

カプサイシンによるPC12細胞内の活性酸素レベルの調節： バニロイド受容体系の関与について

喬 善 楼, 李 偉 華, 坪 内 涼 子, 村 上 恵 子, 吉 野 昌 孝

(愛知医科大学・生化学講座*)

Involvement of vanilloid receptor on capsaicin-induced ROS production in PC12

Shanlou QIAO, Weihua LI, Ryoko TSUBOUCHI, Keiko MURAKAMI, and Masataka YOSHINO

Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine

Nagakute, Aichi, 480-1195, Japan

Summary

Capsaicin (CPS) is a major pungent principle present in hot peppers and is widely consumed as a food additive in the world. Capsaicin actions have traditionally been divided into specific (vanilloid receptor-mediated) and nonspecific effects. The vanilloid receptor 1 (VR1) is a nonselective cation channel that is activated by pungent vanilloid compound, extracellular protons or noxious heat. mRNA of VR1 and VRL1 were expressed in PC12 cells, and only VR1 mRNA was detected in glioma and A10 cell lines. VR1 protein was demonstrated in PC12 cells by immunocytochemistry and Western blotting. Capsaicin, the VR1 receptor agonist, led to an increase in intracellular calcium ion and this effect was blocked by pretreatment with VR1 receptor antagonist capsazepine (CPZ). Treatment of PC12 cells with low concentration of capsaicin (5 - 50 μ M) increased reactive oxygen species production which was inhibited by capsazepine; by contrast, capsaicin inhibits the production of ROS at high dose, and capsazepine did not inhibit this effect. These findings suggest that PC12 cells can be used as a new model system for elucidating a molecular mechanism of the VR1-mediated signal pathway in neuron system, and differential effects of vanilloid receptor on capsaicin-induced ROS production in PC12.

カプサイシンは唐辛子の辛味成分であり、調味料として用いられるが、疼痛の伝達、潰瘍の修復、抗酸化作用、アポトーシスの誘導、癌化防止或いは誘発などの生理病理作用が報告されている。多くの神経受容神経、特に無髄のC繊維がカプサイシン感受性を持つことが報告されており、ラット新生仔へのカプサイシンの投与は神経細胞の脱落を引き起こす¹⁾。カプサイシンの作用部位は皮膚や角膜、口腔粘膜に多く分布しており、更に筋や関節、内臓、特に心血管系、呼吸器系、膀胱尿路系でも分布が認められ、自律神経に重要であることが報告されている。1997年カプサイシン投与による細胞内Ca²⁺の濃度上昇を指標とした方法を用いてカプサイシン受容体遺伝子がクローニングされた²⁾。この受容体はvanilloid receptor 1 (VR1, TRPV1)と命名された。VR1は838個のアミノ酸からなる分子量95,000の蛋白質で、6回膜貫通構造のイオンチャンネルを形成すると推定されている。特異抗体を用いた免疫組織化学的な解析法によって、感覚神経、後根神経節や三叉神経節の中の神経細胞にのみ発現が認められている^{2,3)}。また、これらの神経の投射先である脊髄後角の表層(I, II)と尾側三叉神経神経核においても発現が確認された。膀胱、尿管また消化管粘膜下の神経終末や粘膜上皮、皮膚の角質細胞にもVR1の発現が認められた^{4,5,6,7,8)}。VR1はカプサイシンのみならず、組織損傷

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作 (〒480-1195)

を招く熱（43度以上）や細胞外液の酸性化（プロトン）によっても活性化される多刺激受容体であることが分った。現在ではVR1（TRPV1）の他、そのホモログである Vanilloid receptot protein-like 1（VRL-1/TRPV2）、TRPV4、TRPV5、TRPV6、TRPVxとともにtransient receptor potential（TRP）イオンチャネルのサブファミリーTRPVを形成する。

