

201411036A

厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

**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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川井 章

平成27（2015）年 4月

厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川井 章

平成 27（2015）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	1
川井 章	
II. 分担研究報告	
1. S-TuD 製剤の大量合成法の最適化及び予備安定性試験	21
川井 章	
2. microRNA 阻害剤(Tough Decoy)の製剤開発および動物実験のデータ評価	27
伊庭 英夫	
3. microRNA 阻害剤の製剤管理および有効性試験、安全性管理	31
松田 範昭	
4. イヌ骨肉腫症例に対する抗 mir-133a 核酸製剤投与	35
伊藤 博	
5. イヌ自然発症肉腫症例での腫瘍内 miR-133a 発現	97
落谷 孝広	
6. イヌ自然発症骨肉腫 D-TuD-133a 投与モデルの microRNA-133a 濃度	101
根津 悠	
7. 骨肉腫臨床検体の解析	105
尾崎 敏文	
8. 骨肉腫臨床検体の解析	109
尾崎 充彦	
9. 骨肉腫患者由来血中 miRNA 発現の解析	113
藤原 智洋	
10. 骨肉腫細胞の膜タンパク質のプロテオーム解析による治療標的候補の探索のための 基盤的技術の開発	117
近藤 格	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	121
IV. 研究成果の刊行物	123

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(革新的がん医療実用化研究事業)
研究総括報告書

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 数年治療成績の改善をみない骨肉腫に対する新規治療法として、我々は現行標準治療に locked nucleic acid (LNA)による miR-133a 阻害を併用した治療を開発し、非臨床におけるその有効性を平成 23 年度までに見出してきた。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)を導入した前臨床試験を平成 24 年度より行っている。本研究報告書は平成 26 年度における進捗状況を総括するものである。

川井らは、日本発新規 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検討した。前年度検討した 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法のさらなる最適化を検討した結果、これまでよりも少ない精製回数で効率的に合成品を得ることに成功した。さらに医薬品開発に必要な安定性試験についても実施し、治験薬製造が可能な状況を達成した。

伊庭らは、平成 24 年度までに S-TuD の基本分子構造に関する諸パラメーターの最適化を終えており、本年度は薬物動態を解析するために real-time RT-PCR 法を用いた S-TuD の超微量検出法の開発を行い、これを確立した。また種々の S-TuD の導入が interferon などの免疫反応を一切誘導しないことが示された。また、S-TuD の血清中での安定性の評価を行い、マウス血清や、ヒト血清内で極めて安定であることが確認された。

松田らは、S-TuD-133a の動物モデルにおける有効性と安全性の検証を継続した。皮下腫瘍作成後、切除モデルにおいて、S-TuD-133a および S-TuD-100 などの単独および併用による転移抑制効果、延命効果を検証した。DDS 併用の有無の検討により、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。これまでのところ S-TuD 製剤の単独投与による毒性は見られず、シスプラチンとの併用においても毒性の増強は見られていない。

伊藤らはイヌ自然発生骨肉腫症例での S-TuD の安全性試験を行い、その安全性を確認した。また、実際にイヌ骨肉腫における S-TuD の臨床的な有効性についての評価を行った結果、四肢に発症した骨肉腫は、抗がん剤単独治療に比較して肺転移の抑制が認められた。また、落谷、根津らは、イヌ自然発生骨肉腫における血清および腫瘍組織の miR-133a を検索した。その結果、イヌ骨肉腫でもヒト同様にその発現が確認された。根津らはさらに、S-TuD-133a 投与前後における血清中 miR-133a 発現レベルの推移の検証でを行い、S-TuD-133a 投与前と比較して投与後(断脚前)で有意に発現レベルが低下していることを見出した。しかし断脚後 S-TuD-133a 投与を継続しても血清 miR-133a の発現レベルが再度上昇してくる症例も認められた。イヌ骨肉腫の 1 年生存率は 30-60%と報告されており、現時点では断脚後経過観察期間が 1 年未満の症例がほとんどである。さらなる経過観察を継続することで、より詳細な解析・検討が可能である。

尾崎らは、ヒト骨肉腫臨床材料における miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析を目的として、岡山大学整形外科における材料収集および発現解析を行った。ヒト骨肉腫 25 例の凍結標本を収集し、miR-133a の標的遺伝子 annexin A2 (ANXA2)の発現解析を行い、それぞれの予後との相関性を解析したところ、ANXA2 高発現が患者の overall survival および metastasis-free survival の予後良好と相関する傾向が見出された。

尾崎らは同様に、ヒト骨肉腫臨床材料を用い ANXA2 の発現を免疫染色により評価した。鳥取大学に保管されているヒト骨肉腫切除標本 10 例における検討により、骨肉腫における ANXA2 陽性腫瘍細胞は、類骨形成能の高い領域で多く観察された。検討に用いた骨肉腫 10 例において、ANXA2 陽性例および陰性例はそれぞれ 5 例ずつであった。ANXA2 陽性例は、肺転移陽性群において 4 例中 1 例 (25.0%)、一方肺転移陰性例群において 6 例中 4 例 (66.7%)と前者で低値を示した。以上より、ヒト骨肉腫原発薬において、miR-133a 発現がその標的分子である ANXA2 発現を低下させ、肺転移促進性に関することで予後不良となることが示唆され、骨肉腫における miR-133a 機能阻害の有用性を示唆する結果となった。

細胞内だけでなく細胞外へも分泌される、いわゆる分泌型 miRNA の骨肉腫における知見は未だ得られておらず、藤原らは、骨肉腫における分泌型 miR-133a のおよびその臨床病理学的相関性との解析から新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。2010 年から 2012 年に採取された治療前の骨肉腫患者 10 名、非骨肉腫患者 10 名、および健康者 8 名から採取された血清を解析したところ、健康者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清で miR-133a 発現が有意に高いことが示された。さらに、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示し、単癌状態を示すバイオマーカーあるいは S-TuD 治療における効果判定のモニタリングマーカーとしての可能性が示唆された。

近藤らは、miRNA が発現制御する遺伝子の候補の中から膜タンパク質を特異的に抽出するための基盤技術の開発を試みた。細胞膜上のタンパク質をビオチン標識し、タンパク質を抽出してアビジンカラムで精製、ペプチド化した後に、質量分析で同定した。複数の骨肉腫細胞および骨芽細胞を調べ、実験手法の最適化を図り、平均して 300 種類のタンパク質を同定した。本研究は、同定されたタンパク質のデータベース化、および細胞間での多様性を反映しうる鍵となる膜タンパク質の同定のための基盤技術として、今後の応用が期待される。

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、その悪性形質に關与する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。そこでジンデザイン社と協同し、大量合成プロトコールの作成を継続している。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、製剤自体の安定性や血中における安定性など、検討すべき課題が多いのが現状である。その課題に取り組みながら、本製剤の有効性ならびに安全性の検証を進める必要がある。

