質とする様々な生化学反応

* CD 38: Cluster of differentiation 38

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

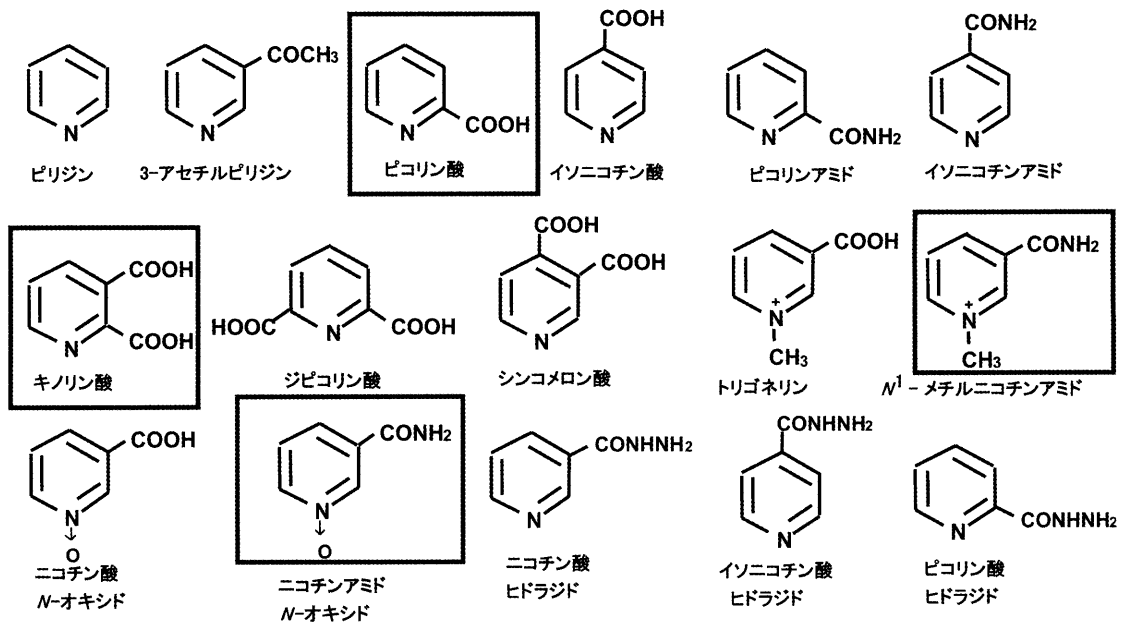


図3. ピリジン環を基本骨格とし、ニコチン酸やニコチンアミドの構造異性体や環構造に様々な置換基が結合した化合物（枠はほ乳類における生体内因子）

因となる損傷した DNA を修復する機構への影響、また治療面としては、がん細胞の死滅を目的としてアポトーシスを始めとする細胞死や、特に白血病細胞の増殖能の喪失を目的として細胞分化などを研究対象として設定し、様々な研究を展開してきた。今回は、その研究経緯を紹介させて頂くとともに、今後の展望について概説する。

実験方法

1. 静脈血からの正常ヒトリンパ球の分離と培養および薬剤処理

健常成人男子非喫煙者より採血した静脈血から、Ficoll-Paque (GE Healthcare 社) を用いた比重遠心法により、単核白血球画分 (リンパ球+単球) を回収し、正常ヒトリンパ球として、以下の実験に用いた。

リンパ球は 10% (56°C, 30 分にて非働化したもの) ウシ胎児血清 (Gibco BRL Co. lot 38N9543), 100 μg/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリン, 2 mM グルタミンを含有する RPMI1640 (Invitrogen Co.) (以下、基本培地と称す) 中、CO₂ インキュベーターにて、1×10⁶ cells/ml の細胞密度になるように培養した。ニコチン酸およびニコチンアミドは基本培地に終濃度 5 μM~10 mM となるように添加し、24~72 時間処理した。

ニトロソグアニジン (*N*-methyl-*N*¹-nitro-*N*-nitrosoguanidine: MNNG) 処理は、終濃度 0.5 および 1.0 μg/ml となるように培地中に添加した後、CO₂ インキュベーターにて、1×10⁶ cells/ml の細胞密度で 1 時間 DNA 損傷処理を施した。その後、細胞を 200×g にて遠心回収し、再び基本培地に懸濁して所定時間培養した。

