

博士論文

論文題目

TGF- β および IL-10 による協調的液性免疫制御機構の解明

氏名 井上 眞璃子

目次

要旨	2
序文	3
方法	8
結果	
1) TGF- β は抗 IgM 抗体刺激および、抗 CD40 抗体/IL-4 刺激による B 細胞増殖を抑制する	17
2) TGF- β は LPS 刺激下における B 細胞活性化を抑制出来ない	18
3) TGF- β および IL-10 は協調的に液性免疫を制御する	21
4) TGF- β および IL-10 は協調してオートファジーを抑制する	24
5) TGF- β および IL-10 は協調して eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路を抑制する	26
6) TGF- β および IL-10 による IL-6 産生制御	27
7) TGF- β 3 は IL-10 と協調して TLR7 アゴニストによるループス様病態を改善する	28
考察	31
謝辞	38
参考文献	39
図	51

要旨

TGF- β および IL-10 は代表的な抑制性サイトカインであるが、向炎症性作用も有しており、両サイトカインによる協調的作用は解明されていない。本研究では TGF- β および IL-10 の B 細胞に及ぼす影響を検討した。TGF- β は、抗 CD40 抗体および IL-4 刺激による抗体産生を抑制したが、TLR 刺激下では IL-10 の存在がその抑制能に必要であった。IL-10 添加による協調的阻害作用は、eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路抑制を介した B 細胞オートファジー制御によるものと考えられた。両サイトカインによる協調的液性免疫制御は、自己抗体産生機序を介する自己免疫疾患の新規治療法開発に繋がる可能性を内包している。

序文

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は、抗核抗体、抗 double strand DNA (ds-DNA) 抗体などの多彩な自己抗体産生を特徴とし、腎臓・皮膚・神経など全身性に障害が起こる難治性全身性自己免疫疾患である。自己反応性 T 細胞や B 細胞の活性化、各種自己抗体による免疫複合体の組織沈着などがその病態形成に関与すると考えられている¹。SLE の病態形成において B 細胞は、自己抗体や過剰な炎症性サイトカインの産生に加えて、自己抗原提示、炎症性 CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性細胞誘導など中心的な役割を担っており、自己抗体産生メカニズムを介する自己免疫疾患の治療ターゲットとして B 細胞が近年注目されてきている²。B 細胞表面に発現する CD20 に対する抗 CD20 抗体であるリツキシマブ (Rituximab) は、B 細胞の直接障害やアポトーシスを誘導する。オープンラベル試験や症例報告では SLE に対する有効性が示されているが^{3, 4}、大規模臨床試験では明らかな効果は示されず^{5, 6}、臨床試験における患者選択や併用薬剤の問題が指摘されている。B 細胞表面に発現し、抑制性のシグナルを伝達する CD22 に対する抗体、エプラツズマブ (Epratuzumab) は第 III 相試験が進行中である⁷。また、B 細胞の生存に必須なサイトカイン B cell activating factor (BAFF) に対する中和抗体であるベリムマブ (Belimumab) は臨床試験にて有効性が認められ^{8, 9}、2011 年にアメリカ食品医薬品局 (FDA) に 56 年ぶりに SLE 治療

の新規薬剤として認証された。その他多様な新規薬剤が SLE に対する治療薬として検討されているが実用化に至る薬剤は限られており、新たな治療戦略の開発が求められている。

制御性 T 細胞 (regulatory T: Treg) は免疫応答の抑制的制御 (免疫寛容) を司る T 細胞サブセットであり、その機能障害は自己免疫性疾患発症に直結することより¹⁰、自己免疫性疾患治療への応用が期待されている。Treg は胸腺で誘導される胸腺由来 Treg (tTreg) と末梢 (胸腺外) で誘導される末梢性 Treg (pTreg) に大きく分類され、tTreg としては、転写因子 forkhead box P3 (Foxp3) をマスター制御遺伝子とする CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞が知られている^{11, 12}。免疫学的恒常性は、tTreg と pTreg が協調することで保たれているが、近年まで pTreg の特異的な細胞表面マーカーや転写因子が不明であり、pTreg 研究の大きな障害となっていた。当研究室では、末梢で誘導され、定常状態において転写因子 Egr2 を特異的に発現する CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性 Treg (以下、LAG3⁺ Treg) を同定した^{13, 14}。LAG3⁺ Treg は抑制性サイトカイン IL-10 を高産生し、活性化 T 細胞を制御する。近年我々は、LAG3⁺ Treg が Egr2 および Fas 発現依存性に transforming growth factor-β3 (TGF-β3) を産生すること、またループモデル MRL-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) マウスにおける自己抗体産生および病勢を TGF-β3 依存性に改善することを明らかにした¹⁵。

TGF- β は細胞の分化・遊走・接着、個体発生、創傷治癒、炎症・免疫、癌の浸潤・転移など幅広い領域に重要な役割を担っているサイトカインである。TGF- β には TGF- β 1, β 2, β 3 の3つのアイソフォームがあり、このうち TGF- β 1 が免疫調整作用をもつサイトカインとして広く知られている。TGF- β 1 が T 細胞に及ぼす影響として、naïve CD4⁺ T 細胞から Foxp3⁺ Treg を誘導する一方、IL-6 存在下ではヘルパーT細胞のサブセットの一つである IL-17 産生性 Th17 細胞を誘導し、SLE、関節リウマチを始めとする各種自己免疫性疾患の病態形成に関与していると考えられている。また、TGF- β 1 は naïve CD4⁺ T 細胞から Th1, Th2 への分化を抑制する^{16, 17}。一方、近年まで TGF- β 2 および TGF- β 3 は免疫学的恒常性維持に主要な役割を果たしていないと考えられてきたが^{18, 19, 16}、2012年に Kuchroo らが、IL-6 存在下において TGF- β 3 がより病原性の強い Th17 細胞を誘導することを報告した²⁰。またクロマチン制御因子 TRIM28 欠損マウスにおける検討では、T 細胞からの亢進した TGF- β 3 産生が IL-17 産生を誘導することも報告され²¹、免疫制御機構における TGF- β 3 の役割が注目されてきている。

B 細胞に対して TGF- β 1 は増殖や活性化を阻害することが知られている¹⁹。マウス B リンパ球前駆細胞では TGF- β 1 により B 細胞の分化を促進する転写因子である E2A の阻害蛋白 Id3 が誘導され、B リンパ球前駆細胞の増殖が阻害される²²。また、マウ

ス脾細胞から分離した B 細胞において TGF- β 1 は B 細胞受容体 (B cell receptor: BCR) シグナルを抑制する Ship-1 や CD72 の発現を誘導し、BCR シグナルを制御する²³。マウス B 細胞株においては、TGF- β 1 はサイクリン依存キナーゼインヒビターである p27^{Kip1} 発現を誘導する²⁴。抗体産生に関しては、TGF- β 1 は *in vitro* で LPS 刺激されたマウス B 細胞の IgA へのクラススイッチを誘導して IgA 産生を増強させることが知られている^{25, 26}。TGF- β 1 が B 細胞上に存在する TGF β レセプターII (TGF β RII) と TGF β RI からなるヘテロマーに結合すると、リン酸化された Smad2 および Smad3 が核内へ移行し、IgA へのクラススイッチに必要な constant heavy chain α (C α) のプロモーター領域に結合することで、IgA へのクラススイッチが誘導されることが報告されている²⁷。一方、TGF- β 1 は *in vitro* で IL-4 によって誘導されるマウス B 細胞の IgG1 産生を抑制する²⁸。生体内では B 細胞特異的に TGF β RII をノックアウトしたマウスの血清 IgG 濃度は上昇し、血清 IgA 濃度は減少することも示されている²⁹。このように、TGF- β 1 は液性免疫においても促進性、抑制性の両作用を有している。

一方で、TGF- β 3 による免疫抑制作用については不明なままであったが、近年我々は、TGF- β 3 が強力な液性免疫制御能を有し、ループスモデルマウスの病勢を改善することを報告した^{15, 30}。しかしながら、SLE の病態形成において B 細胞における Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 2、4、7、8、9 シグナルが亢進することが広く知ら

れており³¹、これら自然免疫系を介した液性免疫制御機構における TGF- β 3 の役割は不明なままであった。

本研究では、LAG3⁺ Treg が高産生する抑制性サイトカインである TGF- β 3 および IL-10 による液性免疫制御機構につき、獲得免疫系、自然免疫系の両面から TGF- β 1 との異同も含め詳細な検討を行った。

方法

マウス

7-8 週齢のメス C57BL/6J (B6) マウスおよびメス BALB/c マウスは日本 SLC から購入した。MyD88 ノックアウトマウスおよび TRIF ノックアウトマウスはオリエンタル酵母工業から購入した。8 週齢のメス GFP-LC3 マウス³²は理研 BRC より購入した。全てのマウスは specific pathogen free 環境で飼育し、7-9 週齢のマウスを実験に用いた。本研究は東京大学第二種使用等拡散防止措置（部局認証番号 29-6）および動物実験計画（認証番号 医-P14-121）において承認を受け、東京大学のガイドラインに基づいて行った。

試薬

Recombinant TGF- β 1 (rTGF- β 1) および rTGF- β 3 は Miltenyi Biotec、rIL-10 は R&D、rIL-4 は Cell Signaling、抗マウス IgM F (ab')₂ フラグメント (α IgM) は Jackson ImmunoResearch Laboratories、CpG-ODN1826 (CpG) は Enzo Life Sciences、抗 CD40 抗体 (α CD40) は BD Pharmingen、R-848 は Enzo Life Sciences、Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5 (LPS) は SIGMA より購入した。

APC-Cy7 抗 B220 抗体 (RA3-6B2, 2:100) 、7-AAD (3:100) は BioLegend より、抗

phospho-Syk 抗体、抗 Syk 抗体、抗 phospho-STAT6 抗体、抗 STAT6 抗体は Cell Signaling より購入した。

B 細胞は RPMI-1640 に 10% FBS、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、50 μM 2-メルカプトエタノール(全て Sigma から購入) を添加した培地を用いて培養した。

B 細胞の分離

B 細胞はマウス脾細胞を単離したのち、B cell アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いた magnetic-activated cell sorting (MACS) システムにて以下の手順で採取した。マウス脾臓を採取後、細かく切断して 70 μm セルストレイナー (BD Bioscience) にて単細胞にした後、ACK lysis buffer にて赤血球を溶血した。細胞溶液 400 μL に biotin-antibody cocktail (CD43, CD4, Ter-119 に対する monoclonal 抗体カクテル) を 100 μL 加え 4°C で 10 分間反応させた後、anti-biotin microbeads を 200 μL 加え 4°C 15 分反応させ、LS カラムを用い negative selection により B 細胞を分離した。分離後、抗 B220 抗体にて染色を行い FACS で解析したところ purity は 95%以上であった。

B 細胞培養

細胞増殖の測定には、0.2 $\mu\text{g/ml}$ の 5- or 6- (N-スクシンイミジルオキシカルボニル)フルオレセイン 3',6' -ジアセテート (CFSE; Dojindo) で 37°C 10 分標識させた B 細胞を用いた。96 well flat bottom プレートに分離した B 細胞を 3×10^5 個/well、RPMI 培地を 100 $\mu\text{L/well}$ 加え、 αIgM 10 $\mu\text{g/ml}$ 、LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 、R-848 200 ng/ml にて刺激し、rTGF- β 1 2 ng/ml または rTGF- β 3 2 ng/ml および IL-10 50 ng/ml を加えて 37°C で 3 日間培養した。細胞を回収後、APC-Cy7 抗 B220 抗体、7-アミノアクチノマイシン D (7AAD) で染色し、FACSVantage SE (BD Bioscience) にて解析した。得られたデータは FlowJo Software (Tree star) を用いて解析した。

