

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670868

研究課題名(和文) 仮想病理画像と定量抗体プロテオミクスによる唾液腺腫瘍の分子標的バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Development of the therapeutic targets for salivary gland carcinoma using virtual pathology and antibody-based proteomics

研究代表者

本田 一文 (Honda, Kazufumi)

独立行政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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺がんの組織マイクロアレイ(TMA)を作製し、抗体基盤プロテオミクスで予後予測・治療効果予測バイオマーカー探索を行った。細胞運動に關与する細胞突起形成に必須なタンパク質アクチニン-4(ACTN4)が唾液腺がんを高発現していることを見出した。唾液腺TMAを用いてACTN4の遺伝子コピー数を調査した。ACTN4遺伝子コピー数症例は、正常コピー数症例に比べて有意に全生存期間が短かった。Cox比例ハザードモデルに多変量解析では、ACTN4の遺伝子増幅が独立した予後因子となり、死亡に対する危険率は組織学的悪性度分類より高かった。ACTN4遺伝子増幅は唾液腺がんの予後予測因子である。

研究成果の概要(英文)：To identify the biomarker for decision of therapeutic strategy in salivary gland carcinoma, we made tissue microarray of the salivary gland carcinoma, and searched it by antibody-based proteomics. We identified overexpression of actin-4 (ACTN4) that is associated with cancer metastasis in salivary gland carcinoma. To confirm the gene amplification of ACTN4, we investigated the copy number of ACTN4 by FISH analysis. FISH (fluorescence in situ hybridization) revealed that overall survival time of patients with gene amplification of ACTN4 was significantly shorter than it of patients with normal copy number. The multivariate Cox regression analysis revealed that gene amplification of ACTN4 remained as an independent prognostic factor. The gene amplification of ACTN4 is a potential prognostic biomarker for salivary gland carcinoma.

研究分野：バイオマーカー研究

キーワード：唾液腺がん 組織マイクロアレイ プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

肺がん、乳がん、胃がんなどの分野では、臓器毎に画一的な治療を選択するのではなく、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム情報から悪性化のドライバーとして重要な分子群を同定し、**がん自身の生物学的背景に立脚し最適化された個別化医療が確立されてきている。**

特定の治療により恩恵を受ける患者群を濃縮するためのコンパニオンバイオマーカーが注目を集めているが、**唾液腺悪性腫瘍を体系的に層別化して治療する「個別化医療」**はいまだ確立されていない。その理由としては、「**唾液腺悪性腫瘍の発症率は全悪性腫瘍の中でも0.3%と稀少であり、さらにヒト固形腫瘍の中でも組織学的に最もバラエティーに富む腫瘍であることから、本腫瘍を体系的に層別化し、生物学的機構に迫れるほどの統計学的解析が困難である。**」**「唾液腺がんの発育は他臓器の腫瘍に比べて緩慢なものが多いが、神経浸潤を始めた特徴的な進展形式を示し、浸潤の分子機構は未だ解明されていない。」**、「**顎顔面部に発症するため、審美的な観点から外科手術による切除範囲が制約を受け、治療の体系化が困難である。**」などが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺腫瘍の病理組織検体を用いて悪性化機構にかかわる分子群の同定と、唾液腺腫瘍の個別化医療のためのバイオマーカーの確立により、新規治療戦略を開発する。

3. 研究の方法

1) 統計学的解析に耐えうる症例数の唾液腺腫瘍とそのカウンターパートである正常唾液組織を配置した組織マイクロアレイ (tissue microarray, TMA) を用意して、抗体を基盤としたタンパク質網羅的解析 (**antibody-based proteomics**) による**唾液腺腫瘍の新規分子標的の抽出を行う。**

2) Antibody-based proteomics による解析には、研究代表者が独自に開発進めている解析システム (**automated quantitative proteome-scale antibody screening of protein expression by quantitative digital immunofluorescence pathology: AQDIP**) と国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野が所有する**抗体ライブラリー**を利用する。

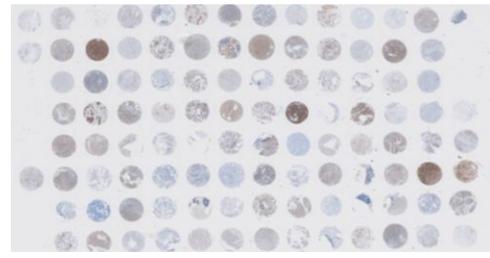
4. 研究成果

1) 唾液腺がん組織マイクロアレイの作製

8種類の唾液腺悪性腫瘍 (adenoid cystic carcinoma, acinic cell carcinoma, carcinoma not otherwise specified, epithelial-myoepithelial carcinoma,

mucoepidermoid carcinoma, myoepithelial carcinoma, salivary duct carcinoma, oncocytic carcinoma) が72症例分、4種類の唾液腺良性腫瘍 (pleomorphic adenoma, myoepithelioma, oncocytoma, Warthin tumor) が12症例搭載されたTMAブロックを作製し、標的分子評価用の薄切切片を用意した。

