

CDK6, MET が mir-34b/c の標的であることを明らかにした (Toyota et al, *Cancer Res*, 2008)。また、mir-34b/c は胃癌においても高頻度にメチル化を認め、消化管腫瘍の発生と進展に重要な役割を果たすことが示唆された。本年度はさらに、microRNA microarray を用いて、DNMT1 および DNMT3 をノックアウトした大腸がん細胞株において、発現が誘導される microRNA 470 個を網羅的に解析し、10 個の microRNA が DNA メチル化により不活化されていることを確認した。現在、臨床例におけるメチル化の頻度や標的遺伝子に関して解析中である。

D. 考察

DNA メチル化プロファイルと遺伝子変異の解析から、胃がんが3つのサブタイプに分類されること、特にゲノムワイドな低メチル化は、CIMP-low、p53 変異と相関を認めたが、今後染色体の増幅や欠失と関連するか解析が必要と考えられる。多発性骨髄腫の一部は、デキサメサゾン耐性を示すが、その機構として RASD1 遺伝子のメチル化が関与する可能性を示唆した。今後、さらに網羅的解析を進め、多発性骨髄腫の抗がん剤感受性の指標となるような DNA メチル化プロファイルを明らかにする。DNA メチル化を認めた microRNA に関しては、臨床病理学的因子との関連、標的タンパクの同定およびがん化における役割を明らかにする。

E. 結論

CIMP 陽性胃癌および大腸癌のジェネティック、エピジェネティック異常の関連を明らかにした。また、DNA メチル化は抗がん剤感受性を予測する分子マーカーとして重要であることが示唆された。microRNA の DNA メチル化は消化管癌の発生に重要な役割を果たすことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Shinomura Y, Tokino T and Imai K. *Cancer Epigenomics : Implications of DNA methylation in personalized therapy*. *Cancer Sci*, in press.
2. Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Ashida M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T and Shinomura Y. LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in helicobacter pylori-related enlarged fold gastritis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17:

2555-2564, 2008.

3. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka Y, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y and Tokino T. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 29: 1312-1318, 2008.
4. Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Hiratsuka H and Tokino T. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 99: 958-966, 2008.

本研究費に密接に関係するもの

1. Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chyng W, Estecio MR, Kondo K, Guo Y, Ahmed SS, Toyota M, Itoh F, Suk KT, Cho MY, Shen L, Jelinek J and Issa JP. Sensitive and specific detection of early gastric cancer using DNA methylation analysis of gastric washing. *Gastroenterol*, in press.
2. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y and Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and BTG4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68: 4123-4132, 2008.
3. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R and Dohi T. DNA hypermethylation contributes incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterol*, 135: 142-151, 2008.
4. Ting A, Suzuki H, Cope L, Schuebel K, Lee B, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T and Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res*, 68: 2670-2575, 2008.
5. Suzuki H, Toyota M, Caraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB and Tokino T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *British J Cancer*, 98: 1147-1156, 2008.
6. Toyota M, Kashima L and Tokino T. CHFR as a potential anticancer target. *Cancer Drug Discovery and Development Checkpoint Response in Cancer Therapy*. pp163-176, Edited by Dai W,

Humana Press, NJ, USA, 2008.

7. Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K and Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol*, 43: 378-389, 2008.
8. Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, Sasaki Y, Hiratsuka H and Tokino T. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 32: 1253-1261, 2008.

2.学会発表

1. Toyota M. The role of DNA methylation changes in signaling pathway. AACR Special Conference on Cancer Research: Cancer Epigenetics. Boston, May 2008.
2. Toyota M. Epigenetic gene silencing and microRNA in human colon cancer. Symposium, 36th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tokyo, October 2008.

3. 豊田実 新規エピゲノム法の開発と消化器癌発生の分子機構 第5回日本消化管学会総会シンポジウム 2009年2月
4. 豊田実 大腸癌のシグナル経路異常におけるDNAメチル化の役割 第67回日本癌学会総会シンポジウム 2008年10月
5. 豊田実 癌におけるエピジェネティックな異常の網羅的解析 第31回日本分子生物学会第81回日本生化学会合同年会 シンポジウム 2008年12月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1. 鈴木拓、豊田実、今井浩三、篠村恭久、時野隆至. 癌の検出方法および検出用キット、ならびに癌治療剤. 特願 2008-121671、平成 20 年 5 月 7 日出願

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

胃癌におけるエピジェネティック異常に基づいた高精度がん化予測診断

研究分担者 伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科 教授

研究要旨

内視鏡診断技術の発達により Stage I 胃癌症例が50%以上を占めるわが国において、胃癌治療もより低侵襲に行われることが求められている。裏返すと、今後わが国のハイリスク残胃癌症例が増加することは明らかであり、効果的なフォローアッププログラムを構築することが重要となる。現在、残胃に対するフォローは内視鏡医による経験に基づいた診断および、スポット生検による病理診断のみである。我々は、残胃を低侵襲かつ効率的、網羅的に診断すべく方法を発明した。すなわち胃洗浄液による遺伝子診断である。胃の発癌機構にエピジェネティックな異常が大きく関与することを臨床応用し、胃洗浄液により回収された胃粘膜細胞由来の gDNA を複数の遺伝子メチル化異常を解析することにより、癌存在診断、予測診断ができる系を構築したのである。

そこで、本年度は術後残胃癌患者（開腹術、内視鏡治療を含む）の効果的なフォローアッププログラムを、この検査法を用いることにより構築しようというものである。

A. 研究目的

今回の研究は、この通常内視鏡検査時に処分していた廃液から gDNA を抽出、DNA のメチル化を調べることにより、再発の予測診断を行うものである。

B. 研究方法

1. 自主試験に対する倫理委員会の承諾後、低侵襲治療（腹腔鏡下部分胃切除術、開腹部分胃切除術、経内視鏡的粘膜切除術、経内視鏡的切開剥離術）予定胃癌患者へ説明。承諾の得られた100症例の治療前、治療後経過観察時（最低1回）の2点で胃洗浄サンプルを得る（計200サンプル）。検体管理センターを介して連結可能匿名化とした後、gDNA を抽出、パイサルファイト処理を行い、-20度にて管理する。

2. すべてのデータを統計解析し再発予測、同定診断プログラムを構築する。

（倫理面への配慮）

研究に必要な検体は通常破棄される胃洗浄廃液であり、大学施設生命倫理委員会への承諾を行った後、患者様への十分なインフォームドコンセントのもと同意を得た症例にのみ実施されるものである。また、試料については、連結可能匿名化を行い、医療情報管理を厳重に行うこ

ととする。

C. 研究結果

我々はまず、既知のマーカー候補遺伝子に加え MCAM (MCA-Microarray 法) により得られた146候補遺伝子を、8胃癌細胞株を用いて定量的DNAメチル化解析方法であるパイロシーケンシング法により38候補遺伝子を選出した。これらの遺伝子に対し、ランダムに選択した胃癌症例腫瘍部DNA (n=6) と、ボランティア症例の正常胃粘膜DNA (n=6) を用いてメチル化解析を行い、メチル化レベルを標準化したのち、ROC (Receiver Operating Characteristic) カーブを用いて優位差、感度、特異度、PPV, NPV を求め、最終的に5候補遺伝子 (MINT25, GDNF, PRDM5, ADAM23, MLF7) を選出した。

次にこれら5候補遺伝子を用いて、合計153臨床サンプル（胃癌腫瘍部生検からのDNA: T(20)、胃癌近隣非腫瘍部生検からのDNA: N(20)、胃癌胃洗浄液からのDNA: W(20)、ボランティア胃正常粘膜からのDNA: EN(48)、ボランティア正常胃内洗浄液からのDNA: EW(48))を用いて検証を行った。同じく全てのメチル化レベルを標準化したのち、ROC (Receiver Operating Characteristic) カーブを用いて優位差、感度、特異度、PPV, NPV を求め評価を行った。

