

厚生労働科学研究研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下 義博

平成16(2004)年3月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 山下義博	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNA チップを用いた早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 山下義博	7
2.	「cDNA サブトラクションクローニング法による早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究 自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行	9
3.	「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究 自治医科大学・医学部・消化器内科学 菅野健太郎	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV.	研究成果の刊行物・別冊	15

主任研究者： 山下義博 自治医科大学医学部 助手

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。膵臓がんの治癒率向上のためにも、治癒切除が可能な早期の段階で信頼性良く膵臓がん診断を可能にする新規分子マーカーの同定が世界的な急務である。ERCPの際に採取される膵液は膵管上皮細胞を豊富に含み、特に担がん患者のそれには正常膵管上皮と膵臓がん細胞（悪性化した膵管上皮）とが共に存在する。我々は本研究計画において、健常人及び膵がん患者の膵液より膵管上皮細胞を純化し両者を直接比較すれば膵臓がん特異的分子マーカーが効率良く同定することを目指した。既にこれまで健常人130例、慢性膵炎15例、良性膵腫瘍35例、および膵臓がん30例の膵管上皮細胞の収集に成功している。これら膵管上皮細胞を試料として Affymetrix 社全ヒト遺伝子チップ HGU133A&B セットによる大規模発現解析と cDNA サブトラクションクロニング法によるスクリーニングを平行して解析しており、既に複数の膵臓がん特異的遺伝子が同定されている。またこれらについて健常人、良性膵腫瘍及び膵臓がんサンプル各30例程の定量的 real-time PCR 法解析を行い、一部の遺伝子については既に膵臓癌特異的発現が確認された。

分担研究者

山下義博	自治医科大学・ゲノム機能研究部・助手
間野博行	自治医科大学・ゲノム機能研究部・教授
菅野健太郎	自治医科大学・内科学消化器・教授

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既のがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。DNA チップは数千～数万種類の遺伝子の発現変化を数回の実験で解析可能にする最新の研究機器であり、本システムを用いることで膵

臓がんの新たな分子診断マーカーが同定されることが期待される。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いた DNA チップ解析を大規模に行うことにより、膵がん細胞特異的発現を示す遺伝子の同定が可能になると期待される。平成16年3月現在で正常膵管上皮130例、良性膵腫瘍30例、膵臓がん35例の純化検体細胞の保存に成功している。本研究計画では更に Pancreas Bank の拡充を行い（目標症例数：正常、膵臓がん各200例）DNA チップによる網羅的スクリーニングを続行すると共に、既に同定された新規分子診断マーカーを用いた RT-PCR 法による膵臓がん早期診断キットの開発を行う。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白 MUC1 は正常膵管上皮および膵臓がん

の両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによるMUC1陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を膵臓がん32例、良性膵腫瘍35例、慢性膵炎15例および正常130例について収集することに成功した。

(2) DNAチップ解析。Pancreas Bankの健常人25例および膵臓がん24例より純化した膵管上皮サンプルよりmRNA分画を調整し、二本鎖cDNAとした後、T7 RNAポリメラーゼによってcRNAを作成した。これをアフィメトリクスジャパン社の全ヒト遺伝子DNAチップ(HGU133)にハイブリダイズさせ、GeneChipスキャナーによって結合cRNA量を定量した。得られた膨大な遺伝子発現データは、housekeeping genesの発現量の平均値によって正規化した後、Silicon Genetics社のGeneSpringソフトウェアにより解析した。

(3) cDNAサブトラクションクローニング。健常者検体4例および膵臓がん患者検体4例よりそれぞれcDNA画分を作成し、それぞれ「健常」および「膵がん」cDNAプールを得た。後者においてのみ発現する遺伝子を取り出すため、cDNAサブトラクションクローニング解析を行い、当該cDNA断片をランダムに約400種類クローニングし、その塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及びの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C&D. 研究結果および考察

(1) 膵臓がん24例、健常者25例、計49例の純化膵管上皮細胞においてGeneChip解析を行い、4,400種類のプロープセット(計

3万3千種類の遺伝子に相当)における遺伝子発現データを得た。両群間で発現の平均値の差の検定をWelch ANOVA法によって行い、 $P < 0.001$ となる遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに膵臓がん特異的新規診断用遺伝子マーカーを検出するために、健常者においては全く発現しないが、少なくとも一部の膵臓がんサンプルにおいて高発現する遺伝子を選択した。我々の遺伝子データ(約216万種類のデータポイント)からこの目的に合う遺伝子をスクリーニングしたところ、計7種類の遺伝子を同定することに成功した。また新規膵臓がんマーカーの候補遺伝子については、さらに症例を増やして、定量的real-time RT-PCR法による当該遺伝子mRNA量の検定を拡大しているところである。

