

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得(出願)

1) 米国特許出願 61/696981, MicroRNA-based methods and Assays for Osteosarcoma, 2012.9.5 (出願中)

発明者：落谷孝広、藤原智洋

2) 国際特許出願 PCT/IB2012/002626、MICRORNA-BASED METHODS AND ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA, 2012.9.7 (出願中)

発明者：落谷孝広、藤原智洋

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

S-TuD 製剤の大量合成プロトコールの開発
骨肉腫における miR-133a の標的遺伝子の解析

研究分担者 藤原 智洋 国立がん研究センター中央病院骨軟部腫瘍科

研究要旨

日本発の新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の創薬開発を進めるため、ジーンデザイン社と共同で、S-TuD の大量合成プロトコールを作成した。まず 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の検討を行った。得られた条件を基に生産実施した結果、一定の収率で合成品を得ることに成功した。次に 2 本鎖形成試験を行った結果、望ましい 2 本鎖純度を得るために 1 本鎖 RNA 純度の向上が必要であることが明らかとなり、この規定を基に 2 本鎖化する条件が得られ大量生産を実施し、併せて規格試験設定の為の基礎条件を検討した。これらの結果により、S-TuD 大量合成プロトコールの基盤技術が確立した。

また、骨肉腫がん幹細胞分画の悪性形質を制御する分子メカニズムを解明する目的で、骨肉腫における miR-133a の標的遺伝子の解析を行った。まず、miR-133a 導入骨肉腫 CD133 低発現細胞における miRNA-Argonaute-2 複合体に対する免疫沈降法から得られた cDNA を用いて標的遺伝子の網羅的解析を行った結果、がん抑制性機能を含む複数の標的遺伝子が同定された。その複数の候補に対する siRNA を作成・導入し、がん幹細胞様性質制御の可否を検討した結果、個々の分子がそれぞれ薬剤耐性、浸潤性を制御することが明らかになった。最後に、これら標的遺伝子の 3' UTR における miR-133a 結合阻害効果をレポーターアッセイにより確認した。これら一連の結果により、miR-133a による骨肉腫がん幹細胞分画の悪性形質制御には、複数のがん抑制性機能を有する標的遺伝子を介していることが分子生物学的に明らかになった。

A. 研究背景、目的 (背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株におけるがん幹細胞分画を単離し、その悪性形質に関与する microRNA として miR-133a を同定した。さらに、locked nucleic acid (LNA) による miR-133a 機能阻害により、薬剤耐性や浸潤能などのがん幹細胞分画における悪性形成の制御を、in vitro、in vivo において見出してきた。

LNA はリボ核酸の五炭糖の 2' 位と 4' 位とがメチレン架橋 (O-CH₂-架橋) され、コンフォメーションを N 型となるように化学修飾することにより対象核酸分子とのハイブリダイゼーションが強化されている。既にデンマークのサンタリス・ファーマ社が慢性 C 型肝炎に対する治療薬として応用しており、同社は LNA 誘導体を利用した miR-122 の阻害剤の投与により C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制することに成功し、第 II 相臨床試験に入っている。しかし、

LNA 製品は海外に特許が認可されている。

一方、S-TuD は共同研究者である伊庭らが開発した新規 microRNA 阻害剤であり、in vitro 環境下において、同濃度の LNA よりも高い阻害活性を有することが明らかになっている。しかし生体内での効果は未だ確認されておらず、そのための大量合成の手段も確立されていない。そこでジーンデザイン社と協同し、大量合成プロトコールの作成を開始した。S-TuD は 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA 同士が、両端に相補鎖を形成し中央部に非相同領域を配位するユニークな 2 本鎖構造を有する。この構造体を大量合成するためには、従来の合成法で困難とされる長鎖 1 本鎖 RNA 大量合成方法の最適化、2 本鎖化方法の最適化、さらには医薬品開発に必須である規格試験の確立が必要である。

このような背景を基に、日本で開発された S-TuD を応用することで、骨肉腫に対する新規治療法の創出を目的とした。また、

miR-133a阻害による骨肉腫がん幹細胞性質の抑制の機序が分かっていないため、その分子機構を解析することを目的に、更なるin vitro解析を行った。

B. 研究方法

まず 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の検討を中容量の固相合成システムを用いた。得られた条件を基に約 10 倍スケールの固相合成システムを用いて生産実施した。次に得られた 1 本鎖同士を用いて 2 本鎖化するための基本条件検討と判定方法の設定を行った。得られた条件を基に 2 本鎖化を実施し、必要とされる 2 本鎖純度に達するための諸条件を確認した。この規定を基に S-TuD の大量生産を実施し、併せて規格試験設定の基礎方法を検討した。

また、miR-133a 導入骨肉腫 CD133 低発現細胞における miRNA-Argonaute-2 複合体に対する免疫沈降法から得られた cDNA を用いて標的遺伝子の網羅的解析を行った。その複数の候補に対する siRNA を作成・導入し、がん幹細胞様性質制御の可否を検討した。また、その 3'UTR における miR-133a 結合阻害効果をレポーターアッセイにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては動物実験およびヒト検体を用いた解析を行っておらず、倫理審査対象とはなっていない。

C. 研究結果

2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の合成及び精製について、基本的な方法を確立し、大量生産を実施した。得られた高純度 1 本鎖修飾 RNA 同士 2 本鎖化を行う際の条件検討及び、純度 85%以上の 2 本鎖を得られる条件を確立し、最終収量 1 グラムの S-TuD を得ることに成功した。

次に、創薬開発に向かうための規格試験設定を最終目標として、まず 2 本鎖化した S-TuD について、純度検定の方法を検討し、基礎条件を得るとともに、1 本鎖合成物の不純物について定性的解析を実施した。

また、標的遺伝子検索においては、miRNA-Argonaute-2 複合体に対する免疫沈降法から得られた cDNA の網羅的解析から、

約 5,000 種類の候補遺伝子を得た。また、miR-133a を細胞内導入した骨肉腫細胞株から得られた cDNA の網羅的解析から、約 2,000 種類の候補遺伝子を得た。これらのデータおよび in silico で確認されている miR-133a の標的遺伝子から共通するものが 20 種類選出された。個々の遺伝子に対する siRNA を作成し、それぞれの発現抑制下に機能解析を行ったところ、SGMS2、UBA2、SNX30、ANXA2 が浸潤能を規定し、MAST4、DUSP11、ANXA2 が薬剤抵抗性を規定することが明らかとなった。

