

片桐浩久, 高橋満, 他:
転移性骨腫瘍への治療戦略(脊椎・骨盤・四肢) 骨転移の予後 最新の結果と治療選択
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

高橋満, 他:
骨肉腫の系統的治療後に生じた肺転移再発例に対する治療成績
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

和佐潤志, 高橋満, 他:
軟部肉腫進行例に対する ifosfamide、carboplatin、etoposide 併用療法(ICE療法)の治療成績
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

鈴木隆辰, 高橋満, 他:
脊椎の片側圧潰signは転移性脊椎腫瘍の有用な指標である
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

藤浩, 高橋満, 他:
体幹部骨・軟部悪性腫瘍に対する高線量陽子線治療
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

高橋満, 他:
放射線治療今後: 腫瘍外科、内科医から放射線治療医へのメッセージ
第 50 回日本癌治療学会学術集会
(2012.10.25-27 横浜)

堀田哲夫, 畠野宏史, 他:
自家照射骨を用いた患肢温存手術の成績と今後の展望
第 85 回日本整形外科学会学術総会
(2012.5.17-20 京都)

畠野宏史, 守田哲郎, 他:
大腿骨近位部骨腫瘍に対する京セラ 2 型ロングステム (PHS II) および Kyocera Limb Salvage (KLS) システムによる治療成績
第 85 回日本整形外科学会学術総会
(2012.5.17-20 京都)

畠野宏史, 守田哲郎, 他:
腫瘍型人工膝関節置換術後の膝蓋骨の位置の異常と患肢機能
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

守田哲郎, 他:
がん専門病院におけるがんのリハの現状と課題
第 54 回日本リハビリテーション医学会関東地方会
(2013.2.2 新潟)

吉田行弘, 他:
悪性神経鞘腫の 1 例
第 52 回関東整形災害外科学会
(2012.3.22-23 横浜)

小島敏雄, 吉田行弘, 他:
仙骨脊索腫に対する切除後 10 年以上の成績
第 85 回日本整形外科学会学術総会
(2012.5.17-20 京都)

吉田行弘, 他:
腫瘍型人工関節折損例の原因とその対策
第 85 回日本整形外科学会学術総会
(2012.5.17-20 京都)

谷口真史, 吉田行弘, 他:
右上肢予防接種痕に生じたグロムス腫瘍の 1 例
第 61 回東日本整形災害外科学会
(2012.9.21-22 高崎)

吉田行弘:
一般医が扱ってもよい骨腫瘍
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

吉田行弘:
腫瘍型人工関節の合併症とその対策について
第 6 回金沢骨軟部腫瘍セミナー
(2012.12.15 金沢)

福島万奈, 野島孝之, 他:
副鼻腔腫瘍の 1 例
第 47 回日本骨軟部腫瘍研究会 (2012.4.21 東京)

野島孝之:
軟骨性腫瘍の病理鑑別診断におけるピットホール
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会

(2012.7.14-15 東京)

湊宏, 野島孝之, 他:

病理検査における医療安全管理. 検体採取から病理検査報告書の伝達まで
第5回日本予防医学リスクマネジメント学会北陸地方会 (2012.10.13 富山)

中田聡子, 野島孝之, 他:

右第5趾軟部腫瘍 (digital fibromyoma)
第24回北陸病理集談会 (2012.11.3 金沢)

野島孝之:

骨腫瘍病理の見方と鑑別診断
第58回日本病理学会秋期特別総会
(2012.11.22-23 名古屋)

中田聡子, 野島孝之, 他:

心タンポナーデで発症した肺動脈内膜肉腫の1例
検例
第58回日本病理学会秋期特別総会
(2012.11.22-23 名古屋)

湊宏, 野島孝之, 他:

臨床検査における患者誤認対策, 病理検査における検体誤認, 傾向と対策
第59回日本臨床検査医学会学術集会
(2012.11.29-12.2 京都)

木下英理子, 野島孝之, 他:

鼻腔の inflammatory myofibroblastic tumor の1例
第70回日本病理学会中部支部交見会
(2012.12.15 名古屋)

Oda Y., et al.:

Epithelial and cartilaginous differentiation in clear cell chondrosarcoma
Electronic exhibit at the 2012 Annual meeting of the International Skeletal Society
(2012.9.5-8 Rome, Italy)

Oda Y.:

Fibrocartilagenous mesenchymoma of bone
XXIXth Congress of the International Academy of Pathology (2012.9.10-10.5 South Africa)

Kumagai R, Oda Y., et al.:

Superficial cervicovaginal myofibroblastoma

The 4th Taiwan-Japan Conjoint Slide Conference
(2012.10.26 Tokyo, Japan)

小田義直:

軟部腫瘍の分子基盤と診断・治療における統括病理学
第101回日本病理学会総会 (2012.4.26-28 東京)

高橋祐介, 小田義直, 他:

Myxofibrosarcoma における Akt/mTOR pathway の検討
第101回日本病理学会総会 (2012.4.26-28 東京)

三好きな, 小田義直, 他:

横紋筋肉種における CXCR4、VEGF 発現の臨床病理学的解析
第101回日本病理学会総会 (2012.4.26-28 東京)

小田義直:

軟部腫瘍における病理診断の up-date
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

石井武彰, 小田義直, 他:

右上腕骨腫瘍の1例
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

松本嘉寛, 小田義直, 他:

傍脊椎部に発生した悪性神経鞘腫瘍の治療成績
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

薛宇孝, 小田義直, 他:

軟部平滑筋肉腫において Akt/mTOR pathway の活性化は予後不良因子である
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

山田裕一, 小田義直, 他:

孤立性線維性腫瘍に関する Akt-mTOR pathway 活性化およびチロシンキナーゼ型受容体発現の検討
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

坂本昭夫, 小田義直, 他:

骨内ガングリオンの臨床像
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会

(2012.7.14-15 東京)

小田義直:

骨軟部腫瘍の病理-神経原性腫瘍を含む
第 348 回 MOC 会 (2012.7.23 福岡)

小田義直:

軟部腫瘍の病理診断と遺伝子診断. 日本病理学会
近畿支部主催
夏期病理診断セミナー: 外科病理学の up-to-date
Part2 (2012.8.4 京都)

小田義直, 他:

軟部肉腫における分子標的の探索
Investigation of the molecular target in soft tissue
sarcoma

肉腫の病理と治療標的探索

Topics of bone and soft tissue sarcoma

第 71 回日本癌学会学術総会 (2012.9.19-21 札幌)

藤原悠子, 小田義直, 他:

YB-1 は骨肉腫において細胞増殖を促し、その臨床
予後と関連する

Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and
associates with clinical prognosis of osteosarcoma

第 71 回日本癌学会学術総会 (2012.9.19-21 札幌)

孝橋賢一, 小田義直, 他:

microRNA と形質発現に基いた小児 SMARCB1/INI1
欠失腫瘍群の再分類

Re-classification of pediatric SMARCB1/INI1-deficient
tumor, according to microRNA and
immunohistochemical expression

第 71 回日本癌学会学術総会 (2012.9.19-21 札幌)

藤原稔史, 小田義直, 他:

腫瘍関連マクロファージはユーイング肉腫の予後
と関連する

Macrophages infiltration associates with poor prognosis
in Ewing sarcoma.

