第 42 回総会ポスター受賞記念論文

総 説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第 42 回総会長 佐藤伸一

制御性 B 細胞の分化誘導因子と作用機序に関する検討

吉 崎 歩^{*1}, Tedder F. THOMAS^{*2}**IL-21 induces regulatory B cell differentiation
and immunosuppressive effect through cognate interaction with T cells**Ayumi YOSHIZAKI^{*1} and Thomas F. TEDDER^{*2}^{*1}Department of Dermatology, University of Tokyo Graduate School of Medicine^{*2}Department of Immunology, Duke University Medical Center, Durham, USA

(Accepted December 1, 2014)

summary

For a long time, it has been thinking that B cells regulate immune responses by producing antigen-specific antibodies. However, previous studies have revealed that specific B-cell subsets can also negatively regulate T-cell immune responses, and have been termed regulatory B cells. Recently, our study showed that mouse CD1d^{hi}CD5⁺ B cell subsets mainly produce IL-10. Therefore, we named these populations B10 cells. In our previous studies have also indicated that human B10 cells with the ability to express the inhibitory cytokine interleukin (IL)-10 have been identified. Although it is rare, B10 cells are potent negative regulators of antigen-specific inflammation and T-cell-dependent autoimmune diseases in mice. How B10-cell IL-10 production and regulation of antigen-specific immune responses are controlled in vivo without inducing systemic immunosuppression is unknown. Using an experimental autoimmune encephalomyelitis, which is a mouse model for multiple sclerosis, we have shown that B10-cell maturation into functional IL-10-secreting effector cells that inhibit in vivo autoimmune disease requires IL-21 and CD40-dependent cognate interactions with T cells. In addition, the ex vivo provision of CD40 and IL-21 receptor signals can drive B10-cell development and expansion by four-million-fold, and generate B10 effector cells producing IL-10 that markedly inhibit disease symptoms when transferred into mice with established autoimmune disease. The ex vivo expansion and reinfusion of autologous B10 cells may provide a novel and effective in vivo treatment for severe autoimmune diseases that are resistant to current therapies.

Key words——regulatory B cell; B10 cell; IL-21; autoimmune disease; mouse model**抄 録**

近年, B 細胞の働きは単に抗体を産生するのみではなく, 抗原提示や炎症性サイトカインの産生, T 細胞をはじめとする免疫細胞の活性化誘導など, 炎症反応において中心的な役割を果たすことが知られるようになってきた. B 細胞は炎症反応を誘導するだけでなく, 活性化した炎症細胞に作用することで, 免疫抑制作用をも発揮することが知られているが, 著者らのグループでは, この中でも特に interleukin (IL)-10 を介して免疫抑制作用を発揮する集団として, CD1d^{hi}CD5⁺ という表面マーカーを発現する B 細胞を同定し, 主に IL-10 を産生することから B10 細胞と名付けた. B10 細胞は種々の動物モデルにおいて, 疾患改善効果を有しているため, 新たな治療法の候補として研究と臨床の双方から注目を集めている. 長らく, B10 細胞の分化誘導因子は明らかでなかったが, 著者らは IL-21 が B10 細胞を顕著に誘導することを明らかとした. また B10 細胞の働きは MHC class II を介した, 抗原特異的なものであることを示した. さらに, 著者らは CD40 リガンドである CD154 と B lymphocyte stimulator を共発現させた NIH-3T3 細胞を作成し, これをフィーダー細胞として用いることで IL-4 と IL-21 の存在下に, 生体内にわずかしかな存在しない B10 細胞を in vivo で 400 万倍に増殖させるシステムを樹立した.

^{*1} 東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科^{*2} Department of Immunology, Duke University Medical Center

1. はじめに

B細胞は抗体産生を大きな特徴とし、自己免疫疾患では自己抗体がその病態と密接に関連すると考えられていることから、自己免疫疾患の病態の形成と進展に深く関与していると認識されている。近年の著しい免疫学の進歩によりB細胞の役割は、単に抗体産生のみならず、抗原提示能、T細胞やマクロファージ、樹状細胞をはじめとする他の炎症細胞の活性化や分化誘導、またB細胞自身からの炎症性サイトカイン産生といった多様な領域に及ぶことが報告されている。これまでB細胞は、その除去療法が多く自己免疫疾患で、一定の効果を示してきたため、いわゆる「悪玉」のイメージが強かった。ところが近年、抑制性の働きを持つB細胞の存在が明らかとなり、制御性B細胞の研究として多くの動物実験が行われるようになった。この結果、B細胞から産生されるインターロイキン (IL)-10 が自己免疫や炎症反応の抑制に重要な役割を果たしていることが解ってきたが、どのようなB細胞集団がIL-10を産生するのかは、長期間に渡って明確とならず、ある報告ではリンパ濾胞の marginal zone B細胞がIL-10を産生するとされ、また別の報告では腹腔に存在するB1a細胞がIL-10を産生するといったように、統一された見解は得られていなかった^{1,2)}。IL-10の細胞内染色が可能となり、マウスにおけるB細胞の中で、CD1d^{hi}CD5⁺という独特な細胞表面マーカーの組み合わせを持つB細胞集団がIL-10を主に産生することが解ったのは2008年のことである³⁾。著者らのグループが見いだした、このCD1d^{hi}CD5⁺という独自の表面マーカーを持つ新しいB細胞集団はB10細胞と名付けられた³⁾。現在、B10細胞は、IL-10産生を介して種々の自己免疫疾患モデルマウスにおいて優れた免疫抑制作用を発揮し、あらたな治療法になり得るとして、研究と臨床の双方から注目を集めている。しかしながら、生体内においてどのような分子がB10細胞を誘導しているのかは明らかでなく、また、B10細胞は1匹のマウス個体にせいぜい 2×10^6 個ほどしか存在しておらず、1匹のexperimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)などの疾患モデルを治療するには $1-2 \times 10^6$ 個のB10細胞が必要となることから、ヒトへの応用を考える際に、生体内のB10細胞の数の少なさが大きな問題となっていた。本研究では、B10細胞を生体内で誘導する分子を明らかとし、その誘導機

構を解き明かすことで生体外でのB10細胞の増殖を可能とし、新規治療への新たな道を拓くことを目的とした。

2. B10細胞の分化誘導因子

生体外において、B10細胞はphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とionomycinを用いて刺激を与えることでIL-10を産生するが、あらかじめ抗CD40抗体でB細胞上のCD40を刺激すると、B10細胞が増加することが過去の報告より明らかとなっている³⁾。CD40のリガンドであるCD154は主にT細胞上に発現しており、CD40を介したT細胞からの刺激は、B細胞の分化を誘導することが良く知られている。これらのことから制御性B細胞にはCD40-CD154のinteractionによって分化を促される前駆細胞が存在すると考えられている^{3,4)}。一方でlipopolysaccharide (LPS)による刺激はCD40刺激を介さずに前駆細胞からの制御性B細胞分化を誘導することが示されており、このことは感染症などの場合に、過剰な免疫反応を抑制することに役立っていると考えられている³⁾。しかしながら、PMAやionomycinといった刺激物質は生体内には存在せず、今回著者らは、生体内においては、どのような分子がこれらの役割を担うのかを調べた。炎症に関与すると考えられているサイトカインのうち、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-21、IL-23、IL-27、interferon (IFN)- γ 、tumor growth factor (TGF)- β を用いて、B細胞の刺激を行ったところ、IL-21で刺激した際に著明なB10細胞の増加とIL-10産生量の上昇を認めた(図1)。このことから、IL-21は生体内におけるB10細胞の強力な分化誘導因子であることが明らかとなった。IL-21はリンパ組織における胚中心で濾胞ヘルパーT細胞(Tfh細胞)から主に産生されることが知られており⁵⁾、生体内でのB10細胞の誘導には胚中心とTfh細胞が大きく関与している可能性が示された。

