ビタミン B₆ の抗腫瘍作用およびホモシステインの神経傷害の作用機序, 食品摂取頻度と血漿ホモシステイン濃度に関する研究

(平成 26 年度日本栄養・食糧学会奨励賞受賞)

叶 内 宏 明^{*、1}

(2014 年 7 月 25 日受付; 2014 年 10 月 31 日受理)

要旨: ビタミン B₆ (B₆) の抗腫瘍作用が報告されており, その作用機序を検討した。乳癌細胞株 MCF-7 を用いて B₆ が p53 タンパク質を介して細胞増殖を抑制することを明らかにした。また, B₆ の中でピリドキサル (PL) が最も強い作用を持つこと, PL は他の B₆ に比べて細胞膜親和性が高いことを見いだした。B₆ を必要とする代謝の 1 つにホモシステイン (Hcy) 代謝がある。疫学調査の結果から, 高 Hcy 血症と認知症の関連が示唆されている。神経芽細胞腫 SH-SY5Y と星状膠細胞 U-251MG を用い, Hcy の神経細胞傷害に U-251MG から放出される未知な細胞死誘導因子が関係することを見いだした。鹿児島県あまみ地域住民における血漿 Hcy 濃度と食品摂取状況の横断的疫学研究から, 血漿 Hcy を下げる因子として男性および閉経後の女性では豆類の高頻度摂取, さらに女性では卵の高頻度摂取が関係することを見いだした。

キーワード: ビタミン B₆, 乳癌, p53, ピリドキサル, ホモシステイン

ビタミン B₆ (B₆) は補酵素として様々な生体内反応に必須であるが, 近年 B₆ のがん抑制作用が明らかにされつつある。がん患者血清中の B₆ 濃度はがん患者以外よりも低い¹⁾²⁾。また Johansson *et al.*³⁾ は European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort study において血清 B₆ 濃度が低いと肺がんのリスクが低くなることを報告している (5.7–28.4 nM vs. 57.8–629 nM of B₆; odds ratio, 0.44; 95% CI, 0.33–0.60; *p* value for the trend, <0.001)。薬物によって誘導した大腸がんモデルマウス, もしくは乳がんモデルラットに B₆ を過剰に経口投与することで, がん化が抑制されることも報告されている⁴⁾⁵⁾。ネコ乳がん細胞株 FRM は 5 mM のピリドキシン (PN) 添加によって細胞増殖が完全に抑制され, 電子顕微鏡による観察ではアポトーシス様の核断片化・凝集や細胞が被乳期に似た形態に変化することが明らかにされている⁶⁾。DNA マイクロアレイによって, 5 mM PN 添加後のヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞の遺伝子発現変化を解析した結果, 発現量を増大させる遺伝子として *Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3)*, *Clusterin*, *Sequestosome 1*, 抑制する遺伝子として *Annexin A1*, *Cyp11B1* などが見いだされている⁷⁾。HT29 大腸がん細胞もしくは HepG2 肝臓がん細胞にピリドキサル (PL) を添加した場合, IGFBP-1 発現の上昇が報告され

ている⁸⁾。PN による遺伝子発現調節機構として, いくつかの転写因子に活性型 B₆ であるピリドキサル 5' リン酸 (PLP) がシッフ塩基を介して結合して, DNA との結合性に影響を及ぼすことが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。PN によって遺伝子発現が誘導される遺伝子のうちアポトーシスを誘導することが知られている IGFBP-3 の誘導機序を明らかにするため, 細胞内シグナル経路に関与するさまざまな阻害剤を用いて検討を行った。その結果 p53 選択的阻害剤であるピフィスリン- α が PN による IGFBP-3 誘導を抑制することを見いだした¹¹⁾。

