(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103477228 A
(43)申请公布日 2013.12.25

(21)申请号 201280005338.5

(22)申请日 2012.01.13

(30)优先权数据
10-2011-0003423 2011.01.13 KR

(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.07.12

(86)PCT申请的申请数据
PCT/KR2012/000338 2012.01.13

(87)PCT申请的公布数据
WO2012/096545 KO 2012.07.19

(71)申请人 延世大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72)发明人 宋始英　朴秀彬　金善雅

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

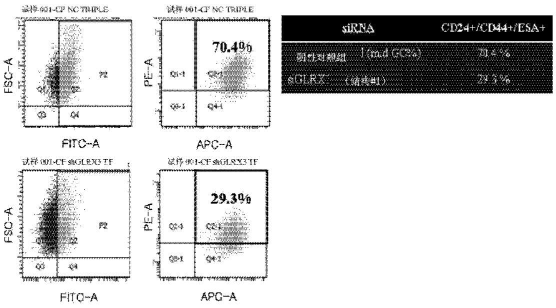
权利要求书3页　说明书29页
序列表2页　附图19页

(54)发明名称

利用胰腺癌癌症干细胞特性的胰腺癌新型生物标记及用途

(57)摘要

本发明涉及胰腺癌干细胞及针对胰腺癌的新的分子标记、标记检测方法及筛选方法。本发明作为从胰腺癌细胞株中发掘的标记，是一种通过胰腺癌干细胞标记的检测，对胰腺癌，尤其是对早期的胰腺癌进行检测的标记。并且，利用本发明的标记，能够对胰腺癌进行准确的诊断及预后分析。



CN 103477228 A

1. 一种胰腺癌癌症干细胞标记检测用试剂盒，其特征在于，包含 ：

（i）寡肽、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、配体、肽核酸或适配体，分别与选自包含基因库接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001077415.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质进行特异性结合，或者

（ii）引物或探针，与编码上述各个蛋白质的多核苷酸相结合。

2. 一种胰腺癌诊断或预后分析用试剂盒，其特征在于，包含 ：

（i）寡肽、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、配体、肽核酸或适配体，分别与选自包含基因库接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001077415.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质进行特异性结合，或者

（ii）引物或探针，与编码上述各个蛋白质的多核苷酸相结合。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰腺癌诊断或预后分析用试剂盒，其特征在于，上述试剂盒为免疫分析用试剂盒。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰腺癌诊断或预后分析用试剂盒，其特征在于，上述试剂盒为荧光分析试剂盒，蛋白质微陈列试剂盒或酶联免疫吸附测定试剂盒。

5. 一种胰腺癌癌症干细胞的检测方法，其特征在于，包括以下步骤 ：

对选自包含人类生物学试样中的基因库接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP001077415.1 的蛋白质、基因库

接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质或对分别编码这些蛋白质的多核苷酸进行检测的步骤。

6. 一种胰腺癌诊断方法，其特征在于，包括以下步骤：

对选自包含人类生物学试样中的基因库接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001077415.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质或对分别编码这些蛋白质的多核苷酸进行检测的步骤。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的胰腺癌诊断方法，其特征在于，上述胰腺癌诊断方法以抗原 - 抗体反应方式实施。

8. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法，其特征在于，上述生物学试样为血液或血清。

9. 一种胰腺癌的预防或治疗用物质的筛选方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤(a)，将包含选自包含基因库接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001077415.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白

质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质的细胞或组织与要所要分析的试样相接触，

步骤（b），检测上述步骤（a）中的一种以上蛋白质或编码这些蛋白质的各个多核苷酸的表达量；

在减少上述一种以上的蛋白质或编码这些蛋白质的各个多核苷酸的高表达的情况下，上述试样被判定为胰腺癌的预防或治疗用物质。

10. 一种癌症的预防或治疗用药剂学组合物，其特征在于，包含谷氧还蛋白 -3 的活性抑制剂或表达抑制剂作为有效成分。

11. 根据权利要求 10 所述的癌症的预防或治疗用药剂学组合物，其特征在于，上述癌症起源于癌症干细胞。

12. 根据权利要求 10 所述的癌症的预防或治疗用药剂学组合物，其特征在于，上述癌症为胰腺癌。

13. 根据权利要求 10 所述的癌症的预防或治疗用药剂学组合物，其特征在于，上述有效成分是包含与谷氧还蛋白 -3 互补的序列的 siRNA 或 shRNA。

14. 一种癌细胞增殖的抑制方法，其特征在于，包括对谷氧还蛋白 -3 活性或表达进行抑制的步骤。

15. 根据权利要求 14 所述的癌细胞增殖的抑制方法，其特征在于，上述癌细胞为癌症干细胞。

16. 一种癌症的预防或治疗方法，其特征在于，包括将谷氧还蛋白 -3 的活性抑制剂或表达抑制剂的药剂学有效量给药到实验对象的步骤。

17. 根据权利要求 16 所述的癌症的预防或治疗方法，其特征在于，上述癌症为胰腺癌。

利用胰腺癌癌症干细胞特性的胰腺癌新型生物标记及用途

【技术领域】

[0001] 本发明涉及利用胰腺癌癌症干细胞特异新型生物标记及其用途。

【背景技术】

[0002] 有报告指出，癌组织与普通脏器一样，也存在维持和再生癌组织的癌症干细胞（cancer stem cells or tumor initiating cells），这癌症干细胞既能干预癌症的初始的同时，对癌症治疗结束后减少的癌细胞的再生方面也进行干预，从而对癌症的复发或转移及抗癌治疗的耐性引发方面产生很深的影响（BB Zhou et al.Nature Reviews Drug Discovery，8:806-823（2009））。因此，为了从根本上诊断及治疗癌症，应关注癌症干细胞，其虽然只占癌组织的极少一部分，但对癌症的发病、维持及复发方面起着核心作用，并且，对癌症干细胞的更多的理解也将有助于用于早期诊断的诊断用标记的研发。

[0003] 胰腺癌是一种 5 年生存率为 1 ～ 4％，平均存活期间达到 5 个月的致命癌症，它在人体癌症中显示最不良的预后。80 ～ 90％患者中，在诊断时，由于是在无法进行期待完全治愈的根治性切除的状态下发现，因此，预后不良，并且，由于治疗主要依赖于抗癌疗法，因此，比任何人体癌症都要迫切需要早期诊断法的研发。

[0004] 到目前为止，对胰腺癌具有疗效的包括 5- 氟尿嘧啶、吉西他滨（gemcitabine）及特罗凯（tarceva）的几种抗癌剂的治疗效果非常让人失望，并且，对抗癌治疗的反应率仅为 15％上下，而此类事实启示，为了提高胰腺癌患者的预后，迫切需要更加有效的早期诊断法及治疗法的研发。

[0005] 本说明书全文中，参照多篇论文及专利文献，并标示了其引用。所引用的论文及专利文献的公开内容，作为参照全部插入到本说明书中，从而更加明确地说明本发明所属技术领域的水平及本发明的内容。

【发明概述】

[0006] 【要解决的问题】

[0007] 本发明者为了发掘一种对胰腺癌癌症干细胞和 / 或胰腺癌进行迅速、准确的分子诊断的新型生物标记，锐意努力研究。其结果，查明所发掘的多个生物标记能够对根据胰腺癌癌症干细胞的生物学特性的诊断，尤其能够对胰腺癌进行早期诊断，并且，也是一种能够判定预后的标记及用于今后治疗目标的标志物，从而完成本发明。

[0008] 因此，本发明的目的在于，提供胰腺癌癌症干细胞的特异生物标记检测用试剂盒。

[0009] 本发明的另一目的在于，提供胰腺癌的诊断或预后分析用试剂盒。

[0010] 本发明的再一目的在于，为了提供胰腺癌的诊断或预后所需的信息，提供检测胰腺癌癌症干细胞标记的方法。

[0011] 本发明的又一目的在于，为了提供胰腺癌的诊断或预后所需的信息，提供检测胰腺癌标记的方法。

[0012] 本发明的还有一个目的在于，提供胰腺癌的预防或治疗用物质的筛选方法。

[0013]　本发明的其他目的在于，提供癌症的预防或治疗用药剂学组合物。

[0014]　本发明的其他目的在于，提供癌细胞的增殖抑制方法。

[0015]　本发明的其他目的在于，提供癌症的预防或治疗方法。

[0016]　本发明的其他目的及优点将通过发明内容、权利要求书及附图变得更加明确。

[0017]　【解决问题的手段】

[0018]　根据本发明的一实施方式，本发明提供一种胰腺癌癌症干细胞标记检测用试剂盒，其包含：(i) 寡肽、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合(chimeric) 抗体、配体、肽核酸(PNA，Peptide nucleic acid) 或适配体(aptamer)，分别与选自包含基因库(Genbank) 接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001077415.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质进行特异性结合，或者(ii) 引物或探针，与编码上述各个蛋白质的多核苷酸相结合。

[0019]　根据本发明的另一实施方式，本发明提供一种胰腺癌诊断或预后分析用试剂盒，其包含：(i) 寡肽、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合(chimeric) 抗体、配体、肽核酸(PNA，Peptide nucleic acid) 或适配体(aptamer)，分别与选自包含基因库接入号码为 AAH14372.2 的蛋白质、基因库接入号码为 CAD89908.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001077415.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAI21475.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653337.1 的蛋白质、基因库接入号码为 CAA27309.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW66403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAQ63403.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAB34148.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH47896.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_001619.1 的蛋白质、基因库接入号码为 2PD5_A 的蛋白质、基因库接入号码为 AAF72885.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_653280.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF83085.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAH70129.1 的蛋白质、基因库接入号码为 1X71_A 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB55338.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW68058.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAF85629.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质进行特异性结合，或者(ii) 引物或探针，与编码上述各个蛋白质的多核苷酸相结合。

[0020] 本发明者为了发掘对胰腺癌癌症干细胞和/或胰腺癌进行迅速、准确的分子诊断的新的生物标记，锐意努力研究。其结果，查明所发掘的多个生物标记能够诊断出胰腺癌癌症干细胞，尤其对胰腺癌进行早期诊断，并且，也是一种能够判定预后的标记。

[0021] 本发明的特征在于，利用通过鉴定出从胰腺癌细胞株中分离的胰腺癌癌症干细胞中进行特异性表达的蛋白质而被查明的新型胰腺癌癌症干细胞标记，能够将胰腺癌在早期进行非常准确的诊断及预后分析。

[0022] 本说明书中的句子“胰腺癌的诊断或预后分析用试剂盒”意味着包含胰腺癌的诊断或预后分析用组合物的试剂盒。因此，上述术语“胰腺癌的诊断或预后分析用试剂盒”能够与“胰腺癌的诊断或预后分析用组合物”相互交替使用或混用。

[0023] 本说明书中的术语“诊断”包括判定特定疾病或疾患的一个客体的感受性(susceptibility)，判定一个客体是否现在具有特定疾病或疾患，判定患有特定疾病或疾患的一个客体的预后(prognosis)(例如，鉴定预转移性或转移性癌症状态，决定癌症的阶段或决定对治疗的癌症的反应性)或治疗指标(therametrics)(例如，为了提供有关疗效的信息，对客体的状态进行监视)。

[0024] 本发明中的术语“胰腺癌(pancreatic cancer)”意味着胰腺细胞中起源的癌症。胰腺癌有很多种类，但由于胰管细胞中产生的胰管腺癌占90％左右，因此，一般来说，胰腺癌意味着胰管腺癌。除此之外，还有囊性癌(囊腺癌)、内分泌肿瘤等。胰腺癌患者中约有5～10％具有遗传易感性，在胰腺癌患者中，存在胰腺癌家族史的情况约为7.8％左右，这与在一般人群中的胰腺癌发生率0.6％相比，频率要高。胰腺癌是一种5年生存率在5％以下的预后非常差的癌症。其理由在于，大部分的癌症都是在进行后才能发现，因此，发现当时，能够进行手术切除的情况在20％以内，且即使肉眼观察到已完全切除，也会因细微的转移而减少生存率的提高，并且，对抗癌剂及放射治疗的反应低。因此，能够提高生存率的最重要的方法是在无症状或在非特异性时，早期发现并进行手术。

[0025] 本发明者确认，在使用本发明的标记时，能够从个体获得对胰腺癌的发病与否方面敏感度及可靠性高的结果。

[0026] 本发明中的术语“诊断用标记，用于诊断的标记或诊断标记(diagnosis marker)”是指将胰腺癌细胞或组织与正常细胞或组织区分地进行诊断的物质，与正常细胞相比，包含在具有胰腺癌的细胞或组织中显示增加形态的多肽或核酸(例如，mRNA等)、脂质、糖脂质、糖蛋白及糖(单糖，二糖，低聚糖等)等有机生物体分子等。对于本发明的目的，上述胰腺癌诊断标记是选自包含基因库接入号码为AAH14372.2的蛋白质、基因库接入号码为CAD89908.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_001077415.1的蛋白质、基因库接入号码为CAI21475.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653337.1的蛋白质、基因库接入号码为CAA27309.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW66403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAQ63403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAB34148.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH47896.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_001619.1的蛋白质、基因库接入号码为2PD5_A的蛋白质、基因库接入号码为AAF72885.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653280.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF83085.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH70129.1的蛋白质、基因库接入号码为1X71_A的蛋白质、基因库接入号码为BAB55338.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW68058.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF85629.1的蛋白质、基因库接入

号码为 BAB70777.1 的蛋白质、基因库接入号码为 NP_109591.1 的蛋白质、基因库接入号码为 AAD22767.1 的蛋白质、基因库接入号码为 BAC04252.1 的蛋白质、基因库接入号码为 EAW47735.1 的蛋白质及基因库接入号码为 EAW97581.1 的蛋白质的组中的一种以上蛋白质，并且，是在胰腺癌癌症干细胞中增加表达的蛋白质。此类标记不仅包含蛋白质，还包含对任一种蛋白质进行编码的 DNA 或 mRNA，优选地，是包含两个以上这些标记的复合标记。

[0027]　本发明中，在胰腺癌的诊断中所使用的句子“蛋白质表达水平的测定”是在生物学试样中，从上述多个基因中确认已表达的蛋白质是否存在和确认表达程度，优选地，意味着利用对上述基因的蛋白质进行特异性结合的抗体，确认蛋白质的量。为此进行的分析方法的例子有蛋白质印迹法、酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）、放射免疫分析（RIA：Radioimmunoassay）、放射免疫扩散法（radioimmunodiffusion）、奥克特洛尼（Ouchterlony）免疫扩散法、火箭（rocket）免疫电泳、组织免疫染色、免疫沉淀法（Immunoprecipitation Assay）、补体结合试验（Complement Fixation Assay）、荧光活化细胞分选（Fluorescence Activated Cell Sorter，FACS）、蛋白芯片（protein chip）等，但本发明的分析方法并不局限于上述例子。

[0028]　本发明中，“抗体”意味着对抗原性部位进行指示的特异性蛋白质分子。对于本发明的目的，抗体意味着对标记蛋白质进行特异性结合的抗体，且均包含多克隆抗体、单克隆抗体及重组抗体。

[0029]　如上所述，由于查明了新型胰腺癌标记蛋白质，因此，利用它来生成抗体可以利用所属领域广泛公知的技术容易地进行制备。

[0030]　多克隆抗体能够通过所属领域广泛公知的方法进行生产，上述方法是将胰腺癌标记蛋白质抗原向动物注射后，从动物身上采血，从而获得包含抗体的血清。此类多克隆抗体能够从山羊、兔子、羊、猴、马、猪、牛、狗等任一动物种类的宿主中制备而得。

[0031]　单克隆抗体能够利用所属领域广泛公知的杂交瘤细胞的方法（hybridoma method）（参照 Kohler 及 Milstein（1976）European Jounral of Immunology6:511-519）或噬菌体抗体库（Clackson et al，Nature，352:624-628，1991；Marks et al，J.Mol.Biol.，222:58，1-597，1991）技术来制备。通过上述方法制备的抗体能够利用凝胶电泳、透析、盐沉淀、离子交换色谱法及亲和色谱法等方法来进行分离、提炼。

[0032]　并且，本发明的抗体既是一种具有 2 个整体长度的轻链及具有 2 个整体长度的重链的完整的形态，也是一种包含抗体分子的功能性片段。抗体分子的功能性片段意味着至少拥有抗原结合功能的片段，其中有 Fab、F（ab’）、F（ab’）2 及 Fv 等。

[0033]　本发明中，与酶的活性型相结合的适配体为寡核酸或肽分子，而适配体的一般内容在 Bock LC et al.，Nature355（6360）：564－6（1992）；Hoppe-Seyler F，Butz K″Peptide aptamers:powerful new tools for molecular medicine″.J Mol Med.78（8）：426－30（2000）；Cohen BA，Colas P，Brent R.″An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library″.Proc Natl Acad Sci USA.95（24）：14272－7（1998）中已有详细的公开。

[0034]　根据本发明的优选实施例，本发明为了诊断胰腺癌癌症干细胞和／或胰腺癌，包含与选自上述蛋白质组中的一种以上蛋白质分别进行特异性结合的寡肽、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合（chimeric）抗体、配体、肽核酸（PNA，Peptide nucleic acid）或适配体

(aptamer)，更优选地，是寡肽、单克隆抗体、多克隆抗体或嵌合抗体，进而优选地，是单克隆抗体或多克隆抗体，最优选地，是单克隆抗体。

[0035] 本发明中，优选地，上述抗体是与微观粒子(micro particle)相结合的抗体(conjugated antibody)。并且，优选地，上述微观粒子是有色乳胶(colored latex)或胶体金粒子(colloidal gold particle)。本发明中，上述抗体可以是能够测定基于对上述20个标记的公知的mRNA基因进行编码的蛋白质的表达水平的任何抗体，但优选地，上述试剂盒是免疫分析(immunoassay)用试剂盒，最优选地，上述试剂盒是流式荧光分析试剂盒、蛋白质微陈列试剂盒或酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0036] 上述流式荧光分析试剂盒、蛋白质微陈列试剂盒或酶联免疫吸附测定试剂盒包含针对选自上述蛋白质组中的任一种以上的蛋白质的多克隆抗体及单克隆抗体以及对结合有标志物的上述多克隆抗体和单克隆抗体的第二抗体。

[0037] 本发明中，试剂盒的种类的例子有免疫层析试纸条试剂盒、流式荧光分析试剂盒、蛋白质微陈列试剂盒、酶联免疫吸附测定试剂盒或免疫斑点试剂盒等，但是，在本发明中能够使用的试剂盒的种类并不局限于上述例子。

[0038] 上述试剂盒为了执行酶联免疫吸附测定，还能追加包含所需的必要因素。酶联免疫吸附测定试剂盒包含对标记蛋白质的特异抗体。抗体作为一种对各个标记蛋白质的特异性及亲和性高，对其他蛋白质几乎没有交叉反应性的抗体，是单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。并且，酶联免疫吸附测定试剂盒能够包含对于对照组蛋白质特异的抗体。除此之外，酶联免疫吸附测定试剂盒还能包含对相结合的抗体进行检测的试剂，例如，标志的第二抗体、发色团(chromophores)、酶(例如，与抗体相结合)及能够与其基质或抗体相结合的其他物质等。

[0039] 并且，上述试剂盒为了同时分析复合标记，还能追加包含执行蛋白质微陈列所需的必要因素。微陈列试剂盒包含在固体上相结合的标记蛋白质的特异抗体。抗体作为一种对各个标记蛋白质的特异性及亲和性高，对其他蛋白质几乎没有交叉反应性的抗体，是单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。并且，蛋白质微陈列试剂盒能够包含对于对照组蛋白质特异的抗体。除此之外，蛋白质微陈列试剂盒还能包含对相结合的抗体进行检测的试剂，例如，标志的第二抗体、发色团、酶(例如，与抗体相融合)及能够与其基质或抗体相结合的其他物质等。利用蛋白质微陈列分子分析试样的方法是从试样中分离蛋白质，并将分离的蛋白质与蛋白芯片进行杂交，从而形成抗原-抗体复合体，并对其进行读取，来确认蛋白质的存在或表达程度，从而提供胰腺癌的诊断所需的信息。

[0040] 流式荧光分析(Luminex Assay)是在未对少量(10～20μl)的患者试样进行预处理的状态下，能够同时测定最多100种分析物(analyte)的高通量(high-throughput)定量分析方法，上述方法由于灵敏度良好(pg单位)，能够在较短时间内进行定量(3～4小时)，因此，是一种能够代替现有的酶联免疫吸附测定(ELISA)或酶联免疫斑点法(ELISPOT)的分析方法。上述流式荧光分析(Luminex Assay)作为在96孔板(well plate)的各个孔中，能够同时分析100种以上的生物学试样的多路复用荧光微孔板(multiplexed fluorescent microplate)分析方法，使用两种激光探测仪(laser detector)进行实时的信号传递，从而对区分100个以上的不同颜色组的聚苯乙烯珠(polystyrene bead)进行定量。上述100个珠以如下方法进行区别。一侧是由红色荧光珠(red fluorescence bead)分成十个步

骤以上，另一侧是由橙色荧光珠（orange fluorescence bead）分成十个步骤，来显示强度（intensity）的差异，且它们之间的多个珠（bead）按分别不同的比例混合红色（red）和橙色（orange）的比例（ratio），从而在整体上构成 100 个颜色编码珠集（color-coded bead set）。并且，各个珠上附着着所要分析的蛋白质的抗体，因此，通过利用它的免疫抗体反应也能进行蛋白质的定量。该试样使用两个激光（laser）进行分析，即，一个激光（laser）检测（detection）珠（bead），从而获得识别号，而另一个激光检测与黏附在珠上的抗体进行反应的试样内的蛋白质。因此，能够在一个孔中同时分析 100 种生物体内的蛋白质。此分析的优点在于，能够以 15μl 左右的少量试样也能进行检测。

[0041] 本发明的能够执行流式荧光分析的荧光试剂盒包含对标记蛋白质特异的抗体。抗体作为一种对各个标记蛋白质的特异性及亲和性高，对其他蛋白质几乎没有交叉反应性的抗体，是单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。并且，荧光试剂盒能够包含对于对照组蛋白质特异的抗体。除此之外，荧光试剂盒还能包含对相结合的抗体进行检测的试剂，例如，标志的第二抗体、发色团、酶（例如，与抗体相接合）及能够与其基质或抗体相结合的其他物质等。上述抗体可以是与微观粒子（micro particle）相结合的抗体（conjugated antibody），且上述微观粒子也可以是有色乳胶（colored latex）或胶体金粒子（colloidal gold particle）。

[0042] 本发明的胰腺癌诊断或预后分析用试剂盒中，包括上述胰腺癌诊断用免疫层析试纸条的胰腺癌诊断试剂盒是一种为了执行在 5 分钟内获得分析结果的快速测试（Rapid test），包含所需的必要因素为特征的诊断试剂盒。优选地，上述免疫层析试纸条包括（a）吸收试样的样品垫（sample pad）；（b）与试样内的上述 20 个基因组中选择的任一种以上的基因蛋白质相结合的结合垫（conjugate pad）；（c）处理了试线（test line）及控制线（control line）的测试膜（test membrane），上述试线包含上述 20 个基因组中选择的任一种以上的基因蛋白质的单克隆抗体，（d）吸收剩余试样的吸收垫（absorption pad）；及（e）支撑体。并且，包含免疫层析试纸条（Immunochromatographic strip）的快速测试试剂盒包含对标记蛋白质的特异抗体。上述抗体作为一种对各个标记蛋白质的特异性及亲和性高，对其他蛋白质几乎没有交叉反应性的抗体，是单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。并且，快速测试试剂盒能够包含对对照组蛋白质特异的抗体。除此之外，快速测试试剂盒还能包含对相结合的抗体进行检测的试剂，例如，固定有特异抗体和第二抗体的硝酸纤维素膜、与结合了抗体的珠相结合的膜、在吸收垫和样品垫等的诊断中所需的其他物质等。

[0043] 优选地，本发明中基于免疫斑点分析的蛋白质表达水平的测定应包括以下步骤：（a）膜上打点（dotting）生物学试样的步骤，（b）将对选自包含上述 20 个基因的组中的任一种以上的基因蛋白质特异的抗体与上述打点的膜进行反应的步骤，以及（c）在上述进行反应的膜中添加接合有标志体的第二抗体，并进行发色的步骤；优选地，上述酶联免疫吸附测定分析方法包括以下步骤：（a）将对选自具有上述 20 个标记的碱基序列的基因组中的任一种以上的基因蛋白质特意的抗体 1 吸附于固相体的步骤，（b）附着于上述固相体的抗体 1 和胰腺癌疑似患者的生物学试样相接触，来形成抗原 - 抗体复合体的步骤，（c）处理对通过具有选自结合有标志物的上述 20 个标记的碱基序列的基因组中的 1 种以上基因进行编码的蛋白质特异的抗体 2，来与上述复合体进行结合的步骤，以及（d）检测上述标志物，来测定蛋白质的浓度的步骤；优选地，上述蛋白质微陈列分析方法包括以下步骤：（a）将对选

自由上述20个标记组成的基因组中的1个以上基因蛋白质特异的多克隆抗体固定于芯片的步骤，(b)将上述固定的多克隆抗体1与胰腺癌疑似患者的生物学试样相接触，来形成抗原－抗体复合体的步骤，(c)处理对通过具有选自结合有标志物的上述20个标记的碱基序列的基因组中的任一种以上基因进行编码的蛋白质特异的单克隆抗体，来与上述复合体进行结合的步骤，以及(d)检测上述标志物，来测定蛋白质的浓度的步骤。

[0044] 通过上述分析方法，能够对正常对照组中的抗原－抗体复合体的形成量和胰腺癌疑似患者中的抗原－抗体复合体的形成量进行比较，并在胰腺癌标记基因中判断作为蛋白质的重要的表达量是否增加，从而诊断胰腺癌疑似患者的实际胰腺癌是否发病。

[0045] 本发明中的术语“抗原－抗体复合体”意味着胰腺癌标记蛋白质和对此特异的抗体的结合物，抗原－抗体复合体的形成量能够通过检测标签(detection label)的信号的大小进行定量测定。

[0046] 此类检测标签能够选自包含酶、荧光物、配体、发光物、微观粒子(microparticle)、氧化还原分子及放射性同位素的组中，但并不局限于此。作为检测标签，在使用酶的情况下，能够使用的酶有β－葡糖苷酸酶、β-D-葡萄糖苷酶、β-D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶、己糖激酶和焦磷酸化酶(GDPase)、核糖核酸酶(RNase)、葡萄糖氧化酶和荧光素酶、磷酸激酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶、谷草转氨酶、磷酸苯酚丙酮酸脱羧酶及β－内酰胺酶等，且并不局限于此。荧光物包含荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛及荧光胺等，且并不局限于此。配体包含生物素衍生物等，且并不局限于此。发光物包含吖啶酯、虫荧光素、荧光素酶等，且并不局限于此。微观粒子包含胶态金、有色乳胶等，且并不局限于此。氧化还原分子包含二茂铁、钌络合物、紫罗碱、醌、Ti离子、Cs离子、二酰亚胺、1,4-苯醌、对苯二酚、K4W (CN) 8、[Os (bpy) 3]2+、[RU (bpy) 3]2+及[MO (CN) 8]4-等，且并不局限于此。放射性同位素包含3H、14C、32P、35S、36Cl、51Cr、57Co、58Co、59Fe、90Y、125I、131I及186Re等，且并不局限于此。

[0047] 优选地，蛋白质表达水平的测定利用酶联免疫吸附测定方法。酶联免疫吸附测定包括直接酶联免疫吸附测定、间接酶联免疫吸附测定、直接夹心酶联免疫吸附测定及间接夹心酶联免疫吸附测定等多种酶联免疫吸附测定方法。上述直接酶联免疫吸附测定利用对附着于固体支撑体的抗原进行鉴定的标志的抗体，上述间接酶联免疫吸附测定利用在对附着于固体支撑体的抗原进行鉴定的抗体的复合体中，对捕获抗体进行鉴定的标志的抗体，上述直接夹心酶联免疫吸附测定利用附着于固体支撑体的抗体和抗原的复合体中鉴定抗原的标志的另一抗体，上述间接夹心酶联免疫吸附测定利用与另一抗体进行反应后，鉴定此抗体的标志的第二抗体，上述另一抗体在附着于固体支撑体的抗体和抗原的复合体中鉴定抗原。更优选地，通过夹心酶联免疫吸附测定方法进行检测，上述夹心酶联免疫吸附测定方法是在固体支撑体附着抗体，对试样进行反应后，附着对抗原－抗体复合体的抗原进行鉴定的标志的抗体，从而进行酶发色，或者附着对鉴定抗原－抗体复合体的抗原的抗体进行标志的第二抗体，从而进行酶发色。确认胰腺癌标记蛋白质和抗体的复合体形成程度，从而能够确认胰腺癌是否发病。

[0048] 并且，优选地，利用蛋白质印迹法，其利用对上述胰腺癌标记的一种以上抗体。在试样中分离整体蛋白质并进行电泳，来将蛋白质按大小进行分离之后，向硝酸纤维素膜移

动，从而与抗体进行反应。所生成的抗原－抗体复合体的量通过利用标志的抗体进行确认的方法，对基于基因的表达生成的蛋白质的量进行确认，从而确认胰腺癌是否发病。上述检测方法通过调查在对照组中的标记基因的表达量和在产生胰腺癌的细胞中的标记基因的表达量的方法形成。mRNA 或蛋白质水平能够以上述的标记蛋白质的绝对（例：μg/ml）或相对（例：信号的相对强度）差异显示。

[0049] 并且，优选地，应实施免疫组织染色，其利用对上述胰腺癌标记的一种以上抗体。采取及固定疑似正常胰脏组织及胰腺癌的组织后，利用所属领域广泛公知的方法制备石蜡包埋块。将这些制备成多个 μm 厚度的切片，并贴在载玻片后，通过在它和上述抗体中选择的一个及公知的方法进行反应。之后，清洗未进行反应的抗体，且以上述检测标签中的一个进行标志，从而在显微镜上读取抗体是否标志。

[0050] 并且，优选地，利用蛋白芯片，上述蛋白芯片由上述胰腺癌标记的一个以上的抗体在基板上的指定位置排列，从而进行高密度的固定化。利用蛋白芯片对试样进行分析的方法能够通过在试样中分离蛋白质，并将分离的蛋白质与蛋白芯片进行杂交，来形成抗原－抗体复合体，并对此进行读取，来确认蛋白质的存在或表达程度，从而确认胰腺癌是否发病。

[0051] 本发明的生物学试样意味着组织、细胞、血液、血清、血浆、唾液、脑脊液或尿，优选地，意味着血液或血清，最优选地，意味着血清。

[0052] 本发明中，用于诊断胰腺癌的句子“多核苷酸的测定”意味着作为在生物学试样中确认对本申请的蛋白质标记进行编码的多核苷酸是否存在和确认表达程度的过程，对多核苷酸的量进行测定。对此的分析方法包括逆转录－聚合酶链反应（RT-PCR）、竞争性逆转录－聚合酶链反应（Competitive RT-PCR）、实时逆转录－聚合酶链反应（Real-time RT-PCR）、核糖核酸酶保护测定（RPA；RNase protection assay）、印迹杂交（Northern blotting）及 DNA 芯片等，但并不局限于此。

[0053] 本发明中用作标记的，对上述蛋白质组中选择的各个蛋白质标记进行编码的碱基序列能够包含与其序列具有同质性的碱基序列。

[0054] 优选地，本发明中的多核苷酸意味着 DNA 或 mRNA 的片段。

[0055] 本发明的诊断用试剂盒中所利用的探针或引物具有与编码上述各个蛋白质的多核苷酸序列及多核苷酸序列互补的序列。

[0056] 本发明的“引物”意味着以具有短的自由 3 末端羟基的核酸序列形成互补性的模板（template）和碱基对，并具有用于模板链复制的始点功能的短核酸序列。引物在适当的缓冲溶液及温度中用作聚合反应（即，DNA 聚合酶或逆转录酶）的试剂及不同的 4 种核苷三磷酸的存在下，能够公开 DNA 合成。本发明的引物是一种作为对各个标记基因的特异引物，具有 7 个至 50 个核苷酸序列的正义及反义核酸。引物能够混入作为 DNA 合成的始点的不会变化引物基本性质的附加特征。

[0057] 本发明的引物能够使用亚磷酰胺固体支撑体方法或其他广为公知的方法进行化学合成。此类核酸序列也能利用所属领域公知的很多方法变形。此类变形的非限制性例子包括甲基化，“覆盖”，作为天然核苷酸的一种以上同族体的置换及核苷酸之间的变形，例如，向不带电的连接体（例：甲基磷酸酯、磷酸三脂、亚磷酰胺及氨基甲酸盐等）或带电的连接体（例：磷硫酯、二硫代磷酸酯）的变形。核酸能够包含进行一个以上的附加性共轭的残

基，例如，蛋白质(例：核酸酶、毒素、抗体、信号肽及聚赖氨酸等)、插入剂(例：吖啶、补骨脂素等)、螯合剂(例：金属、放射性金属、铁、氧化金属等)及烷化剂。本发明的核酸序列还能利用直接或间接提供信号的标志进行变形，而上述信号是一种能够检测到的信号。标志的例子有放射性同位素、荧光性分子及生物素等。

[0058] 本说明书中所使用的术语“探针”意味着自然的或变形的单体或连接的线性低聚物，并包含脱氧核糖核酸及核糖核酸，也能够与靶核苷酸序列进行特异杂交，同时，也是自然存在或人为合成的。优选地，本发明的探针为单链，且是寡核苷酸。

[0059] 利用探针的情况下，将探针与cDNA分子进行杂交。在本发明中，适合的杂交条件能够通过最优化的程序以一系列的过程来决定。此类程序为了树立在研究室中使用的协议，由所属领域技术人员以一系列的过程实施。例如，温度、成分的浓度、杂交及清洗时间、缓冲液的成分及它们的pH及离子强度等条件依存于探针的长度及GC量及靶核苷酸序列等多种因子。用于杂交的详细条件能够在Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)；及M.L.M.Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc.N.Y.(1999)中确认。例如，上述严格条件中的高严格条件意味着在0.5M NaHPO4，7%十二烷基硫酸钠(SDS，sodium dodecyl sulfate)，1mM乙二胺四乙酸(EDTA，Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)中以65℃的条件进行杂交，并在0.1×标准枸橼酸盐水(SSC，standard saline citrate)/0.1% SDS中以68℃的条件进行清洗。或者，高严格条件意味着在6×SSC/0.05%焦磷酸钠中以48℃的条件进行清洗。低严格条件意味着例如，在0.2×SSC/0.1% SDS中以42℃的条件进行清洗。

[0060] 根据本发明的另一实施方式，本发明为了提供胰腺癌的诊断或预后所需的信息，提供一种检测胰腺癌干细胞标记的方法，其对选自包含人类生物学试样中的基因库接入号码为AAH14372.2的蛋白质、基因库接入号码为CAD89908.1的蛋白质、基因库接入号码为NP001077415.1的蛋白质、基因库接入号码为CAI21475.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653337.1的蛋白质、基因库接入号码为CAA27309.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW66403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAQ63403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAB34148.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH47896.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_001619.1的蛋白质、基因库接入号码为2PD5_A的蛋白质、基因库接入号码为AAF72885.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653280.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF83085.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH70129.1的蛋白质、基因库接入号码为1X71_A的蛋白质、基因库接入号码为BAB55338.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW68058.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF85629.1的蛋白质、基因库接入号码为BAB70777.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_109591.1的蛋白质、基因库接入号码为AAD22767.1的蛋白质、基因库接入号码为BAC04252.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW47735.1的蛋白质及基因库接入号码为EAW97581.1的蛋白质的组中的一种以上蛋白质或对分别编码这些蛋白质的多核苷酸进行检测的步骤。

[0061] 根据本发明的另一实施方式，本发明为了提供胰腺癌的诊断或预后所需的信息，提供一种检测胰腺癌标记的方法，其对选自包含人类生物学试样中的基因库接入号码为AAH14372.2的蛋白质、基因库接入号码为CAD89908.1的蛋白质、基因库接入号码

为NP_001077415.1的蛋白质、基因库接入号码为CAI21475.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653337.1的蛋白质、基因库接入号码为CAA27309.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW66403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAQ63403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAB34148.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH47896.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_001619.1的蛋白质、基因库接入号码为2PD5_A的蛋白质、基因库接入号码为AAF72885.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653280.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF83085.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH70129.1的蛋白质、基因库接入号码为1X71_A的蛋白质、基因库接入号码为BAB55338.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW68058.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF85629.1的蛋白质、基因库接入号码为BAB70777.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_109591.1的蛋白质、基因库接入号码为AAD22767.1的蛋白质、基因库接入号码为BAC04252.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW47735.1的蛋白质及基因库接入号码为EAW97581.1的蛋白质的组中的一种以上蛋白质或对分别编码这些蛋白质的多核苷酸进行检测的步骤。

[0062] 用于测定由上述蛋白质组组成的组中选择的蛋白质或对这些蛋白质分别进行编码的多核苷酸的表达水平的分析方法能够使用所属领域公知的方法，其中包括，例如，逆转录－聚合酶链反应、竞争性逆转录－聚合酶链反应、实时逆转录－聚合酶链反应、核糖核酸酶保护分析法（RNase protection assay）、印迹杂交及DNA芯片等，但并不局限于此。

[0063] 检测具有癌症干细胞的胰腺癌诊断标记的本发明的方法通过以下方法执行，即，从人类的胰脏细胞试样中测定由上述多个蛋白质组成的组中选择的蛋白质或对这些蛋白质分别进行编码的多核苷酸的表达水平，并将上述测定的表达水平与正常对照组试样的蛋白质或核苷酸的表达水平进行比较。

[0064] 检测本发明的具有癌症干细胞的胰腺癌诊断标记的方法，在利用胰腺癌患者的细胞试样来执行的情况下，能够判断采取试样的患者的胰腺癌预后。

[0065] 上述正常对照组试样是指从没有患癌症的人类身上采集的不包含胰脏细胞、无癌症的正常胰脏细胞及癌症干细胞的早已确认的试样，例如，包括在非粘结性培养条件下确认不形成球的癌症干细胞的胰腺癌细胞株试样或确认为非恶性的胰腺癌患者的癌症以外的细胞试样等，但并不局限于此。在上述正常对照组试样内，能使用如上所述的相同的方法来测定由上述多个蛋白质组成的蛋白质组中选择的一种以上的蛋白质或对这些蛋白质进行编码的各个多核苷酸的表达水平。

[0066] 通过上述多个检测方法能够比较在正常对照组中的由上述多个蛋白质组成的蛋白质中选择的一种以上的蛋白质或对此进行编码的各个多核苷酸的表达量和作为癌症干细胞检测对象的胰腺癌患者中的选自由上述多个蛋白质组成的蛋白质中的一种以上的蛋白质或对此进行编码的各个多核苷酸表达量，并判断上述表达量是否有显著的变化，由此可诊断胰腺癌患者试样内是否包含癌症干细胞。

[0067] 具体而言，患者试样中的由上述多个蛋白质组成的蛋白质中选择的一种以上的蛋白质或对此进行编码的各个多核苷酸表达水平占正常对照组试样中的由上述多个蛋白质组成的蛋白质中选择的一种以上的蛋白质或对此进行编码的各个多核苷酸表达水平的150％以上的情况下，判断为包含胰腺癌癌症干细胞。

[0068] 根据本发明的另一实施方式，本发明提供一种胰腺癌的预防或治疗用物质的筛选

方法，其包括以下步骤：

[0069] 步骤(a)，将包含选自包含基因库接入号码为AAH14372.2的蛋白质、基因库接入号码为CAD89908.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_001077415.1的蛋白质、基因库接入号码为CAI21475.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653337.1的蛋白质、基因库接入号码为CAA27309.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW66403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAQ63403.1的蛋白质、基因库接入号码为AAB34148.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH47896.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_001619.1的蛋白质、基因库接入号码为2PD5_A的蛋白质、基因库接入号码为AAF72885.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_653280.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF83085.1的蛋白质、基因库接入号码为AAH70129.1的蛋白质、基因库接入号码为1X71_A的蛋白质、基因库接入号码为BAB55338.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW68058.1的蛋白质、基因库接入号码为BAF85629.1的蛋白质、基因库接入号码为BAB70777.1的蛋白质、基因库接入号码为NP_109591.1的蛋白质、基因库接入号码为AAD22767.1的蛋白质、基因库接入号码为BAC04252.1的蛋白质、基因库接入号码为EAW47735.1的蛋白质及基因库接入号码为EAW97581.1的蛋白质的组中的一种以上蛋白质的细胞或组织与要所要分析的试样相接触，

[0070] 步骤(b)，检测上述步骤(a)中的一种以上蛋白质或编码这些蛋白质的各个多核苷酸的表达量；在减少上述一种以上的蛋白质或编码这些蛋白质的各个多核苷酸的高表达的情况下，上述试样被判定为胰腺癌的预防或治疗用物质。

[0071] 本发明者发现由上述多个蛋白质组成的组中选择的蛋白质或对此进行编码的各个多核苷酸的情况下，与一般的胰脏癌细胞不同，在胰腺癌癌症干细胞内的多核苷酸的表达有着显著的增加。与一般的胰脏癌细胞不同，靶蛋白或对此进行编码的多核苷酸的表达只在胰腺癌癌症干细胞内具有特异的显著增加是表示它们对癌症干细胞的生存而言是必要的因素，并且，阻断它们的表达的物质会引导对癌症干细胞的成长的抑制及凋亡，从而判定为有助于胰腺癌的根本治疗的物质，即，胰腺癌的治疗剂。

[0072] 通过上述本发明的筛选方法来鉴定的胰腺癌治疗剂不仅将占癌组织的大部分的普通癌细胞作为靶，也将占癌组织的极少一部分，却对癌症的发病和维持、复发起着核心作用的胰腺癌癌症干细胞作为靶，因此使胰腺癌的根本性治疗成为可能。

[0073] 根据本发明的又一实施方式，本发明提供一种癌症的预防或治疗用药剂学组合物，其包含谷氧还蛋白-3（GLRX3，Glutaredoxin-3）的活性抑制剂或表达抑制剂作为有效成分。

[0074] 根据本发明的优选实施例，本发明的组合物是一种药剂学组合物，其包含(a)上述本发明的谷氧还蛋白-3的活性抑制剂或表达抑制剂的药剂学有效量；及(b)药剂学上接受的载体。本说明书中的术语“药剂学有效量”意味着达成上述谷氧还蛋白-3的活性抑制剂或表达抑制剂的功效或活性的充分的量。

[0075] 本发明的组合物由药剂学组合物制备的情况下，本发明的药剂学组合物包含药剂学上接受的载体。本发明的药剂学组合物中包含的药剂学上接受的载体是在制剂时通常利用的，其包含乳糖、葡萄糖、蔗糖，山梨糖醇，甘露糖醇，淀粉，阿拉伯树胶，磷酸钙，藻酸盐，明胶，硅酸钙，微晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，纤维素，水，糖浆，甲基纤维素，羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁及矿物油等，但并不局限于此。本发明的药剂学组

合物除了上述成分之外，还能追加包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、悬浮剂及保存剂等。适合的药剂学上接受的载体及制剂在 emington's Pharmaceutical Sciences（19th ed.，1995）中有详细记载。

[0076] 本发明的药剂学组合物能够进行口服给药或非口服给药，而在进行非口服给药的情况下，能够通过静脉注射、皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、经皮给药、粘膜给药及点眼给药等方式给药。优选地，适用非口服给药方式。

[0077] 本发明的药剂学组合物的适合的给药剂量会根据制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病态、饮食、给药时间、给药途径、排泄速度及反应灵敏度等因素，能够下多种处方。本发明的药剂学组合物的一般给药剂量以成人为准，在 0.0001 ～ 10000mg/kg 范围内。

[0078] 本发明的药剂学组合物根据所属领域技术人员能够容易实施的方法，利用药剂学上接受的载体和／或稀释剂进行制剂化，从而以单位容量形态制备或装在大容量容器内进行制备。此时，剂型可以是油或水性介质中的溶液、悬浮液、糖浆或乳化液形态，或是浸膏剂、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂的形态，且还能包含分散剂或稳定剂。

[0079] 本说明书中所利用的谷氧还蛋白 -3 活性抑制剂或谷氧还蛋白 -3 表达抑制剂会减少用于表达作为癌症干细胞标记的 CD24、CD44 及 ESA 的细胞，且会减少作为癌症干细胞特征的增殖率及移动能力。并且，减少球体的形成，从而最终能够抑制视为癌症发生的初期现象的癌症干细胞的增殖。

[0080] 本发明中所利用的谷氧还蛋白 -3 的活性抑制剂是与谷氧还蛋白 -3 进行特异性结合的抗体或肽，小分子量的化合物或天然提取物。

[0081] 本发明中能够利用的，与谷氧还蛋白 -3 进行特异性结合的具有活性的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体，优选为单克隆抗体。针对谷氧还蛋白 -3 的抗体能够通过所属领域通常实施的方法，例如，熔融法（Kohler and Milstein，European Journal of Immunology，6:511-519（1976））、重组 DNA 法（美国专利第 481656 号）或噬菌体抗体库（Clackson et al，Nature，352:624-628（1991）及 Marks et al，J.Mol. Biol.，222:58，1-597（1991））进行制备。对抗体制备的一般过程已在 Harlow，E. and Lane，D.，Using Antibodies:A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Press，New York，1999；Zola，H.，Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques，CRC Press，Inc.，Boca Raton，Florida，1984 及 Coligan，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY，Wiley/Greene，NY，1991 中有着详细记载，且上述多个文献作为参照插入本说明书中。例如，产生单克隆抗体的杂交瘤细胞的制备是将不凋亡化的细胞株与抗体－产生淋巴球进行融合来组成，且在此过程中所需的技术是所属领域技术人员公知的，因此，能够容易地实施。多克隆抗体是将谷氧还蛋白 -3 蛋白质抗原向适合的动物注射，并从该动物中收集抗血清后，利用公知的亲和性（affinity）技术，从抗血清中分离抗体后获得。

[0082] 与谷氧还蛋白 -3 进行特异性结合，从而抑制谷氧还蛋白 -3 活性的肽能够通过所属领域公知的通常的方法，例如，噬菌体显示方式获得（Smith GP，"Filamentous fusion phage:novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface".Science228（4705）:1315－1317（1985）；Smith GP，Petrenko VA，"Phage display".Chem.Rev.97（2）:391－410（1997））。

[0083] 抑制谷氧还蛋白 -3 活性的小分子量的化合物能够通过后述的筛选方法容易地获得。

[0084] 本发明中所利用的谷氧还蛋白 -3 表达抑制剂是与谷氧还蛋白 -3 基因进行特异性结合的反义寡核苷酸或 siRNA 寡核苷酸或 shRNA 寡核苷酸。

[0085] 本说明书中的术语“反义寡核苷酸”意味着含有与特定 mRNA 的序列互补的核酸序列的 DNA 或 RNA 或它们的衍生物，且与 mRNA 内的互补性序列相结合，从而起到阻碍 mRNA 的蛋白质翻译的作用。反义序列意味着与谷氧还蛋白 -3 互补并与谷氧还蛋白 -3mRNA 相结合的 DNA 或 RNA 序列，并能够阻碍谷氧还蛋白 -3mRNA 的翻译，向细胞质内的易位（translocation）、成熟（maturation）或其他所有整体生物学功能的必要活性。反义核酸的长度为 6 ～ 100 碱基，优选为 8 ～ 60 碱基，更优选为 10 ～ 40 碱基。

[0086] 上述反义核酸为了增进功效，能够在一个以上的碱基、糖或骨架（backbone）的位置变形（De Mesmaeker et al.，Curr Opin Struct Biol.，5（3）：343-55（1995））。核酸骨架能够变形为磷硫酯、磷酸三酯、甲基磷酸、单链烷基、环烷基、单链杂原子、杂环糖之间的结合等。并且，反义核酸能够包含一个以上的置换的糖组份（sugar moiety）。反义核酸能够包含变形的碱基。变形的碱基包含次黄嘌呤、6- 甲基腺嘌呤、5-me 嘧啶（尤其是 5- 甲基胞嘧啶）、5- 羟甲基胞嘧啶（HMC）、糖基 HMC、龙胆二糖基 -HMC（gentobiosyl HMC）、2- 氨基腺嘌呤、2- 硫脲嘧啶、2- 硫代胸腺嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 羟甲基尿嘧啶、8- 氮鸟嘌呤、7- 氮杂鸟嘌呤、N6 腺嘌呤、2，6- 二氨基嘌呤等。并且，本发明的反义核酸虽然能够提高上述反义核酸的活性及细胞的附着性，但也能与一个以上的组份（moiety）或结合物（conjugate）进行化学结合。之中包含胆固醇部分、胆固醇基部分、胆酸、硫醚、硫代胆固醇、脂族链、磷脂、聚胺、聚乙二醇链、金刚烷酯、棕榈基部分、十八胺、乙胺 - 碳酰基 - 羟胆固醇部分等脂溶性部分，但并不局限于此。包含脂溶性部分的寡核苷酸和制备方法在本发明的技术领域中已公开（美国专利第 5138045 号，第 5218105 号及第 5459255 号）。上述变形的核酸能够增加核酸酶的稳定性，并增加反义核酸和靶 mRNA 之间的结合亲和力。

