

F. 健康危険情報

なし

研究 2：ペプチドリガンドライブラリーを用いた血清腫瘍マーカー開発の新しい実験方法の開発

A. 研究目的

血清腫瘍マーカー開発のための新しい実験方法を確立すること

B. 研究方法

B-1. ペプチドリガンドライブラリー ProteoMiner (バイオラド社) を用いた。タンパク質の吸着と回収、ビーズの洗浄についてはメーカーの推奨する方法を使用した。

B-2. 血漿サンプル

市販の血漿 (コスモバイオ社) を使用した。

B-3. 液体クロマトグラフィー

HiTrap Blue カラム、HiTrap Protein G カラム、Resource Q カラムを用い、AKTA エクスプローラーを使用して血漿タンパク質を分画した (いずれも GE 社)。

B-4. 蛍光二次元電気泳動法

回収したタンパク質を超高感度の蛍光色素で標識し、大型の二次元電気泳動ゲル (一次元目 IPG ゲル、二次元目 EttanDalttwelve、いずれも GE 社)

で分離した。電気泳動後のゲルをレーザースキャナー (GE 社) にかけて、タンパク質スポットを蛍光シグナルとして読み取った。読み取られた画像の解析には Progenesis SameSpot (Non-linear Dynamics 社) を使用し、ProteoMiner で濃縮されるタンパク質スポットを同定した。

B-6. タンパク質同定実験

同定したタンパク質スポットを自動分取ロボットにてゲルから回収し、トリプシンにてペプチド化し、質量分析装置 (LTQ、サーモフィニガン社) にてタンパク質を決定した。同定には MasCot ソフトウェアを使用した。

C. 研究結果

蛍光二次元電気泳動法を用いた実験では、ProteoMiner 処理なしでは 6390 種類のタンパク質スポットを観察した。一方、ProteoMiner によって濃縮されたサンプルでは 8030 種類のタンパク質スポットが観察された。ProteoMiner によって濃度が 20 倍以上濃縮されたタンパク質スポットは 256 種類あった。質量分析による同定を 200 種類のタンパク質スポットについて試み、そのうち 89 種類について同定に成功した。同定されたタンパク質は、一般的な血漿タンパク質に加えて組織から漏れ出ていると考えられるタンパク質 (tissue leakage protein) も含まれていた。

D. 考察

ペプチドリガンドライブラリーを用いることで、血漿プロテオームの新たな様相を観察できることがわかった。本方法がバイオマーカー探索に有用かどうかについては、濃縮されるタンパク質をさらに網羅的に調べ、ng/mlオーダーのタンパク質がどれくらい含まれているかを調べる必要がある。また、【研究1】において同定されたタンパク質の検出にもペプチドリガンドライブラリーによる濃縮が有効かどうかを試したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mima T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer*, in press.
2. Kikuta K, Tochigi N, Saito S, Shimoda T, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Suehara Y, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2010; 4, 560-7.
3. Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y,

Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci*. 2010; 101, 882-8.

2. 学会発表

1. 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」日本プロテオーム学会シンポジウム、千葉
2. 近藤格「蛍光二次元電気泳動法と抗体を用いたプロテオーム解析による大腸がんバイオマーカーの開発」大腸癌研究会、鹿児島
3. 近藤格「電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発」日本電気泳動学会、札幌
4. 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日本癌学会 学術集会シンポジウム、大阪
5. 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」ヨーロッパプロテオーム学会、エストリル、ポルトガル

6. 近藤格「Biomarker Development by Sarcoma Proteomics」結合組織腫瘍学会、パリ、フランス
7. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日本分子生物学会ワークショップ、神戸
8. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日米癌学会合同会議、千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

- 1) 発明の名称：「癌の検出法」
- ①発明者：近藤格、岡麻子、内田好昭、小見和也
- ②出願日：2010年12月28日
- ③出願番号：特願2010-292664
- ④出願人：国立がん研究センター、富士レビオ株式会社
- ⑤発明の内容の概略：癌の血清腫瘍マーカーになりうるタンパク質を見出した。

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

日本電気泳動学会 児玉受賞 近藤格「電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発」

厚生労働科学補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）分担研究報告
がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

「早期大腸がん症例における血清中ダーモカインの解析」

	氏名	所属	職名
分担研究者	菊池正二郎	兵庫医科大学上部消化管外科	講師

研究要旨

プロテオーム解析による血液診断法を検診に応用し、実用化していくためには対照となるべき安定した測定系が必要である。そこで独自に構築したサンドイッチ ELISA 法により、平成 20 年度までに早期大腸がん 130 症例における血清ダーモカイン（以下 DK）を測定したところ既存腫瘍マーカーである CEA/CA19-9/p53 自己抗体との 4 項目測定での診断感度は 60.7%であった。実用化に向けてさらに安定した高感度測定系を開発するために、抗体と検出系を変更して、蛍光抗体を用いた高感度検出系を確立することができた。また、京都府立医科大学消化器内科教室との共同研究で早期大腸がん内視鏡切除症例の治療前後での血清収集と匿名化臨床情報収集も行った。平成 23 年 3 月 31 日時点で新しく 521 検体を収集管理している。今年度中には新しい高感度測定系による解析を進める予定である。新規分子 G2 の腺がんにおける発現解析も行っている。G2 は DK 同様に重層上皮関連分子でありヒト大腸がん組織において発現する。APC +/-マウスにおける異所性発現を免疫組織学的に解析したところ、早期がんにおける発現を確認した。マウス大腸がん発がんモデルの解析とヒト臨床検体解析を組み合わせることで、発がんリスクの高い腺腫を含めたがん検診マーカーの開発が期待される。

平成 23 年度は、分担研究として DK と G2 に関して重層上皮関連分子の早期大腸がんにおける発現と腫瘍マーカーとしての開発を進めてゆく予定である。

A. 研究目的

大腸がんは早期診断が出来れば内視鏡切除を含む外科的切除で治療する疾患である。したがってがん検診で無症状の段階でがんを発見し、早期に

治療を開始することは有効ながん対策法の一つと考えられる。本研究班では、全国どの医療施設でも同じ条件で、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、精密検診を

