

B リンパ球増殖・分化機構の解明とその異常制御に関する研究

Studies on the regulation and manipulation of B lymphocyte response

代表研究者 大阪大学細胞工学センター教授 岸本 忠三
Prof., Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.
Tadamitsu KISHIMOTO

協同研究者 大阪大学細胞センター助教授 平野 俊夫
Assoc. Prof., Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.
Toshio HIRANO

大阪大学細胞工学センター助手 菊谷 仁
Assist. Prof., Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.
Hitoshi KIKUTANI

Human B cell stimulatory factor 2 (originally designated BSF2) was initially characterized and isolated as a T cell-derived factor that caused the terminal maturation of activated B cell to immunoglobulin producing cells. Molecular cloning of the cDNA has revealed that BSF2 is identical with 26 KD protein, interferon β 2, plasmacytoma growth factor and hepatocyte stimulating factor and the designation "IL-6" has been proposed for this molecule. It is now known that BSF2/IL-6 has a wide variety of biological functions and that abnormal regulation of BSF2/IL-6 expression may be related to the pathogenesis of certain autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and multiple myeloma.

The cDNA for the IL-6 receptor has been cloned and the deduced amino acid sequence demonstrates that the receptor belongs to Ig-superfamily. Although IL-6 is a potent growth factor, the receptor does not have tyrosine kinase domain in its cytoplasmic portion, suggesting the presence of novel intracytoplasmic signal transducer.

Lymphocyte Fc ϵ receptor (Fc ϵ RII) was found to be a B cell specific differentiation antigen, CD 23, the expression of which is very much restricted to a certain differentiation stage of B cells. The cDNA for Fc ϵ RII (CD23) has been cloned and the deduced amino acid sequence demonstrated that Fc ϵ RII has a unique structure with its C-terminal outside the cell and N-terminal inside the cell. The C-terminal half of the molecule was secreted as an IgE binding factor.

Recombinant soluble Fc ϵ RII has been prepared utilizing the chimeric gene and soluble IgE binding molecules were shown to be able to inhibit the binding of IgE with Fc ϵ RII as well as Fc ϵ RI expressed on basophiles. The result suggests the possible application of the soluble Fc ϵ RII for the manipulation of allergic diseases.

研究目的

抗体分子は生体の免疫系において最も中心的な役割を担う分子である。細菌やウィルス感染に対し防御機能を発揮する一方、自己免疫疾患やアレルギーの発症原因ともなる。抗体はBリンパ球によって作られることはよく知られている。Bリンパ球が抗原刺激を受けて抗体産生細胞へと増殖、分化するプロセスは哺乳動物細胞における増殖、

分化のメカニズムを研究する上において最もよいモデルの一つとなってきた。Bリンパ球が抗体産生細胞へ増殖分化するプロセスにはTリンパ球とマクロファージの存在が必須であることは既に1960年代の終わりに明らかにされたが、それ以来Tリンパ球のヘルパー機能がどのように発揮されるかという問題、すなわちTリンパ球の機能をメディエートする分子はどのようなものかとい

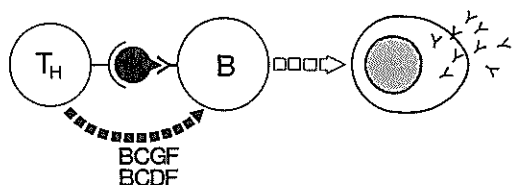


図1. Bリンパ球の増殖分化に関与するTリンパ球由来増殖因子 (BCGF) と分化因子 (BCDF)

う問いかけが免疫学の中心課題の一つであり続けてきた。

既に1970年代の初めに我々を含めていくつかのグループによりTリンパ球の培養上清中にBリンパ球を抗体産生細胞へ増殖、分化させる活性が存在することが報告されている。我々は抗IgM抗体とTリンパ球培養上清という二つのシグナルによりBリンパ球に抗体産生を誘導しうること1975年に報告した。すなわちBリンパ球表面上の抗原レセプター (IgM分子) に抗原が結合するというシグナルとTリンパ球のヘルパーファクターという二つのシグナルがBリンパ球を抗体産生細胞へ増殖分化させるために必要であるということが明らかとなった。

それではこのヘルパーファクターというのはいかなる物質であろうか。その微量なこと (1 ng/10⁶ T cells) のためにその分子の本体が明らかになるにはそれから約10年の歳月が必要であった。1982年に我々はヒトのBリンパ球を用いてヘルパーファクターは機能的に二つの異なった分子に分けられることを見いだした。一つは抗原で刺激されたBリンパ球を増殖させそのクローンサイズを増大させる増殖因子であり、これに我々はBリンパ球増殖因子 (B cell growth factor, BCGF) と名づけた。もう一つは増殖したBリンパ球に抗体産生を誘導する分子であり、これにBリンパ球分化因子 (B cell differentiation factor, BCDF) という名がつけられた (図1)。この研究は、Bリンパ球の抗体産生細胞への増殖、分化を調節する分子の構造を明らかにし、構造の基盤の上になって、抗体産生調節機構を解明しようとする目的で行われた。

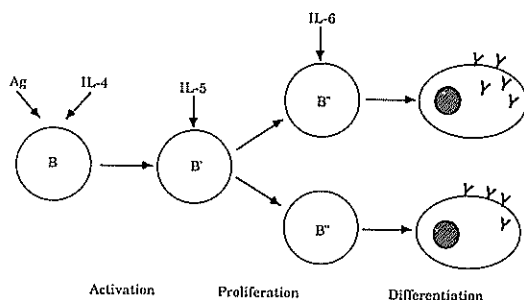


図2. Bリンパ球の活性化、増殖、分化過程とそれに関与するインターロイキン

研究経過と成果

a) Bリンパ球増殖・分化因子遺伝子のクローニング

1986年、Bリンパ球の増殖、分化にかかわる三つの分子、IL-4 (BCGF1/BSF1)、IL-5 (BCGF2)、IL-6 (BCDF/BSF2) をコードする遺伝子がクローニングされ、その全構造が決定された。IL-6は我々の研究グループによりその全構造が決定された。その結果、図2に示すようにBリンパ球が抗体産生細胞に増殖、分化するプロセスにはTリンパ球に由来する三つの分子 IL-4 (BSF1)、IL-5 (BCGFII)、IL-6 (BSF2) が関与し、IL-4がBリンパ球をG₀からG₁へ活性化し、IL-5が増殖を誘導し、IL-6が最終的に抗体産生細胞への分化を誘導することが明らかとなった。最近の研究では抗IL-6抗体は*in vitro*における抗体産生を完全にブロックすることが示され、IL-6はBリンパ球が抗体産生細胞へ分化する上において必須の分子の一つであることが確認された。

クローニングされたヒトIL-6のcDNAの塩基配列から推測されるアミノ酸配列は図3に示すとおりである。IL-6は184個のアミノ酸よりなり4個のシステイン基を持っている。マウスのIL-6の配列と比較するとこの4つのシステインの位置はヒト、マウスで同じでありCysとCysにはさまれた56番目から65番目までのアミノ酸配列はマウスとヒトで90%のホモロジーを有しており、この部分がレセプターとの結合にかかわっている可能性を示唆する。

IL-6のcDNAクローニングとほぼ時を同じく

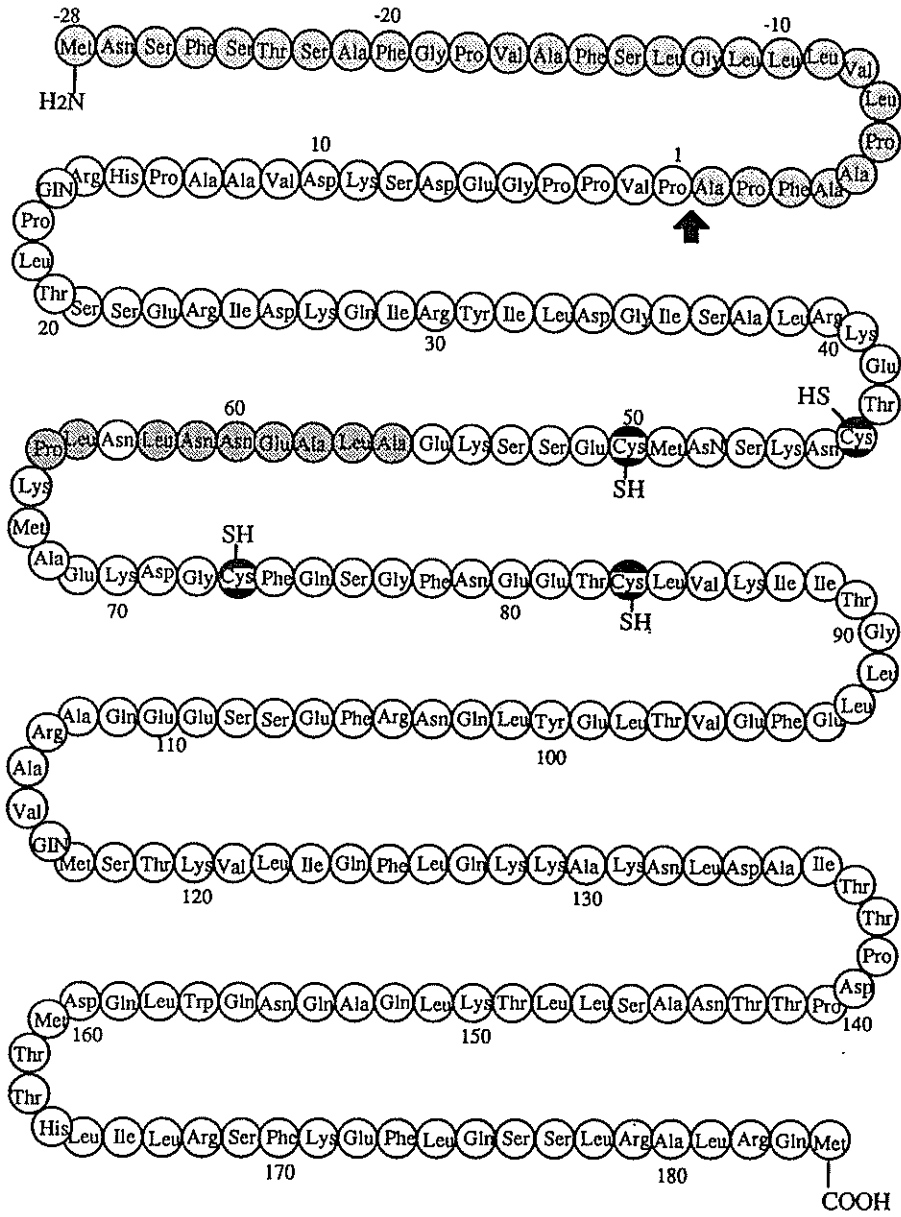


図3. ヒトインターロイキン6の一次構造
 (●) は、シグナルペプチド部分を示す。
 (⊖) は、システイン残基を示す。
 (⊕) は、マウスIL-6とヒトIL-6に共通に存在するアミノ酸配列を示す。

してIFN β 2あるいは26kd蛋白と呼ばれていた分子のcDNAがクローニングされた。またミエローマ増殖因子が精製されその部分アミノ酸配列が決定された。その結果、これらの分子は全く同

一であり、同じ分子の異なった機能を見ていたということが明らかとなった。IFN β 2と呼ばれて研究されていた分子のIFN活性については議論のあったところであるがリコンビナントIL-6を用

