

201313002B(1/3)

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の
解明と応用に関する研究

平成22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成26年(2014)年 5月

1 / 3冊

目 次

I 総合研究報告	
ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の 解明と応用に関する研究	…………… 1
牛島俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野	
II 研究成果の刊行に関する一覧表	……………25
III 研究成果の刊行物・別刷	

総合研究報告書

ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の解明と応用に関する研究

研究代表者 牛島俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 分野長

研究要旨

遺伝子のメチル化異常誘発の感受性に、ゲノムの構造である SINE および LINE との距離が関与していることを明らかにした。DNA メチル化異常誘発には、特定の慢性炎症が重要であること、単球・マクロファージが DNA メチル化異常誘発の重要な Effector である可能性が非常に高いこと、炎症などにより獲得した後天性の H3K27me3 異常も、DNA メチル化異常の誘因となることを示した。大腸腫瘍由来の初期化細胞を樹立し、*Apc* のレスキューにより個体への発生が可能であることを明らかにした。マウス生体内で山中 4 因子を発現させ、その初期化の程度が不十分だとヒト Wilms 腫瘍と極めて類似した腫瘍が形成されることを見出した。ヒト大腸がん及び胃がんにおいて DNA メチル化異常が誘発されるがん抑制遺伝子、non-coding RNA を複数 (*ANGPTL4*, *FHL1*, *DGKG*, *miR1-1*) 同定した。胃がんにおいて CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) とがん遺伝子の変異が関連していることを示した。CIMP 陽性腎細胞がんを判別することによる腎細胞がん予後診断マーカーパネルを開発し、検証コホートで有用性を確認した。胃洗浄廃液での DNA メチル化解析による胃がんの存在診断について、前向き多施設臨床試験を進めた。神経芽細胞腫の予後診断を継続して実施している。DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニング系を構築し、4 個のヒット化合物を得た。各種エピジェネティック修飾の組み合わせを可視化する技術 (iChmo) を開発した。

研究分担者

金井 弥栄 国立がん研究センター研究所
分子病理分野・分野長
豊田 実ⁱ⁾ 札幌医科大学
生化学第二講座・教授
鈴木 拓ⁱⁱ⁾ 札幌医科大学
分子生物学講座・教授
伊東 文生 聖マリアンナ医科大学
消化器肝臓内科・教授
山田 泰広 京都大学 iPS 細胞研究所
教授

ⁱ⁾ 分担研究期間：平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 6 月 16 日

ⁱⁱ⁾ 分担研究期間：平成 23 年 6 月 17 日～平成 26 年 3 月 31 日

A. 研究目的

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

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

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

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

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

一方、DNA メチル化異常が深くヒト発がんに関与し、診断的にも有用であるにも関わらず、どのような要因により、また、どのような分子機構により誘発されるのかについては、不明の点が多い。研究代表者らは、ヒト胃がんの強力な誘発因子である *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) 感染者の胃粘膜では、高度の DNA メチル化異常が蓄積していることを見出してきた。

本研究では、(1) DNA メチル化異常誘発の要因や分子機構を明らかにすること、(2) 特にゲノム網羅的な DNA メチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子のサイレンシングを含めて、がんでのエピジェネティック異常の全体像を解明してがんの本態を明らかにすること、(3) がんの診断マーカーとして臨床的に役立つ DNA メチル化変化を同定すること、(4) エピジェネティック治療の基盤を確立すること、を目的とする。

B. 研究方法

(1) マウス、スナネズミ、細胞株

Balb/c マウスは、日本チャールス・リバーから購入した。ヌードマウス、スナネズミは、日本クレアから購入した。細胞初期化因子の発現のコントロールが可能なマウスとして、*Rosa26* プロモーター制御下に *M2rtTA* を発現し、*Col1a1* 遺伝子座において tet オペレーター下に 2A polypeptide で連結させた山中 4 因子を有するトランスジェニックマウス (「初期化可能マウス」) を作製した。Balb/c マウス、あるいは家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Apc^{Min/+}* マウスに、強力な大腸発がんプロモーターである dextran sodium sulfate (DSS) を飲水投与して、大腸炎あるいは大腸腫瘍を誘発した。ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与をうけた。

(2) マウス大腸腫瘍細胞の初期化と分化

初期化可能マウスを *Apc^{Min/+}* マウスと交配し、DSS を投与することで誘発した大腸腫瘍に試験管内でドキシサイクリンを添加することで山中 4 因子を発現させ、大腸腫瘍由来の初期化細胞 (reprogrammed tumor cells; RT 細胞) を得た。

樹立した初期化細胞が、腫瘍細胞由来であることの確認は、PCR-RFLP 法を用いて *Apc* 遺伝子の LOH を

検索することにより行った。樹立された細胞の完全な初期化の評価は、*Nanog* 遺伝子の mRNA 発現解析により行った。

大腸腫瘍由来 RT 細胞の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。生体内での分化誘導は、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行った。

(3) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

ヒトのサンプルから抽出したゲノム DNA の網羅的なメチル化解析には、Illumina 社の (1) Infinium HumanMethylation27 または (2) HumanMethylation450 BeadChip、3) Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CGI マイクロアレイ法、あるいは (4) Methylated CpG island amplification microarray (MCAM) 法、(5) ゲノムキャプチャーにより回収した CGI 由来 DNA を次世代シーケンサーを用いてバイサルファイトシーケンシングする方法の、5 通りの方法を使い分けた。

MeDIP-CGI マイクロアレイ法では、ゲノム DNA を抗 5-メチルシチジン抗体で免疫沈降したものを、34,697 カ所の CGI を搭載するアレイにハイブリダイズさせ、本研究内で独自に開発したアルゴリズム (Me value) によりメチル化の程度を判定した。

Infinium を用いた解析では、重亜硫酸処理したゲノム DNA を増幅後 HumanMethylation27 では 27,578 CpG 部位、HumanMethylation450 では 482,421 CpG 部位が解析可能な BeadChip にハイブリダイズして、プライマー伸長反応後、iSCAN (Illumina) スキャナを用いてデータを取得した。完全メチル化を 1、完全非メチル化を 0 とする β 値を用いてメチル化の程度を判定した。

MCAM 法では、MCA 法により準備したプローブを、*XmaI/SmaI* により切断されてできた PCR 増幅可能な領域をカバーするように専用設計した DNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。

ゲノムキャプチャーは、ゲノム DNA を重亜硫酸処理し、2,076 個の CGI の標的配列由来の DNA を、完全メチル化された配列とメチル化されていない配列に対して作製したベイトを用いて回収することによって行った。回収した DNA はゲノムキャプチャーして得た DNA を次世代シーケンサー SOLiD (Life technologies 社) を用いてシーケンスした。

(4) ゲノム領域特異的な DNA メチル化解析

非メチル化シトシンを特異的にウラシルに変換する重亜硫酸処理の後、methylation-specific PCR (MSP) 法、定量的 MSP 法、シーケンス法、pyrosequencing 法、MassARRAY 法により解析した。MasARRAY 法においては、得られた質量分析結果を、解析ソフトウェア EpiTYPER (SEQUENOM) を用いて、

リファレンス配列にアラインメントし、メチル化DNAに由来するRNA断片と非メチル化DNAに由来するRNA断片との質量の比から、DNAメチル化率を算出した。

(5) ゲノム網羅的なヒストン修飾解析

特定のヒストン修飾に特異的な抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行った。網羅的解析ではCGIマイクロアレイ(ChIP-chip)と次世代シーケンサー(ChIP-seq)を用いた。

(6) ゲノム網羅的な遺伝子および non-coding RNA 発現解析、ゲノムコピー数異常解析

オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて行った。

(7) 遺伝子および noncoding RNA 発現定量解析

リアルタイムPCRを用いた定量的RT-PCR法により行った。

(8) 遺伝子変異解析

Life Technologies社のIon AmpliSeq Cancer Panel Kitおよび36個のカスタムプライマーを用いて55個のがん関連遺伝子をカバーする226種の増幅産物から成るライブラリーを作成し、Life Technologies社のIon 316あるいは318 chipおよびIon PGM Sequencerを用いて塩基配列を決定した。マッピングと変異アレル頻度の解析はCLC bio社のCLC Genomics Workbenchを用いて行った。変異が認められた領域は個別に増幅し、ジデオキシ法により塩基配列を確認した。

(9) 遺伝子機能解析

遺伝子導入後、コロニー形成アッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイにより解析した。

(10) 病理解析

組織は24時間緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィンに包埋後、組織切片を作製、病理組織学的に検討した。組織切片はHE染色および免疫染色にて検索した。

(11) 胃洗浄液の回収

EMR: Endoscopic mucosal resection/ ESD: Endoscopic submucosal dissection治療の適応となる症例の治療前後(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回収した。通常内視鏡検査時の洗浄に使用する洗浄液量に合わせて、かつ、形状をDNA回収時の遠心分離に対応できるものにして新規に作成した250 mL専用採取管を用いて胃洗浄液を回収した。採取管の素材には洗浄廃液採取量の視認性を考慮してpolyethylene terephthalateを用い、形状はDNA回収時の遠心分

離に対応できるものとした。採取管には2つの専用連結管を連結させ、すべての内視鏡装置の吸引口に適合するように新たに設計したコネクタを用いた。

(12) 統計解析・分子経路解析

Kaplan-Meier解析による予後解析、多変量ロジスティック回帰分析法による多変量解析を行った。網羅的に解析した腎組織におけるメチル化レベルと各種臨床病理学的所見との関係の解析においては、主成分分析、Cumulative logit model解析、Wilcoxon matched-pairs解析、Jonckheere-Terpstra傾向検定、Random forest解析を行った。分子経路探索はMetaCoreソフトウェア(<http://www.genego.com>)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

臨床材料は同意を得て採取した材料を、文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、各施設の倫理委員会に研究の承認を得て使用した。手術材料の残余の組織等の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し、文書で同意を得ている。試料の採取に当たっては、患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせなかった。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。全ての動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を得て、動物愛護に配慮して施行した。

C. 研究結果

(1) DNAメチル化異常の誘発要因や分子機構

1-1 DNAメチル化異常誘発の標的遺伝子決定機構

本研究開始までに、研究代表者らは*H. pylori*感染者の胃粘膜では特定の遺伝子にDNAメチル化異常が誘発されていること、メチル化異常誘発に抵抗性を示す遺伝子は有意に高レベルの転写活性型のヒストン修飾およびPoI II結合レベルを示すことを世界で初めて明らかにした。

本研究では、DNAメチル化異常誘発の遺伝子特異性におけるゲノム構造の影響について検討した。乳腺および前立腺のそれぞれ正常細胞およびがん細胞株についてDNAメチル化感受性のプロモーターCGI及び抵抗性のプロモーターCGIをゲノム網羅的に同定した。ゲノム上の散在する繰り返し配列であるSINE及びLINE近傍のCGIは有意にメチル化抵抗性であることを確認した。組織非特異的なDNAメチル化異常誘発感受性について多変量解析を行い、SINE及びLINEからの距離は、PoI II結合やH3K27me3修飾と同様に、他の因子と独立してDNAメチル化異常誘発の感受性に関与していることを明らかにした。

1-2 各種炎症の DNA メチル化異常誘発能

本研究開始までに、スナネズミモデルを用いて、ピロリ菌感染が DNA メチル化異常誘発の原因であること、DNA メチル化異常の誘発には感染の結果誘発された炎症が重要であることを明らかにしてきた。

本研究では、ピロリ菌感染以外の要因による炎症でも長期間持続すれば DNA メチル化異常が誘発されるのかを検討した。その結果、高濃度アルコールや高張食塩水の持続投与では、急性炎症が繰り返し誘発され、高度の細胞増殖が誘発されるにもかかわらず、解析した 8 個の CGI の DNA メチル化異常は誘発されなかった。従って、特定の慢性炎症が DNA メチル化異常の誘発に重要であることが示された。また、DNA メチル化異常誘発の程度と発現量が関連する炎症関連遺伝子として、*Il1b*, *Nos2*, *Tnf* の 3 遺伝子を見出した。

1-3 マウス大腸炎モデルにおける DNA メチル化異常誘発に重要な遺伝子の同定

本研究開始までに、DSS 投与マウス大腸炎モデルにおいて、誘発された腫瘍での DNA メチル化異常を同定、その異常は発がんに遙か先だって大腸粘膜に誘発され、発がんの素地の形成に関与していることを明らかにしてきた。

本研究では、このモデルにおける DNA メチル化異常誘発に関連する炎症関連因子について検討した。T・B 細胞が遺伝的に欠損している SCID マウスに DSS を飲水投与した。SCID マウスでも、野生型マウスと同等に、大腸腫瘍が誘発され、さらに大腸粘膜に DNA メチル化異常が誘発された。従って、DNA メチル化異常誘発の最終段階には T・B 細胞は不要であることが示された。DSS 投与後に、SCID マウスおよび野生型マウスの双方で共通して DNA メチル化異常誘発の程度と相関して発現上昇が認められる炎症関連遺伝子として、*Ifng*, *Il1b*, *Nos2* を見出した。

同様のマウスモデルにおいて、炎症により誘発される H3K27me3 修飾異常を同定した。この異常は、炎症に曝露した直後に誘発され、その後炎症が消失した後も長期間持続すること、DSS/AOM により誘発される腫瘍においても存在することを見出した。また、H3K27me3 の上昇が見られた遺伝子に関して、DNA メチル化レベルを調べたところ、一部の遺伝子 (*Dapk1*) において DNA メチル化異常が誘発されることを見出した。

さらに、TMK1 細胞株を炎症関連因子である IL1β で処理することにより、DNA メチル基転移酵素の活性に変化が無いものの、DNA 脱メチル化に関与する *TET* 遺伝子群の発現が低下することを見出した。同様の結果は、ピロリ菌に感染したスナネズミ胃粘膜においても認められた。

1-4 がん細胞エピジェネティック異常の起源解明のための腫瘍細胞のリプログラミング/再分化

本研究開始までに、DNA 低メチル化マウスを用いて、グローバルな DNA 低メチル化が、胃腫瘍および口腔腫瘍発生を強く抑制すること、また、DNA メチル化が大腸腫瘍細胞の未分化状態および増殖状態の維持に関与することを明らかにしてきた。

本研究では、iPS 細胞作製技術を用いることにより、腫瘍細胞のリプログラミング/再分化を行い、がん細胞における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研究を進めた。

当初は *Apc*^{Min/+}マウス大腸腫瘍細胞にレトロウイルスを用いて山中 4 因子を強制発現させることで、形態的に iPSC に類似した細胞 (T-iPSC 様細胞) を樹立した。T-iPSC 様細胞には、*Nanog* 遺伝子などの初期化マーカーは発現しておらず、初期化が不完全な細胞と考えられた。

そこで山中 4 因子の発現コントロールに、ドキシサイクリンによる遺伝子発現系を利用したマウスシステムを用いた (初期化可能マウス)。このマウスを *Apc*^{Min/+}マウスと交配し、得られたマウスに DSS 飲水投与することにより、大腸腫瘍を誘発した。大腸腫瘍細胞を培養し、試験管内でドキシサイクリン処理により山中因子を誘導することで、形態が多能性幹細胞に類似した細胞株を複数得た。これら細胞株では、腫瘍細胞由来であること、完全初期化のマーカーとして使用される *Nanog* 遺伝子が発現していることが確認された。腫瘍細胞の完全な初期化が可能であることが示唆された。

樹立した大腸腫瘍由来の reprogrammed tumor cells (RT 細胞) をマウス初期胚にマイクロインジェクションすることで、RT 細胞が胎盤組織へと分化することが確認された。また、胎盤組織に分化した大腸腫瘍細胞由来 RT 細胞は、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 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された。そこで *Apc* 遺伝子のレスキューを行うと、個体への発生が可能となり、*Apc* 遺伝子の欠損が分化異常の原因となっていることが示された。作製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腫瘍が発生する一方で、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。

さらに、初期化可能マウスにドキシサイクリンを約 4 週間投与することにより、様々な臓器に多能性幹細胞を含む奇形腫が発生することを見出し、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、Wilms 腫瘍に類似した腫瘍の形成を引き起こすことを見出した。不完全な初期化により発生したがん細胞は、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) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

2-1 エピジェネティックにサイレンシングされる non-coding RNA の網羅的同定

本研究開始までに、がんでは異常 DNA メチル化によりサイレンシングされる microRNA のスクリーニングを行い、大腸がん、胃がん、乳がんにおいて *miR-34b/c* の異常 DNA メチル化が認められることを報告してきた。

本研究では、microRNA の転写開始点を正確に把握して、DNA メチル化解析を行うことを目的として、*DNMT1*, *DNMT3B* の DKO 細胞における H3K4me3 の ChIP-seq 解析を、特に microRNA に関して詳細に行った。ゲノム中 233 個の microRNA 前駆体に、HCT116 細胞では認められず、DKO 細胞特異的な H3K4me3 のピークを認めた。その中で 22 個の microRNA が DKO 細胞で発現上昇し、前駆体の第一エクソン 5 kb 以内に CGI を有し、DNA メチル化によりサイレンシングされていた。同様に大腸がんにおいてメチル化異常を示す long non-coding RNA (lncRNA) 遺伝子の同定を進め、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 遺伝子を新規に 2 個同定した。

同定された microRNA の一つである、*miR1-1* は 76% の大腸がん組織でメチル化を認めた。一方、正常大腸組織ではメチル化レベルは非常に低く、便や血清からの大腸がんのスクリーニングに有用である可能性が示唆された。*miR1-1* を過剰発現させた細胞では、細胞運動が遅く、遊走も阻害されていた。

2-2 大腸発がん早期のメチル化異常と臨床像の関係

大腸がんをはじめ様々な臓器のがんで CIMP の存在が認められているが、CIMP と臨床像との関連は未だ不明な点が多い。本研究では、大腸腺腫の DNA メチル化を解析し、内視鏡像および臨床病理像との関連を詳細に検討した。その結果、大腸腺腫の一群はすでに CIMP 陽性を獲得していることが示された。そして、大腸発がん早期にメチル化する遺伝子として *KCNV1*, *IGF2BP1* など新たに同定した。さらに、通常の Type II ピットに類似しながらも、円形に開いた形状のピットパターンが、*BRAF* 変異陽性かつ CIMP 陽性の鋸歯状腺腫にきわめて特異的に見られることを新たに見だし、これを Type II-Open ピットと命名した。

2-3 メチル化により不活化されるがん抑制遺伝子の同定

本研究において新たに、*ANGPTL4* 遺伝子は腫瘍の血管新生を抑制し、変異および DNA メチル化の双方

で不活化されるがん抑制遺伝子であることを示した。

また、*FHL1* 遺伝子は 1 回のヒットで不活化しうる X 染色体上の遺伝子の中で *FHL1* 遺伝子は、変異および DNA メチル化の双方で不活化されるがん抑制遺伝子であること、発がんの素地の形成に関与していることを示した。

さらに、シグナル脂質変換酵素遺伝子 *DGKG* の異常 DNA メチル化は大腸腺腫および大腸がんを高頻度で認められること、*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ることを示した。

側方進展型で非浸潤性の大腸がんでは高度なメチル化を示し、浸潤性大腸がんでは低レベルのメチル化を示す遺伝子として *NTSR1* を見出した。*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、*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。

加えて、DNA メチル化異常誘発機構の解析によりメチル化抵抗性と判定された遺伝子の中に、がんではメチル化により不活化されるがん抑制遺伝子が例外的に含まれることを示し、この事実を応用してがん抑制遺伝子の新規同定法 (Outlier Approach) を開発した。

2-4 胃がんにおける CIMP とがん遺伝子変異の関係

胃がんでのジェネティックおよびエピジェネティック異常の全体像の解明を目的として、50 症例の胃がんについて、DNA メチル化のゲノム網羅的解析および 55 個のがん関連遺伝子についての変異解析を行った。その結果、異常メチル化を示す遺伝子数は個々の胃がんにより大きく異なること、27 症例の胃がんにおいて合計 35 個の変異が認められることを示した。CIMP 陽性の胃がんは、がん遺伝子の変異も持つ傾向があることを見出した。さらに、WNT 経路ではその negative regulator の DNA メチル化異常が主に認められること、*AKT/mTOR* 経路や *MAPK* 経路ではがん遺伝子変異が主であること、*p53* 経路では *p53* 遺伝子変異と下流遺伝子の DNA メチル化異常の双方が認められることを示した。

(3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

3-1 腎細胞がんの各種診断マーカー同定のための網羅的 DNA メチル化解析

本研究では、網羅性の高い解析である HumanMethylation27 を施行して、DNA メチル化異常を介して腎細胞がんの発生に関与する遺伝子の同定を目指した。正常腎組織と前がん状態にある腎組織の間で、DNA メチル化率に有意な差のある 4,830 個の CpG 部位を同定した。また、正常腎組織・前がん状態にある腎組織・腎細胞がん組織の 3 群間に、一定の傾向をもって変化を認める 11,093 個の CpG 部位

を同定した。これらにおける DNA メチル化状態は、前がん状態において正常腎組織に比し既に変化しており、腎細胞がんへの進展に伴ってさらに同じ方向に変化すると考えられた。同一症例から得られた非がん腎組織と腎細胞がん組織の間では、10,874 個の CpG 部位における DNA メチル化状態が両者の間で有意に異なっていた。これら全ての検定で有意となった 801 個の CpG 部位においては、前がん状態において正常腎組織に比して DNA メチル化状態が変化し、その変化がさらに亢進して腎細胞がんの発生に関与する可能性があると考えられた。

3-2 CIMP による腎細胞がんの予後診断

3-1 の解析を進展させ、腫瘍径・肉眼型・組織学的異型度・腎静脈本幹腫瘍栓の有無・静脈侵襲の有無・発育様式・壊死の有無・診断時の病期とその DNA メチル化状態が有意に相関した 246 個の CpG 部位を同定した。これらの中に、DNA メチル化異常を介して腎細胞がんの臨床病理学的悪性度を規定する CpG 部位の候補が存在すると考えられた。

そして、非がん腎組織検体においてメチル化レベルが特に低値であり、腎細胞がん組織検体において同一症例の非がん部と比べて特に DNA メチル化亢進が顕著である CpG 部位が CIMP 陽性症例に蓄積していることを見出した。両群の判別に有用である CpG 部位を解析した結果、17 遺伝子 18 個の CpG 部位が腎細胞がん CIMP マーカーであると考えられた。CIMP マーカー 14 遺伝子について、MassARRAY 解析を至適条件で実施できることを示し、学習コホートの 102 組織検体を、MassARRAY 解析に供した。23 個の CpG ユニットの診断閾値を組み合わせると CIMP 診断基準を定めた結果、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可能であった。

検証コホート腎臓明細胞がん 100 症例のがん組織検体の解析の結果、これまでに策定した診断基準により 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も CIMP 陽性腎臓明細胞がんは有意に不良であった。

他方で、MassARRAY 法は定量性に優れているが、高額な機器を要し、少数症例ごとの解析に適さない。そこで、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、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 法による結果と良好な一致を見ている。

3-3 胃洗浄廃液由来 DNA を用いた胃がんの存在診断
がんの存在診断としては、通常内視鏡検査・治療時に発生する胃洗浄廃液由来 DNA を用いた、DNA メ

チル化異常検出 (*MINT25*, *SOX17*, *miR34b/c*, *ACMG1*) による胃がんの存在診断の開発を進めた。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、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進めており、DNA メチル化解析を継続している。現在 3 年目経過中である。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。

3-4 CIMP による神経芽細胞腫の予後診断

本研究開始までに、CIMP が神経芽細胞腫の予後診断に有用であることを示してきた。本研究では、CIMP による神経芽細胞腫の予後診断の前向き試験を継続し、累積 227 症例について CIMP の診断を行った。

3-5 胃発がんリスク診断

発がんリスク診断としては、本研究開始までに、ピロリ菌感染陰性者では、胃粘膜 DNA メチル化レベルが胃発がんリスクと相関することを世界で初めて示してきた。早期実用化のため、胃粘膜 DNA メチル化異常を用いたリスク診断については、平成 20 年度から他の研究費により、大規模な臨床試験を開始した。826 症例での前向き臨床研究 (ESD 後の再発予測) の結果、有用性が確認された。

(4) エピジェネティック治療の基盤確立

4-1 DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニング

新規の DNA メチル化異常の誘発因子および新規のエピジェネティック薬のハイスループットスクリーニングを可能にするために、DNA メチル化されたプロモーターの下流にマーカー遺伝子を導入した DNA 脱メチル化剤スクリーニング用の細胞株の樹立を進めた。DNA メチル化した遺伝子プロモーターの下流に分泌性ルシフェラーゼを接続したコンストラクトを、HCT116 細胞株に導入した。その結果、既知の DNA 脱メチル化剤 (5-aza-dC) 処理に反応して発光し、外来性遺伝子プロモーターが脱メチル化されるクローンを 3 個樹立した。さらにサブクローニングを行い、高感度・高特異度で DNA 脱メチル化剤の検出が可能なサブクローンを合計 14 個樹立した。本細胞を用いて、理化学研究所との共同研究により、19,840 個の化合物ライブラリー (NPDepo) をスクリーニングし、再現性が確認された 4 個のヒット化合物を得た。

4-2 複合エピジェネティック修飾の可視化技術の開発

がん細胞においては様々なエピジェネティック異

常が認められるが、いずれのエピジェネティック修飾も単独では生理的に存在するもので、治療標的としてはがん特異性が劣る。そこで、本研究では、エピジェネティック修飾の組み合わせに着目し、*in situ* proximity ligation assay 法を応用して、各種エピジェネティック修飾の組み合わせを可視化する技術(iChmo)を開発した。

D. 考察

(1) DNA メチル化異常の誘発要因や分子機構

DNA メチル化異常の発がんへの深い関与を考えると、その誘発機構の解明は急務である。異常の標的となる遺伝子は、研究開始までに証明したエピジェネティックな機構に加えて、本研究では、ゲノムの構造である SINE および LINE との距離により決定されていることを解明し、両者は独立して関与していることも明らかにした。この機構はメチル化プロファイル生成機構の重要な一部と考えられる。特定の発がん因子曝露によるメチル化プロファイル生成機構が解明されれば、分子疫学等への応用が期待できる。

DNA メチル化異常誘発要因の研究としては、本研究開始までに、ピロリ菌感染スナネズミモデル、DSS 投与マウス大腸炎モデルを用いて、DNA メチル化異常誘発に炎症が重要であることを示してきた。本研究においては、特定の慢性炎症が DNA メチル化異常誘発に重要であること、DNA メチル化異常誘発の最終段階に T・B 細胞は不要であり、単球・マクロファージが DNA メチル化異常誘発の重要な Effector である可能性が非常に高いこと、元々もっている H3K27me3 修飾のみならず、炎症などにより獲得した後天性の H3K27me3 異常も、DNA メチル化異常の誘因となること、を示した。さらにピロリ菌感染および、慢性炎症による DNA メチル化異常の誘発と発現量がよく相関する IL1 β による細胞株の処理により、DNA 脱メチル化に関わる *TET* 遺伝子群の発現が低下することを明らかにした。このことから、DNA 脱メチル化作用の減弱が IL1 β によるメチル化異常誘発機構の一部である可能性が示された。DNA メチル化異常の誘発に重要な因子や機構を解明すれば、発がん促進作用の強い炎症の判別や、その抑制による新たな疾患予防戦略を立てることが可能になる。

腫瘍細胞の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が必要である。本年度の研究において、大腸腫瘍細胞から樹立された RT 細胞を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から、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。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と共に、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。

さらに、不完全な初期化、即ち、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を示唆された。本研究における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慮すると、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、エピジェネティック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を示唆された。

(2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

がん細胞および前がん病変におけるエピゲノム異常の解明は、がんそのものや発がん過程を理解するため、また、これらの異常を臨床応用するための基盤的情報である。本研究においては、各種ゲノム網羅的解析を行い、ヒト大腸がん及び胃がんにおいて DNA メチル化異常が誘発されるがん抑制遺伝子、miRNA を複数 (*ANGPTL4*, *FHL1*, *DGKG*, *miR1-1*) 同定してきた。*NTSRI* 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。

また、大腸前がん病変の網羅的 DNA メチル化解析から、大腸発がんの早期の段階で多数の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されていることが明らかとなった。これらのメチル化を便や大腸洗浄液から検出することで大腸がんの早期診断が可能であるか、検証を継続している。また、大腸腫瘍の拡大内視鏡によるピットパターン分類において、本研究で新たに、*BRAF* 変異陽性かつ *CIMP* 陽性の鋸歯状腺腫にきわめて特異的に見られるピットパターンを見出し、Type II-Open ピットと命名した。この知見は、分子異常と腫瘍の形態の興味深い関連を明らかにするとともに、*CIMP* 陽性大腸がんの前癌病変を効率的に同定しうる診断法につながると期待される。

さらに、エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、胃がんにおいては、ジェネティック、エピジェネティック双方の異常により、がん関連遺伝子経路の異常が形成されていることを示した。また、*CIMP* 陽性の胃がんは、がん遺伝子の変異をも持つ傾向があることを見出し、大腸がんで見出された *CIMP* とがん遺伝子変異との関連が、胃がんにおいても認められることを示した。

(3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

DNA メチル化異常の診断的応用は、実用化段階を迎えている。がんの病態診断としては、神経芽細胞腫の予後診断の精度が向上すれば、特に中間リスク群で、積極的または待機的な治療選択がより正確に行えるようになる。検査企業との共同研究も順調に進行している。

また、腎細胞がんについては、MassARRAY プラットフォームを用いて CIMP 陽性腎細胞がんを判別することによる、腎細胞がん予後診断マーカーパネルを開発し、検証セットを用いてその有用性を確認した。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。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。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。さらに、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、DNA メチル化診断専用機器の共同開発研究を進めている。実用化されれば、再発リスクに応じた術後治療が実施可能になると期待される。

がんの存在診断に関しては、通常の内視鏡検査時には破棄している胃洗浄液を用いて DNA メチル化異常を検出することが有用であることが強く示唆された。前向き多施設臨床試験は順調に進展しており、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。我が国の内視鏡医の診断能力の高さには定評があるが、判別困難な病変があることも事実である。通常は廃棄される胃洗浄液を用いた胃がんの存在診断が実用化されれば、侵襲度の非常に低い新たな検査法として価値は大きい。

発がんリスク診断としては、別途遂行した前向き臨床研究により、非がん部に蓄積した DNA メチル化異常を用いて特定個人の現在の発がんリスクの診断が可能であることが示された。今後は、診断結果に応じて生活指導や検診の間隔調整が行えるか否かを明らかにする。エピジェネティック異常の蓄積を用いたリスク診断に関しては、本研究班の研究者が世界の最先端である。

(4) エピジェネティック治療の基盤確立

新規の DNA メチル化異常の誘発因子のスクリーニングは、ひいては新規エピジェネティック薬の開発に繋がる。現在、各国でエピジェネティック薬の開発競争が行われている。本研究で樹立した細胞株を

用いることにより、プレートリーダーを用いたハイスループットな DNA 脱メチル化剤スクリーニングが可能になった。さらに、本研究におけるスクリーニングで得られたヒット化合物 4 個の中には既知の DNA 脱メチル化剤が含まれ、スクリーニング系の妥当性が示された。また、幅広い作用点の化合物の検出が可能な本スクリーニング系の特徴から、従来とは異なる作用点を持つ化合物も含まれることが期待される。スクリーニング対象とするライブラリーを拡張することにより、さらに多くのヒット化合物が得られる可能性もある。

エピジェネティック修飾の組み合わせに注目し、その可視化技術 (iChmo) を開発した。本技術は、今後、がん特異性が高いエピジェネティック修飾の組み合わせの探索に活用する。がん特異性が高いものを見出すことができれば、エピジェネティック治療に腫瘍特異性をもたらす可能性が示される。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Ando T, Kushima R, Sugiyama T, Katai H, Noshiro H and Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. **Gastric Cancer**, online.
2. Okochi-Takada E, Hattori N, Tsukamoto T, Miyamoto K, Ando T, Ito S, Yamamura Y, Wakabayashi M, Nobeyama Y and Ushijima T. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. **Oncogene**, 33: 2273-2278, 2014.
3. Takahashi T, Matsuda Y, Yamashita S, Hattori N, Kushima R, Lee YC, Igaki H, Tachimori Y, Nagino M and Ushijima T. Estimation of the fraction of cancer cells in a tumor DNA sample using DNA methylation. **PLoS One**, 8: e82302, 2013.
4. Shigematsu Y, Niwa T, Rehnberg E, Toyoda T, Yoshida S, Mori A, Wakabayashi M, Iwakura Y, Ichinose M, Kim YJ and Ushijima T. Interleukin-1b induced by *Helicobacter pylori*

- infection enhances mouse gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, 340: 141-147, 2013.
5. Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H and Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. **J Clin Invest**, 123: 2935-2947, 2013.
 6. Asada K, Abe M and Ushijima T. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. **J Hum Genet**, 58: 428-433, 2013.
 7. Hattori N, Niwa T, Kimura K, Helin K and Ushijima T. 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.
 8. Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A and Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. **Jpn J Clin Oncol**, 43: 641-645, 2013.
 9. Asada K, Ando T, Niwa T, Nanjo S, Watanabe N, Okochi-Takada E, Yoshida T, Miyamoto K, Enomoto S, Ichinose M, Tsukamoto T, Ito S, Tatematsu M, Sugiyama T and Ushijima T. *FHL1* 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.
 10. Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yoda Y, Yamashita S, Kushima R, Maekita T, Ichinose M, Katai H, Park WS, Hong YS, Park CH and Ushijima T. 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.
 11. Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Mori A, Tatematsu M and Ushijima T. Prevention of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent. **Cancer Prev Res**, 6: 263-270, 2013.
 12. Takeshima H, Ikegami D, Wakabayashi M, Niwa T, Kim YJ and Ushijima T. Induction of aberrant trimethylation of histone H3 lysine 27 by inflammation in mouse colonic epithelial cells. **Carcinogenesis**, 33: 2384-2390, 2012.
 13. Frau M, Tomasi ML, Simile MM, Demartis MI, Salis F, Latte G, Calvisi DF, Seddaiu MA, Daino L, Feo CF, Brozzetti S, Solinas G, Yamashita S, Ushijima T, Feo F and Pascale RM. Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression. **Hepatology**, 56: 165-175, 2012.
 14. Kikuyama M, Takeshima H, Kinoshita T, Okochi-Takada E, Wakabayashi M, Akashi-Tanaka S, Ogawa T, Seto Y and Ushijima T. 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.
 15. Nanjo S, Asada K, Yamashita S, Nakajima T, Nakazawa K, Maekita T, Ichinose M, Sugiyama T and Ushijima T. Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past *H. pylori* infection. **Gastric Cancer**, 15: 382-388, 2012.
 16. Shigematsu Y, Niwa T, Yamashita S, Taniguchi H, Kushima R, Katai H, Ito S, Tsukamoto T, Ichinose M and Ushijima T. Identification of a DNA methylation marker that detects the presence of lymph node metastases of gastric cancers. **Oncol Lett**, 4:268-274, 2012.
 17. Ushijima T and Takeshima H. Epigenetic epidemiology of infectious diseases. In: Michels KB (ed), *Epigenetic Epidemiology*. Germany, Springer, 269-288, 2012.
 18. Ushijima T and Hattori N. Molecular pathways: involvement of *helicobacter pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. **Clin Cancer Res**, 18: 923-929, 2012.
 19. Katsurano M, Niwa T, Yasui Y, Shigematsu Y, Yamashita S, Takeshima H, Lee M. S, Kim Y. J, Tanaka T and Ushijima T. Early-stage formation of an epigenetic field defect in a mouse colitis model, and non-essential roles of T- and B-cells in DNA methylation induction. **Oncogene**, 31: 342-351, 2012.
 20. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T and Ushijima T. Effects of genome architecture and epigenetic factors on susceptibility of promoter CpG islands to aberrant DNA methylation induction. **Genomics**, 98: 182-188, 2011.
 21. Cai LY, Izumi S, Abe M, Imura M, Yasugi T, Wakazono K, Ohnuki Y, Kondo A and Ushijima T. Does aberrant DNA methylation occur in human uterine leiomyomas? An Attempt of Genome-Wide Screening by MS-RDA. **Tokai J Exp Clin Med**,

- 36: 84-90, 2011.
22. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S and Ushijima T. Methylation silencing of angiopoietin-like 4 in rat and human mammary carcinomas. **Cancer Sci**, 102: 1337-1343, 2011.
 23. Hur K, Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Tatematsu M, Yang HK and Ushijima T. Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of specific types of inflammation. **Carcinogenesis**, 32: 35-41, 2011.
 24. Gyobu K, Yamashita S, Matsuda Y, Igaki H, Niwa T, Oka D, Kushima R, Osugi H, Lee S, Suehiro S and Ushijima T. Identification and validation of DNA methylation markers to predict lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinomas. **Ann Surg Oncol**, 18: 1185-1194, 2011.
 25. Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S, Maekita T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. *Alu* and *Sata* hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. **Int J Cancer**, 128: 33-39, 2011.
 26. Ushijima T and Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
 27. Takeshima H and Ushijima T. Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
 28. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.
 29. Tomita H, Hirata A, Yamada Y, Hata K, Oyama T, Mori H, Yamashita S, Ushijima T and Hara A. Suppressive effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 31: 1627-1633, 2010.
 30. Ishii G, Hashimoto H, Asada K, Ito T, Hoshino A, Fujii S, Kojima M, Kuwata T, Harigaya K, Nagai K, Ushijima T and Ochiai A. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts. **Int J Oncol**, 37: 317-325, 2010.
 31. Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, Oda I, Gotoda T and Ushijima T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. **J Gastroenterol**, 45: 37-44, 2010.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Arai E, Chiku S, 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. **Carcinogenesis**, 33: 1487-1493, 2012.
 36. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y and Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. **Int J Cancer**, 129: 1170-1179, 2011.
 37. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J and Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. **Carcinogenesis**, 32: 462-469, 2011.
 38. Arai E and Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. **Int J Clin Exp Pathol**, 4: 58-73, 2011.
 39. Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S and Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. **Pathobiology**, 78: 1-9, 2011.
 40. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J and Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome

- array-based methylated CpG island amplification. **J Biomed Biotechnol**, 2011: 780836, 2011.
41. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. **Cancer Sci**, 101: 36-45, 2010.
 42. Arai E and Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. **Epigenomics**, 2: 467-481, 2010.
 43. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S and Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. **Cancer Sci**, 101: 231-240, 2010.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. **Front Genet**, 4: 258, 2013.
 48. 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.
 49. 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.
 50. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. **Mol Oncol**, 6: 567-578, 2012.
 51. 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.
 52. Maruyama R and Suzuki H. Long noncoding RNA involvement in cancer. **BMB Rep**, 45: 604-611, 2012.
 53. Kimura T, Yamamoto E, Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T and Toyota M. A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. **Am J Gastroenterol**, 107: 460-469, 2012.
 54. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res**, 72: 1126-1136, 2012.
 55. Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K and Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. **Cancer Res** 71: 5646-5658, 2011.
 56. Kamimae S, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishikawa M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K and Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of

- colorectal tumors. **Cancer Prev Res**, 4: 674-683, 2011.
57. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JPI, Shinomura Y, Tokino T and Toyota M. IGFBP7 is p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. **Carcinogenesis**, 31: 342-349, 2010.
 58. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano H, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. **Carcinogenesis**, 31: 2066-2073, 2010.
 59. Yamashita M, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto E, Kamimae S, Watanabe Y, Kai M, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Imai K, Tokino T and Itoh, F. DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae. **Cancer Sci**, 101: 1708-1716, 2010.
 60. Fujikane T, Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Ashida M, Ohe-Toyota M, Kai M, Nishidate T, Sasaki Y, Ohmura T, Hirata K and Tokino T. Genomic Screening for genes upregulated by demethylation identified novel targets of epigenetic silencing in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 122: 699-710, 2010.
 61. Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, Shimizu H, Nojima M, Iwaki H, Nobuoka T, Nishida T, Miyazaki Y, Takamaru H, Yamamoto E, Yamamoto H, Tokino T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. A novel correlation between genome-wide hypomethylation and malignancy of gastrointestinal stromal tumor. **Clin Cancer Res**, 16: 5114-5123, 2010.
 62. 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.
 63. 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.
 64. 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.
 65. Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K and Yamada Y. Cellular reprogramming and cancer development. **Int J Cancer**, 132: 1240-1248, 2012.
 66. 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.
 67. Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and Yamada Y. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. **Development**, 139: 667-677, 2012.
 68. Hatano Y, Yamada Y, Hata K, Phutthaphadoong S, Aoki H and Hara A. Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, *Rest*, does not promote mouse colon carcinogenesis. **Cancer Sci**, 102: 1659-1664, 2011.
 69. Sakai H, Yamada Y, Shimizu M, Saito K, Moriwaki H and Hara A. Genetic ablation of Tnf alpha demonstrates no detectable suppressive effect on inflammation-related mouse colon tumorigenesis. **Chem Biol Interact**, 184: 423-430, 2010.
 70. Yamada Y, Aoki H, Kunisada T and Hara A. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. **Cell Stem Cell**, 6: 10-15, 2010.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Yamada M, Fukagawa T, Nakajima T, Asada K, Sekine S, Yamashita S, Okochi-Takada E, Taniguchi H, Kushima R, Oda I, Saito Y, Ushijima T and Katai H. Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving *CDHI*. **Gastric Cancer**, online.
 2. Imaoka T, Nishimura M, Doi K, Tani S, Ishikawa K, Yamashita S, Ushijima T, Imai T and Shimada Y. Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis. **Int J Cancer**, 134, 1529-1538, 2014.
 3. Yoshida T, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, Oka M, Watanabe M,

- Enomoto S, Niwa T, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Takeshita T, Ushijima T and Ichinose M. Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody titer. **Int J Cancer**, 134: 1445-1457, 2014.
4. Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T and Nohara K. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. **Cancer Sci**, 104: 1575-1585, 2013.
 5. Ito Y, Yamada Y, Asada K, Ushijima T, Iwasa S, Kato K, Hamaguchi T and Shimada Y. 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.
 6. Yoshida T, Kato J, Maekita T, Yamashita S, Enomoto S, Ando T, Niwa T, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Iguchi M, Tamai H, Ushijima T and Ichinose M. Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active *Helicobacter pylori*-related gastritis. **Gastric Cancer**, 16: 488-497, 2013.
 7. Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T and Narita M. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. **Brain**, 136: 828-843, 2013.
 8. Chiba T, Marusawa H and Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. **Gastroenterology**, 143: 550-563, 2012.
 9. Watanabe M, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Yoshida T, Mukoubayashi C, Deguchi H, Enomoto S, Ueda K, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Tekeshita T, Mohara O, Ushijima T and Ichinose M. Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. **Int J Cancer**, 131: 2632-2642, 2012.
 10. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa TO and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. **Oncogene**, 31: 3949-3960, 2012.
 11. Matsuda Y, Yamashita S, Lee YC, Niwa T, Yoshida T, Gyobu K, Igaki H, Kushima R, Lee S, Wu MS, Osugi H, Suehiro S and Ushijima T. 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.
 12. Lee YC, Wang HP, Wang CP, Ko JY, Lee JM, Chiu HM, Lin JT, Yamashita S, Oka D, Watanabe N, Matsuda Y, Ushijima T and Wu MS. Revisit of field cancerization in squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract: better risk assessment with epigenetic markers. **Cancer Prev Res**, 4: 1982-1992, 2011.
 13. Ushijima T and Yoshida T. Field cancerization in gastric cancer. In: Dakubo GD (ed), Field cancerization: basic science and clinical applications. USA, Nova Science Publishers, 187-199, 2011.
 14. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T and Suzuki T. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. **Hippocampus**, 21: 127-132, 2011.
 15. Ushijima T, Okochi-Takada E and Takeshima H. Epigenomic analysis in toxicology. In: Handbook of Systems Toxicology. ed. Casciano DA and Sahu SC. John Wiley & Sons, West Sussex, 489-507, 2011.
 16. Herceg Z and Ushijima T. Introduction: Epigenetics and cancer. **Adv Genet**, 70: 1-23, 2010.
 17. Niwa T and Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. **Adv Genet**, 71: 41-56, 2010.
 18. Ikegami D, Narita M, Imai S, Miyashita K, Tamura R, Takagi S, Yokomizo A, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Kuzumaki N, Ushijima T and Suzuki T. Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine. **Addict Biol**, 15: 358-361, 2010.
 19. Kuzumaki N, Ikegami D, Imai S, Narita M, Tamura R, Yajima M, Suzuki A, Miyashita K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Ushijima T and Suzuki T.

- Enhanced IL-1 β production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. **Synapse**, 64: 721-728, 2010.
20. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Sasaki T, Niikura K, Narita M, Miyashita K, Imai S, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T and Suzuki T. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. **Synapse**, 64: 611-616, 2010.
 21. Hattori N and Ushijima T. Analysis of gene-specific DNA methylation. In: Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. ed. Tollefsbol T. Academic Press, England, pp125-134, 2010.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Kanai Y and Arai E. DNA methylation alterations in human cancers. In: Tollefsbol T (ed), Epigenetics in Human Disease. Amsterdam, Elsevier, 29-52, 2012.
 35. 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.
 36. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H and Kanai Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. **Histopathology**, 60: E12-18, 2012.
 37. Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y and Nakao M.

- Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in the human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, 32: 1529-1541, 2012.
38. Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T and Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. **Genome Res**, 22: 208-219, 2012.
 39. Kanai Y and Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *In: Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. ed. Grisham JW and Thorgeirsson S. Springer, New York, pp147-159, 2010.
 40. 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.
 41. 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.
 42. Nosho 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.
 43. Honda S, Okada T, Miyagi H, Minato M, Suzuki H and Taketomi A. Spontaneous rupture of an advanced pancreatoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers. **J Pediatr Surg**, 48: e29-32, 2013.
 44. 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.
 45. 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.
 46. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Nosho K, Suzuki H and Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. **World J Gastroenterol**, 18: 2745-2755, 2012.
 47. Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho 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.
 48. 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.
 49. 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.
 50. 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.
 51. Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y and Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. **Gut**, 61: 392-401, 2012.
 52. Watanabe Y, Oishi 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.

53. Yano Y, Konishi K, Yamochi T, Katagiri A, Nozawa H, Suzuki H, Toyota M, Kubota Y, Muramoto T, Kobayashi Y, Tojo M, Konda K, Makino R, Kaneko K, Yoshikawa N, Ota H and Imawari M. Clinicopathological and molecular features of colorectal serrated neoplasias with different mucosal crypt patterns. **Am J Gastroenterol**, 106: 1351-1358, 2011.
 54. Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M and Shinomura Y. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. **Digestion**, 83: 241-249, 2011.
 55. Sugai T, Habano W, Jiao YF, Toyota M, Suzuki H, Tsukahara M, Koizuka H, Akasaka R, Koeda K, Wakabayashi G and Suzuki K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. **Oncol Rep**, 23: 25-33, 2010.
 56. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A and Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene**, 29: 3723-3731, 2010.
 57. Sugai T, Habano W, Endoh M, Konishi Y, Akasaka R, Toyota M, Yamano H, Koeda K, Wakabayashi G and Suzuki K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. **Int J Cancer**, 127: 2500-2509, 2010.
 58. 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.
 59. 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.
 60. Baba S, Oishi Y, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Hiraishi T, Maehata T, Nagase Y, Fukuda Y, Nakazawa M, Ishigouoka S, Hattori N, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M and Itoh F. Gastric Wash-Based Molecular Testing for Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. **Digestion**, 84: 299-305, 2011.
2. 学会発表
 1. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation of *H. pylori* infection, and its application to cancer risk diagnosis and prevention. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013. (invited)
 2. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Yamashita S, Ando T, Sugiyama T, Katai H and Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancers. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013.
 3. Ushijima T. Epigenomic alterations induced by chronic inflammation. Jacque-Monod Conference. Roscoff, September, 2013. (invited)
 4. Ushijima T. Inflammation and epigenetic field for cancerization. 2nd Taiwan Epigenomics Meeting. Chia-Yi, July, 2013. (invited)
 5. Ushijima T and Takeshima H. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of gastric cancers. Next Frontiers to Cure Cancer. São Paulo, June, 2013. (invited)
 6. Yoda Y, Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yamashita S, Ando T, Sugiyama T, Katai H and Ushijima T. Mutation analysis by a personal sequencer and comprehensive DNA methylation analysis of gastric cancers. Workshop at the 10th International Gastric Cancer Congress. Verona, June, 2013. (invited)
 7. Ushijima T. Aberrant H3K27me3 and DNA methylation induced by chronic inflammation. Gordon Research Conference Cancer Genetics and Epigenetics). Il Ciocco, April, 2013. (invited)
 8. Ushijima T. Sample optimization for development of clinically relevant cancer risk and prognostic biomarkers. Workshop at the AACR Annual Meeting. Washington, DC, April, 2013. (invited)
 9. Ushijima T. Inflammation and epigenetic field for cancerization. Third Clinical Epigenetics International Meeting. Solingen, March, 2013. (invited)
 10. Hattori N, Kimura K and Ushijima T. Applications of iChmo to Analyzing Novel Biological Phenomema. JSPS A3 Foresight Program 2013 Sapporo Meeting. Sapporo, March, 2013.
 11. Ushijima T. Induction mechanisms of epigenetic alterations by chronicinflammation. International Symposium on Genetic Regulation and Targeted Therapy of Cancer. Guangzhou, November, 2012. (invited)
 12. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization: its induction mechanisms. International Symposium on Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate. Kyoto,

