

平成23年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009年度～2010年度  
 課題番号：21780122  
 研究課題名（和文） GABAのマスト細胞機能に及ぼす影響と抗アレルギー作用に関する基礎的研究  
 研究課題名（英文） Studies on inhibitory effect against mast cell function and anti-allergic property of GABA  
 研究代表者  
 原 崇 (HARA TAKASHI)  
 新潟大学・自然科学系・准教授  
 研究者番号：20323959

## 研究成果の概要（和文）：

$\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）および GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬である baclofen はマスト細胞のヒスタミン遊離を抑制した。また、マスト細胞は GABA<sub>B</sub> 受容体を発現し、関連するシグナル伝達が確認された。さらに、T 細胞、NK 細胞においても GABA<sub>B</sub> 受容体の発現が確認され、GABA が免疫機能に影響を及ぼす可能性が示された。一方、GABA および baclofen の経口投与により Th2 偏向状態にある BALB/c マウスの血中 IgE レベル亢進が有意に抑制され、そのメカニズムとして Th1 型免疫応答の誘導による Th1/Th2 バランスの改善が背景にあることが推察された。GABA は GABA<sub>B</sub> 受容体を介してマスト細胞機能と IgE 産生を抑制し、抗アレルギー作用を発揮することが期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

We found that gamma-amino-butyric acid type B (GABA<sub>B</sub>) receptor is expressed in mast cells, while gamma-amino-butyric acid (GABA) and baclofen, a GABA<sub>B</sub> receptor agonist, exhibit suppressive effect on histamine release in mast cells. Expression of GABA<sub>B</sub> receptor was also detected in T cells and NK cells. Oral administration of GABA or baclofen successfully suppressed serum IgE level in Th2-dominant BALB/c mice. The mechanisms underlying this suppression by GABA included the alteration of Th1/Th2 balance toward to Th1-biased state. There is the possibility that GABA can down-regulate mast cell functions and IgE production via GABA<sub>B</sub> receptor, leading to attenuation of IgE-mediated allergic responses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：GABA、GABA<sub>B</sub>受容体、マスト細胞、脱顆粒、アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は神経伝達物質である一方で、食品由来の機能性成分として認知されており、血圧降下作用を始めとして幾つかの生理活性が知られている。経口摂取した GABA は吸収され、血中へ移行することが明らかとなっている。しかし、GABA の作用メカニズムに関しては未だに不明な点が残されている。これまでの研究を通じ、GABA および GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬である baclofen がラットマスト細胞様細胞株 (RBL-2H3) のヒスタミン遊離を抑制することを見出した。また、RBL-2H3 細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体 (GABA<sub>B</sub>R1、GABA<sub>B</sub>R2) の mRNA の発現を確認した。現時点では、マスト細胞に限らず免疫担当細胞に及ぼす GABA の影響、その分子的基盤となる GABA 受容体の発現に関する報告は少なく、GABA が免疫機能へ及ぼす作用は未知数といえる状況にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、正常なマスト細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体の発現を確認し、GABA および GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬である baclofen がヒスタミン遊離などの細胞機能に及ぼす影響を調べる。また、GABA の抗アレルギー作用について検討する目的で、マウス経口投与試験により GABA が血中 IgE レベルや脾臓細胞のサイトカイン産生応答に及ぼす影響について調べる。さらに、マスト細胞以外の免疫担当細胞において GABA<sub>B</sub> 受容体の発現がみられるか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) マスト細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体の発現を確認する。この目的で、ラット腹腔マスト細胞 (ラット腹腔より採取したマスト細胞) とマウス骨髄由来マスト細胞 (マウス骨髄細胞より分化誘導して得られたマスト細胞)、ラットマスト細胞様 RBL-2H3 細胞とを対象とし、タンパク質レベルと mRNA レベルで GABA<sub>B</sub> 受容体を構成する 2 つのサブユニット GABA<sub>B</sub>R1、GABA<sub>B</sub>R2 を検出した。タンパク質レベルの確認は、細胞膜タンパク質を含む画分を抽出し、抗 GABA<sub>B</sub>R1 抗体並びに抗 GABA<sub>B</sub>R2 抗体を活用したウエスタンブロット解析により実施した。mRNA レベルの確認は、RT-PCR 法により検討した。

(2) GABA<sub>B</sub> 受容体を介した細胞内シグナル伝達について検討する。この目的で、RBL-2H3 細胞とラット腹腔マスト細胞に対し、抗 DNP-IgE と DNP-BSA による IgE を介した活性化を促し、それに伴う細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入に対する GABA 並びに baclofen の影響について Fluo-3 を蛍光指示薬とした FACS 解析により

