

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05547

研究課題名(和文) 口腔がん治療に有効な新規分子標的の探索と創薬展開

研究課題名(英文) Discovery of the novel targets for tongue cancer

研究代表者

本田 一文 (Kazufumi, Honda)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10260936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：I/II期舌がんでACTN4遺伝子増幅に関する死亡に関する危険率は、6.36(95% CI 1.85-21.91)であった。全生存期間ではACTN4タンパク質(-)/ACTN4遺伝子コピー数(正常)とACTN4タンパク質高発現(+)/ACTN4遺伝子コピー数(正常)は、ACTN4タンパク質高発現(+)/ACTN4遺伝子コピー数(増加)のMSTは有意に短かった。後発頸部リンパ節転移症例に関して再発後頸部かく清術を施行した症例のサブグループ解析ではACTN4遺伝子コピー数(増加)症例全例で3年以上の生存は見込めなかった。舌がんの治療戦略決定に資するバイオマーカーの抽出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACTN4タンパク質高発現症例は、後発頸部リンパ節転移の危険性が高いが、転移巣確認後での頸部かく清でもレスキューできる可能性があることを示している。一方で、ACTN4遺伝子コピー数の増幅症例は後発転移巣が確認されてからの頸部かく清では間に合わないことを示している。I/II期舌がんの治療戦略決定に資するバイオマーカーの抽出に成功した。今後は口腔がんでも転移活性評価と術後補助療法バイオマーカーとしての概念実証をしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Gene amplification of ACTN4 is closely associated with the metastatic potential of various cancers. We retrospectively estimated amplification of the ACTN4 gene to determine its usefulness as a prognostic biomarker for stage-I/II of tongue cancer. Patients (n=54) with stage-I/II of tongue cancer were retrospectively enrolled according to the Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). Copy number of ACTN4 and protein expression of actinin-4 were evaluated by fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC), respectively. The overall survival time of patients with gene amplification of ACTN4 was significantly shorter than that of patients without gene amplification (p=0.001, log-rank test). Gene amplification of ACTN4 was a significant independent risk factor for death of patients with stage-I/II tongue cancer ([HR]; 6.08). Gene amplification of ACTN4 is a potential of prognostic biomarker for overall survival of tongue cancer.

研究分野：バイオマーカー、腫瘍生物学、外科系歯学

キーワード：ACTN4 遺伝子増幅 予後マーカー 舌がん 補助化学療法 転移活性 治療戦略決定バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

① 口腔がん転移浸潤能を評価するバイオマーカーと転移抑制のための創薬標的の必要性

口腔がんの治療では、原発巣を外科的に完全切除に成功したにも関わらず、転移巣の制御に難渋し、不幸な転帰を迎えることがしばしばある。特に早期がんにおける後発遠隔転移は、予後不良を規定する因子となる。集団を対象とした口腔がんの治療は標準化されているが、治療対象となる個々の患者のがんの個性に立脚した治療は確立されていない。口腔がんの遠隔転移や再発を予測するバイオマーカーを確立できればがんの個性に立脚した術後療法やフォローアップメニューなどの個別化医療を提示できる可能性がある。また転移の制御は、口腔がんの予後の改善に貢献することが予測される。今回の研究では口腔がんの再発転移を予測するバイオマーカーを同定し、個別化医療バイオマーカーの資質と創薬標的の可能性についてその概念を実証（proof of concept: POC）する。

2. 研究の目的

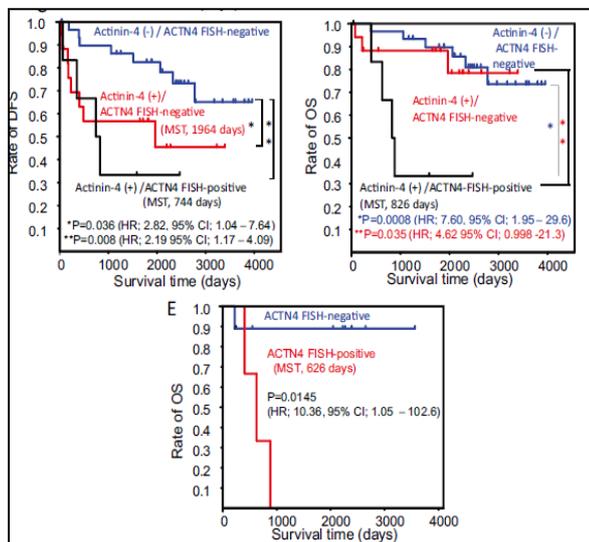
- ① 口腔がんの転移形質を規定する生物学的背景を解明し、後発転移や予後を予測するバイオマーカーを開発する。
- ② 転移を促進する細胞運動や浸潤に関与する細胞突起形成の生物学的機構を明らかにし、転移を阻止する創薬標的を抽出する。