ここまでの研究では B₆ として PN を用いていたが, MCF-7 の細胞増殖を完全に阻害する濃度が 10 mM と極めて高い問題があった。再度, MCF-7 を用いて各種 B₆ の増殖抑制活性を比較した結果, ピリドキサル (PL) が最も強い作用であり, 0.5 mM PL が 10 mM PN と同等の細胞増殖抑制作用を持つことを明らかにした。また, 0.5 mM PL によっても IGFBP-3 発現が誘導された。IGFBP-3 誘導に p53 の関与が疑われたため, 細胞内 p53 量をイムノブロットング法および免疫細胞化学的方法で検討し, PL 添加後に p53 量が増大すること, さらに p53 の細胞核内移行が認められた⁷⁾。これらの結果から PL は p53 を活性化することが示唆された。細胞周期解析を行い, 0.5 mM PL 添加 1 日後から SubG₁ 細胞集団

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: kano@agri.kagoshima-u.ac.jp)

¹ 鹿児島大学共同獣医学部基礎獣医学講座分子病態学分野 (890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24)

および G_0/G_1 期細胞集団の割合上昇, G_2/M 期細胞集団の割合減少が認められた¹²⁾。これらの影響も p53 の活性化が関与していると推測される。p53 siRNA を導入して p53 をノックダウンした条件で PL の影響を検討した結果, 0.5 mM PL による細胞生存率の低下および細胞増殖抑制作用は認められなくなった⁶⁾。同様な結果は p53 選択的阻害剤ピフィスリン- α 添加時にも認められた。これらの結果は PL による MCF-7 細胞の細胞死誘導作用および細胞増殖抑制作用は p53 が重要な役割を担っていることを意味している。Zhang *et al.*¹³⁾ は同様に PL が p53 を活性化することを様々ながん細胞株およびマウスを用いた *in vivo* 試験で明らかにしている。一方, 10 mM 以上の PL を添加した場合にはピフィスリン- α が存在しても顕著な細胞死が誘導され, 高濃度 PL は p53 が関与しない細胞死を誘導することが示唆された。PN や PL によって誘導される sequestosome 1 や clusterin はピフィスリン- α 添加の影響を全く受けない (未発表)。B₆ が p53 以外の転写因子も活性化していることを示唆している。

B₆ の中で PL は最も強く MCF-7 細胞増殖を抑制する。B₆ の構造の違いによる作用の違いはマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞においても認められている¹⁴⁾。RAW264.7 細胞をリボポリサッカライドで刺激すると NF- κ B の活性化が起こるが, 各種 B₆ はそれぞれこの活性化を抑制する。その中で PL は特に強い作用を持つ。このような B₆ の細胞への作用の違いが活性型 B₆ である PLP の細胞内濃度の変化に起因すると推測し, 各種 B₆ 添加後の PLP の細胞内濃度を比較した。PN 添加後に細胞内 PLP 濃度が有意に高くなったが, その他の B₆ は細胞内 PLP 濃度に影響を及ぼさなかった¹⁴⁾。これらの結果は PL が最も強い作用を持つことと矛盾している。また B₆ のアンタゴニストとして用いられる 4-デオキシピリドキシンを過剰量添加しても PL の細胞増殖抑制作用は影響を受けないこと (図 1), 4-デオキシピリドキシ単独投与は PN と同程度の細胞増殖抑制作用を示すことを明らかにした。すなわち, B₆ の細胞増殖抑制作用は PLP を介していないことを示唆している。B₆ の生理作用発揮に細胞膜上で何らかのタンパク質との相互作用が関与していると仮説をたて, 各種 B₆ と細胞膜の親和性を, 表面共鳴プラズモンセンサーを用いて測定した。金膜状に培養した RAW264.7 細胞上に PBS もしくは試験液 (各種 B₆ を添加した PBS) を流しながら, 下方からレーザーを照射し, 反射角度の変化をグラフ化した (図 2)。試験液を流している間はピリドキサミンが最も細胞膜と相互作用をしているが, 試験液から PBS に変更した後, 反射角度が初期状態に戻るまでを比較すると, PL が最も値が大きかった。PL は他の B₆ に比べて細胞膜との親和性が強いことを示唆しているが, さらに慎重な検討が必要である。

