

ユニットの診断閾値を組み合わせてCIMP診断基準を策定した。同診断基準により、Infinium解析により既に同定していた学習コホートのCIMP陽性腎細胞がん14症例を、感度・特異度とも100%でCIMP陰性腎細胞がん症例から区別することができた。

本年度は、検証コホート腎淡明細胞がん100症例のがん組織検体において、CIMP診断のためのMassARRAY解析を実施した。平成24年度に策定したCIMP診断基準に組み込まれた23 CpGユニットのDNAメチル化率の精密定量値の、検証コホート100症例における分布は、学習コホート102症例のそれと良く類似していた。23 CpGユニットにおけるDNAメチル化プロファイルが、腎淡明細胞がんにおいて再現することが分かった。23 CpGユニットのうち16 CpGユニット以上においてDNAメチル化率が診断閾値より高値を示し、平成24年度に策定したCIMP診断基準によりCIMP陽性と診断された検証コホートの腎細胞がんは、5症例であった。

検証コホートにおいて、我々の診断基準によりCIMP陰性・CIMP陽性と診断された腎細胞がん症例の予後を、 Kaplan-Meier法で評価した（観察期間27日ないし5,031日 [平均1,860日]）。CIMP陽性腎淡明細胞がん症例の無再発生存率 ($P=1.41 \times 10^{-5}$)・全生存率 ($P=2.43 \times 10^{-13}$)は、CIMP陰性症例に比して有意に低値であった（ログランク検定）。Cox回帰によって、検証コホートのCIMP陽性腎細胞がんの再発のハザード比は10.6倍（95%信頼区間2.81-40.2, $P=5.03 \times 10^{-4}$ ）、死亡のハザード比は75.8倍（95%信頼区間7.81-735, $P=1.89 \times 10^{-4}$ ）であった。以上により、我々の基準を用いたCIMP診断が、腎細胞がん症例の予後診断法として有用であることが分かった。言い換えると、平成24年度までに策定した診断基準で、予後不良であるCIMP陽性腎細胞がんを再現性を持って診断できることが、平成25年度に明らかになった。

他方で、MassARRAY法は研究目的の解析に際しては定量性に優れているが、大型で高額な機器を要し、解析手技は煩雑で、また少数症例ごとの解析に適さない。そこで、エピゲノム診断の病院における臨床検査としての実用化のために、国内診断機器メーカーと共同研究契約を結び、MassARRAY法とは異なるプラットフォームのDNAメチル化診断専用機器の共同開発研究を実施している。同社の採用する測定原理により我々と同一の組織検体においてDNAメチル化定量を実施したところ、DNAメチル化率ならびにCIMPの有無の判定について、MassARRAY法による我々の結果と良好な一致を見ている。

また、本研究事業と異なるプロジェクト型共同研究で、CIMP陽性腎細胞がんにおける、エクソソーム解析（網羅的遺伝子変異解析）・SurePrint Human Gene Expressionアレイを用いたトランスクリプトーム解析・two dimensional

image converted analysis of liquid chromatography-mass spectrometry法によるプロテオーム解析の統合解析（多層的オミックス解析）を試みている。アミノ酸置換を伴う1塩基変異・欠失挿入型変異・mRNA発現異常・タンパク発現異常が高頻度である遺伝子を用いたMetaCore分子経路解析で、CIMP陽性腎細胞がんにおいては、3層のオミックスの異常が、細胞接着・細胞周期・DNA修復に関わる多数の分子経路に集積していることが分かった。これらの分子経路を構成する分子は、CIMP陽性腎細胞がんの治療薬創薬標的候補と考えられた。最も異常の頻度が高い分子経路の構成分子の、CIMP陽性症例における有意な発現亢進を、定量RT-PCR法で検証した。腎がん細胞株17株においてInfinium解析・MassARRAY解析・定量RT-PCR解析を実施し、CIMP陰性モデル腎がん細胞株3株・CIMP陽性モデル腎がん細胞株3株を同定した。最も異常の頻度が高い治療標的候補分子経路の上位分子の複数の阻害剤を入手し、CIMP陽性モデル腎がん細胞株において半数阻害濃度等を算出し、奏効性の検証を進めている。今後、免疫不全動物におけるCIMP陽性腎がん細胞株移植モデル等を用いて前臨床研究を進める予定である。

D. 考察

腎細胞がんは労働人口に属する壮年期にもしばしば発生し、検診における超音波検査等で診断され、対側の腎臓が健康であればほぼ例外なく手術適応になる。すなわち、CIMPマーカー遺伝子を用いた我々の予後診断法の実施に際しては、手術検体から余分な侵襲なく組織検体が採取でき、臨床検査として導入し易いと期待される。発がん過程で起こったDNAメチル化異常は、維持メチル化機構によりDNA2重鎖上に共有結合で安定に保持されるため、がん細胞の微小環境の影響を受けやすいmRNA・タンパク質発現等に比し、診断指標としての再現性が高く、バイオマーカーとして概して優れていると考えられる。

腎摘除術で根治する症例群が腎細胞がんの大勢をなす反面、急速に遠隔転移を来す症例群も明らかに存在し、両者の臨床経過には大きな差がある。病理組織学的に低異型度で最もありふれた組織型である胞巣型淡明細胞がん属しながら、急速に遠隔転移を来す症例が比較的しばしば経験される。このような症例群があらかじめ予測できれば、泌尿器科診療にとって有益である。本研究により我々の開発したCIMP診断基準が予後診断法として有用であることを示し得たので、病院における臨床検査としての実用化研究を、本研究期間終了後も継続して推進したい。

さらに、多層的オミックス解析の結果を総合すると、我々が本研究において実用化を目指しているCIMP診断法は、単に予後予測を行うだけでなく、個別化医療の基盤となる病型診断であると期待された。

手術検体において我々の診断法を実施し、CIMP 陰性であれば術後再発なく根治することが期待される。CIMP 陽性群においては、再発の早期診断を目指した頻回の画像診断等が推奨されるのみならず、同定した分子経路の阻害剤を再発後の治療に用いるか、術後直ちに実施するアジュバント療法に用いる、といった個別化医療のスキームが考えられる。今後、前臨床研究をさらに進め、CIMP 診断をコンパニオン診断とし、同定した分子経路の阻害剤を用いた術後アジュバント療法の、医師主導治験等の提唱につなげたい。

E. 結論

CIMP マーカー遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化率を定量することにより、腎細胞がんの予後診断法を開発した。企業との共同研究を行い、病院における臨床検査としての実用化を目指している。CIMP 診断は、CIMP 陽性腎細胞がん症例における標的治療のコンパニオン診断となる可能性があり、個別化医療に有用であると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

- Sato T, Arai E, Kohno T, Takahashi Y, Miyata S, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. **Int J Cancer**, in press.
 - Kanai Y and Arai E. Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium. **Front Genet**, 5: 24, 2014.
 - 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. **PLoS One**, 8: e59444, 2013.
- 本研究費に密接に関係するもの
- Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, Mori T, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T and Kanai Y. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. **Int J Cancer**, online.
 - 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.
 - Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, Kushima R, Hiraoka N, Tsuta K, Tsuda H and Kanai Y. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. **Br J Cancer**, 108: 951-958, 2013.
 - Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H and Hirao Y. Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. **BMC Cancer**, 13: 275, 2013.
 - Matsubara A, Sekine S, Yoshida M, Yoshida A, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H and Kanai Y. Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumors. **Histopathology**, 62: 657-661, 2013.
 - Matsubara A, Sekine S, Kushima R, Ogawa R, Taniguchi H, Tsuda H and Kanai Y. Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum. **J Pathol**, 229: 579-587, 2013.
 - Yamazaki H, Mori T, Yazawa M, Maeshima A, Matsumoto F, Yoshimoto S, Ota Y, Kaneko A, Tsuda H and Kanai Y. Stem cell self-renewal factors, Bmi1 and HMGA2 expressed in head and neck squamous cell carcinoma: Clues to the tumor characteristics for diagnosis. **Lab Invest**, 93: 1331-1338, 2013.
 - Nakagawa T, Hara T, Kawahara T, Ogata Y, Nakanishi H, Komiyama M, Arai E, Kanai Y and Fujimoto H. Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy. **J Urol**, 189: 1275-1281, 2013.
 - Hara T, Nakanishi H, Nakagawa T, Komiyama M, Kawahara T, Manabe T, Miyake M, Arai E, Kanai Y and Fujimoto H. Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer. **Int J Urol**, 20: 993-999, 2013.
 - Oguro S, Shimada K, Ino Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma. **Am J Surg Pathol**, 37: 1030-1038, 2013.
 - Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Oguro S, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Kanai Y and Hiraoka N. Arginase II expressed in cancer-associated

fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer. **PLoS One**, 8: e55146, 2013.

12. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. **Br J Cancer**, 108: 914-923, 2013.

2. 学会発表

1. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit, Phuket, April 2013. (invited)
2. 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. AACR Annual Meeting 2013, Washington, DC, April, 2013.
3. 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. AACR Annual Meeting 2013, Washington, DC, April, 2013.
4. Arai E, Miura F, Yamashita S, Shibata T, Ito T, Suzuki Y, Tian Y, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T and Kanai Y. Epigenome mapping in purified human hepatocytes. Annual Meeting and Science Days IHEC 2013, Berlin, November, 2013.
5. Yamanoi K, Arai E, Takahashi Y, Miyata S, Kushima R, Katai H, Sakamoto M and Kanai Y. Epigenetic clustering of gastric carcinoma based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013.
6. 新井恵吏, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma.

第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013年5月.

7. 田迎, 新井恵吏, 後藤政広, 藤元博行, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質陽性腎細胞がんの DNA メチル化診断法の開発. Epigenetic diagnosis of CpG island methylator phenotype renal cell carcinomas. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013年5月.
8. 金井弥栄. がんにおけるエピゲノム変化の解明と病態診断への応用. シンポジウム7「エピゲノムが拓く新たな人体病理学」第102回日本病理学会総会, 2013年6月 (招待講演).
9. 新井恵吏, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 澁谷亜矢子, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月.
10. 金井弥栄. 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムの取り組み. Activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). モーニングレクチャー5, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月 (招待講演).
11. 新井恵吏, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 澁谷亜矢子, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質腎細胞がんの多層的オミックス解析. Integrated Multilayer-Omics Analysis in CpG Island Methylator Phenotype-positive Renal Cell Carcinomas. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.
12. 田迎, 新井恵吏, 後藤政広, 藤元博行, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質マーカー遺伝子の DNA メチル化レベルを指標とする腎細胞がんの予後診断法の開発. Epigenetic prognostication of renal cell carcinoma patients using CpG island methylator phenotype marker genes. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10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、メチル化異常が前がん病変で発生すること、コピー数異常はその後のがん化の過程で獲得されることを明らかにした。大腸がん臨床例のメチル化異常およびコピー数異常に基づくクラスタリング結果が、臨床病期と良く相関することから、予後予測システムに応用しうる可能性が示された。また大腸がんにおいてシグナル脂質変換酵素遺伝子 DGKG のメチル化を同定した。DGKG メチル化は大腸腺腫および大腸がんを高頻度であり、その発現回復は大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤を抑制したことから、新規大腸がん抑制遺伝子候補と考えられた。

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。H24 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・肝がん・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。遺伝子機能をコピー形成アッセイ、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した。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん過程におけるゲノム・エピゲノム異常獲得の解析

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。大腸前がん病変からがんに至るまでのゲノム・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解析を行った。その結果、多くのメチル化は腺腫の段階で発生し、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) も腺腫においてしばしば認められた。一方、増幅・欠失などのコピー数異常は腺腫ではほとんど認められず、粘膜内がん以降に獲得されることが示された。また、大腸がんを CIMP とコピー数異常によってクラスタリング解析した結果、臨床ステージ分類および転移との相関が認められた。このことからメチル化異常とコピー数異常とを組み合わせることが、大腸がんの臨床予後予測に有用であることが示唆された。

(2) 大腸がんの網羅的 DNA メチル化解析と新規がん関連遺伝子メチル化の同定

大腸がん細胞においてエピジェネティックに不活化し、かつ臨床例においても高頻度にメチル化する遺伝子を同定するため、エピゲノムの統合解析を行った。大腸がん細胞 HCT116 において脱メチル化処理によって発現回復する遺伝子を cDNA アレイおよびヒストン修飾 (H3K4me3) データから割り出し、腺管分離法で分離した大腸がん臨床例の DNA メチル化を

MCAM 法で解析した。それらを統合した結果、大腸がんにおいてメチル化する遺伝子 219 個を同定した。Gene Ontology 解析からそれらの遺伝子は発生、分化に強く関連することがわかった。その中で我々は、シグナル脂質変換酵素遺伝子 DGKG に着目した。DGKG は PKC を介した細胞シグナルや、RAC を介した細胞運動能への関与が知られている。DGKG は大腸腺腫および大腸がんの 50~60%においてメチル化していた。また DGKG 発現により大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤の抑制効果が認められた。これらの結果から、DGKG が新規のがん抑制遺伝子であること、そして DGKG 遺伝子メチル化が大腸がんマーカーとして有用である可能性が示された。

(3) 大腸がんメチル化形質と相関する遺伝子異常の同定

がんにおける DNA メチル化異常の原因はいまだ不明な点が多い。大腸がんにおけるメチル化異常に関与する分子メカニズムを解明するため、CIMP 陽性大腸がんと CIMP 陰性大腸がんを対象に全エクソシーケンズ解析を行った。その結果、CIMP 陽性の大腸癌において高頻度に、クロマチン再構成因子である CHD7 および CHD8 の遺伝子変異を見いだした。またバイオインフォマティクス解析の結果、正常ヒト幹細胞において CHD7 の標的となる遺伝子は、大腸がんにおいてメチル化する傾向が示されたことから、これらの遺伝子変異が異常メチル化の成立に関わっている可能性が示された。

D. 考察

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、メチル化異常は前がん病変から発生していること、ゲノムコピー数異常は前がん病変からがん細胞への過程において獲得されることを明らかにした。メチル化異常とコピー数異常を組み合わせることで、がんの転移や予後を予測しうる可能性が示された。

DGKG 遺伝子メチル化は、大腸腺腫および大腸がんにおいて高頻度にメチル化しており、大腸がんの早期診断マーカー候補と考えられる。また DGK ファミリー蛋白はシグナル脂質変換酵素であり、セカンドメッセンジャーとして多様な生理的シグナル伝達に関わっているとされる。DGKG のがん細胞における役割はいまだ不明な点が多いが、DGKG の腫瘍抑制メカニズムをさらに明らかにすることで、新たな治療標的の同定につながることを期待される。

がんのメチル化異常発生メカニズムはいまだ不明であるが、我々は CIMP 陽性大腸がんにおいてクロマチン再構成因子をコードする CHD7 および CHD8 の変異を同定した。DNA メチル化異常への直接の関与は不明であるが、幹細胞における CHD7 標的とがん細胞に

おけるメチル化遺伝子がオーバーラップする点は興味深く、今後さらに検討が必要と考えられた。

E. 結論

大腸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。DGKG 遺伝子は新規大腸がん関連遺伝子であり、そのメチル化は診断マーカーとして有用性が示された。DGKG の関与するシグナル経路が、新たながん治療標的となりうる可能性が示唆された。また、大腸がんメチル化異常と相関する可能性のある遺伝子変異を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Nosho K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H and Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. **J Gastroenterol**, online.
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. 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.
4. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. **Front Genet**, 4: 258, 2013.

本研究費に密接に関係するもの

1. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP and Estécio MR. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. **Gastroenterology**, 146: 530-538, 2014.
2. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T,

- An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estecio MR and Issa JP. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. **Cancer Res**, 74: 1311-1318, 2014.
3. Noshio K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H and Shinomura Y. Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway. **Carcinogenesis**, 35: 776-783, 2014.
 4. Honda S, Okada T, Miyagi H, Minato M, Suzuki H and Taketomi A. Spontaneous rupture of an advanced pancreaticoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers. **J Pediatr Surg**, 48: e29-32, 2013.
 5. Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T and Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. **Exp Mol Pathol**, 94: 322-329, 2013.
 6. Ohashi T, Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H and Tokino T. AKR1B10, a transcriptional target of p53, is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with Poor Prognosis. **Mol Cancer Res**, 11: 1554-1163, 2013.
2. 学会発表
1. 鈴木 拓. がんエピゲノム解析による病態解明と診断応用. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月.
 2. 鈴木 拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 鈴木 亮, 清水崇, 原田 拓, 山野泰穂, 野島正寛, 高塚伸太郎, 新沼 猛, 甲斐正広, 篠村恭久, 今井浩三. マイクロ RNA 遺伝子のエピジェネティクス異常と臨床応用. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.
 3. 丸山玲緒, 山本英一郎, 糸川昂平, 津矢田明泰, 鈴木 亮, 芦田仁己, 佐藤亜紀子, 甲斐正広, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木 拓. 消化器癌において重要な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的同定の試み. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.
 4. 原田 拓, 山本英一郎, 野島正寛, 丸山玲緒, 佐藤亜紀子, 甲斐正広, 山野泰穂, 鈴木 拓. 腸管洗浄液のメチル化検出による大腸癌診断法の開発. 第33回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013年10月.
 5. 丸山玲緒, 山本英一郎, 糸川昂平, 津矢田明泰, 鈴木 亮, 芦田仁己, 甲斐正広, 佐藤亜紀子, 新沼 猛, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木 拓. 消化器癌の発生や進展に関与する長鎖 ncRNA の量的・質的異常の探索と臨床応用への試み. 第33回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013年10月.
 6. 鈴木 拓. microRNA 遺伝子のエピジェネティクス異常によるがん診断. 日本がん分子標的治療学会第9回トランスレーショナルワークショップ, 2014年1月.
 7. 鈴木 拓. 消化器癌のマイクロ RNA 異常とその臨床応用. エピジェネティック療法研究会第6回講演会, 2014年2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

早期胃癌は内視鏡による低侵襲な治療が広く行われてきているが、内視鏡治療後の遺残や再発を発見するための定量的な診断ツールは存在しない。我々は異常 DNA メチル化が胃発癌の過程において早期に高頻度に存在することを報告し、胃洗浄廃液を用いた DNA メチル化解析が胃癌発見において有用であることを報告した（欧州特許成立）。今回、Methylated CpG island amplification Microarray (MCAM) 解析にて選出した BARHL2 遺伝子が早期胃癌の内視鏡治療マーカーとして有用であるかに関して、機能解析とともに検討した。BARHL2 遺伝子 DNA メチル化は、胃発癌早期において重要であることが示唆された。我々の戦略では、このように同定された遺伝子は、直ちに有望なバイオマーカー候補となりうる。胃洗浄液を用いたエピジェネティック解析は、今までにない視点からの診断法であるだけでなく、胃癌の分子病態解明にも有用である。進行中の前向き多施設共同試験「内視鏡胃洗浄廃液を用いた胃癌内視鏡治療後異時再発の予測診断への応用」における DNA メチル化解析により、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1年後のメチル化が上昇している症例が存在したことは興味深い。今後、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。

A. 研究目的

早期胃癌内視鏡治療前後 6 症例 12 検体の胃洗浄廃液から抽出した DNA の網羅的メチル化解析にて有意に治療前後で差を認めた 18 の候補アレイプローブ（11 遺伝子）のうち HOX ドメインを有する転写因子である BARHL2 遺伝子の機能解析および分子マーカーとしての有用性を明らかにする。併せて、前向き多施設共同試験における DNA メチル化解析を継続する。

B. 研究方法

1. 胃癌細胞株を対象に、バイサルファイトパイロシーケンス法にて BARHL2 遺伝子の DNA メチル化レベルを解析した。リアルタイム PCR で BARHL2 発現を解析した。脱メチル化剤処理による再発現実験を行った。遺伝子導入を行い、コロニーフォーメーションアッセイを行った。

2. 胃癌組織の tissue microarray および胃腺腫組織を対象に抗 BARHL2 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。早期胃癌内視鏡治療前後の 64 症例 128 検体の胃洗浄廃液 DNA を対象に、バイサルファイトパイロシーケンス法にて BARHL2 遺伝子の DNA メチル化レベルを検討した。

3. 平成 23 年 4 月より聖マリアンナ医科大学、北

海道大学をはじめとする 10 施設により、前向き多施設共同試験「内視鏡胃洗浄廃液を用いた胃癌内視鏡治療後異時再発の予測診断への応用」が進行している。本試験における検体から DNA を抽出しパイロシーケンスで DNA メチル化を解析した。

（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。

C. 研究結果

1. BARHL2 遺伝子に関し、バイサルファイトパイロシーケンシングのプライマーを設計し、解析した。BARHL2 メチル化レベルは、MKN1 (56%)、MKN7 (75%)、MKN45 (96%)、MKN74 (34%)、NUGC3 (13%)、KatoIII (16%)、AZ521 (92%) であった。メチル化レベルの高い MKN7、MKN45 で BARHL2 発現低下を認め、DNA メチル化レベルと発現レベルの逆相関を認めた。MKN7、MKN45 の脱メチル化剤処理により BARHL2 の再発現を認めた。さらに、MKN45 に対する BARHL2 の遺伝子導入により、コロニーフォーメーション能の抑制を認

めた。

2. 胃癌組織における BARHL2 発現を免疫蛍光染色により解析した。胃炎および腺腫組織においては、核に発現を認めた。一方、胃癌組織では、高頻度で、発現低下、消失を認めた。検出セット (64 症例、128 検体) における BARHL1 メチル化解析で、症例の約 8 割が治療前において、BARHL2 遺伝子高メチル化を示し、治療後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した ($p < 0.0001$)。

3. 早期胃癌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ている。DNA メチル化解析を継続した。興味深いことに、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1 年後の解析において、メチル化が上昇している症例が存在した。

D. 考察

MCAM 法を用いて、早期胃癌内視鏡治療前後 6 症例 12 検体の胃洗浄廃液から抽出した DNA のメチル化解析にて有意に治療前後で差を認めた 18 の候補アレイプローブ (11 遺伝子) のうち BARHL2 の解析を行った。

BARHL2 遺伝子 DNA メチル化は、胃発癌早期において重要であることが示唆された。我々のストラテジーでは、このように同定された遺伝子は、直ちに有望なバイオマーカー候補となりうる。

次世代シーケンスや各種オミクス解析法が著しく進歩しても、解析対象となる検体の選択が重要である。早期胃癌内視鏡治療前後の胃洗浄廃液サンプルを比較解析することは、背景粘膜等様々な要因によるバイアスを受けない極めて有用な方法であることが示唆された。

進行中の前向き多施設共同試験における DNA メチル化解析 (MINT25、SOX17、miR34b/c) により、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1 年後のメチル化が上昇している症例が存在したことは興味深い。今後の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解析は、今までにない視点からの診断法であるだけでなく、胃癌の分子病態解明にも有用である。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 (3 年目) において有望な成果が得られつつある。

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. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K and Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. **Genes Cells**, 18: 1120-1130, 2013.

2. 学会発表

1. 大石嘉恭, 渡邊嘉行, 平石哲也, 前畑忠輝, 伊東文生. 早期胃癌分子診断応用における Sox17 遺伝子高メチル化の有用性. 第 50 回日本臨床分子医学会学術集会, 2013 年 4 月.

2. 細谷浩介, 渡邊嘉行, 及川律子, 森田 亮, 吉田良仁, 前畑忠輝, 松本伸行, 山本博幸, 伊東文生. 早期胃癌の分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月

3. 前畑忠輝, 渡邊嘉行, 及川律子, 吉田良仁, 森田亮, 細谷浩介, 松本伸行, 山本博幸, 伊東文生. 早期胃癌の分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性. 第 64 回日本電気泳動学会総会, 2013 年 11 月

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

がん細胞における 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由来の初期化細胞を得た (reprogrammed tumor cells; RT 細胞)。本年度は①初期化可能マウスの解析を行うとともに、②大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いた解析を行った。

①初期化可能マウスに不完全な細胞初期化を誘導すると小児がん類似腫瘍が形成されることを示した。小児がん類似腫瘍細胞は、完全初期化により非腫瘍性細胞へと分化させることが可能であった。遺伝子変異に依存しないエピゲノム異常による発がん経路が存在することが明らかとなった。②大腸腫瘍由来 RT 細胞を、様々な細胞へと分化を誘導した。RT 細胞を大腸上皮に分化させると、再度腫瘍性増殖能を獲得することが分かった。しかし、胎盤や肝臓など別の細胞種に分化させると腫瘍性増殖能を失うことを示した。①②の結果は、発がんおよびがん細胞の維持における細胞分化状態、およびエピゲノム状態の重要性を示す結果であると考えられる。

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を観察され、発がんに促進的な役割を果たしていることが示唆されている。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 作製技術をエピゲノム変化を積極的に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た。

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」を作製した。初期化可能マウスを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)。

本年度は、①初期化可能マウスの解析を行うとともに、②大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いた解析を行うこ

とで、がん細胞におけるエピゲノム異常の起源、役割を検討した。

B. 研究方法

①初期化可能マウスを用いたがんエピゲノム研究

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を用いた。ドキシサイクリン投与調節により生体内での細胞初期化を途中で停止させ、初期化失敗細胞の病理組織学的解析および分子生物学的解析を行った。不完全な初期化により生じたがん細胞は、再度、細胞初期化因子を再発現させることで、完全初期化を試みた。樹立されたがん細胞由来 iPS 細胞を用いて、胚盤胞へのマイクロインジェクションを行い、偽妊娠マウス子宮に移植することでキメラマウス作製を試みた。

②大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いたがんエピゲノム研究

大腸腫瘍由来 *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。*Apc* 遺伝子の欠損が細胞分化能に影響を与えることを考慮し、野生型 *Apc* 遺伝子を用いて欠損した *Apc* 機能をレスキューし、分化を誘導した。分化誘導後にレスキューした *Apc* 遺伝子を再破壊して、大腸腫瘍細胞と同じ遺伝子異常を持つ様々な分化細胞を作出した。異なる種類の

分化細胞における大腸腫瘍細胞遺伝子異常の振る舞いを分子病理学的に検討した。

(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

①初期化可能マウスを用いたがんエピゲノム研究

初期化可能マウスにドキシサイクリンを約 4 週間投与すると、様々な臓器に腫瘍形成が認められた。それらは多能性幹細胞を含む奇形腫であり、生体マウス内で iPS 細胞を作製することに成功した。次に生体内初期化を途中で中止したところ、奇形腫とは異なる腫瘍の形成を引き起こすことが分かった。不完全な細胞初期化における腫瘍は、小児がんに類似することが分かった。DNA メチル化状態を検討すると、それらの腫瘍細胞では多能性幹細胞と部分的に類似した DNA メチル化パターンを示すことが明らかとなった。一方で、腫瘍細胞では、多能性幹細胞におけるポリコム標的遺伝子が抑制されていなかった。多能性獲得に向かう不完全なエピゲノムの改変が小児がん類似病変の形成、維持に関与していることが示唆された。同時に細胞脱分化が DNA メチル化異常の原因となりうることが示唆された。興味深いことに、不完全な初期化によるがん細胞は、完全初期化により、iPS 細胞へと変化し、非腫瘍性の細胞へと分化可能であることが確認された。

②大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いたがんエピゲノム研究

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。大腸腫瘍細胞における *Apc* 遺伝子の欠損が分化異常の原因となっている可能性を考慮し、*Apc* 遺伝子機能をレスキューすることでキメラマウスの作製に成功した。キメラマウスにおいてレスキューした *Apc* 遺伝子を再破壊した結果、腸管上皮においては速やかに腫瘍が発生することを確認した。しかしながら、肝臓など他の種類の細胞種では、*Apc* 遺伝子の再破壊後も明らかな腫瘍性変化は確認できなかった。

D. 考察

初期化可能マウスを用いて不完全な細胞初期化が小児がんに類似した発がんを引き起こすことを明らかにした。さらにこのマウスに発生したがん細胞を完全初期化することで iPS 細胞が樹立可能であり、がん細胞由来 iPS 細胞が非腫瘍性の細胞に分化することを示した。これら一連のプロセスには遺伝子配列の変化は起こらないことを考えると、不完全な初期化による発がん過程は遺伝子変異により引き起こされるのではなく、エピジェネティクス修飾状態の変化による発がんであることが示唆された。小児がんなど一部のがんでは同様の発がんメカニズムが働いている可能性が考えられた。同時にそのようながんでは、エピゲノム制御への介入が有効な治療法となりうることが示唆された。

大腸腫瘍細胞から樹立された RT 細胞は、大腸上皮以外に分化転換させると、その腫瘍性増殖能を失う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を失うことが示された。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、この結果は、エピゲノム制御が、遺伝子に傷を持ったがん細胞においても、そ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。

E. 結論

我々の細胞初期化技術を用いた研究結果により、発がん過程やがん細胞の維持においてエピゲノム制御機構が重要な役割を果たすことが明らかとなった。エピジェネティック修飾状態を標的としたがん治療の重要性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Ohnishi K †, Semi K †, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K and Yamada Y. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. † These authors are equally contributed to this work. *Cell*, 156: 663-677, 2014.
2. 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.

3. 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.

2.学会発表

1. Yamada Y. Dissecting cancer biology by studying induced pluripotency. Gordon Research Conference. Galveston, TX, March, 2014.

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

雑誌（本研究費に謝辞のあるもの）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoda Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer.	Gastric Cancer			online
Okochi-Takada E, <u>Ushijima T</u> , et al.	ANGPTL4 is a secreted tumor-suppressor that inhibits angiogenesis.	Oncogene			online
Takahashi T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Estimation of the fraction of cancer cells in a tumor DNA sample using DNA methylation.	PLoS One	8	e82302	2013
Shigematsu Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	Interleukin-1b induced by <i>Helicobacter pylori</i> infection enhances mouse gastric carcinogenesis.	Cancer Lett	340	141-147	2013
Zhu Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression.	J Clin Invest	123	2935-2947	2013
Asada K, <u>Ushijima T</u> , et al.	Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas.	J Hum Genet	58	428-433	2013
Hattori N, <u>Ushijima T</u> , et al.	Visualization of multivalent histone modification in a single cell reveals highly concerted epigenetic changes on differentiation of embryonic stem cells.	Nucleic Acids Res	41	7231-7239	2013
Asada K, <u>Ushijima T</u> , et al.	Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas.	Jpn J Clin Oncol	43	641-645	2013
Asada K, <u>Ushijima T</u> , 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, <u>Ushijima T</u> , 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
Niwa T, <u>Ushijima T</u> , 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
Sato T, <u>Kanai Y</u> , et al.	Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease.	Int J Cancer			in press

Kanai Y and Arai E.	Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium.	Front Genet	5	24	2014
Sato T, Kanai Y, et al.	DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma.	PLoS One	8	e59444	2013
Suzuki R, Suzuki H, et al.	Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk.	J Gastroenterol			online
Sawada T, Suzuki H, 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
Shimizu T, Suzuki H, et al.	Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer.	Eur Urol	63	1091-1100	2013
Suzuki H, et al.	Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer.	Front Genet	4	258	2013
Ohnishi K, Semi K, Yamada Y, et al.	Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.	Cell	156	663-677	2014
Hirata A, Ushijima T, Yamada Y, 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, Yamada Y, et al.	<i>EWS/ATF1</i> expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice.	J Clin Invest	123	600-610	2013
Yamada M, Ushijima T, et al.	Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving <i>CDHI</i> .	Gastric Cancer			online
Imaoka T, Ushijima T, et al.	Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis.	Int J Cancer	134	1529-1538	2014
Yoshida T, Ushijima T, et al.	Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and <i>Helicobacter pylori</i> antibody titer.	Int J Cancer	134	1445-1457	2014
Suzuki T, Ushijima T, et al.	Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors.	Cancer Sci	104	1575-1585	2013
Ito Y, Ushijima T, et al.	EGFR L2 domain mutation is not correlated with resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients.	J Cancer Res Clin Oncol	139	1391-1396	2013
Yoshida T, Ushijima T, et al.	Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active <i>Helicobacter pylori</i> -related gastritis.	Gastric Cancer	16	488-497	2013
Imai S, Ushijima T, et al.	Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain.	Brain	136	828-843	2013
Arai E, Kanai Y, et al.	Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome.	Int J Cancer			online

Saito Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells.	Int J Cancer	132	1751-1760	2013
Nishikawa G, <u>Kanai Y</u> , et al.	Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms.	Br J Cancer	108	951-958	2013
Chihara Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis.	BMC Cancer	13	275	2013
Matsubara A, <u>Kanai Y</u> , et al.	Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumors.	Histopathology	62	657-661	2013
Matsubara A, <u>Kanai Y</u> , et al.	Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum.	J Pathol	229	579-587	2013
Yamazaki H, <u>Kanai Y</u> , et al.	Stem cell self-renewal factors, Bmi1 and HMGA2 expressed in head and neck squamous cell carcinoma: Clues to the tumor characteristics for diagnosis.	Lab Invest	93	1331-1338	2013
Nakagawa T, <u>Kanai Y</u> , et al.	Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy.	J Urol	189	1275-1281	2013
Hara T, <u>Kanai Y</u> , et al.	Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer.	Int J Urol	20	993-999	2013
Oguro S, <u>Kanai Y</u> , et al.	Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma.	Am J Surg Pathol	37	1030-1038	2013
Ino Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	Arginase II expressed in cancer-associated fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer.	PLoS One	8	e55146	2013
Ino Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer.	Br J Cancer	108	914-923	2013
Tahara T, <u>Suzuki H</u> , et al.	Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators.	Gastroenterology	146	530-538	2014
Tahara T, <u>Suzuki H</u> , et al.	Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma.	Cancer Res	74	1311-1318	2014
Nosho K, <u>Suzuki H</u> , et al.	Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway.	Carcinogenesis	35	776-783	2014
Honda S, <u>Suzuki H</u> , et al.	Spontaneous rupture of an advanced pancreatoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers.	J Pediatr Surg	48	e29-32	2013
Morita R, <u>Suzuki H</u> , et al.	DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers.	Exp Mol Pathol	94	322-329	2013
Ohashi T, <u>Suzuki H</u> , et al.	AKR1B10, a transcriptional target of p53, is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with Poor Prognosis.	Mol Cancer Res	11	1554-1163	2013
Watanabe Y, <u>Itoh F</u> , et al.	Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.	Genes Cells	18	1120-1130	2013

Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer

Yukie Yoda · Hideyuki Takeshima · Tohru Niwa · Jeong Goo Kim · Takayuki Ando · Ryoji Kushima · Toshiro Sugiyama · Hitoshi Katai · Hirokazu Noshiro · Toshikazu Ushijima

Received: 13 December 2013 / Accepted: 18 January 2014
© The International Gastric Cancer Association and The Japanese Gastric Cancer Association 2014

Abstract

Background The profiles of genetic and epigenetic alterations in cancer-related pathways are considered to be useful for selection of patients likely to respond to specific drugs, including molecular-targeted and epigenetic drugs. In this study, we aimed to characterize such profiles in gastric cancers (GCs).

Methods Genetic alterations of 55 cancer-related genes were analyzed by a benchtop next-generation sequencer. DNA methylation statuses were analyzed by a bead array with 485,512 probes.

Results The WNT pathway was activated by mutations of *CTNNB1* in 2 GCs and potentially by aberrant methylation of its negative regulators, such as *DKK3*, *NKDI1*, and *SFRP1*, in 49 GCs. The AKT/mTOR pathway was activated by mutations of *PIK3CA* and *PTPN11* in 4 GCs. The MAPK pathway was activated by mutations and gene amplifications of *ERBB2*, *FLT3*, and *KRAS* in 11 GCs. Cell-cycle regulation was affected by aberrant methylation of *CDKN2A* and *CHFR* in 13 GCs. Mismatch repair was affected by a mutation of *MLH1* in 1 GC and by aberrant methylation of *MLH1* in 2 GCs. The p53 pathway was inactivated by mutations of *TP53* in 19 GCs and potentially by aberrant methylation of its downstream genes in 38 GCs. Cell adhesion was affected by mutations of *CDH1* in 2 GCs.

Conclusions Genes involved in cancer-related pathways were more frequently affected by epigenetic alterations than by genetic alterations. The profiles of genetic and epigenetic alterations are expected to be useful for selection of the patients who are likely to benefit from specific drugs.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10120-014-0348-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Yoda · H. Takeshima · T. Niwa · J. G. Kim · T. Ushijima (✉)
Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan
e-mail: tushijim@ncc.go.jp

Y. Yoda · H. Noshiro
Department of Surgery, Faculty of Medicine, Saga University, Saga, Japan

J. G. Kim
Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

T. Ando · T. Sugiyama
Third Department of Internal Medicine, University of Toyama, Toyama, Japan

R. Kushima
Pathology Division and Clinical Laboratory, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

H. Katai
Gastric Surgery Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

Keywords Epigenetics · DNA methylation · Genetic alterations · Gastric cancer · Cancer-related pathway

Abbreviations

GC Gastric cancer
CGI CpG island
PGM Personal Genome Machine
TSS Transcription start site
CIMP CpG island methylator phenotype

Introduction

Genetic and epigenetic alterations are involved in gastric cancer (GC) development and progression by activating growth-promoting pathways and inactivating tumor-suppressive pathways. Genetic alterations consist of point mutations, small insertions and deletions, and chromosomal gains and losses, including gene amplifications. Among epigenetic alterations, aberrant DNA methylation of a promoter CpG island (CGI) is known to repress transcription of its downstream gene consistently, and a tumor suppressor gene can be permanently inactivated by this mechanism [1]. In gastric carcinogenesis, the contribution of aberrant methylation is known to be large because *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection causes aberrant methylation [2].

Growth-promoting pathways activated in GCs include the WNT, AKT/mTOR, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. These pathways can be activated not only by activating mutations of oncogenes but also by inactivation of their negative regulators. The WNT pathway can be activated by activating mutations of *CTNNB1* (β -catenin) and by inactivation of its negative regulators, such as *SFRP1* [3], *DKK3* [4], and *WIF1* [5]. The AKT/mTOR pathway can be activated by activating mutations of *PIK3CA* and by inactivation of its negative regulators, such as *PTEN* and *THEM4* [6]. The MAPK pathway can be activated by activating mutations and gene amplifications of *ERBB2* and *KRAS* and by inactivation of its negative regulators, such as *RASSF1A* [7].

Tumor-suppressive pathways inactivated in GCs include the RB/p16 pathway (cell-cycle regulation), mismatch repair, the p53 pathway, and cell adhesion. The RB/p16 pathway can be inactivated by mutations, losses, and aberrant DNA methylation of *RB* and *p16* [8], and by inactivation of a cell-cycle checkpoint gene, *CHFR* [9]. Mismatch repair can be affected by mutations, losses, and aberrant methylation of mismatch repair genes, such as *MLH1* and *MSH2* [10]. The p53 pathway can be inactivated by mutations and losses of *TP53* and potentially by inactivation of multiple members of its downstream genes, including *IGFBP7*, *MIR34b/c*, and *THBS1* [11]. Cell adhesion can be affected by mutations, losses, and aberrant methylation of *CDH1* and is known to be important for diffuse-type histology [12–14].

Analysis of these genetic and epigenetic alterations is important for selection of patients who are likely to respond to specific molecular-targeted drugs, such as trastuzumab (*ERBB2* amplifications) [15] and everolimus (*PIK3CA* mutations) [16]. Also, the profiles of the alterations are expected to enable selection of patients who are likely to benefit from epigenetic drugs [17–20]. Nevertheless, until

recently, these genetic and epigenetic alterations have been analyzed only individually because technologies for their comprehensive analysis have not been available at a reasonable cost. Now, point mutations and gene amplifications of a large number of target genes can be analyzed by benchtop next-generation sequencers [21], and a comprehensive DNA methylation profile can be analyzed using a bead array [22].

In this study, we aimed to establish an integrated profile of genetic and epigenetic alterations in GC-related pathways using these new technologies.

Materials and methods

Samples

Fifty GC and corresponding non-cancer samples were collected surgically (41 samples) or endoscopically (9 samples). Additionally, normal gastric mucosae of 6 healthy volunteers without current *H. pylori* infection were endoscopically collected. All the procedures were approved by the Institutional Review Boards and performed with informed consents. Among the 50 GC samples, 30 GC samples were used in our previous study [23]. The samples were stored in *RNAlater* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA was extracted from the GC, non-cancer, and normal gastric mucosae samples by the phenol/chloroform method, and extracted DNA was quantified using a Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies). Total RNA was extracted using IS-OGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan).

Analysis of somatic mutations

Sequence variations were obtained using the Ion Personal Genome Machine (PGM) sequencer (Life Technologies) as described previously [23]. Twenty GC samples were newly analyzed, and their reading depths are shown in Supplementary Table 1. The data were combined with the previously reported mutation data [23]. All the sequence variations identified by the Ion PGM sequencer were confirmed by dideoxy sequencing with primers listed in Supplementary Table 2. When a variation was absent in the corresponding non-cancer tissue, the variation was considered as a somatic mutation.

Analysis of gene amplifications

Gene amplifications of 33 genes with three or more polymerase chain reaction (PCR) amplicons were analyzed using the data of reading depths obtained by the Ion PGM

sequencer. Reading depths of the PCR amplicons in a specific GC sample were plotted against the mean reading depths of those in the 50 GC samples, and genes with PCR amplicons whose reading depths were larger (threefold or more) than those of the other genes were defined as amplified genes.

Selection of genes of cancer-related pathways

Genes involved in seven cancer-related pathways (the WNT pathway, the AKT/mTOR pathway, the MAPK pathway, cell-cycle regulation, mismatch repair, the p53 pathway, and cell adhesion) were selected from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database (<http://www.genome.jp/kegg/>). Regarding the signaling pathways activated in GCs, their negative regulators were selected. Regarding the pathways inactivated in GCs, their positive regulators and downstream effectors were selected. A total of 72 genes were selected as candidates for analysis of DNA methylation in this study.

Analysis of DNA methylation

DNA methylation levels of 485,512 probes (482,421 probes for CpG sites and 3,091 probes for non-CpG sites) were obtained using an Infinium HumanMethylation450 BeadChip array as described previously [24]. Twenty GC samples were newly analyzed, and the data were combined with the previously reported methylation data [23]. To adjust for probe design biases, intraarray normalization was performed using a peak-based correction method, Beta MIxture Quantile dilation [25]. The methylation level of each CpG site was represented by a β value that ranged from 0 (unmethylated) to 1 (fully methylated).

DNA methylation of a CGI in a promoter region, especially in the 200-bp upstream region from a transcription start site (TSS) (TSS200), is known to consistently silence its downstream gene, whereas that of downstream exons is weakly associated with increased expression [1, 26–28]. Therefore, we were careful to analyze DNA methylation of a CGI in a TSS200 as much as possible. To achieve this, probes for CpG sites were assembled into 296,494 genomic blocks smaller than 500 bp. Among the 296,494 genomic blocks, 59,757 were located in CGIs and 11,307 of them were located in TSS200s. Of the 72 genes selected for the cancer-related pathway analysis, 52 genes had genomic blocks in their promoter CGIs unmethylated in normal gastric mucosae. For *MLH1*, two genomic blocks in its two TSS200s were analyzed. For *CDKN2A* (*p16*), a genomic block immediately downstream of its TSS was analyzed because no genomic block was located in its TSS200, although it had a CGI spanning from its promoter region to exon 1. The positions of CpG sites of the 53 blocks are shown in Supplementary

Table 3. The DNA methylation level of a genomic block was evaluated using the mean β value of all the probes within the genomic block, and the methylation status of the genomic block was classified into unmethylated (β value, 0–0.2), partially methylated (β value, 0.2–0.4), and heavily methylated (β value, 0.4–1.0).

Analysis of gene expression

The data of gene expression in normal gastric mucosae without *H. pylori* infection, analyzed by the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), were obtained from our previous study [23]. Genes with signal intensities of 250 or more were defined as expressed genes.

Survival curve and statistical analysis

The Kaplan–Meier survival curves were drawn using SPSS 13.0J (SPSS Japan, Tokyo, Japan) for overall survival (OS) of 41 patients whose prognostic information was obtained. The differences in the survival rates were evaluated using the Mantel–Cox test. Association between a pathway alteration and clinicopathological characteristics was evaluated by the Fisher exact test (gender, histological differentiation, depth of tumor, lymph node metastasis, and recurrence) and the Student's *t* test (age). *H. pylori* infection status was not evaluated because it is known that most GC patients had current or past infection of *H. pylori* [29].

Results

Point mutations and gene amplifications in GCs

Among the 50 GCs analyzed for mutations of the 55 cancer-related genes, 27 GCs had 35 somatic mutations, among which 32 and 3 were missense and nonsense mutations, respectively (Table 1). Five oncogenes, *CTNNB1*, *ERBB2*, *KRAS*, *PIK3CA* and *PTPN11*, and four tumor suppressor genes, *CDH1*, *MLH1*, *SMARCB1*, and *TP53*, were mutated. *TP53* was most frequently mutated (19 of the 50 GCs), and *CDH1*, *CTNNB1*, *ERBB2*, *KRAS*, and *PIK3CA* were mutated in 2 or more GCs.

Gene amplification was analyzed for the 33 cancer-related genes in the 50 GCs (Fig. 1, Supplementary Table 4). *ERBB2* was amplified in 3 GCs (S17TP, 3.6-fold; S23TP, 10.5-fold; and S36TP, 5.4-fold; respectively). *FLT3* (S152TP, 3.7-fold), *KRAS* (S18TP, 5.8-fold), and *MLH1* (S131TP, 3.5-fold) were amplified in 1 GC. The combination of point mutations and gene amplifications showed that 58 % of GCs (29 of the 50 GCs) had at least one genetic alteration of the 55 cancer-related genes.

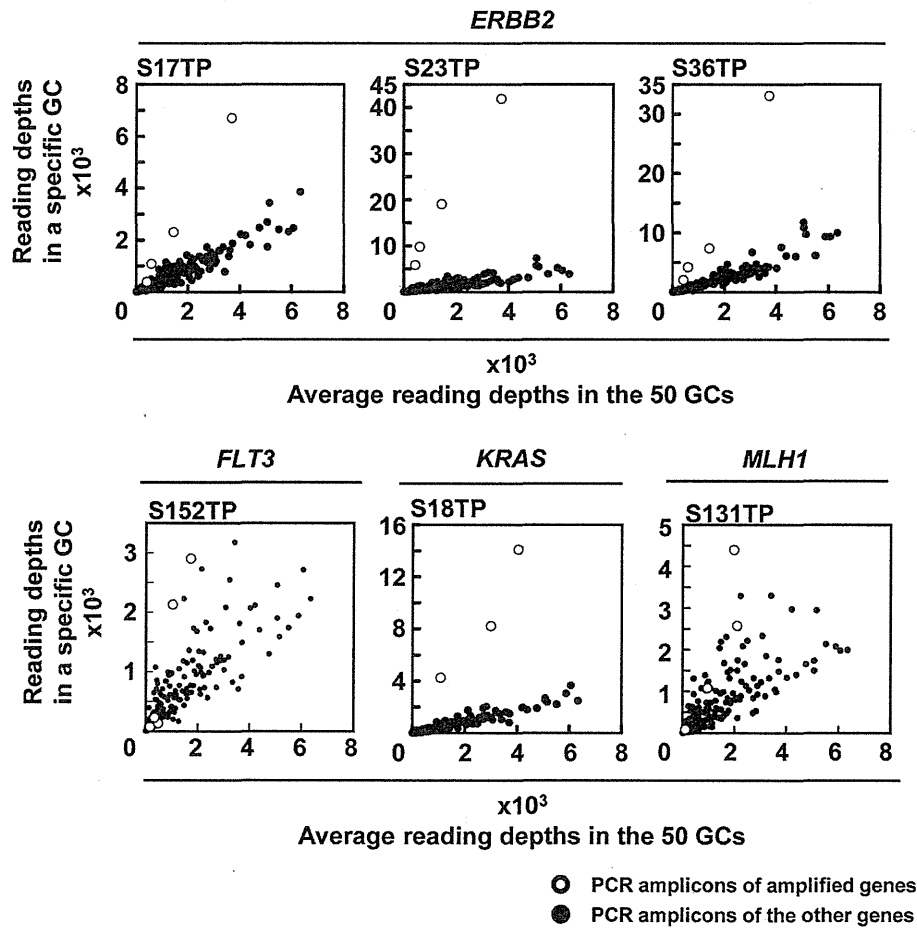
Table 1 List of somatic mutations identified in the 50 gastric cancers (GCs)

Sample name	Gene	Coverage	Variant frequencies	Nucleotide change	Amino acid change	References
S1TP	<i>CDH1</i>	399	10.3	c.1198G>A	p.Asp400Asn	[23]
S2TP	<i>TP53</i>	496	34.1	c.581T>G	p.Leu194Arg	[23]
S3TP	No mutation					This study
S4TP	<i>TP53</i>	438	74.2	c.581T>G	p.Leu194Arg	[23]
S5TP	<i>KRAS</i>	1626	54.4	c.38G>A	p.Gly13Asp	[23]
	<i>SMARCB1</i>	50	56	c.1130G>A	p.Arg377His	[23]
S6TP	<i>TP53</i>	2077	24.7	c.820G>C	p.Val274Leu	[23]
S9TP	No mutation					[23]
S10TP	<i>TP53</i>	2030	41.1	c.833C>A	p.Pro278His	This study
S11TP	<i>TP53</i>	10211	53.4	c.844C>T	p.Arg282Trp	[23]
S12TP	<i>ERBB2</i>	24516	63.8	c.2264T>C	p.Leu755Ser	[23]
S13TP	<i>TP53</i>	70	15.7	c.478A>G	p.Met160Val	[23]
	<i>ERBB2</i>	482	23.9	c.2264T>C	p.Leu755Ser	[23]
S14TP	No mutation					[23]
S15TP	<i>TP53</i>	534	40.3	c.743G>A	p.Arg248Gln	[23]
S16TP	<i>TP53</i>	453	36.2	c.660T>G	p.Tyr220Ter	[23]
S17TP	No mutation					[23]
S18TP	<i>TP53</i>	1946	26.5	c.537T>A	p.His179Gln	[23]
S19TP	No mutation					[23]
S20TP	No mutation					[23]
S21TP	No mutation					This study
S22TP	No mutation					[23]
S23TP	<i>TP53</i>	565	67.8	c.537T>A	p.His179Gln	[23]
S24TP	No mutation					[23]
S25TP	<i>TP53</i>	609	45.6	c.401T>G	p.Phe134Cys	This study
S26TP	No mutation					This study
S31TP	<i>KRAS</i>	1979	56.6	c.35G>T	p.Gly12Val	This study
	<i>PTPN11</i>	7391	56.8	c.182A>G	p.Asp61Gly	This study
S32TP	No mutation					[23]
S33TP	<i>MLH1</i>	4092	45.4	c.1744C>G	p.Leu582Val	[23]
	<i>CTNNB1</i>	11994	20.5	c.101G>A	p.Gly34Glu	[23]
	<i>PIK3CA</i>	276	49.3	c.1633G>A	p.Glu545Lys	[23]
	<i>TP53</i>	1142	34.9	c.524G>A	p.Arg175His	[23]
S34TP	<i>TP53</i>	551	28.3	c.641A>G	p.His214Arg	[23]
S35TP	<i>KRAS</i>	770	41.3	c.35G>T	p.Gly12Val	[23]
S36TP	<i>TP53</i>	1142	34.9	c.524G>A	p.Arg175His	[23]
S37TP	<i>PIK3CA</i>	59	15.3	c.1624G>A	p.Glu542Lys	[23]
S39TP	No mutation					This study
S40TP	No mutation					[23]
S42TP	No mutation					[23]
S43TP	<i>TP53</i>	239	74.9	c.1024C>T	p.Arg342Ter	[23]
S44TP	<i>CDH1</i>	368	10.3	c.119C>T	p.Thr40Met	This study
	<i>TP53</i>	1163	14.6	c.818G>A	p.Arg273His	This study
S45TP	No mutation					[23]
S47TP	<i>CTNNB1</i>	4591	33.7	c.121A>G	p.Thr41Ala	[23]
S51TP	No mutation					This study
S53TP	<i>TP53</i>	1467	20.2	c.844C>T	p.Arg282Trp	This study

Table 1 continued

Sample name	Gene	Coverage	Variant frequencies	Nucleotide change	Amino acid change	References
S54TP	No mutation					This study
S124TP	No mutation					This study
S131TP	<i>PIK3CA</i>	266	17.3	c.1633G>A	p.Glu545Lys	This study
	<i>TP53</i>	898	67.8	c.493C>T	p.Gln165Ter	This study
S137TP	<i>KRAS</i>	508	34.4	c.35G>A	p.Gly12Asp	This study
S141TP	No mutation					This study
S150TP	No mutation					This study
S151TP	No mutation					This study
S152TP	No mutation					This study
S154TP	No mutation					This study
S162TP	<i>TP53</i>	605	36.5	c.400T>G	p.Phe134Val	This study

Fig. 1 Gene amplification of *ERBB2*, *FLT3*, *KRAS*, and *MLH1*. Reading depths of the PCR amplicons in a specific gastric cancer (GC) were plotted against the mean reading depths of the PCR amplicons in the 50 GCs. *ERBB2* was amplified in 3 GCs (S17TP, 3.6-fold; S23TP, 10.5-fold; and S36TP, 5.4-fold). *FLT3* (S152TP, 3.7-fold), *KRAS* (S18TP, 5.8-fold), and *MLH1* (S131TP, 3.5-fold), respectively, were amplified in 1 GC each. Open circles show the reading depths of PCR amplicons of the amplified genes



Growth-promoting pathways affected by epigenetic and genetic alterations

Aberrant DNA methylation of the 53 promoter CGIs of the 52 genes involved in the seven cancer-related pathways was

combined with genetic alterations in the 50 GCs (Fig.). First, potential activation of growth-promoting pathways by aberrant methylation of their negative regulators, in addition to activating genetic alterations (point mutations and gene amplifications), were analyzed. Regarding the WNT

