

表1 質量分析計による解析手法

1) トップダウンプロテオミクス
MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry)
SELDI-MS (surface enhanced laser desorption/ ionization mass spectrometry)
2) ショットガンプロテオミクス
主としてLC-ESI-MS, 最近ではMALDI-TOF/TOF
●安定同位体標識
ICAT (isotope-coded affinity tagging)
iTRAQ (isobaric tagging for relative and absolute quantitation)
SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture)
●無標識法
2DICAL (2-dimensional image converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry)

てポストゲノム時代に大きな期待が寄せられている。質量分析計によるプロテオーム解析法は、タンパク質を出発点として解析していくトップダウンプロテオミクス法と、タンパク質を消化酵素で処理したペプチドを出発点とするショットガンプロテオミクス法に大きく分けられる(表1)。

トップダウンプロテオミクス法であるSELDI (surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry) 法により卵巣癌診断の可能性が示唆されたことにより<sup>2)</sup>, 質量分析計による癌診断の可能性がクローズアップされた。その後もこの手法を用いて多くの診断マーカーに関する論文が報告されている。本田らはこの手法に精密質量分析計を用いた改良を加え、癌診断マーカーの開発を進めている(第3章-2)。

ショットガンプロテオミクス法は液体クロマトグラフィーと質量分析計(LCMS)を組合わせた解析システムが主として用いられる。同位体ラベル法<sup>3)</sup>や同定されたタンパク質、ペプチドの結果から解析する手法<sup>4)</sup>が広く行われているが、多数検体を比較可能な解析手法としてわれわれは2DICAL (2-dimensional image converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry) 法を開発した<sup>5)</sup>。より多くの正確なプロテオーム情報を得るために、機器の改善とともに解析技術が日々更新されている。

#### ii) 二次元電気泳動の利用

プロテオーム解析手法として二次元電気泳動は非常に有用な解析手法である。最終的には質量分析計によるタンパク質同定を行うが、再現性、感度が優れているため臨床的に有用なマーカーをタンパク質レベルで拾い出すことが可能である。中村らはこの手法を用いて肝細胞癌の診断マーカーを開発してきており(第3章-1)、近藤らも蛍光色素を用いた二次元電気泳動を用いて癌診断マーカーを開発している<sup>6)</sup>。

### iii) 抗体の利用

タンパク質解析に多大なる貢献をしたのは、特異タンパク質を認識する抗体による研究であった。現在でも、質量分析計などで同定されるタンパク質の確定にあたっては、抗体による発現の確認を必要とする場合も多い。非常に長い歴史の中でつくられてきた抗体を、大規模なタンパク質解析に用いることはきわめて合理的な発想である。現在、さまざまな抗体アレイが考案されており、古閑らによる詳細を参照されたい(第3章-3)。

以上の解析手法でどれが優れているかということは問題ではなく、プロテオーム解析が発展していくためには、それぞれの手法がその特徴を生かしながら有機的に結合していくことが重要である。

## 2) 糖鎖解析手法

### i) 糖鎖解析の歴史

糖鎖解析は糖脂質の解析とともに発展し、癌との関連は古くから認識されていたが、抗体技術が飛躍的に進歩した1980年代に探索された癌関連抗原の多くが糖鎖関連であったことより、癌診断、治療における糖鎖の可能性が再認識された<sup>7) 8)</sup>。1990年代に入り、糖転移酵素が次々とクローニングされ<sup>9)</sup>、糖転移酵素のノックアウトマウスや遺伝子導入により、糖鎖機能と生命現象との関連が次々と明らかにされ<sup>10)</sup>、2000年代に入り糖鎖を応用した抗ウイルス薬<sup>11)</sup>が臨床の現場に現れたことにより、糖鎖を利用した疾患応用への期待はさらに高まってきている。また、糖鎖そのものの構造はその複雑性ゆえに解析が難しいとされてきたが、質量分析計による解析手法の向上により構造解析のスループットが飛躍的に向上し、複雑性のさらに高い糖タンパク質の糖鎖解析も行えるようになった現在、大規模解析による新規の糖鎖関連診断マーカーの開発が進められている。

### ii) 糖鎖を用いた診断へのアプローチ

糖鎖を用いた癌診断への応用にあたっては、タンパク質、糖鎖の相互関係は複雑となるため、糖鎖の側からアプローチするか、タンパク質からアプローチするか、糖タンパク質(糖ペプチド)としてアプローチするかによって戦略が異なり、解析手法も異なってくる(図2)。すなわち、糖鎖関連抗体、レクチンなど糖鎖でまず分画し、それらの糖鎖をもつ糖タンパク質を解析していく方法、タンパク質に対する抗体でまず分画し、それぞれの糖タンパク質に発現する糖鎖を解析していく方法、特に分画せず、そのまま糖タンパク質、糖ペプチドとして解析していく方法に大きく分けることができる。次に、抽出した糖タンパク質の糖鎖を、酵素、または、化学反応によって糖鎖とタンパク質(ペプチド)とに遊離し、糖鎖部分のみを解析する手法、またはタンパク質(ペプチド)部分のみを解析する手法、抽出した糖タンパク質をそのまま、または、トリプシン処理により糖ペプチドにして解析する手法に分けられる。

### iii) 現在の糖鎖解析

糖鎖のみを解析する手法は歴史も長く、多くの研究者によって技術開発が進められ、さまざまな解析法が存在する。そのなかで、質量分析計を用いた糖鎖解析は、非常に効率よく糖鎖構造が決定されるようになってきており、特に、亀山らの開発した多段階タンデム質量分析計を用いた位置異性、立体異性を含めて精密に糖鎖構造を解析可能な微量迅速解析システムは注目を集めている<sup>12)</sup>。また、糖鎖が遊離されたタンパク質の解析は質量分析

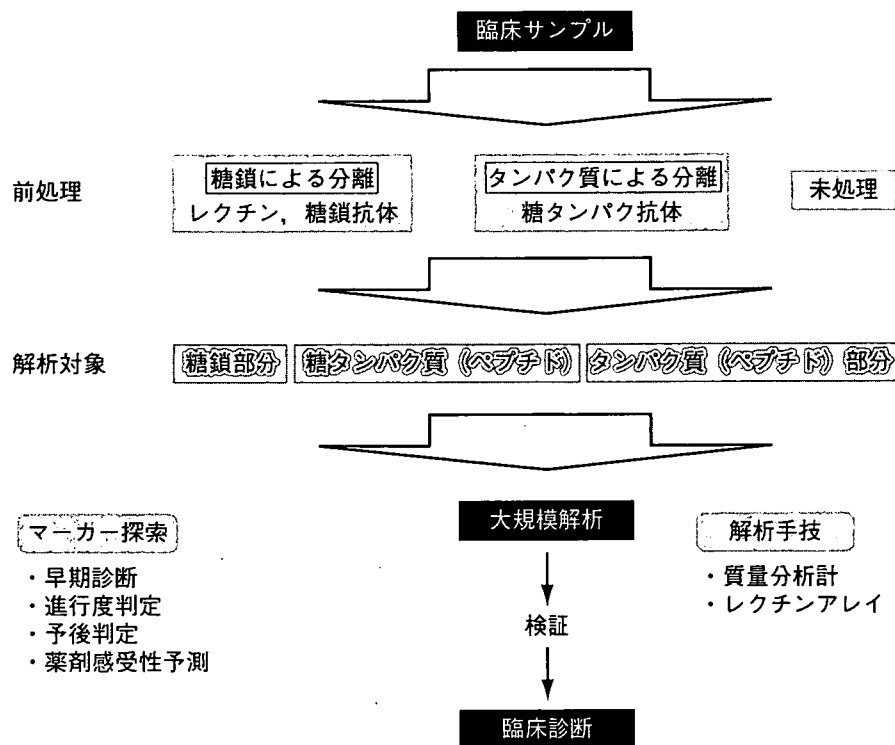


図2 糖鎖解析技術による診断応用までの流れ図

計により網羅的に進められ、特定の糖鎖構造をもつ糖タンパク質が同定されている。特に、梶らのIGOT (isotope-coded glycosylation-site-specific tagging) 法はN-結合型糖鎖を有する糖ペプチドの同定を効率よく行うことができる<sup>13)</sup>。また、フコースをもつ糖鎖を網羅的に解析する手法は植田らが詳しく述べている (第3章-4)。糖タンパク質、糖ペプチドとしての解析が、現在のところ最も難しい手技であるが、質量分析計での乖離を調整して、糖鎖とペプチド部分をきれいに分離して解析するハードウェアの開発<sup>14)</sup>や解析ソフトの開発が進められ、難易度の高い糖鎖修飾のあるタンパク質同定も可能になってきた。平林らのエバネッセント波励起型レクチンマイクロアレイはきわめて微量で糖鎖構造の違う糖ペプチド、糖鎖が解析可能であり、糖タンパク質のマーカー探索を行ううえで有用な手段である (第3章-5)。各ペプチドフラグメントに糖鎖が付加しているかを判定するシステムを備えている2DICAL法は、糖鎖の異なる糖ペプチドの定量比較が可能であり、同一ペプチドの糖鎖構造の違いから診断マーカーを開発する有用な手段として期待されている (図3)。

三善らが明らかにしていることである (第3章-6) が、このような糖鎖の網羅的解析が可能になるまでには糖鎖研究の長く深い積み重ねがあり、網羅的解析の結果が糖鎖生物学に密接に結びつくことによって初めて糖鎖の疾患応用への期待に応えられるようになることを忘れてはならない。

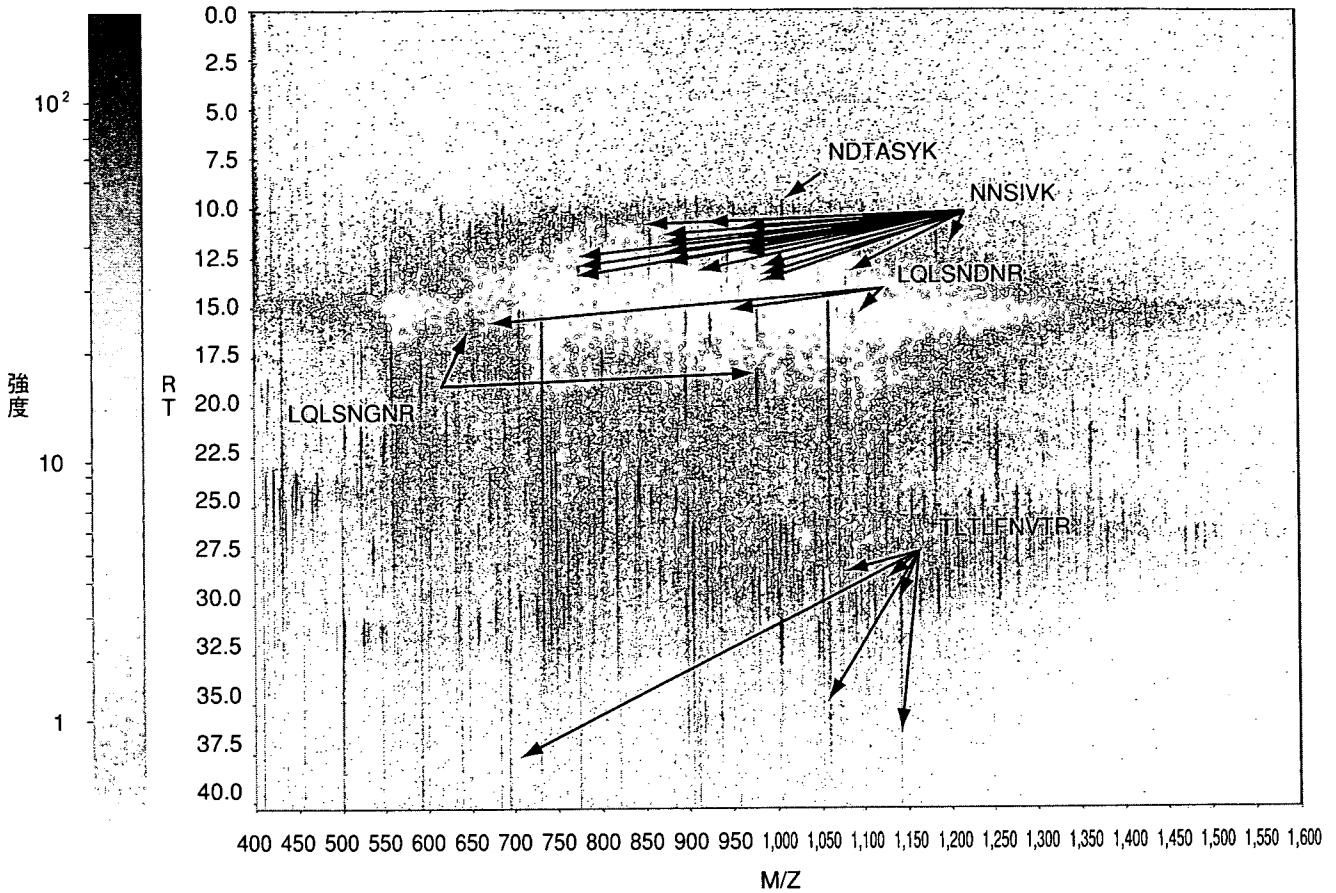


図3 2DICALにより同定されたCEA (carcinoembryonic antigen) のペプチドレベルでの糖鎖変異 (巻頭カラー図7参照)

CEAのトリプシン分解産物のLCMSデータを2DICALで処理し、質量電荷比(M/Z)と保持時間(RT)を軸として、ピーク強度を二次元に展開したものである。糖鎖修飾のあるペプチドピークを矢印で示し、そのペプチド配列を矢印の起点に示す。同一ペプチドの異なった糖鎖修飾が診断マーカーとなる可能性が示唆される

## 2. プロテオーム・糖鎖解析技術を活用した大規模解析による診断の問題点と課題

### 1) 大規模解析の必要性

癌診断などの臨床応用を目指した場合に、大規模解析には2つの意味合いが含まれる。プロテオーム解析はゲノム解析と同様に網羅的解析を意味し、1つのサンプルに含まれるきわめて多数の情報を解析することが、第一の大規模解析である。第二の大規模解析は、臨床診断に応用するがゆえに必要となるもので、それは多くのサンプルを解析することである。

臨床材料を扱うとき20例程度の検討でよい結果が出て、多数の症例を比べると差がみえなくなってくることは臨床研究をする場合によく経験することであり、また、世にバイオマーカー候補と発表された論文は数多くありながら、臨床検査として認可されるものはきわめて少ないことも事実である。われわれの試算では判別率が90% (感度、特異度がともに90%であるような場合) になる因子が、10対10の症例比較で得られた結果の場合で

は95%の信頼区間は64%から98%になり、実際はほとんど判別できない（偶然に2群に分けた場合の判別率50%になる）危険もあることが示された。

臨床的に意味のあるデータを示すためには、研究レベルにおいても、ある程度のサンプル数での解析から得られた結果であることが必要となる。さらに実際の臨床に当たってはすべての人に応用されなければならないのであるから、再現性、簡便性なども考慮に入れた臨床治験が組めるような研究データを提示し、最終的な大規模解析がなされなければならない。トップダウンプロテオミクスの解析手法であるSELDI法はそのような大規模解析に適しているが、さらに詳しくプロテオーム解析可能なショットガンプロテオミクスの解析では、同位体を用いる方法では数検体の比較しかできず、また、ペプチド、タンパク質同定結果から量的比較する手法も間接的な定量法であることは否めない。2DICAL法などのLCMS（liquid chromatography mass spectrometry）データを直接定量比較できる手法<sup>15)</sup>はそのような問題を解決でき、今後のショットガンプロテオミクスによる大規模解析が期待される。

## 2) 前処理の選択

1つの試料を大規模解析するにあたって、現在の技術がもつ最大の問題点は、すべての情報を解析するまでの技術がまだないことである。質量分析計での大規模解析に究極的に求められるものは、存在する全分子の量を測定することであるが、そのためには、あらゆる分子に対して1分子ごとに計測できるシステムでなければならない。確かに超伝導装置を用いた1分子ごとの測定は現時点でも可能であるが、実用を目指すのはまだ先の話である。