抗体濃度測定、サイトカイン濃度測定

抗体濃度測定および IL-6 濃度測定には、B 細胞を αCD40 10 $\mu\text{g/ml}$ 、IL-4 20 ng/ml 、LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 、R-848 200 ng/ml 、CpG 1 μM で刺激し、rTGF- β 1 2 ng/ml または rTGF- β 3 2 ng/ml および IL-10 50 ng/ml を加えて 37°C で 7 日間培養した上清を用いた。上清中のイムノグロブリン濃度は Mouse IgG、IgM、IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories) を用い、製造者の説明書に基づいて測定した。IL-6 濃度測定には、Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) を用いた。

ウエスタンブロット

MACS システムで分離したマウス B 細胞を CpG-ODN 刺激で 72 時間培養し、最後の 16 時間は rTGF- β 3 20 ng/ml を添加した。その後 α IgM 10 μ g/ml または rIL-4 10 μ g/ml で刺激し、0、1、5、15 分後に細胞を回収した。回収した細胞は Halt Protease Inhibitor cocktail kit (Thermo Fisher, 1:100) を加えた lysis buffer (50 mM Tris-HCL、0.15 M NaCl、1% Triton-X、1 mM EDTA) で処理し、2 \times Laemmli Sample Buffer (Sigma) を加え 95°C 5 分間反応させた。BCA Protein Assay kit (Pierce) にて総タンパク質濃度を測定してサンプル間のタンパク濃度をそろえた後、7.5%ミニプロテイン TGX プレキャストゲル (Bio-Rad) にて泳動し、Immobilon-P PVDF メンブレン (Millipore) に転写、5% BSA でブロッキングした。抗 phospho-Syk 抗体、抗 Syk 抗体、抗 phospho-STAT6 抗体、抗 STAT6 抗体 (すべて 1:1000) で一晩 4°C にて反応後、ヤギ抗ウサギ IgG - horseradish peroxidase (HRP) (Invitrogen, 3:10000) で 1 時間室温で反応させ、ECL Prime (GE Healthcare) を用いて検出した。

RNA 抽出、cDNA 合成、定量的 RT-PCR

RNA は RNeasy Micro kit (QIAGEN) を用いて製造者の説明書に基づいて抽出し、SuperScript III (Invitrogen) および Random Primers (Invitrogen) を用いて cDNA に逆

転写した。定量的 RT-PCR (qRT-PCR) は QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)

を用いて iCycler (Bio-Rad) にて行った。β-アクチンに対する目的遺伝子の相対的な

RNA 発現量を測定した。

qRT-PCR に用いたプライマー配列は以下の通りである。

Atf4_FW : 5'-TCGATGCTCTGTTTCGAATG-3'

Atf4_RV : 5'-GGCAACCTGGTCGACTTTTA-3'

Atg12_FW : 5'-GGCCTCGGAACAGTTGTTTA-3'

Atg12_RV : 5'-CAGCACCGAAATGTCTCTGA-3'

Atg161l_FW : 5'-GCCCAGTTGAGGATCAAACAC-3'

Atg161l_RV : 5'-CTGCTGCATTTGGTTGTTTCAG-3'

Cebpb_FW : 5'-ATCGACTTCAGCCCCTACCT-3'

Cebpb_RV : 5'-TAGTCGTCGGCGAAGAGG-3'

Ddit3_FW : 5'-CCTAGCTTGGCTGACAGAGG-3'

Ddit3_RV : 5'-CTGCTCCTTCTCCTTCATGC-3'

Map11c3b_FW : 5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'

Map11c3b_RV : 5'-ATTGCTGTCCCGAATGTCTC-3'

Pkr_FW : 5'-CCTCAGAGAACGTGTTTACG-3'

Pkr_RV : 5'-TCAATTCTGTGTTTCGCTTT-3'

Sqstm1_FW : 5'-TGGGCAAGGAGGAGGCGACC-3'

Sqstm1_RV : 5'-CCTCATCGCGGTAGTGCGCC-3'

Actb_FW : 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'

Actb_RV : 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'

GFP-LC3 解析

GFP-LC3 マウスより MACS システムにて B 細胞を単離し、96 well flat bottom プレートに 3×10^5 個/well 加え、LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 、rTGF- β 3 2 ng/ml、IL-10 50 ng/ml を添加して 37°C で 3 日間培養した。培養後細胞を回収し、APC-Cy7 抗 B220 抗体、7AAD で染色したのち、0.05% のサポニンで 2 分間処理後 FACS にて GFP の蛍光強度を観察した。

次世代シーケンス解析サンプル作製、解析方法

24 well プレートに MACS にて単離した B 細胞を 3.3×10^6 個/well、RPMI 培地を 1 ml/well で加え、LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ で刺激し、rTGF- β 1 2 ng/ml または rTGF- β 3 2 ng/ml および IL-10 50 ng/ml を加えて 37°C で 3 日間培養した。細胞を回収後、APC-Cy7 抗 B220 抗体、7-アミノアクチノマイシン D (7AAD) で染色し、7AAD⁻B220⁺細胞を 1×10^7

個ソートし、RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。

シーケンスライブラリーの作成には、TruSeq Stranded mRNA HT Sample Preparation Kit (イルミナ) を使用した。total RNA より polyA⁺ RNA を単離したのち断片化し、この RNA 断片を鋳型として逆転写反応により一本鎖 cDNA を合成した。この一本鎖 cDNA を鋳型として dUTP を取り込ませた二本鎖 cDNA を合成し、得られた二本鎖 cDNA の両末端を平滑化・リン酸化処理した後、3'-dA 突出処理を行い、index 付きアダプターを連結した。アダプターを連結した二本鎖 cDNA を鋳型とし、dUTP を持つ鎖を選択的に増幅しないポリメラーゼにより PCR 増幅を行い、シーケンスライブラリーとした。次世代シーケンサーHiSeq 2500 (イルミナ) にて、シーケンス解析を行った。シーケンス解析で得られたデータは、TopHat2³³ にて参照配列 UCSC mm10 にマッピングを行い、HTseq³⁴ を用いてリードカウントを算定した。各サンプル間の正規化および Differentially Expressed Genes (DEGs) の検出 (I/NI value > 0.2) は、R Dexus package³⁵ を用いて行った。検出された DEGs に関するヒートマップおよびクラスタリングは R Heatplot package を用いた。

プラスミドベクター作製

TGF-β3 フラグメントは TGF-β3 cDNA を含む OmicsLink Expression-Ready

ORF-cloning vector (GeneCopoeia) を用いて単離し、EcoRI 部位で pCAGGS ベクター³⁶にサブクローニングし pCAGGS- Tgfb3 を作製した。プラスミド pCAGGS-II10 は大阪大学宮崎純一博士より供与を受けた³⁷。プラスミドはコンピテントセル *Escherichia coli* JM109 (東洋紡) に形質転換させた後増幅し、EndFree plasmid Maxi kit (Qiagen) を用い製造者の説明書に基づいて精製した。

プラスミドベクター投与

精製したプラスミド pCAGGS-Tgfb3 は 100 µg を乳酸リンゲル液 100 µl に溶解し、眼窩静脈叢に注射を行った³⁸。プラスミド pCAGGS-II10 は乳酸リンゲル液に 0.1 mg/g body weight で溶解し、尾静脈より急速静注した。プラスミドベクターは 2 週間毎に計 2 回投与した。

イミキモドクリーム塗布

7 週齢のメス BALB/c マウスを用い、週 3 回右耳に 5%イミキモド (IMQ) クリーム (持田製薬) 1.25 mg を塗布した。

血清抗 ds-DNA 抗体濃度測定

レビス ds-DNA マウス ELISA KIT (シバヤギ) を用いて定法に従い血清中の抗 ds-DNA 抗体価を測定した。

結果

1) TGF- β は抗 IgM 抗体刺激および、抗 CD40 抗体/IL-4 刺激による B 細胞増殖を抑制する

B 細胞受容体 (B cell receptor: BCR) 刺激による B 細胞活性化における TGF- β 1 および TGF- β 3 の影響につき検討を行った。マウス脾細胞より分離した B 細胞を carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) にてラベルし、TGF- β 1 または TGF- β 3 存在下、非存在下にて α IgM で刺激し、3 日間培養した。その結果、TGF- β 1、TGF- β 3 ともに B 細胞の増殖を完全に抑制した (図 1a)。さらに、TGF- β 3 によるシグナル伝達機構への影響についても検討を行った。 α IgM により B 細胞受容体 (B cell receptor: BCR) が架橋されると、spleen tyrosine kinase (Syk) がリン酸化され、その後のカスケードが進行することで細胞増殖が誘導される³⁹。TGF- β 1 は α IgM 刺激による Syk のリン酸化を抑制することが報告されている²³。B 細胞を CpG-ODN 刺激で 56 時間培養して活性化したのち、TGF- β 3 を加えて 18 時間培養し、 α IgM 刺激後の Syk リン酸化を経時的に評価したところ、TGF- β 3 も α IgM 刺激による Syk リン酸化の抑制を認め、TGF- β 3 は Syk のリン酸化抑制を介して B 細胞増殖を抑制すると考えられた (図 1b)。

B 細胞は細胞膜上に CD40 を発現し、T 細胞上に存在する CD40 リガンドと結合す

ると B 細胞の増殖や分化が誘導される³⁹。この T 細胞依存性の B 細胞活性化は *in vitro* では B 細胞を α CD40 で刺激することで再現され、さらに生体内においては T 細胞が産生する IL-4 を加えると B 細胞増殖は増強されるとともに、免疫グロブリンのアイソタイプスイッチがおこり抗体産生が誘導される⁴⁰。そこで、 α CD40 + IL-4 刺激で B 細胞を TGF- β 1 または TGF- β 3 存在下、非存在下にて 7 日間培養したのち、培養上清中のイムノグロブリン (immunoglobulin: Ig) 濃度を ELISA にて測定したところ、TGF- β 1、TGF- β 3 とともに IgG、IgA、IgM 産生を抑制した (図 1c)。

IL-4 が B 細胞の IL-4 受容体 (IL-4R) と結合すると、janus kinase 1 (JAK1) および JAK3 のリン酸化を介して signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) がリン酸化される。リン酸化 STAT6 は二量体を形成して核内に移行し転写活性を示す⁴¹。TGF- β 1 は STAT6 リン酸化を抑制することで抗体産生を抑制することが報告されている²³。IL-4 添加後のリン酸化 STAT6 をウエスタンブロッティングにて検出したところ、TGF- β 3 も STAT6 リン酸化を抑制した (図 1d)。

以上のことより、TGF- β 3 は TGF- β 1 と同様に B 細胞活性化に重要な Syk および STAT6 のリン酸化抑制を介して、獲得免疫系により誘導される液性免疫を制御していると考えられた。