[0087] 反义寡核苷酸的情况下，以通常的方法在试管中合成后向生物体内给药，或使反义寡核苷酸在生物体内合成。在试管中合成反义寡核苷酸的一例是利用 RNA 聚合酶 I。反义 RNA 在生物体内合成的一例是由识别部位（MCS）的起源使用反方向的载体，从而使反义 RNA 进行转录。优选地，使此类反义 RNA 使序列内存在翻译终止密码子，从而不能翻译成肽序列。

[0088] 本发明中能够利用的反义寡核苷酸的设计参照序列目录第一序列的核苷酸序列，从而根据所属领域公知的方法，能够容易制备（Weiss，B.（ed.）：Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA：Novel Pharmacological and Therapeutic Agents，CRC Press，Boca Raton，FL，1997；Weiss，B.，et al.，Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. Cell. Mol. Life Sci.，55：334-358（1999））。

[0089] 根据本发明的优选实施例，谷氧还蛋白 -3 的表达抑制剂是包含与谷氧还蛋白 -3 基因互补的序列的 siRNA 或 shRNA。

[0090] 本发明中，术语“siRNA”意味着对 RNA 的妨碍或基因移植起到介质作用的核酸分子（参照：WO00/44895，WO01/36646，WO99/32619，WO01/29058，WO99/07409 及 WO00/44914）。

siRNA 由于能够抑制靶基因的表达，因此，作为有效的基因敲落方法或基因治疗方法提供。siRNA 虽然在植物、虫子、果蝇及寄生虫中首次发现，但最近，研发 / 利用 siRNA，从而应用于哺乳类细胞的研究中。

[0091] 本发明的 siRNA 分子能够由正义链（与 p53mRNA 序列相对应（corresponding）的序列）和反义链（与 p53mRNA 序列互补的序列）位于相反的方向，从而形成双链的结构。并且，根据另一实施例，本发明的 siRNA 分子能够具有自补（self-complementary）正义链及反义链的单链结构。

[0092] siRNA 不会局限于 RNA 之间配对的双链 RNA 部分完全成双，而是包含由错配（所对应的碱基并非互补）、隆起（一侧链没有对应的碱基）等引起的无法成双的部分。整体长度为 10 ～ 100 碱基，优选地，为 15 ～ 80 碱基，更优选地，为 20 ～ 70 碱基。

[0093] siRNA 末端结构只要是能够通过 RNAi 的效果来抑制 p53 基因的表达的，钝性（blunt）末端或粘性（cohesive）末端都可以。粘性末端结构是 3'－末端突出结构和 5'－末端突出结构都可以。

[0094] 本发明的 siRNA 分子能够具有在自补（self-complementary）正义链及反义链之间插入短的核苷酸序列（例如，约 5 ～ 15nt）的形态，在此情况下，基于核苷酸序列的表达而形成的 siRNA 分子通过分子内的杂交形成发夹结构，且在整体上形成茎和环结构。上述茎和环结构在体外或体内进行处理，从而生成可介于 RNAi 的活性 siRNA 分子。

[0095] 根据本发明的优选实施例，上述 siRNA 是对序列表第 1 位的谷氧还蛋白 -3 基因的第 591 至第 616 核苷酸互补的序列，是序列目录第 2 序列及第 3 序列中记载的 siRNA，且上述 shRNA 是对序列表第 1 位的谷氧还蛋白 -3 基因的第 496 至第 516 核苷酸互补的序列，是序列目录第 4 序列中记载的 shRNA。

[0096] 本说明书的术语“作为有效成分包含”意味着包含达成下述谷氧还蛋白 -3（Glutaredoxin-3）的活性抑制剂或表达抑制剂的功效或活性所需的充分的量。本发明的组合物中包含的谷氧还蛋白 -3（Glutaredoxin-3）的活性抑制剂或表达抑制剂的定量上限能够由所属领域技术人员在适当的范围内选择并实施。

[0097] 本发明的癌症预防或治疗用药剂学组合物，优选地，上述癌症是起源于癌症干细胞的癌症，更优选地，上述癌症是胰腺癌。

[0098] 根据本发明的另一实施方式，本发明提供癌症细胞的增殖抑制方法，上述方法包括抑制谷氧还蛋白 -3（Glutaredoxin-3）的活性或表达的步骤。

[0099] 优选地，上述癌细胞为癌症干细胞。

[0100] 根据本发明的另一实施方式，本发明提供癌症的预防或治疗方法，上述方法包括将谷氧还蛋白 -3（Glutaredoxin-3）的活性抑制剂或表达抑制剂的药剂学有效量给药到实验对象（subject）的步骤。

[0101] 优选地，上述癌症为胰腺癌。

[0102] 【发明的效果】

[0103] 归纳本发明的特征及优点如下。

[0104] （i）本发明提供对胰腺癌干细胞及胰腺癌的新型分子标记、标记检测方法及筛选方法。

[0105] （ii）本发明作为从胰腺癌细胞株中发掘的标记，是一种能够通过胰腺癌干细胞标

记的检测，来检测胰腺癌，尤其是早期的胰腺癌的标记。

[0106] （iii）并且，利用本发明的标记，能够对胰腺癌进行准确的诊断及预后分析。

【附图说明】

[0107] 图 1 是将多个胰腺癌细胞株（Hpac、CAPAN1、CAPAN2、CFPAC、ASPC1、BXPC3、MIAPACA2 及 PANC1）进行球体培养的结果。表示了在 Hpac、CAPAN1 及 CAPAN2 中形成球体的结果。

[0108] 图 2a ～图 2b 是在球状细胞中分析癌症干细胞相关基因的表达的图。图 2a 是与 Hpac 黏附相比，视为癌症干细胞信号体系的 Notch、Hedgehog 及 wnt 信号环在环状细胞中活性化的结果。图 2b 是表示干细胞的多分化能力的 oct4、nanog 及视为癌症干细胞标记的 ABGC2 增加的结果。

[0109] 图 3 是对球状细胞中通过实质细胞分析的癌症干细胞标记的表达进行分析的图。能够确认，作为癌症干细胞标记的 CD44 及 PROM2 等在球状细胞中增加。

[0110] 图 4a ～图 4c 是确认基于众所周知的干细胞信号阻断药物对球的形成抑制的结果。图 4a 是基于药物对球的形成进行抑制的显微镜图。图 4b 是以图表表示基于药物对球的形成进行抑制时的球状细胞的直径差异的图。图 4c 是表示基于药物的球的形成数量的图表。以此类结果为基础，能够确认，基于干细胞信号阻断药物来抑制球的形成，且球的直径及数量也会减少。

[0111] 图 5a ～图 5c 是对 Hpac 黏附细胞和球状细胞的癌化能力的差异进行确认的结果图像。图 5a 是显示形成肿瘤的免疫控制老鼠的胰脏和肺转移的图像。图 5b 是摘除老鼠中观察到胰脏及转移的器官，从而进行 H & E 免疫染色的图像。图 5c 是将 Hpac 的黏附细胞和球状细胞的肿瘤大小差异以图表进行表示的。将 Hpac 黏附细胞和球状细胞向免疫控制老鼠进行原位（in situ）移植，来比较肿瘤形成能力时，在移植持有癌症干细胞的特性的 Hpac 球的组中，癌症的形成能力有着较高的显示，并显示了观察到向肺和腹膜等器官及组织转移的结果。

[0112] 图 6 是将识别的多个分泌蛋白质的表达在 Hpac 和 Capan1 细胞的黏结及球培养液中通过蛋白质印迹法进行确认的结果。可见，AKR1B1、HSP90、ALDH、波形蛋白及谷氧还蛋白 -3 在 Hpac 球或 CAPAN1 球的培养液中有所增加。

[0113] 图 7 是在 AsPC-1、BxPC-3、Capan-1、Capan-2、Cfpac-1、HPAC、Panc-1 及 Miapaca-2 的 8 种胰腺癌干细胞及 HPDE 中提取 mRNA 及蛋白质，从而确认谷氧还蛋白 -3 的表达的结果。

[0114] 图 8 是向全部表达癌症干细胞标记 CN24、CD44 及 ESA 的细胞（CD24+/CD44+/ESA+）及对 3 种标记都不表达的细胞（CD24-/CD44-/ESA-）分划胰腺癌细胞的细胞中，对谷氧还蛋白 -3 的表达进行确认的结果。

[0115] 图 9 表示上述结果是在导入谷氧还蛋白 -3siRNA 和控制 siRNA 时，确认癌症干细胞标记的 3 个种类（CD24+/CD44+/ESA+）的表达变化的结果。

[0116] 图 10a 及图 10b 是在谷氧还蛋白 -3 击倒（k/d）细胞株中对谷氧还蛋白 -3 的抑制引起的变化进行确认的结果，图 10a 是对谷氧还蛋白 -3 的 mRNA 及蛋白质表达进行确认的蛋白质印迹法的结果，图 10b 及图 10c 是确认细胞增殖率的结果。

[0117] 图 11a 及图 11b 是确认根据谷氧还蛋白 -3 击倒的癌症干细胞的相关特性变化的

结果，图 11a 是确认谷氧还蛋白 -3 击倒细胞株的球的形成能力的结果，图 11b 是确认生存率及增殖率的结果。

[0118] 图 12 是在人体胰腺癌组织微陈列中通过免疫组织化学染色，来确认多个分泌蛋白质的图像。这是包含 AGPAT4 及谷氧还蛋白 -3 的 7 个分泌蛋白质在胰腺癌组织中增加的结果。

[0119] 图 13 是在人体正常胰脏组织和胰腺癌组织中，确认包含 AGPAT4 及谷氧还蛋白 -3 的 7 个分泌蛋白质的表达的图像。7 个蛋白质都显示，与正常胰脏组织相比，在胰腺癌组织中显示显著的高表达。

[0120] 图 14a ～图 14b 是在胰腺癌患者的血清中确认现在用作胰腺癌标记的 CA19-9 的结果。图 14b 是在胰腺癌患者的血清中确认现在用作胰腺癌标记的 CEA 的结果。虽然 CA19-9 及 CEA 都是现在所使用的胰腺癌诊断标记，但能够确认的是，每个患者对 CA19-9 及 CEA 的表达都有显著差异。

[0121] 图 15a ～图 15b 是使用多重亲和去除系统（MARS，Multiple affinity removal column system）检测正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清后，对通过蛋白质印迹法分泌的蛋白质中 MSK2 蛋白质的表达进行确认的结果。图 15a 是表示 MSK2 蛋白质的表达的蛋白质印迹法的结果。图 15b 是将 MSK2 蛋白质的蛋白质印迹法的结果以密度计量学进行测定，从而以图表表示的图。这是与正常人的血清相比，在胰腺癌血清中高表达的结果。

[0122] 图 16a ～图 16b 是使用多重亲和去除系统（MARS，Multiple affinity removal column system）检测正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清后，对通过蛋白质印迹法分泌的蛋白质中波形蛋白（vimentin）的表达进行确认的结果。图 16a 是表示波形蛋白的表达的蛋白质印迹法的结果。图 16b 是将波形蛋白的蛋白质印迹法的结果以密度计量学进行测定，从而以图表表示的。这是与正常人和慢性胰腺炎患者的血清相比，在胰腺癌血清中高表达的结果。

[0123] 图 17a ～图 17b 是使用多重亲和去除系统（MARS，Multiple affinity removal column system）检测正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清后，对通过蛋白质印迹法分泌的蛋白质中 ALDH 蛋白质的表达进行确认的结果。图 17a 是表示 ALDH 蛋白质的表达的蛋白质印迹法的结果。图 17b 是将 ALDH 蛋白质的蛋白质印迹法的结果以密度计量学进行测定，从而以图表表示的。这是与正常人和慢性胰腺炎患者的血清相比，在胰腺癌血清中高表达的结果。

[0124] 图 18a ～图 18b 是使用多重亲和去除系统（MARS，Multiple affinity removal column system）检测正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清后，对通过蛋白质印迹法分泌的蛋白质中谷氧还蛋白 -3 蛋白质的表达进行确认的结果。图 18a 是表示谷氧还蛋白 -3 蛋白质的表达的蛋白质印迹法的结果。图 18b 是将谷氧还蛋白 -3 蛋白质的蛋白质印迹法的结果以密度计量学进行测定，从而以图表表示的。这是与正常人和慢性胰腺炎患者的血清相比，在胰腺癌血清中高表达的结果。

[0125] 图 19a 及图 19b 是在胰腺癌患者的血清中，通过酶联免疫吸附测定确认谷氧还蛋白 -3 的表达的结果。图 19a 是对正常对照组患者、慢性胰腺炎患者及胰腺癌患者的血液进行分离，从而比较谷氧还蛋白 -3 的表达的结果，图 19b 是对谷氧还蛋白 -3 的表达程度为 1800ng/ml 以上的患者和 1800ng/ml 以下的患者的生存期间进行比较的图表。

【具体实施方式】

[0126] 以下，通过实施例对本发明进行更加详细的说明。这些实施例仅仅是为了对本发进行更加具体的说明的，而根据本发明的要点，本发明的范围不会因这些实施例而受到限制是所属领域技术人员显而易见的。

[0127] 【实施例】

[0128] 在没有其他额外提及的情况下，固体／固体为（重量／重量）份或％，固体／液体为（重量／体积）份或％，液体／液体为（体积／体积）份或％。

[0129] 【实验材料及方法】

[0130] 【从人体胰腺癌细胞株中分离及培养具有癌症干细胞特性的球体】

[0131] 人体胰腺癌细胞株 8 周（Hpac、Capan1、Capan2、Cfpac1、Aspc1、Bxpc3、Miapaca2 及 Panc1）都从美国典型培养物保藏中心（ATCC，American Type Culture Collection；马纳萨斯，弗吉尼亚州）购入，并通过美国典型培养物保藏中心提示的协议，将多个细胞株在成长培养基中培养。即，AsPC-1 及 BxPC-3 细胞在包含 10％胎牛血清（FBS；Hyclone 公司，洛根市，犹他州）的 RPMI1640（Invitrogen Gibco 公司，大岛，纽约）中培养，而 Capan-1 及 CFPAC-1 细胞在包含 10% 胎牛血清的伊斯科韦氏改良达尔伯克氏培养基（IMDM，Iscove'sModified Dulbecco's Medium）（源特级胎牛血清公司：Invitrogen Gibco）中培养。Capan-2 细胞在包含 10％胎牛血清的麦科伊 5a（Invitrogen Gibco 公司）中培养，且 MIA PaCa-2 细胞在包含 10％胎牛血清及包含 2.5％马血清的（Hyclone 公司）的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基（DMEM，dulbecco's modified eagle medium）（源特级胎牛血清公司：Invitrogen Gibco）中培养。Hpac 细胞在包含 10％胎牛血清的 DMEM/ 哈姆氏 F12（Ham's F12）（D/F12；源特级胎牛血清公司：Invitrogen Gibco）中培养，且 PANC-1 细胞在包含 10％胎牛血清的 DMEM 中培养。

[0132] 为了球体（sphere）的培养，将多个胰腺癌细胞株向补充上皮生长因子（10ng/ml，R & D 系统公司，明尼阿波利斯，明尼苏达州）、碱性成纤维细胞生长因子（10ng/ml，R & D 系统公司）1× 胰岛素－转铁蛋白－硒化物（ITS，insulin transferring selenium，Gibco 公司）及 0.5％胎牛血清的无血清 DMEM/F12 培养基中以 1000 细胞 /ml 的比例与 6 孔超低集群板（康宁公司，康宁，纽约）接种后，培养 7 天～ 10 天。以相同的培养液与培养皿（能啃公司：Nalgene Nunc，罗切斯特，纽约）进行黏附，从而将在接合（adherent）的状态下培养的细胞作为对照组。

[0133] 【球状细胞中的癌症干细胞相关多个基因的表达分析】

[0134] 使用 RNA 简易试剂盒（凯杰公司，瓦伦西亚，加利福尼亚）提取 Hpac 黏结和球状细胞的总 RNA。通过 Superscript II（Gibco BRL 公司，格兰德艾兰，纽约）的反应，对在 42℃中提取一小时的 2μg 的各个 RNA 进行逆转录反应。通过癌症干细胞相关基因的引物和 Taq 聚合酶的聚合酶链式反应，分析球状细胞中的癌症干细胞相关基因的表达，并将 β－肌动蛋白（Beta actin）基因的表达作为对照组。癌症干细胞相关基因的引物碱基序列、聚合酶链式反应温度及周期数在下列表中进行显示。

[0135] 【表 1】

[0136]

基因	正向引物碱基序列（5’-3’）	反向引物碱基序列（5’-3’）	Tm/频率
Jagged 1	CTCAATTACTGTGGGACTCATCA	GAACACTCACACTCAAAGCCC	52℃/30
Notch3	ATGGTGGGAACTAAACACAGCT	ATGACCCTGGAGGAAGCACA	55℃/35
Hes1	GTGCTGTCTGGATGCGGAGT	GAACACTCACACTCAAAGCCC	55℃/35
Ihh	CCTGAACTCGCTGGCTATCT	AATACACCCAGTCAAAGCCG	56℃/35
PTCH	GCAGTGGTGAGAGAAAAGGA	CTCGGATTGGTGACCATAAG	59℃/30
Gli1	AGAGTCCAGGGGGTTACATA	AGAGTCCAGGGGGTTACATA	57℃/35
Wnt4	CTCCTCGTCTTCGCCGTCTT	TACTGGCACTCCTCAATGGA	62℃/40
Dvl2	GGTTGGGGAGACGAAGGTGATT	ATCTGAGGACACCAGCCAGGATAC	58℃/30
Lef1	CGAAGAGGAAGGCGATTTAG	GGATGGGTGGAGAAAGAGAT	62℃/40
Oct4	GTGGAGGAAGCTGACAACAA	AGCAGCCTCAAAATCCTCTC	62℃/27
Nanog	ACTGTCTCTCCTCTTCCTTCCT	AGAGTAAAGGCTGGGGTAGGTA	61℃/30
Stat3	GTCTGGCTGGACAATATCAT	TTGGGAATGTCAGGATAGAG	56℃/30
ABCG2	TATGAGTGGCTTATCCTGCT	CACTGATCCTTCCATCTTGT	56℃/30
PTEN	GGACGAACTGGTGTAATGAT	CAGACCACAAACTGAGGATT	56℃/30
β-肌动蛋白	GGCATCCTCACCCTGAAGTA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	55℃/25

[0137] 【在球状细胞中通过实质细胞分析的癌症干细胞标记的表达分析】

[0138] 从 Hpac 细胞中进行黏结及球的培养后，处理细胞消化溶液（Accutase，西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州），从而制备相同数量的单一细胞悬浮液。之后，以癌症干细胞标记抗体对黏结及球状细胞进行染色，并将 FITC-CD44（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）、PE-PROM2（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）、PE-EphA2（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）、PE-CD130（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）、PE-CD271（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）、PE-CD24（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）、PE-CD133（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）及 PE-CD117（BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）分别用作标记抗体。

[0139] 实质细胞分析利用 BD LSR II（BD 生物科学公司，富兰克林湖，新泽西州）实施，且通过 BD FACSDiva 软件进行分析。

[0140] 【基于干细胞信号阻断药物的球体形成的抑制】

[0141] 将众所周知的干细胞信号阻断药物 γ-分泌酶抑制剂（DAPT）（玉博生物科技有限公司 :Calbiochem，圣地亚哥，加利福尼亚州，美国）、环耙明（Cyclopamine-KAAD）（玉博生物科技有限公司 :Calbiochem，圣地亚哥，加利福尼亚州，美国）、LiCl（西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州）、全反式维甲酸（ATRA）（西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州）、OV（S 西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州）向培养液中添加，从而培养球。在 7 天后确认球的形成是否受到抑制。

[0142] 【Hpac 球体的癌化能力的确认】

[0143] 将从人体胰腺癌细胞株 Hpac 中培养的黏结细胞和球状细胞以 0.25％的胰蛋白酶 EDTA（Gibco BRL 公司，格兰德艾兰，纽约）进行处理，从而制备相同数量的单一细胞悬浮液。之后，向 NOD-SCID 免疫控制老鼠（查尔斯河，日本）的胰脏直接进行原位（in situ）移植，从而对黏结细胞和球状细胞之间的肿瘤的形成能力进行观察。

[0144] 【球状细胞中的癌症干细胞相关分泌蛋白质的分析】

[0145] 为了在形成球体的细胞的培养液中分析与癌症干细胞相关的分泌蛋白质，将 Hpac

和 Capan1 细胞进行 7 天～ 10 天的黏结培养或球培养。然后，换成无血清 DMEM/F12 培养基(Gibco BRL 公司，格兰德艾兰，纽约) 后重新培养 24 小时。利用离心分离及过滤器收集黏结及球体的培养上清液。

[0146] 使用具有 3kDa 分子量切断(molecular-mass cut off:MWCO) 的超滤超离心过滤装置将包含多种分泌蛋白质的上清液进行浓缩后，实施蛋白质组学分析(2-D 凝胶分析和 MALDI-TOF)。利用胰蛋白酶将染色的凝胶形象进行分析后显示差异的斑点进行切割后，通过基质辅助激光解析电离飞行时间(MALDI-TOF，matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight)进行识别。数据库搜索引擎使用莫托洛拉自动顺序计算机控制测试器(MASCOT)(Na K et al.,Proteomics (9):3989-3999,2009)。

[0147] 【在球状细胞的培养液中通过蛋白质印迹法(Western blot)的胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质的表现分析】

[0148] 为了在 Hpac 和 Capan1 的黏结及球培养液中验证基于蛋白质组学分析进行识别的多个分泌蛋白质的表达，利用离心分离及过滤器收集黏结及球体培养上清液。

[0149] 使用具有 3kDa 分子量切断(molecular-mass cut off，MWCO) 的超滤超离心过滤装置进行浓缩之后，根据蛋白质定量，将每 25μg 与 10％的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶进行加载(loading) 后进行电泳。将通过电泳分别按大小进行分划的多个蛋白质向聚偏二氟乙烯膜(PVDF)(密理博公司，比尔里卡，马萨诸塞州，美国)移动后，为了减少非特异反应，在添加 5％的无脂奶(non-fat milk)的 TBS-T (Tris-buffered saline/0.05%Tween-20)中进行 1 小时的阻塞。然后，将各个膜与蛋白质组学结果识别的与分泌蛋白质对应的第一抗体在 4℃条件下进行一夜的反应。第一抗体使用了老鼠单克隆 AKR1B1 (圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州)，兔子多克隆 HSP90 (圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州)，老鼠单克隆 ALDH (BD Biosciences PharMingen 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)，老鼠单克隆波形蛋白(圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州) 及老鼠单克隆谷氧还蛋白 -3 (亚诺法公司，台北)。

[0150] 与第一抗体反应的各个膜在 TBS-T 缓冲器中清洗后，与辣根过氧化物酶(HRP,horseradish peroxidase)- 结合第二抗体(圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州) 进行 1 小时的反应。将各个蛋白质利用增强化学发光体系(Enhanced chemiluminescence system)(PIERCE 公司，罗克福德，伊利诺斯州) 进行检测。

[0151] 【胰腺癌细胞株中的谷氧还蛋白 -3mRNA 及蛋白质表达的确认】

[0152] 从 AsPC-1、BxPC-3、Capan-1、Capan-2、Cfpac-1、HPAC、Panc-1 及 Miapaca-2 的 8 种胰腺癌细胞株及人胰腺导管上皮细胞(HPDE，Human Pancreatic Ductal Epithelial cell) 中提取 mRNA 及蛋白质，从而确认谷氧还蛋白 -3 的表达。使用 RNA 简易试剂盒(凯杰公司，瓦伦西亚，加利福尼亚，美国) 提取胰腺癌细胞株的总 RNA，并通过 Superscript II (Gibco BRL 公司，格兰德艾兰，纽约) 的反应，对各个 RNA 进行逆转录反应。通过谷氧还蛋白 -3 引物和 Taq 聚合酶的聚合酶链式反应，分析胰腺癌细胞株中的谷氧还蛋白 -3 基因的表达，并以 β- 肌动蛋白(Beta actin) 基因的表达作为对照组。胰腺癌细胞株中的谷氧还蛋白 -3 蛋白质表达分析是在细胞总蛋白质及分泌蛋白质中实施。细胞总蛋白质利用细胞溶解缓冲器(50mM Tris,150mM NaCl,25mM β-glycerophosphate,25mM NaF,0.5M EDTA,1%NP-40,0.1mM PMSF,1％蛋白酶抑制混合物(Roche)) 提取。为了分泌蛋白质的准

