

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 cyclooxygenase-2 発現の調節作用

新居 智恵 川田 朗史 村上 幸生[§] 片山 直

明海大学歯学部病態診断治療学講座総合口腔診断学分野

要旨 : RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞株における細菌内毒素 (LPS) 誘導性 cyclooxygenase (COX)-2 発現に関するフェノール関連化合物, およびその合成二量体の調節作用について検討した. LPS は RAW264.7 細胞において顕著な COX-2 遺伝子発現を処理後 3 時間で, COX-2 タンパク質発現を処理後 6 時間で誘導した. 次に LPS により誘発される COX-2 発現に対するフェノール関連化合物 [*p*-cresol, thymol, 2,4-di-*tert*-butylphenol (DTBP), 2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethyl biphenyl (DDBP, *p*-cresol 二量体), および 3,3',5,5'-tetra-*tert*-butyl-1,1'-biphenyl-2,2'-diol (TTBBD, DTBP 二量体)] の効果を検討した. DTBP は COX-2 発現に対して抑制効果を示さなかったが, *p*-cresol, thymol は 10 μ M の濃度で RAW264.7 細胞の LPS 刺激 COX-2 発現を軽度抑制し, また DDBP と TTBBD は顕著な抑制を示した. 一方, LPS で誘発される転写因子 Nuclear factor kappa-B (NF- κ B) 活性化に及ぼすフェノール関連化合物の効果を検討したところ, DDBP と TTBBD は単量体と比較して, LPS 処理後 30 分で誘導される I κ B- α のリン酸化とタンパク質分解を顕著に抑制した. また, これらの化合物は NF- κ B を構成する p65, p50, p52 の NF- κ B コンセンサス配列への結合を同様に抑制した. 今回の研究結果は, フェノール関連二量体化合物である DDBP と TTBBD が転写因子 NF- κ B の抑制を介し, COX-2 に起因する種々の慢性炎症性疾患に対する有効な治療薬として作用しうる可能性を示唆した.

索引用語 : Phenol 関連化合物, 二量体, LPS, COX-2, NF- κ B

Regulatory Effects of Phenol-related Dimer Compounds on Lipopolysaccharide-induced Expression of Cyclooxygenase-2 in a Mouse Macrophage-like Cell Line

Tomoe ARAI, Akifumi KAWATA, Yukio MURAKAMI[§] and Tadashi KATAYAMA

Division of Oral Diagnosis, Department of Diagnostic and Therapeutic Sciences, Meikai University School of Dentistry

Abstract : The present study was undertaken to investigate the effects of some phenol-related compounds on the expression of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cyclooxygenase-2 (COX-2) and activation of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) in the murine macrophage-like cell line, RAW264.7. LPS induced the expression of COX-2 mRNA and protein at 3 and 6 hours after the start of treatment, respectively. Next, the effects of *p*-cresol, thymol, 2,4-di-*tert*-butylphenol (DTBP), 2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethyl biphenyl (DDBP, a cresol dimer) and 3,3',5,5'-tetra-*tert*-butyl-1,1'-biphenyl-2,2'-diol (TTBBD, a DTBP dimer) on LPS-induced COX-2 expression, were investigated. The LPS-induced expression of COX-2 was inhibited slightly by *p*-cresol and thymol at 10 μ M, whereas it was inhibited more strongly by DDBP and TTBBD than by the monomeric compounds. DTBP was not inhibitory. When the effects of these compounds on activation of the transcription factor NF- κ B were investigated, DDBP and TTBBD markedly inhibited LPS-stimulated phosphorylation and proteolysis of I κ B- α . These phenolic compounds also strongly inhibited the LPS-stimulated binding of NF- κ B components (p65, p50 and p52) to the consensus sequences. These observations suggest that DDBP and TTBBD may act as inhibitors of LPS-induced COX-2 expression *via* suppression of NF- κ B activation by inhibiting the phosphorylation of I κ B- α , and that phenolic dimer compounds such as DDBP and TTBBD may be effective therapeutic agents against chronic inflammatory diseases involving COX-2.

Key words : phenol-related compounds, dimer, LPS, COX-2, NF- κ B, macrophages, I κ B- α phosphorylation

緒 言

植物フェノール関連化合物は優れた抗酸化作用を有し、食品添加物や化粧品、香料、医薬品などに広く使用されている^{1,2)}。また、フェノール関連化合物の一部は酸化防止剤や紫外線吸収剤としてポリカーボネートの重合促進剤や塩化ビニルの安定剤などの工業製品にも応用されている。歯科領域では phenol や cresol は菌髄鎮静薬や根管消毒剤として、thymol は歯磨剤や根管消毒剤の添加物として今なお臨床に使用されている^{3,4)}。古くからこれらの化合物は抗炎症作用を有することが知られているが^{5,6)}、これらの化合物は酸化されやすく、自己酸化によりフェノキシラジカル化し、プロオキシダントとして働き、細胞傷害性を誘導する⁷⁾。このことは、高濃度のフェノール関連化合物は抗炎症薬としてよりも、むしろ起炎物質として作用することを示唆している。Murakami ら^{8,9)}は、ラジカル化しにくい構造のフェノール関連化合物を探したところ、いくつかのフェノール関連化合物のオルト二量体が、単量体に比べ細胞傷害性が少なく、抗酸化作用を有し、マクロファージ様細胞からの炎症性サイトカイン産生を抑制することを見出した。このことは、ラジカル化しにくい構造のフェノール関連化合物に抗炎症作用が存在することを示唆している。

細胞膜リン脂質の不飽和脂肪酸のアラキドン酸はアラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て生理活性物質に変換されることが知られている。Cyclooxygenase (COX) はアラキドン酸を prostanoid と呼ばれる prostaglandin (PG) や thromboxane などの生理活性物質に代謝する過程に関与する律速酵素である。COX には2つの isoform があり、COX-1、COX-2 と呼ばれている^{10,11)}。COX-1 は全身の組織に広く分布し、恒常的に発現しており、特に、胃粘膜保護、血流や血圧維持、血小板凝集に関与している。一方、COX-2 は多くの細胞で普段は発現が低い、転写因子 nuclear factor kappa-B (NF- κ B) の活性化を介して増殖因子や炎症性サイトカイン、細菌リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) などの菌体成分で発現が誘導される¹⁰⁻¹⁴⁾。COX-2 は PG を介した血管透過性の亢進や発痛に関与し炎症巣を作り上げるだけでなく、胃癌、大腸癌、頭頸部癌などの腫瘍から高率に発現が確認され、腫瘍形成にも関与することが考えられている¹⁵⁻¹⁸⁾。

そこで今回、強力に炎症性サイトカインの産生を誘導

する細菌構造物である LPS^{19,20)} を使用し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7²¹⁾ における LPS 誘導性 COX-2 発現に関するフェノール関連化合物 (*p*-cresol, thymol, DTBP, および *p*-cresol と DTBP の合成二量体である DDBP, TTBBD) の調節作用について検討したので報告する。

材料と方法

1. 使用試薬

p-Cresol, thymol は和光純薬工業 (大阪), 2,4-di-*tert*-butylphenol (DTBP) は東京化成工業 (東京) より購入した。*p*-Cresol 二量体 [2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethylbiphenyl (DDBP)], DTBP 二量体 [3,3',5,5'-tetra-*tert*-butyl-1,1'-biphenyl-2,2'-diol (TTBBD)] は各単量体より酸化的オルト二量化反応により合成した^{22,23)}。フェノール関連化合物の化学構造式を Fig 1 に示す。LPS は *Escherichia coli* O111: B4 LPS (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) を使用した。

2. 使用細胞と細胞傷害性試験

本実験には、マウスマクロファージ様細胞株 RAW 264.7 (大日本住友製薬, 大阪) を使用した。細胞は、penicillin 100 U/ml, streptomycin sulfate 100 μ g/ml を含む 10% 牛胎仔血清 (Flow Laboratory, MacLean, VA, USA) 添加 RPMI 1640 培地 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 中で 37°C, 5% CO₂ の条件で培養した。細胞傷害性試験は水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 の還元作用を応用した cell counting kit-8 (CCK-8) (同仁化学研究所, 熊本) を使用した²⁴⁾。すなわち、 1.0×10^5 cells/ml の濃度の RAW 264.7 細胞を 96 穴平底型マイクロカルチャープレート (Nalgenunc International, 東京) の各穴に播種し前培養

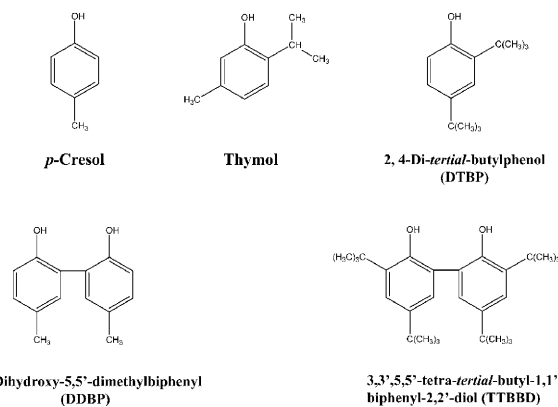


Fig 1 Structures of phenol-related compounds.

§ 別冊請求先: 村上幸生, 〒350-0283 埼玉県坂戸市けやき台 1-1 明海大学歯学部病態診断治療学講座総合口腔診断学分野

を行った。その後、Fig 1 に示した各種フェノール関連化合物を最終濃度 0.01 μM ~10 mM になるように段階的に希釈し添加して、24 時間培養した。培養後 CCK-8 溶液を添加し、1 時間の呈色反応を行い、450 nm における吸光度を NJ-2001 マルチスキャンイムノリーダー（日本インターメッド、東京）を用いて測定した。相対的生細胞数はフェノール関連化合物非添加の細胞を 100 % として算出した値を用いて表した。

3. RNA の調製法および Northern blot assay

RAW264.7 細胞 (1.0×10^7 cells/ml) を、60 mm プラスチックシャーレ (Falcon Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種し、24 時間培養後、培地を交換し、各種フェノール関連化合物と 30 分間前処理後、LPS を所定の時間処理した。その後、acid guanidine phenol chloroform (AGPC) 法を用いて細胞より total RNA を回収した²⁵⁾。すなわち、細胞を 4.2 M guanidine isothiocyanate 液に溶解し、この溶解液を等量の water-saturated phenol 液に混合した。その後、2 M sodium acetate と chloroform/isoamyl alcohol (49:1) 混合液を添加し、氷上 20 分静置し、遠心分離後 ethanol 沈殿を行い精製 RNA とした。遺伝子発現は、Northern blot 法により検討した。すなわち、精製 RNA を 1% agarose gel で電気泳動を行い、RNA をナイロン膜 (MSI Magnagraph, Westboard, MA, USA) に転写し固相化した。このナイロン膜を 50% formamide, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), $5 \times \text{SSC}$ [$1 \times \text{SSC} = 150$ mM NaCl, 15 mM sodium citrate (pH 7.0)], $1 \times \text{Denhardt's}$ solution [0.02% Ficoll, 0.02% bovine serum albumin (BSA), 0.02% polyvinylpyrrolidone], denatured salmon sperm DNA を含む prehybridization buffer で 42°C, 18 時間 prehybridization を行った。その後、Megaprime DNA labeling system (GE ヘルスケアジャパン、東京) を用いて予め [α -³²P]-dCTP (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) で標識した mouse COX-2 cDNA プロンプ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), 5'-end labelling system (Promega, Madison, WI, USA) を用いて予め [γ -³²P]-ATP (PerkinElmer) で標識した β -actin oligonucleotide プロンプ (GeneDetect, Bradenton, FL, USA) を用いて、最終濃度 10% dextran sulfate を加えた prehybridization buffer 中で 42°C, 18 時間 hybridization を行った。Hybridization 後、このナイロン膜を $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS で 55°C, 1 時間洗浄し乾燥した。Kodak X-OMAT film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) を用い、-80°C, 24 時

間オートラジオグラフィーを行い、その遺伝子発現の程度をデンシトメトリーにて検討した^{26,27)}。定量は COX-2 mRNA/ β -actin mRNA の値を計算し、相対的評価を行った。

