

cell renal cell carcinomas. **Carcinogenesis**, 33: 1487-1493, 2012.

本研究費に密接に関係するもの

1. Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Tsugawa H, Hibino S, Kanai Y, Saito H and Hibi T. The tumor suppressor *microRNA-29c* is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. **Int J Cancer**, 132: 1751-1760, 2013.
 2. Kanai Y and Arai E. DNA methylation alterations in human cancers. In: Tollesbol T (ed), *Epigenetics in Human Disease*. Amsterdam, Elsevier, 29-52, 2012.
 3. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H and Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. **PLoS One**, 7: e43403, 2012.
- 2.学会発表
1. Kanai Y, Shibata T, Ito T, Suzuki Y, Yamashita S, Tian Y, Gotoh M, Ojima H and Arai E. Standard epigenome analysis in digestive organs and research applications to multistage hepatocarcinogenesis. International Human Epigenome Consortium 2012. Seoul, September 2012 (invited).
 2. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage hepatocarcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop. Busan, November-December 2012 (invited).
 3. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. Ninth American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference. Hawaii, February 2013.
 4. Arai E, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H and Kanai Y. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. Ninth American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, February 2013.
 5. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Gotoh M, Mori T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T and Kanai Y. Multilayer-omics (whole-exome, methylome and transcriptome) analysis identifies the Wnt/ β -catenin pathway as a key player in the development of renal cell carcinoma. 103rd American Association of Cancer Research Annual Meeting. Washington DC, April 2013.
 6. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stage cluster lung adenocarcinomas into subclusters associated with carcinogenetic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. 103rd American Association of Cancer Research Annual Meeting. Washington DC, April 2013.
 7. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit. Thailand, 2013 (invited).
 8. 新井恵吏, 坂本裕美, 市川 仁, 戸塚裕彦, 後藤政広, 森 泰昌, 大浪澄子, 中川 徹, 藤元博行, 王 凌華, 油谷浩幸, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎臓明細胞がんにおける多層的オミックス (エクソーム・メチローム・トランスクリプトーム) 解析. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
 9. 佐藤 崇, 新井恵吏, 河野隆志, 後藤政広, 渡辺俊一, 副島研造, 別役智子, 金井弥栄. 前がん段階における DNA メチル化異常が肺腺がんの悪性度と予後を規定する. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
 10. 西山直隆, 新井恵吏, 長塩 亮, 藤元博行, 細田文恵, 柴田龍弘, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 金井弥栄. 尿路上皮がんにおけるゲノム構造異常: 臨床病理学的意義ならびに DNA メチル化異常との関係. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

分担研究報告書

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

研究分担者 鈴木 拓 札幌医科大学分子生物学講座 教授

研究要旨

本研究ではゲノムワイドなメチル化解析を行い、がんにおける DNA メチル化の役割を明らかにすることを目的とする。本年度は、大腸がんおよび前がん病変におけるゲノム・エピゲノム解析を行い、メチル化異常が大腸発がんの早期から発生することを明らかにした。非浸潤性大腸がんと浸潤性大腸がんの DNA メチル化を比較することで、がん浸潤と相関する遺伝子メチル化を同定した。さらに大腸がんにおいてメチル化する long noncoding RNA 遺伝子を同定した。また、肝がん臨床例を対象に網羅的 DNA メチル化解析を行い、肝がんにおいて高頻度な遺伝子メチル化を複数同定した。これらのメチル化は、がんの早期診断や質的診断マーカーとして有用であると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、DNA メチル化の網羅的解析により発がんに関与する新規遺伝子を同定し、がん化における役割を明らかにすることを目的とする。H23 年度までの研究で、大腸がんエピゲノム解析、microRNA（以下 miRNA）遺伝子のエピジェネティックな異常の解析、大腸がん・胃がん・乳がん・膀胱がんにおけるメチル化異常の同定を行ってきた。本年度はエピゲノム解析データを基に、がん診断マーカーとなりうる遺伝子メチル化の同定を行った。また同定した遺伝子の機能解析および診療への応用可能性を検討した。

B. 研究方法

網羅的 DNA メチル化解析を Methylated CpG island amplification microarray (MCAM)法によって行った。ゲノムコピー数異常をアレイ CGH 法によって解析した。各遺伝子の DNA メチル化は bisulfite sequencing および bisulfite pyrosequencing により検討した。遺伝子および noncoding RNA 発現を real-time RT-PCR 法により解析した。ヒストン修飾は、クロマチン免疫沈降(ChIP)した産物をシークエンス(ChIP-seq)することで解析した。遺伝子機能をコロニー形成アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイにより解析した。

(倫理面への配慮)

平成 17 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進める。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に説明し文書で同意を得、連結可能匿名化して解析を行い、患者のプライバシーを遵守し、

札幌医科大学の倫理委員会の承認を得て使用する。

C. 研究結果

(1) 大腸がんおよび前がん病変の解析

一般にメチル化異常は発がん過程の早期に発生するとされているが、その詳細は不明な点が多い。大腸前がん病変におけるゲノム・エピゲノム異常を明らかにするため、大腸腺腫、粘膜内がん、大腸がん組織を対象に網羅的解析を行った。その結果、BRAF 変異陽性の鋸歯状大腸腺腫はすでに CpG アイランドメチル化形質 (CIMP)を獲得していることを明らかにした。しかしゲノムコピー数異常は大腸腺腫ではほとんど認められなかった。一方、進行大腸がんでは染色体増幅および欠失が、ステージおよび遠隔転移と強く相関した。このことから、大腸前がん病変で生じるメチル化異常は、早期診断マーカーとして重要であると考えられた。

(2) 大腸がん浸潤と相関する遺伝子メチル化

大腸がんの浸潤・転移に関与する遺伝子メチル化を明らかにするため、側方進展型で非浸潤性の大腸がん臨床例と、浸潤性大腸がん臨床例のメチル化を MCAM 法により比較した。その結果、ニューロテニン受容体 1 型(NTSR1)遺伝子のメチル化は、非浸潤性がんにおいて高度だが、浸潤がんでは低レベルであることを明らかにした。機能解析の結果、NTSR1 の過剰発現によって大腸がん細胞のコロニー形成および浸潤能が増加し、逆に NTSR1 のノックダウンによってコロニー形成および浸潤能の抑制が認められた。また NTSR1 のメチル化を示さない大腸がん症例は、メチル化を示す症例と比較して予後不良であった。これらの結果から、NTSR1 のメチル化は大腸が

んの浸潤性および予後予測因子となりうることが示された。

(3) 大腸がんにおいてメチル化異常を示す long ncRNA 遺伝子の同定

近年、long noncoding RNA (lncRNA)とがんとの関わりが注目されている。そこで、(1)で行ったエピゲノムデータを基に、大腸がん関連 lncRNA の同定を試みた。大腸がんにおいてメチル化異常を受けるが、正常大腸ではメチル化されていない lncRNA 遺伝子をスクリーニングした結果、lncRNA-X1 と lncRNA-X2 の 2 種類を同定した (論文準備中)。これらの lncRNA 遺伝子のプロモーターCpG アイランドは大腸がんおよび前がん病変において高頻度にメチル化していることから、大腸がん診断マーカーとして有用であると考えられた。

(4) 肝がんの網羅的メチル化解析

原発性肝がん(HCC)関連遺伝子メチル化を同定するため、16 例の HCC 臨床例 (HBV 陽性 4 例、HCV 陽性 5 例、HBV/HCV 陰性 7 例) を対象に MCAM 解析を行った。その結果、メチル化する遺伝子の数は HCV 陽性 HCC において最多であり (平均 342 遺伝子)、次いで HCV 陽性 HCC (平均 332 遺伝子)、HBV/HCV 陰性 HCC で最も少ない (平均 259 遺伝子) ことが明らかとなった。また、いずれのタイプの HCC においても高頻度にメチル化する遺伝子として KLHL35、PAX5、PENK、SPDYA を同定した。これらの遺伝子メチル化はがん特異的であり、HCC 腫瘍マーカーとして有望であることが ROC 曲線解析から示された。

D. 考察

がんエピゲノム解析を通して、がんにおいてメチル化異常を来す遺伝子を複数同定した。大腸がんおよび前がん病変のゲノム・エピゲノム解析を行った結果、メチル化異常はがん化の早期から発生していることを明らかにした。メチル化異常を便や大腸洗浄液から検出することで、早期診断への応用が期待される。また NTSR1 遺伝子のように、大腸腺腫では高頻度にメチル化しているが、進行大腸がんでは頻度が低下し、メチル化が浸潤性と逆相関する遺伝子も明らかとなった。このように、臨床病理学的所見とメチル化との相関を詳細に検討することで、浸潤・転移予測や予後予測などの質的診断に応用できると考えられた。

これまで我々は microRNA 遺伝子のメチル化異常を多数同定してきたが、今年度の研究では lncRNA 遺伝子もまた、DNA メチル化によるエピジェネティックな制御を受けることを明らかにした。今回同定した lncRNA 遺伝子は大腸がんおよび前がん病変において高頻度にメチル化していることから、新規大

腸マーカーとして有用と考えられた。lncRNA の機能についてはいまだ不明であり、今後の検討を要する。

E. 結論

大腸がん、肝がんにおけるエピゲノム解析を行い、新規診断マーカー候補となる遺伝子メチル化を複数同定した。NTSR1 遺伝子メチル化は大腸がん浸潤予測および予後予測因子となりうることを明らかにした。さらに、がんにおいてメチル化異常を来す lncRNA 遺伝子を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T and Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. **Eur Urol**, 63: 1091-1100, 2013.
2. Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F and Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**, 52: 140-149, 2013.
3. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y and Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. **Am J Pathol**, 181: 1847-1861, 2012.
4. Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Aberrant methylation of *RASGRF1* is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. **Cancer Prev Res**, 5: 1203-1212, 2012.
5. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. **Mol Oncol**, 6: 567-578. 2012.
6. Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma.

Tumour Biol, 33: 1307-1317, 2012.

7. Maruyama R and Suzuki H. Long noncoding RNA involvement in cancer. **BMB Rep**, 45: 604-611, 2012.

本研究費に密接に関係するもの

1. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Noshō K, Suzuki H and Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. **World J Gastroenterol**, 18: 2745-2755, 2012.
2. Sukawa Y, Yamamoto H, Noshō K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, Nakazawa M, Nobuoka T, Kawayama M, Mikami M, Matsuno T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K and Shinomura Y. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 18: 6577-6586, 2012.
3. Yi JM, Dhir M, Guzzetta AA, Iacobuzio-Donahue CA, Heo K, Yang KM, Suzuki H, Toyota M, Kim HM and Ahuja N. DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. **Tumour Biol**, 33: 363-372, 2012.
4. Oishi Y, Watanabe Y, Yoshida Y, Sato Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M and Itoh F. Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. **Tumour Biol**, 33: 383-393, 2012.
5. Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y and Tokino T. CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. **J Biol Chem**, 287: 12975-12984, 2012.

2.学会発表

1. Suzuki H. Dysregulation of noncoding RNA genes and its clinical application. 9th AACR-Japanese

Cancer Association Joint Conference. Maui, February 2013 (invited).

2. 鈴木 拓. 大腸がんのエピゲノム解析によるがん関連 miRNA 遺伝子の同定. 第 59 回日本食品科学工学会大会, 2012 年 8 月.
3. Suzuki H, Niinuma T, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Noshō K, Yamamoto H, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
4. 鈴木 拓, 山本英一郎, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 20 回日本消化器関連学会週間(JDDW 2012), 2012 年 10 月.
5. 鈴木 拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 山野泰穂, 甲斐正広, 山本博幸, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会. 2012 年 11 月.
6. 鈴木 拓, 野島正寛, 丸山玲緒, 山本英一郎, 津矢田明泰, 篠村恭久. miR-196a および HOTAIR の過剰発現は消化管間質腫瘍の悪性度を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月.
7. 鈴木 拓, 山本英一郎, 神前正幸, 丸山玲緒, 野島正寛, 山野泰穂, 菅井 有, 山本博幸, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 9 回日本消化器学会総会学術総会, 2013 年 1 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当無し

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し

分担研究報告書

胃癌におけるエピジェネティック異常に基づいた高精度がん化予測診断

研究分担者 伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科 教授

研究要旨

内視鏡診断技術の発達により Stage I 胃癌症例が 50%以上を占めるわが国において、内視鏡的治療をはじめとした低侵襲胃癌治療の開発がめざましい。一方で、今後わが国のハイリスク残胃癌症例に対する適切な検査系の確立が必須であるものの未だ十分ではない。現在、残胃癌に対して内視鏡医による経験に基づいた診断、スポット生検による病理診断のみである。我々は、残胃癌を低侵襲かつ効率的よく診断する方法を開発した。すなわち胃洗浄廃液による遺伝子診断である。胃の発癌機構にエピジェネティックな異常が大きく関与することを臨床診断へ応用し、網羅的メチル化解析等により選出した候補遺伝子（MINT25, SOX17, miR34b/c, ACMG1）を分子マーカーとし、胃洗浄廃液により回収された胃粘膜細胞由来のゲノム DNA を用いて癌存在診断、予測診断ができる可能性を予備試験により確認し、前向き多施設共同試験を実施中にある。