また、現状での質量分析計はフェムトモル (f mol) からアトモル (a mol) レベルの感度を有しているが、これを大規模解析と抱き合わせると大きな問題が起こる。大規模解析に求められるものはより多くの物質を調べることであるが、より多くの物質を調べようとすると量的な競争が起こるため、質量分析計が本来もつ感度での検出ができなくなってしまふのである。そのため、質量分析計に十分な働きをしてもらうために、質量分析計で計測する前の処理が重要になってくる。前処理としては不要な物質を除く方法（除去）と、必要なものを集めてくる方法（濃縮）があるが、除去も濃縮もせず、より細かく分離することで、質量分析計での感度を上げる方法もある。

さまざまな知識を応用して前処理を行い、質量分析計などの最新の機器が十分な威力が発揮できる工夫をすることが研究者としての腕の見せ所である。

## 3) 材料の選択

臨床診断に用いられる材料は、組織、血液、体液（尿、分泌液など）があげられる。そのなかで血液を用いた診断は日常の臨床診断に用いられやすく、多くの解析が行われている。さまざまな癌で特異的なプロテオームマーカーが発見されており、大規模な解析での検証が現在進行中である。

組織からのプロテオームは、診断のみならず、治療標的を探索するうえで、重要な材料である。すでに、二次元電気泳動を用いて解析が進められているが、組織としてはタンパク質の高次構造が保存される必要があり、新鮮凍結標本を用いなければならない。

しかし、一次構造のみ必要なショットガンプロテオミクスの解析にホルマリンパラフィン切片からサンプルを提供できる環境が整ってきており、レーザーマイクロダイセクションと抱き合わせて、病理組織と対応したプロテオーム解析がさらに発展していくものと思われる。2DICAL法はそのような解析に最も適しており、われわれもホルマリンパラフィン切片からのプロテオーム解析に取り組み始めている。一方、組織に直接レーザーをあて質量分析計で計測する方法も提唱されているが<sup>16) 17)</sup>、現時点では組織学的に違うものとして捉えなければならないものが混在したデータとなっており、質量分析計の高分子領域の感度の改善や顕微鏡の搭載など、いくつかの課題を克服したうえで実用化されていくものと思われる。

## おわりに

古来より物質の根源を求めた学問は原子の存在を明らかにした。そしてその原子の構成をさらに求めることで、原子力を導き出すこととなった。一方、原子の相互作用が分子を生み出し、その分子による相互作用を解明する研究は、生命科学という最も複雑な研究の1つへと発展した。数十のアミノ酸のつながりがさまざまなタンパク質をつくり出し、生命の源になっていることがわかった20世紀の半ば、鎖状構造を有する核酸と糖鎖がタンパク質の両脇を固めるものとして次の研究対象となった。核酸は生命の情報を含有する最も重要な分子と認識され、遺伝子という称号を得て、すべての生命現象を統括するものとしての地位を得た。そして、核酸全配列が解明された今、原子や分子のつながりから生命現象を解明する真の分子生物学が始まろうとしている。

われわれが行っている質量分析計での解析は、究極的には生体の全分子の量を測定できるシステムになるであろう。しかし、生命における原子、分子間の関連を調べるには他のシステムのアプローチが必要である。さまざまな分野でのコラボレーション、データ共有がなされていくことで、分子生物学がさらなる発展を遂げ、医療を始めさまざまな分野が大きく変革していくことになるであろう。

## 文献

- 1) 波及・深化する糖鎖研究 (古川鋼一, 他/編) : 羊土社, 東京, 2007
- 2) Petricoin, E. F. et al. : Lancet, 359 : 572-577, 2002
- 3) Shiio, Y. et al. : J. Am. Soc. Mass Spectrom., 14 : 696-703, 2003
- 4) Ishihama, Y. et al. : Mol. Cell Proteomics, 4 : 1265-1272, 2005
- 5) Ono, M. et al. : Mol. Cell Proteomics, 5 : 1338-1347, 2006
- 6) Kondo, T. et al. : Nature Protoc., 1 : 2940-2956, 2006
- 7) Hakomori, S. : Adv. Cancer Res., 52 : 257-331, 1989
- 8) Ono, M. et al. : Cancer, 78 : 1179-1186, 1996
- 9) Narimatsu, H. : Glycoconj. J., 21 : 17-24, 2004
- 10) Ono, M. et al. : Cancer Res., 59 : 2335-2339, 1999
- 11) Eisenberg, E. J. et al. : Antimicrob. Agents Chemother., 41 : 1949-1952, 1997
- 12) Kameyama, A. et al. : Anal. Chem., 77 : 4719-4725, 2005
- 13) Kaji, H. et al. : Nature Biotechnol., 21 : 667-672, 2003
- 14) Adamson, J. T. et al. : J. Proteome Res., 5 : 493-501, 2006
- 15) Zhang, H. et al. : Mol. Cell Proteomics, 4 : 144-155, 2005

- 16) Bouamrani, A. et al. : Clin. Chem., 52 : 2103-2106, 2006  
17) Yanagisawa, K. et al. : J. Natl. Cancer Inst., 99 : 858-867, 2007

<著者プロフィール>

尾野雅哉：1983年東京大学医学部卒業。卒業後、東京大学第一外科入局。'92～'94年、国立がんセンターがん専門修練医として、廣橋説雄部長（現がんセンター総長）に実験病理学を教授される。1997～2000年ワシントン大学箱守仙一郎教授より糖鎖生物学の薫陶を受け、帰国後、自治医科大学消化器一般外科学講座講師を経て、2003年より現職。macro, micro, molecularの3つが一体となった疾患解明と合理的治療法の開発を目指す。

山田哲司：1981年東京医科大学卒業。呼吸器外科の臨床研修の後、'90年より国立がんセンター研究所病理部にて廣橋説雄博士（現国立がんセンター総長）指導のもと病理組織学と腫瘍病理学の研究を始め、2001年より国立がんセンター研究所腫瘍プロテオミクス・プロジェクト・リーダー、'04年より現職。プロテオームによるバイオマーカー開発に取り組んでいる。

EXPERIMENTAL MEDICINE

実験医学 増刊

別刷

**羊土社**

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail : eigyo@yodosha.co.jp



～プロテオーム・大規模タンパク質解析を利用した診断～

## 2. ダイレクトタンパク質プロファイルによる膵癌血漿診断への応用

本田一文, 山田哲司

昨今, 質量分析を用いた血清・血漿タンパク質ダイレクトプロファイル法による診断マーカーの開発が注目を集めている。われわれは, 膵癌血漿診断マーカー開発を目的に 245 例の血漿検体を SELDI-QqTOF-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization coupled with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry) 法を用いて, ダイレクトタンパク質プロファイルを行った。4 本のペプチドピーク情報から, 学習セット, 検証セットともに 90% 以上の判別率で膵癌を判定する判別モデルの導出に成功した。本稿では実用化の可能性を含めて論じたいと思う。

### はじめに

近年, 質量分析法を用いた癌診断マーカーの開発が注目を集めている。血液中を循環しているタンパク質を酵素消化やラベルやタグを付与することなしに, 直接質量分析を用いてタンパク質の質量を網羅的に計測し, そのプロファイル情報を使って罹患者を検出しようという試みが積極的に行われている。循環タンパク質の質量変化は, タンパク質の翻訳後修飾, 特定部位での切断や消化の状態を反映するため, 病態に従い変化する生体反応をモニターするよい指標になると考えられている<sup>1)</sup>。これら変化を網羅的に捉えプロファイルすることにより, 担癌状態と非担癌状態を見きわめ

るための特徴を抽出することが可能であり, このような原理に基づいた癌患者血清・血漿タンパク質のダイレクトタンパク質プロファイルが行われ, 成果をあげている<sup>2)</sup>。

