

201409004B (1/2)

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）

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験

(H24- 臨研推 - 一般 - 003)

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

(1/2 冊)

研究代表者 田澤 立之

平成 27 (2015) 年 5 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）

肺胞蛋白症の吸入治療のための新規 GM-CSF 製剤の非臨床試験

（H24 - 臨研推 - 一般 - 003）

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

（1/2 冊）

研究代表者 田澤 立之

平成 27（2015）年 5 月

目次

I. 総合研究報告書

- 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----- 1
田澤立之

II. 総合研究報告書（研究分担者）

1. サル肺胞マクロファージを用いた、*in vitro* での PAP 患者肺胞内の再現の試み----- 14
中田 光
2. GM-CSF 薬理試験の検討----- 25
湯尾 明
3. 指定難病肺胞蛋白症の認定基準紹介と
GM-CSF 吸入治療開発の海外の動向に関する報告----- 28
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----- 33
内田寛治
5. 種間での GM-CSF 薬理効果の検討に関する研究----- 37
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----- 41
井上 彰

III. 項目別研究報告

1. 指定難病肺胞蛋白症の認定基準紹介と GM-CSF 吸入治療開発の海外の動向に関する報告--45
井上義一
2. カニクイザルでの GM-CSF 吸入単回投与による薬物動態についての検討----- 47
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
3. 6 カ月間反復吸入投与毒性試験についての検討----- 56
田澤立之, 中垣和英, 中田光
4. 自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入製剤の医師主導治験についての検討----- 60
田澤立之 北村信隆 田中崇裕 白井久美子 上田隆宏 井上彰 井上義一 中田光

IV. 資料

1. 26 週反復吸入投与毒性試験計画書案----- 67
2. 自己免疫性肺胞蛋白症に対する GM-CSF 吸入製剤の医師主導治験実施計画書案----- 89
3. GM-CSF 吸入製剤の日本人健常成人男性における非遮蔽化薬物動態調査
に関する手順書案-----126

V. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 156

I . 総合研究報告書

総合研究報告書

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)

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：自己免疫性肺胞は、蛋白症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肺胞マクロファージのサーファクタント除去能の低下により呼吸不全を生じる稀少肺疾患で、新規治療薬として本邦未承認のヒトリコンビナント GM-CSF 製剤の吸入薬開発に向けた非臨床試験の方法を考えるため、CHO 細胞由来製剤および酵母由来製剤の関連企業と連携して、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、以下の結果を得た。①CHO 細胞、酵母、大腸菌由来の 3 製剤の比較では、コロニーアッセイではほぼ同等の活性をもち、②CHO 細胞由来製剤は質量分析で糖鎖修飾が多く、患者由来 GM-CSF 抗体との avidity はやや低いが、GM-CSF 依存性細胞株の生残率は高く、シアリダーゼ処理による検討で、シアリル化糖鎖のため細胞への結合・内在化・分解が遅れ生理活性が持続する可能性が示され、③好中球表面の CD11b 発現量および STAT5 のリン酸化反応の評価でも、上記 3 製剤ほぼ同等の活性をもち、④ヒト GM-CSF の他の動物種の末梢血顆粒球への作用の検討では、マウス末梢血顆粒球への活性はないが、イヌおよびウサギ末梢血顆粒球の CD11b の発現増強がみられ、⑤カニクイザルへの GM-CSF 製剤の気管内噴霧、膜型ネブライザー、ジェットネブライザーによる単回投与試験では、いずれの方法でも血中 GM-CSF 濃度推移・薬物動態解析が可能で、⑥大腸菌製剤および CHO-GMCSF のカニクイザルへの 12 週間の間欠的経気道反復投与を 3 コース行い、血中で抗 GM-CSF 抗体が検出され、泡沫状肺胞マクロファージの出現等がみられ、この抗体の中和活性については個体差が大きいことが示された。以上の結果および酵母由来製剤の製造企業の協力を得て、医薬品・医療機器総合機構の薬事戦略相談での事前相談、対面助言を受け、6 カ月間反復吸入投与毒性試験計画、検証試験実施計画、健常成人での薬物動態試験計画を策定し、日本医療研究開発機構研究費へ分担研究者の中田を研究代表者としての応募がなされ、幸いに採択され、平成 27 年度よりこれらの試験を開始の予定である。

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、肺胞の表面張力を減じるの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に進む稀少肺疾患である。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。手術室での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、本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 (Tazawa et al. *Am J Respir Crit Care Med.*171:1142–9, 2005. Tazawa et al. *Am J Respir Crit Care Med.*181:1345–54, 2010)。

自己免疫性肺胞蛋白症は、本邦では50歳代の発症がもっとも多く男性に多い。働き盛りの男性に多い本症について、厚生労働省科学研究費による「びまん性肺疾患に関する調査研究卵班、肺胞蛋白症、遺伝性間質性肺疾患に関する研究：重症難治化要因とその克服研究班」が分担研究者の井上により組織され、診断・治療・管理の指針の編集や重症度分類の策定がなされ、指定難病の認定基準案が作成されて、平成27年度の指定難病化が見込まれている。

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細胞由来製剤を開発中の国内企業および酵母由来GM-CSF製剤の提供を製造販売する企業と連携して、薬理学的特性と哺乳動物を用いた吸入毒性試験の方法の検討をしてきた。研究班では、①各製剤の薬理学的特性の検討(質量分析、患者抗体との結合、GM-CSF依存性細胞株での生理活性の評価)、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種特異性の高いヒトGM-CSFの他種動物での検討、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と出現抗体の解析、⑦6カ月反復吸入投与毒性試験と検証試験実施計画案の策定の7項目について検討・実施した。

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, 商品名ルーカイン, 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質量分析、糖鎖修飾と細胞増殖・生存促進

①-1 質量分析

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

①-2 肺胞蛋白症患者由来の抗体を用いた免疫学的解析

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

①-3 CHO細胞由来GM-CSFの脱シアリル化

CHO細胞由来GM-CSF (1 mg/ml) を100 mM 酢酸 Na Buffer (pH 5.0) と2 mM CaCl₂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。

①-4 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% CO₂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として、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 x 10⁴/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

好中球表面のCD11b発現量へパリン血中にGM-CSFを最終濃度0, 1, 10ng/mLとなるよう加え、37°C30分培養後FITC-CD11b抗体およびPE-CD16抗体染色を混和して、氷上に15分おき、lysing solutionで赤血球の溶血と白血球の固定を行い、BD Accuri C6 フローサイトメーターで好中球画分のCD11b発現量を測定した。

STAT5 のリン酸化反応

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

④他の動物種の顆粒球の D11b 発現量評価

動物のヘパリン血 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。

⑤大型哺乳動物での吸入実験と細径気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取による評価

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

⑥GM-CSF 製剤の経気道的単回投与実験

各用量雌雄各 1 例 (中等用量は 2 例) 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。

⑦GM-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 μ g/body/回, 1 コース目と 2 コース目は 2 回/週, 3 コース目は 1 回/週, 12 週) を各製剤オス 2 例のカニクイザルに施行し、定期的に採血し抗体の検出を行うとともに、一般状態観察、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。3 コース目終了後、剖検で肺の所見を確認した。

⑧GM-CSF 抗体中和活性の測定

血漿の GM-CSF 中和活性は、血漿を系列希釈し、molgramostim または CHO-GM と反応を行い、中和されずに残存した GM-CSF 活性を TF-1 の増殖によって測定した。すなわち、ヒト型 GM-CSF 0.1ng/ml と系列希釈した血漿とを等量混合し、37C で 1 時間反応させた後、2 x 10⁴ 個の TF-1 細胞に加え、CO₂ インキュベータ内で 3 日培養した。68 時間目に WST-8 試薬 (同仁化学) を加え、さらに 4 時間培養した後、マイクロプレートリーダーで、450nm の吸光度を測定した。GM-CSF のみの培養を 0%, GM-CSF を加えない培養を 100% 抑制として、各希釈血漿で得られた吸光度から、減少した吸光度の割合を計算し、プロビット法によって、中和活性力価 IC₅₀ を算定した。さらに、新潟大学より提供された各血漿の抗体量のデータから、血漿中の抗体 1 μ g の力価、すなわち比活性を計算した。

⑨6 カ月間反復吸入投与毒性試験ならびに検証試験の実施計画策定

本課題を進め、慢性毒性試験計画を策定するため、PMDA の薬事戦略相談を受けた、事前相談として 2012 年 9 月 7 日、2013 年 7 月 30 日、2014 年 3 月 28 日の 3 回実施した結果をもとに 2014 年 8 月に対面助言を申し込み、10 月 24 日に対面助言を受けた。さらに動物試験での策定のため 2014 年 3 月 30 日に事前相談を受けた。平成 26 年度の対面助言ならびに事前相談での相談事項を以下の通りである。