検討した。また、情報伝達分子に対する阻害剤を用いて GABA<sub>B</sub> 受容体のシグナル伝達について検討した。

(3) マスト細胞以外の免疫担当細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体の発現を調べる。この目的で、磁気ビーズ標識抗体を用いてマウス脾臓細胞より T 細胞と NK 細胞を分離し、GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニット GABA<sub>B</sub>R1 および GABA<sub>B</sub>R2 の発現について RT-PCR 法により検討した。

(4) GABA の経口投与により血中 IgE レベルが低下するか否か検討する。本研究では実験動物として BALB/c マウス (♀、6 週齢) を用い、Th2 偏向誘導作用を有する水酸化アルミニウムゲルとオボアルブミン (OVA) を腹腔投与することにより血中の OVA 特異的 IgE レベルを上昇させ、GABA 並びに baclofen を毎日単回経口投与した。毎週 1 回採血し、ELISA 法により IgE、IgG1、IgG2a などの抗体の血中レベルを追跡した。6 週間飼育後、抗原誘導性のサイトカイン産生応答について検討する目的で脾臓より脾臓細胞を採取し、OVA を添加した 10%FBS-RPMI1640 培地を用いて培養した。5 日間培養後、培養上清中の IFN- $\gamma$  と IL-4 を ELISA 法により定量した。

## 4. 研究成果

(1) ラット腹腔マスト細胞、マウス骨髄由来マスト細胞、RBL-2H3 細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニット GABA<sub>B</sub>R1、GABA<sub>B</sub>R2 の mRNA 発現が確認された。それらの発現量は、GABA<sub>B</sub>R1の方が GABA<sub>B</sub>R2 よりも高い傾向にあり、脳組織と比較すると両サブユニット共に低い発現レベルであった。また、ラット腹腔マスト細胞と RBL-2H3 細胞の細胞膜画分に GABA<sub>B</sub>R1 と GABA<sub>B</sub>R2 のタンパク質を確認した。機能的な GABA<sub>B</sub> 受容体の細胞表面への発現には GABA<sub>B</sub>R1 と GABA<sub>B</sub>R2 の両者が不可欠であることが報告されている。これらの結果より、マスト細胞は GABA<sub>B</sub> 受容体を発現し、GABA に応答し得ることが示された。

(2) GABA および baclofen はラット腹腔マスト細胞のヒスタミン遊離を抑制し (図 1)、これに伴い細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入が抑制されていることが確認された。また、この抑制作用は抑制性 G タンパク質である Gi に対する阻害作用が知られている百日咳毒素 (PTX) より減弱した (図 2)。これは、マスト細胞において GABA<sub>B</sub> 受容体を介した細胞内シグナル伝達が生じることを支持する結果である。さらに、GABA および baclofen による MAP キナーゼ (ERK) のリン酸化も確認された。RBL-2H3 細胞においても、これらと同様の結果が確認された。

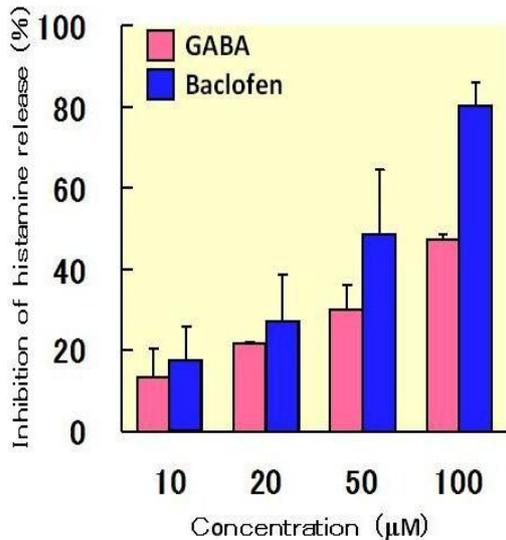


図1 GABA および baclofen によるラット腹腔マスト細胞のヒスタミン遊離抑制

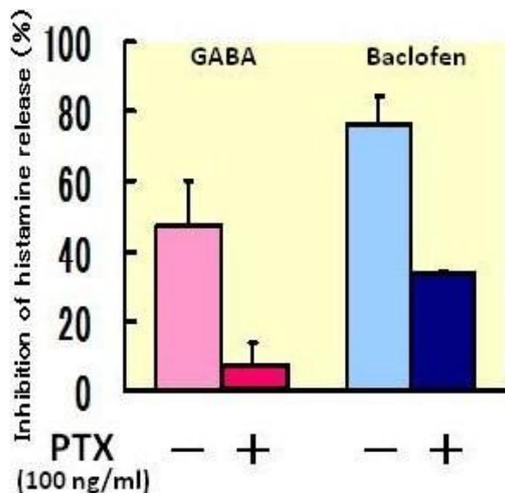


図2 百日咳毒素 (PTX) による GABA および baclofen のヒスタミン遊離抑制作用の阻害

(3) マウス T 細胞および NK 細胞において GABA<sub>B</sub>R1 および GABA<sub>B</sub>R2 の mRNA 発現が確認された。それらの mRNA 発現量は、両細胞共に GABA<sub>B</sub>R1 の方が GABA<sub>B</sub>R2 よりも高い傾向にあり、脳組織と比較すると両サブユニット共に低い発現レベルであった。これらの結果より、マスト細胞に限らず、いくつかのタイプの免疫担当細胞は GABA<sub>B</sub> 受容体を発現し、GABA に応答し得る可能性が示された。今後、T 細胞および NK 細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体を介した細胞内情報伝達、細胞機能へ及ぼす影響につ