4. Western blot assay

細胞は Northern blot と同様の条件で、60 mm シャーレで所定の時間培養後、細胞溶解液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1% deoxycholate, 0.5% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.25 mM phenylmethylsulfonyl flupride (PMSF), 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin] で溶解しタンパク質を抽出した。その後、抽出したタンパク質は 12.5% polyacrylamide gel の条件下で Tris-glycine buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine) を用いて SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後、タンパク質はセミドライ型トランスブロットシステム (ATTO, 東京) を使用し polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Milipore, Bedford, MA, USA) に転写した。ブロットは、0.05% Tween-20 を含む Tris buffered saline (TBS) buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] に溶解した 5% スキムミルクで 2 時間ブロッキングを行い、0.1% Tween-20 を含む TBS buffer で洗浄した。その後 PVDF 膜は、12 時間、4°C, 5% bovine serum albumin (BSA) 含有 TBS buffer 中に希釈した goat anti-mouse COX-2 polyclonal antibody (C-20) (希釈倍率 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-mouse I κ B- α polyclonal antibody, rabbit anti-mouse phospho-I κ B- α polyclonal antibody (希釈倍率 1:2,000, New England Biolabs, Beverly, MA, USA), rabbit anti-mouse β -actin polyclonal antibody (希釈倍率 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology) と反応した後、0.1% Tween-20 を含む TBS buffer で 2 回洗浄した。その後、膜は 4°C にて 3 時間、BSA 含有 TBS buffer 中に希釈した horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti rabbit IgG antibody (希釈倍率 1:5,000, New England Biolabs) と反応させ、0.1% Tween-20 を含む TBS buffer で 2 回洗浄した。洗浄後、PVDF 膜上に転写されたタンパク質は Phototope-HRP Western blot detection kit (New England Biolabs) を用いて化学発光させ、X-OMAT film (Eastman Kodak Company) に感光させた後、それぞれのタンパク質の発現の程度をデンシトメトリーにて検討した²⁸⁾。定量は COX-2 protein/ β -actin protein の値を計算し、相対的評価を行った。

5. 核タンパク質の回収と NF- κ B 結合

細胞核タンパク質は細胞を Northern blot 法と同様の条件で、60 mm シャーレで所定の時間培養後、Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) を使用して回収した。回収した核タンパク質中の NF- κ B の DNA 結合活性は ELISA を原理とした Trans-AM NF- κ B family kit (Active Motif) を用いて測定した²⁹⁾。すなわち、NF- κ B 結合配列である 5'-GGGACTTCC-3' のコンセンサス配列のオリゴヌクレオチド DNA が固相化されている ELISA プレート中の各 well に Complete binding buffer を添加し、予め Complete lysis buffer にて至適濃度に希釈した核タンパク質 (5 μ g) を添加し、100 rpm のシェーカー (ATTO) に乗せ室温にて 60 分間結合反応を行った。洗浄後に Antibody binding buffer で希釈 (1:1,000) した p65, p50, p52, RelB の各 NF- κ B 抗体をさらに添加し、室温にて 60 分反応させた。再び洗浄後、kit に添付の HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:1,000) を添加し、室温にて 60 分反応させた。更に洗浄排液後、Developing solution にて 5 分間発色させ反応停止後、450 nm の吸光度を NJ-2001 マルチスキャンイムノリーダー (日本インターメッド) を用いて測定した。

6. デンシトメトリー

Northern blot, Western blot の結果、X 線フィルム上に得られた mRNA, タンパク質の画像は GT-X 970 スキャナー (セイコーエプソン, 東京) で直接取り込んだ後、NIH Image version 1.62 (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) を用いて発現量を解析した。

結 果

1. フェノール関連化合物の細胞傷害性

はじめに、各フェノール関連化合物の RAW264.7 細胞に対する細胞傷害性について検討した。RAW264.7 細胞を種々の濃度の *p*-cresol, thymol, DTBP, DDBP, あるいは TTBBD と 24 時間培養し相対的生細胞数を Cell Counting Kit で測定した。その結果、いずれの化合物も 100 μ M 以下の濃度では顕著な細胞傷害性を示さなかった (Fig 2)。

2. LPS による RAW264.7 細胞における COX-2 発現の誘導

RAW264.7 細胞の COX-2 遺伝子発現に及ぼす LPS の作用について LPS 処理後、経時的に total RNA を回収し、COX-2 遺伝子発現誘導作用を検討した。LPS は、

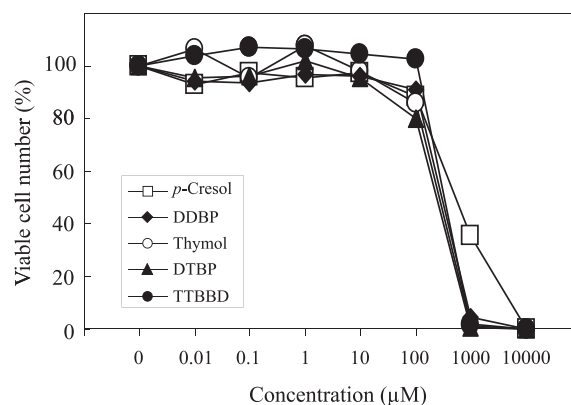


Fig 2 Cytotoxicity of phenol, *p*-cresol, thymol, DTBP, DDBP and TTBBD towards RAW264.7 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of phenol-related compounds for 24 h and viable cell numbers were assessed by cell counting kit. Each value represents triplicate assays.

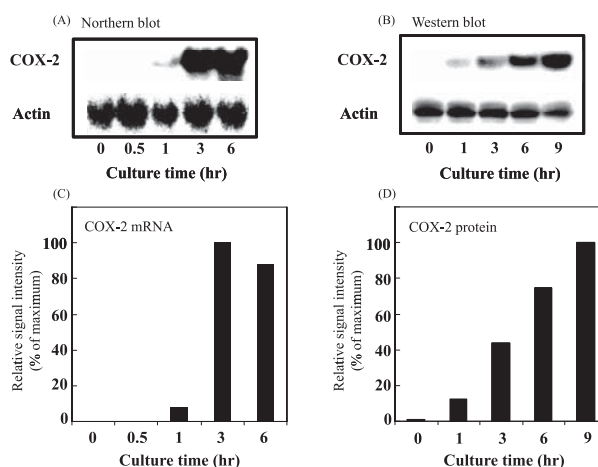


Fig 3 LPS-induced COX-2 expression in RAW264.7 cells. (A) The cells were incubated with or without LPS at 100 ng/ml, and then the total RNA was prepared at the indicated times after the initiation of the treatment. Northern blot analysis was performed with [³²P]-labeled COX-2 cDNA probe and β -actin antisense-oligonucleotides probe. (B) The cells were treated or not with LPS at 100 ng/ml. Thereafter, equal amounts of cell lysates were analyzed by Western blot analysis with antibody raised against COX-2 and β -actin. (C and D) Autoradiographs from the Northern blots and Western blots were quantified by densitometry and values were normalized to levels of β -actin mRNA or protein. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

RAW264.7 細胞において処理後 3 時間で顕著な COX-2 遺伝子発現を誘導した (Fig 3A)。本実験と全く同じ条件下で行った β -actin 遺伝子発現は、LPS 処理群と比較して何ら差異を認めることがなかった。

次に、COX-2 タンパク質発現に及ぼす LPS の作用に

ついて LPS 処理後, 経時的に細胞質蛋白質を回収し, Western blot 法により検討した. その結果, LPS 処理後 3 時間で COX-2 タンパク質の発現が認められ, 6~9 時間後ではほぼ最大の発現量に達した (Fig 3B).

