

## インターロイキン5の構造と機能

鶴岡伸夫

**要約:** インターロイキン5 (IL-5) は, T細胞が産生するサイトカインのなかでも稀な, ジスルフィド結合を介したホモダイマー構造を有する糖タンパク質である。他のサイトカインが複数の標的細胞に働くことにより多彩な生物活性を示すのに対して, ヒトIL-5の生物活性は, 好酸球系前駆細胞にのみ作用するものと考えられてきた。実際, マウスにおいてもヒトにおいても同様に, IL-5は好酸球系前駆細胞に働いて, 選択的な好酸球の増殖ならびに分化を引き起こすことが明らかとなった。一方, 血中および組織局所における好酸球増多は, 気管支喘息, アトピー性アレルギー, 蠕虫感染, 種々の癌において認められる特徴的な症状である。これら種々のヒト好酸球性疾患において認められる好酸球増多がIL-5の産生を伴っていることから, IL-5が好酸球増多症において一定の役割を果たしているだろうと考えられるようになった。さらに現在では, IL-5は好酸球増多症を引き起こす主要な, そして恐らく唯一のサイトカインであると広く認められるようになった。そこで, 本総説では, このユニークなサイトカインの構造と機能について詳細に述べてみたい。

**索引用語:** インターロイキン5, T細胞代替因子, 好酸球分化因子, 糖鎖構造,

## Structure and function of Interleukin 5

NOBUO TSURUOKA

**Abstract:** Interleukin 5 (IL-5) is unusual among the T-cell-produced cytokines in being a disulfide-linked homodimeric glycoprotein. In contrast to other cytokines, which have pleiotropic action on a variety of cell types, the biological activity of human IL-5 has assumed to be restricted to the eosinophil cell lineage. IL-5 acts on eosinophil lineages to induce their selective proliferation and differentiation in humans as well as in mice. Blood and local tissue eosinophilia are recognized features of bronchial asthma, atopic allergy, helminthic infestations, and various malignant disorders. The association of these eosinophilia with the IL-5 production in a wide spectrum of human eosinophilic diseases suggest a unique role for IL-5 in the progression of eosinophilia. Furthermore, it is now recognized that IL-5 is the major, and possibly the only cytokine involved in the production of specific eosinophilia. In this review, I will discuss the structure and function of this unique cytokine in detail.

**Key phrases:** Interleukin 5, T cell-replacing factor, eosinophil differentiation factor, carbohy

サントリー株式会社生物医学研究所  
大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1

Suntory Institute for Biomedical Research,  
1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho,  
Mishima, Osaka 618

\*本総説は岐阜薬科大学博士論文(乙第194号)の内容を中心にまとめたものである。

drate structure,

骨髄には“多能性血液幹細胞”と呼ばれる骨髄の造血組織の微細環境やサイトカインなどの細胞増殖分化因子のシグナル次第ではどのような種類の血液細胞にもなりうる細胞群が存在している。細胞が固有の機能をもった成熟細胞に分化する場合、それらすべての成熟細胞は、この多能性幹細胞から成熟分化したものと考えられている。最近、最後の血液細胞分化因子と言われていた血小板増加因子TPO (*c-mpl* リガンド)の遺伝子がクローニングされ<sup>1)~4)</sup>、また、生理的に機能していることが示された<sup>5)</sup>。この結果、各種サイトカインを単独であるいはその組み合わせにより、試験管内で成熟した細胞に分化させることがほとんど可能になってきたと考えられる。実際の生体内における造血機構としては、造血機構の恒常性を維持するために成熟血液細胞が常に新生される“構成的造血反応”、炎症反応時や寄生虫感染時における生体の防御反応としての“誘導的造血反応”の二つにわけて考えることができる。どちらの場合においても各種サイトカインの作用による制御を受けている。また、これらの造血反応を制御しているサイトカインの特色としては、1) 複数の標的細胞に働くことにより多彩な生物活性を示す。2) 同一の標的細胞に対して複数のサイトカインが重複して作用する。3) レセプターサブユニットを共有する結果、複数のサイトカインが同一の細胞内シグナル伝達機構を共有することによりサイトカインネットワークを形成する。などの多様性を示すことが一般に認められている。

サイトカインの中でもインターロイキン5 (IL-5) は、インターロイキン3 (IL-3) および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) とともに血液幹細胞に働いて、好酸球への分化増殖を促進する重要な因子である<sup>6), 7)</sup>。特に、IL-5は、好酸球の最終分化段階に関与し、寄生虫感染<sup>8)</sup>やアレルギー性疾患<sup>9), 10)</sup>において好酸球を局所に動員する主要な因子であることがわかってきた。このような好酸球の誘導的造血反応は、寄生虫感染では、寄生虫排除という生体防御反応であると考えられる。一方、アレルギー性疾患においては、炎症局所に好酸球が浸潤するとともに好酸球顆粒由来蛋白質が組織障害性を引き起こすことが明らかとなり、好酸球はアレルギー性炎症における増幅細胞として注目を集めるようになった<sup>11)</sup>。

これらのことから、細胞分化増殖因子としてのヒトIL-5は、好酸球の誘導的造血反応を制御する極めて選択的な好酸球増殖分化因子として捉えることも可能であるように思われる。そこで、本総説では、遺伝子組換えIL-5の構造ならびに機能についての筆者らの研究を中心に紹介すると共に、サイトカインとしてのIL-5の位置づけについてもわかりやすく解説しながら考察してみたい。

## IL-5の発見

B細胞が分化増殖して抗体産生細胞になるためには、マクロファージやT細胞由来のいくつかの液性因子がその制御に関与していることが知られている。インターロイキン5 (IL-5) は、当初、成熟後期B細胞に作用して抗体産生細胞に最終分化させる因子、すなわち、T細胞代替因子 (T cell-replacing factor, TRF) として報告された<sup>12)~14)</sup>。また、このT細胞代替因子は、マウス慢性B白血病細胞株であるBCL<sub>1</sub>細胞の増殖誘導活性で定義されるBCGF II 活性をも併せもつことから、既知のサイトカイン活性を示さない新しいサイトカインであると考えられるようになった。一方、Sandersonら<sup>15)</sup>は、寄生虫感染マウスの脾細胞を用いた一連の実験から、アロ抗原反応性T細胞クローンの培養上清中に好酸球分化因子活性を認め、この因子をEDF (Eosinophil differentiation factor) と命名した。その後、EDFもBCGF II 活性を示すことが明らかとなり、TRFとEDFの異同に興味を持たれた。TRFとEDFの異同については、それぞれの遺伝子のクローニングにより明らかとなった。すなわち、1986年Kin

ashi ら<sup>16)</sup>は、マウス慢性B白血病細胞株であるBCL<sub>1</sub>細胞の増殖促進活性とIgM産生誘導活性を指標にマウスTRFのcDNAをクローニングし、ヒトTRFのcDNAは、マウスとの相同性に基つきAzuma ら<sup>17)</sup>によってクローニングされた。また、1987年Campbell ら<sup>16)</sup>によりクローニングされたEDF遺伝子は、TRF遺伝子と同一であることが判明した。これが現在のIL-5である。

## IL-5の発現

ヒトIL-5は、大腸菌<sup>18)</sup>や酵母<sup>19)</sup>でも発現されている。しかしながら、筆者らは、動物細胞での発現を試みた。一般に、動物細胞でタンパク質を発現する場合、CHO細胞が使われることが多い。その理由は、発現しようとするタンパク質の遺伝子増幅が比較的容易であることによる。実際の遺伝子増幅の手段としては、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子とメトトレキセート(MTX)による組み合わせで行う。一般に、MTXは葉酸拮抗作用によりDNA合成を阻害するため、白血病の治療や、最近では、低用量で慢性関節リウマチなどに使用されている薬剤である。ところが、MTX投与を受けた患者の中には、homologous staining regionと呼ばれる染色体上のトリプシン消化後のギムザ染色で強く染色される一部の領域が伸びる現象が認められる。この領域には、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子があり、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子が近傍を含めて数千ベースに渡って、増幅していることがわかった。このメカニズムについてはよくわかっていないが、この現象をタンパク質の発現に利用するために、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子欠損CHO細胞が開発された<sup>20)</sup>。したがって、ウイルスプロモーターの下流にジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子および発現しようとするタンパク質の遺伝子を繋いだプラスミドを細胞内にトランスフェクションし、その後、MTX耐性株をとることにより比較的容易に目的としたタンパク質遺伝子の増幅した産生株を取得することができる。その他、遺伝子増幅のシステムとして、glutamine synthetase 遺伝子とその酵素阻害剤であるmethionine sulphoximineによる系も利用されている<sup>21)</sup>。

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子とMTXによる組み合わせでヒトIL-5ならびにマウスIL-5を発現したところ、その発現量はどちらも10 mg/L程度であった。この発現量については、CHO細胞における発現量としては少ない部類に属する。また、大腸菌での発現量と比べると極めて低いレベルである。しかしながら、大腸菌で発現した場合の問題点としては、組換えタンパク質に糖鎖が付加しないこと、また、正しくfoldingしたタンパク質が必ずしも得られないことの二点が挙げられる。したがって、CHO細胞における発現は、大腸菌でうまく発現しない場合や糖鎖が活性発現に必須である場合に有用な方法であると思われる。最近では、昆虫細胞用の発現ベクターも開発されており、筆者らも他のタンパク質での発現を試みている<sup>22),23)</sup>。

## IL-5の構造および特徴

### 1) 一次構造

クローニングされたヒトIL-5cDNAから予想されるアミノ酸配列は134個のアミノ酸からなる。CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトIL-5により検討したところ、分泌過程で19個のシグナルシーケンスが遺伝子組換えヒトIL-5の前駆体から切り離される。その結果、ヒトIL-5の成熟タンパク質は、イソロイシンをN末端とする115個のアミノ酸から成るポリペプチドがホモダイマーを形成している<sup>24)</sup>。一方、マウスIL-5も同様に、そのcDNAから予想されるアミノ酸配列は133個のアミノ酸からなり、20個のシグナルシーケンスが切り離されることにより、マウスIL-5の成熟タンパク質は、ヒトIL-5と比べるとN末端部分のアミノ酸が二つ欠けたメチオニンをN末端とする113個のアミノ酸から成るポリペプチドが、ホモダイマーを形成している。また、CHO細胞で発現した遺伝子組換えマウスIL-5では、C末端アミノ酸のグリシン(Gly-113)を欠失した分子種が約40%認められる。ヒトIL-5で検討したC

末端アミノ酸を除去した実験では、少なくともC末端4残基は活性発現に必須でないとの結果を得ていることから、マウスIL-5におけるC末端アミノ酸のグリシンは、活性発現に必須でないと思われる。C末端アミノ酸の役割については後述する。一方、天然マウスIL-5においては、C末端アミノ酸のグリシン(Gly-113)を欠失した分子種が存在するか否かは不明である。また、ヒトIL-5とマウスIL-5のアミノ酸レベルにおける相同性は、73%である。天然IL-5ならびに遺伝子組換えIL-5のいずれも分子量約46 kDa-50 kDaである。しかし、IL-5タンパク質のみの分子量が約25 kDaと計算されることから、IL-5分子量の約半分は糖鎖である。したがって、IL-5の糖鎖構造や糖鎖の機能について明らかにすることは重要であると思われる。

## 2) ジスルフィド結合

IL-5は一分子内に二つのシステインがあり、ヒトIL-5の場合、44番目と86番目にシステインが存在する。そこで、IL-5のジスルフィド結合様式を検討した。すなわち、IL-5を酵素的に消化し、ペプチドフラグメントを得たのち、各ペプチドフラグメントを逆相HPLCにより分離し、ペプチドマップを作製した。この時、還元条件下および非還元条件下におけるペプチドマップを行い、システイン残基を含むペプチドフラグメントを同定した。さらに、システイン残基を含むペプチドフラグメントのN末端アミノ酸配列分析を行った結果、ヒトIL-5のジスルフィド結合様式は、44番目と86番目のシステインが、それぞれ、分子間でジスルフィド結合を形成していることを確認した<sup>26)</sup>。

## 3) 糖鎖付加可能箇所および結合位置

ポリペプチドに結合している糖鎖には、

- a) アスパラギン結合型糖鎖 (N型糖鎖)
- b) ムチン型糖鎖 (O型糖鎖)
- c) GPI (glycosylphosphatidylinositol)-アンカー

の三種類存在することが知られている<sup>26)</sup>。GPI-アンカーと結合した糖鎖はペプチドと脂質間の橋わたし役を担っているが、CNTF(ciliary neurotropic factor)レセプターでは、膜貫通領域を持たないかわりに、このGPI-アンカーにより膜と結合している<sup>27)</sup>。また、アスパラギン結合型糖鎖は、アミノ酸配列 Asn-X-Ser or Thr の Asn に結合する糖鎖であり、すべてN-アセチルグルコサミン残基を介してアスパラギンに結合している。ムチン型糖鎖は、一般に、N-アセチルガラクトサミン残基を介して Ser あるいは Thr 残基に結合している糖鎖であるが、ヒドロキシリジンあるいはヒドロキシプロリンを介して結合する例も知られている。

アミノ酸配列から予想されるアスパラギン結合型糖鎖付加可能箇所は、ヒトIL-5ではAsn-28 と Asn-71 の2箇所、また、マウスIL-5ではAsn-26, Asn-55 および Asn-69 の3箇所である。しかしながら、後述する糖鎖構造解析により、実際のヒトIL-5におけるアスパラギン結合型糖鎖付加箇所はAsn-28 の1箇所であった。一方、マウスIL-5におけるアスパラギン結合型糖鎖付加箇所は、Asn-26 および Asn-55 の2箇所であった。また、ムチン型糖鎖糖鎖は、ヒトIL-5では、Thr-3 に結合していることを確認したが、マウスIL-5ではムチン型糖鎖は結合していなかった。

## 4) 高次構造

1934年、イギリスのBernal と Crowfoot <sup>28)</sup>はペプシン結晶のX線回折写真の撮影に成功し、タンパク質のような大きな分子においても一定の分子構造をとることを実証した。ついで、1967年、Phillips ら <sup>29),30)</sup>はX線結晶構造解析によりグロビン類で $\alpha$ ヘリックス構造を、また、リゾチームで $\beta$ シート構造を実証した。これらの歴史を経て種々のタンパク質の高次構造の解析が成されるようになり、今日までに1000を越えるタンパク質の高次構造が判明している。X線結晶構造解析は、いかに良質の結晶タンパク質を得るかにより分解能が規定される。

IL-5では、1993年、Milburn ら<sup>31)</sup>により大腸菌で発現したヒトIL-5が結晶化され、2.4 Åの分解能でX線結晶構造解析に成功した。その結果、他のサイトカインと同様に、4つの $\alpha$ ヘリックス構造と2つの $\beta$ シート構造を形成していた(Table 1)。しかしながら、すでに結晶構造解析されているGM-CSFなどとは異なり、IL-5は二量体を形成してはじめて4 $\alpha$ -2 $\beta$ 構造をとることが明らかとなった。

Table 1 Cytokine tertiary structure predictions<sup>31)</sup>

Query sequence	Tertiary structure	Number of residues used in alignment	Most similar structure	Normalized Z score
IL-1 $\beta$	$\beta$ -Barrel	153	M-CSF	0.04
IL-2	4 $\alpha$ -2 $\beta$	133	IL-4	3.25
IL-3	Unknown	133	GH	2.66
IL-4	4 $\alpha$ -2 $\beta$	129	IL-5	4.95
IL-5	4 $\alpha$ -2 $\beta$	115	IL-4	4.38
IL-6	Unknown	183	M-CSF	3.58
IL-7	Unknown	129	IL-2	4.72
IL-8	1 $\alpha$ -4 $\beta$	72	IL-4	1.33
IL-10	Unknown	161	IL-2	3.71
IL-11	Unknown	182	IL-5	4.34
GM-CSF	4 $\alpha$ -2 $\beta$	127	M-CSF	3.27
G-CSF	Unknown	174	GM-CSF	2.29
M-CSF	4 $\alpha$ -2 $\beta$	150	GM-CSF	3.18
GH	4 $\alpha$	191	IL-2	1.79
LIF	Unknown	179		2.32
SCF	Unknown	164	M-CSF	6.35
EPO	Unknown	166	GM-CSF	3.55

## IL-5の糖鎖構造

### 1) アスパラギン結合型糖鎖

アスパラギン結合型糖鎖は、その構成糖および分岐の型から高マンノース型、複合型、混合型の3タイプに分類される。一般に、これらアスパラギン結合型糖鎖の生合成は、まず、粗面小胞体の内腔側で脂質中間体からその糖鎖部分が、翻訳中のポリペプチド鎖のアスパラギンにひとまとめに転移されることから始まる。その後、粗面小胞体でグルコースと一部のマンノースが除去されるが、一部の粗面小胞体局在性のアスパラギン結合型糖鎖をもつ糖タンパク質はこのままとどまるため、高マンノース型糖鎖のままとなる。その他のオルガネラ糖タンパク質、細胞表面糖タンパク質あるいは分泌糖タンパク質は、ベシクル輸送によりゴルジ体に移り、さらにマンノースが除去される。このゴルジ体では、ゴルジ体酵素であるN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ群の作用のよりN-アセチルグルコサミンが導入され、分枝構造をとるようになる。この分枝構造の形成により、高マンノース型糖鎖から混成型糖鎖および複合型糖鎖への変換が始まり、フコースの導入、また、トランスゴルジ領域でのガラクトースの導入を経て、最後に、シアル酸が導入されてアスパラギン結合型糖鎖の生合成が完成する。これら一連のアスパラギン結合型糖鎖合成のそれぞれのステップで、種々の酵素が触媒として働いていることがわかっている。その中でも、分枝構造の形成に関わる酵素群は重要である。

Brockhausen ら<sup>32)</sup>は、1988年、ニワトリオボムコイドで実際に観察されるアスパラギン結合型糖鎖の分枝構造

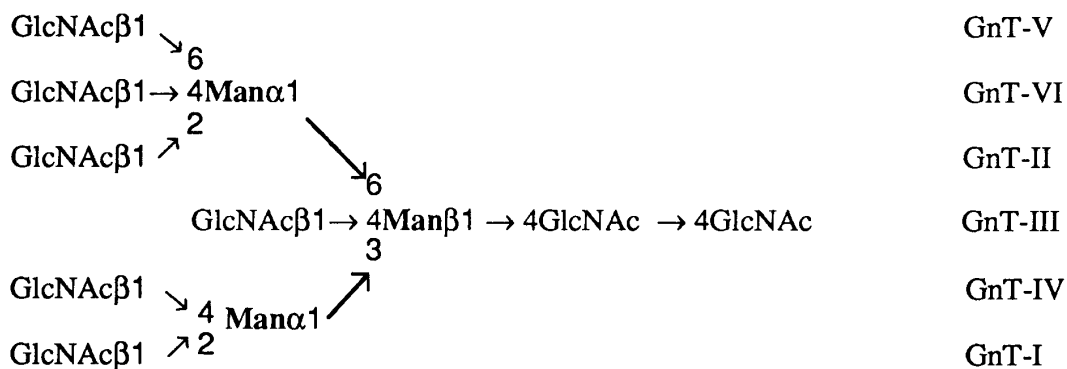


Fig. 1 Highly branched asparagine-linked sugar chains in hen ovomucoid and *N*-acetylglucosaminyltransferases<sup>32)</sup>.

から、*N*-アセチルグルコサミンの転移導入反応を触媒している6種の*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをGnT-IからGnT-VIと命名した(Fig. 1)。すなわち、Man  $\alpha$  1-3(Man  $\alpha$  1-6)Man  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-4GlcNAc のトリマンノシル構造のコア構造に、*N*-アセチルグルコサミンが転移することによりこれらの分枝構造が形成されることになる。また、*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ群遺伝子の発現は、厳密に制御されていると考えられるが、癌化など生体の恒常性が失われる場合に*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ活性の上昇が認められることが知られている。特に、肝癌におけるGnT-III酵素活性の上昇や、乳癌におけるGnT-V酵素活性の上昇が確認されている。筆者らも*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ酵素研究の一環としてGnT-V酵素の研究に取り組み、ヒトGnT-V酵素単離精製に成功している<sup>33)</sup>。

アスパラギン結合型糖鎖構造解析は、Kobata ら<sup>34)</sup>によって開発された方法が一般に用いられる。すなわち、ヒドラジン分解してアスパラギン結合型糖鎖を遊離した後、還元末端をNaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>によりトリチウム標識する。その後、エキソグリコシダーゼ消化やレクチンカラムクロマトグラフィーおよびBio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィーの組み合わせにより分離同定していく。CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトIL-5のアスパラギン結合型糖鎖構造をTable 2にまとめて示した<sup>35)</sup>。その結果、CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトIL-5アスパラギン結合型糖鎖の主な構造は、シアル酸の結合していない二本鎖複合型糖鎖であった。また、CHO細胞で発現した遺伝子組換えIL-5では、糖鎖末端シアル酸を含む割合は13.3%と非常に少ないが、すべて $\alpha$  2,3 結合であった。これは、CHO細胞で発現した糖タンパク質共通の特徴であり、CHO細胞が $\beta$ -galactoside  $\alpha$  2,6-sialyltransferaseを欠いているためと考えられている。実際、CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトEPOのシアル酸結合が、すべて $\alpha$  2,3 結合であるのに対して、ヒト尿中から精製したヒトEPOでは、40% が $\alpha$  2,6結合であった<sup>36)</sup>。そこで、CHO細胞に $\beta$ -galactoside  $\alpha$  2,6-sialyltransferase cDNAを発現し、人為的にSialylationする試みもなされている<sup>37)</sup>。また、EPOの場合、アスパラギン結合型糖鎖の主な構造は、CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトEPOおよびヒト尿中から精製したヒトEPOどちらの場合においても4本鎖糖鎖であった。このように、同じCHO細胞で発現した組換えタンパク質でも糖鎖の分枝構造の違いが生じる原因についてはよくわかっていない。しかし、可能性の一つとして、前述の*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子がタンパク質の立体障害により作用できない結果、限定された分枝構造にとどまるものと考えられる。

## 2) ムチン型糖鎖

ムチン型糖鎖はアスパラギン結合型糖鎖に比べ基本骨格が単純であり、一つの糖鎖の分子量も小さい。しかしながら、IgA<sub>1</sub> のようにヒンジ部における22個のアミノ酸のうち5箇所ムチン型糖鎖が並んで密に結合している例も知

Table 2 Proposed structure of the asparagine-linked sugar chains of rhIL-5

Structures	Molar ratio(%)
$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	2.6
$(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2)_{0-1} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \end{array} \right. \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	1.0
$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \end{array} \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 2 \\ \searrow 4 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \\ \searrow 3 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	1.0
$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \end{array} \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 2 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	6.6
$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \end{array} \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 4 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	3.9
$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	70.7
Acidic forms of oligosaccharides in the following fractions	
$(\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3)_{1-2} \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \end{array} \right. \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 2 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	2.1
$(\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3)_{1-2} \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \end{array} \right. \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 4 \\ \searrow 2 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	1.2
$(\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3)_{1-2} \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \right. \begin{array}{l} \searrow 6 \\ \searrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$	10.0

られている。

前述の通り、ヒトIL-5には、Thr-3 にムチン型糖鎖が結合している。そこで、CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトIL-5のムチン型糖鎖構造を決定するために、ヒトIL-5をAPI消化後、逆相HPLCにより分析した。その結果、Thr-3 を含むペプチドは、2つのピークとして溶出した。また、ムチン型糖鎖の分析には、基質特異性の高い *Streptococcus pneumoniae* 由来のエンド- $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼがよく用いられる。そこで、本酵素をはじめとして各種酵素を用いて、この2つのペプチドに結合したムチン型糖鎖を詳細に分析した。その結果、Table 3に示すような糖鎖構造であることが判明した<sup>38)</sup>。組成比は、Thr-3 を含む2つのペプチドのアミノ酸分析の比によって決定したところ、約6:4であった。

Table 3 Proposed structures of the O-linked sugar chains of rhIL-5

Structures	Molar ratio(%)
$\begin{array}{l} \text{NeuNAc}\alpha 2 \searrow 6 \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \nearrow 3 \end{array} \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{Thr}$	60.3
$\text{NeuNAc}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{Thr}$	39.7

## IL-5の機能

### 1) 生物活性

#### B細胞に対する作用

マウスIL-5は、マウス慢性B白血病細胞株であるBCL<sub>1</sub>細胞の増殖誘導活性 (BCGF II 活性)や活性化マウスB細胞をIgM, IgG<sub>1</sub>, IgA産生細胞へ分化誘導する活性を示す。また、IL-5を発現したトランスジェニックマウスは、顕著な好酸球増多症を示すと共に血清IgMが著しく上昇し、血清IgAも上昇した<sup>39)</sup>。しかしながら、ヒトIL-5のヒトB細胞への作用は、活性があるとする成績<sup>40)</sup>とともに活性がないとする成績<sup>41)</sup>もあり、確かなことは不明である。筆者らもヒトIL-5のヒトB細胞への作用を追試したが、活性を示す結果は得られなかった。いずれにせよ、ヒトIL-5のヒトB細胞への作用は、極めて稀な条件下においてのみ認められるものと思われる。ヒトIL-5のマウスB細胞への作用をみたのがFig. 2Aである。ヒトIL-5は、マウスIL-5の1/2500の活性を示すにとどまった<sup>42)</sup>。また、放射性ヨードラベル体を用いて競合的阻害実験によりレセプターに対する結合能を検討した結果、マウスおよびヒトIL-5の生物活性は、レセプター結合能と相関していることが明らかとなった(Fig. 2B)。

#### 好酸球に対する作用

IL-5の好酸球に対する作用は、ヒトIL-5でもマウスIL-5でも同様に確認されている。IL-5は、IL-3およびGM-CSFとともに好酸球の骨髓前駆細胞に働いて、好酸球を分化増殖する活性(EDF 活性)を示す。3者はそれぞれ単独で好酸球コロニー形成能を持っているが、IL-3やGM-CSFは、好酸球コロニーだけでなく好中球、単球、マクロファージなどのコロニー形成能をも併せ持っている。しかしながら、IL-5では好酸球コロニーのみを形成することから、選択的な好酸球分化因子であるといえる。また、IL-5は5FU抵抗性の幼若な好酸球骨髓前駆細胞には働かないことから、好酸球系骨髓前駆細胞の最終分化成熟を支持するものと考えられる。実際、IL-3やGM-CSFにより分化成熟



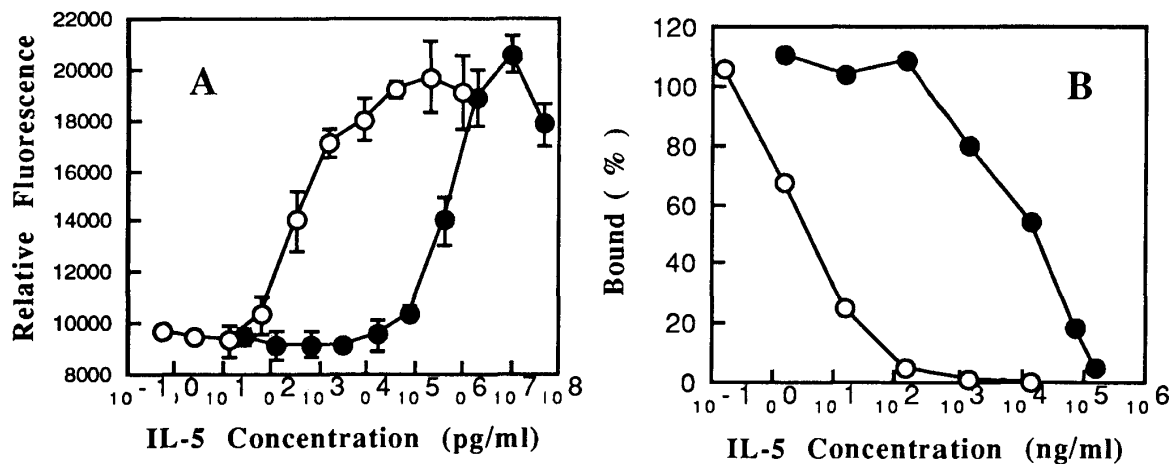


Fig. 2 (A) Dose response for rmIL-5 (○) and rhIL-5 (●) in IgM-inducing assays. (B) Inhibition of binding of <sup>125</sup>I-rmIL-5 to BCL<sub>1</sub> cells by rmIL-5 (○) or rhIL-5 (●).

した好酸球が幼若な好酸球であるのに対して、IL-5により分化誘導された好酸球コロニーの大半が成熟好酸球であることが示されている。また、IL-5の好酸球への作用として、成熟好酸球からのスーパーオキシド産生の増強<sup>43)</sup>、および好酸球の遊走活性<sup>44)</sup>などが報告されている。

#### その他の作用

IL-5のその他の作用として、好塩基球への作用が挙げられる。IL-5は、好塩基球の生存延長活性<sup>45)</sup>ならびに好塩基球からのロイコトリエンC<sub>4</sub>やヒスタミン遊離の促進活性<sup>46)</sup>を示す。

#### 2) 活性発現部位

サイトカインのC末端アミノ酸を除去すると、その生物活性が減少することがIL-6<sup>47)</sup>やTNF- $\alpha$ <sup>48)</sup>で示されている。そこで、ヒトIL-5のC末端アミノ酸を除去した場合の生物活性について検討した。ヒトIL-5の場合、メチオニン残基がC末端(Met-107)にのみ一つ存在することがわかっている。そこで、CNBr処理によりメチオニンC末端側で切断し、ヒトIL-5(1-107)を得、intactヒトIL-5の活性と比べることにした。その結果、Fig. 3に示したように、ヒトIL-5(1-107)は、全く活性を失う結果となった。次に、クロラミンTにより、Met-107の化学修飾を行った結果、活性発現にはC末端メチオニンが重要であることがわかった<sup>49)</sup>。

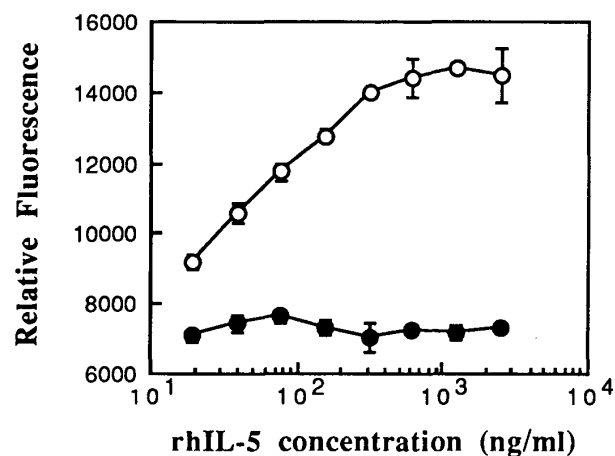


Fig. 3 Effect of CNBr treatment on the IgM-inducing activity of rhIL-5 on BCL<sub>1</sub> cells. RhIL-5 was treated with (●) or without (○) CNBr and purified by C-4 reversed phase HPLC.

一方, McKenzieら<sup>50)</sup>は, 非常に巧妙な方法でIL-5の活性発現部位を検討している。彼らは, マウスIL-5とヒトIL-5の各種キメラタンパク質をコードする遺伝子を作製し, COS-1細胞にトランスフェクションすることにより発現したキメラタンパク質の活性を評価した。すなわち, マウスIL-5とヒトIL-5の種特異性を利用して, 各キメラタンパク質のマウス細胞に対する挙動がマウスタイプ(高比活性型)になるかヒトタイプ(低比活性型)になるかを検討した。その結果, IL-5のC末端から約1/3のアミノ酸が生物活性発現に重要であることを示した。また, Shanafeltら<sup>51)</sup>も, IL-5とGM-CSFのキメラタンパク質を用いた実験から, 同様にIL-5のC末端が活性発現に重要であることを示した。

3) IL-5における糖鎖の役割

糖タンパク質に結合した糖鎖の役割については, いくつかのことが考えられる。例えば, 糖鎖による立体障害によりプロテアーゼに対する安定性が増大したり, 糖鎖付加により粘度や親水性が上昇することも知られている。また, GalやGalNAcを露出した糖タンパク質は, 肝臓に集積することも知られている<sup>52)</sup>。糖タンパク質であるヒトIL-5の糖鎖の役割の一つとして, 活性発現への寄与を確かめることは重要であると思われる。そこで, 糖鎖を除去した場合のヒトIL-5の活性を intact ヒトIL-5の活性と比べた<sup>39)</sup>。各糖鎖を除去した場合の SDS-PAGE 分析結果を Fig. 4に示す。これらのサンプルを用いてマウスBCL<sub>1</sub>細胞の分化誘導に及ぼす影響について検討した。その結果, Fig. 5に示したように, アスパラギン結合型糖鎖を除去することによりマウスBCL<sub>1</sub>細胞の分化誘導活性が2.8倍上昇し, また, ムチン型糖鎖を除去するとintactヒトIL-5に比べ約10倍の活性を示した。また, アスパラギン結合型糖鎖の除去は, 熱安定性を著しく低下させることから, IL-5におけるアスパラギン結合型糖鎖は, IL-5の熱安定性に寄与していることがわかった。

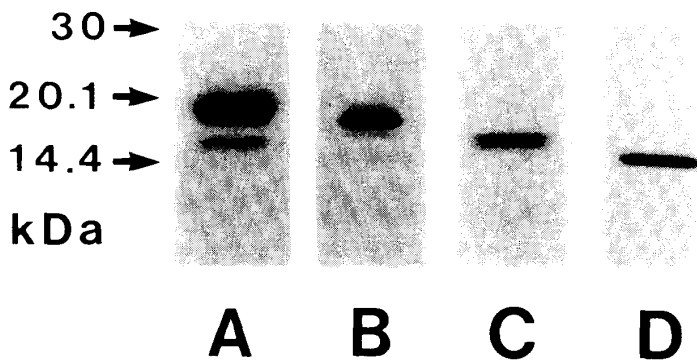


Fig. 4 Glycosidase treatment of rhIL-5. Lane A, untreated rhIL-5 ; lane B, de-O-glycosylated rhIL-5 ; lane C, de-N-glycosylated rhIL-5 ; lane D, fully deglycosylated rhIL-5.

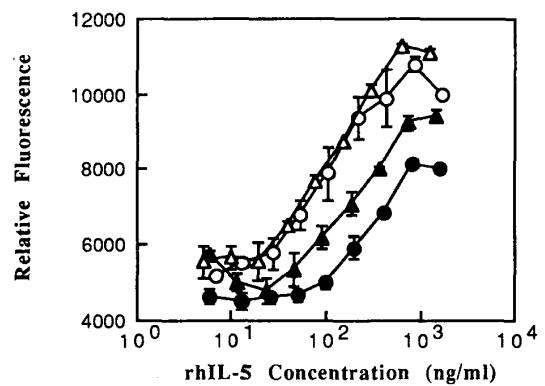


Fig. 5 Dose-response curves obtained by IgM-inducing of various glyco-forms of rhIL-5. Untreated rhIL-5 (●) ; de-O-glycosylated rhIL-5 (○) ; de-N-glycosylated rhIL-5 (▲) ; fully deglycosylated rhIL-5 (△).

IL-5レセプターの構造と機能

1) IL-5レセプターの構造

IL-5レセプターは,  $\alpha$  および  $\beta$  の二本のポリペプチド鎖からなり, この  $\alpha$  および  $\beta$  鎖は, いずれもサイトカインレセプタースーパーファミリーに属することが報告されている<sup>53)-56)</sup>。サイトカインレセプタースーパーファミ

リーの特徴は、7回膜貫通型のホルモンレセプターやチロシンキナーゼレセプターとは異なり、単一の膜貫通ドメインを持ち、N末端が細胞外に出ていること、また、非常によく保存されたシステインとTrp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWSモチーフ)が存在することなどを挙げることができる。ちなみに、C末端が細胞外に出ている例としては、Fc $\epsilon$ RII (CD23)が知られている。

また、サイトカインレセプタースーパーファミリーに属するレセプター系の多くが、その構成成分を共有していることも大きな特徴であると思われる。現在までに、

- a) 共通の $\beta$ 鎖( $\beta c$ )を持つIL-3/IL-5/GM-CSFレセプター
- b) gp130を共有するIL-6/LIF/CNTF/オンコスタチンM/IL-11レセプター
- c) 共通の $\gamma$ 鎖( $\gamma c$ )を持つIL-2/IL-4/IL-7/IL-9/IL-13/IL-15レセプター

などが知られている<sup>57)</sup>。これらのレセプターは、複数のサブユニットにより高親和性レセプターを形成している。その他のサイトカインレセプタースーパーファミリーに属するものとしては、EPOレセプター、TPOレセプター、G-CSFレセプター、IL-12レセプター、プロラクチンレセプター、成長ホルモンレセプターなどがある。また、M-CSFレセプター、*c-kit*、*flk-2*などのように、チロシンキナーゼ型レセプターに分類されるもの、および、インターロイキンと名前がついているがIL-8レセプターのように7回膜貫通型ホルモンレセプターに分類されるものもある。

以上のように、IL-5レセプターでは、共通の $\beta$ 鎖( $\beta c$ )を持つIL-3/IL-5/GM-CSFレセプター系として、各サイトカイン特異的結合蛋白質として特異的リガンドと低親和性の結合をする $\alpha$ 鎖と、それ自体はどのサイトカインとも結合しないが $\alpha$ 鎖とともに高親和性レセプターを形成する $\beta$ 鎖のヘテロダイマーのレセプター構造を形成している。また、サイトカインレセプターは、リガンドが結合することにより各レセプターコンポーネントがdimerizationすることによりシグナル伝達が始まることが知られている。IL-5の場合、レセプターコンポーネントがどのようにdimerizationするかについては現在のところ成績は得られていないが、( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>を形成するのではないかと予測されている。

## 2) 可溶性 IL-5レセプター $\alpha$ 鎖の機能

共通の $\beta$ 鎖( $\beta c$ )を持つIL-3/IL-5/GM-CSFレセプター系において、リガンド特異性を規定していると考えられるのが $\alpha$ 鎖である。IL-5レセプター $\alpha$ 鎖は、スプライシングの違いにより可溶性IL-5レセプター $\alpha$ 鎖cDNAが単離されており、実際IL-5反応性TF-1細胞では、膜結合型IL-5レセプター $\alpha$ 鎖とともに可溶性IL-5レセプター $\alpha$ 鎖が発現している。このようなサイトカインレセプターの可溶性型の存在は、IL-1レセプター、IL-2 $\alpha$ レセプター、IL-4レセプター、IL-6レセプター、IL-7レセプター、LIF (leukemia inhibitory factor)レセプター、G-CSFレセプター、GM-CSFレセプター、M-CSFレセプター、CNTFレセプター、TNF- $\alpha$ レセプターなどで報告されている。これらの可溶性レセプターの生体内における機能については、次の三つの場合が考えられる。

- a) リガンドを安定化し、血清中の結合タンパク質として機能する場合。
- b) 膜結合型レセプターと拮抗し、リガンドのシグナルを弱めるように機能する場合。
- c) 可溶性レセプターがリガンドと複合体を形成し、シグナルを伝達する場合。

多くの場合、可溶性レセプターは、膜結合型レセプターと拮抗していると考えられる<sup>58)</sup>。一方、可溶性レセプターがリガンドと複合体を形成し、シグナルを伝達することがIL-6レセプターおよびCNTFレセプターで明らかとなっている<sup>59),60)</sup>。すなわち、可溶性IL-6レセプターおよび可溶性CNTFレセプターは、それぞれのリガンドと複合体を形成した後、シグナルトランスデューサー分子であるgp130と結合してシグナルを伝達する。さらに、マウス破骨細胞

形成系に可溶性IL-6レセプターおよびIL-6を作用させると、それぞれ単独では破骨細胞を形成しないものの、共存下において破骨細胞が形成された<sup>61)</sup>。このような現象は、gp130を共有するレセプター系で共通のことかどうか興味深い。

可溶性 IL-5レセプター  $\alpha$  鎖は、上記三つのうちのどのタイプに属するであろうか。筆者らは、可溶性マウス IL-5レセプター  $\alpha$  鎖をCHO細胞で発現させ、アフィニティーカラムで精製した。精製した可溶性マウス IL-5レセプター  $\alpha$  鎖を用いて、細胞の増殖におよぼす影響について検討した<sup>62)</sup>。その結果、可溶性マウス IL-5レセプター  $\alpha$  鎖は、マウスIL-5により惹起したマウスBCL<sub>1</sub>細胞の分化を用量依存的に抑制した(Fig. 6)。このことは、可溶性マウス IL-5レセプター  $\alpha$  鎖が膜結合型レセプターと拮抗し、Antagonist として働くことを示している。また、マウスBCL<sub>1</sub>細胞上の  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖により形成される高親和性レセプターに対して低親和性マウス  $\alpha$  鎖が阻害効果を示すためには、5000倍以上の量が必要であった。さらに、可溶性マウス IL-5レセプター  $\alpha$  鎖は、マウス IL-5によるヒトTF-1細胞の増殖を抑制したが、ヒトIL-5によるヒトTF-1細胞の増殖は抑制しなかった。以上の事は、マウスおよびヒトにおけるIL-5の種特異性が、少なくとも一部は、レセプターの  $\alpha$  鎖に起因していることを示している。したがって、共通の  $\beta$  鎖( $\beta c$ )を持つIL-3/IL-5/GM-CSFレセプター系における各サイトカイン 特異的な阻害剤としては、 $\alpha$  鎖を阻害することにより可能であると考えられる。

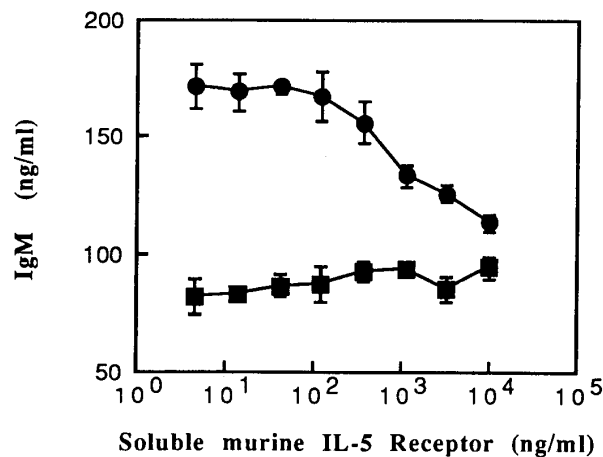


Fig. 6 Effect of sIL-5R  $\alpha$  on rmlIL-5-induced differentiation of BCL<sub>1</sub> cells. BCL<sub>1</sub> cells were cultured in the absence (■) or presence (●) of 100 pg/ml rmlIL-5 with various concentrations of sIL-5R  $\alpha$ .

## IL-5と疾患

### 1) 寄生虫感染とIL-5

寄生虫感染時における特徴的な臨床症状は、末梢血好酸球数の増加、寄生虫寄生局所における好酸球の浸潤および血中IgEレベルの上昇である。しかしながら、寄生虫の種類や宿主体内における寄生虫存在部位などによりほとんど好酸球性反応を示さない場合もある。高度の好酸球増多を示す寄生虫としては、蠕虫（線虫、吸虫、条虫、鉤虫、蛔虫などの腸内寄生虫の総称）が知られている。1989年Coffman ら<sup>8)</sup>は、鉤虫の一種である *Nippostrongylus brasiliensis* をマウスに感染させた場合、末梢血好酸球増多および肺浸潤好酸球の増多は抗IL-5抗体で完全に抑制され、また、血中IgEレベルは抗IL-4抗体で抑制されることを示した。さらに、Sher ら<sup>63)</sup>はマンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) をマウスに感染させた場合、好酸球増多ならびに血中IgEレベルは、抗IL-5抗体および抗IL-4抗体でそれぞれ抑制されるが、抗IL-5抗体を投与しても再感染防御能は不変であると報告している。一方、

Korenaga ら<sup>64)</sup>は、線虫の一種である*Strongyloides venezuelensis*をマウスに感染させた場合、抗IL-5抗体の投与により再感染における肺の幼虫回収数が有意に増加することから、IL-5が寄生虫感染防御に関与すると推察している。これまでのところ、IL-5により誘導された好酸球に寄生虫感染防御能があるかどうかについては意見がわかれている。誘導された好酸球の活性化状態の違いによるかもしれない。

また、ヒトの場合においても、寄生虫感染時にIL-5発現が亢進していることが報告されている。すなわち、1990年、Limaye ら<sup>65)</sup>は、蠕虫の一種であるロア糸状虫 (*Loa loa*) 感染者ではmRNA レベルでIL-5の産生が亢進しているが、IL-3やGM-CSFの産生は健常者と差がないと報告している。いずれにせよ、寄生虫感染における好酸球の誘導的造血反応は、IL-5が中心的な役割を担っていることは確かなようである。

## 2) アレルギー性炎症とIL-5

### IL-5の炎症惹起性

筆者らは、遺伝子組換えマウスIL-5をモルモットに比較的高用量(15  $\mu$ g)気管支内投与すると、気道の炎症ならびに気道のアセチルコリンに対する反応性亢進、すなわち気道過敏症を引き起こすことを示してきた<sup>66),67)</sup>。これらのことは、IL-5がアレルギー性炎症において好酸球を介する強力なinducerであることを示している。しかしながら、遺伝子組換えマウスIL-5をマウスに気管支内投与しても、気道の炎症や気道過敏症を引き起こすことはなかった。この理由については明らかでないが、もともとモルモットにおいては末梢血好酸球数が高いのに対して、マウスでは末梢血好酸球がほとんど存在していないことによるのかもしれない。また、好酸球はPAF産生細胞であることから、PAFとIL-5の関連についても検討した<sup>68)</sup>。その結果、モルモットに気道炎症を引き起こさない量(2.5  $\mu$ g)の遺伝子組換えマウスIL-5を気管支内投与しておく、PAFによる気道過敏症が明らかに増強することがわかった。アレルギー性炎症における好酸球の誘導的造血反応とIL-5抗原感作により誘導される好酸球増多にIL-5が関与しているという報告は多い。例えば、Okudaira ら<sup>69)</sup>は、卵白アルブミンをマウスに点鼻することにより作製した肺好酸球症モデルにおいて、抗IL-5中和抗体は肺への好酸球浸潤を抑制することを示した。また、Kaneko ら<sup>70)</sup>は、ragweed pollen extract をマウス腹腔内投与することにより作製した腹膜炎モデルにおいて、抗IL-5中和抗体が腹腔内好酸球数の蓄積を抑制することを示した。さらに、Gulbenkian ら<sup>71)</sup>は、卵白アルブミンで感作したモルモット肺における好酸球浸潤を抗IL-5中和抗体が抑制すると報告している。一方、Chand ら<sup>72)</sup>は、前3者の報告では抗IL-5中和抗体投与が抗原誘発前であることから、予防的効果しかみていないとして抗原誘発後に抗IL-5中和抗体の投与実験を行った。すなわち、モルモットを卵白アルブミンで感作した後、抗原吸入4時間後に抗IL-5中和抗体を投与した時の気管支肺胞洗滌液(BALF)中の好酸球を測定した。その結果、抗原誘発後の投与においてもBALF中の好酸球は、用量依存的に抗IL-5中和抗体により抑制された。以上のように、寄生虫感染における好酸球の誘導的造血反応時と同様に、アレルギー性炎症における好酸球の誘導的造血反応においても、IL-5が中心的な役割を担っていることが明らかである。

### アレルギー性気管支喘息における気道過敏症とIL-5

次に、抗原で誘発された気道反応性亢進へのIL-5の関与について考えてみたい。気道反応性が亢進するメカニズムの一つに以下の仮説が考えられている。

- a) 抗原感作した動物の気道局所に浸潤してきたTリンパ球からIL-5が産生する。
- b) 産生されたIL-5は、気道に好酸球浸潤を引き起こす。
- c) 浸潤してきた好酸球は、脱顆粒することにより組織障害性タンパク質を放出し、気道上皮細胞を障害し剥離させる。

d) 気道上皮細胞が剥離した結果, 知覚神経末端の露出, 上皮細胞の透過性の亢進などにより, 気道反応性が亢進する。

そこで, 筆者ら<sup>73),74)</sup>は, マウスに抗原反復吸入により気道炎症ならびに気道過敏症を誘発させ, 抗IL-5中和抗体ならびに可溶性マウスIL-5レセプター $\alpha$ 鎖の影響について検討した。先ず, マウスに卵白アルブミンを腹腔内投与し, 能動的に感作した。次に, 卵白アルブミンを反復吸入させることにより経気道の感作した。最後の抗原吸入から24時間後にアセチルコリンに対する気道の反応性を測定した。

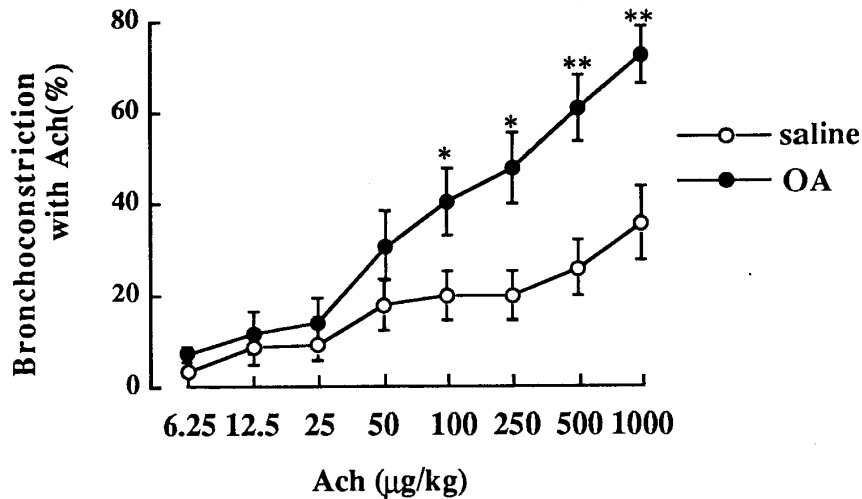


Fig. 7 Dose-response curve of acetylcholine for bronchoconstriction in saline or OA (antigen)-treated BALB/c mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs normal by unpaired student's *t*-test. Ach = a cetylcholine

