

- 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

2019年8月30日

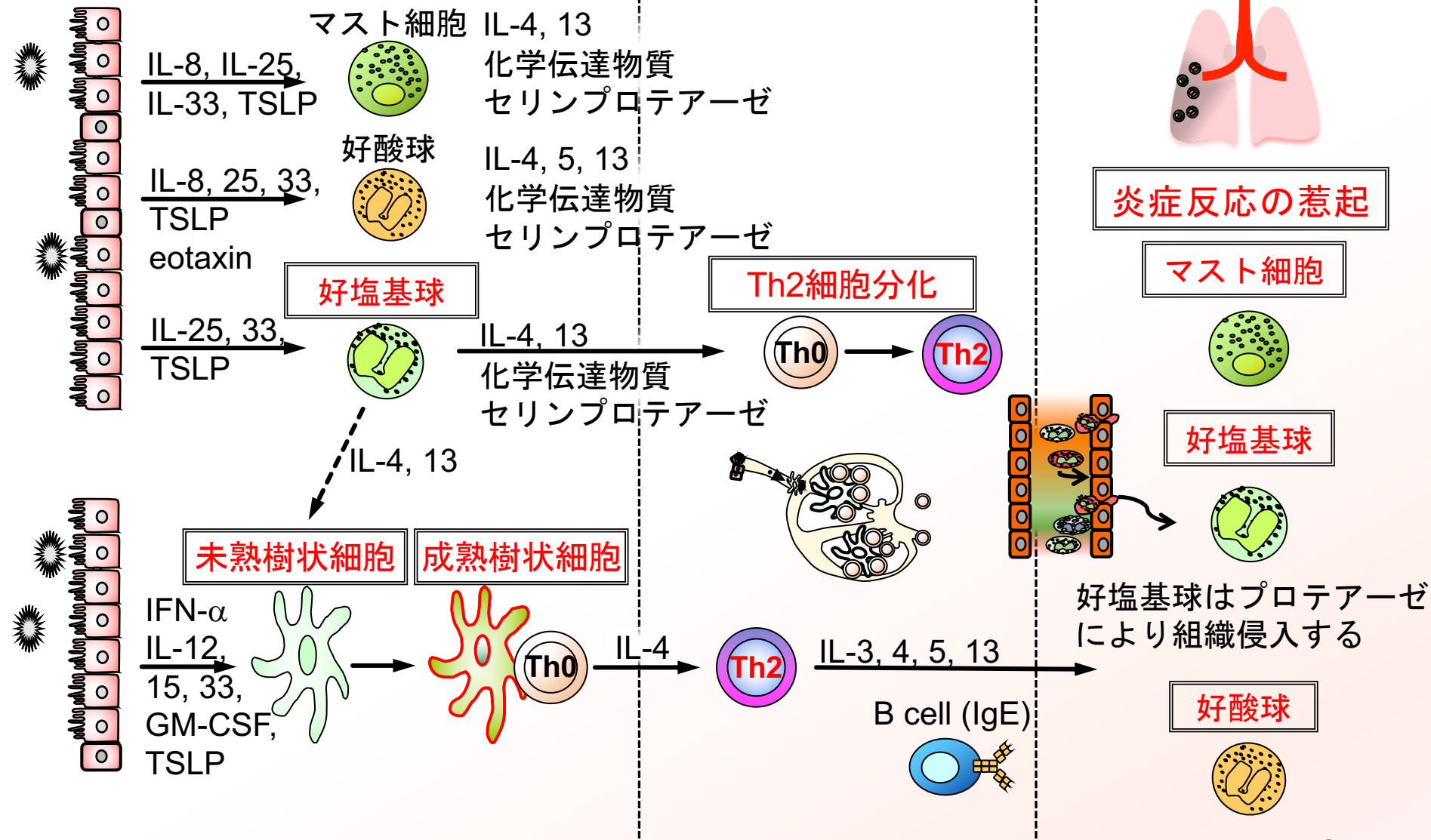
東北医科薬科大学・免疫学教室・中村 晃

呼吸器におけるアレルギー反応

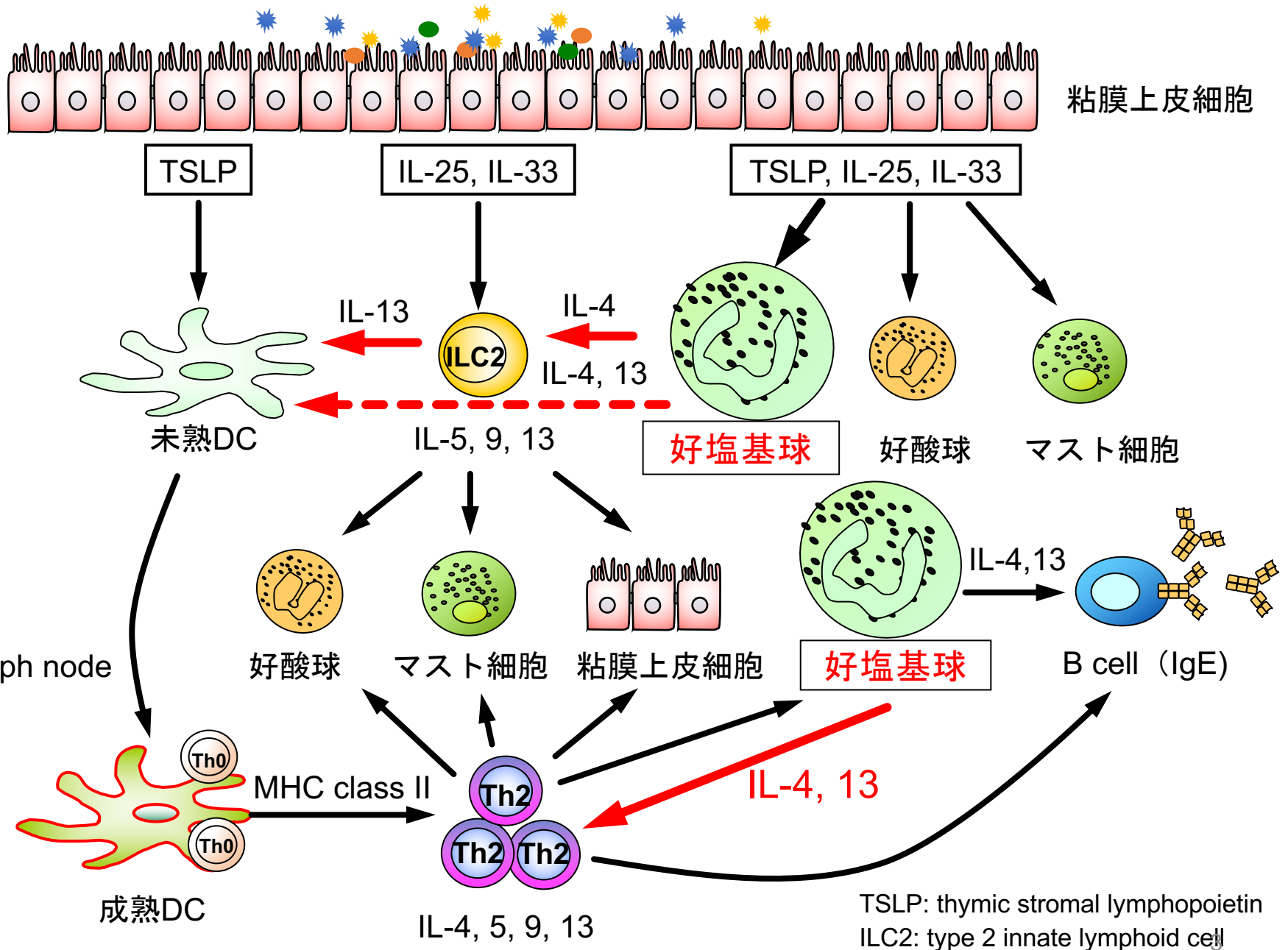
肺実質(肺胞)と間質(粘膜下組織)

