

マウスマクロファージにおける magnolol と honokiol による
Porphyromonas gingivalis リポ多糖体刺激
TNF- α 発現の抑制作用

川田 朗史

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：片山 直 教授)

Inhibitory Effects of Magnolol and Honokiol on
Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide-stimulated
TNF- α Expression
in Mouse Macrophages

Akifumi KAWATA

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Tadashi KATAYAMA)

和文抄録

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) は慢性歯周炎の主要な病原性細菌で菌体表面のリポ多糖 (LPS) や線毛の直接的な刺激を介して宿主細胞からの炎症性メディエーター産生に寄与している。Tumor necrosis factor- α (TNF- α) は LPS などにより誘導される炎症性サイトカインで、炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの生理現象に関与しており、その発現は転写因子 nuclear factor kappa-B (NF- κ B) の活性化により調節されている。植物性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、化粧品、医薬品として古くから広く使用されている。Magnolol と honokiol は、フェノール二量体構造をした neolignan 誘導体でホオノキ (*Magnolia officinalis*) から抽出され、長い間日本や中国での漢方薬として使用されてきた。Murakami らは以前 *bis*-eugenol (eugenol オルト二量体) が高濃度でマウスマクロファージにおける *Escherichia coli* LPS 誘導性炎症性サイトカイン発現を抑制することを報告した。しかし magnolol や honokiol による *P. gingivalis* LPS 刺激 TNF- α 発現調節効果に関する報告はない。そこで今回、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を使用し、*P. gingivalis* LPS (P. LPS) 刺激 TNF- α 発現に及ぼす magnolol と honokiol の調節作用について検討した。P. LPS は RAW264.7 細胞において顕著な TNF- α タンパク質発現を処理後 3 時間で誘導した。Magnolol, honokiol, eugenol, *bis*-eugenol などのフェノール関連化合物は 100 μ M 以下の濃度では著明な細胞傷害性を示さなかった。そこで P. LPS による TNF- α 発現

がこれらのフェノール関連化合物で抑制されるか否か検討を行った。その結果、magnolol, honokiol は 50 μ M の濃度で RAW264.7 細胞の LPS 刺激 TNF- α 発現を抑制したが、eugenol, bis-eugenol は抑制をしなかった。一方、NF- κ B 活性化に関する magnolol と honokiol の作用を検討したところ、これらの化合物は、I κ B- α のリン酸化依存性タンパク分解を顕著に抑制した。また、これらの化合物は NF- κ B 複合体のうち、p65, p50, p52, RelB の κ B 配列への結合活性を顕著に抑制した。これらの結果は、magnolol と honokiol が、P.LPS 誘導性の I κ B- α リン酸化を抑制することにより、NF- κ B 活性化を抑制し、TNF- α 遺伝子発現を抑制することを示している。今回の研究結果は、magnolol, honokiol が NF- κ B の活性化や、TNF- α 産生に起因する炎症性反応に対して抑制効果を示す可能性を示唆した。

索引用語 : Magnolol, Honokiol, LPS, TNF- α , NF- κ B, RAW264.7 細胞

欄外表題 : Magnolol と honokiol は LPS 誘発性 TNF- α 発現を抑制する

Abstract

Porphyromonas gingivalis (*P.gingivalis*) is the major pathogen responsible for chronic-periodontitis which contributes for inflammatory mediators from the host cell by the direct stimulation of lipopolysaccharide (LPS) or the fimbria on surface of organisms. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a potent inflammatory cytokine, which is induced by the stimulation of LPS and participates in the physiological reactions such as the inflammation, cell growth, and apoptosis, that are mediated by the activation of possess on nuclear factor kappa-B (NF- κ B). Phytophenols possess on anti-oxidant activities and have been widely used as the food additive, cosmetic, and the medical products. Magnolol and honokiol are neolignane derivatives containing a biphenolic structure extracted from the stem bark of *Magnolia officinalis* and they have long been used in Chinese and Japanese traditional medicines. Murakami et al previously reported that *bis*-eugenol (eugenol ortho dimer) inhibited *Escherichia coli* LPS induced inflammatory cytokine expressions at relatively high concentrations in the mouse macrophage. However, there were no report about the inhibitory effects of magnolol and honokiol on the *P.gingivalis* LPS stimulated TNF- α expression in macrophages. Therefore, in this study, using the mouse macrophage-like RAW264.7 cells, we examined the inhibitory effect of magnolol and honokiol on the *P.gingivalis* LPS (P.LPS) stimulated TNF- α expression. P.LPS stimulated markedly TNF- α productions at 3 hours after the treatment. Phenol compounds such as magnolol,

honokiol, eugenol and *bis*-eugenol at the concentration of 100 μ M or less did not show any cytotoxicity in RAW 264.7 cells. Also, we examined whether P.LPS-induced TNF- α expressions were inhibited with these phenol compounds. As a result, magnolol and honokiol inhibited the P.LPS-stimulated TNF- α expression in RAW264.7 cells at the concentration of 50 μ M whereas eugenol and *bis*-eugenol was inactive. On the other hand, we further investigated the regulatory effects of magnolol and honokiol on the NF- κ B activation, and found these compounds significantly inhibited the phosphorylation dependent proteolysis of I κ B- α . In addition, these compounds significantly inhibited P.LPS stimulated binding of NF- κ B subunit such as p65, p50, p52, RelB to its consensus sequences in the cells.

These results provide the evidence that magnolol and honokiol inhibits P.LPS-stimulated NF- κ B activations by suppressing the I κ B- α phosphorylation subsequently exerting the preventing action of the TNF- α expression. Our present results suggest that magnolol and honokiol could inhibit the TNF- α related inflammatory responses followed by inhibition of NF- κ B activation.

Key words: Magnolol, Honokiol, LPS, TNF- α , NF- κ B, RAW264.7 cells

Running title: Magnolol and honokiol inhibit LPS-stimulated TNF- α expression in RAW264.7 cells.

1. 緒言

Prophyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) は歯周疾患患者の歯周ポケット内に常在するグラム陰性菌で慢性歯周炎の主要な病原性細菌である。多くの研究者は本菌が外膜小胞や付着因子、リポ多糖(LPS)、溶血素、タンパク質分解酵素などの病原性因子を保有していることを示している¹⁻⁴⁾。LPSはグラム陰性菌の外膜の主要な構成成分であり、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) のようなアラキドン酸代謝を含む炎症性メディエーターや interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカイン産生を強く刺激する^{5, 6)}。このような炎症性サイトカインや炎症性メディエーターは組織由来の酵素や matrix metalproteinases (MMPs) などの放出を刺激し、歯周組織における細胞外マトリックスや歯槽骨の破壊を促進させると考えられている^{4, 7)}。

TNF- α は主に活性化マクロファージにより産生されることが知られているが、当初固形癌に対して出血性の壊死を生じさせるサイトカインとして発見された⁸⁾。TNFの生理作用は、生体内の細胞に広く存在している TNF 受容体(TNFR)を介して発現するが、特に TNFR スーパーファミリーに属する TNFR1 は細胞内デスドメインを介してカスパーゼ-8の活性化により細胞にアポトーシスを誘導する⁹⁾。また、TNF- α は細胞接着分子や IL-1, IL-6, PGE₂ などの炎症性メディエーターなどの発現や形質細胞による抗体産生の亢進を行うことにより感染防御や抗腫瘍作用の発現にも関与する。しかし、過剰な発現は敗血症性ショック、全身性炎症反応症候群、関節リウマチ、脂質異常症や糖尿病、乾癬、骨粗鬆症などの

多くの疾患を招く炎症性メディエーターとして機能する¹⁰⁻¹³⁾。さらに TNF- α の発現は転写因子 nuclear factor kappa-B (NF- κ B) の活性化によっても調節されている¹⁴⁾。それゆえ、LPS 誘導性の TNF- α 産生を抑制できる物質を探索することは臨床的見地からも意義がある。

植物性フェノール関連化合物は優れた抗酸化剤として食品添加物や化粧品、香料や医薬品に広く使用されている^{15, 16)}。とりわけ、magnolol と honokiol はフェノール二量体構造をした neolignan 誘導体でモクレン科の植物であるホオノキ (*Magnolia officinalis*) から採取され、厚朴という生薬の主要な成分として臨床で広く用いられている¹⁷⁾。深美ら¹⁸⁾や石井ら¹⁹⁾は以前 eugenol 二量体や *p*-cresol 二量体などの合成二量体が *Escherichia coli* LPS 刺激 TNF- α 発現を部分的に抑制できることを報告した。しかしながら、天然の二量体化合物である magnolol と honokiol が *P. gingivalis* LPS 刺激 TNF- α 発現とその情報伝達機構を調節するか否かについて検討した報告はない。

そこで今回、*P. gingivalis* LPS を使用し、RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞株における LPS 誘導性 TNF- α の発現に及ぼす magnolol, honokiol の効果について転写因子調節作用も含めて検討したので報告する。

2. 材料と方法

1. 使用試薬

Magnolol と honokiol はキシダ化学工業(大阪), eugenol は東京化成工業(東京)を購入し使用した. *bis*-Eugenol は eugenol より酸化的二量化反応で合成したものを使用した²⁰⁾. Eugenol, eugenol 二量体, およびその類似化合物の化学構造式を Fig. 1 に示す. LPS は *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株由来 LPS(和光純薬工業, 大阪)を使用した. マウス組織型 TNF- α は Miltenyi Biotec (Bergisch Glandbach, Germany)製を入手した.

