

氏 名 (本籍) いし 石 ほら 原 けん 研 じ 治

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 270 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 12 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 論 文 題 目 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

(主 査)  
論 文 審 査 委 員 教 授 大 内 和 雄 教 授 榎 本 武 美  
教 授 永 沼 章

## 論文内容要旨

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いる。このようなアレルギー性炎症疾患では、T細胞、好酸球、および肥満細胞が病態形成に深く関わっていると考えられている。とりわけ、好酸球は骨髄、末梢血、および炎症部位で増加し、炎症部位に浸潤した好酸球は顆粒蛋白質を放出し、種々のケミカルメディエーターやサイトカインを産生することが報告されている。好酸球の特異顆粒中に存在する4つの塩基性の蛋白質 major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin, および eosinophil peroxidase は種々の細胞に対して障害活性を持つこと、また、MBP がアトピー性皮膚炎患者の病変部位、および気管支喘息患者の気管支粘膜中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が報告されている。従って、好酸球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ている。

Interleukin-5 (IL-5) は、分子量約13kDa 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、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、マウスB細胞の増殖を誘導する因子 (B-cell growth factor II:BCGF-II), 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), 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) として報告された。1986年に TRF の 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。ヒトおよびマウスの 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、好酸球から活性酸素の放出を誘導する作用、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-5mRNA 発現量は、病気の重症度や気管支粘膜中の浸潤好酸球数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患者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性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明らかではなく、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、ラット IL-5cDNA を IL-5 依存性マウスB細胞株 T88-M細胞および B13細胞に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 活性を持つことが間接的に証明された。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、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。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することにより、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を明らかにすることを目的とした。

すなわち、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、4 時間後に採取した腹腔浸潤細胞より RT-PCR 法を用いてラット IL-5cDNA をクローニングし、ラット IL-5cDNA を挿入したバキュロウイルスをカイコ幼虫に感染させ、recombinant ラット IL-5 をカイコ幼虫の体液中に発現させた。発現された recombinant ラット IL-5 は陰イオン交換クロマトグラフィーおよび疎水クロマトグラフィーによって95.5%まで精製し、精製した recombinant ラット IL-5 を抗マウス IL-5 抗体を用いて Western blot 法により検出した結果、recombinant ラット IL-5 は活性型である 2 量体を形成していることが明らかになった。次に、recombinant ラット IL-5 の生物活性について解析した。その結果、recombinant ラット IL-5 は IL-5 依存性マウス B 細胞株 T88-M 細胞の増殖を誘導し、この増殖は抗マウス IL-5 抗体によって抑制された。また、メチルセルロース法を用いてラット骨髓細胞を recombinant ラット IL-5 存在下で 6 日間培養した結果、好酸球のコロニーが形成された。さらに、ラット腹腔から採取して精製した好酸球を recombinant ラット IL-5 存在下で培養すると、好酸球の生存率の低下が抑制された。従って、recombinant ラット IL-5 は、これまで間接的に証明されていたようにマウス B 細胞に対して BCGF-II 活性を示すことが証明された。また、recombinant ラット IL-5 は好酸球前駆細胞に対して EDF 活性を示すこと、および成熟好酸球に対して好酸球生存延長活性を示すことが明らかになった（第一章）。

Recombinant ラット IL-5 はラット骨髓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メチルセルロース法により明らかになった（第一章）ことから、*in vivo* においても、ラット IL-5 は骨髓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、骨髓内においては、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。そこで、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、ラットの骨髓細胞を各種濃度の recombinant ラット IL-5 を含む液体培地中で培養することにより、骨髓細胞中の相互作用が起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。その結果、recombinant ラット IL-5 存在下でラット骨髓細胞を培養すると、好酸球数は培養日数および recombinant ラット IL-5 の濃度に依存して増加した。培養開始 6 日後の骨髓細胞中に占める好酸球数の割合は90%以上であった。また、抗ラット MBP 抗体を用いて Western blot 法により培養骨髓細胞中の MBP 量を検出した結果、骨髓細胞中の MBP 量は recombinant ラット IL-5 によって増加した。さらに、ラット尾静脈から10 pmol/kgの投与量で recombinant ラット IL-5 を12時間おきに6日間投与した結果、末梢白血球および骨髓細胞中の好酸球数の割合が増加した。これらの結果から、recombinant ラット IL-5は骨髓細胞の培養系、および *in vivo*

