

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

妻木 陽子, 鳥井 蓉子^{*1}, 坂井堅太郎^{*2}

(2018年10月9日 受理)

Effect of Histidine and Carnosine on Degranulation in RBL-2H3

Yoko TSUMAKI, Yoko TORII^{*1} and Kentaro SAKAI^{*2}

Abstract

Most food allergies are caused by immunoglobulin epsilon (IgE)-dependent immediate immune responses. Upon ingestion of allergens that act as antigens, antigen-specific IgE antibodies are produced in the body, and sensitization is established through the binding of IgE antibodies to high-affinity IgE receptors on mast cells. When the same allergen invades again, owing to the acquired immune sensitivity, it binds to the specific IgE antibodies, thereby degranulating histamine and serotonin. Histamine is one of the several compounds responsible for causing allergic symptoms, and is synthesized via histidine decarboxylation by histidine decarboxylase (HDC). As it is one of the essential amino acids, the body obtains this compound through its diet. In this study, the influence of high levels of histidine on the synthesis and the degranulation of histamine were examined.

L-histidine and a dipeptide of L-histidine, L-carnosine, were added to RBL-2H3 cells (rat basophil leukemia model) at a final concentration of 0.5 mM or 1 mM and incubated for 3 hours. After incubation, degranulation was induced via antigen-antibody reaction using IgE antibodies in combination with antigens or A23187, a calcium ionophore. The β -hexosaminidase release rate (%), a degranulation index, was calculated. Expression of the HDC gene was also detected using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

The results indicate that the induction of degranulation was promoted by the addition of L-histidine, particularly by L-carnosine. However, the expression of the HDC gene was reduced due to the addition of L-histidine or L-carnosine. Thus, induction of degranulation was found to be promoted when histidine or carnosine levels were high, indicating the possibility that L-histidine and L-carnosine are potential causes of allergic symptoms. However, the mechanisms involved in the stimulation of histamine synthesis and induction of degranulation that subsequently reduced HDC gene expression remain unclear. Hence, further research is needed to clarify these stimulatory

^{*1} 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

^{*2} 徳島文理大学人間生活学部食物栄養学科

mechanisms and explore the potential for preventing the onset and exacerbation of allergic symptoms by adjusting the quantity of histidine obtained through the diet.

Keywords: allergy, histamine, histidine, HDC, RBL-2H3

は じ め に

食物アレルギーとは、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義される¹⁾。最も多い免疫学的機序としては、免疫グロブリンのひとつである IgE を介する IgE 依存性反応であり、この反応の多くは、抗原曝露から 2 時間以内に症状が誘発される即時型反応である¹⁾。

IgE 依存性反応では、体内に抗原であるアレルゲンが侵入するとアレルゲン特異的 IgE 抗体が誘導され、肥満細胞上の高親和性 IgE 受容体に結合することで感作が成立する^{2) 3)}。感作成立後、再び体内にアレルゲンが侵入すると、肥満細胞上の特異的 IgE 抗体に結合し、架橋されることにより肥満細胞の活性化が起こり、脱顆粒が誘導される。IgE 依存性アレルギー反応の即時相においては、脱顆粒により肥満細胞内にあるヒスタミンやセロトニンなどの生理活性物質が細胞外へ放出され、様々なアレルギー症状が引き起こされる^{2) 3)}。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、気管支や腸管の平滑筋収縮、血圧降下、浮腫などの症状を誘発する¹⁾。

