

ニコチン酸、ニコチンアミドおよびイソニコチン酸の ヒト白血病細胞に対する分化誘導

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

Differentiation induced by nicotinic acid, nicotinamide and isonicotinic acid in human leukemia cell lines

Shin OGATA, Chieri IDA, and Hiroshi TAGUCHI

Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507

Abstract

We have been investigating the effective uses of prevention and treatment of life style-related disease by nicotinic acid and its related compounds. We investigated differentiation-inducing abilities of 23 nicotinic acid-related compounds in two human leukemia cell lines. In this study, We used human myeloid leukemia cells, HL-60 and human erythroleukemia cells, K562. As the results, differentiation to granulocyte-like cells was induced by nicotinamide, nicotinamide *N*-oxide, and isonicotinic acid in HL-60 cells. In K562 cells, differentiation to erythroid-like cells was induced by nicotinic acid and isonicotinic acid.

Key Words: nicotinic acid, nicotinamide, human leukemia cell, NAD,
isonicotinic acid, 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、様々な研究が展開されてきた。主にその機能としては、ニコチン酸、ニコチンアミドを前駆体とし、生体内で各合成経路を経て、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。しかしながら、ADP-リボシル化に代表されるように、NADを基質とする種々の反応が見いだされつつある¹⁾。近年では、ジーンサイレンシングを始めとする遺伝子発現制御に関与するとされ、また糖尿病やアルツハイマー

病の発症に関与するとされる、Sirtuin シリーズの発見¹⁾、細胞内カルシウムイオンの濃度調節に関与するとされる因子の一つ、サイクリックADP-リボースの合成酵素である、ヒト表面抗原CD38に関しては、精神活動への影響についても報告がなされ²⁾、生命現象の根幹に関与する重要な現象として、また疾病予防の観点からも注目されている。以上のように、特にニコチンアミドは、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。

一方、ニコチン酸およびニコチンアミドは、単独でもしくはNADを介して、各種生物に対し様々な薬理的作用を有することが報告されている。そ

2009年10月30日受理

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* For correspondence (e-mail: hiroshi@bio.mie-u.ac.jp)

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³⁾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。一方、同様に NAD の前駆体として機能するニコチンアミドには、そのような作用はないが、ラットにおいて、ストレプトゾトシンやアロキサンにより誘発される糖尿病の予防効果や、一方で過剰摂取による成長阻害が報告されている⁴⁾。また、それら関連化合物についても、様々な薬理効果が報告されている。例えば、ピコリン酸、ジピコリン酸、イソニコチンアミドは、ヒト白血病細胞 HL-60 に対して、アポトーシス誘導作用を有する点⁵⁾、結核の治療薬として、古くから常用されてきた、イソニコチン酸ヒドラジドに関しては、各種活性酸素種に対する消去活性を有していること⁶⁾を、我々は見出している。

我々がかねてより、このビタミンおよびその関連化合物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様々な研究を展開してきた。今回は、その研究成果の中でも、特にヒト白血病細胞に対する分化誘導効果に関する知見に焦点を絞り、今後の展望について概説する。

実験方法

1. ヒト白血病細胞の培養および分化誘導

ヒト前急性骨髄性白血病細胞 HL-60 および、ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 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、5%の終濃度となるように設定した 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 および K562 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、HL-60 の場合、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、K562 の場合、赤芽球系細胞への分化誘導剤として、酪酸ナトリウムを用いて、同条件にて誘導を行った。

2. MTT アッセイによる細胞増殖への影響の解析

各種誘導処理において、分化誘導がなされているかについて確認するために、その指標のひとつとして、細胞の増殖抑制効果を目安とした。すなわち、細胞を誘導処理した後、5 mg/ml MTT 溶液を培地量に対して、1/10 量添加し、4 時間培養した後、さらに、イソプロパノールと塩酸からなる細胞溶解液を培地量に対して等量添加し、細胞増殖によって生成したホルマザンを可溶化した。その後、マイクロプレートリーダーにて、550 nm の吸光度を測定することにより、細胞増殖への影響を解析した。

