

の臨床応用に向けて活性の部分での疑念が払拭され、糖鎖修飾のメリットが生きるものと思われ、臨床適用時の有効性が期待出来ると考えられた。

製剤の安全性、ならびに持続性等は最終的には *in vivo* での検証が必要であると考えられるが、我々の用いた検証手法は全血を用いるため、簡便であり、また好中球に余分な刺激を与えること無く測定に持ち込めるため、本研究目的で使用するには最適であったと思われる。今後は GM-CSF シグナルの好中球機能に与える影響をさらに追求するとともに、その安定性の検証、さらには GM-CSF シグナルの詳細な解析が必要となるものと思われる。

E. 結論

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) の生物活性を、好中球へのシグナル伝達を中心に解析した。JCR-GM-CSF は、好中球内のシグナル伝達、また接着因子発現に関して、これまでの製剤と同等の活性を示した。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

日下部良臣、内田寛治、BC Trapnell、山田芳嗣.
GM-CSF 刺激による好中球 CD11b の上昇率で
術後患者や重症感染症患者の免疫能を評価する。
麻酔 2012; 61:131

Brenna Carey, Claudia Chalk, Kanji Uchida,
Takuji Suzuki, Koh Nakata, Yoshikazu Inoue,

and Bruce Trapnell. Dried Blood Spot Card
Testing For Diagnostic, Epidemiological And
Longitudinal Evaluation Of Pulmonary
Alveolar Proteinosis: The US National PAP
Registry Study. Am. J. Respir. Crit. Care Med.
2012; 185: A5799.

Yoshiomi Kusakabe, Kanji Uchida, Bruce C.
Trapnell, and Yoshitsugu Yamada. Validation
And Mechanism Of Flow-Based Whole Blood
Assay To Evaluate Phagocyte Immune
Function. Am. J. Respir. Crit. Care Med.
2012; 185: A4263.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

CHO 細胞由来 GM-CSF の *in vitro* 特性に関する研究

○橋本淳史¹、伊藤祐子¹、田澤立之¹、中田 光¹

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

新しい国産組み替え GM-CSF 製剤として CHO 細胞由来の GM-CSF を企業と共同開発中である。その性状を大腸菌由来及び酵母由来製剤と比較した。CHO 細胞由来 GM-CSF は分子量 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。患者 GM-CSF 自己抗体との結合量、avidity は、CHO 製剤が他の 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 製剤が低濃度において他の二者に比べて高かった。CHO 製剤の存在下では、TF-1 細胞は細胞死が抑制されていることが示唆された。また、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、大腸菌、酵母由来 GM-CSF 活性は完全に阻害されるのに対し、CHO 細胞由来 GM-CSF 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。

A. 目的

自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入療法は、同疾患に対する非侵襲的治療として、全肺洗浄法に代わりうる新治療として期待されている。世界で入手しうる GM-CSF は、大腸菌由来組み替え GM-CSF と酵母由来組み替え GM-CSF であるが、どちらも我が国では未承認薬であり、吸入療法剤として使用するには、前臨床試験と治験を経なければならない。日本ケミカルリサーチ社は、同症の吸入療法剤として CHO 細胞由来 GM-CSF を開発し、前臨床試験用に田澤らに提供している。本研究は、平成 24 年度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）「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検討」に採択され、実用化に向けて *in vitro* の性能試験が開始された。

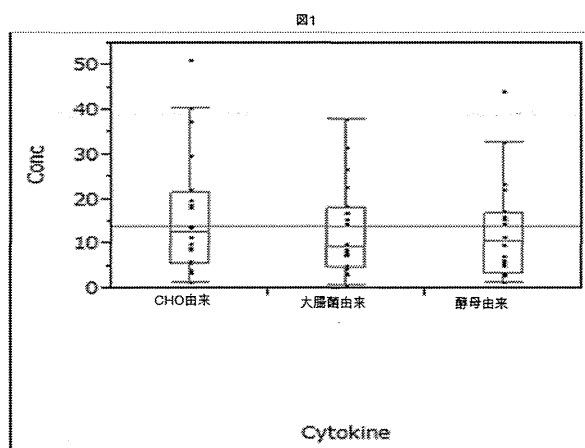
B. 対象と方法

CHO 細胞由来 GM-CSF は、研究用試薬として日本ケミカルリサーチ社が試作したものを用いた。コントロールとして Amoytop 社の大腸菌由来ヒト組み替え GM-CSF (Molgramostim)、Genzyme 社の酵母由来ヒト組み替え GM-CSF (Salgramostim) を用いた。GM-CSF 自己抗体との結合をみるために ELISA 法を用いた。Avidity の測定に 8M urea 変性法を用いた。GM-CSF の生物活性を調べるために、GM-CSF 依存株 TF-1 細胞の増殖を MTT assay 法を用いて調べた。また、同細胞の細胞死を AnnexinV 蛍光抗体を用いて検出した。GM-CSF 自己抗体は、自己免疫性肺胞蛋白症 20 例のプール血清を硫酸沈殿し、透析後、プロテイン A/G セファロースカラムにかけて、IgG 分画を精製し、さらに酵母由来 GM-CSF

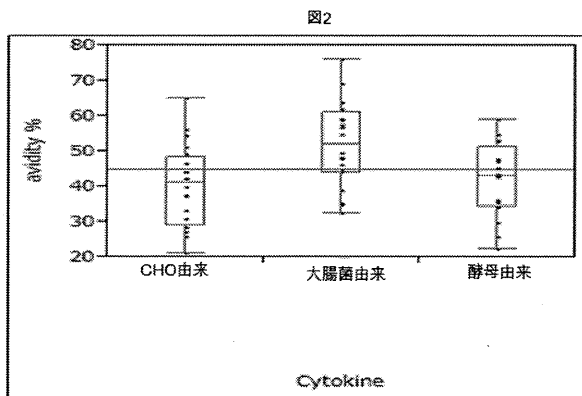
をリガンドとするアフィニティーカラムで精製した。

結果

CHO 細胞由来 GM-CSF は、大腸菌由来、酵母由来 GM-CSF に比べて GM-CSF 自己抗体との結合が劣ることを 20 人の自己免疫性肺胞蛋白症患者血清を用いて確認した(図 1)

