

ビタミン B₆ の抗腫瘍効果に関する基礎的・臨床的研究

岡 達 三 (鹿児島大学農学部教授)

1. はじめに

近年、ビタミンに対する社会の認識は大きく変化し、ビタミンの欠乏を対象とした時代から直接疾病の予防や治療に応用する時代へ変化してきている。腫瘍に対するビタミンの効果については、緑黄色野菜の摂取とがんのリスクに関する研究が報告されて以来、多くの疫学的研究や介入試験に基づいて抗酸化作用を示すカロテノイド、ビタミン C ならびにビタミン E などにがんのリスクと強い負の相関があることが示されてきた。世界中から得られたこれらの結果は、1997年に World Cancer Research Fund から発行された“Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective”にまとめられている。

一方、ビタミン B₆ (B₆) は、動物の成長や発生に必須な水溶性ビタミンであり、活性型であるピリドキサルリン酸 (PLP) がアミノ酸代謝に関与する酵素の補酵素として機能している。我々は、これまで B₆ の補酵素としての機能以外に、活性型である PLP が転写調節因子と相互作用して遺伝子発現を抑制することを明らかにしてきた¹⁻⁹⁾。一方、がん細胞やがん患者の血清では B₆ 濃度が減少していることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。本研究では、以上の結果に基づいて、がん細胞へ B₆ を添加すると細胞増殖性のがん遺伝子の発現を抑制し、ひいてはがん細胞の増殖を抑制するのではないかの考えに至り、がん細胞の増殖に及ぼす B₆ の効果を検討した。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

ヒト肝がん細胞である HepG2 細胞 (HB 8065, ATCC) を 10% 牛胎児血清, 100IU/ml penicillin ならびに 100μg/ml streptomycin を含む MEM 培地で培養した。

2.2 SDS-PAGE とアルブミンのイムノブロット分析

HepG2 細胞から分泌されるアルブミンに及ぼす B₆ の効果を検討する目的で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とイムノブロット分析を行った。50μl の培養液を SDS-PAGE で展開した後、Coomassie brilliant blue で染色した。一方、5μl の培養液を SDS-PAGE で展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてイムノブロット分析を行った。

2.3 ノーザンブロット分析

細胞から TRIzol 試薬 (GIBCO BRL) を用いて全 RNA を抽出した。アガロースゲルで電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、³²P で標識したヒトアルブミン cDNA および GAPDH cDNA を用いてノーザンブロットを行った。mRNA 発現量はレーザーデンスitomーターによって定量化した。

2.4 培養細胞のタンパク質合成能

MEM 0.1ml 当たり 1×10^4 個の細胞を 96 ウェルのプレート上で 24 時間培養した後、MEM のみあるいは種々の濃度のピリドキシンを含む MEM

と培地を交換し更に3時間培養した。その後、 $0.5\mu\text{Ci}$ の $[^{14}\text{C}]$ leucine (比活性 $56\text{mCi}/\text{mmol}$) を加えて16時間インキュベートした。インキュベート後細胞をPBSで洗い、マイクロチューブへ移した。遠心後、細胞に10%トリクロロ酢酸(TCA)を加え、TCA不溶性の沈殿物の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

2.5 形態学的解析

HepG2細胞をピリドキシン存在下あるいは非存在下で4日間培養した後、 $800\times g$ で3分間遠心して細胞を回収した。得られた細胞を2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer (pH 7.4) で3時間固定した。1% osmium tetroxide で再固定後、脱水してEpon 812で抱埋した。超薄切片をuranyl acetate と lead citrate で染色し、JEM-1200 EXLL電子顕微鏡にて観察した。

2.6 *in vivo* での腫瘍増殖に及ぼす B₆ の効果

マウス自然発症肝がん由来のMH-134細胞をC3H/Heマウスの背部皮下に移植し、3日後にコントロール、0.5 mg 群、1.0 mg 群に分けて飼育した。コントロール群には生理食塩水 $0.1\text{ml}/\text{body}$ を、0.5mg 群及び1.0mg 群には $10\text{mg}/\text{ml}$ の塩酸ピリドキシンをそれぞれ $0.05\text{ml}/\text{body}$ 、 $0.1\text{ml}/\text{body}$ ずつ腹腔内に毎日投与した。投与1週間後に腫瘍を摘出して重量を測定した。