肺間質とリンパ節

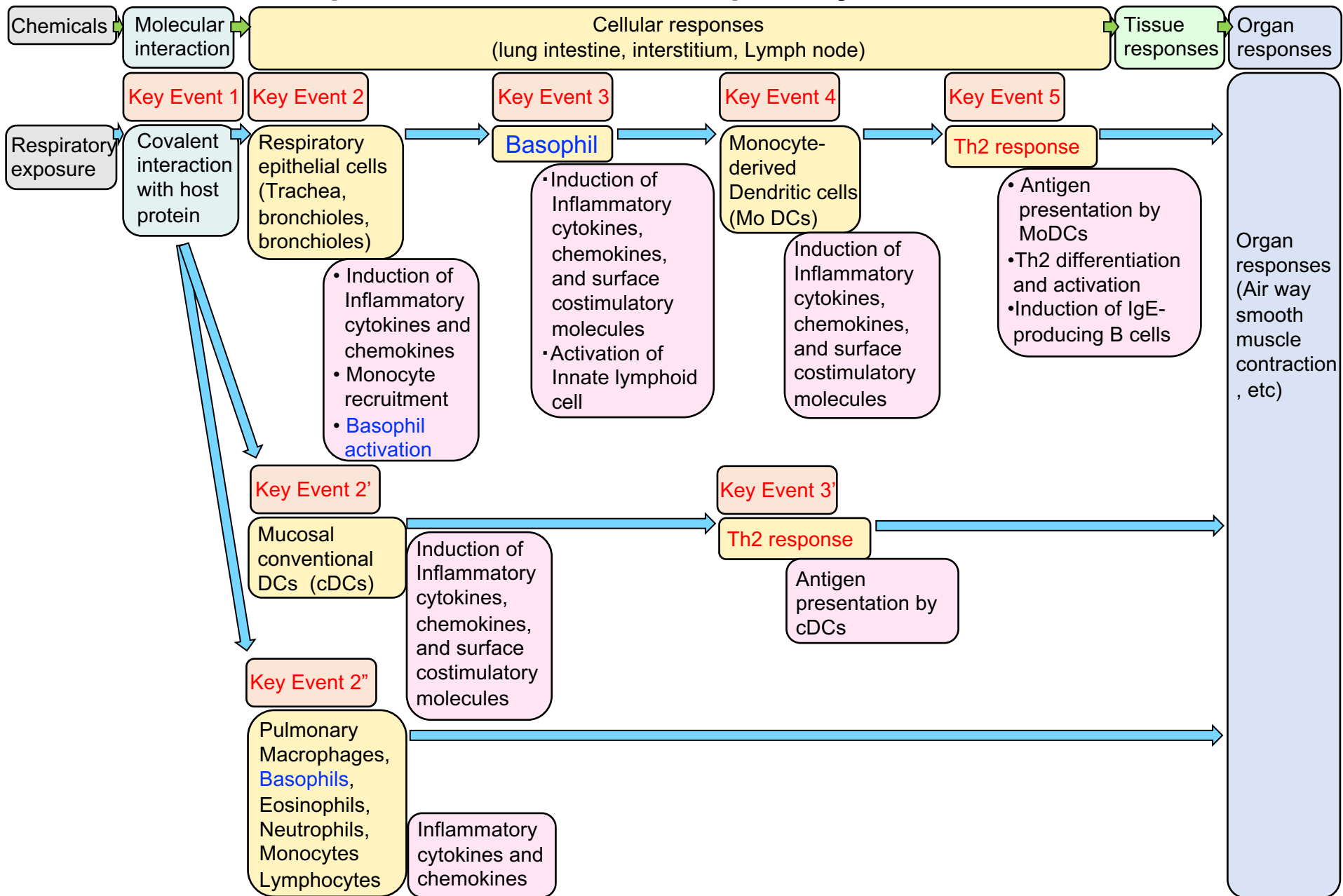
肺実質と間質



好塩基球はTh2反応を促進する

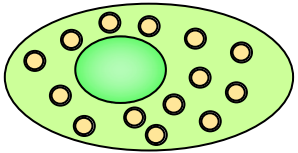

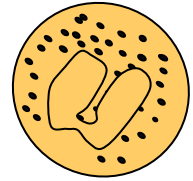


Proposed AOP model of Respiratory Sensitization

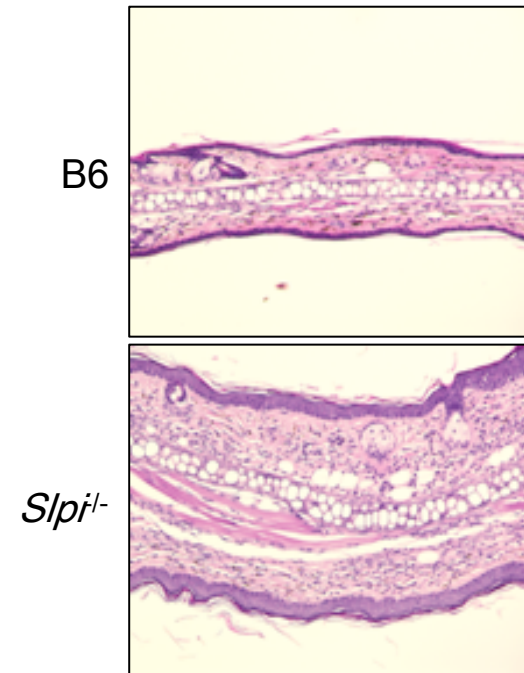
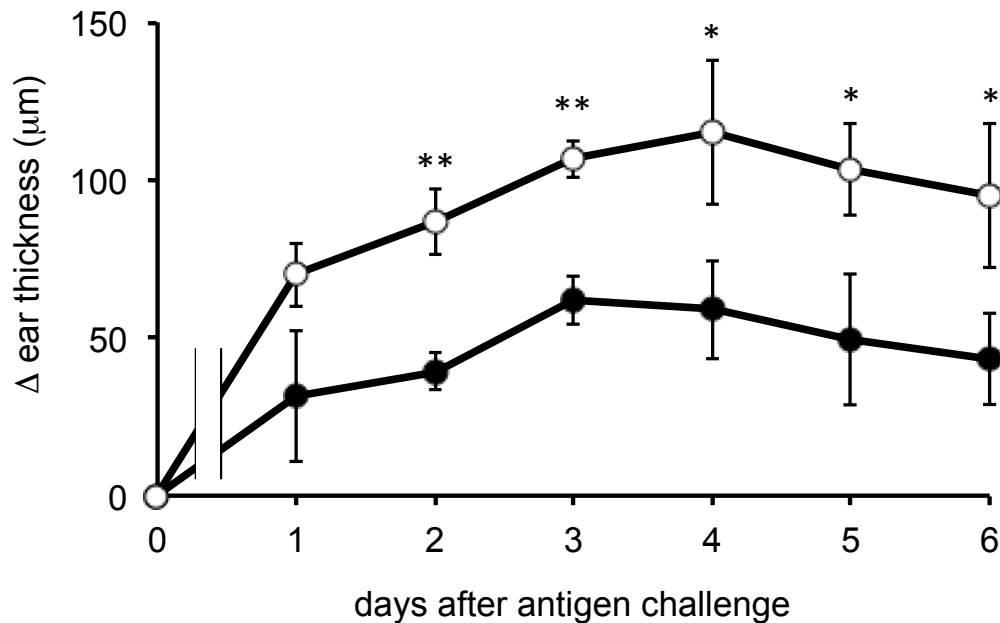
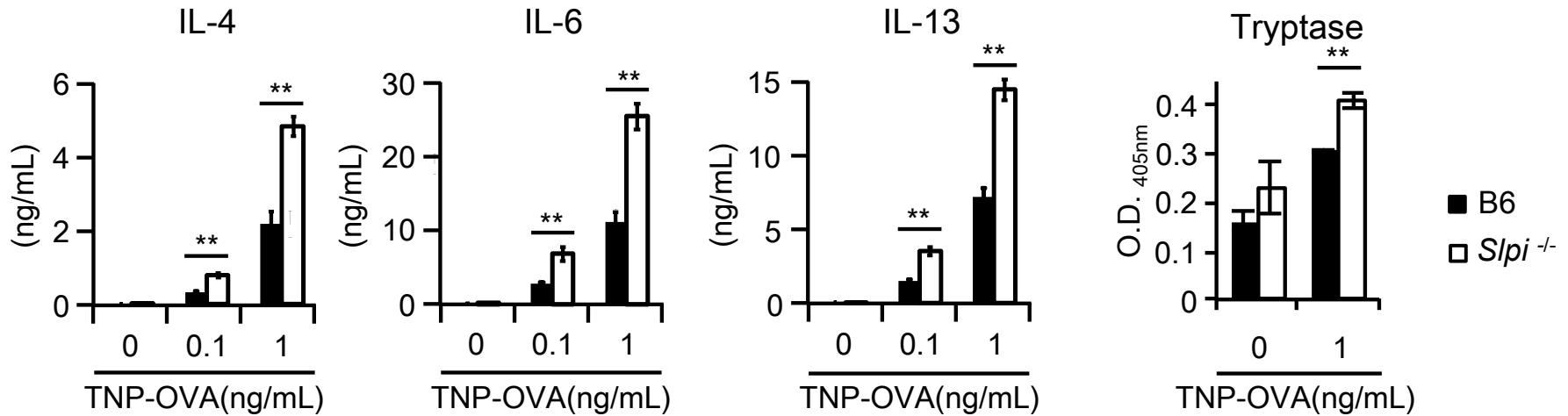


※Key event 2', 3' and 2'' occur in the lung intestine

アレルギーのエフェクター細胞における セリンプロテアーゼインヒビターの発現

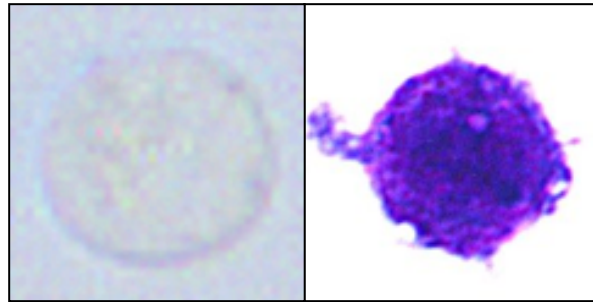
	 マスト細胞	 好塩基球	 好酸球
脂質 メディエーター	PGD ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , PAF, TXA ₂	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , PGD ₂ , PGE ₂ , PAF
化学伝達物質	Histamine, Heparin, Serotonin	Histamine, Heparin, Serotonin	MBP, EDN, ECP, EPO
サイトカイン	IL-3, 4, 5, 6, 8, 13 TNF-a, GM-CSF	IL-3, 4, 5, 6, 13	IL-3, 4, 5, 6, 13, GM-CSF, TGF-a, b
タンパク分解 酵素 (セリン プロテアーゼ)	Granzyme B, Cathepsin G Chymase, Tryptase	Granzyme B, Cathepsin G Chymase, Tryptase	MMP-1, 9
内因性セリン プロテアーゼ インヒビター	Serpin b2, b6a	Serpin b1a, Serpin b2, SLPI	Serpin b2, SLPI

SLPIを欠損した好塩基球は、IgE刺激後のサイトカイン産生や好塩基球依存的な皮膚アナフィラキシー反応が亢進する



【目的】

セリンプロテアーゼインヒビター欠損ヒト好塩基球株を用いた化学物質過敏症の高感度*in vitro*評価系の開発



対象株

KU812-F: Human basophilic cell line

(Kishi K, et al. Leuk. Res. 9: 381-390, 1985)