备，在没有血清的条件下对细胞培养液进行离心分离，从而去除细胞分散物，最终以80％体积的冰冷的(ice-cold)丙酮沉淀。沉淀的分泌蛋白质以100％冰冷的丙酮经过清洗步骤后，利用离心真空干燥器烘干，之后再用细胞溶解缓冲器进行溶解。将总蛋白质及分泌蛋白质根据蛋白质定量，将每25μg与10％的SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行加载(loading)后进行电泳。将通过电泳分别按大小进行分划的多个蛋白质向聚偏二氟乙烯膜(PVDF，poly vinylidene fluoride)(密理博公司，比尔里卡，马萨诸塞州，美国)移动后，为了减少非特异反应，在添加5％的无脂奶(non-fat milk)的TBS-T(Tris-buffered saline/0.05%Tween-20)中进行1小时的阻塞。然后，将聚偏二氟乙烯膜与谷氧还蛋白-3的第一抗体(亚诺法公司，台北，中国)在4℃条件下进行一夜的反应。与第一抗体进行反应的各个聚偏二氟乙烯膜在TBS-T缓冲器中清洗后，与辣根过氧化物酶(HRP，horseradish peroxidase)-结合第二抗体(圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州，美国)进行1小时的反应。具有免疫反应的蛋白质利用西碧化学发光底物系统(PIERCE公司，罗克福德，伊利诺斯州)进行检测。

[0153] 【具有胰腺癌癌症干细胞的特性的细胞分化中的谷氧还蛋白-3超表达的确认】

[0154] 为了分划具有癌症干细胞特性的细胞，将培养的胰腺癌细胞株HPAC和CFPAC-1以细胞消化溶液(Accutase，西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州)进行处理，从而制备相同数量的单一细胞悬浮液。然后，以癌症干细胞标记PE-CD24(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)、APC-CD44(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)及FITC-ESA(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)在冰中进行10分钟的染色。作为抗体的同型对照，利用提炼的老鼠IgG1、λ-FITC、IgG2a、κ-PE及IgG2b、κ-APC(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州，美国)进行染色。细胞的分类则利用了FACSAria II(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州，美国)。对3种标记都进行表达的细胞(CD24+/CD44+/ESA+)和对上述3种标记都不表达的细胞(CD24－/CD44－/ESA－)的分划细胞中，使用RNA简易试剂盒(凯杰公司，瓦伦西亚，加利福尼亚)提取了胰腺癌细胞株的总RNA。通过Superscript II(Gibco BRL公司，格兰德艾兰，纽约，美国)的反应对各个RNA进行逆转录反应后，通过基于谷氧还蛋白-3引物及Taq聚合酶的聚合酶链式反应分析谷氧还蛋白-3基因的表达，并将β-肌动蛋白(Beta actin)基因的表达作为对照组。

[0155] 为了阻碍谷氧还蛋白-3，利用了对谷氧还蛋白-3的siRNA(invitrogen stealthTM siRNA duplex oligoribonucleotides)。正义siRNA为UGA GGG AGU UCU UUA GCU AAC UCU G，反义siRNA为CAG AGU UAG CUA AAG AAC UCC CUC A。对照组siRNA使用了invitrogen公司的阴性对照组Med GC。利用RNAiMAX(Invitrogen Gibco公司，卡尔斯巴德，加利福尼亚州，美国)向CRAPC-1细胞移入谷氧还蛋白-3或阴性对照组siRNA后，培养72小时。培养好的细胞处理细胞消化溶液(Accutase，西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州)，从而制备相同数量的单一细胞悬浮液后，利用PE-CD24(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)、APC-CD44(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)及FITC-ESA(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)进行染色。实质细胞分析利用BD LSR II(BD生物科学公司，富兰克林湖，新泽西州)实施，并通过BD FACSDiva软件进行分析。

[0156] 【阻碍谷氧还蛋白 -3 表达的细胞株的构建及特性分析】

[0157] 为了获得由阻碍谷氧还蛋白 -3 的表达引起的效果，制备对谷氧还蛋白 -3 的 shRNA（SABiosciences SureSilencingTM shRNA 核外遗传基因）及对照组 shRNA，从而向 HPAC 细胞株永久移入，并树立谷氧还蛋白 -3 击倒（k/d，knock-down）细胞株，从而照射谷氧还蛋白 -3mRNA 及蛋白质表达。对谷氧还蛋白 -3 的 shRNA 的序列为 GTG GAA ATT CTT CAC AAA CAT，对照组 shRNA 的序列为 GGA ATC TCA TTC GAT GCA TAC，且拣选标记为嘌呤（puromycin，2.0μg/ml）。在移入基因的前一天，将相同数量的细胞与板进行黏附后，在移入基因的当天，将谷氧还蛋白 -3 的 shRNA 及对照组 shRNA 与 Lipofectamine2000（Invitrogen 公司，卡尔斯巴德，加利福尼亚州，美国）混合，从而向细胞移入。移入基因后经过 24 小时后，换成包含 2μg 嘌呤霉素的培养液后，持续培养 3 天以上。从嘌呤霉素培养液中存活下来的细胞重新以 1 细胞 / 孔的比例与 96 孔板黏附后进行培养。在各个孔存活下来进行增殖的细胞中提取 mRNA 及蛋白质，从而通过聚合酶链式反应和蛋白质印迹法确认谷氧还蛋白 -3 的表达变化，从而最终确保 2 个谷氧还蛋白 -3k/d 细胞株的克隆和 2 个对照组克隆。为了确认所确保的谷氧还蛋白 -3k/d 的癌症相关特性的变化，执行了细胞增殖速度和细胞增殖移动分析（wound-healing assay）。细胞增殖速度是将各个克隆的细胞以每 1.25×10^4 个与 24 孔板进行黏附后，在 5 天的时间内，每天按时将细胞以 0.25% 的 trypsin-EDTA 取下，并在血细胞计数器（hematocytometer）中测定细胞数量。细胞增殖移动分析是在进行细胞培养时，细胞的数量几乎 100% 填满孔之后，进行刮擦，并在显微镜下，对每个时间段的刮伤的恢复能力进行观察，并拍摄照片（Olympus DP50）。

[0158] 【阻碍谷氧还蛋白 -3 表达的细胞株的癌症干细胞相关特性的变化分析】

[0159] 谷氧还蛋白 -3 蛋白质是以胰腺癌癌症干细胞相关蛋白质导出的，因此，确认了由谷氧还蛋白 -3k/d 引起的癌症干细胞相关特性的变化。首先，确认了谷氧还蛋白 -3k/d 细胞株及对照组细胞株的球的形成能力。为此，将 2 克隆的谷氧还蛋白 -3k/d 细胞株和 2 克隆的对照组细胞株进行 7 天的球培养。克隆形成法（clonogenic assay）是将细胞培养液中烧开的 0.6% 的琼脂（agar）在 24 孔板进行凝固（下层培养基）后，在其上方，将 1000 个 / 孔的细胞与 0.3% 的琼脂 - 细胞培养液（上层培养基）混合，从而进行凝固。当与 0.3% 的上层培养基凝固时，在其上方添加每 500μl/ 孔的培养液。每隔 3 天添加一次培养液，并培养 3 ～ 4 周后，清除琼脂上的培养液，并以结晶紫进行染色后，测定菌落的数量。

[0160] 【通过免疫组织化学染色的人体胰腺癌组织中的胰腺癌癌症干细胞相关多个分泌蛋白质的表达分析】

[0161] 将胰脏组织切片在二甲苯内进行脱蜡，并在每个等级的乙醇内进行再水化。利用包含 0.3% 的过氧化氢的甲醇溶液，在常温中对内生性过氧化物酶的活性进行 20 分钟的阻塞。在柠檬酸盐缓冲液（0.01M，pH6.0）中实施 4 分钟的微波抗原搜索。之后，利用 10% 正常驴血清溶液对切片进行 1 小时的培养，从而减少非特异性背景染色。以 1:200 的比例进行稀释和反应的第一抗体为老鼠单克隆 AGPAT4（亚诺法公司，台北）、老鼠单克隆 AKR1B1（圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州）、兔子多克隆 HSP90（圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州）、老鼠单克隆 ALDH（BD Biosciences PharMingen，San Diego，CA）、兔子多克隆 MSK2（圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州）、老鼠单克隆 Vimentin（圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州）及老鼠单克隆谷氧还蛋白 -3（亚诺法公

司，台北)。

[0162] 阻塞的部分与第一抗体在4℃条件下进行一夜的培养。之后的反应是利用在Envision试剂盒(DakoCytomation公司，卡宾特里亚，加利福尼亚州，美国)中包括的推荐过程来实施的。

[0163] 最后，利用3,3’-二氨基联苯胺(3,3’-diaminobenzidine;DakoCytomation公司，卡宾特里亚，加利福尼亚州，美国)培养切片，并利用变形的哈里斯氏苏木精(西格玛奥德里奇公司，圣路易斯，密苏里州)溶液进行对照染色。

[0164] 染色的强度分别以一、+、++及+++进行评价，上述一、+、++及+++与阴性、弱、中及强的褐色染色的存在相关。

[0165] 【在正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清中通过蛋白质印迹法(Western blot)的胰腺癌癌症干细胞相关分泌蛋白质的表达分析】

[0166] 在正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清中实施了通过蛋白质印迹法(Western blot)的胰腺癌癌症干细胞相关分泌蛋白质的表达分析。

[0167] 为了确认从正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清中发掘的分泌蛋白质的表达，选定5例正常血清(normal)，5例慢性胰腺炎血清(chronic pancreatits)，20例胰腺癌患者血清(pancreatic cancer)。

[0168] 选定的共计30例的血清使用多重亲和去除系统(MARS，Multiple affinity removal column system)清除作为血清内的6种主要蛋白质的白朊、铁传递蛋白、IgG、IgA、结合珠蛋白(haptoglobin)及抗胰蛋白酶(anti-trypsin)后，使用具有3kDa分子量切断(MWCO，molecular-mass cut off)的超滤超离心过滤装置进行浓缩，并将各个例子的蛋白质以每浓度为40μg的相同的浓度与10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行加载后，进行电泳。将通过电泳按大小进行分化的蛋白质向聚偏二氟乙烯膜(密理博公司，比尔里卡，马萨诸塞州，美国)移动后，为了减少非特异反应，在添加5%无脂奶的TBS-T(Tris-buffered saline/0.05%Tween-20)中进行1小时的阻塞。之后，将各个第一抗体与各个膜在4℃条件下进行一夜的反应。

[0169] 以1:500的比例稀释的各个第一抗体为兔子多克隆MSK2(圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州)、老鼠单克隆波形蛋白(圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州)、老鼠单克隆ALDH(BD Biosciences PharMingen公司，圣地亚哥，加利福尼亚州)及老鼠单克隆谷氧还蛋白-3(亚诺法公司，台北)。

[0170] 利用TBS-T缓冲器清洗与第一抗体进行反应的膜后，与HRP-结合第二抗体(圣克鲁斯生物技术公司，圣克鲁斯，加利福尼亚州)进行1小时的反应。蛋白质通过增强化学发光体系(nhanced chemiluminescence system)(PIERCE公司，罗克福德，伊利诺斯州)检测。

[0171] 【确认胰腺癌患者血液中的谷氧还蛋白-3的表达】

[0172] 为了在实际临床患者(正常对照组患者28名，慢性胰腺炎患者9名及胰腺癌患者57名)的血清中确认谷氧还蛋白-3的表达，执行了酶联免疫吸附测定(USCN GLRX3ELISA kit)。酶联免疫吸附测定方法按酶联免疫吸附测定试剂盒制备公司的协议执行。患者的血清对PBS以1:10稀释后使用。标准浓度是从10nM/ml开始，稀释每1/2进行准备。稀释的患者血清和标准浓度分别放入谷氧还蛋白-3酶联免疫吸附测定试剂盒96孔，并在37度条件下进行2小时的反应。分别放入100μl的检测试剂A，并重新在37度条件下进行1小时

的反应。清除所有溶液后，利用清洗溶液清洗 3 次。分别放入 100μl 的检测试剂 B，并在 37 度条件下进行 30 分钟的反应。清除溶液，并清洗 5 次后，分别放入 90μl 的基质溶液，并在 37 度条件下反应 15 ～ 20 分钟后，分别放入 50μl 的结束溶液，在 450nm 中测定发色。

[0173]　【实验结果】

[0174]　【从胰腺癌细胞株中分离及培养具有癌症干细胞特性的球】

[0175]　对显示癌症干细胞特性的球是否形成进行确认的结果，确认了共计 8 种胰腺癌细胞株中，在 Hpac、Capan1 及 Capan2 的细胞株中形成了球，其中，选择 Hpac 和 Capan1 进行后续试验(图 1)。

[0176]　【球状细胞中的癌症干细胞相关多个基因的表达分析】

[0177]　执行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的结果，确认了与胰腺癌细胞株 Hpac 的黏结相比，球中的 Notch、Hedgehog 及 Wnt 等干细胞相关信号传递体系存在活性化。对公认为在发生初期增加的干细胞的多分化能力进行显示的 oct4、nanog 及 stat3 等基因表达也有增加，除此之外，也能确认 ABCG2、PTEN 等多个癌症干细胞标记的表达也有增加(图 2a ～ 2b)。

[0178]　【球状细胞中通过实质细胞分析的多个癌症干细胞标记的表达分析】

[0179]　通过实质细胞的分析，在 Hapc 和 Hpac-sphere 中确认多个癌症干细胞标记的表达的结果，确认了 CD44、PROM2、EphA2、CD130 及 CD271 有增加(图 3)。

[0180]　【基于干细胞信号阻断药物的球形成的抑制】

[0181]　确认了由于因 Hpac- 球的形成能力而广为流传的干细胞信号进行阻断的药物，会受到完全的抑制会减少(图 4a ～ 4c ;DAPT 是 Notch 抑制剂 ;KAAD 是 HH 抑制剂 ;Licl 是 GSK3b 抑制剂 ;ATRA 是 Oct4 抑制剂，OV 是 Nanog 抑制剂)。

[0182]　【Hpac 球体的癌化能力的确认】

[0183]　将从人体胰腺癌细胞株 Hpac 中通过球体培养形成的 Hpac- 球体向 NOD/SCID 老鼠的胰脏中进行原位移植，从而在比较肿瘤形成能力时，与 Hpac 相比，移植具有癌症干细胞的特性的 Hpac- 球体的组中，癌症形成能力有着高显示，并观察到向肺和腹膜等器官及组织的转移(图 5a ～ 5c)。

[0184]　Hpac 球状细胞表达有关癌症干细胞的基因及标记，且以增加癌化能力的结果(图 1 ～ 5c)为基础，照射由球分泌的蛋白质轮廓，从而判断出能够预测胰腺癌干细胞特异标志物。

[0185]　【球状细胞中的癌症干细胞相关分泌蛋白质的分析】

[0186]　Hpac 和 Capan1 的黏结和球中检测出 587 个配对点(paired spots)，其中，与黏结相比，球体中检测出 55 个 2 倍以上增加的斑点。

[0187]　对球体凝胶的 55 个 2 倍以上增加的斑点中对 41 个斑点执行 MALDI-TO，从而识别胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质(表 2)。【表 2】

[0188]

点号	倍数变化（Fold change）	GI 编号	接入号码（Accession number）	蛋白质名称
15378	4.1	GI:30268237	CAD89908.1	假设蛋白
15386	2.5	GI:41352061	NP_055704.2	金属蛋白酶 1 前体
15391	2.7	GI:20149594	NP_031381.2	90kDa 热休克蛋白 β1
15413	2.7	GI:16507237	NP_005338.1	70kDa 热休克蛋白 5
15429	4.3	GI:145701028	NP_001077415.1	假设蛋白 LOC55471 亚型 3
15436	9.2	GI:56203587	CAI21475.1	1-酰基甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶 4（AGPAT4）
15470	2.3	GI:4504025	NP_002055.1	谷氧还蛋白
15602	5.2	GI:39644662	AAH09206.2	热休克蛋白 90AB1
15619	2.8	GI:21396487	NP_653337.1	热休克蛋白 LOC55471 亚型 1
15665	2.3	GI:31543	CAA27309.1	未命名蛋白产品
15680	2.2	GI:38014278	AAH01678.2	微管蛋白 β3
15687	2.3	GI:62414289	NP_003371.2	波形蛋白
15737	4.3	GI:24308169	NP_060009.1	动力蛋白、纤毛轴、重链 3
15792	2.3	GI:4504025	NP_002055.1	谷氧还蛋白
15805	2.0	GI:119586807	EAW66403.1	人绒毛膜促性腺激 2042304
15821	3.3	GI:34304594	AAQ63403.1	热休克蛋白 FLJ10808 亚型
15871	3.3	GI:998688	AAB34148.1	红细胞 26S 蛋白酶亚基
15882	6.2	GI:28839796	AAH47896.1	核糖体蛋白 S6 激酶 kDa
15890	2.1	GI:48257132	AAH14372.2	谷氧还蛋白 3
15977	3.8	GI:4502049	NP_001619.1	醛酮还原酶家族，成员 B1
15978	3.4	GI:4502049	NP_001619.1	链 A，人醛糖还原酶突变体
16000	2.3	GI:171848760	2PD5_A	链 A，人醛糖还原酶突变体
16026	2.5	GI:8118090	AAF72885.1	形成素相关蛋白 2
16051	17.0	GI:21389577	NP_653280.1	热休克蛋白 LOC146705
16087	4.4	GI:157168362	NP_000261.2	嘌呤核苷磷酸化酶
16095	3.7	GI:4503143	NP_001900.1	组织蛋白酶 D 前原蛋白
16139	2.1	GI:158261815	BAF83085.1	未命名蛋白产品
16159	2.6	GI:47682755	AAH70129.1	磷酸丙糖异构酶 1 蛋白
16193	2.5	GI:662841	AAA62175.1	热休克蛋白 27
16246	2.2	GI:60593959	1X71_A	链 A，噬铁蛋白的晶体结构
16268	2.1	GI:544759	AAB29537.1	胆绿素-IX β 还原酶同工酶 I
16288	2.0	GI:14042653	BAB55338.1	未命名蛋白产品
16337	2.0	GI:119588464	EAW68058.1	四次穿膜蛋白 18，亚型 CRA_a
16432	2.2	GI:158259341	BAF85629.1	未命名蛋白产品
16528	2.5	GI:16549206	BAB70777.1	未命名蛋白产品
16610	2.9	GI:178375	AAB46377.1	乙醛脱氢酶（ALDH）
16625	5.6	GI:13489087	NP_109591.1	丝氨酸蛋白酶抑制因子亚型 B
16629	9.4	GI:4558862	AAD22767.1	A-激酶锚定蛋白 AKAP350
16640	2.4	GI:21752882	BAC04252.1	未命名蛋白产品

[0189]

16643	5.3	GI:119568120	EAW47735.1	被膜收缩蛋白重复区 1
16650	2.3	GI:119617987	EAW97581.1	人绒毛膜促性腺激 2015069

[0190] 同时识别与癌症干细胞相关的 HSP90AB1、ALDH 及波形蛋白（vimentin）等蛋白质，因此，启示表 1 中提示的多个分泌蛋白质具有胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质的可能性。

[0191] 【验证通过蛋白质印迹法（Western blot）的胰腺癌癌症干细胞相关分泌蛋白质的表达】

[0192] 为了通过 MALDI-TOF 分析发掘的胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质的验证，使用常用化的抗体，在 Hpac 和 Capan1 细胞的黏结及球培养液中实施蛋白质印迹法。验证了包含谷氧还蛋白 -3 的 5 个分泌蛋白质在胰腺癌细胞株 Hpac 和 Capan1 的球培养液中有所增加（图 6）。

[0193] 【胰腺癌细胞株中的谷氧还蛋白 -3mRNA 及蛋白质表达的确认】

[0194] 提取 AsPC-1、BxPC-3、Capan-1、Capan-2、Cfpac-1、HPAC、Panc-1 及 Miapaca-2 的 8 种胰腺癌细胞株及人类胰腺导管上皮细胞（HPDE，Human Pancreatic Ductal Epithelial cell）中的 mRNA 及蛋白质，来确认谷氧还蛋白 -3 的表达。其结果，确认了与正常 HPDE 相比，在 8 种胰腺癌细胞株中的谷氧还蛋白 -3mRNA 都进行高表达。并且，8 种胰腺癌细胞株表达谷氧还蛋白 -3 蛋白质，并通过培养液中的蛋白质印迹法，在除了 HPAC 的剩余胰腺癌细胞株中，将谷氧还蛋白 -3 向细胞外分泌（图 7）。

[0195] 【具有胰腺癌癌症干细胞特性的细胞分划中确认谷氧还蛋白 -3 超表达】

[0196] 利用视为癌症干细胞标记的 CD24、CD44 及 ESA 将胰腺癌细胞株 HPAC 进行荧光染色后，将胰腺癌细胞分划为将 3 种标记都进行表达的细胞（CD24+/CD44+/ESA+）和对上述标记都不表达的细胞（CD24 － /CD44 － /ESA －）时，能够确认 CD24+/CD44+/ESA+ 分划的细胞与 CD24 － /CD44 － /ESA －分划的细胞相比，对谷氧还蛋白 -3 进行超表达。这在作为其他胰腺癌细胞株的 CFPAC-1 中也确认了相同的结果（图 8）。

[0197] 并且，上述癌症干细胞的分划会因谷氧还蛋白 -3 表达的阻碍而产生变化，与对照组 siRNA 相比，对谷氧还蛋白 -3 处理 siRNA 时，CD24+/CD44+/ESA+ 分划从 70.4％减少至 29.3％（图 9）。

[0198] 【构建阻碍谷氧还蛋白 -3 表达的细胞株及特性分析】

[0199] 为了获得谷氧还蛋白 -3 表达的阻碍引起的效果，制备对谷氧还蛋白 -3 的 shRNA 及对照组 shRNA，并向 HPAC 细胞株进行永久移入，从而树立谷氧还蛋白 -3 击倒（k/d）细胞株。树立的谷氧还蛋白 -3k/d 细胞株与对照组相比，在谷氧还蛋白 -3 的 mRNA 及蛋白质表达方面具有显著的减少（图 10a）。在对照组及谷氧还蛋白 -3shRNA 的各个细胞株中选取两个以上的阳性克隆，并查明其特性。与对照组相比，能够确认谷氧还蛋白 -3k/d 细胞（sh3-G10 及 sh3-H10）中的增殖率有所减少（图 10b），且经过能够同时查看细胞的增殖移动能力的细胞增殖移动分析（wound-healing assay）后确认，谷氧还蛋白 -3k/d 细胞中的细胞增殖移动能力与对照组相比有所低下（图 10c）。

[0200] 【阻碍谷氧还蛋白 -3 表达的细胞株的癌症干细胞相关特性的变化分析】

[0201] 谷氧还蛋白 -3 蛋白质是以胰腺癌癌症干细胞相关蛋白质导出的，因此，确认了由谷氧还蛋白 -3k/d 引起的癌症干细胞相关特性的变化。首先，确认了谷氧还蛋白 -3k/d 细胞株及对照组细胞株的球的形成能力（图 11a）。结果，谷氧还蛋白 -3k/d 细胞都没能形成球。

相反，对照组细胞株显示都很好地形成球。这与在培养球时增加谷氧还蛋白-3表达的结果显示同一线上的结果。并且，关注生存能力及增殖能力的克隆形成法(clonogenic assay)的结果显示，谷氧还蛋白-3k/d细胞与对照组细胞相比形成少数的群落(图11b)。

[0202] 上述的结果表明，谷氧还蛋白-3既显示作为与胰腺癌癌症干细胞相关的致癌相关标记，而且，由谷氧还蛋白-3的阻碍引起的多种癌症相关特性的低下而言，也显示作为胰腺癌治疗剂靶的可能性。

