

201007006A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成23年(2011)年 4月

目 次

I 総括研究報告

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

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 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野
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 国立がん研究センター中央病院消化管内視鏡科
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 国立がん研究センターがん予防・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
山道信毅 東京大学医学部附属病院消化器内科
6. 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（倫理委員会審査状況） 15
田中雅樹 静岡がんセンター内視鏡科

III 研究成果の刊行に関する一覧表 16

IV 研究成果の刊行物・別刷り

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 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 分野長

研究要旨

がん患者の非がん部には、既に DNA メチル化異常が蓄積しており、その量が発がんリスクと相関することがある（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ことを目的とした。今年度までに ESD 患者 829 例の登録を完了し、追跡を開始した。新規マーカー遺伝子として、今年度は、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い、胃がん患者で高度にメチル化される 7 遺伝子（*EMX1*、*miR-663*、*NKX6-1*、*OTP*、*OPLAH*、*CYP1B1*、*NEFM*）を同定した。単発胃癌 131 例、多発胃癌 22 例を用いた横断的メチル化解析により、前年度までに開発した *miR-124a-3*、及び、*NKX6-1* はオッズ比 6.1、3.6 で多発胃癌患者を同定できることを見出した。

研究分担者

中島 健 国立がん研究センター中央病院
内視鏡部・医員
島津 太一 国立がん研究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
山道 信毅 東京大学医学部附属病院
消化器内科・助教
田中 雅樹 静岡がんセンター
内視鏡科・副医長

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実現できると予測される。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される。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が予測可能か否か、前向き研究により明らかにすることを目的とした。

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。本研究の開始時に得られていた *FLNC* や *THBD*、前年度までに開発した *miR-124a-3* に加え、今年度は、さらに高いオッズ比を示す新規マーカーの分離を進めた。

A. 研究目的

早期胃がんに対する内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後、高頻度に異時性多発胃癌が発生する（年率 2.5%）ことが問題となっている。高頻度の多発の原因として、胃がん患者の非がん部胃粘膜には、*H. pylori* 感染により誘発された DNA メチル化異常が既に蓄積していること、*H. pylori* 感染陰性者では胃粘膜 DNA メチル化レベルは胃がんリスクと相関することを、申請者が見出した [Clin Cancer Res, 16:989, 2006; CEBP, 15:2317, 2006]。

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。したがって、エピジェネテ

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した。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、追跡を開始している（二次登録、目標 1000 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と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

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、抗メチル化 DNA 抗体による濃縮後、CpG アイランドアレイを用いた網羅的解析を行った。

(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している。DNA メチル化は、動物では生殖細胞系列で初期化されるものであり、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。

C. 研究結果

(1) 症例の登録状況

国立がん研究センター中央病院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、検体収集・データ管理を継続した。今年度までに、3 施設で ESD 患者 958 例 (国立がん研究センター中央病院 716 例、和歌山医大付属病院 96 例、東大病院 146 例) の症例登録 (一次登録) を終了した。外科切除追加症例、他臓器がん合併症例等を除外した後、829 例 (国立がん研究センター中央病院 633 例、和歌山医大付属病院 75 例、東大病院 121 例) を二次登録し、追跡を開始した。

当初の計画では、脱落症例の発生を考慮し、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 例の二次登録を目標とした。しかしながら、静岡がんセンターでは、倫理審査委員会での審査が、登録終了の 2 ヶ月前時点でも開始されず、症例登録を行わなかった。

現在、前年度までに開発した *miR-124a-3*、及び、今年度に開発した *EMX1*、*NKX6-1* について、観察開始時の横断的メチル化解析を行っている。

(2) 新規マーカー遺伝子

(a) 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い、胃がん患者の非がん部胃粘膜で高度にメチル化される 7 遺伝子 (*EMX1*、*miR-663*、*NKX6-1*、*OTP*、*OPLAH*、

CYP1B1、*NEFM*) を同定した。ピロリ菌現感染陰性の胃がん患者 21 例、及び健常者 14 例の胃粘膜で各遺伝子のメチル化レベルを測定し、ROC 曲線を描いたところ、7 遺伝子それぞれの AUC は、0.84、0.78、0.84、0.83、0.83、0.78、0.84 と高い正確度で胃がん患者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。

(b) 単発胃がん 131 例、多発胃がん 22 例を用いて横断的メチル化解析を行い、前年度までに開発した *miR-124a-3*、及び、上記の *NKX6-1* はオッズ比 6.1、3.6 で多発胃がん患者を単発胃がん患者から区別できることを見出した。

D. 考察

3 施設において順調に症例の登録が完了し、今年度までに 829 例の追跡を開始した。除菌後多発胃がんの発生率は年間 1.1-2.5% と報告されており、ハザード比 2.5 のマーカーが得られた場合、有意差を得るために最小限必要な症例数、720 例を超えている。今後、脱落症例を可能な限り少なくし、追跡を継続する。

