

- 1) 研究分野 小児、高齢者、遺伝子疾患等化学物質の
感受性が高い集団における安全性
- 2) 課題番号 2012 PT3-01

セリンプロテアーゼインヒビター欠損 細胞を用いた化学物質過敏症の高感度 *in vitro*評価系の開発

副題：呼吸器アレルギー検出のための細胞を用いた
*in vitro*系の検討

中村 晃
(金沢医科大学医学部免疫学講座)

【要 旨】

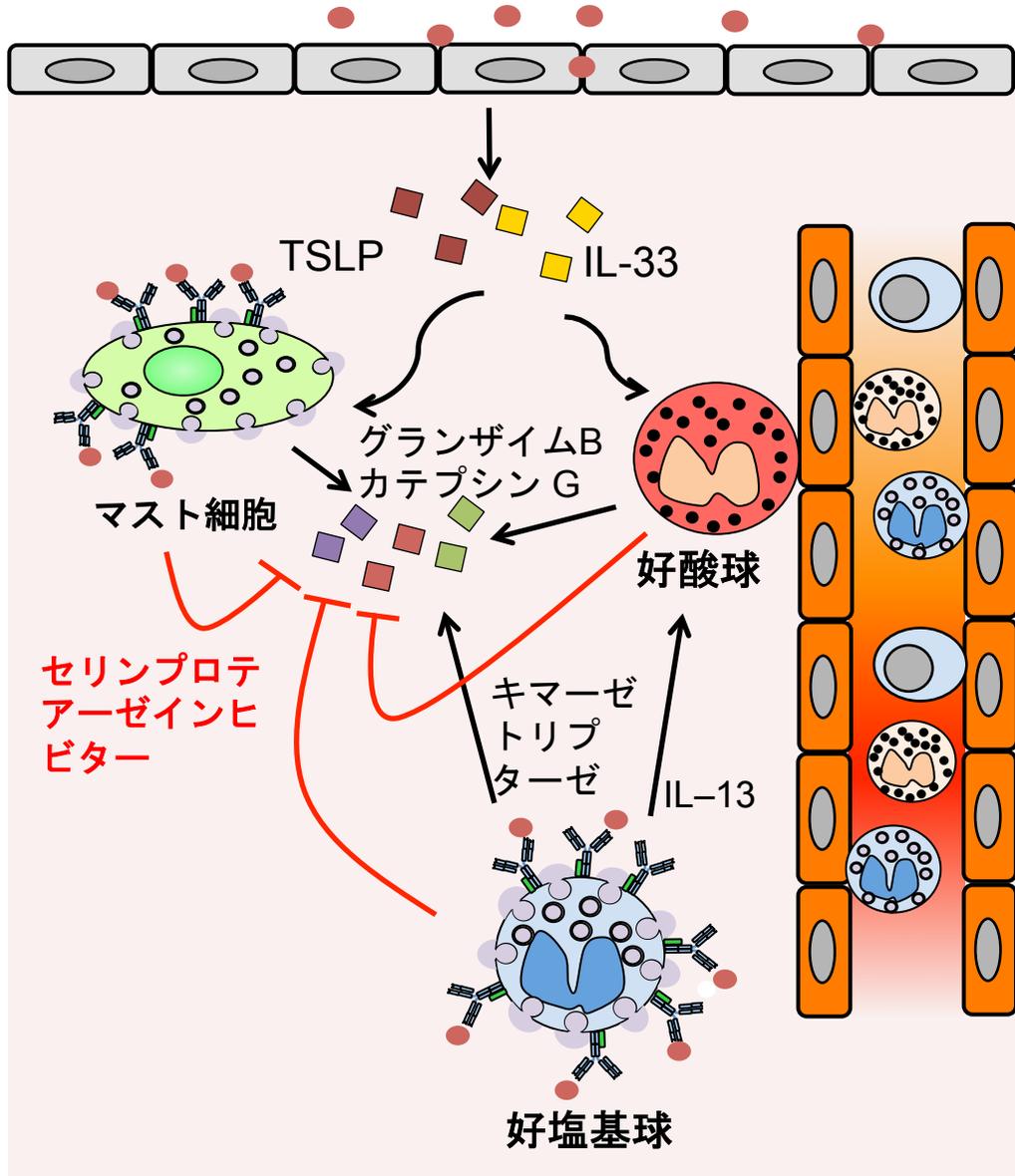
〔研究背景および目的〕

吸入抗原による呼吸器アレルギー反応には、好塩基球と好酸球が必須の役割を果たしている。好塩基球や好酸球は、細胞外マトリックスを破壊するセリンプロテアーゼを分泌し、炎症を引き起こすが、これらの細胞での化学物質応答性については報告が殆どないのが現状である。本研究は、ヒト好塩基球様細胞株KU812-Fにおいてセリンプロテアーゼを制御するセリンプロテアーゼインヒビターであるSerpín b1のshRNAによる欠損株を樹立することにより高感度の*in vitro*評価系の開発を目的とした。

〔研究結果〕

樹立された恒常的Serpín b1 ノックダウン株(以下KU812F-T09)ではトルエンジイソシアネート(TDI)刺激によるIL-6産生が親株より約2倍となり、これまで親株で反応がなかった8種類の化学物質刺激でもIL-6産生の亢進が認められた。またTDIおよびIgE同時刺激によりIL-13産生の亢進も認められた。ヒト細胞株においてセリンプロテアーゼインヒビターを欠損させることにより高感度の評価系のモデル細胞となる可能性が示された。

