

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 8月24日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592537

研究課題名（和文） 光照射によるフェノール系抗酸化剤の癌細胞への影響

研究課題名（英文） Effects of Visible Light-irradiated Phenolic Antioxidant Compounds on Cancer Cells

研究代表者

岡田 典久 (OKADA NORIHISA)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：40146220

研究成果の概要（和文）：クルクミン（カレー粉の主成分）とカプサイシン（唐辛子の主成分）のマウス頬粘膜への塗布やその後の歯科用可視光線照射による研究において、炎症や細胞死が惹起され、後者により癌化した細胞を標的に殺傷することが窺われた。また、両者とも光照射との併用によって、より低濃度でヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖抑制作用を発現するようになり、光力学療法の臨床応用への可能性が示唆され、アポトーシスの傾向はクルクミンで顕著であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Visible light (VL) irradiation effects of the mucous membranes of mice treated with curcumin (chief ingredient of the curry powder) and capsaicin (chief ingredient of the red pepper) were investigated. It was found that inflammation and apoptosis were caused by the VL treatment of both compounds, particularly the latter could kill cancer cells. In addition, curcumin and capsaicin could accelerate the cytostasis action of the human squamous cell carcinoma cells at more low concentrations in combination with VL irradiation. This suggested a possibility to the clinical application of the photodynamic therapy of curcumin due to the potent apoptotic activity of this compound.

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	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：口腔診断学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌細胞・抗酸化剤・光照射・フェノール・photodynamic therapy

1. 研究開始当初の背景

白板症などの口腔前癌病変の発症が、食品含有の抗酸化剤などにより制御される可能性が疫学的に報告されているが、その反面、ノニルフェノール、ビスフェノールAなどフェノール誘導体が内分泌攪乱作用、発癌作用

などに関連していることも報告されている。香料や抗酸化剤は、食品に添加されるばかりでなく、歯科領域においてもフェノールやエージノール化合物などが歯内療法治療薬や歯科材料として広く臨床に用いられている。フェノール化合物は抗酸化剤として働くば

かりでなく、プロオキシダントとしても働くため、抗炎症作用、抗癌作用の反面、細胞障害作用、発癌作用を有し複雑な挙動を示す。フェノール化合物は、口腔環境で酸化されてラジカル化する。このラジカルが細胞を障害し、さらにアポトーシスを正常細胞や癌細胞に惹起させることも知られている。そこで我々は、このラジカル化を制御し生理活性を高めるため、新規物質としてユージノール誘導体、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエンの二量体化合物を合成した。これらの二量体化合物はプレリミナリの検討で細胞障害性が小さく、活性酸素消去や一酸化窒素ラジカル消去活性を示し、マクロファージ様株化細胞のリポ多糖類誘導発現を抑制したので、すぐれた抗炎症性を示すことが示唆された (Okada N, Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Sakagami H and Fujisawa S., Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by eugenol-related compounds. *Anticancer Res*, 25: 3263-3269, 2005. 査読有)。

最近我々は、ユージノールは歯科用レジック充填可視光線照射器で光照射すると、著しく酸化され、プロオキシダントとなり、細胞特に癌細胞を障害することを見出した (Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S and Ueha T., Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials*, 22: 1459-1466, 2001. 査読有)。ユージノール系化合物抗酸化剤は、プロオキシダントとアンチオキシダントの二つの顔をもち、酸素、光、酵素により複雑に作用が異なることが知られている。ユージノールを二量体にすると、酸化活性が抑制され細胞障害性が減少し、抗炎症作用が増すことを見いだした。この結果は、これらの化合物に構造-活性相関があり、光、酸素などによりユージノール系化合物の生体反応性は制御できる可能性を示唆している (Atsumi T, Tonosaki K and Fujisawa S., Induction of early apoptosis and ROS-generation activity in human gingival fibroblasts (HGF) and human submandibular gland carcinoma (HSG) cells treated with curcumin. *Arch Oral Biol*, 51: 913-921, 2006. 査読有)。また、ユージノールをマウスの口腔粘膜に塗布後、歯科用可視光線照射すると組織侵襲性が顕著に増大する。しかし、そのオルト二量体の影響は少なかった (Fujisawa S, Muraoka E, Nakazato, Y and Okada N., Effects of visible light irradiation on eugenol-treated oral mucosa. *Dent Mater J*, 24: 202-206, 2005. 査読有)。

歯科用可視光線照射によりプロオキシダ

ント化するフェノール類として、ユージノール以外にカレー粉のターメリックに含まれる黄色い色素成分のクルクミンや唐辛子の主成分であるカプサイシンがある。これらの化合物は、抗炎症作用やアポトーシス誘導活性を有することが知られているが、歯科治療薬としての研究は無いのが現状であった。