において EDF 活性を示すことが明らかになり、ラット IL-5 の EDF 活性は好酸球増多に関与していることが示唆された (第二章)。

IL-5 レセプターは、 $\alpha$ 鎖、および IL-3 や GM-CSF のレセプターと共通の  $\beta$ 鎖 (common  $\beta$ 鎖:  $\beta c$ 鎖) の 2 つのサブユニットから構成される。IL-5 が IL-5 レセプターに結合すると  $\beta c$ 鎖に会合している JAK 2, Fes, および Lyn などのチロシンキナーゼが速やかに活性化され、JAK 1, JAK 2, STAT 1, および STAT 5 などを介する JAK/STAT シグナル伝達経路, あるいは Ras, Raf-1, MEK, および p44/42MAP キナーゼを介する p44/42MAP キナーゼシグナル伝達経路などを活性化することが報告され、ヒト 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。一方、ヒト IL-5 によるヒト好酸球の生存延長誘導作用には JAK 2 の活性化, mRNA の合成, および蛋白質合成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。そこで、recombinant ラット IL-5 によるラット好酸球の生存延長作用機序について、特に細胞内シグナル伝達経路の観点から解析した。ラット腹腔から採取して精製した好酸球を recombinant ラット IL-5 存在下で培養した結果、p44/42MAP キナーゼおよび STAT 5 のリン酸化が誘導され、それぞれ MEK 1 阻害薬 PD98059 および JAK 2 阻害薬 AG490 によって抑制された。また、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、その作用は蛋白質合成阻害薬 cycloheximide, RNA 合成阻害薬 actinomycin D, チロシンキナーゼ阻害薬 herbimycin A, および JAK 2 阻害薬 AG490 によって抑制され、MEK 1 阻害薬 PD98059 では抑制されないことが明らかになった。これらの結果から、recombinant ラット IL-5 は JAK 2 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 キナーゼではなく JAK 2/STAT 5 が関与していることが示唆された (第三章)。

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、好酸球増多因子としてのラット IL-5 の生物活性に着目して解析した結果、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。

## 審査結果の要旨

気管支喘息などのアレルギー性炎症のモデル動物として活用されているラットにおいて、ラット interleukin-5 (IL-5) が好酸球の増多に実際に関与しているかどうか明らかにされていなかった。本研究は、recombinant ラット IL-5 を作製し、ラット IL-5 が好酸球の増多に関与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病態モデル動物としてラットが活用できる動物種であるかどうかを明らかにすることを目指したものである。

まず、*Ascaris suum* extract を抗原として感作したラットの腹腔内に抗原液を注入して腹腔に浸潤した細胞からラット IL-5 cDNA をクローニングし、recombinant ラット IL-5 を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て精製した。こうして調製した recombinant ラット IL-5 には、B細胞の増殖を誘導する活性 (B-cell growth factor II 活性)、ラット好酸球前駆細胞から成熟好酸球への分化・増殖を誘導する活性 (eosinophil differentiation factor 活性)、および成熟好酸球の生存延長活性があることを明らかにした。また、ラットの尾静脈から recombinant ラット IL-5 を投与することにより、*in vivo* においても、recombinant ラット IL-5 には末梢血白血球中および骨髓細胞中の好酸球数の割合を増加させる作用があることを明らかにし、ラット IL-5 が生体内において好酸球の産生に関与していることを示した。さらに、recombinant ラット IL-5 による成熟好酸球の生存延長の誘導の作用機序について解析し、recombinant ラット IL-5 は、ラット成熟好酸球のアポトーシスを抑制することにより好酸球の生存を延長させ、その作用は p44/42MAP kinase シグナル伝達経路ではなく、JAK 2 /STAT 5 シグナル伝達経路を介して何らかの蛋白質合成を誘導するためであることを示唆した。

Recombinant ラット IL-5 はじめて標品として作製することに成功した功績は大きく、これを用いてラット IL-5 がラット好酸球に対して EDF 活性および好酸球生存延長活性を持つことを明らかにし、ラットにおいてもヒトと同様に IL-5 が好酸球増多因子として作用することを示すことができた。すなわち、IL-5 が関与することによる好酸球増多を伴うアレルギー性炎症の病態モデル動物として、ラットを活用することができることを明らかにした。本研究成果により、アレルギー性炎症における IL-5 と好酸球の役割について、ラットを病態モデル動物として活用し、さらに詳細な解析を行うことが可能になった。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。