

図 2-6 : 症例 F X線・CT 検査

a : 術前肺野レントゲン検査 : 転移なし

b : 術前頭部レントゲン検査 : 右下顎骨筋突起陰影の減少を認める(矢印)。

c : 術前頭部 CT 検査 : 右下顎骨に眼窩まで広がる病変を認める(矢印)。

d : 術後 6 ヶ月肺野レントゲン検査 : 転移なし

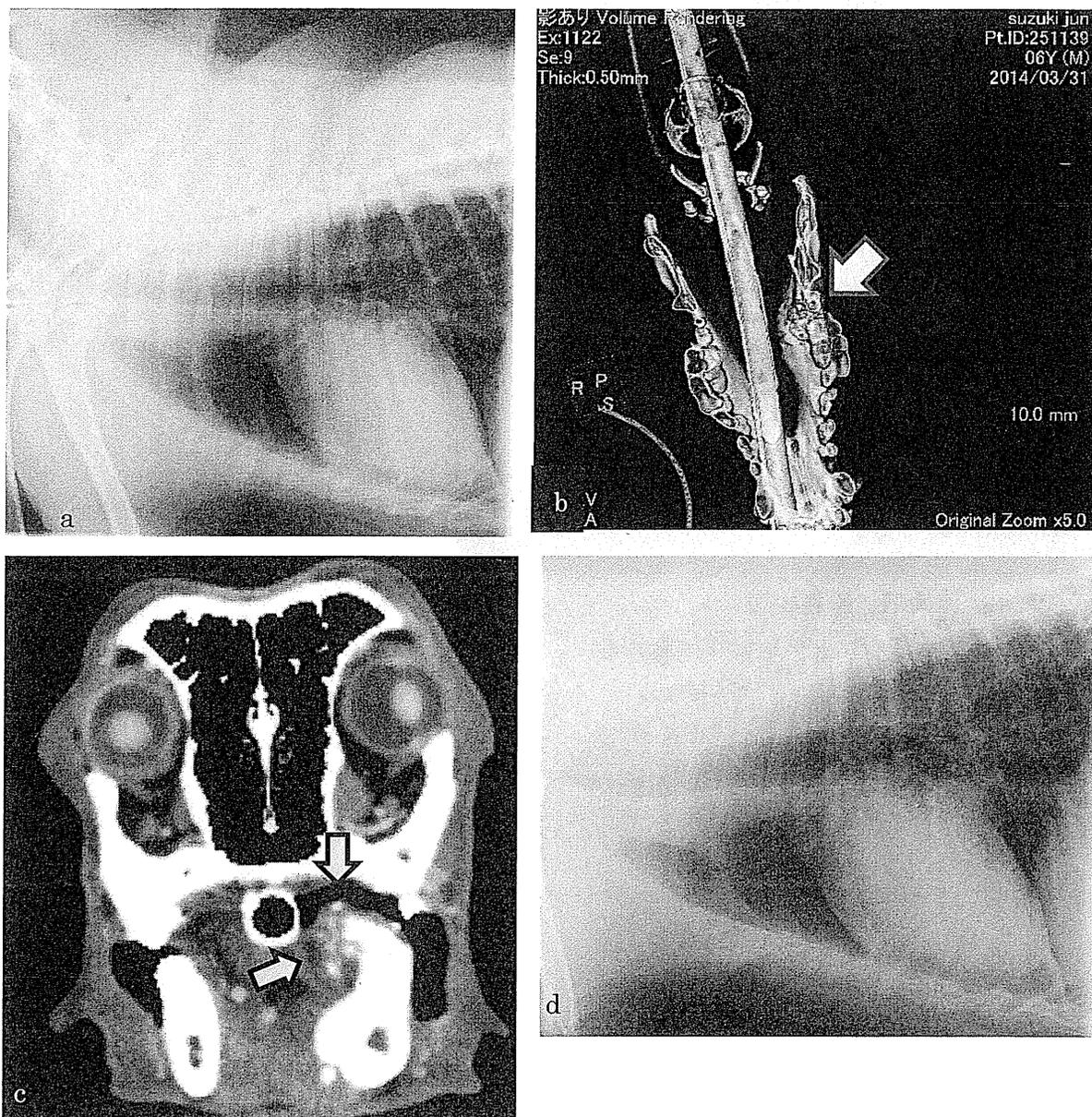


図 2-7：症例 G X線・CT 検査

a：術前肺野レントゲン検査：転移なし

b,c：術前頭部 CT 検査：右下顎骨、骨融解・骨増生の混合病変を認める(矢印)。

d：術後 6 ヶ月肺野レントゲン検査：転移なし

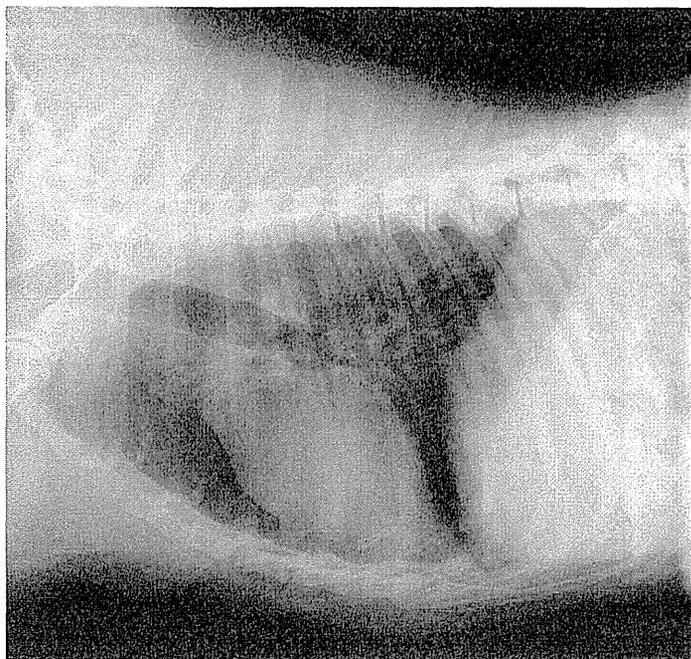


図 2-8 : 症例 H X線検査

術後 5 ヶ月肺野レントゲン検査 : 転移なし。

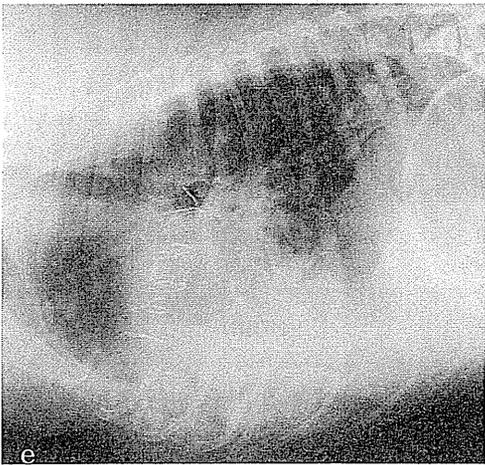
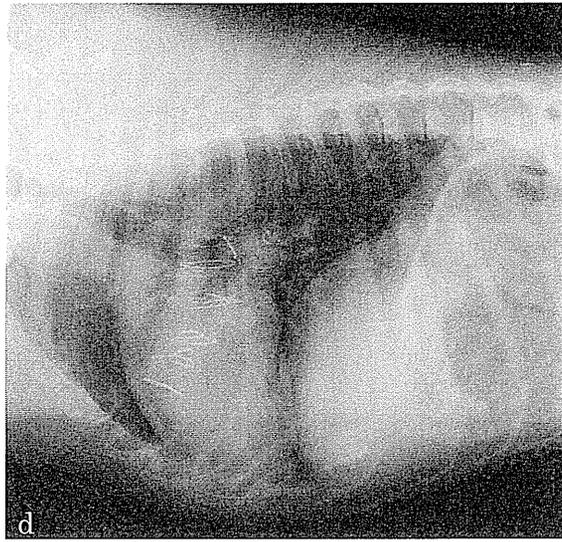
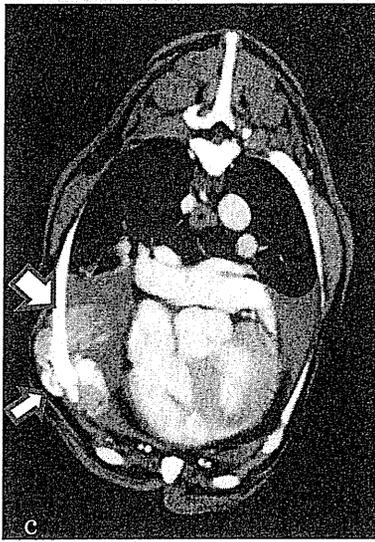
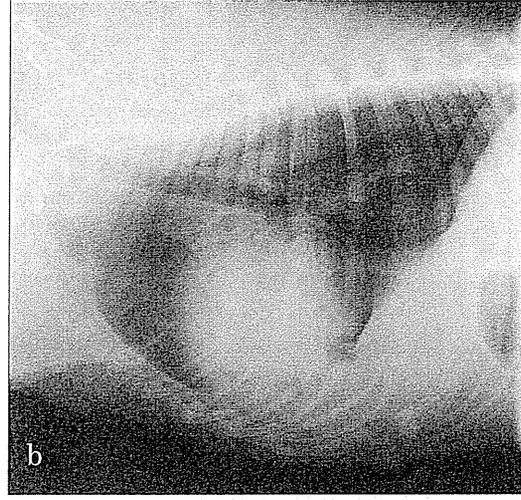
