

- 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, Mechttersheimer 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 pftetin: 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

- endoprotheses 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 Musculoskeletal 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)
- 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。

S-TuD の in vitro 有効性の検証

研究分担者 落谷 孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

研究要旨

日本国内で開発された S-TuD を用いて、骨肉腫の悪性形質に関与する microRNA-133a (miR-133a) の発現を阻害することにより得られる抗腫瘍効果を、ヒト骨肉腫細胞株を用いて in vitro で解析した。評価項目は、骨肉腫細胞株の浸潤能、細胞増殖能および薬剤感受性である。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 ($p = 0.003$) を認めた。一方で、細胞増殖、薬剤抵抗性に関しては 2 群間で有意差は認められなかった。骨肉腫臨床材料を用いた解析で、腫瘍内 miR-133a の発現は患者の全生存期間、無病生存期間と有意な相関にあったことを分担研究者の藤原は明らかにしている。S-TuD による発現阻害が浸潤能を低下させた今回の研究結果がこのような臨床的背景と相関する可能性があり、今後更なる in vitro 解析および in vivo 解析を継続する。

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。

また平成24年度には、Synthetic Tohgh Decoy (S-TuD) 大量合成プロトコルの基盤技術を開発し、またmiR-133aの複数の標的遺伝子を介して浸潤能の改善を引き起こしていることを報告した。そして、国立がん研究センター中央病院、岡山大学そして鳥取大学と協力し、骨肉腫臨床検体(ホルマリン固定・パラフィン包埋標本)からのRNA抽出、microRNA測定を開始した。

骨肉腫の治療成績はこの10年来大きな改善が見られておらず、骨肉腫にspecificな治療薬の現れていない現在において、革新的な治療標的分子と成りうると考えられる。そして国内開発されたS-TuDは、そのシーズとして大きな可能性を秘めている。

本研究は、LNAで得られたmiR-133a阻害効果が、S-TuDによっても同様に得られることの実験的検証を目的としている。国内で初めて開発されたS-TuD-133aを用いてS in vitro で機能解析を行った。

B. 研究方法

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 Carboplatin(CBDCA) を選択した。

(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

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(図 2、 $p=0.003$, $n=4$)。

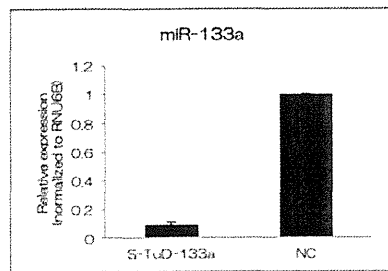


図 1. miR-133a RT-qPCR

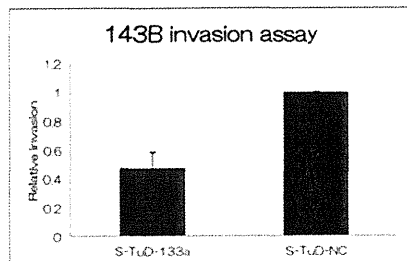
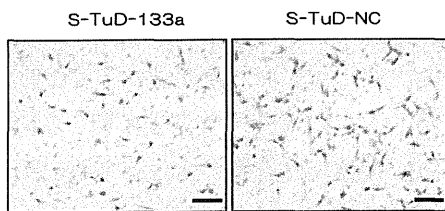


図 2. Invasion assay (上図; scale bar 100um)

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(図 3、4)。

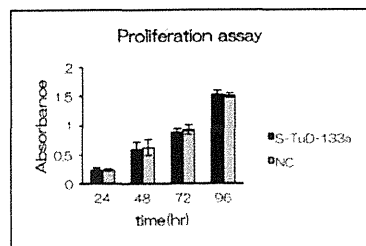


図 3. Proliferation assay

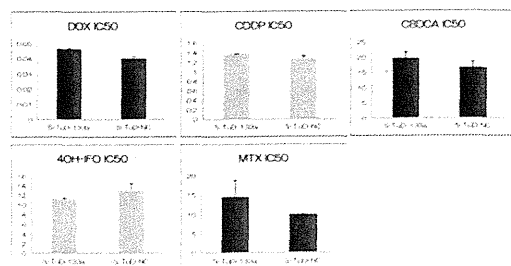


図 4. Cytotoxicity assay, IC50 値

D. 考察

S-TuDを用いてヒト骨肉腫細胞株 143B の miR-133a を発現阻害することで、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。

