

博士論文

Recombinant ラット interleukin-5 の作製
およびラット好酸球増多因子としての
生物活性の解析

東北大学 大学院 薬学研究科
製薬化学専攻

石原 研 治

①

博士論文

Recombinant ラット interleukin-5 の作製
およびラット好酸球増多因子としての
生物活性の解析

東北大学 大学院 薬学研究科
製薬化学専攻

石原 研 治

本論文中で使用した略語の一覧

- AG490 : 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide
 βc : common β
BCGF- II : B-cell growth factor II
BmNPV : silkworm *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus
BSA : bovine serum albumin
CD : cluster of differentiation
cDNA : complementary deoxyribonucleic acid
CPd : cysteine proteinase-deleted
DMSO : dimethylsulfoxide
DNA : deoxyribonucleic acid
ECP : eosinophil cationic protein
EDF : eosinophil differentiation factor
EDN : eosinophil-derived neurotoxin
EPO : eosinophil peroxidase
FBS : fetal bovine serum
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
herbimycin A : (15R)-17-demethoxy-15-methoxy-11-O-methyl-gledanamycin
Ig : immunoglobulin
IL : interleukin
JAK : Janus protein kinase
kDa : kilo Dalton
LT : leukotriene
MAP : mitogen-activated protein
MBP : major basic protein
MEK : mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
mRNA : messenger ribonucleic acid
MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PBS : phosphate-buffered saline
 PD98059 : 2'-amino-3'-methoxyflavone
 RNA : ribonucleic acid
 SDS-PAGE : sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
 SRS-A : slow reacting substance of anaphylaxis
 STAM : signal transducing adaptor molecule
 STAT : signal transducers and activators of transcription
 TBS : Tris-buffered saline
 TRF : T-cell replacing factor

目次

緒言	-----	1
第一章 Recombinant ラット interleukin-5 の作製およびその生物活性の解析		
1. 序論	-----	4
2. 実験結果		
2-1. Recombinant ラット IL-5 の発現	-----	6
2-2. Recombinant ラット IL-5 の精製	-----	7
2-3. T88-M 細胞の増殖に対する recombinant ラット IL-5 の効果	..	9
2-4. ラット骨髄細胞のコロニー形成に対する recombinant ラット IL-5 の効果	-----	10
2-5. ラット腹腔好酸球の生存に対する recombinant ラット IL-5 の効果	-----	11
3. 考察	-----	13
第二章 ラット骨髄細胞の培養系および <i>in vivo</i> における recombinant ラット interleukin-5 の EDF 活性の解析		
1. 序論	-----	16
2. 実験結果		
2-1. ラット骨髄細胞の培養系における好酸球数の変化に対する recombinant ラット IL-5 の効果	-----	17
2-2. ラット骨髄細胞中の MBP 量に対する recombinant ラット IL-5 の効果	-----	19
2-3. Recombinant ラット IL-5 を静脈注射した場合の末梢血白血球中および骨髄細胞中の好酸球数の割合	-----	20
3. 考察	-----	22

第三章 Recombinant ラット interleukin-5 によるラット好酸球生存延長 作用機序の解析	
1. 序論	24
2. 実験結果	
2-1. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に 対する cycloheximide および actinomycin D の作用	25
2-2. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に 対する herbimycin A の作用	26
2-3. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に 対する p44/42 MAP キナーゼの関与	26
2-4. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に 対する AG490 の作用	28
2-5. STAT1 および STAT5 のリン酸化に対する recombinant ラット IL-5 の作用	29
2-6. Recombinant ラット IL-5 による STAT5 のリン酸化に対する AG490 の作用	31
2-7. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球のアポトーシス 抑制	32
2-8. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球のアポトーシス 抑制作用に対する種々の薬物の効果	33
3. 考察	34
総括	37
実験材料および実験方法	40
謝辞	47
引用文献	48
発表論文リスト	60

緒言

好酸球は、好酸性の顆粒を持つ白血球として 1879 年に Ehrlich により命名され、1889 年には気管支喘息で¹⁾、1892 年には痒疹や蕁麻疹などの皮膚疾患で^{2,3)}好酸球数が増加することが報告された。好酸球は、slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) を不活化する作用を持つアシルサルファターゼ⁴⁾(後に、SRS-A の実体が leukotriene (LT) C₄、LTD₄、LTE₄ であることが明らかにされ、これらの物質はアシルサルファターゼの基質にはならないことが判明した。)、あるいはヒスタミンを不活化する作用を持つヒスタミナーゼ⁵⁾を細胞内に保有することから、1980 年代までは好酸球はアレルギー性炎症反応の悪化を抑制する細胞であると考えられていた。しかし、好酸球顆粒蛋白質として知られる 4 つの塩基性蛋白質 major basic protein (MBP)⁶⁾、eosinophil cationic protein (ECP)⁷⁾、eosinophil-derived neurotoxin (EDN)⁸⁻¹⁰⁾、および eosinophil peroxidase (EPO)¹¹⁾ が好酸球から単離され、それらの顆粒蛋白質が種々の細胞に対して細胞障害活性を持つこと¹²⁾、寄生虫に対して傷害活性を持つこと^{13,14)}などが報告され、さらに、MBP がアトピー性皮膚炎患者の病変部位¹⁵⁾、および気管支喘息患者の気管支粘膜中¹⁶⁾に沈着していること、あるいは気管支喘息患者の喀痰中の MBP の濃度は MBP が *in vitro* で細胞障害活性を示す濃度であること¹²⁾から、好酸球はアレルギー性炎症を悪化させる細胞として考えられるようになった。

近年、生活環境の変化に伴って気管支喘息、アトピー性皮膚炎、あるいはアレルギー性鼻炎などのアレルギー性炎症疾患の患者数が増加しており、1993 年に National Heart Lung Blood Institute (NIH/NHLBI) および WHO は、喘息管理・予防のグローバルストラテジー (Global Strategy for Asthma Management and Prevention) を発表し、気管支喘息は「慢性の気道炎症性疾患であり、気道炎症により気流制限が起こる疾患」と規定された。気管支喘息患者は、わずかな抗原や化学物質の吸入によっても気道収縮が惹起される状態、すなわち気道過敏状態にあり、それらの物質の吸入によって可逆性の気道収縮が起こる¹⁷⁾。好酸球は、顆粒蛋白質のほかに、気道収縮作用を持つ LTC₄¹⁸⁻²⁰⁾、血管透過性亢進作用を持つ血小板活性化因子^{21,22)}、あるいは interleukin (IL)-3、IL-4、IL-5、IL-8、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、regulated upon activation in

normal T cells expressed and secreted (RANTES)、および macrophage inflammatory protein-1 α など種々のサイトカインを産生する²³⁾ことが報告されているため、炎症部位に浸潤した好酸球は気道過敏反応^{20,22,24)}や組織傷害^{12,25)}を誘発し、炎症反応を悪化させる細胞として考えられるようになってきている。特に、好酸球による組織傷害とそれに付随した気道の組織修復の繰り返しは、気道基底膜の肥厚化に伴い気道内腔の狭窄を導くため、気管支喘息の重症化の要因として考えられている²⁶⁾。

IL-5は、分子量約13 kDaのポリペプチドが2量体を形成するサイトカインであり²⁷⁾、活性化されたタイプ2ヘルパーT細胞、肥満細胞および好酸球によって産生され^{23,28,29)}、マウスB細胞の増殖を誘導する因子(B-cell growth factor II: BCGF-II)³⁰⁾、マウスB細胞を抗体産生細胞へ分化させる因子(T-cell replacing factor: TRF)^{27,31,32)}、およびマウス好酸球前駆細胞を成熟好酸球へ分化させる因子(eosinophil differentiation factor: EDF)^{33,34)}として報告された。1986年、Kinashiら³⁵⁾によってTRFのcomplementary DNA (cDNA)がクローニングされ、これらの因子が同一蛋白質であることが明らかになりIL-5と命名された。マウスおよびヒトのIL-5はこれらの作用のみならず、好酸球の生存を延長させる作用^{36,37)}、好酸球から活性酸素の放出を誘導する作用³⁸⁾、さらに免疫グロブリンによって誘導される好酸球の脱顆粒反応を増強する作用³⁹⁾があることが報告されている。また、気管支喘息患者の気管支粘膜中のIL-5 mRNA発現量は、病気の重症度⁴⁰⁾や気管支粘膜中の浸潤好酸球数^{41,42)}と相関することが報告されている。従って、IL-5は好酸球数の増加を誘導することにより、気管支喘息をはじめとするアレルギー性炎症疾患の病態形成に深く関与していると考えられるが、その詳細な機序については不明な点が多く残されている。

ラットは気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患や炎症病態モデル動物として用いられている動物種⁴³⁻⁵⁰⁾であるにも関わらず、ラットIL-5の標品化が行われていなかったため、ラットIL-5がラット好酸球に対してどのような生物活性を示すかわらかではなく、ラット好酸球とラットIL-5の関係はマウスおよびヒトの解析結果から推定せざるを得なかった。なお、ラットIL-5は、1991年にそのcDNAがクローニングされ、マウスおよびヒトのIL-5とアミノ酸レベルでそれぞれ92%、67%の相同性を持つことが明らかにされた⁵¹⁾。また、IL-5依存性マウスB細胞株

T88-M細胞およびB13細胞にラットIL-5 cDNAを発現させるとこれらの細胞が増殖することから、ラットIL-5はBCGF-II活性を持つことが示唆されていた⁵¹⁾。当教室では、アスカリス抗原で感作したラットの腹腔に抗原を投与することにより、ラットの骨髄、末梢血および腹腔に好酸球増多を生じさせる系を確立している^{49,52)}。そこで、本研究は、ラットにおいてIL-5が好酸球増多を実際に誘導しているかどうかを解析し、IL-5が関与する好酸球増多を伴うアレルギー性炎症のモデル動物として、ラットを使用することが適切であるかどうか明らかにすることを目的として、アスカリス抗原で感作したラットより、ラットIL-5 cDNAをクローニングし、バキュロウイルス発現系を用いてカイコ幼虫の体液中にrecombinantラットIL-5を発現させ、精製したrecombinantラットIL-5を用いてラット好酸球に対する生物活性について解析した(第一章)。次に、recombinantラットIL-5をラットに投与することにより、recombinantラットIL-5が*in vivo*においてもEDF活性を示すかどうか解析した(第二章)。最後に、IL-5による好酸球の生存延長機序が明確にされていなかったため、recombinantラットIL-5による細胞内シグナル伝達の面から生存延長機序を解析した(第三章)。

第一章 Recombinant ラット interleukin-5 の作製およびその生物活性の解析

1. 序論

マウスおよびヒトの IL-5 遺伝子のクローニング^{35,53)} や recombinant IL-5 の作製⁵⁴⁻⁵⁷⁾ によって、IL-5 は好酸球の機能さらにアレルギー性炎症の病態形成に関与しているサイトカインの一つであることが明らかにされてきた^{28,37-39)}。IL-5 がその活性を示すためには、分子量約 13 kDa のポリペプチドが 2 量体を形成することが必要であり、単量体では活性を示さないこと⁵⁸⁾ が報告されている。また、IL-5 に付加される糖鎖は活性に影響を与えないこと⁵⁶⁾ から、種々の発現系で recombinant IL-5 の発現が行われてきた^{54,55)}。発現された recombinant IL-5 については、IL-5 が発見された経緯から、B 細胞に対する BCGF-II 活性³⁰⁾、および TRF 活性^{27,31,32)}、また、好酸球前駆細胞に対する EDF 活性^{33,34)} を示すかどうかにより、その活性が評価されている。マウス B 細胞株 T88-M 細胞^{59,60)} および B13 細胞⁶¹⁾ はマウス IL-5 に依存して増殖するため、recombinant IL-5 が BCGF-II 活性を持つかどうかを解析するのに適した系であり広く利用されている。Überla ら⁵¹⁾ は、1991 年にラット IL-5 遺伝子をクローニングし、T88-M 細胞および B13 細胞にラット IL-5 遺伝子を導入するとそれらの細胞が増殖するようになること、およびラット IL-5 遺伝子を導入したそれらの細胞の培養液上清中には T88-M 細胞あるいは B13 細胞を増殖させる活性があることを示すことにより、ラット IL-5 が BCGF-II 活性を持つことを間接的に証明した。しかし、Überla ら⁵¹⁾ は recombinant ラット IL-5 を作製してその作用を直接的に示したのではなかったため、ラット IL-5 が確実に BCGF-II 活性を示したのかどうかは明らかではなかった。このように、これまで recombinant ラット IL-5 が作製されていなかったため、ラット IL-5 がラット好酸球に対して、マウスやヒトの IL-5 がそれぞれの好酸球に示すような作用と同じ作用を持つかどうかは現在まで不明であった。

当教室では、アスカリス抗原で感作したラットの腹腔に抗原溶液を注入することにより腹腔に好酸球浸潤が多く生じる系を確立し^{49,52)}、骨髄および末梢血中でも好酸球数が増加すること、また抗原注入により腹腔に浸潤した好酸球数は 48 時間後

まで高いレベルに維持されることから、アスカリス抗原を腹腔に注入するとラット IL-5 が産生され、産生されたラット IL-5 がそのような作用を発現している可能性があることを示唆してきた⁴⁹⁾。そこで、本研究では、腹腔浸潤細胞の RNA からラット IL-5 の cDNA をクローニングした後、recombinant ラット IL-5 を作製し、ラット好酸球に対する recombinant ラット IL-5 の生物活性を明らかにすることを目的とした。

2. 実験結果

2-1. Recombinant ラット IL-5 の発現

Recombinant ラット IL-5 を発現させる目的で、アスカリス抗原で感作したラットの腹腔に抗原溶液を注入して4時間後の腹腔浸潤細胞を採取し、腹腔浸潤細胞より調製した total RNA からラット IL-5 プライマーを用いて reverse transcription-polymerase chain reaction を行い、ラット IL-5 cDNA をサブクローニングした。

Recombinant ラット IL-5 は、バキュロウイルス発現系を用いてカイコ幼虫の体液中に発現させた。

すなわち、ラット IL-5 cDNA を cysteine protease-deleted (CPd) バキュロウイルスに組み込むことによって CPd ラット IL-5 recombinant ウイルスを構築し、カイコ幼虫に経口感染させた。5日後にカイコ幼虫の体液を採取し、体液中の recombinant ラット IL-5 の発現を検出するため SDS-PAGE および抗マウス IL-5 抗体を用いて Western blot を行った。その結果、CPd ラット IL-5 recombinant ウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液中には、recom-

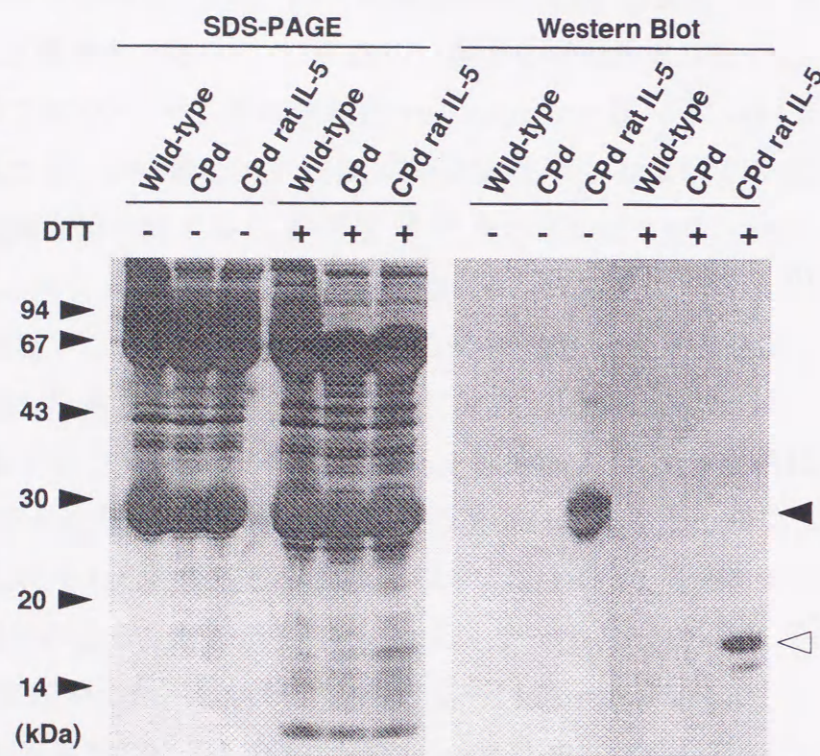


Fig. 1. SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant rat IL-5 produced in hemolymph of silkworm *Bombyx mori* larvae
Hemolymph was collected from wild-type silkworm *Bombyx mori* larvae (Wild-type) and from silkworm *Bombyx mori* larvae infected with CPd control virus (CPd) or CPd rat IL-5 recombinant virus (CPd rat IL-5). It was diluted 20-fold with PBS, and proteins were separated by SDS-PAGE. Recombinant rat IL-5 was analyzed by Western blotting. The analysis was performed under reduced (+) and non-reduced (-) conditions using dithiothreitol (DTT). Dimeric and monomeric recombinant rat IL-5 proteins are indicated by closed and open arrowheads, respectively, on the right side. Positions of molecular weight (kDa) markers are shown on the left side.

binant ラット IL-5 が還元条件下および非還元条件下でそれぞれ 15 および 30 kDa の分子量蛋白として検出された (Fig. 1)。一方、無処置のカイコ幼虫の体液中、あるいはコントロールバキュロウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液中には、recombinant ラット IL-5 は検出されなかった (Fig. 1)。従って、CPd ラット IL-5 recombinant ウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液中に、recombinant ラット IL-5 は 2 量体として産生されることが示唆された。

2-2. Recombinant ラット IL-5 の精製

Recombinant ラット IL-5 を精製する目的で、CPd ラット IL-5 recombinant ウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液を 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) で希釈し、陰イオン交換カラムであるポロス PI/M PEEK カラムに負荷した。開始 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0) で非吸着画分を溶出した後、溶出 buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.0) でカラムに吸着したタンパク質を溶出した。各画分に含まれる recombinant ラット IL-5 は、抗マウス IL-5 抗体を用いて Western blot 法で検出した。その結果、recombinant ラット IL-5 は非吸着画分に検出されたので、recombinant ラット IL-5 が含まれる非吸着画分に終濃度が 1.8 M になるように硫酸アンモニウムを加えて、2.1 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸 buffer (pH 7.0) で平衡化した疎水カラムであるポロス PE/M PEEK カラムに負荷した。硫酸アンモニウムの連続塩濃度勾配 (2.1 ~ 0 M) によりカラムに吸着したタンパク質を溶出した結果、0 M 硫酸アンモニウム溶出画分に recombinant ラット IL-5 が検出されたため、溶出した画分を疎水クロマトグラフィーによる分画を再度行うことによりさらに精製した。その結果、精製タンパク質の 95.5 % が recombinant ラット IL-5 であった (Table 1)。精製 recombinant ラット IL-5 を SDS-PAGE および Western blot を行った結果、recombinant ラット IL-5 は、還元条件下および非還元条件下でそれぞれ 15 および 30 kDa の分子量蛋白として検出された (Fig. 2)。以上の方法により、1.8 ml のカイコ幼虫の体液由来蛋白質 (86.4 mg) から 50.7 μ g の recombinant ラット IL-5 が 2 量体を形成した状態で精製された (Table 1, Fig. 2)。

Table 1. Purification of recombinant rat IL-5

Purification Stage	Total Protein* (μg)	IL-5 Content** (% of total protein)	Total Rat IL-5 (μg)	Yield (%)
Hemolymph of <i>B.mori</i> larvae infected with CPd rat IL-5 recombinant virus	86400	1.2	1040	100
POROS PI/M PEEK Column (pooled fractions)	3590	14.3	513	49.3
POROS PE/M PEEK Column (final pooled fractions)	50.7	95.5	48.4	4.7

* Total protein was determined using the BCA protein assay reagent with bovine serum albumin as a standard.

