

IL-6 阻害剤の研究

保 斎 川 藤 貴 司
二 鈴 木 研 輔 浩
鈴 木 木

A Research on Inhibitor of Interleukin-6

Kiyoshi YASUKAWA
Takashi SAITO
Kensuke FUTATSUGI
Hiroshi SUZUKI

Interleukin-6 (IL-6) is a key molecule in the immune system, acute phase reaction and hematopoiesis. For the patients suffering from rheumatoid arthritis or AIDS, aberrant production of IL-6 has been shown to be pathogenetically related to multiple myeloma and some autoimmune diseases, suggesting possible clinical uses of inhibitors of IL-6 for the treatment of these diseases.

We have conducted the extensive researches on the inhibitors of IL-6; the genetically engineered soluble human IL-6 receptor, modified soluble human IL-6 receptor, antibodies to human IL-6 receptor and genetically engineered soluble human gp 130 have been prepared and their effects to inhibit IL-6 activity evaluated. Some of anti-human IL-6 receptor antibodies have been found to inhibit effectively the IL-6 activity.

1. はじめに

インターフェロン α , β , γ , CSF 類, インターロイキン 1~11, エリスロポイエチン等は生体中に存在するサイトカインと呼ばれる微量タンパク質で、細胞膜上の受容体（レセプター）タンパク質に結合することにより、種々の重要な生理活性（細胞が増殖する等）を担っている。

遺伝子工学の進歩により、これらサイトカインやレセプターの組み換え体（リコンビナント）蛋白質が大量に生産できるようになった。現在、サイトカインやレセプターの、診断薬や医薬としての開発がさかんに行われている。すでにインターフェロンがB型肝炎の治療薬として、エリスロポイエチンが造血剤として認可された。

インターロイキン-6 (IL-6)¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ は生体内で、Bリシンパ球には抗体の產生⁶⁾、骨髄細胞には血小板への分化⁷⁾⁸⁾、肝臓細胞には急性期タンパク質の產生等⁹⁾を誘導する。医薬への応用としては、癌の放射線治療の副作用として起こる血小板減少に対して有用であると考えられる。一方、ミエローマ（骨髄性白血病）では IL-6 の過剰产生が病気の原因であること¹⁰⁾、リューマチ等の自己免疫疾患では IL-6 の過剰产生が病状と深く関係している¹¹⁾ことが示された。したがって IL-6 の作用を阻害する薬剤は、これらの疾患の治療薬として期待される。なお、ミエローマやリューマチは何らかの原因（例えばウイルス感染）で IL-6 が過剰产生になるのであり、IL-6 を投与しすぎるとミエローマや自己免疫疾患になるというわけではない。また IL-6 は、上記のような種

々の生理活性を担っているが、これらは他のサイトカインでも代替できると考えられるので、IL-6 阻害剤を投与すると抗体産生ができなくなるというわけではない。

我々は IL-6 阻害剤の研究を行ってきた。これまでに

- 1) 可溶性 IL-6 レセプター,
- 2) 変異型可溶性 IL-6 レセプター,
- 3) IL-6 レセプターに対する抗体,
- 4) 可溶性 gp130
- 5) gp130 に対する抗体

をそれぞれ IL-6 阻害剤として適当かどうかを検討してきた結果、

- i) 可溶性 IL-6 レセプターと
- ii) 変異型可溶性 IL-6 レセプターについては不適当であること、
- iii) IL-6 レセプターに対する抗体が適当であることを見いだした。
- iv) 可溶性 gp130 と
- v) gp130 に対する抗体は検討中である。我々の IL-6 阻害剤の研究の流れを以下にまとめてみた。

2. ヒト IL-6 の遺伝子工学的生産

IL-6 の阻害剤を研究するためには、大量のリコンビナントヒト IL-6 が必要である。我々は、ヒト IL-6 を大腸菌で生産することに成功した¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。

まず IL-6 を大腸菌で発現させるためのプラスミド pGBS-4 を作製した (Fig. 1)。pGBS4 は、trp プロモーターの下流に、開始コドン ATG、及び、hGH ポリペプチド、トロンビン認識配列 (Pro-Arg)、IL-6 をコードする塩基配列が続く。pGBS4 からは IL-6 が hGH (ヒト成長ホルモン) との融合タンパク質として発現され、配列特異的エンドペプチダーゼであるトロンビンにより、hGH 由来のポリペプチドと IL-6 に分離されるようにデザインされている。

次に大量培養を行った。pGBS-4 で形質転換された RB791 株を 15 リットルファーメンターを用いて LB-Amp 培地で培養し、600 nm の吸収が 2~3 に達したところで、IAA (インドールアクリル酸) を加え、6 時間後に大腸菌を集めた。

菌体からの IL-6 の精製、活性の回復は以下のように行った。菌体は、超音波破碎処理後、8 M 尿素で可溶化し、透析で尿素を 1 M まで落としてから、トロンビンで切断した。処理物は 6 M 塩酸グアニジンで変性後、透析で塩酸グアニジンを除き、リフォールディングを行った。さらに硫安分画を行い、最終的に SDS-PAGE

で均一な IL-6 を得た (Fig. 2)。

精製した IL-6 は天然の IL-6 と同一の生物活性を示

Ile Leu Ile Glu Gly Arg Pro Arg Ala Pro Val Pro Pro
G ATC CTC ATC GAA GGT CGT CCG CGT GCT CCG GTT CCG
GAG TAG CTT CCA GCA GGC GCA CGA GGC CAA GGC GGT CC

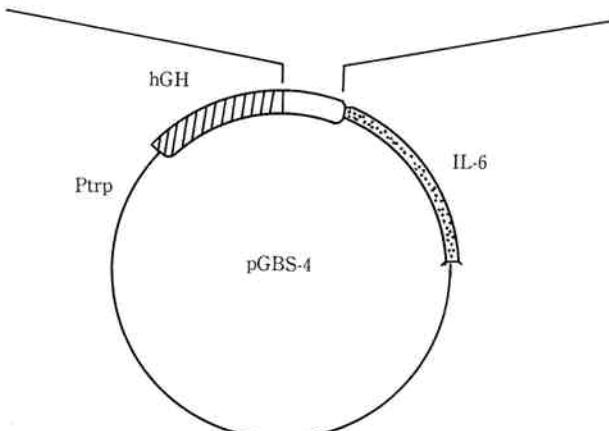


Fig. 1. Structure of pGBS-4

The shaded region represents the EcoR II-BamH I fragment of pBSF-2.38 (Hirano et al., 1986) containing IL-6 cDNA. The arrow indicates the cleavage site for thrombin, and the underling shows the thrombin site. The open region represents that derived from synthetic oligonucleotide.

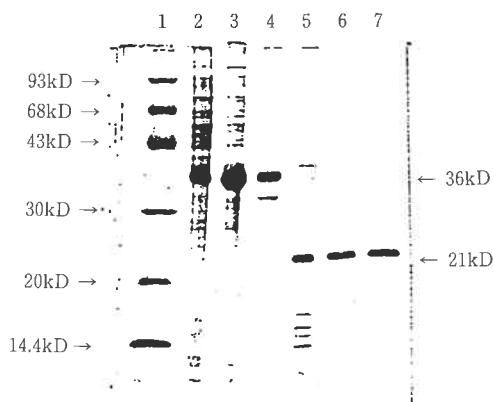


Fig. 2. SDS-PAGE analysis

The protein was analyzed by electrophoresis on a 0.1% SDS/15% polyacrylamide gel under reducing condition. Mw (kDa) of standards are shown to the left. Lane 1, marker; lane 2, total proteins obtained from *E. coli* RB791 transformed with pGBS-4; lane 3, the centrifuged pellet after homogenization; lane 4, refolded extract by urea; lane 5, thrombin treated extract; lane 6, refolded extract by guanidine; lane 7, the purified IL-6 after ammonium sulfate fractionation.