2. DNA 鎖切断同定法に基づく DNA 修復アッセイ

DNA 修復のアッセイは Birnboim らの方法⁵⁾に従った。すなわち、ヒトリンパ球を、種々の濃度にてニコチン酸、ニコチンアミドにて前処理を行い、PBS(-) にて洗浄した後、さらに MNNG にて DNA 損傷処理を行った。その後のリンパ球 (3×10⁶ cells) を洗浄した後、Solution A 300 μl に懸濁し、3 本のチューブに 100 μl ずつ分注した。これらを、それぞれ、Sample (S), Total (T), Background (B) とし、各チューブに Solution B 100 μl 加え、氷中にて 20 分放置し、細胞を可溶化させた。S チューブに Solution C 50 μl, Solution D 50 μl を穏やかに添加し、氷中に 30 分放置した。その後、15°C で 60 分インキュベートした。最後に氷中で冷却し、Solution E 200 μl を加え、巻き戻しを停止させた。T チューブは Solution C, D, E の mixture 300 μl を穏やかに

加え、氷中に30分、15°Cで60分インキュベートした。BチューブはSolution C, D 50 μ l 添加後、数秒間、超音波処理を行い、後の処理はSチューブと同様に処理した。最後はすべてのチューブにSolution F 750 μ l 加え、日立社製、650-60型蛍光分光光度計にて蛍光強度 (Ex: 520 nm, Em: 590 nm) を測定した。なお、2本鎖DNAの割合((%) double-stranded DNA) は以下に示す式より求めた。

(%) double-stranded DNA

$$= (F_s - F_b) / (F_t - F_b) \times 100$$

F_s: Sample fluorescence, F_t: Total fluorescence, F_b: Background fluorescence

(なお、各試薬の組成については以下に示した)

Solution A: 0.25 M inositol, 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 1 mM MgCl₂

Solution B: 9 M urea, 10 mM NaOH, 2.5 mM CDTA (1, 2-Cyclohexanediaminetetraacetic acid), 0.1% SDS

Solution C: 0.45 Vol. Solution B in 0.2 M NaOH

Solution D: 0.40 Vol. Solution B in 0.2 M NaOH

Solution E: 1 M glucose, 14 mM 2-メルカプトエタノール

Solution F: 6.7 μ g/ml エチジウムブロマイド in 13.3 mM NaOH

3. 細胞培養およびアポトーシス誘導

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 は、基本培地中、CO₂ インキュベーターにて培養した。またアポトーシスの誘導に関しては、HL-60 が 5×10^5 cells/ml の細胞密度の状態にて、終濃度 10 mM になるようにニコチン酸関連化合物 (本研究では、全て、ナカライ社、シグマ社、東京化成社より入手したものをを用いた。) を添加し、12~24 時間 CO₂ インキュベーター中で培養した。

4. アガロースゲル電気泳動ならびに形態観察に基づくアポトーシスの検出

アポトーシスを誘導した細胞 (5.0×10^5 cells) を遠心回収し、PBS(-) にて洗浄した。細胞を Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM

EDTA, 0.1% Triton X-100) 100 μ l に浮遊させ、細胞を溶解させた。続いて遠心後、上清を回収し、RNase A 処理 (50°C, 30 分)、プロテイナーゼ K 処理 (50°C, 60 分) を順次施した後、イソプロパノール沈殿により断片化 DNA を回収し、それぞれのサンプルを 2% のアガロースゲルにて電気泳動を行った。なお分子量マーカーは、123 bp DNA ラダーを Invitrogen 社より購入して用いた。

また形態観察については、細胞を遠心回収し、PBS(-) にて洗浄後、1% グルタルアルデヒドにて、室温で 30 分間細胞を固定した。そして、固定した細胞をヘキスト 33342 (Calbiochem 社) にて染色し、スライドガラスにマウント後、蛍光顕微鏡にて核の形態変化を観察した。

5. 細胞培養および分化誘導

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 は、5% ウシ胎児血清 (BioWest 社)、100 μ g/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン、2 mM グルタミンを含有する RPMI 1640 (Invitrogen Co.) 中、CO₂ インキュベーターにて培養し、細胞密度が 5×10^5 cells/ml 以上にならないように維持した。また分化誘導に関しては、HL-60 が 1×10^5 cells/ml の細胞密度の状態にて、終濃度 10~25 mM になるようにニコチン酸関連化合物を添加し、最大 72 時間 CO₂ インキュベーター中で培養した。なお、陽性コントロールとして、顆粒球様細胞への分化誘導は、all-trans-retinoic acid (ATRA) を、マクロファージ様細胞への分化誘導については、ホルボールエステル (TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を用いて、同条件にて誘導を行った。