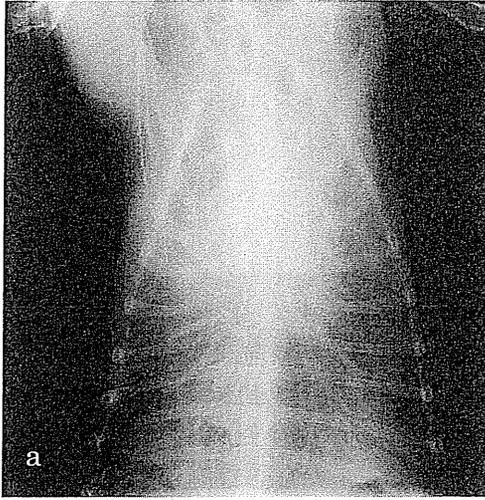


図 2-9 : 症例 I X線・CT 画像

- a,b : 術前レントゲン検査 : 心臓にシルエットサイン陽性、胸水を認める。
- c : 術前 CT 検査 : 胸壁に腫瘤性病変と右第 5 肋骨に骨吸収・骨増生の混合所見を認める(矢印)。
- d : 術後 2 ヶ月肺野レントゲン検査 : 転移なし。
- e : 術後 4 ヶ月肺野レントゲン検査 : 胸水貯留、および肺野全体への腫瘍の浸潤を認める。

Day	S-TuD 投与	投与経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	○	静脈	0.75mg			
3	○	静脈	1.50mg			
5	手術(左後肢断脚術)					
27	○	静脈	2.25mg	CBDCA	70mg/m ²	25.2mg
48	○	静脈	2.98mg	CBDCA	70mg/m ²	50.4mg
69	○	静脈	3.71mg	CBDCA	70mg/m ²	75.4mg
90	○	静脈	4.44mg	CBDCA	70mg/m ²	100.4mg
118				CBDCA	70mg/m ²	125.4mg

