

200924018B

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、  
プロテオミクス、メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

平成19-21年度 総合研究報告書

主任研究者 門田 守人

平成22(2010)年4月

# 目次

## I. 総合研究報告書

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、  
プロテオミクス、メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立  
門田 守人 ————— 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 7

III. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 13

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、プロテオミクス、  
メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

研究分担者 門田守人 大阪大学・副学長

**研究要旨**

我々は基盤研究（A）の補助により、個別化医療の確立に向け、消化器がんの網羅的遺伝子発現解析手法を用いたファンクショナルゲノミクスによる生物学的特性の解明を進めてきた。今後は、遺伝子のみならず、タンパク、代謝産物を対象としたプロテオミクス、メタボロミクス技術も応用し、これまでの基礎研究成果を臨床応用するため、大規模症例を対象とした prospective な検証による evidence を示す必要がある。そこで、本3次がんの事業では、個別化医療実用化のための体制整備と臨床応用を目的として、臨床チップやバイオマーカーによる予後予測臨床試験を計画した。

**A. 研究目的**

2007年度に実施されるがん対策基本法では、患者本人の意向を尊重した適切な医療体制の整備を基本理念とし、革新的技術を応用したがん研究の推進と成果の臨床応用が重要な課題として挙げられている。医療資源と患者の利益という観点より、evidence に基づいた治療の標準化は個別化とのダイナミックな循環によって進められるべきである。個別化医療に必要なのはまず個性の診断で、分子生物学的な特徴をあらゆるサンプルソースを用いて体系的に捉えることが有効である。そこで、本3次がんの事業では、消化器がんの大規模症例を対象に、がん組織の遺伝子・タンパク発現プロファイルによる転移・再発の予測診断系の構築と、がん患者の末梢血からメタボローム解析によるバイオマーカーを探索し、prospective な検証によって分子個別診断の evidence を示すとともに、その成果を臨床応用化することを目的とする。

**B. 研究方法**

大阪大学の基幹関連施設による消化器がん大規模症例の集積コンソーシアムにより、登録・集積された症例を対象に、遺伝子発現はヒト全遺伝子搭載 DNA チップ（44K）を用いて、またタンパク発現は従来の二次元電気泳動法に比べ、感度・汎用性の高い MALDI-TOF/MS と安定同位体標識試薬 NBS（2-nitrobenzenesulfonyl）法を組合せ、定量性の高いプロテオミクス手法を確立し、それぞれの発現プロファイルを取得する。

がんの転移・再発に関わる遺伝子、タンパクを絞り込むと同時に予測診断系を構築する。またパスウェイネットワーク解析で転移・再発に中心的な役割を果たすと思われる遺伝子を選択的に搭載した安価で再現性の高い臨床チップを開発し、その信頼性を多数症例の検体による validation study で検証する。

さらに、より簡便性を図るため、がん患者の末梢血から超高感度・超高分解能のフーリエ変換質量分析とハイスループット・スクリーニング法（HTS）を用いてメタボライトを同時一斉分析し、メタボライトバイオマーカーを探索する。

**（倫理面への配慮）**

本研究ではゲノムは扱わないが、3省合同の「ゲノムに関する指針」に準じた情報管理を行い、大阪大学の倫理規定に従って、患者の同意が得られたサンプルを使用した。

**C. 研究結果**

症例集積コンソーシアムにより約 4500 例の消化器がん組織と臨床情報が集積された。大腸がん 500 例、肝臓がん 200 例、胃がん 170 例、食道がん 100 例の遺伝子発現プロファイルを取得した。大腸がんでは根治切除後の異時性再発予測が 79%、肝臓がんでは根治切除後の残肝早期再発予測が 78%、胃がんでは根治切除後の腹膜再発予測が 75%、食道がんでは生検材料よりリンパ節転移予測が 70%可能な遺伝子群の同定と予測判別式を構築した。臨床ベースで適用を

図り、大腸がんに対する臨床チップ（第 4 世代）を新規に開発・作成し、独立した根治切除後 stage II, III 300 例の検証試験で、DFS が有意に異なる 2 群（予後良好群、予後不良群）に判別することが可能となり、その診断能が検証された。

プロテオミクスでは、大腸がん 24 例、肝臓がん 12 例を NBS 解析し、大腸がんで特異的に発現する新規 22 種類のタンパクおよび肝転移に関与する 12 種類のタンパク、また肝臓がんで特異的に発現する 64 種類のタンパクを同定した。さらに大腸がんの病勢を反映する 3 種の血清中タンパクをし、独立した 250 例の血清サンプルでその診断能を検証した。同定遺伝子発現は RT-PCR 法で、タンパク発現はウェスタンブロット法でそれぞれデータの信頼性を実証した。

メタボロミクスでは大腸がん 83 例、胃がん 45 例、膵がん 40 例の血清分析で、それぞれ 6 種、10 種、8 種の特異的なメタボライトを同定し、大腸がんの 200 例の検証試験では、血清存在診断で特異度 97%、感度 74% の高い正診率が得られた。

#### D. 考察

それぞれの OMIC 技術によって同定された分子は、他の assay 法での発現 verification でも相同性の高いデータが得られていることから、それぞれがんの存在・病勢診断マーカー、さらには治療標的となることが期待される。今後は遺伝子とタンパクの相互関係を考慮し、パスウェイネットワーク解析することで、より中心的な役割を果たす分子の絞り込みと、candidate を適正に搭載した臨床型の DNA チップを用いた正確な予測診断系が期待される。また血清レベルでもメタボライトマーカーによる早期大腸がんリスクを評価する可能性が示され、OMICS 技術の臨床応用が期待された。

#### E. 結論

本研究では、がんの遺伝子・タンパクの両

者から得られた基礎的研究の成果と、がん患者の末梢血のメタボローム解析によって得られた特異的メタボライト発現パターンの結果を、臨床研究デザインに合わせ prospective に解析することで、トランスレーショナルリサーチとして十分な evidence が得られることが期待され、臨床応用の基盤が整えられてきた。

#### F. 研究発表

（研究の刊行に関する一覧表に記載）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、プロテオミクス、  
メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

研究分担者 松原謙一 株式会社DNAチップ研究所

研究要旨

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクスの確立

**A. 研究目的**

大腸がんを対象に用い、ファンクショナルゲノミクスを基に実用化に向けた研究開発を行う。

**B. 研究方法**

切除大腸がん試料からRNAを抽出し発現プロファイルを解析することにより術後の個別化予後予測を可能とする。今回は多数試料の解析を追加して昨年までの成果確認を行う一方、より実用に適する方法論を開発する

