

## RBL-2H3 細胞でのヒスチジン細胞内輸送経路の検討

妻木 陽子<sup>\*1</sup>, 鳥井 蓉子<sup>\*2</sup>, 坂井堅太郎<sup>\*3</sup>

(2022年10月10日 受理)

### Investigating Intracellular Histidine Transport Pathway in RBL-2H3 Cells

Yoko TSUMAKI<sup>\*1</sup>, Yoko TORII<sup>\*2</sup> and Kentaro SAKAI<sup>\*3</sup>

#### Abstract

Histamine causes allergic symptoms. It is synthesized in mast cells by decarboxylation of histidine by histidine decarboxylase (HDC). As histidine is an essential amino acid, the human body absorbs it through dietary sources, and a diet containing excess histidine may affect histamine synthesis. The researchers have previously shown that a high concentration of histidine promotes degranulation in RBL-2H3 cells. However, the transport pathway of histidine to mast cells is currently unclear. Therefore, the expression of genes encoding histidine transporters in RBL-2H3 cells was assessed, in order to clarify the histidine transport pathway in mast cells and the effect of histidine on degranulation. After transporting histidine into the mast cells, L-alanyl-L-alanine which is a competitive inhibitor of histidine was utilized to induce degranulation. The induction of degranulation was examined by measuring  $\beta$ -hexosaminidase release rate.

The expression of histidine transporters' genes, PHT1, PHT2, and PEPT1 in RBL-2H3 cells was analyzed by RT-PCR. The release rate of  $\beta$ -hexosaminidase was measured by adding histidine at final concentrations of 0.5 mM to 1.0 mM and 50 mM L-alanyl-L-alanine to RBL-2H3 cells. After incubating the cells for 24 hours, they were stimulated with the calcium ionophore A23187 to induce degranulation.

PHT1 gene expression, which transports histidine, dipeptide, and tripeptide, was observed, but neither PHT2 or PEPT1 expressions were observed. The rate of  $\beta$ -hexosaminidase release was increased by the addition of 0.5 mM and 1.0 mM histidine, which enhanced degranulation induction. In contrast, simultaneous addition of both histidine and 50 mM L-alanyl-L-alanine showed a significant decrease in  $\beta$ -hexosaminidase release rate compared to addition of histidine alone. This suggests that L-alanyl-L-alanine might have inhibited the histidine uptake pathway, thereby suppressing the induction of degranulation. Therefore, this study shows that histidine is transported into the mast cells via PHT1 and L-alanyl-L-alanine inhibits histidine transport into the mast cells. Future study is needed to further clarify the histidine transport pathway into the cell and its effect on histamine synthesis.

**Keywords:** allergy, histidine, histamine, PHT1, RBL-2H3

<sup>\*1</sup> 広島女学院大学人間生活学部管理栄養学科

<sup>\*2</sup> 2016年度広島女学院大学大学院人間生活学研究科生活科学専攻修了

<sup>\*3</sup> 徳島文理大学人間生活学部食物栄養学科

## はじめに

アレルギー症状を誘発する因子には、ヒスタミンやセロトニンなどの生理活性物質がある<sup>1)</sup>。特にヒスタミンは血管拡張作用や血管透過性亢進作用があり、蕁麻疹などの皮膚症状や気道閉塞などの呼吸器症状を引き起こすことが知られている<sup>2)</sup>。アレルギーが起こるメカニズムには特異的 IgE 抗体が関与する IgE 依存性反応が最も多く、アレルギー反応を誘導する抗原が体内に曝露され感作が成立した後に再度体内に抗原が侵入すると、肥満細胞上で抗原特異的 IgE 抗体と抗原が架橋反応をし、脱顆粒によりヒスタミンやセロトニンが放出されることで症状が誘発される<sup>1)</sup>。このヒスタミンは、肥満細胞内でヒスチジンがヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine decarboxylase: HDC) により脱炭酸されることで合成するといわれている<sup>3)</sup>。ヒスタミン合成の基質となるヒスチジンは必須アミノ酸であるため供給源は食事に依存し、ヒスチジンが過剰となる供給環境ではヒスタミン合成に影響を及ぼすと考えられる。これまで我々は、ヒスチジンおよびヒスチジンのジペプチドであるカルノシンが脱顆粒に及ぼす影響を検討し、高濃度環境下として設定した終濃度 0.5 mM, 1.0 mM のヒスチジンおよびカルノシンいずれにおいても脱顆粒の誘導を促進する傾向にあることを示し、アレルギー症状の惹起に繋がる可能性を示唆した<sup>4)</sup>。