** Rat IL-5 contents were estimated by densitometric scanning of silver-stained SDS-polyacrylamide gels.

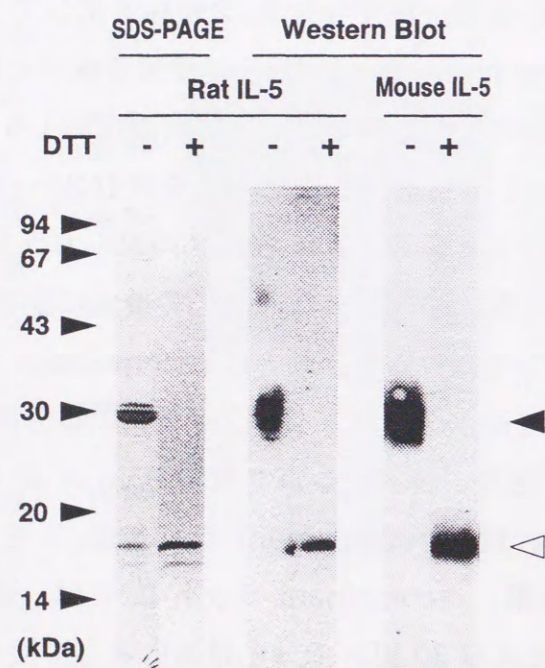


Fig. 2. SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified recombinant rat IL-5

Purified recombinant rat IL-5 from hemolymph of silkworm *Bombyx mori* larvae infected with CPd rat IL-5 recombinant virus and recombinant mouse IL-5 were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting under reduced (+) or non-reduced (-) conditions using dithiothreitol (DTT). Dimeric and monomeric IL-5 proteins are indicated by closed and open arrowheads, respectively, on the right side. Positions of molecular weight (kDa) markers are shown on the left side.

2-3. T88-M 細胞の増殖に対する recombinant ラット IL-5 の効果

Recombinant ラット IL-5 が BCGF-II 活性を持つかをどうか明らかにする目的で、IL-5 依存性マウス B 細胞株 T88-M 細胞を各種濃度の recombinant ラット IL-5 を含む培地中で 48 時間培養した後、MTT 法を用いて T88-M 細胞の増殖率を測定した。その結果、T88-M 細胞は、0.1 ~ 100 pM の recombinant ラット IL-5 によって濃度依存的に増殖した (Fig. 3A)。また、100 pM の recombinant ラット IL-5 による増殖誘導活性は、同濃度の recombinant マウス IL-5 による活性とほぼ同等であった (Fig. 3A)。さらに、100 pM の recombinant ラット IL-5 による T88-M 細胞の増殖は、100 および 1000 ng/ml の抗マウス IL-5 抗体によって濃度依存的に抑制された (Fig. 3B)。従って、recombinant ラット IL-5 は、BCGF-II 活性を持つことが明らかになった。

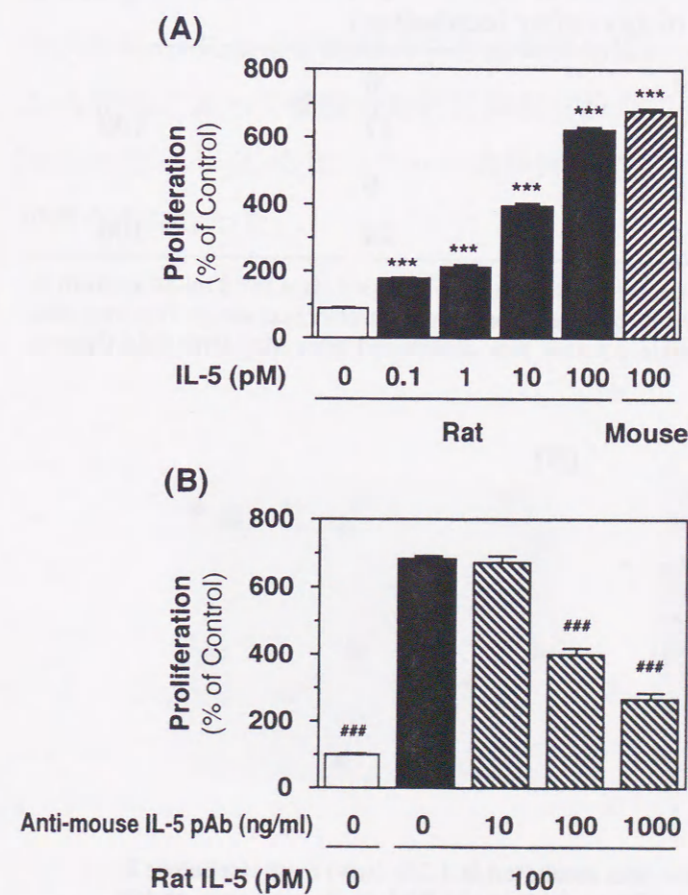


Fig. 3. Effects of recombinant rat IL-5 on proliferation of T88-M cells

(A) T88-M cells (1×10^4 cells) were incubated at 37°C for 48 h in 0.1 ml of medium containing the indicated concentrations of recombinant rat IL-5 or 100 pM recombinant mouse IL-5. (B) T88-M cells (1×10^4 cells) were incubated for 48 h at 37°C in 0.1 ml of medium containing the indicated concentrations of anti-mouse IL-5 neutralizing polyclonal antibody (anti-mouse IL-5 pAb) in the presence of 100 pM recombinant rat IL-5. The proliferation of T88-M cells was determined by MTT assay. Values are the means from 6 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: (A) *** $P < 0.001$ vs. vehicle control; (B) *** $P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without anti-mouse IL-5 pAb.

2-4. ラット骨髄細胞のコロニー形成に対する recombinant ラット IL-5 の効果

Recombinant ラット IL-5 が EDF 活性を持つかどうか明らかにする目的で、メチルセルロース法によりラット好酸球コロニーの形成能を解析した。1.2 x 10⁵ 個のラット骨髄細胞を 100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下、あるいは非存在下で 6 日間培養した。その結果、recombinant ラット IL-5 非存在下では、コロニーは形成されなかった (Table 2)。しかし、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で培養した場合、17 および 24 個のコロニーが形成された (Table 2, Fig. 4A)。それぞれのコロニーを May-Grünwald-Giemsa で染色した結果、すべてのコロニーが好酸球から形成されていることが明らかになった (Table 2, Fig. 4B)。従って、recombinant ラット IL-5 は EDF 活性を持つことが明らかになった。

Table 2. Effects of recombinant rat IL-5 on colony formation by bone marrow cells from normal rats

	Rat IL-5 (pM)	Total Colonies (6 days after incubation)	Eosinophilic Colonies	%
(Exp.1)	0	0	0	
	100	17	17	100
(Exp.2)	0	0	0	
	100	24	24	100

Bone marrow cells (1.2 x 10⁵ cells) from normal rats were incubated at 37°C for 6 days in 12 ml of medium in the presence or absence of 100 pM recombinant rat IL-5. The colonies were enumerated and each colony was suspended in medium. The number of eosinophilic colonies was determined after May-Grünwald-Giemsa staining.

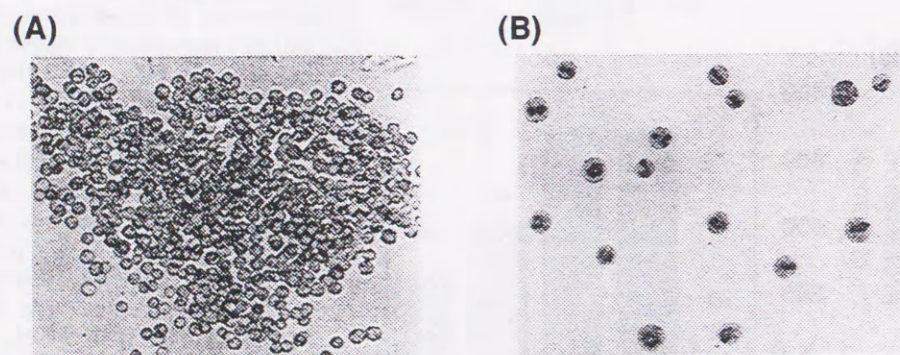


Fig. 4. Microscopic observations of the cells incubated in 1.2% (w/v) methylcellulose in α MEM supplemented with 30% (v/v) FBS and 1% (w/v) BSA in the presence of 100 pM recombinant rat IL-5 for 6 days

(A) Appearance of a typical eosinophilic colony (original magnification x 100).

(B) May-Grünwald-Giemsa staining of single cells from an eosinophilic colony (original magnification x 200).

2-5. ラット腹腔好酸球の生存に対する recombinant ラット IL-5 の効果

Recombinant ラット IL-5 が、ラット成熟好酸球に対して好酸球生存延長活性を持つかどうかを明らかにする目的で、ラット腹腔から採取して精製した好酸球を各種濃度の recombinant ラット IL-5 存在下で培養した。その結果、recombinant ラット IL-5 非存在下で好酸球を培養すると、好酸球の生存率は 96 時間まで経時的に低下した (Fig. 5A) が、100 pM の recombinant ラット存在下で培養すると、好酸球の経時的な生存率の低下は 96 時間まで抑制された (Fig. 5A)。Recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長作用は、IL-5 非存在下で培養した場合と比較して 24、48、72、および 96 時間後で認められた (Fig. 5A)。また、各種濃度の recombinant ラット IL-5 存在下で好酸球を 96 時間培養した結果、好酸球の生存率の低下は recombinant ラット IL-5 によって濃度依存的に抑制された (Fig. 5B)。Recombinant ラット IL-5 による好酸球生存延長活性は、recombinant マウス IL-5 による活性とほぼ同等であった (Figs. 5A and 5B)。さらに、100 pM の recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長作用は、1、10、および 100 ng/ml の抗マウス IL-5 抗体によって濃度依存的に抑制された (Fig. 5C)。これらの結果から、recombinant ラット IL-5 は、ラット成熟好酸球に対して好酸球生存延長活性を持つことが明らかになった。

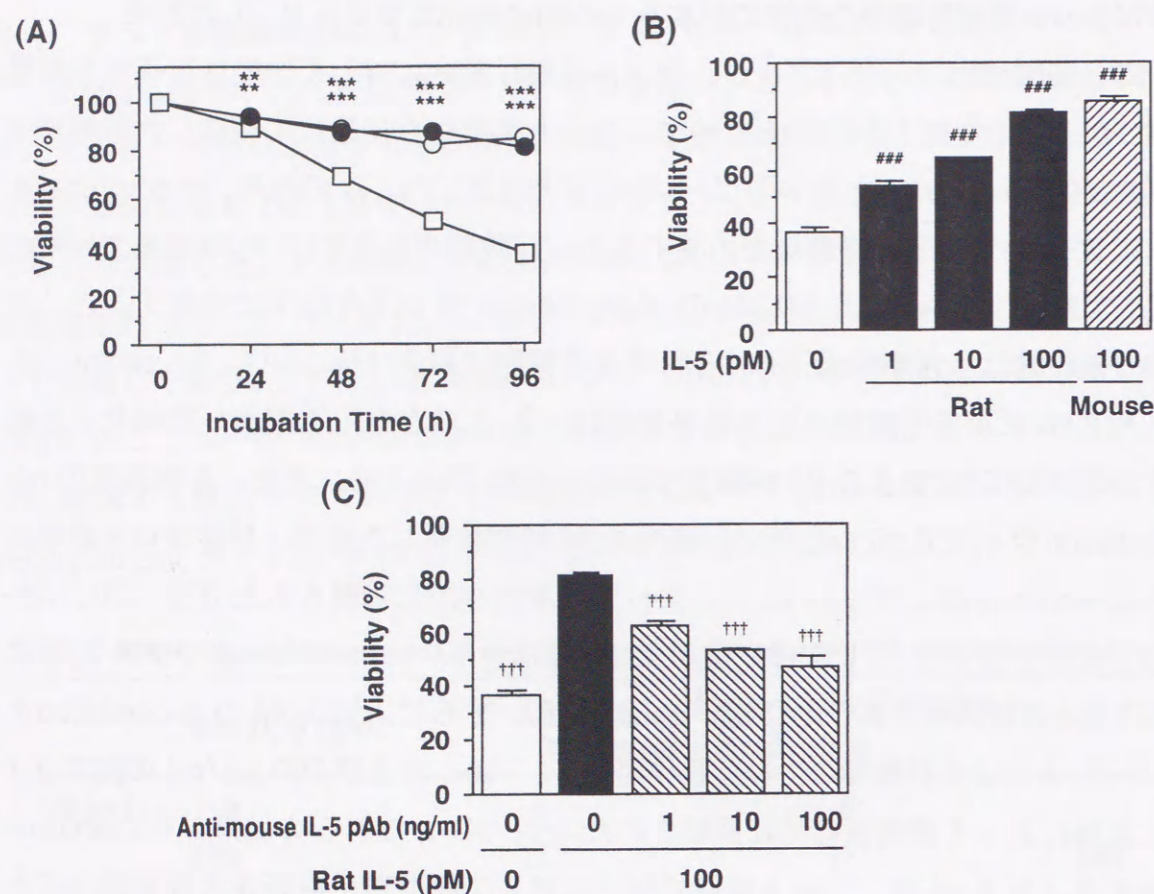


Fig. 5. Effects of recombinant rat IL-5 on the viability of rat eosinophils

(A) Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 0.1 ml of medium containing 100 pM recombinant rat IL-5 (closed circles), 100 pM recombinant mouse IL-5 (open circles), or vehicle (open squares). (B) Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium containing the indicated concentrations of recombinant rat IL-5 or 100 pM recombinant mouse IL-5. (C) Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium containing 100 pM recombinant rat IL-5 and the indicated concentrations of anti-mouse IL-5 neutralizing polyclonal antibody (anti-mouse IL-5 pAb). The viability of eosinophils was determined by the ability to exclude Trypan blue dye. Values are the means from 5 samples. S.E.M. is within each symbol in (A). Statistical significance: (A) $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. corresponding control; (B) $###P < 0.001$ vs. vehicle control; (C) $###P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without anti-mouse IL-5 pAb.