3. 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 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、デジタルカメラにて撮影した。

4. ヘモグロビンの定量

細胞を遠心で回収後、ペレットを観察し、その変化をデジタルカメラで撮影した。その後、低張処理により細胞を破碎したのち、分光光度計により、ヘモグロビンの特徴的な吸収波長のひとつ、413 nm の吸光度を測定し、非誘導処理の細胞サンプルの吸光度を、100 とした場合で比較した。

結果と今後の展望

ヒト急性白血病細胞 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、分化誘導能を有しているユニークな細

胞株である⁷⁾。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が、大きな問題点として、再発率が高い点が挙げられる。そこで、他に分化誘導効果のある化合物と併用することで、分化誘導剤の全体的な濃度を下げるという対応がなされている。

そこで、我々は、そのような候補が、ニコチン酸、ニコチンアミドを始めとし、さらに 20 数種類におよぶ、それら関連化合物に存在しないかどうか着目した。その結果、図 1 では、誘導処理に伴う細胞増殖への影響を検討した結果である。細胞分化に先立って、まず増殖抑制がかかることを目安に、ニコチンアミドを始めとするいくつかの候補を得た。増殖抑制の目安としては、他の研究を参考に、誘導処理していない増殖率を、100%とした場合、約 70%以下とした。ただし、50%を切ると、ほとんどの細胞が死滅していた。なお、イソニコチン酸の場合、ほぼ 50%の増殖抑制を示したが、我々の過去の検討において細胞が死滅していない事を確認している⁵⁾。さらに、図 2 では、ギムザ染色を行い、核の形態を顕微鏡観察し

た結果である。いずれも、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（分葉化）が認められていた。一方、HL-60 がマクロファージ様に分化誘導する際に認められる特徴のひとつであるが、通常、浮遊状態で増殖する HL-60 が培養容器の底部に付着した状態を示すような化合物は認められなかった。

ヒト慢性白血病細胞 K562 は、酪酸ナトリウムやヘミンなどで赤血球様細胞へ分化誘導をさせる事が可能であるために、グロビン遺伝子の発現解析において、古くから利用されてきた細胞株である。

HL-60 の場合と同様、まずは、増殖抑制を目安にスクリーニングを行った結果、今回検討した化合物においては、HL-60 の場合とは傾向が異なり、ニコチン酸とイソニコチン酸において増殖抑制が認められ、誘導処理により赤血球様細胞の分化の特徴である細胞が赤みを帯びてくるとともに、ヘモグロビンの合成の上昇も認められた。しかしながら、ニコチンアミドに関しては、増殖抑制効果は認められたものの、そのような作用はな