本稿では, 血清・血漿サンプルを消化酵素による消化を行うことなしに MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) 法や SELDI-TOF-MS 法などを用いてタンパク質の質量を網羅的に直接計測するダイレクトタンパク質プロファイル法によるマーカー探索の現状を紹介し, 最近われわれが開発した本方法を用いた膵癌診断法について紹介する。

#### [キーワード&略語]

血漿ペプチドプロファイル, 膵癌血漿診断マーカー, 質量分析

MALDI-TOF-MS : matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

ROC : recursive operation curve

SELDI-QqTOF-MS : surface-enhanced laser desorption/ionization coupled with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry

Application of direct plasma proteome to early detection of pancreatic cancer

Kazufumi Honda/Tesshi Yamada : Chemotherapy Division and Cancer Proteomics Project, National Cancer Center Research Institute (国立がんセンター研究所化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト)

## 1 血清・血漿ダイレクトタンパク質プロファイル法による癌診断マーカー探索の現状

血液中に循環するタンパク質は、患者の病態を反映し、翻訳後修飾や、タンパク質分解酵素による特異的な切断、消化を受けながら、質量を変化していく。この質量変化を網羅的に観察しプロファイルすれば、病態に特徴的な変化を捉えられる可能性がある。このような理論的な根拠のもと、世界中の多くの施設で、ダイレクトタンパク質プロファイル法を用いた診断マーカー探索が進められている<sup>1)~4)</sup>。この方法を用いた場合には、現状の質量分析計の性能からすれば、30,000 Da程度までのペプチド領域の観察が限界となる。この領域での質量分析には、MALDIやSELDI-TOF-MSが使用されることが多い。

2002年にNCI (National Cancer Institute), 米国食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) のグループからSELDI-TOF-MSにより卵巣癌患者を100%近くの判別率で検出するペプチドプロファイルが発表されると<sup>5)</sup>, タンパク質ダイレクトプロファイル法が診断マーカー抽出に強力なツールになることが多くの研究者に認識されるようになっていく<sup>6) 7)</sup>。その後、SELDI-TOF-MSによる前立腺癌診断のための決定木の発表などが続き<sup>8)</sup>, 探索方法も確立されて、多種多様な癌種でのマーカー抽出が報告されていく<sup>4)~10)</sup>。血液検体を簡単に再現性の高い前処理法で処理した後、MALDI-TOF-MSで循環ペプチドの質量をプロファイルし、診断マーカーを抽出しようという試みも積極的に進められており、子宮体癌の血清アルブミン結合画分ペプチドの質量プロファイルによる診断マーカーの抽出や<sup>11)</sup>, 膀胱癌, 乳癌, 前立腺癌に特異的に認められるペプチド断片の同定などが報告されている<sup>12)</sup>。また、癌診断マーカーだけでなく血清ペプチドプロファイルから食道癌の術前化学放射線療法の奏功性を予測する判別モデルの抽出や<sup>13)</sup>, 肺非小細胞癌に対するゲフィチニブ奏功性を予想するマーカーなどが抽出され報告されている<sup>14)</sup>。

## 2 血漿ダイレクトタンパク質プロファイル法による膵癌診断マーカーの開発と臨床応用の可能性<sup>15)</sup>

膵癌は難治性な悪性腫瘍である。その難治である理由は、膵癌は細胞生物学的な悪性度が高いという特徴を有するだけでなく、臨床症状が乏しく、膵臓という解剖学的な特性のために超音波診断や内視鏡的な診断が困難であり、早期膵癌の検出は容易ではないからである。事実、膵癌と診断された患者のうち、手術適応があったのは20~40%程度といわれている<sup>16)</sup>。膵癌の臨床予後を改善させるためには、非侵襲的な方法で、担癌患者を効率的に検出する診断法を開発し、検診に応用することが有効な戦略になると考えられる。国立がんセンター研究所化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクトでは、上記目的を達成するために膵癌患者血漿とその対照者血漿のペプチドプロファイルを取得し、膵癌患者を検出するペプチドプロファイル判別モデルの抽出を試みた。

### 1) 対象検体と計測方法

対象は2002年8月から2003年10月までに国立がんセンター中央病院で採取された膵癌患者血漿(104例分)と健常者血漿(116例分)(表1), ならびに東京医科大学病院で採血された膵癌患者(9例), 良性膵疾患患者(11例), 健常者(5例)である。これら、血漿検体はすべて同一条件で採取され、解析まで-80℃で凍結保存された。血漿検体は変性剤をもちいてタンパク質を変性させた後、BioRad社製のSELDI-ProteinChipを用いて4条件でのアフィニティー精製を行った。質量の計測には解像度と質量精度を担保するために四重極搭載直型質量分析計を用いて質量分析を行った(図1)。四重極搭載直型質量分析計で計測された質量情報は、国立がんセンター研究所で独自で開発されたコンピュータ解析ソフトウェアNCC-ProteoJudgeを使用して解析を行った<sup>13) 15)</sup>。以上のように、高分解能質量分析計を用いてProteinChipを計測しプロファイルするSELDI-TOF-MS法の改良システム“SELDI-QqTOF-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization coupled with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry)”を確立した。

表1 測定検体の臨床背景

	学習セット			検証セット		
	癌 (n=71)	健常者 (n=71)	p値	癌 (n=33)	健常者 (n=45)	p値
年齢 (平均±標準偏差)	61.3±9.06	62.1±10.0	0.60*	62.0±9.06	63.2±11.7	0.6*
性別						
男性	37	33	0.50**	18	24	0.92**
女性	34	38		15	21	
腫瘍発生部位						
膵頭部	34					
膵体尾部	37					
不明	0					
臨床病期						
I期	1					
II期	6					
III期	10					
IV期	54					

\*Fisher's exact probability t-test

\*\*student's t-test

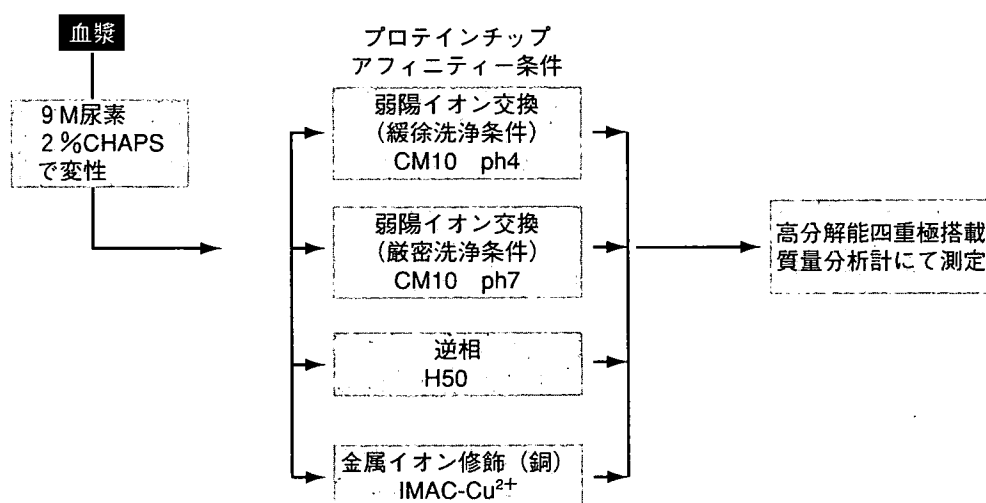


図1 SELDI-QqTOF-MSによる血漿検体の計測の流れ

血漿を変性剤を用いて変性を行った後に、弱陽イオン交換を2条件、逆相、金属イオン修飾条件の4条件を用いてアフィニティー精製し、高分解能四重極搭載質量分析計で計測した

## 2) SELDI-QqTOF-MSによる計測の網羅性と再現性

まず最初にわれわれが確立したSELDI-QqTOF-MSによる検出ペプチド数と計測再現性について検証した。今回使用したProteinChipの4条件(図1)をSELDI-QqTOF-MSによって計測した場合、検出できるペプチドピークの数には637であった。同一検体を計測した場合の定量再現性を検討するために、癌患者24例と健常者24例を二重複試験で計測し、同一検体