現在のヒト医療あるいは獣医療での骨肉腫の治療は、外科的手術、放射線療法、および薬物療法(主として抗がん剤や分子標的治療薬)が主流となっている。他にも温熱療法、活性化リンパ球療法などの免疫療法、高濃度ビタミンC点滴療法、代替療法(サプリメントやホメオパシーなど)、あるいは外科療法の併用としての動注療法などが行われている。このように様々な療法があり、また医療の発展により生存率は上昇したものの、ヒトで5年生存率が50~70%、犬での1年生存率が30~60%と、依然として根治を見込める安定した治療法は確立されていない。イヌの骨肉腫は、イヌの骨原発性腫瘍の80%程を占め、患部に強い疼痛を与えQuality of lifeを著しく損なう。断脚などの侵襲性が高い外科手術を行ったとしても、発見時から早期に肺転移を起こす腫瘍であり、予後は非常に悪い。前述の既存療法や検査では治療成績に限界があるため、新たな治療法や早期発見や予後、再発判定の為のマーカーが求められている。ヒトの骨肉腫とイヌのそれは発生年齢が若齢と中齢の二峰性の分布を取ることや、発生部位の病態が非常に似ていることから、腫瘍発生のメカニズムも類似していると考えられている。今回臨床試験に用いたS-TuDはヒトの骨肉腫に発現しているmiR-133aの阻害剤であるが、イヌでの有効性も期待でき、同時にその成果はヒト医療の発展にも繋がると予想される。

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

HCT-116 細胞に 10nM S-TuD を transfection 法で導入し、7 ないし 24 時間後に Total mRNA を回収した。そして Interferon の標的遺伝子群である内在性の OAS-1, OAS-2, MX1, IRF-9, IFITM-1 mRNA の発現量を real-time PCR 法で検定した。

(4)S-TuD の血清中での安定性の評価
各種 S-TuD をマウスまたはヒト血清と混合後 37°C で一定時間保温後、液体 N2 中で凍結した。各検品は、核酸分解酵素のない H2O で 100 倍希釈後直ちに、20%TBE native polyacryl amiole gel により 200V で電機泳動した。ゲルは SyBR Gold (Invitrogen) により染色し、Wise UV (WUV-M20) で検出した。

(5)ヒト骨肉腫マウス移植モデルを用いた S-TuD-133a 有効性試験
S-TuD-133a および S-TuD-100 生物学的安全性は、シスプラチンとの併用のもと、臨床想定投与量前後における反復投与試験で確認した。この臨床想定投与量は、マウス担癌モデルでの標的 miRNA のノックダウン効果および延命効果に基づいて設定している。ところが、実際の臨床においては、原発巣の腫瘍は外科的に切除することが常であり、その処置後の転移を如何に抑制するかが延命効果に直結すると考える。そこで、マウスを用いた比較的大規模な群構成において、より臨床に近いと考えられる骨内腫瘍形成後、断脚モデルおよび、再現性の高い皮下腫瘍作成後、切除モデルにおいて、S-TuD-133a および S-TuD-100 投与による転移抑制効果、延命効果を検証した。その際、シスプラチンの併用ならびに S-TuD の DDS として有用なペプチドキャリア A6K の併用による影響も含めて検証し、安全性試験の結果をふまえた臨床適用の至適投与量の設定を試みた。試験は、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。

(6)イヌ自然発生骨肉腫症例に対する S-TuD-133a 有効性試験

【試供動物】

術前あるいは術後の病理検査で骨肉腫が確定診断された 8 症例と術前の病理検査にて骨肉腫が疑われた 1 症例を対象とした。

S-TuD を投与した骨肉腫症例は、付属骨格

に発生したものが 4 例(大腿骨骨頸部 2 例、橈骨遠位部 1 例、上腕骨近位部 1 例)、軸性骨格に発生したものが 4 例(下顎 2 例、上顎 1 例、肋骨 1 例)であった。また、術前の病理検査で骨肉腫が疑われたが、術後病理検査で悪性間葉系腫瘍と診断された 1 例(左後肢)においても、S-TuD 臨床試験を行った。

術前に S-TuD を投与できた症例は 4 例あり、内訳は四肢に発生したものは 3 例、下顎に発生したものが 1 例であった。術後から投与を始めた症例は 5 例あり、内訳は四肢に発生したものは 2 例、下顎 1 例、上顎 1 例、そして肋骨 1 例であった。

【手術】

原則的に完全切除を目的とした根治手術を行った。なお四肢に発生した場合、前肢は肩甲骨から、後肢は大腿骨頭から離断する断脚術を行った。

【抗がん剤】

Carboplatin(CBDCA)を主に用いた。製剤はカルボプラチン点滴静注液 150mg「サワイ」(沢井製薬、大阪、日本)を使用した。その他に症例の状態により Cisplatin(CDDP)、Cyclophosphamide (CPA)、Doxorubicin(DXR)、ならびに Etoposide(VP-16)を用いた。製剤はそれぞれ、ランダ注(日本化薬、東京、日本)、エンドキサン注(塩野義製薬、大阪、日本)、アドリアシン注(協和発酵、東京、日本)、ならびにペプシドカプセル(ブリistolマイヤーズ、東京、日本)を用いた。

【投与方法】

以下のプロトコールに沿って投与された。

day	採血	手術	抗がん剤投与	S-TuD投与	レントゲン検査	CT検査	miR133定盤
0	○ (S-TuD投与前)			○	○	△	○(血清)
3	○			○			
6	○	○					○(組織)
抜糸処置(術後約2週間)							
0 (抗がん剤投与初日)	○		○	○			
21	○		○	○	○		
42	○		○	○			○(血清)
63	○		○	○	○		
3month					○		○(血清)
6month					○	○	
1year					○	○	○(血清)

○・・・原則として行う。

△・・・可能であれば行う。

術前投与が可能であった症例には、術前に S-TuD を 0.1mg/kg を計 2 回、最低 24 時間以上間隔を空けて静脈内投与した。術後の投与は原則として抜糸後(約 2 週目)、CBDCA

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。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、ヒト骨肉腫手術検体におけるがん幹細胞分画の存在とその分画におけるmiR-133a高発現を見出してきた。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の標的遺伝子群の同定および臨床病理学的因子と比較検討は、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行うことを目的とした。国立がん研究センター中央病院および鳥取大学・岡山大学における臨床材料を用いて検討した。

さらに、miRNA 細胞内だけでなく細胞外へも分泌され(分泌型miRNA)、血液中に安定した形で存在することが知られるようになった。特にがんをはじめとする疾患の病態やステージなど、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化するため、血液などの体液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとして開発されようとしている。骨軟部腫瘍における分泌型miRNAの存在は明らかになっておらず、本年度は骨肉腫における分泌型miR-133aのおよびその臨床病理学的相関性との解析から新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。

また、miRNAは複数の遺伝子の発現および分子パスウェイを制御することによってがん幹細胞の維持・分化に関わっている。miRNAが制御するタンパク質の候補は数多く報告されており、どの候補に焦点を当てるかが研究の成否を分けることになる。候補タンパク質のうち、膜タンパク質を重点的に調べることは、治療標的の新規候補の同定および個別化医療

のためのバイオマーカー候補の同定において有効である。一方、ある遺伝子産物・タンパク質が膜に局在するかどうかは核酸・アミノ酸配列から予想することは未だ困難であり、データベースとしても開発途中である。現状では、実際のサンプルにあたって解析を行う必要があるが、そのための方法論も未だ確立されていない。タンパク質を網羅的に解析する手法として質量分析を用いた実験が普及しており、一度に数千種類のタンパク質を同定・定量できる標準的な装置が市販されている。一方、膜タンパク質を特異的にスクリーニングする手法については開発が必要である。骨肉腫の新規治療法の開発に資する膜タンパク質の同定法を確立する基盤的技術を開発するために、実験手法の最適条件を検討した。

このような背景をもとに、本年度は、S-TuD合成プロトコルの最適化、S-TuD 製剤の安定性評価、S-TuD 製剤の超微量検出法の開発、S-TuD の血清中での安定性評価、単癌マウスに対する有効性試験、イヌ自然発生骨肉腫症例に対する有効性および安全性試験、それに伴う腫瘍内および血清中 miRNA の発現解析等を行った。

B. 研究方法

(1)S-TuD 製剤の大量合成法の最適化及び予備安定性試験

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、いくつかの異なる S-TuD に対して数百ミリグラム以上の合成を実施した。併せて治験薬としての安定性を評価する為、S-TuD 凍結乾燥品の予備的な長期安定性試験(1年間)を行い、各ポイントでの物性試験を実施した。

(2)S-TuD の超微量検出法の開発
精製された S-TuD122 標品(全て 2'-O-Methyl 化されている)を用いて、MBS(miRNA binding site)と Stem II 領域に対する primer を設計し、これを逆転写酵素により伸長させ得られた cDNA を real-time PCR により増幅、定量する系を数種考案した。

(3)S-TuD の免疫反応誘導性の検討

と併用して S-TuD 0.1mg/kg を、4 回を目安として投与した。投与回数や投与開始日、投与間隔、CBDCA の用量は症例の状態に応じて異なり、表 6 に示した。投与方法は静脈カテーテルを留置し、CBDCA をボラス投与した後に、生理食塩水をカテーテル内洗浄の目的で少量静脈内投与し、その後に S-TuD を投与した。

術前投与が出来なかった症例に対しては、状態を見て抗がん剤投与に耐えられると判断された時に CBDCA と併用して、S-TuD 0.1mg/kg を血管内投与した。術後の投与方法は、動注カテーテルを留置した症例には動注カテーテルから CBDCA の投与終了後に、生理食塩水を洗浄目的で注入し、その後 S-TuD を投与した。

なお、全ての症例で、初回投与の前に飼い主に今回の試験についての目的および実験動物での安全性を説明し、投与の同意を頂いた上で、投与プロトコルを開始した。

【身体検査】

来院時の身体検査項目として体温、体重測定を行い、家庭での一般状態の聴取を実施した(排尿、排便、活動性、食欲の様子やその他飼い主の気づいた変化等)。これらは S-TuD 投与直前から、S-TuD の投与プロトコル終了まで実施した。

【病理検査】

東京農工大学農学部臨床腫瘍学研究室およびノースラボ(北海道、日本)に病理検査依頼した。

【X 線・CT 検査】

レントゲン検査、あるいはコンピュータ断層撮影(CT)検査により、術前の腫瘍の確認、術後の再発や転移の有無を確認した。

【血液検査】

症例の静脈から採血された血液を用いて検査を実施した。血液検査は S-TuD ならびに抗がん剤投与の前後に実施した。血漿は主にアルカリフォスファターゼ(ALP)の推移を観察する目的で血液化学検査を実施した。その他に血糖値(GLU)、血液尿素窒素(BUN)、血漿クレアチニン(CRE)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総ビリルビン(T-BiL)、総コレステロール(T-Cho)、血中総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、血中電解質(Na-K-Cl)、カルシウム(Ca)、リン(P)、および C 反応性蛋白(CRP)の

測定を、症例の状態を鑑みながら測定した。血液化学検査には FUJI DRI CHEM 7000V を用いた。血清分離は 3000rpm、10min で行い、分離した血清は -80°C にて保存した。

【腫瘍組織採材】

外科手術にて摘出した腫瘍組織の一部を採材し、液体窒素に 10 秒間浸漬して、急速凍結させ保存した。検体は miR-133a を定量するまで -80°C で保存した。

(7)イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験における骨肉腫組織・血清中 miR-133a 解析リアルタイム定量 PCR(qRT-PCR)を用いて、以下の条件で解析した。

組織:組織は凍結したままマルチビーズショッカー(安井機器)により粉碎後、QIAzol Lysis Reagent(QIAGEN) 700 μl に溶解。更に miRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を使用して total RNA を抽出。primer は hsa-miR-133a(cfa-miR-133a と相同性あり、Mature miRNA sequence UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU)を用いた。inner control として、RNU6B を用いた。

血清:S-TuD 術前投与が可能だった症例には、S-TuD 投与前、手術前、術後 1.5 ヶ月、および術後 3 ヶ月時点の血清を用いて miR-133a を定量した。術前投与が行えなかった症例に関しては、術後 1.5 ヶ月、術後 3 ヶ月時点での血清を用いて miR-133a を定量した。症例 D は、術後 9 ヶ月、12 ヶ月時点での血清で定量した。採取した血液を 10,000rpm、10min、 4°C で遠心し、上清 200 μL を使用し、miRNeasy Mini Kit を用いて、QIAGEN Supplementary Protocol(Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit)に従い total RNA 抽出した。primer は has-miR-133a、および cel-miR-39(Mature miRNA sequence UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG)を用いた。Taqman プローブはそれぞれに特異的なものを用いた。

血清、組織共に、RNA 逆転写は Taqman microRNA Reverse Transcription Kit を用い、qRT-PCR には Taqman 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG を用いた。血清サンプルおよび組織サンプルにおける発現量の解析には Comparative Ct 法を用い

た。

(8)岡山大学における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a 標的遺伝子の発現解析

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凍結保存検体の検索を開始した。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(25例)を収集可能であった。それぞれの検体より RNA 抽出を行い、miR-133a の標的遺伝子である annexin A2 (ANXA2) および β -actin の発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

(9)鳥取大学における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a 標的遺伝子の発現解析

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 10 例を対象にし、ANXA2 発現を免疫組織化学的に検索した。腫瘍細胞における ANXA2 陽性細胞を検索し、陽性細胞率 10%以上の症例を陽性例、他方 10%未満の症例を陰性例とした。臨床病理学的因子と比較検討し、ANXA2 発現の意義を検索した。

(10)骨肉腫患者由来血中 miRNA 発現の解析

岡山大学ならびに国立がん研究センターにおいて保管されている、骨肉腫患者由来血清の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、2000年～2012年に採取された治療前の骨肉腫患者 10 名、非骨肉腫患者 10 名、および健常者 8 名から採取された血液より血清を分離し RNA 抽出を行った。それぞれの検体より RNA 抽出を行い、miR-133a および *cel-miR-39* の発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

(11)骨肉腫細胞の膜タンパク質のプロテオーム解析による治療標的候補の探索のための基盤的技術の開発

細胞：骨肉腫細胞 (HOS、HMMG/HOS、143B、MG63) および骨芽細胞 (hFOB) を使用した。

ビオチン標識法：培養細胞を PBS で洗浄し血清タンパク質を除去した後、膜表面に存在するタンパク質をビオチン化した。ビオチン化試薬としてビオチンとタンパク質結合部位との

