

200924002A(1/3)

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト多段階発がん過程におけるエピジェネティックな異常の  
網羅的解明と臨床応用に関する研究

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 / 3冊

## 目 次

### I 総括研究報告

- ヒト多段階発がん過程におけるエピジェネティックな異常の  
網羅的解明と臨床応用に関する研究 ..... 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. DNAメチル化異常のゲノム網羅的な解析とリスク診断・性質  
診断への応用 .....10  
牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部
2. 諸臓器の前がん状態ならびにがんの臨床病理学的特性の基盤  
となるDNAメチル化異常の網羅的解析 .....13  
金井弥栄 国立がんセンター研究所病理部
3. DNAメチル化の分子機構の解析およびがんにおいて不活化さ  
れる新規遺伝子の同定 .....19  
豊田実 札幌医科大学学生化学講座
4. 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 .....22  
伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科
5. 膵胆道領域の癌診断におけるepigenetic molecular marker  
の有用性 .....24  
松林宏行 静岡県立静岡がんセンター内視鏡科
6. DNA低メチル化の消化管腫瘍発生への影響 .....25  
山田泰広 京都大学iPS細胞研究センター

- III 研究成果の刊行に関する一覧表 .....27

総括研究報告書

ヒト多段階発がん過程におけるエピジェネティックな異常の網羅的解明と臨床応用に関する研究

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

本研究では、DNAメチル化異常の誘発機構を明らかにし、ゲノム網羅的な解析によりDNAメチル化異常を解明、がんの本態を明らかにすると同時に、臨床的に有用な診断方法の開発を行う。本年度は、遺伝子のメチル化感受性には、正常細胞における低転写のみならず、Pol II結合が重要であることを世界で初めて示し、特定のヒストン修飾も重要であることを確認した。また、*H. pylori*感染はDNAメチル化異常誘発の原因であること、そのためには*H. pylori*自体よりも炎症が重要であることを明らかにした。モデルマウスによる検討で、DNA低メチル化は、消化管腫瘍形成を抑制し、DNAメチル化が大腸腫瘍細胞の未分化状態および増殖状態の維持に関与することを示唆した。胃がんおよび乳がんにおける*miR-34b/c*の異常メチル化を明らかにした。DNAメチル化により不活化される新規乳がん抑制遺伝子候補*NTN4*を同定した。次世代シーケンサーを用いて遺伝子転写開始点の網羅的解析を行い、DNAメチル化の標的遺伝子となるnon-coding RNAを同定した。肝発がんリスク評価指標の開発において、パイロシーケンス法を用いることで、昨年度までの指標に比し、感度・特異度を向上させ、微量の検体にも適用可能とした。胃洗浄廃液での*SOX17*のメチル化を用いて、優れた感度・特異度で胃がんの存在を診断できる可能性を示した。神経芽細胞腫の予後診断を継続して実施している。

研究分担者  
金井 弥栄 国立がんセンター研究所  
病理部・部長  
豊田 実 札幌医科大学  
生化学講座・教授  
伊東 文生 聖マリアンナ医科大学  
消化器肝臓内科・教授  
松林 宏行 静岡県立静岡がんセンター  
内視鏡科・医長  
山田 泰広<sup>1)</sup> 岐阜大学大学院医学系研究科  
腫瘍制御学講座・准教授  
京都大学 iPS 細胞研究センター  
特定拠点教授  
<sup>1)</sup>平成22年2月1日 岐阜大学から京都大学へ異動

る methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) 法や methylated CpG island amplification-RDA (MCA-RDA)法を開発、これらの方法は世界的に使用されてきた。

ゲノム網羅的な解析により見出されたDNAメチル化異常が遺伝子プロモーター領域CpGアイランド(CGI)に存在する場合、下流遺伝子のサイレンシングの原因となる。サイレンシングされる遺伝子には、がん化の原因として関与する遺伝子（ドライバー；主ながん抑制遺伝子）と、がん化の結果または随伴現象としてサイレンシングされた遺伝子（パッセンジャー）とが存在する。ドライバーの同定が重要なことは明らかであるが、パッセンジャーや遺伝子サイレンシングの原因とはならない非プロモーター領域のDNAメチル化異常でも、診断的に有用な場合がある。

DNAメチル化異常の診断応用は、発がんリスク診断、存在診断、病態診断に大別できる。まず、研究代表者らにより、DNAメチル化異常はがん患者の非がん部にも存在し、その量は発がんリスクと相関することが示されている。従って、非がん組織に蓄積したDNAメチル化異常の測定により、発がんリ

A. 研究目的

DNAメチル化に代表されるエピジェネティックな修飾は、体細胞分裂に際して忠実に複製される。その異常は、がん抑制遺伝子の不活化やゲノム不安定性の誘発を通じて発がんに関与することが明らかとなっている。研究代表及び分担者は、DNAメチル化状態の違いに関するゲノム網羅的解析法であ

スク診断が行える可能性がある。次に、DNA メチル化異常は、突然変異とは異なり、多くの正常型 DNA に埋没した異常 DNA を鋭敏に検出できるため、がんの存在診断に有用である。さらに、DNA メチル化状態は遺伝子発現と比べて短期的変動が極めて少ないことを活用して、がんの悪性度・予後・治療感受性予測等の病態診断に用いることが出来る。研究代表者による神経芽細胞腫の予後診断など、既存の診断法を上回る有用性を示す場合がある。

一方、DNA メチル化異常が深くヒト発がんに関与し、診断的にも有用であるにも関わらず、どのような要因により、また、どのような分子機構により誘発されるのかについては、不明の点が多い。研究代表者らは、ヒト胃がんの強力な誘発因子である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染者の胃粘膜では、高度の DNA メチル化異常が蓄積していることを見出してきた。また、研究分担者は DNA 低メチル化マウスを用いて、グローバルな DNA 低メチル化は大腸の微小腺腫や肝がんは促進、大腸肉眼的腫瘍や胃がん、口腔がんは抑制することを示してきた。

本研究では、(1) DNA メチル化異常の誘発機構や低メチル化の発がんにおける役割を明らかにすること、(2)特にゲノム網羅的な DNA メチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子のサイレンシングを含めて、がんでのエピジェネティック異常の全体像を解明してがんの本態を明らかにすること、(3) がんの診断マーカーとして役立つ DNA メチル化変化を同定すること、を目的とする。

## B. 研究方法

### (1) マウス、スナネズミ、細胞株

グローバルな DNA 低メチル化のモデルマウスとして、*Dnmt1* の低発現マウスを用いた。*Dnmt1* knock-out allele である c allele と低発現 allele である chip allele を家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスと組み合わせることにより、*Apc<sup>Min/+</sup>; Dnmt1<sup>chip/c</sup>* マウスを作出した。対照コントロールとして *Apc<sup>Min/+</sup>; Dnmt1<sup>chip/+</sup>* マウスを用いた。これらのマウスに、強力な大腸発がんプロモーターである dextran sodium sulfate (DSS) を飲水投与して大腸腫瘍を誘発した。

スナネズミ、Balb/c マウスは、日本クレアから購入した。ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与をうけた。

### (2) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

ゲノム網羅的な DNA メチル化解析には、1) 脱メチル化剤処理後、発現マイクロアレイによりスクリーニングする方法、2) BAC array-methylated CpG island amplification (BAMCA) 法または MCA-Microarray (MCAM) 法、3) methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CGI マイクロアレイ法の、3通りの方法を使い分けた。

脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理後、発現マイクロアレイにより再発現した遺伝子を網羅的に解析した。BAMCA および MCAM 法は、MCA 法により準備したプローブを、BAMCA 法では 4361 種の BAC クローンをプローブとして搭載する Whole-Genome Array 4500 に、MCAM 法では *XmaI/SmaI* により切断されてできた PCR 増幅可能な領域をカバーするように設計した DNA マイクロアレイに、それぞれハイブリダイゼーションさせた。MeDIP-CGI マイクロアレイ法は、ゲノム DNA を抗 5-メチルシチジン抗体で免疫沈降したものを、ゲノム上の 34,697 カ所の CGI を搭載するアレイにハイブリダイズさせ、本研究内で独自に開発したアルゴリズムによりメチル化の程度を判定した。

