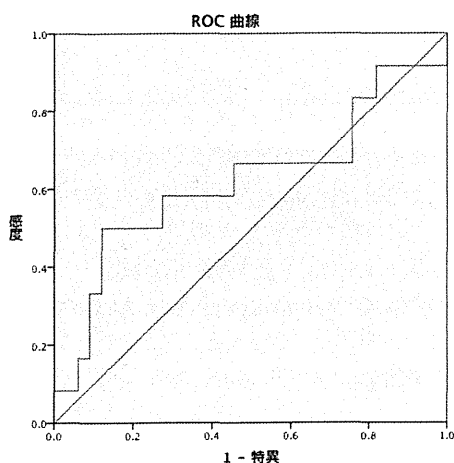
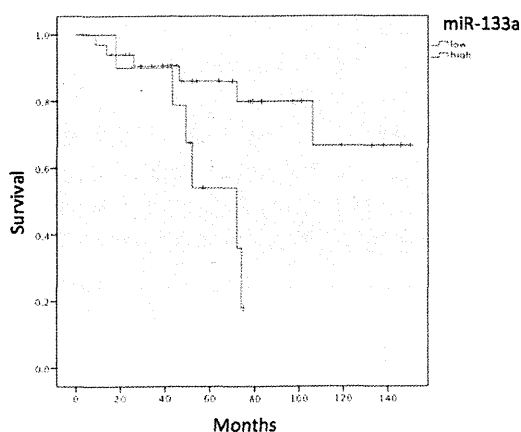


が判明した。miR-133aのcut off pointはROC曲線を作成し、Youden-Indexにより統計学的に算出した(図1)。



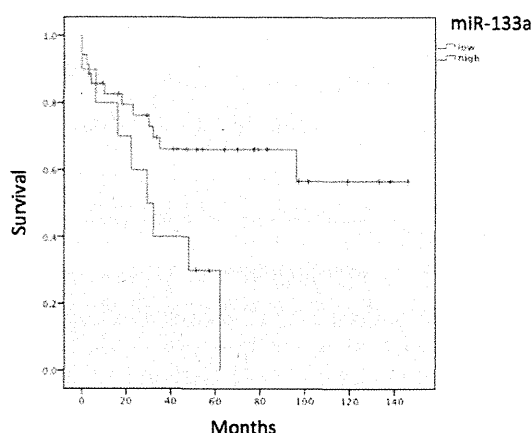
(図1) miR-133aの発現に基づくROC曲線

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, $p = 0.016$)

D. 考察

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。

平成24年度より、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)の収集を開始し、本年度までに45例が解析可能であることが分かった。本年度の解析結果より、これらの検体より抽出されたRNAは、Real-time PCRにてmiRNA発現を測定可能であることが判明した。さらに、miR-133a発現量解析と臨床病理学的因子と比較検討を行った結果、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。

今後は、当施設で採取された臨床検体においてmiR-133a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更なる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

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 を抽出し、miR-133a および RUN6B の発現量を測定した。岡山大学整形外科で得られた臨床検体における miR-133a 高発現が患者予後不良と有意に相関していることが明らかになった。国立がん研究センター中央病院で得られた結果との相同性が確認され、miR-133a 機能阻害の治療的意義が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yoneda Y, Ito S, Kunisada T, Morimoto Y, Kanzaki H, Yoshida A, Shimizu K, Ozaki T, Ouchida M. Truncated SSX protein suppresses synovial sarcoma cell proliferation by inhibiting the localization of SS18-SSX fusion protein. PLoS One. 2013;8(10):e77564.
- ② Hasei J, Sasaki T, Tazawa H, Osaki S, Yamakawa Y, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T. Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. Molecular Cancer Therapeutics. 2013; 12(3): 314-325

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。

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、昨年度の引き続き鳥取大学医学部における材料収集を継続した。本年度は、昨年度構築したパラフィンブロックから RNA を抽出し Real-time PCR をおこなう技術を基に、これまでに少なくとも 18 例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を収集し、前述した miRNA 発現について Real-time PCR 解析をおこなった。18 例中 11 例において各 miRNA 発現量が定量的に測定でき、これらの症例について臨床データの抽出をおこなった。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。今後、ヒト骨肉腫における miR-133a の発現意義をさらなる患者数で明らかにするため、国立がん研究センター中央病院および岡山大学のデータとあわせ、miRNA 発現量と臨床病理学的データとの検討を進めることとした。