3. 結 果

3.1 HepG2細胞の増殖に及ぼすピリドキシン及びその他の B₆ 化合物の効果

HepG2細胞を培養している培地にピリドキシンを加えると、投与量依存的に細胞の増殖を阻害した(図1)。特に5mMのピリドキシンを添加した細胞の増殖は完全に抑制された。一方、ピリドキシン以外の他の B₆ 化合物について、細胞増殖抑制の効果を検討した結果、ピリドキサルが

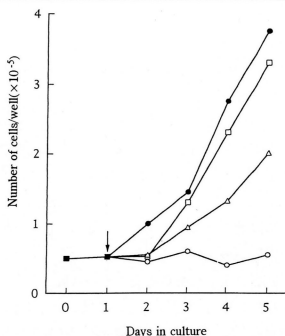


図1 HepG2細胞の増殖に及ぼすピリドキシンの効果
●: 0 mM, □: 2.5 mM, △: 4.0 mM, ○: 5.0 mM
ピリドキシン

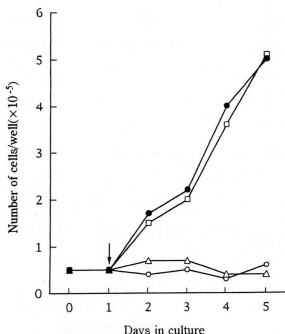


図2 HepG2細胞の増殖に及ぼすビタミン B₆ 化合物の効果
●: 無添加, □: ピリドキサミン, △: ピリドキサル,
○: ピリドキシン

効果的であった(図2)。5mMのピリドキシン存在下で培養した細胞をtrypan blueで染色すると96~98%がpositiveであり、ピリドキシン非存在の培地に変えて再び培養すると細胞の増殖が観察された。

3.2 HepG2細胞のアルブミン分泌に及ぼす ピリドキシンの効果

ヒト肝がん由来の HepG2 細胞は、肝特異的なアルブミンや α フェトプロテインのような血漿タンパク質を合成分泌する^{13,14)}。B₆が細胞の増殖を抑制するのみならず、細胞の機能にも影響を及ぼすかどうかを検討する目的で、アルブミンの分泌に及ぼすピリドキシンの効果を検討した。細胞を培養した培養液を毎日交換し、HepG2細胞から培養液中に分泌されたアルブミンを SDS-PAGE によって分析した。その結果ピリドキシンを含まないコントロールの培地には培養後5日目まで十分なタンパク質が観察されたが、ピリドキシンを含む培地では培養した時間に依存してタンパク質の分泌が減少した (図3A)。HepG2が分泌する主要なタンパク質はアルブミンであることから、アルブミンの分泌をイムノブロットによって検討した。5mMのピリドキシンを含む培地では、アルブミンの分泌が顕著に減少し、培養後5日目ではコントロールの10%まで低下した (図3B)。

3.3 アルブミン遺伝子発現に及ぼすピリドキシンの効果

ピリドキシンによるアルブミン分泌の低下がアルブミン mRNA の低下によるかどうかを検討す

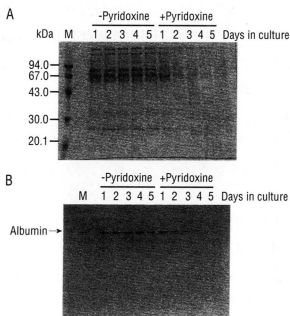


図3 HepG2細胞の分泌タンパク質に及ぼすピリドキシンの効果

A: 全ての分泌タンパク質に及ぼすピリドキシンの効果 (SDS-PAGE), B: アルブミンの分泌に及ぼすピリドキシンの効果 (イムノブロット)

る目的でノーザンブロットを行った。5mMのピリドキシンを培地に添加後、HepG2細胞におけるアルブミン mRNA レベルは20時間の代謝半減期で急速に減少した (図4A, B)。一方、コントロールとしての GAPDH の発現には何ら影響を及ぼさなかった (図4A)。これらの結果は、ピリドキシンが細胞内においてアルブミンのような分泌性タンパク質の発現に選択的に影響を及ぼすことを示唆している。

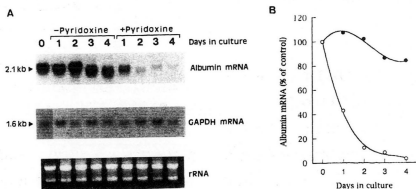


図4 HepG2細胞のアルブミン遺伝子発現に及ぼすピリドキシンの効果

A: アルブミン mRNA のノーザンブロット解析, GAPDH mRNA はコントロールとして示してある。

B: (A)をスキャン後、定量化してグラフで示してある。

●: -B₆, ○: +B₆

3.4 タンパク質合成に及ぼすピリドキシンの効果

細胞内タンパク質合成に及ぼすピリドキシンの効果について検討した。HepG2 細胞を種々の濃度のピリドキシンと 3 時間インキュベートした後、標識ロイシンの細胞内タンパク質への取り込みを検討した。HepG2 細胞におけるタンパク質合成能は添加したピリドキシンの濃度依存的に減少し、

