

200907013A (1/2)

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成22年(2010)年 4月

1 / 2冊

## 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 ..... 5  
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） ..... 8  
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 .....9  
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 .....11  
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 .....13  
藤城光弘 東京大学光学医療診療部

### III 研究成果の刊行に関する一覧表 .....15

### IV 研究成果の刊行物・別刷り .....2冊目

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

胃がんなど一部のがんでは、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（エピジェネティックな発がんの素地）。胃がんでは、早期胃がん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。そこで、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前向き研究により明らかにする。平成 21 年度までに 834 例を登録し、観察開始時の DNA メチル化レベル測定用の DNA を抽出した。感度・特異度が高い新規マーカー遺伝子を同定するために、平成 21 年度は、胃がん患者非がん部胃粘膜と健常者胃粘膜とを用いた DNA メチル化アレイ解析を行い、両方で DNA メチル化レベルが異なる CpG アイランド 27 個を同定した。測定方法も臨床検査として実施可能なように、異なる施設・異なる時点においても高度の再現性が得られるように高度化した。平成 21 年度までに、複数回、独立に測定した DNA メチル化レベルの変動係数 0.03 を達成し、ほぼ同一の値が得られる測定手順を確立した。

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
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 光学医療診療部・准教授

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。

A. 研究目的

早期胃がん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、胃がんのみならず、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

日常的に臨床で利用されるマーカーとするためには、高いオッズ比を示す新規マーカー遺伝子の分離が必要である。平成 20 年度までにマイクロ RNA 遺伝子 *miR-124a-3* のオッズ比は 10-20 に達することを見出した。平成 21 年度は、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、高いオッズ比を示す新規マーカーの分離を進めた。さらに、DNA メチル化レベルの測定に関しては、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。

B. 研究方法

(1) 対象

早期胃がんに対して ESD を施行予定または施行後の症例を登録（一次登録）し、ピロリ菌感染がある場合は除菌する。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し、追跡開始する（二次登録、目標 1,000 例）。二次登録した患者について 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明らかにする。

最適と思われるマーカー遺伝子が得られた時点で、横断的解析を行い、どの程度のオッズ比が得られるか明らかにする。

## (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*、*THBD*、及び *miR-124a-3* 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

DNA メチル化アレイを用いた網羅的解析と、個別遺伝子の評価の両方を行う。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。

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。

### (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専任のコーディネーターを配置、また、和歌山県立医科大学。東京大学の各施設でも支援者を配置し、データ管理を継続した。平成 21 年度までに、国立がんセンターでは、665 例の症例登録（一次登録）を行い、外科切除追加症例、他臓器がん合併症例等の除外後、608 例の観察開始（二次登録）を行った。和歌山県立医科大学では、除外症例なく、108 例の二次登録を行った。東京大学では 130 例の一次登録、118 例の二次登録を行っ

た。平成 21 年度までに 3 施設で合計 834 例の二次登録を行った。

当初の計画では、平成 21 年度で症例登録を完了する予定であったが、脱落症例の発生を考慮し、1) 平成 22 年度 7 月末までの登録継続、2) 新規分担研究施設の追加（静岡県立静岡がんセンター）を行い、合計 1,000 例の二次登録を目指す。静岡県立静岡がんセンターでは倫理審査委員会での研究計画審査中であり、近日中に承認される見込みである。

これまでに同定した 3 マーカー遺伝子 (*FLNc*、*THBD*、及び *miR-124a-3*) の有用性を評価するため、ピロリ菌現感染陰性の胃癌患者 57 例、及び健常者 54 例の胃粘膜で各遺伝子のメチル化レベルを測定し、オッズ比を計算した。その結果、3 遺伝子それぞれ、6.4、22.7、68.6 と極めて高いオッズ比で胃癌症例の非がん部胃粘膜を健常者の胃粘膜から区別できることを見出した。

## (2) 新規マーカー遺伝子

平成 21 年度は、網羅的解析では、ピロリ菌現感染陰性の胃癌患者の非がん部胃粘膜と健常者胃粘膜 3 例ずつをプールし、DNA メチル化アレイ解析を行った。両方で DNA メチル化レベルが異なる CpG アイランド 27 個を同定した。

個別の遺伝子では、新たに報告された *miR-34b/c* について、本研究に適したメチル化レベル測定系を開発した。平成 22 年度は、新規マーカーを更に充実し、それぞれ、横断的解析によりどの程度のオッズ比が得られるかを検討する。

## (3) 測定方法の高度化

数%程度の DNA メチル化の正確な定量には定量 MSP 法が最適とされている。しかし、発がんリスク診断では、異なる時間・場所・実施者による高度の再現性が必要である。平成 21 年度までに、細胞株由来のコントロール DNA を用いて複数回、DNA メチル化を定量し、変動係数 0.03 とほぼ同一の値が得られる測定手順を確立した。