【背景および目的】



アレルギー反応は好塩基球、マスト細胞、好酸球により誘導される。特に呼吸器アレルギーでは好塩基球と好酸球が関与している

これらの細胞が産生するセリンプロテアーゼはアレルギーの増悪化に関与する

セリンプロテアーゼはセリンプロテアーゼインヒビターによって制御される

代表的なセリンプロテアーゼインヒビターであるSLPIを欠損したマウス好塩基球や好酸球は一部の化学物質に対して高反応性を示した

セリンプロテアーゼインヒビターヒト欠損細胞株を用いた化学物質過敏症の高感度 *in vitro* 評価系の開発を目的とする

【使用化学物質】

	検 体	感作性		検 体	感作性
C0	塩化ナトリウム（対照）	-	C12	5-メチル-2,3-ヘキサンジオン	Sh
C1	塩化ニッケル	Sah	C13	安息香酸フェニル	Sh
C2	硫酸ニッケル	Sah	C14	4-エトキシメチレン-2-フェニル -2-オキサゾリン-5-オン	Sah
C3	塩化コバルト	Sah	C15	トリメリト酸無水物	Sa
C4	硫酸ベリリウム	Sah	C16	トルエン2,4-ジイソシアネート	Sah
C5	4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート	Sah	C17	<i>p</i> -フェニレンジアミン	Sh
C6	ジニトロベンゼンスルホン酸	Sh	C18	テトラメチルチウラムジスルフィド	Sh
C7	グルタルアルデヒド	Sah	C19	トリニトロクロロベンゼン	Sh
C8	ホルムアルデヒド	Sh	C20	フルオロセインイソチオシアネート	Sah
C9	塩化ベンゾイル	Sh	C21	アゾジカルボンアミド	Sah
C10	1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン	Sh	C22	シクロヘキサンジカルボン酸無水物	Sah
C11	エチレングリコールメタクリレート	Sh	C23	メチルシクロヘキサンジカルボン酸 無水物	Sah

Sa : 呼吸器感作性、Sh : 皮膚感作性
Sah : 皮膚・呼吸器感作性

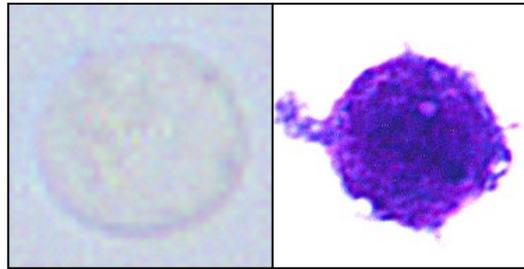
対象株：ヒト好塩基球様細胞株KU812-F
ヒト好酸球様細胞株EoL-1

KU812-F: Human basophilic cell line (Kishi K, et al. Leuk. Res. 9: 381-390, 1985)

慢性骨髄性白血病患者より樹立された細胞株

定常状態でIgE受容体を発現している

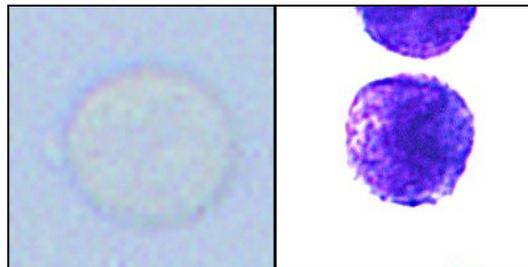
IL-3 (20ng/ml)添加3日間で好酸球様に分化する



EoL-1: Human eosinophilic cell line (Saito H, et al. Blood 66:1233-1240,1985)