(2) 既に我々はカスタムDNAチップを用いたPancreas Bankの解析も終了しており、その結果複数の膵臓がん特異的遺伝子の同定に成功している。得られた遺伝子については既に50例を超えるサンプルを用いてreal-time RT-PCR法による発現定量を終了しており、複数の膵臓がん特異的遺伝子を同定した。これら遺伝子マーカーは単独では感度は高いものの陽性率が必ずしも高くない(偽陰性が認められる)ため、複数のマーカーを組み合わせて偽陰性を減らす工夫を行っている。

(3) 膵臓がん4例および健常者4例のサンプルからcDNA調整しそれぞれプールした後、両グループ間で発現が異なるcDNA断片のサブトラクションクローニングを行った。同定された約400種類のcDNAについてはone-pass sequenceを行い、そのannotationも終了した。現在これら膵臓がん選択的cDNAの中で真に早期診断マーカーとして有用なものを、DNAチップ実験の場合と同様に、サンプルを拡大してreal-time RT-PCR法による発現定量を大規模に行っている。

E. 結論

本研究事業において膵臓がんの早期診断マーカー同定を目指した研究が順調に進行している。膵液より膵管上皮細胞を純化する

バンク事業も順調に拡大しており、来年度から新たな研究協力施設も2カ所増加する予定である。膵液より純化した膵管上皮細胞のバンク事業として計200例を超えており、我々のPancreas Bankは世界最大の膵管上皮バンクとなっている。本バンクサンプルによる膵臓がん早期診断マーカーの同定も、カスタムDNAチップ、アフィメトリクス社全ヒト遺伝子チップ、およびcDNAサブトラクションクローニング法など多方面から解析がなされており、成果も確実に得られている。来年度はPancreas Bankをさらに拡充し、また得られた遺伝子発現情報を統合するとともに、既に膵臓がん早期診断マーカーの良い候補として同定されたものについては、本遺伝子発現をRT-PCR法により検出する「膵臓がん早期診断キット」の開発に着手する予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

山下義博

- 1) K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas". *Int J Cancer* **108**: 237-242, 2004.
- 2) H. He, Y. Hirokawa, A. Gazit, Y. Yamashita, H. Mano, Y. Kawakami, Kawakami, C.Y. Hsieh, H.J. Kung, G. Lessene, J. Baell, A. Levitzki and H. Maruta. "The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation". *Cancer Biol Ther* **3**: 2004.
- 3) Y.L. Choi, H. Makishima, J. Ohashi, Y. Yamashita, R. Ohki, K. Koinuma, J. Ota, Y. Isobe, F. Ishida, K. Oshimi and H. Mano. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of

- granular lymphocytes with purified CD3-CD56⁺ fractions". *Leukemia* in press, 2004.
- 4) K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada, J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano. "Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma". *Cancer Sci.* **94**: 263-270, 2003.
- 5) S. Ueno, R. Ohki, T. Hashimoto, T. Takizawa, K. Takeuchi, Y. Yamashita, J. Ota, Y.L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**: 771-777, 2003.
- 6) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 7) J. Ota, Y. Yamashita, K. Okawa, H. Kisanuki, S. Fujiwara, M. Ishikawa, Y.L. Choi, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, D. Compton, T. Kadoya and H. Mano. "Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders". *Oncogene* **22**: 5720-5728, 2003.
- 8) Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano. "DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia". *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.
- 9) R. Ohki, J. Ohashi, K. Yamamoto, S. Ueno, J. Ota, Y.-L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, Y. Yamashita, Y. Misawa, K. Fuse, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "Prediction of cardiac function from gene expression profiles in human atrial myocytes". *J. Cell Physiol*

in submission, 2003.

