

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。JCR ファーマ株式会社製の 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髄血液細胞を作用対象細胞として、メルセルロースを用いた半固形培地でのコロニーアッセーを実施し、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。従って、JCR ファーマ株式会社製の 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が、今後は Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF を私用するという選択肢も考慮する必要がある、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 JCR ファーマ株式会社が 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、JCR ファーマ株式会社が開発製造した 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、JCR ファーマ株式会社製の 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、 3×10^4 / 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。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。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。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。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。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、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。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。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で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。JCR ファーマ株式会社製の 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、ヒト骨髓血液細胞を対象としたメルセルロース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、JCR ファーマ株式会社製の 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

無し

2. 学会発表

1. 佐伯久美子、西尾美和子、中原正子、米代武司、佐伯晃一、長谷川護、阿久津英憲、梅澤明弘、安田和基、戸辺一之、窪田和雄、斉藤昌之、湯尾 明：ヒト多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞の造血ストロマ機能の評価。第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月、横浜。
2. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K: Classical brown adipocytes generated from human pluripotent stem cells: towards therapeutic development for the treatment of metabolic disorders. The 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2013, Boston, USA.
3. 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：PMA SK 法によるヒト褐色脂肪細胞分化誘導過程における転写制御ネットワーク解析。第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：血管平滑筋細胞の増殖を抑制する血管内皮細胞の検出方法

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、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

出願番号：特願 2013-115325

出願日：平成 25 年 5 月 31 日

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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

研究分担者 井上義一 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

研究要旨

現在難病対策事業は全般にわたって改革が求められ難病関連科学研究費の大幅な改革が予定されている。肺胞蛋白症の研究はこれまで世界をリードしながら成果を上げ予算を獲得して来た。平成 25 年度で、肺胞蛋白症（PAP）を含む殆どの難病研究班が終了し、本研究のようなプロジェクト単位の研究費（日本版 NIH 予算）が中心となる予定である。その中で政策医療的な難病研究班は、統合されたうえで学会との連携が求められている。平成 26 年度から、PAP のガイドライン作製等に関する研究は、びまん性肺疾患に関する研究班の中で扱われる。本 PAP 治療班はプロジェクト単位の研究班であり研究期間と予算は限られているが、その中で薬剤の選択、製薬メーカとの連携を密にしながら、PMDA の求めるデータを期間内に出して行かなければならない。同時に、これまでも研究班による研究組織を基盤として患者データベース準備と治験組織の準備が昼用である。一方、類似薬剤の開発情報を広く収集し我が国の研究体制をオープンとして我が国の PAP 患者の手元に一刻も早く安全で有効な薬剤が提供されることが望まれる。

A. 研究目的

我が国の難病対策事業は全般にわたって改革が求められ難病関連の科学研究費の大幅な改革が予定されている。肺胞蛋白症研究はこれまで世界をリードしながら成果を上げ予算を獲得して来た。本研究班では前臨床試験を実施中であるが、臨床治験の実施に向けても準備を進めている。現在の研究費と難病対策の状況、海外での GM-CSF 開発状況について調査し、我々の臨床治験へのスムーズな移行を目指す。

B. 研究方法

- (1) 難病研究体制の改革の予定と我が国の PAP 研究のこれまでの流れと今後の展望。
- (2) 海外の GM-CSF による PAP 試験の調査 (Clinical Trial.gov)。

（倫理面への配慮）

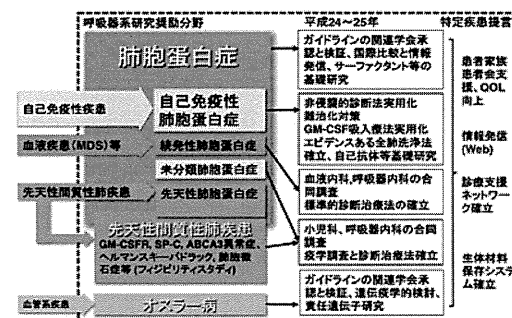
本調査では、患者への介入を伴わず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果と考察

- (1) 現在難病対策事業は全般にわたって改革が

求められ難病関連科学研究費の大幅な改革が予定されている。肺胞蛋白症の研究はこれまで世界をリードしながら成果を上げ予算を獲得して来た。平成 24～25 年 PAP は「難治性稀少肺疾患（肺胞蛋白症、先天性間質性肺疾患、オスラー病）に関する調査研究」（H24 一 難治等（難）一 一般-035）等出研究を実施してきた（図 1）。

図 1 難治性稀少肺疾患（肺胞蛋白症、先天性間質性肺疾患、オスラー病）に関する調査研究の概要。



これらの研究を含む、難病研究班は、平成25年度で殆どが終了し、プロジェクト単位の研究費を主体とした日本版NIH予算に変わっていく予定である。その中で政策医療的な難病研究班は、統合されたうえで学会との連携が求められている。平成26年度から、PAPのガイドライン作製等に関する研究は、びまん性肺疾患に関する研究班の中で扱われる。本PAP治療班はプロジェクト単位の研究班であり研究期間と予算は限られているが、その中で薬剤の選択、製薬メーカーとの連携を密にしながら、PMDAの求めるデータを期間内に出して行かなければならない。同時に、これまでも研究班による研究組織を基盤として患者データベース準備と治験組織の準備が昼用である。一方、類似薬剤の開発情報を広く収集し我が国の研究体制をオープンとして我が国のPAP患者の手元に一刻も早く安全で有効な薬剤が提供されることが望まれる。

- (2) 表1に海外における肺胞蛋白症を対象としたGM-CSF治療治験(全てSargramostim)を列挙する(Clinical Trial.gov掲載分)。これ以外にも臨床治験実施計画の予定がある(Molgramostim, Ph2&3)

表1 海外における肺胞蛋白症を対象としたGM-CSF治療治験。

Title	Sponsor	Drug	Phase, Clin.Trials.gov Identifier	Start
Inhaled Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP) (FAMPAP)	Children's Hospital Medical Center, Cincinnati PI: Bruce Trapnell, MD	Sargramostim (Leukine, Genzyme, a Sanofi Co), Inhaled	Ph.2, NCT01511068	2012
GM-CSF in Patients With Pulmonary Alveolar Proteinosis	FDA Office of Orphan Products Development Contact: Mani S. Kavuru, M.D.	Sargramostim Injections, Subcutaneous	Ph.2, NCT00030056	2001
Whole Lung Lavage (WLL)/Inhaled Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) in Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP)	IRCCS Policlinico S. Matteo, PI: Maurizio Luisetti, MD	Sargramostim, Inhaled	Oh.2&3, NCT00901511	2009
Study of Subcutaneous Injection of Low-dose	Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai,	Sargramostim, Injections, Subcutaneous	Ph.2 NCT01983657	2012

rhGM-CSF +/- WLL in PAP	China, P.I. Huiping Li, Dr			
-------------------------	----------------------------	--	--	--

D. 結論

我が国の難病対策の変革の流れの中で、PAP研究費を確実に獲得し、製薬企業、公的機関(PMDA等)、患者および患者会と十分に連携を取る事が必要である。これらの情報と連携を取ることで、試験を進め、PAP患者の手元に安全かつ有効な薬剤が提供されることが望まれる。

E. 健康危険情報

該当無し。

F. 研究発表

I. 論文発表(〇〇件)

- (1) Arai T, Inoue Y, Sugimoto C, Inoue Y, Nakao K, Takeuchi N, Matsumuro A, Hirose M, Nakata K, Hayashi S. CYFRA 21-1 as a disease severity marker for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Respirology*. 2013 Nov 20. doi: 10.1111/resp.12210. [Epub ahead of print]
- (2) 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, Ichihata 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, 2014.
- (3) Handa T, Nakatsue T, Baba M, Takada T, 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.
- (4) 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
- (5) 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 (κ/λ) ratio of

GM-CSF autoantibodies is associated with disease severity in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis Clin Immunol. 2013 Dec;149(3):357-64.

- (6) Lisa R Young, Hye-Seung Lee, Yoshikazu Inoue, Joel Moss, Lianne G Singer, Charlie Strange, Koh Nakata, Alan F Barker, Jeffrey T Chapman, Mark L Brantly, James M Stocks, Kevin K Brown, Joseph P Lynch 3rd, Hilary J Goldberg, Gregory P Downey, Jeffrey J Swigris, Angelo M Taveira-DaSilva, Jeffrey P Krischer, Bruce C Trapnell, Francis X McCormack, for the MILES Trial Group. 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. The Lancet Respiratory Medicine, 2013;1(6):445-452
- (7) Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 188 (6): 733-748, 2013.
- (8) Tokura S, Okuma T, Akira M, Arai T, Inoue Y, Kitaichi M. Utility of expiratory thin-section CT for fibrotic interstitial pneumonia. Acta Radiologica. 2013 DOI: 10.1177/0284185113512300.
- (9) Yoshinobu Matsuda, Kazunobu Tachibana, Yumiko Sasaki, Kazunari Tsuyuguchi, Masanori Kitaichi, Yoshikazu Inoue. Tracheobronchial lesions in eosinophilic pneumonia. Respiratory Investigation., 2013 (on line, in press)
- (10) Swigris JJ, Lee HS, Cohen M, Inoue Y, Moss

J, Singer L, Young LR, McCormack FX. St. George's Respiratory Questionnaire has Longitudinal Construct Validity in Lymphangiomyomatosis. Chest. 143(6):1671-8, 2013

- (11) Horiuchi-Yamamoto Y, Gemma A, Taniguchi H, Inoue Y, Sakai F, Johkoh T, Fujimoto K, Kudoh S. Drug-induced lung injury associated with sorafenib: analysis of all-patient post-marketing surveillance in Japan. Int J Clin Oncol 18(4):743-9, 2013
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

II. 学会発表

A. 国際学会 (〇〇件)

- (1) Hirose M, Matsumuro A, Arai T, Sugimoto C, Kohashi Y, Tachibana K, Kitaichi M, Akira M, Okada M, Inoue Y. Serial evaluation of serum biomarkers in the fatal cases with lymphangiomyomatosis, 16th Annual the LAM Foundation International Research Conference 2013, Cincinnati, OH, 2013/4/12
- (2) T. Ichihata, S. Ohishi, K. Uchida, Y. Inoue, T. Arai, H. Ishii, K. Nakata ; Surveillance of whole lung lavage for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan European Respiratory Society Annual Congress Barcelona (Spain) 2013 2013. 9. 7~9. 11
- (3) Inoue Y, Hirose M, Matsumuro A, Arai T, Sugimoto C, Kohashi Y, Matsuda Y, Takeuchi N, Hirooka A, Tachibana K, Kitaichi M, Akira M, Okada M, Hayashi S. Outcome of patients with lymphangiomyomatosis treated with sirolimus, 16th Annual the LAM Foundation International Research Conference 2013, Cincinnati, OH, 2013/4/12
- (4) Nakata K, Inoue Y, Seyama K, Tazawa R, Takada T, Mikami A, Yoshizawa H, Nagai K, Tamada T, Hayashida M, Hirai T, Hattori N, Watanabe N. Multicenter Lymphangiomyomatosis Sirolimus Trial for Safety (MLSTS) in Japan, 16th Annual the LAM Foundation International Research Conference 2013, Cincinnati, OH, 2013/4/12
- (5) Nakatani T, Arai T, Kitaichi M, Tachibana K, Tsuyuguchi K, Sugimoto C, Hirooka A, Kohashi Y, Tsuji T, Minomo S, Takeuchi N, Matsuda Y, Akira M, Haya

- shi S, Inoue Y. High Frequency Of Usual Interstitial Pneumonia Pattern In The 14 Cases Of Pleuroparenchymal Fibroelastosis In A Surgical Lung Biopsy Series [Poster Board # E84], American Thoracic Society International Conference 2013, Philadelphia, 2013/5/17-22, Am J Respir Crit Care Med 2013;187:A1474
- (6) 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 [Poster Board # C4], American Thoracic Society International Conference 2013, Philadelphia, 2013/5/17-22, Am J Respir Crit Care Med 2013;187:A2851
- (7) Inoue Y, Arai T, Nakata K, Yamaguchi E, Ichihata 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 T, Tsuyuguchi K. Longitudinal Cohort Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis [Poster Board # C5], American Thoracic Society International Conference 2013, Philadelphia, 2013/5/17-22, Am J Respir Crit Care Med 2013;187:A2852
- (8) Tsuyuguchi K, Yoshida S, Nakatani T, Inoue Y, Suzuki K, Okada M, Hayashi S. Clinical Features Of Mycobacterium Kansasii Pulmonary Disease [Poster Board # 409], American Thoracic Society International Conference 2013, Philadelphia, 2013/5/17-22, Am J Respir Crit Care Med 2013;187:A5107
- (9) Inoue Y, Nakatani T, Arai T, Kitaichi M. Pleuroparenchymal Fibroelastosis: Comparison with Idiopathic Pulmonary Upper Lobe Fibrosis, THE FLEISCHNER SOCIETY 44th ANNUAL MEETING, Jeju Island, South Korea, 2013/6/12-14
- (10) Kagawa T, Arai T, Sugimoto C, Tachibana K, Tuji T, Matsuda Y, Sasaki Y, Sugawara R, Inoue Y, Fujita Y, Teramoto T, Kitaichi M, Hayashi S, Inoue Y. Clinical significance of hemosiderin-laden macrophages in bronchoalveolar lavage fluids of patients with idiopathic interstitial pneumonias/P2325, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY ANNUAL CONGRESS 2013, BARCELONA, SPAIN, 2013/9/9
- (11) Ichikawa T, Ohishi S, Ushida K, Inoue Y, Arai T, Ishii H, Nakata K. Surveillance of whole lung lavage for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan/P2356, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY ANNUAL CONGRESS 2013, BARCELONA, SPAIN, 2013/9/9
- (12) Inoue Y, Azuma A, Ogura T, Taniguchi H, Chida K, Bando M, Niimi Y, Kaku-tani S, Suga M, Sugiyama Y, Kudoh S, Nukiwa T. All-case post-marketing surveillance (PMS) of pirfenidone in Japan: Clinical characteristics, efficacy and safety profile in >1300 patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/P3369, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY ANNUAL CONGRESS 2013, BARCELONA, SPAIN, 2013/9/9
- (13) Arai T, Inoue Y, Tachibana K, Sugiyama C, Kagawa T, Inoue Y, Kitaishi M, Okumura T, Akira M, Hayashi S. High-resolution computed tomography pattern reflects pathophysiologic differences in acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia/P3371, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY ANNUAL CONGRESS 2013, BARCELONA, SPAIN, 2013/9/10
- (14) Sugimoto C, Arai T, Kitaichi M, Akira M, Hirooka A, Minomo S, Hayashi S, Inoue Y. Smoking status and long term clinical outcome in patients with pulmonary Langerhans cell histiocytosis /P3820, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY ANNUAL CONGRESS 2013, BARCELONA, SPAIN, 2013/9/10
- (15) Taniguchi H, Kudoh S, Ando M, Ohe Y, Nakagawa K, Arakawa H, Ebina M, Inoue Y, Genna A, Kusumoto M, Kuwano K, Sakai F, Johkoh T, Fukuda Y, Kiyohara Y, Yamazaki N, Seki A, Fukuoka M. Incidence of interstitial lung disease (ILD) and risk factors for developing ILD: A final analysis of a large-scale erlotinib Japanese surveillance study in non-small-cell lung cancer

(SCLC)/P5124, EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY ANNUAL CONGRESS 2013, BARCELONA, SPAIN, 2013/9/11

- (16) Kuwano K, Kudoh S, Ando M, Ohe Y, Nakagawa K, Yamazaki N, Arakawa H, Inoue Y, Ebina M, Kusumoto M, Gemma A, Sakai F, Johkoh T, Taniguchi H, Fukuda Y, Seki A, Fukuoka M. Investigation of risk factors for developing interstitial lung disease (ILD) and poor prognostic factors for ILD death in Japanese patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC): a final analysis of a large-scale erlotinib surveillance study (POLARSTAR), 15th World Conference on Lung Cancer, Sydney, Australia, 2013/10/28
- (17) Hirose M, Matsumuro A, Arai T, Sugimoto C, Kohashi Y, Tachibana K, Kitaichi M, Akira M, Okada M, Inoue Y. PS203. Retrospective Analysis Of The Patients With Lymphangiomyomatosis, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/11
- (18) Sugiyama Y, Inoue Y. <Chares> Assembly Symposium5 Interstitial Lung Disease When and how should we treat IPF? : Past and present, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/11
- (19) Costabel U, Inoue Y. <Chairs> Congress Symposium4 Rare Lung Diseases Recent advances in rare lung diseases, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/12
- (20) Matsuda Y, Tachibana K, Tamura T, Nakao K, Sasaki Y, Sugimoto C, Arai T, Tokoro A, Inoue Y. OS106. Continuous Subcutaneous Injection Of Morphine For Dyspnea In Patients With Terminal Stage Interstitial Pneumonias, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/12
- (21) Ishii H, Nakata K, Tazawa R, Inoue Y. OS122. Clinical Characteristics Of Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis Complicated With Myelodysplastic Syndrome In Japan, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory

Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/12

- (22) Inoue Y, Ando M, Ohe Y, Nakagawa K, Yamazaki N, Arakawa H, Ebina M, Kuwano K, Kusumoto M, Gemma A, Sakai F, Johkoh T, Taniguchi H, Fukuda Y, Seki A, Fukuoka M, Kudoh S. OS129. Poor Prognostic Factors For Interstitial Lung Disease (ILD) -Related Death In Japanese Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients In The Polarstar Study, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/12
- (23) Inoue Y. CB6-1. Update of the International Multidisciplinary Classification of the IIPs: Roles of Biomarkers, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/12
- (24) Matsumuro A, Hirose M, Arai T, Sugimoto C, Kohashi Y, Kitaichi M, Akira M, Hayashi S, Okada S, Inoue Y. PS420. Measurement Of Inflammatory Cytokines By Multicytokine Assay In Patients With Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiratory Final Program, Yokohama, Japan, 2013/11/12

B. 国内学会 (18件) 省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
発明の名称：バイオマーカー
発明者：井上義一、熊ノ郷淳、木田博
出願日：2013年3月18日
出願番号：特願2013-55358
出願人：国立大学法人大阪大学
発明の内容の概要：非特異的間質性肺炎の診断を簡便かつ高精度に行うことを可能とするバイオマーカーの開発
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
特記事項無し

生体におけるGM-CSF生物活性測定に関する研究

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

研究要旨

本研究で目指す GM-CSF 製剤の治療的臨床適用では、GM-CSF の生物活性をモニタリングすることが必須である。本分担研究では、GM-CSF の生物活性を測定する簡便で再現性の良い方法として、全血中の好中球表面に発現する接着因子 CD11b を定量して、GM-CSF 刺激を加えることでそれが上昇する現象を測定する、CD11b stimulation index を開発した。好中球表面の CD11b は様々な実験上の因子でも変動しうるため、再現性の良い条件を検討し、自己免疫性肺胞蛋白症患者の診断ツールとしての有用性を検討した。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、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。

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に関わっていることがほぼ証明されている。本研究班では、昨年度より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おり、その生物活性の測定方法の開発が必要である。

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。我々は、GM-CSF 刺激を受けた好中球が、細胞表面上の接着因子 CD11b の発現量を上昇させる現象を、フローサイトメトリー法を用いて測定する、CD11b 刺激係数 (CD11b Stimulation Index) を開発した。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

昨年度本方法を用いて GM-CSF 製剤の生物活性を測定し、JCR-GM-CSF が、大腸菌由来や酵母菌由来のリコンビナント GM-CSF と遜色のない

生物活性を持つことを示した。今回本方法を、肺胞蛋白症患者の診断ツールとして確立するべく、理想的条件や診断閾値を検討した。

B. 研究方法

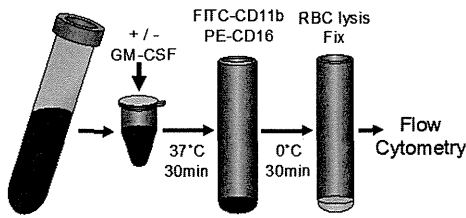
健常ボランティア 38 名、特発製肺胞蛋白症患者 10 名よりヘパリンまたは EDTA によって抗凝固された全血を用いた。

採血後全血の保存条件を 0, 25, 37°C で好中球表面上の CD11b の変化を観察した。またそれに伴う、CD11b 刺激係数の変化を観察した。それぞれの温度から 37°C へ温度変化を起こした時の変化も検討した。

また、抗凝固薬のヘパリンと EDTA との違い、さらに赤血球溶血剤の影響を検討した。

また、細胞内の CD11b の量を同じく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 μ l 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 (図 1, 2) を CD11b stimulation index (CD11bSI) と定義し、38 名の健常者と 10 名の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。



Phlebotomy

図 1. 採血から測定までの流れ

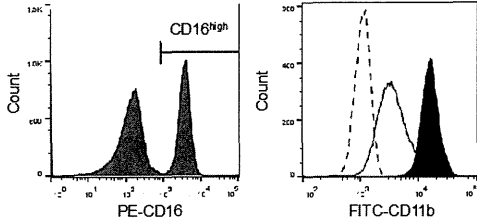


図 2. (左)CD16^{high} 集団(好中球), (右)その表面上の CD11b 発現量(破線:isotype control, 実線:基礎値, 塗りつぶし:GM-CSF 刺激後の値)。

(倫理面への配慮)

健康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、被験者の同意を文書で取得したのち採血した。データは連結可能匿名化され、個人情報とは公開されない。

C. 研究結果

採血後、室温で保存すると、2 時間程度で好中球表面上の CD11b が上昇を始め、それに伴って、CD11bSI は有意に低下した (図 3)。また、採血後 1 日以上経過すると、CD11bSI は 100 を大幅に下回ったが、採血後すぐに刺激、染色を行って、固定すると 5 日間は測定可能であった (図 4)。0°C で保存すると、好中球表面上の CD11b 基礎値の上昇は抑制された (図 3A) が、その後 37°C に上昇させると著明に CD11b が上昇し、温度変化が細胞表面の CD11b 上昇を引き起こすことが明らかとなった (図 5)。

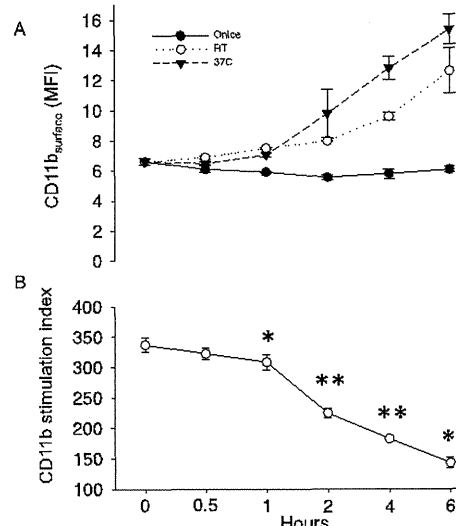


図 3. 採血後の CD11b 基礎値の変化(A)と CD11bSI の動き (B)

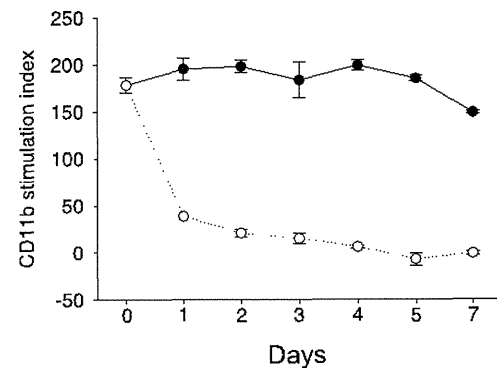


図 4. 採血後の CD11bSI の変化

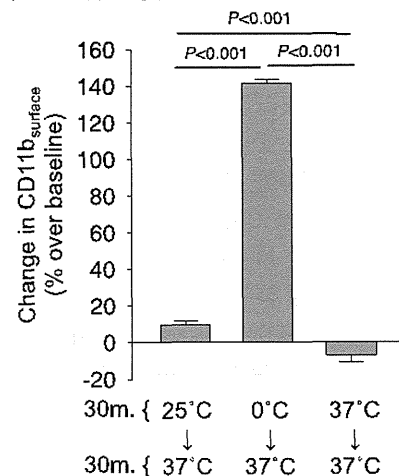


図 5. 温度変化と CD11b 基礎値の変化 (%)

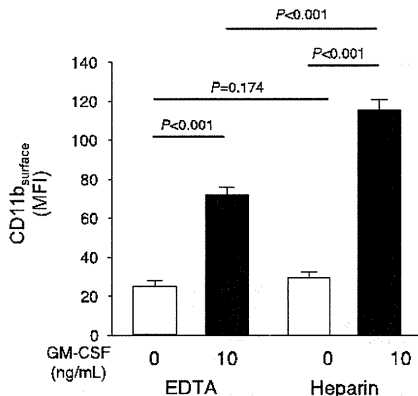


図 6. 抗凝固薬による CD11b の値の違い

抗凝固薬の EDTA を用いると、GM-CSF 刺激を行った際の CD11b 上昇が低く抑えられ、CD11b の細胞表面の上昇が Ca イオンを介していることが示唆された (図 6)。

さらに、細胞内と細胞外の CD11b を別々の蛍光物質をもつ抗 CD11b 抗体で染色すると、細胞内に細胞外よりも大量の CD11b が存在しており、GM-CSF 刺激で細胞内 CD11b が細胞外へシフトしていることが示唆された (図 7A)。細胞内外の CD11b をあわせた total CD11b は有意差が無かった (図 7B, C)。

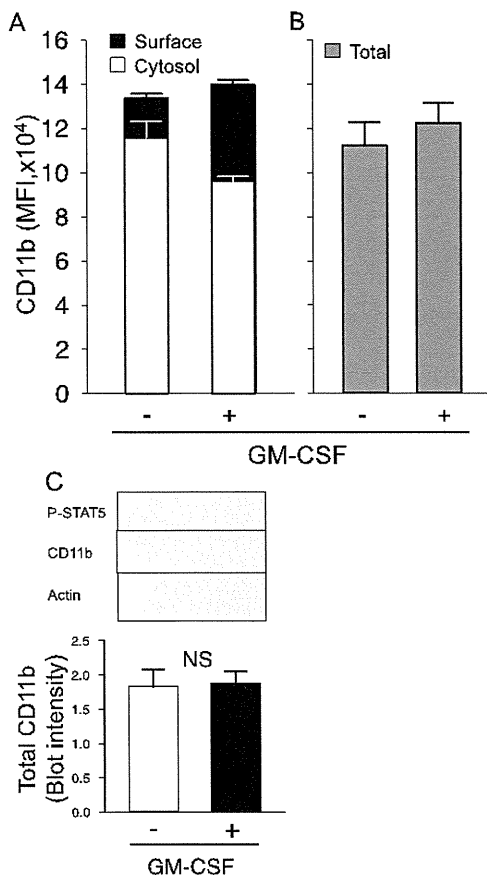


図 7. 細胞内外の CD11b の量 (A, B) フローサイトメトリー法, (C) ウェスタンブロッティング法。

自己免疫製肺胞蛋白症患者は健常者と比較して、CD11bSI が有意に低く (図 8)、今回行ったパイロットスタディでは、112 という数値が、診断の sensitivity, specificity 共に 100% であった (図 9)。

