

## 論文の内容の要旨

論文題目 TGF- $\beta$  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

全身性エリテマトーデス (SLE) は、抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体などの多彩な自己抗体産生を特徴とする代表的な難治性全身性自己免疫疾患であり、SLE の病態形成において B 細胞は自己抗体や炎症性サイトカインの産生、および自己抗原提示など中心的な役割を担っている。そのため、自己抗体産生メカニズムを介する SLE をはじめとした自己免疫疾患に対する B 細胞をターゲットとした治療が近年注目されてきている。

当研究室では、制御性 T 細胞 (Treg) のサブセットの一つである、IL-10 を高産生する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup>Treg (LAG3<sup>+</sup> Treg) を同定しているが (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 13974)、近年、我々は LAG3<sup>+</sup> Treg が transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) 産生を介して B 細胞活性化を制御することを報告した (*Nat Commun.* 2015; 19; 6: 6329)。

TGF- $\beta$  は細胞の増殖や分化、癌の転移などの幅広い領域で重要な役割を担っているサイトカインである。TGF- $\beta$  には TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 の 3 つのアイソフォームがあるが、これまでの免疫学研究の対象のほとんどは TGF- $\beta$ 1 であると言っても過言ではなく、近年まで TGF- $\beta$ 2,  $\beta$ 3 は免疫学的恒常性維持には関与しないと考えられてきた (*Clin Exp Rheumatol.* 2015; 33: S63)。2012 年に TGF- $\beta$ 3 が病原性の強い Th17 を誘導することが報告されたが (*Nat Immunol.* 2012; 13: 991)、我々は上記報告にて初めて TGF- $\beta$ 3 の抑制性活性を明らかにした。TGF- $\beta$ 1 は B 細胞に対して抗 CD40 抗体 + IL-4 刺激では抗体産生および増殖を抑制するが、TLR シグナル存在下においては IgA 産生を増強する (*Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 99) など、刺激条件により異なった作用を示すという特徴がある。TGF- $\beta$ 3 は TGF- $\beta$ 1 と同じ受容体に結合してシグナルを伝達することから、TGF- $\beta$ 3 も TGF- $\beta$ 1 同様に多彩な作用をもつ可能性が想定された。SLE の発症起点においては各種 TLR signal の関与が報告されており (*Int J Mol Sci.* 2015; 16: 13084)、TLR 刺激を含む各種 B 細胞刺激条件における TGF- $\beta$ 3 の影響につき以下の検討を行った。また、B 細胞活性化を抑制する LAG3<sup>+</sup> Treg は TGF- $\beta$ 3 のみならず IL-10 も高産生することより、IL-10 単独もしくは、TGF- $\beta$ 3 および IL-10 のコンビネーションによる B 細胞への影響についても同時に検討し、両サイトカインが同時に作用する生理的意義についても検証した。

その結果、TGF- $\beta$  は抗 IgM 抗体刺激下の細胞増殖を Syk のリン酸化抑制を介して制御し、抗 CD40 抗体および IL-4 刺激による抗体産生を STAT6 のリン酸化抑制を介して制御することが明らかとなった。ループス様症状を示す C57BL/6<sup>prilpr</sup> マウスは TLR4 を欠損させるとリンパ節腫脹や抗 ds-DNA 抗体産生が改善し (*J Immunol.* 2009; 183: 6207)、TLR4 のループスの病態への関与が指摘されている。そのため TLR4 アゴニストである LPS 刺激下における TGF- $\beta$  および IL-10 の作用につき検討した。その結果、TGF- $\beta$  は LPS 刺激による B 細胞増殖を抑制出来ず、抗体産生を増強した。また、IL-10 は LPS 刺激下の B 細胞増殖を抑制できず、抗体産生を誘導した。そこで、TGF- $\beta$  と IL-10 の両サイトカイン存在下で検討を行ったところ LPS 刺激による B

細胞増殖と抗体産生は抑制された。これら *in vitro* の検討において、TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 3 の作用に有意な差は認めなかった。TGF- $\beta$  および IL-10 単独では抗体産生が誘導されるが、両サイトカインが同時に作用することで逆に抗体産生が抑制される作用を認め、ここで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として提唱する。

生体内においては、TGF- $\beta$ 1 は線維化促進や耐糖能障害の報告がある一方、TGF- $\beta$ 3 は癒傷化の抑制や耐糖能異常改善の効果が報告されていることより (*Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 484、*J Biol Chem.* 2013; 288: 32074)、治療応用を視野に TGF- $\beta$ 3 を中心に以下の検討を行った。TGF- $\beta$ 3 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- $\beta$ 3 単独、IL-10 単独または、TGF- $\beta$ 3 および IL-10 の存在下にて LPS 刺激した B 細胞を次世代シーケンサーを用いて RNA シークエンス解析を行った。変動遺伝子のクラスター解析を行ったところ、無刺激 B 細胞と LPS + TGF- $\beta$ 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、ICS 条件では無刺激状態に近い遺伝子発現プロファイルになることが示された。

オートファジーは細胞内での過剰なタンパク質蓄積や細胞飢餓に対処する、リソソームでのタンパク質分解機構である (*Nat Cell Biol.* 2010; 12: 814)。オートファジーは B 細胞において形質細胞の維持や (*Nat Immunol.* 2013; 14: 298) SLE の病態形成においても中心的役割を果たしている (*Ann Rheum Dis.* 2015; 74: 912)。そこで ICS 条件におけるオートファジー関連遺伝子の発現を調べたところ、遺伝子発現は抑制されており、オートファジーの誘導と相関するタンパク質である LC3II の発現量を GFP-LC3 トランスジェニックマウス (*Mol Biol Cell.* 2004; 15: 1101) 由来の B 細胞を用いて観察したところ、ICS 条件では LC3II 発現が低下しオートファジーは抑制されていた。これらの結果より、TGF- $\beta$ 3、IL-10 の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、抗体産生が制御されると考えられた。

オートファジーを誘導するシグナル経路として、eIF2 $\alpha$ -ATF4 シグナル伝達経路が報告されている (*Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 7683)。eIF2 $\alpha$ -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しているが (*Cell Mol Life Sci.* 2013; 70: 3493)、この経路の遺伝子発現が無刺激条件と ICS 条件で低下しており ICS 作用の重要な経路であることが示唆された。

ATF4 の標的遺伝子 CHOP は IL-6 の転写を増強することが報告されている (*FEBS Lett.* 2003; 541: 33)。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 (*J Immunol.* 1993; 151: 6525)。そこで IL-6 産生について検討したところ、ICS 条件で培養した B 細胞では IL-6 産生が完全に抑制されており、ICS 条件では eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路抑制を介した 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 細胞以外にもあり (*Nat Immunol.* 2015; 16: 448)、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。

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 (*Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 823)。TLR7 アゴニストであるイミキモド (IMQ) をマウスに塗布するとループス様症状を呈することが報告されており (*Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 694)、この IMQ 塗布ループスモデルマウスを用いて IL-10 および TGF- $\beta$ 3 の生体内における効果を検討した。目的の遺伝子をほぼ全身性に過剰発現させることができる pCAGGS プラスミドベクター (*Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289: 1088) を用いて、IMQ

塗布ループモデルマウスの生体内で TGF- $\beta$ 3 および IL-10 を誘導した。その結果、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制御し協調的に作用した。

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。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いる (*Nat Rev Rheumatol.* 2015; 11: 328)。今回の検討から、B 細胞をターゲットとした IL-10 および TGF- $\beta$ 3 の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る可能性が示唆された。