一方、ヒスチジンやカルノシンが細胞内へ取り込まれる機構は明らかとなっていない。人が食事から摂取するヒスチジンは通常は L 型アミノ酸の L-ヒスチジンであり、ヒスチジンやペプチドは水溶性であるため、能動輸送により特異的輸送体を用いて細胞内へ取り込まれると考えられる<sup>5)</sup>。ヒスチジンやペプチドの輸送体には、PHT1 (Peptide histidine transporter 1: slc15a4), PHT2 (Peptide histidine transporter 2: slc15a3), PEPT1 (Peptide transporter 1: slc15a1), PEPT2 (Peptide transporter 2: slc15a2) があり、このうち、PHT1 と PHT2 はヒスチジン、ジペプチドおよびトリペプチドを輸送し、PEPT1 と PEPT2 はジペプチドとトリペプチドを輸送すると報告されている<sup>6)</sup>。これらの輸送体の発現場所は、PHT1 が肺、脾臓、胸腺、心臓、副腎、PHT2 が脳、網膜、脾臓、心臓、骨格筋、PEPT1 が小腸、腎臓、PEPT2 が腎臓、肺、脳、乳腺、気管支上皮といわれているが、ヒスタミン合成に関わる肥満細胞に発現しているかは明確にされていない<sup>6)</sup>。また、PHT1, PHT2, PEPT2 の発現が認められている GBM (glioblastoma: 膠芽腫) 細胞においては、カルノシンと  $\beta$ -アラニル L-アラニンまたはヒスチジンを同時添加すると、 $\beta$ -アラニル L-アラニンとヒスチジンはカルノシンに対して競合的に阻害し取り込みを大幅に減少させること、さらに、PHT1, PHT2, PEPT2 をノックダウンしてカルノシンの取り込みを検討した結果、カルノシンの輸送には PHT1 が関わっていることが示されている<sup>7)</sup>。

そこで本研究では、ヒスチジンの肥満細胞内への輸送経路と脱顆粒への影響を明らかにするため、RBL2H3 細胞を用いてヒスチジンの輸送体候補として PHT1, PHT2, PEPT1 の遺伝子発現を検討した。さらに L-アラニル L-アラニン（L-alanyl-L-alanine）をヒスチジンの競合阻害物質として活用し、ヒスチジンと同時に添加することで肥満細胞内へのヒスチジンの取り込みを抑制し脱顆粒に影響を及ぼすか  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率から検討を行った。

## 実験方法

実験方法は既報論文の手法を参考にした<sup>4) 8)</sup>。

### 1) 細胞培養

肥満細胞培養株 RBL-2H3 細胞（rat basophilic leukemia：ラット好塩基球形白血病細胞）はヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入をし、MEM（Minimum Essential Medium Eagle；Sigma 社）に 10% FBS（Fetal Bovine Serum；Equitech-Bio 社）、1 % L-Glutamine（Sigma 社）、1 % Antibiotic-antimycotic mixed stock solution（ナカライテスク社）を添加したものを細胞培養培地として、37℃、5 % CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。

### 2) L-ヒスチジン溶液および L-アラニル L-アラニン溶液の調整

L-histidine（分子式 C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>）（ナカライテスク社）は滅菌水（ナカライテスク社）で一晩振とう溶解し、2.5 mM と 5.0 mM に調整した。実験では細胞培養培地に含まれているヒスチジン塩酸塩の濃度 0.2 mM の 2.5 倍、5.0 倍の濃度となるように L-ヒスチジン溶液を添加し、終濃度を 0.5 mM、1.0 mM とした。

