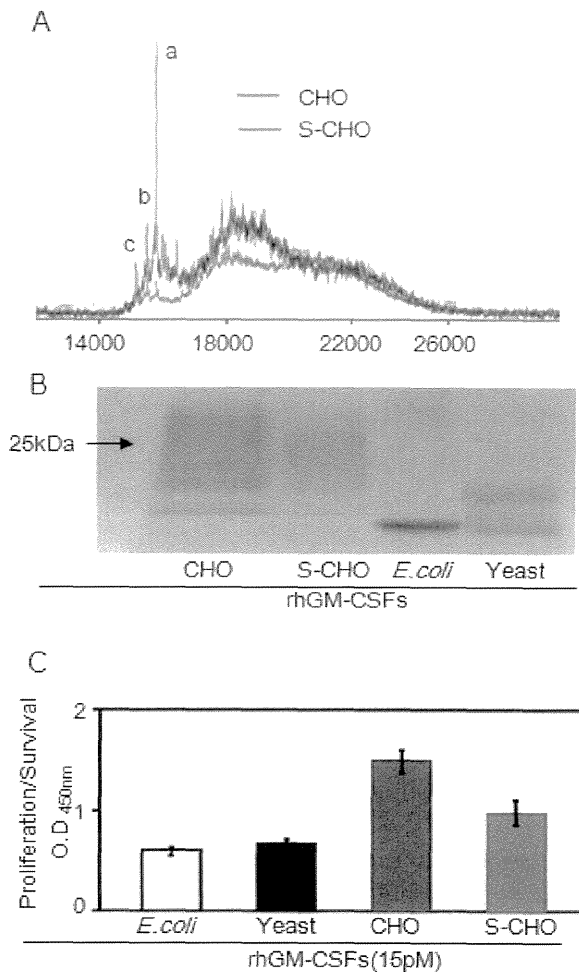


Figure 5

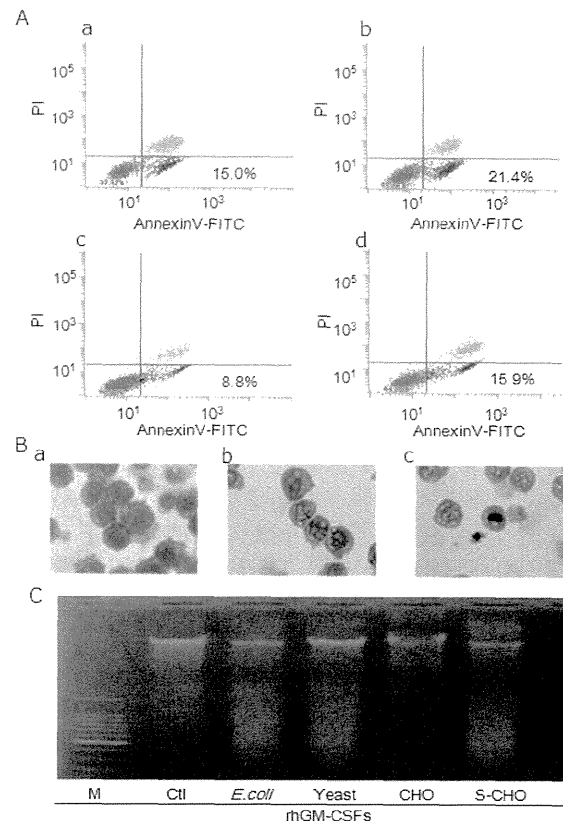


### C.6. TF-1 細胞の細胞死に対する rhGM-CSF の効果

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

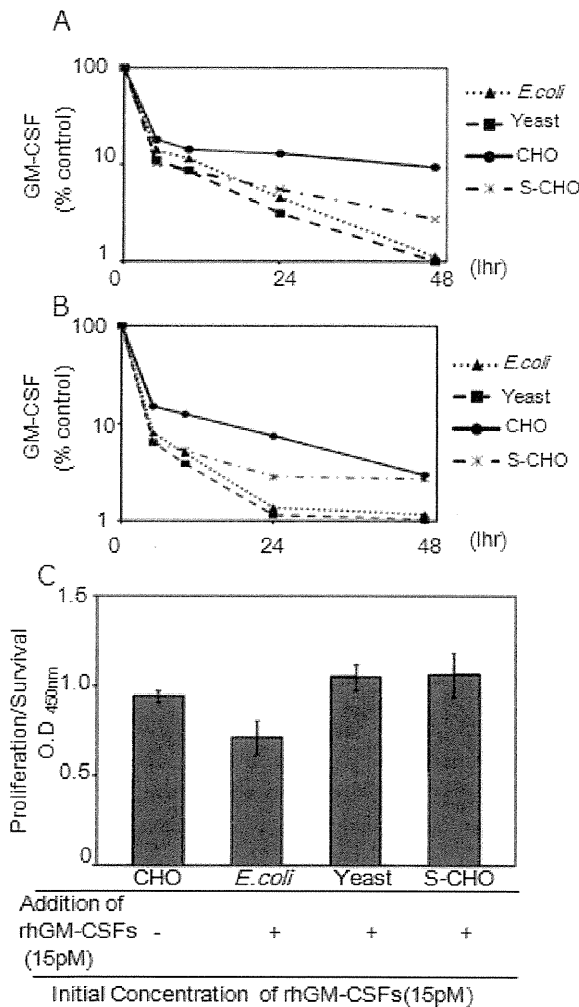


### C.7. TF-1 細胞と PBMCs の GM-CSF クリアランス

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、今までの研究では 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日本ケミカルリサーチ(株)研究本部 研究所 浅野正寛様、立花克彦様、西野勝哉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

##### I. 論文発表

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*. 2

014;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 ( $\kappa/\lambda$ ) 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, H  
abu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, T  
akai T, Satake M. Runx1 Deficiency in C  
D4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune In  
flammatory Lung Disease Due to Spontane  
ous Hyperactivation of Cells. *J Immunol*.  
188:5408-20, 2012.

10. Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Kas  
ahara Y, Hojo M, Nei T, Nakayama H,  
Motoi N, Urano S, Eda R, Yokoba M, Ts  
uchihashi Y, Nasuhara Y, Ishii H, Ebina  
M, Yamaguchi E, Inoue Y, Nakata K, Taz  
awa 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, K  
aneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakaga  
ki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata  
T, Azuma A, Nakata K. IgM-type GM-CS  
F autoantibody is etiologically a bystander  
but associated with IgG-type autoantibody  
production in autoimmune pulmonary alve  
olar 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 i  
mproves lung clearance in pulmonary alve  
olar 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

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  
Respirology, 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.

