

博士論文

ヒト B 細胞における
トランスフォーミング増殖因子- β 3 の作用の検討

土田 優美

目次	
目次	2
要旨	3
序文	4
方法	10
B 細胞の分離	10
細胞培養	10
抗体産生の評価	11
細胞分裂の評価	11
フローサイトメトリー	12
RNA-Seq	13
定量的ポリメラーゼ連鎖反応	14
ウェスタンブロット法	15
統計学的分析	17
結果	18
TGF- β 3 は IL-21 と sCD40L 刺激下での B 細胞機能を抑制する	18
TGF- β 1、 β 3 は Toll 様受容体-9 刺激下での B 細胞機能を抑制する	20
TGF- β 1、 β 3 投与により、B 細胞のトランスクリプトームは大きく変化する	21
TGF- β 1、 β 3 は、抗体産生細胞(ASC)に重要な転写因子を抑制する	25
TGF- β 1、 β 3 は、Syk のリン酸化を抑制する	27
TGF- β 3 は、Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こす	28
TGF- β 1、 β 3 は、SLE 患者の B 細胞の抗体産生も抑制する	30
考察	31
謝辞	37
引用文献	38

ヒト B 細胞における

トランスフォーミング増殖因子- $\beta 3$ の作用の検討

所属:大学院医学系研究科内科学専攻 博士課程

生体防御腫瘍内科学講座 アレルギー・リウマチ学

指導教員名: 山本 一彦

申請者名: 土田 優美

要旨

トランスフォーミング増殖因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)は、免疫において抑制性のサイトカインとして知られているが、TGF- $\beta 3$ の報告は限られている。近年、マウスにおいて TGF- $\beta 3$ が B 細胞の増殖・抗体産生を抑制することが報告された。ヒト B 細胞に対する TGF- $\beta 3$ の作用は明らかでなく、今回ヒト B 細胞に対する TGF- $\beta 3$ の作用を検討した。TGF- $\beta 3$ は、ヒト B 細胞の増殖、抗体産生を抑制した。TGF- $\beta 3$ は、Syk のリン酸化を抑制し、抗体産生細胞への分化に重要である Blimp-1 等の転写因子の発現を抑制した。TGF- $\beta 3$ を介した治療が、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患に有用である可能性が示唆された。

序文

トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)は、当初線維芽細胞の形質転換を促す因子として報告されたサイトカインである[1, 2]。その後、TGF- β は、細胞増殖、アポトーシス、発生、分化等、形質転換以外にも様々な生命活動に関与することが報告され、がん、動脈硬化、発生、免疫等あらゆる分野において着目されている[3-7]。

TGF- β は、アクチビン(activin)、骨形成因子(bone morphogenetic protein、BMP)等とともに、TGF- β スーパーファミリーに属する[8]。哺乳類において、TGF- β にはアミノ酸配列の異なる3つのアイソフォームが報告されている[8, 9]。いずれのアイソフォームも、latency associated protein(LAP)と結合し二量体となり、small latent complex(SLC)を形成、更に latent TGF- β binding protein(LTBP)と結合して分泌される[8, 9]。この状態でTGF- β は活性を持たず、plasmin や matrix metalloproteinase(MMP)等のプロテアーゼ(protease)、インテグリン(integrin)等によって活性化されることによって、TGF- β はその機能を発揮するようになる。TGF- β 1、 β 2、 β 3 のいずれも、リガンドが結合することによりTGF- β receptor I(T β RI)とTGF- β receptor II(T β RII)が複合体を形成し、T β RIがリン酸化され、キナーゼ(kinase)としての活性を持つようになり、下流の分子にシグナルが伝わる[8, 9]。

TGF- β 1、 β 2、 β 3 の発現臓器や時期が異なることや[10, 11]、それぞれのアイソフォームの欠損マウスの表現型が大きく異なること等から、アイソフォームによって生物学的意義が異なると考えられている。具体的なアイソフォームによる発現部位の違いに関しては、評価方法・文献によって異なるが、一般的には、TGF- β 1 が最も広範に発現しているアイソフォームとされている[8, 10-12]。TGF- β 1 欠損マウスは、卵黄囊の血管や造血の異常のため胎性致死となることがあり[13, 14]、胎性致死とならない場合には、生後種々の臓器で炎症細胞浸潤が見られることから、TGF- β 1 は、発生や免疫系の制御に重要であると考えられている[15, 16]。ヒトにおいても、TGF β 1 の多型は、関節リウマチ[17-19]、強皮症[20, 21]等の自己免疫疾患との関連が報告されている。その他、TGF- β 1 の多型は癌[22-24]や心血管イベント[25, 26]、骨粗鬆症[27]、糖尿病性腎症[28]等、様々な疾患との関連が報告されており、あらゆる臓器の生理において重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、TGF- β 2は胎児の神経細胞、グリア細胞、腎臓等で発現が高いとされている[8, 10]。TGF- β 2 欠損マウスでは、心血管系や肺、頭蓋顔面、四肢、尿路系等、様々な臓器に奇形が見られ、これらの臓器の発生において重要と考えられている[14]。ヒトで、TGF- β 2 の変異は、ファロー四徴症[29]、大動脈瘤や大動脈解離[30]との関連が報告されている。

TGF-β3 は、発生中の口蓋、心血管系、筋肉、乳腺等での発現が高く[10, 12]、発生における上皮・間葉系の組織の相互作用に重要なサイトカインとされている。TGF-β3 欠損マウスでは口蓋裂や肺の低形成が見られる[14, 31, 32]。ヒトで TGF-β3 の変異や多型は、口蓋裂・口唇裂[33]、大動脈瘤や大動脈解離[34]、不整脈原性右室異形成[35]、筋肉量の低下や関節拘縮を伴う奇形症候群[36]等との関連が報告されており、これらの臓器の発生、ホメオスターシスに重要であると考えられている。TGF-β3 の多型は、肺病変を伴うサルコイドーシスとの関連も報告されており、TGF-β3 は、ヒトにおける免疫の制御に関与している可能性が示唆されている[37, 38]。

ノックアウトマウスの表現型の違いの多くは、発現臓器や時期による違いによるものと考えられているが、TGF-β1 欠損マウスの TGF-β1 遺伝子座に TGF-β3 遺伝子を導入したマウスの表現型は野生型と異なるため、TGF-β1 と β3 の作用は完全には同一ではないと考えられている[39]。また、

アイソフォーム特異的な中和抗体を損傷部位に添加した際の作用が異なること[40]等からも、TGF-β1 と β3 は発現の制御機構だけでなく、その生物学的活性も異なると考えられている。特に損傷治癒の過

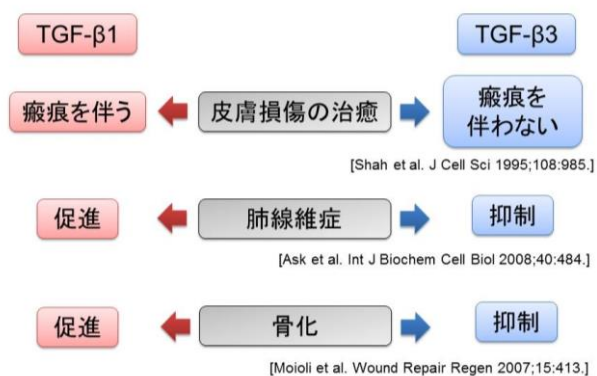


図 1. TGF-β1 と β3 の異なる作用

TGF-β1 と β3 は異なる作用を発揮することもある。文献 40、42、44 をもとに作図。

程における線維化への影響が、TGF- β 1 と β 3 で異なるという報告は複数あり、皮膚[40, 41]、肺[42]、角膜[43]の損傷治癒において、TGF- β 1 は線維化を促し、TGF- β 3 はこれを抑制すると報告されている。また、TGF- β 1 は骨化を促すが、TGF- β 3 は抑制する[44]。糖の代謝に対する影響も TGF- β 1 と TGF- β 3 で異なると報告されている[39] (図 1)。TGF- β 1、 β 3 とともに同じ受容体を介して作用するにも関わらず、その生物学的活性が異なる理由としては、受容体に結合した際のリガンドと受容体の複合体の形態が異なるためと考えられている[12]。

前述の通り、ノックアウトマウスの表現型等から、TGF- β 1 は免疫の制御に重要と考えられており、TGF- β の3つのアイソフォームのうち、免疫では、今まで主に TGF- β 1 が着目を浴びてきた。TGF- β 1 は、免疫系のあらゆる細胞に作用することが知られている。TGF- β 1 は、過剰な免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の代表例である Foxp3 制御性 T 細胞 (Foxp3⁺ Treg) の分化を促す[45, 46]。一方、TGF- β 1 は、インターロイキン (IL) -6 等の炎症性サイトカインと同時に存在すると、炎症を惹起する Th17 細胞への分化を促進する[47-49]。また、TGF- β 1 は、樹状細胞 (dendritic cell、DC) の遊走能を抑制し、また DC による共刺激分子 (co-stimulatory molecule) や炎症性サイトカインの発現を抑制する[50]。TGF- β 1 は natural killer 細胞 (NK 細胞) の増殖、活性も抑制する[51]。

B 細胞に関しては、TGF- β 1 がマウス・ヒト B 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導すること、抗体産生を抑制することが古くから報告されている[52-58]。しかし、一部

の条件では、TGF-β1 は B 細胞の増殖、IgA へのクラススイッチ、IgA の産生を促し、その作用は環境に依存する[59-61]。生体内で、TGF-β1 は、Foxp3⁺ Treg の膜表面に発現しており、Foxp3⁺ Treg による B 細胞の抑制に関与する[62]。B 細胞自身も TGF-β1 を分泌し、その分裂の抑制に関わるとの報告もある[63-65]。

近年、主にマウスでの研究から、免疫においても TGF-β3 の重要性が認識されるようになりつつある。例えば、マウス B 細胞が TGF-β3 を産生し、Foxp3⁺ Treg の増殖を促す[66]。また、マウスにおいて、TGF-β3 存在下で誘導された Th17 細胞は、TGF-β1 存在下で誘導された Th17 細胞と比較して、炎症を惹起する能力が高いとの報告もある[67]。また、TGF-β3 の産生が亢進している T 細胞特異的 tripartite motif containing 28 (TRIM28) 欠損マウスでは、自己反応性の T 細胞の増加が認められる[68]。

それまで、TGF-β3 の液性免疫 (humoral immunity) への影響の報告はなかったが、最近当研究室から TGF-β3 がマウスの液性免疫の制御において重要であることが報告された。CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞 (LAG3⁺ Treg) は、2009 年当

研究室から報告された IL-10 を産生する制御性 T 細胞であり、細胞表面マーカー lymphocyte activation gene-3 (LAG3)、転写因子 early growth response gene-2 (Egr2) の発現を特徴とする[69]。2015 年 1 月マウ

