

血清中mRNA発現量を定量化する新規アッセイ法の 悪性腫瘍における臨床的意義について

¹⁾鳥取大学医学部病態解析医学講座薬物治療学分野

²⁾鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻遺伝子医療学部門

三浦典正¹⁾, 塚本智恵¹⁾, 佐藤鈴奈¹⁾, 清水美佳¹⁾, 樺島広子¹⁾,
高橋俊作¹⁾, 原田知実¹⁾, 長谷川純一¹⁾, 汐田剛史²⁾

Clinical significance of novel assay to quantify serum mRNA expression in malignancies

Norimasa MIURA¹⁾, Tomoe TSUKAMOTO¹⁾, Reina SATO¹⁾, Mika SHIMIZU¹⁾,
Hiroko KABASHIMA¹⁾, Shunsaku TAKAHASHI¹⁾, Tomomi HARADA¹⁾,
Junichi HASEGAWA¹⁾, Goshi SHIOTA²⁾

¹⁾*Division of Pharmacotherapeutics, Department of Pathophysiological and
Therapeutic Science, Faculty of Medicine, Tottori University*

²⁾*Division of Molecular and Genetic Medicine, Department of Genetic Medicine
and Regenerative Therapeutics, Graduate School of Medicine, Tottori University*

ABSTRACT

Currently available tumor markers for hepatocellular carcinoma (HCC) are α -fetoprotein (AFP), lens culinaris agglutinin-reactive AFP (AFP-L3), and des- γ -carboxy prothrombin (DCP). However, their diagnostic potential cannot surpass abdominal ultrasonography (US) as modalities to detect small HCC at early stage, leading that they may delay its diagnosis. We here introduce a newly developed quantitative detection method for serum hTERT mRNA, which has a clinical significance in HCC diagnosis. In 64 patients with HCC, 20 with liver cirrhosis, 20 with chronic hepatitis, and 50 healthy individuals, we measured serum hTERT mRNA by using the newly developed real-time quantitative RT-PCR with SYBR Green I. Briefly, we examined its sensitivity and specificity in HCC diagnosis, clinical significance in comparison with other tumor markers, and its correlations with the clinical parameters by using multivariate analyses and Friedman test. Serum hTERT mRNA showed higher values in patients with HCC than those with chronic liver diseases. hTERT mRNA expression was demonstrated to be independently correlated with clinical parameters such as tumor size, number and differentiation degree ($P < 0.001$, each). hTERT mRNA expression independently correlated with clinical parameters such as differentiation degree ($P < 0.001$). The sensitivity/specificity of hTERT mRNA in HCC diagnosis showed 88.2%/70.0%. hTERT mRNA proved to be expectedly superior to AFP mRNA, AFP and DCP in

されている mRNAs^{16, 17, 18, 19, 20}), そして viral mRNA²¹) が挙げられる. 癌患者の血液中からは多種にわたる RNA マーカーが DNA マーカーよりも検出されることで, 従来及び現行のどの腫瘍マーカーよりも, RNA の方が高感度に検出できるということになる. ある研究では, 2 種類のテロメレースマーカーが乳癌で 44% の陽性率と低率であったが¹⁴), それでもテロメレーズ RNA は全く転移巢のない未分化で小さな原発巣の乳癌患者の血清中でも検出できることから有望なマーカーと言える. Dasi らは, リアルタイム逆転写 RT-PCR 法で血中を循環しているテロメレーズ RNA が癌に対して高感度なマーカーであることを示した¹⁵). その研究では, 9 症例の大腸癌患者のうち 8 症例がヒトテロメレーズ逆転写酵素遺伝子陽性であり, 9 症例の悪性リンパ腫患者のうち全例が陽性であった. 一方, 10 名の健常者は全員陰性であった.