2. 研究の目的

歯科用可視光線照射によりプロオキシダント化するフェノール類として、ユージノール以外にカレー粉のターメリックに含まれる黄色い色素成分のクルクミンや唐辛子の主成分であるカプサイシンがある。これらの化合物は、抗炎症作用やアポトーシス誘導活性を有し、抗がん作用があることが知られている。しかしながら、口腔前癌病変の癌化予防、その他口腔病治療薬としての研究はないのが現状である。オルトメトキシフェノール類であるクルクミンやフェノール性アルカロイドのカプサイシンなど、これらを光制御することにより、プロオキシダントとアンチオキシダント作用を制御し、正常細胞、癌細胞、また組織レベルでの口腔粘膜にいかなる影響を与えるかを検討し、**photodynamic therapy** の臨床応用を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) マウス頬粘膜へのクルクミン、カプサイシンの塗布実験と Hematoxylin and eosin (HE 染色)、TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL 法染色) での評価と電子顕微鏡での評価。

明海大学歯学部実験動物ガイドラインに従い実験を行った。すなわち、7週令の ICR 系マウスを購入し、本学実験動物センターで1週間(8週令、体重 30~40mg)飼育して環境に慣らしてから実験に供した。ペントバルビタール溶液(ソムノペンチル、50mg/kg)の腹腔内麻酔科に右側頬粘膜にクルクミン、カプサイシンを1分間塗布後、照射群は歯科用可視光線照射器(Astral, Litema Astra Dental, Germany)で1分間と5分間照射した後屠殺した。また、非照射群は1分間と5分間放置した後屠殺した。そして、標本の半分は通法に従いパラフィン包埋後、HE染色とTUNEL法染色で評価した。また、もう半分は通法に従い電子顕微鏡(JEM-100cx, JEOL, 昭島)用に資料を作製し評価した。

- (2) Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)法による50%ラジカル消去力の測定。

フリーラジカルは非常に不安定で、反応性が高いと言われているが、DPPHはフリーラジカルとして安定した存在が知られている。そのため、クルクミン、カプサイシンの抗酸化

能を DPPH 法により測定した。

(3) ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2) での細胞増殖活性の評価。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2) を使用し、96 ウェルプレートに 2×10^3 個/ウェルの細胞を播種し、24 時間培養後、実験に供した。光照射は、歯科用可視光線照射器 (Astral, Litema Astra Dental, Germany) を使用し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2) への照射時間の影響と隣接するウェルへの影響を調べた。光照射による細胞増殖活性に有意な差が生じる時間の照射を行い、48 時間後に WST-8 を用いて細胞増殖活性を評価した。また、クルクミン、カプサイシン処置群は、処置 2 時間後に光照射を行い、48 時間後に WST-8 を用いて細胞増殖活性を評価した。

4. 研究成果

(1) マウス頬粘膜への塗布実験および HE 染色、TUNEL 法染色と電子顕微鏡での組織病理学的所見

①クルクミン、カプサイシンとも上皮層の細胞排列の乱れを認めた (図 1)。

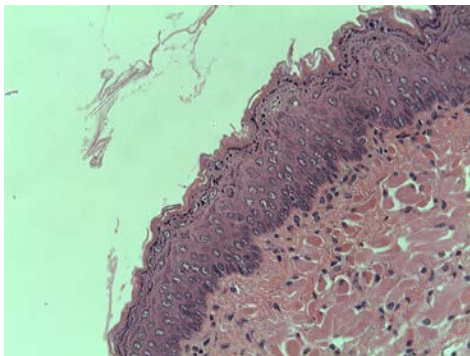


図 1 カプサイシン塗布による組織像

②クルクミン、カプサイシンとも角化層の増生を認めた。

③クルクミン、カプサイシンとも顆粒層の顆粒細胞の増加を認めた。

④クルクミン、カプサイシンとも棘細胞層での核の扁平化を認めた。

⑤クルクミン、カプサイシンとも作用時間と可視光線照射時間を長くすることにより、①から④の変化が増加する傾向にあったが、特にカプサイシンで著明であった (図 2、3)。