3. Phenol 関連化合物による LPS 誘導性 COX-2 発現の抑制

LPS は RAW264.7 細胞の COX-2 遺伝子ならびにタンパク質発現を誘導する結果が得られたことから, この発現に及ぼすフェノール関連化合物の調節作用を検討した. RAW264.7 細胞に所定の濃度に希釈した *p*-cresol, thymol, DTBP, DDBP, あるいは TTBBBD を 30 分間前処理し, LPS 処理 3 時間後に total RNA を回収し, COX-2 遺伝子発現を調べた. その結果, *p*-cresol 処理群では COX-2 遺伝子発現を 30% 程度抑制したが, DDBP 処理群では 10 μ M の濃度で 80% 程度抑制した (Fig 4A). Thymol 処理群は COX-2 遺伝子発現を約 60% 抑制した (Fig 4B). また, TTBBBD 処理群では COX-2 遺伝子発現を 10 μ M の濃度で 90% 抑制したが, DTBP 処理群では抑制効果は認められなかった (Fig 4C, D). 本実験で使用した濃度での phenol 関連化合物単独処理では

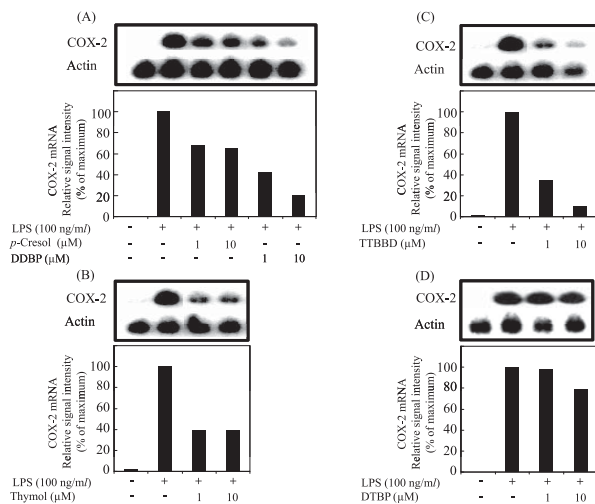


Fig 4 Inhibitory effects of phenol-related compounds on LPS-induced COX-2 gene expression in RAW264.7 cells. The cells were pretreated or not for 30 min with the indicated concentrations of *p*-cresol or DDBP (A), thymol (B), TTBBBD (C) and DTBP (D), and then treated or not for 3 h with LPS at 100 ng/ml. Thereafter, their total RNA was prepared, and Northern blot analysis was performed with [³²P]-labeled COX-2 cDNA probe and β -actin antisense-oligonucleotides probe. Autoradiographs from the Northern blots were quantified by densitometry and values were normalized to levels of β -actin mRNA. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

COX-2 遺伝子発現は検出されなかった (データを示さない). 一方, 本実験と同じ条件下での β -actin 遺伝子発現は LPS やフェノール関連化合物処理の影響を何ら受けなかったことから, LPS 誘導性 COX-2 遺伝子発現の抑制作用は, フェノール系薬物による特異的な作用であることが示唆された.

次にフェノール関連化合物の LPS 誘導性 COX-2 タンパク質発現に対する影響を検討する目的で, 細胞に 30 分 *p*-cresol, thymol, DTBP, DDBP, あるいは TTBBBD を前処理し, LPS 処理後 6 時間の細胞質タンパク質を回収し, Western blot 法で検討した. その結果, 遺伝子発現のデータとほぼ同様の傾向で, *p*-cresol 処理群では COX-2 発現を 10 μ M の濃度で約 50% 抑制したが, DDBP 処理群では同じ濃度で 80% 抑制した (Fig 5A). Thymol 処理群は COX-2 発現を 40~50% 抑制した (Fig 5B). また, TTBBBD 処理群では COX-2 発現を 70~80% 抑制したが, DTBP 処理群は全く抑制しなかった (Fig 5C, D). 一方, DTBP は単独処理で COX-2 タンパク質発現を 30% 前後誘導することが判明した (Fig 5C). 以上の結果は, フェノール関連二量体化合物の DDBP および TTBBBD が LPS 誘導性 COX-2 発現をそれぞれの単

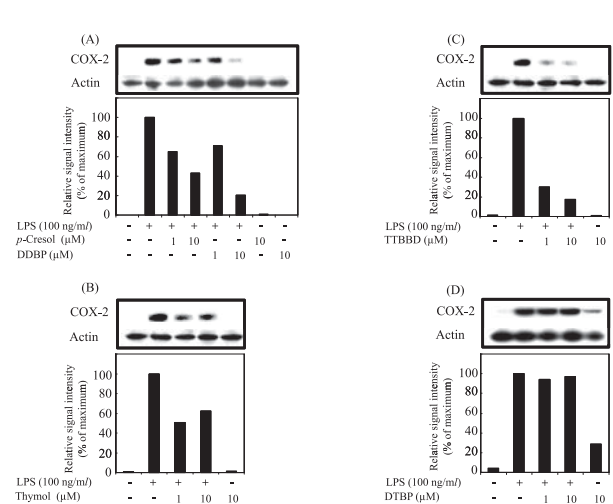


Fig 5 Inhibitory effects of phenol-related compounds on LPS-induced production of COX-2 protein in RAW264.7 cells. The cells were pretreated or not for 30 min with the indicated concentrations of *p*-cresol or DDBP (A), thymol (B), TTBBBD (C) and DTBP (D), and then treated or not for 3 h with LPS at 100 ng/ml. Thereafter, equal amounts of cell lysates were analyzed by Western blot analysis with antibody raised against COX-2 and β -actin. Autoradiographs from the Western blots were quantified by densitometry and values were normalized to levels of β -actin protein. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

