茶抽出物のヒト株化マスト細胞 ヒスタミン合成酵素に与える影響

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 野菜茶業研究所*

森脇佐和子・浅井和美・山本(前田)万里

(平成16年10月21日受理)

Effect of Tea Extracts on Histidine Decarboxylase of Human Mast Cell Line, HMC-1

Sawako Moriwaki, Kazumi Asai and Mari Maeda-Yamamoto

National Institute of Vegetable and Tea Science,

National Institute Agriculture and Bio-oriented Research Organization

Summary

Recently, it has been increased the allergic disease like the phenomenon of immune hypersensitiveness. Mast cells play a critical role of allergy and release histamine, which is chemical mediator of allergy. Human mast cell line, HMC-1, has a great store of histamine, however, the histamine release is little. Therefore, we paid attention to histamine synthetase (histidine decarboxylase, HDC), and attempted to screen anti-allergic components in tea. HDC gene transcription level of cells was measured with RT-PCR. Among tea cultivars tested, it was shown that HDC expression of mRNA levels was decreased in 'Hatsumomiji', especially. On the other hand, tea catechines have not influenced on expression of HDC mRNA. From these results, we presumed that the lowering of the mRNA expression level is caused by the interaction of various tea components. This study suggested that this assay was useful for the screening of anti-allergic components.

Key words : allergy, histamine, histidine decarboxylase (HDC), mast cell, RT-PCR

1 緒 言

近年、アレルギー疾患は増加傾向にあり、特にスギ花粉に対する花粉症症状を持つ人は、人口のおよそ三割に達するといわれている。このように国民病といわれるまでに社会問題

化しているアレルギー疾患について、非常に高い関心が寄せられている。

免疫系は、生体防御を行う非常に重要な機構で、アレルギーは、この免疫系の過剰反応によって起こると考えられており、特にマスト細胞の関与が大きいといわれている。

* 〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷2769

ヒスタミンは、アミノ酸の一つであるヒスチジンから合成される生体内アミンの一つで、マスト細胞から放出されたヒスタミンは、粘膜に存在する神経を刺激して痒みやくしゃみといった症状を引き起こすといわれている。そのヒスタミンの合成酵素として、ヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine decarboxylase; HDC) が知られ、ヒスチジンのカルボキシル基を脱炭酸することによりヒスタミンに変換している。マスト細胞のヒスタミンは抗原-IgE抗体複合体の刺激で遊離され、ヒスタミン H₁ 受容体を介した即時型アレルギー反応に関与している^{1,2)}。

マスト細胞を指標とした抗アレルギー性の検定は、細胞から遊離されたヒスタミンを酵素免疫測定法 (ELISA) または HPLC 法で定量し、その遊離量から評価している。しかし、抗アレルギー成分の探索を行う上で、その試験対象を食品、中でも茶とした場合、ELISA 法では非特異的な反応が多くみられることにより、適切な評価ができないのが現状である。またヒトの株化マスト細胞は、ヒトマスト細胞性白血病細胞株 'HMC-1' 一種のみしか樹立されておらず³⁾、この細胞は、ヒスタミンを細胞内に貯留するが、脱顆粒、ヒスタミン遊離がわずかしき起こらないことが確認されている⁴⁾。そのため、ほとんどの試験はげっ歯類の株化マスト細胞やマウス骨髓由来培養マスト細胞 (BMMC) を調製して行わざるをえないことから、ヒトの株化細胞を用いた評価系の構築が望まれている。

HMC-1 は、ヒスタミン遊離という観点からの抗アレルギー性試験の使用には不適であるが、細胞内のヒスタミン貯留量が多いことより、細胞内ヒスタミン量の変動、さらにヒスタミン合成酵素の発現調節という新たな視点で、抗アレルギー性を評価できる細胞として有用であると考えられる。また、アレルギーの詳細なメカニズムはヒトとげっ歯類では異なるため、評価試験系にヒト株化細胞である HMC-1 を使用することは、より適切であると考ええる。

そこで今回、アレルギーに関与するマスト

細胞のヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) に着目し、茶抽出物が HDC に与える影響について検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 使用細胞