カプサイシンの薬理神経化学作用は既に多数報告があるが、カプサイシンと細胞内活性酸素レベルとの関連について明らかではない点が多い。今回我々はPC12細胞株中にVR1発現を見つけ出し、細胞内の活性酸素レベルに対するカプサイシンによるVR1の役割を検討した結果、低濃度カプサイシンでは主にバニロイド受容体を介したことが分った。活性酸素の増加に対して、高濃度ではバニロイド受容体に依存せずにcoenzyme QのantagonistとしてNADH：coenzyme Q oxidoreductaseの活性を抑制することによって、細胞内の活性酸素を制御する機構について報告する。

材料・方法

細胞株及び培養：HIH3T3, PC12, Neuro2A, glioma cell lineをDMEM+10%牛胎児血清で継代培養をし、マウス白血病細胞M1及びマクロファージ様細胞Mm1（理化学研究所細胞バンクより入手）を同様に培養した。

RT-PCR：QIAGEN Rneasy Mini Kit（lot No：74104, Qiagen Hilden, Germany）を用いてRNAを分離し、Cytoplasmic RNAの吸光度を分光光度計を用いて測定した。オリゴ（dT）プライマーを用いて、逆転写酵素によりcDNAを合成した。生成したcDNAを鋳型DNAとして、PCRを行った。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（G3PDH）を内部標準物質としてVR1mRNAを定量した。使用したPCRプライマー：VR1: 5'-CAAGGCTGTCTTCATCATCC-3' and 5'-ATTCCCACACACCTCCCAGTTC-3'; VRL1: 5'-GATGAAGAGGGCAATGC-3' and 5'-CCATTCAGTCTCCATGAAGC-3'; GAPDH(F): 5'-AAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAAT-3'; GAPDH(R): 5'-TTCCCGTCTAGCTCAGGGATGACCTTGCCC-3'。PCRの条件は初回熱変性を95度で10分、次の熱変性を94度で30秒、アーニリングを55度で30秒、合成反応を72度で1分。これらを1サイクルとして30サイクル繰り返し、最後に72度で2分の合成反応を加えた。PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色-紫外線照射によりPCR増幅産物バンドを検出した。

細胞内カルシウムイオン濃度測定：細胞内カルシウムイオン濃度の変動はカルシウム蛍光指示試薬Fura-2を用いた。すなわち、洗浄した細胞に終濃度10 μ MのFura-2を37度にて45分間負荷後、カルシウム測定用緩衝液に懸濁して、340 nmと380 nm励起による490 nm蛍光強度比を測定した。

細胞内活性酸素の測定：蛍光プローブDCFH-DAを用いてカプサイシンによる細胞内活性酸素レベルの変化を測定した。DCFH-DAは細胞膜を容易に通過し、細胞内エステラーゼによる加水分解を受けて、無蛍光のDCFHになり、次いで活性酸素によって酸化され強い蛍光を出すDCFを生成する。DCF蛍光強度は細胞内活性酸素レベルと平行していることはすでに証明されている⁹⁾。カプサイシン処理後細胞を集め、Hank's液で2回洗い、細胞数を 4×10^5 に調整し、DCFH-DA（最終濃度10 μ M）を37度1時間放置後、蛍光を測定する。

Western blotting analysis：細胞溶解液（20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate）を用いて、培養細胞のtotal lysatesを調製した。蛋白量をBCAにて定量した後、SDS sample bufferに溶解し100度、5分煮沸し、これを電気泳動用サンプルとした。その20 μ gを5-15%SDS-PAGEを用いて電気泳動した後、PVDF膜に転写して3%アルブミンで約1時間室温にてブロッキングを行った後、Cu/Zn SOD, Mn SOD, VR1抗体と一晚反応させた。0.05%のTween 20含んだPBSにて3回洗浄後ペルオキシダーゼ結合した二次抗体（1：1000希釈）と室温で1時間反応させ、洗浄後ECL法にて発色させた。

結果と考察

従来、Vanilloid receptor機能研究の材料としては、後根神経節細胞の初代培養あるいはVR1強制発現した細胞を使

うのがほとんどであるが、今回 mRNA 及び蛋白レベルで PC12 細胞の VR1 と VRL1 発現を明らかにした (Fig. 1)。さらに glioma cells, A10 についても VR1 の発現が認められた。特に PC12 に対して低濃度のカプサイシンによるカルシウムの細胞への流入、また capsaizepine によるカルシウムの細胞への流入の抑制が認められた (Fig. 2)。PC12 細胞は VR1 受容体を持つ細胞と思われ、VR1 の機能解析のツールとして、神経系の生理及び病理意義の解明に有用と考える。