3. B10細胞が免疫抑制作用を発揮する機序

これまでに制御性B細胞はEAE^{2,6,7)}、炎症性腸疾患モデル⁸⁻¹⁰⁾、コラーゲン誘導性関節炎モデル¹¹⁻¹³⁾、接触皮膚炎モデル³⁾といった、様々な自己免疫/炎症性疾患モデルにおいて、その免疫抑制作用が示されてきた。いずれのモデルにおいても、B10細胞は著明な抗炎症作用を示しており、 $1-2 \times 10^6$ 個のB10細胞の養子移入は、疾患モデルの症状を有意に抑制している。B10細胞の免疫抑制作用は、IL-10ノッ

図1 各種サイトカインを用いた B10 細胞の誘導実験

炎症に関わるサイトカインを用いて、野生型脾臓 B 細胞を刺激した。IL-21 は顕著に B10 細胞を誘導した。他のサイトカインに関しては、サイトカインによる刺激を与えていないものと比べ、B10 細胞の増加を認めなかった。同様に IL-10 の産生量に関しても、炎症に関わるサイトカインのなかでは、IL-21 が最も強く B 細胞からの IL-10 産生を誘導した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ をそれぞれ示す。

クアウトマウスから得られた B10 細胞では認められないことから、B10 細胞の免疫抑制作用は IL-10 を介していることが強く示唆される^{3,4,6,8}。しかし、B10 細胞から産生される IL-10 の量は極めて微量であり、どのように B10 細胞が免疫抑制作用を発揮しているのかは、長年に渡って不明瞭のままであった。興味深い現象として、ミエリン関連蛋白質やコラーゲンで免疫を行われた個体から採取された B10 細胞は、免疫を行われていない個体から得られた B10 細胞よりも強力に炎症反応を抑制することが明らかとなっている^{3,4,6,8,13,14}。このことは、既に免疫されたマウスには、その抗原に対応する B10 細胞が存在しており、この抗原特異的 B10 細胞を免疫前のマウスへ投与することで、引き続いて行われる免疫による炎症反応を強力に抑制できた可能性を示唆している。今回、著者らは EAE のモデルを用い、B10 細胞の養子移入実験を行った(図2)。まず、CD19 ノックアウトを用いて EAE モデルを作成した。CD19 は B 細胞の活性を司る重要な表面分子の一つで、CD19 を欠損した B 細胞では、B 細胞の活性化が著しく低下することが知られている¹⁵。CD19 ノックアウトマウスでは B10 細胞が著しく減少していることが報告されており、同時に EAE や腸炎、接

触皮膚炎の症状は増強される^{3,6,8}。この CD19 ノックアウトマウスで認められる各モデルの症状増悪は、野生型の B10 細胞を養子移入することで改善されることから、B10 細胞の減少が、症状の増悪に関わっていることが示唆されている。CD19 ノックアウトマウスを用いることにより、あたかも B10 細胞を除去した状態を生み出すことが可能となり、養子移入した B10 細胞の効果をはっきりとした形で表すことが可能となる。今回の著者らの実験では、過去の報告と同様に、CD19 ノックアウトマウスに誘導された EAE の症状は、野生型 B10 細胞の養子移入によって顕著に抑制されたが、IL-10 ノックアウトマウスから得られた B10 細胞では、その症状抑制効果が失われていた。興味深いことに、IL-21 レセプター、CD40、MHC class II それぞれのノックアウトマウスから得られた B10 細胞も、IL-10 ノックアウトマウスと同様に、EAE の症状を抑制できなかった。同様に、EAE における T 細胞の増殖と IL-17 および IFN-γ 産生に関して検討を行ったところ、野生型マウスから得られた B10 細胞は T 細胞の増殖およびサイトカイン産生を有意に抑制することができたが、やはり IL-10、IL-21 レセプター、CD40、MHC class II ノックアウトマウスから得られた B10

図2 各ノックアウトマウスから得られた B10 細胞の、EAE に対する養子移入実験

CD19 ノックアウトマウスを用いて作成された EAE に対する B10 細胞の効果を検討した。CD19 ノックアウトマウスをミエリン関連タンパク質で免疫する 1 日前に CD1d^{hi}CD5⁺ の B10 細胞を 1 匹あたり 2×10^6 個、養子移入した。野生型マウスから得られた B10 細胞は EAE の症状を有意に抑制したが、IL-10、IL-21 レセプター、CD40、MHC class II (MHC II)、それぞれのノックアウトマウスから得られた B10 細胞では、症状を抑制することが出来なかった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ をそれぞれ示す。

細胞では、これらの抑制効果は認められなかった(図3)。これらのことは、B10 細胞が免疫抑制作用を発揮するためには、IL-10 のみならず、B 細胞上の IL-21 レセプター、CD40、MHC class II が重要であることを示している。

以上のことより、著者らは一つの仮説を提唱する(図4)。これまでの報告で、自己免疫疾患モデルマウスでは B10 細胞の増加を認めることが知られており、抗原特異的な B 細胞刺激は、ナイーブな B 細胞を B10 前駆細胞へと分化させることが示唆されている^{3,4,6)}。B10 前駆細胞は捕らえた抗原を MHC class II 上へ提示しており、同じく抗原特異的な T 細胞と T 細胞受容体を介して抗原特異的に結合する。この、いわゆる T 細胞-B 細胞 cognate interaction のなかで T 細胞からは IL-21 が産生され、B10 前駆細胞は IL-21 レセプターでそれを受け取ることにより、B10 細胞への分化が促され、IL-10 を産生するようになる。IL-21 産生 T 細胞の多くは胚中心に存在する T_{fh} 細胞であることから、これらの反応は胚中心にて行われている、B 細胞の affinity maturation や class switch と密接に関連していると考えられる。

B10 細胞から放出された IL-10 は、近傍にいる T 細胞などの免疫細胞へ作用し、免疫抑制作用を発揮することが想定される¹⁶⁾。

4. Ex vivo 誘導 B10 細胞培養システムの樹立

これまでの結果より、B10 細胞は CD40 と IL-21 といった胚中心にみられるような分子と密接に関わっていることが示唆された。そこで著者らは B10 細胞を生体外 (ex vivo) で増殖させるために、これらの分子を発現したフィーダー細胞を作成した。CD40 および B lymphocyte stimulator (BLys) を用いた B 細胞の培養システムは過去に報告されており^{17,18)}、これらを参考に NIH-3T3 細胞に CD154 と BLys の expression vector を導入し、IL-4 および IL-21 の存在下に B 細胞を培養した(図5)。このフィーダー細胞を用いた培養システムで、B 細胞は 9 日間の培養後に 25,000 倍の増殖を認めた。このうち、B10 細胞の割合は 37% であり、培養開始時と比較し 400 万倍の増殖を認めた。このように、著者らは B10 細胞の ex vivo 誘導 B10 細胞培養システムを樹立した¹⁶⁾。

図3 各ノックアウトマウスから得られた B10 細胞の T 細胞の増殖能に対する影響

(A) B10 細胞の T 細胞の増殖能に及ぼす影響を検討するために、CD19 ノックアウトマウスを用いて EAE を作成し、野生型および IL-10、IL-21 レセプター、CD40、MHC class II (MHC II)、それぞれのノックアウトマウスから得られた B10 細胞の養子移入実験を行った。野生型 B10 細胞は T 細胞の増殖を顕著に抑制したが、IL-10、IL-21 レセプター、CD40、MHC II ノックアウトマウスから得られた B10 細胞では、この抑制効果が認められなかった。T 細胞の分裂能は、ミエリン関連タンパク質特異的 T 細胞受容体を持つ T 細胞を Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) であらかじめ標識し、EAE を惹起したマウスに養子移入することにより検討した。(B) 同様に B10 細胞の T 細胞のサイトカイン産生能に対する影響を検討した。野生型 B10 細胞は T 細胞の IL-17 および IFN-γ の産生を著しく抑制したが、IL-10、IL-21 レセプター、CD40、MHC II ノックアウトマウスから得られた B10 細胞では、これらの抑制効果が認められなかった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ をそれぞれ示す。

図4 B10 細胞の作用機序

B 細胞受容体 (BCR) に対する抗原刺激によって活性化された B10 細胞の前駆細胞 (B10 pro 細胞) は、抗原を自身の MHC class II (MHC II) 上へ提示し、T 細胞受容体 (TCR) を介して T 細胞と結合することで IL-21 を T 細胞から受け取ると考えられる。IL-21 刺激を受けた B10 pro 細胞は B10 細胞へと分化し IL-10 を産生するようになる。B10 細胞から産生された IL-10 は T 細胞をはじめとした周囲の免疫細胞を抑制する。このように B10 細胞の IL-10 を介した免疫抑制作用は MHC II と TCR の結合に強く依存しており、このことは B10 細胞が抗原特異的な機序で免疫抑制作用を発揮することを示唆している。

図5 ex vivo 誘導 B10 細胞培養システム

CD40 と Blys を発現する expression vector を組み込んだ NIH-3T3 細胞をフィーダー細胞として用い、野生型マウスの脾臓から得られた B 細胞を、IL-4 と IL-21 の存在下に、9 日間培養した。B 細胞全体として培養開始時 (day 0) と比較して 25,000 倍に増殖し、B10 細胞は 400 万倍の増殖を認めた。ex vivo 誘導 B10 細胞は表現型として CD19^{int}CD5⁺ を呈した。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ をそれぞれ示す。

5. Ex vivo 誘導 B10 細胞の疾患発症抑制および症状改善効果

次に ex vivo 誘導 B10 細胞培養システムにて得られた B10 細胞を用いて、野生型マウスで作成した EAE モデルに対する養子移入実験を行った (図 6)。ex vivo 誘導 B10 細胞は、EAE の発症前に養子移入することで、症状の発症を著明に抑制した。さらに、すでに EAE が完成した状態で ex vivo 誘導 B10 細胞を養子移入すると、それまで見られていた症状の顕著な改善を認めた。従来のマウス脾臓から得られた B10 細胞では、その効果は限定的であり、B10 細胞がほとんど存在しない CD19 ノックアウトマウスにおいて誘導された、EAE をはじめとする自己免疫/炎症性疾患の発症抑制を行うことができてい

たが^{3, 4, 6, 8, 13, 14)}、今回用いた ex vivo 誘導 B10 細胞では野生型マウスにおいて誘導された EAE の症状を、発症前のみならず発症後にも抑制することができた¹⁶⁾。

この疾患抑制効果は、IL-10 ノックアウトマウスと MHC class II ノックアウトマウスから得られた ex vivo 誘導 B10 細胞では完全に失われていた (図 7)。特に、MHC class II ノックアウトから得られた脾臓 B 細胞は、ex vivo 誘導 B10 細胞培養システムで野生型脾臓 B 細胞と同様の増殖率、B10 細胞誘導率を示していたことから、細胞の分化・増殖機能に異常があるわけではなく、免疫抑制作用の発現には MHC class II を介した T-B 細胞間の cognate interaction が重要であることが、この実験からも示唆された。

図6 野生型マウスに誘導した EAE に対する ex vivo 誘導 B10 細胞の養子移入実験

野生型マウス脾臓から B 細胞を抽出し、フィーダー細胞と IL-4 および IL-21 の存在下に培養した。このようにして得られた ex vivo 誘導 B10 細胞を、EAE を惹起した野生型マウスに対して 1 匹あたり 1×10^6 個、養子移入した。野生型マウスから得られた ex vivo 誘導 B10 細胞は EAE の発症前、発症後に関わらず、症状を著明に改善した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ をそれぞれ示す。