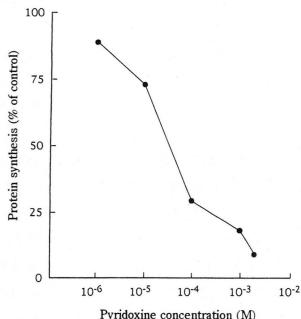


図 5 HepG2 細胞のタンパク質合成能に及ぼすピリドキシンの効果

[¹⁴C] ロイシンの細胞内タンパク質への取り込みによりタンパク質合成能を測定した。ピリドキシンを加えない時のタンパク質合成能 (81,000cpm/well) を 100% とした。

5 mM ピリドキシンではコントロールの 10% まで低下した (図 5)。

3.5 細胞の形態に及ぼすピリドキシンの効果

細胞内クロマチン構造は、遺伝子の転写活性に依存して変化することが知られている¹⁵⁾。B₆ は HepG2 細胞のアルブミン遺伝子発現を抑制することから、B₆ による HepG2 細胞の形態的变化を電子顕微鏡によって観察した。ピリドキシン非存在下で培養したコントロールの HepG2 細胞は、核膜がくびれた典型的ながん型の細胞核を示すとともに複数個の核小体が観察された (図 6 A)。一方、5 mM のピリドキシン存在下で培養した細胞は 1 個の核小体をもつ滑らかな環状の核を示し、核膜周辺には多くのヘテロクロマチンが観察された (図 6 B)。

3.6 *in vivo* での腫瘍増殖に及ぼす B₆ の効果

マウス自然発症肝がん由来の MH-134 細胞を C3H/He マウスの背部皮下に移植し、*in vivo* での腫瘍増殖に及ぼす B₆ の効果を検討した。腫瘍細胞を移植後、3 日目から 0.5mg と 1.0mg の塩酸ピリドキシンをそれぞれ腹腔内に 1 週間投与した。その後腫瘍組織を摘出して重量を測定した結果、0.5 mg 群ではコントロールの 60% まで、また 1.0mg 群では 50% まで低下した (図 7)。一方、

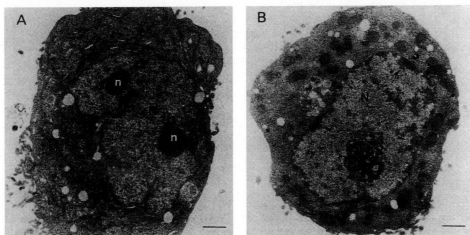


図 6 HepG2 細胞の形態学的変化に及ぼすピリドキシンの効果

A: ピリドキシンを含まない培地で培養した HepG2 細胞, B: 5 mM のピリドキシンを含む培地で培養した HepG2 細胞

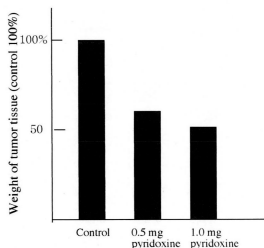


図7 マウス自然発症肝がん由来 MH-134 細胞を移植した担がんモデルマウスのがん組織重量に及ぼすピリドキシンの効果

マウス自然発症肝がん由来の MH-134 細胞を C3H/He マウスの背部皮下に移植し、3 日後にコントロール、0.5mg 群、1.0 mg 群に分けて飼育した。コントロール群には生理食塩水 0.1 ml/body を、0.5mg 群及び 1.0mg 群には 10mg/ml の塩酸ピリドキシンをそれぞれ 0.05ml/body、0.1ml/body ずつ腹腔内に毎日投与した。投与 1 週間後に腫瘍を摘出して重量を測定した。コントロールを 100% として示してある。

マウスの体重や肝重量には何ら変化は観察されなかった。

4. 考 察

DiSorbo らは、ラット hepatoma 細胞である Fu 5-5 を培養している培地に 5 mM のピリドキシンを添加してがん細胞の増殖抑制効果を観察した¹⁵⁾。このような効果は、肝がん細胞のみならず 0.5 mM のピリドキサルを添加したヒトメラノーマ細胞においても観察されている¹⁶⁾。しかし B₆ による Fu 5-5 細胞やヒトメラノーマ細胞の増殖抑制機構については明らかにされていない。