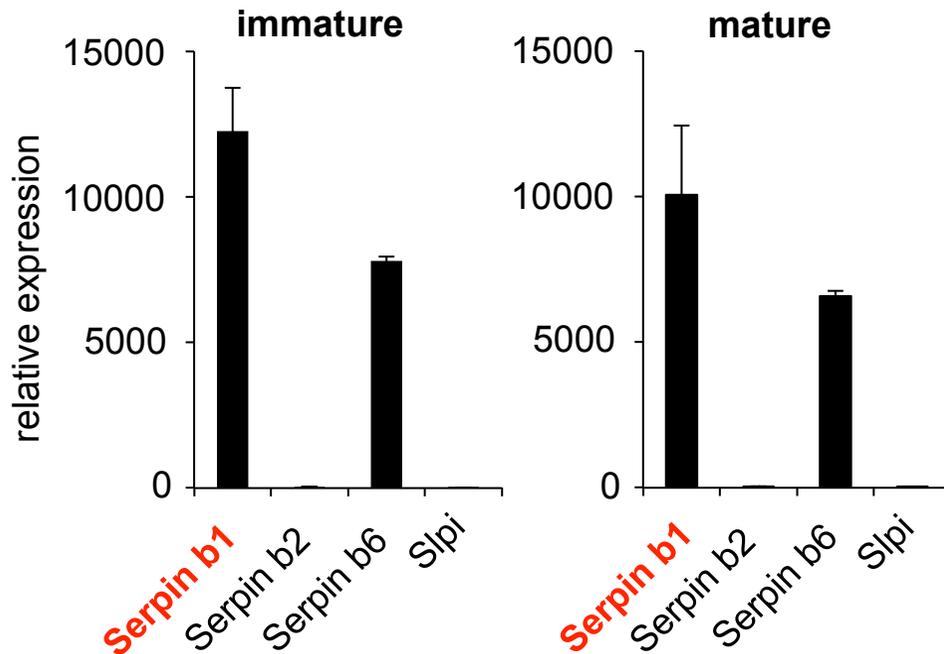
好酸球性白血病患者より樹立された細胞株

n-butylate (histone deacetylases inhibitor) 添加8日間で、
好酸球様細胞株に分化する

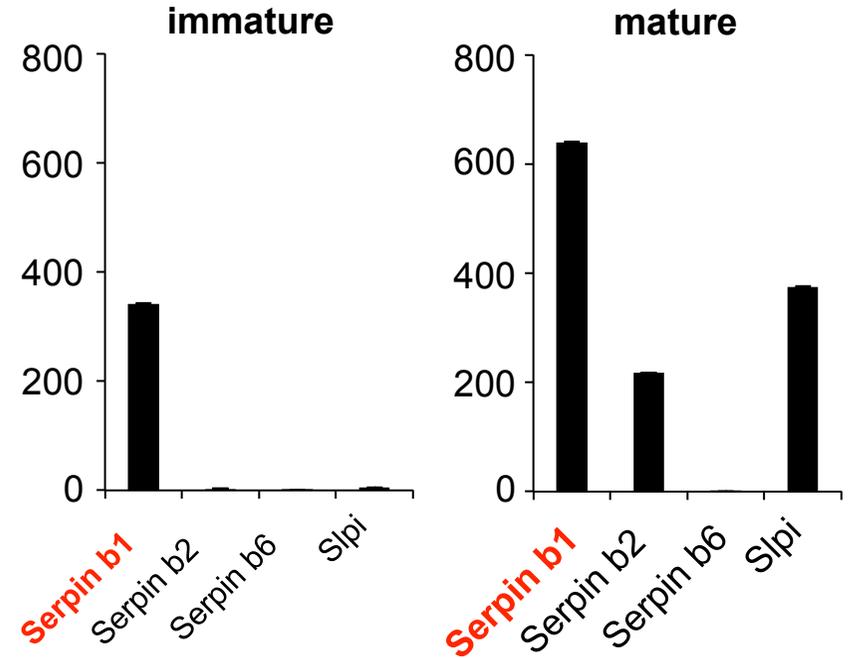


KU812-FおよびEoL-1におけるセリンプロテアーゼインヒビターの定量的PCR法による発現解析

KU812-F



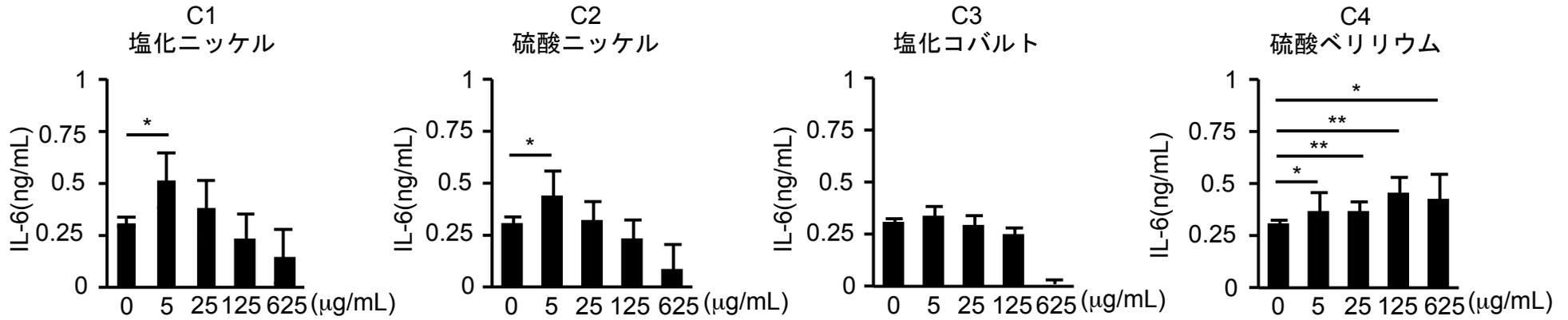
EoL-1



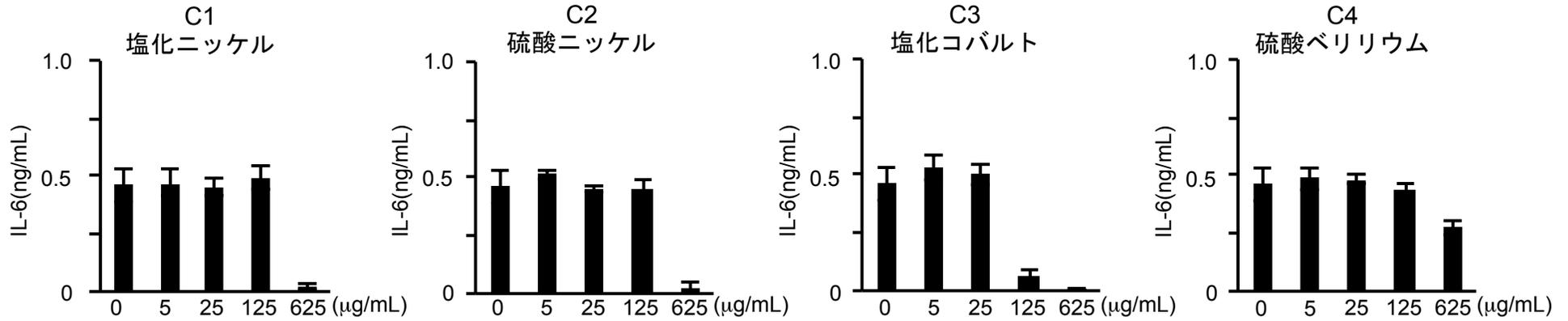
ヒト好塩基球様細胞株KU812-Fのshort hairpin(sh) RNAによるSerpin b1ノックダウン株の樹立

ノックダウン株と親株におけるIL-6産生

KU812-F-T09

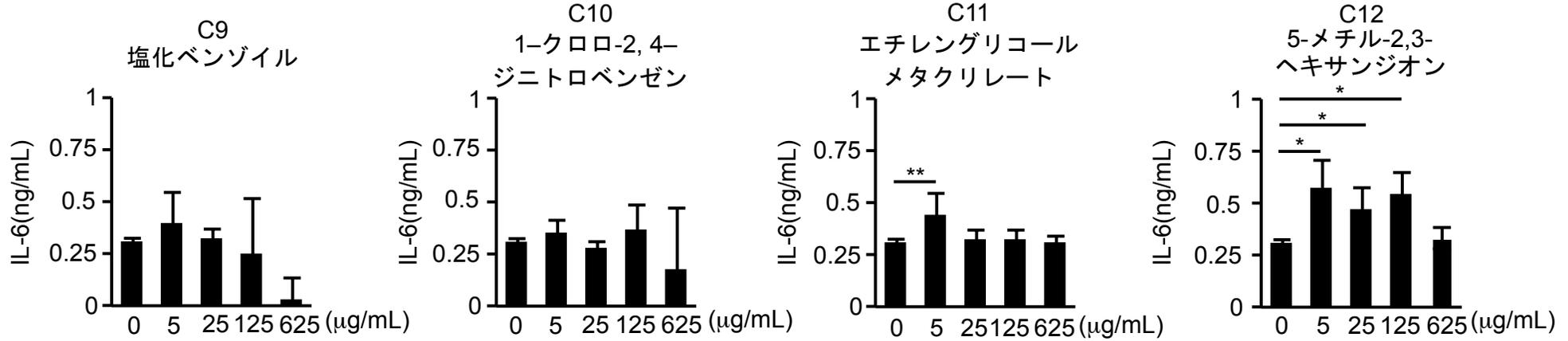


KU812-F

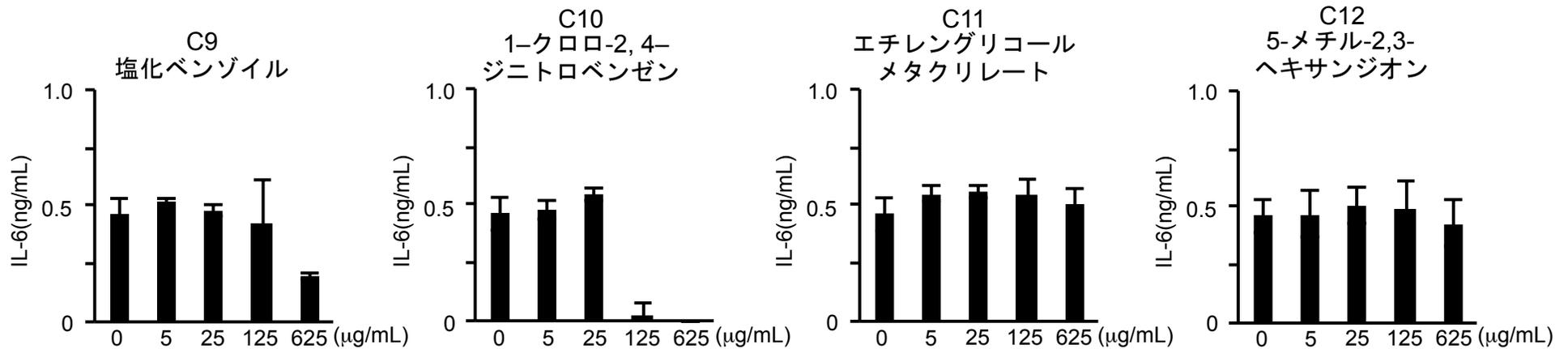


ノックダウン株と親株におけるIL-6産生

KU812-F-T09

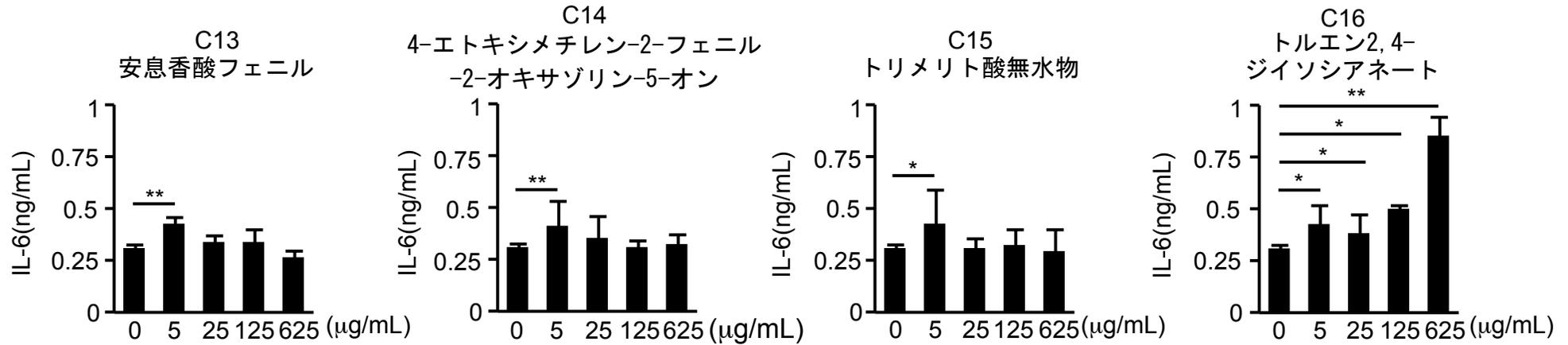


KU812-F

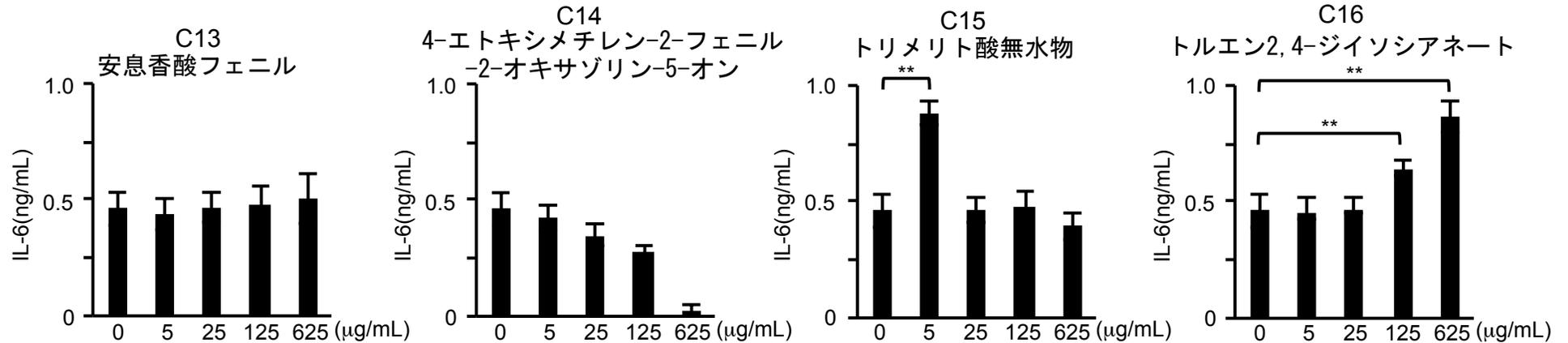


ノックダウン株と親株におけるIL-6産生

KU812-F-T09

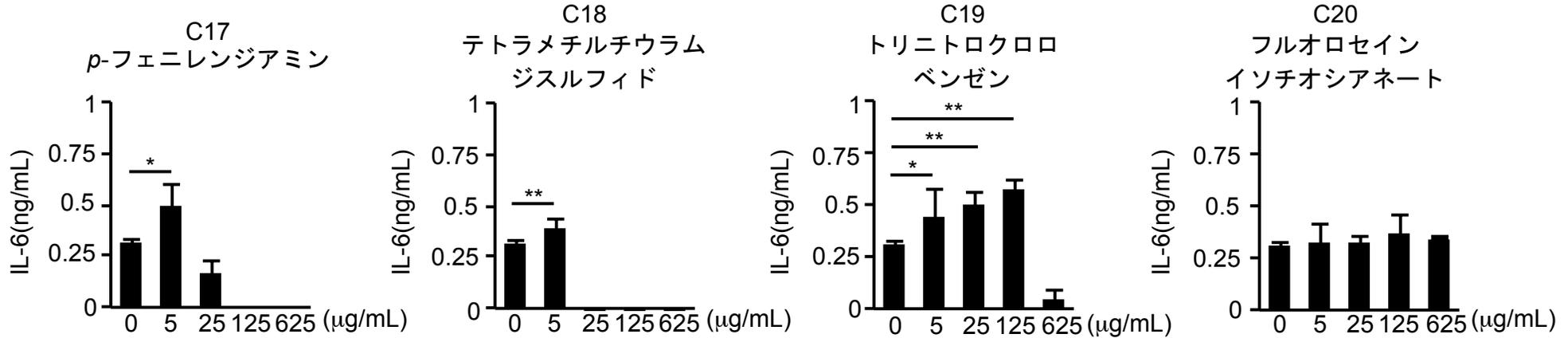


KU812-F