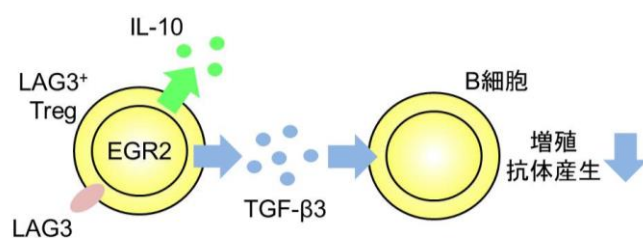


図 2. TGF-β3 とマウス B 細胞

LAG3⁺ Treg は、TGF-β3 を介して B 細胞の機能を抑制する。文献 69、70 をもとに作図。

スにおいて、LAG3⁺ Treg が、TGF-β3 を産生し、TGF-β3 を介して、B 細胞の活性化、増殖、抗体産生を抑制することが報告された[70](図 2)。また、TGF-β3 発現ベクターの投与により、全身性自己免疫疾患の代表例である全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus、SLE)のモデルマウスの病勢は改善し、TGF-β3 の治療応用が、自己免疫疾患に有用である可能性が示唆された[70]。

今までヒト B 細胞に対する TGF-β3 の作用の報告はなく、今回私はヒト末梢血 B 細胞を使用し、ヒト B 細胞における TGF-β3 の作用を検討した。TGF-β3 は、TGF-β1 と同様に、ヒト B 細胞の増殖、抗体産生細胞(antibody secreting cell、ASC)への分化、抗体産生を抑制した。

TGF-β1 による B 細胞の抑制は以前から報告されているものの、そのメカニズムの検討は腫瘍学の文脈で悪性リンパ腫細胞を使用したものが多く、正常な免疫系の B 細胞における TGF-β による抑制のメカニズム、特に抗体産生に関連する経路への影響に関しては不明な点が多い。今回、その点に関して、初代培養のヒト末梢血 B 細胞を使用し、RNA-Sequencing (RNA-Seq)によるトランスクリプトーム解析、細胞内染色やウェスタンブロット法を用いて検討した。

方法

B 細胞の分離

健康人の末梢血から Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) による密度勾配遠心 (density gradient centrifugation) にて末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells、PBMC) を分離した。Ammonium chloride potassium (ACK) 溶血緩衝液を用いて溶血を行った後、Human B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を使用し、ネガティブセレクションで B 細胞を磁気細胞分離 (Magnetic Activated Cell Sorting、MACS) した。大部分の実験において、精度 95% 以上の B 細胞が得られた。健康人末梢血の使用は、東京大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会にて承認を受けている (承認番号: G3582)。

細胞培養

細胞の培養では、特に記載のない限り、RPMI1640 (Invitrogen) に 10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum、FCS) (Equitech Bio)、100 μ g/ml L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Invitrogen)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (Sigma) を添加した培地を使用した。一部の試験では、FCS の TGF- β の作用を除外するため、X-VIVO15 (Lonza) を使用した。

細胞は原則として $3 \times 10^5 / 150 \mu\text{l} / \text{well}$ で 96 穴プレートを用いて培養を行った。SLE 患者と健常人の B 細胞での TGF- β 1、TGF- β 3 の作用の比較の際には、SLE 患者の末梢血において、リンパ球、B 細胞が少ないことから、 $1 \times 10^5 / 150 \mu\text{l} / \text{well}$ で培養を行った。Smad 蛋白のリン酸化の評価の際には $1.3 \times 10^6 / 1 \text{ml} / \text{well}$ で 24 穴プレートを用いて培養した。

TGF- β 1、TGF- β 3 (R&D) は、特に記載のない限り 1ng/ml で使用した。インターロイキン-21 (IL-21) (PeproTech) は 50ng/ml、可溶性 CD40 リガンド (sCD40L) (PeproTech) は 2 μ g/ml、CpG-ODN 2006 (Enzo Life Sciences) は 6 μ g/ml で使用した。B 細胞受容体 (BCR) 刺激には、Goat anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch) を 2.5 μ g/ml で投与した。

抗体産生の評価

IL-21 と sCD40L 刺激の場合には 11 日後、CpG-ODN2006 刺激の場合には 7-8 日後に上清を回収した。IgG、IgA、IgM は、それぞれ Human IgG ELISA Quantitation Set、Human IgA ELISA Quantitation Set、Human IgM ELISA Quantitation Set (Bethyl) および ELISA Starter Accessory Kit (Bethyl) を用いて定量した。

細胞分裂の評価

2%FCS 含有の培地に、 1×10^7 /ml の濃度で B 細胞を浮遊させ、最終濃度 $2 \mu\text{M}$ となるように Carboxyfluorescein Succinimidyl ester (同仁化学研究所) を添加し、5 分間、室温にて標識を行った。その後、100% FCS で洗浄、10%FCS 入りの培地に細胞を再浮遊し、培養した。IL-21 と sCD40L 刺激の場合には 5 日後、CpG-ODN2006 刺激の場合には 6 日後にフローサイトメトリー解析を行った。

フローサイトメトリー

Human Fc Receptor Binding Inhibitor Purified (eBioscience) で非特異的な抗体結合を阻害し、次のモノクローナル抗体での染色を行った。HLA-DR の発現評価の際には、CD19-APC (clone: HIB19, BioLegend)、HLA-DR-PE (clone: L243, eBioscience) で染色を行い、CD38^{high} 形質芽細胞への分化を評価する際には、CD19-APCCy7 (clone: HIB19, BioLegend)、CD38-APC (clone: HIT2, BioLegend) で染色を行った。

死細胞率の評価には、7-Amino-Actinomycin D (Biolegend) を使用した。CFSE による細胞分裂を評価する際や、細胞表面マーカーを解析する際にも、培養期間 5 日間以上の細胞を解析する場合には、死細胞の影響を除去するため、7-Amino-Actinomycin D (Biolegend) を併用した。

Blimp-1 の細胞内染色には、Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer (eBioscience)、Blimp-1 (N-20) AF488 (Santa Cruz) を使用した。リン酸化 STAT3 の細

胞内染色の評価の際には、反応時間終了後、細胞を 2%パラホルムアルデヒドで固定し、96%メタノールで細胞膜を透過させ、PE Mouse Anti-Stat3 (pY705) (BD) で染色した。

フローサイトメトリー解析には、MoFlo XDP (Beckman Coulter) を使用した。データは FlowJo 7.6.5 (Tree Star) で解析した。

RNA-Seq

IL-21 と sCD40L、もしくは、CpG-ODN2006 刺激下で、B 細胞を 48 時間培養した。RNA は RNeasy micro kit (Qiagen) で抽出し、TruSeq Stranded mRNA LT Kit (Illumina) を使用してライブラリー調整、MiSeq (Illumina) で、paired-end のシーケンシングを行った。Cutadapt[71]、FASTX-Toolkit (<http://hannonlab.cshl.edu/fastx-toolkit>) を使用し、アダプター配列、phred クオリティスコア 20 未満の末端をトリミングした。Quality control 後のリード数は、 $5.9 \times 10^5 \sim 8.2 \times 10^5$ であった。UCSC hg19 reference sequence (<http://genome.ucsc.edu/>) を reference genome とし、STAR[72] を用いてマッピングを行い、UCSC gene model をもとに HTSeq[73] を用いて各遺伝子の read count を求めた。ライブラリー調整、シーケンシング、マッピング、read count の算出は理化学研究所 統合生命医科学研究センター自己免疫疾患研究チームに依頼した。

Trimmed Mean of M-values (TMM) normalization[74]を行い、 $\log_2(\text{count}+2)$ を用いて、limma[75]の plotMDS 機能を使用し multi-dimensional scaling (MDS) plot を作図した。MA plot の作図および発現変動遺伝子 (differentially expressed genes、DEG) の判定には、edgeR[76]を使用した。Benjamini-Hochberg 法により false discovery rate (FDR) 0.05 以下となる遺伝子を DEG とした。RNA-Seq データの解析には、R version 3.1.1 を使用した。

前述の基準により DEG と判定された遺伝子群の遺伝子名および log fold change (log FC) を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen) (<http://www.ingenuity.com/>) に入力し、パスウェイ解析を行った。

定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction、PCR)

RNeasy micro kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、random primers (Invitrogen)、Superscript III (Invitrogen) を用いて、相補的 DNA (complementary DNA、cDNA) を作成した。定量的 PCR には、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen)、CFX コネクトリアルタイム PCR (BioRad) を使用した。使用したプライマーは表 1 の通りであり、遺伝子発現量の比較は、GAPDH を基準とした比較 Ct 法を用いて行った。

表 1. 定量的 PCR で使用したプライマー配列

遺伝子名		プライマー配列
GAPDH	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC
IRF4	Forward	ACCTGCAAGCTCTTTGACAC
	Reverse	AAAGCATAGAGTCACCTGGAATC
PRDM1	Forward	GTGTCAGAACGGGATGAACA
	Reverse	GCTCGGTTGCTTTAGACTGC
XBP1	Forward	CCGCAGCACTCAGACTACG
	Reverse	TGCCCAACAGGATATCAGACT

ウェスタンブロット法

反応時間終了後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline、PBS) で洗浄し、Halt Protease Inhibitor Cocktail、Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) を添加した Lysis バッファー (50mM Tris HCl pH 7.5、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mM EDTA) で、細胞を溶解した。Laemmli Sample Buffer (BioRad) を加え、95°C、5 分間沸騰し、変性させた。

ミニプロテイン TGX ゲル 7.5% (BioRad) および 10 倍希釈したプレミックスバッファー 10x トリス/グリシン/SDS (BioRad) を用いて、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。その後、セミドライ式ブロッティングにて、Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore) に転写した。

5% ウシ血清アルブミン (Sigma) もしくはスキムミルク (雪印) を使用し、2 時間以上室温でブロッキングを行った。その後、抗 phospho-Syk (Tyr525/526) (C87C1) 抗体 (Cell Signaling)、もしくは、抗 phospho-Smad1/5 (Ser463/465) (41D10) 抗体 (Cell Signaling)、抗 phospho-Smad3 (Ser423/425) (C25A9) 抗体 (Cell Signaling) で、4°C、一晩インキュベートし、翌日 horseradish peroxidase (HRP) -Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Zymed) で、室温で 1 時間インキュベートした。検出には、ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を使用し、画像は ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて取得した。

ストリッピングは、抗 phospho-Smad1/5 抗体の場合には、Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) で 2 時間、室温でインキュベートした。抗 phospho-Syk 抗体、抗 phospho-Smad3 抗体の場合には、上記バッファーでの処理後もシグナルが残存することから、自作のストリッピング・バッファー (50mM 2-メルカプトエタノール (Sigma)、2% ドデシル硫酸ナトリウム、100mM Tris-HCl) で、50°C、30 分間インキュベートした。

ストリッピングの後再度ブロッキングを行い、抗 Syk 抗体 (Cell Signaling)、もしくは、抗 Actin (I-19) 抗体 (Santa Cruz)、抗 phospho-Smad2 (Ser465/467) (138D4) 抗体 (Cell Signaling) でインキュベートし、以後前述の通り、二次抗体のインキュベーションおよび