3. 研究の方法

- ① 先行研究で同定された研究シーズ（*ACTN4*等）について、口腔がんのバイオマーカーや創薬標的としての妥当性を臨床検体や細胞株・モデル動物を用いて概念実証する。
- ② 先行研究の口腔がんキノームプロファイルから選別された創薬標的候補を再評価し既存薬・阻害化合物が存在する場合には口腔がんへの適応拡大やドラッグリポジショニングをする。
- ③ 研究シーズに対する阻害化合物の臨床試験に必要な前臨床データを取得する。

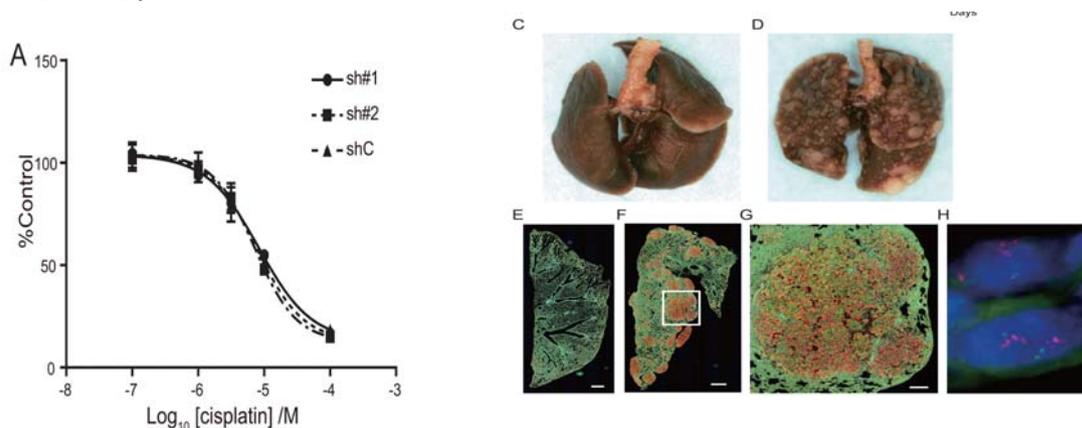
4. 研究成果

I/II 期舌がんて舌部分切除症例に関して *ACTN4* のタンパク質発現と遺伝子増幅を免疫組織化学および FISH 法で検討した。*ACTN4* タンパク質過剰発現している症例が 43%、遺伝子増幅している症例が 11% であった。*ACTN4* 遺伝子増幅に関する死亡に関する危険率は、6.36 (95% CI 1.85 - 21.91) であった。後発頸部リンパ節転移に関する median survival time (MST) は、*ACTN4* タンパク質発現 (-) / 遺伝子コピー数 (正常) / *ACTN4* タンパク質高発現 (+) / 遺伝子コピー数 (正常) 症例、*ACTN4* タンパク質高発現 (+) / 遺伝子コピー数 (増加) で、それぞれ「到達せず」、「1964 日」、「744 日」であった。後発頸部リンパ節転移までの期間は、*ACTN4* タンパク質発現 (-) / 遺伝子コピー数 (正常) と *ACTN4* タンパク質高発現 (+) / 遺伝子コピー数 (正常) 症例、*ACTN4* タンパク質高発現 (+) / 遺伝子コピー数 (増加) 症例間で統計学的有意に短かった。一方で、全生存期間で検討すると、*ACTN4* タンパク質 (-) / *ACTN4* 遺伝子コピー数 (正常) と *ACTN4* タンパク質高発現 (+) / *ACTN4* 遺伝子コピー数 (正常) は、MST に達しなかったが、*ACTN4* タンパク質高発現 (+) / *ACTN4* 遺伝子コピー数 (増加) の MST は、826 日と統計学的に有意に短かった。*ACTN4* タンパク質高発現 (+) / *ACTN4* 遺伝子コピー数 (正常) 症例における後発頸部リンパ節転移と全生存期間に対する MST の相違は、同症例が舌部分切除術による初回治療後の後治療が強く影響したものと考えられる。事実、舌部分切除後の後発頸部リンパ節転移症例に関して再発後頸部かく清術を施行した症例のサブグループ解析では、*ACTN4* 遺伝子コピー数 (正常) 症例の 5 年生存率は 85% 以上であったが、*ACTN4* 遺伝子コピー数 (増加) 症例全例で 3 年以上の生存は見込めなかった。本結果は、*ACTN4* タンパク質高発現症例は、後発頸部リンパ節転移の危険性が高いが、転移巣確認後の頸部かく清でもレスキューできる可能性があることを示している。一方で、*ACTN4* 遺伝子コピー数の増幅症例は後発転移巣が確認されてからの頸部かく清では間に合わないことを示している可能性がある。転移活性の高い腫瘍には原発腫瘍における治療のみならず潜在的