本研究では、ヒト肝がん細胞である HepG2 細胞を培養した培地にピリドキシンを加えて顕著な増殖抑制効果を観察した。HepG2 細胞は、アルブミン分泌能を有していることからアルブミンの分泌に及ぼすピリドキシンの効果を検討し、アルブミンの分泌は 5 mM のピリドキシンによって有意に低下することを観察した。またアルブミン分泌の低下はアルブミン遺伝子発現の低下に起因

していた。

B₆ の活性型である PLP は、アミノ酸代謝に関与する酵素の補酵素として知られているが、補酵素としての機能以外にも RNA polymerase¹⁷⁾、Reverse transcriptase¹⁸⁾ あるいは DNA polymerase¹⁹⁾ の活性部位に存在するリジン残基の ϵ -NH₂ とシッフベースを介して結合し、それぞれの酵素の活性を阻害することが知られている。また Cidrowski のグループは、細胞内の PLP 濃度を変化させることによってステロイドホルモン依存性のレポーター遺伝子の発現が変化することを報告し、PLP はステロイドファミリーによる遺伝子発現の modulator であることが示唆されている^{20,21)}。

一方、我々は B₆ 欠乏ラットの肝臓においてアルブミン遺伝子発現が増大することを見だし、PLP の HNF1 や C/EBP といった転写調節因子への結合が解除された結果、転写調節因子の DNA への結合が増大し、アルブミン遺伝子発現が増大することを報告してきた⁴⁾。今回、HepG2 細胞におけるアルブミン遺伝子発現も 5 mM のピリドキシンによって有意に低下したが、これも PLP が転写調節因子へ結合した結果、転写調節因子の DNA への結合が抑制され、アルブミン遺伝子発現が減少したと思われる。ピリドキシンによる細胞増殖抑制については、今後増殖性因子の遺伝子発現についても検討する予定である。

HepG2 細胞を形態的に観察すると典型的な癌型の細胞核が観察されたが、ピリドキシンの添加により、HepG2 は正常な細胞核を示し、核小体は 1 個で核膜周辺には多くのヘテロクロマチンが観察された。これは B₆ が転写調節因子のみならず細胞増殖に関わるに他の様々な細胞内タンパク質とも相互作用した結果である可能性を示唆している。また B₆ による抗腫瘍効果はマウス自然発症肝癌由来の MH-134 細胞を移植した C3H/He

マウスを用いた *in vivo* の実験でも観察され、ピリドキシンを投与したマウスのがん組織重量は、コントロールに比べて約50%まで減少した。今後がん組織中のがん遺伝子発現に及ぼす B₆ の効果や延命効果を検討していく予定である。ビタミン B₆ は水溶性ビタミンとはいうものの高濃度で長期間摂取することにより神経症などの副作用を起こすことが知られていることから、ヒトへ応用する場合、慎重な投与量の評価が必須であると思われる。最近、疫学調査から B₆ が肺がんのリスクを減少させることが報告された^{22,23)}。将来、ビタミン B₆ ががんの予防に対して有効となることが期待される。

5. ま と め

ビタミン B₆ の抗腫瘍効果について HepG2 細胞と MH-134 細胞を移植した担がんモデルマウスを用いて検討した。HepG2 細胞の増殖とタンパク質合成は 5 mM のピリドキシンを培地に加えることによって完全に抑制された。種々の B₆ 化合物について検討した結果、ピリドキサルがピリドキシンと同様の効果を示した。ピリドキシンによる HepG2 細胞の増殖抑制は、アルブミン遺伝子発現の抑制とアルブミンの分泌の抑制を伴っていた。HepG2 細胞を形態的に観察すると典型的な癌型の細胞核が観察されたが、ピリドキシンの添加により、HepG2 は正常な細胞核を示し、核小体は 1 個で核膜周辺には多くのヘテロクロマチンが観察された。またマウス自然発症肝がん由来の MH-134 細胞を C3H/He マウスの背部皮下に移植し、*in vivo* での腫瘍増殖に及ぼす B₆ の効果を検討した。腫瘍細胞を移植後、3 日目から 0.5 mg と 1.0 mg の塩酸ピリドキシンをそれぞれ腹腔内に 1 週間投与した結果、腫瘍組織重量は 0.5mg 群ではコントロールの 60%まで、また 1.0mg 群では50%まで低下した。