## D. 考察

参加 3 施設において順調に症例の登録が進んでいる。平成 22 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。

平成 21 年度は、834 例を登録し、観察開始時の DNA メチル化レベル測定用の DNA を抽出した。これまでに同定した 3 マーカー遺伝子 (*FLNc*、*THBD*、及び *miR-124a-3*) のメチル化レベルが、胃癌症例の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜との区別に関し、それぞれ、6.4、22.7、68.6 と極めて高いオッズ比を

示した。本研究では、単発胃がんと多発胃がんとを区別する必要があるために、これよりは難度が高いと思われる。しかし、DNA メチル化異常を用いた発がんリスク診断の有用性を示す結果であることは間違いない。

新規マーカー遺伝子としては、網羅的解析では、DNA メチル化アレイ解析により、ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜を3例ずつプールして解析し、両者でDNA メチル化レベルが異なるCpGアイランド27個を同定した。今後、多数症例の解析により、これらの中から有用性が高いものを選別していく。一方、個別の遺伝子では、*miR-34b/c* のメチル化レベル測定系を開発した。今後もオッズ比の高いマーカー遺伝子の探索を続ける。

定量的MSP法は、平成21年度までに、細胞株由来のコントロールDNAを用いて複数回DNAメチル化を定量し、ほぼ同一の値が得られる測定手順を確立した。

#### E. 結論

非がん部胃粘膜に蓄積したDNAメチル化異常定量による発がんリスク診断前向き試験のための症例蓄積は順調に進んでいる。世界初の「組織に蓄積したDNAメチル化異常を利用した疾患リスク診断」として成果が得られる可能性が高い。

