

201438105A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

難治性神経芽腫に対する分化誘導療法併用下での
エピジェネティック治療開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 牛島 俊和

平成27年(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「難治性神経芽腫に対する分化誘導療法併用下でのエピジェネティック治療開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I.	委託業務成果報告（総括）	
	難治性神経芽腫に対する分化誘導療法併用下での エピジェネティック治療開発に関する研究	----- 1
	牛島 俊和 国立がん研究センター	
II.	委託業務成果報告（業務項目）	
1.	医師主導治験に関する研究	----- 5
	河本 博 国立がん研究センター	
	仁谷 千賀 大阪市民病院機構	
	吉村 健一 金沢大学	
	野村 尚吾 国立がん研究センター	
	木村 利美 東京女子医科大学	
	尾崎 雅彦 国立がん研究センター	
	佐藤 暁洋 国立がん研究センター	
	濱田 哲暢 国立がん研究センター	
	原 純一 大阪市民病院機構	
	田口 智章 九州大学	
2.	奏効の分子機構と治療効果マーカーに関する研究	----- 8
	牛島 俊和 国立がん研究センター	
	服部奈緒子 国立がん研究センター	
III.	学会等発表実績	----- 1 1
IV.	研究成果の刊行・別刷	----- 1 3

委託業務成果報告（総括）

難治性神経芽腫に対する分化誘導療法併用下でのエピジェネティック治療開発に関する研究

業務主任者 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

神経芽腫は最頻かつ予後最不良の小児脳外固形腫瘍である。難治例の大半が高度な DNA メチル化異常（CpG アイランドメチル化形質；CIMP）をもつこと、DNA 脱メチル化剤 decitabine（DAC）と分化誘導剤 13-cis-RA の併用が神経芽腫細胞株に高い分化誘導能を示すこと、更に、臨床導入可能な国内開発合成レチノイド tamibarotene（TBT）は、より強い分化誘導能と DAC との併用効果をもつことを、業務主任者は見いだしてきた。本研究では、①TBT との併用下での DAC 療法の臨床開発を行う。また、②承認後の投与方法最適化や新しい DNA 脱メチル化剤への置換のために、奏効の分子機構の解明と治療効果マーカーの開発を行う。本年度は、① 開発戦略を確定し、TBT の小児用製剤の準備を完了、最初の治験の試験資料を作成した。1 施設での IRB 承認を得て、他 2 施設での IRB 審査申請を行い、治験開始届けを終了した。登録システム、症例報告フォーム、データベース作成（EDC 利用）、モニタリングおよび監査計画の作成など、試験管理準備も完了した。② 移植腫瘍を用いて低用量 TBT が著しい腫瘍増殖抑制効果と分化誘導能を示すことを確認した。また、神経芽腫奏効性マーカーの開発のため、CIMP の新たな標的遺伝子を同定し、腫瘍から遊離 DNA を用いた DNA メチル化解析が有用である可能性を示した。

業務項目の担当責任者

河本 博	国立がん研究センター・医長
仁谷千賀	大阪市民病院機構・医長
吉村健一	金沢大学・特任教授
野村尚吾	国立がん研究センター・研究員
木村利美	東京女子医科大学・部長
尾崎雅彦	国立がん研究センター・治験事務局長
佐藤暁洋	国立がん研究センター・部長
濱田哲暢	国立がん研究センター・部門長
原 純一	大阪市民病院機構・副院長
田口智章	九州大学・教授
服部奈緒子	国立がん研究センター・研究員

A. 研究目的

- ① 難治性神経芽腫に対して、分化誘導療法併用下でのエピジェネティック治療の医師主導治験を実施し、難治例の大半が高度な DNA メチル化異常（CpG アイランドメチル化形質；CIMP）をもつ神経芽腫を対象にして、エピジェネティック治療の確立を目指す。
- ② 上記治療承認後の投与方法最適化や新しい DNA 脱メチル化剤への置換を視野に入れ、奏効の分子機構の詳細の解明と治療効果マーカーの開発を行う。

B. 研究方法

① 医師主導治験

(1) プロジェクトの総合推進

TBT と DAC 併用療法の開発では、TBT 単剤の用量探索（第 I 相試験）後に、TBT 推奨用量下に DAC の用量探索および両剤の推奨用量での安全性、有効性確認試験（併用第 I/II 相試験）とすすみ、両剤同時承認を目指す。当該年度は TBT 単剤の用量探索（第 I 相試験）について試験開始準備を行う。

