

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23390469

研究課題名(和文)キナーゼ抗体ライブラリーを用いた新規口腔がん治療標的分子の探索

研究課題名(英文)Development of novel molecular targets for oral cancer with kinome profile by antibody-based proteomics

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・その他部局等・その他

研究者番号：10260936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんの分子標的治療薬剤のバリエーションは他のがん種に比べて少ない。現在、各種がん治療に利用される分子標的には、タンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)が選択されることが多い。口腔がんにおけるキナーゼ発現プロファイルから、口腔がん特有な新規分子標的治療法を開発できる可能性がある。そこで、口腔がんをキナーゼ抗体を用いて網羅的に発現解析から口腔がんキナーゼプロファイルを完成させ、新規分子標的の可能性のあるキナーゼを同定した。そのうち1つは口腔がんの浸潤先進部に強く発現し、口腔がん転移阻止治療の開発に貢献する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Molecular target therapy has gained attention among the therapeutic strategies for cancer. To identify novel molecular targets for tongue cancer, we performed a proteomic analysis of surgical specimens of tongue cancer using an antibody library consisting of the kinome. We created a tissue microarray (TMA) comprising tongue cancer, and then we screened overexpressing kinase proteins in tongue cancer by antibody library. We identified kinase-X, which was overexpressed in the invasive front of the tongue cancer, but was not expressed at the normal mucosa of the tongue. Overexpression resulted from transfection of kinase-X to tongue cancer cells that showed increased cell motility. The increased cell motility was decreased by an administration of a small molecular inhibitor of kinase-X. Proliferation of cells transfected with kinase-X was decreased by the inhibition of kinase-X. We concluded that kinase-X has potential as a novel molecular target for squamous cell carcinoma of the tongue.

研究分野：外科系歯学

キーワード：キノーム 口腔がん 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

口腔がんはヒト個性にとって最も重要な顎顔面部に発症するため、最小限な侵襲で最大の効果を発揮する個別化医療の開発が求められている。個別化医療の遂行には、がんの個性を的確にとらえ、最適治療を予測するコンパニオン診断法が必要となる。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、個々の患者のがんの個性に立脚した治療はいまだ確立されていない。口腔がんの分子標的治療として抗 EGFR 抗体薬が臨床現場に投入されているだけで、他がん種に比較すると分子標的治療戦略のバリエーションが少ない。

他がん種での分子標的治療の適応を勘案すると、遺伝子変異やタンパク質の発現情報をバイオマーカーとして、特定のフラクションに対する分子標的治療の個別化が進められている。

口腔がん中で高悪性化形質を有する一部の症例を特異的に識別するコンパニオン診断バイオマーカーと、それら患者に使用できる分子標的薬剤の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔外科領域悪性腫瘍に対するコンパニオン診断バイオマーカーと新規治療標的分子候補の抽出である。

3. 研究の方法

本研究では、口腔がん TMA とキヌーム抗体ライブラリーを用いて口腔がん新規治療標的分子候補とそのコンパニオン診断バイオマーカーの開発を目指し、以下の基盤を開発から研究と、それに引き続き候補分子スクリーニング、生物学的検証研究を行った。

基盤開発 (図 1)

口腔がんパラフィンブロックの健常口腔粘膜部とがん部の 2 か所からコアを抽出し、41 例を搭載した**口腔がん TMA**を作成した。

口腔がん細胞株パネルの細胞塊をホルマリンで固定した**細胞ベレットアレイ**を作成し、口腔がん細胞株のタンパク質発現プロファイルやゲノムコピー数異常の検索を簡易に行える基盤を準備した。

キヌーム情報から 430 種類のキナーゼに対する抗体を集積し、キナーゼ抗体ライブラリーを構築した。

分子標的候補のスクリーニング

口腔がん TMA をキナーゼ抗体ライブラリーで免疫染色を行い、臨床情報、予後情報、病理所見を参考に分子標的候補のスクリーニングを行った。

がん細胞増殖アッセイ、浸潤アッセイ

標的分子候補の生物学的機能解析を、リポ

フェクトアミン法を用いた遺伝子導入法を用いたタンパク質強制発現法で解析した。

Wound healing assay, トラスウェルもぐりこみアッセイ、ATP による細胞増殖アッセイを用いて、浸潤能、細胞増殖速度を解析した。

図 1 基盤開発 舌がん TMA の作成とキナーゼ抗体ライブラリーを用いた分子標的候補同定方法

Materials and methods

High-throughput screening methods for kinase antibodies

1. TMA of stage I/II tongue cancer

Head and neck oncology, National Cancer Center Hospital (1999-2007)