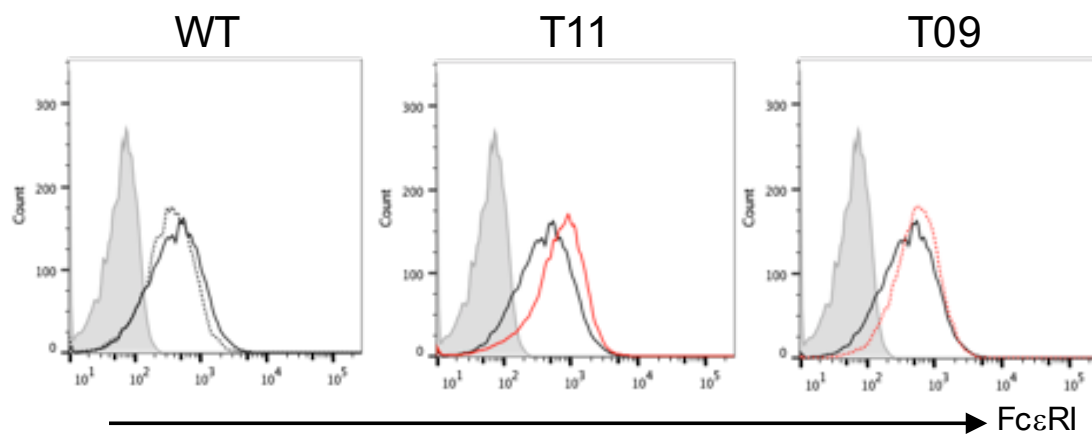
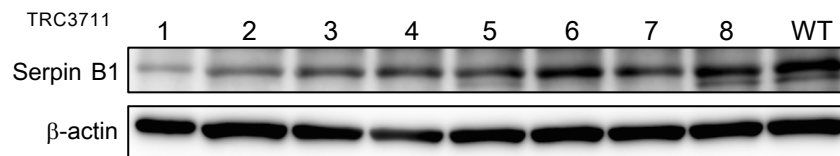
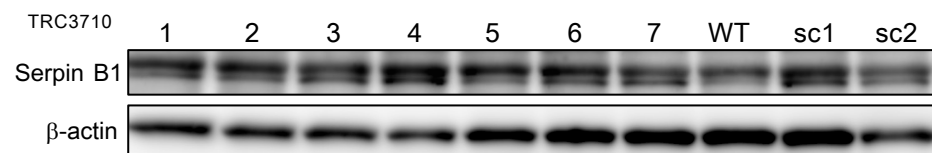
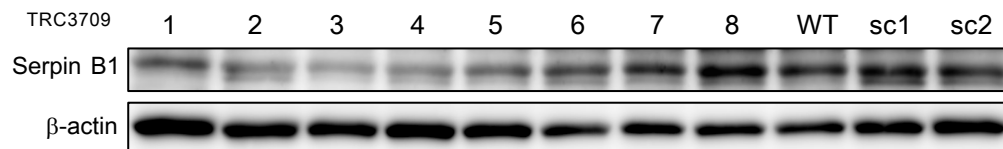
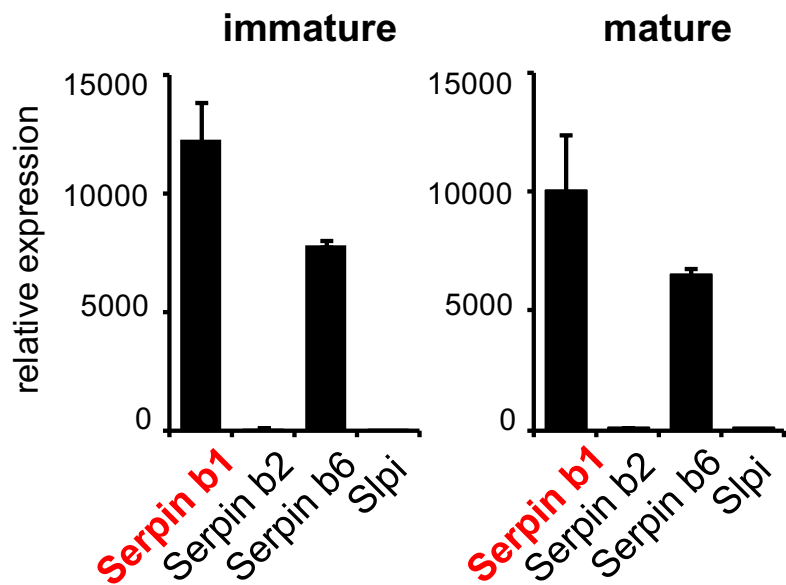
慢性骨髄性白血病患者より樹立された細胞株

IgE受容体を発現している好塩基球様白血病細胞株

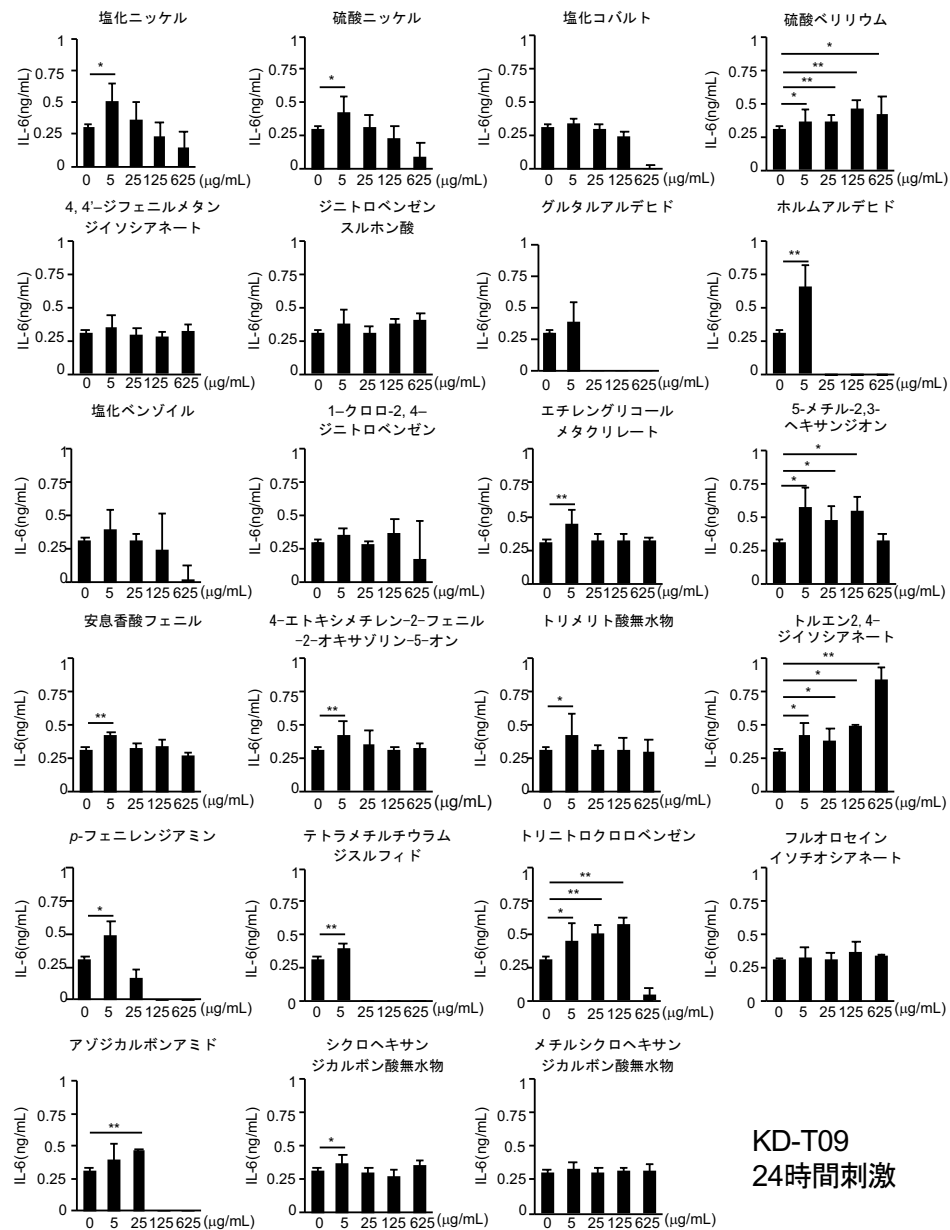
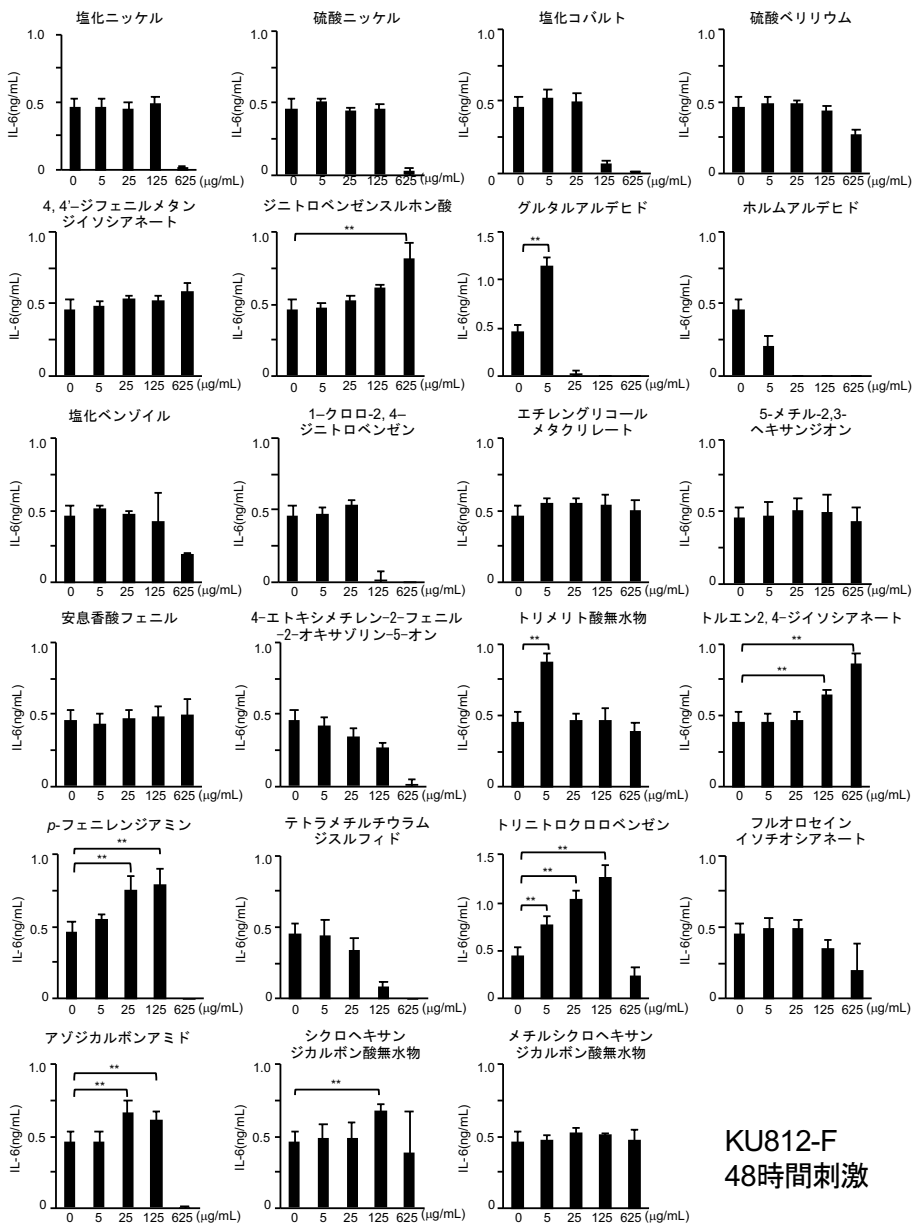
東北大学加齢医学研究所・医用細胞資源センター・細胞バンクより入手 (TKG 0304)。