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 RAW264.7(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 Lab., MacLean, VA, USA) 添加 RPMI 1640 培地 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 中で 37 $^{\circ}$ 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²¹⁾. すなわち, 1.0×10^5 cells/100 μ l の濃度の RAW264.7 細胞に 10%牛胎仔血清を添加し, 96 穴平底型マイクロカルチャープレート(Nalge Nunc International, 東京)の各穴に播種して 48 時間前培養を行った. その後, Fig. 1 に示した各種化合物を dimethyl sulfoxide(和光純薬工業)に溶解し 100 mM としたもののから, それぞれ最終濃度

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. TNF- α の測定法

RAW264.7 細胞 (1.0×10^6 cells/100 μl) を無血清で 96 穴平底型マイクロカルチャープレート (Nalge Nunc International) の各穴に播種して 24 時間培養した。培地を交換し、100 ng/ml の濃度に希釈した P. LPS を加えた。所定の時間後に培養上清を回収し TNF- α 測定のための試料とした。つづいて同様に培養し、所定の濃度に希釈した LPS を加え、6 時間後に回収した。TNF- α の測定は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法に基づいた TNF- α ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) にて測定した。すなわち、anti mouse TNF- α antibody が固相化されている ELISA プレート中の各 well に standard diluent buffer にて至適濃度に希釈した培養上清を添加し、直後に biotin-conjugated anti mouse TNF- α antibody をさらに添加し、室温にて 90 分インキュベートした。洗浄後、streptavidin-HRP を添加し、室温にて 30 分静置した。更に洗浄排液後、tetramethylbenzidine にて 30 分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。TNF- α 量は、kit に同梱されている既知濃度の recombinant マウス TNF- α より検量線を作成し、その吸光度より算出した値を測定値とした²²⁾。

4. Total RNA の調整と定量 Polymerase chain reaction (PCR) 法

RAW264.7 細胞 (2.0×10^4 cells/100 μ l) を無血清で 96 穴平底型マイクロカルチャープレート (Nalge Nunc International) の各穴に播種して 24 時間培養した。培地を交換し 5 μ M と 50 μ M の濃度に希釈した試薬を 30 分間前処理後、P. LPS または TNF- α を処理し 3 時間後、RNeasy Plus micro kit (QIAGEN Japan, 東京) にて total RNA を回収した。²³⁾その後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Life Technologies Japan, 東京) とサーマルサイクラー (PerkinElmer Japan, 横浜) を用いて逆転写反応による cDNA の合成を行った。TNF- α と cyclooxygenase (COX)-2 の mRNA 発現は TaqMan probe/primer mixture (Life Technologies Japan) を使用し、定量 PCR システム GeneAmp SDS5700 (Life Technologies Japan) にて TaqMan probe のレポーター色素の蛍光強度と反応サイクル数を測定した。内因性コントロールは 18S rRNA を用いた。

5. I κ B- α のリン酸化依存性タンパク質分解

I κ B- α のリン酸化と分解は細胞を溶解後、抗 I κ B- α 抗体並びに抗リン酸化 I κ B- α 抗体を使用した Western blot 法で検討した。RAW264.7 細胞 (3.0×10^6 cells/ml) は無血清で 60 mm シャーレで 24 時間前培養した。培地を交換し 50 μ M

の濃度に希釈した試薬を 30 分間前処理後, P. LPS を処理し 30 分後, 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 fluoride (PMSF), 10 µg/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 Tris-glycine buffer system (25 mM Tris, 192 mM glycine) と 12.5 % polyacrylamide gel (和光純薬工業) 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, 24 時間, 4°C, 5 % bovine serum albumin (BSA) 含有 TBS buffer 中に希釈した rabbit anti-human IκB-α polyclonal antibody, rabbit anti-human phospho-IκB-α (Ser32) monoclonal antibody (希釈倍率 1:100, Cell Signaling technology, Beverly, MA, USA), rabbit anti-human actin (H-196) polyclonal antibody (希釈倍率 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と反応させた後, 0.1 % Tween-20 を含む TBS buffer で 2 回洗浄した. その後, PVDF 膜は 4 °C にて 3 時間, BSA 含有 TBS buffer 中に希釈した Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (希釈倍率 1:200, Bio Rad, Hercules,

CA, USA)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 20× LumiGLO Reagent and 20× Peroxide(Cell Signaling technology)を用いて化学発光させ、X-OMAT film(Carestream Health, Rochester, NY, USA)に感光させた後、それぞれのタンパク質の発現の程度を検討した²⁴⁾。

6. 核タンパク質の調整と NF- κ B DNA 結合活性

RAW264.7 細胞 (3.0×10^6 cells/ml) を無血清で 60 mm シャーレで 24 時間培養した。培地を交換し 50 μ M の濃度に希釈した試薬を 30 分間前処理後、LPS 処理 1 時間後、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²⁵⁾。すなわち、NF- κ B 結合配列である 5'-GGGACTTTCC-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 (20 μ l) 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。Wash buffer での洗浄後に Antibody binding buffer で希釈 (1:1000) 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 (1:1000) を添加し、室温にて 60 分反応させた。更に洗浄後

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.

3. 結果

1) フェノール関連化合物の細胞傷害性

はじめに, ユージ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 magnolol, honokiol, eugenol, *bis*-eugenol を添加し, 24 時間培養し相対的生細胞数を Cell Counting Kit-8 で測定した. その結果, magnolol, honokiol, は eugenol, *bis*-eugenol と比べ 10 倍低い濃度で細胞障害性を示したものの, 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) P. LPS による RAW264.7 細胞における TNF- α 発現の誘導

RAW264.7 細胞の TNF- α 産生動態に及ぼす P. LPS の作用について検討した. LPS 処理後, 経時的に培養上清を回収し, 産生された TNF- α 量を ELISA 法で定量した. P. LPS は約 3 時間後に顕著な TNF- α 産生を誘導し, 9 時間後ではほぼ最大に達した (Fig. 3A). 次に細胞へ所定の濃度に希釈した P. LPS を処理し, 6 時間後に培養上清を回収し TNF- α 量を定量した. P. LPS は濃度依存性に TNF- α タンパク質産生を誘導した (Fig. 3B).