いて詳細な検討が待たれる。

(4) GABA (1 mg/mouse/day) の経口投与によりマウス血中の OVA 特異的 IgE レベルが低下することが確認された (図 3)。GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬 baclofen (10 μg/mouse/day) を経口投与した場合も同様の効果が確認された。また、GABA および baclofen は血中総 IgE レベルも低下させた (図 3)。GABA および baclofen による IgE レベル低下と同時に IgG1 レベルも低下し、その一方で IgG2a レベルは上昇する傾向がみられた。なお、血中 IgA および IgM レベルは GABA および baclofen 投与により顕著な変化は認められなかった。マウス脾臓細胞の抗原 (OVA) 誘導性のサイトカイン産生応答について検討した結果、GABA 並びに baclofen 投与群マウス脾臓細胞では、対照群のそれと比較し、IFN-γ 産生が増強さ

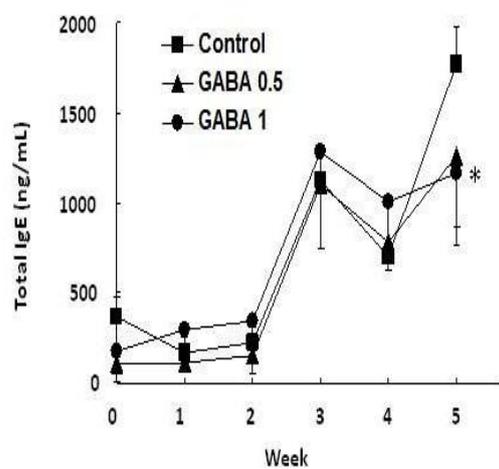
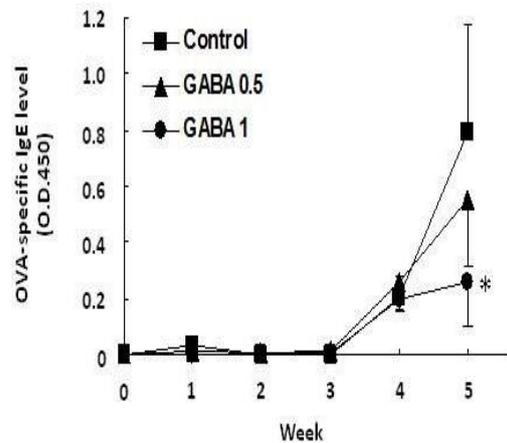


図3 GABA 経口投与による血中 IgE レベル亢進の抑制  
\*p<0.05 vs Control

れ、IL-4 産生は減弱していた。(3)において、T細胞における GABA<sub>B</sub> 受容体 mRNA の発現が確認されたことから、摂取した GABA が T 細胞に直接作用し、サイトカイン産生に影響を及ぼす可能性について検討が待たれる。血中の抗体の IgG2a/IgG1 比と脾臓細胞が産生するサイトカインの IFN- $\gamma$ /IL-4 比は、どちらも GABA 並びに baclofen の経口投与により増大することから、Th1 型免疫応答が誘導されていることが推察された。以上の結果から、GABA が Th1/Th2 バランスに影響を及ぼし、Th2 優位の免疫応答を改善することにより IgE 産生亢進を抑制し、抗アレルギー作用を発揮することが期待される。今後、GABA 並びに baclofen の経口投与による免疫担当細胞の挙動変化について詳細に解析し、GABA の新規生理活性の解明へ向け検討を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Hori A., Hara T., Sato K. and Joh T. Influence of  $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) on IgE Production in Ovalbumin-immunized BALB/c Mice. Bulletin of the Faculty of Agriculture Niigata University 2010, 査読無, Vol.62(2), 117-123.

[学会発表] (計1件)

石川 公亮, 寺平 拓也, 和田 紘稔, 原 崇, 城 斗志夫 血中高IgEレベルマウス脾細胞のIFN- $\gamma$ およびIL-4産生に及ぼす $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の影響 日本食品科学工学会第57回大会 東京農業大学 2010年9月2日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 崇 (HARA TAKASHI)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：20323959

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし