

濱口貴彦、内田淳正、他
距骨に発生した骨軟骨腫の1例
第107回中部日本整形外科災害外科学会
(2006年10月 神戸)

倉田竜也、内田淳正、他
Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST)
の治療経験
第107回中部日本整形外科災害外科学会
(2006年10月 神戸)

新谷 健、内田淳正、他
Decorinはマウス骨肉腫の肺転移を抑制する
第21回日本整形外科学会基礎学術集会
(2006年10月 長崎)

里中東彦、内田淳正、他
強力ストロボ光によるアクリジンオレンジ光線力
学的療法 of 殺腫瘍細胞効果の増強第21回日本整
形外科学会基礎学術集会 (2006年10月 長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

高悪性度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 紡錘形細胞肉腫遺伝子の遺伝子発現プロファイニングの結果から、病理診断分類と独立して生命予後と関連する遺伝子として、機能未知の遺伝子（仮称 C7059）を同定した。C7059 高発現症例は生命予後不良であり、多変量解析によっても、有意な相関を示す唯一の因子であった。C7059 蛋白は約 110kD のアクチンと結合する細胞質蛋白であり、免疫組織染色では、再発・転移が発生した症例において、強い染色性を認めた。C7059 高発現の培養肉腫細胞において、siRNA を用いて発現を抑制すると細胞の運動浸潤能が低下し、逆に C7059 を導入した不死化ヒト間葉系幹細胞は、浸潤能及び足場非依存性増殖能を獲得した。機能ドメイン解析及び免疫共沈降により、C7059 は Src 結合蛋白であることが判明した。以上の結果より、C7059 蛋白は紡錘形細胞肉腫の生物学的悪性度と関連している蛋白であり、新たな分子標的治療の候補となるものと考えられる。

A. 研究目的

紡錘形肉腫の多くは、現行の化学療法に対して抵抗性であり、転移を予防する有力な手段は無い。治療の標的となる因子を同定するために、網羅的遺伝子発現解析を行い、予後と関連する遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

65 例の成人紡錘形細胞肉腫より抽出した RNA を用いて、約 23,000 遺伝子の網羅的発現解析を行い、生命予後及び遠隔転移発生を指標として、相関性をもつ遺伝子を検索した。同定した遺伝子の発現を、定量的 RT-PCR により再確認した。N 端のポリペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作成し、ウェスタンブロット、免疫細胞染色及び免疫組織染色を行った。培養肉腫細胞における発現を解析し、高発現株に対して、siRNA による発現抑制の影響を解析した。更に研究者らが樹立した不死化ヒト間葉系幹細胞に導入し、安定発現株を得て、その表現型を解析した。

倫理面への配慮：ヒト肉腫組織からの RNA 抽出及び発現解析実験は、京都大学医学部医の倫理委員会により承認された実験として行った。

C. 研究結果

1) C7059 遺伝子の同定

遠隔転移発生あるいは生命予後を指標とした解析のいずれにおいても C7059 が最も相関の高い遺伝子として同定された。病理診断名、FNCLCC 分類による悪性度等の因子を用いた多変量解析において、C7059

高発現は生命予後と唯一相関する因子であった。定量的 RT-PCR による再確認においても、発現量と予後の間に有意な相関を認め、更に新規症例 10 例においても予後との相関が観察された。

2) C7059 蛋白の同定

特異的ポリクローナル抗体を作成し、ウェスタンブロット、細胞及び組織免疫染色を行った結果、C7059 蛋白が約 110kD のアクチンと結合する細胞質蛋白であることが判明した。

3) C7059 蛋白の機能解析

C7059 陽性培養肉腫細胞において、特異的 siRNA によりその発現を抑制すると増殖能は影響されないが、浸潤能が抑制されることが判明した。逆に陰性肉腫細胞において一過性に過剰発現させると浸潤能が亢進した。更にレンチウイルスベクターにより不死化ヒト間葉系幹細胞に導入し、得られた安定発現細胞株は、細胞浸潤能が著しく亢進し、足場非依存性増殖能も獲得された。免疫細胞染色及び免疫沈降法により Src 結合蛋白であることが判明した。

D. 考察

正常間葉系組織における C7059 の発現は、腫瘍組織と比較すると極めて低く、C7059 の発現は腫瘍化に伴って誘導されたものと考えられる。アクチン及び Src との結合能をもつこと、siRNA による発現抑制及び強制発現実験の結果より細胞浸潤能に関与している可能性があることより、C7059 が Src を介した細胞運動に関与している可能性が考えられ、転移発生との関連遺伝子として同定された事実と符合するものであると考える。今後は更に機能を詳細

に解析するとともに、動物モデルを用いた転移抑制実験を行い、治療への応用を解析する予定である。

E. 結論

紡錘形細胞肉腫の生命予後に関連する遺伝子を同定した。規定する蛋白は機能解析より、細胞浸潤能に関与する蛋白であることが判明し、予後診断のみならず、治療への応用も期待できるものであると考えられる。

F. 健康危険情報

手術切除標本を用いた解析であり、関連する健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

Otsuka S, Toguchida J, et al.

A variant of the SYT-SSX2 fusion gene in a case of synovial sarcoma.

Cancer Genet Cytogenet. 167(1):82-88,2006

Kohno Y, Toguchida J, et al.

Expression of claudin7 is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas, and regulated by an Ets family transcription factor, ELF3.

J Biol Chem. 281(50): 38941-38950,2006

Shima Y, Toguchida J, et al.

In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-ras^{Val12}.

Biochem Biophys Res Commun. 353(1):60-66,2007

2. 学会発表

Ishibe T, Toguchida J, et al. : Gene-expression pattern and differentiation potential of synovial sarcoma suggests its cell-of-origin as neural crest-derived cells. The Joint Symposium of the IVR 50th Anniversary Symposium and the 2nd International Symposium of Institutes Network (2006.5.30 京都)

Shima, Y., Toguchida, J, et al. : Transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-ras^{Val12} associates with the induction of autophagy and the loss of osteogenic property. 12th Annual Meeting of CTOS (2006.11.2 Venice)

Kohno, Y., Toguchida, J, et al. : Expression of claudin7 is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas, and regulated by a member of ets family transcription factor, ELF3. 12th Annual Meeting of CTOS (2006.11.2 Venice)

Shibata, K.R., Toguchida, J, et al. : Expression of p16INK4 in mesenchymal stem cells and the effect on growth. 12th Annual Meeting of CTOS (2006.11.2 Venice)

嶋靖子、戸口田淳也、他：間葉系幹細胞初代培養系における癌化関連変異の解析. 第19回日本軟骨代謝学会 (2006. 3. 4 横浜)

石部達也、戸口田淳也、他：滑膜肉腫に対する分子標的治療の可能性. 第106回中部日本整形外科学会 (2006. 4. 7 大阪)

保坂泰介、戸口田淳也、他：ユーイング肉腫の治療成績. 第12回小児固形腫瘍研究会 (2006. 4. 14 京都)

大塚聖視、戸口田淳也、他：幹細胞研究からみた骨肉腫の多分化能. 第26回近畿肉腫研究会 (2006. 5. 27 大阪)

中山富貴、戸口田淳也、他：デスモイドの自然経過. 第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006. 7. 6 札幌)

嶋靖子、戸口田淳也、他：間葉系幹細胞初代培養系における癌化関連遺伝子の変異解析. 第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006. 7. 6 札幌)

渡部基信、戸口田淳也、他：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はmalignant rhabdoid tumorに対して、AIFを介し autophagic cell deathを誘導する. 第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006. 7. 6 札幌)

上島大輔、戸口田淳也、他：新規癌関連遺伝子C7orf24の骨肉腫における発現および機能解析. 第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006. 7. 6 札幌)

中山富貴、戸口田淳也、他：軟部悪性腫瘍の治療成績. 第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006. 7. 6 札幌)

保坂泰介、戸口田淳也、他：5年以上無病期間を維持した後に再燃した骨肉腫の3例。第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会（2006.7.6札幌）

大塚聖視、戸口田淳也、他：間葉系幹細胞様の多分化能をもつ骨肉腫培養細胞系の樹立。第39回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会（2006.7.6札幌）

保坂泰介、戸口田淳也、他：大腿骨遠位部骨腫瘍に対するK-MAX KNEE systemの使用経験。第107回中部日本整形外科災害外科学会（2006.10.7神戸）

光野芳樹、戸口田淳也、他：滑膜肉腫における上皮構造形成に関するクローディン遺伝子群の解析。日本分子生物学会2006フォーラム（2006.11.8名古屋）

大塚聖視、戸口田淳也、他：間葉系幹細胞様の分化特性をもつ骨肉腫培養細胞系の樹立。日本分子生物学会2006フォーラム（2006.11.8名古屋）

光野芳樹、戸口田淳也、他：滑膜肉腫における上皮構造形成に関するクローディン遺伝子群の解析。第21回日本整形外科学会基礎学術集会（2006.11.19長崎）

嶋靖子、戸口田淳也、他：間葉系幹細胞初代培養における癌化関連遺伝子の変異解析。第21回日本整形外科学会基礎学術集会（2006.11.19長崎）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

悪性骨・軟部腫瘍に対する分子標的治療としての抗血管新生療法に関する研究

分担研究者 矢部 啓夫 慶應義塾大学医学部整形外科講師

研究要旨 新規血管新生関連遺伝子（plasminogen related gene-B: PRG-B）が悪性骨・軟部腫瘍に対する抗血管新生療法の標的遺伝子となりうるか検討した。本遺伝子由来リコンビナント蛋白（plasminogen related protein-B: PRP-B）は軟骨肉腫細胞株 CS-1 の増殖抑制は示さなかったが、その VEGF 産生抑制を介した抗血管新生作用を示した。また、PRP-B の細胞受容体に関して、血管内皮細胞と腫瘍細胞に同様の機構があることが推測された。PRG-B は悪性骨・軟部腫瘍に対する抗血管新生療法の標的遺伝子となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年の化学療法およびMRIをはじめとする画像診断の進歩により、悪性骨・軟部腫瘍の治療成績は改善が見られた。しかし、進行例や化学療法抵抗例では肺転移を生じ、予後は不良である。このように、悪性骨・軟部腫瘍患者の予後を規定する最大の要因は肺転移をはじめとする遠隔転移である。転移を形成する過程で最も重要な生物学的現象が腫瘍血管新生であり、この過程を制御することで転移を抑制できる可能性が高い。現在までわれわれは、この血管新生を標的とした抗血管新生療法についてさまざまな研究を重ねてきた。今回、新規血管新生関連遺伝子（plasminogen related gene-B: PRG-B）を標的とした分子標的治療について研究を行い、その生理活性について検討した。

B. 研究方法

人胎児肝臓の cDNA library を screening し、ヘキサヒスチジンタグをもつ plasmid にサブクローンし、大腸菌を用いて新規血管新生関連遺伝子（plasminogen related gene-B: PRG-B）由来リコンビナント蛋白を作製した。さらに、カラムを用いて精製し、これを plasminogen related protein-B: PRP-B とした。高悪性度軟骨肉腫細胞株 CS-1 を用いて、PRP-B の細胞増殖（cell proliferation）に対する影響、PRP-B と細胞との接着（cell attachment）を検討した。Cell proliferation assay では、細胞の増殖能を PRP-B 処理 48 時間培養後 proliferation assay kit（Promega）を用いて測定した。Cell attachment assay では PRP-B の細胞との接着能を、各種蛋白を coat した 96well プレートに CS-1 を 4 時間接着させ、接着した細胞数を crystal violet により染色し測定した。PRP-B が CS-1 の血管新生に

与える影響について、PRP-B 添加による VEGF 発現・産生の変化を蛋白レベルと遺伝子レベルで検討した。また、最後に PRP-B の受容体に関する検討も行った。

C. 研究結果

精製した PRP-B は SDS-PAGE で、9kD の単一のバンドを示した。細胞増殖に対する PRP-B の影響は、コントロールの BSA に比較し PRP-B は CS-1 の細胞増殖を抑制する傾向を示したが、有意差はなかった。細胞接着の結果は、コントロールの蛋白と比較して、PRP-B は CS-1 と有意に高い接着性を示した。また、CS-1 の VEGF 産生に与える影響については、PRP-B 添加により、蛋白レベル・遺伝子レベルともに VEGF の発現抑制が有意に見られた。われわれは血管内皮細胞を用いた検討で、PRP-B の内皮細胞に対する接着が、 $\alpha V \beta 3$ integrin を介していることを明らかにしてきた。そこで、CS-1 に対しても同様の機構があるのではないかと考え、RGD peptide の細胞接着に対する影響を検討した。Gelatin に対する細胞接着は RGD peptide により抑制されなかったが、PRP-B に対する接着は RGD peptide による抑制が見られ、PRP-B の細胞受容体に関して、内皮細胞と腫瘍細胞に同様の機構があることが推測された。

D. 考察

悪性骨・軟部腫瘍においては腫瘍内血管密度と予後に相関が見られることが報告されている。つまり、腫瘍血管新生の盛んな腫瘍は、腫瘍内血管密度が高まり遠隔転移をきたしやすいことになる。現行の化学療法は、腫瘍細胞そのものを標的とした治療であり、化学療法感受性のある腫瘍では高い腫瘍壊死率が得られる。しかし、化学療法感受性の低い腫瘍や