3) フェノール関連化合物による P. LPS 誘導性 TNF- α 発現の抑制

P. LPS は RAW264.7 細胞の TNF- α 産生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抑制作用を検討した。細胞に所定の濃度に希釈した magnolol, honokiol, eugenol, *bis*-eugenol を 30 分間前処理後 LPS 処理し 6 時間後の培養上清を回収し、ELISA 法で検討した。その結果、magnolol, honokiol は 50 μ M で TNF- α 産生の抑制を認めたが、eugenol, *bis*-eugenol 処理群には弱い抑制効果しか見られなかった (Fig. 4)。次に遺伝子レベルでの P. LPS 誘導性 TNF- α 発現のフェノール関連化合物の抑制作用を検討した。RAW264.7 細胞に先の実験と同条件で 30 分間前処理後 LPS 処理し、3 時間後の total RNA を回収して TNF- α mRNA 発現を定量 PCR で調べ、Control を 1 として表記した。その結果、タンパク質産生と同様に magnolol, honokiol は LPS 誘導性 TNF- α 遺伝子発現を濃度依存性に抑制したが、eugenol, *bis*-eugenol 処理群には抑制効果は認めなかった (Fig. 5)。一方、magnolol と honokiol の抑制効果が LPS 情報伝達機構特異的なものであるか調査するため、LPS とは細胞受容体の異なる TNF- α を使用して COX-2 mRNA 発現を、同様に定量 PCR を用いて検討し、Control を 1 として表記した。その結果、P. LPS と同様に magnolol, honokiol 処理群では TNF- α 誘導性 COX-2 mRNA 発現を顕著に抑制したが、eugenol, *bis*-eugenol 処理群には弱い抑制効果しか見られなかった (Fig. 6)。この結果は magnolol と honokiol の抑制効果が LPS 情報伝達機構特異的でないことを示している。

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。フェノール関連化合物は TNF- α 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 リン酸化依存性タンパク質分解を抑制できるか検討した。所定の濃度に希釈した magnolol, honokiol, eugenol, *bis*-eugenol を 30 分間前処理後 LPS 処理し、30 分後に細胞質タンパク質を回収し Western blot 法にて検討した。その結果、Fig. 7 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、magnolol, honokiol により抑制された。一方で、eugenol, *bis*-eugenol は I κ B- α のリン酸化、タンパク質分解を強く抑制しなかった。本実験と全く同じ条件下での β -actin 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、P. LPS 刺激 I κ B- α のリン酸化依存性の抑制作用は、magnolol と honokiol による特異的な作用であることが判明した。

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 50 μ M の magnolol, honokiol, eugenol, *bis*-eugenol で 30 分間前処理を行い、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 p65, p50, p52, 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. 8 に示すように magnolol, honokiol は p65, p50, p52, RelB の DNA への結合を抑制したが eugenol, *bis*-eugenol は抑制しなかった。これらの結果から、magnolol と honokiol は転写因子 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。

4. 考察

Magnolol と honokiol はモクレン科ホオノキの樹皮などから抽出される phenylpropanoid 化合物で、特にシナホオノキ (*Magnolia officinalis*) の樹皮は厚朴という生薬として発熱や頭痛、不安、下痢、喘息、脳卒中などの治療薬として使われ、すぐれた抗炎症作用を有している¹⁷⁾。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が^{26, 27, 28)}、これらの化合物は酸化されやすく、自動酸化により高濃度ではフェノキシラジカル化し、プロオキシダントとして働き炎症やアレルギー反応のような副作用を引き起こす。これは化合物の持つ酸化反応や二次的な reactive quinone methide intermediate の形成に起因する^{29, 30, 31)}。Fujisawa らの研究グループは、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探索したところ、*bis*-eugenol³²⁾、dehydrodiisoeugenol³³⁾、*bis*-butylated hydroxyanisole (BHA)³⁴⁾、*bis*-ferulic acid³⁵⁾などの二量体化合物がそれぞれの単量体と比較して炎症性サイトカインや cyclooxygenase (COX)-2 の発現を顕著に抑制することを発見した。この結果は二量体化で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おり、eugenol 二量体に構造が似た物質である magnolol と honokiol には同様の効果があるのではないかと考えた。そこで、はじめにマウスマクロファージ細胞様 RAW264.7 における *P. gingivalis* LPS 誘導性 TNF- α 発現に及ぼす magnolol と honokiol

の調節効果について検討した。その結果、これらの化合物はともに 50 μM の低濃度で P.LPS 刺激 TNF- α 発現を遺伝子レベルとタンパク質レベルの両方で濃度依存的に抑制した (Fig. 4, 5)。しかしながら、対照として用いた eugenol と bis-eugenol に同じ濃度での抑制効果は認められなかった。LPS は宿主細胞上の CD14 \cdot Toll-like-receptor 4 (TLR-4) \cdot MD-2 複合体を介した認識機構によって細胞内に情報伝達されることが知られている³⁶⁾。それゆえ、magnolol が LPS シグナルのみを特異的に抑制するか検討することは興味がある。そこで、次にマクロファージ細胞表面上のレセプターの異なる TNF- α を刺激剤に用いて COX-2 mRNA 発現に及ぼすこれら magnolol と honokiol の調節作用について検討した。その結果、これら二つの化合物は LPS 刺激 TNF- α 発現と同様に、TNF- α 刺激 COX-2 mRNA 発現を抑制した。一方、我々は最近、magnolol と honokiol が RAW 細胞の本菌線毛刺激 COX-2 発現と NF- κ B 活性化を抑制することを報告した³⁷⁾。線毛は宿主細胞の TLR-2 や CR3, CD11b/CD18 を受容体としていることが示されている^{38, 39, 40)}。これらの結果は magnolol と honokiol が LPS-TLR-4 シグナル伝達系だけでなく、TLR-2, CR3, CD11b/CD18, TNFR などを経する多くのシグナル伝達系に対して非特異的に抑制できる化合物であることを示唆している。

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り、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⁴¹⁾。NF- κ B ファミリーに属する分子は 5 種類が知られており、Class I (p50, p52) と Class II

(RelA(p65), RelB, c-Rel)に分類される。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^{41, 42)}。とりわけ p50-p65 ヘテロ二量体は NF- κ B シグナル情報伝達路の主要な二量体であり、非刺激下では I κ B- α と結合することで活性が抑制され細胞質に存在している⁴³⁾。その活性化は IKK(I κ B kinase) α と IKK β , 調節サブユニット NF- κ B essential modulator(NEMO)から構成される IKK 複合体によって制御されている。LPS や TNF- α などの刺激によって IKK 複合体は活性化し、I κ B- α のリン酸化、プロテアソームによる分解を誘導する。その結果、p50-p65 複合体は核に移行し、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⁴⁴⁾。Magnolol, honokiol は LPS による I κ B- α のリン酸化と分解、その後の p52, p65, p50, RelB の κ B 配列への結合を抑制した(Fig.7, 8)。対照に用いた eugenol と *bis*-eugenol にはほとんど抑制傾向が認められなかったことから、今回の結果は magnolol と honokiol が有力な LPS 誘導性 NF- κ B 活性化の抑制剤である可能性を示唆した。しかしながら、その抑制機構に及ぼす各サブユニットの細胞内の分布や発現動態についての詳細は未だ不明なところが多く今後の課題であると考ええる。

今回の実験で magnolol と honokiol は対照として用いた eugenol や *bis*-eugenol と比較して大きな抗炎症作用を示した。この 2 つの化合物の作用の差異は、おそらくフェノール性 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いことが過去の我々の研究より明らかにされている^{35, 45)}。また、今回の実験で使用した化合物の BDE 値は honokiol > magnolol > eugenol > bis-eugenol の順に低いことが報告されている⁴⁶⁾。したがって、BDE が eugenol や bis-eugenol より高い magnolol と honokiol 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 TNF- α 発現や NF- κ B 活性化が抑えられたものと考えられる。一方、phenol 構造体が所有する抗炎症性に関連する生物学的活性は定量的構造活性相関 (QSAR) による BDE や軌道電子の受け渡しに関する molecular orbital energies で予測できる可能性が示唆されている^{47, 48, 49)}。我々も phenol 関連化合物分子が持つ chemical hardness (η), や electronegativity (χ) などの化学的記述子を計算し、それらの値と生物学的活性間の相関について QSAR を行ない構造-活性関係を明らかにする因子分析方法でフェノール関連化合物の構造と細胞傷害性や COX-2 抑制に関する反応を予測してきた⁵⁰⁾。その結果、 χ 値が高い化合物に抗炎症作用があることが分ってきた^{37, 51, 52)}。 χ 値は magnolol が 3.240, honokiol が 3.002, eugenol が 2.6, bis-eugenol が 2.715 であり、顕著な COX-2 抑制効果を示した magnolol と honokiol は、eugenol や bis-eugenol と比較して高い χ 値を持っていることが報告されている⁴⁶⁾。それゆえ、今回の抗炎症作用はこれらの化合物の持つ構造的特性によっても調節されている可能性があると考えられる。