表 7-1 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 A

Day	S-TuD 投与	投与経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	○	静脈	3.3mg			
3	○	静脈	6.6mg			
5	手術(左前肢断脚)					
26	○	静脈	9.9mg	CBDCA	200mg/m ²	200mg
47	○	静脈	13.2mg	CBDCA	200mg/m ²	400mg
68	○	静脈	16.5mg	CBDCA	200mg/m ²	600mg
89	○	静脈	19.8mg	CBDCA	200mg/m ²	800mg

表 7-2 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 B

Day	S-TuD 投与	投与 経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	手術(左後肢断脚)					
16	○	静脈	0.9mg/kg	CBDCA	300 mg/m ²	144mg
40	○	静脈	1.8mg/kg	CBDCA	300 mg/m ²	288mg
68	○	静脈	2.7mg/kg	CBDCA	300 mg/m ²	432mg
89	○	静脈	3.6mg/kg	CBDCA	300 mg/m ²	576mg

表 7-3 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 C

Day	S-TuD 投与	投与経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	○	静脈	mg			
3	○	静脈	mg			
6	手術(左前肢断脚術)					
21	○	静脈	mg	CBDCA	270mg/m ²	mg
50	○	静脈	mg	CBDCA	270mg/m ²	mg
77	S-TuD および CBDCA 投与に来院されたが、右股関節の疼痛が強く、歩行困難。 レントゲン検査により右大腿骨骨頭領域に骨増生が認められる。S-TuD および CBDCA 投与中止					
91	右股関節に緩和的放射線治療実施、以降					
124	死亡					

表 7-4 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 D

Day	S-TuD 投与	投与 経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	手術(左後肢断脚)					
4	○	静脈	0.22mg	CBDCA	50mg/m ²	7.0mg
11	○	静脈	0.42mg	CBDCA	50mg/m ²	14.0mg
20	○	静脈	0.61mg	CBDCA	50mg/m ²	21.0mg
以降、近医にて CBDCA50mg/m ² /week を9回行ない、治療を終了とした。						
治療終了時		静脈	0.61mg	CBDCA	50mg/m ²	84.0mg
1year	手術(右腎臓摘出)					

表 7-5 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 E

Day	S-TuD 投与	投与経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	手術(右下顎骨片側部分切除および動注リザーバー設置)					
21	○	動脈	0.51mg	CBDCA	10mg	10mg
35	○	動脈	1.02mg	CBDCA	10mg	20mg
52	○	動脈	1.52mg	CBDCA	10mg	30mg
80	○	動脈	2.02mg	CBDCA	10mg	40mg
101	○	動脈	2.52mg	CBDCA	10mg	50mg
122	○	動脈	3.02mg	CBDCA	10mg	60mg
143	○	動脈	3.52mg	CBDCA	10mg	70mg
164		動脈		CBDCA	5mg	75mg

表 7-6 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 F

Day	S-TuD 投与	投与経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	○	静脈	4.5mg			
4	○	静脈	9.0mg			
9	手術(左下顎骨片側部分切除および動注リザーバー設置)					
21	○	動脈	14.0mg	CBDCA	30mg	30mg
31	○	動脈	19.0mg	CBDCA	30mg	60mg
52	○	動脈	24.0mg	CBDCA	30mg	90mg
73	○	動脈	29.0mg	CBDCA	30mg	120mg
101	○	動脈	34.0mg	CBDCA	30mg	150mg
122	○	動脈	39.0mg	CBDCA	30mg	180mg

表 7-7 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 G

Day	S-TuD 投与	投与 経路	S-TuD 合計 投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0	手術(上顎腫瘍減容積手術および動注カテーテル留置)					
0		動脈		CBDCA	CBDCA 30mg	CBDCA 30mg
12		動脈		CBDCA ADM	CBDCA 30mg ADM 2mg	CBDCA 60mg ADM 2mg
26	○	動脈	2.2mg	CBDCA ADM	CBDCA 25mg ADM 1mg	CBDCA 85mg ADM 3mg
40	○	動脈	4.4mg	CBDCA	CBDCA 25mg	CBDCA 110mg ADM 3mg
54	○	動脈	6.6mg	CDDP	CDDP 1.5mg	CBDCA 110mg ADM 3mg CDDP 1.5mg
68	○	動脈	8.6mg	CBDCA	CBDCA 30mg	CBDCA 140mg ADM 3mg CDDP 1.5mg
82	○	動脈	11.1mg	CBDCA	CBDCA 30mg	CBDCA 170mg ADM 3mg CDDP 1.5mg
96	○	動脈	13.1mg	CBDCA	CBDCA 20mg	CBDCA 190mg ADM 3mg CDDP 1.5mg
106	○	動脈	17.1mg (試験的 に倍量 投与)	CBDCA	CBDCA 20mg	CBDCA 210mg ADM 3mg CDDP 1.5mg

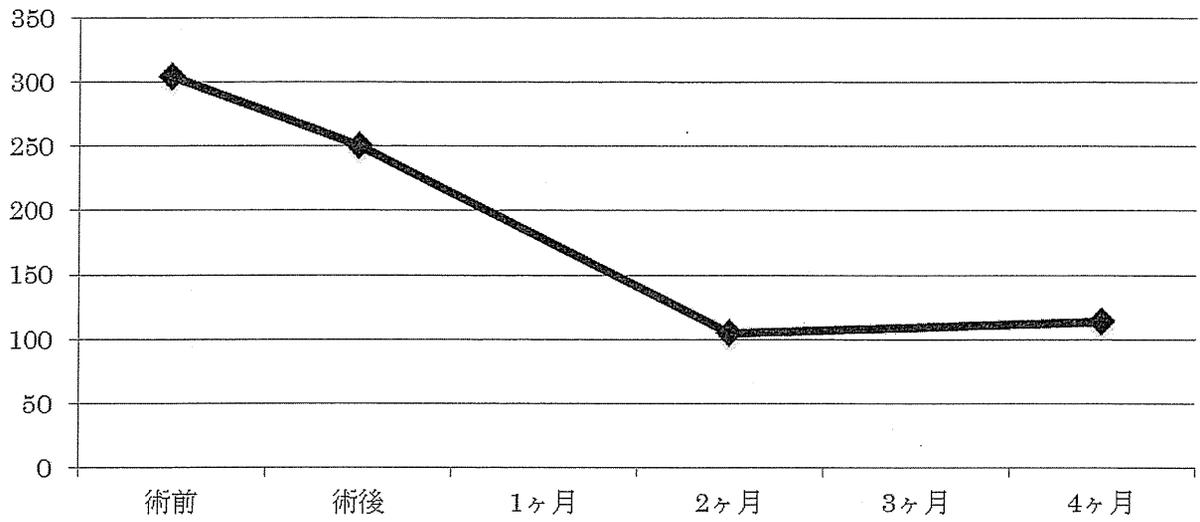
表 7-8-1 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 H