カプサイシンの活性酸素の調節作用は抑制と増強両方報告されている。De と Ghosh はカプサイシン前処理で化学ガスの肺刺激物による肺損害あるいは化学物質に引き起こされた肺、肝臓組織中の脂質過酸化を防ぐことを示している^{10, 11)}。In vivo でもカプサイシンによる赤血球の膜の脂質過酸化の阻止が報告されている¹²⁾。カプサイシンによるラット腹膜マクロファージの ROS 放出の抑制¹³⁾、及び glioma cell あるいは血小板活性因子による活性酸素抑制も報告されている^{14, 15)}。近年、カプサイシンは melatonin より有力な抗酸化作用も報告された¹⁶⁾。しかし一方、カプサイシンによ

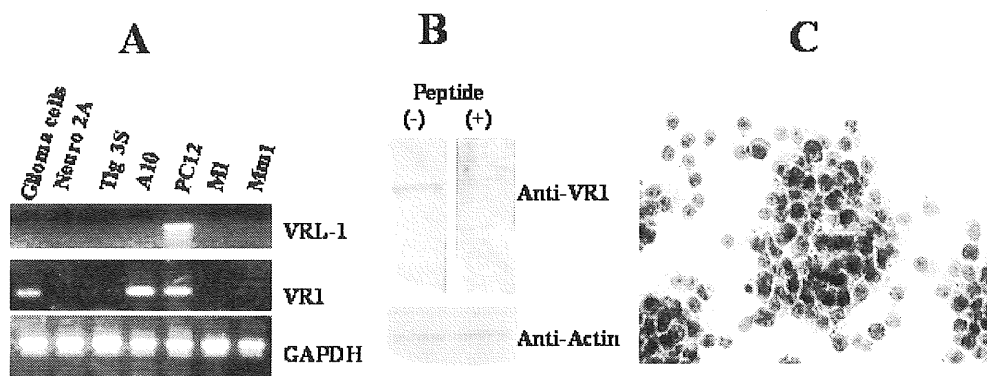


Fig. 1 A. Expression of vanilloid receptor and vanilloid-like receptor in cultured cells. Total RNA isolated from the indicated cell lines was reverse transcribed and PCR products with VR1 and VRL-1 primers after 35 amplification cycles in an ethidium bromide-stained agarose gel. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers were used as normalization control. B. VR1 Westernblot of PC12 cells. Anti-VR1 serum specifically detected a 93 kDa band. C. Immunocytochemical detection of VR1 peptides in cultured PC12 cells.

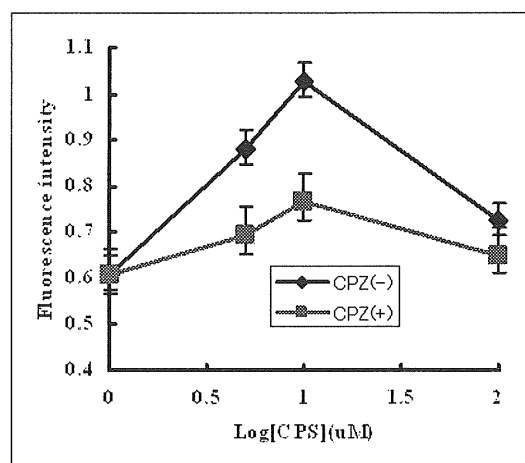


Fig. 2 Effect of capsaicin on the calcium concentrations in PC12 cells. PC12 cells were treated with 5, 10, 100 μ M capsaicin in the absence and presence of 10 μ M capsaizepine. capsazepine was added to the medium 30 min before the addition of capsaicin. Intracellular calcium concentration was determined by Fura-2 fluorescence technique. Data are the mean of three independent samples at 10 min after the addition of capsaicin.