した。

3. 可溶性ヒト IL-6 レセプターの遺伝子工学的生産

IL-6 は、細胞膜上の IL-6 レセプターと結合することにより、シグナルを伝達すると考えられる。したがって細胞膜結合領域及び細胞内領域の欠失した可溶性 IL-6 レセプターは、IL-6 との結合能を保持していれば、細胞膜上の IL-6 レセプターと結合する IL-6 の数を減少させ、最終的に IL-6 作用を阻害することが期待される (Fig. 3)。実際、可溶性レセプターによる阻害が IL-1 や IL-4 で示されている。我々は、可能性ヒト IL-6 レセプターを CHO 細胞で生産することに成功した¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。

最初に CHO 細胞での可能性ヒト IL-6 レセプター発現用プラスミド pECEdhfr344 を以下の手順で作製した。まず、プラスミド pBSF2R. 236¹⁸⁾ を Sph I により切断して、IL-6 レセプター N 末端側の 402 個のアミノ酸をコードする部分を含む cDNA 断片を得た。これを M13mp18 に挿入した後、オリゴヌクレオチド 5' ATATTCTCTAGAGAGATTCT 3' を用いて、部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、345 番目のアミノ酸をコードする DNA を終止コドンに変換し、mp18-344 を作製した。次に、SV40 初期プロモーター及び後期プロモーターを有するプラスミド pECE¹⁹⁾ の Pvu II 部位に pSV2-dhfr²⁰⁾ の dhfr 遺伝子を挿入し、pECEdhfr を作製した。これを HindIII 及び Sal I により切断し、mp18-344 2 本鎖 DNA の HindIII-Sal I 断片 (1200 bp) を挿入し、pECEdhfr344 を作製した (Fig. 4)。

次に可溶性ヒト IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株を以下の手順で樹立した。pECEdhfr344 を Chen らの方法²¹⁾ により、dhfr 遺伝子欠損 CHO 細胞株 DXB-

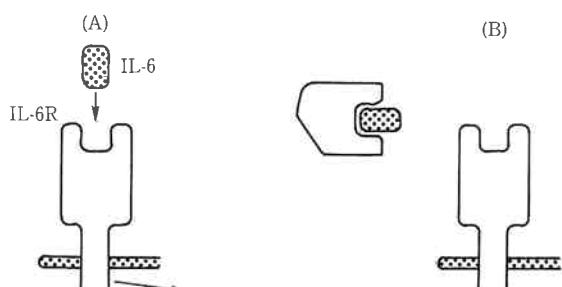


Fig. 3 (A) IL-6 binds to IL-6 receptor and mediates its function.
(B) sIL-6R inhibits the function of IL-6

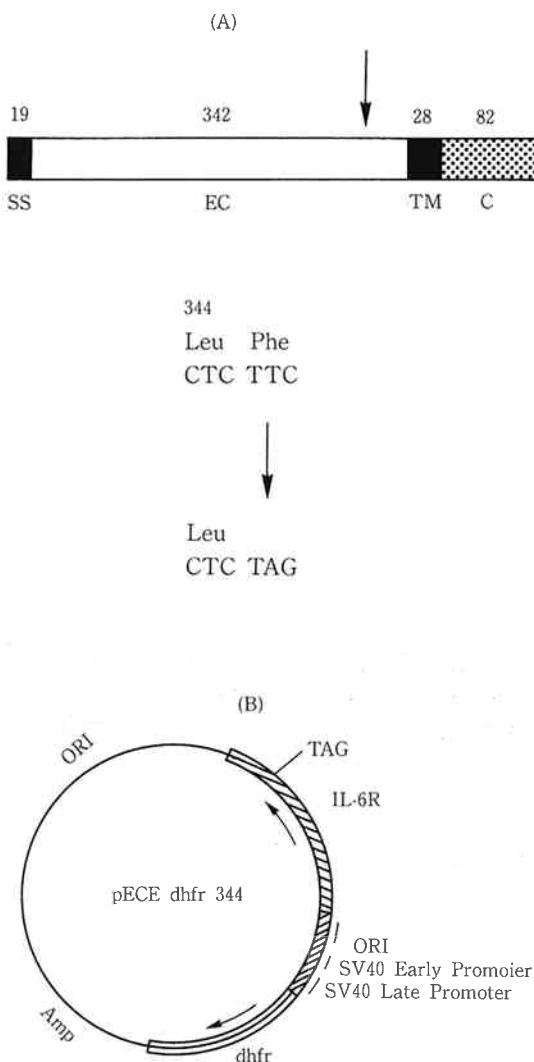


Fig. 4 (A) Insertion of stop codon into human IL-6R cDNA.
(B) Structure of pECEdhfr344.

11²²⁾ に導入し、メソトレキセート (MTX) でスクリーニングをした。培養上清中の可溶性ヒト IL-6 レセプターの検出は、抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 MT18²³⁾ と ¹²⁵I 標識の IL-6 のサンドイッチ検出法を用いた。最終的に可溶性ヒト IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株 5E27 を樹立した。

現在、可溶性ヒト IL-6 レセプターを下記の方法で大量培養している。5E27 を 10 層式細胞培養装置セルファクトリー (Nunc 社) を用いて、10% 牛胎児血清入 α-MEM 培地 2 リットルで密な状態まで培養後、培地を除き、PBS で洗浄後、MEM non-essential amino acid solution (シグマ社) 及び L-グルタミン (シグマ社) を含むエスクロン SF-0 無血清培地 (三光純薬) 2 リットルに置換し培養した。3 日後、培養上清を回収し、新たな 2 リットルの SF-0 培地でさらに 3 日間培養

した。こうして計4リットルの培養上清を得た。

可溶性ヒトIL-6レセプターの精製は、カラムクロマトグラフィーを用い、以下のように行った。まず、遠心分離機で6000 rpm、10分間遠心し沈殿を除き、0.22 μmのフィルターで沪過した。沪過液を排除分子量1万の中空糸用限外沪過システム(東ソー)を用いて、500 mlまで濃縮した。濃縮液は、TSKgel Blue 5PW(東ソー)にかけ、10 mM Tris-HCl(pH 8.0)存在下で、3M KCl、0M KSCNから0M KCl、3M KSCNの塩濃度勾配により溶出した。活性画分を集め、10 mM Tris-HClに透析した後、TSKgel DEAE 5PW(東ソー)にかけ、10 mM Tris-HCl(pH 8.0)存在下で、0M NaClから1M NaClの塩濃度勾配により溶出した。再び活性画分を集め、濃縮及び10 mMリン酸バッファ(pH 7.0)に透析後、TSKgel G3000SW(東ソー)にかけた。活性画分を集めることにより、可溶性ヒトIL-6レセプター精製品を得た。Fig. 5はBlue 5PWカラムクロマトグ

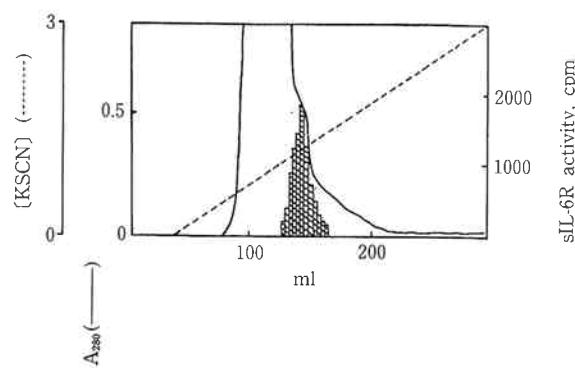


Fig. 5 Affinity HPLC pattern of concentrated serum-free culture medium of 5E27 cells.

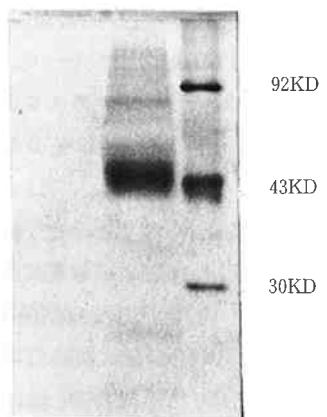


Fig. 6 SDS-PAGE of purified sIL-6R.

ラフィーの溶出パターンを、Fig. 6は可溶性ヒトIL-6レセプター精製品のSDS-PAGEのパターンを示す。

4. 可溶性ヒトIL-6レセプターのIL-6増強効果、及び第2のレセプターgp130の発見

IL-6のシグナル伝達システムのモデルとしてFig. 3が当時受け入れられており、可溶性ヒトIL-6レセプターはIL-6作用を阻害すると予想された。ところが、実際に評価してみると、可溶性ヒトIL-6レセプターはIL-6作用を阻害するどころか、IL-6存在下で逆にIL-6作用を増強することがわかった。そして可溶性ヒトIL-6レセプターを用いた種々の研究の結果より、第2のレセプターgp130(糖タンパク質で見かけ上の分子量が13万という意味)の存在が発見され²⁴⁾²⁵⁾、IL-6のシグナル伝達システムの新たなモデルとして新たにFig. 7が提唱されるようになった。可溶性ヒトIL-6レセプターがIL-6作用を増強することは、以下の実験により示された。マウス白血病細胞株M1²⁶⁾は、IL-6により分化が誘導され、増殖が阻害されることが知られている²⁷⁾。M1細胞(10⁵細胞/ml, 0.2 ml/well)を20 ng/mlのIL-6存在下、あるいは非存在下で、種々の

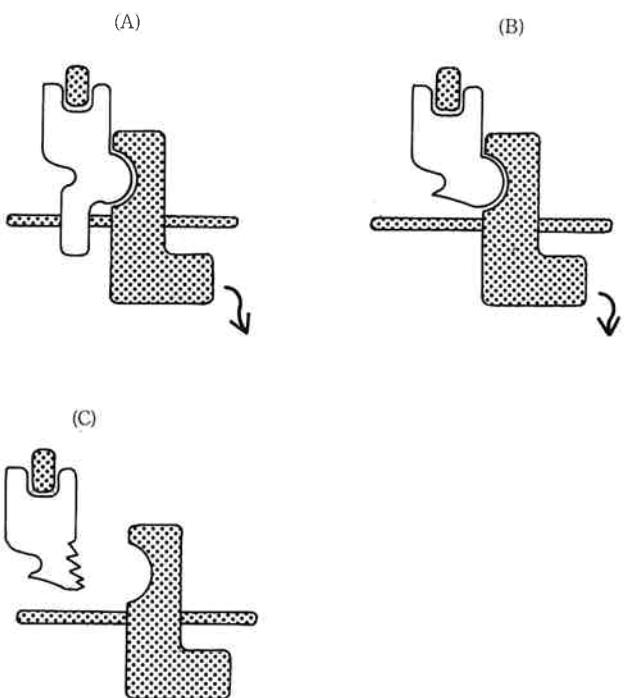


Fig. 7 (A) IL-6-bound-IL-6 receptor associates gp130 and mediates its function.
(B) IL-6-bound-soluble IL-6 receptor associates gp130 and mediates its function.
(C) The mutant of sIL-6R inhibits the function of IL-6.