116	○	動脈	19.1mg (薬液の 漏出が 見られ 始める)	CBDCA	CBDCA 20mg	CBDCA 230mg ADM 3mg CDDP 1.5mg
123	○	動脈	19.1mg (漏出の 観点か ら投与 せず)	CDDP	CDDP 10mg	CBDCA 230mg ADM 3mg CDDP 11.5mg
130	○	動脈	21.1mg	CBDCA	CBDCA 20mg	CBDCA 250mg ADM 3mg CDDP 11.5mg
134		動脈	投与中 止	CBDCA	CBDCA 10mg	CBDCA 260mg ADM 3mg CDDP 11.5mg
141		動脈		CBDCA	CBDCA 10mg	CBDCA 270mg ADM 3mg CDDP 11.5mg
152		動脈		CDDP	CDDP 10mg	CBDCA 270mg ADM 3mg CDDP 21.5mg
157	減容積手術					

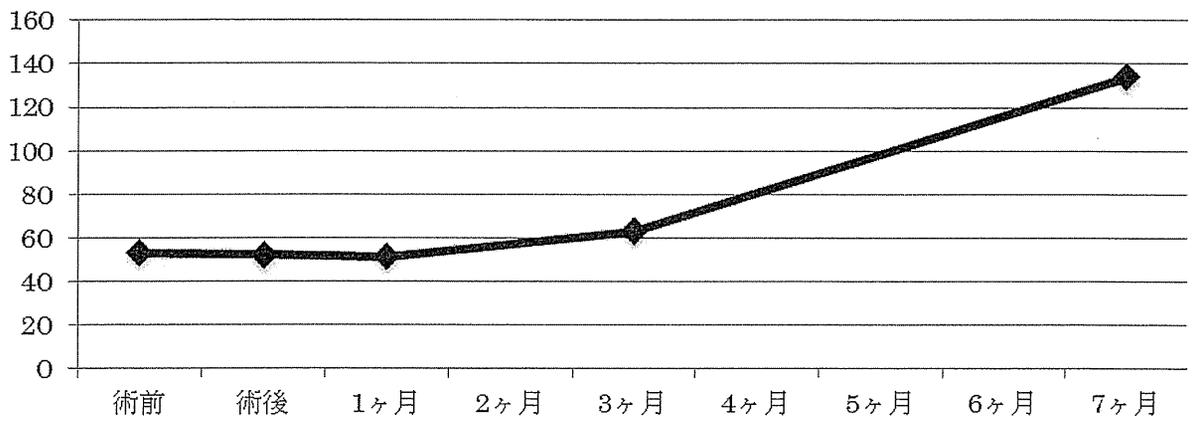
表 7-8-2 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 H

Day	S-TuD 投与	投与経路	S-TuD 合計投与量	抗がん剤	抗がん剤 投与量	抗がん剤 合計投与量
0		手術(右第5肋骨部分切除術)				
14	○	静脈	3.0mg	CBDCA	70mg/m ²	70mg
35	○	静脈	6.1mg	CBDCA	85mg/m ²	135mg
56	○	静脈	9.2mg	CBDCA	85mg/m ²	220mg
80				VP-16 25mg CPA 50mg	P.O E.O.D 14days	
94				VP-16 25mg CPA 50mg	P.O E.O.D 14days	
112	全身状態の悪化により死亡					