肥満細胞内のヒスタミンは、必須アミノ酸の一つであるヒスチジンがヒスチジン脱炭酸酵素(histidine decarboxylase: HDC) によって脱炭酸されることにより合成されることが知られており、HDC のヒスタミン合成に関わる経路については、細胞内局在や前駆体の存在などが明らかとされている⁴⁾。しかし、ヒスタミンの基質となるヒスチジンが、どのように肥満細胞に取り込まれ、合成が調節されているかは明らかとされていない。我々は、ヒスチジンは必須アミノ酸であるため供給源は食事に由来し、ヒスチジンの供給が過剰な環境においては、ヒスタミン合成に影響を及ぼすのではないかと考えている。また、食事から摂取されるヒスチジンは、アミノ酸単体のみではなくジペプチドやトリペプチドもある。L-ヒスチジンのジペプチドにはカルノシンやアンセリンが知られており、その中でもカルノシンは、L-ヒスチジンと β -アラニンのジペプチドであり、経口摂取されるとそのまま腸管で吸収された後に代謝されるとの報告があるため、カルノシンもヒスタミンの基質になりうると考えられる^{5) 6)}。

そこで本研究では、ラット好塩基球形白血病細胞である RBL-2H3 細胞を用いて高ヒスチジンおよび高カルノシン条件下におけるヒスタミン合成に及ぼす影響について、脱顆粒の誘導指標である β -ヘキソサミニダーゼ遊離および HDC の遺伝子発現から検討を行った。

実験方法

1) 細胞培養

肥満細胞培養株 RBL-2H3 細胞 (rat basophil leukemia: ラット好塩基球性白血球細胞) (JCRB) は 10% Fetal Bovine Serum Sterile Filtered (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 Minimum Essential Medium Eagle; MEM (Sigma 社) を細胞培養培地として CO₂ インキュベーター内にて 37°C, 5% CO₂ 環境下にて培養した。

2) L-ヒスチジンおよび L-カルノシンの調整

L-histidine (ナカライテスク社) を滅菌水 (ナカライテスク社) に溶解し一晩室温にて振とうさせ, L-ヒスチジン溶液とした。細胞培養培地に含まれるヒスチジン塩酸塩の終濃度は 0.2 mM である。本研究では, 培地に含まれるヒスチジン塩酸塩の 2.5 倍, 5.0 倍の濃度となるよう L-ヒスチジン溶液を培地に添加し, 終濃度を 0.5 mM, 1 mM とした。

L-Carnosine (東京化成工業株式会社) を滅菌水に溶解し, L-カルノシン溶液とした。L-カルノシンも L-ヒスチジンと同様に培地に添加し, 終濃度を 0.5 mM, 1 mM とした。なお, L-ヒスチジンおよび L-カルノシン無添加群を NT (non-treatment) とした。

3) β -ヘキソサミニダーゼアッセイ法

継代期にある RBL-2H3 細胞を 1×10^6 cells/ml に調整し, 24 well マイクロプレート (IWAKI 社) の各ウェルに 400 μ l ずつ加え, 一晩培養した。その後, L-ヒスチジン溶液または L-カルノシン溶液をそれぞれ 40 μ l 添加し, 終濃度を 0.5 mM, 1 mM とし, 3 時間培養した。

脱顆粒の誘導は, 抗原抗体反応を利用した方法と, カルシウムイオノフォアである A23187 を用いた方法と 2 手法で行った。

抗原抗体反応を利用した脱顆粒の誘導では, 3 時間培養後のマイクロプレートの各ウェルに 20 μ g/ml anti-DNP-IgE (Sigma 社) を 22 μ l ずつ添加し終濃度を 1.1 μ g/ml とし, 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。培養後, PBS (-) で各ウェルを 2 回洗浄し, HANKS balanced solution (Sigma 社) で調整した 0.1% BSA 溶液を 160 μ l 添加し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで 10 分間培養した。なお, HANKS balanced solution のみ 160 μ l 添加した群を抗原 (-) 群とした。1 mg/ml DNP-BSA (Sigma 社) を 3.2 μ l 添加し (終濃度 20 μ g/ml), 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで 1 時間培養後, 10 分間氷上に静置し, 細胞外液とした。細

胞外液50 μ l を96 well マイクロプレート (IWAKI 社) に分取後, 残余の細胞外液を吸引除去し 0.1%NP-40を 150 μ l 添加し, 常温で10分間培養し, 細胞内液とした。培養後, 細胞内液 50 μ l を96 well マイクロプレートに分取した。