最後に、本研究を遂行するにあたり、多大なるご援助を賜りました浦上食品・食文化振興財団および関係各位に心より感謝いたしますとともに、貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) 岡 達三 農芸化学会誌 72, 1187-1190 (総説) (1998)
- 2) Oka, T., Komori, N., Kuwahata, M., Sassa, T., Suzuki, I., Okada, M. and Natori, Y. *FEBS Lett.* 331, 162-164 (1993)
- 3) Oka, T., Komori, N., Kuwahata, M., Suzuki, I., Okada, M. and Natori, Y. *Experientia* 50, 127-129 (1994)
- 4) Oka, T., Komori, N., Kuwahata, M., Okada, M. and Natori, Y. *Biochem. J.* 309, 243-248 (1995)
- 5) Oka, T., Komori, N., Kuwahata, M., Hiroi, Y., Shimoda, T., Okada, M. and Natori, Y. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41, 363-375 (1995)
- 6) Sato, A., Nishioka, M., Awata, S., Nakayama, K., Okada, M., Horiuchi, S., Okabe, N., Sassa, T., Oka, T. and Natori, Y. *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 409-413 (1996)
- 7) Oka, T., Kuwahata, M., Sugitatsu, H., Tsuge, H., Asagi, K., Kohri, H., Horiuchi, S. and Natori, Y. *J. Nutr. Biochem.* 8, 211-216 (1997)
- 8) Molina, A., Oka, T., Munoz, S., Chikamori-Aoyama, M., Kuwahata, M. and Natori, Y. *Nutr. Cancer* 28, 206-211 (1997)
- 9) Oka, T. *Nutr. Res. Rev.* 14, 257-265 (2001)
- 10) Thanassi, JW., Nutter, LM., Meisler, NT., Commers, P. and Chiu, JF. *J. Biol. Chem.* 256, 3370-3375 (1981)
- 11) Potera, C., Rose, DP. and Brown, RR. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1677-1679 (1977)
- 12) Chrisley, BM., Hendricks, TS. and Driskell, JA. *Nutr. Res.* 6, 1023-1029 (1986)
- 13) Javitt, NB. *FASEB J.* 4, 161-168 (1990)
- 14) Knowles, BB., Howe, CC. and Aden, DP. *Science* 209, 497-499 (1980)
- 15) DiSorbo, DM. and Litwack, G. *Nutr. Cancer* 3, 216-222 (1982)
- 16) DiSorbo, DM. and Nathanson, L. *Nutr. Cancer* 5, 10-15 (1983)
- 17) Venegas, A., Martial, J. and Valenzuela, P. *Bio-*

- chem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1053-1059 (1973)
- 18) Basu, A., Tirumalai, RS. and Modak, MJ. *J. Biol. Chem.* 264, 8746-8752 (1989)
- 19) Modak, MJ. *Biochemistry* 15, 3620-3626 (1976)
- 20) Allgood, VE., Powell-Oliver, FE. and Cidlowski, JA. *J. Biol. Chem.*, 265, 12424-12433 (1990)
- 21) Allgood, VE. and Cidlowski, J. A. *J. Biol. Chem.*, 267, 3819-3824 (1992)
- 22) Hartman, T., Woodson, K., Stolzenberg-Solomon, R., Vitamo, J., Selhub, J., Barrett, MJ. and Albanes, D. *Am. J. Epidemiol.* 153, 688-693 (2001)
- 23) 趙 升, 岡 達三 ビタミン 75, 395-396 (2001)

Basic and clinical study on the anti-tumor effect of vitamin B₆

Tatsuzo Oka (Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

The effect of vitamin B₆ on the growth of a human hepatoma cell line HepG2 in culture and MH-134 hepatoma-bearing mice were studied. The growth of HepG2 cells and protein synthesis were almost completely inhibited in medium supplemented with 5 mM pyridoxine. Pyridoxal was as effective as pyridoxine, but pyridoxamine showed no inhibitory action. The growth inhibition of HepG2 cells by pyridoxine was accompanied by a marked inhibition of secretion of plasma proteins, particularly albumin. Northern blot analysis of albumin mRNA showed that pyridoxine caused a rapid decrease in the expression of albumin gene. The electron-microscopic examination of pyridoxine-treated HepG2 cells revealed a smoothing of nuclear membrane, a decrease in the number of nucleoli, and an appearance of aggregated heterochromatin structures. These morphological features are compatible with the depressed transcriptional activity in the pyridoxine-treated cells. On the other hand, the weight of tumor tissue was decreased to 50% by the administration of 1 % pyridoxine to MH-134-bearing mice.