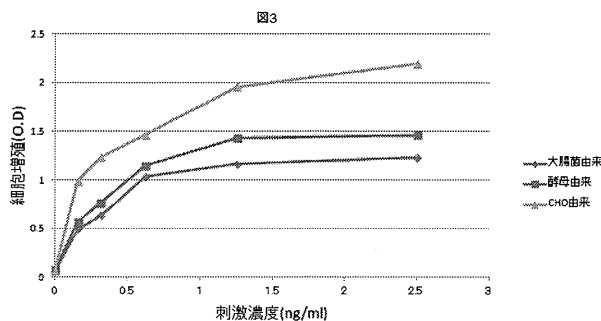


また、同抗体との結合力を avidity index として測定すると、20 人の血清でやはり低いことが判明した(図 2)。

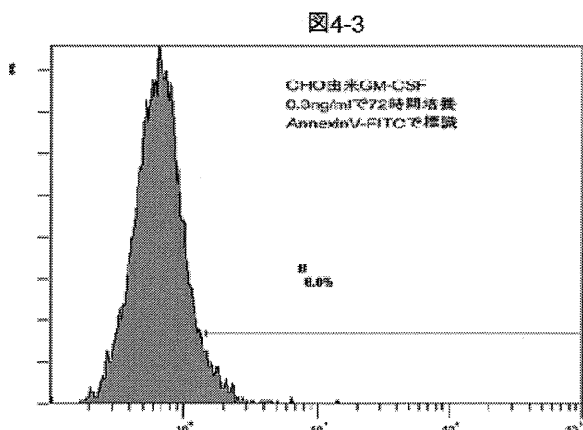
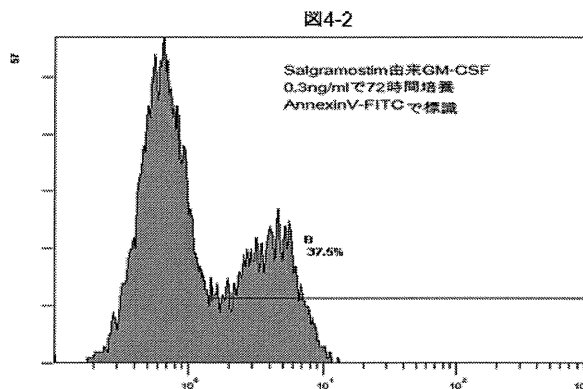
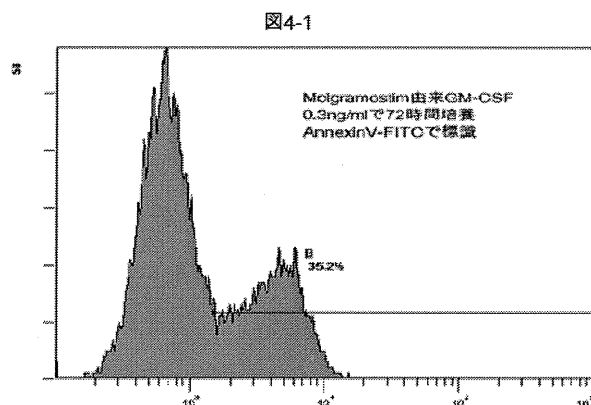


次に濃度 0、0.15、0.3、0.6、1.25、2.5 ng/ml の範囲で TF-1 細胞の生残率を MTT assay で調べたところ、低濃度 (0-0.5ng/ml) において、CHO 細胞由来 GM-CSF は大腸菌由来及び酵母由来 GM-CSF よりも生残

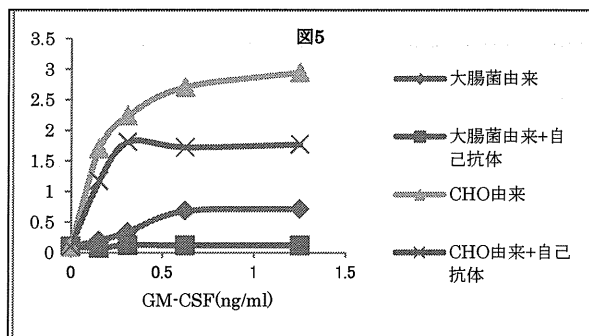
率が高いことがわかった (図 3)。

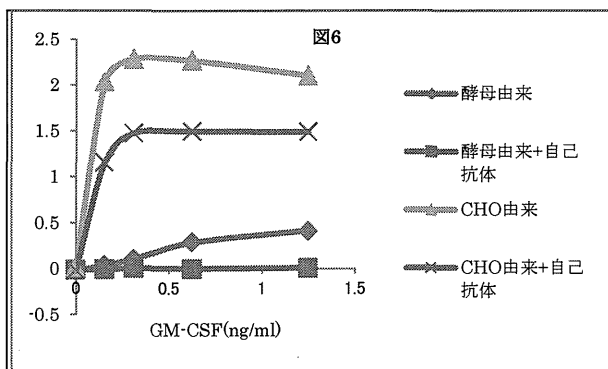


次に低濃度における細胞の生存を annexin V の発現を通じて調べたところ、0.3 ng/ml の存在下で培養した TF-1 細胞で、大腸菌由来 GM-CSF では 35.2%、酵母由来 GM-CSF では 37.5% であるのに対し、CHO 細胞由来 GM-CSF では、8.0% と低かった (図 4-1、4-2、4-3)。

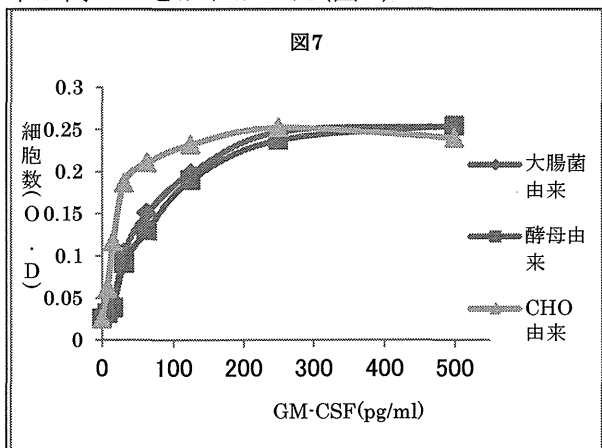


次に、精製 GM-CSF 自己抗体を $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加して TF-1 細胞の生残率を MTT assay で調べたところ、CHO 由来の GM-CSF は大腸菌由来及び酵母由来 GM-CSF よりも生残率が高く、精製 GM-CSF 自己抗体に抵抗性を示すことがわかった。(図 5、6)





また GM-CSF の濃度を 0、7.8、15.6、31.2、62.4、125、250、500 pg/ml の範囲で健常者の PBMC で生残率を MTT assay で調べたところ、低濃度 (0-250pg/ml) において、CHO 細胞由来 GM-CSF は大腸菌由来及び酵母由来 GM-CSF よりも生残率が高いことがわかった(図 7)



考案

GM-CSF は低濃度においては、細胞の生存をサポートし、高濃度においては細胞の増殖と分化を支持することがわかっている。今回低濃度の GM-CSF で TF-1 細胞の生存に CHO が大腸菌由来、酵母由来のそれよりも有利に作用したのは、CHO 由来 GM-CSF にある糖鎖が他の 2 者に比べてより強い生存シグナルを与えるからだと思われる。

結論

CHO 細胞由来 GM-CSF は、低濃度において TF-1 細胞の生残率を保持する作用があることが示唆された。

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。

C. 健康危険情報

特記すべきことはありません。

D. 研究発表

1. 論文

1. 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.* 2012; 1;302(9)
2. Ohashi K, Sato A, Takada T, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(3)
3. Saraya T, Nakata K, Nakagaki K, Motoi N, Iihara K, Fujioka Y, Oka T, Kurai D, Wada H, Ishii H, Taguchi H, Kamiya S, Goto H. Identification of a mechanism for lung inflammation caused by *Mycoplasma pneumoniae* using a novel mouse model. *Results in Immunology* 1, 2011
4. 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(2):284-93, 2012
5. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med.* 364:1596-1606, 2011
6. 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. *European Respir. J.* 37:465-468, 2011
7. Miyabayashi T, Kagamu H, Koshio J, Ichikawa K, Baba J, Watanabe S, Tanaka H, Tanaka J, Yoshizawa H, Nakata K, Narita I. Vaccination with CD133+ melanoma induces specific Th17 and Th1 cell-mediated antitumor reactivity against parental tumor. *Cancer Immunol*

- Immunother*, 60(11): 1597–1608, 2011
8. Masuko H, Hizawa N, Chonan T, Nakata K, Hebisawa A. Indium–Tin Oxide Does Not Induce GM–CSF Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med*. 184:741, 2011
 9. 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. Genetics*, 2010
 10. Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Trapnell BC, Nakata K (corresponding author). High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: Pathogenesis and Mechanisms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21:263–273, 2010
 11. Sakagami T, Beck D, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Nakata K, Keller G, Wood RE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Luisetti M, Davies S, Krischer JP, Brody A, Ryckman F, Trapnell BC. Patient-derived GM–CSF Autoantibodies Reproduce Pulmonary Alveolar Proteinosis in Non-human Primates. *Am J Respir Crit Care Med*. 182(1):49–61, 2010
 12. Costabel U, Nakata K. Pulmonary alveolar proteinosis associated with dust inhalation: not secondary but autoimmune? *Am J Respir Crit Care Med*. 181(5):427–8, 2010
 13. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, Nakata K. Inhaled Granulocyte/Macrophage–Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 181(12):1345–54, 2010
 14. Urano S, Kaneko C, Nei T, Motoi N, Tazawa R, Watanabe M, Tomita M, Adachi T, Kanazawa H, Nakata K. A cell free assay to estimate the neutralizing capacity of granulocyte–macrophage colony–stimulating factor autoantibodies. *J Immunol. Methods*, 360(1–2):141–8, 2010

著書

1. 垣下榮三, (34人略) 中田 光, (72人略) 吉矢和久. T. 肺胞タンパク症, 疾病と治療 I, 南江堂, 2010, 96
2. Trapnell BC, Nakata K, Kavuru M. Pulmonary Alveolar Proteinosis, Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 2010, 63, 1516–36
3. 安保徹, (18人略) 中田光, (5人略) 渡辺雅人. 病態のしくみがわかる免疫学. 8. 肺疾患 P.176–18.

株式会社 医学書院. 2010年10月

4. 藤田次郎, 久保恵嗣, (69人略) 中田光, (3人略) 岸本卓巳. 間質性肺疾患 診療マニュアル. IV 間質性肺疾患の病態と治療マニュアル E. 肉芽腫形成性疾患・その他の間質性肺疾患 6, 肺胞蛋白症 (PAP) P.309–311. 株式会社 南江堂. 2010年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

種間でのGM-CSF薬理効果の検討に関する研究

研究分担者 中垣 和英 日本獣医生命科学大学 准教授

研究要旨；

リコンビナント・タンパク質は、生産条件や生産する宿主細胞の由来によって、付加糖鎖に違いが生じる。製剤の産生において、この違いは薬物動態に影響があることが知られており、製剤の特質を決定する上で重要な要因である。現在、ヒト型 GM-CSF (huGM-CSF) 製剤は、大腸菌由来と酵母由来が一般的であり、ほ乳動物細胞由来ヒト型 GM-CSF は研究レベルで使用されるのみである。GM-CSF の生理活性は、GM-CSF 依存性細胞株（例、TF-1）を用いて、増殖活性を測定するのが一般的であるが、ヒト以外の動物細胞を用いて、増殖活性以外の生理作用を調べることも、橋渡し研究としては重要であると考えられる。当該分担グループは、huGM-CSF のマウス末梢血顆粒球への不活性を再確認するとともに、ヒト型 GM-CSF のイヌの末梢血顆粒球の CD11b の発現増強への影響を証明した。また、由来の異なる 3 huGM-CSF に明確な違いは認められなかった。

A. 研究目的

マウス GM-CSF 依存マウス細胞株、FDCEP-1 にヒトの GM-CSF レセプター α subunit を発現させると、ヒトの GM-CSF に応答して、増殖活性を示すことが報告されていて、マウス common β subunit からの刺激が増殖を誘導する。しかし、一般的には、ヒト GM-CSF はマウスの GM-CSF 依存細胞株に対し、増殖活性を誘導できないことが知られているが、マウスの細胞に対するヒトの GM-CSF の生理活性を、増殖活性以外で評価した報告は認められない。

一方、ヒト由来のサイトカインの幾つかは、イヌに対し有効な活性を有していることが知られている。ヒトの GM-CSF は、イヌの GM-CSF の代用として、実験的に用いられているが、その活性の比較を行った研究は認められない。

リコンビナント ヒト GM-CSF を製剤化のため、ヒト以外の動物を用いて、その活性を安

定的に測定できる評価系が必要である。私どもは、動物が毒性・薬理効果評価として利用できるかを探るために、平成 24 年度はマウスおよびイヌを用いて本研究を行った。

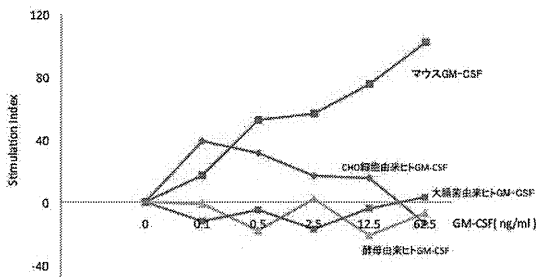
B. 研究方法

マウス。当該施設内での動物実験は、日本獣医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。

C. 研究結果

マウス細胞を用いた増殖作用で確認されていると同様に、マウスの末梢血好中球の CD11b の発現は、ヒト・リコンビナント GM-CSF による刺激によって発現増加を認めなかった（図 1）。

図 1 CD11b / mouse peripheral Granulocytes



一方、製法の異なる三種のヒト型 GM-CSF はイヌの末梢血顆粒球に対し、濃度依存的に、CD11b の発現増加を示した。イヌ 2 頭の結果において、共通して見られることは、CHO 細胞由来ヒト GM-CSF が低濃度では CD11b の発現増加が見られないが、濃度依存的に急激な発現増加が認められ、大腸菌由来 GM-CSF(イヌを含めて)と異なる Kinetics を有する可能性が考えられた。大腸菌由来ヒト型 GM-CSF はイヌと同じような活性値を示したが、頭数が少ないため、3 製剤の中で、どの製剤の活性が高いかを評価するまでには至らなかった (図 2,3)。

図 2 CD11b / Canine Peripheral Granulocytes (Dog NO.1)

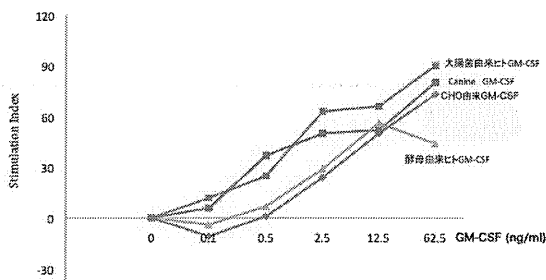
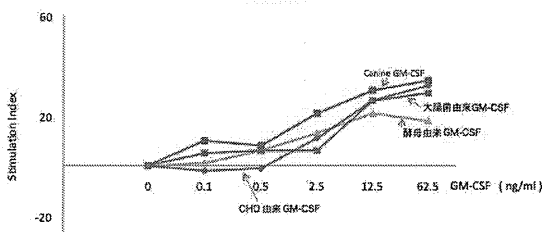


図 3 CD11b / Canine Peripheral Granulocytes (Dog No.2)



D. 考察

マウスの common β subunit がヒト型 GM-CSF と相互作用をする可能性が示唆されているが、本研究では、マウスの顆粒球を活性化することは無く、従来、知られている GM-CSF 依存性マウス細胞の増殖不応答を再確認した。

今回の研究ではイヌの末梢血顆粒球を活性化することがわかった。その活性の強さは、入手可能なイヌ型 GM-CSF に対する応答に比べれば、やや劣るものの、イヌを用いて、ヒト型 GM-CSF の生理活性を測定することが可能であると考えられる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

「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検討」に関する研究

研究分担者 井上 彰 東北大学病院

研究要旨

難治性疾患領域に関する他の医師主導治験その他重要な臨床試験の情報収集を行い、本研究の質の向上に貢献するとともに、非臨床試験終了時には速やかに承認申請へ向けた具体的な臨床試験へ移行できる体制づくりを行った。

A. 研究目的

本研究を順調に遂行するために必要な難治性疾患領域に関する他の医師主導治験その他の重要な臨床試験の情報収集を行う。

B. 研究方法

本研究課題とは異なる呼吸器領域の難治性疾患である肺癌を対象として、計画から実施段階にある医師主導治験に参加し、情報を得る。

（倫理面への配慮）

実際の患者を対象とした臨床試験を行う際には、すべて「ヘルシンキ宣言」および「臨床試験に関する倫理指針」に従って実施し、IRB審査承認が得られた説明文書による説明と自由意思による文書同意、個人情報保護の厳守を徹底するものとする。

C. 研究結果

国内未承認ながら有効な薬剤が存在するRET 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌に対する観察研究および当該薬剤を用いた医師主導治験について研究代表者と連絡を取り、同観察研究に参加することで情報を収集した。

D. 考察

本研究課題である肺胞蛋白症は国内の患者が1000例程度の希少疾病であり、そのための薬剤開発には多くの制約が伴う。先述の「RET 融合

遺伝子を有する非小細胞肺癌」も発症頻度が肺癌全体の1%と年間数百例で、平均余命が1年前後であることから本研究課題と同様の難しい対象であるが、海外で承認されている薬剤を用いた医師主導治験が開始された。同試験に関する情報を得ることは本研究課題が非臨床試験から臨床試験へ移行する際に有用であると思われる。

E. 結論

本研究課題と同じ呼吸器領域の難治性疾患を対象とした医師主導治験から有用な情報を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Inoue A**, Kobayashi K, Maemondo M, et al. Updated Overall Survival Results from A Randomized Phase III Trial Comparing Gefitinib with Carboplatin-Paclitaxel for Chemo-Naive Non-Small Cell Lung Cancer with Sensitive EGFR Gene Mutations (NEJ002). **Ann Oncol** 24: 54-9, 2013

- 2) Oizumi S, Kobayashi K, **Inoue A**, et al. Quality of Life with Gefitinib in Patients with EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Quality of Life Analysis of North East Japan Study Group 002 Trial. **Oncologist** 17: 863-70, 2012
- 3) Maemondo M, Minegishi Y, **Inoue A**, et al. First-Line Gefitinib in Patients Aged 75 or Older With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Harboring Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: NEJ 003 Study. **J Thorac Oncol** 7: 1417-1422, 2012
- 4) Soda M, Isobe K, **Inoue A**, et al. A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 18: 5682-9, 2012
- 5) Mochizuki S, Nishimura N, **Inoue A**, et al. Miliary brain metastases in 2 cases with advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR mutation during gefitinib treatment. **Respiratory Invest** 50: 117-21, 2012
- 6) Ishimoto O, Sakakibara T, Maemondo M, **Inoue A**, et al. S-1 Combined with Bi-Weekly Docetaxel for Non-Small Cell Lung Cancer Previously Treated with Platinum-Based Chemotherapy: A Phase II Study of North Japan Lung Cancer Group (NJLCG0701). **Cancer Clin Oncol** 1: 108-17, 2012.
- 7) Kobayashi M, Miki Y, Ebina M, Abe K, Mori K, Narumi S, Suzuki T, Sato I, Maemondo M, Endo C, **Inoue A**, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules as surrogate markers for EGFR inhibitor sensitivity in human lung adenocarcinoma. **Brit J Cancer** 107: 1745-53, 2012
2. 学会発表
- 1) Inoue A, Sugawara S, Oizumi S, et al. Preliminary results from a prospective study of systemic chemotherapy with carboplatin plus amrubicine for thymic malignancies. 3rd ITMIG meeting, Fukuoka, abst ITP-013, 2012
- 2) 井上彰：分子標的治療. 第 29 回日本呼吸器外科学会総会教育講演、秋田、2012、5 月
- 3) 井上彰：臨床論文の書き方. 第 7 回日本緩和医療薬学会教育セミナー、東京、2012、6 月
- 4) 井上彰：EGFR. 第 38 回肺癌診断会シンポジウム 2、越後湯沢、2012、6 月
- 5) 井上彰：イレッサ使うなら初めからにしましょうよ. 第 101 回日本呼吸器学会東海地方学会イブニングセミナー、名古屋、2012、6 月
- 6) 井上彰、小野学、佐々木陽彦、一ノ瀬正和：クリゾチニブによる急性肺障害の一例. 第 51 回日本肺癌学会東北支部会、弘前、2012、7 月
- 7) 井上彰、ほか：Randomized phase II trial comparing carboplatin with weekly paclitaxel and docetaxel alone for elderly patients with non-small cell lung cancer: NJLCG0803. 第 10 回日本臨床腫瘍学会 International session 7. 大阪、2012、7 月
- 8) 井上彰：EGFR-TKI が教えてくれたこと. 第 53 回日本肺癌学会総会シンポジウム 1、岡山、2012、11 月

- 9) 井上彰：肺がん患者における緩和ケア。
第 53 回日本肺癌学会総会ランチョンセ
ミナー18、岡山、2012、11 月
- 10) 井上彰：進行肺がんの薬物療法。第
7 回医療の質・安全学会学術集会シンポ
ジウム 10、大宮、2012、11 月
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

特になし

[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

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
呼吸不全・難治性肺疾患研究部
井上義一

【はじめに】

肺胞蛋白症(PAP)はサーファクタントの生成または分解過程に障害により肺胞腔内を主として末梢気腔内にサーファクタント由来物質である好酸性、顆粒状の蛋白様物質が異常貯留を来す疾患の総称である。肺胞蛋白症は、我が国では、奨励研究として取り上げられ、研究が進められてきた。本年度は、将来の臨床試験を鑑み、(1) GM-CSF 吸入療法対象患者：自己免疫性肺胞蛋白症疫学調査、(2) 本邦の稀少肺疾患研究の現状と動向について報告した。

【方法】

- [A]これまでの自己免疫性 PAP の疫学データについて文献的考察を行う。特にわが国で実施したコホート調査について報告。(第1回班会議で報告)
- [B]我が国の難病対策について報告(第2回班会議で報告)。

【結果】

[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

- (1) 自己免疫性 PAP に関する多施設共同コホート横断的疫学研究により、我々は、1999-2006の間、248名の PAP 患者を登録しそのうち自己免疫性 PAP は223名(89.9%)であった(図1)。
- (2) Autoimmune PAP の発生分布に我が国では地域差無かった。
- (3) Incidence は年間 0.24(日本全体)から 0.49

人(新潟県)であった。Prevalence は100万人あたり、2.04(日本全体)-6.2(新潟県)人であった。過去の報告では Prevalence は Israel で、100万人あたり 3.7人(Ben-Dov,1999)、米国で 10~40人(Wasserman K, 1994)であった。

- (4) 現在の我が国での PAP 患者数は、約 900人自己免疫性 PAP 患者数は約 800人と推定された(表1)。
- (5) 女性男性比は 72(32%) : 151(68%)で男性に多い。
- (6) 登録時の年齢は 51(41-58)歳であった。
- (7) 28.5%に喫煙歴。26%に粉じん吸入歴を認めた。
- (8) 抗 GM-CSF 自己抗体濃度は 15.3(8.0-26.8) μ g/ml であった。PAP の重症度とは関連しなかった。

図1 我が国に行ける自己免疫性 PAP の分布。

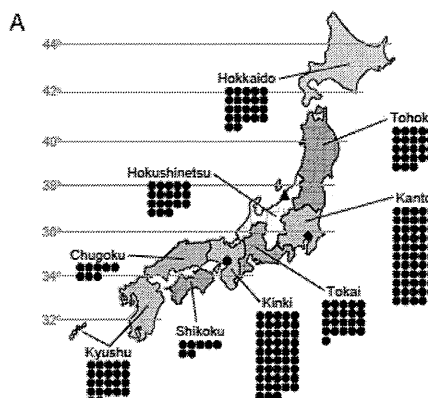


表1 我が国の PAP 患者数の推定 (2010 年、国勢調査人口 128.057352 x 100 万人)

| 自己免疫性 PAP 有病率 | 自己免疫性 PAP 全患者数 | 全 PAP 患者数 |
|-------------------|----------------|--------------|
| (2.04~)6.2/100 万人 | (261~) 794 人 | (290~) 882 人 |

[B] 本邦の稀少肺疾患研究の現状と動向

- (1) 難病とは (施策上)、原因不明、治療方法未確立であり、かつ、後遺症を残すおそれが少なくない疾病、経過が慢性にわたり、単に経済的な問題のみならず介護等に著しく人手を要するために 家族の負担が重く、また精神的にも負担の大きい疾病をさす (難病対策要綱 (昭和 47 年 10 月厚生省))。
- (2) 我が国の難病対策では、症例数が少なく、原因不明で、治療方法が確立しておらず、生活面への長期にわたる支障がある疾患についての対策として、臨床調査研究分野の 130 疾患、特定疾患治療研究事業として 56 疾患、平成 21 年度から研究奨励分野が加わった。肺胞蛋白症は研究奨励分野として研究されている。
- (3) 今後特定疾患治療研究事業の対象疾患の拡大が予定されているが、現状について班会議にて報告した。

【考察】

PAP の患者数は少なく、GM-CSF 吸入療法の対象患者である自己免疫性 PAP の患者数は全国でも 800 人弱と考えられる。超稀少疾患を対象とした薬剤開発は、企業だけの企画では進みにくいですが、公的補助、研究班、患者団体、に企業が加わることで可能となろう。

「PAP の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験」研究により、現在前臨床試験が実施されつつある。今後、前臨床試験と同時に GM-CSF 吸入療法の臨床試験に向けて、治験実施体勢を整える予定である。

【参考文献】

- 1) Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, et al. Characteristics of A large cohort of patients with Autoimmune pulmonary Alveolar proteinosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med.* 177(7):752-62, 2008
- 2) Jeffrey J. Swigris, Hye-Seung Lee, Marsha Cohen, Yoshikazu Inoue, Joel Moss, Lianne

