

Tyrphostin AG490 Reduces Acute Rejection in the Rat Lung

Takao HIGUCHI, Takeshi SHIRAISHI, Shin HIRAYAMA, Masafumi HIRATSUKA,
Satoshi YAMAMOTO, Akinori IWASAKI and Takayuki SHIRAKUSA

Second Department of Surgery, Fukuoka University School of Medicine

Abstract : The JAK/STAT pathway, one of intracellular signals from IL-2 receptor (IL-2R), plays a critical role in T-cell development and function. Tyrphostin AG490 is a promising agent for the blockade of IL-2R signaling at the level of Jak3 kinase. A recent investigation indicates that AG490 efficiently blocks the Jak3 activity in T-cells. To test the notion that inhibition of JAK3 may have an immunosuppressive potential, a 7-day course of i.p injection with 10 mg/kg, 15 mg/kg, and 20 mg/kg of AG490 was used to inhibit the rejection of heterotopically transplanted Brown Norway (BN : RT1ⁿ) lung allografts in Fischer 344 (F344 : RT1^l) recipients. The progression of rejection was evaluated radiographically using a semiquantative grading system (Aeration Score : AS ; 0=opaque→6=full aeration). Recipients were sacrificed on day 8, and the grade of rejection was histologically determined based on the I. W. F of lung acute rejection (Rejection Score : RS ; 0=no rejection→4=severe rejection). The AG490-treated recipients showed a significantly high AS in comparison to the untreated recipients on day 6. In addition, a significant suppression of rejection in the AG490-treated recipients was histologically confirmed in a dose dependent manner. We conclude that the inhibition of the JAK/STAT pathway may allow for the efficient suppression of lung allograft rejection.

Key words : Transplantation, Acute rejection, Janus Kinase 3 (JAK3), Tyrphostin AG490

6 = full aeration) でモニターした。また移植後 8 日目に犠牲死させ、肺摘出標本を病理学的移植肺拒絶反応スコア (Rejection Score : RS ; 0 = no rejection → IV = severe/destructive rejection) にて評価した。AG490 投与群は非投与群に比し、移植後 6 日目において有意に高い AS を示した。また移植後 8 日目における移植片の RS においても AG490 投与群で有意に低値を示した。AG490 投与で急性拒絶反応が有効に制御され、さらにその抑制効果は dose dependent であることが示された。

索引用語：肺移植，急性拒絶反応，Jak3，Tyrphostin AG490

はじめに

移植組織の急性拒絶反応は細胞性免疫が主体である。拒絶反応の first step は、宿主 T 細胞上の T 細胞抗原受容体 (TCR) がドナー抗原提示細胞 (APC) によって提示された抗原情報 (抗原 + MHC) を認識することより始まる。

T 細胞の活性化には TCR を介する抗原認識シグナル (signal 1) に加え、Interleukin (IL)-2 のようなサイトカインの合成や分泌を促進させる働きをもつ B7-1/CD28 や CD40/CD154 などの Co-stimulation シグナル (signal 2) が必要不可欠である。この 2 つのシグナルが同時に供給されることによって、IL-2 産生と IL-2 レセプター発現が誘導され、IL-2 レセプターを介する増殖シグナルにより T 細胞は活性化され増殖できるようになる¹⁾²⁾。

IL-2 レセプターは分子量 55kD アミノ酸数 251 の α 鎖と 75kD アミノ酸数 525 の β 鎖および 64kD アミノ酸数 367 の γ 鎖の 3 分子からなる。3 分子が共同すると高親和性のレセプターとして働き、IL-2 に反応しやすくなる。IL-2 の結合により、細胞活性化のシグナルは、IL-2 レセプターに会合している JAK/STAT 系などのシグナル伝達経路によって細胞内へ伝わる¹⁾³⁾⁴⁾。

JAK/STAT 経路は、IL-2 レセプターからのシグナル伝達において重要な役割を持っている。現在までに JAK ファミリーは Jak 1, Jak 2, Jak 3, Tyk 2 の計 4 種、STAT ファミリーは Stat 1, Stat 2, Stat 3, Stat 4, Stat 5 a, Stat 5 b, Stat 6 の計 7 種のファミリー分子が同定されている⁵⁾⁷⁾。IL-2 レセプターには Jak 1, Jak 3 が会合しているが、レセプターへの IL-2 の結合により、互いに接近してリン酸化しあい活性化されレセプターのチロシンをリン酸化する。リン酸化されたチロシン残基に転写因子である Stat 3, Stat 5 が結合し、さらに Jak 3 により Stat 5 タンパクのチロシン残基がリン酸化される。リン酸化された Stat タンパクは速やかに Stat 同士で二量体を形成し、そのまま核内に移行し転写因子として作用して、細胞増殖などに関わる遺伝子を発現させる⁷⁾。