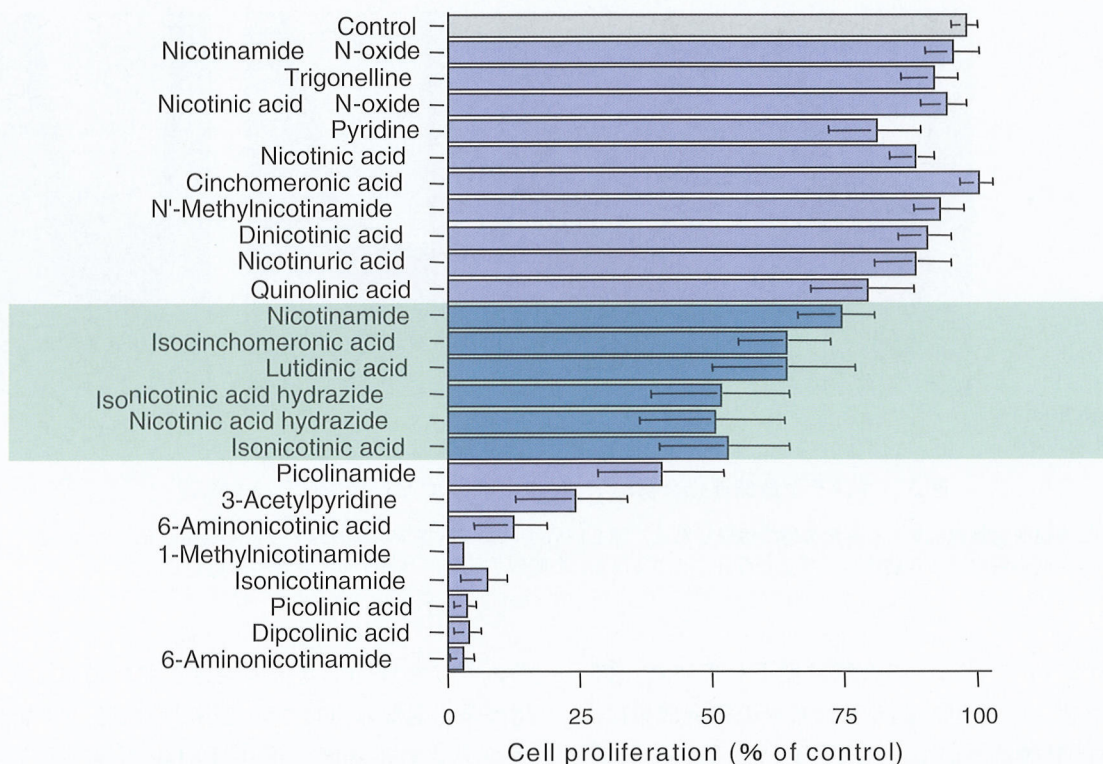


図 1. 第 1 次スクリーニング：MTT アッセイ法による細胞増殖抑制効果の検討

ヒト白血病細胞 HL-60 をニコチン酸関連化合物終濃度 10 mM にて処理した後、MTT アッセイにて細胞増殖への影響を検討した。

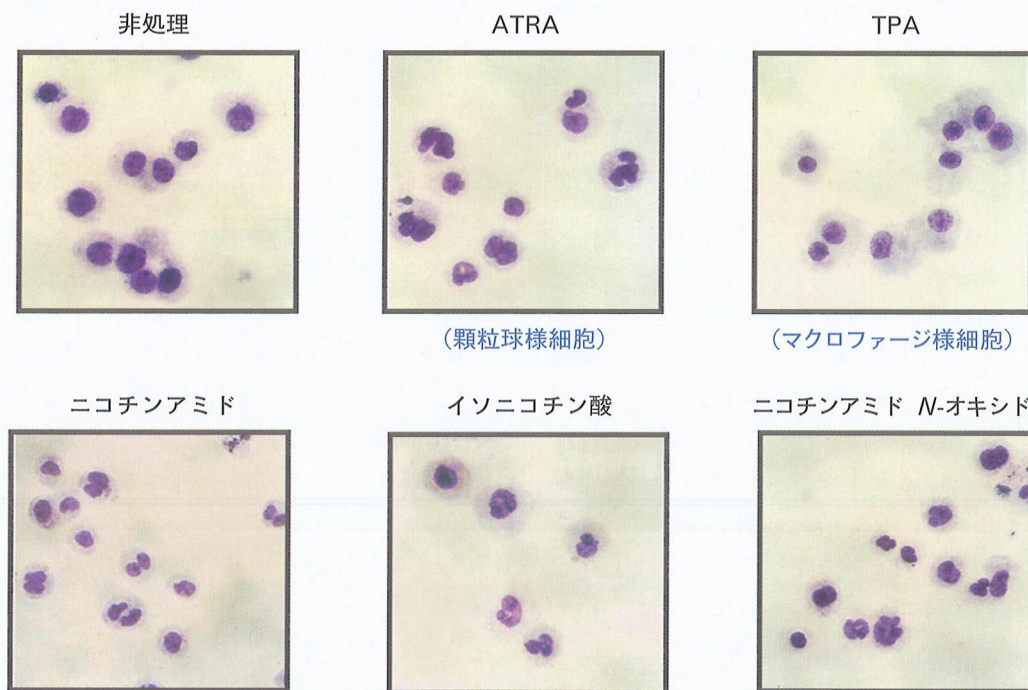


図2. ギムザ染色法による分化誘導能を有するニコチン酸関連化合物の検索

ヒト白血病細胞 HL-60 を各化合物終濃度 10 mM にて処理した後、細胞を固定、ギムザ染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。(ただし Positive control として用いた、ATRA は 1 μ M で、TPA は 16 nM で処理した。)

