

「オレンジオイルとリモネン オイルによる p38 経路を介 した PC12m3 細胞の分化」

四宮 美佐恵 加納 良男 河村 顕治
谷田 恵美子 名越 恵美 赤松 恵美
吉備国際大学・保健科学部・看護学科

アロマセラピーに使用されるエッセンシャルオイルの効果をもたらす作用機序を明らかにすることを目的に実験を行った。神経細胞は神経成長因子 (NGF) によってその神経突起が誘導されるが、その時、細胞内シグナル伝達に働く ERK、JNK、p38MAPK 経路が重要な作用をされると言われている。そこで、いろいろな物理的刺激によって神経突起が誘導される特殊な神経細胞である PC12m3 細胞を用いてリモネンが神経突起の形成に働くか、また、ERK、JNK、p38MAPK 経路のうちどの経路に働くかを調べた。その結果、リモネンは、主として p38MAPK 経路を活性化することで神経分化に働く事が判明した。

キーワード：アロマセラピー エッセンシャル
オイル PC12 変異細胞 p38MAP キナーゼ

はじめに

近年、アロマセラピーが注目を集めるようになってきた。アロマセラピーは、植物の花、葉、種子、幹、果皮、樹脂などから抽出された 100% 天然の精油を疾病の治療や予防に用いる植物療法の一つであり、医療従事者が補完・代替療法として行っている。アロマセラピーを行なう時に使用する精油 (エッセンシャルオイル) は、植物の花、葉、種子、幹、果皮、樹脂など様々な部分より抽出された天然植物の素材で、有効成分を高濃度含有した揮発性の芳香物質である。香りとして嗅覚を刺激し、その反応が人間の身体をコントロールしている視床下部に良い影響を与える。精油 (エッセンシャルオイル) の成分である芳香分子に様々な薬効作用があり、その成分が、鼻粘膜や肺胞より吸収されて血液中

に入り、各臓器に運ばれて効果をもたらすことも解明されてきた。また、リラックス効果を引き出し、生体の恒常性を正常化させる。

一方、生体を構成している細胞は、増殖因子やいろいろな刺激に対して増殖や分化あるいは細胞死を起こしている。細胞の増殖や分化はさまざまな遺伝子が順序正しく発現していくことで成就する。これにはいろいろな細胞外の刺激が、巧みに細胞内情報伝達経路を活用し、遺伝子に伝えられる事によって起こっている。細胞内の情報伝達は増殖因子によって働く ERK 経路と熱や浸透圧、各種薬剤それに放射線などいろいろな環境要因によって働く JNK、p38MAPK 経路の 3 つに大別される。この経路は独立に働くことで細胞が増殖するか細胞死を起こすかなどの細胞の運命を決めることで生体の恒常性を保っている。

そこで、今後、アロマセラピーが医学的治療として認められるには、なにより作用機序の解明と治療効果についての客観的評価が行なわれなければならないと考える。そのため本研究では、細胞の増殖や分化などに働くさまざまな遺伝子が順序正しく発現することをコントロールしている細胞内情報伝達経路について、神経細胞を用いる事によって、アロマセラピーの効果をもたらす作用機序を明らかにする。

実験方法

1. 細胞の培養

実験に使用した細胞は、ラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された細胞分化能を有する PC12 細胞の変異細胞 (PC12m3) である。正常な PC 細胞に神経成長因子を作用させると、MAPK が持続して活性化し、その結果細胞分化と神経突起の成長が誘導される。細胞は、0.35% のグルコースを含む DMEM に 10% 馬血清と 5% 牛胎児血清を加え、さらに 80 μ g/ml のカナマイシンを加えた培地を用いて継代した。全ての細胞は、37 \cdot 5% CO₂ 含有の状態の炭酸ガス培養器の中において培養した。

2. 神経突起形成の測定

インキュベーション 5~7 日後、神経様突起の形成は神経の長さと数を計測することで測定した。細胞の持つ一つあるいは数個の神経突起は、細胞の直径の 1.5 倍以上の長さのものをカ

ウントした。

3. ERK、JNK、p38MAPK の検出

活性化した ERK、JNK、p38MAPK 検出は、免疫ブロッティング法を用いて行った。まず、PC12m3 細胞 100 万個を 25 cm² にフラスコに蒔き、5 日間炭酸ガス培養器で培養を行い、無血清下でオレンジ・リモネンオイルを加え、酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニルメンブレンにプロットした。プロットした蛋白質は、ホスホ ERK 抗体、ホスホ JNK 抗体、ホスホ p38 抗体を作用させてリン酸化した ERK、JNK、p38MAPK の検出を行った。

結果

1. オレンジピター・オレンジスイートによる神経突起の形成

薬剤やストレス高感受性を示す突然変異細胞である PC12m3 にエッセンシャルオイルのオレンジピター・オレンジスイートを 2 μl 加え 1 週間培養した。その結果、コントロール群に対してオレンジピターは 6.3 倍、オレンジスイート 35.1 倍の神経突起の形成が観察された。さらに、オレンジピター・オレンジスイートの細胞毒性をメチレンブルー染色法で調べた。生細胞は、コントロール群に対してオレンジピターは 25.1%、オレンジスイートは 13.1% であり、オレンジピターよりオレンジスイートの方が細胞分化による細胞増殖の抑制が強い事がわかった。

死細胞は、コントロール群に対してオレンジピターは 1.8 倍、オレンジスイートは 0.7 倍であり、オレンジピターには若干の細胞毒性がみられたが、オレンジスイートには毒性は観察されなかった。

2. リモネンによる神経突起の形成

オレンジピター・オレンジスイートに 95~98% 含まれるリモネンについて調べた。

PC12m3 にリモネン 0.5 μl を加え 1 週間培養した。その結果、コントロール群に対して 28.8 倍の神経突起の形成が観察された。

また、リモネン 0.5 μl と p38MAPK キナーゼ阻害剤である SB2035801/10 0.5 μl を加え 1 週間培養した。その結果、コントロール群に対し

て阻害剤を加えたものは、神経突起形成の抑制がみられ、p38MAPK キナーゼが神経突起形成に関与している事が判明した。

3. エッセンシャルオイルによる 3 種類の MAP キナーゼの活性化

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞とその親細胞である PC12 細胞に無血清下で 10~50 分間リモネン処理を行い、免疫プロット法により活性化した ERK・JNK・p38MAPK の検出を行った。

ERK

神経細胞においては、神経成長因子 (NGF) 等に反応してその再生や可塑性それに神経伝達といった活動をおこなっているが、その神経細胞の活動にはある種の細胞内シグナル伝達系が働いている。神経細胞で働くシグナル伝達には ERK というリン酸化酵素 (キナーゼ) が主として使われている。今回、PC12m3 細胞にリモネン処理を行った結果、活性化した ERK が検出された。

JNK

炎症性サイトカインやストレスによって活性化され、細胞死の誘導に働く JNK のリモネンによる活性化を調べたところ、ほとんど活性化は見られなかった。このことより、リモネンは、細胞毒性には働いていないと考えられる。

p38MAPK

我々の研究において、p38MAPK の活性化は、PC12m3 細胞のニューロンの分化を促す重要な役割を担っていることがわかっていて、今回、リモネンを PC12m3 細胞に 0.5 μl、30 分間作用させてウエスタンプロット法を行ったところ、p38MAPK の活性化がみられた。このことより、リモネンは、p38MAPK の経路を介し神経突起形成を誘導させる事が明らかになった。

考察

今回は、抗ストレス効果を持つことがわかっている柑橘類の精油、オレンジピターとオレンジスイートと二つの精油の主成分で 95~98% 含まれているリモネンについて調べた。

その結果、オレンジスイートはオレンジピターの 5.6 倍の神経突起形成が観察された。これは、その他の成分としてオレンジスイートに含まれるにゲニオールが関係しているのではない

