

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2009
課題番号：18592197
研究課題名（和文） メトキシフェノール関連化合物による転写因子活性化調節作用を探る
研究課題名（英文） Regulatory effects of methoxyphenols on the transcription factor activation in mammalian cells.
研究代表者 村上 幸生
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：00286014

研究成果の概要（和文）：メトキシフェノール関連化合物である BHA、*bis*-BHA、*o*-vanillin、guaiacol、curcumin、tetrahydrocurcumin、phenol、biphenol を使用して培養細胞刺激後の転写因子活性化の調節作用について検討した。水素原子が引き抜かれにくい構造をした化合物は redox-sensitive な転写因子の活性化とその後のサイトカインや COX-2 発現を抑制した。この結果は、メトキシフェノール関連化合物の転写因子調節作用がその構造特異性に起因することを示し、これらはそのフェノール効果で局所の炎症や発癌性を予防する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the regulatory effects of methoxyphenols such as BHA, *bis*-BHA, *o*-vanillin, guaiacol, curcumin, tetrahydrocurcumin, phenol and biphenol, on the transcription factor activation stimulated by LPS or other stimulants in mammalian cells. Methoxyphenols which hardly abstracted an H atom from the phenolic OH group inhibited a transcriptional activity of redox-sensitive transcription factors, and suppressed COX-2 and cytokine expression. These observations suggested that methoxyphenol compounds possessed a therapeutic potential against chronic inflammation and mutagenesis by its phenol function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,100,000	570,000	3,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般（含病態検査学）

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景
優れた抗酸化剤や香料として広く化粧品や食品添加物として使用されているメトキシフェノール関連化合物は抗炎症作用や口腔前癌病変の発癌予防効果を示すことが知られているが、これらの単量体は自らフェノキシラジカル化し生体為害反応を引き起こすことが報告されている。Fujisawaらはメトキシフェノール関連二量体化合物を合成し、これら二量体化合物が単量体の優れた抗炎症作用、抗癌作用、抗酸化作用を温存したままで低細胞障害性と高抗酸化力を示すことを発見した。私共はこれらの二量体化合物が炎症性サイトカイン発現の調節作用を有することを証明した。この結果はこれらの化合物が酸化還元感受性転写因子の活性化調節物質になりうる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

フェノール関連化合物はその抗酸化性ゆえに酸化還元感受性である NF- κ B、AP-1、p53、STATs 等を初めとする多くの転写因子の活性化を調節できる可能性がある。このことはフェノール関連化合物が転写因子の抑制を介して炎症や発癌に密接に関連している生理活性物質や増殖因子、サイトカインの発現を調節するだけでなく、これらの物質により二次的に刺激される転写因子の更なる活性化をも制御できる可能性もあることを示唆している。米国の R. Ghosh らは J. Biol. Chem. 誌にユージノールが細胞周期推進を調節する転写因子の一つである E2F1 の転写活性を抑制しメラノーマ細胞の増殖をコントロールできる可能性を報告した。この結果はフェノール関連化合物の転写因子制御機構の解明が悪性新生物の増殖を阻止し、転写因子をターゲットとした直接的な抗腫瘍薬としても機能できることを示唆した。本研究は、フェノール関連化合物（主にメトキシ置換基を有するフェノール化合物）に焦点を当て、顎口腔領域炎症を引き起こす細菌菌体成分や口腔前癌病変を引き起こす活性酸素、増殖因子、サイトカインなどで刺激される転写因子活性化のこれらの化合物による調節作用を情報伝達経路の関与も含めて明かにしようとするものである。フェノール関連化合物の転写因子調節作用を研究することは炎症や前癌病変、悪性腫瘍の新たな化学療法を開発するうえにおいても重要と考える。

3. 研究の方法

- (1). メトキシフェノール関連化合物の生理活性物質現調節作用の検討
マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7