骨肉腫臨床サンプルにおいて、ヒト骨肉腫細胞株がん幹細胞分画で高発現している miR-133a と全生存率、無病生存率は有意に相関していることが報告されている (Fujiwara T, et. al. Stem Cells. In press)。本研究で得られた結果から、S-TuD-133a は細胞の浸潤、転移(主に肺)を抑制し、治療効果改善に貢献できる可能性が考えられる。これは共同研究者の藤原が in vivo 試験で検証しており、更なる大規模な試験による評価を予定している。

E. 結論

S-TuD-133a はヒト骨肉腫細胞株の miR-133a を機能阻害し、悪性形質の一つである新順応を有意に低下させることが明らかとなり、LNA 製剤の効果との相同性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka Nobuyoshi, Yoshioka Y, Takahashi-Ryou-u, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. STEM CELLS, in press

Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T. Myelodysplastic syndromes are induced by histone

methylation-altering *ASXL1* mutations. *J Clin Invest*, 123:4627-4640, 2013

Fujiwara T, Kawai A, Yoshida A, Ozaki T, Ochiya T. Cancer stem cells of sarcoma. In: Fujiwara T, Kawai A, Yoshida A, Ozaki T, Ochiya T (eds), *Role of cancer stem cells in cancer biology and therapy*. USA, CRC Press, pp 23-78, 2013

Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*, 288:10849-10859, 2013

Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, Hagiwara K, Katsuda T, Ono M, Ochiya T. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:376-382, 2013

Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet*, 4:173, 2013

Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Ochiya T. Functional analysis of exosomal microRNA in cell-cell communication research. *Methods Mol Biol*, 1024:1-10, 2013

Ochiya T, Lotvall J. Exosome as a novel shuttle for innovation. preface. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:2013

Takahashi RU, Takeshita F, Honma K, Ono M, Kato K, Ochiya T. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3 β . *Sci Rep*, 3:2474, 2013

Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*, 21:185-191, 2013

Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Jpn J Clin Oncol*, 43:596-607, 2013

Uchino K, Takeshita F, Takahashi RU, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H, Sonoke S, Yano J, Sasaki H, Nozawa S, Yoshiike M, Kitajima K, Chikaraishi T, Ochiya T.

Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression. *Mol Ther*, 21:610-619, 2013

2. 学会発表

「Functional Imaging of Cancer-Specific Exosomes In Tumor Metastasis」、落谷孝広、19th日本遺伝子治療学会 (2013.7.3 岡山)

「遺伝子導入技術に基づく分子イメージング」、落谷孝広、29th日本DDS学会学術集会 (2013.7.4-5 京都)

Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer. Ochiya, T. World CTC, Berlin, Deutschland. April 23-27

「分子がん転移研究の新たなる潮流：エクソソームによる前転移ニッシュの実態解明」、落谷孝広、22th日本がん転移学会学術集会・総会 (2013.7.10-12 長野)

「骨肉腫の肺前転移ニッシュ形成における腫瘍由来エクソソームの役割の解明 (代：勝田 毅)」、落谷孝広、5th日本RNAi研究会 広島 (2013.8.29-31 広島)

「Exosomes/microRNA-mediated cancer metastasis: A novel approach for cancer diagnosis and treatment」、落谷孝広、75th日本血液学会学術集会 (2013.10.10-13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。

S-TuD-133a の生体内移行及び有効性試験

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 の生体内効果を評価するため、単独投与および既存の抗がん剤の併用による有効性試験を行った。併用投与プロトコールは、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 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、肺転移形成を有意に抑制されることが明らかとなった。また、その後の経過観察により、S-TuD-133a とシスプラチン併用群において単癌マウスの生存期間の延長が観察された。

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。このような課題をもとに、S-TuD-133a および S-TuD-NC の開発を進め、本年度はそれを用いて in vitro、in vivo における解析を進めている。本分担報告書では、in vivo における内容をまとめる。