量体より強力に抑制することが分った。

4. フェノール関連化合物による LPS 刺激 I κ B- α のリン酸化依存性タンパク質分解の調節作用

転写因子 NF- κ B は無刺激の状態では、抑制性タンパク質である I κ B- α によりその活性が抑制されている。しかし、LPS などの刺激が細胞膜受容体に伝達されると、I κ B- α がリン酸化されてプロテアソームで分解される。その結果、I κ B- α と結合していた NF- κ B が遊離し、核内に移動し、標的遺伝子のプロモーターに存在する NF- κ B 結合配列に結合する。フェノール関連二量体化合物は COX-2 発現を顕著に抑制したことから、これらの化合物は NF- κ B の活性化を抑制する可能性が考えられた。そこで、フェノール関連化合物が LPS 刺激 I κ B- α リン酸化依存性蛋白分解を調節できるか検討した。RAW264.7 細胞を 10 μ M の *p*-cresol, thymol, DDBP, あるいは TTBBBD で 30 分間前処理し、LPS 処理後 30 分に細胞質タンパク質を回収し Western blot 法にて検討し

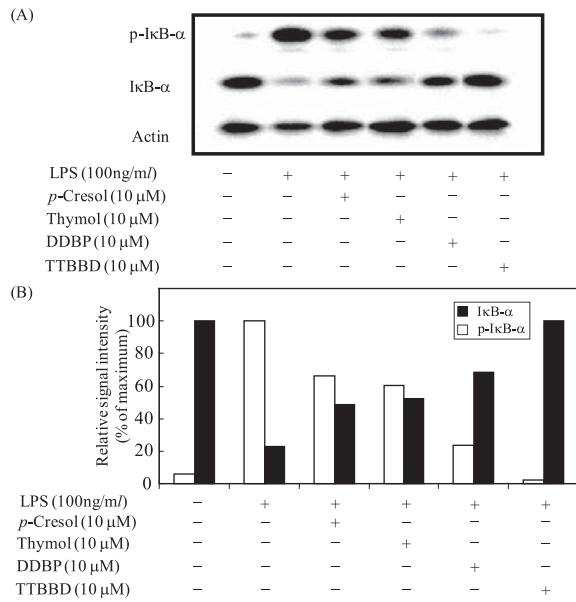


Fig 6 Inhibitory effects of phenol-related compounds on LPS-stimulated phosphorylation dependent proteolysis of I κ B- α in RAW264.7 cells. The cells were pretreated or not for 30 min with *p*-cresol or DDBP, thymol, and TTBBBD at 10 μ M, and then treated or not for 30 min with LPS at 100 ng/ml. Thereafter, equal amounts of cell lysates were analyzed by Western blot analysis with antibody raised against phosphorylated I κ B- α , I κ B- α and β -actin (A). Autoradiographs from the Western blots were quantified by densitometry and values were normalized to levels of β -actin protein (B). Reproducible results were obtained in another independent experiment.

た。その結果、Fig 6 に示すように、LPS による I κ B- α のリン酸化とタンパク質分解は、二量体化合物 TTBBBD によりほぼ完全に抑制された。また、二量体化合物の DDBP は I κ B- α のリン酸化を 80% 程度抑制した。一方、これに反して単量体の *p*-cresol, thymol は I κ B- α のリン酸化、タンパク質分解を 50~60% 程度しか抑制しなかった。

5. フェノール関連化合物による NF- κ B サブユニットの DNA 結合活性に対する抑制作用

フェノール関連二量体化合物は LPS 刺激 I κ B- α のリン酸化依存性タンパク質分解を顕著に抑制したことから、これらの化合物は NF- κ B の活性化を抑制する可能性が考えられた。そこで、ELISA を原理とした Trans AM NF- κ B family kit を用いてこれらの化合物による NF- κ B サブユニットのコンセンサス配列への結合活性に対する影響について検討した。RAW264.7 細胞を 10 μ M の *p*-cresol, thymol, DDBP, あるいは TTBBBD で 30 分間前処理し、LPS 処理 1 時間後の核タンパク質を回収し NF- κ B 複合体を構成する p50, p52, p65, RelB の各サブユニットの DNA 結合活性を検討した。その結果、Fig 7 に示すように *p*-cresol と thymol は p50, p52, p65 の DNA への結合を軽度抑制した。一方、二量体 DDBP, TTBBBD は単量体に比べて NF- κ B 各サブユニットの DNA 結合

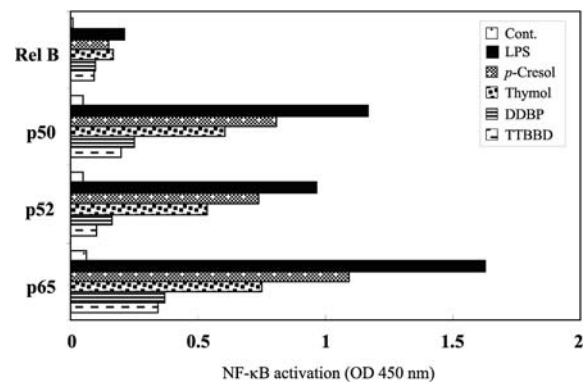


Fig 7 Inhibitory effects of phenol-related compounds on LPS-stimulated binding to its consensus sequences of NF- κ B in RAW264.7 cells. The cells were pretreated or not for 30 min with *p*-cresol or DDBP, thymol, and TTBBBD at 10 μ M, and then treated or not for 1 h with LPS at 100 ng/ml. Then the nuclear extracts were prepared and used in a Trans-AM (Active Motif) ELISA-like assay kit to quantitate the NF- κ B p50, p52, p65 and RelB DNA-binding activity. The colorimetric reaction was read as the optical density (OD) at 450 nm. Each value represents triplicate assays. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

活性を顕著に抑制した。

これらの結果から、二量体フェノール関連化合物は単量体に比較して転写因子 NF- κ B の活性化を効果的に抑制することが明らかとなった。

考 察

植物性フェノール関連化合物は古くから抗炎症作用を有していることが知られている³¹⁾。しかし、eugenol のような天然 *o*-methoxyphenol は抗酸化作用を有する一方で、高濃度ではそのプロオキシダント効果によりそれ自身がフェノキシラジカル化され、炎症やアレルギー反応のような副作用を引き起こすことも知られている。それゆえ、ラジカル化しプロオキシダントになりにくい構造のフェノール関連化合物を見出すことは意義あることと考える。今回、マウスマクロファージ様細胞株 RAW 264.7 における LPS 誘導性 COX-2 発現と NF- κ B 活性化を *p*-cresol, thymol, DTBP およびその合成二量体、DDBP, TTBBBD が抑制するか否か検討した。