行うべき症例を効率良く絞るプレスクリーニングに使用できる新規腫瘍マーカーを開発することを最終的な目的としている。

B. 研究方法

平成 21 年から第 3 次対がん総合戦略研究事業研究課題「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」の研究分担者として早期大腸がんに対する新しい腫瘍マーカーの開発を行っている。プロテオーム解析による血液診断法を検診に応用し、実用化していくために、複数施設から同一のプロトコールで採血し収集された多数の症例を用いて、その感度、特異度を検証していく必要がある。本研究班ではすでに各地のがん医療の中核となる 7 つの医療機関が参加する班組織により全く同一の採血、輸送、保存プロトコールで、膵がん以外にも胃がん、大腸がん、などの比較的罹患率の高いがんの罹患者、および鑑別疾患の対象となる良性疾患患者および健常者から血清・血漿を匿名化された精度の高い臨床情報を収集している。

当該研究者は研究分担者として抗 DK 抗体、抗 G2 抗体を複数作製している。平成 22 年度中には、新しいポリクローナル抗体を使った安定した高感度 ELISA を開発した。これらの抗体の中でプロテオーム解析に使用可能なものがあれば提供して解析に使用する予定である。

また、京都大学物質—細胞東郷シス

テム拠点・松井 毅助教と共同で APC +/-マウス大腸がん発がんモデルにおける DK/G2 の発現解析を行っている。このモデルでは腺腫ががん化する際の DK/G2 の発現が解析できる。実際の臨床では腺腫由来の大腸がんが多く、より早期で診断可能となれば、本研究の主旨とも合致する。したがって、APC +/-マウスモデルの結果を参考にしながら DK/G2 の腫瘍マーカーとしての開発を進める予定である。

(倫理面への配慮)

「臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年厚生労働省告示第 255 号)」等の指針に沿った計画を作成し、京都府立医科大学および兵庫医科大学倫理委員会の認可のもと血清と匿名化臨床検体情報の管理を行っている。

C. 研究結果

平成 23 年 3 月 31 日時点で内視鏡切除症例血清 521 検体を収集管理している。これまでの解析では血清 DK 陽性率は手術大腸がん症例 (Tis:28.6%, T1:36.8%) に対して内視鏡切除症例 (Tis:10%, T1:33.3%) と内視鏡切除症例 (Tis) では決して高くなかった。しかし、腺腫症例での偽陽性は 10%であり CEA, p53 自己抗体に比較しても低い傾向にあった。また、外科手術症例と同様に既存腫瘍マーカーである CEA/CA19-9/p53 自己抗体との重複陽性例は非常に少なく既存マーカーに DK を加えることで診断感度は改善した。DK は早期大腸がん症例

に対する診断マーカーとしては有用であると思われる。また、新規分子 G2 の腺がんにおける発現解析を開始した。G2 は DK 同様に重層上皮関連分子でありヒト大腸がん組織における発現とマウス発がんモデルである APC min マウスにおける異所性発現を免疫組織学的に解析したところ、早期がんにおける発現を確認した。

D. 考察

これまでの解析結果からは DK、G2 の早期大腸がんにおける発現は確認されており、DK に関しては実験的 ELISA では有効性は確認された。しかしプロテオーム解析における有効性・安定性などは未知数であり、今後の研究課題である。改善すべき点も多いと思われるが、実用化されればこれまでに類を見ない有効な検診プログラムとなることが期待できる。大腸がんの罹患数がわが国のみならず世界的に多いことと併せれば社会的意義は非常に大きい。

E. 結論

印環細胞がんや粘液がんなどの特殊型を除けば、単層上皮である腺上皮に腺がんが発生する際には、細胞密度の上昇とともに偽重層が認められる。DK や G2 は重層関連分子であるが、早期腺がんにおけるこれらの分子の異所性発現の解析は発がん初期における新しい腫瘍マーカーの開発につながる可能性があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、論文発表

1: Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer.

Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E.

J Gastroenterol. 2010

Dec;45(12):1201-11. Epub 2010 Jul 21.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1、特許出願

なし

2、実用新案登録

なし

3、その他

なし

厚生労働科学補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）分担研究報告
がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

「プロテオミクス手法を用いた腫瘍マーカー候補の獲得とその応用について」

	氏名	所属	職名
分担研究者	佐藤雄一	北里大学	教授

研究要旨

がん患者血清中の腫瘍関連自己抗体の解析を腫瘍細胞の二次元電気泳動法と免疫ブロット法を組み合わせ、網羅的に選択し、その後合成タンパク質をメンブレンにドットし、多数例のがん患者血清、健常人血清を用いて絞り込みを行った。その結果、神経内分泌肺癌の小細胞癌では認められるが、大細胞性神経内分泌癌では認められない抗 Hu-C、抗 Hu-D 自己抗体を見出した。両者の鑑別に有用な血清診断マーカーとなる可能性がある。さらに、神経内分泌肺癌の鑑別に bHLH 型の転写因子で、神経内分泌方向への分化に重要な役割を担う hASH1 が有用であることを報告してきたが、今回、同じ bHLH 型で腺上皮への分化に重要な役割を担う HES1 と hASH1 の mRNA 発現の比率が小細胞癌と大細胞性神経内分泌癌で異なることを見出した。これら分子の発現も両者の鑑別に有用となる可能性がある。一方、6 型中間径フィラメントであり、中枢神経系細胞の幹/前駆細胞で発現が認められる nestin の発現と非小細胞性肺癌と悪性黒色腫の臨床病理学的因子との関連性を免疫組織化学的に検討した。その結果、非小細胞性肺癌では 171 例中 27 例に発現が認められ、発現の認められた症例は統計学的に低分化、リンパ節転移あり、腫瘍内脈管侵襲あり、胸膜浸潤あり、予後不良の傾向を示した。多変量解析で nestin の発現は非小細胞性肺癌患者の予後に影響を与える独立因子であることが証明された。また、nestin 陽性群は陰性群に比して、全患者間で、Stage II/III 患者間で、さらに Stage I 患者間でも有意に予後不良であった。Nestin は肺癌切除患者での予後不良因子であり、アジュバント化学療法を受けるべき患者の選択に有用である可能性がある。悪性黒色腫における nestin の発現と患者の予後との関連性を免疫組織化学的に検討した。その結果、nestin は 56.5% の症例で発現が認められ、stage I, II における nestin 陽性の症例は陰性の症例に比して、有意に 5 年生存率が低下していた。Nestin は悪性黒色腫においても予後不良の予測因子となる可能性がある。

