

博士論文

T 細胞における Egr2/Egr3 依存性 TGF- β 3 産生
機構を介した液性免疫制御に関する検討

森田 薫

目次

要旨	・ ・ ・ 3
序文	・ ・ ・ 4
方法	・ ・ ・ 11
結果	・ ・ ・ 25
考察	・ ・ ・ 42
謝辞	・ ・ ・ 53
引用文献	・ ・ ・ 54
図	・ ・ ・ 65

T 細胞における Egr2/Egr3 依存性 TGF- β 3 産生機構を介した 液性免疫制御に関する検討

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： 森田 薫

要旨

CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ 制御性 T 細胞 (LAG3⁺ Treg) は転写因子 Egr2 を特異的に発現する。*EGR2* は SLE の疾患感受性遺伝子であることより、LAG3⁺ Treg 細胞による液性免疫制御機構につき検討した。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は TGF- β 3 産生を介して Tfh 細胞、GCB 細胞分化を抑制した。また、T 細胞特異的 Egr2/Egr3 欠損マウスは SLE 様病態を呈し、LTBP-3 誘導不全による LAG3⁺ Treg 細胞の TGF- β 3 分泌障害がその病態形成に関与していた。本知見は、LAG3⁺ Treg 細胞および TGF- β 3 を用いた自己免疫疾患の新規治療法開発の礎となると考えられた。

序文

自己免疫疾患は多数の疾患の総称であるが、その多くは自己抗体を産生するという特徴を持つ。健常人における免疫システムは、自己組織または内因性抗原に対して免疫応答をおこさない。この状態は免疫学的寛容（トレランス）として知られている。T細胞およびB細胞の異常はトレランスの破綻を導き、自己抗体産生機序において中心的な役割を果たしていると考えられている。

病原性を有する自己抗体の多くは体細胞高頻度突然変異（somatic hypermutation）および、クラススイッチ組換えを起こした高親和性 immunoglobulin G (IgG) である[1]。通常、高親和性抗体は、二次リンパ組織内でナイーブ B 細胞（naïve B 細胞）が抗原に暴露された後、濾胞性ヘルパーT細胞（follicular helper T cells: Tfh 細胞）による刺激によって胚中心領域に誘導され、胚中心 B 細胞（germinal center B cells: GCB 細胞）として体細胞高頻度突然変異、クラススイッチ組換えを起こし、最終的にメモリーB細胞およびプラズマ細胞へと分化する過程を経て産生されるようになる[2]。よって、高親和性自己抗体産生機序において胚中心応答の異常は極めて重要な位置を占めると考えられる。

抗 dsDNA 抗体といった抗核抗体など多様な自己抗体産生を特徴とし、

多臓器に炎症を認める全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) では、末梢血の Tfh 細胞数は病勢と相関して増加を認めることや[3]、二次リンパ濾胞における自己反応性 B 細胞排除の障害を認めることなどが報告されている[4]。また、New Zealand Black/White (NZB/W) F1 マウス、Roquin^{san/san} (sanroque) マウスなどの SLE モデルマウスでも過剰な胚中心応答が認められ[1, 5, 6]、Sanroque マウスに胚中心形成に必要な転写因子 *B-cell CLL/lymphoma 6* (*Bcl-6*) のハプロ不全を伴うと、SLE 様症状が減弱することが報告されている[7]。また、シェーグレン症候群患者の唾液腺では過剰な胚中心応答を認め、胚中心に存在する GCB 細胞はシェーグレン症候群に特徴的な抗核抗体である抗 SS-A、SS-B 抗体を産生するという報告もある[8]。以上より自己抗体産生において中心的役割を担う Tfh 細胞および GCB 細胞の制御システムの解明は、SLE を含む自己抗体産生を介した各種自己免疫疾患の新規治療法開発に直結する。

一方、T 細胞による自己免疫制御機構において最も重要な細胞サブセットとして制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg 細胞) が知られている。Treg 細胞は分化誘導の側面から、胸腺で誘導される内因性 Treg 細胞 (naturally occurring regulatory T cells: nTreg 細胞) および、末梢で誘導される Treg 細胞 (inducible regulatory T cells: iTreg 細胞) に大別される[9]。

坂口らにより報告された CD4⁺CD25⁺Treg 細胞 (CD25⁺ Treg 細胞) は代表的 nTreg 細胞であり [10]、そのマスター制御遺伝子として転写因子 *forkhead box P3 (Foxp3)* が同定されている。ヒト *FOXP3* 遺伝子の機能異常は IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群という全身性自己免疫疾患の発症を引き起こす。臨床症状として、難治性下痢、皮膚炎、甲状腺機能低下症、I 型糖尿病などの多発性内分泌異常、溶血性貧血、血小板低下を認め、生後数ヶ月以内に敗血症または低栄養にて死亡することが多い [11]。また、マウスにおいても *Foxp3* 遺伝子の機能異常を認める *scurfy* マウスが知られており、皮膚、肝臓、肺を中心とした多臓器に炎症を認め、生後 1 ヶ月以内に死亡することが知られている [12]。

近年、二次リンパ濾胞内の免疫応答抑制に関連した CD25⁺ Treg 細胞サブセットとして、濾胞内に存在する CXCR5⁺CD25⁺ Treg 細胞 (follicular regulatory T cells: Tfr 細胞) が 3 つの独立したグループより報告された [13, 14, 15]。この Tfr 細胞は nTreg 細胞より分化し [13]、*Foxp3*、*glucocorticoid-induced TNFR family related gene (GITR)*、*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)* といった CD25⁺ Treg 細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを有すると同時に、*Bcl-6*、*C-X-C chemokine receptor type 5 (CXCR5)*、*programmed cell death1 (PD1)*、*inducible*

T-cell co-stimulator (ICOS) といった Tfh 細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルも併せ持つ[16]。Tfr 細胞は、Tfh 細胞において GCB 細胞の誘導に重要な CD40L、インターロイキン (interleukin: IL) -4、IL-21 を発現せず、負の補助刺激受容体である CTLA-4 を介して GCB 細胞の誘導を制御する[15]。また、Tfr 細胞およびヒトとの関連について、ヒト *FOXP3* 遺伝子の機能異常によって引き起こされる IPEX 症候群の末梢血では健常人と比較して抗核抗体を産生する B 細胞が増加するという報告もある[17]。以上のことより CD25⁺ Treg 細胞は自己抗体産生を介する自己免疫疾患発症制御において重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら IPEX 症候群では SLE に特徴的な血清抗 dsDNA 抗体価上昇や糸球体腎炎の症状などは稀である[18]。このことは nTreg 細胞以外にも SLE の病態を制御する Treg サブセットが存在する可能性を示唆している。

iTreg 細胞には末梢で誘導される Foxp3⁺ iTreg 細胞[19]、 Type I Treg 細胞 (Tr1 細胞) [20]等が現在までに報告されている。Tr1 細胞は抑制性サイトカイン IL-10 を大量に産生する代表的な iTreg 細胞であり、*in vitro* では IL-27 および TGF- β 1 によって誘導され[20]、マウスにおける腸炎や自己免疫性脳脊髄炎を抑制することが知られている[21]。しかしながら近年まで Tr1 細胞に関する特異的細胞表面マーカーやマスター制御遺伝子は不明なままであり、その同定はサ

イトカインプロファイルに依存している現状があり、このことが iTreg 細胞研究進展の大きな障害となってきた[22]。また、生体内における iTreg 細胞の分化誘導メカニズムも十分には解明されていない。

当研究室の岡村らは 2009 年に iTreg 細胞の一サブセットとして、lymphocyte activation gene-3 (LAG3) を表面マーカーとして有し、抑制性サイトカイン IL-10 を高産生する CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ 制御性細胞 (LAG3⁺ Treg 細胞) を同定し、転写因子 early growth response gene-2 (Egr2) がマスター制御遺伝子として働くことを報告した[23]。LAG3 は CD4 と構造的な相同性を持ち、CD4 よりも強い MHC class II 分子への結合性を有する膜貫通型タンパクである[24, 25]。LAG3⁺ Treg 細胞は脾臓に CD4⁺ T 細胞中 8%、脾臓に 3%ほど存在しており、その抑制能は Foxp3 に依存せず、T 細胞受容体刺激に対して不応答性 (anergy) であるという特徴を示す。機能においてはナイーブ T 細胞 (naïve T 細胞) の増殖を抑制し、T 細胞および B 細胞を欠損する recombination activating gene1 (RAG1) ノックアウトマウスに CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} T 細胞移入することで発症する大腸炎モデルを IL-10 依存性に抑制する。LAG3⁺ Treg 細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析により、Egr2 が LAG3⁺ Treg 細胞に特異的に発現していることが明らかとなり、レトロウイルスベクターを用いて Egr2

を強制発現させた naïve T 細胞では、LAG3 および IL-10 発現が共に誘導され、naïve T 細胞の増殖を抑制するといった LAG3⁺ Treg 細胞様の性質を認める。これらのことより、Egr2 は naïve T 細胞に LAG3⁺ Treg 細胞の性質を付与するマスター制御遺伝子として考えられている[22, 23]。

Egr family は Egr1 から Egr4 までの 4 種類で構成されるが、それらの中で Egr3 は Egr2 と同様に Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) 依存性に発現し、E3 ユビキチンリガーゼである Cbl-b の発現誘導を介して T 細胞の anergy 誘導に関与することより、Egr2 とともに免疫学的恒常性維持に重要な転写因子と考えられている[26]。近年、Egr2 および自己免疫疾患との関係に関して、*EGR2* は SLE の疾患感受性遺伝子であること[27]、また、T 細胞、B 細胞特異的 Egr2 欠損マウスは SLE 様病態を呈することが報告されている[28]。さらに、Egr2 を欠損した場合、Egr3 が Egr2 の補完的機能を持つことが予想され、実際、T 細胞、B 細胞特異的な Egr2 および Egr3 の両遺伝子の欠損マウスは Egr2 単独欠損マウスよりも強い SLE 様病態を呈することが報告されている[28]。これらのことは、SLE の疾患制御機構においてリンパ球における Egr2 および Egr3 発現が重要な役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、何れの細胞サブセットにおける Egr2 発現が SLE の病態制御に関与しているかは不明であった。

上述の如く Egr2 の機能は Egr3 により補完されることが想定されることより、免疫学的恒常性維持機構における T 細胞上の Egr2 の役割を解析するには、Egr2 および Egr3 の両遺伝子欠損マウスを用いた解析が必要となる。本研究においては、T 細胞特異的に Egr2 および Egr3 を欠損したマウスを作製し、同マウスが、皮膚、腎臓をはじめとする多臓器への炎症細胞浸潤や、Tfh 細胞および GCB 細胞の過形成、血清抗 dsDNA 抗体価の上昇といった SLE に特徴的症候を認めることを示した。さらに、LAG3⁺ Treg 細胞の機能解析を通じて、Egr2、および Egr3 による補完作用を介した latent TGF- β binding protein 3 (LTBP-3) 発現誘導による transform growth factor- β 3 (TGF- β 3) [30] 分泌経路が存在することを解明し、これらの SLE 様症候が LAG3⁺ Treg 細胞の TGF- β 3 分泌障害によるものであることを明らかにした。本研究は、免疫システムにおいては抑制性機能が不明であった TGF- β 3 による液性免疫制御能をその分泌機構も含め解明し、LAG3⁺ Treg 細胞および TGF- β 3 が SLE をはじめとする自己抗体産生機序を介する自己免疫疾患に対する重要な治療ターゲットとなり得ることを提示する。

方法

実験動物

C57BL/6 マウス (wild type: WT) は日本 SLC から、CD4-Cre トランスジェニックマウス (CD4-Cre⁺) は Taconic から購入した。Egr2 floxed マウス (Egr2^{fl/fl}) は Patrick Charnay (INSERM, France) から譲渡して頂いた。Egr3 floxed マウス (Egr3^{fl/fl}) は Egr3 の exon2 を挟んで loxP 配列を導入し作出した。Egr2 CKO マウス (Egr2^{fl/fl} CD4-Cre⁺) は Egr2^{fl/fl} マウスと CD4-Cre⁺ マウスを交配させ作出した。Egr2/3 DKO マウスは (Egr2^{fl/fl} Egr3^{fl/fl} CD4-Cre⁺) はまず Egr2 CKO マウスと Egr3^{fl/fl} マウスを交配させることで Egr2^{fl/+} Egr3^{fl/+} CD4-Cre⁺ マウスを作出し、次にこれらのマウス同士を交配させることで作出した。すべての動物実験は、東京大学 (所属施設) における指針および、国際的な指針に従って行った。

サイトカイン・抗体・抗原・細胞分離

抗 CD3e 抗体 (145-2C11)、抗 CD28 抗体 (37.51)、抗 CD40 抗体 (3/23)、抗 IL-4 抗体 (11B11)、抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2)、Fc ブロック抗 CD16/CD32 抗体 (1.5:100 dilution)、FITC 標識抗 CD45RB 抗体 (16A, 2:100)、PE 標識 CD45RB 抗

体 (16A, 1:100)、APC-Cy7 標識抗 CD45RB 抗体 (16A, 2:100)、PE 標識抗 LAG3 抗体 (C9B7W, 3:100)、APC 標識抗 LAG3 抗体 (C9B7W, 3:100)、FITC 標識抗 GL7 抗体 (Ly-77, 0.5:100)、FITC 標識抗 CD25 抗体 (PC61, 2:100)、PE 標識抗 CD25 抗体 (PC61, 1:100)、APC 標識抗 CD25 抗体 (PC61, 1:100)、APC-Cy7 標識抗 CD25 抗体 (PC61, 1:100)、APC 標識抗 CD4 抗体 (L3T4, 1:100)、APC-Cy7 標識抗 CD4 抗体 (L3T4, 1:100)、APC-Cy7 標識抗 B220 抗体 (RA3-6B2, 1:100)、APC 標識抗 B220 抗体 (RA3-6B2, 1:100)、PE 標識抗 CD40 抗体 (3/23, 1:100)、PE 標識抗 PD-1 抗体 (J43, 2:100)、ビオチン化抗 CD45RB 抗体 (16A)、ビオチン化抗 CXCR5 抗体 (2G8)、ビオチン化抗 Fas/APO-1 抗体 (Jo2)、ストレプトアビジン-APC は BD Biosciences から購入した。ビオチン化抗 CD8a 抗体 (53-6.7)、ビオチン化抗 CD19 抗体 (6D5)、ビオチン化抗 CD11c 抗体 (N418)、IL-4、IL-6、IL-21、IL-23、BAFF (B cell activating factor) は Biolegend から購入した。PE 標識抗 Egr2 抗体 (erongr2, 1:100) は eBioscience から購入した。ストレプトアビジン結合マイクロビーズ、TGF- β 1、TGF- β 3 は Miltenyi Biotec から購入した。抗 IgG F(ab')₂ フラグメント、Alexa Fluor 488 標識抗 LAG3 抗体 (C9B7W, 1:100) は AbD Serotec から購入した。

表現型解析

WT マウス、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウス 各々20 匹に関して 36 週齢までの蛋白尿、生存率を継時的に解析した。蛋白尿に関しては 4 週間毎にアルブスティックス・エームス尿検査試験紙 (SIMENS Healthcare) を用いて半量定量的に解析を行った。蛋白尿 0~4 の値は次に相当する。0 = なし、1 = 30 - 100 mg/dl、2 = 100 - 300 mg/dl、3 = 300 - 1,000 mg/dl、4 \geq 1,000 mg/dl。生存曲線に関してはカプラン・マイヤー法を用いて解析を行った。また 36 週齢の WT マウス、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスの血清中における抗 dsDNA 抗体価はレビス抗 dsDNA 抗体 ELISA kit (Shibayagi) を用いて解析を行った。

免疫病理組織学的解析

16 週齢、36 週齢の WT マウス、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウス 各々8 匹の腎臓、皮膚、唾液腺、肺、肝臓、胃、膵臓を解析に用いた。それぞれの組織は 4% パラホルムアルデヒドにて固定を行い、パラフィンに包埋した。次に厚さ 6 μ m で切り出し、キシレンにて脱パラフィン化を行った後、ヘマトキシリン・エオジン (HE: Hematoxylin - eosin) 染色を行った。

腎組織の IgG 蛍光染色は 4% パラアルデヒドによる固定、パラフィンによる包埋、切り出し、キシレンによる脱パラフィン化を行った後、120 $^{\circ}$ C、

10 分間オートクレーブし、抗原の賦活化を行った。次に 1 次抗体抗 IgG F (ab')₂ フラグメント (STAR8B) を 100 倍希釈にて 4 °C、1 時間反応させた。tris-buffered saline (TBS) で洗浄後、2 次抗体 Alexa Fluor 488 抗 IgG 抗体 (Invitrogen) を 100 倍希釈にて室温、1 時間反応させた。TBS にて洗浄後、封入を行い蛍光顕微鏡にて解析を行った。以上の組織染色はバイオ病理研究所の協力を得て行った。