3. 考察

本研究において、バキュロウイルス発現系を用いてカイコ幼虫の体液中に recombinant ラット IL-5 を発現させ、精製することにより recombinant ラット IL-5 をはじめて標品として作製することに成功し、recombinant ラット IL-5 に BCGF-II 活性、EDF 活性、および好酸球生存延長活性があることを証明し、マウスやヒトと同様にラットにおいても IL-5 はこれらの生物活性を示すことを明らかにした。

バキュロウイルス発現ベクターである silkworm *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) は、カイコ幼虫の体液中に大量の蛋白質を発現させる目的で利用されている⁶²⁾。しかし、BmNPV を利用してカイコ幼虫の体液中に蛋白質を発現させると、発現した蛋白質は BmNPV 由来のシステインプロテアーゼによって分解されるために収率が減少することが報告されている⁶³⁾。Suzuki ら⁶⁴⁾ は、BmNPV 由来のシステインプロテアーゼ遺伝子を欠失させた CPd バキュロウイルスを構築し、CPd バキュロウイルスを利用することによって wild-type バキュロウイルスより効率よく外来遺伝子産物を発現できることを報告した。そこで、本研究では、大量の recombinant ラット IL-5 を得るために、CPd バキュロウイルスを用いて recombinant ラット IL-5 を発現させることを試みた。その結果、CPd ラット IL-5 recombinant ウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液 1.8 ml (86.4 mg 蛋白) 中には、1040 μg の recombinant ラット IL-5 が含まれおり (Fig. 1, Table 1)、活性型である 2 量体を形成していることが明らかになった (Fig. 1)。最近、Pierrot ら⁶⁵⁾ は、recombinant ラット IL-5 を以下の 2 つの方法によって発現させた。すなわち、6 x histidine-tag を recombinant ラット IL-5 に付加させて大腸菌に発現させる方法、および GST-fusion protein として Sf9 細胞に発現させる方法である。これらの fusion protein は B13 細胞に対して BCGF-II 活性を持つことが報告された⁶⁵⁾ が、本研究でカイコ幼虫の体液中に発現させて作製した recombinant ラット IL-5 は fusion protein として発現させていないため、Pierrot ら⁶⁵⁾ によって作製された recombinant ラット IL-5 より生理的に近いコンフォメーションを形成していると考えられる。また、本研究では recombinant ラット IL-5 を 2 量体として発現させて精製した (Figs. 1 and 2) が、Pierrot ら⁶⁵⁾ は単量体として精製した後、人工的に 2 量体にする方法をとっている。本研究で行った発現および精製方法は、re-

combinant ラット IL-5 を大量に精製する方法として Pierrot ら⁶⁵⁾の方法よりも優れた方法である。

Überla ら⁵¹⁾は、ラット IL-5 遺伝子をクローニングし、ラット IL-5 が BCGF-II 活性を持つことを示唆した。すなわち、IL-5 依存性マウス B 細胞株 T88-M 細胞および B13 細胞にラット IL-5 遺伝子を導入すること、あるいはラット IL-5 遺伝子を導入したそれらの細胞の培養液上清で培養することによって、T88-M 細胞や B13 細胞が増殖するようになることを示すことにより、ラット IL-5 には BCGF-II 活性があることを間接的に証明した。そこで、本研究では、作製した recombinant ラット IL-5 が T88-M 細胞の増殖を誘導するかどうか解析した。その結果、recombinant ラット IL-5 は T88-M 細胞の増殖を濃度依存的に誘導し、その作用は抗マウス IL-5 抗体によって抑制された (Fig. 3)。これらの結果から、ラット IL-5 はマウス B 細胞に対して BCGF-II 活性を持つことが明らかになった。IL-5 の B 細胞に対する作用は、マウスおよびヒトで異なることが報告されている²⁸⁾。すなわち、マウス IL-5 はマウス B 細胞に対して BCGF-II 活性を持つが、ヒト IL-5 はヒト B 細胞に対して活性を持たない。ラット B 細胞は入手できなかったため、本研究ではマウス B 細胞株を用いて recombinant ラット IL-5 の活性を測定した。従って、本研究で得られた結果はラット B 細胞に対するラット IL-5 の作用を示すものではない。

マウスおよびヒトの IL-5 は好酸球に対して共通する作用を持つ。すなわち、成熟好酸球に対して生存延長作用を持つこと^{36,37)}、および好酸球前駆細胞に対して成熟好酸球への分化誘導作用を持つこと^{33,34,66)}である。IL-5 によるこれらの作用は好酸球増多を誘導するように作用するため、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症疾患の病態を悪化させる要因の一つとして考えられる。ラットは、アレルギー性炎症モデル動物として多く活用されており⁴³⁻⁵⁰⁾、アレルギー性炎症における好酸球の関与について解析が行われている^{43-45,48-50)}。例えば、ovalbumin を吸入させて誘発するラット気管支喘息モデルにおいて、肺組織中の IL-5 mRNA 発現量と肺組織に浸潤した好酸球数は ovalbumin 吸入によってともに増加することが報告されており、ラット IL-5 が好酸球増多に関与していることが示唆されている⁴⁸⁾。また、Nittoh ら⁴⁹⁾は、アスカリス抗原で感作したラットの腹腔に抗原溶液を注入することによって骨髄、末梢血、および腹腔で好酸球増多が誘発されることを報告しており、この作用がラット IL-5 によるものであると示唆している

が、ラット好酸球に対するラット IL-5 の作用はこれまで明らかにされていなかったが、本研究により、recombinant ラット IL-5 には EDF 活性および好酸球生存延長活性があることが明らかになった。従って、ラットは、マウスおよびヒトの場合と同様に、IL-5 によって好酸球増多が誘導される動物種であることが示唆された。

第二章 ラット骨髄細胞の培養系および *in vivo* における recombinant ラット interleukin-5 の EDF 活性の解析

1. 序論

Recombinant ラット IL-5 はラット骨髄細胞中の好酸球前駆細胞に直接作用し、好酸球コロニーを形成させる能力があることが明らかになった(第一章)ことから、*in vivo*においても、ラット IL-5 は骨髄内において好酸球の産生を誘導することが考えられた。しかし、骨髄内においては、好酸球前駆細胞から成熟好酸球への分化および増殖が様々な種類の細胞の相互作用によって起こっている可能性があるため、*in vitro*で示されたラット IL-5 による EDF 活性が *in vivo*における好酸球増多の一因になっているかどうかは正確には不明である。当教室では、ラットをアスカリス抗原で感作することによって、骨髄細胞中の好酸球数および好酸球顆粒蛋白質の一つである MBP の発現量が増加することを明らかにしている⁴⁹⁾。MBP⁶⁾は ECP⁷⁾、EDN⁸⁻¹⁰⁾、および EPO¹¹⁾などの他の好酸球顆粒蛋白質とともに好酸球の特異顆粒中に存在するが、MBP は特異顆粒中の蛋白質の 55%、好酸球の総蛋白質の 25% を占め⁶⁾、好酸球前駆細胞から成熟好酸球への分化段階でのみ発現が誘導されるが⁶⁷⁾、ECP および EDN は好酸球の分化段階のみならず成熟好酸球でも発現していること⁶⁷⁾が報告されている。マウスおよびヒトの系において、好酸球への分化過程は IL-5 が選択的に誘導すること^{33,34,66)}が報告されている。従って、ラットにおいても、IL-5 は好酸球の最終分化に関与すると同時に MBP の発現も誘導することが予測された。

そこで、本研究ではラット IL-5 の生体内における作用について明らかにする目的で、ラットの骨髄細胞を各種濃度の recombinant ラット IL-5 を含む液体培地中で培養することにより、骨髄細胞中の相互作用が起こり得る状態にした場合に EDF 活性がみられるかどうか、さらに recombinant ラット IL-5 を静脈注射した場合に EDF 活性がみられるかどうかについて、好酸球数および MBP の発現量を指標にして解析した。

2. 実験結果

2-1. ラット骨髄細胞の培養系における好酸球数の変化に対する recombinant ラット IL-5 の効果

ラット骨髄細胞を 100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下あるいは非存在下で 6 日間培養した後、hematoxylin および Luxol-fast-blue で染色した結果、recombinant ラット IL-5 非存在下では、hematoxylin によって核のみが染色される細胞が多数を占めた (Fig. 6A)。しかし、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で培養すると、hematoxylin によって核のみが染色される細胞のうち多数の細胞の細胞質が Luxol-fast-blue で染色された (Fig. 6B)。従って、recombinant ラット IL-5 はラット骨髄細胞の培養系において骨髄細胞中の好酸球数の割合を増加させることが明らかになった。

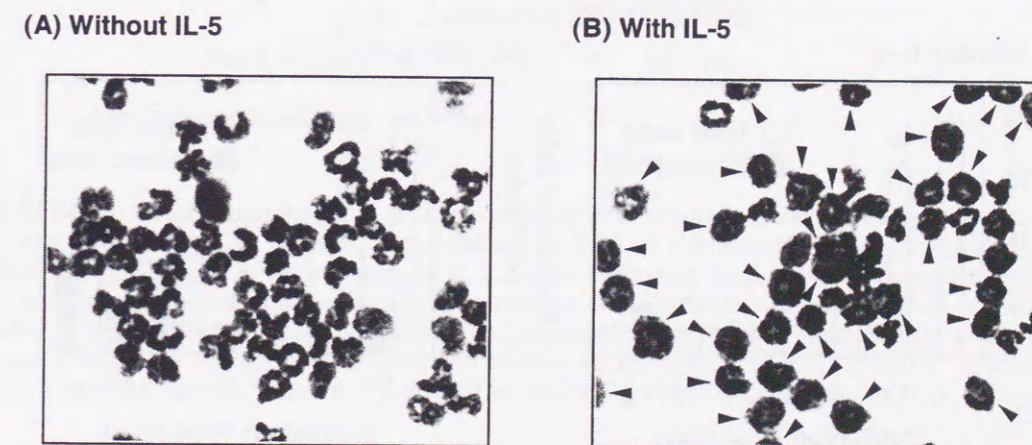


Fig. 6. Microscopic observations of the rat bone marrow cells
Rat bone marrow cells were incubated for 6 days in the presence (B) or absence (A) of recombinant rat IL-5 (100 pM). The cells were smeared and stained with Luxol-fast-blue and hematoxylin. Eosinophils are shown by arrowheads. Original magnification x 200.

そこで、ラット骨髓細胞の培養系において、骨髓細胞中の好酸球数が recombinant ラット IL-5 によって増加するかどうか解析した。培養開始前、 2×10^6 個の骨髓細胞中には $(10.6 \pm 1.1) \times 10^4$ 個の好酸球が存在していた (Fig. 7A)。骨髓細胞を recombinant ラット IL-5 非存在下で培養すると、総細胞数および好酸球数は経時的に減少した (Fig. 7A)。培養開始 6 日後では、総細胞数および好酸球数は、それぞれ $(11.8 \pm 1.0) \times 10^4$ 個、および $(0.6 \pm 0.1) \times 10^4$ 個であった (Fig. 7A)。一方、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で骨髓細胞を培養した場合、好酸球数は培養開始 3 日目以降経時的に増加した (Fig. 7B)。総細胞数は、培養開始 3 日目までは recombinant ラット IL-5 非存在下と同様に減少したが、好酸球数の増加に伴って 3 日目以降は総細胞数の減少が抑制された (Fig. 7B)。培養開始 6 日後では、総細胞数および好酸球数は、それぞれ $(69.5 \pm 2.6) \times 10^4$ 個、および $(63.9 \pm 3.9) \times 10^4$ 個であり (Fig. 7B)、骨髓細胞中の約 90% が好酸球であった。

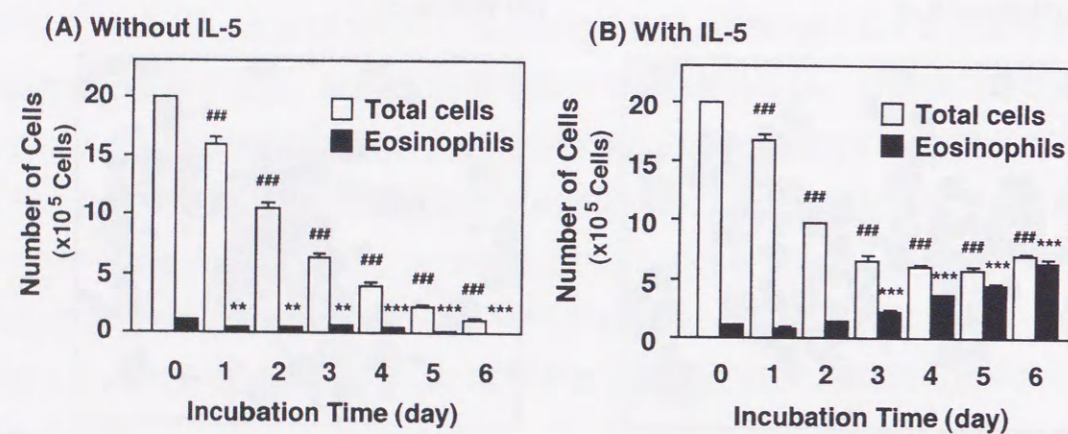


Fig. 7. Time-course of the effects of recombinant rat IL-5 on the number of eosinophils in rat bone marrow cells

Rat bone marrow cells (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 5 ml of medium in the presence (B) or absence (A) of recombinant rat IL-5 (100 pM). After incubation, the number of total cells (open columns) was counted using a hemocytometer, and total number of eosinophils (closed columns) was calculated as follows; total number of eosinophils = [number of total cells] x [eosinophils (%)] x 0.01. Values are the means from 6 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. the number of eosinophils before incubation (day 0). ### $P < 0.001$ vs. the number of bone marrow cells before incubation (day 0).

次に、各種濃度の recombinant ラット IL-5 存在下でラット骨髓細胞を 6 日間培養した。その結果、recombinant ラット IL-5 非存在下あるいは 0.1 および 1 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で培養した場合、培養開始前と比較して好酸球数は減少したが、10 および 100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で培養すると、好酸球数は recombinant ラット IL-5 によって濃度依存的に増加した (Fig. 8)。従って、recombinant ラット IL-5 は骨髓細胞の培養系において好酸球数を増加させる作用があることが明らかになった。

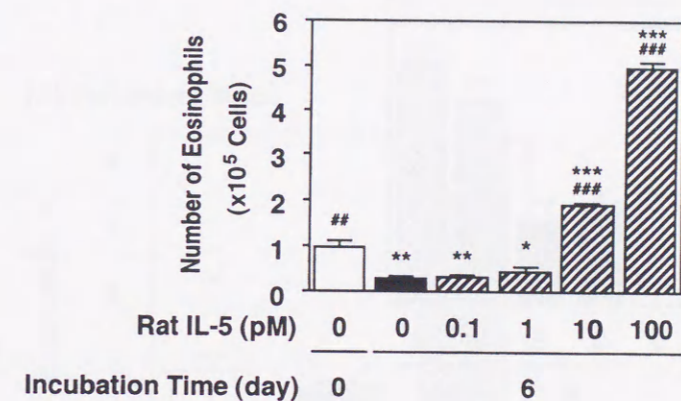


Fig. 8. Effects of recombinant rat IL-5 on the number of eosinophils in rat bone marrow cells

Rat bone marrow cells (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for 6 days in 5 ml of medium containing the indicated concentrations of recombinant rat IL-5. After incubation for 6 days, the number of total cells was counted using a hemocytometer, and total number of eosinophils was calculated as follows; total number of eosinophils = [number of total cells] x [eosinophils (%)] x 0.01. Values are the means from 6 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. before incubation (day 0); ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. after 6 days incubation without rat IL-5.

2-2. ラット骨髓細胞の中の MBP 量に対する recombinant ラット IL-5 の効果

Recombinant ラット IL-5 存在下でラット骨髓細胞を培養すると好酸球数が増加した (Figs. 7 and 8) が、このとき好酸球顆粒蛋白質である MBP の発現も増加するかどうかを明らかにする目的で、ラット骨髓細胞を recombinant ラット IL-5 存在下で培養し、抗ラット MBP 抗体を用いて Western blot 法により MBP を検出し

た。その結果、recombinant ラット IL-5 非存在下で培養すると、培養開始 6 日後の骨髓細胞中の MBP 量は培養開始前と比較してわずかに減少した (Fig. 9)。一方、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で培養した場合、骨髓細胞中の MBP 量は培養開始 3 日後および 6 日後で経時的に増加した (Fig. 9)。従って、recombinant ラット IL-5 による好酸球数の増加は、MBP の発現が伴っていることが示唆された。

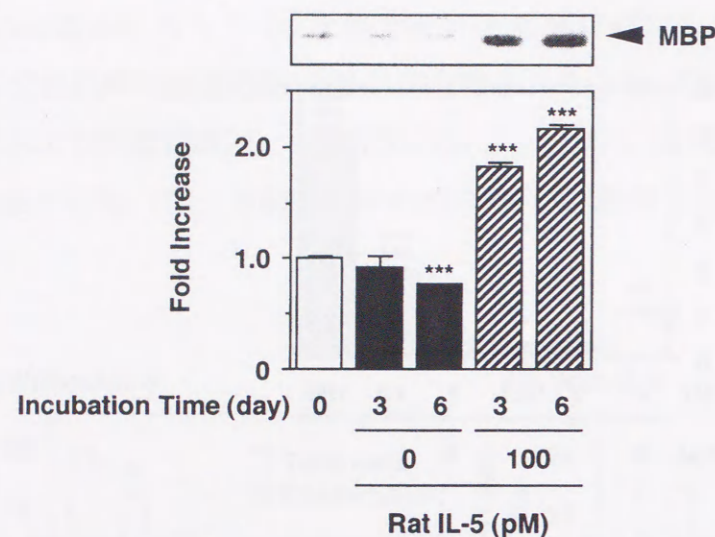


Fig. 9. Detection of MBP in cultured rat bone marrow cells

Rat bone marrow cells (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 5 ml of medium in the presence or absence of recombinant rat IL-5 (100 pM). The cells were lysed, and MBP contents in 1×10^5 cells were detected by immunoblotting (upper panel). The MBP was quantified by scanning densitometry, and the density of MBP in the cells is shown in lower panel. The mean density at day 0 is set to 1.0. Values are the means from 3 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: $***P < 0.001$ vs. before incubation (day 0).

2-3. Recombinant ラット IL-5 を静脈注射した場合の末梢血白血球中および骨髓細胞中の好酸球数の割合

Recombinant ラット IL-5 をラットに投与した場合に好酸球増多が誘導されるかどうか明らかにする目的で、recombinant ラット IL-5 を 10 pmol/kg の投与量

でラット尾静脈から 12 時間おきに 6 日間投与し、最後の投与から 12 時間後に末梢血白血球および骨髓細胞を採取し、好酸球数の割合を算定した。その結果、recombinant ラット IL-5 を 6 日間投与したラットの末梢血白血球および骨髓細胞中の好酸球数の割合は recombinant ラット IL-5 を投与する前と比較して有意に増加した (Fig. 10)。また、recombinant ラット IL-5 を 3 日間投与したラットにおいても末梢血白血球および骨髓細胞中の好酸球数の割合は増加した (data not shown)。一方、vehicle を投与した群では、好酸球数の割合は投与前に比べて有意な変化は認められなかった (Fig. 10)。従って、recombinant ラット IL-5 は、*in vivo* において好酸球増多を誘導する作用があることが明らかになった。

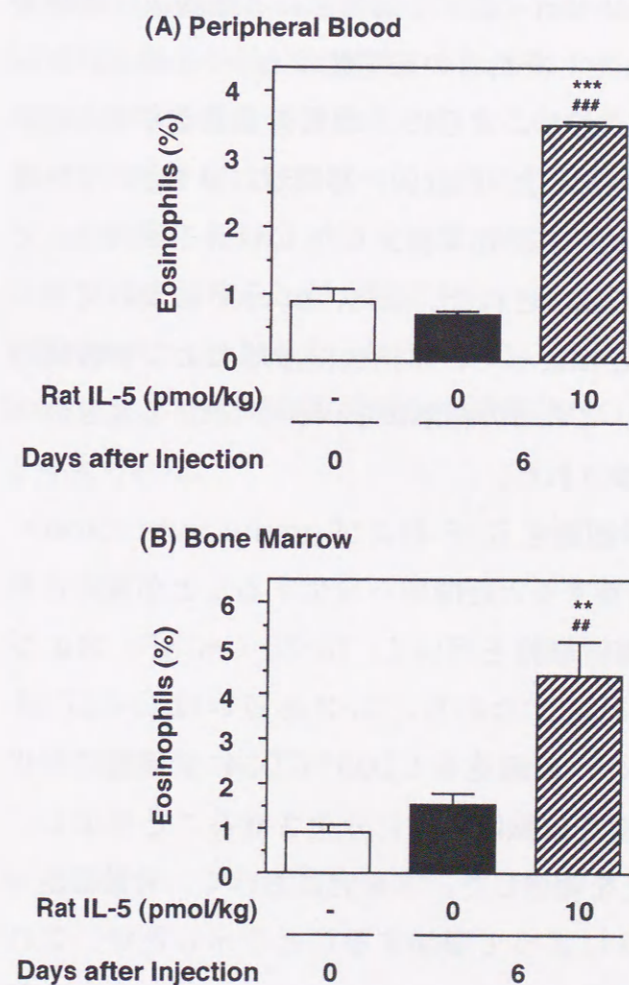


Fig. 10. Effects of recombinant rat IL-5 on the population of eosinophils in peripheral blood cells and in bone marrow cells

Recombinant rat IL-5 was injected intravenously at a dose of 10 pmol/kg at intervals of 12 h for 6 days, and the number of eosinophils in peripheral blood cells (A) and in bone marrow cells (B) was counted 12 h after the last injection of recombinant rat IL-5. Percent of eosinophils was calculated as follows; eosinophils (%) = [number of cells stained with Luxol-fast-blue/number of cells stained with hematoxylin] x 100. Values are the means from 5-6 rats with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. before injection (day 0); $##P < 0.01$, $###P < 0.001$ vs. corresponding 6 day control.