検出を行った。バンドの濃度は、ImageQuant TL ver 9.1 (GE Healthcare)を用いて評価した。

統計学的分析

データは、平均値±標準偏差として記載した。RNA-Seq データ以外のデータの統計学的分析には、GraphPad Prism 5 を使用し、2 群間の比較には、Mann-Whitney の U 検定を使用した。多群間の比較には、一元配置分散分析法 (one way analysis of variance、one way ANOVA)、Dunnett 法を使用した。p 値 0.05 以下を有意と判定した。

結果

TGF- β 3 は IL-21 と sCD40L 刺激下での B 細胞機能を抑制する

B 細胞の活性化のメカニズムは、T 細胞依存性と T 細胞非依存性に大別される。T 細胞依存性の活性化において、B 細胞は、リンパ組織の胚中心 (germinal center) の濾胞性ヘルパーT 細胞 (follicular helper T cell、Tfh) の膜表面に発現している CD40L 等の共分子 (costimulatory molecule)、および、Tfh が分泌する IL-21 を初めとしたサイトカイン等による刺激を受ける。これらのシグナルにより、B 細胞は生存・増殖し、形質芽細胞 (plasmablast)・形質細胞 (plasma cell) といった抗体産生細胞 (antibody secreting cell、ASC) に分化し、抗体を産生する[77]。

今回、T 細胞依存性の B 細胞活性化のモデルの一例として、IL-21 と sCD40L 刺激下でのヒト末梢血 B 細胞への影響を検討した。TGF- β 1 と同様に、TGF- β 3 は IL-21 と sCD40L 刺激下での IgG、IgA、IgM の産生を抑制した (図 3A)。また、培地のウシ胎児血清には、LTBP と結合し、生物学的活性を持たない latent form が主体であるものの、1-2ng/ml の TGF- β 1 が含まれている[78]。その影響を除いて、TGF- β 1、TGF- β 3 の作用を検討するため、非血清培地を使用して同様の実験を行い、同様の結果を得た (図 3B)。TGF- β 1 と同じく、TGF- β 3 の投与により、死細胞は増加し、細胞死の増加が TGF- β 3 による抗体産生抑制のメカニズムの一因である可能性が示唆された (図 3C)。また、TGF- β 3 は、TGF- β 1 と同様に、B 細胞の分裂、CD38^{high} 形質芽細胞への分化

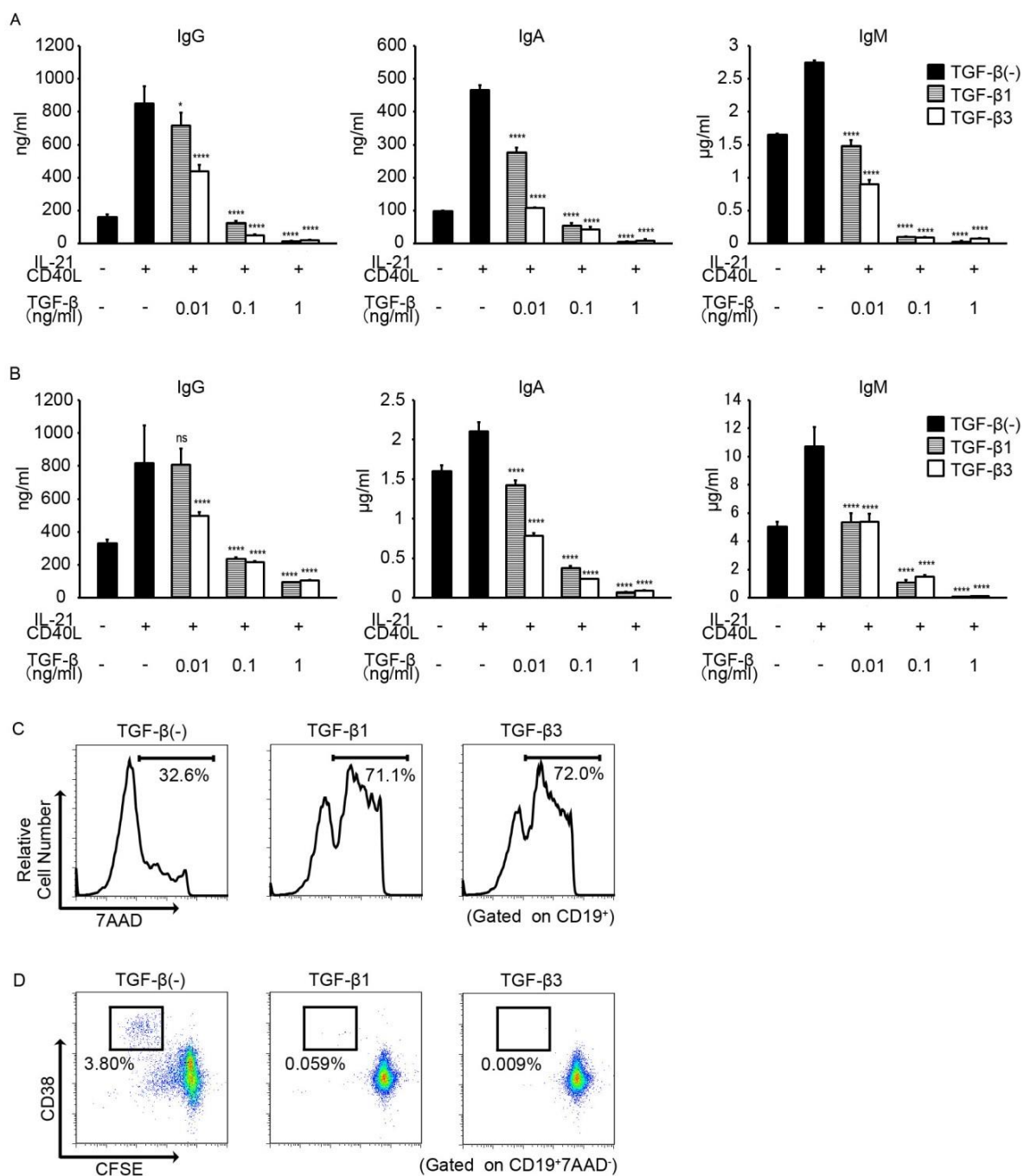


図 3. TGF-β3 は IL-21 と sCD40L 刺激下での B 細胞機能を抑制する。
 B 細胞を IL-21 と sCD40L 刺激下で 11 日間 (A)血清培地、(B)非血清培地で培養し、抗体産生を評価した。IL-21 と sCD40L 刺激を行ったサンプルにおいて、TGF-β を投与した各群と TGF-β 非投与群を Dunnett 法で比較した (n=3)。ns は $p \geq 0.05$ 、* は $p < 0.05$ 、****は $p < 0.0001$ を示す。
 B 細胞を IL-21 と sCD40L で 5 日間刺激し、(C)死細胞率、(D)分裂と形質芽細胞への分化を評価した。
 (A)、(B)、(D)は 2 回、(C)は 3 回の類似した実験の代表的な結果である。

も抑制し、TGF- β 1、 β 3 による B 細胞の抗体産生の抑制には、B 細胞の細胞死の増加に加えて、B 細胞の増殖の抑制および ASC への分化の抑制が関与していることが示唆された(図 3D)。

TGF- β 1、 β 3 は Toll 様受容体-9 刺激下での B 細胞機能を抑制する

一部の抗原は、BCR をクロスリンク (cross link) すること、Toll 様受容体 (Toll-like receptor、TLR) を刺激することにより、T 細胞非依存性に B 細胞活性化を促

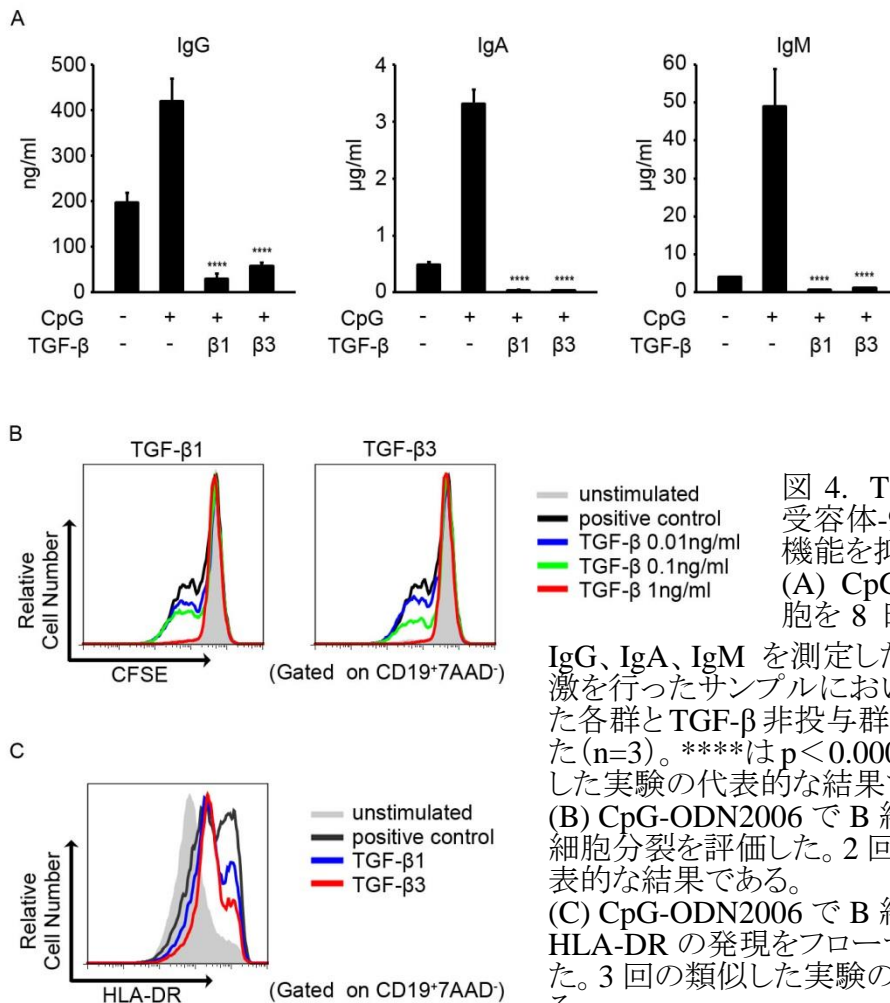


図 4. TGF- β 1、 β 3 は Toll 様受容体-9 刺激下での B 細胞機能を抑制する。

(A) CpG-ODN2006 で、B 細胞を 8 日間刺激し、上清での IgG、IgA、IgM を測定した。CpG-ODN2006 刺激を行ったサンプルにおいて、TGF- β を投与した各群と TGF- β 非投与群を Dunnett 法で比較した (n=3)。****は p<0.0001 を示す。2 回の類似した実験の代表的な結果である。

(B) CpG-ODN2006 で B 細胞を 6 日間刺激し、細胞分裂を評価した。2 回の類似した実験の代表的な結果である。

(C) CpG-ODN2006 で B 細胞を 7 日間刺激し、HLA-DR の発現をフローサイトメトリーで評価した。3 回の類似した実験の代表的な結果である。

す[79]。TLR 刺激下でのヒト B 細胞への TGF- β の影響の検討は、TGF- β 1 も含めて限られており、今回、TLR-9 のアゴニストである CpG-ODN 2006 刺激で B 細胞を刺激し、TGF- β 1、 β 3 による影響を検討した。

TGF- β 1、 β 3 は、CpG-ODN 2006 刺激による B 細胞の IgG、IgA、IgM の産生を抑制した(図 4A)。また、CpG-ODN2006 刺激下での細胞の増殖は、TGF- β 1、 β 3 によって濃度依存性に抑制された(図 4B)。TGF- β 1、TGF- β 3 は、HLA-DR の発現を抑制し(図 4C)、B 細胞の抗原提示細胞としての機能も抑制する可能性が示唆された。

TGF- β 1、 β 3 投与により、B 細胞のトランスクリプトームは大きく変化する

以上をまとめると、TGF- β 3 は、T 細胞依存性・非依存性の活性化において、TGF- β 1 と同様に、ヒト B 細胞の増殖や抗体産生を抑制する。

TGF- β 1 によるヒト B 細胞の抑制は以前から報告されているものの、その機序の検討は、腫瘍学の文脈の中で、悪性リンパ腫由来の細胞株を使用したものがほとんどである[65, 80-83]。初代培養のヒト B 細胞を用いた検討は少なく、TGF- β による B 細胞抑制のメカニズムの検討は p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA) や、BCL2-interacting killer (BIK)、BCL2-like 1 (BCL2L1) 等のがん遺伝子やがん抑制遺伝子、アポトーシス関連遺伝子に限られており、抗体産生に関連する経路への報告は限られている[65, 80]。

がん化の過程において、細胞の TGF- β への感受性が変化することは多々あり、悪性リンパ腫細胞と正常の B 細胞では、TGF- β の受容体、および、そのシグナル伝達に関わる分子の発現が異なると報告されている[8, 82, 83]。そのため、正常な B 細胞において TGF- β が B 細胞を抑制するメカニズムを解明するに当たっては、初代培養の B 細胞を使用し、TGF- β 作用のメカニズムを検討する必要があると考えた。

TGF- β による B 細胞抑制のメカニズムを検討するため、IL-21 と sCD40L 刺激もしくは CpG-ODN2006 刺激下で健常人 2 名の B 細胞を培養し、TGF- β 1、TGF- β 3 の投与によるトランスクリプトームへの影響を RNA-Seq で比較した。いずれの刺激下でも、TGF- β を投与した B 細胞では、トランスクリプトームに大きな変化が認められ、TGF- β 1 と β 3 によるトランスクリプトームへの影響は類似していた (図 5A)。

B 細胞が抗体産生細胞へ分化する際に重要であるインターフェロン調節因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF4) は、IL-21 と sCD40L 刺激および CpG-ODN2006 刺激のいずれの刺激下においても、TGF- β 3 によって抑制された[84] (図 5B、5C)。また、B 細胞の生存を抑制する dual specificity phosphatase 4 (DUSP4) [85]、Sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) [86]、および、B 細胞の活性化を抑制する Fc receptor-like 4 (FCRL4) [87] は、いずれの刺激下でも、TGF- β 3 による発現の亢進が認められた (図 5B、5C)。

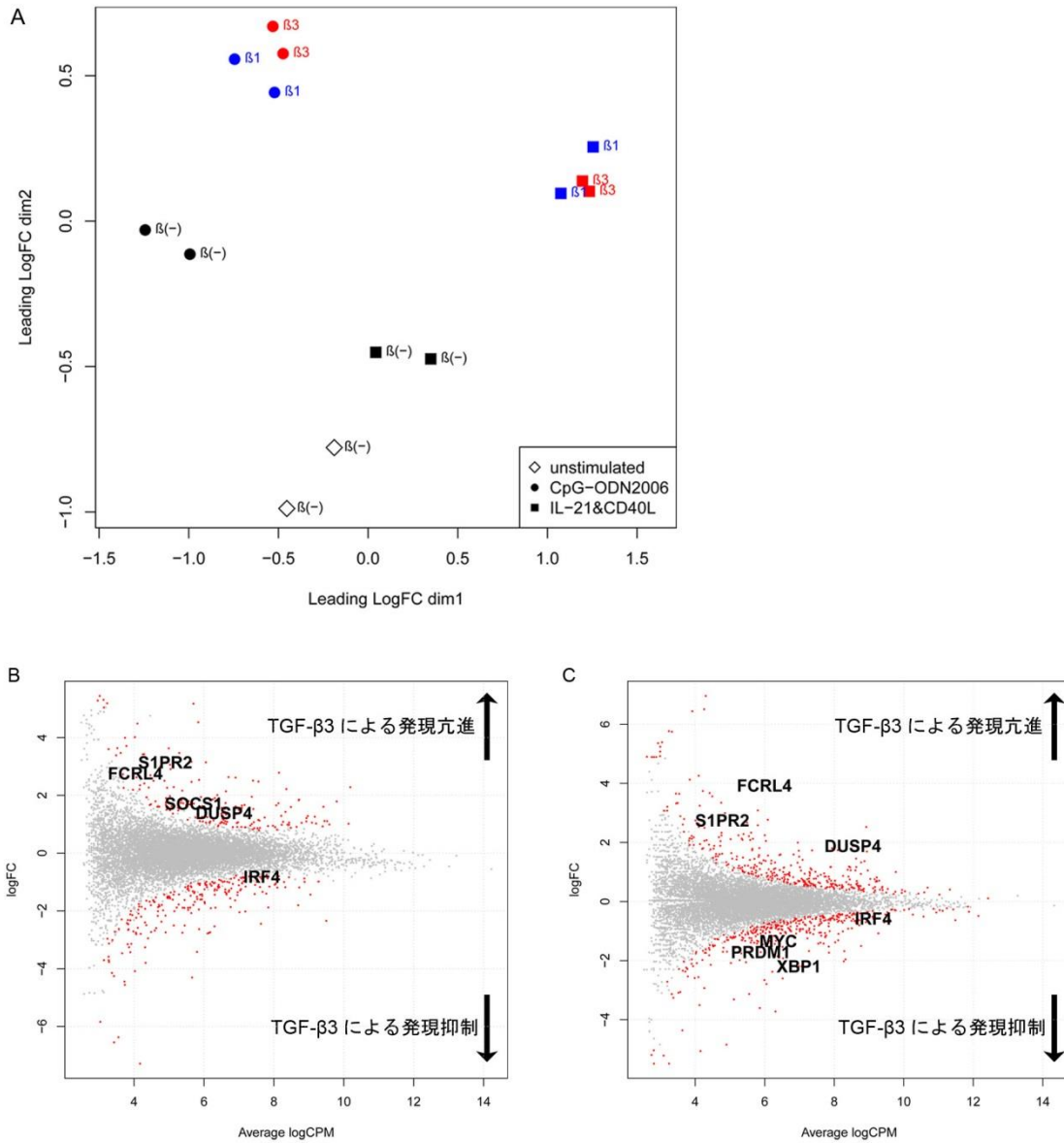


図5. TGF-β1、β3の投与により、B細胞のトランスクリプトームは大きく変化する。健康人2名のB細胞をIL-21とsCD40L刺激およびCpG-ODN2006刺激下で培養し、TGF-β非投与群(β(-))、TGF-β1投与群(β1)、TGF-β3投与群(β3)を比較した。(A) MDS plot。(B) IL-21とsCD40L刺激下、(C) CpG-ODN2006刺激下でのTGF-β非投与群 vs. TGF-β3投与群のMA plot。赤色がDEGを示す。一部のDEGの遺伝子名も併せて提示した。

その他、IL-21 と sCD40L 刺激下では、TGF- β 3 の投与により、Janus kinase (Jak) -signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路を抑制する suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) の発現の亢進が認められた[88]。また、CpG-ODN2006 刺激下において、TGF- β 3 は、ASC への分化に関わる PRDM1、X-box 結合タンパク質 1 (X-box binding protein 1, XBP1) [84]、細胞増殖に重要である c-Myc[89]等の発現を抑制した(図 5C)。

CpG-ODN2006 刺激下での、TGF- β 非投与群と TGF- β 3 投与群の間での DEG を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて解析したところ、unfolded protein response (UPR) に関連する遺伝子が、多く含まれていた(表 2)。UPR は、小胞体において、正常な構造に折りたたまれない蛋白質が蓄積することに伴う細胞毒性 (Endoplasmic reticulum stress、小胞体ストレス) から細胞を守るための機構であり、適切に UPR が惹起されないと、小胞体ストレスから細胞は細胞死に至る。ASC は、大量の抗体を産生し、それに伴い正常な構造に折りたたまれない蛋白質も多く発生することから、ASC において UPR は重要であり、ASC においては、XBP1 が UPR の誘導に重要な役割を担っている[84, 90]。

表 2. CpG-ODN2006 刺激下で TGF- β による変動が予測されるパスウェイ

Canonical Pathway	p-value
Unfolded protein response	0.000
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	0.000
tRNA Charging	0.000
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	0.002
IL-4 Signaling	0.003
Cholesterol Biosynthesis I	0.003
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	0.003
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	0.003
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	0.003
p53 Signaling	0.005
TR/RXR Activation	0.005
Glycolysis I	0.005
B Cell Receptor Signaling	0.009
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	0.009

IPA を使用し、CpG-ODN2006 刺激下での TGF- β 非投与群と TGF- β 3 投与群の間での発現変動遺伝子の canonical pathway 解析を行った。p-value は、DEG が、IPA に登録されている既知のパスウェイ (canonical pathway) 中の分子と偶然一致する確率を Fisher's exact test で評価し、Benjamini Hochberg 法による多重検定補正を行った結果を示す。p 値 0.01 以下となるパスウェイを提示した。

TGF- β 1、 β 3 は、ASC に重要な転写因子を抑制する

刺激を受けた B 細胞では、核内因子 κ B (nuclear factor-kappa B、NF κ B) や STAT3 が活性化し、それらを介して IRF4、B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1; 遺伝子 PRDM1 によってエンコードされる) が誘導され、これらによって、XBP1 が誘導されるとされている[84, 91-93] (図 6A)。TGF- β 1、 β 3 による抗体産生の抑制のメカニズムの一つとして、この経路が抑制されている可能性を考え、TGF- β 1、 β 3 によるこの経路への影響を検討した。

まず、定量的 PCR で、IRF4、PRDM1、XBP1 の発現を評価した。これらの遺伝子の発現は、TGF- β 1、 β 3 によって抑制された(図 6B、6C)。さらに、Blimp-1 に関しては、細胞内染色を行い、蛋白質のレベルでも TGF- β 1、 β 3 によって抑制されることを確認した(図 6D)。なお、STAT3 のリン酸化に関しては、TGF- β 1、 β 3 投与による変化は認めなかった(図 6E)。