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平成 24 年度に引き続きおこなった。平成 24 年度までに収

集された 11 標本に加え、平成 24 年までに手術を施行された 7 標本のあわせて 18 標本から RNA を抽出し、Real-time PCR をおこなった。発現量の検索には miR-133a を対象にし、RNU6B 発現量にて補正を行った。

(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.2312)。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、そのデータは全て施錠可能な部屋の中で管理した。

C. 研究結果

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。

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 のうち、Real-time PCR にて miRNA 発現を測定する目的に適していた症例は 18 例中 11 例のみであった。比較的古い症例で特にホルマリンによる長期固定されていた症例や壊死領域の多い標本において Real-time PCR 解析不適切例が多いことがわかった。今後は、さらに症例数を増やすと共に、解析可能な RNA 抽出のため、固定条件の改善と RNA 抽出により適切な標本の選択についても十分な注意を払うこととした。

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。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。今後は更なる患者数でヒト骨肉腫における miR-133a の発現意義を明らかにするため、国立がん研究センター中央病院および岡山大学のデータとあわせ、miRNA 発現量と臨床病理学的データとの検討を進める予定である。

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、加えてヒト骨肉腫症例において miR-143 の標的遺伝子として同定した PAI-1 および MMP13 発現増加が肺転移を介した予後の不良化に関与してい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 およびその標的遺伝子である PAI-1 および MMP13 発現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 11 例から Real-time PCR での解析可能な RNA が抽出し、miR-133a および RNU6B 発現量を測定した。加えて、この 11 例の臨床データを抽出した。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。今後、他施設におけるデータとあわせてさらに多くの患者数での検討を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

Osaki M, Kosaka N, Okada F, Ochiya T: Circulating miRNAs in drug safety assessment for hepatic and cardiovascular toxicity: the latest biomarker frontier? Molecular Diagnosis & Therapy (in press)

Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, Osaki M, Okada F, Takenaka A: Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. Int J Oncol 44(1), 53-58, 2014

2. 学会発表

尾崎充彦、平畑美緒、神田裕介、落谷孝広、押村光雄、井藤久雄、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 発現量低下が関与する 第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 6-8 日、札幌

尾崎充彦、岡田 太:miR-143 によるヒト骨肉腫細胞の肺転移抑制機構 第22回日本がん転移学会学術集会、2013年7月11-12日、松本

尾崎充彦、平畑美緒、神田裕介、落谷孝広、井藤久雄、岡田 太:PAI-1 はヒト骨肉腫細胞の肺転移を予防するための標的遺伝子となりうる 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3-5日、横浜

尾崎充彦、平畑美緒、岡田 太:マイクロRNAを核酸医薬として用いたがん治療への展開 第34回日本臨床薬理学会学術総会、2013年12月4-6日、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。

microRNA 阻害剤の製剤管理および有効性試験、安全管理

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 S-TuD133a を用いた、新規の骨肉腫治療薬剤の開発を目的とし、臨床適用が可能なグレードでの製造およびラットに対する 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。以上の結果から、本剤の臨床応用可能性が高まった。

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、平成24年度の成果として、miR-133a に対する阻害剤として 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た。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、動物試験に適合するスペックでの製造、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

平成24年度までの成果として、S-TuD の合成プロセスを最適化することで、85%以上の純度で合成が可能となり、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の開発に成功した。本年度は、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を行って、その必要性を検証した。また、上述のプロセスで合成した

S-TuD133a 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。

(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 と A6K の複合体を調製し、マウスでの比較有効性試験を実施した結果、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、S-TuD の全身投与での奏効性を確認した。

ラットに対する 4 週間反復投与毒性試験の結果を表 1 に示す。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。