メチオニン代謝は B₆ を必要とすること, その代謝異

図 1 4-デオキシピリドキシが MCF-7 細胞生存率に及ぼす影響

96 well プレートに播種した翌日に各種濃度の 4-デオキシピリドキシもしくは 0.5 mM ピリドキサルを同時に添加し 24 時間培養した。細胞生存率はアラマブルーを添加して 2 時間後の培地の吸光度変化を測定した。 $n = 4$, 異なる文字間に有意差あり, $p < 0.05$, Tukey-Kramer の HSD 検定。

常で生じるホモシステイン (Hcy) が認知症のリスクになることが報告されている¹⁵⁾。これまで Hcy の神経細胞傷害メカニズムについての検討を, アルツハイマー病研究で頻繁に用いられるヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて行った。SH-SY5Y 細胞の細胞生存率に影響を及ぼす Hcy 濃度は 1 mM 以上であった¹⁶⁾。血漿中 Hcy 正常域は一般的に $< 15 \mu\text{M}$ とされる¹⁷⁾。Hcy 血症患者において 1 mM を超える例はないため (叶内ら, 未発表), 生理的条件下で Hcy 分子が直接 SH-SY5Y 細胞に傷害を与えることはないと推測している。しかし, SH-SY5Y 細胞とアストロサイトに分類されるヒト星状膠細胞株 U-251MG 細胞との共培養時に Hcy を添加すると, $50 \mu\text{M}$ Hcy が SH-SY5Y 細胞の生存率を低下させた¹⁸⁾。U-251MG 細胞の生存率に影響は認められない。共培養実験を行ったきっかけは, 脳内環境において神経細胞は近接するアストロサイトに多くの影響を受けているため, 同様な環境を再現することであった。U-251MG 細胞を $100 \mu\text{M}$ Hcy 添加培地で 5 日間培養し, その培養液 (コンディションドメディウム) で SH-SY5Y を培養すると細胞生存率が有意に低下した。Hcy を添加せずに調製したコンディションドメディウムでは毒性は認められなかった。これらの結果は, U-251MG 細胞から SH-SY5Y 細胞の生存率に影響を与える分子の放出が Hcy 刺激によって起こっていることを示唆している。Hcy はスーパーオキシドアニオン産生酵素である NADPH オキシダーゼを活性化することが報告されている¹⁹⁾。NADPH オキシダーゼ選択的阻害剤であるアポサイニンを用いると, U-251MG 細胞を介した Hcy の SH-SY5Y 細胞傷害が抑制された¹⁸⁾。しかし, 培地中のスーパーオキシドアニオン, 過酸化水素, 過酸化脂質濃度を定量したがいずれも変化は認められなかった¹⁷⁾。すなわち, 活性酸素種は

図2 表面共鳴プラズモンセンサーを用いたRAW264.7細胞表面と各種B₆の親和性の比較
金膜上で培養した細胞上に各種B₆を含むリン酸緩衝生理食塩水液(PBS)を流した。細胞膜上に分子が結合すると縦軸の値が大きくなる。図左は1 mMのPL, PM, もしくはPNを流した結果, 図右は各濃度のPLを流した結果を示す(Nutrition, 2010 (26), 648-652¹⁴⁾より転載)。

