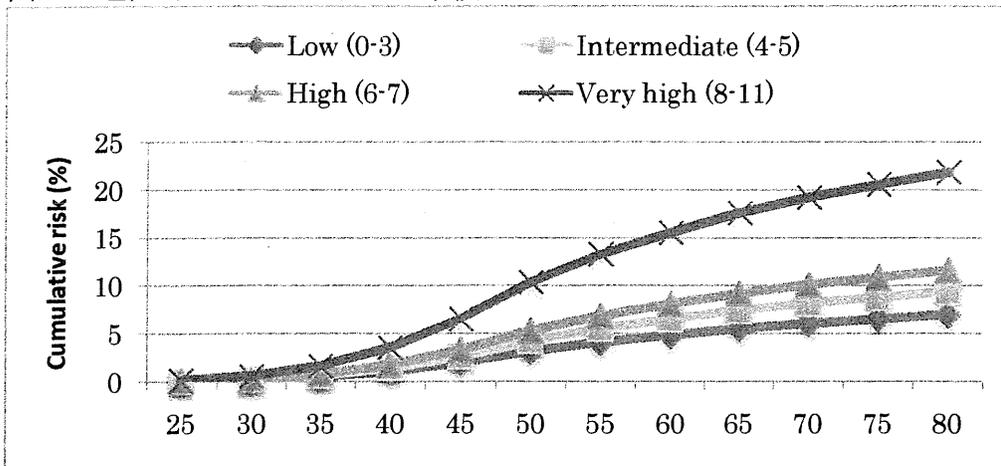


図2. 遺伝的リスク別の乳がん累積リスク



Risk group	Cumulative risk by age of 75 years (%)	95% confidence interval
Low	6.5493	(4.9745-8.4985)
Intermediate	8.7999	(8.6016-8.8966)
High	10.931	(10.611-11.130)
Very High	20.621	(19.256-24.575)

## 「プロテオーム解析に関する研究」

分担研究者 尾野雅哉

国立がん研究センター研究所・創薬臨床研究分野・ユニット長

## 研究要旨

われわれが開発した2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC/MS))はハイスループットなショットガンプロテオミクス解析手法である。2DICALを用い膵がん発症危険因子を膵がん発症前血液サンプルから探索するとともに、2DICALで発見してきた各種腫瘍マーカーを既存の臨床検査手法や質量分析計を用いた新規の測定手法 (MRM (Multiple Reaction Monitoring))により検証することを目的に本分担研究を行っている。本年度は水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質が膵がん発症危険因子となりうるかを検討するために血液サンプルの準備を行った。

## A. 研究目的

2DICALは、複数のスペクトラムからなる液体クロマトグラフィー質量分析計 (LCMS) データを、各スペクトラムの相関係数からLCの時間変動を補正して、質量電荷比 ( $m/z$ )、保持時間 (RT) の2軸を持つ平面に描出する手法を基本とする。この手法により同一ペプチド由来のピークが、強度 (Intensity) を変数に持つ  $m/z$ 、RT 座標に変換され、複数サンプル間での無標識定量比較解析をショットガンプロテオミクスで可能にした。同時にサンプル (S) をもうひとつの次元にとらえ、同一  $m/z$  のピークを RT、サンプルの2軸の平面で描出することができ、多数検体間の定量比較も可能としている。

この技術の開発により、LCMSで作成される膨大なピークデータから効率よくかつ定量的に多数検体解析が可能となり、ショットガンプロテオミクスにおける血中腫瘍マーカー開発が可能となった。本研究では、本技術を用いて新規の膵がん危険因子を膵がん発症前血液サンプルから探索するとともに、2DICALで発見してきた各種腫瘍マーカーを既存の臨床検査手法や質量分析計を用いた新規の測定手法 (MRM (Multiple Reaction Monitoring))により検証することを目的とする。

## B. 研究方法

## 1) 膵がん発症危険因子の探索

約6万人のコホートより発症している約140例の膵がん症例の発症前検体を、膵がん発症危険因子探索の対象とする。この血液検体に対して対照、検証となる膵がん患者や健常者、慢性膵炎患者等の血液検体は採血・保存方法を標準化し、人間ドックや歯科の受診症例を含めて収集するとともに、すでに収集された検体で、倫理的要件を満たすものも解析対象とする。これらの血液検体を用いて、膵がん症例の発症前検体とその他の検体のプロテオームを2DICALによって比較解析し、膵がん発症危険因子の探索を行う。

## 2) 腫瘍マーカー実用化に向けた技術開発

2DICALで発見された腫瘍マーカー候補である水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質に対

して、サンドイッチアッセイ系を構築し、水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質が膵がん発症危険因子となりうるかを検討する。2DICALで発見された腫瘍マーカー候補である水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質で、特異抗体が得られなかったペプチド部位に対してMRMを用いた検証実験を行い、MRMでの膵がん発症危険因子の検討を行う。

また、2DICALの解析能力を高める技術開発も同時に進行させる。

## (倫理面への配慮)

国立がん研究センター、その他連携各施設の倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮した患者、健常者より得られた血漿検体を用いた。

## C. 研究結果

## 1) 膵がん発症危険因子の探索

協力施設での倫理審査が完了したので、本年度は6万人コホートより発症した膵がん症例と年齢、性別を一致させた対照症例、計540例の血液サンプルを水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質濃度測定を含めたプロテオーム解析ができるように分注作業を行った。

## 2) 腫瘍マーカー実用化に向けた技術開発

水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質に対してトランスジェニック社が開発したサンドイッチELISA測定キットを用いて、水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質が膵がんの発症危険因子となりうるかを測定するための準備を行った。

また、旧来の2DICALは質量分析計でアノテーション情報が十分に利用できない点を改善するために、タンデムマス (MSMS) のアノテーションデータをすべて拾い上げるアルゴリズムが加えられたが、そのシステムを加えたことによりピーク認識で誤差が生じることが明らかになった。

## D. 考察

水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質に

対するサンドイッチ ELISA キットによる測定により、血漿水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンの濃度は膵がん患者では健常者と比較して有意な濃度上昇が認められたため、水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質が膵がんの発症危険因子となりうる可能性を検討するために、6万人コホート研究の血液測定の準備を開始した。

技術開発においては、正確なプロテオーム解析を遂行するために、2DICAL バージョンアップによるピーク認識誤差の改善を早急に行う必要があることが認識された。

## E. 結論

1. サンドイッチ ELISA 測定キットを用いて、6万人コホートより発症した膵がん症例と年齢、性別を一致させた対照症例、計 540 例の血液サンプルの水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質濃度測定を行う。
2. 2DICAL バージョンアップによる不具合を早急に改善する。その解決までは、旧来の 2DICAL を組み合わせてプロテオーム解析を行う。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

(2012 年 4 月 1 日から 2013 年 3 月 31 日まで)

### 1. 論文発表

1. Yokomizo, A., Takakura, M., Kanai, Y., Sakuma, T., Matsubara, J., Honda, K., Naito, S., Yamada, T., Ono, M.  
Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney.  
Cancer Biomark10, 175-83 (2012).
2. Miyamoto, T., Kitamura, N., Ono, M., Nakamura, Y., Yoshida, M., Kamino, H., Murai, R., Yamada, T., Arakawa, H.  
Identification of 14-3-3gamma as a MIEAP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control.  
Sci Rep 2, 379 (2012).
3. Ono, M., Kamita, M., Murakoshi, Y., Matsubara, J., Honda, K., Miho, B., Sakuma, T., Yamada, T.  
Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL: 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry.  
Int J Proteomics 2012, Article ID 897412 (2012).
4. 尾野雅哉、紙田正博、松原淳一、村越雄介、

山田哲司。

プロテオミクス解析システム 2 D I C A L を用いたがんバイオマーカー開発  
細胞 44, 46-49 (2012).

5. Fukawa, T., Ono, M., Matsuo, T., Uehara, H., Miki, T., Nakamura, Y., Kanayama, H., Katagiri, T.  
DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas.  
Cancer Res72, 5867-77 (2012).
  6. Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Imada, K., Oda, Y., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S., Ono, M.  
Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer.  
ISRN Oncol2012, Article ID 768190 (2012).
  7. 尾野雅哉、紙田正博、松原淳一、山田哲司。  
プロテオーム解析によるがん診断と治療への道。  
分子消化器病 9, 71-6 (2012).
  8. Nakano, T., Matsushima-Hibiya, Y., Yamamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Fukuda, H., Ono, M., Takamura-Enya, T., Kinashi, H., Totsuka, Y.  
ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from Streptomyces coelicolor.  
Toxicon63, 55-63 (2013).
  9. Honda, K., Ono, M., Shitashige, M., Masuda, M., Kamita, M., Miura, N., Yamada, T.  
Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine  
Jpn J ClinOncol43, 103-9 (2013).
  10. Yoneyama, T., Ohtsuki, S., Ono M., Ohmine, K., Uchida, Y., Yamada, T., Tachikawa, M., Terasaki, T.  
Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis.  
J Proteome Res12, 753-62 (2013).
- ### 2. 学会発表
1. 60<sup>th</sup> Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics  
平成 24 年 5 月 22 日 (Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada)  
Sakuma T, Ono M., Kuwabara H, Banno M, Kamita

- M, Yamada T  
Wonder 3: A new computer algorithm for modified protein identification utilizing MS3 multi-tandem mass spectrum
2. 日本プロテオーム学会 2012 年大会  
平成 24 年 7 月 27 日 (日本科学未来館、東京都)  
紙田正博、きょう建生、酒井義人、伊藤研悠、渡邊研、原田敦、新飯田俊平、山田哲司、尾野雅哉  
2DICAL を用いた腰部脊柱管狭窄症のプロテオーム解析
  3. Hupo 2012 11<sup>th</sup> Annual World Congress  
平成 24 年 9 月 9 日 (Hynes Convention Center, Boston, USA)  
Kamita M, Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M  
A New Diagnostic Biomarker for Prostate Cancer Patients Detected by 2DICAL
  4. 第 71 回日本癌学会学術総会  
平成 24 年 9 月 21 日 (ホテルロイトン札幌、札幌市)  
高倉美智子、横溝晃、紙田正博、宮永晃彦、渡辺隆文、鄭基晩、山田哲司、内藤誠二、尾野雅哉  
PSA グレーゾーン値前立腺癌患者の新規診断マーカー。
  5. 生命医薬情報学連合大会  
平成 24 年 10 月 17 日 (タワーホール船堀、東京都)  
尾野雅哉  
プロテオームのがん診断と治療への応用
  6. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会  
平成 23 年 10 月 26 日 (名古屋国際会議場、名古屋市)  
きょう建生、紙田正博、東祥子、伊藤研悠、酒井義人、五十嵐文子、渡辺研、山田哲司、尾野雅哉、原田敦、新飯田俊平  
プロテオミクスを基盤とした脊柱管狭窄症肥厚靱帯のタンパク質局在
  7. 9th AACR-JCA Joint Conferences  
平成 25 年 2 月 22 日 (Hyatt Regency Maui, Maui, USA)  
Ono M, Kamita M, Yamada T  
A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL
- H, 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1、特許
    - 1、発明の名称：Novel tumor marker for pancreatic cancer  
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日：2012 年 10 月 12 日  
特許番号：第 EP2182061 号 (欧州)
    - 2、発明の名称：液体クロマトグラフィーのデータ補正方法  
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日：2012 年 11 月 2 日  
特許番号：第 5119405 号
    - 3、発明の名称：修飾  $\alpha$  フィブリノゲンタンパク質またはその免疫原性断片  
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄  
特許日：2012 年 11 月 30 日  
特許番号：第 5140809 号
  - 2、実用新案登録  
なし
  - 3、その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）  
分担研究報告書逆相血漿マイクロアレイによる膵がん血漿診断マーカーの開発  
ApoAII ホモダイマー C 末端修飾型早期膵がん診断マーカーキットの開発  
血漿・血清診断マーカーのためのバイオバンク構築