る ROS の増加とアポトーシスとの関連が多く研究者によって報告されている。カプサイシンは幾つかの transformed cells の活性酸素の産生の促進作用が報告され^{17, 18, 19, 20)}。カプサイシンによるヒト内皮細胞の脂質過酸化の促進が見出されている²¹⁾、本研究では、同じ PC12 細胞でも低濃度 (< 10 μ M) カプサイシン処理 24 時間後の場合、活性酸素の増加に対して、高濃度では活性酸素の抑制が認められた (Fig. 3, Fig. 4)。

カプサイシンの活性酸素の調節作用は vanilloid receptor 経由或いは非経由の二つに分けられる。カプサイシンが vanilloid receptor の細胞内のドメインと結合する場合は、細胞外カルシウムの細胞内への流入によって、細胞質内のカルシウム濃度を一定に保つため、ミトコンドリアへの大量のカルシウムの集積、ミトコンドリア膜 potential ($\Delta\Psi_m$) の変化を介して、活性酸素の産生を調節する。本研究では低濃度 (5 - 10 μ M) の場合は活性酸素の生成が増加し、capsazepine による抑制作用も認められ、したがって、低濃度カプサイシンによる ROS 産生は vanilloid receptor 経由と考えられる。

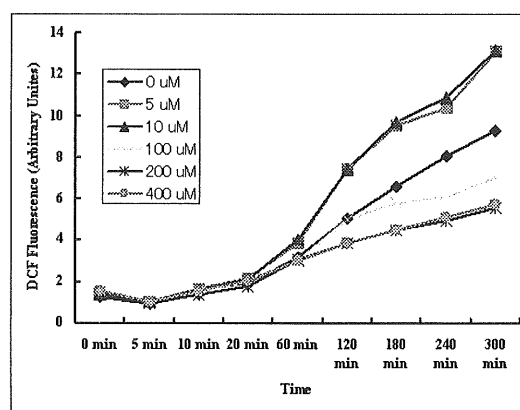


Fig. 3 Dose and time-dependent ROS production in PC12 cells treated with capsaicin.

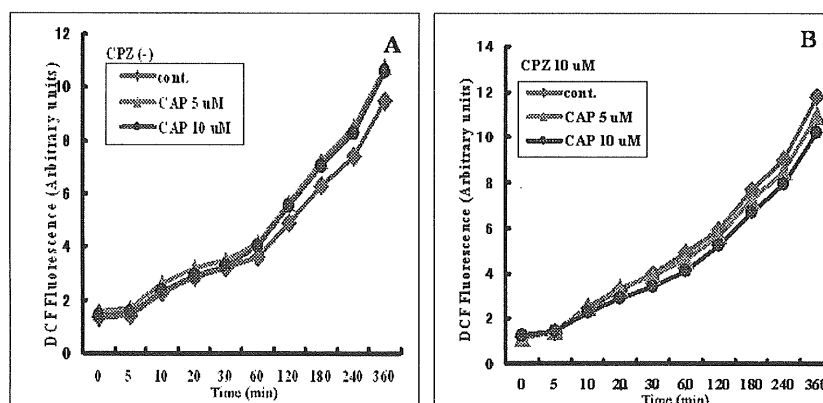


Fig. 4 Effects of capsazepine on the production of reactive oxygen species in PC12 cells. PC12 cells were pre-incubated for 1 h without or with 10 μ M capsazepine, washed to remove agents, and then stimulated with different concentrations of capsaicin. DCF fluorescence intensity was measured at the indicated time.

一方、カプサイシン作用の vanilloid receptor を経由しない報告は多数見られる。PMOR (plasma membrane NADH-oxidoreductase electron transport chain) は NADH-oxidase 活性を持つ、電子を coenzyme Q による細胞質の NADH から外部の電子レセプター (酸素) へ移動させる。カプサイシンは quinone analogue でもあり、coenzyme Q の antagonist として PMOR を抑制、活性酸素の増加^{17, 18, 19)} 或いは抑制¹⁴⁾ を引き起こす。カプサイシンはミトコンド