第 71 回日本癌学会学術総会 (2012.9.19-21 札幌)

藤原稔史, 小田義直, 他:

マクロファージの浸潤は Ewing 肉腫の予後不良因
子である

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2012.10.26-27 名古屋)

佛淵由佳, 小田義直, 他:

Costello 症候群に合併した横紋筋肉腫の剖検例
第 58 回日本病理学会秋期特別総会
(2012.11.22-23 名古屋)

久田正昭, 小田義直, 他:

横紋筋肉腫における FOXO1 発現の検討
第 54 回日本小児血液・がん学会
(2012.11.30-12.2 横浜)

蛭田啓之, 他:

骨・軟部腫瘍における組織学的治療評価の実際と問
題点

第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

眞鍋淳, 蛭田啓之, 他:

下腿近位部軟部肉腫切除後の伸展機構再建を膝骨
付き脛骨膝腱のパスツール処理で行った 1 例
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

粕谷秀輔, 蛭田啓之, 他:

腫瘍性骨軟化症の 2 例
第 24 回日本骨軟部放射線研究会
(2013.1.25-26 沖縄)

山口岳彦:

Parachordoma -概念と鑑別診断-

第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

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

II. 分担研究報告

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治療確立のための研究

研究代表者 岩本 幸英 九州大学大学院医学研究院整形外科 教授
研究分担者 松延 知哉 九州大学病院整形外科 助教

研究要旨 四肢に発生する高悪性度軟部腫瘍は、円形細胞肉腫と非円形細胞肉腫に大別され、後者が大多数を占める。非円形細胞軟部肉腫に対する現在の標準治療は手術であるが、手術単独での長期生存率は約 35%に過ぎない。全身的治療としての化学療法が試みられているが、その有用性は世界的にも未だ確立していない。四肢に発生する非円形細胞肉腫に対する標準治療を確立することを目的として、ADM+IFO 併用術前術後化学療法の有効性と安全性を第 II 相試験により評価した。平成 24 年 11 月の集計では、2 年無増悪生存割合 76.4%、8 年無増悪生存割合 65.3%、2 年全生存割合 91.7%、8 年全生存割合 83.3%と良好な成績が得られており、生命予後が改善される可能性が高いと予測され、今後も引き続き追跡調査、解析を行っていく予定である。また、転移の無い四肢発生の高悪性度骨肉腫に対し、MTX、ADM、CDDP の 3 剤による術前化学療法を行い、効果が不十分である症例に術後補助化学療法として上記 3 剤に IFO を追加する上乗せ延命効果があるかどうかを、ランダム化比較により検証する臨床試験を開始した。予定症例数は 200 例であり、平成 22 年より登録を開始し、平成 25 年 2 月現在で 81 例の一次登録を行っている。

A. 研究目的

四肢に発生する高悪性度軟部腫瘍は円形細胞肉腫と非円形細胞肉腫に大別され、後者が大多数を占める。円形細胞肉腫に対する化学療法の有効性は証明されているが、非円形細胞肉腫に対する化学療法の有効性は未だ確立しておらず、手術による切除が治療の中心となっている。しかし、肺転移を高率に生じるため、手術単独による高悪性度軟部肉腫の 10 年生存率は約 35%と不良であり、全身的治療法としての有効な化学療法の確立が重要である。欧米における進行例に対する臨床試験では、アドリアマイシン(ADM)とイホマイド(IFO)の有効性が示されており、この 2 剤が非円形細胞軟部肉腫に対し最も効果的な薬剤と考えられる。一方、手術と併用する補助化学療法に関しては有効性を示すデータに乏しいが、ADM を含む補助化学療法の比較試験のメタアナリシスでは、IFO を含んでいない、薬剤強度が低いなどの問題点はあるものの、特に四肢発生例の予後を改善する可能性が示された。我が国においても、四肢原発の非円形細胞軟部肉腫の生命予後改善のために、手術と併用しうる有効な化学療法を確立することが重要である。しかし、我が国においては、軟部肉腫進行例に対する ADM+CPM+IFO の第 II 相試験が行われたのみであり、手術と組み合わせた補

助化学療法の第 II 相試験が存在しておらず、第 III 相試験を行うための基盤が整っていない。また、我が国においては EPI の肉腫に対する保険適応がない。そこで、高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する補助化学療法の有効性と安全性を評価する第 II 相試験を計画し、薬剤としては現時点で最も効果が期待できる ADM+IFO 併用療法を用いることとした。プロトコール作成に当たっては Japan Clinical Oncology Group(JCOG)と綿密に協議を行い、科学的かつ倫理的に妥当な試験計画を立案した。我が国で最も活発に四肢軟部肉腫の治療にあたっている 26 施設を、JCOG 骨軟部腫瘍グループとして組織した。ADM+IFO を術前 3 コース、術後 2 コースの計 5 コース行い、その有効性を評価する予定とした。本研究によって、ADM+IFO 療法の有効性が認められれば、高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する標準的治療法の確立が期待される。世界的にみても、補助化学療法の有効性を示す画期的な研究となり、世界標準となりうる可能性を秘めている。

骨肉腫の治療成績は MTX、ADM、CDDP の 3 剤を中心とする化学療法の進歩により改善されてきた。骨肉腫では、治療が奏効した場合、腫瘍径の縮小よりも腫瘍内の壊死が見られる。そのため、他の固形がんとは異なり、化学療法の効果判定は、主と

して切除標本での腫瘍壊死割合により行われる。術前化学療法による腫瘍壊死割合が 90%以上の症例 (good responder) は予後がよく、90%未満の症例 (standard responder) が予後不良とされている。この予後不良な術前化学療法の効果不十分例に対し、術後に薬剤を変更する試みがなされてきたが、治療成績の改善は得られていない。厚生労働省がん研究助成金 岩本班「原発性悪性骨腫瘍に対する標準的治療法の開発と治療成績の改善に関する研究」を中心に行なわれた骨肉腫の多施設共同研究 NECO-95J (Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma in Japan)の結果から、MTX、ADM、CDDP の3剤による術前化学療法の効果不十分例に対し、術後にこの3剤に IFO を加えた化学療法を行うことで、予後が改善する可能性が示唆された。この NECO-95J レジメンの有用性を検証し標準治療として確立するためには、第 III 相ランダム化比較試験が必要と考えられる。

B. 研究方法

高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する Ifosfamide, Adriamycin による補助化学療法の第 II 相臨床試験

研究形式：

多施設共同第 II 相臨床試験であり、プライマリエンドポイントは2年無増悪生存割合、セカンダリエンドポイントは術前化学療法の奏効割合、3年無増悪生存割合、無増悪生存期間、全生存期間、有害事象発生割合、重篤な有害事象発生割合、心毒性発生割合、脳症発生割合、手術合併症発生割合、病理学的奏効割合とする。

対象：

- 1) 年齢 20~70 才、2) ECOG Performance Status 0-1、3) 四肢原発の軟部腫瘍、4) 切開生検サンプルを用いた病理診断にて非円形細胞軟部肉腫 (WHO 分類の以下のいずれか; 悪性線維性組織球腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、滑膜肉腫、多形型横紋筋肉腫、未分化肉腫、分類不能肉腫)、5) AJCC 病期分類で Stage III (T2bN0M0)、6) MRI での評価可能病変を有する、7) 切除可能、8) 未治療例かつ他の癌種に対し化学療法・放射線療法の既往がない。

化学療法スケジュール (計5コース)：

ADM 30 mg/m²/day (day 1-2)

IFO 2 g/m²/day (day 1-5)

以上を3週1コースとして術前3コース、術後2コースの計5コース実施する。

外科的切除術：

術前化学療法終了後、3コース目の化学療法開始日

より5週以内に広範切除術を施行する。

治療効果判定と治療の継続：

術前化学療法3コース終了後MRIを撮影し、2方向計測にて評価する。術前化学療法中に臨床的に増悪と判断された場合は、化学療法を中止して切除を行う。手術後の切除縁評価にて十分な切除縁が得られていないと判断される場合は、術後化学療法の終了後に各施設の判断により放射線療法を実施してもよい。治療終了例は再発を認めるまで追加治療を行わず経過を観察する。治療中止例の後治療は自由とする。

エンドポイントと予定症例数：

本研究のプライマリエンドポイントは2年無増悪生存割合、セカンダリエンドポイントは、奏効割合、3年無増悪生存割合、無増悪生存期間、全生存期間および安全性である。症例集積期間は4年間とし、登録終了2年後に主たる解析を行う。登録予定症例数は75例である。プロトコール治療全体の有効性の指標として、主たる解析時の2年無増悪生存割合が、手術単独例での術後2年無再発増悪生存割合の40%を15%上回55%程度が得られるかどうかを検討する。

骨肉腫術後補助化学療法における Ifosfamide 併用の効果に関するランダム化比較試験

研究形式：多施設共同第III相ランダム化比較試験。プライマリエンドポイントはA、B群の無病生存期間、セカンダリエンドポイントはG群の無病生存期間、群ごとの無再発生存期間、群ごとの全生存期間、術前増悪割合、一次登録日を起算日とし全群を併合した全生存期間、有害事象、患肢機能。

対象：1) 切除可能な上肢帯を含む上肢、下肢帯を含む下肢に発生した高悪性度骨肉腫、2) 臨床病期がIIA、IIB、III、3) 高悪性度骨肉腫の既往がない、4) 化学療法、放射線療法の既往がない、5) 明らかな家族性腫瘍の家族歴をもたない、6) 40歳以下、7) Performance Status (ECOG)0-1、8) 主要臓器機能が保たれている。

患者登録とランダム割付：JCOG データセンターにて2段階登録を行う。一次登録後、術前化学療法を行い、手術後に切除標本の腫瘍壊死割合を病理組織学的に判定し、効果不十分例 (standard responder) を二次登録し術後治療群のランダム割付を行う (A群・B群)。割付調整因子は施設、T因子、発生部位。著効例 (good responder) には術前と同じレジメンで術後化学療法を行う (G群)。

術前化学療法：AP (ADM 60mg/m²+CDDP 120mg/m²)2コース、MTX (12g/m²)4コース。

手術療法：術前化学療法終了後、4週以内に手術を

施行し、切除標本の腫瘍壊死割合を判定する。

術後化学療法：効果不十分例を二次登録し、ランダム割付により、以下のいずれかの術後化学療法を実施。

A 群：AP2 コース、MTX6 コース、ADM (90mg/m²) 2 コース

B 群：AP2 コース、MTX4 コース、IFO (16g/m²) 6 コース

予定症例数：

登録期間 6 年、追跡期間 10 年、200 例を予定症例数とする。

(倫理面への配慮)

参加患者の安全性確保：適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化される。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従い以下を遵守する。

1) 研究実施計画書の IRB 承認が得られた施設のみから患者登録を行う。

2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より得る。未成年者の場合は親権者より文書で同意を得るとともに本人からのアセントも得る。

3) データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報(プライバシー)保護を厳守する。

研究の第三者的監視：JCOG (Japan Clinical Oncology Group) は国立がん研究センターがん研究開発費指定研究 6 班 (20 指-1~6) を中心に、同計画研究班および厚生労働科学研究費がん臨床研究事業研究班、合計 33 研究班の任意の集合体であり、JCOG に所属する研究班は共同で、Peer review と外部委員審査を併用した第三者的監視機構としての各種委員会を組織し、科学性と倫理性の確保に努めている。本研究も、JCOG のプロトコル審査委員会、効果・安全性評価委員会、監査委員会、放射線治療委員会などによる第三者的監視を受けることを通じて、科学性と倫理性の確保に努める。

C. 研究結果

高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する Ifosfamide, Adriamycin による補助化学療法の第 II 相臨床試験

本研究は、四肢に発生する高悪性度軟部腫瘍の大多数を占める非円形細胞肉腫に対する標準治療を確立することを主目的としている。高悪性度軟部肉腫に対する化学療法の臨床研究を中心に据えてお

り、これまでに骨軟部悪性腫瘍の治療を実施している中心的な 26 施設による全国規模の研究組織を整備し、JCOG と慎重に討論を重ね科学的根拠に基づき倫理的にも問題のない臨床研究プロトコルを作成した。各施設での IRB 審査を経て平成 16 年 3 月から症例登録を開始した。適格年齢上限を 70 歳までに引き上げ、組織型として分類不能肉腫を追加するプロトコル改訂を実施し症例集積の促進を図った結果、登録症例数は平成 20 年 9 月現在で 72 例となり、登録終了とした。また、本年度においては 2 回の班会議を開催し、定期モニタリングにより、登録症例の追跡調査、CRF 回収状況のチェック、CRF レビューを実施した。登録症例の病理中央診断委員会の検討では、これまでに病理組織診断で不適格とされた症例は 1 例のみである。また、定期モニタリングの結果では、有害事象による化学療法の中止が 8 例あったが、治療関連死亡例は報告されておらず、安全性に大きな問題は生じていない。研究計画では、手術単独例での術後 2 年無再発生存割合 40%を 15%上回る 55%程度が得られるかどうかを検討する予定であったが、平成 24 年 11 月の集計では、2 年無増悪生存割合は 76.4%、8 年無増悪生存割合は 65.3%と、予想をはるかに上回る好成績が得られていた。全生存割合についても、2 年全生存割合は 91.7%、8 年全生存割合は 83.3%と、生命予後が改善される可能性が高いと予測されている。より長期の予後を解析するために、更に 5 年間追跡期間を延長し、10 年間追跡を行うようにプロトコルを改訂する予定である。また、本研究の後継研究のプロトコルについての検討も開始した。