感染症や慢性炎症の遷延化は周囲組織の治癒不全や異形成を導くことが報告されている⁵³⁾. Murakami らは以前 *Porphyromonas endodontalis* の LPS が TNF- α , IL-1 β や好中球走化性因子などの炎症性サイトカインの産生を介し, 慢性感染根管由来の顎口腔領域膿瘍形成に重要な役割を演じている可能性を報告した²⁴⁾. 今回の我々の実験は慢性歯周炎モデルを想定した *P. gingivalis* LPS による TNF- α 発現の調節機構を検討したものであるが, その TNF- α も我々の実験では COX-2 発現を早期に誘導することを証明した (Fig. 6). 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⁵⁴⁻⁵⁷⁾. 一方, NF- κ B は炎症性サイトカインの誘導を導くことから免疫機能や炎症を活性化する因子と考えられていたが, 最近ではアポトーシス誘導機能を不活性化し, 癌の進展を促進することが明らかになった⁵⁸⁾. また, 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⁵⁹⁾. このように NF- κ B は炎症やアポトーシス耐性を正に調整し, NF- κ B を阻害する NSAID 様化合物は抗炎症剤, 抗癌剤などの広い分野に薬剤として応用される可能性がある⁶⁰⁾. 最近, magnolol と honokiol は多くの細胞で情報伝達系の調節を介して様々な炎症性メディエーターを抑制し全身疾患発症の予防的効果を発揮する可能性が理解されるようになってきた⁶¹⁻⁶⁴⁾. 従って, 腫瘍細胞を含む様々な細胞において magnolol と honokiol の反応性を多くの情報伝達系を含めて詳細に検

討すること、また、抑制効果が LPS との結合によるものか否かを検討することは今後の重要な研究課題と考える。

今回の研究結果は、フェノール関連化合物のうち、特に magnolol や honokiol が低濃度で転写因子 NF- κ B の抑制を介し、TNF- α に起因する慢性炎症性疾患の効率的な予防剤として機能し得る可能性を示唆した。臨床歯科領域において、magnolol や honokiol を含む生薬は応用されていないため、これらの化合物が歯周病予防剤や歯周病に対する炎症抑制剤として応用できるのではないかと考える。

5. 結論

フェノール関連化合物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 細胞における LPS 誘導性 TNF- α 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. Magnolol, honokiol, eugenol, *bis*-eugenol 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. P. LPS は RAW264.7 細胞の TNF- α 遺伝子発現を処理後 3 時間で誘導し、その発現は P. LPS 濃度依存的であった。
3. Magnolol, honokiol は 50 μ M の濃度で RAW264.7 細胞の P. LPS 刺激 TNF- α 遺伝子発現を顕著に抑制したが、eugenol, *bis*-eugenol は弱い抑制が見られた。
4. Magnolol と honokiol は、P. LPS 刺激 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が eugenol と *bis*-eugenol は弱い抑制が見られた。
5. Magnolol と honokiol は NF- κ B サブユニットの κ B 配列への結合を抑制したが、eugenol と *bis*-eugenol は抑制しなかった。

以上本研究から、フェノール関連化合物のうち magnolol, honokiol の LPS 刺激 TNF- α 発現の抑制機構は I κ B- α のリン酸化依存性タンパク質分解抑制に起因

した NF- κ B 活性化の抑制によることが明らかとなった。今回の結果は magnolol, honokiol が他のフェノール関連化合物に比べ TNF- α に起因する慢性炎症性疾患に対する低濃度で効率的な予防剤として機能しうる可能性を示唆した。

謝辞

稿を終わるにあたり，終始御指導，御校閲を賜りました明海大学歯学部病態診断治療学講座総合臨床歯科学分野・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・大森喜弘教授に深謝いたします。本研究の遂行にあたり終始適切なる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明海大学歯学部病態診断治療学講座総合臨床歯科学分野の各位に厚く御礼申し上げます。

- 1) Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, Ratnayake D and Yamamoto K: *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem.* *128*: 153-159, 2000.
- 2) Bainbridge BW and Darveau RP: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* *59*: 131-138, 2001.
- 3) Laine ML, Appelmelk BJ, van Winkelhoff AJ: Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* *31*: 278-284, 1996.
- 4) Davey M, Liu X, Ukai T, Jain V, Gudino C, Gibson FC 3rd, Golenbock D, Visintin A and Genco CA: Bacterial fimbriae stimulate proinflammatory activation in the endothelium through distinct TLRs. *J Immunol.* *180*: 2187-2195, 2008.
- 5) Dinarello CA: Interleukin-1 and its biologically related cytokine. *Adv Immunol* *44*, 153-205, 1989
- 6) Beutler B and Cerami A: The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* *7*, 625-655, 1989
- 7) Bainbridge BW, Coats SR and Darveau RP: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the

- innate host defense system. *Ann Periodontol.* 7: 29–37, 2002.
- 8) Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10, 411–452, 1992
- 9) Guicciardi ME and Gores GL: Life and death by death receptors. *FASEB J* 23, 1625–1637, 2009
- 10) Brouckaert P and Fiers W: Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol* 216, 167–187, 1996
- 11) Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL and Montori V: Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies : systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 295, 2275–2285, 2006
- 12) Uysal KT, Wiesbrock SM and Hotamisligil GS: Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- α -mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 139, 4832–4838, 1998
- 13) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ and Suda T: Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK

- interaction. J Exp Med 191, 275-286, 2000
- 14) Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA and Jongeneel CV: Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. J Exp Med 171, 35-47, 1990
- 15) 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
- 16) IARC: Eugenol, IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 36, 75-97, 1985
- 17) Wang JP, Hsu MF, Raung SL, Chen CC, Kuo JS and Teng CM: Anti-inflammatory and analgesic effects of magnolol. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 346: 707-712, 1992.
- 18) 深美 優, 村上幸生 : Eugenol 二量体によるリポ多糖体誘導性 TNF- α 発現の調節作用. 明海大歯誌, 31 巻, 46-55, 2002
- 19) 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
- 20) Kadoma Y, Murakami Y, Ogiwara T, Machino M, Yokoe I and Fujisawa S: Radical-scavenging activity and cytotoxicity of *p*-methoxyphenol and *p*-cresol dimmers. Molecules 15, 1103-12, 2010
- 21) 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
- 22) 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
- 23) Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159, 1987
- 24) 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
- 25) 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
- 26) Egan RW, Humes JL and Kuehl FA Jr: Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclooxygenase. *Biochemistry* 17, 2230-2234, 1978
- 27) 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

- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 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) 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
- 35) 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
- 36) da Siva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS and Ulevitch RJ: Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276, 21129–21135, 2001.
- 37) 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-s gene and lipopolysaccharide-stimulated activation of nuclear factor-kB in RAW264.7 cells. *In vivo* 28: 719–726, 2014
- 38) Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Russell MW and Genco RJ: Dependence of bacterial protein adhesins on

- toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. Clin Diagn Lab Immunol. 9: 403-411, 2002.
- 39) Takeshita A, Murakami Y, Yamashita Y, Ishida M, Fujisawa, Kitano S and Hanazawa S: *Porphyromonas gingivalis* fimbriae use $\beta 2$ integrin (CD11/CD18) on mouse peritoneal macrophages as a cellular receptor, and the CD18 β chain plays a functional role in fimbrial signaling. Infect Immun. 66, 4056-4060, 1998
- 40) Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Shakhathreh MA, James D, Nishiyama S, Yoshimura F and Demuth DR: Subversion of innate immunity by periodontopathic bacteria via exploitation of complement receptor-3. Adv Exp Med Biol. 632: 203-219, 2008.
- 41) Gilmore TD: The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. Oncogene 18, 6842-6844, 1999
- 42) Panwalkar A, Verstovsek S and Giles F: Nuclear factor-kappa B modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. Cancer 100, 1578-1589, 2004
- 43) 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
- 44) Baeuerle PA, Baltimore D.: Activation of DNA-binding activity in an

- apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. : Cell 22, 53(2), 211-7, 1988
- 45)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
- 46)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
- 47)Fujisawa S, Ishihara M, Murakami Y, Atsumi T, Kadoma Y and Yokoe I: Predicting the biological activities of 2-methoxyphenol antioxidants: Effects of dimers. In Vivo 21, 181-188, 2007
- 48)Maynard AT, Huang M, Rice WG and Covell DG: Reactivity of the HIV-1 nucleocapsid P7 zinc finger domains from the perspective of density function theory. Proc Natl Acad Sci USA 95, 11578-11583, 1998
- 49)Kobayashi S, Shinohara H, Tabata K, Yamamoto N and Miyai A: Stereo structure- controlled and electronic structure-controlled estrogen-like

- chemicals to design and develop nonestrogenic bisphenol A analogs based on chemical hardness concept. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54, 1633–1638, 2006
- 50) Kadoma Y, Murakami Y, Atsumi T, Ito S, and Fujisawa S: Chapter 5 Cloves (Eugenol). 117–148. in *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices. Modern Uses for Ancient Medicine* by Editors B.B. Aggawal and A.B. Kunnumakkara. World Scientific Publishing Co. Pre. Ltd. 5 Toeh Link, Singapore 596224. pp1–430, 2009.
- 51) Murakami Y, Ishii H, Takada N, Tanaka S, Machino M, Ito S and Fujisawa S: Comparative anti-inflammatory activities of curcumin and tetrahydrocurcumin based on the phenolic O–H bond dissociation enthalpy, ionization potential and quantum chemical descriptor. *Anticancer Res* 28: 699–708, 2008
- 52) Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T and Fujisawa S: The radical scavenging activity and cytotoxicity of resveratrol, orcinol and 4-allylphenol and their inhibitor effects on Cox-2 gene expression and Nf-kb activation in RAW264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*-fimbriae. *In vivo* 29: 341–250, 2015
- 53) Moss SF and Blaser MJ: Mechanisms of disease: inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2, 90–97, 2005
- 54) 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
- 55) Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P and Harkonen M: Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57, 1276-1280, 1997
- 56) 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
- 57) Evans JE and Kargman SL: Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Curr Pharmacol Design* 10, 627-634, 2004
- 58) Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK and Sethi G: Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72, 1605-1621, 2006.
- 59) 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
- 60) Gilmore TD and Herscovitch M: Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25, 6887-6899, 2006
- 61) Cho JH, Jeon YJ, Park SM, Shin JC, Lee TH, Jung S, Park H, Ryu J, Chen

- H, Dong Z, Shim JH and Chae JI: Multifunctional effects of honokiol as an anti-inflammatory and anti-cancer drug in human oral squamous cancer cells and xenograft. *Biomaterials* 53: 274-284, 2015
- 62)Liu J, Zhang C, Liu Z, Zhang J, Xiang Z and Sun T: Honokiol downregulates Kruppel-like factor 4 expression, attenuates inflammation, and reduces histopathology after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 40: 363-368, 2015
- 63)Liang CJ, Lee CW, Sung HC, Chen YH, Wang SH, Wu PJ, Chiang YC, Tsai JS, Wu CC, Li CY, Chen YL: Magnolol reduced TNF- α -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via JNK/p38 and NF- κ B signaling pathways. *Am J Chin Med* 42: 619-637, 2014
- 64)Chunlian W, Heyong W, Jia X, Jie H, Xi C and Gentao L: Magnolol inhibits tumor necrosis factor- α -induced ICAM-1 expression via suppressing NF- κ B and MAPK signaling pathways in human lung epithelial cells. *Inflammation* 37: 1957-1967, 2014.

Figure Legends

Fig. 1. Structures of magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol.

Fig. 2. Cytotoxicity of magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol 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 mean of triplicate assays. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

Fig. 3. *P. gingivalis* LPS-induced TNF- α expression in RAW264.7 cells. (A) The cells were treated or not with P.LPS at 100 ng/ml, and then the culture supernatant was collected at the selected times after the initiation of the treatment. TNF- α production was quantified by ELISA. The colorimetric reaction was read as the optical density (OD) at 450 nm. (B) The cells were incubated with or without P.LPS at 100 ng/ml, and then the culture supernatant was collected at the selected times after the initiation of the treatment. TNF- α production was quantified by ELISA. The colorimetric reaction was read as the optical density (OD) at 450 nm. Each value represents mean of triplicate assays. Reproducible results were

obtained in another independent experiment.

Fig. 4. Inhibitory effects of magnolol and honokiol on P. LPS-induced TNF- α production in RAW264.7 cells. The cells were pretreated for 30 min with the indicated concentrations of magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol respectively. They were then incubated for 6 h with or without P. LPS at 100 ng/ml. Thereafter, the culture supernatant was collected and TNF- α production was quantified by ELISA. The colorimetric reaction was read as the optical density (OD) at 450 nm. Each value represents mean of triplicate assays. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

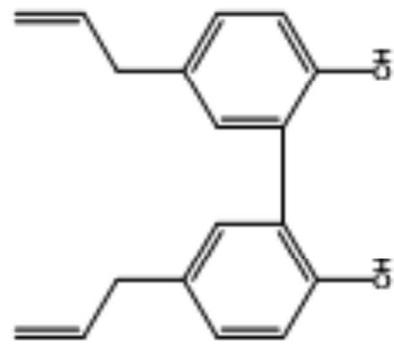
Fig. 5. Inhibitory effects of magnolol and honokiol on P. LPS-induced TNF- α gene expression in RAW264.7 cells. The cells were pretreated for 30 min with the indicated concentrations of magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol respectively. They were then incubated for 3 h with or without P. LPS at 100 ng/ml, and their total RNA was prepared. Each cDNA was synthesized, and the expression levels of TNF- α mRNA were quantified by real time PCR and standardized against the expression of 18S rRNA. Each value represents mean of triplicate assays. Reproducible results were

obtained in another independent experiment.

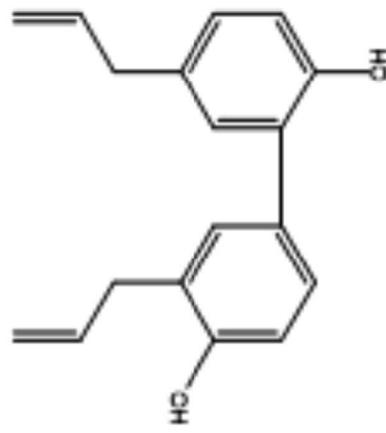
Fig. 6. Inhibitory effects of magnolol and honokiol on TNF- α -induced COX-2 gene expression in RAW264.7 cells. The cells were pretreated or not for 30 min with the 50 μ M of magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol respectively. They were then incubated for 3 h with or without P.LPS at 100 ng/ml, and their total RNA was prepared. Each cDNA was synthesized, and the expression levels of COX-2 mRNA were quantified by real-time PCR and standardized against the expression of 18S rRNA. Each value represents mean of triplicate assays. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

Fig. 7. Inhibitory effects of magnolol and honokiol on the phosphorylation dependent proteolysis of P.LPS-stimulated I κ B- α in RAW264.7 cells. The cells were pretreated for 30 min with magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol at 50 μ M, and then incubated for 30 min with or without P.LPS at 100 ng/ml. Thereafter, equal amounts of cell lysates were analyzed by Western blotting after SDS-PAGE with phosphor-specific anti-I κ B- α antibody, anti-I κ B- α antibody or anti- β -actin antibody. Reproducible results were obtained in another independent experiment.

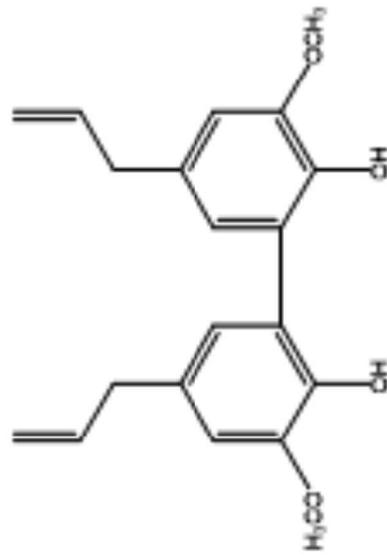
Fig. 8. Inhibitory effects of magnolol and honokiol on P.LPS-stimulated binding to its consensus sequences of NF- κ B in RAW264.7 cells. The cells were pretreated or not for 30 min with magnolol, honokiol, eugenol and *bis*-eugenol at 50 μ M, and then treated or not for 1 h with LPS at 100 ng/ml. Then 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 OD at 450 nm. Each value represents mean of triplicate assays. Reproducible results were obtained in another independent experiment.



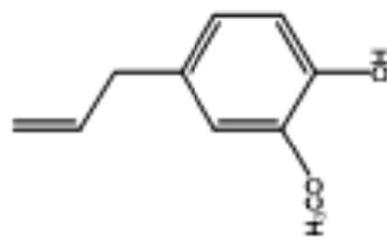
Magnolol



Honokiol



***bis*-Eugenol**



Eugenol

Fig.1

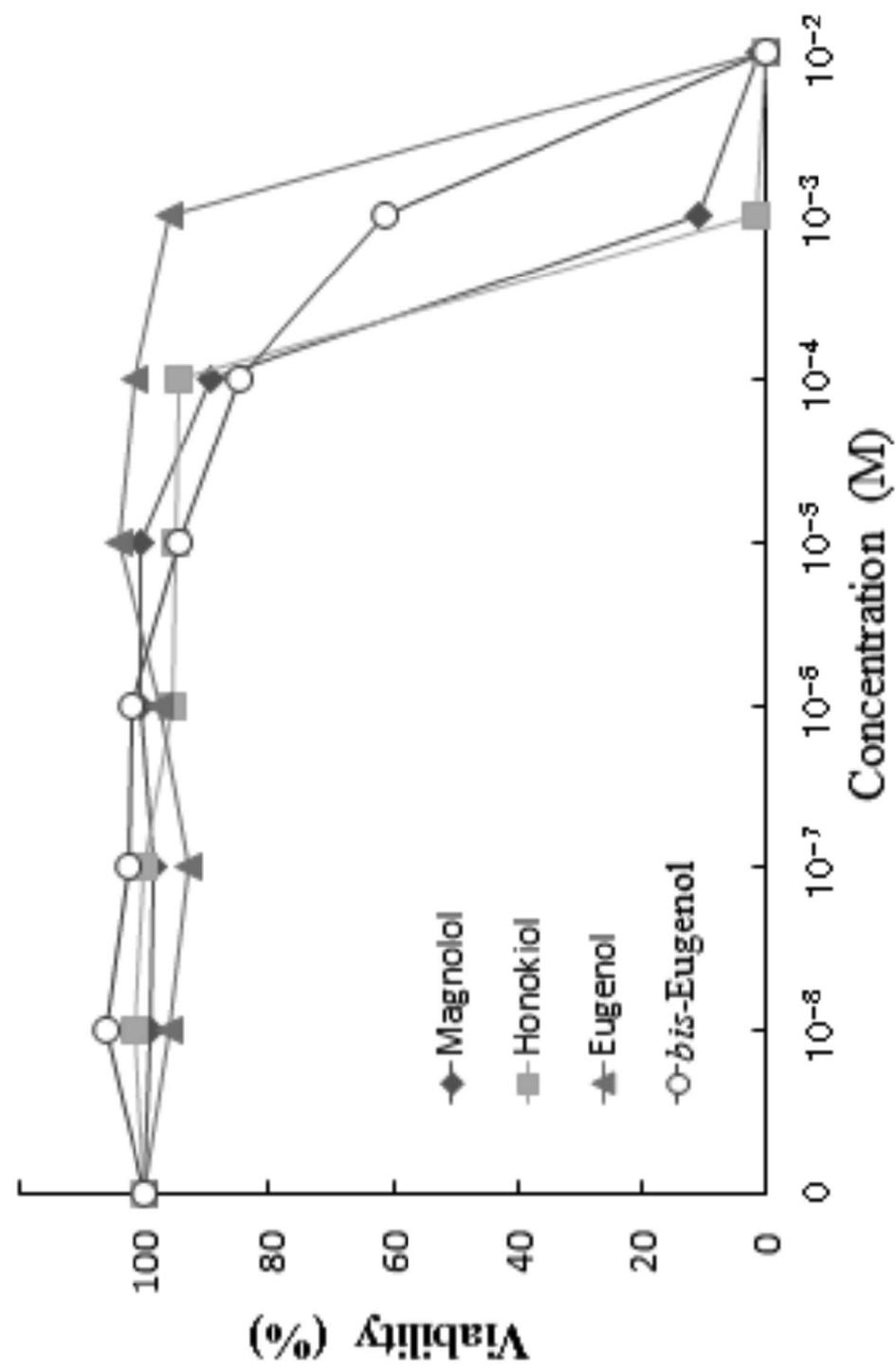


Fig.2

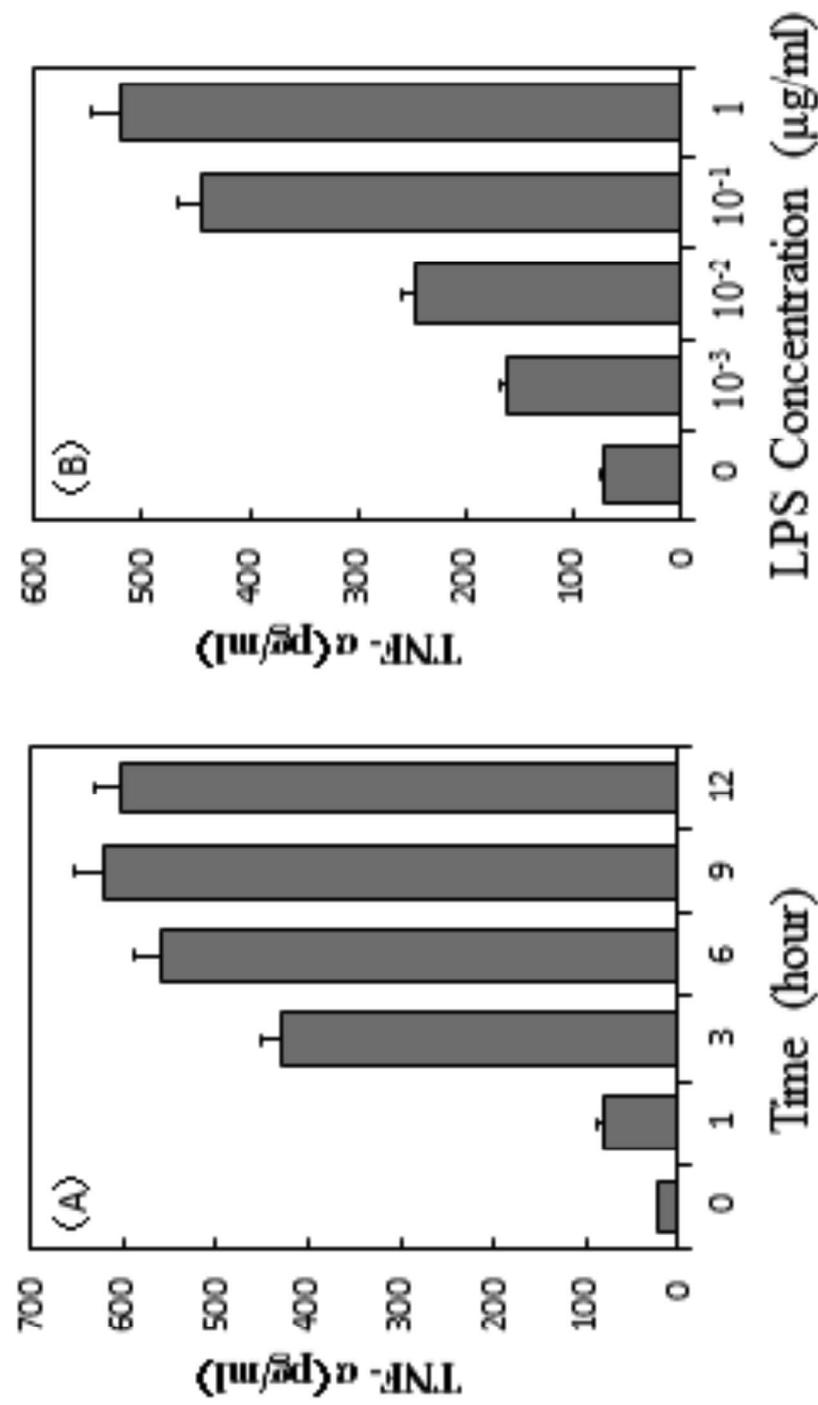


Fig.3

