

造血領域における IL-6R の用途探索

| | | |
|---|---|---|
| 保 | 川 | 清 |
| 家 | 亀 | 宇 |
| 井 | 出 | 彦 |
| 田 | 崎 | 一 |
| 中 | 村 | 誠 |
| 村 | 山 | 敬 |
| 勝 | 浦 | 公 |
| | | 男 |

Evaluation of Intreleukin-6 Receptor in Hematopoiesis

Kiyoshi YASUKAWA
 Harutaka YAGAME
 Teruhiko IDE
 Seiichi TAZAKI
 Makoto NAKAMURA
 Keiichi MURAYAMA
 Kimio KATSUURA

We tested the effects of a recombinant human soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) in hematopoiesis; a combination of sIL-6R and IL-6 dramatically stimulated expansion of hemopoietic progenitor cells as well as CD34⁺ cells in the presence of stem cell factor (SCF), and stimulated megakaryopoiesis from CD34⁺ cells in the presence of SCF or thrombopoietin, suggesting the possible clinical application for *ex vivo* expansion of CD34⁺ cells and *in vivo* platlet augmentation. We also established the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* secreting sIL-6R, from the supernatant of which the sIL-6R was purified by a single affinity chromatography step using a monoclonal antibody to IL-6R.

1. はじめに

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) は、骨髄に存在し、血液中を流れる赤血球、白血球、及び血小板のおおものの細胞で、各種血球系への分化能のみならず、自己再生能をもつ。

この造血幹細胞の増殖分化・自己再生、骨髄への定着・末梢への流出の制御には、骨髄中の造血幹細胞の局所的環境が重要な役割を果たしている。この局所的

環境には、造血幹細胞の周辺に存在する細胞 (ストローマ細胞と呼ばれる) が産生する蛋白質性のファクター (サイトカインや造血因子と呼ばれる) が深く関わっている。

近年の科学の進歩は、各種造血因子の構造や役割を解明するのみならず、一部の造血因子を医薬品として応用するに至った。赤血球系への分化を誘導する造血因子であるエリスロポエチン (EPO, erythropoietin) は、手術時の輸血の代替 (自己血貯血) や貧血治療薬

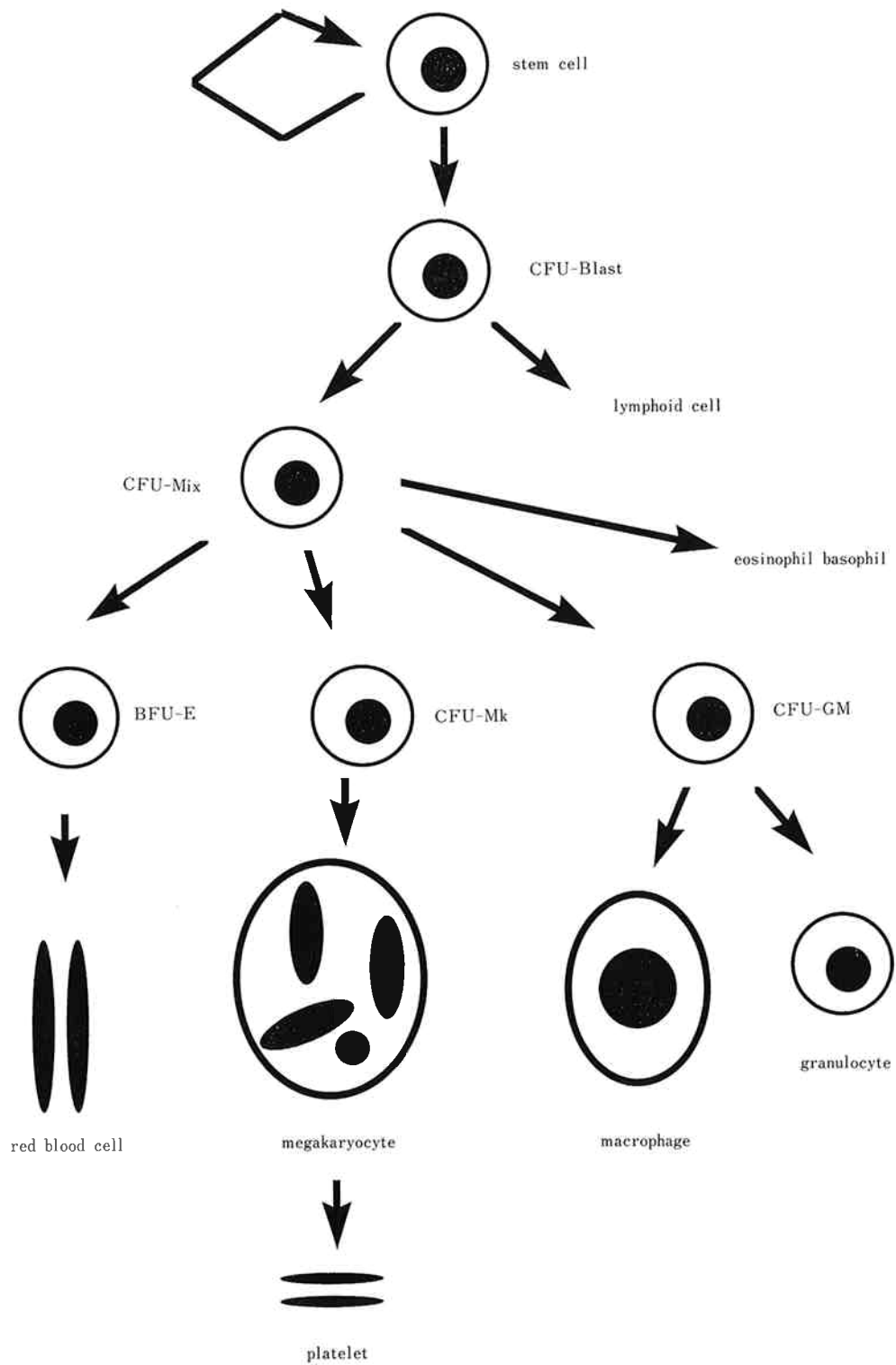


Fig. 1 Generation of hematopoietic progenitors from stem cells.

