

厚生労働科学研究費補助金  
(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業))  
総括研究報告書

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験  
(H24- 臨研推 - 一般 -003)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田澤 立之

平成 25(2013) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業))

総括研究報告書

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験

(H24-臨研推-一般-003)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田澤 立之

平成25 (2013) 年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験-----1	
田澤立之	

### II. 分担研究報告

1. GM-CSF 薬理試験の検討-----8	
湯尾 明	
2. GM-CSF 製剤の生物活性の解-----15	
内田寛治	
3. CHO 細胞由来 GM-CSF の in vitro 特性に関する研究-----19	
中田 光	
4. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 23	
中垣和英	
5. 「肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験」に関する研究-----25	
井上 彰	
6. [A] GM-CSF 吸入療法対象患者：自己免疫性肺胞蛋白症疫学調査	
[B]本邦の稀少肺疾患研究の現状と動向 -----28	
井上 義一	

### III. 項目別研究報告

1. 質量分析を用いた GM-CSF 製剤の比較検討----- 30	
田澤立之, 山縣彰, 伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 中田 光	
2. GM-CSF 製剤の生物活性の解析----- 33	
内田寛治, 日下部良臣, 鈴木洋子, 山田芳嗣	
3. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 36	
中垣和英, 布村由香	
4. カニクイザルを用いた GM-CSF 吸入動物実験の検討-----38	
田澤立之,伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 中垣和英, 中田 光	

### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表-----48

### V. 資料-----52

(資料) カニクイザルでのヒトリコンビナント GMCSF 製剤吸入の効果の解析報告書

## 肺胞蛋白症の吸入治療のための新規GM-CSF製剤の非臨床試験

研究代表者 田澤 立之 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 講師

### 研究要旨

肺胞蛋白症の 9 割は顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に対する自己抗体により生ずる. 新規治療法として GM-CSF の吸入投与による新治療が発案され, 日本国内の多施設第 2 相臨床研究で有効性と安全性が示された. 本研究では, 本邦未承認の GM-CSF 製剤を吸入薬として開発するため, CHO 細胞由来の GM-CSF 製剤(以下 CHO-GMCSF)を開発中の国内企業と連携し CHO-GMCSF の薬理学的特性の解析と, 哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法を検討し, 今年度は以下の結果を得た.

①CHO-GMCSF 製剤の質量分析では, 既存の GM-CSF 製剤と比べ, 分子量が大きく糖鎖修飾が多いこと, ②ヒト骨髓血液細胞を作用対象細胞としてメチルセルロースを用いたコロニーアッセイでは, CHO-GMCSF は既存 GM-CSF 製剤と同様の十分な活性をもつこと, ③好中球表面の CD11b 発現量および STAT5 のリン酸化反応の評価でも, CHO-GMCSF は既存製剤とほぼ同等の活性をもつこと, ④CHO-GMCSF は, 患者 GM-CSF 自己抗体との結合量, avidity では他製剤に比し若干劣るが TF-1 細胞に対する生残率の他製剤に比べて高いこと, ⑤ヒト GM-CSF の他の動物種の末梢血顆粒球への作用の検討では, マウス末梢血顆粒球への活性はないが, イヌ末梢血顆粒球の CD11b の発現増強がみられ, CHO-GMCSF と他の製剤の間に差はなかったこと, ⑥カニクイザルでの気管支肺胞洗浄 (BAL) による肺内環境の評価が可能であり, 急性毒性予備実験で, 投与 GMCSF の生理活性を確認できることが示された.

### 研究分担者

中田 光

新潟大学医歯学総合病院

生命科学医療センター・教授

湯尾 明

国立国際医療研究センター研究所・部長

井上 義一

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・部長

中垣 和英

日本獣医生命科学大学獣医学部・准教授

内田 寛治

東京大学医学部・講師

井上 彰

東北大学病院・特任准教授

### A. 研究目的

肺胞蛋白症は, 肺胞内にサーファクタント物質が蓄積して呼吸不全にいたる疾患で, その 9 割が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) に対する自己抗体が原因である. 標準治療は, 全身麻酔下での全肺洗浄であるが侵襲が大きい. より簡便な治療法が望まれていた. 当研究グループは, GM-CSF の吸入投与による新治療を発案し, 2005-2008 年に日本国内 9 施設による世界初の多施設第 2 相臨床研究を実施し, 有効性と安全性を示した. 本研究では, 本邦未承認の GM-CSF 製剤を吸入薬として開発するため, CHO 細胞由来の GM-CSF 製剤 (以



下 CHO-GM-CSF)) を開発中の国内企業とよりラボレベル製品の提供をうけて薬理学的特性の解析と、哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法を検討し、研究期間終了後に出来上がる予定の GMP レベル製品を用いる非臨床試験の実際の項目内容と、動物吸入毒性試験の方法を立案することを目的とする。このため今年度は、連携企業より提供される CHO-GM-CSF と海外で承認市販されている既存の GM-CSF 製剤を用いて、①質量分析での評価、②コロニーアッセイによる正常ヒト造血前駆細胞に対する増殖・分化誘導作用の評価、③好中球表面の CD11b 発現量および STAT5 のリン酸化反応の評価によるシグナル伝達系への影響の検討、④肺胞蛋白症患者由来の抗体を用いた免疫学的解析、⑤他の動物種の末梢血顆粒球への活性の評価、⑥カンクイザルでの吸入動物実験と細径気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取による評価、の 6 項目について検討した。

## B. 研究方法

**GM-CSF 製剤**：以下の 3 種類の製剤を用いた。

1. CHO 細胞由来ヒト GM-CSF (日本ケミカルリサーチ社提供) 1 mg/mL
2. 酵母由来ヒト GM-CSF (Genzyme 社 商品名ルーカイン 一般名サルグラモスチム sargramostim) 0.25 mg/vial
3. 大腸菌由来ヒト GM-CSF (Amoytop 社 一般名モルグラモスチム) 0.15 mg/vial

1. は PBS に溶解した状態で提供され、2. 3. については凍結乾燥品の製剤を購入した。

### ①質量分析

測定装置として、ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics) を、標的プレートとして MTP384 polished steel plate (Bruker Daltonics, 209520) を用いて測定を行った。

### ②コロニーアッセイ

正常人由来のヒト骨髓血液細胞を作用対象細胞

として、メチルセルロースを用いた半固形培地でのコロニーアッセイを実施し、各濃度の GM-CSF を用いて容量依存曲線を作成した。

### ③シグナル伝達系

#### 好中球表面の CD11b 発現量

血液中に GM-CSF を最終濃度 0, 1, 10ng/mL とするよう加え、37°C 30 分培養後 FITC-CD11b 抗体および PE-CD16 抗体染色を混和して、氷上に 15 分おき、lysing solution で赤血球の溶血と白血球の固定を行い、BD Accuri C6 フローサイトメーターで好中球画分の CD11b 発現量を測定した。

#### STAT5 のリン酸化反応

全血を用いて、GM-CSF 製剤で上と同様に刺激した後、溶血・細胞を固定後、メタノールを用いて白血球細胞表面に抗体を通す pore を空けて、抗リン酸化 STAT-5-Alexa Fluor 647 で染色し、細胞内の転写因子 STAT-5 のリン酸化成分を、上記フローサイトメーターで定量した。

#### ④肺胞蛋白症患者由来の抗体を用いた免疫学的解析

ELISA の系で GM-CSF 製剤を各種濃度でプレートにコートして、自己免疫性肺胞蛋白症患者血清との反応性を評価した。Avidity の測定に 8M urea 変性法を用いた。さらに、GM-CSF 依存性の TF-1 細胞株への増殖促進作用に対する患者自己抗体の阻害を MTT アッセイで評価した。

#### ⑤他の動物種の末梢血顆粒球への活性の評価

マウスおよびイヌより採血し、直ちにヘパリン化し、氷上で GM-CSF 0.1~60.5ng/ml になるように添加し、37 度の CO2 インキュベータ内に 15 分孵置した。CD11b, Gr-1, CD14 モノクロナール抗体で 30 分間染色し、固定・溶血後、フローサイトメータで定量した。

#### ⑥大型哺乳動物での吸入実験と細径気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取による評価

カニクイザルで、気管内への PennCentury 社のマイクロスプレーによる投与と、細径気管支ファイバースコープ（オリンパス社 BF Type XP60）による気管支肺胞洗浄液採取による評価の予備実験を行った。CHO-GMCSF および酵母由来、大腸菌由来の GM-CSF 製剤を 0.5mg/body の連日 3 日気管内投与を行い、一般状態、末梢血の血算、血液生化学、気管支肺胞洗浄液所見および、day12 の剖検で評価した。

#### 倫理面への配慮

⑤の解析について実施施設の日本獣生命科学大学動物実験取り扱い規定に基づいて、飼育環境の enrichment や苦痛の軽減に配慮し、倫理的に行った。

⑥の動物実験について、イナリサーチ社の動物実験審査委員会（#12221, #12222, 2012 年 11 月 21 日承認）ならびに新潟大学動物実験倫理委員会（新大研第 295-2 号, 2012 年 12 月 17 日承認）に実験計画書を提出し、審査を受け、指摘事項を修正して、承認を受けた。

個体差を考慮して予備実験および第 1 回実験に加えて第 2 回実験を施行することを計画し、修正した実験計画書をイナリサーチ社の動物実験審査委員会（#13012, 2013 年 1 月 22 日承認）ならびに新潟大学動物実験倫理委員会（新大研第 330 号, 2013 年 2 月 4 日承認）に提出し審査を受け、指摘事項を修正して承認を受けた。

実施にあたっては、飼養施設の獣医師が立ち会い、実験操作が苦痛の軽減に配慮し、倫理的に行われていることを確認した。

### C. 研究結果

#### ①質量分析

CHO-GMCSF および大腸菌由来のモルグラモスチム、酵母菌由来のサルグラモスチムと比較し、CHO-GMCSF は他の製剤とくらべ分子量が大きく 1 万 5 千から、2 万 5 千にわたり、多様

な糖鎖修飾を受けた蛋白であることが分かった。

#### ②コロニーアッセイ

いずれの GM-CSF 製剤も 1 ng/ml の濃度でほぼ最大の活性を示した。大腸菌由来のモルグラモスチムの活性が他の製剤よりやや高い傾向にあったが、有意差はなかった。CHO-GMCSF は十分な活性を有する製剤と考えられた。

#### ③シグナル伝達系

CHO-GMCSF と他の GM-CSF 製剤との活性の違いを比較した。好中球の GM-CSF 受容体下流に位置する STAT5 のリン酸化反応では、CHO-GMCSF は他の製剤と比較して差を認めず、また好中球表面の接着因子 CD11b の発現量の上昇はやや低値だが、最大値は差がなかった。これらの結果より CHO-GMCSF は他の製剤と比較してほぼ同等の活性をもつと考えられた。

④PAP 患者由来の抗体を用いた免疫学的解析患者 GM-CSF 自己抗体との結合量、avidity は、CHO-GMCSF が他の 2 者に比べて若干劣るが、MTT assay を指標とした TF-1 細胞に対する生残率の測定では CHO-GMCSF が低濃度において他の二者に比べて高かった。CHO-GMCSF の存在下では、TF-1 細胞は細胞死が抑制されていることが示唆された。精製抗 GM-CSF 自己抗体による GM-CSF 生物活性の阻害実験では、モルグラモスチムやサルグラモスチムの活性は完全に阻害されるのに対し、CHO-GMCSF は、完全に抑制されず、別のシグナル経路が働いていることが示唆された。

#### ⑤他の動物種の末梢血顆粒球への活性の評価

ヒト GM-CSF 製剤ではマウス末梢血顆粒球への活性がみられないことが再確認された。これに対して、ヒト GM-CSF の添加によりイヌの末梢血顆粒球の CD11b の発現増強が濃度依存的

にみられた。CHO-GMCSF, モルグラモスチム, サルグラモスチムの三者間に明確な差はみられなかった。

#### ⑥カニクイザルでの吸入動物実験と細径気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取による評価

投与終了翌日の末梢血白血球数の増加および気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の増加をみとめ、気管支肺胞洗浄液および血漿中から、GM-CSF 活性を検出した。1 週間後の末梢血、気管支肺胞洗浄液では、細胞数の増加が回復する傾向がみられた。剖検では、右肺に軽度の水腫様変化が 1 例みられたが、他に有意の所見なく、この変化は前日の気管支鏡の影響と考えられた。これらより GM-CSF 製剤の気管内スプレー投与により生理学的変化が全身性に確認でき、本動物での細径気管支鏡での気管支肺胞洗浄液評価が可能であり、CHO-GMCSF は他の製剤と比較して吸入動物実験で同様の活性を示すことが示唆された。

#### D. 考察

今回の質量分析で CHO-GMCSF は、酵母菌由来のサルグラモスチムや大腸菌由来のモルグラモスチムと比較して分子量が大きく、しかも 15000~25000kDa と幅広く分布しており、複雑な糖鎖修飾を受けていることが示唆されたが、コロニーアッセイ、STAT5 のリン酸化反応、好中球表面の接着因子 CD11b の発現量での生物活性に関する解析では、他の 2 製剤と比較して、CHO-GMCSF は有意の差はみられなかった。CHO-GMCSF で低濃度で TF-1 細胞の生残率が高かった点は興味深い。GM-CSF は低濃度では細胞の生存を支持するとされが、この解析では AnnexinV による apoptosis の評価が行われ、TF-1 細胞の apoptosis が抑制されていたことと符合する。この CHO-GMCSF の生物活性は、

精製 GM-CSF 自己抗体で完全にはブロックされず、別のシグナル経路が働いていることが示唆された。糖鎖修飾との関連について、次年度以降の解析の対象としたい。

動物種についての特異性については、今回マウスとイヌで検討を行い、ヒト型リコンビナント GM-CSF の薬効や毒性評価のために、マウスを用いることが困難であることが再確認されたが、イヌを用いる可能性が示唆された。前臨床試験において、動物 2 種での毒性試験を考える必要がある場合に、サル以外の候補としてイヌを考えられるのは心強い。

本研究ではカニクイザルでの細径気管支ファイバースコープが可能であり、吸入した GMCSF による細胞増加や、GM-CSF 活性が検出できることが示された。GM-CSF 吸入治療は、6 か月以上続く治療であり、この期間に準じた長期投与実験を計画しなければならないが、肺内の評価を剖検でしかできない場合には、動物例数も増やす必要がある。細径気管支ファイバースコープで BAL ができることは、観察データを増やし、動物例数を減らせる点で重要である。今回の予備実験の結果をもとに、本格的な急性毒性試験を次年度には計画したい。

#### E. 結論

CHO-GMCSF は既存の酵母菌、大腸菌由来の製剤と比べて質量分析で分子量が大きく複雑な糖鎖修飾を受けているが、コロニーアッセイ、STAT5 のリン酸化反応、好中球表面の接着因子 CD11b の発現量で生物活性の検討では有意の差はみられなかった。ヒト GM-CSF を用いた他の動物種の細胞の検討ではイヌでの薬理的検討や毒性試験の可能性が示唆された。カニクイザルでの細径気管支ファイバースコープによる BAL が可能であり、吸入した GMCSF による細胞増加効果や、GM-CSF 活性の評価が可能であることが示された。

## 謝辞

CHO 細胞由来 GM-CSF のご提供と情報の提供をしてくださった日本ケミカルリサーチ㈱に感謝いたします。また動物実験計画において貴重な助言をいただき実施に際して多大なご支援をいただいた㈱イナリサーチ に感謝いたします。

## F. 健康危険情報

本研究は, *in vitro* および動物での解析であるため, ヒトでの該当する情報はない。

カニクイザルへのヒト GM-CSF の気管内投与実験では, カニクイザル 6 頭に, 1 日用量 0.5mg/body (およそ 0.08-0.16mg/kg) での連日 3 日間気管内に直接スプレーカニューレで投与し, 全例で一般状態に変化なく, 投与終了翌日に一時的な末梢白血球の増加や CRP の軽度上昇がみられたが, 1 週間後には回復した。

ヒトでの肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入治療臨床研究でのネブライザーでの 1 日用量は, 0.25mg/body (体重 50kg として 0.005mg/kg) であるが, 呼気中にも薬剤が放出されるため, ネブライザーでの気道内沈着率が 15%程度と推察される。したがって実際の気道内投与 1 日量は 0.75  $\mu$ g/kg 程度と考えられ, 上記のカニクイザルでの細径スプレーカニューレによる気管内投与の *intensity* はおよそ 100 倍程度になるものと考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating

factor. *Intern Med.* 51:1737-42, 2012.

2. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. Runx1 Deficiency in CD4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune Inflammatory Lung Disease Due to Spontaneous Hyperactivation of Cells. *J Immunol.* 188:5408-20, 2012.
3. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Kasahara Y, Hojo M, Nei T, Nakayama H, Motoi N, Urano S, Eda R, Yokoba M, Tsuchihashi Y, Nasuhara Y, Ishii H, Ebina M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J.* 39:777-80, 2012.
4. Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CSF autoantibody is etiologically a bystander but associated with IgG-type autoantibody production in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 302:L959-64, 2012.
5. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med.* 106:284-93, 2012.
6. Urano S, Tazawa R, Nei T, Motoi N, Watanabe M, Igarashi T, Tomita M, Nakata K. A cell free



assay system estimating the neutralizing capacity of GM-CSF antibody using recombinant soluble GM-CSF receptor. *J Vis Exp*. 52:pii 2742, 2011.

7. Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y, Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M, Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichiwata T, Trapnell BC, Goto H, Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *Eur Respir J*. 37:465-8, 2011.
8. Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, Tazawa R, Kaneko C, Nei T, Yamamoto T, Hayashi T, Tagawa T, Nagayasu T, Kuribayashi F, Ariyoshi K, Nakata K, Morimoto K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J Med Genet*. 48:205-9, 2011.
2. 学会発表
1. Tazawa R MP615 GM-CSF Inhalation as a Less Invasive Treatment for Pulmonary Alveolar Proteinosis. Tuesday, May 22, 2012, 12:00-13:00, Room 258-260 (South Building, Mezzanine Level), Moscone Center, South Building, 2012 Annual Congress of American Thoracic Society, San Francisco.
2. Takahito Nei, Shinya Urano, Chinatsu Kaneko, Ryushi Tazawa, Yoshikazu Inoue, Toru Arai, Masaki Hirose, Kazuhide Nakagaki, and Koh Nakata. Reduction Of IgG- And IgA- But Not IgM- GM-CSF Autoantibody Level In The Serum Strongly Associated The Remission Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis (aPAP). *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 185: A5796.
3. Koh Nakata, Takahito Nei, Natsuki Motoi, Ryushi Tazawa, and Shinya Urano. Repertoire Analysis Of GM-CSF Autoantibody MRNA By

Next Generation Sequencing In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 185: A5800.

4. Ryushi Tazawa, Toru Arai, Toshinori Takada, Yasunori Kasahara, Yoshiko Tsuchihashi, Takahito Nei, Masayuki Hojo, Hideaki Nakayama, Masanori Yokoba, Shinya Ohkouchi, Haruyuki Ishii, Ryosuke Eda, Yasuyuki Nasuhara, Masahito Ebina, Masanori Akira, Etsuro Yamaguchi, Yoshikazu Inoue, and Koh Nakata. Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP) And Inhaled Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Therapy--Clinical Features Predicting Recurrence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 185: A5794.
5. Haruyuki Ishii, Ryushi Tazawa, Yoshikazu Inoue, and Koh Nakata. Prognosis Of Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis Complicated With Myelodysplastic Syndrome: 28 Cases In Japan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 185: A5797.
6. Koh Nakata, Shinya Urano, Keiichi Akasaka, and Ryushi Tazawa. Evidence For Permeation Of IgG Type GM-CSF Autoantibody From Circulation To Lung In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 185: A5801.
7. Koh Nakata, Takahito Nei, Shinya Urano, Ryushi Tazawa, and Bronchial Azuma. IgM Type GM-CSF Autoantibody Is Etiologically Bystander But Involved In Development Of IgG Type Autoantibody In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2012; 185: A5802.
8. Brenna Carey, Kanji Uchida, Koh Nakata, Ryushi Tazawa, Yoshikazu Inoue, Masaki

- Hirose, Mani S. Kavuru, Mary J. Thomassen, Maurizio Luisetti, Francesca Mariani, Ilaria Campo, Ulrich Costabel, Francesco Bonella, Rhonda Vandyke, Claudia Chalk, and Bruce C. Trapnell. A Multicenter, International Evaluation Of Blood Testing For The Diagnosis Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A1624.
9. Takahito Nei, Shinya Urano, Chinatsu Kaneko, Natsuki Motoi, Ryushi Tazawa, Kazuhide Nakagaki, Arata Azuma, and Koh Nakata. Molecular Evolution Of Gm-Csf Autoantibody-Light Chain In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A1628.
10. Kanji Uchida, Koh Nakata, Brenna Carey, Claudia Chalk, Yoshikazu Inoue, Ryushi Tazawa, and Bruce C. Trapnell. Towards Global Standardization Of Serologic Blood Testing For The Diagnosis Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A1634.
11. Koh Nakata, Takahito Nei, Shinya Urano, Natsuki Motoi, and Ryushi Tazawa. Isotype Switch Of Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Autoantibody Is Promoted In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A2345.
12. Koh Nakata, Natsuki Motoi, Shinya Urano, Ryushi Tazawa, Makiko Nakano, and Kazuyuki Omae. Characterization Of Pulmonary Alveolar Proteinosis Developed In Rats Exposed To Indium-Tin Oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A1637.
13. Haruyuki Ishii, Koh Nakata, Hajime Goto, Ryushi Tazawa, and Yoshikazu Inoue. Clinical Features Of Secondary Pulmonary Alveolar ProteINOSis Complicated With Myelodysplastic Syndrome In Japan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A1632.
14. Ryushi Tazawa, Kazumasa Ohashi, Atsuyasu Sato, Toru Arai, Yasunori Kasahara, Masayuki Hojo, Masanori Yokoba, Yoshiko Tsuchihashi, Haruyuki Ishii, Yasuyuki Nasuhara, Masahito Ebina, Toshinori Takada, Etsuro Yamaguchi, Yoshikazu Inoue, and Koh Nakata. Effect Of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Inhalation On Bronchoalveolar Lavage Fluid And Serum In Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: A1618.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
該当事項なし
2. 実用新案登録  
該当事項なし
3. その他  
該当事項なし

## GM-CSF薬理試験の検討

研究分担者 湯尾 明 独立行政法人国立国際医療研究センター部長

### 研究要旨

肺胞蛋白症という疾患は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に対する自己抗体が原因であり、その治療においては、体内（特に肺胞内）での GM-CSF の活性の復活が重要であり、適切な遺伝子組換え型ヒト GM-CSF の投与が有効である。その目的のために、新規 GM-CSF 製剤を開発中の国内企業と連携して、製品の特性を検討して生物活性（正常ヒト造血前駆細胞に対する増殖・分化誘導作用）を評価するための研究を行った。日本ケミカルリサーチ社製の CHO 細胞由来の GM-CSF の活性を検定するために、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF と Genzyme 社製の酵母（*sacchalomyces*）由来の GM-CSF（Leukine）を対照として実験を行った。正常人由来のヒト骨髓血液細胞を作用対象細胞として、メルセルローズを用いた半固形培地でのコロニーアッセイを実施し、各濃度の GM-CSF を用いて容量依存曲線を作成した。その結果、いずれの GM-CSF も 1 ng/ml の濃度においてほぼ最大の活性を有していた。Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF の活性が他の 2 社製品よりやや高い傾向が認められたが、有意差は認められなかった。従って、日本ケミカルリサーチ社製の CHO 細胞由来の遺伝子組換え型ヒト GM-CSF は十分な活性を有する製品であると考えられた。

### A. 研究目的

肺胞蛋白症は、肺胞内にサーファクタント物質が蓄積して呼吸不全にいたる疾患で、その 9 割が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) に対する自己抗体が原因である。本研究班の研究代表者らは、本症に対し 1 日 20 分程度の GM-CSF 吸入治療の有効性と安全性を、国内 9 施設による世界初の多施設第 2 相臨床研究で示した。しかし GM-CSF 製剤は本邦未承認で、入手に不安がある。本研究課題は、新規 GM-CSF 製剤を開発中の国内企業と連携して、製品の特性を検討し、非臨床試験、特に哺乳動物を用いた毒性試験の方法について検討・企画立案する。

最近、CHO 細胞の製品技術を持つ国内企業日本ケミカルリサーチ（Japan Chemical Research、

JCR）が CHO 細胞由来の GM-CSF 製剤の開発中である。同製剤は、哺乳類特有の糖鎖修飾のため、半減期が長く、抗体による障害をうけにくく、免疫反応性が低い等の利点が期待される。本研究では、同社と連携して、同製剤が、従来品と同等の効力と安全性を持つことを検証するために、培養細胞での製品の基礎的な検討を行い、非臨床試験の特に哺乳動物を用いた毒性試験の方法について、既存 GM-CSF 製剤を用いた予備実験や内外の研究結果を収集により、GMP 製品での試験方法を企画立案する。

本分担研究者の分担課題は、日本ケミカルリサーチ（JCR）社が開発製造した CHO 細胞由来の GM-CSF 製剤の培養系での生物活性を詳細に検討して、非臨床試験、特に哺乳動物を用いた毒性試験のための基礎データを集積することで

ある。

## B. 研究方法

半固形培地でのコロニーアッセーにより、GM-CSF の造血促進活性を定量的に検討した。用いたヒト GM-CSF は、日本ケミカルリサーチ (JCR) 社製の CHO 細胞由来の GM-CSF、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、Genzyme 社製の酵母 (sacchalomyces) 由来の GM-CSF (Leukine) の 3 種類である。コロニーアッセーの対象細胞は、健常成人由来のヒト骨髄血液細胞で、半固形培地は、メチルセルロースを用いた市販の培地 (MethoCult4230) を使用した。コロニーアッセーのための細胞培養に際しての細胞培養密度は、 $3 \times 10^4$  / ウェルで、GM-CSF の段階濃度希釈は、10 ng/ml、1 ng/ml、0.1 ng/ml、0.03 ng/ml、0.01 ng/ml、0.001 ng/ml、とした。14 日間の培養の後にウェルごとのコロニー数を目視にて算定した。コロニーの形態は、目視にて CFU-G (顆粒球コロニー)、CFU-GM (顆粒球マクロファージコロニー)、CFU-M (マクロファージコロニー) に分類した。有意差の統計検定は、Standard t-test を用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究には、患者検体は使用せず、動物実験も含まれない。正常人骨髄細胞は幅広く流通する市販のものを用いるので「臨床研究に関する倫理指針」の適応は無い。

## C. 研究結果

正常人骨髄血液細胞を用いた半固形培地コロニーアッセーにより、GM-CSF の培養系での生物活性 (白血球系のヒト血液細胞に対する造血促進作用) を定量的に検討した。

用いた 3 種類の GM-CSF (JCR 社製の CHO 細胞由来の GM-CSF、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、Genzyme 社製の酵母由来の GM-CSF

(Leukine)) はいずれも、様々の骨髄系 (白血球系、もしくは、顆粒球マクロファージ系) のコロニー (Large CFU-G、Small CFU-G、Total CFU-G、CFU-GM、CFU-M) の形成を概ね容量依存的に誘導した (表 1)。形成されたコロニーの形態は、典型的で過去の文献合致するものであった (図 1)。すなわち、CFU-G は細胞がコンパクトに密集したコロニー、CFU-M は細胞がばらけたコロニー、CFU-GM は両者の中間の形態を示すコロニーであった。この中で、Large CFU-G の数が、用いた GM-CSF の活性を最も定量的に表すことが明らかとなった (表 1)。従って、今年度の本研究では培養開始後 2 週間後の Large CFU-G の数を元に GM-CSF の活性評価を行った。

今回用いた 3 種類の遺伝子組換え型ヒト GM-CSF は、いずれも用量依存的に Large CFU-G を誘導した (表 1)。いずれの GM-CSF も 1 ng/ml の濃度においてほぼ最大の活性を有していた (表 1)。ただし、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF の活性が他の 2 社よりやや高い傾向が認められたが (表 1)、有意差は認められなかった。

## D. 考察

本分担研究者らは従来より健常成人由来のヒト好中球などの白血球を用いて、遺伝子組換え型ヒト GM-CSF の生物活性評価を *in vitro* の測定系を駆使して行ってきた。具体的には、ヒト好中球活性酸素産生能に対する GM-CSF の増強効果を、様々の段階希釈濃度の GM-CSF の検討により容量依存曲線を求めて評価。検定してきた (図 2)。その結果、大腸菌由来の GM-CSF と CHO 細胞由来の GM-CSF は、その生物活性の最大値において同等で有る事を示してきた。ただし、濃度依存性において CHO 細胞由来の GM-CSFの方がやや高濃度を必要とする傾向も認められた (図 2)。すなわち、CHO 細胞由来の GM-CSF においては容量依存曲線が下には

なく右にシフトしている可能性が示唆された。

一方、今回の班研究において、他の分担研究者によって、ヒト白血病細胞株の増殖刺激活性において、CHO 細胞由来の GM-CSF の活性がむしろ上にシフトしていることを示唆する結果も得られている。

そのような中で、本分担研究者は、ヒト正常造血細胞への増殖分化に対する遺伝子組換え型ヒト GM-CSF の作用をコロニーアッセイという古典的で正当な手法により検討し、どの遺伝子組換え型ヒト GM-CSF もほぼ同等の活性を有することを明らかにした。ただし、ヒト好中球の場合と同様に、今回の検討でも、CHO 細胞由来の GM-CSF の方がやや高濃度を必要とする傾向も認められた。

## E. 結論

肺胞蛋白症は、GM-CSF に対する自己抗体が原因の難病であり、その治療においては肺胞内での GM-CSF の活性の復活が重要である。本研究においては、新規 GM-CSF 製剤を開発中の国内企業と連携して、製品の生物活性を評価した。日本ケミカルリサーチ (JCR) 社製の CHO 細胞由来の GM-CSF の活性を評価するために、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF と Genzyme 社製の酵母 (sacchalomyces) 由来の GM-CSF (Leukine) を対照として実験を行った。手法は、ヒト骨髄血液細胞を対象としたメルセルローズ半固形培地でのコロニーアッセイであり、各濃度の GM-CSF により容量依存曲線を作成した。その結果、いずれの GM-CSF も 1 ng/ml の濃度においてほぼ最大の活性を有していた。大腸菌由来の GM-CSF の活性が他の 2 製品 (CHO 細胞由来、酵母由来) よりやや高い傾向が認められたが、有意差は無かった。従って、日本ケミカルリサーチ (JCR) 社製の CHO 細胞由来の遺伝子組換え型ヒト GM-CSF は、十分な活性を有する製品であると考えられ、治療薬と

しての可能性が示された。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A: Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. Cell Reprogram 14:171-185, 2012.
2. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K: Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. Cell Metab 16:394-406, 2012.

### 2. 学会発表

1. 西尾 美和子、中原 正子、佐伯晃一、長谷川 護、湯尾 明、佐伯 久美子：ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の作製。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月、横浜。
2. 西尾 美和子、中原 正子、佐伯晃一、長谷川 護、湯尾 明、佐伯 久美子：ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の作製。第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月、横浜。



3. 中原 正子、西尾 美和子、佐伯晃一、長谷川護、湯尾 明、佐伯 久美子：血管内皮細胞による血管平滑筋増殖抑制の機序：動脈狭窄症の新規治療開発に向けて。第11回日本再生医療学会総会、2012年6月、横浜。
4. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K: Brown adipocyte differentiation of human pluripotent stem cells without genetic manipulation. The 10th Annual Meeting International Society of Stem Cell Research, June 2012, Yokohama, Japan.
5. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K: Production of functional classical brown adipocyte from human pluripotent stem cells using a special differentiation cocktail without genetic manipulation. 第17回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2012年8月、大阪。
6. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K: Production of functional classical brown adipocyte from human pluripotent stem cells using a special differentiation cocktail without genetic manipulation. Benzone Symposium, August 2012, Copenhagen, Denmark.
7. 西尾 美和子、中原 正子、戸辺一之、斉藤昌之、湯尾 明、佐伯 久美子：ヒトES/iPS細胞からの機能的褐色脂肪細胞の分化誘導。第33回日本肥満学会、2012年10月、京都。
8. 佐伯晃一、長谷川護、西尾美和子、湯尾 明、佐伯 久美子：ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の分化誘導。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡。

多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞、多能性幹細胞由来細胞凝集物と、その製造方法及び細胞療法、内科療法

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター、ディナベック株式会社

国際出願番号 PCT/JP2012/61212

国際出願日 平成24年 4月26日

## 2. 実用新案登録

無し

## 3. その他

無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

**表1 3種類の遺伝子組換え型ヒトGM-CSFのコロニー形成能**

	Small CFU-G	Large CFU-G	Total CFU-G	CFU-GM	CFU-M	Total Myeloid
<b>Positive control</b> (84534)	2+/-2*	49+/-2##	51+/-2*	11+/-6	18+/-5	80+/-11
<b>Negative control</b> (solvent control)	30+/-6	2+/-2	32+/-4	10+/-1	32+/-5	74+/-9
<b>Control Article 1 - Leukine; Genzyme</b>						
10 ng/mL	32+/-7	25+/-6*	57+/-12	10+/-3	30+/-3	97+/-8
1 ng/mL	33+/-4	21+/-4*	54+/-8	11+/-2	33+/-7	97+/-6
0.1 ng/mL	32+/-5	8+/-3	40+/-3	10+/-3	32+/-3	82+/-6
0.03 ng/mL	37+/-6	4+/-2	41+/-8	7+/-2	29+/-2	77+/-11
0.01 ng/mL	32+/-6	4+/-1	36+/-6	10+/-4	28+/-7	74+/-9
0.001 ng/mL	28+/-6	3+/-1	31+/-7	6+/-2	32+/-3	69+/-9
<b>Control Article 2 - rHuGM-CSF; Amoytop</b>						
10 ng/mL	26+/-3	29+/-6*	55+/-9	14+/-4	34+/-2	103+/-12
1 ng/mL	27+/-10	27+/-3**	54+/-11	13+/-4	28+/-6	95+/-15
0.1 ng/mL	34+/-5	13+/-5	46+/-9	9+/-7	35+/-7	91+/-18
0.03 ng/mL	30+/-2	7+/-3	37+/-4	7+/-2	33+/-6	77+/-2
0.01 ng/mL	29+/-2	5+/-2	33+/-1	6+/-2	31+/-11	70+/-12
0.001 ng/mL	29+/-3	2+/-0	31+/-3	5+/-1	35+/-3	70+/-7
<b>Test Article - CHO-rHuGM-CSF(JCR)</b>						
10 ng/mL	28+/-3	20+/-3*	48+/-6	10+/-2	32+/-6	89+/-12
1 ng/mL	35+/-8	19+/-3#	54+/-9	9+/-1	34+/-2	97+/-8
0.1 ng/mL	33+/-6	9+/-2	41+/-7	8+/-1	31+/-5	80+/-11
0.03 ng/mL	31+/-6	6+/-1	37+/-6	10+/-1	27+/-3	73+/-4
0.01 ng/mL	29+/-6	3+/-1	32+/-6	8+/-2	32+/-7	72+/-3
0.001 ng/mL	31+/-4	3+/-2	34+/-5	9+/-2	28+/-3	71+/-8

§ p<0.01 compared to solvent control; \* p<0.005 compared to solvent control; # p<0.001 compared to solvent control

\*\* p<0.0005 compared to solvent control; ## p<0.0001 compared to solvent control

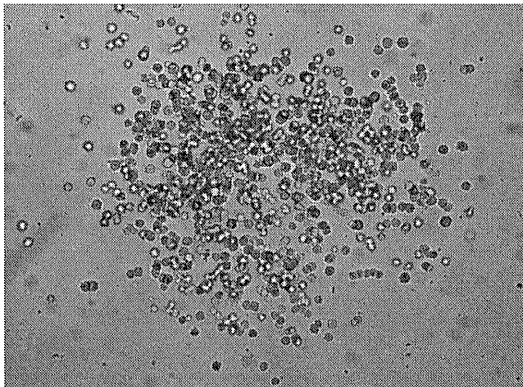
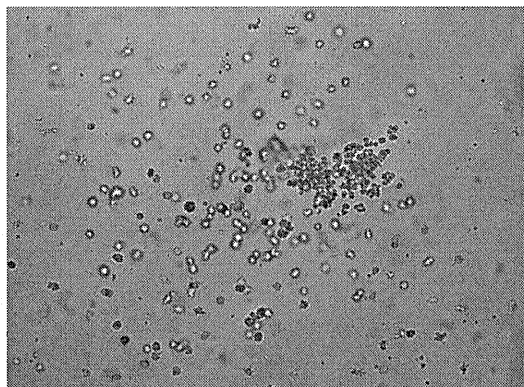
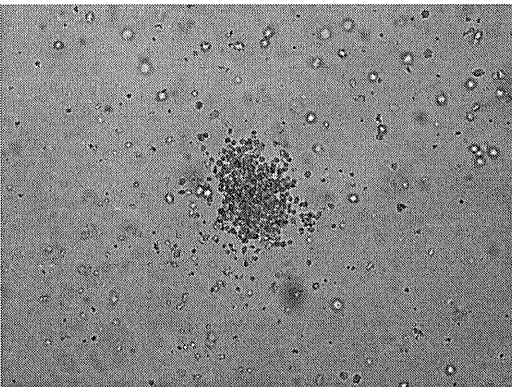
# 図1 形成されたコロニーの形態

Leukine (酵母由来)(Genzyme)

Large CFU-G

CFU-GM

CFU-M



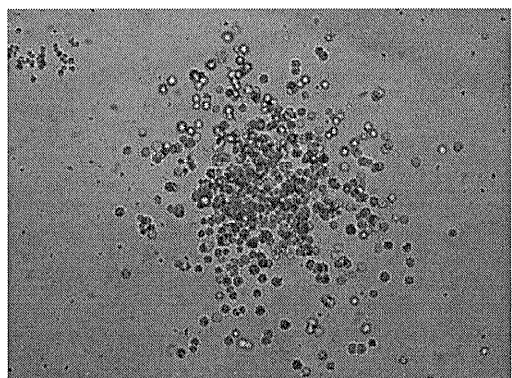
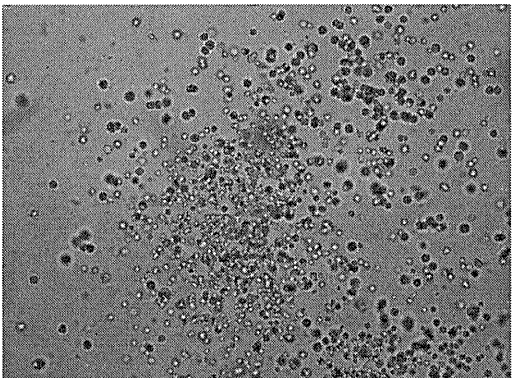
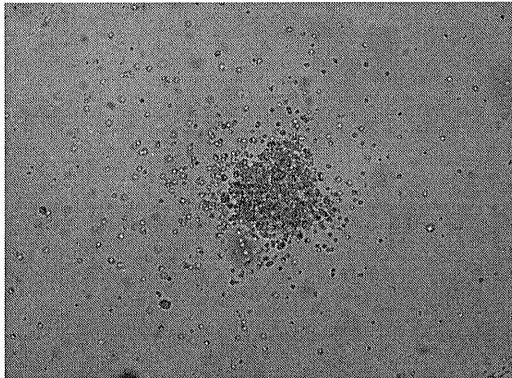
13

CHO細胞由来(JCR)

Large CFU-G

CFU-GM

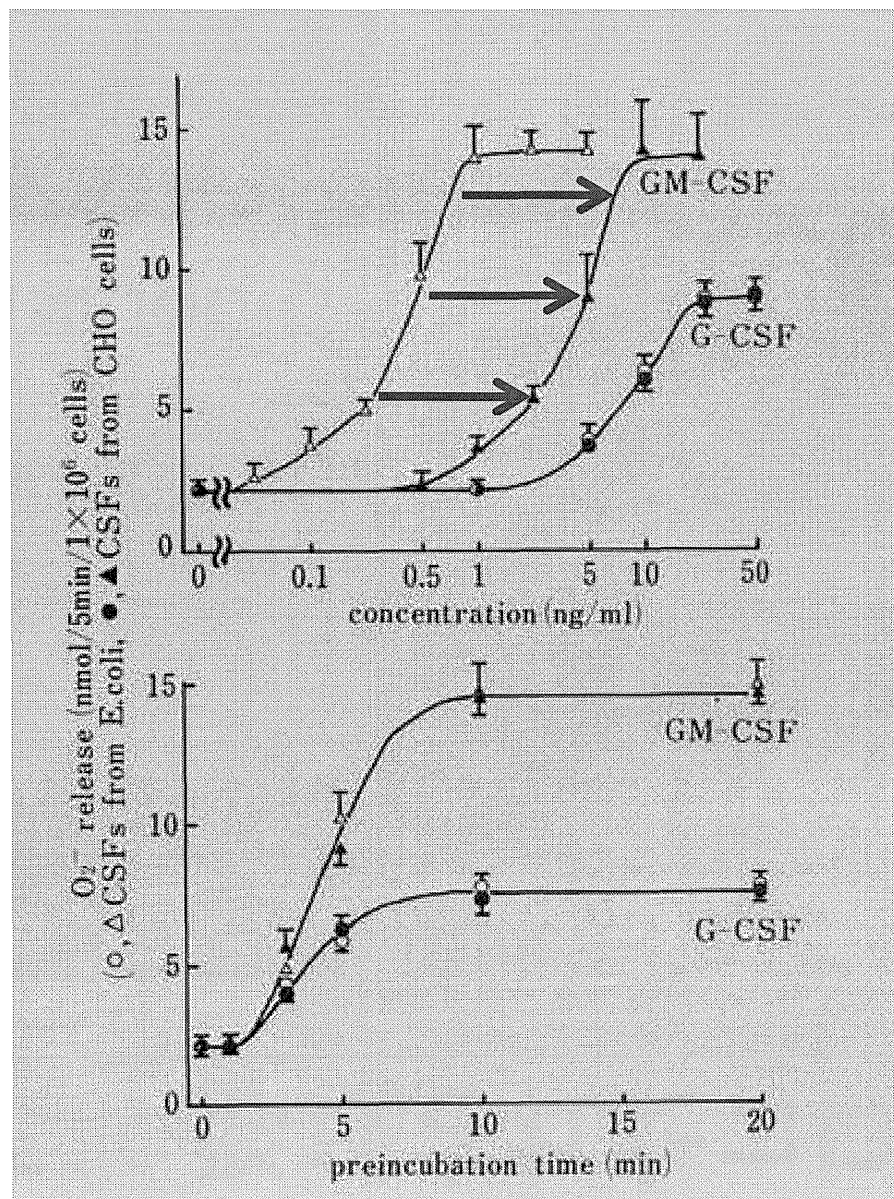
CFU-M



## 図2 好中球活性酸素産生に対する増強効果

濃度依存性

(容量依存曲線)



1. 大腸菌由来がCHO由来より低濃度で有効
2. 最大効果は同等



容量依存曲線が横方向にシフト

(受容体との親和性?)

## GM-CSF製剤の生物活性の解析

研究分担者 内田 寛治 東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター 講師

### 研究要旨

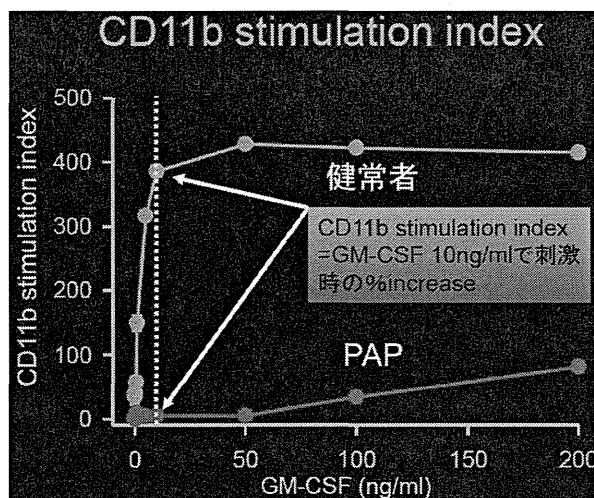
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF)は、成熟貪食細胞の免疫機能を賦活する生化学的特徴を持つ。本研究ではJCR社製チャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いて精製されたリコンビナントGM-CSF (JCR-GM-CSF)の生物活性測定に、上記性質を利用して他のGM-CSF製剤との活性の違いを比較した。好中球のGM-CSF受容体下流に位置するSTAT5のリン酸化反応は、JCR-GM-CSFは他の製剤と比較して差を認めず、また好中球表面の接着因子CD11bの発現量の上昇は若干低値を認めたが、最大値は差を認めなかった。これらより本研究で生物活性評価したJCR-GM-CSFは他の製剤と比較してほぼ同等の活性をもつと考えられた。

### A. 研究目的

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF)は、肺泡マクロファージの成熟に関わるサイトカインであり、進行性の呼吸不全をその主徴とする稀少瀰漫性肺疾患である、肺胞蛋白症患者では、その中和抗体がその病因に関わっていることが、ここ10数年の研究によってほぼ証明されている<sup>1)</sup>。本研究班では、チャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いて精製されたリコンビナントGM-CSF (以下、JCR-GM-CSF)を上記疾患の治療薬としての臨床応用を目指しているが、製剤の生化学的評価を行ううえで、免疫担当細胞に対するGM-CSF刺激のシグナル強度を検定する必要がある。

GM-CSFシグナルは成熟貪食細胞にも働いてその抗菌活性を賦活する、強力な免疫賦活作用を持っている<sup>2)</sup>。そこで我々は、GM-CSFがその受容体に結合して起こる受容体β鎖における転写因子STAT5のリン酸化を観察すること

で、JCR-GM-CSF製剤の受容体からのシグナル伝達の強さを定量し、既存のリコンビナントGM-CSF (大腸菌由来、酵母菌由来)と比較した。また、GM-CSF刺激を受けた好中球は、細胞表面上の接着因子CD11bの発現量を上昇させる。この発現量の増加率を評価する方法を我々は考案し、CD11b刺激係数 (CD11b



Stimulation Index)として発表した(図1)<sup>3)</sup>。

図1. CD11b Stimulation index



この方法は、自己免疫性肺胞蛋白症の診断に、および二次性肺胞蛋白症、および GM-CSF 受容体異常に伴う肺胞蛋白症、原因不明の肺胞蛋白症との鑑別に重要であることは以前より報告されている<sup>4</sup>

本研究では、上記2つの方法を用いて JCR-GM-CSF の性能評価を行った。

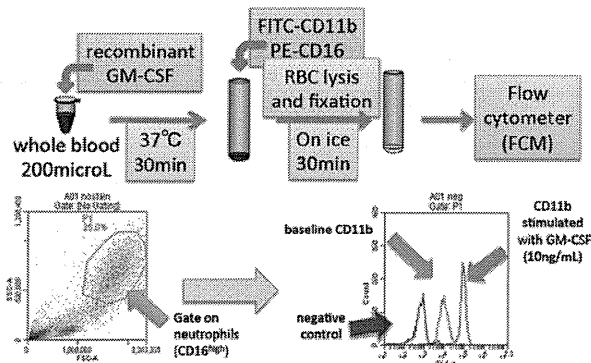
## B. 研究方法

健康者ボランティアから、ヘパリンまたは EDTA によって抗凝固された全血を用いた。

### (1)CD11b 発現量上昇試験

血液 200  $\mu$ l 中に、JCR-GM-CSF を最終濃度 0, 1, 10ng/mL となるよう投与し、37°C 30分培養し、その後 FITC-CD11b 抗体および PE-CD16 抗体染色を混和して、氷上 15 分培養した。BD FACS lysing solution® を用いて赤血球の溶血と白血球の固定を行い、BD Accuri C6 フローサイトメーターを用いて、好中球画分の CD11b 発現量を測定した (図2)。

図2. CD11b stimulation index 測定方法



また、生物活性を比較するため、大腸菌由来のリコンビナントヒト GM-CSF (ATGen 社製、Amoytop 社製)、酵母菌由来のリコンビナントヒト GM-CSF (Leukine®, Genzyme 社製) また他の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、G-CSF、IL-6、IL-8、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ )、抗炎症性サイ

トカイン等 (IL-10、C5a) を陰性コントロールとして測定した。

### (2)STAT5 リン酸化試験

また、同じく全血を用いて、上記 GM-CSF 製剤で刺激を同様に加えた後、赤血球を溶血し、細胞を固定後、メタノールを用いて白血球細胞表面に抗体を通す pore を空ける処理を行ったのち、抗リン酸化 STAT-5-Alexa Fluor 647 で染色し、細胞内の転写因子 STAT-5 のリン酸化成分を、上記フローサイトメーターで定量した (図3)。

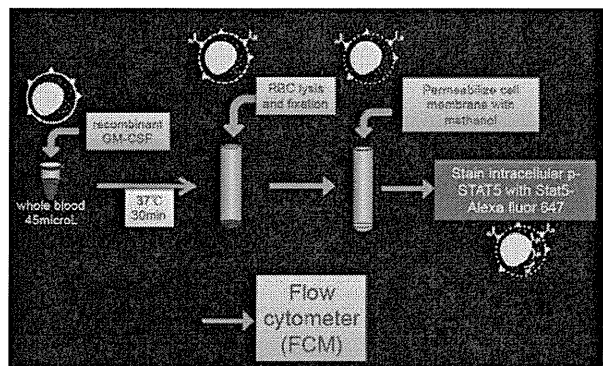


図3. 細胞内染色によるリン酸化 STAT 5 の検出

## C. 研究結果

### (1)CD11b 発現量上昇試験

GM-CSF は TNF- $\alpha$  同様、速やかに CD11b の細胞表面発現量の上昇を引き起こした。他のサイトカインと比較してもその上昇力価はたかく、強力に CD11b 発現量を上昇させる効果が確認された (図4)。

### 各種サイトカインの好中球刺激効果 CD11b

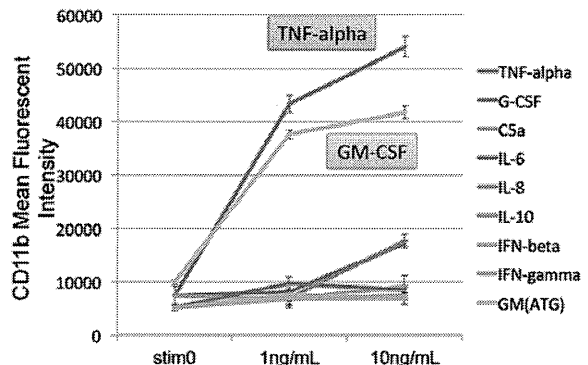
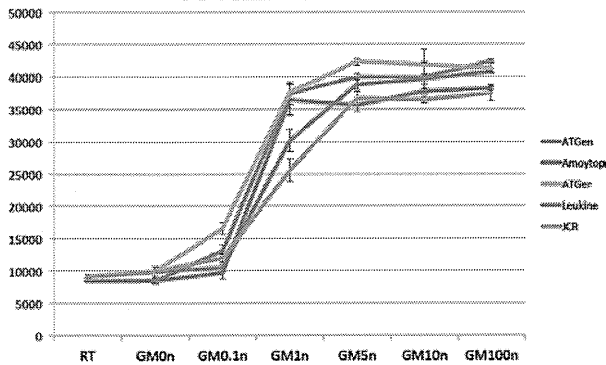


図4. 各種サイトカインの刺激による好中球

表面上 CD11b 発現量

図 5. GM-CSF 製剤毎の CD11b 発現量変化  
CD11b 発現量上昇の製剤毎の比較



GM-CSF 刺激による上記発現量の上昇を各 GM-CSF 製剤で比較したところ、JCR-GM-CSF は低濃度での CD11b 発現量が若干低い傾向が認められたが、プラトー値は他の製剤と大きな違いは無かった (図 5)。

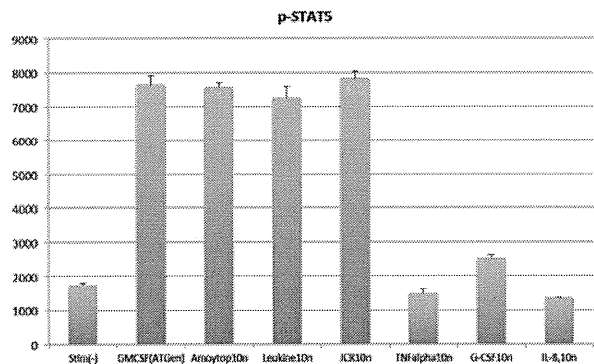
## (2) STAT5 リン酸化試験

好中球細胞内 STAT5 は、GM-CSF 刺激により、速やかにリン酸化された一方、シグナル伝達に STAT5 が関わらないとされる TNF $\alpha$ 、G-CSF、IL-8 では、リン酸化を示す蛍光強度の変化は認められなかった。

リン酸化 STAT-5 の量は、蛍光強度で比較すると、大腸菌由来のリコンビナントヒト GM-CSF (ATGen 社製、Amoytop 社製)、酵母菌由来のリコンビナントヒト GM-CSF (Leukine®, Genzyme 社製) と比較して差を認めなかった (図 6)。

図 6. 各種サイトカインによる好中球内のリン酸化 STAT5 の蛍光強度

## 各種サイトカインによる好中球のSTAT5リン酸化



## D. 考察

本研究結果より、JCR-GM-CSF 製剤は好中球内へのシグナルを STAT-5 のリン酸化を通じて正しく伝達し、さらに接着因子の CD11b 発現を誘導することで、成熟貪食細胞の生体防御能、殺菌能を賦活する効果において、市販のリコンビナント GM-CSF と同様の効果を持つことが示唆された。

本製剤はほ乳類系の細胞株から抽出されたリコンビナントサイトカインであり、糖鎖修飾を受けていることが、その生化学的、生物学的活性発現に影響を及ぼすことが懸念されていた。本研究結果から、本 GM-CSF 製剤が、糖鎖修飾をもたない、あるいはその程度が限られている他細胞株由来のリコンビナント GM-CSF と同等の生物活性を有することが確認された。

一般的に糖鎖修飾を受けているサイトカインは、生体内での半減期が、他のリコンビナント製剤と比較して長いことが知られている。また本製剤はほ乳類由来細胞株からつくられたリコンビナント製剤であり、異種動物由来の細胞株から作成した蛋白と比べて、生体投与した際、宿主が活性を中和する抗体を産生する頻度も少ないことが期待される。今回本製剤の生物活性が同等であることが確認されたことから、今後