毒性物質としてではなく、細胞内シグナルに利用されている可能性が疑われる。また、U-251MG細胞から神経細胞死を起こす分子が産生されていることが示唆される。

Hcyの直接の細胞傷害性について結論は出ていないが、その血漿中濃度はメチオニン代謝状態の指標になる。メチオニン代謝はメチル基供与などの一炭素代謝やシステインへの変換およびグルタチオン産生の場合である。メチル基を必要とする様々な分子、特に近年はエピジェネティクスの異常と疾病の関係も報告されている²⁰⁾²¹⁾。またグルタチオンは生体内抗酸化分子として極めて重要であることは言うまでもない。高Hcy血症改善のために葉酸、B₁₂、B₆などを強化した介入試験において高Hcy血症が改善されているが、心血管疾患の発症などの改善には至っていない²¹⁾。高用量の葉酸投与によってHcy濃度の改善がされても、高用量の葉酸は5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素などを阻害するため²²⁾、メチオニン代謝が改善されない場合が起こりうる。特定のビタミン強化に頼らず、日々の食生活によってメチオニン代謝を改善することが可能であるか模索することを目的として、食品摂取頻度調査結果と血漿Hcy濃度の関係について横断的調査「あまみの生活習慣病予防と長寿に関する研究」に参加した(鹿児島大学倫理委員会受付番号第76号)。対象者の平均年齢は54.1歳であり、男性年齢と女性年齢の間に有意差は認められていない。しかし、女性に比べて男性の血漿Hcy濃度が有意に高く、女性においても閉経後にHcy濃度が有意に高いことが示された(男性 18.4 ± 6.9 ($n = 1,174$), 女性閉経前 15.4 ± 6.1 ($n = 246$), 女性閉経後 17.4 ± 7.1 ($n = 947$), $\text{mean} \pm \text{SD} \mu\text{M}$)。血漿Hcy濃度と年齢に正の相関があることが報告されている¹⁷⁾。しかし、本研究では年齢とHcyの間に相関は認められなかった。その原因

として、本研究の調査参加者は39歳以上としたことが考えられる。平均年齢26歳であった当研究室在籍者6名の血漿Hcy濃度は $12.5 \pm 4.8 \mu\text{M}$ ($\text{mean} \pm \text{SD}$)であり、本疫学研究の対象者と比べて低濃度であった。調査を行った地域では、39歳までに血漿Hcy濃度が上昇し、その後、ほぼ一定水準になっていることが推測される。喫煙をしている場合としていない場合を比べると、全体および男性のみで場合分けした場合に有意に高かった($p < 0.05$)。飲酒は1日純アルコール量で約40g(日本酒2合以上)を摂取している場合とそうでない場合で比較したが、有意な差は認められなかった。食品摂取頻度を数値化してHcyとの関係のある食品の抽出をステップワイズ法(F値1以上)で行い、重回帰分析(JMP ver. 9)を行った。男性では豆類もしくは魚の摂取頻度が高い場合、女性では卵の摂取頻度が高い場合にHcy濃度が低くなる関係が明らかになった。一方、葉酸を多く含む野菜類の摂取頻度とHcy濃度に関連は認められなかった(叶内ら、未発表)。若年男性を対象にした研究²³⁾においても野菜類摂取とHcy濃度に有意な関連はないこと、納豆、豆腐の摂取頻度が高いとHcy濃度が低くなる傾向が報告されている。大豆に含まれるイソフラボンはエストロゲン様作用を持つ。男性で豆類によってHcy濃度が低いことと関連性が疑われる。卵とメチオニン代謝についてはこれまで関連づける論文は報告されていない。Hcyからメチオニンへの変換過程のひとつにコリンが関わっており、コリン由来サプリメントがHcy濃度改善作用を示すことが報告されている²⁴⁾。卵に豊富に含まれるフォスファチジルコリンが関係している可能性もあるが、今後詳細な検討が必要である。

B₆による乳がん細胞増殖抑制作用メカニズム、Hcyの神経細胞毒性メカニズム、最後にメチオニン代謝を改

善しうる食事についてこれまで得られた結果を紹介した。説明が不十分である箇所も多々あるため引用した文献をご参照いただければ幸いである。

本奨励賞の受賞に際し、推薦、選考いただきました先生方に厚くお礼申し上げます。ビタミンB₆の新機能を開拓され、研究だけでなく多くのお手本を示して下さい、故岡達三先生に感謝の意を表するとともに、誌面を借りてご冥福をお祈りいたします。博士後期課程から今にいたるまで公私にわたりお世話になっております、九州大学教授山田耕路先生ならびに立花宏文先生に心から感謝申し上げます。表面共鳴プラズモンセンサーを用いた実験、B₆測定、疫学調査はそれぞれ、九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点准教授藤村由紀先生、四国大学生生活科学部教授渋谷まゆみ先生、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授嶽崎俊郎先生にお世話になりました。厚くお礼申し上げます。さらには、熱心に研究に従事してくれた鹿児島大学分子病理学分野の卒業生、研究をバックアップいただいた企業とその研究員の皆様にも厚くお礼申し上げます。

文 献

- Potera C, Rose DP, Brown RR (1977) Vitamin B₆ deficiency in cancer patients. *Am J Clin Nutr* **30**: 1677-9.
- Chrisley BM, Hendricks TS (1986) Vitamin B-6 status of a group of cancer patients. *Nutr Res* **6**: 1023-9.
- Johansson M, Relton C, Ueland PM, Vollset SE, Midttun Ø, Nygård O, Slimani N, Boffetta P, Jenab M, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Fagherazzi G, Kaaks R, Rohrmann S, Boeing H, Weikert C, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, van Gils CH, Peeters PH, Agudo A, Barricarte A, Navarro C, Rodríguez L, Sánchez MJ, Larrañaga N, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Crowe F, Gallo V, Norat T, Krogh V, Masala G, Panico S, Sacerdote C, Tumino R, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Rasmuson T, Hallmans G, Riboli E, Vineis P, Brennan P (2010) Serum B vitamin levels and risk of lung cancer. *JAMA* **303**: 2377-85.
- Komatsu S, Watanabe H, Oka T, Tsuge H, Kato N (2002) Dietary vitamin B₆ suppresses colon tumorigenesis, 8-hydroxyguanosine, 4-hydroxynonenal, and inducible nitric oxide synthase protein in azoxymethane-treated mice. *J Nutr Sci Vitaminol* **48**: 65-8.
- Shimada D, Fukuda A, Kawaguchi H, Kato N, Yoshida H, Kanouchi H, Oka T (2005) Effect of high dose of pyridoxine on mammary tumorigenesis. *Nutr Cancer* **53**: 202-7.
- Shimada D, Fukuda A, Kanouchi H, Matsumoto M, Oka T (2006) Vitamin B₆ suppresses growth of the feline mammary tumor cell line FRM. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1038-40.
- 叶内宏明, 岡達三 (2012) 乳がん細胞株におけるビタミンB₆の遺伝子発現調節作用. *ビタミン* **86**: 425-31.
- Zhang P, Suidasari S, Hasegawa T, Yanaka N, Kato N (2013) High concentrations of pyridoxal stimulate the expression of IGFBP1 in HepG2 cells through up-regulation of the ERK/c-Jun pathway. *Mol Med Rep* **8**: 973-8.
- Oka T (2001) Modulation of gene expression by vitamin B₆. *Nutr Res Rev* **14**: 257-66.
- Huq MD, Tsai NP, Lin YP, Higgins L, Wei LN (2007) Vitamin B₆ conjugation to nuclear corepressor RIP140 and its role in gene regulation. *Nat Chem Biol* **3**: 161-5.
- Nakari M, Kanouchi H, Oka T (2011) High dose of pyridoxine induces IGFBP-3 mRNA expression in MCF-7 cells and its induction is inhibited by the p53-specific inhibitor pifithrin-α. *J Nutr Sci Vitaminol* **57**: 280-4.
- Masaki M, Tatsuzo O, Hiroaki K (2015) Growth suppression and cell death by pyridoxal is dependent on p53 in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biosci Biotechnol Biochem* (in press).
- Zhang P, Suidasari S, Hasegawa T, Yanaka N, Kato N (2014) Vitamin B₆ activates p 53 and elevates p 21 gene expression in cancer cells and the mouse colon. *Oncol Rep* **31**: 2371-6.
- Kanouchi H, Shibuya M, Tsukamoto S, Fujimura Y, Tachibana H, Yamada K, Oka T (2010) Comparisons of uptake and cell surface binding among pyridoxal, pyridoxine, and pyridoxamine in RAW264.7 cells. *Nutrition* **26**: 648-52.
- Miller JW (1999) Homocysteine and Alzheimer's disease. *Nutr Rev* **57**: 126-9.
- Hirashima Y, Seshimo S, Fujiki Y, Okabe M, Nishiyama K, Matsumoto M, Kanouchi H, Oka T (2010) Homocysteine and copper induce cellular apoptosis via caspase activation and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neuronal cell line SH-SY5Y. *Neurosci Res* **67**: 300-6.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **346**: 476-83.
- Fujiki Y, Hirashima Y, Seshimo S, Okamoto T, Sugimoto Y, Matsumoto M, Oka T, Kanouchi H (2012) Homocysteine induced SH-SY5Y apoptosis through activation of NADPH oxidase in U251MG cells. *Neurosci Res* **72**: 9-15.
- Yi F, Chen QZ, Jin S, Li PL (2007) Mechanism of homocysteine-induced Rac1/NADPH oxidase activation in mesangial cells: role of guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* **20**: 909-18.
- Ingrosso D, Perna AF (2009) Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia. *Biochim Biophys Acta* **790**: 892-9.
- Bergman Y, Cedar H (2013) DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 274-81.
- Miller ER 3rd, Juraschek S, Pastor-Barriuso R, Bazzano LA, Appel LJ, Guallar E (2010) Meta-analysis of