[0203] 【验证人体胰腺癌组织中的胰腺癌癌症干细胞相关多个分泌蛋白质的表达】

[0204] AGPAT4的情况下，能够观察的共计29名TMA切片中，以15例“++”和14例“+++”，在胰腺癌患者的100％胰腺癌组织中表达(图12中的A组)。

[0205] AKR1B1的情况下，能够观察的共计27名TMA切片中，以10例“－”、15例“+”及2例“++”，在胰腺癌患者的62.9％胰腺癌组织中表达(图12中的B组)。

[0206] HSP90的情况下，能够观察的共计28名TMA切片中，以1例“+”、19例“++”及8例“+++”，在胰腺癌患者的100％胰腺癌组织中表达(图12中的C组)。

[0207] ALDH的情况下，能够观察的共计26名TMA切片中，以4例“－”、8例“+”、7例“++”及7例“+++”，在胰腺癌患者的84.6％胰腺癌组织中表达(图12中的D组)。

[0208] MSK2的情况下，能够观察的共计27名TMA切片中，以1例“－”、5例“+”、8例“++”及13例“+++”，在胰腺癌患者的96.2％胰腺癌组织中表达(图12中的E组)。

[0209] 波形蛋白的情况下，主要染色细胞外部的间质组织(interstitium)。染色的细胞虽然大多形成管状结构，但推断出癌细胞并非如此。癌症的细胞质几乎没有染色。28例的胰腺癌组织中，有一例焦点(focal)染色(图12中的F组)。

[0210] 谷氧还蛋白-3的情况下，能够观察的共计25名TMA切片中，以11例“－”、11例“+”及4例“++”，在胰腺癌患者的57.6％胰腺癌组织中表达(图12中的G组)。

[0211] 在通过胰腺癌患者的手术的切除组织的石蜡切片中，也通过免疫组织化学染色验证了胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质的表达。能够确认的是，视为与癌症干细胞相关联的HSP90和ALDH及本研究所发掘的包含谷氧还蛋白-3的7个胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质都与正常胰脏组织相比，在胰腺癌组织中具有强表达(图13的A组～G组)

[0212] 【验证正常、慢性胰腺癌及胰腺癌患者血清中发掘的分泌蛋白质的表达】

[0213] 对发掘的分泌蛋白质常用化的酶联免疫吸附测定试剂盒的附件，通过对一部分蛋白质的蛋白质印迹法执行表达验证。

[0214] 为了确认从正常、慢性胰腺炎及胰腺癌患者的血清中发掘的分泌蛋白质的表达，选定5例正常血清(normal)，5例慢性胰腺炎血清(chronic pancreatits)，20例胰腺癌患者血清(pancreatic cancer)。为了对本研究中发掘的胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质与现有的用作胰腺癌标记的CA19-9和CEA进行比较，图14a～14b表示了选定的胰腺癌患者(PC2-PC10)的血清内的CA19-9及CEA的浓度。

[0215] 在通过蛋白质印迹法对发掘的分泌蛋白质的表达进行验证之前，选定的共计30例的血清使用多重亲和去除系统(MARS，Multiple affinity removal column system)清除作为血清内的6种主要蛋白质的白朊、铁传递蛋白、IgG、IgA、结合珠蛋白(haptoglobin)及抗胰蛋白酶(anti-trypsin)后，使用具有3kDa分子量切断(MWCO，molecular-mass cut off)的超滤超离心过滤装置进行浓缩，并将各个例子的蛋白质以相同的浓度用于蛋白质印

迹法。

[0216] 在分泌蛋白质中，与癌症干细胞之间的关联性广为流传的波形蛋白和 ALDH 的情况下，与正常和慢性胰腺炎患者的血清相比，在胰腺癌患者的血清中显示进行更多表达的结果。作为胰腺癌癌症干细胞分泌蛋白质进行发掘的谷氧还蛋白 -3 同样也在正常血清中进行非常低的表达，与此相反，在胰腺癌患者血清的 50％以上显示比正常及慢性胰腺炎高的表达(图 15a 至图 18b)。

[0217] 【确认胰腺癌患者血液中的谷氧还蛋白 -3 表达】

[0218] 为了在实际临床患者的血液中确认谷氧还蛋白 -3 的表达，执行了酶联免疫吸附测定(USCN GLRX3ELISA kit)。对 28 名正常对照组患者、9 名慢性胰腺炎患者及 57 明胰腺癌患者执行后，确认在胰腺癌患者的血液中显示高的谷氧还蛋白 -3 表达(图 19a)。尤其，在未接受手术，只接受放射治疗或药物治疗的 29 名患者中，谷氧还蛋白 -3 水平在 1800ng/ml 以上的患者的生存期间为 155 天，相反的，在 1800ng/ml 以下的患者的情况下，生存期间为 463 天，因此，根据谷氧还蛋白 -3 水平显示了生存期间的差异(图 19b)。

[0219] 【研究】

[0220] 癌组织与一般脏器一样，存在维持和再生癌组织的癌症干细胞，而这些不仅干预癌症的发生，也干预适用现有的癌症治疗法后减少的癌细胞的再生，从而对癌症的复发或转移起到核心作用(BB Zhou et al.Nat Rev Drug Discov.,8:806-823(2009))。而且，癌细胞进行异种接合(heterogenous)，其中，只有一部分细胞是具有癌症形成能力的肿瘤启动细胞(tumor initiating cell)，并称为癌症干细胞。这些细胞在体外(in vitro)进行悬浮培养时，形成球，而通过球的培养获得的细胞与原来的细胞株相比，具有强有力的癌症形成能力(A.Dubrovska et al.Proc Natl Acad Sci USA.,106:268-273(2009))，并且，在这些细胞中，与原来的细胞株相比，一部分癌症及癌症干细胞相关基因及蛋白质进行较强的表达。

[0221] 本研究确认从胰腺癌细胞株形成的球会形成子球(sub-sphere)，从而具有干细胞的自我再生(self renewal)的特性，并对癌症发生及干细胞的特性维持进行干预的 Notch、Hedgehog 及 wnt 信号等众所周知的干细胞相关信号体系(T.Reya et al.Nature,414:105-111 (2001))进行活性化，同时，确认了公认为在发生初期增加的显示干细胞的多分化能力的 oct4 及 nanog 基因的表达有增加。除此之外，对癌症干细胞的生存及维持方面起着重要作用的 PTEN 的表达也有增加，从而显示于干细胞相关的过去的报告一致的结果(J.Zhou et al.Proc Natl Acad Sci USA.,104:16158-16163(2007))。通过实质细胞的分析对 Hpac 和 Hpac- 球的干细胞标志物进行比较的结果表明，球中 CD44、PROM2、EphA2、CD130 及 CD271 等众所周知的干细胞标志物和 / 或表达与癌症的恶性度相关的蛋白质的细胞数有所增加。

[0222] 为了以上述结果为基础，连接视为癌症发生过程的初期现象的癌症干细胞的作用，也为了识别及验证在培养具有癌症干细胞特性的球状细胞时分泌的蛋白质，执行蛋白质组学分析，并由此对胰腺癌患者中特异分泌的蛋白质进行了验证。

[0223] 蛋白质组学结果，识别了包含 HSP90、波形蛋白、HSP27 及 ALDH 的 AGPAT4、AKR1B1、MSK2 及谷氧还蛋白 -3 等分泌蛋白质。在胰腺癌组织中确认此类分泌蛋白质的表达的结果，确认了与正常组织相比，在胰腺癌组织中具有显著增加，且分泌蛋白质的表达在胰腺癌患

者的血清中，与正常相比更高。虽然，作为酶联免疫吸附测定试剂盒的附件，通过蛋白质印迹法确认了血清中的表达，但能够验证的是，本研究中所发掘的分泌蛋白质的表达在胰腺癌患者的血清中有增加。

[0224] 尤其，谷氧还蛋白 -3 不仅在胰腺癌患者的血清中有增加，也根据谷氧还蛋白 -3 表达高的胰腺癌患者的生存期间与谷氧还蛋白 -3 表达相对低的胰腺癌患者的生存期间相比存在较低显示的现象，以及阻碍谷氧还蛋白 -3 表达时，多种癌症相关特性及癌症干细胞特性会减少的结果而言，谷氧还蛋白 -3 不仅在胰腺癌诊断中使用，也能用作治疗用靶或预后标记。

[0225] 并且，作为多种癌症的治疗靶（therapeutic target）的 HSP90（L.Whitesell and S.L.Lindquist,Nat Rev Cancer,5:761-772（2005））、对癌症干细胞相关的间充质的转移的作为上皮（Epithelial to Mesenchymal transition）标记的波形蛋白（JM.Lee et al.J Cell Biol.,172:973-981（2006）;PB.Gupta et al.Cell.,138:645-659（2009））、作为与癌症干细胞的特性的抗癌剂耐性相关的蛋白质 HSP27（S.Oesterreich et al.Cancer Res.,53:4443-4448（1993））、最近作为癌症干细胞标记兴起的 ALDH（C.Jauffret et al.Clin Cancer Res.,16:45-55(2010)）等的一同识别表示本研究中发掘的分泌蛋白质为癌症干细胞相关分泌蛋白质的可能性。

[0226] 胰腺癌是一种 5 年生存率为 1 ～ 4%，平均存活期间达到 5 个月的致命癌症，它在人体癌症中显示最不良的预后，而且治疗主要依赖抗癌疗法，因此，比任何人体癌症都要迫切需要早期诊断法的研发。

[0227] 到目前为止，对胰腺癌具有疗效的包括 5- 氟尿嘧啶、吉西他滨及特罗凯的抗癌剂治疗的反应率仅为 15% 上下，而此类事实启示，为了提高胰腺癌患者的预后，迫切需要更加有效的早期诊断法的研发。

[0228] 因此，对本研究所发掘的胰腺癌干细胞相关分泌蛋白质进行持续研究，从而使通过利用它的新的癌症早期诊断法的研发及与现有标记的组合，利用更加有意义的癌症干细胞的诊断法的研发成为可能。进一步地，提供新的癌症治疗的靶，从而树立利用癌症干细胞的新的诊断法及治疗开发的基础将成为可能。

[0229] 以上，对本发明的特定部分进行详细记述，而对于所属领域技术人员而言，这些具体记述仅仅是优选实施例，本发明的范围不会由此受到限制是显而易见的。因此，本发明的实质范围应视为根据权利要求和其同等技术方案进行定义。

[0230] 【参考文献】

[0231] 1.BB Zhou,et al.Tumour-initiating cells:challenges and opportunities for anticancer drug discovery.Nat Rev Drug Discov.8:806-823（2009）。

[0232] 2.A.Dubrovska,et al.,The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations.Proc Natl Acad Sci USA.106:268-273（2009）。

[0233] 3.MM Ho,et al.,Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells.Cancer Res.67:4827-4833（2007）。

[0234] 4.T Reya,et al.,Stem cells,cancer,and cancer stem cells. Nature.414:105-111（2001）。

[0235] 5.J Zhou,et al.,Activation of the PTEN/mTOR/STAT3pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance.Proc Natl Acad Sci USA.104:16158-16163 (2007)。

[0236] 6.SV Shmelkov,et al.,CD133expression is not restricted to stem cells,and both CD133+and CD133－metastatic colon cancer cells initiate tumors. J Clin Invest.118:2111-2120 (2008)。

[0237] 7.L.Whitesell and S.L.Lindquist.,HSP90and The chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer,5:761-772 (2005)。

[0238] 8.JM.Lee,et al.,The epithelial－.mesenchymal transition:new insights in signaling,development,and disease.J Cell Biol.172:973-981 (2006)。

[0239] 9.PB.Gupta,et al.,Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening.Cell.138:645-659 (2009)。

[0240] 10.S.Oesterreich,et al.,The small heat shock protein hsp27is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines.Cancer Res.53:4443-4448 (1993)。

[0241] 11.C.Jauffret,et al.,Aldehyde Dehydrogenase1－positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer.Clin Cancer Res.16:45-55 (2010)。

[0242] 12.Na K,Lee EY,Lee HJ,et al.Human plasma carboxylesterase 1,a novel serologic biomarker candidate for hepatocellular carcinoma. Proteomics9:3989-3999 (2009)。

[0001]

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> 利用胰腺癌癌症干细胞特性的胰腺癌新型生物标记及用途

<130> PP110140

<150> KR 10-2011-0003423
<151> 2011-01-13

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 1008
<212> DNA
<213> GLRX3

<400> 1
atggcggcgg gggcggctga ggcagctgta gcggccgtgg aggaggtcgg ctcagccggg 60

cagtttgagg agctgctgcg cctcaaagcc aagtccctcc ttgtggtcca tttctgggca 120

ccatgggctc cacagtgtgc acagatgaac gaagttatgg cagagttagc taaagaactc 180

cctcaagttt catttgtgaa gttggaagct gaaggtgttc ctgaagtatc tgaaaaatat 240

gaaattagct ctgttcccac ttttctgttt ttcaagaatt ctcagaaaat cgaccgatta 300

gatggtgcac atgccccaga gttgaccaaa aaagttcagc gacatgcatc tagtggctcc 360

ttcctaccca gcgctaatga acatcttaaa gaagatctca accttcgctt gaagaaattg 420

actcatgctg ccccctgcat gctgtttatg aaaggaactc ctcaagaacc acgctgtggt 480

ttcagcaagc agatggtgga aattcttcac aaacataata ttcagtttag cagttttgat 540

atcttctcag atgaagaggt tcgacaggga ctcaaagcct attccagttg gcctacctat 600

cctcagctct atgtttctgg agagctcata ggaggacttg atataattaa ggagctagaa 660

gcatctgaag aactagatac aatttgtccc aaagctccca aattagagga aaggctcaaa 720

gtgctgacaa ataaagcttc tgtgatgctc tttatgaaag gaaacaaaca ggaagcaaaa 780

tgtggattca gcaaacaaat tctggaaata ctaaatagta ctggtgttga atatgaaaca 840

ttcgatatat tggaggatga agaagttcgg caaggattaa aagcttactc aaattggcca 900

acataccctc agctgtatgt gaaaggggag ctggtgggag gattggatat tgtgaaggaa 960

ctgaaagaaa atggtgaatt gctgcctata ctgagaggag aaaatcgc 1008

<210> 2
<211> 25
<212> RNA
<213> GLRX3 正义 siRNA

<400> 2

[0002]

ugagggaguu cuuuagcuaa cucug 25

<210> 3
<211> 25
<212> RNA
<213> GLRX3 反义 siRNA

<400> 3
cagaguuagc uaaagaacuc ccuca 25

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> GLRX3 shRNA

<400> 4
gtggaaattc ttcacaaaca t 21

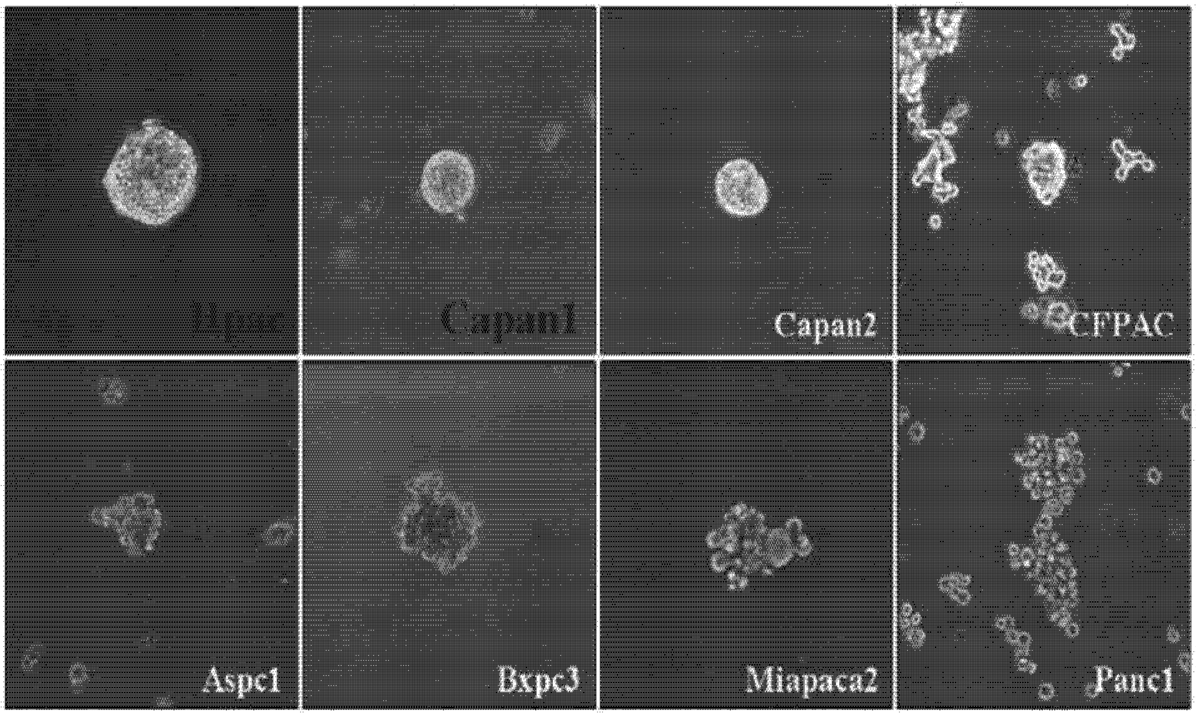

Hpac
Capan1
Capan2
CFPAC
Aspc1
Bxpc3
Miapaca2
Panc1

图 1

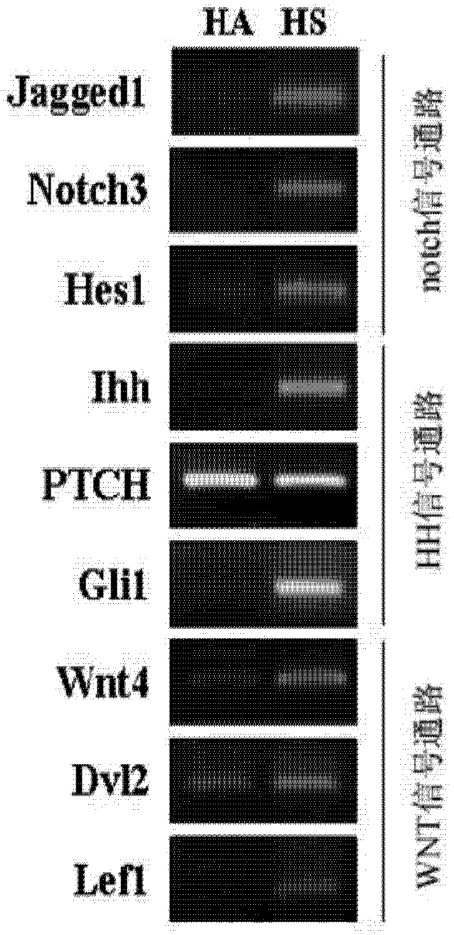

HA
HS
Jagged1
Notch3
Hes1
Ihh
PTCH
Gli1
Wnt4
Dvl2
Lef1
notch信号通路
HH信号通路
WNT信号通路

图 2a

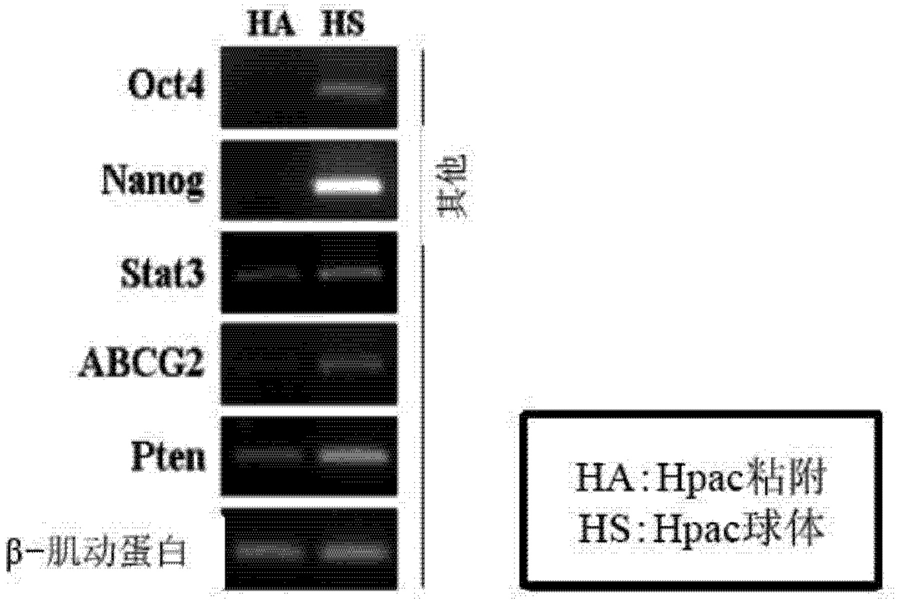

HA
HS
Oct4
Nanog
Stat3
ABCG2
Pten
β-肌动蛋白
其他
HA:Hpac粘附
HS:Hpac球体

图 2b

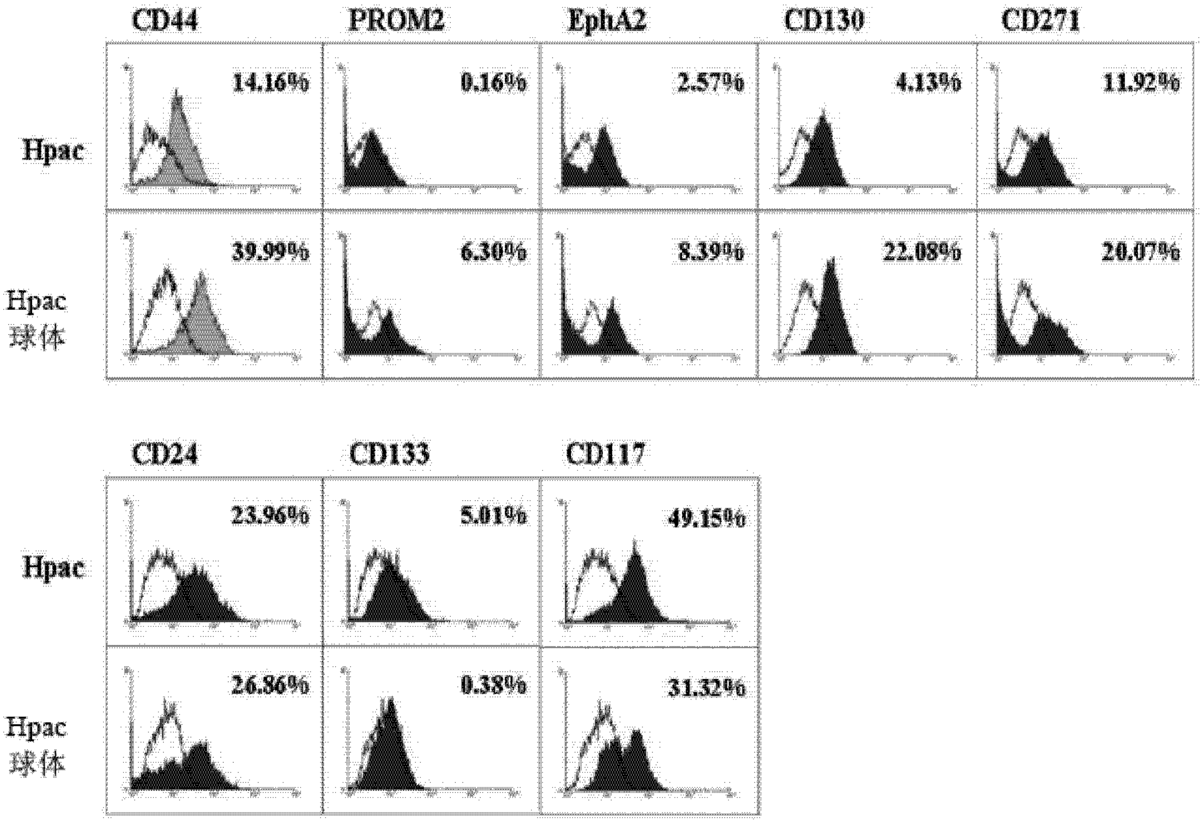

CD44
PROM2
EphA2
CD130
CD271
Hpac
14.16%
0.16%
2.57%
4.13%
11.92%
Hpac 球体
39.99%
6.30%
8.39%
22.08%
20.07%
CD24
CD133
CD117
Hpac
23.96%
5.01%
49.15%
Hpac 球体
26.86%
0.38%
31.32%

