

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37409

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16165

研究課題名(和文)リン酸化酵素CaMKIIによるIgEクラススイッチ制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanism of IgE class switch recombination by CaMKII

研究代表者

田邊 香野 (Tanabe, Kano)

熊本保健科学大学・保健科学部・講師

研究者番号：20761282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：I型アレルギーに重要なIgEはB細胞がIgEクラススイッチ(IgE CSR)を起こすことで産生が開始される。しかし、同様の刺激でIgG1へとクラススイッチを起こすなど、それらの制御機構は未だ不明な点も多い。本研究ではCaMKIIがsequence CSRのIgG1からIgEへの制御にNF- $\kappa$ B alternative経路を介した経路として関与している可能性を見出した。さらにこれまで報告のなかったプロテインホスファターゼによるIgE CSR制御の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型アレルギーには共通してIgE産生が重要だが、その産生制御メカニズムの全貌は未だ明らかになっていない。今回の研究成果より、CaMKIIの活性がsequence CSRのIgG1からIgEへの制御に関与する可能性が見いだされた。これは今まで考えられていなかった増悪因子の検討につながる結果である。またプロテインホスファターゼによるIgE CSR制御はこれまで報告がなく、新たな制御機構の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Type I allergy is mediated by IgE antibody, which is produced by allergen specific B cells via IgE class switch recombination (CSR). However, the regulatory mechanism is unclear how to select IgE or IgG1 CSR. In this study, we show that CaMKII is involved in resulting IgE CSR via NF- $\kappa$ B alternative pathway. Furthermore, it is suggested that protein phosphatase may be important molecules for the regulation of IgE CSR.

研究分野：免疫学

キーワード：クラススイッチ CaMKII IgE プロテインホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

型アレルギー（花粉症や喘息、食物アレルギーなどが含まれる）は近年の罹患率の増加傾向から、国民病とも呼ばれており、実に多彩な症状を呈する。しかし、アレルギー反応には共通して B 細胞が産生する抗体の一種である IgE が重要な働きをしており、その産生には IgE クラススイッチ（以下、IgE CSR）反応が必須である。近年、この IgE 産生において次々と新しい分子メカニズムが報告され、従来の提唱されていた制御メカニズムよりも複雑であることが分かってきた。さらに、IgE には低親和性 IgE と高親和性 IgE があることが報告されており、これらは難治性アレルギーなどの病態に重要であると考えられている。これらは IgE CSR の過程に違いがあることが分かっており、低親和性 IgE は従来考えられていた通り IgM から IgE へ直接クラススイッチする方法である（以下、direct CSR）。一方、高親和性 IgE は一度 IgG1 を介してから IgE へのクラススイッチが起きる（以下、sequence CSR）。（図 1）

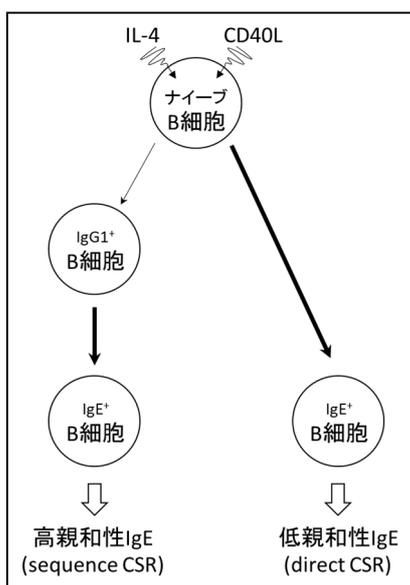


図 1

しかしこれらがどのようにして direct CSR もしくは sequence CSR を起こすように制御されているのかはよく分かっていない。申請者はこれまでに IgE CSR の制御に転写因子 NF- $\kappa$ B の alternative 経路の活性化が重要であり、さらにその活性化経路はリン酸化酵素であるカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMKII) による制御を受けていることを見出してきた。IgE CSR における NF- $\kappa$ B alternative 経路に関する報告として、2002 年に Bhattacharya D.らによって alternative 経路の活性化は IgG1 へのクラススイッチを抑制するが IgE CSR は変化しなかったと報告があるが、IgE CSR の詳細なメカニズムは未だ不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では CaMKII を介した NF- $\kappa$ B alternative 経路が direct CSR もしくは sequence CSR の IgG1 から IgE へのクラススイッチを制御しているのではないかと考え、IgE CSR の分子メカニズム解明を行うことにした。

## 3. 研究の方法

### (1) IgE CSR および IgG1 CSR (IgG4 CSR) の検出

CSR はそれぞれ指標となる GLT および 1GLT (ヒトの場合、4 GLT) をリアルタイム PCR を用いて評価する。

### (2) NF- $\kappa$ B alternative 経路の関与

NF- $\kappa$ B alternative 経路では TRAF3 のユビキチン化や p52 の核移行が活性化の指標となる。これらをウエスタンブロット法を用いて評価する。また制御分子の探索のため、分子の結合を免疫

沈降法または Ni-pull down 法により回収後、ウエスタンブロット法を用いて解析する。さらに分子のリン酸化は特異的リン酸化抗体もしくはフォスタグビオチンを用いてウエスタンブロット法で検出する。

### (3) CaMKII KO 細胞株の樹立

Electroporation 法を原理とする Neon Transfection System を用いて sh CaMKII プラスミドの恒常発現細胞株を作成し、CaMKII KO 細胞株の樹立を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) マウス B 細胞における IgE CSR への CaMKII 分子の関与