L-alanyl-L-alanine（分子式 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>）（Sigma 社）は PBS で振とう溶解し、250 mM に調整した。実験では終濃度 50 mM となるよう細胞培養培地に添加した。

なお、L-ヒスチジン溶液および L-アラニル L-アラニン溶液のいずれも添加していない群を NT（non-treatment）とした。

### 3) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: RT-PCR）

継代期にある RBL-2H3 細胞を 5 ~ 6 × 10<sup>6</sup> cells/dish に調整し、10 cm 細胞培養用シャーレに全量 10 ml になるよう播種した。24 時間培養後 PBS にて洗浄し、RNAiso plus（タカラバイオ社）にて RNA 抽出を行った。cDNA は oligo dT primer（Invitrogen 社）を用いて 2.5 μg の RNA から合成し、Go Taq<sup>®</sup> Green Master Mix（Promega 社）と標的遺伝子の Primer から PCR によ

表 1 RT-PCR で用いた Primer sequence

Primer Sequence			Amplicon size (bp)
PHT1 (Slc15a4)	Sense	5'-GCAGCGGAGAAGTGGTGAAG-3'	270
	Anti-sense	5'-GCAGGCAGCGTGTGATGG-3'	
PHT2 (Slc15a3)	Sense	5'-CCTCTACTTAGTGTGCTTCTCTTGG-3'	272
	Anti-sense	5'-AGACGGGTGTGGCGATGAG-3'	
PEPT1 (Slc15a1)	Sense	5'-CCGTCTAACATGAAGTCCGTGC-3'	197
	Anti-sense	5'-GCTGGGTTGGATGTAGGTGTAGAAT-3'	
GAPDH	Sense	5'-GGTGATGCTGGTGTGAGTATG-3'	299
	Anti-sense	5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGATGG-3'	

る遺伝子増幅を行った。Primer の遺伝子配列を表 1 に示す。PCR 反応は、Thermal cycler（株式会社アステック）を用いて 95℃ 1分間を 1 サイクル、95℃ 1分間・58℃ 1分間・72℃ 1分間を 35 サイクル、72℃ 5分間を 1 サイクルの条件下で行い、1.5% アガロースゲルで電気泳動後、UV transilluminator による紫外線照射にて PCR 生成物を確認した。なお、コントロールには内部標準遺伝子であるグリセルアルデヒド -3- リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) を用いた。

#### 4) $\beta$ -ヘキソサミニダーゼアッセイ

継代期にある RBL-2H3 細胞を  $5 \sim 6 \times 10^6$  cells/ml に調整し、24 well microplate (IWAKI 社) の各 well に 400  $\mu$ l ずつ播種し、一晚培養した。培養後、2.5 mM および 5.0 mM の L-ヒスチジン溶液、250 mM の L-アラニル L-アラニン溶液を添加して終濃度をそれぞれ 0.5 mM, 1.0 mM, 50 mM とし、24時間培養した。その後、100  $\mu$ M Calcium Ionophore A23187 (Sigma 社) を終濃度 1.0  $\mu$ M となるよう添加し30分の培養により脱顆粒を誘導した。脱顆粒誘導後10分間の氷上静置をし、培養液を細胞外液として96 well microplate (IWAKI 社) へ 50  $\mu$ l 分取した。残余の細胞外液は吸引除去し、各 well に0.1% NP-40を 200  $\mu$ l 添加し、常温で10分間培養後に細胞内液として 50  $\mu$ l を96 well microplate へ分取した。細胞外液、細胞内液それぞれに 10  $\mu$ g/ml 4-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (Sigma 社) を終濃度 5  $\mu$ g/ml となるよう添加をし、1 時間培養後に 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 200  $\mu$ l を加え、反応を停止した。その後、Microplate Reader MTP-310 (コロナ電気株式会社) で 405 nm の吸光度を測定した。

$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率は、測定した吸光度を基に次の式で算出した。

$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率 (%) =

$$\{\text{細胞外 } \beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離量} / \text{細胞内 } \beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離量}\} \times 100$$

## 5) 統計分析

$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。サンプル間の有意差検定は、一元配置分散分析後 Tukey の多重比較を行い、統計学的有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 結 果