腎臓組織の評価に関しては[31]を参考にスコアリングを行った。糸球体病変に関しては炎症細胞浸潤、細胞増殖、半月体形成、壊死の 4 項目で評価し、それぞれ 0~4 (0 = 正常、1 = 糸球体 25% 未満に病変あり、2 = 糸球体 25~50% に病変あり、3 = 糸球体 50~75% に病変あり、4 = 糸球体 90% 以上に病変あり) でスコアリングを行い、それらの合計点で比較解析を行った。間質性病変に関しても 0~4 で評価を行い、比較解析を行った。

マウス脾臓・リンパ節の免疫細胞の採取

マウスより摘出した脾臓・リンパ節は細切、1 mg/ml IV 型コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) にて処理を行い、70 μm セルストレーナーで濾過後、2% fetal calf serum (FCS) 入り phosphate buffered saline (PBS) (2% FPBS) で懸濁した。脾臓はさらに ammonium chloride potassium (ACK) lysis buffer を用いて溶血操作を行

った。溶血後の細胞は 2% FPBS で再懸濁した。細胞懸濁液は抗 CD16/CD32 抗体による Fc ブロック後、各種抗体にて標識を行いフローサイトメーターにて解析した。

細胞分画の濃縮

脾臓細胞からの各種 T 細胞サブセットの分取は magnetic cell sorting (MACS) 磁気細胞分離法により細胞分画を濃縮後、フローサイトメーターを用いてソーティングを行った。ナイーブ CD4⁺T 細胞 (naïve T 細胞)、CD4⁺CD25⁻ 制御性 T 細胞 (CD25⁺ Treg 細胞) の分離には脾細胞懸濁液をビオチン化抗 CD8 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD11c 抗体で標識後、ストレプトアビジン結合マイクロビーズと結合させ MACS LS 分離カラム (Miltenyi Biotec) を通過したネガティブフラクションを使用することにより CD4⁺ T 細胞を濃縮分離した。CD4⁺LAG3⁺CD25⁻ 制御性 T 細胞 (LAG3⁺ Treg 細胞) の分離にはビオチン化抗 CD8 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD45RB 抗体による標識を行い、CD4⁺CD45RB^{low} 細胞分画の濃縮を行った。B 細胞は B 細胞アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) のプロトコルに沿って、ネガティブセレクションにて濃縮分離した (純度 95%以上)。

MACS 磁気細胞分離法により濃縮された細胞懸濁液は、各種抗体にて標識後、フローサイトメーター FACS Vantage (BD Bioscience) または Moflo XDP (Beckman Coulter) を用いてソーティングを行った (純度 99%以上)。尚、解析は FlowJo10.0.8 (TreeStar) を使用した。

マウス脾臓 B 細胞の培養

マウス脾臓から B 細胞アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いて磁気分離した B 細胞は carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) にて標識後、96 フラットプレート上に、1 フラットあたり培地 100 μ l に B 細胞 3×10^5 細胞ずつ懸濁し、37 $^{\circ}$ C、3 日間または 7 日間培養を行った。培地には 10% FCS、100 μ g/ml L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノールを加えた Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 (Life technologies) をコンプリートメディウムとして使用した。B 細胞の刺激には抗 CD40 抗体最終濃度 10 μ g/ml と IL-4 最終濃度 20 ng/ml と BAFF 最終濃度 100 ng/ml を細胞懸濁時に加えた。さらに TGF- β 1、TGF- β 3 を最終濃度 1 ng/ml の濃度になるように加えた。3 日間培養した B 細胞は各種抗体にて標識後、フローサイトメトリーにて増殖・分化について解析を行った。7

日間培養した B 細胞は、培養上清に含まれる IgG または IgA 抗体産生量を ELISA にて解析した。

B 細胞増殖解析

細胞増殖の解析には CFSE 解析を行った。1 x 10⁷ 細胞の B 細胞を PBS で 1 回洗浄した後、1 μM CFSE 溶液 10 ml で再懸濁し、37 °C、15 分インキュベーションし標識した。その後同量の氷冷した RPMI-1640 + 10% FCS を加え洗浄を行い、RPMI-1640 + 10% FCS に再懸濁した。CFSE 標識した B 細胞は前述の通り培養しフローサイトメトリーを用いて解析を行った。

マウス脾臓 T 細胞の培養

LAG3⁺ Treg 細胞に関しては抗 CD3 抗体 10 μg/ml と抗 CD28 抗体 5 μg/ml で前日にプレコートした 96 フラットプレート上に、1 ウェルあたり培地 100 μl にフローサイトメーターでソートした LAG3⁺ Treg 細胞を 3 x 10⁵ 細胞ずつ懸濁し、37 °C、3 日間の培養を行った。培地は 10% FCS 含有の RPMI-1640 (Invitrogen) とした。培養後の細胞はフローサイトメトリーにて一定細胞数ずつ再回収し、定量リアルタイム PCR 法にて遺伝子発現を解析した。また培養上清

中に含有される TGF- β 3 に関しマウス TGF- β 3 ELISA キット (Mybiosource)を用いて解析を行った。

Tfh 細胞様ヘルパーT細胞の誘導に関してはフローサイトメーターでソートした naïve T 細胞を抗 CD3 抗体 2 μ g/ml と抗 CD28 抗体 2 μ g/ml で前日にプレコートした 96 フラットプレート上に、1 フラットあたり培地 100 μ l に naïve T 細胞 3 x 10⁵ 細胞ずつ懸濁し、37 °C、4 日間の培養を行った。この際使用した培地は 1% Nutridoma-SP (Sigma-Aldrich)、600 μ g/ml L-グルタミン、50 U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、25 μ M 2-メルカプトエタノールを加えた advanced RPMI -1640 (Life technologies) を使用した。Tfh 細胞様ヘルパー T 細胞の誘導には IL-6 最終濃度 20 ng/ml、IL-21 最終濃度 50 ng/ml によるサイトカイン共刺激を行った。更に TGF- β 1、または TGF- β 3 を最終濃度 1 ng/ml の濃度になるように添加し、遺伝子発現プロファイルの変化を定量リアルタイム PCR 法にて評価した。

***In vitro* における LAG3⁺ Treg 細胞と B 細胞の共培養**

マウス脾臓から B 細胞アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を使用して B 細胞を磁気分離し、フローサイトメーターにて naïve T 細胞または

LAG3⁺ Treg 細胞をソートした。CFSE にて標識した B 細胞と naïve T 細胞または LAG3⁺ Treg 細胞を、前日に抗 CD3 抗体 10 µg/ml にてコートしておいた 96 フラットプレートに 1 x 10⁵ 細胞ずつ懸濁し、抗 CD40 抗体 10 µg/ml と IL-4 20 ng/ml の刺激下で 3 日間または 7 日間共培養した。CFSE による細胞増殖と Annexin V apoptosis Detection Kit (BD pharmingen) によるアポトーシスの解析には 3 日間培養した細胞を使用した。また、定量的リアルタイム PCR 法にて遺伝子発現を解析する際も 3 日間培養後の細胞をフローサイトメトリーにて一定細胞数ずつ再回収し解析した。培養上清中の IgG 抗体量の解析には 7 日間培養した細胞の培養上清を使用した。

上清中サイトカイン測定

B 細胞培養上清中の IgG および IgA の ELISA (enzyme-linked Immunosorbent assay) に関しては Mouse IgG, IgA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories) を使用し解析を行った。LAG3⁺ Treg 細胞の培養上清中の TGF-β3 ELISA に関しては mouse TGF-β3 ELISA kit (Mybiosource) を使用し解析を行った。

定量リアルタイム PCR 法

培養前または *in vitro* で刺激培養後のマウス脾臓細胞から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA 抽出を行った。Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写を行い、cDNA 合成を行った。定量的リアルタイム PCR 法には QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて行い、蛍光測定には CFX Connect™ リアルタイム PCR 解析システムを用いて解析を行った。各遺伝子発現量は、ハウスキーピング遺伝子である β -アクチン発現量を用いて相対定量 ($\Delta\Delta Ct$) 解析にて評価した。

Primer 配列

Egr2

Forward 5'-AGCCGTTTCCCTGTCCTCTG-3'

Reverse 5'-GTCCCTCACCACCTCCACTT-3'

Egr3

Forward 5'-GGCCTTGATGGTCTCCAGTG-3'

Reverse 5'-CAACGACATGGGCTCCATTC-3'

Aicda

Forward 5'-AACCCAATTTTCAGATCGCG-3'

Reverse 5'-AGCGGTTTCCTGGCTATGATAAC-3'

Bcl6

Forward 5'-GCAGTTTAGAGCCCATAAGA-3'

Reverse 5'-GTACATGAAGTCCAGGAGGA-3'

Batf

Forward 5'-GAGCTGCGTTCTGTTTCTCC-3'

Reverse 5'-CCAGAAGAGCCGACAGAGAC-3'

Tgfb3

Forward 5'-GAAGAGATGCACGGGGAGAG-3'

Reverse 5'-CACTGAGGACACATTGAAACGAA-3'

Ltbp1

Forward 5'-AGCACCATCACCTCTGCTCT-3'

Reverse 5'-CAGACACTGCTGTCCTCCAA-3'

Ltbp2

Forward 5'-CATCAAACAGCACCAACCAC-3'

Reverse 5'-GAAGCCAGAACGGCAGATAC-3'

Ltbp3

Forward 5'-ACGGCCTCAGTTGCATAGAC-3'

Reverse 5'-AAAGAGCCTGGTGTGTTTCGT-3'

Ltbp4

Forward 5'-GAATCTGCCTGGGTCCTTTC-3'

Reverse 5'-ACGCCCTGTAGTGTCTCACA-3'

β actin

Forward 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'

Reverse 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'

LAG3⁺ Treg 細胞の Egr2/3 DKO マウスへの移入

フローサイトメーターを用いて WT マウスの脾臓から回収した 3×10^5 個 /PBS 100 μ l の LAG3⁺ Treg 細胞を Egr2/3 DKO マウスの 2、4 週齢期の 2 回、経静脈的に投与した。コントロール群には PBS 100 μ l を経静脈的に投与した。

LAG3⁺ Treg 細胞の 2 回目の移入から 4 週間後、Egr2/3 DKO マウスの脾臓の Tfh 細胞、GCB 細胞に関してフローサイトメトリー解析を行った。

pCAGGS-Tgfb3 ベクターの作製

Tgfb3 cDNA (NM_009368) を含む OmicsLink Expression-Ready ORF cloning vector (GeneCopoeia) を使用し、この vector を CAG (cytomegalovirus immediately early enhancer/chicken b-actin hybrid) プロモーターを含む pCAGGS vector (大阪大学 生化学・分子生物学 幹細胞制御学 宮崎 純一 教授より譲渡) にサブクローニングし pCAGGS-Tgfb3 を作製した。このプラスミドベクターを大腸菌 JM109 に導入し、EndFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) にてプラスミドベクターをクローニングした。

pCAGGS-Tgfb3 の Egr2/3 DKO マウスへの移入

PBS に溶解した pCAGGS-Tgfb3 または control pCAGGS ベクター100 μ g を Egr2/3 DKO マウスの 4、6、8 週齢期に 3 回、経静脈的に投与し、12 週齢期に脾臓の Tfh 細胞、GC B 細胞に関してフローサイトメトリー解析を行った。

Ltbp3 siRNA を用いたノックダウン解析

LAG3⁺ Treg 細胞へ Ltbp3 siRNA を導入し、LTBP-3 発現をノックダウンする実験は Accell siRNA 導入プロトコル (Thermo Scientific) に沿って実験を行

った。フローサイトメーターにてソートした naïve T 細胞と LAG3⁺ Treg 細胞を 96 フラットプレート上に 1 フラットあたり培地 100 μ l に T 細胞 4 x 10⁵ 細胞ずつ懸濁した。初回の培地は 0.5% FCS 含有の Accell siRNA 導入メディウム (Thermo Scientific) に、Accell Ltbp3 siRNA または Accell control siRNA を 1 μ M の濃度になるよう加えた培地を使用し、37 °C、48 時間培養した。その後、培地を 10% FCS 含有 RPMI-1640 (Invitrogen) に置換し、37 °C、72 時間さらに培養した。その後、細胞と培養上清を回収し、*Ltbp3*、*Tgfb3* mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR 法、培養上清中の TGF- β 3 産生量を ELISA にて解析した。

統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism6 (GraphPad 社) または R 言語を用いて行った。蛋白尿の継時的変化は Mann-Whitney U test を用いた。リンパ球の割合または総数、抗体量、定量的リアルタイム PCR 法に関しては 3 群以上の場合、one-way ANOVA 後、Bonferroni 法により補正を行い解析した。2 群の場合は Student's t-test にて解析を行った。**P* 値 0.05 未満もしくは、***P* 値 0.01 未満を持って統計学的有意差ありと判定した。

結果

1. CD4⁺CD25⁺LAG3⁺制御性 T 細胞は B 細胞活性化を制御する

当研究室の岡村らは 2009 年に末梢で誘導される制御性 T 細胞の一つとして、抑制性サイトカイン IL-10 を高産生する CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ 制御性細胞 (LAG3⁺ Treg 細胞) を同定し、転写因子 early growth response gene 2 (Egr2) がマスター制御性遺伝子として働くことを報告した[23]。これまでの報告では、LAG3⁺ Treg 細胞は T 細胞依存性の大腸炎モデルマウスにおいて、IL-10 依存性に T 細胞を抑制することで発症を抑制することは明らかとなっていたが、LAG3⁺ Treg 細胞が液性免疫を制御するか否かに関しては不明であった。そこでまず、LAG3⁺ Treg 細胞による B 細胞の増殖、抗体産生に対する抑制能につき *in vitro* における検討を行った。具体的には野生型 (wild type: WT) マウス脾臓から回収した B 細胞を、ナイーブ CD4⁺ T 細胞 (naïve T 細胞) または LAG3⁺ Treg 細胞と抗 CD40 抗体および IL-4 の刺激下において 3 日間、ないし 7 日間共培養し、B 細胞の増殖、アポトーシス、抗体産生に関する解析を行った。

その結果、LAG3⁺ Treg 細胞と共培養した B 細胞は naïve T 細胞と共培養した場合と比較して AnnexinV 陰性 PI 陰性の生細胞の割合が減少した (図 1a,

b)。また、同様の実験においてB細胞をCFSEラベルして細胞増殖解析した結果、LAG3⁺ Treg細胞はnaïve T細胞と共培養した場合と比較してB細胞の細胞増殖を抑制した(図1c)。培養上清中のIgG抗体産生に関してもLAG3⁺ Treg細胞と共培養した群はnaïve T細胞と共培養した群と比較して低下を認めた(図1d)。さらに、72時間共培養後、B細胞をフローサイトメトリーにて分取し、その遺伝子発現を定量的リアルタイムPCR法にて解析したところ、LAG3⁺ Treg細胞と共培養したB細胞は*Aicd*、*Bcl6*といったGCB細胞に重要な遺伝子発現の低下を認めた(図1e)。

以上よりLAG3⁺ Treg細胞はB細胞の増殖、分化、抗体産生を抑制することで液性免疫を制御していると考えられた。

2. Egr2欠損LAG3⁺ Treg細胞におけるEgr3の補完的作用

EgrファミリーはEgr1からEgr4が知られているが、Egr3はEgr2と同様の機能を持ち、またEgr2が欠損した際Egr3の補完的作用を持つということが報告されていることより[29]、LAG3⁺ Treg細胞においてもEgr3がEgr2の補完的作用を示すかにつき、T細胞特異的にEgr2を欠損するEgr2^{fl/fl} CD4-Cre⁺ (Egr2 conditional knock out mice: Egr2 CKO) マウスを用いて解析を行った。

その結果、WTマウス由来のLAG3⁺ Treg細胞は既報[23]と一致してEgr2発現の上昇を認めたが、Egr3の発現の上昇は認めなかった(図2a)。一方、Egr2を欠損したLAG3⁺ Treg細胞ではEgr3発現の代償的上昇を認めた(図2a)。この結果より、Egr3はLAG3⁺ Treg細胞においてEgr2の補完的機能を持つ可能性が示唆された。

そこで、先ず Cre-loxP システムを用いて、Egr3のT細胞特異的 conditional knockout (KO) マウスを作製した。具体的にはCD4-Cre⁺マウスに当科で作成したEgr3 floxed (Egr3^{fl/fl}) マウスを交配した(図2b)。Egr3 floxedマウスは、CD4-Cre⁺マウスと交配されることで、Egr3のexon 2領域がT細胞特異的に欠失する(図2c, d)。さらに、Egr2 floxed (Egr2^{fl/fl}) マウスを交配することで、Egr2^{fl/fl}Egr3^{fl/fl}CD4-Cre⁺ (Egr2 and Egr3 double conditional KO: Egr2/3 DKO) マウスを作出した。Egr2/3 DKOマウスはT細胞特異的にEgr2およびEgr3を共に欠損する。上述の如く、Egr2 CKOマウスのLAG3⁺ Treg細胞ではEgr3の代償性に増加を認めるが(図2a)、Egr3 CKOマウスのT細胞ではEgr2の発現に変化は認めなかった(図2d)。これらのことより、Egr3はEgr2欠損時に代償的に作用し、Egr3の欠損はEgr2発現には影響しないと考えられた。