2012 年に出願した国際特許に、本年度の研究成果の知見を加え、日本、米国、欧州に移行予定(2014年3月)である。

表 1 ラットに対する 4 週間反復投与による安全性試験

観察項目	S-TuD133a 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	死亡例なし 異常所見なし	2 例がそれぞれ投与 19、18 日目に死亡 生存例では 1 例で消瘦(軽度)がみられた	2 例がそれぞれ投与 19、6 日目に死亡 生存例では 2 例で消瘦(軽度)がみられた
体重・ 摂餌量	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、体重の定値傾向、摂餌 量の定値傾向がみられた	シスプラチン単独投与群と比較して、体 重・摂餌量ともに明らかな変化はみられ なかった
尿検査	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、pH の低値傾向がみら れ、1 例では尿潜血反応の陽性反応もみら 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、ヘマトクリット値、白血球数、PT、 APTT の低値傾向がみられ、血小板の高値 傾向がみられた	シスプラチン単独投与群と比較して、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、総ビリルビン、総蛋白 質の低値傾向、トリグリセリド、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、明 らかな変化はみられなかった
剖検・ 器官重量	対照群と比較して、被験物 質の影響と考えられる変 化はみられなかった	死亡例においては、脾臓及び胸腺の小型及 び胃の拡張が全例でみられ、1 例では肺の 赤色巣がみられた 腎臓(左右)の褪色が全例にて、胸腺の小 型が 1 例でみられた 対照群と比較して、精巣、胸腺、精囊、前 立腺の絶対及び相対重量の低値傾向、腎臓 重量の絶対及び相対重量の高値傾向がみら れた	死亡した 1 例では精巣(左右)の小型が、 生存例で胸腺、精囊及び前立腺の小型が 2 例見られた その他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

D. 考察

S-TuD133a は、低用量にてマイクロ RNA 阻害効果の増強を認めたため、DDS を用いずとも、S-TuD 単体にて生体内で十分機能することが示唆された。

S-TuD133a 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。以上の結果から、本剤の臨床応用可能性が高まった。

E. 結論

miR-133a をターゲットとした、S-TuD133a による、骨肉腫がん幹細胞阻害効果と、安全性を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

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

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

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

研究分担者 吉村 健一 神戸大学医学部附属病院

研究要旨

サブグループ解析とは、評価対象となる治療または介入の有効性や安全性（毒性）を、何らかの因子で定義されるサブグループに限定して評価する解析法をいう。近年、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。本研究では、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、現実に応じ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）

サブグループ（部分集団）解析とは、評価対象となる治療または介入の有効性や安全性（毒性）を、何らかの因子で定義されるサブグループに限定して評価する解析法をいう。Pocock ら(1987)の報告によれば、ランダム化臨床試験の結果を報告する論文のうち、約50%において少なくとも1つ以上のサブグループ解析が主論文中に報告されている。

サブグループ解析に関して、よく議論がなされる統計的問題点は主に以下の3つにまとめることができる。

- i) 帰無仮説（例. 群間差がない）が正しい場合、第一種の過誤（ α エラー）がインフレーションさせしまい、これにより、第一種の過誤の確率を事前に定めた有意水準（e.g. 5%）に保つことができない [偽陽性の問題]。
- ii) 対立仮説（例. 群間差がある）が正しい場合、第二種の過誤（ β エラー）をインフレーションさせてしまい、これにより、検出力を低下させてしまう [偽陰性の問題]。
- iii) サブグループ解析は事後的に恣意的なかたちで実施されること多い [post-hoc analysisの問題]。

臨床試験や観察研究を含む臨床研究において、その解析の妥当性が上記の観点から議論になることが多いものの、非臨床試験（基礎研究）などでも同様に考えることができる。

上記を理由としてNew England Journal of

Medicineが2007年に示した投稿ガイドライン（Wang R ら, 2007）を代表として、統計的観点からはサブグループ解析に対して否定的な意見が多くだされてきた。一方、近年、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。分子標的治療薬と呼ばれる薬剤は、従来一般的な抗悪性腫瘍薬（いわゆる殺細胞性薬剤）とは異なり、その開発段階から既知の標的を定めた上で創薬がなされる。このため、実際には予め想定していた既知の標的に対する効果とは異なる機序が認められることも現状多く存在するものの、既知・未知問わず、特定のサブグループに対して効果が期待されることが予め想定されることが多い。抗体医薬品や小分子化合物などの分子標的治療薬を適切に開発するために、従来一般的な殺細胞性薬剤とは異なるパラダイムとして、これまで統計学的な妥当性から、いわば敬遠されてきたサブグループ解析の重要性が急速に高まっているといえる。一方、これらニーズに比して、統計学上、方法論上の整備は明らかに不十分である。今後、これらの整備および必要に応じて新規開発を行って行く上では、これらニーズや現状の問題点を洗い出し、基礎的資料を作成する必要がある。