#### F. 健康危険情報 該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Nakajima, T., Enomoto, S, Yamashita, S, Ando, T, Nakanishi, Y, Nakazawa, K, Oda, I, Gotoda, T and Ushijima, T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. **J Gastroenterol**, 45: 37-44, 2010.
2. Hosoya, K, Yamashita, S, Ando, T, Nakajima, T, Itoh, F and Ushijima, T. Adenomatous polyposis coli 1A is likely to be methylated as a passenger in human gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, 285: 182-189, 2009.
3. Oka, D, Yamashita, S, Tomioka, T, Nakanishi, Y, Kato, H, Kaminishi, M and Ushijima, T. The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. **Cancer**, 115: 3412-3426, 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. 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.
6. 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. Takeshima, H, Yamashita, S, Shimazu, T., Niwa, T and Ushijima, T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. **Genome Res**, 19: 1974-1982, 2009.
2. Yanaoka, K, Oka, M, Ohata, H, Yoshimura, N, Deguchi, H, Mukoubayashi, C, Enomoto, S, Inoue, I, Iguchi, M, Maekita, T, Ueda, K, Utsunomiya, H, Tamai, H, Fujishiro, M., Iwane, M, Takeshita, T, Mohara, O and Ichinose, M. Eradication of *Helicobacter pylori* prevents cancer development in subjects with mild gastric atrophy identified by serum pepsinogen levels. **Int J Cancer**, 125: 2697-2703, 2009.
3. Yanaoka, K, Oka, M, Yoshimura, N, Deguchi, H, Mukoubayashi, C, Enomoto, S, Maekita, T, Inoue, I, Ueda, K, Utsunomiya, H, Iguchi, M, Tamai, H, Fujishiro, M., Nakamura, Y, Tsukamoto, T, Inada, K, Takeshita, T and Ichinose, M. Preventive effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on cancer development in extensive metaplastic gastritis, a *Helicobacter pylori*-negative precancerous lesion. **Int J Cancer**, 126: 1467-1473, 2009.
4. Goto, O, Fujishiro, M., Kodashima, S, Ono, S, Niimi, K, Hirano, K, Yamamichi, N and Koike, K. A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of postendoscopic submucosal dissection bleeding. **Gastrointest Endosc**, 71: 241-248, 2010.
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. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S and Omata, M. Is it possible to predict the procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? **J Gastroenterol Hepatol**, 24: 379-383, 2009.
  7. 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**, 41: 725-728, 2009.
  8. 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.
  9. Miki, K, Fujishiro, M, Kodashima, S and Yahagi, N. Long-term results of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method among an asymptomatic middle-aged Japanese population. **Dig Endosc**, 21: 78-81, 2009.
  10. Miki, K and Fujishiro, M. Cautious comparison between East and West is necessary in terms of the serum pepsinogen test. **Dig Endosc**, 21: 134-135, 2009.
  11. Yamamichi, N, Inada, K, Furukawa, C, Sakurai, K, Tando, T, Ishizaka, A, Haraguchi, T, Mizutani, T, Fujishiro, M, Shimomura, R, Oka, M, Ichinose, M, Tsutsumi, Y, Omata, M and Iba, H. Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex cooperatively regulate villin expression in gastrointestinal cells. **Exp Cell Res**, 315: 1779-1789, 2009.
  12. Yamamichi, N, Shimomura, R, Inada, K, Sakurai, K, Haraguchi, T, Ozaki, Y, Fujita, S, Mizutani, T, Furukawa, C, Fujishiro, M, Ichinose, M, Shiogama, K, Tsutsumi, Y, Omata, M and Iba, H. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. **Clin Cancer Res**, 15: 4009-4016, 2009.
  13. Enomoto, S, Yahagi, N, Fujishiro, M, Oka, M, Muraki, Y, Deguchi, H, Ueda, K, Inoue, I, Maekita, T, Magari, H, Mukoubayashi, C, Nakazawa, K, Iguchi, M, Yanaoka, K, Arie, K, Tamai, H, Omata, M and Ichinose, M. Assessment of Intraoperative bleeding during endoscopic submucosal dissection and endoscopic hemostasis using high-frequency hemostatic forceps. **J Wakayama Med Soc**, 60: 124-129, 2009.
2. 学会発表
    1. Ushijima, T, Niwa, T and Takeshima, H. Epigenetic Field for Cancerization: As a Target for Risk Diagnosis, Cancer Prevention, and Marker for Molecular Epidemiology. Avison Symposium at Yonsei University. Seoul, January, 2009.
    2. Ando, T, Yoshida, T, Enomoto, S, Asada, K, Tatematsu, M, Ichinose, M, Sugiyama, T and Ushijima, T. Involvement of microRNA silencing in the formation of field defect for gastric carcinogenesis. AACR 100th annual meeting. Colorado, April, 2009.
    3. Ushijima, T. Induction of aberrant DNA methylation by inflammation caused by *H. pylori* infection. 29th Sapporo Cancer Seminar on "*Helicobacter pylori* and gastric cancer". Sapporo, July, 2009.
    4. Ushijima, T. Induction of aberrant DNA methylation as a major carcinogenic pathway by *Helicobacter pylori* infection. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and related-organisms. Niigata, September, 2009.
    5. Ushijima, T. The Role of Epigenetics in the Development of Gastric Cancer. SIDDS 2009. Seoul, November, 2009.
    6. Ushijima, T. Epigenetic Field Defect for Gastric Cancers. Guangzhou First International Symposium of Cancer Epigenetics. Guangzhou, November, 2009.
    7. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S, Niimi, K, Yamamichi, N and Omata, M. Usefulness of magnifying endoscopy with narrow band imaging (NBI) for endoscopic submucosal dissection (ESD) of early gastric cancer. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Gastrointestinal Endoscopy. Seoul, March, 2009.
    8. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S, Niimi, K, Hirano, K, Yamamichi, N and Koike K. A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection (ESD) for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of post-ESD bleeding. GASTRO2009 UEGW/WCOG. London, November, 2009.
    9. 中島 健, 安藤孝将, 生島俊和 胃癌リスクマーカーとしての DNA メチル化異常—臨床応用に向けて 日本消化器関連学会週間 シンポジウム 6 消化器癌におけるエピジェネティクス 2009年10月 京都
    10. 前北隆雄, 一瀬雅夫 DNA メチル化異常を用いた新規胃癌リスクマーカーの開発 日本消化器関連学会週間 シンポジウム 6 消化器癌におけるエピジェネティクス 2009年10月 京都
- 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

胃がんなど一部のがんでは、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（エピジェネティックな発がんの素地）。胃がんでは、早期胃がん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。そこで、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前向き研究により明らかにする。平成 21 年度までに 834 例を登録し、観察開始時の DNA メチル化レベル測定用の DNA を抽出した。感度・特異度が高い新規マーカー遺伝子を同定するために、平成 21 年度は、胃がん患者非がん部胃粘膜と健常者胃粘膜とを用いた DNA メチル化アレイ解析を行い、両者で DNA メチル化レベルが異なる CpG アイランド 27 個を同定した。測定方法も臨床検査として実施可能なように、異なる施設・異なる時点においても高度の再現性が得られるように高度化した。平成 21 年度までに、複数回、独立に測定した DNA メチル化レベルの変動係数 0.03 を達成し、ほぼ同一の値が得られる測定手順を確立した。