2) TGF- β は LPS 刺激下における B 細胞活性化を抑制出来ない

TLR はパターン認識受容体の一種であり、病原体に関連する分子パターンを認識して I 型インターフェロンといった炎症性サイトカイン産生の誘導など、自然免疫を惹起する。B 細胞において TLR シグナルは炎症性サイトカインの産生の促進に加えて、細胞の分化増殖および抗体産生促進にも関与する。マウス B 細胞において細胞膜上には TLR1/2, TLR4 が、エンドソーム内には TLR3, TLR7, TLR9 が発現し、TLR1/2 はリポペプチド、TLR4 はリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS)、TLR3 は二本鎖 RNA (double-strand RNA: dsRNA)、TLR7 は一本鎖 RNA (single-strand RNA: ssRNA)、TLR9 は CpG DNA をそれぞれ認識する^{42, 43}。TGF- β 1 は LPS 刺激下で IgA へのクラススイッチを誘導することが報告されている²⁵。TLR4 が自己免疫疾患の病態に及ぼす影響については複数の報告がある⁴⁴。ループス様症状を示す C57BL/6^{lpr/lpr} マウスは、TLR2 または TLR4 が欠損することでリンパ節腫脹の減少や抗 ds-DNA 抗体の減少が認められる⁴⁵。また、プリスタン誘導性ループスモデルマウスにおいて TLR4 を欠損させると、抗 ds-DNA 抗体や抗 ribonucleoprotein (RNP) 抗体は減少し、糸球体への免疫複合体沈着が減弱する⁴⁶。

そこで、LPS 刺激下での B 細胞における TGF- β の作用を検討した。CFSE ラベルした B 細胞を TGF- β 1 または TGF- β 3 存在下、非存在下にて LPS で刺激し、細胞増殖の変化および抗体産生量を調べた。その結果、TLR4 刺激下では TGF- β 1 および TGF- β 3

は B 細胞の増殖を抑制することができず (図 2a)、IgG、IgA の産生を逆に促進し (図 2b)、刺激条件によって TGF- β の B 細胞への作用が異なる事が明らかになった。LPS 刺激下での B 細胞増殖に対する TGF- β 1 の影響に関しては、細胞増殖を抑制するとする報告があるが^{47, 48}、培養時の細胞密度が今回施行した検討より少ないため異なる結果となった可能性がある。抗体産生に関しては、LPS 刺激下で TGF- β 1 は IgA および IgG2b 産生を増強し^{47, 49}、既報と矛盾しない結果であった。

TLR4 は下流のシグナル伝達経路としてアダプタータンパク質である Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP)、myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) を介した経路と TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)、TRIF-related adaptor molecule (TRAM) を介した経路が存在する⁵⁰。また、TLR4 アゴニストである LPS はリポド A 部分が TLR4 シグナルを引き起こすのに加え、ポリサッカライド部分は BCR シグナルを誘導する⁵¹。LPS 刺激下で TGF- β がいずれのシグナル伝達経路に作用しているか確認するため、TRIF ノックアウト (TRIF KO) マウス、および MyD88 ノックアウト (MyD88 KO) マウスから得られた B 細胞を用いて検討を行った。TRIF KO マウス B 細胞を LPS 刺激すると、MyD88 を介したシグナルおよび BCR シグナルを介して B 細胞は増殖するが⁵²、ここに TGF- β を加えると B 細胞増殖は一部抑制され、LPS 刺激 B 細胞におけ

る TGF- β 3 による増殖抑制抵抗性は TRIF シグナル伝達系が部分的に関与していた(図 2c)。MyD88 KO マウス B 細胞を LPS 刺激にて培養した場合では B 細胞はほとんど増殖せず⁵³、TGF- β による B 細胞増殖への作用は評価できなかつた(図 2c)。

次に、MyD88 KO マウス、TRIF KO マウス B 細胞を用いて TGF- β による抗体産生増強効果への MyD88 および TRIF の影響を検討した。MyD88 KO マウスは WT マウスと比較して血清中の IgG2b、IgG2c、IgG3 濃度が低く⁵⁴、MyD88 KO B 細胞を *in vitro* で CpG 刺激すると IgM、IgG1、IgG2c 産生が抑制され⁵⁵、抗体産生およびクラススイッチにおける MyD88 シグナルの関与が報告されている。培養上清中の IgG 濃度を測定したところ、TRIF KO マウスでは WT マウスと比較し、TGF- β による抗体産生増強効果が弱かつた。一方、MyD88 KO マウスでは LPS 刺激にて抗体産生はほとんどおこらず、TGF- β による作用は評価できなかつた(図 2d)。以上のことより TGF- β による LPS 刺激下の抗体産生増強効果は TRIF を介した経路が一部関与していることが示唆された。

3) TGF- β および IL-10 は協調的に液性免疫を制御する

TGF- β は *in vitro* の検討にて TLR 刺激下の B 細胞増殖および抗体産生を抑制することが出来なかつたが、LAG3⁺ Treg は TGF- β 3 とともに IL-10 も高産生しており¹⁵、LAG3⁺ Treg が B 細胞を抑制する機序として IL-10 単独もしくは TGF- β 3 および IL-10

のコンビネーションによる作用を想定した。

IL-10 は T 細胞、B 細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞などの細胞が産生し、抗炎症作用や免疫抑制能を持つサイトカインとして知られているが⁵⁶、T 細胞の増殖抑制やサイトカイン産生抑制、および樹状細胞やマクロファージにおける抗原提示抑制やサイトカイン産生抑制能を有する⁵⁷。マウス B 細胞に対する IL-10 の作用については、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) class II の発現を増強し、無刺激培養下で細胞の生存を高めるとする報告がある⁵⁸。LPS 刺激下の B 細胞増殖に関しては、IL-10 は影響を及ぼさないとする検討がある一方⁵⁸、増殖を抑制したとする報告もある⁵⁹。抗体産生に関して、IL-10 は LPS 刺激されたマウス B 細胞において IgM から IgG3 へのクラススイッチを誘導し、一方で LPS + TGF- β 1 で誘導される IgA へのクラススイッチを抑制するという報告があるが、LPS 刺激下における IL-10 の影響は不明なままであり、IL-10 単独による影響なのか、TGF- β および IL-10 の協調的作用の結果なのかは明らかにされていない⁶⁰。

LPS 刺激下に TGF- β を加えて CFSE ラベルした B 細胞の増殖を検討した。予測された如く、TGF- β 1 のみならず、TGF- β 3 も LPS 刺激による B 細胞増殖を抑制出来なかった (図 3a)。しかしながら、IL-10 存在下において TGF- β 1 および TGF- β 3 は共に B 細胞の増殖を抑制した (図 3a)。次に抗体産生について確認したところ、TGF- β

単独および IL-10 単独で抗体産生は増強していたが、TGF- β および IL-10 を同時に添加することで抗体産生は抑えられた (図 3b)。このように、TGF- β および IL-10 は単独では抗体産生促進性に機能するが、両サイトカインが同時に作用することで抗体産生は抑制されるという新しい現象が観察され、ここに阻害性サイトカイン協調 (inhibitory cytokine synergy: ICS) 作用という概念を提唱する。

TGF- β および IL-10 による ICS 作用に関連する遺伝子を網羅的に解析するため、TGF- β 3 単独、IL-10 単独または、TGF- β 3 および IL-10 の存在下、非存在下にて LPS 刺激した B 細胞を次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) を用いて RNA シークエンス解析 (RNA-sequencing: RNA-seq) を行った。変動遺伝子 (Differentially Expressed Gene : DEG) のクラスター解析を行ったところ、無刺激 B 細胞と LPS + TGF- β 3 + IL-10 刺激 (以下 ICS 条件) B 細胞が同じクラスターに分類された (図 3c)。

この結果は、TGF- β 3 および IL-10 が同時に作用することで、LPS 刺激された B 細胞が各単独サイトカイン添加時と全く異なる無刺激状態に近い遺伝子発現プロファイルになることを意味しており、これまでの各刺激条件における抗体産生の結果と矛盾しない。さらに検出された DEG に関して 16 のクラスターに分類したところ、無刺激条件と ICS 条件でともに発現が低下している群に、*Prdm1* が含まれた。*Prdm1* は転写因子 Blimp-1 をコードし、Blimp-1 は形質細胞の分化に必須の転写因子である⁶¹。*Prdm1*

遺伝子発現を qRT-PCR でも検討したところ、ICS 条件で確かに *Prdm1* の遺伝子発現は低下していた (図 3d)。また、同様に形質細胞分化に必要な転写因子 IRF4 の遺伝子発現も qRT-PCR で検討したが、ICS 条件で低下していた (図 3d)。このことから、ICS 条件では、Blimp-1 や IRF4 の発現低下を介して形質細胞分化が抑えられ、抗体産生が抑制されたと考えられた。

4) TGF- β および IL-10 は協調してオートファジーを抑制する

オートファジーは真核生物で酵母から高等動植物まで高度に保存された、リソソームでのタンパク質やオルガネラの分解機構である。細胞内での過剰なタンパク質蓄積を防いだり細胞飢餓に対処したりする働きをもち、ユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムである⁶²。オートファジーは B 細胞において形質細胞の維持や SLE の病態形成においても中心的役割を果たしている^{63, 64}。

そこで、qRT-PCR でオートファジー関連遺伝子の発現を検討したところ、ICS 条件ではオートファジー関連タンパク質である LC3b、Atg12、p62、Atg16L1 の遺伝子発現が低下していた (図 4a)。

次に、実際にオートファジーが抑制されているかを検討するため、green fluorescence protein (GFP) - microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) トランスジェニックマウス (GFP-LC3 Tg マウス) 由来 B 細胞を用いた実験を行った。オートファジーに

において、タンパク質やオルガネラはオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造に包み込まれ、そこにリソソームが結合して消化される⁶²。LC3はオートファゴソーム形成に重要なタンパク質であり、合成された後に細胞質内で可溶性のLC3-Iとなった後、オートファジーが誘導されると膜結合型のLC3-IIとなりオートファゴソーム膜に結合する。LC3-IIの量はオートファゴソーム形成と相関するため、オートファジーの誘導や抑制を評価するための実験手法としてLC3-II量の測定が用いられている⁶⁵。CAGプロモーター、すなわちサイトメガロウイルスエンハンサーとチキン β -アクチンプロモーターをつなげた構造と、ウサギ β -グロビン遺伝子のpolyAシグナルサイトによって、ほぼ全身の臓器でLC3とGFPの融合タンパク質を発現するGFP-LC3 Tgマウス³²由来のB細胞を各種刺激条件で活性化し、サポニンを用いて細胞質内のLC3-Iを溶出させることでLC3-IIの蛍光のみを検出することが出来る⁶⁶。

GFP-LC3マウスB細胞を3日間培養後、サポニンで処理してGFPの蛍光強度をFACSにて解析したところ、TGF- β 3、IL-10の各単独刺激条件ではGFP発現の増強を認めたが、ICS条件においてはGFP発現が無刺激条件と同程度まで低下していた(図4b)。以上の結果より、TGF- β 3、IL-10は単独でLPS刺激によるオートファジーは促進されるが、両サイトカインが協調的に作用することでオートファジーが抑制され、抗体産生がパラドキシカルに制御されると考えられた。

5) TGF- β および IL-10 は協調して eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路を抑制する