図1: 本研究で作製した唾液腺がん組織マイクロアレイ



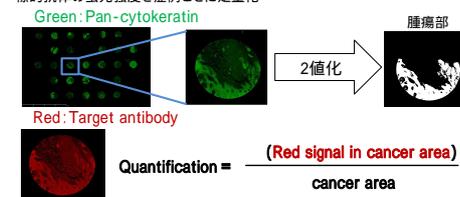
2) AQDIPを用いた唾液腺がんTMA用抗原解析用アルゴリズムの作製

国立がん研究センター研究所で開発されたTMA解析用抗原定量ソフトウェアであるAQVIPのアルゴリズムを調整し、免疫染色から抗原発現量を定量的に解析するツールを完成させた。

図2: サイトケラチン染色部位を認識し唾液腺がん部分を2値化するアルゴリズムの作成。蛍光強度から抗原の発現を定量化に成功

3. 定量的タンパク質発現プロファイリングの取得

蛍光デジタル病理画像からパンサイトケラチン染色をガイドに腫瘍部における標的抗体の蛍光強度を症例ごとに定量化

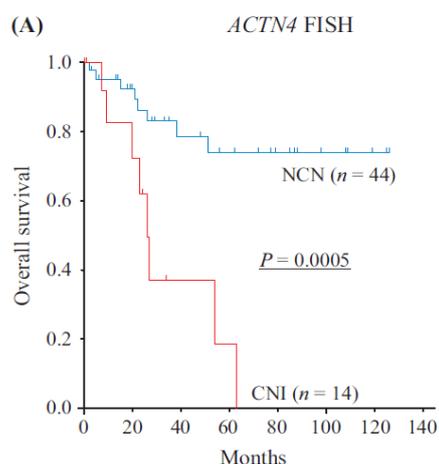
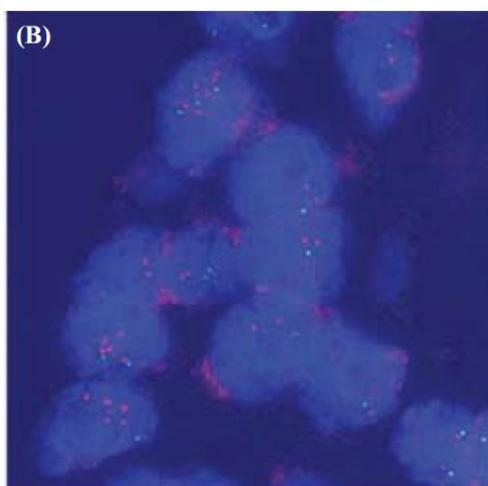
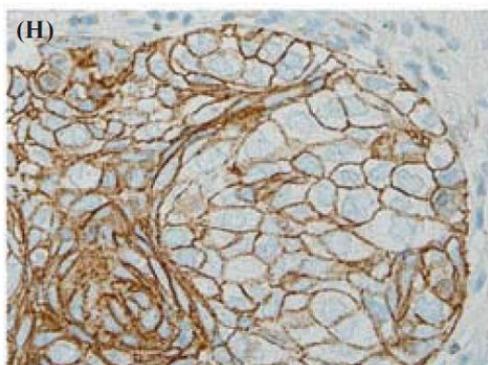


3) 唾液腺がんの予後を予測するバイオマーカーの同定

唾液腺がんTMAと抗体ライブラリーの探索研究から、ACTN4の遺伝子コピー数の増加が、唾液腺がんの全生存期間を予測する予後予測マーカーとして有用であることを明らかにした。ACTN4は19qの遺伝子上にコードされている。ACTN4のBACクローンからFISHプローブを作製し、唾液腺がんTMAにハイブリダイズしたところ、一部の腫瘍でACTN4の遺伝子増幅が認められた。遺伝子増幅患者は、正常コピー数患者に比べて全生存割合が統計学的に有意に低下していた。死

亡に対する危険率は、組織学的悪性度分類より高かった。

図 2: ACTN4 免疫染色画像、FISH 画像と全生存期間曲線



FISH (+) 症例は、正常コピー数症例に比較して全生存期間が有意に短い。(Watabe et al. Cancer Med. 2014)

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 22 件)

英語論文

1. 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.(査読あり)

2: 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.. (査読あり)

3: 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. (査読あり)

4: 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. (査読あり)

5: 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. (査読あり)