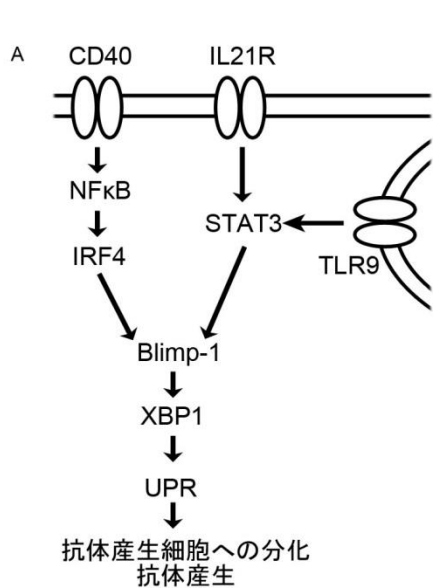


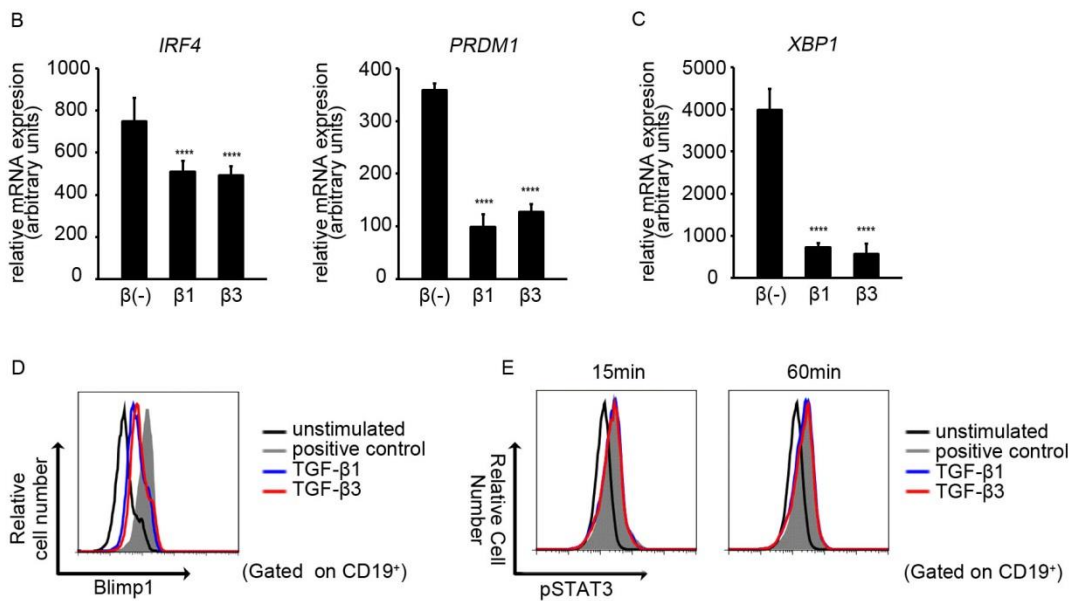
図 6. TGF- β 1、 β 3 は、ASC への分化に重要な転写因子を抑制する。

(A) ASC への分化に関わる分子の模式図。文献 84、90-93 をもとに作成。

IL-21 と sCD40L 刺激下で、(B)3 日間、(C)5 日間培養した B 細胞で定量的 PCR を行った。TGF- β 非投与群(β -)を、TGF- β を投与した各群 (TGF- β 1 : β 1、TGF- β 3 : β 3)と Dunnett 法で比較した ($n=3$)。****は $p < 0.0001$ を示す。3 回の類似した実験の代表的な結果である。

(D) B 細胞を IL-21 と sCD40L、CpG ODN2006 刺激下で 4 日間培養し、細胞内染色で Blimp-1 の発現を比較した。2 回の類似した実験の代表的な結果である。

(E) B 細胞を一晩 TGF- β 非投与下もしくは TGF- β 1、 β 3 投与下で培養した後、15 分もしくは 60 分 IL-21 で刺激し、STAT3 のリン酸化を評価した。2 回の類似した実験の代表的な結果である。



TGF- β 1、 β 3 は、Syk のリン酸化を抑制する

前述のパスウェイ解析にて、B 細胞受容体 (BCR) シグナリングに関連する分子も、DEG に多く含まれていたことから(表 2)、次に、この経路に着目した。Syk は、BCR 刺激によって、リン酸化を受け、活性化するチロシンキナーゼであり、BCR 刺激後の B 細胞の大部分の反応において必須な分子である[94]。BCR 刺激後、Syk を介して、NF κ B や nuclear factor of activated T cells (NFAT)、activator protein-1 (AP-1) 等の B 細胞の生存、増殖、ASC への分化に重要な転写因子が活性化される(図 7A)[95]。Syk は、BCR 刺激だけでなく、TLR9 刺激によってもリン酸化を受け、TLR9 刺激による B 細胞の増殖・抗体産生にも必須であると報告されている(図 7A)[92, 96]。

関節リウマチや SLE 等の自己免疫疾患の患者の末梢血 B 細胞では、Syk のリン酸化が亢進しており、Syk はこれらの疾患の病態生理において重要と考えられている[97-99]。TGF- β 1、 β 3 は、マウス B 細胞における Syk のリン酸化を抑制すると報告されているが[53, 70]、ヒト B 細胞における報告はない。

ウェスタンブロット法により、TGF- β 1、 β 3 投与下で BCR 刺激後の Syk のリン酸化を評価した。TGF- β 1、 β 3 ともに、Syk のリン酸化を抑制した(図 7B)。

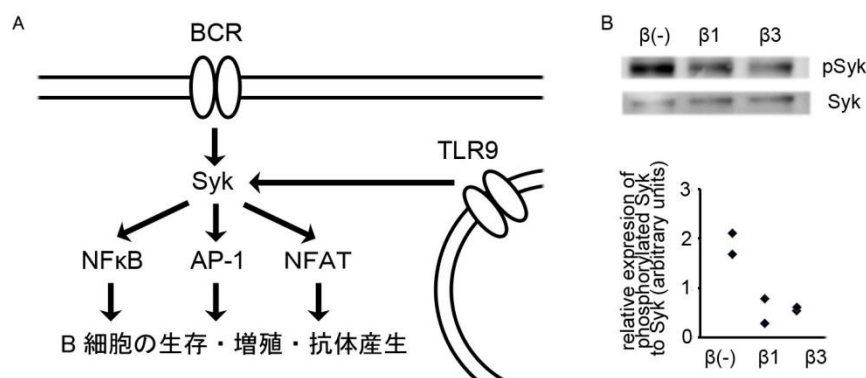


図 7. TGF- β 1、 β 3 は、Syk のリン酸化を抑制する。
 (A) Syk に関連する分子の模式図。文献 92、94-96 をもとに作図。
 (B) B 細胞に一晩培地のみ($\beta(-)$)もしくは TGF- β 1(β 1)、 β 3(β 3)を投与した後、15 分間 BCR 刺激を行い、Syk のリン酸化をウェスタンブロット法にて評価した。2 回の類似した実験の代表的な結果を示す。サンプル量の制限のため、各実験ともに $n=2$ であり、統計学的検定は行わなかった。

TGF- β 3 は、Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こす

TGF- β スーパーファミリーのサイトカインのシグナル伝達には、Smad 蛋白が重要である。Smad 蛋白は、receptor-activated Smad (R-Smad)、common Smad (co-Smad)、inhibitory Smad (I-Smad) の 3 種類に分類される。リガンドが受容体することにより、R-Smad がリン酸化を受け、co-Smad の Smad4 と複合体を形成し、核内に移行しその作用を発揮する[4]。R-Smad には、Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8 の 5 種類が知られており、一般的には、TGF- β の場合には、Smad2・Smad3 がリン酸化され、Smad1・Smad5・Smad8 は BMP 等の TGF- β スーパーファミリーの他のサイトカインのシグナル伝達に関与するとされている[4]。

しかし、B 細胞特異的 Smad2 欠損マウス、Smad3 欠損マウスを用いた検討から、TGF- β 1 によるマウス B 細胞抑制には Smad2、Smad3 は必要でない可能性が示唆さ

れている[100, 101]。また、B 細胞系のヒト悪性リンパ腫細胞を用いた検討では、TGF- β 1 による B 細胞の増殖抑制には、Smad2・Smad3 ではなく、Smad1・Smad5 のリン酸化が関与している可能性が示唆されており、ヒト末梢血 B 細胞で TGF- β 1 は Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こすと報告されている[83]。

そのため、TGF- β 3 によるヒト B 細胞の抑制に Smad1・Smad5 のリン酸化が関与している可能性を考え、TGF- β 3 も Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こすか検討した。血液中の TGF- β の影響を除くため、ヒト末梢血 B 細胞を一晩非血清培地で培養した後、TGF- β 1、 β 3 で刺激を行い、ウェスタンブロット法にて Smad1・Smad5 のリン酸化を評価した。TGF- β 3 は、TGF- β 1 と同様に、Smad2、Smad3 の Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こした(図 8)。

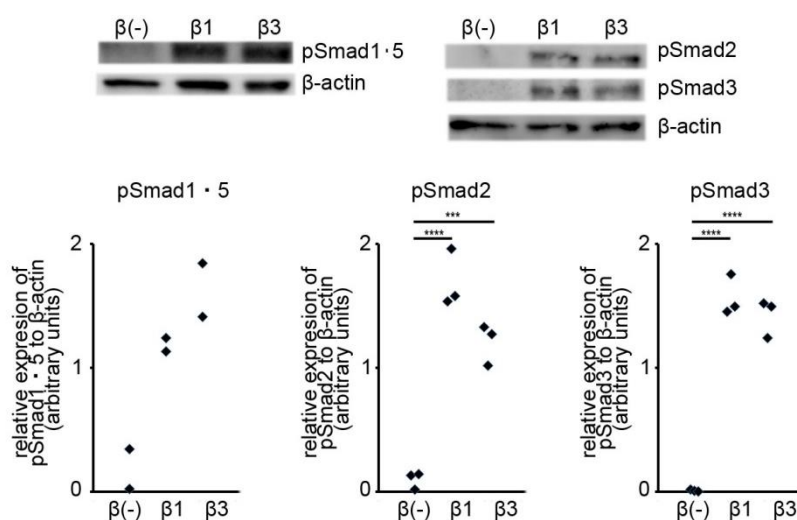


図 8. TGF- β 3 は、Smad2、Smad3 に加えて Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こす。一晩非血清培地で培養した B 細胞を 1 時間 TGF- β 1 もしくは β 3 10ng/ml で刺激し、Smad のリン酸化を評価した。2 回の類似した実験の代表的な結果を示す。サンプル量の制限のため、Smad1・5 は、各実験ともに n=2 であり統計学的検定は行わなかった。Smad2、Smad3 は、TGF- β 非投与群(beta(-))を、TGF- β を投与した各群と Dunnett 法で比較した(n=3)。***は p<0.001、****は p<0.0001 を示す。