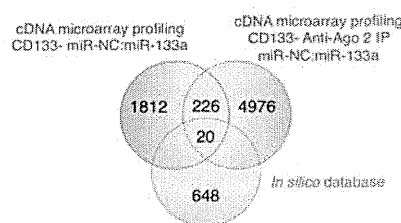


図 1. cDNA microarray および in silico database に基づいた miR-133a 標的遺伝子の検索

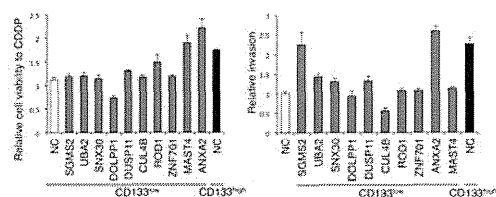


図 2. siRNA を用いた miR-133a 標的遺伝子発現抑制による機能解析

D. 考察

本研究の結果、S-TuD の大量合成プロトコル確立及び規格試験設定の基礎データが得られ、日本発の新規 miRNA 阻害剤を用いた創薬開発の加速をもたらすと考えられた。大量生産に関しては、1 本鎖部分の効率的合成法の確立、精製方法の大幅な単純化が課題であり、規格試験設定については、1 本鎖部分の不純物の定量的解析、1 本鎖部分の配列解析、2 本鎖純度検定試験法の規格試験化が課題であると考えられた。

また、miR-133a の標的遺伝子を解析することで、浸潤能や薬剤抵抗性の改善を規定

する分子が明らかとなった。これらは、既に他のがん種においてがん抑制性に働いているものを含んでいる。miR-133a は骨肉腫がん幹細胞分画においてはがん促進性の機能を有していると考えられるため、このようながん抑制性分子ががん幹細胞分画において発現抑制されていることが悪性形質の発現に寄与していることが考えられた。逆に、miR-133a 阻害においては、これらがん抑制性分子が発現促進され、骨肉腫の悪性形質の抑制に寄与していることが考えられた。

E. 結論

本研究の結果、S-TuD 大量合成プロトコールの基盤技術が開発され、規格試験法設定の為の基礎条件が得られた。miR-133a 発現阻害による骨肉腫がん幹細胞形質の抑制の更なる機序が明らかとなった。複数の標的遺伝子を介して、浸潤能や薬剤抵抗性の改善を引き起こしていることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

16. 藤原智洋、川井 章、小坂展慶、尾崎敏文、落谷孝広：骨軟部肉腫における microRNA の最新の知見と臨床応用への挑戦、癌と化学療法、2013年3月号、癌と化学療法社、東京
17. Tomohiro Fujiwara, Akira Kawai, Akihiko Yoshida, Toshifumi Ozaki, and Takahiro Ochiya. Cancer Stem Cells of Sarcoma. Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy.P23-78 Eds. Thomas Dittmar, Enrico Mihich, Kurt S. Zanker. SCIENCE PUBLISHERS. ENFIELD, NEW HAMPSHIRE, USA.

2. 学会発表

22. Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi , Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya:RNA-I THERAPEUTICS AS A NOVEL STRATEGY AGAINST TUMOR-INITIATING POPULATION OF OSTEOSARCOMA; MICRORNA INHIBITION IN COMBINATION WITH

CURRENT CHEMOTHERAPY, 2012年11月, 17th Connective Tissue Oncology Society, Prague

23. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広：新規 microRNA 阻害剤による骨肉腫に対する前臨床試験 2012年10月 第27回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋
24. Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi , Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya: A Novel Therapeutic Strategy against Tumor Initiating Cells of Osteosarcoma; microRNA Inhibition with the Combination of Current Chemotherapy 2012年9月 第71回日本癌学会日本癌学会学術総会、札幌
25. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広：RNA 干渉による原発性および転移性骨腫瘍の制御 2012年7月 第30回日本骨代謝学会学術集会、東京
26. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広：RNA 干渉による骨肉腫の幹細胞性の制御 2012年7月 第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、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
 - 1)米国特許出願 61/696981, MicroRNA-based methods and Assays for Osteosarcoma、2012.9.5 (出願中)
 - 2)国際特許出願 PCT/IB2012/002626、MICRORNA-BASED METHODS AND ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA、2012.9.7 (出願中)

S-TuD については、共願による製法特許取得を検討中である。

- 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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

microRNA 阻害剤（Tough Decoy）の製剤開発および動物実験のデータ評価
研究分担者 伊庭 英夫 東大・医科学研究所

研究要旨

我々は特定の miRNA を高い効率で阻害する RNA decoy 分子である S-TuD (synthetic TuD) を開発し、これが既存の miRNA 阻害剤をはるかに凌ぐ阻害効率であることを示すと共にその基本構造の設計法をすでに公表して日本の特許も取得している。しかし骨肉腫制圧のためには阻害効率を最適化が必須であり、まだ確定していない S-TuD の諸パラメーターを設定する必要である。本研究ではまず数多くの miRNA 分子に対して S-TuD が普遍的に高い阻害効率を持つための基本構造の諸条件、特に miRNA binding site (MBS) の配列設計法を中心に研究を行なった。その結果 1 個の S-TuD に含まれる 2 つの MBS 間で多くの塩基対を形成すると阻害効率が低減するというすでに公表した基本原理が、幅広い miRNA に対する S-TuD の一般則として成立した。そこでさらに最適配列を予想する基本アルゴリズムを開発し、それを用いて決定した miR-133a に対する MBS をもつ S-TuD (S-TuD-miR133a) を、本年度の動物実験に供したところ良好な結果を得ている。これと並行して他のパラメーターについても検討を開始しており今後も最適化にむけて集中したい。

