

201438083A

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 岩本 幸英

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、総長 久保 千春 代理人 産学官連携本部長 若山 正人が実施した平成26年度「高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究」の成果を取りまとめたものです。

# 目次

## I. 委託業務成果報告（総括）

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究	岩本 幸英	1
---------------------------	-------	---

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究	岩本 幸英 松延 知哉	47
2. JCOG0905登録症例数の解析	平賀 博明	53
3. 高悪性度軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究	中馬 広一	56
4. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究	田仲 和宏	60
5. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療確立のための研究	戸口田 淳也	64
6. 脊椎および骨盤骨に発生した骨肉腫・骨悪性線維性組織球腫の治療成績 —手術療法と重粒子線治療の比較—	比留間 徹	67
7. 肉腫診断における高感度CRPの有用性に関する研究	松峯 昭彦	70
8. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究	尾崎 敏文	75
9. 骨肉腫患者の肺転移症例に対する治療戦略	米本 司	77
10. 悪性軟部腫瘍に対するパゾパニブの治療効果に関する研究	森岡 秀夫	79
11. iPS細胞作製技術を用いた明細胞肉腫の発生メカニズム解析	大野 貴敏	83
12. 小児期・青年期の骨肉腫の診断に対する血清アルカリフォスファターゼ の新しい評価方法に関する研究	下瀬 省二	86
13. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療確立のための研究	西田 佳弘	89
14. 悪性骨腫瘍切除後の再建における同種骨の利用 筋肉内粘液腫の治療方針 浸潤性発育を示す軟部肉腫の至適切除範囲の提案 肉腫の融合遺伝子診断	松本 誠一	94
15. AYA世代の骨・軟部悪性腫瘍患者の終末期治療に関する研究	荒木 信人	100
16. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究	加谷 光規	103
17. 悪性軟部腫瘍における新規予後不良因子の検索	平岡 弘二	104
18. BH-3 mimeticを用いた軟骨肉腫に対する新規分子標的治療の開発	森井 健司	106
19. 進行期高悪性度骨軟部腫瘍における標準治療確立のための研究	保坂 正美	109
20. 類上皮肉腫に対するmTORとc-METを標的とした治療による抗腫瘍効果	吉川 秀樹	113
21. 高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療確立のための研究	杉浦 英志	116
22. ヒト軟骨分化誘導間葉系幹細胞移植による免疫不全マウス皮下への 異種移植における異所性骨再生に関する研究	阿部 哲士	120
23. 腫瘍用人工膝関節置換術の膝蓋骨に関連する合併症について	畠野 宏史	122

24.	高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究	吉田 行弘	125
25.	メトトレキサート大量療法 (HDMTX) における排泄遅延に関する研究	横山 良平	127
26.	四肢以外に発生した肉腫に対する治療の現状と問題点に関する研究	高橋 満	129
27.	骨軟部腫瘍における病理診断の精度管理に関する研究	野島 孝之	131
28.	非円形細胞悪性軟部腫瘍におけるAKT/mTORシグナル経路の治療標的としての可能性に関する研究	小田 義直	133
29.	悪性骨軟部腫瘍の標準治療確立に関する病理学的検討	蛭田 啓之	138
30.	脊椎原発性悪性腫瘍あるいは転移性腫瘍と鑑別を要する脊椎血管腫の臨床病理学的特徴について	山口 岳彦	140

Ⅲ.	学会等発表実績		143
----	---------	--	-----

# I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

高悪性度骨軟部腫瘍に対する標準治療確立のための研究

業務主任者 岩本 幸英 九州大学大学院医学研究院整形外科 教授

研究要旨 【軟部肉腫】四肢に発生する高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対しては、これまでに行った JCOG0304 の結果から、アドリアマイシン(ADM)+イフォスファミド(IFO)併用術前術後化学療法 (AI 療法) が標準治療と判断されている。しかし、AI 療法では長期の入院を要し毒性も強いいため、比較的高齢者に多い非円形細胞軟部肉腫に対しては、より毒性が軽い治療法の開発が求められている。一方、ゲムシタビン(GEM)+ドセタキセル(DOC)併用化学療法(GD 療法)は、軟部肉腫進行例での有効性が示されており、外来でも治療可能であるため期待を集めている。本研究においては、切除可能な四肢・体幹発生の高悪性度非円形細胞肉腫に対し、標準治療である AI 療法に対する GD 療法の全生存期間における非劣性をランダム化比較試験 JCOG1306 により検証することを目的とする。また、非円形細胞肉腫の中でも特に抗がん剤の感受性が低い類上皮肉腫および粘液線維肉腫に対するがん化メカニズムを解析した。更に、滑膜肉腫特異的融合遺伝子 SYT-SS18 によるがん化メカニズムを分子生物学的に検討した。【骨肉腫】転移の無い四肢発生の高悪性度骨肉腫に対し、MTX、ADM、CDDP の 3 剤による術前化学療法を行い、効果が不十分である症例に術後補助化学療法として上記 3 剤に IFO を追加する上乗せ延命効果があるかどうかを、ランダム化比較により検証する臨床試験を開始した。予定症例数は 200 例であり、平成 22 年より登録を開始し、平成 27 年 2 月現在で 127 例の一次登録、76 例の二次登録を行っている。一次登録ペースは予定ペースの 75%とやや不良である程度であるが、二次登録ランダム化例が予想よりも少なく予定ペースの約 50%に留まっており、試験参加施設で治療された全骨肉腫症例数の実態を調査し、JCOG0905 の一次登録数が低迷している原因を明らかにし、重篤な有害事象を引き起こしうる MTX 排泄遅延の態様について明らかにすることを目的とした研究も行った。遠隔転移を有する骨肉腫症例の予後は不良であるが、少数の遠隔転移のみの場合には予後の改善が見込まれることもあるため、予後因子解析を行った。一方、遠隔転移を有する骨肉腫に対する新規治療法の開発のため、分子標的治療の開発を目指した基礎的研究も実施した。

担当責任者

平賀 博明

北海道がんセンター腫瘍整形外科 医長

中馬 広一

国立がんセンター中央病院骨軟部腫瘍科 科長

田仲 和宏

大分大学医学部人工関節学講座 講師

戸口田 淳也

京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野 教授

比留間 徹

神奈川県立がんセンター骨軟部腫瘍外科 部長

松峯 昭彦

三重大学大学院医学系研究科整形外科学 准教授

尾崎 敏文

岡山大学大学院整形外科学 教授

米本 司

千葉県がんセンター整形外科 部長

森岡 秀夫

慶応義塾大学医学部整形外科 専任講師

大野 貴敏

岐阜大学大学院医学系研究科整形外科学 准教授

下瀬 省二

広島大学大学院医歯薬保健学研究院整形外科 准教授

西田 佳弘

名古屋大学医学部整形外科 准教授

松本 誠一

がん研有明病院整形外科 部長

荒木 信人

大阪府立成人病センター整形外科 主任部長

加谷 光規  
札幌医科大学医学部整形外科学講座 講師  
平岡 弘二  
久留米大学医学部整形外科 准教授  
森井 健司  
杏林大学医学部整形外科 准教授  
保坂 正美  
東北大学大学院医学系研究科整形外科 講師  
吉川 秀樹  
大阪大学大学院医学系研究科整形外科 教授  
杉浦 英志  
愛知県がんセンター中央病院整形外科 部長  
阿部 哲士  
帝京大学医学部整形外科 准教授  
畠野 宏史  
新潟県立がんセンター新潟病院整形外科 部長

吉田 行弘  
日本大学医学部整形外科 専任講師  
横山 良平  
国立病院機構九州がんセンター整形外科 医長  
高橋 満  
静岡県立静岡がんセンター 副院長  
松延 知哉  
九州大学病院整形外科 助教  
野島 孝之  
金沢医科大学臨床病理学 教授  
小田 義直  
九州大学大学院医学研究院形態機能病理 教授  
蛭田 啓之  
東邦大学医療センター佐倉病院病理診断科 准教授  
山口 岳彦  
獨協医科大学越谷病院病理診断科 学内教授

## A. 研究目的

### 【軟部肉腫】

四肢に発生する高悪性度軟部腫瘍は円形細胞肉腫と非円形細胞肉腫に大別され、後者が大多数を占める。平成16年度から「がん臨床研究事業」により高悪性度非円形細胞軟部肉腫を対象に実施されたJCOG0304の結果、アドリアマイシン(ADM)+イフォスファミド(IFO)併用術前術後化学療法(AI療法)による5年生存率は83.3%であり、試験開始時の標準治療である手術単独の5年生存率約50%に比較して非常に良好であった。この結果を踏まえてJCOG骨軟部腫瘍グループでは、AI療法を四肢原発切除可能な高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対する標準治療とみなしてよいと判断している。しかし、AI療法では長期の入院を要し、Grade3、4の強い血液毒性が必発であるため、比較的高齢者に多い非円形細胞軟部肉腫に対しては、より毒性が軽く身体的、経済的負担の少ない治療法の開発が求められている。

近年、ゲムシタビン(GEM)+ドセタキセル(DOC)併用化学療法(GD療法)は、進行軟部肉腫に対して有効であり、外来でも治療可能であり安全性が高いことが報告されており、切除可能な高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対しての効果も期待されている。そこで本研究の目的は、切除可能な四肢・体幹発生の高悪性度非円形細胞肉腫に対し、標準治療であるAI療法に対するGD療法の全生存期間における非劣性をランダム化比較試験により検証することであり、JCOG1306として実施する。本研究によって

GD療法の安全性と有効性が認められれば、高悪性度非円形細胞軟部肉腫に対するより毒性や負担の少ない新規標準的治療法の確立が期待される。

悪性円形細胞の形態を有する腫瘍(Ewing肉腫、横紋筋肉腫)ではキメラ遺伝子などの分子生物学的な病態の解明が進み、化学療法などを組み合わせた集学的治療で好成績をあげているが、類上皮肉腫、粘液線維肉腫などの非円形細胞悪性軟部腫瘍においては、発生機序の解明や有効な治療法の確立は未だ進んでおらず、外科的切除が行われているものの一旦再発・転移を来した場合は有効な薬物療法がなく依然予後不良である。今回、類上皮肉腫と粘液線維肉腫におけるAKT-mTOR pathwayの病態への関与を調査し、治療標的としての可能性について検討を目的とした研究を行った。

軟部肉腫においては、染色体点座に伴う融合遺伝子の存在が特徴的であり、高悪性度非円形細胞肉腫の一つである滑膜肉腫におけるSYT-SSX融合遺伝子の機能解析を行い、新規治療法の開発に結びつく可能性を検討した。

### 【骨肉腫】

骨肉腫の治療成績はメトトレキサート(MTX)、ADM、シスプラチン(CDDP)の3剤を中心とする化学療法の進歩により改善されてきた。骨肉腫では、治療が奏効した場合、腫瘍径の縮小よりも腫瘍内の壊死が見られる。そのため、他の固形がんとは異なり、化学療法の効果判定は、主として切除標本での腫瘍壊死割合により行われる。術前化学療法による

腫瘍壊死割合が 90%以上の症例 (good responder) は予後がよく、90%未満の症例 (standard responder) が予後不良とされている。この予後不良な術前化学療法の効果不充份例に対し、術後に薬剤を変更する試みがなされてきたが、治療成績の改善は得られていない。厚生労働省がん研究助成金岩本班「原発性悪性骨腫瘍に対する標準的治療法の開発と治療成績の改善に関する研究」を中心に行なわれた骨肉腫の多施設共同研究 NECO-95J (Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma in Japan)の結果から、MTX、ADM、CDDP、3剤による術前化学療法の効果不充份例に対し、術後にこの3剤にIFOを加えた化学療法を行うことで、予後が改善する可能性が示唆された。このNECO-95Jレジメンの有用性を検証し標準治療として確立するためには、第III相ランダム化比較試験が必要と考えられたため、平成22年からJCOG0905試験として実施している。

ランダム化比較試験の遂行のためには一次登録数を予定以上に確保する事と、二次登録の割合を上げることが課題である。また、重篤な有害事象の発生も臨床研究の妨げとなる。そこで、試験参加施設で治療された全骨肉腫症例数の実態を調査し、JCOG0905の一次登録数が低迷している原因を明らかにする事やMTXの排泄遅延に関する臨床研究も行った。

肺転移を生じた骨肉腫患者の予後は依然として極めて不良であるが、原発巣が制御された少数個の遠隔転移に対し局所治療を行い得る状態がありえるか、骨肉腫肺転移患者の予後因子解析を行うことを目的とした後方視的研究を行った。また、将来のさらなる遠隔転移を有する骨肉腫の治療成績向上に向けて、基礎的研究も実施した。

## B. 研究方法

### 【軟部肉腫】

#### I. 高悪性度非円形細胞肉腫に対する ADM+IFO による補助化学療法と GEM+DOC による補助化学療法とのランダム化第 II/III 相試験 (JCOG1306)

##### 【デザイン】

多施設共同ランダム化第II/III相試験である。第II相部分での Primary endpoint は術前化学療法無増悪完遂割合、第III相部分では全生存期間とする。

##### 【対象】

年齢 20~70 歳、四肢または体幹発生の非円形細胞肉腫である。

T2bN0M0 または anyTN1M0 (UICC/AJCC 7th edition) (初回の局所再発例も含む)。

病理組織学的に、高悪性度未分化多形肉腫、線維肉腫、粘液線維肉腫、平滑筋肉腫、滑膜肉腫、脂肪肉腫、多形型横紋筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、血管肉腫、未分化肉腫/分類不能肉腫のいずれかである。組織学的悪性度 FNCLCC grade 2-3 である。辺縁切除縁以上での切除が可能と判断される。

ECOG Performance status 0-1 である。

化学療法、放射線治療の既往がない。

##### 【患者登録とランダム割付】

JCOG データセンターでの中央登録を行う。

①施設、②初再発の別 (初発 vs.再発)、③部位 (四肢 vs.体幹) を割付調整因子とする最小化法を用いて治療群を A 群: AI 療法、B 群: GD 療法にランダム割付する。

##### 【治療】

化学療法:

A 群: ADM 30 mg/m<sup>2</sup> (day 1-2)、IFO 2 g/m<sup>2</sup> (day 1-5)。

B 群: GEM 900mg/m<sup>2</sup> (day 1,8)、DOC 70mg/m<sup>2</sup> (day 8)。

両群ともに3週1コースとして術前3コース、術後2コースの計5コース実施する。

手術療法 (A、B 群共通): 術前化学療法3コース終了後、腫瘍切除術を施行する。

##### 【解析】

主たる解析は登録終了3年後。両群の全生存期間を比較する。

##### 【予定登録数】

JCOG0304のAI療法による3年生存割合は87.5%であったが、本試験JCOG1306では体幹発生例、再発例、所属リンパ節陽性例など、やや予後不良な対象も含めることを考慮し、標準治療群の3年生存割合を85%とし、試験治療群の3年生存割合を87%と見込み、希少がんであることを考慮して有意水準を片側 $\alpha$ 10%とし、検出力70%、登録期間6年、追跡期間3年として必要解析対象数を求め、1群65人で計130人、若干の追跡不能例を見込んで予定登録数を140人とした。

#### II. AKT/mTOR シグナル経路の治療標的としての可能性に関する研究

A. 類上皮肉腫; VAESBJ と先行研究で我々が樹立した Asra-EPS の2つのヒト類上皮肉腫細胞株を研究対象とした。mTOR 阻害剤はすでに腎癌で臨床応用されている RAD001 を使い、選択的 c-MET 阻害剤は現在進行固形癌で臨床試験中の INC280 を使用した。WST-1 assay にて薬剤による細胞増殖抑制効果を調べ、Flow cytometry により細胞周期を解析した。mTOR や c-MET の関連タンパクの発現を



Western blotting 法にて調べ、培養液中の HGF の分泌量を ELISA 法にて測定した。腫瘍細胞を背部皮下に移植した担癌マウスを用いて *in vivo* における薬剤の抗腫瘍効果を検討し、臨床検体の免疫組織化学染色を行った。

B. 粘液線維肉腫; 75 例(原発例)および 22 例(再発例)について、Akt, mTOR, S6RP, 4EBP1, MEK のリン酸化型のタンパクの発現と臨床病理学的因子との相関を評価し、それぞれの蛋白同士についても発現を比較検討した。蛋白発現についての評価は免疫組織化学染色で陽性細胞が 10%以上ある場合を発現陽性例とした。さらに凍結標本を用いて Western blot を行い、リン酸化蛋白発現を確認した。原発症例 10 例については凍結標本を用い、AKT1 とその上流の PIK3CA における mutation の有無を確認した。

### III. 悪性軟部腫瘍に対する分子標的治療の基礎的研究

(A)滑膜肉腫(以下 SS)における融合遺伝子である SYT-SSX 遺伝子を標的とした新規治療開発のため、SYT-SSX 蛋白の下流に存在する遺伝子である Frizzled homologue 10 (FZD10) 遺伝子を対象として、まずその転写制御機構を解析した。

1) 分化段階毎の SS18-SSX 融合遺伝子の発現誘導: これまでの研究から得られた、SS が神経堤に由来する細胞であるとの仮説のもとに、多能性幹細胞から神経堤細胞、そして神経堤由来の間葉系幹細胞を分化誘導するシステムにおいて、各段階で SS18-SSX を発現させ、その際に発現する遺伝子を網羅的に解析した。

2) FZD10 遺伝子発現に対する SS18-SSX の作用の解析: これまでの研究から得られた SS が神経堤に由来する細胞であるとの仮説のもとに、多能性幹細胞から神経堤細胞、そして神経堤由来の間葉系幹細胞を分化誘導するシステムにおいて、各段階で SS18-SSX を発現させ、それぞれの細胞における FZD10 遺伝子の発現及び遺伝子制御領域におけるヒストン修飾の状態を解析した。

(B)明細胞肉腫; 明細胞肉腫 (clear cell sarcoma; CCS) は染色体相互転座 t(12;22)により生じる融合がん遺伝子 *EWS/ATF1* によって生じることが知られている。正確な肉腫の起始細胞や、*EWS/ATF1* 以外の発がん関連因子の必要性など明らかではない。iPS 細胞作製技術を用いて CCS 起始細胞を同定すること、CCS 発生メカニズムの理解を深める為に以下の実験を行った。

1) ドキシサイクリン (Dox) により *EWS/ATF1* 発

現調節できる CCS モデルマウスから得られた肉腫細胞株 G1297 (Yamada K et al. JCI 2013) を使用した。これらに山中 4 因子である *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* をレトロウイルスベクターにより導入した。iPS 細胞の多能性評価として 1. 多能性関連遺伝子発現 (Realtime PCR 法)、2. 奇形種形成能、3. キメラマウス寄与能を評価した。得られた iPS 細胞が肉腫由来のがん遺伝子異常および染色体異常を有することを Exon シークエンス法および Comparative Genomic Hybridization 法 (CGH) により評価した。2) 肉腫 iPS 細胞を種々の細胞腫へ分化させるため、肉腫 iPS 細胞の胚盤胞への注入および偽妊娠マウスの子宮内移植を行い、キメラマウスを作製した。肉腫 iPS 細胞は HA-tag により標識されている。キメラマウス体内における iPS 細胞由来細胞の存在は組織標本の免疫染色 (抗 HA 抗体) により確認した。3) キメラマウスに Dox を投与し、がん遺伝子異常を有する種々の分化細胞において *EWS/ATF1* を誘導した。*EWS/ATF1* 誘導性肉腫の発生の有無およびその発生部位を調査した。

### 【骨肉腫】

### IV. 骨肉腫術後補助化学療法における IFO 併用の効果に関するランダム化比較試験 (JCOG0905)

研究形式: 多施設共同第III相ランダム化比較試験。プライマリエンドポイントはA、B群の無病生存期間、セカンダリエンドポイントはG群の無病生存期間、群ごとの無再発生存期間、群ごとの全生存期間、術前増悪割合、一次登録日を起算日とし全群を併合した全生存期間、有害事象、患肢機能

対象: 1) 切除可能な上肢帯を含む上肢、下肢帯を含む下肢に発生した高悪性度骨肉腫、2) 臨床病期がIIA、IIB、III、3) 高悪性度骨肉腫の既往がない、4) 化学療法、放射線治療の既往がない、5) 明らかな家族性腫瘍の家族歴をもたない、6) 40 歳以下、7) Performance Status (ECOG)0-1、8) 主要臓器機能が保たれている。

患者登録とランダム割付: JCOG データセンターにて2段階登録を行う。一次登録後、術前化学療法を行い、手術後に切除標本の腫瘍壊死割合を病理組織学的に判定し、効果不十分例 (standard responder) を二次登録し術後治療群のランダム割付を行う (A 群・B 群)。割付調整因子は施設、T 因子、発生部位。著効例 (good responder) には術前と同じレジメンで術後化学療法を行う (G 群)。

術前化学療法: AP (ADM 60mg/m<sup>2</sup>+CDDP 120mg/m<sup>2</sup>)2 コース、MTX (12g/m<sup>2</sup>) 4 コース。

手術療法：術前化学療法終了後、4週以内に手術を施行し、切除標本の腫瘍壊死割合を判定する。

術後化学療法：効果不十分例を二次登録し、ランダム割付により、以下のいずれかの術後化学療法を実施。

A群：AP 2 コース、MTX 6 コース、  
ADM (90mg/m<sup>2</sup>) 2 コース

B群：AP 2 コース、MTX 4 コース、  
IFO (15g/m<sup>2</sup>) 6 コース

予定症例数：

登録期間 6 年、追跡期間 10 年、200 例を予定症例数とする。

#### V. JCOG0905 登録症例数の解析

2011 年から 2015 年まで毎年 1 月に、JCOG0905 参加全 30 施設に対して、前年 1 年間に各施設で新たに診断した骨肉腫の症例数に関するアンケート調査を行った。質問項目は全骨肉腫症例数（転移例、体幹発生例、中高齢者発生例を含む）、JCOG0905 適格症例数、JCOG0905 適格例だが試験参加についての説明を行えなかった症例の数およびその理由、JCOG0905 参加についての説明を行ったが同意を得られなかった症例の数およびその理由である。アンケートは JCOG 骨軟部腫瘍グループのメーリングリストを通じて配布され、各施設のコーディネーターが主体となって返答していただいた。また、二次登録前のプロトコル治療中止理由をモニタリングレポートから抽出分類し解析した。

#### VI. メトトレキサート大量療法 (HDMTX) における排泄遅延に関する研究

2002 年より 2010 年までに九州がんセンターで高悪性度骨肉腫および骨悪性線維性組織球腫（平滑筋肉腫を含む）に対して HDMTX 行った 25 患者について、年齢、投与量、腎機能、血中 MTX 濃度の最高値と安全域である 10<sup>-6</sup>mol/L 未満になるまでに要した時間を後方視的に解析した。

#### VII. 骨肉腫患者の肺転移症例に対する治療戦略

1976 年から 2011 年の間に、当院で原発巣に対する根治的治療および肺転移巣に対し 1 回以上の肺転移巣切除術を施行された骨肉腫患者を対象とした。臨床病理学的情報を収集し、単変量および多変量解析による予後因子解析を肺転移巣切除術単位で行った。肺転移巣は切除後病理学的に確認されたもののみを対象とした。

#### VIII. 骨肉腫細胞株に対する腫瘍溶解ウイルス OBP-301 およびゾレドロン酸併用抗腫瘍効果に関する研究

ヒト骨肉腫細胞株(143B, MNNG/HOS, SaOS-2, U2OS)を用いて検討を行った。OBP-301 および ZOL の抗腫瘍効果を XTT-assay を用いて評価した。併用時の相乗効果を combination index を算出し検討した。細胞死に関する検討としてアポトーシスの誘導を評価した。アポトーシスの評価は western blot による cleaved-PARP の発現変化を、DAPI 染色による核の断片化の確認を行った。また real-time PCR を用いて ZOL が OBP-301 の増殖に与える影響を評価した。In vivo では luciferase を導入した 143B 細胞を用いて脛骨同所性マウスモデルを作成し、IVIS imaging system および  $\mu$ -CT を用いて抗腫瘍効果および骨破壊抑制効果の検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、JCOG 試験として適格条件やプロトコル治療の中止・変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化され、安全性の確保が図られている。また、JCOG では所属する研究班が共同で、peer review と外部委員審査を併用した第三者的監視機構としての各種委員会を組織し、科学性と倫理性の確保に努めている。本研究においても、JCOG のプロトコル審査委員会、効果・安全性評価委員会、監査委員会などによる第三者的監視を受けることを通じて、科学性と倫理性の確保に努めており、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言の遵守を徹底している。

また、臨床サンプルを用いた研究においては、文部科学省・厚生労働省・経済産業省による、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に準じて行い、十分なインフォームドコンセントを得、個人情報の保護を徹底し、同意の撤回は随時可能と明記し患者・家族の利益を守ることに配慮した。

本研究で使用する動物の飼養保管、福祉および倫理的な取り扱いに関して該当する法律、法令、規則およびガイドライン（厚生労働省の所管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（平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）を含む）をすべて遵守することに合意し、さらに、「3R」原則—動物使用数を削減する、可能な限り動物以外の代替法を用いる、利用する研究手法を改善する—に従うことを約束し研究を実施した。

## C. 研究結果

### 【軟部肉腫】

#### I. 高悪性度非円形細胞肉腫に対する ADM+ IFO による補助化学療法と GEM+DOC による補助化学療法とのランダム化第 II/III 相試験 (JCOG1306)

本試験のプロトコールは平成 26 年 2 月に JCOG プロトコール審査委員会により承認された。それを受けて、本年度は参加各施設での IRB 承認と症例登録の開始を行った。

現在までに参加 30 施設中 29 施設で IRB 承認が得られ、登録可能な状況となっている。JCOG1306 試験への第 1 例目の登録は平成 26 年 6 月 19 日であり、それ以後現在までの登録症例数は 23 例と順調である。GD 療法群で予期される有害事象である Grade 3 の間質性肺炎が 1 例発生したため、班会議を通じて周知し、情報共有を行った。それ以外には重篤な有害事象や治療関連死亡も発生していない。

#### II. AKT/mTOR シグナル経路の治療標的としての可能性に関する研究

A. 類上皮肉腫；類上皮肉腫細胞株 2 株ではヒト皮膚線維芽細胞に比べ AKT/mTOR 経路の恒常的な活性化が観察された。RAD001 は類上皮肉腫細胞株 2 株に対して濃度依存的に G0/G1 cell cycle arrest を誘導することで、ヒト皮膚線維芽細胞に比べてより強い細胞増殖抑制効果を示した。RAD001 は *in vivo* においても腫瘍増大抑制効果を示したが、その効果は限定的で、RAD001 投薬群でも緩徐な腫瘍増大傾向を認めた。*in vitro*, *in vivo* の双方において RAD001 は mTOR 下流の S6RP のリン酸化を抑制したが、mTOR 上流の AKT のリン酸化を再亢進した。mTOR 阻害剤投与に伴う AKT の再活性化は上流の receptor tyrosine kinase(RTK)の活性化を介してもたらされるとされており、類上皮肉腫細胞株 2 株の受容体チロシンリン酸化酵素(phospho-RTK)を網羅的に解析したところ、2 株で共に c-MET の著明な活性化が確認された。2 株は培養液中に c-MET のリガンドである HGF を大量に分泌しており、担癌マウスの血中からもヒト HGF が検出された。2 株において INC280 投与により c-MET と下流の AKT や ERK のリン酸化が減弱し濃度依存的に細胞増殖が抑制されたが、mTOR 阻害剤と同様に *in vivo* における腫瘍抑制効果は限定的であった。また、2 株において RAD001 投与に伴う AKT の再活性化が INC280 投与により相殺され、その機序が HGF/c-MET 経路の再活性化による negative feedback の解除である可能性が示唆された。2 株に対して RAD001 と INC280 を併用す

ることにより *in vitro*, *in vivo* において各々の単剤に比してより強い細胞増殖及び腫瘍増大抑制効果が観察された。当科で過去に手術を施行した類上皮肉腫患者 6 例の臨床検体においても高頻度に HGF(6 例/6 例)、c-MET(6 例/6 例)、phospho-MET(5 例/6 例)、phospho-AKT(6 例/6 例)のタンパク発現を認めた。滑膜肉腫における Akt、mTOR、4E-BP1、S6 の各リン酸化タンパクの陽性率はそれぞれ 76.5%、67.6%、60.0%、41.9%であった。それぞれの陽性は互いに相関していた。pmTOR および p4E-BP1 陽性例は核分裂像が多い傾向にあり、p4E-BP1 陽性例は壊死範囲が広い傾向にあった。pmTOR および p4E-BP1 陽性は予後不良因子でもあった。Western blotting では腫瘍組織において正常組織よりも強い Akt、mTOR、S6 のリン酸化を認めた。解析した凍結検体 35 例において、PI3KCA および Akt1 遺伝子変異は見つからなかった。

B. 粘液線維肉腫：原発例では Akt、mTOR、S6RP、4EBP1 のリン酸化は 65%、45%、41%、66%の症例に認め、再発例についても 66%、71%、47%、38%に見られ、原発例、再発例ともに高い陽性率を示し、Akt-mTOR pathway の活性化を確認できた。さらに凍結標本を用いて Western blot を行い、リン酸化蛋白発現を確認した。Akt と mTOR については、リン酸化発現例について比較検討したところ、有意な(p=0.012)相関が得られた。Pathway 全体が発現している症例は 12 例(16%)であった。悪性度については FNCLCC で high grade な腫瘍と pmTOR の発現に相関を認めた(p=0.011)。MAP kinase(MEK)pathway においては、MEK のリン酸化は 64%の症例で見られ、S6RP との有意な相関(P=0.032)を認めた。これによって、Akt-mTOR 系の下流である S6RP の発現は MAP kinase との関連も示唆された。原発例(凍結材料)で、Akt (AKT1)とその上流にある PIK3(PIK3CA) の mutation を確認したが、いずれも mutation は認めなかった。

#### III. 悪性軟部腫瘍に対する分子標的治療の基礎的研究

(A)滑膜肉腫(以下 SS)；

1) 分化段階毎の SS18-SSX 融合遺伝子の発現誘導：多能性幹細胞、神経堤細胞、そして神経堤由来の間葉系幹細胞のそれぞれで SS18-SSX 融合遺伝子発現させた前後の遺伝子プロファイルを、SS 株及び原発巣組織での発現プロファイルと比較検討した。その結果、それぞれの段階で異なる遺伝子群が誘導され、神経堤細胞において誘導した際の発現プロファイルが細胞株及び原発巣組織のプロファイ

ルと最も近似していることが判明した。

2) SS18-SSX による *FZD10* 遺伝子の発現誘導：多能性幹細胞の段階で発現させると *FZD10* 遺伝子の発現は誘導されるが、細胞死を惹起した。一方、間葉系幹細胞において発現させた場合、*FZD10* 遺伝子の発現は誘導されなかった。神経堤細胞において発現させた時のみ、*FZD10* 遺伝子の発現が誘導され、かつ細胞は生存した。

3) SS18-SSX の *FZD10* 遺伝子の発現誘導作用におけるエピゲノムの影響：3種類の細胞のヒストンメチル化状態を誘導前後で比較したところ、誘導された細胞では repressive mark が減少し、active mark が亢進していたが、誘導されなかった間葉系幹細胞では、active mark が誘導されなかった。

(B)明細胞肉腫；

1) G1297 に山中4因子を導入すると低頻度ながら iPS 細胞様のコロニー形態を示す細胞が得られた。Realtime PCR 法にて肉腫 iPS 細胞株は多能性関連遺伝子 *Nanog*, *Oct3/4*(内因性)を胚性幹細胞 (ES 細胞)と同程度発現していることを確認した。肉腫由来 iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下へ移植すると三胚葉からなる奇形腫を形成した。また本細胞の胚盤胞への注入および偽妊娠マウスの子宮内移植を行った結果、キメラマウスの作製に成功した。Exon シークエンスおよび CGH による遺伝子変異解析、染色体解析の結果、肉腫 iPS 細胞は G1297 特異的遺伝子異常、染色体異常を保持していた。

2) キメラマウスの全身臓器の組織標本を作製し、抗 HA 抗体を用いた免疫染色を行った。肉腫 iPS 細胞由来の細胞が腸管、肝臓、心臓、腎臓、皮膚などの全身の様々な臓器および組織に存在していることが確認された。

3) キメラマウスに Dox を投与し、全身臓器に存在する肉腫 iPS 細胞由来の細胞において *EWS/ATF1* 発現を誘導した。がん遺伝子異常を有するものの *EWS/ATF1* 発現によっても腸管、肝臓、心臓、腎臓、皮膚などに存在する細胞では肉腫形成は誘導されなかった。ヒト CCS の好発部位である腱、筋膜周囲のみ肉腫形成を認めた。また詳細な組織学的解析により筋膜を形成する細胞、筋膜近傍の結合組織に存在する細胞が細胞増殖を開始することが判明した。

#### 【骨肉腫】

#### IV. 骨肉腫術後補助化学療法における IFO 併用の効果に関するランダム化比較試験 (JCOG0905)

本プロトコールは JCOG プロトコール審査委員会の承認を得て(JCOG0905)、各施設の IRB 承認後、

平成 22 年 2 月より順次症例の登録を開始した。平成 27 年 2 月末現在 127 例が一次登録、76 例が二次登録されている。一次登録ペースは予定ペースの 75%とやや不良である程度であるが、二次登録ランダム化例が予想よりも少なく予定ペースの約 50%に留まっており、ランダム化の同意取得割合を高める必要がある。