リア電子伝達系のNADH:coenzyme Q oxidoreductase (i.e., EC 1.6.99.3, complex I)にも阻害し、活性酸素を増加する²²⁾。高濃度カプサイシン ($> 100 \mu\text{M}$) は早期ではROSの増加を認め、24時間後ROSの抑制作用が見られ、capsazepineによる抑制作用は認められなかった (Fig. 5)。また、高濃度のカプサイシンによる細胞内へのカルシウム流入が見られないことから (Fig. 2)、高濃度カプサイシンの場合はvanilloid receptorを経由しないと考えられる。

活性酸素産生と同時に、細胞内活性酸素を除去する酵素群も影響を受ける。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) はスーパーオキシドを過酸化水素と酸素分子に、カタラーゼは過酸化水素を水に変化する酵素である。また、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) は活性酸素だけでなく、過酸化脂質も還元して無毒化する。このほか、ビタミンC、ビタミンE、 β -カロチン、グルタチオン (GSH) などの低分子化合物も重要な役割を果たしている。この中で最も強力な抗酸化作用のあるものはSODである。本研究ではカプサイシンによるCu/ZnSODの抑制が認められた。さらにカプサイシンのantagonistであるruthenium redはCu/ZnSODの抑制を阻止できなかったことから、vanilloid receptorを経由しないことが認められた (Fig. 6)。Cu/ZnSOD抑制の機序は明らかではないが、カプサイシンによる細胞内活性酸素の産生による二次的な影響或いはカプサイシンの直接作用によるものと推測する。

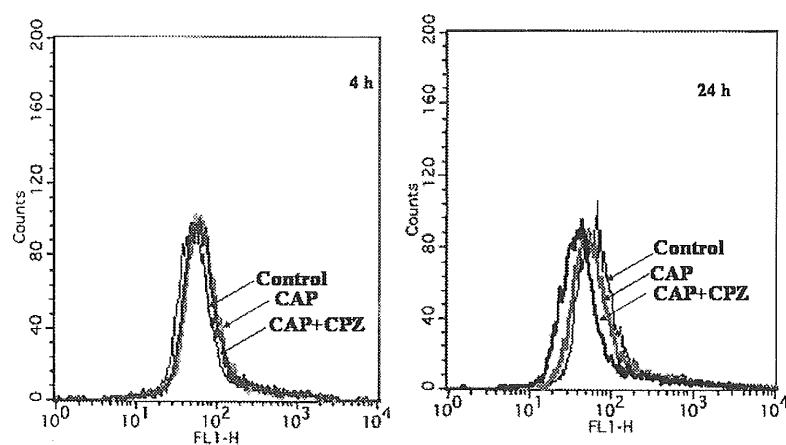


Fig. 5 The production of ROS. ROS levels were determined by analysis of CM-H2DCFH fluorescence in control cells treated with DMSO, in cells treated with $100 \mu\text{M}$ Capsaicin, and in cells treated with $25 \mu\text{M}$ capsazepine and $100 \mu\text{M}$ capsaicin for 4 h (left) and 24 h (right).

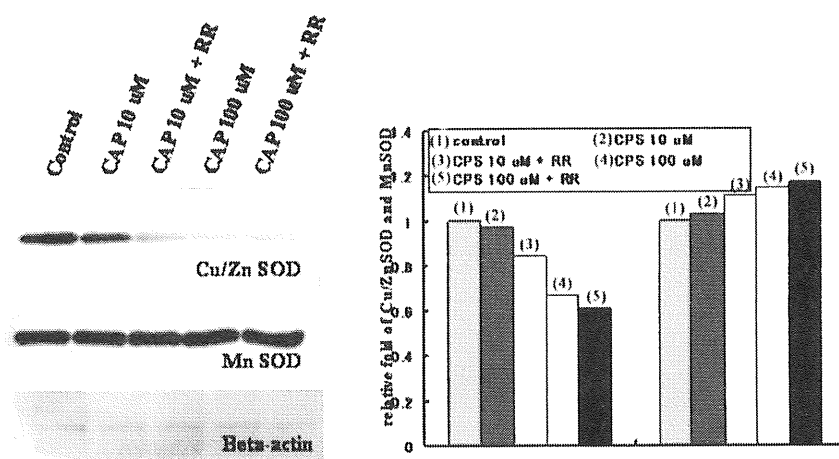


Fig. 6 Western blot analysis of Cu/Zn SOD and MnSOD in control cells treated with DMSO, in cells treated with $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ capsaicin, and in cells treated with $25 \mu\text{M}$ ruthenium red and $10 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$ capsaicin. Graphic representation of Cu/Zn SOD and MnSOD. Bar and error bar correspond to mean + S.E..

