

26-A-9 希少がんの全国規模の研究基盤構築による研究の推進

近藤 格

国立がん研究センター 研究所

**研究の分類・属性**

発がん・がん生物学分野

**研究の概要**

本研究の目的は、希少がんの研究を推進するための全国的な研究基盤を構築することである。がん研究において臨床検体から引き出される情報はきわめて重要であり、新しい治療法の開発には臨床検体の使用は不可欠である。一方、希少がんの臨床検体は数、量ともにきわめて限られており、メジャーな悪性腫瘍のように臨床検体そのものをバンク化して一般に配布することはできない。有限な臨床検体を無限の研究リソースに変換することが必要である。

有限な臨床検体を無限の研究リソースに変換するための方策として、本研究では、1) 臨床検体から腫瘍細胞を株化して外部の研究者がアクセスできるようにする。2) 臨床検体に含まれる腫瘍細胞の網羅的遺伝子解析データを採取しデータバンクして一般公開する。そして、3) 全国規模のネットワークの構築を視野に入れた多施設共同研究を実施する。希少がんとしては肉腫と悪性脳腫瘍を対象とするが、希少がん全般に本アプローチを展開することを検討する。

国立がん研究センターには希少がん症例が集まりやすく、希少がんの株化やデータ採取を行いやすい。希少がんの細胞株はごく一部の組織型においてしか公的にバンク化されておらず、臨床検体を用いた網羅的遺伝子解析のデータベースは存在しないことが、新しい治療法の開発する上での妨げとなっている。株化された腫瘍細胞やデータベースは研究のあらゆる場面で必要とされているものの、個別研究としては研究費を獲得しにくく、研究者の個人的な業績にはなりにくい。したがって、公的な事業として推進されるべき性格の研究である。希少がんの研究は、一施設の症例だけで行うことは困難であり多施設共同研究が必要である。全国規模の臨床試験が実施されてきた経緯および特定の学閥に支配されない組織体制などから、国立がん研究センターは多施設共同研究や全国ネットワークの構築を推進しやすい。本研究は、このような国立がん研究センターの利点を活用する。

本研究期間内には、腫瘍細胞の株化および網羅的遺伝子解析データベースの実現可能性を検証し、また、実際に成果を出し、本研究の有効性を全国の研究者にアピールできるようにする。また、全国ネットワークの形成を視野に入れて多施設共同研究を推進する。多くの組織型について研究期間内にすべての実験を終了することはできないが、研究期間中に同様のアプローチを肉腫、悪性脳腫瘍以外の希少がんに拡大するように努める。腫瘍細胞の株化およびデータベース構築はある程度の年月をかけて行う必要があるため、研究期間終了後は、外部資金を獲得するなどして本研究を継続することを試みる。

**平成 27 年度研究経費**

14,986 千円

## 研究班の組織

研究者名	所属研究機関名・職名	分担研究課題名
近藤 格	国立がん研究センター・希少がん研究分野・分野長、希少がん対策室・室員	肉腫のPDXモデル・初代培養細胞株の樹立と分子背景の解析 肉腫の網羅的発現解析とデータベース構築
市村 幸一	国立がん研究センター・脳腫瘍連携研究分野・分野長	悪性脳腫瘍のPDXモデル・初代培養細胞株の分子背景の解析 脳腫瘍の網羅的発現解析・遺伝子変異解析とデータベース構築
今井 俊夫	動物実験支援施設・支援施設長	肉腫および悪性脳腫瘍のPDXモデル・初代培養細胞株の樹立
川井 章	国立がん研究センター中央病院・骨軟部腫瘍科・医長、希少がん対策室・室長	肉腫の臨床情報の解析
成田 善孝	国立がん研究センター中央病院・脳神経外科・科長、希少がん対策室・室員	悪性脳腫瘍の臨床情報の解析
吉田 朗彦	国立がん研究センター中央病院・病理科・医員、希少がん対策室・室員	肉腫と悪性脳腫瘍の病情報の解析
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及び京都大学iPS細胞研究所分化誘導研究分野・教授	肉腫のPDXモデル・初代培養細胞株の樹立と分子背景の解析
尾崎 敏文	岡山大学医歯薬学研究科 生体機能再生・再建学 整形外科教授	肉腫のPDXモデル・初代培養細胞株の樹立と分子背景の解析

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

### 全期間

#### (目的と到達目標)

肉腫及び悪性脳腫瘍の全国の研究基盤を構築することが本研究の目的である。そのためにPDX および細胞株を

樹立し、網羅的遺伝子解析のデータベースを構築する。そして、希少がん研究を全国規模のネットワークを介して行うための組織体制を構築する。

## 第2年次

### (到達目標)

肉腫及び悪性脳腫瘍を対象としてPDXモデルおよび初代培養細胞株を樹立する。そして、希少がん樹立した肉腫及び悪性脳腫瘍のPDXモデルおよび初代培養細胞の分子背景の解析を継続する。多施設共同研究を行い、希少がん研究の全国規模のネットワークの構築のあり方を検討する。網羅的解析データの公開に向けて成果をまとめる。国立がん研究センター内部および製薬企業など外部の組織との共同研究を通じて、樹立したPDXモデルおよび初代培養細胞株を活用する。