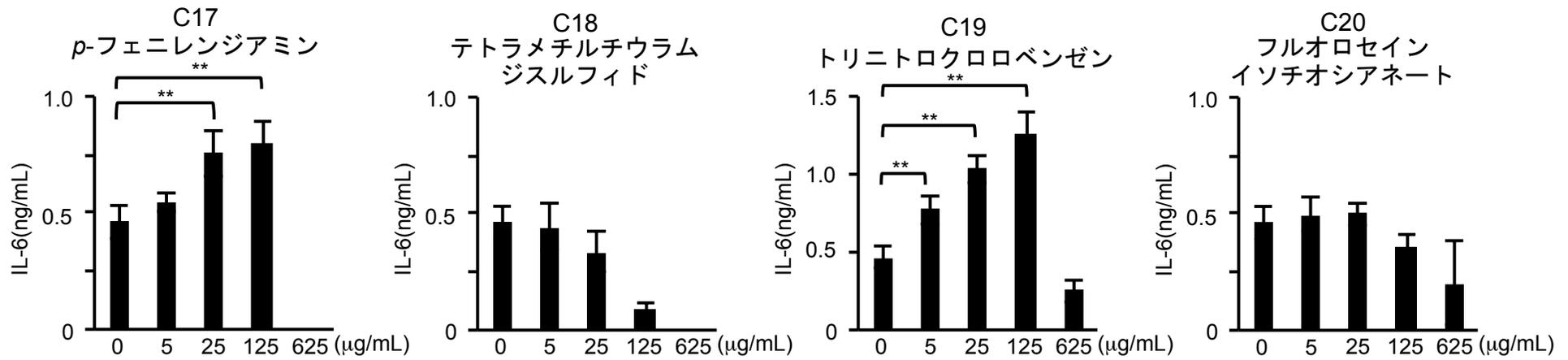


ノックダウン株と親株におけるIL-6産生

KU812-F-T09

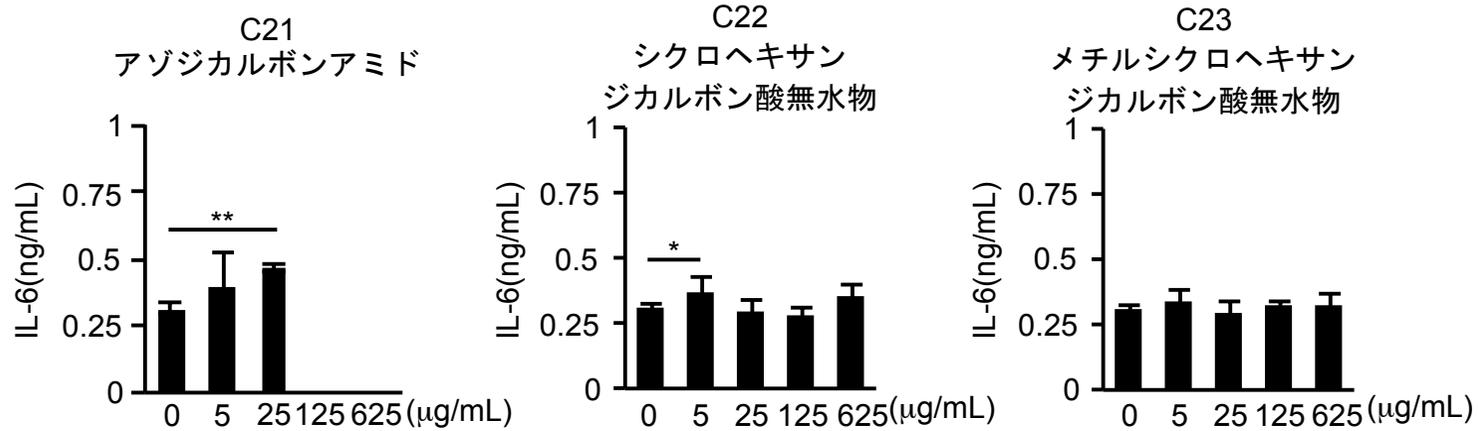


KU812-F

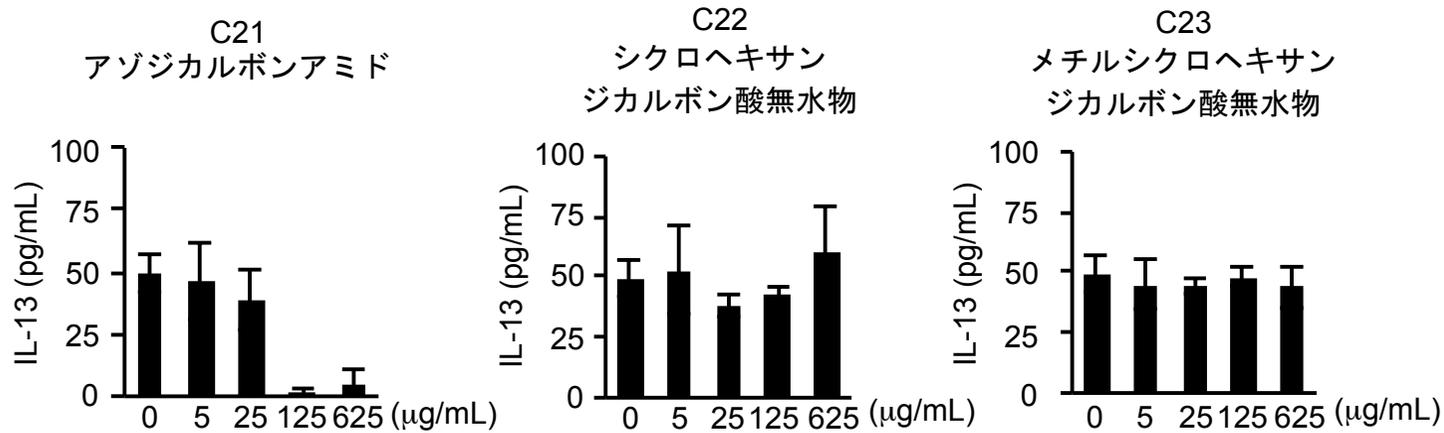


ノックダウン株と親株におけるIL-6産生

KU812-F-T09

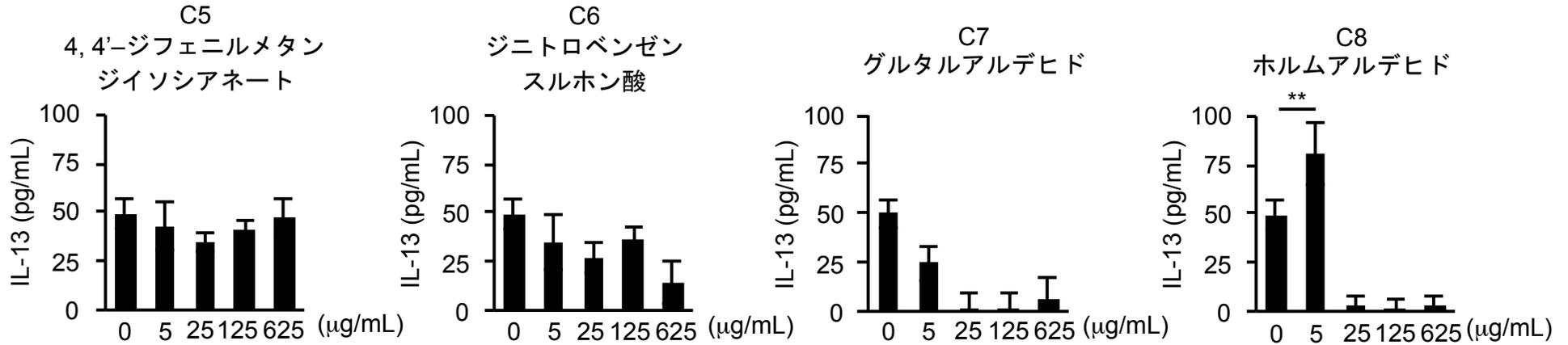


KU812-F

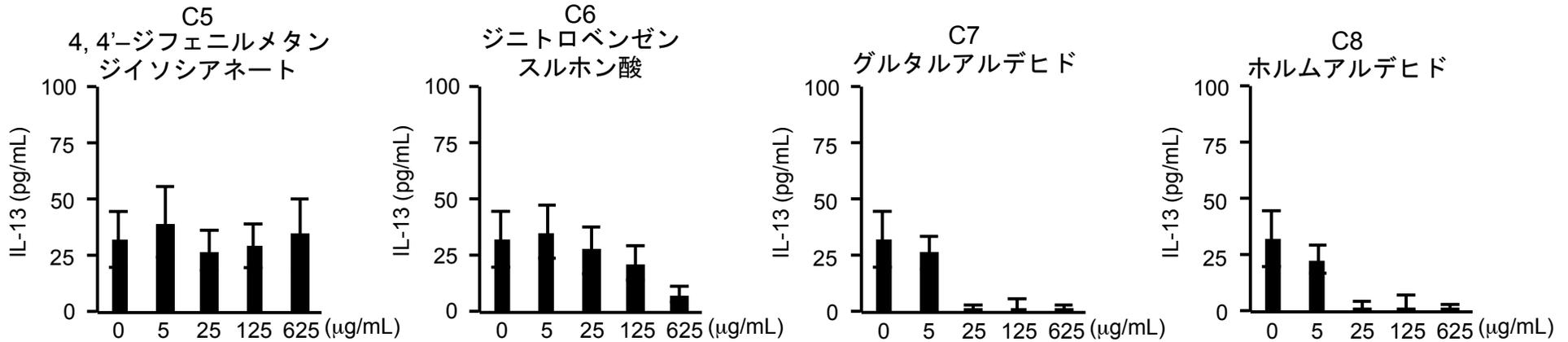


ノックダウン株と親株におけるIL-13産生

KU812-F-T09