KU812-Fにおけるセリンプロテアーゼインヒビター Serpin b1ノックダウン株の樹立

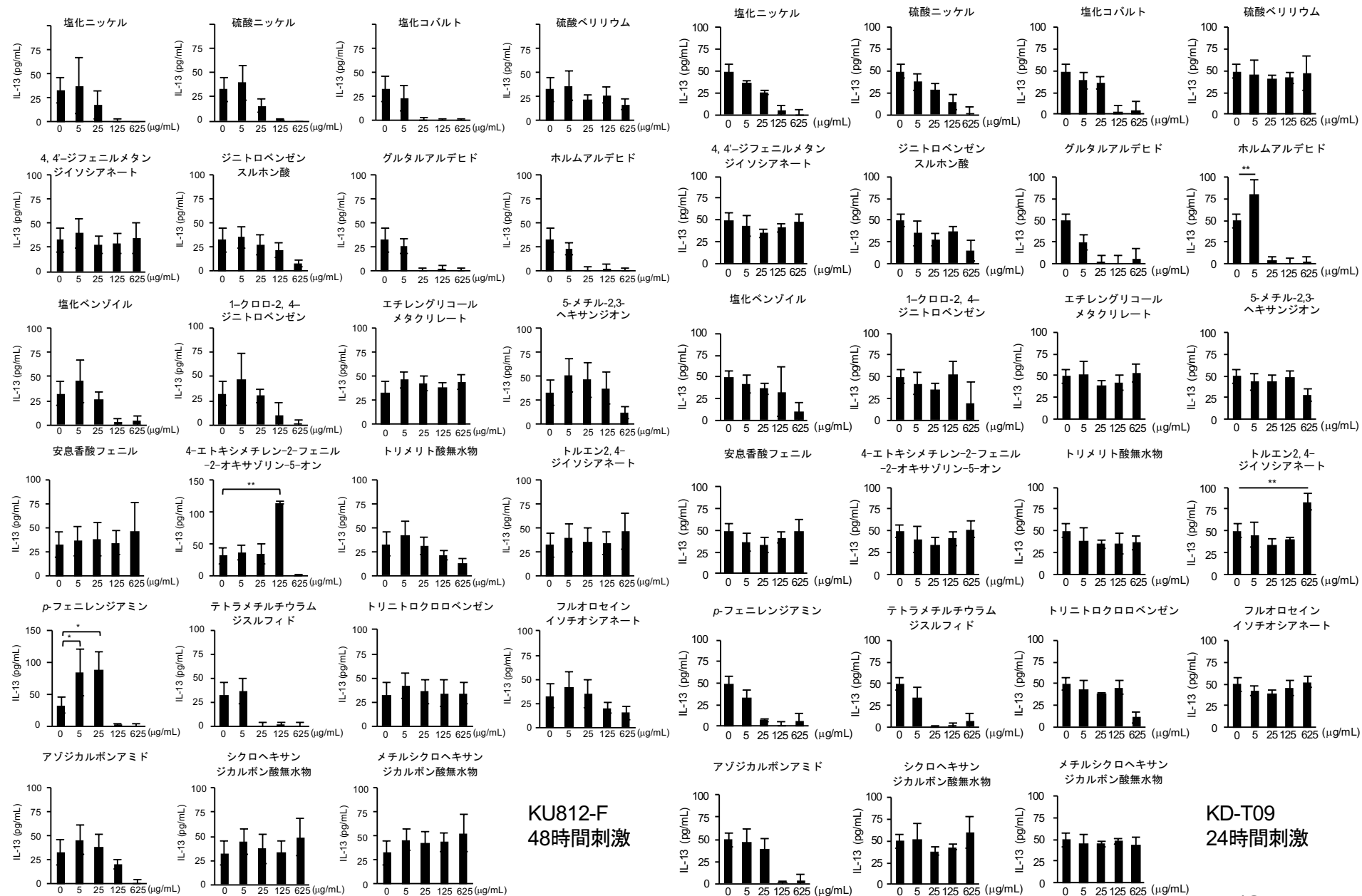
Serpin protease inhibitor



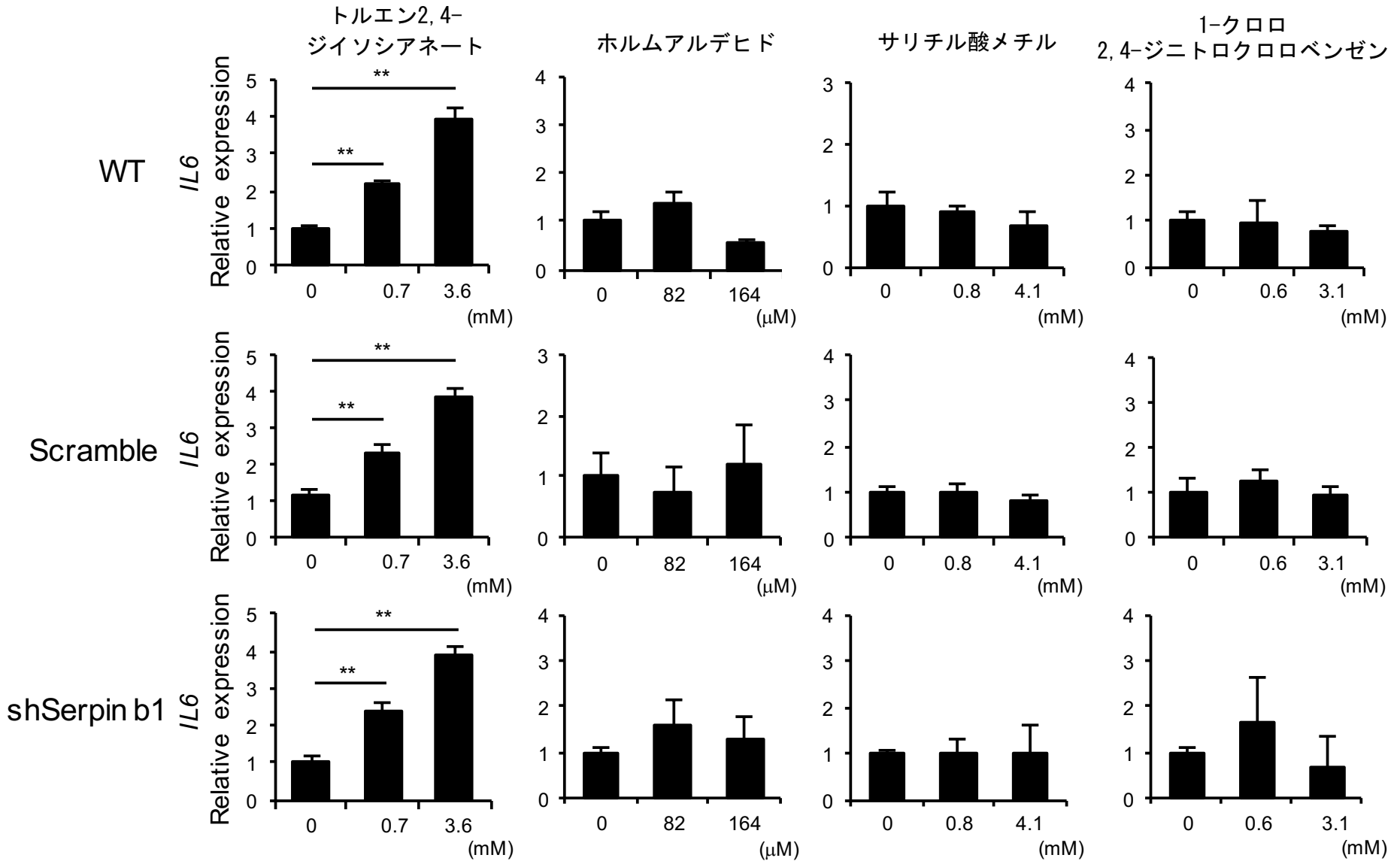
KU812-F (左) およびKD-T09株 (右) における化学物質刺激後のIL-6産生



