

Heat Shock Protein 27 Expression in EUS-FNA Samples  
Can Predict Gemcitabine Sensitivity in Pancreatic  
Cancer.

(EUS-FNA検体でのHSP27発現の評価は膵癌における  
Gemcitabine感受性予測に有用である)

氏名 川野 道隆

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用分子生命科学系専攻  
先端分子応用医科学領域  
消化器病態内科学分野

平成30年6月

## 目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	3
4. 方法	3
(1) 対象	3
(2) 方法	3
(3) 解析	4
5. 結果	4
6. 考察	8
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	10

# 1. 要旨

## 背景と目的：

Gemcitabine (GEM) 感受性の評価は膵癌における適正な治療導入に寄与する。我々はこれまで膵癌におけるHSP27発現増強がGEM耐性に関与していることを報告した。今回、臨床的に膵癌におけるHSP27発現をEUS-FNA検体を用いて検討することを目的とした。さらにHSP27発現とGEM感受性の関連を検討することを目的とした。

## 方法：

2010年9月から2013年11月までに当院でEUS-FNAを施行し外科切除した膵癌患者19例を対象とした。EUS-FNA検体と切除標本のHSP27発現の相関を検討した。HSP27発現とGEM感受性の関連を検討するために2007年1月から2014年9月までに当院でEUS-FNAを施行した切除不能膵癌のうち、GEM単剤で治療導入した19例を対象とした。EUS-FNA検体におけるHSP27およびリン酸化HSP27の発現率を測定し、発現率別にGEMの治療効果（生存率、GEM投与継続期間）を評価した。

## 結果：

EUS-FNA検体と切除標本のHSP27発現率は有意な相関関係を呈した ( $p < 0.01$ )。また、切除不能膵癌19例のリン酸化HSP27高発現群において有意にGEM抵抗性を示した ( $P < 0.05$ )。リン酸化HSP27 (Ser82) 発現率のCut off値を51.6%に設定すると、GEM感受性の評価における正診率は82.4%で最も良好な診断精度を示した。さらにリン酸化HSP27 (Ser82) 発現率51.6%以上の群は51.6%未満の群と比較し有意に生存率は低く、GEM投与継続期間は短かった ( $P < 0.05$ )。

## 結論：

膵癌におけるHSP27発現の評価は切除標本との相関が示されたことでEUS-FNA検体でも行うことが可能であることが証明された。EUS-FNA検体におけるHSP27発現率の測定はGEM感受性の予測に有用であることが示唆された。

## 2. 研究の背景

膵癌は進行が速く、早期診断が困難で、効果的治療も乏しいことから最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。唯一の根治的治療は外科切除であるが、診断時に局所進行あるいはリンパ節転移や臓器転移を来していることが多く、切除不能症例が膵癌患者の多くを占める。そのような症例における予後改善には化学療法の進歩が重要と考えられる。切除不能膵癌に対する化学療法の位置づけとしてはBurrisら<sup>[1]</sup>がGemcitabine（以下、GEM）は5FUと比較して有意な生存期間延長と症状緩和効果を示すことを報告しており、現在の標準化学療法として確立している。近年ではGEMとの比較試験によりErlotinib併用療法<sup>[2]</sup>やS-1併用療法<sup>[3]</sup>で生存期間の延長が証明されている。また、FOLFIRINOX療法<sup>[4]</sup>やGEM併用nab-paclitaxel療法<sup>[5]</sup>も生存期間の延長が証明され、選択可能な抗癌剤は徐々に増えている。GEM単剤の生存期間中央値6.8か月に対して、FOLFIRINOX療法は生存期間中央値11.1か月と優れた治療成績を示したが、骨髄抑制、発熱性好中球減少など毒性は強く、しばしば重篤な感染症を発症する。このため、年齢や全身状態、腫瘍の局在などを考慮した上で慎重に投与する必要があり、安全に投与することが可能な薬剤としては確立していない。

このため、今後もGEMを基盤とした化学療法は切除不能膵癌において鍵を握る治療と考えられる。膵癌はGEMに対して本来から持つ耐性あるいはGEM投与後に獲得する耐性があり、治療効果に影響する<sup>[6]</sup>。近年の遺伝子解析技術の進歩により膵癌細胞に対するGEM感受性関連因子を解明する報告があり<sup>[7]</sup><sup>[8]</sup>、テーラーメイド治療が期待されている。GEMをより効果的に使用するためにはGEM感受性の分子機構を理解することが必要不可欠である。