現在、*miR-124a-3*、*EMX1*、及び *NKX6-1* について観察開始時の横断的メチル化解析を進めている。これにより、発がんリスク予測の基礎データを構築するのみならず、生活歴等との相関も解析可能となる。今後も、各種研究費の支援を求め、5 年間の追跡を完遂する予定である。

新規マーカー遺伝子として、DNA メチル化アレイを用いた網羅的解析により、健常者に比べて胃がん患者の非がん部胃粘膜で高度にメチル化される 7 遺伝子 (*EMX1*、*miR-663*、*NKX6-1*、*OTP*、*OPLAH*、*CYP1B1*、*NEFM*) を同定した。7 遺伝子のメチル化レベルを測定することにより、高い正確度で胃がん患者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。

本研究の単発胃がんと多発胃がんの比較は、健常者と胃がんの比較より難度が高い。しかし、*miR-124a-3*、及び *NKX6-1* はオッズ比 6.1、3.6 で多発胃がん患者を単発胃がん患者から区別できることから、有用性が示される可能性は十分に高いと考えている。単に有意差を示すのみでなく臨床で利用される高い感度と特異度を達成するために、さらに高いオッズ比を示す新規マーカーの分離を目指す。

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の登録・追跡を予定通り開始した。追跡継続により、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. Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S, Maekita T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. Alu and Satalpha hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. **Int J Cancer**, 128: 33-39, 2011.

本研究費に密接に関係するもの

1. Hur K, Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Tatematsu M, Yang HK and Ushijima T. Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of specific types of inflammation. **Carcinogenesis**, 32: 35-41, 2011.
2. Ushijima T and Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
3. Takeshima H and Ushijima T. Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
4. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.
5. Takachi R, Inoue M, Shimazu T, Sasazuki S, Ishihara J, Sawada N, Yamaji T, Iwasaki M, Iso H, Tsubono Y and Tsugane S. Consumption of sodium and salted foods in relation to cancer and cardiovascular disease: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. **Am J Clin Nutr**, 91: 456-464, 2010.
6. Sasazuki S, Inoue M, Sawada N, Iwasaki M, Shimazu T, Yamaji T and Tsugane S. Plasma levels of C-reactive protein and serum amyloid A and gastric cancer in a nested case-control study: Japan Public Health Center-based prospective study. **Carcinogenesis**, 31: 712-718, 2010.
7. Inoue I, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Niwa T, Deguchi H, Watanabe M, Enomoto S, Maekita T, Ueda K, Iguchi M, Yanaoka K, Tamai H, Arii K, Oka M, Fujishiro M, Takeshita T, Iwane M, Mohara O and Ichinose M. Elevated risk of colorectal adenoma with *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis: a population-based case-control study. **Int J Cancer**, in press.

8. 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, 2010.
9. Enomoto S, Yanaoka K, Utsunomiya H, Niwa T, Inada K, Deguchi H, Ueda K, Mukoubayashi C, Inoue I, Maekita T, Nakazawa K, Iguchi M, Arii K, Tamai H, Yoshimura N, Fujishiro M, Oka M and Ichinose M. Inhibitory effects of Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold et Zucc.; Ume) on *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. **Eur J Clin Nutr**, 64: 714-719, 2010.
10. Ono S, Fujishiro M, Kodashima S, Minatsuki C, Hirano K, Niimi K, Goto O, Yamamichi N and Koike K. Controversy on the management of anticoagulants and antiplatelet agents for scheduled endoscopy. **Dig Endosc**, 23: 1-4, 2011.
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. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Niimi K, Yamamichi N and Omata M. Feasibility of endoscopic submucosal dissection for patients with chronic renal failure on hemodialysis. **Dig Endosc**, 22: 45-48, 2010.
13. Niimi K, Fujishiro M, Kodashima S, Goto O, Ono S, Hirano K, Minatsuki C, Yamamichi N and Koike K. Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for colorectal epithelial neoplasms. **Endoscopy**, 42: 723-729, 2010.

2. 学会発表

1. Shigematsu Y, Niwa T, Ichinose M and Ushijima T. Current status of our research to identify CpG islands whose DNA methylation status is associated with the presence of lymph node metastases of gastric cancers. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar. Beijing, October, 2010.
2. Ando T, Asada K, Yoshida T, Sugiyama T and Ushijima T. Involvement of microRNA silencing in the formation of field defect for gastric carcinogenesis. 18th United European

Gastroenterology Week. Barcelona, October, 2010.

3. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T and Ushijima T. The presence of repetitive elements LINE and SINE confers susceptibility to aberrant DNA methylation induction. 5th Asian Epigenomics Meeting and A3 Symposium. Jeju, June, 2010.
4. Yamashita S, Gyobu K and Ushijima T. Identification of DNA methylation markers to predict metastasis of esophageal cancer by MeDIP-CpG island microarray analysis. 5th Asian

Epigenomics Meeting and A3 Symposium. Jeju, June, 2010.