6. ギムザ染色法に基づく分化誘導の評価

誘導処理後の HL-60 を遠心回収し、PBS(-) にて洗浄後、70% エタノールにて一晩固定した。そして、固定した細胞の懸濁液の一部をスライドガラスにマウントした後、十分に風乾し標本作製した。さらに標本を、ギムザ染色試薬 (ナカライテスク社) にて、室温 30 分染色した後、洗浄、風乾し、光学顕微鏡により核の形態を観察した。

結果と今後の展望

まず、DNA 修復に関しては、ヒト正常リンパ球を用いて、損傷 DNA に対する修復能への影響について検討したところ、ニコチン酸処理 (5 μ M, 72 時間前処理) においては DNA 修復を促進し、意外なことに、同様に NAD の前駆体として機能するニコチンアミド (10 mM, 72 時間前処理) においては、逆に DNA 修復を阻害することを見出した (図 4)。以上の結果は、DNA 修復機構において、特にその初期応答として、NAD を基質とする生化学反応のひとつである、ポリ (ADP-リボシル) 化の関与が知られていることから、ニコチン酸、ニコチンアミドが NAD の前駆体であり、その一方で、ニコチンアミドがその反応における分解産物であり、ポリ (ADP-リボシル) 化の阻害剤であることから、この反応に影響をおよぼした結果、以上のような現象が認められたと示唆される。

また、ヒト白血病細胞 HL-60 を用いて、ニコチン酸関連化合物にアポトーシス誘導作用がないかについて検討したところ、特に、ピコリン酸、ジピコリン酸、イソニコチンアミドにおいて、強い作用が見いだされた。その中でも特に強い作用が認められたピコリン酸による検討結果について代表例として、図 5 に示した。ピコリン酸は、トリプトファンから NAD が生合成される *de novo* 経路の中間代謝産物で生体内に通常成分として存在し、免疫能を増強する作用が示唆されている⁶⁾。また、ラットに対し成長促進作用を示し、経口投

与すると体重や肝重量の増加が起こることが報告されている⁷⁾。さらにそのキレート効果を利用し、ダイエットサプリメント⁸⁾や、糖尿病治療薬⁹⁾など様々な利用が期待されているユニークな化合物である。また、ジピコリン酸は、*Bacillus* 属の胞子中に存在し、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の特異的なキレート剤として作用することで、胞子形成時における薬剤耐性に寄与する事が知られている¹⁰⁾。イソニコチンアミドについては PARP 阻害剤であることが知られている¹¹⁾。また一方で、抗結核治療薬として有名なイソニコチン酸ヒドラジドの代謝副産物として生体内で生じることが知られている。なお、ラットに長期投与しても発がん性は示さず、むしろリンパ種の発症を抑える作用があることが報告されている¹²⁾。ちなみに、イソニコチン酸ヒドラジドは、我々の検討において、高い抗酸化作用を見いだしており¹³⁾、それが結核菌の細胞壁構成成分の一部であるミコール酸生合成酵素の活性中心に作用することで治療効果に寄与することが報告されている¹⁴⁾。

さらにヒト白血病細胞 HL-60 は、ビタミン A 関連化合物である、*all-trans-retinoic acid* (ATRA) などにより顆粒球様細胞、活性型ビタミン D などにより単球様細胞、発がんプロモーターの一つホルボールエステルなどによりマクロファージ様細胞へと、複数経路への分化誘導能を有しているユニークな細胞株である。特に、ATRA に関しては、急性前骨髄性白血病の治療において、臨床現場で絶大な効果を挙げていることが知られている。実際、我々は、ニコチン酸、ニコチンアミド

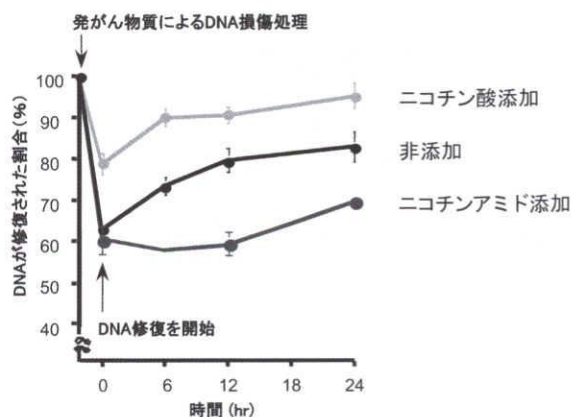


図 4. ニコチン酸およびニコチンアミドがヒトリンパ球における損傷 DNA の修復に及ぼす影響

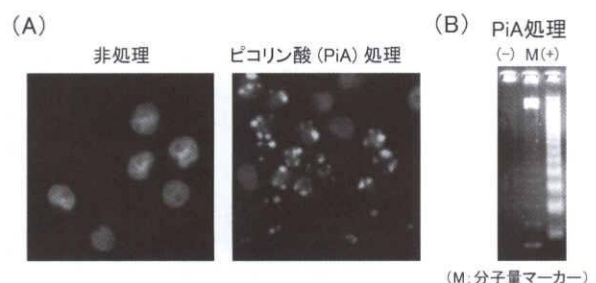


図 5. ピコリン酸 (PiA) 処理により、アポトーシスを誘導し死滅した白血病細胞 HL-60 の様子

- (A) 核の形態を蛍光顕微鏡により観察した結果
- (B) 細胞より DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った結果