（目的）

本研究では、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。

B. 研究方法

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する。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者データの利用を含まない。しかしながら、本研究を実施する上でも、各種倫理指針の趣旨に従って倫理面への配慮を十分に行うこととした。

C. 研究結果

1) ガイドライン等における記載

収集したガイドラインごとにサブグループ解析についての記載を収集した結果を以下に示す。

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」

1. 報告書には、治験対象集団の人口統計学的特性 (demographic characteristics) 及びその他の予後に影響し得る因子を記述すること。さらに、治験が十分に大規模であって可能な場合には、人口統計学的な (例えば、年齢、性、人種、体重の) () や、その他 (例えば、腎機能や肝機能) の部分集団に関するデータを示すこと。それにより、有効性又は安全性に存在し得る差異を明確にすることができる。しかしながら、通常は、総括的な分析に用いられるさらに大きなデータベースにおいて、部分集団の反応は吟味されるべきである。(序文)
2. 別個に結果を吟味するような部分集団があれば、それらを明確にすること。(9.7.1 統計及び解析計画)
3. 主たるエンドポイント(結果の指標)が複数あった場合、特定のエンドポイントに対して複数の解析を行った場合、多くの治療群があった場合、又は患者集団のうちの一つかの部分集団について検討した場合には、多重性の問題を認識していることを統計解析に反映すべきであり、第一種の過誤の水準に対

して用いた統計学的調整を説明するか、又はそれらを不必要と考えた理由を述べること。

(11.4.2.5 多重比較・多重性)

4. もし試験の症例数が十分に多いならば、重要な人口統計学的測定値又は基準値で定義される部分集団について、異常に大きな又は小さな反応があるかどうか及び得られた結果について検討すること。例えば年齢、性若しくは人種別、重症度別若しくは予後因子による分類別、又は同一薬効群の薬剤による前治療歴別に効果を比較すること。これらの解析が、試験の規模が小さすぎるという理由で実施されなかったならば、その旨を記すこと。これらの解析は、部分集団についての検討を行わなければ効能が裏付けられないような試験の「救済」を意図するものではなく、他の試験で検討する価値のある仮説を示唆する、又は表示情報の充実、患者の選択、用量の選択などに役立つ可能性のあるものである。特定の部分集団における特定の効果についての仮説があらかじめある場合、その仮説とその評価は計画された統計解析に含まれるべきである

(11.4.2.8 部分集団の検討)

b. ICH E9 ガイドライン「臨床試験のための統計的原則」

1. 主要変数が試験治療によるものとは別の作用と、系統的に関連している例がよくみられる。例えば、年齢や性といった共変量と関連がある場合、又は多施設共同治験では異なる施設で試験治療を受けた被験者という部分集団間に差がみられる場合がある。共変量の影響又は部分集団の効果を調整することは予定した解析の重要部分となる場合があり、したがって治験実施計画書に記述すべきである。主要変数に重要な影響を及ぼすと予想される共変量と要因は、試験開始前に議論して確認しておくべきであり、精度を向上させ、試験治療グループ間のバランスの欠如を埋め合わせるため、それらを解析でどう取り扱うかを考慮すべきである。計画時に

一つ以上の因子を層別因子として用いたならば、それらの因子を解析時に考慮することが適切である。調整することの潜在的な有益さが疑わしい場合にはしばしば、調整しない解析に主要な関心を払うと宣言し、調整した解析はそれを補うものとするのが薦められる。施設の効果及び基準となる時点での主要変数の測定値の役割には特別な注意を払うべきである。しかし、ランダム化後に測定された共変量を主要な解析で調整することは薦められない。なぜならばそのような共変量は試験治療の影響を受けている可能性があるからである。(5.7 部分集団、交互作用及び共変量)