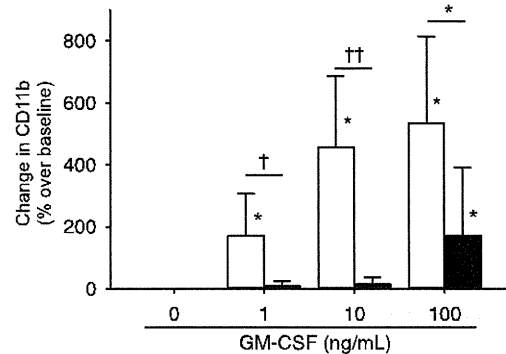


図 8. CD11b 変化率 (%). 白: 健常者、黒: 自己免疫製肺胞蛋白症

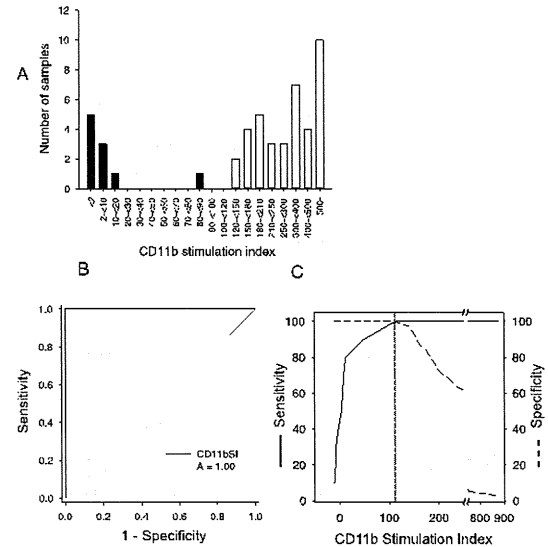


図 9. A. CD11bSI のヒストグラム。白: 健常者、黒: 自己免疫製肺胞蛋白症。B, C, AUC 曲線、112 を診断閾値とすると感度、特異度が 100% となる。

D. 考察

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これまでも知られていたが、その定量には測定条件が大きく影響し、これまで実用化されていなかった。

自己免疫性肺胞蛋白症患者の血清中に高濃度存在する抗 GM-CSF 自己抗体は、antigen-capture assay である ELISA 法で測定可能である。しかしこの測定法は定量に必要な標準抗体が存在する施設でしか測定が不可能であり、本研究で開発、評価した方法は、稀少な測定試薬を必要とせず、かつ採血後 2 時間程度で結果を得ることができるため、今後 GM-CSF の臨床応用の際に、GM-CSF の生物活性をモニタリ

ングする上でも強力なツールとなりうると考えられる。

好中球表面上の CD11b はその他の炎症性疾患でも上昇することが知られており、今後はこうした疾患群との違いをより詳細に検討して行く必要がある。

E. 結論

本方法は、適切にコントロールされた実験環境で行えば、再現性が高い結果が得られ、GM-CSF 生物活性を簡便に短時間で測定することができる。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

I. 論文発表（4件）

1. Uchida K, Yasunaga H, Sumitani M, Horiguchi H, Fushimi K, Yamada Y. Effects of Remifentanyl on In-hospital Mortality and Length of Stay Following Clipping of Intracranial Aneurysm: A Propensity Score Matched Analysis. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2014 Feb 5. Epub ahead of print
2. Nakamura M, Uchida K, Akahane M, Watanabe Y, Ohtomo K, Yamada Y. Effects on Gastric Emptying and Carbohydrate Loading of an Oral Nutritional Supplement and an Oral Rehydration Solution: A Crossover Study with Magnetic Resonance Imaging. *Anesthesia and Analgesia.* 2013 Dec 31. Epub ahead of print
3. 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.* 2014. 402:57-70
4. Sumitani M, Yasunaga H, Uchida K, Horiguchi H, Nakamura M, Ohe K, Fushimi K, Matusda S, Yamada Y. Perioperative factors affecting the occurrence of acute complex regional pain syndrome following limb bone fracture surgery: Data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *Rheumatology.* 2013 Dec 24. Epub ahead of print

II. 学会発表

A. 国際学会（1件）

Kusakabe Y, Uchida K, Yamamura Y, Suzuki Y, Hiruma T, Yamada Y. Effect Of Interferon Beta On Survival For Murine Polymicrobial Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 187:2013:A1315

国内学会（2件）

1. 日下部良臣, 内田寛治, 鈴木洋子, 山村睦朗, 比留間孝広, 山田芳嗣. マウス敗血症モデルでインターフェロン β は生存率を改善する。日本麻酔科学会第60会学術集会. 2013年5月23日. 札幌市
2. 前川真基, 中村誠, 内田寛治, 山田芳嗣. 経口補水液と経口栄養サプリメントの補水効果及び糖負荷効果の比較。日本麻酔科学会第60会学術集会. 2013年5月23日. 札幌市

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
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
布村 由香 日本獣医生命科学大学 研究補助

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上市されており、ほ乳動物細胞由来 huGM-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、GM-CSF が多面的な生理作用を持っていることから、増殖活性以外の活性も、比較検討することが望ましい。このような、観点から、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、GM-CSF の末梢血顆粒球の CD11b 発現増強作用を指標に、活性を測定した。本年度の研究では、ヒトの最適モデルとして使用されるマカク属サル使用の妥当性と、huGM-CSF の活性・毒性試験を行うのに、サル以外の動物を使用することが可能かを調べた。まず検討した齧歯類、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、molgramistim 1/8, sargramostim 1/26, CHO 由来 GM-CSF で 1/624 と、CHO 細胞由来 GM-CSF で、有意な低活性が認められた。

A. 研究目的

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。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調べるために、平成 25 年度はラット、ウサギ、ネコ、サルを用いて本研究を行った。

B. 研究方法

実験動物業者（NAS 研究所）よりカニクイザルのヘパリン血液を購入、採血後 1 時間以内に使用した。すなわち、ヘパリン血 100 μ l に各種濃度の各 GM-CSF を加え、37 $^{\circ}$ 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。

（倫理面への配慮）

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。

C. 研究結果

ラットではマウス・ラットのリコンビナント GM-CSF 刺激で CD11b の発現が増加するが、ED₅₀ を計算できるほど明確な用量対反応を検出できなかった。

ウサギの CD11b 発現はヒトの GM-CSF で発現増加した。その ED₅₀ はサルの ED₅₀ に比べ、molgramistim 1/8, sargramostim 1/26, CHO 由来 GM-CSF で 1/624 と、CHO 由来 GM-CSF の活性が有意に低かった (P<0.05、図 1、表 1)。

図 1 ウサギの末梢血顆粒球発現における各種ヒト型 GM-CSF の影響 (ED₅₀ 値)

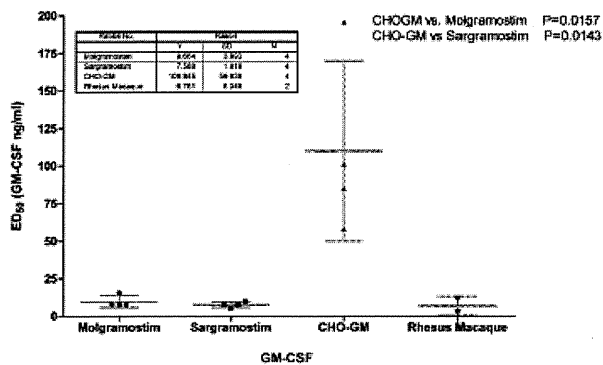
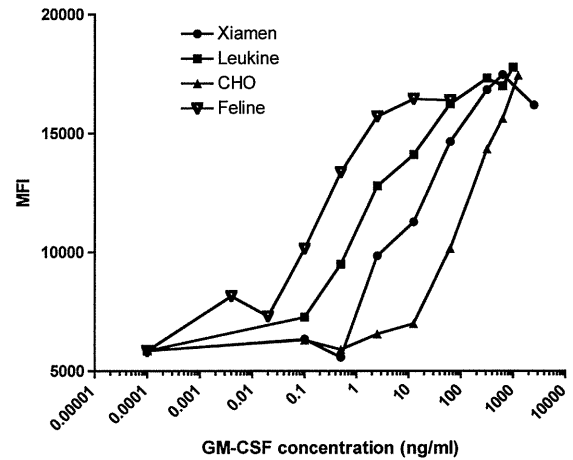


表 1 各種動物末梢血顆粒球の CD11b 発現増強を指標とした由来別 huGM-CSF の ED₅₀ 値 (ng/ml)

	Molgramostim	Sargramostim	CHO 由来
サル	0.170	0.287	0.176
ウサギ	9.664	7.588	109.8
ネコ	10.25	1.73	139.5

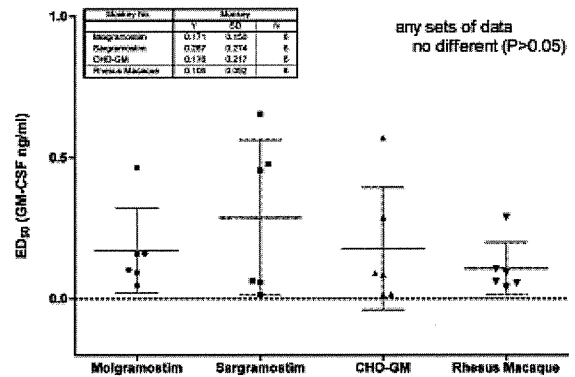
一頭のみ結果ではあるが、ネコの末梢血顆粒球でも同様の傾向が見られた (表 1)。

図 2 ネコの末梢血顆粒球発現における各種ヒト型 GM-CSF の用量-反応グラフ



各由来 huGM-CSF によるカニクイザル末梢血顆粒球の CD11b 発現増強を測定したところ、3 種 GM-CSF の ED₅₀ 値に有意差を認めなかった (P>0.05、図 2、表 1)。また、アカゲザルのリコンビナント GM-CSF と比較しても、有意差を認めなかった (P>0.05、図 2)

図 2 カニクイザルの末梢血顆粒球発現における各種ヒト型 GM-CSF の影響 (ED₅₀ 値)



D. 考察

昨年度のマウスの成績と本年度のラットの結果から見ると、現在のところ、CD11b を用いた方法では、ヒト型 GM-CSF の活性測定には齧歯目 (ラット・マウス) を用いることが困難であると考えられる。一方、ヒト型 GM-CSF をカニクイザルの CD11b 発現で測定した場合、十分な活性を示すことから、本製剤の活性を、サルを用い

て測定することに十分な妥当性があると考ええる。

一方、ウサギやネコ末梢血顆粒球（イヌ）の CD11b 発現増強を測定した場合、CHO 細胞由来 GM-CSF の活性は他の GM-CSF の 1/10 近くまで低下してしまう。このことは GM-CSF の糖鎖結合量の違いの影響と推定されるが、GM-CSF とその受容体との適性度が低いほど糖鎖修飾の影響を受けやすいのかも知れない。糖鎖の影響の程度をヒトに外挿する上で、質量分析と合わせて、有用な道具になると考える。

E. 結論

ヒト型 GM-CSF の活性を測定する上で、CD11b 発現増強を測定する方法は有益な情報を与えてくれた。この検査法では、齧歯目の動物は適さない。ヒト型 GM-CSF の活性測定のためには、サルが最も妥当性のあるモデル動物であるが、ウサギやイヌ、ネコも別な角度から、有益であると考えられる。

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、本研究終了後に予定されている承認申請へ向けた臨床試験（医師主導治験など）の実施に向けた検討を行った。

A. 研究目的

本研究後の臨床試験（医師主導治験など）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

肺胞蛋白症について実施されている他試験の情報収集に加え、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例未満の希少疾病であり、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治性疾患であるが、海外で承認されている薬剤を用いた医師主導治験が順調に行われている。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

I. 論文発表（7件）

1. Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, **Inoue A**, et al. Effectiveness of Gefitinib against Non-Small-Cell Lung Cancer with the Uncommon EGFR Mutations G719X and L861Q. **J Thorac Oncol** 2014; 9: 189-94.

2. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, **Inoue A**, et al. LUX-Lung 4: A Phase II Trial of Afatinib in Patients with Advanced, Non-Small Cell Lung Cancer who Progressed on Prior Treatment with Erlotinib, Gefitinib, or Both. **J Clin Oncol** 2013; 31: 3335-41.

3. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, **Inoue A**, et al. Efficacy and safety of the selective ALK inhibitor CH5424802/RO5424802 in patients with ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer: a phase I/II study (AF-001JP study). **Lancet Oncol** 2013; 14: 590-8.

4. Sugawara S, Maemondo M, Tachihara M, **Inoue A**, et al. Randomized Phase II Trial of Uracil/tegafur and Cisplatin Versus Vinorelbine and Cisplatin with Concurrent Thoracic Radiotherapy for Locally Advanced Unresectable Stage III Non-small-cell Lung Cancer : NJLCG 0601. **Lung Cancer** 2013; 81: 91-6.

5. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, Tan EH, Ho JC, Chu da T, Zaatar A, Osorio Sanchez JA, Vu VV, Au JS, **Inoue A**, et al. Impact of epidermal growth factor receptor inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. **J Natl Cancer I** 2013; 105: 595-605.

6. Akamatsu H, **Inoue A**, Mitsudomi T, et al. Interstitial Lung Disease associated with Gefitinib in Japanese Patients with EGFR Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Combined analysis of two phase III trials (NEJ 002 and WJTOG 3405). **Jpn J Clin Oncol** 2013; 43: 664-8.

7. Yanagisawa S, **Inoue A**, Koarai A, et al. Successful crizotinib retreatment after crizotinib-induced interstitial lung disease. **J Thoracic Oncol** 2013; 8: e73-4.

II. 学会発表

A. 国際学会 (3件)

1. **Inoue A**, et al. Individualized dose adjustments facilitate continuous

treatment with afatinib, allowing patients (pts) with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy and erlotinib or gefitinib to maintain clinical benefit. **ESMO** 2013, Amsterdam, abst 3478.

2. **Inoue A**, et al. Phase II study of S-1 plus irinotecan for EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) resistant to both platinum-based chemotherapy and EGFR-TKI: NJLCG0804. **WCLC** 2013, Sydney. abst 1373.

3. **Inoue A**, et al. One-year follow-up of a Phase I/II study of a highly selective ALK inhibitor CH5424802/RO5424802 in ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **WCLC** 2013, Sydney. abst 2591.

B. 国内学会 (1件)

1. **井上彰**: EGFR-TKI の現状と展望. 第53回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 11、東京、2013、4月

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

III. 項目別研究報告

生体における GM-CSF 生物活性測定に関する研究

東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター

内田寛治

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、昨年度より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。我々は、GM-CSF 刺激を受けた好中球が、細胞表面上の接着因子 CD11b の発現量を上昇させる現象を、フローサイトメトリー法を用いて測定する、CD11b 刺激係数（CD11b Stimulation Index）を開発した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

昨年度本方法を用いて GM-CSF 製剤の生物活性を測定し、JCR-GM-CSF が、大腸菌由来や酵母菌由来のリコンビナント GM-CSF と遜色のない生物活性を持つことを示した。今回本方法を、肺胞蛋白症患者の診断ツールとして確立するべく、理想的条件や診断閾値を検討した。

対象と方法

健常ボランティア 38 名、特発製肺胞蛋白症患者 10 名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。

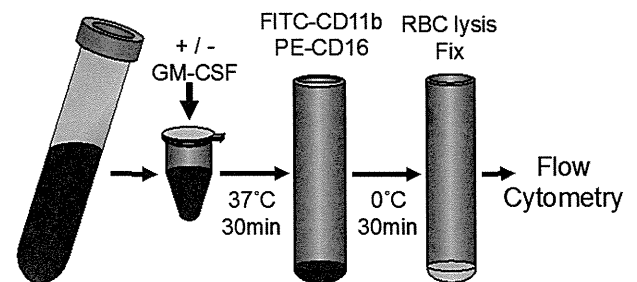
採血後全血の保存条件を 0, 25, 37°C で好中球表面上の CD11b の変化を観察した。またそれに伴う、CD11b 刺激係数の変化を観察した。それぞれの温度から 37°C へ温度変化を起こした時の

変化も検討した。

また、抗凝固薬のヘパリンと EDTA との違い、さらに赤血球溶血剤の影響を検討した。

また、細胞内の CD11b の量を同じく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低量し、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 μ l 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（図 1, 2）を CD11b stimulation index (CD11bSI) と定義し、38 名の健常者と 10 名の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。



Phlebotomy

図 1. 採血から測定までの流れ

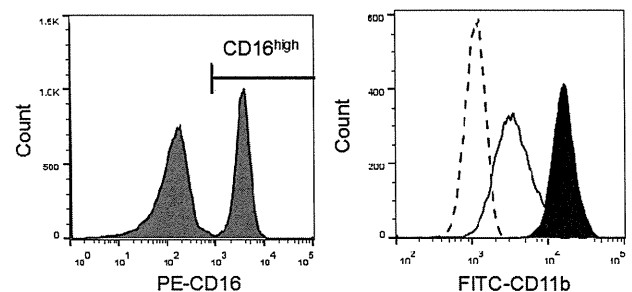


図 2. (左) CD16^{high} 集団(好中球), (右) その表面上の CD11b 発現量(破線: isotype control, 実線: 基礎値, 塗りつぶし: GM-CSF 刺激後)。

結果

採血後、室温で保存すると、2 時間程度で好中球表面上の CD11b が上昇を始め、それに伴って、CD11bSI は有意に低下した（図 3）。また、