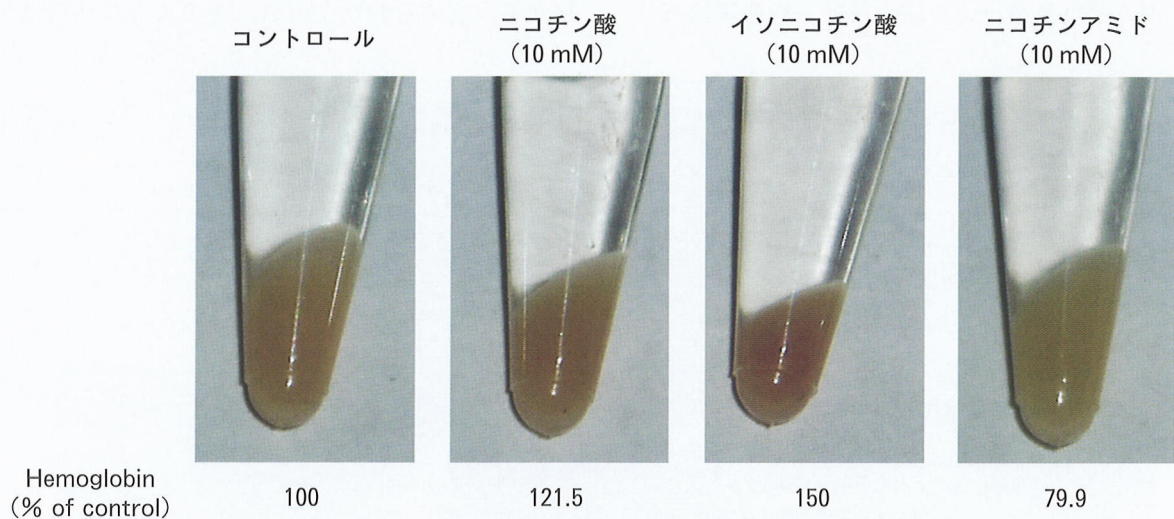


図3. ニコチン酸関連化合物が K 562 のヘモグロビン産生に及ぼす影響

ヒト白血病細胞 K562 を各化合物で処理した後、遠心回収後ペレットをデジタルカメラにて撮影した。さらに細胞を低張処理により破碎し、分光光度計により 413 nm の吸収を元に、ヘモグロビン量を測定した。

く、逆にヘモグロビンの合成は低下していた (図3および表1)。今回、紹介した我々の研究成果は、その作用機構について、現在、色々な観点から解析中である。

ニコチンアミドとニコチン酸は、ビタミンとしては、同じ NAD の前駆体として機能するが、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を示さない事に起因すると予想される¹⁾。著者らは、近

表 1. ニコチン酸関連化合物が K562 の細胞増殖に及ぼす影響

Compounds	Concentration (mM)	Cell proliferation ^a (% of control)
Control	—	100
N ¹ -Methylnicotinamide	15	64.2 ± 6.22
Isonicotinic acid	10	81.2 ± 1.53
Isonicotinic acid hydrazide	5	79.3 ± 3.10
Lutidinic acid	10	86.2 ± 3.92
Nicotinamide	10	84.0 ± 2.81
Nicotinamide N-oxide	25	63.0 ± 2.61
Nicotinic acid	10	89.8 ± 8.50
Nicotinic acid hydrazide	5	78.0 ± 3.42
	10	61.5 ± 2.50
Picolinic acid	1	82.3 ± 1.70
Picolinamide	15	69.5 ± 1.45
Positive control		
Sodium butyrate	1	66.9 ± 2.40

^a Cell proliferation was measured by MTT assay after 72h treatment.