### (3) ゲノム領域特異的な DNA メチル化解析

非メチル化シトシンを特異的にウラシルに変換する bisulfite 処理の後、シーケンス法、Methylation-specific PCR (MSP) 法、定量的 MSP 法、及び、pyrosequencing 法により解析した。Pericentromeric repeat のメチル化は、DNA メチル化感受性制限酵素を用いたサザンブロットで解析した。BAC クローンのメチル化レベルは、蛍光強度比の実測値を用いた。

### (4) 遺伝子発現定量

領域特異的解析は定量的 RT-PCR 法により、ゲノム網羅的解析はマイクロアレイ法により行った。胃組織中の *miR-34b/c* の発現については RNA FISH 法により *in situ* で解析した。

### (5) クロマチン免疫沈降法

抗ヒストン H3Ac 抗体、H3K4me3 抗体、H3K9me3 抗体、H3K27me3 抗体、Pol II 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。網羅的解析では CGI マイクロアレイ (ChIP-chip) と次世代シーケンサー (ChIP-seq) を用いた。

### (6) 病理解析

組織は 24 時間緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィンに包埋後、組織切片を作製、病理組織学的に検討した。細胞増殖活性の検討は Ki-67 免疫染色により行った。

### (7) 細胞悪性度の評価

細胞増殖能をコロニーフォーメーションアッセイにより解析した。

### (8) 統計解析

Kaplan-Meier 解析、Cox 比例ハザードモデルに基づく多変量解析を行った。

### (倫理面への配慮)

臨床材料は同意を得て採取した材料を、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、各施設の倫理委員会に研究の承認を得て使用した。全ての動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を得て、動物愛護に配慮して施行した。

## C. 研究結果

### (1) DNA メチル化異常の誘発機構と低DNA メチル化の発がんにおける意義

昨年度までに、*H. pylori* 感染者の胃粘膜では特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されていること、特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発される機構として、低転写が DNA メチル化感受性に重要であることをゲノムレベルで明らかにしてきた。本年度はさらに、低転写の遺伝子の中でも DNA メチル化感受性と抵抗性が存在する機構を解析するため、転写活性型のヒストン修飾 2 個(H3Ac, H3K4me3)、転写不活化型のヒストン修飾 2 個(H3K9me3, H3K27me3)、および Pol II 結合について、前立腺および乳腺正常細胞における状態をゲノム網羅的に解析した。その結果、メチル化に抵抗性を示す遺伝子は有意に高レベルの転写活性型のヒストン修飾、及び、結合した Pol II レベルを示すことを世界で初めて明らかとした。また、メチル化に高感受性を示す遺伝子は、有意に高レベルの H3K27me3 の修飾をもつことも確認された。多変量解析の結果、H3K27me3 修飾と Pol II 結合は他の因子と独立して DNA メチル化異常誘発の感受性に関与していることが示された。

*H. pylori* をスナネズミに感染させることにより胃粘膜で DNA メチル化異常が誘発されることを観察し、*H. pylori* 感染が原因であることを証明した。更に、DNA メチル化異常誘発の機構として、菌自身と感染に由来する炎症のどちらが重要かを明らかにするために、スナネズミに *H. pylori* を感染させ、感染後 1 週から免疫抑制剤シクロスポリン A を飲水投与した。投与後 20 週において、シクロスポリン A 投与群の *H. pylori* の菌体数は非投与と同程度あるいはそれ以上に認められたにも関わらず、胃粘膜での DNA メチル化異常は非投与に比べて劇的に抑制された。従って、*H. pylori* による DNA メチル化異常誘発には、菌自身ではなく、感染の結果誘発された炎症が重要であると考えられた。

昨年度までに、DNA 低メチル化マウス *Dnmt1<sup>chip/c</sup>* を用いて、グローバルな DNA 低メチル化が、胃腫瘍および口腔腫瘍発生を強く抑制することを明らかにしてきた。本年度は、DSS 投与による *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスでの大腸腫瘍に関し、低メチル化が DSS 投与後短期 (3 週後) での腫瘍性病変の発生は優位に抑制しないものの、DSS 投与後長期 (13 週後) での腫瘍発生は強く抑制した (*Dnmt1<sup>chip/c</sup>* マウス 15.8±1.9%, *Dnmt1<sup>chip/+</sup>* マウス 30.2±3.3%  $P<0.001$ )。また、腫瘍の比較検討において、胚細胞への分化を示唆する PAS-AB 陽性粘液細胞の出現率は *Dnmt1<sup>chip/c</sup>* マウスにおいて有意に増加、一方、神経内分泌細胞を示唆するクロモグラニン A 陽性細胞の出現率は差がなかったことから、DNA 低メチル化により、腫瘍細胞の分化が特に杯細胞選択的に誘導されることが示唆され

た。さらに、*Dnmt1<sup>chip/c</sup>* マウスの腫瘍では Ki67 陽性細胞率が有意に減少していたことから DNA 低メチル化による細胞増殖活性の抑制が示唆された。

### (2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

昨年度までに、がんでは異常メチル化により不活化される microRNA のスクリーニングを行い、microRNA-34b/c が大腸がんにおいて異常メチル化により不活化されることを報告してきた。本年度は、胃がんおよび乳がんにおける *miR-34b/c* の異常メチル化について検討した。*MiR-34b/c* の異常メチル化は胃がん症例 68 例中 48 例(48%)に認められた。*MiR-34b/c* を胃がん細胞株に導入することにより、細胞増殖を抑制すること、*miR-34b/c* が MET の発現を抑制することを明らかにした。さらに、*miR-34b/c* は胃粘膜の底部、固有腺にあたる領域に強く発現し、胃腺の上部では発現が低いことを明らかにした。*MiR-34b/c* の異常メチル化は、大腸がんだけでなく、胃がん・乳がんでも発生進展に関与し、がん診断や治療の標的として重要である可能性が示唆された。

乳がんの発生と進展における DNA メチル化異常の役割を明らかにするため、乳がん細胞株をメチル化阻害剤処理することにより、発現誘導される遺伝子群を網羅的に解析した。その結果、288 遺伝子の発現が脱メチル化により誘導された。これら遺伝子中、*DFNA5*, *SFRP1*, *DKK3*, *FKBP6*, *LOXL4*, *OSBPL3*, *NTN4*, *PGP9.5*, *PON1*, *TRIM50* の 10 遺伝子に関して、発現抑制がプロモーター領域の DNA メチル化により起こることを明らかにした。同定したメチル化の新規標的遺伝子 *NTN4* について細胞増殖に与える影響を解析したところ、細胞増殖を抑制する作用を有することが明らかとなった。*NTN4* のメチル化は正常乳腺組織に比べ、乳がん組織で明らかに高値を示し(感度 98.6%、特異度 76.5%)、乳がんの検出のマーカーとしても有用である可能性が示唆された。

microRNA の前駆体は、しばしば成熟型 microRNA の数 10kB 上流から転写され、エピジェネティックな異常の解析において、転写開始点を正確に把握して、DNA メチル化解析を行うことが重要である。ゲノムワイドな転写開始点のマッピングを行うため、H3K4me3 の ChIP-seq により転写開始点の網羅的解析を行った。その結果、*DNMT1* および *DNMT3B* ノックアウト細胞において、HCT116 細胞と比べ、25,000 程度の H3K4me3 のピークを認めた。これらのピークの中には、従来のプロモーターアレイでは同定出来なかった non-coding RNA が存在した。

### (3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

発がんリスク診断としては、昨年度までに、*H. pylori* 感染陰性者では、胃粘膜 DNA メチル化レベルが胃発がんリスクと相関することを示してきた。早

期実用化のため、胃粘膜 DNA メチル化異常を用いたリスク診断については、昨年度から他の研究費により、大規模な臨床試験を開始した。また、慢性肝炎・肝硬変組織からの肝細胞がん発生のリスクを診断するために、BAMCA 法で 25 個の BAC クローンを同定し、判定基準の決定、評価を進めてきた。

本年度は、まず、BAMCA 法で同定した代表的な BAC 領域において、シグナルに関与しうる 2,000bp 以内に近接する全ての *XmaI/SmaI* 認識部位における DNA メチル化率を定量した。その結果、BAMCA 法が染色体の広い範囲で同期して起こる DNA メチル化の変化を検出していることが確認された。次に、BAMCA 法で発がんリスク評価指標として同定した BAC クローン 25 個について、それらの中に存在する 203 個の *XmaI/SmaI* 認識部位の DNA メチル化状態を pyrosequencing 法で評価した。その結果、59 個の CpG 部位において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、DNA メチル化レベルが有意に異なっていた。更に、再現性に優れた 30 領域について、学習コホートを用いて DNA メチル化レベルのカットオフ値を設定し、30 領域中 15 領域以上で満たす場合に発がん高リスク群と判定することとした。その結果、検証コホートにおいても、非がん肝組織を、感度・特異度とも 100% で正常肝組織から区別できた。これら 30 領域のうち 11 領域は CGI に位置し、残る 19 領域は CGI に含まれなかった。特定の遺伝子のプロモーターには 1 領域しか含まれていなかった。慢性肝炎を呈する非がん肝組織と肝硬変症を呈する非がん肝組織との間で、基準を満たす領域数に有意差はなかった ( $P = 0.053$ ) ことから、本マーカーは、単に肝炎ウイルス感染や、慢性肝炎・肝硬変症の段階における炎症や繊維化の程度を反映するのではなく、真に発がんリスクを反映する可能性が示唆された。

がんの存在診断としては、通常内視鏡検査・治療時に発生する胃洗浄廃液由来 DNA を用いた、DNA メチル化異常検出による胃がんの存在診断の開発を継続した。既知のマーカー候補遺伝子に加え MCAM 法により得られた 18 候補遺伝子のなかから最も有意差のある *SOX17* 遺伝子を同定した。検証セット (40 症例、80 サンプル) を用いて、昨年度までに同定した *MINT25* とともに、解析した。その結果、内視鏡治療前後における 2 個の候補遺伝子 (*MINT25*, *SOX17*) は治療後で有意にメチル化レベルの低下を示した。

がんの病態診断として、昨年度までに、CIMP が神経芽細胞腫の予後診断に有用であることを示してきた。また、肝細胞がんの予後診断に有用な 41 個の BAC クローンを、多発性骨髄腫の薬剤反応性診断に有用な *RASD1* 遺伝子を同定してきた。本年度は、CIMP による神経芽細胞腫の予後診断の前向き試験を継続し、検体累積 173 例について CIMP の診断を行った。

## D. 考察

### (1) DNA メチル化異常の誘発機構と低 DNA メチル化の発がんにおける意義

DNA メチル化異常の発がんへの深い関与を考えると、その誘発機構の解明は急務である。DNA メチル化異常誘発の標的遺伝子の決定機構については、遺伝子低転写に加えて、Pol II 結合が重要であることを世界で初めて明らかにした。最近報告のあった、H3K27me3 修飾が重要であることも確認できた。これ以外に、ゲノムの構造も関与していることを示唆する結果が得られており、来年度には、さらに詳細が解明されることが期待できる。この機構はがん化に重要な遺伝子が不活化される機構として重要であるのみならず、メチル化プロファイル生成機構としても重要である。特定の発がん因子曝露によるメチル化プロファイル生成機構が解明されれば、分子疫学等への応用が期待できる。

グローバルな DNA 低メチル化状態は、大腸、胃、口腔において腫瘍形成抑制的に作用することを明らかにしてきた。本年度の研究では DNA 低メチル化の腫瘍抑制作用は、DNA メチル化が大腸腫瘍細胞の未分化状態および増殖状態の維持に関与することを阻害するためであるが示唆された。DNA メチル化修飾が消化管腫瘍発生の予防に応用可能であることを示唆する知見と考えられる。

### (2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

本年度までに *miR-34b/c* の異常メチル化について胃がんおよび乳がんにおける検討を進めた。がんの種類により、メチル化される microRNA には差があると考えられ、各種腫瘍の発生に関与する microRNA の同定が重要と考えられる。また、microRNA のメチル化解析には転写開始点を正確に決定することが重要である。ChIP-seq 法を用いて、転写開始点のマッピングを行い、microRNA 前駆 RNA の新規の転写開始点を多数同定することができた。マイクロアレイ解析では同定できない DNA メチル化により不活化された non-coding RNA を同定するための基盤情報となる。

*NTN4* は netrin ファミリーに属する遺伝子で血管新生の抑制に関与する。*NTN4* の異常メチル化は乳がん臨床例において高率に認められ、乳がんの進展に関与すると考えられる。血清中のメチル化検出により乳がんの早期発見や再発予測に利用出来る可能性も示唆された。

### (3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

DNA メチル化異常の診断的応用は、実用化段階を迎えている。既に前向き臨床試験 (他の研究事業) へと移行した胃がんのリスク診断に加え、肝細胞が

んのリスク診断についても有用な DNA メチル化マーカーセットが得られてきている。今年度の研究では、マーカーを、判定が煩雑な BAC アレイにおける蛍光強度から、pyrosequencing 法による個別 CpG のメチル化レベルへと転換することができた。Pyrosequencing 法を用いることで、感度・特異度が向上し、微量の断片化した DNA にも適用可能となった。インターフェロン療法適応の決定のために採取される肝生検標本を用いた発がんリスク評価法として実用化し得ると期待される。今後、大規模な臨床試験へと移行するか否かの判断が必要である。

がんの存在診断に関しては、胃洗浄液を用いて胃がんの存在診断が行える可能性を示した。我が国の内視鏡医の診断能力の高さには定評があるが、判別困難な病変があることも事実である。また、胃がんはアジアで多いがんであるが、アジアの内視鏡医の診断能力が我が国のレベルに達していないことも事実である。通常は廃棄される胃洗浄液を用いた胃がんの存在診断が実用化されれば、価値は大きい。

神経芽細胞腫の予後診断は臨床応用に十分な精度があることがわかっており、臨床試験に伴う診断を継続して実施している。

#### E. 結論

公衆衛生上重要な DNA メチル化異常の誘発機構の解明を進めた。がんでの各種遺伝子の DNA メチル化異常の解明は、本態解明に加えて、がんの検出、病態、及び、予後の診断に有用である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

- Niwa, T, Tsukamoto, T, Toyoda, T, Mori, A, Tanaka, H, Maekita, T, Ichinose, M, Tatematsu, M and Ushijima, T. Inflammatory processes triggered by *H. pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.
- Takeshima, H and Ushijima, T. Methylation Destiny: Moira Takes Account of Histones and RNA Polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
- Ushijima, T and Asada, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
- 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.
- 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, 2009.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yamashita, S, Hosoya, K, Gyobu, K, Takeshima, H and Ushijima, T. Development of a novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis. **DNA Res**, 16: 275-286, 2009.
- Ushijima, T and Yamashita, S. Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). **Methods Mol Biol**, 507: 117-130, 2009.
- 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.
- Kanai, Y and Arai, E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: Molecular Genetics of Liver Neoplasia. ed. Grisham, JW and Thorgeirsson, S. Springer, in press.
- Arai, E and Kanai, Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. **Epigenomics**, in press.
- Kanai, Y. 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 and Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. **Cancer Sci**, 101: 231-240, 2010.
16. Okamura, J, Sekine, S, Nara, S, Ojima, H, Shimada, K, Kanai, Y and 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.
17. 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.
18. Arai, E, Ushijima, S, Gotoh, M, Ojima, H, Kosuge, T, Hosoda, F, Shibata, T, Kondo, T, Yokoi, S, Imoto, I, Inazawa, J, Hirohashi, S and 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.
19. 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. **Gastroenterology**, 5: 2304-2315, 2009.
20. Sekine, S, Ogawa, R, Mcmanus, MT, Kanai, Y and Hebrok, M. Dicer is required for proper liver zonation. **J Pathol**, 219: 365-372, 2009.
21. Sekine, S, Nakanishi, Y, Ogawa, R, Kouda, S and Kanai, Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. **Virchows Arch**, 454: 513-517, 2009.
22. Akishima-Fukasawa, Y, Nakanishi, Y, Ino, Y, Moriya, Y, Kanai, Y and Hirohashi, S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. **Am J Clin Pathol**, 132: 202-210, 2009.
23. Yamanashi, T, Nakanishi, Y, Fujii, G, Akishima-Fukasawa, Y, Moriya, Y, Kanai, Y, Watanabe, M and Hirohashi, S. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. **Oncology**, 77: 53-62, 2009.
24. Yamashita, M, Toyota, M, Suzuki, H, Nojima, M, Yamamoto, E, Kamimae, S, Watanabe, Y, Kai, M, Akashi, H, Maruyama, R, Sasaki, Y, Yamano, H, Sugai, T, Shinomura, Y, Imai, K, Tokino, T and Itoh, E. Epigenetic inactivation of interferon regulatory factor genes in gastric cancer. **Cancer Sci**, in press.
25. Fujikane, T, Nishikawa, N, Toyota, M, Suzuki, H, Nojima, M, Maruyama, R, Ashida, M, Ohe-Toyota, M, Kai, M, Nishidate, T, Sasaki, Y, Ohmura, T, Hirata, K and Tokino, T. Genomic Screening for genes upregulated by demethylation identified novel targets of epigenetic silencing in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, in press.
26. Suzuki, H, Igarashi, S, Nojima, M, Maruyama, R, Yamamoto, E, Kai, M, Akashi, H, Watanabe, Y, Yamamoto, H, Sasaki, Y, Itoh, E, Imai, K, Sugai, T, Shen, L, Issa, JPJ, Shinomura, Y, Tokino, T and Toyota M. IGFBP7 is p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. **Carcinogenesis**, 31: 342-349, 2010.
27. Nojima, M, Maruyama, R, Yasui, H, Suzuki, H, Maruyama, Y, Tarasawa, I, Sasaki, Y, Asaoku, H, Sakai, H, Hayashi, T, Mori, M, Imai, K, Tokino, T, Ishida, T, Toyota, M and Shinomura, Y. Genomic Screening for Genes Silenced by DNA Methylation Revealed an Association between RASD1 Inactivation and Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. **Clin Cancer Res**, 15: 4356-4364, 2009.
28. 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**, 100: 787-791, 2009.
29. Toyota, M, Suzuki, H and Shinomura, Y. The Epigenome of colorectal cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**, 5: 84-89, 2009.
30. Toyota, M, Suzuki, H, Yamamoto, E, Yamano, H, Imai, K and Shinomura, Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in cancer. **Epigenomics**, 1: 291-299, 2009.
31. 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 with DNA methylation analysis of gastric washes. **Gastroenterology**, 136: 2149-2158, 2009.
32. Baba, S, Yamada, Y, Hatano, Y, Miyazaki, Y, Mori, H, Shibata, T and Hara, A. Global DNA hypomethylation suppresses squamous

- carcinogenesis in the tongue and esophagus. **Cancer Sci**, 100: 1186-1191, 2009.
33. Yamada, Y, Aoki, H, Kunisada, T and Hara, A. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. **Cell Stem Cell**, 6: 10-15, 2010.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Saito, Y, Suzuki, H, Tsugawa, H, Nakagawa, I, Matsuzaki, J, Kanai, Y and 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.
  2. Yamashita, Y, Yuan, J, Suetake, I, Suzuki, H, Ishikawa, Y, Choi, YL, Ueno, T, Soda, M, Hamada, T, Haruta, H, Takada, S, Miyazaki, Y, Kiyoi, H, Ito, E, Naoe, T, Tomonaga, M, Toyota, M, Tajima, S, Iwama, A and Mano, H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene**, in press.
  3. Sugai, T, Habano, W, Endoh, M, Konishi, Y, Akasaka, R, Toyota, M, Yamano, H, Koeda, K, Wakabayashi, G and Suzuki, K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. **Int J Cancer**, in press.
  4. Sugai, T, Habano, W, Jiao, YF, Toyota, M, Suzuki, H, Tsukahara, M, Koizuka, H, Akasaka, R, Koeda, K, Wakabayashi, G and Suzuki, K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. **Oncol Rep**, 23: 25-33, 2010.
  5. Samuel, MS, Suzuki, H, Buchert, M, Putoczki, TL, Tebbutt, NC, Lundgren-May, T, Christou, A, Inglese, M, Toyota, M, Heath, JK, Ward, RL, Waring, PM and Ernst, M. Elevated Dnmt3a activity promotes polyposis in ApcMin mice by relaxing extracellular restraints on Wnt signaling. **Gastroenterol**, 137: 902-913, 2009.
  6. Kashima, L, Toyota, M, Mita, H, Suzuki, H, Idogawa, M, Ogi, K, Sasaki, Y and Tokino, T. CHFR, a potent tumor suppressor, downregulates interleukin-8 via inhibition of NF-kB. **Oncogene**, 28: 2643-2653, 2009.
  7. Tomita, M, Toyota, M, Ishikawa, C, Nakazato, T, Okudaira, T, Matsuda, T, Uchihara, J, Taira, N, Ohshiro, K, Senba, M, Tanaka, Y, Ohshima, K, Saya, H, Tokino, T and Mori, N. Overexpression of Aurora a by loss of CHFR gene expression increases the growth of HTLV-1-infected T cells through enhanced NF-kB activity. **Int J Cancer**, 124: 2607-2615, 2009.
  8. Goto, Y, Shinjo, K, Kondo, Y, Shen, L, Toyota, M, Suzuki, H, Gao, Y, An, B, Fujii, M, Murakami, H, Osada, H, Taniguchi, T, Usami, N, Kondo, M, Hasegawa, Y, Shimokata, K, Matsuo, K, Hida, T, Fujimoto, N, Kishimoto, T, Issa, JP and Sekido, Y. Characteristic epigenetic profiles of malignant pleural mesothelioma. **Cancer Res**, 69: 9073-9082, 2009.
  9. Suzuki, H, Toyota, M, Kondo, Y and Shinomura, Y. Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. **Methods Mol Biol**, 512: 55-69, 2009.
2. 学会発表
1. Ushijima, T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. 18th Cancer Research Institute cancer symposium on "DNA and Histone Methylation in Cancer". Seoul, June, 2009.
  2. 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.
  3. Ushijima, T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. Epigenetics in Development and Diseases Conference: 4th Asian Epigenomics Meeting. Singapore, August, 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. Ushijima, T. Instructive induction of aberrant DNA methylation, and epigenomic analysis of its underlying mechanisms. Epigenetics 2009 Australian Scientific Meeting. Melbourne, December, 2009.
  8. Ushijima, T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. 第 68 回日本癌学会学術総会 international session 2009 年 10 月
  9. Ushijima, T. Unique Nature of Epigenetic

- Alterations: Epigenetic Field Defect and Instructive Induction. 第 68 回日本癌学会学術総会 Mauvernay 賞受賞講演 2009 年 10 月
10. 牛島俊和、丹羽 透 *H. pylori* 感染に伴う慢性炎症による DNA メチル化異常誘発 第 51 回日本消化器病学会大会シンポジウム S9: 炎症と消化器発癌 2009 年 10 月
  11. 牛島俊和 胃がんから消化器がんにおける DNA メチル化異常を考える 第 20 回日本消化器癌発生学会総会シンポジウム 2009 年 11 月
  12. Ushijima, T and Takeshima, H. Instructive induction of aberrant DNA methylation, and epigenomic analysis of its underlying mechanisms. 第 32 回日本分子生物学会年会シンポジウム 2009 年 12 月
  13. 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 alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Denver, April, 2009.
  14. Kanai, Y. Epigenetic analyses in HCC. Basic workshop: Current Frontier in Genomic and Epigenetic Research on Liver Cancer. International Liver Cancer Association Third Annual Conference. Milan, September, 2009.
  15. Arai, E, Ushijima-Wakai, 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 renal tumors of various histological subtypes and nontumorous renal tissues. American Association for Cancer Research Special Conference on Cancer Epigenetics. Puerto Rico, January, 2010.
  16. Kanai, Y. DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer research and the Japanese Cancer Association "Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics". Hawaii, February, 2010.
  17. 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 年 5 月
  18. 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 年 5 月
  19. 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 年 6 月
  20. 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 年 6 月
  21. 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 年 10 月
  22. 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 年 10 月
  23. 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 年 10 月
  24. 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 年 10 月
  25. Toyota, M. Colorectal cancer epigenetics. 37th Meeting of International Society for Oncology and Biomarkers. Amsterdam, September, 2009.
  26. Toyota, M., Suzuki, H., Yamamoto, E., Kamimae, S., Nijima, M., Shinomura, Y. and Imai, K. Colorectal cancer epigenome and clinical implication. First Guangzhou Symposium of Cancer Epigenetics and Kick-off Meeting of A3 Foresight Program and 973 Project. Guangzhou, November, 2009.
  27. Toyota, M. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. The 14th Korean-Japan Cancer Research Workshop. Kanazawa, December, 2009.
  28. Toyota, M., Suzuki, H., Akashi, H., Maruyama, R., Yamamoto, E., Nojima, M., Shinomura, Y. and Imai, K. Genome wide analysis of transcription start sites of epigenetically silenced genes using next-generation sequencer. AACR Special Conference on Cancer Epigenetics. Puerto Rico, January, 2010.

29. 豊田 実、篠村恭久、今井浩三 エピゲノム解析による消化器癌の診断と発癌リスク予測シンポジウム：第 46 回日本臨床分子医学会学術総会 2009 年 4 月
30. 豊田 実 癌抑制遺伝子の DNA メチル化と RNAi エピジェネティクス：ゲノムを管理し活用する戦略 千里ライフサイエンスセミナー 2009 年 4 月
31. 豊田 実、今井浩三、篠村恭久 エピゲノム解析による炎症を介した胃発癌の分子機構解析と診断・発癌リスク予測への応用 第 51 回日本消化器病学会大会 2009 年 10 月
32. Watanabe, Y, Maehata, T, Toyota, M and Itoh, F. Usefulness of DNA Methylation Analysis Using Gastric Washes as a Treatment. AACR Cancer Epigenetics. PuertoRico, January, 2010.
33. 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 68 回日本癌学会学術集会 2009 年 10 月
34. 渡邊嘉行、山下真幸、伊東文生 新たな胃癌特異的メチル化遺伝子の網羅的解析 第 68 回日本癌学会学術集会 2009 年 10 月
35. 渡邊嘉行、前畑忠輝、伊東文生 胃洗浄液 MCAM による胃がん分子内視鏡診断 JDDW2009 2009 年 10 月
36. 山田泰広、波多野裕一郎、平田暁大、原 明 Role of epigenetic modifications in colon tumorigenesis. 第 68 回日本癌学会学術総会シンポジウム 2009 年 10 月
37. 山田泰広、波多野裕一郎、廣瀬善信、原 明 発がんにおけるエピジェネティック異常の意義 第 98 回日本病理学会総会ワークショップ 2009 年 5 月
38. Yamada, Y, Aoki, H, Kunisada, T and Hara, A. Tumor suppressor Rest promotes the early differentiation of embryonic stem cell. The 14th Korea-Japan Cancer Research Workshop “Translational cancer research and progress in colorectal cancer”. Kanazawa, December, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
    1. 金井弥栄、新井恵吏、長塩亮「Pyrosequencing 技術を用いて DNA メチル化状態を定量評価し肝細胞がんの発生リスクを評価する方法」(2010 年 5 月出願予定)
    2. 豊田 実、山本英一郎、神前正幸、鈴木 拓、山野泰穂. Method for detection of diseases using colonic mucosa. 出願先：米国、出願番号：61/238,106、平成 21 年 8 月 28 日出願
    3. 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

DNA メチル化異常のゲノム網羅的な解析とリスク診断・性質診断への応用

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

DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与するが、その誘発要因や誘発の分子機構に関しては不明の点が多い。今年度は、遺伝子のメチル化異常誘発の感受性には、正常細胞における低転写のみならず、特定のヒストン修飾および Pol II 結合が重要であることを示した。また、*H. pylori* 感染による胃粘膜での DNA メチル化異常誘発には、*H. pylori* 自体よりも炎症が重要であることを明らかにした。マイクロアレイによるゲノム網羅的 DNA メチル化解析に利用可能な定量的な指標を開発した。ヒト乳がんで CIMP と *HER2* 増幅の関連を見出した。神経芽細胞腫の予後診断は、前向き試験を継続した。

A. 研究目的

DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな修飾は、体細胞分裂に際して忠実に複製される。その異常は、がん抑制遺伝子の不活化やゲノム不安定性の誘発を通じて発がんに関与することが明らかとなっている。研究代表者は、DNA メチル化状態の違いに関するゲノム網羅的解析法である methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA)法を開発、本法は世界的に使用されてきた。

ゲノム網羅的な解析により見出された DNA メチル化異常が遺伝子プロモーター領域 CpG アイランド (CGI) に存在する場合、下流遺伝子のサイレンシングの原因となる。サイレンシングされる遺伝子には、がん化の原因として関与する遺伝子（ドライバー；主にごん抑制遺伝子）と、がん化の結果または随伴現象としてサイレンシングされた遺伝子（パッセンジャー）とが存在する。ドライバーの同定が重要なことは明らかであるが、パッセンジャーや、遺伝子サイレンシングの原因とはならない非プロモーター領域の DNA メチル化異常でも、診断的に有用な場合がある。

研究代表者は、ヒト胃がんの強力な誘発因子である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染者の胃粘膜では、高度の DNA メチル化異常が蓄積していること、その量は発がんリスクと相関することを示してきた。最近では、様々ながんで、非がん組織に蓄積した DNA メチル化異常が注目され、発がんリスク診断への応用が試みられている。また、DNA メチル化状態は遺伝子発現と比べて短期的変動が極めて少ないことを活用して、がんの悪性度・予後・治療感受性予測等の病態診断に用いることが出来る。研究代表者は、

複数の CGI がメチル化される性質 (CpG アイランドメチル化形質; CIMP) をもつ神経芽細胞腫は予後不良であることも示してきた。CIMP は、既知の予後マーカーを上回る信頼性を示す。

本研究では、(1) DNA メチル化異常の誘発機構を明らかにすること、(2) ゲノム網羅的な DNA メチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子のサイレンシングを含めて、がんでのエピジェネティック異常の全体像を明らかにすること、(3) がんの診断マーカーとして役立つ DNA メチル化変化を同定すること、を目的とする。

B. 研究方法

(1) スナネズミ、マウス、細胞株

スナネズミおよび Balb/c マウスは、日本クレアから購入した。ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与をうけた。

(2) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

ゲノム網羅的な DNA メチル化解析には、methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CGI マイクロアレイ法を使用した。MeDIP-CGI マイクロアレイ法においては、ゲノム DNA を抗 5-メチルシチジン抗体で免疫沈降したものを、ゲノム上の 34,697 カ所の CGI を搭載する DNA マイクロアレイにハイブリダイズさせ、独自に開発したアルゴリズムによりメチル化の程度を判定した。

(3) ゲノム領域特異的な DNA メチル化解析

非メチル化シトシンを特異的にウラシルに変換する bisulfite 処理の後、シークエンス法、Methylation-specific PCR (MSP)法、定量的 MSP 法により解析した。

#### (4) 遺伝子発現定量

領域特異的解析は定量的 RT-PCR 法により、ゲノム網羅的解析はマイクロアレイ法により行った。

#### (5) 蛋白質発現解析

Western blot 法により行った。

#### (6) クロマチン免疫沈降法

抗ヒストン H3Ac 抗体、H3K4me3 抗体、H3K9me3 抗体、H3K27me3 抗体、Pol II 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。ゲノム網羅的解析は CGI マイクロアレイを用いて行った。

#### (7) 予後解析

Kaplan-Meier 解析、Cox 比例ハザードモデルに基づく多変量解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

臨床材料は同意を得て採取した材料を、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審査委員会の承認を得て使用した。全ての動物実験は、国立がんセンターの動物実験倫理審査委員会の承認を得て、動物愛護に配慮して施行した。

### C. 研究結果

#### (1) DNA メチル化異常の誘発機構

昨年度までに、*H. pylori* 感染者の胃粘膜では特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されていること、特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発される機構として、低転写が DNA メチル化感受性に重要であることをゲノムレベルで明らかにしてきた。本年度はさらに、低転写の遺伝子の中でも DNA メチル化感受性と抵抗性が存在する機構を解析するため、転写活性型のヒストン修飾 2 個 (H3Ac, H3K4me3)、転写不活化型のヒストン修飾 2 個 (H3K9me3, H3K27me3)、および Pol II 結合について、前立腺および乳腺正常細胞における状態をゲノム網羅的に解析した。その結果、メチル化に抵抗性を示す遺伝子は有意に高レベルの転写活性型のヒストン修飾および結合した Pol II レベルを示すことを世界で初めて明らかとした。また、メチル化に高感受性を示す遺伝子は、有意に高レベルの H3K27me3 の修飾をもつことも確認された。多変量解析の結果、H3K27me3 修飾と Pol II 結合は他の因子と独立して DNA メチル化異常誘発の感受性に関与していることが示された。

*H. pylori* をスナネズミに感染させることにより、*H. pylori* 感染が DNA メチル化異常誘発の原因であることを証明した。更に、DNA メチル化異常誘発の機構として、菌自身と感染に由来する炎症のどちらが重要かを明らかにするために、スナネズミに *H. pylori* を感染させ、感染後 1 週から免疫抑制剤シクロスポリン A を飲水投与した。投与後 20 週において、シクロスポリン A 投与群の *H. pylori* の菌体数は非投

与と同程度あるいはそれ以上に認められたにも関わらず、胃粘膜での DNA メチル化異常は非投与に比べて劇的に少なかった。従って、*H. pylori* による DNA メチル化異常誘発には、菌自身ではなく、感染の結果誘発された炎症が重要であると考えられた。

潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて DNA メチル化異常による発がんの素地の有無を明らかにするため、AOM および DSS を投与したマウス大腸における腫瘍について網羅的 DNA メチル化解析を行い、メチル化が認められた 10 個の遺伝子について、DSS を投与したマウス大腸におけるメチル化レベルを定量的に解析した。その結果、4 個の遺伝子について経時的な DNA メチル化異常の亢進が認められ、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて DNA メチル化異常による発がんの素地が形成されていると考えられた。

#### (2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明

がんでのメチル化異常の全体像の解明において、定量的なゲノム網羅的解析技術の開発は重要である。本年度は、MeDIP-CGI マイクロアレイ法において、メチル化の程度の判定を可能とする指標 (Me Value) およびそれを導くアルゴリズムを開発した。この方法を用いて、4 種のヒト胃がん細胞株を解析したところ、CGI のうち 12-24% がメチル化していること、特に遺伝子のプロモーター領域の CGI では 7-13% がメチル化していることが明らかとなった。

#### (3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

がんの病態診断として、CIMP が *MYCN* 遺伝子増幅よりも神経芽細胞腫の予後と強く関連することを示してきた。昨年度までに、治療的応用の可能性を考え、DNA 脱メチル化剤と分化誘導剤の併用が、細胞株の増殖抑制と分化誘導に相乗的な効果をもつことを示した。また、臨床試験に際して得られる検体累積 95 例について CIMP の診断を行った。本年度も前向き試験を継続し、検体累積 173 例について CIMP の診断を行った。

*HER2* 増幅はヒト乳がんの重要な診断・治療標的であるが、DNA メチル化異常との関連は知られていない。そこでヒト乳がんメチル化異常を示す遺伝子として以前に同定した 11 個の遺伝子におけるメチル化レベルを乳がん 63 症例について定量的に解析した。その結果、CIMP が *HER2* 増幅と強く相関していることが明らかとなった。

### D. 考察

DNA メチル化異常の発がんへの深い関与を考えると、その誘発機構の解明は急務である。DNA メチル化異常誘発の標的遺伝子の決定機構については、遺伝子低転写に加えて、Pol II 結合が重要であることを世界で初めて明らかにした。最近報告のあった、H3K27me3 修飾が重要であることも確認できた。こ

れ以外に、ゲノムの構造も関与していることを示唆する結果が得られており、来年度には、さらに詳細が解明されることが期待できる。この機構はがん化に重要な遺伝子が不活化される機構として重要であるのみならず、メチル化プロファイル生成機構としても重要である。特定の発がん因子曝露によるメチル化プロファイル生成機構が解明できれば、分子疫学等への応用が期待できる。

DNA メチル化異常誘発に炎症が重要であることが明らかになったので、今後は関与する炎症成分の同定が重要な課題である。DSS を投与したマウス大腸で DNA メチル化異常が誘発されることが示されたので、各種炎症性サイトカイン等のノックアウトマウスを用いて同様の実験を行うことにより、DNA メチル化異常に重要な炎症成分が同定できると考えており、研究を進めている。

定量的なゲノム網羅的解析技術として開発した、MeDIP-CGI マイクロアレイ法における新規指標およびアルゴリズムは、各種研究における応用が期待できる。

DNA メチル化異常の診断的応用は、実用化段階を迎えている。神経芽細胞腫の予後診断は臨床応用に十分な精度があることがわかっており、前向き試験を継続している。

## E. 結論

発がん因子曝露による DNA メチル化異常誘発の標的遺伝子の決定機構については、遺伝子低転写に加えて、Pol II 結合が重要であることが、明らかになった。がんでの DNA メチル化異常は、がんの病態マーカーとして有用であり、実用化に向けた研究を進めている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Niwa, T, Tsukamoto, T, Toyoda, T, Mori, A, Tanaka, H, Maekita, T, Ichinose, M, Tatematsu, M and Ushijima, T. Inflammatory processes triggered by *H. pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.
2. Takeshima, H and Ushijima, T. Methylation Destiny: Moira Takes Account of Histones and RNA Polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
3. Ushijima, T and Asada, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
4. 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.
  5. 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, 2009.
  6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. Yamashita, S, Hosoya, K, Gyobu, K, Takeshima, H and Ushijima, T. Development of a novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis. **DNA Res**, 16: 275-286, 2009.
  10. Ushijima, T and Yamashita, S. Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). **Methods Mol Biol**, 507: 117-130, 2009.
  11. 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.
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. Ushijima, T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. 18th Cancer Research Institute cancer symposium on "DNA and Histone Methylation in Cancer". Seoul, June, 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. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. Epigenetics in Development and Diseases Conference: 4th Asian Epigenomics Meeting. Singapore, August, 2009.
  5. 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.
  6. Ushijima, T. The Role of Epigenetics in the Development of Gastric Cancer. SIDDS 2009. Seoul, November, 2009.
  7. Ushijima, T. Epigenetic Field Defect for Gastric Cancers. Guangzhou First International Symposium of Cancer Epigenetics. Guangzhou, November, 2009.
  8. Ushijima, T. Instructive induction of aberrant DNA methylation, and epigenomic analysis of its underlying mechanisms. Epigenetics 2009 Australian Scientific Meeting. Melbourne, December, 2009.
  9. Ushijima, T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. 第 68 回日本癌学会学術総会 international session 2009 年 10 月
  10. Ushijima, T. Unique Nature of Epigenetic Alterations: Epigenetic Field Defect and Instructive Induction. 第 68 回日本癌学会学術総会 Mauvernay 賞受賞講演 2009 年 10 月
  11. 牛島俊和、丹羽 透 *H. pylori* 感染に伴う慢性炎症による DNA メチル化異常誘発 第 51 回日本消化器病学会大会シンポジウム S9:炎症と消化器発癌 2009 年 10 月
  12. 牛島俊和 胃がんから消化器がんにおける DNA メチル化異常を考える 第 20 回日本消化器癌発生学会総会シンポジウム 2009 年 11 月
  13. Ushijima, T and Takeshima, H. Instructive induction of aberrant DNA methylation, and epigenomic analysis of its underlying mechanisms. 第 32 回日本分子生物学会年会シンポジウム 2009 年 12 月
- 4.
  - 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  
該当無し

分担研究報告書

諸臓器の前がん状態ならびにがんの臨床病理学的特性の基盤となる  
DNAメチル化異常の網羅的解析

研究分担者 金井弥栄 国立がんセンター研究所病理部 部長

研究要旨

本邦におけるヒト肝細胞がんの多くは、B型・C型肝炎ウイルス感染による慢性肝炎・肝硬変症を前がん状態とし、感染から長期間を経て発生する。適切な経過観察法の設定とがんの早期発見・治療のために、前がん状態における発がんリスク指標が求められている。本研究は、組織検体におけるゲノム網羅的DNAメチル化状態の解析に基づき、多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常の意義の理解を進めることを目的としている。本年度は特に、慢性肝炎・肝硬変症によって経過観察中の患者における発がんリスク評価指標の開発を行った。非肝細胞がん症例より得られた正常肝組織 (C)ならびに肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織 (N)において、BACアレイを基盤としたメチル化CpGアイランド増幅法(BAMCA法)によって既に同定した、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 (*Int J Cancer* 2009; 125: 2854-62) 上の203 *Xma* I/*Sma* I 認識部位におけるDNAメチル化状態を、パイロシークエンス法で定量的に再評価した。学習コホートのC (n=10)とN (n=12)の間で有意 ( $P<0.001$ )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NをC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N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 (n=47)においても感度・特異度とも100%でNを発がん高リスク状態にあると診断できた。パイロシークエ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、感度・特異度を向上させた発がんリスク指標を開発し得た。パイロシークエンス法は微量の断片化したDNAにも適用可能であることから、インターフェロン療法適応の決定のために採取される肝生検標本を用いた発がんリスク評価法として実用化し得ると期待される。

A. 研究目的

本研究は、組織検体におけるゲノム網羅的 DNAメチル化状態の解析に基づき、多段階発がん過程における DNAメチル化異常の意義の理解を進めることを目的としている。肝細胞がんについての解析には昨年度までに既に着手していたところであったが、本年度は特に、慢性肝炎・肝硬変症によって経過観察中の患者における発がんリスク評価指標の開発・改良を行った。

B. 研究方法

学習コホートとして、国立がんセンター中央病院における肝部分切除術標本より採取した、肝炎ウイルス感染がなく組織学的に特記すべき所見のない正常肝組織 10 検体 (C1~C10) (男性 7 例・女性 3 例、

平均年齢 (±SD) 58.4±9.7 歳、結腸がんの肝転移症例 9 例・消化管間質腫瘍の肝転移症例 1 例) ならびに肝細胞がん症例の非がん肝組織 12 検体 (N1~N12) (男性 9 例・女性 3 例、平均年齢 65.3(±6.4)歳、B型肝炎ウイルス感染症例 6 例・C型肝炎ウイルス感染症例 6 例、慢性肝炎 4 例・肝硬変 8 例) を解析に供した。

検証コホートとして、肝炎ウイルス感染がなく組織学的に特記すべき所見のない正常肝組織 25 検体 (C11~C35) (男性 20 例・女性 5 例、平均年齢 61.8±7.1 歳、結腸がんの肝転移症例 21 例・消化管間質腫瘍の肝転移症例 1 例・胃がんの肝転移症例 1 例・膵がんの肝転移症例 1 例・結腸カルチノイド腫瘍の肝転移症例 1 例) ならびに肝細胞がん症例の非がん肝組織 22 検体 (N13~N34) (男性 20 例・女性 2 例、

平均年齢 61.9±8.5 歳、B 型肝炎ウイルス感染症例 4 例・C 型肝炎ウイルス感染症例 16 例・肝炎ウイルス感染がない症例 2 例、慢性肝炎 13 例・肝硬変 9 例) を解析に供した。

比較のため、学習コホートならびに検証コホートと同一症例より採取した肝細胞がん組織 34 検体 (T1~T34) を解析に供した。さらに、肝炎ウイルス感染があるが肝細胞がんを発生していない症例の肝組織 14 検体 (V1~V14) (男性 6 例・女性 8 例、平均年齢 65.1±8.2 歳、結腸がんの肝転移症例 12 例・胃がんの肝転移症例 2 例) を解析に供した。

昨年度までの本研究で、bacterial artificial chromosome (BAC)アレイを用いたメチル化 CpG アイランド増幅 (BAMCA)法を用いて、前がん段階における発がんリスクマーカーとなる 25 の BAC クロウンを同定している。本年度は、この 25 の BAC クロウン上にあり、BAMCA 法で有効なシグナルとなる 2000bp 以下の PCR 産物を生ずる *Xma* I/*Sma* I 認識部位を含んだ 203CpG 部位において、パイロシーケンス法により個々の CpG 単位で DNA メチル化率を定量評価した。具体的には、新鮮凍結組織より高分子量の DNA をフェノール・クロロホルム法により抽出し、Epitect Bisulfite kit (キアゲン) を用いてバイサルファイト処理を行った。標的 CpG 部位に対する PCR プライマーならびにシーケンスプライマーは、Pyrosequencing Assay Design Software ver. 1.0 (キアゲン) を用いて設計した。Epitect methylated human control DNA (キアゲン) と Epitect unmethylated human control DNA (キアゲン) をそれぞれ陽性対照・陰性対照とし、PCR バイアスを排除するため全てのプライマーセットについて PCR 条件を最適化した。ピオチン化 PCR 産物をストレプトアビジンビーズを用いて精製し、パイロシーケンサ (Pyro Mark Q24、キアゲン社) を用いて定量的に解析した。

#### (倫理面への配慮)

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 (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。手術材料の残余の組織等の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し、文書で同意を得ている。試料の採取に当たっては、患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせなかった。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

BAMCA 法は染色体の広い領域の DNA メチル化状態を概括するのに適しているとされるが、本研究でもまず、BAMCA 法で肝発がんリスク指標として同定した代表的な BAC 領域において、BAMCA 法で有効に評価される 2000bp 程度以下の PCR 産物を生ずる全ての *Xma* I/*Sma* I 認識部位における DNA メチル化率を、パイロシーケンス法で定量的に再評価した。例えば BAC クロウン X において、BAMCA 法による蛍光強度比は肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において正常肝組織に比し有意に低値であり、肝細胞がん組織においてさらに有意に低値であった。パイロシーケンス法で解析した全 10 ケ所の CpG 部位の DNA メチル化率は、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において正常肝組織と同程度であるか有意に低値であり、肝細胞がん組織においてさらに低値であった。BAMCA 法が染色体の広い範囲で同期して起こる DNA メチル化の変化を検出し得ていることが確認された。BAC クロウン Y においては、BAMCA 法による蛍光強度比は肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において正常肝組織に比し有意に高値であった。パイロシーケンス法で解析した全 10 ケ所のうち 7 ケ所の CpG 部位において、DNA メチル化率は、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において正常肝組織に比して不変であり、残る 3 ケ所において非がん肝組織において極めて高値であった。再度、BAMCA 法の妥当性が検証された。

そこで、BAMCA 法で発がんリスク評価指標として同定した 25BAC 領域上の 203 *Xma* I/*Sma* I 認識部位について、DNA メチル化状態をパイロシーケンス法で評価したところ、59CpG 部位において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、DNA メチル化率が有意 ( $P < 0.001$ ) に異なっていた。再現性に優れた指標とするため、パイロシーケンス技術の特性に鑑み、平均 DNA メチル化率が 10%以下となる 14CpG 部位を診断指標の候補から除外した。残る 45CpG 部位を含む 30bp 以下の 30 領域を診断指標とした。30 領域それぞれに対して、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感度あるいは特異度 70%以上で区別できるように、DNA メチル化率のカットオフ値を設定した。さらに、30 領域のカットオフ値を組み合わせて発がんリスク評価指標を設定した。同指標を 15 領域以上で満たす場合に発がん高リスク群と診断するとすると、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%で正常肝組織から区別し、発がん高リスク状態にあると診断することができた。検証コホートの肝

細胞がん症例より得られた非がん肝組織も、感度・特異度とも 100%で正常肝組織から区別し、発がん高リスク状態にあると診断することができた。

発がんリスク評価指標となる 30 領域の内訳を見ると、特定の遺伝子のイントロン 15 領域 (そのうち第 1 イントロン 3 領域)、エクソン 3 領域、非翻訳領域 2 領域、非コード領域 9 領域となっており、特定の遺伝子のプロモーターには発がんリスク評価指標は 1 領域しか含まれていなかった。発がんリスク評価指標となる 30 領域のうち、11 領域は CpG アイランドに位置し、残る 19 領域は CpG アイランドに含まれなかった。

学習コホートならびに検証コホートの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織のうち、慢性肝炎を呈する非がん肝組織 ( $20.6 \pm 3.1$ ) と肝硬変症を呈する非がん肝組織 ( $22.9 \pm 3.8$ ) との間で、我々の診断基準を満たす領域数に有意な差を認めなかった ( $P=0.0525$ )。他方で、学習コホート・検証コホートとは別の、肝細胞がんを発症していない肝炎ウイルス感染症例より得られた肝組織 14 検体 (V1~V14) において、同様に 30 領域の DNA メチル化状態を評価した。V1~V14 において我々の診断基準を満たす領域数 ( $12.0 \pm 5.0$ ) は、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織 ( $21.7 \pm 3.6$ ) に比して有意に低値であった ( $P<0.0001$ )。

学習コホートならびに検証コホートの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織において、23 領域以上で我々の診断基準を満たす症例は、23 領域未満において我々の診断基準を満たす症例に比して、無再発生存率 ( $P=0.0023$ ) ならびに全生存率 ( $P=0.0015$ ) が有意に低値であった。

## D. 考察

パイロシークエンス法により BAMCA 法の妥当性が検証された。BAMCA 法では染色体の広い範囲で同期して起こる DNA メチル化の変化を有効に検出し得ていることがわかった。

BAMCA 法で既に同定していた、慢性障害肝における肝細胞がん発生のリスクを反映する 25BAC 領域にある個々の 203CpG 部位について、パイロシークエンス法によって DNA メチル化状態を定量的に再評価し、新たな発がんリスク評価指標を開発した。パイロシークエンス法により診断能力の高い CpG 部位を同定して指標に組み入れることにより、BAMCA 法に基づく従前の肝発がんリスク評価指標に比し、感度・特異度を向上させることができた。

新しい発がんリスク指標に用いられた 30 領域のうち、特定の遺伝子のプロモーター領域に存在するものは、1 領域に過ぎなかった。発がんリスクの段階では、がん関連遺伝子等のプロモーター領域そのものには DNA メチル化異常が未だ波及していないことは、了解可能である。発がんリスク評価指標とな

る CpG 部位は、従来看過されてきた CpG アイランド以外の領域、特にジーンボディーや非コード領域にも、多数存在することがわかった。従来の発がん過程における DNA メチル化研究の多くにおいては、網羅的解析法を用いていても、プロモーターアレイ等を用いることにより、解析対象とする染色体部位に偏りがあった。本研究の結果は、臨床的に有益な診断指標等を得るために、従来看過されてきた遺伝子のプロモーター領域等以外の染色体部位も、丹念に解析することが肝要である可能性を示唆している。

30 領域における DNA メチル化状態に関して、慢性肝炎を呈する非がん肝組織と、肝硬変症を呈する非がん肝組織との間で、有意な差を認めなかった。他方で、肝炎ウイルス感染を伴いながら肝細胞がんを発症していない症例の肝組織においては、我々の判定基準を満たす領域数は少数であった。これらの知見は、我々の診断基準が、単に肝炎ウイルス感染や、慢性肝炎・肝硬変症の段階における炎症や繊維化の程度を反映するのではなく、真に発がんリスクを反映する可能性を示唆している。

非がん肝組織における同定した 30 領域における DNA メチル化状態が、症例の予後と有意に相関したことから、症例の予後を規定する DNA メチル化プロファイルが、前がん段階において既に確立している可能性が示唆された。同定した 30 領域における DNA メチル化状態は、前がん段階で単に変化しているのではなく、臨床病理学的意義を有するので、前がん段階からの発がんリスク評価指標としても、妥当であると考えられた。

開発した発がんリスク評価指標により、肝炎ウイルスに感染しているが肝細胞がんを発症していない症例の一部が、肝発がん高リスク群に属すると判定されたが、これらの症例に対しては今後肝細胞がんを発症するか前向きに経過観察を行う予定である。

## E. 結論

慢性肝炎・肝硬変患者の組織検体で DNA メチル化指標を用いた発がんリスクの評価法を確立した。パイロシークエンス法は微量の断片化した DNA にも適用可能とみられ、インターフェロン療法適応の決定のために採取される肝生検標本を用いた発がんリスク評価法として、実用化し得ると期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. 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.
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 and 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 and Hebrok, M. Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. **Gastroenterology**, 5: 2304-2315, 2009.
  4. Sekine, S, Ogawa, R, Mcmanus, MT, Kanai, Y and Hebrok, M. Dicer is required for proper liver zonation. **J Pathol**, 219: 365-372, 2009.
  5. Sekine, S, Nakanishi, Y, Ogawa, R, Kouda, S and Kanai, Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. **Virchows Arch**, 454: 513-517, 2009.
  6. Akishima-Fukasawa, Y, Nakanishi, Y, Ino, Y, Moriya, Y, Kanai, Y and Hirohashi, S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. **Am J Clin Pathol**, 132: 202-210, 2009.
  7. Yamanashi, T, Nakanishi, Y, Fujii, G, Akishima-Fukasawa, Y, Moriya, Y, Kanai, Y, Watanabe, M and Hirohashi, S. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. **Oncology**, 77: 53-62, 2009.
  8. Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. **Cancer Sci**, 101: 36-45, 2010.
  9. Arai, E and Kanai, Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. **Epigenomics**, in press.
  10. Kanai, Y and Arai, E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. ed. Grisham, JW and Thorgeirsson, S. Springer, in press.
  11. Nishiyama, N, Arai, E, Chihara, Y, Fujimoto, H, Hosoda, F, Shibata, T, Kondo, T, Tsukamoto, T, Yokoi, S, Imoto, I, Inazawa, J, Hirohashi, S and Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. **Cancer Sci**, 101: 231-240, 2010.
  12. Okamura, J, Sekine, S, Nara, S, Ojima, H, Shimada, K, Kanai, Y and 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.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Saito, Y, Suzuki, H, Tsugawa, H, Nakagawa, I, Matsuzaki, J, Kanai, Y and 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.
- 2.学会発表
1. Kanai, Y. Epigenetic analyses in HCC. Basic workshop: Current Frontier in Genomic and Epigenetic Research on Liver Cancer. International Liver Cancer Association Third Annual Conference. Milan, September, 2009.
  2. 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 alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Denver, April, 2009.
  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 年 5 月
  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 年 6 月
  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 年 6 月
  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 年 10 月
  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 年 5 月
  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 年 10 月
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 年 10 月
  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 年 10 月
  11. Kanai, Y. DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer research and the Japanese Cancer Association “Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics”. Hawaii, February, 2010.
  12. Arai, E, Ushijima-Wakai, 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 renal tumors of various histological subtypes and nontumorous renal tissues. American Association for Cancer Research Special Conference on Cancer Epigenetics. Puerto Rico, January, 2010.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
金井弥栄、新井恵吏、長塩亮「Pyrosequencing 技術を用いて DNA メチル化状態を定量評価し肝細胞がんの発生リスクを評価する方法」(2010 年 5 月出願予定)
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。