登録開始以降、年 2 回の中央モニタリングが行われており、CRF 回収状況のチェック、CRF レビューを継続している。これまで、有害事象によるプロトコール治療中止も 8 例に生じているが、多くは CDDP による腎毒性であったため、平成 26 年度に行われたプロトコール改訂では腎毒性を軽減するために CDDP の投与時間を 4-6 時間から 24 時間に変更された。術後化療においては逸脱に伴う重篤な有害事象が数例見られているが、術前化療においては逸脱に伴う重篤な有害事象は見られておらず、患者リスクの最小化が担保されつつ試験が進捗しているものと思われる。

#### V. JCOG0905 登録症例数の解析

アンケートは全 30 施設から回答を得る事ができた。全骨肉腫症例は 2010 年が 108 例、2011 年が 112 例、2012 年が 84 例、2013 年が 99 例、2014 年が 86 例であり、年による変動がみられた。JCOG0905 適格例は 2010 年が 40 例、2011 年が 42 例、2012 年が 37 例、2013 年が 45 例、2014 年が 32 例であり、全骨肉腫症例の約 4 割であった。非適格の理由も調査した 2013 年と 2014 年については、非適格例 108 例のうち、48 例 44%が 41 歳以上、23 例 21%は転移あり、16 例 15%は発生部位が適格外、8 例は病理診断が適格外 (低悪性度骨肉腫)、4 例は Li-Fraumeni 症候群などの家族歴、1 例は HBs 抗原陽性のため非適格であり、年齢による非適格が高い割合を占めた。試験参加についての説明を行えなかった症例数は各年とも 1 例から 3 例と少数であった。同意取得率は 2011 年が 82.1%、2012 年が 69.4%、2013 年が 69.0%、2014 年が 76.7%であり、高い割合を維持していた。同意を得られなかった理由はランダム化に対する拒否が主であったが、臨床試験に対する理解不足に起因すると思われる不同意や、施設の治療方針とプロトコール治療の相違による不同意もみられた。また、適格症例に対する登録例数の割合は施設により大きく異なっていた。

二次登録前のプロトコール治療中止 37 例の中止理由は、無効中止が 15 例、有害事象が 8 例、有害事象と関連のある患者拒否が 12 例、その他が 2 例であった。有害事象によるプロトコール治療中止 8

例の内訳は、腎毒性が5例と最多であったが、全例2013年までの症例であり、2014年には発生しなかった。有害事象と関連のある患者拒否12例中、5例は効果が不十分であることに起因しており、5例はランダム化に対する拒否であった。

## VI. メトトレキサート大量療法 (HDMTX) における排泄遅延に関する研究

25患者の年齢は10歳から59歳、中央値19歳、平均27歳であった。投与量は $6.4\sim 12\text{g/m}^2$ で計180コースが投与され、投与開始72時間後の血中濃度をモニターできたのは164コースであった。血中濃度が $10^{-6}\text{mol/L}$ 未満になるのが72時間を超える排泄遅延は49コースに出現した。33コースは96時間以内に安全域になったが、3コース(3患者)は120時間を超えて $10^{-6}\text{mol/L}$ 以上であった。

投与量は15歳以下では $12\text{g/m}^2$ 、16歳以上は $8\text{g/m}^2$ で投与することが多かったが、排泄 $12\text{g/m}^2$ では48コース中12コース(25%)で排泄遅延を生じ、 $8\text{g/m}^2$ 以下の76コースでも25例(33%)に排泄遅延が発生した。

また120時間を超えて排泄遅延が続いた3例は年齢が54、57、59歳であった。57歳の1例は血中濃度が $10^{-6}\text{mol/L}$ 未満になるのに288時間を要し、その間にGrade 4の好中球および血小板減少を来した。また、好中球減少に伴って敗血症を来し、エンドトキシンショックを合併して血液透析を行った。この患者のクレアチニンクリアランス(Ccr)はCockcroft-Gaultの計算式では $90\text{ml/min}$ 、実測で $60\text{ml/min}$ と低かったが、その他の患者ではCcrと排泄遅延に関連は見られなかった。

## VII. 骨肉腫患者の肺転移症例に対する治療戦略

71例中47例(66%)で2回以上の肺転移巣切除術が施行されており、最大施行数は6回であった。151回の肺転移巣切除術において、切除転移巣数は1-20個(中央値2個)であり、全転移巣の合計最大径は $8\sim 120\text{mm}$ (中央値 $20\text{mm}$ )であった。3年全生存率は41.7%(95%CI 34.0-50.0%)であった。単変量解析では不完全切除、肺外転移の有無、無転移期間、肺転移の個数、総転移巣最大径が有意な予後因子となった。多変量解析の結果、不完全切除(ハザード比3.42)、1年未満の無転移期間(1.97)、4個以上の転移巣(2.42)、および $30\text{mm}$ 以上の総転移巣最大径(2.19)が有意な予後不良因子であった。

## VIII. 骨肉腫細胞株に対する腫瘍溶解ウイルス

## OBP-301 およびゾレドロン酸併用抗腫瘍効果に関する研究

すべての骨肉腫細胞株において OBP-301 および ZOL 単独投与で時間および濃度依存性の抗腫瘍効果を認めた。また併用により相加から相乗効果を認めた。ZOL によって濃度依存的に cleaved-PARP の増加、核の断片化を認めアポトーシス誘導を確認した。また OBP-301 との併用により、ZOL 単独と比較して cleaved-PARP の増加を認めた。ZOL による OBP-301 の増殖抑制は認めなかった。マウス同所性モデルでは OBP-301 単独群、ZOL 単独群と比較して併用群では有意に腫瘍増殖を抑制し、ZOL 単独群、併用群において骨破壊の抑制効果がみられた。

### D. 考察

#### 【軟部肉腫】

#### I. 高悪性度非円形細胞肉腫に対する ADM+IFO による補助化学療法と GEM+DOC による補助化学療法とのランダム化第 II/III 相試験 (JCOG1306)

昨年度までに本研究のプロトコルを完成させ、JCOG プロトコル審査委員会による承認を得た。それを受けて本年度は JCOG 骨軟部腫瘍グループにおける JCOG1306 試験の登録を開始した。1施設を除いて参加全施設で IRB 承認が得られており、残り1施設も間もなく承認の見込みである。登録例は現在まで23例であるが、稀少がん種であること、ほぼ同じ対象に実施された先行研究である JCOG0304 では、開始11ヶ月時点で4例しか登録できていなかったことから考えると、本試験においては順調に症例集積が進んでいると考えられた。しかし、更なる登録促進のために、各施設での適格例への IC 取得率のアップを要請しているところである。

有害事象については、GD 療法群で1例の間質性肺炎の発生が報告されているが、予期される有害事象であり、適切な治療により軽快している。有害事象については、予期されるものであってもグループ内での周知を徹底し、注意喚起を図ることが重要であり、今後も安全性に注意を払いながら登録促進を図っていく必要がある。

#### II. AKT/mTOR シグナル経路の治療標的としての可能性に関する研究

A. 類上皮肉腫；mTOR 阻害剤投与に伴う受容体を介した AKT の活性化の亢進は治療抵抗性の要因として報告されている。今回の結果より、類上皮肉腫では autocrine 的に HGF/c-MET 経路が活性化してい

るものと考えられ、類上皮肉腫において活性化した HGF/c-MET シグナルは下流の AKT/mTOR 経路の活性化を生じ腫瘍形成に関与すると共に、mTOR 阻害剤に対する治療抵抗性にも関与しているものと考えられた。

B. 粘液線維肉腫；原発巣、再発巣ともに Akt-mTOR pathway、MAP kinase(MEK) pathway の活性化が見られ、それぞれの蛋白発現に相関を認め、分子標的治療のターゲットになる可能性が示唆された。また腫瘍の悪性度と AKT/mTOR pathway の活性化との関連が示唆された。

### III. 悪性軟部腫瘍に対する分子標的治療の基礎的研究

(A) 滑膜肉腫(以下 SS)；SS18-SSX 遺伝子発現誘導後の遺伝子プロファイルの比較より、神経堤細胞が SS の起源である仮説を支持する結果が得られた。そして SS18-SSX 遺伝子のエピゲノム改変作用は細胞分化状態 (cellular context) に依存することが明らかになり、至適な細胞を用いて解析を行う必要性が示された。