TGF- β 1、 β 3 は、SLE 患者の B 細胞の抗体産生も抑制する

SLE 患者の末梢血リンパ球では、健常人と TGF- β の受容体の発現が異なると報告されている[102]。そのため、SLE 患者の B 細胞では、TGF- β 1、 β 3 の作用が健常人と異なる可能性を考え、SLE 患者の B 細胞に TGF- β 1、 β 3 を投与し、IgG 産生への影響を検討した。SLE 患者の B 細胞の抗体産生も、TGF- β 1、 β 3 によって抑制され、3 例という今回の限られた検討の中では、健常人との有意な差は見られなかった(図 9)。

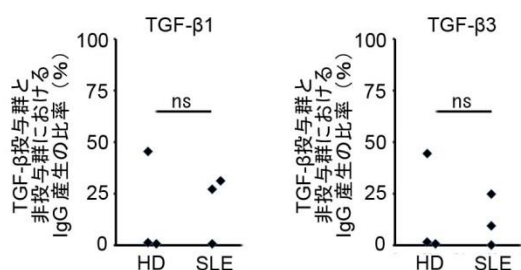


図 9. TGF- β 1、 β 3 は、SLE 患者の B 細胞抗体産生も抑制する。健常人 (HD) 3 名と SLE 患者 (SLE) 3 名の B 細胞を CpG-ODN2006 刺激下で 7 日間培養し、TGF- β 1、 β 3 の投与による抗体産生を評価した。Mann-Whitney の U 検定。ns は $p \geq 0.05$ を示す。

考察

TGF- β の 3 つのアイソフォームのうち、免疫における TGF- β 1 の重要性は長年認識されていたものの、免疫系における TGF- β 3 に関する検討は少なかった。しかし、最近マウスでの検討から、免疫においても、TGF- β 3 の重要性が指摘されている[66, 67, 70]。今までヒト B 細胞における TGF- β 3 の作用の検討はなく、今回私はヒト末梢血 B 細胞に対する TGF- β 3 の作用を検討した。TGF- β 3 は、TGF- β 1 と同様に、IL-21 と sCD40L 刺激、CpG-ODN2006 刺激のいずれの刺激下においても、B 細胞の増殖と抗体産生を抑制した。

TGF- β 1、 β 2 によるヒト B 細胞の抑制は古くから報告されているものの[54, 103]、その機序の検討は、腫瘍学の文脈の中で、悪性リンパ腫由来の細胞株を使用したものが多く、初代培養の B 細胞を用いた検討は限られている[80-82]。がん化の過程において、TGF- β への感受性や、TGF- β 受容体および TGF- β のシグナル伝達にかかわる分子の発現が変化することもあることから[82, 83]、初代培養の B 細胞を使用し TGF- β による B 細胞抑制の機序を検討する必要があると考え、ヒト末梢血 B 細胞を用いて、TGF- β による B 細胞抑制の機序を検討した。

RNA-Seq にて、TGF- β 1、 β 3 による B 細胞のトランスクリプトームへの影響を評価し、パスウェイ解析を行ったところ、TGF- β 3 は、ASC にとって重要である UPR に関わる遺伝子に大きく影響を与えることが推測された。そのため、ASC における UPR の誘導に

重要である XBP1 への影響を検討し、TGF- β 1、 β 3 は、XBP1 とその誘導に関わる IRF4 や Blimp-1 の発現を抑制することを示した。その他、パスウェイ解析の結果、TGF- β 3 は、BCR シグナリングにも影響を与えることが推測されたことから、TGF- β 1、 β 3 による BCR シグナリングへの影響を検討し、BCR シグナリングに重要である Syk のリン酸化が TGF- β 1、 β 3 によって抑制されることを示した。

IRF4 を誘導する因子の一つとして NF κ B が知られており[104]、マウス B 細胞において TGF- β 1 は NF κ B の抑制因子である I kappa-B (I κ B) の発現を誘導することにより、NF κ B の活性を抑えることが報告されている[105]。TGF- β 1、 β 3 はヒト B 細胞においても、I κ B の発現を誘導することにより NF κ B を抑制し、NF κ B の抑制を介して IRF4 や Blimp-1 等の転写因子、ASC への分化を抑制している可能性が考えられる。また、BCR 刺激により I κ B の分解が亢進し、NF κ B が活性化されることから[106]、NF κ B の抑制には、Syk の抑制も関与している可能性がある(図 10)。

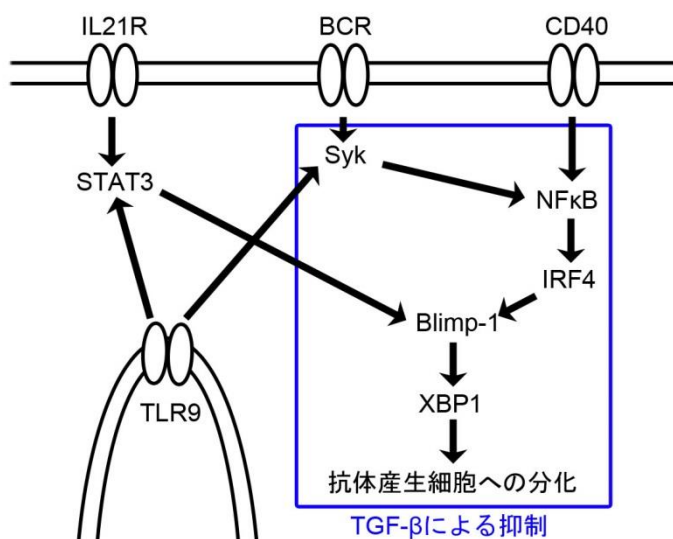


図 10. TGF- β 1、 β 3 によるヒト B 細胞抑制の機序
TGF- β 1、 β 3 によるヒト B 細胞抑制の機序の模式図。今回の実験結果および文献 89、90-96 をもとに作図した

通常 TGF- β 1 や β 3 のシグナル伝達には Smad2・Smad3 が重要であるとされているものの、TGF- β 1 によるヒト B 細胞の抑制には、Smad1・Smad5 が重要と報告されており [107]、今回 TGF- β 3 も Smad1・Smad5 のリン酸化を引き起こすことを示した。Smad1・Smad5 によって誘導される因子の一つとして、inhibitor of differentiation (Id) が知られている [108]。マウス B 細胞において、Id3 は、リンパ球の分化や増殖の制御に重要である E protein の作用を拮抗することにより、B 細胞のアポトーシスや増殖抑制を引き起こすことが示唆されており [109]、ヒト B 細胞においても Smad1・Smad5 は、Id3 の誘導を介して B 細胞を抑制している可能性が考えられる。

なお、同じく Smad1・Smad5 を介して作用する BMP-6 は、ヒト B 細胞において、XBP1 を抑制するものの、IRF4、Blimp-1 は抑制しないと報告されており [107]、今回の TGF- β 1、 β 3 が IRF4 と Blimp-1 を抑制するという結果と異なる。この相違は、細胞密度や培地等の培養条件による差の可能性もあるが、BMP-6 と TGF- β 1、 β 3 で B 細胞抑制の機序が異なる可能性も否定できない。具体的には、TGF- β は、Smad 蛋白を介さず、mitogen activated protein kinase (MAPK) 等の non-Smad pathway を介して作用することもあり [8]、non-Smad pathway が TGF- β 1、 β 3 によるヒト B 細胞の抑制に関わっている可能性も考えられる。今回、non-Smad pathway に関する検討は不十分であり、今後より詳細な検討が必要である。

なお、今回行った検討の大部分において、濃度が同じである場合、TGF- β 1、 β 3 の作用は同じであった。しかし、部位・時期にもよるが、多くの場面において、生体内での TGF- β 1、 β 3 の濃度は異なる。例えば、血漿において、TGF- β 1 濃度は 0.1ng/ml から 25ng/ml と報告されており[110]、TGF- β 3 濃度は 0.1ng/ml[111]から 1.6ng/ml[110]と報告されており、TGF- β 1 の方がやや高い。血小板中に、TGF- β 1 は 4000 分子/個、TGF- β 3 は 10 分子/個含まれており[110]、血小板が活性化する損傷治癒の場面等においては、TGF- β 1 の濃度が高いと考えられる。一方、臍帯では TGF- β 3 の濃度が高いと報告されている[112]。そのため、試験管内で同じ濃度の TGF- β 1 と β 3 の作用が同じでも、生体内での意義は異なる可能性がある。

本研究にはいくつか限界がある。まず、今回行った実験は、いずれも試験管内での系であり、活性化した TGF- β 1、 β 3 を使用したが、生体内で TGF- β は LTBP と結合し活性を持たない状態で分泌され、その作用を発揮するにはインテグリン等による活性化が必要である[8, 9]。生体内で TGF- β 1、 β 3 が B 細胞に作用する際に、TGF- β 1、 β 3 を活性化している分子、および、それを発現している細胞に関しては、まだ検討が不十分である。

また、今回 TGF- β 1、 β 3 の B 細胞全体への影響のみを見ており、B 細胞のサブセットによって、TGF- β 1、 β 3 の影響が異なるか検討できていない。TGF- β 1、 β 3 と同じく TGF- β スーパーファミリーに属する BMP6 および BMP7 に関しては、ナイーブ B 細胞

とメモリーB細胞を分離してヒトB細胞への影響を検討した報告があり、抗体産生や細胞分裂、ASCへの分化への影響は、ナイーブB細胞とメモリーB細胞で同じ傾向であることが報告されている[107, 113]。そのため、TGF- β 1、 β 3も、ナイーブB細胞、メモリーB細胞両者の機能を抑制する可能性が高いと考えられる。しかし、BMP6のヒトB細胞アポトーシスへの影響は、ナイーブB細胞とメモリーB細胞で異なるとの報告もあり[113]、今後ナイーブB細胞とメモリーB細胞を分離し、TGF- β 1、 β 3の作用を検討する必要があると考えられる。

また、FCRL4等、TGF- β 1、 β 3によるB細胞の抑制に関与していると思われる分子の一部に関しては、RNA-Seqの一手法のみでの検討となっており、今後定量的PCR等、他の手法での確認が必要であると考えられる。さらに、SLE患者と健常人のB細胞でのTGF- β 1、 β 3の作用の比較は、ごく少数例であり、今後より多くの症例、より多彩な症例での検討が必要である。

SLEのモデルマウスの病勢はTGF- β 3発現ベクターの投与で改善し[70]、今回TGF- β 3がヒトB細胞の機能を抑制することが示されたことから、TGF- β 3を介した治療がヒトの自己免疫疾患に有用である可能性が示唆される。今回の検討において、TGF- β 1と β 3は両者ともに同じようにヒトB細胞を抑制したが、他臓器におけるTGF- β 1と β 3の作用は異なるため、TGF- β 3の方がより自己免疫疾患の治療に適している可能性がある[39, 42-44]。具体的には、TGF- β 1では他臓器の線維化や耐糖能の悪化等