血液中 hTERT mRNA の診断への応用

癌細胞由来の hTERT mRNA や内因性 RNA 成分は, 血清中の RNase により安定性が保てないため検出できないと考えられていた. 血液中 RNA は, 採血後少なくとも 24 時間は安定であるため^{22, 23}), 即ち検出可能であることを意味している^{24, 25}). 実際, hTERT mRNA は乳癌患者の血清中から検出され, その感度と特異度は高々 40% と 100% であった²⁶). 我々は以前, 血清中の HCC 由来 RNA の検出を定性的に検討し, 約 88% が陽性であることを報告した²⁷). これは血清 RNA が HCC だけでなく他の癌診断にも応用できることを示唆している. このように, 私たちは癌診断のための最も検出に適した分子として hTERT を選別した. この拙著では, テロメレーズ活性が多段階的に高まることと, 血行性であることから, HCC が hTERT を評価する最も適した癌と考え, その mRNA を検出する有用性を検討した²⁸).

肝癌における hTERT mRNA 検出の対象, 方法及び結果の概要

1) 対象

124 名の患者 [64 例の肝癌 (HCC), 20 例の肝硬変 (LC), 20 例の慢性肝炎 (CH)] が当検討に登録された. HC の全例が肝病態の背景として LC を有していた. 患者の平均年齢は HCC では 66 歳,

LC で 64 歳, 肝炎患者で 55 歳であった. 66 例の患者が HCV 感染患者で, 30 例が HBV 感染, 2 例が HCV と HBV の重複感染, 5 例が肝炎ウイルス陰性者であった. 検討項目として, 性別, 年齢, 病因, Pugh スコア, Child 分類, 背景肝病変, 総ビリルビン (TB), アルブミン (Alb), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), α -fetoprotein (AFP), AFP-L3, DCP, HCV 量, HCV サブタイプ, 腫瘍数, 腫瘍径, 腫瘍分化度, 転移の有無などの臨床病理学的因子を評価した. 12 名の女性 (22 ~ 83 歳: 平均 58 歳) を含む 50 名の健常者が対照として検討に加えられた. 血清中 hTERT mRNA が肝内の HCC に由来し, かつ肝臓組織から遊離・脱落して, 血液循環中に運ばれるかの真偽を検討するために, 更に外科的切除を受けた 10 例の肝癌組織および血清中の hTERT mRNA を定量的に検討した.

2) 方法

RNA は, 以前私たちが報告したように 3 段階での遠心分離を行い得られた血清から DNase 処理を経て抽出, 精製された^{26, 27}). 定量的リアルタイム RT-PCR 法は, ライトサイクラー (Roche) により, SYBR Green I を用いて, 再現性を確認して実行された. 当手法の hTERT mRNA 及び AFP mRNA に関する dynamic ranges は約 5 コピー以上であり, 各検体における偽陰性の可能性を除去することができた. hTERT mRNA と AFP mRNA の両方とも, 肝病変の増悪に伴い段階的に発現が高まり, その定量値は LC, CH, 健常者より有意に HCC で高かった (hTERT で $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$; AFP で $P = 0.011$, $P = 0.044$, $P < 0.0001$, 図 1-A). hTERT や他のマーカーに影響する有意な臨床病理学的所見や, それらの肝病変間での有意差, 各臨床パラメーター内の層別化されたカテゴリーが統計学的に評価された. Alb, 腫瘍径, 腫瘍数, 腫瘍分化度, 転移の有無が, hTERT mRNA の発現と有意に相関していた (各 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$, 表 1). バイオマーカー間の相関を検討するために Pearson 相関検定がなされ, hTERT mRNA の発現レベルが有意に AFP mRNA 発現レベルと相関することが認められた ($P < 0.05$). 診断の正診度を評価するために, 慢性肝病変患者と肝癌患者についてバイオマーカーに関する比較を receiver operator