2. 試験治療の効果自身もまた部分集団や共変量により異なる可能性がある。例えば、効果は年齢とともに減少する場合があります、被験者の特別な診断分類では、より大きな効果があることもある。そのような交互作用は予想されたり、交互作用自体に重要な関心がある場合(例えば高齢者医療など)があり、したがって部分集団別解析又は交互作用を含んだ統計モデルは予定した検証的解析に含まれる場合がある。しかし、多くの場合、部分集団別解析又は交互作用解析は探索的であるため、探索的であることを明確に確認しておくべきである。それらの解析では、全体でみられた試験治療の効果がすべて一様であるかどうかを探索すべきである。一般に、そのような解析は、まず問題となっている統計モデルに交互作用項を加えることから始めるべきであり、適切な被験者の部分集団内、又は共変量によって定められる層内を更に探索的に解析することによって補われる。探索的解析である場合、これらの解析結果は慎重に解釈すべきである。試験治療の有効性(若しくは有効性がないこと)、又は安全性に関する結論は、どのようなものであっても、探索的な部分集団別解析のみに基づいては受け入れ難い。(5.7 部分集団、交互作用及び共変量)
3. 一般に、予定していない解析は最小限

にとどめるべきである。予定外の解析は、試験治療の効果が何か別の要因に応じて変化する可能性があると考えられる場合に実施される例がよくみられる。その場合、被験者集団の中で試験治療効果が特に有益な部分集団を明らかにする試みがなされるであろう。よく知られているように、予定していない部分集団別解析を拡大解釈することは潜在的に危険なことであり(5.7 節を参照)、慎重に避けるべきである。試験治療が被験者のある部分集団に何の利益もないと思われる場合、又は有害作用があるように思われる場合にも同様の問題が生じるが、それらの可能性について正しい評価を行うべきであり、したがって常に報告すべきである。

(6.5 統合した要約)

- 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)
 1. Investigation into the effects of treatment in well-defined subsets of the trial population is an integral part of clinical trial planning, analysis and inference that follows the inspection of the primary outcome of the trial. The guideline should assist in the planning and presentation of these investigations and in the understanding of factors to be discussed when considering the credibility of findings.
 2. The more homogeneous the population studied, in terms of baseline risk and in terms of response to treatment, the lower the importance of exploratory subgroup analyses for regulatory assessment. The more heterogeneous the study population, the greater the importance of subgroup analyses to check that the estimated overall effect is broadly applicable and supports assessment of risk-benefit across the breadth of the proposed indication. Exploration of heterogeneity should

- include covariate-adjusted analyses and subgroup analyses.
3. Methodological complications related to multiple analyses mean that exploratory investigations into effects in subsets of the trial population must proceed with caution taking into consideration all available evidence, not only the point estimates from individual subgroup analyses. Despite the statistical complications, not investigating, or ignoring results of subgroup analyses could also lead to incorrect decisions.
 4. Assessors should expect to find discussion in the trial protocol of the expected degree of heterogeneity of the patient population in terms both of factors likely to be prognostic for the 66 course of disease and those that are plausibly predictive of differential response to treatment. A strategy that simply assumes homogeneity of a population in terms of its likely response to treatment, without discussion and without further investigation, is not sufficient. Analogously, it is not sufficient to dismiss all subgroup findings that indicate heterogeneity of response as being spurious. The benefits of this additional discussion are to maximise the a priori discussion of the importance of certain subgroups and thus to minimise the a posteriori discussion in an attempt to promote rational consideration of subgroups and to reduce the risk for erroneous conclusions. Done properly, this should minimise the need for data-driven investigations, relying instead on a well-reasoned pre-specified strategy.
 5. Consistency of findings in relevant subgroups needs to be discussed in the analysis report: Forest plots graphing the treatment effect in a series of subgroups and statistical

methods to assess heterogeneity of treatment effects estimated in subgroups play an important role for the provision of signals as to whether the overall treatment effect applies to the full trial population. Clinical and pharmacological knowledge are needed to evaluate the credibility and relevance of signals that are generated. A number of factors influence the credibility of a subgroup finding, including 'biological plausibility' and replication of evidence as well as the strength of evidence from the trial(s). Credible explanations for heterogeneity should be sought. Multiple analyses and data presentations may be required to properly inform an assessment of credibility.