マウス脾臓 B 細胞を用いて、IgE CSR および IgG1 CSR の指標である GLT および 1GLT をリアルタイム PCR で検出したところ、マウスの系統 (BALB/c, C57BL/6) により CaMKII 阻害剤 KN-93 の与える影響が異なっていた。さらに多段階的な IgE CSR の制御分子の検討を行うには、より解析が行いやすく、KN-93 により GLT 合成抑制が顕著である BALB/c 系統から樹立されたマウス B 細胞株 M12 を用いて IgE CSR の影響を解析した。M12 細胞はすでに IgG1 に CSR が完了している細胞株であり、IL-4 と抗 CD40 抗体によって GLT が誘導されることが明らかとなっているため、sequence CSR への CaMKII の影響が検討できると考えた。

M12 細胞では KN-93 により GLT の誘導が抑制されることを明らかにしていたが濃度依存的に GLT が抑制されることが明らかとなった。さらに CaMKII が NF- $\kappa$ B alternative 経路に重要な TRAF3 のユビキチン化を増強することを明らかとしていたため、CaMKII が TRAF3 をリン酸化することがユビキチン化に重要ではないかと考え、TRAF3 のリン酸化を M12 細胞や 293T 細胞を用いて検討した。TRAF3 のリン酸化は検出されなかったが、CaMKII と TRAF3 が直接結合していること、結合している CaMKII はリン酸化が生じており、活性化を示唆する結果を得た。またこの過程により、CaMKII と関連性が深いプロテインホスファターゼの一種である PP2A ファミリー分子の関与が見いだされた。

CaMKII は B 細胞における機能はほぼ報告されていないが中枢神経系ではよく研究されており、CaMKII と関連する PP2A ファミリー分子との関連性は深い。PP2A ファミリー分子は TRAF3 と結合し、ユビキチン化を増強させることが明らかとなった。さらに PP2A ファミリー分子阻害剤であるオカダ酸による処理を行うと、M12 細胞において GLT の合成抑制を示し、p52 も核移行も抑制したことから CaMKII と PP2A ファミリー分子がともに IgG1 から IgE への CSR を NF- $\kappa$ B alternative 経路を介して制御している可能性を見出した。これまで PP2A ファミリー分子が NF- $\kappa$ B alternative 経路を介して IgE CSR の制御に関与するという報告はなく、新しい制御機構の一端が明らかになった可能性が示唆された。

### (2) ヒト B 細胞株を用いた IgE CSR 制御解析

M12 細胞では Direct CSR の解析ができないため、IL-4 反応性を持ち、IgM を有したヒト B 細胞株 Ramos2G.6 を用いて CaMKII による制御の検討を行った。Ramos2G.6 細胞では M12 細胞と異なり、KN-93 による GLT 抑制が認められなかったが、Ramos2G.6 細胞は CaMKII や PP2A ファミリー分子の発現があることがウエスタンブロット法で確認されたため、sh CaMKII を Electroporation 法 (1350V, 30msec, 1puls) を用いて導入し、CaMKII KO 細胞株を樹立することを目指した。しかし、sh CaMKII の導入は Ramos2G.6 細胞では致命的であり、樹立は行えなかった。

一方、Ramos2G.6 細胞を用いてオカダ酸による GLT および 4GLT の影響を検討したが、十分な有意差は検討できなかった。これは Ramos2G.6 細胞のホスファターゼ活性を測定したところ抗 CD40 抗体単独刺激では活性が認められたが、IL-4/抗 CD40 抗体で刺激では活性の増加が認められなかったことから、Direct CSR と Sequence CSR では関与する制御分子に違いがある可能性が示唆された。

ただし、本研究では解析条件の単純化を図るために、マウスとヒトと異なる種の細胞株を中心に解析を行ったことから、種の違いによる制御分子の違いが認められた可能性も否定はできない。さらに Ramos2G.6 細胞を用いて、homotypic aggregation についての検討も行った。B 細胞は IL-4/CD40L 刺激により homotypic aggregation を起こすことが古くからよく知られている。それに反して homotypic aggregation の意義はよく分かっていない。本研究ではオカダ酸処理を行うことで homotypic aggregation 形成とその持続に影響を与えることが明らかとなった。

さらに Ramos2G.6 細胞の刺激に伴う細胞表面および細胞内分子の変化をフローサイトメトリー法を用いて検討した。すると、刺激に応じて膜表面 IgM の低下が認められ、これはオカダ酸処理によりさらに低下傾向を示した。一方、細胞内の IgE はオカダ酸処理により増加傾向を示した。このことから PP2A サブファミリー分子は B 細胞の homotypic aggregation や IgE 合成に影響を与える可能性が見いだされた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kano Tanabe, Ryutaro Kajihara	4. 巻 44
2. 論文標題 The role of protein phosphorylation in the regulation of class switch recombination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 545-558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 田邊香野	4. 巻 18
2. 論文標題 リンパ球におけるCaMKIIの機能と役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 熊本保健科学大学研究誌	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 田邊香野	4. 巻 17
2. 論文標題 CaMKIIはTRAF3のユビキチン化を介してIgEクラススイッチを制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 科学評論社 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 294-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田邊 香野、上妻 行則
2. 発表標題 Protein phosphatase is involved in the maintenance of homo typical aggregation by CD40 stimulation in Ramos cells.
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kano Tanabe, Seiji Inui
2. 発表標題 Protein phosphatase enhances IgE class switch recombination, but to no IgG4
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kano Tanabe
2. 発表標題 CaMKII and protein phosphatase regulates IgE class switch recombination via TRAF3 ubiquitination
3. 学会等名 World Allergy Congress (WAC) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊香野
2. 発表標題 PP6はNF- B alternative経路を介したIgEクラススイッチ制御に関与する
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊香野
2. 発表標題 プロテインホスファターゼはIgEクラススイッチを促進する
3. 学会等名 第9回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊香野
2. 発表標題 Alpha4 enhances IgE class switch recombination via ubiquitination of TRAF3 in NF- B alternative pathway
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------