好中球の機能分化と増殖の制御

豊田淑江・山口照英・押澤 正・内田恵理子・早川堯夫*

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

The regulation of functional differentiation and proliferation of HL-60 cells into neutrophils

To examine the regulatory mechanisms of proliferation and maturation in neutrophilic lineage cells, we have found the existence of transferrin receptor (Trf-R) positive (Trf-R⁺) and negative (Trf-R⁻) cells in DMSO-treated HL-60 cells and successfully sorted into Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells. Differentiated Trf-R⁻ cells exhibited much more maturation of neutrophilic cells as compared with Trf-R⁺ cells, and G-CSF accelerated differentiation of Trf-R⁻ cells. On the other hand, Trf-R⁺ cells had a tendency to proliferate rather than differentiate, and proliferation has enhanced by G-CSF. These results indicate that Trf-R expression coincides with the commitment to proliferate or differentiate of HL-60 cells, and G-CSF accelerates these commitments. On the basis from the results of G-CSF-induced signal transduction in Trf-R⁺ and Trf-R⁻ cells, STAT 3 promoted the differentiation of HL-60 cells into neutrophils, while p70 S6 kinase promotes proliferation and negatively regulate neutrophilic differentiation.

We also examined cross talk of G-CSF and GM-CSF on the differentiation of HL-60 cells into neutrophils. While G-CSF accelerate the neutrophilic differentiation of DMSO-treated HL-60 cells, GM-CSF markedly inhibited the G-CSF induced enhancement of neutrophilic differentiation. Furthermore, GM-CSF did not alter the G-CSF induced tyrosine phosphorylation of STAT 3, but GM-CSF inhibited the nuclear translocation of tyrosine-phosphorylated STAT 3. Therefore, we concluded that G-CSF-dependent nuclear translocation of STAT 3 coordinates with the promotion of neutrophilic differentiation in DMSO-treated HL-60 cells.

Rec. 11/27/2000, Acc. 1/11/2001, pp 199~207

Toshie Kanayasu-Toyoda・Teruhide Yamaguchi・
Tadashi Oshizawa・Eriko Uchida・Takao Hayakawa*

key words : differentiation of neutrophils, G-CSF, P70 S6 kinase, STAT3, PI3-kinase

好中球は、生体に進入してくる細菌や異物を貪食するとともに種々の分解酵素や活性酸素産生による殺菌を行い、生体防御や炎症に重要な役割を演じている。血中の好中球レベルは通常4,000~7,000/ μ l程度であるが、細菌感染などの

炎症反応が起こると急激な動員が行われ、ときには数万にも及ぶ。このように好中球は必要に応じて短時間に動員されることが特徴であり、好中球の機能的成熟や増殖は骨髓において厳密に制御されている。この生体防御に重要な役割を担っている好中球の分化・増殖の制御機構を解明することは生体防御や炎症反応を理解するうえで非常に重要である。

好中球の分化・増殖にはさまざまなサイトカインや増殖因子が関与しているが、そのなかでも顆

* Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部
Offprint requests to : Toshie Kanayasu-Toyoda, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(a) トランスフェリン受容体発現

(b) 肝細胞成長因子(HGF)受容体発現

(c) 分画後のトランスフェリン受容体発現

(d) 分画後のG-CSF受容体発現

図 1 好中球に分化させた HL-60 細胞の各種受容体の発現

DMSOで好中球に分化させた2日目のHL-60細胞を用いて各種受容体発現をフローサイトメーターで測定した。(c)(d)は抗Trf-R抗体を用いた磁気ビーズ法により分画したTrf-R⁺細胞, Trf-R⁻

細胞のTrf-RとG-CSF受容体の発現を示している。Trf-Rの発現だけがヘテロでありこれを利用してTrf-R⁺細胞, Trf-R⁻細胞を分画できることが示された。

粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は特に好中球系細胞の分化・増殖に重要な役割を果たしている¹⁾。

本稿では、好中球やマクロファージへの分化能を有し、これらの分化モデルとして非常によく研究されているHL-60細胞を用いて、G-CSFの好中球分化や増殖に及ぼす影響を解析した。特に、HL-60細胞を好中球に分化誘導するとトランスフェリン受容体(Trf-R)の発現の高いTrf-R陽性(Trf-R⁺)細胞と低いTrf-R陰性(Trf-R⁻)細胞が出現すること、およびTrf-R⁺細胞は増殖型であり、Trf-R⁻細胞は分化型であることを見出したので、これらの細胞の分化や増殖のコミットメントの制御とそれに及ぼすG-CSFの作用について解析した²⁾。また、好中球系細胞の分化・増殖に重要な働きをされると考えられているもう一つのサイトカインである顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)とG-CSFのクロストークについても解析した³⁾。このHL-60細胞を用いた好中球の分化・増殖の解析に基づいて生体

における好中球分化・増殖の制御機構についても考察した。

HL-60細胞の好中球分化に伴うTrf-R発現の変化

HL-60細胞はDMSOやレチノイン酸処理により好中球に分化することが知られている。この分化誘導時における種々のサイトカイン受容体の発現変化について解析したところ、図1に示すように、DMSOを加えて2日目では肝細胞成長因子(HGF)受容体であるMetの発現は分化前とほとんど変化がなく、図1bに示すように一つのピークしか観察されないが、Trf-R発現は分化誘導に伴って発現量が低下するとともに図1aに示すように二つのピークが観察され、Trf-R発現に関してヘテロな集団が存在することが示唆された²⁾。そこでTrf-Rの抗体を用いて、磁気ビーズ法で分画することにより図1cのようにTrf-R⁺細胞とTrf-R⁻細胞を分離することができた。一方、両細

(a) トランスフェリン受容体陽性細胞・陰性細胞のスーパーオキシド産生

(b) トランスフェリン受容体陽性細胞・陰性細胞の細胞周期

図 2 トランスフェリン受容体陽性細胞と陰性細胞の分化・増殖

- (a) 分化の指標としてのスーパーオキシド産生；磁気ビーズ分画後両細胞に G-CSF を加えて 5 日間培養した。オプソニン化ザイモザン刺激により産生するスーパーオキシド量はチトクローム c 法で測定した。
- (b) 増殖の指標としての細胞周期；(a) で分画した細胞に G-CSF を加えて 22 時間後に DNA をヨウ化プロピディウムで蛍光染色し、フローサイトメーターにてその取り込みを測定した。

細胞とも G-CSF 受容体の発現(図 1 d)には差異は認められなかった。また、データは示さないが、HGF 受容体についても G-CSF 受容体と同様に両細胞間で差異は認められなかった。レチノイン酸による分化誘導に伴っても、このような Trf-R⁺細胞と Trf-R⁻細胞の出現が認められた。したがって、HL-60 細胞の好中球分化誘導に伴う Trf-R 発現の特異的な変化は、分化に伴う細胞特性の変化によるのではないかと考え、Trf-R⁺細胞と Trf-R⁻細胞の分化能や増殖能について解析をした。

Trf-R⁺細胞と Trf-R⁻細胞の分化・増殖能の解析

DMSO による分化誘導 2 日目に細胞を回収し、磁気ビーズ法により Trf-R⁺細胞と Trf-R⁻細胞に分画した。さらに、両細胞に G-CSF を加えて培養し、分化・増殖の変化を解析した。分化の指標

としては、formyl-Met-Leu-Phe(fMLP)受容体発現、fMLP やオプソニン化ザイモザン刺激による活性酸素生成量を測定した。増殖能に関しては細胞数および細胞周期を解析した。

図 2 a に示すように、分化した Trf-R⁻細胞は貪食刺激により Trf-R⁺細胞に比べより高い活性酸素生成能を示した。さらに、Trf-R⁻細胞の活性酸素生成能は G-CSF 存在下に培養することによりさらに促進された。このような活性酸素生成能の亢進は、fMLP 刺激においても認められた。一方、fMLP 受容体の発現も Trf-R⁻細胞では、Trf-R⁺細胞に比べ亢進しており、その発現は G-CSF を添加して培養した Trf-R⁻細胞でもっとも高くなった。

細胞増殖能に関しては、分化能と逆に Trf-R⁺細胞が Trf-R⁻細胞に比べより高い能力を有しており、G-CSF によりさらに増殖能が促進された。細胞の DNA をヨウ化プロピディウムで蛍光染色

し、その標識量より細胞周期を解析した場合にも、Trf-R⁺細胞の増殖能の高さを示す結果が得られた。すなわち、Trf-R⁺細胞ではG₀/G₁期の占める割合が少なく、S+G₂/M期の占める割合が多いことが認められ、G-CSFはTrf-R⁺細胞のS+G₂/M期の比率をさらに増加させた(図2b)。

以上の結果から、Trf-R⁻細胞は分化に強くコミットメントされている細胞であり、Trf-R⁺細胞は増殖コミットメントの強い細胞であることが示唆された。さらに、G-CSFは両細胞のコミットメントの方向を変えることなく、そのコミットメントを促進することが明らかになった。

このように好中球への分化誘導に伴ってTrf-Rの発現のみが異なる細胞が出現してくる機構として、不等分裂が考えられる。Trf-R⁺およびTrf-R⁻細胞が出現してくるのは、培養後2日目であるが、HL-60細胞の倍加時間は通常40時間であることから、この間に平均1回の分裂が起きていると想定され、不等分裂が起きているとする仮説に矛盾はない。現在、Trf-R⁺およびTrf-R⁻細胞をつくりだす機構として不等分裂が起きているかについて詳細な検討を進めているところである。

分化・増殖に重要なシグナル伝達

Trf-R⁺細胞とTrf-R⁻細胞でG-CSF受容体の発現は差がないにもかかわらず(図1d)、G-CSFによる作用が異なるのは受容体からのシグナル伝達に差があるのではないかと考えられた。G-CSF受容体はサイトカインスーパーファミリーに属し⁴⁾、キナーゼドメインをもたないが⁵⁻⁷⁾、JAK2およびSTAT1やSTAT3をリクルートして活性化する⁸⁻¹²⁾。そのなかでも特に好中球分化においてSTAT3の活性化が重要であることが示唆されている^{13,14)}。すなわちG-CSFの刺激により受容体にリクルートされたJAK2によりSTAT3の705番目のチロシンがリン酸化され、分子内に存在するSH2ドメインを介してダイマーを形成し、核へ移行すると考えられている。そこでチロシンリン酸化STAT3(PY-STAT3)を認識する抗体を用いてG-CSFによるSTAT3の活性化を調べた。その結果、STAT3の発現量

に差はみられないが(図3a, 上段)、G-CSF刺激に伴うPY-STAT3の増加はTrf-R⁻細胞で有意に高いことが明らかとなった(図3a, 下段および棒グラフ)。このことは、STAT3の活性化がG-CSFの分化促進作用に重要なシグナルであるとする報告とよく一致していた。

p70S6kinase(p70S6K)はセリン・スレオニンキナーゼであり、それ自身のセリン・スレオニンがリン酸化されることにより活性化される。活性化されたp70S6Kにより40SリボソームのS6蛋白がリン酸化され、細胞周期をG₁期からS期に移行させるのに重要な役割を果たしていると考えられている¹⁵⁾。図2bで示したように、Trf-R⁺細胞は、G-CSF添加によりその増殖能が強く亢進することから、G-CSF刺激によるp70S6Kの活性化について解析した。Trf-R⁺細胞ではp70S6Kの発現量が多く、リン酸化の程度を示す電気泳動でのmobility shiftがG-CSFにより顕著に亢進されていた(図3b, 上段)。またその活性化とよく相関することが知られている411番目のセリンのリン酸化はTrf-R⁺細胞においてTrf-R⁻細胞に比べ亢進しており、G-CSF添加によりさらに強く促進された(図3b, 下段および棒グラフ)。したがって、p70S6KはTrf-R⁺細胞の高い増殖性やG-CSFが誘導する増殖に重要なシグナルを担っていることが示唆された。

p70S6KのHL-60細胞の増殖・分化における役割とその上流の解析

p70S6Kの活性化にホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)が深く関わっているとする報告¹⁶⁾がある一方で、それを否定する報告¹⁷⁾もあり、p70S6Kの上流のシグナル伝達系については未だ十分に解明されていない。このような混乱は、細胞ごとにその制御が異なっていることも一つの原因ではないかと想定される。そこでTrf-R⁺細胞とTrf-R⁻細胞のPI3Kの活性を比較してみた。図4に示すように、Trf-R⁺細胞のほうがG-CSF存否に関わらずはるかに高いPI3K活性を示した。また、Trf-R⁺細胞では、G-CSF添加によりPI3K活性が顕著に亢進するが、Trf-

図 3 トランスフェリン受容体陽性細胞と陰性細胞におけるシグナル伝達
G-CSF添加直後にシグナル伝達解析をそれぞれ特異的な抗体を用いて解析した。(a)抗STAT3抗体(上段), 抗PY-STAT3抗体(下段)用い, それを定量化した(グラフ), (b)抗p70 S6K抗体(上段), 抗PS-p70 S6K抗体(下段)用い, それを定量化した(グラフ)。

R-細胞では亢進が認められなかった。そこで、PI 3 Kの阻害剤であるワートマニンやp70 S6Kの特異的阻害剤であるラパマイシンを用いて、増殖や分化がどのような影響を受けるかを解析した。

Trf-R⁺細胞とTrf-R⁻細胞を分画後、ワートマニン存在下に分化させるとG-CSFによって促進される増殖が部分的に阻害されること、およびG-CSFによるp70 S6K活性化もワートマニンによって部分的に阻害されることから、PI 3 KはP70 S6Kの上流の一部として寄与するがそれ以外のp70の活性化経路も存在するものと考えられた¹⁸⁾。一方、ワートマニン存在下にTrf-R⁺細胞を培養すると、活性酸素生成活性やfMLP-Rの発現を指標としたその分化はTrf-R⁻細胞と同程度にまで促進された。このことより、① G-CSF刺激によるHL-60細胞の増殖促進はp70 S6Kが中心的な役割を担っていると考えられた。また、

② ラパマイシン処理したTrf-R⁺細胞の分化がTrf-R⁻細胞と同レベルになることより、p70 S6Kは分化に負の制御を行っていることが推定された。以上の結果から、HL-60細胞の好中球への分化や増殖の制御におけるp70 S6KやPI 3 Kの役割についての仮説を図5にまとめた。今後、増殖や分化に深く関わっていると考えられるp70 S6Kの標的分子としてc-mycが想定されるが、現在c-mycを含めたその下流の因子の解析を行っているところである。

HL-60細胞の好中球分化におけるG-CSFとGM-CSFのクロストーク

生体における好中球分化にはG-CSF以外にさまざまなサイトカインがその制御に関わっていると想定される。特に、G-CSF以外にGM-CSFが好中球分化や増殖に関わる因子として医薬品への開発が行われている。そこで、G-CSFとGM-

図4 フォスファジリノシトール3キナーゼ (PI 3 K) 活性

Trf-R⁺細胞およびTrf-R⁻細胞のPI 3 K活性は磁気ビーズ分画後³³Pを取り込ませG-CSF添加後5分に細胞を回収し産生されたフォスファチジルイノシトール3リン酸の放射線量を測定した。PI 3 K活性はG-CSF添加後5分で最大に達することにより、その5分における活性を両細胞間で比較した。

CSFのHL-60細胞の好中球分化におけるクロストークについて解析を行った³⁾。HL-60細胞にDMSO分化を誘導したのち、G-CSFやGM-CSFを添加してさらに培養したところ、G-CSFでは顕著な活性酸素生成能の促進が認められるが、GM-CSFでは強い分化の抑制効果が認められた

(図6)。両サイトカインを添加した場合には、G-CSFの促進効果が消失し、対照群より低い活性酸素生成能しか認められなくなった。すなわち、HL-60細胞の好中球分化に対してG-CSFが促進作用を、GM-CSFは抑制作用をもつことが明らかになった。一方、両サイトカインともDMSOで分化誘導したHL-60細胞の増殖を促進し、その促進作用はGM-CSFのほうが高かった。また、両サイトカインを添加したときの増殖促進作用は、GM-CSF単独の時と同レベルまで促進された。

次に、両サイトカインを添加したときのシグナル伝達のクロストークについてp70S6K、MAPキナーゼ(MAPK)、およびSTAT3の活性化を中心に解析を行った。その結果、G-CSF添加によりp70S6KとSTAT3のリン酸化が認められたが、MAPKの活性化は認められなかった。一方、GM-CSF添加によりp70S6KとMAPKの活性化は認められるもののSTAT3のリン酸化は認められなかった。両サイトカインを添加したときにはすべてのシグナル伝達系が活性化された。GM-CSFにより、p70S6KとMAPKの両

図5 Trf-R⁺細胞およびTrf-R⁻細胞のG-CSFによる分化と増殖

Trf-R⁻細胞は分化型でありSTAT3のチロシンリン酸化が分化に、またTrf-R⁺細胞は増殖型であり、p70S6Kの発現量の増加とリン酸化の亢進が増殖に重要なシグナルであることを示している。G-CSFは両細胞のコミットメントを変えるこ

となくそれぞれの能力を促進した。G-CSF存在下、Trf-R⁻細胞のp70S6Kやその上流のPI3Kを抑制すると、分化型に変化することを示している。

図 6 スーパーオキシド産生能における G-CSF と GM-CSF の効果

HL-60 細胞を DMSO で好中球に分化誘導し、2 日目に G-CSF, GM-CSF, あるいは両サイトカインを同時に加えてさらに 5 日間培養した。FMLP あるいはオプソニン化ザイモザン(OZ)刺激による O₂⁻生成は図 2 と同様チトクローム c 法にて測定した。

シグナル系が活性されることはその強い増殖促進活性に一致している。一方、好中球分化に STAT 3 の活性化が重要な働きをしていることが示唆されているが、HL-60 細胞の好中球分化を阻害する GM-CSF を添加したときにも G-CSF による STAT 3 のチロシンリン酸化は影響を受けなかったことより、GM-CSF による好中球分化の阻害作用は STAT 3 のチロシンリン酸化の

図 7 チロシンリン酸化 STAT 3 の核移行

HL-60 細胞を DMSO で好中球への分化を開始し、2 日目に G-CSF や GM-CSF を HL-60 細胞に添加し、30 分後にそれぞれの細胞を固定し、抗 PY-STAT 3 抗体と FITC 標識二次抗体で細胞を染色した。G-CSF および GM-CSF を添加する 30 分前に 5 μg/ml の PD 98059 を添加した (G+GM-CSF+PD)。対照群および GM-CSF 添加群の矢印は細胞の存在位置を示している。

レベルではないと考えられた。

STAT 3 は JAK 2 によりチロシンリン酸化され、分子内の SH 2 ドメインを介して二量体を形

図 8 HL-60 細胞の好中球分化の G-CSF と GM-CSF による制御モデル

成し核へ移行するとともに、目的遺伝子のプロモーター部位に結合することにより、その遺伝子の転写を誘導すると考えられている。そこで PY-STAT 3 の核移行がこれらのサイトカインによってどのように影響されるのかについて検討した(図 7)。その結果、G-CSF を添加して 30 分後には PY-STAT 3 の核への集積が認められるが、GM-CSF ではチロシンリン酸化も認められなかった。一方、両サイトカインを同時に添加すると STAT 3 のチロシンリン酸化が認められるにも関わらず、核移行は認められなかった。両サイトカインのシグナルの違いを検討してみると、G-CSF は MAPK を活性化しないのに対し、GM-CSF は活性化する。そこで、MAPK の上流にある MEK の特異的な阻害剤である PD 98059 を用いて STAT 3 の核移行について調べてみた。その結果、PD 98059 で処理すると GM-CSF が存在しても、G-CSF により PY-STAT 3 は核へ移行できることが明らかになった。したがって G-CSF の分化促進効果を GM-CSF が抑制するのは GM-CSF が MEK を通じて MAPK を活性化し、これが PY-STAT 3 の核移行を阻害するためであることが示唆された。

HL-60 細胞の好中球への分化における G-CSF と GM-CSF のクロストークに対する筆者らの仮説を図 8 にまとめた。G-CSF は、分化誘導された HL-60 細胞の p 70 S 6 K 系と STAT 3 の活性化を引き起こし、前者は細胞増殖促進に、後者は分化に深く関わるシグナル系と考えられる。一方、GM-CSF は P 70 S 6 K および MAPK 経路を活性化し、強い増殖促進活性をもつが、活性化された MAPK は STAT 3 の核移行を阻害する。その結果、GM-CSF 添加により HL-60 細胞の分化の抑制が起こるものと想定された。

おわりに

筆者らが見出した HL-60 細胞の好中球分化に伴う Trf-R⁺細胞と Trf-R⁻細胞の出現は、好中球の分化・増殖の制御機構を明らかにするうえで非常に有効な手段を提供してくれるものと思われる。特に血球分化において、このように 2 種類の異なる細胞をつくりだす機構として不等分裂が関

わっている可能性もあり、その機構を探るうえで非常に有用なモデルになると思われる。また、MAPK による STAT 3 の核移行の阻害機構については STAT 3 の活性化・核移行シグナルを解析するうえで非常に重要なテーマと考えられる。さらに、p 70 S 6 K や PI 3 K を初めとしてさまざまなシグナル伝達分子が好中球分化に重要な役割を担っていることを明らかにしてきたが、これらの解析結果が生体における好中球分化においても当てはまるのかについても解明をする必要がある。

今回執筆の機会を与えてくださいました富山医科大学・薬学部・生理化学研究室の中川秀夫先生、実践女子大学・生活科学部・食生活科学科の矢田純一先生に深謝致します。

文 献

- 1) Nicola NA : Granulocyte colony-stimulating factor and differentiation-induction in myeloid leukemic cells. *Int J Cell Cloning* 5 : 1-15, 1987.
- 2) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Uchida E, Hayakawa T : Commitment of neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells coincides with expression of transferrin receptor. Effect of granulocyte colony stimulating factor on differentiation and proliferation. *J Biol Chem* 274 : 25471-25480, 1999.
- 3) Yamaguchi T, Mukasa T, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Hayakawa T : The role of STAT 3 in granulocyte colony-stimulating factor-induced enhancement of neutrophilic differentiation of Me₂SO-treated HL-60 cells. GM-CSF inhibits the nuclear translocation of tyrosine-phosphorylated STAT 3. *J Biol Chem* 274 : 15575-15581, 1999.
- 4) Bazan JF : Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 6934-6938, 1990.
- 5) Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, Nagata S : Expression cloning of a receptor for murine granulocyte-colony-stimulating factor. *Cell* 61 : 341-350, 1990.
- 6) Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Pan C-X, Seto Y, Nagata S : Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J* 10 : 2855-2865, 1991.
- 7) Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S : Growth and differentiation signals mediated by different regions in the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor. *Cell* 74 : 1079-1087, 1993.
- 8) Nicholson SE, Oates AC, Harpur AG, Ziemiecki A, Wilks AF, Layton JE : Tyrosine kinase JAK 1 is

- associated with the granulocyte-colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine-phosphorylated after receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 2985-2988, 1994.
- 9) Nicholson SE, Novak U, Ziegler SF, Layton JE : Distinct regions of the granulocyte colony-stimulating factor receptor are required for tyrosine phosphorylation of the signaling molecules JAK 2, Stat 3, and p 42, p 44^{MAPK}. *Blood* 86 : 3698-3704, 1995.
 - 10) Shimoda K, Iwasaki H, Okamura S, Ohno Y, Kubota A, Arima F, Otsuka T, Niho Y : G-CSF induces tyrosine phosphorylation of the JAK 2 protein in the human myeloid G-CSF responsive and proliferative cells, but not in mature neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 203 : 922-928, 1994.
 - 11) Barge RMY, de Koning JP, Pouwels K, Dong F, Löwenberg B, Touw IP : Tryptophan 650 of human granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) receptor, implicated in the activation of JAK 2, is also required for G-CSF-mediated activation of signaling complexes of the p 21 ras route. *Blood* 87 : 2148-2153, 1996.
 - 12) Rauprich P, Kasper B, Tidow N, Welte K : The protein tyrosine kinase JAK 2 is activated in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 86 : 4500-4505, 1995.
 - 13) Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, Akira S : STAT 3 activation is a critical step in gp 130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 3963-3966, 1996.
 - 14) Shimozaki K, Nakajima K, Hirano T, Nagata S : Involvement of STAT 3 in the granulocyte colony-stimulating factor-induced differentiation of myeloid cells. *J Biol Chem* 272 : 25184-25189, 1997.
 - 15) Pullen N, Thomas G : The modular phosphorylation and activation of p 70^{86k}. *FEBS Lett* 410 : 78-82, 1997.
 - 16) Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J : PDGF-and insulin-dependent pp 70 S 6 k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370 : 71-75, 1994.
 - 17) Ming X-F, Burgering BMTh, Wennström S, Claesson-Welsh L, Heldin C-H, Kozma SC, Thomas G : Activation of p 70/p 85 S 6 kinase by a pathway independent of p 21 ras. *Nature* 371 : 426-429, 1994.
 - 18) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T : The role of the p 70 S 6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells-A study of transferrin receptor-positive and negative cells obtained from dimethyl sulfoxide or retinoic acid-treated HL-60 cells. To be submitted.