間にジスルフィド結合が入っているものを使用した。全タンパク質を細胞から抽出し、ビオチン化されたタンパク質をアビジンカラム(ピアス社)で回収した。そして、還元剤でカラムを処理することで、ビオチン・アビジン複合体からタンパク質を回収した。最後に遠心濃縮によりタンパク質を濃縮した。

ペプチド調整と質量分析：回収されたビオチン化タンパク質をトリプシンで切断してペプチド化し、質量分析装置 (OrbiTrap XL、サーモ社) にてペプチドの精密質量を測定した。得られたペプチドのデータについて、MasCot ソフトウェア (マトリックス・サイエンス社) を使用してデータベース検索を行い、ペプチドの同定および半定量を行った。

(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。

ヒト組織標本を用いた解析に関しては、文部科学省および厚生労働省による疫学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、事前に各施設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 製剤の大量合成法の最適化及び予備安定性試験

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初期製法から約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、合成方法が改善された結果、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

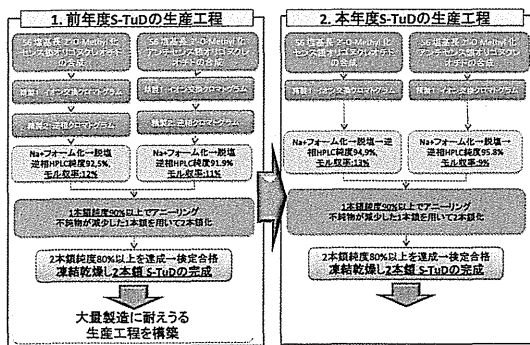
製が3回は必要だったところ、各1本鎖共、陰イオンクロマトグラフィーの精製のみで望ましい純度が確保できることをS-TuD-NC21nt-1の合成に際して確認した。

これらの製造工程が改善した結果の比較を前年度分として主に精製の工程が短縮され、治験薬の実製造に適した各工程の最適化と単純化が達成された。

予備的な安定性試験に関しては、1本鎖部分の不純物の定量的解析と配列解析、2本鎖純度検定を実施した。S-TuDの安定性試験はこれまで実施された実績がなかったが、凍結乾燥状態での1年間の安定性試験を実施した。温度は-20℃及び5℃の2つの温度設定で実施した。また試験は質量分析、吸光度試験、二本鎖の純度試験及びエンドキシシン検定を各時点で測定し、物性及び生物学的な変化の有無を確認した。

その結果、2つの温度設定の各期間において規格設定値を超える変化は確認できなかった。このため、S-TuD凍結乾燥品の保管温度は冷凍保存だけでなく、冷蔵保存が可能であることが示された。

S-TuD大量合成プロトコルの単純化



(2)S-TuD の超微量検出法の開発

これまでに miR-122RNA を標的とする S-TuD122 を材料系に選び、S-TuD122 に特異的な primer を用いて半定量的 RT-PCR さらには、real-time RT-PCR による超微量検出法の開発に成功し、検量線の解析から fM の精製標品の検量線の濃度まで検出できる系が作成できた。現在 S-TuD の種類によらず使用できる Stem II 領域に対する universal primer set を使用して、ほぼ同程度の感度で検出する系も確立した。

(3)S-TuD の免疫反応誘導性の検討

種々の S-TuD (10nM) や positive control としての Poly (I::C) (100ng/ml) を HCT116 細胞に transfection 後 7 ないし 24 時間後に RNA を抽出して、各内在性遺伝子 mRNA 量を定量的 PCR で定量した。その結果、S-TuD を transfection した細胞は、いずれの Interferon 応答遺伝子群の誘導をしないことが示された。

(4)S-TuD の血清中での安定性の評価

S-TuD をマウス血清や、ヒト血清内に添加して 37℃ で保温して解析したところ、3 日以上にわたってほぼ消化されることなく血中で安定に存在することが確認された。

(5)ヒト骨肉腫マウス移植モデルを用いた S-TuD-133a 有効性試験

はじめに骨内腫瘍形成後、断脚モデルを検討したが、手技の不安定性や処置時間の問題等から、比較可能な群数での実験モデルの作成に至らなかった。そこで、再現性の高いことが期待できる皮下腫瘍作成後、切除モデルに移行し、外科的処置後の転移検証モデルを確立した。S-TuD-133a 単体、S-TuD-100 単体、それらの組み合わせ、シスプラチンとの併用、A6K キャリアの併用の群を設定して、8 週間の静脈内反復全身投与試験を行った。

0.1mg/kg の S-TuD-100 または S-TuD-133a の全身投与により、がん幹細胞分画の阻害性が見られた。両者の併用による効果の増強は、より長期間の延命効果の検証試験において確認する必要が示唆された。転移抑制や延命効果に関しては、有意差が出た時点において、至適投与量の決定ができると思われる。

DDS である A6K の添加による、腫瘍抑制効果の増強は確認されなかった。これは、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ためであると考えられる。すなわち、S-TuD 単剤での全身での奏効性が確認されたといえる。

S-TuD 単独での毒性は、S-TuD-133a および S-TuD-100 の両者において見られなかった。シスプラチン併用群では、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たが、S-TuD 併用投与による毒性の増強はみられなかった。

(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

以下のデータにおける図表等詳細データは伊藤らの分担研究報告書に記載している。

【一般状態】

全症例において、S-TuD 投与に起因すると思われる副作用は確認されなかった。局所再発が認められた症例 H、と症例 I、および肺転移が起り死亡した症例 D を除き、投与症例群に、体温、体重、排尿、排便、活動性、食欲に大きな変動は認められなかった。

【治療経過】

全症例において、S-TuD 治療投与プロトコルが完了、あるいはプロトコル途中で死亡している。

症例 A,B,C,F,および G は投与プロトコルを完遂し、転移や再発は現在認められていない。

症例 E は投与プロトコルを完遂後、術後 1 年で右腎臓への転移を認めた。

症例 H は外科手術で腫瘍を完全切除できず、再発を認めた。

症例 D,I は術後早期に、S-TuD 治療投与プロトコル中に死亡した。

【血液検査】

全血球計算: 症例 H では術後、局所再発した腫瘍からの出血が著しかったことに起因すると思われるヘマトクリット値の低下が起きた。症例 E では術後から血小板の値が低下した(全身状態に異常は認めなかった)。それ以外の症例では特に大きな問題は認められなかった。

血液化学検査: 術前に ALP が正常値(<254 IU/L)を越えていた症例は、症例 H の 1 例を除き術後には正常値に帰した。腫瘍を除去し切れなかった症例 H の ALP 値は一定して高値を推移し、症例 I の ALP 値は再発が発覚した頃に急激に上昇した。

【X 線・CT 検査】

術後に X 線および CT 検査にて再発や転移は 3 症例で認められた。転移症例は症例 D(肺転移)、症例 I(胸腔内再発)、および症例 E(右腎臓への転移)であった。その他の 6 例では、現在までの術後 3 ヶ月～1 年に渡って転移は認められていない(外科手術で腫瘍を除去し切れなかった症例 H を含む)。

