

201309013A

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・治験推進研究事業))

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田澤 立之

平成 26(2014) 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・治験推進研究事業))

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田澤 立之

平成 26 (2014) 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. シアリル化糖鎖修飾がサイトカインの生物活性に及ぼす影響について----- 8  
中田 光
2. GM-CSF 薬理試験の検討----- 17  
湯尾 明
3. 肺胞蛋白症臨床研究の動向および難病対策改革からみた肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入治療の  
方向性----- 21  
井上義一
4. 生体における GM-CSF 生物活性測定に関する研究----- 26  
内田寛治
5. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 30  
中垣和英
6. 「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----- 33  
井上 彰

### III. 項目別研究報告

1. 生体における GM-CSF 生物活性測定に関する研究-----36  
内田寛治
2. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 39  
中垣和英, 布村由香
3. カニクイザルでの GM-CSF 吸入試験方法の検討----- 42  
田澤立之, 中垣和英, 伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 赤坂圭一, 中田光
4. カニクイザルでのヒト GM-CSF 製剤反復気管内投与による抗 GM-CSF 抗体産生----- 50  
田澤立之, 中垣和英, 伊藤祐子, 橋本淳史, 田中崇裕, 赤坂圭一, 中田光

### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 54

### V. (資料)動物実験報告書----- 61

# 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

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 准教授

研究要旨：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る自己免疫性肺胞蛋白症の新規治療として有望視される GM-CSF 吸入治療に必要な，GM-CSF 製剤（本邦未承認）の吸入薬開発のための非臨床試験の検討のため，CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤（以下 CHO-GMCSF）を開発中の国内企業と連携して，その薬理学的特性と哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法を検討している．今年度は以下の結果を得た．

①シアルル化糖鎖修飾をもつ CHO-GMCSF は，大腸菌や酵母由来の GM-CSF に比べて，低濃度において細胞の増殖や生存をより強く促進することが示され，シアル酸付加による細胞への結合・内在化・分解の遅れにより生理活性が持続する可能性が考えられた．②CHO 細胞，大腸菌，酵母由来の 3 種類の GM-CSF 製剤の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では，大腸菌由来の GM-CSF の活性がやや高い傾向にあった．③GM-CSF の生物活性を測定する簡便な方法として，全血中の好中球表面に発現する接着因子 CD11b が GM-CSF 刺激により上昇する現象を測定する，CD11b stimulation index を開発し，ヘパリン採血後の保存温度を保つことで再現性の良い結果を得た．④ヒト GM-CSF 製剤の他の動物種での GM-CSF の末梢血顆粒球の CD11b 発現増強作用の検討では，昨年度報告のイヌのほかウサギでの増強作用がみられたが，大腸菌製剤にくらべ CHO-GMCSF では低活性がみられた．⑤カニクイザルへの GM-CSF 製剤の単回吸入投与を，気管内噴霧，膜型ネブライザー，ジェットネブライザーを用いて行い，いずれの方法でも血中 GM-CSF 濃度推移を検出できた．⑥大腸菌製剤および CHO-GMCSF のカニクイザルへの週 2 回，12 週間の経気道反復投与を行い，3-4 週後より血中で抗 GM-CSF 抗体が検出されたが，12 週時の気管支肺胞洗浄液（BALF）の白濁や無構造沈殿物などの肺胞蛋白症の発症所見はみられなかった．

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，肺胞の構造維持に重要なサーファクタント物質が末梢気腔内に異常に蓄積して呼吸不全を呈する疾患で，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と考えられる自己免疫性肺胞蛋白症である．全身麻酔下での全肺洗浄が標準治療とされるが侵襲が大きいため，私たちの研究グループでは，より簡便な治療として GM-CSF 吸入の治療研究を 2000 年より開始し，2005 年—2008 年に本邦 9 施設による多施設第 2 相試験を世界に先駆けて実施し，その有効性と安全性を示した．

本研究では，本邦未承認の GM-CSF 製剤の吸入薬としての開発のため，CHO 細胞由来 GM-CSF 製

剤（以下 CHO-GM-CSF）を開発中の国内企業よりラボレベル製品の提供をうけて、薬理学的特性と哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法を検討している。本年度は酵母由来 GM-CSF 製剤の提供も米国の製造販売企業から受けて、①CHO-GM-CSF の糖鎖修飾と、細胞の増殖生存促進の生理活性との関連、②各種 GM-CSF 製剤の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シグナル伝達系のモニター方法としての好中球表面の CD11b の発現量測定系の開発、④他の動物種の顆粒球の CD11b 発現量評価による活性の比較、⑤気道内投与方法としてマイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによる GM-CSF 製剤の単回投与実験、⑥GM-CSF 製剤のマイクロスプレーによる経気道反復投与での抗体産生観察実験、の 6 項目について検討した。

## B. 研究方法

### GM-CSF 製剤

1. CHO 細胞由来ヒト GM-CSF (JCR ファーマ株式会社提供) 1mg/mL
  2. 酵母由来ヒト GM-CSF (一般名サルグラモスチム, Genzyme 社提供) 40mg/6mL
  3. 大腸菌由来ヒト GM-CSF (一般名モルグラモスチム, Amoytop 社) 0.15mg/vial
1. および 2. については PBS に溶解された状態で提供され、3. については、凍結乾燥品の製剤を購入した。

### ①糖鎖修飾と細胞増殖・生存促進

#### ①-1 CHO-GM-CSF の脱シアリル化

CHO-GM-CSF (1 mg/ml) を 100 mM 酢酸 Na Buffer (pH 5.0) と 2 mM CaCl<sub>2</sub> の混合液中で Clostridium perfringens 由来 Sialidase (0.05 U/ml, Sigma-Aldrich, MO, USA) 含有アガロースゲルと一緒に 37°C で 60 分インキュベートした。その後、アガロースゲルを除去し、PBS で透析した。

#### ①-2 質量分析

Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) を使用しポジティブイオンモードで検出した。

#### ①-3 細胞増殖/生存活性の測定

TF-1 細胞および PBMCs と単球を各種 rhGM-CSF を添加して Macrophage serum free medium (GIBCO BRL) 中で TF-1 は 72 時間、PBMCs は 168 時間、単球は 168 時間培養した。その後、培養液 100 μl に対して

(5-[2,4-bis(sodiooxysulfonyl)phenyl]-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium]) ; CCK-8, Doujindo) を 10 μl を各ウェルに添加した。添加後さらに 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間培養を行い、各ウェルのホルマザン形成を OD450nm とし、吸光度計 (Bio-Rad) を用いて測定した。

### ②コロニーアッセイ

対象細胞は、健常成人由来のヒト骨髓血液細胞で、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。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。

### ③好中球表面の CD11b の発現量測定系

細胞内の CD11b の量をフローサイトメトリー法で細胞内サイトカイン染色法を用いて定量し、GM-CSF 刺激によって細胞内外の CD11b 量がどのように変化するかを検討した。血液 200 μl 中に、GM-CSF を最終濃度 10 ng/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 分培養することで得られる、CD11b 値の基礎値からの上昇率を CD11b stimulation index (CD11bSI) と定義し、健常者と自己免疫製肺胞蛋白症患者で測定した結果から、診断閾値を検定した。

### ④他の動物種の顆粒球の CD11b 発現量評価

動物のヘパリン血 100 μl に各種濃度の各 GM-CSF を加え、37°C に 30 分間保温した後、CD11b 抗体で染色・パラフォルムアルデヒド固定して、FACSarray で蛍光強度を測定した。

### ⑤GM-CSF 製剤の経気道的単回投与実験

各用量雌雄各 1 匹のカニクイザルに酵母由来 GM-CSF 製剤を単回気管内投与 (0.005, 0.05 及び 0.5 mg/body) 又は 2 種のネブライザー (膜型/ジェット) を用いて単回吸入投与 (0.05, 0.5 及び 5 mg/body) し、投与前および投与後 24 時間まで経時的に血漿を採取した。GM-CSF の作用を確認するため、一般状態観察、体温測定、血液検査及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取を行った。