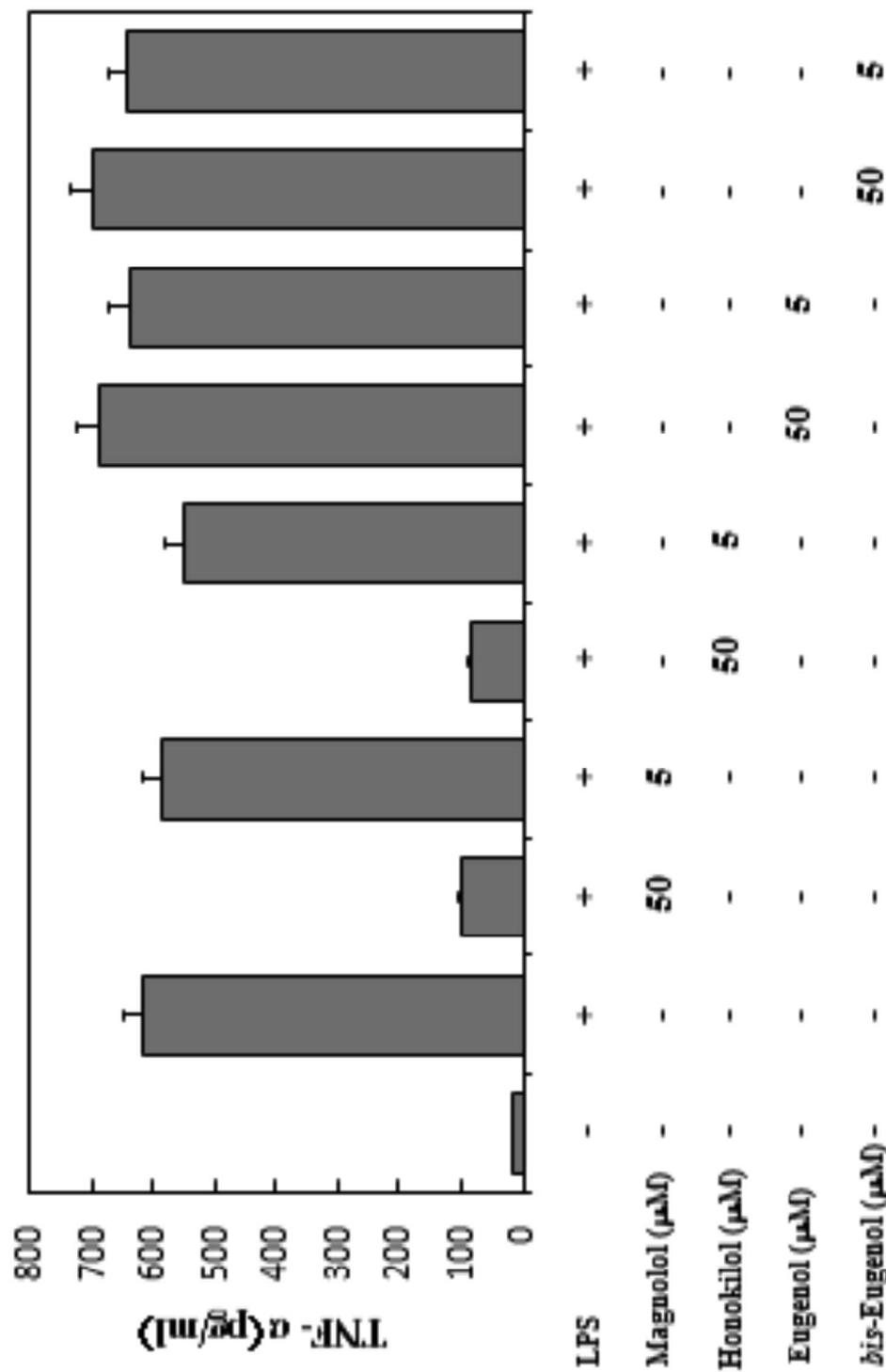


Fig.4

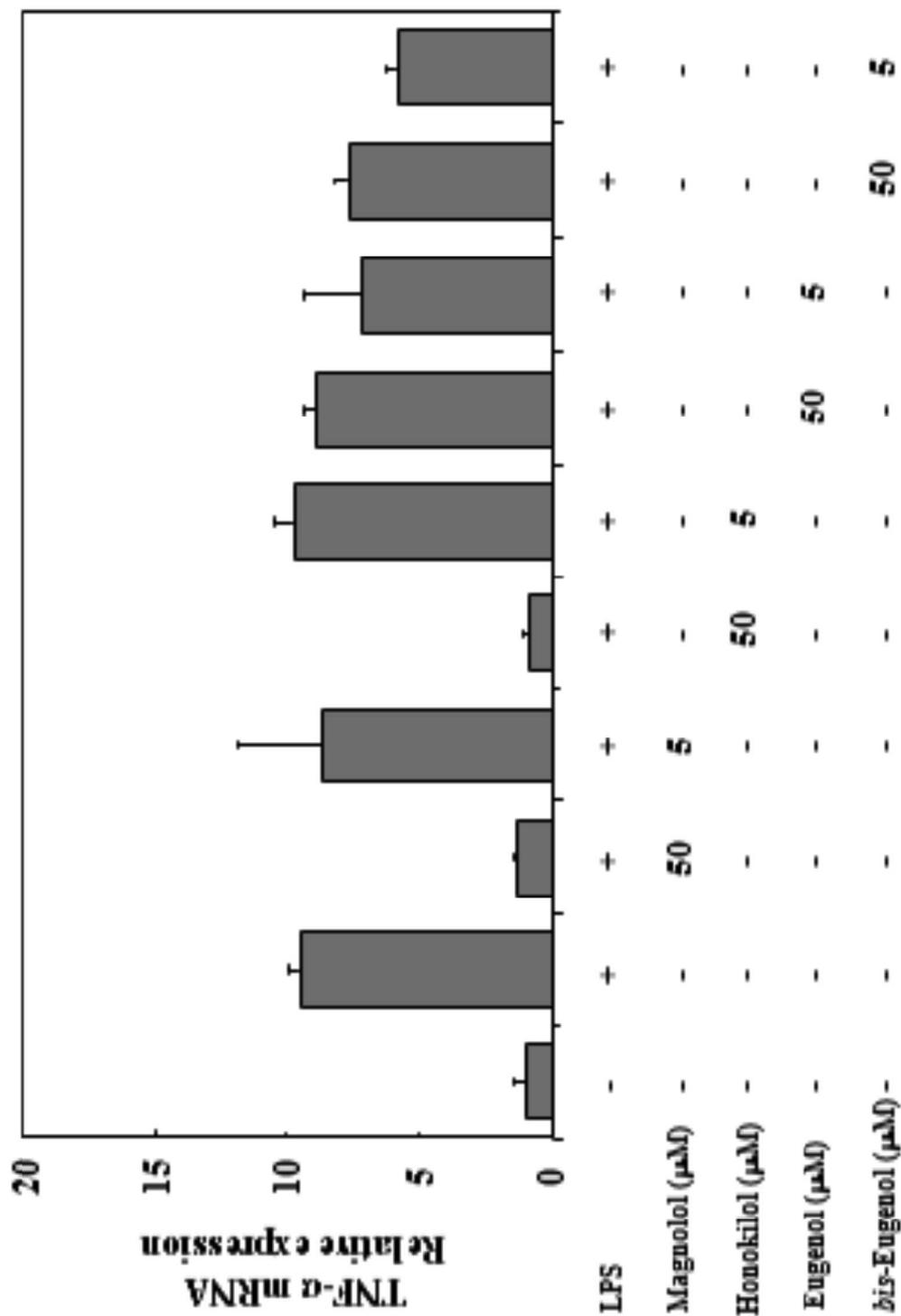


Fig.5

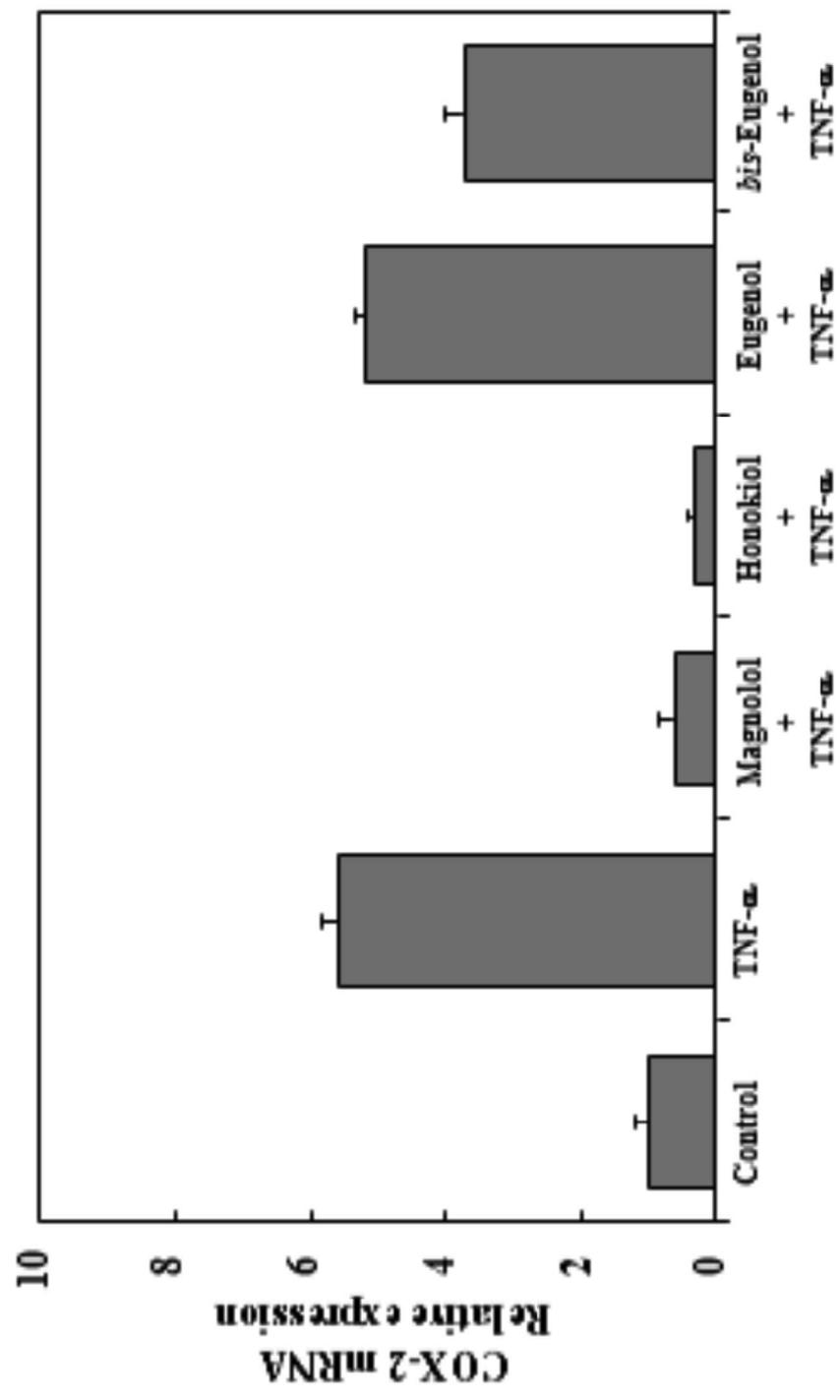
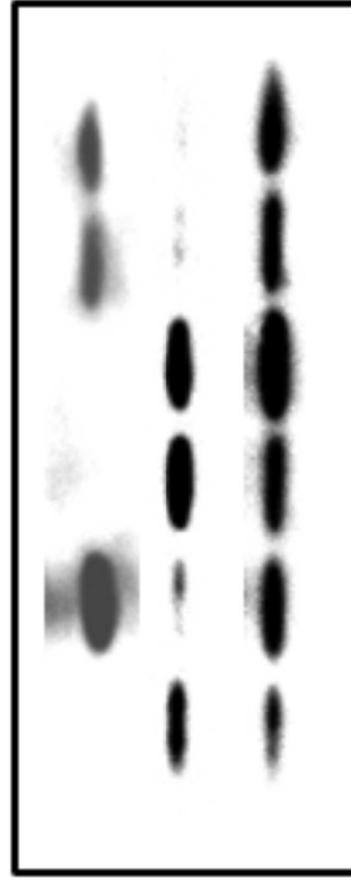


Fig.6



p-IκB-α

IκB-α

Actin