### 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., Chroneos, 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., Mermod, 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

## 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

3種類の GM-CSF 製剤、すなわち、Genzyme 社製の酵母（*sacchalomyces*）由来の GM-CSF（Leukine）、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、日本ケミカルリサーチ社製の CHO 細胞由来の GM-CSF、の生物活性を比較検討した。正常人由来のヒト骨髓血液細胞を作用対象細胞として、メルセルロースを用いた半固形培地でのコロニーアッセーを実施した。その結果、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF の活性が他の 2 社製品よりやや高い傾向が認められたが有意差は認められなかった。

### 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（生物活性中和抗体）が原因であり、肺胞内での GM-CSF の活性回復、すなわち GM-CSF 吸入両方が有効な治療法である。本分担研究では、製法の異なる 3 種類も遺伝子組換え型ヒト GM-CSF の生物活性を検討してその有効性を評価する。

### 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、Genzyme 社製の酵母（*sacchalomyces*）由来の GM-CSF（Leukine）、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、日本ケミカルリサーチ社製の CHO 細胞由来の GM-CSF 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。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。有意差の統計検定は、Standard t-test を用いた。

### （倫理面への配慮）

倫理面での配慮を要する研究は無かった。

### C. 研究結果

3種類の GM-CSF（Genzyme 社製の酵母由来の GM-CSF（Leukine）、Amoytop 社製の大腸菌由来の GM-CSF、JCR 社製の CHO 細胞由来の GM-CSF）はいずれも、様々の骨髓系（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。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、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。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。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

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ー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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

#### 2. 学会発表

1. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K: Production of functional classical brown adipocyte from human pluripotent stem cells using a special differentiation cocktail without genetic manipulation. Benzene Symposium, August 2012, Copenhagen, Denmark.
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、湯尾 明、佐伯久美子：動脈狭窄の新規治療開発に向けた新しい細胞モデル系の開発。日本内分泌学会第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー、2014 年 7 月、山梨。

#### 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：霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特許登録第 0005067949 号