オートファジーを誘導するシグナル経路として、eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α)
- activating transcription factor 4 (ATF4) シグナル伝達経路が報告されている⁶⁷。

eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路は TLR 刺激を含む様々なストレス応答に関与する経路である⁶⁸。eIF2 はタンパク質の翻訳開始に必須な酵素で、 α 、 β 、 γ の3つのサブユニットからなる⁶⁸。細胞にさまざまなストレスがかかると、eIF2 の α サブユニット (eIF2 α) のリン酸化が起こり、mRNA 全体の翻訳活性の低下と転写因子 ATF4 を始めとした一部の遺伝子の活性化が誘導される。ストレスにさらされた細胞でタンパク質の合成を減らす事で細胞への負担を減らす一方で、ストレスに対応するための特定の遺伝子を発現させる作用がある⁶⁸。このような eIF2 α のリン酸化を介した一連の翻訳制御は、統合的ストレス応答 (integrated stress response : ISR) とよばれている⁶⁹。哺乳類には general control nonderepressible 2 (GCN2)、protein kinase R (PKR)、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) の4つの eIF2 α キナーゼが存在し、それぞれが異なるストレスにより活性化され eIF2 α をリン酸化する。アミノ酸飢餓が GCN2 を、ウイルス感染が PKR を、小胞体ストレスが PERK を活性化することがそれぞれ知られている⁶⁸。PKR は主に dsRNA により活性化され、細胞質内の dsRNA が PKR に結合すると PKR は自己リン酸化して活性化し、二量体を形成

して eIF2 α をリン酸化する⁷⁰。dsRNA 以外にも LPS が TLR4 に結合すると、アダプタータンパク質 TRIF を介して PKR が活性化し eIF2 α のリン酸化が生じる⁷⁰。

eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路に関連するタンパク質の遺伝子発現を RNA-seq において確認したところ、ICS 条件で発現が低下していた (図 5a)。また、qRT-PCR でも検討したところ、RNA-seq における解析結果と同様に、PKR、ATF4、また ATF4 の標的遺伝子のひとつである C/EBP homologous protein (CHOP) の発現が LPS 刺激と比較して ICS 条件で有意に低下していた (図 5b)。ATF4、CHOP はオートファジー関連遺伝子の発現を誘導することが報告されており⁶⁷、これらの結果より TGF- β および IL-10 は LPS 刺激条件下において協調して eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路に関連した遺伝子群を抑制することで、オートファジーを抑制して液性免疫を制御すると考えられた。

6) TGF- β および IL-10 による IL-6 産生制御

IL-6 は B 細胞の抗体産生を誘導する B 細胞刺激因子 (BSF-2) としてクローニングされ、関節リウマチをはじめ自己免疫疾患の病態に深く関与する炎症性サイトカインとして知られている⁷¹。SLE 患者の B 細胞においては、IL-6 受容体が恒常的に発現するとともに IL-6 産生も起こり、この IL-6 のオートクライン作用が B 細胞の過剰な活性化や自己抗体産生を惹起し、SLE の病態形成に関与している⁷²。IL-6 の転写は、

C/EBP β と nuclear factor-kappa B (NF- κ B) が協調して活性化することや⁷³、CHOP に より増強されること⁷⁴が報告されている。qRT-PCR では ICS 条件で CHOP および C/EBP β の遺伝子発現は低かった (図 5b, 6a)。さらに B 細胞を各種 TLR 刺激下で培養した上清中の IL-6 を測定したところ、ICS 条件では IL-6 産生が完全に抑制されていた (図 6b)。これらのことより、ICS 条件においては、CHOP および C/EBP β 発現抑制を介する IL-6 産生制御が B 細胞活性化阻害メカニズムに関与している可能性が考えられた。しかし、炎症組織において IL-6 産生細胞は B 細胞以外にも報告があり⁷⁵、生体内における病態形成への影響については更なる検討が必要である。

7) TGF- β 3 は IL-10 と協調して TLR7 アゴニストによるループス様病態を改善する

TLR7 は SLE の疾患感受性遺伝子であり、SLE の病態形成において重要な役割を果たしている⁷⁶。TLR7 の遺伝子多型の SLE 発症への関与が指摘されている⁷⁷。SLE 患者およびループスモデルマウスの形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells : pDCs) は TLR7 を介して一本鎖 RNA を含んだ免疫複合体を認識して I 型インターフェロンを産生する⁷⁸。ループスモデル MRL/*lpr* マウスにおいて TLR7 を欠損させると抗 Sm 抗体など自己抗体の産生および腎障害の改善が認められる⁷⁹。一方、TLR7 トランスジェニックマウスでは糸球体腎炎や抗 RNA 抗体産生が誘導される⁸⁰。

そこで、TLR7 刺激下での ICS 効果につき、TLR7 アゴニストであるレシキモド (R848) を用いて *in vitro* における検討を行った⁸¹。その結果、CFSE ラベルした B 細胞の R848 刺激下における細胞増殖を TGF- β 3、IL-10 は単独では抑制出来なかったが、TGF- β 3、IL-10 が協調的に作用することで抑制効果を認めるようになった (図 7a)。抗体産生に関しては IL-10 単独でも抑制されていたが、ICS 条件においてはより強い抗体産生抑制効果を認めた (図 7b)。

In vivo における ICS 効果について、TLR7 アゴニストである IMQ 塗布ループスマウスモデルマウスを用いて検討した。IMQ を週 3 回 BALB/c マウスの耳に塗布すると、4 週後には自己抗体である抗 ds-DNA 抗体の上昇や糸球体腎炎などループス様の症状が認められる⁸²。治療効果の確認には、pCAGGS-Tgfb3 ベクターおよび pCAGGS-II10 ベクター³⁷を用いた。pCAGGS プラスミドベクターは、CAG プロモーターによって、導入した遺伝子をほぼ全身性に過剰発現する³⁶。この IMQ 塗布ループスマウスモデルマウスに、pCAGGS-Tgfb3 ベクターおよび pCAGGS-II10 ベクターを静脈内投与し、自己抗体産生につき評価を行った。その結果、pCAGGS-II10 と pCAGGS-Tgfb3 をともに投与した群においてのみ有意な治療効果を認め、IMQ 塗布により上昇した血清中抗 ds-DNA 抗体が低下した (図 7d)。このことより pCAGGS-Tgfb3 + pCAGGS-II10 投与は IMQ 塗布ループスマウスモデルマウスの病勢を改善する効果があると考えた。これらの結果より、

TGF- β 3 は IL-10 の存在下において有効な治療効果を発揮すると考えられた。

考察

本研究では、IL-10 および、TGF- β アイソフォームのうち免疫学的恒常性維持において中心的役割を果たしていることが想定される TGF- β 1、3 のマウス B 細胞に及ぼす影響を検討した。TGF- β は抗 IgM 抗体刺激下の細胞増殖や抗 CD40 抗体および IL-4 刺激による抗体産生を抑制したが、TLR4 アゴニストである LPS 刺激による細胞増殖を抑制出来ず、抗体産生は増強した。一方、IL-10 存在下では、TGF- β は LPS 刺激による細胞増殖および抗体産生を抑制した。複数のサイトカインが同時に作用することで、個々のサイトカイン単独による作用の総和より強い効果を示すことが知られており、cytokine synergy と呼ばれている⁸³。今回我々は、LPS 刺激下で単独では抗体産生促進性に機能する TGF- β および IL-10 が同時に存在すると、逆に抗体産生は抑制される現象を観察し、阻害性サイトカイン協調 (inhibitory cytokine synergy: ICS) 作用という新たな概念を提唱した。さらに、TGF- β および IL-10 は、様々なストレス応答に関与している eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路の抑制を介し B 細胞のオートファジーを制御することで、ICS 作用をもたらすことを示した。

今回、LAG3⁺ Treg が産生する TGF- β 3 と共に、以前より免疫調整能が指摘されている TGF- β 1 が B 細胞に及ぼす影響を検討したが、*in vitro* の検討にて TGF- β 1 と TGF- β 3 の効果に大きな違いは認められなかった。TGF- β 1 と TGF- β 3 が T 細胞に及ぼす影響

の違いに関して、TGF- β 1 と IL-6 は Th17 を誘導するが、TGF- β 3 と IL-6 はより病原性の強い Th17 を誘導するという報告がある²⁰。しかし TGF- β 3 単独の T 細胞への影響は不明であり、IL-10 は Th17 誘導阻害効果がある⁸⁴ことを考慮すると、TGF- β 3 と IL-10 が同時に存在する ICS 条件では TGF- β 3 による病原性の強い Th17 への誘導効果が得られないと推測される。

In vitro での B 細胞に対する TGF- β 1 と TGF- β 3 の作用の違いは認められなかったが、*in vivo* での両者の作用の相違は報告されている。TGF- β 1 は TGF- β 3 より強く肺の線維化を引き起こし⁸⁵、創傷治癒において TGF- β 1 は癒痕化を誘導する一方 TGF- β 3 は癒痕化を抑制する⁸⁶。また、TGF- β 1 は耐糖能異常を引き起こすが⁸⁷、TGF- β 3 は耐糖能異常を改善する⁸⁸。これらの観点より、自己免疫疾患における自己抗体産生抑制の治療効果を狙って全身性に TGF- β 1 または TGF- β 3 投与を検討した場合、TGF- β 1 は線維化や耐糖能異常を起こす可能性があり、TGF- β 3 投与が適していると考えられる。

IL-10 は抗炎症性サイトカインとして知られているが、B 細胞に対しては抗体産生誘導に働くことが知られている。ヒト B 細胞に対する IL-10 の作用は詳細に検討されており、IL-10 は *in vitro* でヒト B 細胞の生存を増強し⁸⁹、細胞増殖を誘導する⁹⁰。また、IL-10 は抗 CD40 抗体で活性化された B 細胞において IgG1、IgG3 へのクラススイッチを誘導し⁹¹、CpG 刺激と協調して STAT1、STAT3、interferon regulatory factor1 1

(IRF1)、IRF4 を活性化し、IgG1、IgG2、IgG3 へのクラススイッチを誘導する⁹²。
マウス B 細胞における IL-10 の作用は不明な点が多い。既報では IL-10 は LPS 刺激下の IgG3 産生を抑制するが、IL-5 および IL-4 存在下での IgG1 産生は抑制できない⁹³。
今回の検討では LPS 刺激下で IL-10 単独では IgG および IgA 産生を誘導し、R848 刺激下では IgG1、IgA 産生は抑制された。LPS や R848 および IL-10 の濃度、培養時の細胞密度などが *in vitro* における IL-10 の抗体産生に影響を及ぼした可能性が考えられる。

SLE における IL-10 の関与については、ループスモデルマウスである New Zealand black and New Zealand white (NZB/W) F1 マウスに抗 IL-10 抗体を投与すると自己免疫症状の発症が遅れ⁹⁴、SLE 患者の T 細胞が除去されたヒト末梢血単核細胞に IL-10 を加えて培養すると抗体産生が増強することが報告されている⁹⁵。また、SLE 患者では疾患活動性と血清中 IL-10 濃度が正の相関を示し⁹⁶、SLE の疾患感受性と IL-10 遺伝子の一塩基多型との関連が示されていることが知られており⁹⁷、IL-10 による抗体産生誘導が SLE 発症機序に関与することが示唆されている。

IL-10 受容体は IL-10 Receptor 1 (IL-10R1) と IL-10R2 からなり、JAK1 および tyrosine kinase 2 (TYK2) を介して STAT1、STAT3 および STAT5 を活性化する⁵⁶。STAT3 を欠損した好中球やマクロファージでは IL-10 による炎症性サイトカインの産生抑制が

起こらないことなどから⁹⁸、特に STAT3 を介したシグナル伝達が IL-10 の免疫抑制能に関与していると考えられている。同じく STAT3 を活性化する IL-21 が、TGF- β 1 による IgG2b へのクラススイッチを抑制することが報告されており⁴⁷、STAT3 が B 細胞における TGF- β の作用調整に関与している可能性が推測される。