- folic acid supplementation trials on risk of cardiovascular disease and risk interaction with baseline homocysteine levels. *Am J Cardiol* **106**: 517-27.
- 23) 荒木理沙, 丸山千寿子, 山口玲奈, 木村正儀 (2012) 若年成人男性における血漿ホモシステイン濃度と血清葉酸, ビタミン B₁₂ 濃度および食品群別食物摂取頻度の関連. 日本栄養・食糧学会誌 **65**: 145-53.
- 24) Innis SM, Davidson AG, Melynck S, James SJ (2007) Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* **85**: 702-8.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **68**: 13-17 (2014)

Review

Mechanism for the Anti-tumorigenic Effects of Vitamin B₆, Characterization of Neuronal Cell Injury by Homocysteine, and Relationship between Dietary Habits and Plasma Homocysteine Concentration

(Young Investigator Award of JSFNS (2014))

Hiroaki Kanouchi ^{*,1}

(Received July 25, 2014; Accepted October 31, 2014)

Summary: Vitamin B₆ is reported to have anti-tumorigenic effects, but the mechanism responsible is not well understood. We found that vitamin B₆ activates p53, resulting in growth suppression and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. Among the vitamin B₆ analogs, pyridoxal has the strongest effect. Differences in the effects of these analogs may be related to differences in cell surface interactions. Pyridoxal was observed to show the strongest binding to the cell surface among the vitamin B₆ analogs. Although epidemiological studies have shown that homocysteinemia is related to dementia, precisely how homocysteine induces dementia has not been clarified. Homocysteine is an amino acid and its metabolism requires vitamin B₆, folate, and vitamin B₁₂. We conclude that U-251MG glioma cells may secrete molecules that are cytotoxic to SH-SY5Y neuroblastoma cells upon stimulation with homocysteine. Epidemiological studies on the relationship between human plasma homocysteine concentrations and dietary habits in the Amami Islands, Kagoshima Prefecture, found that a high consumption of beans or eggs was related to lower homocysteine concentrations in men and postmenopausal women respectively.

Key words: vitamin B₆, breast cancer, p53, pyridoxal, homocysteine

* Corresponding author (E-mail: kano@agri.kagoshima-u.ac.jp)

¹ Department of Veterinary Pathobiology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan