

201332013A

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

microRNA阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした
新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川井 章

平成 26 (2014) 年 4 月

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

**microRNA阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした
新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験に関する研究**

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川井 章

平成 26 (2014) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした新たな革新的
がん治療の実用化を目指す前臨床試験に関する研究 1
川井章

II. 分担研究報告

1. S-TuD 製剤の大量合成プロトコールの開発 13
川井章
2. S-TuD の in vitro 有効性の検証 19
落谷孝広
3. S-TuD-133a の生内移行及び有効性試験 23
藤原智洋
4. microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を目的とした前臨床試験に
おける解析-S-TuD 製剤の安全性試験- 27
根津悠
5. microRNA 阻害剤 (Tough Decoy) の製剤開発および動物実験のデータ評価 29
伊庭英夫
6. イヌ骨肉腫症例に対する抗 miR-133a 核酸製剤投与 33
伊藤博
7. 骨肉腫臨床検体の解析 39
尾崎敏文
8. 骨肉腫臨床検体の解析 43
尾崎充彦
9. microRNA 阻害剤の製剤管理および有効性試験、安全性管理 47
松田範昭
10. 動物個体を用いた核酸医薬生体内有効性および毒性試験における
統計的検討および統計解析 49
吉村健一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 55

IV. 研究成果の刊行物・別刷 59

I. 総括研究報告

microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした
新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験
研究代表者 川井 章 国立がん研究センター中央病院骨軟部腫瘍科

研究要旨

この10年来治療成績の改善がみられない骨肉腫に対し、我々は locked nucleic acid (LNA)による miR-133a 阻害を応用した現行治療法の改変により動物モデルにおいてその有効性を確認した。本研究班は、LNA よりも少量で効果を示す日本発新規 microRNA 阻害剤 Synthetic Tough Decoy (S-TuD)を応用し、新規治療法創出を目的とした前臨床試験を平成24年度より開始している。本研究報告書は平成25年度における進捗状況を総括するものである。

伊庭らは、阻害効率を最適化した S-TuD を合成することを目標に、まだ確定していない S-TuD RNA 構造の諸パラメーターを検討した。本年度は特に Stem2 の2重鎖 RNA 鎖長（これまでは10塩基対に固定化していた）を中心に研究を行った。数種の miRNA に対する S-TuD を合成し、同モルの投与時の阻害効率を比較すると Stem2 の鎖長が10~14塩基対で、ほぼ同等の高い阻害効率を示した。合成修飾 RNA の収率、純度から考えると合成鎖長は、短ければ短いほど有利であることから、今後は Stem2 の長さは10塩基対に固定することとした。従って昨年度の動物実験に供した miR-133a に対する最適化した MBS をもつ S-TuD (S-TuD-miR133a) に新たに構造変化を与える必要はないことが判明した。

その技術を用い、川井らはジーンデザイン社と協同で、S-TuD の大量合成法の最適化プロトコルの改良を行った。具体的には、前年度初期検討した 2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖 RNA の大量合成方法の最適化を検討した。その結果、これまでよりも高収率で合成品を得ることに成功した。次に合成した1本鎖 RNA による2本鎖形成試験を行った結果、望ましい2本鎖純度が得られた。これらの結果、生産収率が大幅に改良され S-TuD の治験薬製造が可能となる状況を達成した。また医薬品開発に必要な規格試験についても、治験薬製造が可能な状況を達成した。

本製剤を用いて、松田らは S-TuD-133a のラットに対する4週間反復投与による安全性試験を行った。その結果、S-TuD 単独での毒性は見られず、シスプラチンと S-TuD 併用投与による毒性の増強はみられなかった。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。また、根津らは、骨肉腫の悪性形質と密接に関与する miRNA-133a と並んで重要である miRNA-100 についてその安全性を検証した。具体的には、S-TuD100 単独投与によるラット単回全身投与試験の結果、期待される薬効量の1000倍量までの安全性を確認したところ、臨床時に想定される妥当な投与量における、S-TuD100 の十分な安全性を確認した。

落谷・藤原は、S-TuD-133a の骨肉腫に対する抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で解析した。その結果、negative control(S-TuD-NC)群と比較して S-TuD-133a 群で浸潤能の有意な低下 ($p = 0.003$)を認め、LNA と同様の効果が確認された。一方、マウスを用いた有効性試験においては、併用投与プロトコールとして、locked nucleic acid (LNA)での評価法と同じく(Fujiwara et al, STEM CELLS, 2014)、シスプラチン投与の24時間前にマウス尾静脈より S-TuD-133a を0.1mg/kgを投与した。その結果、S-TuD-NC (negative control) と S-TuD-133a との間に移植原発巣の腫瘍サイズの有意差はみられなかったが、肺転移形成を抑制することが明らかとなった。さらに、S-TuD-133a とシスプラチン併用群において担癌マウスの生存期間の延長が観察された。

伊藤らは、イヌの長幹骨である四肢に発生した骨肉腫に対して S-TuD を投与し、臨床プロトコールによる安全性の評価および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。安全性試験では4頭のビーグル犬を用いて S-TuD を高濃度に投与した結果、臨床症状、血液検査値および病理組織学的検査に明らかな異常は認められず極めて安全域の広い薬剤であることが判明した。これまでに左後肢と左前肢に発生した2例の骨肉腫で断脚前後に S-TuD を投与し、肺への転移を観察した。1症例目は、投与後4カ月間、2症例目は投与後10カ月間の長期にわたり肺への転移を認めていない。2例の転移による有無を経過観察中である。

尾崎・尾崎らは、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、岡山大学医学部および鳥取大学医学部における材料収集を開始した。岡山大学では45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。鳥取大学では、18例を収集し、RNA を抽出した。miR-133a および RUN-6B 発現量を測定した結果、全ての症例においてマイクロ RNA 発現を確認することが可能であった。定量 PCR にて発現解析を解析し、それぞれの予後との相関性を解析したところ、岡山大学の患者群において、miR-133a の高発現が患者の Overall survival および Metastasis-free survival の予後不良と有意に相関していることが明らかになった。これは国立がん研究センター中央病院における結果と一致する結果であり、骨肉腫における miR-133a 機能阻害の臨床的意義が示された。鳥取大学の患者群については、entry 数が少ないため予後における有意差は確認されなかったが、不良な転帰を辿った患者群における miR-133a の発現量は、予後良好群と比べ、約14倍高値を示した。

最後に吉村は、前臨床試験全般に求められる統計的手法について検討した。抗体医薬品や小分子化合物などの分子標的治療薬が多く開発されるに至り、これら治療薬に想定される機序を考慮すると、サブグループ解析の重要性が急速に高まっている。吉村は、日米欧の規制当局等によるガイドラインにおけるサブグループ解析に関する記述をまとめることによって、サブグループ解析を実施する場合の現状の論点をまとめることを目的とした。その結果、サブグループ解析の結果の解釈において重要なポイントである、consistency (均一性)、生物学的尤もらしさ、エビデンスの再現性それぞれの評価において、現状よく用いられる方法では必ずしも十分な評価が行えないことが示された。サブグループ解析について、方法論上の整備が現状不十分であり、現実に即した新たな解析方法の開発を要することが示された。

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製品は海外企業が既に特許を獲得している。

一方、これまでに伊庭らは特定の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)。

このS-TuDは、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。

また、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。例えば、術後FOLFOX療法を施行したステージIV大腸癌において、CD133高発現症例は無増悪生存期間(PFS)が有意に不良であることが示されている。また、別のコホートでは、大腸癌症例において、CD133、CD44、LGR5の発現がいずれも高い症例で最も予後不良であったと報告されている。骨肉腫において、がん幹細胞マーカーにおける予後解析の報告は未だなされていない。

このような背景をもとに、平成24年度は、S-TuDの開発合成、大量合成プロトコールの確立、安全性試験の着手、in vitro試験の着手、in vivo試験の着手、DDSの検討、骨肉腫臨床検体における解析が予定通り行われた。特に、S-TuD-antimiR-133aの合成法の確立は世界初であり、創薬研究の大きな一歩であった。また、miR-133a標的遺伝子には骨肉腫の予後に関与する新たな分子が同定されており、本研究を通じて骨肉腫の新たな分子標的遺伝子が同定されたことも大きな成果であった。

本年度は、S-TuDの更なる最適化、S-TuD製剤の開発プロトコールの改良、S-TuD製剤の複数の標的にわたる安全性試験、S-TuD-133aを用いた骨肉腫におけるin vitroないしin vivo解析、イヌ骨肉腫自然発生例を用いたS-TuD有効性および安全性試験、多施設におけるヒト骨肉腫臨床材料を用いたmiR-133aの発現解析を行った。

B. 研究方法

(1) S-TuD の最適化

miR-122, miR-142-3p に対する S-TuD の阻害効果の assay は、Haraguchi T, et al: Nucleic Acids Res 40:e58 2012 に準拠して行ない、培養細胞に対して 3' -UTR に対応する miRNA の完全相補配列を含むレポーターを transient expression させることにより行った。

具体的には miR-122 に対する S-TuD は、内在性の miR-122 を高レベルに発現している Huh-7 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。reporter plasmid は各種の投与量の S-TuD RNA と cotransfection して 48 時間後に、dual luciferase 法により定量を行った。

(2) S-TuD 製剤の合成プロトコールの改良

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小容量の固相合成システムを用い各種条件検討を行った。得られた最適条件を基にグラムスケールが製造可能な固相合成システムを用い、数百ミリグラム以上の合成を 3 つの異なる S-TuD(S-TuD133a -pf, S-TuD100-5p-pf, S-TuD-NC1nt-1) に対して生産実施した。

次に精製した 1 本鎖同士を用いて 2 本鎖化するための基本条件の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。これらの条件を基に S-TuD の大量生産を実施し、併せて規格試験設定の為の基礎的な分析手法として、2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の定量的な不純物解析法及び 2 本鎖純度検定試験法の最適を行った。

(3) S-TuD 製剤安全性試験

S-TuD-133a および S-TuD-100 という骨肉腫の悪性形質に関与する二つの標的別の製剤を用い、ラットに対する 4 週間反復投与による安全性試験および、シスプラチン併用時の反復投与安全性試験を実施した。試験は、GLP 対応の委託試験施設 (株式会社新日本科学 安全性研究所) にて行った。

(4) S-TuD を用いた in vitro 解析

ヒト骨肉腫細胞株 143B を用いて、S-TuD-133a (ジーンデザイン社、最終濃度 30nM) により miR-133a の発現を阻害し、RT-qPCR により阻害効率を確認した。また miR-133a 発現阻害による機能解析として Matrigel を用いた invasion assay、薬剤感受性試験、さらには proliferation assay を行った。薬剤としては、ヒトに使用される Doxorubicin(DOX)、Cisplatin(CDDP)、Ifosfamide(IFO)、Methotrexate(MTX)、およびイヌに対して使用される Calboplatin(CBDCA) を選択した。

(5) S-TuD を用いた in vivo 解析

生体内有効性試験のため、移植マウス自然肺転移骨肉腫治療モデルを用いた。具体的には、骨肉腫高転移株 143B 1.5×10^6 cells を 4-6 週雌ヌードマウスの脛骨近位へ投与し、腫瘍サイズおよび肺転移をそれぞれ caliper、IVIS システムにて評価した。

治療群は、①生食/生食、②S-TuD-NC/生食、③S-TuD-133a/生食、④S-TuD-NC/シスプラチン、⑤S-TuD-133a/シスプラチン、の 5 群に分けて評価を行った。S-TuD は 0.1mg/kg で尾静注投与、シスプラチンは 3.5mg/kg で腹腔内投与を行った。肺転移評価後、すべてのマウスの生存期間を観察し、Kaplan-Meier 法にて解析した。

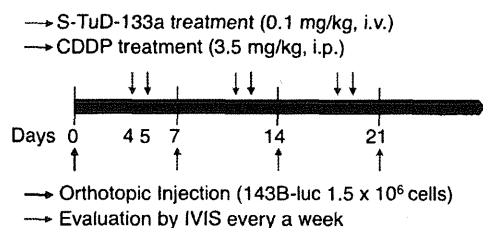


図 1. 併用投与群のプロトコール

(6) イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験および安全性試験

・S-TuD の臨床プロトコールにおける安全性の評価

ビーグル犬 4 頭 (雄 2 頭、雌 2 頭) を用いて行った。

1) 投与方法

- ▶ 薬剤投与は、一週間隔で 3 回血管内に投与した
- ▶ 静脈に設置した留置針を經由して薬剤を投与した。

- ▶ カルボプラチンは 50mg/m² を 5% グルコース液に溶解し、30 分かけて投与した。次いで S-TuD を 5ml の生理食塩液で溶解 (10mg/vial で保存) し、投与群に対し指定の用量を 30 分かけて投与した。
- ▶ 余剰の S-TuD は直ちに凍結保存した。

2) 投与群・投与量

- ▶ A: 0.1mg/kg + カルボプラチン 50mg/m²
- ▶ B: 1.0mg/kg + カルボプラチン 50mg/m²
- ▶ C: 5.0mg/kg + カルボプラチン 50mg/m²
- ▶ D: 陰性 S-TuD (陰性コントロール) + カルボプラチン 50mg/m²

3) 検査項目

(1) 一般血液・生化学検査

(2) 臨床観察

- ▶ 活動性
- ▶ 排尿状態
- ▶ 排便状態
- ▶ 体温
- ▶ 心拍数・心拍異常
- ▶ 脱水の有無
- ▶ 可視粘膜所見
- ▶ 体表リンパ節・腹部触診所見

1 日 2 回 (9 時・17 時) 下記の項目を確認する。

血液検査は投与前、投与後 1 日目、7 日目、10 日目、14 日目、17 日目、21 日目とした。

(3) 病理検査

病理は最終日の 21 日目に行った。

採材臓器

- ▶ 腹腔内
- ▶ 肝臓 / 脾臓 / 胃 / 十二指腸 / 膵臓 / 腎臓 (左右) / 膀胱 / 生殖器 (卵巣 / 子宮体 or 精巣 / 前立腺)
- ▶ 胸腔内
- ▶ 心筋 / 肺
- ▶ その他
- ▶ 大腿筋 / 体表リンパ節 (浅頸リンパ節) / 骨髄

・骨肉腫の治験症例

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、抗ガン剤投与、断脚を実施した患犬に S-TuD を投与して臨床への有効性を評価した。

断脚された患犬へ S-TuD を全身投与して、肺転移の出現、増大にかかる期間 (PFS) で有効評価を検討した。

(1) 有効性評価基準

①. 断脚例

- ①-1 肺転移なし

評価: 肺転移出現までの期間

①-2 肺転移有り

② 評価: 肺転移の増大にかかる期間を評価した。

③ 投与方法

カルボプラチン + S-TuD (全身)

④ 投与量

S-TuD: 0.1mg/kg

カルボプラチン 200mg/m²

⑤ 検査法

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。

⑤-1 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)

(7) 多施設における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a 発現解析

平成 24 年度より、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、2000 年～2012 年に手術を施行された標本 (45 例) を収集可能であった。本年度は、それぞれの検体より RNA 抽出を行い、また、Real-time PCR に適したサンプルであるかを確認した。さらに、miR-133a および RUN6B 発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

鳥取大学においては、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 18 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 溶液を用いて Real-time PCR をおこない miR-133 および RUN6B 発現量を測定した。測定した 18 例中 11 例において全ての RNA 発現量を検出できたことから、これらの症例に関する臨床データをファイルから抽出した。

各 miRNA 発現との関連性の比較に用いるため、臨床データとしては、年齢・性別・発生部位・subtype・初診時転移の有無と部位・術前/術後化学療法の内容 (種類のみ)・化学療法奏功性・経過観察期間・腫瘍学的転帰・

転移/再発/死亡までの期間を抽出した。

(8)統計解析法の検討

日米欧の規制当局等によるガイドライン (ICH ガイドラインを含む)におけるサブグループ解析についての記載を収集し、実際にサブグループ解析を実施する場合の現状の論点を抽出した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織標本を用いた解析に関しては、当センター倫理審査委員会の承認を受けている (No.16-50 ゲノム・プロテオーム解析に基づく骨軟部腫瘍の分子病態把握とその臨床応用を目指す多施設共同研究)。

動物を用いた解析において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、個人情報に徹底して保護した。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

(1) S-TuD の最適化

miR-122, 及び miR-142-3p に対する S-TuD 分子を昨年度決定した MBS を使用して、Stem2 の鎖長の異なるものをそれぞれ合成した。それら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、以下の結果を得た。

Stem2 の鎖長が 8, 10, 12, 14, 16, 18 塩基対の 6 種の S-TuD-miR-122 を同モルで Huh7 細胞にそれぞれ導入して解析したところ、Stem2 の鎖長が 14, 12 でほぼ最大の阻害効果を観察し、10 では、これに次ぐ高い阻害効果がみられた。一方鎖長 8 では、その活性は大きく損なわれた。

同様の assay を、S-TuD-142-3p を miR-142 を外来的に強制発現させた HEK293 細胞細胞に導入していったところ、10-14 でほぼ最大の阻害活性を得た。同質量の投

与と比較すると鎖長が短い方が有利となることもあり、Stem の長さを従来型の 10 から伸ばしても、阻害活性を高めることはほとんどないと結論した。

その結果、昨年度大量合成した本研究班で *in vivo* で使用した S-TuD-miR133a は Stem2 鎖長の面からも、至適域にあることが判明した。

(2)S-TuD 製剤の合成プロトコールの改良

2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の課題として、合成、精製、2 本鎖化の最適化が必要だったが、今回検討を行った結果、現在までに 1 本鎖部分の合成については約 3 倍の高収率で目的産物得られ、精製方法の単純化と 2 本鎖化の最適化を達成した。具体的には、合成収率が改善された結果、合成時に生じる不純物は大幅に減少し、前年度の製造状況では精製が 3 回から 5 回は必要だったところ、各 1 本鎖共、陰イオンクロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィー各 1 回ずつの精製のみで望ましい純度が確保できる状況となった。

(3)S-TuD 製剤安全性試験

ラットに対する 4 週間反復投与毒性試験の結果、S-TuD 単独での毒性は見られなかった。シスプラチン投与群では 4 例が死亡し、各検査においてシスプラチンの毒性と考えられる変化が散見されたが、S-TuD 併用投与による毒性の増強はみられなかった。

また、S-TuD100 の単回全身投与試験の結果、S-TuD 単独投与ではいずれの検査においても変化はみられなかった。シスプラチン投与各群では、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、病理組織学的検査において、シスプラチンの投与に起因すると考えられる種々の変化がみられた。シスプラチン単独投与群と比較して、S-TuD 併用投与群では体重の低値傾向及び尿素窒素、クレアチニンの高値傾向がみられた。以上の結果より、S-TuD の単独投与による毒性はみられないが、シスプラチンとの併用投与によってシスプラチンの毒性を僅かに増強する可能性が示唆された。

(4)S-TuD を用いた *in vitro* 解析

ヒト骨肉腫細胞株 143B を用いて

S-TuD-133aによりmiR-133aの発現阻害をすることで、RT-qPCRでおよそ90%発現が抑制されていることを確認した(図1)。matrigelを用いたinvasion assayを行ったところ、S-TuD-133a群ではNegative control群と比較して浸潤能をおよそ50%抑制した($p=0.003$, $n=4$)。一方で、proliferationおよびcytotoxicityアッセイではいずれも2群間で有意な差は認められなかった。

(5)S-TuDを用いたin vivo解析

腫瘍形成については、①・②・③群と④・⑤群で有意差を認めたものの、②・③群間および④・⑤群間での有意差は認められなかった。すなわち、シスプラチンによる腫瘍抑制効果は明らかであったが、S-TuD-133aとコントロール群の間での有意差は認められなかった。しかし、IVISによる肺転移の評価においては、⑤群で最も肺転移形成が抑制されていることが判明した。また、②・③群間でも肺転移形成に差を認め、S-TuD-133aによる転移抑制効果が示唆された。IVISによる肺転移の評価の後、すべてのマウスの生存期間をfollowした結果、⑤群において最も長い生存期間の延長が観察された。

(6)イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験および安全性試験

1.安全性試験

1) 臨床観察

検体A・Bは投与後13日目で軟便・下痢を発症したが対照療法で治癒。検体Dは、投与後9日目で水溶性の下痢を呈したが対照療法で速やかに改善された(S-TuDとの因果関係は不明)。投与群は全体的に軟便を併発しているが、コントロール犬も同様な症状を呈しているためS-TuDとの関連性は不明である。

2) 血液検査

コントロールを除く実験犬A,B,CはS-TuD投与後2週目で一過性の白血球の上昇が認められたが、生化学検査値の異常は認められなかった。炎症性反応を示すCRP値は、DおよびBで一過性に上昇したが、他の試験犬では異常が認められなかった。