A. 研究目的

早期胃がん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、胃がんのみならず、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、高いオッズ比を示す新規マーカー遺伝子の分離が必要である。平成 20 年度までにマイクロ RNA 遺伝子 *miR-124a-3* のオッズ比は 10-20 に達することを見出した。平成 21 年度は、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、高いオッズ比を示す新規マーカーの分離を進めた。さらに、DNA メチル化レベルの測定に関しては、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。

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

胃がんリスクとの相関が示されている *FLNc*、*THBD*、及び *miR-124a-3* 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

DNA メチル化アレイを用いた網羅的解析と個別遺伝子の評価の両方を行う。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。

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。

### (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

平成 21 年度までに 834 例の登録を完了した。3 施設で採取された内視鏡検体 1,045 検体について、DNA を抽出、品質管理を行った。

これまでに同定した 3 マーカー遺伝子 (*FLNc*、*THBD*、及び *miR-124a-3*) の有用性を評価するため、ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者 57 例、及び健常者 54 例の胃粘膜で各遺伝子のメチル化レベルを測定し、オッズ比を計算した。その結果、3 遺伝子それぞれ、6.4、22.7、68.6 と極めて高いオッズ比で胃がん症例の非がん部胃粘膜を健常者の胃粘膜から区別できることを見出した。

### (2) 新規マーカー遺伝子

平成 21 年度は、網羅的解析では、ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者の非がん部胃粘膜と健常者胃粘膜 3 例ずつをプールし、DNA メチル化アレイ解析を行った。両者で DNA メチル化レベルが異なる CpG アイランド 27 個を同定した。

個別の遺伝子では、新たに報告された *miR-34b/c* について、本研究に適したメチル化レベル測定系を開発した。平成 22 年度は、新規マーカーを更に充実し、それぞれ、横断的解析によりどの程度のオッズ比が得られるかを検討する。

### (3) 測定方法の高度化

数%程度の DNA メチル化の正確な定量には定量 MSP 法が最適とされている。しかし、発がんリスク診断では、異なる時間・場所・実施者による高度の再現性が必要である。平成 21 年度までに、細胞株由来のコントロール DNA を用いて複数回、DNA メチル化を定量し、変動係数 0.03 とほぼ同一の値が得られる測定手順を確立した。

## D. 考察

参加 3 施設において順調に症例の登録が進んでいる。平成 22 年度には、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。

平成 21 年度は、834 例を登録し、観察開始時の DNA メチル化レベル測定用の DNA を抽出した。これまでに同定した 3 マーカー遺伝子 (*FLNc*、*THBD*、及び *miR-124a-3*) のメチル化レベルが、胃がん症例の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜との区別に関し、それぞれ、6.4、22.7、68.6 と極めて高いオッズ比を示した。本研究では、単発胃がんと多発胃がんとを区別する必要があるために、これよりは難度が高いと思われる。しかし、DNA メチル化異常を用いた発がんリスク診断の有用性を示す結果であることは間違いない。

新規マーカー遺伝子としては、網羅的解析では、DNA メチル化アレイ解析により、ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜を 3 例ずつプールして解析し、両者で DNA メチル化レベルが異なる CpG アイランド 27 個を同定した。今後、多数症例の解析により、これらの中から有用性が高いものを選別していく。一方、個別の遺伝子では、*miR-34b/c* のメチル化レベル測定系を開発した。今後もオッズ比の高いマーカー遺伝子の探索を続ける。

定量的 MSP 法は、平成 21 年度までに、細胞株由来のコントロール DNA を用いて複数回 DNA メチル化を定量し、ほぼ同一の値が得られる測定手順を確立した。

## 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

本研究費に謝辞があるもの

1. Nakajima, T, Enomoto, S, Yamashita, S, Ando, T, Nakanishi, Y, Nakazawa, K, Oda, I, Gotoda, T and Ushijima, T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. **J Gastroenterol**, 45: 37-44, 2010.
2. Hosoya, K, Yamashita, S, Ando, T, Nakajima, T, Itoh, F and Ushijima, T. Adenomatous polyposis coli 1A is likely to be methylated as a passenger in human gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, 285: 182-189, 2009.
3. Oka, D, Yamashita, S, Tomioka, T, Nakanishi, Y, Kato, H, Kaminishi, M and Ushijima, T. The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. **Cancer**, 115: 3412-3426, 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. 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.
6. 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.