TGF- β 1 による IgA へのクラススイッチを誘導する機序に関しては、T 細胞依存性の経路と非依存性の経路が示されている²⁷。TGF- β 1 が TGF- β R に結合すると Smad2、Smad3 がリン酸化され Smad4 とともに核内に移行し、IgA へのクラススイッチに必要な遺伝子である C α のプロモーター領域にある Smad-binding elements (SBEs) に結合する。さらに C α のプロモーター領域にある RUNX-binding elements (RBEs) に runt-related transcription factor 3 (RUNX3) が、cyclic AMP response element (CRE) に cyclin AMP response element binding protein (CREB) がそれぞれ結合する事で C α の発現が誘導される。これに加え、T 細胞依存性の経路では CD40 下流の NF- κ B がクラススイッチに必須な酵素である activation-induced deaminase (AID) の発現を誘導し、T 細胞非依存性の経路では、TLR、MyD88 を介して NF- κ B が核内に移行することで AID の発現がおこる。

ICS 条件にて IgA の産生増強が起こらなかった要因に関して、C α の発現を誘導する Smad や RUNX3、CREB などの転写因子の発現や活性化を IL-10 が抑制した可能性

が考えられ、実際に CREB のサブタイプの一つである ATF4 の遺伝子発現は ICS 条件にて低下していた。また、TGF- β の下流の Smad と IL-10 下流の STAT3 が相互作用し、単独での転写活性と異なった転写制御能を示す可能性も考えられる。実際、STAT3 と Smad1 が p300 を介して複合体を形成してプロモーター上で協調的に働くことで、シグナルの協調作用が起こることが明らかにされており⁹⁹、このような STAT と Smad の協調効果により cytokine synergy が得られた可能性も推測される。その他、TGF- β のシグナルの下流には Jun N-terminal kinase (JNK) 、 Ras-extracellular signal-regulated kinase (Erk) などを経た Smad-independent pathway も重要な役割を果たしていることが知られており^{17, 18}、これらのシグナル伝達経路の関与についても今後検討を要する。

ICS 作用に関与する遺伝子の解析を行うため RNA-seq を施行したところ、ICS 条件は無刺激 B 細胞と同じクラスターに分類され、ICS 条件で細胞増殖および抗体産生が抑制されることと矛盾しない結果となった。無刺激条件と ICS 条件でともに発現が低下している遺伝子群として eIF2 α -ATF4 経路があり、ATF4 が遺伝子発現を誘導するオートファジー関連遺伝子の影響を検討した。qRT-PCR においても *Atf4* 発現は低下しており、オートファジー関連遺伝子発現も低下、また GFP-LC3 マウス B 細胞を用いた *in vitro* の実験で ICS 条件ではオートファジーが抑制されていた。TGF- β 1 がオー

トファジーに及ぼす影響に関しては、ヒト肝癌由来細胞株やヒト乳癌由来細胞株で TGF- β 1 はオートファジーを亢進¹⁰⁰、マウス尿管上皮細胞では亢進¹⁰¹、ヒト肺線維芽細胞では抑制¹⁰²と細胞種によって異なり、IL-10 はマウスマクロファージにおけるオートファジーを抑制すると報告されている¹⁰³。B 細胞特異的にオートファジー関連遺伝子である Atg5 を欠損させたマウスでは抗体産生能が障害され⁶³、NZB/W F1 ループモデルマウスの B 細胞ではオートファジーは亢進し、SLE 患者でも B 細胞でのオートファジー活性化が認められていることより⁶⁴、形質細胞分化や自己反応性 B 細胞の生存維持にオートファジーが関与していると考えられている。これらの背景より、ICS 条件でオートファジーが抑制されていることが抗体産生抑制の要因の一つと考えた。

TLR7 は ssRNA を認識し、ループスの発症に深く関与していることが明らかになっており⁷⁶、TLR7 アゴニストである R848 を用いて *in vitro* の検討を行った。R848 刺激下では TGF- β および IL-10 による B 細胞増殖抑制効果は弱く、また抗体産生に関しては IL-10 単独で抗体産生は部分的に抑制され、そこに TGF- β を加えることでさらに抑制されるという LPS 刺激とは一部異なる結果であった。TLR4 下流では、TIRAP / MyD88 および TRIF / TRAM を介した経路が存在するが、TLR7 下流では MyD88 がシグナル伝達に関与し⁵⁰、それぞれ細胞内のシグナル伝達経路が異なる。そのため、LPS

刺激下で認められた ICS 作用における抑制メカニズムが TLR7 刺激下でも同様に生じるのか、更なる検討が必要である。また、TLR7 アゴニストである IMQ 用いた SLE 誘発モデルマウスを用いての検討では、pCAGGS-Tgfb3 および pCAGGS-Il10 の投与は生体内における自己抗体産生を有意に抑制し、*in vivo* においては TGF- β 3 と IL-10 が協調的に作用することが示された。

IL-10 を始めとした抗炎症性サイトカインの全身投与は自己免疫疾患に対する治療戦略として検討されてきたが、正常組織への副作用の問題から投与量が制限され十分な治療効果が得られなかった¹⁰⁴。そこでモノクローナル抗体とサイトカインを融合させ、標的細胞にのみサイトカインを作用させるイムノサイトカインが新たな治療薬として期待されており、既に関節リウマチに対して、フィブロネクチンの **extra domain A** に対する抗体と IL-10 を融合させたイムノサイトカインの臨床試験が行われている¹⁰⁵。SLE において、自己抗体産生や炎症性サイトカインに関与する B 細胞をターゲットとした治療開発が注目されている。今回の検討から、B 細胞表面マーカーに対する抗体に IL-10 および TGF- β 3 を結合させ、B 細胞特異的に IL-10 および TGF- β 3 を作用させるイムノサイトカインが、自己抗体産生を介する SLE を始めとした自己免疫疾患の新規治療戦略となり得ることが期待される。

謝辞

本研究にあたり、東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科教授
山本一彦 教授には指導教官としてご指導ご鞭撻をいただきました。ここに深謝申し
上げます。

本研究の機会を与えてくださり、実験の指導や日々の議論を通じて多くの知識や示
唆をいただきました、東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科講師
藤尾圭志 博士、および同特任助教 岡村僚久 博士に厚く御礼申し上げます。

また、共同研究者として惜しみないご協力をいただきました 駒井俊彦 先生、
森田薫 先生、 岩崎由希子 博士、 照屋周造 先生に心より感謝の意を表明致し
ます。

pCAGGS プラスミドベクターは大阪大学大学院医学系研究科幹細胞制御学
宮崎純一 教授より、GFP-LC3 マウスは東京大学大学院医学系研究科分子生物学
水島昇 教授よりご提供いただきました。ここに深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Lisnevskiaia, L., Murphy, G. & Isenberg, D. Systemic lupus erythematosus. *The Lancet* **384**, 1878-1888 (2014).
2. Sanz, I. & Lee, F.E.-H. B cells as therapeutic targets in SLE. *Nature Reviews Rheumatology* **6**, 326-337 (2010).
3. Lu, T.Y.T. et al. A retrospective seven-year analysis of the use of B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus at university college london hospital: The first fifty patients. *Arthritis & Rheumatism* **61**, 482-487 (2009).
4. Díaz-Lagares, C. et al. Efficacy of rituximab in 164 patients with biopsy-proven lupus nephritis: Pooled data from European cohorts. *Autoimmunity Reviews* **11**, 357-364 (2012).
5. Merrill, J.T. et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: The randomized, double-blind, phase ii/iii systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis & Rheumatism* **62**, 222-233 (2010).
6. Rovin, B.H. et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: The lupus nephritis assessment with rituximab study. *Arthritis & Rheumatism* **64**, 1215-1226 (2012).
7. Wallace, D.J. et al. Efficacy and safety of epratuzumab in patients with moderate/severe active systemic lupus erythematosus: results from EMBLEM, a phase IIb, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Annals of the Rheumatic Diseases* **73**, 183-190 (2013).
8. Navarra, S.V. et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic

- lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **377**, 721-731 (2011).
9. Furie, R. et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **63**, 3918-3930 (2011).
 10. Campbell, D.J. & Ziegler, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **7**, 305-10 (2007).
 11. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-64 (1995).
 12. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-61 (2003).
 13. Okamura, T. et al. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 13974-13979 (2009).
 14. Okamura, T., Fujio, K., Sumitomo, S. & Yamamoto, K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* **71 Suppl 2**, i96-100 (2012).
 15. Okamura, T. et al. TGF- β 3-expressing CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nature Communications* **6**, 6329 (2015).
 16. Rubtsov, Y.P. & Rudensky, A.Y. TGF β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nature Reviews Immunology* **7**, 443-453 (2007).
 17. Yoshimura, A. & Muto, G. TGF-beta function in immune suppression. *Curr Top*

- Microbiol Immunol* **350**, 127-47 (2011).
18. Govinden, R. & Bhoola, K.D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology & Therapeutics* **98**, 257-265 (2003).
 19. Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L. & Flavell, R.A. Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* **24**, 99-146 (2006).
 20. Lee, Y. et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature Immunology* **13**, 991-999 (2012).
 21. Chikuma, S., Suita, N., Okazaki, I.-M., Shibayama, S. & Honjo, T. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development in vivo. *Nature Immunology* **13**, 596-603 (2012).
 22. Kee, B.L., Rivera, R.R. & Murre, C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nat Immunol* **2**, 242-7 (2001).
 23. Roes, J., Choi, B.K. & Cazac, B.B. Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor β receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 7241-7246 (2003).
 24. Kamesaki, H., Nishizawa, K., Michaud, G.Y., Cossman, J. & Kiyono, T. TGF-beta 1 induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mRNA and protein in murine B cells. *J Immunol* **160**, 770-7 (1998).
 25. Coffman, R.L., Lebman, D.A. & Shrader, B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* **170**, 1039-44 (1989).
 26. Stavnezer, J. & Kang, J. The surprising discovery that TGF beta specifically induces

- the IgA class switch. *J Immunol* **182**, 5-7 (2009).
27. Cerutti, A. The regulation of IgA class switching. *Nature Reviews Immunology* **8**, 421-434 (2008).
 28. Yamamoto, T. et al. Involvement of NF- κ B in TGF- β -mediated suppression of IL-4 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 627-634 (2004).
 29. Cazac, B.B. & Roes, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* **13**, 443-51 (2000).
 30. Okamura, T. et al. Role of TGF-beta3 in the regulation of immune responses. *Clin Exp Rheumatol* **33**, 63-9 (2015).
 31. Ma, K., Li, J., Fang, Y. & Lu, L. Roles of B Cell-Intrinsic TLR Signals in Systemic Lupus Erythematosus. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 13084-13105 (2015).
 32. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**, 1101-11 (2004).
 33. Kim, D. et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**, R36 (2013).
 34. Anders, S., Pyl, P.T. & Huber, W. HTSeq a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166-169 (2014).
 35. Klambauer, G., Unterthiner, T. & Hochreiter, S. DEXUS: identifying differential expression in RNA-Seq studies with unknown conditions. *Nucleic Acids Research* **41**, e198-e198 (2013).