間野博行

- 1) Y.L. Choi, H. Makishima, J. Ohashi, Y. Yamashita, R. Ohki, K. Koinuma, J. Ota, Y. Isobe, F. Ishida, K. Oshimi and H. Mano. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3⁺CD56⁺ fractions". *Leukemia* in press, 2004.
- 2) H. He, Y. Hirokawa, A. Gazit, Y. Yamashita, H. Mano, Y. Kawakami, Kawakami, C.Y. Hsieh, H.J. Kung, G. Lessene, J. Baell, A. Levitzki and H. Maruta. "The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation". *Cancer Biol Ther* **3**: 2004.
- 3) K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas". *Int J Cancer* **108**: 237-242, 2004.
- 4) K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada, J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano. "Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma". *Cancer Sci.* **94**: 263-270, 2003.
- 5) S. Ueno, R. Ohki, T. Hashimoto, T. Takizawa, K. Takeuchi, Y. Yamashita, J. Ota, Y.L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**: 771-777, 2003.
- 6) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 7) N. Suzuki, S. Nakamura, H. Mano and T. Kozasa. "Alpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 733-738, 2003.
- 8) J. Ota, Y. Yamashita, K. Okawa, H. Kisanuki, S. Fujiwara, M. Ishikawa, Y.L. Choi, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, D. Compton, T. Kadoya and H. Mano. "Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders". *Oncogene* **22**: 5720-5728, 2003.
- 9) Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano. "DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia". *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.
- 10) K. Ohmine, T. Nagai, T. Tarumoto, T. Miyoshi, K. Muroi, H. Mano, N. Komatsu, F. Takaku and K. Ozawa. "Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR". *Stem Cells* **21**: 315-321, 2003.
- 11) R. Ohki, K. Yamamoto, S. Ueno, H. Mano, U. Ikeda and K. Shimada. "Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes". *Cardiovasc Drugs Ther* **17**: 231-236, 2003.
- 12) R. Ohki, J. Ohashi, K. Yamamoto, S. Ueno, J. Ota, Y.-L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, Y. Yamashita, Y. Misawa, K. Fuse, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "Prediction of cardiac function from gene expression profiles in human atrial myocytes". *J. Cell Physiol* in submission, 2003.
- 13) Y. Ogata, M. Takahashi, S. Ueno, K. Takeuchi, T. Okada, H. Mano, S. Ookawara, K. Ozawa, B.C. Berk, U. Ikeda, K. Shimada and E. Kobayashi. "Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro".

Hypertension **41**: 1156-1163, 2003.

- 14) N.J. Horwood, T. Mahon, J.P. McDaid, J. Campbell, H. Mano, F.M. Brennan, D. Webster and B.M. Foxwell. "Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production". *J. Exp. Med.* **197**: 1603-1611, 2003.
- 菅野健太郎
- 1) K. Sugano. "[The use and abuse of ICD-10—a critical view from a gastroenterologist]". *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **100**: 1357-1363, 2003.
- 2) H. Ohnishi, T. Miyata, H. Yasuda, Y. Satoh, K. Hanatsuka, H. Kita, A. Ohashi, K. Tamada, N. Makita, T. Iiri, N. Ueda, H. Mashima and K. Sugano. "Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in TGF-beta 1 regulation of pancreatic stellate cellular functions". *J Biol Chem* 2003.
- 3) S. Wada, T. Yano, K. Tamada, T. Tomiyama, S. Tano, K. Ido and K. Sugano. "Endoscopic microwave lithotripsy of a biliary stone lodged at a choledochoduodenal anastomosis". *Gastrointest Endosc* **58**: 464-466, 2003.
- 4) N. Ohnishi, T. Miyata, H. Ohnishi, H. Yasuda, K. Tamada, N. Ueda, H. Mashima and K. Sugano. "Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis". *Gut* **52**: 1487-1493, 2003.
- 5) H. Yamamoto, H. Kawata, K. Sunada, A. Sasaki, K. Nakazawa, T. Miyata, Y. Sekine, T. Yano, K. Satoh, K. Ido and K. Sugano. "Successful en-bloc resection of large superficial tumors in the stomach and colon using sodium hyaluronate and small-caliber-tip transparent hood". *Endoscopy* **35**: 690-694, 2003.
- 6) A. Kuno, K. Ido, N. Isoda, Y. Satoh, K. Ono, S. Satoh, H. Inamori, K. Sugano, N. Kanai, T. Nishizawa and H. Okamoto. "Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus". *Hepatol Res* **26**: 237-242, 2003.
- 7) Y. Ishino, K. Ido and K. Sugano. "Improvement of the automatic endoscopic reprocessor: self-cleaning disinfecting connectors between endoscope and reprocessor". *Endoscopy* **35**: 469-471, 2003.
- 8) K. Satoh, H. Kawata, K. Tokumaru, Y. Kumakura, Y. Ishino, S. Kawakami, K. Inoue, T. Kojima, Y. Satoh, H. Mutoh, K. Kihira and K. Sugano. "Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of *Helicobacter pylori*". *Dig Liver Dis* **35**: 78-84, 2003.
- 9) M. Hozumi, K. Ido, S. Hiki, N. Isoda, N. Nagamine, K. Ono, Y. Sato, Y. Onobuchi, Y. Kobayashi, Y. Hirayama, T. Yanagawa and K. Sugano. "Easy and accurate targeting of deep-seated hepatic tumors under laparoscopy with a forward-viewing convex-array transducer". *Surg Endosc* 2003.
- 10) K. Sugano. "Molecular abnormalities in the precancerous conditions of the stomach". *Intern Med* **42**: 283-284, 2003.
- 11) H. Yamamoto and K. Sugano. "A new method of enteroscopy—the double-balloon method". *Can J Gastroenterol* **17**: 273-274, 2003.
- 12) Y. Kaneko, S. Sakurai, M. Hironaka, S. Sato, S. Oguni, Y. Sakuma, K. Sato, K. Sugano and K. Saito. "Distinct methylated profiles in *Helicobacter pylori* dependent and independent gastric MALT lymphomas". *Gut* **52**: 641-646, 2003.
- 13) A. Eda, H. Osawa, K. Satoh, I. Yanaka, K. Kihira, Y. Ishino, H. Mutoh and K. Sugano. "Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa". *J Gastroenterol* **38**: 14-22, 2003.
- 14) Y. Miyakura, K. Sugano, F. Konishi, N. Fukayama, S. Igarashi, K. Kotake, T. Matsui, Y. Koyama, M. Maekawa and

H. Nagai. "Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis". *Genes Chromosomes Cancer* **36**: 17-25, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日
- 2 公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日
- 3 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日
- 4 出願番号：特願 2001-337752・発明者：間野博行・名称「多発性骨髓腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001年11月2日
- 5 出願番号：特願 2001-56438・発明者：間野博行・名称「慢性骨髓性白血病の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2001年3月1日

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書
「DNA チップを用いた早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

主任研究者： 山下義博 自治医科大学医学部 助手

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。我々は診断目的に採取する膵液より正常および悪性膵管上皮細胞純化保存する「Pancreas Bank」事業を推進し、それより純化したサンプルを用いて大規模 DNA チップ遺伝子発現解析を行った。具体的には健常者 25 例および膵臓がん患者 24 例サンプルについて、全ヒト遺伝子が配置された Affymetrix 社 HGU133DNA チップを用いて約 3 万 3 千種類の遺伝子発現データを得た。得られた発現プロファイルを健常者および膵がん患者群で比較し、両群間で発現量の平均値にかんする t 検定を行った。その結果両群を選別可能な遺伝子セットの抽出に成功した。さらに、膵臓がんサンプルにおいてのみ高発現する遺伝子も計 7 種類同定することに成功した。これらは新規分子診断マーカーの良い候補となる。

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にかんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いた DNA チップ解析を大規模に行うことにより、膵がん細胞特異的発現を示す遺伝子の同定が可能になると期待される。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白 MUC1 は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによる MUC1 陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科

だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を膵臓がん 32 例、良性膵腫瘍 35 例、慢性膵炎 15 例および正常 130 例について収集することに成功した。

(2) DNA チップ解析。Pancreas Bank の健常人 25 例および膵臓がん 24 例より純化した膵管上皮サンプルより mRNA 分画を調整し、二本鎖 cDNA とした後、T7 RNA ポリメラーゼによって cRNA を作成した。これをアフィメトリクスジャパン社の全ヒト遺伝子 DNA チップ（HGU133）にハイブリダイズさせ、GeneChip スキャナーによって結合 cRNA 量を定量した。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及びの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C&D. 研究結果および考察

(1) 膵臓がん 24 例、健常者 25 例、計 49 例の純化膵管上皮細胞において GeneChip 解析を行い、4,400 種類のプローブセット（計 3 万 3 千種類の遺伝子に相当）における遺伝子発現データを得た。両群間で発現の平均値の差の検定を Welch ANOVA 法によって

行い、 $P < 0.001$ となる遺伝子セットを抽出することに成功した。さらに膵臓がん特異的新規診断用遺伝子マーカーを検出するために、健常者においては全く発現しないが、少なくとも一部の膵臓がんサンプルにおいて高発現する遺伝子を選択した。我々の遺伝子データ（約216万種類のデータポイント）からこの目的に合う遺伝子を見つけたところ、計7種類の遺伝子を同定することに成功した。また新規膵臓がんマーカーの候補遺伝子については、さらに症例を増やして、定量的real-time RT-PCR法による当該遺伝子mRNA量の検定を拡大しているところである。

(2) 既に我々はカスタムDNAチップを用いたPancreas Bankの解析も終了しており、その結果複数の膵臓がん特異的遺伝子の同定に成功している。得られた遺伝子については既に50例を超えるサンプルを用いてreal-time RT-PCR法による発現定量を終了しており、複数の膵臓がん特異的遺伝子を同定した。これら遺伝子マーカーは単独では感度は高いものの陽性率が必ずしも高くない（偽陰性が認められる）ため、複数のマーカーを組み合わせて偽陰性を減らす工夫を行っている。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas". *Int J Cancer* **108**: 237-242, 2004.
- 2) H. He, Y. Hirokawa, A. Gazit, Y. Yamashita, H. Mano, Y. Kawakami, Kawakami, C.Y. Hsieh, H.J. Kung, G. Lessene, J. Baell, A. Levitzki and H. Maruta. "The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and

Malignant Transformation". *Cancer Biol Ther* **3**: 2004.

- 3) Y.L. Choi, H. Makishima, J. Ohashi, Y. Yamashita, R. Ohki, K. Koinuma, J. Ota, Y. Isobe, F. Ishida, K. Oshimi and H. Mano. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3⁺CD56⁺ fractions". *Leukemia* **18**: 556-565, 2004.
- 4) K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada, J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano. "Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma". *Cancer Sci.* **94**: 263-270, 2003.
- 5) S. Ueno, R. Ohki, T. Hashimoto, T. Takizawa, K. Takeuchi, Y. Yamashita, J. Ota, Y.L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**: 771-777, 2003.
- 6) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 7) J. Ota, Y. Yamashita, K. Okawa, H. Kisanuki, S. Fujiwara, M. Ishikawa, Y.L. Choi, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, D. Compton, T. Kadoya and H. Mano. "Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders". *Oncogene* **22**: 5720-5728, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書
「cDNA サブトラクシオンクローニング法による早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

分担研究者： 間野博行 自治医科大学医学部教授

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、治癒率向上のためにもどう疾患の新規分子マーカーの同定が世界的な急務である。診断目的に採取される膵液は膵管上皮細胞を豊富に含み、特に担がん患者のそれには正常膵管上皮と膵臓がん細胞（悪性化した膵管上皮）とが共に存在する。我々は本研究計画において、健常人及び膵がん患者の膵液より膵管上皮細胞を純化し両者を直接比較することで膵臓がん特異的分子マーカーを効率良く同定することを目指した。既にこれまで健常人130例、慢性膵炎15例、良性膵腫瘍35例、および膵臓がん30例の膵管上皮細胞の収集に成功している。これら膵管上皮細胞を試料として膵臓がん患者サンプル特異的に発現する遺伝子を cDNA サブトラクシオンクローニング法によってスクリーニングした。得られた cDNA 断片計 384 クローンについて塩基配列の決定を行い既に 200 種類近くの膵臓がん特異的遺伝子マーカーの同定に成功している。現在これら cDNA について、解析症例数を増やした形での定量的 real-time RT-PCR 法を施行中であり、新規がん特異的マーカーの同定を試みている。

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いた cDNA サブトラクシオンクローニング実験を行うことで、膵臓がんのみに発現する遺伝子の同定を網羅的に試み、これら遺伝子を利用した同疾患の早期診断キットの開発を試みる。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白 MUC1 は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによる MUC1 陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科

だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を膵臓がん32例、良性膵腫瘍35例、慢性膵炎15例および正常130例について収集することに成功した。

(2) cDNA サブトラクシオンクローニング。健常者検体4例および膵臓がん患者検体4例よりそれぞれ cDNA 画分を作成し、それぞれ「健常」および「膵がん」cDNA プールを得た。後者においてのみ発現する遺伝子を取り出すため、cDNA サブトラクシオンクローニング解析を行い、当該 cDNA 断片をランダムに384種類クローニングし、その塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及びの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C&D. 研究結果および考察

(1) 膵臓がん4例および健常者4例のサンプルからcDNA調整しそれぞれプールした後、両グループ間で発現が異なるcDNA断片のサブトラクシオンクローニングを行った。同定された約400種類のcDNAについてはone-pass sequenceを行い、そのannotationも終了した。現在これら膵臓がん選択的cDNAの中で真に早期診断マーカー

ーとして有用なものを、DNAチップ実験の場合と同様に、サンプルを拡大してreal-time RT-PCR法による発現定量を大規模に行っている。

(2) 既に我々はカスタムDNAチップを用いたPancreas Bankの解析も終了しており、その結果複数の膵臓がん特異的遺伝子の同定に成功している。得られた遺伝子については既に50例を超えるサンプルを用いてreal-time RT-PCR法による発現定量を終了しており、複数の膵臓がん特異的遺伝子を同定した。これら遺伝子マーカーは単独では感度は高いものの陽性率が必ずしも高くない(偽陰性が認められる)ため、複数のマーカーを組み合わせて偽陰性を減らす工夫を行っている。

E. 結論

本研究事業において膵臓がんの早期診断マーカー同定を目指した研究が順調に進行している。我々のPancreas Bankサンプルによる膵臓がん早期診断マーカーの同定も、確実に成果を得た。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. He, Y. Hirokawa, A. Gazit, Y. Yamashita, H. Mano, Y. Kawakami, Kawakami, C.Y. Hsieh, H.J. Kung, G. Lessene, J. Baell, A. Levitzki and H. Maruta. "The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation". *Cancer Biol Ther* **3**: 2004.
- 2) K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas". *Int J Cancer* **108**: 237-242, 2004.
- 3) K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada,

J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano. "Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma". *Cancer Sci.* **94**: 263-270, 2003.

- 4) S. Ueno, R. Ohki, T. Hashimoto, T. Takizawa, K. Takeuchi, Y. Yamashita, J. Ota, Y.L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**: 771-777, 2003.
- 5) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 6) N. Suzuki, S. Nakamura, H. Mano and T. Kozasa. "Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 733-738, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DनावेC 研究所・公開日：1997年9月18日
- 2 公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日
- 3 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日
- 4 出願番号：特願 2001-337752・発明者：間野博行・名称「多発性骨髄腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001年11月2日

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

分担研究者：菅野健太郎 自治医科大学医学部教授

研究要旨：膵癌発症のハイリスク状態である慢性膵炎は膵組織の線維化を伴う病態であるが、その機序を解明するため、ラット膵から線維化に最も深く関与すると考えられる細胞である Stellate cell を単離しその活性化機構、増殖反応について検討し、新しい知見を見だし論文発表した。実際のヒト膵疾患における膵液からの診断を実用化するための第一歩として、留置カニューレション下で純粋膵液を大量に採取するシステムを確立し、各種膵疾患から細胞診を行うとともに、後日の遺伝子発現プロファイル解析等のために、臨床サンプルを採取した。次年度以降さらに多数のサンプルの収集を行い、発現解析を行う予定である。

A. 研究目的

①膵癌の発生母地として慢性膵炎が重要である。慢性膵炎は膵の炎症に伴う膵内外分泌腺の破壊と線維化を特徴とする病態であるが、その機構は不明な点が多い。本研究では、膵線維化のメカニズムを解明するため、その病態に最も重要であると考えられる膵Stellate細胞を単離し、その分子応答について検討した。

②膵癌のDNAチップ解析に用いる膵液収集を行う。

B. 研究方法

①ラット膵から膵Stellate cellをコラゲナーゼ、プロナーゼによる酵素処理後、Nycodenz を用いて密度勾配遠心分離を行い、分離精製し初代培養系を作成した。この培養系を用いて、膵の線維化に重要であると考えられるActivin A, TGF β 、Angiotensin IIの効果を中心に検討した。

②患者様のインフォームドコンセントのに基づいて慢性膵炎、比較的緩徐な経過を辿る膵腫瘍であるIntraductal papillary mucinous tumor (IPMT) 及び膵癌患者のERCP検査後、膵管内に留置カニューレションを行い、セクレチン刺激後の純粋膵液を採取し、病理細胞診に供するとともに、連結可能匿名化した後、識別番号を付したサンプルの収集事業を行った。

（倫理面の配慮）

遺伝子解析のための倫理規定は自治医科大学学内の遺伝子研究審査委員会ならびに倫理委員会の承認を得ており、文書に

よる同意を得て検体の採取を行った。

C. 研究結果

①膵Stellate cellの分子応答

Stellate cell は Activin A 及びその受容体を有しており、Activin A 刺激に応答して、活性化されコラーゲン産生が高まる。また Activin A と TGF β は相互に作用を増強しあうこと、一方 Follistatin は TGF β の作用を抑制することによってコラーゲン産生を低下させることから、線維化の抑制の手段となりうる可能性が示された(Gut 論文)。

Stellate cell の活性化やコラーゲン産生ならびに増殖に重要な役割を果たしている TGF β はこの細胞から autocrine 的に分泌されているが、その細胞内情報伝達機構を Smad 2, 3 を中心に解明した。すなわち、TGF β による細胞活性化反応は Smad 2 を介していること、細胞増殖反応は Smad 3 によって抑制されること、自己の TGF β mRNA 産生の増加は ERK-依存性の経路を介することが示された (J. Biol. Chem. 論文)。