同士の相関係数を計測したが、その平均値はいずれのアフィニティー条件でも0.95以上を保っていた(表2)。

## 3) 機械学習法を用いた学習セットからの膵癌判別モデルの導出

血漿ペプチドプロファイルから判別モデルの導出を行うために、国立がんセンター中央病院で採血された検体のうち癌患者と健常者の間で、性、年齢などが偏らないように調整した学習セットを選別した。選別した学習セットは膵癌患者が71例、健常者が71例の合

表2 SELDI-QqTOF-MS法による検出ピーク数と実験再現性

	検出ピーク数	相関係数(r) ± 標準偏差
H50	263	0.96 ± 0.03
CM10 ph4	124	0.99 ± 0.01
CM10 ph7	73	0.98 ± 0.01
IMAC-Cu <sup>2+</sup>	177	0.95 ± 0.04
合計	637	

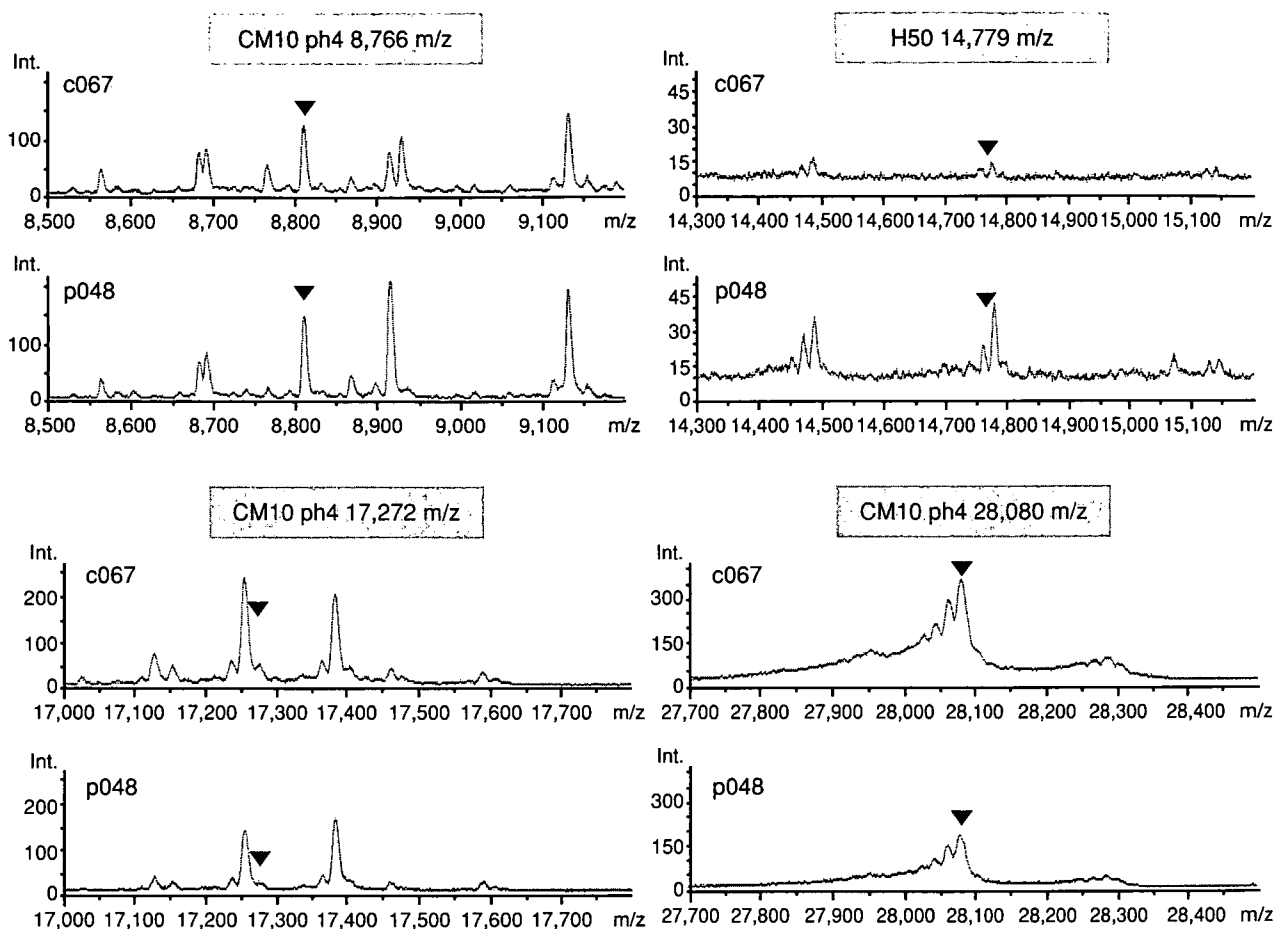


図2 膵癌判別モデルに使用される4本のペプチドピーク (文献15から改変)

CM10 ph4 8,766, 17,272, 28,080 m/z, H50 14,779 m/zの4本のピークが選択された。c067: 健常者血漿, p048: 膵癌患者血漿

計142例分の血漿とした(表1)。この検体のペプチドプロファイルをSELDI-QqTOF-MSで計測し、すべてのデータをNCC-ProteoJudgeに保管、臨床情報と統合し、膵癌患者と健常者を判別する判別モデルを構築した。判別モデル構築には、サポートベクターマシン (support vector machine) を使用した<sup>17)</sup>。

導出された判別モデルは、CM10 ph4の条件で観察される8,766, 17,272, 28,080 m/zと、H50で観察される14,779 m/zの4本のピークで構築されており(図

2)、この4本のペプチド情報をもとに分離境界面を設定し、その距離と方向をもとに、担癌状態か非担癌状態かを判別した。学習セット142例分に対して感度97.2%、特異度94.4%を有していた(図3A, 表3)。ROC (recursive operation curve) 分析<sup>18)</sup>では、各ピークに対するROC曲線下面積値は0.925から0.648までの間に分布しており、4本のピークを組合わせた場合のROC曲線下面積は0.978であった(図3B)。

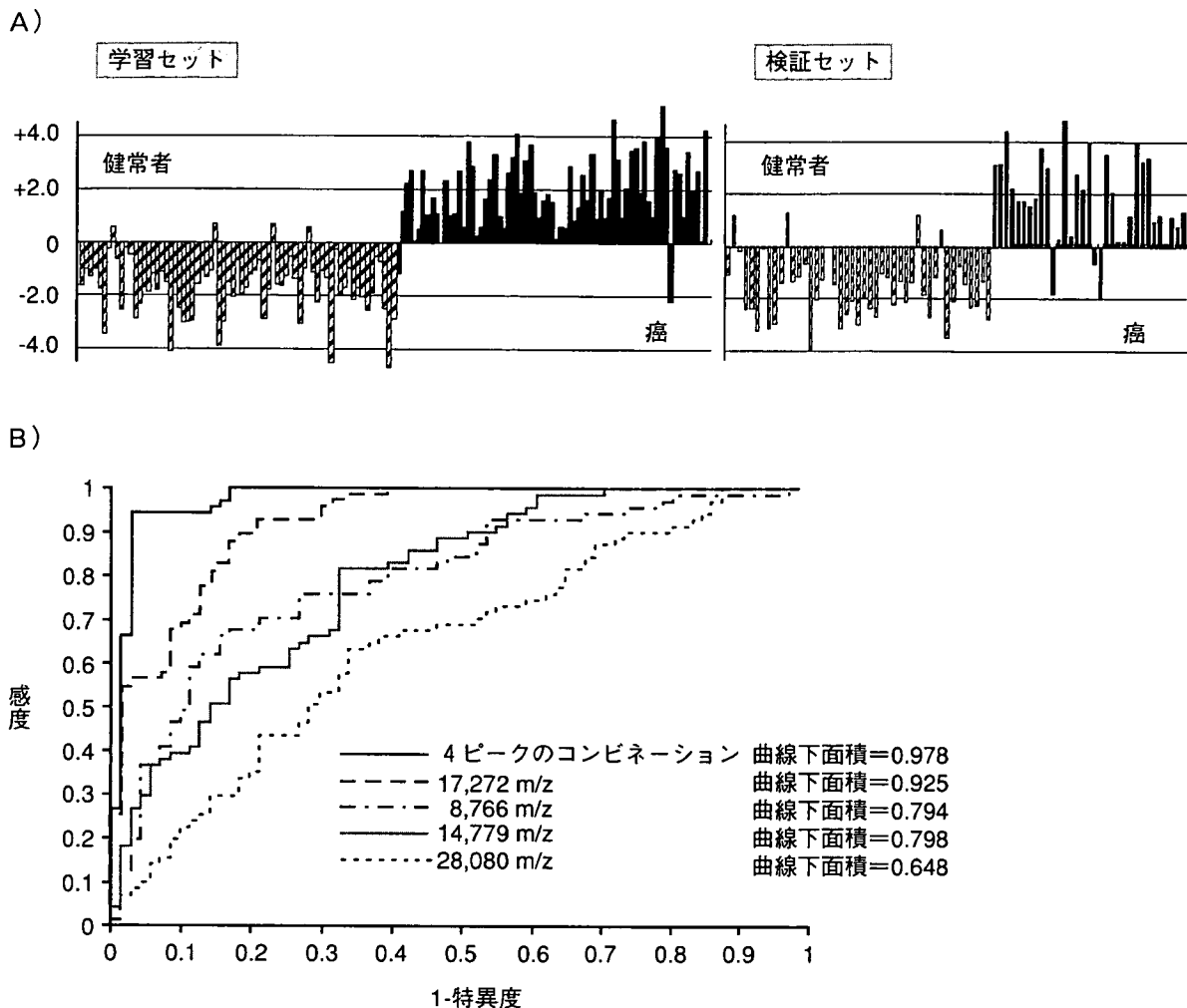


図3 判別モデルの判別率 (文献15から改変)

A) 分離境界面に対する各症例の距離と方向. 分離境界面を0と定義したとき癌患者は(+)の方向, 健常者は(-)方向に分類される. B) 学習セットにおけるROC曲線と曲線下面積. 各4本のROC曲線と4本を組合わせた場合のROC曲線下面積

#### 4) 検証セットによる判別モデルの検証

学習セットによって導出された判別モデルの正確性を検証する目的で, 国立がんセンター中央病院で採取された血漿検体のうち, 学習セットの導出に用いられなかった膵癌(33例), 健常者(45例)の計78例分の血漿を用いて判別モデルによる検証を試みた. 先に述べた4本のピークから導き出された分離境界面を固定し, 各検体について距離と方向を計算し, 判別を行った. 33例の膵癌のうち30例(90.9%)を膵癌と判定し, 健常者45例のうち41例(91.1%)と判定した. 国立がんセンター中央病院で採血された検証の中に臨床病期I, II期の早期膵癌が5例含まれていたが, そのうち4例を膵癌と判定した(表3).

#### 5) 多施設検体による膵癌判別モデルの検証

判別モデルの正確性について, 単施設から得られた検体では90%以上の感度, 特異度で検証することが可能であったが, モデル検証に使われた検体は国立がんセンター中央病院だけで採取された検体であるため検体の保存法や採血手技による偏りを反映している可能性を否定できない. また国立がんセンター中央病院で採血された検体であるため, 良性膵疾患などの良性疾患症例に対する判別率を検証することができなかった.

そこで, 本判別モデルが国立がんセンター中央病院以外で採血された検体に対する有効性について, 東京医科大学病院で採血された検体を用いて検証した. 膵癌患者9例中8例を膵癌, 健常者5例中4例を健常者

表3 SELDI-QqTOF-MS法による診断基準を用いた正診率

	学習セット		検証セット	
	症例数	正診率	症例数	正診率
健常者	71	67(94.4%)	45	41(91.1%)
癌	71	69(97.2%)	33	30(90.9%)
腫瘍発生部位				
膵頭部	34	33(97.1%)	17	14(82.4%)
膵体尾部	37	36(97.3%)	10	10(100%)
不明	0	0	6	6(100%)
臨床病期				
I期	1	0(0%)	1	1(100%)
II期	6	6(100%)	4	3(75.0%)
III期	10	9(90%)	1	1(100%)
IV期	54	54(100%)	27	25(92.6%)

と判定した。良性膵疾患は、良性膵腫瘍の6例中4例、慢性膵炎5例中1例を膵癌と診断した。

### 6) CA19-9と血漿ペプチドプロファイルによる判別モデルのコンビネーションによる膵癌の検出

既存の膵癌腫瘍マーカーとしてCA19-9が知られており、実際の臨床検査で使用されている<sup>19)</sup>。CA19-9と血漿ペプチドプロファイル判別モデルのコンビネーションが判別率を向上させるかどうかを検討した。コンビネーション陽性とはCA19-9のカットオフを37 U/mLと定義し、CA19-9もしくは血漿ペプチドプロファイル判別モデルのいずれかのうちの1つでも陽性と判定された場合を、膵癌と判別した。コンビネーションによる判別には、CA19-9を測定することができた検証セット68例（膵癌患者29例、健常者39例）の血漿検体を使用した。CA19-9の単独の膵癌患者検出率は86.2% (26/29)で偽陽性率は7.7% (3/39)であったのに対して、血漿ペプチドプロファイル判別モデルの検出率は89.7% (26/29)で偽陽性率は10.3% (4/39)であった。血漿ペプチドプロファイル判別モデルの検出率は、CA19-9に勝っていたが、偽陽性率では劣っていた。CA19-9と血漿ペプチドプロファイルによる判別法は互いに相補的で、コンビネーションした場合の検出率は臨床病期I、II期の早期膵癌を含めて100%検出することが可能だった。その偽陽性率は15.4%であった。

### 3 タンパク質ダイレクトプロファイル法による膵癌マーカーの実用化に向けて

以上述べてきたように、ダイレクトプロファイル法による診断マーカー開発と臨床応用の可能性について現状を述べてきた。現在まで報告されたマーカーのうちのいくつかは再現性の確認が行われ、実際の臨床応用に向けた取り組みがなされ始めている<sup>20)</sup>。われわれが進めている膵癌の診断マーカー開発も、研究レベルでの可能性の提示から、臨床応用に向けた取り組みに進みつつある。つい最近、ハイデルベルグ大学の外科のグループは膵癌患者96名分と健常者96名分の血清ペプチドのダイレクトプロファイリングをSELDI-TOF-MS法を用いて行い、膵癌患者と健常者の間に明らかに挙動が異なるペプチドピークの抽出を試みた。彼らは、17,270と28,090 Daに認められるピークが膵癌で減少していることを見出した。特に、17,270 Daのペプチドピークは、t検定によって $P=3.85 \times 10^{-13}$ という非常に小さい値を有しており、さらにそのROC曲線下面積は0.947と高値であった<sup>21)</sup>。この論文は、われわれの報告をほぼ追試した形になり、ドイツでもわれわれが報告した2ピークが再抽出されたことは非常に興味深い。

今後の実用化に向けた取り組みには、少なくとも2つのことをクリアしなければならない。1つは、①より大きな多施設共同研究でこれらマーカーの精度を再

検証すること、もう1つは、②試薬や機器を統一し臨床検査に耐えうる品質に向上させ、薬事法の規定に従う体外診断薬としての品質管理を行うこと、などである。上記①については、現在国内8カ所の医療機関の協力を得て、消化器癌の血液検体が同一のプロトコールで収集され、大規模検証実験がスタートしている。②については、より精度が高く安定的なプロファイルの取得を目指して、試薬と検査手順の開発が進められている。薬事法に対応した臨床治験を進められるようにさらなる基盤を整備していく所存である。

## 文献

- 1) Liotta, L. & Petricoin, E. F. : J. Clin. Invest., 116 : 26-29, 2006
- 2) Petricoin, E. F. et al. : Nature Rev. Cancer, 6 : 961-966, 2006
- 3) Shau, G. H. et al. : Brief. Funct. Genomic. Proteomic., 2 : 147-158, 2003
- 4) Petricoin, E. F. et al. : Proteomics, 4 : 2357-2360 : 2004
- 5) Petricoin, E. F. et al. : Lancet, 359 : 572-577, 2002
- 6) Seibert, V. et al. : Brief. Funct. Genomic. Proteomic., 4 : 16-24, 2004
- 7) Omenn, G. S. : Proteomics, 6 : 5662-5673, 2006
- 8) Adam, B. L. et al. : Cancer Res., 62 : 3609-3614, 2002
- 9) Zhang, Z. et al. : Cancer Res., 64 : 5882-5890, 2004
- 10) Hara, T. et al. : J. Urol., 174 : 1213-1217, 2005
- 11) Kikuchi, S. et al. : Cancer Sci., : 822-829, 2007
- 12) Villaeuva, J. et al. : J. Clin. Invest., 116 : 271-284, 2006
- 13) Hayashida, Y. et al. : Clin. Cancer Res., 11 : 8042-8047, 2005
- 14) Tabuchi, F. et al. : J. Natl. Cancer Inst., 99 : 838-846, 2007
- 15) Honda, K. et al. : Cancer Res., 65 : 10613-10622, 2005
- 16) Yamamoto, M. et al. : Pancreas, 16 : 238-242, 1998
- 17) Byvatov, E. & Shneider, G. : Appl. Bioinformatics, 2 : 67-77, 2003
- 18) Metz, C. E. : Semin. Nucl. Med., 8 : 283-289, 1978
- 19) Ritts, R. E. et al. : J. Gastrointest. Surg., 1 : 243-248, 1997
- 20) <http://edrn.nci.nih.gov>
- 21) Ehmann, M. et al. : Pancreas, 34 : 205-214, 2007

### <筆頭著者プロフィール>

本田一文：東京医科大学研究医，国立がんセンターリサーチレジデント，東京医科大学助手，同大学霞ヶ浦病院部長代行を経て，2005年から国立がんセンター研究所化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト室長。基礎医学の成果を臨床医学に応用できるように心がけ，研究を行っている。

# Pharma

The Review of Medicine and Pharmacology

# Medica

Volume 26

別刷

メディカルレビュー社



# ゲノム・プロテオーム 研究の成果

国立がんセンター研究所化学療法部腫瘍プロテオミクスプロジェクト

山田 哲司

## KEY WORDS

- マイクロアレイ  
(microarray)
- プロテオミクス  
(proteomics)
- パラジン (palladin)
- 遺伝性膵癌

## はじめに

膵癌は難治性の高い悪性腫瘍の1つである。これは膵癌細胞の生物学的悪性度が高く、早期に周囲臓器に浸潤し、またリンパ節および遠隔臓器に転移することに加え、解剖学的に早期診断が困難であることが理由であると考えられる。事実、95%の症例がステージⅢないしⅣ期の進行した状態で発見されており(日本膵臓学会の全国膵癌登録20年間の集計)、画像診断の発達した現在でも、切除可能例は全体の20~40%といわれている。また手術が行われた症例でも術後早期に再発することが多く、膵癌全体の5年生存率はわずか約6%で(地域癌登録協同調査)、国内で1年間に2万人以上(22,260人、平成16年厚生労働省「人口動態統計」)の方が膵癌で死亡している。癌による死因の6.9%を占め、肺、胃、大腸、肝癌に次いで第5位である。ウイルス性肝炎の制御が進み、肝癌が減少に転

じれば、第4位になることは間違いないと考えられ、すでに欧米では第4位となっている。また膵癌による死亡者数はこの20年間で約2.5倍と急増しており、早急な対策が必要である。

このような予後不良な膵癌の治療成績を改善させるためには、現在用いられている診断法・治療法の使用法や組み合わせをさらに改善することも重要であるが、画期的に膵癌患者の予後を向上させるためには、早期発見や個別化医療(テーラーメイド医療)へ応用できる新規バイオマーカーの開発、膵癌の発生と浸潤・転移の分子機構の解明による新たな分子標的治療薬の開発が必要である。

ゲノミクス(genomics)やプロテオミクス(proteomics)といった所謂「-omics」研究は、何らかの生命現象を既存の知見や仮説によらず、とりあえず大規模・網羅的にすべての遺伝子・蛋白質を解析し、その結果を統計的な手法を用いて俯瞰することで理論的

Genomics and proteomics  
of pancreatic cancer.

Tesshi Yamada (部長)

には到達できなかったような知見を得ようとするものであり、従来の研究手法とは根本的に異なる。近年、マイクロアレイ (microarray) や質量分析 (mass spectrometry) などのゲノミクス・プロテオミクスの解析手法とバイオインフォマティクス (bioinformatics) の技術が急速に進歩し、画期的な新規診断法・治療法の開発に結びつくことが期待されている。

本稿では膵癌の発生と浸潤・転移に関するゲノム異常の知見について断片的ではあるが概論を述べ、基礎から臨床までさまざまなレベルで行われているゲノミクス・プロテオミクスの最前線の研究について紹介する。

## I. 膵癌のゲノム異常

### 1. k-ras

浸潤性膵管癌の90%を超えるほとんどの症例でk-ras (*KRAS*) 遺伝子の機能獲得性の変異が認められる<sup>1)</sup>。*KRAS*遺伝子産物は細胞膜受容体からのシグナルを核内へ伝達するMAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路にかかわっており、遺伝子変異により恒常的なMAPK経路の活性化をもたらす。*KRAS*遺伝子の変異はpancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) でも認められる。しかし、遺伝子操作により活性化型k-ras (*Kras*<sup>G12D</sup>) を発現するマウスモデルではPanINは発生するが、浸潤癌の発生はまれであることから<sup>2)</sup>、なんらかの別の遺伝子変異が*KRAS*遺伝子の変異に加えて起こることが、浸潤性増殖に必要であると考えられている<sup>3)</sup>。

### 2. SMAD4/DPC4

18qの欠失は膵癌の90%以上の症例で認められ、Hahnらはその標的癌抑制遺伝子としてDPC4 (*SMAD4*) を同定した<sup>4)</sup>。*SMAD4/DPC4*はtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) シグナル伝達系にかかわる分子であり、膵癌の約55%で遺伝子変異がみられる。PanINにおける蛋白質発現解析よりWilentzらはDPC4の失活は膵癌の多段階発癌の比較的後期に起こると結論した<sup>5)</sup>。前述の活性化型k-rasを発現するマウスモデルに*Smad4/Dpc4*のヘミ欠失をさらに導入することで、浸潤性の腺癌が発生すると報告され<sup>6)</sup>、DPC4の機能不全が膵癌の浸潤性増殖をもたらすものと考えられている。

### 3. その他

さまざまな癌で変異がみられ膵癌に特徴的というわけではないが、*CDKN2A*や*TP53*などの癌抑制遺伝子も50%以上の症例で変異のため失活している。

## II. ゲノムの構造異常の網羅的解析

ゲノムワイドにcDNAやBAC (bacterial artificial chromosome) DNAを貼り付けたマイクロアレイを用い、遺伝子のコピー数変化、すなわち増加(増幅)と減少(欠損)が膵癌においても解析されている<sup>7)</sup>。Heidenbladらは8q, 12p, 7q, 18q, 19q, 6p, 8pのコピー数増加が膵癌で高頻度に認められ、9p24, 9p21, 9q32, 10p12, 10q22, 12q24, 18q23の領域でホモ欠失がみられたことを報告している<sup>8)</sup>。

これらのうち、19q13領域の遺伝子

増幅は膵癌でしばしば報告されてきた。従来*AKT2*がこの増幅領域の標的遺伝子と考えられてきたが、*AKT2*の遺伝子増幅と発現が必ずしも関連しないため、別の標的遺伝子があるものと考えられていた。最近この染色体領域から*IXL*, *MLL2*, *hPaf1*など多くの癌遺伝子候補が同定されている<sup>9)~11)</sup>。この領域にある複数の遺伝子の増幅と発現亢進が膵癌の発生あるいは進展にかかわっている可能性がある。

## III. 遺伝性膵癌の原因遺伝子の同定

家族性に腫瘍が発生する家系の罹患者と非罹患者の比較ゲノム解析によって、散发性の症例でも体細胞性の遺伝子変異がみられる癌遺伝子、癌抑制遺伝子が同定されており、有効なアプローチであると考えられる。最近、米国ワシントン大学などのグループが1家系のみではあるが、4q32-34にある家族性の膵癌遺伝子としてpalladin (*PALLD*) を同定した<sup>12)</sup>。*PALLD*の変異はactin結合蛋白質であるactininとの結合部位にあり、変異型palladinの強制発現にて細胞骨格の変化や運動性の亢進をもたらされたと報告されている。膵癌の培養細胞でも変異が発見されたと報告されており、今後散发性の膵癌を含む多数症例での解析が期待される。

## IV. 膵癌のエピゲノム異常

遺伝子プロモータ領域の5'-CpG methylationは遺伝子発現を抑制し、遺伝子欠損と同様に癌抑制遺伝子の不活化をもたらす。p16INK4a/*CDKN2/*

MTS1 (CDKN2A) 癌抑制遺伝子はホモ欠失などのgeneticな異常に加え、プロモータのhypermethylationによるepigeneticな異常により膵癌のほぼ全例で失活しているとされている<sup>13)</sup>。Hagiharaらはmethylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を用い、膵癌細胞株でプロモータのhypermethylationをきたしている13遺伝子を同定した<sup>14)</sup>。PengらはDNMT1 (DNA methyltransferase 1) 蛋白質の発現が膵癌におけるメチル化した遺伝子の数と強い相関があることを明らかにした<sup>15)</sup>。

## V. 膵癌のマイクロアレイ解析

Prasadら<sup>16)</sup>はPanINの病変と正常膵管上皮よりレーザーマイクロダイゼクションにより抽出したRNAを用い、6,500遺伝子について発現を解析した。3倍以上発現の亢進する32遺伝子と低下する17遺伝子を同定した。特に前腸 (foregut) のマーカーと考えられているgastrin, GATAs, TFF1, pepsinogen C, などがPanINで高発現していることが明らかとなった。Nakamuraら<sup>17)</sup>はレーザーマイクロダイゼクションにより膵癌上皮より特異的にRNAを抽出し、23,040遺伝子の発現を正常の膵管上皮と比較解析し、発現の亢進する260遺伝子と低下する346遺伝子を同定した。膵癌組織には間質成分が多く、レーザーマイクロダイゼクションが必須である。また腺房上皮がほとんどを占める正常膵臓組織と腺管上皮由来と考えられる膵癌との遺伝子発現の比較をマイクロアレイで行った場合は、少なくとも *in situ* hybridizationや免疫染

色を行い、膵癌細胞特異的な発現を確認する必要がある。

膵癌に限らず、マイクロアレイデータから転移や患者の予後などのさまざまな臨床情報と相関する多数の遺伝子が抽出されているが、そのリストから背景となる生物学的現象が容易に推察できないことのほうが多いようである。いわゆるパスウェイ解析やGene Ontology解析を行い、無理な理論を組み立てている論文も散見される。また多数症例のゲノミクス・プロテオミクスの大量のデータから市販の統計ソフトを用い、安易な結論を導いている論文も多くみられる。市販のマイクロアレイが比較的安価に利用できるようになり、特にこの傾向が強まることを懸念する。数学的な検証のみでは不十分で、独立した症例による検証の重要性を強調しておきたい。

## VI. 膵癌のプロテオーム解析

検診で無症状の段階で発見し、早期に治療を開始することは全身臓器のどの癌においても有効と考えられる。しかし、現在有用性が確立した膵癌の検診法はない。全国どの医療施設でも採取可能で、被験者の負担が少なく、非侵襲的に得られる血液を検体に用い、微少の癌を発見し早期に治療を開始することが可能となれば、その遠隔成績は飛躍的に向上することが期待される。現在、膵癌で臨床に使用されている腫瘍マーカーとしてCA19-9があるが、早期の膵癌に対しては感度が十分に高くなく、また良性疾患や健常者で高値を示すことも多く、満足できるものではない。米国食品医薬品局Food and Drug Administration (FDA) はCA19-9

による膵癌検診を推奨していない。したがってより鋭敏かつ特異性の高いマーカーの開発が必要である。

質量分析によるプロテオーム解析は近年急速な技術革新が行われ、微量な蛋白質、ペプチドの発現パターンが高感度に検出されるようになってきている。国立がんセンター研究所腫瘍プロテオミクスプロジェクトではプロテインチップと高分解能の四重極ハイブリッド型質量分析機を用いたSELDI-QqTOF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation hybrid Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry)法により、膵癌患者71例と健常者71例を学習セットとして、サポートベクターマシーンアルゴリズムの教師付機械学習を行い、両者を感度97.2%、特異度94.4%で診断する4本のペプチドピークを抽出した。いずれもMann-Whitney U検定で膵癌患者と正常者の間でピーク強度は統計学的に有意な差 ( $p < 0.01$ )があり、さらに78例の検証セットを盲検し、感度90.9%、特異度91.9%で膵癌患者を診断することができることを検証した。またCA19-9のcut off値を37U/mLとして組み合わせると、ステージI/II期の早期患者も含め100%検出することが可能だった<sup>18)</sup>。この成果を検証するために現在第三次対がん総合戦略研究事業として国内の8カ所の医療機関が参加する多施設共同研究が進行している<sup>19)</sup>。

## おわりに

質量分析や液体クロマトグラフィーなどのプロテオミクスの技術革新は目覚ましく、たとえばホルマリン固定パラフィン切片からも蛋白質をペプチド

として抽出し、大規模な定量プロテオーム解析ができるようになってい  
る。今後、臨床応用可能なバイオマ  
ーカーや治療標的の発見が加速さ  
れるものと期待される。

## 文 献

- 1) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al : Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53 : 549 - 554, 1998
- 2) Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, et al : Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4 : 437-450, 2003
- 3) Olive KP, Tuveson DA : The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 12 : 5277-5287, 2006
- 4) Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al : DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271 : 350-353, 1996
- 5) Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, et al : Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia : evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60 : 2002 - 2006, 2000
- 6) Izeradjene K, Combs C, Best M, et al : *Kras* (G12D) and *Smad4/Dpc4* haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell* 11 : 229-243, 2007
- 7) Inazawa J, Inoue J, Imoto I : Comparative genomic hybridization (CGH) -arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 95 : 559-563, 2004
- 8) Heidenblad M, Schoenmakers EF, Jonson T, et al : Genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals multiple amplification targets and novel homozygous deletions in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 64 : 3052 - 3059, 2004
- 9) Huntsman DG, Chin SF, Muleris M, et al : MLL2, the second human homolog of the *Drosophila* trithorax gene, maps to 19q13.1 and is amplified in solid tumor cell lines. *Oncogene* 18 : 7975-7984, 1999
- 10) Moniaux N, Nemos C, Schmiech BM, et al : The human homologue of the RNA polymerase II -associated factor 1 (hPaf1), localized on the 19q13 amplicon, is associated with tumorigenesis. *Oncogene* 25 : 3247-3257, 2006
- 11) Kuuselo R, Savinainen K, Azorsa DO, et al : Intersex-like (IXL) is a cell survival regulator in pancreatic cancer with 19q13 amplification. *Cancer Res* 67 : 1943-1949, 2007
- 12) Pogue-Geile KL, Chen R, Bronner MP, et al : Palladin mutation causes familial pancreatic cancer and suggests a new cancer mechanism. *PLoS Med* 3 : 2216-2228, 2006
- 13) Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al : Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57 : 3126-3130, 1997
- 14) Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, et al : Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene* 23 : 8705-8710, 2004
- 15) Peng DF, Kanai Y, Sawada M, et al : DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 27 : 1160-1168, 2006
- 16) Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N, et al : Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res* 65 : 1619-1626, 2005
- 17) Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, et al : Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* 23 : 2385-2400, 2004
- 18) Honda K, Hayashida Y, Umaki T, et al : Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* 65 : 10613-10622, 2005
- 19) 山田哲司, 本田一文 : プロテオミクス解析による膵臓がんの血漿マーカーの開発. *ファルマシア* 43 : 32-36, 2007