A. 研究目的

通常内視鏡検査・治療時に発生する胃洗浄廃液からゲノム DNA を抽出、網羅的メチル化解析により得た候補遺伝子（MINT25, SOX17, miR34b/c, ACMG1）を分子マーカーとし、前向き多施設共同試験を行うためのシステムを構築する。

（倫理面への配慮）

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

B. 研究方法

1. 予備試験の実施：EMR: Endoscopic mucosal resection/ ESD: Endoscopic submucosal dissection 治療の適応となる 40 症例の治療前後（治療直前および、治療 1 週間後の内視鏡観察時）から採取した洗浄廃液を用い、4 つの候補遺伝子を用い、DNA メチル化解析を定量性に優れた Bisufite-Pyrosequencing 法にて行う。

C. 研究結果

1. 本年度までに、40 症例による予備試験登録を終了し、4 候補遺伝子（MINT25, SOX17, miR34b/c, ACMG1）を用いた DNA メチル化定量解析を行った。結果、症例の約 8 割が治療前において高メチル化を示し、治療後にそのメチル化レベルに有意な低下を示した。また、内視鏡治療後の病理組織学的な検討において切除断端陽性となった症例では、治療後も依然としてメチル化レベルが低下せず完全切除できていないことを予測することが出来る可能性が示唆された。

2. 胃洗浄廃液を効率よく回収することが可能な専用採取管の設計および制作を行う。また、将来的な臨床検査系への応用を見据えた、検体搬送および、効率的な DNA 抽出系の検討を行い、既存の受諾サービスで対応が可能であることを確認している。

2. 胃洗浄廃液を効率よく回収すべく、250mL 専用採取管を作成し、医療用としての使用認可を得た。

3. 平成 23 年 4 月より前向き多施設共同試験が北海道大学、聖マリアンナ医科大学、筑波大学をはじめとする 10 施設により登録が開始されている。EMR/ESD 情報、内視鏡観察情報、除菌の有無について検討する。

3. 北海道大学光学診療部を中心とした多施設共同試験グループ（SGIST: Sapporo GI Study Team）による採択を受け、聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科、筑波大学消化器内科、札幌厚生病院消化器科、札幌医療センター斗南病院消化器病センター、

札幌北楡病院消化器科、手稲溪仁会病院消化器病センター、恵佑会札幌病院消化器内科、小樽腋済会病院消化器科、小樽協会病院消化器内科、済生会横浜市東部病院消化器科が加わり、早期胃がんに対する内視鏡治療症例 300 症例を対象に治療前後、1 年～5 年後まで洗浄廃液を回収し、再発予測診断プログラムの構築を目的として前向き試験を開始した。現在 2 年目経過中である。

4. 新たな候補遺伝子として *BARHL2* が同定された。

D. 考察

通常の内視鏡検査時に破棄している胃洗浄廃液を用い、エピジェネティックな異常を診断に応用することが有用であることが強く示唆され、さらに候補遺伝子 (*MINT25*, *SOX17*, *miR34b/c*, *ACMG1*) を用いて前向き多施設臨床試験を行うことで、臨床応用へ向けた大きな一歩となる可能性が考えられた。

E. 結論

胃洗浄液を用いたエピジェネティック診断は、今までにない視点からの診断法であるだけでなく、通常廃棄される廃液を利用する、侵襲度の非常に低い新たな検査法として非常に有望であり、前向き多施設臨床試験 (2 年目) 症例エントリー中にある。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞はないが強く関連がある論文

1. Hama R, Watanabe Y, Shinada K, Yamada Y,

Ogata Y, Yoshida Y, Tamura T, Hiraishi T, Oikawa R, Sakurai J, Maehata T, Koizumi H and Itoh F. Characterization of DNA hypermethylation in two cases of peritoneal mesothelioma. *Tumor Biol*, 33: 2031-2040, 2012.

2. 学会発表

1. Watanabe Y, Oishi Y, Yoshida Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H and Itoh F. DDW2012. San Diego, May 2012.
2. Watanabe Y, Sato Y, Ishigooka S, Hosoya K, Oikawa R, Maehata T, Yasuda H and Itoh F. ACG2012. Las Vegas, October 2012.
3. Watanabe Y, Yoshida Y, Oikawa R, Maehata T and Itoh F. SIDDS2012. Seoul, November 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

Date of Filing: 15.05.07

Priority: JP/15.05.06/ JPA 2006134878

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

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

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

分担研究報告書

がん細胞 DNA メチル化異常の起源解明

研究分担者 山田泰広 京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨

本研究では iPS 細胞 (iPSC) 作製技術を応用することで、がん細胞のエピゲノム異常の起源および意義を明らかにすることを目的としている。昨年度までの研究において、ドキシサイクリン投与により山中 4 因子が誘導可能である「初期化可能マウス」を作製し、*Apc* Min マウス大腸腫瘍細胞の完全な初期化を目指した。初期化可能マウスに発生した大腸腫瘍細胞にドキシサイクリンを用いて初期化因子を発現させることで、*Nanog* 遺伝子を発現する大腸腫瘍由来の初期化細胞を得ることが出来た (reprogrammed tumor cells; RT 細胞)。

本年度は大腸腫瘍由来 RT 細胞の分化誘導を試みた。分化誘導により、RT 細胞は栄養外胚葉への分化を示し、最終的に胎盤組織の一部に組み込まれることを明らかにした。胎盤に分化した大腸腫瘍細胞は増殖を停止し腫瘍性増殖能を失うことが分かった。我々が作製した初期化可能マウスを用いたリプログラミング/再分化の系は、腫瘍細胞における細胞分化状態の意義および、その背景にあるエピゲノム異常の意義、起源を解析するために有用なツールとなることが示唆された。

A. 研究目的

DNA メチル化異常に代表されるエピゲノム異常は多くのがんに観察され、発がんに促進的な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、がん細胞におけるエピゲノム異常の原因や発がんにおける意義については、未だ不明な点が多く、より効果的な治療方法の開発には、がん細胞におけるエピゲノム異常の起源、役割を解明する必要がある。

iPS 細胞 (iPSC) 作製に必要な初期化因子の発現は、遺伝子配列情報に変化を及ぼさないもののエピゲノム状態の改変を誘導し、多能性幹細胞樹立に至る。本研究では iPSC 作製技術を用いてエピゲノム変化を誘導するツールとして捉え、腫瘍細胞のゲノム異常をそのままに、エピジェネティック修飾状態に強制的な変化を誘導することで、がん細胞のエピゲノム異常の起源および意義を明らかにすることを目的としている。