## ⑥GM-CSF製剤経気道反復投与での抗体産生

CHO 細胞由来 GM-CSF 製剤および大腸菌由来 GM-CSF 製剤の 2 種類の製剤を用いて、マイクロスプレーによる気管内噴霧投与 (15  $\mu$ g/body/回, 2 回/週, 12 週) を各製剤オス 2 例のカニクイザルに施行し, 1 週間毎に採血し抗体の検出を行うとともに, 一般状態観察, 2 週間毎の血液検査及び 12 週後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取を行った。

### (倫理面への配慮)

①については, 新潟大学医学部倫理委員会に申請し承認を得た。ヒト血液の採取の際には, 被験者より文書による同意を得て実施した。

②については, 患者検体は使用せず, 動物実験も含まれない。正常ヒト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。

③については, 健常者血液採取は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。また自己免疫製肺胞蛋白症患者の血液採取はシンシナティ子供病院で倫理委員会の承認を得て, 被験者の同意を文書で取得したのち採血した。

④については, 動物の血液供給元の会社 (NAS 研究所、成田) の倫理規定に基づいて, 実験を遂行した。

⑤については, 専門飼養施設 (株式会社イナリサーチ) の動物実験審査委員会 (#13179, 2013 年 8 月 22 日承認, ジェットネブライザー追加実験 #13259, 2013 年 11 月 14 日承認) ならびに新潟大学動物実験倫理委員会 (新大研第 193 号 1, 2013 年 9 月 18 日承認, ジェットネブライザー追加実験, 新大研第 269 号 7, 2013 年 12 月 4 日承認) により審査・承認された試験計画書に沿って実施された。

⑥については, 専門飼養施設 (株式会社イナリサーチ) の動物実験審査委員会 (#13261, 2013 年 11 月 15 日承認) ならびに新潟大学動物実験倫理委員会 (新大研第 269 号 6, 2013 年 12 月 4 日承認) により審査・承認された試験計画書に沿って実施された。

## C. 研究結果

### ①CHO-GMCSFの糖鎖修飾と、細胞の増殖生存促進の生理活性との関連

脱シアリル化処理後の CHO-GMCSF による TF-1 細胞の長時間刺激細胞増殖/生存活性は脱シアリル化前の同濃度の CHO-GM-CSF に比べて顕著に減少し、大腸菌由来製剤、酵母由来製剤の活性と同等レベルになった。以上から、シアリル基が低濃度の CHO-GMCSF の細胞増殖/生存活性にプラスに作用していることが明らかとなった。

### ②各種GM-CSF製剤の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

CHO 細胞由来, 大腸菌由来, 酵母由来のいずれの 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。

### ③シグナル伝達系のモニター方法としての好中球表面のCD11bの発現量測定系の開発

好中球表面の CD11b は様々な実験上の因子でも変動しうるが、ヘパリン採血した血液を温度変化の少ない条件下で保存することで、再現性の良い結果を得ることができた。少人数のパイロットスタディでは、CD11b stimulation index の数値 112 で、健常者と自己免疫製肺胞蛋白症患者を感度、特異度 100% で分けることができた。

### ④他の動物種の顆粒球のCD11b発現量評価による活性の比較

齧歯類、ラットでは判定するのに十分な活性を得ることができなかった。前年度に報告したイヌ以外の動物では、ウサギの末梢血顆粒球の CD11b の発現増強を確認したが、サルの ED50 に比べて、大腸菌由来製剤 1/8, 酵母由来製剤 1/26, CHO-GMCSF で 1/624 と、CHO-GMCSF で、有意な低活性が認められた。

### ⑤マイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによるGM-CSF製剤の単回投与実験

いずれの投与方法でも末梢血中の白血球数, 好中球及び好酸球数, CRP の上昇が認められ, 血中 GM-CSF が検出可能で, 24 時間の濃度推移を測定できた。ネブライザーでの 5mg 投与と ス

プレーでの 0.5mg 投与はほぼ同等の血中濃度を示した。一般状態、体温及び一般細菌及び真菌検査に異常は認められなかった。

#### ⑥GM-CSF製剤のマイクロスプレーによる経気道反復投与での抗体産生観察実験

大腸菌由来製剤投与群では、反復投与継続により、投与開始後 12 週までに 60  $\mu$ g/mL 以上のレベルまで抗体価が上昇した。これに対して、CHO 細胞由来製剤投与群では、投与開始後 4 週より抗体が検出されたが、抗体価は投与開始後 12 週までおよそ 30  $\mu$ g/mL 程度のレベルにとどまって推移した。2 週終了時の気管支肺胞洗浄液では外観の白濁はみられず、無構造沈殿物もみられなかったが、抗 GM-CSF 抗体が検出され、泡沫マクロファージ様細胞が少数みられた。

#### D. 考察

CHO-GMCSF は、大腸菌由来製剤、酵母由来製剤に比べて、糖鎖修飾に富むことが、昨年度の質量分析での解析であきらかになっている。哺乳動物のサイトカインにはシアリル化糖鎖が付加されているものが多く、大腸菌由来のリコンビナント製剤に比べると生体内で半減期が長くなることが知られているが、*in vitro* でのシアリル化糖鎖の生物学的意義は不明である。

本研究では、哺乳動物細胞由来の GM-CSF はコロニーアッセイで、大腸菌由来製剤に比してヒト骨髄細胞への増殖・分化誘導作用がやや低い傾向がみられたが、低濃度においては、TF-1 細胞や PBMC に対する大腸菌あるいは酵母由来の GM-CSF に比べて、細胞の増殖や生存をより強く促進することが明らかになった。これは、シアリル酸付加による、細胞への結合、細胞内への内在化・分解が遅れ、結果として GM-CSF の効果が長時間持続するためであると考えられ、さらなる検証が必要である。

好中球表面上の CD11b が好中球の活性化度の鋭敏なマーカーであることは知られていたが、その定量には測定条件が大きく影響し、実用化されていなかった。好中球表面の CD11b の発現量測定系は、適切な実験環境管理下であれば、再現性が高く、GM-CSF 生物活性を簡便に短時間で測定できることが本研究で示された。好中球表面上の CD11b は他の炎症性疾患でも上昇することが知られており、今後そうした疾患群との違いを検討する必要がある。

マウスおよびラットの顆粒球の CD11b 発現量

評価による活性の比較からは、ヒト GM-CSF の活性測定に齧歯目を用いることは困難と考えられた。一方ヒト GM-CSF を用いてカニクイザルの顆粒球 CD11b 発現解析では十分な活性がみられた。ウサギの顆粒球の CD11b 発現解析では CHO-GM-CSF の活性は、他のヒト GM-CSF 製剤に比べ 1/10 まで低下する。糖鎖修飾の影響と思われるが、受容体との結合度が低いとより強い影響が出る可能性がある。

カニクイザルへの気道内投与の方法の検討として、マイクロスプレー、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによる GM-CSF 製剤の単回投与実験を行ったが、ネブライザー投与では、投与薬剤の相当量が呼気中に放出され、臨床的にはネブライザーの吸入効率は、10-15%程度とされるため、本研究では、マイクロスプレーでの投与量の 10 倍量をネブライザーでの投与量とした。この投与量設定は概ね妥当だったと考えられ、ネブライザーでの 5mg 投与と スプレーでの 0.5mg 投与はほぼ同等の血中濃度を示した。また膜型ネブライザーとジェットネブライザーはほぼ同等の血中濃度を示した。今後、例数を増やしてさらに検討する必要がある。

CHO-GMCSF、大腸菌由来製剤のいずれの経気道的な反復投与によっても、血中抗 GM-CSF 抗体を投与開始後 4 週程度検出できることが明らかとなった。BALF 中の一部に泡沫マクロファージの出現がみられたが、無構造沈殿物や洗浄液の白濁などはみられず、肺胞蛋白症の発症を示す所見はなかった。さらに反復投与を続けた場合の抗体の特性に変化の解析、特に、GM-CSF 依存細胞株などでの中和能のバイオアッセイも必要と考えられた。

#### E. 結論

CHO-GMCSF の薬理学的作用について、細胞の増殖や生存促進、他の動物種での顆粒球の CD11b 発現などの面で糖鎖修飾が重要であることが示され、今後さらなる検討が必要と考えられた。カニクイザルへの気道内投与の方法の検討として、マイクロスプレーによる気管内噴霧は、ネブライザーに比べ、1/10 程度の用量で同等の効果が得られ、膜型とジェット型のネブライザーはほぼ同等の用量でよいことが明らかとなった。また、GM-CSF 製剤の経気道的反復投与により、常用量 (5  $\mu$ g/kg/回) 週 2 回投与、4 週程度で血中で抗 GM-CSF 抗体を検出できるようになることが明らかになり、さらに例数を



増やして検討する必要がある。

## 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 JCR ファーマ株式会社に感謝いたします。酵母由来 GM-CSF 製剤を提供してくださった Genzyme 社に感謝いたします。また動物実験計画において貴重なご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株式会社イナリサーチ 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。

## G. 研究発表

### I. 論文発表 (5件)

1. Tazawa R, Inoue Y, Arai T, Takada T, Kasahara Y, Hojo M, Ohkouchi S, Tsuchihashi Y, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Ishii H, Nei T, Morimoto K, Nasuhara Y, Ebina M, Akira M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Nakata K. Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *Chest* in press.
2. Hisata S, Moriyama H, Tazawa R, Ohkouchi S, Ichinose M, Ebina M. Development of pulmonary alveolar proteinosis following exposure to dust after the Great East Japan Earthquake. *Respir Investig.* 51(4):212-6, 2013.
3. Nei T, Urano S, Itoh Y, Kitamura N, Hashimoto A, Tanaka T, Motoi N, Kaneko C, Tazawa R, Nakagaki K, Arai T, Inoue Y, Nakata K. Light chain ( $\kappa/\lambda$ ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol.* 2013 in press.
4. Hashimoto A, Tanaka T, Itoh Y, Yamagata A, Kitamura N, Tazawa R, Nakagaki K, Nakata K. Low concentrations of recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor derived from Chinese hamster ovary cells augments long-term bioactivity with delayed clearance in vitro. *Cytokine* 2014 in press
5. Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, Inoue Y, Uchida N, Nishida A, Kogure Y, Saraya T, Tomii K, Takada T, Itoh Y, Hojo M, Ichiwata T, Goto H, Nakata K. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. *BMC Pulmonary Medicine* 2014 in press.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## II. 学会発表

### A. 国際学会 (6件)

1. Tazawa R, Arai T, Kasahara Y, Hojo M, Ohkouchi S, Eda R, Yokoba M, Tsuchihashi Y, Nei T, Nakayama H, Ishii H, Morimoto K, Nasuhara Y, Takada T, Ebina M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K. Vital Capacity And Recurrence After Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Inhalation Therapy For Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic society International conference 2013, Philadelphia, 2013.5.
2. Inoue Y, Arai T, Nakata T, Yamaguchi E, Ichiwata T, Ebina M, Tazawa R, Ishii H, Setoguchi Y, Kitaichi M, Akira M, Tatsumi K, Nasuhara Y, Cho K, Tsuchihashi Y, Uchida K, Takada T, Nakayama H, Tomii K, Sugimoto C, Kohashi Y, Ohkouchi S, Kasahara Y, Morimoto K, Nakatani Y, Tsuyuguchi K, Japan PAP Study Group. Longitudinal Cohort Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic society International conference 2013, Philadelphia, 2013.5.
3. Nakata K, Nei T, Urano S, Tazawa R, Azuma B. IgM Type GM-CSF Autoantibody Is Etiologically Bystander But Involved In Development Of IgG Type Autoantibody In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Alveolar Proteinosis. American Thoracic society International conference 2013, Philadelphia, 2013.5.
4. Nakata K, Nei T, Urano S, Tazawa R, Azuma B. IgM Type GM-CSF Autoantibody Is Etiologically Bystander But Involved In Development Of IgG Type Autoantibody In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. Alveolar Proteinosis. American Thoracic society International conference 2013, Philadelphia, 2013.5.
5. Ishii H, Nakata K, Tazawa R, Inoue Y,

Japan Rare Lung Disease Consortium.  
Characteristics Of Negative GM-CSF  
Autoantibody Pulmonary Alveolar  
Proteinosis (NA-PAP) In Japan. American  
Thoracic society International conference  
2013, Philadelphia, 2013.5.

6. Nakata K, Nei T, Motoi N, Urano S, Tazawa R, Nakagaki K, Suzuki M, Takizawa J. A Mechanism For Acceleration Of GM-CSF Autoantibody Production In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic society International conference 2013, Philadelphia, 2013.5.

#### B. 国内学会（1件）

1. 田澤立之，新井徹，笠原靖紀，放生雅章，大河内眞也，江田良輔，横場正典，土橋佳子，中山秀章，石井晴之，森本浩之輔，南須原康行，高田俊範，海老名雅仁，山口悦郎，井上義一，中田光. 肺胞蛋白症の GM-CSF 吸入治療の予後と肺活量. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会，東京，2013. 04.

#### 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

## II. 分担研究報告

## シアリル化糖鎖修飾がサイトカインの生物活性に及ぼす影響について

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

○橋本淳史<sup>1</sup>、田中崇裕<sup>1</sup>、伊藤祐子<sup>1</sup>、田澤立之<sup>1</sup>、赤坂圭一<sup>1</sup>

1) 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター

哺乳動物のサイトカインにはシアリル化糖鎖が付加されているものが多く、*E.coli* 由来に比べて、*in vivo* で半減期が長くなることが知られている。しかしながら、*in vitro* におけるシアリル化糖鎖の生物学的意義は不明である。我々は、哺乳動物細胞由来の GM-CSF は *E.coli* あるいは yeast 由来の GM-CSF に比べて、低濃度において細胞の増殖や生存をより強く促進することを見出した。これは、シアル酸付加による、細胞への結合と細胞内への internalization、つづく分解が遅れ、結果として GM-CSF の効果が長時間持続するためであると考え、検証を進めている。

### 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、*E.coli* 由来組み替え GM-CSF と Yeast 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。JCRファーマ株式会社は、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、CHO 細胞を含む哺乳動物のサイトカインに特徴的なシアル酸付加の意義を *E.coli* および yeast 由来 GM-CSF と比較検討して明らかにすることで、よりヒトに近く効率的な吸入薬の作製が期待される。

### B. 対象と方法

#### B.1. 細胞

GM-CSF 依存株である TF-1 細胞は北村先生の好意により提供を受けた [22]。末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) と単核球は健康者の末梢血から分離した [8]。本研究は、新潟大学医学部倫理委員会に申請し承認を得た。ヒト血液の採取の際には、被験者より文書による同意を得て実施した。

#### B.2. rhGM-CSF

Molgramostim (erhGM-CSF) は Amoytop Biotech Co., Ltd. (Xiamen, Fujian, PRC)、Sargramostim (yrhGM-CSF) は Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) から購入した。CHO 細胞由来 rhGM-CSF (crhGM-CSF) は

JCR Pharmaceuticals Co., Ltd. (Ashiya, Hyogo, Japan) の好意による提供を受けた。

#### B.3. crhGM-CSF の脱シアリル化

crhGM-CSF (1 mg/ml) を 100 mM 酢酸 Na Buffer (pH 5.0) と 2 mM CaCl<sub>2</sub> の混合液中で *Clostridium perfringens* 由来 Sialidase (0.05 U/ml, Sigma-Aldrich, MO, USA) 含有アガロースゲルと一緒に 37°C で 60 分インキュベートした。その後、アガロースゲルを除去し、PBS で透析した。

#### B.4. 質量分析

10 µl の GM-CSF (erhGM-CSF; 150 µg/ml, yrhGM-CSF; 250 µg/ml, chGM-CSF; 200 µg/ml) に 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) を 90 µl、0.5 µl の MB-HIC8 magnetic C8 beads (Bruker Daltonics, Hercules, MA, USA) を混和後、室温で 5 分間静置した。ビーズに結合しているタンパク質を 4.5 µl の 60% acetonitrile (ACN)、0.1% TFA にて溶出した。2 µl の溶出液に対して 1 µl の matrix solution (10 g/l sinapinic acid in 70% ACN, 0.1% TFA) を混ぜ、スチールプレートに滴下した。質量分析は Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Hercules, MA, USA) を使用しポジティブイオンモードで検出した。

#### B.5. SDS-PAGE

rhGM-CSFs (6.5 ng) を SDS-PAGE (還元状態) にて泳動した。ゲルは Gel stain solution (ORIOLE Fluorescent Gel Stain, Bio-Rad, CA, USA) で染色し Image analyzer (MiniLumi, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) にて解析した。

### **B.6. DNA fragment 測定**

TF-1 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/ml) を GM-CSF 存在下 (15pM) で 72 時間培養した後 [27]、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を使用して DNA を採取した。DNA (3.5  $\mu$ g) を 1% アガロースゲルで泳動した(25 min at 100 V)。その後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド (10 mg/ml, Nippon Gene, Tokyo, Japan) で染色し、MiniLumi (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) にて測定した。

### **B.7. リン酸化 STAT5 の測定**

抗凝固剤を添加した新鮮血に rhGM-CSF (15, 60, 500 pM) を添加して 30 分 37°C でインキュベートした後、Fix/Lyse buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) にて溶血/固定をした。その後、冷メタノールを添加して -20°C で 1 時間インキュベートした。遠心してメタノールを取り除き 3% FCS/0.01%  $\text{NaN}_3$ /PBS solution に再懸濁し、Alexa Fluor 647-labeled anti-pSTAT5 (BD Biosciences, San Jose, CA, New Jersey, USA) で染色し、フローサイトメトリー (Cell Analyzer, Sony, Tokyo, Japan) にて測定した。

### **B.8. 好中球 CD11b 発現増強の測定**

好中球 CD11b 測定は論文を参照した [25]。ヘパリン化した全血に rhGM-CSF を添加してインキュベート後、表面マーカーの CD11b をフローサイトメトリーにて測定した。結果は  $\text{CD11b 発現} = (\text{刺激した際の好中球の CD11b 発現} - \text{刺激していない好中球の CD11b 発現}) / \text{刺激していない好中球の CD11b 発現} \times 100$  を計算し評価した。

### **B.9. PBMCs における MIP-1 $\alpha$ 産生増強の測定**

Macrophage-serum-free medium (GIBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) を使用し、 $1 \times 10^6$  個の PBMCs に GM-CSF を添加または未添加で培養し、その上清を採取し MIP-1 $\alpha$  の産生を参考文献 [26] を元に ELISA kit (Quantikine, R&D Systems, Mincapolis, MN, USA) を用いて測定した。

### **B.10. 細胞増殖/生存活性の測定**

TF-1 細胞および PBMCs と単球 ( $2 \times 10^4$  cells/well) を各種 rhGM-CSF を添加して Macrophage serum free medium (GIBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) 中で TF-1 は 72 時間、PBMCs は 168 時間、単球は 168 時間培養した [27]。その後、培養液 100  $\mu$ l に対して (5-[2,4-bis(sodiooxysulfonyl)phenyl]-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium]) ; CCK-8, Doujindo, Kumamoto,

Japan) を 10  $\mu$ l を各ウェルに添加した。添加後さらに 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で 4 時間培養を行い、各ウェルのホルマザン形成を  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  として、吸光度計 (Bio-Rad, CA, USA) を用いて測定した。

### **B.11. 抗体による TF-1 細胞増殖抑制試験**

TF-1 細胞に対して GM-CSF (15pM) および 500 ng/ml goat anti-GM-CSF antibody (R&D Systems, Mincapolis, MN, USA) を添加し、72 時間培養を行い、上述のように細胞増殖/生存活性を測定した。GM-CSF (15pM) のみ添加した場合をコントロールとして比較した。

### **B.12. 形態変化および細胞生存の測定**

TF-1 cells を rhGM-CSF 存在下で培養後、 $1 \times 10^5$  cells をサイトスピン (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) に供し、標本を作製した (200rpm 2 分)。風乾後の細胞を Diff-Quick (Sysmex, Hyogo, Japan) にて染色した。細胞の大きさは顕微鏡下の強拡大視野にてマイクロメーター (MeCan Imaging, Saitama, Japan) を使用して測定した。また PI 染色 (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche, Basel, Switzerland) にて生細胞数を計数した。

### **B.13. アポトーシス細胞の検出**

TF-1 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) を FITC-labeled anti-Annexin-V 抗体 (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche, Basel, Switzerland) 2 $\mu$ l 添加し、15 分 4 °C の条件下で反応させた。その後フローサイトメトリー (Sony) を用いて陽性細胞を計測した。

### **B.14. GM-CSF クリアランス測定**

PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) または TF-1 細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/ml) に各 rhGM-CSF を 5 pM (PBMCs に対し)、15 pM (TF-1 細胞に対し) 添加し、complete medium (RPMI 1640 (GIBCO BRL, Palo Alto, CA, USA))、含 10% FCS (Nichirei, Bioscience Inc, Tokyo, Japan)、100 mg/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン) 中、5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C の条件下で培養し、5、10、24、48 時間後の培養上清を採取した。培養上清中の rhGM-CSF 濃度を ELISA (Quantikine, R&D Systems, Mincapolis, MN, USA) を用いて測定し、培養開始時の濃度に対する割合%を残存率とした [8]。

### **B.15. 統計解析**

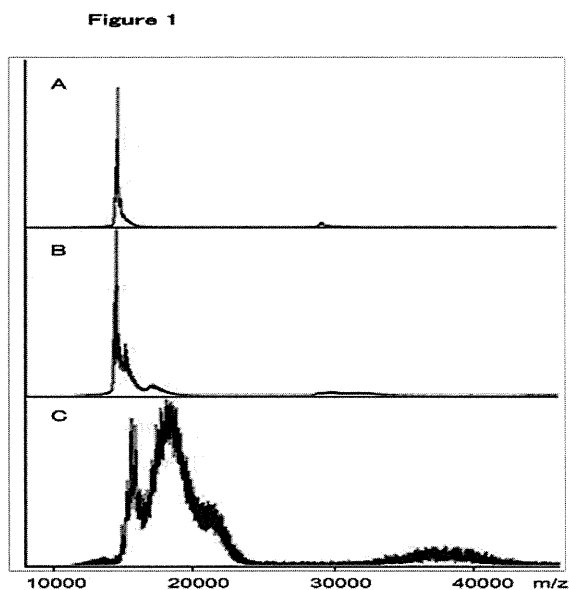
まず、Shapiro-Wilk tests で正規性を確認し、2 群間の比較では一元配置分散分析を使用した。さらに Bonferroni-調整済の p 値による多重比較検定を行った ( $p > 0.05$ )。全ての検定は両側検定

で  $p = 0.05$  を有意水準とした。解析には JMP (10.0.0) software (SAS, Cary, NC, USA) を使用した。

### C. 結果

#### C.1. rhGM-CSF の分子量

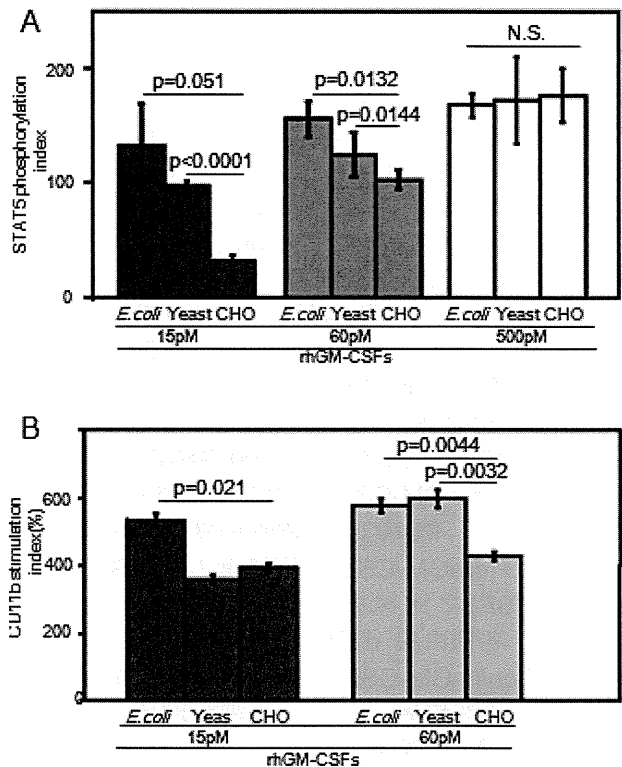
*E. coli* 由来 rhGM-CSF (erhGM-CSF)、yeast 由来 rhGM-CSF (yrhGM-CSF)、CHO 細胞由来の rhGM-CSF (crhGM-CSF) の平均分子量測定のためマスペクトル解析を行った。erhGM-CSF は 14.5 kDa の単一ピークを呈し、yrhGM-CSF には 14.2、14.4、15.0 kDa のピークがあり、その平均分子量は 14.7 kDa であった、crhGM-CSF は 16-28 kDa に幅広い連続ピークを示し、その平均分子量は 19.0 kDa であった (Fig. 1)。



#### C.2. 短時間刺激時の rhGM-CSF の生物活性

3 種の組み換え GM-CSF (rhGM-CSF) のいずれかの存在下で単球と顆粒球を 0.5 時間刺激した際の STAT5 リン酸化を測定した。crhGM-CSF で刺激をした細胞は 15 pM および 60 pM 両濃度において、erh-, yrh-GM-CSF に比べて STAT5 のリン酸化が有意に低かった。しかしながら 500 pM の濃度では 3 つの rhGM-CSF 間に差は見られなかった (Fig. 2A)。また、60 pM において CD11b 発現増強 (CD11b stimulation index) を測定したところ、crhGM-CSF は  $425\% \pm 15\%$  と erhGM-CSF の  $576\% \pm 27\%$  と yrhGM-CSF の  $625\% \pm 33\%$  に比べて有意に低かった (Fig. 2B)。

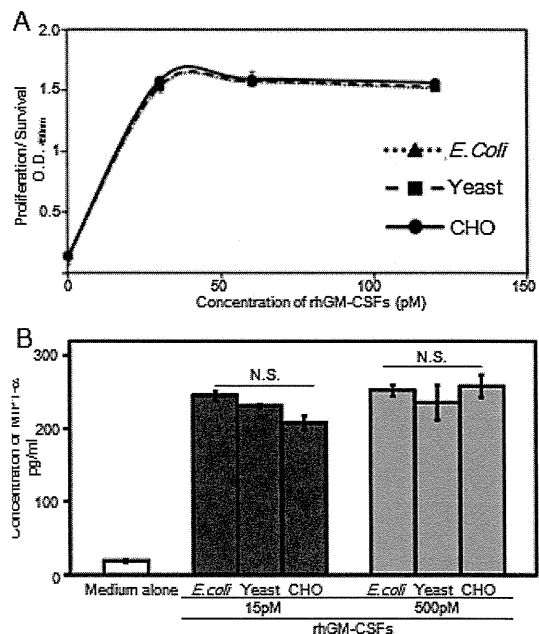
Figure 2



#### C.3. 中時間刺激時の rhGM-CSF の生物活性

TF-1 細胞を 30-120 pM の濃度で 3 種 GM-CSF (erh-, yrh-, crh-) のいずれかを添加して、24 時間培養後の細胞増殖/生存活性 (方法 2.10 参照) を測定した結果、有意な差はなかった (Fig 3A)。15 pM と 500 pM の存在下で同様に PBMCs を培養して MIP1- $\alpha$  の産生をみたところ、やはり 3 者間に有意な差は見られなかった (Fig3B)。

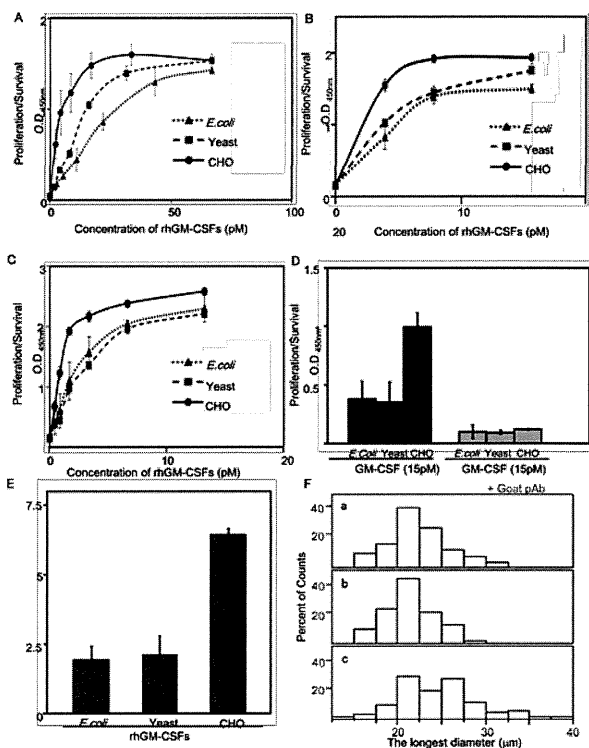
Figure 3



#### C.4. 長時間刺激時の rhGM-CSF の生物活性

rhGM-CSF 存在下で TF-1 細胞を 72 時間、単球及び PBMCs を 168 時間培養した後の細胞増殖/生存活性を 3 種類の rhGM-CSF の間で比較した。15 pM の crhGM-CSF で培養した TF-1 細胞は他の同濃度の rhGM-CSF で培養した細胞よりも細胞増殖/生存活性が高かったが、60 pM で培養した際には差は見られなかった。15 pM の場合の 50% 効果量 (Effective Dose; ED<sub>50</sub>) を求めたところ、erhGM-CSF は 21 pM、yrhGM-CSF は 24 pM であったが、crhGM-CSF は 3.9 pM とより低い値を示した (Fig 4A)。単球の細胞増殖/生存活性を測定したところ 4 pM の crhGM-CSF で培養した細胞は、他の rhGM-CSF で培養した細胞よりも有意に高い活性を示した。ED<sub>50</sub> は、erhGM-CSF で 10.7 pM、yrhGM-CSF で 4.9 pM に対し、crhGM-CSF で 3.9 pM であった (Fig 4B)。同様に PBMCs の細胞増殖/生存活性は、2-4 pM の crhGM-CSF は同濃度の erhGM-CSF、yrhGM-CSF に比べて有意に高い活性を示した (Fig 4C)。各種由来 rhGM-CSF の存在下でヤギ免疫抗 *E. coli* -GM-CSF ポリクローナル抗体を添加し 72 時間培養したところ細胞増殖/生存活性は同様に強く抑制された、このことから crhGM-CSF の TF-1 細胞に対する細胞増殖/生存活性には、糖鎖が影響しているものの、活性の発現にはポリペプチド鎖が重要であることが示唆された (Fig 4D)。各 30 pM の rhGM-CSF 存在下で 72 時間培養した TF-1 細胞の細胞増殖率は、erhGM-CSF では  $1.95 \pm 0.5$  倍、yrhGM-CSF では  $2.0 \pm 0.7$  倍、crhGM-CSF では  $6.45 \pm 0.3$  倍であった (Fig 4E)。15 pM の crhGM-CSF の存在下で 72 時間培養した TF-1 細胞の長径は  $27.07 \mu\text{m}$  と  $21.02 \mu\text{m}$  の 2 峰性のピーク呈し (平均  $24.09 \mu\text{m}$ )、erhGM-CSF (平均  $22.09 \mu\text{m}$ ) または yrhGM-CSF (平均  $22.00 \mu\text{m}$ ) では単峰性のピークを呈した (Fig 4F)。この結果から、crhGM-CSF は erhGM-CSF や yrhGM-CSF に比べて低濃度において細胞増殖/生存活性が高いばかりではなく細胞の成長にも高い効果があった。erhGM-CSF と yrhGM-CSF の長時間刺激時の増殖/生存活性及び成長活性は同等だった。

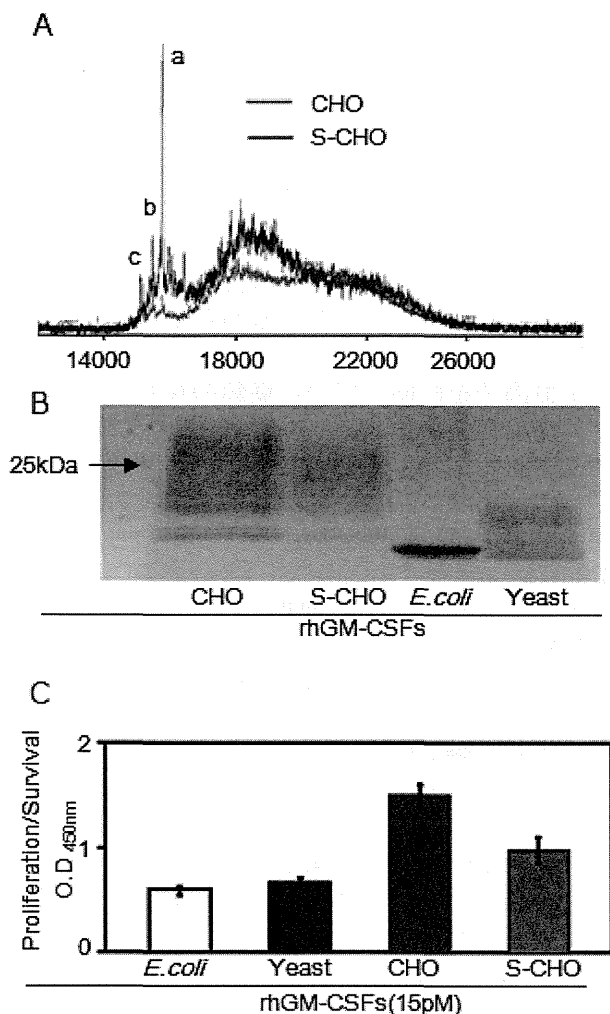
Figure 4



### C.5. 脱シアリル化による crhGM-CSF の細胞増殖/生存活性の変化

我々は crhGM-CSF のオリゴ糖の分子の遠位末端に位置しているシアリル酸に対してシアリダーゼ処理を行い、脱シアリル化が crhGM-CSF の細胞増殖/生存活性に与える影響を調べた [20]。マスマスペクトル解析を行うと、モノ-、ジ-、トリ-、テトラシアリル基に対応するマスマスペクトルピークがシアリダーゼ処理前に比べて大きく減少していた (Fig 5A)。SDS-PAGE にて crhGM-CSF に特徴的ないくつかのバンドが処理後に減弱し脱シアリル化反応が行われたことを支持した (Fig 5B)。処理後の crhGM-CSF (15 pM) による TF-1 細胞の長時間刺激細胞増殖/生存活性は脱シアリル化前の同濃度の crhGM-CSF に比べて顕著に減少し、erhGM-CSF、yrhGM-CSF の活性と同等レベルになった。以上から、シアリル基が低濃度の crhGM-CSF の細胞増殖/生存活性にプラスに作用していることが明らかとなった。

**Figure 5**

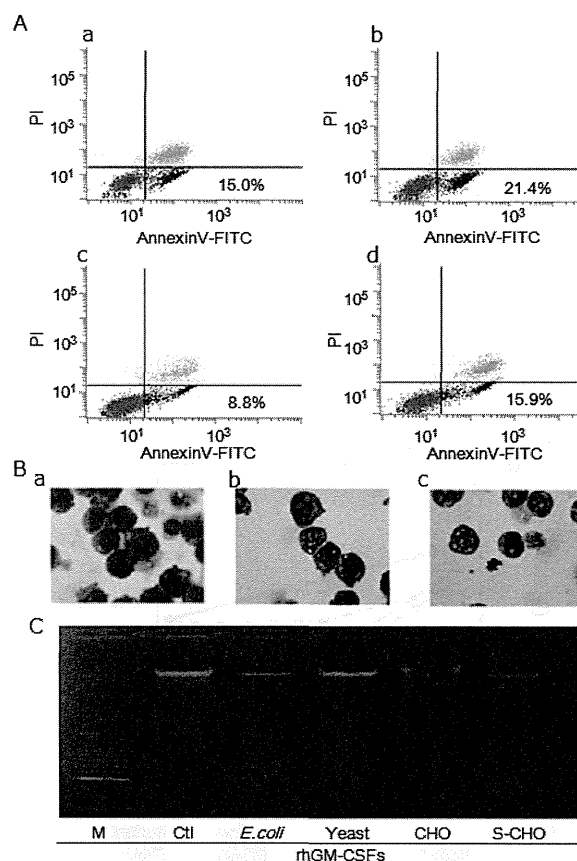


### C.6. TF-1 細胞の細胞死に対する rhGM-CSF の効果

erhGM-CSF 及び yrhGM-CSF の存在下で 72 時間培養したときの TF-1 細胞の増殖/生存活性が crhGM-CSF に比べて低いのは培養後の生細胞数が crhGM-CSF よりも少ないためであると考へた。そこで TF-1 細胞の細胞死をフローサイトメトリーを使用して Annexin V の発現を測定することで評価を行った。30 pM の濃度で crhGM-CSF を添加し 72 時間培養したところ、細胞死の割合が 8.8% だった。一方、erhGM-CSF は 17.0%、yrhGM-CSF は 21.4%、シアリダーゼ処理 crhGM-CSF は 15.9% であった (Fig 6A)。また TF-1 細胞を crhGM-CSF で培養すると、他の rhGM-CSF で培養したものに比べて核の空胞化やクロマチン凝集など細胞死を示唆する所見が少なかった (Fig6B)。培養後の TF-1 細胞から DNA を抽出しアガロースゲル電気泳動を行ったところ erhGM-CSF、yrhGM-CSF、およびシアリ

ダーゼ処理 crhGM-CSF の存在下で培養した細胞では DNA ラダーが顕著であった (Fig6C) が、crhGM-CSF の存在下で培養した細胞では、明らかにラダーが減少していた。これらの結果により crhGM-CSF は erhGM-CSF、yrhGM-CSF、シアリダーゼ処理 crhGM-CSF に比べてより効果的に細胞死を抑制することが示唆された。