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞、多能性幹細胞由来細胞凝集物と、その製造方法及び

細胞療法、内科療法

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター、ダイナバック株式会社

国際出願番号 PCT/JP2012/61212

現在、欧州、米国など各国移行中

## 2. 実用新案登録

無し

## 3. その他

無し

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）  
総合研究報告書（研究分担者）

[A] GM-CSF吸入療法対象患者：自己免疫性肺胞蛋白症疫学調査

[B]本邦の稀少肺疾患研究の現状と動向

[C] 肺胞蛋白症臨床研究の動向、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

[D] 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

研究分担者 井上義一 NHO近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター長

## 研究要旨

肺胞蛋白症(PAP)の GM-CSF 吸入療法治験実施にむけて以下の調査を報告した。

[A] GM-CSF 吸入療法対象患者：自己免疫性肺胞蛋白症疫学調査

[B]本邦の稀少肺疾患研究の現状と動向

[C] 肺胞蛋白症臨床研究の動向、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

[D] 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

## A. 研究目的

肺胞蛋白症(PAP)の GM-CSF 吸入療法治験実施にむけて以下の調査を報告した。これらのデータの一部は『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』班（課題番号H26-委託（難）-一般-077）の成果とであるが、本研究後の治験実施時には必須情報と考え整理し最新情報を加えて報告した。

[A] これまでの自己免疫性 PAP の疫学データについて文献的考察を行う。特にわが国で実施したコホート調査について報告。

[B] 我が国の難病対策について報告。

[C] 肺胞蛋白症臨床研究の動向、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。

[D] 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。

## B. 研究方法

[A] GM-CSF 吸入療法対象患者：自己免疫性肺胞蛋白症疫学調査。患者数の調査。

[B]本邦の稀少肺疾患研究の現状と動向調査。

[C] 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を整理し今後の展望をまとめる。また海外の GM-CSF による PAP 試験の調査と整理。

[D] 肺胞蛋白症指定難病の認定基準案を紹介（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）。GM-CSF 吸入療法は、インターネットで公開されている情報を紹介。

## （倫理面への配慮）

多くの本調査は、患者への介入を伴わず、倫理面への配慮は不要である。一部データについては臨床研究の疫学倫理指針に則って実施した。

## C. 研究結果

[A] 自己免疫性 PAP に関する多施設共同コホート横断的疫学研究により、我々は、1999-2006 の間、248 名の PAP 患者を登録しそのうち自己免疫性 PAP は 223 名（89.9%）であった。

[B] 今後特定疾患治療研究事業の対象疾患の拡大が予定されているが、現状について班会議にて報告した。

[C] 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。

[D] 自己免疫性 PAP（特発性 PAP）及び先天性 PAP（遺伝性 PAP）を指定難病の対象とし管理区分重症度Ⅲ以上を対象とする。

GM-CSF には酵母由来の sargramostim と、大腸菌由来の molgramostim の 2 種類について報告がされ、米国、欧州、日本、中国で治験が予定されている。

