

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580139

研究課題名（和文） NAD 前駆体ニコチン酸の長寿因子 Sirt1 活性化を介した心筋保護作用

研究課題名（英文） Cardioprotective effects of nicotinic acid via Sirt1 activation

研究代表者

原 伸正 (HARA NOBUMASA)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：20284028

研究成果の概要（和文）：高脂血症薬として長期経口投与されるニコチン酸は心筋細胞そのものに対しても直接的な保護作用を発揮するがその作用機序は不明である。本研究において、ニコチン酸が、酸化ストレス負荷によるラット心筋細胞の障害を、細胞内 NAD レベルを増加させることにより抑制することを明らかにした。ニコチン酸による心筋細胞のストレス抵抗性の増加とその作用機序の解明は、このビタミンを用いた心疾患の予防と治療のための有用な手段の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Nicotinic acid (NA) exhibits various pharmacological actions including cardioprotection against oxidative stress. However, mechanisms underlying the reported actions of NA remain unclear. We have found that NA increases cellular NAD contents in primary rat cardiomyocytes and that the vitamin protects the cardiomyocytes against oxidative stress-induced damage by increasing cellular NAD contents.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ニコチン酸・NAD・Sirt1・心筋細胞・ストレス・細胞死・高脂血症薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 高脂血症薬として長期経口投与されるニコチン酸 (NA) は心筋細胞そのものに対し

ても直接的な保護作用を発揮するが、その作用機序は不明である。

(2) NAD依存性脱アセチル化酵素 Sirt1は、細胞死を促進する因子を脱アセチル化し不活性化することにより細胞死を防ぐ。しかし、細胞が酸化ストレスにさらされると、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1) が活性化され細胞内 NAD レベルが低下する。この低下は、Sirt1 の活性低下を招き、細胞死促進因子を活性化させ、その結果細胞死を引き起すと考えられている。

(3) Sirt1 を活性化すると細胞のストレス抵抗性と生存が促進されること、さらに NA ホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAPRT) を有する細胞において NA が Sirt1 の活性に必要な NAD の細胞内濃度を増加させるための最も優れた前駆体であることから、NA が細胞内 NAD レベルを増加させ Sirt1 を活性化させることにより心筋保護作用を発揮しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

NA が酸化ストレス負荷によるラット初代培養心筋細胞の細胞死を細胞内 NAD レベルの増加による Sirt1 の活性化を介して抑制するか、を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NA の心筋細胞内 NAD レベルにおよぼす効果の検討

①NA からの NAD 生合成経路に関わる酵素の発現---成体マウスおよび新生ラット初代培養心筋細胞における NA からの NAD 生合成経路酵素の発現をウエスタンブロット法および RT-PCR 法で確認する。この経路の律速酵素である NAPRT の発現は、さらに放射性 NA を用いた酵素活性の測定により確認する。

②NAD レベル増加に対する至適 NA 濃度の決

定---心筋培養細胞の培養液にさまざまな濃度の NA を添加し、LC/MS/MS 法により細胞内 NAD レベルを測定する。

(2) 酸化ストレスによる細胞障害への NA の効果の解析

①酸化ストレスの心筋細胞障害および心筋細胞内NADレベルへの効果---培養心筋細胞に対する酸化ストレスとして H_2O_2 を用いる。96穴プレートに播いた心筋細胞を H_2O_2 で処理した後、WST-1を添加し細胞障害の程度を算出する。 H_2O_2 添加による心筋細胞内 NADレベルの減少をLC/MS/MS法で確認する。

②酸化ストレスによる心筋細胞内 NADレベルの低下および細胞障害誘導へのNAの効果---心筋細胞に H_2O_2 とともにNAを投与し、酸化ストレスによる細胞障害の程度を測定する。並行して細胞内NADレベルを LC/MS/MS 法で測定する。

(3) NA の細胞保護効果における Sirt1 関与の解析---Sirt1 特異的阻害剤で前処理した心筋細胞を用意し、NA 存在下で酸化ストレスによる細胞障害性を測定する。

4. 研究成果

(1) NA は心筋細胞 NAD レベルを増加させる

①哺乳動物の心臓には NA からの NAD 生合成に必要な酵素 (図 1A) NAPRT、NA モノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NMNAT)、および NAD 合成酵素 (NADsyn) 全てを発現していた (図 1B)。

②ラット初代培養心筋細胞において RT-PCR 法によりこれらの酵素の発現を確認した。NA からの NAD 生合成の律速段階酵素である NAPRT の発現は、放射性 NA を用いた酵素活性の測定により確認された。