の副作用が懸念されるが[39, 42-44]、TGF- β 3 はこのような副作用を起こさずに、自己免疫疾患における過剰な B 細胞の活性化を抑制できる可能性が考えられる。

TGF- β 3 の治療応用を検討するに当たっては、追加で検討が必要な点がある。まず、強皮症において、TGF- β 1、 β 2、 β 3 の全てのアイソフォームに対する中和抗体である fresolimumab[114]は皮膚硬化を改善するものの、TGF- β 1 のみに対する CAT-192 では改善が見られなかった[115]。この解離の原因の一つとして、TGF- β 2、 β 3 が強皮症における皮膚硬化に関与しており、その中和を行うことによって、治療効果が得られた可能性が指摘されている[114]。そのため、自己免疫疾患への TGF- β 3 の治療応用を検討するに当たっては、強皮症様の病態を引き起こさないか十分に注意が必要であると考えられる。

また、マウス T 細胞において、TGF- β 3 は、炎症を惹起する能力の高い Th17 細胞の誘導[67]や自己反応性の T 細胞の増加[68]との関連が報告されているため、TGF- β 3 の投与により、炎症が悪化する可能性も否定できない。この点に関しては、今後ヒト T 細胞に対する TGF- β 3 の作用の検討が必要と思われ、また TGF- β 3 の治療応用に当たっては、抗体とサイトカインを融合させ特定の部位のみに作用させる antibody-cytokine fusion protein[116]としての治療応用も検討される。臨床応用に向けての検討課題はまだ多いが、本研究により、TGF- β 3 の治療応用に向けて一歩前進したと思われる。

謝辞

本研究をすすめるにあたりまして、東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学山本一彦教授に、多くのご指導、ご支援をいただきました。心より感謝申し上げます。

また、研究開始の段階から現在に至るまで懇切丁寧な指導をしていただきました藤尾圭志講師、岡村僚久助教、住友秀次助教に心より感謝いたします。また、マウスにおける同テーマに取り組んでいる研究室の森田薫大学院生、井上眞理子大学院生、駒井俊彦大学院生にも、実験上の様々なアドバイスをいただき、感謝いたします。

理化学研究所統合生命医科学研究センター自己免疫疾患研究チームの高地雄太上級研究員、鈴木亜香里上級研究員、石垣和慶研究員には、RNA-Seq 解析の実施、データ解析におきまして、多大なご協力をいただき、深く感謝いたします。

引用文献

1. Roberts, AB, Sporn, MB, Assoian, RK, Smith, JM, Roche, NS, Wakefield, LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A.83:4167-71,1986.
2. de Larco, JE, Todaro, GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci U S A.75:4001-5,1978.
3. Roberts, AB, Anzano, MA, Wakefield, LM, Roche, NS, Stern, DF, Sporn, MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. Proc Natl Acad Sci U S A.82:119-23,1985.
4. Kamato, D, Burch, ML, Piva, TJ, Rezaei, HB, Rostam, MA, Xu, S, et al. Transforming growth factor-beta signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation. Cell Signal.25:2017-24,2013.
5. Principe, DR, Doll, JA, Bauer, J, Jung, B, Munshi, HG, Bartholin, L, et al. TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. J Natl Cancer Inst.106:djt369,2014.
6. McCaffrey, TA. TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis. Cytokine Growth Factor Rev.11:103-14,2000.

7. Travis, MA, Sheppard, D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.*32:51-82,2014.
8. Kubiczikova, L, Sedlarikova, L, Hajek, R, Sevcikova, S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.*10:183,2012.
9. Lafyatis, R. Transforming growth factor beta--at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.*10:706-19,2014.
10. Pelton, RW, Saxena, B, Jones, M, Moses, HL, Gold, LI. Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol.*115:1091-105,1991.
11. Pelton, RW, Dickinson, ME, Moses, HL, Hogan, BL. In situ hybridization analysis of TGF beta 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF beta 1 and beta 2. *Development.*110:609-20,1990.
12. Lavery, HG, Wakefield, LM, Occleston, NL, O'Kane, S, Ferguson, MW. TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine Growth Factor Rev.*20:305-17,2009.
13. Dickson, MC, Martin, JS, Cousins, FM, Kulkarni, AB, Karlsson, S, Akhurst, RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development.*121:1845-54,1995.

14. Dunker, N, Krieglstein, K. Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem.*267:6982-8,2000.
15. Shull, MM, Ormsby, I, Kier, AB, Pawlowski, S, Diebold, RJ, Yin, M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.*359:693-9,1992.
16. Kulkarni, AB, Karlsson, S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol.*143:3-9,1993.
17. Ceccarelli, F, Perricone, C, Fabris, M, Alessandri, C, Iagnocco, A, Fabro, C, et al. Transforming growth factor beta 869C/T and interleukin 6 -174G/C polymorphisms relate to the severity and progression of bone-erosive damage detected by ultrasound in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*13:R111,2011.
18. Matthey, DL, Nixon, N, Dawes, PT, Kerr, J. Association of polymorphism in the transforming growth factor {beta}1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*64:1190-4,2005.

19. Zhang, L, Yan, JW, Wang, YX, Wan, YN, Li, JP, Liu, P, et al. Association of TGF-beta1 +869C/T promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.*40:4811-7,2013.
20. Wan, YN, Wang, YJ, Yan, JW, Li, XP, Tao, JH, Wang, BX, et al. The effect of TGF-beta1 polymorphism on systemic sclerosis: a systematic review and pooled analysis of available literature. *Rheumatol Int.*33:2859-65,2013.
21. Crilly, A, Hamilton, J, Clark, CJ, Jardine, A, Madhok, R. Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.*61:678-81,2002.
22. Vinod, C, Jyothy, A, Vijay Kumar, M, Raghu Raman, R, Nallari, P, Venkateshwari, A. Heterozygosity for TGF beta1 -509C/T Polymorphism is associated with risk for breast cancer in South Indian population. *Tumour Biol.*34:99-105,2013.
23. Ma, J, Liu, YC, Fang, Y, Cao, Y, Liu, ZL. TGF-beta1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. *Genet Mol Res.*14:4461-8,2015.
24. Wang, Y, Yang, H, Li, L, Xia, X. An updated meta-analysis on the association of TGF-beta1 gene promoter -509C/T polymorphism with colorectal cancer risk. *Cytokine.*61:181-7,2013.

25. Sie, MP, Uitterlinden, AG, Bos, MJ, Arp, PP, Breteler, MM, Koudstaal, PJ, et al. TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study. *Stroke*.37:2667-71,2006.
26. Najar, RA, Ghaderian, SM, Panah, AS. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with genetic susceptibility to acute myocardial infarction. *Am J Med Sci*.342:365-70,2011.
27. Sun, J, Zhang, C, Xu, L, Yang, M, Yang, H. The transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene polymorphisms (TGF-beta1 T869C and TGF-beta1 T29C) and susceptibility to postmenopausal osteoporosis: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*.94:e461,2015.
28. Zhou, TB, Jiang, ZP, Qin, YH, Drummen, GP. Association of transforming growth factor-beta1 T869C gene polymorphism with diabetic nephropathy risk. *Nephrology (Carlton)*.19:107-15,2014.
29. Gao, Y, Ma, XJ, Huang, GY, Zhang, J, Wang, HJ, Ma, D, et al. DNA sequencing of TGFbeta2 in sporadic patients with tetralogy of Fallot. *Exp Ther Med*.3:878-80,2012.
30. Boileau, C, Guo, DC, Hanna, N, Regalado, ES, Detaint, D, Gong, L, et al. TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet*.44:916-21,2012.

31. Proetzel, G, Pawlowski, SA, Wiles, MV, Yin, M, Boivin, GP, Howles, PN, et al.
Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.*11:409-14,1995.
32. Kaartinen, V, Voncken, JW, Shuler, C, Warburton, D, Bu, D, Heisterkamp, N, et al.
Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.*11:415-21,1995.
33. Tang, M, Wang, Y, Han, S, Guo, S, Wang, D. Transforming growth factor-beta3 gene polymorphisms and nonsyndromic cleft lip and palate risk: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.*17:881-9,2013.
34. Bertoli-Avella, AM, Gillis, E, Morisaki, H, Verhagen, JM, de Graaf, BM, van de Beek, G, et al. Mutations in a TGF-beta ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J Am Coll Cardiol.*65:1324-36,2015.
35. Vanderschuren, KL, Sieverink, T, Wilders, R. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy type 1: a light on molecular mechanisms. *Genet Res Int.*2013:460805,2013.
36. Rienhoff, HY, Jr., Yeo, CY, Morissette, R, Khrebtukova, I, Melnick, J, Luo, S, et al. A mutation in TGFB3 associated with a syndrome of low muscle mass, growth retardation,

- distal arthrogyrosis and clinical features overlapping with Marfan and Loeys-Dietz syndrome. *Am J Med Genet A*.161a:2040-6,2013.
37. Kruit, A, Grutters, JC, Ruven, HJ, van Moorsel, CH, Weiskirchen, R, Mengsteab, S, et al. Transforming growth factor-beta gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis. *Chest*.129:1584-91,2006.
38. Pabst, S, Franken, T, Schonau, J, Stier, S, Nickenig, G, Meyer, R, et al. Transforming growth factor- β gene polymorphisms in different phenotypes of sarcoidosis. *Eur Respir J*.38:169-75,2011.
39. Hall, BE, Wankhade, UD, Konkel, JE, Cherukuri, K, Nagineni, CN, Flanders, KC, et al. Transforming growth factor-beta3 (TGF-beta3) knock-in ameliorates inflammation due to TGF-beta1 deficiency while promoting glucose tolerance. *J Biol Chem*.288:32074-92,2013.
40. Shah, M, Foreman, DM, Ferguson, MW. 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.
41. Finnson, KW, McLean, S, Di Guglielmo, GM, Philip, A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. In. *Adv Wound Care* (New Rochelle);195-214, 2013.

42. Ask, K, Bonniaud, P, Maass, K, Eickelberg, O, Margetts, PJ, Warburton, D, et al. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *Int J Biochem Cell Biol.*40:484-95,2008.
43. Karamichos, D, Hutcheon, AE, Zieske, JD. Reversal of fibrosis by TGF-beta3 in a 3D in vitro model. *Exp Eye Res.*124:31-6,2014.
44. Moioli, EK, Hong, L, Mao, JJ. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen.*15:413-21,2007.
45. Chen, W, Jin, W, Hardegen, N, Lei, KJ, Li, L, Marinos, N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.*198:1875-86,2003.
46. Peng, Y, Laouar, Y, Li, MO, Green, EA, Flavell, RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101:4572-7,2004.
47. Banchereau, J, Pascual, V, O'Garra, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol.*13:925-31,2012.
48. Wilson, NJ, Boniface, K, Chan, JR, McKenzie, BS, Blumenschein, WM, Mattson, JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.*8:950-7,2007.