骨肉腫術後補助化学療法における Ifosfamide 併用の効果に関するランダム化比較試験

本プロトコルは JCOG プロトコル審査委員会の承認を得て(JCOG0905)、各施設の IRB 承認後、平成 22 年 2 月より順次症例の登録を開始した。平成 25 年 2 月末現在、81 例の一次登録、36 例の二次登録が得られている。また、本年度においては 2 回の班会議を開催し、プロトコル遵守状況の検討および安全性の評価を行った。また、定期モニタリングにより、CRF 回収状況のチェック、CRF レビューを実施した。平成 24 年度後期定期モニタリングの結果では、治療関連死亡が 1 例報告されたため、班会議で治療継続の是非も含め検討した。平成 25 年度以降も症例集積と定期モニタリングを実施していく予定である。

D. 考察

高悪性度軟部肉腫の大多数を占める非円形細胞肉腫の長期生存率は、現在の標準治療である手術単独では約35%と不良であり、治療成績の改善が強く求められている。死因の殆どは肺転移であることから、全身的治療としての有効な化学療法の確立が必要である。しかし、世界的に見ても、高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する化学療法の有効性は未確定である。進行例を対象とする臨床試験の結果から、現時点で軟部肉腫に対する奏効性が最も高い薬剤はADMとIFOと考えられるが、化学療法による進行例の生存率の有意な改善は得られなかった。そこで、手術と併用した補助化学療法によって、非進行例の生命予後の改善を得ようとする臨床研究が立案され実施されているが、その有効性はいまだ確立されていない。我が国では高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する臨床試験が少なく、切除不能の進行例に対してADM+CPM+IFO 3剤併用化学療法の第II相試験が行われたのみであり、本研究で対象とする切除可能な症例に対する臨床試験は皆無である。本研究においては、登録終了後3年経過時の解析で、予想をはるかに上回る好成績であり、生命予後が改善される可能性が高いと予測される。本研究によって、手術可能な四肢発生例に対するADM+IFO療法の有効性が認められれば、高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する標準的治療法の確立が期待される。世界的にみても、補助化学療法の有効性を示す画期的な研究となり、世界標準となりうる可能性を秘めた極めて意義深いものである。今後も追跡調査を続け本試験を完遂することが重要である。

骨肉腫の治療成績はMTX、ADM、CDDPの3剤を中心とする化学療法の進歩により改善されてきたが、術前化学療法による腫瘍壊死割合が90%以上の症例(good responder)は予後がよく、90%未満の症例(standard responder)が予後不良とされている。MTX、ADM、CDDP、3剤による術前化学療法の効果不十分例に対し、術後にIFOを加えた化学療法を行うことの有用性を検証し標準治療として確立するためには、第III相ランダム化比較試験が必要と考え、臨床試験を立案した。平成22年1月にJCOGによるプロトコール承認が得られ、平成25年2月末現在、81例の一次登録、36例の二次登録が得られている。平成25年度以降も症例集積と定期モニタリングを実施していく予定である。

E. 結論

四肢発生の高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する標準治療を確立することを目的とし、現時点でも

つとも有効性と考えられるADM+IFOによる術前術後補助化学療法の有効性と安全性を検討する第II相試験を開始した。全国26施設からなるJCOG骨軟部腫瘍グループ内で症例登録を行い、平成20年9月で登録を終了した。平成23年の10月に解析を行い、2年無増悪生存割合は76.4%、5年無増悪生存割合は64.3%と良好な成績が得られていた。本研究によってADM+IFO療法の有効性が示されれば、高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する標準的治療法の確立が期待できる。

転移の無い四肢発生の高悪性度骨肉腫に対し、MTX、ADM、CDDPの3剤による術前化学療法を行い、効果が不十分である症例に術後補助化学療法として上記3剤にIFOを追加する上乘せ延命効果があるかどうかを、ランダム化比較により検証する臨床試験を開始した。平成22年2月より登録を開始し、現在まで81例の一次登録、36例の二次登録が得られている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwamoto Y, et al.:

The Activity of the Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group
Jpn J Clin Oncol, 42(6):467-70, 2012

Fujiwara-Okada Y, Iwamoto Y, et al.:

Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and is associated with clinical outcomes of osteosarcoma
Br J Cancer, in press 2012

Setsu N, Iwamoto Y, et al.:

Inhibin- α and synaptophysin immunoreactivity in synovial sarcoma with granular cell features
Hum Pathol, 43(6):850-7, 2012

Ishii T, Iwamoto Y, et al.:

Leiomyosarcoma in the humerus with leukocytosis and elevation of serum G-CSF
Skeletal Radiol, 41(6):719-23, 2012

Setsu N, Iwamoto Y, et al.:

The Akt/Mammalian Target of Rapamycin Pathway Is Activated and Associated With Adverse Prognosis In Soft Tissue Leiomyosarcomas
Cancer, 15;118(6):1637-48, 2012

- Li Y, Iwamoto Y, et al.:
Impairment of p53 acetylation by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing Family Tumors
Cancer Lett, 1;320(1):14-22, 2012
- Sakamoto A, Iwamoto Y, et al.:
Myxoid liposarcoma with negative features on bone scan and [18F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography
World J Surg Oncol, 10(1):214, 2012
- Sakamoto A, Iwamoto Y, et al.:
Nonossifying fibroma presenting as an aneurysmal bone cyst: a case report
J Med Case Rep, 29;6(1):407, 2012
- Endo M, Iwamoto Y, et al.:
Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors
Clin Cancer Res, 19(2):450-61, 2013
- Setsu N, Iwamoto Y, et al.:
Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 in soft tissue leiomyosarcoma is associated with a better prognosis
Int J Cancer, 132(1):109-15, 2013
- Matsuura S, Iwamoto Y, et al.:
Epithelial and cartilaginous differentiation in clear cell chondrosarcoma
Hum Pathol, 44:237-43, 2013
- Endo M, Matsunobu T, Iwamoto Y, et al.:
Low-grade central osteosarcoma arising from bone Infarct
Human Pathology, in press 2013
- 坂本昭夫, 岩本幸英:
今日の軟部腫瘍の治療と分子生物学
軟部腫瘍における治療の進歩
軟部腫瘍 I-診断と研究の進歩-
病理と臨床
文光堂, 東京, 30(2):116-20, 2012
- 岩本幸英:
悪性線維性組織球種の過去、現在、未来
日整会誌, 86:1101, 2012
- 松延知哉, 岩本幸英:
悪性骨・軟部腫瘍の治療の進歩
日本医事新報, 4621:52-3, 2012
- 坂本昭夫, 岩本幸英:
成人型線維肉腫
骨軟部腫瘍
研修医のための見逃すと困る整形外科疾患
関節外科, 31(4):204-5, 2012
- 坂本昭夫, 岩本幸英:
未分化多形性肉腫/悪性線維性組織球腫
骨軟部腫瘍
研修医のための見逃すと困る整形外科疾患
関節外科, 31(4):206-7, 2012
2. 学会発表
Iwamoto Y:
Current status and perspectives on treatments for musculoskeletal sarcomas
2 Asia-pacific orthopaedic symposium in 2012 Annual Fall Congress of the Korean Orthopaedic Association (2012.10.18 Seoul, Korea)
- Iwamoto Y:
Current status and perspectives on treatments for bone and soft tissue sarcomas
Japanese OA-ORS Symposium in The Seventh International Congress of Chinese Orthopaedic Association (2012.11.16 Beijing, China)
- 田仲和宏, 岩本幸英, 他:
軟部肉腫に対する化学療法が多施設共同臨床試験 (JCOG0304)
第 85 回日本整形外科学会学術総会
(2012.5.17-20 京都)
- 坂本昭夫, 岩本幸英, 他:
骨腫瘍症例における”非アナトミカル”ロッキングプレートの使用経験
第 123 回西日本整形・災害外科学会
(2012.6.2-3 北九州)