最近の報告では、in vitro において Tyrphostin AG490 (benzylidene malonitrile 誘導体) は、IL-2 レセプター内の Jak 3 autokinase 活性と Stat 5 タンパクのリン酸化を抑制することで、シグナル伝達をブロックし IL-2 産生性 T 細胞増殖を抑制することが証明されている⁸⁾⁹⁾。この結果、移植臓器の急性拒絶反応を抑制しうる可能性が示唆されている¹⁰⁾。

今回我々は、ラット同種肺移植モデルを作製し、AG490 投与により肺移植片急性拒絶反応の抑制が可能か否かを検討した。

対象と方法

1. 実験動物

福岡大学アニマルセンター内の SPF (specific pathogen free) エリアで “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” に準じたガイドラインに沿って飼育された MHC (RT1) 不適合の Fischer 344 (F344, RT1^l) と Brown Norway (BN, RT1ⁿ) のラット (雄, 体重 : 200 ~ 250g) を用いた。

2. 肺移植

ドナー BN ラットの左肺をレシピエント F344 ラットに、Mizuta らが提唱したカフ法を用いて同所性移植を行った¹¹⁾。

【ドナー手術】

ドナー BN ラットに Ketamine (40mg/kg) を筋肉注射し仰臥位に固定した。頸部切開しチューブを挿入した後、人工呼吸 (換気量約 2.5ml/回, 換気回数 90回/分) を開始した。陰茎静脈よりヘパリン (0.1ml) 注入後、開胸開腹した。腹部大動脈を切開し、下大静脈を遮断した後、右心室から 18G の注射針を肺動脈本幹に挿入して冷生理食塩水で肺を灌流した。灌流液は左心耳切開孔より回収した。1cmH₂O 圧で肺を加圧した状態で気管を結紮切離して、後縦隔沿いに気管を剥離し、心肺を enblock に摘出した。心肺と一緒に摘出した食道を剥離した後、左肺を分離し、肺動脈 (PA) と肺静脈 (PV) にそれぞれカフを装着した。

【レシピエント手術】

レシピエント F344 ラットに Ketamine を筋肉注射した後、経口的に挿管し人口呼吸を開始した。後側方切開にて左開胸した後、肺門部を剥離した。移植片の PA, PV をカフ法にてレシピエント肺動静脈に吻合した。気管支は 8-0 ポリプロピレン糸を用いて連続縫合した。PV→PA の順にマイクロクリップを外して血流を再開させた後、閉胸し挿管チューブと胸腔ドレーンを抜去した。

【実験群】

レシピエントは移植後無作為に 3 群に分けた。移植のみを行った Control 群 (n=6), 移植後に Tyrphostin AG490 の溶媒として使用した DMSO のみを投与した Vehicle 群 (n= 6), Tyrphostin AG490 投与した Treatment 群に設定した。さらに AG490 投与群は投与量により 10mg/kg/day (low-dose, n=6), 15mg/kg/day (n=6), 20mg/kg/day (high-dose, n=3) の 3 群に分けた。投与はラットを halothane で麻酔した後、移植後 7 日間連続の腹腔内注射を行った。

3. 拒絶反応評価

【胸部X線スコア】

移植肺の急性拒絶反応の進行は連日の胸部X線撮影を行った。X線撮影は、レシピエント F344 ラットを halothane で麻酔をかけた後、第 2 斜位に固定し撮影した。胸部X線所見は無作為に、J. Prop が提唱した Grading scale for ventilation score of left lungs on chest roentgenograms を用いて半定量的に評価した (表 1)。Aerated surface area と Density をそれぞれ 0 ~ 3 の 4 段階で評価し、合計したスコアを Aeration Score (AS) とした (0 : opaque lung→6 : normal-appearing lung)¹²⁾。

【病理学的拒絶反応スコア】

レシピエント F344 ラットは、移植後 8 日目に犠牲死させた。摘出した各群の移植肺は、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行った。病理学的な急性拒絶反応の程度は、Working formulation for classification and grading of lung allograft rejection を用いて半定量的に評価し、Rejection Score (RS) とした (表 2)¹³⁾¹⁴⁾。

表 1 胸部X線スコア

(*Jm. Prop, M. D. 1987*)

Score	Aerated surface area	+ Density
3	Total to two thirds	Nomal
2	Two thirds to one thirds	Patchily increased
1	One thirds to minimal	Moderately increased
0	Not aerated	Opaque

表 2 病理学的拒絶反応スコア

(*S. Yousem, M. D. 1996*)