表 7-9 症例別 S-TuD および抗がん剤投与歴：症例 I

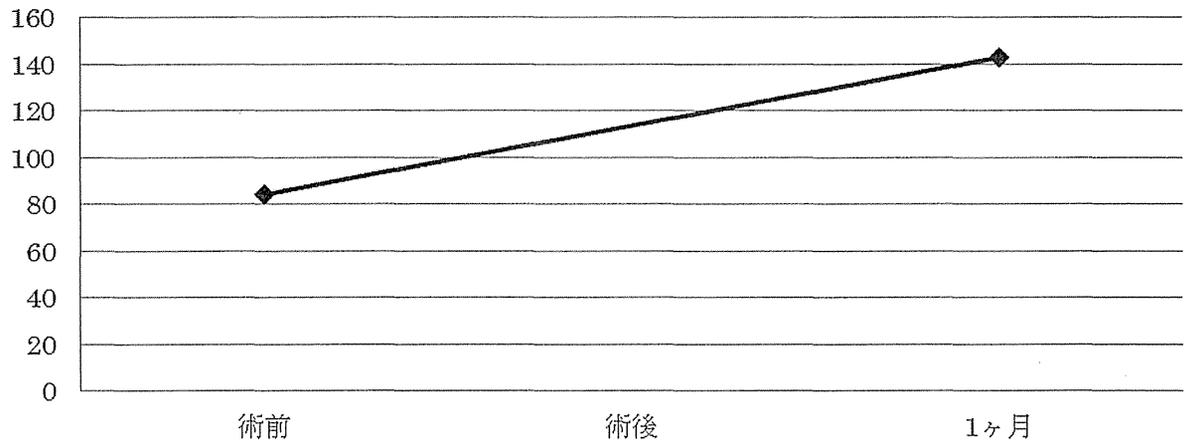


症例 A

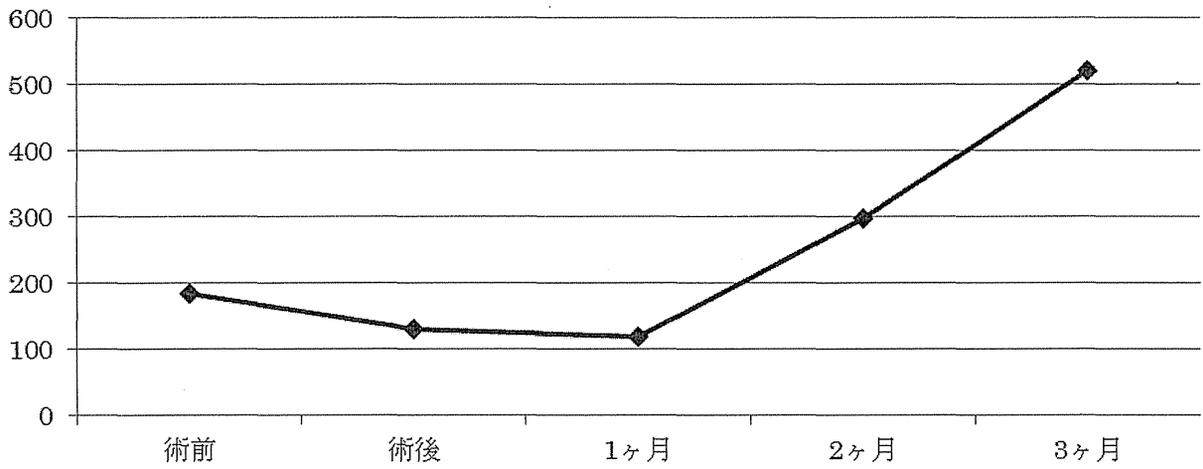


症例 B

図 3-1 症例別 ALP 推移

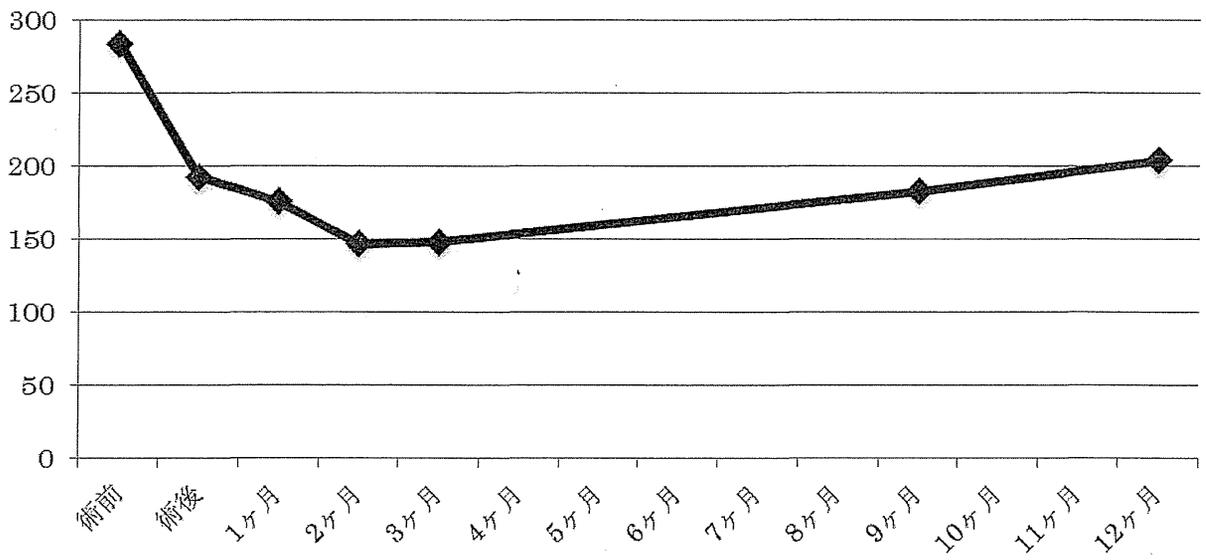


症例 C

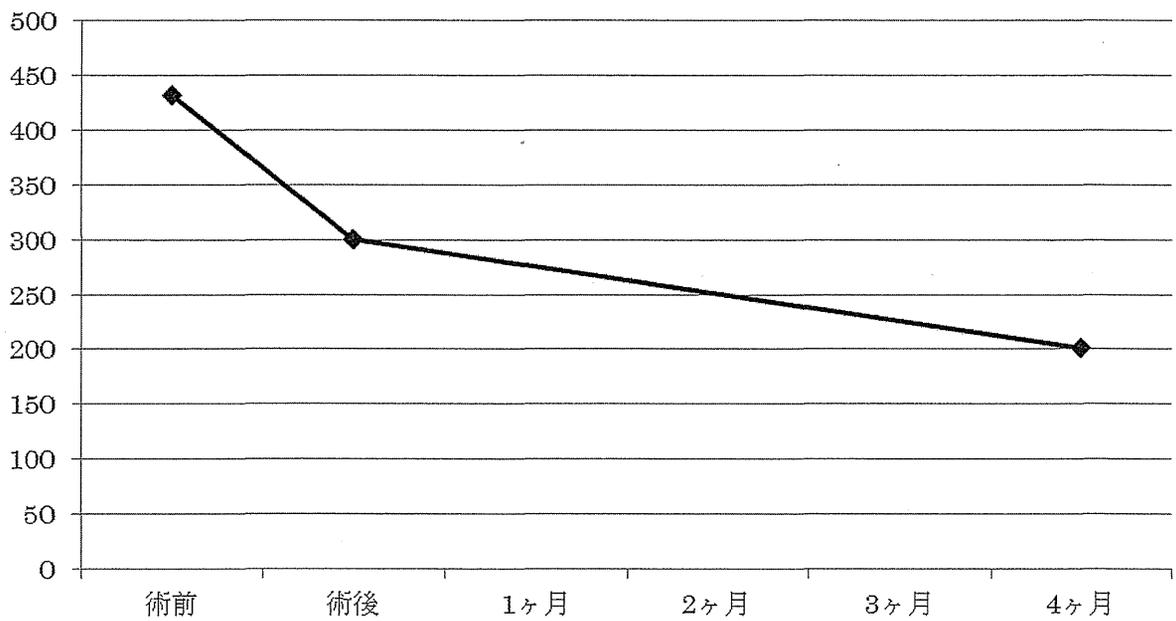


症例 D

図 3-2 症例別 ALP 推移

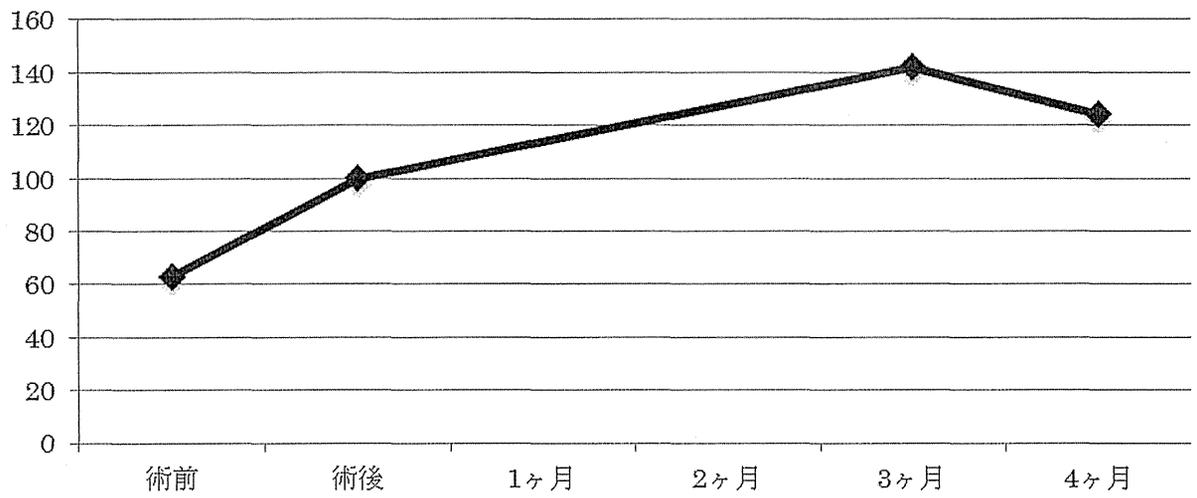


症例 E

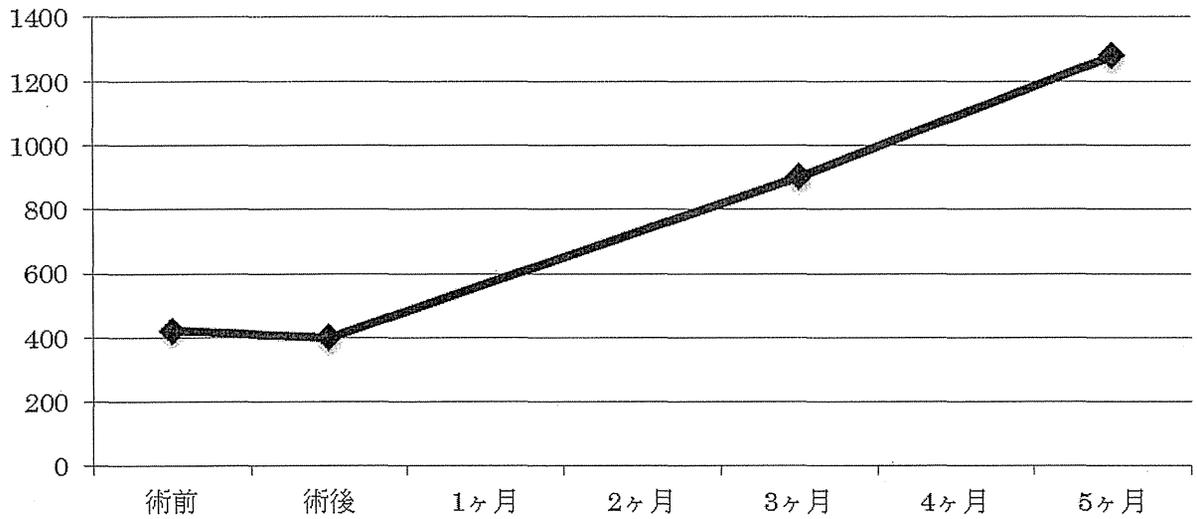


症例 F

図 3-3 症例別 ALP 推移

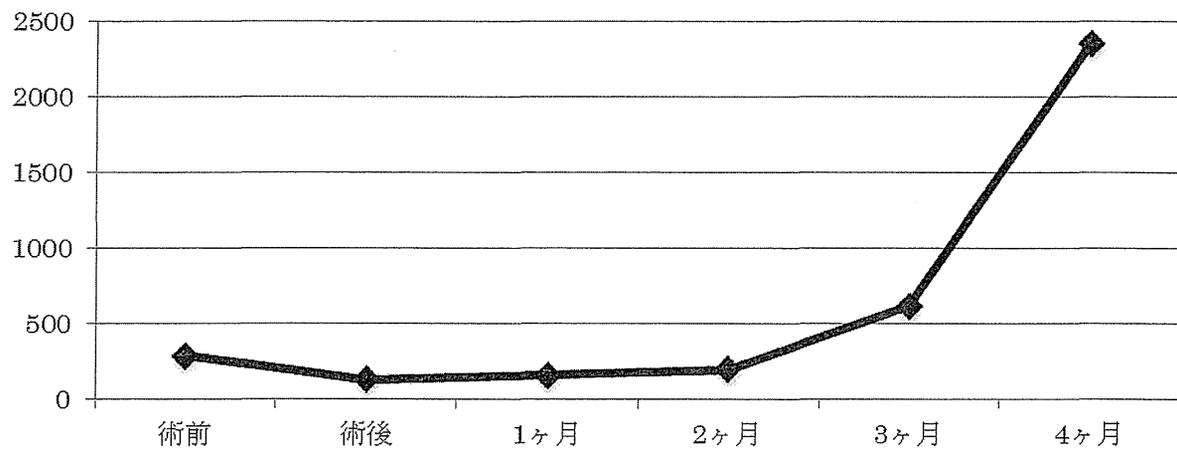


症例 G



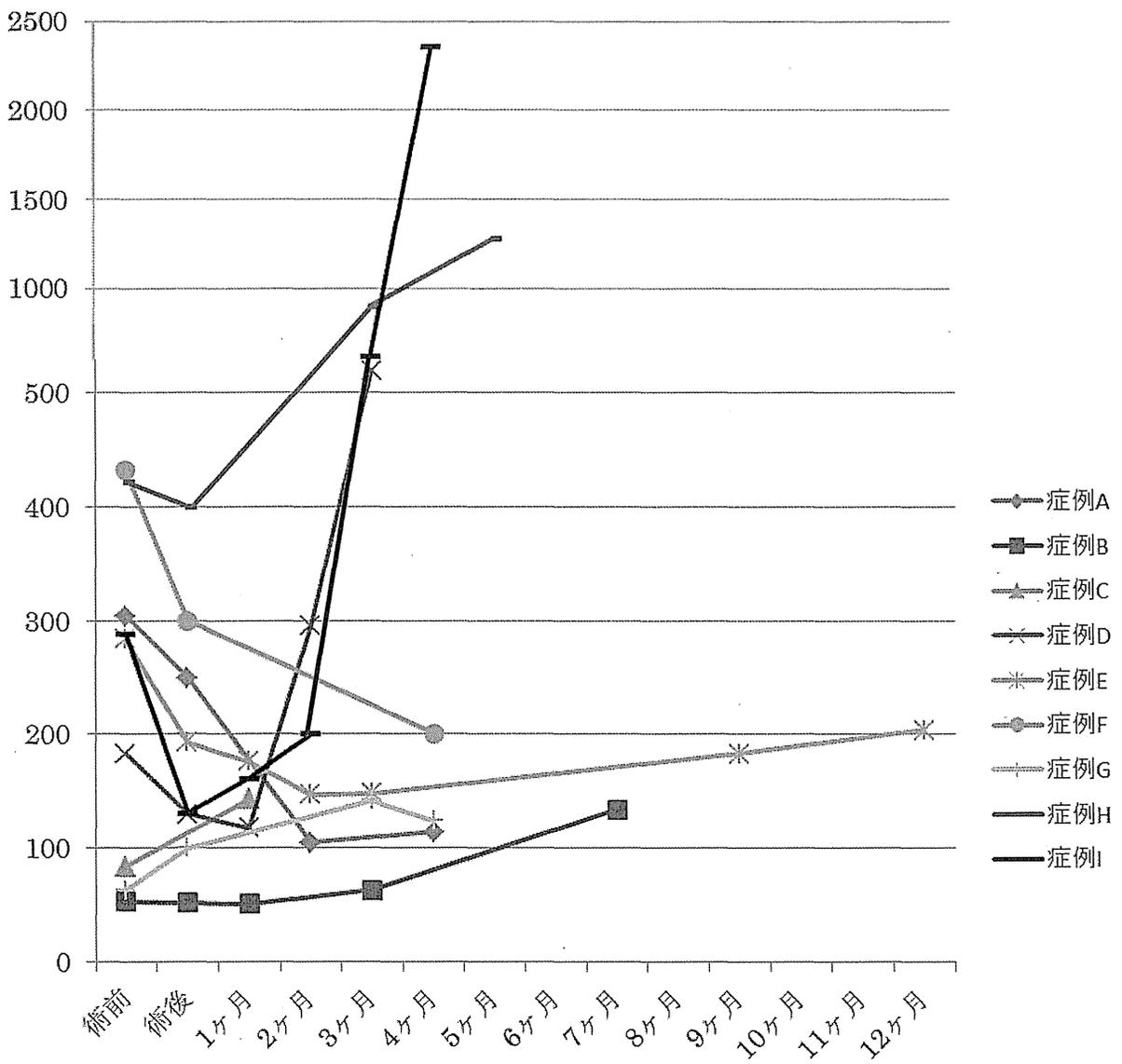
症例 H

図 3-4 症例別 ALP 推移



症例 I

図 3-5 症例別 ALP 推移



VII. 参考文献

1. Coyle VJ, Rassnick KM, Borst LB, Rodriguez CO Jr, Northrup NC, Fan TM, Garrett LD. Biological behaviour of canine mandibular osteosarcoma. A retrospective study of 50 cases (1999-2007). *Vet Comp Oncol.* 2013 Feb 15. doi: 10.1111/vco.12020.
2. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods.* 2007 Sep;4(9):721-6. Epub 2007 Aug 12.
3. 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 miR-133a Expression Profiles and Functions in Malignant Osteosarcoma-Initiating Cells. *Stem Cells* 32:959-973, 2014
4. Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells” *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 6 e43
5. Haraguchi T, Nakano H, Tagawa T, Ohki T, Ueno Y, Yoshida T, Iba H, A potent 20-O-methylated RNA-based microRNA inhibitor with unique secondary structures. *Nucleic Acids Research*, 2012 40-8