### 1) RBL-2H3 細胞でのヒスチジン・ペプチド輸送体の遺伝子発現

RBL-2H3 細胞において GAPDH, PHT1, PHT2, PEPT1 の mRNA 発現を解析した。RT-PCR 法により検出された遺伝子バンドを図 1 に示す。ヒスチジン、ジペプチド、トリペプチドを輸送する PHT1 の遺伝子バンドは確認できたが、PHT2 および PEPT1 の遺伝子バンドは確認できなかった。

### 2) L-ヒスチジンと競合阻害物質 L-アラニル L-アラニンが $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率に及ぼす影響

$\beta$ -ヘキソサミニダーゼアッセイから得られた細胞外液と細胞内液の吸光度を用いて遊離率を算出し、A23187 刺激を行っていない NT (-) を 100% として比較検討を行った。

図 2 に示す通り、NT (-) 100% に対して、A23187 刺激を行った NT (+) は 139%、A23187 刺激に加えヒスチジンを添加した His 0.5 mM (+) は 141%、His 1.0 mM (+) は 143% といずれも有意な上昇 ( $p < 0.05$ ) がみられた。さらに A23187 刺激を行わずヒスチジンのみ添加した His 0.5 mM (-) も NT (-) に対して 136% と有意な上昇 ( $p < 0.05$ ) がみられ、His 1.0 mM (-)

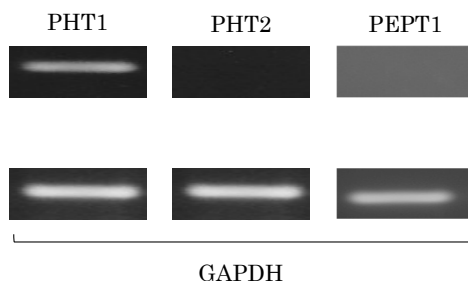


図 1 RBL-2H3 細胞での PHT1, PHT2, PEPT1 の遺伝子発現

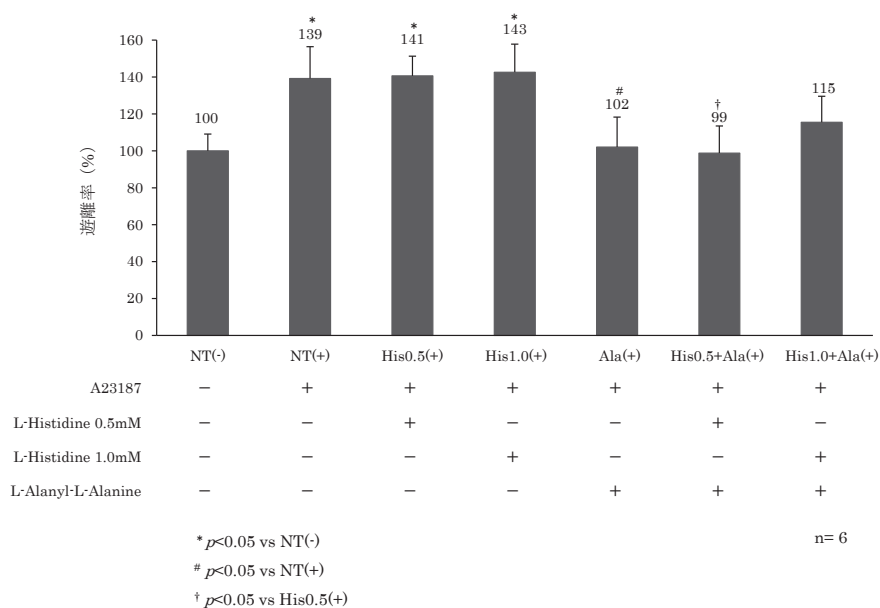


図2 L-ヒスチジンおよびL-アラニンL-アラニン添加による $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率への影響（脱顆粒誘導あり）