B. 研究方法

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 1.5x10⁶ 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。

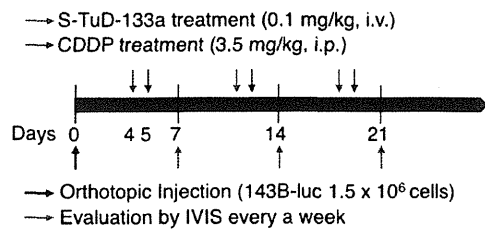


図 1. 併用投与群のプロトコール

(倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センター研究所における動物実験に関する倫理審査の承諾の元に行われている。

C. 研究結果

腫瘍形成については、①・②・③群と④・⑤群で有意差を認められたものの、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(図2)。

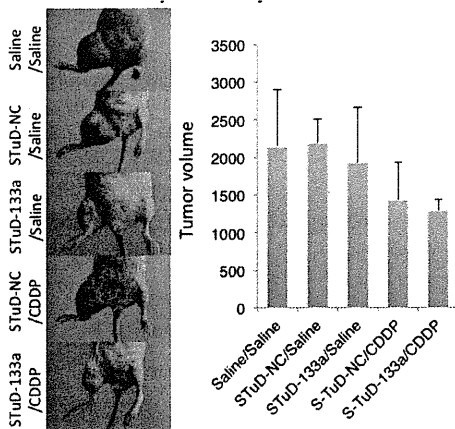


図2. 移植腫瘍原発巣のサイズの変化

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(図3)。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。

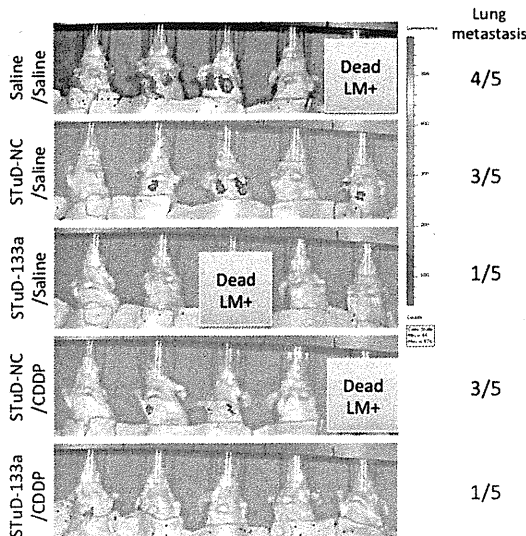


図3. IVIS による肺転移の評価

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。

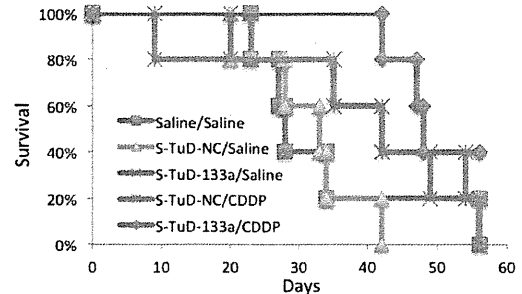


図4. 各群の生存期間

D. 考察

本研究の結果、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。

E. 結論

本研究の結果、S-TuD-133a の骨肉腫肺転移抑制効果が示唆された。今後はさらなる大規模な生体内試験を行うことにより、本製剤の有効性を明らかにしていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Tomohiro Fujiwara, Akira Kawai, Akihiko Yoshida, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya. Cancer Stem Cells of Sarcoma. Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. PP. 23-72, SCIENCE PUBLISHERS. ENFIELD, New Hampshire, 2013

2. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, et al. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA - 133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma - initiating cells. Stem Cells. 2013
3. 藤原智洋, 川井 章, 小坂展慶, 落谷孝広, 尾崎敏文. 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 号, p. 305-313, 2013
4. 滑川 陽一, 小林 英介, 藤原 智洋, 丹澤 義一, 川井 章, 中馬 広一. 後頸部両側に発生し, 異なる MRI 所見を呈した spindle cell lipoma の 1 例. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌, Vol. 56, No. 4, p. 865-866, 2013
- 井 章, 尾崎敏文, 落谷孝広: RNA 干渉核酸医薬による骨肉腫がん幹細胞様形質の制御を基盤とした新規治療戦略, 第 121 回中部日本整形災害外科学会学術総会, 名古屋, 2013
6. 藤原智洋, 小坂展慶, 高橋陵宇, 竹下文隆, 窪田大介, 近藤 格, 川井章, 尾崎敏文, 落谷孝広: 骨肉腫がん幹細胞様性質に対する RNA 干渉を応用した前臨床試験とその臨床的意義, 第 45 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 東京, 2013
7. 藤原智洋, 川井 章, 小倉浩一, 浅野尚文, 薛 宇孝, 小林英介, 丹沢義一, 中谷文彦, 中馬広一: 臼蓋を含む原発性骨盤悪性骨腫瘍に対する外科治療の検討, 第 45 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 東京, 2013

2. 学会発表

1. Fujiwara T., Kosaka N., Takahashi R., Takeshita F., Kawai A., Ozaki T., Ochiya T.: A preclinical trial of RNAi therapeutics as a novel strategy against tumor-initiating phenotype of osteosarcoma, Orthopaedic Research Society, San Antonio, 2013
2. Fujiwara T., Katsuda T., Kosaka N., Kawai A., Toshifumi Ozaki T., and Ochiya T.: Possible roles of osteosarcoma-derived exosomes in promoting pre-metastatic niche in the lung, 27th European MusuloSkeletal Oncology Society (EMSOS) Meeting, Gothenburg, 2013
3. Fujiwara T., Katsuda T., Kosaka N., Kawai A., Toshifumi Ozaki T., and Ochiya T.: OSTEOSARCOMA-DERIVED EXOSOMES PROMOTE LUNG METASTASIS, 18th Connective Tissue Oncology Society, New York, 2013
4. 藤原智洋, 勝田 毅, 小坂展慶, 川井章, 尾崎敏文, 落谷孝広: 腫瘍由来エクソソームは骨肉腫の進展においてどのような役割を担うか, 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉, 2013
5. 藤原智洋, 小坂展慶, 窪田大介, 川

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)

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。

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 －

研究分担者 根津 悠 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

研究要旨

microRNA 阻害剤である Synthetic Tough Decoy (S-TuD) を用い、骨肉腫のがん幹細胞を標的とした新規の治療薬剤の開発を目的とする。昨年度までに、microRNA-133a をターゲットとして、動物モデルでの S-TuD の薬効および安全性を検証した。本年度は、骨肉腫におけるがん幹細胞において、microRNA-133a と並んで重要と考える microRNA-100 について、新規に S-TuD-100 を合成してその阻害効果と安全性を検証した。

S-TuD-100 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。また、シスプラチンとの併用によるラット単回全身投与試験の結果、臨床時に想定される妥当な投与量における、S-TuD-100 の十分な安全性を確認した。以上の結果より、S-TuD 製剤の安全性を異なる標的 miRNA の間で確認することができた。

A. 研究背景、目的 (背景)

がん幹細胞は、癌および肉腫の両者において、その発生・進展・転移・再発・治療抵抗性に深く関わっている。我々は骨肉腫におけるがん幹細胞の細胞集団を同定し、その分画をmicroRNAの機能阻害をすることで、がん幹細胞の抑制が可能であることを証明してきた。平成24年度までの成果として、機能阻害のターゲットとして、microRNA-133aを選択し、阻害剤Synthetic Tough Decoy (S-TuD)を用いることで、動物モデルでの薬効および安全性を示した。S-TuDは共同研究者の伊庭らにより開発され、製品化における特許の問題が生じないだけでなく、従来のmicroRNA阻害剤の問題(投与量が高用量となることや、DDSの必要性など)を解決できる可能性が高い。本年度は、骨肉腫におけるがん幹細胞において、microRNA-133aと並んで重要と考えるmicroRNA-100について、新規にS-TuD100を合成してその阻害効果を検証した。S-TuD100の安全性に関して、ラット単回全身投与試験および、シスプラチンとの併用安全性試験を実施し、検証した。本試験により、S-TuD製剤の幅広い安全性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

平成24年度までに行ったS-TuD133aの合成プロセス最適化に関する成果を応用し、S-TuD100に関しても、GLP動物試験への十

分な適合性をもち、将来的にGMP製造による臨床適用が可能となるグレードの製剤にて検証した。ラットに対する単回全身投与安全性試験および、シスプラチン併用時の単回投与安全性試験について、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)にて実施した

(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-TuD100 を雄性 Crl:CD (SD)ラットに 1, 10 または 100 mg/kg で単回静脈内投与し、毒性を評価すると共に、STuD100 (100 mg/kg) 投与後 24 時間の時点でシスプラチンを 6 mg/kg の用量で併用静脈内投与し、シスプラチンの毒性が増強するかあわせて評価した。表 1 に単回全身投与試験の結果を示す。

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、STuD 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。

表 1 ラットに対する S-TuD100 の単回投与安全性試験

観察項目	S-TuD100 単独投与群	シスプラチン単独投与群	S-TuD・シスプラチン併用群
一般状態	異常所見なし	異常所見なし	異常所見なし
体重	対照群と比較して、明らかな変化はみられなかった	投与の翌日から体重の減少が散見され、対照群と比較して、観察期間を通じて体重の低値傾向がみられた	シスプラチン単独投与群と比較して、僅かに体重が低値を示す傾向がみられた
血液学的検査	対照群と比較して、明らかな変化はみられなかった	対照群と比較して、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、網赤血球数、血小板数及び/または白血球数(好中球数)の低値がみられた	シスプラチン単独投与群と比較して、明らかな変化はみられなかった
血液生化学的検査	対照群と比較して、明らかな変化はみられなかった	対照群と比較して、 γ -GTP、総コレステロール、グルコース、尿素窒素、クレアチニンの高値傾向がみられた	シスプラチン単独投与群と比較して、尿素窒素及びクレアチニンの高値傾向がみられた
剖検	被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった	投与群全例で、腎臓(左右)の褪色(髄質外帯:白色、皮質:やや淡褐色)がみられた	シスプラチン単独投与群と比較して、明らかな変化はみられなかった
病理組織学的検査	被験物質の影響と考えられる変化はみられなかった	全例で腎臓(左右)の髄質外帯/皮質の尿細管上皮における異型核、髄質外帯及び皮質の尿細管上皮の好塩基性化がみられ、腎臓の髄質外帯における遠位尿細管の拡張及び髄質外帯及び/または皮質の単核細胞浸潤が3例、髄質内帯における硝子円柱が1例でみられた。大腿骨髄では、1例で造血細胞の減少及び脂肪髄がみられた	シスプラチン単独投与群と同様の組織変化がいずれも全例でみられた。STuD100高用量の併用投与群で、シスプラチン単独投与群に比べ髄質外帯における遠位尿細管の拡張の程度がやや増したが、それ以外の変化では組織学的変化の頻度及び程度はシスプラチン単独投与群とほぼ同等であった。大腿骨髄では、2例で造血細胞の減少及び脂肪髄がみられた

D. 考察

骨肉腫モデルマウスにおける有効性試験の結果、0.1mg/kg の S-TuD100 の全身投与により、がん幹細胞分画の阻害性が見られている。今回の安全性試験は、薬効量の 10~1000 倍量について検証したものである。その結果、S-TuD100 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、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、S-TuD 製剤の安全性を異なる標的 miRNA の間で確認することができ、本剤および S-TuD133a もしくはそれらの併用による臨床応用可能性が高まった。

E. 結論

miR-100 をターゲットとした、S-TuD100 について、骨肉腫がん幹細胞阻害が期待される薬効量の 1000 倍量までの安全性を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表
関連発表なし
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。

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（氏名） 東大・医科学研究所（所属）

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、米国、及び中国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した S-TuD を合成することが望まれることからまだ確定していない S-TuD RNA 構造の諸パラメーターを設定する必要がある。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）を中心に研究を行なった。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、短か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。

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なく、miRNA を標的とした核酸医薬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。我々はさらに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 (登録番号第 4936343 号)、米国 (登録番号 8,563,709)、中国 (登録番号 ZL200980152926 X 号) の特許を取得している。

（目的）

骨肉腫制圧のためには S-TuD の阻害効率を最適化した構造の設計法を確立する必要がある。昨年度に MBS 配列の最適化をおえたので、今年度は Stem2 の鎖長の最適化を行なうことを目的とした。

B. 研究方法

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なった。

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-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。

この結果、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。

D. 考察

S-TuD の合成を委嘱したジーンデザイン社の技術者に問い合わせた所、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、報告を受けた。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。

E. 結論と展望

昨年度の藤原らの成果から Stem2 が 10 塩基の S-TuD の水溶液を直接の尾静脈に注射して、効率良く腫瘍に導入できることが示されている。直接投与においては特に低分子量であることが導入に有利と予想されることから、本研究で Stem2 の鎖長が 10 塩基対の S-TuD で、*in vitro* での至適の阻害効果を得られたことは、*in vivo* における導入効率の面からも好ましいと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mizutani, T., Ishizaka, A., Suzuki, Y., and Iba, H. 7SK small nuclear ribonucleoprotein complex is recruited to the HIV-1 promoter via short viral transcripts *FEBS Letters* in press

原口健、上野義仁、伊庭英夫：microRNA 阻害法の開発：「TuD RNA 発現ベクター」と「S-TuD」、AnitSense 17(2):15-25, 2013

2. 学会発表

Hiramatsu Hiroaki, Haraguchi Takeshi, Kobayashi Kyosuke, Kondo Masayuki, Kobayashi Kazuyoshi, Harada Kenji, Yoshida Tetsuo, and Iba Hideo.

Regulation of target specificity of the miRNA inhibitor, Tough Decoy RNA

第 36 回日本分子生物学会年会 神戸
2013 年 12 月 3 日～6 日

小林郷介：ウイルス増殖を抑制する microRNA 「m iR-199a/-214 クラスター」に関する研究。口頭発表 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸国際会議場、2013 年11月10日～12日

Haraguchi, T., Hiramatsu, H, and Iba, H. Comparative analysis of efficient expression vectors for miRNA inhibitory decoy “TuD RNA” 第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月4日

Kobayashi, K., Hiramatsu, H., haraguchi, T., Sakurai, K., Iba, H. Dependency of the SWI/SNF complex and d4 family proteins for the expression of NF- κ B target genes. 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 4 日

伊庭英夫：講演 東京理科大学RNA科学総合研究センター公開シンポジウム。東京、葛飾キャンパス 2013年7月17日

伊庭英夫：マイクロRNAの新展開と創薬への利用。ゲノム創薬フォーラム第32回談話会 東京、2013年5月28日

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。

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

イヌの長幹骨である四肢に発生した骨肉腫に対して microRNA 阻害剤 (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。

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パードやグレイハンドなどに後発する。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。治療方法もヒトとほぼ同様に断脚手術前後にシスプラチンやカルボプラチンによる抗ガン剤投与および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。そのため犬の骨肉腫治療としての抗miR-133a核酸製剤の一つであるS-TuD投与における安全性を評価するため、健常犬の血管内に投与し、臨床症状、身体検査、血液検査および病理学的検査を行いその安全性を評価した。また、犬の自然発症例の骨肉腫についてその臨床的な治療の有効性も併せて評価した。

B. 研究方法

1) 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)／骨髓

4) 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)

(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

1. 安全性試験

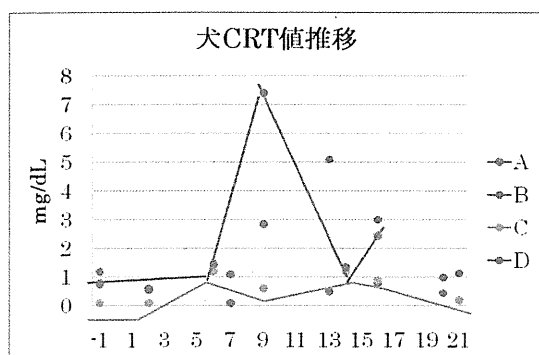
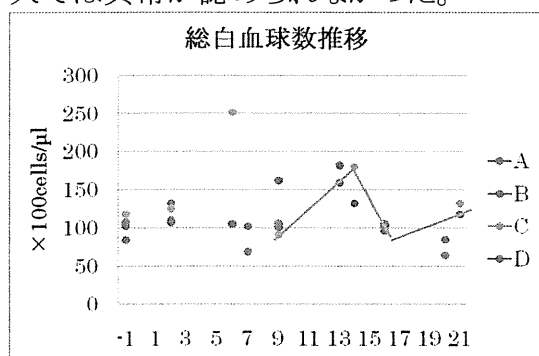
1) 臨床観察