Pleiotropic functions of IL-6

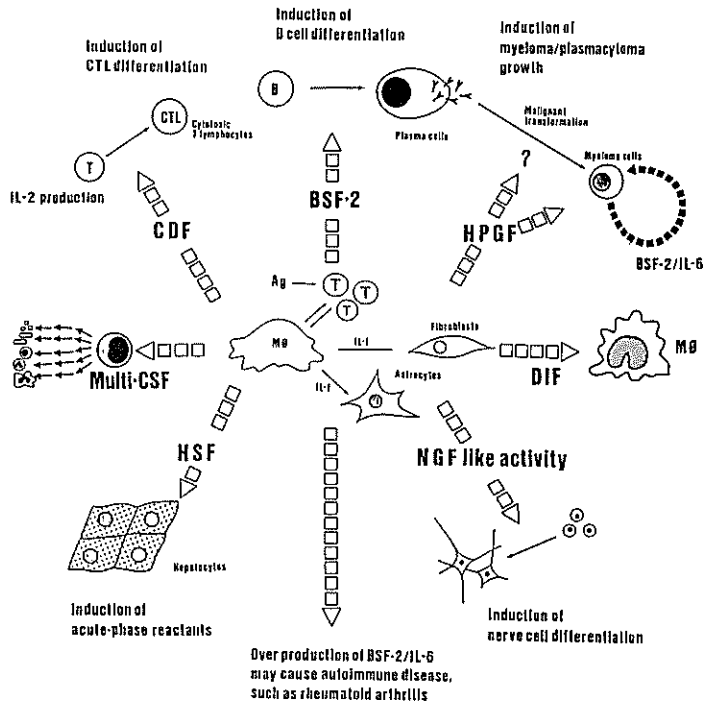


図4. インターロイキン6の生物活性

いた実験から、この分子には全くIFN活性のないことが証明された。さらに、リコンビナント分子と抗IL-6抗体を用いた実験からIL-6は肝細胞に働いて急性期蛋白の産生を誘導する肝細胞刺激因子(HSF)の本体であることも明らかとなった。抗体産生と急性期反応は感染、炎症、組織損傷などに対する生体の防御反応において最も重要な二つの柱である。したがって、IL-6は生体防御において中心的な役割を担う分子であることが明らかとなってきた。

更に、IL-6は造血幹細胞に働いてこれを活性化し造血の初期に必須の分子であることも明らかになってきた。IL-6はさらに脳神経細胞にもなんらかの作用を発揮することを示唆する結果が報告されるようになった。ラットのpheochromocytoma(PC12)をIL-6とともに培養すると神経成長因子(NGF)添加でみられると同様にPC12細胞は突起を出して神経細胞へと分化する。この結

果はIL-6が脳でもなんらかの作用を発揮している可能性を示唆する。IL-6の多様な機能をまとめたのが図4である。当初抗体産生を誘導する分子として追い求められてきた分子は単にBリンパ球のみでなくTリンパ球にも、肝細胞にも、血液細胞にも、脳神経細胞にも、増殖、分化の作用を発揮する分子であることが明らかとなってきた。生体防御という面から考えると、単に抗体産生だけでなく、急性期反応、血液細胞の動員、脳神経の刺激などが当然必要であり、IL-6という一つの分子がこれらすべての反応にかかわっていることは、これらすべての反応がハーモニーを保って引き起こされる上において理にかなっているとも考えられる。

b) IL-6と免疫異常

i) IL-6と多発生骨髄腫

ヒトのIL-6はマウスのplasmacytomaやhybridomaに対して強い増殖作用を発揮する。

このことから当然考えられることは IL-6 の発現異常がヒトの多発性骨髄腫（ミエローマ）の発症にかかわっているのではないかという可能性である。そこで我々は 26 例のミエローマ患者の骨髄よりミエローマ細胞を分離し、i) IL-6 はミエローマ細胞の増殖を促進するか、ii) ミエローマ細胞は IL-6 を作るか、iii) 抗 IL-6 抗体はミエローマの増殖をブロックするかということを調べてみた。その結果明らかになったことは IL-6 はミエローマの増殖を促進し、ミエローマ細胞は程度の差こそあれ全例において IL-6 を産生し、抗 IL-6 抗体は *in vitro* におけるミエローマの増殖を抑制することが明らかとなった。このことは、IL-6 はミエローマの自己増殖因子としてミエローマの増殖に必須の分子であり、その発現異常がミエローマの発症に深くかかわっていることが証明された。

ii) IL-6 と自己免疫疾患

心房肉腫 (Cardiac myxoma) は心房内に発生する良性腫瘍である。しかし興味あることは患者の 1/3 以上は自己抗体を産生し、自己免疫症状を呈する。しかもこの腫瘍を摘出すると数か月後に自己抗体は消失する。手術で得られた myxoma 細胞は IL-6 mRNA を大量に発現し、腫瘍細胞は抗 IL-6 抗体で染色されることが明らかとなった。この結果は *in vivo* において IL-6 が異常に産生されると患者は自己免疫様症状を呈することを示唆している。

それでは慢性関節リウマチ (RA) に代表される全身性自己免疫疾患には IL-6 の異常発現が関与しているであろうか。活動期の RA 患者の滑膜液中には大量の IL-6 活性 (10~50 ng/ml) が認められた。バイオプシーで得られた滑膜組織は IL-6 mRNA を発現し、その培養液は IL-6 活性を示した。さらに RA 患者から確立された滑膜細胞株は持続的に IL-6 を産生し続けた。これらの結果は RA の滑膜において持続的な IL-6 の発現があることを示している。IL-6 の産生異常は RA の症状、例えば滑膜における抗体産生細胞の浸潤と自己抗体の産生、血清中における急性期蛋白の増加 (CRP やアミロイドーシス)、 γ グロブリンの増加

などをよく説明することが出来る。

c) IL-6 レセプター

これまで述べてきたように、IL-6 は種々の細胞に増殖や分化あるいは増殖抑制などの多彩な作用を発揮する。このような機能の多様性がどのような機構により発現されるかを明らかにしていくためには IL-6 レセプターの分子構造を明らかにすることが必須である。インターフェロンやインターロイキンに代表されるポリペプチドメディエーターに対する標的細胞上のレセプターは通常 $10^2 \sim 10^3$ のオーダーであり、これはホルモンや増殖因子のレセプターのそれに比して約 1/100 以下である。したがってレセプターを精製し、あるいはレセプターに対するモノクローナル抗体を作るといったことはほとんど不可能に近いことであり、したがってこれらサイトカインと呼ばれる分子に対するレセプターは、まだどれ一つとしてその構造は明らかにされていない。唯一の例外は、IL-2 レセプターの α 鎖 (Tac) であるがこれが機能を発揮し、シグナルを伝達するためには、 β 鎖が必要とされており、この β 鎖はまだその遺伝子がクローニングされていない。

我々は、IL-6 レセプターをコードする遺伝子をクローニングするため新しい方法を導入した。高い発現効率を持ったベクター (CDM8) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、これを COS 細胞に導入し、レセプターを発現する細胞を蛍光色素を結合した IL-6 で検出し、この細胞をセルソーターを用いて取り出すという方法である。この方法を用いて、IL-6 レセプターをコードする cDNA プラスミッド pBSF2R.236 を単離した。このプラスミッドより得られた DNA をマウスの繊維芽細胞やヒトの T 細胞株 (JURKAT) などに導入することにより、これらの細胞表面上に IL-6 レセプターを発現させることが出来るという結果が確認された。

IL-6 レセプター cDNA の全塩基配列とそれより類推されるアミノ酸配列より明らかになったことは、i) レセプターは 468 個のアミノ酸より構成され、ii) N 端から約 90 個のアミノ酸は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するドメイン

IL-6 Receptor is a member
of Immunoglobulin Superfamily

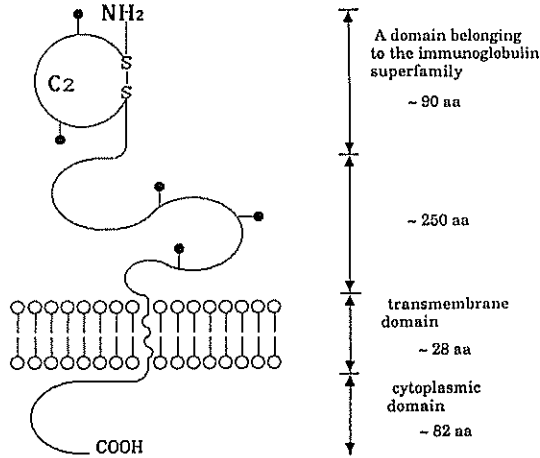


図5. ヒトインターロイキン6レセプターのモデル(●)は、N結合型糖鎖結合部位を示す。

構造を形成し、iii) 細胞内部分は82個のアミノ酸より構成され、増殖因子レセプターであるにかかわらずチロシンキナーゼのドメインを持たないということであった。このレセプターのアミノ酸配列と構造を模式的に示したのが図5である。IL-6による刺激はPIターンオーバー、Ca⁺⁺イオンの変動、C-キナーゼの活性化、蛋白のリン酸化などの生化学的変化を誘導せず、それ自身チロシンキナーゼドメインを持たないことからユニークなシグナル伝達のメカニズムの存在が推察される。

d) Fcεレセプター (FcεRII) とBリンパ球分化抗原 (CD23)

アレルギーの原因となるIgE抗体の産生には他にみられないいくつかの特徴が存在する；花粉、ダニ、寄生虫といった抗原が強いIgE抗体産生を誘導すること、長く続くIgE抗体の産生は正常人にはみられず、アトピーの患者に限られているということである。この現象を説明するのに今から約15年前、我々はIgE抗体産生に関与するユニークなヘルパーTリンパ球(The)が存在すること、この細胞はIgE抗体産生を選択的に高めるヘルパーファクターを産生することを報告した。しかしその当時この現象をうまく説明するこ

とは不可能であった。最近Th細胞はサイトカインの産生に関して2つのサブpopulationに分けられることが報告された。すなわちTh1はIL-2やγ-IFNを産生し、Th2はIL-4を産生するというものである。IL-4はIgE抗体産生を誘導し、γ-IFNはこの作用を打ち消すことが知られている。したがって、我々が15年前に報告したTheはTh2でありIgE産生を選択的に高めた因子はIL-4であったのであろうということになる。

一方、我々はIgEに結合する活性を持ちIgE産生を抑制する分子の存在を報告してきた。リンパ球表面上にはIgEを結合するレセプター、Fcεレセプター(FcεRII)が存在することが報告されている。したがって、IgE結合因子はFcεRIIの一部が可溶化したものではないかということが当然考えられる。そこで我々はFcεRIIに対するモノクローナル抗体を作製しFcεRIIをコードする遺伝子をクローニングすることを試みた。

FcεRIIを認識するモノクローナル抗体を用いて明らかになったことはFcεRIIはBリンパ球表面上にのみ特異的に発現される分化抗原であるということであった。この結果は、ロゼット法などを用いて報告されてきたFcεRIIはTリンパ球に発現されるというこれまでの結果とは異なるもの

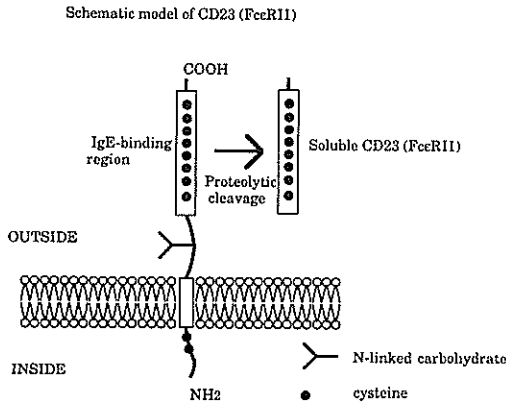


図6. Fcεレセプター (CD23) の構造模式図

であった。アトピー患者では、FcεRIIの発現は著明に亢進していたが、Tリンパ球上での発現はみられなかった。

Bリンパ球上でのFcεRIIの発現を詳細に検討してみると i) FcεRIIは μ^+/δ^+ の末梢成熟Bリンパ球のすべてに発現している, ii) 骨髄に存在する μ^+ 未熟Bリンパ球表面上には発現していない, iii) μ^+/δ^+ Bリンパ球がクラス転換して, γ^+ , α^+ あるいは ε^+ B細胞になるとFcεRIIの発現は消失する, iv) IL-4はFcεRIIの発現を著明に増強する, しかし, γ^+ , α^+ , ε^+ 細胞での消失は不可逆的でIL-4により発現は再誘導されないなどであった。IL-4がIgE産生とFcεRIIの産生を増強すること, アトピー患者では高IgE血症とFcεRIIの発現亢進がみられることを考えにいとアトピーはIL-4産生の異常としてとらえられるかもしれない。

さて, FcεRIIをコードする遺伝子をクローニングするためヒトのDNAをマウスL細胞に移入し, 抗FcεRII抗体を用いて選別を繰り返し, FcεRIIを発現するL細胞クローンを樹立した。このL細胞クローンをヒトのリンパ球表面抗原を認識する種々のモノクローナル抗体を用いてスクリーニングしてみるとCD23のグループにはいるモノクローナル抗体はすべてこのL細胞と反応しうることが明らかとなった。すなわちFcεRIIはCD23として登録されていたBリンパ球抗原であることが明らかとなった。CD23はB

リンパ球の増殖, Epstein Bair Virus によるtransformationと関連して興味をもたれていた抗原であった。すなわちある種の抗CD23抗体はBリンパ球に増殖を誘導しうること, EBNAIIはBリンパ球にCD23の発現を誘導しうること, EBVトランスフォームB細胞株の培養上清中の自己増殖因子の活性は抗CD23抗体で吸収されるといったものであった。そこでこの分子(FcεRII/CD23)はアレルギーの制御とともにBリンパ球の増殖制御という面でも注目を受けるようになった。

e) FcεRIIの構造とリコンビナント可溶性FcεRIIの作用

FcεRIIの機能を解明するために我々はまずFcεRIIをコードするcDNAをクローニングし, その全構造を明らかにした。図6に示すようにFcεRIIはユニークな構造をとっていた; i) FcεRIIは321個のアミノ酸よりなり, ii) シグナル配列をもたず, iii) そのN端を細胞内にC端を細胞外にだし, iv) アシアロ糖蛋白レセプターと高度のホモロジーを示した。C端側の150個のアミノ酸が細胞から放出され, IgE結合因子として培養液中やアトピー患者の血清中に存在することも明らかとなった。

そこでこのIgE結合因子をリコンビナント分子として大量に作製し, その機能を調べることを試みた。C端側150個のアミノ酸をコードするcDNAにはシグナル配列がないためIgE結合因子はCHO細胞で発現しなかった。そこでIL-6のシグナル配列をこれに結合したキメラ遺伝子を作製し, これをCHO細胞で発現させることにより可溶性FcεRII (IgE結合因子)を大量に得ることが可能となった。

まず, rFcεRIIが, IgEのFcεRIIやさらにはFcεRIへの結合をブロックしうるか否かを検討した。その結果, FcεRIIを発現する好酸球細胞株(EOL-3)とIgE結合赤血球とのロゼット形成をrFcεRIIが完全にブロックしうること, マクロファージからのIgE結合赤血球刺激によるスーパーオキシドの産生もブロックされることが示された。さらに画期的なことは ^{125}I -IgEのFcεRI

を介しての好塩基球への結合が rFcεRII によりブロックされることが認められた。これらのことは rFcεRII がアレルギー反応を引き起こすエフェクター細胞への IgE 結合をブロックすることによりアレルギー反応を制御しうる可能性のあることを示している。

興味あることは rFcεRII は B リンパ球に対してなんら増殖活性を示さないということであった。しかし、FcεRII を発現しないパーキット細胞株 (BL41) に FcεRII をコードする cDNA を移入してこれを発現させるとパーキット細胞が EBV トランスフォーム細胞のごとく細胞集塊を作ることが分かった。さらにこれに rFcεRII を添加するとこの細胞凝集はブロックされた。すなわち FcεRII は B リンパ球表面上では B リンパ球に特異的な接着分子として機能していることが示された。したがって、FcεRII/CD23 は B リンパ球のリンパ組織における局在、リンパ球, germinal center の形成, などに役割を担っているのかもしれない。

今後の課題と発展

IL-6 に関しては、大きく分けて三つの面からのアプローチが考えられる。一つはレセプターを介するシグナルの伝達機構である。先にも述べたが IL-6 レセプターはチロジキナーゼのドメインを持たず、また、いかなる既知の生化学的変化も誘導しない。レセプターと相互作用する新しいシグナルトランスデューサーの存在を仮定しての研究の進展が期待される。二つめは IL-6 遺伝子発現の制御のメカニズムである。IL-6 は多くの細胞に種々のシグナルで誘導されしかもその発現異常が種々の病気の発症にかかわることを考えると、その発現制御の機構解明は重要である。この遺伝子発現を制御する DNA 結合蛋白の構造決定、シグナルによる変化、種々の病的細胞でのその変化の解明はミエローマや自己免疫疾患発症の本態に迫りうるであろう。第 3 は IL-6 遺伝子移入による病気のモデルマウスの作製とその治療法の開発である。既に我々は、ミエローマの発症に成功した。種々の組織特異プロモーターを用いることによりいくつかの病気の本態に迫りうるこ

と期待される。

FcεRII に関してはアレルギーの制御という観点と B リンパ球の分化という点から以下のような展開が期待される。リコンビナント可溶性 FcεRII が好酸球、マクロファージ上の FcεRII への IgE の結合のみならず、好塩基球上に発現される FcεRI への IgE の結合もブロックすることはこの分子がアレルギーにおけるエフェクター相の制御にかかわりうることを強く示唆する。すなわち、この分子の濃度を粘膜局所で上昇させ花粉やダニに対する IgE 抗体の好塩基球、マスト細胞、好酸球などへの結合をブロックすることによりアレルギーの侵入により起こる化学伝達物質の遊離を抑えることが出来るであろうと期待される。もし、これが可能となれば、レセプターを用いた病気の制御の最初の例となるであろう。

先に述べたように FcεRII を発現させた、パーキット細胞株は細胞集塊を形成し、この凝集は可溶性 FcεR によりブロックされる。このことは FcεRII が接着分子として機能している可能性を示唆している。しかしそうであるとすれば FcεRII が接着する相手方の分子は何であるのか、それはどのような細胞に発現しているか、という問いが生まれる。可溶性 FcεRII や B リンパ球を認識する多数のモノクローナル抗体のパネルを用いてそのような問題にアプローチすることが可能になるであろう。

発表論文

- 1) Nakagawa, T., T. Hirano, N. Nakagawa, K. Yoshizaki, and T. Kishimoto: Effect of recombinant IL-2 and γ -IFN on proliferation and differentiation of human B cells. *J. Immunol.*, 134, 959-966 (1985).
- 2) Kishimoto, T.: Factors affecting B cell growth and differentiation. *Annual. Rev. Immunol.*, 3, 133-157 (1985).
- 3) Kishimoto, T., T. Hirano, H. Kikutani, A. Muraguchi, K. Shimizu, H. Kishi, S. Kashiwamura, T. Taga, S. Inui, R. Kimura, N. Nakano, K. Ishibashi, and M. Tagawa: Regulation of growth and differentiation of human B cells. *In Human T Cell Clone*, ed. by M. Feldmann *et al.*, The Humana Press, pp. 349-359 (1985).
- 4) Kishimoto, T., K. Yoshizaki, M. Okada, T.

- Kuritani, H. Kikutani, N. Sakaguchi, Y. Miki, H. Kishi, T. Nakagawa, K. Shimizu, K. Fukunaga, and T. Taga: Growth and differentiation factors an activation of human B cells. *In Lymphokines*, 10, ed. by M. H. Schreier, and K. A. Smith, Academic Press, Inc., pp. 15-31 (1985).
- 5) Kikutani, H., T. Taga, S. Akira, H. Kishi, Y. Miki, O. Saiki, Y. Yamaura, and T. Kishimoto: Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J. Immunol.*, 134, 990-995 (1985).
 - 6) Shimizu, K., T. Hirano, K. Ishibashi, N. Nakano, T. Taga, K. Sugamura, Y. Yamaura, and T. Kishimoto: Immortalization of BGDF (BCGF II)- and BCDF-producing T cells by human T cell leukemia virus (HTLV) and characterization of human BGDF (BCGF II). *J. Immunol.*, 134, 1728-1733 (1985).
 - 7) Kishimoto, T.: Functions and properties of immunoregulatory molecules from human T hybridomas. *In T Cell Hybridomas*, ed. by M. J. Taussing, CRC Press, pp. 265-276 (1985).
 - 8) Hirano, T., H. Kikutani, K. Shimizu, H. Kishi, T. Taga, K. Ishibashi, S. Inui, S. Kashiwamura, N. Nakano, Y. Miki, T. Nakagawa, and T. Kishimoto: Regulation of human B lymphocytes differentiation: Characterization of B cell stimulatory factors. *In Immune Regulation*, ed. by M. Feldmann and N. A. Mitchison, The Humana Press, pp. 89-100 (1985).
 - 9) Kishi, H., S. Inui, A. Muraguchi, T. Hirano, Y. Yamamura, and T. Kishimoto: Induction of IgG secretion in a human B cell clone with recombinant IL-2. *J. Immunol.*, 134, 3104-3107 (1985).
 - 10) Hirano, T., T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K. Shimizu, K. Nakajima, K. H. Pyun, and T. Kishimoto: Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 82, 5490-5494 (1985).
 - 11) Suemura, M., and T. Kishimoto: Regulation of human IgE response by T cells and their products. *Int. Archs Allergy Appl. Immune.*, 77, 26-31 (1985).
 - 12) Yamamura, K., H. Kikutani, V. Folsom, L. K. Clayton, M. Kimoto, S. Akira, S. Kashiwamura, S. Tonegawa, and T. Kishimoto: Functional expression of a microinjected Ea^d gene in C57 BL/6 transgenic mice. *Nature*, 316, 67-69 (1985).
 - 13) Nakajima, K., T. Hirano, F. Takatsuki, N. Sakaguchi, N. Yoshida, and T. Kishimoto: Physicochemical and functional properties of murine B cell-derived B cell growth factor II. *J. Immunol.*, 135, 1207-1210 (1985).
 - 14) Yoshizaki, K., L. T. Tseng, T. Nakayama, S. Kishimoto, and T. Kishimoto: Isolation of B cell-derived B cell differentiation factor (B-BCDF). *Cellular and Molecular Biology of Lymphokines*, pp. 241-245 (1985).
 - 15) Yoshikubo T., M. Kimoto and T. Kishimoto: IgM induction in murine B hybridomas with Ia restricted T cell clones: A monoclonal model for T and B cell interactions in antibody response. *Microbiol. Immunol.*, 29, 993-1003 (1985).
 - 16) Suemura, M., E. L. Barsumian, A. Maeda, Y. Hattori, H. Kikutani, R. R. Hardy, and T. Kishimoto: Isolation, characterization and regulation of the expression of Fcε receptors (FcεR) by utilizing monoclonal anti-FcεR antibodies. *In Proceedings of the XII International Congress of Allergology and Clinical Immunology*, pp. 16-22 (1986).
 - 17) Okada, M., N. Yoshimura, Y. Ichimori, S. Kishimoto, S. Nakai, N. Nishino, and T. Kishimoto: Immunological and molecular characterizations of T cell-derived T cell activating factor. *J. Immunol.*, 136, 1288-1294 (1986).
 - 18) Kikutani, H., R. Kimura, H. Nakamura, R. Sato, A. Muraguchi, N. Kawamura, R. R. Hardy, and T. Kishimoto: Expression and function of an early activation marker restricted to human B cells. *J. Immunol.*, 136, 4019-4026 (1986).
 - 19) Kikutani, H., H. Nakamura, R. Sato, R. Kimura, K. Yamasaki, R. R. Hardy, and T. Kishimoto: Delineation and characterization of human B cell subpopulations at various stages of activation, utilizing a B cell-specific monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 136, 4027-4034 (1986).
 - 20) Muraguchi, A., H. Nishimoto, N. Kawamura, A. Hori, and T. Kishimoto: B cell-derived BCGF functions as autocrine growth factor(s) in normal and transformed B lymphocytes. *J. Immunol.*, 137, 179-186 (1986)
 - 21) Suemura, M., H. Kikutani, E. L. Barsumian, Y. Hattori, S. Kishimoto, R. Sato, A. Maeda, H. Nakamura, H. Owaki, R. R. Hardy, and T. Kishimoto: Monoclonal anti-Fcε receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fcε receptors on human B and T cells. *J. Immunol.*, 137, 1214-1220 (1986).

- 22) Suemura, M., and T. Kishimoto: IgE class-specific regulatory factor(s) and Fcε receptors on lymphocyte. *Int. Rev. Immunol.*, **2**, 27-42 (1987).
- 23) Kikutani, H., M. Suemura, H. Owaki, H. Nakamura, R. Sato, K. Yamasaki, E. L. Barsumian, R. R. Hardy, and T. Kishimoto: Fcε receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells prior to the isotype switching. *J. Exp. Med.*, **164**, 1455-1469 (1986).
- 24) Kawamura, N., A. Muraguchi, A. Hori, Y. Horii, S. Mutsuura, R. R. Hardy, H. Kikutani, and T. Kishimoto: A case of human B cell leukemia implicating an autocrine mechanism in the abnormal growth of Leu 1 B cells. *J. Clinical Investigation*, **78**, 1331-1338 (1986).
- 25) Kishimoto, T., T. Hirano, H. Kikutani, K. Yasukawa, T. Taga, N. Nakano, R. R. Hardy, and S. Tsunasawa: Regulation of human B cell differentiation: Molecular structure and immunological functions of human B cell differentiation factor (BSF2). *Prog. in Immunology*, **6**, 357-367 (1986).
- 26) Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi, and T. Kishimoto: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, **324**, 73-76 (1986).
- 27) Kikutani H., S. Inui, R. Sato, E. L. Barsumian, H. Owaki, K. Yamasaki, T. Kaisho, N. Uchiyoshi, R. R. Hardy, T. Hirano, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, M. Suemura, and T. Kishimoto: Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell*, **47**, 657-665 (1986).
- 28) Hirano, T., T. Taga, K. Yasukawa, K. Nakajima, N. Nakano, F. Takatsuki, M. Shimizu, A. Murashima, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, and T. Kishimoto: Human B cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **84**, 228-231 (1987).
- 29) Hayakawa, K., R. Ishii, K. Yamasaki, T. Kishimoto, and R. R. Hardy: Isolation of high affinity memory B cells: Phycoerythrin as a probe for antigen binding cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **84**, 1379-1383 (1987).
- 30) Yukawa, K., H. Kikutani, H. Owaki, K. Yamasaki, A. Yokota, H. Nakamura, E. L. Barsumian, R. R. Hardy, M. Suemura, and T. Kishimoto: A B cell specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (FcεR) on lymphocytes. *J. Immunol.*, **138**, 2576-2580 (1987).
- 31) Hardy, R. R., K. Hayakawa, M. Shimizu, K. Yamasaki, and T. Kishimoto: Rheumatoid factor secretion from human Leu-1 B cells. *Science*, **246**, 81-83 (1987).
- 32) Nakajima, K., T. Hirano, K. Koyama, and T. Kishimoto: Detection of receptors for murine B cell stimulatory factor 1 (BSF1): presence of functional receptors on CBA/N splenic B cells. *J. Immunol.*, **139**, 774-779 (1987).
- 33) Wang, F., C. D. Gregory, M. Rowe, A. B. Rickinson, D. Wang, M. Birkenbach, H. Kikutani, T. Kishimoto, and E. Kieff: Epstein-Barrvirus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B cell activation antigen CD23. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 3452-3456 (1987).
- 34) Kishimoto, T.: Factors, receptors and signals for B lymphocyte activation. *Prog. in Allergy*, **42**, 280-305 (1988).
- 35) Kishimoto, T.: B cell stimulatory factors—Molecular structure, biological function and the regulation of the expression. Special Article: *J. Clin. Immunol.*, **7**, 343-356 (1987).
- 36) Nishimoto, H., H. Kikutani, K. Yamaura, and T. Kishimoto: Expression of I-E molecules in NOD mice prevents the development of autoimmune insulinitis. *Nature*, **328**, 432-434 (1987).
- 37) Yasukawa, K., T. Hirano, Y. Watanabe, K. Muratani, T. Matsuda, S. Nakai, and T. Kishimoto: Structure and expression of human B cell stimulatory factor 2 (BSF2/IL-6) gene. *EMBO J.*, **6**, 2939-2945 (1987).
- 38) Noma, T., T. Mizuta, A. Rosen, T. Hirano, T. Kishimoto, and T. Honjo: Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunology Letters*, **15**, 249-253 (1987).
- 39) Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, H. Northoff, U. Ganter, J. Baucer, T. Kishimoto and P. C. Heinrich: Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF 2/IFN-β2) regulates β-fibrinogen and albumin mRNA levels in fao-9 cells. *FEBS Lett.*, **15**, 249-253 (1987).
- 40) Nakano, N., R. R. Hardy, and T. Kishimoto: Identification of intrathymic T progenitor cells by expression of thy-1, IL-2 receptor and CD3. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 1567-1571 (1987).
- 41) Kishimoto, T., H. Nishimoto, H. Kikutani, and K. Yamaura: Transfer of the Ea gene into NOD

- mice prevents the development of autoimmune insulinitis. *Proc. Japan Acad.*, **63**, 155-157 (1987).
- 42) Taga, T., Y. Kawanishi, R. R. Hardy, T. Hirano and T. Kishimoto: Receptors for B cell stimulatory factor 2 (BSF2): Quantitation, specificity, distribution and regulation of the expression. *J. Exp. Med.*, **166**, 967-981 (1987).
 - 43) Kishimoto, T., T. Hirano, H. Kikutani, and A. Muraguchi: Delineation of human B cell differentiation: Immunological and molecular characterization of human B cell differentiation factor (BSF-2). In *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation*, ed. by Gupta, S., Paul, W. E., and Fauci, A. C., Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 177-188 (1987).
 - 44) Kishimoto, T., T. Hirano, H. Kikutani, H. Kishi, S. Kashiwamura, K. Nakajima, T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, H. Nakamura, R. Sato, T. Kamiya, K. Yamazaki, and R. R. Hardy: Cellular and molecular mechanisms of human B-lymphocyte differentiation. In *Cellular, Molecular and Genetic Approaches to Immunodiagnosis and Immunotherapy*, ed. by Kano, K., Mori, S., Sugisaki, T., Torisu, M., U. Tokyo Press, pp. 37-46 (1987).
 - 45) Hirano, T., T. Matsuda, M. Turner, M. Feldmann, B. Tang, N. Miyasaka, M. Shimizu, and T. Kishimoto: B cell Stimulatory Factor 2 (BSF2 /IL-6) and Rheumatoid Arthritis. *Proc. Japan Acad. Ser. B*, **63**, 281-283 (1987).
 - 46) Kishimoto, T., T. Taga, K. Yasukawa, Y. Watanabe, T. Matsuda, K. Nakajima, and T. Hirano: Molecular structure and immunological function of human B cell differentiation factor (BSF2). In "Molecular Basis of Lymphokine Action" ed. by D. R. Webb, C. W. Pierce, S. Cohen, Humana Press, Inc. pp. 123-136 (1987).
 - 47) Muraguchi, A., T. Hirano, B. Tang, T. Matsuda, Y. Horii, K. Nakajima, and T. Kishimoto: The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* **167**, 332-344 (1988).
 - 48) Hardy, R. R., T. Kishimoto, and K. Hayakawa: Differentiation of B cell progenitors *in vitro*: Generation of surface IgM⁺ B cells, including Ly-1 B, from Thy-1⁻ asialoGM₁⁺ cells in newborn liver. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 1769-1774 (1988).
 - 49) Kishimoto, T. and T. Hirano: Molecular Regulation of B Lymphocyte Response. *Ann. Rev. Immunol.*, **6**, 485-512 (1988).
 - 50) Hirano, T., T. Matsuda, K. Hosoi, A. Okano, H. Matsui, and T. Kishimoto: Absence of antiviral activity in recombinant B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6). *Immunology Lett.*, **17**, 41-45 (1988).
 - 51) Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka, A. Kuramoto, and T. Kishimoto: Autocrine generation and essential Requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, **332**, 83-85 (1988).
 - 52) Reis, L. F., J. Le, T. Hirano, T. Kishimoto, and J. Vilcek: Antiviral action of tumor necrosis factor in human fibroblasts is not mediated by cell stimulatory factor 2/IFN- β_2 , and is inhibited by specific antibodies to IFN- β . *J. Immunol.*, **140**, 1566-1570 (1988).
 - 53) Lotz, M., F. Jirik, R. Kabouridis, C. Tsoukas, T. Hirano, T. Kishimoto, and D. A. Carson: BSF-2 /IL-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **167**, 1253-1258 (1988).
 - 54) Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto, T.-A. Tran-Thi, K. Decker, and P. Heinrich: Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur. J. Biochem.*, **173**, 287-293 (1988).
 - 55) Sakane, T., N. Suzuki, S. Takada, Y. Ueda, Y. Murakawa, T. Tsuchida, Y. Yamauchi, and T. Kishimoto: B cell hyperactivity and its relation to distinct clinical features and the degree of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, **31**, 80-87 (1988).
 - 56) Geiger, T., T. Andus, J. Klapproth, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich: Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 717-721 (1988).
 - 57) Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich: Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1 β and tumor necrosis factor α on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 739-746 (1988).
 - 58) Geiger, T., T. Andus, J. Bauer, H. Northoff, U. Ganter, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich: Cell-free synthesized interleukin-6 (BSF-2/IFN- β) exhibits hepatocytestimulating activity. *Eur. J. Biochem.*, in press (1988).
 - 59) Geiger, T., T. Andus, J. Klapproth, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich: Induction of acute-phase proteins by interleukin-6 *in vivo*.