3. 考察

Luxol-fast-blue 染色は特異的に好酸性顆粒蛋白質を染色するため、好酸球前駆細胞および成熟好酸球を同定するために利用される染色方法⁶⁸⁾であるが、ヒト好中球も好酸球に比べてわずかであるが好酸球顆粒蛋白質である ECP および EDN を持つことが報告されている⁶⁹⁾ため、好中球も Luxol-fast-blue で染色される可能性があった。そこで、種々の白血球が Luxol-fast-blue で染色されるかどうか検討した結果、ラット腹腔から採取した好中球⁷⁰⁾およびマクロファージ⁷¹⁾は Luxol-fast-blue では染色されず、好酸球のみが Luxol-fast-blue により染色された (data not shown)。本研究において、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下でラット骨髄細胞を 6 日間培養した結果、Luxol-fast-blue で染色される細胞数は総細胞数の約 90% になった (Figs. 6 and 7)。また、それらの細胞数は recombinant ラット IL-5 によって濃度依存的に増加した (Fig. 8)。さらに、培養骨髄細胞中の MBP 量も recombinant ラット IL-5 によって増加した (Fig. 9)。好中球には MBP が発現していないことが報告されている⁶⁹⁾ため、本研究で検出した Luxol-fast-blue で染色される細胞は好酸球であることが強く示唆された。また、*in vivo* においても、recombinant ラット IL-5 を投与することによって、末梢血白血球および骨髄細胞中の好酸球数の割合が増加した (Fig. 10)。これらの結果から、ラット IL-5 は生体内において好酸球産生を誘導することが示唆された。

マウスおよびヒトにおいて、骨髄幹細胞を IL-5 および granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 存在下で培養すると好酸球へ分化することが報告されている^{66,72,73)}。Ema ら⁷³⁾は、ヒト骨髄幹細胞を用いて、IL-3、G-CSF、および IL-5 の分化に対する作用の違いを示した。すなわち、IL-3 あるいは G-CSF は cluster of differentiation (CD) 33⁺ CD34⁺ 幹細胞を CD33⁺ CD34⁻ 幹細胞に分化させるが、IL-5 は CD33⁺ CD34⁻ 幹細胞を成熟好酸球に分化させることを示し、IL-5 が好酸球の最終分化を誘導することを報告した。本研究において、骨髄細胞中の好酸球数は recombinant ラット IL-5 によって増加することを示したが、これは、ラット骨髄細胞中の CD33⁺ CD34⁻ 幹細胞が recombinant ラット IL-5 に応答して好酸球へ分化した結果によるものではないかと考えられる。

好酸球への分化や MBP mRNA の発現は、GATA1、GATA2、C/EBP α 、およ

び C/EBP β などの転写因子によって制御されている⁷⁴⁻⁷⁶⁾。すなわち、C/EBP α は G-CSF レセプターの発現あるいは好酸球の産生に関与していること⁷⁵⁾、一方、C/EBP β は好酸球への分化を誘導すること⁷⁶⁾が報告されている。また、GATA1 が MBP mRNA の発現を誘導するのに対して、GATA2 はその作用を抑制すること⁷⁴⁾が報告されている。成熟好酸球を IL-5 あるいは GM-CSF 存在下で培養すると、Janus protein kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) シグナル伝達経路、p44/42 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼシグナル伝達経路、および PI3-K/Akt シグナル伝達経路が活性化するが⁷⁷⁻⁸⁴⁾、p44/42 MAP キナーゼシグナル伝達経路の活性化は IL-5 あるいは GM-CSF によって誘導される好酸球の生存延長⁸⁴⁾や LTB₄ による好酸球の凝集、アラキドン酸代謝、あるいは H₂O₂ 産生の亢進には関与していないこと⁸⁵⁾が報告されている。しかし、NIH3T3 細胞を用いた解析から転写因子 C/EBP β は p44/42 MAP キナーゼシグナル伝達経路を介して活性化されることが報告されている⁸⁶⁾ため、p44/42 MAP キナーゼの活性化は好酸球への分化に必要であると考えられる。

本研究において、ラット IL-5 は骨髄細胞の培養系、および *in vivo* において EDF 活性を示すことが示唆された。従って、ラット IL-5 の EDF 活性は好酸球増多に関与していると考えられる。また、本研究で用いた骨髄細胞の培養系は、今後、IL-5 による好酸球前駆細胞から好酸球への分化誘導の詳細な解析に活用できるものと考えられる。

第三章 Recombinant ラット interleukin-5 によるラット好酸球生存延長作用機序の解析

1. 序論

IL-5、IL-3、および GM-CSF のレセプターは、それぞれのサイトカインに固有の α 鎖、および IL-5、IL-3、GM-CSF のレセプターに共通の β 鎖 (common β 鎖: βc 鎖) の 2 つのサブユニットから構成される⁸⁷⁾。しかし、通常、 α 鎖および βc 鎖は会合しておらず、リガンドが α 鎖と低親和性 ($K_d > 0.5$ nM) で結合した後、 βc 鎖と結合し高親和性 ($K_d \sim 100$ pM) レセプターが構成される⁸⁷⁾。また、これらのサイトカインの生物活性は、 α 鎖のみでは不十分であり、 βc 鎖が必要であることが報告されている⁸⁷⁾。IL-5 が IL-5 レセプターに結合すると βc 鎖に会合している JAK2^{88,89)}、Fes⁸⁹⁾、および Lyn⁹⁰⁾ などのチロシンキナーゼが速やかに活性化され、JAK1、JAK2、STAT1、および STAT5 などを経る JAK/STAT シグナル伝達経路^{79,81, 82)}、あるいは Ras、Raf-1、mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK)、および p44/42 MAP キナーゼを介する p44/42 MAP キナーゼシグナル伝達経路⁷⁷⁻⁷⁹⁾などを活性化することが報告され、IL-5 によるヒト好酸球内のシグナル伝達経路が明らかにされつつある。

ヒト IL-5 によるヒト好酸球の生存延長誘導作用には JAK2 の活性化⁷⁹⁾、mRNA の合成³⁷⁾、および蛋白質合成³⁷⁾が関与していることが示唆されているが、その作用機序は IL-5 による好酸球内シグナル伝達経路の解析結果と比較して部分的にしか明らかにされておらず、不明な点が多く残されている。第一章では、recombinant ラット IL-5 が好酸球生存延長活性を持つことを示したが、本章ではその機序について、特に細胞内シグナル伝達経路の観点から解析した結果について記す。

2. 実験結果

2-1. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に対する cycloheximide および actinomycin D の作用

Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導に蛋白質合成が関与しているかどうかを明らかにする目的で、100 pM の recombinant ラット IL-5 および各種濃度の蛋白質合成阻害薬 cycloheximide あるいは RNA 合成阻害薬 actinomycin D を含む培地中でラット腹腔から採取して精製した好酸球を 96 時間培養し、recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長の誘導がこれらの薬物により抑制されるかどうかを Trypan blue 色素排除法により解析した。その結果、recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長作用は 108 nM (30 ng/ml) および 360 nM (100 ng/ml) の cycloheximide (Fig. 11A)、あるいは 8 nM (10 ng/ml) および 80 nM (100 ng/ml) の actinomycin D (Fig. 11B) によって濃度依存的に抑制された。従って、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導に蛋白質合成が関与していることが示唆された。

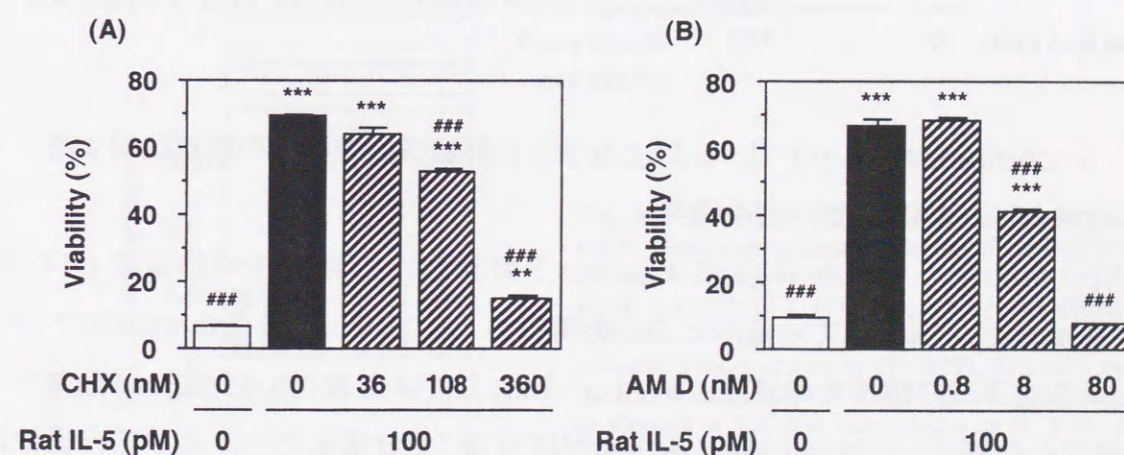


Fig. 11. Effects of cycloheximide and actinomycin D on recombinant rat IL-5-induced prolongation of rat eosinophil survival

Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5 and the indicated concentrations of cycloheximide (CHX) (A) or actinomycin D (AM D) (B). The viability of eosinophils was determined by the ability to exclude Trypan blue dye. Values are the means from 5 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5; ### $P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without CHX or AM D.

2-2. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に対する herbimycin A の作用

Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導にチロシンキナーゼの活性化が関与しているかどうかを明らかにする目的で、100 pM の recombinant ラット IL-5 および各種濃度のチロシンキナーゼ阻害薬 herbimycin A を含む培地中で好酸球を 96 時間培養した。その結果、recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長作用は 10 および 100 nM の herbimycin A によって濃度依存的に抑制された (Fig. 12)。従って、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導にチロシンキナーゼの活性化が関与していることが示唆された。

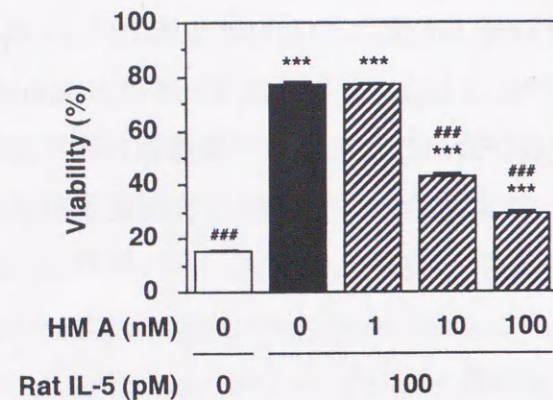


Fig. 12. Effects of herbimycin A on the recombinant rat IL-5-induced prolongation of rat eosinophil survival

Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5 and the indicated concentrations of herbimycin A (HM A). The viability of rat eosinophils was determined by the ability to exclude Trypan blue dye. Values are the means from 5 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: *** $P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5; ### $P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without HM A.

2-3. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に対する p44/42 MAP キナーゼの関与

Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導に p44/42 MAP キナーゼが関与しているかどうかを解析した。100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で好酸球を培養後、Western blot 法でリン酸化 p44/42 MAP キナーゼを検出した結果、p44/42 MAP キナーゼは培養 15 分後をピークとして一過性にリン酸化された (Fig. 13)。また、MEK1 阻害薬 PD98059 で好酸球を 30 分間プレインキュベートした後、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で 15 分間刺激すると、recombinant ラット IL-5 による p44/42 MAP キナーゼのリン酸化は、10 および 30 μ M の PD98059 によって濃度依存的に抑制された (Fig. 14)。

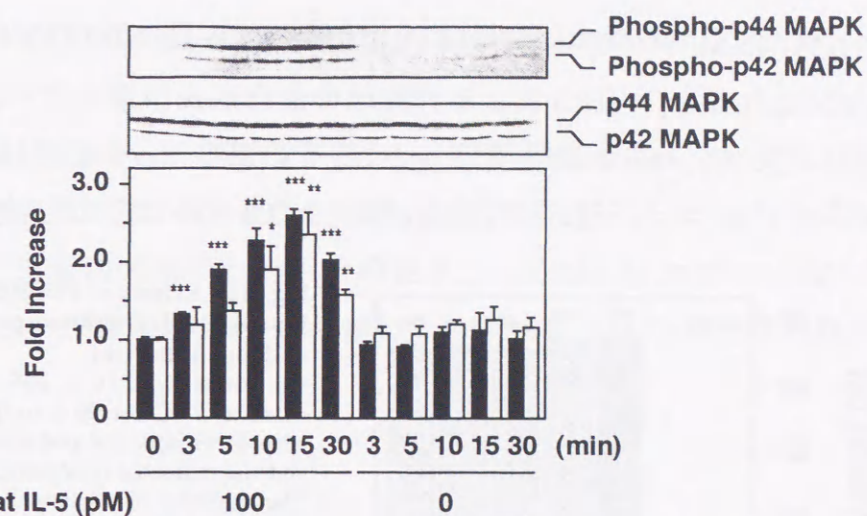


Fig. 13. Time-course of recombinant rat IL-5-induced phosphorylation of p44/42 MAP kinases in rat eosinophils

Rat eosinophils (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 2 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5. The cells were lysed and phosphorylated p44/42 MAP kinases (upper panel) and p44/42 MAP kinases (middle panel) were detected by immunoblotting. The phosphorylated p44/42 MAP kinases and p44/42 MAP kinases were quantified by scanning densitometry. The density ratio of phosphorylated p44 MAP kinase to p44 MAP kinase (closed column) and that of phosphorylated 42 MAP kinase to p42 MAP kinase (open column) are shown in lower panel. The mean density ratio at time 0 min is set to 1.0. Values are the means from 3 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 0 min.

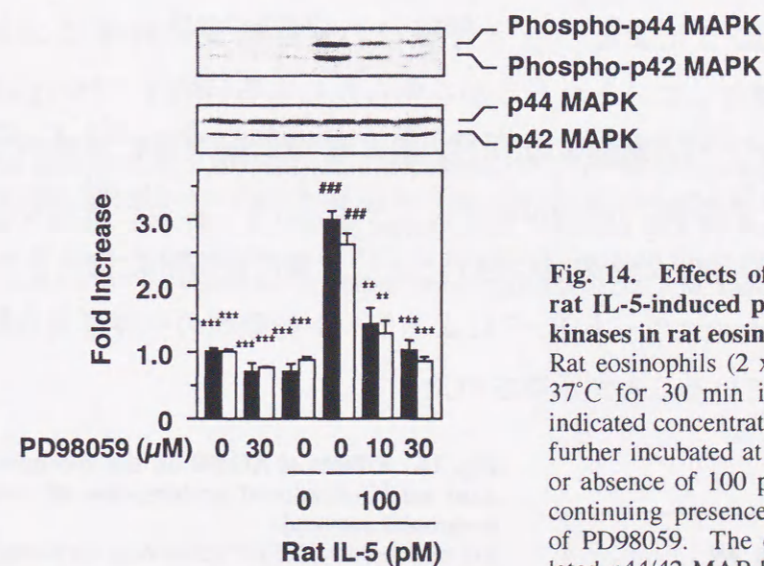


Fig. 14. Effects of PD98059 on the recombinant rat IL-5-induced phosphorylation of p44/42 MAP kinases in rat eosinophils

Rat eosinophils (2×10^6 cells) were preincubated at 37°C for 30 min in 2 ml medium containing the indicated concentrations of PD98059. The cells were further incubated at 37°C for 15 min in the presence or absence of 100 pM recombinant rat IL-5 and the continuing presence of the indicated concentrations of PD98059. The cells were lysed and phosphorylated p44/42 MAP kinases (upper panel) and p44/42 MAP kinases (middle panel) were detected by immunoblotting. The phosphorylated p44/42 MAP kinases and p44/42 MAP kinases were quantified by scanning densitometry. The density ratio of phosphorylated p44 MAP kinase to p44 MAP kinase (closed column) and that of phosphorylated p42 MAP kinase to p42 MAP kinase (open column) are shown in lower panel. The mean density ratio at the 0 min is set to 1.0. Values are the means from 3 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without PD98059; ### $P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5 without PD98059. The left side 2 sets of columns represent that the cells were preincubated at 37°C for 30 min in the presence or absence of 30 μ M PD98059, and determined the level of phosphorylated p44/42 MAP kinases and p44/42 MAP kinases.

しかし、p44/42 MAP キナーゼのリン酸化を抑制する濃度の PD98059 は、100 pM の recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長作用を全く抑制しなかった (Fig. 15)。従って、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導に p44/42 MAP キナーゼのリン酸化は関与していないことが示唆された。

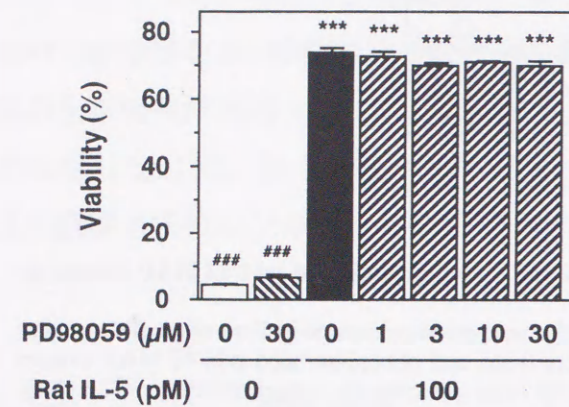


Fig. 15. Effects of PD98059 on the recombinant rat IL-5-induced prolongation of rat eosinophil survival
Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5 and the indicated concentrations of PD98059. The viability of eosinophils was then determined by the ability to exclude Trypan blue dye. Values are the means from 5 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: *** $P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5 without PD98059; ### $P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without PD98059.