(B) 明細胞肉腫；今回 CCS モデルマウスに発生した *EWS/ATF1* 誘導性肉腫細胞を初期化、さらに様々な細胞種へと再分化することに成功した。一般的にがんとは遺伝子異常の疾患と考えられている。しかし、腸管、肝臓、心臓などの非肉腫起始細胞においては CCS に必須である融合遺伝子 *EWS/ATF1* とがん遺伝子異常、染色体異常があっても肉腫形成は誘導されず、筋膜、筋膜周囲の特異的細胞に肉腫を誘導した (細胞種特異的発がん)。この結果は起始細胞という細胞種特異的なエピゲノム状態、転写ネットワークと *EWS/ATF1* の作用に重要な関連があることを示唆していると思われる。本研究を新規治療へと進展させるべく、明細胞肉腫の発生メカニズムの解析を深め、特異的治療ターゲット同定につなげたい。

#### 【骨肉腫】

### IV. 骨肉腫術後補助化学療法における IFO 併用の効果に関するランダム化比較試験 (JCOG0905)

若年者に好発する骨肉腫は、5 年生存率約 60% と予後不良な疾患であるが、我が国での年間発生数は約 200 例に過ぎない希少がんであり、治療開発には全国規模の多施設共同研究が必須である。骨肉腫の治療成績は MTX、ADM、CDDP の 3 剤を中心とする化学療法による腫瘍壊死割合が 90% 以上の症例 (good responder) は予後がよく、90% 未満の症例 (standard

responder) が予後不良とされている。MTX、ADM、CDDP、3 剤による術前化学療法の効果不充份例に対し、術後に IFO を加えた化学療法を行うことの有用性を検証し標準治療として確立するためには、第 III 相ランダム化比較試験が必要と考え、臨床試験を立案した。平成 22 年 1 月に JCOG によるプロトコール承認が得られ、平成 27 年 2 月末現在 127 例が一次登録、76 例が二次登録されている。一次登録ペースは予定ペースの 75% とやや不良である程度であるが、二次登録ランダム化例が予想よりも少なく予定ペースの約 50% に留まっており、ランダム化の同意取得割合を高める必要がある。有害事象の予防は、プロトコール治療完遂に重要である。腎機能障害は CDDP では特に注意する有害事象であり、そのピーク時の血中濃度と腎機能障害との関連が報告されている。そのため、旧プロトコール治療では、CDDP 投与時間が 4-6 時間であったものを、24 時間投与に変更した。変更後の腎機能障害によるプロトコール治療中止は現時点で報告されていないが、今後も腎機能障害も含め、有害事象報告のレビュー継続が必要である。骨肉腫は患者の多くが小児であり、JCOG 骨軟部腫瘍グループでは、JCOG0905 の計画・実施に際して、JCOG で初めて小児患者用の「アセント文書 (本申請書に添付)」を作成し、患児に安心して研究に協力してもらえるよう努めるとともに、小児の四肢の骨軟部腫瘍に特有の、患児の成長に合わせて脚長差を調整できる伸張型人工関節を用いる際の取扱いの最適化、抗がん剤による発育障害に対する対処、患児とその両親に対する精神心理学的サポート、就学に対する配慮等について、整形外科医と小児科医の間で、日常診療以上の緊密な情報共有・連携体制の構築に努め、グループ班会議での議論等を通じて、希少がん・小児がん特有の課題の解決に向けて取り組みつつ研究を進めてきた。こうした解題への取り組みを通じて、希少がん・小児がん治療における診療科横断的、病院横断的な集学的連携体制の構築や、患児・両親へのサポート体制の質的向上、診療の均てん化が見込まれ、小児がん対策の推進に寄与し得ると期待される。

### V. JCOG0905 登録症例数の解析

2014 年の JCOG0905 一次登録症例数の減少は、骨肉腫全症例および適格症例数の減少が主因と思われる。しかし、適格症例に対する登録症例数の割合は参加施設間で 0% から 100% まで大きく異なっており、必ずしも適格症例数が多い施設で登録例が多い傾向ではなかった。今後も施設訪問などを通じて登録症例割合の低い施設での登録を増やす努力が

必要と思われた。

二次登録前のプロトコール治療中止が予想よりも多く、二次登録が予定通り進んでいないのが現状である。有害事象によるプロトコール治療中止も8例に生じたが、多くはCDDPによる腎毒性であったため、プロトコール version1.3 への改訂で投与時間4-6時間を24時間に延長した。2014年には腎毒性によるプロトコール治療中止は報告されておらず、今後も投与時間延長の効果を期待したい。一方、ランダム化を拒否してプロトコール治療中止となる例が増加している。各々の治療の特徴をある程度理解した上でランダム化を拒否していると思われる例が散見されるため、対応が難しい。多国が参加して行なわれた The European and American Osteosarcoma Study Group (EURAMOS) の骨肉腫に対する第Ⅲ相試験であるEURAMOS-IはJCOG0905と類似した構造の試験であるが、good responder 1041例中ランダム化されたのは715例(68%)、poor responder 1059例中ランダム化されたのは618例(58%)であった。対象の主体が小児であり、かつ術後の組織学的効果によりグループ分けされた後にランダム割付するという試験の実態なのではないかと考える。

本試験では、CRFと追跡調査用紙の提出、およびそれらに対するdata centerからの問い合わせに対する回答が著しく不良であることも問題であり、2013年のJCOG総合班会議でも報告された。これに対し、研究事務局からの督促、対応不十分な施設においては施設コーディネーターの交代、CRCの育成などを行った結果、2014年後期モニタリングレポートでは、未回収CRF、CRFの不明点・未記入の問い合わせの未回収、追跡調査未回収、追跡調査の不明点・未記入の問い合わせの未回収はいずれもゼロとなった。

## VI. メトトレキサート大量療法 (HDMTX) における排泄遅延に関する研究

従来より小児ではMTXの排泄が速いことが指摘され、15歳を境に投与量を分けていたが、今回の解析でも16歳以上では投与量が少ないにも関わらず排泄遅延の頻度が高いことが確認された。MTXの投与前にはCcrによる腎機能の評価が行われるが、Ccrと排泄遅延の間には明確な関連性はなかった。また、実測値とCockcroft-Gaultの計算式による値との間にはばらつきが大きくCcrによる腎機能の評価には注意が必要である。むしろ年齢、特に50歳以上では排泄遅延の頻度が高くなる傾向があり投与量の設定に注意が必要である。

現在実施中の骨肉腫に対するJCOG0905プロトコールの対象は40歳以下となっており、この点では問題はないが、30歳まで12g/m<sup>2</sup>を投与することになっており排泄遅延に警戒する必要がある。

## VII. 骨肉腫患者の肺転移症例に対する治療戦略

今回の検討で骨肉腫肺転移例の予後良好因子とされた、1年以上の無転移期間、肺転移数が3個以下、肺転移の合計最大径が30mm未満、完全切除可能、これらの条件を全経過中で満たしていた10例の10年全生存率は90.0%であり、それ以外の症例(17.5%)と比較し有意に予後良好であった(P=.0002)

## VIII. 骨肉腫細胞株に対する腫瘍溶解ウイルスOBP-301およびゾレドロン酸併用抗腫瘍効果に関する研究

我々は腫瘍特異的に抗腫瘍効果をもたらすOBP-301の骨軟部腫瘍に対する有用性を報告してきた。また近年、骨肉腫細胞に対してZOLの抗腫瘍効果や他の抗がん剤との併用における相乗効果が報告されている。今回、骨肉腫に対してOBP-301とZOLの併用により抗腫瘍効果の相加から相乗的な増強作用が認められ、そのメカニズムとしてはアポトーシスの増強作用が考えられた。今後、抗腫瘍効果の増強メカニズムの詳細な解明が必要であるが、骨肉腫に対する治療法の1つとして期待がもたらされる結果となった。またOBP-301単独では抑制しきれなかった骨破壊をZOLにより抑制することが可能であった。他の癌腫や骨腫瘍においてもこれらの併用治療の有用性が確認されれば、症例数の多い転移性骨腫瘍や他の原発性骨腫瘍などに応用可能でありさらなる可能性が広がる。