（倫理面への配慮）

大阪大学生命研究倫理委員会の承認済

**C. 研究結果**

昨年度に行った大腸がん stageII 手術試料に160試料を追加し、RNA解析成果に基づく予後予測が適正に行われることを確認。さらにチップ基板を安価にした製品を使っても成果の劣らないことを確認した。

**D. 考察**

本解析を進めることにより、がん切除患者の予後予測が個人レベルで行えることが証明された。解析用チップのより安価な実用製品も検証済みとなり、内容・技術共に実用に適するレベルに達した。これにより、今後大規模実地テストに進む準備が整った。

**E. 結論**

1. 消化器癌の内、大腸がんを選び、その切除試料のRNAを多数解析しプロファイルの特徴から、少なくとも Stage II の

患者に対して実用レベルで個人の予後予測判別を行い得ることを確認した。

2. このシステムはロバストであり、300例にさらに160例新たな試料を加えても確実な判別のできることを示した。

3. また、解析技法について、実用に適する新たなチップ基板の検討を行い、これも順調に推移した。

4. これによって大規模実地テストに進むことができる状況に達したと考えている。

**F. 研究発表**

（研究の刊行に関する一覧表に記載）

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

（予定を含む。）

- 1.特許取得  
（準備中）
- 2.実用新案登録  
特になし
- 3.その他  
特になし

**NBS 法による大腸癌組織の蛋白質発現解析**

研究分担者 西村紀 大阪大学蛋白質研究所

**研究要旨**

大腸癌組織のプロテオーム解析により同定された新規の大腸癌関連蛋白質のうち、ELISA 測定系が構築できた 20 種類について、大腸癌患者および健常者血漿中の蛋白質濃度を測定し、血中マーカーとしての利用可能性を評価した。その結果、3 種類の蛋白質(Protein X, Protein Y, Protein Z)について、癌患者群と健常者群の間で有意な差が認められた。そこで、これら 3 つのマーカーについて、血中濃度と癌の進行度との関連性、術前・術後における血中濃度変化、マーカー閾値の設定と病態別陽性率などについて、さらに詳細な解析を行った。

これらの詳細解析の結果をまとめると、Protein X と Protein Y については存在診断マーカー、Protein Z については病勢マーカーとしての特徴をそれぞれ有しており、これら 3 種類の大腸癌関連蛋白質はいずれも臨床マーカーとして応用できる可能性があることがわかった。特に Protein Z については、既存の病勢マーカーである CEA, CA19-9 と組み合わせることで、患者補足率を大きく相補する可能性が示された。

**A. 研究目的**

新規大腸癌関連蛋白質を同定し、バイオマーカー(診断、予後予測、治療ターゲットなど)への応用を目的とする。

**B. 研究方法**

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)による血中濃度測定によって癌患者群(105 症例)と健常者群(100 名)間で統計学的有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた 3 種類 (Protein X, Protein Y, Protein Z) の癌関連蛋白質について、①癌の進行度(Tumor Stage)と血中濃度の関係性 ②術前・術後における血中濃度変化 ③癌の病態別でのマーカー陽性率、について詳細解析を行った。

Protein Z については病勢マーカーとしての特徴を示していたことから、CEA および CA19-9 に対する相補的マーカーとしての有用性を検討した。

なお、本研究では既存の癌マーカー値(CEA, CA19-9, SCC 抗原, CA125, CA15-3 及び PSA)が全て正常範囲である者を健常人として定義して各解析を行った。また、術前・術後での血中濃度の比較においては、手術後の根治度が A (Cure A)であった患者の血漿サンプルを解析対象とした。

**(倫理面への配慮)**

大阪大学医学部の倫理規定に従って患者の同意が得られたサンプルを使用した。

**C. 研究結果**

各検体における血中濃度と癌の進行度との関係について調べると、Protein Z の血中濃度は Tumor stage の進行に伴って増加する傾向を示していたのに対して、Protein X と Protein Y についてはそのような傾向を示していなかった。また、術前・術後における血中濃度比較では、3 種類全ての癌関連蛋白質について、術後に濃度が有意 ( $p < 0.05$ ) に減少していることが確認された。

次に、各癌関連蛋白質のマーカーとしての閾値設定を、ROC 曲線を利用して行った。この値を用いて癌の病態別 (locoregional stage (stage 0-II)、metastatic stage (stage III-IV)) でのマーカー陽性率について調べたところ、Protein X と Protein Y については比較的早期ステージである Locoregional stage 患者群での陽性率が高いのに対して、Protein Z については metastatic stage 患者群での陽性率が高かった。

特に Protein Z については、既存の大腸癌マーカーである CEA, CA19-9 と併用することにより、CEA, CA19-9 を単独で使用した場合と比較して陽性率の十分な上積み効果が認められた。

**D. 考察**

Protein Z については、血中濃度は CEA と同様に Tumor stage の進行に伴って増加する傾向を示していた。また、術前術後の比較においても Cure A 患者のほとんどにおいて、その値が減少していた。これらの性質は、

CEAのような病勢マーカーに特徴的なものであり、Protein Zもまた病勢マーカーであることを強く示唆する結果である。

また、Protein Zの既存マーカー(CEAおよびCA19-9)に対する相補的マーカーとしての有用性を検討すると、Protein Zを組み合わせた場合の上積み効果が十分あることが分かった。つまり、Protein ZをCEAやCA19-9と組み合わせて用いることにより、術後の経過観察を、より多くの患者に対して行える可能性が示された。

その一方、Protein XとProtein Yについては、Tumor stageが進行するに伴って濃度が増加する傾向を示していなかった。病勢別での陽性率について調べてみると、Metastatic stageの患者の陽性率は低く、むしろLocoregional stageの患者での陽性率の方が高いほどであった。以上のことから、Protein XとProtein Yは存在診断に有利な特徴を備えていると思われる。

#### E. 結論

我々は今回、20種類の大腸癌マーカー候補蛋白質のELISA解析により、3種類の癌関連蛋白質の血漿濃度が大腸癌の罹患と関連性があることを初めて実証した。更に、Protein Zに関しては病勢マーカーとしての特徴、Protein X, Protein Yは存在診断マーカーとしての特徴を呈していることが分かった。特に、Protein Zに関してはCEA、CA19-9に対する相補的病勢マーカーとしての応用の可能性も示唆された。

#### F. 研究発表

- 1)Sonomura K., Nishimura O et al.: Terminal proteomics: N- and C-terminal analysis for high-fidelity identification of proteins using mass spectrometry.: Rapid Communications in Mass Spectrometry (23):611-618,2009
- 2)Matsuo E, Nishimura O et al.: A new strategy for protein biomarker discovery utilizing 2-nitrobenzenesulfenyl (NBS) reagent and its applications to clinical samples.: Journal of chromatography B(877):2607-2614,2009
- 3)Matsuo E, Nishimura O et al., A new strategy for protein biomarker discovery utilizing 2-nitrobenzenesulfenyl (NBS) reagent and its applications to clinical samples.:

Proteomics(9):4063-4070,2009

- 4)Sonomura K, Nishimura O et al., A method for terminus proteomics: Selective isolation and labeling of N-terminal peptide from protein through transamination reaction.: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters(19):6544-6547,2009
- 5)Ezure T, Nishimura O et al., Expression of human Cu, Zn-superoxide dismutase in an insect cell-free system and its structural analysis by MALDI-TOF MS.: Journal of biotechnology(144):287-292,2009
- 6)Suzuki T, Nishimura O et al., Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system.: Journal of biotechnology(145):73-78,2009
- 7)Omar MFM, Nishimura O et al., Molecular-assisted immunohistochemical optimization.: Acta histochemica: in press,2010
- 8)Kuyama H, Nishimura O et al.: An approach to C- and N-terminal sequencing of protein: Mass spectrometry-based de novo amino acid sequencing with the combination of site-specific tris (2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium-acetylation of  $\alpha$ -amino group and selective recovery of terminal peptides.: Biomacromolecular Mass Spectrometry(2) in press,2010
- 9)Ezure T, Nishimura O et al., Development of an Insect Cell-Free System.: Current Pharmaceutical Biotechnology in press,2010

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1.特許取得  
現在、特許申請準備中(2件)
- 2.実用新案登録  
特になし
- 3.その他  
特になし

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、プロテオミクス、  
メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

研究分担者 山崎泰代 Phenomenome Discoveries Inc.(PDI)

**研究要旨**

消化器がん患者の末梢血からメタボローム解析によりバイオマーカーを探索し、臨床応用を目的として大規模症例を対象とした評価試験を行った。

**A. 研究目的**

消化器がん患者の末梢血からメタボローム解析によりバイオマーカーを探索し、臨床応用化することを目的とする。

**B. 研究方法**

がん患者の末梢血から、PDI 独自のフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計を用いたメタボロミクス技術を用いて、独自のデータ解析を行い、メタボライトバイオマーカーを探索した。

さらに、多検体分析が可能なスクリーニング法を開発し、独立検体を用いて、バイオマーカーとしての臨床評価を行った。

**(倫理面への配慮)**

大阪大学の倫理規定に従って被験者の同意が得られた検体を使用した。

**C. 研究結果**

大腸がんの特異的に発現する新規メタボライトマーカーの検証試験では、計 81 例の血清をブラインドで分析したところ、特異度 97%、感度 80%の正診率が得られた。また、同一患者の手術後の検体でも、バイオマーカーレベルは改善しなかった。

膵がんの研究では、計 90 例の末梢血のメタボローム解析により、膵がん関連メタボライト群を発見した。続いてスクリーニング法を開発し、独立回収した 351 例の血清をブラインドで分析したところ、特異度 95%、感度 70%の正診率が得られた。

**D. 考察**

大腸がんの特異的な新規メタボライトマーカーは、手術前後の患者のその発現レベルに改善がみられないことから、腫瘍除去によっても、代謝システムの欠乏が元に戻らないことを示している。これは、臨床的に検出される腫瘍の発生以前に、このシス

テムの欠乏が先行していることを示唆し、早期に大腸がんのリスクを評価する新規の方法である可能性がある。

膵がんは早期発見が難しいが、今回の膵がんの研究により、血清レベルでもメタボライトバイオマーカーによるがんのリスクを評価できる可能性が示され、今後の臨床応用が期待される。

**E. 結論**

本研究では、がん患者の末梢血を用いたメタボローム解析により、がん特異的メタボライトマーカーを発見した。さらにハイスループット・スクリーニング法を確立し、メタボライトバイオマーカーとして有用なスクリーニング法となることが期待される。

**F. 研究発表**

1. 論文発表

(研究の刊行に関する一覧表に記載)

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 (外国語)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kuyama H, Nishimura O <i>et al.</i>	A New Method for N- and C-Terminal De Novo Amino Acid Sequencing of Proteins By Mass Spectrometry	J.K.Lang	Handbook on Mass spectrometry: Instrumentation, Data and Analysis, and Applications	Nova Science Publishers, Inc.	New York, USA	2010	389-420
Sonomura K, Nishimura O <i>et al.</i>	SPECIFIC ISOLATION OF N- AND C-TERMINAL PEPTIDES OF PROTEINS THOROUGH A TRANSAMINATION REACTION	Kouji Okamoto	PEPTIDE SCIENCE 2009	Japanese Peptide Symposium Kitakyushu	Osaka, Japan	2010	in press

雑誌 (外国語)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamasaki M., et al.	The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer.	Int J Oncol.	30(1)	129-138	2007
Kittaka N., et al.	Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data	European Journal of Cancer	44	885-897	2008
Komori T., et al.	Gene expression of colorectal cancer: preoperative genetic diagnosis using endoscopic biopsies.	Int J Oncol.	32(2)	367-375	2008
Nakahira S, et.al	Pretreatment with S-1, an Oral Derivative of 5-Fluorouracil, Enhances Gemcitabine Effects in Pancreatic Cancer Xenografts	ANTICANCER RESEARCH	28	179-186	2008
Takeno A, et.al	Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis	Br J Cancer	21(99)	1307-1315	2008
Yamamoto H, et.al	Overexpression of MT1-MMP is insufficient to increase experimental liver metastasis of human colon cancer cells	Int J Mol Med	22(6)	757-761	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

Yoshioka S, et.al	Molecular prediction of early recurrence after resection of hepatocellular carcinoma	Br J Cancer	145(5)	457-464	2009
Noda T, et.al	Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma.	Br J Cancer	100(10)	1647-1658	2009
Makino T, et.al	Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma	Ann Surg Oncol	16(7)	2058-2064	2009
Motoori M, et.al	The feasibility of using biopsy samples from esophageal cancer for comprehensive gene expression profiling	Int J Oncol	35(2)	265-271	2009
Uemura M, et.al	Prevention of severe pelvic abscess formation following extended radical surgery for locally recurrent rectal cancer	Ann Surg Oncol	16	2204-2210	2009
Asaoka T, et.al	Differential transcriptome patterns for acute cellular rejection in recipients with recurrent hepatitis C after liver transplantation	Liver Transpl	15(12)	1738-1749	2009
M Miyake,K Matsubara et al.	Heterogeneity of Colorectal Cancers and Extraction of Discriminator Gene Signatures for Personalized Prediction of Prognosis	Brit. J. Cancer		(投稿中)	
Watanabe M., et al.	An Application of the 2-Nitrobenzenesulfonyl (NBS) Method to Proteomic Profiling of Human Colorectal Carcinoma:A Novel Approach for Biomarker Discovery	PROTEOMICS-Clinical Applications		in press	2008
Kuyama H., et al.	A Simple and Highly Successful C-terminal Sequence Analysis of Proteins by Mass Spectrometry	Proteomics	8(8)	1539-1550	2008
Kuyama H., et al.	Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives	Rapid Communications in Mass Spectrometry	22	1109-1116	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