細胞を使用して eugenol、iso-eugenol、methoxymethylphenol (MMP)、buthylhydroxyanisole (BHA)、*o*-vanillin、guaiacol、curcumin、tetrahydrocurcumin、phenol、2,2'-biphenol、4,4'-biphenol の効果を検討した。bis-Eugenol、 α -diisoeugenol、dehydrodiisoeugenol、bis-BHA、bis-MMP は単量体それぞれを酸化的二量化反応で合成した。Escherichia coli 0111 B4 LPS、歯周病原細菌 Porphyromonas gingivalis ATCC33277 株の線毛 (Yoshimura らの方法に準じて精製：J. Bacteriol. 160, 1984) を刺激剤として使用した。細胞を刺激しメトキシフェノール関連化合物添加後に total RNA を回収し炎症性サイトカイン、COX (cyclooxygenase)-2 などの mRNA 発現を検討した。また、細胞蛋白質も同様に発現があるか否か検討した。

- (2). メトキシフェノール関連化合物の転写因子活性化調節作用の検討

上記と同様の方法で細胞を刺激しメトキシフェノール関連化合物を添加後に細胞核蛋白質を回収した。転写因子 AP-1、NF- κ B、STAT1、STAT3、Egr-1 等が結合する転写因子結合配列のオリゴヌクレオチドを細胞核蛋白質と結合させ、その結合がメトキシフェノール関連化合物によって調節されたか否か EMSA 法で検討した。

また、Luciferase assay による一過性転写活性化試験も一部の試薬で行った。

- (3). メトキシフェノール関連化合物の情報伝達系調節作用の検討

上記と同様の方法で細胞を刺激しメトキシフェノール関連化合物を添加後に細胞質蛋白質を回収した。転写因子活性化を導く情報伝達機構をメトキシフェノール関連化合物が調節するか否かを Western blot 法で検討した。

4. 研究成果

- (1). メトキシフェノール関連化合物の生理活性物質現調節作用の検討
Eugenol、iso-eugenol、bis-eugenol、 α -diisoeugenol、dehydrodiisoeugenol、MMP、bis-MMP、BHA、bis-BHA、*o*-vanillin、

guaiacol、curcumin、tetrahydrocurcumin、phenol、2,2'-biphenol、4,4'-biphenol を使用して細胞刺激後の生理活性物質発現の調節作用を検討した。炎症性サイトカイン発現や炎症調節物質の発現調節作用を検討した。その結果、*bis*-eugenol、dehydrodiisoeugenol、*bis*-MMP、*bis*-BHA などのメトキシフェノール二量体と *o*-vanillin、curcumin、2,2'-biphenol は炎症性サイトカイン発現や COX-2 発現を抑制した。それらの構造的特徴は水素原子が引き抜かれにくい構造とっていることであった。この結果はフェノール性 OH からの水素原子の引き抜かれる解離エンタルピー (BDE) の高次計算 (abinitio, DFT) により、生理活性を持ちそうなメトキシフェノール関連化合物をある程度予測することが可能であることを示唆した。

(2). メトキシフェノール関連化合物の転写因子活性化調節作用の検討

炎症性サイトカイン発現や COX-2 発現を抑制したメトキシフェノール関連化合物について、転写因子活性化調節作用を所有するか否か検討した。その結果、NF- κ B や AP-1 活性化はこれらの関連化合物で抑制された。この結果はこれらの化合物が酸化還元感受性転写因子の活性化調節物質になりうる可能性を示唆した。

(3). メトキシフェノール関連化合物の情報伝達系調節作用の検討

代表的な酸化還元感受性転写因子である NF- κ B の情報伝達機構について転写活性化を抑制できたメトキシフェノール関連化合物について検討した。その結果、いずれの化合物も情報伝達に関わる蛋白質発現を抑制した。この結果はこれらの化合物が酸化還元感受性転写因子の転写活性化を調節できる物質である可能性を改めて示唆した。