昨年度までの研究により、ドキシサイクリン投与により細胞初期化 4 因子が誘導可能である「初期化可能マウス」を作製し、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Apc*^{Min/+} (*Apc* Min) マウスと交配することで、大腸腫瘍細胞から *Nanog* 遺伝子を発現する初期化細胞を得ることが出来た (reprogrammed tumor cells; RT 細胞)。マウス大腸腫瘍細胞の完全な初期化に成功した。

異なる分化状態の RT 細胞を解析することにより、

がん細胞におけるエピゲノム異常の起源、役割を検討することが可能である。本年度は樹立した RT 細胞の分化能についての検討を行った。

B. 研究方法

ドキシサイクリンによる遺伝子発現系を利用して細胞初期化因子を発現コントロールできる初期化可能マウスシステムを用いた。初期化可能マウスを *Apc* Min マウスと交配し、強力な大腸発がんプロモーターである dextran sodium sulfate (DSS) を投与することで大腸腫瘍誘発を行った。7 週齢マウスに DSS (2%) を 1 週間飲水投与し、投与終了後 4 週後に屠殺し、大腸を摘出し、ドキシサイクリンにより初期化因子誘導可能な大腸腫瘍を得た。試験管内でドキシサイクリンを添加することで得られた *Nanog* 発現 RT 細胞を分化誘導に用いた。

大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いて、試験管内および生体内での分化誘導を試みた。試験管内分化誘導は、血清存在下、LIF およびフィーダー細胞非存在下で行った。GFP でラベルした RT 細胞をマウス初期胚 (8 細胞期) にマイクロインジェクションすることにより生体内での分化誘導を試みた。RT 細胞を注入したマウス初期胚は偽妊娠マウス子宮に移植し、その後の分化を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、動物実験実施機関 (京都大学

iPS 細胞研究所) の動物実験委員会の承認を得た。動物愛護の精神に配慮し、3R に努めて実験を施行した。

C. 研究結果

RT 細胞を分化誘導培養条件で培養すると栄養外胚葉分化に重要な転写因子である *Cdx2* 遺伝子の発現が上昇することを確認した。網羅的遺伝子発現解析により、*Cdx2* 遺伝子の発現上昇は未分化状態の RT 細胞においても認められた。*Cdx2* 遺伝子の発現上昇が大腸腫瘍の *Apc* 遺伝子欠損に関連するかを確認するために、*Apc* 遺伝子欠損 ES 細胞を作製した。*Cdx2* 遺伝子の発現上昇は *Apc* 遺伝子欠損 ES 細胞でも確認され、*Apc* 遺伝子の欠損が *Cdx2* 遺伝子発現上昇の原因となっていることが明らかになった。

大腸腫瘍由来の RT 細胞を 8 細胞期のマウス初期胚にマイクロインジェクションすることで、大腸腫瘍由来 RT 細胞が胎盤組織へと分化することが確認された。胎盤組織に分化した大腸腫瘍細胞由来 RT 細胞は、組織学的に周囲の胎盤組織と区別不可能であり、細胞増殖能を評価する Ki67 免疫染色にて腫瘍性増殖能を失っていることが示唆された。

一方で初期胚に注入した RT 細胞は胎児成分には一切寄与しないことが分かった。RT 細胞は栄養外胚葉への分化能を有するものの、体細胞への分化能を持たないことが示唆された。

D. 考察

本研究の最終目的であるエピジェネティック修飾異常の起源および意義解明には、腫瘍細胞の完全な初期化、およびその再分化が必須である。昨年までの研究により大腸腫瘍細胞の完全な初期化に成功した。本年度の研究により、樹立された RT 細胞が栄養外胚葉への分化能を有することが示された。興味深いことに、胎盤に分化転換した大腸腫瘍細胞は、その腫瘍性増殖能を失い増殖を停止することが明らかとなった。腫瘍発生に十分な遺伝子変異を有する腫瘍細胞であっても、その分化状態の変化により腫瘍細胞の性質が大きく変化することが示された。

分化状態はエピジェネティクス修飾状態の変化により制御されていることから、我々の結果は、エピジェネティック修飾状態ががん細胞の性質決定に重要な役割を果たしていることを示すものと考えられる。エピゲノム制御を標的としたがん治療の妥当性を示す結果と考えられた。さらには、エピジェネティック修飾状態を標的とした腫瘍細胞の分化転換ががん治療に応用可能であることを示唆する結果と考えられた。

一方で、腫瘍細胞におけるエピゲノム異常の起源解明には、大腸腫瘍由来 RT 細胞の大腸上皮へと分化誘導し、その過程でのエピゲノム解析が必要である。しかしながら、RT 細胞は体細胞への分化能を持たな

いことが明らかになりつつある。大腸腫瘍細胞における *Apc* 遺伝子の欠損がその原因になっている可能性を考えており、今後は樹立された RT 細胞に一時的に *Apc* 遺伝子機能を回復させ大腸上皮への分化を試みる予定である。

E. 結論

腫瘍細胞のリプログラミング/再分化の系は、がん細胞におけるエピゲノム異常の意義、および起源を解明するために有用なモデルと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Hirata A, Utikal J, Yamashita S, Aoki H, Watanabe A, Yamamoto T, Okano H, Bardeesy N, Kunisada T, Ushijima T, Hara A, Jaenisch R, Hochedlinger K and Yamada Y. Dose-dependent roles for canonical Wnt signaling in *de novo* crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. **Development**, 140: 66-75, 2013.
2. Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A and Yamada Y. *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. **J Clin Invest**, 123: 600-610, 2013.
3. Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K and Yamada Y. Cellular reprogramming and cancer development. **Int J Cancer**, 132: 1240-1248, 2012.
4. Arioka Y, Watanabe A, Saito K and Yamada Y. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. **PLoS One**, 7: e45031, 2012.

2. 学会発表

1. Yamada Y. Application of reprogramming technology to cancer research. 19th international Charles Heidelberger symposium on Cancer Research. Kagoshima, February 2013.