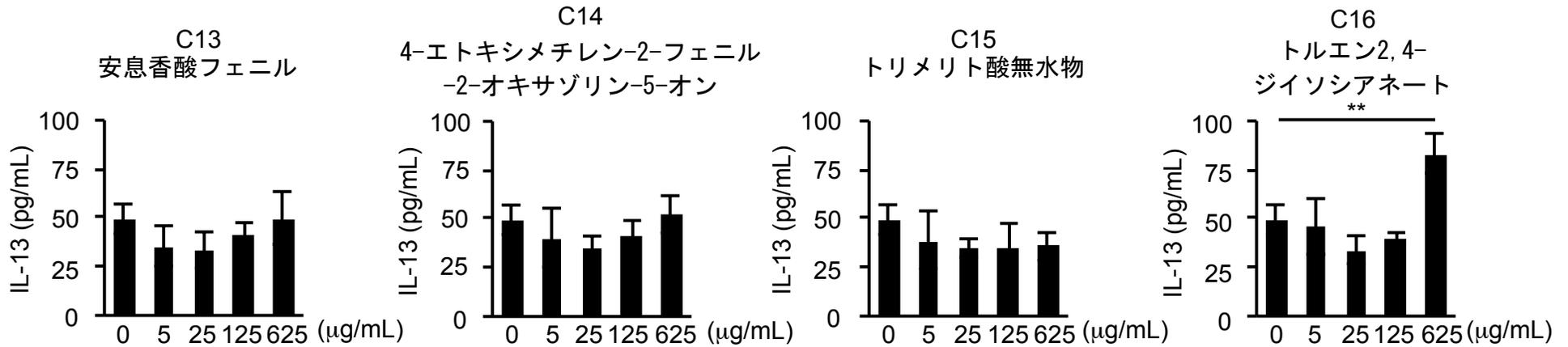


KU812-F

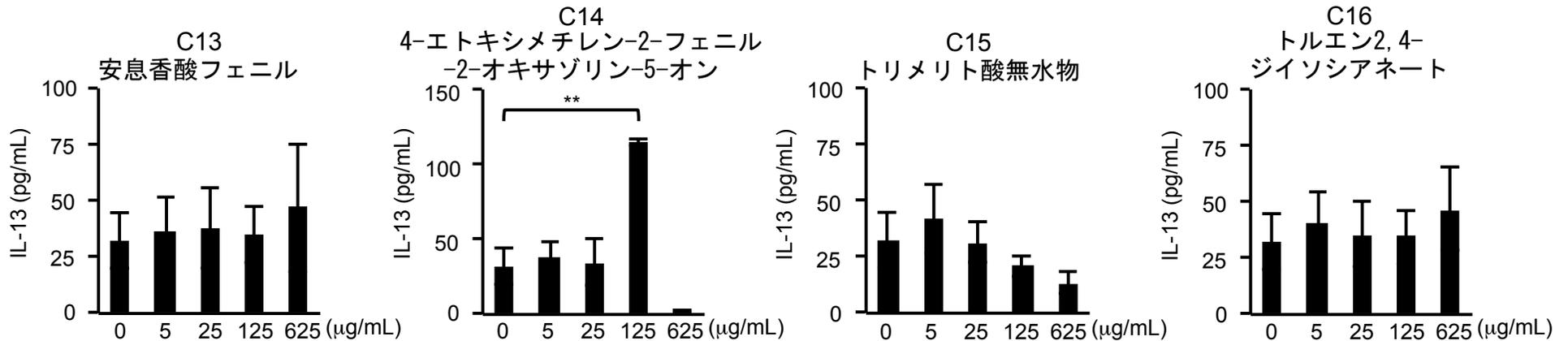


ノックダウン株と親株におけるIL-13産生

KU812-F-T09

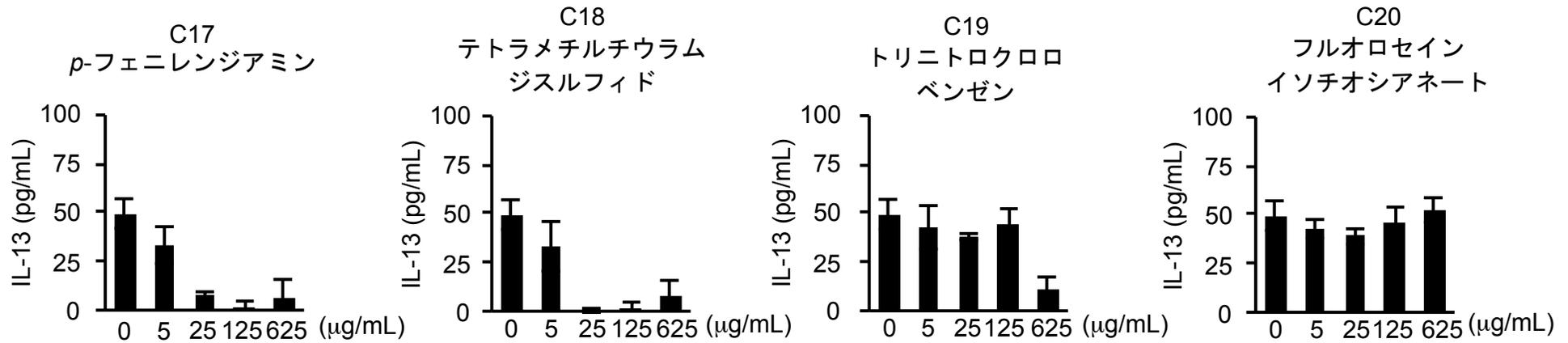


KU812-F

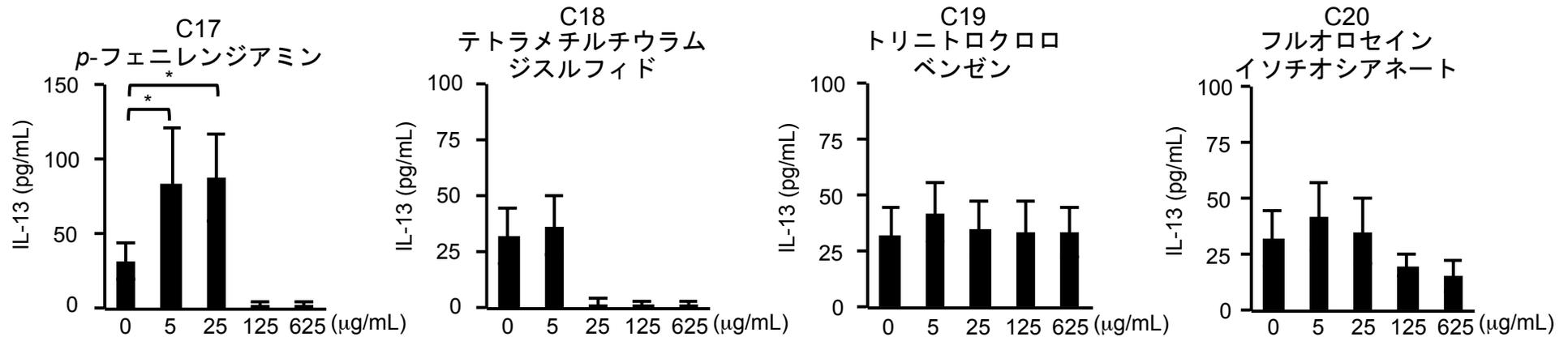


ノックダウン株と親株におけるIL-13産生

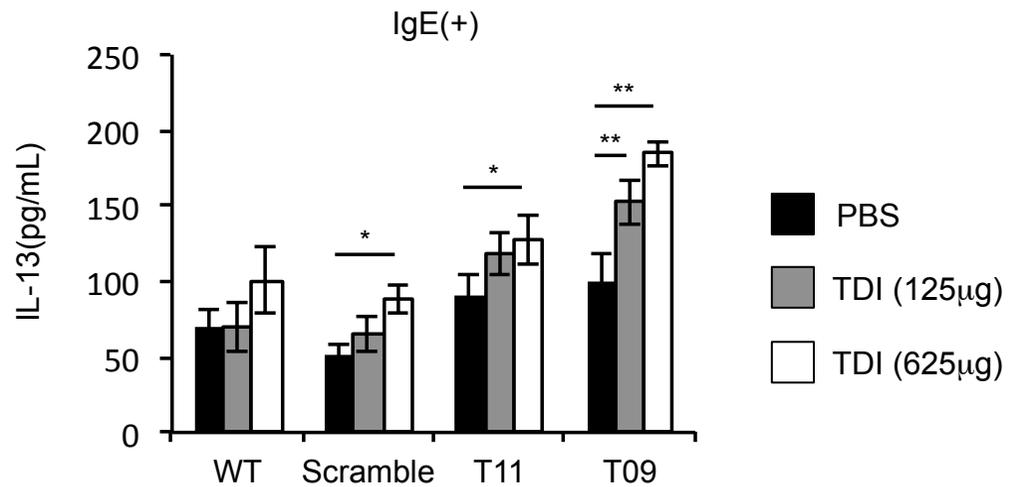
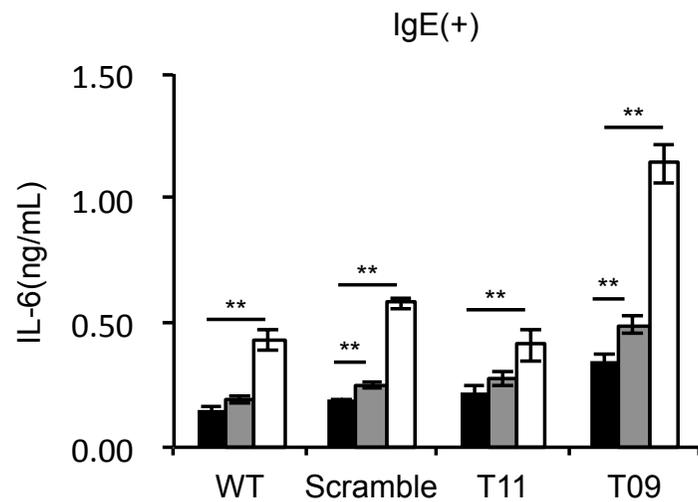
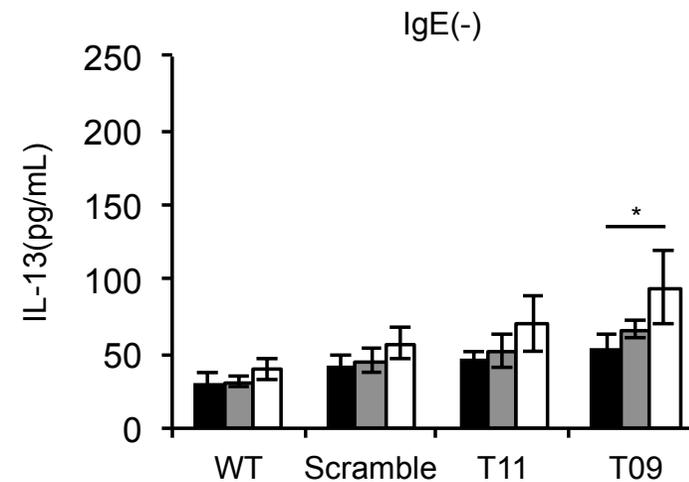