6. Hatano H, Morita T, Kobayashi H, Murai T. Treatment and outcome of Osteosarcoma: A 50-year Retrospective review. *Clinical journal of Niigata cancer center* 2011/09(in Japanese)
7. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, Galasso M, Gaudio E, Nuovo GJ, Lovat F, LeBlanc K, Palatini J, Randall RL, Volinia S, Stein GS, Croce CM, Lian JB, Aqeilan RI. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1865-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2663. Epub 2012 Feb 20.
8. Julius M Liptak, Debra A Kamstock, William S Dernel, Gabrielle J Monteith, Scott A Rizzo, Stephen J Withrow. Oncologic outcome after curative-intent treatment in 39 dogs with primary chest wall tumors (1992-2005). *Vet Surg.* July 2008;37(5):488-96.
9. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T, Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *The official journal of the Japanese Cancer Association.* 2010 7/07
10. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs *in vivo* with ‘antagomiRs’. *Nature.* 2005 Dec 1;438(7068):685-9. Epub 2005 Oct 30.
11. Lane A, Black M, Wyatt K. Toxicity and efficacy of a novel doxorubicin and carboplatin chemotherapy protocol for the treatment of canine appendicular osteosarcoma following limb amputation. *Aust Vet J.* March 2012;90(3):69-74.
12. Ma C, Liu Y, He L. microRNAs - powerful repression comes from small RNAs *Sci china Ser C-Life Sci*, 2009, 52(4):323-330