転移巣に関する十分な治療戦略を持って対処する必要があるのかもしれない。I/II 期舌がんの治療戦略決定に資するバイオマーカーの抽出に成功した。

同上仮説を実証する目的で、がん細胞株動物移植モデル実験を実施した。ACTN4 遺伝子コピー数の増幅が確認できる細胞株を免疫不全マウスの尾静脈に注入したところ、肺への遠隔転移を顕著に観察できたが、同細胞に ACTN4 のタンパク質発現をノックダウンした細胞株を作成しマウスの尾静脈にしても、肺への転移は確認できなかった。ACTN4 遺伝子コピー数の増幅は肺転移活性を増加させることで、予後不良を促している可能性がある。そこで、ACTN4 ノックダウン細胞株とペアレント細胞株で抗がん剤への感受性を確認したが、奏効性には変化は認められなかった。転移活性の高い腫瘍個性を判別し、補助化学療法実施は合理的と考えられる。同結果を参考に現在肺腺がんの補助化学療法効果予測バイオマーカーとして臨床開発を開始した。今後は口腔がんでも転移活性評価と術後補助療法バイオマーカーとしての POC を取得していく予定である。



引用文献

1. Shiraishi H, Fujiwara Y, Kakuya T, Tsuta K, Motoi N, Miura N, Watabe Y, Watanabe SI, Noro R, Nagashima K, Huang W, Yamada T, Asamura H, Ohe Y, ***Honda K****. Actinin-4 protein overexpression as a predictive biomarker in adjuvant chemotherapy for resected lung adenocarcinoma. *Biomark Med.* 2017 Jun 29. doi: 10.2217/bmm-2017-0150.

2. Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, Watabe Y, Miura N, Shoji H, Onidani K, Shibahara T, Honda K*. Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Apr 3. pii: S0901-5027(17)31345-0. 2017. doi: 10.1016/j.ijom.2017.03.001.

3. Miura N, Kamita M, Kakuya T, Fujiwara Y, Tsuta K, Shiraishi H, Takeshita F, Ochiya T, Shoji H, Huang W, Ohe Y, Yamada T, ***Honda K****. Efficacy of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer assessed by metastatic potential associated with ACTN4. *Oncotarget.* May 31;7(22):33165-78, 2016.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件) (全て査読有)

1. Onidani K, Shoji H, Kakizaki T, Yoshimoto S, Okaya S, Miura N, Sekikawa S, Furuta K, Lim CT, Shibahara T, Boku N, Kato K, ***Honda K****.

Monitoring of cancer patients via next-generation sequencing of patient-derived circulating tumor cells and tumor DNA. *Cancer Sci.* 2019 Jun 6. doi: 10.1111/cas.14092. [Epub ahead of print]

2. ***Honda K****. Katzke V. A. Hüsing A., Okaya¹ S, Shoji H, Onidani K, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Weiderpass E, Vineis P, Muller D, K, Tsilidis K. K, Palli D, Pala V, Tumino R, Naccarati A, Panico S, Aleksandrova K, Boeing H, Bueno-de-Mesquita H. B, Peeters² P. H 3, Trichopoulou A, Lagiou P, Khaw K.-T, Wareham N. J, Travis R. C, Merino S, Duell E. J, Rodríguez-Barranco M, Chirlaque M. D, Barricarte A, Rebours V, Boutron-Ruault M.-C, Romana Mancini³ F, Brennan P, Scelo G, Manjer J., Sund M, Öhlund D, Canzian F, Kaaks R*. CA19-9 and Apolipoprotein-A2 isoforms as detection markers for pancreatic cancer - a prospective valuation. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1877-1887. doi: 10.1002/ijc.31900. Epub 2018 Dec 4.
3. Abouleila Y, Onidani K, Ali A, Shoji H, Kawai T, Lim CT, Kumar V, Okaya S, Kato K, Hiyama E, Yanagida T, Masujima T, Shimizu Y, ***Honda K****. Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells. *Cancer Sci*. 2019 Feb;110(2):697-706. doi: 10.1111/cas.13915. Epub 2019 Jan 5
4. Nishiumi S, Fujigaki S, Kobayashi T, Kojima T, Ito Y, Daiko H, Kato K, Shoji H, Kodama Y, ***Honda K***, Yoshida M. Metabolomics-based Discovery of Serum Biomarkers to Predict the Side-effects of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2019 Jan;39(1):519-526. 2019. doi: 10.21873/anticancer.13143.
5. Iemoto T, Nishiumi S, Kobayashi T, Fujigaki S, Hamaguchi T, Kato K, Shoji H, Matsumura Y, ***Honda K***, Yoshida M. Serum level of octanoic acid predicts the efficacy of chemotherapy for colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019 Jan;17(1):831-842. 2019. doi: 10.3892/ol.2018.9731.
6. Sekikawa S, Onda T*, Miura N, Nomura T, Takano N, Shibahara T, ***Honda K***. Underexpression of α -1-microglobulin/bikunin precursor predicts a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2018 Dec;53(6):2605-2614. 2018. doi: 10.3892/ijo.2018.4581. Epub 2018 Oct 1.
7. Fujigaki S, Nishiumi S, Kobayashi T, Suzuki M, Iemoto T, Kojima T, Ito Yi, Daiko H, Kato K, Shouji H, ***Honda K***, Azuma T and Yoshida M. Identification of serum biomarkers of chemoradiosensitivity in esophageal cancer via the targeted metabolomics approach. *Biomark Med* 2018 Aug;12(8):827-840. 2018 doi: 10.2217/bmm-2017-0449. Epub 2018 Jul 25.
8. Kobayashi T, Sato Y, Nishiumi S, Yagi Y, Sakai A, Shiomi H, Masuda A, Okaya S, Kutsumi H, Yoshida M, ***Honda K***. Serum apolipoprotein A2 isoforms in autoimmune pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. 497(3):903-907. 2018
9. Yamaguchi H, Ito Y, Miura N, Nagamura Y, Nakabo A, Fukami K, ***Honda K***, Sakai R. Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells. *Eur J Cell Biol*. 2017 Oct;96(7):685-694. 2017.
10. Shiraishi H, Fujiwara Y, Kakuya T, Tsuta K, Motoi N, Miura N, Watabe Y, Watanabe SI, Noro R, Nagashima K, Huang W, Yamada T, Asamura H, Ohe Y, ***Honda K****. Actinin-4 protein overexpression as a predictive biomarker in adjuvant chemotherapy for resected lung adenocarcinoma. *Biomark Med*. 2017 Jun 29. doi:

10.2217/bmm-2017-0150. [Epub ahead of print]

11. Shoji H, Tada K, Kitano S, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Boku N, ***Honda K***, Yamada T, Heike Y, Hamaguchi T. The peripheral immune status of granulocytic myeloid-derived suppressor cells correlates the survival in advanced gastric cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Oncotarget* 2017 May 30. doi: 10.18632/oncotarget.18297. [Epub ahead of print].

12. Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, Watabe Y, Miura N, Shoji H, Onidani K, Shibahara T, ***Honda K****. Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Apr 3. pii: S0901-5027(17)31345-0. 2017. doi: 10.1016/j.ijom.2017.03.001.

13. Hirata Y, Kobayashi T, Nishiumi S, Yamanaka K, Nakagawa T, Fujigaki S, Iemoto T, Kobayashi M, Okusaka T, Nakamori S, Shimahara M, Ueno T, Tsuchida A, Sata N, Ioka T, Yasunami Y, Kosuge T, Kaneda T, Kato T, Yagihara K, Fujita S, Yamada T, ***Honda K***, Azuma T, Yoshida M. Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics. *Clin Chim Acta*. 2017 Feb 16;468:98-104. 2017. doi: 10.1016/j.cca.2017.02.011.

14. Yoneyama T, Ohtsuki S, ***Honda K***, Kobayashi M, Iwasaki M, Uchida Y, Okusaka T, Nakamori S, Shimahara M, Ueno T, Tsuchida A, Sata N, Ioka T, Yasunami Y, Kosuge T, Kaneda T, Kato T, Yagihara K, Fujita S, Huang W, Yamada T, Tachikawa M, Terasaki T. Identification of IGFBP2 and IGFBP3 As Compensatory Biomarkers for CA19-9 in Early-Stage Pancreatic Cancer Using a Combination of Antibody-Based and LC-MS/MS-Based Proteomics. *PLoS One*. Aug 31;11(8):e0161009, 2016.

15. Takahashi N, Iwasa S, Fukahori M, Sudo K, Sasaki Y, Shoji H, Honma Y, Okita NT, Takashima A, Hamaguchi T, Boku N, Shimada Y, ***Honda K***, Yamada T, Yamada Y. A phase I study of the combination of panitumumab and bevacizumab in KRAS wild-type colorectal cancer patients previously treated with fluoropyrimidine, oxaliplatin, irinotecan and bevacizumab. *Cancer Chemother Pharmacol*. Sep;78(3):567-75, 2016..

16. Miura N, Kamita M, Kakuya T, Fujiwara Y, Tsuta K, Shiraishi H, Takeshita F, Ochiya T, Shoji H, Huang W, Ohe Y, Yamada T, ***Honda K****. Efficacy of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer assessed by metastatic potential associated with ACTN4. *Oncotarget*. May 31;7(22):33165-78, 2016.

17. Shoji H, Miura N, Ueno H, ***Honda K****. Measurement of copy number of ACTN4 to optimize the therapeutic strategy for locally advanced pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2018 Sep;18(6):624-629. doi: 10.1016/j.pan.2018.06.003. Epub 2018 Jun 18.

18. ***Honda K****, Srivastava S. Potential usefulness of apolipoprotein A2 isoforms for screening and risk stratification of pancreatic cancer. *Biomark Med*. Nov;10(11):1197-1207, 2016.

① **本田一文** 「がんバイオマーカー探索から社会実装まで」 第 37 回日本口腔腫瘍学会 教育講演 2019 年 1 月 24 日 長崎市

② **本田一文** 「早期診断バイオマーカー探索から臨床開発・国際協働による展開へ」第 63 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 シンポジウム 1 「オミクス研究が切り開くがんバイオマーカー開発のカッティングエッジ」 (シンポジウム オーガナイザー 本田一文、鶴澤成和) 2018 年 11 月 2 日千葉市 (幕張メッセ国際会議場・国際展示場)

③ **本田一文** 「がんバイオマーカー探索研究から実用化研究・社会実装まで」第 36 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 ワークショップ 4 「臨床研究およびバイオマーカー等による個別化治療の現状と課題」 2018 年 1 月 26 日 新潟市 (新潟グランドホテル)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：森 泰昌

ローマ字氏名： Taisuke Mori

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター中央病院

部局名：病理科

職名：医員

研究者番号 (8 桁)：00296708

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：吉本 世一

ローマ字氏名： Seichi Yoshimoto

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター中央病院

部局名：頭頸部外科

職名：科長

研究者番号 (8 桁)：00462242