2-4. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長の誘導に対する AG490 の作用

Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導に JAK/STAT シグナル伝達経路が関与しているかどうかを明らかにする目的で、100 pM の recombinant ラット IL-5 および各種濃度の JAK2 阻害薬 AG490 を含む培地中で好酸球を 96 時間培養した。その結果、recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長作用は 10、30、および 100 μM の AG490 によって濃度依存的に抑制された (Fig. 16)。従って、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長の誘導に JAK2 の活性化が関与していることが示唆された。

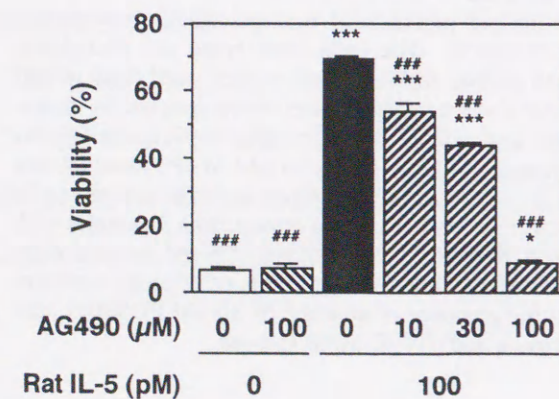


Fig. 16. Effects of AG490 on the recombinant rat IL-5-induced prolongation of rat eosinophil survival
Rat eosinophils (1×10^5 cells) were incubated at 37°C for 96 h in 0.1 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5 and the indicated concentrations of AG490. The viability of eosinophils was then determined by the ability to exclude Trypan blue dye. Values are the means from 5 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5 without AG490; ### $P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without AG490.

2-5. STAT1 および STAT5 のリン酸化に対する recombinant ラット IL-5 の作用

Recombinant ラット IL-5 存在下でラット好酸球を培養したときに STAT1 および STAT5 の活性化が起こるかどうかを明らかにする目的で、STAT のリン酸化を指標に Western blot 法で解析した。その結果、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下でラット好酸球を 30 分間培養しても STAT1 はリン酸化されなかった (Fig. 17)。

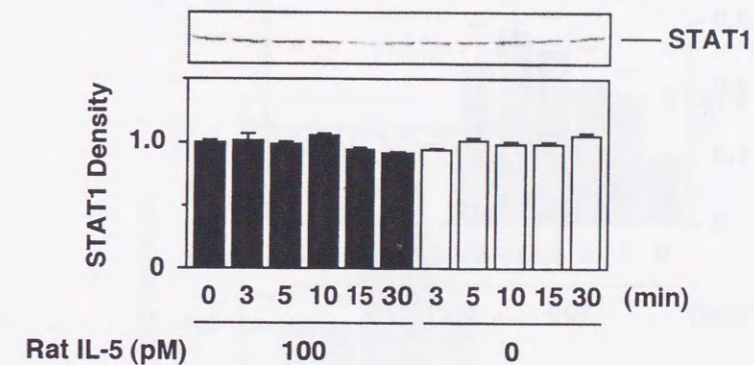


Fig. 17. Effects of recombinant rat IL-5 on phosphorylation of STAT1 in rat eosinophils
Rat eosinophils (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 2 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5. The cells were lysed, and STAT1 and phosphorylated STAT1 were detected by immunoblotting (upper panel). Because STAT1 was not phosphorylated by recombinant rat IL-5, the density of STAT1 in the cells is shown in lower panel. The mean density at time 0 min is set to 1.0. Values are the means from 3 samples with S.E.M. shown by vertical bars.

一方、STAT5は100 pMのrecombinantラットIL-5によって15分後をピークとして一過性にリン酸化された(Fig. 18A)。また、各種濃度のrecombinantラットIL-5存在下で好酸球を15分間培養すると、STAT5は10および100 pMのrecombinantラットIL-5によって濃度依存的にリン酸化された(Fig. 18B)。従って、recombinantラットIL-5はSTAT1ではなくSTAT5のリン酸化を誘導することが示唆された。

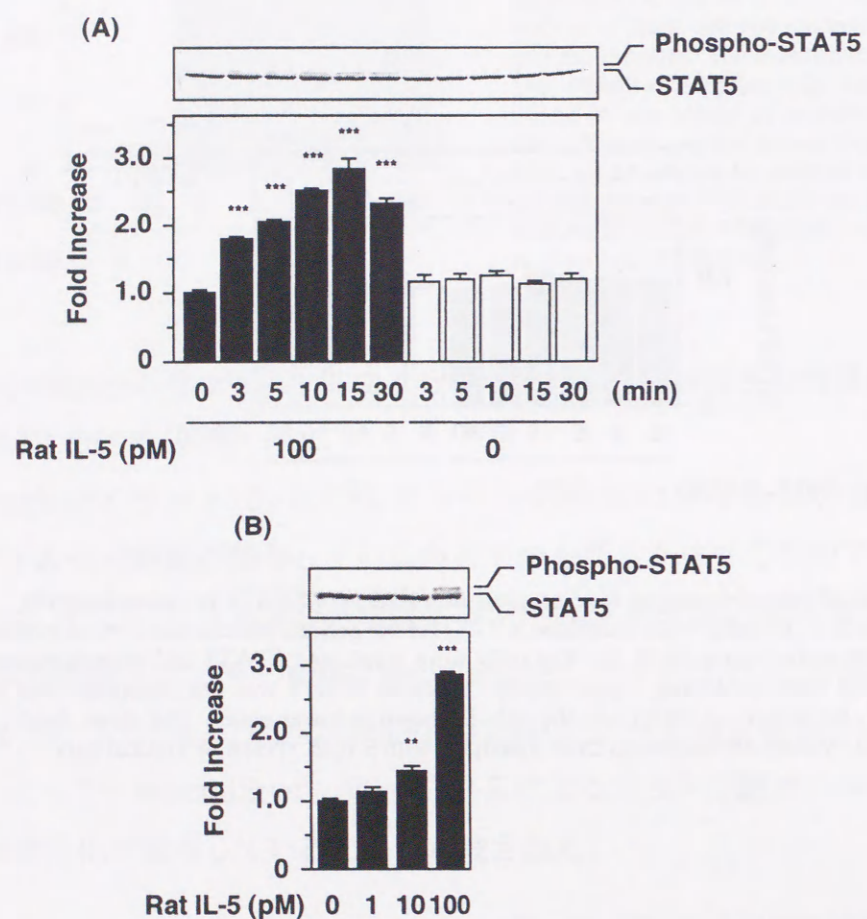


Fig. 18. Effects of recombinant rat IL-5 on phosphorylation of STAT5 in rat eosinophils
 (A) Rat eosinophils (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for the periods indicated in 2 ml of medium with or without 100 pM recombinant rat IL-5. (B) Rat eosinophils (2×10^6 cells) were incubated at 37°C for 15 min in 2 ml of medium containing the indicated concentrations of recombinant rat IL-5. The cells were lysed, and phosphorylated STAT5 and STAT5 were detected by immunoblotting (upper panel). The phosphorylated STAT5 and STAT5 were quantified by scanning densitometry, and the density ratio of phosphorylated STAT5 to STAT5 is shown in lower panel. The mean density ratio at time 0 min is set to 1.0. Values are the means from 3 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: (A) $***P < 0.001$ vs. 0 min; (B) $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5.

2-6. RecombinantラットIL-5によるSTAT5のリン酸化に対するAG490の作用

RecombinantラットIL-5存在下でラット好酸球を培養したときに誘導されるSTAT5のリン酸化にJAK2が関与しているかどうかを明らかにする目的で、JAK2阻害薬AG490で好酸球を6時間プレインキュベートした後、100 pMのrecombinantラットIL-5で15分間刺激してWestern blot法でリン酸化STAT5を検出した。その結果、STAT5のリン酸化は、100 μM のAG490によって抑制された(Fig. 19)。従って、recombinantラットIL-5によるSTAT5のリン酸化はJAK2の活性化を介していることが示唆された。

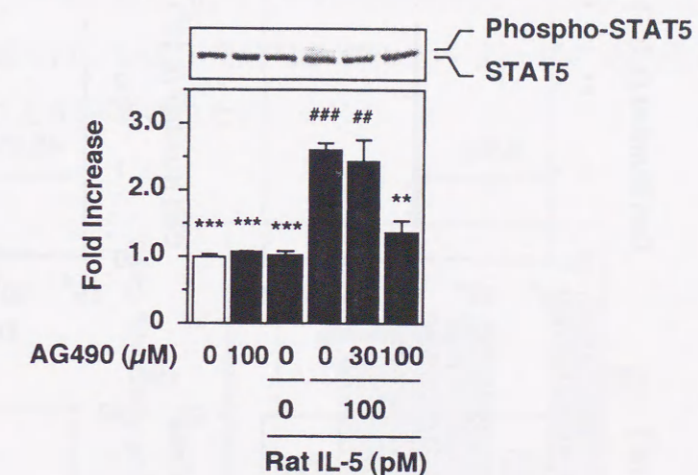


Fig. 19. Effects of AG490 on recombinant rat IL-5-induced phosphorylation of STAT5 in rat eosinophils

Rat eosinophils (2×10^6 cells) were preincubated at 37°C for 6 h in 2 ml of medium containing the indicated concentrations of AG490 and further incubated at 37°C for 15 min in the presence or absence of 100 pM recombinant rat IL-5 and the continuing presence of the indicated concentrations of AG490. The cells were lysed, and phosphorylated STAT5 and STAT5 were detected by immunoblotting (upper panel). The phosphorylated STAT5 and STAT5 were quantified by scanning densitometry, and the density ratio of phosphorylated STAT5 to STAT5 is shown in lower panel. The mean density ratio at time 0 min is set to 1.0. Values are the means from 3 samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance: $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. 100 pM rat IL-5 without AG490; $\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$ vs. 0 pM rat IL-5 without AG490. The left side 2 columns represent that the cells were preincubated at 37°C for 6 h in the presence or absence of 100 μM AG490, and determined the level of phosphorylated STAT5 and STAT5.

2-7. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球のアポトーシスの抑制

ラット好酸球を 100 pM の recombinant ラット IL-5 を含む培地中で培養すると、好酸球の生存率の低下が抑制されることを第一章で示した。この作用は、recombinant ラット IL-5 がラット好酸球のアポトーシスを抑制するためなのかどうかを明らかにする目的で、recombinant ラット IL-5 存在下あるいは非存在下で好酸球を 72 時間培養した後、好酸球の DNA の断片化の程度を指標として FACScan によって解析した。その結果、recombinant ラット IL-5 非存在下で培養すると、DNA の断片化を起こした好酸球の割合は、培養開始時に比べて増加した (Fig. 20)。また、100 pM の recombinant ラット IL-5 存在下で培養した場合、recombinant

ラット IL-5 非存在下で培養した時と比較して、DNA の断片化を起こした好酸球の割合が減少した (Fig.20)。従って、recombinant ラット IL-5 はラット好酸球のアポトーシスを抑制することによって、好酸球の生存延長を誘導していることが示唆された。

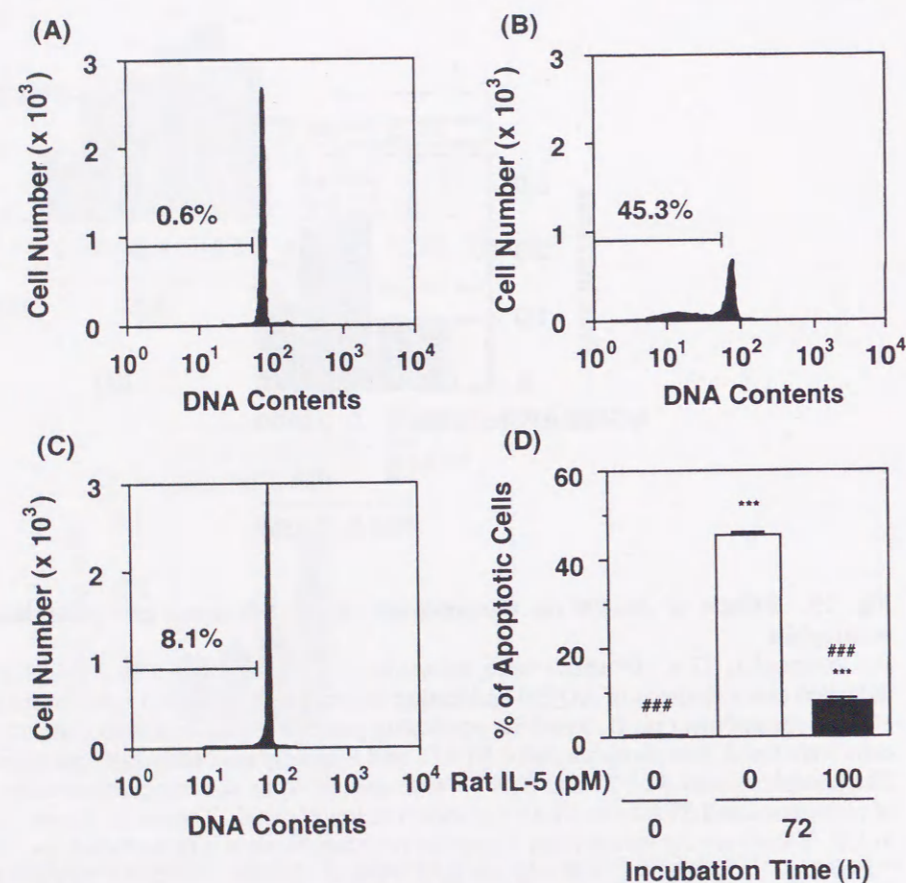


Fig. 20. Anti-apoptotic effects of recombinant rat IL-5 on the rat eosinophil survival

Rat eosinophils (1×10^6 cells) were incubated at 37°C for 72 h in 1 ml of medium in the presence (C) or absence (B) of 100 pM recombinant rat IL-5. Eosinophil apoptosis was assessed by flow cytometry using propidium iodide before incubation (A) or 72 h after incubation (B, C). The percent of apoptotic cells calculated by the flow cytometry is indicated in A, B, and C, and represented as a histogram (D). Values are the means from 3 samples with S.E.M. Statistical significance: *** $P < 0.001$ vs. before incubation, ### $P < 0.001$ vs. 72 h after incubation without rat IL-5.

2-8. Recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球のアポトーシス抑制作用に対する種々の薬物の効果

100 pM の recombinant ラット IL-5 および種々の薬物を含む培地中でラット好酸球を 72 時間培養した後、好酸球の DNA 断片化の程度を FACScan を用いて解析した。その結果、好酸球のアポトーシスは recombinant ラット IL-5 によって抑制され (Fig. 21)、recombinant ラット IL-5 による作用は 360 nM (100 ng/ml) の蛋白質合成阻害薬 cycloheximide、80 nM (100 ng/ml) の RNA 合成阻害薬 actinomycin D、100 nM のチロシンキナーゼ阻害薬 herbimycin A、および 100 μM の JAK2 阻害薬 AG490 によって抑制された (Fig. 21)。しかし、30 μM の MEK1 阻害薬 PD98059 は recombinant ラット IL-5 による好酸球アポトーシスの抑制作用を打ち消さなかった (Fig. 21)。従って、recombinant ラット IL-5 による好酸球のアポトーシスの抑制には、JAK2 を含むチロシンキナーゼの活性化および蛋白質合成が関与していることが示唆された。

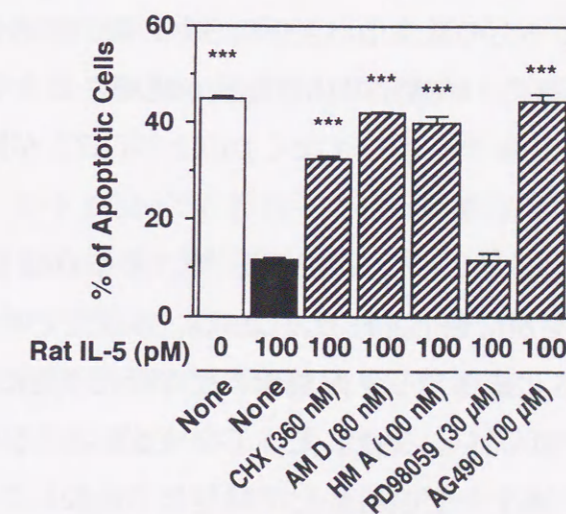


Fig. 21. Effects of various reagents on the recombinant rat IL-5-induced inhibition of rat eosinophil apoptosis

Rat eosinophils (1×10^6 cells) were incubated at 37°C for 72 h in 1 ml of medium in the presence or absence of 100 pM recombinant rat IL-5 and the indicated concentrations of cycloheximide (CHX), actinomycin D (AM D), herbimycin A (HM A), PD98059, or AG490. Eosinophil apoptosis was assessed by flow cytometry using propidium iodide. Values are the means from 3 samples. Statistical significance: *** $P < 0.001$ vs. None in the presence of 100 pM rat IL-5.