学会発表

1. Ushijima, T, Niwa, T and Takeshima, H. Epigenetic Field for Cancerization: As a Target for Risk Diagnosis, Cancer Prevention, and Marker for Molecular Epidemiology. Avison Symposium at Yonsei University. Seoul, January, 2009.
2. Ando, T, Yoshida, T, Enomoto, S, Asada, K, Tatematsu, M, Ichinose, M, Sugiyama, T and Ushijima, T. Involvement of microRNA silencing in the formation of field defect for gastric carcinogenesis. AACR 100th annual meeting. Colorado, April, 2009.
3. Ushijima, T. Induction of aberrant DNA methylation by inflammation caused by *H. pylori* infection. 29th Sapporo Cancer Seminar on "*Helicobacter pylori* and gastric cancer". Sapporo, July, 2009.
4. Ushijima, T. Induction of aberrant DNA methylation as a major carcinogenic pathway by *Helicobacter pylori* infection. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and related-organisms. Niigata, September, 2009.
5. Ushijima, T. The Role of Epigenetics in the Development of Gastric Cancer. SIDDS 2009. Seoul, November, 2009.
6. Ushijima, T. Epigenetic Field Defect for Gastric Cancers. Guangzhou First International Symposium of Cancer Epigenetics. Guangzhou, November, 2009.

- 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

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が、2010 年 3 月時点まででは合計 665 名を登録し 608 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、2008 年 6 月に登録を開始した。2010 年 3 月時点までに 665 名を登録し、608 名が追跡観察群にエントリーした。57 名が追加外科切除等を理由に脱落した。

D. 考察

エントリーから 2 年目に入り対象者が主に新規 ESD に限定されるので去年に比較して、一ヶ月あたりの平均登録者数が約 10 名と減少している。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

研究開始 2 年目にあたり、一ヶ月あたりの登録者数が減少したが、当初の研究計画の際の想定範囲内であり、平成 22 年 7 月までの登録期間内に、計 800 人の登録を引き続き目標とする。

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.
2. Nakajima, T, Enomoto, S, Yamashita, S, Ando, T, Nakanishi, Y, Nakazawa, K, Oda, I, Gotoda, T and Ushijima, T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. **J Gastroenterol**, 45: 37-44, 2010.

2. 学会発表

1. 中島 健、安藤孝将、牛島俊和 胃癌リスクマーカーとしての DNA メチル化異常—臨床応用に向けて—日本消化器関連学会週間 シンポジウム 6 消化器癌におけるエピジェネティクス 2009 年 10 月 京都

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 メチル化レベルと生活習慣関連要因との関連を横断的に検討する研究計画にしたがい、研究参加者のリクルートをおこなった。研究参加者は、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 300 名である。ヘリコバクター・ピロリ菌の現感染陽性者の割合は 40%（120 名）、除菌から 6 ヶ月後の再受診が可能であった 110 名の除菌成功割合は 70%であった。研究に必要な試料の収集が完了したため、次年度以降、胃粘膜 DNA メチル化レベルの解析、血液検体の測定をおこない、生活習慣関連要因との関連性を検討していく予定である。

A. 研究目的

健常者においては HP 以外の胃がん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、すでに胃がん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、胃発がんメカニズムの解明、胃の発がんリスクを予測するマーカーの開発に有用な知見が得られることが期待できる。

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

対象者の適格基準は、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日本人である。除外基準は、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、胃がんの既往あり、胃切除術の既往あり、胃粘膜の生検・除菌が不適当と医師が判断した者、研究参加への同意が得られなかった者である。

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に 7 ヶ所の胃粘膜生検をおこなう。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または鏡検法で HP 現感染が陽性と判定された者については、標準的除菌治療を施行する。除菌治療から 6 ヶ月以降に除菌判定のため尿素呼気試験、メチル化レベル測定のための胃粘膜生検をおこなう。

(1) 内視鏡検査実施方法

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 カ所より採取する。

(2) 病理組織学的検索

改訂シドニー分類により胃炎・HP 感染の評価をおこなう。

(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、胃がん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。

(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。

血液試料については、検診受診時に採血をおこない-80℃で凍結保存しているものを持ちこる。また、除菌後再受診者については、再度同意をとり血清検体の提供をうける。これらを持ちこって血清 HP 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

平成 21 年度 4 月から 8 月末までリクルートをおこなった。適格基準を満たした 773 名のうち、除外基準を満たさなかった 396 名に研究参加への説明をおこない、同意を得た 300 名(うち男性 59%、n=177)の参加者を登録した。男女別の平均年齢(±標準偏差)、HP の現感染陽性の割合は、それぞれ 59±8 歳、58±8 歳、41%、39%であった。HP 現感染が陽性と判定された 120 名のうち、7 名(胃がん 2 名、除菌薬に対する副作用ありで除菌中止 2 名、胃潰瘍で他院紹介 1 名、除菌に対する同意撤回 2 名)が除菌後受診の対象から除外された。除菌 6 ヶ月後の再受診では 3 名が受診できず(他疾患で死亡、骨折、精神疾患による)、110 名が除菌判定・上部消化管内視鏡検査を受けた。尿素呼吸試験による除菌成功割合( $\Delta^{13}\text{C}$ : 2.5‰未満)は 70%であった。