36. Nitta, Y. et al. Systemic delivery of interleukin 10 by intramuscular injection of expression plasmid DNA prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Hum Gene Ther* **9**, 1701-7 (1998).
37. Jiang, J., Yamato, E. & Miyazaki, J.-i. Intravenous Delivery of Naked Plasmid DNA for in Vivo Cytokine Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**, 1088-1092 (2001).
38. Yan, S. et al. High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA. *Journal of Controlled Release* **161**, 763-771 (2012).
39. Kurosaki, T., Shinohara, H. & Baba, Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* **28**, 21-55 (2010).
40. Hawkins, E.D. et al. Quantal and graded stimulation of B lymphocytes as alternative strategies for regulating adaptive immune responses. *Nature Communications* **4** (2013).
41. Geha, R.S., Jabara, H.H. & Brodeur, S.R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Reviews Immunology* **3**, 721-732 (2003).
42. Bekeredjian-Ding, I. & Jegou, G. Toll-like receptors - sentries in the B-cell response. *Immunology* **128**, 311-323 (2009).
43. Pone, E.J. et al. B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: Modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. *Autoimmunity* **48**, 1-12 (2015).
44. Liu, Y., Yin, H., Zhao, M. & Lu, Q. TLR2 and TLR4 in Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **47**, 136-147

- (2013).
45. Lartigue, A. et al. Critical Role of TLR2 and TLR4 in Autoantibody Production and Glomerulonephritis in lpr Mutation-Induced Mouse Lupus. *The Journal of Immunology* **183**, 6207-6216 (2009).
 46. Summers, S.A. et al. TLR9 and TLR4 are required for the development of autoimmunity and lupus nephritis in pristane nephropathy. *Journal of Autoimmunity* **35**, 291-298 (2010).
 47. Seo, G.Y., Youn, J. & Kim, P.H. IL-21 ensures TGF- β 1-induced IgA isotype expression in mouse Peyer's patches. *Journal of Leukocyte Biology* **85**, 744-750 (2009).
 48. Klein, J. et al. B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cell fate. *J Immunol* **176**, 2389-96 (2006).
 49. Garcia, B. et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on IgA vs. IgG2b production by lipopolysaccharide-stimulated lymph node B cells: a comparative study with spleen B cells. *Eur J Immunol* **26**, 2364-70 (1996).
 50. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**, 373-384 (2010).
 51. Pone, E.J. et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nature Communications* **3**, 767 (2012).
 52. Yamamoto, M. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3 (2003).

53. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-22 (1999).
54. Kobayashi, T. et al. Tonic B cell activation by Radioprotective105/MD-1 promotes disease progression in MRL/lpr mice. *Int Immunol* **20**, 881-91 (2008).
55. Barr, T.A., Brown, S., Mastroeni, P. & Gray, D. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN-gamma production from T cells and control switching to IgG2c. *J Immunol* **183**, 1005-12 (2009).
56. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
57. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A. & Hymowitz, S.G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual Review of Immunology* **29**, 71-109 (2011).
58. Go, N.F. et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* **172**, 1625-31 (1990).
59. Marcelletti, J.F. IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced murine B cell proliferation and cross-linking of surface antigen receptors or ligation of CD40 restores the response. *J Immunol* **157**, 3323-33 (1996).
60. Shparago, N. et al. IL-10 selectively regulates murine Ig isotype switching. *Int Immunol* **8**, 781-90 (1996).
61. Shapiro-Shelef, M. & Calame, K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* **5**, 230-42 (2005).
62. Yang, Z. & Klionsky, D.J. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology* **12**, 814-822 (2010).

63. Pengo, N. et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nature Immunology* **14**, 298-305 (2013).
64. Clarke, A.J. et al. Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Annals of the Rheumatic Diseases* **74**, 912-920 (2015).
65. Kabeya, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j* **19**, 5720-8 (2000).
66. Eng, K.E., Panas, M.D., Karlsson Hedestam, G.B. & McInerney, G.M. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy. *Autophagy* **6**, 634-41 (2010).
67. B'Chir, W. et al. The eIF2 /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research* **41**, 7683-7699 (2013).
68. Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S. & Samali, A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* **70**, 3493-511 (2013).
69. Harding, H.P. et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-108 (2000).
70. Hsu, L.C. et al. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* **428**, 341-5 (2004).
71. Calabrese, L.H. & Rose-John, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology* **10**, 720-727 (2014).
72. Nagafuchi, H., Suzuki, N., Mizushima, Y. & Sakane, T. Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in the excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **151**, 6525-34 (1993).
73. Matsusaka, T. et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically

- activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10193-7 (1993).
74. Hattori, T., Ohoka, N., Hayashi, H. & Onozaki, K. C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Letters* **541**, 33-39 (2003).
 75. Hunter, C.A. & Jones, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* **16**, 448-57 (2015).
 76. Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology* **6**, 823-835 (2006).
 77. Lee, Y.H., Lee, H.S., Choi, S.J., Ji, J.D. & Song, G.G. Associations between TLR polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* **30**, 262-5 (2012).
 78. Banchereau, J. & Pascual, V. Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. *Immunity* **25**, 383-392 (2006).
 79. Christensen, S.R. et al. Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity* **25**, 417-428 (2006).
 80. Deane, J.A. et al. Control of Toll-like Receptor 7 Expression Is Essential to Restrict Autoimmunity and Dendritic Cell Proliferation. *Immunity* **27**, 801-810 (2007).
 81. Tomai, M.A., Imbertson, L.M., Stanczak, T.L., Tygrett, L.T. & Waldschmidt, T.J. The Immune Response Modifiers Imiquimod and R-848 Are Potent Activators of B Lymphocytes. *Cellular Immunology* **203**, 55-65 (2000).
 82. Yokogawa, M. et al. Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads

- to Systemic Autoimmunity in Wild-Type Mice: A New Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* **66**, 694-706 (2014).
83. Bartee, E. & McFadden, G. Cytokine synergy: An underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine* **63**, 237-240 (2013).
84. Huber, S. et al. Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity* **34**, 554-565 (2011).
85. Ask, K. et al. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF- β isoform 1 but not TGF- β 3. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 484-495 (2008).
86. Shah, M., Foreman, D.M. & Ferguson, M.W. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* **108 (Pt 3)**, 985-1002 (1995).
87. Yadav, H. et al. Protection from Obesity and Diabetes by Blockade of TGF- β /Smad3 Signaling. *Cell Metabolism* **14**, 67-79 (2011).
88. Hall, B.E. et al. Transforming Growth Factor- β 3 (TGF- β 3) Knock-in Ameliorates Inflammation Due to TGF- β 1 Deficiency While Promoting Glucose Tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 32074-32092 (2013).
89. Itoh, K. & Hirohata, S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol* **154**, 4341-50 (1995).
90. Rousset, F. et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1890-3 (1992).
91. Malisan, F. et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch

- recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* **183**, 937-47 (1996).
92. He, B., Qiao, X. & Cerutti, A. CpG DNA Induces IgG Class Switch DNA Recombination by Activating Human B Cells through an Innate Pathway That Requires TLR9 and Cooperates with IL-10. *The Journal of Immunology* **173**, 4479-4491 (2004).
 93. Pecanha, L.M., Snapper, C.M., Lees, A., Yamaguchi, H. & Mond, J.J. IL-10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses in vitro. *J Immunol* **150**, 3215-23 (1993).
 94. Ishida, H. et al. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* **179**, 305-10 (1994).
 95. Llorente, L. et al. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **181**, 839-44 (1995).
 96. Park, Y.B. et al. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* **16**, 283-8 (1998).
 97. Moser, M. et al. IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **8**, e69547 (2013).
 98. Takeda, K. et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* **10**, 39-49 (1999).
 99. Nakashima, K. et al. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* **284**, 479-82 (1999).
 100. Kiyono, K. et al. Autophagy Is Activated by TGF- β and Potentiates TGF- β -Mediated

- Growth Inhibition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Research* **69**, 8844-8852 (2009).
101. Ding, Y. et al. Autophagy Regulates TGF- β Expression and Suppresses Kidney Fibrosis Induced by Unilateral Ureteral Obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology* **25**, 2835-2846 (2014).
 102. Patel, A.S. et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* **7**, e41394 (2012).
 103. Ní Cheallaigh, C., Keane, J., Lavelle, E.C., Hope, J.C. & Harris, J. Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives. *Clinical & Experimental Immunology* **164**, 291-300 (2011).
 104. Ferrari, M., Onuoha, S.C. & Pitzalis, C. Trojan horses and guided missiles: targeted therapies in the war on arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **11**, 328-337 (2015).
 105. Galeazzi, M. et al. A phase IB clinical trial with Dekavil (F8-IL10), an immunoregulatory 'armed antibody' for the treatment of rheumatoid arthritis, used in combination with methotrexate. *Isr Med Assoc J* **16**, 666 (2014).

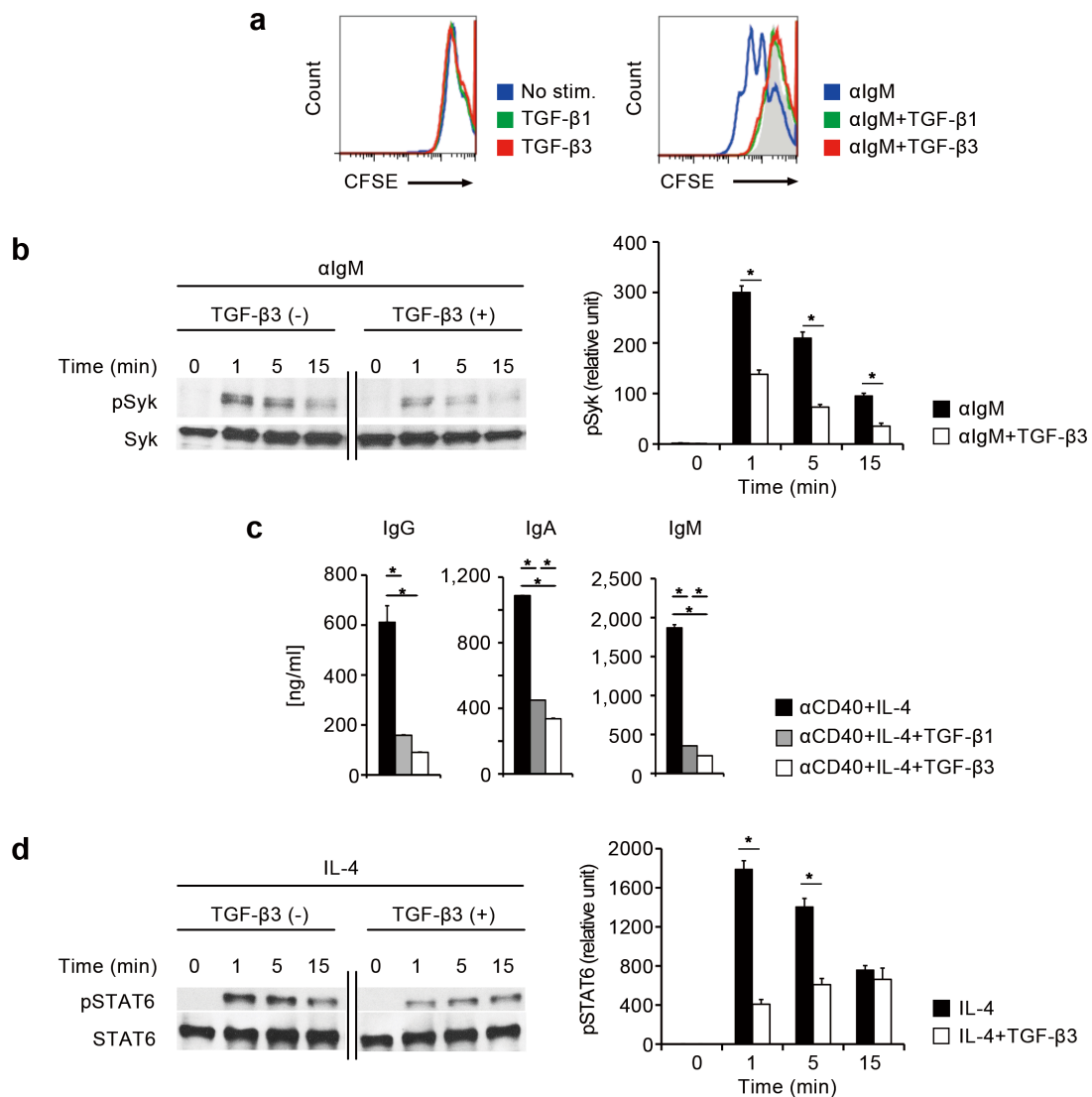


図1 TGF-βはαIgM刺激およびαCD40 + IL-4刺激によるB細胞増殖を抑制する

a) CFSE染色したB細胞を無刺激またはαIgM刺激下でTGF-β1またはTGF-β3を添加し3日間培養した。7AAD⁻B220⁺でゲートしたヒストグラムを提示した。