49. Yang, L, Anderson, DE, Baecher-Allan, C, Hastings, WD, Bettelli, E, Oukka, M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*.454:350-2,2008.
50. Flavell, RA, Sanjabi, S, Wrzesinski, SH, Licona-Limon, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*.10:554-67,2010.
51. Marcais, A, Viel, S, Grau, M, Henry, T, Marvel, J, Walzer, T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol*.4:450,2013.
52. Leberman, DA, Edmiston, JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect*.1:1297-304,1999.
53. Roes, J, Choi, BK, Cazac, BB. Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.100:7241-6,2003.
54. Kehrl, JH, Thevenin, C, Rieckmann, P, Fauci, AS. Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol*.146:4016-23,1991.
55. Petit-Koskas, E, Genot, E, Lawrence, D, Kolb, JP. Inhibition of the proliferative response of human B lymphocytes to B cell growth factor by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*.18:111-6,1988.

56. Armitage, RJ, Macduff, BM, Spriggs, MK, Fanslow, WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol.*150:3671-80,1993.
57. Sonoda, E, Matsumoto, R, Hitoshi, Y, Ishii, T, Sugimoto, M, Araki, S, et al. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med.*170:1415-20,1989.
58. Bouchard, C, Fridman, WH, Sautes, C. Effect of TGF-beta1 on cell cycle regulatory proteins in LPS-stimulated normal mouse B lymphocytes. *J Immunol.*159:4155-64,1997.
59. Dullaers, M, Li, D, Xue, Y, Ni, L, Gayet, I, Morita, R, et al. A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity.*30:120-9,2009.
60. Coffman, RL, Lebman, DA, Shrader, B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med.*170:1039-44,1989.
61. van Vlasselaer, P, Punnonen, J, de Vries, JE. Transforming growth factor-beta directs IgA switching in human B cells. *J Immunol.*148:2062-7,1992.

62. Nakamura, K, Kitani, A, Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.*194:629-44,2001.
63. Jelacic, K, Cimbri, R, Nawaz, F, Huang da, W, Zheng, X, Yang, J, et al. The HIV-1 envelope protein gp120 impairs B cell proliferation by inducing TGF-beta1 production and FcRL4 expression. *Nat Immunol.*14:1256-65,2013.
64. Matthes, T, Werner-Favre, C, Tang, H, Zhang, X, Kindler, V, Zubler, RH. Cytokine mRNA expression during an in vitro response of human B lymphocytes: kinetics of B cell tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)6, IL-10, and transforming growth factor beta 1 mRNAs. *J Exp Med.*178:521-8,1993.
65. Spender, LC, O'Brien, DI, Simpson, D, Dutt, D, Gregory, CD, Allday, MJ, et al. TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL. *Cell Death Differ.*16:593-602,2009.
66. Shah, S, Qiao, L. Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population via TGF-beta3. *Eur J Immunol.*38:2488-98,2008.
67. Lee, Y, Awasthi, A, Yosef, N, Quintana, FJ, Xiao, S, Peters, A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.*13:991-9,2012.

68. Chikuma, S, Suita, N, Okazaki, IM, Shibayama, S, Honjo, T. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development in vivo. *Nat Immunol.*13:596-603,2012.
69. Okamura, T, Fujio, K, Shibuya, M, Sumitomo, S, Shoda, H, Sakaguchi, S, et al. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106:13974-9,2009.
70. Okamura, T, Sumitomo, S, Morita, K, Iwasaki, Y, Inoue, M, Nakachi, S, et al. TGF-beta3-expressing CD4+CD25(-)LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Commun.*6:6329,2015.
71. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.*17:10-2,2011.
72. Dobin, A, Davis, CA, Schlesinger, F, Drenkow, J, Zaleski, C, Jha, S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.*29:15-21,2013.
73. Anders, S, Pyl, PT, Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.*31:166-9,2015.
74. Robinson, MD, Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.*11:R25,2010.

75. Ritchie, ME, Phipson, B, Wu, D, Hu, Y, Law, CW, Shi, W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*43:e47,2015.
76. Robinson, MD, McCarthy, DJ, Smyth, GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.*26:139-40,2010.
77. Crotty, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.*15:185-9,2015.
78. Oida, T, Weiner, HL. Depletion of TGF-beta from fetal bovine serum. *J Immunol Methods.*362:195-8,2010.
79. Rawlings, DJ, Schwartz, MA, Jackson, SW, Meyer-Bahlburg, A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol.*12:282-94,2012.
80. Spender, LC, Carter, MJ, O'Brien, DI, Clark, LJ, Yu, J, Michalak, EM, et al. Transforming growth factor-beta directly induces p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) during the rapid induction of apoptosis in myc-driven B-cell lymphomas. *J Biol Chem.*288:5198-209,2013.

81. Bakhshayesh, M, Zaker, F, Hashemi, M, Katebi, M, Solaimani, M. TGF-beta1-mediated apoptosis associated with SMAD-dependent mitochondrial Bcl-2 expression. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.*12:138-43,2012.
82. Chen, G, Ghosh, P, Osawa, H, Sasaki, CY, Rezanka, L, Yang, J, et al. Resistance to TGF-beta 1 correlates with aberrant expression of TGF-beta receptor II in human B-cell lymphoma cell lines. *Blood.*109:5301-7,2007.
83. Bakkebo, M, Huse, K, Hilden, VI, Smeland, EB, Oksvold, MP. TGF-beta-induced growth inhibition in B-cell lymphoma correlates with Smad1/5 signalling and constitutively active p38 MAPK. *BMC Immunol.*11:57,2010.
84. Nutt, SL, Hodgkin, PD, Tarlinton, DM, Corcoran, LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.*15:160-71,2015.
85. Schmid, CA, Robinson, MD, Scheifinger, NA, Muller, S, Cogliatti, S, Tzankov, A, et al. DUSP4 deficiency caused by promoter hypermethylation drives JNK signaling and tumor cell survival in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med.*212:775-92,2015.
86. Green, JA, Cyster, JG. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol Rev.*247:36-51,2012.

87. Sohn, HW, Krueger, PD, Davis, RS, Pierce, SK. FcRL4 acts as an adaptive to innate molecular switch dampening BCR signaling and enhancing TLR signaling. *Blood*.118:6332-41,2011.
88. Shuai, K, Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*.3:900-11,2003.
89. Ott, G, Rosenwald, A, Campo, E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*.122:3884-91,2013.
90. Todd, DJ, McHeyzer-Williams, LJ, Kowal, C, Lee, AH, Volpe, BT, Diamond, B, et al. XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J Exp Med*.206:2151-9,2009.
91. Ding, BB, Bi, E, Chen, H, Yu, JJ, Ye, BH. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol*.190:1827-36,2013.
92. Jabara, HH, McDonald, DR, Janssen, E, Massaad, MJ, Ramesh, N, Borzutzky, A, et al. DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation. *Nat Immunol*.13:612-20,2012.

93. Saito, M, Gao, J, Basso, K, Kitagawa, Y, Smith, PM, Bhagat, G, et al. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell*.12:280-92,2007.
94. Kulathu, Y, Grothe, G, Reth, M. Autoinhibition and adapter function of Syk. *Immunol Rev*.232:286-99,2009.
95. de Gorter, DJ, Vos, JC, Pals, ST, Spaargaren, M. The B cell antigen receptor controls AP-1 and NFAT activity through Ras-mediated activation of Ral. *J Immunol*.178:1405-14,2007.
96. Kremlitzka, M, Macsik-Valent, B, Erdei, A. Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells. *Cell Mol Life Sci*.72:2223-36,2015.
97. Iwata, S, Yamaoka, K, Niuro, H, Jabbarzadeh-Tabrizi, S, Wang, SP, Kondo, M, et al. Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*.24:695-704,2015.
98. Iwata, S, Nakayamada, S, Fukuyo, S, Kubo, S, Yunoue, N, Wang, SP, et al. Activation of Syk in peripheral blood B cells in patients with rheumatoid arthritis: a potential target for abatacept therapy. *Arthritis Rheumatol*.67:63-73,2015.

99. Fleischer, SJ, Giesecke, C, Mei, HE, Lipsky, PE, Daridon, C, Dorner, T. Increased frequency of a unique spleen tyrosine kinase bright memory B cell population in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*66:3424-35,2014.
100. Klein, J, Ju, W, Heyer, J, Wittek, B, Haneke, T, Knaus, P, 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.
101. Yang, X, Letterio, JJ, Lechleider, RJ, Chen, L, Hayman, R, Gu, H, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *Embo j.*18:1280-91,1999.
102. Hrycek, A, Kusmierz, D, Dybala, T, Swiatkowska, L. Expression of messenger RNA for transforming growth factor-beta1 and for transforming growth factor-beta receptors in peripheral blood of systemic lupus erythematosus patients treated with low doses of quinagolide. *Autoimmunity.*40:23-30,2007.
103. Kehrl, JH, Taylor, AS, Delsing, GA, Roberts, AB, Sporn, MB, Fauci, AS. Further studies of the role of transforming growth factor-beta in human B cell function. *J Immunol.*143:1868-74,1989.

104. Grumont, RJ, Gerondakis, S. Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB. *J Exp Med.*191:1281-92,2000.
105. Arsura, M, Wu, M, Sonenshein, GE. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity.*5:31-40,1996.
106. Petro, JB, Rahman, SM, Ballard, DW, Khan, WN. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J Exp Med.*191:1745-54,2000.
107. Huse, K, Bakkebo, M, Oksvold, MP, Forfang, L, Hilden, VI, Stokke, T, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7. *Eur J Immunol.*41:3135-45,2011.
108. ten Dijke, P, Korchynskiy, O, Valdimarsdottir, G, Goumans, MJ. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol.*211:105-13,2003.
109. Kee, BL, Rivera, RR, Murre, C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nat Immunol.*2:242-7,2001.
110. Grainger, DJ, Mosedale, DE, Metcalfe, JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.*11:133-45,2000.

111. Jamdar, S, Al-Mowallad, AF, Kumar, S, Siriwardena, AK. Differential kinetics of plasma CD105 and transforming growth factor beta expression early in human acute pancreatitis. *Pancreas*.32:152-8,2006.
112. ten Dijke, P, Hansen, P, Iwata, KK, Pieler, C, Foulkes, JG. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*.85:4715-9,1988.
113. Kersten, C, Sivertsen, EA, Hystad, ME, Forfang, L, Smeland, EB, Myklebust, JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol*.6:9,2005.
114. Rice, LM, Padilla, CM, McLaughlin, SR, Mathes, A, Ziemek, J, Goummih, S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest*.125:2795-807,2015.
115. Denton, CP, Merkel, PA, Furst, DE, Khanna, D, Emery, P, Hsu, VM, et al. Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum*.56:323-33,2007.

116. Young, PA, Morrison, SL, Timmerman, JM. Antibody-cytokine fusion proteins for treatment of cancer: engineering cytokines for improved efficacy and safety. *Semin Oncol.*41:623-36,2014.