13. M A Kruse, E S Holmes, J A Balko, S Fernandez, D C Brown; M H Goldschmidt. Evaluation of clinical and histopathologic prognostic factors for survival in canine osteosarcoma of the extra-cranial

flat and irregular bones. *Vet Pathol.* July 2013;50(4):704-8.

14. Margaret E. Dickerson. Retrospective Analysis of Axial Skeleton Osteosarcoma in 22 Large-Breed Dogs. *J Vet Intern Med* 15[2]:120-124 Mar-Apr'01
Retrospective Study 25 Refs
15. Michael F. Clarke, John E. Dick, Peter B. Dirks, Connie J. Eaves, Catriona H.M. Jamieson, D. Leanne Jones, Jane Visvader, Irving L. Weissman, and Geoffrey M. Wahl. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* October 1, 2006
16. Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression *Molecular Therapy* (2011) 19 6, 1123–1130. doi:10.1038/mt.2011.53
17. Pedro P. Medina, Mona Nolde, Frank J. Slack.
"OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma". *Nature* 467, 86–90 (2010)
18. Skorupski KA, Uhl JM, Szivek A, Allstadt Frazier SD, Rebhun RB, Rodriguez CO Jr. Carboplatin versus alternating carboplatin and doxorubicin for the adjuvant treatment of canine appendicular osteosarcoma: a randomized, phase III trial. *Vet Comp Oncol.* 2013 Oct 4. doi: 10.1111/vco.12069
19. Ulf Andersson Ørom, Sakari Kauppinen, Anders H. Lund LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* Volume 372, 10 May 2006, Pages 137–141