#### 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。今回、HP 現感染陽性者 120 名、陰性者 180 名、陽性者のうち除菌により HP 現感染が陰性となった者 77 名について DNA メチル化測定用の胃粘膜を採取することができた。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ことが期待される。

#### E. 結論

研究に必要な試料の収集が完了したため、次年度以降、胃粘膜 DNA メチル化レベルの解析、血液検体の測定をおこない、生活習慣関連要因との関連性を検討していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

本研究費に謝辞があるものなし

本研究費に密接に関係するもの

1. Takeshima, H, Yamashita, S, Shimazu, T, Niwa, T and Ushijima, T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. **Genome Res**, 19: 1974-1982, 2009.

##### 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)

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 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・ピロリ菌が感染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、(2)ヘリコバクター・ピロリ菌現感染陰性の場合でも、胃癌患者の非がん部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)多発胃癌患者の非がん部胃粘膜には単発胃癌患者の非がん部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、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）が異時性多発胃癌の発生予測に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】

早期胃癌に対して内視鏡的粘膜切開剥離術（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して追跡を開始する。平成 22 年度中に約 1000 例の登録を完了する予定である（和歌山県立医科大学第二内科では、平成 22 年 2 月末時点で 108 例の登録が完了している）。今後、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、及び新規に同定された胃癌リスクマーカーである *miR-124a-3*, *miR-34b/c* を用いる。

A. 研究目的

(1)早期胃癌患者における ESD 施行後の異時性多発胃癌発生予測に、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の相関を解析する。

なおこの研究は、国立がんセンター、和歌山県立医科大学、東京大学、県立静岡がんセンターの 4 施設で行い、約 1000 例を登録・追跡する予定である（平成 22 年度まで）。

同時に、DNA メチル化レベルと胃癌リスクがより相関する遺伝子を、胃癌患者非がん部胃粘膜と健常者胃粘膜を用いてゲノム網羅的な DNA メチル化解析をする。

高度の再現性・正確性を実現するため、すべての検体を一括して解析する予定である。

（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している。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

和歌山県立医科大学第二内科では、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 22 年 1 月末時点で 248 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、これら ESD 治療後患者および今後早期胃癌に対し ESD を予定している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、本研究に順次登録している。平成 22 年 2 月末時点で 108 例の登録が完了した。同時点での脱落例はない。今後も症例を順次蓄積していく予定である。

同意を得て、登録、検体採取と速やかに、かつ確実に行えるよう役割分担とシステム作りを行った。また特に、管理・マネージメントが非常に重要であると考え、ファイル管理ソフトを用いて、専任者にその任を当たらせることとした。

症例のメチル化レベルの解析に関して、平成 20 年度までにマイクロ RNA 遺伝子 *miR-124a-3* のメチル化レベルが胃癌症例の非がん部胃粘膜と健常者の胃粘膜を効率よく区別できることを見出した。また、平成 21 年度に報告された *miR-34b/c* の測定系も既に確立した。

#### D. 考察

現在は、症例登録のシステムを構築し、順調に登録が進んでいる。今後、さらに症例登録の増加が見込まれる。また、胃癌リスクマーカーの測定系は既に確立しており、検体がそろい次第、既知のリスクマーカー (*FLNc*, *HAND1*, *LOX*, 及び *THBD* のプロモーター領域 CpG アイランド) と共に解析する予定である。

#### E. 結論

現在、順調に登録が進んでいる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞はないが強い関連があるもの

1. Yanaoka, K, Oka, M, Ohata, H, Yoshimura, N, Deguchi, H, Mukoubayashi, C, Enomoto, S, Inoue, I, Iguchi, M, Maekita, T, Ueda, K, Utsunomiya, H, Tamai, H, Fujishiro, M, Iwane, M, Takeshita, T, Mohara, O and Ichinose, M. Eradication of *Helicobacter pylori* prevents cancer development in subjects with mild gastric atrophy identified by serum pepsinogen levels. **Int J Cancer**, 125: 2697–2703, 2009.
2. Yanaoka, K, Oka, M, Yoshimura, N, Deguchi, H, Mukoubayashi, C, Enomoto, S, Maekita, T, Inoue, I, Ueda, K, Utsunomiya, H, Iguchi, M, Tamai, H, Fujishiro, M, Nakamura, Y, Tsukamoto, T, Inada, K, Takeshita, T and Ichinose, M. Preventive effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on cancer development in extensive metaplastic gastritis, a *Helicobacter pylori*-negative precancerous lesion. **Int J Cancer**, 126: 1467–1473, 2009.