岡田悠子, 岩本幸英, 他:
Y-box binding protein-1 は骨肉腫細胞の増殖を調節し、骨肉腫の臨床予後と関連する
第 16 回日本がん分子標的治療学会
(2012.6.27-29 北九州)

岩本幸英:
悪性骨軟部腫瘍の治療の進歩
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

石井武彰, 岩本幸英, 他:
右上腕骨腫瘍の 1 例
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

松本嘉寛, 岩本幸英, 他:
傍脊椎部に発生した悪性神経鞘腫瘍の治療成績
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

薛宇孝, 岩本幸英, 他:
軟部平滑筋肉腫において Akt/mTOR pathway の活性化は予後不良因子である
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

山田裕一, 岩本幸英, 他:
孤立性線維性腫瘍に関する Akt-mTOR pathway 活性化およびチロシンキナーゼ型受容体発現の検討
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

岡田悠子, 岩本幸英, 他:
Y-box binding protein-1 は骨肉腫細胞の増殖を調節し、骨肉腫の臨床予後と関連する
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

坂本昭夫, 岩本幸英, 他:
骨内ガングリオンの臨床像
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14 東京)

藤原悠子, 岩本幸英, 他:
YB-1 は骨肉腫において細胞増殖を促し、その臨床予後と関連する
第 71 回日本癌学会(2012.9.19-21 札幌)

小田義直, 岩本幸英, 他:
軟部肉腫における分子標的の探索
第 71 回日本癌学会(2012.9.19-21 札幌)

G. 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

JCOG0905 参加施設における骨肉腫症例数の実態

研究分担者 平賀 博明 北海道がんセンター腫瘍整形外科 医長

研究要旨 現在登録進行中である JCOG0905 の 2012 年一次登録数は 25 例であり、2011 年の 32 例を下回った。参加施設へのアンケートによると、全骨肉腫症例数に対する JCOG0905 適格例の割合と、同意取得割合に著変はなかったが、全骨肉腫症例数が 2011 年の 112 例に対して 2012 年が 72 例と大幅に減少していた。骨肉腫の年間発生数に大きな変化がなかったと仮定すると、骨肉腫患者の治療施設の分布に変化があったことが一因と考えられる。

A. 研究目的

骨肉腫術後補助化学療法における Ifosfamide 併用の効果に関するランダム化比較試験（JCOG0905）は本邦初となる骨軟部腫瘍についての第 III 相試験である。6 年間で 200 例の一次登録を予定していたが、2012 年の一次登録数は 25 例であり、年間登録予定数の 33 例を下回った。一次登録症例数に対する二次登録症例数の割合も予定より低いため、一次登録数を予定以上に確保する事が急務である。本研究の目的は、試験参加施設で治療された全骨肉腫症例数の実態を調査し、JCOG0905 の一次登録数減少の原因を明らかにする事である。

B. 研究方法

2012 年 1 月と 2013 年 1 月に、JCOG0905 参加全 26 施設に対して、各々 2011 年と 2012 年の 1 年間に各施設で新たに診断した骨肉腫の症例数に関するアンケート調査を行った。質問項目は全骨肉腫症例数（転移例、体幹発生例、中高齢者発生例を含む）、JCOG0905 適格症例数、JCOG0905 適格例中、試験参加についての説明を行えなかった症例の数およびその理由、JCOG0905 参加についての説明を行ったが、同意を得られなかった症例の数およびその理由である。アンケートは JCOG 骨軟部腫瘍グループのメーリングリストを通じて配布され、各施設のコーディネーターが主体となって返答していただいた。

（倫理面への配慮）

アンケートには症例の個人情報の記載が必要ないよう配慮した。

C. 研究結果

アンケートは 2011 年については参加施設全 26 施

設から、2012 年については 1 施設を除く 25 施設から回答を得る事ができた。転移例、体幹発生例、中高齢者発生例を含む全骨肉腫症例数は 2011 年の 112 例に対して 2012 年は 72 例と減少していた。これは回答を得られなかった 1 施設分の症例数を加味しても、30 例以上の減少と判断された。適格例は 2011 年が 40 例、2012 年が 30 例であり、全骨肉腫症例に対する割合は、各々 35.7%、41.7%とやや上昇していた。試験参加についての説明を行えなかった症例数は 2011 年が 3 例、2012 年が 1 例とわずかであり、同意取得率は 2011 年が 80.0%、2012 年が 83.3%と著変なかった。試験参加についての説明が行えなかった理由は、病状の進行や患者の生活状況などであった。同意を得られなかった理由は患者や患者家族との治療方針の不一致、治療薬剤の予想される有害事象などが主因であったが、臨床試験に対する理解不足に起因すると思われる不同意も散見された。

D. 考察

JCOG0905 参加 26 施設で新たに診断した全骨肉腫症例数の減少は、骨肉腫の年間発生数に大きな変化がなかったと仮定すると、骨肉腫患者の治療施設の分布に変化があったことが一因と考えられる。現在の参加施設である 26 施設は積極的に骨肉腫の治療を行っている施設として選定されたが、地域環境の変化や医師の異動に伴い骨肉腫患者の集積状況が変化する可能性は十分考えられる。2 年間のアンケート調査で明らかに変化と断定する事は困難であるため今後の調査継続が必要であるが、状況によっては施設の入れ替えも必要と思われる。

全骨肉腫症例数に対する JCOG0905 適格例の割合は当初半数程度と予想していたが、実際には 35%か

ら40%とやや低い傾向であった。不適格の理由はアンケートで質問しなかったが、理由を記載した施設の回答では、年齢、発生部位、転移が主であり予想される範囲内であった。

予想した同意取得率は50%であったが、実際には2011年、2012年とも80%と高い取得率であった。二次登録で患者側の希望によるプロトコル中止例がみられることより、この高率の同意取得率を数字通り解釈することはできないが、それでも十分に評価できるものであると考える。一方、臨床試験そのものに対する患者側の理解不足に起因する不同意もみられることより、試験についての説明の工夫も今後必要と思われる。

E. 結論

2012年のJCOG0905への一次登録数の減少は、参加施設で診断された全骨肉腫症例数の減少によるものと思われる。骨肉腫患者の治療施設の分布に変化があったことが一因と考えられ、継続的な調査が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kimura T, Hiraga H, et al.:

CD133 Negatively Regulates Tumorigenicity via AKT Pathway in Synovial Sarcoma
Cancer Investigation, 30:390-7, 2012

Takeda N, Hiraga H, et al.:

Zoledronic acid enhances the effect of radiotherapy for bone metastases from renal cell carcinomas: more than a 24-month median follow-up
J Orthop Sci, 17:770-4, 2012

平賀博明:

悪性骨腫瘍

骨・軟部腫瘍

新臨床腫瘍学 改訂第3版

南江堂, 東京, 489-93, 2012

2. 学会発表

平賀博明, 他:

下肢悪性骨腫瘍に対する処理骨あるいは同種骨と血管柄付き腓骨を併用した関節温存患肢温存術
第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

G. 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

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療確立のための研究

研究分担者 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、以下 SS)における融合遺伝子である *SYT-SSX* 遺伝子の機能解析を目指して、*in vitro* の研究を行った。これまでの研究により同定した *SYT-SSX* 蛋白の下流に存在する遺伝子である *Frizzled homologue 10 (FZD10)* 遺伝子を対象として、まず主たる転写制御領域を同定した。次にエピゲノムの解析を行い、*SYT-SSX* がヒストンメチル化を活性型に変化させることで発現を誘導することを明らかにした。

A. 研究目的

SS は成人発生の軟部肉腫の一つである。稀な腫瘍ではあるが、*SYT-SSX* 融合遺伝子という特異的な遺伝子変異を有していること、複数の細胞株が樹立されていること等より、多くの基礎的な研究が進められている。*SYT-SSX* 融合タンパクの機能としては、クロマチン修飾を改変することで、遺伝子発現を制御することが提唱されているが、その詳細は明らかにされていない。下流遺伝子を同定し、それぞれに対する発現制御機構を明らかにすることは、*SYT-SSX* 融合タンパクの腫瘍発生における役割を解明すると同時に、新規の治療法の開発にも結びつく可能性がある。そこで本研究では、これまでに我々が下流遺伝子として同定した WNT 蛋白の受容体の一つである *Frizzled homologue 10 (FZD10)* 遺伝子に関して、その発現制御機構における *SYT-SSX* 融合タンパクの関与を解析した。

B. 研究方法

1) *FZD10* 遺伝子発現制御領域の同定：ルシフェラーゼレポーターシステムを用いて *FZD10* 遺伝子の発現制御領域の同定を試みた。次に同定した領域に関して *FZD10* 発現陽性細胞である SS 細胞株、陰性細胞である正常皮膚細胞及びヒト胚性幹細胞を用いて、それぞれの DNA メチル化及びヒストンアセチル化及びメチル化を解析した。

2) *FZD10* 遺伝子発現に対する *SYT-SSX* の作用の解析：*SYT-SSX* 遺伝子に対する siRNA を用いたノックダウン実験と、発現ベクターを用いた発現誘導実験を行い、それぞれにおいて *FZD10* 遺伝子の発現の変化及びその際のヒストン修飾の変化を解析した。

(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) *FZD10* 遺伝子発現制御領域の同定：*FZD10* 遺伝子発現遺伝子のプロモーター領域において、特定の転写因子の結合部位を含む転写活性領域を同定した。エピゲノムの修飾に関しては、発現陽性、陰性に関わらず、DNA は低メチル化状態であり、その関与は低いと考えられた。一方、ヒストンのアセチル化及びメチル化に関しては、SS 細胞株では活性型であり、皮膚線維芽細胞では抑制型であった。興味深いことに胚性幹細胞では両者が共存する両価型となっていた。

2) *SYT-SSX* の作用の解析：SS 細胞株において、*SYT-SSX* をノックダウンすると、その程度に応じて *FZD10* 遺伝子の発現も低下し、その際にはヒストンメチル化が抑制型に変化した。一方、皮膚線維芽細胞において *SYT-SSX* を強制発現させても、ヒストンメチル化は変化したが、*FZD10* 遺伝子の発現は誘導されなかった。しかし胚性幹細胞では発現が誘導され、発現誘導機構には、それぞれの細胞におけるヒストン修飾の状態が重要な因子であることが判明した。

D. 考察

SYT-SSX によるクロマチン修飾の改変に関しては、発現抑制機構への関与が報告されているが、亢進機構へ関与は明らかにされていない。今回 *SY-SSX* がヒストンアセチル化を亢進型に改変することで下流遺伝子の発現を誘導する機構が明らか

になった。同時に、その作用には元来の細胞のヒストン修飾の状態が重要であることも明らかになり、SS の起源細胞の探索において考慮すべき点であると考えられる。

E. 結論

SYT-SSX 蛋白は、SS 起源細胞において、ヒストン修飾の改変を介して遺伝子発現を誘導する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hayakawa K, Toguchida J, et al.:

Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells
Biochem Biophys Res Commun, in press 2012

Kawaguchi S, Toguchida J, et al.:

SYT-SSX breakpoint peptide vaccines in patients with synovial sarcoma: A study from the Japanese Musculoskeletal Oncology Group
Cancer Sci, 103(9):1625-30, 2012

Kajita Y, Toguchida J, et al.:

The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1)
PLoS One, in press 2013

Yamada K, Toguchida J, et al.:

EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice
J Clin Invest, in press 2013

2. 学会発表

Fukuta M, Toguchida J, et al.:

Establishment and functional analysis of iPS cells with drug-inducible SYT-SSX fusion gene
10th ISSCR (2012.6.13-16 Yokohama, Japan)

Takahashi R, Toguchida J, et al.:

AFAP1L1 accelerates growth of sarcoma cells in vivo through the association with protein complex in invadopodia
The 17th Annual Meeting of the Connective Tissue Oncology Society(CTOS)
(2012.11.14-17 Prague, Czech Republic)

Hayakawa K, Toguchida J, et al.:

Application of iPS cell technology for the analysis of origin-unknown sarcoma characterized by a specific fusion gene
The 17th Annual Meeting of the Connective Tissue Oncology Society(CTOS)
(2012.11.14-17 Prague, Czech Republic)

Tamaki S, Toguchida J, et al.:

Cell context is an important factor for the role of SYT-SSX on epigenetic regulation of transcription
The 17th Annual Meeting of the Connective Tissue Oncology Society(CTOS)
(2012.11.14-17 Prague, Czech Republic)

福田誠, 戸口田淳也, 他:

薬剤誘導型発現ベクターを用いた SYT-SSX 融合遺伝子導入 iPS 細胞の樹立
第 11 回日本再生医療学会総会
(2012.6.12-14 横浜)

玉置さくら, 戸口田淳也, 他:

滑膜肉腫の発生機構に関して
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

早川和男, 戸口田淳也, 他:

薬剤誘導型発現ベクターを用いた SYT-SSX 融合遺伝子導入 iPS 細胞の樹立
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

戸口田淳也, 他:

肉腫の病態解明への幹細胞研究の応用
第 71 回日本癌学会学術総会(2012.9.19-21 札幌)

福田誠, 戸口田淳也, 他:

iPS 細胞を用いた肉腫研究：滑膜肉腫の起源細胞の解明をめざして
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2012.10.26-27 名古屋)

戸口田淳也:

骨・軟部腫瘍に関する基礎研究の現況
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2012.10.26-27 名古屋)

G. 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

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に対する研究

研究分担者 尾崎 敏文 岡山大学大学院整形外科学 教授

I. 骨肉腫に対する新たな治療法の確立に対する研究

研究要旨 骨肉腫に対する新たな治療法の確立を目的とした。我々は腫瘍特異的に増殖し腫瘍融解を来たすよう設計されたウイルス製剤(OPB-301)を開発し、OPB-301 が骨肉腫細胞株に対して抗腫瘍効果を示すことを確認した。しかし OPB-301 と現在の標準的治療で用いられる化学療法との併用による効果は明らかでない。本研究では OPB-301 と化学療法の併用による骨肉腫細胞株への抗腫瘍効果を検討した。今回の検討では、OPB-301 と化学療法の併用により相加・相乗の抗腫瘍効果を認めた。OPB-301 は体表からの腫瘍選択的な投与が可能であり、四肢の骨肉腫に対しては他の悪性腫瘍と比べて比較的投与が容易というメリットがある。OPB-301 と化学療法の併用療法は、骨肉腫の有効な治療法となり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

骨肉腫の予後は化学療法の導入により劇的に改善したが、化学療法に抵抗性を示す症例もみられ、近年5年生存率は70%台で推移している。そのため骨肉腫に対する新たな治療法の確立が重要な課題である。近年、腫瘍選択的に増殖する遺伝子改変アデノウイルスを用いた癌ウイルス療法が様々な臓器由来の癌細胞に対して強力な抗腫瘍活性を示す事が示されており、新たな治療法として注目されている。多くの悪性腫瘍でテロメラーゼ活性を示す事が広く知られており、我々はテロメラーゼ活性に依存して増殖する腫瘍融解アデノウイルス(OPB-301)を開発した。骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果も確認され、OPB-301 はテロメラーゼ依存的に増殖し、E1A と E1B の発現を介して抗腫瘍効果を示すと考えられている。OPB-301 は米国での第 I 相臨床試験を終了し、日本での臨床試験を検討中である。しかし将来的に OPB-301 を臨床応用するにあたり、現在の標準的治療で用いられる化学療法との併用効果は明らかとなっていない。そこで我々は OPB-301 と化学療法の併用による骨肉腫細胞株への抗腫瘍効果を、*in vitro* および *in vivo* で検討を行った。

B. 研究方法

ヒト骨肉腫細胞株(HOS、MNNG/HOS、143B、SaOS-2)を用いて検討を行った。OPB-301 および抗がん剤の抗腫瘍効果を XTT-assay を用いて評価した。抗がん剤は NECO-95J プロトコールで用いられる

doxorubicin および cisplatin を使用した。細胞死に関する検討としてはオートファジーとアポトーシスの誘導を評価した。オートファジーの評価のため、Western blot で LC3-I から LC3-II への conversion と p62 の degradation を測定した。アポトーシスの評価のため、cleaved-PARP を Western blot で、active caspase-3 の発現を FACS analysis により測定した。また real-time PCR を用いて抗がん剤が OPB-301 の増殖に与える影響を評価した。*In vivo* では MNNG/HOS を用いて xenograft model を作成し抗腫瘍効果の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験を行うにあたり、「岡山大学における動物実験規則」に従い、詳細な動物実験に関する計画書を作成・提出し、所定の手続きは完了しており、その規定に従っている。動物実験の際には、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」に従い、外科的な処置を行う際には適切な麻酔を行い、動物に無用な苦痛を与えないように最大限の注意を払った。

C. 研究結果

すべての骨肉腫細胞株において OPB-301 と抗がん剤の併用により相加・相乗効果を認めた。OPB-301 によって濃度依存的にオートファジーが誘導された。OPB-301 との併用により、抗がん剤単独と比較して cleaved-PARP と active caspase-3 の発現の増強を認めた。抗がん剤による OPB-301 の増殖抑制は

認めなかった。Xenograft model では OBP-301 単独群、抗がん剤単独群と比較して併用群では有意に腫瘍増殖を抑制した。

D. 考察

アデノウイルス製剤による抗腫瘍効果においては、E1A を介して誘導されるオートファジーの関与が知られている。また E1A はアポトーシス制御に関与する Bcl-2 ファミリー蛋白質の発現への関与も指摘されている。本研究では OBP-301 の感染によって、抗がん剤によるアポトーシスの増強が認められた。その理由としては、OBP-301 によって発現した

E1A によって抗がん剤によるアポトーシスの誘導が促進され、抗がん剤感受性が亢進した可能性が考えられた。本研究により、OBP-301 と化学療法の併用療法が今後新しい治療戦略となることが期待される。

E. 結論

OBP-301 は、現在の標準的治療で用いられる化学療法との併用において良好な結果を示した。今後、OBP-301 と化学療法の併用療法が骨肉腫治療の新たな選択肢となり得る可能性が示唆された。

II. 悪性末梢神経鞘腫瘍に対する新しい治療標的に関する研究

研究要旨 末梢神経腫瘍におけるマイクロ RNA (miRNA) のプロファイリングを行い、悪性化に関与していると考えられる miRNA を同定した。その中の miR-21 について、悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST) 細胞株に miR-21 インヒビターを導入して機能解析を行い、さらに標的候補である programmed cell death protein 4 (PDCD4) について調べた。miR-21 インヒビターの MPNST 細胞株への導入によりアポトーシスの増加、細胞増殖の抑制、PDCD4 タンパク量の増加を認めた。これらの結果より miR-21 は MPNST においてそのターゲットである PDCD4 を介し腫瘍化と腫瘍増殖に重要な役割を持つことが示唆された。miR-21 と PDCD4 は MPNST に対しての治療標的となると期待される。

A. 研究目的

手術や化学放射線療法などの集学的治療の進歩にもかかわらず MPNST 患者の 5 年生存率は約 50% である。本研究では末梢神経腫瘍の miRNA プロファイルを調べ、MPNST の腫瘍化と増殖における miRNA の役割を良性の神経線維腫 (NF) と比較検討した。さらに、我々は MPNST における特異的な miRNA とその標的について調べ新たな治療標的を見つけることを目的とした。

B. 研究方法

miRNA 発現プロファイリング

miRNA プロファイリングとして MPNST 6 検体、NF 6 検体を調べた。組織から RNA を抽出し、157 の miRNA を含む TaqManR MicroRNA Assay Human Panel Early Access Kit を使用して定量的 real-time RT-PCR (qRT-PCR) を行った。

末梢神経腫瘍における miRNA 発現

プロファイリングで得られた結果について確証を得るため追加の実験を行った。MPNST 12 検体、NF

11 検体、正常神経 5 検体と 3 つの MPNST 細胞株から RNA を抽出しプロファイリングで有意差のあった miRNA について qRT-PCR を行った。

MPNST 細胞株での miR-21 のノックダウン

細胞活性解析と caspase 検定のため、MPNST 細胞株 YST-1 細胞に miRNA インヒビター、negative control を導入した。インヒビター導入から 48 時間後に Caspase-Glo™ 3/7 Assay を用いてアポトーシスを調べ、72 時間後に CellTiter-Glo™ 20/20 Luminometer を用いて細胞増殖を調べ比較した。