3. Egr2/3 DKO マウスは Egr2 CKO マウスと比較して早期より SLE 様症状を認める

Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスが引き起こす病態について解析を行った。具体的には WT マウスをコントロールとして、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスの経時的变化を 36 週齢まで解析した。

その結果、Egr2 CKO マウスは WT マウスと同様に 36 週に至るまで死亡例を認めなかったが、Egr2/3 DKO マウスの累積死亡率は 30%であった (図 3a)。Egr2/3 DKO マウスは Egr2 CKO マウスと比較して血清抗 dsDNA 抗体価の上昇傾向 (図 3b) および、早期より蛋白尿を認めた (図 3e)。また、Egr2/3 DKO マウスでは皮膚炎を自然発症した (図 3c)。皮膚の病理組織では炎症細胞浸潤、上皮過形成、表皮突起の延長を認め、一部基底膜の液状化も認めた (図 3d)。16 週齢の病理解析において腎の病理組織では Egr2 CKO マウスは細胞増殖と抗 IgG 抗体の沈着といった免疫複合型の糸球体腎炎の所見を認め、Egr2/3 DKO マウスではさらに強い兆候を認めた (図 3f, g)。

以上のことより、T 細胞上の Egr2 発現および、Egr3 による Egr2 の機能補完作用が SLE 病態形成制御において重要であると考えられた。

4. Egr2/3 DKO マウスは多臓器に炎症性細胞の浸潤を認める

T 細胞特異的に Egr2、Egr3 を欠損した影響に関して、36 週齢で腎臓、皮膚以外の組織も含めて解析を行った。腎臓において Egr2/3 DKO マウスでは、16 週齢と比較してさらなる炎症細胞浸潤と細胞増殖を認め、さらに半月体形成および壊死所見も認めた (図 4a, b)。また、Egr2/3 DKO マウスでは腎臓以外に肺、肝臓、膵臓、胃、唾液腺といった多臓器に炎症細胞の浸潤を認めたが (図 4c)、これらの臓器への炎症細胞浸潤はヒトの SLE では稀な所見であり [32]、T 細胞上の Egr2、Egr3 発現は SLE における罹患臓器以外のより広範な臓器における免疫学的寛容の維持にも関与していると考えられた。

5. Egr2/3 DKO マウスでは二次リンパ組織で濾胞ヘルパー T 細胞、胚中心

B 細胞過形成を認める

次に T 細胞特異的に Egr2、3 欠損が免疫システムに及ぼす影響に関し二次リンパ組織内の T 細胞に関して解析を行った。肉眼的に Egr2 CKO マウスと比較して、Egr2/3 DKO マウスの方がより強い脾腫を認めた (図 5a)。フローサイトメトリー解析において Egr2 CKO マウスでは WT マウスと比較してメモリー CD4⁺ T 細胞 (memory T 細胞) の増加を認め、Egr2/3 DKO マウスではさらに強

い傾向を示した (図 5b)。

次に、Memory T 細胞の中でどの T 細胞が特異的に増加しているかに関して解析を行ったところ、Egr2 CKO、Egr2/3 DKO マウスでは Tfh 細胞の過形成が認められ、Egr2 CKO マウスよりも Egr2/3 DKO マウスでより強い増加傾向を示した (図 5c)。この傾向は 6、12、18 週齢と観察するマウスの週齢を変えて解析を行っても同様に Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスで Tfh 細胞の継続的な増加傾向を認めた (図 5c)。さらに、脾臓以外の二次リンパ節 (頸部、鼠径、腰リンパ節) の解析でも Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスで Tfh 細胞の増加を認めた (図 5e)。

また、WT マウスは定常状態においては GCB 細胞形成を殆ど認めないが、Egr2 CKO、Egr2/3 DKO マウスにおいては定常状態でも GCB 細胞の過形成を認め、その傾向は Egr2/3 DKO において顕著であった (図 5d)。6、12、18 週齢と観察するマウスの週齢を変えて解析を行ったところ、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスの GCB 細胞の過形成は継続的な増加傾向を認めた (図 5d)。また、脾臓以外の二次リンパ節 (頸部、鼠径、腰リンパ節) おいても Egr2/3 DKO マウスでは GCB 細胞の過形成を認めた (図 5f)。以上より、T 細胞における Egr2、Egr3 発現は胚中心を形成する Tfh 細胞分化および、GCB 細胞分化の制御に重要

な機能を持つ可能性が示唆された。

6. WT マウス由来 LAG3⁺ Treg 細胞の養子移入は Egr2 DKO マウスにおける GCB 細胞、Tfh 細胞分化を制御する

次に、Egr2/3 DKO マウスの Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成が Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞の機能異常に起因するか否かにつき、WT マウス脾臓の LAG3⁺ Treg 細胞を Egr2/3 DKO マウスに養子移入し、正常な LAG3⁺ Treg 細胞の機能を回復させることによって Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成が抑制されるかどうか解析を行った。

具体的には Egr2/3 DKO マウスの 2、4 週齢期に WT マウス由来の LAG3⁺ Treg 細胞を経静脈的に養子移入し、8 週齢期に Egr2/3 DKO マウスの脾臓における Tfh 細胞、GCB 細胞の形成につき解析を行った (図 6a)。その結果、WT マウス由来の LAG3⁺ Treg 細胞を移入した群において Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成の有意な抑制効果が認められた (図 6b, c)。この結果より Egr2/3 DKO マウスにおける Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成は Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞の機能異常によって生じる可能性が高いと考えられた。

7. LAG3⁺ Treg 細胞は抑制性サイトカイン TGF-β3 を高産生する

次に、LAG3⁺ Treg 細胞の液性免疫制御に関する抑制性因子につきマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は naïve T 細胞、CD25⁺ Treg 細胞と比較して、TGF-β3 を高発現することが示唆された (図 7a)。定量的リアルタイム PCR 法による解析においても LAG3⁺ Treg 細胞は naïve T 細胞、CD25⁺ Treg 細胞と比較して *Tgfb3* mRNA を高発現していた (図 7b)。また、CD8⁺ T 細胞、B 細胞、樹状細胞を含めた他の免疫細胞との比較においても LAG3⁺ Treg 細胞の *Tgfb3* mRNA 発現量は著しく高かった (図 7c)。

さらにタンパクレベルでの TGF-β3 産生を確かめるために、LAG3⁺ Treg 細胞を TCR 刺激下で 3 日間培養し、培養上清における TGF-β3 の産生量を ELISA にて評価した。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞はタンパクレベルでも TGF-β3 を約 20 ng/ml と大量に産生することが明らかとなった (図 7d)。一方、LAG3⁺ Treg 細胞は TGF-β1、2 の産生を認めなかった (図 7e, f)。

既報と一致して CD25⁺ Treg 細胞は TGF-β1 の産生を認めたが[33]、TGF-β3 の産生は認めなかった。また、近年 *RAR-related orphan receptor gamma t* (*Roryt*)をマスター制御遺伝子とし炎症性サイトカイン IL-17 を産生する Th17 細胞も TGF-β3 を mRNA レベルで高発現することが報告されており[34]、Th17 細胞

胞の TGF- β 3 の産生量をタンパクレベルで確認したところ、Th17 細胞は LAG3⁺ Treg 細胞の約 1/3 程度しか TGF- β 3 を産生しなかった (図 7g)。

以上より、LAG3⁺ Treg 細胞は TGF- β family の中で TGF- β 3 を特異的に高産生することが明らかとなった。

8. TGF- β 3 は *in vitro* における GCB 様細胞の分化、増殖を抑制する

TGF- β 1 による液性免疫制御に関しては B 細胞の増殖、抗体産生を抑制するということが報告されているが[35]、TGF- β 3 による液性免疫制御に関する報告例がない。しかしながら、TGF- β 1 と TGF- β 3 は同じ受容体と結合することより[36]、TGF- β 3 も TGF- β 1 と同様に B 細胞の増殖、抗体産生を抑制する機能を有するのではないかという仮説を立て、*in vitro* における機能解析を行った。

Egr2/3 DKO マウスでは GCB 細胞の過形成を認め、LAG3⁺ Treg 細胞の移入によって過形成の抑制を認めたことから、*in vitro* で誘導した GCB 細胞に対する TGF- β 3 の作用の関する解析を行った。*In vitro* で GCB 細胞を誘導する方法として、IL-4 刺激下で、B 細胞を BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) と CD40L を発現させた feeder cell line と共培養させ誘導するという報告がある[37]。今回私は WT マウスの脾臓から回収した B 細胞

を IL-4、抗 CD40 抗体および BAFF 刺激下で培養し、GCB 様細胞へと分化するかどうか解析を行った。その結果、B 細胞は IL-4、抗 CD40 抗体および BAFF 刺激下においても B220⁺Fas⁺GL7⁺ の GCB 細胞に類似した細胞に分化し (図 8a)、上清の IgG 抗体量の著明な増加を認めた (図 8c)。次に TGF- β 1 または TGF- β 3 をさらに添加することで B 細胞の増殖、分化、抗体産生への影響を、フローサイトメトリー、上清中ノイムノグロブリン濃度測定にて解析したところ、TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加した群は添加していない群と比較して、GCB 様細胞の割合が有意に低下した (図 8a)。また、B 細胞を CFSE ラベルして、細胞増殖を解析した結果、TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加した群は添加していない群と比較して有意に B 細胞の細胞増殖が抑制された (図 8b)。また、培養上清中の IgG 抗体産生量に関しても TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加した群は添加していない群と比較して産生量の低下を認めた (図 8c)。いずれの解析においても TGF- β 1 と TGF- β 3 で抑制能の差異は認めなかった。また TGF- β 1 は LPS 刺激下で IgA を誘導するという報告があるが[38]、今回の条件では IgA の産生も TGF- β 1 および TGF- β 3 の添加により抑制された (図 8c)。

以上より、TGF- β 3 は TGF- β 1 と同様に B 細胞の GCB 細胞への分化および増殖を抑制し、抗体産生も抑制することが明らかとなった。

9. TGF- β 3 は *in vitro* で誘導された Tfh 様細胞の機能を制御する

次に TGF- β 3 の Tfh 細胞分化に対する影響につき *in vitro* での解析を行った。*In vitro* における Tfh 様細胞を誘導する方法として naïve T 細胞に IL-6 および IL-21 を添加して誘導する方法が知られている [39, 40]。本検討ではそこに TGF- β 1 または TGF- β 3 を添加し Tfh 細胞に対する抑制効果を定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。その結果、ポジティブコントロールでは既報[39, 40]と一致して Tfh 細胞に特徴的な *Bcl6*、*Batf*、*Il-21* mRNA 発現が上昇したのに対して、TGF- β 3 を添加した群では *Bcl6* mRNA 発現の低下は認めなかったが、*Batf*、*Il-21* mRNA 発現の低下を認めた (図 9)。TGF- β 1 も同様に解析を行ったが、TGF- β 1 および TGF- β 3 間で抑制能の有意な差は認めなかった。

以上より TGF- β 3 は Tfh 細胞における *Il-21*、*Batf* mRNA 発現を抑制することで Tfh 細胞の機能を抑制していることが推測された。

10. LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 依存性に TGF- β 3 を産生する

ここまでの検討にて Egr2/3 DKO マウスによる Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成は Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞の機能異常によるということ、

また LAG3⁺ Treg 細胞は TGF-β3 産生を介して液性免疫を制御することが明らかとなった。これらの結果から私は Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞は TGF-β3 産生になんらかの異常が生じ、GCB 細胞および Tfh 細胞分化を制御できなくなるのではと仮説を立て、Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞について解析を行った。

初めに Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスの脾臓における LAG3⁺ Treg 細胞の割合に関して解析を行った。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスで段階的に割合が増加する傾向を認めた (図 10a)。

Egr2、Egr3 および TGF-β3 の関係に関して、WT マウス、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスの脾臓から LAG3⁺ Treg 細胞を回収し、3 日間 T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) 刺激下で培養後、培養上清中の TGF-β3 につき ELISA を用いて検討した。その結果、LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2 単独欠損でも TGF-β3 産生は低下するが、Egr2、Egr3 を両方欠損することで検出感度以下まで著しく低下した (図 10b)。上述の検討にて Th17 細胞も少量ながら TGF-β3 を産生することを確認したが (図 7g)、Th17 細胞も LAG3⁺ Treg 細胞と同様に Egr2、Egr3 が両方欠損すると TGF-β3 産生は検出感度以下まで著しく低下した (図 10c)。

以上より、LAG3⁺ Treg 細胞は Egr2、Egr3 依存性に TGF-β3 を産生する

ことが明らかとなった。また、これら結果より Egr2/3 DKO マウスにおける Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成は、Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞による TGF-β3 産生障害が一因であることが示唆された。

11. pCAGGS-Tgfb3 ベクター投与は Egr2/3 DKO マウスにおける GCB 細胞過形成を改善させる

Egr2/3 DKO マウスの Tfh 細胞、GCB 細胞の過形成が LAG3⁺ Treg 細胞の TGF-β3 産生の低下によるものかどうかを検証するために、pCAGGS-Tgfb3 ベクターを Egr2/3 DKO マウスに投与して、TGF-β3 による Egr2/3 DKO マウスの Tfh 細胞、GCB 細胞形成への影響を検証した。

具体的には pCAGGS-Tgfb3 ベクターを Egr2/3 DKO マウスに対して、4、6、8 週齢期の計 3 回、経静脈的に投与し、12 週齢期に脾臓を回収し、Tfh 細胞、GCB 細胞形成に関する解析を行った。その結果 pCAGGS-Tgfb3 投与は血清中 TGF-β3 濃度を上昇させ、pCAGGS コントロールベクター投与群と比較して GCB 細胞の形成を有意に抑制することが明らかとなった (図 11b)。一方、pCAGGS-Tgfb3 は Tfh 細胞の分化を抑制しなかった (図 11a)。これらのことより、LAG3⁺ Treg 細胞は TGF-β3 産生を介して GCB 形成を抑制することで液性免疫を

制御することが示唆された。

12. LAG3⁺ Treg 細胞における Egr2、Egr3 欠損は、*Tgfb3* mRNA 発現に影響しない

Egr2、Egr3 欠損によって LAG3⁺ Treg 細胞の TGF-β3 産生が低下することより (図 10b)、Egr2、Egr3 を介した TGF-β3 の産生制御メカニズムにつき検討を行った。Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞が TGF-β3 をタンパクレベルだけでなく mRNA レベルでも低下させているか否かにつき定量的リアルタイム PCR 法にて解析を行った。WT マウス、Egr2 CKO マウス、Egr2/3 DKO マウスから LAG3⁺ Treg 細胞を回収し、*Tgfb3* mRNA の遺伝子発現を解析した結果、予想に反して Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞は WT マウス由来と比較して *Tgfb3* mRNA の発現低下は認めなかった (図 12a)。TGF-β3 蛋白産生を解析した実験と同様に LAG3⁺ Treg 細胞を 3 日間 TCR 刺激下に培養し、*Tgfb3* mRNA の遺伝子発現を解析したが、この条件においても Egr2、Egr3 を欠損した LAG3⁺ Treg 細胞は WT マウス由来と比較して *Tgfb3* mRNA の発現に差を認めず、*Tgfb3* mRNA レベルは TCR 刺激により全て低下を認めた (図 12c)。TCR 刺激後の *Tgfb3* mRNA 抑制は negative feed back 機構による制御の可能性が考えられる。これら

のことより、Egr2、Egr3 は TGF- β 3 の転写に直接機能せず、異なる機序で TGF- β 3 の産生を制御している可能性が示唆された。

13. Egr2、Egr3 は LTBP-3 発現誘導を介して TGF- β 3 産生を制御している

TGF- β は細胞内で複数のプロセッシングを受けて細胞外に産生されるという特徴がある[41]。翻訳直後の pre-pro-TGF β は latency associated peptide (LAP) と mature TGF- β が結合した形であるが、pre-pro-TGF- β とジスルフィド結合によって二量体を構成することで pro-TGF- β を形成する。次に pro-TGF- β はゴルジ体でフーリンというプロタンパク質転換酵素により LAP と mature TGF- β の間が切断され small latent complex (SLC) を形成する。この SLC は切断された mature TGF- β が非共有結合によって LAP に包まれたような形体をとり、mature TGF- β が受容体と結合するのを防いでいる。最後に SLC は latent TGF- β binding protein (LTBP) とジスルフィド結合することで large latent complex (LLC) を形成し細胞外へと移行する。LTBP は SLC との結合部分とは反対側で細胞外マトリックスに結合し、integrin と協調的に作用することで LAP から mature TGF- β を遊離させ、近傍の細胞に作用するように補助を行うタンパクであるが、LTBP-3 に関しては TGF- β と結合しない限り、単独では細胞外に産生されない[42, 43]。