再発・転移例などでは化学療法抵抗性であることが多く、治療に対する新しいアプローチが必要である。抗血管新生療法は腫瘍細胞の血管新生因子発現やそれにより増加する腫瘍血管を標的としており、これに関しては、薬剤耐性は存在しないといわれている。1997年 Folkman らは内在性血管新生阻害因子である endostatin を担癌マウスに投与し、腫瘍血管新生の制御により腫瘍増殖を抑制しうることを示した。しかし、臨床試験では endostatin 単剤での有効性は確認されなかった。今回の我々の検討は、PRP-B が有力な悪性骨・軟部腫瘍に対する血管新生阻害剤となり得る可能性を示した。しかし PRP-B に関しては、その細胞内の局在や遺伝子の発現調節に関していまだ不明な点が多く、さらに研究を進める必要がある。また細胞上の受容体の同定や、細胞内シグナルの解析も重要である。血管新生阻害剤は、共通の作用機序を持っている可能性があり、これらの解明は、今後抗癌剤としての血管新生阻害剤臨床試験の停滞解決につながる可能性もあると思われる。

E. 結論

新規血管新生関連遺伝子 (plasminogen related gene-B: PRG-B) 由来リコンビナント蛋白 (plasminogen related protein-B: PRP-B) は軟骨肉腫細胞株 CS-1 の増殖抑制は示さなかったが、その VEGF 産生抑制を介した抗血管新生作用を示した。PRP-B の生理活性と抗血管新生作用機序の解明は、悪性骨・軟部腫瘍に対する抗血管新生療法研究の進展に寄与する可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Futani H, Yabe H, et al.

Long-term follow-up after limb salvage in skeletally immature children with a primary malignant tumor of the distal end of the femur.

J Bone Joint Surg Am., 88: 595-603, 2006.

Takeuchi K, Yabe H, et al.

Dedifferentiated parosteal osteosarcoma with well-differentiated metastases.

Skeletal Radiol., 35: 778-782, 2006.

Miyake A, Yabe H, et al.

A case of metacarpal chondrosarcoma of the thumb. Arch Orthop Trauma Surg., 126: 406-410, 2006.

Hashimoto J, Yabe H, et al.; Prevalence and clinical features of Paget's disease of bone in Japan.

J Bone Miner Metab., 24:186-190, 2006.

Nagoshi N, Yabe H, et al.

Epithelioid sarcoma arising on the forearm of a 6-year-old boy: case report and review of the literature.

Pediatr Surg Int., 22: 771-773, 2006.

Takao E, Yabe H, et al.

Chondromyxoid fibroma of the sternum.

J Thorac Cardiovasc Surg., 132: 430-431, 2006.

Takata S, Yabe H, et al.

Guidelines for diagnosis and management of Paget's disease of bone in Japan.

J Bone Miner Metab., 24: 359-367, 2006.

Morioka H, Yabe H, et al.

Large chondrosarcoma of the rib invading the mediastinum and the spine.

J Thorac Cardiovasc Surg., 132: 986-987, 2006.

Kawai A, Yabe H, et al.;

Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: a study of 75 patients.

Cancer., 109: 109-116, 2007.

Obata H, Yabe H, et al.

Clinical outcome of patients with Ewing sarcoma family of tumors of bone in Japan: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group cooperative study.

Cancer., 19; 109: 767-775, 2007.

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他 : 【骨盤部悪性骨腫瘍に対する患肢温存手術】 骨盤部悪性骨・軟部腫瘍に対する患肢温存手術 切除範囲と術後機能からみた再建方法の選択. 整・災外 49(3): 259-266, 2006

矢部啓夫 : V. 疾患編 (3) 骨腫瘍および腫瘍類似疾患 (腫瘍類似疾患)

整形外科診療実践ガイド Quick Reference Guide for Management in Orthopaedics.

p 357-360, 2006, 文光堂 (東京)

森岡秀夫、矢部啓夫
代謝性骨疾患—各論 骨 Paget 病、講義録 運動器
学 p348-350、2006

2. 学会発表

保坂聖一, 森井健司, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
類表皮嚢胞から発生した扁平上皮癌の 2 例.
第 46 回関東整形災害外科学会
(2006, 3, 24-25, 東京)

吉山晶, 森井健司, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
淡明細胞軟骨肉腫の 2 例.
第 46 回関東整形災害外科学会
(2006, 3, 24-25, 東京)

松本守雄, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
仙骨悪性腫瘍に対する手術治療の成績と問題点.
日本脊椎脊髄病学会 (2006, 4. 20-23, 東京)

伊原公一郎, 大井律子, 川井章, 矢部啓夫, 他
肘以遠発生軟骨肉腫の治療成績 多施設共同研究.
第 79 回日本整形外科学会学術総会
(2006, 5. 18-21, 横浜)

川井章, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
明細胞肉腫の治療成績に関する多施設共同研究.
第 79 回日本整形外科学会学術総会
(2006, 5. 18-21, 横浜)

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
「運動器の 10 年」運動器移植・再生医療の現況と
展望 全国アンケート調査を含めて 骨腫瘍切除
後再建材料としての同種骨移植の意義と問題点.
第 79 回日本整形外科学会学術総会
(2006, 5. 18-21, 横浜)

吉山晶, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 森井健司, 他
脚延長および骨切り術により矯正を行った Ollier
病の 1 例.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

穴澤卯圭, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
MIS 関連 類骨骨腫に対する低侵襲手術の検討.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
骨・軟部腫瘍関係の保険点数は適正か否か 悪性
骨・軟部腫瘍診療における包括医療の問題点 主に
医療経済性について.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
悪性骨・軟部腫瘍治療における術後感染の問題点と
対策 腫瘍用人工関節置換術後感染の現状と対策
原疾患と再建部位からみた危険因子.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

森井健司, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
患肢温存・機能再建 肩甲上肢帯に発生した悪性
骨・軟部腫瘍の治療成績.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

矢部寛樹, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
Ewing 肉腫/PNET における腫瘍抗原の発現および予
後との関連.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

中山ロバート, 矢部啓夫, 他
DNA 修復関連遺伝子の多型と悪性骨・軟部腫瘍の易
罹患性との関連.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

鈴木禎寿, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
当科における肺癌四肢骨転移手術例の検討.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

吉山晶, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
甲状腺癌骨転移に対する外科的治療.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

竹内克仁, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
骨肉腫に対する抗血管新生療法としてのメトロノ
ーム化学療法の試み.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

須佐美知郎, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
骨移植・マイクロサージャリー 悪性骨・軟部腫瘍
広範切除後の長管骨骨欠損部に対する熱処理自
家・同種骨移植の有用性.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

森井健司, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
骨巨細胞腫の治療戦略 保存骨移植を用いた骨巨
細胞腫の治療成績.
第 39 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2006, 7. 6-7, 旭川)

竹内克仁, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
高齢者の悪性腫瘍の治療 80 歳以上高齢者発生軟
部肉腫の治療成績.
第 55 回東日本整形災害外科学会
(2006, 9. 15-16, 東京)

鈴木禎寿, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
悪性骨腫瘍切除後再建における同種骨移植の治療
成績.
第 55 回東日本整形災害外科学会
(2006, 9. 15-16, 東京)

須佐美知郎, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
低悪性度軟骨肉腫に対する外科的治療.
第 55 回東日本整形災害外科学会
(2006, 9. 15-16, 東京)

吉山晶, 矢部啓夫, 森岡秀夫, 他
腎細胞癌骨転移に対する外科的治療.
第 55 回東日本整形災害外科学会
(2006, 9. 15-16, 東京)

