

200807026A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による

多発胃癌発生予測に関する前向き研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成21年(2009)年 4月

目 次

I 総括研究報告

- 胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による
多発胃癌発生予測に関する前向き研究 1
牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部

II 分担研究報告

- 1 胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による
多発胃癌発生予測に関する前向き研究 6
牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部
- 2 胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による多発胃癌
発生予測に関する前向き研究（症例の登録と検体の採取） 9
中島健 国立がんセンター中央病院内視鏡部
- 3 検診受診者における生活習慣と胃粘膜DNAメチル化レベルとの
関連に関する研究 10
島津太一 国立がんセンターがん予防検診研究センター予防研究部
- 4 胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による
多発胃癌発生予測に関する前向き研究 12
一瀬雅夫 和歌山県立医科大学第二内科
- 5 胃癌内視鏡治療後の多発胃癌発生予測に関する前向き研究に
おける症例集積方法確立のための研究 14
藤城光弘 東京大学医学部附属病院消化器内科

III 研究成果の刊行に関する一覧表 17

IV 研究成果の刊行物・別刷り 19

総括研究報告書

胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による多発胃癌発生予測に関する前向き研究

研究代表者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部 部長

研究要旨

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)後に、異時性多発胃癌の発生が多く、多数の患者の高頻度の経過観察が負担となっている。研究代表者らは、がん患者の非がん部には、既に DNA メチル化異常が蓄積しており、その量が発がんリスクと相関すること（エピジェネティックな発がんの素地）を明らかにしてきた。本研究では、ESD 後の異時性多発胃癌の発生予測に非がん部胃粘膜生検組織における DNA メチル化量の測定が有用であるか否かを、800 例の前向き研究により明らかにする。平成 20 年度は、多施設共同研究の体制を整備し、各施設の倫理審査委員会の承認を得た。症例の登録を開始し、460 例の登録を完了した。また、日常臨床で利用される高い感度と特異度を達成するために、高いハザード比を示す新規マーカーの分離を進めた。miR-124a 遺伝子を用いると、ハザード比 10-20 に達することを見出した。さらに、研究目的から臨床検査へ移行することを考え、異なる施設・異なる時点でも高度の再現性が得られるように測定方法の高度化を行っている。

研究分担者

中島 健	国立がんセンター中央病院 内視鏡部・医師
島津 太一	国立がんセンターがん予防検診研究センター 予防研究部・研究員
一瀬 雅夫	和歌山県立医科大学 第二内科・教授
藤城 光弘	東京大学医学部附属病院 消化器内科・助教

非常に応用範囲が広いと期待できる。そこで、本研究では、非がん部胃粘膜での DNA メチル化異常の定量により、ESD 後の異時性多発胃癌の発生を予測可能か否かを、前向き研究により明らかにする。ピロリ菌感染が現に存在すると、幹細胞での DNA メチル化異常を反映すると考えられる永続的メチル化に加え、除菌により低下する一過性メチル化が存在する。そこで、ESD 前後に除菌を施行、永続的メチル化が測定可能な症例を対象とする。

日常的に臨床で利用されるマーカーとするためには、高いハザード比 (HR) を示す新規マーカー遺伝子の分離が必要である。本研究の基礎となる研究で用いた *FLNc* や *THBD* では、HR が 2-3 程度であり、より高い HR を示すマーカー遺伝子の同定が必要である。さらに、DNA メチル化レベルの測定に関し、現時点での手法では、単一施設・同一時点での測定の場合に、測定値 $\pm 15\%$ という高い再現性が得られる。今後、研究目的から臨床検査へ移行することを考慮し、異なる施設・異なる時点の測定でも、高い再現性が得られるように、測定方法を高度化する。

A. 研究目的

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜切除術(EMR)および粘膜下層剥離術(ESD)は、現在、我が国で年間 30,000 件程度施行され、生活の質の改善に大きく貢献している。一方、非がん部胃粘膜が広く残るために、内視鏡的治療後の異時性多発胃癌の発生が多い。高頻度かつ長期間にわたる経過観察が負担となっている。

研究代表者らは、胃癌患者の非がん部には、既に DNA メチル化異常が蓄積していること（エピジェネティックな発がんの素地）、その量は胃発がんリスクと相関すること、ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）の感染は強力に DNA メチル化異常を誘発すること、を示してきた。エピジェネティックな発がんの素地は、胃癌のみならず、乳がん、大腸がん、食道がん、肝がん、腎がん等でも認められることが、複数の研究者によりこれまでに示された。

以上から、エピジェネティックな発がんの素地の程度の測定により発がんリスク診断が行えると予測される。また、このような方法が実用化されれば、

B. 研究方法

(1) 対象

早期胃癌に対して ESD を施行する、もしくは既に施行した患者 800 例。但し、ESD 施行時 80 歳を超える患者、内視鏡検査をうけることが本人の利益に反すると判断される患者等は除外する。ESD 治療後の異時性多発胃癌の頻度は年間約 2.5%前後で、ピロリ菌除菌後の胃癌発生量の減少を考慮すると 5 年

間では約 7%と考えられる。低メチル化群に対する高メチル化群での胃がん発生のハザード比が 5 であれば、たとえ 500 例の解析でも有意差(有意水準 5%、検出力 80%、ログランク検定)を示すことが可能である。

(2) 検体採取と症例追跡

同意を得られた患者について、ピロリ菌現感染の有無を呼気法または培養法により判定する。ピロリ菌現感染陽性の場合、標準的除菌治療を施行する。除菌施行 6 ヶ月以降に行われる ESD 後経過観察のための内視鏡検査の際に、除菌効果判定とメチル化量測定のための胃粘膜生検を行ない、その時点を観察開始点とする。除菌失敗例は観察対象としない。ピロリ菌現感染陰性の場合、ESD 施行時にメチル化量測定のための検体も採取し、その時点を観察開始点とする。ESD 施行後の場合、ESD 後経過観察のための内視鏡検査時に胃粘膜生検を行い、その時点を観察開始点とする。胃粘膜生検は、前庭部の定点から 2 個の検体を得る。

症例は、生検検体採取後、胃がんの発生をエンドポイントに 5 年間追跡する。

(3) 定量的 DNA メチル化解析

胃がんリスクとの相関が示されている *FLNC*, *HAND1*, *LOX*, 及び *THBD* のプロモーター領域 CpG アイランドについて、定量的メチル化特異的 PCR 法により、メチル化された DNA 分子と、メチル化されていない DNA 分子の絶対数を測定する。全 DNA 分子数に対するメチル化された DNA 分子数を求めることにより、胃粘膜の「DNA メチル化レベル」を算出、蓄積した DNA メチル化異常の量の指標とする。

(4) 新規マーカー遺伝子の探索

個別遺伝子の評価と、DNA メチル化アレイを用いた網羅的解析との両方を行う。個別遺伝子としては、近年重要性に注目が集まる microRNA (miRNA) 遺伝子、胃がん抑制作用が報告された遺伝子等を対象に、リスクマーカーとしての有用性を検討する。ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者及び健常者の胃粘膜で DNA メチル化レベルを測定し、高メチル化レベルによる HR を計算する。

網羅的解析は、胃がん患者の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜とを用いて DNA メチル化アレイ解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、各施設の倫理審査委員会による承認を得て実施する。承認条件に、十分な説明を行った後、研究参加に関する文書による同意を得ること等が含まれる。なお、ESD、除菌等は、日常臨床として施行するものである。DNA メチル化は、動物では生殖細胞系列で初期化されるために、子孫に対する影響がある遺伝情報の解析は、本研究には含まれない。

新規マーカーの探索や分子機構の解析に実験動物の使用が必要な場合、実験動物倫理審査委員会の承認を得る。

C. 研究結果

(1) 症例の登録状況

国立がんセンターでは、本研究の基本的計画について平成 20 年 4 月 17 日に倫理審査委員会の承認を取得、血清マーカーとの比較まで包含した修正計画について、平成 20 年 9 月 9 日に承認を取得した。高品質の臨床情報が収集できるように専任のコーディネーターを配置し、データ管理を開始した。平成 21 年 2 月末で 443 例の登録を完了、429 例について追跡観察を開始した。

和歌山県立医科大学では、平成 20 年 11 月 14 日に倫理審査委員会の承認を取得、症例の蓄積を開始した。登録可能症例が 80 例程度あり、今後、順次、同意を取得、登録の予定である。東京大学では、11 月 21 日に倫理委員会の承認を取得し、平成 21 年 2 月末で 17 例の登録を完了した。以上、3 施設で、合計 460 例の登録を完了した。

(2) 新規マーカー遺伝子

miRNA 遺伝子のうち、DNA メチル化により転写調節され、胃がん以外のがんも含め、がん抑制作用が報告されている遺伝子を文献的に検索、*miR-124a* (*miR-124a-1*, *miR-124a-2*, *miR-124a-3* の 3 遺伝子)、*miR137*, *miR193a*, *miR-127* の 6 遺伝子を胃がんでサイレンシングされる miRNA 遺伝子の候補とした。胃がん細胞株 11 系統を用いて、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化と転写抑制の相関を検討、*miR-124a* の 3 遺伝子はメチル化サイレンシングされるが、他の 3 遺伝子はサイレンシングされないことを確認した。

miR-124a の 3 遺伝子について、健常者 (ピロリ菌現感染陰性 28 名、陽性 28 名)、胃がん患者 (陰性 16 名、陽性 29 名) について、胃粘膜での DNA メチル化レベルを測定した。これらは、ピロリ菌現感染陰性の健常者の胃粘膜ではメチル化されていないのに対し、感染陰性の胃がん患者の非がん部胃粘膜では高度に (7-16 倍) メチル化されていた (表)。また、*LOX* に代表される既知のマーカー遺伝子では、ピロリ菌現感染陽性の方が、ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者よりも高いメチル化レベルを示したのに対し、*miR-124a* の 3 遺伝子では、ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者は、ピロリ菌現感染陽性者と同等の高いメチル化レベルを示した。ピロリ菌現感染陰性者の中で、高メチル化レベルが胃がん患者を予測する HR は 11-22 に達した。

ゲノム網羅的な DNA メチル化解析は、現在、実験が進行中である。

			<i>miR-124a-1</i>	<i>miR-124a-2</i>	<i>miR-124a-3</i>	<i>LOX</i>
		N				
<i>H. pylori</i> (-)	1) healthy volunteers	28	0.76 ± 1.70	5.75 ± 7.73	4.45 ± 9.29	0.43 ± 1.22
	2) gastric cancer patients	16	11.82 ± 12.94	41.66 ± 19.33	59.42 ± 30.71	10.64 ± 11.33
<i>H. pylori</i> (+)	3) healthy volunteers	28	9.96 ± 12.28	44.79 ± 23.96	39.66 ± 30.08	20.10 ± 15.72
	4) gastric cancer patients	29	12.28 ± 14.31	46.33 ± 28.36	37.48 ± 25.13	15.93 ± 12.58
P value	1) vs 3)		<0.001	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	1) vs 2)		0.004	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.003
	3) vs 4)		0.51	0.77	0.77	0.28

表 胃粘膜での各 miRNA 遺伝子と *LOX* のメチル化レベル (%)

(3) 測定方法の高度化

全 DNA 分子中数%程度の DNA 分子に DNA メチル化が存在する場合、正確な定量には定量的 MSP 法が最適とされている。現有の測定技術を用いると、同一の時期であれば、複数回測定しても、測定誤差は測定値±15%と高度の再現性を達成していることを確認した。今後、臨床検査として、異なる施設・異なる時点での測定でも高度の再現性が得られるように、標準 DNA の調製方法、希釈方法、内部標準の設置等を検討した。

D. 考察

参加3施設の倫理委員会の承認を得ることができ、順調に症例の登録が進んでいる。平成21年度は症例の登録を、特に、和歌山県立医科大学と東京大学で加速し、800例に到達する見込みである。今後、最適と思われるマーカー遺伝子が得られた時点で、追跡開始時の横断的プロファイルを作成する。発がんリスク予測の基礎データとするのみならず、追跡開始時の DNA メチル化レベルを用いて、生活歴等との相関も解析可能となる。

新規マーカーとして、miRNA 遺伝子の検討を行い、*miR-124a-1*、*-2*、*-3* の3遺伝子の DNA メチルレベルが非常に良好な HR を与えることを見出した。また、これら3遺伝子は、*LOX* 等これまでに測定してきた通常の遺伝子と異なり、そのメチル化レベルがピロリ菌感染陰性化後も低下しないことから、胃の幹細胞で容易にメチル化される可能性がある。また、がん抑制作用が報告されていることから、胃発がんの素地の原因の一つとして関与している可能性もある。今回得られた良好な HR が、他の集団でも得られるかについては、今後検証が必要である。

定量的 MSP 法は研究目的には高度の再現性を実現しているが、臨床検査として利用するためには、さらに改良が必要と考えられた。既に検討した項目

を改良することで、異なる施設・異なる時期の測定でも、誤差を測定値±20%程度にすることが出来ると考えている。

E. 結論

非がん部胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常の定量により、発がんリスクを診断できる可能性が高い。前向き試験の症例蓄積は順調に進んでおり、最適と思われるマーカー遺伝子が得られた時点で高精度に解析、症例の追跡により、DNA メチル化レベルを用いた発がんリスク診断の臨床的有用性を証明する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費によることが明記されたもの

- Oka, D., Yamashita, S., Tomioka, T., Nakanishi, Y., Kato, H., Kaminishi, M., and Ushijima, T. The presence of aberrant DNA methylation in non-cancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer*, in press.
- Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Sugiyama, T., and Ushijima, T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*, 124: 2367-2374, 2009.

3. Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., Nakazawa, K., and Ushijima, T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer*, 124: 905-910, 2009.
4. Terada, K., Okochi-Takada, E., Akashi-Tanaka, S., Miyamoto, K., Taniyama, K., Tsuda, H., Asada, K., Kaminishi, M., and Ushijima, T. Association between frequent CpG island methylation and *HER2* amplification in human breast cancers. *Carcinogenesis*, 30: 466-471, 2009.
5. Yanaoka, K., Oka, M., Mukoubayashi, C., Yoshimura, N., Enomoto, S., Iguchi, M., Magari, H., Utsunomiya, H., Tamai, H., Arie, K., Ohata, H., Fujishiro, M., Takeshita, T., Mohara, O., and Ichinose, M. Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests –outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 838-845, 2008.
6. Yanaoka, K., Oka, M., Yoshimura, N., Mukoubayashi, C., Enomoto, S., Iguchi, M., Magari, H., Utsunomiya, H., Tamai, H., Arie, K., Yamamichi, N., Fujishiro, M., Takeshita, T., Mohara, O., and Ichinose, M. Risk of gastric cancer development in asymptomatic middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody levels. *Int J Cancer*, 123: 917-926, 2008.

本研究費に密接に関係するもの

1. Nakajima, T., Enomoto, S., and Ushijima, T. DNA methylation: a marker for carcinogen exposure and cancer risk. *Environ Health Prev Med*, 13: 8-15, 2008.
2. Ono, S., Fujishiro, M., Niimi, K., Goto, O., Kodashima, S., Yamamichi, N., and Omata, M. Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients taking anti-coagulants or anti-platelet agents. *Dig Liver Dis*, in press.
3. Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., and Omata, M. Is it possible to predict procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? *J Gastroenterol Hepatol*, in press.
4. Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., and Omata, M. Outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer with special reference to validation for curability criteria. *Endoscopy*, 41: 118-122, 2009.
5. Ono, S., Fujishiro, M., Goto, O., Kodashima, S., and Omata, M. En bloc resection of cardia cancer and lipoma with endoscopic submucosal dissection. *Dig Liver Dis*, 41: 237, 2009.
6. Fujishiro, M., Oda, I., Yamamoto, Y., Akiyama, J., Ishii, N., Kakushima, N., Fujiwara, J., Morishita, S., Kawachi, H., Taniguchi, H., and Gotoda, T. Multi-center survey regarding the management of anticoagulation and antiplatelet therapy for endoscopic procedures in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 214-218, 2009.
7. Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Kakushima, N., Ono, S., Yahagi, N., and Omata, M. Feasibility of electrocautery snaring as the final step of endoscopic submucosal dissection for stomach epithelial neoplasms. *Dig Liver Dis*, 41: 26-30, 2009.
8. Fujishiro, M., Kodashima, S., Takubo, K., Kakushima, N., and Omata, M. Detailed comparison between endo-cytoscopy and horizontal histology of an esophageal intraepithelial squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*, 21: 181-185, 2008.
9. Fujishiro, M. Endoscopic submucosal dissection for gastric cancer. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 11: 119-124, 2008.
10. Goto, O., Fujishiro, M., Kakushima, N., Kodashima, S., Ono, S., Yamaguchi, H., Nomura, S., Kaminishi, M., and Omata, M. Endoscopic submucosal dissection as a staging measure may not lead to worse prognosis in early gastric cancer patients with additional gastrectomy. *Dig Liver Dis*, 40: 293-297, 2008.
11. Ogura, K., Okamoto, M., Sugimoto, T., Yahagi, N., Fujishiro, M., Kakushima, N., Kodashima, S., Kawabe, T., and Omata, M. Efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection for gastric cancer in patients with liver cirrhosis. *Endoscopy*, 40: 443-445, 2008.
12. Fujishiro, M., Kodashima, S., Goto, O., Ono, S., Muraki, Y., Kakushima, N., and Omata, M. Successful en bloc resection of superficial esophageal cancer treated by endoscopic submucosal dissection with a splash-needle (with video). *Endoscopy*, 40: E81-82, 2008.
13. Kakushima, N. and Fujishiro, M. Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol*, 14: 2362-2367, 2008.
14. Otani, K., Kitayama, J., Kaisaki, S., Ishigami, H., Hidemura, A., Fujishiro, M., Omata, M., and Nagawa, H. Early gastric cancer shows different associations with adipose tissue volume depending on histological type. *Gastric Cancer*, 11: 86-95,

- 2008.
15. Fujishiro, M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol*, 14: 4289-4295, 2008.
 16. Fujishiro, M., Kodashima, S., Goto, O., Ono, S., Muraki, Y., Kakushima, N., and Omata, M. Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for the gastrointestinal epithelial neoplasms with a splash-needle. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 18: 592-597, 2008.
 17. Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., Goto, O., Yamamichi, N., Yahagi, N., Kashimura, K., Matsuura, T., Iguchi, M., Oka, M., Ichinose, M., and Omata, M. Submucosal injection of normal saline may prevent unexpected deep thermal injury of argon plasma coagulation in an in vivo porcine stomach. *Gut and Liver*, 2: 95-98, 2008.
 18. Ono, S., Fujishiro, M., Kodashima, S., Goto, O., and Omata, M. Submerging endoscopic submucosal dissection leads to successful en bloc resection of colonic laterally spreading tumor with submucosal fat. *Gut and Liver*, 2: 209-212, 2008.
2. 学会発表
1. Ushijima, T. Epigenetic field defect, and cancer risk diagnosis. AACR Special Conference "Cancer Epigenetics", Boston, May 2008.
 2. Ushijima, T., Nakajima, T., Ando, T., and Niwa, T. Epigenetic carcinogenic factors in the environment. 38th Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, Dubrovnik, September 2008.
 3. Ushijima, T., Niwa, T., and Ando, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by *Helicobacter pylori* infection. ISOBM 2008, Tokyo, October 2008.
 4. Ushijima, T. Formation of epigenetic field for cancerization by environmental factors. The 2nd Shanghai Symposium of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, July 2008.
 5. Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., and Ushijima, T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. 16th UEGW, Vienna, October 2008.
 6. Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., and Omata, M. Feasibility of electrocautery snaring as the final step of endoscopic submucosal dissection for stomach epithelial neoplasms. DDW, San Diego, May 2008.
 7. Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., and Omata, M. Is it possible to predict procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? UEGW, Vienna, October 2008.
 8. Ono, S., Fujishiro, M., Kodashima, S., Goto, O., and Omata, M. Treatment outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients with anti-coagulants or anti-platelet agents. UEGW, Vienna, October 2008.
 9. 中島健、山下聡、牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による特定遺伝子のメチル化と低転写の関与 第94回消化器病学会総会 2008年5月
 10. 中島健、山下聡、前北隆雄、丹羽透、牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による胃粘膜でのDNAメチル化異常と標的遺伝子特異性 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月
 11. 前北隆雄、一瀬雅夫 胃炎進展・胃がんリスクとDNAメチル化異常 第7回消化器病フォーラム 2008年11月
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
該当無し
 2. 実用新案登録
該当無し
 3. その他
該当無し

分担研究報告書

胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による多発胃癌発生予測に関する前向き研究

研究分担者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部 部長

研究要旨

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)後に、異時性多発胃癌の発生が多く、多数の患者の高頻度の経過観察が負担となっている。研究代表者らは、がん患者の非がん部には、既に DNA メチル化異常が蓄積しており、その量が発がんリスクと相関すること（エピジェネティックな発がんの素地）を明らかにしてきた。本研究では、ESD 後の異時性多発胃癌の発生予測に非がん部胃粘膜生検組織における DNA メチル化量の測定が有用であるか否かを、800 例の前向き研究により明らかにする。平成 20 年度は、460 例の登録を完了、398 検体から DNA を抽出した。さらに、日常臨床で利用される高い感度と特異度を達成するために、高いハザード比を示す新規マーカーの分離を進めた。*miR-124a* 遺伝子を用いると、ハザード比 10-20 に達することを見出した。測定方法も研究目的から臨床検査へ移行することを考え、異なる施設・異なる時点での測定でも高度の再現性が得られるように測定方法の高度化を行っている。

A. 研究目的

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜切除術(EMR)および粘膜下層剥離術(ESD)は、現在、我が国で年間 30,000 件程度施行され、生活の質の改善に大きく貢献している。一方、非がん部胃粘膜が広く残るために、内視鏡的治療後の異時性多発胃癌の発生が多い。高頻度かつ長期間にわたる経過観察が負担となっている。

研究代表者らは、胃癌患者の非がん部には、既に DNA メチル化異常が蓄積していること（エピジェネティックな発がんの素地）、その量は胃癌リスクと相関すること、ヘリコバクター・ピロリ菌（ピロリ菌）の感染は強力に DNA メチル化異常を誘発すること、を示してきた。エピジェネティックな発がんの素地は、胃癌のみならず、乳がん、大腸がん、食道がん、肝がん、腎がん等でも認められることが、複数の研究者によりこれまでに示された。

以上から、エピジェネティックな発がんの素地の程度の測定により発がんリスク診断が行えると予測される。また、このような方法が実用化されれば、非常に応用範囲が広いと期待できる。そこで、本研究では、非がん部胃粘膜での DNA メチル化異常の定量により、ESD 後の異時性多発胃癌の発生を予測可能か否かを、前向き研究により明らかにする。ピロリ菌感染が現に存在すると、幹細胞での DNA メチル化異常を反映すると考えられる永続的メチル化に加え、除菌により低下する一過性メチル化が存在する。そこで、ESD 前後に除菌を施行、永続的メチル化が測定可能な症例を対象とする。