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

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 |
|-----------------------------|---|--------------|------------------------------|----------|-----------|------|---------|
| Ushijima T and Takeshima H. | Epigenetic epidemiology of infectious diseases. | Michels KB | Epigenetic Epidemiology | Springer | Germany | 2012 | 269-288 |
| Kanai Y and Arai E. | DNA methylation alterations in human cancers. | Tollefsbol T | Epigenetics in Human Disease | Elsevier | Amsterdam | 2012 | 29-52 |

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 |
|-------------------------------------|---|------------------|-----|-----------|----------|
| Okochi-Takada E, Ushijima T, et al. | ANGPTL4 is a secreted tumor-suppressor that inhibits angiogenesis. | Oncogene | | | in press |
| Asada K, Ushijima T, et al. | Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. | Jpn J Clin Oncol | | | in press |
| Niwa T, Ushijima T, et al. | Prevention of <i>Helicobacter pylori</i> -induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent. | Cancer Prev Res | 6 | 263-270 | 2013 |
| Asada K, Ushijima T, et al. | <i>FHL1</i> on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. | Oncogene | 32 | 2140-2149 | 2013 |
| Kim JG, Ushijima T, et al. | Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. | Cancer Lett | 330 | 33-40 | 2013 |
| Takeshima H, Ushijima T, et al. | Induction of aberrant trimethylation of histone H3 lysine 27 by inflammation in mouse colonic epithelial cells. | Carcinogenesis | 33 | 2384-2390 | 2012 |
| Frau M, Ushijima T, et al. | Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression. | Hepatology | 56 | 165-175 | 2012 |
| Kikuyama M, Ushijima T, et al. | Development of a novel approach, the epigenome-based outlier approach, to identify tumor-suppressor genes silenced by aberrant DNA methylation. | Cancer Lett | 322 | 204-212 | 2012 |
| Nanjo S, Ushijima T, et al. | Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past <i>H. pylori</i> infection. | Gastric Cancer | 15 | 382-388 | 2012 |
| Shigematsu Y, Ushijima T, et al. | Identification of a DNA methylation marker that detects the presence of lymph node metastases of gastric cancers. | Oncol Lett | 4 | 268-274 | 2012 |
| Sato T, Kanai Y, et al. | DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. | PLoS One | 8 | e59444 | 2013 |

| | | | | | |
|--|--|--------------------------|-----|-----------|----------|
| Arai E, <u>Kanai Y</u> , et al. | Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. | Carcinogenesis | 33 | 1487-1493 | 2012 |
| Shimizu T, <u>Suzuki H</u> , et al. | Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. | Eur Urol | 63 | 1091-1100 | 2013 |
| Sawada T, <u>Suzuki H</u> , et al. | Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. | Genes Chromosomes Cancer | 52 | 140-149 | 2013 |
| Yamamoto E, <u>Suzuki H</u> , et al. | Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. | Am J Pathol | 181 | 1847-1861 | 2012 |
| Takamaru H, <u>Suzuki H</u> , et al. | Aberrant methylation of <i>RASGRF1</i> is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. | Cancer Prev Res | 5 | 1203-1212 | 2012 |
| <u>Suzuki H</u> , et al. | DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. | Mol Oncol | 6 | 567-578 | 2012 |
| Shitani M, <u>Suzuki H</u> , et al. | Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. | Tumour Biol | 33 | 1307-1317 | 2012 |
| Maruyama R and <u>Suzuki H</u> | Long noncoding RNA involvement in cancer. | BMB Rep | 45 | 604-611 | 2012 |
| Hirata A, <u>Ushijima T</u> , <u>Yamada Y</u> , et al. | Dose-dependent roles for canonical Wnt signaling in <i>de novo</i> crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. | Development | 140 | 66-75 | 2013 |
| Yamada K, <u>Yamada Y</u> , et al. | <i>EWS/ATF1</i> expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. | J Clin Invest | 123 | 600-610 | 2013 |
| Semi K, <u>Yamada Y</u> , et al. | Cellular reprogramming and cancer development. | Int J Cancer | 132 | 1240-1248 | 2012 |
| Arioka Y, <u>Yamada Y</u> , et al. | Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. | PLoS One | 7 | e45031 | 2012 |
| Yoshida T, <u>Ushijima T</u> , et al. | Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active <i>Helicobacter pylori</i> -related gastritis. | Gastric Cancer | | | in press |
| Chiba T, <u>Ushijima T</u> , et al. | Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. | Gastroenterology | 143 | 550-563 | 2012 |
| Watanabe M, <u>Ushijima T</u> , et al. | Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and <i>Helicobacter pylori</i> antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. | Int J Cancer | 131 | 2632-2642 | 2012 |
| Kong D, <u>Ushijima T</u> , et al. | Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. | Oncogene | 31 | 3949-3960 | 2012 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------|-----|-------------|------|
| Matsuda Y, <u>Ushijima T</u> , et al. | Hypomethylation of Alu repetitive elements in esophageal mucosa, and its potential contribution to the epigenetic field for cancerization. | Cancer Causes Control | 23 | 865-873 | 2012 |
| Saito Y, <u>Kanai Y</u> , et al. | The tumor suppressor <i>microRNA-29c</i> is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. | Int J Cancer | 132 | 1751-1760 | 2013 |
| AkatsukaS, <u>Kanai Y</u> , et al. | Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. | PLoS One | 7 | e43403 | 2012 |
| Yamamoto H, <u>Suzuki H</u> , et al. | Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. | World J Gastroenterol | 18 | 2745-2755 | 2012 |
| Sukawa Y, <u>Suzuki H</u> , et al. | Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. | World J Gastroenterol | 18 | 6577-6586 | 2012 |
| Yi JM, <u>Suzuki H</u> , et al. | DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. | Tumour Biol | 33 | 363-372 | 2012 |
| Oishi Y, <u>Suzuki H</u> , <u>Itoh F</u> , et al. | Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. | Tumour Biol | 33 | 383-393 | 2012 |
| Kashima L, <u>Suzuki H</u> , et al. | CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. | J Biol Chem | 287 | 12975-12984 | 2012 |
| Hama R, <u>Itoh F</u> , et al. | Characterization of DNA hypermethylation in two cases of peritoneal mesothelioma. | Tumor Biol | 33 | 2031-2040 | 2012 |