## E. 結論

### 【軟部肉腫】

本年度はJCOG1306試験の登録を開始し、順調な登録が行われていると考えられた。来年度以降も安全性に注意を払いながら登録促進を図っていく予定である。

非円形細胞肉腫の中でも類上皮肉腫、粘液線維肉腫等は抗がん剤の感受性が低いことが知られている。ともにAkt/mTOR pathwayがそのがん化メカニズムに関与していたが、類上皮肉腫に対してmTOR阻害剤とc-MET阻害剤を併用が、粘液線維肉腫ではAkt/mTOR阻害が治療標的となり得ることが示唆された。

滑膜肉腫等の軟部肉腫には染色体転座による融合

遺伝子の形成が特徴的に認められる。滑膜肉腫特異的融合遺伝子産物 SS18-SSX 蛋白のヒストン修飾を改変する機能は細胞の分化状態により異なり、神経堤由来細胞が前駆細胞の候補であると考えられる。

#### 【骨肉腫】

転移の無い四肢発生の高悪性度骨肉腫に対し、MTX、ADM、CDDP の 3 剤による術前化学療法を行い、効果が不十分である症例に術後補助化学療法として上記 3 剤に IFO を追加する上乗せ延命効果があるかどうかを、ランダム化比較により検証する臨床試験を開始した。平成 22 年 2 月より登録を開始し、平成 27 年 2 月末現在 127 例が一次登録、76 例が二次登録されている。JCOG 骨軟部腫瘍グループでの JCOG0905 適格例は、研究開始以降 2014 年が最低の 32 例であり、同年の一次登録症例数が 23 例と少なかった主因と考えられた。一方、施設間で登録率が異なっており、登録率の低い施設での患者登録を進めることが必至であると考えられた。一方、ランダム割付拒否によるプロトコル治療中止は、ある程度の割合でおこることは避けられないと考えられた。

プロトコル治療中止となる有害事象として CDDP による腎毒性と MTX 排泄遅延は特に注意する必要がある。二次登録前プロトコル治療中止の一因であった腎毒性については、第 3 版へのプロトコル改訂で CDDP 投与時間の延長を規定したので、今後の腎毒性の軽減効果が期待される。HDMTX では年齢が上がるるとともに排泄遅延の危険性が高くなるため、年齢を考慮した投与量設定が必要である。

肺転移を有する進行例は JCOG0905 の対象とはならないが、治療戦略を検討することは重要である。今回の検討で骨肉腫肺転移例の予後良好因子とされた、1 年以上の無転移期間、肺転移数が 3 個以下、肺転移の合計最大径が 30mm 未満、完全切除可能、これらの条件を全経過中で満たしていた 10 例の 10 年全生存率は 90.0% であり、それ以外の症例 (17.5%) と比較し有意に予後良好であった (P=.0002)。

OBP-301 に加え、ZOL を用いることは آپトーシス増強を介した相乗的な抗腫瘍効果に加え、骨破壊の抑制効果が得られた。骨肉腫に対しての有用な治療となり得る。

#### F. 健康危険情報

JCOG0905 において、1 例 CDDP・ADM 投与後に高尿酸血症 grade4 を認めた。JCOG 効果・安全評価委員会による審査では、同治療が原因となり生じた有害事象 (possible) と判断された。審査意見では、

治療前から UA 上昇があり、治療に伴う腫瘍崩壊で、UA 上昇が加速された可能性が指摘され、検査値の変化によりアロプリノールなどでの対応を行うことが妥当であったと指摘されたが、今後の治療の継続は認められた。グループ内での周知徹底を行い、プロトコル改訂も行った。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kataoka K, Matsunobu T, Iwamoto Y, et al.:

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  
Jpn J Clin Oncol, 44(8):765-769, 2014

Nabeshima A, Matsunobu T, Iwamoto Y, et al.:

Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via the HB-EGF-EGFR-PI3K/Akt pathways

Br J Cancer, 112(3):547-555, 2015

Takahashi Y, Iwamoto Y, et al.:

Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway in myxofibrosarcomas

Human Pathology, 45(5):984-993, 2014

Yamada Y, Iwamoto Y, et al.:

Activation of the Akt-mTOR pathway and receptor tyrosine kinase in patients with solitary fibrous tumors

Cancer, 120(6):864-876, 2014

Yamada Y, Iwamoto Y, et al.:

Malignant solitary fibrous tumor with high-grade nuclear atypia: An alternate entity for the undetermined tumor group

Pathol Res Pract, 211(2):117-124, 2015

Kohashi K, Iwamoto Y, et al.:

Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: miR193a-5p is suggested to downregulate SMARCB1 mRNA expression

Mod Pathol, 27(6):832-839, 2014



- Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al.:  
Malignant peripheral nerve sheath tumors presenting as spinal dumbbell tumors: clinical outcomes and characteristic imaging features  
Eur Spine J, in press 2014
- Miyoshi K, Iwamoto Y, et al.:  
Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma  
Hum Pathol, 45(9):1900-1909, 2014
- Kohashi K, Iwamoto Y, et al.:  
ERG and SALL4 expressions in SMARCB1/INI1-deficient tumors: a useful tool for distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor  
Hum Pathology, 46(2):225-230, 2015
- Sakamoto A, Iwamoto Y, et al.:  
Aggressive clinical course of epithelioid angiosarcoma in the femur: a case report  
World J Surg Oncol, 12(1):281, 2014
- 中川亮, 松延知哉, 岩本幸英, 他 :  
上腕骨悪性腫瘍に対する腫瘍用人工肘関節置換術の治療成績の検討  
整形外科と災害外科, 63(3):643-648, 2014
- 幸山敦子, 松延知哉, 岩本幸英, 他 :  
橈骨遠位端に発生した骨肉腫に対し、広範切除および血管柄付き腓骨移植術を施行した2例  
整形外科と災害外科, 63(3):649-652, 2014
- Suzuki H, Hiraga H, et al.:  
A case of pure sclerosing epithelioid fibrosarcoma with a cytogenetic and fluorescence in situ hybridization study  
Pathol Int, 65(1):48-50, 2015
- Kataoka K, Hiraga H, et al.:  
A randomized phase II/III trial of perioperative chemotherapy with adriamycin plus ifosfamide vs gemcitabine plus docetaxel for high-grade soft tissue sarcoma: Japan Clinical Oncology Group study JCOG1306  
Jpn J Clin Oncol, 44:765-769, 2014
- Saito A, Hiraga H, et al.:  
Clinical experience using a tensor fascia lata flap in oncology patients  
Surg Today, 44(8):1438-1442, 2014
- Suzuki H, Hiraga H, et al.:  
Adult rhabdomyoma of the extremity  
Int J Surg Pathol, 22(7):634-639, 2014
- Saito A, Hiraga H, et al.:  
Posterior thigh flap revisited: clinical use in oncology patients  
Surg Today, 44(6):1013-1017, 2014
- Nishida Y, Chuman H, et al.:  
Chronic expanding hematoma with a significantly high fluorodeoxyglucose uptake on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography, mimicking a malignant soft tissue tumor  
J Med Case Rep, 8:349, 2014
- Miyamoto S, Chuman H, et al.:  
Early Mobilization after Free-flap Transfer to the Lower Extremities: Preferential Use of Flow-through Anastomosis  
Plast Reconstr Surg Glob Open, 2(3):e127, 2014
- Chuman H:  
Musculoskeletal tumor  
Gan To Kagaku Ryoho, 41(3):294-295, 2014
- Ogura K, Chuman H, et al.:  
Immediate soft-tissue reconstruction using a rectus abdominis myocutaneous flap following wide resection of malignant bone tumours of the pelvi  
Bone Joint J, 96-B(2):270-273, 2014
- Setsu N, Chuman H, et al.:  
Histological analysis suggests an invasion-independent metastatic mechanism in alveolar soft part sarcoma  
Hum Pathol, 45(1):137-142, 2014
- Kataoka K, Tanaka K, et al.:  
A randomized phase II/III trial of perioperative chemotherapy with adriamycin plus ifosfamide

vs gemcitabine plus docetaxel for high-grade soft tissue sarcoma: Japan Clinical Oncology Group study JCOG1306  
Jpn J Clin Oncol, 44:765-769, 2014

Kawano M, Tanaka K, et al.:  
Dendritic cells combined with immunogenic cell death induced by doxorubicin exhibits antitumor effects in osteosarcoma  
Oncol Let, in press 2014

Iwasaki T, Tanaka K, et al.:  
Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells  
Int J Oncol, 46(4):1543-50, 2015

細山継晃, 田仲和宏, 他:  
骨軟部肉腫に対する Gemcitabine+Docetaxel 併用療法の効果  
整形外科と災害外科, in press 2014