フェノール化合物で根管消毒剤などに使用されている *p*-cresol とその二量体の DDBP, シソ科イブキジャコウソウ属 (*Thymus*) でタイム様の臭気を有し防腐剤、殺菌剤、洗口液などに使用される thymol の効果を検討したところ、*p*-cresol は 10 μ M の濃度で LPS 誘導性 COX-2 発現を抑制したが、DDBP は *p*-cresol より強く COX-2 の発現を抑制した (Fig 4A, Fig 5A)。また、thymol も COX-2 発現抑制作用を有することが明らかになった (Fig 4C, Fig 5C)。以上のことから、*p*-cresol や thymol は根管消毒剤としての効果に加え、COX-2 発現抑制効果もあることが明らかになった。また、*p*-cresol と DDBP はどちらもラジカル捕捉作用を持つが、二量体の DDBP の方がフリーラジカル捕捉作用が強いことが報告されている²²⁾。このことは、二量体化が抗酸化作用を増強できることを示している。

一方、酸化防止剤や紫外線吸収剤としてポリカーボネートの重合促進剤や塩化ビニルの安定剤などの工業製品にも応用されている単量体 DTBP は LPS 誘導性 COX-2 発現を全く抑制しなかった (Fig 4B, Fig 5B)。しかしながら、二量体である TTBBBD は供試した 5 種類の試薬中最も高度に抑制した (Fig 4D, Fig 5D)。一般的に、二量体による抗炎症作用の違いはフェノール性 OH から水素が引き抜かれる時の解離エンタルピー (BDE: bond dissociation enthalpy) の差異に起因していることが考えられる。BDE が高い化合物では水素原子の引き抜きがなく、フェノール化合物がラジカル化しにくく安定化する³¹⁾。したがって、BDE が単量体 DTBP より高い TTBBBD ではプロオキシダント効果が抑えられ抗酸化作用が増大し COX-2 発現を抑制したものと考えられる³²⁾。一般的に *o*-biphenols のような二量体化は単量体の持つ毒性やプロオキシダント効果を減少させフェノール誘導体の安定化、抗酸化作用と抗炎症作用を増強させることが多い。このような、二量体化による抗酸化・抗炎症作用の増強作用は eugenol と bis-eugenol⁸⁾, isoeugenol と dehydrodiisoeugenol³³⁾, butylated hydroxyanisole (BHA) と bis-BHA⁹⁾, ferulic acid と bis-ferulic acid³⁴⁾, phenol と 2,2'-biphenol³⁵⁾ および 4-methoxyphenol と DDMBP (2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybiphenyl) (未発表データ) などの単量体-二量体間の研究で明らかにされている。それゆえ、BDE 値やラジカル捕捉作用を基準に種々のフェノール化合物二量体を合成し、これらの抗炎症作用を研究することは歯科治療薬のドラッグデザインを考案する上で重要なことと考える。

近年、化合物の構造や活性部位の立体的役割と宿主受容体との相互作用が最近重要視されている。これは宿主の酵素やその活性部位、受容体が化合物の立体構造と適合し key and keyway の関係を保ち、わずかな立体構造の変異が細胞シグナルの on-off を左右することを示している^{36,37)}。フェノール性 OH の BDE の差異やラジカル捕捉作用も構造特異的であることが理解されつつあり^{34,38)}、化合物のデザインは複数のラジカル捕捉作用研究や抗炎症作用などの評価が重要な位置を占められる。

一方、Ishii ら³⁹⁾は DDBP が LPS 刺激 TNF- α 発現の抑制を示すが、2,2-biphenol は低濃度では促進、高濃度では抑制といった、二相性の変化を示すことをすでに報告した。このことは、二量体構造をとっていても条件によっては、抗酸化・抗炎症作用よりもプロオキシダント・炎症作用が増強されることを示唆している。フェノール関連化合物によるプロオキシダント・炎症作用および細胞傷害性はフェノール化合物の mitochondrial uncoupling, フェノキシラジカル産生, フェノール代謝などに関連した二次的な reactive quinone methide intermediate 形成などが複雑にからみあい誘導されることが報告されている^{7,38,40,41)}。本研究においても、DTBP の単独処理で、本細胞の蛋白質発現をわずかに誘導する現象を観察している (Fig 5)。一方、フェノール関連化合物単量体の 1 つである eugenol は優れた抗酸化剤であることが知られている⁸⁾。Koike⁴²⁾は eugenol が使用されている根管充填剤がヒト歯根膜組織由来線維芽細胞様細胞の細胞機

能を抑制し根尖周囲組織の治癒を妨げる要因になる可能性を明らかにした。また最近、私共は eugenol が IL-1 β 刺激ヒト歯髄細胞の IL-8 産生を抑制するが、ヒト歯肉線維芽細胞では抑制しない知見を得た⁴³⁾。それゆえ、フェノール関連化合物の歯科治療を含む臨床的应用には目的に応じた慎重な取り扱いが必要であると考えらる。