A23187 を用いた脱顆粒の誘導では, L-ヒスチジンおよび L-カルノシンを添加し 3 時間培養後, 各ウェルに 10 μ M Calcium Ionophore A23187 (Sigma 社) を 40 μ l 添加し (終濃度 1.0 μ M), 37°C, 5 %CO₂ のインキュベーターで30分間培養した。培養後, 10分間氷上に静置し, 細胞外液とした。細胞外液 50 μ l を96 well マイクロプレートに分取後, 残余の細胞外液を吸引除去し 0.1%NP-40を 150 μ l 添加し, 常温で10分間培養し, 細胞内液とした。培養後, 細胞内液 50 μ l を96 well マイクロプレートに分取した。

抗原抗体反応または A23187 を用いて脱顆粒を誘導し得られた細胞外液, 細胞内液それぞれに 10 μ g/ml 4-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma 社) を 50 μ l ずつ添加し (終濃度 5 μ g/ml), 37°C, 5 %CO₂ インキュベーターにて 1 時間培養した。反応停止液として 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 10.0) 200 μ l を添加し, マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した。

β -ヘキソサミニダーゼ遊離率は, 細胞外液の吸光度を細胞外 β -ヘキソサミニダーゼ遊離量, 細胞内液の吸光度を細胞内 β -ヘキソサミニダーゼ遊離量とし, 次式にて求めた。

$$\beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{細胞外 } \beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離量}}{\text{細胞内 } \beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離量}} \right\} \times 100$$

4) 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 6×10^6 cells/10 ml に調整し, 100 mm 細胞培養用シャーレに播種した。L-ヒスチジン溶液と L-カルノシン溶液を終濃度 0.5 mM, 1 mM となるよう 100 μ l 添加し, 37°C, 5 %CO₂ インキュベーターにて 3 時間培養した。培養後, PBS (-) にて 1 回洗浄し, RNAiso plus (タカラバイオ社) にて RNA 抽出を行った。抽出後, 2.5 μ g の RNA より oligo dT primer (Invitrogen 社) を用いて cDNA の合成を行い, GoTaq®Green Master Mix (Promega 社) と標的遺伝子の Primer から PCR による遺伝子増幅を行った。本研究で解析した遺伝子 (HDC, GAPDH) の配列を表 1 に示す。PCR 反応は, 95°C 1 分間: 1 サイクル, 95°C 1 分間, 58°C 1 分間, 72°C 1 分間: 30 サイクル, 72°C 5 分間: 1 サイクルを条件として行い, 1.5% アガロースゲルで電気泳動をし, UV transilluminator による紫外線照射にて PCR 生成物を確認した。なお, 検出された遺伝子バンドはイメージスキャナを用いて画像取得し, 画像解析ソフト ImageJ (NIH) を用いて発現強度を解析した。検出した遺伝子は, 内部標準遺

表 1 RT-PCR 法で用いた Primer Sequence

		Primer Sequence	Product size (bp)
HDC	Sense	5'-CTCCTTCACCTTTAACCCTTCCAAG-3'	720
	Anti-sense	5'-ATCCATTGTCGTTTCCAGACTGTC-3'	
GAPDH	Sense	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAGTATG-3'	299
	Anti-sense	5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGATGG-3'	

伝子としたグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) の発現に対する比を求め、NT の値を 100 として遺伝子の発現強度を求めた。

5) 統計分析

β -ヘキソサミニダーゼアッセイより得られた β -ヘキソサミニダーゼ遊離率および RT-PCR より得られた発現強度は、平均値 \pm 標準偏差で示した。また、サンプル間の有意差検定は t 検定を用いて行った。