- November, 2012. (invited)
13. Ushijima T. Epigenetic alterations in tumors, pre-tumorous stages, and their origin. 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. Fukuoka, November, 2012. (invited)
 14. Ushijima T. Chronic inflammation and epigenetic alterations. The 2nd Epigenomics of Common Diseases Conference. Baltimore, October, 2012. (invited)
 15. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization: its cause and clinical implications. São Paulo Advanced School of Comparative Oncology. São Paulo, September-October, 2012. (invited)
 16. Ushijima T. *Helicobacter pylori* infection, inflammation, DNA methylation, and gastric cancer. 4th Asia-Pacific Gastroesophageal Cancer Congress. Singapore, July, 2012. (invited)
 17. Hattori N, Niwa T, Helin K and Ushijima T. Development of a novel technique to visualize a combination of histone modifications. ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, June, 2012.
 18. Ushijima T. Epigenetic field defect induced by chronic inflammation. The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research. Chiba, May, 2012. (invited)
 19. Ushijima T. Epigenetic field defect as cancer risk marker and prevention target. 2012 Seoul National University Cancer Research Institute Symposium. Seoul, May, 2012. (invited)
 20. Ushijima T. Induction mechanisms of aberrant DNA methylation. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, April, 2012. (invited)
 21. Ushijima T. The etiology and mechanisms of epigenomic aberrations: their application to prevention of epigenomic disorders. BIOtech 2012. Tokyo, April, 2012. (invited)
 22. Ushijima T. The *H. pylori* infection- inflammation- DNA methylation- gastric cancer pathway. The 21st HCS – The 5th Three Universities' Consortium International Symposium. Hiroshima, November, 2011. (invited)
 23. Ushijima T. Basic and translational aspects of epigenetic field for cancerization. France-Japan Symposium on Cancer Research 2011. Tokyo, November, 2011. (invited)
 24. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by *Helicobacter pylori* infection – its use as cancer risk diagnosis and molecular mechanisms. Japanese-German Cancer Workshop. Hiroshima, September, 2011. (invited)
 25. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S, Watanabe N and Ushijima T. Identification of genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. International Symposium "Sex-differences in Epigenetics and Epigenomics". Tokyo, September, 2011.
 26. Ushijima T. Epigenetic risk diagnosis of gastric cancer, and its molecular basis. 4th Annual Scientific Meeting of The Singapore Gastric Cancer Consortium. Singapore, July, 2011. (invited)
 27. Ushijima T. Aberrant DNA methylation and gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress. Seoul, April, 2011. (invited)
 28. Ushijima T. Dynamic aspects of epigenome - induction of aberrant DNA methylation by carcinogenic bacterial infection. 11th Belgian Society of Human Genetics Meeting. Louvain-la-Neuve, March, 2011. (invited)
 29. Ushijima T. Epigenome damage by the environment. Howard Hughes Medical Institute "Unraveling epigenomes in health and disease" Workshop. Washington, DC, December, 2010. (invited)
 30. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S, Watanabe N and Ushijima T. Identification of five genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Kyoto, December, 2010.
 31. Ushijima T. Critical role of inflammation triggered by *H. pylori* infection in methylation induction. 41st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November, 2010. (organizer, invited)
 32. Ushijima T. Epimutation induction by environmental factors, such as *H. pylori* infection and smoking. Symposium at Annual Meeting of Environmental Mutagen Society. Fortworth, October, 2010. (invited)
 33. Shigematsu Y, Niwa T, Ichinose M and Ushijima T. Current status of our research to identify CpG islands whose DNA methylation status is associated with the presence of lymph node metastases of gastric cancers. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar. Beijing, October, 2010.
 34. Hattori N, Okochi-Takada E, Takeshima H, Wakabayashi M, Yamashita S and Ushijima T. Screening of promoter CpG islands methylated in

- human mammary epithelial cells. NSFC A3 foresight program 2010 seminar. Beijing, September, 2010.
35. Ushijima T. Epigenetic field defect in the stomach: formation by inflammation due to *Helicobacter pylori* infection and use as a cancer risk marker. 3rd Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium. Singapore, July, 2010. (invited)
 36. Ushijima T. Critical role of *H. pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field for gastric cancers. Seoul International Gastric Cancer Symposium. Seoul, June, 2010. (invited)
 37. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by *H. pylori* infection-triggered inflammation. 5th Asian Epigenome Meeting. Jeju, June, 2010. (invited)
 38. Ushijima T and Takeshima H. Methylation destiny: aberrant DNA methylation targets genes defined by stalled RNA polymerase II, histone modifications, and distance to repetitive sequences. Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology. Seoul, May, 2010. (invited)
 39. Ushijima T. Cancer epigenome: Translation into preventiv, diagnostic, and therapeutic targets. Korean National Cancer Center Symposium. Seoul, May, 2010. (invited)
 40. Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by *H. pylori*-induced inflammation. AACR Annual Meeting. Washington, DC, April, 2010. (chair, invited)
 41. 與田幸恵, 竹島秀幸, 丹羽透, 山下聡, 安藤孝将, 杉山敏郎, 片井均, 牛島俊和. 遺伝子異常およびエピジェネティック異常の影響を受ける癌関連パスウェイの統合的解析. 第86回日本胃癌学会総会, 2014年3月.
 42. 高橋崇真, 山下聡, 松田恭典, 久嶋亮治, 牛島俊和. DNAメチル化を用いた細胞含有量測定マーカーの確立. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月
 43. 與田幸恵, 竹島秀幸, 丹羽透, 山下聡, 安藤孝将, 杉山敏郎, 片井均, 牛島俊和. Integrated profiles of genetic and epigenetic alterations involved in gastric cancer-related pathway. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月.
 44. 牛島俊和. 炎症によるエピジェネティック異常誘発の分子機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「DNAメチル化の制御機構-メチル化模様形成・維持と消去-」, 2013年11月.
 45. 牛島俊和. Induction mechanism of epigenetic alterations. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.
 46. 與田幸恵, 竹島秀幸, 若林美香, レンバークエミル, 渡邊直子, 牛島俊和. 低用量エピジェネティック治療が高い治療効果を示すメカニズムの解明. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.
 47. 牛島俊和. エピゲノム変化の誘発機構. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月.
 48. 牛島俊和. *H. pylori*感染胃炎によるエピジェネティックな発がん素地の形成とその橋渡し. 第19回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2013年6月.
 49. 高橋崇真, 山下聡, 松田恭典, 久嶋亮治, 牛島俊和. DNAメチル化を用いた細胞含有率測定マーカーの確立. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013年5月.
 50. 牛島俊和. エピジェネティックな胃発癌機構とリスク診断への応用. 第85回日本胃癌学会総会, 2013年2-3月.
 51. 牛島俊和. ピロリ菌感染によるエピジェネティック異常誘発の解明と発がんリスク診断への応用. 第23回日本消化器癌発生学会総会, 2012年11月.
 52. 牛島俊和. DNAメチル化異常の起源と診断への応用. 第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月.
 53. 牛島俊和, 丹羽透, 南條宗八. Bringing epigenetic field defect into cancer risk diagnosis and prevention. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
 54. 丹羽透, 竹島秀幸, 池上大悟, 山下聡, 牛島俊和. ヒストン修飾異常もエピジェネティックな発がんの素地に関与する可能性. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
 55. 竹島秀幸, 池上大悟, 若林美香, 牛島俊和. 特定の細胞外環境はH3K27トリメチル化異常を誘発する. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
 56. Hattori N, Niwa T and Ushijima T. Development of a novel technique to visualize combination of histone modifications. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月.
 57. 牛島俊和. "Dynamic" Phase of Epigenome: Induction of Aberrant DNA Methylation by Inflammation. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.
 58. 大河内(高田)江里子, 丹羽透, 若林美香, 森明子, 牛島俊和. 高感度DNA脱メチル化剤検出系の開発. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.
 59. 服部奈緒子, 丹羽透, 牛島俊和. ヒストン修飾の組合せの可視化技術の開発. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.