Acute Rejection
Grade 0 : No significant abnormality
Grade 1 : Minimal acute rejection
Grade 2 : Mild acute rejection
Grade 3 : Moderate acute rejection
Grade 4 : Severe acute rejection

表 3 手術時間・移植片虚血時間

Group	Operation time (min)	Graft ischemic time (min)
Control	130±4.28	110±3.42
Vehicle	135±5.03	108±5.72
AG490 (10mg/kg)	130±3.89	105±3.66
AG490 (15mg/kg)	120±4.56	109±6.17
AG490 (20mg/kg)	130±5.63	111±8.00

4. 統計

統計処理には、Statcel version を用いた。各データは平均±標準誤差で示し、2 群間の検定は Student t-test で行い、p<0.05 を有意とした。

結 果

作製したラット左肺同種移植モデルは全て、移植後 1 日目の胸部X線所見において移植肺の生着を確認した。Control 群、Vehicle 群、AG490 投与群の 3 群間において、手術時間や虚血時間に有意差は認めなかった (表 3)。AG490-High dose (20mg/kg/day) 群において、作製した 6 頭のうち 3 頭が移植後 2 ~ 4 日目の間に移植肺の機能を維持したまま死亡しており、Tyrphostin AG490 による細胞毒性の可能性が考えられた。この死亡した 3 頭は設定した群から除外することとした。

移植後 7 日目における胸部X線の所見を提示する。Control 群の移植左肺の胸部X線所見 (図 1 a) は、移植をしていない右肺に比べ、著しい透過性の低下を認めため AS=0 とした。それに比し、Tyrphostin AG490 15mg/kg 投与群の胸部X線所見 (図 1 b) は、良好な含気を示し浸潤影は認めないため AS=6 とした。

移植後 1 日目から 8 日目まで連日胸部X線撮影し評価したものをグラフに示す (図 2)。Tyrphostin AG490 (15mg/kg/day) 投与群は、移植後 8 日目においても

AS=5.2±0.3であったのに対し、Control, Vehicle 群は移植5日目を境にASの低下を認め、移植後7日目においては有意な差を認めた (P<0.05)。さらに Tyrphostin AG490 投与を High dose 群 (20mg/kg/day) と Low dose 群 (10mg/kg/day) で比較したものを (図3) に示す。移植後6日目において AG490-Low dose 群では AS=3.8±0.4 であったのに比し、AG490-High dose 群は AS=5.4±0.3 と有意に良好な AS を示した (P<0.05)。Tyrphostin AG490 の効果は dose dependent に抑制作用があることを認めた。

移植後8日目に摘出した移植肺の肉眼的所見を示す。Control 群の移植肺は肝様の色調変化を呈しており、肺組織の硬化を認め換気不能であった (図4a)。それに対し Tyrphostin AG490 投与群の移植肺は、正常肺の色調とほとんど変わらず含気も良好であった (図4b)。

移植後8日目における各群の病理組織所見を示す。Control 群, Vehicle 群の病理組織では、mononuclear cell infiltration が血管周囲だけでなく間質に及んでおり、更に肺胞内出血・肺胞破壊等を認めたため RS を grade 4 とした (図5a)。それに対して Tyrphostin AG490 投与群の病理組織では、軽度の perivascular cuffing を認めるのみで、RS を grade 1 と判定した (図5b)。各群の病理学的拒絶反応スコアをグラフに示す (図6)。Control 群と Vehicle 群に対し、Tyrphostin

AG490 投与群は低い RS を認めた (P<0.05)。さらに AG490-Low dose 群は RS=2.5±0.3, AG490-High dose 群は RS=1.7±0.7 を示し、病理学的拒絶反応においても dose dependent な抑制効果が証明された。

考 察

急性移植拒絶反応の主体はT細胞の反応であると考えられている。1つはキラーT細胞の誘導による移植細胞の破壊であり、もう1つは移植抗原と反応したT細胞が産生、放出するサイトカインによる移植組織の障害である。この一連の免疫応答は、増殖因子、サイトカイン、ケモカインなどの液性因子によるT細胞の増殖、分化・成熟、そして活性化など、多彩な機能の誘導により絶妙に制御されている²⁾。この急性拒絶反応を抑制するためには、特定の移植抗原によって活性化されたT細胞の増殖、及び活性化を抑えることが重要となる。

現在、臓器移植に対して様々な免疫抑制剤が使用されている。シクロスポリンA (cyclosporine A : CsA) や FK506 は、カルシニューリン活性を抑制することで、TCR を介する T細胞初期活性化を特異的にブロックする作用を持つ¹⁵⁾。また、T細胞抗原 (CD3) に対するモノクローナル抗体 (OKT3) や Co-stimulation シグナルをブロックする CTLA4-Ig 等の効果が検討され



図1a 胸部X線所見 (Control 群, 移植後7日目)
移植左肺は著しい透過性の低下を認めた。(AS=0)



図1b 胸部X線所見 (Treatment 群, 移植7日目)
良好な含気を示し、浸潤影は認めなかった。(AS=6)

ている¹⁶⁾¹⁷⁾。

最近では、ラパマイシン (RAPA) や抗 IL-2 レセプター抗体等の IL-2 を介する活性化経路を特異的に阻害する薬剤が注目されており、これらの薬剤は他の正常細胞に影響することなく、移植抗原により活性化されたT細胞の増殖のみを抑制する可能性がある^{18)–20)}。特に IL-2 レセプター γ C 鎖シグナルカスケードの中で最も重要な Jak 3 キナーゼをターゲットとする治療戦略が注目されている。Jak 3 は、ほぼあらゆる細胞に発現している他の JAK ファミリーと異なり、リンパ球系の細胞の γ C 鎖に特異的に結合しており、シグナル伝達に必須のキナーゼである³⁾²¹⁾。

動物実験において Jak 3 ノックアウトマウスでは、リ

ンパ球系の細胞の分化が著しく障害され、末梢のB, T細胞が著明に減少していた。これは γ C 鎖遺伝子の変異により発症する重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency disease : SCID) の表現型と似かよっている。従来知られていた γ C 鎖遺伝子の変異による SCID はX染色体連鎖であるが、Jak 3 遺伝子の変異により常染色体遺伝子の SCID がヒトでも認められることが判明している^{22)–24)}。

Tyrphostin AG490 は、JAK/STAT シグナル経路の γ C/Jak 3 シグナルを選択的に抑制し、さらにその下流の Stat 5 a/b の活性をもブロックすることで移植抗原に対するT細胞の活性を抑制する事が知られている^{10) 25) 26)}。また Tyrphostin AG490 は移植抗原によ

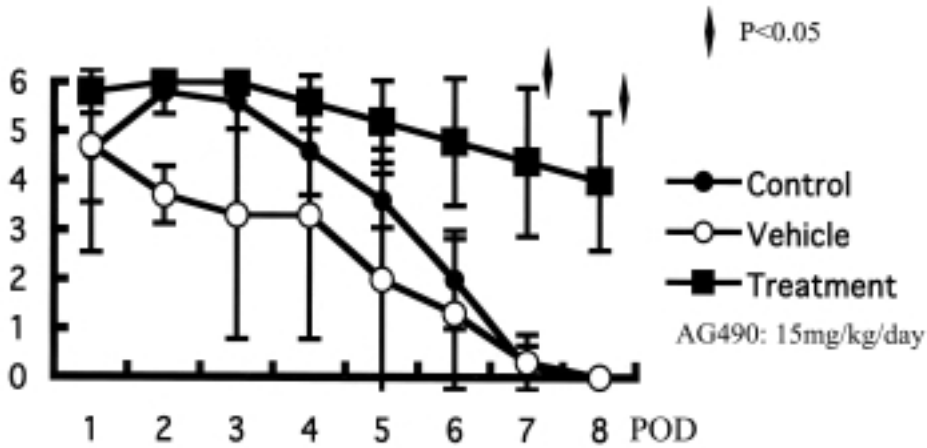


図2 胸部X線スコア
Treatment 群は移植後7日目において、AS に有意な差を認めた (P<0.05)

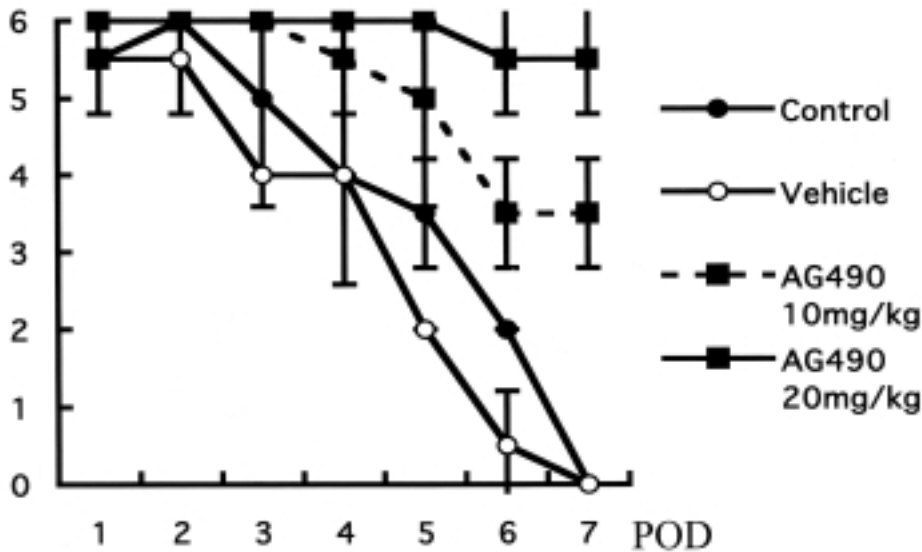


図3 胸部X線スコア (High dose vs Low dose)
AG490-High dose 群は、AG490-Low dose 群に比し良好な AS を示した。

て活性化されたT細胞内の IL-2, IFN- γ の産生を効果的に抑制する⁸⁾²⁷⁾。しかし, Tyrphostin AG490 は TCR を介するシグナルや Co-stimulation シグナルに対してはほとんど影響せず, カルモジュリン依存性プロテインキナーゼやセリン/スレオニンホスファターゼ (カルシニューリン) の活性, T細胞内の早期チロシンリン酸化,

移植抗原由来の芽球形成, CD25 や CD69 の早期活性化などの抑制は認めない事が分かっている⁹⁾¹⁰⁾²⁸⁾。

今回我々は, in vivo における Tyrphostin AG490 の効果を検討するために, ラット同種肺移植モデルを用いた。移植後1日目から8日目まで連日胸部X線撮影し, 拒絶反応の進行を評価すると, Tyrphostin AG490

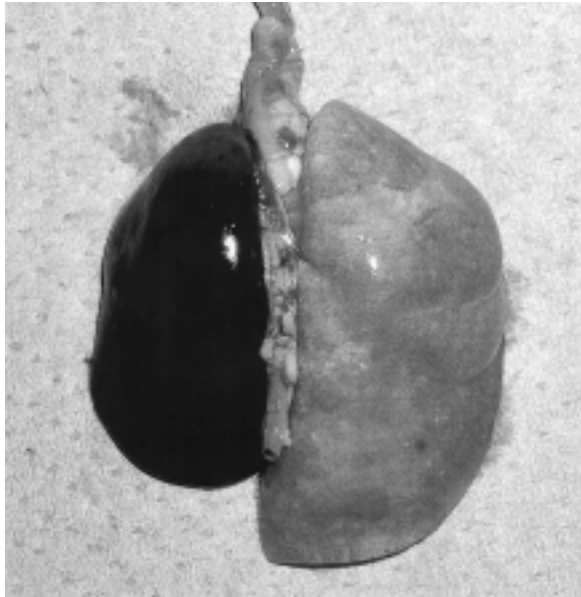


図 4 a 肉眼的所見 (Control 群, 移植後 8 日目)
移植左肺は肝様の色調を呈し硬化している。

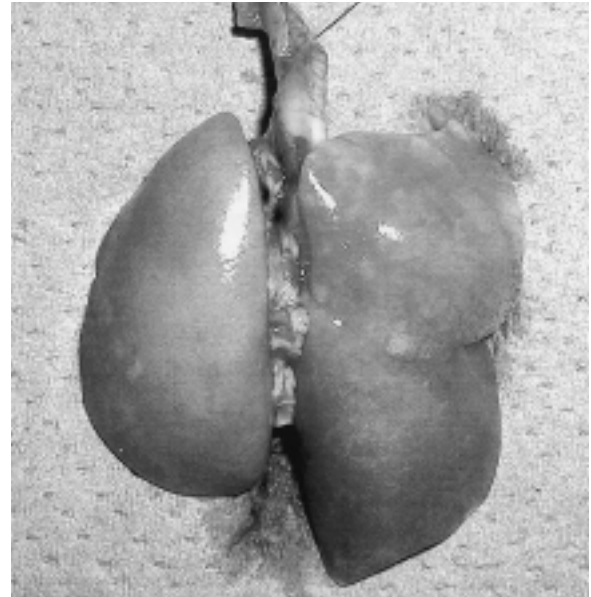


図 4 b 肉眼的所見 (Treatment 群: 15mg/kg/day, 移植後 8 日目)
移植左肺は正常肺の色調と変わらない。

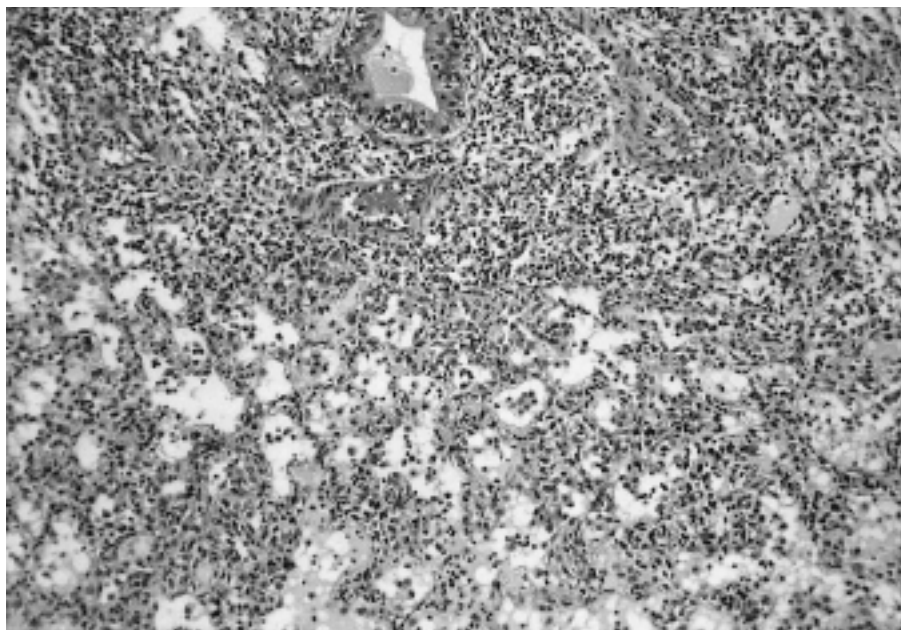


図 5 a 病理学的所見 (Control 群, 移植後 8 日目)
間質への Mononuclear cell の著明な浸潤 (I. W. F grade: 4)

(15mg/kg/day) 投与群は, Control, Vehicle 群と比べ拒絶の進行を遅らせ, 移植後 7 日目において有意な差を認めた ($P < 0.05$). さらに Tyrphostin AG490 投与の High dose (20mg/kg/day) と Low dose (10mg/kg/day) との比較により, Tyrphostin AG490 の抑制効果は dose dependent であることが分かった.

移植後 8 日目に犠牲死させ摘出した移植肺の肉眼的所

見, および病理組織所見においても, Tyrphostin AG490 の抑制効果は明らかであった.

Tyrphostin AG490 の Jak 3 シグナル経路をブロックする効果が, 移植抗原により活性化された T 細胞, 特に移植片を破壊するような effector T cell やサイトカインの増殖を効果的に抑制したため, 移植片の急性拒絶反応制御に繋がったと考えられた. しかし一方, AG490

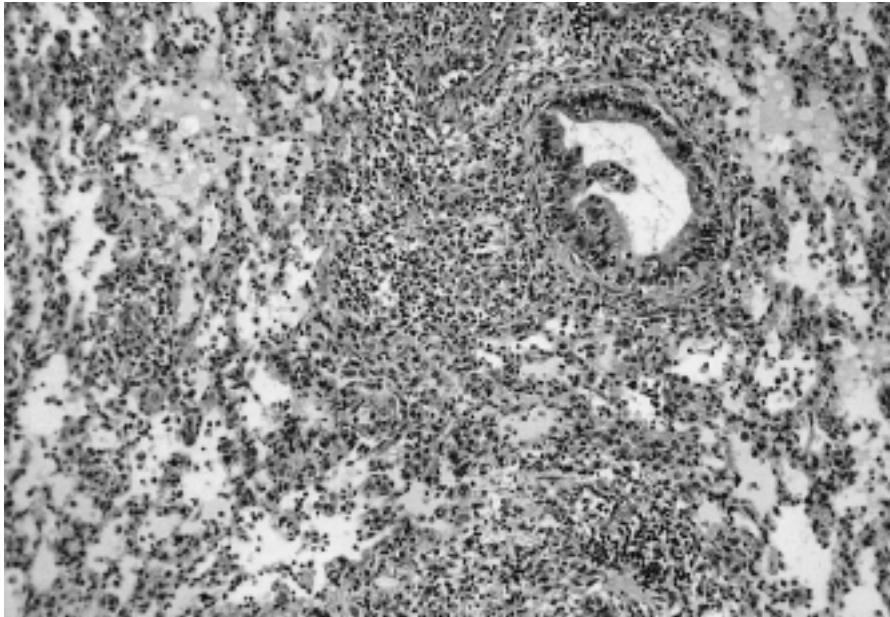


図 5 b 病理学的所見 (Vehicle 群, 移植後 8 日目)
軽度の perivascular cuffing を認めるのみ (I. W. F grade : 4)

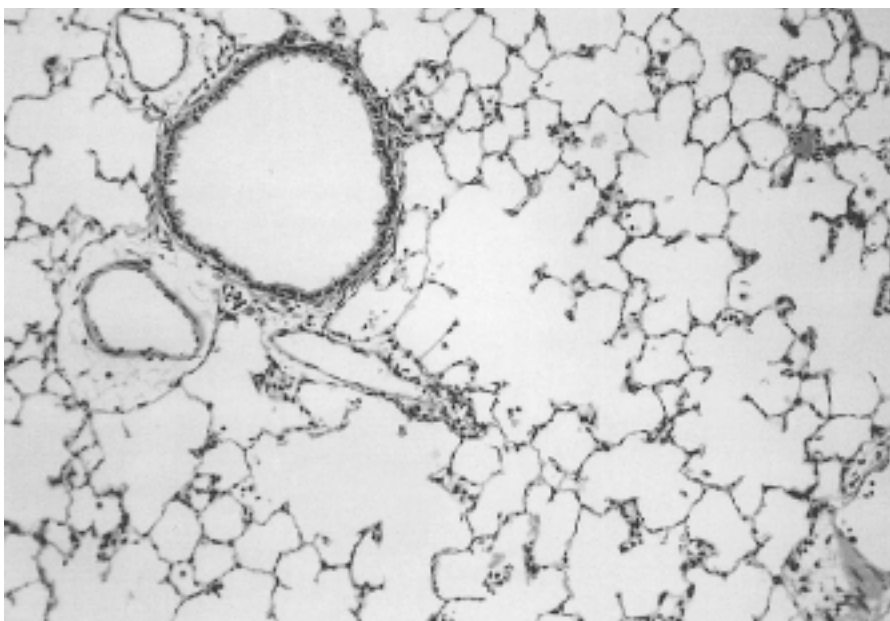


図 5 c 病理学的所見 (Treatment 群 : 15mg/kg/day, 移植 8 日目)
正常肺組織とほとんど変わりなし (I. W. F grade : 1)

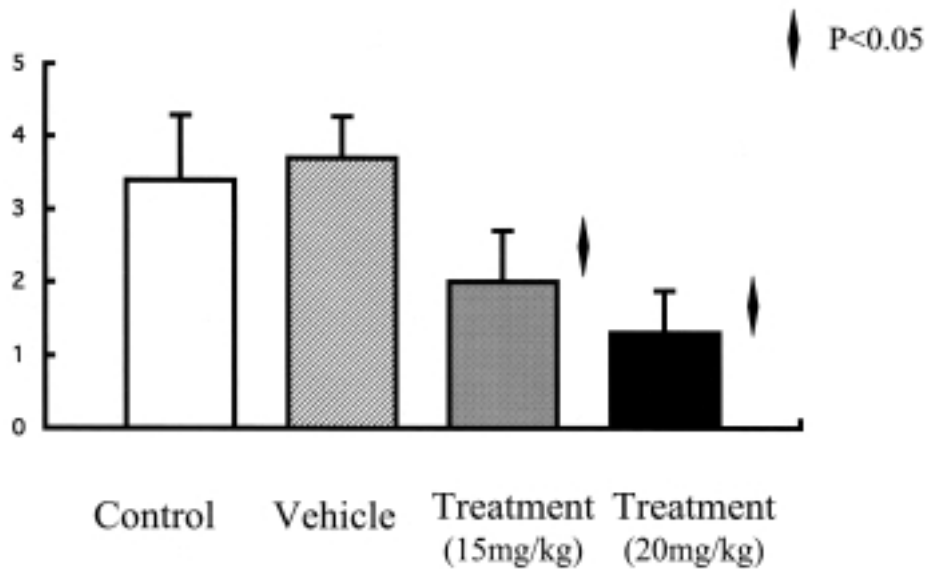


図6 病理学的拒絶反応スコア
Treatment 群は移植後7日目において、RS に有意な差を認めた (P<0.05)

High dose (20mg/kg/day) 群において、作製した6頭のうち3頭が移植後2~4日目の間で死亡しておりTyrphostin AG490の細胞毒性と考えられた。

今後、Tyrphostin AG490の毒性軽減による投与dose-upの方策、あるいは既存の免疫抑制剤との併用による副作用の軽減等検討が必要である。

文 献

- 1) Nelson, B. H. and Willerford, D. M. : Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.*, 70 : 1-81, 1998.
- 2) Kane, L. P., Lin, J. and Weiss, A. : Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.*, 12 : 242-249, 2000.
- 3) Thomis, D. C. and Berg, L. J. : The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling. *Curr. Opin. Immunol.*, 9 : 541-547, 1997.
- 4) Liu, K. D., Gaffen, S. L. and Goldsmith, M. A. : JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 10 : 271-278, 1998.
- 5) Schindler, C. and Darnell, J. E., Jr. : Transcriptional responses to polypeptide ligands : the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 64 : 621-651, 1995.
- 6) Ihle, J. N. : STATs : signal transducers and activators of transcription. *Cell*, 84 : 331-334, 1996.
- 7) Darnell, J. E., Jr. : STATs and gene regulation. *Science*, 277 : 1630-1635, 1997.
- 8) Kirken, R. A., Erwin, R. A., Taub, D., Murphy, W. J., Behbod, F., Wang, L., Pericle, F. and Farrar, W. L. : Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J. Leukoc. Biol.*, 65 : 891-899, 1999.
- 9) Wang, L. H., Kirken, R. A., Erwin, R. A., Yu, C. R. and Farrar, W. L. : JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J. Immunol.*, 162 : 3897-3904, 1999.
- 10) Saemann, M. D., Bohmig, G. A., Osterreicher, C. H., Staffler, G., Diakos, C., Krieger, P. M., Horl, W. H., Stockinger, H. and Zlabinger, G. J. : Suppression of primary T-cell responses and induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in vitro by the Janus kinase inhibitor tyrphostin AG490. *Transplantation*, 70 : 1215-1225, 2000.
- 11) Mizuta, T., Kawaguchi, A., Nakahara, K. and Kawashima, Y. : Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 97 : 578-581, 1989.
- 12) Prop, J., Wagenaar-Hilbers, J. P., Petersen, A. H. and Wildevuur, C. R. : Diagnosis of rejection in rat lung allografts by bronchoalveolar lavage. *Transplant. Proc.*, 19 : 3779-3780, 1987.
- 13) Yousem, S. : A perspective on the Revised Working Formulation for the grading of lung allograft rejection. *Transplant. Proc.*, 28 : 477-479, 1996.
- 14) Yousem, S. A., Berry, G. J., Cagle, P. T., Chamberlain, D., Husain, A. N., Hruban, R. H., Marchevsky, A., Otori, N. P., Ritter, J., Stewart, S. and Tazelaar, H. D. : Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection : Lung Rejection Study Group. *J. Heart. Lung.*

- Transplant., 15 : 1-15, 1996.
- 15) O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J. and O'Neill, E. A. : FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature.*, 357 : 692-694, 1992.
 - 16) Schwab, R., Crow, M. K., Russo, C. and Weksler, M. E. : Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody : role of modulation of T3 molecules and interleukin 1. *J. Immunol.*, 135 : 1714-1718, 1985.
 - 17) Lenschow, D. J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J. R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M. G., Linsley, P. S. and Bluestone, J. A. : Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science.*, 257 : 789-792, 1992.
 - 18) Calne, R. Y., Collier, D. S., Lim, S., Pollard, S. G., Samaan, A., White, D. J. and Thiru, S. : Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet.*, 2 : 227, 1989.
 - 19) Thomson, A. W. and Woo, J. : Immunosuppressive properties of FK-506 and rapamycin. *Lancet.*, 2 : 443-444, 1989.
 - 20) Soulillou, J. P., Cantarovich, D., Le Mauff, B., Giral, M., Robillard, N., Hourmant, M., Hirn, M. and Jacques, Y. : Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts. *N. Engl. J. Med.*, 322 : 1175-1182, 1990.
 - 21) Thomis, D. C. and Berg, L. J. : Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function. *J. Exp. Med.*, 185 : 197-206, 1997.
 - 22) Nosaka, T., van Deursen, J. M., Tripp, R. A., Thierfelder, W. E., Witthuhn, B. A., McMickle, A. P., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. and Ihle, J. N. : Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science.*, 270 : 800-802, 1995.
 - 23) Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H. and Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T. and Saito, T. : Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity.*, 3 : 771-782, 1995.
 - 24) Thomis, D. C., Gurniak, C. B., Tivol, E., Sharpe, A. H. and Berg, L. J. : Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science.*, 270 : 794-797, 1995.
 - 25) Behbod, F., Erwin-Cohen, R. A., Wang, M. E., Trawick, B. W., Qu, X., Verani, R., Kahan, B. D., Stepkowski, S. M. and Kirken, R. A. : Concomitant inhibition of Janus kinase 3 and calcineurin-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts. *J. Immunol.*, 166 : 3724-3732, 2001.
 - 26) Eriksen, K. W., Kaltoft, K., Mikkelsen, G., Nielsen, M., Zhang, Q., Geisler, C., Nissen, M. H., Ropke, C., Wasik, M. A. and Odum, N. : Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia.*, 15 : 787-793, 2001.
 - 27) Constantin, G., Brocke, S., Izikson, A., Laudanna, C. and Butcher, E. C. : Tyrphostin AG490, a tyrosine kinase inhibitor, blocks actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.*, 28 : 3523-3529, 1998.
 - 28) De Vos, J., Jourdan, M., Tarte, K., Jasmin, C. and Klein, B. : JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br. J. Haematol.*, 109 : 823-828, 2000.

(平成15.11.10受付, 15.12.24受理)