結果、胃洗浄液から回収したDNA量は、胃粘膜

生検2個より抽出したDNAより多く、またDNAの質も良好であった。さらに、今回候補とした5遺伝子のメチル化異常は高頻度に胃癌に認め、なかでもMINT25は最も優れたマーカー候補であり感度(90%)、特異度(96%)、AUC(0.961)を示した。興味深いことに、生検組織と洗浄液から抽出したgDNAによるメチル化解析の結果はすべての候補遺伝子において強く相関しており胃洗浄液による診断方法が有効であることを裏付けていた。

D. 考察

通常の内視鏡検査時に破棄している胃洗浄液を用い、エピジェネティックな異常を診断に適用することは非常に有用であることが証明され、今後は臨床への応用を目指すべく、多施設による臨床自主試験が早急に望まれる。

E. 結論

胃洗浄液を用いたエピジェネティック診断は感度、特異度に優れ、かつ侵襲度の非常に低い検査法として有用である。

熟練した内視鏡検査医の育成が未完成の諸国においては、内視鏡診断の補助として、またわが国をはじめとした内視鏡診断が非常に進んでいる諸国においては、肉眼的に所見を読むことのできない再発予測として(分子内視鏡として)有効と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Maehata T, Taniguchi H, Yamamoto H, Noshio K, Adachi Y, Miyamoto N, Miyamoto C, Akutsu N, Yamaoka S and Itoh E. Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *W J Gastroenterol*, 14: 2702-2714, 2008.

本研究費に密接に関係するもの

1. Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chung W, Estecio MR, Kondo K, Guo Y, Ahmed SS, Toyota M, Itoh E, Suk KT, Cho MY, Shen L, Jelinek J and Issa JP. Sensitive and specific detection of early

gastric cancer using DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology*, in press.

2. 学会発表

1. Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chung W, Estecio MR, Kondo K, Guo Y, Ahmed SS, Toyota M, Itoh E, Suk KT, Cho MY, Shen L, Jelinek J and Issa JP. Discovering sensitive and specific methylation markers using gastric washes as a new diagnostic tool for early gastric cancer. *AACR Cancer Epigenetics*, Boston, May, 2008.
2. Watanabe Y, Toyota M, Itoh E and Issa JP. DNA methylation analysis of gastric washes as a new molecular diagnostic tool for gastric cancer. 36th congress of the International Society of Oncology and Biomarkers (ISOBM)", Tokyo, Oct, 2008.
3. 渡邊嘉行、豊田実、伊東文生 遺伝子メチル化異常を用いた様々な消化管癌診断への応用 第5回日本消化管学会総会学術大会ワークショップ 2009年2月
4. 渡邊嘉行、前畑忠輝、豊田実、伊東文生 胃洗浄液を用いた新たなメチル化解析の胃癌診断への応用 第5回日本消化管学会総会学術大会コアシンポジウム 2009年2月
5. 渡邊嘉行、豊田実、伊東文生 胃洗浄液を用いたメチル化解析の胃癌診断への応用 第16回日本消化器病関連学会週間 2008年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

Date of Filing: 15.05.07

Priority: JP/15.05.06/ JPA 2006134878

Title: Method for Detecting Disease-related Marker Using Gastric Mucosal Lavage Fluid

Designated States: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SK TR

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

膵胆道領域の癌診断における epigenetic molecular marker の有用性

研究分担者 松林宏行 静岡県立静岡がんセンター内視鏡科 医長

研究要旨

膵胆道系腫瘍の早期診断を目的として、そのハイリスク群或は前駆病変から発癌までの過程における各種遺伝子のメチル化を幅広く検索し、膵癌診断用・胆道癌診断用のメチル化マーカーprofileを作成する。また実際に、膵液・胆汁あるいは組織検体におけるDNAメチル化の検索が臨床的にハイリスク群の絞り込みや癌診断に寄与するかを検討する。

A. 研究目的

膵液や胆汁を用いたDNAメチル化検索がヒト膵胆道癌のハイリスク群の絞り込みあるいは診断のためのマーカーになるかを検討する。

B. 研究方法

GeneChipを用いて、ヒト膵胆道癌細胞株に脱メチル化剤を付加した後でx5～x10倍の遺伝子発現の回復を認めた遺伝子群を絞り込む。これら遺伝子群および既知の膵胆道癌の発癌に関与する癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子のpromoter領域のメチル化を切除癌検体に応用し、癌部で特異的にメチル化が認められるかを確認する。次に、膵液・胆汁検体に応用し、癌例に対して感度・特異度高く検出されるかを検索する。