##### 2. 学会発表

1. 前北隆雄、一瀬雅夫 DNA メチル化異常を用いた新規胃癌リスクマーカーの開発 日本消化器関連学会週間 シンポジウム 6 消化器癌におけるエピジェネティクス 2009年10月 京都

#### 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

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 東京大学光学医療診療部 准教授 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、外来経過観察中の2000年以降のESD後患者と新規にESDを行う患者を基本的に全例登録するように心がけた。2010年3月26日の段階で130例の症例登録を得ている。2010年7月末で症例の登録を完了まで、引き続き積極的な症例登録を継続する予定である。

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）に研究分担施設として参加するに当たり、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こと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。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し、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い、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、症例集積は、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。2010年3月26日の段階で全登録症例数（一次登録）は130例で、その内訳は①59例、②16例、③48例、④7例であった。その後、外科切除追加症例、他臓器がん合併症例等の除外後、118例（①55例、②15例、③41例、④7例）の二次登録を行い経過観察中である。

D. 考察

当院においては、紹介患者が多く、当院での経過観察を継続している患者が少ない点が症例集積には不利な点であるが、ESD後の症例においては、研究同意の得られた75例を一次登録した。また、新規ESD症例に関しても、55例の一次登録が得られた。今後も引き続き、症例集積完了の2010年7月末まで、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い、症例集積を130例まで行った。今後も、精力的に症例登録を行っていく予定である。

F. 研究発表

1.論文発表

本研究費に謝辞があるもの  
なし

本研究費に密接に関係するもの

1. 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.
  2. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S and Omata, M. Is it possible to predict the procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? **J Gastroenterol Hepatol**, 24: 379-383, 2009.
  3. 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**, 41: 725-728, 2009.
  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. Miki, K, Fujishiro, M, Kodashima, S and Yahagi, N. Long-term results of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method among an asymptomatic middle-aged Japanese population. **Dig Endosc**, 21: 78-81, 2009.
  6. Miki, K and Fujishiro, M. Cautious comparison between East and West is necessary in terms of the serum pepsinogen test. **Dig Endosc**, 21: 134-135, 2009.
  7. Yamamichi, N, Inada, K, Furukawa, C, Sakurai, K, Tando, T, Ishizaka, A, Haraguchi, T, Mizutani, T, Fujishiro, M, Shimomura, R, Oka, M, Ichinose, M, Tsutsumi, Y, Omata, M and Iba, H. Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex cooperatively regulate villin expression in gastrointestinal cells. **Exp Cell Res**, 315: 1779-1789, 2009.
  8. Yamamichi, N, Shimomura, R, Inada, K, Sakurai, K, Haraguchi, T, Ozaki, Y, Fujita, S, Mizutani, T, Furukawa, C, Fujishiro, M, Ichinose, M, Shiogama, K, Tsutsumi, Y, Omata, M and Iba, H. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. **Clin Cancer Res**, 15: 4009-4016, 2009.
  9. Yanaoka, K, Oka, M, Ohata, H, Yoshimura, N, Deguchi, H, Mukoubayashi, C, Enomoto, S, Inoue, I, Iguchi, M, Maekita, T, Ueda, K, Utsunomiya, H, Tamai, H, Fujishiro, M, Iwane, M, Takeshita, T, Mohara, O and Ichinose, M. Eradication of Helicobacter pylori prevents cancer development in subjects with mild gastric atrophy identified by serum pepsinogen levels. **Int J Cancer**, 125: 2697-2703, 2009.
  10. Yanaoka, K, Oka, M, Yoshimura, N, Deguchi, H, Mukoubayashi, C, Enomoto, S, Maekita, T, Inoue, I, Ueda, K, Utsunomiya, H, Iguchi, M, Tamai, H, Fujishiro, M, Nakamura, Y, Tsukamoto, T, Inada, K, Takeshita, T and Ichinose, M. Preventive effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on cancer development in extensive metaplastic gastritis, a Helicobacter pylori-negative precancerous lesion. **Int J Cancer**, 126: 1467-1473, 2009.
  11. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S, Niimi, K, Hirano, K, Yamamichi, N and Koike, K. A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of postendoscopic submucosal dissection bleeding. **Gastrointest Endosc**, 71: 241-248, 2010.
  12. Enomoto, S, Yahagi, N, Fujishiro, M, Oka, M, Muraki, Y, Deguchi, H, Ueda, K, Inoue, I, Maekita, T, Magari, H, Mukoubayashi, C, Nakazawa, K, Iguchi, M, Yanaoka, K, Arii, K, Tamai, H, Omata, M and Ichinose, M. Assessment of Intraoperative bleeding during endoscopic submucosal dissection and endoscopic hemostasis using high-frequency hemostatic forceps. **J Wakayama Med Soc**, 60: 124-9, 2009.
- 2.学会発表
1. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S, Niimi, K, Yamamichi, N and Omata, M. Usefulness of magnifying endoscopy with narrow band imaging (NBI) for endoscopic submucosal dissection (ESD) of early gastric cancer. The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Gastrointestinal Endoscopy, Seoul, March, 2009.
  2. Goto, O, Fujishiro, M, Kodashima, S, Ono, S, Niimi, K, Hirano, K, Yamamichi, N and Koike, K. A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection (ESD) for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of post-ESD bleeding. GASTRO2009 UEGW/WCOG, London, November, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
該当無し