対面助言 (2014 年 10 月 24 日)

- ・非臨床試験の項目の充足性について
- ・第 I 相試験の要否及びその実施時期について
- ・第 III 相試験 (検証的試験) の試験デザインについて

- 1) 目標例数の設定について
- 2) 用法・用量の設定について
- 3) 主要評価項目及び評価時期について
- 4) その他の評価項目について

事前相談 (2015 年 3 月 30 日)

26 週間反復吸入投与毒性試験での 3 用量での試験計画 (用量, 吸入器, 製剤) について

(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。また自己免疫性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。

⑤⑥⑦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ならびに新潟大学動物実験倫理委員会により審査・承認された試験計画書に沿って実施され、採取された検体を用いた。

C. 研究結果

①-1 質量分析

CHO-GMCSF および大腸菌由来のモルグラモスチム、酵母菌由来のサルグラモスチムと比較し、CHO-GMCSF は他の製剤とくらべ分子量が大きく 1 万 5 千から、2 万 5 千にわたり、多様な糖鎖修飾を受けた蛋白であることが分かった。

①-2 PAP 患者由来の抗体を用いた免疫学的解析

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

①-3 CHO-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コロニーアッセイ

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

③シグナル伝達系

CHO 細胞由来、酵母由来、大腸菌由来の GM-CSF 製剤との活性の違いを比較した。好中球の GM-CSF 受容体下流に位置する STAT5 のリン酸化反応では、CHO-GMCSF は他の製剤と比較して差を認めず、また好中球表面の接着因子 CD11b の発現量の上昇はやや低値だが、最大値は差がなかった。これらの結果より 3 種類の製剤と比較してほぼ同等の活性をもつと考えられた。

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

ヒト GM-CSF 製剤ではマウス末梢血顆粒球への活性がみられないことが再確認された。これに対して、ヒト GM-CSF の添加によりイヌの末梢血顆粒球の CD11b の発現増強が濃度依存的にみられた。CHO-GMCSF、モルグラモスチム、サルグラモスチムの三者間に明確な差はみられなかった。また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カニクイザルでの吸入動物実験と細径気管支ファイバースコープによる気管支肺胞洗浄液採取による評価

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

が可能であることが示唆された。

⑥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 0.5mg 投与とスプレーでの 0.05mg 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。中等量用量での血中濃度薬物推移濃度曲線を n=4 として作成でき、薬物動態解析が可能であることが示された。

⑦GM-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、

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 µg/body/回, 2 回/週, 12 週) を施行した動物 (各製剤オス 2 例) では 4 週間後より抗体活性がみられた。3 ヶ月の休薬期間を置いて、同じ投与による抗体観察をさらに 12 週行った。休薬期間直後には低値であった抗体価は、投与継続により、前回と同様のレベルの抗体価に達し、気管支肺胞洗浄液では一部に泡沫状マクロファージが見られた。さらに 2 カ月の休薬期間を置いて、週 1 回の GM-CSF 気管内噴を 12 週間行ったところ、治療直前の GM-CSF 抗体価は前回より高く、速やかに抗体価レベルは前回レベルに達した。BALF では、一部に泡沫状マクロファージがみられた。動物の一般状態観察、血算、血液生化学検査については、著しい変化はみられず推移した。

⑧中和活性解析

上記抗体観察実験の血液検体の ELISA 法による抗体量の定量では、一連の吸入投与によって、全頭に抗体産生応答が認められたが、1 回目の投与の中和活性は、molgramostim 投与の 1 頭のみ、2 回目には 2 頭に認められた。しかし、3 回目の投与では、molgramostim 投与のカニクイザルの中和活性が消失した。血漿の中和活性能は、ELISA 法による抗 GM-CSF 抗体量と一致しなかった。また、中和抗体の産生は個体差が大きく、中和能を実測することなく予測すること

はできないと考えられた。

⑨6 カ月間反復吸入投与毒性試験ならびに検証試験の実施計画策定

6 カ月間反復吸入投与毒性試験案について PMDA に対面助言で示して、①被験物質は 3 用量設定することが望ましい、②米国で実施予定の 28 日反復吸入毒性試験の結果を踏まえて用量を設定すべき、③実際に試験を計画する場合には、投与量の設定を含めて、事前に機構に相談することを勧める、との意見が示され、3 月 30 日の事前相談で再度相談し、修正した GM-CSF のカニクイザルを用いた 26 週間反復吸入投与毒性試験計画案は次の通りである。

- ・試験系：カニクイザル 24 匹 (雌雄各 12 例)
- ・群構成：4 群 (対照群+被験物質 3 用量), 3 例/群
- ・投与経路：検証試験で使用するネブライザーでの吸入投与
- ・用量：対照薬と GM-CSF 5mcg/kg/day (第Ⅲ相試験の用量に相当) を含む 3 用量

第Ⅰ相試験については、健康成人を対象とした単回投与による薬物動態の検討について、第Ⅲ相試験と同時期に可能な限り早い段階で薬物動態データが入手可能となるよう計画するよう機構の見解が示されたため、薬物動態試験の概要を作成し、機構に示してコメントを求めたところ、①健康成人における血中 GM-CSF 濃度の背景値が入手可能であればプラセボ対照群省略も一案、②用量漸増試験ではなく 3 用量並行実施で可とのコメントが示された。これらの意見をもとに以下のような概要の第Ⅰ相試験計画を策定した。

1 スキーム (次頁)

2 目的

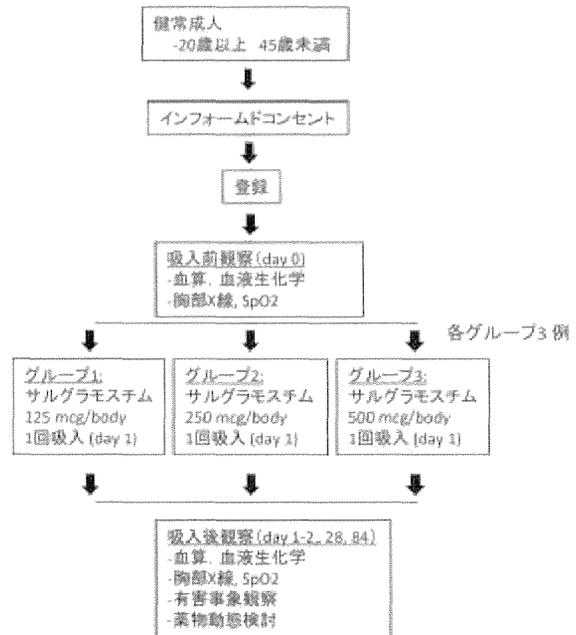
自己免疫性肺胞蛋白症を適応とする GM-CSF 吸入製剤の、健康成人での薬物動態の解析を行い、有害事象発現割合を評価し、安全性の評価を行う。