5. Takeshima H, Yamashita S, Niwa T, Shimazu T and Ushijima T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Washington DC, April, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

分担研究報告書

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

研究分担者 牛島俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 分野長

研究要旨

がん患者の非がん部には既に DNA メチル化異常が蓄積しており、その量が発がんリスクと相関することがある（（エピジェネティックな発がんの素地））。胃癌では、早期胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後に、異時性多発胃癌の発生が多く、多数の患者の高頻度の経過観察が負担となっている。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ことを目的とした。今年度までに ESD 患者 829 例の登録を完了し、追跡を開始した。新規マーカー遺伝子として、今年度は、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い、胃癌患者で高度にメチル化される 7 遺伝子（*EMX1*、*miR-663*、*NKX6-1*、*OTP*、*OPLAH*、*CYP11B1*、*NEFM*）を同定した。単発胃癌 131 例、多発胃癌 22 例を用いた横断的メチル化解析により、前年度までに開発した *miR-124a-3*、及び、*NKX6-1* はオッズ比 6.1、3.6 で多発胃癌患者を同定できることを見出した。

A. 研究目的

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後、高頻度に異時性多発胃癌が発生する（年率 2.5%）ことが問題となっている。高頻度の多発の原因として、胃癌患者の非がん部胃粘膜には、*H. pylori* 感染により誘発された DNA メチル化異常が既に蓄積していること、*H. pylori* 感染陰性者では胃粘膜 DNA メチル化レベルは胃癌リスクと相関することを、申請者は見出した [Clin Cancer Res, 16:989, 2006; CEBP, 15:2317, 2006]。

エピジェネティックな発がんの素地は、胃癌のみならず、乳がん、大腸がん、食道がん、肝がん、腎がん等でも認められることが、複数の研究者によりこれまでに示された。したがって、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実現できると予測される。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される。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が予測可能か否か、前向き研究により明らかにすることを目的とした。

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。本研究の開始時に得られていた *FLNc* や *THBD*、前年度までに開発した *miR-124a-3* に加え、今年度は、さらに高いオッズ比を示す新規マーカーの分離を進めた。

B. 研究方法

(1) 前向き試験

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

(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

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、抗メチル化 DNA 抗体による濃縮後、CpG アイランドアレイを用いた網羅的解析を行った。

（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している。DNA メチル化は、動物では生殖

細胞系列で初期化されるものであり、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。

C. 研究結果

(1) 前向き試験

今年度までに 829 例の登録を完了し、追跡を開始した。3 施設で観察開始時の DNA メチル化レベル測定用の DNA を抽出し、*Bam*HI 制限酵素処理、及び重亜硫酸ナトリウム処理を行った。現在、前年度までに開発した *miR-124a-3*、及び、今年度に関した *EMX1*、*NKX6-1* について、観察開始時の横断的メチル化解析を行っている。

(2) 新規マーカー遺伝子

(a) 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い、胃癌患者の非がん部胃粘膜で高度にメチル化される 7 遺伝子 (*EMX1*、*miR-663*、*NKX6-1*、*OTP*、*OPLAH*、*CYP1B1*、*NEFM*) を同定した。ピロリ菌感染陰性の胃癌患者 21 例、及び健常者 14 例の胃粘膜で各遺伝子のメチル化レベルを測定し、ROC 曲線を描いたところ、7 遺伝子それぞれの AUC は、0.84、0.78、0.84、0.83、0.83、0.78、0.84 と高い正確度で胃癌患者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。

(b) 単発胃癌 131 例、多発胃癌 22 例を用いて横断的メチル化解析を行い、前年度までに開発した *miR-124a-3*、及び、上記の *NKX6-1* はオッズ比 6.1、3.6 で多発胃癌患者を単発胃癌患者から区別できることを見出した。

D. 考察

3 施設において順調に症例の登録が完了し、今年度までに 829 例の追跡を開始した。現在、*miR-124a-3*、*EMX1*、及び *NKX6-1* について観察開始時の横断的メチル化解析を進めている。これにより、発がんリスク予測の基礎データを構築するのみならず、生活歴等との相関も解析可能となる。今後も、各種研究費の支援を求め、5 年間の追跡を完遂する予定である。

新規マーカー遺伝子として、DNA メチル化アレイを用いた網羅的解析により、健常者に比べて胃癌患者の非がん部胃粘膜で高度にメチル化される 7 遺伝子 (*EMX1*、*miR-663*、*NKX6-1*、*OTP*、*OPLAH*、*CYP1B1*、*NEFM*) を同定した。7 遺伝子のメチル化レベルを測定することにより、高い正確度で胃癌患者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。

本研究の単発胃癌と多発胃癌の比較は、健常者と胃癌の比較より難度が高いが、*miR-124a-3*、及び *NKX6-1* はオッズ比 6.1、3.6 で多発胃癌患者を単発胃癌患者から区別できることを示した。臨床で

利用される高い感度と特異度を達成するために、さらに高いオッズ比を示す新規マーカーの分離を目指す。

E. 結論

非がん部胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常量による発がんリスク診断前向き試験のための症例の登録・追跡を予定通り開始した。追跡継続により、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. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S, Maekita T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. Alu and Satalpha hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. **Int J Cancer**, 128: 33-39, 2011.