- Singer, Lisa R. Young, Francis X. McCormack. St. George's Respiratory Questionnaire has Longitudinal Construct Validity in Lymphangioleiomyomatosis. *Chest* (in press), 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(3): 777-780, 2012
 - 4) Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Isii 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(2):284-93, 2012
 - 5) Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y, Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M, Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichihata T, Trapnell BC, Goto H, Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *Eur Respir J.* 37(2):465-8, 2011

質量分析を用いた GM-CSF 製剤の比較検討

田澤立之¹, 山縣彰², 伊藤祐子¹, 橋本淳史¹, 中田 光¹

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 2) 株式会社東和環境化学

はじめに

肺胞蛋白症は、末梢気腔内にサーファクタン
ト由来物質が蓄積し、呼吸不全に至る稀少びまん性肺疾患である。その病因としては、肺胞マ
クロファージの分化増殖に関与するサイトカイン
である顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
(Granulocyte-Macrophage Colony-
Stimulating Factor; GM-CSF)の中和抗体が関
与するとされている¹。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、CHO-GMCSF)
を上記疾患の新規治療薬としての臨床開発を目
標としている。

GM-CSF 製剤には、既存のリコンビナント製
剤として大腸菌由来の molgramostim、と酵母
菌由来の sargramostim がある。これに比して
新規製剤として開発中の CHO-GMCSF は、哺
乳類の細胞に由来する製剤で、糖鎖修飾により
代謝活性や生理活性などの点で既存製剤と比
べ有利な特性を示すことが期待されている。本
検討では、CHO - GMCSF をについて、酵母由来
製剤の sargramostim、大腸菌由来製剤の
molgramostim との分子量を比較し、分子とし
ての特徴をあきらかにすることを目的に、質量
分析による検討を試みた。

対象と方法

製剤:平成 24 年 6 月に連携企業より提供を受け
た CHO-GMCSF について、以下の条件で質量
分析をおこなった。

サンプル

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, 0.4 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 - 市販品を購入) 0.25 mg/mL,
0.1 mL
3. 大腸菌由来ヒト GM-CSF (Amoytop 社 一
般名モルグラモスチム - 市販品を購入) 0.3
mg/mL, 0.5 mL

前処理

- ①サンプルの濃縮に Profiling Kits MB-HIC8
(Bruker Daltonics, 219041) を用いた。
- ②サンプル 10 μ L に 0.1% TFA を 90 μ L を
加えた。
- ③0.5 μ L の磁性ビーズ MB C8 を加えて混合
し室温で 5 分置いた。
- ④磁石によりビーズをトラップしながら、100
 μ L の 0.1% TFA で 3 回洗浄した。
- ⑤4.5 μ L の 60% アセトニトリル、0.1% TFA 溶
液で磁性ビーズからタンパク質を溶出した。

質量の測定

測定装置:

ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics)

標的プレート:

MTP384 polished steel plate (Bruker
Daltonics, 209520)

検出器 リニアモード: ポジティブ

(10,000-100.000 m/z)

マトリクス溶液：

10 g/l Sinapinic acid (Bruker Daltonics, 201345), 70% アセトニトリル, 0.1% TFA

測定方法：

2 μ L 溶出サンプル と 1 μ L のマトリクス溶液を標的プレートに乾燥させて測定

校正用タンパク質：

Cytochrome C 1 価イオンの平均質量 12,361

Myoglobin 1 価イオンの平均質量 16,953

Trypsinogen 1 価イオンの平均質量 23,982

結果

提供製剤と、外国で承認市販されている酵母由来製剤と大腸菌由来製剤を用いて、質量分析を行い 3 製剤での比較した。図に示されるように酵母由来のサルグラモスチム (Leukine®, Genzyme 社製)、大腸菌由来のモルグラモスチムでは 14.5 kD 付近に強いピークが見られるが、CHO 細胞由来 GM-CSF では、18 kD 付近に幅広のピークがみられた。また各製剤の 30 kD 付近に広いピークが見られ、ダイマー形成によるものと推定された。(図 1)。

考案

本検討では、市販品の酵母由来製剤サルグラモスチムや大腸菌由来製剤モルグラモスチムに比較して、CHO 細胞由来の GM-CSF 製剤は分子量が大きく広い範囲に分布しており、糖鎖による複雑な修飾を受けていることが示唆された。これは CHO 細胞が哺乳類細胞特有の糖鎖修飾とくにシアル酸の付加によるものと考えられる。

結論

連携企業より提供された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 (CHO-GM-CSF) を質量分析を行い、既存の GM-CSF リコンビナント製剤と比較した。CHO-GM-CSF は分子量が大きく広い範

囲に分布しており、糖鎖による複雑な修飾を受けていることが示唆された。

謝辞

本研究で用いたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞由来のヒト GM-CSF 製剤は、日本ケミカルリサーチ株式会社より提供を受けた。ここに記して深甚の謝意を表す。

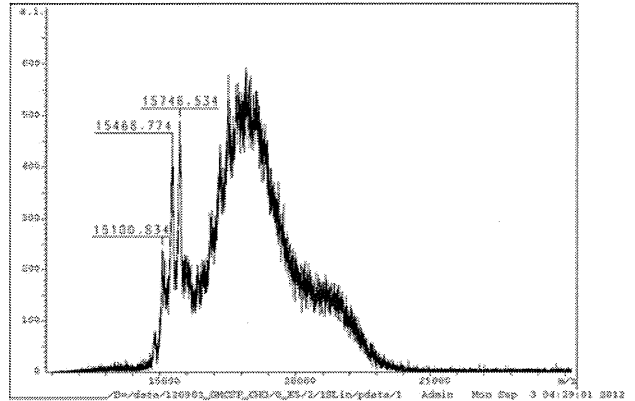
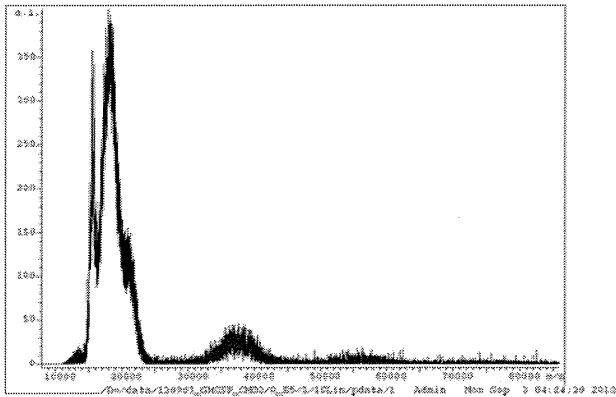
参考文献

1. Sakagami T, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Wood RE, Wert SE, Whitsett JA, Trapnell BC, Luisetti M. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2009 Dec 31;361(27):2679-81.

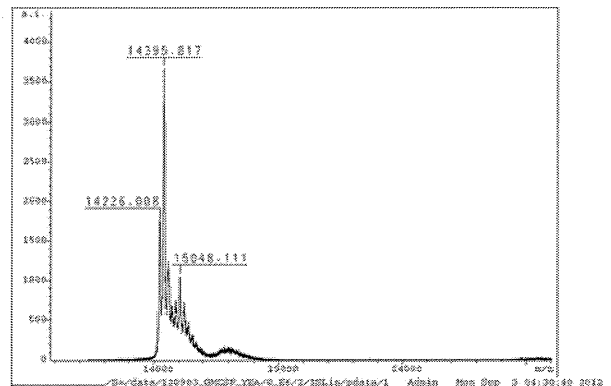
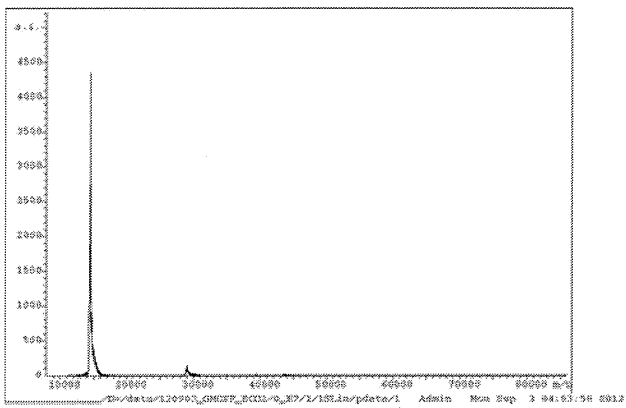
図1. 各種GMCSF製剤の質量分析

測定領域 9,000-35,000 m/z
表示領域 10,000-30,000 m/z

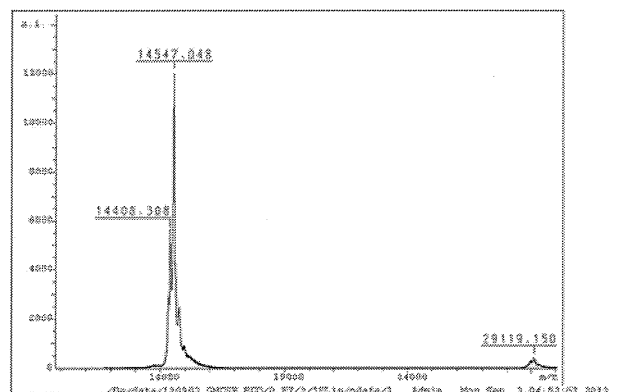
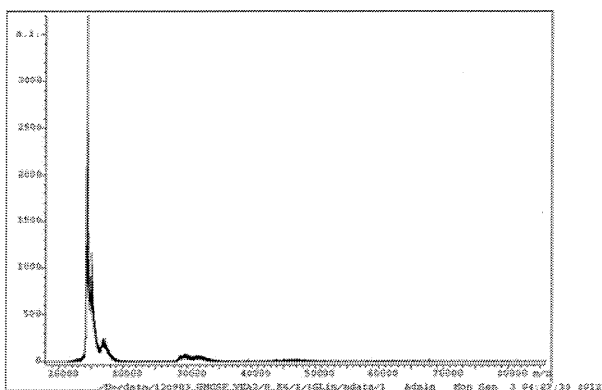
測定領域 8,000-86,000 m/z
表示領域 8,000-86,000 m/z



CHO細胞由来GM-CSF



sargramostim



molgramostim

GM-CSF 製剤の生物活性の解析

東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター

内田寛治、日下部良臣、鈴木洋子、山田芳嗣

はじめに

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、肺胞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ほぼ証明されている¹。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、そ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²。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³。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⁴

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。

対象と方法

健常ボランティアより、ヘパリンまたは EDTA によって抗凝固された全血を用いた。

血液 200 μl 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

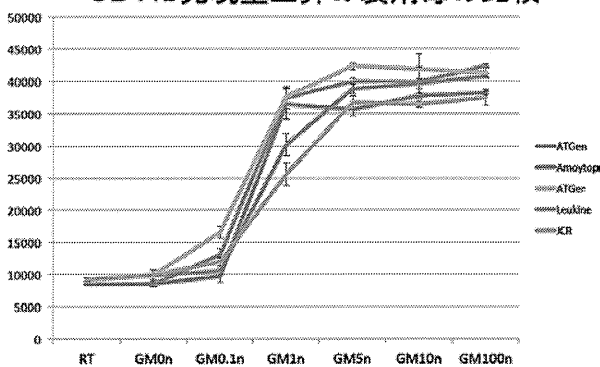
また、生物活性を比較するため、大腸菌由来のリコンビナントヒト GM-CSF (ATGen 社製、Amoytop 社製)、酵母菌由来のリコンビナントヒト GM-CSF (Leukine®, Genzyme 社製) また他の炎症性サイトカイン (TNF-α、G-CSF、IL-6、IL-8、IFN-β、IFN-γ)、抗炎症性サイトカイン等 (IL-10、C5a) を陰性コントロールとして測定した。

結果

GM-CSF は TNF-α 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。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 1)。

図 1. 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

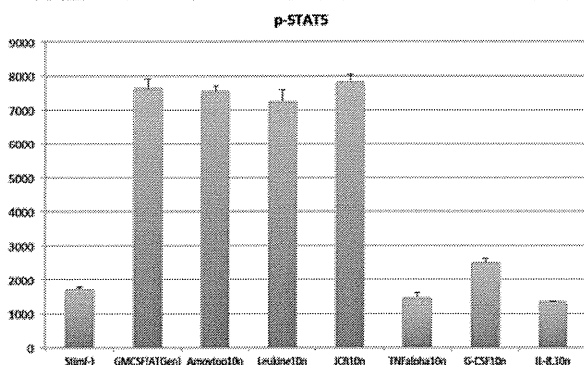


また、好中球細胞内 STAT5 は、GM-CSF 刺激により、速やかにリン酸化された一方、シグナル伝達に STAT5 が関わらないとされる TNF α 、G-CSF、IL-8 では、リン酸化を示す蛍光強度の変化は認められなかった。

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 2)。

図 2. 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



考案

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り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、今後の臨床応用に向けて活性の部分での疑念が払拭され、ほ乳類細胞由来の蛋白の強みが、臨床応用に生きる可能性が示唆された。

製剤の安全性、ならびに持続性等は最終的には in vivo での検証が必要であると考えられるが、我々の用いた検証手法は全血を用いるため、簡便であり、また好中球に余分な刺激を与えること無く測定に持ち込めるため、本研究目的で使用するには最適であったと思われる。今後は GM-CSF シグナルの好中球機能に与える影響をさらに追求するとともに、その安定性の検証、さらには GM-CSF シグナルの詳細な解析が必要となると考える。

結論

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) の生物活性を、好中球へのシグナル伝達を中心に解析した。JCR-GM-CSF は、好中球内のシグナル伝達、また接着因子発現に関して、これまでの製剤と同等の活性を示した。

謝辞

本研究の費用の一部は、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)「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) から一部援助を受けた。

参考文献

- (1) Sakagami T, Uchida K, Suzuki T, Carey BC, Wood RE, Wert SE, Whitsett JA, Trapnell BC, Luisetti M. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2009 Dec 31;361(27):2679-81.
- (2) Coxon A, Tang T, Mayadas TN. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1999; 190(7): 923-34
- (3) Uchida K, Beck DC, Yamamoto T, Berclaz PY, Abe S, Staudt MK, Carey BC, Filippi MD, Wert SE, Denson LA, Puchalski JT, Hauck DM, Trapnell BC. GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 2007;356(6):567-79.
- (4) Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK, Noguee LM, Wood RE, Zimmerman SL, Smolarek T,

Dishop MK, Wert SE, Whitsett JA, Grabowski G, Carey BC, Stevens C, van der Loo JC, Trapnell BC. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J Exp Med.* 2008;205(12):2703-10.

種間でのGM-CSF薬理効果の検討に関する研究

日本獣医生命科学大学、獣医学部、獣医学科
中垣 和英 布村 由香

はじめに

マウス GM-CSF 依存マウス細胞株、FDCP-1 にヒトの GM-CSF レセプター α subunit を発現させると、ヒトの GM-CSF に応答して、増殖活性を示すことが報告されていて、マウス common β subunit からの刺激が増殖を誘導する¹。しかし、一般的には、ヒト GM-CSF はマウスの GM-CSF 依存細胞株に対し、増殖活性を誘導できないことが知られているが²、マウスの細胞に対するヒトの GM-CSF の生理活性を、増殖活性以外で評価した報告は認められない。

一方、ヒト由来のサイトカインの幾つかは、イヌに対し有効な活性を有していることが知られている^{3,5}。ヒトの GM-CSF は、イヌの GM-CSF の代用として、実験的に用いられているが⁶、その活性の比較を行った研究は認められない。

リコンビナント ヒト GM-CSF を製剤と用いるためには、ヒト以外の動物を用いて、その活性を安定して測定できる評価系が必要である。私どもは、ヒト以外の動物を用いて毒性・薬理効果の判定として利用することを探るために、マウスおよびイヌを用いて本研究を行った。

対象と方法

マウスとイヌにおける、ヒト型 GM-CSF の薬理効果を検討した。研究対象となるヒト型 GM-CSF は CHO 細胞由来 GM-CSF⁰、大腸菌由来 GM-CSF¹、酵母由来 GM-CSF² で

あり、さらに、対象として被検細胞の動物種型の GM-CSF (R&D systems) を用いた。マウスは眼窩下静脈叢より採血、イヌでは頸静脈より採血し、直ちにヘパリンにて凝固を阻止した。ヘパリン血は 100 μ l ずつ滅菌エッペンドルフチューブに分注し、GM-CSF それぞれに 0.1~60.5ng/ml になるように添加した。すべての操作を氷上で行い、一斉に 37°C の CO₂ インキュベータ内に 15 分孵置した。血液は、CD11b, Gr-1, CD14 モノクロナール抗体で、4°C で 30 分間染色した。血液細胞を固定液 (BioLEgend) で固定し、塩化アンモニウムで溶血後、FACS 洗浄液で洗浄した。細胞は FACSArray cytometer でデータを取り込み、解析を行った。

結果

マウス細胞を用いた増殖作用で確認されていると同様に、マウスの末梢血好中球の CD11b の発現は、ヒト・リコンビナント GM-CSF による刺激によって発現増加を認めなかった。

一方、由来の異なる三種のヒト型 GM-CSF はイヌの末梢血顆粒球に対し、濃度依存的に、CD11b の発現増加を示した。2 頭の結果において、共通して見られることは、CHO 細胞由来ヒト GM-CSF が低濃度では CD11b の発現増加が見られないが、濃度依存的に急激な発現増加が認められ、大腸菌由来 GM-CSF (イヌを含めて) と異なる Kinetics を有する可能性が考えられた。大腸菌由来ヒト型 GM-CSF はイヌと同じような

活性値を示したが、頭数が少ないため、3 製剤の中で、どの製剤の活性が高いかを評価するまでには至らなかった。

考案

GM-CSF の顆粒球が活性化により、内在性の CD11b が発現増加することが報告されている⁷。マウスの common β subunit がヒト型 GM-CSF と相互作用をする可能性が示唆されているが、本研究では、マウスの顆粒球を活性化することは無く、従来、知られている GM-CSF 依存性マウス細胞の増殖不応答を再確認した。

ヒト型 GM-CSF のイヌへの投与によって、末梢血顆粒球の増加が見られたという報告は認められないが、今回の研究ではイヌの末梢血顆粒球を活性化することがわかった。その活性の強さは、入手可能なイヌ型 GM-CSF に対する応答に比べれば、やや劣るものの、イヌを用いて、ヒト型 GM-CSF の生理活性を測定することが可能であると考えられる。

結論

ヒトのリコンビナント 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。

謝辞

CD11b 測定にあたり、ご助言を頂いた東京大学医学部麻酔科講師内田寛治博士に深謝いたします。

参考文献

1. Barbara McClure, et al. 2001 Perverted responses of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in mouse cell lines due to cross-species

beta-subunit association. *Blood*, 98, 3165-3168.

2. Personal Communications

3. Brad W. Fenwick, et al. 1988 Human recombinant interleukin-2₁₂₅ induced *in vitro* proliferation of equine, caprine, ovine, canine and feline peripheral blood lymphocytes. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 11, 51-60.

4. Kraig Abrams, et al. 2003 Recombinant human macrophage colony-stimulating factor-induced thrombocytopenia in dogs. *British Journal of Hematology*, 121, 614-622.

5. Brian C. Gilger, et al. 2001. Low-Dose Oral Administration of Interferon-alpha for the Treatment of Immune-Mediated Keratoconjunctivitis Sicca in Dogs. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19, 901-905.

6. Evelin Neuner, et al. 1998. Studies on canine bone marrow long-term culture: effect of stem cell factor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 61, 1-16.

7. Kanji Uchida et al. 2007 GM-CSF Autoantibodies and Neutrophil Dysfunction in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *The New England Medical Journal* 356, 567-579.