私は T 細胞における TGF- β 3 の効率的な分泌において Egr2、Egr3 による LTBP family の誘導が関連するのではないかという仮説を立て、以下の検討を行った。

LTBP family は LTBP-1 から LTBP-4 までの 4 種類が存在するが、TCR 刺激下に培養後、LAG3⁺ Treg 細胞で特異的に mRNA 発現の上昇を認めたのは LTBP-3 であった (図 13a)。次に Egr2 単独欠損、または Egr2、Egr3 両方欠損した LAG3⁺ Treg 細胞において *Ltbp3* mRNA の発現を解析したところ TCR 刺激後 *Ltbp3* mRNA の発現の上昇は認めなかった (図 13a)。これらの結果より TCR 刺激後に誘導される *Ltbp3* mRNA の発現増強は Egr2、Egr3 によって制御されていることが示唆された。

次に、LTBP-3 の存在が TGF- β 3 の細胞外への分泌に必要であるかどうか、*Ltbp3* siRNA 導入によって LTBP-3 発現をノックダウンし、その結果 TGF- β 3 の産生が低下するか否かにつき解析を行った。初めに *Ltbp3* siRNA を LAG3⁺ Treg 細胞に導入し 2 日間培養した。その後、培養液を交換して、さらに 3 日間培養し、培養上清中の TGF- β 3 タンパク産生量と回収細胞の遺伝子発現に関して解析を行った。その結果、*Ltbp3* siRNA によるノックダウンは LAG3⁺ Treg 細胞の *Tgfb3* mRNA 発現レベルに影響しなかったが、培養上清の TGF- β 3 タンパク量は検出感度以下まで著明に低下した (図 13b)。

これらの結果より、TGF- β 3 の細胞外への産生は LTBP-3 が必須であり、Egr2 と Egr3 は LTBP-3 発現を誘導することで LAG3⁺ Treg 細胞における TGF- β 3 分泌を制御していると考えられた。

考察

本研究において、LAG3⁺ Treg細胞による液性免疫制御機構を明らかにした。LAG3⁺ Treg細胞はTGF-β3を高産生し、TGF-β3は強力なTfh細胞、GCB細胞分化抑制能を有していた。T細胞特異的にEgr2およびEgr3を欠損するEgr2/3 DKOマウスはループス様病態を自然発症したが、LAG3⁺ Treg細胞におけるEgr2、Egr3機能異常によりTCR刺激後のLTBP-3誘導不全が生じ、その結果、TGF-β3が分泌されないことがその病態形成に関与していると考えられた。

SLEを含めた自己抗体産生を特徴とする自己免疫疾患において、Tfh細胞およびGCB細胞相互作用による過剰な胚中心応答がその病態形成において重要な役割を果たしている[1]。過剰な免疫応答を制御するサブセットとしてTreg細胞が広く知られているが、近年、胚中心応答を抑制する細胞として濾胞内に存在するTfr細胞が報告された[13, 14, 15]。Tfr細胞は胸腺で分化するnTreg細胞より誘導されることが考えられており、nTreg細胞およびTfh細胞の各々に特徴的な遺伝子プロファイルも併せ持つ。また、nTreg細胞のマスター制御遺伝子であるFOXP3遺伝子の機能異常によるIPEX症候群では抗核抗体といった自己抗体を産生することより[17]、nTreg細胞が液性免疫を制御することが想定されている。

しかしながら、IPEX症候群においては、自己抗体産生機序を介する代表的自己免疫疾患であるSLEに特徴的な血清抗dsDNA抗体価の上昇や糸球体腎炎の症状などは稀であり[18]、SLEの病態制御にはnTreg細胞以外の制御性サブセットも関与していると考えられる。免疫学的恒常性はnTreg細胞、および末梢で誘導されるiTreg細胞が協調することで保たれているが、胚中心応答制御におけるiTreg細胞の機能は不明なままであった。

当研究室の岡村らは2009年に、iTreg細胞の新しいサブセットとして、IL-10を高産生するLAG3⁺ Treg細胞を同定した[23]。LAG3はCD4と構造的な相同性を持ち、より強いMHC class II分子への結合性を有するI型膜タンパクであるが[24, 25]、近年CD49bとともにTr1細胞の特異的細胞表面マーカーとなることが報告されている[44]。定常状態においてLAG3⁺ Treg細胞はEgr2を特異的に発現しており、Egr2をnaïve T細胞に強制発現させることでLAG3⁺ Treg細胞の性質が付与されることから、Egr2はLAG3⁺ Treg細胞のマスター制御遺伝子として機能すると考えられている。さらに、*EGR2*はSLEの疾患感受性遺伝子であること[27]、T細胞、B細胞特異的Egr2欠損マウスはSLE様病態を呈すること[28]が近年報告された。このことは、Egr2を高発現するLAG3⁺ Treg細胞が液性免疫を制御する可能性を示唆している。本研究では、LAG3⁺ Treg細胞がGCB細胞、Tfh細胞

の分化抑制を介して、胚中心応答を制御していることを明らかにし、iTreg細胞の中で胚中心応答制御を行う細胞をはじめて同定した。これまでに、濾胞応答を制御するサブセットとして、Tfr細胞以外に、Qa-1a拘束性CD8⁺Treg細胞[45]、Breg細胞が報告されているが[46]、これらの制御性サブセットがどのような疾患において病勢を制御しているのかは未だ十分には解明されておらず、その制御メカニズムも含め今後の詳細な検討が待たれる。

代表的な抑制性サイトカインとしてIL-10以外にTGF- β 1が広く知られているが[47]、ヒトにおいてはTGF- β familyとして、TGF- β 1に構造的に類似したTGF- β 2、TGF- β 3が報告されている[48]。ヒトのTGF- β 2はTGF- β 1と71%、TGF- β 3はTGF- β 1と72%、TGF- β 2はTGF- β 3と76%と、高いアミノ酸配列の相同性を有する[49, 50]。TGF- β familyによる液性免疫制御についてはいくつかの報告がある。TGF- β RIIをB細胞特異的に欠損させたTgfb β 2^{fl/fl}CD19Cre⁺ マウスは血清IgG値の上昇、ならびに抗dsDNA抗体価の上昇を認めることが報告されており[51]、また、TGF- β RIIをT細胞特異的に欠損させTgfb β 2^{fl/fl}Cd4Cre⁺ マウスは早期より血清抗dsDNA抗体価の上昇および多臓器への炎症細胞浸潤を認め、およそ5週齢で死に至る[52, 53]。これらノックアウトマウスの病態は、TGF- β がB細胞およびT細胞

に対して抑制効果を有することを意味している。本研究では、LAG3⁺ Treg細胞がTGF-β3を10,000 ~ 30,000 pg/mlと大量に産生すること[54]を明らかにした。

免疫学においては近年までTGF-β2およびTGF-β3は重要な役割を果たしていないと考えられてきており[47, 48, 55]、液性免疫制御に対してもTGF-β1 KOマウスの形質[56, 57]やTGF-β1を用いた各種検討[47]よりTGF-β1が制御能を有することは広く知られているが、TGF-β3の抑制機能については不明なままであった。ただし、TGF-β3はTGF-β1と同様にTGF-βRIIおよびTGF-βRIを介してそのシグナルを伝達し、両サイトカインの*in vitro*におけるその生物活性は類似していることが多く報告されている[58]。本研究では、LAG3⁺ Treg細胞がTGF-β3を大量に産生することに加え、TGF-β3はTGF-β1と同様にGCB細胞、Tfh細胞の分化を抑制し、液性免疫を制御することを明らかにした。この研究結果は、TGF-β familyによる液性免疫制御にはTGF-β1だけでなくTGF-β3も極めて重要な因子であることを初めて示したという点で意義深い。一方で、TGF-β3 KOマウスは肺の形成障害や口蓋裂形成により生後20時間程度で死亡するが[59, 60]、TGF-β1 KOマウスは自己抗体産生および多臓器の炎症を認め生後4週程度で死亡することから[56, 57]、*in vivo*においては異なる機能を有すると考えられている。

上述の如く、LAG3⁺Treg細胞はEgr2を特異的に発現し、Egr2がその機能発現において重要な役割を果たしていることが想定される。Egr familyはEgr1からEgr4までの4種類で構成されるが、それらの中でEgr2とEgr3はCbl-bの発現誘導を介してT細胞のanergy誘導に関与することにより、免疫学的恒常性維持に重要な転写因子と考えられている[26]。また、Egr3はEgr2の機能を補完することが近年考えられており、今回の検討においても、Egr2を欠損したLAG3⁺Treg細胞はEgr3発現の代償的上昇を認めた。これらのことは、LAG3⁺Treg細胞におけるEgr2の機能解析に当たっては、T細胞特異的にEgr2、Egr3両方を欠損させたマウスの作出が必須であることを意味している。リンパ球特異的にEgr2、Egr3を欠損させたマウスがループス様症状を呈するという報告があるが[29]、同報告で使用されているマウスはT細胞のみならずB細胞も含めてEgr2、Egr3が欠損しており、SLE病態解明にはT細胞もしくはB細胞特異的にEgr2、Egr3を欠損したマウスによる検討が必要である。そこで、本研究ではT細胞特異的にEgr2、Egr3が欠損したEgr2/3 DKOマウスを作出した。Egr2/3 DKOマウスはSLEモデルマウスの典型とされる、皮膚炎、IgG抗体沈着型の糸球体腎炎、脾腫、血清抗dsDNA抗体価の上昇をEgr2 CKOマウスと比較して早期から認めた。また、Egr2/3 DKOマウスはSLEに典型的な所見以外に、唾液腺、肝臓、肺、膵臓、胃といった多臓器にも炎症

細胞浸潤を認めたことより、Egr2およびEgr3はSLE以外のより広範な自己免疫疾患の制御に関与していることが示唆された。機能性*Foxp3*遺伝子を欠損した Scurfyマウスでも皮膚、肝臓、肺、眼結膜を中心に多臓器に炎症細胞浸潤を認めるが[61, 62, 63, 64]、Egr2/3 DKOマウスで認めた唾液腺への炎症細胞浸潤を認める報告はなく、nTreg細胞とLAG3⁺Treg細胞はそれぞれ異なる臓器における免疫学的恒常性維持に関与していることが示唆された。

自己抗体産生においては、過剰な胚中心応答が中心的な役割を果たしている。Egr2/3 DKOマウスの二次リンパ組織ではTfh細胞、GCB細胞の過形成という胚中心応答の亢進を認め、また、Egr2を発現するLAG3⁺Treg細胞の養子移入によって治療効果が認められたことより、Egr2、Egr3発現は、LAG3⁺Treg細胞の胚中心応答の制御に重要であることが示唆された。一方、Egr2/3 DKOマウスは、既報[29]におけるリンパ球特異的にEgr2、Egr3を欠損させたマウスと比較して自己免疫疾患としての表現型は弱かった。このことは、T細胞上のみならず、B細胞上のEgr2、Egr3発現も免疫学的恒常性維持に関与していることを示唆している。Egr2は骨髄内のリンパ球性共通前駆細胞 (common lymphoid progenitor: CLP)、pre-pro B細胞においても発現していることが報告されており、リンパ球上でEgr2を発現するようにしたトランスジュニックマウスでは、Pax5の遺伝子発現抑制

を通してpro B細胞への分化抑制に機能することが報告されている[65]。一方で、Egr2をリンパ球特異的に欠損させたマウスではB細胞の分化異常は生じないという一見相矛盾することも報告されているが[65]、B細胞においても同様に、Egr2に対してEgr3が補完的な機能持つ可能性を示唆している。Egr3をT細胞、B細胞特異的に欠損したマウスでは、明らかな自己免疫疾患の発症は認めないことより[29]、T細胞、B細胞上に発現するEgr3は免疫学的恒常性維持においてはEgr2の機能を補完することにその役割があると考えられる。今後は、B細胞におけるより詳細なEgr2、Egr3の機能解析が必要である。

TGF- β super familyのうち、TGF- β 1、2、3はタンパクに翻訳された後、細胞内で複数のプロセッシングを受け、最終的にmature TGF- β + LAP + LTBPから形成されるタンパク複合体として細胞外へ移行するといった複雑な分泌過程を経るという特徴がある[41]。LTBP familyはLTBP-1からLTBP-4の4種類のアイソフォームからなる、細胞外マトリックス構成タンパクである[66]。この中でLTBP-2以外はmature TGF- β とLAPから構成されるsmall latent complex (SLC)と結合し、SLCの細胞外マトリックスへの貯蓄、また活性化に関与する。LTBP-1は全身の臓器で発現し[67]、TGF- β 1、2、3のSLCいずれとも結合可能であるが、LTBP-1分泌にTGF- β は必ずしも必須ではない[68]。LTBP-2は肺を主として心臓、

肝臓、筋肉、胎盤に発現し[69]、LTBP-2 KOマウスは胎生致死となる[70]。LTBP-3は神経、心臓、骨、筋肉などに発現し[71, 72]、LTBP-3 KOマウスは早期より頭蓋顔面の骨格異常が出現する[73]。LTBP-3もLTBP-1と同様にTGF- β 1、2、3のSLCいずれとも結合可能であるが、LTBP-3はSLCとの結合なしでは分泌されないという特徴を持つ[42, 43]。LTBP-4は大動脈、心臓、腸、卵巣に発現し[74, 75]、LTBP-4 KOマウスは大腸癌、心筋症、肺気腫が発症する[76]。LTBP-4はTGF- β 1のSLCとしか結合しない[77]。

LAG3⁺Treg細胞はTCR刺激後にLTBP-3を高発現しており、Egr2が欠損することでLTBP-3発現は有意に低下した。また、Ltp3 siRNAによるLtp3遺伝子のノックダウンによりTGF- β 3分泌が著しく低下したことより、LAG3⁺Treg細胞におけるTGF- β 3分泌には、Egr2およびEgr3を介したLTBP-3発現誘導が必要であると考えられた。LTBP-3発現誘導が、Egr2、Egr3による直接的なものか、間接的なものかに関しては、promoter assayなどを含めたより詳細な検討が今後必要である。

TGF- β 3の機能に関して、本研究では抑制性サイトカインとしての機能に注目したが、TGF- β 3はpathogenic Th17細胞を誘導するという報告もある[36]。しかし、LAG3⁺Treg細胞の養子移入実験では、pathogenic Th17細胞応答亢進を示

唆する自己免疫疾患は発症しなかった。その理由として、LAG3⁺ Treg細胞がTh17細胞の分化を抑制するIL-10も高産生している点が挙げられ、今後TGF-β3とIL-10の協調作用を研究することは治療応用の側面でも大変重要と考えられる。

SLEにおいて、Tfh細胞、GCB細胞の過形成による過剰な胚中心応答が自己抗体産生に関与していることはマウス、ヒト両方において報告されている[1, 5, 6, 7]。本研究でもEgr2/3 DKOマウスのSLE様病態機序に関して、胚中心応答を中心に解析を行い、LAG3⁺ Treg細胞がEgr2、Egr3依存性にTGF-β3を分泌し、TGF-β3を介してTfh細胞、GCB細胞の形成を抑制すること明らかにした。定常状態においてLAG3⁺ Treg細胞はT細胞B細胞境界領域に存在しているが[61]、抗原暴露されたナイーブB細胞もpre GCB細胞としてpre Tfh細胞とT細胞B細胞境界領域で一度相互作用した後に胚中心内へ移行していくため、LAG3⁺ Treg細胞は胚中心外の段階において抑制をかけている可能性が想定される。また、SLEの自己抗体産生に関しては、濾胞外のB細胞が関与するというとも言われており、SLEモデルマウスのMRL/MpJ-*Fas*^{lpr} (MRL^{lpr}) マウスでは、自己抗体産生B細胞は胚中心経由せず、リンパ濾胞外のT細胞B細胞境界領域でプラズマブラストへと分化すると報告されており[78, 79]、LAG3⁺ Treg細胞はこのような濾胞外免疫応答制御においても有効に機能すると推測される。LAG3⁺ Treg細胞が活性後に胚

中心内に移行するかどうかに関しては、より詳細な検討を要する。

本研究により得られた知見より、SLEを含めた自己免疫疾患に対して、TGF- β 3を用いたサイトカイン療法が有効であることが示唆される。TGF- β 1も同様の液性免疫制御能を有するが、TGF- β 1は皮膚・肺を含めた臓器の線維化や[80, 81, 82]、耐糖能異常[83]を引き起こすリスクがある。それに対してTGF- β 3は抗線維化[80, 81, 82]と耐糖能異常改善[83]といったTGF- β 1とは相対する作用を有するため、治療応用としてはTGF- β 3が適していると考えられる。TGF- β 1およびTGF- β 3は同一の受容体に結合するにも関わらず、以上のような相反する作用を持つ原因は明らかでないが、Th17細胞誘導において、TGF- β 1はSmad2/ Smad3のリン酸化経路を促進するのに対し、TGF- β 3はSmad1/Smad5のリン酸化経路を促進するといった異なるシグナル伝達経路が報告されており[36]、TGF- β 1とTGF- β 3の作用の違いもこの伝達経路の違いにより生じていることが推測される。TGF- β 3を用いたサイトカイン療法においてはその副作用を最小限とし、その作用を最大限にするために、B細胞特異的なデリバリーシステムが求められる。近年、免疫サイトカインという新しい治療法が注目されており、IL-10については関節リウマチで臨床試験に入っている[84]。TGF- β 3についても免疫サイトカイン療法を用いることでB細胞特異的に作用させることが可能かもしれない。

本研究では T 細胞上の Egr2、Egr3 発現が、LAG3⁺ Treg 細胞による TGF- β 3 産生を通じて液性免疫制御に重要であることを明らかとし、T 細胞上の Egr2、Egr3 の発現異常は、LAG3⁺ Treg 細胞による TGF- β 3 の分泌障害を引き起こし、SLE をはじめとする自己抗体産生を特徴とした自己免疫疾患の発症誘引となることを示した。さらにこれらの知見は、LAG3⁺ Treg 細胞および TGF- β 3 が自己免疫疾患に対する重要な治療ターゲットとなり得ることを示唆しており、本研究は SLE を含む自己抗体産生機序を介する自己免疫性疾患の新規治療薬開発の重要な礎となると考えられた。

謝辞

本研究において多くの御助言と御支援を賜り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 山本 一彦 教授に心から感謝を申し上げます。

東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ内科の藤尾 圭志 講師、岡村 僚久 特任助教、岩崎 由希子 助教、住友 秀次 助教、庄田 宏文 助教には、研究方針決定に非常に有益な着想を賜り、深く感謝を申し上げます。

また、pCAGGS vector を提供して頂いた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、および Egr2 floxed マウスを提供して頂いた Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Patrick Charnay 教授にも、ここに深く感謝の意を表します。

本研究は日本学術振興会 特別研究員奨励費 (DC1) の支援を受け、行われました。ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

1. Vinuesa, C. G., Sanz, I. & Cook, M. C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 845–857 (2009).
2. Nutt, S. L. & Tarlinton, D. M. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat. Immunol.* 12, 472–7 (2011).
3. Simpson, N. *et al.* Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 234–244 (2010).
4. Cappione, A. *et al.* Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 115, 3205–16 (2005).
5. Jiang, Y. *et al.* Genetically determined aberrant down-regulation of FcγRIIB1 in germinal center B cells associated with hyper-IgG and IgG autoantibodies in murine systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 11, 1685–91 (1999).
6. Vinuesa, C. G. *et al.* A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435, 452–458 (2005).
7. Linterman, M. a *et al.* Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 561–576 (2009).
8. Salomonsson, S. *et al.* Cellular basis of ectopic germinal center formation and

- autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 48, 3187–201 (2003).
9. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30, 626–635 (2009).
 10. Sakaguchi, S. & Powrie, F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317, 627–9 (2007).
 11. Otsubo, K., Kanegane, H., Kobayashi, I. & Miyawaki, T. IPEX syndrome and human Treg cells. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 33, 196–206 (2010).
 12. Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., Rinchik, E. M. & Russell, L. B. Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5528–32 (1991).
 13. Linterman, M. A. *et al.* Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982 (2011).
 14. Chung, Y. *et al.* Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17, 983–988 (2011).
 15. Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B. & Sharpe, A. H. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* 41, 1026–39 (2014).
 16. Sage, P. T. & Sharpe, A. H. T Follicular Regulatory Cells in the Regulation of B cell Responses. *Trends Immunol.* 36, 410–8 (2015).

17. Kinnunen, T. *et al.* Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood*. 121, 1595–1603 (2013).
18. Moudgil, A. *et al.* Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome: an unusual cause of proteinuria in infancy. *Pediatr. Nephrol.* 22, 1799–802 (2007).
19. Bilate, A. M. & Lafaille, J. J. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 733–58 (2012).
20. Pot, C., Apetoh, L. & Kuchroo, V. K. Type 1 Regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 23, 202–208 (2011).
21. Apetoh, L. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11, 854–861 (2010).
22. 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).
23. Okamura, T. *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).
24. Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D. & Triebel, F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur. J. Immunol.* 25, 2718–21 (1995).
25. Huard, B., Prigent, P., Pagès, F., Bruniquel, D. & Triebel, F. T cell major

histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4+ T cell clone responses following LAG-3 binding. *Eur. J. Immunol.* 26, 1180–6 (1996).

26. Safford, M. *et al.* Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat. Immunol.* 6, 472–480 (2005).
27. Myouzen, K. *et al.* Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2313–2320 (2010).
28. Zhu, B. *et al.* Early growth response gene 2 (Egr-2) controls the self-tolerance of T cells and prevents the development of lupuslike autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 205, 2295–2307 (2008).
29. Li, S. *et al.* The Transcription Factors Egr2 and Egr3 Are Essential for the Control of Inflammation and Antigen-Induced Proliferation of B and T Cells. *Immunity* 37, 685–696 (2012).
30. Okamura, T. *et al.* Role of TGF- β 3 in the regulation of immune responses. *Clin. Exp. Rheumatol.* 33, 63–9 (2015)
31. Atkinson, C., Qiao, F., Song, H., Gilkeson, G. S. & Tomlinson, S. Low-dose targeted complement inhibition protects against renal disease and other manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* **180**, 1231–8 (2008).
32. Cervera, R. *et al.* Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 72, 113–24 (1993).

33. 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, 629–644 (2001).
34. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* 13, 991–999 (2012).
35. Roes, J., Choi, B. & Cazac, B. Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7241–7246 (2003).
36. Feng, X. H. & Derynck, R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693 (2005).
37. Nojima, T. *et al.* In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* 2, 465 (2011).
38. Stavnezer, J. & Kang, J. The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch. *J. Immunol.* 182, 5–7 (2009).
39. Ise, W. *et al.* The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat. Immunol.* 12, 536–543 (2011).
40. Schmitt, N. *et al.* The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat. Immunol.* 15, 856–865 (2014).
41. Shi, M. *et al.* Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 474, 343–349 (2011).

42. Chen, Y., Dabovic, B., Annes, J. P. & Rifkin, D. B. Latent TGF-beta binding protein-3 (LTBP-3) requires binding to TGF-beta for secretion. *FEBS Lett.* 517, 277–280 (2002).
43. Penttinen, C., Saharinen, J., Weikkolainen, K., Hyytiäinen, M. & Keski-Oja, J. Secretion of human latent TGF-beta-binding protein-3 (LTBP-3) is dependent on co-expression of TGF-beta. *J. Cell Sci.* 115, 3457–68 (2002).
44. Gagliani, N. *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 19, 739–746 (2013).
45. Kim, H.-J. J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L. & Cantor, H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* 467, 328–332 (2010).
46. Yang, M., Rui, K., Wang, S. & Lu, L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 122–132 (2013).
47. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L. & Flavell, R. A. Transforming Growth Factor-B Regulation of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 99–146 (2006).
48. Massague, J. The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597–641 (1990).
49. Kondaiah, P. *et al.* Identification of a Novel Transforming Growth Factor- β mRNA in *Xenopus laevis**. *J. Biol. Chem.* 265, 1089–1093 (1990).
50. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700 (2003).

51. Cazac, B. B. & Roes, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13, 443–451 (2000).
52. Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. Transforming Growth Factor- β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms. *Immunity* 25, 455–471 (2006).
53. Marie, J. C., Liggitt, D. & Rudensky, A. Y. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity* 25, 441–454 (2006).
54. Okamura, T. *et al.* TGF- β 3-expressing CD4(+)CD25(-)LAG3(+) regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat. Commun.* 6, 6329 (2015).
55. Govinden, R. & Bhoola, K. D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacol. Ther.* 98, 257–265 (2003).
56. Kulkarni, A. B. *et al.* Transforming growth factor β _1_ null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 770–774 (1993).
57. Shull, M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693–699 (1992).
58. Graycar, J. L. *et al.* Human transforming growth factor-beta 3: recombinant expression, purification, and biological activities in comparison with transforming growth factors-beta 1 and -beta 2. *Mol. Endocrinol.* 3, 1977–86 (1989).
59. Taya, Y., O’Kane, S. & Ferguson, M. W. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 126, 3869–3879 (1999).

60. Proetzel, G. *et al.* Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 11, 1–15 (2013).
61. Wildin, R. S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27, 18–20 (2001).
62. Lyon, M. F., Peters, J., Glenister, P. H., Ball, S. & Wright, E. The scurfy mouse-mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott- Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2433–2437 (1990).
63. Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E. & Russell, L. B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J. Pathol.* 138, 1379–1387 (1991).
64. Chen, Z., Benoist, C. & Mathis, D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14735–14740 (2005).
65. Li, S. *et al.* Early Growth Response Gene-2 (Egr-2) Regulates the Development of B and T Cells. 6, 1–9 (2011).
66. Hyytiäinen, M., Penttinen, C. & Keski-Oja, J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 41, 233–264 (2004).
67. Olofsson, A. *et al.* Efficient association of an amino-terminally extended form of human latent transforming growth factor-beta binding protein with the

- extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 270, 31294–7 (1995).
68. Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C. H. & Keski-Oja, J. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J. Cell Biol.* 124, 171–81 (1994).
 69. Morén, A. *et al.* Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269, 32469–78 (1994).
 70. Shipley, J. M. *et al.* Developmental expression of latent transforming growth factor beta binding protein 2 and its requirement early in mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4879–87 (2000).
 71. Yin, W. *et al.* Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J. Biol. Chem.* 270, 10147–60 (1995).
 72. Dabovic, B. *et al.* Bone abnormalities in latent TGF- β binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF- β bioavailability. *J. Cell Biol.* 156, 227–232 (2002).
 73. Dabovic, B. *et al.* Bone defects in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF-beta presentation. *J Endocrinol* 175, 129–141 (2002).
 74. Yin, W. *et al.* Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J. Biol. Chem.* 270, 10147–60 (1995).
 75. Saharinen, J., Taipale, J., Monni, O. & Keski-Oja, J. Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta-binding protein,

LTBP-4. *J. Biol. Chem.* 273, 18459–69 (1998).

76. Sterner-Kock, A. *et al.* Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev.* 16, 2264–73 (2002).
77. Saharinen, J. & Keski-Oja, J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol. Biol. Cell* 11, 2691–704 (2000).
78. Jacobson, B. A. *et al.* Anatomy of autoantibody production: dominant localization of antibody-producing cells to T cell zones in Fas-deficient mice. *Immunity* 3, 509–19 (1995).
79. Mandik-Nayak, L., Bui, A., Noorchashm, H., Eaton, A. & Erikson, J. Regulation of anti-double-stranded DNA B cells in nonautoimmune mice: localization to the T-B interface of the splenic follicle. *J. Exp. Med.* 186, 1257–67 (1997).
80. Ferguson, M. W. J. & O’Kane, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 839–50 (2004).
81. Ask, K. *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).
82. Xu, L. *et al.* Transforming growth factor β 3 attenuates the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in mice by decreasing fibrocyte recruitment and regulating IFN- γ /IL-4 balance. *Immunol. Lett.* 162, 27–33 (2014).
83. 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. *J. Biol. Chem.* 288, 32074–92 (2013).

84. Ferrari, M., Onuoha, S. C. & Pitzalis, C. Trojan horses and guided missiles: targeted therapies in the war on arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 328–37 (2015).

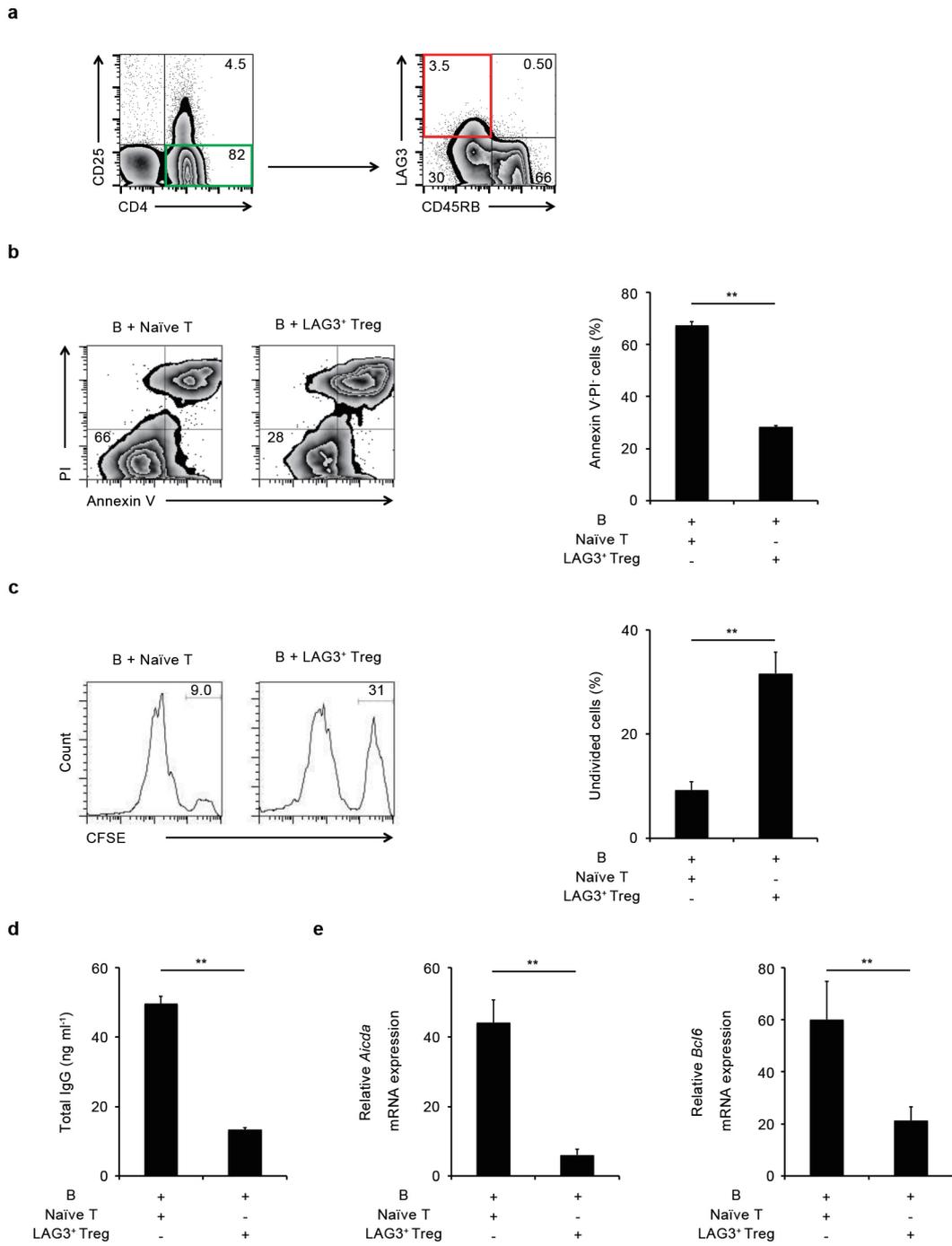


図1. LAG3⁺ Treg細胞は*in vitro*においてB細胞の増殖、分化、抗体産生を制御する

a) WTマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞 (CD4⁺LAG3⁺CD25⁺CD45RB^{low}) ゲーティング方法。b) anti-CD40 mAbおよびIL-4で刺激したB細胞 (CD4⁺CD43⁺Ter-119⁻) およびnaïve T細胞 (CD4⁺CD25⁺CD44^{low}CD62L^{high}) またはLAG3⁺ Treg細胞を、anti-CD3 mAbでコートしたプレート上で3日間共培養し、AnnexinV/PI染色により細胞死をフローサイトメトリーにて評価した (B220⁺CD4⁺細胞ゲーティング)。c) a)と同様の実験においてB細胞をCFSEラベルして細胞増殖をフローサイトメトリーにて評価した (B220⁺CD4⁺細胞ゲーティング)。d) a)と同様の実験において7日間共培養後、上清に含まれるtotal IgG産生量をELISAで評価した。e) a)と同様の実験において3日間共培養後、B細胞を回収し、定量的リアルタイムPCR法にて*Aicda*、*Bcl6*の遺伝子発現を解析した (β -actin遺伝子により正規化)。グラフは3回実験を施行して得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。フローサイトメトリー図は典型例を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (two-tailed Student's *t*-test)。

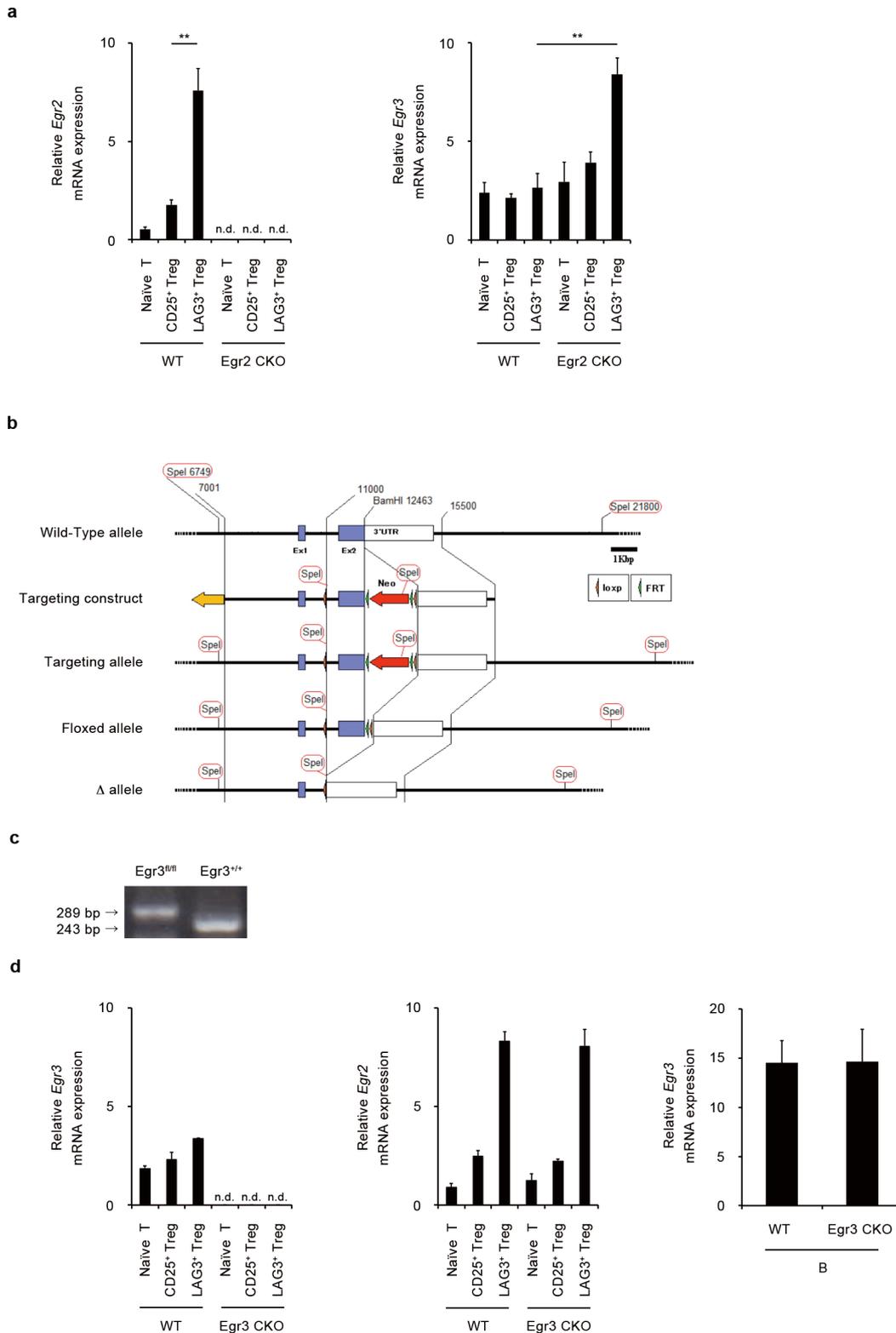


図2. Egr2 CKOマウスのLAG3⁺ Treg細胞はEgr3発現が代償的に上昇する

a) WTマウス、Egr2 CKOマウス脾臓のnaive T細胞、CD25⁺ Treg細胞 (CD4⁺CD25⁺) およびLAG3⁺ Treg細胞におけるEgr2、Egr3の遺伝子発現量を定量的リアルタイムPCR法にて解析した (β -actinにて正規化) (n.d.: not detected). **b**) マウスEgr3遺伝子の野生型アレル、ターゲティングベクター、ターゲティングアレルの略図 (SpeI、BamHI: 制限酵素、Ex: exon、Neo: neomycin、FRT: Flp recombinase target、loxP: locus of X-over P1)。ターゲティングベクターはexon2をloxPで挟むように設計した。 **c**) マウスの尾から抽出したgenomic DNAを用いたEgr3遺伝子のgenotyping. **d**) WTマウス、Egr3 CKOマウス脾臓のB細胞、naive T細胞、CD25⁺ Treg細胞、およびLAG3⁺ Treg細胞におけるEgr2、Egr3の遺伝子発現量を定量的リアルタイムPCR法にて解析した。グラフは3回実験を施行して得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。

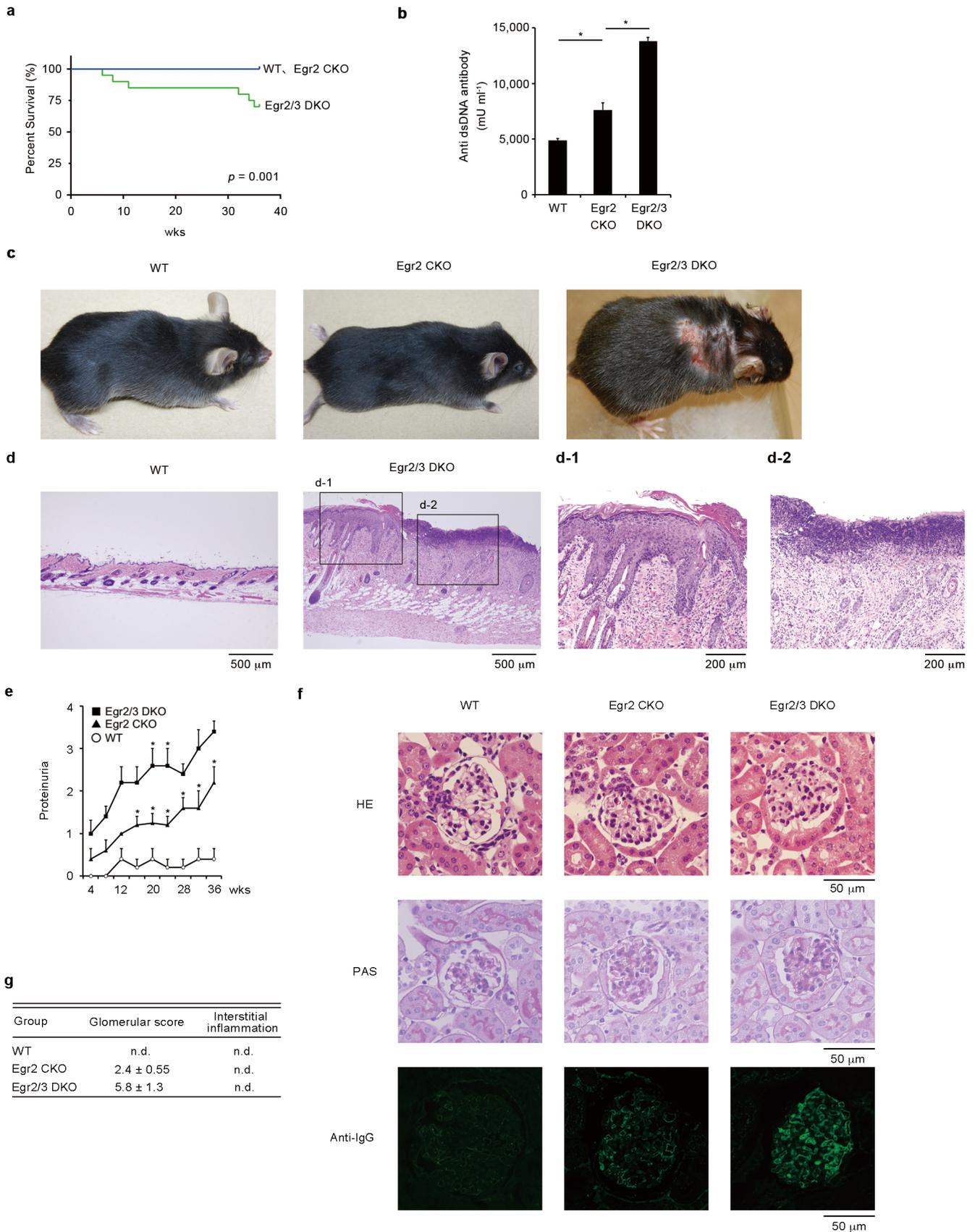


図3. Egr2 CKO、Egr2/3 DKOマウスはループス様病態を示す

a) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウスの生存曲線 (wks: weeks) (Log-rank test)。b) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウス血清の抗dsDNA抗体価 (16wks)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。c) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウスの皮膚所見 (16wks)。d) WT、Egr2/3 DKOマウスの皮膚病理組織像 (16wks)。e) WT、Egr2 CKO、Egr2/3 DKOマウスにおける蛋白尿-時間曲線。* $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test) f) WT、Egr2 CKO、Egr2/3 DKOマウスの腎臓における病理組織像 (16wks)、(HE: hematoxylin eosin染色、PAS: Periodic acid-Schiff染色Anti-IgG: anti-IgG pAbによる染色)。g) WT、Egr2 CKO、Egr2/3 DKOマウスの腎病理組織像のスコアリング結果 (16wks)。グラフは各々10匹のマウス (a)のみ20匹) に関して実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。病理組織像は10匹のマウスのうち典型例を示す。

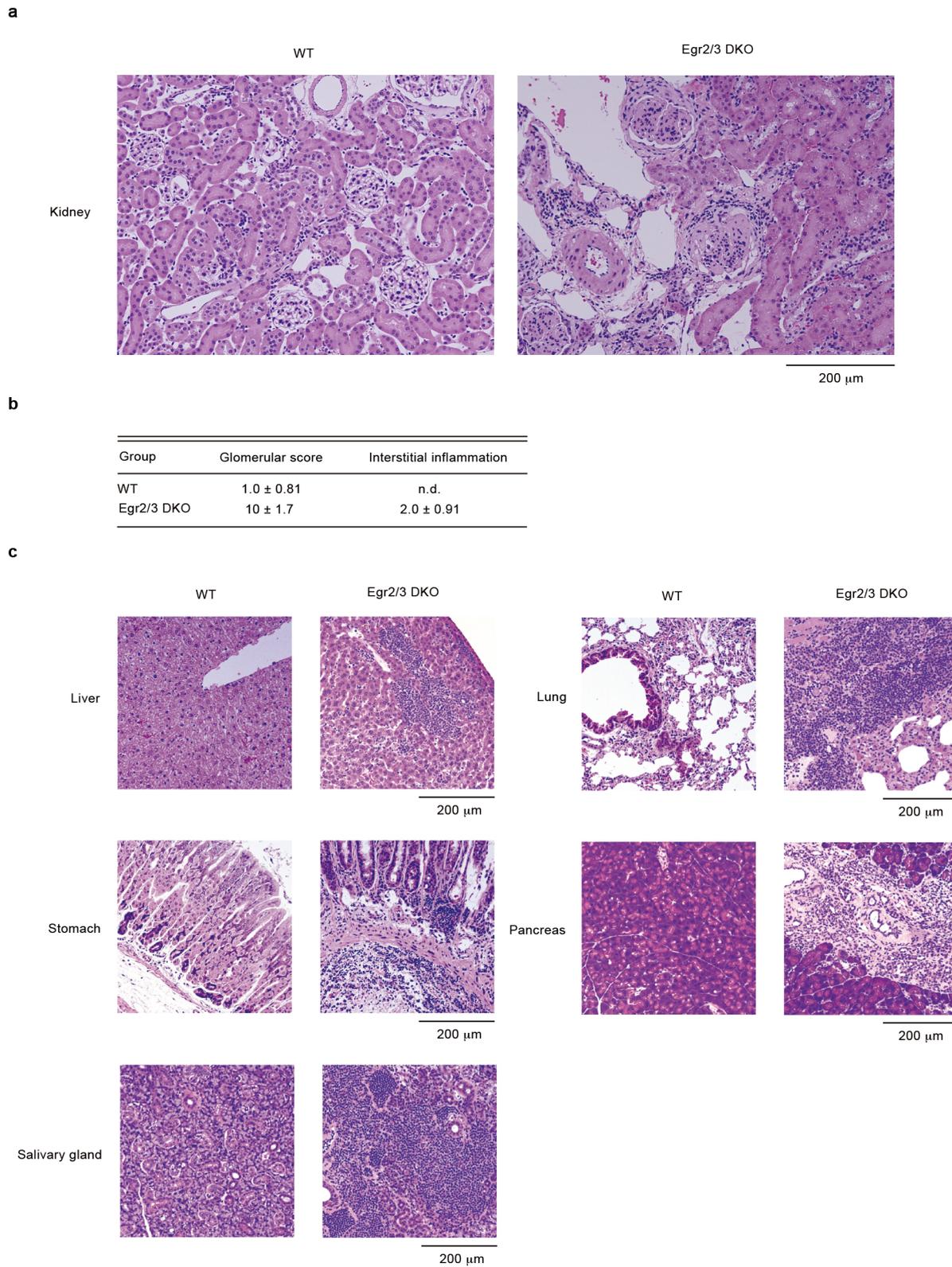


図4. Egr2/3 DKOマウスは多臓器への炎症細胞浸潤を認める

a) WT、Egr2/3 DKOマウス36週齢の腎臓における病理組織像 (36wks)。 **b)** a)における腎病理組織像のスコアリング。 **c)** WT、Egr2/3 DKOマウスの全身の多臓器における病理組織像 (36wks)。病理組織像は各々10匹のマウスの組織像のうち典型例を示す。

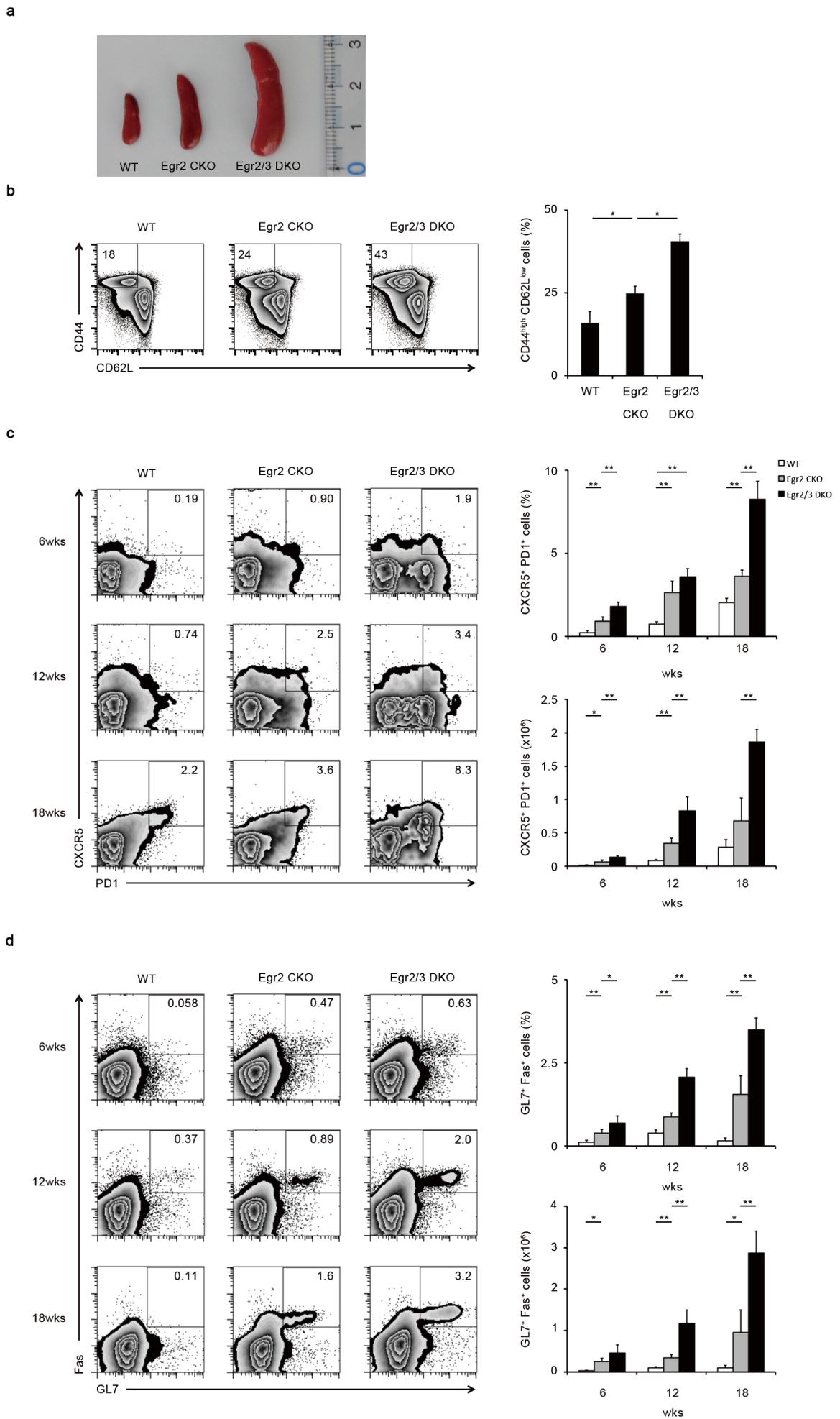
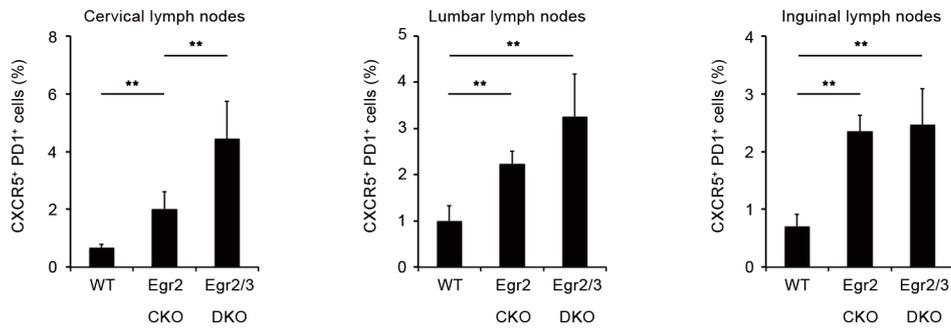


図5. 次項に続く

e



f

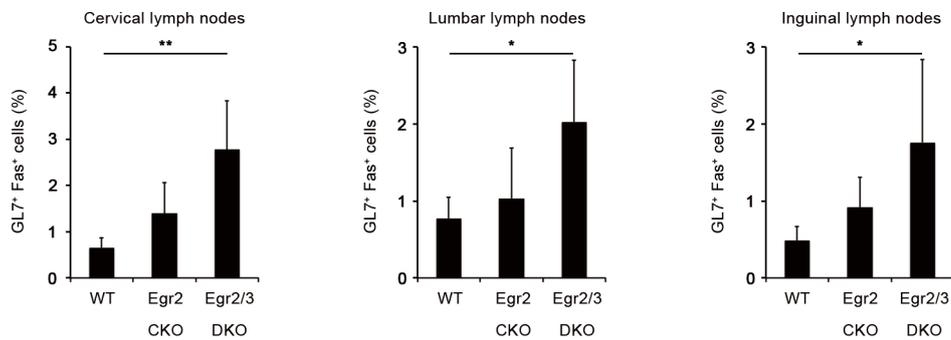


図5. Egr2 CKO、Egr2/3 DKOマウスの二次リンパ組織ではTfh細胞、GCB細胞の過形成を認める

a) WT、Egr2CKO、およびEgr2/3 DKOマウスの脾臓 (16wks)。b) WT、Egr2CKOおよびEgr2/3 DKOマウスの脾臓においてmemory CD4⁺ T細胞 (CD4⁺CD25⁺CD44^{high}CD62L^{low}) をフローサイトメトリーにて解析した (12wks)、(CD4⁺CD25⁺細胞ゲーティング)。c) WT、Egr2CKOおよびEgr2/3 DKOマウスの脾臓においてTfh細胞 (CD4⁺CD25⁺CXCR5⁺PD1⁺) をフローサイトメトリーにて解析した (6、12、18wks)、(CD4⁺CD25⁺細胞ゲーティング)。d) c) と同一の組織においてGCB細胞 (B220⁺GL7⁺Fas⁺) をフローサイトメトリーにて解析した (6、12、18wks)、(B220⁺細胞ゲーティング)。e) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウスの脾臓以外の二次リンパ節 (cervical/lumbar/inguinal lymph nodes) においてTfh細胞をフローサイトメトリーにて評価した (18wks)、(CD4⁺CD25⁺細胞ゲーティング)。f) e) と同一組織においてGCB細胞をフローサイトメトリーにて解析した (18wks)、(B220⁺細胞ゲーティング)。グラフは各々8匹のマウスに関して実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。

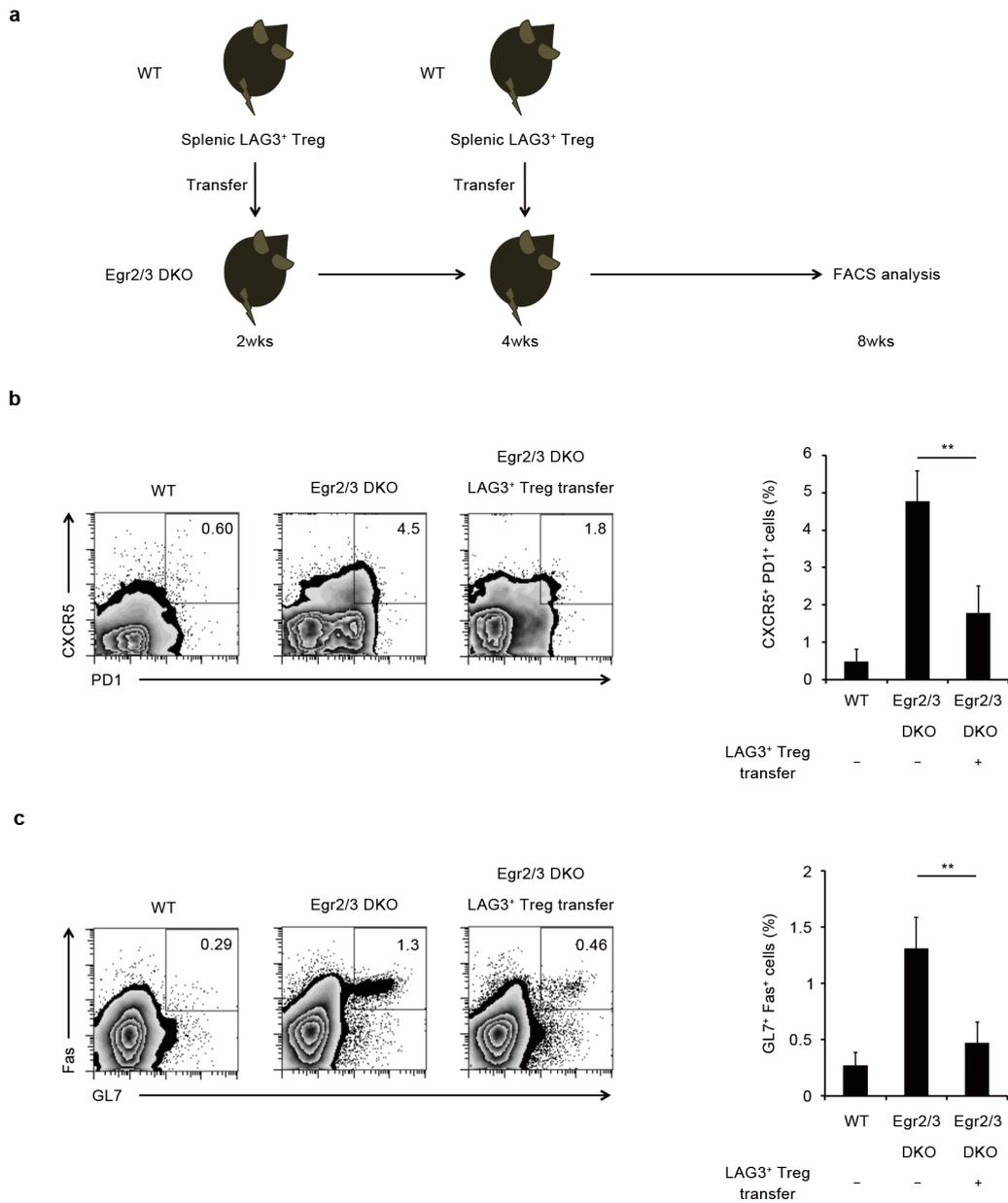


図6. WTマウス由来のLAG3⁺ Treg細胞養子移入によってEgr2/3 DKOマウスのTfh細胞、GCB細胞過形成は抑制される
a) Egr2/3 DKOマウスに対するLAG3⁺ Treg細胞養子移入実験の略図。Egr2/3 DKOマウスの2、4週齢期にWTマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞を経静脈的に養子移入し、8週齢期に脾臓のTfh細胞、GCB細胞をフローサイトメトリーにて評価した。
b) a)におけるTfh細胞のフローサイトメトリー解析 (CD4⁺CD25⁺細胞ゲーティング)。
c) a)におけるGCB細胞のフローサイトメトリー解析 (B220⁺細胞ゲーティング)。グラフは各々8匹のマウスに関して実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。フローサイトメトリー図は典型例を示す。** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。

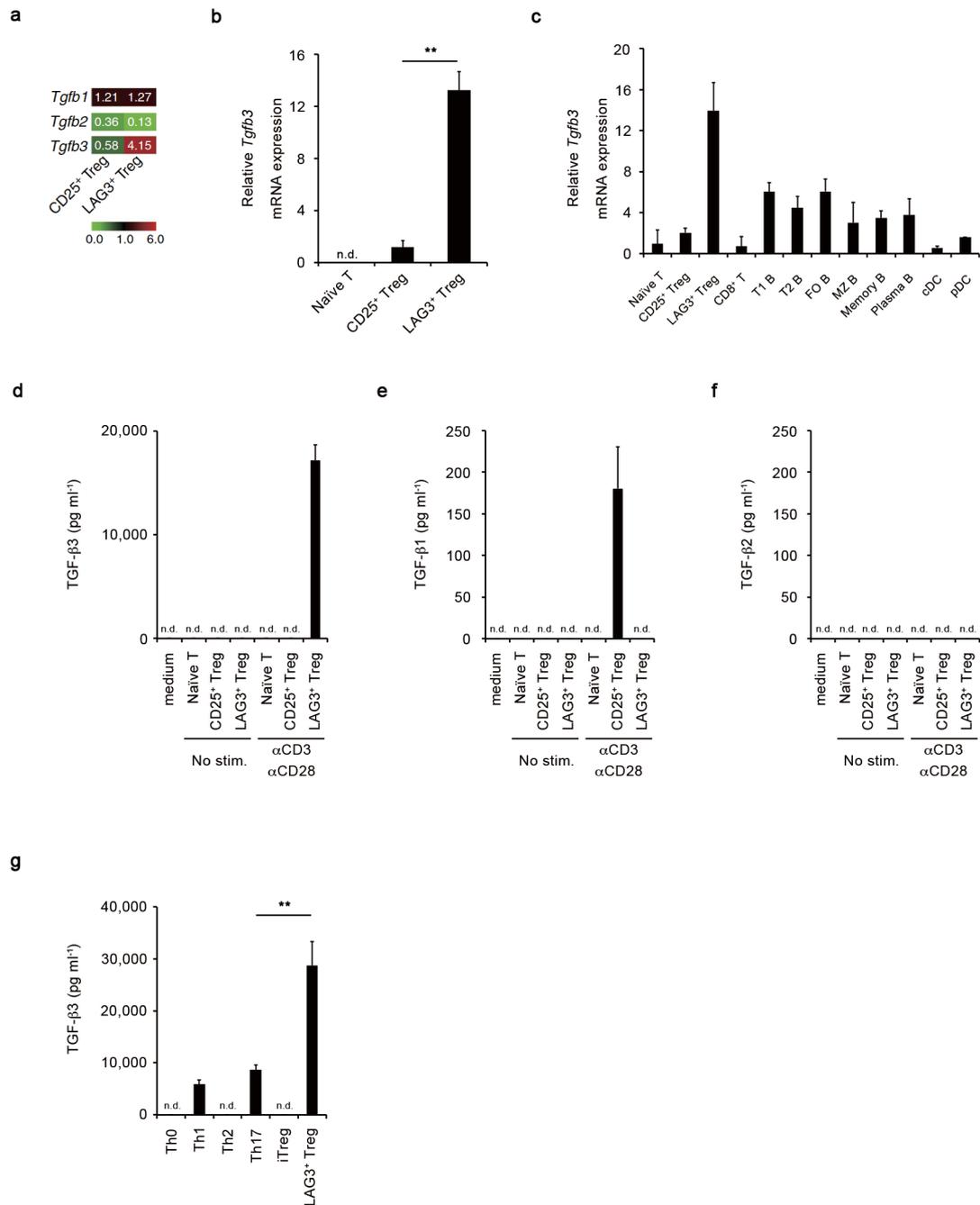
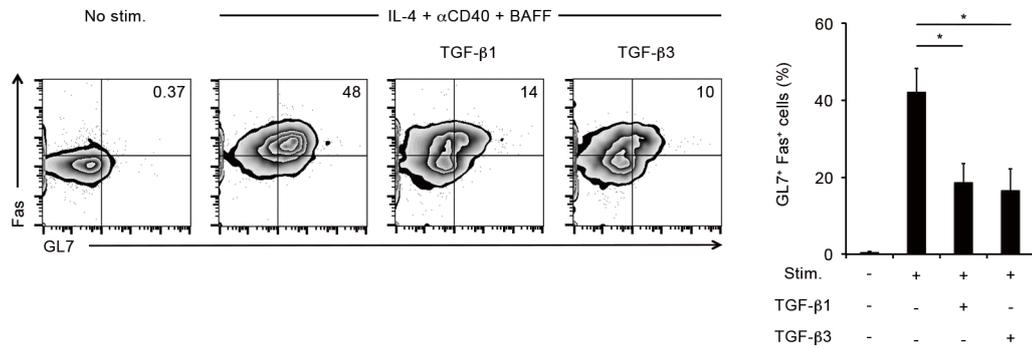


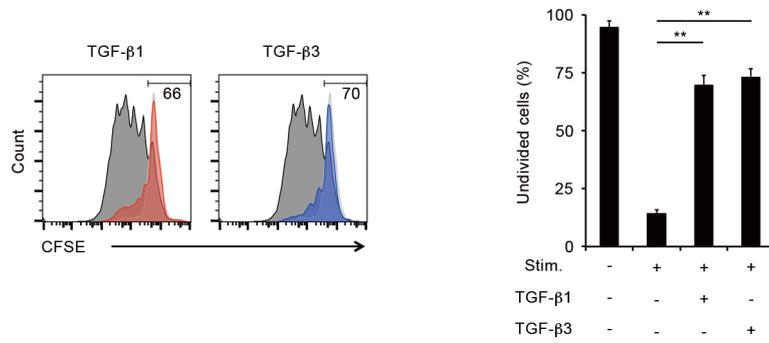
図7. LAG3⁺ Treg細胞はサイトカインTGF-β3を特異的に高産生する

a) WTマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞およびCD25⁺ Treg細胞の遺伝子発現プロファイルに関するマイクロアレイ解析結果。各遺伝子発現に関して、naive T細胞における遺伝子発現量をコントロールとして、ヒートマップを作成した。**b**) WTマウス脾臓のnaive T細胞、CD25⁺ Treg細胞およびLAG3⁺ Treg細胞の*Tgfb3*遺伝子発現量を定量的リアルタイムPCR法にて解析した (β -actin遺伝子発現により正規化)。**c**) WTマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞およびCD4⁺ T細胞以外の免疫細胞との*Tgfb3*遺伝子発現量の比較を定量的リアルタイムPCR法にて解析した (β -actin遺伝子発現により正規化)、[T1 B: Transitional1 B細胞 (B220⁺CD93⁺IgM^{high}CD23^{low})、T2 B: Transitional2 B細胞 (B220⁺CD93⁺IgM^{high}CD23^{high})、FO B: Follicular B細胞 (B220⁺CD93⁺CD23^{high}CD21^{low})、MZ B: Marginal zone B細胞 (B220⁺CD93⁺CD23^{low}CD21^{high})、Memory B細胞 (B220⁺CD138^{low}IgG1^{high}CD38^{high})、Plasma B細胞 (B220⁺CD138^{high})、cDC: conventional dendritic cell (B220⁺CD11b⁺CD11c^{high})、pDC: plasmacytoid dendritic cell (B220⁺CD11b⁺CD11c^{int}Gr-1⁺)]。**d**) TGF-β3の蛋白レベルでの産生に関して、WTマウス脾臓のnaive T細胞、CD25⁺ Treg細胞およびLAG3⁺ Treg細胞を無刺激、またはanti-CD3 mAbおよびanti-CD28 mAbをコートしたプレート上で3日間培養し、培養上清中のTGF-β3産生量をELISAにて解析した。**e**) **d**)と同様の実験において、培養上清中のTGF-β1産生量をELISAにて解析した。**f**) **d**)と同様の実験において、培養上清中のTGF-β2産生量をELISAにて解析した。**g**) WTマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞およびTh0細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、iTreg細胞とのTGF-β3産生量の比較をELISAにて評価した (Th: T helper細胞、iTreg: induced regulatory T細胞)。グラフは3回実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。

a



b



c

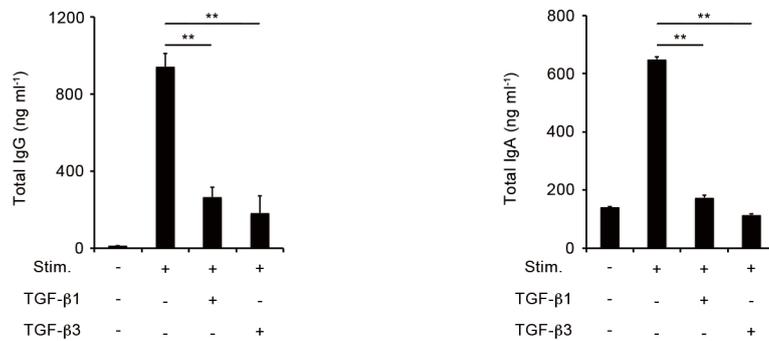


図8. TGF-β3はGCB細胞への分化、増殖、抗体産生を抑制する

a) *In vitro* におけるGCB様細胞誘導。WTマウス脾臓のB細胞をanti-CD40 mAbおよびIL-4、BAFFの刺激下で3日間培養することによって、GCB細胞に特徴的な表面マーカー (Fas⁺GL7⁺B220⁺) を有する細胞が分化した(左図)。この*in vitro*で誘導したGCB様細胞に対してTGF-β1、TGF-β3の抑制効果を検討するために、TGF-β1またはTGF-β3を培養開始時にB細胞に添加し、3日間培養後、フローサイトメトリーにて解析した (B220⁺ゲーティング)、(左図)。b) a)と同様の実験においてB細胞をCFSEにてラベルして細胞増殖を解析した (B220⁺ゲーティング)、(黒色：anti-CD40 mAb、IL-4およびBAFFを添加した群、灰色：無刺激群、赤色：刺激に加えてTGF-β1を添加した群、青色：刺激に加えてTGF-β3を添加した群)。c) a)と同様の実験において7日間培養後、培養上清中のIgG、IgA産生量をELISAにて解析した。グラフは3回実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。フローサイトメトリー図は典型例を示す。**P* < 0.05、***P* < 0.01 (Bonferroni post-test)。