結 果

1) L-ヒスチジンおよび L-カルノシン添加による β -ヘキソサミニダーゼ遊離率への影響

β -ヘキソサミニダーゼアッセイ法により測定した細胞外液と細胞内液の吸光度から β -ヘキソサミニダーゼ遊離率を算出し、NT を 100% として比較検討した。

抗原抗体反応または A23187 を用いて脱顆粒を誘導した結果をそれぞれ図 1 と図 2 に示す。L-ヒスチジン (His) の終濃度を 0.5 mM, 1 mM となるよう添加し、抗原抗体反応により脱顆粒を誘導した結果、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離率は NT に対して 108%, 105% と若干の上昇が見られた (図 1)。一方、L-カルノシン (Car) を終濃度 0.5 mM, 1 mM となるよう添加した場合、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離率は NT に対して 111%, 112% と有意な上昇 ($p < 0.05$) が見られた (図 1)。また、A23187 により脱顆粒を誘導した結果、L-ヒスチジンの終濃度 0.5 mM, 1 mM では、NT に対して 100%, 99% と β -ヘキソサミニダーゼ遊離率に変化はみられなかったが、L-カルノシンの終濃度 0.5 mM, 1 mM では、105%, 106% と、L-カルノシン 1 mM で有意な上昇 ($p < 0.05$) が見られた (図 2)。

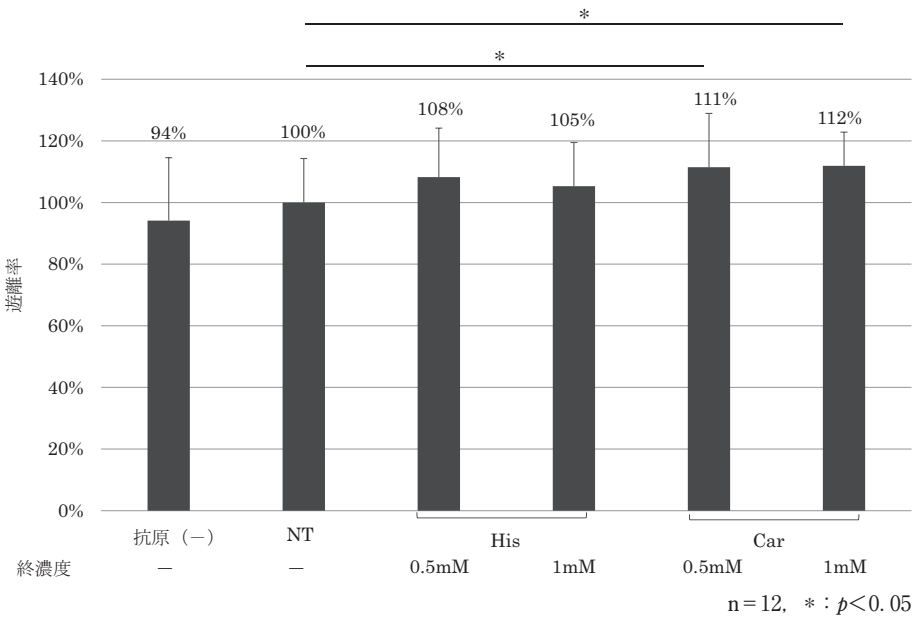


図1 L-ヒスチジンおよびL-カルノシン添加による β -ヘキソサミニダーゼ遊離率 (抗原抗体反応による脱顆粒の誘導)