一方、近年の研究から NF- κ B のような酸化還元感受性転写因子が TNF- α のような炎症性サイトカインの産生を介して敗血症性ショック、慢性関節リウマチ、高脂血症や糖尿病などの多くの疾患を mediate していることが報告されている。また、COX-2 は発ガン誘発が指摘されている。メトキシフェノール関連化合物が転写因子調節作用を有し、これらの疾患の予防剤として機能できれば新たな抗

酸化治療戦略を組み立てることが可能となってくる。しかしながら、遺伝子発現調節機構にはエビジェネティックな転写調節を初めとして未だ不明な点も多い。今後の課題はこれらの化合物がどのような次元での転写調節を介して炎症・腫瘍関連遺伝子発現を調節しているのかを調査することが急務と考える。

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 6 件)

- 1) Murakami, Y., Ishii, H., Hoshina, S., Takada, N., Ueki, A., Tanaka, S., Kadoma, Y., Ito, S., Machino, M. and Fujisawa, S.: Antioxidant and cyclooxygenase-2-inhibiting activity of 4,4'-biphenol, 2,2'-biphenol and phenol. *Anticancer Res.* 29, 2403-2410, 2009.
- 2) Murakami Y., Ishii, H., Takada, N., Tanaka, S., Machino, M., Ito, S. and Fujisawa, S.: Comparative anti-inflammatory activities of curcumin and tetrahydrocurcumin based on the phenolic O-H bond dissociation enthalpy, ionization potential and quantum chemical descriptor. *Anticancer Res.* 28, 699-708, 2008.
- 3) Fujisawa, S., Ishihara, M., Murakami, Y., Atsumi, T., Kadoma, Y. and Yokoe, I.: Predicting the biological activities of 2-methoxyphenol antioxidants: Effects of dimers. *In Vivo.* 21, 181-188, 2007.
- 4) Murakami, Y., Hirata, A., Ito, S., Shoji, M., Tanaka, S., Yasui, T., Machino, M. and Fujisawa, S.: Re-evaluation of cyclooxygenase-2-inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with

lipopolysaccharide. Anticancer Res. 27, 801-808, 2007.

- 5) Murakami, Y., Shoji, M., Hirata, A., Tanaka, S., Hanazawa, S., Yokoe, I. and Fujisawa, S.: An ortho dimer of butylated hydroxyanisole inhibits nuclear factor kappa B activation and gene expression of inflammatory cytokines in macrophage stimulated by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Arch. Biochem. Biophys. 449, 171-177 66, 2006.
- 6) Murakami, Y., Shoji, M., Ogiwara, T., Tanaka, S., Yokoe, I. and Fujisawa, S.: Preventive effect of ortho dimer of butylated hydroxyanisole on activator protein -1 activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages stimulated by fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*, an oral anaerobe. Anticancer Res. 26, 2915-2920, 2006.

[学会発表] (計1件)

- 1) 石井宏明、村上幸生、保科修平、高田直樹、藤澤盛一郎、町野 守: *p*-クレゾール二量体による LPS 刺激 TNF- α 発現の調節作用. 第 63 回日本口腔科学会, 浜松, 2009 年 4 月.
- 2) 村上幸生、石井宏明、高田直樹、丸山剛央、湯原健司、保科修平、小林聡子、細谷明代、田中庄二、藤澤盛一郎、町野 守: フェノール関連二量体化合物による LPS 刺激 TNF- α 発現の抑制作用. 第 21 回日本口腔診断学会, 東京, 2008 年 9 月.

[図書] (計1件)

- 1) Kadoma, Y., Murakami, Y., Atsumi, T., Ito, S., and Fujisawa, S.: Chapter 5 Cloves (Eugenol), in Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices. Modern

Uses for Ancient Medicine. World Scientific Publishing Co. Pre. Ltd. 5 Toeh Link, Singapore 596224. pp117-148, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 幸生 (MURAKAMI YUKIO)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号: 00286014

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: