

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10364

研究課題名（和文）Redox感受性転写因子活性化に及ぼすフェノール関連化合物の調節作用を探る

研究課題名（英文）Exploring the regulatory effects of phenol-related compounds on the activation of redox-sensitive transcription factors

研究代表者

村上 幸生（Murakami, Yukio）

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：00286014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：Eugenol、bis-eugenolなどの抗酸化性フェノール関連化合物、構造体中にフェノール環を有し可視光線による励起作用があるtetracycline（TC）を使用してLPS刺激培養細胞の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調節作用について検討した。TCに可視光線照射すると抗炎症作用が強く出現しHO-1発現を誘導した。HO-1発現はbis-eugenolがもっとも優勢に誘導し、転写因子Nrf2の活性化を強く導くことを発見した。抗酸化性フェノール関連化合物の抗炎症作用は炎症関連転写因子だけでなく、求電子剤/抗酸化剤応答エレメント転写系の増強にも起因する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、Nrf2等は炎症や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光線化学療法（PDT）や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索することはPDT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 regulatory effects of antioxidant phenol-related compounds such as eugenol and bis-eugenol, as well as tetracycline (TC), which has a phenol ring in its structure and can be excited by visible light, on the production of inflammatory bioactive substances and activation of redox-sensitive transcription factors in LPS-stimulated cultured cells. When TC was irradiated with visible light, it exhibited a strong anti-inflammatory effect, and induced hemeoxygenase-1 (HO-1) expression. We found that, among the antioxidant phenol-related compounds, bis-eugenol was predominant in inducing HO-1 expression, which led to marked activation of the transcription factor Nrf2. It was suggested that the anti-inflammatory effect of antioxidant phenol-related compounds might be attributable to not only inflammation-related transcription factors, but also enhancement of the electrophile/antioxidant response element transcription system.

研究分野：口腔診断学

キーワード：レドックス 酸化還元 転写因子 抗酸化剤 フェノール関連化合物

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が近年明らかになった。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-活性関係を調べたところ、二量体化合物は炎症性サイトカインや生理活性物質の発現抑制作用を有することを見出した。一方、光感受性薬剤を用いた光線力学療法(PDT)が癌の新しい治療法として注目を浴びている。げっ歯類の口腔粘膜に抗酸化性フェノール関連化合物を光感受性薬剤として使用し PDT を行いその組織傷害性を観察している研究も散見するが、細胞核中の redox 感受性転写因子の動向は知られていない。この結果はこれらの抗酸化性フェノール関連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。

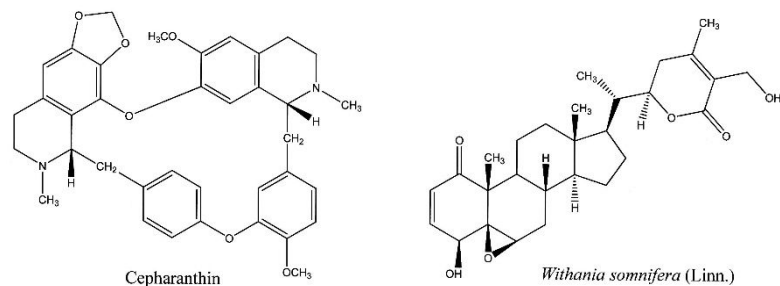
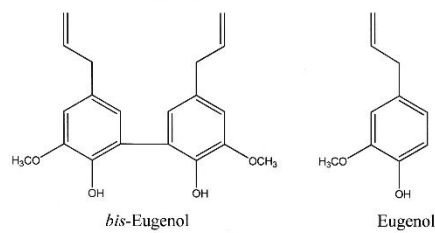
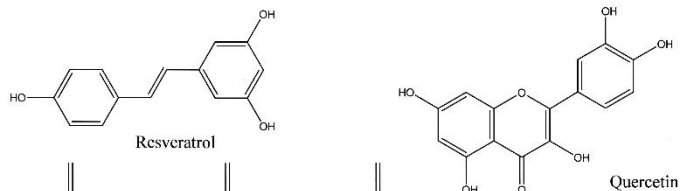
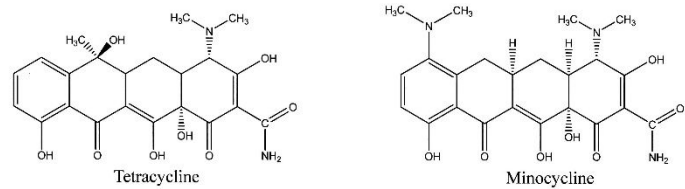
2. 研究の目的

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 NF- κ B、AP-1、p53、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、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、抗酸化性フェノール関連化合物に焦点を当て、顎口腔領域に慢性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と PDT 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、*bis*-eugenol、resveratrol、quercetin、また、抗酸化性を有する広域抗菌剤で、構造体中にフェノール環を有し可視光線による励起作用がある tetracycline (TC) minocycline (MC)、難治性疾患の治療薬として知られるタマサキツヅラフジ抽出アルカロイドである cepharanthin の効果を検討した。アシュワガンダ (*Withania somnifera*) 根抽出物の感染性宿主の細胞傷害性の検討も行った。*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) を刺激剤として使用した。これらの化合物の細胞傷害性は 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 tumor necrosis factor (TNF)-、cyclooxygenase (COX)-2、nitric oxide synthase (NOS)2、heme oxygenase (HO)-1、interleukin (IL)-23 等の 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。一方、歯科用の G-Light Prima-II Plus LED 可視光線照射器を使用して TC、MC、cepharantine の LPS 刺激 COX-2、TNF-、NOS2、HO-1 の mRNA 発現動向も検討した。



(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 Nrf2 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。

4 . 研究成果

(1) Tetracycline (TC)とその関連化合物による抗酸化 / 抗炎症作用に及ぼす可視光線照射の影響と PDT の効果の検討

Redox 感受性転写因子はラジカルの酸化的攻撃により活性化され、慢性炎症や悪性新生物の発生に関与することが知られている。著者らは以前、ラジカル化し難い構造のフェノール関連化合物が抗酸化作用を介して多くの redox 感受性転写因子の転写調節作用を持つ可能性を示した。また、本化合物は prooxidant と antioxidant の両方の性質を持つことから、PDT (Photo dynamic therapy : 光線化学療法) でより強力な効果を誘導する可能性があった。そこで今回の研究では、その構造体の中にフェノール環を有する抗酸化性の広域抗菌剤で、可視光線による励起作用が知られている tetracycline (TC) とその関連化合物を使用して、これらの化合物の抗酸化 / 抗炎症作用に及ぼす可視光線照射の影響と PDT の効果について検討した。TC は 0.4mM で RAW264.7 細胞の LPS 刺激 COX-2、TNF- α 、NOS2 発現を促進したが、minocycline (MC) は顕著に抑制した。2 種類のポリフェノール (resveratrol、quercetin) はそれぞれ単独で LPS 刺激 COX-2、TNF- α 、NOS2 発現を顕著に抑制した。しかし、TC や MC を共存させてもその抑制効果をさらに促進することはなかった。歯科用の G-Light Prima-II Plus LED 可視光線照射器を使用して TC、MC の LPS 刺激 COX-2、TNF- α 、NOS2 発現動向を検討したところ、TC は光照射によってこれらの発現を顕著に抑制したが MC は未照射と大差はなかった。また、resveratrol にも軽度の光照射による抗炎症作用の増強作用が認められた。一方、TC を RAW264.7 細胞へ単独処理し光照射すると H0-1 発現が顕著に誘導された。今回の結果は可視光線照射が TC に構造変化をもたらす redox 感受性転写因子の活性化を介して H0-1 発現を刺激し抗炎症性が付与されたものと考えた。可視光線照射 TC は局所の炎症に対する PDT に有用であることが示唆されたことから、今後の展開として、フェノール関連化合物の抗酸化 / 抗炎症メカニズムを考察するうえにおいてこれらの化合物の抗酸化応答エレメント刺激作用とその redox 感受性転写因子の調節作用の検討を思索する。

(2) タマサキツヅラフジ抽出アルカロイド cepharanthin の抗酸化 / 抗炎症作用に及ぼす効果と PDT の効果の検討

ツヅラフジ科植物タマサキツヅラフジから抽出されたビスコクラウリン型アルカロイドの一種である cepharanthin は造血機能亢進作用、免疫機能促進作用、抗アレルギー作用などが報告されており、臨床ではマムシ咬傷、円形脱毛症、放射線による白血球減少症などの治療薬として使

用されている。一方 cepharanthin は NF- κ B の活性化を阻害することで多くの癌細胞の増殖抑制や放射線感受性の制御を行い抗炎症作用を発揮することが報告されている。そこで、著者らは cepharanthin を使用して、この化合物の抗酸化 / 抗炎症作用に及ぼす可視光線照射の影響と PDT の効果について検討した。しかしながら、当該化合物による抗炎症効果は個々の刺激物やメルクマールとした mRNA 発現によってまちまちで一定の効果が認められなかった。さらに PDT 効果はほとんどなく、次年度以降に方針の練り直しが必要と考えられた。

(3) アシユワガンダ根抽出物の感染性宿主の細胞傷害性の検討

Withania somnifera (アシユワガンダ) は、関節痛、血液浄化作用、抗ストレス性、寄生虫感染などに効果があるとされ、抗ストレス性のハーブとして用いられるフェノール関連化合物である。アーユルヴェーダ医学でも用いられている。根抽出物がヘキサノール無鞭毛型の *in vitro* 増殖阻害試験結果および無鞭毛型段階の寄生虫宿主であるマクロファージ (RAW264.7) 細胞において細胞傷害性が認められたことから将来的にこの物質の転写因子活性化についても調査が必要と考える。

(4) 抗酸化性フェノール関連化合物による HO-1 発現と抗酸化 / 抗炎症作用に及ぼす効果

著者らは以前、ラジカル化し難い構造のフェノール関連化合物が抗酸化作用を介して多くの redox 感受性転写因子の転写調節作用を持つ可能性を示した。一方、これらの化合物は抗酸化に関連した遺伝子発現も調節できることが想像できた。HO-1 は、ヘムのビリベルジン、遊離鉄、一酸化炭素への分解を触媒し、生体内での免疫反応と炎症を抑制し、抗炎症作用、抗酸化作用、および抗増殖作用を示すヘム酸素添加酵素である。そこで今回の研究では、抗酸化性フェノール関連化合物のうち eugenol と bis-eugenol の HO-1 誘導作用と転写因子活性化について検討した。bis-Eugenol は HO-1 発現を時間的濃度依存性に促進したが、eugenol は HO-1 発現を bis-eugenol の 1/3 程度しか促進しなかった。大腸菌リポ多糖体 (*E. coli* LPS : LPS) を刺激剤として処理したところ、bis-eugenol は COX-2 と TNF- α mRNA の顕著な抑制を示したが、eugenol に抑制効果は見られなかった。bis-eugenol は LPS の有無に関わらず HO-1 発現を誘導した。一方、HO-1 遺伝子発現機構は、遺伝子上流に存在する抗酸化剤応答配列 ARE (antioxidant response element) または親電子性物質応答配列 EpRE (electrophile responsive element) を介した転写レベルの発現調節が必要で、この転写調節にはロイシンジッパー転写因子である nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) が重要な役割を演じている。bis-Eugenol は Nrf2 を活性化し ARE への結合を促進した。しかし、eugenol には認められなかった。今回の結果は、bis-eugenol が Nrf2 活性化因子の 1 つであることが明らかになった。それゆえ、curcumin や magnolol などの eugenol 関連化合物二量体の抗酸化 / 抗炎症メカニズムを再評価するためには、これらの化合物ラジカル捕捉活性と関連した Kelch-like erythroid protein with cap'n collar (CNC) homology (ECH)-associated protein 1 (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介した調節機構の存在も視野に入れて検討しなければならないという興味ある知見を得たと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Murakami Y, Kawata A, Suzuki S and Fujisawa S | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Radical-scavenging and pro-/anti-inflammatory activity of tetracycline and related phenolic compounds with or without visible light irradiation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 In Vivo. | 6. 最初と最後の頁 81-94 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11748 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 村上幸生, 川田朗史 |
| 2. 発表標題 Eugenol二量体はRAW264.7細胞のヘムオキシゲナーゼ1発現を誘導する. |
| 3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 村上幸生 |
| 2. 発表標題 テトラサイクリン関連化合物/ポリフェノールの組合せによる抗炎症効果の増強化作用を探索. |
| 3. 学会等名 第38回明海歯科医学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 村上幸生, 川田朗史 |
| 2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisリポ多糖体刺激RAW264.7細胞の炎症メディエーター調節作用におけるtetracyclineおよび関連フェノール関連化合物の再評価. |
| 3. 学会等名 32回日本口腔診断学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|