## D. 考察と結論

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

[B] 今後、前臨床試験と同時にGM-CSF吸入療法の臨床試験に向けて、治験実施体勢を整える。

[C] 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。

[D] PAPは2015年指定難病のリストに入っており、認定基準の固定、診療ガイドライン等の整備が前述の研究班を中心に進められている。

Sargramostimとmolgramostimは糖鎖、アミノ酸配列が両剤は異なり、わが国でもともに使用できるようにすれば患者にとりメリットがある。

## E. 健康危険情報

該当および特記事項はなし。

## F. 研究発表

### I. 論文発表 (〇〇件)

- (1) Akasaka K, Tanaka T, Maruyama T, Kitamura N, Hashimoto A, Ito Y, Watanabe H, Wakayama T, Arai T, Hayashi M, Mori-yama 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 Jan 15; 308(2):L105-17.
- (2) Nakatani T, Arai T, Kitaichi M, Akira M, Tachibana K, Sugimoto C, Hirooka A, Tsuji T, Minomo S, Hayashi S, Inoue Y. Pleuroparenchymal fibroelastosis from a consecutive database: a rare disease entity?, *Eur Respir J*. 2015 Feb 19. pii: E RJ-02147-2014. [Epub ahead of print].
- (3) Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Sclenker-Herceg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014 May 29;370(22):2071-82.
- (4) Richeldi L, Cottin V, Flaherty KR, Kolb M, Inoue Y, Raghu G, Taniguchi H, Hansell DM, Nicholson AG, Le Maulf F, Stowasser S, Collard HR. Design of the INPULSIS™ trials: two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2014 Jul;108(7):1023-30.
- (5) Ogura T, Taniguchi H, Azuma A, Inoue Y, Kondoh Y, Hasegawa Y, Bando M, Abe S, Mochizuki Y, Chida K, Klüglic M, Fujimoto T, Okazaki K, Tadayasu Y, Sakamoto W, Sugiyama Y. Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2014 Dec 10. pii: ERJ-01980-2013. [Epub ahead of print]
- (6) Gupta R, Kitaichi M, Inoue Y, Kotloff R, McCormack FX. Lymphatic manifestations of lymphangiomyomatosis. *Lymphology*. 2014 Sep;47(3):106-17.
- (7) Gemma A, Kudoh S, Ando M, Ohe Y, Nakagawa K, Johkoh T, Yamazaki N, Arakawa H, Inoue Y, Ebina M, Kusumoto M, Kuwano K, Sakai F, Taniguchi H, Fukuda Y, Seki A, Ishii T, Fukuoka M. Final safety and efficacy of erlotinib in the phase 4 POLARSTAR surveillance study of 10 708 Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2014 Dec;105(12):1584-90. doi: 10.1111/cas.12550. PMID: 25287435 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- (8) Kanazu M, Arai T, Sugimoto C, Kitaichi M, Akira M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Inoue Y. An intractable case of hermannsky-pudlak syndrome. *Intern Med* 2014 Nov 15;53(22):2629-2634.
- (9) Judson MA, Costabel U, Drent M, Wells A, Maier L, Koth L, Shigemitsu H, Culliver DA, Gelfand J, Valeyre D, Sweiss N, Crouser E, Morgenthau AS, Lower E E, Azuma A, Ishihara M, Morimoto S, Yamaguchi T, Shijubo N, Grutters JC, Rosenbach M, Li HP, Rottoli P, Inoue Y, Prasse A, Baughman RP, Organ Assessment Instrument Investigators TW. The WASOG Sarcoidosis Organ Assessment Instrument: An update of a previous clinical tool. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*.

- 2014 Apr 18;31(1):19-27.
- (10) Arai T, Inoue Y, Sasaki Y, Tachibana K, Nakao K, Sugimoto C, Okuma T, Akira M, Kitaichi M, Hayashi S. Predictors of the clinical effects of pirfenidone on idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Investig*. 2014 Mar;52(2):136-43.
  - (11) Kinehara Y, Kida H, Inoue Y, Hirose M, Nakabayashi A, Takeuchi Y, Hayama Y, Fukushima K, Hirata H, Inoue K, Minami T, Nagatomo I, Takeda Y, Funakoshi T, Kijima T, Kumanogoh A. Development of microscopic polyangiitis-related pulmonary fibrosis in a patient with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *BMJ Open*. 2014 Nov 4;14:e0172. doi: 10.1136/bmjopen-2014-0172. PMID: 25366193 [PubMed - in process]
  - (12) Matsuda Y, Tachibana K, Sasaki Y, Tsuyuguchi K, Kitaichi M, Inoue Y. Tracheobronchial lesions in eosinophilic pneumonia. *Respir Investig*. 2014 Jan;52(1):21-7.
  - (13) Tokura S, Okuma T, Akira M, Arai T, Inoue Y, Kitaichi M. Utility of expiratory thin-section CT for fibrotic interstitial pneumonia. *Acta Radiol*. 2013 Nov 19. doi: 10.1177/0284185113512300.
  - (14) 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 Jan 15;402(1-2):57-70.
  - (15) Ishii H, Seymour JF, Tazawa R, Inoue Y, Uchida N, Nishida A, Kogure Y, Saraya T, Tomii K, Takada T, Itoh Y, Hojo M, Ichihata T, Goto H, Nakata K. Secondary pulmonary alveolar proteinosis complicating myelodysplastic syndrome results in worsening of prognosis: a retrospective cohort study in Japan. *BMC Pulm Med*. 2014 Mar 5;14:37.
  - (16) 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 T V, 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*. 2013 Sep 15;188(6):733-48.
  - (17) Arai T, Inoue Y, Tachibana K, Tsuyuguchi K, Nishiyama A, Sugimoto C, Sasaki Y, Kagawa T, Matsuda Y, Hayashi S. Cytomegalovirus infection during immunosuppressive therapy for diffuse parenchymal lung disease. *Respirology*. 2013 Jan;18(1):117-24, 2013
  - (18) Arai T, Inoue Y, Sugimoto C, Otsuka J, Nishiyama A, Inoue Y, Kagawa T, Nakao K, Takeuchi N, Matsumuro A, Hirose M, Nakata K, Akira M, Kitaichi M, Hayashi S. CYFRA 21-1 as a disease severity marker for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *Respirology*. 2013 Nov 20. doi: 10.1111/resp.12210
  - (19) 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 Dec;149(3):357-64.
  - (20) Young L, Lee HS, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker A F, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Downey GP, Swigris JJ, Taveira-DaSilva AM, Krischer JP, Trapnell BC, McCormack FX; 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. *Lancet Respir Med*. 2013 Aug;1(6):445-52.
  - (21) 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, Tsumi K, Yamaguchi E, Nakata K. Duration of benefit in patients with autoimmune

- e pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *Chest*. 2014 Apr; 145(4):729-37
- (22) Takeuchi N, Arai T, Kitaichi M, Inoue Y. A comorbid case of multicentric Castleman's disease and pulmonary hyalinising granuloma successfully treated with tocilizumab and corticosteroid. *BMJ Case Rep*. 2013 Sep 26;2013.
- (23) Yoshinobu Matsuda, Kazunobu Tachibana, Yumiko Sasaki, Kazunari Tsuyuguchi, Masanori Kitaichi, Yoshikazu Inoue. Tracheobronchial lesions in eosinophilic pneumonia. *Respiratory Investigation*, 2013 (online, in press)
- (24) 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
- (25) 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 Lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 143(6):1671-8, 2013
- (26) Tsujino K, Takeda Y, Arai T, Shintani Y, Inagaki R, Saiga H, Iwasaki T, Tetsumoto S, Jin Y, Ihara S, Minami T, Suzuki M, Nagatomo I, Inoue K, Kida H, Kijima T, Ito M, Kitaichi M, Inoue Y, Tachibana I, Takeda K, Okumura M, Hemler ME, Kumanogoh A. Tetraspanin CD151 Protects against Pulmonary Fibrosis by Maintaining Epithelial Integrity. *Am J Respir Crit Care Med*. 186(2):170-80, 2012
- (27) Tachibana K, Arai T, Kagawa T, Minomoto S, Akira M, Kitaichi M, Inoue Y \*. A Case of Combined Sarcoidosis and Usual Interstitial Pneumonia. *Internal Medicine* 51:1893-7,2012
- (28) McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 364(17):1595-606, 2011
- (29) Ishii H, Tazawa R, Kaneko C, Saraya T, Inoue Y, Hamano E, Kogure Y, Tomii K, Terada M, Takada T, Hojo M, Nishida A, Ichiwata T, Trapnell BC, Goto H, Nakata K. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis: pre-mortem cases in Japan. *Eur Respir J*. 37(2):465-8, 2011
- (30) 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*. 2012; 39(3): 777-780.
- (31) Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasuhara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med*. 106(2):284-93, 2012 Feb
- (32) Homma S \*, Azuma A, Taniguchi H, Ogura T, Mochizuki Y, Sugiyama Y, Nakata K, Yoshimura K, Takeuchi M, Kudoh S; Japan NAC Clinical Study Group, Collaborators: Kudoh S, Azuma A, Homma S, Taniguchi H, Ogura T, Mochizuki Y, Sugiyama Y, Nakata K, Munakata M, Nukiwa T, Ishii Y, Yoshimura K, Oritsu M, Yoshizawa Y, Takizawa H, Ohta K, Suzuki E, Chida K, Inoue Y, Kohno N, Nishioka Y, Hamada H, Kohno S, Suga M, Taguchi Y, Noma S, Takahashi H, Kanazawa M, Sakai F, Tomii K, Tomioka Y, Takeuchi M. Efficacy of inhaled N-acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2012 Apr;17(3):467-77

## II. 学会発表

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

発明者：井上義一、熊ノ郷淳、荒瀬尚、木田博

出願日：2014年3月17日

出願番号：PCT/JP2014/57128

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

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

## GM-CSF製剤の生物活性の解析に関する研究

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

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF)は、成熟貪食細胞の免疫機能を賦活する生化学的特徴を持つだけでなく、肺胞蛋白症の病因メカニズムにおいて重要な役割をもつ。本研究事業では自己免疫性肺胞蛋白症患者の吸入治療に一定の成果が報告されているリコンビナント GM-CSF 製剤を開発し、臨床応用に向けた基礎検討を行うことを目的としており、GM-CSF のシグナルを検討する方法を開発、評価することは大変重要である。我々は好中球を GM-CSF で刺激した際に、表面抗原である CD11b が迅速に発現量を上げる特徴を利用して、CD11b stimulation index 法を開発し、血液中の GM-CSF 活性を測定した。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、その堅牢性を検討後、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結果、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、CD11b stimulation index 112 が、診断の感度、特異度 100% であった。本方法を用いて、JCR 社製チャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いて精製されたリコンビナント GM-CSF (JCR-GM-CSF) の生物活性を測定したところ、大腸菌由来、酵母由来の GM-CSF と比較して遜色ない活性値が得られた。また GM-CSF 受容体下流に位置する STAT5 のリン酸化反応テストでも同様の力価が確認できた。GM-CSF に対する自己抗体が高濃度発現している患者血清中で、抗体と結合している GM-CSF の量を定量するために、抗原抗体複合体を SDS 処理と熱処理して、抗原を遊離させて検出する、SDS-ELISA 法を現在構築する準備を進めている。

### 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因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)、および酵母菌由来のリコンビナント GM-CSF (以下、yeast-GM-CSF) を、上記疾患の治療薬として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。この測定法を最適化し、自己免疫性肺胞蛋白症の診断ツールとして使用が可能かどうかの検討を行った。またこの他に、自己免疫性肺胞蛋白症患者血清中の GM-CSF の活性検討するうえでは、フリーの GM-CSF だけでなく、自己抗体と結合している GM-CSF の量も検討する必要がある。今回は今後検討する課題として、我々のグループが過去に開発した抗体結合型 GM-CSF の測



定法についてあらたな方法を検討した。

## B. 研究方法

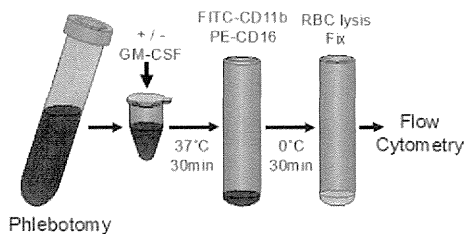
健常ボランティア 38 名、特発製肺胞蛋白症患者 10 名よりヘパリンまたは EDTA によって抗凝固された全血を用いた。

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  $\mu$ 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

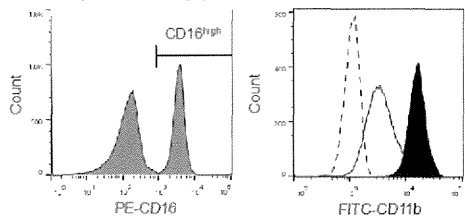


図 2. (左) CD16<sup>high</sup> 集団 (好中球), (右) その表面上の CD11b 発現量 (破線: isotype control, 実線: 基礎値, 塗りつぶし: GM-CSF 刺激後の値)。

## (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、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。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ることがわかった。温度変化が細胞表面の CD11b 上昇を引き起こすことも明らかとなった。

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 3)。

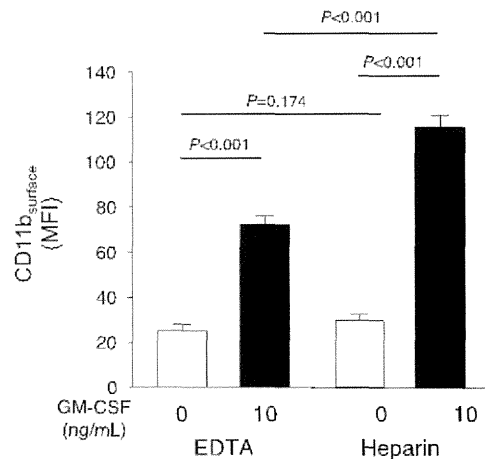


図 3. 抗凝固薬による CD11b の値の違い

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 4A)。細胞内外の CD11b をあわせた total CD11b は有意差が無かった (図 4B, C)。

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、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 5)。

また、過去に我々のグループが開発した、SDS 処理と熱変性による抗原抗体分離後、抗原である GM-CSF を検出する ELISA 法を文献から再検討した。GM-CSF を検出する ELISA に、GM-CSF 抗体を混和すると、複合体となった GM-CSF は検出出来なくなる。そこで、同じサンプルを

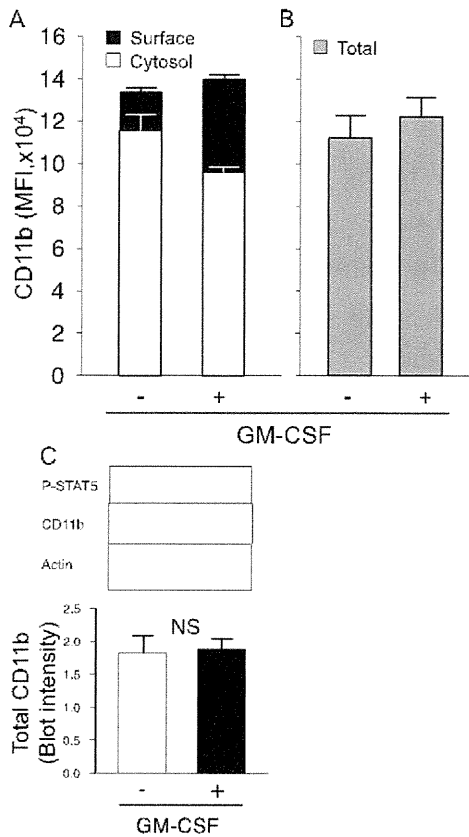


図4. 細胞内外の CD11b の量(A, B)フローサイトメトリ法, (C) ウェスタンブロッティング法

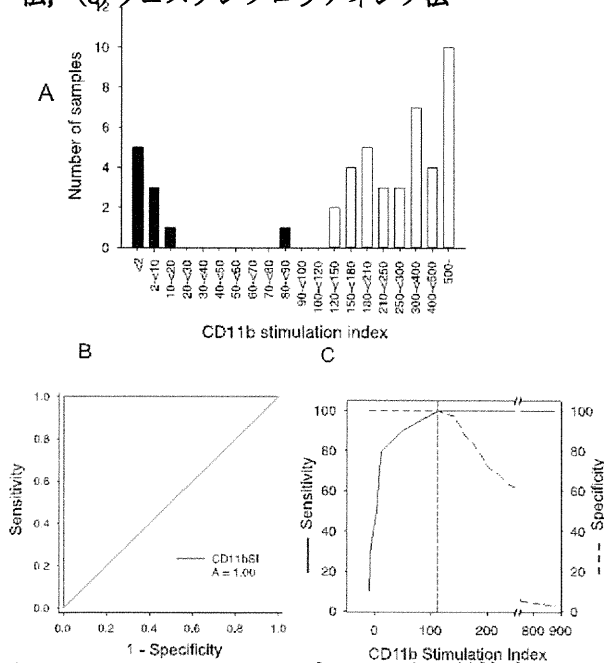


図5. A. CD11bSI のヒストグラム。白：健常者、黒、自己免疫製肺胞蛋白症。B, C, AUC 曲線、112 を診断閾値とすると感度、特異度が 100%となる。

SDS0.8-1.0%で処理をすることにより、抗体と結

合している抗原をほぼ 100%ELISA 法により回収できることを確認した(図6)が、この方法に使用した ELISA 用抗体は現在入手出来ないため、熱変性した GM-CSF をマウスおよびウサギに免疫することで、変性状態の GM-CSF を検出できる ELISA 用抗体のペアの作成準備を開始した。

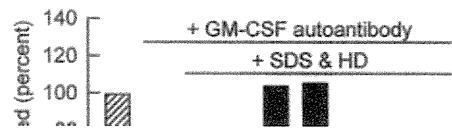
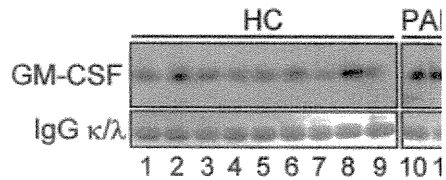


図6. GM-CSF を検出する ELISA.自己抗体と混和すると検出できなくなるが、SDS 処理と熱処理を行うと、SDS 濃度 0.8-1.0%でほぼ 100%GM-CSF が再検出できる。(Uchida et al. Blood. 2009)

#### 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 の臨床適応の際に、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。

また、抗原抗体複合体を形成している GM-CSF を測定することができれば、患者の重症度や治療効果を推定する指標を新たに得る事につながり、治療適応判断や治療中のモニタリング手段としても有効性が期待される。

**E. 結論**

好中球 CD11b 発現量の上昇率を見る CD11b stimulation index 法は、最適化された方法では、堅牢な方法で、肺胞蛋白症診断などに有効である。本方法を用いて、各種 GM-CSF 製剤の力価を検討した。抗原抗体複合体を形成している GM-CSF の測定法は ELISA 法に用いる抗体の作成計画が進行中である。

**F. 健康危険情報**

総括研究報告書にまとめて記入

**G. 研究発表****I. 論文発表 (4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.* 308:L105-L117, 2015
2. Kusakabe Y, Uchida K, Hiruma T, Suzuki Y, Totsu T, Suzuki T, Carey BC, Yamada Y, Trapnell BC. A standardized blood test for the routine clinical diagnosis of impaired GM-CSF signaling using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 413:1-11, 2014
3. 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). *Journal of Veterinary Medical Science.* 76(8).1173-6, 2014
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. *Journal of Immunological Methods*

**II. 学会発表****A. 国際学会 (2件)**

1. Brenna Carey, Claudia Chalk, Kanji Uchida, Takuji Suzuki, Koh Nakata, Yoshikazu Inoue, and Bruce Trapnell. Dried Blood Spot Card Testing For Diagnostic, Epidemiological And Longitudinal Evaluation Of Pulmonary Alveolar Proteinosis: The US National PAP Registry Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A5799.
2. Yoshiomi Kusakabe, Kanji Uchida, Bruce C. Trapnell, and Yoshitsugu Yamada. Validation And Mechanism Of Flow-Based Whole Blood Assay To Evaluate Phagocyte Immune Function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: A4263.

**B. 国内学会 (1件)**

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

**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  
特記すべき事無し

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 実験助手

研究要旨

現在、ヒトの顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)は種特異性が高く、安全性や薬理効果試験に、サルを用いなければ成らないとされてきた。しかし、サルを用いた試験には、動物購入・飼育に要する費用や飼育条件から、多くの動物を用いて実施するのが困難である。サルは、遺伝的な統制がとられていない点、ヒトと同様ではあるが、個体間のばらつきも多く、少数の動物を使った試験の成績では、その信頼性に問題が残る。そこで、サル以外の動物を薬理効果や安全性試験に使用の可能性を評価するために、薬物評価に汎用されるマウスやラットの齧歯目の小型動物および、中型実験動物のイヌ、ウサギ、ネコを用いた。方法は、様々な濃度の sargramostim, molgramostim, CHO 細胞産生 GM-CSF (CHO-GM) で各動物の末梢血顆粒球を 30 分間刺激し、細胞表面マーカーCD11b の発現を FACSArray で平均蛍光強度 (MFI; mean fluorescence intensity) を測定した。得られた値は、プロビット法によって ED<sub>50</sub> を求め、各動物の感受性の違いを、カニクイザルと比較した。結果、マウスやラットはヒト型 GM-CSF に対し反応しなかった。イヌやウサギ、ネコの顆粒球は molgramostim と CHO-GM 刺激に対し、CD11b 発現の増高が認められた。Molgramostim に対する各種動物の ED<sub>50</sub> をカニクイザルの ED<sub>50</sub> と比較すると、イヌはカニクイザルの 1/8.2、ウサギ 1/57、ネコ 1/60.3 の活性を示した。一方、CHO-GM で比較すると、イヌでは 1/12.7、ウサギ 1/623.9、ネコ 1/792.6 であった。GM-CSF は重量あたりの生理活性が非常に高いことから、薬理効果試験や安全性の評価にイヌを用いることができることが示唆された。

サルにとってヒト型 GM-CSF は異種タンパクであり、その中和抗体産生は薬理効果や安全性に好ましからぬ影響を与える可能性が考えられる。そこで、ヒト型 GM-CSF を長期投与されたカニクイザルの血漿の中和活性の推移を調べた。GM-CSF は molgramostim と CHO-GM を使い、鼻口マスクを使って、各 2 頭ずつに週 2 または 1 回、12 週間吸入投与した。さらに、約 3 ヶ月の休薬期間を置いて、3 回繰り返した。測定法は、希釈血漿と GM-CSF とを 37°C で反応させ、残った GM-CSF の活性を TF-1 細胞の増殖で測定した。血漿の中和活性はプロビット法を用いて、IC<sub>50</sub> を算出した。第 1 コース、抗体は吸入開始 3-4 週間目全頭に確認された（新潟大学データ）が、中和活性は 7 週目から、molgramostim を投与した 1 頭のみ認められ、時間経過と共に上昇した。さらに、休薬後、第 2 コースの投与で、第 1 コースに中和活性を認めたカニクイザルと CHO-GM 投与したカニクイザル、計 2 頭に中和活性を認めた。この 2 頭の中和活性は、抗体量の推移に類似していたが、molgramotim を投与した、もう 1 頭は抗体量が上昇した（新潟大学データ）にも関わらず、中和活性を認めなかった。第 3 コースの吸入では、前出の CHO-GM 投与カニクイザル血漿中に中和活性を認めたが、molgramostim を投与したカニクイザルは中和能が低値で推移した。カニクイザルは、外来性の GM-CSF に対し、全頭に抗体産生応答を示した（新潟大学データ）が、中和活性は半分の動物にしか認められず、個体差が大きかった。