図7 各ノックアウトマウスから得られた ex vivo 誘導 B10 細胞の誘導効率と EAE に対する養子移入実験

IL-21 レセプター、CD40、CD19、それぞれのノックアウトマウスから得られた B 細胞を ex vivo 誘導 B10 細胞培養システムを用いて培養したところ、いずれも野生型マウスと比較して著明な B 細胞の増殖率および ex vivo 誘導 B10 細胞の誘導率の低下を認めた。IL-10 ノックアウトマウスから得られた ex vivo 誘導 B10 細胞では、野生型マウスで認められた疾患抑制効果が消失した。さらに MHC class II (MHC II) ノックアウトマウスから得られた ex vivo 誘導 B10 細胞では、B 細胞の増殖率、ex vivo 誘導 B10 細胞の誘導率は野生型マウスと同程度であったにも関わらず、IL-10 ノックアウトマウスと同様に、疾患抑制効果が消失した。MD4 は B 細胞受容体が hen egg lysosome に特異的となっているトランスジェニックマウスであるが、B 細胞の増殖および B10 細胞の誘導率の著明な低下を認めていた。このことは、ex vivo 誘導 B10 細胞誘導システムでは B 細胞受容体の特異性が重要な役割を果たすことを示唆している。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ をそれぞれ示す。

6. おわりに

多くの自己免疫疾患や炎症性疾患において、その原因は未だ十分に明らかとはなっていないが、ステロイドや免疫抑制薬が有効であることから、異常に活性化した免疫系の関与が強く示唆されている。これらの疾患に罹患した患者は、ステロイドと免疫抑制薬による加療を受けることとなるが、これらの治療には感染症などのいわゆる副作用の問題が常につきまとい、QOL は著しく阻害されている。近年注目を集めている B10 細胞は、もともと正常な免疫反応のなかで抑制性の役割を果たす制御性免疫細胞であり、免疫抑制薬などとは全く異なる、新しい機序で自己免疫/炎症性疾患を治療できることが期待されている。また、今回著者らの研究が示したように、B10 細胞は抗原特異的に免疫反応を抑制できることが示唆されており、自己免疫疾患においては特に疾患の発症と進展に大きく関与していると考えられている自己抗原に対する自己免疫反応を、感染症などに対する他の免疫反応を妨げることなく、限定的に抑制できる可能性がある。このことは、B10 細胞が従来の免疫抑制薬のような易感染性などの副作用なく、自己免疫疾患を制御出来る可能性を予感させる。さらなるデータの集積を行うことで、ヒトにおける B10 細胞の効果を見極め、B10 細胞療法が自己免疫/炎症性疾患に対する副作用の少ない、効果的な、新たな標準療法の一つとなることが望まれる。

文 献

- 1) Mizoguchi, A., et al.: Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. **16**: 219–230, 2002.
- 2) Fillatreau, S., et al.: B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. **3**: 944–950, 2002.
- 3) Yanaba, K., et al.: A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. **28**: 639–650, 2008.
- 4) Kalampokis, I., et al.: IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*. **15**: S1, 2013.
- 5) Spolski, R., et al.: IL-21 and T follicular helper cells. *Int Immunol*. **22**: 7–12, 2009.
- 6) Matsushita, T., et al.: Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. **118**: 3420–3430, 2008.
- 7) Wolf, S.D., et al.: Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B-cell deficient mice. *J Exp Med*. **184**: 2271–2278, 1996.
- 8) Yanaba, K., et al.: IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model. *Am J Pathol*. **178**: 735–743, 2011.
- 9) Goetz, M., et al.: Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis*. **13**: 1365–1368, 2007.

- 10) Mizoguchi, A., et al.: Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor a mutant mice. *J Exp Med.* **186**: 1749–1756, 1997.
- 11) Mauri, C., et al.: Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* **197**: 489–501, 2003.
- 12) Evans, J.G., et al.: Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* **178**: 7868–7878, 2007.
- 13) Yanaba, K., et al.: B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol.* **179**: 1369–1380, 2007.
- 14) Yanaba, K., et al.: IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model. *Am J Pathol.* **178**: 735–743, 2011.
- 15) Tedder, T.F., et al.: The CD19–CD21 signal transduction complex of B lymphocytes regulates the balance between health and autoimmune disease: systemic sclerosis as a model system. *Curr Dir Autoimmun.* **8**: 55–90, 2005.
- 16) Yoshizaki, A., et al.: Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* **491**: 264–268, 2012.
- 17) Nojima, T., et al.: In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nature Comm.* **2**: 465, 2011.
- 18) Poe, J., et al.: Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice. *PLoS ONE.* **6**: e22464, 2011.