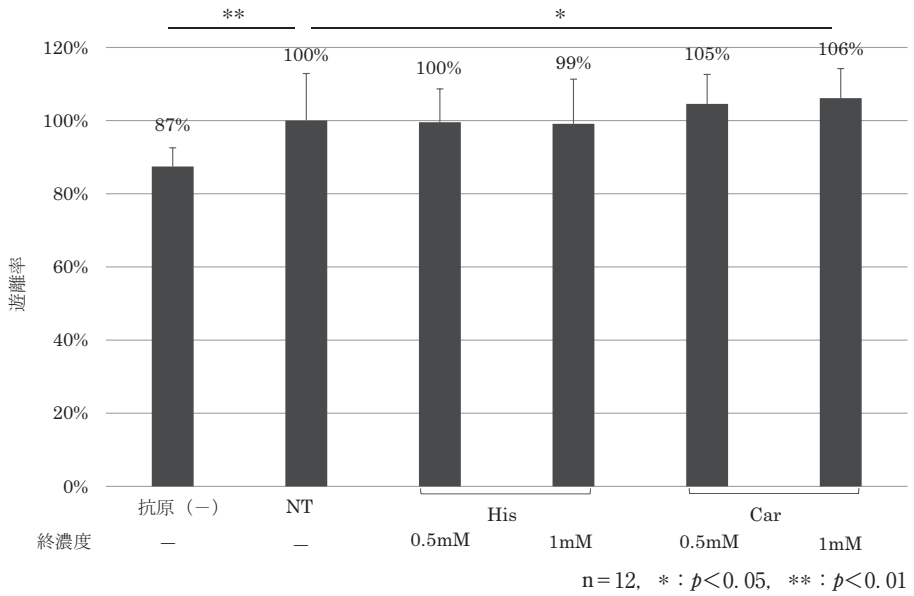


図2 L-ヒスチジンおよびL-カルノシン添加による β -ヘキソサミニダーゼ遊離率 (A23187 による脱顆粒の誘導)

2) L-ヒスチジンおよび L-カルノシン添加によるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の遺伝子発現に及ぼす影響

RT-PCR 法により検出された遺伝子バンドを図 3 に示す。遺伝子バンドを ImageJ により解析し、NT, L-ヒスチジン (His), L-カルノシン (Car) を GAPDH の発現により補正したうえで NT の発現強度を100とし、HDC の mRNA 発現強度を算出した。HDC の mRNA 発現は、L-ヒスチジンを添加し終濃度を 0.5 mM, 1 mM とした場合、それぞれ83, 80と、NT と比べ低下が認められた (図 4)。L-カルノシンを添加し終濃度を 0.5 mM, 1 mM とした場合も、それぞれ88, 91と、NT と比べ低下が認められた (図 4)。

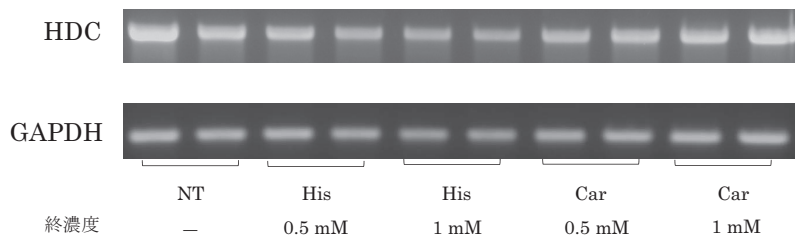
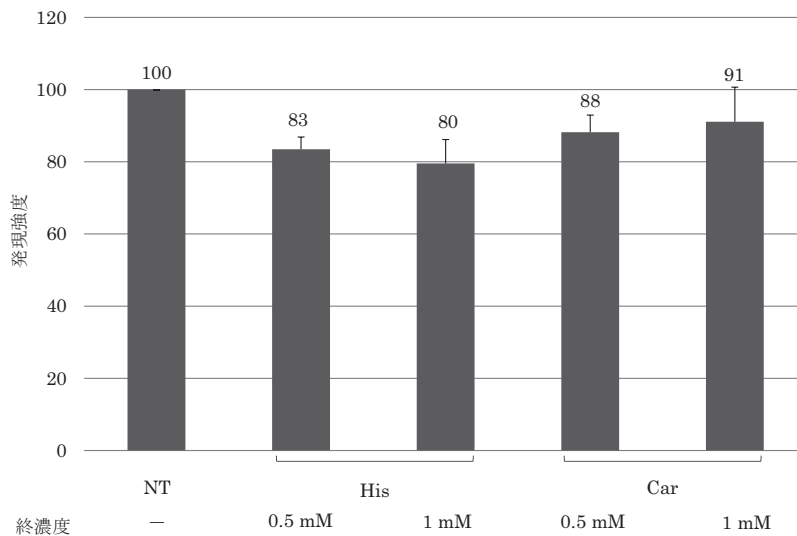