### (年次評価時点の実績要点)

肉腫及び悪性脳腫瘍を対象としてPDX、初代培養細胞、細胞株の樹立を試みた。

#### 〔肉腫〕

国立がん研究センター中央病院の肉腫症例を対象として、PDX、初代培養細胞、細胞株の樹立を行った。

樹立したPDX、初代培養細胞、細胞株の分子背景の解析を行った。具体的には、樹立できたPDX、初代培養細胞、細胞株に対して、NCC Oncopanelの解析を実施した(解析中)。

国立がん研究センター内部および製薬企業など外部の組織との共同研究を通じて、樹立したPDX、初代培養細胞、細胞株を活用するために、製薬企業と共同研究を開始した。具体的には、製薬企業が新規に開発した分子標的薬で、いくつかの肉腫培養細胞株(細胞バンク由来)にきわめて高い薬効を示すものについて、我々の樹立したPDX、初代培養細胞、細胞株を用いてその薬効を評価し分子背景を解明するという内容である。また、同様の共同研究の成立に向けた話し合いを他の製薬企業とも進めている。

多施設共同研究を行うために、さまざまな組織型の肉腫に対応できる方法論の確立を試みた。脂肪含有量や弾性繊維の量などが組織型ごとに異なり、その都度、手法を工夫する必要があった。多数症例で経験を積み、PDX、初代培養細胞、細胞株の樹立に向けて臨床検体を引き受けることができる技術レベルに到達した。また、同一性試験、マイコプラズマチェック、分子背景の解析、情報管理システムなど、外部の臨床検体を引き受ける組織としての体裁を整えることができた。京都大学、岡山大学の分担研究者と多施設共同研究のあり方について話し合いを行い、合意に達し、倫理委員会の審査に向けて準備をしている。

希少がん研究の全国規模のネットワークの構築のあり方を検討するために、いくつかの学術集会で研究成果を発表し、整形外科医や病理医に意見を求めると共に、協力を呼びかけた。概ねたいへん良好な反応であり、首都圏のいくつかの大学とはすぐにでも共同研究を開始できる印象である。さらに意見を聴取して、臨床検体を提供する側にメリットのある条件を決める予定である。

網羅的解析データの公開に向けてデータを採取した。具体的には、骨に原発する悪性腫瘍として骨肉腫とユースティング肉腫に着目してDNAメチル化のデータを採取した。

#### 〔悪性脳腫瘍〕

国立がん研究センター及び共同研究機関において手術された脳腫瘍の新鮮手術検体を動物実験支援施設・高橋真美研究員の支援により免疫不全動物(NOGマウス)の皮下に移植し、PDXモデルの作成を試みた。本年度は中枢神経系悪性リンパ腫1例を含む2例の移植を行い、経過を観察している。昨年度移植した6例については、2例が樹立されたため(いずれもYolk sac tumor)、移植腫瘍を再移植可能な形で凍結保存してある。他の2例(Yolk sac tumor x1, Anaplastic ependymoma x1)については腫瘍の生着が認められたため、複数回の継代を繰り返して現在も観察を続けている。残り2例については現在まで生着の兆候はない。

#### 〔病理診断〕

第1年次に行った滑膜肉腫診断におけるSMARCB1染色の意義についての検討を進め、その診断的有用性を確認した。

病理診断の見直し作業を通して、近年注目されている CIC 融合遺伝子を有する未分化肉腫を 20 症例同定したため、その臨床病理像を詳細に検討し、Ewing 肉腫との鑑別に有用な形態的・免疫組織化学的パラメータを同定した。

病理診断の見直し作業において、これまで認識されていなかったと思われる女性外陰領域の SMARCB1 消失を伴う腫瘍の一群を同定し、新しい疾患単位として MELTVR という名称で提唱した。

## 研究成果と考察

### 第 2 年次評価時点

#### 1-A 網羅的遺伝子解析のデータ採取

##### サブテーマ 1

##### 鑑別診断のための診断バイオマーカーを探索するための網羅的解析 (滑膜肉腫、MPNST)

第一年次にパイロット的に行った SMARCB1 染色を用いた滑膜肉腫と MPNST の鑑別診断に関する検討を継続し、さらに多数の腫瘍亜型と比較することで、SMARCB1 染色性減弱が滑膜肉腫に特異的であることを確かめ、論文に発表した。MPNST における PRC2 不活化に伴う H3K27me3 染色の意義については、別の研究費の枠組みで検討を続けることとした。

##### サブテーマ 2

##### 小児悪性骨腫瘍 (肉腫) における網羅的 DNA メチル化解析 (骨肉腫 30 症例)

小児悪性骨腫瘍 (肉腫) の代表である骨肉腫と Ewing 肉腫について、治療奏効性や予後に関わる因子を調べるために、ゲノム網羅的にメチル化の解析を行った (図 1)。肉腫のメチル化プロファイルは消化管がん (食道がん、胃がん、大腸がんなど) と大きく異なること、低メチル化領域が多いことがわかった。メチル化によって制御される遺伝子の同定と機能解析を進めている。

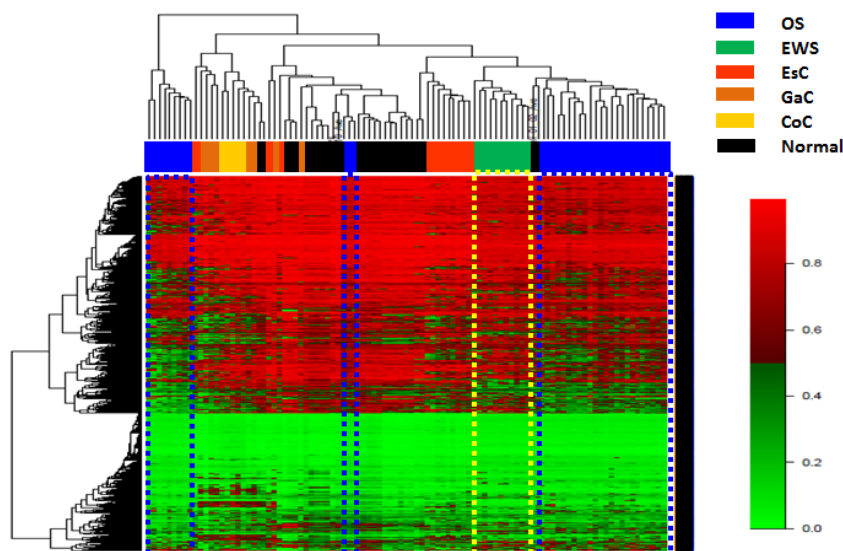


図 1 骨肉腫と Ewing 肉腫のゲノム網羅的 DNA メチル化の解析

階層的クラスタ解析でサンプルはそれぞれの組織型に対応して分類される。DNA メチル化のパターンは組織型を反映することを確認した。

##### サブテーマ 3

##### 頭蓋内悪性リンパ腫 (PCNSL) の予後・治療反応性予測因子及び治療標的を探索するための網羅的解析

第 2 年次に行った実験の検証を行い、結果をまとめて論文を発表した (Nakamura T, et al. Neuropathol Appl Neurobiol [Epub ahead of print] 2015)。

## サブテーマ4

### 臨床試験に含まれる悪性脳腫瘍のバイオマーカー探索のための網羅的解析(30 症例)

悪性脳腫瘍のバイオマーカー探索コホートは 800 例を超え、当初の予定を大幅に上回ったが、下記にあるように本研究開発費においては第 2 年次以降は網羅的遺伝子解析データの新規取得実験を縮小することとなったため、追加症例の解析は他の研究費で継続することとした。

#### 1-B 病理アーカイブの診断再検討

病理診断再確認の過程で、分類困難とされた腫瘍に注目してそれらの再分類をこころみた。

a. Ewing 肉腫、滑膜肉腫、分類不能肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫などと診断されてきた小円形細胞肉腫のなかに、CIC 融合遺伝子 (CIC-DUX4, CIC-FOXO4) を有する小円形細胞肉腫群が少なからず混在していることを明らかにした。後ろ向きに CIC 融合遺伝子陽性肉腫 20 例を同定し、これらを EWSR1 融合遺伝子陽性の古典的な Ewing 肉腫と臨床病理学的に比較した。その結果、CIC 肉腫は Ewing 肉腫と比較して、分葉状増殖、核の軽度大小不同、核小体明瞭性、紡錘形細胞化、粘液変性の諸パラメータにおいて形態的に区別しうることを示し、また CD99 の染色パターン、NKX2.2, calretinin, WT1 の免疫染色が両者の鑑別に有用であることを示した。さらに CIC 肉腫は Ewing 肉腫よりも予後不良であることを明らかにした。この結果を論文にまとめ、現在 In press の状態である。

b. 類上皮肉腫、分類不能肉腫、悪性ラブドイド腫瘍、骨外性粘液性軟骨肉腫などと診断されてきた腫瘍のなかに、特徴的な臨床病理像を呈する 9 例を同定し、新規腫瘍型の可能性がある特異な一群として myoepithelioma-like tumor of the vulvar region (MELTVR) という名称で提唱した。MELTVR は成人女性外陰領域 (外陰、鼠径部、恥骨前) 皮下の境界明瞭で分葉する腫瘍として発生し、特徴的な組織形態を示す。また免疫組織化学的にも AE1/AE3(dim), EMA+, S100-, CD34-, SMARCB1 (lost), ER+ という一貫した形質を示す。組織学的には悪性を強く示唆する形態を呈するが、奇妙なことに遠隔転移や腫瘍死した症例はなく、少数例での検討ながら予後良好の可能性を示唆する結果であった。この結果を論文にまとめ、発表した。

#### 2. PDX、初代培養細胞、細胞株の樹立

昨年度から樹立を始めたものも含め、現在の状況を整理した表を以下に示す (表 1)。分裂回数が少ない初期～中期培養の状態の細胞 (初代培養細胞) をストックし、生体に近い状態の細胞を使用する実験に備えている。継代を繰り返すうちに初代培養細胞の中から無限の増殖能を得て不死化した細胞が発生することがあり、このような細胞を「細胞株」とみなしている。そのような細胞は、軟寒天培地で培養するなどして腫瘍性を確認した。現状では、細胞株として樹立されたものは未だ少数である。初代培養細胞をたくさん保存している。これから初期初代培養細胞を創薬研究に役立てるべく、分子背景の解析および薬効評価の条件の検討を進めている。

表1 手術検体から直接培養した細胞

症例	最終診断名	ストック(数)			Soft agar assay
		P0-P9	P10-P27	P28-P30	
1	Angiosarcoma	0	0	0	-
2	Chondrosarcoma	2	0	0	-
3	Chondrosarcoma	6	6	0	-
4	Chondrosarcoma	7	0	0	-
5	Chondrosarcoma	0	0	0	-
6	Clear cell sarcoma	2	4	0	-
7	Clear cell sarcoma	0	0	0	-
8	Dendritic cell sarcoma	4	0	0	-
9	High grade sarcoma	1	0	0	-
10	Leiomyosarcoma	5	0	20	済
11	Leiomyosarcoma	6	4	0	-
12	Liposarcoma (dedifferentiated)	9	6	0	-
13	Liposarcoma (dedifferentiated, with homologous lipoblastic differentiation)	4	2	0	-
14	Liposarcoma (pleomorphic)	0	0	0	-

15	Liposarcoma (myxoid / round cell)	4	3	0	-
16	Liposarcoma (myxoid)	2	0	0	-
17	Liposarcoma (myxoid)	1	0	0	-
18	Liposarcoma (myxoid)	0	0	0	-
19	Malignant neoplasm sarcoma	3	0	0	-
20	Malignant ossifying fibromyxoid tumor	2	0	0	-
21	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	1	0	0	-
22	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	1	5	0	-
23	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	3	3	0	-
24	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	1	0	0	-
25	Myxofibrosarcoma (MFS)	1	0	0	-
26	Myxofibrosarcoma (MFS)	1	0	0	-
27	Myxofibrosarcoma (MFS)	0	0	0	-
28	Myxofibrosarcoma (MFS)	0	0	0	-
29	Myxofibrosarcoma (MFS)	0	0	0	-
30	Osteosarcoma	3	7	0	-
31	Osteosarcoma (high-grade)	1	0	0	済
32	Pleomorphic sarcoma	5	0	0	-
33	Rhabdomyosarcoma (mixed embryo and alveolar)	6	3	0	-
34	Round cell sarcoma	2	3	0	-
35	Sarcoma, not otherwise specified (NOS)	3	5	0	-
36	Sarcoma, not otherwise specified (NOS)	13	16	0	済
37	Sarcoma, not otherwise specified (NOS)	2	0	0	-
38	Sarcoma, not otherwise specified (NOS)	0	0	0	-
39	Sarcoma, not otherwise specified (NOS)	0	0	0	-
40	Solitary fibrous tumor	3	0	0	-
41	Synovial sarcoma	0	0	0	-
42	Unclassifiable	1	0	0	-
43	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	3	4	0	-
44	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	1	0	0	-
45	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	3	5	19	済
46	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	0	0	0	-
小計		112	76	39	4
合計				227	

未だ肉腫の組織型の種類が少なく、同じ組織型の細胞が複数扱われている。公的細胞バンクに存在しない多数の組織型の肉腫の細胞をそろえるためには、単施設だけでは不十分であり多施設が共同して樹立計画を行う必要があると考えられる。

30回以上分裂した細胞は無限の増殖能を獲得しつつあると考え、軟寒天培地での増殖を調べるなどして腫瘍能を検定している(図2)。肉腫のある組織型においては特徴的な遺伝子の異常が報告されており診断にも使われている。そのような組織型に関しては遺伝子の異常の測定を進めている。

たくさんの阻害剤をスクリーニングするためには均一な状態で安定して無限に増殖する「細胞株」、製品化に近い抗がん剤など少数の阻害剤の薬効評価には、生体に近いPDXや「初代培養細胞」が有用だと考えている。

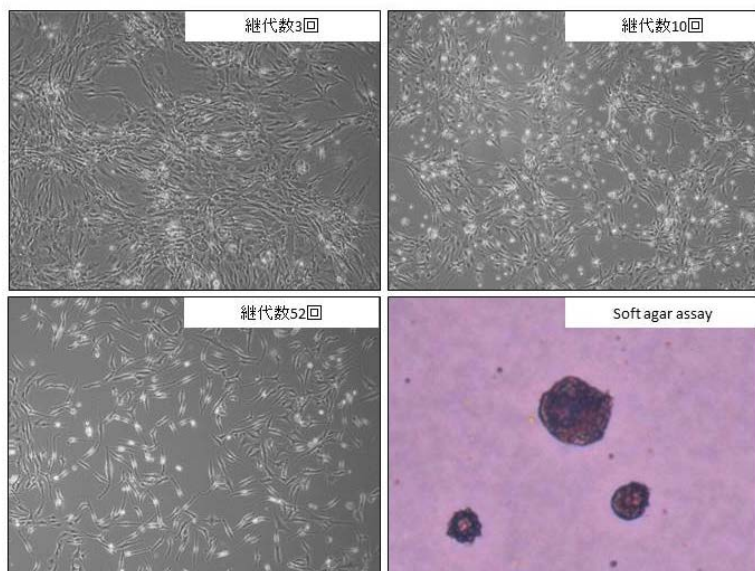


図2 平滑筋肉腫の例。継代を重ねるごとに形態的に均一な細胞集団となった。最終的に軟寒天培地にて腫瘍性を確認した。

第2年次は、初代培養・細胞株の樹立の体制を確立した。具体的には、個体認識のための in-house の STR 測定実験系、マイコプラズマ検出試験と除染系、進捗状況を症例単位で一元的に管理するための in-house データベース、などを構築した (図3)。

検体番号SCC#	52	最終診断名	Rhabdomyosarcoma, mixed embryo and alveolar	実験開始日	2015/02/02
		術前診断名	Rhabdomyosarcoma	PDX番号	なし
対象組織	手術検体	PDX	その他	PDX組織識別番号	なし
組織を分取した日	2015/02/02	樹立	平成26年	平成27年	平成28年
培養皿番号	SCC-52	継代数	5	顕微鏡写真	
継代・播種日	2015/03/10				
播種dishサイズ	φ 10cm	細胞分取・剥離条件	0.05% Trypsin-EDTA	Mycoplasma	陰性
播種dish枚数	2	培地	DMEM		未実施
細胞冷凍保存本数	1	血清濃度	FBS 10%	STR	同一
経過	継代中	添加剤	Antibiotic-Antimycotic		未実施
備考	化学療法なし 初発 3/20 増殖速度は依然として遅い 細胞に均一性がみられ てきた。	培地交換等		NCC-Chocpanel	実施
		特殊処理	1-t/1-O ver.1.3		未実施
		播種dish表面処理など	通常	融合遺伝子	FOXO1 rearranged
		PDX樹立	平成27年	遺伝子変異	

図3 実験・進捗管理システムの端末。検体の採取から樹立までの情報を一元化し、メンバー全員が情報をリアルタイムに共有できるようにした。プロジェクト管理や消耗品状況の把握など、研究業務の効率化のためのシステムに発展させる計画である。

PDXについては、myxoid fibrosarcoma、undifferentiated pleomorphic sarcoma、angiosarcoma、epithelioid angiosarcoma、perineurioma、extraskeletal myxoid chondrosarcoma、chondrosarcoma、osteosarcoma、synovial sarcoma、alveolar soft-part sarcoma、clear cell sarcoma、cic-associated sarcoma、high grade sarcoma、spindle cell sarcoma、sarcoma (indefined)、sarcoma (not otherwise specified)、などの移植を手掛けた (29 症例)。そして昨年度移植分より 7 症例、今年度移植分より 2 症例、合計 9 症例分について新たに PDX 株の樹立に成功した。

PDX に移植された腫瘍からの細胞株の樹立も試みた (表 2)。樹立した PDX と対になる細胞株は創薬研究において有用だと考えている。手術検体から直接の培養と並行して、PDX で増殖させてから培養系に移す実験を行った。一部は細胞株の樹立まで成功し、残りは継代・観察を続けている。

表2 PDX から培養した細胞

症例	最終診断名	ストック(数)			Soft agar	Geno-typing
		P0-P9	P10-P27	P28-P30		
1	Clear cell sarcoma	3	0	0	-	-
2	Leiomyosarcoma	8	10	40	済	済
3	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	2	0	19	済	済
4	Myxofibrosarcoma (MFS)	11	9	0	-	-
5	Myxofibrosarcoma (MFS)	7	7	10	-	済
6	Myxofibrosarcoma (MFS)	15	9	0	-	-
7	Liposarcoma (myxoid)	3	0	0	-	-
8	Osteosarcoma (high-grade)	19	14	10	済	済
9	Liposarcoma (pleomorphic)	1	5	0	-	-
10	Rhabdomyosarcoma (mixed embryo and alveolar)	2	0	0	-	-
11	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	4	4	0	-	-
12	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	3	5	50	済	済
13	Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS)	0	0	20	済	済
14	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	0	0	0	-	-
15	Myxofibrosarcoma (MFS)	0	0	0	-	-
16	Myxofibrosarcoma (MFS)	0	0	0	-	-
17	Unclassifiable	0	0	0	-	-
18	Angiosarcoma	0	0	0	-	-
19	Chondrosarcoma	0	0	0	-	-
20	Chondrosarcoma	0	0	0	-	-
21	Dendritic cell sarcoma	0	0	0	-	-
22	Leiomyosarcoma	0	0	0	-	-
23	Liposarcoma (dedifferentiated)	0	0	0	-	-
24	Liposarcoma (dedifferentiated, with homologous lipoblastic differebtiation)	0	0	0	-	-
25	Liposarcoma (liposarcoma)	0	0	0	-	-
26	Liposarcoma (liposarcoma)	0	0	0	-	-
27	Liposarcoma (myxoid / round cell)	0	0	0	-	-
28	Liposarcoma (myxoid)	1	4	0	-	-
29	Liposarcoma (myxoid)	0	0	0	-	-
30	Malignant ossifying fibromyxoid tumor	0	0	0	-	-
31	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	1	0	0	-	-
32	Malignant periphera nerve sheath tumor (MPNST)	0	0	0	-	-
33	Myxofibrosarcoma (MFS)	3	0	0	-	-
34	Pleomorphic sarcoma	0	0	0	-	-
35	Round cell sarcoma	0	0	0	-	-
36	Sarcoma, not otherwise specified (NOS)	0	0	0	-	-
37	Solitary fibrous tumor	3	2	10	-	済