イヌ自然発生骨肉腫症例に対する有効性・安全性評価

番号	犬種	年齢	性別	発生部位	初診時転移	転移の有無・部位	局所再発	経過観察期間	転帰
A	バグ	11	F	大腿骨	なし	なし	なし	6ヵ月	CDF
B	ジャーマン・シェパード	9	M	肋骨	なし	なし	なし	12ヵ月	CDF
C	ワイベット	12	F	大腿骨	なし	なし	なし	3ヵ月	CDF
D	アイリッシュ・セッター	10	M	上腕骨	なし	肺、大腿骨	なし	2ヵ月	DOD
E	チワワ	8	M	大腿骨	なし	腎臓	なし	12ヵ月	AWD
F	ミニチュア・シュナウザー	7	F	下顎骨	なし	なし	なし	6ヵ月	CDF
G	ゴールデン・レトリバー	6	M	下顎骨	なし	なし	なし	6ヵ月	CDF
H	雑種	15	M	上顎骨	なし	なし	あり *原発巣遺残	5ヵ月	DOD
I	ドールマン	9	F	肋骨	なし	肺	なし	2ヵ月	DOD

(7)イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験における骨肉腫組織・血清中 miR-133a 解析

組織: 本研究班のイヌ自然発症骨肉腫に対して S-TuD-133a 投与を行った症例の内、手術検体が確保可能であった 5 症例、6 検体での腫瘍内 miR-133a 発現レベルを解析した。6 検体の miR-133a 発現レベルは様々であった。

症例 No.4 では、初発時の検体と転移時の検体の比較が行え(いずれも S-TuD-133a 投与後)、転移時は初発時と比較して、腫瘍内 miR-133a の発現が上昇していた。

また他の症例と比較して腫瘍内 miR-133a の発現レベルが異常高値であった症例 No.9 は、断脚後 4 ヶ月で死亡しており非常に予後不良の症例であった。

しかし、No.2 のように発現レベルが他と比較して高値でなくても予後不良である症例も認められた。

いずれの症例も S-TuD-133a 投与前の腫瘍組織また正常組織の確保が出来ず、症例毎、症例間の十分な比較が行えておらず、今後の課題である。

血清: 以下の 2 項目において検討した。

①S-TuD-133a 投与前血清中 miR-133a 発現量: 図 2 に症例毎の投与前血清中 miR-133a の qRT-PCR の結果を示した。その発現レベルと表 1 に示す予後との間に相関は認めなかった。しかし、正常犬 6 症例との比較では、骨肉腫症例では血清中 miR-133a の発現が高い傾向にあった。

②S-TuD-133a 投与前後 miR-133a 発現推移: S-TuD-133a 投与前と比較すると手術前(1 回または 2 回投与後)では、有意に血清中 miR-133a の発現レベルが低下していた(p

く 0.05)。しかし、断脚後 1.5 ヶ月、3 ヶ月では有意差を認めず、断脚後に発現が再度上昇する症例も認めた。

(8)岡山大学における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a 標的遺伝子の発現解析

2000～2012 年に岡山大学整形外科で治療を行った 25 症例のヒト骨肉腫切除標本の凍結標本を収集した。患者群の内訳は、男性 11 例、女性 14 例、平均年齢 31 歳であった。

これらの検体より常法にて RNA を抽出した。Real-time PCR にて β -actin 発現量を測定した結果、いずれの発現も確認可能であることを確認した。

ANXA2 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、ANXA2 の発現高値と患者予後良好が相関する傾向にあることが判明した。ANXA2 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。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、ANXA2 高値を示す患者群の予後は ANXA2 低値を示す患者群の予後よりも良好である傾向が示され、10 年全生存率はそれぞれ 75%、50%であった (log-rank test: $p = 0.430$)。

同様に、Disease-free survival を Kaplan-Meier 法により解析した結果、ANXA2 高値を示す患者群の予後は ANXA2 低値を示す患者群の予後よりも良好である傾向にあり、5 年無病生存率はそれぞれ 48%、30%であった (log-rank test: $p = 0.320$)。

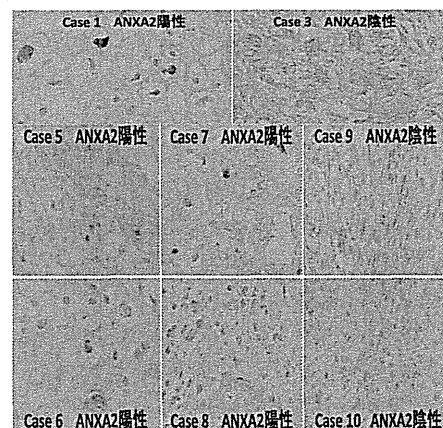
(9)鳥取大学における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a 標的遺伝子の発現解析

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 10 例を集め、薄切および脱パラフィン後、抗 ANXA2 抗体を用いて免疫組織化学をおこなった。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、年齢・性別・発生部位・組織型・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・術後転移の有無を抽出した。この患者群は男性 3 例、女性 7 例、平均年齢 16.1 歳で、発生部位は大腿骨 5 例、脛骨 2 例、腓骨 2 例、上腕骨 1 例であった。ヒト骨肉腫組織における ANXA2 発現は、腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に観察された。

ANXA2 陽性腫瘍細胞は、類骨形成能の高い部位で比較的多く観察される一方で、類骨形成が乏しいあるいは見られない部位では、ほとんど観察されなかった。本研究で解析した 10 例中、ANXA2 陽性例および陰性例はそれぞれ 5 例ずつであった。治療抵抗性を示し死亡に至った症例は 5 例であり、内 4 例は術後に肺転移を生じた。肺転移陽性症例 4 例における ANXA2 陽性例は 1 例、陰性例は 3 例であった。一方、肺転移陰性症例 6 例における ANXA2 陽性例は 4 例、陰性例は 2 例であった。換言すれば、ANXA2 陽性例は、肺転移陽性群において 4 例中 1 例 (25.0%)、一方肺転移陰性例群において 6 例中 4 例 (66.7%) と前者で低値を示しており、ANXA2 発現低下が肺転移に関与することが示唆された。稀少サンプル数のため統計学的な有意差は得るには至らなかった。ANXA2 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。

(図 1)

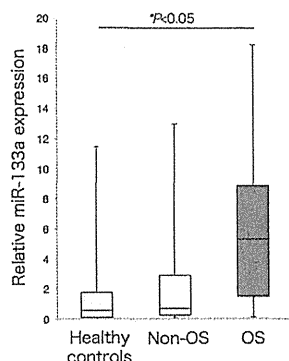
(図 2)



転移陰性例 (n=6)
ANXA2陽性症例率 4/6 (66.7%)

(10)骨肉腫患者由来血中 miRNA 発現の解析

2010 年から 2012 年に採取された治療前の骨肉腫患者 10 名、非骨肉腫患者 10 名、および健常者 8 名から採取された血液より血清を分離し RNA 抽出を行った。それぞれのサンプルにおける miRNA の発現を RT-PCR 法で確認したところ、miR-133a 発現が健常者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清で有意に発現が高いことが示された。特に、骨肉腫患者群と健常者群の間には統計学的有意差を認めた (図 3)。



(図3) 血中 miR-133a の発現解析

さらに、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示し、単癌状態を示すバイオマーカーとしての可能性が示された。