我々はこれまでにプロテオーム解析によって膵癌におけるGEM耐性関連蛋白質の同定を行い、治療への応用を目指してきた。2次元電気泳動、Liquid chromatography-mass spectrometryを用いてGEM感受性膵癌細胞株とGEM耐性膵癌細胞株の細胞内蛋白質の発現を比較し、発現に差のある蛋白質を確認した。そのうちGEM耐性株でHSP27の発現が上昇していた。また、GEM耐性株でHSP27発現を低下させるとGEM感受性が回復することを確認した<sup>[9]</sup><sup>[10]</sup>。さらに、GEM耐性株でリン酸化HSP27の発現が上昇していることを明らかにした<sup>[11]</sup>。

また、近年、膵癌のEndoscopic ultrasound-fine needle aspiration（EUS-FNA）検体を用いた抗癌剤感受性試験や抗癌剤耐性遺伝子の検討が試みられている<sup>[8]</sup>。EUS-FNA検体を用いた治療効果の予測が可能となれば、切除不能膵癌や術後補助化学療法の薬剤選択の一助となる可能性がある。過去にEUS-FNA検体によるHSP27発現率およびリン酸化HSP27発現率を評価した研究はない。

## 3. 目的

本研究の目的はEUS-FNA検体におけるHSP27およびリン酸化HSP27の発現率を評価し、GEM感受性との関連を明らかにすることである。

## 4. 方法

### (1) 対象

#### EUS-FNA検体と切除標本におけるHSP27発現率の比較

EUS-FNA検体と切除標本におけるHSP27発現率を比較し、切除標本との関連性を評価した。対象は2010年9月から2013年11月までにEUS-FNAにより膵癌と診断し、外科手術した19例とした。EUS-FNA検体と切除標本におけるHSP27発現率の相関を調べた。

#### EUS-FNA検体のHSP27発現率およびリン酸化HSP27発現率とGemcitabine感受性の比較

2007年1月から2014年9月までにEUS-FNAを施行した切除不能膵癌のうち、一次治療でGEM単剤を導入した19例とした。EUS-FNA検体でHSP27およびリン酸化HSP27発現率を評価し、GEMの感受性の有無を評価した。効果判定はGEM投与を1クール以上施行し、CTでRECIST<sup>[12]</sup>を用いて評価した。今回の研究ではComplete response : CR、Partial response : PR症例はなく、Stable disease : SD例をGEM感受性あり、Progressive disease : PD例をGEM抵抗性ありとした。

### (2) 方法

#### 免疫組織化学

酵素抗体法であるVECTASTAIN ABCキット (VECTOR Laboratories社) を用いた。組織切片は3  $\mu$ m厚の薄片に固定し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋を行った。組織切片をキシレンで脱パラフィン化し、アルコールで水和化する。0.01mol/lのクエン酸ナトリウム緩衝液の中で5分間、97°Cで熱し、抗原を賦活化した。続いて0.3%過酸化水素を混合したメタノール溶液で30分間、常温でインキュベーションし内在性酵素活性を不活化した。二次抗体を調整した動物種の正常血清を滴下し、一次抗体の非特異的結合をブロックする。目的の抗原に対応する一次抗体を滴下し4°Cで24時間置くことで組織切片と反応させる。その後、ビオチン標識二次抗体を加えると、一次抗体・二次抗体・ビオチンの複合体が形成される。アビジン-ビオチン標識酵素の複合体を加えてビオチン標識二次抗体と結合させる。最後に酵素基質溶液と反応させて発色させる。切片の後処理としてヘマトキシリンに浸して対比染色を行う。そしてアルコールで脱水処理、キシ

レンで透徹処理を行い、最後に封入する。特異抗体はmouse anti-HSP27 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, F-4: sc-13132)、rabbit anti-phosphorylated HSP27 antibody (Abcam, Ser15: ab39399, Ser78: ab32501, Ser82: ab155987) を用いた。