図 3 L-ヒスチジンおよび L-カルノシン添加による遺伝子発現への影響



n = 2

図 4 L-ヒスチジンおよび L-カルノシン添加による HDC の mRNA 発現

考 察

アレルギー症状を誘発する生理活性物質のひとつであるヒスタミンは、L-ヒスチジンがヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）により脱炭酸され合成される⁴⁾。人体では、肥満細胞や好塩基球がヒスタミン産生細胞として知られており、IgE 抗体と抗原の架橋反応によりヒスタミンが脱顆粒されると、様々なアレルギー症状が引き起こされる^{4) 7)}。本研究では、RBL-2H3 細胞を用いて L-ヒスチジンおよび L-ヒスチジンのジペプチドである L-カルノシンがヒスタミン合成に及ぼす影響について、L-ヒスチジンおよび L-カルノシンを終濃度 0.5 mM, 1 mM となるよう添加し 3 時間刺激後の β -ヘキソサミニダーゼ遊離率および HDC の遺伝子発現から検討を行った。

β -ヘキソサミニダーゼは、肥満細胞や好塩基球の顆粒中に存在するリソソーム酵素であり、ヒスタミンと同様に抗原刺激により脱顆粒されることから、脱顆粒の指標として用いられる⁸⁾。脱顆粒は、肥満細胞上の高親和性 IgE 受容体に結合した IgE 抗体が抗原と架橋を形成し、肥満細胞内の小胞体にシグナルが伝達されることで細胞質内のカルシウム濃度が上昇し誘導される⁴⁾。本研究で用いた RBL-2H3 細胞は、細胞表面上に IgE 受容体を発現することが知られており、IgE 刺激によりヒスタミンや IL-4 などを産生することからアレルギー反応の評価系として使用され、高い HDC 活性も有している^{9) 10)}。一方、カルシウムイオノフォアである A23187 も細胞膜に存在するカルシウムイオンチャネルの透過性を高め、細胞内へのカルシウムイオンの輸送を亢進させることで脱顆粒の誘導を促進させる¹¹⁾。本研究結果では、脱顆粒の誘導方法として抗原抗体反応および A23187 を用いて行い、いずれにおいても、L-カルノシンの添加によって脱顆粒の誘導が促進された。また、L-ヒスチジンの添加でも、脱顆粒の誘導が促進される傾向にあったが、A23187 により脱顆粒を誘導した場合は、あまり変化はみられなかった。このように、脱顆粒の誘導方法により若干の差はみられたものの、L-ヒスチジンおよび L-カルノシンの添加により脱顆粒が促進することが示唆され、特にヒスチジンのジペプチドである L-カルノシンの方がより促進させることが確認された。

また、HDC の遺伝子発現は、RT-PCR 法により検討を行った。肥満細胞内における HDC の細胞内局在は、サイトゾルと顆粒において異なると考えられている⁴⁾。サイトゾルには前駆体の 74 kDa の HDC が分布しておりヒスタミンを産生するが、ubiquitine-proteasome 系により速やかに代謝される^{10) 12)}。一方で、小胞体やゴルジ、顆粒画分には、成熟体の 53 kDa の HDC が分布しており、顆粒内でヒスタミンを産生し貯留する可能性が示唆されている¹⁰⁾。RBL-2H3 細胞は高い HDC 活性を有する細胞株であり、74 kDa たんぱく質として合成された HDC はプロセッシングを受け、53 kDa になることが報告されている¹⁰⁾。本研究では、L-ヒスチジンおよび