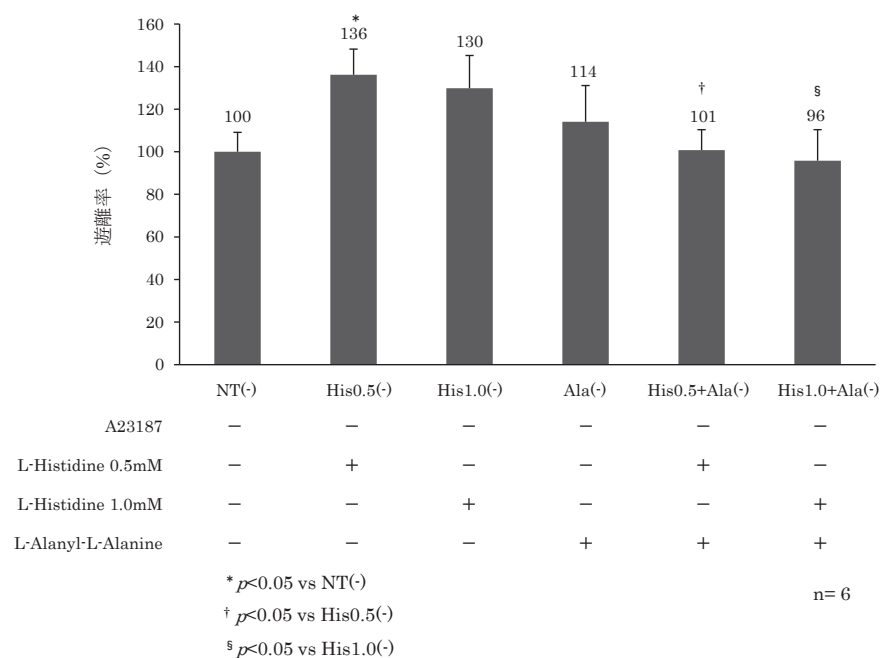


図3 L-ヒスチジンおよびL-アラニンL-アラニン添加による $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率への影響（脱顆粒誘導なし）

も130%と上昇がみられた(図3)。一方、L-アラニル L-アラニンを添加した群はいずれも NT (-) に対して有意な上昇は認められなかった(図2, 3)。

## 考 察

アレルギー症状は肥満細胞から放出されるヒスタミンによって惹起されるが、このヒスタミンは必須アミノ酸のひとつであるヒスチジンから合成されることが知られている。これまで我々は、RBL-2H3 細胞を用いて高濃度のヒスチジンおよびカルノシン環境下において脱顆粒の誘導が促進される可能性を示してきた<sup>4)</sup>。しかし、肥満細胞へのヒスチジンの輸送経路については明らかとなっていない。

本研究結果から、RBL-2H3 細胞に発現するヒスチジンおよびペプチド輸送体は PHT1 であることが確認された(図1)。興味深いことに PHT2 や PEPT1 は発現が認められなかったことから、RBL-2H3 細胞でのヒスチジンやカルノシンの輸送は PHT1 が主経路となる可能性が考えられる。また、ヒスチジンの細胞内への輸送から脱顆粒の誘導までを検討するため、L-アラニル L-アラニンをヒスチジンの競合阻害物質として添加し、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離率から解析した。まず、A23187 刺激を行わず脱顆粒を誘導していない NT (-) に対して、A23187 刺激を行った NT (+) で有意な上昇が見られたことから、脱顆粒の誘導が促進されており、さらにヒスチジンを添加した His 0.5 mM (+) と His 1.0 mM (+) でも上昇がみられたことから、ヒスチジンにより脱顆粒の誘導が促進されたことが示唆された(図2)。一方、A23187 刺激を行わずヒスチジンを添加した His 0.5 mM (-) と His 1.0 mM (-) でも NT (-) に対して上昇が見られたため、ヒスチジン添加により自然遊離が上昇したことが考えられる(図3)。これに対し、競合阻害物質として L-アラニル L-アラニンを添加した場合には、L-アラニル L-アラニン単体もしくはヒスチジン同時添加いずれにおいても NT (-) に対する有意な上昇は見られなかった(図2, 3)。A23187 刺激を行わず L-アラニル L-アラニンのみを添加した場合には、NT (-) に対して有意ではないが上昇がみられたが、ヒスチジンと L-アラニル L-アラニンを同時に添加すると、ヒスチジン 0.5 mM, 1.0 mM 単独添加に比べていずれも有意な減少がみられた(図3)。同様に、A23187 刺激により脱顆粒を誘導した場合においても、ヒスチジンと L-アラニル L-アラニン同時添加では、ヒスチジン 0.5 mM, 1.0 mM 単独添加に比べていずれも減少がみられた(図2)。このことから、L-アラニル L-アラニンがヒスチジンの取り込み経路を阻害したため、脱顆粒の誘導が抑えられた可能性が示唆された。GBM 細胞も RBL2H3 細胞と同様に PHT1 の発現が確認されており、カルノシンへの競合阻害物質として L-アラニル L-アラニンを添加した場合、カルノシンの細胞内への取り込みが抑制されることが報告されている<sup>7)</sup>。また、