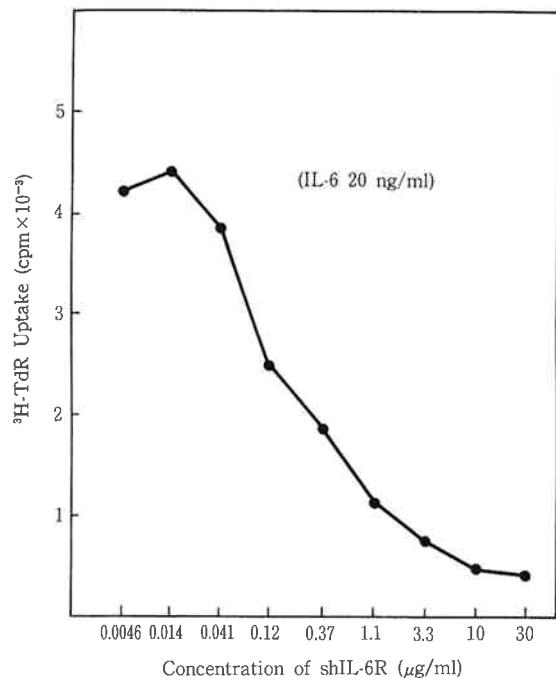


Fig. 8 Agonistic effect of shIL-6R in IL-6-mediated growth inhibitor of M1 cells.

濃度の可溶性ヒト IL-6 レセプターを加えて培養した。培養開始60~70時間後にトリチウムチミジン(750 nCi/well)をパルス処理し、その後細胞を集め取り込まれた放射能を測定した。Fig. 8 に示されるように、IL-6 存在下で、可溶性ヒト IL-6 レセプターは、IL-6 作用を増強する（この場合は細胞の増殖を阻害する）ことがわかった。このような可溶性ヒト IL-6 レセプターによる IL-6 増強効果は、抗体産生誘導や骨髄細胞増殖の系でも観察された。

5. IL-6 作用を阻害する変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターの作製の試み

可溶性ヒト IL-6 レセプターは IL-6 非存在下では gp130 と結合しない。しかし、Fig. 7 に示すように可溶性ヒト IL-6 レセプターは、IL-6 存在下では IL-6 と結合後、一部構造が変わり、gp130 と結合できるようになる。したがって Fig. 7 に示すように、可能性ヒト IL-6 レセプターに1~数個のアミノ酸残基の変異を導入し、IL-6 との結合能を保持し、IL-6 と結合後 gp130 と結合できないような変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターを作製できれば、IL-6 阻害作用を有することが期待できる。我々は、遺伝子レベルで変異を導入し、1~2個のアミノ酸残基の置換した、あるいは一定の部分ペプチドが欠失した変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターを52種類作製した。そしてそれを発現させ、IL-6 阻害効果を調べたが、IL-6 阻害効果を有するものはな

Table 1 Summary of soluble IL-6 receptor mutants.

No.	Mutation	Binding to IL-6	Inhibition for IL-6
d 30, 254	—	—	—
d 30, 233	—	—	—
d 30, 147	—	—	—
d 147, 161	—	—	—
d 177, 184	—	—	—
d 194, 204	—	—	—
d 204, 210	—	—	—
d 216, 225	—	—	—
d 227, 239	—	—	—
d 236, 243	—	—	—
d 248, 255	—	—	—
d 270, 274	—	—	—
dex3	d 116, 148	—	—
dex4	d 160, 212	—	—
dex5	d 220, 267	—	—
33	113V P > G T	+	—
35	125S P > I S	—	—
14	129D V > K L	+	—
36	135G P > S T	+	—
15	145K A > R P	+	—
16	153 F > L	+	—
17	160D F > E L	+	—
18	162Q E > L Q	+	—
39	169Q E > L Q	+	—
19	174 F > I	+	—
20	185S S > R P	+	—
21	201K F > H L	+	—
42	201K F > E L	+	—
43	204K T > R S	+	—
22	212G I > E F	+	—
23	220A N > V D	+	—
24	232 R > S	+	—
46	240D P > N A	—	—
47	247S F > A V	—	—
25	250R L > S I	—	—
48	254E L > V H	—	—
26	254 Q > A	+	—
27	260Q R > A G	+	—
28	263K T > N A	—	—
29	271K D > R Y	+	—
49	274Q H > L Q	—	—
50	278V I > G H	—	—
51	281D A > V D	—	—
52	288H V > Y L	+	—
30	291 Q > K	—	—
54	293R A > G N	—	—
55	297E F > A I	—	—
56	301G E > V D	—	—
31	305E W > D R	—	—
57	308P E > L Q	+	—
58	313T P > K L	—	—
32	321S P > N S	+	—

く (Table 1), この方法を断念した。

変異型可溶性ヒト IL-6 レセプター遺伝子は以下の手順で作製した。mp18-344 (第3章参照) に、部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、種々のアミノ酸残基置換あるいは一定の部分ペプチドの欠失に対応する DNA レベルでの変異をそれぞれ導入した。次に変異型可溶性ヒト IL-6 レセプター遺伝子を動物細胞発現用ベクター pSVL (ファルマシア) に挿入し、変異型可溶性ヒト IL-6 レセプター発現ベクターをそれぞれ作製した。

発現及び評価は以下の手順で行った。まず、上記ベクターを COS1 細胞に導入し、3日後培養上清を集めめた。培養上清中の変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターの検出は、抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 MT18²³⁾ を用いた免疫沈降により行った。また、変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターの IL-6 との結合能の評価は、MT18 と ¹²⁵I 標識 IL-6 のサンドイッチ検出法により、IL-6 作用の阻害能の評価は、M1 細胞の分化誘導 (第4章参照) に対する阻害効果の検討により、それぞれを行った。

Table 1 に示すように、52種類の変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターのうち、30種類について発現が確認され、そのうちの22種類について IL-6 との結合能が確認された。しかしながら、IL-6 阻害効果をもつものはなかった。

IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターが作製できなかった原因として2つ考えている。ひとつは、IL-6 レセプターの IL-6 結合部位と gp130 結合部位が極めて近く、アミノ酸残基の置換では分離できない場合である。この場合は、この方法では IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターは作製できないことになる。ふたつめは、IL-6 レセプターの IL-6 結合部位と gp130 結合部位は充分離れており、アミノ酸残基の置換で分離できるが、作製したものの中に IL-6 阻害効果をもつものがなかった場合である。この場合は、さらに多くの変異型を作製することにより IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターに巡り合えると考えられる。また現在進行中の IL-6 や IL-6 レセプターの高次構造に関する研究より得られる知見が、IL-6 阻害効果をもつ変異型可能性ヒト IL-6 レセプターの作製に、今後重要になるであろう。

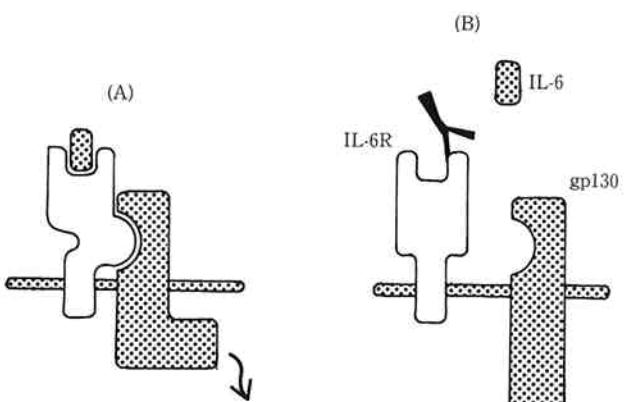


Fig. 9 (A) IL-6-bound-IL-6 receptor associates gp130 and mediates its function.
(B) Anti-IL-6 receptor antibody inhibits the function of IL-6.

6. IL-6 作用を阻害する抗ヒト IL-6 レセプター抗体の作製

可溶性ヒト IL-6 レセプターや変異型可溶性ヒト IL-6 レセプターによる IL-6 作用の阻害が未達成に終わった。次に我々は、Fig. 9 に示されるように、抗ヒト IL-6 レセプター抗体による IL-6 作用の阻害を試みた。

抗体を IL-6 阻害剤として開発する際の問題点として、抗原性と阻害効果が低いことが考えられる。前者は、ヒト由来抗ヒト IL-6 レセプター抗体が原理上作製できず、マウス等の異種動物由来になると、後者は、抗原と抗体の結合定数は、リガンドとレセプターの結合定数より高いことに起因する。また、前者は、V領域がマウスでC領域がヒトのキメラ抗体を作製すること、後者は、多くのモノクローナル抗体をスクリーニングし、IL-6 阻害効果の強い抗体をスクリーニングすることで解決していくしかない。なおリコンビナントヒト IL-6 をマウスに免疫して得られた抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体のいくつか²⁸⁾²⁹⁾、及び、細胞膜をマウスに免疫して得られた抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体 PM1²³⁾ が IL-6 作用を *in vitro* で阻害することがすでに知られていた。我々は、可溶性ヒト IL-6 レセプター (第3章参照) をマウスに免疫し、多数のクローンをスクリーニングし、IL-6 阻害効果の強いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを12株樹立し、5つのグループに分類した。

可溶性 IL-6 レセプターを免疫した Balb/c マウスの脾細胞とミエローマ株 P3U1 を20:1の割合で融合し、HAT 培地で培養した。まず、培養上清中に抗原である

可溶性 IL-6 レセプターを認識する抗体が產生されているかどうかを調べた結果、2400ウエル中、240ウエルを選抜した。次に、培養上清中の抗可溶性ヒト IL-6 レセプター抗体が IL-6 と IL-6 レセプターの結合を阻害するかどうかを、抗ヒト IL-6 レセプター抗体 MT18 と ¹²⁵I 標識 IL-6 による可溶性ヒト IL-6 レセプターのサンドイッチの検出に対する阻害効果により調べた結果、240ウエル中、36ウエルを選抜した。続いて、36ウエルをそれぞれ限界希釈した結果、41クローンを樹立した。各クローンの產生する抗体のアイソタイプは、IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM がそれぞれ、36, 2, 1, 2 クローンであった。続いて、培養上清中の抗可溶性ヒト IL-6 レセプター抗体の IL-6 作用阻害効果を、B 細胞株 CESS に対する抗体產生誘導の阻害効果、及び白血病細胞株 ILKM3 に対する増殖誘導の阻害効果により比較検討結果、41クローン中21クローンを選抜した。この中には、すでに樹立されている抗ヒト IL-6 レセプター抗体產生ハイブリドーマ PM1 を含む。選抜したハイブリドーマは、それぞれマウスに移植して、腹水から抗体を精製した。最後に、精製抗体の IL-6 作用阻害効果を、白血病細胞株 MM-S1 に対する増殖誘導の阻害効果により比較検討結果、21クローン中12クローンを選抜した。選抜した12種からあらゆる2種の組合せによるサンドイッチ ELISA で可溶性ヒト IL-6 レセプターが検出できるかどうかをそれぞれ調べた結果、12種の抗体を5つのグループに分類した。(Group I : PM1, 4-16, 5-14, 21-7; Group II : 64-7, 52-4; Group III : 146-15, 169-12, 169-26; Group IV : 12-20, 10-26; Group V : 1-21)

7. 可溶性マウス IL-6 レセプターの遺伝子工学的生産、及び抗マウス IL-6 レセプター抗体の作製

抗ヒト IL-6 レセプター抗体を IL-6 阻害剤として開発していく過程で、ヒトに対するシミュレーションモデルとして、抗マウス IL-6 レセプター抗体を自己免疫疾患マウス等に投与してその効果を調べる研究が重要になる。我々は、可溶性マウス IL-6 レセプターを遺伝子工学的に生産し、それをラットやモルモットに免疫し、抗マウス IL-6 レセプター抗体を作製³⁰⁾³¹⁾した。

最初に CHO 細胞での可溶性マウス IL-6 レセプター発現用プラスミド pdRm324 を以下の手順で作製した。まず、プラスミド Lambda P1³²⁾を EcoRI により切断して、マウス IL-6 レセプターをコードする 1470 pb

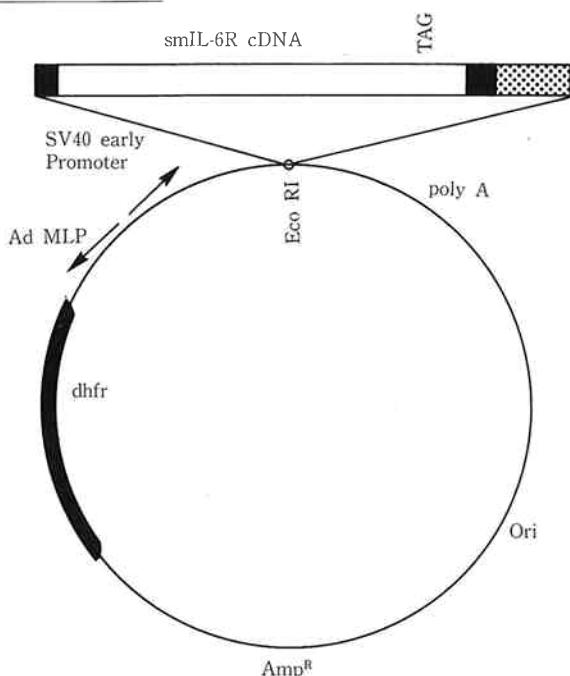


Fig. 10 Structure of pdRsmIL6R324.

の cDNA 断片を得た。これを M13mp18 に挿入した後、オリゴヌクレオチド 5' AATCCTCTAGAACCCCA 3' を用いて、部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、325番目のアミノ酸をコードする DNA を終止コドンに変換し、mp18-m324 を作製した。次に pAdD26SVpA 由来の発ベクターである pdR に、mp18-m324 の EcoRI-EcoRI 断片を挿入し、pdRsmIL6R324 を作製した (Fig. 10)。

次に可溶性マウス IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株を以下の手順で樹立した。pdRsmIL6R324 を Chen らの方法²¹⁾により、dhfr 遺伝子欠損 CHO 細胞株 DXB-11²²⁾に導入し、メソトレキセート (MTX) でスクリーニングをした。培養上清中の可能性マウス IL-6 レセプターの検出は、抗ヒト IL-6 レセプター抗体 MT18 と ¹²⁵I 標識 IL-6 による可溶性ヒト IL-6 レセプターのサンドイッチの検出に対する阻害効果の検出法を用いた。最終的に可溶性マウス IL-6 レセプター高発現 CHO 細胞株 MR25 を樹立した。

可溶性マウス IL-6 レセプターの大量生産は、可溶性ヒト IL-6 レセプターと同様の方法により行った (第3章参照)。

可溶性マウス IL-6 レセプターの精製は、カラムクロマトグラフィーを用い、以下のように行った。まず、遠心分離機で 6000 rpm, 10 分間遠心し沈殿を除き、0.22 μm のフィルターで沪過した。沪過液を排除分子量 1 万の中空糸用限外沪過システム (東ソー) を用いて、500 ml まで濃縮した。濃縮液は、TSKgel Blue 5PW (東

ソ）にかけ、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下で、3M KCl, 0M KSCN から 0M KCl, 3M KSCN の塩濃度勾配により溶出した。活性画分を集め、10 mM Tris-HCl に透析した後、TSKgel DEAE 5PW (東ソー) にかけ、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下で、0M NaCl から 1M NaCl の塩濃度勾配により溶出した。再び活性画分を集め、濃縮後、TSKgel G3000SW (東ソー) にかけた。活性画分を集めることにより、可溶性マウス IL-6 レセプター精製品を得た。Fig. 11 は各種カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを表わす。精製可溶性マウス IL-6 レセプターは、N末端解析の結果、N末端が22番目のロイシン残基で、見かけ上の分子量が約43000であった。

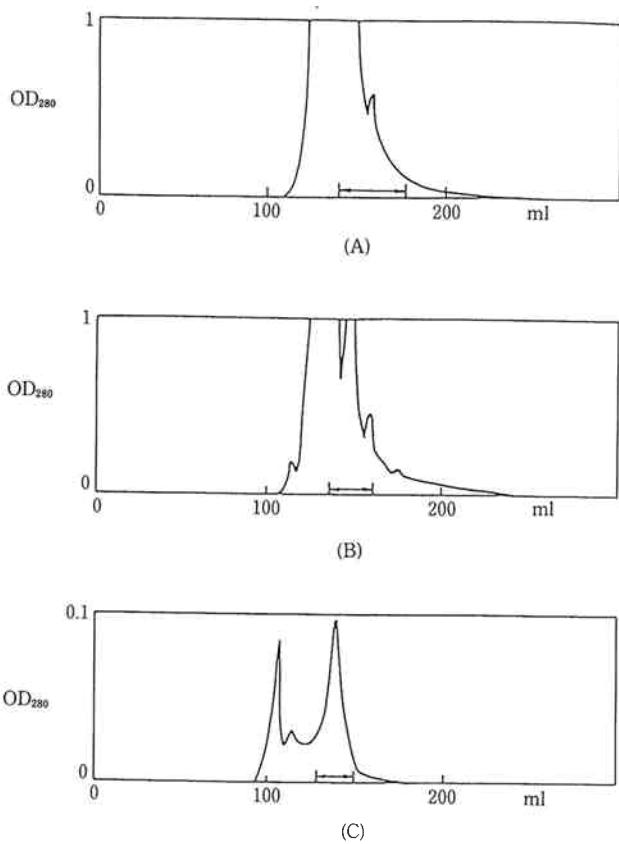


Fig. 11 Purification of smIL-6R. Profiles of absorbance at 280 nm of following column chromatographies are shown. (A) Affinity HPLC pattern of concentrated serum-free culture medium (8 liters) of MR25 cells. (B) Anionic ion exchange HPLC pattern of active fractions from an affinity HPLC. (C) Gel filtration HPLC pattern of active fractions from an anionic ion exchange HPLC. An aliquot of each fraction was assessed, and active fractions are shown by

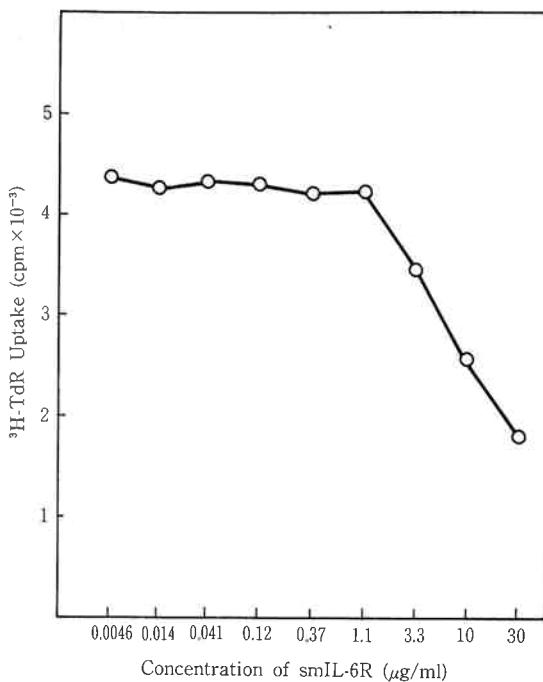


Fig. 12 Agonistic effect of smIL-6R in IL-6-mediated growth inhibition of M1 cells.

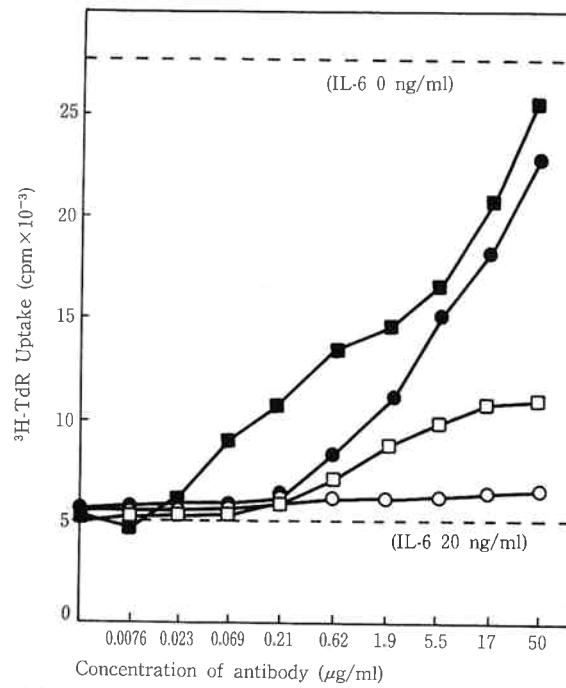


Fig. 13 Effect of anti-mIL-6R antibodies on IL-6 mediated growth inhibition of M1 cells. M1 cells were cultured with indicated concentrations of rat anti-mIL-6R polyclonal antibody (●), control rat IgG (○), RS13 (■), and RS15 (□) in the presence of 20 ng/ml of hIL-6. The average values of the duplicates are shown. Values in the presence or absence of 20 ng/ml IL-6 without any antibodies are indicated as dashed lines.

次に可溶性マウス IL-6 レセプターの IL-6 増強効果を調べた。Fig. 12 に示すように、マウス白血病細胞株 M1 は、20 ng/ml の IL-6 存在下で、可能性マウス IL-6 レセプターに濃度依存的に増殖抑制がかかること、すなわち可溶性マウス IL-6 レセプターの IL-6 増強効果が示された。

抗マウス IL-6 レセプターモノクローナル抗体の作製、及び性状の決定は、以下の手順で行った。可溶性マウス IL-6 レセプターを Wistar ラットに免疫し、ラットミエローマ細胞株 YB2/0 との融合後、スクリーニングを行い、最終的に抗マウス IL-6 レセプターモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを 8 株 (RS11~18) 樹立した。抗体のアイソタイプは、RS11 が IgG1, RS12~RS18 が IgG2a であった。次に RS11~RS18 のインビトロでの IL-6 阻害効果を IL-6 増殖依存性ハイブリドーマ MH60 に対する増殖誘導の阻害効果、及び白血病細胞株 M1 に対する分化誘導（増殖阻害）の阻害効果により比較検討結果、どの抗体も IL-6 阻害効果を示し、RS13 が最も IL-6 阻害効果が強いことがわかった。これは、RS11~RS18 が、免疫原として用いたリコンビナント可溶性マウス IL-6 レセプターだけでなく、細胞膜上のマウス IL-6 レセプターをも認識することを示す。Fig. 13 は、RS13, RS15, モルモット由来抗可溶性マウス IL-6 レセプターが M1 細胞に対する IL-6 の分化誘導（増殖阻害）を阻害するのに対し、コントロールのラット Ig は阻害しないことを示す。

8. 抗マウス IL-6 レセプター抗体による IL-6 作用の阻害

我々は、モルモット由来抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体をマウスに投与することにより、IL-6 の血小板增多作用⁷⁾、及び抗体産生増強効果³³⁾を阻害することを示した³⁴⁾³⁵⁾。これは、抗マウス IL-6 レセプター抗体が、インビトロだけでなくインビボでも IL-6 作用を阻害することを示す。また最近、マウス IL-6cDNA を導入することにより IL-6 依存的に増殖するマウスミエローマ細胞株のマウス体内での増殖が、抗マウス IL-6 レセプター抗体により阻害されることが示された。これらの結果は、抗ヒト IL-6 レセプター抗体が IL-6 阻害剤として開発できることを示唆する最初の例である。

抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体による、IL-6 の血小板增多作用の阻害は、以下の手順で行った。C57BL/6 マウス 1 群 5 匹、全 7 群を用いた。PBS 1% BSA に溶解したモルモット由来抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体あるいはコントロールモルモット抗体 100 μl、及び、PBS, 1% BSA に溶解したリコンビナントヒト IL-6 を 12 時間ごとに 5 日間連続腹くう内投与をした。6 日目に、後大静脈より全採血をし、血小板数をヘモサイトメーター PC-601 (エルマ社製) で数えた。Fig. 14 に示すように抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体の、IL-6 の血小板增多作用に対する阻害が観察された。

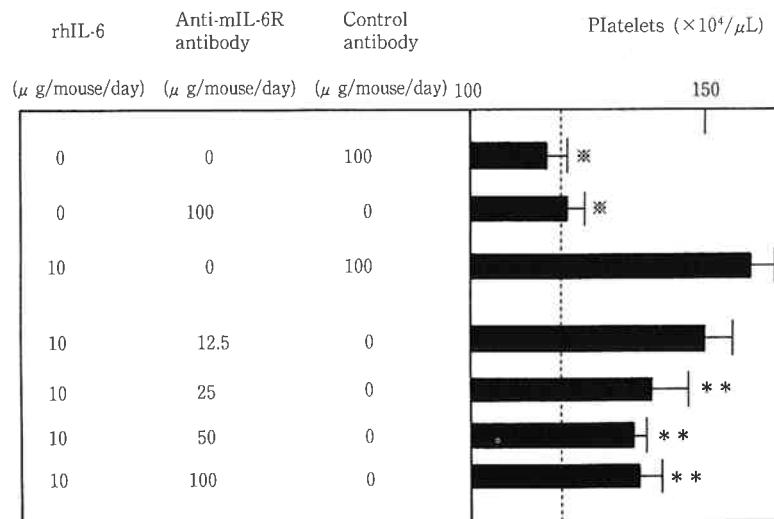


Fig. 14 *In vivo* effects of anti-mIL-6R antibody on platelet counts. Data are expressed as the mean of five mice. Bars, mean SD value; the broken line, platelet count of untreated mice; *, not significantly different from mice without treatment; **, significantly different from rhIL-6 and control antibody-treated mice ($p < 0.01$ by Student's t test).

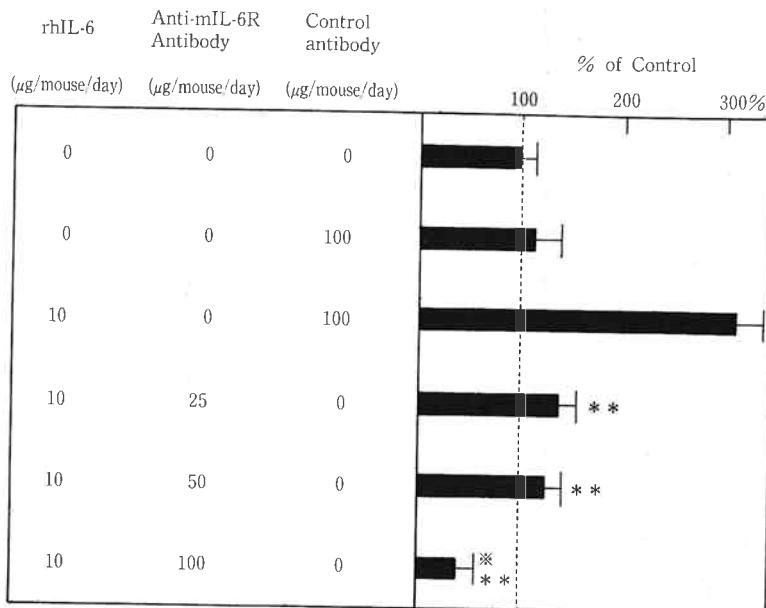


Fig. 15 *In vivo* effects of anti-mIL-6R antibody on the level of anti-DNP antibody. Anti-DNP antibody in control and treated mice was measured. Data represent the mean value of five mice and are expressed as % of control (non-treated mice). Bars, mean SD value; the broken line, control value; **, significantly different from rhIL-6 with control antibody-treated mice ($p < 0.01$ by χ^2 analysis). ***, significantly below the level of control mice ($p < 0.05$ by χ^2 analysis).

抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体による、IL-6 の抗体産生増強効果の阻害は、以下の手順で行った。Balb/c マウス 1 群 5 匹、全 6 群を用いた。マウスに 1 mg の DNP/BSA (シグマ社製) を皮下投与し、翌日から、PBS、1% BSA に溶解したモルモット由来抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体あるいはコントロールモルモット抗体 100 μl 、及び、PBS、1% BSA に溶解したリコンビナントヒト IL-6 を 24 時間ごとに 6 日間連続腹くう内投与をした。7 日目に、後大動脈より全採血をし、血清分離をし、抗 DNP/BSA 抗体値を通常の ELISA 法で測定した。Fig. 15 に示すように抗マウス IL-6 レセプターポリクローナル抗体の、IL-6 の抗体産生増強効果に対する阻害が観察された。特に、100 $\mu\text{g}/\text{day}$ の抗マウス IL-6 レセプター抗体投与では、IL-6 未投与のレベル以下に下がった。これは、抗マウス IL-6 レセプター抗体が投与した IL-6 だけでなく、内在性の IL-6 の効果をも阻害したこと示唆する。

9. 可溶性 gp130 の遺伝子工学的生産

第 2 のレセプター gp130 が発見された結果、IL-6 のシグナル伝達システムの新たなモデルとして Fig. 7 が提唱された。細胞膜結合領域及び細胞内領域の欠失した可溶性 gp130、あるいは gp130 に対する抗体は、IL-6 と IL-6 レセプターとの複合体との結合能を保持してい

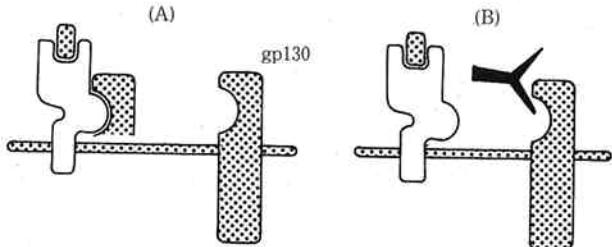


Fig. 16 (A) Soluble gp130 inhibits the function of IL-6.
(B) Anti-gp130 antibody inhibits the function of IL-6.

れば、細胞膜上の gp130 と結合する IL-6 と IL-6 レセプターの複合体の数を減少させ、最終的に IL-6 作用を阻害することが期待される (Fig. 16)。我々は、現在可溶性ヒト gp130 を CHO 細胞で生産することに取り組んでいる。また可溶性 gp130 の検出法を確立し、発現させた可溶性 gp130 が、IL-6 と IL-6 レセプターとの複合体に結合することを示した。可溶性ヒト gp130 あるいは抗ヒト gp130 抗体による IL-6 阻害効果の検討は、今後の課題である。

CHO 細胞での可溶性 gp130 発現用プラスミド pECEdhfrgp620 を以下の手順で作製した。まず、ヒト gp130 cDNA の³⁶⁾ コーディング領域を完全に含む約 3000 bp の EcoRI I-EcoRI I 断片を得た。これを M13mp18 に挿入した後、オリゴヌクレオチド

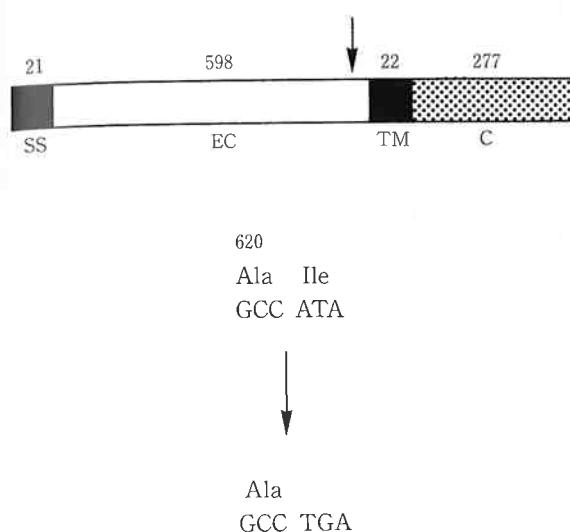


Fig. 17 Insertion of stop codon into human gp130 cDNA.

5'GGAAATATCCGCTCGAGATGTTGACGT 3' を用いて部位特異的インビトロ変異体作製システムにより、開始コドンのすぐ上流に Xho I サイトを導入した。続いて、オリゴヌクレオチド 5'GAAATTGAAGC-CTGAGCTCATAGTCGTGCCT 3' を用いて、同システムにより、621番目のアミノ酸をコードする DNA を終止コドンに変換し、mp18-gp620 を作製した。次に mp18-gp620 の 2 本鎖 DNA を Xho I, Sac I で cDNA を切りだし、pECEdhfr (第3章参照) に挿入し、pECEdhfrgp620 を作製した (Fig. 17)。

可溶性ヒト gp130 の検出法は以下の通りである。まず、プレートに抗ヒト gp130 抗体 AM64³⁶ を固相化した。次に検体を加えた。さらに IL-6 と可溶性ヒト IL-6 レセプター (ともに 5 μg/ml)、モルモット由来抗ヒト IL-6 レセプターポリクローナル抗体、アルカリフォスファターゼ結合うさぎ由来抗モルモット抗体、基質の順に加えることにより、pECEdhfrgp620 を導入した CHO 細胞の培養上清中の可能性ヒト gp130 が検出

できた。なお、現時点では、標準物質として使える濃度既知の可溶性ヒト gp130 が得られていないため、本検出法の感度は不明である。また、以上の結果は可溶性ヒト gp130 が IL-6 と IL-6 レセプターの複合体と結合し得ることを示す。

10. IL-6, IL-6 レセプターの高次構造の研究

我々は、東京大学薬学部荒田教授との共同で、我々の作製した IL-6 及び可能性 IL-6 レセプターを用いて、NMR を軸として、IL-6, IL-6 レセプターの高次構造の研究を行っている。その結果、IL-6 ペプチド中のチロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、メチオニン残基について溶液中での環境を観測³⁷⁾³⁸⁾、IL-6 の構造活性相関（生物活性と構造との関係の研究）を行った³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾。また、大阪大学蛋白研究所勝部教授、ロックフェラー大学セラミ教授との共同で IL-6, IL-6 レセプターの結晶構造解析の研究を行っている。現時点では、高次構造の研究により得られた知見を IL-6 阻害剤の研究に生かすことができないが、近い将来、IL-6 阻害効果をもつ変異型可溶性 IL-6 レセプターの作製等に生かしていきたい。

1 次元及び 2 次元 NMR スペクトルにもとづいて、His, Tyr 残基のタイプ別帰属、及び Trp158 の帰属を行った。HD 交換の結果より、Tyr32 を帰属した。光 CIDNP スペクトルでは、His16, Tyr32, Trp158 由來の明瞭なシグナルが観測され、これらの残基が溶媒に露出していること、Tyr98, Tyr101, His165 はタンパク質分子中に埋もれていることが示唆された。

構造活性相関からは以下の知見を得た。IL-6 の Tyr32 のヨウ素化、及び Koshland 試薬による Trp158 の修飾により、それぞれ、生物活性は変化しなかった。クロラミン T による Met 残基の酸化の結果、Table 2 に示すように、5 つの Met 残基間で修飾の程度が異なる

Table 2 Influence of oxidation of Met residues on bioactivity and binding to IL-6 receptor.