L-カルノシンを添加し、mRNA レベルでの HDC の遺伝子発現を検討したが、L-ヒスチジンおよび L-カルノシンいずれの添加においても、NT と比べ発現は低下した。我々は、高ヒスチジン条件下、特にカルノシンにおいて β -ヘキソサミニダーゼ遊離率が上昇したことから、HDC の発現が上昇しヒスタミン合成を促進すると考えていた。しかし、HDC の遺伝子発現が低下したため、HDC の発現に関わらず、基質としてヒスチジンが増えることによりヒスタミン合成を促進する可能性が考えられた。一方で、マクロファージ様株 RAW264.7 細胞において thapsigargin 刺激によりヒスタミン産生を上昇させた際、HDC の mRNA は刺激後 4 時間頃から検出され、分子量 74 kDa の HDC たんぱく質は 8 時間頃から検出されたとの報告がある^{13) 14)}。本研究では、3 時間の刺激により検討を行ったことから、経時的な検討も必要であると考えられる。

以上、本研究において高ヒスチジンおよび高カルノシン条件下での脱顆粒の誘導が促進され、アレルギー症状の惹起に繋がる可能性が示唆された。しかし、ヒスタミン合成酵素である HDC の発現上昇はみられなかったことから、ヒスタミン合成の促進機序は明らかとなっていない。また、ヒスチジンおよびカルノシンの細胞内への取り込み機構も分かっていない。今後、これらの機構が明らかとなり、細胞内へのヒスチジンの取り込みを制御することによりヒスタミン合成を調節することが可能となれば、食事由来のヒスチジンやカルノシンの摂取量を調節することでアレルギーの発症の予防や症状の悪化を防ぐことに繋がる可能性が示唆される。

付記：本研究は2016年度広島女学院大学学術研究助成（研究代表者：妻木陽子，研究課題名：食事由来のヒスチジンがヒスタミン合成およびアレルギー発症に及ぼす影響）にもとづく研究の一環として実施された。

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、広島女学院大学人間生活学部管理栄養学科2015年度卒業生の石原綾女さん、板倉志保さん、河田真歩さん、鬼頭奈見さんに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 海老澤元宏，伊藤浩明，藤澤隆夫監修（2016）食物アレルギー診療ガイドライン2016，株式会社協和企画，東京

- 2) 渥美達也, 小池隆夫, アレルギーと過敏反応 (2003) 免疫生物学—免疫系の正常と病理—原著第5版 (笹月健彦監訳), pp. 471–500, 株式会社南江堂, 東京
- 3) Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM (2008) The development of allergic inflammation. *Nature* **454**(7203): 445–454.
- 4) 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.
- 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) Gardner MLG, Illingworth KM, Kelleher J, Wood D (1991) Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol* **439**: 411–422.
- 7) 森 秀治, 高橋英夫, 西堀正洋 (2008) 誘導性ヒスタミンによる自然免疫応答の制御機構, YAKUGAKU ZASSHI **128**(2): 247–253.
- 8) Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI (1979) Immunologic release of β -hexosaminidase and β -glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol* **123**(4): 1445–1450.
- 9) Barsumian EL, Iversky C, Petrino MG, Siraganian RP (1981) IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol* **11**(4): 317–323.
- 10) Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ichikawa A (1998) Intracellular localization of the 74- and 53-kDa forms of L-histidine decarboxylase in a rat basophilic/mast cell line, RBL-2H3. *J Biol Chem* **273**(14): 8177–8182.
- 11) Baba Y, Nishida K, Fujii Y, Hirano T, Hikida M, Kurosaki T (2008) Essential function for the calcium sensor STIM 1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat Immunol* **9**(1): 81–88.
- 12) Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ohmura S, Ichikawa A (1997) Degradation of the 74 kDa form of L-histidine decarboxylase via the ubiquitin-proteasome pathway in a rat basophilic/mast cell line (RBL-2H3). *FEBS Lett* **417**: 203–207.
- 13) Shiraishi M, Hirasawa N, Kobayashi Y, Oikawa S, Murakami A, Ohuchi K (2000) Participation of mitogen-activated protein kinase in thapsigargin- and TPA-induced histamine production in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Br J Pharm* **129**: 515–524.
- 14) 平澤典保, 大内和雄 (2001) マクロファージ様細胞株におけるヒスタミン産生機構とその制御, 日薬理誌 **118**: 23–28.