

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03686

研究課題名(和文)喫煙肺胞蛋白症患者のための新規GM-CSF吸入治療プロトコルの開発

研究課題名(英文) Novel protocols of inhaled GM-CSF therapy for smoker patients with pulmonary alveolar proteinosis

研究代表者

田澤 立之 (TAZAWA, Ryushi)

東京医科歯科大学・学生支援・保健管理機構・教授

研究者番号：70301041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肺胞蛋白症(aPAP)に対する新規治療である顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)吸入治療の治療抵抗例の対策を検討した。他のびまん性肺疾患での抗GM-CSF抗体陽性例を検索して過敏性肺炎症患者で陽性例が少数みられ間質性肺炎マーカーとの関連が示唆された。GM-CSF経気道投与とリツキシマブに抗体抑制のためリツキシマブを先行投与し重篤な副作用なく初期の抗体産生抑制効果が示唆された。吸入方法改善のため、高分子のGM-CSFの気道～血中への薬物動態の数理モデルを作成し気管支内への薬剤沈着と気管支から肺胞への移流が重要な要素であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

aPAPに対するGM-CSF吸入製剤は本年薬機法による製造販売承認があり今後実地臨床での使用が進められるが、その際に大きく参考となる研究成果が得られた。診断に有用な抗GM-CSF抗体について知見が得られ、GM-CSF気道投与とリツキシマブ静脈注射の併用の可能性がリツキシマブで検討され、効率のよい吸入方法を考えるため、過去の非臨床試験データを基盤に、分子量の大きいGM-CSF製剤の気道～血中への薬物動態の数理モデルが作成され、1回換気量や呼吸回数が吸気の薬剤濃度・滞留時間に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted the following studies on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) inhalation therapy for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis (aPAP), which Japanese authority recently approved. A search for positive cases in other diffuse lung diseases revealed a few positive cases in patients with hypersensitivity pneumonitis. We attempted to rhGM-CSF inhalation treatment in combination with rituximab to suppress anti-GM-CSF antibodies in four cynomolgus monkeys at a fully AAALAC certified facility under the approval of the Animal Experiment Ethics Committees. The animals completed treatment without any serious side effects, and the antibody production was suppressed at the initial stage of the inhalation. To consider an efficient inhalation method, we created a mathematical model for the pharmacokinetics of GM-CSF from the respiratory tract to the bloodstream, suggesting the importance of drug deposition in the bronchi and advection to the alveoli.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：GM-CSF 抗GM-CSF抗体 GM-CSF吸入治療 肺胞蛋白症 リツキシマブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫性肺胞蛋白症 (aPAP) は、抗 GM-CSF 自己抗体の出現により、肺胞マクロファージの分化増殖が障害され、肺胞クリアランス機能が低下し、肺胞のサーファクタント由来物質が貯留して、呼吸不全をきたす肺稀少疾患である。GM-CSF 吸入療法は、吸入投与した GM-CSF が肺胞内の病因物質である抗 GM-CSF 自己抗体を一時的に凌駕することで、肺胞マクロファージのサーファクタント物質除去能の回復をめざすもので、本邦での医師主導治験 PAGE 試験で有効性が証明された。しかし喫煙者・既喫煙者群では AaDO2 の改善が不十分だった。この原因として、喫煙による抗体産生などの免疫変容や気道上皮への影響が考えられた。実際に、喫煙・既喫煙者では血清抗 GM-CSF 自己抗体の上昇が非喫煙群に比べて有意に高かった。そこで、当初本研究では aPAP 患者および他のびまん性肺疾患患者の臨床検体を用いて喫煙者の特性を調べ、さらにカニクイザルでの rhGM-CSF 吸入モデルで、抗体産生細胞を抑制するリツキシマブ静注と、GM-CSF 吸入を併用し、抗 GM-CSF 抗体産生と生体の反応を検討する計画を立てた。

(2) しかし、2020 年よりのコロナ禍により、全国の非常事態制限による行動制限や、医療機関の診療制限等により稀少疾患である肺胞蛋白症患者の新規受診が期待できない状況となった。そのため、他のびまん性肺疾患患者 (サルコイドーシスと過敏性肺臓炎) の臨床検体を用いての GM-CSF 抗体検索解析を実施することとした。

(3) カニクイザルでの検討については、国内の AAALAC 完全認証施設に委託して、検討を進めた。当該施設は、COVID-19 が流行する大都市を離れた地方の郊外に所在し、感染予防策も確実にとられて実施された。

(4) 喫煙者を含めて気道内の薬物沈着や気道被覆液の変化が、吸入薬剤の動態にどのように関係するかを考察するため、GM-CSF 吸入薬剤の気道系での動態を数理的に解析するモデルの構築を試みた。基盤のデータとして PAGE 試験以前に行われたカニクイザルでの単回吸入投与による血中薬物濃度推移を用いて高分子である GM-CSF の気道内から血中への動態の数理解析を実施した。

2. 研究の目的

(1) びまん性肺疾患での抗 GM-CSF 抗体陽性例の検索：近年、ヒトの血清中には、各種サイトカインに対する自己抗体が微量存在することが知られている (文献)。抗 GM-CSF 抗体は、クローン病などのような慢性炎症性疾患患者でも検出されることが報告されている (文献)。呼吸器疾患でも、上記の肺胞蛋白症のほか、サルコイドーシスでも低レベルで検出されることが報告 (文献) されている一方、過敏性肺炎や特発性肺線維症患者などの他の間質性肺炎患者の血中での抗 GM-CSF 抗体の検出については包括的な報告が計画時にはなかった。サルコイドーシスや過敏性肺炎と診断されている患者の血清中に抗 GM-CSF 抗体があるかどうかを検索し、陽性例についての臨床的な特徴を検証した。

(2) GM-CSF 経気道投与動物モデルでのリツキシマブ併用：カニクイザルでの経気道的 rhGM-CSF 投与モデルでの抗 GM-CSF 抗体産生が、抗体を産生する B 細胞を抑制する抗ヒト CD20 抗体製剤リツキシマブの併用で抑制されるかを確かめ、抗 GM-CSF 抗体の産生の推移を観察し、あわせてリツキシマブの B 細胞抑制効果および rhGM-CSF 製剤の経気道的投与とリツキシマブの経静脈的投与による全身状態への影響に関する情報を集め、併用療法の可能性を調べた。

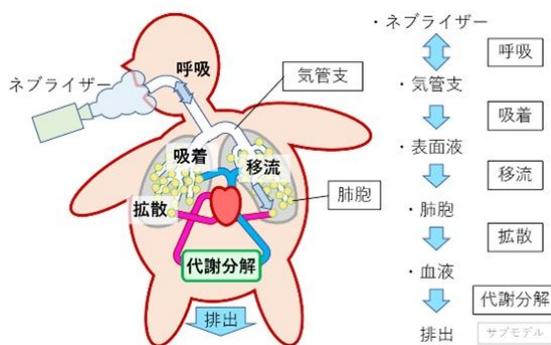
(3) GM-CSF 吸入の薬物動態数理モデル：aPAP に対する GM-CSF 吸入療法は、24 週多施設共同無作為化試験 (PAGE 試験) で有効性が確認され、2024 年 3 月承認となった。喫煙者・非喫煙者を含めて、今後の GM-CSF 吸入治療の実臨床への応用では、吸入薬物動態の個体差に合わせた吸入方法の最適化が必要となる。そこで、過去に実施したカニクイザルでの単回 GM-CSF 吸入投与の非臨床試験のデータを基盤にして吸入 GM-CSF の薬物動態を予測できる数理モデルの作成を試みた。

3. 研究の方法

(1) 東京医科歯科大学呼吸器内科で採取され検体の保管について同意が得られているサルコイドーシス 30 例および過敏性肺炎 31 例の患者検体について、同大学倫理委員会の審査承認を受け、ポスター掲示により臨床データと過去に得られた検体を用いて抗 GM-CSF 抗体が検出を試みることを周知し、抗 GM-CSF 抗体の検索を実施した。得られた測定結果を臨床データとともに解析し、抗 GM-CSF 抗体と、疾患の進行速度や他のバイオマーカーなどとの関連を解析した。

(2) 2 - 3 歳齡の雌カニクイザル 4 例に対して、 rhGM-CSF を 1 週間に 2 回の頻度で 12 週間気管内噴霧投与し、併せて リツキシマブを 2 週間に 1 度の頻度で 6 週間静脈内投与した。グループ 1 の動物 (3 例) では、 のリツキシマブ投与開始後 3 週目からの rhGM-CSF 投与を実施した。グループ 2 の動物 (1 例) では、 の rhGM-CSF 製剤の投与開始後 6 週からのリツキシマブの投与を実施した。一般状態観察、体重測定、血液学的検査 (2 週毎)、血液生化学的検査 (投与前および投与後 3 回)、抗 GM-CSF 抗体検査 (2 週毎) および気管支肺胞洗浄液 (rhGM-CSF 投与前、投与後 6 週、12 週) により評価した。「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、AAALAC International により認証されている動物実験専門施設 (認証番号 001107) に委託して、試験施設の実験審査委員会 (IACUC) ならびに東京医科歯科大学動物実験審査委員会による審査・承認を受けた試験計画書に従って、試験施設の動物実験指針に従い、適正に実施された。気管支肺胞洗浄液採取は、塩酸メドトミジンおよびミタゾラムの筋肉内投与で鎮静後、ケタミンの筋肉内投与を行い、呼吸数・体温・心拍数を目視・触診でモニターしながら、キシロカイン液の口腔内散布後、細径気管支ファイバースコープ (Olympus BF-XP60) を挿入しキシロカイン液の気管支内散布をしながら楔状挿入したスコープを通して、温生理食塩水 5mL の注入・吸引を 5 回行った。血中抗 GM-CSF 抗体については、Anti-GM-CSF ELISA kit (MBL 社 文献) による測定を検査施設で行った。

(3) PAGE 試験に先立つ非臨床試験でのカニクイザルへのネブライザーやマイクロスプレーでの GM-CSF 吸入投与の検討で、スプレー投与等で用量が多いと Tmax が遅れることや、吸入翌日の血中で GM-CSF は検出不可のところ、気管支肺胞洗浄液で検出可能であることより、気道に薬剤が滞留する可能性が示唆された。そこで、吸入薬剤の血中への吸収過程を 薬剤のミスト化、 呼気・吸気の時間変化、 気管支・肺胞表面への吸着、 気管支から肺胞への移流、 肺胞から血液中への拡散、 血中薬剤の代謝分解、 に分けて薬剤血中濃度推移を予測する数理モデルをマクロを用いてエクセルシート上で構築した。

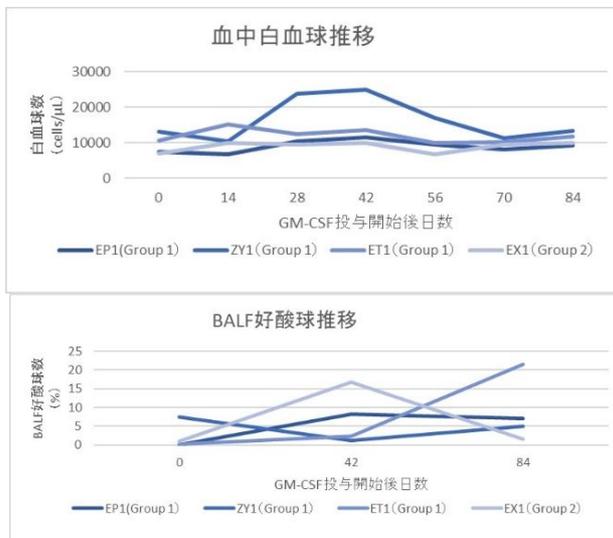


このモデルでは、 で、気体流量、液滴径、薬剤量、薬液量、吸入時間から、ミスト流量と薬剤量を算出し、 で人工呼吸器の設定に沿った形で換気回数・1 回換気量・吸気/呼気比・換気パターンを設定し、換気流量を計算し、 で気腔内の容積と変化・表面積・表面被覆液厚さ・吸着効率を設定し、ミストから被覆液に薬剤が吸着される速度を計算する。 では、表面被覆液は気管支表面から分泌され一部は食道へ排除され、残りが肺胞へ移流して吸収されるとして、表面被覆液の分泌量を設定し、薬剤の排出速度と肺胞への移流速度を計算し、 では、血液量・拡散効率・代謝/分解効率・血流量を設定して、血中への拡散速度と代謝/分解速度を計算する。

4. 研究成果

(1) 先行研究で陽性例のみられたサルコイドーシスについては、30 例の保存血清検体中で抗 GM-CSF 抗体陽性例はみられなかった。過敏性肺炎 31 例の検討では、5 例が基準値を超えて抗 GM-CSF 抗体陽性と判定された。5 例の平均年齢は 68 歳で陰性例群と比較して有意差はなかった。喫煙歴、粉塵暴露歴についても陰性例と比較して有意差がなかった。努力性肺活量等の呼吸機能の指標でも有意差はみられなかった。同時期に他施設で行われた過敏性肺炎患者での同抗体の検索結果 (文献) と同様に間質性肺炎マーカー (KL-6, SP-D) が高値であり、吸入抗原による免疫反応を基盤にした局所の GM-CSF 発現に伴う抗体産生促進が示唆された。

(2) 投与期間中、一般状態、体重、血液生化学では大きな異常変動はみられないまま、投与を終了した。経過中、GM-CSF 吸入後 2 週以降、白血球数、好酸球数の上昇がみられ、rhGM-CSF の作用と考えられたが、各々 25000 台、1000 台の上昇にとどまり、抗 GM-CSF 抗体による抑制作用も考えられた。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中でも、好酸球の分画の増加する例がみられた。抗 GM-CSF 抗体は、グループ 1 (3 例、動物名 EP1、ZY1、ET1) では、リトキシマブの投与を rhGM-CSF 製剤の経気道投与に先行させて実施し、GM-CSF 投与初期の抗体産生を抑制する効果がみられた。グループ 2 (1 例、動物名 EX1) では、rhGM-CSF 吸入を先行させ、6 週後からリツキシマブを投与し



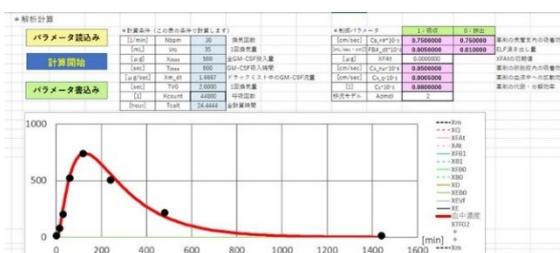
たところ、抗体抑制効果は不十分な結果であった。常用量の投与では、rhGM-CSF とリツキシマブ投与の併用では重篤な有害事象はみられなかった。rhGM-CSF 製剤に先行してのリツキシマブ投与では、GM-CSF 開始後 2 週での抗体はみられず、4 週でも rhGM-CSF 抗体産生は一定の抑制がみられたが、GMCSF 開始して抗体産生をみたあとのリツキシマブ投与では抗体産生を抑制するのは難しいことが示唆された。



(3) このモデルで、吸着効率、移流量 拡散効率、代謝分解効率の設定を調整し、血中濃度推移曲線を実測値にフィットさせることを試みたところ、以下のように調整することが可能だった。

- ・沈着効率が増加すると血中 GM-CSF 濃度も上がる
- ・移流量が増えると血中 GM-CSF 濃度も上がり、Tmax が早まる
- ・拡散効率が上がると血中 GM-CSF 濃度は下がり、Tmax が早まる
- ・代謝分解効率を下げると血中 GM-CSF 濃度は上がる

これにより、各種パラメータ（吸着効率，表面被覆液分泌量，拡散効率，代謝分解効率）を調整し、血中濃度推移の実測値（右図の）をシミュレートすることができた。



このモデルでの吸入方法に関する検討では、吸入効率を高めるためには、気管支への薬剤の吸着量を高めることが重要で、呼吸を維持できる範囲で、1 回換気量を減らして吸気中の薬剤濃度を高め、呼吸回数を下げて薬剤を吸入する時間・薬剤を含む吸気が肺の中にある時間を長くすることが、薬剤の吸収効率を高めるために効果的と考えられた。

作成した数理モデルは、2-3 歳の体重 3kg のカニクイザルでのデータをもとにしており、ヒトの換気量・気腔内表面積等で修正し、血中濃度推移を指標に、換気量，呼吸回数，薬剤投与量等の最適化を行い、成人等に対応できる見通しが示された。

< 引用文献 >

Svenson M, et al. J Clin Invest. 1993;92:2533-9.
 Dabritz J, et al. Am J Gastroenterol. 2013;108:1901-10
 Arai T, et al. Intern Med. 2020;59:2539-2546.
 Nakata K, et al. ERJ Open Res. 2020;6:00259-2019
 Hirose M, et al. Orphanet J Rare Dis. 2021;16:115,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimasaki S, Baba T, Ogura T, Akasaka K, Matsushima H, Izumi S, Takasaki J, Tsushima K, Kinouchi T, Kichikawa Y, Awashima M, Izumo T, Awano N, Nishimura N, Tazawa R, Mikami A, Kitamura N, Ishii H, Kurihara Y, Taniguchi M, Aikawa S, Okada M, Morita Y, Ishikawa Y, Ohinata A, Nakata K.	4. 巻 55
2. 論文標題 Short-term inhalation of sargramostim with concomitant high-dose steroids does not hasten recovery in moderate COVID-19 pneumonia: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 857 ~ 873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23744235.2023.2254380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Papiris SA, Campo I, Mariani F, Kallieri M, Kolilekas L, Papaioannou AI, Gonca Chousein E, Cetinkaya E, Bonella F, Borie R, (25名略) Kanaka-Gantenbein C, Karakatsani A, Loukides S, Costabel U, Crestani B, Morgan C, Tazawa R, Bush A, Griese M, Manali ED.	4. 巻 9
2. 論文標題 COVID-19 in patients with pulmonary alveolar proteinosis: a European multicentre study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ERJ Open Res.	6. 最初と最後の頁 00199-2022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/23120541.00199-2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Oda M, Yamaura K, Ishii H, Kitamura N, Tazawa R, Abe M, Tatsumi K, Eda R, Kondoh S, Morimoto K, Tanaka T, Yamaguchi E, Takahashi A, Izumi S, Sugiyama H, Nakagawa A, Tomii K, Suzuki M, Konno S, Ohkouchi S, Tode N, Handa T, Hirai T, Inoue Y, Arai T, Asakawa K, Tanaka T, Takada T, Nonaka H, Nakata K.	4. 巻 102
2. 論文標題 Quantitative Evaluation of Changes in Three-Dimensional CT Density Distributions in Pulmonary Alveolar Proteinosis after GM-CSF Inhalation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiration	6. 最初と最後の頁 101-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000528038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohkouchi S, Kanehira M, Saigusa D, Ono M, Tazawa R, Terunuma H, Hirano T, Numakura T, Notsuda H, Inoue C, Saito-Koyama R, Tabata M, Irokawa T, Ogawa H, Kurosawa H, Okada Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Metabolic and Epigenetic Regulation of SMAD7 by STC1 Ameliorates Lung Fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 320-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-04450C.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaue S, Yamaguchi E, Inoue Y, (21名略) Tazawa R, (8名略) Ishii H, (19名略) Nakata K, Hirota T, Tamari M, Okada Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic determinants of risk in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21011-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田澤立之	4. 巻 110
2. 論文標題 肺胞蛋白症とGM-CSF吸入治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本内科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1918 - 1925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田澤立之	4. 巻 149巻特別2
2. 論文標題 【免疫・炎症疾患のすべて】免疫・炎症疾患各論/呼吸器疾患 肺胞蛋白症(PAP)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 S247-S249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田澤立之
2. 発表標題 最適な吸入方法とは？ 吸入数値モデルから言えること
3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム「GM-CSF承認後の自己免疫性肺胞蛋白症診療」（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Koh Nakata, Ryushi Tazawa, Page Research Group, Nobutaka Kitamura, Haruyuki Ishii.
2. 発表標題 Two-year cohort study after GM-CSF inhalation therapy for autoimmune pulmonary alveolar proteinosis
3. 学会等名 The 2023 ERS International Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田澤立之
2. 発表標題 肺胞蛋白症とGM-CSF吸入療法
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会シンポジウム「難治性呼吸器疾患に対する吸入療法の新展開」2022年12月2日（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田澤立之
2. 発表標題 肺胞蛋白症とGM-CSF吸入治療
3. 学会等名 第118回日本内科学会講演会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Tazawa, (11名略) H. Ishii, (15名略) T. Tanaka, T. Takada, A. Mikami, N. Kitamura, K. Nakata.
2. 発表標題 Antibody Against Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and Inhaled GM-CSF for Pulmonary Alveolar Proteinosis.
3. 学会等名 ATS 2020 Virtual American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田澤立之「肺胞蛋白症」 in 弦間昭彦、西岡安彦、矢寺和博 編集	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 516
3. 書名 呼吸器疾患最新の治療2023-2024	

1. 著者名 田澤立之「肺胞蛋白症」 in 福井 次矢、高木 誠、小室 一成 総編集	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2224
3. 書名 今日の治療指針 2022年版 [デスク判]	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石井 晴之 (Ishii Haruyuki) (30406970)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中田 光 (Nakata Koh) (80207802)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授 (13101)	
研究分担者	田中 崇裕 (Tanaka Takahiro) (70455400)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	
研究分担者	小松崎 恵子 (Keiko Komatsuzaki) (50867306)	東京医科歯科大学・職員健康管理室・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関