

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592939

研究課題名(和文)酸化還元感受性転写因子の抗酸化性フェノール関連化合物による調節作用を探る

研究課題名(英文)Regulatory effects 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) 3,200,000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ギノール、ビスユーギノール、ホーノキオール、マグノロール、p-クレゾール、p-クレゾール二量体、p-ヒドロキシアニソール(pHA)、pHA二量体、トコフェロール誘導体、生体活性物質インドール、メラトニンを使用して培養細胞刺激後の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。抗酸化作用を持ち、自動酸化しにくい二量体化合物及びメラトニンはNF- κ Bの活性化とシクロオキシゲナーゼ-2発現を抑制した。この結果は、フェノール二量体化合物およびメラトニンの転写因子調節作用がこれらの抗酸化性に起因することを示し、慢性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 inhibitory effects of phenol related compounds; eugenol, bis-eugenol, honokiol, magnolol, p-cresol, p-cresol dimer, p-hydroxyanisole (pHA), pHA dimer and tocopherols, and bioactive compounds; indol and melatonin on the redox-sensitive transcription factor activation stimulated with LPS or other stimulants in mammalian cells. Some of phenolic dimmers and melatonin inhibited a transcriptional activity of nuclear factor kappa B and also suppressed cyclooxygenase-2 expression. These observations suggested that inhibitory effects of these compounds on NF- κ B activation and cox2 expression might be associated with their antioxidant activity. These antioxidant compounds may be applicable for preventing chronic inflammation and carcinogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔外科学一般

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ギ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、癌などの原因となる。炎症や癌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癌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、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 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 Pisano らも Mol Cancer 誌に eugenol 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。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) 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 eugenol、bis-eugenol、*p*-cresol、*p*-cresol dimer、*p*-hydroxyanisole (pHA)、pHA dimer、indol、melatonin、honokiol、magnolol、 α -tocopherol、 β -tocopherol、 γ -tocopherol、 δ -tocopherol の効果を検討した。bis-Eugenol、*p*-cresol dimer、pHA dimer は単量体それぞれを酸化的二量化反応で合成した。Escherichia coli O111 B4 LPS、歯周病原細菌 Porphyromonas gingivalis ATCC33277 株線毛 (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 を回収し炎症性サイトカイン、COX-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) 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、STAT1、STAT3 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の生理活性物質現調節作用の検討

Eugenol、*bis*-eugenol、*p*-cresol、*p*-cresol dimer、pHA、pHA dimer、indol、melatonin、honokiol、magnolol、 α -tocopherol、 β -tocopherol、 γ -tocopherol、 δ -tocopherol 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。初めに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。LPS あるいは線毛刺激による生理活性物質発現の調節作用では、*bis*-eugenol、*p*-cresol dimer、pHA dimer などの抗酸化性フェノール関連化合物二量体と melatonin、honokiol、magnolol、 α -tocopherol、 β -tocopherol、 γ -tocopherol、 δ -tocopherol は COX-2 発現を抑制した。しかし、eugenol、*p*-cresol、pHA、indol では認められなかった。化学記述子を半経験的分子軌道法や density function theory 用いて計算し、それら値と生物学的活性間の相関について定量的構造活性相関 (QSAR) を行ったところ、それらの構造的特徴は phenol 性 OH の抗酸化作用に起因した酸化されにくくラジカル捕捉性が高い構造とっていることであった。この結果は QSAR で予想された抗酸化性フェノール関連化合物が局所炎症反応に対して NSAIDs 様の抗炎症作用を発揮できる可能性を示唆した。

(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

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これらの関連化合物で強力に抑制されることを発見した。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である可能性を示唆した。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- α 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改めて示唆した。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、これらの疾患の致命的病因になっている可能性が指摘されている。今回の研究では成果に示すように酸化還元感受性転写因子のうち NF- κ B に関して詳細に検討できたが、いくつかの転写因子では明確な結果を得るに至らなかった。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つ、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

(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8件)

1) Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T and Fujisawa S. Inhibitory effects of *p*-cresol and *p*-hydroxy anisole dimers on expression of the cyclooxygenase-2 gene and lipopolysaccharide-stimulated activation of nuclear factor- κ B in RAW264.7 cells. *In Vivo*, 28, 719-726, 2014

2) 新居智恵, 川田朗史, 村上幸生, 片山直: Phenol 関連二量体化合物によるマウスマクロファージ様細胞株におけるリポ多糖体刺激 COX-2 発現の調節作用. *明海歯学*, 43 巻, 18-27, 2014.

3) Murakami Y, Kawata A, Koh T, Seki Y, Tamura S, Katayama T and Fujisawa S: Inhibitory effects of tocopherols on expression of the cyclooxygenase-2 gene in RAW264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α or *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *In Vivo*, 27, 451-458, 2013

4) Koh T, Murakami Y, Tanaka S, Machino M and Sakagami H: Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 β -stimulated gingival fibroblast and pulp cells. *In Vivo*, 27, 269-274, 2013.

5) Murakami Y., Kawata A, Seki Y, Koh T, Yuhara K, Maruyama T, Machino M, Ito S, Kadoma Y and Fujisawa S : Comparative inhibitory effects of magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor kappa B activation in RAW264.7 macrophage-like cells stimulated with fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. In Vivo, 26, 941-950 , 2012.

6) Murakami Y., Machino M and Fujisawa S : *Porphyromonas gingivalis* fimbria-induced expression of inflammatory cytokines and cyclooxygenase-2 in mouse macrophages and its inhibition by the bioactive compounds fibronectin and melatonin. ISRN Dent 2012:350859. doi: 10.5402/2012/350859. Epub 2012 Apr 1.

7) Murakami Y., Yuhara K, Takada N, Arai T, Tsuda S, Takamatsu S, Machino M and Fujisawa S : Effect of melatonin on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappa B activation in RAW264.7 macrophage-like cells stimulated with fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. In Vivo, 25, 641-648, 2011

8) 石井宏明 , 村上幸生 : *p*-Cresol 二量体による LPS 誘発性 TNF- α 発現の調節作用 . 明海歯学 , 40 巻 , 136-145 , 2011

〔学会発表〕(計1件)

1) 高 泰浩, 齋藤嘉大, 村上幸生, 片山 直, 坂上 宏 : ユージノールの口腔内細胞による炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響. 第55回日本歯科基礎医学会, 岡山, 2013年9月

6 . 研究組織

(1) 村上 幸生 (MURAKAMI YUKIO)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 0 0 2 8 6 0 1 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :