

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

BMP-2 は悪性線維性組織球腫の予後因子である

分担研究者 内田 淳正 三重大学医学部整形外科教授

研究要旨 悪性線維性組織球腫（MFH）は、化学療法や放射線療法を併用することも多いが、いずれも十分な効果を得られないことが多く、今なおその 5 年生存率は 40～60% と予後の悪い疾患である。今回予後因子を検索する目的で、BMP-2（Bone Morphogenetic Protein-2）の発現の予後に及ぼす影響を免疫組織学的手法を用いて検討したところ、単変量、多変量解析の結果、BMP-2 高発現群は低発現群に比して有意に予後が良いことが明らかとなった。

A. 研究目的

悪性線維性組織球腫（MFH）において、BMP-2（Bone Morphogenetic Protein-2）の発現が、予後に及ぼす影響を検討すること。

B. 研究方法

三重大学および大阪大学にて 1986 年から 2002 年の間に治療を受けた高悪性度の軟部 MFH29 症例（男 15 例、女 14）を対象とした。外科的切除を施行され、内 11 症例は化学療法を単独で併用、5 症例は放射線療法単独、8 症例はその両者を併用されたものである。これらの症例より得られた組織よりパラフィン包埋切片を作成し、BMP-2 特異的モノクローナル抗体を用い BMP-2 の免疫組織染色を行なった。また染色結果を、染色される腫瘍細胞の割合により BMP-2 高発現群（14 症例）と低発現群（15 症例）に分けたのち、臨床情報を含めて統計学的に解析した。

C. 結果

1. 全ての症例に BMP-2 の発現がみられ、また染色はいずれも腫瘍細胞の細胞質に局在し、組織型とは無関係に広くみられた。
2. Kaplan-Meier 法によって算出された全 29 症例の累積 5 年生存率は 59.1%であった
3. BMP-2 高および低発現群各々の 5 年生存率はそれぞれ 85.7%と 36.1%であり統計学的有意差を認めた (log-rank test)。
4. BMP-2 高および低発現群各々の累積 5 年無病生存率は 65.7%と 16.9%であり、統計学的有意差を認めた (log-rank test)。
5. 多変量解析 (Cox-regression analysis) においても累積 5 年生存率・累積 5 年無病生存率とも唯一 BMP-2 高陽性群のみが有意に予後よかった。

D. 考察

BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) は TGF- β (Transforming Growth Factor- β) に属する活性型蛋白で、骨形成蛋白と訳されているようにもとは Urist らによって異所性骨化を誘導する蛋白として紹介され、骨の形成に大きな関わりを持つものと考えられていた。しかし現在ではその骨形成能のみならず、種々のレセプターを介し多機能未分化間葉系細胞の細胞遊走や細胞間接着等に関与し、これら胎生期における神経、筋、軟骨や心臓等の臓器の形成過程において極めて重要な役割を担っていることも判明している。今回 BMP-2 が MFH の生物学的特性になんらかの形で深く関与し、予後因子であることが判明した。今後治療方針の決定に BMP-2 発現の有無を加味することが可能であり、BMP-2 は臨床的にも有用な Biomarker と考えられた。

E. 結論

悪性線維性組織球腫(MFH)において、BMP-2(Bone Morphogenetic Protein-2) 発現は予後因子となりうる。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Asano N Yamazaki T Seto M Matsumine A
Yoshikawa H Uchida A:The expression and prognostic
significance of bone morphogenetic protein-2 in patients
with malignant fibrous histiocytoma.

J Bone Joint Surg 86B:607-612 2004

Matsumine A Myoui A Kusuzaki K Araki N Seto M Yoshikawa H Uchida A:Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumor surgery
J Bone Joint Surg 86B:719-725 2004

Asanuma K Wakabayashi H Hayashi T Okuyama N Seto M Matsumine A Kusuzaki k Uchida A
Thrombin Inhibitor, Argatroban, Prevents Tumor Cell Migration and Bone Metastasis
Oncology 67:166-173 2004

Kudawara I Araki N Myoui A Kato Y Uchida A
Yoshikawa H:New cell lines chondrocytic phenotypes from human chondrosarcoma
Virchow Arch 444:577-586 2004

Uchida A Wakabayashi H Okuyama N Matsumine A Kusuzaki K:Metastatic bone disease: pathogenesis and strategies for treatment.J Orthop Sci 9:415-420 2004

Fukuda A Kusuzaki K Hirata H Matsubara T Seto M Matsumine A Uchida A
Metastasis of malignant peripheral nerve sheath tumor to free vascularized myocutaneous flap
Oncol Rep 13:295-297 2005

Yoshida K Kusuzaki K Matsubara T Matsumine A Kumamoto T Komada Y Naka N Uchida A
Periosteal Ewing' s sarcoma treated by photodynamic therapy with acridine orange
Oncol Rep 13-279-282 2005

2. 学会発表

Miyazaki S, Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Okamura A, Okuyama T, Seto M, Shiraishi T, Nobori T, Uchida A
Expression of Methlthioadenosine Phospholyrase in Osteosarcoma
50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (March 7-10,2004)

Asanuma K, Wakabayashi H, Okuyama N, Seto M, Matsumine A, Kusuzaki K, Asanuma K, Uchida A
Prevention of Bone Metastasis in Human Breast Cancer by The Thrombin Inhibitor
50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (March 7-10,2004)

Hirata H, Nagakura T, Tsujii T, Morita A, Yoshida T, Fujisawa K, Uchida A
ECM Remodeling Causes Carpal Tunnel Syndorome
50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (March 7-10,2004)

Tsujii M, Hirata H, Nagakura T, Morita A, Yoshida T, Fujisawa K, Uchida A
Roles of Tenascin C, PG-E2 and MMP2 in CTS
50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (March 7-10,2004)

Yamada M, Masuda K, Uchida A
Osteogenetic Protein-1 Stimulates The Production and Accumulation of Proteoglycan by Tendon Cells
The 15th Korean-Japanese Combined Orthopaedic Symposium(June 24-26,2004)

Hioki Y, Kaneko T, Mizutani N, Uchida A
Management and Outcome on Preventing Falls in Our Hospital
International Society for Fracture Repair Symposium (June 29-July 1,2004 Yokohama, Japan)

Matsumine A, Kusuzaki K, Ueda T, Okamura A, Uchida A
Small leucine-rich proteoglycan, decorin expression as a biomarker of outcome in soft tissue tumor
40th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (June,2004 New Orleans, LA)

Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K, Araki N, Ueda T, Seto M, Okuyama N, Yoshikawa H, Uchida A
Long-term follow-up study of calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumor surgery
5th Meeting of Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society (April, 2004 Izmir, Turkey)

Tomoda R, Okuyama N, Matsumine A, Kusuzaki K, Seto M, Uchida A
Survival and revision of tumor knee prosthesis
5th Meeting of Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society (April, 2004 Izmir, Turkey)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究

分担研究者 吉川 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）教授

研究要旨 骨・軟部悪性腫瘍に対する WT1 ペプチドを用いた腫瘍特異的免疫療法の開発

A. 研究目的

骨・軟部悪性腫瘍（肉腫）に対する WT1 遺伝子産物を分子標的とした腫瘍特異的免疫療法の有効性を検討すること。

B. 研究方法

昨年までの研究により我々は、種々の骨・軟部悪性腫瘍において正常軟部組織に比し WT1 遺伝子の過剰発現を高率に認める（36 例中 27 例(75%)) ことを明らかにし、免疫組織染色でも腫瘍細胞に WT1 蛋白の発現がみられることを確認した。さらには、WT1 が正常組織では生殖器、腎、造血前駆細胞および中皮組織など限局性にしか発現していないことから、WT1 遺伝子産物を分子標的とした腫瘍特異的免疫療法の可能性が示唆される。本学の杉山らは、HLA 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導し WT1 発現癌細胞を傷害する WT1 ペプチドを用いた腫瘍ワクチン療法を開発した。白血病、肺癌、乳癌患者を対象とした臨床第 I 相試験により、WT1 ペプチドの安全性を確認した後、平成 16 年 1 月より、「WT1 ペプチドを用いた悪性固形腫瘍に対する免疫療法の第 III 相臨床試験」（骨・軟部肉腫を含む）が本学医学倫理委員会の承認を経て本格的に開始された。本臨床試験を通じて、これまで難治性の疾患であった骨・軟部悪性腫瘍に対する新規の治療戦略である腫瘍特異的免疫療法の有効性につき評価・検討を行った。

（倫理面への配慮）

各患者に本臨床試験の概要につき十分説明し文書による同意を得た上で、参加してもらっている。また臨床試験実施の際には、その安全性に十分配慮の上遂行している。

C. 結果

今までのところ、骨・軟部悪性腫瘍症例の本臨床試験へのエントリーは 6 例である。組織診断別の内訳は、軟部肉腫が 4 例(PNET2 例、MFH1 例、線維肉腫 1 例)、骨腫瘍が 2 例（淡明細胞軟骨肉腫 1 例、間葉性軟骨肉腫 1 例）で、比較的進行例が

多く、明らかに臨床的に WT1 ペプチド療法の有効性を示した症例は未だ認めていない。安全性については、本ワクチン療法に伴う重篤な副作用は皮内投与局所の発赤・腫脹以外見られていない。

D. 考察

高悪性度骨・軟部腫瘍の治療成績は、外科的手術療法に加え、化学療法と放射線療法併用による集学的治療の進歩により改善してきたが、肺を中心に遠隔転移を来し易く、未だ十分に予後良好な疾患とは言い難い。今後さらなる予後改善のためには、遠隔転移の制御が不可欠の課題である。そこで従来 of 全身化学療法に加え、遠隔転移の制御を目的とした腫瘍特異的免疫療法は有効な治療手段となる可能性があると考えられる。そこで今回我々は、骨・軟部悪性腫瘍を含む種々の悪性腫瘍に共通して高率に過剰発現している WT1 遺伝子産物を標的とした、WT1 ペプチド腫瘍ワクチン療法の臨床試験を開始した。骨・軟部悪性腫瘍においては臨床的に有効な症例は未だ認められないが、脳腫瘍や乳癌の一部で有効と思われる症例が見られることから、今後さらに症例を増やし(30 例を予定)、骨・軟部悪性腫瘍においても有効例を探索・評価することにより、腫瘍特異的免疫療法の確立を目指したい。

E. 結論

- 1) 骨・軟部悪性腫瘍に対する WT1 ペプチドを用いた腫瘍特異的免疫療法の第 II 相臨床試験を開始した。
- 2) 現在まで、6 例の骨・軟部悪性腫瘍症例がエントリーされ、臨床的に有効と判断された症例は未だないが、安全性に関しては、皮内投与局所の発赤・腫脹以外はとくに見られていない。

F. 健康危険情報

大阪大学において、WT1 ペプチドを用いた白血病・肺がん・乳がんに対する腫瘍特異的免疫療法

の第Ⅰ相臨床試験が実施され、副作用等を含めた臨床データが集積されたが、WT1 ペプチド投与に伴う重篤な副作用はとくに認められなかった。さらに今回の第Ⅱ相臨床試験においても、現時点で重篤な副作用は認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ochi, K., Daigo, Y., Katagiri, T., Nagayama, S., Tsunoda, T., Myoui, A., Naka, N., Araki, N., Kudawara, I., Ieguchi, M., Toyama, Y., Toguchida, J., Yoshikawa, H., Nakamura, Y.: Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma by gene-expression profiles. *International Journal of Oncology*, 24:647-655, 2004.

Sakaura, H., Hosono, N., Mukai, Y., Ishii, T., Yonenobu, K., Yoshikawa, H.: Outcome of total en bloc spondylectomy for solitary metastasis of the thoracolumbar spine. *Journal of Spinal Disorders and Tech.*, 17:297-300, 2004.

Kudawara, I., Araki, N., Myoui, A., Uchida, A., Fukuda, H., Yoshikawa, H.: Synovial sarcoma after chemotherapy for osteosarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 418:198-201, 2004.

Asano, N., Yamazaki, T., Seto, M., Matsumine, A., Yoshikawa, H., Uchida, A.: The expression and prognostic significance of bone morphogenetic protein-2 in patients with malignant fibrous histiocytoma. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 86 B:607-612, 2004.

Yoshikawa, H., Nakase, T., Myoui, A., Ueda, T.: Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *Journal of Orthopaedic Science*, 9:334-340, 2004.

Fang, Z., Matsumoto, S., Ae, K., Kawaguchi, N., Yoshikawa, H., Ueda, T., Ishii, T., Araki, N., Kito, M.: Postirradiation soft tissue sarcoma: a multiinstitutional analysis of 14 cases in Japan. *Journal of Orthopaedic Science*, 9:242-246, 2004.

Nakanishi, H., Araki, N., Joyama, S., Higuchi, C., Mano, M., Ishiguro, S., Itoh, K., Ueda, T., Yoshikawa, H.: Myxoid Liposarcoma With Adipocytic Maturation: Detection of TLS/CHOP Fusion Gene Transcript. *Diagn Mol Pathol*, 13:92-96, 2004.

Nakanishi, H., Araki, N., Kuratsu, S., Narahara, H., Ishikawa, O., Yoshikawa, H.: Skeletal metastasis in patients with gastric cancer. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 423:208-212, 2004.

Higashiyama, M., Kodama, K., Takami, K., Higaki, N., Yamada, T., Mano, M., Tsukamoto, Y., Araki, N., Yoshikawa, H.: Surgical treatment of bone metastasis followed by a primary lung cancer lesion: report of a case. *Surgery Today*, 34:600-605, 2004.

Ida, K., Kawaguchi, S., Sato, Y., Tsukahara, T., Nabeta, Y., Sahara, H., Ikeda, H., Torigoe, T., Ichimiya, S., Kamiguchi, K., Wada, T., Nagoya, S., Hiraga, H., Kawai, A., Ishii, T., Araki, N., Myoui, A., Matsumoto, S., Ozaki, T., Yoshikawa, H., Yamashita, T., Sato, N.: Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A*2402 anchor substitute. *Journal of Immunology*, 173:1436-1443, 2004.

Kudawara, I., Araki, N., Myoui, A., Kato, Y., Uchida, A., Yoshikawa, H.: New cell lines with chondrocytic phenotypes from human chondrosarcoma. *Virchows Archives*, 444:577-586, 2004

Matsumine, A., Myoui, A., Kusuzaki, K., Araki, N., Seto, M., Yoshikawa, H., Uchida, A.: Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumor surgery. A long term follow-up study. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 86B:719-725, 2004.