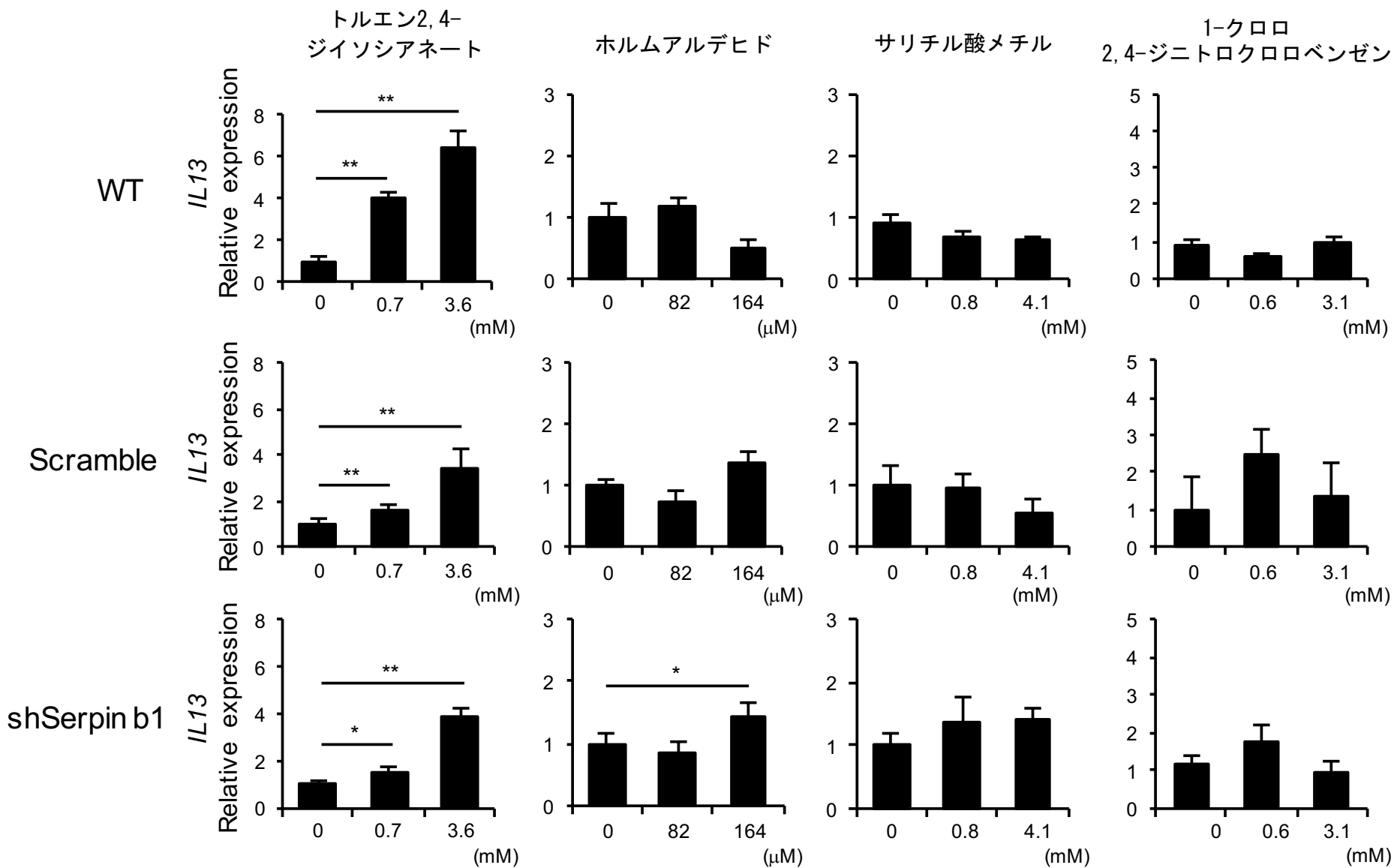
KU812-F (左) およびKD-T09株 (右) における化学物質刺激後のIL-13産生



ノックダウン株における呼吸器皮膚感作性化学物質刺激後のIL-6 mRNA

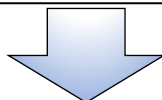


ノックダウン株における呼吸器皮膚感作性化学物質刺激後のIL-13 mRNA

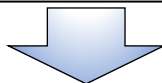


RNAシーケンスによるTDI刺激後の遺伝子発現解析

- ノックダウンT09株およびScramble株においてTDI (0.7mMおよび3.6mM) 6時間刺激
- シーケンサー: illumina HiSeq 2500
- 読み取り塩基: 2 × 101 bp (paired-end read)
- リファレンス ゲノム&トランスクリプト: UCSC hg38

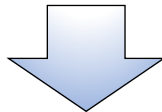


マッピング: TopHatプログラム (v2.1.0) (リードの断片化とマッピング)



アセンブル: Cufflinksプログラム (v2.2.1)

$$\text{各遺伝子の長さ} = \frac{\text{isoform (1)の長さ} \times \text{リード数} + \text{isoform (2)の長さ} \times \text{リード数} \dots}{\text{遺伝子のリード数} [\text{isoform(1)+(2)+.....}]}$$

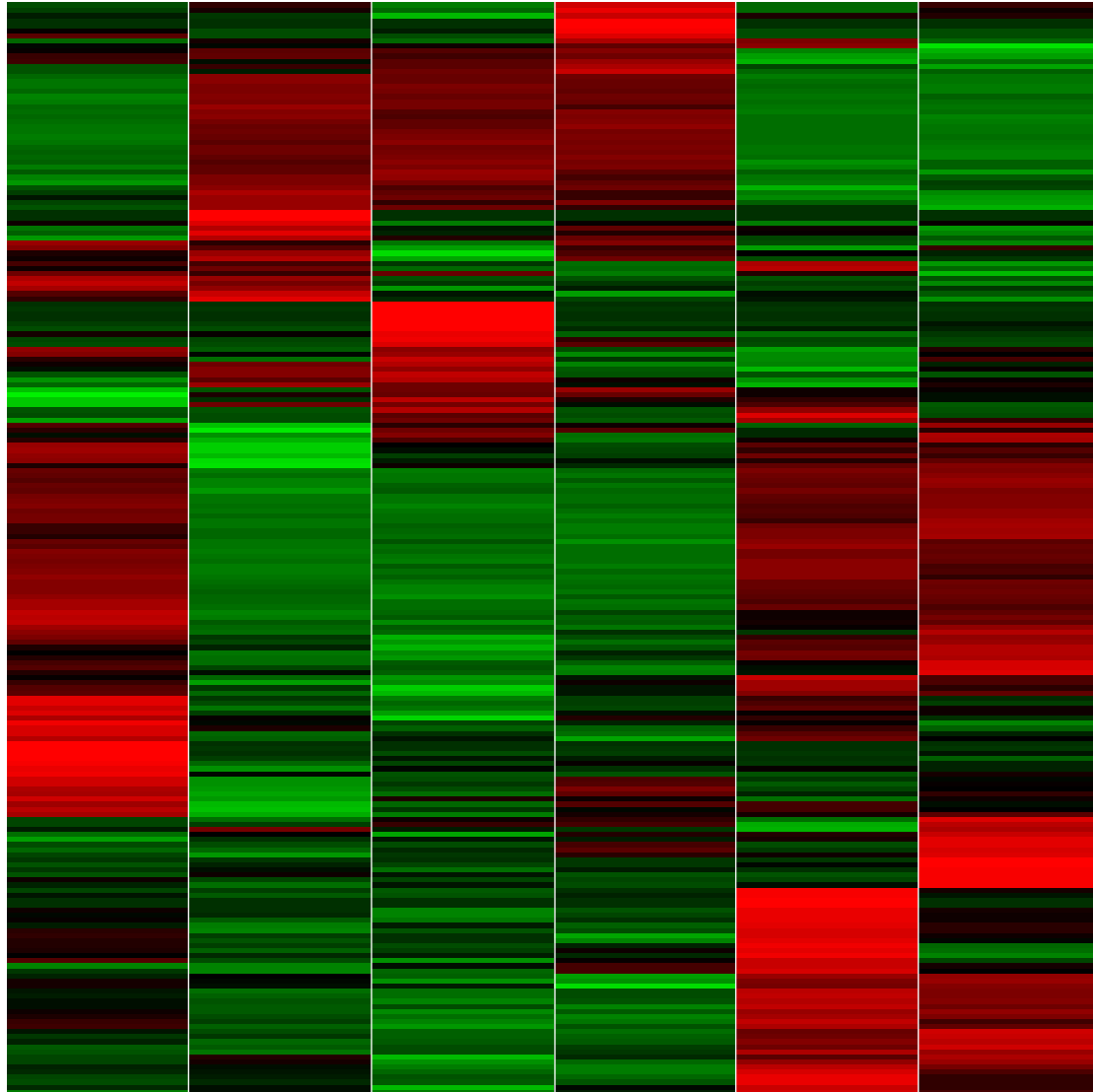


発現量データ (genes.fpk_tracking)

$$\text{遺伝子発現量} = \frac{\text{遺伝子のリード数}}{\text{補正後の遺伝子の長さ} \times \text{総リード数 (ex. 41,788,287)}} \times 10^9$$

RNAシーケンスによるTDI刺激後の遺伝子発現解析

KD-PBS SC-PBS SC-TDI (0.7mM) SC-TDI (3.6mM) KD-TDI (0.7mM) KD-TDI (3.6mM)



ノックダウンT09株および
Scramble株においてTDI
(0.7mMおよび3.6mM)
6時間刺激

遺伝子数 24,504個
6サンプル間で発現量に2倍
以上変動する遺伝子は216個
のみ

TDI刺激後に1.5倍以上の発現
変動を認めた遺伝子は112個

TDI刺激後の代表的な発現亢進遺伝子

Gene	SC-PBS	SC-TDI-M	SC-TDI-H	KD-PBS	KD-TDI-M	KD-TDI-H
CD69	16.5767	18.0048	23.9364	27.0201	29.4944	32.3015
jun D	14.7057	14.1889	18.524	23.7596	27.424	28.1896
EGR1	3.56104	5.04215	6.45532	4.86509	6.10607	9.08599
sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1PR4)	5.65033	5.06836	5.67821	7.15397	8.21484	9.18908
CXCR 4	0.442905	0.505799	0.500332	2.0963	1.66133	2.37982

CD69 : 気管支喘息患者の好酸球での発現亢進とIgE濃度との相関

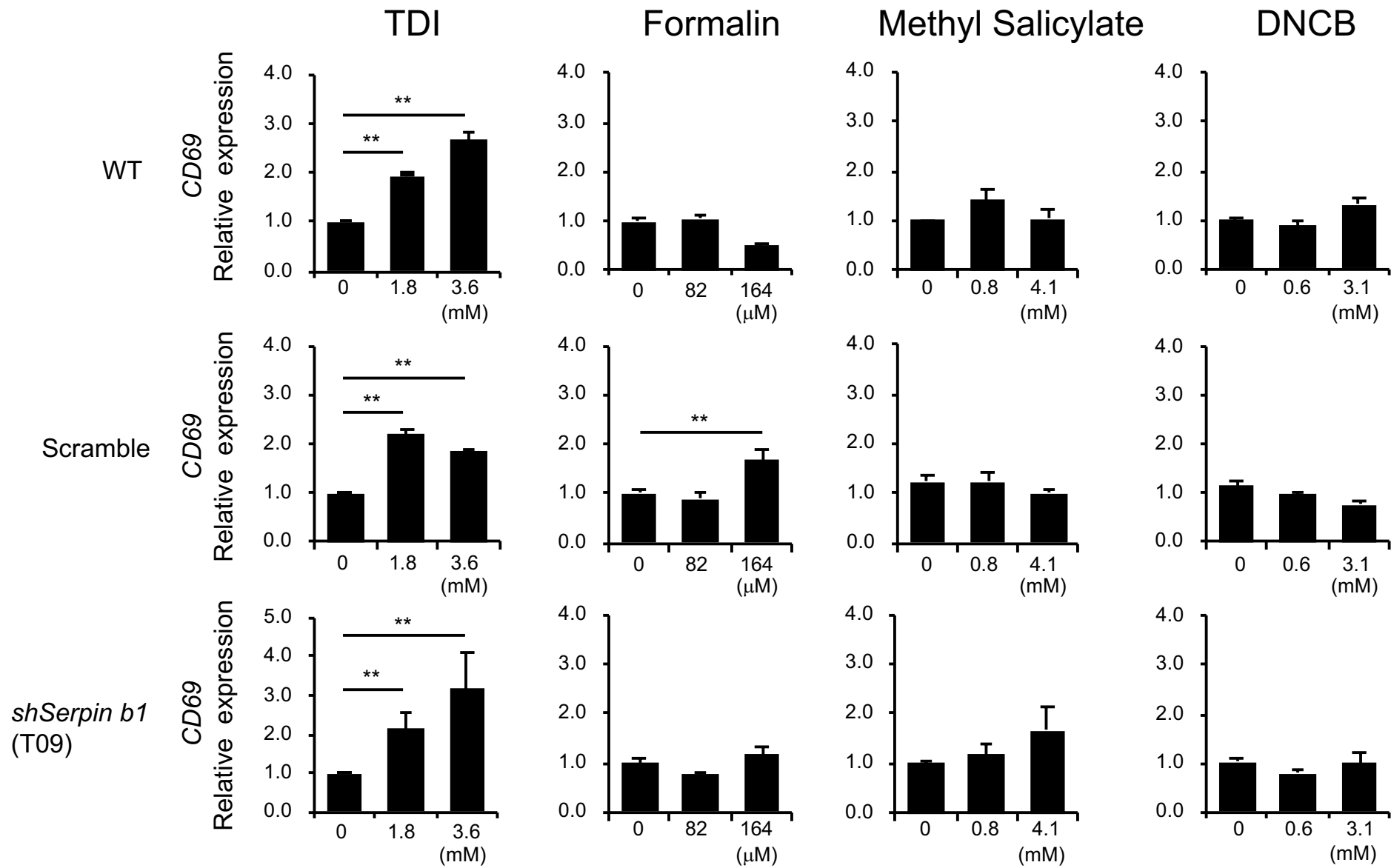
Jun D : 転写因子AP-1と複合体を形成し、サイトカイン産生の促進

EGR1 : 成長ホルモンの転写。CD69の転写因子の一つ

S1PR4 : 好中球の遊走促進。ヒト白血球数との相関

CXCR4 : ケモカイン受容体。HIV受容体。T細胞と樹状細胞、癌細胞（腺癌やリンパ腫など）に発現。

定量的PCRによるCD69mRNA発現解析



FACSによるCD69発現解析

1) 継代培養

細胞数 2×10^4 cells/ml (10cm dish)で 3日毎に継代

2) 前培養

細胞数 $4-5 \times 10^4$ cells/ml (0.9 ml /24 well plate)で 24時間

3) 刺激実験

化学物質100 ulを添加し、24時間後FACS解析

生死細胞染色 (Fixable Viability Stain 510) にて生存率
90%以上濃度で刺激

4) CD69発現解析

CD69-APC/Isotype control染色によりh-CLATと同じく
RFI (Relative fluorescence intensity)で評価

$$\text{RFI} = \frac{\text{GMFI}(\text{Chemical:anti-CD69ab}) - \text{GMFI}(\text{Chemical:isotype})}{\text{GMFI}(\text{PBS:anti-CD69ab}) - \text{GMFI}(\text{PBS:isotype})} \times 100$$

親株・ノックダウン株における化学物質刺激後のCD69発現

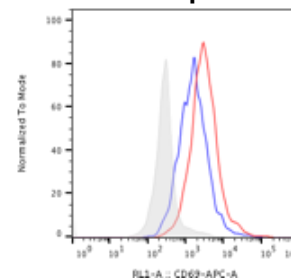
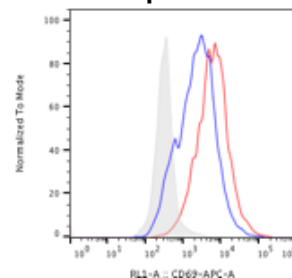
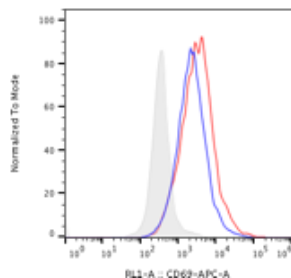
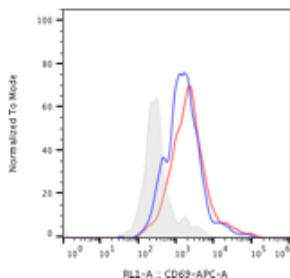
WT

Scramble

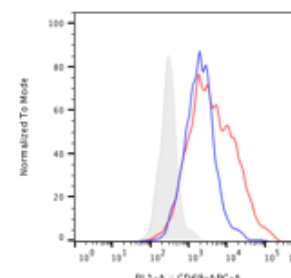
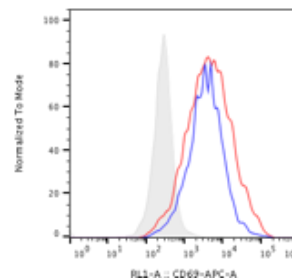
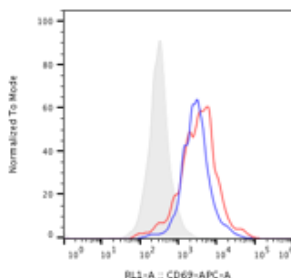
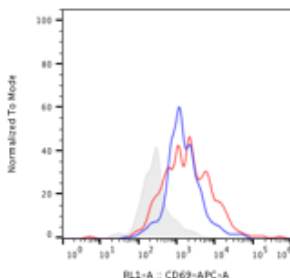
sh SerpinB1-T09

sh SerpinB1-11

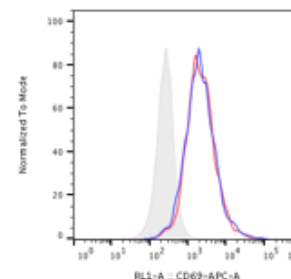
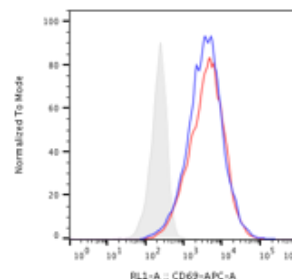
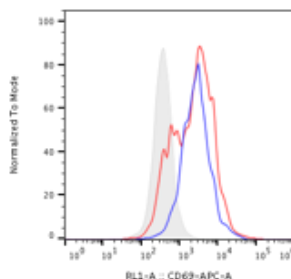
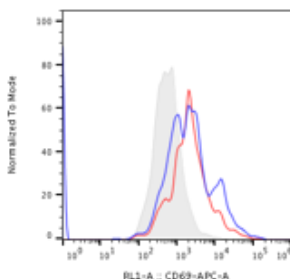
TDI
0.36 mM



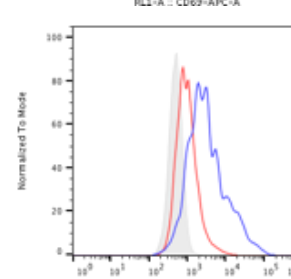
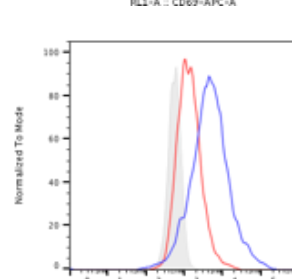
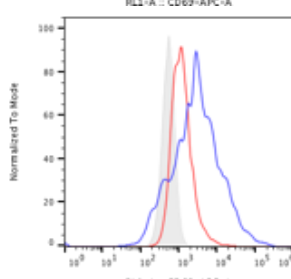
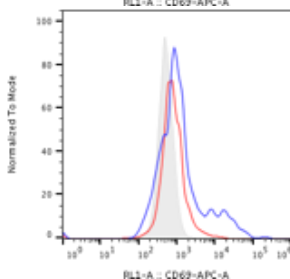
Formalin
0.083 mM



Methyl
salicylate
0.8 mM



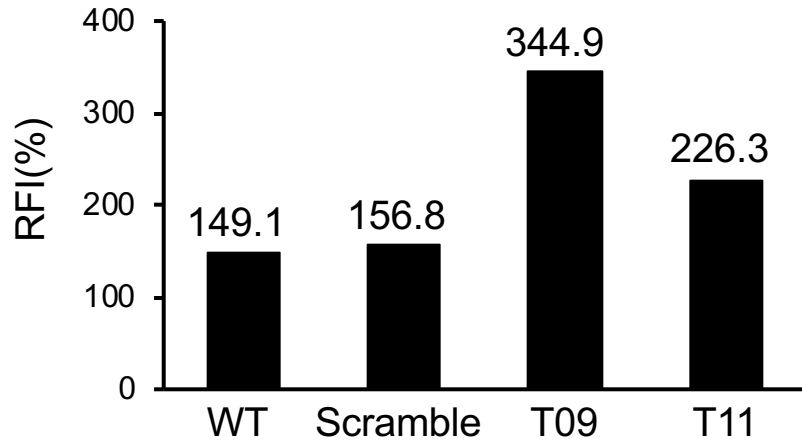
DNCB
0.6 mM



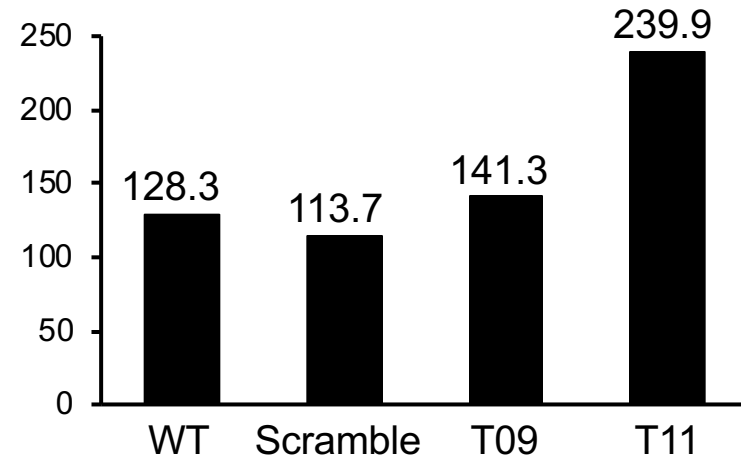
— isotype
— control
— chemical

親株・ノックダウン株における化学物質刺激後のCD69発現(RFI%)