- ・主要評価項目：薬物動態パラメータ
- ・副次評価項目：有害事象発現割合

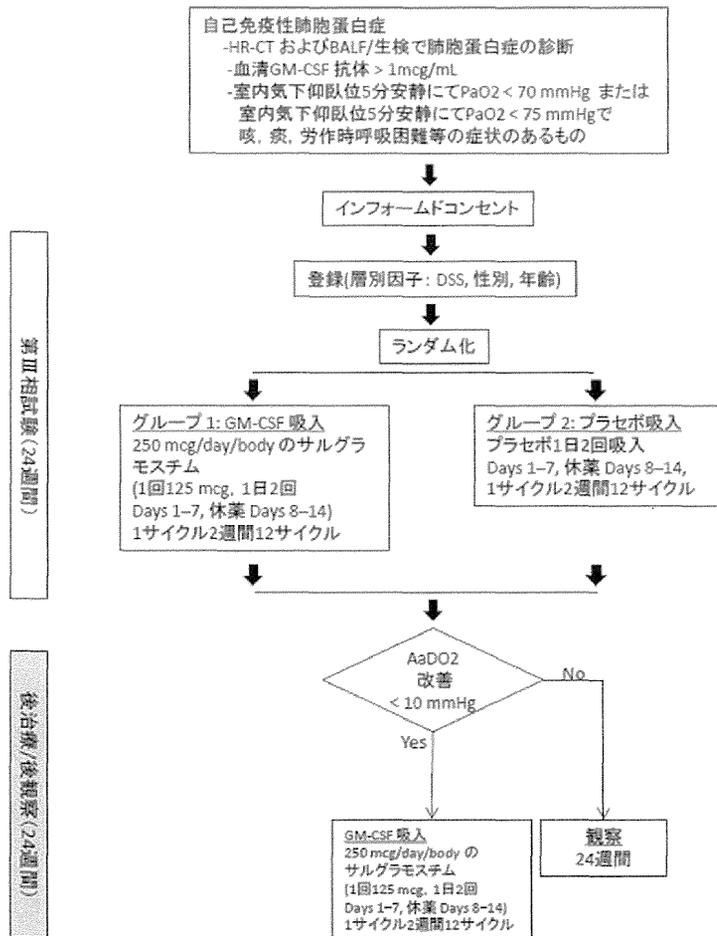
3 対象

登録時 20 歳以上 45 歳未満の 健康成人男性

薬物動態試験スキーム



検証試験スキーム



4 治療

- ・グループ 1 : GM-CSF 吸入製剤 125mcg/body を 1 回吸入 , 予定症例 : 実薬 3 例
- ・グループ 2 : GM-CSF 吸入製剤 250mcg/body を 1 回吸入 , 予定症例 : 実薬 3 例
- ・グループ 3 : GM-CSF 吸入製剤 500mcg/body を 1 回吸入 , 予定症例 : 実薬 3 例

5 予定登録数と登録期間

- ・予定登録参加者 9 例
- ・登録期間 : 3 か月 予定例数に達しないときさらに 3 か月延長する

検証試験について、治験実施計画案を策定し、対面助言で示して、以下の概要で概ね受け入れ可能とのコメントが示された。

1. スキーム (前頁)

2. 目的 : 自己免疫性肺胞蛋白症患者における GM-CSF 吸入の安全性および AaD02 改善における有効性の確認

3. 目標例数 : 60 例 (実薬 30 例 偽薬 30 例)

4. 用法・用量 : (125 μ g/回、1 日 2 回、7 日間吸入投与後、7 日間休薬を 1 コースとして、12 コース)

5. 主要評価項目 : ベースラインからの AaD02 の改善量

6. 評価時期 : 治験薬投与開始後 24 週時点
その他の評価項目 : 徴候 (QOL, 息切れ, 咳), 酸素療法の必要性, 肺機能 (%VC, %DLCO, PaO₂), 画像所見 (CT スコア), 血清マーカー (KL-6, CEA, CYFRA 21-1, SP-A, SP-D, LDH, 抗 GM-CSF 抗体.)

D. 考察

GM-CSF 各種製剤の、質量分析で CHO-GMCSF は、酵母菌由来のサルグラモスチムや大腸菌由来のモルグラモスチムと比較して分子量が大きく、しかも 15000~25000kDa と幅広く分布しており、複雑な糖鎖修飾を受けていることが示唆されたが、コロニーアッセイ、STAT5 のリン酸化反応、好中球表面の接着因子 CD11b の発現量での生物活性に関する解析では、他の 2 製剤と比較して、CHO-GMCSF は有意の差はみられなかった。

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は、大腸菌由来製剤に比して

やや低い傾向がみられたが、低濃度においては、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。

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、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。今年度の中等用量での試行でも、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 0.5mg 投与と スプレーでの 0.05mg 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同様の血中濃度を示した。しかし、この中等用量でも体重換算したヒトでの用量の 30 倍以上でありヒトでの薬物動態試験ではより鋭敏な測定方法の検討も必要と考えられた。

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 抗体を出現し、休薬期間をおいた再投与では抗体出現が早期になり、一部の個体では中和活性も上昇する可能性があることが分かった。BALF 中の一部に泡沫マクロファージの出現がみられた。さらに反復投与を続けた場合の抗体の特性の変化には個体差があることが示唆された。

本研究での結果および、酵母由来製剤を米国で製造販売しているジェンザイム社の意向より、酵母由来製剤での、製造販売承認を目標とした医師主導治験および非臨床試験の可能性が考えられるようになった。PMDA との薬事戦略相談を繰り返し懇切なコメントをいただき、新潟大学病院プロトコルデータセンターの統計解析担当者の支援を得て検証試験の実施計画書案を作

り、同社からの資料も添付して本年度は対面助言を受けることができた。対面助言での機構の意見・見解をもとに、26週反復吸入投与毒性試験、検証試験ならびに薬物動態試験の計画を策定し、日本医療研究開発機構研究費への応募につなげることができた。

E. 結論

GM-CSF 各種製剤の、質量分析で CHO-GMCSF は、分子量が大きく、しかも 15000~25000kDa と幅広く分布しており、複雑な糖鎖修飾を受けていることが示唆されたが、コロニーアッセイ、STAT5 のリン酸化反応、好中球表面の接着因子 CD11b の発現量での生物活性に関する解析では、製剤間で有意の差はみられなかった。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 μg/kg/回) 週 2 回投与で抗 GM-CSF 抗体を検出できるようになることが明らかになった。抗体の中和活性は個体差が大きくさらなる、解析が必要がある。

これまでの検討結果および薬事戦略相談を通じた PMDA のコメントを得て、本研究の目的である、6 カ月間反復吸入投与試験の計画を立てることができ、さらに医師主導治験の形で行う検証試験と薬物動態試験の計画を策定し、分担研究者の中田を研究代表者として AMED 研究費に応募し、幸いに採択通知を受け、次年度よりこれらの試験を開始の予定である。

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、酵母由来 GM-CSF 製剤を提供してくださった Genzyme 社、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、および薬事戦略相談で懇切な対応をいただいた医薬品・医療機器総合機構の皆様へ深謝いたします。

F. 研究発表

I. 論文発表 (12件)

1. Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Moriyama H, Uchida K, Ohkouchi S, Tazawa R, Takada T, Yamaguchi E, Ichiwata T, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Kobayashi H, Nakata K. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(2):L105-17.

2. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-regulation of cluster of differentiation (CD) 11b expression on the surface of canine granulocytes with human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Vet Med Sci.* 2014;76(8):1173-6.
3. 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;68(2):118-26.
4. 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 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy. *Chest.* 2014;145(4):729-37.
5. 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.
6. 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 in press.
7. 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.

8. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, Ohkouchi S, Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *Intern Med.* 51:1737-42, 2012.
9. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi C Y, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. Runx1 Deficiency in CD4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune Inflammatory Lung Disease Due to Spontaneous Hyperactivation of Cells. *J Immunol.* 188:5408-20, 2012.
10. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Kasahara Y, Hojo M, Nei T, Nakayama H, Motoi N, Urano S, Eda R, Yokoba M, Tsuchihashi Y, Nasuhara Y, Ishii H, Ebina M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Reduced GM-CSF autoantibody in improved lung of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J.* 39:777-80, 2012.
11. Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CSF autoantibody is etiologically a bystander but associated with IgG-type autoantibody production in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 302:L959-64, 2012.
12. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med.* 106:284-93, 2012.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

II. 学会発表

A. 国際学会 (18件)

1. R. Tazawa, K. Ito, T. Ogi, H. Ishii, T. Sakagami, Y. Ito, A. Hashimoto, T. Tanaka, K.-I. Akasaka, J. Tohyama, K. Nakata. Adult-Onset Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis Caused By CSF2RA Deletion. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 18, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
2. H. Ishii, R. Tazawa, Y. Inoue, T. Nishizawa, T. Inui, T. Nagatomo, M. Yomota, S. Mikura, K. Hashimoto, T. Handa, K. Tomii, K. Nakata. Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis Complicating Myelodysplastic Syndrome Results In A Worsening Of Prognosis. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 18, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
3. K. Nakata, K. Akasaka, T. Tanaka, T. Maruyama, R. Tazawa, E. Yamaguchi, T. Ichiwata. A Differential Equation For Permeation Of Antibody From Blood To The Lung. Annual Meeting of American Thoracic Society, May 21, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA
4. Tazawa R, Nakagaki K, Ito Y, Hashimoto A, Tanaka T, Akasaka K-I, Nakata K. A Preclinical Study for Development of a New GM-CSF Inhalation Drug as a Treatment of Pulmonary Alveolar Proteinosis. 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, November 14, 2014, Bali International Convention Centre, Nusa Dua, Bali, Indonesia
5. Tazawa R. Rare Lung Diseases. 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, November 15, 2014, Bali International Convention Centre, Nusa Dua, Bali, Indonesia (招請講演)
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. American Thoracic society International conference 2013, Philadelphia, 2013.5.

7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Tazawa R MP615 GM-CSF Inhalation as a Less Invasive Treatment for Pulmonary Alveolar Proteinosis. Tuesday, May 22, 2012, 12:00-13:00, Room 258-260 (South Building, Mezzanine Level), Moscone Center, South Building, 2012 Annual Congress of American Thoracic Society, San Francisco.
 13. Takahito Nei, Shinya Urano, Chinatsu Kaneko, Ryushi Tazawa, Yoshikazu Inoue, Toru Arai, Masaki Hirose, Kazuhide Nakagaki, and Koh Nakata. Reduction Of IgG- And IgA- But Not IgM- GM-CSF Autoantibody Level In The Serum Strongly Associated The Remission Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis (aPAP). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5796.
 14. Koh Nakata, Takahito Nei, Natsuki Motoi, Ryushi Tazawa, and Shinya Urano. Repertoire Analysis Of GM-CSF Autoantibody MRNA By Next Generation Sequencing In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5800.
 15. Ryushi Tazawa, Toru Arai, Toshinori Takada, Yasunori Kasahara, Yoshiko Tsuchihashi, Takahito Nei, Masayuki Hojo, Hideaki Nakayama, Masanori Yokoba, Shinya Ohkouchi, Haruyuki Ishii, Ryosuke Eda, Yasuyuki Nasuhara, Masahito Ebina, Masanori Akira, Etsuro Yamaguchi, Yoshikazu Inoue, and Koh Nakata. Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP) And Inhaled Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Therapy--Clinical Features Predicting Recurrence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5794.
 16. Haruyuki Ishii, Ryushi Tazawa, Yoshikazu Inoue, and Koh Nakata. Prognosis Of Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis Complicated With Myelodysplastic Syndrome: 28 Cases In Japan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5797.
 17. Koh Nakata, Shinya Urano, Keiichi Akasaka, and Ryushi Tazawa. Evidence For Permeation Of IgG Type GM-CSF Autoantibody From Circulation To Lung In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5801.
 18. Koh Nakata, Takahito Nei, Shinya Urano, Ryushi Tazawa, and Bronchial Azuma. IgM Type GM-CSF Autoantibody Is Etiologically Bystander But Involved In Development Of IgG Type Autoantibody In Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5802.
- B. 国内学会 (3件)**
1. 田澤立之, 伊藤健一郎, 荻喬博, 石井晴之,

(5名略)中田光. 成人発症遺伝性肺胞蛋白症と GM-CSF 受容体 α 鎖変異. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年 4 月 25 日・大阪国際会議場・大阪

2. 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. GM-CSF 吸入製剤開発のための前臨床試験の検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 2014 年 4 月 25 日・大阪国際会議場・大阪
3. 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.

G. 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．総合研究報告書（研究分担者）

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¹、田中崇裕¹、伊藤祐子¹、田澤立之¹、赤坂圭一¹

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られる。

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。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、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) と単核球は健常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 CaCl₂ 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 μ l の GM-CSF (erhGM-CSF; 150 μ g/ml, yrhGM-CSF; 250 μ g/ml, chGM-CSF; 200 μ g/ml) に 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) を 90 μ l、0.5 μ l 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 μ l の 60% acetonitrile (ACN)、0.1% TFA にて溶出した。2 μ l の溶出液に対して 1 μ l 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 (還元状態下) 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 (2×10^5 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 μ 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% 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 CD11b インディックス = (刺激した際の好中球の CD11b 発現 - 刺激していない好中球の CD11b 発現) / 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 α 産生増強の測定

Macrophage-serum-free medium (GIBCO BRL, Palo Alto, CA, USA) を使用し、 1×10^6 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 α 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 (2×10^4 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 μ 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 μ l を各ウェルに添加した。添加後さらに 37°C、5% 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 OD_{450nm} 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、 1×10^5 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 (1×10^6 cells/ml) を FITC-labeled anti-Annexin-V 抗体 (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche, Basel, Switzerland) 2 μ 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 (1×10^6 cells/ml) または TF-1 細胞 (4×10^5 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% 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

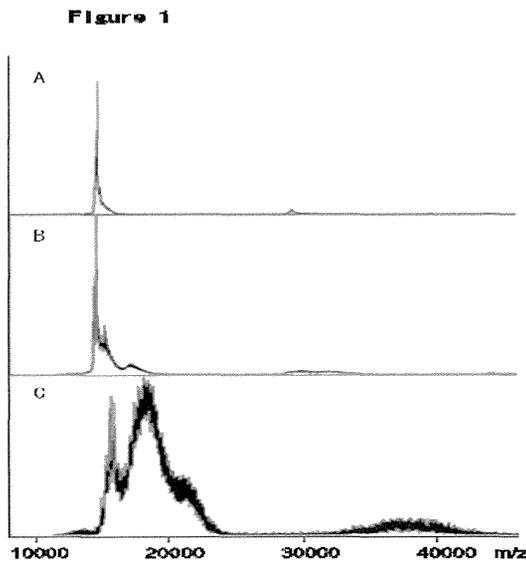
まず、Shapiro-Wilk tests で正規性を確認し、2 群間の比較では一元配置分散分析を使用した。さらに Bonferroni-調整済の p 値による多重比較検定を行った ($p > 0.05$)。全ての検定は両側検定

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

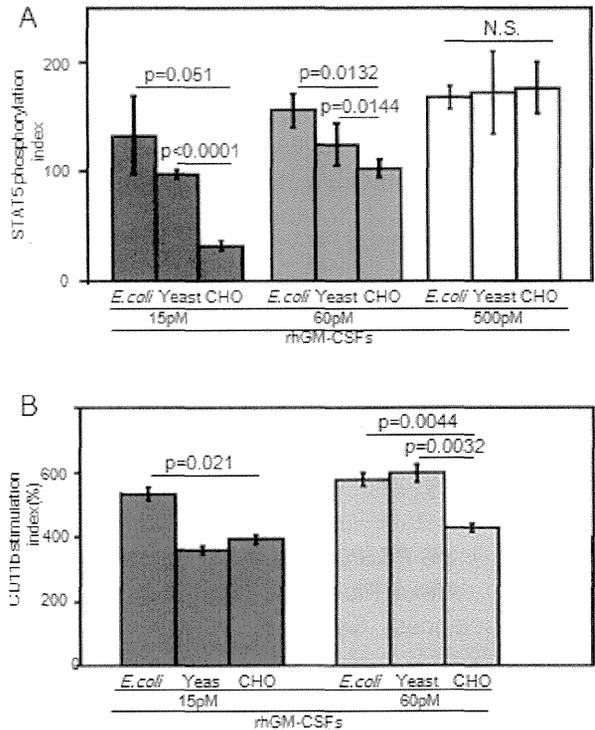
E. coli 由来 rhGM-CSF (erhGM-CSF)、yeast 由来 rhGM-CSF (yrhGM-CSF)、CHO 細胞由来の rhGM-CSF (crhGM-CSF) の平均分子量測定のためマスペクトル解析を行った。erhGM-CSF は 14.5 kDa の単一ピークを呈し、yrhGM-CSF には 14.2、14.4、15.0 kDa のピークがあり、その平均分子量は 14.7 kDa であった、crhGM-CSF は 16-28 kDa に幅広い連続ピークを示し、その平均分子量は 19.0 kDa であった (Fig. 1)。



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)。

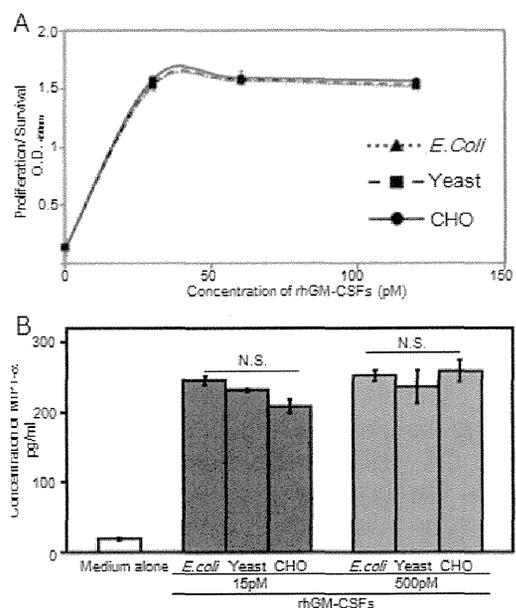
Figure 2



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- α 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; ED₅₀) 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。ED₅₀ 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 ± 0.5 倍、yrhGM-CSF では 2.0 ± 0.7 倍、crhGM-CSF では 6.45 ± 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 μm と 21.02 μm の 2 峰性のピーク呈し (平均 24.09 μm)、erhGM-CSF (平均 22.09 μm) または yrhGM-CSF (平均 22.00 μm) 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。

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。