その結果, Fig. 7に示したようにアセチルコリンに対する気道反応性の亢進が認められた。この時のBALF中のIL-2, IL-4, IL-5,  $\gamma$ -IFN 量を測定した結果, IL-4およびIL-5産生量が高く, IL-2や $\gamma$ -IFN 産生量が低いことからTH2 タイプ優位の反応がおきていることがわかった。この系における抗IL-5中和抗体ならびに可溶性マウスIL-5レセプター $\alpha$ 鎖の影響を検討した結果, 抗IL-5中和抗体はBALF中の好酸球数を用量依存的に抑制したが(Fig. 8),

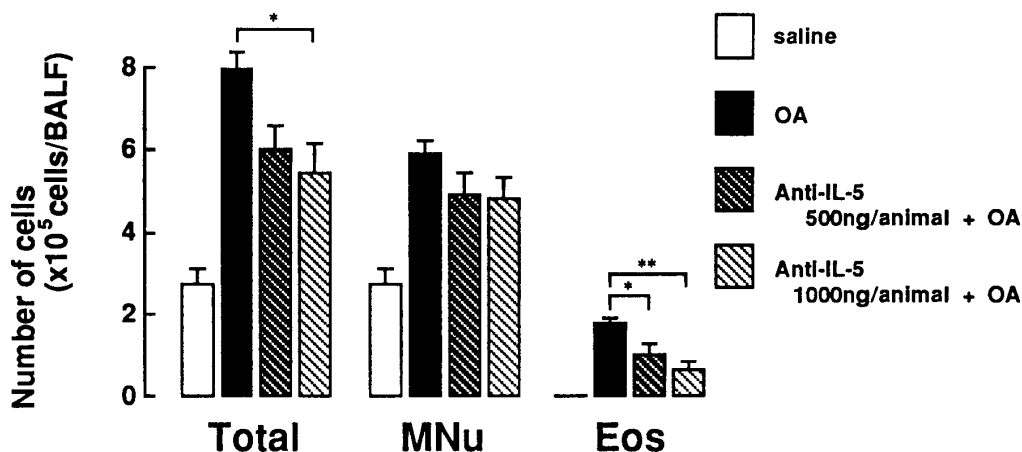


Fig. 8 Effect of anti-IL-5 (NC-17) on OA (antigen)-induced leukocyte accumulation in BALF from BALB/c mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control by Dunnett 1-side test. Abbreviations : MNu = mononuclear cells, Eos = eosinophils.

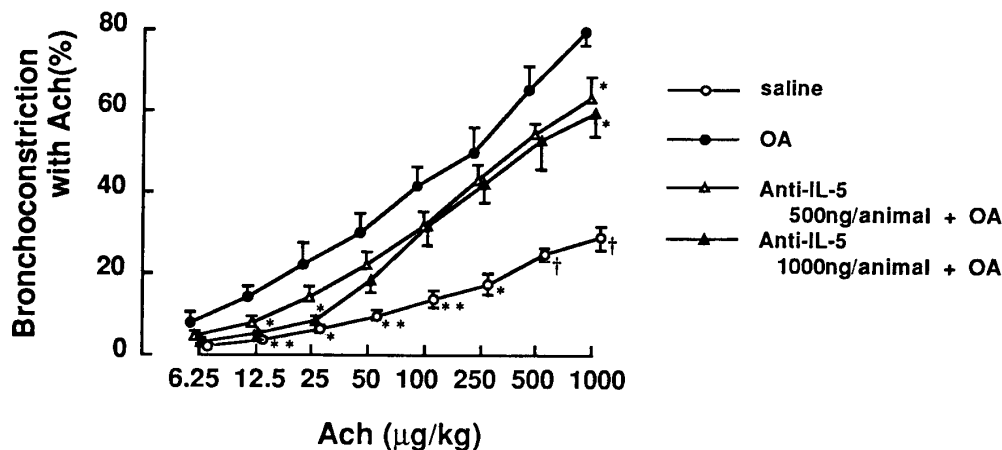


Fig. 9 Effect of anti-IL-5 (NC-17) on OA (antigen)-induced increase in airway responsiveness to acetylcholine in BALB/c mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , † $P < 0.001$  vs control by unpaired student's *t*-test. Ach = acetylcholine

アセチルコリンに対する気道反応性の亢進にはほとんど影響を与えなかった (Fig. 9)。可溶性マウスIL-5レセプター $\alpha$ 鎖も同様の結果であった。

一方, van Oosterhout ら<sup>75)</sup>は, モルモット気道過敏症モデルにおいて, 抗マウスIL-5中和抗体の投与は, BALF中の好酸球数を抑制するとともに気道過敏症を抑制することを示した。彼らの実験は, 感作動物としてモルモットを用いていること, また, 気道過敏症の評価を摘出気管支平滑筋の収縮で検討している点で筆者らの系とは異なっている。前述のIL-5の炎症惹起性が, モルモットでは認められるのに対してマウスでは認められないことから, 気道過敏症に対するIL-5の関与についての実験結果の違いは動物種によるものかもしれない。また, 誘導された好酸球の活性化状態の違いによるものかなど明らかでない点があり, 今後に残された課題である。

#### ヒトアレルギー性疾患患者とIL-5

Hamid ら<sup>76)</sup>は, 気管支喘息患者の気管支粘膜を用いて *in situ* hybridization 法によりIL-5 mRNA を検出した結果, 10例中6例においてIL-5 mRNA を検出し, 喘息の重症度とIL-5の発現量が相関すると報告している。Robinson ら<sup>77)</sup>は, アトピー性喘息患者の気管支肺胞洗滌液 (BALF) 中のTリンパ球を用いて各種サイトカイン mRNA の発現を検討したところ, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5およびGM-CSFの mRNA の発現が亢進しているが,  $\gamma$ IFNの発現量は変わらないことを示した。この結果から, 彼らは, アトピー性喘息患者においてはTH2 タイプTリンパ球が優位であると推察している。また, 同様に鼻炎患者のTリンパ球では, IL-3, IL-4, IL-5およびGM-CSFの mRNA の発現が亢進しているが, IL-2および $\gamma$ IFNの発現量は不変であることを示した<sup>78)</sup>。もともと, TH1 タイプおよびTH2 タイプを分類できることを示したのは, Mossman ら<sup>79)</sup>である。1986年Mossman らは, 樹立した2つマウスT細胞クローンについて検討した結果, マウスCD4陽性ヘルパーTリンパ球を, サイトカインの産生パターンからTH1 タイプTH2 タイプの二つのサブタイプに分類できるとした。ヒトの場合には, 樹立したヒトT細胞クローンのサイトカイン産生パターンがマウスの場合ほど厳密には区別できないようである。また, 最近のLeung ら<sup>80)</sup>の報告によれば, ステロイド抵抗性喘息患者 (SR Asthma) とステロイド感受性喘息患者 (SS Asthma) における非常に興味深い解析結果を示している。すなわち, glucocorticoid治療前においてSR AsthmaではBALF中細胞のIL-2およびIL-4発現量が, SS Asthmaよりも有意に高い。一方, glucocorticoid治療後SS AsthmaではBALF中細胞のIL-4およびIL-5発現量が低下し,  $\gamma$ -IFN 発現量は増加したが, SR AsthmaではBALF中細胞のIL-4およびIL-5発現量は不変であると報告している。SR Asthmaにおいては, IL-2およびIL-4により単核球のgluco

corticoidレセプターの親和性が低下しているためと考えられている<sup>81)</sup>。以上のように、活性化Tリンパ球がTH1 およびTH2のどちらのサブタイプが優位であるかにより産生されるサイトカイン量が異なること、また、ヒトの場合、TH1 タイプTH2 タイプのサイトカイン産生パターンがマウスの場合ほど厳密には区別できないことなどから、ヒト疾患における病態が多様性を示し、病態解析をより困難なものとしていると思われる。

#### アトピー性喘息患者リンパ球のIL-5産生能

筆者らは、CHO細胞で発現した遺伝子組換えヒトIL-5を用いて、ポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体を作製し、ELISAを構築した<sup>82)</sup>。本法における検出感度は3.9 pg/mlであることから、各種検体のヒトIL-5濃度を測定することが可能となった。生体材料としては、血清、血漿、胸水、水泡液およびリンパ球刺激培養上清などの測定を行ってきた。その結果、リンパ球刺激時のIL-5産生能が良いパラメーターとなりそうである。これまでに、癌患者にIL-2を投与によるLAK療法を行うと、持続的な好酸球増多症が起きることが確認されている。これはIL-2によりIL-5の発現が増加するためである<sup>83)</sup>。実際、末梢血リンパ球にIL-2を作用させると、培養上清中にIL-5が産生する。また、IL-2のかわりにPMAおよびPHAなどの刺激によるIL-5産生も可能である。一般に、患者リンパ球のレクチンに対する幼若化反応を検査することが臨床で行われているが、アトピー性疾患におけるIL-5産生の検討は、治療効果を判定する上で重要な指標となりうるかもしれない。そこで、アトピー性喘息患者および健康人の末

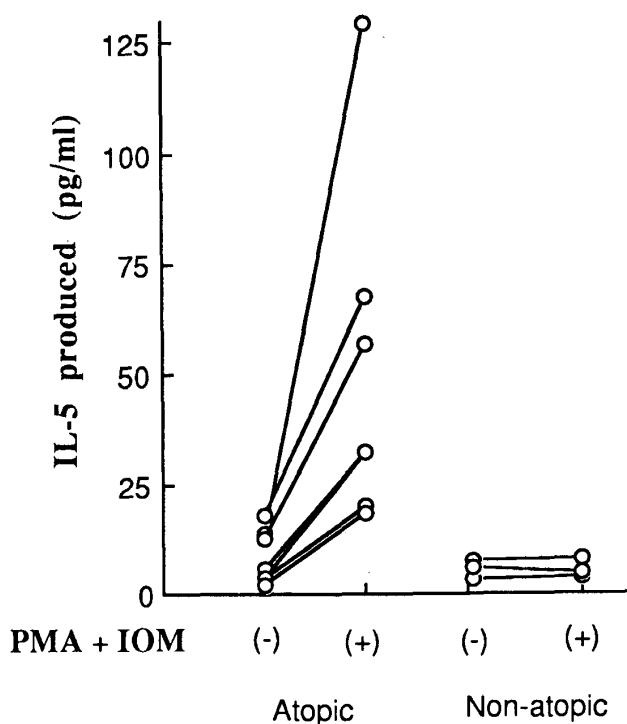


Fig. 10 IL-5 production by PBMC from atopic patients and healthy control donors. PBMC = peripheral blood mononuclear cells

梢血リンパ球をPMAおよびIonomycin刺激し、24時間後の培養上清中のIL-5の産生量をELISAで測定した<sup>84)</sup>。その結果、Fig. 10に示したように、アトピー性喘息患者の末梢血リンパ球を刺激した時のみに有意なIL-5産生の増加が認められた。

#### 3) その他の好酸球性疾患とIL-5

好酸球増多・筋痛症候群 (Eosinophilia-myalgia syndrome : EMS)



EMS は、L-tryptophan 含有の健康食品を摂取することにより生じた好酸球増多と好酸球性筋膜炎に伴う激しい筋痛を症状とする疾患である。Yamaoka ら<sup>85)</sup>は、L-tryptophan の製造過程に生じる副反応物 (1,1'-ethylidene nebis(tryptophan)) がTリンパ球からのIL-5産生を促し、好酸球増多を引き起こすことを明らかにした。EMSは、IL-5により誘導された好酸球が組織障害を引き起こした典型的な例である。

#### 好酸球性血管性浮腫(episodic angioedema and eosinophilia)

好酸球性血管性浮腫は、再発性の浮腫、蕁麻疹、発熱、末梢血好酸球増多の症状を呈し、病変部皮膚の血管周囲への好酸球浸潤と好酸球特異顆粒であるMBP(Major basic protein) の沈着を特徴とする疾患である。Butterfield ら<sup>86)</sup>は、好酸球性血管性浮腫患者3例の血中IL-5量を測定し、血中IL-5量が高値である間は末梢血好酸球数の増多が認められるが、glucocorticoid 投与により血中IL-5が検出されなくなるのに伴い末梢血好酸球増多が改善されると報告している。

#### 木村氏病(好酸球性リンパ濾胞様構造増生性肉芽腫)

木村氏病は、リンパ濾胞の増生と強度な好酸球浸潤を伴う炎症性肉芽像を認める疾患で高IgE血症を呈する。Enokihara ら<sup>87)</sup>は、木村氏病患者のT細胞が、IL-2 刺激12-24時間後に IL-5 mRNA を発現していることを証明した。また、Enokihara ら<sup>88)</sup>は、筆者らとの共同研究で好酸球増多症患者(宮崎住血吸虫1例、木村氏病3例)から分離した直後の末梢血リンパ球を用いて、RT-PCR でIL-5 mRNA の発現の有無を検討した。その結果、健常人4例では全くIL-5 mRNAを検出できなかったのに対して、患者では全例でIL-5 mRNAを検出した。この結果から、リンパ球分離後刺激したり培養したりしない、より*in vivo*に近い状態での木村氏病患者リンパ球においてもIL-5 が発現していることがわかった。

以上、遺伝子組換えIL-5の構造ならびに機能についての筆者らの研究を中心に紹介すると共に、サイトカインとしてのIL-5の位置づけについて概説した。これらの結果から、ヒトIL-5は好酸球の誘導的造血反応を制御する極めて選択的な好酸球増殖分化因子としての生理機能を示していることが明らかとなった。また、誘導された好酸球は活性化されてPAFやLTC<sub>4</sub>を産生するばかりでなく、好酸球自身が好酸球増殖分化因子であるIL-3、IL-5 およびGM-CSFを産生していることもわかってきた。サイトカインネットワークのなかで制御されている好酸球の機能についてのさらなる研究が今後期待される。

#### 引用文献

- 1) Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gueney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W.-J., Oles, K.J., Hultgren, W.J., Solberg, L.A.J., Goeddel, D.V., and Eaton, D.L., *Nature*, **369**, 533-538 (1994)
- 2) Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., Kramer, J.M., Bell, L.A., Sprecher, C.A., Blumberg, H., Johnson, R., Prunkard, D., Ching, A.F.T., Mathewes, S.L., Baily, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Osborn, S.G., Evans, S.J., Sheppard, P.O., Presnell, S.R., O'hara, P.J., Hagen, F.S., Roth, G.J., and Foster, D.C., *Nature*, **369**, 565-568 (1994)
- 3) Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D., Broudy, V.C., Lin, N., Bailey, M., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Oort, P.J., Hagen, F.S., Roth, G.J., Papayannopoulou, T., and Foster, D.C., *Nature*, **369**, 568-571 (1994)

- 4) Wendling, F., Maraskovsky, E., Debili, N., Florindo, C., Teepe, M., Titeux, M., Methia, N., Breton-Gorius, J., Cosman, D., and Vainchenker, W., *Nature*, **369**, 571-574 (1994)
- 5) Gurney, A.L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F.J., and Moore, M.W., *Science*, **265**, 1445-1447 (1994)
- 6) Campbell, H.D., Tucker, W.Q.J., Hort, Y., Martinson, M.E., Mayo, G., Clutterbuck, E.J., Sanderson, C.J. and Young, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6629-6633 (1987)
- 7) Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A. and Takatsu, K., *J. Exp. Med.*, **167**, 43-56 (1988)
- 8) Coffman, R. L., Seymour, B. W. D., Hudak, S., Jackson, J. and Rennick, D., *Science*, **245**, 8647-8651 (1989)
- 9) Durham, S. R., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Mackay, I. S., Kay, A. B. and Hamid, Q. A., *J. Immunol.*, **148**, 2390-2394 (1992)
- 10) Hamid, Q., Azzawi, M., Ying, S., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., Corrigan, C. J., Bradley, B., Durham, S. R., Collins, J. V., Jeffery, P. K., Quint, D. J. and Kay, A. B., *J. Clin. Invest.*, **87**, 1541-1546 (1991)
- 11) Hamann, K. J., Barker, R. L., Ten, R. M. and Gleich, G. J., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **94**, 202-209 (1991)
- 12) Dutton, R.W., Falkoff, R., Hirst, J.A., Hoffman, M., Kappler, J.W., Ketton, J.R., Lesley, J.F., and Vann, D., *Prog. Immunol.*, **1**, 355-368 (1971)
- 13) Schimpl, A., and Wecker, E., *Nature*, **237**, 15-17 (1972)
- 14) Takatsu, K., Tanaka, K., Tominaga, A., Kumahara, Y. and Hamaoka, T., *J. Immunol.*, **125**, 2646-2653 (1980)
- 15) Sanderson, C.J., Campbell, H.D., and Young, I.G., *Immunol. Rev.* **102**, 29-50 (1988)
- 16) Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E., Tanabe, T., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt-Lindqvist, S., Takahashi, M., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K. and Honjo, T., *Nature*, **324**, 70-73 (1986)
- 17) Azuma, C., Tanabe, T., Konishi, M., Kinashi, T., Noma, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., Hammarstrom, L., Edvard-Smith, C.I., Severinson, E. and Honjo, T., *Nucleic Acid. Res.*, **14**, 9149-9158 (1986)
- 18) Graber, P., Bernard, A. R., Hassell, A. M., Milburn, M. V., Jordan, S.R, Proudfoot, A.E.I, Fattah, D., and Wells, T.N.C. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 751-755 (1993)
- 19) Tavernier, J., Devos, R., van der Hyden, J., Hauquier, G., Bauden, R., Fache, I., Kawashima, E., Vandekerckhove, J., Contreras, R., and Fiers, W., *DNA*, **8**, 491-501 (1989)
- 20) Urlaub, G., and Chasin, L.A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 4216-4220 (1980)
- 21) Young A.P., and Ringold, G.M., *J. Biol. Chem.*, **258**, 11260-11266 (1983)
- 22) Kobayashi, J., Imanishi, S., Inoue, H., Ohsuye, K., Yamaichi, K., Tsuruoka, N., and Tanaka, S., *Cytotechnology*, **8**, 103-108 (1992)

- 23) Ishida, N., Tsujimoto, M., Kanaya, T., Shimamura, A., Tsuruoka, N., Kodama, S., Katayama, T., Oikawa, S., Matsui, M., Nakanishi, T., Kobayashi, J., and Nakazato, H., *J. Biochem.*, **115**, 279-285 (1994)
- 24) Tsujimoto, M., Adachi, H., Kodama, S., Tsuruoka, N., Yamada, Y., Tanaka, S., Mita, S. and Takatsu, K., *J. Biochem.*, **106**, 23-28 (1989)
- 25) Minamitake, Y., Kodama, S., Katayama, T., Adachi, H., Tanaka, S., and Tsujimoto, M., *J. Biochem.*, **107**, 292-297 (1990)
- 26) Dwek, R.A., Edge, C.J., Harvey, D.J., Wormald, M.R., and Parekh, R.B., *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 65-100 (1993)
- 27) Davis, S., Aldrich, T.H., Ip, N.Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P.S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H., Chevalier, S., and Yancopoulos, G.D., *Science*, **259**, 1736-1739 (1993)
- 28) Bernal, J. D., Crowfoot, D.C., *Nature*, **133**, 794 (1934)
- 29) Blake, C. C. F., Mair, G. A., North, A.C.T., Phillips, D.C., *Proc. Roy. Soc.*, **B167**, 365-377 (1967)
- 30) Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A.C.T., Phillips, D.C., *Proc. Roy. Soc.*, **B167**, 378-388 (1967)
- 31) Milburn, M. V., Hassell, A. M., Lambert, M. H., Jordan, S.R, Proudfoot, A.E., Graber, P. and Wells, T.N.C. *Nature*, **363**, 172-176 (1993)
- 32) Brockhausen, I., Carver, J., and Schachter, H., *Biochem. Cell Biol.*, **66**, 1134 -1151 (1988)
- 33) Gu, J., Nishikawa, A., Tsuruoka, N., Ohno, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K., and Taniguchi, N., *J. Biochem.*, **113**, 614-619 (1993)
- 34) Takasaki, S., Mizuochi, T., and Kobata, A., *Meth. Enzymol.*, **83**, 263-268 (1982)
- 35) Kodama, S., Endo, T., Tsuruoka, N., Tsujimoto, M., and Kobata, A., *J. Biochem.*, **110**, 693-701 (1991)
- 36) Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N., and Kobata, A., *J. Biol. Chem.*, **263**, 3657-3663 (1988)
- 37) Lee, E.U., Roth, J., and Paulson, J.C., *J. Biol. Chem.*, **264**, 13848-13855 (1989)
- 38) Kodama, S., Tsujimoto, M., Tsuruoka, N., Sugo, T., Endo, T., and Kobata, A., *Eur. J. Biochem.*, **211**, 903-908 (1993)
- 39) Tominaga, A., Takaki, S., Koyama, N., Katoh, S., Matsumoto, R., Migita, M., Hitoshi, Y., Hosoya, Y., Yamauchi, S., Kanai, Y., Miyazaki, J.-I., Usuku, G., Yamamura, K.-I. and Takatsu, K., *J. Exp. Med.*, **173** 429-437 (1991)
- 40) Bertolini, J.N., Sanderson, C.J., and Benson, E.M., *Eur. J. Immunol.*, **23**, 398-402 (1993)
- 41) Clutterbuck, E., Shields, J. G., Gordon, J., Smith, S. H., Boyd, A., Callard, R. E., Campbell, H. D., Young, I. G., and Sanderson, C. J., *Eur. J. Immunol.*, **17**, 1743-1750 (1987)
- 42) Tsuruoka, N., Funakoshi, K., Kodama, S., and Tsujimoto, M., *Cell. Immunol.*, **125**, 354-362