(Executive summary)

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

のように適切な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ムチェ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

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。

E. 結論

本研究では、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た。また、これに基づいて実際にサブグループ解析を実施し、結果を解釈する場合の現状の論点をまとめた。その結果、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。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

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
特になし。
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, Takahiro Ochiya	Cancer Stem Cells of Sarcoma	Thomas Dittmar	Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy	SCIENCE PUBLISHERS	New Hampshire	2013	23-72
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	佐々木常雄	癌と化学療法	癌と化学療法社	東京	2013	305-313

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
Tadashi Kondo, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Daisuke Kubota, Takashi Tajima, Mukaihara K, Hitoshi Ichikawa, Akira Kawai	Proteomic approach toward personalized sarcoma treatment: lessons from prognostic biomarker discovery in gastrointestinal stromal tumor	Proteomics Clin Appl	7(1-2)	70-78	2013
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.	SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ β -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma	Oncogene	7	1-11	2013
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	SRC signaling is crucial in the growth of synovial sarcoma cells	Cancer Res	73 (8)	2518-28,	2013

Shintaro Iwata, Takeshi Ishii, Akira Kawai, Toru Hiruma, Yō Takeshi Nemoto, Hiroto Kamoda, Naofumi Asano, Masanobu Takeyama	Prognostic Factors in Elderly Osteosarcoma Patients: A Multi-institutional Study.	Ann Surg Oncol	21	263-268	2013
Teruhito Yoshitaka, Akira Kawai, Shigeru Miyaki, Kunihiro Numoto, Kazutaka Kikuta, Toshifumi Ozaki, Martin Lotz, Hiroshi Asahara	Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma	J Orthop Res	31(12)	1992-8	2013
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	中部整災誌	56 (4)	865-866	2013
Fujiwara T1, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, 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		1-36	2014
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)	1-8	2013
Uchino K, Ochiya T, Takeshita F	RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment	Jpn J Clin Oncol	43	596-607	2013
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」	Antisense	17	15-25	2013
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	588(9)	1630-6	2014
Yoneda Y, Ito S, Kunisada T, Morimoto Y, Kanzaki H, Yoshida A, Shimizu K, Ozaki T, Ouchida M.	Truncated SSX protein suppresses synovial sarcoma cell proliferation by inhibiting the localization of SS18-SSX fusion protein.	PLoS One.	8(10)	E77564	2013

Hasei J, Sasaki T, Tazawa H, Osaki S, Yamakawa Y, Kunisada T, Yoshida A, Hashimoto Y, Onishi T, Uno F, Kagawa S, Urata Y, <u>Ozaki T</u> , <u>Fujiwara T</u> .	Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells.	Molecular Cancer Therapeutics.	12(3)	314-325	2013
<u>Osaki M</u> , Kosaka N, Okada F, Ochiya T	Circulating miRNAs in drug safety assessment for hepatic and cardiovascular toxicity: the latest biomarker frontier?	Molecular Diagnosis & Therapy	18(2)	121-6	2014
Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, <u>Osaki M</u> , Okada F, Takenaka A	Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma.	Int J Oncol	44 (1)	53-58	2014

IV. 研究成果の刊行物

Chapter 2

Cancer Stem Cells of Sarcoma

Tomohiro Fujiwara,^{1,a,2,4} Akira Kawai,² Akihiko Yoshida,³ Toshifumi Ozaki⁴ and Takahiro Ochiya^{1,b,*}

Introduction

Sarcomas are malignant mesenchymal tumors. Mesenchymal tissue is defined as a complex of nonepithelial structures of the body exclusive of reproductive tissue, glia, and hematopoietic and lymphoid tissue. Embryonically, these nonepithelial structures are derived from the mesoderm and, to a lesser degree, from the neuroectoderm and are grouped into fibrous tissue, adipose tissue, skeletal muscle, blood and lymph vessels, and peripheral nervous tissue (Aogi et al. 2000). The word “sarcoma” is derived from the Greek word *sarkoma* meaning “fleshy outgrowth”; sarcomas can present as either a bone sarcoma or a soft tissue sarcoma (Misra et al. 2009).