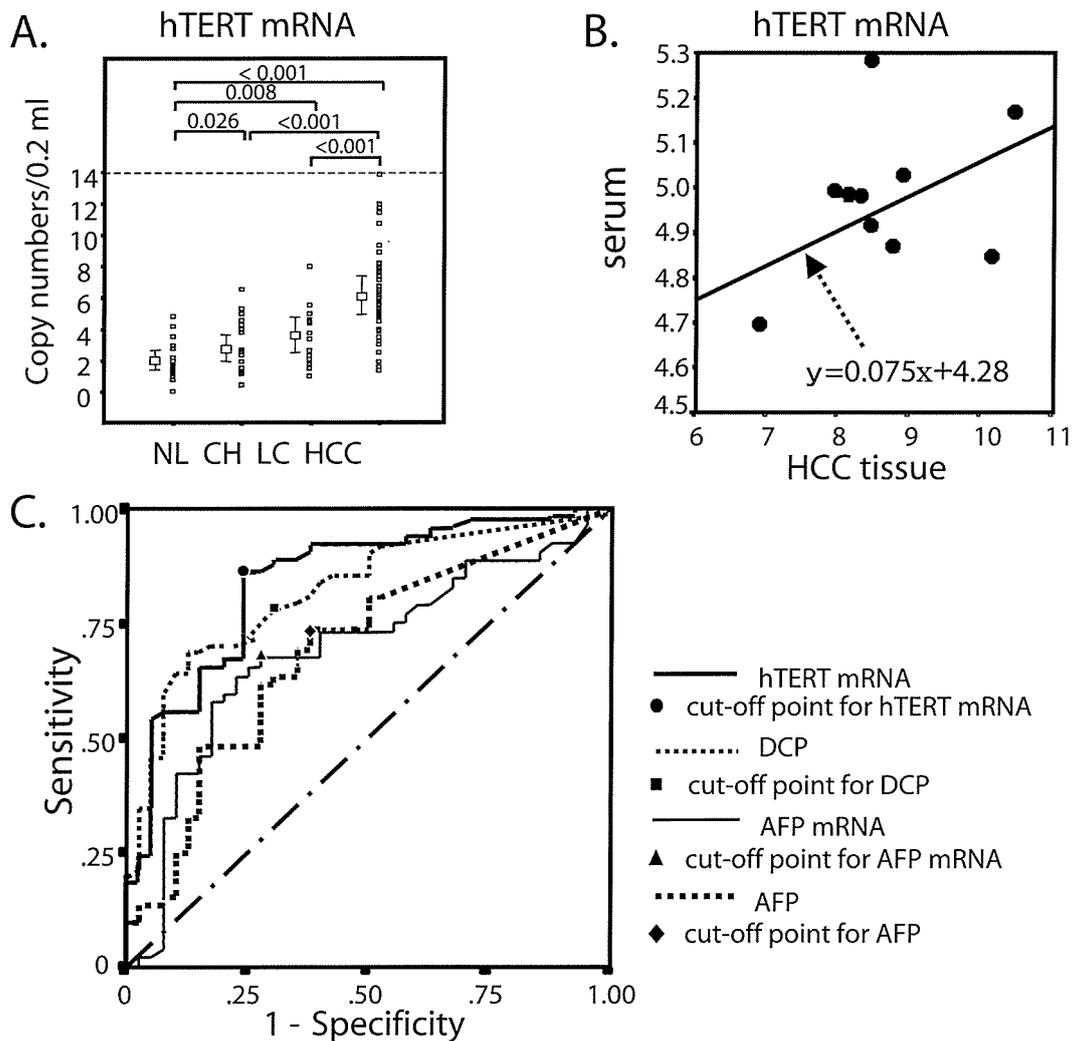


図 1

リアルタイムRT-PCR法によるHCC患者, LC患者, CH患者, 健常者の血清中hTERT mRNA値とAFP mRNA値(対数変換). 各群間での95%信頼区間を定量点の近傍に示す. 5群間での有意差を散布図上部に示している. NL: 正常肝(健常者). OL: 他の肝病変を有する患者, CH: 慢性肝炎患者, LC: 肝硬変患者, HCC: 肝癌患者(図1-A). 散布図は血清中hTERT mRNA値と肝癌組織中hTERT mRNA値との有意な相関が10症例について示している. Paired t 検定($P = 0.01$)とSpearman相関検定($P = 0.017$)で解析した(図1-B). hTERT mRNAとAFP mRNAに関するReceiver operator characteristic (ROC) curve解析を示している. その曲線は定量測定値を統計解析ソフトSPSS13.0で解析かつ描画したものである. The dotted line, bold dotted line, solid line, and bold solid lineは DCP, AFP, AFP mRNA, hTERT mRNA, に相当する. 各線は各マーカーのカットオフ値を示している(図1-C).

characteristic (ROC) curve解析を用いて施行した. この検査系はコピー数とPCRサイクル数との間に線形相関を認め, 良質のRNAコントロールによる良好な検定線として評価された ($r^2 > 0.99$). 肝癌組織(原発部位)と血清との間にhTERT mRNA定量値の相関が認められるが,

Paired t 検定とSpearman相関検定を用いて解析された.

3) 結果

肝癌組織中のhTERT mRNAの血清中hTERT mRNAとの有意な相関が示された(各 $P < 0.01$, $P < 0.05$, 図1-B). DCP (PIVKA-II),

表 1 腫瘍マーカーと臨床病理学的所見との有意的相関を検討するための統計学的解析

			Multivariate analyses and Freidman test			
Clinical parameters	# of patient		hTERT mRNA	AFP mRNA	AFP (-L3)	DCP
			<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Age mean:59 years old (range 22 to 83)			0.408	0.798	0.681 (0.690)	0.981
Gender			0.761	0.089	0.412 (0.408)	0.380
	M	94				
	F	60				
Etiology			0.250	0.651	0.304 (0.052)	0.842
	HBV	30				
	HCV	66				
	HBV+HCV	3				
	NBNC	2				
	Alcohol	3				
Underlying lesion			0.060	0.973	0.621 (0.026)	0.534
	Normal	50				
	CH	32				
	LC	70				
Albumin (g/dl)			0.018	0.340	0.540 (0.601)	0.001
Total bilirubin (mg/dl)			0.928	0.693	0.111 (0.432)	0.933
Alanine aminotransferase (IU/l)			0.538	0.149	0.001 (0.001)	0.978
Child-Pugh Scale	A	21	0.136	0.573	0.373 (0.020)	0.001
	B	44				
	C	5				
AFP (ng/ml)			0.201	0.319	—	—
AFP-L3 (%)			0.123	0.425	—	—
DCP (mAU/ml)			0.854	0.651	—	—
Size of tumor (mm)	< 20	18	<0.001	0.061	0.358 (0.001)	0.258
	20~30	26				
	> 30	20				
Number of tumors	1	10	<0.001	0.123	0.200 (0.012)	0.086
	2	27				
	≥ 3	27				
Differentiation degree			0.010	0.096	0.011 (0.010)	0.285
	AH	3				
	Well	33				
	Moderate	27				
	Undifferentiated	1				

Only hTERT mRNA correlated with albumin, tumor size, tumor number, and differentiation degree of tumor independently during the progression from chronic liver diseases to HCC. HBV: hepatitis B virus, HCV: hepatitis C virus, NBNC: non-HBV non-HCV, AH: adenomatous hyperplasia.

表 2

A.				
	Sensitivity	Specificity	<i>p</i> value	PPV/NPV
AFP	0.693	0.600	0.002	0.812/0.389
AFP-L3	0.563	0.925	0.304	0.778/0.277
DCP	0.815	0.635	< 0.001	0.852/0.405
AFP mRNA	0.716	0.675	< 0.001	0.695/0.741
hTERT mRNA	0.882	0.700	< 0.001	0.862/0.870

B.				
Tumor marker	CH/LC → HCC		LC → HCC	
	(n=40)	(n=64)	(n=20)	(n=64)
AFP level		0.376		0.532
AFP-L3		0.144		0.228
DCP		0.317		0.479
AFP mRNA		0.001		0.001
hTERT mRNA		< 0.001		< 0.001

(表2-A) HCCの各腫瘍マーカーの感度/特異度とPPV/NPVを示す. PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value. (表2-B) 肝発癌過程での各腫瘍マーカーにおける統計上の有意差を示す.

AFP値, AFP-L3 (%) が腫瘍数と有意な相関を示し (各 $P < 0.05$), 腫瘍径を < 20 mm, $20-30$ mm, > 30 mmで層別化した検定でも有意差を示した. さらにhTERT mRNA発現はHCCの高分化度および中分化度と密接に相関を示した ($P < 0.05$). また肝癌患者を慢性肝炎患者から区別するためには, hTERT mRNAは他の腫瘍マーカーより優れていて, Friedrich検定により有意差を示した ($P < 0.01$). ROC curve解析では, hTERT mRNAのHCCにおける感度/特異度は88.2/68.7%であった(図1-C, 表2-A). 両mRNAに対する現状で予想されるカットオフ値は12,500コピー数/0.2 mlと3,000コピー数/0.2 mlであった. 当定量アッセイでの肝発癌における感度/特異度が表2-Bに示されている. 肝発癌過程でのhTERT mRNAのPositive predictive value (PPV)/negative predictive value (NPV)は0.862/0.870であった. またAFP mRNA, AFP値, AFP-L3値, DCPのPPV/NPVは0.695/0.741, 0.812/0.389, 0.778/0.277, 0.852/0.405であった.

hTERT mRNAの推定カットオフ値を用いた数症例に関する考察

当検討では, 64例のHCC患者のうち8例が血清中hTERT mRNAの推定されるカットオフ値以下であり, 陰性とみなされた. 何故hTERT mRNAがこれらの患者で陰性なのかの詳細は不明であるが, 8例中5例が背景の肝病変が非代償性肝硬変であった. 非代償性肝硬変では, 不死化された肝細胞のアポトーシスを促進することが報告されているTGF- β の血清レベルが高いことが報告されている²⁹⁾. 従って, これらの症例ではTGF- β の高発現が不死化細胞のアポトーシスを刺激し, hTERT mRNAの低発現を導いているという可能性がある²⁴⁾. 他のhTERT mRNA陰性3症例は, HCCが1年間ほとんど進展しなかったのも矛盾していないのかもしれない. また5例のHCC患者では, 外科的切除後1年間, hTERT mRNA定量値を経時的に測定し, 再発した2例ではhTERT mRNAの増加を認めた. hTERT mRNAの血清中検出レベルは, 再発をきたさなかった他3例のうち2例が測定値に変化

表 3 血液中を循環するmRNAを用いた当検出系の臨床（疾患）への適用例

1. <i>An application for malignancies</i>	
a) <u>A diagnosis of malignancies</u>	b) <u>A Comparison of hTERT mRNA with PET in periodic medical examination for cancer</u>
Lung cancer	
Adenocarcinoma	
Squamous cell carcinoma	
Small cell lung carcinoma	c) <u>An evaluation of the induction or effect of anticancer therapy</u>
Large cell lung carcinoma	
Gynecological malignancies	
Ovarian cancer	
Uterine cancer	
Gastroenterological malignancies	2. <i>An application for other diseases</i>
Hepatocellular carcinoma	a) <u>Inflammatory diseases</u>
Stomach cancer	Fulminant hepatitis
Colon cancer	Autoimmune disease
Pancreatic cancer	Nonalcoholic steatohepatitis
Esophageal cancer	
Breast cancer	b) <u>Ischemic diseases</u>
Thyroid cancer	
Otolaryngological cancer	c) <u>Lifestyle-related diseases</u>
Urinary cancer	Insulin resistance
Sarcoma	

はなかったが、残りの1例はhTERT mRNAの定量値が上昇した。その原因は尚も不明であるが、背景の肝病変である強い活動性の炎症に原因があるのかもしれない。

他の疾患特異的mRNAとその臨床的意義の検討

例えば、肺癌、卵巣癌 (submitted for publication) などのような悪性腫瘍においても、このhTERT mRNAを用いた当アッセイ系は有用で、高い感度/特異度を示した (各89.0/72.7%, 90.9/90.0%)。我々は疾患特異的なmRNAを探し、それを臨床およびプライマリーケアの段階でバイオマーカーとして適用することを計画している。実は多くの医師研究者が従事する医療現場には難病の早期診断も大きな課題となっており (表3), 診断ツールとしてPositron Emission Tomography (PET)よりも優れた腫瘍におけるhTERT mRNAのようなmessageが各難病についても掘り起こされることが必要である。更に検討中の課題としては炎症性疾患がある。なぜなら当

手法は24時間以内の体内での現象を捉えられるので、炎症性病変特異的なmRNAが見出されれば (劇症肝炎は投稿準備中), すぐにでも蛋白検出法よりも鋭敏にその発現レベルを採血のみで検出できることになり、患者への治療に即座に対応できることになる。診断が難しい疾患や生活習慣病 (インスリン抵抗性)などもまた、その適応である。

結 語

定性での検討後、細胞性蛋白を除去し、細胞性核酸の試料 (血清) への混入を最小限に抑制する定量測定法により、我々は血液中で不安定とみなされてきた核酸を検出する感度を高めてきた。そしてhTERT mRNAを始めとしてPCRで効率的に増幅できる優れたプライマーの設定により、それが可能であった³⁰⁾。図1-Bに示されているように、血清中hTERT mRNA測定値と原発組織でのhTERT mRNA測定値との相関が認められたことは、血清中hTERT mRNAは腫瘍細胞由来

であることを強く示唆する。免疫担当細胞に取り込まれて処理された産物を検出している可能性もあるが、いづれにしても腫瘍細胞有りきであることに間違いはない。AFPはHCCで広く信頼されて使用されるマーカーである。しかし、早期肝癌に対してではなく、進行した肝癌に対して有効なのであり、早期診断及び再発診断という観点で考えると、十分なマーカーとは言えない³¹⁾。HCCは、如何なる治療を受けても、その生物学的特性により何度もポリクローナルな再発を来たすため、血清中でhTERT mRNA値を測定することは、その再発の早期診断を可能にする。それ故、我々はHCC治療後の経過を慎重に観察しなければならない。hTERT mRNA発現は高～中分化度のHCCと密接に相関を示した。Nakashioらは以前、HCCの分化度とテロメラーゼ発現とは有意な相関を示すことを報告しており、我々の結果を支持している³²⁾。hTERT mRNAは、肝癌診断においてAFP mRNAと比較して高い感度と特異度を示した。HCCにおいてhTERT mRNAが高い感受性を示すことは、AFP mRNAがHCC細胞や障害を受けた肝細胞に関連しているのに対して、hTERT mRNAは主にHCC細胞で産生されているからかもしれない。Waguriらは、原発肝癌由来で、血液中を循環する癌細胞のhTERT mRNAは検出可能であることを証明し³³⁾、当検討では血清中hTERT mRNAの定量値がHCCの早期診断を可能にすることを強く示唆している。

我々は、hTERT mRNAと予後との関連を評価し³⁴⁾、他の癌における腫瘍マーカーとしても、その有用性を証明しなければならない。そのために多施設大規模研究を行っており、現在登録している280例の解析を急ぎ、検出での有用性のみならずHCCモニターの結果を確認しなければならない (unpublished data)。

当検査系は、多くのhTERT陽性悪性腫瘍の診断や癌特異的遺伝子が既知である腫瘍の診断、RNA遺伝子の診断、蛋白が低発現であるが腫瘍特異的発現を呈する癌腫に応用可能である。近い将来、当検査系のプライマリーケアレベルでの臨床検査システムへの導入が期待される。

文 献

- 1) El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340: 745-750.
- 2) Shirabe K, Takenaka K, Taketomi A, Kawahara N, Yamamoto K, Shimada M, et al. Postoperative hepatitis status as a significant risk factor for recurrence in cirrhotic patients with small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1996; 15:1050-1055.
- 3) Collier J and Sherman M. Screening of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 37: 273-278.
- 4) Dohmen K, Shirahama M, Onohama S, Miyamaoto Y, Torii Y, Irie K, et al. Differences in survival based on the type of follow-up for the detection of hepatocellular carcinoma: an analysis of 547 patients. *Hepatol Res* 2000; 18:110-121.
- 5) Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Yamamoto M, Takasaki K, Nakano M. Clinicopathologic features of patients with hepatocellular carcinoma seropositive for a-fetoprotein-L3 and seronegative for 12 des- γ -carboxyprothrombin in comparison with those seropositive for des-g-carboxy prothrombin alone. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 772-778.
- 6) Srivastava S, Gopal-Srivastava R. Biomarkers in cancer screening: a public health perspective. *J Nutr* 2002; 132(8 Suppl): 2471S-2475S.
- 7) Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol* 2001; 2: 698-704.
- 8) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.
- 9) Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46: 318-322.
- 10) Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 65-73.
- 11) Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang

- J, Chan AT, Lee JC, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 15; 59: 1188-1191.
- 12) Silva J, Silva JM, Garcia V, Garcia JM, Dominguez G, Bonilla F. RNA is more sensitive than DNA in identification of breast cancer patients bearing tumor nucleic acids in plasma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 375-376.
- 13) Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-1965.
- 14) Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M, Anker P. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3823-3826.
- 15) Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, Garcia-Conde J, Alino SF. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001; 81: 767-769.
- 16) Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, Provencio M, Espana P, Bonilla F. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2821-2825.
- 17) Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 172-178.
- 18) Gal S, Fidler C, Lo YM, Chin K, Moore J, Harris AL, Wainscoat JS. Detection of gammaglobin mRNA in the plasma of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 192-194.
- 19) Fleischhacker M, Beinert T, Ermitsch M, Seferi D, Possinger K, Engelmann C, Jandrig B. Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945:179-188.
- 20) Hasselmann DO, Rappl G, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep* 2001; 8:115-118.
- 21) Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F, Provencio M, San Martin S, Espana P, Bonilla F. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1999; 59: 3251-3256.
- 22) Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of filterable and non filterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48: 1212-1217.
- 23) Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of Endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48:1647-1653.
- 24) Tatsuma T, Goto S, Kitano S, Lin YC, Lee CM, Chen CL. Telomerase activity in peripheral blood for diagnosis of hepatoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 1064-1070.
- 25) Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-1965.
- 26) Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte M-F, Lyautey J, Lederry C, Movarekhi S, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3823-3826.
- 27) Miura N, Shiota G, Nakagawa T, Sano A, Marumoto A, Kishimoto Y, et al. Sensitive detection of hTERT mRNA in the serum of

- patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2003; 64: 430–434.
- 28) Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, et al. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 56–62.
- 29) Cavin LG, Romieu-Mourez R, Panta GR, Sun J, Factor VM, Thorgeirsson SS, et al. Inhibition of CK2 activity by TGF- β 1 promotes IkappaB-alpha protein stabilization and apoptosis of immortalized hepatocytes. *Hepatology* 2003; 38: 1540–1551.
- 30) Miura N, Maeda Y, Kanbe T, Yazama H, Takeda Y, Sato R, Tsukamoto T, Sato E, Marumoto A, Harada T, Sano A, Kishimoto Y, Hirooka Y, Murawaki Y, Hasegawa J, Shiota G. Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 1; 11: 3205–3209.
- 31) Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int J Cancer* 2004; 112: 44–50.
- 32) Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, Shimamoto F, Tahara E, Tahara H, Ide T, Kajiyama G. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2000; 36: 496–502.
- 33) Waguri N, Suda T, Nomoto M, Kawai H, Mita Y, Kuroiwa T, Igarashi M, Kobayashi M, Fukuhara Y, Aoyagi Y. Sensitive and specific detection of circulating cancer cells in patients with hepatocellular carcinoma; detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA after immunomagnetic separation. *Cancer Res* 2003; 9: 3004–3011.
- 34) Fujita Y, Fujikane T, Fujiuchi S, Nishigaki Y, Yamazaki Y, Nagase A, Shimizu T, Ohsaki Y, Kikuchi K. The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with non small cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 1008–1013.