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

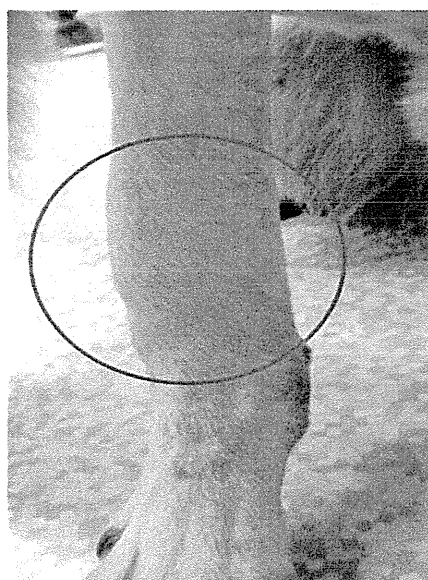
すべての組織において異常は認められなかった。

▶ 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



左前肢やや腫脹、跛行(負重する)、患部熱感有り 患部腫脹(4.5×3×3cm)

(2) 初診:24年11月

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

(3) 臨床経過:

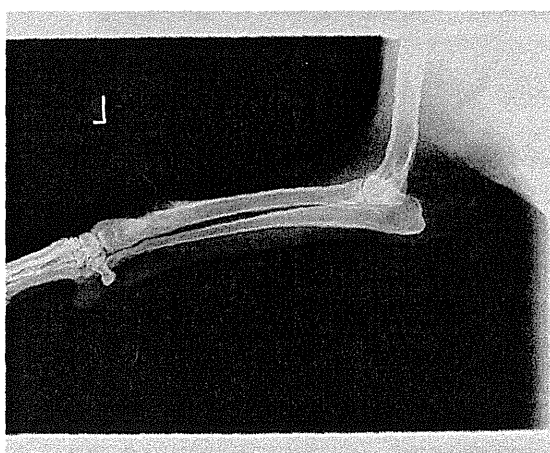
ぬのかわ犬猫病院の供血犬として、2カ月に1度程度の頻度で採血を実施していた。

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瘤を認めた(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。

(4) 病理所見:

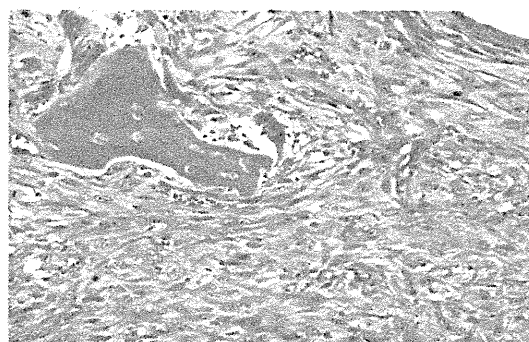
橈骨遠位に骨融解および骨膜反応を伴う腫瘤を認めた。針吸引細胞診では背景に骨基質を伴う異型性の強い細胞が多数採取され、骨肉腫と判断した。

(4)-1 病理組織所見

大小不同の短紡錘形～不整形の腫瘍細胞がびまん性に増殖し、周囲骨組織の骨髓腔への浸潤も認められる。増殖細胞の異型度は高く、分裂像もみられる。増殖巣内には骨基質の残存が認め

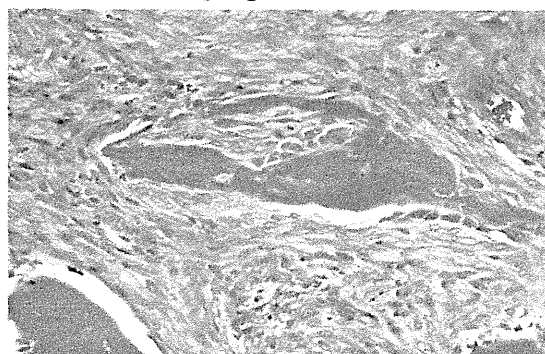
られ、その周囲には破骨細胞の出現も見られる。また、出血・壊死も認められる。周囲組織との境界は不明瞭。

▶ 病理診断:骨肉腫



(5) 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。

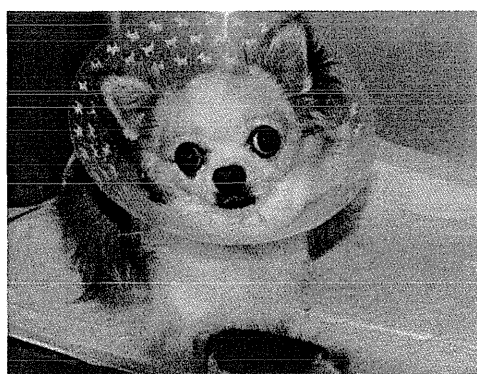
カルボプラチン 200~300mg/m²(BW 34kg)

X-ray 断脚後 3 カ月間では肺への転移は認められない。

2 症例

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)

(1)初診:2013.7.4 左後肢の大腿部腫大、負重困難

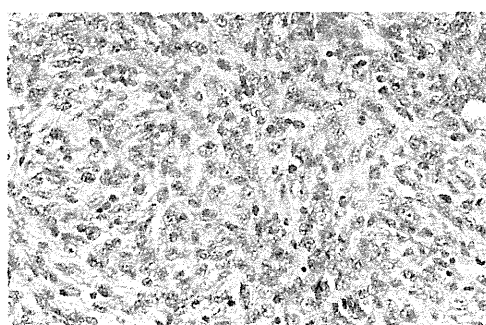


診断:間葉系腫瘍 (骨肉腫?)

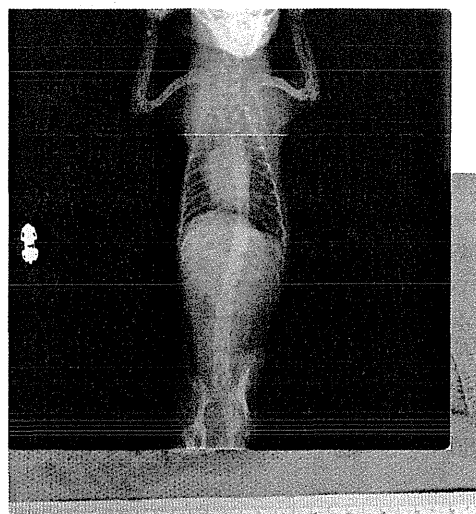
所見:紡錘形~星芒状(線維芽細胞様細胞)小型~中型の両染色性~弱好酸性胞体を有する類円形~卵円形、多角形、多稜形~星芒状あるいは不整形の独立円形細胞(組織球様細胞)が充実性に腫瘍増殖している。

核分裂像:3~4 個/1 視野

以上の結果、悪性の間葉系腫瘍であるが、明瞭な分化傾向が見いだされない。



左後肢の股関節より断脚



X線所見:5 か月目肺転移なし

(2) 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 か月の長期にわたり肺転移は認められない。

D.考察

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。

E. 結論

今回の症例は、S-TuD 投与後、まだいずれも肺転移が認められていない。今回の症例は 2 例と少ないが、1 頭は転移性がなく病理組織学的にも骨肉腫と診断されていることから、今後詳細な観察を継続し有効性の価値ある症例の一助としたい。イヌの骨肉腫における自然発症例は、大型犬の減少と共に発症率が極めて低くなっているが、犬の骨肉腫はヒトと類似していることから、今後症例をさらに積み重ねて、あらゆる角度から分析を行っていききたい。

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。

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

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、岡山大学医学部における材料収集を開始した。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。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、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。

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

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。

(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 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

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