41 patients

2. Immunohistochemistry (IHC)

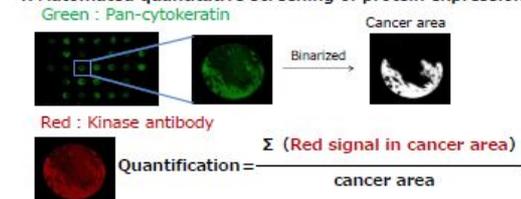
Each TMA was double-stained with anti pan-cytokeratin antibody (green fluorescence) and one of the 430 kinase antibodies (red fluorescence).

3. Virtual pathology imaging



$$41 \text{ patients} \times 430 \text{ kinase} = 17,630 \text{ data}$$

4. Automated quantitative screening of protein expressions



5. Screening for candidates of therapeutic targets of kinases for tongue carcinoma.

- ① Patients were classified into two groups, as high or low expression, according to hierarchy clustering analysis.
- ② We selected the kinase antibodies, with which statistical significances were recognized, from clinic-pathological data.

6. Confirmation of candidates by using whole-mount tissue slides

4. 研究成果

1) 国立がん研究センター中央病院で手術された 1/II 期舌扁平上皮がん以下記 3 点の条件を除外した 41 症例 (除外条件; A. 初回手術時の頸部かく清術施行例、B. 手術前後の補助化学療法施行例、C. 局所再発症例) で構成された 41 例を搭載した舌がん TMA を作成した (図 1)。

2) I/II 期舌扁平上皮がん TMA をキナーゼ抗体ライブラリーで免疫蛍光染色を行い、仮想病理画像と蛍光染色強度を利用したタンパク質発現プロファイル法から、舌扁平上皮がんの浸潤先進部に強発現し、健常舌粘膜に発現が認められないキナーゼ-X (Z-protein) を同定した (図 2)。

3) キナーゼ X (Z-プロテイン) の強発現症例は、発現が認められない症例に比較して、disease free survival (DFS), overall survival (OS) とともに不良で、DFS, OS に対する生存期間は、キナーゼ-X (Z-protein) の

高発現症例が、発現が認められない症例に比較して短かった(図2)。

4) 標的分子候補の生物学的機能解析を、リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入法を用いたタンパク質強制発現法で解析したところ、強制発現口腔がん細胞株は、コントロール細胞株に比較して、細胞の運動能が亢進していた。

5) Xキナーゼ(Z-protein)は、新規舌がんの治療標的として有用である可能性が高い。

図2、キナーゼ-X(Z-protein)の舌がん・舌健常粘膜部における発現と予後への関

Result

Two kinases had statistically significant differences for pathological differentiation, mode of invasion (Jakobsson classification) and late metastasis of cervical lymph nodes

430 kinases → Oncogene type → We called it Z-kinase
Tumor suppresser gene type

Expression of Z-kinase in tongue squamous cell carcinomas and normal tongue epithelium.



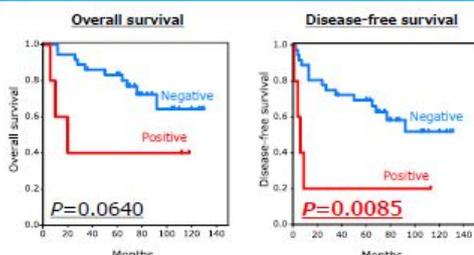
Representative cases of tongue squamous cell carcinomas (A,B) and normal tongue epithelium (C) showing negative (A,C) and positive (B) immunoreactivity with anti-Z-kinase antibody.

Correlation between protein expression of Z-kinase and late metastasis of cervical lymph nodes in patients with stage I/II tongue cancer (n=41).

The expression of Z-kinase was significantly associated with late metastasis of cervical lymph nodes.