- 6: 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. (査読あり)
- 7: 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. (査読あり)
- 8: 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: 10.1007/s10014-013-0139-z. Epub 2013 Mar 17. PubMed PMID:23504125. (査読あり)
9. 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. **Ann Oncol**. 2013 Oct;24(10):2594-600. (査読あり)
10. 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.. (査読あり)
11. 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**. 2013 Aug;104(8):1045-51. doi:10.1111/cas.12187. [Epub ahead of print] (査読あり)
12. 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**. 2013 Aug;26(8):1041-50. doi: 10.1038/modpathol.2013.54. (査読あり)
13. Murakami N, **Mori T**, Yoshimoto S, Ito Y, Kobayashi K, Ken H, Kitaguchi M, Sekii S, Takahashi K, Yoshio K, Inaba K, Morota M, Sumi M, Itami J. Expression of EpCAM and prognosis in early-stage glottic cancer treated by radiotherapy. **Laryngoscope**. 2014 Nov;124(11):E431-6. doi: 10.1002/lary.24839. Epub 2014 Jul 14. PubMed PMID: 25043563. (査読あり)
14. Sukeda A, **Mori T**, Suzuki S, Ochiai A. Adenocarcinoma of the pigmented ciliary epithelium. **BMJ Case Rep**. 2014 Jul 11;2014. pii: bcr2014204534. doi: 10.1136/bcr-2014-204534. PubMed PMID: 25015166. (査読あり)
15. Yazawa M, **Mori T**, Nakayama Y, Kishi K. Basic study of soft tissue augmentation by adipose-inductive biomaterial. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2015 Jan;103(1):92-6. doi: 10.1002/jbm.b.33180. Epub 2014 Apr 25. PubMed PMID:24764287. (査読あり)
- 16, Toriyama A, **Mori T**, Sekine S, Yoshida A, Hino O, Tsuta K. Utility of PAX8 mouse monoclonal antibody in the diagnosis of thyroid, thymic, pleural and lung tumours: a comparison with polyclonal PAX8 antibody. **Histopathology**. 2014 Oct;65(4):465-72. doi: 10.1111/his.12405. Epub 2014 Apr 26. PubMed PMID:24592933. (査読あり)
17. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, **Mori T**, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T, Kanai Y. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. **Int J Cancer**. 2014 Sep 15;135(6):1330-42. doi: 10.1002/ijc.28768. Epub 2014 May 2. PubMed PMID: 24504440; PubMed Central PMCID: PMC4235299. (査読あり)
18. Yagishita S, Horinouchi H, Yoroazu T, Kitazono S, Mizugaki H, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, **Mori T**, Tsuta K, Sumi M, Tamura T. Secondary osteosarcoma developing 10 years after

chemoradiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2014 Feb;44(2):191-4. doi: 10.1093/jjco/hyt192. Epub 2013 Dec 13. PubMed PMID: 24338556. (査読あり)

19. Sato Y, Ojima H, Onaya H, **Mori T**, Hiraoka N, Kishi Y, Nara S, Esaki M, Shimada K, Kosuge T, Sugihara K, Kanai Y. Histopathological characteristics of hypervascular cholangiocellular carcinoma as an early stage of cholangiocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Oct;44(11):1119-29. doi: 10.1111/hepr.12236. Epub 2014 Jan 7. PubMed PMID: 24033892. (査読あり)

20. Shibahara T, Yamamoto N, Yakushiji T, **Nomura T**, Sekine R, Muramatsu, K, Ohata, H. Narrow-band imaging system with magnifying endoscopy for early oral cancer. *The -Bulletin of Tokyo Dental College.* 2014;55(2):87-94. PMID: 24965953(査読あり)

21. Yamamoto N, Onda T, Sugahara K, **Nomura T**, Shibahara, T. Molecular biological change in oral cancer, summary of our researches *Japanese Dental Science Review,* 2014;51(1):25-33. doi:10.1016/j.jdsr.2014.09.003 (査読あり)

日本語総説

1. 山田哲司, 野呂林太郎, **本田一文**
肺がんの予後予測と遺伝子シグナチャー
(特集 がん分子診断のパラダイムシフト)
最新医学 69 (12), 2512-2519 2914

【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 千葉市

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 2 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

2. 三 浦奈美、紙田正博、**本田一文**、山田哲司 「プロテオーム解析による膵癌診断方法の開発」**膵癌治療 up-to-date 2015**; 91-98
監修 跡見 裕、編集 海野倫明、土田明彦

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 1 件）

名称： -アクチニン-4 遺伝子のコピー数または発現レベルを指標とした膵癌の検出を補助する方法および診断のためのキット
発明者：本田一文、他 7 名
権（HONDA Kazufumi イエンス振興財団）
種類：特許
番号：特許第 5391400 号
出願年月日：平成 20 年 7 月 2 日
取得年月日：平成 25 年 10 月 25 日
国内外の別： 日本

〔その他〕

ホームページ等
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
研究所創薬臨床研究分野 ユニット長
研究者番号：10260936

(2)研究分担者

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

野村 武史
東京歯科大学オーラルメディシン・口腔外科学講座 教授
研究者番号 60328268