かと考えられる。また、オレンジビターに若干の細胞毒性がみられたのは、その他の成分として、光毒性を持つフルクマリン類が含まれていることが関係していると考えられる。

リモネンについては、リモネンにより p38MAPK が主として活性化し、各種蛋白質群の合成を促進する事で細胞内の環境を大きく変化させたと考えられる。p38MAPK の活性は細胞の生き残りに貢献している。つまり、p38MAPK はストレス性依存の分化に重要な働きをしている。また、リモネンは JNK の活性が弱いため JNK 系路による細胞毒性はあまりないと考えられる。さらに、JNK より ERK、p38MAPK の方がリモネンによる効果がより強い活性を示すことが分かり、JNK より ERK、p38MAPK の方が細胞の分化・保護に優勢に働いていたと考えられる。このことより、リモネンは細胞死を抑え、ストレスを回避する作用を持っていることが明らかになった。

オレンジは、モノテルペン炭化水素類の d - リモネンを約 95% 含み、親しみやすい柑橘類の香りをもつので、室内の空気清浄化やコロンなど芳香剤として利用することが多いが、微量ながらフルクマリン類を含有するので、光毒性に注意する必要がある。消化器系の働きを活発にするリモネンの特性を期待して、マッサージオイルに加えると芳香による精神安定効果と共に相乗効果が期待できる。また、鎮静作用、精神安定作用を持つエステル類やテルペン系アルデヒドなどとの相乗作用で、精神面や肉体面での鎮静と疲労回復に効果が期待できる。

リモネンは、アセチルコリンエステラーゼ(神経伝達物質アセチルコリンを分解する酵素)抑制作用により、血圧降下作用や消化管の蠕動促進作用がある他、抗変異原性作用、抗がん作用(胃がん、肺がんなど)中枢神経抑制による鎮静効果、去痰作用、抗結石作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、末梢血管収縮作用(回腸、子宮などで)などの作用が報告されている。また、腫瘍の化学的予防と化学療法(剤)に有効で、抗発がん性効果が高いと言われている。

精油の細胞内シグナル伝達系への効果は、がんイニシエーターを抑える発がん性解毒酵素を誘導する。ストレスでは発がん因子とされる c - Jun や c Myc が過剰発現するが、リモ

ネンはこれを抑える。

また、3-hydroxy-3-methylglutaryl(HMG) coenzyme A reductase を抑制しコレステロール合成を下げるだけでなく、メバロン酸由来イソプレネン複合体と Ras や Ras 関連蛋白質との結合を阻害する。特にがん細胞はこの阻害効果に敏感なため、がん細胞で余計に抑制が強く起こる。また、この抑制は Rho 蛋白を低下させアクチンの細胞運動を抑制したり、細胞のケモタキシスを抑制したり、ウロキナーゼ分泌(腫瘍転移にウロキナーゼが必要)を抑制したり組織プラスミンゲン(多いほど乳がん細胞では良性)を増加させたりする。生体内でリモネンからできるリモネンの異性体である Perillic acid もおなじ働きがあり、あわせて強力に MAPK 経路を遮断する。

さらに、リモネンは細胞不死化に繋がる Bax の低下と BCL - XL を下げ、アポトーシスを促し、がん細胞を破壊する。また、細胞周期を G0/G1 で停止させる。これもがんの発生を防ぐ。さらに、がん抑制の働きを持つ p53 の発現を高める。がんが転移するには細胞の接着性が下がる必要がある。リモネンは、細胞間の Gap junctional コミュニケーション複合体を増す。これは、がんの転移を防ぐ効果があることを意味する。

精油(エッセンシャルオイル)の生体への影響として香りによる嗅覚への刺激はダイレクトに大脳辺縁系に働き、記憶を司る海馬、快・不快を司る扁桃核、意欲を司る帯状回に刺激を与える。良い香りであることを脳が受け入れると人は快適な気持ちになり、体内で快適なホルモン物質が分泌される。心地よい香りは心身をリラックスさせ、本来人間に備わっている自然治癒力を高める。そこで、様々な疾患に対する治療方法として、現在、注目を集めるようになってきた、花や草や木の香りをを用いて心身を癒し、疾患を治療する方法であるアロマセラピーに使用される精油(エッセンシャルオイル)リモネンは、細胞の分化・保護に働く。また、細胞死を抑え、ストレスを回避する作用も持っていることが明らかになったことより、アロマセラピーは感染から身を守り、自然治癒力を促進し、心身の安定を促し、疾患の治療や予防に効果があるのではないかと考える。