(11)骨肉腫細胞の膜タンパク質のプロテオーム解析による治療標的候補の探索のための基盤的技術の開発

本研究では、膜タンパク質を特異的に回収するためにビオチン化試薬を使用した。本試薬は膜に浸透することなく、細胞外に存在するタンパク質だけを標識する。標識後に全タンパク質を回収し、アビジンカラムで精製することで、膜タンパク質等の細胞外タンパク質を回収することができる。本手法が発表された当初は、カラム内にて形成されるビオチン・アビジン複合体からタンパク質を回収することが著しく困難であり、効率よく膜タンパク質を精製することが困難だった。その後、ビオチンとタンパク質の間にジスルフィド結合付スペーサーを入れることで、還元剤処理によって効率よくタンパク質を回収できるようになった。本研究では新しくスペーサーにジスルフィド結合の入った新しいスペーサー付ビオチン化試薬を用い、骨肉腫の膜タンパク質の網羅的解析を行った。

膜タンパク質の網羅的解析を行った。コントロールとしてビオチン化試薬の入らないバッファーで処理した細胞から同様に抽出・精製したペプチドを使用した。差分解析を行うことで膜タンパク質の同定を試みた。また、骨肉腫細胞の対照として骨芽細胞を使用した。標識、精製、濃縮などさまざまな実験条件を検討し、骨肉腫細胞における膜タンパク質の同定を行った。それぞれの細胞株より、平均して300種類ほどの膜タンパク質を同定した。

同定されたタンパク質の中には今までの報告から機能的に重要な役割を果たすタンパク質や創薬標的になりうるタンパク質が含まれていた。骨肉腫と骨芽細胞の間に発現差のあるタンパク質、骨肉腫細胞間で共通して発現する膜タンパク質を同定した。

D. 考察

miRNA 阻害剤 S-TuD による新たな革新的がん治療の実用化に向けて解決すべき課題には、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、標的遺伝子を含めた臨床側面との関連性、など、様々な検討事項が存在する。各分担研究者らにより、平成26年度にあらかじめ想定していた計画課題は順調に遂行され、臨床応用への基盤作りが整いつつある。

川井らの研究により、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た。予備的な安定性試験を実施し、-20℃及び5℃で二本鎖の凍結乾燥品は安定であることを確認した。これらのことから治験薬製造開始が可能なる状況が達成できたと考えられる。

伊庭らによるS-TuDの超微量検出法の開発およびS-TuDの血清中での安定性の検証により、生体各組織内でのS-TuDの薬物動態を解析するための分子基盤が確立された。血中での安定性は、S-TuDに存在する2重鎖のstem構造と全ヌクレオチドが2'-O-methyl化していることを反映していると考えられ、RNA医薬品として優れた性質を持つことが示された。

松田らの研究により、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。両者の併用による効果の増強は、より長期間の延命効果の検証試験において確認する必要が示唆されたが、それにより、臨床に即した形での本剤の至適投与量の設定が可能となり、さらなる大型動物モデルでの前臨床試験、ヒトへの臨床試験への架け橋となることが期待できる。S-TuDの単独投与における毒性は見られず、シスプラチンとの併用においても毒性の増強は見られなかった。転移抑制や延命効果に成果が出た時点において、臨床に即した形での有効性の実証や、

至適投与量の決定が可能となる。

イヌ骨肉腫に対する有効性試験に先だって、d 手術前に S-TuD 単独で投与された 4 例における有害事象を評価したが、明らかな毒性は認められなかった。また、手術前に単剤投与を行った 4 症例を含む抗がん剤を併用した 9 症例においても抗がん剤の毒性の増強はみられなかった。この結果から、S-TuD-133a の生体内における一定の安全性が確認された。S-TuD のイヌ自然発生骨肉腫症例に対する有効性試験においては、治療後経過観察期間を継続中であるが、現時点で一定の効果が期待できる。本報告書を作成する時点での無症候期間の平均値は 184.5 日、中央値は 185 日である。この結果は、外科手術を施し補助療法で CBDCA を投与した犬骨肉腫症例群の無転移期間を現時点では越していないが経過観察期間が短いためであり、今後とも定期検査を行い転移や再発の有無の追跡調査を継続することにより、S-TuD-133a の有効性が次第に明らかとなる。

イヌ血清中の miR-133a は、全ての症例で認められ、正常犬との比較では骨肉腫症例では血清中 miR-133a 発現レベルは高い傾向にあった。また、転移や再発に伴い上昇する症例もあり、予後や再発の判定のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。現在転移がない症例群においても、血清中 miR-133a の数値は下降している症例(A,C,G,H)、上昇している症例(B,F)に分かれており、今後とも推移を調査し、転移や再発の有無を調べ、相関性を調査する必要があると思われる。今後、血清中 miR-133a が上昇した症例で転移や再発が認められ、下降した症例では認められないようであれば、血清中 miR-133a が ALP より優れた腫瘍マーカーとして利用できる可能性が出てくると思われる。症例 E は、左後肢腫瘍の病理組織検査により悪性線維性組織球肉腫の可能性が高いと診断され、右腎臓の転移発見時に血清中 miR-133a の発現の上昇が確認されており、骨肉腫以外の腫瘍においても miR-133a が転移に関与している可能性が示唆され、S-TuD-antimiR-133a の適応対象が拡大する可能性が示唆された。肺への浸潤を起こした症例 I では血清内 miR-133a の値は S-TuD 投与にもかかわらず常に一定であり、かつ早期再発を起こしたことから、再発を予兆していたことが考えられる。症例 A、症例 G は、

術前から血清中 miR-133a の発現量が低下し、術後も低い値を保っており、症例 C は術後の S-TuD 投与から、miRNA-133a の発現量の低下が見られたが、これは S-TuD 投与によるものと思われる。

腫瘍組織中の miR-133a の発現量を検査した結果、検索できた 5 症例(症例 A,D,E,F,I) 全ての腫瘍組織中に miR-133a が確認された。なかでも早期に再発し胸腔内および肺へ浸潤がみられた症例 I の腫瘍組織の miR-133a は、数千倍という極めて高い値を示した。しかし、それぞれの腫瘍組織中の miR-133a の発現量の値に大きな数値の分散がみられたことから、その値で再発や転移を予測することは不可能であると思われる。しかし、S-TuD 投与により腫瘍組織内の miR-133a 発現量が減少するかは、今回の試験では確かめられなかった。今後、骨肉腫症例に対し S-TuD を試験する際には、S-TuD 投与以前と手術時に組織を採材し、組織内の miRNA 発現推移を調べる必要があると思われる。また現時点では症例数が十分とは言えず、骨肉腫担がん犬の S-TuD 投与症例を増やすことが重要である。さらには、現在の S-TuD 投与症例の追跡調査や、in vitro での犬骨肉腫細胞の miR-133a の発現と浸潤能の相関性の調査、S-TuD 投与前後の組織採材による S-TuD の組織内 miRNA 抑制の評価などが必要であると考えられた。

miR-133a の標的遺伝子群のうち、ANXA2 は骨肉腫細胞において最も浸潤性を制御する遺伝子であることが、共同研究者である藤原らにより特定されている。この ANXA2 遺伝子発現高値は、国立がん研究センターにおける骨肉腫症例の予後良好と有意な相関関係にあった。本研究では、岡山大学における患者予後との解析を行った結果、ANXA2 遺伝子発現高値は、有意差はみられなかったものの、患者予後良好と相関する傾向にあることが判明した。本研究においては RNA が良好な条件で保存されていた対象患者の除外により対象患者数が少なかったことが原因の一つと考えられた。また、骨肉腫原発巣における ANXA2 発現との関連性を免疫組織染色により検討した結果、肺転移陰性例の多くが ANXA2 陽性例であるのに対し、肺転移陽性症例の 75% が ANXA2 陰性例であり、ANXA2 発現低下が肺転移促進に関与してい