を始めとする 20 数種類におよぶ関連化合物による分化誘導効果について検討したところ、ニコチンアミドを始めとする、いくつかのニコチン酸関連化合物処理により、顆粒球様細胞への分化誘導効果を見出している。しかしながら、ニコチン酸に関しては、上述のような作用は認められない¹⁵⁾。図 6 では、HL-60 を、ニコチンアミドでは、15 mM、ニコチンアミド *N*-オキシドでは、25 mM、イソニコチン酸では、10 mM にて、72 時間処理した後、ギムザ染色を行い、顕微鏡観察を行った結果である。いずれにおいても、ATRA 処理の場合と同様に、顆粒球様細胞への分化に特徴的な形態である、核の多核化が認められていた。ニコチンアミドとニコチン酸は、先述したとおり、NAD の前駆体として機能し、ビタミンとしては等価であるが、先の DNA 修復の結果と同じように、このような薬理的な効果の場合においては、その作用は全く異なる点について挙げられる。すなわち、ニコチンアミドは、ポリ (ADP-リボシル) 化を始めとする、様々な生化学反応の阻害剤として機能するが、ニコチン酸にはそのような機能がないことがキーポイントであることが予想される。また、ニコチンアミドと同様に、顆粒球様細胞への分化誘導効果が認められた、ニコチンアミド *N*-オキシドは、ニコチンアミドの尿中代謝産物であることが知られており、またイソニコチン酸については、生体成分ではないが、ニコチン

酸の構造異性体である¹⁶⁾。これらの化合物の生体内における動向については不明な点が多く、また知見自体も乏しいのが現状である。

今回、紹介させて頂いた我々の研究成果は、その作用機構について、現在、色々な方向から解析中である。しかしながら、これらの知見を有効的に利用することを考えた場合、特に問題となるのが、その作用濃度についてである。すなわち、ニコチン酸の損傷 DNA に対する修復促進効果を除くと、基本的にその作用濃度は、mM オーダーと非常に高いものである。我々が対象とする化合物が、水溶性ビタミンやその関連化合物であることから、その点については、回避しがたい問題点であることも予想される。ただ、ニコチン酸とビタミン E が化学的な結合によりコンプレックスを形成した化合物が、低濃度で、また徐放性を示し、末梢血流障害改善のための治療薬として利用されている事実ヒントを得て、そのような観点からの試みも検討中である。さらにヒト白血病細胞 HL-60 に対して、分化誘導効果が認められたニコチンアミドは、言うまでもなく、ビタミンである。このような栄養素が、非選択的に細胞内に取込まれるとは考えがたく、我々は選択的な取り込み機構の存在を想定し、現在、研究を展開中である。その点について明らかにすることで、新たなアプローチが見いだされると考える。