(倫理面への配慮)

当院倫理審査委員会に研究計画書の承認を得て、患者様に膵液・胆汁の研究利用への同意を得た後に研究に用いる。

C. 研究結果

現在、研究検体の集積過程である。

D. 考察

現在、研究検体の集積過程である。

E. 結論

現在、研究検体の集積過程である。

F. 研究発表

1.論文発表

本研究費に謝辞があるものなし

本研究に関連が深いもの

2. 松林宏行, 臨床検体を用いたDNAメチル化検出とがん診断への応用. 最新医学, 63: 802-810, 2008.
3. 松林宏行, 小野裕之, 福富晃, Michael Goggins. 家族性膵癌. Journal of Familial Tumors, 8: 24-28, 2008

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）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

DNA 低メチル化の消化管腫瘍発生への影響

研究分担者 山田泰広 岐阜大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

DNA メチル化を伴うがん抑制遺伝子のサイレンシングは、様々ながんでは報告され、脱メチル化剤の臨床応用が注目されている。一方で、グローバルな低メチル化はゲノムの不安定性を引き起こし、発がんに促進的に働くことが明らかになりつつある。昨年度までの研究において、DNA 低メチル化が、胃腫瘍発生を強く抑制することを明らかにした。今年度は、DNA 低メチル化が舌・食道における発がんに及ぼす影響を検討した。DNA 低メチル化は舌および食道発がんにおいても強い発がん抑制効果を示した。DNA 低メチル化における発がん抑制作用は浸潤がん発生に対して顕著であり、DNA メチル化が腫瘍の悪性転換に重要な役割を有することが示唆された。以上の結果より、グローバルな DNA 低メチル化状態は、舌から大腸までの全消化管において腫瘍形成抑制的に作用することが確認された。これらの結果は、DNA メチル化修飾が消化管腫瘍発生の予防および治療に応用可能であることを示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

マウスモデルを用いて、グローバルな DNA 低メチル化による消化管発がん過程に及ぼす影響とそのメカニズムを検索し、消化器がんにおける脱メチル化剤の臨床応用への可能性を検討する。

B. 研究方法

実験 1

DNA 低メチル化の口腔発がんへの影響を、動物モデルを用いて検討した。グローバルな DNA 低メチル化モデルマウスとして、DNA メチル化維持に必須である Dnmt1 の hypomorphic allele を持つマウスを使用した。口腔発がんモデルは、化学発がん物質(4-nitroquinoline 1-oxide; 4NQO)を用いたモデルを使用した。

5 週齢の DNA 低メチル化マウス(Dnmt1 chip/c マウス)およびコントロールマウス(Dnmt1 chip/+ マウス)に、口腔化学発がん物質 4NQO (100ppm) を、20 週間経口投与し、25 週齢での舌および食道腫瘍形成を検索した。

実体顕微鏡を用い外表的な腫瘍の数及び最大径を計測し、また組織切片を作成し、HE 染色における形態変化、免疫染色による検索を行うことで、DNA 低メチル化による口腔多段階発がんへの修飾を分子病理学的に検討した。細胞増殖能の検討は、Ki67 免疫染色にて行った。細胞分化の検討では、重層扁平上皮基底層の分化マーカーと

して CK19 免疫染色を行い、DNA 低メチル化マウスおよびコントロールマウスでの分化状態の変化を検討した。

実験 2

化学発がん物質を用いた胃がんモデルにおいて、化学物質により誘導された遺伝子発現変化が持続し、発がんに寄与することが示されている。今回、DNA 低メチル化が胃腫瘍の発生を抑制するメカニズムを明らかにするため、N-Methyl-N-nitrosourea (MNU)投与後の胃粘膜における遺伝子発現変化を解析した。6 週齢の DNA 低メチル化マウス(Dnmt1 chip/c マウス)およびコントロールマウス(Dnmt1 chip/+ マウス)に、MNU (240ppm)を 1 週間経口投与し、2 週間経過後に、幽門部胃粘膜より粘膜上皮を分離し、マイクロアレイ解析に供した。MNU を投与していない同週齢の DNA 低メチル化マウスおよびコントロールマウスを実験対照群とし、同様にマイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイ解析の結果はリアルタイム PCR により確認した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、岐阜大学動物実験委員会の承認を得た。動物愛護に配慮して実験を施行した。

