

## 学位研究紹介

**2-methoxy-4-vinylphenol の RAW264.7  
細胞における抗炎症活性には HO-1 によ  
る iNOS 転写抑制が関与する  
Anti-inflammatory activity of  
2-methoxy-4-vinylphenol involves  
transcriptional inhibition of  
lipopolysaccharide-induced inducible  
nitric oxidase synthase by heme  
oxygenase-1**

新潟大学大学院医歯学総合研究科 組織再建口腔外科学分野

浅見 栄里

Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial  
Region, Faculty of Dentistry & Graduate School of Medical and  
Dental Science, Niigata University

Eri Asami

**【背景および目的】**

炎症の発症過程において、マクロファージは細菌毒素や癌細胞に応答し、炎症性メディエーターを放出することで炎症反応が生じる。その中でも一酸化窒素 (NO) の過剰産生は炎症性の組織障害等に関与し、さらに近年では癌の血管新生、増殖速度に深く関与していることが報告されている。

2-methoxy-4-vinylphenol (2M4VP) は酒類の原料となるブドウ等の細胞壁に結合したフェルラ酸から酵母によって生合成されるフェノール類であり、赤ワイン等に含まれる天然化合物である。2M4VP は炎症メディエーターである NO を抑制し、抗炎症活性を有することが報告されているが、その作用機序は未だに明らかになっていない。一方、抗炎症作用をもつ抗酸化酵素 HO-1 は転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が核内に存在する antioxidant response element (ARE) に結合することで転写が促進されること、さらには HO-1 が炎症性メディエーターの産生促進に関与する誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現を阻害し、NO の産生を抑制すること報告されている。

本研究では 2M4VP は Nrf2/ARE 経路を介して HO-1 の発現を増加させ、iNOS 発現を阻害することで NO 産生を抑制するとの仮説のもと、2M4VP の抗炎症作用メカニズムを検討した。

**【材料と方法】**

抗炎症作用スクリーニングで使用されるマクロファージ系細胞 RAW264.7 を用いて、リポポリサッカロイド (LPS) 処理により炎症を惹起させ、2M4VP の抗炎症活性を解析した。NO 産生は Griess 法にて測定し、iNOS ならびに HO-1 の発現を qPCR およびウエスタンブロットティングにて解析した。さらに、2M4VP が転写因子 Nrf2 を介して HO-1 の発現に関与することを明らかにするため、Nrf2 阻害剤 (ML385) を用いて解析を行った。また 2M4VP が、Negative regulator として細胞質内で Nrf2 と結合することでその核内移行を阻害する Keap1 へ与える影響をウエスタンブロットティングにて解析した。2M4VP の Nrf2 の核内移行への影響は免疫染色にて評価した。2M4VP による Nrf2 の ARE への結合促進については ARE responsive luciferase reporter が組み込まれた HEK293 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイにて解析を行った。

**【結 果】**

NO および TNF- $\alpha$  (data not shown) の産生は 2M4VP の濃度依存的に減少した (図 1. A)。また、2M4VP 投与により iNOS の発現が減少した (図 1. B)。一方 2M4VP を投与することで HO-1 の発現が促進されたのに対し、ML385 処理後に 2M4VP 投与を行っても HO-1 の発現促進は認められなかった (図 1. C)。一方で、2M4VP 投与により Keap1 の発現は減少し (図 2. A)、Nrf2 の核内移行の促進が促進された (図 2. B)。さらに 2M4VP 投与により Nrf2 の ARE への結合が促進されたのに対し、ML385 処理後の細胞では Nrf2 の ARE への結合促進は認められなかった (data not shown)。

**【考察および結論】**

本研究では、2M4VP の抗炎症作用のメカニズムを明らかにした。2M4VP は Nrf2 の Negative regulator である Keap1 の発現を減少させ、Nrf2 の核内移行を促進し、ARE への結合を増強させた。これにより、HO-1 の発現が促進され、iNOS 発現が抑制されることで最終的に NO 産生が抑制されたと考えられる (図. 3)。これまでの研究から、炎症性メディエーターの産生には複数の経路が関与していることが報告されているが、2M4VP