細胞は、既存のヒト株化マスト細胞である HMC-1 を用いた。この細胞は、IgE と結合する高親和性 IgE レセプター (FcεRI) の発現が安定していないため、その構成タンパク質である α 鎖または β 鎖遺伝子を導入した細胞を作成した。α 鎖遺伝子発現ベクターは pMKIT-FcεRI-α (順天堂大学より譲与) を用いた。β 鎖遺伝子 (0.8kb) は、哺乳類用発現ベクター pCEP4 (10.4kb, invitrogen 社製) に組み込み、β 鎖遺伝子発現ベクター pCEP4-FcεRI-β を構築したものを用いた。各遺伝子は、Human CD34 Cell Nucleofector Kit™ (amaxes GmbH 社製) を用いたエレクトロポレーション法により細胞に導入し、1 mg/mL の抗生物質 (α 鎖: G418, β 鎖: ハイグロマイシン) で遺伝子導入株を選抜した。得られた遺伝子導入株のレセプター構成サブユニット mRNA は、いずれも発現していることを確認している。α 鎖または β 鎖を高発現する HMC-1α 鎖高発現株を α 株、β 鎖高発現株を β 株とし、実験に使用した。各々 10% ウシ胎仔血清を含む RPMI1640 培地で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2.2 試料の調製

(1) 茶 試 料

茶品種として、'あさぎり、おくむさし、ただにしき、はつもみじ、ひめみどり、べにふうき、やえほ、やまとみどり、やぶきた、大葉烏龍' の 10 種を、野菜茶業研究所金谷研究拠点試験圃場で 2003 年度一番茶期に摘採後、電子レンジ乾燥 (1,600W、4 分程度) させたものを試料とした。各々粉碎した試料 約 0.2g を 60°C、10 分間蒸留水 10mL で抽出後、タンニン量が 100 μg/mL になるように蒸留水で希釈した。なおタンニンの定量は既存の方法⁵⁾に

従った。

(2) カテキン類の調製

主要カテキン類4種(Sigma社製)のうち、EGCG, EGCはリン酸緩衝食塩水(PBS-)に、ECG, ECは0.6% DMSO (dimethyl sulfoxide)を含むPBS-に各々可溶化したものを用いた。

2.3 ヒスタミン定量法

細胞内総ヒスタミン量はオンカラム HPLC 法で定量した⁶⁾。各細胞 (1×10^6 cells/1.8 mL) を各茶抽出物共存下 (終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$) で 37°C , 5% CO_2 条件下にて2日間培養後、回収した細胞を0.1% Triton X-100で可溶化した。その上清に含まれるヒスタミン量を HPLC (LC-10AD システムおよび RF-10AXL 蛍光検出器 (株式会社島津製作所製) により測定した。カラムは Shodex Asahipak ODP-50 4E ($4.6 \text{ mm i.d.} \times 150 \text{ mm}$, 粒径 $5 \mu\text{m}$) (昭和電気(株)製) を使用し, 1 mM α -フタルアルデヒド (OPA) および 1 mM N-アセチルシステインを含むアセトニトリル/50 mM ホウ酸 (80/20, v/v) の溶離液を流速 0.5 mL/min で流し測定した。

2.4 RT-PCR

HDC mRNA プライマーは、既知の HDC mRNA 配列 (NCBI/GenBank data accession No.M60445) より構築し、フォワードプライマーを 5'-ATC ATC TCC TGC CCC ACT G-3', リバースプライマーを 5'-CAG AAG GCC ATC GAG GAA G-3' として用いた。細胞内発現標準遺伝子として、ハウスキーピング遺伝子の一つである β アクチンを用い⁷⁾, フォワードプライマー 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3', リバースプライマー 5'-CCC TCC ATC GTC CAC CGC AAT GCT TCT AG-3' を構築して使用した。total RNA は, ISOGEN (日本ジーン社製) で各細胞から抽出し, cDNA は Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences 社製) を用いて合成した。RT-PCR は, iCycler (BIO-RAD 社製) を使用し, 95°C で 60 秒, 60°C で 60 秒, 72°C で 60 秒のサイ

クルを35回行い, cDNA を増幅させた。増幅断片は, アガロースゲル電気泳動で確認した。バンドの解析は, NIH image ソフトを用い, 相対強度を数値化して表示した。