	Negative (n=36)	Positive (n=5)	
Absence (n=30)	29(80.6%)	1(20.0%)	P=0.014
Presence (n=11)	7(19.4%)	4(80.0%)	

Survival time of patients with stage I/II tongue cancer according to protein expression of the Z-kinase.



5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

- 1: Murakami N, Matsumoto F, Yoshimoto S, Ito Y, Mori T, Ueno T, Tsuchida K, Kashihara T, Kobayashi K, Harada K, Kitaguchi M, Sekii S, Umezawa R, Takahashi K, Inaba K, Igaki H, Itami J. Patterns of recurrence after selective postoperative radiation therapy for patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2016 Mar 7;16(1):192.doi:10.1186/s12885-016-2229-x.
- 2: Ohtomo-Oda R, Komatsu S, Mori T, Sekine S, Hirajima S, Yoshimoto S, Kanai Y,

Otsuji E, Ikeda E, Tsuda H. SMYD2 overexpression is associated with tumor cell proliferation and a worse outcome in human papillomavirus-unrelated nonmultiple head and neck carcinomas. *Hum Pathol*. 2016 Mar;49:145-55. doi:

3. Honda K, Kobayashi M, Okusaka T, Rinaudo JA, Huang Y, Marsh T, Sasajima Y, Nakamori S, Sanada M, Shimahara M, Ueno T, Tsuchida A, Sata N, Ioka T, Yasunami Y, Kosuge T, Miura N, Kamita M, Sakamoto T, Shouji H, Jung G, Srivastava S, Yamada T. Plasma biomarker for detection of early stage pancreatic cancer and risk factors for pancreatic malignancy using antibodies for apolipoprotein-AII isoforms. *Sci. Rep*. 2015 Nov 9;5:15921.

4. Honda K. The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell Biosci*. 2015 Aug 18;5:41.

5. Watabe Y, Nomura T, Onda T, Yakushiji T, Yamamoto N, Ohata H, Takano N, Shibahara T. Malignant transformation of oral leukoplakia with a focus on low-grade dysplasia. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology Volume 28, Issue 1, January 2016, Pages 26–29, 2016*

6. Okamoto N, Suzuki H, Kawahara K, Honda K, Miura N, Hirashima T, Tamiya M, Morishita N, Shiroyama T, Tanaka A, Tani E, Hamaguchi M, Kitani M, Yamada T, and Kawase I. The Alternatively Spliced Actinin-4 Variant as a Prognostic Marker for Metastasis in Small-cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2015 Mar;35(3):1663-7.

7: Watanabe T, Ueno H, Watabe Y, Hiraoka N, Morizane C, Itami J, Okusaka T, Miura N, Kakizaki T, Kakuya T, Kamita M, Tsuchida A, Nagakawa Y, Wilber H, Yamada T and Honda K. ACTN4 copy number increase as a predictive biomarker for chemoradiotherapy of locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015 Feb 17;112(4):704-13.doi:

10.1038/bjc.2014.623. Epub 2015 Jan 20..

8: Tanaka N, Yamashita T, Yamamoto S, Matsunobu T, Tsuda H, Honda K, Yamada T, Tamai S, Shiotani A. Histological growth pattern of and alpha-actinin-4 expression in thyroid cancer. *Anticancer Res*. 2014 Jun;34(6):3157-63. PubMed PMID: 24922688.

9: Masuda M, Chen WY, Miyanaga A, Nakamura Y, Kawasaki K, Sakuma T, Ono M, Chen CL, Honda K, Yamada T. Alternative mammalian target of rapamycin (mTOR) signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular

- carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Jun;13(6):1429-38. doi: 10.1074/mcp.M113.033845. Epub 2014 Mar 18. PubMed PMID: 24643969; PubMed Central PMCID: PMC4047464.
- 10: Watabe Y, Mori T, Yoshimoto S, Nomura T, Shibahara T, Yamada T, **Honda K**. Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma. *Cancer Med*. 2014 Jun;3(3):613-22. doi: 10.1002/cam4.214. Epub 2014 Feb 27. PubMed PMID: 24574362; PubMed Central PMCID: PMC4101752.
- 11: Kobayashi E, Satow R, Ono M, Masuda M, **Honda K**, Sakuma T, Kawai A, Morioka H, Toyama Y, Yamada T. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma. *Oncology*. 2014;86(2):94-103. doi: 10.1159/000357408. Epub 2014 Jan 18. PubMed PMID: 24457375.
- 12: Sakane A, Alamir Mahmoud Abdallah A, Nakano K, **Honda K**, Kitamura T, Imoto I, Matsushita N, Sasaki T. Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via filamins. *Genes Cells*. 2013 Sep;18(9):810-22. doi:10.1111/gtc.12078. Epub 2013 Jul 25. PubMed PMID: 23890175.
- 13: Fukushima S, Yoshida A, **Honda K**, Maeshima AM, Narita Y, Yamada T, Shibui S, Tsuda H. Immunohistochemical actinin-4 expression in infiltrating gliomas: association with WHO grade and differentiation. *Brain Tumor Pathol*. 2014 Jan;31(1):11-6. doi: 14.1007/s10014-013-0139-z. Epub 2013 Mar 17. PubMed PMID: 23504125.
15. Noro R, **Honda K**, Tsuta K, Ishii G, Maeshima M, Miura N, Furuta K, Shibata T, Tsuda H, Ochiai A, Sakuma T, Nishijima N, Gemme A, Asamura H, Nagai K, Yamada T. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. *Annals of Oncology*. In press.
16. Abdallah A, Nakano K, **Honda K**, Kitamura T, Imoto I, Matsushita N; Sasaki, T. Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via filamins. *Genes to Cells*.
17. Makuuchi Y, **Honda K**, Osaka Y, Kato K, Kojima T, Daiko H, Igaki H, Ito Y, Hoshino S, Tachibana S, Watanabe T, Furuta K, Sekine S, Umaki T, Watabe Y, Miura N, Ono M, Tsuchida A, Yamada T. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci*. in press 2013 May 4. doi: 10.1111/cas.12187.
18. Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, Watabe Y, **Honda K**, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol*. In press, 2013 Apr 5. doi: 10.1038/modpathol.2013.54.
19. **Honda K**, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura N, Yamada T. Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Feb;43(2):103-9.
16. Miyanaga A, **Honda K**, Tsuta K, Masuda M, Yamaguchi U, Fujii G, Miyamoto A, Shinagawa S, Miura N, Tsuda H, Sakuma T, Asamura H, Gemma A, Yamada T. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. *Ann Oncol*. 2013 Jan;24(1):84-90
20. Sakane A, Abdallah AA, Nakano K, **Honda K**, Ikeda W, Nishikawa Y, Matsumoto M, Matsushita N, Kitamura T, Sasaki T. Rab13 small G protein and Junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):42455-68.
21. **Honda K**, Okusaka T, Felix K, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Tsuchida A, Shimahara T, Shimahara M, Yasunami Y, Kuwabara H, Sakuma T, Otsuka Y, Ota N, Shitashige M, Kosuge T, Büchler MW, Yamada T. Possible detection of early-stage pancreatic cancer by quantitative mass spectrometry: protein characterization and multi-institutional validation. *PLoS One*. 2012;7(10):e46908. doi: 10.1371/journal.pone.0046908. Epub 2012 Oct 8.
22. Yamamoto S, Tsuda H, **Honda K**, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Histopathology*. 2012 Jun;60(7):1073-83.
23. Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, **Honda K**, Kitabayashi I,

Yamada T. β -catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. **Gastroenterology**. 2012 Mar;142(3):572-81.

24. Matsubara J, **Honda K**, Ono M, Sekine S, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Sakuma T, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Tsuchida A, Shimahara M, Yasunami Y, Chiba T, Yamada T. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2011 Oct;20(10):2195-203.

25. Ito H, **Honda K**, Satow R, Arai E, Shitashige M, Ono M, Sakuma T, Sakano S, Naito K, Matsuyama H, Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. **Jpn J Clin Oncol**. 2011 Jul;41(7):847-53.

【学会発表】(計 11 件)

【招待講演(筆頭のみ)】

1) **本田一文** 文部科学省 がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン - 高度がん医療開発を先導する専門家の養成 - 4 大学合同事業: 慶應義塾大学・東海大学・東京歯科大学・信州大学 公開講座「口腔がん治療の均てん化・標準化」特別講演 「がん個別化医療・早期診断バイオマーカーの開発と実用化」2015年2月8日新宿 NS ビル東京都

2) **本田一文** 日本医療研究開発機構設立準備委員会、医薬基盤研、理化学研究所、産業総合研究所主催【オールジャパンの創薬支援 - 創薬立国日本に向けて】「シスプラチン耐性克服に向けた創薬を目指して-進行卵巣がんのシスプラチン耐性腫瘍に対する創薬-」創薬支援ネットワーク・シンポジウム 2015年1月16日 グランフロント大阪 ナレッジシアター 大阪市

3) **本田一文**、トランスオミクスワークショップ 「プロテオミクス総括」2014年12月6日 第1回トランスオミクス研究会 東北メディカルメガバンク 仙台市

4) **本田一文**、日本口腔外科学会・日本口腔病理学会・日本歯科放射線学会、口腔3学会シンポジウム「唾液腺がん組織マイクロアレイを用いた予後予測バイオマーカーの同定」2014年10月18日 幕張国際会議場 千葉市

5) **本田一文**、パープルリボン医療セミナー ジャパン東京 2014 シンポジスト 「膵臓がんの早期発見 -膵がん検診の効率化を目指した血液バイオマーカーの実用化-」

6) **本田一文**、第62回重粒子医科学センター研究交流会「がん個別化医療バイオマーカー

の開発と実用化」2015年9月4日、独立行政法人 放射線医学研究所 千葉氏

7) **本田一文**、第27回青森呼吸器研究会 特別講演 「がん個別化医療選択のためのバイオマーカー開発と実用化」2014年8月30日 ホテル青森 青森市

8) **本田一文**、「アレイ技術・抗体基盤・質量分析基盤プロテオミクスの融合-がんバイオマーカー探索と検証に向けて-」日本プロテオーム学会 2014年大会 シンポジウム 2014年7月18日 つくば国際会議場 つくば市

【国際学会(筆頭のみ)】

1) **Kazufumi Honda**¹, Michimoto Kobayashi², Gimán Jung², Tesshi Yamada¹. Possible Detection of Early-Stage Pancreatic Cancer by Measuring Plasma Apolipoprotein-All isoforms. Scientific Workshop, National Cancer Institute (NCI), Early Detection Research Network (EDRN), October 10th 2014, Hyatt Regency Bethesda ML, USA.

2) **Kazufumi Honda**, and Tesshi Yamada. Gene amplification of ACTN4 is a predictor of cancer metastasis. 15th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society. June 30th 2014. German Cancer Research Center. Dkfz. Heidelberg Germany.

3) **Kazufumi Honda**, Yukio Watabe, Takeshi Nomura, Takahiko Shibahara, Wilber Huang, Wei-Yu Chen, Chi-Long Chen, Tesshi Yamada. Actinin-4 is a predictive biomarker for late metastasis of stage I-II tongue cancer to cervical lymph nodes. 2014 Annual Congress of ROC Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Taiwan, March 8th 2014. Tainan, ROC

【図書】(計 1 件)

1. 小林信, 山田哲司, **本田一文** 「臨床材料を用いたアレイ基盤プロテオミクスを用いた創薬標的・バイオマーカーの開発」臨床プロテオミクス **医学のあゆみ** 251 (10), 980-983、企画 近藤 格

【産業財産権】

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

【その他】

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 一文 (HONDA Kazufumi)

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

(2)研究分担者

森 泰昌 (MORI Taisuke)
研究者番号： 00296708
国立研究開発法人国立がん研究センター・中
央病院・医員

関根 茂樹 (Sekine Shigeki)
国立研究開発法人国立がん研究センター・中
央病院・医長
研究者番号：10321879

平岡 伸介 (HIRAOKA Nobuyoshi)
国立研究開発法人国立がん研究センター・中
央病院・科長
研究者番号：40276217

渡部 幸央 (WATABE Yukio)
東京歯科大学・レジデント
研究者番号：50733490

出雲 俊之 (IZUMO Toshiyuki)
国立大学法人東京医科歯科大学・准教授
研究者番号：80322709

(3)連携研究者
なし。