活性酸素の細胞への影響は細胞の種類, 活性酸素の産生量, 暴露時間, 細胞の抗酸化能力によって左右される。カプサイシンによる大量のROSは細胞死を起こさせ, がん治療に有用である。一方, 適量の活性酸素は転写因子 (NF- κ B) を活性化し, 細胞増殖に不可欠である²³⁾。カプサイシンによるROS産生の機序は非常に複雑であり, さらに検討する必要があると考える。

参考文献

- 1) Jancso, G., Kiraly, E. and Jancso-Gabor, A. (1977) *Nature* 270: 741.
- 3) Ma, QP. (2002) *Neurosci Lett.* 319: 87.
- 4) Birder, LA., Kanai, AJ., de Groat, WC., Kiss, S., Nealen, ML., Burke, NE., Dineley, KE., Watkins, S., Reynolds, IJ. and Caterina, MJ. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 13396.
- 5) Avelino, A., Cruz, C., Nagy, I. and Cruz, F. (2002) *Neuroscience* 109: 787.
- 6) Nozawa, Y., Nishihara, K., Yamamoto, A., Nakano, M., Ajioka, H. and Matsuura, N. (2001) *Neurosci Lett.* 309: 33.
- 7) Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, NH., Chan, CL., Knowles, C. and Williams NS. (2001) *Lancet.* 357: 1338.
- 8) Anavi-Goffer, S., McKay, NG., Ashford, ML. and Coutts, AA. (2002) *Neurosci Lett.* 319: 53.
- 9) Shen, HM., Shi, CY., Shen, Y. and Ong, CN. (1996) *Free Radic Biol Med.* 21: 139.
- 10) De, AK. and Ghosh, JJ. (1992) *Phytotherapy Res.* 6: 34.
- 11) De, AK. and Ghosh, JJ. (1989) *Phytotherapy Res* 3: 159.
- 12) Salimath, BP., Mittelholzer, E., Muggli, R., Dieter, P. and Marme, D. (1986) *Thromb Res.* 41: 519.
- 13) Joe, B. and Lokesh, BR. (1994) *Biochim Biophys Acta.* 1224: 255.
- 14) Lee, YS., Nam, DH. and Kim, JA.. (2000) *Cancer Lett.* 161: 121.
- 15) Choi, SY., Ha, H and Kim, KT. (2000) *J Immunol.* 165: 3992.
- 16) Henderson, DE., Slickman, AM. and Henderson, SK. (1999) *J Agric Food Chem.* 47: 2563.
- 17) Macho, A., Blazquez, MV., Navas, P. and Munoz, E. (1998) *Cell Growth Differ.* 9: 277.
- 18) Macho, A., Calzado, MA., Munoz-Blanco, J., Gomez-Diaz, C., Gajate, C., Mollinedo, F., Navas, P. and Munoz, E. (1999) *Cell. Death. Differ.* 6: 155.
- 19) Macho, A., Lucena, C., Calzado, MA., Blanco, M., Donnay, I., Appendino, G. and Munoz, E. (2000) *Chem Biol.* 7: 483.
- 20) Garle, MJ., Knight, A., Downing, AT., Jassi, KL., Clothier, RH, and Fry, R. *Biochem Pharmacol.* (2000) 59: 563.
- 21) Richeux, F., Cascante, M., Ennamany, R., Sanchez, D., Sanni, A., Saboureau, D. and Creppy, EE. (2000) *Toxicology.* 147: 41.
- 22) Hail, N. Jr and Lotan, R. (2002) *J Natl Cancer Inst.* 94: 1281.
- 23) Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, Sturrock AB, Hueckseadt TP, Ghio AJ, Hoidal JR. (2001) *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C659.