- (1990)
- 43) Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Miura, Y., Kasahara, T., Torisu, T., Mita, S., Tominaga, A., Takatsu, K., and Suda, T., *J. Exp. Med.*, **167**, 1737-1742 (1988)
  - 44) Yamaguchi, Y., Suda, T., Nakano, K., Shiozaki, H., Miura, Y., Hitoshi, Y., Tominaga, A., Takatsu, K., and Kasahara, T., *J. Immunol.*, **145**, 873-877 (1990)
  - 45) Hirai, K., Yamaguchi, M., Misaki, Y., Takahashi, T., Ohta, T., Morita, Y., Ito, K., and Miyamoto, T., *J. Exp. Med.*, **172**, 1525-1528 (1990)
  - 46) Bischoff, S.C., Brunner, T. De Weck, A.L., and Dahinden, C.A., *J. Exp. Med.*, **172**, 1577-1582 (1990)
  - 47) Krüttgen, A., Rose-John, S., Möler, C., Wroblowski, B., Wollmer, A., Mühlberg, J., Hirano, T., Kishimoto, T., and Heinrich, P. C., *FEBS Lett.*, **262**, 323-326 (1990)
  - 48) Gase, K., Korobko, V. G., Wisniewski, J., LE, Dobrynin, V. N., Filippov, S. A., Gutsche, W., Maksimova, Y. N., Schlott, B., Shingarova, L. N., Vilcek, J. and Behnke, D., *Immunology*, **71**, 368-371 (1990)
  - 49) Kodama, S., Tsuruoka, N., and Tsujimoto, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 514-519 (1991)
  - 50) McKenzie, A. N. J., Barry, S. C., Strath, M. and Sanderson, C. J., *EMBO. J.*, **10**, 1193-1199 (1991)
  - 51) Shanafelt, A., Miyajima, A., Kitamura, T. and Kastelein, R. A., *EMBO. J.*, **10**, 4105-4112 (1991)
  - 52) Ashwell, G., and Harford, J., *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 531-554 (1982)
  - 53) Takaki, S., Tominaga, A., Hitoshi, Y., Mita, S., Sonoda, E., Yamaguchi, N. and Takatsu, K., *EMBO. J.*, **9** 4367-4374 (1990)
  - 54) Takaki, S., Mita, S., Kitamura, T., Yonehara, S., Yamaguchi, N., Tominaga, A., Miyajima, A. and Takatsu, K., *EMBO. J.*, **10**, 2833-2838 (1991)
  - 55) Devos, R., Plaetinck, G., van der Heyden, J., Cornelis, S., Vandekerckhove, J., Fiers, W. and Tavernier J., *EMBO. J.*, **10**, 2133-2137 (1991)
  - 56) Tavernier, J., Devos, R., Cornelis, S., Tuypens, T., van der Heyden, J., Fiers, W. and Plaetinck, G., *Cell*, **66**, 1175-1184 (1991)
  - 57) Kishimoto, T., Taga, T., and Akira, S., *Cell*, **76**, 253-262 (1994)
  - 58) Heaney, M. and Golde, D.W., *Blood*, **82**, 1945-1948 (1993)
  - 59) Davis, S., Aldrich, T.H., Valenzuela, D.M., Wong, V., Furth, M.E., Squinto, S.P., and Yancopoulos, G.D., *Science*, **253**, 59-63 (1991)
  - 60) Yasukawa, K., Saito, T., Fukunaga, T., Sekimori, Y., Koishihara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y., Matsuda, T., Yawata, H., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T., *J. Biochem.*, **108**, 673-676 (1990)
  - 61) Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y.,

- Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., Kishimoto, T., and Suda, T., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 11924-11928 (1993)
- 62) Tsuruoka, N., Yamashiro, K., and Tsujimoto, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 335-359 (1992)
- 63) Sher, A., Coffman, R.L., Hieny, S., Cheever, A.W., *J. Immunol.*, **145**, 3911-3916 (1990)
- 64) Korenaga, M., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Sato, Y., Takatsu, K., and Tada, I., *Immunology*, **72**, 502-507 (1991)
- 65) Limaye, A. P. *J. Exp. Med.*, **172**, 399-402 (1990)
- 66) Iwama, T., Nagai, H., Suda, H., Tsuruoka, N. and Koda, A., *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 19-22 (1992)
- 67) Iwama, T., Nagai, H., Tsuruoka, N. and Koda, A., *Clin. Exp. Allergy*, **23**, 32-38 (1993)
- 68) Nagai, H., Yamaguchi, S., Kitagaki, K., Tsuruoka, N., and Koda, A., *Life Sciences*, **52**, 147-151 (1993)
- 69) Okudaira, H. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **94**, 171-173 (1991)
- 70) Kaneko, M., Hitoshi, Y., Takatsu, K., and Matsumoto, S., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **96**, 41-45 (1991)
- 71) Gulbenkian, A. R., Egan, R. W., Fernandez, X., Jones, H., Kreutner, W., Kung, T., Payvandi, F., Sullivan, L., Zurcher, J. A. and Watnik, A. S., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **146**, 263-265 (1992)
- 72) Chand, N., Harrison, J. E., Rooney, S., Pillar, J., Jakubicki, R., Nolan, K., Diamantis, W., and Sofia, D., *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 121-123 (1992)
- 73) Nagai, H., Yamaguchi, S., Inagaki, N., Tsuruoka, N., Hitoshi, Y., and Takatsu, K., *Life Sciences*, **53**, 243-247 (1993)
- 74) Yamaguchi, S., Nagai, H., Tanaka, H., Tsujimoto, M., and Tsuruoka, N., *Life Sciences*, **54**, 471-475 (1993)
- 75) van Oosterhout, A. J. M., Ladenius, A. R. C., Savelkoul, H. F. J., van Ark, I., Delsman, K. C., N. and Nijkamp, F. P., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 548-552 (1993)
- 76) Hamid, Q., Azzawi, M., Ying, S., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., Corrigan, C. J., Bradley, B., Durham, S. R., Collins, J. V., Jeffery, P. K., Quint, D. J. and Kay, A. B., *J. Clin. Invest.*, **87**, 1541-1546 (1991)
- 77) Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C.J., Durham, S.R., and Kay, A.B., *N. Engl. J. Med.*, **326**, 298-304 (1992)
- 78) Durham, S.R., Ying, S., Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderrick, R.M., Mackay, I.S., Kay, A.B., and Hamid, Q.A., *J. Immunol.*, **148**, 2390-2394 (1992)
- 79) Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L., *J. Immunol.*, **136**, 2348-2357 (1986)
- 80) Leung, D.Y.M., Martin, R.J., Szeffler, S.J., Sher, E.R., Ying, S., Kay, B., and Hamid, Q.,

- J. Exp. Med.*, **181**, 33-40, (1995)
- 81) Kam, J.C., Szeffley, S.J., Surs, W., Sher, E.R., and Leung, D.Y.M., *J. Immunol.*, **151**, 3460-3466 (1993)
- 82) Fukuda, Y., Hashino, J., Haruyama, M., Tsuruoka, N., Nakazato, H., and Nakanishi, T., *J. Immunol. Methods*, **143**, 89-94 (1991)
- 83) Enokihara, H., Furusawa, S., Nakakubo, H., Kajitani, H., Nagashima, S., Saito, K., Shishido, H., Hitoshi, Y., Takatsu, K., Noma, T., Shimizu, A., and Honjo, T., *Blood*, **73**, 1809-1813 (1989)
- 84) Mori, A., Suko, M., Nishizaka, Y., Kaminuma, O., Matsuzaki, G., Ito, K., Etoh, T., Nakagawa, H., Tsuruoka, N., and Okudaira, H., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **104**, 32-35 (1994)
- 85) Yamaoka, K., Miyasaki, N., Inuo, G., Saito, I., Kolb, J.-P., Fujita, K., and Kashiwazaki, S., *J. Clin. Immunol.*, **14**, 50-60 (1994)
- 86) Butterfield, J.H., Leiferman, K.M., Abrams, J., Silver, J.E., Bower, J., Gonchoroff, N., and Gleich, G., *Blood*, **79**, 688-692 (1992)
- 87) Enokihara, H., Furusawa, S., Nakakubo, H., Kajitani, H., Nagashima, S., Saito, K., Shishido, H., Hitoshi, Y., Takatsu, K., Noma, T., Shimizu, A., and Honjo, T., *Blood*, **73**, 1809-1813 (1989)
- 88) Enokihara, H., Koike, T., Arimura, H., Aoyagi, M., Watanabe, K., Nakamura, Y., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsujimoto, M., Saito, K., Furusawa, S., and Shishido, H. *Am. J. Hematol.*, **47**, 69-73 (1994)