森井健司, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 他
骨・軟部腫瘍における血管新生の制御 抗腫瘍血管
新生療法の臨床応用への関門.
第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2006, 10. 19-20, 長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
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

骨・軟部肉腫に対するアドリアマイシンとイフォマイド化学療法における
白血球減少症と日和見感染症の検討

分担研究者 阿部 哲士 帝京大学整形外科 講師

研究要旨 アドリアマイシンまたはイフォマイドを用いた化学療法を行った骨・軟部肉腫に対する化学療法における ADR (536 コース)、Ifo (110 コース)、ADR+Ifo (142 コース) を検討した。Grade 3 以上の白血球減少症は ADR (72.8%)、Ifo (71.8%)、ADR+Ifo (80.3%) の頻度で発生しており、持続期間は ADR (平均 4.2 日間)、Ifo (平均 4.8 日間)、ADR+Ifo (平均 5.3 日間) であった。好中球減少時 (好中球<1000) の発熱 (>38.0℃) は ADR (18.1%)、Ifo (27.5%)、ADR+Ifo (22.5%) の頻度で発生していた。FN により、化学療法のスケジュールの遅延や薬剤変更、化学療法の中止は ADR(4.3%)、Ifo(9.0%)、ADR+Ifo (15.5%) の頻度でみられた。

骨・軟部肉腫に対する化学療法では、アドリアマイシンとイフォマイドが中心であり、dose intensity を高めて治療成績を向上させるためには骨髄抑制の克服と併発する感染症対策が極めて重要な課題である。とくに ADR+Ifo 併用化療では好中球減少時の発熱は高い頻度で見られ、高度な耐性菌感染対策とともに発熱後早期よりガイドラインに則った経験的治療を開始すべきである。

A. 研究目的

骨・軟部肉腫に対する化学療法において、アドリアマイシン (ADR) とイフォマイド (Ifo) は抗腫瘍効果が明らかで最も重要かつ必要不可欠な薬剤である。現在イフォマイド-メスナーとアドリアマイシンを中心とした併用療法を高悪性度軟部肉腫に用いた共同研究を行っているが、成人や高齢者の発生が多いことから、骨髄抑制の副作用克服が大きな課題となっている。近年 G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) の導入により最も大きな dose limiting factor である、白血球減少期間の短縮が得られつつある。骨・軟部肉腫の領域に於いて、これらの化学療法時の好中球減少時の発熱及び、日和見感染症の詳細な報告は乏しい。我々は、ADR または Ifo の好中球減少時の発熱及び、日和見感染症について検討した。

B. 研究方法

ADR または Ifo を用いた化学療法を行った骨原発肉腫 55 例、軟部肉腫 83 例における ADR (536 コース)、Ifo (110 コース)、ADR+Ifo (142 コース) を検討した。NCI-CTC ガイドラインに基づき、白血球減少症 (>grade 3) の頻度と期間、好中球減少時 (好中球<1000) の発熱 (>38.0℃) (Febrile Neutropenia : FN) の頻度、FN 時の感染病態と起炎菌について検討した。

(倫理面への配慮) 本研究には、個人を特定可能な情報は含まれず、対象患者が特定されないよう配慮した。治療の選択に当たっては、患者に十分に説明し同意を得て治療をおこなった。

C. 研究結果

Grade 3 以上の白血球減少症は ADR (72.8%)、Ifo (71.8%)、ADR+Ifo (80.3%) の頻度で発生しており、持続期間は ADR (平均 4.2 日間)、Ifo (平均 4.8 日間)、ADR+Ifo (平均 5.3 日間) であった。好中球減少時 (好中球<1000) の発熱 (>38.0℃) は ADR (18.1%)、Ifo (27.5%)、ADR+Ifo (22.5%) の頻度で発生していた。FN により、化学療法のスケジュールの遅延や薬剤変更、化学療法の中止は ADR (4.3%)、Ifo (9.0%)、ADR+Ifo (15.5%) の頻度でみられた。多くの場合不明熱であり、病因が判明した感染症は 42 回 (20.3%) であった。内訳は咽頭炎が 9 回、肺炎 6 回、下痢 (腸炎) 9 回、尿路感染 3 回、カテーテル感染 3 回、皮膚欠損部感染 5 回、手術部感染 5 回、風疹 1 回、带状疱疹 1 回であった。当科で起炎菌が分離、判明した感染症は 207 回の好中球減少時の発熱のうち 38 株 (18.2%) にすぎなかった。内訳は、MRSA9 株、グラム陽性球菌 (非耐性菌) 7 株、緑膿菌 8 株、グラム陰性桿菌 (非耐性菌) 8 株、グラム陰性桿菌 (β ラクターマーゼ産生耐性菌) 3 株、*Clostridium Difficile* 2 株、カンジダ 1 株で

あった。

D. 考察

骨・軟部肉腫に対する化学療法では、アドリアマイシンとイフォマイドが中心であり、dose intensity を高めて治療成績を向上させるためには骨髄抑制の克服と併発する感染症対策が極めて重要な課題である。とくにADR+If α では好中球減少時の発熱は高い頻度で見られ、発熱後早期よりガイドラインに則った経験的治療を開始すべきである。MRSA や β ラクタマーゼ産生耐性グラム陰性桿菌などの高度な耐性菌が約30%で見られ、監視培養による治療前の確認が必要である。また、感染制御部と密に連携し耐性パターンのモニターや、十分な院内感染対策を継続すべきと考える。

E. 結論

アドリアマイシンとイフォマイド併用化学療法は骨髄抑制は著しく併発する感染症対策が極めて重要な課題である。好中球減少時の発熱は高い頻度で見られ、発熱後早期よりガイドラインに則った経験的治療を行うべきである。高度耐性菌の感染対策として、監視培養による治療前の確認、薬剤耐性パターンのモニター、十分な院内感染対策を検討すべきと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Futani H, Minamizaki T, Nishimoto Y, Abe S, et al.
Long-Term Follow-up After Limb Salvage in Skeletally Immature Children with a Primary Malignant Tumor of the Distal End of the Femur
J. Bone Joint Surg. Am., 88: 595 – 603, 2006

阿部哲士 他

腫瘍用人工関節深部感染

日本骨・関節感染症学会誌 20 巻、75–78.2006

阿部哲士

血管肉腫

最新整形外科学大系 20 巻

骨・軟部腫瘍および関連疾患 越智隆弘総編集

中山書店 p 414-415, 2007

阿部哲士

骨外性骨肉腫

最新整形外科学大系 20 巻

骨・軟部腫瘍および関連疾患 越智隆弘総編集

中山書店 p 416-417, 2007

阿部哲士

骨外性軟骨肉腫

最新整形外科学大系 20 巻

骨・軟部腫瘍および関連疾患 越智隆弘総編集

中山書店 p 418-420, 2007

2. 学会発表

阿部哲士 他

腫瘍用人工関節深部感染

第 29 回日本骨・関節感染症学会 2006.6.17 東京

阿部哲士 他

骨巨細胞腫における膝関節温存手術の術後長期成績

第 39 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
2006.7.6-7 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

マウス生体内におけるがん血行性転移のリアルタイム画像解析に関する研究

分担研究者 土屋 弘行 金沢大学大学院がん医化学専攻機能再生学講座機能再建学 助教授

研究要旨 肺転移の有無は軟部肉腫患者をはじめ、担がん患者の予後を左右する。主たる転移経路は血管であり、原発巣からの血管内侵入、血管内移動、小血管での捕捉、血管外脱出、微小転移巣の形成などの過程を経る。それらを個々に考えることは転移のメカニズムの解明やがん治療薬開発という観点から重要である。ラット骨肉腫、マウス肺癌・乳癌、ヒト線維肉腫の核を緑色蛍光蛋白（GFP）で、細胞質を赤色蛍光蛋白（RFP）で標識した dual-color 細胞を樹立した。この dual-color 細胞をヌードマウスに注射し、生きたマウスにおけるがん血行性転移をリアルタイムに観察した。腹部皮膚をフラップ上に開き dual-color 細胞を皮静脈に注入すると、血管内を流れるがん細胞がリアルタイムに観察できた。捕捉されたマウスとラットのがん細胞は血管外脱出し微小転移巣を形成したが、ヒト線維肉腫細胞は血管外に脱出しなかった。心腔内注射後には毛細血管腔に合わせて細長く変形したがん細胞が観察された。Dual-color 細胞を使った動態の観察は、転移のメカニズムを調べる上で全く新しい手法であり、新規抗がん剤の開発に際し強力な道具となりうる。

A. 研究目的

緑色蛍光蛋白（Green Fluorescent Protein: GFP）を発現したがん細胞を使用した動物モデルは、動物を生かしたまま癌細胞の動態を直接観察することを可能にした。しかし血行性転移に関して、原発巣から離脱した癌細胞が全身に播種された後の、微細血管に詰まった癌細胞の動態は依然として不明である。血行性転移はがんが転移する際の主経路であり、この過程を観察することは転移のメカニズムを知る上で重要である。本研究は、がん細胞が全身に播種され、毛細血管に詰まった際のがん細胞の変形や遊走について、生きたマウスを用いて視覚的にその動態を観察することが目的である。

B. 研究方法

より詳細な細胞の動的変化を視覚化するために、ヒト線維肉腫 HT-1080 を、細胞質には赤色蛍光蛋白（Red Fluorescent Protein: DsRed2）、核にはヒストン H2B にリンクした GFP を発現させ（HT-1080 dual-color cell）、一つの細胞において、2 種類の色が発色し、これにより細胞全体のみならず、核までも動的に観察することが可能となる細胞株を樹立した。ケタミンの皮下注射による麻酔を行った後、ヌードマウスの心臓に 5×10^6 個の HT-1080 dual-color cell を注射し、その直後に腹部の皮膚をフラップ上に展開した。そしてそのスキンフラップの内側を CCD カメラにて観察した。また、血管内

を流れている細胞の形態を観察するため、皮膚の動静脈を一箇所だけ結紮したマウスも別に準備した。このマウスは形態を調べるためだけに使われ、遊走能を調べるためには用いなかった。

C. 研究結果

多くの HT-1080 dual-color cell が毛細血管や小動脈に詰まっているのが確認できた。毛細血管において、がん細胞は細胞質のみならず核までもが血管の幅に合わせて細長く変形していた。また毛細血管が三叉になっているところでは、その形状に合わせて細胞質や核が三叉に変形していた。十分細い毛細血管ではがん細胞は細胞質をつなぎ合わせておくことが出来ず、断片化した細胞質が見られた。小動脈に詰まったがん細胞は丸く、核も球形もしくは楕円状だった。これら小動脈内と毛細血管内のがん細胞の細胞全体と核の長軸・短軸を測定したところ、小動脈内における細胞全体の長軸は $23.3 \mu\text{m}$ 、核の長軸は $16.8 \mu\text{m}$ であった。ところが毛細血管に詰まると、細胞はその血管の幅に合わせて変形するため、細胞全体では $92.6 \mu\text{m}$ 、核は $27.6 \mu\text{m}$ であった。つまり毛細管内では細胞全体として 4 倍伸びるのに対し、核は 1.6 倍しか伸長していなかった。また注射直後では、既に機械的に破壊されている多くのがん細胞が観察され、細胞質の一部もしくは全てが剥離されており、核のみが露出していた。またその核さえも大きく変形していた。マウスの麻酔を

継続し、注射直後、そして2時間後に同じ癌細胞を観察することで、毛細血管内の45個の癌細胞の遊走速度を調べた結果、直径が8 µm以上の毛細血管に詰まった場合は、また20個中16個(80%)の細胞が遊走することが出来、48.3 µm/hrまでの速度で遊走した。ところが8 µm以下の場合には25個中21個(84%)の細胞で運動が認められなかった。続いてより長時間の毛細血管における癌細胞の動態観察を行ったところ、癌細胞を心臓に注射して2時間後のスキンプラップには、毛細血管に詰まった5個のHT-1080 dual-color cellを観察することが可能であった。その後、先頭の4つの細胞は一方に、最後尾の細胞は他方向に遊走した。観察してから12時間後までに、先頭の細胞は方向変え遊走を続けた。また先頭より4番目の細胞では、核が断片化して壊れていく状態を観察できた。

D. 考察

この実験のために樹立されたスキンプラップモデルは多くの利点を有していた。スキンプラップは広げられた後、台に水平にしっかりと固定されるため、マウスの呼吸や心拍などの動きが観察に影響することはなかった。また主な動脈を損傷することがないため、血流は常に維持され、皮膚の生態バランスが崩れることはなかった。そして最大24時間後でも再び元の場所に縫い合わせることが可能であった。さらに臓器を外部にさらすことがないため、マウスに対し致命的な操作とはならなかった。本研究で確立されたスキンプラップモデルにより、生体内において血管内のがん細胞を経時的に観察することが可能となった。今後がん細胞の血管外脱出の機序の解明などに有用なモデルになると考える。

E. 結論

核をGFP、細胞質をDsRed2でラベルし、一つの細胞で2種類の色を発色しているHT-1080 dual-color cellを用いて、心臓から播種された癌細胞が全身の毛細血管に塞栓した際の動態を調べた。動物生体内でシングルセルレベルのがん細胞動態を経時的に観察することは、転移のメカニズムを調べる上で全く新しい手法であり、今後のがん研究の有用な手段となる。

F. 健康危険情報

本研究では、ヒトを対象とはしておらず、また研究者に健康被害を与えることはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuchiya H, et al.:

Biological reconstruction after excision of juxta-articular osteosarcoma around the knee: a new classification system.

Anticancer Res 26: 447-454, 2006.

Yamauchi K, Tsuchiya H, et al.:

Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer-cell trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system.

Cancer Res 66: 4208-4214, 2006.

Matsubara H, Tsuchiya H, et al.:

Deformity correction and lengthening of lower legs with an external fixator.

Int Orthop,30(6):550-554,2006

Nishida H, Tsuchiya H, et al.:

Hip joint remodeling in an adult following excision of a giant cell tumor involving the acetabulum: a case report and literature review.

Arch Orthop Trauma Surg 126: 458-463, 2006.

Sakurakichi K, Tsuchiya H, et al.:

Distraction osteogenesis of a fresh fracture site using an external fixator.

J Orthop Sci 11: 390-393, 2006.

Matsubara H, Tsuchiya H, et al.:

Correction and lengthening for deformities of the forearm in multiple cartilaginous exostoses.

J Orthop Sci 11: 459-466, 2006.

Takazawa K, Tsuchiya H, et al.:

Expression analysis for the identification of genes involved in acquired resistance to cisplatin in osteosarcoma cells.

Cancer Genomics & Proteomics 3: 373-382, 2006.

村上英樹, 土屋弘行, 他:

脊椎骨肉腫の”en bloc”切除標本から得た新知見 - 病理から手術へのフィードバック.

臨整外 41: 183-189, 2006.

土屋弘行, 他:
骨腫瘍再利用－液体窒素による凍結処理骨を用いた再建－. 治療 88: 478-481, 2006.

土屋弘行:
最新学際情報－液体窒素処理自家骨を用いた患肢温存手術. 関節外科 25: 546-547, 2006.

土屋弘行, 他:
教育研修講座－患肢温存手術における Biological Reconstruction. 日整会誌 80: 745-753, 2006.

2. 学会発表

Tsuchiya H, et al.
Biological reconstruction
The 6th Meeting of Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society (Chiang Mai, Thailand, 1月18～20日, 2006)

Tsuchiya H, et al.
Tumor surgery using distraction osteogenesis Jubilee All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation
Dedicated to the 100th Anniversary of Russian Scientific-Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Prof. RR Vreden
(St. Petersburg, Russia, 9月20～22日, 2006)

Tsuchiya H, et al.
#1 Reconstruction with tumor-bearing autograft treated by liquid nitrogen
#2 Applications of external fixators in tumor surgery
51th Annual Meeting of Taiwan Orthopaedic Association (Taipei, Taiwan, 10月28～29日, 2006)

土屋 弘行, 他.
骨腫瘍手術における工夫
第8回多摩骨軟部腫瘍研究会
(三鷹市, 1月28日, 2006)

土屋 弘行, 他.
転移性骨腫瘍の治療－四肢および骨盤
第5回癌と骨病変学術講演会(金沢, 2月17日, 2006)

土屋 弘行, 他.
悪性骨軟部腫瘍の治療
日本薬剤師会薬剤師研修講義
(金沢市, 11月1日, 2006)

土屋 弘行, 他.
転移性骨腫瘍の診断と治療
白山市医師会講演会(白山市, 11月28日, 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

進行期骨・軟部肉腫に対する治療

分担研究者 横山 良平 九州がんセンター 整形外科医長

研究要旨 進行期悪性骨腫瘍患者 5 人を含む 27 人の進行期骨・軟部肉腫患者に対して、2002 年 4 月から 2005 年 12 月まで化学療法を主体とした集学的治療を行った。Ifosfamide を中心とした化学療法レジメンでは 50%以上の奏効率が得られたが生存期間の延長の効果は認められなかった。一方、転移腫瘍が化学療法後に切除可能となった患者では切除不能の患者に比べて 2 年生存率が有意に高かった。Ifosfamide の肉腫に対する有用性が改めて確認された。今後は至適併用薬の選択とそれらを組み合わせたレジメンの開発が重要である。

A. 研究目的

治療法の発展により治癒率が向上したとはいえ、骨・軟部肉腫の少なくとも 30~40%の患者は遠隔転移を来して死亡すると推定される。しかし、このような進行期の骨・軟部肉腫に対する標準的治療は確立されていない。ところで、進行期の肉腫に対する治療法の開発は、これらの患者への恩恵となるばかりでなく、限局性の肉腫の治療法の開発にも欠かせないものである。そこで、進行期の肉腫に対して医療実践として行った治療結果を解析した。

B. 研究方法

2002 年 4 月より 2005 年 12 月までに当科で治療した進行期骨・軟部肉腫 27（軟部 22、骨 5、年齢：16~67 歳、中央値 38 歳、男 17、女 10）患者を対象とした。組織診断は、平滑筋肉腫と悪性線維性組織球腫が各 4 例、滑膜肉腫 3 例、脂肪肉腫と悪性末梢神経鞘腫瘍が各 2 例、Ewing 肉腫 4 例（骨 2、軟部 2）、骨肉腫 2、その他 6 例であった。軟部肉腫のうち 14 患者は化学療法の既往がなく、8 人に Ifosfamide と Cyclophosphamide + Adriamycin + Vincristine の交代療法（HI/CAV）を、6 人に Mesna + Adriamycin + Ifosfamide + DTIC（MAID）レジメンによる化学療法を行った。化学療法の既往がある患者に対しては Ifosfamide + Etoposide（IE）、Irinotecan などをセカンドライン治療として行った。化学療法後、切除が可能となった患者に対しては病巣切除を、放射線照射が可能なものには放射線治療を行った。化学療法の奏効率、全患者の生存期間、手術の有無による生存率の差について解析した。

（倫理面への配慮）

後方視的解析であること、化学療法レジメンは既に公表されているものを用いており、倫理的には問題ないと判断した。また、治療開始前に病状の詳細と、予定治療の効果および副作用について十分な説明を行い、患者から同意を得た。

C. 研究結果

化学療法の奏効率は HI/CAV が 50%（4/8）、MAID は 67%（4/6、CR は 1 例）、IE は全例セカンドラインであったが 43%（3/7）であった。全 27 患者の 2 年生存率は 46%で、median survival は 24 ヶ月（95%CF：18.19-29.81）であった。化学療法の奏効の有無と生存期間の間には相関はなかった。一方、化学療法後に病巣切除を行った患者では、切除が出来なかった患者に比べ有意に生存率が良好であった。

D. 考察

これまでに報告されてきた肉腫進行例に対する化学療法の第 II 相試験では、化学療法の生存期間への寄与は少ないとされてきたが、我々の研究でも同様であった。しかし化学療法で切除可能となった患者については明らかに生存期間が延長しており、進行期においても集学的治療の有用性が窺われた。また、軟部肉腫では半数以上が Ifosfamide を含むレジメンに反応することが改めて示されたが、Ifosfamide にどの薬剤を組み合わせるのが望ましいかについては今後の研究課題である。

E. 結論

軟部肉腫に対して Ifosfamide を含むレジメンは有効であり、今後組み合わせる薬剤の選択が鍵となるであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oda Y, Yokoyama R, et al.

CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis. *Modern Pathol*, 19:738-745, 2006

横山良平 (分担執筆): 平滑筋肉腫. 守屋秀繁、他 (編) 整形外科 診療実践ガイド, pp 380-382, 文光堂, 東京, 2006.

横山良平 (分担執筆): 横紋筋肉腫. 守屋秀繁、他 (編) 整形外科 診療実践ガイド, pp 382-384, 文光堂, 東京, 2006.

横山良平 (分担執筆): 骨肉腫. 別所文雄、横森欣司 (編) よく理解できる子どものがん. 診療を深めるための最新の知識とケア pp 292-299. 永井書店, 東京, 2006

2. 学会発表

高比良知也, 横山良平, 他: 非小円形細胞肉腫に対する化学療法の組織学的効果. 第 39 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、札幌、2006.

伊原公一郎, 横山良平, 他: 上肢遠位部発生 Ewing 肉腫の治療成績. 第 39 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、札幌、2006.

横山良平, 他: 転移あるいは切除不能骨・軟部肉腫を有する患者の Management. 第 39 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、札幌、2006.

小田義直, 横山良平, 他: 骨肉腫の原発巣と肺転移巣における CXCR4 および VEGF 発現の比較. 第 39 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、札幌、2006.

芳田辰也, 横山良平, 他: 下腿に発生した悪性骨・軟部腫瘍に対する機能的再建.

第 39 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、札幌、2006.

芳田辰也, 横山良平, 他: ワークショップ 9 「骨軟部腫瘍の集学的治療」: 骨軟部腫瘍切除後マイクロサージャリーによる再建術の治療成績.

第 44 回日本癌治療学会総会、東京、2006.

横山良平, 他: 治療抵抗性あるいは再発骨盤ユーイング肉腫に対する外科的治療.

第 44 回日本癌治療学会総会、東京、2006.

磯村直子, 横山良平, 他: 両側上腕骨に発症した多発性 (多中心性) 骨肉腫の一例.

第 22 回日本小児がん学会、大阪、2006 年.

高橋大二郎, 横山良平, 他: 肺原発ユーイング肉腫ファミリー腫瘍 (ESFT) の一例.

第 22 回日本小児がん学会、大阪、2006 年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

高悪性度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

我々はこれまでに、種々の骨軟部悪性腫瘍において WT1 蛋白の過剰発現が高率に認められる（38 例中 30 例(79%））ことを明らかにしてきた。一方、正常組織では生殖器官、腎、造血前駆細胞、中皮組織などにその発現は限られることから、これらの結果を理論的背景として、WT1 を分子標的とした腫瘍特異的免疫療法の開発を進めてきた。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。当科では杉山らと共同し、骨軟部悪性腫瘍に対する WT1 ペプチドワクチン療法の第 I/II 相臨床試験を実施してきた。本研究では、難治性の骨軟部悪性腫瘍に対する本特異的免疫療法の有効性・安全性につき評価・検討を行った。

（倫理面への配慮）

本臨床試験参加の全患者に対しその概要を十分説明を行った上で文書による同意を得た。また臨床試験プロトコールは当院倫理委員会の審査を受け、安全性に十分配慮の上実施している。

C. 研究結果

これまで本臨床試験へのエントリーは 14 例に達した。このうち軟部肉腫が 12 例(PNET2 例、MFH2 例、DSRCT2 例、MPNST2 例、線維肉腫 1 例、横紋筋肉腫 1 例、明細胞肉腫 1 例、骨外性軟骨肉腫 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）であった。効果判定の結果は SD2 例、PD8 例、中止 2 例であった。進行例が多く、臨床的に WT1 ペプチド療法の有効性を明らかに示した症例は未だ認めていないが、治療開始後 24 ヶ月にわたって stable disease を維持している症例があり、本ワクチン療法の有効性が示唆された。また本療法に伴う重篤な有害事象はこれまでのところ認めていない。

D. 考察

高悪性度骨・軟部腫瘍の治療成績は、外科的療法に加え、化学療法・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。しかし依然、肺を中心に遠隔転移を来し易く、予後良好とは言い難い。さらなる予後改善を図る上で、遠隔転移の制御が不可欠の課題である。従来全身化学療法により制御が行われてきたが、患者の負担は大きかった。腫瘍特異的免疫療法は患者への負担が少なく有効な治療手段と考えられるがまだ利用可能なものは限られている。今回我々は、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を開発し骨軟部悪性腫瘍患者への臨床試験を開始した。臨床的に著効した症例は未だ認められないが、1 例では 24 ヶ月間 stable disease を維持できておりその有用性が示唆された。脳腫瘍や白血病・乳癌の一部にも有効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・軟部悪性腫瘍での有効例を探索・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 相臨床試験を継続施行した。
- 2) 現在まで、12 例の骨・軟部悪性腫瘍症例がエントリーされ、SD2 例、PD8 例、中止 2 例であった。安全性に関しては、皮内投与局所の発赤・腫脹を除き、重篤な有害事象は見られなかった。

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られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hamada K, Yoshikawa H, et al.:

Myoepithelioma of soft tissue originating from the hand:
18F-FDG PET features.

AJR Am J Roentgenol, 186(1): 270-271, 2006.

Hamada K, Yoshikawa H, et al.:

False positive (18)F-FDG PET in an ischial
chondroblastoma; an analysis of glucose transporter 1
and hexokinase II expression.

Skeletal Radiol, 35(5):306-310, 2006.

Hiraga T, Yoshikawa H, et al.:

Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by
bone-derived transforming growth factor- β enhances
bone metastases in breast cancer.

Cancer Res., 66(4): 2067-2073, 2006.

Joyama S, Yoshikawa H, et al.:

Dendritic cell immunotherapy is effective for lung
metastasis from murine osteosarcoma.

Clin Orthop Relat Res., 453: 318-327, 2006.

Matsui Y, Yoshikawa H, et al.:

A novel type of EWS-CHOP fusion gene in myxoid
liposarcoma.

Biochem Biophys Res Commun.. 348(2):437-440, 2006.

Morita S, Yoshikawa H, et al.:

A phase I/II Trial of a WT1 (Wilms' Tumor Gene)
Peptide Vaccine in Patients with Solid Malignancy:
Safety Assessment Based on the Phase I Data.

Jpn J Clin Oncol, 36(4):231-236, 2006.

Sotobori T, Yoshikawa H, et al.:

Prognostic significance of wilms tumor gene (WT1)
mRNA expression in soft tissue sarcoma.

Cancer, 106(10):2233-2240, 2006.

Sotobori T, Yoshikawa H, et al.:

Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic
migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells
by enhancing incorporation of integrin β 1 into lipid rafts.
Exp Cell Res., 312(19):3927-3938, 2006.

吉川秀樹:

骨腫瘍診断へのアプローチ、整形外科診療実践ガイド、文光堂、p.333-335, 2006.

吉川秀樹、名井陽、上田孝文、荒木信人:

仙骨部転移性骨腫瘍の治療、

脊椎脊髄ジャーナル, 19:855-859, 2006.

吉川秀樹:

連通多孔体ハイドロキシアパタイトを用いた腫瘍
外科治療、

関節外科, 25:999-1001, 2006.