本研究費に密接に関係するもの

1. Hur K, Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Tatematsu M, Yang HK and Ushijima T. Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of specific types of inflammation. **Carcinogenesis**, 32: 35-41, 2011.
2. Ushijima T and Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
3. Takeshima H and Ushijima T. Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
4. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.

2. 学会発表

1. Shigematsu Y, Niwa T, Ichinose M and Ushijima T. Current status of our research to identify CpG islands whose DNA methylation status is associated with the presence of lymph node metastases of gastric cancers. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar. Beijing, October, 2010.
2. Ando T, Asada K, Yoshida T, Sugiyama T and Ushijima T. Involvement of microRNA silencing in the formation of field defect for gastric carcinogenesis. 18th United European

- Gastroenterology Week. Barcelona, October, 2010.
3. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T and Ushijima T. The presence of repetitive elements LINE and SINE confers susceptibility to aberrant DNA methylation induction. 5th Asian Epigenomics Meeting and A3 Symposium. Jeju, June, 2010.
 4. Yamashita S, Gyobu K and Ushijima T. Identification of DNA methylation markers to predict metastasis of esophageal cancer by MeDIP-CpG island microarray analysis. 5th Asian Epigenomics Meeting and A3 Symposium. Jeju, June, 2010.
 5. Takeshima H, Yamashita S, Niwa T, Shimazu T and Ushijima T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Washington DC, April, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

分担研究報告書

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

研究分担者 中島 健 国立がん研究センター中央病院消化管内視鏡科 医師

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、2010 年 7 月末をもって登録を終了した。最終的に合計 716 名を登録し 633 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）

国立がん研究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。2011 年 7 月末時点で登録を終了し、716 名を登録し、633 名が追跡観察群にエントリーした。79 名が追加外科切除等を理由に脱落した（4 人は経過観察が保留になっている）。

D. 考察

最終登録数 716 名は当初の当院での目標登録数 800 人に若干少ないが、新規の有望なリスクマーカーも見出されており、研究全体には問題ないと考える。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、最終的には 600 以上の患者を経過観察にエントリーできている。今後、研究からの脱落がないように経過観察を継続する。

F. 研究発表

1.論文発表

本研究費に謝辞があるもの
なし

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

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 国立がん研究センターがん予防・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。今年度は、血清検体を用い抗ヘリコバクター・ピロリ抗体価、ペプシノーゲン I・II、高感度 CRP、血清アミロイド A の測定をおこなった。今後、胃粘膜 DNA メチル化レベルの解析をおこない、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

健常者においてはヘリコバクター・ピロリ菌（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、血清マーカー（ペプシノーゲン、抗 HP 抗体価、炎症マーカーなど）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 ヶ所より採取する。

(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。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いる。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。これらを持ちいて血清 HP 抗体価、ペプシノーゲン値、高感度 CRP、血清アミロイド A 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した。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

研究参加への同意を得た 300 名のうち血清検体が利用できたのは、279 名 (93%)、HP 除菌後再受診した 110 名のうち 81 名 (74%) から除菌後の血清の提供を受けた。除菌前後のペアで血清検体が得られたのは 78 名であった。

血清検体が利用できた 279 名において抗 HP 抗体陽性 ($\geq 10U/ml$) は 40%、ペプシノーゲン陽性 (ペプシノーゲン I $\leq 70ng/ml$ かつペプシノーゲン I/II 比 ≤ 3) は 14% であった。また、高感度 CRP の血清濃度中央値 (四分位範囲) は、0.018 (0.005-0.045) mg/dl、血清アミロイド A は 4.26 (2.38-7.26) $\mu g/ml$ であった。HP 現感染陽性者では、抗 HP 抗体陽性は 96%、ペプシノーゲン陽性は 32%、高感度 CRP の血清濃度中央値 (四分位範囲) は、0.022 (0.008-0.056) mg/dl、血清アミロイド A は、3.95 (2.28-7.26) $\mu g/ml$ であった。一方、HP 現感染陰性者では、抗 HP 抗体陽性は 1%、ペプシノーゲン陽性は 2%、高感度 CRP の血清濃度中央値 (四分位範囲) は、0.016 (0.003-0.039) mg/dl、血清アミロイド A は 4.41 (2.43-7.16) $\mu g/ml$ であった。