20. Vanel M, Blond L, Vanel D. Imaging of primary bone tumors in veterinary medicine: which differences? *Eur J Radiol.* 2013 Dec;82(12):2129-39. doi: 10.1016/j.ejrad. 2011.11.032. Epub 2011 Dec 23.

イヌ自然発症肉腫症例での腫瘍内 miR-133a 発現

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

共同研究者が骨肉腫の悪性形質に関与すると報告し、その発現レベルが有意な予後不良因子であることが明らかにされた microRNA-133a(Stem Cells. 2013)について、昨年度マウスを用いた担がんモデルで S-TuD-133a の有効性を示した。今年度は、大型動物であるイヌの自然発症骨肉腫症例に対する S-TuD-133a の有効性を検討するため、まずイヌ自然発症肉腫症例の腫瘍内 miR-133a 発現レベルを定量 RT-PCR により検証した。

症例数が 5 例と非常に少ない中での検討ではあるが、ヒト同様にイヌ肉腫症例でも miR-133a 発現レベルが悪性度に相関している結果が得られた。しかし、イヌ自然発症肉腫症例の検体を確保することの困難さより、本研究では比較対象として必須であると考えられる S-TuD-133a 投与前組織検体また正常組織検体の確保・検討が行えておらず、本研究班の今後解決すべき重要な課題である。

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)大量合成プロトコー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。そして昨年度は、S-TuD-133aの有効性をin vitroで検証し、LNA同様に骨肉腫細胞株143Bにおいて有意に浸潤能を抑制することを示した。またS-TuD合成の効率化、そしてS-TuD-133aの安全性・毒性試験を行ってきた。

骨肉腫がん幹細胞分画から同定された、悪性形質に関与するmiR-133aは、革新的な治療標的分子と成り得ると考えられる。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。

本研究では、ヒト骨肉腫でその発現レベルの上昇が予後不良因子であったmiR-133aについて、イヌ自然発症肉腫症例の腫瘍内発

現レベルを検証した。

B. 研究方法

イヌ自然発症肉腫 5 症例 (骨肉腫 4 例、悪性間葉系腫瘍 1 例)、6 検体の miR-133a 発現量を定量 RT-PCR を用いて測定した (normalization として RNU6B を用いた)。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて東京農工大学動物実験指針 (平成 18 年環境省告示第 88 号、平成 18 年厚生労働省通知、文部科学省告示第七十一号を含んでいる) に従って行った。個々の症例については獣医師主導型で行い同意を得ている。研究内容については、同大学の倫理委員会の審査・承認を得ており研究の適正性を確保した。