

令和元年5月31日現在

機関番号：32404
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2015～2018
 課題番号：15K11266
 研究課題名(和文) 抗酸化性フェノール関連化合物による酸化還元感受性転写因子の活性化制御機構を探る

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of redox-sensitive transcription factor activation by antioxidative phenol-related compounds

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
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化性フェノール関連化合物であるユージノール、ビスユージノール、レスベラトロール、ケレスチン、ポリエンカロチノイドのリコペン、 β -カロテン、 γ -トコフェロール、 α -トコフェロール、 β -不飽和カルボニル化合物等を使用してLPS刺激培養細胞の向炎症性生理活性物質産生や酸化還元感受性転写因子活性化の調節作用について検討した。抗酸化作用を持つフェノール関連化合物は低濃度で抗炎症作用を発揮した。ヘムオキシゲナーゼ1発現増強の観点から、これらの化合物の抗炎症作用はラジカル捕捉活性と関連した求電子剤/抗酸化剤応答エレメント転写系の効力の増強を来す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化還元感受性転写因子であるNF- κ B、Hif1、Nrf2等は炎症や低酸素、酸化ストレスで活性化され、生活習慣病を引き起こす素因になると考えられており、その活性制御の不良により炎症性疾患や悪性新生物が発症する。それゆえ、今回の研究成果は抗酸化性を有するフェノール関連化合物等の酸化還元感受性転写因子の活性化調節のメカニズムの一端を解明し創薬に重要な役割を果たすと考える。昨今の天然資源の健康食品や医薬品への応用が報じられている中で、転写因子活性化調節作用を担うフェノール関連化合物を始めとした抗酸化性化合物を探査することは光線化学療法を含めた多くの難治性口腔疾患の新たな治療を導くものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the inhibitory effects of phenol-related compounds such as eugenol, bis-eugenol, resveratrol, quercetin, polyene carotenoids such as β -carotene and lycopene, and α -tocopherol, β -unsaturated carbonyl compounds on the expression of pro-inflammatory bioactive compounds and activation of redox-sensitive transcription factors in mammalian cells upon stimulation with LPS. At low concentrations, some antioxidant phenolic compounds exhibit anti-inflammatory properties. In view of the observed upregulation of heme oxygenase 1 mRNA expression by these compounds, it is suggested that their anti-inflammatory activity can lead to enhancement of the potency of the electrophile/antioxidant response element transcription system related to their radical-scavenging activity.

研究分野：口腔診断学

キーワード：抗酸化剤 フェノール関連化合物 酸化還元 転写因子

1. 研究開始当初の背景

Eugenol、isoeugenol、guaiacol、phenol、cresol、ferulic acid のようなフェノール関連化合物は優れた抗酸化剤であり香料、食品、化粧品、医薬品として広く応用されている。歯科領域では酸化亜鉛ユーージノールセメントや根管消毒剤として今なお使用されている。しかし、フェノール関連化合物は自動酸化してフェノキシラジカル化し、プロオキシダントとしても働き、組織傷害性を誘導する。この自動酸化はそのフェノール性 OH からの水素原子の引き抜きに関連していることを我々は近年明らかにした。それゆえ、自動酸化しにくい構造の eugenol 二量体化合物を合成し、その生物活性を検討したところ、高い抗酸化活性と低細胞傷害性を見出した。In vitro の実験でのこれらの化合物の構造-活性関係の研究では、単量体と比べこれら二量体は炎症性サイトカインや、炎症や発癌に関連した cyclooxygenase (COX)-2 の発現抑制作用を所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

酸化還元感受性転写因子は炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの生理現象に関与しており、転写因子活性制御の不良は炎症性疾患、悪性新生物などの原因となる。炎症や悪性新生物組織においては局所でフリーラジカルを溢れさせ酸化還元状態に敏感な転写因子をさらに活性化させる。それゆえ、抗酸化性化合物によるラジカル制御は転写因子の活性化調節を介した悪性新生物の予防に重要と考える。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 nuclear factor kappa B (NF- κ B)、activated protein 1 (AP-1)、p53、nuclear factor-erythroid related factor-2 (Nrf2) 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 eugenol が細胞周期推進を調節する転写因子の活性を抑制しメラノーマ細胞の増殖を調節すること、またイタリアの M. Pisano らは Mol Cancer 誌に curcumin related biphenyl がメラノーマ細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導を引き起こすことを報告している。サウジアラビアの I. Al-Sharif らも BMC Cancer 誌に eugenol が乳癌細胞のアポトーシス誘導を引き起こすことを報告している。これら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も示唆した。本研究は、抗酸化性フェノール関連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らかにしようとするものであった。抗酸化性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慢性炎症性疾患や前癌病変の腫瘍化の予防、悪性新生物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). 抗酸化性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 細胞を使用して抗酸化性フェノール関連化合物である eugenol、isoeugenol、bis-eugenol、resveratrol、4-allylphenol、orcinol、catechin、epicatechin、quercetin、buthylhydroxyanisole (BHA)、buthylhydroxytoluene (BHT)、tri-*t*-butylphenol (TBP)、vanillin、curcumin、またポリエンカロチノイドとして β -carotene、lycopene、活性酸素と反応性が極めて高い tri-*n*-butyl borane、 H_2O_2 、 H_2O_2 -不飽和カルボニル化合物の *trans*-cinnamates (*trans*-cinnamic acid、methyl cinnamate、*trans*-cinnamaldehyde)、acrylates (ethyl acrylate、2-hydroxyethyl acrylate、n-butyl acrylate (nBA))、methacrylates (methyl methacrylate (MMA)、2-hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA)、ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA)、triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA)、n-butyl methacrylate (nBMA)) の細胞傷害性、抗酸化活性、転写因子調節作用や抗炎症作用を検討した。bis-Eugenol は単量体を酸化的二量化反応で合成した。Escherichia coli 0111 B4 LPS (LBL)、歯周病原細菌 Porphyromonas gingivalis ATCC33277 LPS (和光純薬) および線毛 (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。これらの化合物の RAW264.7 細胞での細胞傷害性は CCK-8 細胞毒性測定 kit で検討した。抗酸化活性は 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルの消去能より測定した。細胞を刺激し抗酸化性フェノール関連化合物添加後に total RNA を回収し COX-2、tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、nitric oxide synthase 2 (NOS2)、heme oxygenase 1 (HO-1) の mRNA 発現を TaqMan® Gene Expression Assay で検討した。また、細胞蛋白質も同様に発現の有無を検討した。

(2). 抗酸化性フェノール関連化合物の転写因子活性化調節作用と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抗酸化性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 等が結合する転写因子結合配列のオリゴヌクレオチドと回収した細胞核蛋白質を結合させ、その結合が抗酸化性フェノール関連化合物によって調節されたか否かその転写因子構造分子の結合性まで ELISA 様転写因子活性化分析で検討した。一方、上記と同様の方法で細胞を刺激し抗酸化性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抗酸化性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). 抗酸化性フェノール関連化合物等の生理活性物質現調節作用の検討

抗酸化性フェノール関連化合物：eugenol、isoeugenol、*bis*-eugenol、resveratrol、4-allylphenol、orcinol、catechin、epicatechin、quercetin、BHA、BHT、TBP、vanillin、curcumin、ポリエンカロチノイド： β -carotene、lycopene、活性酸素と反応性が極めて高い *tri-n*-butyl borane、 α - β -不飽和カルボニル化合物：*trans*-cinnamates (*trans*-cinnamic acid、methyl cinnamate、*trans*-cinnamaldehyde)、acrylates (ethyl acrylate、2-hydroxyethyl acrylate、nBA)、methacrylates (MMA、2-HEMA、EGDMA、TEGDMA、nBMA) 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。これらの化合物の細胞傷害性を検討したところ、それぞれ 100 μ M 以下の濃度では認められなかった。DPPH ラジカル消去活性も適度に認められた。Eugenol、*bis*-eugenol、resveratrol、catechin、epicatechin、quercetin、magnolol、honokiol、curcumin 等の抗酸化性フェノール関連化合物、ポリエンカロチノイドである β -carotene、lycopene は高濃度で炎症促進活性を有し、低濃度で LPS や歯周病菌線毛刺激 COX-2、TNF- α 、NOS2 などの向炎症性生理活性物質産生や転写因子活性化を抑制するといった抗炎症作用を有していた。定量的構造活性相関をもとにした検討では eugenol およびその関連化合物の二量体は、大きな抗酸化活性および高い求電子性を示すことが判明した。直接ラジカル消去活性（連鎖破壊性）抗酸化物質であるこれらの化合物は、1 分子中にさまざまな抗酸化物質や生物活性を含む複数の機能を持っているようで、ラジカル媒介慢性疾患を緩和する可能性が示唆された。一方、 α - β -不飽和カルボニル化合物の *trans*-cinnamates 3 種、acrylates 3 種、methacrylates 5 種を使用してその細胞毒性、アレルギー作用、抗癌作用、炎症促進作用および抗炎症作用を含む様々な正および負の調節作用も試験した。Cinnamaldehyde および acrylates は、Michael reaction acceptors として作用するそれらの顕著な能力のために、抗炎症性および炎症誘発性の両方の性質を示した。Methyl cinnamate は、細胞毒性および炎症誘発活性がより少ない強力な抗炎症

Table 1 Anti-inflammatory activity of phenol related compounds

Compound	COX-2 inhibition	NF- κ B inhibition
Eugenol (500 μ M)	-	-
<i>bis</i> -Eugenol (500 μ M)	++	++
Isoeugenol (0.1 μ M)	-	-
Dehydrodiisoeugenol (0.1 μ M)	++	++
α -diisoeugenol (0.1 μ M)	-	n.d
2-methoxy-4-methylphenol (MMP) (500 μ M)	+	n.d
<i>bis</i> -MMP (500 μ M)	++	n.d
Hesperetin (250 μ M)	++	n.d
Hesperidin (250 μ M)	++	n.d
Ferulic acid (FA) (10 μ M)	-	-(AP-1)
<i>bis</i> -FA (10 μ M)	++	++ (AP-1)
Guaiacol (250 μ M)	\pm	\pm
Vanillin (250 μ M)	++	++
Phenol (10 μ M)	-	-
2,2'-Biphenol (10 μ M)	++	++
4,4'-Biphenol (10 μ M)	-	n.d
<i>p</i> -Cresol (10 μ M)	-	-
<i>p</i> -Cresol dimer (10 μ M)	++	++
<i>p</i> -Hydroxianisole (pHA) (10 μ M)	-	-
pHA-dimer (10 μ M)	++	++
BHA (10 μ M)	-	-
<i>bis</i> -BHA (10 μ M)	++	++
Indole (10 μ M)	-	-
Melatonin (10 μ M)	++	++
Curcumin (20 μ M)	++	++
Tetrahydrocurcumin (20 μ M)	-	\pm
Magnolol (40 μ M)	++	++
Honokiol (40 μ M)	++	++
Resveratrol (50 μ M)	++	++
Orcinol (50 μ M)	-	-
4-Allylphenol (50 μ M)	-	-

n.d: Not done; - : did not show the inhibitory effect. \pm : showed the partially inhibitory effect; ++: showed the inhibitory effect; +++: showed the strongly inhibitory effect
COX: cyclooxygenase; NF- κ B: nuclear factor kappa B; AP-1: activator protein-1

活性を示し、この化合物が歯周病および関連する全身性疾患の治療に有用であることを示唆した。また、 α - β -不飽和エステルモノマーのうち nBA と EGDMA は強力な向炎症活性を示した。nBA、EGDMA と TEGDMA はマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の heme oxygenase 1 (HO-1) 遺伝子発現を誘導した。

(2). 抗酸化性フェノール関連化合物等の転写因子活性化調節作用と情報伝達系調節作用の検討

COX-2 発現を抑制した抗酸化性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、酸化還元感受性転写因子のうち NF- κ B は p50、p52、p65、RelB などの個々の複合体分子とコンセンサスヌクレオチドとの結合も抗酸化性フェノール関連化合物で抑制された。一方、NF- κ B 活性化を抑制できた抗酸化性フェノール関連化合物のその情報伝達経路におよぼす作用についても検討した。その結果、これらの化合物も I κ B-情報伝達系に関わる蛋白質のリン酸化を顕著に抑制した。この結果は抗酸化性フェノールが酸化還元感受性転写因子の転写活性化を情報伝達のレベルからも調節できる物質である可能性を示唆した。一方、活性酸素と反応性が極めて高い *tri-n*-butyl borane を用いた試験や HO-1 遺

伝子発現の度合いを通して、抗酸化性フェノール関連化合物やポリエンカロチノイド、 α -不飽和カルボニル化合物の転写因子活性化抑制作用を含む抗炎症作用はラジカル捕捉活性と関連した Ketch-like ECH-associated protein (Keap1)-Nrf2 システムのような求電子剤/抗酸化剤応答エレメント転写系の効力の増強を来し、生物系における化学的発癌を耐性に導く可能性が示唆された。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、関節リウマチ、脂質異常症や糖尿病などの多くの疾患を仲介していることが報告されている。さらに悪性腫瘍では NF- κ B などの転写因子の恒常的活性化が認められる。一方で、COX-2 は大腸癌や肺癌、肝癌、頭頸部癌などで高率に発現し、これらの疾患の致死的原因になっている可能性が指摘されている。また、Keap1-Nrf2 システムは酸化ストレス/親電子性物質に対する生体防御機構でもあるが癌細胞自身の解毒代謝能を高めるという報告もある。昨今の天然資源の健康食品や医薬品への応用が報じられている中で、転写因子活性化調節作用を担う抗酸化性フェノール関連化合物の探査とそれに続く光線化学は口腔疾患の新たな治療を導くものと考えられる。よって、抗酸化性フェノール関連化合物の酸化還元感受性転写因子調節作用を探査しつづけ、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国民医療のさらなる向上に向けての今後の課題になると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- 1) Murakami Y, Kawata A, Suzuki S, Fujisawa S: Cytotoxicity and pro-inflammatory properties of aliphatic alpha, beta-unsaturated acid and ester monomers in RAW264.7 cells and their chemical reactivity. *In Vivo*. 33: 313-323, 2019.
doi:10.21873/invivo.11477
- 2) Murakami Y, Kawata A, Suzuki S, Fujisawa S: Cytotoxicity and pro-/anti-inflammatory properties of cinnamates, acrylates and methacrylates against RAW264.7 cells. *In Vivo*. 32: 1309-1321, 2018.
doi:10.21873/invivo.11381
- 3) Kawata A, Murakami Y, Suzuki S, Fujisawa S: Anti-inflammatory activity of β -carotene, lycopene and tri-*n*-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species. *In Vivo* 32: 255-264, 2018.
doi:10.21873/invivo.11232
- 4) Murakami Y, Kawata A, Fujisawa S: Expression of cyclooxygenase-2, nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1 mRNA induced by *bis*-eugenol in RAW264.7 cells and their antioxidant activity determined using the induction period method. *In Vivo* 31: 819-831, 2017.
doi:10.21873/invivo.11135
- 5) 川田朗史、村上幸生、片山 直: マウスマクロファージにおける magnolol と honokiol による *Porphyromonas gingivalis* リポ多糖体刺激 TNF- α 発現の抑制作用. *明海歯学* 45: 111-121, 2016.
- 6) Fujisawa S and Murakami Y: Eugenol and its role in chronic disease. *Adv Exp Med Biol*. 929: 45-66, 2016.
doi:10.1007/978-3-319-41342-6_3
- 7) 村上幸生, 川田朗史, 片山 直: 植物性 phenol 関連化合物による抗炎症作用と口腔病予防薬への可能性. *明海歯学* 44: 119-128, 2015.
- 8) Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T and Fujisawa S: Radical-scavenging and anti-inflammatory activity of quercetin and related compounds and their combinations against RAW264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Relationships between anti-inflammatory activity and quantum chemical parameters. *In Vivo* 29: 701-710, 2015.
PMID: 26546527
- 9) Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T and Fujisawa S: The radical scavenging activity and cytotoxicity of resveratrol, orcinol and 4-allylphenol and their inhibitory effects on Cox-2 gene expression and Nf κ B activation in RAW264.7 cells stimulated

with *Porphyromonas gingivalis*-fimbriae. In Vivo 29: 341-350, 2015.
PMID: 25977379

- 10) Murakami Y, Kawata A, Katayama T and Fujisawa S: Anti-inflammatory activity of the artificial antioxidants 2-tert-butyl-4-methoxyphenol (BHA), 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2,4,6-tri-tert-butylphenol (TBP), and their various combinations. In Vivo 29: 197-206, 2015.
PMID: 25792646

〔学会発表〕(計 1件)

- 1) 村上幸生: 歯周病原細菌菌体成分刺激による酸化還元感受性転写因子活性化に及ぼす抗酸化性フェノール関連化合物による調節作用を探る．第29回明海歯科医学会，坂戸，2015年．