岩崎達也, 田仲和宏, 他:  
難治性軟部腫瘍に対するパゾパニブの効果  
整形外科と災害外科, in press 2014

Fukuta M, Toguchida J, et al.:  
Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media  
PLOS ONE, 9(12):e112291, 2014

Shimizu T, Toguchida J, et al.:  
IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress  
Cancer Res, 74(22):6531-6541, 2014

Totoki Y, Toguchida J, et al.:  
Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma  
Genome Res, 24(9):1411-1420, 2014

Takahashi R, Toguchida J, et al.:  
AFAP1L1, a novel associating partner with vinculin, modulates cellular morphology and motility, and promotes the progression of

colorectal cancers  
Cancer Med, 3(4):759-774, 2014

Iwata S, Hiruta T, et al.:  
Prognostic Factors in Elderly Osteosarcoma Patients: A Multi-institutional Retrospective Study of 86 Cases  
Ann Surg Oncol, 21(1):263-268, 2014

Kato H, Matsumine A, et al.:  
Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Inhibits Lung Metastasis in an Osteosarcoma Cell Line  
Oncology, 88(3):139-146, 2014

Niimi R, Matsumine A, et al.:  
Cortical Thickness of the Femur and Long-term Bisphosphonate Use  
J Bone Miner Res, 30(2):225-31, 2015

Nakamura T, Matsumine A, et al.:  
Determination of the LD50 of acridine orange via intravenous administration in mice in preparation for clinical application to cancer therapy  
In Vivo, 28(4):523-527, 2014

Kataoka K, Matsumine A, et al.:  
Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. 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  
Jpn J Clin Oncol, 44(8):765-769, 2014

Niimi R, Matsumine A, et al.:  
Determinants associated with bone mineral density increase in response to daily teriparatide treatment in patients with osteoporosis  
Bone, 66:26-30, 2014

Miyazaki T, Matsumine A, et al.:  
Bisphosphonate release profiles from magnetite microspheres  
J Biomater Appl, 29(4):543-547, 2014

- Nakamura T, Matsumine A, et al.:  
Role of high-sensitivity C-reactive protein in the differentiation of benign and malignant soft tissue tumors  
*Anticancer Res*, 34(2):933-936, 2014
- Yamakado K, Matsumine A, et al.:  
Radiofrequency ablation for the treatment of recurrent bone and soft-tissue sarcomas in non-surgical candidates  
*Int J Clin Oncol*, 19(5):955-962, 2014
- Nakamura T, Matsumine A, et al.:  
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  
*Int Orthop*, 38(4):825-830, 2014
- Niimi R, Matsumine A, et al.:  
Efficacy of the dynamic radiographs for diagnosing acute osteoporotic vertebral fractures  
*Osteoporos Int*, 25(2):605-612, 2014
- Niimi R, Matsumine A, et al.:  
An algorithm using the early changes in PINP to predict the future BMD response for patients treated with daily teriparatide  
*Osteoporos Int*, 25(1):377-384, 2014
- Niimi R, Matsumine A, et al.:  
Analysis of daily teriparatide treatment for osteoporosis in men  
*Osteoporos Int*, in press 2015
- 明田浩司, 松峯昭彦, 他:  
脊椎椎体骨折の追跡コホート調査 既存骨骨折が新規骨折の発生様式に与える影響  
*J Spine Res*, 5(2):145-150, 2014
- 浅野貴裕, 松峯昭彦, 他:  
上腕皮下に発生した骨外性骨肉腫の1例  
中部日本整形外科災害外科学会雑誌,  
57(2):321-322, 2014
- 宮村岳, 松峯昭彦, 他:  
骨腫瘍と鑑別を要した特発性大腿骨頭壊死症の1例  
中部日本整形外科災害外科学会雑誌,  
57(2):293-294, 2014
- 奥野一真, 松峯昭彦, 他:  
骨外病変を伴った大腿骨近位悪性骨腫瘍における腫瘍用人工関節置換術後の患肢機能の検討  
中部日本整形外科災害外科学会雑誌,  
57(1):25-26, 2014
- Fujiwara T, Ozaki T, et al.:  
RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis  
*Mol Ther Nucleic Acids*, 2:3:e189, 2014
- Fujiwara T, Ozaki T, et al.:  
MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers  
*Biomed Res Int*, 2014:592868, 2014
- Fujiwara T, Ozaki T, et al.:  
Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells  
*Stem Cells*, 32(4):959-973, 2014
- Nakada E, Ozaki T, et al.:  
Long-term follow-up of resection-replantation for sarcoma in the distal radius  
*J Orthop Sc*, 19(5):832-837, 2014
- 武田健, 尾崎敏文, 他:  
主訴からみる診察フローチャート  
関節外科, 33巻4増刊, 128-142, 2014
- 藤原智洋, 尾崎敏文, 他:  
軟部腫瘍の診療における評価法の活用  
関節外科, 2014年10月増刊号, 182-210, 2014
- 藤原智洋, 尾崎敏文, 他:  
miRNA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, 50巻12月, 97-104, 2014
- Iwata S, Yonemoto T, et al.:  
Prognostic factors in elderly osteosarcoma

patients: A multi-institutional retrospective study of 90 cases  
Ann Surg Oncol, 21:263-268, 2014

Iwata S, Yonemoto T, et al.:  
Impact of infiltrative growth on the outcome of patients with undifferentiated pleomorphic sarcoma and myxofibrosarcoma  
J Surg Oncol, 110:707-711, 2014

Yonemoto T, et al.:  
The prognosis of osteosarcoma occurring as second malignancy of childhood cancers may be favorable: Experience of two cancer centers in Japan  
Int J Clin Oncol, in press 2014

Tsujimura H, Yonemoto T, et al.:  
Successful treatment of histiocytic sarcoma with induction chemotherapy consisting of dose-escalated CHOP plus etoposide and upfront consolidation auto-transplantation  
Int J Hematol, 100:507-510, 2014

Koike M, Yonemoto T, et al.:  
Development of the Japanese version of the Minneapolis-Manchester Quality of Life Survey of Health - Adolescent Form (MMQL-AF) and investigation of its reliability and validity  
Health Qual Life Outcomes, 12:127, 2014

Yamazaki F, Morioka H, et al.:  
Successful treatment of metastatic rhabdomyosarcoma with radiochemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation  
Jpn J Clin Oncol, 45(2): 225-228, 2014

Fukuda S, Morioka H, et al.:  
Computed tomography-guided resection of osteoid osteoma of the sacrum: a case report  
J Med Case Rep, 18;8:206, 2014

Kobayashi E, Morioka H, et al.:  
MicroRNA Expression and Functional Profiles of Osteosarcoma  
Oncology, 86(2):94-103, 2014

Mori T, Morioka H, et al.:

TNF $\alpha$  promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state  
Oncogene, 33:4236-4241, 2014

Kanagawa H, Morioka H, et al.:  
Mycobacterium tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2  
J Bone Miner Metab, in press 2014

Kikuta K, Morioka H, et al.:  
Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma  
Biochim Biophys Acta, in press 2014

Kikuta K, Morioka H, et al.:  
An analysis of factors related to the tail-like pattern of myxofibrosarcoma seen on MRI  
Skeletal Radiol, 44(1):55-62, 2014

Nakayama R, Morioka H, et al.:  
Clinical Outcome after Bone Metastasis (BM) Surgery in Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma (DTC): A Retrospective Study of 40 Cases  
Jpn J Clin Oncol, 44(10):918-925, 2014

Sato Y, Morioka H, et al.:  
The vitamin D analogue ED71 but Not 1,25(OH) $_2$ D $_3$  targets HIF1 $\alpha$  protein in osteoclasts  
PLoS One, 6;9(11):e111845, 2014

宇高徹, 森岡秀夫, 他:  
横紋筋肉腫治療後 26 年で発症した放射線誘発性軟骨肉腫の 1 例  
臨床整形外科, 49(8):723-728, 2014

増田秀輔, 森岡秀夫, 他:  
脛骨遠位に発生した淡明細胞型軟骨肉腫の 1 例  
関東整災誌, 45(2):129-134, 2014

須佐美知郎, 森岡秀夫, 他:  
【人工関節置換術-最新の知見】 特殊な疾患、高度の変形を伴う例に対する人工関節 腫瘍 小児下肢悪性骨腫瘍に対するセラミックス製人工顆を用いた患肢温存手術  
別冊整形外科, 65:218-221, 2014

須佐美知郎, 森岡秀夫, 他:  
【整形外科の手術手技-私はこうしている】 脊椎・