Chapter 14

Epigenetic Epidemiology of Infectious Diseases

Toshikazu Ushijima and Hideyuki Takeshima

Contents

| | | |
|--------|--|-----|
| 14.1 | Introduction..... | 270 |
| 14.2 | Infectious Agents and Methylation Induction..... | 271 |
| 14.2.1 | The Significance of Methylation in Cancers and in Non-cancerous Tissues..... | 271 |
| 14.2.2 | <i>Helicobacter pylori</i> Infection..... | 273 |
| 14.2.3 | Hepatitis Viruses | 274 |
| 14.2.4 | Epstein-Barr Virus..... | 275 |
| 14.2.5 | Papilloma Virus..... | 275 |
| 14.2.6 | Liver Flukes | 276 |
| 14.2.7 | Schistosoma | 276 |
| 14.3 | Mechanisms for Methylation Induction by Infectious Agents..... | 276 |
| 14.3.1 | Role of Chronic Inflammation | 276 |
| 14.3.2 | Direct Effect of Infectious Agents | 277 |
| 14.4 | Methylation Fingerprints Produced by Specific Inducers..... | 277 |
| 14.4.1 | Target Gene Specificity of DNA Methylation in Cancers..... | 278 |
| 14.4.2 | Strategy to Analyze Methylation Fingerprints in Non-cancerous Tissues..... | 278 |
| 14.4.3 | Methylation Fingerprint in Gastric Mucosae Exposed to <i>H. pylori</i> Infection..... | 278 |
| 14.4.4 | Methylation Fingerprint in Esophageal Mucosae of Long-Term Smokers..... | 280 |
| 14.5 | Mechanisms for Formation of a Methylation Fingerprint..... | 280 |
| 14.5.1 | Low Transcription Levels and DNA Methylation Susceptibility..... | 280 |
| 14.5.2 | Trimethylation of Histone H3 Lysine 27 and DNA Methylation Susceptibility | 281 |
| 14.5.3 | Stalled RNA Polymerase II and DNA Methylation Resistance..... | 282 |
| 14.5.4 | Role of Genomic Position Relative to Repetitive Elements | 282 |
| 14.5.5 | A Model for Formation of a Methylation Fingerprint of an Agent | 282 |
| 14.6 | Epilogue | 283 |
| | References..... | 284 |

T. Ushijima (✉) • H. Takeshima

Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute, 1-1 Tsukiji 5-chome,
Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

e-mail: tushijim@ncc.go.jp; hitakesh@ncc.go.jp

Abstract Cancers induced by infectious agents, such as *Helicobacter pylori*, hepatitis viruses, Epstein-Barr virus, papilloma virus, liver fluke, and Schistosoma, are often associated with frequent DNA methylation of tumor-suppressor genes. Chronic inflammation and direct effects of some infectious agents are responsible for methylation induction. Analysis of non-cancerous, thus polyclonal, tissues provides unbiased information on which genes are methylated by specific agents. Gastric mucosae with *Helicobacter pylori* infection show methylation of specific promoter CpG islands. Promoter CpG islands of genes with low transcription levels and trimethylation of histone H3 lysine 27 are susceptible to methylation induction, and those with RNA polymerase II are resistant, even if the genes are not transcribed. Methylation of specific genes is expected to remain even after its inducing agent has vanished and these cytosine methylation fingerprints may prove to be good markers of past exposure to specific agents in molecular epidemiology.

Abbreviations

| | |
|------------------|--|
| CGI | CpG island |
| CIMP | CpG island methylator phenotype |
| DNMT | DNA methyltransferase |
| EBV | Epstein-Barr virus |
| ESCC | Esophageal squamous cell carcinoma |
| <i>H. pylori</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| H3Ac | Acetylation of histone H3 |
| H3K27me3 | Trimethylation of histone H3 lysine 27 |
| H3K4me3 | Trimethylation of histone H3 lysine 4 |
| H3K9me3 | Trimethylation of histone H3 lysine 9 |
| HBV | Hepatitis B virus |
| HCC | Hepatocellular carcinoma |
| HCV | Hepatitis C virus |
| HPV | Human papilloma virus |
| LMP1 | Latent membrane protein 1 |
| MeDIP | Methylated DNA immunoprecipitation |
| MSP | Methylation-specific PCR |
| Pol II | RNA polymerase II |
| PRC | Polycomb repressive complex |

14.1 Introduction

Infectious agents are some of the most well-known inducers of aberrant DNA methylation. Infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), a bacterial strain causally involved in gastric carcinogenesis, is known to induce aberrant DNA methylation in

gastric epithelial cells [1–3]. Infection with hepatitis C and B viruses (HCV and HBV), both of which are involved in the development of hepatocellular carcinomas, is associated with aberrant DNA methylation in cancer tissues and surrounding non-cancerous tissues [4–6]. Infection with Epstein-Barr virus (EBV), associated with lymphomas, nasopharyngeal cancers, and gastric cancers, is also associated with frequent DNA methylation in tumor tissue. Aberrant methylation induced by an infectious agent is present not in random genes, but in a group of genes affected by the agent [7]. Such gene-specific methylation provides an excellent tool for molecular epidemiology revealing past exposure to specific infectious agents, even if these agents are no longer present.

In this chapter, we will introduce methylation induction by infectious agents, its mechanisms, methylation of specific genes by specific inducers (a methylation fingerprint), and its mechanisms. We will conclude with the potential application to epidemiology.

14.2 Infectious Agents and Methylation Induction

Cancers induced by infectious agents, such as *H. pylori*, hepatitis viruses, EBV, papilloma virus, liver fluke, and *Schistosoma*, tend to have frequent aberrant DNA methylation of promoter CpG islands (CGIs) of tumor-suppressor and other genes (Table 14.1). In addition, non-cancerous tissues exposed to some infectious agents also show methylation of some genes, many of which are carried over into cancer cells.

14.2.1 *The Significance of Methylation in Cancers and in Non-cancerous Tissues*

Methylation of promoter CGIs of tumor-suppressor genes is frequently present in cancers induced by an infectious agent. This can be a result of frequent induction of methylation in the infected tissue by the agent, or a result of growth advantage of a cell with methylation of a tumor-suppressor gene and its clonal expansion. If methylation is present in non-cancerous (thus polyclonal) tissue after infection, it is unlikely that a cell with a rare event of methylation of a tumor-suppressor gene, which itself is unrelated to the infection, has been selected and expanded. Therefore, when tumor-suppressor genes or other genes whose methylation can confer growth advantage to a cell are analyzed, use of non-cancerous tissues provides more unbiased information on whether or not an infectious agent is capable of inducing DNA methylation.

Since non-cancerous tissues are polyclonal, high methylation levels of a specific gene means that more cells acquired methylation of this gene in the past. Therefore, high methylation levels can be associated with stronger tissue damage in the past

Table 14.1 Infectious agents and genes whose methylation is associated with an agent

| | Methylated genes in cancer tissue | Methylated genes in non-cancerous tissue | Ref |
|----------------------------|--|--|----------|
| <i>Helicobacter pylori</i> | | | |
| Gastric cancer | | | |
| | <i>CDKN2A</i> | <i>CDKN2A</i> | [2] |
| | <i>FLNc</i> | <i>FLNc</i> | [2] |
| | <i>LOX</i> | <i>LOX</i> | [2, 8] |
| | <i>THBD</i> | <i>THBD</i> | [2] |
| | <i>miR-124a</i> | <i>miR-124a</i> | [8] |
| | 26 genes, including <i>BDNF</i> and <i>IGFBP3</i> | 26 genes, including <i>BDNF</i> and <i>IGFBP3</i> | [9] |
| Hepatitis virus B (HBV) | | | |
| Hepatocellular carcinoma | | | |
| | <i>APC</i> | <i>APC</i> | [6] |
| | <i>CDKN2A</i> | <i>CDKN2A</i> | [6] |
| | <i>RASSF1A</i> | <i>RASSF1A</i> | [6] |
| Hepatitis virus C (HCV) | | | |
| Hepatocellular carcinoma | | | |
| | <i>APC</i> | <i>APC</i> | [5, 6] |
| | <i>CDKN2A</i> | <i>CDKN2A</i> | [6] |
| | <i>RASSF1A</i> | <i>RASSF1A</i> | [6] |
| Epstein-Barr virus (EBV) | | | |
| Gastric cancer | | | |
| | <i>CDH1</i> | | [10] |
| | <i>CDKN2A</i> | | [11, 12] |
| | <i>MGMT</i> | | [11] |
| | <i>PTEN</i> | | [13] |
| Papilloma virus (HPV) | | | |
| Cervical cancer | | | |
| | <i>RASSF1A</i> (unmethylated) ^a | | [14, 15] |
| Head and neck cancer | | | |
| | <i>RASSF1A</i> (unmethylated) ^a | | [16] |
| | <i>SFRP4</i> | | [17] |
| Liver fluke | | | |
| Cholangiocarcinoma | | | |
| | <i>MLH1</i> | | [18] |
| Schistosoma | | | |
| Bladder cancer | | | |
| | <i>APC</i> | | [19] |
| | <i>CDH1</i> | | [19] |
| | <i>CDKN2A</i> | | [19] |
| | <i>RASSF1A</i> | | [19] |

^aConsidered to be due to the functional interaction between *RASSF1A* inactivation and HPV infection

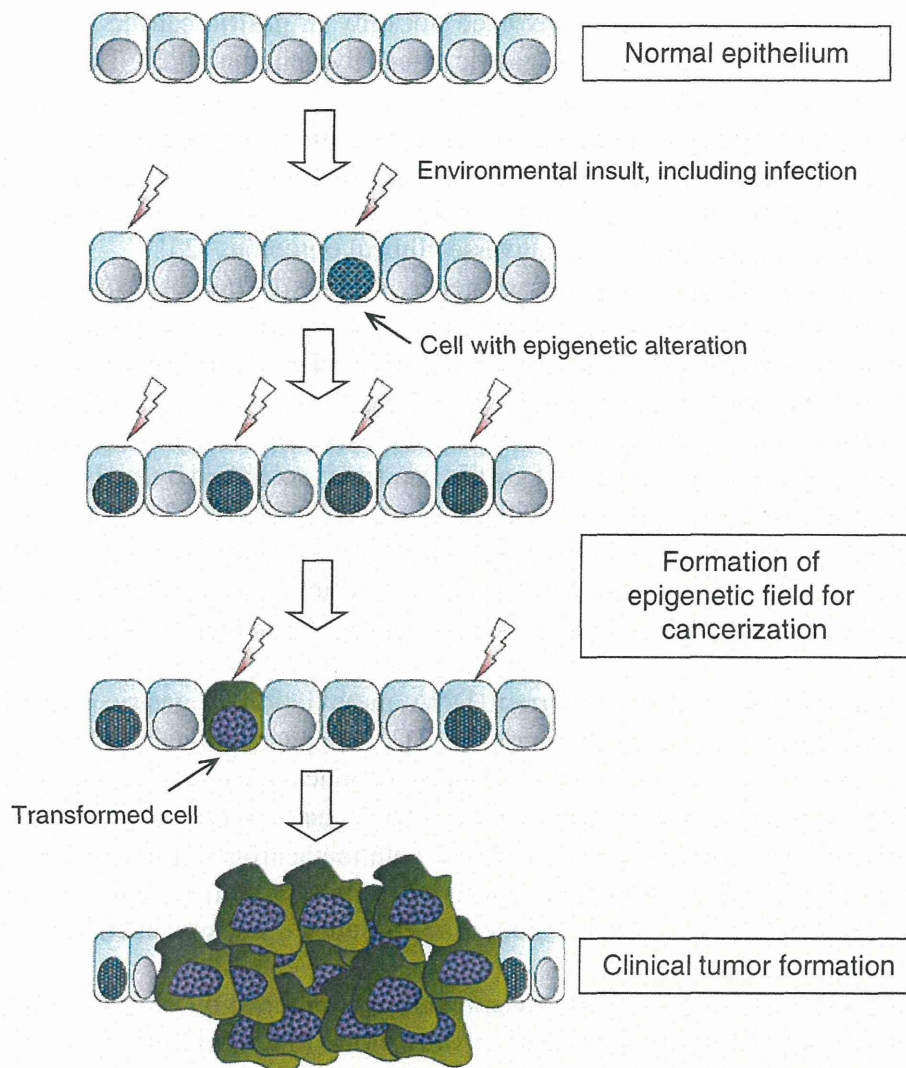


Fig. 14.1 Formation of an epigenetic field for cancerization. Exposure to environmental stimuli, including infection, induces epigenetic alterations in a significant fraction of cells in normal-appearing tissues. When such stimuli continue, epigenetic alterations accumulate in a tissue, and an epigenetic field for cancerization is produced

and accumulation of epigenetic alterations. Indeed, for cancers like gastric cancers and hepatocellular carcinomas (HCCs), methylation accumulation in non-cancerous tissues is known to form a field from which cancers tend to develop (an epigenetic field for cancerization; Fig. 14.1) [20]. Methylation levels in gastric mucosae are associated with risk of developing gastric cancers [20, 21].

14.2.2 *Helicobacter pylori* Infection

Gastric cancer is one of the leading causes of cancer deaths in the world, and most gastric cancer patients have a history of *H. pylori* infection [22]. *H. pylori* is a

Gram-negative bacterium, and is involved not only in gastric cancers but also in peptic ulcers and specific types of gastric B-cell lymphomas [23]. The infection itself is very prevalent, affecting nearly half of the world's population, although the prevalence is consistently decreasing [24]. *H. pylori* infection usually leads to acute and chronic gastritis, but only a small fraction of the infected individuals develop gastric cancer. Differences in *H. pylori* strains and host genetic backgrounds are considered to be responsible for the diverse clinical outcomes [25].

In gastric cancers, tumor-suppressor genes, such as *CDKN2A*, *MLH1*, *CDH1*, and *RUNX3*, are inactivated more frequently by methylation of their promoter CpG islands than by mutations [1]. Recent genome-wide analyses revealed that in addition to tumor-suppressor genes, hundreds of other genes are also methylated in gastric cancers [26, 27]. The possible association between *H. pylori* infection and methylation suggested by analysis of gastric cancers is solidified by analysis of non-cancerous gastric tissues with and without *H. pylori* infection [2, 9]. Methylation levels of eight specific CGIs in individuals with *H. pylori* infection were 5.4- to 303-fold as high as those in individuals without *H. pylori* infection ($P < 0.0001$). In addition to protein coding genes, microRNAs are also methylated in *H. pylori* infected tissues [8].

The accumulation level of aberrant DNA methylation in gastric mucosae is known to correlate with gastric cancer risk [2, 21]. Among individuals without current *H. pylori* infection, methylation levels in gastric mucosae were lowest in healthy individuals, high in cancer patients with a single gastric cancer, and highest in cancer patients with multiple gastric cancers (both metachronous and synchronous gastric cancers) [21]. The correlation strongly supports that the accumulation of aberrant methylation in gastric mucosae produces an epigenetic field for cancerization.

An animal model is available for gastric cancers induced by *H. pylori* infection [28]. Mongolian gerbils infected with *H. pylori* showed increased methylation levels compared with age-matched non-infected gerbils, demonstrating a causal role of *H. pylori* infection in methylation induction [3].

14.2.3 Hepatitis Viruses

HCCs are also a major cause of cancer deaths and are known to arise from liver tissues that heavily suffered from chronic inflammation, such as chronic hepatitis and liver cirrhosis [29]. As etiological agents, HCV and HBV play major roles, as well as some additional agents, such as excessive alcohol consumption and aflatoxin.

HCC tissues also have aberrant methylation of promoter CGIs of multiple tumor-suppressor genes [5, 6, 30]. Some genes, such as *CDKN2A*, are specifically methylated in HCCs while others, such as *RASSF1A*, are already methylated in surrounding liver tissues with chronic hepatitis or liver cirrhosis [30]. HCCs arising from liver cirrhosis have more methylated genes than those arising from chronic hepatitis, indicating that background tissue damage is reflected in HCCs [30]. When methylation

of 19 genes, mostly tumor-suppressor or tumor-associated genes, was analyzed, HCV-positive HCCs had more frequent methylation than had HBV-positive cancers and virus-negative HCCs [6].

Aberrant methylation of various genes is also present in surrounding non-cancerous liver tissues of patients with HCCs [6, 30, 31]. HCV-positive liver tissues show more frequent methylation than HBV-positive liver tissues and virus-negative liver tissues [6], strongly supporting HCV infection induces aberrant DNA methylation. Non-cancerous liver tissues of individuals with HBV and alcoholic hepatitis also had higher methylation levels than normal liver tissues of healthy individuals, indicating that these agents can induce aberrant DNA methylation in human liver tissues.

14.2.4 Epstein-Barr Virus

EBV infection is highly prevalent in the world, and is known to affect mainly B cells [32]. Its infection is implicated as an etiology of EBV-associated B-cell, T-cell, and NK-cell lymphomas and nasopharyngeal carcinomas. A minor fraction of gastric cancers is also associated with EBV infection, and such cancers are accompanied with strong infiltration of inflammatory cells [11, 33]. Gastric cancers with EBV infection are known to be associated with highly frequent methylation of multiple genes, including *CDH1*, *MGMT*, *PTEN*, and *p16*, demonstrating the CGI methylator phenotype (CIMP) [10–13, 33]. Surprisingly, non-cancerous gastric mucosae of patients with gastric cancers with EBV infection tended to have lower levels of methylation than those of patients with gastric cancers but without EBV infection, most of whom were infected by *H. pylori* [12].

14.2.5 Papilloma Virus

Human papilloma virus (HPV) is associated with cervical cancer, head and neck cancers, oral cancers, and possibly lung cancer [34–36]. In cervical cancers, HPV infection was associated with unmethylated status of *RASSF1A*, possibly due to their complementary functions in cervical carcinogenesis [14]. In contrast, in cervical dysplasia, from which cervical cancers develop, aberrant methylation of multiple genes, including *CCNA1*, *DAPK1*, *HS3ST2*, *PAX1*, and *TFPI2*, was present [37, 38], suggesting that HPV infection was associated with methylation induction.

In head and neck cancers, HPV infection was associated with unmethylated status of *RASSF1A*, again possibly due to their complementary functions in cervical carcinogenesis [16]. HPV infection was associated with *SFRP4* methylation in cancer tissues [17].

14.2.6 *Liver Flukes*

Liver flukes are parasites that infect the biliary tract, and are known to be a risk factor for cholangiocarcinoma, a rare malignant liver tumor arising from the intrahepatic biliary tract [39]. Like in other cancers, aberrant DNA methylation of tumor-suppressor genes, such as *APC*, *CDH1*, *CDKN2A*, and *MLH1* is frequently observed in cholangiocarcinoma [40]. Especially, *MLH1* methylation is frequently observed in liver fluke-related cholangiocarcinoma in Thailand [18].

14.2.7 *Schistosoma*

Schistosoma is a parasite that infects the urinary ducts and bladder, and *Schistosoma* infection is associated with risk of several malignancies, including bladder cancers [41]. Bladder cancers in general also show aberrant DNA methylation in multiple genes [42]. Notably, bladder cancers with *Schistosoma* infection had more methylated tumor-suppressor genes, including *APC*, *CDH1*, *CDKN2A*, and *RASSF1A*, than those without *Schistosoma* infection [19].

14.3 Mechanisms for Methylation Induction by Infectious Agents

Infectious agents are inducers of inflammation, which is known to be deeply involved in methylation induction [43, 44]. In addition, direct effects by infectious agents on cancer precursor cells need to be considered.

14.3.1 *Role of Chronic Inflammation*

The role of chronic inflammation in methylation induction was proposed based on the observation that aberrant methylation of specific genes was present in colonic mucosae of patients with ulcerative colitis [43, 45]. In addition, the infectious agents listed above are all associated with chronic inflammation. This strongly indicates that chronic inflammation is involved in methylation induction.

Direct evidence for the role of chronic inflammation in methylation induction was provided by an animal model of methylation induction by *H. pylori* infection. When inflammation induction by *H. pylori* infection was suppressed by treating Mongolian gerbils with cyclosporin A, an immunosuppressant, methylation induction was markedly suppressed without affecting colonization of *H. pylori* (Fig. 14.2). This showed that it is inflammation, not *H. pylori* itself, that is involved in methylation induction [3].