A. 研究背景、目的 (背景)

特定の miRNA を阻害する技術は、研究ツールとしてだけではなく、miRNA を標的とした治療の基本技術として必須となってきた。これまでに我々は特定の miRNA の配列を認識してその活性を阻害する Decoy RNA (TuD RNA; Tough Decoy RNA) を設計し、これを RNA polymerase III により高レベル発現させるユニットを搭載したプラスミドベクターやレトロ/レンチウイルスベクターを開発してきた。TuD RNA は特徴的な二次構造を有していて、従来のデコイ RNA に比べて著しく高い阻害効果を発揮することから、miRNA を対象とした基礎研究において有用なツールとして miRNA の標的の決定、発癌活性の検定をはじめとした幅広い分野で広く使用されている。しかし TuD RNA 発現ウイルスベクターを治療に直接使用するためには、遺伝子治療の必要があるが、残念なことにそれにはまだ課題が多いのが現状である。そこで我々はこの基盤技術の核酸医薬化を目指して、2本の 2'-OME RNA 核酸オリゴで構成される分子を合成しアニールすることにより、TuD RNA の二次構造を模した、S-TuD (Synthetic TuD) と呼ぶ分子を作製した。そして 3 種の miRNA に対する S-TuD につい

て阻害効率の高い共通した設計法を開発して公表し (Haraguchi T, et al: Nucleic Acids Res 40:e58 2012), 日本特許も取得している (登録番号第 4936343 号)。

(目的)

共通した設計法により培養細胞で 30-300pM の S-TuD の transfection で良好な miRNA の阻害が 3 種の miRNA でそれぞれ観察はされている。しかし骨肉腫制圧のためには S-TuD の阻害効率をさらに高めていく不断の努力が必須である。

例えば、S-TuD の独特な構造を形成する、① 2 つの miRNA binding site (MBS) の配列、② MBS と Stem 構造を結合する 4 か所の linker の長さや配列、③ Stem1, Stem2 を構成する 2 重鎖 RNA の鎖長、④ アニールの条件等、まだ普遍的な S-TuD 配列決定法は確立されていない。そこで本研究では、特に重要と考えられる①を中心に最適化を行なうこととした。その条件で、miR-133a に対する S-TuD (S-TuD-miR133a) を設計し、動物実験に供することとした。

B. 研究方法

miR-21, miR-16, miR-200c に対する S-TuD の阻害効果は、Haraguchi T, et al:

Nucleic Acids Res 40:e58 2012 に準拠して行なった。

miR-199a-3p, -5p, miR-214 に対する S-TuD は、それぞれ対応する miRNA をレンチウイルスベクターで強制発現した HeLaS3 を、また miR-142-3p は、miR-142-3p を強制発現した HEK293T 細胞をもちいて assay した。luciferase gene の 3'-UTR 領域に対応する miRNA の完全相補配列を挿入した reporter plasmid を各種の投与量の S-TuD RNA と cotransfection して48時間後に、dual luciferase 法により定量をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験や病理検体等を用いた実験は含まれなかった。

C. 研究結果

miR-21, miR-16, miR200c に対してそれぞれ MBS の少しづつことなる S-TuD 分子を作製しそれらのを培養細胞系に導入後阻害効果を、dual luciferase 法により評価した。これらの結果を評価して、以下の一般則を抽出した。

一般に、より標的 miRNA との結合親和性が高い MBS 配列の方がより効果的であるが S-TuD 分子内での、MBS 間の結合が強い場合は S-TuD は効果が大きく減弱する。この際、S-TuD 内における RNA 構造の予測法として CentroidFold と呼ばれるアルゴリズムを使うと、阻害効果と2次構造予測に良い相関がえられた。すなわち2つの MBS 間で 8 塩基対までの形成は、S-TuD の活性に大きな影響は与えなかった。しかし 9 塩基対以上の形成は、著しく阻害活性を落とすので、標的 miRNA の 5' 端から 10 番目の塩基に対してのみ mismatches を導入した MBS を作製し、塩基対の数を下げることは極めて有効であった。また TuD では、天然の RNA であるため Ago2 による切断が大きくその活性を下げていたが、MBS 配列として標的の miRNA に完全相補な配列の 3' 端から 10 番目と 11 番目の間に 4nt 挿入した配列 (バルジ) を導入することによりこの問題を解決していた。今回 S-TuD に点変異の導入だけでは塩基対の軽減につながらない場合、このバルジ導入法も極めて有効であることが示された。

このような原理に基づく MBS 設計のアルゴリズムを作成し、それぞれ miR-199a-3p, -5p, miR-214、及び miR-142-3p の 4 種の S-TuD を設計しその阻害効率を評価したところ、いずれの場合にも 1nM 以下で、対応する miRNA の活性を完全に抑制しうることが証明された。また miR-133a に対する S-TuD も同じアルゴリズムで設計して、その評価は藤原博士にお願いし、極めて良好な阻害効果を検出している。

D. 考察

本研究で、ほぼ MBS 設計法については確定したと考えられ、ほぼすべての miRNA に対する良好な S-TuD が、このアルゴリズムを使って設計できること、miR-133a もその適用範囲にあることが実証された。我々は同時にパラメーター②③④についても、いくつかの miRNA に対する S-TuD を使って最適化を進めている。予備的には③が最も改良の余地があると考えられるので今後これに取り組みたい。

E. 結論と展望

本研究で、培養細胞での MBS 設計法については確定したと考えられる。今後は他の班員が積極的に進めている in vivo での抗腫瘍活性を含めた解析による DDS や投与法の進展を詳しく評価したい。特に パラメーター①②③④が、in vivo では培養細胞と異なる可能性や核酸修飾で改良する可能性についても注意を払い、治療における S-TuD の最適化を進めていきたい。またある時点から、miR-133a に対する S-TuD 設計に特化した詳細な解析も始める必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishizaka, A., Mizutani, T., Kobayashi, K., Tando, T., Sakurai, K., Fujiwara, T., and Iba, H. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- κ B RelA/p50 heterodimer. *J. Biol. Chem.* 287:11924-11933, 2012.

Kurashima, Y., Amiya T., Nochi T., Fujisawa K., Haraguchi T., Iba H., Tsutsui H., Sato S., Nakajima S., Iijima H., Kubo M., Kunisawa, J., and Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. **Nature Communications** 3:1034, 2012.

Tagawa, T., Haraguchi, T., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Inada, K., and Iba, H. Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumor cells. **Biochem. J.** 447:449-455, 2012.