#### 評価方法

細胞質が茶色に染色された細胞の核の数を特異抗体 (HSP27あるいはリン酸化HSP27) の発現した腫瘍細胞数として計測した。400倍拡大で鏡検し、全腫瘍細胞数のうち染色された腫瘍細胞数の割合を算出した。最も染色されている3視野の平均値を発現率とした。

### (3) 解析

EUS-FNA検体と切除標本のHSP27発現率の相関関係はスピアマン順位相関係数を用いて決定した。2群間の統計学的解析は Fisher's exact test、Student's t-testを用いた。測定したHSP27発現率からGEM感受性の有無を評価するための最適cut-off値はReceiver operating characteristic (ROC) 曲線解析で決定した。発現率別の生存率、GEM投与継続率はKaplan-Meier法を用いた。統計解析にはJMP 12 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) を用いた。P値0.05未満を統計学的に有意とした。

## 5. 結果

#### EUS-FNA検体と切除標本におけるHSP27発現率の比較

##### 患者背景

EUS-FNA検体と切除標本を比較した全19例の患者背景を表1に示す。平均年齢は66.8 ± 10.4歳、男性8例、女性11例。部位は膵頭部が16例、膵体尾部は3例。平均腫瘍径は21.7 ± 6.8mm、進行度はStage (I A/ I B/ II B/ III/IV) 1/2/9/4/3例であった (UICC分類)。

##### EUS-FNA検体のHSP27発現率の正確性

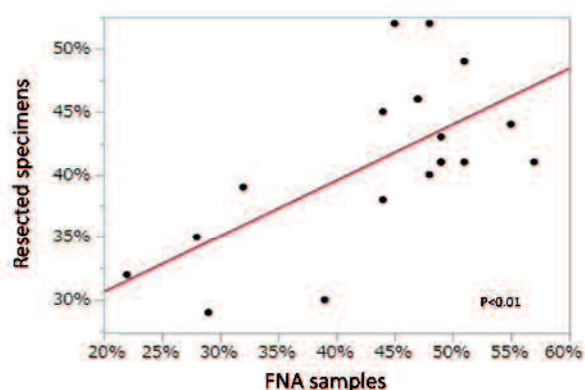
EUS-FNA検体と切除標本のHSP27発現率を対比すると、相関係数は $R=0.61$ を示し、有意な相関関係を認めた ( $p<0.01$ ) (図1)。

表1. EUS-FNA検体と切除標本を比較した19症例の患者背景

	n = 19
Sex, M/F	8/11
Mean age ± SD, Y	66.8 ± 10.4
Location, Ph/Pbt	16/3
Tumor size ± SD, Mm	21.7 ± 6.8
Staging I A/ I B/ II B/ III/IV	1/2/9/4/3

SD:Standard deviation; Ph:pancreatic head; Pbt:pancreatic body and tail.

図1. 切除標本とFNA検体で計測したHSP27発現率の相関関係



EUS-FNA検体のHSP27発現率およびリン酸化HSP27発現率とGemcitabine感受性の比較  
患者背景

切除不能膵癌に対してGEM単剤で治療導入した全19例の患者背景を表2に示す。平均年齢は69 ± 8.4歳、男性5例、女性14例。部位は膵頭部5例、膵体尾部14例。平均腫瘍径は47.4 ± 20.7mm、臓器転移は14例で認め、進行度はいずれもStageIV（UICC分類）。GEM治療効果はSD 6例、PD 13例であった。

表2. 切除不能膵癌に対してGEM単剤で治療導入した19症例の患者背景

	n = 19
Sex. M/F	5/14
Mean age ± SD. y	69 ± 8.4
Location. Ph/Pbt	5/14
Performance status. 0/1	16/3
Tumor size ± SD. mm	47.4 ± 20.7
Staging.	
T 3/4	1/18
M 0/1	5/14
the effects of GEM. SD/PD	6/13

SD:Standard deviation; Ph:pancreatic head; Pbt:pancreatic body and tail;  
GEM:Gemcitabine; SD:stable disease; PD:progressive disease.