る可能性が示唆された。但し、統計学的有意差を得るには至らず、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骨肉腫における ANXA2 の発現意義を転移予測マーカー等の観点から明らかにすると共に、miR-133a 発現量との関連性を併せて検討する必要がある。

これまでに骨肉腫患者血清における発現と臨床背景はどのように相関するかは分かっておらず、分泌型 miR-133a が骨肉腫患者において担癌状態を表しているかどうかを検討した結果、miR-133a 発現が健常者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清で有意に発現が高いことが明らかとなった。統計学的解析による有意差も確認されたが、健常者にも miR-133a が高値を示す症例があった。これは miR-133a が筋特異的 miRNA であり、筋組織の状態についての情報も検討に入れる必要がある。また、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示すことが明らかになった。未だ 2 症例の検討に過ぎないが、今後の症例の蓄積が必要である。この結果により、単癌状態を示すバイオマーカーとしての可能性が示された。今後は多くの症例へ解析を拡げ、バイオマーカーとしての可能性、および、S-TuD-133a による治療のモニタリングが可能となるか検討が必要である。

今回骨肉腫細胞および骨芽細胞を用いて膜タンパク質の網羅的解析を実施したが、骨肉腫細胞において同定された膜タンパク質の発現制御にどの miRNA がどのように関わっているかを調べるために、特定の miRNA の導入前後の細胞を比較解析して、直接的・間接的に制御される膜タンパク質を調べることが次のステップである。ゲノム情報から膜貫通ドメインをもつタンパク質は約 5000 個存在する。一方、本実験手法で同定された膜タンパク質はその 1 割ほどである。予測されるタンパク質の数と実際にプロテオーム解析で同定された数を直接的に比較することはできないが、本研究のタンパク質の網羅性を向上させる余地が存在すると考えられる。すなわち、標識効率、回収率、質量分析の検出限界、などによって網羅性が制限されている可能性がある。今回の検討で標識効率および回収率は最適化をすでに図っており、今以上の網羅性は望み難い。一方、ペプチドを多次元分離するなどによ

って質量分析の検出限界を向上させることによって、同定段階での網羅性を向上させることが可能である。また、細胞間でのばらつきに対して、手法の標準化が課題として残されている。骨肉腫細胞間で共通したタンパク質が少なかった点については、骨肉腫の多様性を反映している可能性がある。臨床病理学的な観察から、症例間、腫瘍間、腫瘍内において骨肉腫は多様性に富んでいることが報告されている。骨肉腫においては、化学療法剤による補助療法と切除術が標準治療として確立されているが、奏効率は 7 割程度に留まっている。治療法の開発のために多様性の分子レベルの解明が求められている所以である。本研究で示唆された、骨肉腫細胞間での膜タンパク質発現パターンの不均一性が、*in vivo* の骨肉腫細胞の多様性とどのように関係しうかを明らかにし、分子レベルに基づく症例および腫瘍の層別化に資するバイオマーカーを特定することが本研究の出口である。

E. 結論

本年度予定していた、S-TuD 合成プロトコルの最適化、S-TuD 製剤の安定性評価、S-TuD 製剤の超微量検出法の開発、S-TuD の血清中での安定性評価、単癌マウスに対する有効性試験、イヌ自然発生骨肉腫症例に対する有効性および安全性試験、それに伴う腫瘍内および血清中 miRNA の発現解析が予定通り行われた。これらの研究結果により、新規 miRNA 阻害剤 S-TuD の骨肉腫に対する臨床応用に向けての基盤が構築された。将来的には骨肉腫の範疇を超え、miRNA 発現異常を示す様々な悪性腫瘍やその他の疾患に対する S-TuD の応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells Fujiwara T, 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. *Stem Cells*. 2014 Apr;32(4):959-73.
2. Phase I and pharmacokinetic study of trabectedin, a DNA minor groove binder, administered as a 24-h continuous infusion in Japanese patients with soft tissue sarcoma
Ueda T, Kakunaga S, Ando M, Yonemori K, Sugiura H, Yamada K, Kawai A. *Invest New Drugs*. 2014 Apr 3.
3. STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors.
Yoshida A, Tsuta K, Ohno M, Yoshida M, Narita Y, Kawai A, Asamura H, Kushima R. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):552-9.
4. Proteomics Identified Overexpression of SET Oncogene Product and Possible Therapeutic Utility of Protein Phosphatase 2A in Alveolar Soft Part Sarcoma.
Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. *J Proteome Res*. 2014 Mar 31.
5. International expert opinion on patient-tailored management of soft tissue sarcomas.
Blay JY, Sleijfer S, Schöffski P, Kawai A, Brodowicz T, Demetri GD, Maki RG. *Eur J Cancer*. 2014 Mar;50(4):679-89.
6. Immediate soft-tissue reconstruction using a rectus abdominis myocutaneous flap following wide resection of malignant bone tumours of the pelvis.
Ogura K, Miyamoto S, Sakuraba M, Chuman H, Fujiwara T, Kawai A. *Bone Joint J*. 2014 Feb;96-B(2):270-3
7. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma.
Kobayashi E, Satow R, Ono M, Masuda M, Honda K, Sakuma T, Kawai A, Morioka H, Toyama Y, Yamada T. *Oncology*. 2014;86(2):94-103.
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.
Nakamura T, Matsumine A, Uchida A, Kawai A, Nishida Y, Kunisada T, Araki N, Sugiura H, Tomita M, Yokouchi M, Ueda T, Sudo A. *Int Orthop*. 2014 Apr;38(4):825-30.
9. Favorable outcome after complete resection in elderly soft tissue sarcoma patients: Japanese Musculoskeletal Oncology Group study.
Yoneda Y, Kunisada T, Naka N, Nishida Y, Kawai A, Morii T, Takeda K, Hasei J, Yamakawa Y, Ozaki T; Japanese Musculoskeletal Oncology Group. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Jan;40(1):49-54.
10. Prognostic factors in elderly osteosarcoma patients: a multi-institutional retrospective study of 86 cases.
Iwata S, Ishii T, Kawai A, Hiruma T, Yonemoto T, Kamoda H, Asano N, Takeyama M. *Ann Surg Oncol*. 2014 Jan;21(1):263-8
11. 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, Kawai A, *Oncogene*. 2014 Oct 16;33(42):5006-16.
12. Clinicopathologic analysis of spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma. Yasui N, Yoshida A, Kawamoto H, Yonemori K, Hosono A, Kawai A. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec 31.
 13. Reversible hair depigmentation in a Japanese female treated with pazopanib. Kobayashi E, Koyama T, Kobayashi K, Setsu N, Kawashima M, Kawai A. *J Dermatol*. 2014 Nov;41(11):1021-2.
 14. Chronic expanding hematoma with a significantly high fluorodeoxyglucose uptake on ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography, mimicking a malignant soft tissue tumor: a case report. Nishida Y, Kobayashi E, Kubota D, Setsu N, Ogura K, Tanzawa Y, Nakatani F, Kato Y, Chuman H, Kawai A. *J Med Case Rep*. 2014 Oct 21;8:349.
 15. Early Mobilization after Free-flap Transfer to the Lower Extremities: Preferential Use of Flow-through Anastomosis. Miyamoto S, Kayano S, Fujiki M, Chuman H, Kawai A, Sakuraba M. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2014 Apr 7;2(3):e127.
 16. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Sep 2;3:e189.
 17. Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma. Kikuta K, Morioka H, Kawai A, Kondo T. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug 28.
 18. An analysis of factors related to the tail-like pattern of myxofibrosarcoma seen on MRI. Kikuta K, Kubota D, Yoshida A, Morioka H, Toyama Y, Chuuman H, Kawai A. *Skeletal Radiol*. 2015 Jan;44(1):55-62
 19. Multiple metastases from histologically benign intraarticular diffuse-type tenosynovial giant cell tumor: a case report. Asano N, Yoshida A, Kobayashi E, Yamaguchi T, Kawai A. *Hum Pathol*. 2014 Nov;45(11):2355-8.
 20. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T. *Genome Res*. 2014 Sep;24(9):1411-20.
 21. The prognosis of osteosarcoma occurring as second malignancy of childhood cancers may be favorable: experience of two cancer centers in Japan. Yonemoto T, Hosono A, Iwata S, Kamoda H, Hagiwara Y, Fujiwara T, Kawai A, Ishii T. *Int J Clin Oncol*. 2014 Jul 15.
 22. Factors that influence functional outcome after total or subtotal scapulectomy: Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG) study. Hayashi K, Iwata S, Ogose A, Kawai A, Ueda T, Otsuka T, Tsuchiya H. *PLoS One*. 2014 Jun 17;9(6)
 23. A randomized phase II/III trial of perioperative chemotherapy with adriamycin plus ifosfamide versus