3. 考察

IL-5による好酸球の生存延長は、アレルギー性炎症での好酸球増多の一因である²⁸⁾。しかし、IL-5がどのような細胞内シグナル伝達経路を介して好酸球の生存延長を誘導しているかは不明な点が多く残されていた。本研究において、recombinant ラット IL-5 存在下でラット好酸球を培養すると、p44/42 MAP キナーゼ (Fig. 13) および STAT5 (Fig. 18) のリン酸化が誘導され、それぞれ MEK1 阻害薬 PD98059 (Fig. 14) および JAK2 阻害薬 AG490 (Fig. 19) によって抑制されること、recombinant ラット IL-5 はラット好酸球のアポトーシスを抑制することによって生存延長を誘導し (Figs. 20 and 21)、その作用は蛋白質合成阻害薬 cycloheximide (Figs. 11A and 21)、RNA 合成阻害薬 actinomycin D (Figs. 11B and 21)、チロシンキナーゼ阻害薬 herbimycin A (Figs. 12 and 21)、および JAK2 阻害薬 AG490 (Figs. 16 and 21) によって抑制され、MEK1 阻害薬 PD98059 (Figs. 15 and 21) では抑制されないことが明らかになった。従って、recombinant ラット IL-5 は JAK2 を含むチロシンキナーゼの活性化および何らかの蛋白質合成を介して好酸球のアポトーシスを抑制する結果、好酸球の生存延長が誘導され、その細胞内シグナル伝達経路には p44/42 MAP キナーゼではなく JAK2/STAT5 が関与していることが示唆された。

好酸球を IL-4⁸³⁾、IL-5^{77-79,83)}、GM-CSF⁸⁴⁾、あるいは LTB₄⁸⁵⁾ で刺激すると、p44/42 MAP キナーゼが活性化される。しかし、本研究で明らかにしたように、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長作用には p44/42 MAP キナーゼの活性化は関与していない。また、ヒト GM-CSF によるヒト好酸球の生存延長作用にも p44/42 MAP キナーゼの活性化は関与していないこと⁸⁴⁾ が報告されている。さらに、LTB₄ による MAP キナーゼの活性化は、モルモット好酸球の凝集、アラキドン酸代謝、あるいは H₂O₂ 産生にも関与していないこと⁸⁵⁾ が報告されており、p44/42 MAP キナーゼは成熟好酸球の生存延長や活性化には関与していないことが考えられる。

JAK/STAT シグナル伝達経路は、様々なサイトカイン刺激で活性化される経路であり、細胞の種々の機能に関与している⁹¹⁾。ヒト好酸球をヒト IL-5 で刺激すると、JAK1⁸⁰⁾、JAK2^{77,79-82)}、STAT1⁸¹⁾、および STAT5⁸²⁾ が活性化することが報

告されている。ヒト IL-5 によるヒト好酸球の生存延長の誘導は、JAK2 阻害薬 AG490 で抑制されること⁷⁹⁾ から、好酸球の生存延長に JAK2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、JAK2 は STAT⁹¹⁾ および signal transducing adaptor molecule (STAM)⁹²⁾ を活性化することが報告されており、IL-5 による好酸球の生存延長の誘導における JAK2 の標的分子、すなわち、STAT1 あるいは STAT5 の活性化が必要なのか、STAT1 および STAT5 の二つの分子の活性化が必要なのか、あるいは必要ないのかは明らかにされていなかった。Pazdrak ら⁸¹⁾ は、ヒト好酸球を 100 pM のヒト IL-5 存在下で培養し、15 および 30 分後に STAT1 がリン酸化されることを報告したが、本研究では STAT1 のリン酸化は認められなかった (Fig. 17)。一方、STAT5 は recombinant ラット IL-5 によって経時的および濃度依存的にリン酸化され (Fig. 18)、その作用は JAK2 阻害薬 AG490 によって抑制された (Fig. 19)。さらに、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長作用も JAK2 阻害薬 AG490 によって抑制された (Figs. 16 and 21)。JAK2 活性化を抑制すると、recombinant ラット IL-5 による STAT5 のリン酸化およびラット好酸球の生存延長の誘導が抑制されることから、recombinant ラット IL-5 によって活性化された JAK2 を介する STAT5 の活性化が好酸球の生存延長の誘導に重要であると考えられる。

Miike ら⁸⁴⁾ は、ヒト GM-CSF 存在下でヒト好酸球を培養したときに誘導される好酸球の生存延長活性のシグナル伝達経路について報告した。本研究によって示唆された recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球生存延長作用とそのシグナル伝達経路は、ヒト好酸球をヒト GM-CSF 存在下で培養した場合⁸⁴⁾ のそれと比較して、以下の (1) ~ (4) の共通点がある。すなわち、(1) アポトーシスによる好酸球の生存率の低下は recombinant ラット IL-5 およびヒト GM-CSF によって抑制されること、(2) p44/42 MAP キナーゼおよび JAK2 が活性化されること、(3) p44/42 MAP キナーゼのリン酸化は好酸球の生存延長に関与していないこと、(4) JAK2 の活性化が好酸球の生存延長に関与していることである。IL-5 レセプターと GM-CSF レセプターは βc 鎖を共有しており⁸⁷⁾、IL-5 による STAT5 の活性化は、 βc 鎖の細胞内ドメインを欠失させることによって消失すること⁹³⁾、および βc 鎖のチロシンリン酸化が関与していること⁹⁴⁾ から、IL-5 および GM-CSF に共通した作用は、 βc 鎖を介するものであると考えられる。しかし、Ogata ら⁸⁰⁾ は、 βc 鎖には

JAK1 が結合し、IL-5 レセプター α 鎖には JAK2 が結合していることを報告しており、IL-5 や GM-CSF のレセプターを介する JAK2 活性化機構は未だ明らかにされていないが、少なくとも好酸球の生存延長の誘導に JAK2 が関与していることが考えられる。また、ヒト好酸球を用いた解析結果³⁷⁾と同様に、本研究では recombinant ラット IL-5 による好酸球生存延長作用に蛋白質合成が関与していることを示した。従って、IL-5 あるいは GM-CSF による好酸球生存延長は、JAK2 によって活性化された STAT5 が好酸球のアポトーシスを抑制する作用を持つ蛋白質の発現を誘導するために起こるのではないかと考えられる。

総括

慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎、あるいはアレルギー性鼻炎などのアレルギー性炎症疾患において、末梢血および炎症部位で好酸球数の増加が認められること²⁸⁾、*in vitro*での解析結果から、好酸球は細胞障害性のある顆粒蛋白質⁶⁻¹¹⁾を放出し、種々のケミカルメディエーター^{4,5,18-21)}やサイトカイン²³⁾を産生することが報告されていることから、炎症部位に浸潤した好酸球は炎症を増悪させる細胞として機能するように考えられるようになった^{28,42,96)}。すなわち、好酸球数の増加はアレルギー性炎症の病態悪化の原因の一つになると考えられるため、好酸球増多機序について詳細に解析することにより、好酸球浸潤が関与するアレルギー性炎症疾患の治療薬の開発に役立つ方法論を構築できる可能性がある。

好酸球増多が起こる原因として、第一に、好酸球の産生が亢進すること、第二に、好酸球のアポトーシスが抑制されることが挙げられる。種々のサイトカインの中で、マウスおよびヒトの IL-5 は、この二つを誘導する活性があることが報告されている^{33,34,36,37,66)}。しかし、ラットは実験モデル動物として汎用されている動物種であるにも関わらず、ラット IL-5 がラット好酸球に対してこのような作用を示すかどうかは明らかにされていなかったため、ラット好酸球とラット IL-5 の関係はマウスおよびヒトの解析結果から推定せざるを得なかった。そこで、本研究は、recombinant ラット IL-5 を作製し、recombinant ラット IL-5 のラット好酸球に対する生物活性について解析した結果、recombinant ラット IL-5 はマウスおよびヒトの IL-5 と同様に EDF 活性(第一章および第二章)および好酸球生存延長活性(第一章および第三章)を持つことが明らかになり、ラットにおいても IL-5 は好酸球増多因子として作用することが示された。

IL-3、IL-5、および GM-CSF のレセプターは βc 鎖を共有しているために好酸球に対する生物活性が類似しており^{87,96)}、これらのサイトカインは共に成熟好酸球の生存延長を誘導する活性を持つこと⁹⁷⁾が報告されている。本研究では、recombinant ラット IL-5 がラット好酸球の生存延長を誘導するためのシグナル伝達経路を示唆した(第三章)が、このシグナル伝達経路は、ヒト IL-5 によるヒト好酸球の生存延長の誘導^{37,79)}のみならず、ヒト GM-CSF によるヒト好酸球の生存延長の誘導のためのシグナル伝達経路⁸⁴⁾と類似している点が多い。すなわち、IL-5 あるいは

GM-CSF が好酸球のアポトーシスを抑制するためには、p44/42 MAP キナーゼの活性化ではなく、JAK2 の活性化および蛋白質合成が必要であると考えられる点である。IL-5 による好酸球の生存延長の誘導は、B cell lymphoma-2 (Bcl-2) mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド⁹⁷⁾、Raf-1 mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド⁷⁹⁾、Lyn mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド⁷⁹⁾、および Lyn-binding peptide inhibitor⁹⁹⁾ を好酸球に導入することによって抑制されることが報告されている。従って、IL-5 や GM-CSF 存在下で好酸球を培養したときに Bcl-2、Raf-1、あるいは Lyn などの蛋白質が合成誘導され、これらの蛋白質が好酸球のアポトーシスを抑制している可能性が考えられる。しかし、IL-5 あるいは GM-CSF が好酸球の生存を誘導するために必要な蛋白質はこれまでに同定されておらず、好酸球の増多を抑制する観点から、好酸球の生存を延長させる作用を持つ蛋白質を同定することが必要である。本研究では、recombinant ラット IL-5 による好酸球の生存延長の誘導が、MEK1 阻害薬 PD98059 では抑制されず、JAK2 阻害薬 AG490 によって抑制されることを明らかにした(第三章)が、このような阻害薬を活用し、IL-5 によって誘導される好酸球生存延長誘導因子の探索が可能になると考えられる。

一方、IL-3 あるいは GM-CSF 存在下で CD34⁺ 幹細胞を培養すると、好中球および単球など種々の細胞へ分化が誘導される^{73,100)}。しかし、IL-5 存在下で CD34⁺ 幹細胞を培養しても好酸球への分化誘導は起こらないが、IL-3 あるいは GM-CSF 存在下で CD34⁺ 幹細胞をプレインキュベートしておくと、これらの細胞は IL-5 によって好酸球へ分化誘導されるようになる^{73,100)}。従って、好酸球への分化に関して IL-3 や GM-CSF は CD34⁺ 幹細胞から好酸球前駆細胞への分化に関与し、IL-5 は好酸球前駆細胞から成熟好酸球への最終的な分化に関与していると考えられている^{73,100)}。IL-3、IL-5、および GM-CSF のレセプターは βc 鎖を共有している⁸⁷⁾ ため、IL-5 による成熟好酸球への最終分化には IL-5 レセプター α 鎖が重要であると考えられている⁸⁷⁾。また、好酸球には顆粒蛋白質である MBP が特異的に存在し⁶⁹⁾、recombinant ラット IL-5 存在下でラット骨髄細胞を培養すると、好酸球への分化誘導と同様に MBP の増加が認められた(第二章)ことから、MBP の発現にも IL-5 レセプター α 鎖が関与していると考えられる。しかし、成熟好酸球は IL-5 レセプター α 鎖を発現しているが、MBP を発現していないことが報告されてい

る⁶⁷⁾ ため、IL-5 レセプター α 鎖の発現のみでは MBP の発現誘導を説明することができない。従って、好酸球の分化段階において IL-5 によるシグナル伝達経路には未だ同定されていない経路が存在すると考えられ、IL-5 による成熟好酸球への最終分化や MBP の発現を規定しているシグナル伝達経路に関与する分子を同定することによって、好酸球の分化機構を明らかにすることができると考えられる。このような作用を持つ分子を同定することは、好酸球増多を抑制するための医薬の開発に寄与すると考えられる。

本研究では、バキュロウイルス発現系を用いてカイコ幼虫の体液中に recombinant ラット IL-5 を大量に発現させて精製することにより、recombinant ラット IL-5 をはじめて標品として作製することに成功した。また、recombinant ラット IL-5 がマウスやヒトの IL-5 と同様に EDF 活性および好酸球生存延長活性を持つことをはじめて明らかにした。従って、ラットにおいても IL-5 が好酸球増多を誘導する因子として作用することが示され、ラットは IL-5 が関与する好酸球増多を伴うアレルギー性炎症のモデル動物として活用できる動物種であることが明らかになり、今後、ラットを実験動物として活用することにより、IL-5 による好酸球増多機構や好酸球のアレルギー性炎症における関与について詳細な解析が行えるようになった。

実験材料 および 実験方法

1. 使用した動物

ラット (Sprague-Dawley 系、雄、specific pathogen-free) は Charles River Japan より購入した。ラットの取扱いは、東北大学大学院薬学研究科動物実験委員会により作成された「実験動物取り扱いに関する指針」に基づいて行った。

2. 使用した薬物

Cycloheximide (Wako)、actinomycin D (Wako)、herbimycin A (Research Biochemicals International)、PD98059 (New England Biolabs)、および AG490 (Sigma) は dimethylsulfoxide (DMSO, Wako) に溶解した後、RPMI-1640 培地 (Gibco-BRL) に添加した。RPMI-1640 培地中の DMSO の終濃度は 0.1% (v/v) にした。

3. ラット腹腔好酸球の採取

ラット腹腔好酸球は、Nittoh ら⁵⁰⁾ および Watanabe ら⁵²⁾ の方法に準じて採取した。Cyclophosphamide (Sigma) を 0.5% (w/v) カルボキシメチルセルロースナトリウム (Wako) に懸濁し、ラット (500-550 g) に 100 mg/kg となるように経口投与した。2 日後、8 mg protein 相当量のアスカリス抗原エキス (Greer Laboratories) を生理食塩水 1 ml に溶解し、アジュバントとして 10 mg の水酸化アルミニウム (Wako) を加えて懸濁し、ラットの頸部 2ヶ所、腰部 3ヶ所に各 0.1 ml ずつ皮下注射し、残りの 0.5 ml を腹腔内注射して感作した。感作して 10 日後に、5 mg protein 相当量のアスカリス抗原エキスを生理食塩水 0.5 ml に溶解し、5 mg の水酸化アルミニウムを加えて懸濁し、全量を腹腔内注射して 2 度目の感作を行った。2 回目の感作を行って 7 日後に、8 mg protein 相当量のアスカリス抗原エキスを生理食塩水 30 ml に溶解し、全量を腹腔内注射して抗原刺激を行った。抗原刺激をして 48 時間後にラットをエーテル麻酔下で頸動脈切断により脱血死させた後、20 ml の phosphate-buffered saline (PBS) を腹腔内に注射し、腹腔浸潤細胞を採取した。細胞を PBS で洗浄した後、4 ml の PBS に懸濁し、あらかじめ 50 ml の遠心管内に重層した Percoll (Sigma) 溶液 (比重 1.080; 5 ml, 1.100; 10 ml) の上に重層し、

1000 x g, 30 分, 4℃ で遠心した後、比重 1.080 と 1.100 の Percoll 溶液の間の細胞を回収して PBS で洗浄することにより好酸球を精製した。好酸球の精製率は May-Grünwald-Giemsa 染色で調べた結果 95% 以上であり、好酸球の生存率は Trypan blue 色素排除法で調べた結果 98% 以上であった。精製した好酸球は RPMI-1640 培地で 3 回洗浄した後、実験に使用した。

4. ラット骨髓細胞の採取

ラット骨髓細胞は Hirasawa ら¹⁰¹⁾ の方法に準じて行った。すなわち、ラット (200-250 g) をエーテル麻酔下で頸動脈を切断することにより脱血死させた後、頸骨および大腿骨から骨髓細胞を採取した。細胞は minimum essential medium alpha (α MEM, Gibco-BRL) で 3 回洗浄した後、実験に使用した。細胞の生存率は Trypan blue 色素排除法で調べた結果 98% 以上であった。

5. ラット IL-5 cDNA のサブクローニング

アスカリス抗原エキスで感作したラットの腹腔に抗原溶液 30 ml を注入して 4 時間後に採取した 1×10^8 個の腹腔浸潤細胞から acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法¹⁰²⁾ に準じて total RNA を抽出した。1 μ g 相当量の total RNA を逆転写酵素 (M-MLV, Gibco-BRL) を含む反応液 20 μ l 中で 37℃、1 時間インキュベートして cDNA を調製した。5 μ l の cDNA をテンプレートとして Taq ポリメラーゼ (Takara) およびラット IL-5 プライマーを含む反応液 50 μ l 中で PCR を行った。ラット IL-5 プライマーは、Überla によって報告されたラット IL-5 cDNA 配列⁵¹⁾ をもとにして、ラット IL-5 の coding region を含むように以下のプライマーを合成した。

(sense) 5'-GGATCCATGAGGATGCTTCTGTGCTT-3'

(antisense) 5'-GAATTCAGCTCAGTCTCAGACTTCC-3'

反応条件は、denaturation 94℃ 30 秒、annealing 57℃ 1 分、extension 72℃ 90 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。PCR は、PCR 産物を pGEM-T ベクター (Promega) に挿入し、大腸菌 (DH5 α strain, Toyobo) にトランスフォームして、ラット IL-5 cDNA をサブクローニングした。なお、ラット IL-5 cDNA は、DNA シークエンサー (Applied Biosystems Model 373A, Perkin Elmer) を用いて

塩基配列を確認した。

6. Recombinant ラット IL-5 の発現

サブクローニングしたラット IL-5 cDNA を pBM050 ベクター¹⁰³⁾ を改変したトランスファーベクター pYNG に挿入し、pYNGrIL-5 ベクターを構築した。pYNGrIL-5 と CPd ウイルス DNA⁶⁴⁾ を混合し (トランスファーベクター: ウイルス DNA = 5:2)、リポフェクチン法により BoMo15AIIc 細胞¹⁰⁴⁾ にコトランスフェクトした。Recombinant ウイルスは、限界希釈法によりスクリーニング¹⁰³⁾ し、polyhedrin negative clone (CPd ラット IL-5 recombinant ウイルス) を得た。ウイルスを感染させた BoMo15AIIc 細胞の培養液上清を経口接種¹⁰⁵⁾ によりカイコ幼虫に投与してカイコ幼虫を感染させた。感染させたカイコ幼虫は 27℃ で飼育し、5 日後に体液を採取した。採取した体液のメチル化を避けるために体液にフェニルチオウレアを添加し、-20℃ で保存した。

7. Recombinant ラット IL-5 の精製

CPd ラット IL-5 recombinant ウイルスを感染させたカイコ幼虫の体液から BioCAD/Sprint システム (PerSeptive) を用いて recombinant ラット IL-5 を精製した。CPd ラット IL-5 recombinant ウイルス感染カイコ体液を 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) で 10 倍に希釈し、陰イオン交換カラムであるポロス PI/M PEEK カラムに負荷した。開始 buffer (10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0) で非吸着画分を溶出した後、溶出 buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0) でカラムに吸着したタンパク質を溶出した (流速 8.0 ml/min)。次いで、非吸着画分に含まれるタンパク質 (粗精製 recombinant ラット IL-5 画分) に終濃度が 1.8 M になるように硫酸アンモニウムを加え、疎水クロマトグラフィーを以下のように行った。2.1 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸 buffer (pH 7.0) で平衡化したポロス PE/M PEEK カラムに粗精製ラット IL-5 画分を負荷し、硫酸アンモニウムの連続塩濃度勾配 (2.1 ~ 0 M) によりカラムに吸着したタンパク質を溶出した (流速 5.0 ml/min)。Recombinant ラット IL-5 は、0 M 硫酸アンモニウム溶出画分に含まれており、疎水クロマトグラフィーを繰り返すことによりさらに精製した。精製 recombinant ラット IL-5 は、0.1% (w/v) BSA を含む PBS に溶解した。なお、精製段階の各画分

