

博士論文(要約)

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

土田 優美

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 土田 優美

トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属するサイトカインであり、細胞増殖、アポトーシス、発生、細胞分化等、様々な生命活動に関与する。哺乳類において、TGF- $\beta$  にはアミノ酸配列の異なる 3 つのアイソフォームがあるが、それぞれ発現臓器・発現時期・ノックアウトマウスの表現型が大きく異なることから、異なる生物学的意義をもつと考えられている。

免疫の分野においては、主に TGF- $\beta$ 1 が抑制性のサイトカインとして報告されてきた。TGF- $\beta$ 1 は、マウスおよびヒト B 細胞の増殖、抗体産生を抑制するが、状況によっては IgA へのクラススイッチおよび IgA の産生を促し、環境依存性が強い。

一方、TGF- $\beta$ 3 の重要性が、主にマウスにおいて認識されつつある。TGF- $\beta$ 3 は、マウス T 細胞に作用すると、Foxp3 陽性制御性 T 細胞の増殖を促し免疫抑制作用を発揮する一方、炎症を惹起する能力の高い Th17 細胞の誘導や自己反応性の T 細胞の増加との関連も報告され

ており、炎症を惹起する能力も持ち合わせている。また、マウス CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞 (LAG3<sup>+</sup> Treg) は TGF-β3 の産生を介して B 細胞の増殖と抗体産生を抑制し、TGF-β3 は液性免疫の制御にも重要である。また、TGF-β3 発現ベクターを全身性エリテマトーデスマデルマウスに投与すると病勢が改善し、TGF-β3 が自己免疫疾患の治療に有用である可能性が示唆されている。

今回、私は、ヒト B 細胞に対する TGF-β3 の作用を検討した。これは今まで報告はない。

まず、IL-21 と可溶性 CD40 リガンド (sCD40L) 刺激下で、TGF-β3 は、TGF-β1 と同じく、ヒト B 細胞の IgG、IgA、IgM の産生を抑制した。また、ヒト B 細胞の細胞死を誘導し、CD38<sup>high</sup> 形質芽細胞 (plasmablast) への分化および増殖を抑制した。

また、Toll 様受容体 (TLR) 9 のアゴニストである CpG-ODN2006 刺激下でも、TGF-β3 は、TGF-β1 と同じく、ヒト B 細胞の抗体産生および増殖を抑制し、HLA-DR 発現も抑制しており、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-β1 によるヒト B 細胞抑制の作用メカニズムの検討は、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り、初代培養のヒト B 細胞を用いた検討は少ない。しかし、がん化の過程で、細胞の TGF-β への反応性が変化することは多い。今回私は、初代培養の B 細胞を用いて、正常な免疫系における TGF-β の B 細胞への作用メカニズムを検討した。

IL-21 と sCD40L 刺激、もしくは、CpG-ODN2006 刺激下のヒト B 細胞への、TGF-β1、β3 のトランスクリプトームへの影響を RNA-Sequencing (RNA-Seq) にて評価した。いずれの

刺激下でも、トランスクリプトームは大きく変化しており、また TGF- $\beta$ 1 と  $\beta$ 3 による変化は類似していた。抗体産生細胞への分化に重要であるインターフェロン調節因子 4 (interferon regulatory factor-4、IRF4) の発現は、いずれの刺激下においても TGF- $\beta$ 3 によって抑制された。また、TGF- $\beta$ 3 の投与により、B 細胞機能を抑制する dual specificity phosphatase 4 (DUSP4) や sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2)、Fc receptor-like 4 (FCRL4) 等の発現が誘導された。

TGF- $\beta$  非投与群と TGF- $\beta$ 3 投与群を比較した発現変動遺伝子 (differentially expressed genes、DEG) をパスウェイ解析したところ、unfolded protein response (UPR) に関連する遺伝子が多く含まれていた。UPR は、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よって生じる小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress、ER stress) から細胞を守るための機構であり、抗体産生細胞では、X-box 結合タンパク質 (X-box binding protein 1、XBP1) が UPR の誘導することによって大量の抗体産生が可能になるとされている。

B 細胞が抗体産生細胞に分化する際には、IRF4 が B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) を誘導し、これらによって XBP1 が誘導される。私は、TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 は、PRDM1 (Blimp-1)、XBP1 の発現を抑制することを定量的 PCR にて示した。また、TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 が蛋白質のレベルでも Blimp-1 を抑制することを細胞内染色にて示した。また、BCR 刺激後の B 細胞の大部分の反応に必須である Syk のリン酸化に対する TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 の影響を、ウェスタンブロット法にて検討したところ、TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 を投与した B 細胞において、BCR 刺激

後の Syk のリン酸化が抑制された。

TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナル伝達においては、receptor Smad (R-Smad) がリン酸化され、Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、作用を発揮する。一般的に、TGF- $\beta$  のシグナル伝達において重要な R-Smad は Smad2、Smad3 とされているが、TGF- $\beta$ 1 による B 細胞抑制には Smad2、Smad3 は必須でなく、Smad1、Smad5 が重要であるとされている。今回私は、TGF- $\beta$ 3 の Smad1、Smad5 のリン酸化への影響をウェスタンブロット法にて検討し、TGF- $\beta$ 3 も TGF- $\beta$ 1 と同じく、Smad2、Smad3 に加えて、Smad1、Smad5 のリン酸化を引き起こすことを示した。

今回の研究をまとめると、TGF- $\beta$ 3 は、TGF- $\beta$ 1 と同じく、IL-21 と sCD40L 刺激、CpG-ODN2006 刺激のいずれの刺激下でも、ヒト B 細胞の増殖や抗体産生を抑制した。また、TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 による抗体産生抑制の機序に関する検討によると TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 は、抗体産生細胞への分化および抗体産生細胞での UPR の誘導に重要な転写因子である IRF4 や Blimp-1、XBP1 の発現を抑制し、また BCR 刺激後の Syk のリン酸化も抑制した。すでにマウスでは TGF- $\beta$ 3 を介した治療が、B 細胞の過剰な活性化を伴う自己免疫疾患に有用である可能性が示唆されており、本研究によりヒトでの TGF- $\beta$ 3 を介した治療に向けて一歩前進したと思われる。