PLPS (100 ng/ml)	-	+	+	+	+	+	+
Magnolol (50 μM)	-	-	+	-	-	-	-
Honokiol (50 μM)	-	-	-	+	-	-	-
Eugenol (50 μM)	-	-	-	-	-	+	-
<i>bis</i> -Eugenol (50 μM)	-	-	-	-	-	-	+

Fig.7

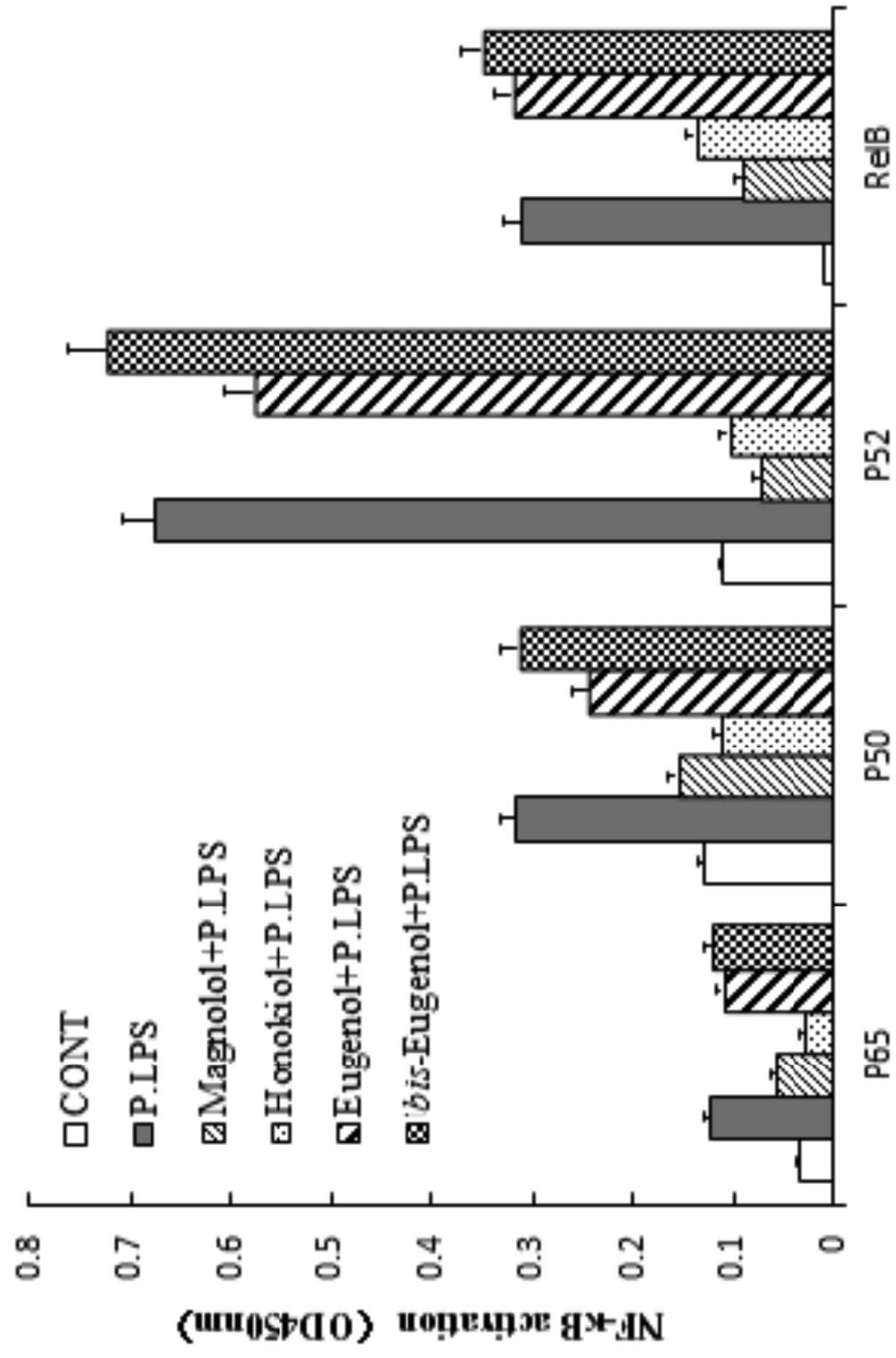


Fig.8