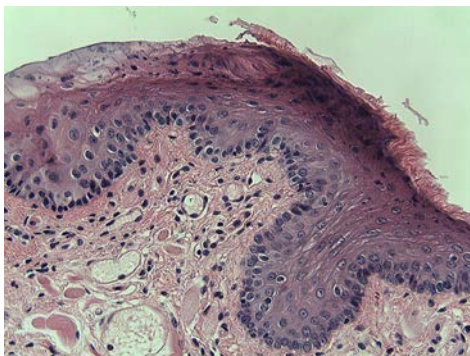


図 2 クルクミン塗布・光 5 分照射後の組織像

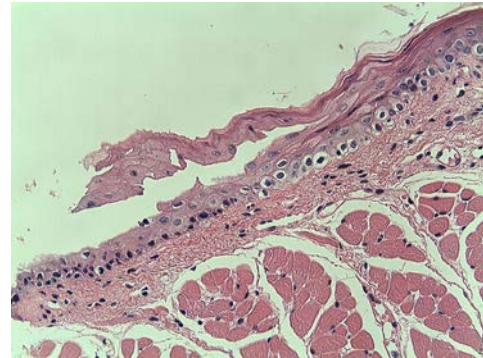


図 3 カプサイシン塗布・光 5 分照射後の組織像

⑥カプサイシンにおいて TUNEL 陽性細胞が散見され、アポトーシス誘導活性がある可能性を認めた (図 4、5)。

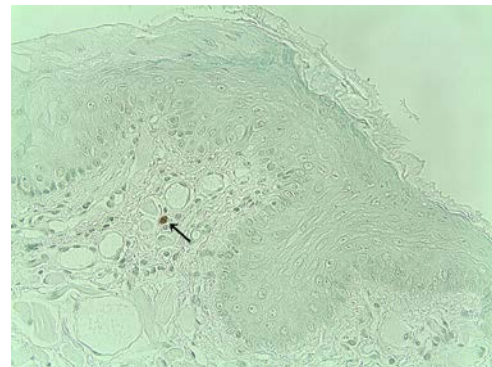


図 4 クルクミン塗布・光 5 分照射後の TUNEL 陽性細胞 (矢印)

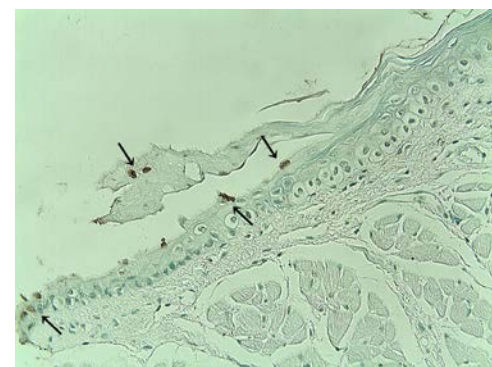


図 5 カプサイシン塗布・光 5 分照射後の TUNEL 陽性細胞 (矢印)

⑦クルクミン可視光線系は組織中のミトコンドリアの融解を示した (図 6)。

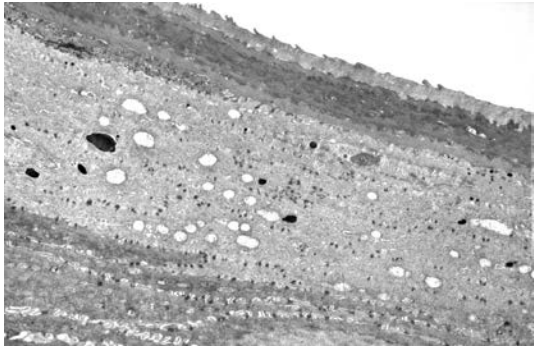


図6 ミトコンドリアの融解像

(2) Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) 法による 50%ラジカル消去力の比較と評価
50%ラジカル消去力 (mM) を比較すると、クルクミン 0.041mM、カプサイシン 0.15mM であり、クルクミンの抗酸化力はカプサイシンより約 4 倍大きかった。

(3) ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2) での細胞増殖活性

①30 秒間の歯科用可視光線照射で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖に有意な減少を認めた。

②96 ウェルプレートでの隣接したウェルへの影響は認められなかった。

③クルクミンは、 $10\mu\text{M}$ 以上の濃度から有意なヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖抑制作用を認め、 $100\mu\text{M}$ ではほぼ細胞死の状態であった。

④クルクミン処置 2 時間後に 30 秒間の光照射を行うと、 $0.1\mu\text{M}$ からヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖の減少傾向を認め、 $10\mu\text{M}$ での細胞増殖抑制作用はさらに増強された。

⑤カプサイシンは、 $100\mu\text{M}$ で軽度であるが有意なヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖の減少を認めた。

⑥カプサイシン処置 2 時間後に 30 秒間の光照射を行うと、 $0.01\mu\text{M}$ からヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖の減少傾向を認め、 $0.1\mu\text{M}$ から有意な細胞増殖の減少を認めた。

以上のことからクルクミン、カプサイシンのマウス口腔粘膜塗布により、炎症が惹起されるが癌化した細胞を標的に殺傷することが窺われた。また、クルクミン、カプサイシンとも光照射との併用によって、より低濃度でヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖抑制作用を発現するようになり、photodynamic therapy の臨床応用への可能性が示唆され、その傾向はクルクミンにおいて顕著であった。

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 1 件)

Okada N, Muraoka E, Fujisawa S and Machino M, Effects of visible light-irradiated curcumin and capsaicin on murine oral mucosa, In vivo, 26(5), 2012, in press. 査読有。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 典久 (OKADA NORIHISA)

研究者番号 : 4 0 1 4 6 2 2 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :