卵アレルギーモデル動物を用いた食物アレルギー発症機序の解明

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授　酒井　徹

■　目　的

NC/Nga(NC)マウスは、コンベンショナル環境下で飼育すると、ヒトのアトピー性皮膚炎に類似した皮膚症状を自然発症するアレルギーのモデル動物であり、現在アレルギー治療のモデル動物として広く用いられている。我々は、NC マウスのアレルギー発症のメカニズムを解析する過程で、このマウスは卵成分の一種である卵白アルブミン(OVA)抗原に対して過剰の免疫応答を示し、OVA 特異的 IgG2a 抗体が、正常マウスの 100 倍以上産生されることを見いだした。また、この原因遺伝子は単一劣性遺伝様式をとることも明らかにしている。本研究では、この原因遺伝子の染色体の位置を明らかにする。また併せて、NC マウスにおけるアレルギー発症に関わる抗原提示機能についても明らかとする。

■　方　法

ELISA 法による血清中の OVA 特異的 IgG2a 抗体産生量の測定

マウス頚動脈より血液を採取し、血清を分離した。OVA 特異的 IgG2a 測定は、ELISA 法により行った。

PCR

マウス尾部より GenElute Mammalian genomic DNA miniprep kit を用い DNA を抽出した。各染色体マイクロサテライトマーカー領域のプライマーを用い、PCR 反応を行った後、4%アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 反応により増幅された産物の大きさの解析を行った。

ウエスタンブロッティング

脾細胞より CD11c 陽性細胞を精製し、溶解バッファーにて試料を調製した。試料を 10%アクリルアミドゲルにて電気泳動した後に、PVDF 膜に転写を行った。カテプシン E およびカテプシン S タンパク質発現を、特異抗体および ECL plus キットを用いて検出を行った。

■　結果および考察

NC マウスに OVA 免疫を施し、OVA 特異的 IgG2a 抗体レベルを測定すると正常マウスである BALB/c マウスに比べ 100 倍以上産生が高いことを見いだした。この OVA 抗原に対する過剰の抗体産生の原因を明らかにするために、バッククロスマウスを用いて解析を行った。その結果は、NC マウスの卵成分に対する過剰の抗体産生は、単一劣性遺伝様式をとる遺伝子により支配されていることが判明した。この原因遺伝子を同定するために、まずマイクロサテライトマーカーによる原因染色体の染色体マッピングを試みた。本研究では 1 ～ 18 番染色体をカバーするマーカーを選択し解析を行った。χ^2 検定を行った結果、D9Mit296(3.001)および D12Mit141(4.227)の χ^2 値が高く、卵成分に対し過剰の抗体産生を引き起こす原因遺伝子はこのマーカーの近傍に存在する可能性がある。

免疫応答を調節する上で抗原提示細胞は免疫応答初期の応答を担う細胞群である。NC マウスは、アトピー様皮膚炎を自然発症するアレルギーのモデル動物である。アトピー様皮膚炎を自然発症するアレルギーのモデル動物としてはカテプシン E 遺伝子欠損動物が知られている。今回、抗原提示に関わる消化酵素であるカテプシン E の発現について解析を行ったところ、NC マウス樹状細胞におけるカテプシン E 発現は、BALB/c および DBA/2 マウスに比べ著しく低下していることが判明した。

■　結　語

NC マウスは、卵成分である OVA に対し過剰の IgG2a 抗体を産生し、この過剰抗体産生は単一の遺伝子により制御されていることが明らかになった。また、この原因遺伝子は染色体 9 又は 12 番に存在する可能性が示された。また、NC マウスは抗原提示に関わるカテプシン E の発現が著しく低下していることが明らかになった。