## 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
<u>Nakajima, T, Ushijima, T, et al.</u>	Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after <i>Helicobacter pylori</i> eradication.	J Gastroenterol	45	37 -44	2010
<u>Hosoya, K, Ushijima, T, et al.</u>	Adenomatous polyposis coli 1A is likely to be methylated as a passenger in human gastric carcinogenesis.	Cancer Lett	285	182 -189	2009
<u>Oka, D, Ushijima, T, et al.</u>	The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers.	Cancer	115	3412 -3426	2009
<u>Terada, K, Ushijima, T, et al.</u>	Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers.	Carcinogenesis	30	466 -471	2009
<u>Ando, T, Ichinose, M, Ushijima, T, et al.</u>	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
<u>Nakajima, T, Ushijima, T, et al.</u>	The presence of a methylation fingerprint of <i>Helicobacter pylori</i> infection in human gastric mucosae.	Int J Cancer	124	905 -910	2009
<u>Takeshima, H, Shimazu, T, Ushijima, T, et al.</u>	The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands.	Genome Res	19	1974 -1982	2009
<u>Yanaoka, K, Fujishiro, M, Ichinose, M, et al.</u>	Eradication of <i>Helicobacter pylori</i> prevents cancer development in subjects with mild gastric atrophy identified by serum pepsinogen levels.	Int J Cancer	125	2697 -2703	2009
<u>Yanaoka, K, Fujishiro, M, Ichinose, M, et al.</u>	Preventive effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on cancer development in extensive metaplastic gastritis, a <i>Helicobacter pylori</i> -negative precancerous lesion.	Int J Cancer	126	1467 -1473	2009
<u>Goto, O, Fujishiro, M, et al.</u>	A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of postendoscopic submucosal dissection bleeding.	Gastrointest Endosc	71	241 -248	2010
<u>Ono, S, Fujishiro, M, et al.</u>	En bloc resection of cardia cancer and lipoma with endoscopic submucosal dissection.	Dig Liver Dis	41	237	2009
<u>Goto, O, Fujishiro, M, et al.</u>	Is it possible to predict the procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer?	J Gastroenterol Hepatol	24	379 -383	2009
<u>Ono, S, Fujishiro, M, et al.</u>	Technical feasibility of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in patients taking anti-coagulants or anti-platelet agents.	Dig Liver Dis	41	725 -728	2009
<u>Goto, O, Fujishiro, M, et al.</u>	Outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer with special reference to validation for curability criteria.	Endoscopy	41	118 -122	2009

Miki, K, <u>Fujishiro, M</u> , et al.	Long-term results of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method among an asymptomatic middle-aged Japanese population.	Dig Endosc	21	78 -81	2009
Miki, K and <u>Fujishiro, M</u> .	Cautious comparison between East and West is necessary in terms of the serum pepsinogen test.	Dig Endosc	21	134 -135	2009
Yamamichi, N, <u>Fujishiro, M</u> , <u>Ichinose, M</u> , et al.	Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex cooperatively regulate villin expression in gastrointestinal cells.	Exp Cell Res	315	1779 -1789	2009
Yamamichi, N, <u>Fujishiro, M</u> , <u>Ichinose, M</u> , et al.	Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development.	Clin Cancer Res	15	4009 -4016	2009
Enomoto, S, <u>Fujishiro, M</u> , <u>Ichinose, M</u> , et al.	Assessment of Intraoperative bleeding during endoscopic submucosal dissection and endoscopic hemostasis using high-frequency hemostatic forceps.	J Wakayama Med Soc	60	124 -129	2009



200907013A (2/2)

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21年度 総括・分担研究報告書  
研究成果の刊行物・別刷

研究代表者 牛島 俊和

平成22年(2010)年 4月

2 / 2冊