さらに Angiotensin II は、自己の受容体と EGF 受容体とのクロストークによる EGF 受容体活性化を介して Stellate cell の増殖を活性化を来す (BBRC 論文)。

②膵管

留置カニューレションを行ってセクレチン刺激を行うことにより、純粋膵液の採取が比較的容易にできた。一部を細胞診に供した残りを連結可能匿名化し、DNA

チップ解析のためのサンプルとして保存した。なお、チップ解析は一括して次年度に行う予定である。

D&E. 考察及び結論

①ラット膵 Stellate cell を用いて線維化に関与する様々な endocrine, paracrine 因子の関与と、その相互作用についての一部を明らかにしえた。膵 Stellate cell は、これまでその細胞としての反応機構、線維化の機構が不明な点が多かったが、多彩な生理活性物質に反応して増殖、線維産生反応を示すことが明らかになった。さらにその反応を抑制することにより、慢性膵炎における膵線維化の制御が可能になると考えられることから、Stellate cell の制御機構のより一層の解明が重要であると考えられた。

②ヒト患者サンプルの採取方法とシステムが確立したことから、今後大規模なサンプル収集が可能となることと思われる。これらのサンプルの遺伝子発現プロファイルを解析することにより、炎症から発癌に至る過程、ならびに緩徐な経過を辿る IPMT の病態ならびに悪性化への診断が解明されることが期待できる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohnishi N, Miyata T, Ohnishi H, Yasuda H, Tamada K, Ueda N, Mashima H, Sugano K. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut* 52: 1487-1493, 2003

2) Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, Ohashi A, Tamada K, Makita N, Iiri T, Ueda N, Mashima H, Sugano K. *J Biol Chem.* 279:8873-8878, 2004

3) Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, Ueda N, Mashima H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, Ohashi A, Tamada K, Sugano K.: Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 2004, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y.L. Choi, H. Makishima, J. Ohashi, Y. Yamashita, R. Ohki, K. Koinuma, J. Ota, Y. Isobe, F. Ishida, K. Oshimi and H. Mano	DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions	Leukemia		18 556-565	2004
H. He, Y. Hirokawa, A. Gazit, Y. Yamashita, H. Mano, Y. Kawakami, Kawakami, C.Y. Hsieh, H.J. Kung, G. Lessene, J. Baell, A. Levitzki and H. Maruta.	The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation	Cancer Biol Ther		3 in press	2004
K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano.	Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas	Int J Cancer		108 237-242	2004
K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada, J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano.	Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma	Cancer Sci		94 263-270	2003
S. Ueno, R. Ohki, T. Hashimoto, T. Takizawa, K. Takeuchi, Y. Yamashita, J. Ota, Y.L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano.	DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure	Biochem. Biophys. Res. Commun		307 771-777	2003
M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano.	DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome	Br J Haematol		123 288-296	2003
N. Suzuki, S. Nakamura, H. Mano and T. Kozasa.	Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF	Proc. Natl. Acad. Sci. USA		100 733-738	2003
J. Ota, Y. Yamashita, K. Okawa, H. Kisanuki, S. Fujiwara, M. Ishikawa, Y.L. Choi, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, D. Compton, T. Kadoya and H. Mano.	Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders	Oncogene		22 5720-5728	2003
Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano	DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia	Leukemia		17 1990-1997	2003
K. Ohmine, T. Nagai, T. Tarumoto, T. Miyoshi, K. Muroi, H. Mano, N. Komatsu, F. Takaku and K. Ozawa	Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR	Stem Cells		21 315-321	2003
R. Ohki, K. Yamamoto, S. Ueno, H. Mano, U. Ikeda and K. Shimada.	Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes	Cardiovasc Drugs Ther		17 231-236	2003
Y. Ogata, M. Takahashi, S. Ueno, K. Takeuchi, T. Okada, H. Mano, S. Ookawara, K. Ozawa, B.C. Berk, U. Ikeda, K. Shimada and E. Kobayashi.	Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro". Hypertension	Hypertension		41 1156-1163	2003
N.J. Horwood, T. Mahon, J.P. McDaid, J. Campbell, H. Mano, F.M. Brennan, D. Webster and B.M. Foxwell.	Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production	J. Exp. Med.		197 1603-1611	2003
S. Wada, T. Yano, K. Tamada, T. Tomiyama, S. Tano, K. Ido and K. Sugano.	Endoscopic microwave lithotripsy of a biliary stone lodged at a choledochoduodenal anastomosis	Gastrointest Endosc		58 464-466	2003
N. Ohnishi, T. Miyata, H. Ohnishi, H. Yasuda, K. Tamada, N. Ueda, H. Mashima and K. Sugano.	Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis	Gut		52 1487-1493	2003
H. Yamamoto, H. Kawata, K. Sunada, A. Sasaki, K. Nakazawa, T. Miyata, Y. Sekine, T. Yano, K. Satoh, K. Ido and K. Sugano.	Successful en-bloc resection of large superficial tumors in the stomach and colon using sodium hyaluronate and small-caliber-tip transparent hood	Endoscopy		35 690-694	2003
A. Kuno, K. Ido, N. Isoda, Y. Satoh, K. Ono, S. Satoh, H. Inamori, K. Sugano, N. Kanai, T. Nishizawa and H. Okamoto.	Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus	Hepatol Res		26 237-242	2003
Y. Ishino, K. Ido and K. Sugano.	Improvement of the automatic endoscopic reprocessor: self-cleaning disinfecting connectors between endoscope and reprocessor	Endoscopy		35 469-471	2003

K. Satoh, H. Kawata, K. Tokumaru, Y. Kumakura, Y. Ishino, S. Kawakami, K. Inoue, T. Kojima, Y. Satoh, H. Mutoh, K. Kihira and K. Sugano.	Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of Helicobacter pylori	Dig Liver Dis	35	78-84	2003
M. Hozumi, K. Ido, S. Hiki, N. Isoda, N. Nagamine, K. Ono, Y. Sato, Y. Onobuchi, Y. Kobayashi, Y. Hirayama, T. Yanagawa and K. Sugano.	Easy and accurate targeting of deep-seated hepatic tumors under laparoscopy with a forward-viewing convex-array transducer	Surg Endosc			2003
K. Sugano.	Molecular abnormalities in the precancerous conditions of the stomach	Intern Med	42	283-284	2003
H. Yamamoto and K. Sugano.	A new method of enteroscopy--the double-balloon method	Can J Gastroenterol	17	273-274	2003
Y. Kaneko, S. Sakurai, M. Hironaka, S. Sato, S. Oguni, Y. Sakuma, K. Sato, K. Sugano and K. Saito.	Distinct methylated profiles in Helicobacter pylori dependent and independent gastric MALT lymphomas	Gut	52	641-646	2003
A. Eda, H. Osawa, K. Satoh, I. Yanaka, K. Kihira, Y. Ishino, H. Mutoh and K. Sugano.	Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa	J Gastroenterol	38	14-22	2003
Y. Miyakura, K. Sugano, F. Konishi, N. Fukayama, S. Igarashi, K. Kotake, T. Matsui, Y. Koyama, M. Maekawa and H. Nagai.	Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis	Genes Chromosomes Cancer	36	17-25	2003
岡野博行.	ゲノムと技術.	JIM	14	110-113	2004
岡野博行.	DNAマイクロアレイの基礎と実際 (3) -発現解析の実際: クラス特異的遺伝子の抽出	Front Wave in Hematology	7	8-9	2003
岡野博行.	プロテオミクスによる疾病解析	現代医療	35	2895-2900	2003
岡野博行.	DNAマイクロアレイの基礎と実際 (2) -発現解析の実際: データの抽出	Front Wave in Hematology	6	8-9	2003
岡野博行.	ゲノム情報をもたらす個別化治療の夢	Front Wave in Hematology	3	4-7	2003
岡野博行.	BAMPスクリーニング: 白血病への包括的アプローチ	臨床血液	44	437-445	2003
岡野博行.	白血病のマイクロアレイ解析	内科	92	434-437	2003
岡野博行.	DNAチップ	日本内科学会雑誌	92	1030-1035	2003
岡野博行.	DNAマイクロアレイの基礎と実際 (1) -DNAマイクロアレイとは何か?	Front Wave in Hematology	5	8-9	2003
岡野博行.	DNAチップによる造血幹腫瘍の解析. ゲノム医学	ゲノム医学	3	167-171	2003
岡野博行.	DNAチップの血液臨床への応用	血液フロンティア	13	65-70	2003
岡野博行.	ポストゲノム時代の医療	分子細胞治療	2	1-2	2003
岡野博行.	DNAチップ法-造血器腫瘍	Medical Technology	31	34-39	2003
菅野健太郎.	The use and abuse of ICD-10--a critical view from a gastroenterologist	日本消化器病学会雑誌	100	1357-1363	2003

20031417

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。