3) 剖検所見

- ▶ 解剖の結果、肉眼的な異常は認められなかった。

▶ 採材組織

すべての組織において異常は認められなかった。

▶ 骨格筋

異常は認められなかった。

2 骨肉腫発症例におけるS-TuDの有効性評価

1)症例①

名前：バンチョウ

カルテ番号：1

動物種：犬 ジャーマン・シェパード

年齢：8歳

性別：去勢雄

体重：34kg

採取部位：左前肢(肩甲骨含む)なお、腫瘍は橈骨遠位に存在

採取日：2013年11月6日(水)

腫瘍の大きさ：4.7×3×3 cm

2) 臨床経過：

ぬのかわ犬猫病院の供血犬として、2カ月に1度程度の頻度で採血を実施していた。

2013年10月24日左前肢の跛行を認めたため、X線撮影を実施した所、左前肢の橈骨遠位に骨融解および骨膜反応を伴う腫瘍を認めた(関節は跨いでいない)。針吸引細胞診では背景に骨基質を伴う異型性の強い細胞が多数採取され、骨肉腫と診断した。なお、胸部X線では明らかな肺腫瘍は認められなかった。

2013年11月1日および2013年11月4日にS-TuDを投与。2013年11月6日に左前肢断脚術を実施した。左橈骨：皮質融解、皮質の不透過性、充実性の骨膜反応(Codman's Triangle)肺転移は認められない。

3)治療

S-TuD:0.1mg/kg/1week/2time(1日目、4日目)を全身投与・検査S-TuDは断脚前に4回/3week 1回/1week、カルボプラチンは、1回/3weekで4回投与する(同時投与)。なお、死亡時には、治療開始からの生存期間(日)を記録し、可能であれば骨肉腫の検体を凍結する。手術1週間前に3日間隔でS-TuDを2回投与し、投与前(直前)と次の日に採血を行う(出来る限りで可)。次いで抗ガン剤およびS-TuD投与後前に血液を採材する。血液・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 200~300mg/m² (BW34kg)。X-ray 断脚後 3 カ月間では肺への転移は認められない。

4) 症例②

犬種：チワワ 性別 雌 体重 2.2kg
稟告：栃木県の開業医で診察、2013.4 左後肢痛がる(負重できない) FNA の結果、骨肉腫の疑い(当大学へ紹介)

5) 治療経過

2013.7.12 大腿部(骨頭~) 摘出

▶ 2013.7.16 S-TuD/0.1mg/kg/iv

カルボプラチン 50mg/m²/week

▶ 2013.7.23 同様(2回目)

▶ 2013.8.1 同様(3回目)

▶ カルボプラチン 50mg/m²/week~
3カ月(12回)

▶ 定期健診(継続中)局所再発(-)
肺転移(-)

7カ月の長期にわたり肺転移は認められない。

(7) 多施設における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a 発現解析

① 岡山大学

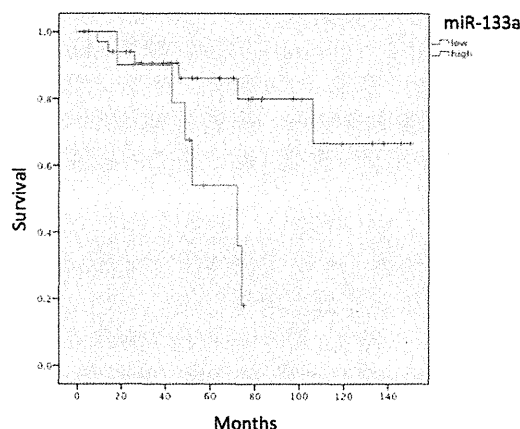
2000-2012年に岡山大学整形外科で治療を行った45症例のヒト骨肉腫切除標本のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックを収集した。患者群の内訳は、男性20例、女性25例、平均年齢33歳。発生部位は大腿骨22例、脛骨6例、上腕骨3例、その他14例であった。

これらの検体の薄切および脱パラフィンを行った後、常法にてRNAを抽出した。Real-time PCRにてRUN6B発現量を測定した結果、いずれのマイクロRNA発現も確認可能であることを確認した。

miR-133aの発現と臨床情報との関連性を統計学的に解析した結果、miR-133aの発現高値と患者予後不良が有意に相関することが判明した。miR-133aのcut off pointはROC曲線を作成し、Youden-Indexにより統計学的に算出した。

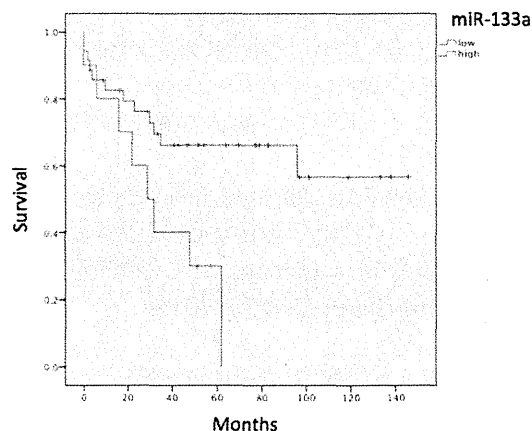
本手法で設定したcut off pointを基準にOverall survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、miR-133a高値を示す患者群の予後はmiR-133a低値を示す患者群の予後よりも有意に悪く、5年生存率はそれぞれ86%、54%であった(log-rank test: p = 0.009) (図

2)。



(図2) miR-133aの発現に基づく Overall survival (log-rank test, p = 0.009)

同様に、Metastasis-free survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、miR-133a高値を示す患者群の予後はmiR-133a低値を示す患者群の予後よりも有意に悪く、5年生存率無転移生存期間はそれぞれ66%、30%であった(log-rank test: p = 0.016)。



(図3) miR-133aの発現に基づく Metastasis-free survival (log-rank test, p = 0.016)

② 鳥取大学

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18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溶液を用いてReal-time PCRをおこないmiR-133およびRNU6B発現量を測定した。測定した18例中11例において全てのRNA発現量を検出できたことから、これらの症例に関する臨床データをファイルから

抽出した。各 miRNA 発現との関連性の比較に用いるため、臨床データとしては、年齢・性別・発生部位・subtype・初診時転移の有無と部位・術前/術後化学療法の内容(種類のみ)・化学療法奏功性・経過観察期間・腫瘍学的転帰・転移/再発/死亡までの期間を抽出した。

これらの臨床情報は、鳥取大学医学部附属病院で治療した 11 例に対して抽出可能であった。この患者群は男性 3 例、女性 8 例、平均年齢 17 歳で、発生部位は大腿骨 6 例、脛骨 2 例、上腕骨 1 例、その他 2 例であった。治療抵抗性を示し死亡に至った症例は 5 例であり、予後良好であった 6 症例と比較し、miR-133a の発現は約 14 倍高値を示した。稀少サンプル数のため統計学的な有意差は得られなかった。miR-133a の発現と、年齢、性別、発生部位、組織型には明らかな統計学的有意差はみられなかった。初診時転移を認める症例はなく、miR-133a の発現との相関性は解析不能であった。