图 3

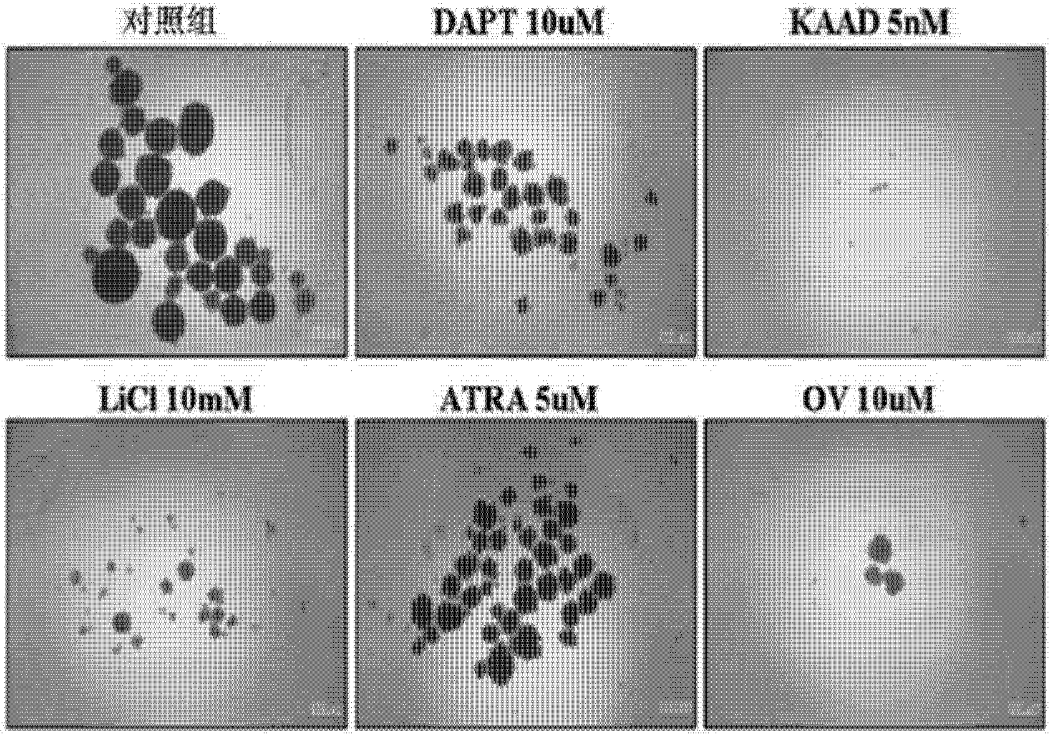

对照组
DAPT 10uM
KAAD 5nM
LiCl 10mM
ATRA 5uM
OV 10uM

图 4a

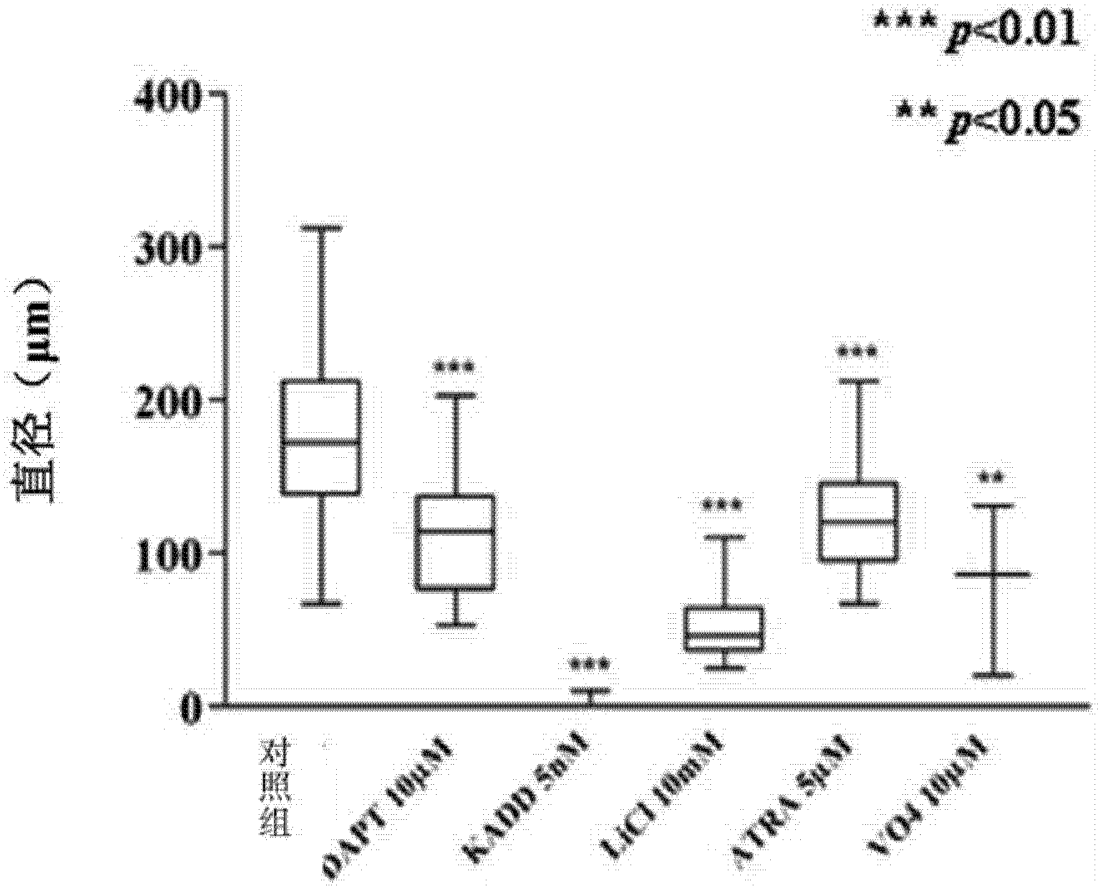

*** p<0.01
** p<0.05
直径（μm）
400
300
200
100
0
***
***
***
***
**
对照组
DAPT 10μM
KAAD 5nM
LiCl 10mM
ATRA 5μM
VO4 10μM

图 4b

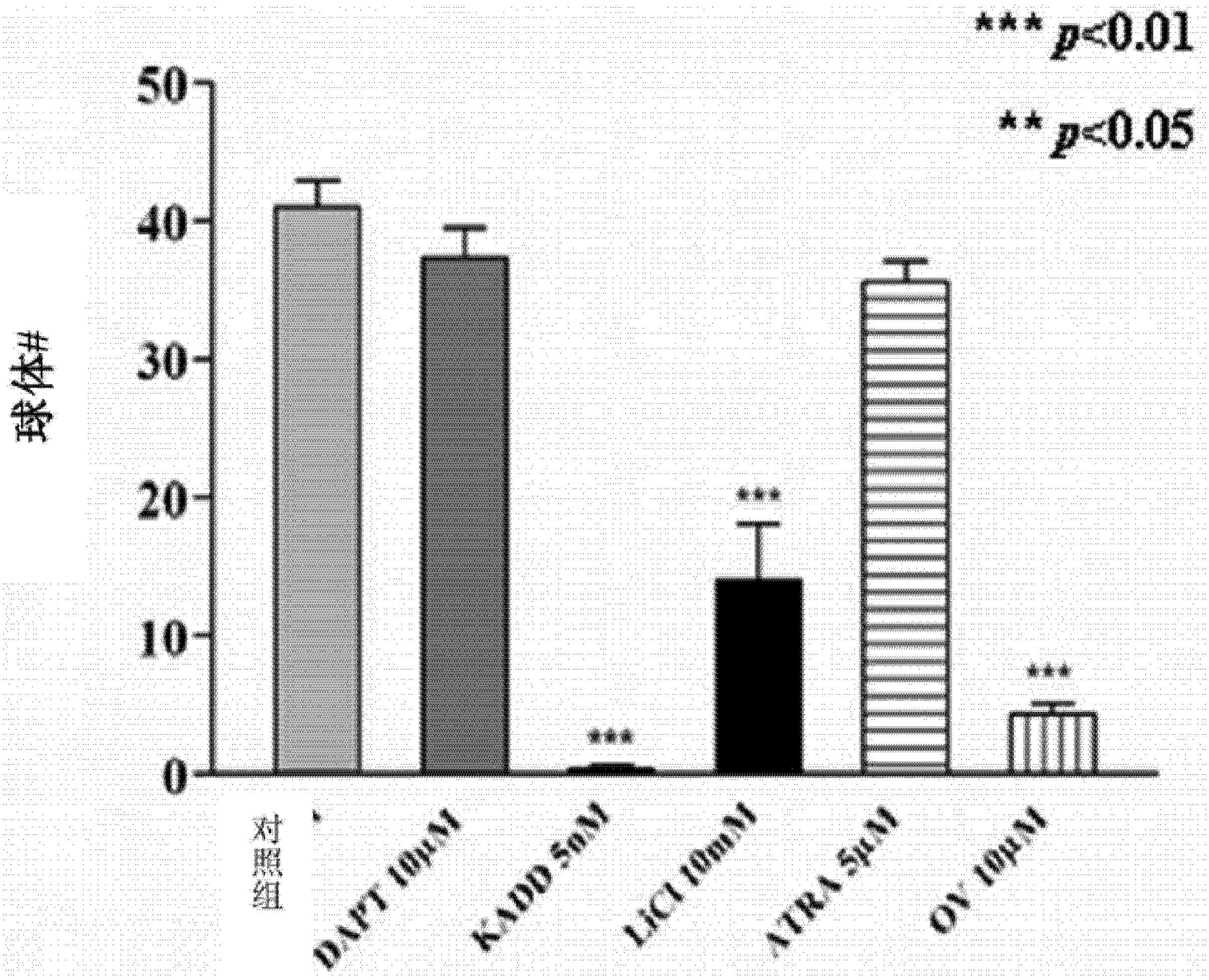
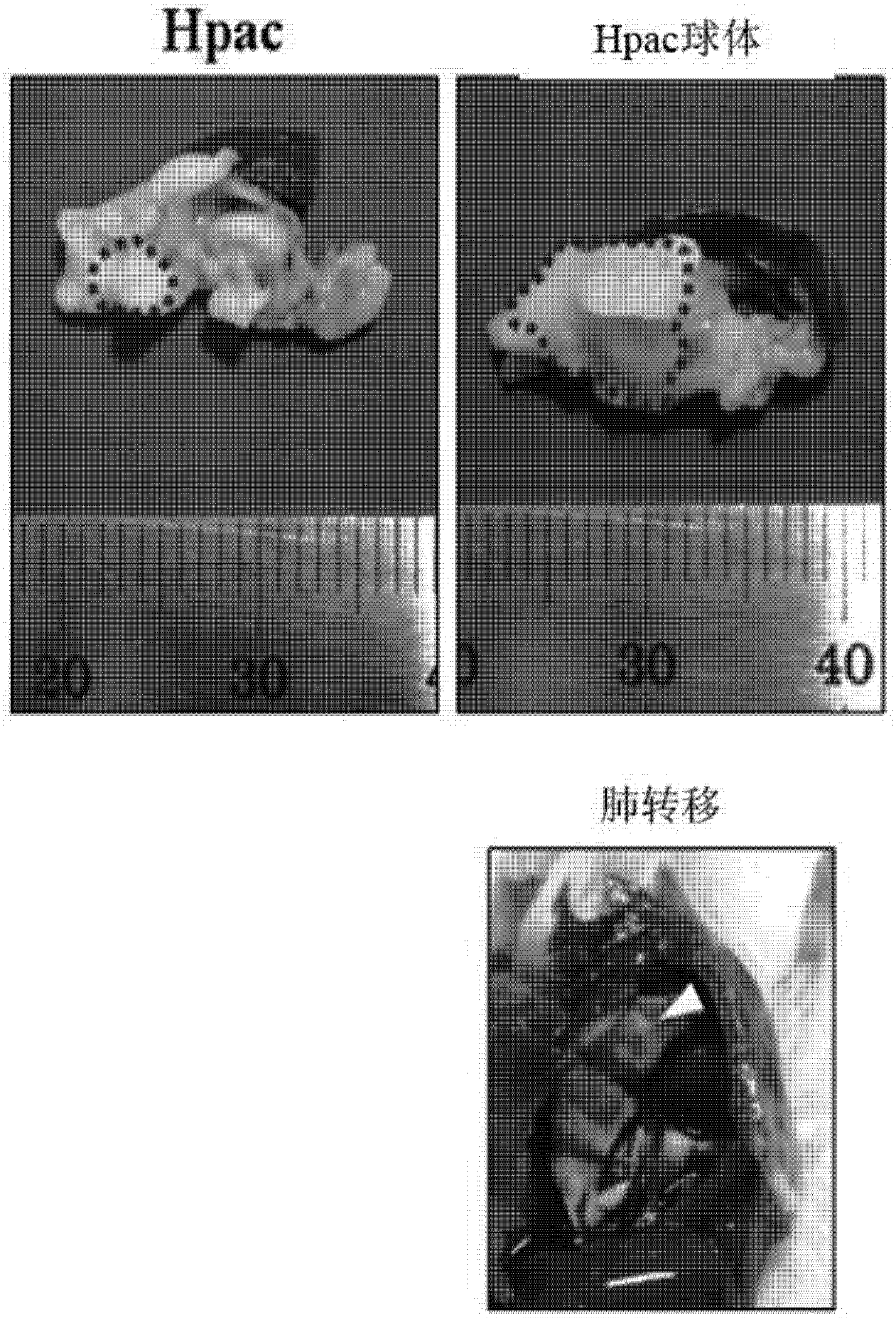

*** $p<0.01$
** $p<0.05$
球体#
50
40
30
20
10
0
***
***
***
对照组
DAPT 10μM
KADD 5nM
LiCl 10mM
ATRA 5μM
OV 10μM

图 4c

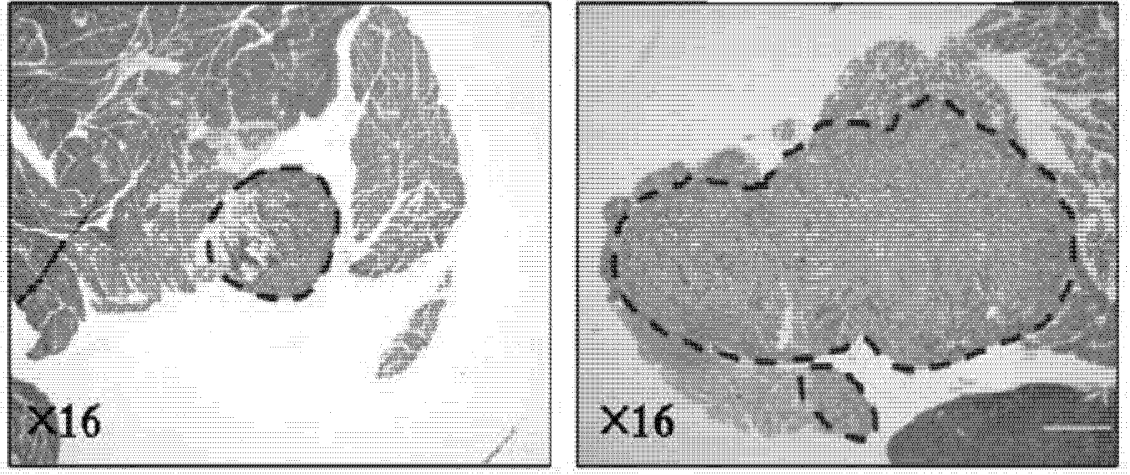


Hpac

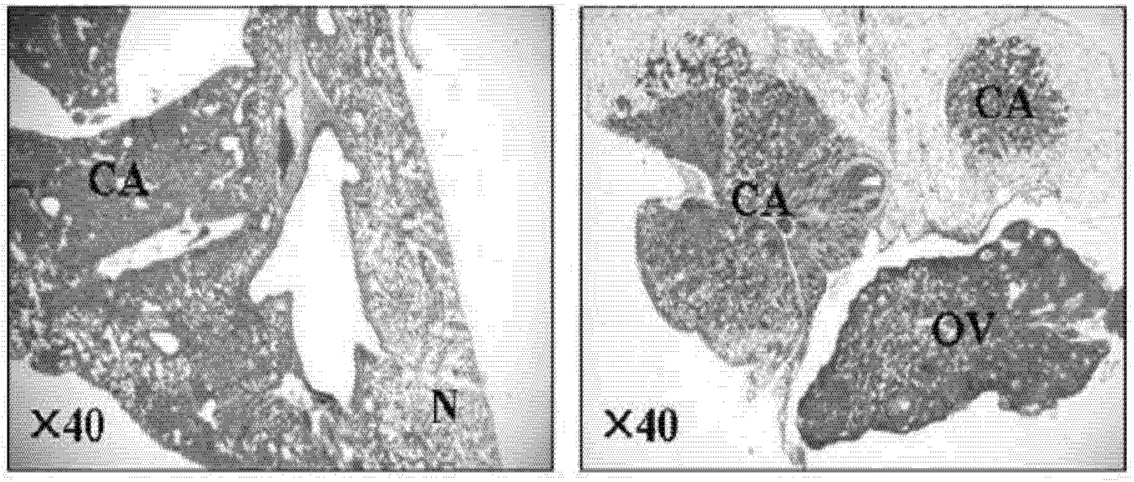
Hpac球体

肺转移

图 5a



Hpac Hpac球体



肺转移 腹膜转移

CA
N
×40
CA
CA
OV
×40

图 5b

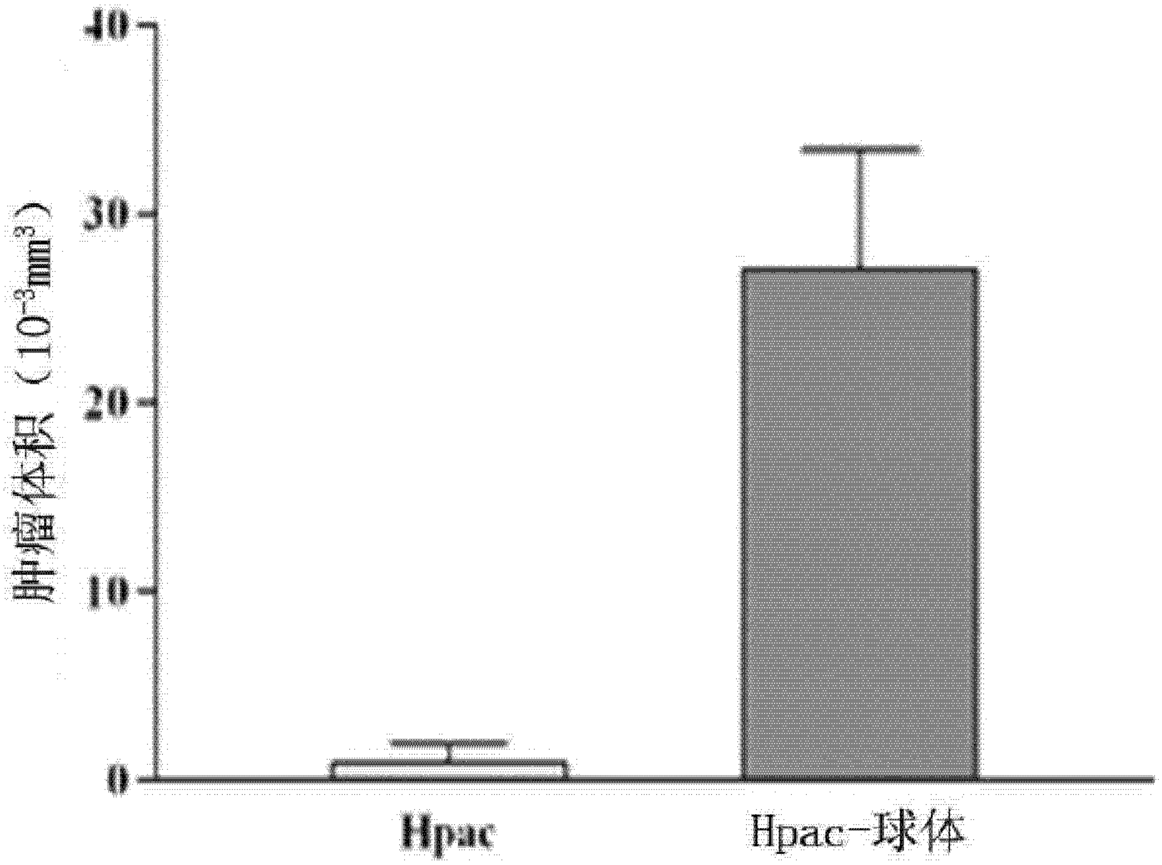


图 5c

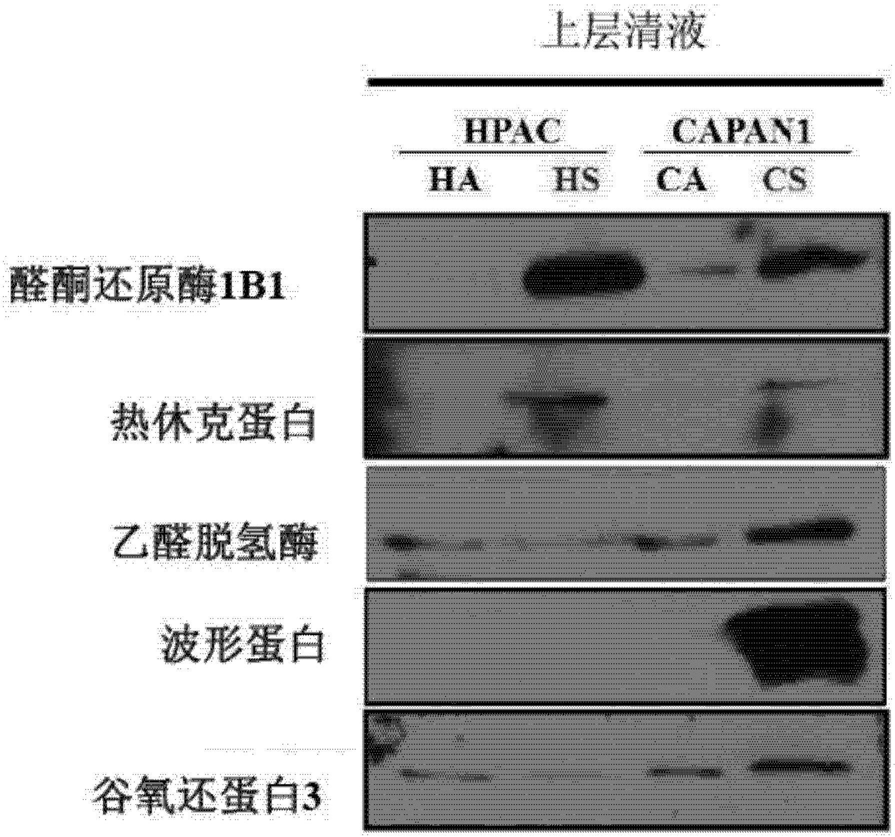

上层清液
HPAC
CAPAN1
HA
HS
CA
CS
醛酮还原酶1B1
热休克蛋白
乙醛脱氢酶
波形蛋白
谷氧还蛋白3

图 6

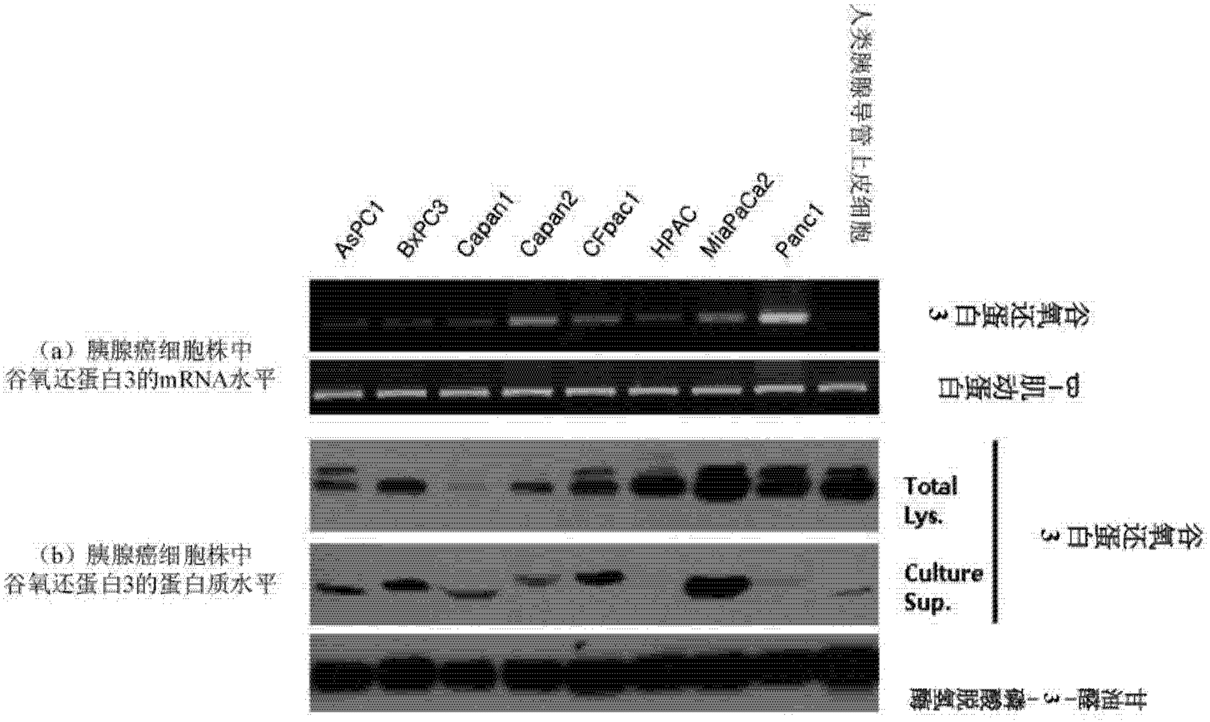

AsPC1
BxPC3
Capan1
Capan2
CFpac1
HPAC
MiaPaCa2
Panc1
人类胰腺导管上皮细胞
(a) 胰腺癌细胞株中
谷氧还蛋白3的mRNA水平
谷氧还蛋白3
β-肌动蛋白
(b) 胰腺癌细胞株中
谷氧还蛋白3的蛋白质水平
Total
Lys.
Culture
Sup.
谷氧还蛋白3
甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 7

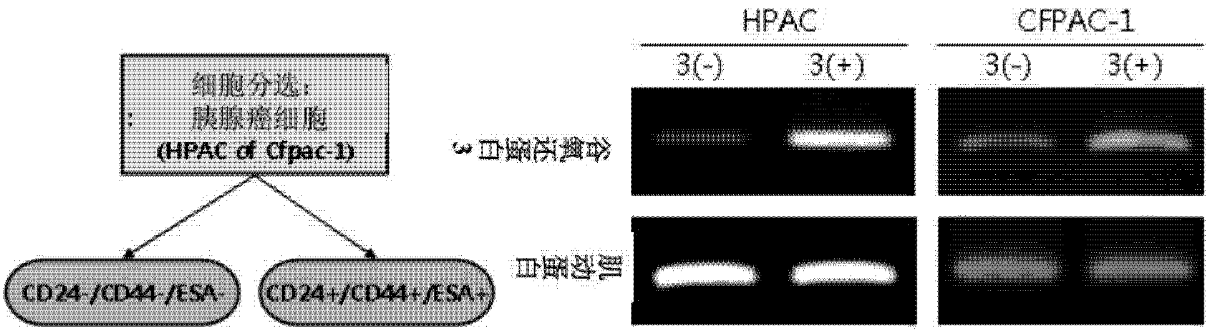
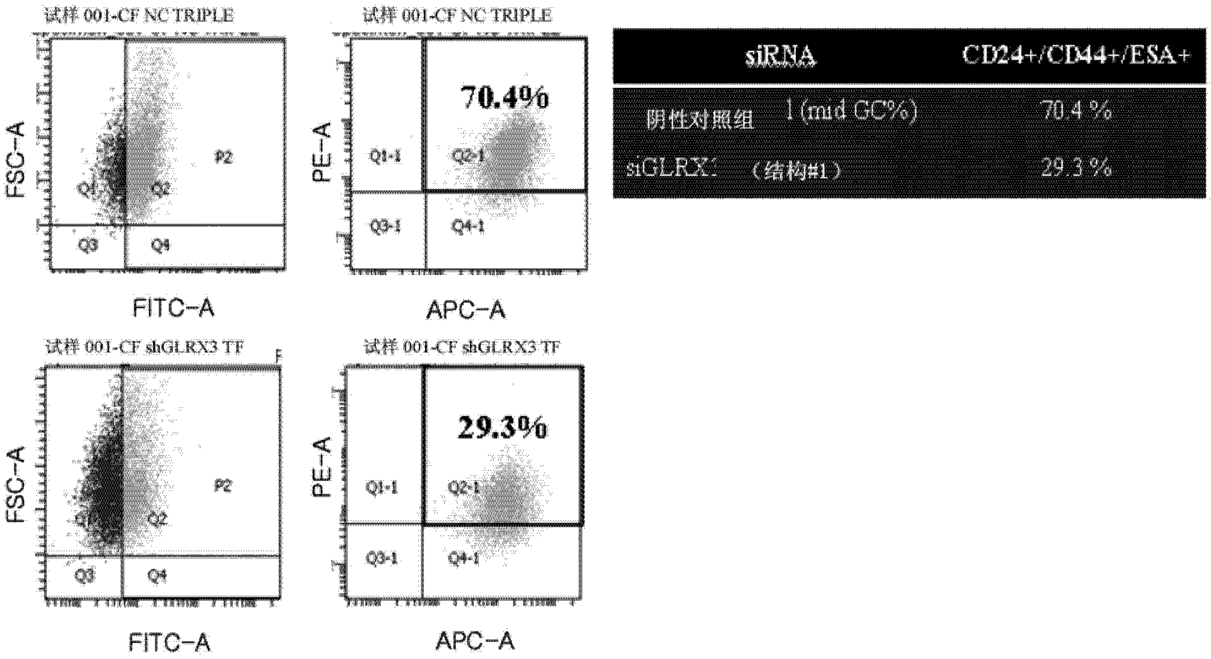

细胞分选：
胰腺癌细胞
(HPAC of Cfpac-1)
CD24-/CD44-/ESA-
CD24+/CD44+/ESA+
HPAC
CFPAC-1
3(-)
3(+)
3(-)
3(+)
谷氧还蛋白3
肌动蛋白

图 8



siRNA		CD24+/CD44+/ESA+
阴性对照组	1 (mid GC%)	70.4 %
siGLRX3	（结构#1）	29.3 %

图 9

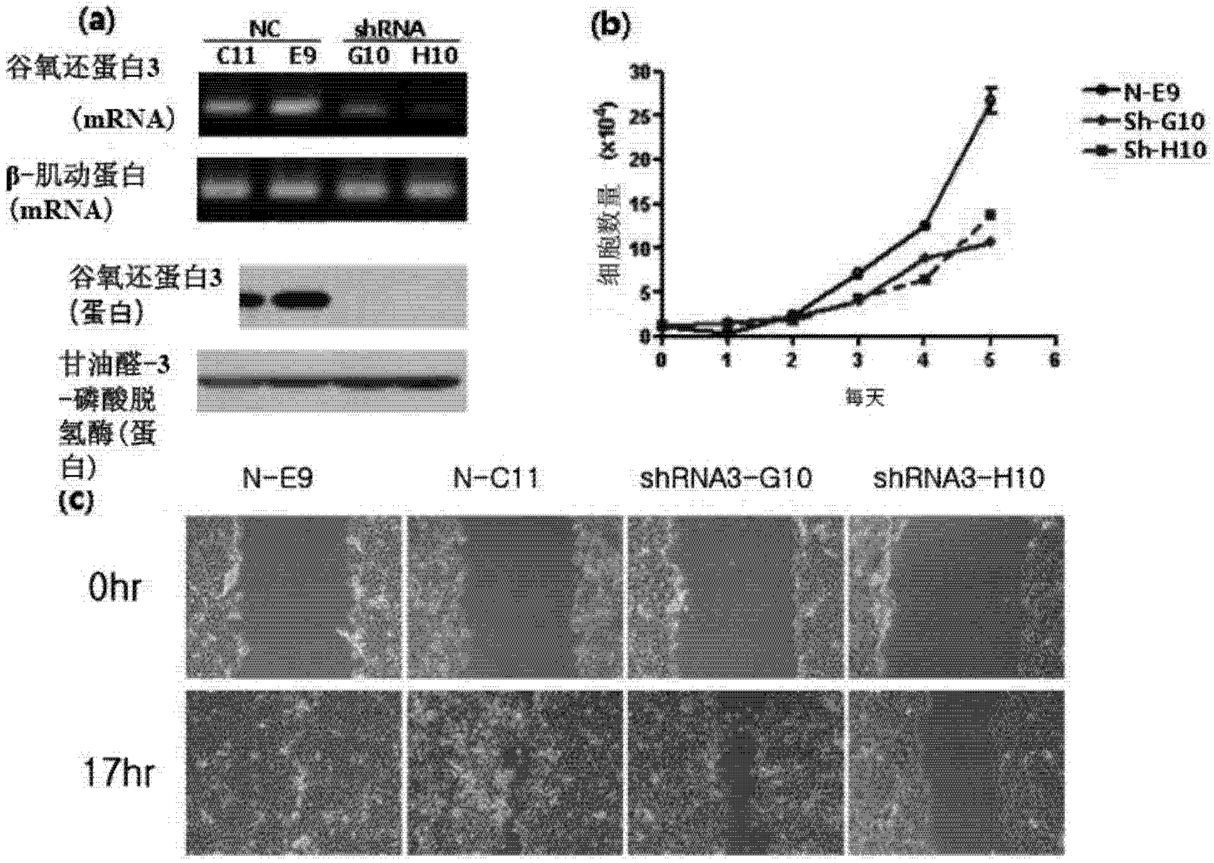

(a)
NC
shRNA
C11
E9
G10
H10
谷氧还蛋白3
(mRNA)
β-肌动蛋白
(mRNA)
谷氧还蛋白3
(蛋白)
甘油醛-3-磷酸脱氢酶(蛋白)
(b)
细胞数量 (×10⁴)
30
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
每天
N-E9
Sh-G10
Sh-H10
(c)
N-E9
N-C11
shRNA3-G10
shRNA3-H10
0hr
17hr

图 10

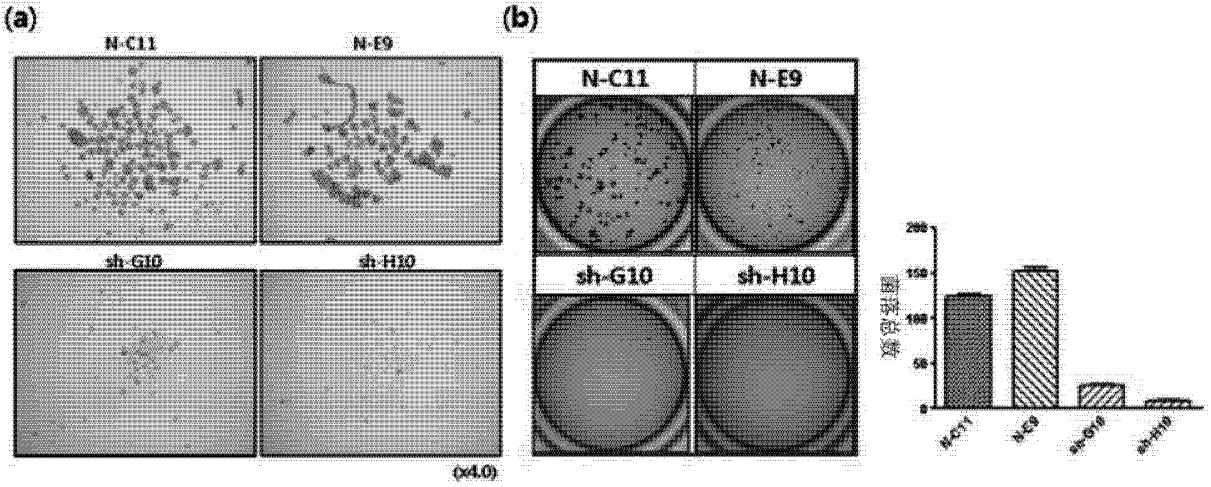
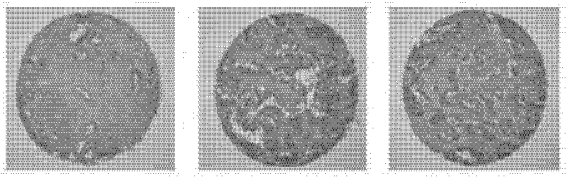
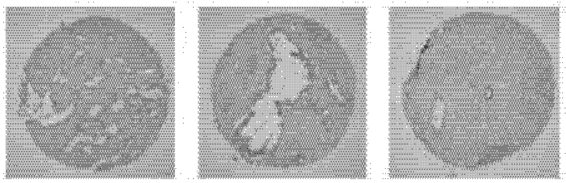
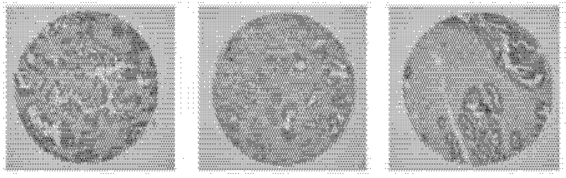
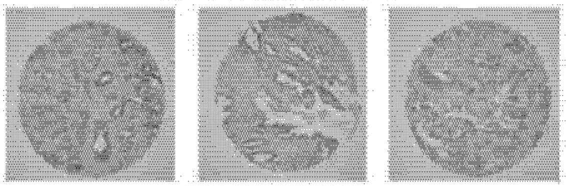

(a)
N-C11
N-E9
sh-G10
sh-H10
(x4.0)
(b)
N-C11
N-E9
sh-G10
sh-H10
菌落总数
200
150
100
50
0
N-C11
N-E9
sh-G10
sh-H10

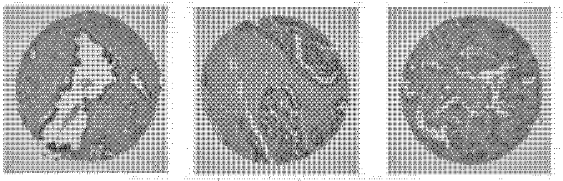
图 11

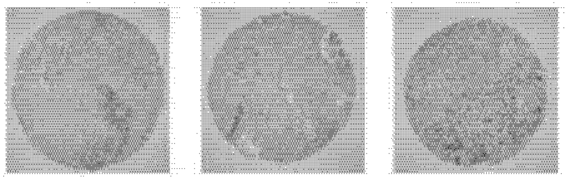

（A）1-酰基甘油-3-磷酸O-酰基转移酶4


（B）醛酮还原酶1


（C）热休克蛋白90AB1


（D）乙醛脱氢酶


（E）核糖体蛋白S6激酶kDa


（F）波形蛋白

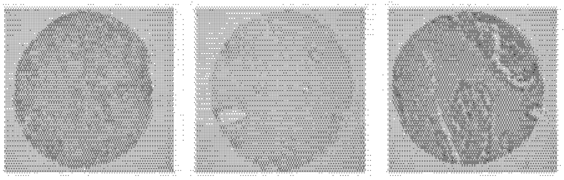
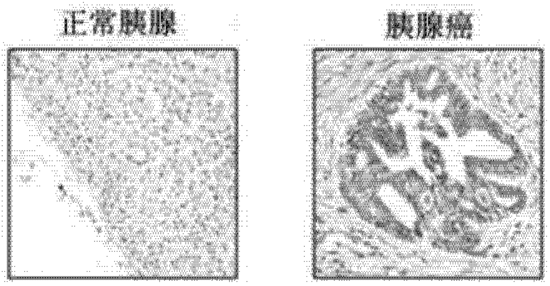
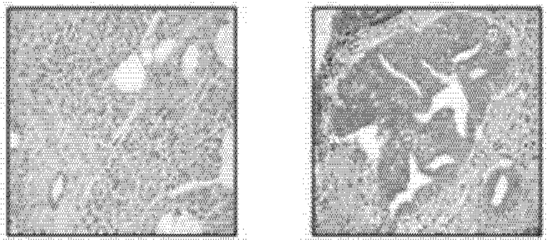

（G）谷氧还蛋白3

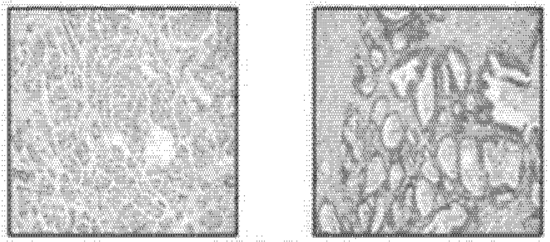
图 12



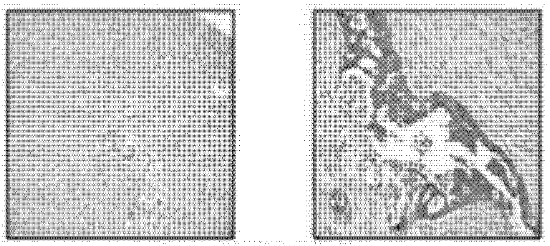
（A）1-酰基甘油-3-磷酸O-酰基转移酶4



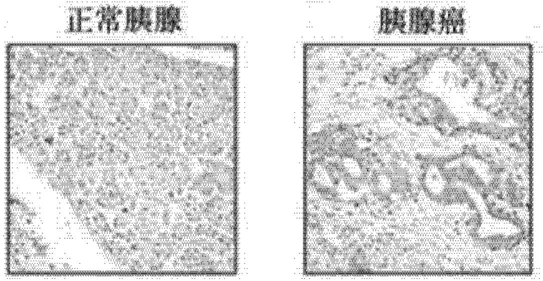
（B）醛酮还原酶



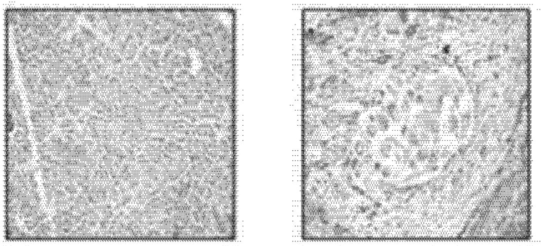
（C）热休克蛋白90



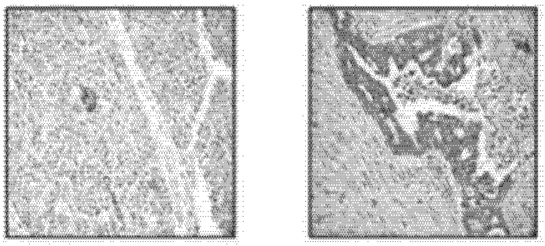
（D）乙醛脱氢酶



（E）丝裂原-应激激活蛋白激酶2



（F）波形蛋白



（G）谷氧还蛋白3

图 13

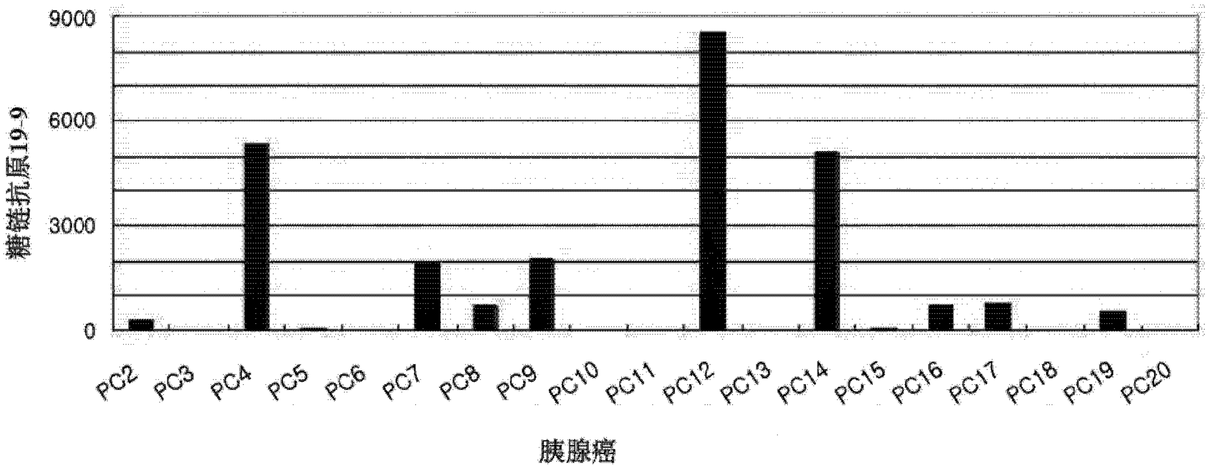

糖链抗原19-9
9000
6000
3000
0
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20
胰腺癌

图 14a

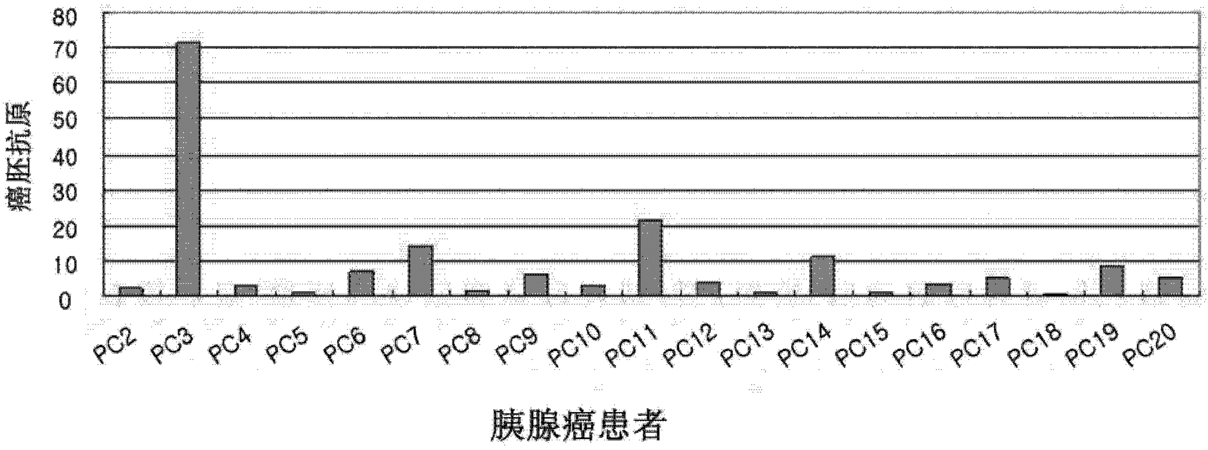

癌胚抗原
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20
胰腺癌患者

图 14b

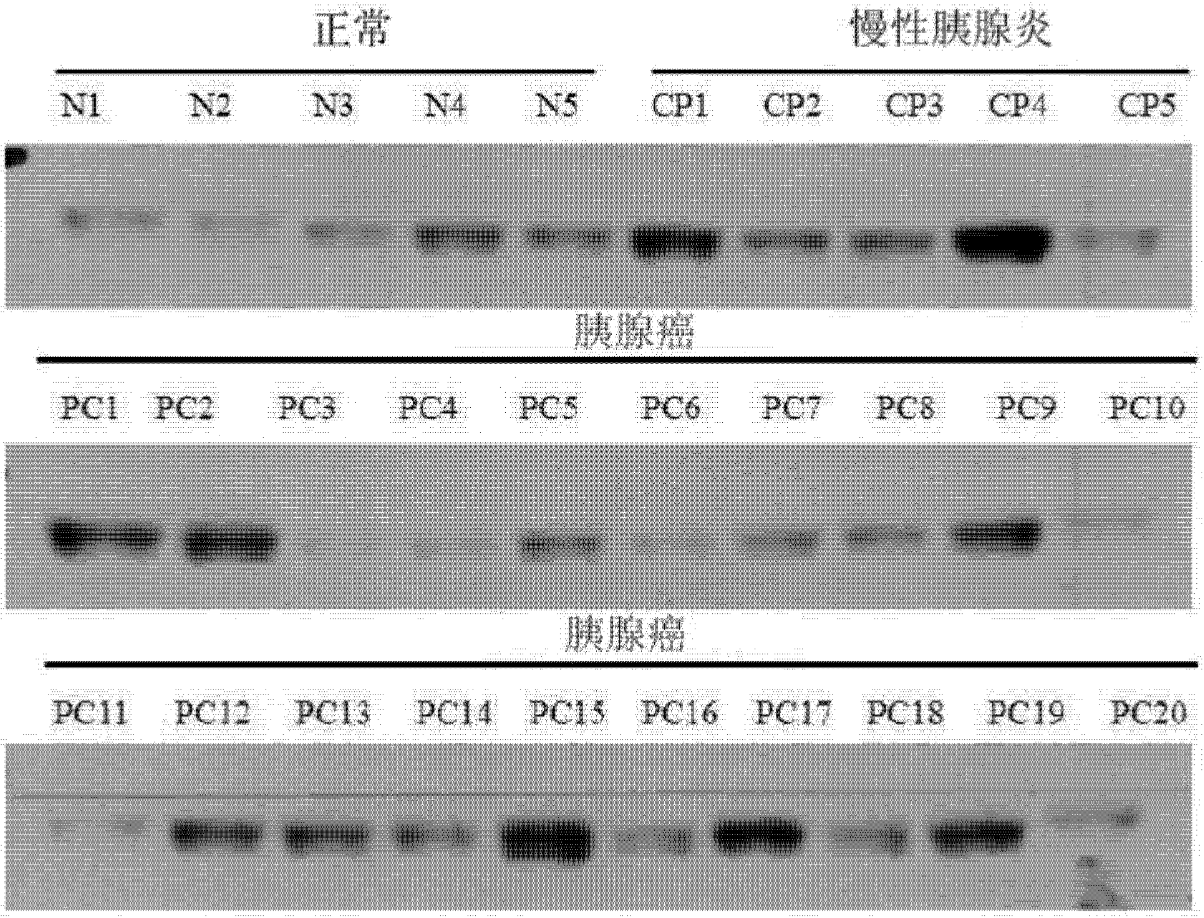

正常
慢性胰腺炎
N1
N2
N3
N4
N5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
胰腺癌
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
胰腺癌
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20

图 15a

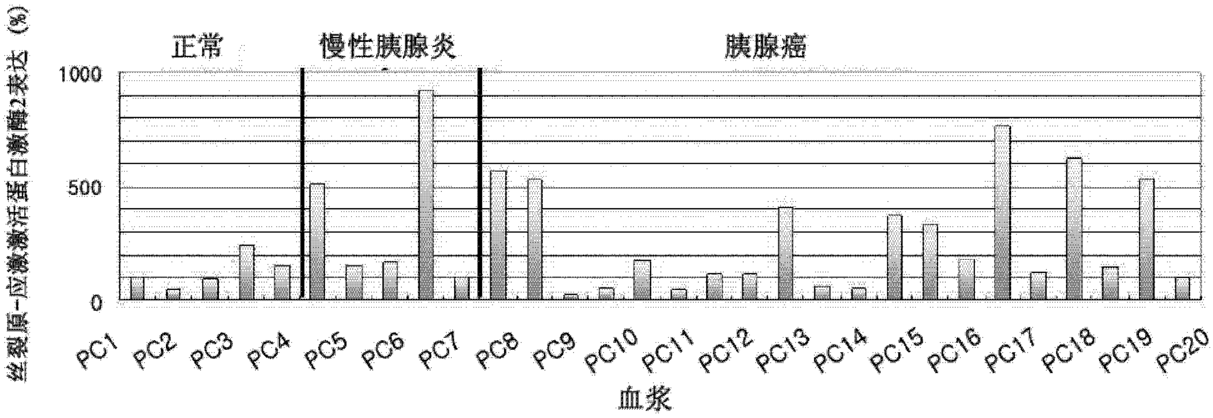

丝裂原-应激激活蛋白激酶2表达 (%)
正常
慢性胰腺炎
胰腺癌
1000
500
0
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20
血浆

图 15b

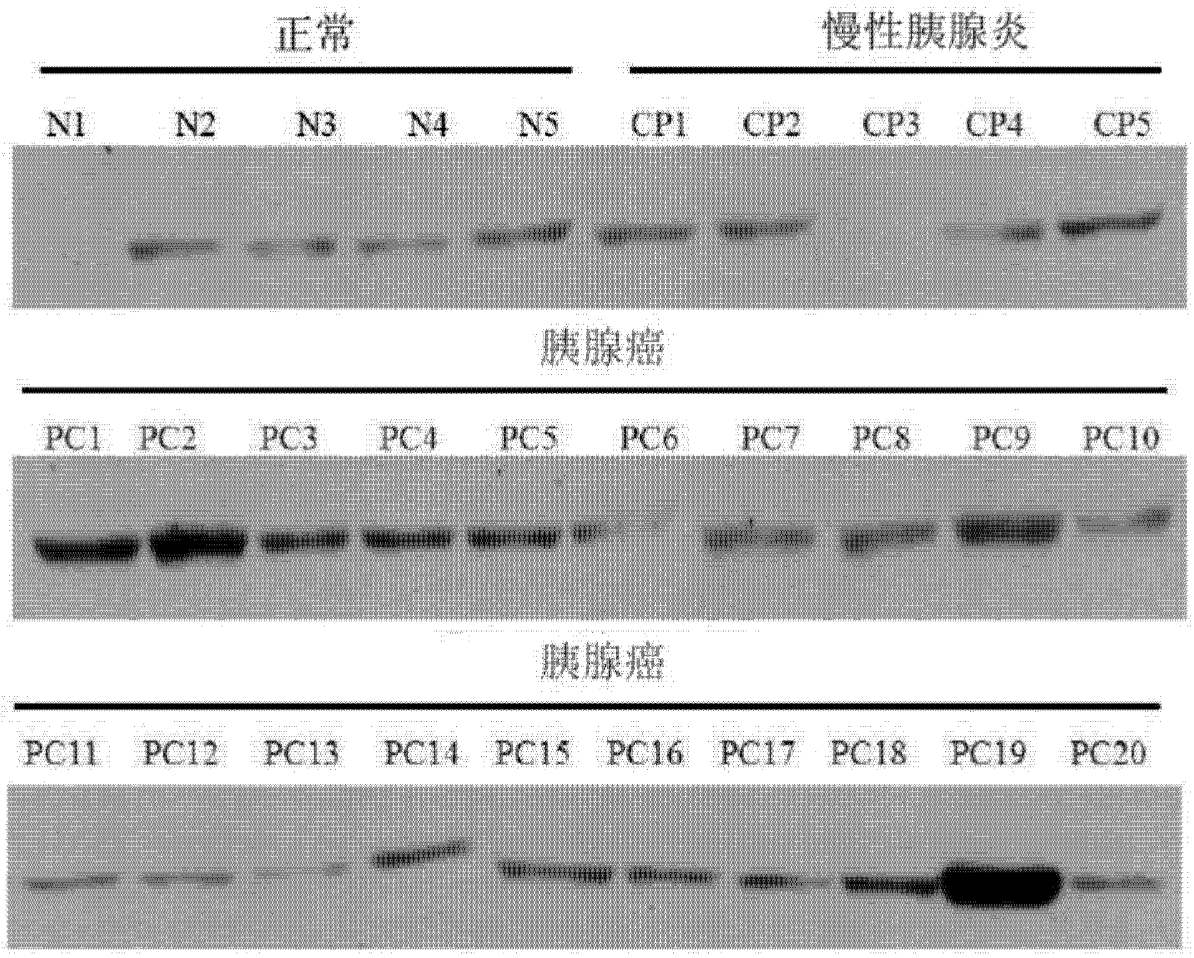

正常
慢性胰腺炎
N1
N2
N3
N4
N5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
胰腺癌
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
胰腺癌
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20

图 16a

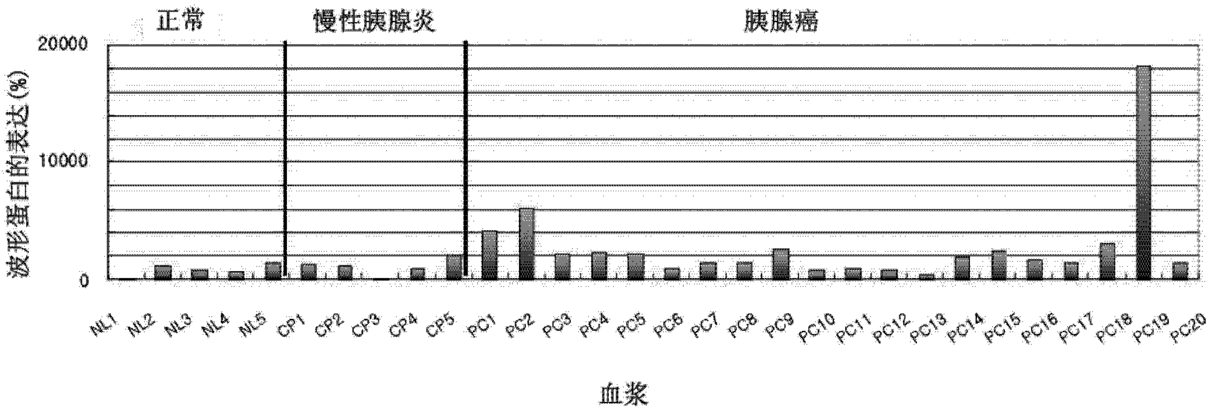

正常
慢性胰腺炎
胰腺癌
波形蛋白的表达(%)
20000
10000
0
NL1
NL2
NL3
NL4
NL5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20
血浆

图 16b

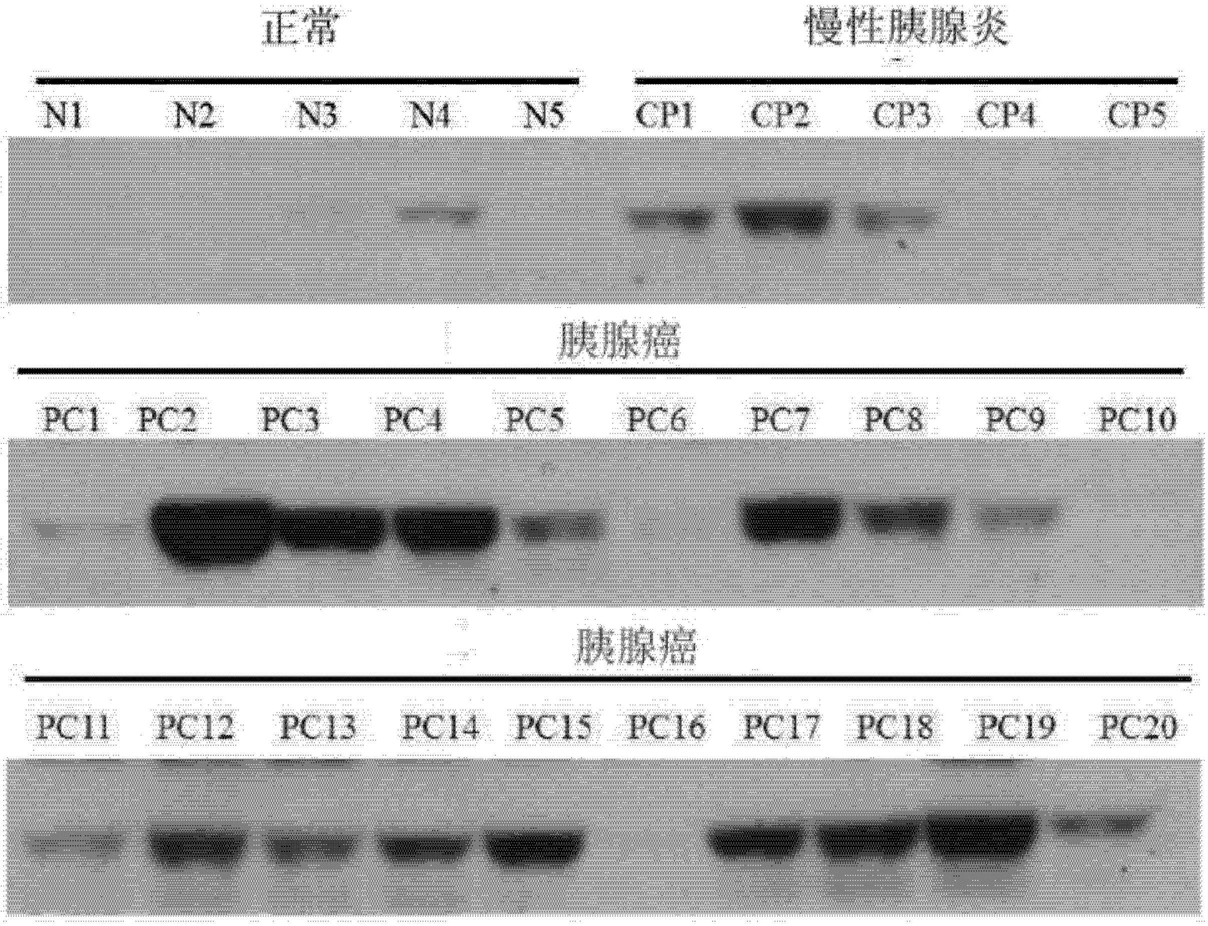

正常
慢性胰腺炎
N1
N2
N3
N4
N5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
胰腺癌
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
胰腺癌
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20

图 17a

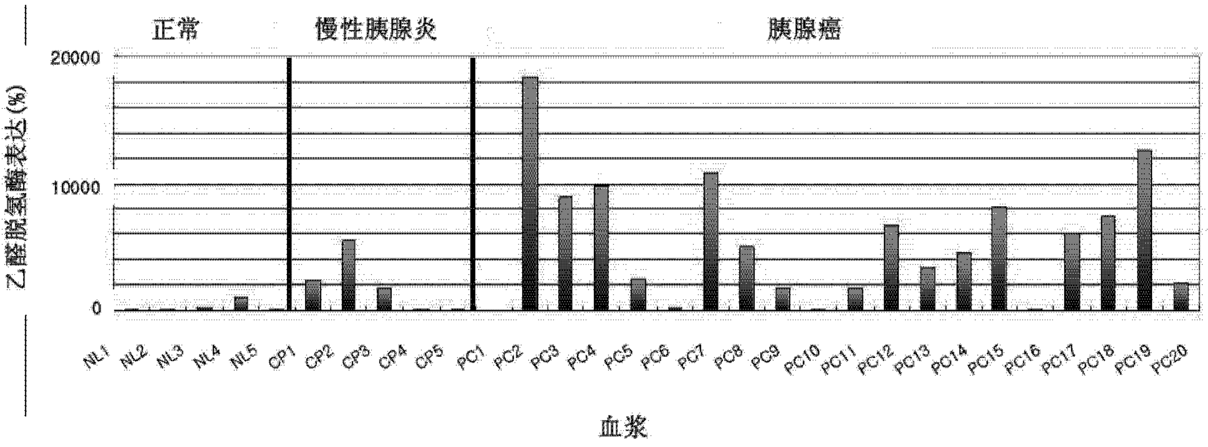

正常
慢性胰腺炎
胰腺癌
乙醛脱氢酶表达(%)
20000
10000
0
NL1
NL2
NL3
NL4
NL5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20
血浆

图 17b

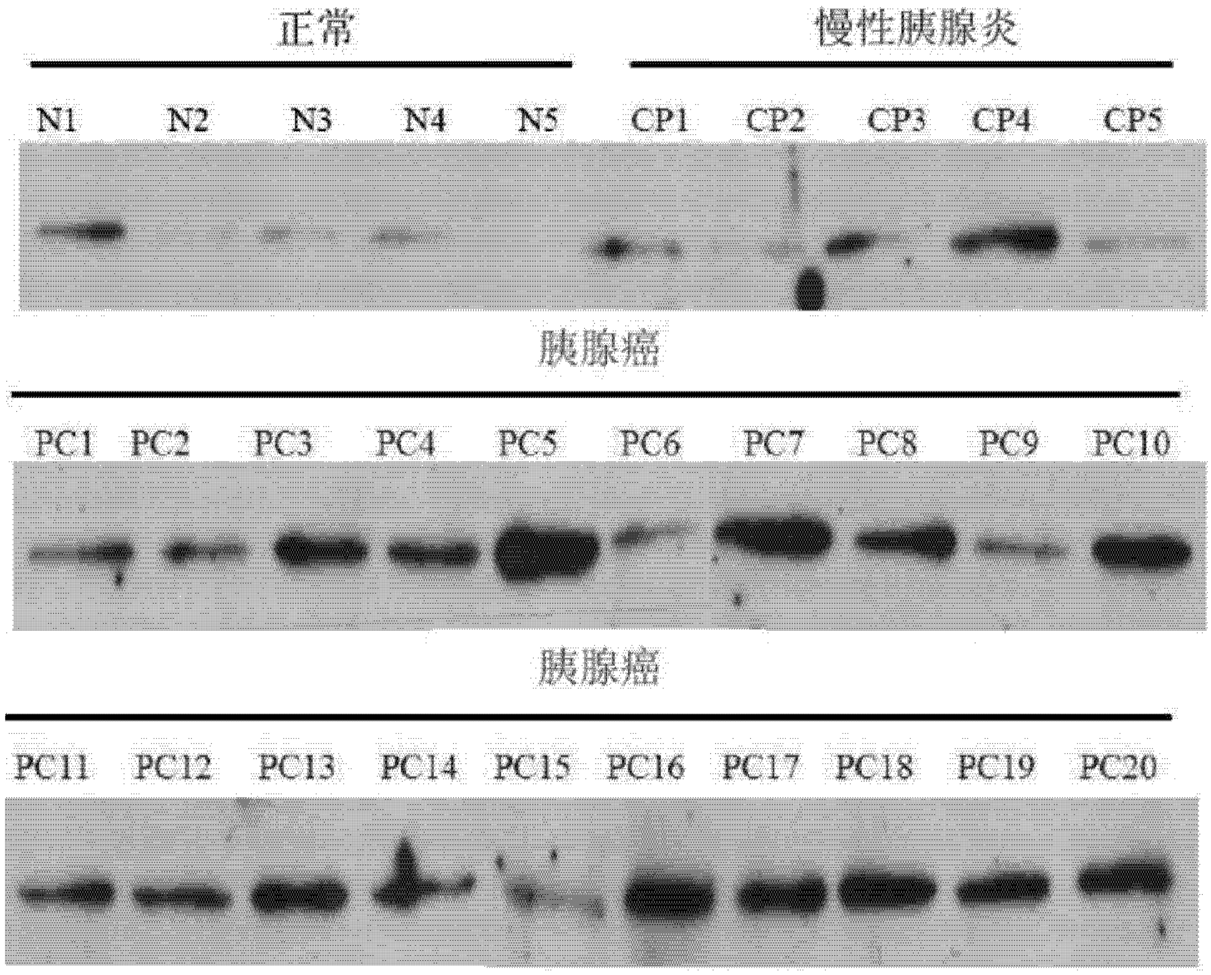

正常
慢性胰腺炎
N1
N2
N3
N4
N5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
胰腺癌
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
胰腺癌
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20

图 18a

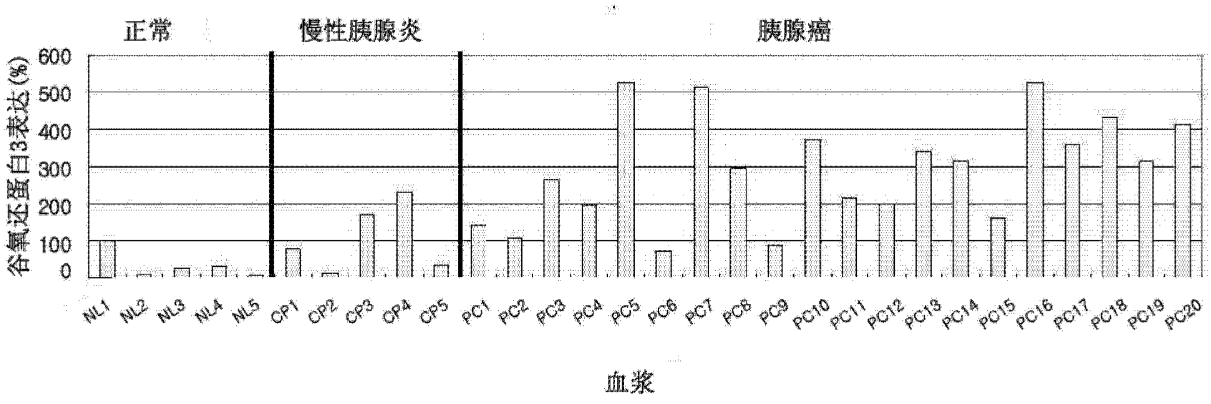

正常
慢性胰腺炎
胰腺癌
谷氧还蛋白3表达(%)
600
500
400
300
200
100
0
NL1
NL2
NL3
NL4
NL5
CP1
CP2
CP3
CP4
CP5
PC1
PC2
PC3
PC4
PC5
PC6
PC7
PC8
PC9
PC10
PC11
PC12
PC13
PC14
PC15
PC16
PC17
PC18
PC19
PC20
血浆

图 18b

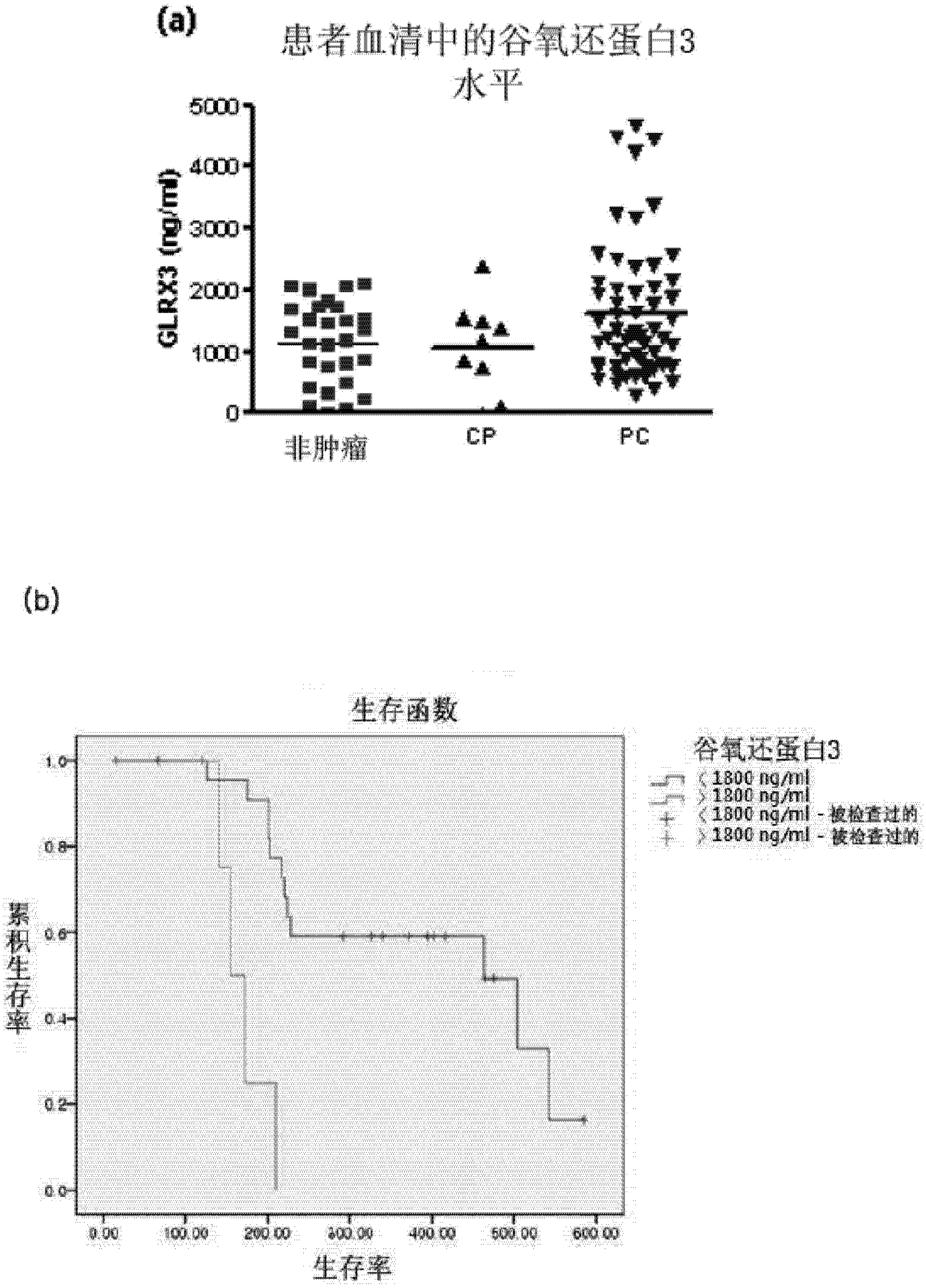

(a)
患者血清中的谷氧还蛋白3
水平
GLRX3 (ng/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
非肿瘤
CP
PC
(b)
生存函数
谷氧还蛋白3
＜1800 ng/ml
＞1800 ng/ml
＜1800 ng/ml - 被检查过的
＞1800 ng/ml - 被检查过的
累积生存率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.00
100.00
200.00
300.00
400.00
500.00
600.00
生存率

图 19