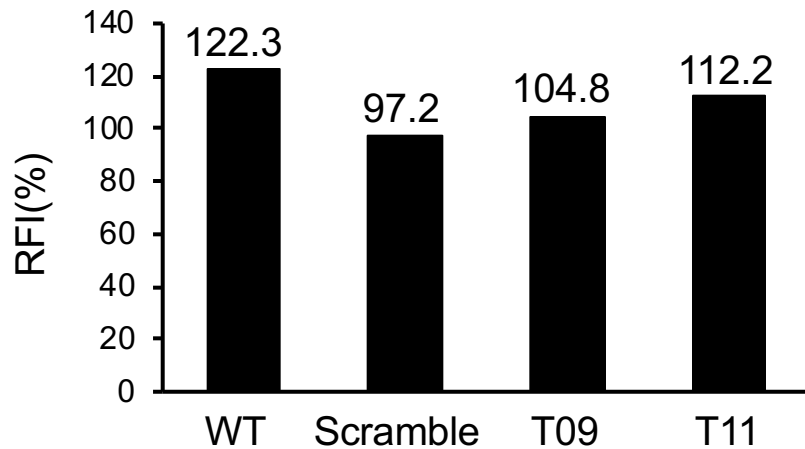
TDI: 0.36 mM



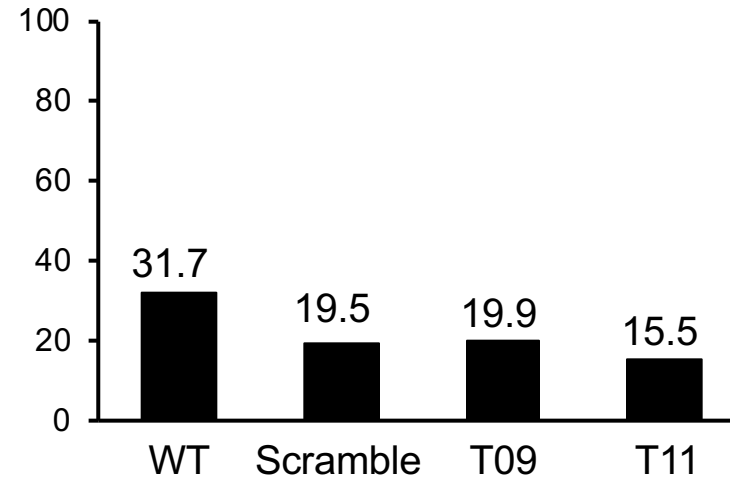
Formalin:0.083 mM



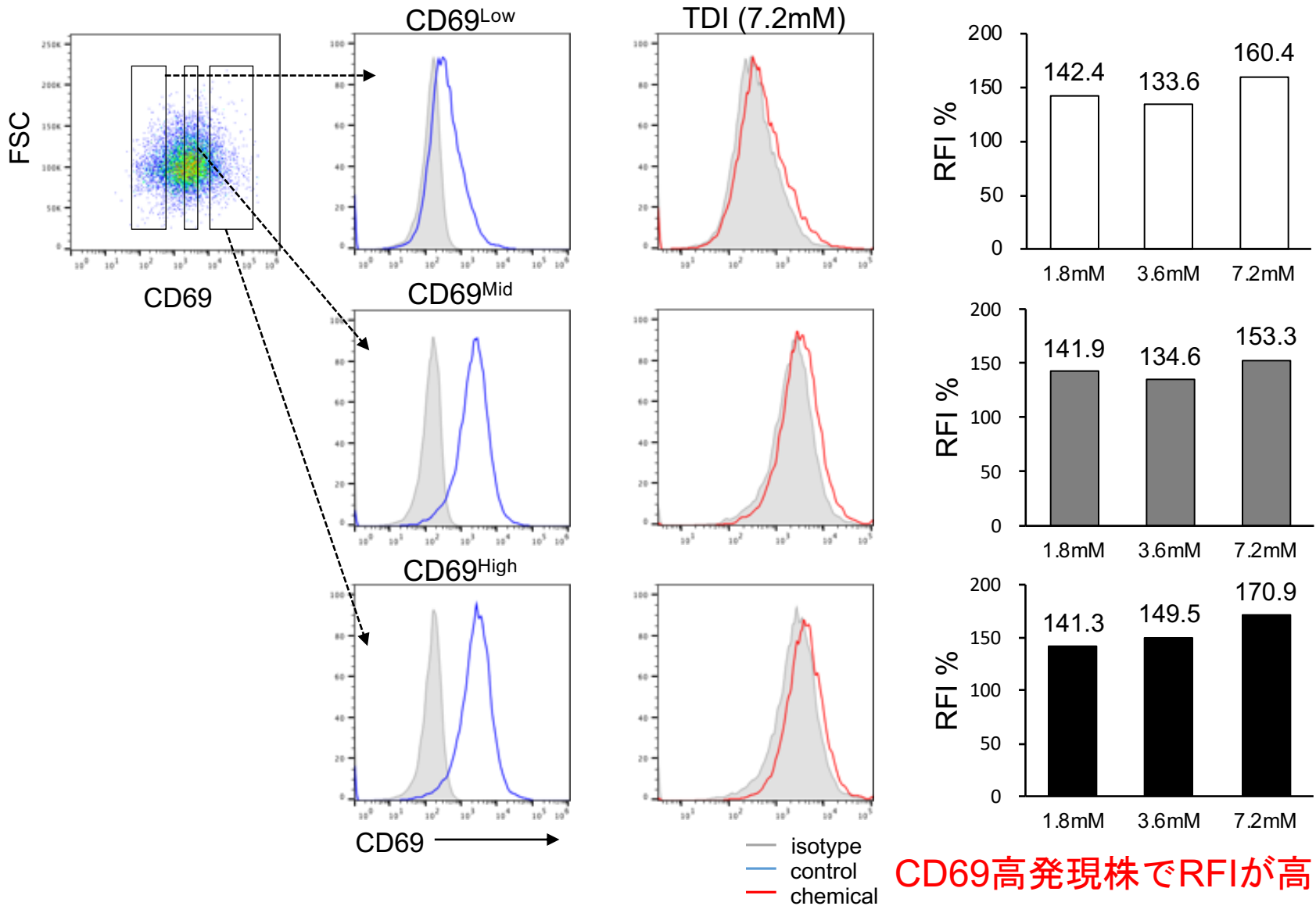
Methyl Salicylate: 0.8 mM



DNCB: 0.6 mM

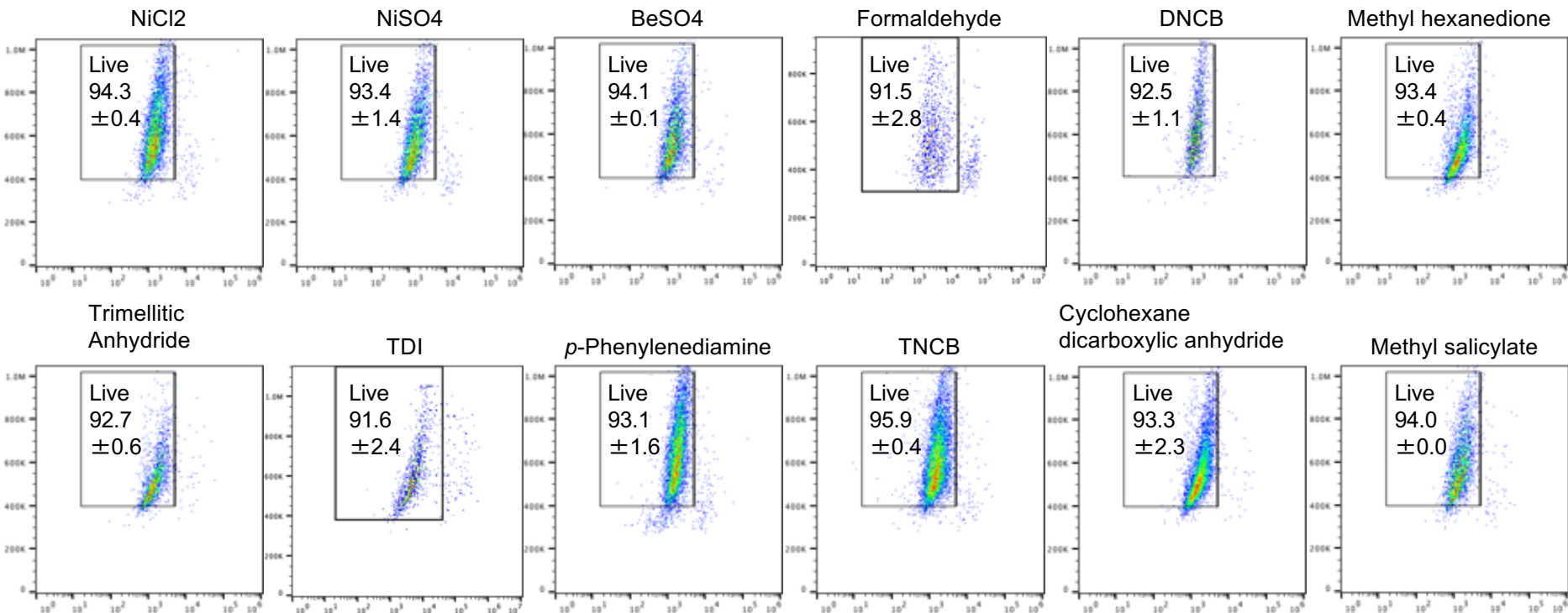


親株KU812-F株のCD69発現によるソーティング



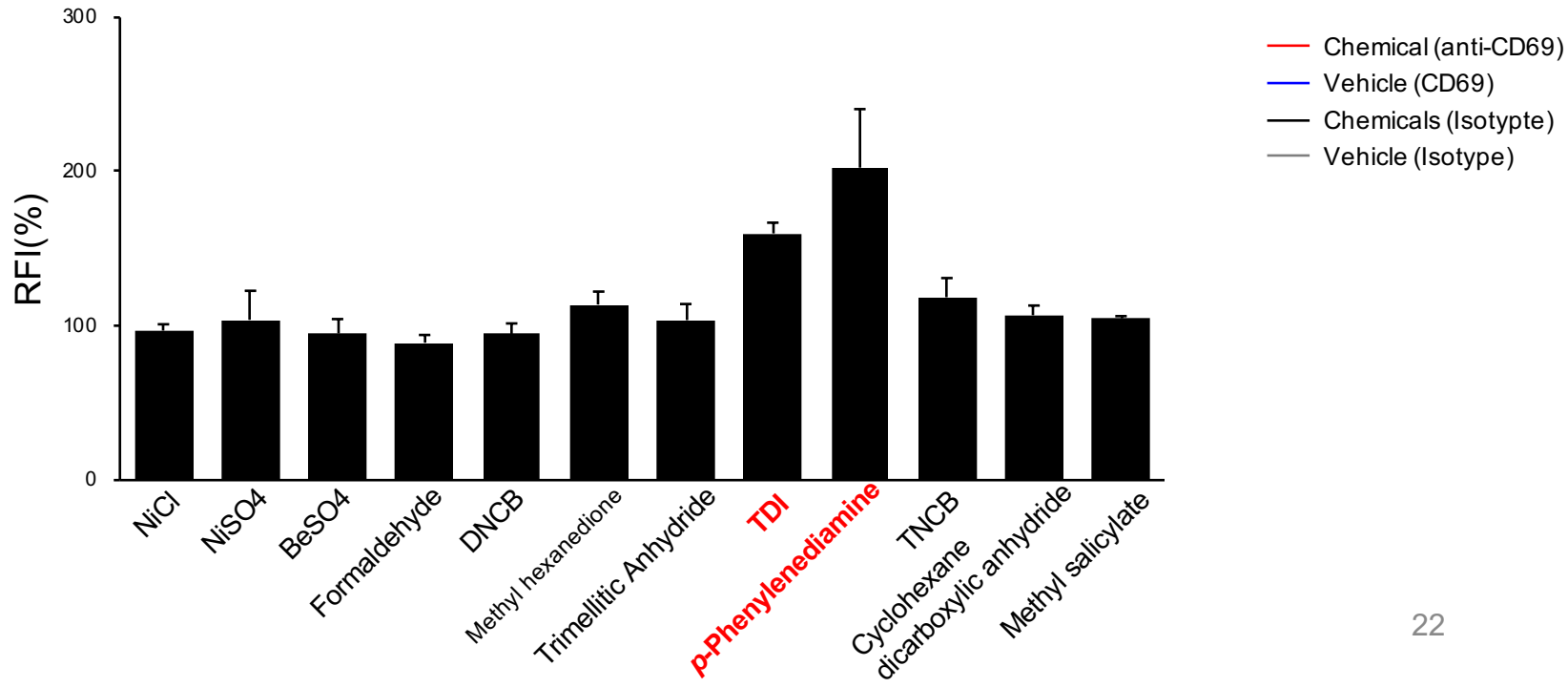
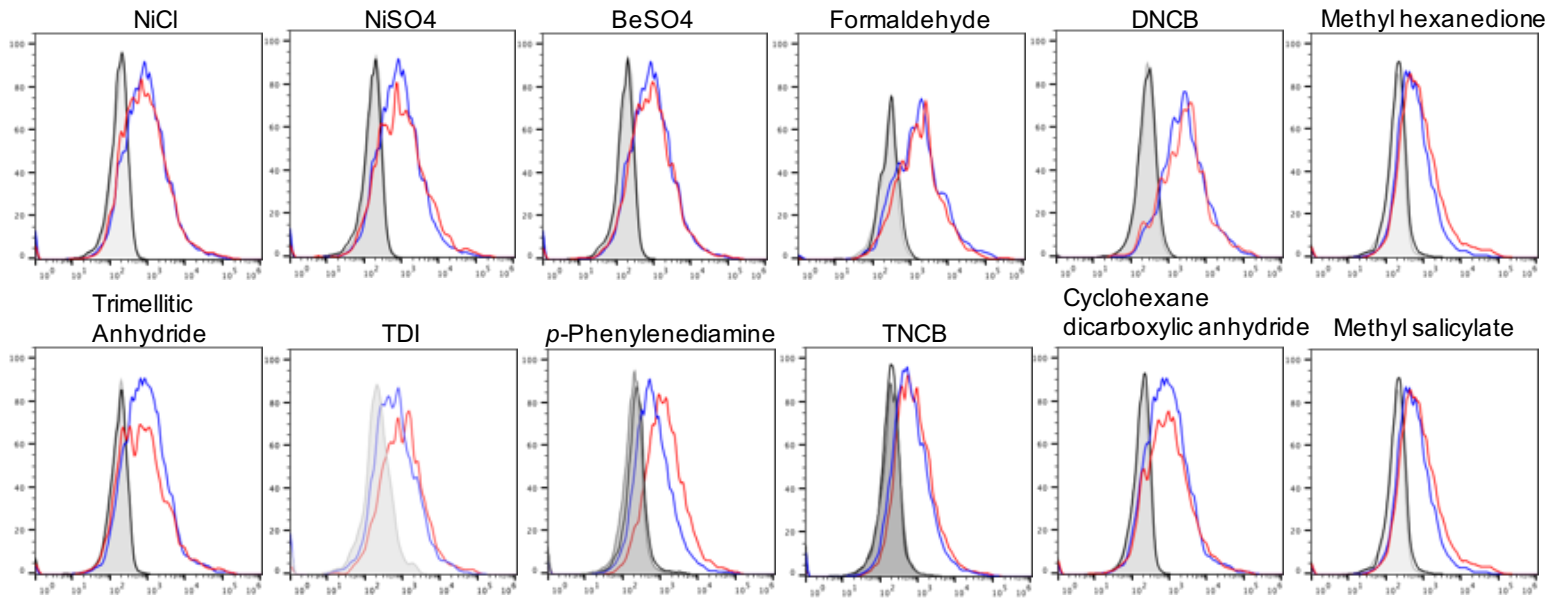
CD69高発現株でRFIが高い傾向

KU812-F株における化学物質刺激後のCD69発現



Chemicals	Concentration	Irritant	Solvent	Chemicals	Concentration	Irritant	Solvent
NiCl ₂	2.5 µg/ml (10 µM)	Skin	H ₂ O	Trimellitic Anhydride	2.5 µg/ml (13 µM)	Skin, Res	EtOH
NiSO ₄	2.5 µg/ml (9.5 µM)	Skin	H ₂ O	TDI	156 µg/ml (0.9 mM)	Res	DMSO
BeSO ₄	2.5 µg/ml (14 µM)	Skin	H ₂ O	<i>p</i> -Phenylenediamine	2.5 µg/ml (23 µM)	Skin, Res	DMSO
Formaldehyde	2.5 µg/ml (0.083 µM)	Skin, Res	H ₂ O	TNCB	5.0 µg/ml (20 µM)	Skin	DMSO
DNCB	0.625 µg/ml (3 µM)	Skin	EtOH	Cyclohexane dicarboxylic anhydride	2.5 µg/ml (16.2 µM)	Skin, Res	EtOH
Methyl hexanedione	2.5 µg/ml (19.5 µM)	Skin	EtOH	Methyl salicylate	5.0 µg/ml (32.9 µM)	Very Weak	EtOH

KU812-F株における化学物質刺激後のCD69発現



【結論と今後の展開】

結論

好塩基球細胞株KU812-F株とSerpine b1ノックダウン株においてTDI刺激後のサイトカインと表面抗原CD69の発現が亢進した。特にCD69のRFI値を指標とする解析が、呼吸器感作のスクリーニング系として有用となる可能性が示唆された

今後の展開

- 1) 呼吸器感作に関わるより多数の化学物質刺激実験
- 2) 細胞毒性の検討
- 3) 他施設での再現性の検討