A. 研究目的

我々の最終目標は低侵襲、非侵襲性に患者から採取できる体液（血液や尿）を利用し、がんの早期診断や抗癌剤等の感受性を予測する分子を同定し、それらを用いたがん診断法の確立にある。その目的のため、抗体ベースアプローチ（ランダム免疫法による腫瘍特異的単クローン性抗体の作製 (*Lung Cancer* 69(1): 54-9, 2010)、がん患者血清、尿中の腫瘍関連自己抗体の解析 (*Int J Oncol*, in press) とプロテオーム・ペプチドームベースアプローチ（腫瘍組織 *Br J Cancer* 101(3): 492-7, 2009、細胞株 *Pathol Int* 60(2): 71-7, 2010、患者血清 *Cancer Genomics & Proteomics* 7(4): 181-9, 2010、尿、髄液 *Pathol Int* 59(11): 797-803, 2009、培養上清中 *Int J Biol Markers* 24(4): 282-5, 2009 の二次元電気泳動法を基本とした腫瘍関連タンパク質やペプチドの解析）により、患者血清中の新規診断マーカー、腫瘍の組織亜型や臨床病期に関連したマーカー、抗癌剤感受性予測マーカーを網羅的に獲得することを第一の目的としている。さらに、獲得したマーカー候補分子に対しては、多数例の腫瘍組織、患者血清、尿等を用いて、有用性を確認し、これら分子を用いた診断法を確立することを第二の目的としている (*Anticancer Res* 30(1): 265-9, 2010, *Eur J Dermatol* 20(3): 283-8, 2010, *Chest* 139(4): 862-9, 2011)。

B. 研究方法

①肺小細胞癌 (SCLC) や大細胞性神経内分泌肺癌 (LCNEC) の新規血清診断マーカーを見出すためにそれぞれ複数の SCLC もしくは LCNEC 由来細胞株を混合後、二次元電気泳動法で分離した。メンブレンに転写後、SCLC や LCNEC 患者血清を一次抗体として免疫ブロット法を行った。反応したタンパク質スポットを切り出し、トリプシン消化後に質量分析装置でタンパク名を決定した。同定されたタンパク質は全て合成し、メンブレンにドット後、再度多数例の肺癌患者血清を一次抗体としてドットブロット法で解析した。同定された HuC, HuD に関しては、肺癌細胞株における mRNA、タンパク質発現を RT-PCR 法や免疫ブロット法で検討した。

②SCLC と LCNEC の鑑別診断のために、外科的に切除され、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋された各種肺癌組織を用いて、bHLH 型転写因子である hASH1 と HES1 の発現を高感度 ISH 法で検討した。

③連続的に外科的に摘出された 171 例の非小細胞性肺癌 (NSCLC) の 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋組織を用いて、nestin の発現を免疫組織化学的に検討した。

④78 例の悪性黒色腫の 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋組織を用いて、nestin の発現を免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

「臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)」等の指針に沿った計画を作成し、北里大学での倫理委員会による審査を受け、研究によって提供者に危険や不利益が生じない事、匿名化が厳重に行われ、個人情報厳重に管理されていること、提供者に同意を得る方法に倫理的な問題がないことを確認し、承認を得た後に研究を開始した。

C, 研究結果

①神経内分泌肺癌の新たな血清診断マーカーを獲得するために、SCLCとLCNEC患者の血清中の腫瘍関連自己抗体を解析するために二次元電気泳動-免疫ブロット法(2DE-IB)を行った。その結果、SCLC患者からはHu-Cタンパク質を含んだ63スポット、41抗原タンパク質が、LCNEC患者からは62スポット、32抗原タンパク質が同定された。18抗原タンパク質は両者で共通して認められた。様々な組織型の肺癌細胞株におけるHu-C, Hu-DのmRNA発現は両方とも8例全例のSCLCやLCNEC由来の細胞株のみに認められた。タンパク質の発現はHu-Cは6例中5例のSCLC由来細胞株、2例全例のLCNEC由来細胞株、Hu-Dは6例中4例のSCLC由来細胞株で発現が認められた。しかし、他の組織型の肺癌細胞株ではHu-C, Hu-DのmRNA、タンパク質の発現は認められなかった。各種肺癌患者、非腫瘍性疾患患者、健常人の血清を用いてHu-C, Hu-Dに対する自己抗体の検出をドットブロット法で検出した。その

結果、抗Hu-C、抗Hu-D自己抗体は、それぞれ31例中4例と31例中6例のSCLC患者に認められたが、他の組織型の肺癌患者や非腫瘍性疾患患者、健常人血清では認められなかった。ROC解析の結果、SCLC患者はHu-CでAUC 0.577、感度12.9%、Hu-DでAUC 0.602、感度19.6%、両者とも特異度100%で他の疾患や健常人と鑑別できることが確認された。また、抗Hu-C、Hu-D自己抗体の量は、症例により様々であり、腫瘍随伴神経症候群の発症とは無関係であった。同じ神経内分泌肺癌である、SCLCとLCNECの鑑別に有用なマーカーとなる可能性が示唆された。

②SCLCとLCNECの生物学的相違を明らかにするために、2つのbHLH型の転写因子で呼吸上皮前駆細胞の神経内分泌方向への分化を正と負に調節しているhASH1とHES1の発現を高感度ISH法で検討した。その結果、hASH1の発現はSCLCの32例中24例(75%)、LCNECの32例中16例(50%)で認められたが、腺癌(AD)では14例中2例、扁平上皮癌(SCC)では10例全例陰性であった。また、それぞれの染色スコアは8.6, 4.2, 0.6, 0であった。一方、HES1の発現はSCLCの32例中19例(59%)、LCNECの31例中28例(87%)、14例全例のAD、10例全例のSCCで認められた。また、それぞれの発現スコアは2.4, 4.8, 5.6, 6.2であった。hASH1の平均染色スコアはLCNECに比して有意に高い傾向を示した($p < 0.01$)。一方、HES1の発現はLCNECに比してSCLCでは有意に低い傾向を示

した。この結果から、SCLCはより神経内分泌的性格を示し、LCNECはより腺上皮の性格に似ていることが明らかとなった。以上より、2つの神経内分泌肺癌の生物学的性格は異なっていることが示唆された。

③nestinの発現はNSCLCの171例中27例(15.8%)で、腫瘍細胞の細胞質に認められた。臨床病理学的にnestinの発現は統計学的有意差を持って扁平上皮癌($p = 0.001$)、低分化($p = 0.007$)、リンパ節転移($p = 0.008$)、腫瘍内脈管侵襲($p = 0.008$)、胸膜浸潤($p = 0.039$)、予後不良($p < 0.001$)で高い傾向が認められた。さらに、多変量解析からnestinの発現は非小細胞性肺癌患者の予後に影響を与える独立因子であることが証明された。また、nestin陽性群は陰性群に比して、全患者間で、Stage II/III患者間で、さらにStage I患者間でも有意に予後不良であった。Nestinは肺癌切除患者での予後不良因子であり、アジュバント化学療法を受けるべき患者の選択に有用である可能性があることが示唆された。

④nestinの発現は78例中45例(59.0%)の悪性黒色腫の細胞質に認められた。陽性率はStage 0で6例全例陰性であったが、Stage Iでは18例中6例(33.3%)、Stage IIでは33例中23例(69.7%)、Stage IIIでは13例中10例(76.9%)、Stage IVでは8例中7例(87.5%)に陽性を示した。Stage別の染色スコアはそれぞれ0, 1.5, 3.18, 3.46, 4.57であった。また、それぞれ

のStageにおけるnestin陽性症例の5年生存率は陰性症例に比して短い傾向を示した。特に、Stage I, IIにおけるnestin陽性患者の予後は陰性患者に比して有意に短いことが確認された。悪性黒色腫におけるnestinの発現は予後不良の因子となる可能性がある。

D, 考察

当研究室で展開しているがん関連自己抗体の解析により、神経内分泌肺癌の2つのタイプを鑑別可能な血清診断マーカーを見出した。自己抗体の解析は今回示した変性した抗原に対する抗原タンパク質の解析と同時に、高次構造を有した完全長タンパク質に対する自己抗体の解析も行っている。その結果から、自己抗体は変性した抗原と高次構造を有した抗原の両方を認識するものがあること、組織型により、同じ抗原でも抗原のエピトープが異なる事、用いる方法により自己抗体が認識する異なった抗原タンパク質が検出されることを確認してきた。その他の肺癌における解析も進んでおり、今後血清診断マーカーとして報告する予定である。

我々は病理診断用の10%ホルマリン固定・パラフィン包埋組織上で、発現量は低いながら、診断上有用な遺伝子のmRNA発現を、今回同様に様々な分子で検討してきた(hASH1 *Mod Pathol* 17: 222-9, 2004, AMF *J Pathol* 210: 431-40, 2006, MAGE-A10 *Br J Cancer* 99: 350-6, 2008)。組織切片上での特

定の遺伝子の発現を検討する場合、免疫染色可能な抗体が市販されていないことがしばしばある。また、サイトカインなどのように産生した細胞と発現している部位が異なることもある。今後、様々なプロテオミクス手法で種々の腫瘍マーカー候補タンパク質が報告されてくると思われるが、その全身組織での発現状況や腫瘍組織での発現の確認等を個々の細胞レベルで詳細に検出する方法として、我々の用いている高感度ISH法は今後ますます有用になっていくものと思われる。

神経幹細胞マーカーである Nestin は毛包幹細胞にも発現しており、多分化能を有することを報告してきた (*Cell Cycle* 8: 1-2, 2009)。また、毛包腫瘍のマーカーとなり得ること (*Eur J Dermatol* 18: 518-23, 2008) や末梢神経の損傷修復に重要な役割を担っていることを報告してきた (*J Cell Biochem* 107: 1016-20, 2009)。また今回、悪性黒色腫や NSCLC において nestin の腫瘍細胞における発現は、予後不良因子であることを報告した。その他の腫瘍における検討も行っているが、共通して nestin 発現腫瘍は分化度が低く、予後不良である傾向があった。Nestin は予後不良症例を選択するのに有用なマーカーとなる可能性がある。

E, 結論

様々なプロテオミクス手法を組み合わせて、血中や尿中そして組織診断

上有用となる腫瘍マーカーの獲得を行っている。特に、今回は自己抗体を利用した腫瘍関連タンパク質の解析を、神経内分泌肺癌の2つのタイプを鑑別する目的で検討した。幾つもの両者を区別できる可能性のある分子を同定することが出来た。この方法は、自覚症状がない早期がん患者の診断にも応用されており、自己抗体の検出から数ヶ月後に腫瘍が見つかったとの報告もある。今後、この方法で他の組織型の肺がんを含めた様々な腫瘍マーカーの同定を行っていく予定である。さらに、進行性肺癌患者の治療全血清を多数例採取しており、抗癌剤感受性予測マーカーの検討にも、この方法を応用する予定である。

F, 健康危険情報

なし

G, 研究発表

1、論文発表

1: Mii S, Niiyama S, Takasu H, Kosaka S, Hara K, Kitasato H, Sato Y, Katsuoka K.

Detection of human papillomavirus type 16 in Bowen's carcinoma of the toe.

Int J Dermatol. [in press]

2: Mii S, Amoh Y, Kitasato H, Sato Y, Katsuoka K.

Nestin expression in Bowen's disease and Bowen's carcinoma associated with human papillomavirus.

Eur J Dermatol. [in press]

3: Matsumoto T, Ryuge S, Kobayashi M, Kageyama T, Hattori M, Goshima N, Jiang S-X, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y.

Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung.

Int J Oncol [in press]

4: Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Hattori M, Iyoda A, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang S-X, Saegusa M.

The balance between the expressions of hASH1 and HES1 differs between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma of the lung.

Lung Cancer [in press]

5: Kobayashi M, Yasuoka Y, Sato Y, Zhou M, Abe H, Kawahara K, Okamoto H.

Upregulation of calbindin D28k in the late distal tubules in the potassium-loaded adrenalectomized mouse kidney.

Clin Exp Nephrol. [in press, published online]

6: Masunaga A, Sato Y, Kadofuku T, Iwamoto S, Masuda M, Suzuki S, Suzuki T, Miyazaki A, Mitsuya T.

A case of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin 6 receptor-producing mediastinal mature cystic teratoma with somatic-type malignancy.

Pathol Int. 2011 Apr; 61(4):243-7

7: Ryuge S, Sato Y, Wang GQ, Matsumoto T, Jiang S-X, Katono K, Inoue H, Satoh Y, Masuda N.

Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer.

Chest 2011 Apr; 139(4):862-9.

8: Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Kodera Y, Ishii J, Matsumoto K, Okayasu I.

Proteomic study of sera from patients with bladder cancer. –Usefulness of S100A8 and S100A9 proteins.

Cancer Genomics & Proteomics 2010 Jul-Aug; 7(4):181-9.

9: Tanabe K, Amoh Y, Kanoh M, Takasu H, Sakai N, Sato Y, Katsuoka K.

Prognostic significance of hair follicle and neural stem cell marker nestin in malignant melanoma patients.

Eur J Dermatol 2010 May-Jun; 20(3):283-8.

10: Takayama A, Takeda A, Sato Y, Sakai N, Sugimoto T, Uchiyama E.

Expression of melanoma antigen gene (MAGE)-A family protein in human cutaneous malignant melanoma.

Kitasato Med J. 2010 Sep; 40(2):103-6.

11: Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Goshima N, Jiang S-X, Okayasu I.

Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas.

Lung Cancer 2010 Jul; 69(1):54-9.

2、学会発表

1: 佐藤雄一、松本俊英、影山泰平、川上和孝、五島直樹。

腫瘍関連分子に対する単クローン性抗体の網羅的作製と自己抗体の網羅的探索。

バイオアカデミックフォーラム 2010 (東京・台場)

2010. 6.30-7.2

2: 佐藤雄一.

H21-23 年度 AKPS (All Kitasato Project Study)共同研究・研究成果中間報告 研究の概要と進捗状況について.

第 8 回北里疾患プロテオーム研究会 (東京・白金)

2010.9.2 [講演要旨集 p7-10, 2010.9]

3: 佐藤雄一、松本俊英、影山泰平、南 尚、小林 信、柳田憲吾.

「成果発表 2」自己抗体検査で開かれる新しい疾患診断 がん患者血清中の 2-DE/IB-dot blot 法を用いたがん関連自己抗体の網羅的解析.

千葉・神奈川バイオ産業広域連携事業 研究成果発表会 (東京・品川)

2011.3.9 [要旨集 p12-14, 2011.3.9]

H, 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1、特許出願

なし

2、実用新案登録

なし

3、その他

なし

別添5 研究成果の刊行に関する一覧表

Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer

Junichi Matsubara, Kazufumi Honda, Masaya Ono, Yoshinori Tanaka, Michimoto Kobayashi, Gimán Jung, Koji Yanagisawa, Tomohiro Sakuma, Shoji Nakamori, Naohiro Sata, Hideo Nagai, Tatsuya Ioka, Takuji Okusaka, Tomoo Kosuge, Akihiko Tsuchida, Masashi Shimahara, Yohichi Yasunami, Tsutomu Chiba, Setsuo Hirohashi, and Tesshi Yamada

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 20:160–171, 2010.

Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray

Yusuke Murakoshi, Kazufumi Honda, Shizuka Sasazuki, Masaya Ono, Ayako Negishi, Junichi Matsubara, Tomohiro Sakuma, Hideya Kuwabara, Shoji Nakamori, Naohiro Sata, Hideo Nagai, Tatsuya Ioka, Takuji Okusaka, Tomoo Kosuge, Masashi Shimahara, Yohichi Yasunami, Yoshinori Ino, Akihiko Tsuchida, Tatsuya Aoki, Shoichiro Tsugane, and Tesshi Yamada

Cancer Sci, 102:630–638, 2010.

Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer Ryo Nagashio, Tomoyuki Tagi, Takeshi Matsui, Shojiro Kikuchi, Sachi Hoshi, Toshiya Ochiai, Yukihito Kokuba, Yoko Kinoshita-Ida, Fumie Kisumi-Hayashi, Koji Morimoto, Toshio Imai, Issei Imoto, Johji Inazawa, and Eigo Otsuji

J Gastroenterol, 45:1201–1200, 2010.

Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung

Toshihide Matsumoto, Shinichiro Ryuge, Makoto Kobayashi, Taihei Kageyama, Manabu Hatori, Naoki Goshima, Shi-Xu Jiang, Makoto Saegusa, Akira Iyoda, Yukitoshi Satoh, Noriyuki Masuda, and Yuichi Sato

Int J Oncol, (in press)

Prognostic significance of the hair follicle stem cell marker nestin in patients with malignant melanoma

Kenichi Tanabe, Yasuyuki Amoh, Maho Kanoh, Hiroshi Takasu, Naohiko Sakai,

Yuichi Sato, and Kensei Katsuoka
Eur J Dermatol, 20:283-289, 2010.

Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer
Shinichiro Ryuge, Yuichi Sato, Guo Qin Wang, Toshihide Matsumoto, Shi Xu Jiang,
Ken Katono, Hayato Inoue, Yukitoshi Satoh, and Noriyuki Masuda
Chest, 139: 862–869, 2010.

Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics
Kazutaka Kikuta, Naobumi Tochigi, Shigeru Saito, Tadakazu Shimoda, Hideo Morioka,
Yoshiaki Toyama, Ako Hosono, Yoshiyuki Suehara, Yasuo Beppu, Akira Kawai,
Setsuo Hirohashi, and Tadashi Kondo
Proteomics Clin Appt, 4:560–567, 2011.

Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention



Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer

Junichi Matsubara, Kazufumi Honda, Masaya Ono, et al.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2011;20:160-171. Published OnlineFirst December 8, 2010.

Updated Version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0397
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cebp.aacrjournals.org/content/suppl/2010/12/07/1055-9965.EPI-10-0397.DC1.html

Cited Articles	This article cites 39 articles, 22 of which you can access for free at: http://cebp.aacrjournals.org/content/20/1/160.full.html#ref-list-1
-----------------------	--

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

Research Article

Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer

Junichi Matsubara^{1,2}, Kazufumi Honda¹, Masaya Ono¹, Yoshinori Tanaka³, Michimoto Kobayashi³, Gimán Jung³, Koji Yanagisawa⁴, Tomohiro Sakuma⁴, Shoji Nakamori⁵, Naohiro Sata⁶, Hideo Nagai⁶, Tatsuya Ioka⁷, Takuji Okusaka⁸, Tomoo Kosuge⁸, Akihiko Tsuchida⁹, Masashi Shimahara¹⁰, Yohichi Yasunami¹¹, Tsutomu Chiba², Setsuo Hirohashi¹, and Tesshi Yamada¹

Abstract

Background: Early detection is essential to improve the outcome of patients with pancreatic cancer. A noninvasive and cost-effective diagnostic test using plasma/serum biomarkers would facilitate the detection of pancreatic cancer at the early stage.

Methods: Using a novel combination of hollow fiber membrane-based low-molecular-weight protein enrichment and LC-MS-based quantitative shotgun proteomics, we compared the plasma proteome between 24 patients with pancreatic cancer and 21 healthy controls (training cohort). An identified biomarker candidate was then subjected to a large blinded independent validation ($n = 237$, validation cohort) using a high-density reverse-phase protein microarray.

Results: Among a total of 53,009 MS peaks, we identified a peptide derived from CXC chemokine ligand 7 (CXCL7) that was significantly reduced in pancreatic cancer patients, showing an area under curve (AUC) value of 0.84 and a P value of 0.00005 (Mann-Whitney U test). Reduction of the CXCL7 protein was consistently observed in pancreatic cancer patients including those with stage I and II disease in the validation cohort ($P < 0.0001$). The plasma level of CXCL7 was independent from that of CA19-9 (Pearson's $r = 0.289$), and combination with CXCL7 significantly improved the AUC value of CA19-9 to 0.961 ($P = 0.002$).

Conclusions: We identified a significant decrease of the plasma CXCL7 level in patients with pancreatic cancer, and combination of CA19-9 with CXCL7 improved the discriminatory power of the former for pancreatic cancer.

Impact: The present findings may provide a new diagnostic option for pancreatic cancer and facilitate early detection of the disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 20(1); 160–71. ©2011 AACR.

Introduction

Pancreatic adenocarcinoma is one of the most aggressive and lethal of diseases. The overall 5-year survival rate of patients with pancreatic cancer is less than 5%, which is the lowest among the more common cancers (1, 2), and the disease is the fifth leading cause of cancer death in Japan and the fourth in the United States, with greater than 23,000 estimated annual deaths in Japan and greater than 33,000 in the United States (3, 4). The 5-year survival rate of patients who were able to undergo surgical resection reaches 20% to 40% (5, 6), but the majority of pancreatic cancer patients have already developed lymph node and/or distant organ metastasis at their first clinical presentation, and only about 20% of patients are able to undergo radical resection (7, 8). The introduction of gemcitabine has significantly improved the overall survival of patients with unresectable pancreatic cancer, but their median survival period still remains about 6 months (9–11). These statistics

Authors' Affiliations: ¹Chemotherapy Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo; ²Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto; ³New Frontiers Research Laboratories, Toray Industries, Kamakura; ⁴BioBusiness Group, Mitsui Knowledge Industry, Tokyo; ⁵Department of Surgery, Osaka National Hospital, National Hospital Organization, Osaka; ⁶Department of Surgery, Jichi Medical University, Shimotsuke; ⁷Department of Hepatobiliary and Pancreatic Oncology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka; ⁸Hepatobiliary and Pancreatic Oncology and Hepatobiliary and Pancreatic Surgery Divisions, National Cancer Center Hospital, Tokyo; ⁹Third Department of Surgery, Tokyo Medical University, Tokyo; ¹⁰Department of Oral Surgery, Osaka Medical College, Osaka; and ¹¹Department of Regenerative Medicine and Transplantation, Fukuoka University Faculty of Medicine, Fukuoka, Japan

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention Online (<http://cebp.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Tesshi Yamada, Chemotherapy Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Phone: 81-3-3542-2511; Fax: 81-3-3547-6045. E-mail: tyamada@ncc.go.jp

doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0397

©2011 American Association for Cancer Research.

demonstrate that early detection is essential for improving the outcome of patients with pancreatic cancer.

Computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and positron emission tomography (PET) are not cost-effective for the screening of pancreatic cancer because of the relatively low incidence of the disease. If a noninvasive and cost-effective screening test employing plasma/serum markers could be devised, it would significantly facilitate the early detection of pancreatic cancer. However, no biomarker suitable for screening of pancreatic cancer is currently available (12). CA19-9 is an established biomarker useful for the follow-up of pancreatic cancer patients receiving treatment, but has not been recommended for cancer screening because of its insufficient sensitivity and specificity (7, 13). Therefore, the discovery of a new biomarker that would be able to supplement CA19-9 has been anticipated.

Recently, advanced proteomic technologies based on mass spectrometry (MS) have been increasingly applied to studies of clinical samples to identify new biomarkers of various diseases (14) including pancreatic cancer (12, 15). It is anticipated that alterations in the protein content of clinical samples reflect the biological status of patients more directly than those in mRNA (16). We previously developed a new shotgun proteome platform, 2-Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and mass spectrometry (2DICAL; ref. 17). 2DICAL is highly advantageous for clinical proteomics because of its high quantification accuracy and throughput. Using 2DICAL, we have been able to identify several plasma/serum biomarkers useful for cancer detection and therapy tailoring (18–20).

The serum/plasma proteome accumulates a large variety of disease-related alterations and is considered to be a rich source of biomarkers. However, for proteomic analysis of blood samples, the efficient depletion of a handful of particularly abundant proteins, such as albumin and immunoglobulin, has been challenging (21). Recently, we developed a novel method for the pretreatment of serum/plasma using the high-performance hollow fiber membrane (HFM) filtration technique (22). This method employs multistage filtration and cascaded cross-flow processes, enabling fully automated separation of proteins below a predetermined molecular weight (22). As the more abundant plasma proteins generally have relatively large molecular weights, they can be efficiently eliminated using the HFM technique.

To identify new biomarkers that might be useful for the early detection of patients with pancreatic cancer, we performed a comprehensive analysis of low-molecular-weight (LMW) plasma proteins in these patients using a combination of the HFM and 2DICAL techniques. A large variety of LMW proteins are known to be secreted from diseased tissues and can serve as good diagnostic biomarkers for various diseases (23, 24). Here, we report the identification and validation of an LMW chemotactic cytokine, CXC chemokine ligand 7 (CXCL7), as a novel biomarker for pancreatic cancer.

Patients and Methods

Plasma samples

Plasma samples were collected prospectively from 282 individuals (K. Honda, T. Okusaka, K. Felix, S. Nakamori, N. Sata, H. Nagai, et al., manuscript submitted) including healthy volunteers and newcomers to mainly departments of gastroenterology between August 2006 and October 2008 at the following 7 hospitals in Japan: National Cancer Center Hospital (NCCCH), Osaka National Hospital (ONH), Jichi Medical School Hospital, Osaka Medical College (OMC), Tokyo Medical University Hospital (TMUH), Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, and Fukuoka University Hospital. This multi-institutional collaborative study group was organized by the "Third-Term Comprehensive Control Research for Cancer" conducted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and as part of the International Cancer Biomarker Consortium (25). The procedures used for collection and storage were kept uniform for all plasma samples.

The 282 plasma samples were split into 2 study sets (referred to as the training and validation cohorts). The training cohort comprised 45 individuals including patients with untreated pancreatic cancer at NCCCH ($n = 19$) and TMUH ($n = 5$), and healthy controls at NCCCH ($n = 2$), TMUH ($n = 9$), OMC ($n = 6$), and ONH ($n = 4$). The validation cohort comprised 237 individuals including 140 patients with pancreatic cancer, 10 patients with chronic pancreatitis, and 87 healthy controls. All patients diagnosed as having pancreatic cancer had histologically or cytologically proven ductal adenocarcinoma. Demographic and laboratory data are summarized in Table 1. The staging of pancreatic cancer was in accordance with the TNM classification of the International Union against Cancer (UICC).

Blood was collected in a tube with EDTA at the time of diagnosis. The plasma was separated by centrifugation and frozen at -80°C until analysis. Samples showing macroscopic evidence of hemolysis were excluded from the current analysis. Written informed consent was obtained from every subject before blood collection. The protocol of this study was reviewed and approved by the institutional ethics committee boards of each participating institution.

Depletion of high-molecular-weight plasma proteins

The plasma samples of the training cohort were filtered through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ pore size filter. Five hundred microliters of the sample was diluted by adding 3.5 mL of 25 mmol/L of ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0). The total 4 mL of the diluted plasma was processed as previously described (22). After 1 hour of fully automated operation, LMW proteins with molecular weights smaller than 60 kDa were recovered (Supplementary Fig. S1) and lyophilized.

The concentration of $\beta 2$ -microglobulin before and after HFM treatment was measured using an ELISA kit (Human Beta-2 Microglobulin ELISA Kit: Alpha Diagnostic Intl. Inc.) to ensure consistent recovery.

Table 1. Clinicopathologic characteristics of individuals in training and validation cohorts

	Training cohort (n = 45)			Validation cohort (n = 237)				
	Healthy control	Cancer	P	Healthy control	Cancer	P ^f	Chronic pancreatitis	P ^f
No. of patients	21	24		87	140		10	
Sex, n								
Male	17	15	0.205 ^a	56	83		8	0.485 ^a
Female	4	9		31	57		2	
Age, y								
mean (SD)	40 (13)	64 (7)	<0.001	43 (16)	66 (10)		58 (13)	0
Tumor location								
Head	-	14	NA	-	59		-	NA
Body or tail	-	10		-	76		-	
Unknown	-	0		-	5		-	
Clinical stage								
I	-	1	NA	-	5		-	NA
II	-	6		-	25		-	
III	-	4		-	40		-	
IV	-	13		-	70		-	
CA19-9 median, U/mL	5.5	1,109	<0.001	10.2	476		5.2	0.06
>37.0 (ULN), no. of patients	2	19		4	110		0	
DUPAN-2 median, U/mL	12	540	<0.001	12	375		25	<0.001
>150.0 (ULN), no. of patients	1	19		0	92		1	
CEA median, ng/mL	1.7	6.0	<0.001	1.7	3.5		2.6	0.110
>5.0 (ULN), no. of patients	1	12		5	49		1	
Total bilirubin median, mg/dL	0.5	0.4	0.688	0.5	0.5		0.5	0.4
>1.2 (ULN), no. of patients	0	2		4	18		0	
CXCL7								
Mass spectrometry peak intensity ^b , mean (SD)	332 (240)	138 (346)	<0.001 ^d	-	-		-	<0.001 ^e
Protein intensity ^c , mean (SD)	4.14 (0.18)	3.83 (0.28)	<0.001 ^e	4.18 (0.14)	3.92 (0.28)		3.99 (0.10)	<0.001 ^e

NOTE. Wilcoxon test was applied to assess differences in values.

Abbreviations: CEA, carcinoembryonic antigen; NA, not applicable; ULN, upper limit of normal.

^aCalculated by Fisher's exact test.

^bIntensity of the corresponding peak measured by quantitative mass spectrometry.

^cMeasured using reverse-phase protein microarrays (logarithmic variable).

^dCalculated by Mann-Whitney U-test.

^eCalculated by Welch's t test.

^fCompared with healthy controls.

Liquid chromatography/mass spectrometry

The HFM-treated samples were digested with sequencing grade-modified trypsin (Promega) and analyzed in duplicate using a nano-flow high-performance liquid chromatography (HPLC; NanoFrontier nLC, Hitachi High-technologies) connected to an electrospray ionization quadrupole time-of-flight (ESI-Q-TOF) mass spectrometer (Q-ToF Ultima, Waters).

MS peaks were detected, normalized, and quantified using the in-house 2DICAL software package, as described previously (17). A serial identification (ID) number was applied to each of the MS peaks detected (1 to 53,009). The stability of LC-MS was monitored by calculating the correlation coefficient (CC) and coefficient of variance (CV) of every measurement. The mean CC \pm SD and CV \pm SD for all 53,009 peaks observed in the 45 duplicate runs were as high as 0.946 ± 0.042 and as low as 0.053 ± 0.010 , respectively.

Protein identification by tandem MS (MS/MS)

Peak lists were generated using the Mass Navigator software package (version 1.2; Mitsui Knowledge Industry) and searched against the SwissProt database (downloaded on April 22, 2009) using the Mascot software package (version 2.2.1; Matrix Science). The search parameters used were as follows. A database of human proteins was selected. Trypsin was designated as the enzyme, and up to 1 missed cleavage was allowed. Mass tolerances for precursor and fragment ions were ± 0.6 Da and ± 0.2 Da, respectively. The score threshold was set to $P < 0.05$ based on the size of the database used in the search. If a peptide was matched to multiple proteins, the protein name with the highest Mascot score was selected.

Western blot analysis

Primary antibodies used were a rabbit polyclonal antibody against platelet basic protein (PBP) precursor (Sigma) and a mouse monoclonal antibody against human complement C3b- α (PROGEN). The anti-PBP antibody recognizes all the known cleaved forms of PBP including CTAP-III and NAP-2. Six microliters of 1:10 diluted plasma sample was separated by SDS-PAGE and electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The membrane was then incubated with the primary antibody and subsequently with the relevant horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG, as described previously (26, 27). Blots were developed using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare).

Reverse-phase protein microarray

The plasma samples were passed through IgY microbeads (Seppro-IgY12, Sigma-Aldrich) using an automated Magtration System SA-1 (Precision System Science) in accordance with the manufacturer's instructions to reduce the 12 most abundant plasma proteins. The

flow-through portion was serially diluted 1:50, 1:100, 1:200, and 1:400 using a Biomek 2000 Laboratory Automation Robot (Beckman Coulter) and randomly plotted onto ProteoChip glass slides (Proteogen) in quadruplicate in a 6,144-spot/slide format using a Protein Microarrayer Robot (Kaken Geneqs). The spotted slides were incubated overnight with the anti-PBP precursor antibody and then with biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) and subsequently with streptavidin-HRP conjugate (GE Healthcare). The peroxidase activity was detected using the Tyramide Signal Amplification (TSA) Cyanine 5 System (PerkinElmer). The slides were counterstained with Alexa Fluor 546-labeled goat anti-human IgG (Invitrogen; spotting control).

The stained slides were scanned on a microarray scanner (InnoScan 700AL; Innopsys). Fluorescence intensity, determined as the mean value of quadruplicate samples, was determined using the Mapix software package (Innopsys). All determined intensity values were transformed into logarithmic variables.

The reproducibility of the reverse-phase protein microarray assay was determined by repeating the same experiment, as reported previously (28). A plasma sample after reduction of the 12 most abundant plasma proteins was serially diluted within a range of 25- to 6,400-fold. Each diluted sample was spotted in quadruplicate onto glass slides and blotted with the anti-PBP antibody. In a representative quality control experiment, the CC value was 0.980 between days and the median CV was 0.047 among the quadruplicates.

Multiplex assay

The levels of CXCL7 in plasma samples were measured using a Milliplex Human Cytokine/Chemokine panel III kit (Millipore) in accordance with the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Statistical significance of intergroup differences was assessed with the Wilcoxon test, Mann-Whitney U test, Welch's *t* test, or Fisher's exact test, as appropriate. The area under the curve (AUC) of the receiver-operating characteristic (ROC) was calculated for each marker to evaluate its diagnostic significance. A composite index of 2 markers was generated using the results of multivariate logistic regression analysis, which also enabled the calculation of sensitivity, specificity, and the ROC curve. Statistical analyses were performed using an open-source statistical language R (version 2.7.0) with the optional module Design package.

Results

Plasma proteins associated with pancreatic cancer

A plasma sample from 1 healthy volunteer was processed 3 times using the HFM filtration technique. The concentration of β 2-microglobulin before and after HFM treatment was measured. The recovery rates were