Molar ratios of Chloramine T	Unmodified Met-					Relative activity	
	50	68	118	162	185	receptor-binding	Ig-induction
[Chlo. T]/[IL-6]	%	%	%	%	%	%	%
0	100	100	100	100	100	100	100
0.5	64	96	78	95	80	100	100
1.5	39	88	57	84	64	87	100
4.5	0	84	5	42	16	37	3
6.5	0	39	0	14	0	8	1
12	0	0	0	0	0	1	0

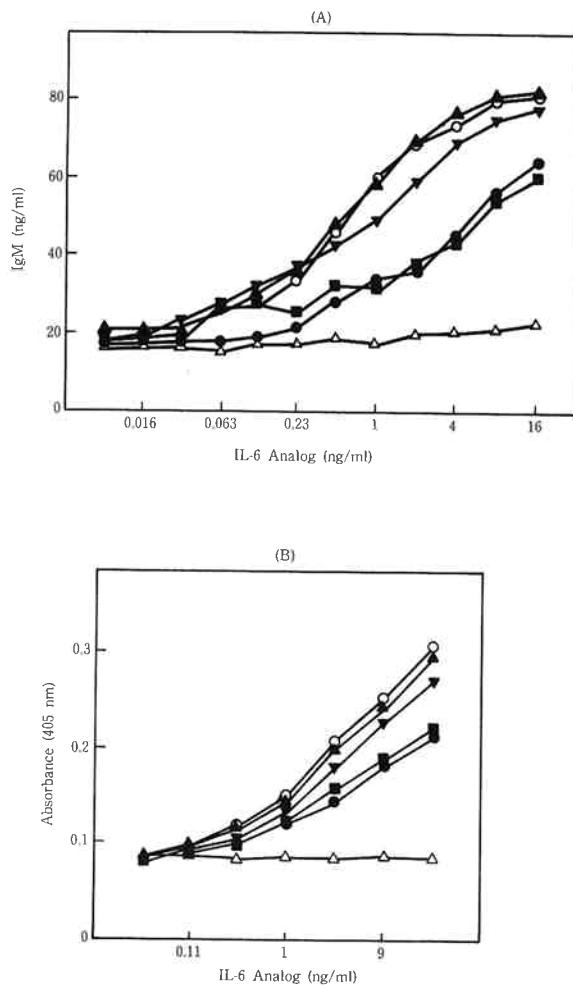


Fig. 18 (a) B-cell stimulatory assay of native IL-6 (○), Met¹⁶²→Ala (●), Leu¹⁵⁹→Val (▲), Leu¹⁶⁶→Val (▼), and Leu^{159,166}→Val (■) mutants, and mock control (△). The concentration of IgM, which is produced in the culture medium of SKW6-CL4 cells, was determined by ELISA. Data represent averages of triplicate determination.

(b) Receptor-binding assay of native IL-6 (○), Met¹⁶²→Ala (●), Leu¹⁵⁹→Val (▲), Leu¹⁶⁶→Val (▼), and Leu^{159,166}→Val (■) mutants, and mock control (△). The quantity of native or mutant IL-6, which bound to soluble IL-6 receptor, was spectrophotometrically measured. Data represent averages of duplicate determinations.

っており、Met162 の修飾の程度と、生物活性及び IL-6 レセプターへの結合活性の低下が一致していた。次に我々は、オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異作製法により、4種類のミュータント IL-6 cDNA を作製した。これをそれぞれ動物細胞発現ベクター

pSVL (ファルマシア) に挿入後、COS1 細胞に導入した。上清中の IL-6 の発現量は抗 IL-6 抗体を用いた ELISA 法で、生物活性は B 細胞株 CL-4 に対する抗体産生誘導により測定した。Fig. 18 に示すように、IL-6 Ala162 と IL-6 Val159, Val166 で活性の大きな低下が認められた。これは、Met162 の近傍領域が IL-6 の生物活性に重要であることを示唆する。

11. IL-6, IL-6 レセプターの測定

IL-6 については、例えば、種々の自己免疫疾患の患者の血清中や、腎移植の後に拒絶反応をおこした患者の尿中や血清中、慢性関節リューマチ患者の関節液中に高い値が報告されている。これらは IL-6 の生理的役割の研究に重要であるだけでなく、新しい診断薬としての期待が高くなっている。我々は、国立予防衛生研究所本多先生と共同で、エイズ患者血清中の IL-6 濃度を測定し、病状の進行とともに血中の IL-6 濃度が高くなることを発見した (Fig. 19)⁴²。

また IL-6 レセプターについては、尿中に IL-6 レセプターが含まれていることが報告されている⁴³だけである。我々は、リコンビナントヒトあるいはマウス可溶性 IL-6 レセプターを標準物質として、抗体を用いたサ

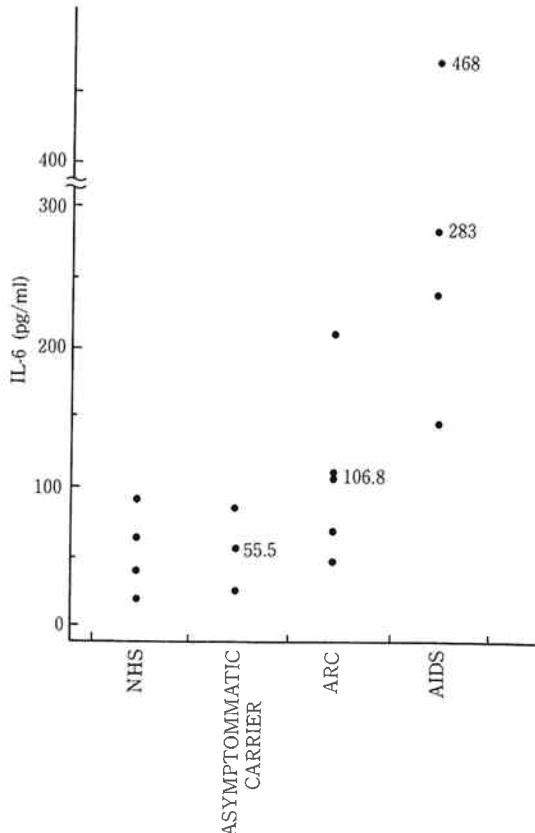


Fig. 19 Serum level of IL-6 in HIV-infected patients.

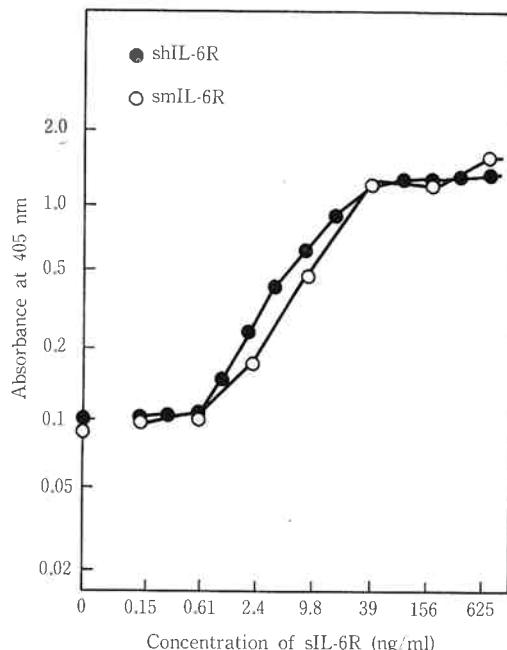


Fig. 20 Sandwich ELSIA for shIL-6R (●) and smIL-6R (○), shIL-6R and smIL-6R (0.15 pg to 1000 ng/ml) was used to make a standard curve. The average values of the duplicate are shown.