として用いられている。また、白血球（特に顆粒球）への分化を誘導する造血因子であるG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor、顆粒球コロニー刺激因子) は、抗癌化学療法に伴う好中球減少症の治療薬や、末梢血幹細胞移植（次の段落に詳細を記載）における、末梢血に骨髄から幹細胞を動員する薬剤として用いられている。一方、血小板の前駆細胞である巨核球への

分化を誘導する造血因子としては、IL-6 (interleukin-6、インターロイキン-6)、TPO (thrombopietin、 trombopoietin、血小板増殖因子)、IL-11 (interleukin-11、インターロイキン-11) が知られている。EPOやG-CSFの場合と同様に、将来的にはある特定の造血因子（あるいはその組み合わせ）が、現行の血小板輸血に代わり、抗癌化学療法に伴う血小板減少症の治療

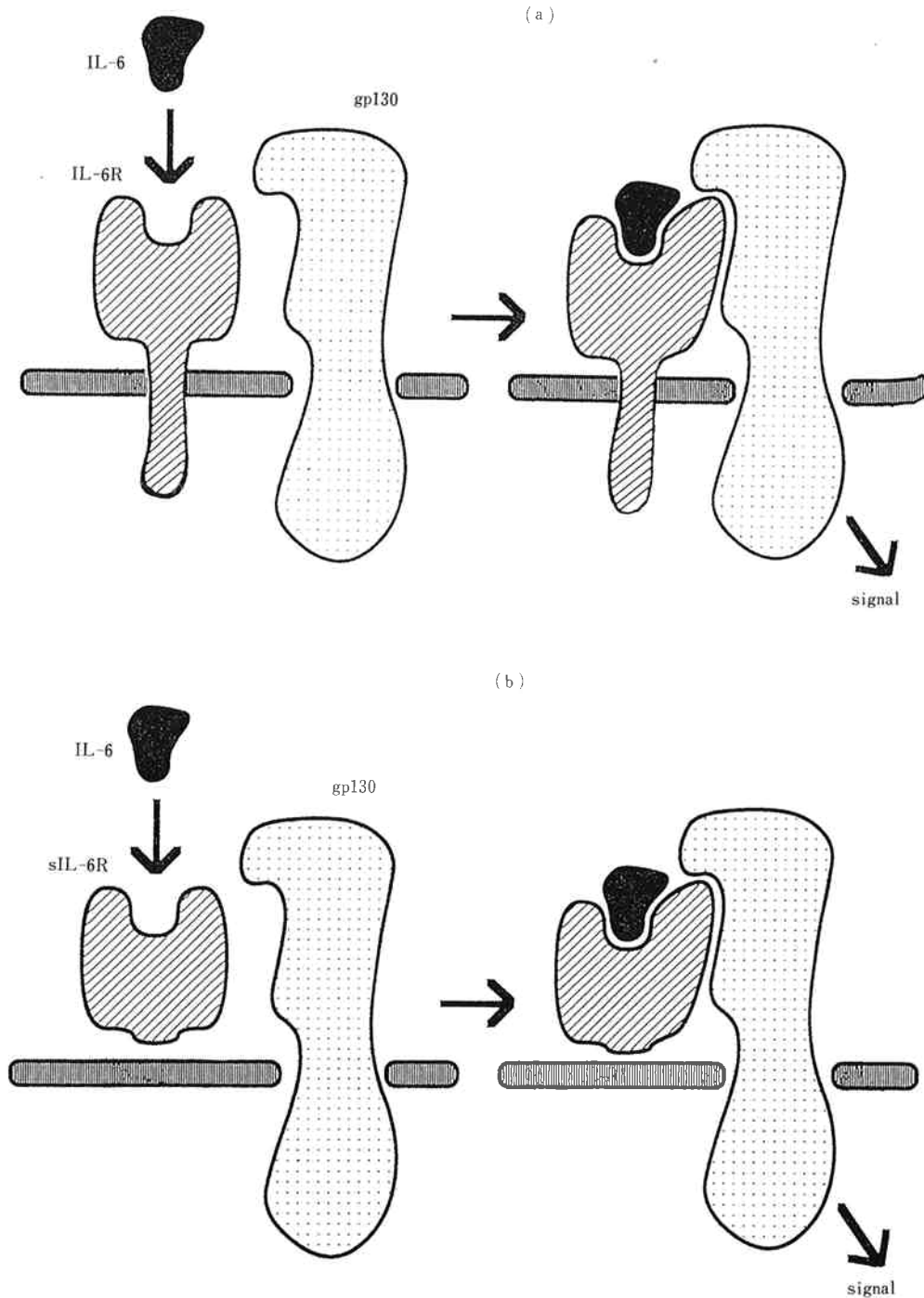


Fig. 2 Schematic model of the IL-6 receptor system.

薬として応用されるものと期待されている。

また、造血幹細胞や造血前駆細胞自体を用いる治療法も広く応用されている。抗癌薬の通常の投与量の数倍以上を用いる超高投与量化学療法は治癒を目的とした治療法であるが、この際の不可避の毒性である骨髄の荒廃を再構築するためには、造血幹細胞や造血前駆細胞の移植が必要である。この目的のために、骨髄移植や末梢血幹細胞移植が広く用いられている。一方、種々の造血因子を用いて *in vitro* (試験管内) で造血幹細胞や造血前駆細胞を増幅することができれば、ドナーの負担を軽減して治療効果を高めることや、造血幹細胞や造血前駆細胞のソースとして臍帯血(さいたい血; 出産時に採取される血液で造血幹細胞を豊富に含む反面、採取量が30mlと少量のため、小児への移植にしか用いられない。臍帯血幹細胞移植はドナーの負担がない。)を用いることも可能になる。遺伝子治療への適用も含め、造血幹細胞の *in vitro* 増幅は、医療に非常に大きなインパクトをもつ。

造血因子は標的細胞 (EPOの場合はBFU-E (赤芽

球バースト形成細胞)、G-CSFの場合はGFU-GM (顆粒球マクロファージ系コロニー形成細胞)、いずれも Fig. 1 を参照) に発現する固有のレセプターである膜蛋白質と結合することにより、増殖分化を誘導する。IL-6 の場合は、標的細胞上に発現する膜蛋白質である IL-6R (IL-6 receptor、IL-6 受容体) に結合後、同一細胞膜上に発現するシグナル伝達蛋白質である gp130 に結合する (Fig. 2 a)。その後、当社で CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵母細胞) を宿主として作製されたリコンビナント可溶性 IL-6R (sIL-6R, 細胞外領域のみから構成され膜から遊離して存在する IL-6R) を用いた実験等により、IL-6・sIL-6R 複合体が、標的細胞上に発現する gp130 に結合することによっても刺激を伝えることが示された (Fig. 2 b)¹⁻⁴⁾。これは、IL-6 だけでは、IL-6R 陽性・gp130 陽性細胞に刺激を伝えることはできても、IL-6R 陰性・gp130 陽性細胞に刺激を伝えることができないのに対し、IL-6・sIL-6R 複合体は、いずれの細胞にも刺激を伝えることを意味する。

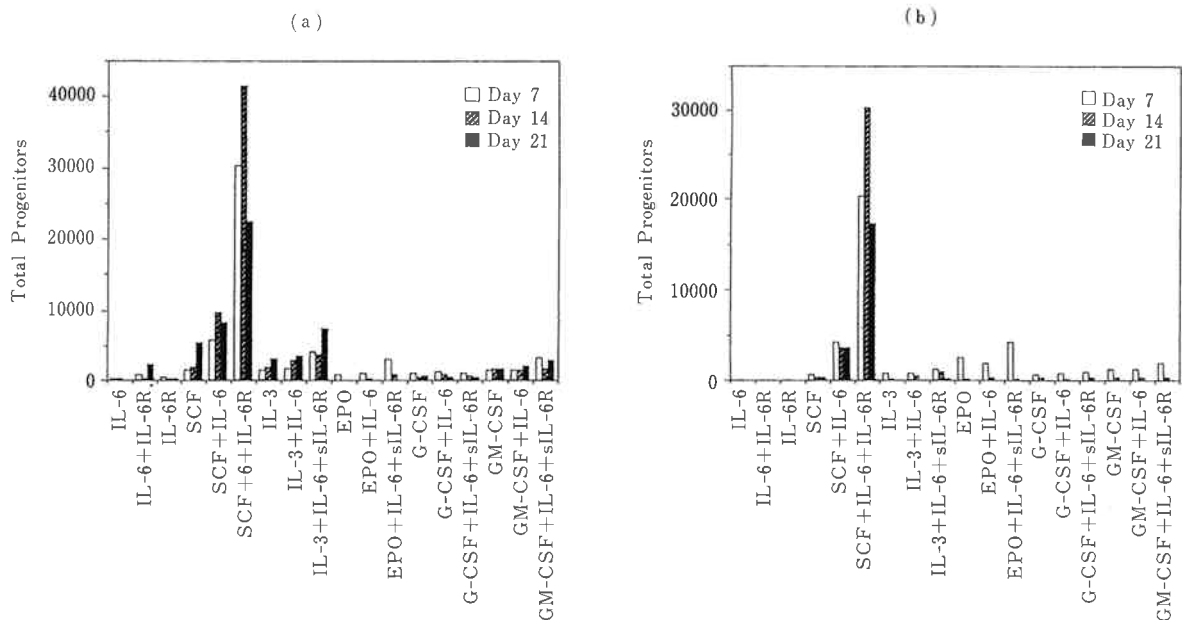


Fig. 3 Generation of total progenitors from 2000 CD34 positive cells in serum-containing (a) or non-serum containing (b) suspension culture supplemented with single factors or in combinations at day 7 (open bars), day 14 (oblique bars) and day 21 (filled bars). One milliliter of culture mixture containing 2000 CD34 positive cells, α -medium, 20% fetal bovine serum, 1% crystallized and deionized fraction V bovine serum albumin (BSA), and different combinations of cytokines was incubated in 24-well tissue plates at 37°C in a humidified atmosphere flushed with 5% CO₂ / 5% O₂ / 90% N₂. Serum-free suspension culture consisted of 2% pure BSA, 200 ug of human transferrin per ml, 0.01 mM 2-mercaptoethanol, and 40 ug of low-density lipoprotein per ml, instead of FBS and BSA.

実際にその後、IL-6 だけでは生物活性を示さないが、IL-6 と sIL-6R の組み合わせで生物活性を示す例が報告されている (胚性幹細胞の増殖⁵⁾、神経疾患モデルマウスへの *in vivo* 投与による治癒⁶⁾)。

今回我々は、CHO細胞由来リコンビナント sIL-6R^{1,2)} を用いて、造血領域における sIL-6R の生理活性を調べた。さらに、CHO細胞と比べ、生産性において優位と思われるピキア酵母を宿主としたリコンビナント sIL-6R 発現系の構築を試みた。

2. IL-6 R の造血幹細胞増幅効果

ヒトの場合、骨髓、末梢血、あるいは臍帯血をソースとして、CD34抗原 (細胞表面に発現している蛋白質の一種) を発現している細胞を分画することにより、造血幹細胞を濃縮できることがよく知られている。そこで、ヒトCD34陽性細胞を種々の造血因子を組み合

わせて寒天プレート上で培養してみると、IL-6、sIL-6R¹⁾²⁾、SCF (stem cell factor、幹細胞増殖因子) を用いることにより、GM (CFU-GM、顆粒球マクロファージ系コロニー形成細胞)、Blast (CFU-blast、芽球コロニー形成細胞)、Meg (CFU-Mk、巨核球系コロニー形成細胞)、B (BFU-E、赤芽球バースト形成細胞)、Mix (CFU-Mix、混合コロニー形成細胞) が多数形成された (Fig. 3)。

また、ヒトCD34陽性細胞を種々の造血因子を組み合わせて液体培地中で培養してみると、IL-6、sIL-6R、SCFを用いることにより、他のいずれの組み合わせよりも多数のCD34陽性細胞の増幅が得られた (Table 1)。さらに、このようにして増幅されたCD34陽性細胞を寒天プレート上で培養すると、各種コロニーが多数形成された (データ省略)。

以上の結果は、IL-6、sIL-6R、SCFを用いること

Table 1 Colony formation from 500 CD34 positive cells in methylcellulose culture

| Factor | No. of Colonies / 500 cells | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|-------|-----|----|-----|-------|
| | GM | Blast | Meg | B | Mix | Total |
| <serum-containing culture> | | | | | | |
| IL-6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| sIL-6R | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| IL-6 + sIL-6R | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| SCF | 13 | 1 | 1 | 0 | 0 | 15 |
| SCF + IL-6 | 54 | 10 | 1 | 0 | 0 | 65 |
| SCF + IL-6 + sIL-6R | 62 | 45 | 13 | 28 | 122 | 270 |
| IL-3 | 23 | 1 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| IL-3 + IL-6 + sIL-6R | 29 | 12 | 1 | 30 | 21 | 93 |
| <serum-free culture> | | | | | | |
| IL-6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| sIL-6R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IL-6 + sIL-6R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SCF | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| SCF + IL-6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| SCF + IL-6 + sIL-6R | 5 | 7 | 5 | 8 | 45 | 70 |
| IL-3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| IL-3 + IL-6 + sIL-6R | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |

One milliliter of culture mixture containing 500 CD34 positive cells, α -medium, 0.9% methylcellulose, 30% FBS, 1% BSA, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, and various combinations of cytokines was placed in each 35-mm Lux standard nontissue culture dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere flushed with 5% CO₂. Serum free methylcellulose culture contained components identical to those in serum-containing culture except 1% pure BSA, 300 ug of human transferrin per ml, 160 ug of soybean lecithin per ml, and 96 ug of cholesterol per ml replaced BSA and FBS.

により、造血前駆細胞が著名に増幅できることを示し、臨床応用の可能性を示唆する。今後、このシステムにより増幅したCD34陽性細胞が、長期の骨髄再構築能をもった真の造血幹細胞が増幅できているかどうか、臨床応用の課題であると思われる。また、IL-6、sIL-6R、SCFの組み合わせが有効であることは、造血幹細胞や造血前駆細胞上のgp130 (IL-6、sIL-6Rのシグナル伝達蛋白質) とc-kit (SCFのシグナル伝達蛋白質) がともに刺激を受けることが増殖分化に必須であることを示す。さらに、IL-6、SCFの組み合わせが有効でないことは、造血幹細胞や造血前駆細胞上にIL-6Rが発現していないことを示唆する。実際、造血幹細胞や造血前駆細胞上には、CFU-GM (顆粒球マクロファージ系コロニー形成細胞) を除き、IL-6Rが発現していないことが別実験で確かめられた⁷⁾。マウスでは造血幹細胞や造血前駆細胞上にIL-6Rが広く発現しており、sIL-6Rを加えなくてもIL-6だけでgp130への刺激が可能であることと比較して、種特異性に由来する興味深い知見である。

3. IL-6Rの巨核球コロニー形成効果

ヒトCD34陽性細胞を種々の造血因子を組み合わせで寒天プレート上で培養してみると、IL-6、sIL-6R、SCFの組み合わせはIL-6、SCFの組み合わせよりも、IL-6、sIL-6R、IL-3の組み合わせはIL-6、IL-3の組み合わせよりも、さらにIL-6、sIL-6R、TPO

の組み合わせはIL-6、TPOよりもそれぞれ有意に巨核球が形成された (Table 2)。ただし、いずれの組み合わせも、TPOとSCFの組み合わせよりは効果が低い。

この結果は、CFU-Mk (巨核球系コロニー形成細胞) 上のgp130への刺激にはIL-6だけでなくsIL-6Rが必須であることを示す。また、前述の結果 (Fig. 3とTable 1) を総合すると、IL-6、sIL-6Rの組み合わせが造血幹細胞から血小板の形成過程全体において有効にgp130を刺激し、個体に血小板増多を誘導することを示唆する。マウスにIL-6を投与すると血小板数を増多させるが^{8,9)}、臨床試験でヒトへIL-6を投与した場合に効果が低い (私信) ことも、上記示唆を支持する。

今後は、マウス等の実験動物にIL-6、sIL-6Rの組み合わせを投与して、血小板数が増多するかどうかを調べるのが課題になると思われる。

4. リコンビナントIL-6Rを発現する

ピキア酵母の樹立

ピキア酵母 (*Pichia pastoris*) はメタノールを唯一の炭素源として生育できる酵母 (メタノール資化性酵母) である。米国フィリップス社 (Phillips Petroleum Company) によって遺伝子工学の宿主-ベクター系として開発された。当社では、過去にピキア酵母でウサギ血清アルブミンを発現させた実績をもつ¹⁰⁾。

Table 2 Mk colony formation from human CD34 positive cells in serum-free methylcellulose culture

| Factor | No. of Colonies / 500 cells | | | |
|----------------------|-----------------------------|--------|--------|-------|
| | CFU-Mk | BFU-Mk | Mk-Mix | Total |
| IL-6 + SCF | 1 | 0 | 0 | 1 |
| sIL-6R + IL-6 + SCF | 9.7 | 3.3 | 22.7 | 35.7 |
| IL-3 | 2.71 | 0 | 0 | 2.7 |
| IL-6 + IL-3 | 3.7 | 0.3 | 2.0 | 6.0 |
| sIL-6R + IL-6 + IL-3 | 4.7 | 1.7 | 4.3 | 10.7 |
| TPO | 24 | 1.3 | 0 | 25.3 |
| IL-6 + TPO | 26 | 2 | 0 | 28 |
| sIL-6R + IL-6 + TPO | 27.3 | 6 | 0 | 33.3 |
| SCF + TPO | 32 | 17.7 | 1.6 | 51.3 |

One milliliter of culture mixture containing 500 CD34 positive cells, α -medium, 0.9% methylcellulose, 1% pure BSA, 300 ug of human transferrin per ml, 160 μ g of soybean lecithin per ml, and 96 ug of cholesterol per ml, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, and various combinations of cytokines was placed in each 35-mm Lux standard nontissue culture dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere flushed with 5% CO₂. Significantly different from their counterparts without sIL-6R (*P<0.05-0.0001).

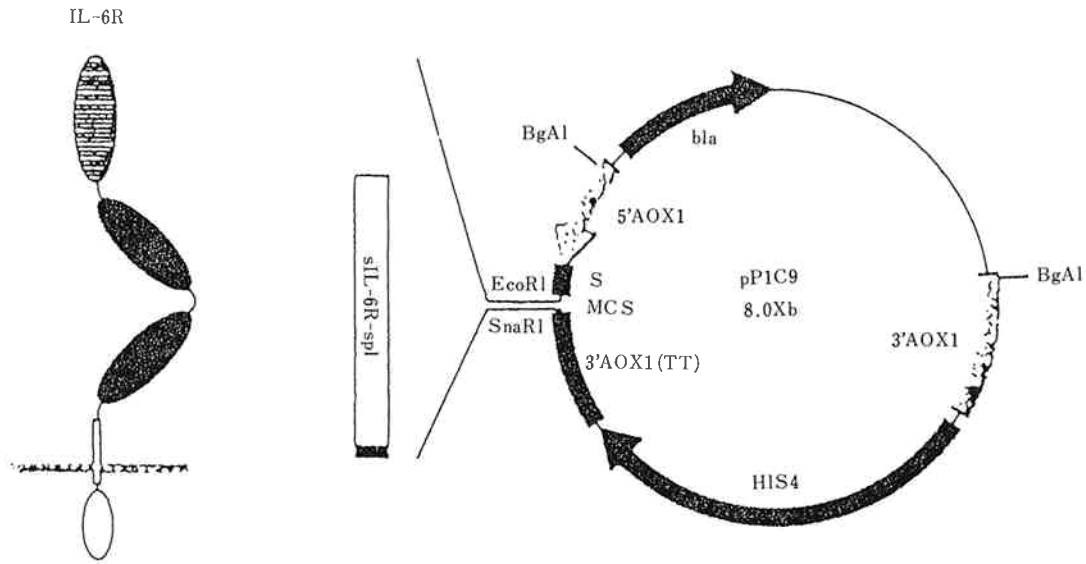


Fig. 4 A construction of *Pichia pastoris* expression vector pPIC9-sIL-6R-spl.

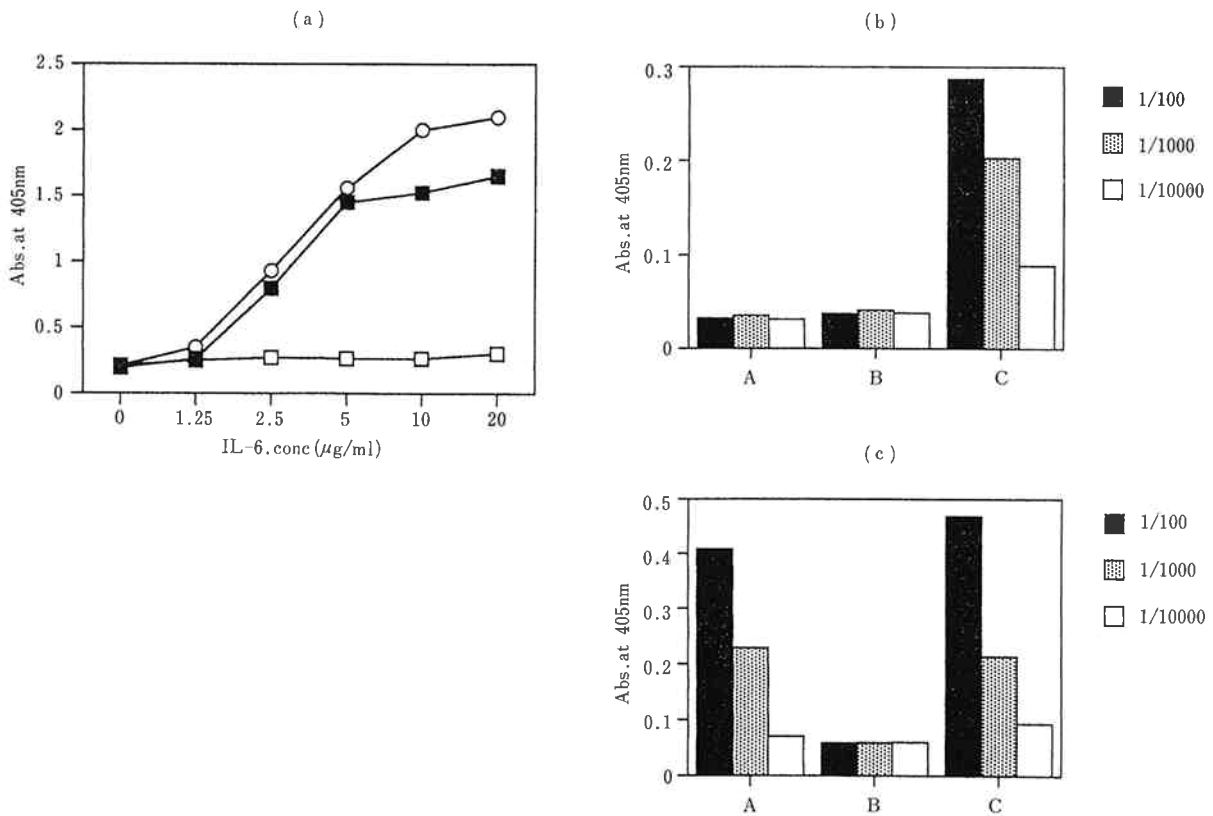


Fig. 5 (a) ELISA for sIL-6R composed of recombinant human IL-6^(14),15) and anti-sIL-6R polyclonal antibody of a 20-fold diluted sample of his4GS115 cells transformed with pPIC9 (control, □) or pPIC-sIL-6Rspl (○) or 0.25 µg/ml of purified sIL-6R expressed in CHO cells (■). (b,c) Sandwich ELISA for sIL-6R composed of anti-human IL-6R mAb MT18 which recognizes the NH₂-terminal part of the IL-6R (b) or PM1 which recognizes the cytokine receptor domain (c). For detection, an anti-sIL-6R polyclonal antibody was used. Supernatants of his4GS115 cells transformed with pPIC9 (control) or pPIC-sIL-6Rspl or 15 µg/ml of purified sIL-6R expressed in CHO cells were analyzed by using 100-fold (filled bar), 1000-fold (stipped bar) or a 10000-fold dilution (open bar).

IL-6Rの113番目のグリシン残基から355番目のプロリン残基までの243アミノ酸のC末端に、GSRRRGSCGL(1文字でのアミノ酸表記法による)の10アミノ酸が付加した配列をコードする発現プラスミドpPIC9-sIL-6Rsplを構築した(Fig. 4)。この243アミノ酸は、IL-6Rの細胞外領域約360アミノ酸中、サイトカインレセプター領域と呼ばれる領域で、IL-6やgp130との結合に必須である¹¹⁾。また、この10アミノ酸配列は、IL-6Rの遺伝子のスプライシングの結果生じたmRNA中に発見されたもので、実際にこの配列を、天然のsIL-6Rが有していることが報告されている^{12, 13)}。

次に形質転換菌を作製した。ピキア酵母GS115株からスフェロプラストを調製し、BglIIIによって線状化したpPIC9-sIL-6Rsplを導入した。形質転換菌は最小栄養培地で培養し、ヒスチジン要求性を失った形質転換菌を選別した。30から100クローンを保存用プレートで培養した後、BMGY培地0.15ml中で30℃で24時間培養した。その後、菌を集め、BMMY培地にサスペンドし、メタノールを加えてPaoxプロモーターを誘導し、30℃で24時間培養した。途中、4時間後と16時間後にメタノールを0.5%加えた。最後に上清を集め、12.5%ゲルで電気泳動を行い、最も発現量の多いクローンsIL-6R-splを選んだ。

次に、形質転換菌株sIL-6R-splの培養上清中のIL-6Rの、IL-6及び抗IL-6R抗体との結合性をそれぞれ解析した。IL-6との結合性をIL-6^{14, 15)}と抗IL-6Rポリクローナル抗体とのELISAで調べた結果、

Fig. 5 aに示すようにIL-6との結合性が確認された。また、抗体との結合性については、IL-6Rのイムグロブリン領域を認識するモノクローナル抗体MT18とは結合しなかった(Fig. 5 b)が、サイトカインレセプター領域を認識するモノクローナル抗体PM1とは結合した(Fig. 5 c)。これは、発現プラスミドpPIC9-sIL-6Rspl(Fig. 4)が、IL-6Rのサイトカインレセプター領域だけをコードすることと矛盾なく対応する。

5. 発酵槽を用いたピキア酵母の培養

2リットルの発酵槽を用いて、形質転換菌株sIL-6R-splの培養を試みた。

これに先立ち、予備検討として、フラスコレベルで、至適メタノール濃度を検討した。その結果、メタノール濃度は2%を超えると菌体増殖、IL-6R生産、メタノール消費に対し阻害効果が確認され、好ましくないと判断した。次に、2リットルの発酵槽のレベルで、複合培地BMMYと合成培地FM21の選択を行った。その結果、Table 3に示すように、合成培地FM21の方が優れており、これを選択した。

2リットルの発酵槽を用いた培養の代表的な結果をFig. 6に示す。また、Fig. 6で用いたsIL-6Rの定量法の原理をFig. 7に示す。ここでは、オンラインメタノールセンサー(ABLE社製)を用いてメタノール濃度を一定濃度に制御している。培養上清中のsIL-6Rの濃度は19mg/lまで達しているが、これは、メタノール

Table 3 Comparison of BMMY and FM21

| Medium | OD600 | IL-6R(mg/l) | Consumption of MeOH(g) |
|--------|-------|-------------|------------------------|
| BMMY | 48 | 1.4 | 125 |
| FM21 | 260 | 10 | 244 |

(1) Fermentation with BMMY : One liter of BMGY (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 13.4 g/l yeast nitrogen base without amino acids, 100 ml/l 1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0), 0.4 mg biotin, 10 ml/l 10% glycerol) was inoculated with a glycerol stock and grown at 30°C for 24 h in 5 liter culture flask. Cells were pelleted, shifted to 1 liter of BMMY medium (same as BMGY except that glycerol was replaced by 5 ml/l methanol) in two liter jar fermentor. (2) Fermentation with FM21 : One liter of FM21 (21ml/l H₃PO₄ (85%) ; 14.28g/l K₂SO₄ ; 3.9g/l KOH ; 11.7g/l MgSO₄·7H₂O ; 0.9g/l CaSO₄·2H₂O ; 1.4ml/l PTM-1(CuSO₄·5H₂O 6g/l ; KI 0.8g/l ; MnSO₄·H₂O 3g/l ; NaMoO₄·2H₂O 0.2g/l ; H₃BO₃ 0.02g/l ; CoCl₂·6H₂O 0.5g/l ; ZnSO₄ 20g/l ; FeSO₄·7H₂O 65g/l) ; 1.4ml/l Biotin(0.2g/l) ; 25g/l glycerol) was inoculated with a glycerol stock. For both fermentations, a methanol feed was initiated upon glycerol exhaustion.

Fermentation parameter included temperature 30°C, pH 5.6 and dissolved oxygen 30% (maintained by agitation and airflow). Methanol was added every 24 hours. Fermentation was performed for 8 days.

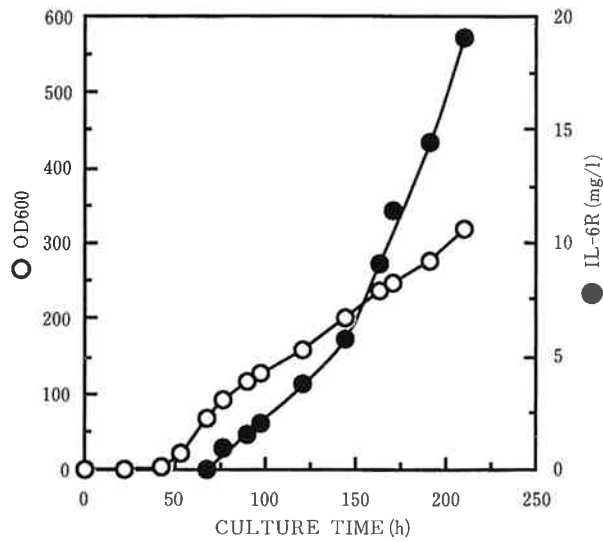


Fig. 6 Fermentation of sIL-6R expressing *Pichia* cells. For fermentation, the Microgen Fermentor (Oriental Biotechnological Systems) was used. The saturated culture was diluted 1:100 in 1 liters of FM21 (21ml H₃PO₄ (85%) ; 14.28g K₂SO₄ ; 3.9g KOH ; 11.7g MgSO₄·7H₂O ; 0.9g CaSO₄·2H₂O ; 1.4ml PTM-1(CuSO₄·5H₂O 6g/l ; KI 0.8g/l ; MnSO₄·H₂O 3g/l ; NaMoO₄·2H₂O 0.2g/l ; H₃BO₃ 0.02g/l ; CoCl₂·6H₂O 0.5g/l ; ZnSO₄ 20g/l ; FeSO₄·7H₂O 65g/l) ; 1.4ml Biotin(0.2g/l) ; 25g glycerol). Fermentation parameter included temperature 30°C, pH 5.6 and dissolved oxygen 30% (maintained by agitation and airflow). Upon glycerol exhaustion, a methanol feed was initiated to maintain the definite concentration.

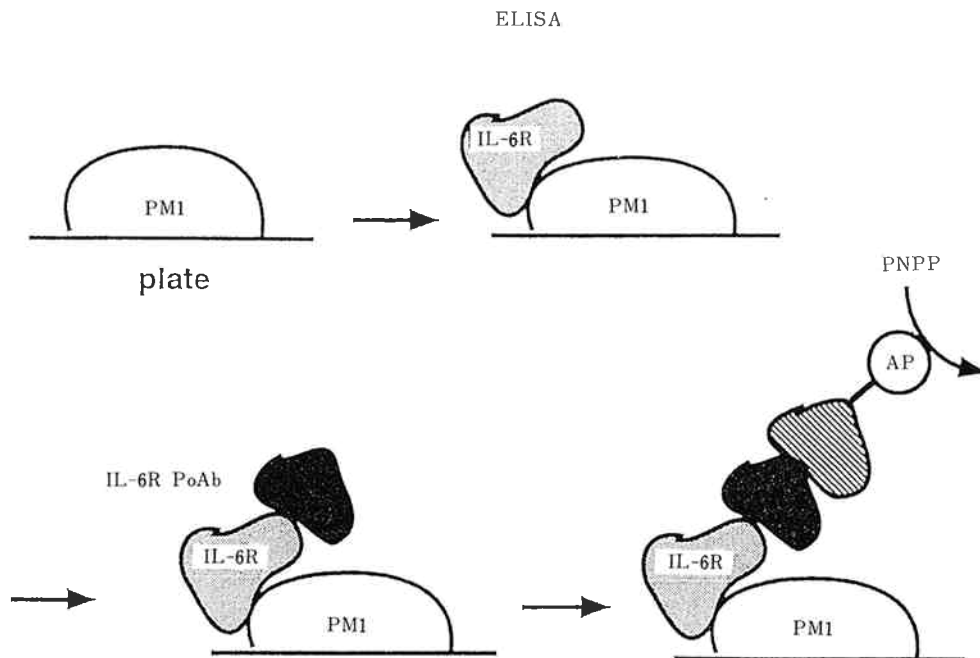


Fig. 7 Principle of ELISA for sIL-6R composed of anti-human IL-6R mAb PM1 and anti-sIL-6R polyclonal antibody.

濃度をマニュアルで制御したときのsIL-6Rの濃度(10mg/l)より高く、オンラインメタノール制御が有効であることを示す。

今後、発現量をさらに増加させるために、添加剤等の検討を行っていきたい。

6. IL-6Rの精製

培養上清中のIL-6Rは、抗体によるアフィニティークロマトにより精製した。培養上清を、分画分子量300万のUF膜で限外ろ過し、さらに分画分子量10000のUF膜で膜濃縮した。濃縮液をフィルターでろ過した後、抗IL-6Rモノクローナル抗体PM1が結合したカラム(AF-Tresyl Toyopearl)にかけた。溶出は、3Mのチオシアン酸カリウムで行い、直ちにリン酸緩衝液に透析した。Fig. 8から明らかなように、SDS/PAGEで均一なsIL-6Rを取得した。

さらに、このようにして取得されたsIL-6Rは、CHO細胞由来のsIL-6Rと比較して、骨髄幹細胞への増殖分化の誘導において、同等の活性を示した(データ省略)。

抗体を用いるアフィニティークロマト法は、精製効率が高いが、スケールアップが困難であることと、溶出条件(この場合は3Mのチオシアン酸カリウム)が蛋白質の変性につながりやすいという欠点をもつ。将来的には、汎用のHPLCを組み合わせた精製方法を構築したい。

また、取得したsIL-6RのN末端・C末端の決定や糖鎖構造の決定も今後の課題である。

7. おわりに

本研究により、IL-6とsIL-6Rの組み合わせが、gp130刺激剤として、造血領域における臨床応用の可能性が示唆された。

gp130の刺激剤として、本研究に用いたIL-6とsIL-6Rの組み合わせが最適かどうかは今後の課題である。例えば、血小板増多効果がよく知られているIL-11もgp130刺激剤のひとつである。IL-11はIL-11R陽性gp130陽性細胞が標的となるのに対し、IL-6とsIL-6Rの組み合わせはgp130陽性細胞がすべて標的となるので、両方で活性の種類や強度が異なるものと思われる。gp130を刺激するファクターは、IL-11以外にもOncostatinMやCiliary Neurotropic factor等が知られている¹⁶⁾。IL-6とsIL-6Rを組み合わせると直ちにIL-6・sIL-6R複合体が形成されるが、結合と解離は一定の結合定数に従うため、低い濃度では、解離に傾く可能性もある。この点を考慮し、最近、IL-6とIL-6Rの融合蛋白質(IL-6とIL-6Rが1本のポリペプチド鎖でつながっている)がピキア酵母で発現され、新しい構造のgp130刺激剤として報告された¹⁷⁾。一方、gp130に対する抗体の中に、gp130を刺激するものが発見されたとの報告もある¹⁸⁾。

さらに、本研究に用いたピキア酵母で発現した

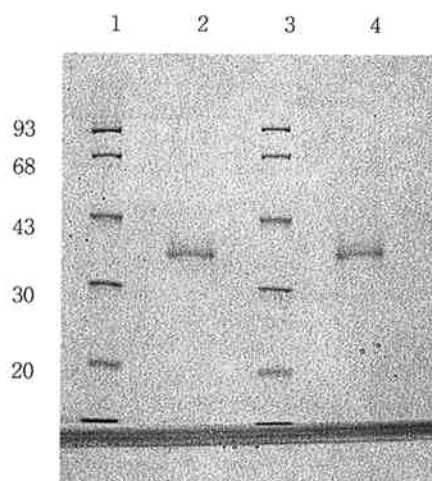


Fig. 8 SDS/PAGE analysis. The purified sIL-6R was analyzed by electrophoresis on a 0.1% SDS/15% polyacrylamide gel under reducing condition. Mw(kDa) of standards are shown to the left. Lane 1, 3, marker; lane 2, 4, purified sIL-6R. sIL-6Rs of lane 2 and lane 4 are different lots.

sIL-6Rの物性の検討 (N末端やC末端の決定、糖鎖構造の決定等) や、培養・精製条件の改良も今後の課題である。

造血領域の新しい治療法の開発は、これまで不治であった病気の治癒を可能にし、将来の医療を一変させるものと期待されている。将来、臨床の場で本研究の成果が生かされることを楽しみに、上記課題に対処していきたい。

本研究は、東京大学医科学研究所中畑龍俊教授とマインツ大学医学部ローズジョン教授との共同研究である。

文 献

- 1) 保川 清, 斉藤貴司, 二木研輔, 鈴木 浩, 東ソー研究報告, **35**, 77 (1991)
- 2) K.Yasukawa, T.Saito, Y.Fukunaga, Y.Sekimori, Y.Koishihara, H.Fukui, Y.Ohsugi, T.Matsuda, H.Yawata, T.Hirano, T.Tagata and T.Kishimoto, *J.Biochem.*, **108**, 673 (1990)
- 3) T.Tagata, M.Hibi, Y.Hirata, K.Yamasaki, K.Yasukawa, T.Matsuda, T.Hirano and T.Kishimoto, *Cell*, **58**, 573 (1989)
- 4) 保川 清, 免疫薬理, **10**, 398 (1992)
- 5) K.Yoshida, Chamber,I., Nichols,J., Smith, A., A.Saito, K.Yasukawa, Shoyab,M., T.Tagata and T.Kishimoto, *Mech.Dev.*, **45**, 163 (1994)
- 6) K.Ikeda, M.Kinoshita, N.Tagaya, T.Shinojima, T.Tagata, K.Yasukawa, H.Suzuki and A.Okano, *Brain Res.*, **726**, 91 (1996)
- 7) S.Tajima, K.Tsuji, Y.Ebihara, Sui,X., R.Tanaka, K.Muraoka, M.Yoshida, K.Yamada, K.Yasukawa, T.Tagata, T.Kishimoto and T.Nakahata, *J.Exp.Med.*, **184**, 1357 (1996)
- 8) T.Ishibashi, H.Kimura, Y.Shikama, T.Uchida, S.Kariyone, T.Hirano, T.Kishimoto, F.Takatsuki and Y.Akiyama, *Blood* **74**, 1241 (1989)
- 9) S.Asano, A.Okano, K.Ozawa, T.Nakahata, T.Ishibashi, K.Koike, H.Kimura, Y.Tanioka, A.Shibuya, T.Hirano, T.Kishimoto, F.Takaku and Y.Akiyama, *Blood* **75**, 1602 (1990)
- 10) 柿谷 均, 金子貴史, 東ソー研究報告, **36**, 3 (1992)
- 11) H.Yawata, K.Yasukawa, S.Natsuka, M.Murakami, K.Yamasaki, M.Hibi, T.Tagata and T.Kishimoto, *EMBO J.*, **12**, 1705 (1993)
- 12) S.Rose-John, and P.C.Heinrich, *Biochem.J.*, **300**, 281 (1994)
- 13) G.Muller-Newen, C.Kohne, R.Keul, U.Hemmann, W.Muller-Esterl, J.Wijdenes, J.P.J.Brakenhoff, M.H.L.Hart, and C.Heinrich, *Eur.J.Biochem.*, **236**, 837 (1996)
- 14) 保川 清, 浅越義弘, 斉藤貴司, 丸尾直子, 三宅俊男, 東ソー研究報告, **32**, 161 (1988)
- 15) K.Yasukawa and T.Saito, *Biotech.Lett.*, **12**, 419 (1990)
- 16) T.Tagata, M.Narazaki, K.Yasukawa, T.Saito, D.Miki, M.Hamaguchi, S.Davis, M.Shoyab, G.D.Yancopoulos, and T.Kishimoto, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 10998 (1992)
- 17) M.Fischer, J.Goldschmitt, C.Peschel, J.P.G.Brakenhoff, K-J.Kallen, A.Wollmer, J.Grotzinger, and S.Rose-John, *NatureBiotech.*, **15**, 142 (1997)
- 18) J.Wijdenes, P.C.Heinrich, G.Muller-Newen, C.Roche, Z-J.Gu, C.Clement, and B.Klein, *Eur.J.Immunol.*, **25**, 123 (1995)



著 者

氏名 保 川 清

Kiyoshi YASUKAWA

入社 昭和59年4月2日

所属 東京研究所

有機分野

主任研究員



著 者

氏名 家 亀 晴 宇

Harutaka YAGAME

入社 平成4年4月1日

所属 東京研究所

有機分野

副主任研究員



著 者

氏名 井 出 輝 彦

Teruhiko IDE

入社 平成元年4月1日

所属 東京研究所

有機分野

副主任研究員



著 者

氏名 田 崎 誠 一

Seiichi TAZAKI

入社 昭和60年4月1日

所属 東京研究所

有機分野



著 者

氏名 中 村 誠

Makoto NAKAMURA

入社 平成2年3月16日

所属 東京研究所

有機分野



著 者

氏名 村 山 敬 一

Keiichi MURAYAMA

入社 昭和53年4月3日

所属 東京研究所

有機分野

主任研究員



著 者

氏名 勝 浦 公 男

Kimio KATSUURA

入社 昭和61年1月16日

所属 東京研究所

有機分野

主席研究員