日常的に臨床で利用されるマーカーとするため

には、高いハザード比 (HR) を示す新規マーカー遺伝子の分離が必要である。本研究の基礎となる研究で用いた *FLNc* や *THBD* では、HR が 2-3 程度であり、より高い HR を示すマーカー遺伝子の同定が必要である。さらに、DNA メチル化レベルの測定に関し、現時点での手法では、単一施設・同一時点での測定の場合に、測定値 \pm 15%という高い再現性が得られる。今後、研究目的から臨床検査へ移行することを考慮し、異なる施設・異なる時点の測定でも、高い再現性が得られるように、測定方法を高度化する。

今年度の分担研究では、新規マーカー遺伝子の分離と、測定方法の高度化を中心に行った。

B. 研究方法

(1) 前向き試験

国立がんセンター中央病院、和歌山県立医大、東京大学にて採取される生検検体、血清を保管する。生検検体に関しては、番号の間違いないように内部対照をおきながら、DNA を抽出、DNA メチル化レベルの測定を行う。

(2) 定量的 DNA メチル化解析

胃癌リスクとの相関が示されている *FLNc*, *HAND1*, *LOX*, 及び *THBD* のプロモーター領域 CpG アイランドについて、定量的メチル化特異的 PCR 法により、メチル化された DNA 分子と、メチル化されていない DNA 分子の絶対数を測定する。全 DNA 分子数に対するメチル化された DNA 分子数を求めることにより、胃粘膜の「DNA メチル化レベル」を算出、蓄積した DNA メチル化異常の量の指標とする。

(3) 新規マーカー遺伝子の探索

個別遺伝子の評価と、DNA メチル化アレイを用いた網羅的解析との両方を行う。個別遺伝子としては、近年重要性に注目が集まる microRNA (miRNA) 遺伝子、胃癌抑制作用が報告された遺伝子等を対象に、リスクマーカーとしての有用性を検討する。ピロリ菌現感染陰性の胃癌患者及び健常者の胃粘膜で DNA メチル化レベルを測定し、高メチル化レベルによる HR を計算する。

網羅的解析は、胃癌患者の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜とを用いて DNA メチル化アレイ解析を行う。

(倫理面への配慮)

ヒト検体は、各施設の倫理委員会の承認を得て使用する。実験動物の使用が必要な場合、実験動物倫理審査委員会の承認を得る。

C. 研究結果

(1) 前向き試験

国立がんセンター中央病院で採取された内視鏡検体 398 検体について、DNA を抽出、品質管理を行った。

(2) 新規マーカー遺伝子

miRNA 遺伝子のうち、DNA メチル化により転写調節され、胃癌以外のがんも含め、がん抑制作用が報告されている遺伝子を文献的に検索、*miR-124a* (*miR-124a-1*, *miR-124a-2*, *miR-124a-3* の 3 遺伝子)、*miR137*, *miR193a*, *miR-127* の 6 遺伝子を胃癌でサイレンシングされる miRNA 遺伝子の候補とした。胃癌細胞株 11 系統を用いて、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化と転写抑制の相関を検討、*miR-124a* の 3 遺伝子はメチル化サイレンシングされるが、他の 3 遺伝子はサイレンシングされないことを確認した。

miR-124a の 3 遺伝子について、健常者 (ピロリ菌現感染陰性 28 名、陽性 28 名)、胃癌患者 (陰性 16 名、陽性 29 名) について、胃粘膜での DNA メチル化レベルを測定した。これらは、ピロリ菌現感染陰性の健常者の胃粘膜ではメチル化されていないのに対し、感染陰性の胃癌患者の非がん部胃粘膜では高度に (7-16 倍) メチル化されていた (表)。また、*LOX* に代表される既知のマーカー遺伝子では、ピロリ菌現感染陽性の方が、ピロリ菌現感染陰性の胃癌患者よりも高いメチル化レベルを示したのに対し、*miR-124a* の 3 遺伝子では、ピロリ菌現感染陰性の胃癌患者は、ピロリ菌現感染陽性者と同様の高いメチル化レベルを示した。ピロリ菌現感染陰性者の中で、高メチル化レベルが胃癌患者を予測する HR は 11-22 に達した。

ゲノム網羅的な DNA メチル化解析は、現在、実験が進行中である。

(3) 測定方法の高度化

全 DNA 分子中数%程度の DNA 分子に DNA メチル化が存在する場合、正確な定量には定量的 MSP 法が最適とされている。現有の測定技術を用いると、同一の時期であれば、複数回測定しても、測定誤差は測定値±15%と高度の再現性を達成していることを確認した。今後、臨床検査として、異なる施設・異なる時点での測定でも高度の再現性が得られるように、標準 DNA の調製方法、希釈方法、内部標準の設置等を検討した。

D. 考察

参加 3 施設の倫理委員会の承認を得ることができ、順調に症例の登録及び DNA 抽出が進んでいる。平成 21 年度は、最適と思われるマーカー遺伝子が得られた時点で、追跡開始時の横断的プロファイルを作成する。発がんリスク予測の基礎データとするの

		<i>miR-124a-1</i>	<i>miR-124a-2</i>	<i>miR-124a-3</i>	<i>LOX</i>	
		N				
<i>H.pylori</i> (-)	1) healthy volunteers	28	0.76 ± 1.70	5.75 ± 7.73	4.45 ± 9.29	0.43 ± 1.22
	2) gastric cancer patients	16	11.82 ± 12.94	41.66 ± 19.33	59.42 ± 30.71	10.64 ± 11.33
<i>H.pylori</i> (+)	3) healthy volunteers	28	9.96 ± 12.28	44.79 ± 23.96	39.66 ± 30.08	20.10 ± 15.72
	4) gastric cancer patients	29	12.28 ± 14.31	46.33 ± 28.36	37.48 ± 25.13	15.93 ± 12.58
<i>P</i> value	1) vs 3)		<0.001	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	1) vs 2)		0.004	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.003
	3) vs 4)		0.51	0.77	0.77	0.28

表 胃粘膜での各 miRNA 遺伝子と *LOX* のメチル化レベル (%)

みならず、追跡開始時の DNA メチル化レベルを用いて、生活歴等との相関も解析可能となる。

新規マーカーとして、miRNA 遺伝子の検討を行い、*miR-124a-1, -2, -3* の 3 遺伝子の DNA メチルレベルが非常に良好な HR を与えることを見出した。また、これら 3 遺伝子は、*LOX* 等これまでに測定してきた通常の遺伝子と異なり、そのメチル化レベルがピロリ菌感染陰性化後も低下しないことから、胃の幹細胞で容易にメチル化される可能性がある。また、がん抑制作用が報告されていることから、胃発がんの素地の原因の一つとして関与している可能性もある。今回得られた良好な HR が、他の集団でも得られるかについては、今後検証が必要である。

定量的 MSP 法は研究目的には高度の再現性を実現しているが、臨床検査として利用するためには、さらに改良が必要と考えられた。既に検討した項目を改良することで、異なる施設・異なる時期の測定でも、誤差を測定値 $\pm 20\%$ 程度にすることが出来ると考えている。

E. 結論

非がん部胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常の定量により、発がんリスクを診断できる可能性が高い。前向き試験の症例蓄積は順調に進んでおり、最適と思われるマーカー遺伝子が得られた時点で高精度に解析、症例の追跡により、DNA メチル化レベルを用いた発がんリスク診断の臨床的有用性を証明する。

F. 研究発表

論文発表

本研究費によることが明記されたもの

Oka, D., Yamashita, S., Tomioka, T., Nakanishi, Y., Kato, H., Kaminishi, M., and Ushijima, T. The presence of aberrant DNA methylation in non-cancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer*, in press.

Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Sugiyama, T., and Ushijima, T.

DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*, 124: 2367-2374, 2009.

Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., Nakazawa, K., and Ushijima, T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer*, 124: 905-910, 2009.

Terada, K., Okochi-Takada, E., Akashi-Tanaka, S., Miyamoto, K., Taniyama, K., Tsuda, H., Asada, K., Kaminishi, M., and Ushijima, T. Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers. *Carcinogenesis*, 30: 466-471, 2009.

学会発表

1. Ushijima, T. Epigenetic field defect, and cancer risk diagnosis. AACR Special Conference "Cancer Epigenetics", Boston, May 2008.
2. Ushijima, T., Nakajima, T., Ando, T., and Niwa, T. Epigenetic carcinogenic factors in the environment. 38th Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, Dubrovnik, September 2008.
3. Ushijima, T., Niwa, T., and Ando, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by *Helicobacter pylori* infection. ISOBM 2008, Tokyo, October 2008. Ushijima, T. Formation of epigenetic field for cancerization by environmental factors. The 2nd Shanghai Symposium of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, July 2008.
4. Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., and Ushijima, T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. 16th UEGW, Vienna, October 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

分担研究報告書

胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による多発胃癌発生予測に
関する前向き研究（症例の登録と検体の採取）

研究分担者 中島 健 国立がんセンター中央病院内視鏡部 医員

研究要旨

本研究では、異時性多発胃癌の発生予測に非がん部胃粘膜の DNA メチル化異常の量（DNA メチル化レベル）が有用であるか否かを、前向き研究により明らかにする。2008 年 6 月に登録を開始し、2009 年 3 月時点までに 443 名を登録し、429 名が追跡観察群にエントリーした。登録に当たって、除菌療法や、検体採取による重篤な合併症は発生していない。

A. 研究目的

本研究では、異時性多発胃癌の発生予測に非がん部胃粘膜の DNA メチル化異常の量（DNA メチル化レベル）が有用であるか否かを、前向き研究により明らかにする

B. 研究方法

早期胃癌に対して ESD を施行予定または施行後の症例を登録、ピロリ菌感染の場合は除菌、除菌後胃粘膜の DNA メチル化レベルが一定化した時点で、DNA メチル化レベルを測定する。5 年間の追跡調査を行い、DNA メチル化レベルと異時性多発胃癌発生との相関を解析する。

（倫理面への配慮）

国立がんセンター倫理審査委員会にて承認を得た。十分な説明を行った後、文書による同意を得て実施中である。

C. 研究結果

2008 年 4 月 17 日に当センター倫理審査委員会の承認を得た後、日常の内視鏡治療・外来追跡に加えて、本研究を行うためのシステムを構築した。CRC を 1 名採用、ワークフローを確立した。2009 年 3 月時点までに 443 名を登録し、429 名が追跡観察群にエントリーした。14 名が追加外科切除を理由に脱落した。

D. 考察

一ヶ月あたり平均 40 人を登録でき、登録状況はきわめて順調と考えます。除菌療法や、検体採取による重篤な合併症は発生していません。

E. 結論

研究初年度であったが、順調に研究参加者を登録

でき、10 ヶ月で、登録 2 年間の目標登録数（800 例）の半数を超過することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, Niwa T, Nakazawa K and Ushijima T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer*, 124: 905-910, 2009.

本研究費に密接に関係するもの

1. Nakajima T, Ushijima T and Enomoto S. DNA methylation: a marker for carcinogen exposure and cancer risk. *Environ Health Prev Med*, 13: 8-15, 2008.

2. 学会発表

1. 中島健、山下聡、牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による特定遺伝子のメチル化と低転写の関与 第94回消化器病学会総会 2008年5月
2. 中島健、山下聡、前北隆雄、丹羽透、牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による胃粘膜での DNA メチル化異常と標的遺伝子特異性 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月
3. Takeshi Nakajima, Satoshi Yamashita, Takao Maekita, Tooru Niwa, and Toshikazu Ushijima. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. 16th United European Gastroenterology Week. October 2008, Vienna, Austria.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当無し

分担研究報告書

検診受診者における生活習慣と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連に関する研究

研究分担者 島津 太一 国立がんセンターがん予防・検診研究センター予防研究部 研究員

研究要旨

健常集団において胃粘膜 DNA メチル化レベルと食物・栄養素摂取、血液試料などとの関連を横断的に検討する研究を計画した。対象者は、国立がんセンターがん予防検診・研究センターの上部消化管内視鏡検診受診者である。ヘリコバクター・ピロリ菌（HP）感染陽性者については除菌療法をおこない、1) HP 除菌前の全対象者、2) HP 現感染陰性者と HP 除菌治療後の対象者について生活習慣と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連を検討する。本研究が胃癌メカニズムの解明、胃の発がんリスクを予測するマーカーの開発につながることを期待される。

A. 研究目的

早期胃癌患者においては、ヘリコバクター・ピロリ菌（HP）除菌後の胃粘膜 DNA メチル化レベルが胃癌再発を予測出来るかどうかを検討するためのコホート研究が本研究班で進行中である。しかしながら、健常者においては HP 以外の胃癌に関連する要因と胃粘膜メチル化レベルとの関連についての検討がほとんどなされていない。除菌後の者もふくむ HP 現感染陰性の集団において、すでに胃癌との関連が報告されている喫煙、塩分摂取、野菜・果物摂取などの生活習慣と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連を検討すれば、胃癌メカニズムの解明、胃の発がんリスクを予測するマーカーの開発が期待できる。

本研究の目的は、がん予防・検診研究センター検診受診者を対象に、胃粘膜 DNA メチル化レベルと食物・栄養素摂取、血液試料などとの関連を横断的に検討し、胃粘膜 DNA メチル化レベルに関連する要因を探索することである。

B. 研究方法

1. 対象

対象は、国立がんセンターがん予防・検診研究センターで実施している検診（対象者 40 歳以上）において上部消化管内視鏡検査を受けた者である。ただし、除外基準（70 歳以上、HP の除菌歴あり、30 日以内のアスピリン・NSAID の服用歴あり、1 年以内に上部消化管内視鏡検査を受診、3 ヶ月で 10% 以上の体重減少、胃癌の既往あり、胃切除術・逆流防止術・迷走神経切除術の既往あり、妊娠の可能性あり）に該当する者は本研究の対象としない。研究期間に登録可能な現実的な対象者数は 300 例を想定している。

2. 方法

研究参加への同意が得られた者には、通常の検診に加えて本研究用の問診票への回答、検診時の上部消化管内視鏡検査施行時の胃粘膜生検（7ヶ所）をおこなう。これにより、胃粘膜の DNA メチル化レベル・病理組織学的評価と HP 現感染の判定をおこなう。

迅速ウレアーゼ試験で HP 現感染が陽性と判定された者については、標準的除菌療法を施行する。迅速ウレアーゼ試験で陰性であった者でも、検鏡法・血清 HP 抗体価により HP 現感染陽性と判断した場合には除菌治療を受けることとする。除菌治療後 6 ヶ月以降に除菌判定のため尿素呼吸試験または迅速ウレアーゼ試験・内視鏡検査を施行し、メチル化レベル測定のための胃粘膜生検（2ヶ所）をおこなう。

(1) 内視鏡検査実施方法

通常光非拡大上部消化管内視鏡検査をおこなう。内視鏡医は本研究の入力フォームに所見を記載する。DNA メチル化測定用の組織は、胃前庭部小弯（幽門輪より 1cm 口側）から 2 切片採取する。組織検査用の定点生検は Dixon らの提唱する 4 ヶ所より採取する。

(2) 病理組織学的検索

病理組織標本の作製、診断は匿名化したうえで外部に委託する。診断基準には Updated Sydney Classification をもちいる。

(3) 胃粘膜 DNA メチル化レベルの測定

採取した検体は RNA later 保存液中に保存し、連結可能匿名化ののち、予防研究部にて凍結保存される。検体から DNA を抽出し、bisulfite 処理後、胃癌リスクとの相関がしめされている FLNc, HAND1, LOX, 及び THBD のプロモーター領域 CpG アイランドについて、定量的メチル化特異的 PCR 法により、DNA

メチル化レベルを算出、蓄積した DNA メチル化異常の量の指標とする。

今後、有用性が高い遺伝子領域が見出された場合、追加解析する。また、現時点では、定量的メチル化特異的 PCR 法による解析を予定しているが、より効率的かつ信頼性が高い方法が開発された場合、変更することもある。

(4) 解析

1) HP 除菌前の全対象者、2) HP 現感染陰性者および HP 除菌治療後の対象者について、質問票からの喫煙・飲酒習慣、食物・栄養素摂取などと胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連を検討する。このさいに、胃粘膜萎縮、前がん病変などの病理組織学的な情報を考慮する。さらに詳しい検討が必要な場合には、血液試料の測定も検討する。また、HP 現感染者において除菌前後の胃粘膜 DNA メチル化レベルの変化度を規定する要因も検討する。

当センターでは、本研究のための同意のもとに収集された内視鏡検査所見、血液試料、生検材料からの情報にくわえて包括同意のもとに以下を収集している。これらはがん予防・検診研究センター個人情報管理室分室で匿名化のうえ管理されており、データリンクにより胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連について解析が可能である。血液試料については、必要な項目が生じた場合測定し利用することができる。

・質問票

がん予防・検診研究センターの検診受診者は、あらかじめ配布されている生活習慣などに関するアンケートに記入して検診時に提出する。アンケートには既往歴や家族歴、喫煙習慣、飲酒習慣、身体活動度、サプリメント摂取状況、半定量的食物摂取頻度調査などが含まれている。

・その他

検診時の血液検査項目、画像データにもとづく項目、質問票にある項目（上記に挙げた以外の生活習慣〔食習慣、運動、サプリメント、睡眠、便通〕、がん家族歴、収入、学歴、職業、心理的要因〔ストレスコーピング〕、女性の生殖に関する要因〔月経、妊娠、出産、ホルモン補充療法〕など）などはすべて関連を検討できる。

・血液試料

検診受診時に採血をおこない-80℃で凍結保存している。これもちいて血清 HP 抗体価、抗 CagA 抗

体価、及びペプシノゲン値を測定する。

(倫理面への配慮)

本研究について文書及び口頭による説明と自署による個別同意を取得する。本研究の研究計画は、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た（承認番号 20-104）。

C. 研究結果

今年度は、倫理審査委員会への研究計画の提出と研究の体制づくりをおこなった。実際の対象者登録開始は平成 21 年度 4 月からおこなう予定である。

D. 考察

DNA メチル化異常の蓄積が過去の発がん因子曝露を反映した「エピジェネティックな発がんの素地」が形成されているのであれば、生活習慣と DNA メチル化レベルとの間に関連性がみとめられる可能性は高い。がん予防・検診研究センターでは生活習慣関連情報を詳細に収集しているため、発がんに関連する曝露要因の DNA メチル化レベルへの寄与を健常集団でも検討できる。

E. 結論

検診受診者において胃粘膜 DNA メチル化レベルと食物・栄養素摂取、血液試料などとの関連を横断的に検討する研究を計画した。健常集団における検討が、胃発がんメカニズムのさらなる理解、胃の発がんリスクを予測するマーカーの開発につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

なし

本研究費に密接に関係するもの

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

分担研究報告書

胃粘膜に蓄積したエピジェネティック異常の定量による多発胃癌発生予測に関する前向き研究

研究分担者 一瀬雅夫 和歌山県立医科大学 第二内科 教授

研究要旨

【背景と目的】

申請者らは、本研究開始までに、(1)ヘリコバクター・ピロリ菌感染が現存すると胃粘膜に強力に DNA メチル化異常が誘発されること(5-300 倍)、(2)ヘリコバクター・ピロリ菌現感染陰性の場合でも、胃癌患者の胃粘膜には健常者の胃粘膜に比して 2-32 倍の DNA メチル化異常が存在すること、(3)多発胃癌患者の胃粘膜には単発胃癌患者の胃粘膜に比べてより多くの DNA メチル化異常が存在すること、を示してきた。

本研究では、異時性多発胃癌の発生予測に非がん部胃粘膜の DNA メチル化異常の量 (DNA メチル化レベル) が有用であるか否かを、前向き研究により明らかにする。

【対象と方法】

早期胃癌に対して ESD を施行予定または施行後の症例を登録、ヘリコバクター・ピロリ菌感染の場合は除菌、除菌後胃粘膜の DNA メチル化レベルが一定化した時点で、DNA メチル化レベルを測定、約 800 例を登録・追跡開始する (平成 22 年度まで)。5 年間の追跡調査を行い、DNA メチル化レベルと異時性多発胃癌発生の相関を解析する。解析遺伝子として、胃がんリスクとの相関が示されている *FLNC*、*HAND1*、*LOX*、及び *THBD* のプロモーター領域 CpG アイランドを用いる。

A. 研究目的

- (1) ESD 施行後早期胃癌患者の異時性多発胃癌の発生予測に、ヘリコバクター・ピロリ菌の現感染がない状態の胃粘膜 DNA メチル化レベルが有用か否かを、前向き研究により明らかにする。
- (2) 胃発がんリスクとその遺伝子の DNA メチル化レベルが相関する新規マーカー遺伝子を、ゲノム網羅的な DNA メチル化解析により同定する。
- (3) 将来、臨床検査として使用可能となるように、定量的 DNA メチル化測定法の高度の再現性・正確性を実現する。

B. 研究方法

早期胃癌に対して ESD を施行予定または施行後の症例を登録、ヘリコバクター・ピロリ菌感染の場合は除菌、除菌後胃粘膜の DNA メチル化レベルが一定化した時点で、DNA メチル化レベルを測定、約 800 例を登録・追跡開始する (平成 22 年度まで)。5 年間の追跡調査を行い、DNA メチル化レベルと異時性多発胃癌発生の相関を解析する。

同時に、DNA メチル化レベルと胃がんリスクがより相関する遺伝子を、DNA メチル化アレイ等を用いて探索する。

(倫理面への配慮)

本研究は、和歌山県立医科大学倫理審査委員会にて平成 20 年 11 月 14 日承認を得た。十分な説明を行った後、文書による同意を得て実施中である。なお、ESD や除菌は、患者のために必要な通常の日常臨床として施行するものであり、特に倫理審査等は必要としない。

C. 研究結果

当院では、平成 14 年より早期胃癌患者に対して ESD を施行しており、平成 21 年 2 月末時点で 200 例を外来フォローしている。本研究は、和歌山県立医科大学倫理審査委員会にて平成 20 年 11 月 14 日承認を得たので、これらの患者に十分にインフォームドコンセントを行い同意を書面で得て、順次エントリーする予定である。また新規患者に関しても同意を書面で得て、エントリーし症例を蓄積していく予定である。同意を得て、エントリー、検体採取、管理と速やかに、かつ確実にやるよう役割分担とシステム作りを当科で行った。

D. 考察

非がん部胃粘膜における DNA メチル化レベ

ルが、異時性多発がんの発生予測に役立つか否か、また、役立つ場合はその予測力（ハザード比）が明らかになると期待される。

現在は、症例エントリーのシステムを構築し、順次症例を集積している段階である。

E. 結論

現在準備段階であり、未解析である。

F. 研究発表

1.論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Yanaoka K, Oka M, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Arai K, Ohata H, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O and Ichinose M. Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests –outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males. *Cancer Epidemiol Biomarkers*

Prev, 17: 838-845, 2008.

2. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Mukoubayashi C, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Arai K, Yamamichi N, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O and Ichinose M. Risk of gastric cancer development in asymptomatic middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody levels. *Int J Cancer*, 123: 917-926, 2008.

2.学会発表

1. 前北隆雄、一瀬雅夫 胃炎進展・胃がんリスクと DNA メチル化異常 第7回消化器病フォーラム 2008年11月

- #### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
- 無し

分担研究報告書

胃癌内視鏡治療後の多発胃癌発生予測に関する前向き研究における症例集積方法確立のための研究

研究分担者 東京大学消化器内科 助教 藤城光弘

研究要旨

東京大学消化器内科において、研究課題「胃癌内視鏡治療後の多発胃癌発生予測に関する前向き研究」の症例登録を円滑に行うために、当院で胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）を施行した患者の臨床病理学的データを入力したデータベースを作成し、当院で経過観察を継続している患者のリストを作成した。また、当大学医学系研究科の倫理委員会承認後の2008年12月以降は新規にESDを行う患者を基本的に全例登録するように心がけた。2009年2月28日の段階で17例の症例登録にすぎないが、引き続き症例登録数を加速すべく積極的に研究の重要性について説明し同意を得る努力を行っていく予定である。

A. 研究目的

胃癌内視鏡治療後の最適な内視鏡サーベイランスについては未だ確立したものがなく、異時性多発胃癌に対してエビデンスに基づかない頻回の内視鏡検査が行われている現状がある。異時性多発胃癌の発生予測に非癌部胃粘膜のDNAメチル化異常の量（DNAメチル化レベル）が有用であるか否かを前向き研究により明らかにしようとする、主任研究者の研究課題「胃癌内視鏡治療後の多発胃癌発生予測に関する前向き研究」（以後、主研究）の趣旨に賛同し、当施設において胃癌内視鏡治療を受ける患者もしくは受けた患者を主研究に効率的に組み入れる、その手法の確立を本研究の目的とした。

B. 研究方法

主研究において登録される患者は、2000年以降に早期胃癌に対するESDを施行し当院で経過観察を継続している、もしくは、倫理委員会承認後、ESDを施行する、40歳以上80歳以下の症例である。研究1として、2000年以降に早期胃癌に対してESDを行った患者のデータベースを構築すること、研究2として、当院の実情に則して、症例集積を円滑に行うためのシュミレーションを行った。また、倫理委員会の承認後は実際に症例の集積を開始した。

（倫理面への配慮）当院の診療情報提供・インフォ

ームドコンセント委員会で承認を得た説明同意文書を用いてESD治療について患者より説明同意を得た。また、実際の症例集積の開始は、主研究の当大学医学系研究科の倫理委員会承認後に開始することとし、主研究についての十分な説明後に同意が得られた患者のみを組み入れることとした。

C. 研究結果

2000年2月から2008年12月までに当院で胃癌に対するESDを施行した症例は539例であり、それらについてデータベースを構築しその臨床病理学的データをエクセルファイルに入力し、外来受診時にそのデータを参照可能とした。また、主研究における登録パターンを、①ESD後ヘリコバクター・ピロリ（HP）除菌後患者、②ESD後HP除菌前患者、③ESD前除菌前患者、④ESD前除菌後患者に分類した。2008年11月21日に倫理委員会の承認を得、症例登録を12月より開始した。2009年3月10日の段階で登録症例は17例で、その内訳は①9例、②0例、③6例、④2例であった。

D. 考察

当院においては、2000年当初より、胃癌に対するESD後はほぼ全例にHP除菌を行っており、登録パターンの①が経過観察例ではほとんどを占めるため、同意が得られ内視鏡検査が行われればすぐに経過観察を開始できるという特徴がある。一方で、紹介患者が多く、当院での経過観察を継続している患

者は全体の約 6 割程度であるという点が症例集積には不利な点である。2008 年の胃 ESD 治療件数は 96 例であり、今後も同等数の ESD が行われていくことが予想されるため、基本的にはすべての症例を主研究に登録すべく努力し、症例登録数の増加に寄与していきたいと考えている。

E. 結論

主研究における円滑な症例登録のための手法確立を行った。症例登録開始が倫理委員会承認の遅れから 2008 年 12 月以降となったが、今後、精力的に症例登録を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

なし

本研究費に密接に関係するもの

1. Fujishiro M, Kodashima S, Takubo K, Kakushima N and Omata M. Detailed comparison between endo-cytoscopy and horizontal histology of an esophageal intraepithelial squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*, 21: 181-185, 2008.
2. Fujishiro M. Endoscopic submucosal dissection for gastric cancer. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 11: 119-124, 2008.
3. Goto O, Fujishiro M, Kakushima N, Kodashima S, Ono S, Yamaguchi H, Nomura S, Kaminishi M and Omata M. Endoscopic submucosal dissection as a staging measure may not lead to worse prognosis in early gastric cancer patients with additional gastrectomy. *Dig Liver Dis*, 40: 293-297, 2008.
4. Yanaoka K, Oka M, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Arii K, Ohata H, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O and Ichinose M. Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests: outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 838-845, 2008.
5. Ogura K, Okamoto M, Sugimoto T, Yahagi N, Fujishiro M, Kakushima N, Kodashima S, Kawabe T and Omata M. Efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection for gastric cancer in patients with liver cirrhosis. *Endoscopy*, 40: 443-445, 2008.
6. Fujishiro M, Kodashima S, Goto O, Ono S, Muraki Y, Kakushima N and Omata M. Successful en bloc resection of superficial esophageal cancer treated by endoscopic submucosal dissection with a splash-needle (with video). *Endoscopy*, 40: E81-82, 2008.
7. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Kakushima N,

- Ono S, Yahagi N and Omata M. Feasibility of electrocautery snaring as the final step of endoscopic submucosal dissection for stomach epithelial neoplasms. *Dig Liver Dis*, 41: 26-30, 2009.
8. Kakushima N and Fujishiro M. Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol*, 14: 2362-2367, 2008.
 9. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Mukoubayashi C, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Arii K, Yamamichi N, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O and Ichinose M. Risk of gastric cancer in asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody levels. *Int J Cancer*, 123: 917-926, 2008.
 10. Otani K, Kitayama J, Kaisaki S, Ishigami H, Hidemura A, Fujishiro M, Omata M and Nagawa H. Early gastric cancer shows different associations with adipose tissue volume depending on histological type. *Gastric Cancer*, 11: 86-95, 2008.
 11. Fujishiro M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol*, 14: 4289-4295, 2008.
 12. Fujishiro M, Kodashima S, Goto O, Ono S, Muraki Y, Kakushima N and Omata M. Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for the gastrointestinal epithelial neoplasms with a splash-needle. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 18: 592-597, 2008.
 13. Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Goto O, Yamamichi N, Yahagi N, Kashimura K, Matsuura T, Iguchi M, Oka M, Ichinose M and Omata M: Submucosal injection of normal saline may prevent unexpected deep thermal injury of argon plasma coagulation in an in vivo porcine stomach. *Gut and Liver*, 2: 95-98, 2008.
 14. Ono S, Fujishiro M, Kodashima S, Goto O and Omata M. Submerging endoscopic submucosal dissection leads to successful en bloc resection of colonic laterally spreading tumor with submucosal fat. *Gut and Liver*, 2: 209-212, 2008.
 15. Ono S, Fujishiro M, Goto O, Kodashima S and Omata M. En bloc resection of cardia cancer and lipoma with endoscopic submucosal dissection. *Dig Liver Dis*, 41: 237, 2009.
 16. Fujishiro M, Oda I, Yamamoto Y, Akiyama J, Ishii N, Kakushima N, Fujiwara J, Morishita S, Kawachi H, Taniguchi H and Gotoda T. Multi-center survey regarding the management of anticoagulation and antiplatelet therapy for endoscopic procedures in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 214-218, 2009.
 17. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S and Omata M. Outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer with special reference to validation for curability criteria. *Endoscopy*, 41: 118-122, 2009.
 18. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S and Omata M. Is it possible to predict procedural time