ンドイッチ ELISA 法を確立し、ヒトあるいはマウス IL-6 レセプターの免疫化学的測定法を初めて確立した (Fig. 20)。また、驚くことに、血清中や尿中に数～数十 ng/ml の IL-6 レセプターが検出された¹⁷⁾。これは IL-6 が数～数十 pg/ml であるとの対照的である。現在、他の研究機関と共同で種々の生体試料中の IL-6 レセプター濃度を測定している。今後、各種疾患と IL-6 レセプター濃度の相関が注目されるが、さらに、生体試料中の IL-6 レセプターの構造 (N末端やC末端), IL-6 との結合能, IL-6 の生物活性に対する影響等を研究していくであろう。また、これらの知見は、抗ヒト IL-6 レセプター抗体を IL-6 阻害剤として開発していく過程で重要である。

12. おわりに

最近、KLEIN (仏, INSERM) らはマウス由来抗ヒト IL-6 抗体を末期ミエローマ患者に投与し、その著効性を示した⁴⁴⁾。これは、IL-6 阻害剤の医薬としての可能性を実証した最初の例である。

ミエローマ患者の場合は、症状が重篤であること、患者の免疫系が破壊されていること等からマウス由来の抗体が治療に行われるが、一般的に他の疾患の場合にマウス由来の抗体を投与すると、抗マウス抗体が産生され、治療効果がなくなる。したがって、抗ヒト IL-6 レセプ

ター・マウスヒトキメラ抗体の作製が必要になる。

今後、IL-6 阻害剤の研究においては

- 1) 抗ヒト IL-6 レセプター抗体の薬理作用
- 2) 抗ヒト IL-6 レセプター・キメラ抗体の作製
- 3) 可溶性gp130, 抗 gp130 抗体の IL-6 阻害効果の検討
- 4) IL-6, IL-6 レセプター, gp130 の高次構造の解析が重要な課題となる。

最後に、生物工学研究所第2研究室・中野功一室長、同・丸尾直子副主任研究員、新材料研究所・福永 剛研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) Kishimoto, T.; *Blood*, 74, 1 (1989)
- 2) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunashawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. and Kishimoto, T.; *Nature*, 324, 73 (1986)
- 3) Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S. and Kishimoto, T.; *EMBO J.*, 6, 2939 (1987)
- 4) Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H. and Kishimoto, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 5490 (1985)
- 5) Hirano, T., Taga, T., Yasukawa, K., Nakajima, K., Nakano, N., Takatsuki, F., Shimizu, M., Murashima, A., Tsunashawa, S., Sakiyama, F. and Kishimoto, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 228 (1987)
- 6) Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, I.; *J. Exp. Med.*, 167, 332 (1988)
- 7) Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F. and Akiyama, Y.; *Blood*, 74, 1241 (1989)
- 8) Asano, S., Okano, A., Ozawa, K., Nakahata, T., Ishibashi, T., Koike, K., Kimura, H., Tanioka, Y., Shibuya, A., Hirano, T., Kishimoto, T., Takaku, F. and Akiyama, Y.; *Blood*, 75, 1602

- (1990)
- 9) Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and Baumann, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7251 (1987)
 - 10) Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., Kuramoto, A. and Kishimoto, T.; *Nature*, **332**, 83 (1988)
 - 11) Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldman, M. and Kishimoto, T.; *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1797 (1988)
 - 12) Asagoe, Y., Yasukawa, K., Saito, T., Maruo, N., Miyata, K., Kono, T., Miyake, T., Kato, T., Kakidani, H. and Mitani, M.; *Biotechnol.*, **6**, 806 (1988)
 - 13) 浅越義弘, 斎藤貴司, 保川清, 丸尾直子, 三宅俊男, 三谷満昭; “日本農芸化学”, **62**, 63 (1988)
 - 14) Yasukawa, K. and Saito, T.; *Biotechnology Letters*, **12**, 419 (1990)
 - 15) 保川清, 斎藤貴司, 関森泰男, 田賀哲也, 平野俊夫, 岸本忠三; “日本免疫学会”, **19**, 355 (1989)
 - 16) Yasukawa, K., Saito, T., Fukunaga, T., Sekimori, Y., Koishihara, Y., Fukui, H., Osugi, Y., Matsuda, T., Yawata, H., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T.; *J. Biochem.*, **108**, 673 (1990)
 - 17) 保川清, 斎藤貴司, 小石原保夫, 福井博泰, 大杉義征, 八幡英夫, 松田正, 平野俊夫, 田賀哲也, 岸本忠三; “日本免疫学会”, **20**, 89 (1990)
 - 18) Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.; *Science*, **241**, 825 (1988)
 - 19) Eliis, L., Clauser, E., Morgan, D. O., Edery, M., Roth, R. A. and Rutter, W. J.; *Cell*, **45**, 721 (1986)
 - 20) Bebbington, C. R. and Hentschel, C. C. G.; *DNA cloning*, vol. III, 163 (1987)
 - 21) Chen, C. and Okayama, H.; *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2745 (1987)
 - 22) Urland, G. and Chasin, L. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4216 (1980)
 - 23) Hirata, Y., Taga, T., Hibi, M., Nakano, N., Hirano, T. and Kishimoto, T.; *J. Immunol.*, **143**, 2900 (1989)
 - 24) Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.; *Cell*, **58**, 573 (1989)
 - 25) 田賀哲也, 日比正彦, 村上正晃, 平田祐一, 保川清, 平野俊夫, 岸本忠三; “日本免疫学会”, **19**, 102 (1989)
 - 26) Ichikawa, Y.; *J. Cell. Physiol.*, **74**, 223 (1969)
 - 27) Miyaura, C., Onozaki, K., Akiyama, Y., Taniyama, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Suda T.; *FEBS Lett.*, **234**, 17 (1988)
 - 28) Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.; *Eur. J. Immunol.*, **18**, 951 (1988)
 - 29) Ida, N., Sakurai, S., Hosaka, T., Hosoi, K., Kunimoto, T., Shimazu, T., Maruyama, T., Matsuura, Y. and Kohase, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 788 (1989)
 - 30) Saito, T., Yasukawa, K., Suzuki, H., Futatsugi, K., Fukunaga, T., Yokomizo, C., Koishihara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y., Yawata, H., Kobayashi, I., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T.; *J. Immunol.* in press
 - 31) 斎藤貴司, 保川清, 鈴木浩, 小石原保夫, 福井博泰, 大杉義征, 八幡英夫, 平野俊夫, 田賀哲也, 岸本忠三; “日本免疫学会”, **20**, 88 (1990)
 - 32) Sugita, T., Totsuka, T., Saito, M., Yamasaki, K., Taga, T., Hirano, T. and Kishimoto, T.; *J. Exp. Med.*, **171**, 2001 (1990)
 - 33) Takatsuki, F., Okano, A., Suzuki, C., Chieda, R., Takahara, Y., Hirano, T., Kishimoto, T., Hamuro, J. and Akiyama, Y.; *J. Immunol.*, **141**, 3072 (1988)
 - 34) Suzuki, H., Yasukawa, K., Saito, T., Anzai, M., Goitsuka, R., Hasegawa, A., Ohsugi, Y., Taga, T. and Kishimoto, T.; *Immunology Letters*, in press.
 - 35) 鈴木浩, 保川清, 斎藤貴司, 大杉義征, 田賀哲也, 岸本忠三; “日本免疫学会”, **20**, 156 (1990)
 - 36) Hibi, M., Murakami, M., Sito, M., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T.; *Cell*, **63**, 1149 (1990)
 - 37) Nishimura, C., Hanzawa, H., Itoh, S., Yasukawa, K., Simada, I., Kishimoto, T. and Arata, Y.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1041**, 243 (1990)
 - 38) 西村千秋, 駄田悌二, 鮎田晋, 保川清, 岸本忠三, 荒田洋治; “日本免疫学会”, **20**, 87 (1990)

- 39) Nishimura, C., Ekida, T., Masuda, S., Futatsugi, K., Itoh, S., Yasukawa, K., Kishimoto, T. and Arata, Y.; *Eur. J. Biochem.*, in press
- 40) Nishimura, C., Futatsugi, K., Yasukawa, K., Kishimoto, T. and Arata, Y.; *FEBS Lett.*, in press
- 41) 二木研輔, 西村千秋, 駅田悌二, 保川 清, 岸本忠三, 荒田洋治; “日本免疫学会”, 20, 87 (1990)
- 42) Honda, M., Kitamura, K., Mizutani, Y., Oishi, M., Arai, M., Okura, T., Igarashi, K., Yasukawa, K., Hirano, T., Kishimoto, T., Mitsuyasu, R., Chermann, J. and Tokunaga, T.; *J. Immunol.*, 145, 4059 (1990)
- 43) Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. and Rubinstein, M.; *J. Exp. Med.*, 170, 1406 (1989)
- 44) Klein, B., Zhang, X., Jourdan, M., Boiron, J., Portier, M., Lu, Z., Wijdense, J., Brochier, J. and Bataille, B.; *Eur. Cytokine Net.* 1, 193 (1990)



著 者
氏名 保川 清
Kiyoshi YASUKAWA
入社 昭和59年4月2日
所属 研究本部
生物工学研究所
第二研究室
副主任研究員



著 者
氏名 斎藤 貴司
Takashi SAITO
入社 昭和62年4月1日
所属 研究本部
生物工学研究所
第二研究室
副主任研究員



著 者
氏名 二木 研輔
Kensuke FUTATSUGI
入社 平成1年4月3日
所属 研究本部
生物工学研究所
第二研究室
副主任研究員



著 者
氏名 鈴木 浩
Hiroshi SUZUKI
入社 昭和61年4月1日
所属 研究本部
生物工学研究所
第二研究室
副主任研究員