## 研究分担者

本田 一文	国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野	ユニット長
小林 道元	東レ株式会社先端融合研究所	主任研究員
金田 隆	日本大学松戸歯学部放射線学講座	教授
加藤 仁夫	日本大学松戸歯学部インプラント科	教授

## 研究の要旨

本研究は、①逆相血漿マイクロアレイ (reverse phase plasma array, RPPA) と抗体ライブラリーによる膵がん膵がん診断マーカーの開発 (RPPA MRM プロジェクト)、②膵がん血漿診断マーカー C 末端欠損型 apolipoprotein AII の ELISA (enzyme-Linked Immunosorbent Assay) キットの構築と診断学的有用性の検討 (ApoAII C 末端マーカープロジェクト)、③健常人血漿・血清検体の収集 (検体収集プロジェクト)、の上記 3 個の独立したプロジェクトから構成されている。

【① RPPA MRM プロジェクト】RPPA で同定された 24 種類の膵がん血漿診断マーカー候補のうち、4 個のタンパク質の絶対定量が、multiple reaction monitoring (MRM) で可能になった (東北大学大学院薬学研究科 寺崎教授研究報告書参照)。

【② ApoAII C 末端マーカープロジェクト】膵がんでは、ApoAII C 末端のアミノ酸が欠失することに着目し、C 末端欠損型 apolipoprotein AII の C 末端構造を特異的に認識する抗体を作成した。これらの抗体を使用し、サンドウィッチ ELISA キットを確立した。本キットで、健常人、膵がん、その他の消化器がんを含む血漿 (n=804) で測定した。膵がんを健常人から area under the curve (AUC) 値、0.87 以上で判別する検査系が構築できた。

【③ 検体収集】健常人血漿と血清が 70 例分登録された。

定系を開発した (東北大学大学院薬学研究科 寺崎教授 研究報告書 参照) (RPPA MRM プロジェクト)。

②国立がん研究センター研究所で同定された膵がん血漿診断マーカーである C 末端欠損型 apolipoprotein AII の ELISA

(enzyme-Linked Immunosorbent Assay) キットを開発し、診断学的有用性を検討した (ApoAII C 末端マーカープロジェクト)。

③検証研究に必要な健常人血漿・血清の収集を行った。(検体収集プロジェクト)。

## B. 研究方法

## 【①RPPA プロジェクト】

健常人 (n=106)、膵がん(n=164)、その他消化器がん・良性疾患 (n=114) 例分の血漿がマイクロアレイされた RPPA を抗体ライブラリーで蛍光免疫染色し、膵がん患者血漿に強発現する診断マーカー候補のスクリーニングを行った。同定された診断マーカー候補は、東北大学大学院薬学研究科寺崎教授チームと、熊本大学大学院生命科学

## A. 研究目的

膵がんの予後の改善のために、無症状な早期膵がんを非侵襲的かつ簡便な方法で検出する血清・血漿腫瘍マーカーの開発が望まれている。また、死亡率の改善には、膵がん発症高危険度群を、発症前に選別し、精密な 2 次スクリーニングや厳密なフォローアップにより、早期発見の機会を得る戦略も有効である。さらに、高危険度群に対して適切な生活習慣を指導できれば、膵がん発症率そのものを減少させる可能性もある。今回われわれは、早期膵がんの血漿・血清診断マーカーならびに、膵がん発症高危険度群選別マーカーの開発を目的に、以下の 3 個の研究を行った。

①国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野で開発された逆相血漿マイクロアレイ (reverse phase plasma array, RPPA) と抗体ライブラリーを組み合わせ、膵がん血漿に高発現するタンパクを同定し、東北大学・熊本大学大学院チームが膵がんの血漿からタンパク質濃度を絶対定量する測

研究部大槻教授チームにより、安定同位体と multiple reaction monitoring (MRM) による質量分析が行われた (東北大学大学院 薬学研究科 分担研究報告書参照)。

【②ApoAII C 末端マーカープロジェクト】  
C 末端欠損型 apolipoprotein AII の C 末端構造を特異的に認識する抗体を作成し、同タンパク質を計測するサンドウィッチ ELISA を構築した。

#### 【健常者血清・血漿の収集】

日本大学松戸歯学部および国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得て、前向きに血漿・血清の収集を開始した。

#### (倫理面での配慮)

検体は、本研究に同意が得られた検体のみで行われた。収集時点ですべて匿名された。解析を行う国立がん研究センター、東北大学大学院、熊本大学大学院には、患者を識別するための ID 番号、名前、生年月日は、一切開示されていない。研究は、国立がん研究センター、東北大学大学院薬学研究科、日本大学松戸歯学部の倫理委員会承認のもと実施された。

### C, 研究結果

#### 【① RPPA MRM プロジェクト】

RPPA により 24 診断マーカー候補が絞り込まれ、そのうち 4 個の分子に対して東北大学・熊本大学大学院チームが絶対定量系を立ち上げた (東北大学大学院薬学研究科 寺崎教授 研究報告書 参照)。