3 実験結果および考察

3.1 茶抽出物による細胞内総ヒスタミン量の変化

著者らはこれまでに, HMC-1 が高濃度のヒスタミンを細胞内に貯留していることを確認

表1 各ヒトマスト細胞株の細胞内総ヒスタミン量

細胞種	総ヒスタミン量 ng/ 10^5 cells
HMC-1	217.658 ± 37.6
α 株	221.716 ± 15.6
β 株	213.749 ± 25.5
mean $\pm$ SD (n = 4)	

している (表1)。このことより, HMC-1 はヒスタミン合成が活発な細胞であると考えられる。そこで, 茶がヒスタミン合成に変化を与えるか調べるため, 2日間茶抽出物共存下で培養した細胞の, 細胞内総ヒスタミン量を測定した。茶抽出物の代わりに PBS- を添加したものをコントロール (100%) とし, 各々比較した。その結果, 誤差が大きくばらつきが認められるものの, 若干ではあるが品種によりヒスタミン量に増減 ($>120\%$, $<80\%$) が認められた (図1)。

マスト細胞では, IgE との結合により炎症性物質の合成が盛んになる^{1,8-10)}。またインターロイキン4 (IL-4) は, ヒトマスト細胞の増殖や活性化に関与しているといわれているサイトカインである^{10,11)}。そこで, これらの因子を茶抽出物と共培養し (IgE: 終濃度 $2 \mu\text{g/mL}$, IL-4: 終濃度 10 ng/mL), 同様に定量を行った。しかしながら, この培養条件では明確な差 ($>120\%$, $<80\%$) は認められなかった (図2)。 α 株は, 'ひめみどり' および IgE, IL-4 と共培養した場合に高い値を示したが, 非常に誤差が大きく, 適切な評価が困難であると

茶抽出物のヒト株化マスト細胞ヒスタミン合成酵素に与える影響

図1 茶抽出物によるヒト株化マスト細胞内ヒスタミン量の変動
コントロールを100%として比較，培養2日後，全ての細胞を回収し
細胞内総ヒスタミン量を定量 (mean±SD (n = 2))

図2 ヒト株化マスト細胞に対する茶抽出物およびIgE, IL-4の影響
コントロールを100%として比較，培養後，全ての細胞を回収し
細胞内総ヒスタミン量を定量 (mean±SD (n = 2))

判断した。

そこで、総ヒスタミン量に変化が見られた5品種‘おくむさし、はつもみじ、ひめみどり、べにふうき、やぶきた’に関し、さらに

図3 各ヒトマスト細胞株に対する茶抽出物の細胞増殖に関する影響

コントロールを100%として比較、培養2日後、全ての細胞を回収し細胞数を測定 (mean±SD (n = 3))

図4 茶抽出物共存下で培養後 1.5×10^6 個当たりの細胞内総ヒスタミン量の変化

コントロールを100%として比較、培養2日後、細胞数を調整し細胞内総ヒスタミン量を定量 (mean±SD (n = 3))

細胞増殖への影響(図3)、一定個数当たりの細胞内ヒスタミン量(図4)について検討したが、いずれにおいても誤差が大きく、有意な差は確認できなかった。

以上の結果より、HMC-1の細胞内総ヒスタミン量は安定しないことが示された。これは、実験を行う際の細胞の状態や操作などが影響するものと考えられ、またHMC-1は、既に高濃度でヒスタミンを貯留しているため、茶添加後に合成されるヒスタミンのわずかな変化量をHPLC法で検出することが困難である可能性も示唆された。

3.2 ヒスタミン合成に茶抽出物与える影響

上記結果を踏まえて、HMC-1を用いた新たな細胞内ヒスタミン変化量の検出方法を検討するために、実際にヒスタミンを合成する酵素であるHDCの発現量に着目した。酵素タンパク質の発現量を指標とする方法は、HPLC法とは異なり実際のヒスタミン量の変動は追跡できないが、HMC-1の高ヒスタミン合成能という特性を有効に活用できると考えた。そこで、茶抽出物のヒスタミン合成に及ぼす影響についてFcεRIレセプタの発現が安定しているβ株を用いて、HDC mRNAの発現量を解析した(図5)。コントロールと比較してHDC mRNAの発現量は、‘はつもみじ’において増加が認められたが、その他の品種では著しい変化は認められなかった。

さらに、IgEおよびIL-4共存下で培養した

図5 茶抽出物がHDCに与える影響

β株を用い、図1と同様の培養条件の細胞を供試した、数字は相対強度を表す。

図6 IgE, IL-4 共存下において茶抽出物が HDC に与える影響
β株を用い、図2と同様の培養条件の細胞を供試した、数字は相対強度を表す。

場合についても、前述の方法と同様に検討した。IgEのみ添加した場合は、いずれも HDC mRNA の発現量に顕著な変化は認められなかった(図6 A)。しかし、IL-4を添加した場合は、いずれの茶抽出物においても HDC mRNA の発現量が低下し、特に‘はつもみじ’の発現量は著しく低くなった(図6 B)。上述したように IL-4 は、マスト細胞の活性化に関与するといわれており、茶成分がIL-4による細胞活性化を抑制し、それに伴い HDC mRNA の転写抑制が起こったと推察された。

以上より、ヒトマスト細胞のヒスタミン合成量の変化を RT-PCR 法により評価できる可能性が示された。

3.3 ヒスタミン合成にカテキン類が与える影響

HMC-1 はホルボールミリステートアセテートやイオノマイシンの様な薬剤刺激によっても活性化される。この薬剤により HMC-1 を刺激した場合、HDC のタンパク質量は増加するが、HDC の mRNA 発現量には変化が認められないという報告がある¹²⁾。これは、刺激薬剤が mRNA からタンパク質への翻訳過程に作用し調節していることを示している。本実験では、茶の品種により HDC の mRNA 発現量に変化が認められており、つまり HDC の mRNA の転写過程を調節するような茶成分が存在す

る可能性が示唆された。

茶抽出物中に存在するカテキン類は、抗酸化能、抗ガン作用のみならず、最近では抗アレルギー作用など様々な効能を有することで注目されている茶に特有の成分の一つである。そこで、HDC mRNA の転写調節にカテキン類が関与している可能性を、主要カテキン類4種を用いて検討した。

まず、カテキン類の細胞増殖に与える影響について検討した。2日間カテキン類共存下(終濃度10μg/mL)で培養した細胞の細胞数をコントロールと比較した。カテキンのみ、または IgE, IL-4 共存下ではいずれも、著しい変化は認められず、また細胞増殖への影響もほとんどないことが確認された(データ省略)。

図7 カテキン類が HDC に与える影響
β株を用い、カテキン類および IgE, IL-4 共存下で培養後の細胞を供試した、数字は相対強度を表す。

次に、前述の方法と同様に HDC の発現量を RT-PCR 法により検討した。HDC の mRNA 発現量は、コントロールと比較して EGCG を添加した場合において、発現の低下が認められた(図7 A)。しかし、IgE, IL-4 共存下ではどのカテキン類でもコントロールとの変化は認められなかった(図7 B, C)。これらの結果より、HDC の mRNA の転写調節にカテキン類が与える影響は少ないことが推察された。

これまでに、緑茶由来の EGCG がラット細胞の HDC に対し直接作用し、ヒスタミン合成を抑制するという報告がある¹³⁾。この報告では、

HDC のタンパク質量は EGCG により変化が認められないとあり、今回の実験と矛盾しない。また逆に、フラボンおよびフラボノール類で処理した HMC-1 では、細胞内ヒスタミン量が増加するという報告がある¹⁴⁾。これらの報告を加味すると、HDC の mRNA 発現レベルの低下は、茶抽出物中の一成分による効果ではなく、様々な成分の相互作用により生じた結果であると推察された。

これまで、抗アレルギー性の指標は、炎症性物質であるヒスタミンの遊離抑制が主に試験されていたが、ヒスタミン合成酵素の発現抑制という観点からも、抗アレルギー性評価試験が行える可能性が示された。この手法では、添加された食品成分等の実験系への影響が軽減できると考えられ、また、簡便な手法であることから汎用性も高いと考えられる。HMC-1 は、ヒスタミン合成が非常に活発な細胞であることから、HDC の測定を行う実験系には非常に有用であり、さらに、株化細胞であるため、安定した実験が行える等の利点が挙げられる。今後、マスト細胞を介するアレルギーにおける食品の有効成分等の評価の一指標として、HDC mRNA の発現解析の利用が期待される。

4 摘 要

マスト細胞はアレルギーの中心的役割もち、ヒスタミンなどの炎症性物質を放出する。本研究では、ヒト株化マスト細胞のヒスタミン合成酵素 (HDC) に着目し、ヒスタミン合成に茶抽出物が及ぼす影響について検討した。その結果、品種により HDC mRNA の発現量が異なることが判明した。しかしながら、カテキン類は HDC mRNA の発現調節に影響を及ぼさなかった。これらの結果より、HDC mRNA 発現量の低下は、様々な茶成分の相互作用によることが推察された。

5 謝 辞

この実験を遂行するにあたりご協力下さいました、江間かおりさん、神田えみさん、久保池千鶴子さんに感謝申し上げます。

6 引 用 文 献

- 1) Tanaka S. (2003): Physiological function mediated by histamine synthesis. *Yakugaku Zasshi*, 123, 547-559.
- 2) 遠藤康男 (2001): 炎症・免疫応答におけるヒスチジンデカルボキシラーゼの誘導. *日薬理誌*, 118, 5-14.
- 3) Butterfield, J.H., D. Weiler, G. Dewald and G.J. Gleich (1988): Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res.* 12, 345-355.
- 4) Watanabe, Y., Y. Todome, H. Ohkuni, S. Sakurada, T. Ishikawa, T. Yutsudo, V.A. Fischetti and J.B. Zabriskie (2002): Cysteine protease activity and histamine release from the human mast cell line HMC-1 stimulated by recombinant *Streptococcal* pyrogenic exotoxin B/ *Streptococcal* cyteine protease. *Infection and Immunity*, 70,3944-3947.
- 5) 池ヶ谷 賢次郎・高柳 博次・阿南 豊正 (1990): 茶の分析法. *茶研報*, No.71, 43-74.
- 6) Saito, K., M. Horie, N. Nose, H. Nakagomi and H. Nakazawa (1992): High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.* 595, 163-168.
- 7) Nakajima-Iijima, S., H. Hamada, P. Reddy and T. Kakunaga (1985): Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: Interspecies homology of sequence in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6133-6137.
- 8) Boyse, J.A (2003): Mast cells: Beyond IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 24-32.
- 9) Kubo, S., K. Matsuoka, C. Taya, F. Kitamura, T. Takai, H. Yonekawa and H. Karasuyama (2001): Drastic up-regulation of Fc ϵ RI on mast cells is

- induced by IgE Binding through stabilization and accumulation of Fc ϵ RI on the cell surface. *J. Immunol.* 167, 3427-3434.
- 10) Wakahara, S., Y. Fujii, T. Nakao, K. Tsuritani, T. Hara, H. Saito and C. Ra (2001): Gene expression profiles for Fc ϵ RI, cytokines and chemokines upon Fc ϵ RI activation in human cultured mast cells derived from peripheral blood. *Cytokine*. 16,143-152.
- 11) Bischoff, S.C, G. Sellge, A. Lorentz, W. Sebald, R. Raab and M.P. Manns (1999): IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8080-8085.
- 12) Maeda, M., H. Taniguchi, I. Ohno, H. Ohtsu, K. Yamauchi, E. Sakurai, Y. Tanno, J.H. Butterfield, T. Watanabe and K. Shirato (1998): Induction of L-histidine decarboxylase in a human mast cell, HMC-1. *Experimental Hematology*. 26, 325-331.
- 13) Rodríguez-Caso, C., D. Rodríguez-Agudo, F. Sánchez-Jiménez and M.A. Media (2003): Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1760-1763.
- 14) Alexandrakis, M., R. Letourneau, D. Kempuraj, K. Kandere-Grzybowska, M. Huang, S. Christosoulou, W. Boucher, D. Seretakakis and T.C. Theoharides (2003): Flavones inhibit proliferation and increase mediator content in human leukemia mast cells (HMC-1). *Eur. J. Haematol.* 71, 448-454.