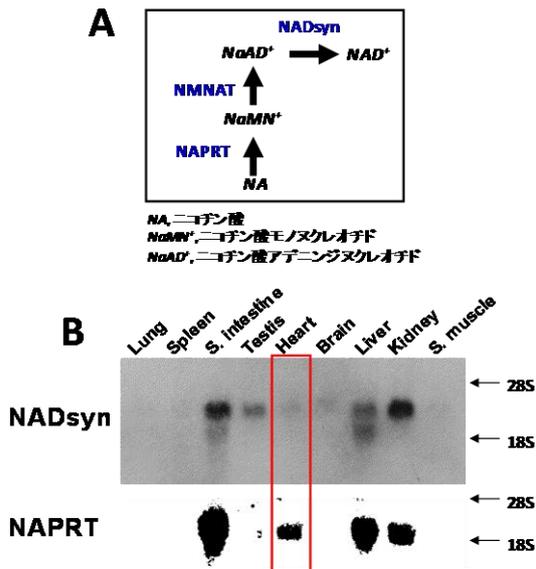


図1

③低濃度の NA を細胞培養液に添加したところ、細胞内 NAD レベルはコントロールに対し顕著に増加した。

(2) NA は酸化ストレスによる細胞障害を抑制する

- ①心筋細胞に H₂O₂ を投与したところ顕著な細胞障害性が観察された。
- ②NA 添加により、上記酸化ストレスによる心筋細胞の細胞障害が抑制された。
- ③NA の細胞保護効果は、このビタミンによる細胞内 NAD レベルの増加と関連していた。

(3) NA の心筋保護効果における Sirt1 関与の検討—Sirt1 の特異的不活性化剤で心筋細胞を前処理し、NA の細胞保護効果を検討した。NA の効果は Sirt1 不活性化剤存在下でもみられた。

(4) 以上の結果から NA はラット初代培養心筋細胞の NAD 濃度を増加させ、このことによって酸化ストレスで生じる細胞内 NAD レベルの低下に拮抗し、心筋細胞をこのストレスから防御し、細胞死を抑制するものと考えら

れた (図 2)。

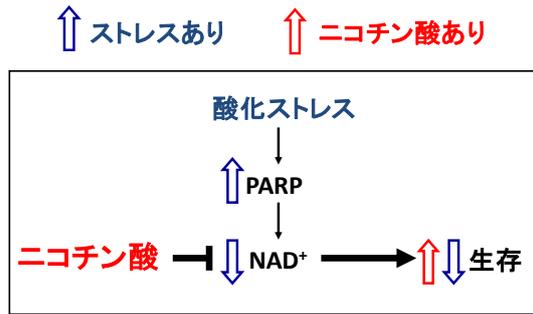


図2

(5) 今後の展望・課題

①NAD 代謝の研究は、NAD が Sirt1 の活性に必要であることが示されてから世界的に注目される分野になった。本研究では NA による NAD レベルの増加が Sirt1 の活性と直接関連するかについては明らかにすることができず、この点についてはさらなる検討が必要であろう。

②今後、NA の作用が Sirt1 活性化によるものであると証明されれば、さらに他の組織においても NA 投与により Sirt1 を活性化できることを示すことになる。ヒト組織において NA により Sirt1 が活性化されることが証明されれば、このビタミンの経口摂取が心疾患の予防と治療のための有用な手段になりうる。

③Sirt1 は糖や脂質の代謝をも制御しており、実際メタボリックシンドロームモデルマウスにおいて Sirt1 活性を高めるとこの動物の代謝異常が改善する。NA をヒトメタボリックシンドロームの予防と治療のための有用な薬剤として用いることができるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Hara N, Yamada K, Shibata T, Osago H, Tsuchiya M, Nicotinamide phosphoribosyltransferase/Visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma., PLoS ONE, 査読有, Vol 6, No.8, 2011, e22781, doi:101371/journal.pone.0022781
- ② Yamada K, Miyazaki T, Hara N, Tsuchiya M., Interferon- γ elevates nicotinamide N-methyltransferase activity and nicotinamide level in human glioma cells., J. Nutr. Sci. Vitaminol. 査読有, Vol 56, No.2, 2010, pp. 83-86, <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.56.83>

[学会発表] (計 12 件)

- ① 原 伸正, 山田和夫, 柴田朋子, 長子晴美, 土屋美加子, ニコチン酸の薬理作用は細胞内NAD レベルの増加を介するか? 第84回日本生化学会大会, 2011年9月21日-24日, 国立京都国際会館(京都市)
- ② 山田和夫, 原 伸正, 長子晴美, 土屋美加子, LC/MS/MS を用いた細胞の酸処理による酸化および還元型 NADP の同時定量法の確立, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月21日-24日, 国立京都国際会館(京都市)
- ③ Hara N, Yamada K, Osago H, Shibata T, Tsuchiya M, Visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase does not function as an extracellular NAD synthetic enzyme. 第83回日本生化学会大会, 2010年12月7-10日, 神戸国際展

示場(神戸市)

- ④ 山田和夫, 原 伸正, 長子晴美, 柴田朋子, 土屋美加子, 質量分析による NADH 酸分解産物を用いた NADH 定量法とこの方法の細胞の酸化還元状態の解析への応用の検討, 第83回日本生化学会大会, 2010年12月7-10日, 神戸国際展示場(神戸市)
- ⑤ 原 伸正, 山田和夫, 柴田朋子, 長子晴美, 土屋美加子, Quantitative determination of NAD turnover using deuterium-labeled nicotinamide and nicotinic acid. 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21-24日, 神戸ポートアイランド(神戸市)
- ⑥ Hara N, Yamada K, Shibata K, Osago H, Tsuchiya M, (招待講演) Elevation of Cellular NAD Levels by Nicotinic Acid and Involvement of Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase in Human cells. NAD METABOLISM AND SIGNALING, JUNE 21-26, 2009, CAREFREE, ARIZONA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 伸正 (HARA NOBUMASA)
島根大学・医学部・講師
研究者番号: 20284028

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：