(8)統計解析法の検討

1) ガイドライン等における記載

a. ICH E3 ガイドライン「治験の総括報告書の構成と内容に関するガイドライン」

b. ICH E9 ガイドライン「臨床試験のための統計的原則」

c. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2014) Guideline on the investigation of subgroups in 4 confirmatory clinical trials (draft; Jan 23, 2014)

2) サブグループ解析の結果の解釈において重要なポイントの抽出

- ・ consistency (均一性)

サブグループ間で治療効果が均一であるのか不均一であるのかを検討する

- ・ 生物学的尤もらしさ

サブグループで治療効果が異なることについての、当該データに限らず、生物学的な観点から説明つけうるものであるかを検討する。特に試験前に検討することが好ましい。

- ・ エビデンスの再現性

サブグループで治療効果が異なる／等しいことについて、複数の類似試験でも示されているかどうかを示す。

3) 現状の問題点の抽出

2)に示したポイントに応じて現状の問題点として以下を抽出した。

- ・ consistency (均一性)に関しては、現状、統計的手法の整備が不十分である。 α エラーの制御、つまり多重性の調整ばかりに着目されることがあるものの、偽陰性も増加することになるため、現状のサブグループ解析のニーズにあった適切な統計手法の開発が望まれる。
- ・ 生物学的尤もらしさに関しては、これをどのように適切にかたちで提示するか、各開発段階において試験計画時にシステマチックに検討する方法についてより現実に即した検討および経験の蓄積が必要である。
- ・ エビデンスの再現性に関しては、関連する臨床試験のデータをどのように定義して、収集していくかについて課題がある。

D. 考察

microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験においては、S-TuD の適正配列考案、創薬化、安全性、有効性、miR-133a の有効性の分子機構、臨床側面との関連性、など、様々な課題が存在する。各分担研究者らによるこれらの研究結果から、平成 25 年度にあらかじめ想定していた計画課題は順調に解決され、最終年度の課題に取りかかるための基盤作りが整った。

伊庭による研究で、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。S-TuD の合成を委嘱したジーンデザイン社の技術者によると、合成産物の純度と収率の面からは、合成鎖長が短ければ短いほど有利であるとのことである。このことも、今後の S-TuD の標準型として Stem-2 の鎖長を 10 塩基に固定するメリットがある。本研究で、S-TuD の設計法についてはほぼ確定したと考えられ、すべての miRNA に対する良好な S-TuD が、この標準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。この最適化により、2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の合成に関しては収率が大幅に改善されたため、合成時に副生成物として生成される不純物が大幅に低減され、その結果、精製回数を少なくすることができ、2 本鎖化を行うことが容易な状況が達成できた。規格試験については、1 本鎖の定量的な不純物解析及び 2 本鎖純度の解析が可能となったため、規格試験化が可能な状況が達成できたと考えられる。

S-TuD の安全性試験においては、S-TuD-133a のラット 4 週間反復投与毒性試験の結果、S-TuD 単独投与においても、シスプラチンとの併用においても毒性は見られなかった。また、S-TuD100 単独での毒性は見られず、シスプラチン投与群では、各検査においてシスプラチンの毒性と考えられる変化が散見され、S-TuD 併用投与によりわずかに毒性の増強がみられた。ただし、この毒性は、薬効用量の 1000 倍量であるため、臨床時に想定される妥当な投与量においては、S-TuD100 の十分な安全性が予想された。以上の結果より、本剤の安全性を異なる標的間で確認することができたことは本年度の大きな成果であったと考えられる。

S-TuD を用いたヒト骨肉腫細胞株を用いた機能解析の結果、LNA 同様、有意にその浸潤能を低下させた。また、proliferation assay の結果も同様であり、LNA においても有意差をみなかったという点で相同性が確認された。一方、薬剤抵抗性は S-TuD における有意差は得られず、以前に得られた LNA による薬剤感受性亢進様の結果は、LNA の細胞毒性による影響が原因と考えられた。

また、in vivo 解析の結果、S-TuD-133a の骨肉腫肺転移抑制効果が示唆された。原発巣の腫瘍形成能には明らかな影響を与えなかったことから、in vitro の結果も考慮すると、浸潤能抑制が反映されたものと考えられた。S-TuD-133a の理想投与量については未だ明らかになっておらず、来年度には投与量の検討が必要となる。また、血中半減期などの薬理学的解析の進達も望まれる。S-TuD の有効性については、さらなる大規模な生体内試験が必要であり、より多くの担癌マウスを用いた大規模試験を来年度以降に予定している。

イヌ骨肉腫は極めて転移性の高い腫瘍で抗がん剤を用いない場合は、約 90% で断脚または原発腫瘍のコントロールから僅か 1 年以内に肺転移を起こし死に至る。今回の 1 症例目は前肢の異常に気づき病理検査の結果骨肉腫と診断され当大学動物医療センターへ紹介された。断脚前に S-TuD を投与され、断脚後にカルボプラチンおよび S-TuD を同時に併用し、カルボプラチン投与の Data と比較した。断脚およびカルボプラチン 1 回/3weeks により治療した生存期間中央値は、6.9 カ月～10.7 カ月で、術後 1 年生存 35% であった。本症例は治療後 4 カ月齢であり現在経過観察中である。2 症例目は、昨年 4 月に後肢の腫脹が認められ、骨肉腫の疑いで当センターへ紹介された。病理の結果は明瞭な分化傾向が認められないため骨肉腫としての診断が難しい症例であり間葉系の腫瘍として診断された。本症例は、飼い主の希望よりなるべく副作用を避ける治療を希望することから lowdose 法を選択して低用量 70mg/m²/iv/weeks で合計 12 回のカルボプラチンを投与した。現在、7 か月間の長期にわたり肺転移が認められていない。

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。岡山大学での解析の結果、miR-133a の高発現が患者の overall survival および metastasis-free survival の予後不良と有意に相関していることが明らかになった。これは主任研究者らによる結果と一致するものである。miR-133a の骨肉腫における臨床的相関性が裏付けられ、miR-133a の発現を制御する治療的意義が複数の施設間で示される結果となった。鳥取大学の検体による解析では、miR-133a 発現量は予後良好群と比較し、予後不良群において高値を示すことが明らかとなった。しかし、統計学的有意差は得られず、稀少サンプル数の影響と考えられた。

抗体医薬品や小分子化合物などの分子標的治療薬が多く開発され、個別化医療の開発が求められる現在において、サブグループ解析のもつ役割は次第に大きくなっている。これまでサブグループ解析については、専ら主

に統計的問題としての多重性に注目が置かれてきており、軽視されてきた側面も大きい。今後、規制科学に限らず、実際の医療に検証試験のエビデンスをいかに適切に取り入れていくか、あるいは分子標的治療薬をどのように適切な戦略のもとに開発していくかを考える上で、サブグループ解析についての実態に即した適切な方法論の開発が求められる。ICH ガイドラインに比して、近年公表された欧州規制当局によるガイドラインは、これまでの調整のみに拘ってきた方法論の開発について、より広い視野で、偽陰性とならないように適切にシグナルを拾い上げていくことの重要性を示しており、今後のこの領域の方法論的發展について、適切な方向を示したものとして、臨床研究者にとっても統計研究者にとっても方向性を大きく変えうる記述を含むガイドラインの構成となっている。

以上より、本年度の課題は計画通り遂行されたと考える。S-TuD の更なる大規模なマウスおよびイヌ有効性試験、臨床検体による複数施設での解析の継続を来年度の課題の軸とする。ひきつづき各研究分担者におけるエフォートを継続していく。

E. 結論

microRNA阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験という課題のもと、S-TuDの更なる最適化、S-TuD製剤の開発プロトコルの改良、S-TuD製剤の複数の標的にわたる安全性試験、S-TuD-133aを用いた骨肉腫におけるin vitroないしin vivo解析、イヌ骨肉腫自然発生例を用いたS-TuD有効性および安全性試験、多施設におけるヒト骨肉腫臨床材料を用いたmiR-133aの発現解析、統計手法の検討が予定通り行われた。特に、S-TuDの生体内安全性の確認は世界初であり、創薬研究の大きな一歩であったと考える。来年度もひきつづき、各課題に対するエフォートを継続していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Proteomic approach toward personalized sarcoma treatment: lessons from prognostic biomarker discovery in gastrointestinal stromal tumor. Tadashi

- Kondo, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Daisuke Kubota, Takashi Tajima, Mukaihara K, Hitoshi Ichikawa, Akira Kawai. Proteomics Clin Appl.: 7(1-2):70-8, 2013
2. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ β -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, Renner M, Kirfel J, Steiner S, Huss S, Koch A, Penzel R, Larsson O, Akira Kawai, Shinya Tanaka, Hiroshi Sonobe, Waha A, Schirmacher P, Mechtersheimer G, Wardelmann E, Hartmann W. Oncogene. Oct 28, 2013
3. SRC signaling is crucial in the growth of synovial sarcoma cells. Michels S, Trautmann M, Sievers E, Kindler D, Huss S, Renner M, Friedrichs N, Kirfel J, Steiner S, Endl E, Wurst P, Heukamp L, Penzel R, Larsson O, Akira Kawai, Shinya Tanaka, Hiroshi Sonobe, Schirmacher P, Wardelmann E, Büttner R, Hartmann W. Cancer Res. 15:73 (8):2518-28, 2013
4. Macrophage Migration Inhibitory Factor and Stearoyl-CoA Desaturase 1: Potential Prognostic Markers for Soft Tissue Sarcomas Based on Bioinformatics Analyses. Hiro Takahashi, Robert Nakayama, Shuhei Hayashi, Takeshi Nemoto, Yasuyuki Murase, Koji Nomura, Teruyoshi Takahashi, Kenji Kubo, Shigetaka Marui, Koji Yasuhara, Tetsuro Nakamura, Takuya Sueo, Anna Takahashi, Kaname Tsutsumiuchi, Tsutomu Ohta, Akira Kawai, Shintaro Sugita, Shinjiro Yamamoto, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda, Teruhiko Yoshida, Tadashi Hasegawa. PLoS One. 22:8 (10) 2013
5. Prognostic Factors in Elderly Osteosarcoma Patients: A Multi-institutional Study. Shintaro Iwata, Takeshi Ishii, Akira Kawai, Toru Hiruma, YoTakeshi Nemoto, Hiroto Kamoda, Naofumi Asano, Masanobu Takeyama. Ann Surg Oncol. Aug 23, 2013
6. Favorable outcome after complete

- resection in elderly soft tissue sarcoma patients: Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. Yasushi Yoneda, Toshiyuki Kunisada, Norifumi Naka, Yoshihiro Nishida, Akira Kawai, Takeshi Morii, Ken Takeda, Hasei J, Yasuaki Yamakawa, Toshifumi Ozaki. Eur J Surg Oncol. Sep 13, 2013
7. An analysis of factors related to recurrence of myxofibrosarcoma. Kazutaka Kikuta, Daisuke Kubota, Akihiko Yoshida, Yoshihisa Suzuki, Hideo Morioka, Yoshiaki Toyama, Eisuke Kobayashi, Fumihiko Nakatani, Hirokazu Chuuman, Akira Kawai. Jpn J Clin Oncol. 43(11):1093-104, 2013
 8. Clinical outcomes of Kyocera Modular Limb Salvage system after resection of bone sarcoma of the distal part of the femur: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. Tetsuro Nakamura, Akihiko Matsumine, Atsumasa Uchida, Akira Kawai, Yoshihiro Nishida, Toshiyuki Kunisada, Nobuhito Araki, Hideshi Sugiura, Masato Tomita, Masahiro Yokouchi, Takafumi Ueda, Akihiro Sudo. Int J Orthop. Oct 26, 2013
 9. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. Teruhito Yoshitaka, Akira Kawai, Shigeru Miyaki, Kunihiko Numoto, Kazutaka Kikuta, Toshifumi Ozaki, Martin Lotz, Hiroshi Asahara. J Orthop Res. 31(12):1992-8, 2013
 10. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. Daisuke Kubota, Kenta Mukaihara, Akihiko Yoshida, Hitoshi Tsuda, Akira Kawai, Tadashi Kondo. J Proteomics. 8: 91:393-404, 2013
 11. The prognostic value of pftin: a validation study in gastrointestinal stromal tumors using a commercially available antibody. Daisuke Kubota, Kenta Mukaihara, Akihiko Yoshida, Yoshiyuki Suehara, Tsuyoshi Saito, Taketo Okubo, Masahiro Gotoh, Hajime Orita, Hitoshi Tsuda, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Tadashi Kondo. Jpn J Clin Oncol. 43(6):669-75, 2013
 12. Functional analysis of cases of tumor endoprostheses with deep infection around the knee: a multi institutional study by the Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG) Takeshi Morii, Hideo Morioka, Takafumi Ueda, Nobuhito Araki, Nobuyuki Hashimoto, Akira Kawai, Katsuhito Takeuchi, Ukei Anazawa, Kazuo Mochizuki, Shoichi Ichimura. J Orthop Sci. 18(4):605-12., 2013
 13. Deep infection in tumor endoprosthesis around the knee: a multi-institutional study by the Japanese musculoskeletal oncology group. Takeshi Morii, Hideo Morioka, Takafumi Ueda, Nobuhito Araki, Nobuyuki Hashimoto, Akira Kawai, Kazuo Mochizuki, Shoichi Ichimura. BMC Musculoskelet Disord. 31: 14:51, 2013
 14. Minimally invasive solid long segmental fixation combined with direct decompression in patients with spinal metastatic disease. Feiyue Lina, Umio Yamaguchi, Tomoya Matsunobu, Eisuke Kobayashi, Fumihiko Nakatani, Akira Kawai, Hirokazu Chuman. Int J Surg. 11(2):173-7, 2013
 15. Massive ossification around the prosthesis after limb salvage treatment for osteosarcoma. Feiyue Lina, Umio Yamaguchi, Yasuo Beppu, Akira Kawai, Hirokazu Chuman. J Orthop Sci. 18(4):667-70, 2013
 16. 今日の処方(南江堂):原発性悪性骨腫瘍, 癌の骨転移
川井 章(執筆) 880-888, 2013
 17. 臨床整形外科(医学書院):悪性骨軟部腫瘍に対する新規治療薬
川井 章(執筆) 48:869-875, 2013
- ## 2. 学会発表
1. 「骨・軟部腫瘍 外科的治療の進歩—あなたの隣の整形外科医はこんなことをやっている！」第 18 回西日本小児がんセミナー(講演) 2013.3.30. 大阪
 2. 「悪性骨・軟部腫瘍に対する新規治療薬の現状と展望」第 86 回日本整形外科

- 学会(シンポジウム) 2013.5.23. 広島
3. 「腫瘍人工関節」 BIOMET KICKOFF Meeting(講演) 2013.6.15. 東京
 4. “Targeted Agents in the Treatment of Soft Tissue Sarcoma” at Taiwan Joint Cancer Conference (Invited Lecture) 2013.7.13, Taipei, Taiwan
 5. 「悪性骨軟部腫瘍に対する新規治療(薬)開発の現状」第29回山陽骨・軟部腫瘍研究会(講演) 2013.8.10. 広島
 6. 「悪性骨軟部腫瘍:新たな治療法の開発」平成25年度岡山整形外科セミナー(講演) 2013.8.17. 岡山
 7. 「悪性骨・軟部腫瘍に対する新規治療法の開発と将来展望」第22回多摩骨軟部腫瘍研究会(講演) 2013.8.24. 三鷹
 8. 「再発あるいは治療抵抗性のc-kitあるいはPDGFR陽性肉腫に対するイマチニブの第II相試験」第11回日本臨床腫瘍学術集会(シンポジウム) 2013.8.31. 仙台
 9. 「臨床医が遺伝子とタンパク質からみた骨軟部腫瘍」第20回東北地区骨・軟部腫瘍研究会(講演) 2013.10.12. 仙台
 10. 「骨・軟部腫瘍の診断と治療」第22回東京品川運動器カンファレンス(講演) 2013.10.24. 東京
 11. 「小児悪性骨・軟部腫瘍に対する外科的治療とその課題」第55回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム) 2013.11.30. 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

- 1) 国際特許出願 PCT/IB2012/002626、
MICRORNA-BASED METHODS AND
ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA,
2012.9.7 (出願中:日本、米国、欧州に移
行予定)

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

S-TuD 製剤の大量合成プロトコルの開発

研究分担者 川井 章 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協同で、S-TuD の大量合成法の最適化プロトコルを作成した。

S-TuD 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。前年度初期検討した 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の最適化を検討した。この結果、これまでよりも高収率で合成品を得ることに成功した。次に合成した 1 本鎖 RNA による 2 本鎖形成試験を行った結果、望ましい 2 本鎖純度が得られた。これらの結果、生産収率が大幅に改良され S-TuD の治験薬製造が可能となる状況を達成した。また医薬品開発に必要な規格試験についても、治験薬製造が可能な状況を達成した。

A. 研究背景、目的
(背景)

日本発の新規 miRNA 阻害剤である 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。2'-O-メチル化 RNA の構造を図 1 に、S-TuD の構造を図 2 に示す。

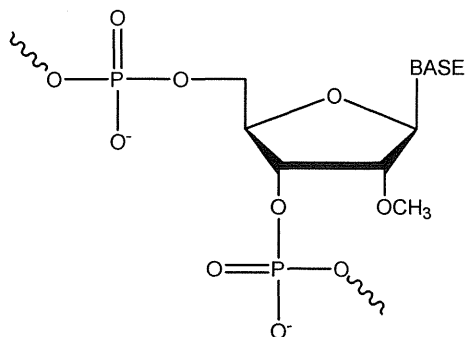


図1. 2'-O-メチル化RNAの構造

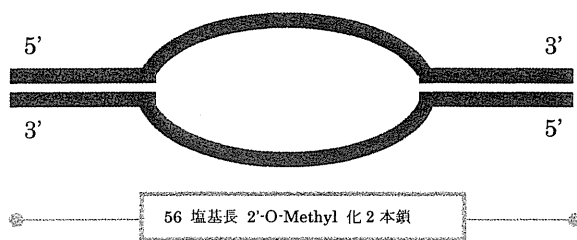


図2. S-TuDの構造

この構造体の大量合成を実用化するためには、従来の合成法で困難とされる長鎖 1 本鎖

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。そこでジーンデザイン社と協同し、治験薬製造まで対応可能な大量合成プロトコルの最適化及び規格試験の検討を行った。

また異なる標的 miRNA に対する S-TuD の合成同等性を検討する為、これまで対象としていた miR-133a とは別の miR-100 に対する S-TuD のグラムスケールの製造を行った。

B. 研究方法

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小容量の固相合成システムを用い各種条件検討を行った。得られた最適条件を基にグラムスケールが製造可能な固相合成システムを用い、数百ミリグラム以上の合成を 3 つの異なる S-TuD (S-TuD133a -pf、S-TuD100-5p-pf、S-TuD-NC1nt-1) に対して生産実施した。

次に精製した 1 本鎖同士を用いて 2 本鎖化するための基本条件の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。これらの条件を基に S-TuD の大量生産を実施し、併せて規格試験設定の為の基礎的な分析手法として、2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の定量的な不純物解析法及び 2 本鎖純度検定試験法の最適を行った。

(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の大量合成方法の課題として、合成、精製、2本鎖化の最適化が必要だったが、今回検討を行った結果、現在までに1本鎖部分の合成については約3倍の高収率で目的産物得られ、精製方法の単純化と2本鎖化の最適化を達成した。具体的には、合成収率が改善された結果、合成時に生じる不純物は大幅に減少し、前年度の製造状況では精製が3回から5回は必要だったところ、各1本鎖共、陰イオンクロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィー各1回ずつの精製のみで望ましい純度が確保できる状況となった。合成後の状況を示したHPLCの結果を図3及び図4に示す。図3は前年度に製造したS-TuD133a-pfのアンチセンス粗合成品のHPLC分析結果で、図4は本年度製造した同配列の粗合成品のHPLC分析の結果を示している。最も高いピークが目的産物であり、それ以外の副生成物のピークの顕著な減少が確認できる。

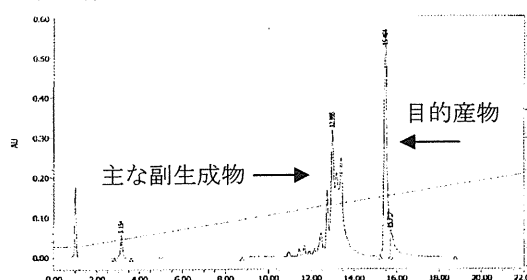


図3.前年度(平成24年度)の合成状況(合成後のHPLC分析結果):目的産物29.0%

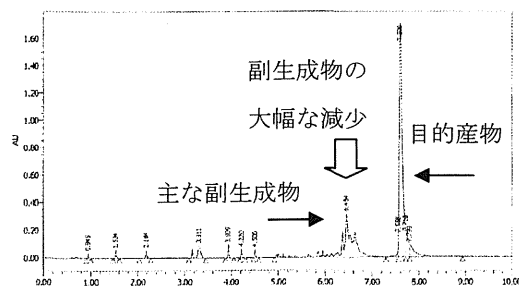


図4.本年度(平成25年度)の合成状況(合成後のHPLC分析結果):目的産物51.9%

陰イオン及び逆相クロマトグラフィーによる精製を各1回ずつ行い、脱塩後、2本鎖化を

行った後、2本鎖の純度分析を行なった結果、治験に向けた非臨床開発段階としては十分な85%以上の純度が得られた。

精製を2回行った後の2本鎖純度分析の結果を、前年度の結果について図5に、本年度の結果について図6に示す。

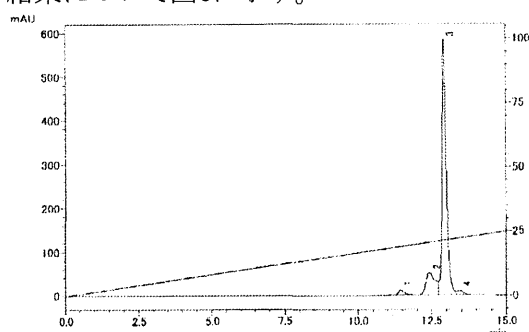


図5.前年度(平成24年度)のHPLC分析による2本鎖純度分析結果:純度80.3%

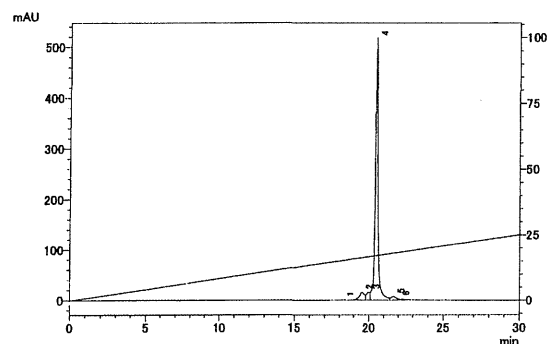


図6.本年度(平成25年度)のHPLC分析による2本鎖純度分析結果:純度92.6%

これらの製造工程が改善した状況の比較を前年度分として図7に、本年分の状況を図8に示す。主に精製の工程が短縮され、治験薬の実製造に耐える各工程の最適化と単純化が達成された。

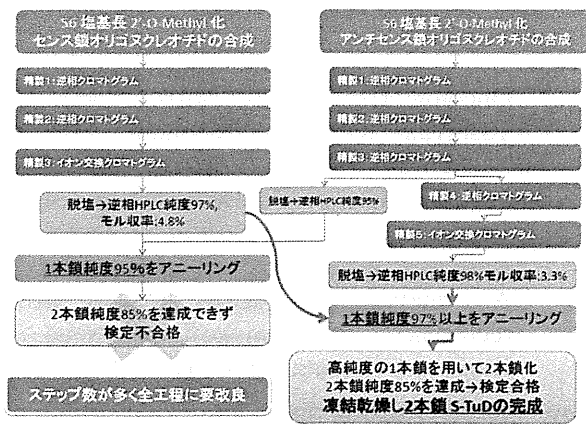


図7.前年度(平成24年度)製造状況

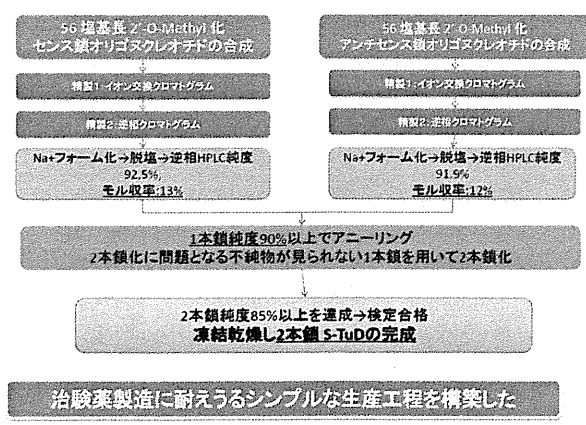


図8.本年度(平成25年度)製造状況

規格試験に関しては、1本鎖部分の不純物の定量的解析と配列解析、2本鎖純度検定試験方法の規格試験化が課題としてあったが、現在までに、1本鎖部分の不純物の定量的解析と2本鎖純度検定試験法の規格化が可能な状況となっている。全体として生産収率が大幅に改良されS-TuDの治験薬製造が可能となる状況を達成した。

上記の合成方法と規格化試験はこれまでにグラムスケールの合成実績のあるmiRNA-133を対象としたS-TuD133a -pfだけでなく、新たにmiRNA-100を標的としたS-TuD100-5p-pfでもグラムスケールの合成を、またネガティブコントロール用に設計されたS-TuD-NC21nt-1でも数百ミリグラムスケールの合成を行い、各S-TuDについて分析も実施した。実際に本年度製造を行ったS-TuDを表1に示す。

表1.製造を行った各S-TuDとその合成量

	S-TuD 名称	合成量
1	S-TuD133a -pf	1g
2	S-TuD100-5p-pf	1g
3	S-TuD-NC21nt-1	200mg

2つ以上の異なる配列のS-TuDについて数百ミリグラムからグラムスケールの合成を行った結果、S-TuD100 -pf とほぼ同様な製造状況が確認できた。この結果、単一の配列に対する最適化ではなく、異なる配列のS-TuD に対して、同様な製造を実施できた為、配列に依存しないS-TuD 製造の最適化が達成できたと考えられる。

D. 考察

2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖RNAの合成に関しては収率が大幅に改善されたため、合成時に副生成物として生成される不純物が大幅に低減され、その結果、精製回数を少なくすることができ、2本鎖化を行うことが容易な状況が達成できた。規格試験については、1本鎖の定量的な不純物解析及び2本鎖純度の解析が可能となったため、規格試験化が可能な状況が達成できたと考えられる。

E. 結論

本研究では、S-TuD 大量合成プロトコルの最適化を行った。その結果、2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖RNAの合成に関しては収率が大幅に改善され、最適化を行うことができた。規格化試験法では、1本鎖の定量的な不純物解析及び2本鎖純度の解析も可能となっているため、全体としては治験薬の製造が可能な状況が達成できたと考えられる。

本研究の結果により、日本発のmiRNA阻害剤S-TuDの治験薬製造が可能な状況を達成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Proteomic approach toward personalized sarcoma treatment: lessons from prognostic biomarker discovery in gastrointestinal stromal tumor. Tadashi Kondo, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Daisuke Kubota, Takashi Tajima,