Results are presented as means ± SD for three independent experiments.

年, このようなニコチンアミドの, ビタミンとしてではなく, 種々の生命現象に対する「調節因子」としての役割に着目し, 主に細胞死や, 今回報告した細胞分化におよぼす影響について研究を重ねてきた。しかしながら, 今回の検討で, K562 においては, ニコチンアミドによる分化誘導効果はなく, 逆に, HL-60 に対しては分化誘導効果があった点については意外な結果であった。ニコチンアミドの場合とは異なり, ニコチン酸は, その生理作用としては, あくまでも, ビタミンとしての作用のみと考えてきたが, ニコチンアミドと同様にニコチン酸それ自体も, 何らかの生化学反応の調節因子として機能している可能性が示唆される結果と考えている。もちろん, 白血病のタイプが違うのであるから, 分化誘導に反応する化合物に違いが生じてくる可能性についても否定できないし, 両者とも, NAD の前駆体として機能するのであるから, 結果的に細胞内 NAD 量の変動に影響してとも考えられる。しかしながら, 我々は, 過去の報告において, リンパ球などの血球系の細胞⁸⁾や, HL-60 などの白血病細胞においては, ニコチン酸では, 低濃度処理で細胞内 NAD 量が増加し, 逆に高濃度処理では細胞内 NAD 量が低下する, 一方, ニコチンアミドの場合, それとは逆の傾向を示す事を見出している。今回は, 同一処理条件

で検討しているの, その可能性は低いのではないかと考えている。

イソニコチン酸については, 今回検討した, どちらのタイプの白血病細胞にも効果を示すという, 既存の分化誘導治療剤では認められなかったような効果が見出された。イソニコチン酸自体は生体成分ではないが, ニコチン酸の構造異性体であり, 特に K562 に対する分化誘導効果については, ニコチン酸の標的因子に対して構造異性体として作用した結果とも考えられる。ただ, HL-60 の場合, その解釈では, 説明がつかない点が出てくる。本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。今後, イソニコチン酸の標的因子を同定していく事により, 本化合物の未知なる作用が見出される事が期待される。

謝 辞

本研究を進めていくにあたり, 有益なるご助言を賜りました, 三重大学大学院生物資源学研究所分子細胞生物学教育研究分野 教授 奥村克純先生に, この場をお借りして, 深く感謝申し上げます。

和文要旨

我々は、ニコチン酸およびその関連化合物による、生活習慣病の予防や治療への有効利用に関する検討を行ってきた。そして、23種類のニコチン酸関連化合物を用いて、2種類の白血病細胞株に対する分化誘導効果について検討を行った。今回の検討では、ヒト急性白血病細胞 HL-60 とヒト慢性白血病細胞 K562 を用いた。その結果、HL-60 においては、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効果が認められた。また、K 562 においては、ニコチン酸とイソニコチン酸において、赤血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科紀要 **34** 55-62 (2007)
- 2) 井田智恵利, 緒方 進, 田口 寛: オキシトシン制御による社会行動における CD 38 の役割. ビタミン **82** 48-49 (2008)
- 3) 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).
- 4) KNIP, M, DOUEK, I. F., MOORE, W. P., GILLMOR, H. A., MCLEAN, A. E., BINGLEY, P. J., and GALE, E. A., Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia*, 1337-1345 (2000).
- 5) OGATA, S., TAKEUCHI, M., OKUMURA, K., and TAGUCHI, H. Apoptosis induced by niacin-related compounds in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2351-2356 (1998).
- 6) 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).
- 7) BREITMAN, T. R. SELONICK, S.E., and COLLINS, S. J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 2936-2940 (1980).
- 8) OGATA, S., OKUMURA, K., and TAGUCHI, H. The effects of niacin on DNA repair after *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine treatment in normal human lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 2116-2118 (1997).