b) 左：B細胞をCpG-ODN刺激で72時間培養後TGF-β3を添加し16時間培養し、その後αIgMを添加し0, 1, 5, 15分後に細胞を回収して得られた細胞溶解液を用いてpSykおよびSykのウェスタンブロットを施行した。右：pSykとSykの割合を示した。 $*p < 0.05$ (unpaired two-tailed Student's t-test)。

c) B細胞をαCD40 + IL-4刺激にTGF-β1またはTGF-β3を添加し7日間培養後得られた上清中のIgG、IgA、IgM濃度をELISAで測定した。 $*p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

d) 左：B細胞をCpG-ODN刺激で72時間培養後TGF-β3を添加し16時間培養し、その後IL-4を添加し0, 1, 5, 15分後に細胞を回収して得られた細胞溶解液を用いてpSTAT6およびSTAT6のウェスタンブロットを施行した。右：pSTAT6とSTAT6の割合を示した。 $*p < 0.05$ (unpaired two-tailed Student's t-test)。

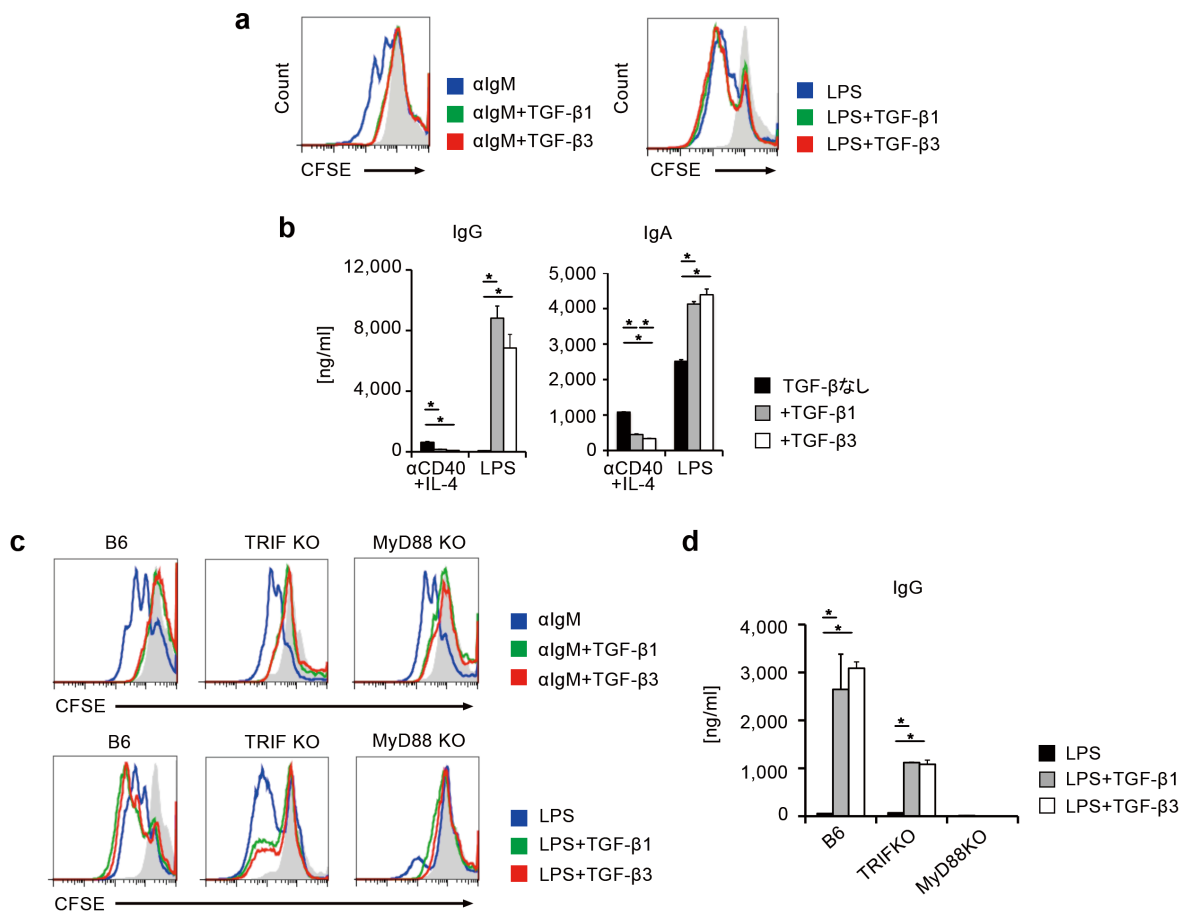


図2 TGF-βはLPS刺激下におけるB細胞活性化を抑制出来ない

- a)** CFSE 染色した B 細胞を α IgM 刺激または LPS 刺激下で TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加し 3 日間培養した。7AAD⁻B220⁺でゲートしたヒストグラムを提示した。
- b)** B 細胞を α CD40 + IL-4 刺激または LPS 刺激下で TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加し 7 日間培養後得られた上清中の IgG、IgA 濃度を ELISA で測定した。 $*p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。
- c)** C57BL/6 (B6) マウス、TRIF ノックアウト (KO) マウス、MyD88 KO マウス由来の B 細胞を CFSE 染色し、LPS 刺激下で TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加し 3 日間培養した。7AAD⁻B220⁺でゲートしたヒストグラムを提示した。
- d)** B6 マウス、TRIF KO マウス、MyD88 KO マウス由来の B 細胞を LPS 刺激下で TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加し 7 日間培養後の上清中の IgG 濃度を ELISA で測定した。 $*p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

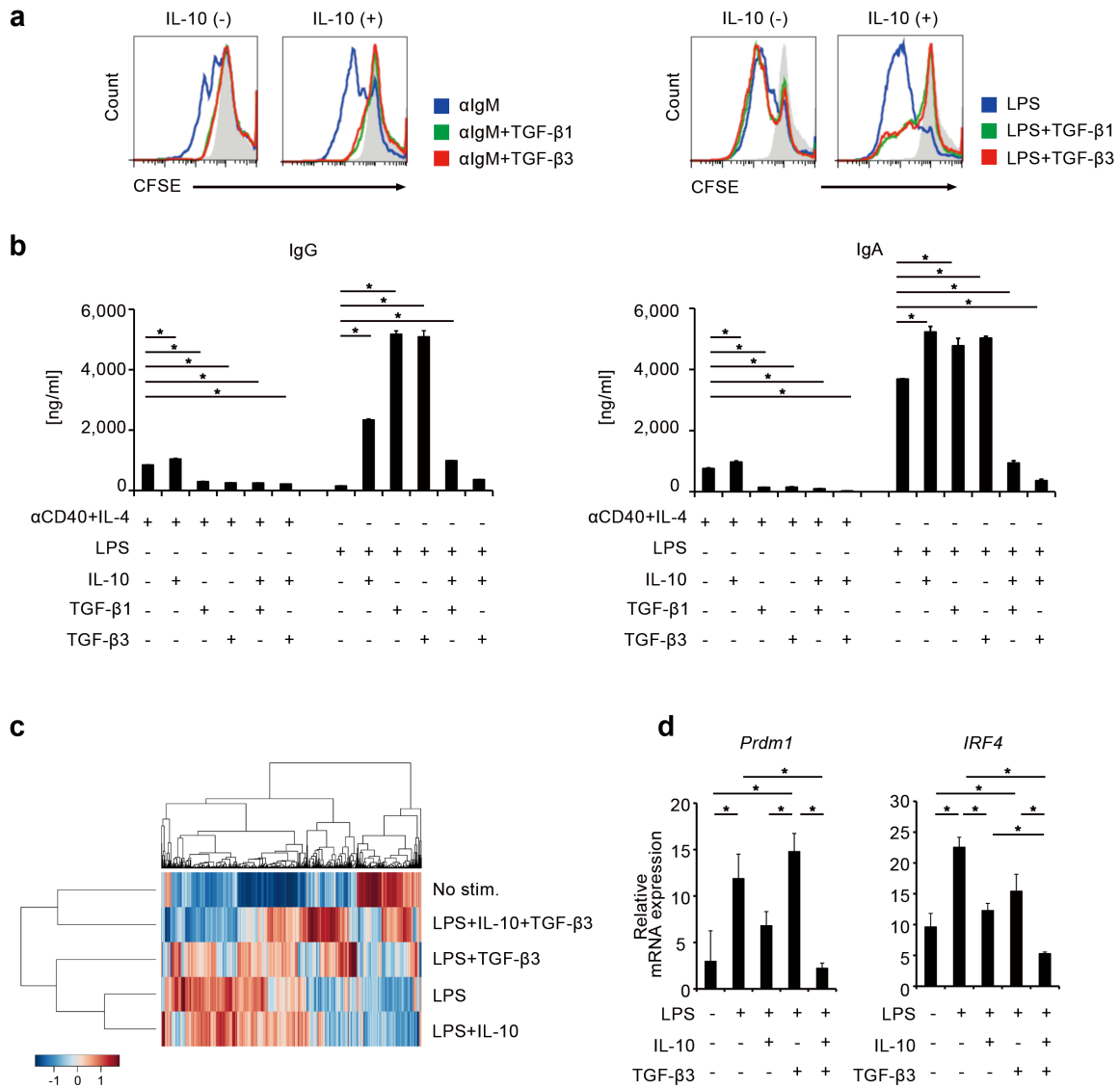


図3 TGF-βおよびIL-10は協調的に液性免疫を制御する

- a) CFSE染色したB細胞をαIgM刺激下でIL-10、TGF-β1またはTGF-β3を添加し3日間培養した。7AAD⁻B220⁺でゲートしたヒストグラムを提示した。
- b) B細胞をαCD40 + IL-4刺激またはLPS刺激下でIL-10、TGF-β1またはTGF-β3を添加し7日間培養後得られた上清中のIgG、IgA濃度をELISAで測定した。 $*p < 0.05$ (Dunnett's multiple comparison test)。
- c) B細胞をLPS刺激下でL-10、TGF-β3を添加し3日間培養後のRNA-seqをNGSを用いて行い、変動遺伝子のクラスター解析を行った。
- d) B細胞をLPS刺激下でIL-10、TGF-β3を添加し3日間培養後のB細胞における各遺伝子発現をqRT-PCRにて比較した。 $*p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