Nakanishi T., et al.	Direct On-Membrane Peptide Fingerprinting with MALDI-MS of Tyrosine-Phosphorylated Proteins Detected by Immunostaining	J. Chromatography B	847	24-29	2007
Sakurai N., et al.	Detection of Co-and Posttranslational Protein N-myristoylation by Metabolic Labeling in an Insect Cell-Free Protein Synthesis System	Anal. Biochem.	362	236-244	2007
Suzuki T., et al.	Protein Prenylation in an Insect Cell-free Protein Synthesis System and Identification of Products by Mass Spectrometry	Proteomics	7	1942-50	2007
Yamaguchi M., et al.	Specific Isolation of N-terminal Fragments from Proteins and their High-fidelity de novo Sequencing	Rapid Communications in Mass Spectrometry	21	3329-3336	2007
Nakanishi T., et al.	Identification on Membrane and Characterization of Phosphoproteins Using an Alkoxide-bridged Dinuclear Metal Complex as a Phosphate-binding Tag Molecule	J. Biomol. Tech	18	278-286	2007
Ezure T., et al.	Expression of Proteins Containing Disulfide Bonds in an Insect Cell-Free System and Confirmation of Their Arrangements by MALDI-TOF-MS	Proteomics	7	4424-4434	2007
Watanabe M, et.al	An Application of the 2-Nitrobenzenesulfonyl (NBS) Method to Proteomic Profiling of Human Colorectal Carcinoma: A Novel Approach for Biomarker Discovery.	Proteomics - Clinical Applications	2	925-935	2008
Kuyama H, et.al	Sensitive Detection of Phosphopeptides by MALDI MS: Use of Alkylphosphonic Acid as Matrix Additives.	Rapid Communication in Mass Spectrometry	22	1109-1116	2008
Ou K, .et.al	Novel Breast Cancer Biomarkers Identified by Integrative Proteomic and Gene Expression Mapping.	Journal of Proteome Research	7	1518-1528	2008
Kuyama H, et.al	A Method for N-terminal de novo Sequence Analysis of Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.	Analytical Biochemistry	380	291-296	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

Kuyama H, et.al	An Improved Method for de novo Sequencing of Arginine-containing, N $\alpha$ -tris (2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium-acetylated Peptides.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	22	2063-2072	2008
Okamura N, et.al	Quantitative Proteomic Analysis to Discover Potential Diagnostic Markers and Therapeutic Targets in Human Renal Cell Carcinoma.	Proteomics	8	3194-3203	2008
Yamaguchi M, et.al	Selective isolation of N-terminal peptides from proteins and their de novo sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry without regard to unblocking or blocking of N-terminal amino acids.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	22	3313-3319	2008
Nakazawa T, et.al	Terminal proteomics: N- and C-terminal analysis for high-fidelity identification of proteins using MS.	Proteomics	8	673-685	2008
Kuyama H, et.al	C-terminal sequence analysis of protein by MS - Efficient isolation and de novo sequencing.	BIOforum Europe	12	14-16	2008
Sonomura K, et.al	The specific isolation of C-terminal peptides of proteins through a transamination reaction and its advantage for introducing functional groups into the peptide.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	23	611-618	2008
Matsuo E, Nishimura O et al..	A new strategy for protein biomarker discovery utilizing 2-nitrobenzenesulfenyl (NBS) reagent and its applications to clinical samples	Journal of chromatography B	877	2607-2614	2009
Kuyama H, Nishimura O et al.	An approach for detecting C-terminal amidation of proteins and peptides by mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization	Proteomics	9	4063-4070	2009
Sonomura K, Nishimura O et al.	A method for terminus proteomics: Selective isolation and labeling of N-terminal peptide from protein through transamination reaction	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	19	6544-6547	2009
Ezure T, Nishimura O et al.	Expression of human Cu, Zn-superoxide dismutase in an insect cell-free system and its structural analysis by MALDI-TOF MS.	Journal of biotechnology	144	287-292	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

Suzuki T, Nishimura O et al.	Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system.	Journal of biotechnology	145	73-78	2010
Omar MFM, Nishimura O et al.	Molecular-assisted immunohistochemical optimization	Acta histochemica		in press	2010
Kuyama H, Nishimura O et al.	An approach to C- and N-terminal sequencing of protein: Mass spectrometry-based de novo amino acid sequencing with the combination of site-specific tris (2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium-acetylation of a-amino group and selective recovery of terminal peptides	Biomacromolecular Mass Spectrometry		in press	2010
Ezure T, Nishimura O et al.	Development of an Insect Cell-Free System.	Current Pharmaceutical Biotechnology		in press	2010
M Miyake, K Matsubara et al.	Heterogeneity of Colorectal Cancers and Extraction of Discriminator Gene Signatures for Personalized Prediction of Prognosis	Brit. J. Cancer		(投稿中)	

書籍（日本語）

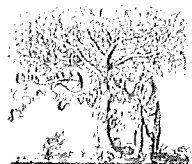
著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌（日本語）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
竹政伊知朗,他	遺伝子発現プロファイルによる消化器癌転移推測の可能性を探る	分子消化器病	4(1)	35-40	2007
山本浩文, 他	転移因子を標的とした肝転移の治療戦略	Biotherapy	22(2)	96-104	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

竹政伊知朗, 他	大腸癌の個別化医療に向けて	Frontiers in Gastroenterology	13(3)	224-231	2008
竹政伊知朗, 他	消化器癌における癌幹細胞研究の現状	日本外科学会雑誌	110(4)	207-212	2009
植村守, 他	大腸癌に対する化学療法、分子標的治療	総合臨床	58(9)	1965-1971	2009
九山浩樹, 他	総説: 安定同位体技術 プロテオーム解析のための安定同位体標識試薬	RADIOISOTOPES	56(6)	303-314	2007
九山浩樹、西村紀	総説: 安定同位体技術 プロテオーム解析のための安定同位体標識試薬	RADIOISOTOPES	56	303-314	2007
松尾英一、西村紀、他	NBS解析システムの開発からバイオマーカ候補タンパク質の探索へ	島津評論	66	161-172	2010
中島ちひろ、西村紀、他	質量分析によるタンパク質・ペプチドC末端アミド化解析のための化学的誘導体化を用いた新規手法について	島津評論	66	185-194	2010



ELSEVIER

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.ejconline.com](http://www.ejconline.com)

## Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data

Nobuyoshi Kittaka<sup>a</sup>, Ichiro Takemasa<sup>a,\*</sup>, Yutaka Takeda<sup>a</sup>, Shigeru Marubashi<sup>a</sup>, Hiroaki Nagano<sup>a</sup>, Koji Umeshita<sup>a</sup>, Keizo Dono<sup>a</sup>, Kenichi Matsubara<sup>b</sup>, Nariaki Matsuura<sup>c</sup>, Morito Monden<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka E-2, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>b</sup>DNA Chip Research Inc., 1-1-43 Suehirocho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan

<sup>c</sup>Department of Functional Diagnostic Science, Osaka University Graduate School of Medicine, 1-7 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 December 2007

Received in revised form

5 February 2008

Accepted 12 February 2008

Available online 11 March 2008

#### Keywords:

DNA microarray

Network analysis

Integrative method

'Hotspot' region

Biological insight

### ABSTRACT

DNA microarray analysis of human cancer has resulted in considerable accumulation of global gene profiles. However, extraction and understanding the underlying biology of cancer progression remains a significant challenge. This study applied a novel integrative computational and analytical approach to this challenge in human hepatocellular carcinoma (HCC) with the aim of identifying potential molecular markers or novel therapeutic targets. We analysed 100 HCC tissue samples by human 30 K DNA microarray. The gene expression data were uploaded into the network analysis tool, and the biological networks were displayed graphically. We identified several activated 'hotspot' regions harbouring a concentration of upregulated genes. Several 'hotspot' regions revealed integrin and Akt/NF- $\kappa$ B signalling. We identified key members linked to these signalling pathways including osteopontin (SPP1), glypican-3 (GPC3), annexin 2 (ANXA2), S100A10 and vimentin (VIM). Our integrative approach should significantly enhance the power of microarray data in identifying novel potential targets in human cancer.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Investigation of various cancers at the molecular level is well underway through functional approaches including DNA microarray technology that can simultaneously detect the expression levels of tens of thousands of genes. The resulting wealth of data has been analysed with a variety of clustering, partitioning and pattern-matching algorithms in the quest to generate molecular signatures for several human malignant tumours with respect to their stage, prognostic outcome and response to therapy.

Notwithstanding the obvious power of the genomic data generated, these molecular analyses have not yielded the ex-

pected advances in our understanding of the mechanisms of cancer development, or the identification of critical genomic and molecular aberrations that would improve the precision of diagnosis or serve as therapeutic targets. This is mainly due to the overwhelming diversity of genome-wide interactions and gene-expression patterns, which limit effective learning from experimental data alone. Network analysis technologies are currently addressing this problem by mapping the gene expression data into relevant networks based on known mammalian biology, derived from basic and clinical research. To this end, our group has combined microarray analysis with a computational tool to obtain further biological insights into the regulatory networks of differentially expressed genes and

\* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3251; fax: +81 6 6879 3259.

E-mail address: [alfa-t@sf6.so-net.ne.jp](mailto:alfa-t@sf6.so-net.ne.jp) (I. Takemasa).

0959-8049/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejca.2008.02.019

the corresponding canonical pathways related to the progression of cancer. We applied this integrative approach to human hepatocellular carcinoma (HCC), the fifth most common malignancy worldwide.<sup>1,2</sup> Despite the remarkable improvements in diagnosis and patient management, the outcome for patients with HCC remains grave, mainly due to the advanced tumour stage accelerated by intrahepatic tumour spread and frequent tumour recurrence.<sup>3</sup> Hepatocarcinogenesis is a multistep process involving somatic mutations, loss of tumour suppressor genes and possibly the activation or overexpression of certain oncogenes.<sup>4</sup> These events lead to changes in the expression of numerous genes, and comparison of gene expression patterns between HCC and normal liver tissue is a popular method for characterising tumour properties and identifying novel target genes for possible therapy. However, this method has not proven to be sufficiently definitive in identifying genetic determinants of specific HCC regulatory pathways. New approaches are urgently needed to better understand the underlying mechanisms of hepatocarcinogenesis, and to develop new therapeutic approaches targeted to HCC-specific molecular abnormalities. By highlighting several activated regions in the genome (known as 'hotspot' regions<sup>5,6</sup>) involved in regulating the progression of HCC, we have identified significantly upregulated genes linked to these 'hotspot' pathways as potential key molecules.

Our integrative analysis revealed two 'hotspot' canonical pathways (integrin and Akt/NF- $\kappa$ B signalling pathways) and identified five potential key genes that were upregulated in the majority of HCC tumours. We further investigated two of these potential key molecules, ANXA2 and S100A10, which were upregulated at the protein and mRNA levels in most HCC samples. Importantly, because it is proteins that function in networks controlling critical cellular events,<sup>7</sup> it is reasonable to speculate that coexpression of ANXA2 and S100A10 at the protein level might have an impact on hepatocarcinogenesis through the activated 'hotspot' pathway.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Tissue samples

Samples from 100 HCC tissues and seven normal livers without virus infection were obtained with informed consent from patients who underwent hepatic resection at Osaka University Hospital from 1997 to 2003. Tissue specimens (approximately 5 mm<sup>3</sup>) for RNA isolation were stored at -80 °C until use. All tissue specimens were submitted for routine pathological evaluation and confirmation of diagnosis. The histopathological characterisation of HCC was based on the Classification of the Liver Cancer Study Group of Japan. Table 1 lists the clinicopathological features of the 100 cases of HCC.

### 2.2. Extraction and quality assessment of RNA

Total RNA was purified from tissue samples using TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA) as described by the manufacturer. The integrity of RNA was assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 LabChip kits (Yokokawa Ana-

**Table 1 – Clinicopathological characteristics of 100 patients with HCC**

Clinicopathological features	n
Age	
Median	66
Range	47–81
Gender	
Male	81
Female	19
Virus	
HBV	21
HCV	40
Both	28
None	11
Child-Turcotte-Pugh stage	
A	77
B	23
C	0
Liver cirrhosis	
Present	42
Absent	58
AFP	
<200 ng/ml	71
≥200 ng/ml	29
PIVKA-II	
<50mAU/ml	36
≥50mAU/ml	64
Tumour size	
<5.0 cm	76
≥5.0 cm	24
Edmonson grading	
1–2	43
3–4	57
Histologic type of tumour	
Well differentiated	4
Moderately differentiated	41
Poorly differentiated	55
Vascular invasion	
Present	41
Absent	59
Intrahepatic metastasis	
Present	22
Absent	78
Pathological stage	
I	23
II	52
III	20
IVA	5
CLIP score	
0	56
1	35
2	8
3	0
4	1
5	0
6	0
JIS score	
0	18
1	46
2	26
3	9
4	1
5	0

CLIP score; The cancer of Liver Italian Program score.

JIS score; The Japan Integrated Staging score.



lytical Systems, Tokyo, Japan). Only high-quality RNA with intact 18s and 28s RNA was used for subsequent analysis. Seven RNA extractions from different normal liver tissue were mixed as the control reference.

### 2.3. Preparation of fluorescently labelled aRNA targets and hybridisation

Extracted RNA samples were amplified with T7 RNA polymerase using the Amino Allyl MessageAmp™ aRNA kit (Ambion, Austin, TX) according to the protocol provided by the manufacturer. The quality of each Amino Allyl-aRNA sample was checked on the Agilent 2100 Bioanalyzer. Five micrograms of control and experimental aRNA samples were labelled with Cy3 and Cy5, respectively, mixed and hybridised on an oligonucleotide microarray covering 30,336 human probes (AceGene Human 30K; DNA Chip Research Inc. and Hitachi Software Engineering Co., Yokohama, Japan). The experimental protocol is available at <http://www.dna-chip.co.jp/thesis/AceGeneProtocol.pdf>. The microarrays were scanned on a ScanArray 4000 (GSI Lumonics, Billerica, MA).

### 2.4. Analysis of microarray data

Signal values were calculated using DNASIS Array Software (Hitachi Software Inc., Tokyo). Following background subtraction, data with low signal intensities were excluded from additional investigation. In each sample, the Cy5/Cy3 ratio values were log-transformed. Then, global equalisation to remove a deviation of the signal intensity between whole Cy3- and Cy5-fluorescence was performed by subtracting the median of all  $\log(\text{Cy5/Cy3})$  values from each  $\log(\text{Cy5/Cy3})$  value. Genes with missing values in more than 20% of samples were excluded from further analysis; a total of 16,923 genes out of 30,336 were available for analysis.

### 2.5. Gene network analysis

We further analysed the signature genes of HCC by Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity systems, Mountain View, CA; <http://www.ingenuity.com>), a web-delivered application that enables biologists to discover, visualise and explore relevant networks significant to their experimental results, such as gene expression array datasets. The application makes use of the Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB), which contains large amounts of individually modelled relationships between gene objects (e.g., genes, mRNAs and proteins) to dynamically generate significant biological networks and pathways. The submitted genes that are mapped to the corresponding gene objects in the IPKB are called 'focus genes'.

The focus genes are used as the starting point for generating biological networks. To start building a network, the Ingenuity software queries the IPKB for interactions between focus genes and all the other genes stored in the IPKB, and then generates a set of networks with a maximum network size of 35 genes. A p value for each network is calculated according to the fit of the user's set of significant genes. This is accomplished by comparing the number of focus genes that participate in a given network relative to the total number of occurrences of those genes in all networks stored in the IPKB. The score of a network is displayed as the negative log of the p value, indicating the probability that a collection of genes equal to or greater than the number in a network could be achieved by chance alone.

### 2.6. Selection of candidate genes expressed in HCC

To identify molecular pathways that may be activated or suppressed in HCC, we used a network knowledge-base approach, Ingenuity Pathway Analysis Software, to analyse genome-wide transcriptional responses in the context of known functional interrelationships amongst proteins, small molecules and phenotypes. The post-normalised genes (16,923 genes) either up- or down-regulated in the microarray data, were uploaded into the IPKB as a tab-delimited text file of GenBank accession numbers. These biological networks comprising 5936 genes are displayed graphically as nodes (genes/gene products) and edges (the biological relationships between the nodes). The nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product. The colour green reflects downregulation of gene expression, and red represents upregulation of gene expression with the significance of that regulation represented by colour intensity. Edges are displayed with various labels that describe the nature of the relationship between the nodes. In this way, simultaneous survey and evaluation of the subnetwork regions enabled us to identify several activated canonical pathways in HCC. We highlighted new molecules linked to the 'hotspot' canonical pathways.

### 2.7. Real-time quantitative RT-PCR analysis

Total RNA (1 µg) was used for reverse transcription, and complementary DNA (cDNA) was generated using the Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) as described previously.<sup>8</sup> Quantification of mRNA expression of the candidate genes listed in Table 2 was performed using a real-time thermal cycler, the LightCycler and detection system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For detection of the amplification products, LightCycler-DNA master SYBR green I (Boehringer

Table 2 – Candidate genes and expression ratio of microarray analysis

CDS ID	Gene symbol	Description	Average of Cy5/Cy3
NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	4.69
NM_004484	GPC3	Glypican 3	4.23
NM_004039	ANXA2	Annexin 2	2.86
M38591	S100A10	Cellular ligand of annexin 2	1.97
NM_003380	VIM	Vimentin	1.82

Mannheim, Mannheim, Germany) was used as described previously.<sup>9</sup> Briefly, a 20  $\mu$ l reaction volume containing 2  $\mu$ l of cDNA and 0.2  $\mu$ mol/l of each primer was applied to a glass capillary. The primer sequences, PCR cycle conditions and annealing temperatures are listed in Supplementary Table 1. Quantitative analysis of mRNA was performed using LightCycler analysis software (Roche Diagnostics). The relative expression level of the candidate gene was computed with respect to the internal standard GAPDH mRNA to normalise for variations in the amount of input cDNA. The level of expression of the candidate gene was provided by the ratio, in which each normalised gene value in tissue samples was divided by GAPDH mRNA in the same control reference used in the microarray assay. We compared the ratio of candidate genes between samples randomly selected out of 100 HCC samples.

### 2.8. Immunohistochemical staining

Formalin-fixed, paraffin-embedded samples were cut into 5  $\mu$ m sections, and these were deparaffinised in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol. Immunohistochemical staining was performed using a Vectastain ABC peroxidase kit (Vector Labs, Burlingame, CA) as described previously.<sup>10</sup> Briefly, the sections were treated for antigen retrieval in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) for 40 min at 95 °C, followed by incubation in methanol containing 0.3% hydrogen peroxide at room temperature for 20 min to block endogenous peroxidase. After blocking endogenous biotin, the sections were incubated with normal protein-block serum solution at room temperature for 20 min, to block non-specific staining, and then incubated overnight at 4 °C with anti-ANXA2 (mouse monoclonal IgG, diluted 1:500, Abcam Inc.), anti-S100A10 (mouse monoclonal IgG, diluted 1:400, Swant Inc.) and anti-GPC3 (mouse monoclonal IgG, University of Toronto, Jorge Filmus et al.<sup>11</sup>) as primary antibodies. After washing three times for 5 min in phosphate buffered saline (PBS), sections were incubated with a biotin-conjugated secondary antibody (horse anti-mouse for ANXA2, S100A10 and GPC3) at room temperature for 20 min and finally incubated with peroxidase-conjugated streptavidin at room temperature for 20 min. The peroxidase reaction was then developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Finally, the sections were counterstained with Mayer's haematoxylin. For negative controls, sections were treated the same way except they were incubated with non-immunised rabbit IgG or Tris-buffered saline instead of the primary antibody. Immunohistochemical staining was assessed by two investigators independently, without the knowledge of the corresponding clinicopathological data.

### 2.9. Statistical analysis

Pearson's correlation coefficient,  $\chi^2$  test, t-test and Kaplan-Meier plot were analysed using StatView (Version 5.0) software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. Hierarchical cluster analysis (HCA) was performed with Euclidean distance coefficient as a similarity coefficient and the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) as the clustering algorithm, using GeneMaths (Version 2.0) software.

## 3. Results

### 3.1. Microarray analysis of gene expression changes in HCC tumours

Gene expression profiling of primary HCC tumours from 100 patients was examined by DNA microarray. We calculated the mean expression levels of each gene across all HCC samples, and, as a preliminary analysis, identified the top 2% of candidate genes displaying at least a 1.5-fold increase in expression. These highly upregulated genes included  $\alpha$ -feto-protein (AFP; data not shown), a common prognostic marker for HCC (fold change = 1.56), and GPC3, recently identified as a novel tumour marker of HCC (fold change = 4.23; fourth highest upregulation).

### 3.2. Identification of biologically relevant networks and potential key genes highly expressed in HCC tumours

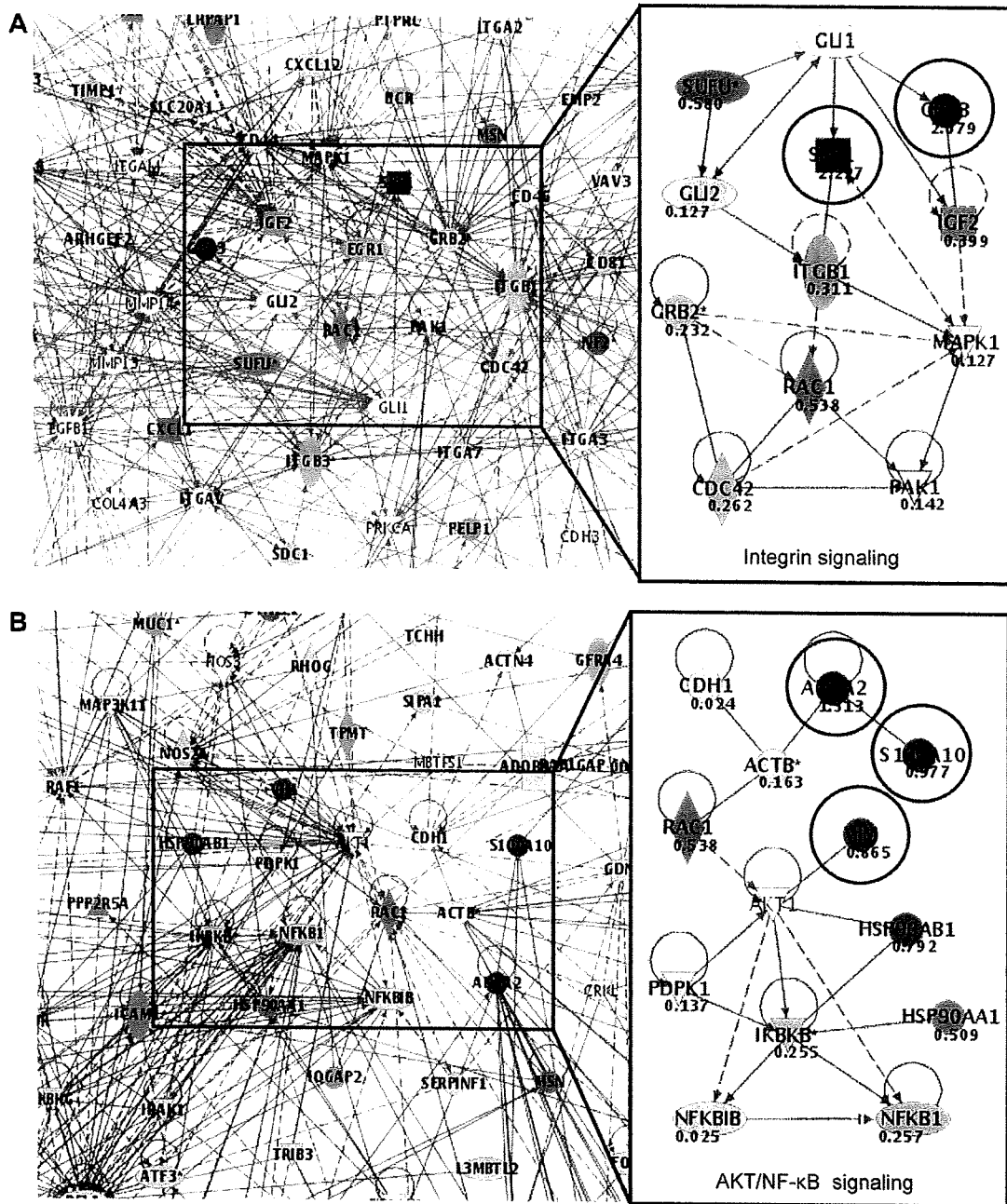
In our global network comprising 5936 genes (Supplementary Fig. 1), we highlighted integrin and Akt/NF- $\kappa$ B signalling as two 'hotspot' pathways that comprised a concentration of upregulated genes. The integrin signalling pathway shown in Fig. 1A (gene subnetworks listed in Supplementary Table 2) was identified as significantly activated in HCC and contained 11 upregulated genes, flagging this pathway as a key regulator in HCC tumourigenesis. This fits with the role of integrin signalling in promoting cell proliferation and cell motility.<sup>12</sup> Furthermore, SPP1 and GPC3 were identified as potential key genes (upregulated with >1.5-fold change), with links to integrin signalling. Similarly, we identified the activation of the Akt/NF- $\kappa$ B pathway shown in Fig. 1B in HCC tumours (gene subnetworks listed in Supplementary Table 3). This signalling pathway contained 12 upregulated genes and plays key roles in many cell processes relevant to tumourigenesis including cell survival and apoptosis.<sup>13</sup> Amongst the genes linked to Akt/NF- $\kappa$ B signalling and that had >1.5-fold change were ANXA2, S100A10 and VIM. Network analysis revealed a link between Akt/NF- $\kappa$ B signalling and both ANXA2 and S100A10 through interactions with  $\beta$ -actin (ACTB) and E-cadherin (CDH1). These candidate genes are listed in Table 2.

### 3.3. Quantitative RT-PCR validation of several selected genes

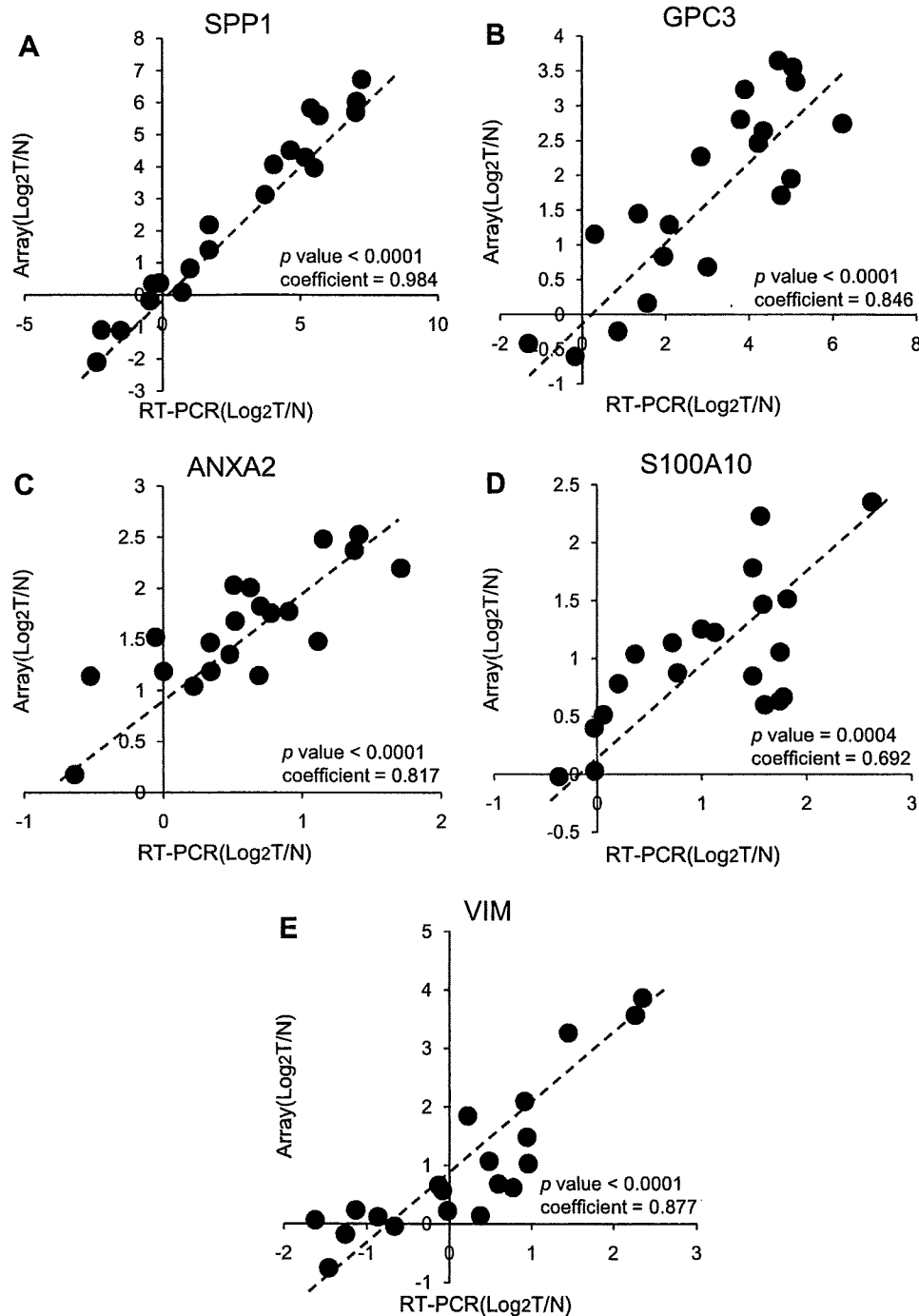
To validate the microarray data, we performed quantitative RT-PCR for candidate genes in 20 samples randomly selected out of the 100 HCC tissues. We compared gene expression levels generated from quantitative RT-PCR with those from microarray analysis by Pearson's correlation coefficients for each candidate gene and StatView Software (Fig. 2). Each of the five genes analysed showed significant correlation confirming the results obtained by DNA microarray.

### 3.4. Immunohistochemical study of glypican 3, Annexin 2 and S100A10 in patient samples

Of the five genes overexpressed in HCC tumours by RT-PCR, immunohistochemical staining for GPC3 was performed on 10 samples of HCC and surrounding non-cancerous tissues



**Fig. 1 - (A)** The integrated method of DNA microarray and Ingenuity Pathway Analysis produced a network with 'hotspot' regions harbouring concentrations of upregulated genes. These genes included ITGB1 (integrin, beta 1), GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), CDC42 (cell division cycle 42), PAK1 (p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1) and MAPK1, which are all associated with integrin signalling. SPP1, GPC3, GLI1, GLI2, SUFU (suppressor of fused homolog) and IGF2 are also linked to this pathway. The circled genes, SPP1, GPC3 and GPC3, were selected as candidate genes. The numerical value of each gene represents the median of all log(Cy5/Cy3) values. **(B)** The integrative method showed a second network including a 'hotspot' region. This region contained AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1), NFKBIB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta), NFKB1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1), IKKB (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta), HSP90AA1 (heat shock protein 90 kDa alpha, class A member 1) and HSP90AB1 (heat shock protein 90 kDa alpha, class B member 1), which are all associated with the Akt/NF-κB signalling pathway. ANXA2, S100A10, ACTB, CDH1 and VIM are also linked to this pathway. The circled genes, ANXA2, S100A10 and VIM, were selected as candidate genes. The numerical value of each gene represents the average of all log(Cy5/Cy3) values.



**Fig. 2 – Results of quantitative RT-PCR on 20 samples randomly selected from the 100 HCC samples. Individual mRNA levels were normalised to GAPDH and expressed relative to those in a mixture of seven normal livers for SPP1, GPC3, ANXA2, S100A10 and VIM. We compared gene expression levels generated from quantitative RT-PCR with those from microarray analysis and used Pearson's correlation analysis for each candidate gene using StatView Software. (A), (B), (C), (D) and (E) show the correlation of SPP1, GPC3, ANXA2, S100A10 and VIM, respectively.**

(Fig. 3A and B). GPC3 expression was observed in 7 of 10 cases of moderately or poorly differentiated HCC. As published previously,<sup>11</sup> staining of GPC3 was observed in a coarsely granular pattern near the cell membrane (2/7) and dispersed evenly in the cytoplasm (5/7). GPC3 expression

was undetectable in all non-neoplastic tissues with diffuse hepatitis changes.

Immunohistochemical staining of ANXA2 and S100A10 was then performed on 20 paraffin-embedded samples of HCC and surrounding non-cancerous tissues. The Ca<sup>2+</sup>-