除菌後の検体 (n=81) では、血清濃度中央値 (四分位範囲) は、高感度 CRP で 0.023 (0.011-0.041) mg/dl、血清アミロイド A で 3.93 (2.60-6.79) $\mu g/ml$ 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。生活習慣関連情報に血清データを加えることにより、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にてより詳細に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、血液検体の測定をおこなった。今後、胃粘膜 DNA メチル化レベルの解析をおこない、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. Takachi R, Inoue M, Shimazu T, Sasazuki S, Ishihara J, Sawada N, Yamaji T, Iwasaki M, Iso H, Tsubono Y and Tsugane S. Consumption of sodium and salted foods in relation to cancer and cardiovascular disease: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr*, 91: 456-464, 2010.
2. Sasazuki S, Inoue M, Sawada N, Iwasaki M, Shimazu T, Yamaji T and Tsugane S. Plasma levels of C-reactive protein and serum amyloid A and gastric cancer in a nested case-control study: Japan Public Health Center-based prospective study. *Carcinogenesis*, 31: 712-718, 2010.

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 7 月 31 日時点で一次登録 96 例の登録 二次登録 75 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との相関を解析する。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。

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。

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 7 月 31 日まで）。

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

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。

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 7 月 31 日時点で 49-81 歳の当研究の適格症例 126 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 23 年 7 月 31 日時点で適格症例 126 例から検体・同意書などが得られた 96 例の一次登録が完了した。除外基準該当として 6 例外科転科 3 例転院 3 例除菌不成功 1 例他疾患で死亡 8 例除菌判定前を除く 75 例が二次登録を完了した。今後除菌前症例を順次除菌治療し成功なら登録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が構築された。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ている。

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、登録症例の追跡が肝要であると考えられる。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、二次登録の多くが完了している。今後、追跡調査に注力する予定である。

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. Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S, Maekita T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. Alu and Satalpha hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. *Int J Cancer*, 128: 33-39, 2010.
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, 2010.
3. Enomoto S, Yanaoka K, Utsunomiya H, Niwa T, Inada K, Deguchi H, Ueda K, Mukoubayashi C, Inoue I, Maekita T, Nakazawa K, Iguchi M, Aarii K, Tamai H, Yoshimura N, Fujishiro M, Oka M and Ichinose M. Inhibitory effects of Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold et Zucc.; Ume) on *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. *Eur J Clin Nutr*, 64: 714-719, 2010.
4. Inoue I, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Niwa T, Deguchi H, Watanabe M, Enomoto S, Maekita T, Ueda K, Iguchi M, Yanaoka K, Tamai H, Aarii K, Oka M, Fujishiro M, Takeshita T, Iwane M, Mohara O and Ichinose M. Elevated risk of colorectal adenoma with *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis: a population-based case-control study. *Int J Cancer*, in press.

2. 学会発表

該当無し

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 東京大学医学部附属病院消化器内科 助教 山道信毅

研究要旨

東京大学医学部附属病院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にて承認された2008年12月以降、外来経過観察中のESD治療後患者と新規にESDを行う患者の全例登録を目指し、2010年7月末の症例登録完了時点で146人の症例登録が得られた。その後、2011年3月末時点での当院の継続観察者は121名である。今後5年間、脱落症例を限りなく少なくするように、経過観察を行なう予定である。

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

登録該当症例を以下のパターン1～4に分類した。

- 1：登録時にESD治療後、除菌すみの症例
- 2：登録時にESD治療後、除菌未の症例
- 3：登録時にESD治療前、除菌未の症例
- 4：登録時にESD治療前、除菌すみの症例

患者の同意を得られ、症例登録の得られたのは150名であったが、そのうち4名は年齢などからもとの適応外であり、症例登録は146名であった。このうち、25名が以下の理由で脱落した。

脱落理由内訳	
抗血小板・抗凝固薬を止められない	2
他院でのフォロー	11
ランサップ副作用	1
患者拒否	1
病状理由（他の癌が見つかった等）	7
Drop	3
合計	29

現在、観察継続しているのは以下121名である。

	全	男	女
観察継続数	121	99	22
パターン1	64	54	10
パターン2	6	3	3
パターン3	36	30	6
パターン4	15	12	3
年齢：歳	45～79	53～78	45～79
平均	67.14	66.93	68.13
標準偏差	6.50	6.27	7.59
まとめ	67.1±13.0	66.9±12.6	68.1±15.2

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希望しない患者が多い点が症例集積には不利な点であるが、2011年3月現在で継続観察をしている症例が121名となっている。症例集積は既に完了しているが、今後も引き続き、脱落症例を可能な限り少なくすべく、努力してゆく予定である。

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、2010年7月末の症例登録完了時点で146人の症例登録が得られた。その後、2011年3月末時点での当院の継続観察者は121名である。今後5年間、脱落症例を限りなく少なくするように、経過観察を行なう予定である。

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. 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.

2. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Niimi K, Yamamichi N and Omata M. Feasibility of endoscopic submucosal dissection for patients with chronic renal failure on hemodialysis. **Dig Endosc**, 22: 45-48, 2010.
3. Niimi K, Fujishiro M, Kodashima S, Goto O, Ono S, Hirano K, Minatsuki C, Yamamichi N and Koike K. Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for colorectal epithelial neoplasms. **Endoscopy**, 42: 723-729, 2010.
4. Ono S, Fujishiro M, Kodashima S, Minatsuki C, Hirano K, Niimi K, Goto O, Yamamichi N and Koike K. Controversy on the management of anticoagulants and antiplatelet agents for scheduled endoscopy. **Dig Endosc**, 23: 1-4, 2011.

2.学会発表

該当無し

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（倫理委員会審査状況）

研究分担者 田中雅樹 静岡がんセンター内視鏡科 副医長

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。当センターの倫理審査委員会に、2009 年 7 月に研究許可申請書を提出し、2009 年 11 月に予備審査を終了した。その後、対象症例を把握し、登録手順等を整え、本審査の開催を待った。しかしながら 2010 年 5 月、本研究の登録終了まで 2 ヶ月となっても倫理審査委員会の事情により本審査が開催されず、登録期間が非常に短くなったため、症例登録することが出来なかった。

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）

当センター倫理審査委員会に研究許可申請書を提出し、2009 年 11 月予備審査を終了した。しかしながら、本研究の登録終了近くになっても本審査が開催されなかった。

C. 研究結果

倫理審査委員会の予備審査終了後、対象症例の把

握、登録手順の整備を行い、本審査の開催を待った。しかしながら、本研究の登録終了近くになっても本審査が開催されず、登録期間が非常に短くなったため、症例登録することが出来なかった。

D. 考察

無し

E. 結論

登録可能期間が非常に短くなったため、最終的に症例登録することが出来なかった。

F. 研究発表

1.論文発表

無し

2.学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当無し

書籍

該当無し

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
Yoshida T, Ushijima T, et al.	Alu and Satalpha hypomethylation in <i>Helicobacter pylori</i> -infected gastric mucosae.	Int J Cancer	128	33-39	2011
Hur K, Ushijima T, et al.	Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of specific types of inflammation.	Carcinogenesis	32	35-41	2011
Ushijima T and Asada K.	Aberrant DNA methylation in contrast with mutations.	Cancer Sci	101	300-305	2010
Takehisa H and Ushijima T.	Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II.	Epigenetics	5	89-95	2010
Niwa T, Ichinose M, Ushijima T, et al.	Inflammatory processes triggered by <i>Helicobacter pylori</i> infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells.	Cancer Res	70	1430-1440	2010
Takachi R, Shimazu T, et al.	Consumption of sodium and salted foods in relation to cancer and cardiovascular disease: the Japan Public Health Center-based Prospective Study.	Am J Clin Nutr	91	456-464	2010
Sasazuki S, Shimazu T, et al.	Plasma levels of C-reactive protein and serum amyloid A and gastric cancer in a nested case-control study: Japan Public Health Center-based prospective study.	Carcinogenesis	31	712-718	2010
Inoue I, Ichinose M, et al.	Elevated risk of colorectal adenoma with <i>Helicobacter pylori</i> -related chronic gastritis: a population-based case-control study.	Int J Cancer			in press
Yanaoka K, Ichinose M, et al.	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	2010
Enomoto S, Ichinose M, et al.	Inhibitory effects of Japanese apricot (<i>Prunus mume</i> Siebold et Zucc.; Ume) on <i>Helicobacter pylori</i> -related chronic gastritis.	Eur J Clin Nutr	64	714-719	2010
Ono S, Yamamichi N, et al.	Controversy on the management of anticoagulants and antiplatelet agents for scheduled endoscopy.	Dig Endosc	23	1-4	2011
Goto O, Yamamichi N, et al.	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
Goto O, Yamamichi N, et al.	Feasibility of endoscopic submucosal dissection for patients with chronic renal failure on hemodialysis.	Dig Endosc	22	45-48	2010
Niimi K, Yamamichi N, et al.	Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for colorectal epithelial neoplasms.	Endoscopy	42	723-729	2010

Alu and Sat α hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae

Takeichi Yoshida^{1,2}, Satoshi Yamashita¹, Takeji Takamura-Enya³, Tohru Niwa¹, Takayuki Ando¹, Shotaro Enomoto², Takao Maekita², Kazuyuki Nakazawa², Masae Tatematsu⁴, Masao Ichinose² and Toshikazu Ushijima¹

¹Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, Chuo-ku, Tokyo, Japan

²Second Department of Internal Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama City, Wakayama, Japan

³Department of Applied Chemistry, Kanagawa Institute of Technology, Atsugi City, Kanagawa, Japan

⁴Division of Oncological Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya City, Aichi, Japan