GEM治療効果別の患者背景

全19例のGEM治療効果別の患者背景を表3に示す。GEM感受性群（SD）は6例、GEM抵抗群（PD）は13例であった。それぞれ平均年齢は66.3 ± 11.5歳、70 ± 7.2歳。男/女は2/4例、3/10例。部位は膵頭部/体尾部2/4例、3/10例。腫瘍径は43.7 ± 20.9mm、47.9 ± 21.1mm。臓器転移の有無は3/3例、11/2例。Performance Status（0/1）は6/0、10/3例。二次治療の有無は3/3例、4/9例。HSP27（F-4）発現率は27.6 ± 21.7%、46.1 ± 23.3%。リン酸化HSP27（Ser15）発現率は13.1 ± 7.9%、31.1 ± 20.4%。リン酸化HSP27（Ser78）発現率は22 ± 13.6%、39.9 ± 19.9%。リン酸化HSP27（Ser82）発現率は30 ± 24%、

58.5 ± 16.9%であった。リン酸化HSP27発現率はSer15,78,82のいずれもGEM抵抗群で有意に発現率は高値であった (P<0.05)。

表3. Gemcitabine治療効果別の患者背景

	GEM sensitive group (n=6)	GEM resistant group (n=13)	P value
Sex.			
Male	2	3	
Female	4	10	n.s.
Mean age ± SD. Y	66.3±11.5	70±7.2	n.s.
Location.			
Ph	2	3	
Pbt	4	10	n.s.
Tumor size ± SD. mm	43.7±20.9	47.9±21.1	n.s.
Metastasis.			
yes	3	11	
no	3	2	n.s.
Performance status.			
0	6	10	
1	0	3	n.s.
Secondary treatment.			
yes	3	4	
no	3	9	n.s.
HSP27 (F-4) ± SD. %	27.6±21.7	46.1±23.3	n.s.
pHSP27 (Ser15) ± SD. %	13.1±7.9	31.1±20.4	P=0.0277
pHSP27 (Ser78) ± SD. %	22±13.6	39.9±19.9	P=0.0313
pHSP27 (Ser82) ± SD. %	30±24	58.5±16.9	P=0.004

GEM:Gemcitabine; SD:standard deviation; Ph:pancreatic head; Pbt:pancreatic body and tail; pHSP27:phosphorylated HSP27; n.s.:not significant.

#### HSP27発現率およびリン酸化HSP27発現率とGEM治療効果

全19例のHSP27発現率およびリン酸化HSP27発現率とGEM総投与量、生存期間の内訳を表4に示す。各々の発現率からGEM感受性の有無を評価するための最適cut-off値は治療効果 (SDあるいはPD) で分け、ROC曲線を作成すると、HSP27およびリン酸化HSP27 (Ser15,78,82) のCut off値は47.3%、23.9%、34.5%、51.6%となり、Area under the curveはそれぞれ0.71、0.83、0.74、0.83であった (表5)。Ser82では感度85%、特異度83%、正診率82%と最も良好な診断精度を示した (表5、図2)。リン酸化HSP27 (Ser82) において発現率別の生存率、GEM投与継続率をKaplan-Meiyerで示すとリン酸化HSP27 (Ser82) 発現率51.6%以上の群は発現率51.6%未満の群と比較して有意に生存率は低く、GEM投与継続期間は短い傾向であった (図3、図4)。



表4. 全19例のHSP27発現率とGemcitabineの治療効果、総投与量および生存期間

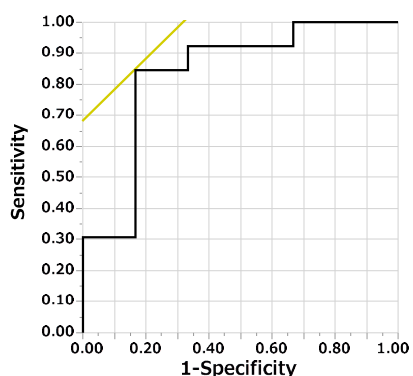
Case.	Mean HSP27 (F-4)	Mean pHSP27 (Ser15)	Mean pHSP27 (Ser78)	Mean pHSP27 (Ser82)	Efficacy of GEM	Total dose (mg)	Survival period (date)
1	0	5.5	23.3	0	SD	7000	319
2	24.2	15.9	29.1	28.3	SD	13200	190
3	37.2	22.5	17.2	66	SD	27200	267
4	51.9	21.4	9.8	30.7	SD	40600	408
5	47.2	9.2	44.4	45.6	SD	20400	324
6	5.1	4.6	8	9.2	SD	47600	365
7	13.2	32.4	15.4	41.5	PD	3600	85
8	24.8	34.8	30.7	62.5	PD	4000	95
9	19.3	23.9	12.5	51.6	PD	3400	177
10	51.7	47.3	35.1	64.7	PD	1000	33
11	47.3	25.3	44.2	51.8	PD	4500	178
12	60.5	30.1	47.8	61.6	PD	2400	80
13	68.1	65	55	65	PD	5400	79
14	66.1	75	62	77.4	PD	3600	166
15	68.5	25	57.2	78.8	PD	6400	114
16	88.4	55.1	76.3	69.8	PD	2400	142
17	31.8	0	32	56.7	PD	1000	50
18	37.6	9.5	11.8	14	PD	5000	90
19	22.2	6.6	38.8	66.9	PD	4000	120