に含まれる recombinant ラット IL-5 は、抗マウス IL-5 ポリクローナル抗体を用いて Western blot 法によって検出した。

8. SDS-PAGE および Western blotting

SDS-PAGE は、Laemmli の方法¹⁰⁶⁾ に準じて行った。電気泳動後、ゲル中の蛋白質は銀染色 (Silver Stain II Kit Wako, Wako) により検出した。

Western blot を行う場合は、電気泳動後、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) へ転写し、抗体の非特異的吸着を防ぐため Block Ace (Dainippon) でブロッキングした。膜を 0.1% (v/v) Tween 20 (Wako) を含む Tris-buffered saline (T-TBS) で洗浄後、1 次抗体、次いでビオチン化 2 次抗体と反応させた。抗体と反応した蛋白質は、ABC 試薬 (Vector Laboratories)、および ECL system (Amersham) を用い、X-Omat AR フィルム (Eastman Kodak) に現像して検出した。また、リブロットを行う場合、2% (w/v) SDS (Wako) および 100 mM 2-メルカプトエタノール (Wako) を含む 62.5 mM Tris-HCl buffer (pH 6.7) 中でニトロセルロース膜を 70℃ で 30 分間加温し、膜を T-TBS で洗浄した。1 次抗体、次いでフォスファターゼ標識 2 次抗体と反応させた後、抗体と反応したタンパク質は、BCIP/NBT color substrate (Promega) を用いて検出した。

使用した抗体について、recombinant ラット IL-5 および recombinant マウス IL-5 を検出する場合は、ヤギ抗マウス IL-5 ポリクローナル抗体 (R&D Systems)、およびビオチン化抗ヤギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を用いた。MBP を検出する場合は、当研究室で作製したウサギ抗ラット MBP ポリクローナル抗体⁴⁹⁾、およびビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories) を用いた。また、ウサギ抗リン酸化ヒト p44/42 MAP キナーゼ (Thr202/Tyr204) ポリクローナル抗体 (New England Biolabs)、およびビオチン化抗ウサギ IgG 抗体を用いてリン酸化 p44/42 MAP キナーゼを検出し、リブロット後、ウサギ抗ラット MAP キナーゼ R2 (ERK1-CT) ポリクローナル抗体 (Upstate Biotechnology)、およびフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories) を用いて p44/42 MAP キナーゼを検出した。STAT1 を検出する場合は、マウス抗ヒト STAT1 α p91 (C-111) モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、およびフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories) を用

いた。STAT5 を検出する場合は、ウサギ抗マウス STAT5b (C-17) ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、およびフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

なお、Western blotting を行った後、MBP 量、STAT1 量、p44/42 MAP キナーゼ量に対するリン酸化 p44/42 MAP キナーゼ量、あるいは STAT5 量に対するリン酸化 STAT5 量は densitometer (Nikon Scantouch, Nikon) を用いて数値化した。

9. 細胞増殖活性の測定

IL-5 依存性マウス B 細胞株 T88-M 細胞^{59,60} は、高知医科大学 教授 富永明 先生の承諾のもと理研ジーンバンクより購入し、10 pM recombinant マウス IL-5 (R&D Systems) および 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories) を含む RPMI-1640 培地中で培養した。T88-M 細胞を RPMI-1640 培地で 3 回洗浄した後、IL-5 の活性を測定するために使用した。IL-5 の活性は Kobayashi らによる MTT 法¹⁰⁷ を改良して行った。すなわち、 1×10^5 個の T88-M 細胞を 1% (v/v) FBS および各種濃度の recombinant ラット IL-5 を含む 1 ml の RPMI-1640 培地に懸濁し、96-well マイクロプレート (Falcon) の各 well に 0.1 ml ずつ播種して 5% CO₂ 存在下 37 °C で 48 時間培養した。培養終了の 4 時間前に 5 μ l の MTT 溶液 (5 mg/ml PBS) を添加し、さらに培養した。70 μ l の培養液上清を除去した後、100 μ l の DMSO を添加して細胞内のミトコンドリアの還元酵素によって生じたホルマザン (MTT 産物) を溶解した。マイクロプレートリーダーにより 570 nm と 630 nm の吸光度の差を測定し、生細胞によって産生されたホルマザン量を指標に細胞増殖活性を測定した。

10. コロニー形成能の測定

コロニー形成能は Yamaguchi らによるメチルセルロース法⁶⁶ を改良して行った。すなわち、 1×10^4 個のラット骨髓細胞を 1.2% (w/v) メチルセルロース (Wako)、30% (w/v) FBS、1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma) および recombinant ラット IL-5 を含む 1 ml の α MEM 培地に懸濁し、6-well マイクロプレート (Corning) の各 well に 4 ml ずつ播種して 5% CO₂ 存在下 37 °C で 6 日間培

養した。形成されたコロニー数を顕微鏡下で計測した後、各コロニーを形成する細胞を May-Grünwald-Giemsa 染色で同定した。

11. 好酸球生存延長活性の測定

好酸球生存延長活性は Nittoh らの方法⁵⁰ に準じて行った。すなわち、 1×10^6 個のラット好酸球を 10% (w/v) FBS および recombinant ラット IL-5 を含む 1 ml の RPMI-1640 培地に懸濁し、96-well マイクロプレートに播種して 5% CO₂ 存在下 37 °C で一定時間培養した。好酸球の生存率は、Trypan blue 色素排除法により測定した。生存率は、以下の式により求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = [\text{生細胞数} / \text{総細胞数}] \times 100$$

12. ラット骨髓細胞の培養

4×10^5 個のラット骨髓細胞を 30% (w/v) FBS、1% (w/v) BSA および recombinant ラット IL-5 を含む 1 ml の α MEM 培地に懸濁し、6-well マイクロプレートの各 well に 5 ml ずつ播種して 5% CO₂ 存在下 37 °C で一定時間培養した。培養終了後、Trypan blue 色素排除法を用いて総生細胞数を算定し、一部の細胞で塗沫標本を作製し、hematoxylin および Luxol-fast-blue で染色して好酸球を同定した。好酸球の割合および好酸球数は以下の式により求めた。

$$\text{好酸球 (\%)} = [\text{Luxol-fast-blue で染色された細胞}] / [\text{hematoxylin で染色された細胞}] \times 100$$

$$\text{好酸球数} = [\text{総細胞数}] \times [\text{好酸球 (\%)}] \times 0.01$$

13. ラット末梢血白血球および骨髓細胞中の好酸球数の割合の算出

10 pmol の recombinant ラット IL-5 を 1 ml の生理食塩水に溶解し、ラット (200-250 g) の尾静脈から 10 pmol/kg となるように 12 時間おきに 6 日間投与した。Control ラットには、recombinant ラット IL-5 を含まない生理食塩水を尾静脈から同様に投与した。最後の投与から 12 時間後に骨髓細胞および末梢血白血球を採取して、hematoxylin および Luxol-fast-blue で染色して好酸球数の割合を求めた。

14. 好酸球アポトーシスの検出

好酸球のアポトーシスの検出は、Nicolettiらの方法¹⁰⁸⁾に準じてフローサイトメトリー法によって行った。培養した好酸球をPBSで洗浄した後、70% (v/v) エタノールに懸濁して-20℃で4時間固定した。500 x g、4℃で5分間遠心した後、好酸球を permeability buffer (0.192 M sodium phosphate, 4 mM citric acid) に懸濁し、室温で30分間インキュベートして遠心した。0.1 mg/ml の RNase (Toyobo) を含む PBS に好酸球を懸濁して37℃で30分間インキュベートした。次いで、好酸球を遠心 (500 x g、4℃、5分間) し、沈澱した好酸球を50 µg/ml のヨウ化プロピジウム (Wako) を含む PBS に懸濁し、さらに室温で30分間インキュベートした。好酸球のDNA含有量は、FACScan (Becton Dickinson) を用いて解析した。

15. キナーゼのリン酸化の検出

各種濃度の recombinant ラット IL-5 を含む RPIM-1640 培地中で 2×10^6 個の好酸球を一定時間培養した。培養した好酸球をPBSで洗浄し、500 x g、4℃で5分間遠心した後、沈澱した好酸球に lysis buffer (25mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaCl, 25 mM glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 25 mM *p*-nitrophenylphosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 10 µg/ml leupeptin, 10 mM sodium pyrophosphate, and 10 nM okadaic acid) を加え、氷上で30分間インキュベートして細胞を溶解させた。18,600 x g、4℃で20分間遠心した後、上清を回収して、Western blot 法により p44/42 MAP キナーゼ、STAT1、および STAT5 のリン酸化を検出した。また、薬物を用いる場合、MEK1 阻害薬 PD98059、あるいは JAK2 阻害薬 AG490 を含む RPMI-1640 培地中で好酸球をそれぞれ30分間、あるいは6時間プレインキュベートした後、recombinant ラット IL-5 を含む培地中で好酸球を培養した。

16. 統計処理

各データは平均値±標準誤差で表し、有意差検定は Dunnett's test により解析した。

謝辞

本研究の遂行ならびに本学位論文の作成にあたりまして、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科機能分子生化学分野 教授 大内和雄 先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本学位論文の御校閲を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野 教授 榎本武美 先生、生体防御薬学分野 教授 永沼章 先生、ならびに薬理学分野 助教授 比佐博彰 先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたりまして、適切な御助言、御協力を賜りました東北大学大学院薬学研究科機能分子生化学分野 助教授 平澤典保 先生、東北大学大学院薬学研究科生化学講座 元助手 日塔武彰 先生、東北大学大学院薬学研究科生化学講座 元助手 山下正道 先生、東北大学大学院薬学研究科生化学講座 元助手 蓬田伸一 先生、東北大学大学院薬学研究科機能分子生化学分野 技官 斉藤浩子 氏、ならびに仙台大学体育学部健康福祉学科 教授 無江季次 先生に厚く御礼申し上げます。また、実験に御協力頂きました佐藤郁子 学士、平形美樹人 修士、小住好子 修士、中島正宏 学士、米沢貴之 学士を始めお世話になった皆様に感謝致します。

最後に、両親に心より感謝致します。

引用文献

- [1] Dr. Gollasch, Zur kenntniss der asthmatischen sputums, *Fortscr. Med.* **7** (1889) 361-365.
- [2] P. Canon, Über eosinophile Zellen und Mastzellen im Blute Gesunder und Kranker, *Dtsch Med. Wochenschr.* **10** (1892) 206.
- [3] E. Neusser, Klinisch-haematologische mittheilungen, *Wien. Klin. Wochenschr.* **5** (1892) 41-46.
- [4] L.W. Turnbull, L.S. Turnbull, J. Crofton, A.B. Kay, Variations in chemical mediators of hypersensitivity in the sputum of chronic bronchitics: correlation with peak expiratory flow, *Lancet* **2** (8082) (1978) 184-186.
- [5] R.S. Zeiger, H.R. Colten, Histaminase release from human eosinophils, *J. Immunol.* **118** (1977) 540-543.
- [6] G.J. Gleich, D.A. Loegering, J.E. Maldonado, Identification of major basic protein in guinea pig eosinophil granules, *J. Exp. Med.* **137** (1973) 1459-1471.
- [7] I. Olsson, P. Venge, Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic proteins of the granules of leukemic myeloid cells, *Blood* **44** (1974) 235-246.
- [8] D.T. Durack, S.M. Sumi, S.J. Klebanoff, Neurotoxicity of human eosinophils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1979) 1443-1447.
- [9] C.G.B. Peterson, P. Venge, Purification and characterization of a new cationic protein -eosinophil protein X (EPX)- from granules of human eosinophils, *Immunology* **50** (1983) 19-26.
- [10] N.R. Slifman, P. Venge, C.G.B. Peterson, D.J. Mckean, G.J. Gleich, Human eosinophil derived-neurotoxin and eosinophil protein X are likely the same protein, *J. Immunol.* **143** (1989) 2317-2322.
- [11] R.L. Olsen, C. Littele, Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood, *Biochem. J.* **209** (1983) 781-787.
- [12] G.J. Gleich, E. Frigas, D.A. Loegering, D.L. Wassom, D. Steinmuller, Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein, *J. Immunol.* **123** (1979) 2925-2927.
- [13] A.E. Butterworth, D.L. Wassom, G.J. Gleich, D.A. Loegering, J.R. David, Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein, *J. Immunol.* **122** (1979) 221-229.
- [14] K.J. Hamann, G.J. Gleich, J.L. Checkel, D.A. Loegering, J.W. McCall, R.L. Barker, In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule protein, *J. Immunol.* **144** (1990) 3166-3173.
- [15] K.M. Leiferman, S.J. Ackerman, H.A. Sampson, H.S. Haugen, P.Y. Venencie, G.J. Gleich, Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis: comparison with onchocerciasis, *N. Engl. J. Med.* **313** (1985) 282-285.
- [16] W.V. Filley, K.E. Holley, G.M. Kephart, G.J. Gleich, Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma, *Lancet* **2** (8288) (1982) 11-16.
- [17] P.G. Gibson, P.J. Manning, P.M. O'Byrne, A. Girgis-Gabardo, J. Dolovich, J.A. Denburg, F.E. Hargreave, Allergen-induced asthmatic responses. Relationship between increases in airway responsiveness and increases in circulating eosinophils, basophils, and their progenitors, *Am. Rev. Respir. Dis.* **143** (1991) 331-335.
- [18] A. Jörg, W.R. Henderson, R.C. Murphy, S.J. Klebanoff, Leukotriene generation by eosinophils, *J. Exp. Med.* **155** (1982) 390-402.
- [19] P.F. Weller, C.W. Lee, D.W. Foster, E.J. Corey, K.F. Austen, R.A. Lewis, Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C₄, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 7626-7630.
- [20] J.W. Weiss, J.M. Drazen, N. Coles, Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans, *Science* **216** (1982) 196-198.
- [21] T. Lee, D.J. Lenihan, B. Malone, L.L. Roddy, S.I. Wasserman, Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 5526-5530.
- [22] F.M. Cuss, C.M. Dixon, P.J. Barnes, Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man, *Lancet* **2** (8500) (1986) 189-192.
- [23] L.B. Martin, H. Kita, K.M. Leiferman, G.J. Gleich, Eosinophils in allergy: role in

- disease, degranulation, and cytokines, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **109** (1996) 207-215.
- [24] R.H. Gundel, L.G. Letts, G.J. Gleich, Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates, *J. Clin. Invest.* **87** (1991) 1470-1473.
- [25] E. Frigas, D.A. Loegering, G.J. Gleich, Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium, *Lab. Invest.* **42** (1980) 35-43.
- [26] R. Beasley, W.R. Roche, J.A. Roberts, S.T. Holgate, Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation, *Am. Rev. Respir. Dis.* **139** (1989) 806-817.
- [27] K. Takatsu, N. Harada, Y. Hara, Y. Takahama, G. Yamada, K. Dobashi, T. Hamaoka, Purification and physicochemical characterization of murine T cell replacing factor (TRF), *J. Immunol.* **134** (1985) 382-389.
- [28] M. Koike, K. Takatsu, IL-5 and its receptor: Which role do they play in the immune response?, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104** (1994) 1-9.
- [29] C.M.M. Williams, J.W. Coleman, Induced expression of mRNA for IL-5, IL-6, TNF- α , MIP-2 and IFN- γ in immunologically activated rat peritoneal mast cells: inhibition by dexamethasone and cyclosporin A, *Immunology* **86** (1995) 244-249.
- [30] S.L. Swain, R.W. Dutton, Production of a B cell growth-promoting activity, (DL) BCGF, from a cloned T cell line and its assay on the BCL1 B cell tumor, *J. Exp. Med.* **156** (1982) 1821-1834.
- [31] K. Takatsu, K. Tanaka, A. Tominaga, Y. Kumahara, T. Hamaoka, Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). III. Establishment of T cell hybrid clone continuously producing TRF and functional analysis of released TRF, *J. Immunol.* **125** (1980) 2646-2653.
- [32] N. Harada, Y. Kikuchi, A. Tominaga, S. Takaki, K. Takatsu, BCGFII activity on activated B cells of a purified murine T cell-replacing factor (TRF) from a T cell hybridoma (B151K12), *J. Immunol.* **134** (1985) 3944-3951.
- [33] C.J. Sanderson, A. O'Garra, D.J. Warren, G.G.B. Klaus, Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: Proposed name interleukin 4, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 437-440.
- [34] A. O'Garra, D.J. Warren, M. Holman, A.M. Popham, C.J. Sanderson, G.G.B. Klaus, Interleukin 4 (B-cell growth factor II/eosinophil differentiation factor) is a mitogen and differentiation factor for preactivated murine B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 5228-5232.
- [35] T. Kinashi, N. Harada, E. Severinson, T. Tanabe, P. Sideras, M. Konishi, C. Azuma, A. Tominaga, S. Bergstedt-Lindqvist, M. Takahashi, F. Matsuda, Y. Yaoita, K. Takatsu, T. Honjo, Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identify with B-cell growth factor II, *Nature* **324** (1986) 70-73.
- [36] Y. Yamaguchi, Y. Hayashi, Y. Sugama, Y. Miura, T. Kasahara, S. Kitamura, M. Torisu, S. Mita, A. Tominaga, K. Takatsu, T. Suda, Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor, *J. Exp. Med.* **167** (1988) 1737-1742.
- [37] Y. Yamaguchi, T. Suda, S. Ohta, K. Tominaga, Y. Miura, T. Kasahara, Analysis of the survival of mature human eosinophils: Interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils, *Blood* **78** (1991) 2542-2547.
- [38] S. Horie, G.J. Gleich, H. Kita, Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils, *J. Allergy Clin. Immunol.* **98** (1996) 371-381.
- [39] T. Fujisawa, R. Abu-Ghazaleh, H. Kita, C.J. Sanderson, G.J. Gleich, Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation, *J. Immunol.* **144** (1990) 642-646.
- [40] M. Humbert, C.J. Corrigan, P. Kimmitt, S.J. Till, A.B. Kay, S.R. Durham, Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156** (1997) 704-708.
- [41] Q. Hamid, M. Azzawi, S. Ying, R. Moqbel, A.J. Wardlaw, C.J. Corrigan, B. Bradley, S.R. Durham, J.V. Collins, P.K. Jeffery, D.J. Quint, A.B. Kay, Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma, *J. Clin. Invest.* **87** (1991) 1541-1546.
- [42] C.J. Corrigan, A.B. Kay, T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma, *Immunol. Today* **13** (1992) 501-507.