Nakanishi, H., Yoshioka, K., Joyama, S., Araki, N., Myoui, A., Ishiguro, S., Ueda, T., Yoshikawa, H., Itoh, K.: IL-6/soluble IL-6R signaling attenuates proliferation and invasion, and induces morphological changes of a newly established pleomorphic malignant fibrous histiocytoma. *American Journal of Pathology*, 165:471-480, 2004.

名井陽、菅野伸彦、小山毅、山梨亘、玉井宣行、上田孝文、吉川秀樹、越智隆弘：骨盤類骨骨腫に対するナビゲーションを利用した小侵襲切除術。整形外科, 55:1466-1467, 2004.

名井陽、吉川秀樹、荒木信人：骨腫瘍。NEW MOOK 整形外科, 15:193-204, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

いずれもなし。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究

分担研究者 尾崎敏文 岡山大学整形外科講師

研究要旨 1、従来の比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法に加えてマイクロアレイ CGH 法を用いて、骨軟部腫瘍の遺伝子・染色体変異の研究を行う。解析によって得られた染色体・遺伝子変異の結果を基に、腫瘍の発生原因の検討、診断の簡便化、新しい治療戦略につながる可能性が期待される。2、滑膜肉腫に特異的な融合遺伝子 SYT-SSX は脱アセチル化酵素複合体(HDAC)と強く結合することが判明している。今回、HDAC 阻害剤である FK228 を用いて滑膜肉腫細胞株に対する腫瘍増殖抑制効果を検討した。

A. 研究目的

1、我々は、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法を用い、軟部肉腫症例の遺伝子・染色体変異の研究を行っている。多数の軟部肉腫の遺伝子・染色体変異の解析を重ねる事により、腫瘍発生のメカニズムの解明だけでなく、新しい診断方法や新しい治療方法の開発を目的とする。今年度は引き続き悪性線維性組織球腫 (MFH) の CGH を行った。

2、これまでの我々の研究により、滑膜肉腫に特異的な SYT-SSX は脱アセチル化酵素複合体と強く結合することにより、滑膜肉腫の腫瘍化に重要な影響を与えているのではないかという可能性が示唆された。このことより、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤FK228が滑膜肉腫に著効すると考え、その有効性を検討した。

B. 研究方法

1、-80℃に保存されている悪性軟部腫瘍を対象に、遺伝子・染色体変異を CGH 法により解析した。得られた結果と、腫瘍の病理組織学的特徴や臨床経過等を比較検討した。変異を高頻度に認められた症例に対しては、マイクロアレイ CGH 法を追加し、変異遺伝子の特定を行った。

(倫理面への配慮) 本研究を施行するにあたっては、施設内の倫理委員会の了承を得た。文部科学省・厚生労働省・経済産業省による、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に準じて行い、十分なインフォームドコンセントを得、個人情報の保護を徹底し、同意の撤回は随時可能と明記し患者・家族の利益を守るようにした。

2、滑膜肉腫細胞株 5 株を用いて、FK228 を投与し、MTT assay を行った。また、各滑膜肉腫細胞株

の細胞浮遊液をマウス皮下に注射し、腫瘍を形成させた後、FK228 を尾静脈より静注し、*in vivo* での腫瘍抑制効果を検討した。

C. 結果

1、MFH の CGH 法による解析では、全例何らかの変異を認めた。特に変異の多かった領域は gain : 1p, 4p, 5p, 12q, loss : 2q, 3p, 16q, 19p であった。CGH の結果と臨床的な予後との比較では、6p12、18q11.2 の gain、2q37 の loss で予後との相関を認めた。

2、MTT assay を用いて解析したところ、濃度依存的に増殖抑制効果を示した。IC50 は滑膜肉腫に対しては 0.02-0.2nM であった。*In vivo* においても、FK228 投与群では著明な腫瘍の縮小を認めた。

D. 考察

1、各腫瘍にいくつかの特徴的な、遺伝子・染色体変異が認められた。MPNST における変異は他の腫瘍より高頻度に出現し、DAB2 と EGFR の gain や、CDH1 の loss が好発する。滑膜肉腫では、monophasic は biphasic よりも遺伝子・染色体変異の点から不安定で、PDGFRA、EGFR、FGFR1、SAS、MDM2 等の gain が高頻度に出現する。脂肪肉腫と MPNST では、予後因子不明であったが、滑膜肉腫、MFH では、変異数と数個の gain が予後と関係あった。

2、滑膜肉腫細胞株に対する FK228 の腫瘍増殖抑制効果は、今までに報告された他の腫瘍細胞株よりも遥かに低濃度であった。

E. 結論

それぞれの組織型で特徴的な染色体・遺伝子変異が認められた。CGH の結果から見た予後因子も検

出された。

HDAC 阻害剤 (FK228) は滑膜肉腫細胞株に対して *in vivo*、*in vitro* で著明な腫瘍抑制効果を認めた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Umehara N, Ozaki T, Sugihara S, Kunisada T, Morimoto Y, Kawai A, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Influence of telomerase activity on bone and soft tissue tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130: 411-16, 2004.

Ozaki T, Wai D, Schaefer KL, Lindner N, Boecker W, Winkelmann W, Dockhorn-Dworniczak B, Poremba C. Comparative genomic hybridization in cartilaginous tumors. *Anticancer Res*, 24: 1721-5, 2004.

Ito T, Ouchida M, Ito S, Jitsumori Y, Morimoto Y, Ozaki T, Kawai A, Inoue H, Shimizu K. SYT, a partner of SYT-SSX oncoprotein in synovial sarcomas, interacts with mSin3A, a component of histone deacetylase complex. *Lab Invest* (in press).

Ito T, Ouchida M, Morimoto Y, Yoshida A, Jitsumori Y, Ozaki T, Sonobe H, Inoue H, Shimizu K. Significant growth suppression of synovial sarcomas by the histone deacetylase inhibitor FK228 *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters* (in press).

尾崎敏文. Topics マイクロアレイ CGH. 医学のあゆみ, 209: 187-8, 2004.

沼本邦彦, 尾崎敏文, 国定俊之, 大畑範英, 井上 一. 当科における軟骨肉腫の治療成績. 中部日本整形外科学会雑誌, 47: 157-158, 2004.

大畑範英, 尾崎敏文, 国定俊之, 森本裕樹, 井上 一. 当科における腹壁外デスマイドの治療成績. 中部日本整形外科学会雑誌, 47: 143-144, 2004.

中川寧子, 尾崎敏文, 国定俊之, 井上 一. 孤立性骨腫瘍の治療成績. 中部日本整形外科学会雑誌, 47: 141-142, 2004.

武田健, 尾崎敏文, 国定俊之, 杉原進介, 井上 一. 腫瘍切除後、加温骨処理を行った症例. 中部日本整形外科学会雑誌, 47: 1065-1066, 2004.

尾崎敏文, 濱田全紀, 国定俊之, 千田益生, 井上 一. AI 回転形成術後のリハビリテーションマニュアル. 整形外科 2004, 55: 1479-1482, 2004.

2. 学会発表

武田 健, 尾崎敏文, 杉原進介, 国定俊之, 井上 一. 骨腫瘍切除後の処理骨利用による再建術の成績 腫瘍切除後、加温骨処理を行った症例. 中部整形災誌, 47 巻春季学会: 124, 2004.

光吉五朗, 尾崎敏文, 国定俊之, 井上 一, 金澤 右. 骨腫瘍に対する CT ガイド下針生検術の有用性. 中部整形災誌, 47 巻春季学会: 36, 2004.