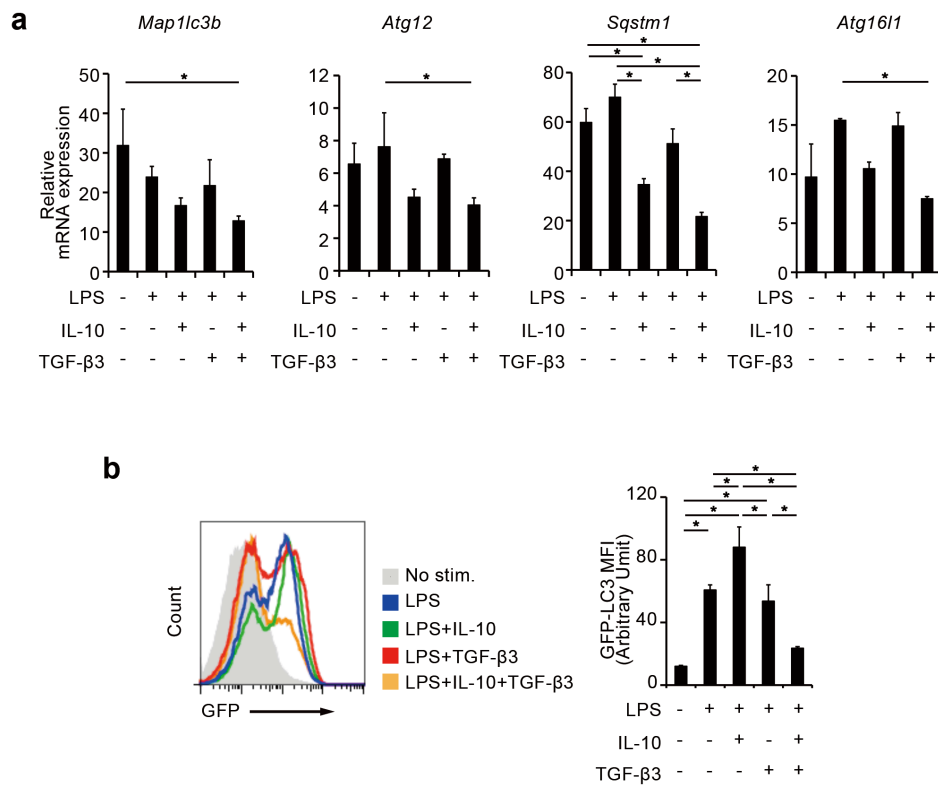


図 4 TGF-β および IL-10 は協調してオートファジーを抑制する

a) B 細胞を LPS 刺激下で IL-10、TGF-β3 を添加し 3 日間培養後の B 細胞における各遺伝子発現を qRT-PCR にて比較した。* $p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

b) 左 : GFP-LC3 Tg マウス由来の B 細胞を LPS 刺激下で IL-10、TGF-β3 を添加し 3 日間培養し、サポニン処理後の GFP 蛍光強度を測定した。7AAD⁻B220⁺でゲートしたヒストグラムを提示した。右 : GFP の mean fluorescence intensity (MFI) を示した。* $p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

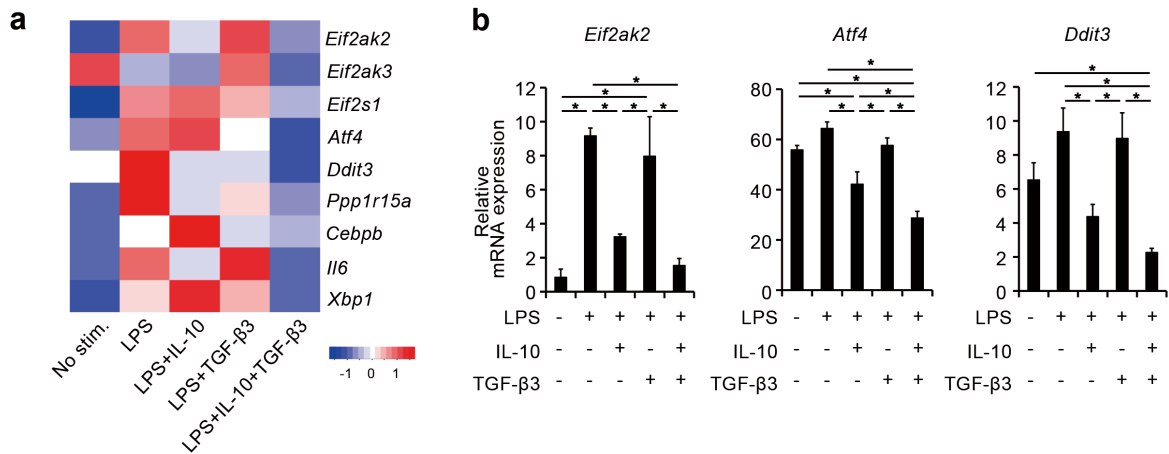


図 5 TGF- β および IL-10 は協調して eIF2 α -ATF4 シグナル伝達経路を抑制する

a) RNA-seq における各培養条件間での遺伝子発現変化をヒートマップにて示した。

b) B 細胞を LPS 刺激下で L-10、TGF- β 3 を添加し 3 日間培養後の B 細胞における各遺伝子発現を qRT-PCR にて比較した。* $p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

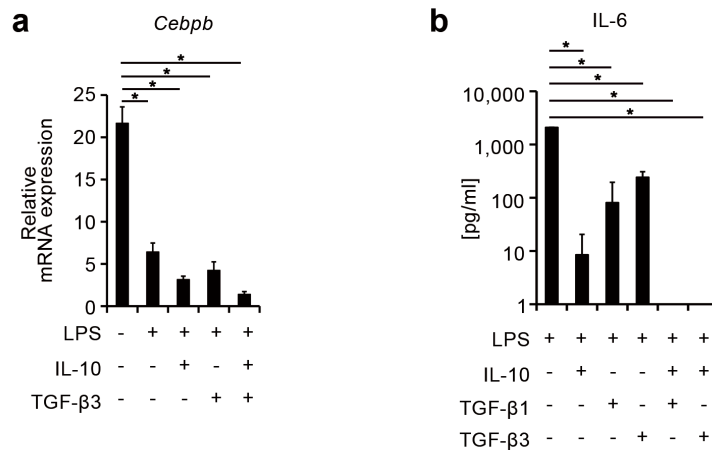


図 6 TGF- β および IL-10 による IL-6 産生制御

a) B 細胞を LPS 刺激下で L-10、TGF- β 3 を添加し 3 日間培養後の B 細胞における *Cebpb* の遺伝子発現を qRT-PCR にて比較した。* $p < 0.05$ (Bonferroni's multiple comparison test)。

b) B 細胞を LPS 刺激下で IL-10、TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加し 7 日間培養後得られた上清中の IL-6 濃度を ELISA で測定した。* $p < 0.05$ (Dunnett's multiple comparison test)。

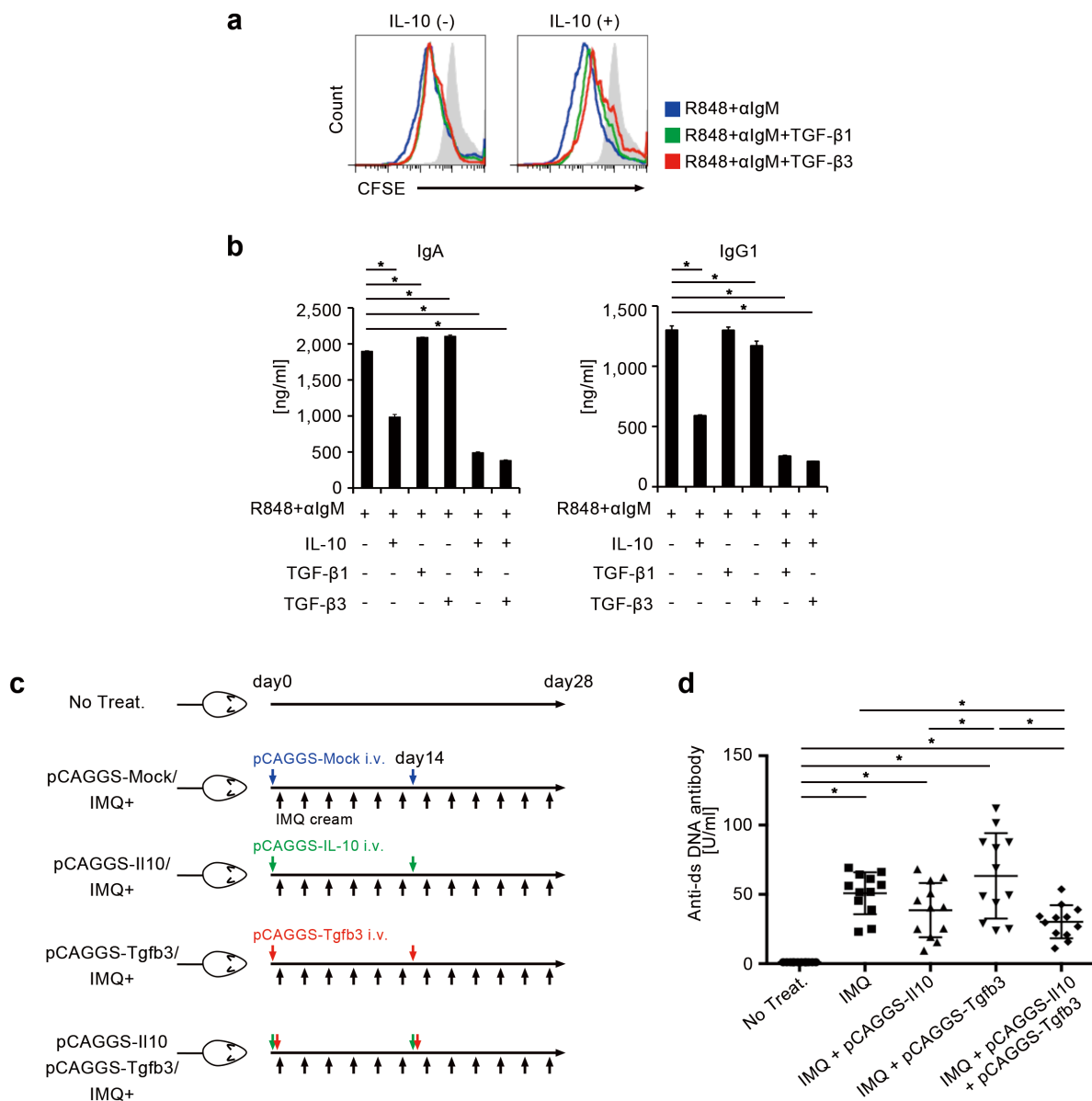


図7 TGF-β3はIL-10と協調してTLR7アゴニストによるループス様病態を改善する

a) CFSE染色したB細胞をR848 + αIgM刺激下でIL-10、TGF-β1またはTGF-β3を添加し3日間培養した。7AAD B220⁺でゲートしたヒストグラムを提示した。

b) B細胞をR848 + αIgM刺激下でIL-10、TGF-β1またはTGF-β3を添加し7日間培養後得られた上清中のIgA、IgG1濃度をELISAで測定した。**p* < 0.05 (Dunnnett's multiple comparison test)。

c) イミキモド塗布ループスモデルマウスにpCAGGS-II10、pCAGGS-Tgfb3を投与した。

d) 4週後の血清抗ds-DNA抗体濃度をELISAにて測定した。**p* < 0.05 (Holm-Sidak's multiple comparisons test)。