NF- κ B は免疫反応において中心的役割を果たす転写因子である。NF- κ B はストレスやサイトカイン、紫外線等の刺激により活性化され、急性および慢性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いる⁴⁴⁾。NF- κ B 活性制御の不良はクローン病や関節リウマチなどの炎症性疾患をはじめとし、癌や敗血症性ショックなどの原因となり、特に悪性腫瘍では多くの場合 NF- κ B の恒常的活性化が認められる⁴⁵⁾。NF- κ B ファミリーに属する分子は 5 種類 (Class I : p50, p52 ; Class II : RelA (p65), RelB, c-Rel) が知られており、これらがホモあるいはヘテロ二量体を形成したものが転写因子として機能し、接着分子、サイトカイン、COX-2、一酸化窒素合成酵素 (iNOS) や免疫系の受容体の遺伝子発現に関与する^{45, 46)}。これらのファミリーは共通して DNA 結合や核内移行、二量体形成の領域が存在するが、Class I 分子に属する p50, p52 には転写抑制作用に関与するアンキリンリピートと呼ばれる配列が存在する。一方、Class II 分子には転写活性化領域が存在し⁴⁷⁾、Class I 分子と Class II がヘテロ二量体を形成することで NF- κ B が転写活性化能を示す⁴⁸⁾。p50/p65 ヘテロダイマーは NF- κ B シグナル情報伝達路の主要な二量体で、非刺激下では細胞質に存在し、I κ B- α と結合することで活性が抑制されている⁴⁹⁾。しかし、LPS や TNF- α 等の刺激により I κ B- α がリン酸化され I κ B- α タンパク質が分解されると核内に移行し、DNA 上の κ B 配列 (5'-GGGACTTCC-3') に結合し、目的遺伝子の転写活性化を誘導する。p-Cresol と thymol は LPS による I κ B- α のリン酸化と分解、その後の p52, p65, p50 の κ B 配列への結合を抑制した。しかし、二量体 DDBP と TTBBBD は単量体フェノール化合物よりも強力に I κ B- α のリン酸化と分解を抑制した (Fig 7)。COX-2 遺伝子はそのプロモーター領域に κ B 配列を持ち、遺伝子発現制御を担っていることが知られている⁵⁰⁻⁵²⁾。従って、フリーラジカル補足能の高いフェノール二量体化合物がその抗酸化作用により NF- κ B の上流を抑制し、NF- κ B 活性化とそれに続く COX-2 遺伝子発現を抑制したものと考えられる。COX-2 は PG を介した血管透過性の亢進や発痛に関与し炎症巣を作り上げるだけでなく、胃癌、大腸癌、

頭頸部癌などの腫瘍から高率に発現が確認され、腫瘍形成にも関与することが考えられている¹⁵⁻¹⁸⁾。多くの腫瘍細胞では NF- κ B が恒常的な活性化を受けていることから、近年、NF- κ B が癌の化学療法におけるターゲットとして注目されている⁵³⁾。従って、腫瘍細胞においてこれらの二量体化合物の反応性を検討することは今後の重要な研究課題といえる。

今回の研究結果は、フェノール関連二量体化合物である DDBP と TTBBBD が転写因子 NF- κ B の抑制を介し、COX-2 に起因する慢性炎症性疾患の効率的な治療薬として機能しうる可能性を示したとともに、歯科領域においては抗炎症性作用を持つ新しいフェノール系根管治療薬の開発に向けたリード化合物としての可能性を示した。

結 論

フェノール関連化合物およびその合成二量体の抗炎症性作用を解明するために、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 における LPS 誘導性 COX-2 発現の抑制作用とその作用に関する転写因子活性化調節機構について検討し、以下の結果を得た。

1. p-Cresol, thymol, DTBP, DDBP, TTBBBD を使用した RAW264.7 細胞の細胞傷害性試験では、いずれの化合物も 100 μ M 以下の濃度では細胞傷害性を示さなかった。
2. 単量体フェノール化合物 p-cresol, thymol は RAW 264.7 細胞の LPS 誘導性 COX-2 遺伝子発現ならびにタンパク質発現を抑制したが、二量体 DDBP, TTBBBD は単量体化合物よりも強力に COX-2 の発現を抑制した。
3. LPS による RAW264.7 細胞の I κ B- α のリン酸化とタンパク質分解は、二量体化合物 TTBBBD によりほぼ完全に抑制された。また、二量体 DDBP は I κ B- α のリン酸化を 80% 程度抑制した。一方、単量体 p-cresol, thymol は I κ B- α のリン酸化とタンパク質分解を 50~60% 程度しか抑制しなかった。
4. 単量体 p-Cresol, thymol は LPS 刺激 NF- κ B サブユニット (p50, p52, p65) のコンセンサス配列への DNA 結合活性を軽度に抑制した。一方、二量体 DDBP, TTBBBD は単量体化合物よりも顕著に DNA 結合活性を抑制した。

以上の結果から、DDBP や TTBBBD などのフェノール関連合成二量体化合物は単量体と比較して LPS によって誘導される NF- κ B の活性化を強力に抑制し、NF- κ B によって制御されている COX-2 遺伝子発現を抑制する

ことが明らかとなった。

今回の研究結果は、フェノール関連二量体化合物である DDBP と TTBBDD が転写因子 NF- κ B の抑制を介し、COX-2 に起因する慢性炎症性疾患に対する有効な治療薬として作用しうる可能性を示唆した。

稿を終わるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました病態診断治療学講座総合口腔診断学分野・片山 直教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲を賜りました薬理学分野・坂上 宏教授、生化学分野・友村明人教授、微生物学分野・大森喜弘教授ならびに総合口腔診断学分野・町野 守前教授に深謝いたします。本研究の遂行にあたり終始適切な御指導を頂戴いたしました本学名誉教授・藤澤盛一郎博士に深謝いたします。また、種々の面にわたりご援助いただきました総合口腔診断学分野の各位に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Markowitz K, Moynihan M, Liv M and Kim S : Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **73**, 729–737, 1992
- 2) IARC : Allyl compounds, aldehydes, epoxides, and peroxides, IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum **36**, 75–97, 1985
- 3) Ahlberg KF and Hoskinson AE : Withdrawal of endodontic sealers. *Br Dent J* **159**, 241, 1985
- 4) Andersen A : Final report on the safety assessment of sodium *p*-chloro-*m*-cresol, *p*-chloro-*m*-cresol, chlorothymol, mixed cresols, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol, isopropyl cresols, thymol, *o*-cymen-5-ol, and carvacrol. *Int J Toxicol* **25**, Suppl 1 : 29–127, 2006
- 5) Azuma Y, Ozawa N, Ueda Y and Takagi N : Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res* **65**, 53–56, 1986
- 6) Anamura S, Dohi T, Shirakawa M, Okamoto H and Tsujimoto A : Effects of phenolic dental medicaments on prostaglandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp and rabbit medulla. *Arch Oral Biol* **33**, 555–560, 1988
- 7) Fujisawa S, Atsumi T, Murakami Y and Kadoma Y : Dimerization, ROS formation, and biological activity of *o*-methoxyphenols. *Arch Immunol Ther Exp* **53**, 28–38, 2005
- 8) Murakami Y, Shoji M, Hanazawa S, Tanaka S and Fujisawa S : Preventive effect of *bis*-eugenol, a eugenol ortho dimer, on lipopolysaccharide- stimulated nuclear factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* **66**, 1061–1066, 2003
- 9) 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 macrophages stimulated by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Arch Biochem Biophys* **449**, 171–177, 2006
- 10) Smith WL, Garavito RM and Dewitt DL : Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157–33160, 1996
- 11) O'Neill GP and Ford-Hutchinson AW : Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* **330**, 156–160, 1993
- 12) O'Banion KM, Winn VD and Young DA : cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4888–4892, 1992
- 13) Xie W, Merrill JR, Bradshaw WS and Simmons DL : Structural determination and promoter analysis of the chicken mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase gene and genetic mapping of the murine homolog. *Arch Biochem Biophys* **300**, 247–252, 1993
- 14) D'Acquisto F, Iuvone T, Rombola L, Sautebin L, Di Rosa M and Carnuccio R : Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J 774 macrophages. *FEBS Lett* **418**, 175–178, 1997
- 15) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LBA and Lipsky PE : Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* **12**, 1063–1073, 1998
- 16) Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P and Harkonen M : Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* **57**, 1276–1280, 1997
- 17) Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL and Dannenberg AJ : Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* **59**, 991–994, 1999
- 18) Evans JE and Kargman SL : Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Curr Pharmacol Design* **10**, 627–634, 2004
- 19) Dinarello CA : Interleukin-1 and its biologically related cytokine. *Adv Immunol* **44**, 153–205, 1989
- 20) Beutler B and Cerami A : The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* **7**, 625–655, 1989
- 21) Ralph P and Nakoinz I : Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines : enhancement by PPD and LPS. *J Immunol* **119**, 950–954, 1977
- 22) Kadoma Y, Murakami Y, Ogiwara T, Machino M, Yokoe I and Fujisawa S : Radical-scavenging activity and cytotoxicity of *p*-methoxyphenol and *p*-cresol dimers. *Molecules* **15**, 1103–1112, 2010
- 23) Saito M, Atsumi T, Satoh K, Ishihara M, Iwakura I, Sakagami H, Yokoe I and Fujisawa S : Radical production and cytotoxic activity of *tert*-butyl-substituted phenols. *In Vitro Mol Toxicol* **14**, 53–63, 2001
- 24) Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y and Ueno K : A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* **44**, 1299–1305, 1997
- 25) Chomczynski P and Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156–159, 1987
- 26) Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y and Fujisawa S : A possible mechanism of maxillofacial abscess formation : involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* **16**, 321–325, 2001
- 27) Hanazawa S, Takeshita A and Kitano S : Retinoic acid sup-