吉川秀樹:

骨肉腫に対する最新の治療戦略、

日整会誌, 80:551-556, 2006.

2. 学会発表

吉川秀樹

第3回秋田骨軟部腫瘍セミナー:

連通多孔体人工骨の開発と骨腫瘍治療への応用

(平成18年2月18日、秋田)

吉川秀樹

第25回滋賀県臨床整形外科医学会学術講演会

(特別講演): 日常診療における骨軟部腫瘍診断のピ
ットフォーラム (平成18年3月4日、大津)

吉川秀樹

第94回日本泌尿器科学会総会 (指導医教育企
画): 腫瘍関連緊急対策 (オンコロジカルエマージェ
ンシー) (平成18年4月14日、福岡)

吉川秀樹

第2回五稜郭セミナー: 外来での骨軟部腫瘍: 腫瘍
or 非腫瘍、良性 or 悪性 (平成18年9月8日、函館)

吉川秀樹

第22回日本小児がん学会 (教育講演): 小児骨腫瘍に
対する患肢温存手術 (平成18年11月25日、大阪)

吉川秀樹

第72回高知整形外科集談会: 骨軟部腫瘍の診断—
良性にみえた悪性病変、悪性にみえた良性病変
(平成18年12月2日、高知)

吉川秀樹

第 8 回 Latest Orthopedics 研究会：骨・軟部腫瘍
診断のピットフォール(平成 18 年 12 月 3 日、岡山)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

高悪性度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 和田 卓郎 札幌医科大学整形外科助教授

研究要旨 骨軟部腫瘍における主要組織適合抗原 HLA-Class I 分子の発現を検索し、予後との関連性を検討した。検索した骨軟部腫瘍 74 例中 46 例（62%）で HLA class I の発現が低下していた。骨肉腫の原発巣では 52% の例で、転移巣では 88% の例で HLA class I の発現が低下していた。また、HLA class I 低発現例の予後は不良であった。

A. 研究目的

骨軟部腫瘍における HLA-Class I 分子の発現を検索し、予後との関連性を検討した。

B. 研究方法

骨軟部肉腫 74 例のパラフィン標本を対象とした。抗 HLA-Class I 単クローン抗体を用いた免疫組織染色法で腫瘍細胞における HLA 分子の発現を検索した。HLA 分子の発現と予後との関連性を検討した。

倫理面への配慮：手術で摘出した腫瘍の標本，診療情報を利用した研究である。患者から包括的同意が取られている。

C. 研究結果

検索した骨軟部腫瘍 74 例中 46 例（62%）で HLA の発現が低下していた。骨肉腫における HLA class I 発現の低下は原発巣 25 例中 13 例（52%）で、転移巣 8 例中 7 例（88%）で認められた。HLA class I 高発現例は低発現例に比べ、over-all survival, event-free survival が有意に良好であった。しかし、MFH ではそのような傾向は認められなかった。

D. 考察

生体には、自家腫瘍を認識し、それを殺傷する免疫監視機構が存在する。それにもかかわらず腫瘍が発生・増殖する機序のひとつに「腫瘍の免疫監視機構からの逃避」が考えられている。細胞傷害性 T リンパ球（CTL）が自家腫瘍を認識するためには、腫瘍が HLA class I 分子を発現し、その分子上に腫瘍抗原ペプチドを発現している必要がある。HLA 分子の発現が低下すると、CTL は腫瘍を認識できない。

本研究の結果から、骨肉腫の原発巣では 50% 以上の例で、転移巣では 80% 以上の例で HLA class I の発現が低下していた。また、HLA class I 低発現例の予後は不良であった。HLA 分子の発現低下が、骨肉腫の生体免疫機構からの逃避機序に関連して

いる可能性が示唆された。

ヒト骨肉腫に対するペプチドワクチン療法を確立するため、我々は腫瘍抗原として papillomavirus bind factor (PBF) を同定した。PBF は転写調節因子と考えられ、骨軟部肉腫に広く発現がみられる。骨肉腫に対する PBF を用いたペプチドワクチン療法を行う際には、治療前に HLA 分子の発現を検索しておくことで、治療効果を予測できる可能性がある。また、ペプチドワクチン療法の効果を高めるためには、腫瘍の HLA 発現を亢進させる工夫を行う必要がある。

E. 結論

骨肉腫の原発巣では 52% の例で、転移巣では 88% の例で HLA class I 分子の発現が低下していた。HLA の発現低下は骨肉腫の予後不良因子であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsukahara T, Wada T, et al.

HLA-restricted specific tumor cytolysis by autologous T-lymphocytes infiltrating metastatic bone malignant fibrous histiocytoma of lymph node.

J Orthop Res, 24(1):94-101,2006

Tsukahara T, Wada T, et al.

Prognostic significance of HLA class I expression in osteosarcoma defined by anti-pan HLA class I monoclonal antibody, EMR8-5.

Cancer Sci, 97(12):1374-1380, 2006

加谷光規, 和田卓郎, 佐々木幹人, 平岩哲郎, 山下敏彦.

骨巨細胞腫に対する関節温存術: リン酸カルシウムペースト充填. *Arthritis*, 4(2): 86-90.2006

川口哲, 和田卓郎, 塚原智英.

骨軟部腫瘍に対する免疫療法.

関節外科, 25(10):1102-1103.2006

和田卓郎. グロムス腫瘍.

In: 守屋秀繁, 糸満盛憲, 内田淳正, 荻野利彦, 黒坂昌弘, 戸山芳昭, eds. *整形外科診療実践ガイド*.

東京: 文光堂. 2006:706-707

和田卓郎. 腱鞘巨細胞腫.

In: 守屋秀繁, 糸満盛憲, 内田淳正, 荻野利彦, 黒坂昌弘, 戸山芳昭, eds. *整形外科診療実践ガイド*.

東京: 文光堂. 2006:707-708

2. 学会発表

Wada T.

Surgical management for bone and soft tissue sarcoma of the upper extremity (Invited).

3rd International Symposium on Hand Surgery and the Advances in Hand Therapy.

May 26, 2006, Bali, Indonesia.

和田卓郎, 金谷耕平, 磯貝哲, 辻英樹, 薄井正道.

手の腫瘍の診断・治療の進歩. 悪性腫瘍の治療

(シンポ). 第49回日本手の外科学会学術集会.

2006年4月20日, 浜松市

和田卓郎, 川口哲, 塚原智英, 井田和功, 木村重治,

佐藤百合子, 山下敏彦, 佐藤昇志:

骨・軟部肉腫に対するペプチドワクチン療法 (シンポ). 第79回日本整形外科学会学術集会.

2006年5月19日, 横浜市

加谷光規, 和田卓郎, 名越智, 川口哲, 佐々木幹人.

山下敏彦, 松村忠紀, 山口岳彦, 長谷川匡, 玉川光春: Myxofibrosarcoma の治療における Jaffe' s triangle の重要性 (シンポ).

第39回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会.

2006年7月6日, 札幌市

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし