

別添1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：生物資源・創薬モデル動物

がんの高度専門医療施設において研究用に提供される試料及び情報を統合した  
バイオバンク構築と、その実証的活用に基づくがんの分子解析に関する研究  
(H19-生物資源-一般-009)

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 金井 弥栄

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
がんの高度専門医療施設において研究用に提供される試料及び情報を統合したバイオバンク構築と、その実証的活用に基づくがんの分子解析に関する研究-----3	
金井弥栄	
II. 分担研究報告	
1. がんの高度専門医療施設において研究用に提供される試料及び情報を統合したバイオバンク構築と、その実証的活用に基づくがんの分子解析に関する研究-----9	
金井弥栄	
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-----19	

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業:生物資源・創薬モデル動物)

統括研究報告書

がんの高度専門医療施設において研究用に提供される試料及び情報を統合したバイオバンク構築と、その実証的活用に基づくがんの分子解析に関する研究  
(H19-生物資源-一般-009)

主任研究者 金井 弥栄(国立がんセンター研究所病理部長)

研究要旨

本研究は、質の高い診療情報・病理所見が付随した豊富な臨床試料よりなるバイオバンクを実証的に構築し、がん研究の推進に資することを目的とする。具体的には、がん診療連携拠点病院等全国約500施設に既に無償配布している院内がん登録アプリケーションHos-CanR 2.5に機能を付加する形で、カタログシステムHos-CanR 2.5バイオバンク版の開発・改良を進めた。要請のあったがん診療連携拠点病院へHos-CanR 2.5バイオバンク版を無償供与し、各施設におけるバイオバンクの運用開始を支援した。国立がんセンター内のバイオバンクには、本年度、946症例・4265バイアルの病理組織試料を新規に受け入れる一方で、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た研究(外部研究機関との共同研究を含む)のために1152症例・2063バイアルを払い出し、10564症例分・41945バイアルを現有して適切に保管している。保管試料が最新のオーム解析に利用しうる質を保持していることを示すため、バンク試料を用いた分子解析を実際に行った。研究代表者は生物資源研究合同班会議に出席し、厚生科学行政上の要請の把握に努めた。本研究終了後もバイオバンクが恒久的研究基盤となるよう、「国立がんセンターバイオバンク運用ポリシー」の策定に向けて、研究協力者等と協議をおこなっている。本バイオバンクはノイズとバイアスが制御された十分な検出力を持つ研究資源となり、診断・予防・治療の革新を目指したがん研究に寄与すると期待される。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関  
における職名

金井弥栄・国立がんセンター研究所(部長)

古田耕・国立がんセンター中央病院(医長)

西本寛・国立がんセンターがん対策情報センター  
(室長)

高上洋一・国立がんセンター中央病院(部長)

吉田輝彦・国立がんセンター研究所(部長)

【以下研究協力者】

## A. 研究目的

国立がんセンターで生み出される質の高い診療情報・病情報付随した豊富な臨床試料を、研究資源バンクとして基盤整備する。バイオバンク試料を用いてゲノム解析等を行い、バイオバンクの活用ががんの予防・診断・治療の標的候補同定に有益であることを実証する。倫理面にも充分留意したバイオバンク構築のノウハウを、全国のがん診療連携拠点病院等に提供し、我が国におけるがんバンクの標準化・ネットワーク化に資することを旨とする。

## B. 研究方法

病理組織試料ならびに血清試料の管理情報と院内がん登録情報を匿名化の上統合し、研究目的での使用に提供者の同意が得られていることを確認できる、カタログシステムの開発を進める。

国立がんセンターに年来蓄積され、平成19年度のバイオバンク事務室開設と共にバイオバンクに移管された病理組織試料・血清試料に加え、新規の病理組織試料・血清試料を受け入れ、カタログシステムに登録する。バンク保管試料を、倫理委員会の承認を得て研究を行う国立がんセンターの研究者に払い出し、データベースを更新する。現有試料は、核酸・蛋白等の変性を防ぎ直ちに研究の用に供する質を保持すべく適切な環境下に保管する。

保管試料が最新のゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析等に利用可能なことを示すため、研究代表者は倫理委員会の承認を得てバンク試料の一部を用いて分子解析を行う。学術的な成果を公表し、バイオバンク活用ががんの診断・予防・治療の革新を目指した研究に資することを実証する。

### (倫理面への配慮)

バンク保管試料は、平成19年8月16日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得

て行われる研究にのみ払い出した。実証的分子解析は、「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得(課題番号16-33「ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化の変化に関する研究」研究代表者:金井弥栄)、倫理面に充分配慮して研究を進めた。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。すなわち、個人識別番号と匿名化番号の対応表は、研究所内におかれた匿名管理者によって終始厳重に管理され、診療情報と同時に閲覧されることはなかった。実験室においては、終始患者個人を特定することなく研究を進めた。

## C. 研究結果

研究協力者等とともに、バイオバンクカタログシステムHos-CanR 2.5バイオバンク版の開発を進めた。本システムは、がん診療連携拠点病院等全国約500施設に既に無償配布している院内がん登録アプリケーションHos-CanR 2.5に、機能を付加する形で開発した。試験ユーザーである国立がんセンターの研究者に対し、Hos-CanR 2.5バイオバンク版の機能性について評価を求め、改良を続けている。本年度は特に、Hos-CanR 2.5バイオバンク版のうちの管理アプリケーション部分の充実に努めた。要請のあったがん診療連携拠点病院へ、Hos-CanR 2.5バイオバンク版を無償供与し、具体的な試料管理方法等についても助言した。これを基に、一部のがん診療連携拠点病院においては、施設内バイオバンクが実稼働している。研究代表者は生物資源研究合同班会議に出席し、厚生科学行政上の要請の把握に努めた。