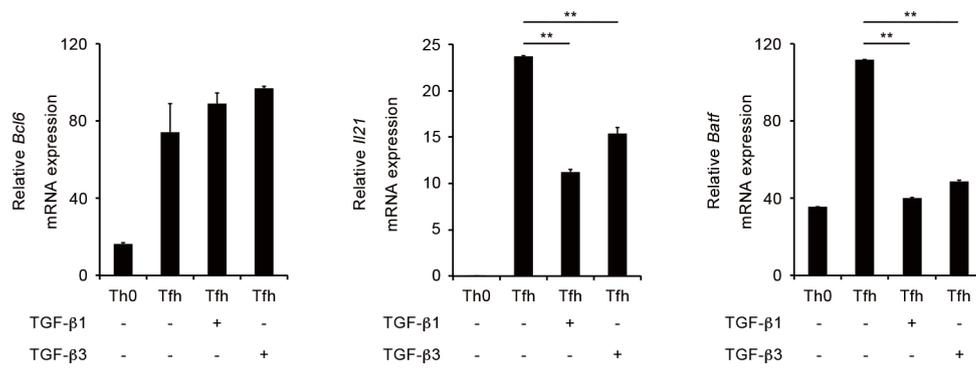


図9. TGF-β3はTfh細胞の機能を抑制する

WTマウス脾臓の naïve T細胞をIL-6およびIL-21にて3日間刺激培養し、Tfh細胞に特徴的な遺伝子発現に関して定量的リアルタイムPCR法にて解析した。グラフは3回実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。

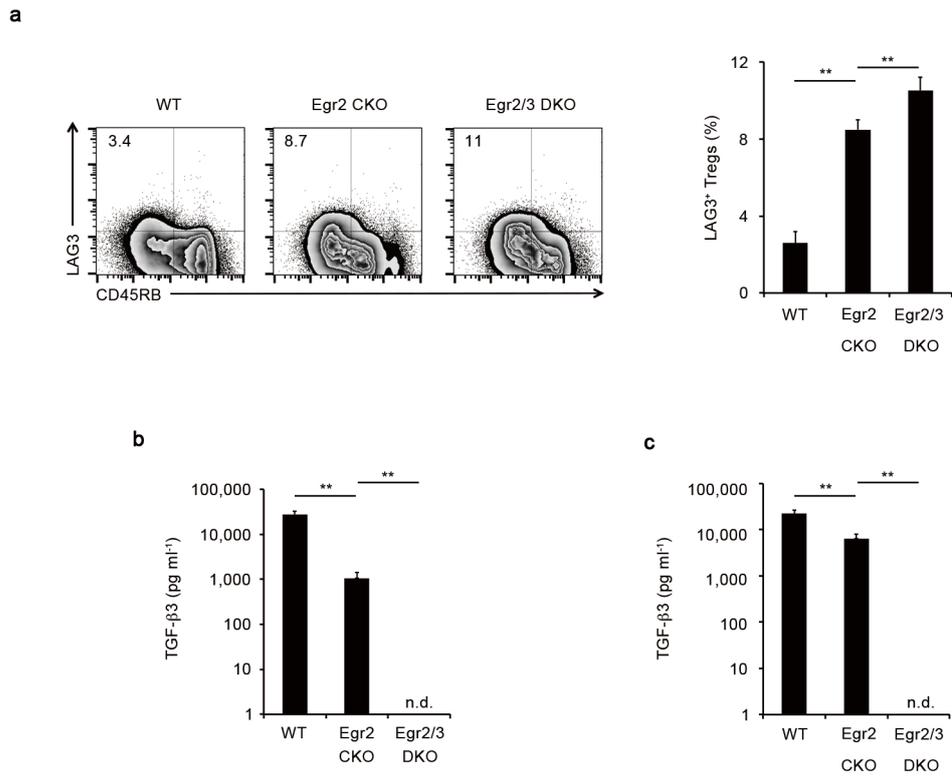


図10. LAG3⁺ Treg細胞はEgr2、Egr3依存性にTGF-β3を産生する

a) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウス脾臓におけるLAG3⁺ Treg細胞をフローサイトメトリーにて解析した (CD4⁺CD25⁺細胞ゲーティング)。
b) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞をanti-CD3 mAbおよびanti-CD28 mAbでコートしたプレート上で3日間刺激培養し、培養上清中のTGF-β3の産生量をELISAにて解析した。**c)** *In vitro*において誘導したTh17細胞に関してb)と同様にTGF-β3の産生量をELISAにて解析した。a)のグラフは各々6匹のマウスに関して実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。フローサイトメトリー図は典型例を示す。b-c)のグラフは3回実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。

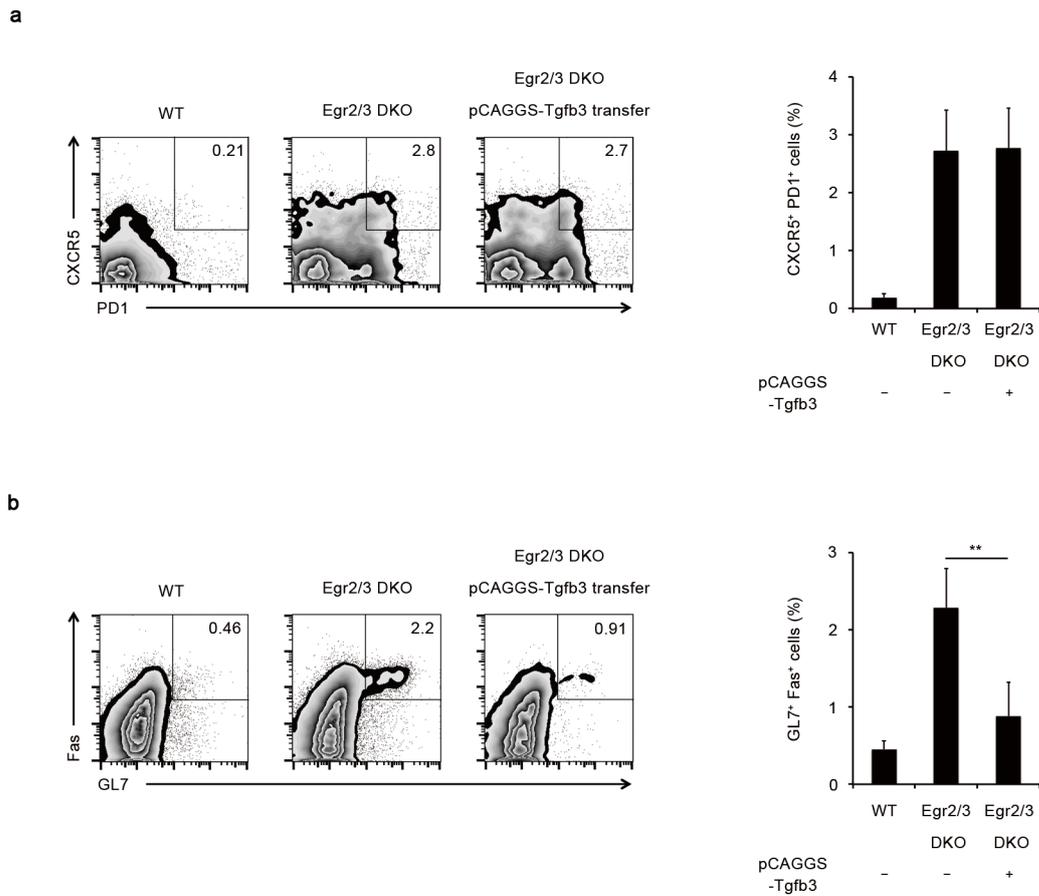


図11. pCAGGS-Tgfb3ベクターはEgr2/3 DKOマウスのGCB細胞過形成を抑制する

a) pCAGGS-Tgfb3ベクターをEgr2/3 DKOマウスの4、6、8週齢期に導入し、12週齢期に脾臓のTfh細胞についてフローサイトメトリーにて解析を行った (CD4⁺CD25⁺細胞ゲーティング)。**b)** a)の実験においてGCB細胞についてフローサイトメトリーにて解析を行った (B220⁺細胞ゲーティング)。グラフは各々マウス8匹に対して実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。フローサイトメトリー図は典型例を示す。****P < 0.01 (Bonferroni post-test)**。

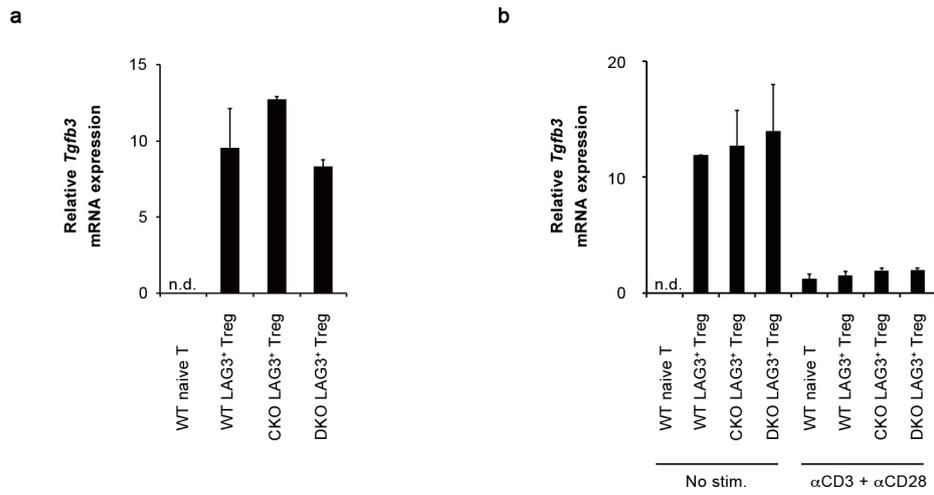


図12. LAG3⁺ Treg細胞におけるEgr2、Egr3欠損は*Tgfb3* mRNAの発現に影響しない

a) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞において*Tgfb3*の遺伝子発現量を定量的リアルタイムPCR法にて解析した (β -actinにて正規化)。b) WT、Egr2 CKOおよびEgr2/3 DKOマウス脾臓のLAG3⁺ Treg細胞を、anti-CD3 mAbおよびanti-CD28 mAbでコートしたプレート上で3日間刺激培養した。その後細胞を回収し、定量的リアルタイムPCR法にて*Tgfb3*の遺伝子発現量を解析した (β -actinにて正規化)。グラフは3回実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。

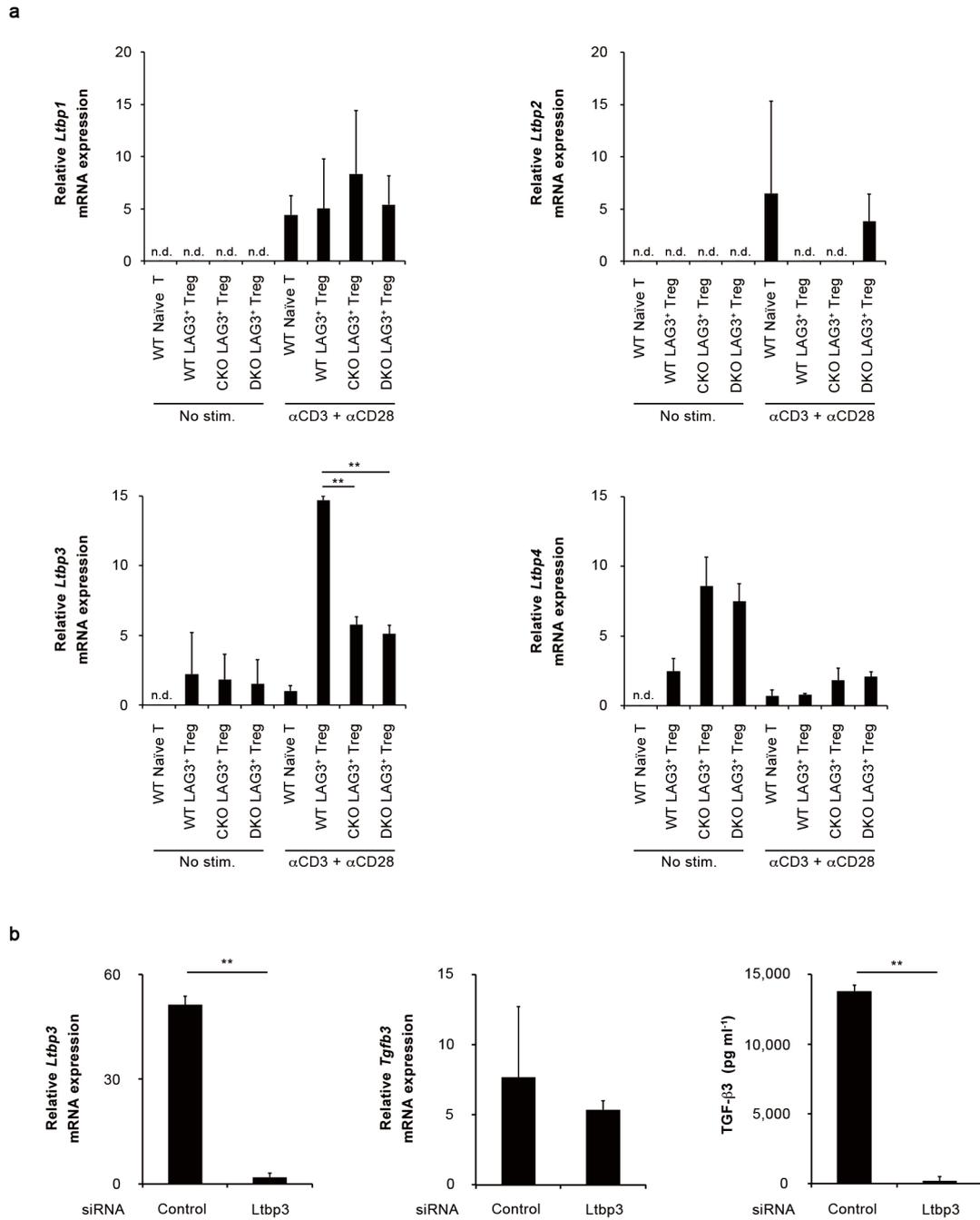


図13. LAG3⁺ Treg細胞はEgr2、Egr3によるLTBP-3発現増強を介してTGF-β3を分泌する

a) WTマウスの脾臓から回収したLAG3⁺ Treg細胞を、anti-CD3 mAbおよびanti-CD28 mAbでコートしたプレート上で、3日間刺激培養した。細胞を回収し、LTBP1-4の遺伝子発現に関して定量的リアルタイムPCR法にて解析を行った (No stim.: No stimulation)。b) LAG3⁺ Treg細胞にLtbp3 siRNAを導入し、その後anti-CD3 mAbおよびanti-CD28 mAbでコートしたプレート上で3日間刺激培養した。回収した細胞の*Tgfb3*、*Ltbp3*の遺伝子発現を定量的リアルタイムPCR法にて、培養上清のTGF-β3産生量をELISAにて解析した。グラフは3回実験を施行し得られた結果の平均値を示し、各エラーバーは標準偏差を示す。** $P < 0.01$ (Bonferroni post-test)。