#### 【② ApoAII C 末端マーカープロジェクト】

C 末端欠損型 apolipoprotein AII の C 末端構造を特異的に認識する抗体によるサンドウィッチ ELISA キットを構築し、プロトコルの最適化、再現性の確認が終了した。健常者、膵がん、その他の消化器がんを含む血漿 (n=804) で測定したところ、C 末端欠損型 apolipoprotein AII を測定することにより、膵がんを健常者から AUC 値、0.87 以上で判別できた。

#### 【検体収集プロジェクト】

日本大学松戸歯学部が血液収集プロトコルを最適化し、収集を開始した。70 例の健常者血漿・血清の登録がなされた。

### D, 考察

平成 24 年度末までに、膵がん診断マーカー候補を簡便かつハイスループットに解析す

る検査系の構築は終了した。中でも、C 末端欠損型 apolipoprotein AII を計測するサンドウィッチ ELISA は、800 例を超える血漿サンプルで検証が終了し、AUC も 0.87 以上と良好な結果である。

本研究の目的は、早期膵がんのための診断マーカー、あるいは膵がん発症高危険群を抽出するための診断マーカーの開発である。現在、利用している血液検体は、あくまで他の診断方法 (画像検査、CA19-9 等) で発見された膵がん患者のものである。そのため、必ずしも早期膵がん診断マーカーの検証研究に適しているとは言い切れない。実臨床での検証が必須であるが、今後は臨床現場で利用するための品質管理法の検討にも傾注すべきであると考えている。

また、現在利用している血漿検体では、膵がん発症前の血液が含まれていないため、危険度群予測の検証は、不可能である。国立がん研究センター予防検診センターには「多目的コホートにおける膵がんのコホート内症例・対照研究」で収集された膵がん発症前の血漿 170 例とケース・コントロール研究として、マッチさせたコントロール血漿 340 例が保存されている。本検体を利用することにより膵がん発症危険率推測に対する有用性を検討できる。平成 25 年度は膵がん高危険度群を抽出に対する有用性を確認する。

### E, 結論

- 1) RPPA から抽出された 24 種類の膵がん血漿診断マーカーのうち、東北大学大学院薬学研究科・熊本大学大学院生命科学研究所のチームが 4 種類のマーカーに対して MRM 絶対定量系を構築した (東北大学大学院 薬学研究科 寺崎教授 報告書参照)
- 2) ApoAII C 末端の状態を評価するサンドウィッチ ELSIA の構築を終了した。膵がん診断学的有用性を検証したが、AUC 0.87 以上で健常者から膵がんを判別した。
- 3) 健常者血漿と血清を 70 例分収集した。

### 研究発表

#### 論文発表

1. Honda K, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura N, Yamada T. Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn J Clin Oncology* 43:103-9, 2013.
2. Honda K, Okusaka T, Felix K, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T,

- Tsuchida A, Shimahara T, Shimahara M, Yasunami Y, Kuwabara H, Sakuma T, Otsuka Y, Ota N, Shitashige M, Kosuge T, Büchler MW, Yamada T. Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer: protein characterization and multi-institutional validation. *PLoS ONE*7:e46908, 2012.
3. Makuuchi M, Honda K, Osaka Y, Kato K, Kojima T, Daiko H, Ito Y, Igaki H, Hosino S, Tachibana S, Watanabe T, Furuta K, Sekine S, Umaki T, Watabe Y, Miura N, Tsuchida A, Yamada T. Soluble interleukin-6 receptor predicts oesophageal carcinoma response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci* (in press).
  4. Ono M, Kamita M, Murakoshi Y, Matsubara J, Honda K, Miho B, Sakuma T, Yamada T. Biomarker discovery of pancreatic and gastrointestinal cancer by 2DICAL: 2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry. *Int J Proteomics*2012:897412, 2012.
  5. Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, Masuda M, Yamaguchi U, Fujii G, Miyamoto A, Shinagawa S, Miura N, Tsuda H, Sakuma T, Asamura H, Gemma A, Yamada T. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. *Ann Oncol*24:84-90, 2013.
  6. Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Imada K, Oda Y, Kamita M, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol.*2012:768190, 2012.
  7. Sakane A, Abdallah AA, Nakano K, Honda K, Ikeda W, Nishikawa Y, Matsumoto M, Matsushita N, Kitamura T, Sasaki T. Rab13 small G protein and Junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development. *J Biol Chem* 287:42455-68, 2012.
- 学会発表
31. Honda K, Yamada T. Rapid biomarker validation by high-density plasma protein array. 2nd Reverse Phase Protein Array Global Meeting Nov. 2012, Edinburg.
  32. Miyanaga A, Honda K, Masuda M, Watabe Y, Watanabe T, Shinagawa S, Asamura H, Gemma A, Yamada T. Prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumors (poster presentation). 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
  33. Honda K, Yamamoto S, Tsuda S, Yamada T. Prognostic and predictive biomarker discovery for advanced ovarian cancer by high-throughput tissue microarray screen. (English Oral session). 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
  34. Masuda M, Honda K, Yamada T. Phosphoproteomics with reverse phase protein microarrays: Identification of a potential response predictor to Sorafenib. (English Oral Session). 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
  35. Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, Masuda M, Tsuda H, Gemma A, Yamada T. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumors. ESMO congress 2012, Sep. 2012 Vienna.
  36. Honda K, Noro R, Miura N, Tsuta K, Ishi G, Tsuda H, Gemma A, Asamura H, Nagai K, Yamada T, GENE Amplification of ACTN4 in lung cancer: a novel prognostic indicator for stage-I adenocarcinoma of the lung. ESMO congress 2012, Sep. 2012 Vienna.
- 知的財産・その他  
なし