Global hypomethylation and regional hypermethylation are supposed to be hallmarks of cancer cells. During gastric carcinogenesis, in which *Helicobacter pylori* infection is causally involved, aberrant hypermethylation is already present in *H. pylori*-infected gastric mucosae. In contrast, little is known about global hypomethylation, which can be caused by hypomethylation of individual repetitive elements and other sequences. We, therefore, investigated hypomethylation of individual repetitive elements and the global 5-methylcytosine content in four groups of gastric mucosal samples that represented the time course of *H. pylori* infection and gastric carcinogenesis [gastric mucosae of *H. pylori*-negative healthy volunteers (G1, n = 34), *H. pylori*-positive healthy volunteers (G2, n = 42), *H. pylori*-positive gastric cancer patients (G3, n = 34) and *H. pylori*-negative gastric cancer patients (G4, n = 20)] and 52 primary gastric cancers. Major variants of Alu, LINE1 and Sat α were identified, and their methylation levels were quantified by bisulfite pyrosequencing. Compared with G1, the Alu methylation level was decreased in G2, G3, G4 and cancers (89.2–97.1% of that in G1, $p < 0.05$). The Sat α methylation level was decreased in G2 (91.6%, $p < 0.05$) and G3 (94.3%, $p = 0.08$) but not in G4 and cancers. The LINE1 methylation level was decreased only in cancers. The 5-methylcytosine content was at similar levels in G2, G3 and G4 and highly variable in cancers. These results showed that Alu and Sat α hypomethylation is induced in gastric mucosae by *H. pylori* infection during gastric carcinogenesis, possibly in different target cells, and that global hypomethylation is not always present in human gastric cancers.

Global hypomethylation and regional hypermethylation are supposed to be hallmarks of cancer cells.¹ Global hypomethylation, defined as the content of 5-methylcytosine in the genome,² is considered to be due to hypomethylation of repetitive elements, which are normally heavily methylated,³ and other sequences. Global hypomethylation is known to cause chromatin decondensation that results in chromosomal instability and cancer development.^{4–7} In addition, hypomethylation of repetitive elements is associated with its elevated transcription,⁸ and that of normally methylated promoter CpG islands can lead to elevated expression of tumor antigens and possible oncogenes.^{8–10} On the other hand, hypermethylation is observed in normally unmethylated promoter CpG islands

and silences downstream genes, including tumor suppressor and other passenger genes.¹¹

Hypermethylation of CpG islands can be present not only in cancers but also in noncancerous tissues.¹² Especially in gastric mucosae, aberrant DNA hypermethylation is induced by *Helicobacter pylori* infection, a major cause of gastric cancers.^{13,14} The methylation levels of CpG islands are very low in gastric mucosae of *H. pylori*-negative healthy individuals (G1; incidence of gastric cancers = 0.03% per year or less¹⁵). They are very high in gastric mucosae of *H. pylori*-positive healthy individuals (G2; incidence = 0.14%¹⁶) and in noncancerous gastric mucosae of *H. pylori*-positive gastric cancer patients (G3; incidence of secondary gastric cancer = 4.1%¹⁷). They are high but lower than in G2 and G3 in noncancerous gastric mucosae of *H. pylori*-negative gastric cancer patients (G4; incidence = 6.2%¹⁸). *H. pylori* infection is known to disappear when severe gastric atrophy is induced as a result of chronic *H. pylori* infection,^{19–22} and the four groups, G1–G4, are considered to represent the natural history of *H. pylori* infection. Methylation levels correlate with gastric cancer risk only in *H. pylori*-negative individuals,^{13,14} suggesting that methylation levels in these individuals reflect the degree of epigenetic damage in stem cells.^{23,24}

In contrast, global hypomethylation during gastric carcinogenesis remains unclear, not only when but also where in the genome it takes place. Major normally methylated repetitive elements consist of Alu, LINE1 and Sat α , which

Key words: hypomethylation, repeat sequence, gastric cancer, *Helicobacter pylori*, carcinogenesis

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

DOI: 10.1002/ijc.25534

History: Received 16 Mar 2010; Accepted 14 Jun 2010; Online 2 Jul 2010

Correspondence to: Toshikazu Ushijima, Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan, Tel.: [+81 3 3547 5240], Fax: +[81 3 5565 1753], E-mail: tushijim@ncc.go.jp

constitute 10, 17 and 4% of the genome, respectively,^{25–27} and collectively cover over 30% of the total CpG sites in the genome.^{28,29} Alu and LINE1 belong to interspersed elements,²⁵ and Sat α is a tandem repeat element^{30,31} confined to the centromeres.³² Hypomethylation of Sat α is known to be induced by loss-of-function mutations of DNA methyltransferase 3B.³³ As a fundamental basis to understand gastric carcinogenesis, we have to clarify whether or not hypomethylation is present in *H. pylori*-infected gastric mucosae and, if present, which repetitive elements or global 5-methylcytosine content are mainly affected.

In this study, we aimed to clarify these issues. To this end, we first identified major variants of Alu, LINE1 and Sat α , and then measured their methylation levels by bisulfite pyrosequencing of DNA from gastric mucosal samples of G1, G2, G3 and G4 and gastric cancer tissues.

Material and Methods

Tissue samples

Gastric mucosae were collected by endoscopic biopsy of the antral region in 34 *H. pylori*-negative (G1: 16 male and 18 female; average age = 51 years, range = 25–91 years) and 42 *H. pylori*-positive healthy volunteers (G2: 21 male and 21 female; average age = 57 years, range = 23–86 years; 19 with gastric atrophy and 23 without; nine with gastric ulcers, eight with duodenal ulcers and three with hyperplastic polyps) and noncancerous gastric mucosae from 34 *H. pylori*-positive (G3: 26 male and 8 female; average age = 68 years, range = 39–87 years; 23 early cancers and 11 advanced cancers) and 20 *H. pylori*-negative gastric cancer patients (G4: 15 male and 5 female; average age = 69 years, range = 38–84 years; 17 early cancers and three advanced cancers). Gastric cancer tissues were obtained from 52 gastric cancer patients (cancers: 52 male; average age = 60 years, range = 29–84 years) who underwent gastrectomy. Informed consents were obtained from all the individuals. Gastric mucosae, noncancerous gastric mucosae and cancer tissues were frozen in liquid nitrogen immediately after biopsy or resection and stored at -80°C until extraction of genomic DNA.

All cancer tissues were histologically diagnosed according to the Japanese classification of gastric carcinoma³⁴ and were classified according to the Lauren classification system (11 intestinal and 41 diffuse types).³⁵ *H. pylori* infection status was detected by use of a serum anti-*H. pylori* IgG antibody test (SRL, Tokyo, Japan).

Cell lines and DNA extraction

Six gastric cancer cell lines, AGS, KATOIII, MKN28, MKN45, MKN74 and NUGC3, were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan) and the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Three gastric cancer cell lines, HSC39, HSC44 and HSC57, were gifted by Dr. K. Yanagihara, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan. TMK1 was gifted by Dr. W. Yasui, Hiroshima University, Hiroshima, Japan. High molecular weight DNA was extracted by the phenol/chloroform method.

Sequencing analysis of repetitive DNA elements

Genomic DNA of a human gastric cancer cell line (AGS) was amplified by PCR with the primers for the three repetitive DNA elements (Supporting Information Table 1): Alu (AluSp from the database of the Genetic Information Research Institute: <http://www.girinst.org/>), LINE1 (X58075) and Sat α (M38468). The PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI), and 12–41 clones for each repetitive DNA element were cycle sequenced. Sequencing was performed using a DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Sodium bisulfite modification and bisulfite pyrosequencing

Bisulfite modification was performed using 1 μg of *Bam*HI-digested genomic DNA as previously described.³⁶ The modified DNA was suspended in 40 μl of Tris-EDTA buffer, and an aliquot of 1 μl was used for bisulfite pyrosequencing. An annealing temperature that could amplify both unmethylated and methylated DNAs was determined by comparing amplification of DNA from peripheral leukocytes (mixture of unmethylated and methylated DNA) and DNA that was fully methylated by *Sss*I methylase (New England Biolabs, Beverly, MA) (Supporting Information Table 2). The PCR product was annealed to 0.2 μM pyrosequencing primers, and pyrosequencing was carried out using the PSQ 96 Pyrosequencing System (Qiagen, Valencia, CA). A methylation level was obtained using PSQ Assay Design software (Qiagen). Two CpG sites (ALU1 and ALU2) were measured for Alu, three for LINE1 (LINE1-1, LINE1-2 and LINE1-3) and one for Sat α (SAT α).

Analysis of the global 5-methylcytosine content

Genomic DNA (2.5 μg) was incubated with five units of DNase I (Sigma, St. Louis, MO) and 4 mM MgCl_2 at 37°C for 18 hr. The sample was further treated with three units of nuclease P1 in 10 mM NaAc (pH 5.2) and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnSO_4 at 37°C for 7 hr and then with 2.5 units of *Escherichia coli* alkaline phosphatase in 0.1 M NH_4HCO_3 at 37°C for 16 hr. After purification, the samples were subjected to liquid chromatography equipped with a photodiode array detector and an electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (LCMS; LCT premier XE, Waters). Peaks of the four deoxyribonucleotides (2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytidine (dC) and thymidine) were monitored with UV 260 nm, whereas that of 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) was detected by a molecular ion of 242 [M+1], retention times of which were compared with that of the authentic sample. Global 5-methylcytosine content was quantified as the fraction of 5mdC quantity in the total 5mdC and dC quantity. The LCMS analysis was performed three times for each sample, and the mean coefficient of variation was confirmed to be less than 3%. Eight of the samples were also subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC)-UV.