- [43] K. Kitagaki, S. Niwa, K. Hoshiko, H. Nagai, S. Hayashi, T. Totsuka, Augmentation of apoptosis in bronchial exuded rat eosinophils by cyclosporin A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222** (1996) 71-77.
- [44] A. Haczk, P. Macary, E.-B. Haddad, T.J. Huang, D.M. Kemeny, R. Moqbel, K.F. Chung, Expression of Th-2 cytokines interleukin-4 and -5 and of Th-1 cytokine interferon- γ in ovalbumin-exposed sensitized Brown-Norway rats, *Immunology* **88** (1996) 247-251.
- [45] D. Cypcar, R. Sorkness, J. Sedgwick, M. Nagata, J. Clough, M. Kaplan, R.F. Lemanske, Jr., Rat eosinophils: Isolation and characterization of superoxide production, *J. Leukoc. Biol.* **60** (1996) 101-105.
- [46] H. Niki, Y. Tominaga, M. Watanabe-Kobayashi, S. Mue, K. Ohuchi, Possible participation of cyclooxygenase-2 in the recurrence of allergic inflammation in rats, *Eur. J. Pharmacol.* **320** (1997) 193-200.
- [47] Y.Q. Xiao, J. Tanabe, T. Edamatsu, N. Hirasawa, S. Mue, K. Ohuchi, Possible participation of macrophage inflammatory protein 2 in neutrophil infiltration in allergic inflammation in rats, *Biochim. Biophys. Acta* **1361** (1997) 138-146.
- [48] S.L. Underwood, D. Raeburn, C. Lawrence, M. Foster, S. Webber, J.-A. Karlsson, RPR 106541, a novel, airways-selective glucocorticoid: Effects against antigen-induced CD4⁺T lymphocyte accumulation and cytokine gene expression in the Brown Norway rat lung, *Br. J. Pharmacol.* **122** (1997) 439-446.
- [49] T. Nittoh, M. Arai, R. Suzuki, A. Kitoh, M. Watanabe, S. Mue, K. Ohuchi, Increase in eosinophilic cell population in bone marrow of rats by immunization with *Ascaris suum* antigen, *Immunol. Invest.* **26** (1997) 439-451.
- [50] T. Nittoh, H. Fujimori, Y. Kozumi, K. Ishihara, S. Mue, K. Ohuchi, Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats, *Eur. J. Pharmacol.* **354** (1998) 73-81.
- [51] K. Überla, W. Li, Z. Qin, G. Richter, T. Raabe, T. Diamantstein, T. Blankenstein, The rat interleukin-5 gene: Characterization and expression by retroviral gene transfer and polymerase chain reaction, *Cytokine* **3** (1991) 72-81.
- [52] M. Watanabe, T. Nittoh, T. Suzuki, A. Kitoh, S. Mue, K. Ohuchi, Isolation and

- partial characterization of eosinophil granule proteins in rats - Eosinophil cationic protein and major basic protein, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108** (1995) 11-18.
- [53] C. Azuma, T. Tanabe, M. Konishi, T. Kinashi, T. Noma, F. Matsuda, Y. Yaoita, K. Takatsu, L. Hammarström, C.I.E. Smith, E. Severinson, T. Honjo, Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue, *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 9149-9158.
- [54] A.E.I. Proudfoot, D. Fattah, E.H. Kawashima, A. Bernard, P.T. Wingfield, Preparation and characterization of human interleukin-5 expressed in recombinant *Escherichia coli*, *Biochem. J.* **270** (1990) 357-361.
- [55] E. Ingley, R.L. Cutler, M.-C. Fung, C.J. Sanderson, I.G. Young, Production and purification of recombinant human interleukin-5 from yeast and baculovirus expression systems, *Eur. J. Biochem.* **196** (1991) 623-629.
- [56] D.Y. Kunimoto, K.C. Allison, C. Watson, T. Fuerst, G.D. Armstrong, W. Paul, W. Strober, High-level production of murine interleukin-5 (IL-5) utilizing recombinant baculovirus expression. Purification of the rIL-5 and its use assessing the biologic role of IL-5 glycosylation, *Cytokine* **3** (1991) 224-230.
- [57] A. Boodhoo, N.E.C. Duke, D. Kong, M.W.L. Ritzel, D.Y. Kunimoto, R.J. Read, Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of murine interleukin-5, *J. Mol. Biol.* **241** (1994) 269-272.
- [58] T. Takahashi, N. Yamaguchi, S. Mita, Y. Yamaguchi, T. Suda, A. Tominaga, Y. Kikuchi, Y. Miura, K. Takatsu, Structural comparison of murine T-cell (B151K12)-derived T-cell replacing factor (IL-5) with rIL-5: dimer formation is essential for the expression of biological activity, *Mol. Immunol.* **27** (1990) 911-920.
- [59] S. Mita, A. Tominaga, Y. Hitoshi, K. Sakamoto, T. Honjo, M. Akagi, Y. Kikuchi, N. Yamaguchi, K. Takatsu, Characterization of high-affinity receptors for interleukin 5 on interleukin 5-dependent cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 2311-2315.
- [60] A. Tominaga, S. Mita, Y. Kikuchi, Y. Hitoshi, K. Takatsu, S. Nishikawa, M. Ogawa, Establishment of IL-5-dependent early B cell lines by long-term bone marrow cultures, *Growth Factors* **1** (1989) 135-146.
- [61] A.G. Rolink, F. Melchers, R. Palacios, Monoclonal antibodies reactive with the mouse

- interleukin 5 receptor, *J. Exp. Med.* **169** (1989) 1693-1701.
- [62] S. Maeda, Expression of foreign genes in insect cells using baculovirus vectors, *in*: K. Maramorosch, A.H. McIntosh (Eds.), *Insect Cell Biotechnology*, CRC Press, Inc., Florida USA, 1994, pp. 1-13.
- [63] T. Ohkawa, K. Majima, S. Maeda, A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *J. Virol.* **68** (1994) 6619-6625.
- [64] T. Suzuki, T. Kanaya, H. Okazaki, K. Ogawa, A. Usami, H. Watanabe, K. Kadono-Okuda, M. Yamakawa, H. Sato, H. Mori, S. Takahashi, K. Oda, Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene, *J. Gen. Viol.* **78** (1997) 3073-3080.
- [65] C. Pierrot, C. Cocude, C. Cêtre, C. Godin, S. Lafitte, M. Capron, J. Khalife, Expression of rat interleukin-5 and generation of neutralizing antiserum: a comparative study of rat IL-5 produced in *Escherichia coli* and insect cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253** (1998) 756-760.
- [66] Y. Yamaguchi, T. Suda, J. Suda, M. Eguchi, Y. Miura, N. Harada, A. Tominaga, K. Takatsu, Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors, *J. Exp. Med.* **167** (1988) 43-56.
- [67] V.G. Gruart, M.-J. Truong, J. Plumas, M. Zandecki, J.P. Kusnierz, L. Prin, D. Vinatier, A. Capron, M. Capron, Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation, *Blood* **79** (1992) 2592-2597.
- [68] D. Shoham, E.B. David, L.A. Rozenszajn, Cytochemical and morphologic identification of macrophages and eosinophils in tissue cultures of normal human bone marrow, *Blood* **44** (1974) 221-233.
- [69] S. Sur, D.G. Glitz, H. Kita, S.M. Kujawa, E.A. Peterson, D.A. Weiler, G.M. Kephart, J.M. Wagner, T.J. George, G.J. Gleich, K.M. Leiferman, Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes, *J. Leukoc. Biol.* **63** (1998) 715-722.
- [70] T. Edamatsu, Y.Q. Xiao, J. Tanabe, S. Mue, K. Ohuchi, Induction of neutrophil chemotactic factor production by staurosporine in rat peritoneal neutrophils, *Br. J. Pharmacol.* **121** (1997) 1651-1658.
- [71] K. Ohuchi, M. Watanabe, K. Yoshizawa, S. Tsurufuji, H. Fujiki, M. Suganuma, T. Sugimura, L. Levine, Stimulation of prostaglandin E2 production by 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-type and non-TPA-type tumor promoters in macrophages and its inhibition by cycloheximide, *Biochim. Biophys. Acta* **834** (1985) 42-47.
- [72] H. Enokihara, S. Nagashima, T. Noma, H. Kajitani, H. Hamaguchi, K. Saito, S. Furusawa, H. Shishido, T. Honjo, Effect of human recombinant interleukin 5 and G-CSF on eosinophil colony formation, *Immunol. Lett.* **18** (1988) 73-76.
- [73] H. Ema, T. Suda, K. Nagayoshi, Y. Miura, C.I. Civin, H. Nakauchi, Target cells for granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5 in differentiation pathways of neutrophils and eosinophils, *Blood* **76** (1990) 1956-1961.
- [74] Y. Yamaguchi, S.J. Ackerman, N. Minegishi, M. Takiguchi, M. Yamamoto, T. Suda, Mechanisms of transcription in eosinophils: GATA-1, but not GATA-2, transactivates the promoter of the eosinophil granule major basic protein gene, *Blood* **91** (1998) 3447-3458.
- [75] D.-E. Zhang, P. Zhang, N.-D. Wang, C.J. Hetherington, G.J. Darlington, D.G. Tenen, Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein α -deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 569-574.
- [76] C. Müller, E. Kowenz-Leutz, S. Grieser-Ade, T. Graf, A. Leutz, NF-M (chicken C/EBP β) induces eosinophilic differentiation and apoptosis in a hematopoietic progenitor cell line, *EMBO J.* **14** (1995) 6127-6135.
- [77] M.E. Bates, P.J. Bertics, W.W. Busse, IL-5 activates a 45-kilodalton mitogen-activated protein (MAP) kinase and Jak-2 tyrosine kinase in human eosinophils, *J. Immunol.* **156** (1996) 711-718.
- [78] K. Pazdrak, D. Schreiber, P. Forsythe, L. Justement, R. Alam, The intracellular signal transduction mechanism of interleukin 5 in eosinophils: the involvement of Lyn tyrosine kinase and the Ras-Raf-1-MEK-Microtubule-associated protein kinase pathway, *J. Exp. Med.* **181** (1995) 1827-1834.

- [79] K. Pazdrak, B. Olszewska-Pazdrak, S. Stafford, R.P. Garofalo, R. Alam, Lyn, Jak2, and Raf-1 kinases are critical for the antiapoptotic effect of interleukin 5, whereas only Raf-1 kinase is essential for eosinophil activation and degranulation, *J. Exp. Med.* **188** (1998) 421-429.
- [80] N. Ogata, T. Kouro, A. Yamada, M. Koike, N. Hanai, T. Ishikawa, K. Takatsu, JAK2 and JAK1 constitutively associate with an interleukin-5 (IL-5) receptor α and β c subunit, respectively, and are activated upon IL-5 stimulation, *Blood* **91** (1998) 2264-2271.
- [81] K. Pazdrak, S. Stafford, R. Alam, The activation of the Jak-STAT 1 signaling pathway by IL-5 in eosinophils, *J. Immunol.* **155** (1995) 397-402.
- [82] N. Ogata, Y. Kikuchi, T. Kouro, M. Tomonaga, K. Takatsu, The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **114**(suppl. 1) (1997) 24-27.
- [83] P.J. Coffey, R.C. Schweizer, G.R. Dubois, T. Maikoe, J.-W.J. Lammers, L. Koenderman, Analysis of signal transduction pathways in human eosinophils activated by chemoattractants and the T-helper 2-derived cytokines interleukin-4 and interleukin-5, *Blood* **91** (1998) 2547-2557.
- [84] S. Miike, A. Nakao, M. Hiraguri, K. Kurasawa, Y. Saito, I. Iwamoto, Involvement of JAK2, but not PI 3-kinase/Akt and MAP kinase pathways, in anti-apoptotic signals of GM-CSF in human eosinophils, *J. Leukoc. Biol.* **65** (1999) 700-706.
- [85] M.A. Lindsay, E.-B. Haddad, J. Rousell, M.M. Teixeira, P.G. Hellewell, P.J. Barnes, M.A. Giembycz, Role of the mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases during leukotriene B₄-induced eosinophil activation, *J. Leukoc. Biol.* **64** (1998) 555-562.
- [86] T. Nakajima, S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto, S. Akira, Phosphorylation at threonine-235 by a *ras*-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) 2207-2211.
- [87] J.M. Woodcock, C.J. Bagley, A.F. Lopez, The functional basis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptor activa-

- tion, basic and clinical implications, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31** (1999) 1017-1025.
- [88] F.W. Quelle, N. Sato, B.A. Witthuhn, R.C. Inhorn, M. Eder, A. Miyajima, J.D. Griffin, J.N. Ihle, JAK2 associates with the β c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membraneproximal region, *Mol. Cell. Biol.* **14** (1994) 4335-4341.
- [89] M.F. Brizzi, M.G. Aronica, A. Rosso, G.P. Bagnara, Y. Yarden, L. Pegoraro, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 3562-3567.
- [90] Y. Li, B.F. Shen, C. Karanes, L. Sensenbrenner, B. Chen, Association between Lyn protein tyrosine kinase (p53/56lyn) and the beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptors in a GM-CSF-dependent human megakaryocytic leukemia cell line (M-07e), *J. Immunol.* **155** (1995) 2165-2174.
- [91] W.J. Leonard, J.J. O'Shea, Jaks and Stats: biological implications, *Annu. Rev. Immunol.* **16** (1998) 293-322.
- [92] T. Takeshita, T. Arita, M. Higuchi, H. Asano, K. Endo, H. Kuroda, N. Tanaka, K. Murata, N. Ishii, K. Sugamura, STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and *c-myc* induction, *Immunity* **6** (1997) 449-457.
- [93] J.M. Woodcock, C.J. Bagley, B. Zacharakis, A.F. Lopez, A single tyrosine residue in the membrane-proximal domain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin (IL)-3, and IL-5 receptor common β -chain is necessary and sufficient for high affinity binding and signaling by all three ligands, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 25999-26006.
- [94] T.B. Van Dijk, E. Caldenhoven, J.A.M. Raaijmakers, J.-W.J. Lammers, L. Koenderman, R.P. De Groot, Multiple tyrosine residues in the intracellular domain of the common β subunit of the interleukin 5 receptor are involved in activation of STAT5, *FEBS Lett.* **412** (1997) 161-164.
- [95] J. Bousquet, P. Chanez, J.Y. Lacoste, G. Barnéon, N. Ghanavian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Laforntaine, P. Godard, F.-B. Michel, Eosinophilic

- inflammation in asthma, *N. Engl. J. Med.* **323** (1990) 1033-1039.
- [96] T. Adachi, R. Alam, The mechanism of IL-5 signal transduction, *Am. J. Physiol.* **275** (1998) C623-C633.
- [97] P.C. Tai, L. Sun, C.J. Spry, Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro, *Clin. Exp. Immunol.* **85** (1991) 312-316.
- [98] K. Ochiai, M. Kagami, R. Matsumura, H. Tomioka, IL-5 but not interferon-gamma (IFN- γ) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of bcl-2 expression, *Clin. Exp. Immunol.* **107** (1997) 198-204.
- [99] T. Adachi, S. Stafford, S. Sur, R. Alam, A novel Lyn-binding peptide inhibitor blocks eosinophil differentiation, survival, and airway eosinophilic inflammation, *J. Immunol.* **163** (1999) 939-946.
- [100] M. Shalit, S. Sekhsaria, H.L. Malech, Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34⁺ cells by IL-5 and other growth factors, *Cell. Immunol.* **160** (1995) 50-57.
- [101] N. Hirasawa, K. Ohuchi, K. Kawarasaki, M. Watanabe, S. Tsurufuji, Occurrence of histamine-production-increasing factor in the post-anaphylactic phase of allergic inflammation, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **88** (1989) 386-393.
- [102] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162** (1987) 156-159.
- [103] S. Maeda, Gene transfer vectors of a baculovirus, *bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, and their use for expression of foreign genes in insect cells, in: J. Mitsuhashi (Ed.), *Invertebrate Cell System Applications*, CRC Press, Inc., Florida USA, 1989, pp. 167-181.
- [104] J. Kobayashi, S. Imanishi, H. Inoue, K. Ohsuye, K. Yamaichi, N. Tsuruoka, S. Tanaka, High level expression of a frog α -amidating enzyme, AE-II, in cultured cells and silkworm larvae using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus expression vector, *Cytotechnology* **8** (1992) 103-108.
- [105] H. Okazaki, T. Kanaya, S. Nishimura, K. Ogawa, H. Watanabe, Peroral inoculation of baculovirus vector to the silkworm, *Bombyx mori*, treated with a low temperature, *J.*

Seric. Sci. Jpn. **64** (1995) 504-508.

- [106] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227** (1970) 680-685.
- [107] Y. Kobayashi, T. Saheki, T. Shinozawa, Induction of PC12 cell death, apoptosis, by a sialoglycopeptide from bovine brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203** (1994) 1554-1559.
- [108] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* **139** (1991) 271-279.

発表論文リスト

1. **Preparation of recombinant rat interleukin-5 by baculovirus expression system and analysis of its biological activities**
K. Ishihara, I. Satoh, T. Nittoh, T. Kanaya, H. Okazaki, T. Suzuki,
T. Koyama, T. Sakamoto, T. Ide, K. Ohuchi
Biochim. Biophys. Acta **1451** (1999) 48-58.

2. **Generation of rat eosinophils by recombinant rat interleukin-5 in vitro and in vivo**
K. Ishihara, I. Satoh, S. Mue, K. Ohuchi
Biochim. Biophys. Acta, accepted (2000)

3. **Possible participation of a JAK2/STAT5 signaling pathway in recombinant rat interleukin-5-induced prolongation of rat eosinophil survival**
K. Ishihara, I. Satoh, S. Mue, K. Ohuchi, submitted (1999)