北村亜以, 阿部信寛, 奥田和弘, 尾崎敏文, 井上 一. 膝関節に発生した腫瘍様滑膜炎の 1 例. 岡山医学会雑誌, 115: 268, 2004.

国定俊之, 光嶋 勲, 尾崎敏文, 沼本邦彦, 井上 一. 穿通枝皮弁を用いて再建した骨軟部腫瘍の治療成績. 日本整形外科学会雑誌, 78: S474, 2004.

尾崎敏文, 国定俊之, 小野 敦, 土井英之, 川井 章, 井上 一. 骨・軟部腫瘍における MRI の進歩. 日本整形外科学会雑誌, 78: S490, 2004.

尾崎敏文, 国定俊之, 吉田晶, 森本裕樹, 川井 章, 井上 一, 長谷川匡, 横山良平, Christopher Poremba. Ewing 腫瘍における染色体不安定性の研究. 日本整形外科学会雑誌, 78: S268, 2004.

奥田和弘, 井上 一, 国定俊之, 尾崎敏文. 腫瘍型人工骨頭置換術を施行した大腿骨近位部腫瘍患者の歩行分析. リハビリテーション医学, 41: 183, 2004.

沼本邦彦, 尾崎敏文, 橋詰博行, 国定俊之, 井上 一, 光嶋 勲. 手に発生した骨軟部肉腫の治療と再建. 日本マイクロサージャリー学会誌, 17: 194-195, 2004.

国定俊之, 尾崎敏文, 橋詰博行, 武田健, 井上一, 光嶋 勲. 穿通枝皮弁を用いて再建した骨軟部腫瘍の治療経験. 日本マイクロサージャリー学会誌, 17: 136, 2004.

沼本邦彦, 尾崎敏文, 国定俊之, 大畑範英, 中川寧子, 武田 健, 吉田 晶, 井上一. 当科における骨原発軟骨肉腫の治療成績. 日本整形外科学会雑誌, 78: S700, 2004.

松本俊之, 尾崎敏文, 中川寧子, 森本祐樹, 井上一. 孤立性骨嚢腫の治療成績. 日本整形外科学会雑誌, 78: S697, 2004.

荒瀧慎也, 尾崎敏文, 田中雅人, 国定俊之, 生熊久敬, 中原進之介, 井上一. 当科における椎体悪性腫瘍の治療経験. 日本整形外科学会雑誌, 78: S692, 2004.

中川寧子, 尾崎敏文, 吉田 晶, 沼本邦彦, 大畑範英, 武田健, 井上一. 神経性腫瘍における CGH 法を用いた染色体不安定性の解析. 日本整形外科学会雑誌, 78: S677, 2004.

大畑範英, 尾崎敏文, 大内田守, 国定俊之, 沼本邦彦, 清水憲二, 井上一. CGH 法, マイクロサテライト解析を用いた骨肉腫における染色体不安定性の検討. 日本整形外科学会雑誌, 78: S674, 2004.

井谷智, 尾崎敏文, 沼本邦彦, 青江 基, 井上一. 脂肪芽細胞腫の 2 例. 日本整形外科学会雑誌, 78: S655, 2004.

狩野岳士, 尾崎敏文, 国定俊之, 井上一, 小野 敦. 軟部腫瘍における Dynamic MRI の有用性. 日本整形外科学会雑誌. 78: S649, 2004.

武田 健, 尾崎敏文, 国定俊之, 中川寧子, 大畑範英, 沼本邦彦, 吉田 晶, 川井 章, 井上一. 骨肉腫に関連した二次性悪性腫瘍の 6 例. 日本整形外科学会雑誌, 78: S643, 2004.

杉原進介, 時岡孝光, 高尾 敦, 遠藤裕介, 島津裕和, 岩田 純, 沼本邦彦, 尾崎敏文, 井上一. 軟部悪性線維性組織球腫の切除縁画像評価の限界についての検討. 日本整形外科学会雑誌, 78: S638, 2004.

尾崎敏文, 光吉五朗, 国定俊之, 内藤訓子, 川井 章, 金澤 右, 濱崎周次, 井上一. 骨軟部腫瘍に対する針生検術の適応と限界. 日本整形外科学会雑誌, 78: S565, 2004.

国定俊之, 奥田和弘, 尾崎敏文, 遠藤裕介, 千田益生, 井上一. 腫瘍型人工骨頭置換術を施行した大腿骨近位部腫瘍患者の歩行分析. リハビリテーション医学, 41 Suppl: S229, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（特に FK228）軟部肉腫（特に滑膜肉腫）に対する用途特許」
日本出願（平成 15 年 6 月 27 日、
出願番号：特願 2003-183643）

当該用途特許の PCT による国際出願
（平成 16 年 6 月 1 1 日）とアメリカへ同時に
出願した（平成 16 年 6 月 29 日）。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究

分担研究者 戸口田 淳也 京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野教授

研究要旨 滑膜肉腫(synovial sarcoma, SS)における fibroblast growth factor (FGF) シグナルの役割を解析し、その阻害剤の分子標的治療剤としての意義を検討した。SS は腫瘍組織及び細胞株の両者において、FGF18 を始めとする複数の FGF 遺伝子を発現かつ培養上清中に分泌し、更に複数の受容体(FGFR)を発現しており、自己分泌機構の存在が伺われた。組換え蛋白の添加により、DNA 合成は亢進し、その際に ERK 及び p38 のリン酸化が亢進した。一方 FGFR 特異的阻害剤の添加により、濃度依存性に増殖は阻害され、その際には ERK のリン酸化が阻害されていたことより、FGFR から ERK へのシグナルが増殖に重要であることが判明した。増殖抑制効果は細胞周期停止によるものであり、その効果は *in vivo* においても観察され、FGFR 阻害剤が SS に対する新規治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

高悪性度軟部肉腫、特に紡錘形細胞肉腫の多くは、既存の抗癌剤による治療法に対して抵抗性であり、予後の改善のためには新規治療法の開発が必要である。その戦略として、遺伝子発現プロファイリングから個々の腫瘍の特性を知り、それに基づき治療の標的となる分子を同定する手法が有効であることが、いくつかの事例において示されている。我々は、48 例の紡錘形細胞肉腫の遺伝子発現プロファイリングを行い、SS において特異的に発現している遺伝子として FGF18 を同定、更にその後の解析で SS が複数の FGF 及び FGFR を発現していることが判明した。本研究は、SS における FGF 遺伝子群の発現の意義を解析し、そのシグナルを阻害することによる増殖に対する効果を解析し、分子標的治療の開発を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

5 種類のヒト SS 細胞株(SYT-SSX1 陽性 2 株、SYT-SSX2 陽性 3 株)及び 18 例の切除組織を用いて解析を行った。まずこれらの SS 腫瘍材料における 23 種類の FGF 及びスプライシングバリエーションを含む 5 種類の FGF 受容体の発現パターンを通常の RT-PCR 法及び定量的 RT-PCR 法により解析した。FGF18 に関しては、細胞内及び培養上清中の存在をウェスタンブロットにより確認した。組換え FGF 蛋白の細胞増殖に対する効果を BrdU 法で解析し、その際の下流キナーゼ群のリン酸化をウェスタンブロットで解析した。次に 2 種類の FGFR 特異的阻害剤の増殖抑制効果を *in vitro* 及びヌードマウスを用い

た *in vivo* 実験系により検討した。その際の下流キナーゼ群のリン酸化の変化及び細胞周期プロファイルを解析した。

C. 結果

細胞株での解析では 23 種類の FGF のうち FGF2、8、9、11 及び 18 遺伝子が 5 株において共通して発現していた。これらのうち少なくとも FGF18 に関しては細胞内及び培養上清中の蛋白の存在が確認された。これらの発現パターンと融合遺伝子のサブタイプあるいは病理分類との間に明確な関連性は認められなかった。受容体に関しては、FGFR2b 以外の受容体を発現しており、自己分泌機構の存在が伺われた。一方原発巣組織腫瘍での遺伝子発現解析では、FGF に関しては細胞株同様上記 5 種類の FGF の発現が共通して認められた。しかし FGFR に関してはやや異なり、細胞系では陰性であった上皮細胞関連 FGFR である FGFR2b が特に二相性 SS の症例で陽性であった。組換え FGF 蛋白、特に FGF8 の添加により全ての SS 細胞株において増殖促進効果が認められ、これは ERK 及び p38 蛋白のリン酸化の亢進を伴っていた。一方 FGFR 特異的阻害剤(SU5402 及び PD166866) は濃度依存性に 5 種類の SS 細胞株全てに対し増殖抑制効果を示し、IC50 は SU5402 で 8.5~17.2 μ M、PD166866 で 0.08~4.0 μ M であった。増殖抑制効果は SS 細胞株を 1%血清下で培養しても観察され、阻害剤が FGFR に関連した自己分泌機構を抑制していることが示唆された。一方、線維肉腫株 HT1080、骨肉腫株 Saos2 に対しては、高濃度においても増殖抑制効果を示さなか

った。増殖抑制は ERK のリン酸化阻害を伴っていたが、p38 のリン酸化は不変であり、増殖に関する FGFR からのシグナルは ERK を介して伝達されていくことが判明した。ヌードマウスに腫瘍を形成する細胞株である SYO-1 を用いた in vivo 実験系においても、PD166866 は腫瘍増大を抑制し、組織学的検索では PCNA 染色陽性細胞の増加が観察された。一方、HT1080 の増殖は全く抑制されなかった。以上より、SS において FGF8 を中心とした FGF シグナルは自己分泌機構を介して ERK のリン酸化による増殖促進作用をもち、FGFR 特異的阻害剤は、そのシグナルを阻害することで細胞周期を停止させ増殖を阻害することが判明した。

D. 考察

SS は紡錘形細胞肉腫の中では比較的抗癌剤に対して反応を示すことがある腫瘍であるが、それでもその頻度は 30%程度に留まる。我々は遺伝子発現プロファイルの結果から、SS が神経堤由来の細胞にその起源をもつことを見出し、他の肉腫で発現が低く、かつ SS で共通して発現が亢進している遺伝子として FGF18 を含む 26 種類の遺伝子を単離した。その後の解析で SS は FGF18 に加えて、複数の FGF、特に神経系組織での発現が報告されている FGF 遺伝子群を発現していることが判明し、SS の神経起源を更に裏付ける結果が得られた。軟部肉腫に対する分子標的治療剤は GIST に対する Imatinib Mesylate 以外は理論的に裏付けられたものはなく、今回用いた FGFR 阻害剤の SS に対する効果は極めて意義の高いものであると考えられる。FGFR 阻害剤のうち PD166866 は IC50 が nM レベルであり、米国では第二相試験まで進んでいる薬剤である。我々の in vivo の結果では、増殖停止効果はあるもののアポトーシスを誘導するには至っていないことから、既存の抗癌剤との併用により、より有効な抗腫瘍効果が期待できると考えられる。

E. 結論

滑膜肉腫において FGF シグナルは自己分泌機構により ERK の活性化を介して腫瘍の増殖に促進的作用を示し、そのシグナル伝達に対する阻害物質は、滑膜肉腫に対する新規治療薬となる可能性がある。

F. 健康危険情報

本研究は現時点では、ヒトを対象としておらず該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishibe, T., Nakayama, T., Okamoto, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Shibata, K. R., Shima, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Nakamura, T., Toguchida, J.
Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. Clin. Cancer Res., in press.

Nagayama, S., Iizumi, M., Katagiri, T., Toguchida, J., Nakamura, Y.
Identification of *PDZK4*, a novel gene with PDZ domains, that is upregulated in synovial sarcomas. Oncogene, 23: 5551-7, 2004.

戸口田淳也、長山聡、岡本健、中村孝志、中村祐輔：
滑膜肉腫の細胞起源。
骨・関節・靭帯 17: 145-148, 2004.

中山富貴、戸口田淳也、坪山直生、中村孝志。
骨軟部腫瘍における融合遺伝子解析の有用性。
中部整災誌 46: 1065-1066, 2004.

2. 学会発表

戸口田淳也：
遺伝子発現プロファイリングからの滑膜肉腫の分子病理解析。
第 93 回日本病理学会 (2004. 6. 11 札幌)

中山富貴、中村孝志、戸口田淳也、中嶋安彬、坪山直生：
神経発生と考えられた腋窩部滑膜肉腫の 1 例。第 400 回京阪神整形外科集談会 (2004. 6. 19 大阪)

西庄功一、中山富貴、青山朋樹、岡本健、西庄功一、石部達也、安良興、嶋靖子、柴田弘太郎、坪山直生、中村孝志、戸口田淳也：
骨肉腫における RECQL4 遺伝子の変異解析。
第 37 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2004. 7. 15 東京)

岡本健、長山聡、青山朋樹、西庄功一、石部達也、中山富貴、中村祐輔、中村孝志、戸口田淳也：
滑膜肉腫における融合遺伝子 SYT-SSX の機能：

下流遺伝子の同定と機能解析.
第 37 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2004. 7. 15 東京)

石部達也、中山富貴、岡本健、長山聡、青山朋樹、
西庄功一、安良興、柴田弘太郎、嶋靖子、中村孝
志、戸口田淳也：
滑膜肉腫の増殖における Fibroblast growth factor
シグナルの関与-分子標的としての有用性の検討-。
第 37 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2004. 7. 16 東京)

中山富貴、坪山直生、戸口田淳也、中村孝志：
未分化紡錘・多形細胞肉腫に対する化学療法の有
効性。
第 37 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2004. 7. 16 東京)

戸口田淳也、石部達也、長山聡、中山富貴、片桐
豊雅、中村祐輔：
骨軟部腫瘍における分子標的治療の開発。
第 63 回日本癌学会総会 (2004. 9. 29 福岡)

福川千香子、長山聡、片桐豊雅、戸口田淳也、
中村祐輔：
滑膜肉腫において高発現する遺伝子 FZD10 の機能
解析およびその抗体の治療への応用。
第 63 回日本癌学会総会 (2004. 9. 29 福岡)

長山聡、井元清哉、片桐豊雅、中山富貴、下平英
寿、ローレンス ミッチェル、宮野悟、戸口田淳也、
中村祐輔：
遺伝子発現プロファイルに基づいた軟部肉腫の分
子生物学的新分類の構築。
第 63 回日本癌学会総会 (2004. 9. 29 福岡)

西庄功一、中山富貴、青山朋樹、石部達也、
嶋靖子、柴田弘太郎、坪山直生、中村孝志、
戸口田淳也：
骨肉腫における RECQL4 遺伝子の変異解析。
第 63 回日本癌学会総会 (2004. 9. 29 福岡)

石部達也、中山富貴、岡本健、長山聡、青山朋樹、
西庄功一、柴田弘太郎、ロバーツ、嶋靖子、
中村孝志、戸口田淳也：
治療標的分子としての滑膜肉腫における FGF シグ
ナル伝達系。
第 63 回日本癌学会総会 (2004. 9. 29 福岡)

戸口田淳也、西庄功一、長山聡、中山富貴、
中村孝志：
遺伝子発現プロファイリングによる肉腫における
病態進行関連遺伝子の探索。
第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2004. 10. 21 東京)

石部達也、中山富貴、岡本健、長山聡、中村孝志、
戸口田淳也：
滑膜肉腫における神経組織関連遺伝子の発現とレ
チノイン酸による分化誘導。
第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2004. 10. 22 東京)

中山富貴、坪山直生、戸口田淳也、宮崎真紀、
平松英文、水嶋康浩、松原央、小林道弘、
足立壮一、中畑龍俊、中村孝志：
四肢骨肉腫に対する VP-16 を併用した化学療法の
治療成績。
第 42 回日本癌治療学会 (2004. 10. 27 京都)

足立壮一、今井剛、渡部基信、松原央、水嶋康浩、
西庄功一、中山富貴、木村晋也、戸口田淳也、中
畑龍俊：
肉腫に対する新規治療。
第 42 回日本癌治療学会 (2004. 10. 27 京都)

Toguchida, J., Nagayama, S., Imoto, S., Nakayama,
T., Nishijo, K., Ishibe, T., Shima, Y., Nakamura,
T., Katagiri, T., Nakamura, Y. :
Molecular signatures for malignant profiles of
spindle cell sarcomas of soft part.
10th CTOS (2004. 11. 12 Montreal)

Ishibe, T., Nakayama, T., Okamo, T., Aoyama, T.,
Nishijo, K., Nagayama, S., Nakamura, T.,
Toguchida, J. :
Fibroblast growth factor signals as a potent
molecular targets in synovial sarcoma.
10th CTOS (2004. 11. 13 Montreal)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍の腫瘍随伴症候群に関する研究

分担研究者 荒木 信人 大阪府立成人病センター 整形外科部長

研究要旨 高悪性度軟部腫瘍では高 CRP 血症や血症板増加などの腫瘍随伴症候群を伴う症例が多い。それらの症例は有意に予後不良で、留意を要する。また、その原因としては腫瘍が産生する IL-6 が重要で、今後の病態解明と治療戦略上有用である。

A. 研究目的

高悪性度軟部腫瘍では高 CRP 血症や白血球、血小板増加などの腫瘍随伴症候群を伴う症例が多い。また、それらの症例は予後不良で、高悪性度軟部腫瘍のうちでも特に悪性度が高い印象がある。今回我々は腫瘍随伴症候群を伴う MFH における、臨床因子との相関と腫瘍随伴症候群の原因究明を行い、この subcategory の実地臨床上の均てん化を目的とした。

B. 研究方法

まず外科的治療を行った 46 例の MFH 症例を、retrospective に術前 CRP 値 1.0 mg/dl を境として高値群と低値群に分け予後や他の臨床因子や血中 IL-6 値との相関解析を行った。

次に高 CRP 血症を呈する症例の肺転移より細胞を分離培養し、造腫瘍性を確認した後、IL-6 関連因子の腫瘍細胞の悪性動態に及ぼす影響を検討した。

（倫理面への配慮）

細胞の分離培養は倫理委員会及び本人の承諾のもとに行い、個人情報情報は細胞分離時に匿名化した。

C. 結果

46 例の MFH の解析では、65% の症例が術前高 CRP 血症を呈しており、その平均は 3.7mg/dl であった。予後との相関では無病生存率、生存率ともに有意に高 CRP 血症群が不良であった。臨床因子との相関では、高 CRP 群は腫瘍サイズ、腫瘍の深さ、組織学的悪性度、等と有意な相関が認められた。また高 CRP 血症 7 例で測定した IL-6 値は総て上昇が認められており、IL-6 が高 CRP 血症と関係していることが示唆された。次に高 CRP 血症を示す MFH の腫瘍細胞を分離培養し、その検討により、細胞自体が IL-6 を発現分泌していること、逆にその receptor は発現が少ないこと、sIL-6R の投与により細胞内 stress fiber が増強し浸潤能と増殖能が

抑制されること、それらの signal 伝達が STAT3 と MAPK のリン酸化を通じて行われることを解明した。

D. 考察

腫瘍自体が産生する IL-6 の腫瘍随伴症候群および、不良な予後への関与が判明したことは、今後の治療戦略上非常に有用である。また、腫瘍細胞への関わりが単純な autocrine ではなく、むしろ腫瘍悪性化の結果として得た形質である可能性が示唆された。従って、sIL-6R を腫瘍に発現させるなど、腫瘍を自滅に導く治療方法の開発の可能性が期待され、さらなる解明を行いたい。

E. 結論

腫瘍随伴症候群を呈する高悪性軟部腫瘍は特に悪性度が高く、臨床上留意が必要である。また、IL-6 の関与等、腫瘍随伴症状の原因の解明は新しい治療方法への手がかりとなる。

F. 健康危険情報

高悪性度軟部腫瘍では腫瘍随伴症候群は比較的多く観察される。そのような subcategory の認識は臨床上有用であり留意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakanishi H, Araki N, et al

Interleukin-6 / soluble interleukin-6 receptor signaling attenuates proliferation and invasion, and induces morphological changes of a newly established pleomorphic malignant fibrous histiocytoma cell line.

Am J Pathol 165; 471-480: 2004.

Nakanishi H, Araki N, et al
Clinical implications of serum C-reactive
protein levels in malignant fibrous histiocytoma.
Int J Cancer 99; 167-170, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究

分担研究者 吉田 行弘 日本大学整形外科講師

研究要旨 非円形細胞肉腫に対する化学療法の有効性を確立するために、化学療法のプロトコルを作成し、世界的にも未だ確立していない標準的治療法を開発する目的で、多施設でその有効性を検討する。

A. 研究目的

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法のプロトコルの確立。

B. 研究方法

当施設および関連施設において経験する高悪性骨軟部腫瘍に対して、ADR、IFO、CDDPなどの化学療法を術前に行い、施行した化学療法の効果を日本整形外科学会の評価基準により評価し、さらに術後の切除標本より、その組織学的有効度を調査し、また長期的予後調査を行う。

C. 結果

現時点までに当施設においては1994年から2003年までの間に13例の悪性軟部腫瘍を経験した。内訳は平滑筋肉腫3例、脂肪肉腫2例、平滑筋肉腫3例、MFH、MPNST、横紋筋肉腫、血管上皮種1例ずつであり、上記の薬剤を使用したMAID療法を術前、術後に施行した。術前化学療法施行回数は1回から3回までであった。5例に術前放射線療法も追加した。術前化学療法施行の効果はそれぞれPR3例、PD1例、NC9例であった。切除標本は生存細胞が見られ、臨床的評価と同様であった。長期的予後調査はいまだ経過観察期間が短いため評価は不可能である。

（倫理的にはプロトコル要旨患者に配布し、承諾を得ている）

D. 考察

高悪性度非円形細胞肉腫は一般にその頻度は少なく、一施設あたりの治療経験数はきわめて少なく、現時点では各施設が各々のプロトコルに沿った化学療法を行い、成績が一定していない。今回のpilot studyにより、一定のプロトコルに沿った術前化学療法で多数例の解析を行うことに

より、世界的標準の化学療法の指針が得られるものと考えられる。

E. 結論

ADRとIFOおよびCDDPは術前化学療法としての評価に値する有効な薬剤であり、今後のプロトコルに組み入れられるべき薬剤と考えた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

吉田行弘、大幸俊三、大幸英至、杉田秀幸、龍順之助：悪性骨軟部腫瘍切除後における至適再建法の選択と問題点。第37回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、東京、2004、7

杉田秀幸、大幸俊三、鳥山正人、鈴木仁、栗原友介、富沢義宏、大幸英至、吉田行弘、龍順之助：下腿遠位および足部悪性軟部腫瘍における機能的再建。第37回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、東京、2004、7

大幸英至、吉田行弘、近藤理、杉田秀幸、鳥山正人、鈴木仁、栗原友介、富沢義宏：手部に発生した悪性骨軟部腫瘍における患肢温存の意義。第37回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、東京、2004、7

吉田行弘、龍順之助：小児悪性骨腫瘍に対する患肢温存法。第42回癌治療学会、京都、2004、11（パネルディスカッション）

吉田行弘、大幸俊三、大幸英至、杉田秀幸、松崎英剛、龍順之助：脛骨近位悪性骨腫瘍に対する膝伸展機構の再建方法。第 53 回東日本整形災害外科学会、山形、2004、9

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度軟部肉腫に対する癌ワクチン療法の開発に関する研究

分担研究者 和田卓郎 札幌医科大学整形外科助教授

研究要旨 滑膜肉腫に特異的な融合遺伝子蛋白 SYT-SSX 由来の腫瘍抗原ペプチド SYT-SSX B:GYDQIMPCK を単独皮下投与する癌ワクチン療法の第1相臨床試験を実施した。多発性転移巣を有する進行期で、かつ HLA-A24 が陽性の患者 6 例を対象とした。ペプチドワクチンを 2 週ごとに計 6 回単独皮下投与した。1 例に微熱がみられた以外、有害事象は発生しなかった。6 例中 1 例で腫瘍増大が抑制された。6 例中 4 例で末梢血中にペプチド特異的 CTL が誘導された。本治療は進行期の高悪性度軟部肉腫の有効な治療法になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は進行期の高悪性度軟部腫瘍に対する新しい治療として、癌ワクチン療法の開発に取り組んできた。昨年度までの成果は次のとおりである。

- 1) 滑膜肉腫抗原として、融合遺伝子産物 SYT-SSX に由来する HLA-A24 拘束性抗原ペプチドを同定。
- 2) 滑膜肉腫患者末梢血中に SYT-SSX ペプチドと特異的に反応する細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を証明。
- 3) 患者末梢血から分離した CTL は、SYT-SSX ペプチドの刺激によりヒト滑膜肉腫細胞を特異的に障害。
- 4) HLA-A24 分子とより親和性の高い改変ペプチドの合成。

昨年度までの結果は、SYT-SSX ペプチドをワクチンとして投与する癌ワクチン療法の可能性を示唆するものである。本年度は SYT-SSX ペプチドを用いた癌ワクチン療法の第1相臨床試験を行った。本治療の安全性と有効性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

切除不能な評価病変を有する進行期滑膜肉腫の 6 例を対象とした。本例は、1) 腫瘍が SYT-SSX 融合遺伝子を発現、2) 患者の HLA が A*2402、などの適格条項を満たした症例である。9-mer のペプチド (SYT-SSX B:GYDQIMPCK) を 2 週ごとに合計 6 回、単独皮下投与した。投与量は最初の 3 例が 0.1mg、その後の 2 例が 1mg であった。

NIH 共通毒性基準に基づき有害事象、遅延型過敏症、ペプチド特異的 CTL の存在頻度、腫瘍径を経時的に評価した。

倫理面に対する配慮：臨床試験の実施に関しては、当該施設の倫理委員会の承認を得た。患者に十分な説明を行い、書面でインフォームド・コンセン

トを得た。また、患者の個人情報を守られるよう最大限度配慮した。

C. 結果

1 例で 1 回目のワクチン投与後に微熱がみられた。他の有害事象の発生はなかった。遅延型過敏反応は全例で陰性であった。6 例中 5 例で病状が進行した。しかし、1 例では腫瘍増大が抑制され NC と判定された。

3 例で末梢血中の CTL 存在頻度が増加した。腫瘍増大が抑制された 1 例では CTL 頻度が減少した。これら 4 例ではペプチド特異的 CTL の誘導が可能であった。

D. 考察

6 例中 1 例で腫瘍増大が抑制されたが、その頻度は高いものではない。今後、IFA、GM-CSF などアジュバントの併用、昨年度合成した改変ペプチドを使用することによって、より高い有効率が期待できる。

腫瘍増大が抑制された例で、CTL の頻度が減少した点は興味深い。CTL が末梢血から腫瘍に動員された可能性が考えられる。

E. 結論

SYT-SSX ペプチドの単独皮下投与による、滑膜肉腫の癌ワクチン療法の安全性が確認された。また、6 例中 1 例で腫瘍の増大が抑制され、4 例の末梢血中にはペプチド特異的 CTL が誘導された。本治療が進行期高悪性度軟部肉腫の有効な治療法になる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujibe M, Wada T, et al.: Thr(203) of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res* 295, 36–47, 2004

Oshima Y, Wada T, et al.: Abdominal small round cell tumor with osteoid and EWS/FLI1. *Hum Pathol* 35, 773-775, 2004.

Wada T et al.: One-bone forearm reconstruction using vascularized fibular graft for massive forearm soft-tissue and bone defect: case report. *J Reconstr Microsurg* 20, 285-289, 2004.

Ida K, Wada T, et al.: Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A*2402 anchor substitute. *J Immunol* 173:1436-43, 2004.

Tsukahara T, Wada T, et al.: Identification of human autoiugous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res* 64:5442-8, 2004.

Soma T , Wada T, et al.: Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res* 2004;300-1:202-12.

Kawaguchi S, Wada T, et al.: Phase I vaccination trial of SYT-SSX junction peptide in patients with disseminated synovial sarcoma. *J Transl Med* 2005;3-1:1.

2. 学会発表

塚原智英, 和田卓郎 他：骨肉腫に対する免疫療法の開発。第19回日本整形外科学会基礎学術集会，東京都，2004年10月21日

和田卓郎 他：再建術の最前線，第42回日本癌治療学会総会シンポジウム，京都，2004年10月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究

分担研究者 井須 和男 北海道がんセンター整形外科医長

研究要旨 7例の悪性軟部腫瘍進行例に対しシスプラチンの動脈内投与と放射線療法との併用をおこなった。5から34ヶ月の経過観察で局所腫瘍の再増殖はみられず切除例では80%以上の壊死率があった。進行例の局所腫瘍コントロールを目的とした治療法として有用と思われる。

A. 研究目的

骨軟部腫瘍進行例においても疼痛の軽減やADLの維持、あるいは局所根治性の向上のため強力な局所療法が必要とされる場合がある。他の癌腫では放射線と化学療法の同時併用により強い局所効果が得られることが判明しており、骨軟部腫瘍に対しても同様の効果を持つ可能性が考えられる。また、抗癌剤を動脈内投与（動注）することにより、さらにより強い局所効果が期待される。骨軟部腫瘍切除不能例に対する抗癌剤動注を用いた放射線化学療法の副作用と短期治療効果を評価した。

B. 研究方法

症例は7例で、男性2例、女性5例、治療開始時の年齢は20才から79才、中央値42才であった。全例高悪性度非円形細胞肉腫で転移を有するか原発巣切除不能の進行例であった。治療部位は脊椎近傍2例、大腿2例、後腹膜、腋窩、下腿各1例で、再発例が2例であった。これらの腫瘍にシスプラチン60mg/m²を3週間あけて2回動注した。クレアチニン・クリアランス60以下の例ではネダプラチン60mg/m²を使用した。放射線照射はCTプランニングを用い、43.6Gyから68.6Gyを同時並行で照射した。動注後の2日間は1日2回照射を行った。経過観察は5か月から33か月であった。副作用はJCOG第2版に従って行った。

C. 結果

治療終了後3週間以内にPRとなった症例はなかったが、脊椎近傍発生の2例で脊髄管内の腫瘍が消失した。また、切除を行わなかった4例中3例で経過とともに腫瘍は縮小し、臨床的にも疼痛が改善しADLが維持された。MRIでは腫瘍内の嚢胞変化、線維化を思わせる変化が生じた。治療後、腫瘍の縮小が見られ切除を行った3例では組織学的に広汎な腫瘍の壊死、嚢胞変化があり、2例で90%

以上、1例で80%の壊死がみられた。腫瘍死した5例の生存期間は5から15ヶ月、中央値11ヶ月であり腫瘍の再増殖はなかった。2例は33ヶ月、34ヶ月で生存中である。

放射線皮膚障害はgrade1が3例でgrade2の1例も腋窩のごく一部に生じたものであった。脊柱近傍発生の1例で治療後一過性の排尿障害がみられたが、他の重篤な副作用は生じなかった。

D. 考察

悪性軟部腫瘍に対する放射線化学療法は、副作用に重篤なものはなく進行例、重要臓器に近接した腫瘍に対しても実施可能であった。今回の経過観察期間では再増殖はみられず短期的には有効な治療法と思われる。画像では早期の変化を把握することは困難であり、短期間に治療効果を判定することは難しい。組織学的効果の確かめられた例でも画像での効果判定は困難であった。放射線療法あるいは化学療法単独との比較が問題となる。

E. 結論

悪性軟部腫瘍進行例に対する放射線化学療法は局所腫瘍のコントロールに有効な治療法と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

井須和男：神経芽細胞腫、脊索腫。二ノ宮節夫他編、今日の整形外科治療指針第5版、229、医学書院、東京、2004

井須和男：高齢者における悪性骨・軟部腫瘍に対する化学療法の適応。日整会誌78巻、392-395、2004

2. 学会発表

合田猛俊、井須和男：骨軟部腫瘍切除後の Microsurgery を用いた再建術。第 106 回北海道整形災害外科学会（2004 年 1 月 24 日～25 日）

大坪英則、井須和男：上腕に発生した Ossifying Fibromyxoid Tumor の 1 例。第 106 回北海道整形災害外科学会（2004 年 1 月 24 日～25 日）

西田恭博、井須和男：脱分化形軟骨肉腫の治療経験。第 106 回北海道整形災害外科学会（2004 年 1 月 24 日～25 日）

合田猛俊、井須和男：骨腫瘍搔爬後の欠損に対する吸収性骨補填材料の使用経験。骨軟部吸収性材料フォーラム 2004（2004 年 3 月 20 日）

合田猛俊、井須和男：上腕骨悪性腫瘍の治療。第 47 回日本手の外科学会学術集会（2004 年 4 月 22, 23 日）

井須和男：悪性軟部腫瘍進行例に対する epirubicin、ifomide 併用療法の試行経験。第 107 回北海道整形災害外科学会（2004 年 8 月 7 日～8 日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療の確立に関する研究

分担研究者 川口 智義 癌研究会附属病院整形外科部長

研究要旨 悪性骨軟部腫瘍の患肢を安全かつ機能的に温存するため、2つのテーマの研究結果を報告した。Ⅰ. 切除縁については手術単独、術前化学療法や放射線療法を行った場合など、背景により安全な切除縁は異なる。また許容される切除縁縮小は術前療法の効果の差により異なる。切除縁縮小は、バリアー部に限るなどについて明らかにした。Ⅱ. 再建法については膝周囲の手術における膝伸展機構の新しい再建法を示し、その優れた結果から温存肢のより安定した機能再建の可能性を示した。

【Ⅰ. 切除縁の研究】

A. 研究目的

悪性骨軟部腫瘍の治療で安全に患肢を温存し、患肢温存率を向上するためには①いかに小さい安全な切除縁を確立するか、②いかに有効な再建手技を確立するかが要求される。この趣旨に添って、今回はさらに症例を加えて安全な切除縁を検討し、さらに膝再建法として重要な脛骨病変切除後の新しい膝伸展筋機構の意義を報告する。

B. 研究方法

1980年以降蓄積された切除縁登録症例1262例、1353手術の解析から局所治癒の意義と至適切除縁を探り併せて、術前療法効果と切除縁縮小の可能性を検討した。登録例は骨高悪性腫瘍340例、骨低悪性腫瘍143例、軟部高悪性腫瘍573例、軟部低悪性腫瘍297例であった。骨高悪性腫瘍の内訳は通常型骨肉腫235例、ユーイング肉腫32例、骨MFH31例などで骨低悪性腫瘍の内訳は軟骨肉腫81例、脊索腫21例などであった。軟部高悪性腫瘍の内訳はMFH213例、滑膜肉腫80例、脂肪肉腫54例、横紋筋肉腫34例など、軟部低悪性腫瘍の内訳は脂肪肉腫96例、分化型脂肪肉腫48例、MFH34例、胞巣状軟部肉腫19例などであった。実施手術の切除縁における最小切除縁でその手術全体の切除縁を評価し、再発の定義は広義のものをを用い同一腫瘍が同一肢に発生したものは全て局所再発とした。累積生存率、累積非転移率、累積局所非再発率などをKaplan-Meier法により求めて解析しlog-rankで検定した。またCox比例ハザードモデルを用いて予後因子の多変量解析も行った。

C. D. 結果及び考察

①予後因子について

高悪性骨軟部肉腫で局所コントロールされた群の20年累積生存率は73%に対し再発を生じた群は17%と両者に明らかな有意差($P < 0.0001$)を認め局所治癒の成否が予後に悪影響を及ぼすことが示唆された。また局所治癒群の20年累積非転移率は66%に対し再発群は16%でありやはり明らかな有意差($p < 0.0001$)を認めた。低悪性群でも同様であり局所再発により転移のリスクが増加する可能性が示唆された。また初診時転移の有無により予後に著しい差を認めた。多変量解析の結果も併せると初診時転移の有無、組織学的悪性度、局所治癒の成否が重要な予後因子と考えた。

②安全な切除縁について

骨軟部肉腫全体の初回あるいは追加手術例における切除縁別局所治癒率はcurative wide procedure、adequate wide procedureがともに92%で差がないがinadequate wide procedureが85%、marginal procedureが73%、intralesional procedureが20%でこれらの間には有意差を認めた。高悪性骨軟部肉腫ではcurative wide procedureが90%、adequate wide procedureが89%で差がないがinadequate wide procedureが85%、marginal procedureが62%、intralesional procedureが25%でやはり有意差を認めた。adequate wideとinadequate wideの間では悪性度に関わらず局所根治性に明かな差が認められadequate wide procedure以上が望ましいと分かった。

軟部MFHの初回あるいは追加手術例における局所治癒率はcurative wide procedureが98%、adequate wide procedureが92%に対しinadequate