表5. ROC曲線解析による最適Cut off値の比較

	AUC	Cut off value (%)	Sensitivity [95% CI]	Specificity [95% CI]	Accuracy [95% CI]
HSP27 (F-4)	0.71	47.3	54 [0.25 - 0.81]	83 [0.43 - 1.00]	63.2 [0.44 - 0.84]
pHSP27 (Ser15)	0.83	23.9	77 [0.62 - 0.96]	100 [0.98 - 1.00]	84.2 [1.10 - 0.97]
pHSP27 (Ser78)	0.74	34.5	77 [0.62 - 0.96]	83 [0.43 - 1.00]	78.9 [0.85 - 0.94]
pHSP27 (Ser82)	0.83	51.6	85 [0.90 - 0.98]	83 [0.43 - 1.00]	84.2 [1.10 - 0.97]

AUC:Area under the curve; CI:confidence interval; pHSP27:phosphorylated HSP27.

図2. リン酸化HSP27 (Ser82) におけるROC曲線解析



When a p-HSP27 (Ser82) detection rate of 51.6% was set as the cut off value based on the ROC curve analysis, GEM sensitivity could be predicted in 84.2% of the cases, which was an appropriate diagnosis rate.

図3. リン酸化HSP27 (Ser82) 発現率別の生存率

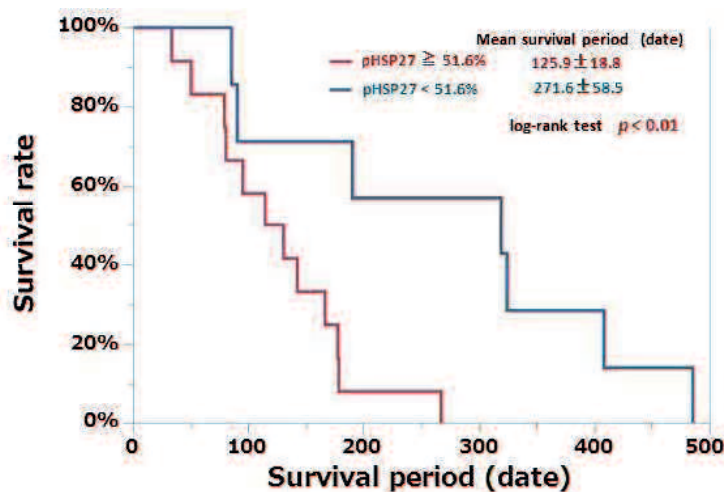
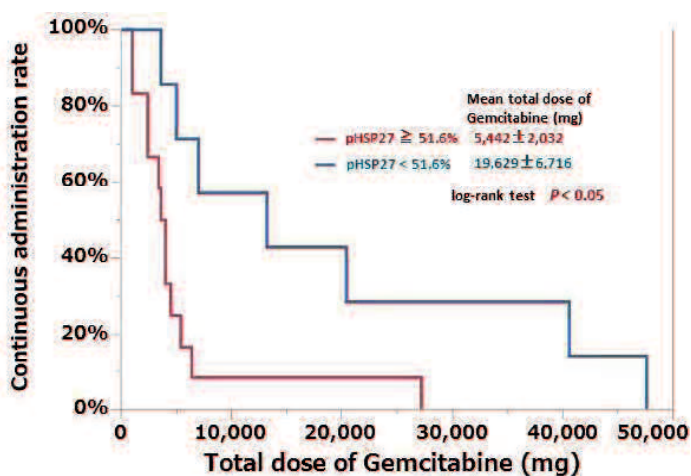