- gemcitabine plus docetaxel for high-grade soft tissue sarcoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1306.
Kataoka K, Tanaka K, Mizusawa J, Kimura A, Hiraga H, Kawai A, Matsunobu T, Matsumine A, Araki N, Oda Y, Fukuda H, Iwamoto Y; Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Aug;44(8):765-9.
24. Differential SALL4 immunoexpression in malignant rhabdoid tumours and epithelioid sarcomas.
Yoshida A, Asano N, Kawai A, Kawamoto H, Nakazawa A, Kishimoto H, Kushima R. *Histopathology*. 2015 Jan;66(2):252-61
 25. Prognostic significance of promyelocytic leukemia expression in gastrointestinal stromal tumor; integrated proteomic and transcriptomic analysis.
Ichikawa H, Yoshida A, Kanda T, Kosugi S, Ishikawa T, Hanyu T, Taguchi T, Sakumoto M, Katai H, Kawai A, Wakai T, Kondo T. *Cancer Sci*. 2015 Jan;106(1):115-124.
 26. 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*, 588:1630-1636 (2014)
PMID 24607481
 27. Kobayashi, K., Sakurai, K., Hiramatsu, H., Inada, K., Shiogama, K., Nakamura, S., Suemasa, F., Kobayashi, K., Imoto, S., Haraguchi, T., Ito, H., Ishizaka, A., Tsutsumi, Y., & Iba H. The miR-199a/Brm/EGR1 axis is a determinant of anchorage-independent growth in epithelial tumor cell lines. *Scientific Reports*, in press.
 28. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai Akira, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells*, 32:959-973, 2014
 29. Fujiwara T, Kawai A, Nezu Y, Fujita Y, Kosaka N, Ozaki T, Ochiya T. Circulating microRNAs in sarcoma: potential biomarkers for diagnosis and targets for therapy. *Chemotherapy*, 3:1000123, 2014
 30. Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Uotani K, Yoshida A, Ochiya T, Ozaki T. MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. *Biomed Res Int*, 2014:592868, 2014
 31. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. *RPN2* gene confers osteosarcoma cell
 32. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 2;3:e189
 33. Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Uotani K, Yoshida A, Ochiya T, Ozaki T. microRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. *Biomed Res Int*. 2014:592868.

34. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T
35. , 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*. 2014 32(4):959-973
36. Nakada E, Sugihara S, Kunisada T, Ozaki T. Long-term follow-up of resection-replantation for sarcoma in the distal radius. *J Orthop Sci*. 2014 19(5):832-837.
37. 国定 俊之, 武田 健, 藤原 智洋, 柳井 広之, 尾崎 敏文. 切除縁評価法の問題点: 悪性骨腫瘍 日整会誌. 2014 88(9):558-594
38. 藤原 智洋, 武田 健, 国定 俊之, 尾崎 敏文. 軟部腫瘍の診療における評価法の活用 関節外科 2014 33(10):182-210
39. Osaki M, Okada F, Ochiya T: MicroRNA therapy targeting cancer stem cells: A new paradigm for cancer treatment and prevention of tumor recurrence. *Ther Deliv* (in press)
40. Ohira T, Sunamura N, Nakayama Y, Osaki M, Okada F, Oshimura M, Kugoh H: miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting PITX1 mRNA in melanoma cells. *Sci Rep* 3(5): 8201, 2015
41. Tomohiro Fujiwara, Akira Kawai, Yutaka Nezu, Yu Fujita, Nobuyoshi Kosaka, Toshifumi Ozaki, and Takahiro Ochiya. Circulating MicroRNAs in Sarcoma: Potential Biomarkers for Diagnosis and Targets for Therapy, *Chemotherapy*. 2014; 3: 123
42. Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Ken Takeda, Koji Uotani, Aki Yoshida, Takahiro Ochiya, and Toshifumi Ozaki. MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. *Biomed Res Int*. 2014: 592868.
43. Fujiwara T, 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*. 2014 Apr;32(4):959-73.
44. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Sep 2;3:e189.
45. 藤原智洋, 尾崎敏文, 川井 章, 落谷 孝広. microRNA の発現抑制による骨肉腫を含むがん治療への応用. 医薬ジャーナル2014年12月号、第50巻、12号、p. 97-104、2014
46. 藤原智洋, 国定俊之, 武田 健, 尾崎 敏文. 軟部腫瘍の診療における評価法の活用 関節外科 2014年10月号、第33巻、33号、p. 184-203、2014
47. 藤原智洋, 榊原浩子, 川井 章. 骨転移の基本・がん種別特徴. 骨転移の診療とリハビリテーション、p. 72-84、医歯薬出版株式会社、東京、2014
48. Ichikawa H, Yoshida A, Kanda T, Kosugi SI, Ishikawa T, Hanyu T, Taguchi T, Sakumoto M, Katai H, Kawai A, Wakai T,