小  
計  
合  
計

86 69 159 5 7  
314

培養細胞合計 ストック本数

541 5 7

肉腫は組織型によって腫瘍組織から腫瘍細胞を回収する方法が異なる。したがって、標準的な初代培養の方法は肉腫では存在しない。我々の経験では、脂肪含有量や弾性繊維の量などが組織型ごとに大きく異なり、その都度、何通りもの手法を工夫する必要があった。技術的な問題として失敗をしないように、貴重な臨床検体を外部から受け入れる際は前もって十分な検討をすることが必要である。平成26年度以降、いろいろな組織型について経験を積み、外部から臨床検体を受け入れることができるレベルに到達したと結論した。分担研究者と打合せをして了解を得て、それぞれの機関において倫理委員会に申請しているところである。また、希少がんの培養細胞株を作製している研究者と連携し、情報の共有を図ったり、使用可能な希少がん細胞のバーチャルデータベースを作成することなどを検討中である。当センターに期待される役割を考えると、全国の研究者の役に立つサービスを提供できるようになることが望ましいと考えている。

同様のことは肉腫（そして悪性脳腫瘍）以外のあらゆる希少がんにあてはまると考えられる。本研究では希少がんのうち肉腫と悪性脳腫瘍を当面は対象としているが、希少がん全体を対象とする方法論、戦略論を確立することが本研究班の長期的な目的であり、国立がん研究センターの研究に求められる方向性と一致していると考えている。そのためのフィージビリティ・スタディーとして、来年度以降は多施設共同の研究に取り組む。

樹立する細胞の実用的な側面を強化するために、希少がんワーキンググループや希少がんへ導入が図られる分子標的薬の臨床試験との連携など、臨床サイドの活動をフォローし、本研究の活動を臨床に役立てる機会をとらえようとしている。新しい抗がん剤の感受性を調べる共同研究については、国内企業1社と話し合いを進めている、平成28年度の後半から肉腫のPDX、平成29年度後半から初代培養細胞や細胞株、をそれぞれ導出したり、それらを使用した研究をセンター内で行う計画である。そのほか、肉腫に対する分子標的薬の臨床試験を計画している複数の製薬企業と話し合いを進めている。センター内の臨床医と連携をとり臨床の状況を鑑みながら、本研究の成果を臨床に役立てる予定である。その過程において、どのような研究リソースが求められていて、どのようなデータあるいはイノベーションが必要かを検討していきたい。

### 倫理面への配慮

肉腫の研究については「ゲノム・プロテオーム解析に基づく骨軟部腫瘍の分子病態把握とその臨床応用を目指す多施設共同研究」、悪性脳腫瘍の研究については「悪性脳腫瘍の新たなバイオマーカー及び分子標的の探索とそれらの臨床応用に向けた多施設共同研究による遺伝子解析」において承認が得られている。他施設に協力を仰ぐ場合には、共同研究者の追加についてすでに承認が得られている上述の研究計画に修正を加えて倫理委員会から承認を得、同時にそれぞれの施設の倫理委員会で本研究の実施に関して承認を得て実施する。

#### 【疫学研究】

臨床検体を用いた実験は、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会等の承認の下、試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ行う。臨床検体が研究に使用されることについて口頭と文書で説明が行われ、提供を断ってもいっさいの不利益が及ばないこと、同意を後に撤回することができることが説明された提供者からの検体を使用する。連結可能匿名化などによって、個人を特定するような情報を厳重に保護し、提供者に不利益が及ばないよう最大限の配慮を払う。

#### 【ゲノム研究】

解析方法の検証研究に使用する解析データの取得に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」並びに「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し、個人情報保護等、試料等提供者の人権擁護上の配慮を十分に行い、また患者にとって不利益や危険性が起こらないように留意し、検体の使用について同意が得られた検体のみを用いる。検体については、国立がん研究センター中央病院個人情報管理者によって連結可能匿名化の作業を行った後に、解析を行う。

### 【動物実験】

動物実験は、動物実験規則にしたがい、「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」を遵守し、動物実験倫理委員会の承認を受けて行う。実験動物は研究上の目的を達するに最小限の数のものを使用する。動物に無用な苦痛を与えないように最大限の注意を払い、外科的な処置を行う際には適切な麻酔を行うなどして苦痛の軽減に努める。

### 【遺伝子組み換え実験】

「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び関連法令に従い、遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けて行う。

## 本研究に関連する、本研究期間中の主な論文・学会発表等

### 第2年次

#### (雑誌論文)

がん研究開発費による成果であることが記載されているもの

1. Xiaoqing Pan, Akihiko Yoshida, Akira Kawai, Tadashi Kondo. Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies. *Expert Review of Proteomics*, in press.
2. Yoshida A, Yoshida H, Yoshida M, Mori T, Kobayashi E, Tanzawa Y, Yasugi T, Kawana K, Ishikawa M, Sugiura H, Maeda D, Fukayama M, Kawai A, Hiraoka N, Motoi T. Myoepithelioma-like Tumors of the Vulvar Region: A Distinctive Group of SMARCB1-deficient Neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2015 Aug;39(8):1102-13.
3. Ito J, Asano N, Kawai A, Yoshida A. The diagnostic utility of reduced immunohistochemical expression of SMARCB1 in synovial sarcomas: a validation study. *Hum Pathol*. 2015 Sep 25. [Epub ahead of print]
4. Tamaki S, Fukuta M, Sekiguchi K, Jin Y, Nagata S, Hayakawa K, Hineno S, Okamoto T, Watanabe M, Woltjen K, Ikeya M, Kato T Jr, Toguchida J. SS18-SSX, the Oncogenic Fusion Protein in Synovial Sarcoma, Is a Cellular Context-Dependent Epigenetic Modifier. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142991.

がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの

5. Yoshinori Asano, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Satoko Tatebe, Issay Kitabayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama, and Rieko Ohki. ER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis. *Sci Rep*, in press.
6. Kikuta K, Morioka H, Kawai A, Kondo T. Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1854(6):696-701.
7. Uemura N, Kondo T. Current advances in esophageal cancer proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1854(6):687-95.
8. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, Matsushita Y, Tamura K, Kinoshita M, Tanaka K, Fukushima S, Takami H, Arita H, Kubo A, Shuto T, Ohno M, Miyakita Y, Kocialkowski S, Sasayama T, Hashimoto N, Maehara T, Shibui S, Ushijima T, Kawahara N, Narita Y, Ichimura K. "Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas." *Neuropathol Appl Neurobiol* [Epub ahead of print] 2015
9. 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*. 106(1):115-124.2015
10. Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese version of the Toronto Extremity Salvage Score (TESS) for patients with malignant musculoskeletal tumors in the lower extremities. gura K, Uehara K, Akiyama T, Iwata S, Shinoda Y, Kobayashi E, Saita K, Yonemoto T, Kawano H, Chuman H, Davis AM, Kawai A. *J Orthop Sci*. 2015
11. Development and external validation of nomograms predicting distant metastases and overall survival after neoadjuvant chemotherapy and surgery for patients with nonmetastatic osteosarcoma: A multi-institutional study.

- Ogura K, Fujiwara T, Yasunaga H, Matsui H, Jeon DG, Cho WH, Hiraga H, Ishii T, Yonemoto T, Kamoda H, Ozaki T, Kozawa E, Nishida Y, Morioka H, Hiruma T, Kakunaga S, Ueda T, Tsuda Y, Kawano H, Kawai A. *Cancer*. 2015
12. Severe hypercalcemia following denosumab treatment in a juvenile patient. Setsu N, Kobayashi E, Asano N, Yasui N, Kawamoto H, Kawai A, Horiuchi K *J Bone Miner Metab*. 2015
  13. Pelvic ring reconstruction with a double-barreled free vascularized fibula graft after resection of malignant pelvic bone tumor. Ogura K, Sakuraba M, Miyamoto S, Fujiwara T, Chuman H, Kawai A. *Arch Orthop Trauma Surg*;135 (5):619-25. 2015
  14. Intercalary reconstruction after wide resection of malignant bone tumors of the lower extremity using a composite graft with a devitalized autograft and a vascularized fibula. Ogura K, Miyamoto S, Sakuraba M, Fujiwara T, Chuman H, Kawai A *Sarcoma*. 2015
  15. Clinicopathologic analysis of spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma. Yasui N, Yoshida A, Kawamoto H, Yonemori K, Hosono A, Kawai A. *Pediatr Blood Cancer*. 62(6):1011-6.2015
  16. Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma. Kikuta K, Morioka H, Kawai A, Kondo T. *Biochim Biophys Acta*. 1854(6):696-701. 2015.
  17. 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*. 44(1):55-62. 2015
  18. 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*.20 (3):613-6. 2015
  19. Clinical Outcomes of Surgical Treatments for Primary Malignant Bone Tumors Arising in the Acetabulum. Fujiwara T, Ogura K, Kobayashi E, Tanzawa Y, Nakatani F, Chuman H, Kawai A. *Sarcoma*.2015:430576.2015
  20. Second primary osteosarcomas in patients with retinoblastoma. Fujiwara T1, Fujiwara M2, Numoto K1, Ogura K1, Yoshida A3, Yonemoto T4, Suzuki S2, Kawai A. *Jpn J Clin Oncol*. 4. pii: hyv140.2015
  21. Myoepithelioma-like Tumors of the Vulvar Region: A Distinctive Group of SMARCB1-deficient Neoplasms. Yoshida A, Yoshida H, Yoshida M, Mori T, Kobayashi E, Tanzawa Y, Yasugi T, Kawana K, Ishikawa M, Sugiura H, Maeda D, Fukayama M, Kawai A, Hiraoka N, Motoi T. *Am J Surg Pathol*.39 (8):1102-13. 2015
  22. Rotationplasty with vascular reconstruction for prosthetic knee joint infection. Fujiki M, Miyamoto S, Nakatani F, Kawai A, Sakuraba M. *Case Rep Orthop*. 2015:241405.2015
  23. Trabectedin monotherapy after standard chemotherapy versus best supportive care in patients with advanced, translocation-related sarcoma: a randomised, open-label, phase 2 study. Kawai A, Araki N, Sugiura H, Ueda T, Yonemoto T, Takahashi M, Morioka H, Hiraga H, Hiruma T, Kunisada T, Matsumine A, Tanase T, Hasegawa T, Takahashi S. *Lancet Oncol*. 16(4):406-16.2015
  24. Osteosarcoma in Asian Populations over the Age of 40 Years: A Multicenter Study. Joo MW, Shin SH, Kang YK, Kawai A, Kim HS, Asavamongkolkul A, Jeon DG, Kim JD, Niu X, Tsuchiya H, Puri A, Wang EH, Chung SH, Chung YG *Ann Surg Oncol*. 22(11):3557-64.2015
  25. Prognostic Value of Relevant Clinicopathologic Variables in Epithelioid Sarcoma: A Multi-Institutional Retrospective Study of 44 Patients. Asano N, Yoshida A, Ogura K, Kobayashi E, Susa M, Morioka H, Iwata S, Ishii T, Hiruma T, Chuman H, Kawai A. *Ann Surg Oncol*. 22(8):2624-32.2015
  26. Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hineno S, Matsunaga K, Woltjen K, Kobayashi Y, Nagata S, Ikeya M, Kato T Jr, Okamoto T, Matsuda S, Toguchida J. Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131998.
  27. Konishi E, Nakashima Y, Mano M, Tomita Y, Nagasaki I, Kubo T, Araki N, Haga H, Toguchida J, Ueda T, Sakuma T, Imahori M, Morii E, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Futani H, Wakasa K, Hoshi M, Hamada S, Takeshita H, Inoue T, Aono M, Kawabata K, Murata H, Katsura K, Urata Y, Ueda H, Yanagisawa A. Primary central chondrosarcoma of long bone, limb girdle and trunk: Analysis of 174 cases by numerical scoring on histology. *Pathol Int*. 2015;65(9):468-75.
  28. Shibayama T, Okamoto T, Nakashima Y, Kato T, Sakurai T, Minamiguchi S, Kataoka TR, Shibuya S, Yoshizawa A, Toguchida J, Haga H. Screening of BCOR-CCNB3 sarcoma using immunohistochemistry for CCNB3: A clinicopathological report of three pediatric cases. *Pathol Int*. 2015;65(8):410-4.
  29. Ozaki T. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. *J Orthop Sci*. 2015; 20(2): 250-263.

30. Shinya T, Sato S, Kunisada T, Inai R, Yanai H, Ozaki T, Kanazawa S. Both a visual and a semiquantitative analysis for differentiating benign from malignant chondrogenic bone tumors using Tc-99m (V) DMSA scintigraphy: a prospective study. Nucl Med Commun. 2015; 36(8): 802-807.
31. Inai R, Shinya T, Tada A, Sato S, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Yanai H, Ozaki T, Kanazawa S. Diagnostic value of Thallium-201 scintigraphy in differentiating malignant bone tumors from benign bone lesions. Ann Nucl Med. 2015; 29(8): 674-681.
32. Uehara T, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Ozaki T, Usono H. Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas. Biomed Res Int. 2015;2015:820813
33. Ogura K, Fujiwara T, Yasunaga H, Matsui H, Jeon DG, Cho WH, Hiraga H, Ishii T, Yonemoto T, Kamoda H, Ozaki T, Kozawa E, Nishida Y, Morioka H, Hiruma T, Kakunaga S, Ueda T, Tsuda Y, Kawano H, Kawai A. Development and external validation of nomograms predicting distant metastases and overall survival after neoadjuvant chemotherapy and surgery for patients with nonmetastatic osteosarcoma: A multi-institutional study. Cancer. 2015; 121(21): 3844-3852.
34. Zhang W, Tanaka M, Sugimoto Y, Takigawa T, Ozaki T. Carbon-ion radiotherapy of spinal osteosarcoma with long-term follow. Eur Spine J. 2015;Epub ahead of print

#### (書籍)

1. Kondo T. Novel prognostic biomarker, pftin, in gastrointestinal stromal tumors: proteomics study. General Methods in Biomarker Research and Their Applications. Vol. 1, pp251-266, Series Editor: Victor R. Preedy, Springer, ISBN 978-94-007-7695-1
2. 近藤格「二次元電気泳動法を用いたがんバイオマーカー開発」遺伝医学MOOK オミクスで加速するがんバイオマーカー研究の最新動向 メディカルドゥ ISSN 1349-2527 63-71
3. 骨腫瘍の画像診断 疑う目を養う・鍛える. 尾崎敏文, 国定俊之 編, 2015, メジカルビュー社
4. 肉腫化学療法. 川井 章, 尾崎敏文 編, 2015, 13-19, 南山堂

#### (知的財産権)

欧州出願「Method for predicting sensitivity of osteosarcoma patient to anticancer agent (15161333.8)」シスメックス株式会社と共同研究を行い、実用化を推進中。

#### (政策提言 (寄与した指針等))

特記事項なし

#### (その他)

第11回日本臨床プロテオーム研究会を開催した(大会長:近藤格、2015年5月23日、国立がん研究センター)。大会長講演として「希少がんを研究すること」という演題で講演を行い、希少がん研究における基盤整備の重要性と本研究の活動について紹介した。