ウエスタンブロット

インヒビター導入 72 時間後の細胞と MPNST、NF、正常神経の臨床サンプルからウエスタンブロットのための細胞溶解物を準備した。10%ゲルを使用して SDS-PAGE を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において RNA 情報の解析にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」

(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守した。

C. 研究結果

miRNA 発現プロファイリング

miRNA 発現プロファイリングでは9種のmiRNAがMPNSTとNFの間で異なる発現を示した。miR-21、miR-135b、miR-152、miR-130、miR-92、miR-15bはMPNSTで発現が高く、miR-125b、miR-127、miR-302dはNFで発現が高かった。

miRNA 発現プロファイリングの確認

プロファイリング解析でNFとMPNSTの間で有意差があった9種のmiRNAのうちfold changeが2倍以上であったmiR-21、miR-125b、miR-127、miR-135b、miR-302についてMPNST、NF、正常神経の新たな臨床サンプル、MPNST細胞株3種における発現を調べた。このうちmiR-21はMPNSTでNF、正常神経と比較して有意に発現が高かった。また、MPNST細胞株での発現も正常神経より有意に高かったため、我々はさらにMPNST細胞におけるmiR-21の機能解析を行った。

MPNST細胞へのmiR-21インヒビターの導入

miR-21インヒビターを導入したYST-1細胞のmiR-21の発現量はmockと比較して66%に減少した($P<0.05$)。CaspaseアッセイではmiR-21インヒビターの導入によりmockと比べアポトーシスが150%に増加した($P<0.01$)。miR-21インヒビターを導入した細胞ではmockと比べ細胞増殖が80%に低下した($P<0.05$)。

MPNST細胞でのmiR-21の機能解析

miR-21インヒビターを導入した細胞ではPDCD4のタンパク合成は40%増加していたが、PDCD4のmRNAレベルは変化していなかった。また、MPNST、NF、正常神経の臨床サンプルでのPDCD4のタンパク発現量の比較では、NFでMPNSTの2倍、正常神経でMPNSTの3倍であった。しかし、PDCD4のmRNAレベルは有意差を認めなかった。

D. 考察

MPNSTはまれな悪性腫瘍であり、化学療法を含めた最適な治療戦略が十分に分かっていない。今回検討した症例では様々な治療が行われており、治療結果とmiRNA発現の間に関連を見つけることは出来なかった。

近年、悪性骨軟部腫瘍においても癌の予後や化学

療法感受性、薬剤耐性に関連するmiRNAの役割が注目されている。

miR-21は、癌だけでなく軟部腫瘍においても高発現しており、miR-21は腫瘍化に関連すると考えられる。今回の検討でmiR-21はMPNSTにおいてNF、正常神経より有意に高く発現していて、miR-21が末梢神経腫瘍の悪性化に関連する重要な因子である可能性が示唆された。

さらに、MPNST細胞株へのmiR-21インヒビターの導入実験では、caspase活性の誘導、細胞増殖の抑制、PDCD4タンパク発現量の増加を認めた。他の悪性腫瘍での、miR-21インヒビター導入によるPDCD4の発現制御の報告やアポトーシスでのPDCD4の発現増加の報告もあり、PDCD4の過剰発現はcaspaseカスケードを介してアポトーシスを誘導すると考えられている。今回の検討でもmiR-21の抑制がPDCD4を増加させcaspaseを活性化させることで、アポトーシスを誘導したと考えられた。PDCD4は腫瘍抑制因子として知られ、ヒトの癌細胞では発現が減少している。今回の研究ではMPNSTの臨床検体でNFよりもPDCD4の発現が減少していた。miR-21の高発現がPDCD4の発現を抑制し、アポトーシスを減少させることで腫瘍性増殖を増加させていると考えられた。

MPNST細胞株、臨床サンプルでPDCD4のmRNA発現に差は認めなかったが、タンパク発現は減少していた。miRNAはmRNAの相補的な配列に結合し、標的遺伝子の発現を転写後のタンパクレベルで制御する。他の癌腫でmiR-21の抑制によりPDCD4のタンパク発現は著明に変化した。mRNA発現は変化しなかったとの報告があり、MPNSTでのmiR-21によるPDCD4の抑制は、転写後に生じていると考えられた。

E. 結論

今回の実験からmiR-21が、そのターゲットであるPDCD4を介し、MPNSTの腫瘍化と腫瘍増殖に重要な役割を持つことが示唆された。miR-21とPDCD4はMPNSTに対しての治療標的となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Itani S, Ozaki T, et al.:

MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4)

J Cancer Res Clin Oncol, 138(9):1501-9, 2012

Kataoka M, Ozaki T, et al.:
Statistical analysis of prognostic factors for survival in patients with spinal metastasis
Acta Med Okayama, 66(3):213-9, 2012

Hasei J, Ozaki T, et al.:
Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells
Mol Cancer Ther, in press 2013

Sasaki T, Ozaki T, et al.:
A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus
Gene Ther, 20(1):112-8, 2013

2. 学会発表

Hasei J, Ozaki T, et al.:
Oncolytic adenovirus-mediated p53 gene transfer induces antitumor effect in human bone and soft tissue sarcoma cells
Orthopaedic Research Society
(2012.2.4-7 San Francisco, USA)

Hasei J, Ozaki T, et al.:
p53-mediated apoptotic signaling overcomes the resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells
American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting
(2012.4.1-4 Chicago, USA)

Hasei J, Ozaki T, et al.:
Oncolytic adenovirus-mediated p53 gene transfer induces antitumor effect in human osteosarcoma cells
9TH Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting (2012.9.6-9 Kuala Lumpur, Malaysia)

尾崎敏文, 他:
日常診療に生かす軟部腫瘍診療ガイドライン
第 85 回日本整形外科学会学術総会
(2012.5.17-20 京都)

Hasei J, Ozaki T, et al.:
Oncolytic adenovirus-mediated p53 gene transfer induces antitumor effect in human osteosarcoma cells
第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会 (JSGT2012)
(2012.6.28-30 熊本)

長谷井嬢, 尾崎敏文, 他:
ヒト骨肉腫細胞に対するp53武装化テロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルスの抗腫瘍効果
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

国定俊之, 尾崎敏文, 他:
体幹部発生軟部肉腫の治療戦略
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

国定俊之, 尾崎敏文, 他:
骨・軟部腫瘍治療におけるタリウムシンチの有用性と限界
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

武田健, 尾崎敏文, 他:
不適切切除された軟部肉腫に対する追加切除の治療成績
第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
(2012.7.14-15 東京)

長谷井嬢, 尾崎敏文, 他:
新規アデノウイルスによるp53強制発現は、骨肉腫細胞における従来型腫瘍融解型アデノウイルス抵抗性を改善する
第 14 回福島骨軟部セミナー(2012.8.15 福島)

Hasei J, Ozaki T, et al.:
p53-mediated apoptosis induction attenuates the resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells
第 71 回日本癌学会学術総会(2012.9.19-21 札幌)

長谷井嬢, 尾崎敏文, 他:
ヒト骨肉腫細胞に対するp53武装化テロメラーゼ依存性腫瘍融解アデノウイルスの抗腫瘍効果
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2012.10.26-27 名古屋)

G. 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