膵がんバイオマーカーの定量質量分析

研究分担者 寺崎哲也 東北大学大学院薬学研究科 教授  
大槻純男 熊本大学大学院生命科学研究部 教授  
立川正憲 東北大学大学院薬学研究科 准教授  
内田康雄 東北大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

本研究では、標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)の手法を用いて、本研究事業分担者の本田博士らが見出した膵増癌バイオマーカー候補タンパク質群の一斉定量系を構築し、膵がん判別診断マーカーとしての評価を行うことを目的とした。本年度は、膵がん血漿マーカー候補24分子について定量系を確立した。膵がん患者検体24例および健常者検体18例の血漿中の候補タンパク質について定量標的ペプチドを設計しLC-MS/MS解析を行った結果、候補タンパク質24分子中4分子の検出が可能であった。これらのタンパク質に対して、膵がんの血漿検体と健常者血漿検体を用いて定量比較を行った結果、膵がん検体では2分子が有意に上昇しており、膵がんマーカーとしての有用性が示された。さらに、同一のタンパク質においても定量標的とするペプチドの選択部位によって異なる定量値を示し、膵臓癌マーカーとして精度が異なることが示された。この結果は、タンパク質が血漿中で断片化して存在していることを示唆しており、標的絶対定量プロテオミクスの手法が、がんマーカーアッセイ系として汎用されているELISA法の開発に不可欠な抗体の抗原部位の選択に極めて有用であることが示された。

A. 研究目的

グローバルプロテオミクス解析は、多数の疾患バイオマーカー候補タンパク質の同定を可能としてきた。しかし、同定されたタンパク質の定量的検証は、特異的抗体の有無や特異性に依存し、ハイスループットな複数分子の一斉定量は困難であった。我々が開発した「標的絶対定量プロテオミクス(Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP)」の技術(Kamiie et al., *Pharm Res*25:1469-1483(2008))は、アミノ酸配列情報のみから短期間で定量法の開発を可能とし、37分子の一斉定量と、質量情報に基づく特異性の高い定量を実現した。本研究では、膵がん血漿マーカーとして本研究事業の分担者である本田博士らが同定した24分子について、QTAP技術を用いて特異的かつ精度よく定量する事によって膵がん識別診断マーカーとしての評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、マーカー候補タンパク質のアミノ酸配列を基に、独自の*in silico*選択基準を用いて高速液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)を用いた定量に適したトリプシ

ン消化ペプチド配列を選択した。一部の候補タンパク質については、1タンパク質に対し、複数の定量標的ペプチドを選択した。定量標的ペプチドについて安定同位体標識及び非標識ペプチドを化学合成し、ペプチド溶液濃度をアミノ酸分析によって決定した。さらに、マーカー候補24分子について、定量標的ペプチドに対しLC-MS/MSを用いて検量線を作成した。膵がん患者(24例)及び健常者(18例)の血漿(1 µL以下)を、尿素で可溶化後還元アルキル化及びトリプシン消化を行い、サンプル中の標的ペプチドを定量解析した。

(倫理面への配慮)

検体の凍結保存及びタンパク質解析研究への活用に対し同意が得られている検体を対象として、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にて解析終了後に凍結保存されている血液検体の余剰分を対象として解析を行った。血漿サンプルは匿名化され、国立がん研究センター研究所及び東北大学大学院薬学研究科倫理委員会の承認のもと、個人への人権の対策を講じた上で解析を実施した。

C. 研究結果

#### ① 膵がんマーカー候補24分子に対する定量系の確立

安定同位体標識定量標的ペプチドおよび非標識ペプチドを化学合成し、内標準法による検量線を作成した。マーカー候補タンパク質24分子25ペプチドの内、16ペプチドは1-500fmolの間、8ペプチドは5-500fmolの間、1ペプチドは10-500fmolの間で良好な直線性を有する検量線 ( $R^2 > 0.99$ ) が得られ、定量系を確立した。

#### ② 血漿中膵臓癌マーカー候補の定量

①で確立したLC-MS/MS一斉定量系を用いて、膵がんマーカー候補24分子に対し、膵がん検体24例および健常者検体18例の定量解析を行った。その結果、候補タンパク質24分子中、4分子5ペプチドの検出が可能であった。これら4分子のうち、2分子3ペプチドについては健常者に比べ、膵がんの血漿で有意に高値を示した。さらに、ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析の結果、この2分子については、膵がん識別診断マーカーとして有用であることが示された。

#### ③ 血漿中断片化タンパク質の定量と膵がんマーカーとしての有用性評価

本研究において定量系を開発した候補タンパク質の中には、文献情報から活性経路によって2つの断片が精製される可能性があるものが含まれていた。そこで、断片それぞれについて個別定量を行った結果、断片1と断片2は、異なる定量値を示し、膵がんマーカーとして精度が異なることが示された。本結果は、タンパク質によっては、血漿中で断片化して存在していることを示唆しており、定量的標的絶対定量プロテオミクスの手法が、疾患マーカーアッセイ系として汎用されているELISA法の開発に不可欠な抗体の抗原部位の選択に極めて有用であることが示された。

#### D. 考察

本研究によって、24種の膵がんマーカー候補の中から、2タンパク質を有用な膵がんマーカーとして絞り込んだ。今後、症例数を大幅に増やすことによって、既存の膵がんマーカーの精度比較を行う予定である。さらに、絞り込んだ1マーカー候補タンパク質については、断片ごとの血漿中存在量に部位差が存在することが明らかとなった。これによって膵がんマーカーの精度は、どのタンパク質部分配列を定量するかに依存することが、初めて示された。従って、臨床診断を目指したELISA

抗体の作製の際には、抗原部位を定量的標的絶対定量プロテオミクスを用いて、定量比較解析することが必須であることが示された。さらに、マーカー候補タンパク質の定量値に基づくROC解析において、抗体を用いる逆相タンパク質アレイ解析では膵がんマーカーとしての優れた予測精度を示した分子について、標的絶対定量プロテオミクスでは有用性を示さなかった事例があった。この原因として、抗体の交差性の問題点があった可能性がある。同定したマーカータンパク質から、さらに候補分子を絞りこむ段階において、定量的標的プロテオミクスによる複数部位のペプチドの定量が有用であることが明らかとなった。

#### E. 結論

標的絶対定量プロテオミクスを用いて、血漿中の24種の膵がんマーカー候補のうち、4タンパク質の絶対量を高感度かつ高精度に定量する系を確立した。さらに、2タンパク質の膵がん早期診断マーカーとしての有用性を定量的に解明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoneyama T, Ohtsuki S, Ono M, Ohmine K, Uchida Y, Yamada T, Tachikawa M, Terasaki T., Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated  $\alpha$ -fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J Proteome Res*, 12:753-62 (2013)

##### 2. 学会発表

1. 大槻純男：定量とくすりからアプローチする疾患プロテオーム解析、北里疾患プロテオーム研究会、2012年8月23日、神奈川
2. 大槻純男：定量的標的プロテオミクスから切り拓くがん診断と個別化治療、臨床応用を目指した最前線セミナー、2012年9月28日、東京
3. 米山敏広、大槻純男、尾野雅哉、大峰健、内田康雄、立川正憲、寺崎哲也：LC-MS/MS-based Quantification of proline-hydroxylated  $\alpha$ -Fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis、第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2012年11月23日、京都

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。) なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野））  
分担研究報告書

膵臓がん患者における血清メタボローム解析

研究分担者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学分野・准教授

研究要旨

本分担研究では、膵臓がん患者における血清メタボローム解析を行い、感度の高い早期発見可能なバイオマーカーを探索する。

A. 研究目的

本分担研究では、膵臓がん患者、ならびに、健常者の血清代謝物を、質量分析計を用いて分析し、膵臓がんに対する新規バイオマーカーの発見を目的とした。

B. 研究方法

神戸大学医学部附属病院、あるいは、関連病院にて、膵臓がん患者と健常者の血清を収集した。血清からメタノール・クロロホルム・水を用いて水溶性代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボローム解析を実施した。倫理面への配慮）血清収集の際、文書によるインフォームド・コンセントを行い、承諾を得た

C. 研究結果

膵がん患者43例と健常者42例をトレーニングセットとし、比較検定を行った結果、膵がん患者にて、18個の代謝物が有意に変動した。さらに、ステップワイズ変数選択-多重ロジスティック回帰分析により、Xylitol, Histidine, Inositol, 1,5-Anhydro-D-glucitolに基づいた膵がん予測式を構築でき、その感度は86.0%、特異度は88.1%であった。膵がん患者42例、慢性膵炎患者23例、健常者41例をバリデーションセットとして、その予測式の検証した結果、感度71.4%、特異度78.1%と良好であった。

D. 考察

構築した予測式のステージIIまでの膵がん患者に対する感度は77.8%、慢性膵炎患者

における偽陽性率は17.4%であったことから、膵がん発症早期段階で、血中代謝物の変動する可能性が考えられた。

E. 結論

血清メタボロミクスを用いた診断的手法は、膵がん患者をより正確かつ早期に発見できる可能性を持つ有用な方法であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi T. et al., A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, in press.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）  
（分担）研究報告書ヒト  $\alpha$ -アクチニン-4 タンパク質の新規スプライズバリエーション特異的抗体作製に関する研究研究分担者： 品川 真吾 株式会社トランスジェニック  
宮本 顕友 同上

## 研究要旨

「小細胞性肺がん」と「大細胞神経内分泌癌」の診断に有用なマーカーとして期待される  $\alpha$ -アクチニン-4 タンパク質の新規スプライズバリエーション(以下、ACTN4-Va)を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を行った。抗体の作製には、株式会社トランスジェニック社が独占的に使用権を持ち、高感度モノクローナル抗体作製を実現する GANP 技術マウスを使用した。結果、免疫染色に適応を持つ 1 クロウンを樹立した。樹立したクロウンは ACTN4-Va 部分ペプチドを検出可能であった。

## A. 研究目的

ヒト ACTN4-Va を認識するモノクローナル抗体の作製

## B. 研究方法

ヒト ACTN4-Va 特異的モノクローナル抗体の作製

## (1) 抗原の調製

まず、免疫抗原に用いる目的で、ACTN4-Va 部分ペプチドを化学合成した。免疫抗原は、ACTN4-Va 部分ペプチドとキャリア蛋白質を結合させて作製した。また、陰性抗原ペプチドとして、同領域の ACTN4 ペプチドを化学合成した。

## (2) マウスへの免疫および脾臓の選択

免疫は定法に従って、GANP 技術マウス 3 匹に免疫抗原ペプチドを 3 回にわたり投与した。その後、抗原ペプチドを用いた ELISA 法により抗体価を確認し、ACTN4-Va 部分ペプチドへの抗体価が高かったマウスから脾臓を摘出し細胞融合に供した。

## (3) 細胞融合

摘出した脾臓は定法に従い、ミエローマ細胞である P3U1 と融合を行った。融合後、選択培地である、HAT 培地に懸濁した融合細胞を、96 穴培養プレートの各ウェルに  $1 \times 10^5$  個 / ウェルとなるように細胞を播きこんだ。

## (4) 抗体産生陽性ウェルのスクリーニング

細胞融合後、10 日目の培養上清を回収し、抗体産生ウェルのスクリーニングを ELISA 法を用いて行った。ELISA 法により選択したウェルの細胞は 24 ウェルプレートに移し、1~2 日間培養し再度 ELISA 法でスクリーニングを行った。

## (5) クローニング

先の方法で選択した特異性の高かったクロウンについては、限界希釈法でクローニングを行った。10 日後、ELISA 法で培養上清中の c に対する抗体価を測定し、陽性であるこ

とを確認した。

## (6) 抗体の精製

得られたクロウンから目的のモノクローナル抗体を定法に従って精製した。具体的にはまず、無血清培地に樹立細胞を  $4 \times 10^5$  個/mL になるよう調製した。その後、培養フラスコにその細胞懸濁液を 50mL 入れ、至適環境下で約 1 週間培養した。培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清をプロテイン G カラムを用いて、グリシンバッファー (pH3.0) で溶出し、モノクローナル抗体を精製した。

## C. 研究結果

(2) マウスへの免疫および脾臓の選択  
GANP マウスへの免疫の結果、融合を行うのに十分な力価を持つマウスが得られた。

## (5) クローニング

最終的に、ACTN4-Va に特異的なモノクローナル抗体を産生する 1 クロウンをクローニングにより樹立した。

## (6) 抗体の精製

先に示した方法によって精製した抗体について、抗体価確認を ELISA 法で行った。結果、培養上清と同様の特異性を持った精製抗体を得ることが出来た。

## D. 考察

ACTN4-Va 部分ペプチドを GANP マウスへ免疫することで、ACTN4-Va 特異的な抗体を 1 クロウン樹立した。当抗体は既に、分担研究者本田によって、組織染色での適用が見出されている。この適用により、悪性腫瘍罹患患者への診断応用が期待できる。また、当抗体が ELISA 適用を持つ点から、その存在が想定されている血中 ACTN4-Va の検出ツールとして有用性が期待できる

## E. 結論

GANP 技術マウスを用いたモノクローナル抗

体作製法により、ヒト $\alpha$ -アクチニン-4タンパク質の新規スプライスバリエントの検出に有用な抗体クローンを得た。

F. 健康危険情報  
特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours

*Annals of Oncology*. 24(1):84-90. 2013.

A. Miyanaga. *et al.*

2. 学会発表

特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

申請中

2. 実用新案登録

特記事項無し

3. その他

特記事項無し

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）  
（分担）研究報告書ヒト  $\alpha$ -アクチニン-4 タンパク質の新規スプライズバリエーションの測定キット開発に関する研究研究分担者： 宮本 顕友 株式会社トランスジェニック  
品川 真吾 同上

## 研究要旨

ヒト  $\alpha$ -アクチニン-4 タンパク質の新規スプライズバリエーション(以下、ACTN4-Va)特異的抗体作製[研究分担者品川]で得られた抗体を用い、臨床検体中の当該物質が測定可能な診断キットを作製した。具体的には、捕捉抗体として ACTN4-Va を認識する抗体、検出用抗体としてヒト  $\alpha$ -アクチニン-4(以下、ACTN4)を認識する抗体を用いて、サンドイッチ ELISA 測定系を構築した。

## A. 研究目的

ヒト  $\alpha$ -アクチニン-4 タンパク質の新規スプライズバリエーションを測定するキットの作製

## B. 研究方法

ヒト ACTN4-Va に特異的な診断キットの作製

## (1) 補足抗体および検出抗体の設定

ヒト ACTN4 を認識する抗体、およびヒト ACTN4-Va を認識する抗体を用いて、精製 ACTN4-Va タンパクを ELISA 法で測定した。具体的には、固相化または検出抗体として上記抗体 2 種を用い、精製 ACTN4-Va タンパクの濃度依存的にシグナルが検出され、バックグラウンドが低い組み合わせをサンドイッチ ELISA 法により決定した。

## (2) 検量線の作成

前項の方法で設定した抗体組み合わせを用いてサンドイッチ ELISA を行い、精製 ACTN4-Va タンパクの検量線を作成した。また、血清含有量が測定値へ与える影響を検討した。

## C. 研究結果

## (1) 補足抗体および検出抗体の設定

検討の結果、捕捉(固相化)抗体に抗 ACTN4-Va 抗体、検出抗体に抗 ACTN4 抗体を設定することで、最も良好な検出感度が得られた。

## (2) 検量線の作成

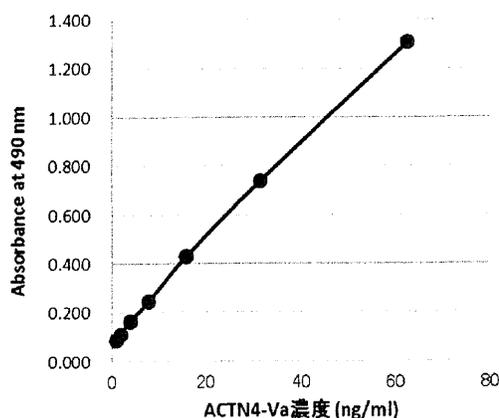
精製 ACTN4-Va タンパクを用いて検量線[図 1]を作成した。また、血清含有量 5%以下であれば、正確に精製 ACTN4-Va タンパク量が定量できる点を確認された。

図 1: ACTN4-Va 測定キットの検量線

## D. 考察

ヒト ACTN4-Va が検出可能なサンドイッチ ELISA キットを構築した。

本キットは溶液中の ACTN4-Va の測定が可能であり、ヒト血液検体に ACTN4-Va タンパクが存在する場合は、その検出に有効である可能性が示された。今後、臨床検体を測定するうえで、本キットは有用な検出ツールとなり得る。

検量線  
(ACTN4濃度 0.98 ~ 62.5 ng/ml)

## E. 結論

ヒト ACTN4-Va を特異的に測定可能なサンドイッチ ELISA キットを構築した。

## F. 健康危険情報

特記事項無し

## G. 研究発表

1. 論文発表  
特記事項無し
2. 学会発表  
特記事項無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特記事項無し
2. 実用新案登録  
特記事項無し
3. その他  
特記事項無し

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

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
緒方広子 土屋直人	血中エクソソーム中のmicroRNAによるがんの診断		細胞工学	学研メデ イカル秀 潤社	日本	2013	85-90
尾野雅哉、 松原淳一、 山田哲司	血漿を用いた膵癌早期マーカー探索	中村和行, 西尾和人, 西村俊秀	臨床プロテオミクス バイオマーカー探索から個別化医療へ	金原出版	東京	2012	338-340

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yunokawa M, Yoshida T, et al	Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells.	Cancer Sci.	103 (9)	1665-1671	2012
Shiraishi K, Yoshida T, et al	A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population.	Nat Genet.	44 (8)	900-903	2012
Iwasaki M, Yoshida T, et al.	Association of postmenopausal endogenous sex hormones with global methylation level of leukocyte DNA among Japanese women.	BMC Cancer.	12 (1)	323	2012
Tada M, Yoshida T, et al.	Genetic polymorphisms of FCGR2A encoding Fcγ receptor IIa in a Japanese population and functional analysis of the L273P variant.	Immunogenetics.	64 (12)	869-877	2012
Ono H, Yoshida T, et al	Association of dietary and genetic factors related to one-carbon metabolism with global methylation level of leukocyte DNA.	Cancer Sci.	103 (12)	2159-2164	2012
Ono H, Yoshida T, et al.	Prostate stem cell antigen gene is expressed in islets of pancreas.	Anat Cell Biol	45 (3)	149-154	2012

Saeki N, <u>Yoshida T</u> et al	Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study.	Cancer Sci.	104	1-8	2012
Fujita T, <u>Yoshida T</u> , et al.	Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice.	Cancer Sci.	104	214-222	2012
Lan Q, <u>Kohno T</u> et al.	Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia	Nature Genetics	44(12)	1330-1335	2012
Okamoto et. al.	miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver.	EMBO J.	31	1752-1763	2012
Yamanoi K, <u>Katai H</u> , et.al.	Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer.	Pathol Int	63(1)	13-19	2013
Terashima M, <u>Katai H</u> , et.al.	Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer.	Clin Cancer Res	18(21)	5992-6000	2012
Kusaka Y, <u>Katai H</u> , et.al.	Clinical significance of molecular detection of matrix metalloproteinase-1 in bone marrow and peripheral blood in patients with gastric cancer.	Ann Surg Oncol	19 (Suppl 3)	430-437	2012
Ishida M, <u>Katai H</u> , et.al.	Metachronous liver metastasis from early gastric cancer.	J Gastrointest Surg	16(4)	837-841	2012

Long J, <u>Iwasaki M</u> .et al	Genome-wide association study in East asians identifies novel susceptibility Loci for breast cancer.	PLoS Genet.	8	e1002532.	2012
Ma X, <u>Iwasaki M</u> .et al	Pathway analyses identify TGFBR2 as potential breast cancer susceptibility gene: results from a consortium study among Asians.	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.	21	1176-1184.	2012
Pandey JP, <u>Iwasaki M</u> .et al	Genetic markers of immunoglobulin G and susceptibility to breast cancer.	Hum Immunol.	73	1155-1158.	2012
Pandey JP, <u>Iwasaki M</u> .et al	Racially restricted contribution of immunoglobulin Fcgamma and Fcgamma receptor genotypes to humoral immunity to human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer.	Clin Exp Immunol.	171	273-277	2013
Sueta A, <u>Ito H</u> , et al	A genetic predictor for breast cancer using a combination of low-penetrance polymorphisms in a Japanese population	Breast Cancer Research and Treatment	132	711-721	2012
Yokomizo, A., <u>Ono, M</u> et al	Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney.	Cancer Biomark	10	175-83	2012
Miyamoto, T <u>Ono, M</u> et al	Identification of 14-3-3gamma as a MIEAP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control.	Sci Rep	2	379	2012
<u>Ono, M.</u> et al	Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL: 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry.	Int J Proteomics		ID 897412	2012

Fukawa, T. <u>Ono</u> , <u>M.</u> et al	DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas.	Cancer Res	72	5867-77	2012
Takakura, M. <u>Ono</u> , <u>M.</u> et al	Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer.	ISRN Oncol		ID 768190	2012
Nakano, T. <u>Ono</u> , <u>M.</u> et al	ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from <i>Streptomyces coelicolor</i> .	Toxicon	63	55-63	2013
Honda, K., <u>Ono</u> , <u>M.</u> et al	Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine	Jpn J Clin Oncol	43	103-109	2013
Yoneyama, T. <u>Ono</u> , <u>M.</u> et al	Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis.	J Proteome Res	12	753-762	2013
<u>Honda K.</u> , et al	Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer: protein characterization and multi-institutional validation.	PLoS ONE	7	e46908	2012
Makuuchi M, <u>Honda K.</u> , et al	Soluble interleukin-6 receptor predicts oesophageal carcinoma response to neoadjuvant chemoradiotherapy.				(in press).
Miyayama A, <u>Honda K.</u> , et al	Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours	Ann Oncol	24	84-90	2013

Sakane A <u>Honda K.</u> , et al	Rab13 small G protein and Junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development.	BiolChem	287	42455-42468	2012
T Kobayashi, et al.	Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventio				in press