Bone Sarcoma

Bone tissue is composed of many kinds of cells, such as osteoblasts, osteocytes, chondrocytes, and periosteal cells, and, in bone marrow, hematopoietic cells, adipocytes, neurocytes, fibroblasts, and vascular

¹Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan.

^aE-mail: tofujiwa@ncc.go.jp; tomomedvn@gmail.com

^bE-mail: tochiya@ncc.go.jp

²Department of Musculoskeletal Tumor Surgery, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan.

³Department of Pathology and Clinical Laboratories, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan.

⁴Department of Orthopedic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan.

*Corresponding author

smooth myocytes. Since the origin of sarcoma has not been identified, bone sarcoma classification is based on morphological findings, such as cell type, architecture, and matrix production. The morphological features of benign and malignant as well as non-neoplastic conditions may overlap. The classification of the World Health Organization (WHO) is presented in Table 1 (Fletcher et al. 2002).

Table 1. WHO classification of bone sarcoma.
(adapted from Fletcher, C.D.M., K.K. Unni., and F. Mertens. 2002.
Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. p. 226. IARC Press. Lyon)

CARTILAGE TUMORS	EWING SARCOMA/PRIMITIVE
Osteochondroma	NEUROECTODERMAL TUMOR
Chondroma	Ewing sarcoma
Enchondroma	HEMATOPOIETIC TUMORS
Periosteal chondroma	Plasma cell myeloma
Multiple chondromatosis	Malignant lymphoma, NOS
Chondroblastoma	GIANT CELL TUMOR
Chondromyxoid fibroma	Giant cell tumor
Chondrosarcoma	Malignancy in giant cell tumor
Central, primary, and secondary	NOTOCHORDAL TUMORS
Peripheral	Chordoma
Dedifferentiated	VASCULAR TUMORS
Mesenchymal	Hemangioma
Clear cell	Angiosarcoma
OSTEOGENIC TUMORS	SMOOTH MUSCLE TUMORS
Osteoid osteoma	Leiomyoma
Osteoblastoma	Leiomyosarcoma
Osteosarcoma	LIPOGENIC TUMORS
Conventional	Lipoma

Table 1. contd....

Table 1. contd....

OSTEOGENIC TUMORS	LIPOGENIC TUMORS
chondroblastic	Liposarcoma
fibroblastic	NEURAL TUMORS
osteoblastic	Neurilemmoma
Telangiectatic	MISCELLANEOUS TUMORS
Small cell	Adamantinoma
Low grade central	Metastatic malignancy
Secondary	MISCELLANEOUS LESIONS
Parosteal	Aneurysmal bone cyst
Periosteal	Simple cyst
High grade surface	Fibrous dysplasia
FIBROGENIC TUMORS	Osteofibrous dysplasia
Desmoplastic fibroma	Langerhans cell histiocytosis
Fibrosarcoma	Erdheim-Chester disease
FIBROHISTIOCYTIC TUMORS	Chest wall hamartoma
Benign fibrous histiocytoma	JOINT LESIONS
Malignant fibrous histiocytoma	Synovial chondromatosis

Excluding myeloma and lymphoma, malignant primary bone sarcomas constitute 0.2% of all malignancies in adults and approximately 5% of childhood malignancies, for which data were obtained in one large series (Surveillance, Epidemiology, and End-Results (SEER) study). In North America and Europe, the incidence rate for bone sarcomas in males is approximately 0.8 new cases per 100,000 population a year (Fletcher et al. 2002). Cancer registry data with histological stratification indicate that osteosarcoma is the most common primary malignant tumor of bone, accounting for approximately 35% of cases, followed by chondrosarcoma for 25%, Ewing sarcoma for 16%, and chordoma for 8% (Table 3) (Dorfman and Czerniak 1995).