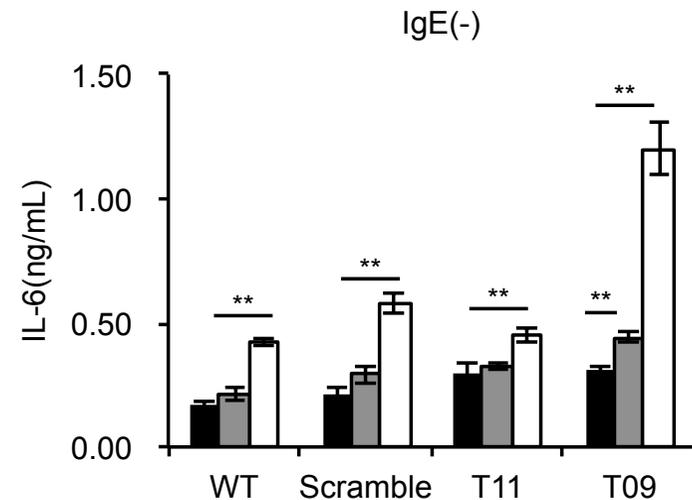
KU812-F-T09



KU812-F



ノックダウン株でのTDI単独・IgE同時刺激によるIL-6・13産生



【結 果】

- 1) ノックダウン株において親株と比べて顕著にIL-6産生が亢進していた化学物質
トルエンジイソシアネート
- 2) ノックダウン株のみでIL-6産生が亢進していた化学物質（低濃度のみ）
塩化ニッケル・硫酸ニッケル・ホルムアルデヒド
エチレングリコールメタクリレート・5-メチル2,3ヘキサンジオン
エトキシメチレンフェニルオキサゾリンオン
テトラメチルチラウムジスルフィド・アゾジカルボンアミド
シクロヘキサンジカルボン酸無水物
- 3) ノックダウン株のみでIL-13産生が亢進していた化学物質
低濃度のみ：ホルムアルデヒド
高濃度のみ：トルエンジイソシアネート
- 4) ノックダウン株・親株ともにIL-6産生が亢進していた化学物質
トリニトロクロロベンゼン
- 5) 親株においてノックダウン株よりIL-6産生が亢進していた化学物質
p-フェニレンジアミン
- 6) 親株のみでサイトカイン産生が亢進していた化学物質
IL-6：ジニトロベンゼンスルホン酸・グルタルアルデヒド
IL-13：エトキシメチレンフェニルオキサゾリンオン・*p*-フェニレンジアミン

【今後の展開】

ヒト好塩基球細胞株KU812-Fおよびヒト好酸球細胞株EoL-1でのshRNAを用いたノックダウンによるセリンプロテアーゼインヒビター欠損株の作製