- Eur. J. Immunol.*, **18**, 717-721 (1988).
- 60) Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich: Action of recombinant human interleukin-6, interleukin-1 β and necrosis factor λ on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 739-746 (1988).
- 61) Matsuda, T., T. Hirano, and T. Kishimoto: Establishment of a IL-6/BSF-2-dependent cell line and preparation of anti-IL-6/BSF-2 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 951-956 (1988).
- 62) Horii, Y., A. Muraguchi, S. Suematsu, T. Matsuda, K. Yoshizaki, T. Hirano, and T. Kishimoto: Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells: Macrophages-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunol.*, **41**, 1529-1535 (1988).
- 63) Satoh, T., S. Nakamura, T. Taga, T. Matsuda, R. Hirano, T. Kishimoto, and Y. Kaziro: Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/Interleukin 6. *Mol Cell Biol.*, **8**, 3546-3549 (1988).
- 64) Asaoku, H., M. Kawano, K. Iwato, O. Tanabe, H. Tanaka, T. Hirano, T. Kishimoto, and A. Kuramoto: Decrease in BSF-2/IL-6 response in advanced cases of multiple myeloma. *Blood*, **72**, 429-432 (1988).
- 65) Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto: Cloning and expression of human interleukin 6 (BSF-2/IFN β 2) receptor. *Science.*, **241**, 825-828 (1988).
- 66) Kishimoto, T., and T. Hirano: A new interleukin with pleiotropic activities. *Bio Essays.*, **9**, 11-15 (1988).
- 67) Tonouchi, N., N. Oouchi, N. Kashima, M. Kawai, K. Nagase, A. Okano, H. Matsui, K. Yamada, T. Hirano, and T. Kishimoto: High-level expression of human BSF-2/IL-6 cDNA in *escherichia coli* using a new type of expression-preparation system. *J. Biochem.*, **104**, 30-34 (1988).
- 68) Kishimoto, T.: B cell differentiation-interleukins and receptors for the antibody response. *In* ISI Atlas of Science., **1**, 149-154 (1988).
- 69) Kishimoto, T., T. Hirano, T. Taga, K. Yamazaki, T. Matsuda, B. Tang, A. Muraguchi, Y. Horii, Y. Kawanishi, Y. Hirata, H. Yawata, K. Yasukawa, Y. Watanabe, M. Shimizu, P. Heinrich, and M. Kawano. A new cytokine, BSF2/IL-6 and its receptor. *In* UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, ed. by O. Witte, M. Howard, and N. Klinman. Alan R. Liss. Inc., New York, p. 157-172 (1988).
- 70) Hirano, T., T. Taga, K. Yamasaki, T. Matsuda, B. Tang, A. Muraguchi, Y. Horii, S. Suematsu, Y. Hirata, H. Yawata, M. Shimizu, M. Kawano, and T. Kishimoto: A multifunctional cytokine, IL-6/BSF-2 and its receptor. *In* The proceeding for the 17th Collegium International Allergologium. ed. by A. Sehon, A. Capron, Karger, in press (1988).
- 71) Hirano, T., T. Taga, K. Yamasaki, T. Matsuda, B. Tang, S. Suematsu, Y. Horii, Y. Hirata, H. Yawata, A. Muraguchi, M. Kawano, N. Miyasaka, M. Shimizu, and T. Kishimoto: Interleukin 6 and its receptor: Pathological role in autoimmunity and lymphoid malignancy. *In* Advances in Immunopharmacology 4. Pergamon Journal Limited, in press (1988).
- 72) Hirano, T. and T. Kishimoto: Interleukin 6. *In* Human monocytes. Academic Press, in press (1988).
- 73) Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J. Immunol.*, **141**, 1543-1549 (1988).
- 74) Miyaura, C., K. Onozaki, Y. Akiyama, T. Taniyama, T. Hirano, T. Kishimoto, and T. Suda: Recombinant human interleukin 6 (B-Cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1). *FEBS Lett.*, **234**(1), 17-21, (1988).
- 75) Shimizu, S., T. Hirano, R. Yoshioka, S. Sugai, T. Matsuda, T. Taga, T. Kishimoto, and S. Konda: Interleukin 6 (B cell stimulatory factor 2)-dependent growth of a Lennert's lymphomaderived T cell line (KT-3). *Blood*, **72**, 1826-1828 (1988).