これまでL-アラニルLアラニンが脱顆粒誘導に及ぼす影響について報告はされていないが, L-アラニン単体ではRBL-2H3細胞において脱顆粒阻害作用は認められないとの報告はある<sup>9)</sup>。これらのことから, 本研究結果はL-アラニルLアラニンがヒスチジン肥満細胞内への輸送を阻害したことによるものと考えられ, さらに輸送体の発現がPHT1のみであったことから, PHT1を介して肥満細胞内へヒスチジンが輸送されていると考えられる。

以上, 本研究結果からRBL-2H3細胞でのヒスチジンの輸送にPHT1が関与している可能性が示唆された。ヒスチジンはヒスタミンの基質となることから, ヒスチジンの過剰な供給はアレルギー症状の誘発に影響することが考えられる。今後はヒスチジンの細胞内への輸送経路およびヒスタミン合成に与える影響をさらに明らかとし, ヒスチジンの供給量を調節することにより, アレルギー症状の誘発を制御できるのか検討をする。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり, 多大なるご協力を賜りました広島女学院大学生生活科学部管理栄養学科2011年度卒業生の藤井美帆さん, 岡野友香さん, 奥田真季さん, 種村朋美さん, 広島女学院大学人間生活学部管理栄養学科2020年度卒業生の秦智菜美さん, 池田奈菜子さん, 三原裕子さん, 森原滯さんに厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 斎藤博久監修 (2007) 小児アレルギーシリーズ 食物アレルギー, 株式会社 診断と治療社, 東京
- 2) 海老澤元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫監修 (2021) 食物アレルギー診療ガイドライン2021, 株式会社 協和企画, 東京
- 3) 田中智之 (2003) ヒスタミン生合成を介して発現する生理機能の解析, YAKUGAKU ZASSHI **123**(7): 547-559.
- 4) 妻木陽子, 鳥井蓉子, 坂井堅太郎 (2019) 肥満細胞培養株 RBL-2H3細胞における, ヒスチジンおよびカルノシンが脱顆粒に及ぼす影響, 広島女学院大学論集 **66**: 33-42.
- 5) 味の素株式会社編 (2003) アミノ酸ハンドブック, 株式会社 工業調査会, 東京
- 6) 日本栄養・食糧学会監修 (2011) 栄養・食品機能とトランスポーター, 株式会社 建帛社, 東京
- 7) H Oppermann, M Heinrich, C Birkemeyer, J Meixensberger, F Gaunitz (2019) The proton-coupled oligopeptide transporters PEPT2, PHT1 and PHT2 mediate the uptake of carnosine in glioblastoma cells. *Amino Acids* **51**(7): 999-1008.
- 8) 松村愛子, 岡野真知子, 妻木陽子, 坂井堅太郎 (2012) 肥満細胞培養株 RBL-2H3のアレルギー関連遺伝子発現に及ぼす栄養因子の影響, 広島女学院大学生生活科学部紀要 **19**: 61-71.
- 9) 田中守, 山岸賢司, 菅原卓也, 廣内智子, 岡本威明 (2012) ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3の脱顆粒に及ぼすカゼイン由来ペプチドおよび関連アミノ酸の影響, 日本食品科学工業会誌 **59**(11): 556-561.