- of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? J Gastroenterol Hepatol, in press.
19. Ono S, Fujishiro M, Niimi K, Goto O, Kodashima S, Yamamichi N and Omata M. Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients taking anti-coagulants or anti-platelet agents. Dig Liver Dis, in press.
 2. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S and Omata M. Is it possible to predict procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? UEGW, Vienna, Oct, 2008.
 3. Ono S, Fujishiro M, Kodashima S, Goto O and Omata M. Treatment outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients with anti-coagulants or anti-platelet agents. UEGW, Vienna, Oct, 2008.
- 2.学会発表
1. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S and Omata M. Feasibility of electrocautery snaring as the final step of endoscopic submucosal dissection for stomach epithelial neoplasms. DDW, San Diego, May, 2008.
 - H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特記すべきことなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oka, D., Yamashita, S., Tomioka, T., Nakanishi, Y., Kato, H., Kaminishi, M., and Ushijima, T.	The presence of aberrant DNA methylation in non-cancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers.	Cancer			in press
Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Sugiyama, T., and Ushijima, T.	DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect.	Int J Cancer	124	2367-2374	2009
Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., Nakazawa, K., and Ushijima, T.	The presence of a methylation fingerprint of <i>Helicobacter pylori</i> infection in human gastric mucosae.	Int J Cancer	124	905-910	2009
Terada, K., Okochi-Takada, E., Akashi-Tanaka, S., Miyamoto, K., Taniyama, K., Tsuda, H., Asada, K., Kaminishi, M., and Ushijima, T.	Association between frequent CpG island methylation and <i>HER2</i> amplification in human breast cancers.	Carcinogenesis	30	466-471	2009
Nakajima, T., Enomoto, S., and Ushijima, T.	DNA methylation: a marker for carcinogen exposure and cancer risk.	Environ Health Prev Med	13	8-15	2008
Yanaoka, K., Oka, M., Mukoubayashi, C., Yoshimura, N., Enomoto, S., Iguchi, M., Magari, H., Utsunomiya, H., Tamai, H., Arii, K., Ohata, H., Fujishiro, M., Takeshita, T., Mohara, O., and Ichinose, M.	Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests—outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males.	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev	17	838-845	2008
Yanaoka, K., Oka, M., Yoshimura, N., Mukoubayashi, C., Enomoto, S., Iguchi, M., Magari, H., Utsunomiya, H., Tamai, H., Arii, K., Yamamichi, N., Fujishiro, M., Takeshita, T., Mohara, O., and Ichinose, M.	Risk of gastric cancer development in asymptomatic middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and <i>Helicobacter pylori</i> antibody levels.	Int J Cancer	123	917-926	2008
Ono, S., Fujishiro, M., Niimi, K., Goto, O., Kodashima, S., Yamamichi, N., and Omata, M.	Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients taking anti-coagulants or anti-platelet agents.	Dig Liver Dis			in press
Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., and Omata, M.	Is it possible to predict procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer?	J Gastroenterol Hepatol			in press
Goto, O., Fujishiro, M., Kodashima, S., Ono, S., and Omata, M.	Outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer with special reference to validation for curability criteria.	Endoscopy	41	118-122	2009
Ono, S., Fujishiro, M., Goto, O., Kodashima, S., and Omata, M.	En bloc resection of cardia cancer and lipoma with endoscopic submucosal dissection.	Dig Liver Dis	41	237	2009

<u>Fujishiro, M.</u> , Oda, I., Yamamoto, Y., Akiyama, J., Ishii, N., Kakushima, N., Fujiwara, J., Morishita, S., Kawachi, H., Taniguchi, H., and Gotoda, T.	Multi-center survey regarding the management of anticoagulation and antiplatelet therapy for endoscopic procedures in Japan.	J Gastroenterol Hepatol	24	214-218	2009
Goto, O., <u>Fujishiro, M.</u> , Kodashima, S., Kakushima, N., Ono, S., Yahagi, N., and Omata, M.	Feasibility of electrocautery snaring as the final step of endoscopic submucosal dissection for stomach epithelial neoplasms.	Dig Liver Dis	41	26-30	2009
<u>Fujishiro, M.</u> , Kodashima, S., Takubo, K., Kakushima, N., and Omata, M.	Detailed comparison between endo-cytoscopy and horizontal histology of an esophageal intraepithelial squamous cell carcinoma.	Dis Esophagus	21	181-185	2008
<u>Fujishiro, M.</u>	Endoscopic submucosal dissection for gastric cancer.	Curr Treat Options Gastroenterol	11	119-124	2008
Goto, O., <u>Fujishiro, M.</u> , Kakushima, N., Kodashima, S., Ono, S., Yamaguchi, H., Nomura, S., Kaminishi, M., and Omata, M.	Endoscopic submucosal dissection as a staging measure may not lead to worse prognosis in early gastric cancer patients with additional gastrectomy.	Dig Liver Dis	40	293-297	2008
Ogura, K., Okamoto, M., Sugimoto, T., Yahagi, N., <u>Fujishiro, M.</u> , Kakushima, N., Kodashima, S., Kawabe, T., and Omata, M.	Efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection for gastric cancer in patients with liver cirrhosis.	Endoscopy	40	443-445	2008
<u>Fujishiro, M.</u> , Kodashima, S., Goto, O., Ono, S., Muraki, Y., Kakushima, N., and Omata, M.	Successful en bloc resection of superficial esophageal cancer treated by endoscopic submucosal dissection with a splash-needle (with video).	Endoscopy	40	E81-82	2008
Kakushima, N. and <u>Fujishiro, M.</u>	Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal neoplasms.	World J Gastroenterol	14	2362-2367	2008
Otani, K., Kitayama, J., Kaisaki, S., Ishigami, H., Hidemura, A., <u>Fujishiro, M.</u> , Omata, M., and Nagawa, H.	Early gastric cancer shows different associations with adipose tissue volume depending on histological type.	Gastric Cancer	11	86-95	2008
<u>Fujishiro, M.</u>	Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms.	World J Gastroenterol	14	4289-4295	2008
<u>Fujishiro, M.</u> , Kodashima, S., Goto, O., Ono, S., Muraki, Y., Kakushima, N., and Omata, M.	Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for the gastrointestinal epithelial neoplasms with a splash-needle.	Surg Laparosc Endosc Percutan Tech	18	592-597	2008
<u>Fujishiro, M.</u> , Kodashima, S., Ono, S., Goto, O., Yamamichi, N., Yahagi, N., Kashimura, K., Matsuura, T., Iguchi, M., Oka, M., <u>Ichinose, M.</u> , and Omata, M.	Submucosal injection of normal saline may prevent unexpected deep thermal injury of argon plasma coagulation in an in vivo porcine stomach.	Gut and Liver	2	95-98	2008
Ono, S., <u>Fujishiro, M.</u> , Kodashima, S., Goto, O., and Omata, M.	Submerging endoscopic submucosal dissection leads to successful en bloc resection of colonic laterally spreading tumor with submucosal fat.	Gut and Liver	2	209-212	2008