研究協力者等とともに、平成19年度に開設した、セキュリティ対策と液体窒素タンク・冷凍冷蔵庫等の設備を備えたバイオバンク事務室の運営にあたった。平成21年度に、病理組織試料946症例・4265バイアル分を新規に受け入れる一方で、国立がんセンターの研究者が倫理委員会の承認を得て行う研究の

ために病理組織試料1152症例・2063バイアル分を払い出し、データベースを更新した。血清試料の受け入れには、研究協力者古田耕があたった。平成22年3月31日現在でバイオバンクが現有する病理組織試料は10564症例分・41945バイアルで、核酸・蛋白等の変性を防ぎ直ちに研究の用に供せる質を保持すべく適切な環境下に保管している。

研究代表者等は、倫理委員会の承認を得ておこなう諸臓器がんの多段階発生過程におけるDNAメチル化異常の網羅的解析に、バンク試料の一部を供した。バイオバンク保管病理組織試料から抽出した核酸検体が、BACアレイを基盤とするメチル化CpGアイランド増幅 (BAMCA)法に供するに十分な質を保持していることを確認した。網羅的解析結果を検証するために、バンク試料由来のゲノムDNAは、DNAメチル化率を精密に定量することができるパイロシーケンス法にも供した。

例えば、BAMCA法で、膵がん組織を、非膵がん症例より得られた正常膵組織ならびに膵がん症例より得られた非がん膵組織から区別するのに有用な、12BACクローンを抽出した。12BACクローンを組み合わせた膵がんの存在診断指標により、検証コホート中の膵がん検体を、感度・特異度とも100%でがんであると診断できた。次に、学習コホートの早期再発群を長期無再発群から区別するのに有用な、11BACクローンを抽出した。11BACクローンを組み合わせた予後予測指標を設定した。検証コホート症例における11BACクローンのDNAメチル化状態は、無再発生存率・全生存率と有意に相関した。多変量解析で、我々の指標は、切除断端の状態やリンパ節転移の有無とは独立した予後予測因子であることが分かった。バイオバンク試料において解析したDNAメチル化プロファイルに基づいて、膵がんの新規の存在診断法・予後予測法を実用化させようと期待された。

さらに、BAMCA法によって昨年度までに同定した、

肝発がんリスクを反映するDNAメチル化の変化を示す25BAC領域上の、203 *Xma* I/*Sma* I 認識部位におけるDNAメチル化状態を、非肝細胞がん症例より得られた正常肝組織ならびに肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において、パイロシーケンス法で定量的に再評価した。学習コホートの正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織の間で、有意にDNAメチル化率が異なる30領域を抽出した。抽出した30領域において、学習コホートの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を正常肝組織から区別するためのカットオフ値を設定することで、学習コホートの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を感度・特異度とも100%で発がん高リスク状態にあると診断できた。同指標を用いると、検証コホートにおいても、感度・特異度とも100%で肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を発がん高リスク状態にあると診断できた。バイオバンク試料にパイロシーケンス法を用いることで、BAMCA法に基づく従前の肝発がんリスク評価指標に比し、発がんリスク指標の感度・特異度を向上させることができた。バイオバンク試料を用いたそのほかの分子病理学研究成果は、G. 研究発表の項に記した。

#### D. 考察

ゲノム規模のDNAメチル化異常は、膵・肝における多段階発がん過程に寄与すると考えられた。バンク試料を用いた実証的分子解析の結果から、バンク試料から抽出した核酸検体が、最新のオーム解析に耐える質を保持していることが分かった。バイオバンク試料を用いた解析が、発がんリスク診断・がんの個性診断ツールの開発の基盤となる可能性が示された。平成21年度においては、新規受け入れ病理組織試料946症例・4265バイアル、払い出し病理組織試料1152症例・2063バイアルとなっており、平成19ならびに20年度に比して、受け入れ・払い出し数ともに増加した。管理アプリケーションの充実等により悉皆的収集が徹底し、バイオバンク室の整備で研究に適した試料の検索等が容易になり、体細胞研究が

促進されたためと考えている。平成22年以降のさらなるバイオバンク体制整備に備え、バイオバンク試料に関するコンタクトパーソンや研究組織の原則・コンタクトパーソンが稀少例であるから払い出しが不適切と判断した場合の調停委員会のありかた等を定めた、「バイオバンク運用ポリシー」の策定に向けて、バイオバンク関係者・ユーザーと協議をおこなっている。

## E. 結論

本研究で開発しがん診療連携拠点病院に配布したカタログシステムHos-CanR 2.5を仲介として、わが国における研究資源のネットワーク化が進むことが期待される。今後もバイオバンク試料を用いた疾患オミックス研究が広く発展し、がんの診断・予防・治療の革新に資する研究成果が継続して挙げられることを期待する。バイオバンク試料を用いたがん研究の重要性についての認識がさらに浸透し、悉皆的試料確保が継続するとともに、構築してきたバイオバンクが本研究終了後も散逸することなく、恒久的研究基盤として長く継承されることが望まれる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, 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.
2. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 125: 2854-2862, 2009.
3. Sekine S, Ogawa R, Ito R, Hiraoka N, McManus MT, Kanai Y, Hebrok M. Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 5: 2304-2315, 2009.
4. Sekine S, Nakanishi Y, Ogawa R, Kouda S, Kanai Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. *Virchows Arch* 454: 513-517, 2009.
5. Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, Kanai Y, Hebrok M. Dicer is required for proper liver zonation. *J Pathol* 219: 365-372, 2009.
6. Ojima H, Kanai Y, Iwasaki M, Hiraoka N, Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Sakamoto M, Hirohashi S. Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma. *Cancer Sci* 100: 62-70, 2009.
7. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 132: 202-210, 2009.
8. Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hirohashi S. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology*, 77: 53-62, 2009.
9. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Nakagawa I, Matsuzaki J, Kanai Y, Hibi T. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene* 28: 2738-2744, 2009.
10. Nakagawa T, Kanai Y, Komiyama M, Fujimoto H, Kakizoe T. Characteristics of prostate cancers found in specimens removed by radical cystoprostatectomy for bladder cancer and their relationship with serum prostate-specific antigen level. *Cancer Sci*



- 100:1880-1884, 2009.
11. Negishi A, Masuda M, Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Nakanishi Y, Kanai Y, Omura K, Hirohashi S, Yamada T. Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 100: 1605-1611, 2009.
  12. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci* 101: 36-45, 2010.
  13. Kanai Y, Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. ed. Grisham JW, Thorgeirsson S, Springer, 2010, in press.
  14. Arai E, Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. *Epigenomics*, in press, 2010.
  15. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. *Cancer Sci* 101: 231-240, 2010.
  16. Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci* 101: 882-888, 2010.
  17. Okamura J, Sekine S, Nara S, Ojima H, Shimada K, Kanai Y, Hiraoka N. Intraductal carcinosarcoma with a heterologous mesenchymal component originating in intraductal papillary-mucinous carcinoma (IPMC) of the pancreas with both carcinoma and osteosarcoma cells arising from IPMC cells. *J Clin Pathol* 63:266-269, 2010.
  18. Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto K, Hirao Y. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci* 101: 250-258, 2010.
  19. Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 16:2518-2528, 2010.
2. 学会発表
    1. Yae Kanai. Epigenetic analyses in HCC. Basic workshop: Current Frontier in Genomic and Epigenetic Research on Liver Cancer. International Liver Cancer Association Third Annual Conference, 2009, Milan.
    2. Eri Arai, Saori Ushijima, Hiroyuki Fujimoto, Fimie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2009, Denver.
    3. 金井弥栄. ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常のゲノム網羅的解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、2009.
    4. 金井弥栄. 多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常-ゲノム網羅的解析を中心に. 第14回東京肝臓シンポジウム「発癌とその制御」、2009.
    5. 金井弥栄. DNAメチル化プロファイルを指標とする発がんリスク評価とがんの病態診断. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患の基盤としてのエピジェネティクス」、2009.
    6. 金井弥栄. がんの臨床病理学的特性の基盤となるDNAメチル化異常. シンポジウム: エピジェネティクス異常の基礎から臨床応用まで. 第68回日本癌学会学術総会、2009.

該当なし

7. 新井恵吏、牛島抄織、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄、金井弥栄. 種々の組織亜型の腎腫瘍におけるDNAメチル化プロファイル. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、2009.
8. 新井恵吏、牛島抄織、後藤政広、尾島英知、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. 肝細胞がんとその前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症におけるゲノム網羅的DNAメチル化プロファイル. 第68回日本癌学会学術総会、2009.
9. 西山直隆、新井恵吏、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、塚本泰司、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. 尿路上皮がんならびに前がん段階にある尿路上皮におけるDNAメチル化プロファイル-発がんリスク評価と予後予測. 第68回日本癌学会学術総会、2009.
10. 千原良友、Gangning Liang、Jones Peter A、新井恵吏、藤元博行、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦、金井弥栄. 定量的DNAメチル化解析に基づく尿路上皮がん診断示標. 第68回日本癌学会学術総会、2009.
11. Yae Kanai. DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. 8<sup>th</sup> Joint Conference of the American Association for Cancer research and the Japanese Cancer Association “Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics”, 2010, Hawaii.
12. Eri Arai, Saori Ushijima-Wakai, Hiroyuki Fujimoto, Fumie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and nontumorous renal tissues. American Association for Cancer Research Special Conference on Cancer Epigenetics, 2010, Puerto Rico.

H. 知的財産権の出願・登録状況



厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業：生物資源・創薬モデル動物)

分担研究報告書

がんの高度専門医療施設において研究用に提供される試料及び情報を統合したバイオバンク構築と、その実証的活用に基づくがんの分子解析に関する研究  
(H19-生物資源-一般-009)

分担研究者 金井 弥栄(国立がんセンター研究所病理部長)

研究要旨

本研究は、質の高い診療情報・病理情報が付随した豊富な臨床試料よりなるバイオバンクを実証的に構築し、がん研究の推進に資することを目的とする。具体的には、がん診療連携拠点病院等全国約500施設に既に無償配布している院内がん登録アプリケーションHos-CanR 2.5に機能を付加する形で、カタログシステムHos-CanR 2.5バイオバンク版の開発・改良を進めた。国立がんセンター内のバイオバンクに、本年度、946症例・4265バイアルの病理組織試料を新規に受け入れる一方で、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た研究(外部研究機関との共同研究を含む)のために1152症例・2063バイアルを払い出し、10564症例分・41945バイアルを現有して適切に保管している。保管試料が最新のオーム解析に利用しうる質を保持していることを示すため、バンク試料を用いた分子解析を実際に行った。すなわち、多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常のゲノム網羅的解析等を行い、バイオバンク試料が難治がんである膵がんの予後予測・慢性肝障害患者における発がんリスク評価等のバイオマーカー開発に適していることを確認した。

A. 研究目的

国立がんセンターで生み出される質の高い診療情報・病理情報が付随した豊富な臨床試料を、研究資源バンクとして基盤整備する。バイオバンク試料を用いてゲノム解析等を行い、バイオバンクの活用ががんの予防・診断・治療の標的候補同定に有益であることを実証する。倫理面にも充分留意したバイオバンク構築のノウハウを、全国のがん診療連携拠点病院等に提供し、我が国におけるがんバンクの標準化・ネットワーク化に資することを目指す。

B. 研究方法

病理組織試料ならびに血清試料の管理情報と院内がん登録情報を匿名化の上統合し、研究目的での使用に提供者の同意が得られていることを確認できる、カタログシステムの開発を進める。

国立がんセンターに年来蓄積され、平成19年度のバイオバンク事務室開設と共にバイオバンクに移管された病理組織試料・血清試料に加え、新規の病理組織試料・血清試料を受け入れ、カタログシステムに登録する。バンク保管試料を、倫理委員会の承認

を得て研究を行う国立がんセンターの研究者に払い出し、データベースを更新する。現有試料は、核酸・蛋白等の変性を防ぎ直ちに研究の用に供せる質を保持すべく適切な環境下に保管する。

保管試料が最新のゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析等に利用可能なことを示すため、倫理委員会の承認を得てバイオバンク試料の一部を用いて分子解析を行う。学術的な成果を公表し、バイオバンク活用ががんの診断・予防・治療の革新を目指した研究に資することを実証する。

#### (倫理面への配慮)

バイオバンク保管試料は、平成19年8月16日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得て行われる研究にのみ払い出した。実証的分子解析は、「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得(課題番号16-33「ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化の変化に関する研究」研究代表者:金井弥栄)、倫理面に充分配慮して研究を進めた。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。すなわち、個人識別番号と匿名化番号の対応表は、研究所内におかれた匿名管理者によって終始厳重に管理され、診療情報と同時に閲覧されることはなかった。実験室においては、終始患者個人を特定することなく研究を進めた。

#### C. 研究結果

研究協力者等とともに、バイオバンクカタログシステムHos-CanR 2.5バイオバンク版の開発を進めた。本システムは、がん診療連携拠点病院等全国約500施設に既に無償配布している院内がん登録アプリケーションHos-CanR 2.5に、機能を付加する形で開発した。試験ユーザーである国立がんセンターの研究者に対し、Hos-CanR 2.5バイオバンク版の機能性について評

価を求め、改良を続けている。本年度は特に、Hos-CanR 2.5バイオバンク版のうちの管理アプリケーション部分の充実に努めた。要請のあったがん診療連携拠点病院へ、Hos-CanR 2.5バイオバンク版を無償供与し、具体的な試料管理方法等についても助言した。これを基に、一部のがん診療連携拠点病院においては、施設内バイオバンクが実稼働している。研究代表者は生物資源研究合同班会議に出席し、厚生科学行政上の要請の把握に努めた。

研究協力者等とともに、平成19年度に開設した、セキュリティー対策と液体窒素タンク・冷凍冷蔵庫等の設備を備えたバイオバンク事務室の運営にあたった。平成21年度に、病理組織試料946症例・4265バイアル分を新規に受け入れる一方で、国立がんセンターの研究者が倫理委員会の承認を得て行う研究のために病理組織試料1152症例・2063バイアル分を払い出し、データベースを更新した。血清試料の受け入れには、研究協力者古田耕があたった。平成22年3月31日現在でバイオバンクが現有する病理組織試料は10564症例分・41945バイアルで、核酸・蛋白等の変性を防ぎ直ちに研究の用に供せる質を保持すべく適切な環境下に保管している。

倫理委員会の承認を得ておこなう諸臓器がんの多段階発生過程におけるDNAメチル化異常の網羅的解析に、バンク試料の一部を供した。バイオバンク保管病理組織試料から抽出した核酸検体が、BACアレイを基盤とするメチル化CpGアイランド増幅(BAMCA)法に供するに十分な質を保持していることを確認した。網羅的解析結果を検証するために、バンク試料由来のゲノムDNAは、DNAメチル化率を精密に定量することができるパイロシークエンス法にも供した。

例えば、BAMCA法で、膵がん組織を、非膵がん症例より得られた正常膵組織ならびに膵がん症例より得られた非膵がん組織から区別するのに有用な、12BACクローンを抽出した。12BACクローンを組み

合わせた膵がんの存在診断指標により、検証コホート中の膵がん検体を、感度・特異度とも100%でがんであると診断できた。次に、学習コホートの早期再発群を長期無再発群から区別するのに有用な、11BACクローンを抽出した。11BACクローンを組み合わせた予後予測指標を設定した。検証コホート症例における11BACクローンのDNAメチル化状態は、無再発生存率・全生存率と有意に相関した。多変量解析で、我々の指標は、切除断端の状態やリンパ節転移の有無とは独立した予後予測因子であることが分かった。バイオバンク試料において解析したDNAメチル化プロファイルに基づいて、膵がんの新規の存在診断法・予後予測法を実用化させようと期待された。

さらに、BAMCA法によって昨年度までに同定した、肝発がんリスクを反映するDNAメチル化の変化を示す25BAC領域上の、203 *Xma* I/*Sma* I 認識部位におけるDNAメチル化状態を、非肝細胞がん症例より得られた正常肝組織ならびに肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において、パイロシーケンス法で定量的に再評価した。学習コホートの正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織の間で、有意にDNAメチル化率が異なる30領域を抽出した。抽出した30領域において、学習コホートの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を正常肝組織から区別するためのカットオフ値を設定することで、学習コホートの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を、感度・特異度とも100%で発がん高リスク状態にあると診断できた。同指標を用いると、検証コホートにおいても、感度・特異度とも100%で肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を発がん高リスク状態にあると診断できた。バイオバンク試料にパイロシーケンス法を用いることで、BAMCA法に基づく従前の肝発がんリスク評価指標に比し、発がんリスク指標の感度・特異度を向上させることができた。バイオバンク試料を用いたそのほかの分子病理

学研究の成果は、G. 研究発表の項に記した。

#### D. 考察

ゲノム規模のDNAメチル化異常は、膵・肝における多段階発がん過程に寄与すると考えられた。バンク試料を用いた実証的分子解析の結果から、バンク試料から抽出した核酸検体が、最新のオーム解析に耐える質を保持していることが分かった。バイオバンク試料を用いた解析が、発がんリスク診断・がんの個性診断ツールの開発の基盤となる可能性が示された。平成21年度においては、新規受け入れ病理組織試料946症例・4265バイアル分、払い出し病理組織試料1152症例・2063バイアル分となっており、平成19ないし20年度に比して、受け入れ・払い出し数ともに増加した。管理アプリケーションの充実等により悉皆的収集が徹底し、バイオバンク室の整備で研究に適した試料の検索等が容易になり、体細胞研究が促進されたためと考えている。平成22年以降のさらなるバイオバンク体制整備に備え、バイオバンク試料に関するコンタクトパーソンや研究組織の原則・コンタクトパーソンが稀少例であるから払い出しが不適切と判断した場合の調停委員会のありかた等を定めた「バイオバンク運用ポリシー」の策定に向けて、バイオバンク関係者・ユーザーと協議をおこなっている。

#### E. 結論

本研究で開発しがん診療連携拠点病院に配布したカタログシステムHos-CanR 2.5を仲介にして、わが国における研究資源のネットワーク化が進むことが期待される。今後もバイオバンク試料を用いた疾患オーム研究が広く発展し、がんの診断・予防・治療の革新に資する研究成果が継続して挙げられることを期待する。バイオバンク試料を用いたがん研究の重要性についての認識がさらに浸透し、悉皆的試料確保が継続するとともに、構築してきたバイオバンク

が本研究終了後も散逸することなく、恒久的研究基盤として長く継承されることが望まれる。

F. 健康危険情報  
総括研究報告書に記入

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, 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.
2. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 125: 2854-2862, 2009.
3. Sekine S, Ogawa R, Ito R, Hiraoka N, McManus MT, Kanai Y, Hebrok M. Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 5: 2304-2315, 2009.
4. Sekine S, Nakanishi Y, Ogawa R, Kouda S, Kanai Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. *Virchows Arch* 454: 513-517, 2009.
5. Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, Kanai Y, Hebrok M. Dicer is required for proper liver zonation. *J Pathol* 219: 365-372, 2009.
6. Ojima H, Kanai Y, Iwasaki M, Hiraoka N, Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Sakamoto M, Hirohashi S. Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma. *Cancer Sci* 100: 62-70, 2009.
7. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 132: 202-210, 2009.
8. Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hirohashi S. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 77: 53-62, 2009.
9. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Nakagawa I, Matsuzaki J, Kanai Y, Hibi T. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene* 28: 2738-2744, 2009.
10. Nakagawa T, Kanai Y, Komiyama M, Fujimoto H, Kakizoe T. Characteristics of prostate cancers found in specimens removed by radical cystoprostatectomy for bladder cancer and their relationship with serum prostate-specific antigen level. *Cancer Sci* 100:1880-1884, 2009.
11. Negishi A, Masuda M, Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Nakanishi Y, Kanai Y, Omura K, Hirohashi S, Yamada T. Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 100: 1605-1611, 2009.
12. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci* 101: 36-45, 2010.
13. Kanai Y, Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. ed. Grisham JW, Thorgeirsson S, Springer, 2010, in press.
14. Arai E, Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. *Epigenomics*, in press, 2010.
15. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and

- urothelia at the precancerous stage. *Cancer Sci* 101: 231-240, 2010.
16. Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci* 101: 882-888, 2010.
  17. Okamura J, Sekine S, Nara S, Ojima H, Shimada K, Kanai Y, Hiraoka N. Intraductal carcinosarcoma with a heterologous mesenchymal component originating in intraductal papillary-mucinous carcinoma (IPMC) of the pancreas with both carcinoma and osteosarcoma cells arising from IPMC cells. *J Clin Pathol* 63:266-269, 2010.
  18. Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto K, Hirao Y. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci* 101: 250-258, 2010.
  19. Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 16:2518-2528, 2010.
2. 学会発表
1. Yae Kanai. Epigenetic analyses in HCC. Basic workshop: Current Frontier in Genomic and Epigenetic Research on Liver Cancer. International Liver Cancer Association Third Annual Conference, 2009, Milan.
  2. Eri Arai, Saori Ushijima, Hiroyuki Fujimoto, Fimie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2009, Denver.
  3. 金井弥栄. ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常のゲノム網羅的解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、2009.
  4. 金井弥栄. 多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常-ゲノム網羅的解析を中心に. 第14回東京肝臓シンポジウム「発癌とその制御」、2009.
  5. 金井弥栄. DNAメチル化プロファイルを指標とする発がんリスク評価とがんの病態診断. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患の基盤としてのエピジェネティクス」、2009.
  6. 金井弥栄. がんの臨床病理学的特性の基盤となるDNAメチル化異常. シンポジウム: エピジェネティック異常の基礎から臨床応用まで. 第68回日本癌学会学術総会、2009.
  7. 新井恵吏、牛島抄織、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄、金井弥栄. 種々の組織型型の腎腫瘍におけるDNAメチル化プロファイル. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、2009.
  8. 新井恵吏、牛島抄織、後藤政広、尾島英知、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄. 肝細胞がんとその前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症におけるゲノム網羅的DNAメチル化プロファイル. 第68回日本癌学会学術総会、2009.
  9. 西山直隆、新井恵吏、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、塚本泰司、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄. 尿路上皮がんならびに前がん段階にある尿路上皮におけるDNAメチル化プロファイル-発がんリスク評価と予後予測. 第68回日本癌学会学術総会、2009.
  10. 千原良友、Gangning Liang, Jones Peter A, 新井恵吏、藤元博行、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦、金井弥栄. 定量的DNAメチル化解析に基づく尿路上皮がん診断示標. 第68回日本癌学会学術総会、2009.



11. Yae Kanai. DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. 8<sup>th</sup> Joint Conference of the American Association for Cancer research and the Japanese Cancer Association “Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics”, 2010, Hawaii.
12. Eri Arai, Saori Ushijima-Wakai, Hiroyuki Fujimoto, Fumie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and nontumorous renal tissues. American Association for Cancer Research Special Conference on Cancer Epigenetics, 2010, Puerto Rico.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



## 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
<u>Kanai Y</u> , Arai E.	DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma.	Grisham JW, Thorgeirsson S	Molecular Genetics of Liver Neoplasia	Springer	New York	2010	in press

## 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
Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, <u>Kanai Y</u>	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
Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, <u>Kanai Y</u>	Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer	125	2854-2862	2009
Sekine S, Ogawa R, Ito R, Hiraoka N, McManus MT, <u>Kanai Y</u> , Hebrok M	Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis.	Gastroenterology	5	2304-2315	2009
Sekine S, Nakanishi Y, Ogawa R, Kouda S, <u>Kanai Y</u>	Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites.	Virchows Arch	454	513-517	2009
Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, <u>Kanai Y</u> , Hebrok M	Dicer is required for proper liver zonation.	J Pathol	219	365-372	2009

Ojima H, <u>Kanai Y</u> , Iwasaki M, Hiraoka N, Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Sakamoto M, Hirohashi S	Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma.	Cancer Sci	100	62-70	2009
Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, <u>Kanai Y</u> , Hirohashi S	Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma.	Am J Clin Pathol	132	202-210	2009
Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, <u>Kanai Y</u> , Watanabe M, Hirohashi S	Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma.	Oncology	77	53-62	2009
Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Nakagawa I, Matsuzaki J, <u>Kanai Y</u> , Hibi T	Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells.	Oncogene	28	2738-2744	2009
Nakagawa T, <u>Kanai Y</u> , Komiyama M, Fujimoto H, Kakizoe T	Characteristics of prostate cancers found in specimens removed by radical cystoprostatectomy for bladder cancer and their relationship with serum prostate-specific antigen level.	Cancer Sci	100	1880-1884	2009
Negishi A, Masuda M, Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Nakanishi Y, <u>Kanai Y</u> , Omura K, Hirohashi S, Yamada T	Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma.	Cancer Sci	100	1605-1611	2009

<u>Kanai Y</u>	Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers.	Cancer Sci	101	36-45	2010
Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, <u>Kanai Y</u>	Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage.	Cancer Sci	101	231-240	2010
Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, <u>Kanai Y</u> , Shibata T	Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment.	Cancer Sci	101	882-888	2010
Okamura J, Sekine S, Nara S, Ojima H, Shimada K, <u>Kanai Y</u> , Hiraoka N	Intraductal carcinosarcoma with a heterologous mesenchymal component originating in intraductal papillary-mucinous carcinoma (IPMC) of the pancreas with both carcinoma and osteosarcoma cells arising from IPMC cells.	J Clin Pathol	63	266-269	2010

Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, <u>Kanai Y</u> , Fujimoto K, Hirao Y	Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer.	Cancer Sci	101	250-258	2010
Satow R, Shitashige M, <u>Kanai Y</u> , Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T	Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma.	Clin Cancer Res	16	2518-2528	2010
Arai E, <u>Kanai Y</u>	DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status.	Epigenomics		in press	2010



## Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome

Eri Arai, Saori Ushijima, Hiroyuki Fujimoto<sup>1</sup>, Fumie Hosoda<sup>2</sup>, Tatsuhiro Shibata<sup>2</sup>, Tadashi Kondo<sup>3</sup>, Sana Yokoi<sup>4</sup>, Issei Imoto<sup>4</sup>, Johji Inazawa<sup>4</sup>, Setsuo Hirohashi and Yae Kanai\*

Pathology Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan, <sup>1</sup>Urology Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan, <sup>2</sup>Cancer Genomics Project and <sup>3</sup>Proteome Bioinformatics Project, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan and <sup>4</sup>Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute and School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8510, Japan

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 3 3542 2511; Fax: +81 3 3248 2463; Email: ykanai@ncc.go.jp

**To clarify genome-wide DNA methylation profiles during multistage renal carcinogenesis, bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification (BAMCA) was performed. Non-cancerous renal cortex tissue obtained from patients with clear cell renal cell carcinomas (RCCs) (N) was at the precancerous stage where DNA hypomethylation and DNA hypermethylation on multiple bacterial artificial chromosome (BAC) clones were observed. By unsupervised hierarchical clustering analysis based on BAMCA data for their N, 51 patients with clear cell RCCs were clustered into two subclasses, Clusters A<sub>N</sub> (n = 46) and B<sub>N</sub> (n = 5). Clinicopathologically aggressive clear cell RCCs were accumulated in Cluster B<sub>N</sub>, and the overall survival rate of patients in Cluster B<sub>N</sub> was significantly lower than that of patients in Cluster A<sub>N</sub>. By unsupervised hierarchical clustering analysis based on BAMCA data for their RCCs, 51 patients were clustered into two subclasses, Clusters A<sub>T</sub> (n = 43) and B<sub>T</sub> (n = 8). Clinicopathologically aggressive clear cell RCCs were accumulated in Cluster B<sub>T</sub>, and the overall survival rate of patients in Cluster B<sub>T</sub> was significantly lower than that of patients in Cluster A<sub>T</sub>. Multivariate analysis revealed that belonging to Cluster B<sub>T</sub> was an independent predictor of recurrence. Cluster B<sub>N</sub> was completely included in Cluster B<sub>T</sub>, and the majority of the BAC clones that significantly discriminated Cluster B<sub>N</sub> from Cluster A<sub>N</sub> also discriminated Cluster B<sub>T</sub> from Cluster A<sub>T</sub>. In individual patients, DNA methylation status in N was basically inherited by the corresponding clear cell RCC. DNA methylation alterations in the precancerous stage may generate more malignant clear cell RCCs and determine patient outcome.**

### Introduction

It is known that DNA hypomethylation results in chromosomal instability as a result of changes in chromatin structure and that DNA hypermethylation of CpG islands silences tumor-related genes in cooperation with histone modification in human cancers (1–5). Accumulating evidence suggests that alterations of DNA methylation are involved even in the early and the precancerous stages (6,7). On the

**Abbreviations:** BAC, bacterial artificial chromosome; BAMCA, bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification; RCC, renal cell carcinoma; TNM, tumor–node–metastasis.

other hand, in patients with cancers, aberrant DNA methylation is significantly associated with poorer tumor differentiation, tumor aggressiveness and poor prognosis (6,7). Therefore, alterations of DNA methylation may play a significant role in multistage carcinogenesis and can become an indicator for carcinogenetic risk estimation and a biological predictor of poor prognosis in patients with cancers. Recently developed array-based technology for accessing genome-wide DNA methylation status (8–10) is now mainly used to identify tumor-related genes silenced by DNA methylation in human cancers. Subclassification of cancers based on DNA methylation status, which may reflect the distinct epigenetic pathways of carcinogenesis, and DNA methylation profiles, which could become the optimum indicator for carcinogenetic risk estimation and prediction of patient outcome, should be further explored in each organ using array-based approaches.

With respect to renal carcinogenesis, we have reported that accumulation of DNA methylation on C-type CpG islands occurs in a cancer-specific but not age-dependent manner (11), even in non-cancerous renal tissue samples obtained from patients with clear cell renal cell carcinomas (RCCs) (6,7,12). Although precancerous conditions in the kidney have been rarely described, from the viewpoint of altered DNA methylation, non-cancerous renal tissues obtained from patients with clear cell RCCs are considered to already be at the precancerous stage in spite of showing no remarkable histological changes and lacking association with chronic inflammation and persistent infection with viruses or other pathogenic microorganisms. Surprisingly, accumulation of DNA methylation on C-type CpG islands in such non-cancerous renal tissues has been shown to be significantly correlated with higher histological grades of the corresponding clear cell RCCs developing in individual patients (6,7,12). However, since in the previous study we examined DNA methylation status on only a restricted number of CpG islands (12), we were unable to conclude that genome-wide DNA methylation alterations in precancerous conditions generate more malignant RCCs. In the previous study, accumulation of DNA methylation on C-type CpG islands in clear cell RCCs themselves was significantly correlated with tumor aggressiveness and poorer patient outcome (12). However, we were unable to conclude that the examined C-type CpG islands are the optimum prognostic indicator for patients with clear cell RCCs.

In this study, in order to clarify genome-wide DNA methylation profiles during multistage renal carcinogenesis, we performed bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification (BAMCA) (13–15) using a microarray of 4361 bacterial artificial chromosome (BAC) clones (16) in normal renal cortex tissue samples, non-cancerous renal cortex tissue samples obtained from patients with clear cell RCC and the corresponding clear cell RCCs.

### Materials and methods

#### Patients and tissue samples

Paired specimens of cancerous tissue (T1–T51) and corresponding non-cancerous renal cortex tissue showing no remarkable histological changes (N1–N51) were obtained from materials surgically resected from 51 patients (RCC1–RCC 51) with primary clear cell RCC. These patients did not receive preoperative treatment and underwent nephrectomy in 1999–2006 at the National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan. There were 34 men and 17 women with a mean (±SD) age of 59 ± 10 years (range 31–81 years). Histological diagnosis was made in accordance with the World Health Organization classification (17). All the tumors were graded on the basis of



previously described criteria (18) and classified according to the pathological tumor-node-metastasis (TNM) classification (19). The criteria for macroscopic configuration of RCC (12) followed those established for hepatocellular carcinoma: type 3 (contiguous multinodular type) hepatocellular carcinomas show poorer histological differentiation and a higher incidence of intrahepatic metastasis than type 1 (single nodular type) and type 2 (single nodular type with extranodular growth) hepatocellular carcinomas (20). The presence or absence of vascular involvement was examined microscopically on slides stained with hematoxylin-eosin and elastic van Gieson. The presence or absence of tumor thrombi in the main trunk of the renal vein was examined macroscopically. RCC is usually encapsulated by a fibrous capsule and well demarcated and hardly ever contains fibrous stroma between cancer cells (panel T in Figure 1A). Therefore, we were able to obtain cancer cells of high purity from surgical specimens, avoiding contamination with both non-cancerous epithelial cells and stromal cells.

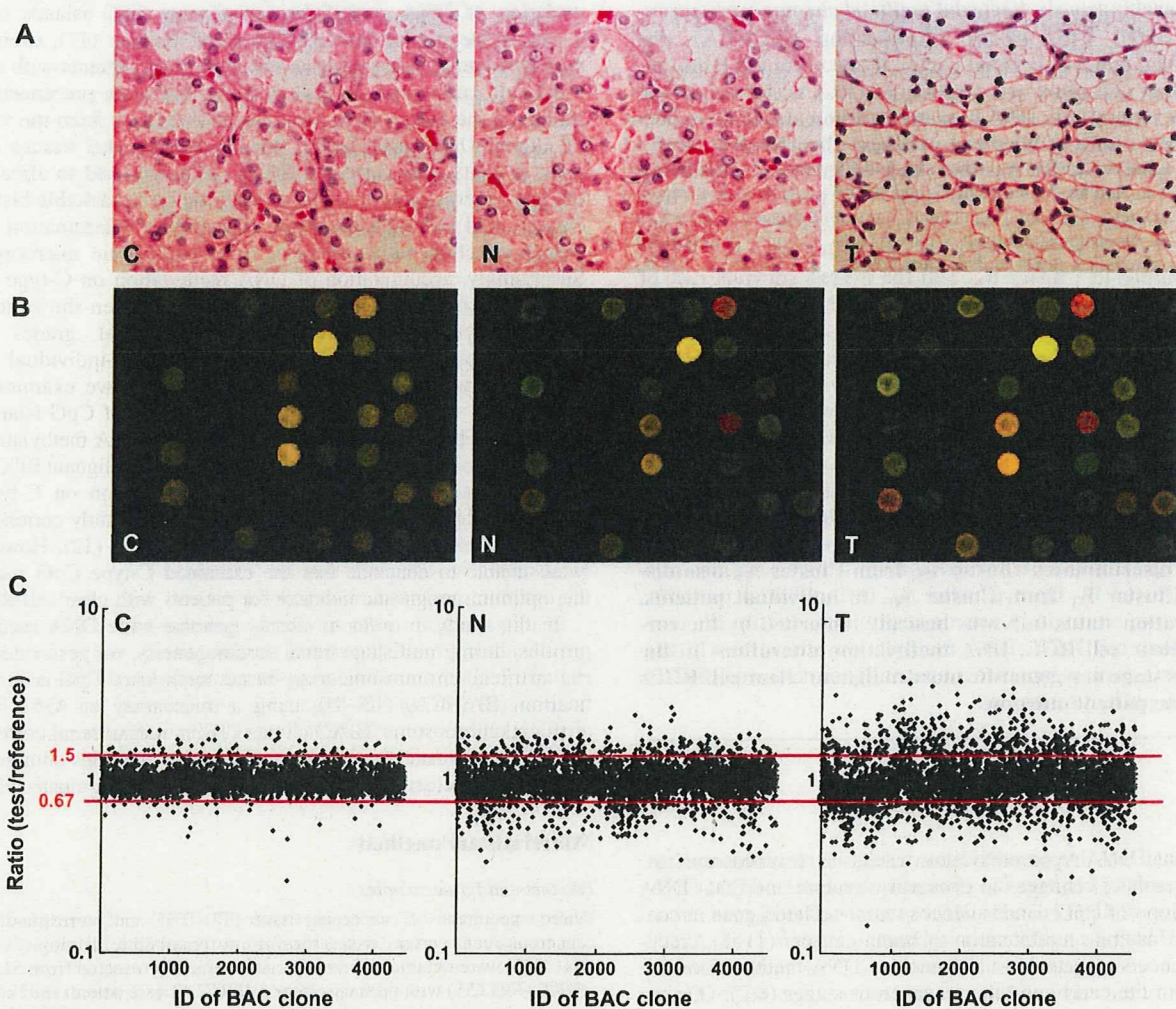
For comparison, eight normal renal cortex tissue samples (C1-C8) were obtained from materials surgically resected from eight patients without any primary renal tumor. These patients included five men and three women with a mean ( $\pm$ SD) age of  $61 \pm 12$  years (range 47-81 years). Six of these patients underwent nephroureterectomy for urothelial carcinomas of the ureter, and the other two patients underwent nephrectomy with resection of retroperitoneal sarcoma around the kidney.

High-molecular weight DNA from these fresh frozen tissue samples was extracted using phenol-chloroform, followed by dialysis. Because DNA methylation status is known to be organ specific (21), the reference DNA for analysis of the developmental stages of clear cell RCC should be obtained from the renal cortex and not from other organs or peripheral blood. Therefore, a mixture of normal renal cortex tissue DNA obtained from six male patients (C9-C14) without any primary renal tumor was used as a reference for analyses of male test DNA samples, and a mixture of normal renal cortex tissue DNA obtained from three female patients (C15-C17) without any primary renal tumor was used as a reference for analyses of female test DNA samples.

This study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Center, Tokyo, Japan.

#### BAMCA

DNA methylation status was analyzed by BAMCA using a custom-made array (MCG Whole Genome Array-4500) harboring 4361 BAC clones throughout chromosomes 1-22 and X and Y (16), as described previously (13-15). Briefly, 5  $\mu$ g aliquots of test or reference DNA were first digested with 100 U of methylation-sensitive restriction enzyme *Sma*I and subsequently with 20 U of methylation-insensitive *Xma*I. Adapters were ligated to *Xma*I-digested sticky ends, and polymerase chain reaction was performed with an adapter primer set. Test and reference polymerase chain reaction



**Fig. 1.** DNA methylation alterations during multistage renal carcinogenesis. (A) Microscopic view of normal renal cortex tissue obtained from a patient without any primary renal tumor (C), non-cancerous renal cortex tissue obtained from a patient with clear cell RCC (N) and clear cell RCC (T). N shows no remarkable histological changes compared with C, i.e. no cytological or structural atypia is evident in N. Since T hardly ever contains fibrous stroma between cancer cells, we were able to obtain cancer cells of high purity, avoiding contamination with stromal cells. Hematoxylin-eosin staining. Original magnification  $\times 20$ . (B) Scanned array images yielded by BAMCA in C, N and T. Test and reference DNA labeled with Cy3 and Cy5 was cohybridized, respectively. (C) Scattergrams of the signal ratios (test signal:reference signal) yielded by BAMCA in C, N and T. In all eight C samples (C1-C8), the signal ratios of 97% of BAC clones were between 0.67 and 1.5 (red bars). Therefore, in N and T, DNA methylation status corresponding to a signal ratio of  $<0.67$  and  $>1.5$  was defined as DNA hypomethylation and DNA hypermethylation on each BAC clone compared with C, respectively. Even though N did not show any remarkable histological changes compared with C [panels C and N in (A)], many BAC clones showed DNA hypomethylation or hypermethylation. In T, more BAC clones showed DNA hypomethylation or hypermethylation, and the degree of DNA hypomethylation and hypermethylation, i.e. deviation of the signal ratio from 0.67 or 1.5, was increased in comparison with N.