図4. リン酸化HSP27 (Ser82) 発現率別のGEM投与継続率



## 6. 考察

EUS-FNA (endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration) は1992年にVilmanから<sup>[35]</sup>により報告された手技であり、膵実質性腫瘍の病理組織学的診断を可能にした。本邦においては2010年の手技の保険収載を契機に広く用いられている。膵癌に対するEUS-FNAの診断能に関してはmeta-analysis<sup>[36]</sup>によると感度が89%、特異度が96%と良好である。偶発症に関しても0~10.5%と低率であり、重篤な出血、穿孔、膵炎に関してはごく少数に留まっており、安全に施行可能である。近年ではGastrointestinal stromal

tumorやPancreatic neuroendocrine tumorなどの腫瘍においてEUS-FNAによる免疫組織化学での診断が確立している。今回、膵癌のEUS-FNA検体を用いたHSP27の免疫組織化学の検討で切除標本と比較したところ、免疫組織学的にHSP27発現率は相関しており、EUS-FNA検体を用いたHSP27の免疫組織学的評価が可能であることが証明された。

HSP27は熱ショックや低酸素ストレスなどにより誘導される分子シャペロンであり、アポトーシスの制御、抗酸化作用、抗炎症作用などの多機能細胞保護効果を有する<sup>[13]</sup><sup>[14]</sup><sup>[15]</sup>。動脈硬化病変<sup>[16]</sup><sup>[17]</sup>や脳血管障害<sup>[18]</sup><sup>[19]</sup>などを改善させる機能があり、様々な疾患の病態と深く関わっていることが知られている。そして生体内でリン酸化など転写後修飾を受け、より活性型に変化することで機能する<sup>[20]</sup>。

HSP27発現は悪性腫瘍においても深く関わりがある<sup>[21]</sup>。乳癌<sup>[22]</sup><sup>[23]</sup>、前立腺癌<sup>[24]</sup>、卵巣癌<sup>[25]</sup>など多くの悪性腫瘍でHSP27発現は増加している。HSP27発現増加は乳癌におけるドキソルビシンが誘導するアポトーシスの阻害作用<sup>[26]</sup><sup>[27]</sup>や、卵巣癌における化学療法抵抗性への関与、胃癌におけるビンクリスチン耐性細胞株でのHSP27発現増加<sup>[28]</sup>などが報告されている。HSP27発現増加が悪性腫瘍における抗癌剤抵抗性への関与を示唆する複数の報告がある一方、HSP27発現増加は子宮内膜癌<sup>[29]</sup>や食道扁平上皮癌において化学療法感受性や予後良好の指標となりうる<sup>[30]</sup>報告も見受けられ、癌種によって多種多様な機能を呈していると考えられる。

膵癌におけるHSP27発現に関する報告も複数見受けられるが、予後との関連性は異なった見解があり、現時点では定まっていない<sup>[31]</sup><sup>[32]</sup>。我々はこれまでの研究結果から、膵癌におけるHSP27発現増加はGEM耐性に関与していると考えている。今回の研究においてもGEM抵抗群ではGEM感受性群と比較してHSP27発現は高率であり、HSP27発現がGEM耐性に関与していることが示唆された。しかし、GEM感受性の評価における診断精度は良好とは言えなかった。これまでの報告ではWestern blot分析においてGEM投与後の膵癌細胞株はHSP27の細胞内局在が異なっていることが確認されている<sup>[31]</sup>。今回我々は免疫組織化学において細胞全体としてのHSP27発現率を評価しているが、今後は核や細胞質などの細胞内局在のレベルでHSP27発現の相違を調査する必要があると考えられた。

ヒトHSP27はSer15,78,82の3つの位置でリン酸化される。HSP27の機能はリン酸化のような転写後修飾によってより安定化する<sup>[33]</sup>。NakashimaらはGemcitabineがp38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2)の活性化を誘導し、それが刺激となりHSP27のリン酸化が誘導される経路を提唱しており、さらには膵癌におけるGemcitabineの効果にはリン酸化HSP27発現が関与していると結論付けている<sup>[34]</sup>。我々はこれまでにWestern blot分析においてGEM耐性膵癌細胞株ではHSP27発現よりもリン酸化HSP27 (Ser78,Ser82)の発現増加が特に強くみられていることを報告した<sup>[11]</sup>。今回の研究でもGEM耐性群でリン酸化HSP27は有意に高発現を示しており、特にリン酸化HSP27 (Ser82)発現率は最適cut off値を51.6%

に設定することで良好な診断精度が示され予後とも関連することが示唆された。今後はリン酸化HSP27がGemcitabine耐性に影響を及ぼす分子生物学的な機序の解明が望まれるであろう。

これまで、抗癌剤感受性試験や遺伝子解析による抗癌剤耐性に関する報告は膵癌切除材料または膵癌細胞株による検討が多かったが、近年では低侵襲であることからEUS-FNA検体を用いた報告が増えている<sup>[37] [38]</sup>。治療前の検体を用いて薬剤の治療効果が予測できることで切除不能膵癌に対する化学療法選択の一助となる可能性がある。

## 7. 結語

膵癌におけるHSP27発現の評価は切除標本との相関が示されたことでEUS-FNA検体でも行うことが可能であることが証明された。EUS-FNA検体におけるHSP27発現率の測定はGEM感受性の予測に有用であることが示唆された。

## 8. 謝辞

本論文を作成するに当たり熱心にご指導、ご鞭撻をいただいた消化器病態内科学 坂井田功教授、戒能聖治准教授に心より感謝申し上げます。また、日々の議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた仙譽学氏、末永成之氏、播磨博文氏、篠田崇平氏、天野彰吾氏、はじめ消化器病態内科学 研究室の皆様にも感謝申し上げます。

## 9. 参考文献

- 1 Burris HA III, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelsen R, Dorr FA, Stephens CD and Von Hoff DD: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 15: 2403-2413, 1997.
- 2 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W: Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trial Group. *J Clin Oncol* 25: 1960-1966, 2007.
- 3 Ueno H, Okusaka T, Furuse J, Yamao K, Funakoshi A, Boku N, Ohkawa S, Yokosuka O, Tanaka K, Moriyasu F, Nakamori S, Sato T: Multicenter phase 2 study of gemcitabine and

- S-1 combination therapy (GS therapy) in patients with metastatic pancreatic cancer. *Jpn. J Clin Oncol* 41: 953-958, 2011.
- 4 Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouam Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Peter-Verge D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C and Ducreux M: FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 364: 1817-1825, 2011.
  - 5 Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, Korn RL, Desai N, Trieu V, Iqlesias JL, Zhang H, Soon-Shiong P, Shi T, Rajeshkumar NV, Maitra A and Hidalgo M: Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I / II trial. *J Clin Oncol* 29: 4548-4554, 2011.
  - 6 Carmichael J, Fink U, Russel RC, Spittle MF, Harris AL, Spiessi G, Blatter J: Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1-5, 1996.
  - 7 Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Okami J, Yoshioka S, Yamasaki M, Marubashi S, Takemasa I, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M and Monden M: Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 120: 1355-1363, 2006.
  - 8 Itoi T, Sofuni A, Fukushima N, Itokawa F, Tsuchiya T, Kurihara T, Moriyasu F, Tsuchida A, Kasuya K: Ribonucleotide Reductase Subunit 2 mRNA Expression in Pretreatment Biopsies Obtained from Unresectable Pancreatic Carcinomas. *J Gastroenterol* 42: 389-394, 2007.
  - 9 Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Mikuriya K, Fujimoto M, Maehara S, Maehara Y, Okita K, Nakamura K, Sakaida I: Proteomics finding heat-shock Protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Int J Oncol* 31: 1345-1350, 2007.
  - 10 Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Taba K, Fujimoto M, Okita K, Nakamura K, Sakaida I: A proteomic profiling of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell lines. *Mol Med Rep* 1: 429-434, 2008.
  - 11 Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Yoshida K, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Nakamura K, Sakaida I: Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 30: 2539-2543, 2010.
  - 12 Eisenhauer EA, Thrasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lancombe D, Verweij J: New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) *45*: 228-247, 2009.

- 13 Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB: Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev* 91: 1123-1159, 2011.
- 14 Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P: Hsp27(HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 581: 3665-3674, 2007.
- 15 Mehlen P, Mehlen A, Godet J, Arrigo AP: Hsp 27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem* 272: 31657-31665, 1997.
- 16 Park HK, Park EC, Bae SW, Park MY, Kim SW, Yoo HS, Tudev M, Ko YH, Choi YH, Kim S, Kim DI, Kim YW, Lee BB, Yoon JB, Park JE: Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 114: 886-893, 2006.
- 17 Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG: Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118: 379-386, 2003.
- 18 Badin RA, Lythgoe MF, van der Weerd L, Thomas DL, Gadian DG, Latchman DS: Neuroprotective effects of virally delivered HSPs in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 371-381, 2006.
- 19 Van der Weerd L, Tariq Akbar M, Aron Badin R, Valentim LM, Thomas DL, Wells DJ, Latchman DS, Gadian DG, Lythgoe MF, de Bellerocche JS: Overexpression of heat shock protein 27 reduces cortical damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 849-856, 2010.
- 20 Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J: HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem* 274: 9378-9385, 1999.
- 21 Ciocca DR, Calderwood SK: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones* 10: 86-103, 2005.
- 22 Kang SH, Kang KW, Kim KH, Kwon B, Kim SK, Lee HY, Kong SY, Lee ES, Jang SG, Yoo BC: Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer* 8: 286, 2008.
- 23 Love S, King R: A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 69: 743-748, 1994.
- 24 Larkin SE, Holmes S, Cree IA, Walker T, Basketter V, Bickers B, Harris S, Garbis SD, Townsend PA, Aukim-Hastie C: Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression. *Br J Cancer* 106: 157-165, 2012.

- 25 Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR: Expression of the Heat Shock Protein HSP27 in Human Ovarian Cancer. *Clin Can Res* 1603: 1603-1609, 1995.
- 26 Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL: Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 52: 2648-3654,
- 27 Hansen RK, Parra I, Lemieux P, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Fuqua SA: Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 56: 187-196, 1999.
- 28 Yang YX, Xiao ZQ, Chen ZC: Proteome analysis of multidrug resistance in vincristine-resistance human gastric cancer cell line SGC7901/VCR. *Proteomics* 6: 2009-2021, 2006.
- 29 Piura B, Rabinovich A, Yavelsky V, Wolfson M: Heat shock proteins and malignancies of the female genital tract. *Harefuah* 141, 969-972, 2002.
- 30 Nakajima M, Kuwano H, Miyazaki T, Masuda N, Kato H: Significant correlation between expression of heat shock proteins 27,70 and lymphocyte infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 178: 99-106, 2002.
- 31 Liu QH, Zhao CY, Zhang J, Chen Y, Gao L, Ni CY, Zhu MH: Role of heat shock protein 27 in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer: Comparative proteomic analysis. *Mol Med Rep* 6: 767-773, 2012.
- 32 Schafer C, Seelinger H, Bader DC, Assmann G, Buchner D, Guo Y, Ziesch A, Palagyi A, Ochs S, Laubender RP, Jung A, De Toni EN, Kirchner T, Goke B, Bruns C, Gallmeier E: Heat shock protein 27 as a prognostic and predictive biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cell Mol Med*: 1582-4934, 2011.
- 33 Benjamin IJ, McMillan DR: Stress (Heat Shock) Proteins Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 83: 117-132, 1998.
- 34 Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Itani, M, Yoshioka T, Matsushima-Nishiwaki R, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H: Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Cancer Letters* 313: 218-225, 2011.
- 35 Vilmann P, Jacobsen GK, Henriksen FW, Hancke S: Endoscopic ultrasonography with guided fine needle aspiration biopsy in pancreatic disease. *Gastrointest Endosc* 38: 172-173, 1992.
- 36 Chen G, Liu S, Zhao Y, Dai M, Zhang T: Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for pancreatic cancer:a meta-analysis.*Pancreatology* 13: 298-304, 2013.

- 37 Wakatsuki T, Irisawa A, Terashima M, Shibukawa G, Takagi T, Imamura H, Takahashi Y, Sato A, Sato M, Ikeda T, Suzuki R, Hikichi T, Obara K, Ohira H: ATP assay-guided chemosensitivity testing for gemcitabine with biopsy specimens obtained from unresectable pancreatic cancer using endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration. *Int J Clin Oncol* 16: 387-394, 2011.
- 38 Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Souzaki R, Tajiri T, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M: Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Neoplasia* 12: 807-817, 2010.