原口健、伊庭英夫: 2'-OME RNA オリゴを基盤とした独特の二次構造を持つ新規 microRNA 阻害剤、S-TuD. **遺伝子医学 MOOK** 23:169-175, 2012.

2. 学会発表

原口 健、上野 義仁、伊庭 英夫
独自の二次構造を持つ 2'-OME RNA オリゴを基盤とした microRNA 阻害剤「S-TuD」
第 12 回分子複合医薬研究会、大阪、2012 年 11 月 12 日

原口 健、上野 義仁、伊庭 英夫
独自の二次構造を持つ 2'-OME RNA オリゴ新規 microRNA 阻害剤「S-TuD」
第 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌、2012 年 7 月 5 日

Iba, H., Sakurai, K., Kobayashi, K., Haraguchi, T. SWI/SNF complex catalytic subunit, Brm, as a key epigenetical regulator in cancer cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 71 回日本癌学会学術総会), 札幌, 2012 年 9 月 19 日 (シンポジウム)

Iba, H., Sakurai, K., Kobayashi, K., Chang J. and Haraguchi, T. Molecular switches formed by miR-199a and Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF chromatin remodeling factor, determine inflammation status in

cancer cells
Homeostatic Inflammation Symposium (IEIS 2012) October 24 Tokyo.

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。を
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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

イヌ骨肉腫症例に対する抗 miR-133a 核酸製剤投与
研究分担者 伊藤 博 東京農工大学附属動物医療センター

研究要旨

骨肉腫のがん幹細胞分画の同定とその性質を制御する miR-133a が主任研究者らにより特定されている。分担研究者である伊藤は、イヌ骨肉腫自然発生例を用いて miR-133a 阻害による生体内治療効果の検討を開始した。具体的には、イヌの長幹骨である四肢に発生した骨肉腫に対して抗 miR-133a 核酸製剤を投与し、腫瘍の増殖性および遠隔転移の有無を指標にその有効性を評価した。これまでに投与が完遂した右前肢発生の 1 例においては、抗 miR-133a 核酸製剤投与中、局所における腫瘍の増大が 4 カ月間もの長期にわたり認められず、続き肺転移も確認されなかった。その後、投与 4 か月目頃から局所腫瘍サイズが増大し、感染を契機に飼い主の希望により安楽死を選択したが、その時点においても肺転移は認められなかった。抗 miR-133a 核酸製剤の転移を抑制する効果が示唆されたが、より多くの症例での検討が必要であり、今後は全国からの登録システムの推進を行っていく。

**A. 研究背景、目的
(背景)**

イヌの骨肉腫は、四肢の長い犬種であるジャーマンシェパードやグレイハンドなどに好発する。また、イヌの骨肉腫の病理学的な所見は、ヒトの若齢性骨肉腫とよく類似している。治療方法もヒトと同様に断脚手術、シスプラチンやカルボプラチンによる抗がん剤投与、放射線療法が行われている。さらにイヌの骨肉腫は、ヒトに比較して肺転移や進行度が早いことから、早期(約1年以内)に抗miR-133a核酸製剤の骨肉腫に対する有効性評価が可能である。

B. 研究方法

イヌの四肢に発生した腫瘍で病理学的に骨肉腫と診断された症例で、抗がん剤投与、断脚および温存療法を希望する患犬を対象とする。

断脚および温存症例の腫瘍部に抗 miR-133a 核酸製剤 (LAN/S-TuD) を全身投与あるいは局注して、局所の腫瘍の抑制効果、肺転移の出現、増大にかかる期間 (PFS) で有効評価を検討する。

1.断脚例

1) 肺転移なし

評価: 肺転移出現までの期間を評価

2) 肺転移有り

評価: 肺転移の増大にかかる期間を評価

投与方法

①CDDP+LAN/S-TuD(全身)

①を拒否された場合

②カルボプラチン+LAN/S-TuD(全身)

②を拒否された場合

④カルボプラチンのみ

* 全身投与におけるLAN/S-TuDの安全性確認が行われてからとする。

2.温存例

評価: 原発巣、肺転移(無場合の場合は出現までの時間、有りの場合は腫瘍抑制効果)

投与方法

①CDDP+LAN/S-TuD(局所)

②CDDP+LAN/S-TuD(全身)

②カルボプラチン+LAN/S-TuD(局所)

②カルボプラチン+LAN/S-TuD(全身)

②カルボプラチンのみ

* 全身投与におけるLAN/S-TuDの安全性確認が行われてからとする。

3.投与量

局所投与:

LNA:1mg/kg

S-TuD:0.1mg/kg

全身投与:

LNA:10mg/kg(or1mg/kg)

S-TuD:1mg/kg(or0.1mg)

4.検査

検査は治療前、1 カ月後、3 カ月後、6 カ月

後、1 年後とする。なお、死亡時には、治療開始からの生存期間(日)を記録し、入手可能であれば骨肉腫の検体を凍結する。

検査項目

- 1) 大きさ(横・奥行き・高さ)
- 2) 同一方向からの写真
- 3) 血液・生化学検査「ALP」
- 4) X-ray (胸部・局所)
- 5) CT(全身 or 胸部・局所)

(倫理面への配慮)

本研究はすべて文科省における研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に(文部科学省告示第七十一号)従って行った。事前の十分な説明と自由意思による同意に基づいた研究を行い、個人情報情報は徹底して保護した。患者情報を記載しているデータファイルは、暗証番号を使用し研究者個人しか使用できないようにした。また、動物研究の開始に関しては、事前に当大学の倫理委員会により審査及び承認を得ることで研究の適正性を確保した。

C. 研究結果

(症例)

患者名：T.G.

品種：ラブラドル・レトリバー

体重：27.6 kg

初診：24 年 6 月

右前肢の橈骨部の腫脹、跛行を主訴として来院した。患部は硬固で骨からの腫脹(長径 5cm)と思われた。飼い主は昨年 23 年 11 月頃に腫脹に気づいていたが、歩行に支障が認められなかった。近医で治療していたが 24 年 4 月頃に跛行が認められたことから当院へ来院した。

当院では、X-ray、血液検査、腫脹部の FNA を実施した。

X-ray 所見では、検査の結果、FNA では紡錘形の大小不同の細胞、核小体明瞭、多核細胞および各分裂像(骨増生)の激しい細胞が確認された。X-ray 所見では肺転移は認められなかった。

治療

メタカム

プレビコックス

鎮痛剤を主体とした治療を希望するが前肢の断脚および積極的な抗がん剤治療

については否定された。

7 月 30 日：痛みは軽減されたせいかよく眠るようになった。腫瘍の大きさに変化は認められなかった。この時点での肺転移は認められなかった。

8 月 9 日 miRNA について飼い主に説明し治療の承諾を得た。投与後の抗がん剤治療も同意を得ることができた。

WBC 6.400

HCT 32.8%

ALP481

その他生化学検査値に異常は認められなかった。

カルボプラチン 50mg/m² (BW28.35kg)

45mg/head

腫瘍のサイズ

長径 7.14 cm

LNA 投与量 2ml

8.27 症状、腫瘍のサイズは変化なし

LNA 投与量 1ml

血液検査値：異常所見なし

9.10 触診しても痛がらないし、気にする様子はない。

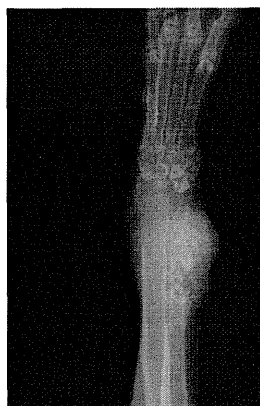
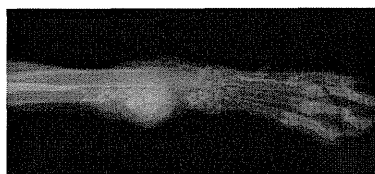
X-ray 肺への転移は認められない。

10.1 特異所見なし

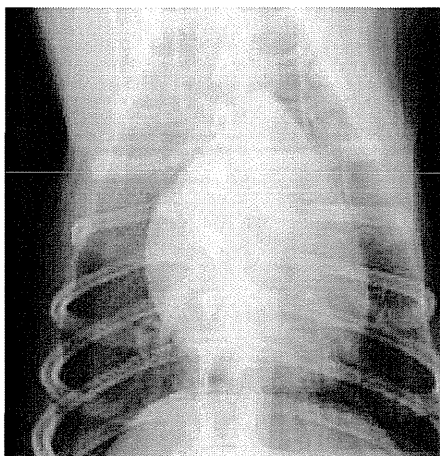
10.18 腫瘍増大(皮膚の壊死がみられる)。

11.29 腫瘍増大(皮膚潰瘍)

12.11 飼い主の希望により安楽死(肺への転移は認められない)。



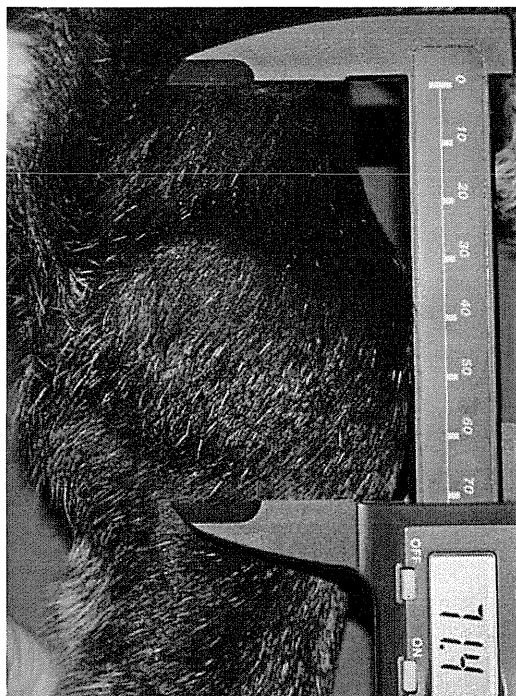
初診時(6.11)のX線所見



肺の所見
投与後 2 カ月目 (10.11) の X 線所見



11.11 の X 線所見



8.9 LNA の局所投与
8.9 腫瘍の計測

D. 考察

四肢の骨肉腫の発生率は、悪性骨腫瘍の 80%以上を占める。特に体重が 20 k g 異常になるとその発生率は増大する (大型犬種)。発生前年齢：中央値 8 歳 (8 カ月~13 歳) 断脚後の骨肉腫の転移率は 98%で、最も多く認められるのは肺への転移である。

- 1) 断脚により治療した 65 頭の生存期間中央値 126 日
- 2) シスプラチン治療による生存期間の中央値は、6-13 ヶ月、1 年生存率 30-62%、2 年生存率 7-12%である。2 年生存率 7-21%である。
- 3) 手術後カルボプラチン (300mg/m²) では、生存期間中央値 10.5 カ月で術後 1 年生存率 35%であった。

今回の症例は前肢の異常に気づき開業医で治療するも改善が認められなかったことから 5 カ月目に当大学センターの腫瘍科に紹介来院された。通常は異常(跛行、腫脹など)に気づいてから約 6 カ月目には殆どの症例で肺転移が認められる。しかし、症例は LNA 投与後、局所における腫瘍の増大が 4 カ月間もの長期にわたり認められず NC 状態が続き肺転

移も確認されなかった。その後、4か月目頃から急速に局所の腫瘍が増大し皮膚の壊死および潰瘍が認められてきた。局所は感染が生じ、液状部の腐敗臭が進んだことから飼い主の希望により安楽死を選択した。当院において治療後6カ月で安楽死に至ったが、肺等への遠隔転移は認められなかった。

E. 結論

腫瘍は抗 miR-133a 製剤投与後2カ月目から急速に増大してきたが肺への転移は認められなかった。早期に断脚処置を施していれば QOL も向上し延命期間が延長したものと推察される。今回の症例は僅か1例と少なく、飼い主の希望によりプロトコルに合致しなかったこともあり抗 miR-133a 製剤における有効性の評価はできなかった。しかしながら、イヌの骨肉腫における自然発症例は、ヒトと類似していることから、今後症例を積み重ねて、あらゆる角度から分析を行うことによって抗 miR-133a 製剤の有効性に対する一助になり得るものと確信された。

F. 研究発表

1. 論文発表

関連論文なし

2. 学会発表

関連発表なし

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

骨肉腫臨床検体の解析
研究分担者 尾崎 敏文 岡山大学大学院整形外科

研究要旨

骨肉腫がん幹細胞性質に関与する miR-133a およびその標的遺伝子が特定されたことに基づき、ヒト骨肉腫臨床検体における miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析をおこなうことを目的として、岡山大学医学部における材料収集を開始した。これまでに少なくとも16例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を収集し、RNA を抽出した。Real-time PCR に適したサンプルであるかを検討する目的で miR-103 および RUN-6B 発現量を測定した結果、全ての症例において miR-103 および RUN6B 発現を確認することが可能であった。本研究では、ヒト骨肉腫組織における miRNA 発現量を解析するため、パラフィンブロックから RNA を抽出し Real-time PCR をおこなう技術基盤を構築した。

A. 研究背景、目的 (背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株においてがん幹細胞分画を単離し、さらにヒト骨肉腫手術検体においてもがん幹細胞分画が存在し、その分画で miR-133a が高発現していることを見出してきた。

近年、ヒト悪性腫瘍におけるがん幹細胞マーカー発現率と患者の予後との間に負の相関があることが報告されつつある。したがって、ヒト骨肉腫組織における miR-133a 発現の臨床病理学的意義を明らかにすること、さらに miR-133a の標的遺伝子群を明らかにし、臨床材料における miR-133a とその標的遺伝子群の発現を検索し、臨床病理学的因子と比較検討することは、骨肉腫の発生および進展のメカニズムを明らかにする上で極めて重要であるのみならず、骨肉腫の治療方針決定や予後予測の観点からも有用性が高い。

このような背景を基に、複数の施設から集められた多数のヒト骨肉腫臨床材料を用い、miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析をおこなうことを目的とした。臨床材料は、国立がん研究センター中央病院および鳥取大学に加え岡山大学も参画し、本研究分担者は岡山大学における臨床材料を用いた検討を担当する。

B. 研究方法

岡山大学医学部において保管されている、ヒト骨肉腫原発巣切除組織のホルマリン固定・パラフィン包埋標本の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、

1990年～2010年に手術を施行された標本(90例)からは、RNA抽出を開始した。また、Real-time PCR に適したサンプルであるかを検討する目的で miR-103 および RUN6B 発現量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて、文部科学省、厚生労働省および経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行った。事前の十分な説明と自由意思による同意に基づいた研究を行い、個人情報情報は徹底して保護した。患者情報を記載しているデータファイルは、暗証番号を使用し研究者個人しか使用できないようにした。また、本研究の開始に関しては、事前に当大学の倫理委員会により審査及び承認を得ることで研究の適正性を確保した。

C. 研究結果

これまでにヒト骨肉腫切除標本のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック16例(2005～2010年)を集め、薄切および脱パラフィン後、常法にて RNA を抽出した。抽出した RNA 溶液の濃度は、100～475ng/ μ l であり、Real-time PCR にて miR-103 および RUN6B 発現量を測定した結果、いずれも miR-103 お

よび RUN6B 発現を確認することができ、本研究をおこなうにあたり適したサンプルであることが確認できた。

D. 考察

岡山大学医学部で収集された臨床検体(ホルマリン固定・パラフィン包埋標本)から抽出された RNA は、Real-time PCR にて miRNA 発現を測定する目的に適していることがわかった。今後は、さらに症例数を増やして RNA を抽出すると共に、miR-133a 発現量解析を開始する予定である。

主任研究者のグループにより、国立がん研究センターで採取された臨床検体において、miR-133a 発現と臨床予後との間に負の相関があることが明らかとなっている。同時に、miR-133a の一部の標的遺伝子発現と臨床予後との間に正の相関関係があることが明らかとなっている。当施設で採取された臨床検体において miR-133a およびその標的遺伝子の相関関係を解析することで、国立がん研究センターで得られた臨床病理学的意義の普遍性を明らかにすることができる可能性が示唆される。

E. 結論

本研究の結果、ヒト骨肉腫ホルマリン固定・パラフィン包埋標本から Real-time PCR での解析可能な RNA が抽出できた。今後、さらに症例数を増やすと共に、抽出した RNA を用いて miR-133a 発現を解析し、臨床病理学的因子との関連性を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

①Itani S, Kunisada T, Morimoto Y, Yoshida A, Sasaki T, Ito S, Ouchida M, Sugihara S, Shimizu K, Ozaki T. 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

2. 学会発表

①尾崎敏文、岡田恭司、川井章、石井猛、西田佳弘、平賀博明、松本誠一、田仲和宏、生越章、荒木信人 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 年 5 月 17-20 日、京都市
②国定俊之、武田健、井谷智、長谷井嬢、杉原進介、尾崎敏文 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 年 7 月 14-15 日、東京都

③武田健、国定俊之、井谷智、長谷井嬢、井上円加、尾崎敏文 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 年 7 月 14-15 日、東京都

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

骨肉腫臨床検体の解析

研究分担者 尾崎 充彦 鳥取大学医学部

研究要旨

ヒト骨肉腫臨床材料を用い miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析をおこなうことを目的として、鳥取大学医学部における材料収集を開始した。これまでに少なくとも 11 例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を収集し、RNA を抽出した。Real-time PCR に適したサンプルであるかを検討する目的で miR-103 発現量を測定した結果、全ての症例において miR-103 発現を確認することが可能であった。本研究では、ヒト骨肉腫組織における miRNA 発現量を解析するため、パラフィンブロックから RNA を抽出し Real-time PCR をおこなう技術基盤を構築した。

**A. 研究背景、目的
(背景)**

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株においてがん幹細胞分画を単離し、さらにヒト骨肉腫手術検体においてもがん幹細胞分画が存在し、その分画でmiR-133aが高発現していることを見出してきた。近年、ヒト悪性腫瘍におけるがん幹細胞マーカー発現率と患者の予後との間に負の相関があることが報告されつつある。したがって、ヒト骨肉腫組織におけるmiR-133a発現の臨床病理学的意義を明らかにすること、さらにmiR-133aの標的遺伝子群を明らかにし、臨床材料におけるmiR-133aとその標的遺伝子群の発現を検索し、臨床病理学的因子と比較検討することは、骨肉腫の発生および進展のメカニズムを明らかにする上で極めて重要であるのみならず、骨肉腫の治療方針決定や予後予測の観点からも有用性が高い。このような背景を基に、複数の施設から集められた多数のヒト骨肉腫臨床材料を用い、miR-133aおよびその標的遺伝子の発現解析をおこなうことを目的とした。臨床材料は、国立がん研究センター中央病院および岡山大学に加え鳥取大学も参画し、本研究分担者は鳥取大学における臨床材料を用いた検討を担当する。

B. 研究方法

鳥取大学医学部において保管されている、ヒト骨肉腫原発巣切除組織のホルマリン固

定・パラフィン包埋標本の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、1996年～2008年に手術を施行された標本(11例)からは、すでに RNA 抽出を開始し、Real-time PCR に適したサンプルであるかを検討する目的で miR-103 発現量を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織標本を用いた解析に関しては、保存されているパラフィンブロックを使用することを本学倫理審査委員会に申請し、承認を受けている(No.1558)。

C. 研究結果

これまでにヒト骨肉腫切除標本のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック11例を集め、薄切および脱パラフィン後、常法にて RNA を抽出した。抽出した RNA 溶液の濃度は、3～250ng/ μ l であり、Real-time PCR にて miR-103 発現量を測定した結果、いずれも miR-103 発現を確認することができ、本研究をおこなうにあたり適したサンプルであることが確認できた。

D. 考察

鳥取大学医学部で収集された臨床検体(ホルマリン固定・パラフィン包埋標本)から抽出された RNA は、Real-time PCR にて miRNA 発現を測定する目的に適していることがわかった。今後は、さらに症例数を増やして RNA

を抽出すると共に、miR-133a 発現量解析を開始することとした。

本研究分担者は、既にヒト骨肉腫への miR-143 導入によりその細胞浸潤能が抑制され、動物モデルを用いた検討により、miR-143 全身投与によるヒト骨肉腫細胞の肺転移が抑制されることを報告している。したがって、ヒト骨肉腫細胞株のがん幹細胞分画で高発現している miR-133a 発現と、骨肉腫細胞の転移に関与する miR-143 との関係を探ることで、miR-133a の生物学的意義を明らかにできる可能性が示唆される。

E. 結論

本研究の結果、ヒト骨肉腫ホルマリン固定・パラフィン包埋標本から Real-time PCR で解析可能な RNA が抽出できた。今後、さらに症例数を増やすと共に、抽出した RNA を用いて miR-133a 発現を解析し、臨床病理学的因子との関連性を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

1. 尾崎充彦、岡田 太:ヒト骨肉腫細胞の肺転移は、miR-143 発現低下による PAI-1 および MMP13 発現量増加が関与する 第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会、2012 年 7 月 12-13 日、広島
2. 尾崎充彦、平畑美緒、田中宏樹、押村光雄、岡田 太:ヒト骨肉腫細胞に対する miR-143 導入効果とその標的遺伝子の siRNA 導入効果の比較検討 第 4 回日本 RNAi 研究会、2012 年 8 月 30 日-9 月 1 日、広島
3. 尾崎充彦、平畑美緒、落谷孝広、田中宏樹、井藤久雄、岡田 太、押村光雄: miR-143 標的遺伝子である PAI-1 と MMP13 はヒト骨肉腫細胞の肺転移を制御する 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌
4. 平畑美緒、尾崎充彦、押村光雄、岡田太:miR-143 標的遺伝子である PAI-1 と MMP13 はヒト骨肉腫細胞の肺転移を制御する 第 35 回日本分子生物学会年

会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

microRNA 阻害剤の製剤管理および有効性試験、安全性管理
研究分担者 松田 範昭 株式会社スリー・ディー・マトリックス事業開発部

研究要旨

miR-133a に対する阻害剤である LNA ならびに S-TuD を用いた新規の骨肉腫治療薬剤の開発を目的とし、GLP 動物試験に適合するスペックでの製造、GLP 動物安全性試験の実施のための諸条件の決定を行った。その結果、GLP 動物試験に適合し、かつ将来的な GMP 製造を可能とするスペックでの S-TuD の大量合成を達成した。S-TuD の臨床想定投与用量を見出し、ラットでの単回投与毒性試験・血中動態試験を実施した。また、S-TuD に対する DDS の必要性の有無をペプチドキャリア A6K を用いて検証したところ、S-TuD の臨床想定投与用量では S-TuD 単体でも顕著な効果を示すことを見出した。

A. 研究背景、目的 (背景)

国立がん研究センターにて、骨肉腫「がん幹細胞」の細胞集団が特定され、その分画を阻害することで腫瘍の進展及び肺転移を抑制することが見出された。機能阻害のターゲットとして、microRNA-133a (miR-133a) が特定され、miR-133a に対する阻害剤である locked nucleic acid (LNA) ならびに Synthetic Tough Decoy (S-TuD) を用いることで、動物モデルにて骨肉腫の治療効果が証明されつつある。本研究班では、当該阻害剤を新規の骨肉腫治療薬剤として開発するべく、GLP 動物試験に適合するスペックでの製造、GLP 動物安全性試験の実施などについて、その実行計画の策定および管理を行うことを目的とする。また、S-TuD を動物で用いるにあたり、DDS の必要性の有無を検証し、必要な場合は複合製剤としての薬剤開発、管理を行う。また、国立がん研究センターを含めた研究過程における知財戦略を策定し、効果的な特許出願を行っていく。

B. 研究方法

LNA の合成に関しては、実績があり、合成に関する特許ライセンスをもつ施設から選定する。S-TuD のグラムオーダーでの大量合成は世界初であるが、他種核酸製剤の合成の実績があり、将来的に GMP での合成が対応可能な施設から選定する。GLP 動物試験に

適した純度を 85% と定め、最終生成物がそれを満たすよう合成・精製プロセスを最適化する。S-TuD および LNA のラットでの単回投与毒性試験・血中動態試験を委託試験施設にて実施し、今後の GLP 動物安全性試験の実施に最適な投与量を決定する。S-TuD の DDS としてペプチドキャリア A6K を検討し、マウスでの比較有効性試験によりその必要性や至適濃度を決定する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して実施した。

C. 研究結果

S-TuD 並びに LNA の合成に関しては、条件を満たす施設として株式会社ジーンデザインを見出し、精製条件を最適化することで最終生成物の純度 85% を達成し、1g 程度の大量合成を実現した。S-TuD の単回投与毒性試験・血中動態試験については、委託試験施設での計画書を策定し、1.0～100 mg/kg の範囲で投与量を決定した。LNA の試験に関しても計画書を策定し、年度内に実施予定

である。S-TuD と A6K の複合体を調製し、マウスでの比較有効性試験の結果、S-TuD の臨床想定投与用量では DDS 無しでも顕著な効果を認めた。研究過程ならびに想定される知見について米国特許出願を行い、さらに2011年に既出願の別特許と合わせて2012年国際特許出願を行った。

D. 考察

S-TuD は2本鎖からなり、各鎖の純度を97%以上に精製を行うことで、最終生成物の純度が85%以上となることを見出した。本精製法は将来的な GMP 製造時にも適用可能であり、今後純度をさらに高めていく計画である。S-TuD の有効性試験の結果から、臨床想定投与用量は 1.0mg/kg 付近と見出され、その100倍量までの単回投与毒性試験・血中動態試験を実施したことで、来年度実施予定の GLP 安全性試験を計画できる。S-TuD と A6K の複合体によるマウス試験では、S-TuD 低用量にて microRNA 阻害効果の増強を認めたが、高用量では A6K の複合による顕著な増強はなく、臨床想定投与用量付近では S-TuD 単体にて生体内で十分機能することが示唆された。DDS の必要性について来年度さらに詳細に検証する。

E. 結論

本研究の結果、GLP 動物試験に適合するスペックの S-TuD の大量合成を達成した。S-TuD の臨床想定投与用量を見出し、ラットでの単回投与毒性試験・血中動態試験を策定した。S-TuD の臨床想定投与用量では DDS 無しでも顕著な効果を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 松田範昭、界面活性剤様ペプチド A6K を担体とした siRNA によるがん治療、*Medical Science Digest*, **38**, 4-5, 2012

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得(出願)

1) 米国特許出願 61/696981, MicroRNA-

based methods and Assays for Osteosarcoma, 2012.9.5 (出願中)

2) 国際特許出願 PCT/IB2012/002626, MICRORNA-BASED METHODS AND ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA, 2012.9.7 (出願中)

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|---|------------------------------|--------------------------------|---|------------------------------|---------|------|-------|
| Tomohiro Fujiwara, Akira Kawai, Akihiko Yoshida, Toshifumi Ozaki, and Takahiro Ochiya | Cancer Stem Cells of Sarcoma | Thomas Dittmar, Kurt S. Zander | Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy | Taylor & Francis Group, LLC. | England | 2013 | 23-78 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---------------------------------|-----------|------------------|------|
| Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya | Competitive Interactions of Cancer Cells and Normal Cells via Secretory MicroRNAs | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY | 287(2) | 1397-1405 | 2012 |
| Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, and Takashi Kato | Micromanaging Iron Homeostasis | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY | 287(41) | 34110-34119 | 2012 |
| Keitaro Hagiwara, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yoshioka, Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita & Takahiro Ochiya | Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity | SCIENTIFIC REPORTS | 2 : 314 | 1-9 | 2012 |
| Shinta Kobayashi, Hisafumi Yamada-Okabe, Masami Suzuki, Osamu Natori, Atsuhiko Kato, ichi Matsubara, Yujau Jau Chen, aki Yamazaki, Shinichi Funahashi, Kenji Yoshida, Eri Hashimoto, Yoshinori Watanabe, Hironori Mutoh, Motooki Ashihara, Chie Kato, Takeshi Watanabe, Takashi Yoshikubo, Norikazu Tamaoki, Takahiro Ochiya, Masahiko Kuroda, Arnold Levine, Tatsumi Yamazaki | LGR5-Positive Colon Cancer Stem Cells Interconvert with Drug Resistant LGR5-Negative Cells and are Capable of Tumor Reconstitution | STEM CELLS | Vol130:12 | 2631-2644 (1-27) | 2012 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|--------------------------|-------------|-----------------|------|
| 藤原智洋、川井 章、小坂展慶、 尾崎敏文、落谷孝広 | 骨軟部肉腫におけるmicroRNAの最新の知見と臨床応用への挑戦 | 癌と化学療法 | 第40巻 3月号 | 305-313 | 2013 |
| 原口健、伊庭英夫 | 2'-OME RNAオリゴを基盤とした独特の二次構造を持つ新規microRNA阻害剤 | 遺伝子医学MOOK | 23 | 169-175 | 2012 |
| Ishizaka,A., Mizutani,T., Kobayashi,K., Tando,T., Sakurai,K., Fujiwara,T., and Iba,H. | Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- κ B RelA/p50 heterodimer. | J. Biol. Chem. | 287 | 11924 -11933 | 2012 |
| Kurashima,Y., Amiya T., Nochi T., Fujisawa K., Haraguchi T., Iba H., Tsutsui H., Sato S., Nakajima S., Iijima H., Kubo M., Kunisawa, J., and Kiyono H | Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors | Nature Communications | 3 | 1034 | 2012 |
| Tagawa, T., Haraguchi, T., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Inada, K., and Iba, H. | Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumor cells. | Biochem. J. | 447 | 449-455 | 2012 |
| Itani S, Kunisada T, Morimoto Y, Yoshida A, Sasaki T, Ito S, Ouchida M, Sugihara S, Shimizu K, Ozaki T | 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 -1509 | 2012 |
| 尾崎充彦、杉本結衣 | マイクロRNAによるがん転移予防への展開 - miR-143による骨肉腫肺転移抑制効果とその標的遺伝子の同定 - | 遺伝子医学MOOK | 23号 | 151-156 | 2012 |
| 松田範昭 | 界面活性剤様ペプチドA6Kを担体としたsiRNAによるがん治療 | Medical Science Digest | 38 | 4-5 | 2012 |