**Figure 6**



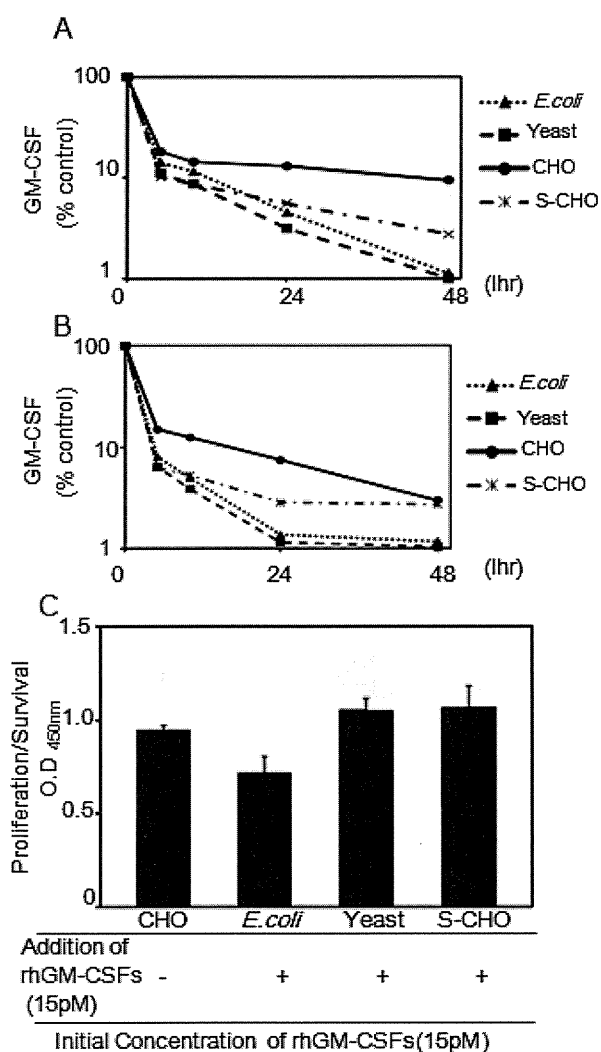
### C.7. TF-1 細胞と PBMCs の GM-CSF クリアランス

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) に 15 pM の erhGM-CSF、yrhGM-CSF、crhGM-CSF あるいはシアリダーゼ処理 crhGM-CSF を添加し、24 時間および 48 時間後に上清中に残存している rhGM-CSF 濃度を測定したところ、crhGM-CSF では培養開始時の 13%、9.5% が残存していたのに対して erhGM-CSF は 4.5%、1.1%、yrhGM-CSF は 3.1%、1%、シアリダーゼ処理 crhGM-CSF は 5.6%、2.7% と細胞による吸収が進んでいた。一方、TF-1 細胞で 24 時間および 48 時間後に培養上清中の rhGM-CSF 濃度を測定したところ、crhGM-CSF は 7.5%、3% が残存していたのに対して erhGM-CSF は 1.3%、1.1%、yrhGM-CSF は



1.1%、1.0%、シアリダーゼ処理 crhGM-CSF は 2.9%、2.7% であった (Fig 7B)。また、48 時間培養後に crhGM-CSF 以外の各種 rhGM-CSF を 15 pM 追加し、その後 24 時間培養継続したところ、図 7C に示すように追加培養した TF-1 細胞の細胞増殖/生存活性は、追加していない crhGM-CSF (15 pM) で培養した TF-1 細胞の活性と同程度にまで上昇した。この結果より、crhGM-CSF は細胞へのクリアランスが遅延することにより *in vitro* においてより長く生物活性が持続されると考えられる。

Figure 7



**D. 考察**

本研究において我々は、低濃度において crhGM-CSF の TF-1 細胞に対する細胞増殖/生存の効果が erhGM-CSF および yrhGM-CSF に比べてより強いことを示した。対照的に、これまでの研究では natural な ヒト GM-CSF は糖鎖がレセプターへの結合を抑制することから生物活性

が低くなると考えられてきた [15,20,24]。ヒト以外の発現系、例えば、yeast-、CHO cells-derived rhGM-CSF は別々の糖鎖を持ち、異なった生物活性を示すことが知られている [18,28]。組み替え GM-CSF をラットに静注した際の半減期は糖鎖修飾が少ないほど短くなり、これにより糖鎖修飾部位がクリアランスに影響し安定性を増加させ、hGM-CSF の分布の変化に関与していることが示唆された。我々は *in vitro* において GM-CSF クリアランスは GM-CSF の糖鎖部分に大きく影響されることを明らかにし、特に遠位末端の糖鎖部分に位置しているシアリル基が重要であることを見出した。

造血因子を修飾している糖鎖の役割については多くの研究がある。第一の意義としては糖たんぱくの分泌に関与することである。エリスロポイエチンの分泌は N-、O- 型糖鎖結合部位の変異を誘発させることで抑制がかかることが知られている [29-31]。しかし、hGM-CSF の分泌の際にツニカマイシンを投与しても抑制されないことから、N 型糖鎖は分泌のプロセスに重要でないことがわかっている [32]。第二に、N 型糖鎖はホルモンやサイトカインのレセプターとの結合を変化させることにより生物活性に影響している。例えばエリスロポイエチンの *in vitro* での活性は糖鎖構造が必要であるが、カルシトニンでは N 型糖鎖によって *in vitro* での活性が著しく減少する。黄体ホルモンの糖鎖はシグナル伝達に必要であるが、糖鎖がない黄体ホルモンの方がレセプターとの親和性は高い [33]。同様に hGM-CSF も糖鎖がない方がレセプターとの親和性は強い [15]。しかしながら、濃度や作用時間を変化させ、hGM-CSF の糖鎖の生物活性を調べた研究はこれまでなかった [32]。crhGM-CSF の造血系細胞に対する作用が短時間と長時間では、全く相反するというを示した研究は、本研究が初めてである。

Chinese hamster ovary 細胞由来 rhGM-CSF (crhGM-CSF) の長時間作用での増殖/生存活性は crhGM-CSF を脱シアリル化することで著しく減少することから、crhGM-CSF の糖鎖上にあるシアリル基が重要であると考えられる。ヒトにおいて GM-CSF は様々な臓器から精製されており、37-200 kDa と様々な分子量をもっている [32]、これは異なる組織で産生される GM-CSF の生物活性が糖鎖修飾の程度によって調節されているかもしれないことを示している。糖鎖上の末端にあるシアリル基は hGM-CSF の電荷や GM-CSFR との親和性に影響を与えることで、組織特異的な活性を持たせているのかもしれない。もし糖鎖修飾のパターンによって hGM-CSF の活性が調整できるのであれば、作用時間を調整してターゲッ

トの細胞特性にあわせて最大の効果を得られるかもしれない。

GM-CSF は細胞上の高親和性レセプターを結合することで働き、そのリガンド/レセプター複合体はすぐに細胞内に取り込まれる [35,36]。細胞内取り込みの時間は rhGM-CSFs の種類によってどう変化するのはよく知られていないが、今回の研究により crhGM-CSF の糖鎖上にあるシアリル基があるとクリアランスが遅延して、結果として生物活性を維持させることが示唆された。今後の研究としては、rhGM-CSF のシアリル基の効果が、レセプターとの結合を弱めることで起きているものなのか、結合してからの細胞内への取り込みの遅延によるものなのかを調べる必要がある。

今回我々は *in vitro* において、rhGM-CSF の糖鎖のシアリル基が細胞の増殖/生存活性を延長させることを初めて報告した。

#### E. 結論

*In vitro* において CHO 細胞由来 GM-CSF は、シアリル酸修飾により GM-CSF の細胞への internalization を遅らせることで、効果を延長し、細胞の増殖/生存活性を維持している。

#### F. 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 JCR ファーマ株式会社のスタッフの皆様に感謝いたします。

#### G. 健康危険情報

特記すべきことはありません。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tazawa R, Inoue, Y(19名略), Nakata K Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *CHEST in press*.

○Uchida K, Nakata K, Carey B, Chalk C, Suzuki T, Sakagami T, Koch DE, Stevens C, Inoue Y, Yamada Y, Trapnell BC. Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *J Immunol Methods*. 2013 Nov 23. pii: S0022-1759(13)00327-X

○ Nei T, Urano S(10名略), Tazawa R, Nakata K. Light chain ( $\kappa/\lambda$ ) ratio of GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis *Clin Immunol*. 2013 Dec;149(3):357-64.

○Young LR, Lee HS, (5名略), Koh Nakata, (14名略) McCormack FX. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangiomyomatosis severity and treatment response:a prospective analysis of the Multicenter International Lymphangiomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial. *Lancet Respir Med*. 2013 Aug;1(6):445-452.

○ Handa T, (3名略), Nakata K, Ishii H. Clinical features of three cases with pulmonary alveolar proteinosis secondary to myelodysplastic syndrome developed during the course of Behçet's disease *Respiratory Investigation*. 2014 ;52(1):75-9.

○Kurai D, Nakagaki K, (3名略) Nakata K, Takizawa H, Goto H. Mycoplasma pneumoniae extract induces an IL-17-associated inflammatory reaction in murine lung: implication for mycoplasmal pneumonia. *Inflammation*. 2013, 36(2):285-93. ○*Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013. 33(3):281-7.

○Sato H, Tazawa R (4 名略), 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*. 2012;51(13):1737-42.

○Wong WF, Kofu K,(10 人略), 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*. 2012. 188(11):5408-20.

○ Nagata M(12 人略), Nakata K, Yoshie H, Takagi R. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone*. 2012.50(5):1123-9. 査読有

○Nei T,(5 人略), Tazawa R,(3 人略), 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*. 2012 May 1;302(9):L959-64.

○Ohashi K, (3 人略), Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur. Respir.J*. 2012; 39(3)

##### 2. 学会発表

○中田 光、稀少肺難病の克服に向けて、第53  
回日本呼吸器学会総会特別講演、2013年5月19  
日、東京国際フォーラム

#### 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 6, 肺胞蛋白症 (PAP) P.309-311. 株式会社 南江堂. 2010年10月

#### 3. 参考文献

- [1] Atkinson, Y.H., Lopez, A.F., Marasco, W.A., Lucas, C.M., Wong, G.G., Burns, G.F. and Vadas, M.A. (1988). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rH GM-CSF) regulates f Met-Leu-Phe receptors on human neutrophils. *Immunology* 64, 519-25.
- [2] Burgess, A.W. et al. (1987). Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 69, 43-51.
- [3] Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485-91.
- [4] Esnault, S. and Malter, J.S. (2002). GM-CSF regulation in eosinophils. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50, 121-30.
- [5] Guthridge, M.A., Stomski, F.C., Thomas, D., Woodcock, J.M., Bagley, C.J., Berndt, M.C. and Lopez, A.F. (1998). Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 16, 301-13.
- [6] Hansen, G. et al. (2008). The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 134, 496-507.
- [7] Martinez-Moczygemba, M. and Huston, D.P. (2003). Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112, 653-65; quiz 666.
- [8] Tanaka, T. et al. (2011). Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J Med Genet* 48, 205-9.
- [9] Hercus, T.R., Thomas, D., Guthridge, M.A., Ekert, P.G., King-Scott, J., Parker, M.W. and Lopez, A.F. (2009). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* 114, 1289-98.
- [10] Trapnell, B.C. and Whitsett, J.A. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* 64, 775-802.
- [11] Huang, F.F. et al. (2011). GM-CSF in the lung protects against lethal influenza infection. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 259-68.
- [12] Weisbart, R.H., Golde, D.W., Clark, S.C., Wong, G.G. and Gasson, J.C. (1985). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* 314, 361-3.
- [13] Socinski, M.A., Cannistra, S.A., Sullivan, R., Elias, A., Antman, K., Schnipper, L. and Griffin, J.D. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the expression of the CD11b surface adhesion molecule on human granulocytes in vivo. *Blood* 72, 691-7.
- [14] Shibata, Y., Berclaz, P.Y., Chronos, Z.C., Yoshida, M., Whitsett, J.A. and Trapnell, B.C. (2001). GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 15, 557-67.
- [15] Cebon, J. et al. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J Biol Chem* 265, 4483-91.
- [16] Forno, G., Bollati Fogolin, M., Oggero, M., Kratje, R., Etcheverrigaray, M., Conradt, H.S. and Nimtz, M. (2004). N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. *Eur J Biochem* 271, 907-19.
- [17] Fibbe, W.E., van Damme, J., Billiau, A., Voogt, P.J., Duinkerken, N., Kluck, P.M. and Falkenburg, J.H. (1986). Interleukin-1 (22-K factor) induces release of granulocyte-macrophage colony-stimulating activity from human mononuclear phagocytes. *Blood* 68, 1316-21
- [18] Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K. and Rennick, D. (1985). Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4360-4.
- [19] Gabilove, J.L., Welte, K., Harris, P., Platzer, E., Lu, L., Levi, E., Mertelsmann, R. and Moore, M.A. (1986). Pluripoietin alpha: a second human

hematopoietic colony-stimulating factor produced by the human bladder carcinoma cell line 5637. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 2478-82.

[20] Broudy, V.C., Kaushansky, K., Segal, G.M., Harlan, J.M. and Adamson, J.W. (1986). Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 7467-71.

[21] Sieff, C.A. (1987). Hematopoietic growth factors. J Clin Invest 79, 1549-57.

[22] Kitamura, T. et al. (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. J Cell Physiol 140, 323-34.

[23] Dorr, R.T. (1993). Clinical properties of yeast-derived versus Escherichia coli-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Clin Ther 15, 19-29; discussion 18.

[24] Moonen, P., Mermoud, J.J., Ernst, J.F., Hirschi, M. and DeLamarter, J.F. (1987). Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 4428-31.

[25] Uchida, K. et al. (2007). GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. N Engl J Med 356, 567-79.

[26] Rosen, L.B. et al. (2013). Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. J Immunol 190, 3959-66.

[27] Uchida, K. et al. (2009). Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects. Blood 113, 2547-56.

[28] Nicola, N.A., Metcalf, D., Johnson, G.R. and Burgess, A.W. (1979). Separation of functionally distinct human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. Blood 54, 614-27.

[29] Dube, S., Fisher, J.W. and Powell, J.S. (1988). Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. J Biol Chem 263, 17516-21.

[30] Teh, S.H., Fong, M.Y. and Mohamed, Z. (2011). Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in Pichia pastoris. Genet Mol Biol 34, 464-70.

[31] Darling, R.J., Kuchibhotla, U., Glaesner, W., Micanovic, R., Witcher, D.R. and Beals, J.M. (2002). Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. Biochemistry 41, 14524-31.

[32] Jonathan CEBON and Antony W. BURGESS. (1991). Glycosylation of Human

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Alters Receptor Binding and Biological Activity. TIGG Vol. 3 No.12

[33] Sairam, M.R. and Bhargavi, G.N. (1985). A role for glycosylation of the alpha subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. Science 229, 65-7.

[34] Walker, F. and Burgess, A.W. (1985). Specific binding of radioiodinated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to hemopoietic cells. Embo j 4, 933-9.

[35] Elliott, M.J., Moss, J., Dottore, M., Park, L.S., Vadas, M.A. and Lopez, A.F. (1992). Differential binding of IL-3 and GM-CSF to human monocytes. Growth Factors 6, 15-29.

[36] Walker, F. and Burgess, A.W. (1987). Internalisation and recycling of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic leukemia. J Cell Physiol 130, 255-61.

#### 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