以上のような問題を克服し、また作用機序など

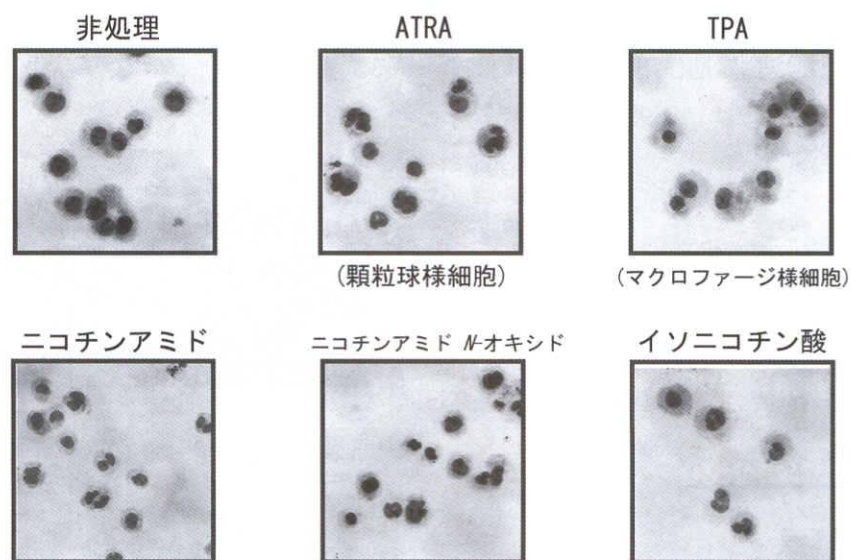


図 6. ヒト白血病細胞 HL-60 に対して各種処理を施し、核の形態をギムザ染色により観察した様子

についても今後明らかにしていくことにより、ビタミンという利点を生かしつつ、サプリメントや食事から効果的に、かつ日常的に摂取することにより、特に生活習慣病に対して予防的な側面を、一方で薬理的な量を摂取することにより、治療的な側面を担うという、新たなビタミンの有効利用について提言するものと期待される。

要 約

我々は、水溶性ビタミンの1つ、ニコチン酸およびその関連化合物の、生活習慣病の予防と治療を目的とした有効利用について取り組んできた。予防を目的とした利用のために、ニコチン酸とニコチンアミドが、ヒト正常リンパ球における損傷DNAの修復におよぼす影響について検討した。その結果、ニコチン酸によりDNA修復が促進した。また治療を目的とした利用のためには、ヒト白血病細胞HL-60に対する、アポトーシス誘導能、分化誘導能について、23種類のニコチン酸関連化合物を用いて検討した。その結果、ピコリン酸、ジピコリン酸、イソニコチンアミドにおいてアポトーシス誘導作用が認められた。またニコチンアミド、ニコチンアミドN-オキシド、イソニコチン酸において、顆粒球様細胞への分化誘導が認められた。

文 献

- 1) 緒方 進, 奥村克純, 田口 寛: NAD ワールドの新展開: 最新のトピックスと展望. 三重大学大学院生物資源学研究所紀要 **34** 55-62 (2007)
- 2) SVEDMYR, N., HARTHON, L., and LUNDHOLM, L., The relationship between the plasma concentration of free nicotinic acid and some of its pharmacologic effects in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **10**, 559-570 (1969).
- 3) 讚井 蕃: ニコチン酸アミドの植物に対する生育調節作用について. 植物の化学調節, **12**, 59-69 (1977).
- 4) 西谷 弘: ナイアシン関連化合物の生理作用および代謝に関する研究. 三重大学博士後期課程学位論文, (1996).
- 5) BIRNBOIM, H. C., and JEVCAK, J. J., Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res.*, **41**, 1889-1892 (1981).
- 6) BOSCO MC, RAPISARDA A, MASSAZZA S, MELILLO G, YOUNG H, VARESIO L. The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in macrophages. *J Immunol.* **164**, 3283-3291 (2000).
- 7) 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).
- 8) LUKASKI HC, SIDERS WA, PENLAND JG. Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight, composition, and iron status. *Nutrition* **23**, 187-195 (2007).
- 9) KOJIMA Y, YOSHIKAWA Y, UEDA E, KONDO M, TAKAHASHI S, MATSUKURA T, SAKURAI H, HIROI T, IMAOKA S, FUNAE Y. Blood glucose lowering and toxicological effects of zinc (II) complexes with maltol, hreonine, and picolinic acid. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **112**, 91-104 (2002).
- 10) WARTH, A. D., Determination of dipicolinic acid in bacterial spores by derivative spectroscopy, *Anal. Biochem.*, **130**, 502-505 (1983).
- 11) UEDA, K., and BANASIK, M., Inhibitors and activators of ADP-ribosylation reactions. *Mol. Cell. Biochem.*, **138**, 185-197 (1994).
- 12) TOTH, B., Lack of carcinogenicity of nicotinamide and isonicotinamide following lifelong administration to mice. *Oncology*, **40**, 72-75 (1983).
- 13) OGATA, S., TAKEUCHI, M., TERADAIRA, S., YAMAMOTO, N., IWATA, K., OKUMURA, K., and TAGUCHI, H. Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 641-645 (2002).
- 14) ARGYROU A, VETTING MW, BLANCHARD JS. New insight into the mechanism of action of and resistance to isoniazid: interaction of Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase with INH-NADP. *J Am Chem Soc.* **129**, 9582-9583 (2007).
- 15) IWATA, K, OGATA, S, OKUMURA, K, and TAGUCHI, H. Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line by niacin-related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1132-1135 (2003).
- 16) 日本ビタミン学会編: ビタミン学 [II], 水溶性ビタミン (東京化学同人)「第4章: ニコチン酸」, 227-303 (1980).