C. 研究結果

実験 1

4NQO による化学発がんモデルでの舌腫瘍発生数/マウス(mean \pm s.d.)は、DNA 低メチル化(Dnmt1 chip/c)マウスで 1.90 ± 0.81 (n=22)、コントロール(Dnmt1 chip/+)マウスで 4.91 ± 1.02 (n=23)であり、DNA 低メチル化は口腔腫瘍発生を強く抑制した($P < 0.05$)。また腫瘍最大径(mean \pm s.d.)は DNA 低メチル化(Dnmt1 chip/c)マウスで 1.30 ± 0.67 mm (n=22)、コントロール(Dnmt1 chip/+)マウスで 2.07 ± 0.57 mm(n=23)であり、DNA 低メチル化は口腔腫瘍の発育を強く抑制した($P < 0.005$)。

組織学的検索において扁平上皮癌の発生率が、DNA 低メチル化マウスで 19.0%、コントロールマウスで 60.9%と浸潤性腫瘍の発生が抑制された($P < 0.005$)。また、Ki67 免疫染色による細胞増殖活性の検討では、舌尖部と舌背部において低メチル化マウスで細胞増殖活性の低下がみられた。さらに CK19 免疫染色における扁平上皮基底層の分化状態の検討では、4NQO 飲水による CK19 陽性層の増加が低メチル化マウスで抑制された。

実験 2

マイクロアレイのデータより、MNU 投与によって誘導される遺伝子発現変化が、DNA の低メチル化によって抑制される場合があることが示唆された。発現変化が抑制された遺伝子のうち、コントロールマウス(Dnmt1 chip/+マウス)において発現変化の大きかった 23 種類の遺伝子について、リアルタイム PCR で確認を行った。その結果、同じ処置を行った動物でも、その発現には個体間で大きなばらつきがあり、マイクロアレイの結果を再現することは難しいことが明らかとなった。

しかしながら、細胞増殖関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR により検討した結果、コントロールマウスで見られる fgf10 (fibroblast growth factor 10)の発現上昇 ($P < 0.05$)が、DNA 低メチル化(Dnmt1 chip/c)マウスでは抑制されていることを見出した。

D. 考察

グローバルな DNA 低メチル化は舌および食道発がんにおいても強い発がん抑制効果を示した。DNA 低メチル化における発がん抑制作用は浸潤がん発生に顕著であった。同様の抑制作用は、昨年度までに行った胃発がんモデルでも観察されており、DNA メチル化が腫瘍の悪性転換に重要な役割を有することが示唆された。抑制メカニ

ズムには、細胞増殖活性の抑制、未分化細胞に対する分化促進作用の関与が示唆された。

一方、胃発がんモデルにおいて、発癌剤暴露後の遺伝子発現異常の持続に、DNA メチル化が関与していることが示唆された。DNA 低メチル化による腫瘍抑制メカニズムに関与している可能性が考えられた。

E. 結論

グローバルな DNA 低メチル化状態は、舌、食道、胃、大腸における消化管腫瘍形成を抑制することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

2. Oyama T, Yamada Y, Hata K, Tomita H, Hirata A, Sheng HQ, Hara A, Aoki H, Kunisada T, Yamashita S and Mori H. Further upregulation of β -catenin/Tcf transcription is involved in the development of macroscopic tumors in the colon of Apc Min/+ mice. *Carcinogenesis*, 29: 666-672, 2008.

2. 学会発表

1. Yamada, Y. Role of DNA methylation in multistage colon carcinogenesis. *Northeastern Asian Symposium on "Cancer Epigenetics"*. Jeju, November 2008.
2. 山田泰広、原明、平田暁大、廣瀬善信、ルドルフ イェーニツシュ、森秀樹 未分化性の維持と発がん 日本病理学会 97 回総会シンポジウム 2008 年 4 月
3. 山田泰広 The role of DNA methylation in carcinogenesis in digestive tract. 日本癌学会 67 回総会シンポジウム 2008 年 10 月

G. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Toyota, M., Kashima, L., and Tokino, T.	CHFR as a potential anticancer target.	Dai W	Cancer Drug Discovery and Development Checkpoint Response in Cancer Therapy	Humana Press	NJ, USA	2008	163-176

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
Ushijima, T. and Yamashita, S.	Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA).	Methods Mol Biol	507	117-130	2009
Abe, M., Watanabe, N., McDonnell, N., Takato, T., Ohira, M., Nakagawara, A., and Ushijima, T.	Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis.	Oncology	74	50-60	2008
Yamashita, S., Takahashi, S., McDonnell, N., Watanabe, N., Niwa, T., Hosoya, K., Tsujino, Y., Shirai, T., and Ushijima, T.	Methylation silencing of transforming growth factor- β receptor type II in rat prostate cancers.	Cancer Res	68	2112-2121	2008
Jones, PA., Baylin, SB., Bernsten, BE., Feinberg, AP., Grealley, JM., Jenuwein, T., Jirtle, R., Ushijima, T., Pierotta, V., Allis, CD., Elgin, SC., Rine, J., and Wu, C.	Moving AHEAD with an international human epigenome project.	Nature	454	711-715	2008
Sekine, S., Ogawa, R., Ito, R., Hiraoka, N., McManus, MT., Kanai, Y., and Hebrok, M.	Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. , 2009.	Gastroenterology			in press
Sekine, S., Nakanishi, Y., Ogawa, R., Kouda, S., and Kanai, Y.	Esophageal melanomas harbor frequent <i>NRAS</i> mutations unlike melanomas of other mucosal sites.	Virchows Archiv			in press
Arai, E., Ushijima, S., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Yokoi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., and Kanai, Y.	Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome.	Carcinogenesis	30	214-221	2009

Ojima, H., <u>Kanai, Y.</u> , Iwasaki, M., Hiraoka, N., Shimada, K., Sano, T., Sakamoto, Y., Esaki, M., Kosuge, T., Sakamoto, M., and Hirohashi, S.	Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma.	Cancer Sci	100	62-70	2009
<u>Kanai, Y.</u>	Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers.	Pathol Int	58	544-558	2008
Arai, E., Ushijima, S., Tsuda, H., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S. and <u>Kanai, Y.</u>	Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome.	Clin Cancer Res	14	5531-5539	2008
Nara, S., Shimada, K., Kosuge, T., <u>Kanai, Y.</u> , and Hiraoka, N.	Minimally invasive intraductal papillary-mucinous carcinoma of the pancreas: clinicopathologic study of 104 intraductal papillary-mucinous neoplasms.	Am J Surg Pathol	32	243-255	2008
<u>Kanai, Y.</u>	Overexpression of HDACs: a prognostic marker for gastric cancer identified by tissue microarray.	Lancet Oncol	9	91-93	2008
Kikuchi, R., Tsuda, H., Kozaki, K., <u>Kanai, Y.</u> , Kasamatsu, T., Sengoku, K., Hirohashi, S., Inazawa, J., and Imoto, I.	Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer.	Cancer Res	68	5067-5075	2008
Ochiai, H., Nakanishi, Y., Fukasawa, Y., Sato, Y., Yoshimura, K., Moriya, Y., <u>Kanai, Y.</u> , Watanabe, M., Hasegawa, H., Kitagawa, Y., Kitajima, M., and Hirohashi, S.	A new formula for predicting liver metastasis in patients with colorectal cancer: immunohistochemical analysis of a large series of 439 surgically resected cases.	Oncology	75	32-41	2008
<u>Toyota, M.</u> , Suzuki, H., Yamashita, T., Hirata, K., Shinomura, Y., Tokino, T., and Imai, K.	Cancer epigenomics: Implications of DNA methylation in personalized cancer therapy.	Cancer Sci			in press
Watanabe, Y., Kim, HS., Castoro, RJ., Chyng, W., Estecio, MR., Kondo, K., Guo, Y., Ahmed, SS., <u>Toyota, M.</u> , <u>Itoh, F.</u> , Suk, KT., Cho, MY., Shen, L., Jelinek, J., and Issa, JP.	Sensitive and specific detection of early gastric cancer using DNA methylation analysis of gastric washing.	Gastroenterol			in press
Imai, T., <u>Toyota, M.</u> , Suzuki, H., Akino, K., Ogi, K., Sogabe, Y., Kashima, L., Maruyama, R., Nojima, M., Mita, H., Sasaki, Y., <u>Itoh, F.</u> , Imai, K., Shinomura, Y., Hiratsuka, H., and Tokino, T.	Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma.	Cancer Sci	99	958-966	2008
Yamamoto, E., <u>Toyota, M.</u> , Suzuki, H., Kondo, Y., Sanomura, T., Murayama, Y., Ohe-Toyota, M., Maruyama, R., Nojima, M., Ashida, M., Fujii, K., Sasaki, Y., Hayashi, N., Mori, M., Imai, K., Tokino, T., and Shinomura, Y.	LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in <i>Helicobacter pylori</i> -related enlarged- fold gastritis.	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev	17	2555-2564	2008

Maruyama, R., Akino, K., <u>Toyota, M.</u> , Suzuki, H., Imai, T., Ohe-Toyota, M., Yamamoto, E., Nojima, M., Fujikane, T., Sasaki, Y., Yamashita, T., Watanabe, Y., Hiratsuka, Y., Hirata, K., <u>Itoh, F.</u> , Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T.	Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer.	Carcinogenesis	29	1312-1318	2008
<u>Toyota, M.</u> , Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T.	Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer.	Cancer Res	68	4123-4132	2008
Kawamura, YI., <u>Toyota, M.</u> , Kawashima, R., Hagiwara, T., Suzuki, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., Kannagi, R., and Dohi, T.	DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer.	Gastroenterol	135	142-151	2008
Ting, A., Suzuki, H., Cope, L., Schuebel, K., Lee, B., <u>Toyota, M.</u> , Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., and Baylin, SB.	A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells.	Cancer Res	68	2670-2575	2008
Suzuki, H., <u>Toyota, M.</u> , Caraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., Sonoda, T., Mori, M., Hirata, K., Imai, K., Shinomura, Y., Baylin, SB., and Tokino, T.	Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer.	British J Cancer	98	1147-1156	2008
Takagi, H., Sasaki, S., Suzuki, H., <u>Toyota, M.</u> , Maruyama, R., Nojima, M., Yamamoto, H., Omata, M., Tokino, T., Imai, K., and Shinomura, Y.	Frequent epigenetic inactivation of <i>SFRP</i> genes in hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol	43	378-389	2008
Sogabe, Y., Suzuki, H., <u>Toyota, M.</u> , Ogi, K., Imai, T., Nojima, M., Sasaki, Y., Hiratsuka, H., and Tokino, T.	Epigenetic inactivation of <i>SFRP</i> genes in oral squamous cell carcinoma.	Int J Oncol	32	1253-1261	2008
Maehata, T., Taniguchi, H., Yamamoto, H., Nosho, K., Adachi, Y., Miyamoto, N., Miyamoto, C., Akutsu, N., Yamaoka, S., and <u>Itoh, F.</u>	Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer.	W J Gastroenterol	14	2702-2714	2008
Oyama, T., <u>Yamada, Y.</u> , Hata, K., Tomita, H., Hirata, A., Sheng, HQ., Hara, A., Aoki, H., Kunisada, T., Yamashita, S., and Mori, H.	Further upregulation of β -catenin/Tcf transcription is involved in the development of macroscopic tumors in the colon of <i>Apc</i> ^{Mim/+} mice.	Carcinogenesis	29	666-672	2008
松林宏行.	臨床検体を用いた DNA メチル化検出とがん診断への応用.	最新医学	63	802-810	2008
松林宏行, 小野裕之, 福富晃, Michael Goggins.	家族性膵癌.	J Familial Tumors	8	24-28	2008