- pression of c-fos gene inhibits expression of tumor necrosis factor- α induced monocyte chemoattractant JE/MCP-1 in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **269**, 21379–21384, 1994
- 28) Imai K, Takeshita A and Hanazawa S : TGF- β inhibits lipopolysaccharide-stimulated activity of c-Jun N-terminal kinase in mouse macrophages. *FEBS Letters* **456**, 375–378, 1999
- 29) Renard P, Ernest I, Houbion A, Art M, LeCalvez H, Raes M and Remacle J : Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for NF- κ B. *Nucleic Acids Res* **29**, E21, 2001
- 30) Egan RW, Humes JL and Kuehl FA Jr : Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclooxygenase. *Biochemistry* **17**, 2230–2234, 1978
- 31) 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
- 32) Fujisawa S and Kadoma Y : Relationship between phenol-induced cytotoxicity and experimental inhibition rate constant or a theoretical parameter. *Mini Rev Med Chem* **12**, 477–490, 2012
- 33) Murakami Y, Shoji M, Hirata A, Tanaka S, Yokoe I and Fujisawa S : Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Archiv Biochem Biophys* **434**, 326–332, 2005
- 34) Hirata A, Murakami Y, Atsumi T, Shoji M, Ogiwara T, Shibuya K, Ito S and Fujisawa S : Ferulic acid dimer inhibits lipopolysaccharide-stimulated cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *In vivo* **19**, 849–854, 2005
- 35) 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
- 36) Noble ME, Endicott JA and Johnson LN : Protein kinase inhibitors : insight into drug from structure. *Science* **303**, 1800–1805, 2004
- 37) Jorgensen ML : The many roles of computation in drug discovery. *Science* **303**, 1813–1818, 2004
- 38) Moridani MY, Siraki A and O'Brien PJ : Quantitative structure toxicity relationships for phenols in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* **145**, 213–223, 2003
- 39) 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* **41**, 49–53, 2011
- 40) Baratt MD, Basketter DA, Roberts DW and Lepoittevin J-P : Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice : possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem Res Toxicol* **10**, 335–343, 1997
- 41) Yamazaki S, Suzuki K, Ikemoto T and Kakishima H : Analysis of contact dermatitis by cytokines. III. – Sensitization and crossreaction of phenolic compounds. *Yakugaku Zasshi* **118**, 324–331, 1998
- 42) 小池成治 : 各種根管充填剤のヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞の機能におよぼす影響. *日歯保誌* **33**, 1055–1069, 1990
- 43) 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
- 44) Gilmore TD : The Rel/NF- κ B signal transduction pathway : introduction. *Oncogene* **18**, 6842–6844, 1999
- 45) Panwalkar A, Verstovsek S and Giles F : Nuclear factor-kappa B modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer* **100**, 1578–1589, 2004
- 46) Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D and Miyamoto S : Rel/NF- κ B/I κ B family : intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* **15**, 2723–2735, 1995
- 47) Gilmore TD : Introduction to NF- κ B : players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684, 2006
- 48) Li Q and Verma IM : NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725–734, 2002
- 49) Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P and Baltimore D : DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, a rel-related polypeptide. *Cell* **64**, 961–969, 1991
- 50) D'Acquisto F, Invone T, Rombola L, Sautebin L, Di Rosa M and Camuccio R : Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J 774 macrophages. *FEBS Lett* **418**, 175–178, 1997
- 51) Cappello C, Zwergal A, Kanclerski S, Haas SC, Kandemir JD, Huber R, Page S and Brand K : C/EBP β enhances NF- κ B-associated signaling by reducing the level of I κ B α . *Cell signal* **12**, 1918–1924, 2010
- 52) Sharif-Askari E, Vassen L, Kosan C, Khandanpour C, Gaudreau MC, Heyd F, Okayama T, Jin J, Rojas ME, Grimes HL, Zeng H and Moroy T : Zink finger protein Gfi 1 controls the endotoxin-mediated Toll-like receptor inflammatory response by antagonizing NF- κ B p65. *Mol Cell Biol* **30**, 3929–3942, 2010
- 53) Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A and Zamora A : The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**, 154–161, 2007

(受付日 : 2013 年 10 月 22 日 受理日 : 2013 年 11 月 27 日)