(2) 試験資料作成と治験開始届け提出

治験薬提供者から情報を得ながら、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP）および関連

法省令、通知に適するよう、必要な試験資料を作成する。

(3) 調整業務・試験管理準備と実施

国立がん研究センター研究支援センター（研究分担：佐藤）の支援の下、CRO および治験薬提供者、輸送業者等、治験実施予定施設との間での調整業務を開始し、試験管理準備を行う。

(4) 薬物血中濃度測定準備と実施

薬物血中濃度測定の系について、の樹立と検体の安定性試験を実施し、測定する。

(5) 各施設での試験実施準備と実施

治験実施予定施設 3 施設で IRB 承認を行い、試験実施準備、症例登録を行う。

② 奏効の分子機構と治療効果マーカー

(1) 治療標的となりうる遺伝子の同定

CIMP の標的となることを見出した遺伝子 200 個から、治療標的となり得る遺伝子という視点で、分化誘導・細胞増殖抑制に重要と考えられるもの 3 個以上を同定する。

(2) 奏効性マーカーの開発

治験登録症例について、骨髄中に残存する神経芽細胞腫に加え、血中遊離 DNA を収集する。また、マウス移植腫瘍治療モデルについても、残存する腫瘍細胞と血中遊離 DNA を回収する。

(3) 治験における POC 取得

上記で DNA 脱メチル化のマーカーとして最適と考えられた材料・遺伝子について、治験症例での POC を取得する。

(倫理面への配慮)

本研究は医師主導治験での実施を計画しているため、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP）および関連する法、省令、通知に適するようなプロトコールと倫理審査委員会の承認を得て実施する。本試験については、神経芽腫を対象とするため多くの例が小児例となることに対して以下に留意して実施する。

①代諾者からの文書による自発的同意に加え、患者本人にも可能な限り理解できるように試験・治療についての説明を行う。

②説明は、形式的に文書でのアセントが用いられることが多いが、実質的に理解が可能なように看護師や child life specialist への治療内容の教育を徹底し、CRC、医師以外からも十分な説明が可能な環境を作る。

個人情報保護のため、データの取り扱いについて

は、患者氏名など直接本人が識別できる情報を用いず、治験管理室での連結匿名を徹底する。薬物動態測定とメチル化測定では検体の授受が発生するため、これについても個人情報の取り扱いに気をつけ SOP での対応を徹底する。

研究の第三者的監視：効果・安全性評価委員会を組織し、研究期間中は試験継続、重篤な有害事象の報告、プロトコール改訂などの適否について諮問可能とする。

C. 研究結果

① 医師主導治験

(1) プロジェクトの総合推進

TBT 単剤の第 I 相試験について、適宜、医薬品医療機器総合機構（PMDA）に確認をとりながら、小児用製剤では新薬としての準備が必要であることを確認し、(2)～(4)の準備を行うとともに、治験薬提供者からの情報により治験薬概要書として作成、治験薬提供者と治験開始前要件として溶出試験、薬剤の安定性試験の実施情報を共有した。また治験開始に当たって治験薬ラベルや治験薬搬入の方法・時期を確定した。

(2) 試験資料作成と治験開始届け提出

GCP に従って、治験実施計画書、同意説明文書・アセント文書、各種標準手順書を作成した。

第 I 相であるため、「抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドライン」に従い、安全性に配慮して一施設から開始し、初期の安全性が確かめた後に他の 2 施設が開始となるように国立がん研究センター中央病院で IRB 承認を 3 月までに得て、治験開始届けを提出、現在 PMDA での 30 日調査中である。照会事項対応を行っている。

(3) 調整業務および試験管理準備

データマネージメント計画を作成すると同時に、登録システム、症例報告フォームの作成とデータベース作成（EDC 利用）を行った。モニタリングおよび監査計画の立案も終了した。いずれも国立がん研究センター研究支援センターによるため CRO 契約は不要であった。治験開始後については、定期 web ミーティングを治験実施施設間で、2 週に 1 回を目途に行うなど運用についても確定し、ウェブ上に治験実施施設、研究支援センターが共有できる情報共有サイトを作成した。

(4) 薬物血中濃度測定

DAC、TBT の PK 解析のために質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた分析方法の検討を進めた。TBT、TBT 安定同位体の合成を終了し、DAC を入手した。TBT、DAC の同時定量法を検討し、予備的測定条件を決定した。さらに GCP 対応として GLP 準拠施設を有する CRO との測定、報告の契約をすすめた。また検体輸送の方法確定を含め SOP を確定した。

(5) 各施設での試験実施準備と実施

2015年2月に研究班としてのキックオフミーティングを行い、各施設での治験実施予定施設のうち国立がん研究センター中央病院では3月にIRB承認が得られており、4月には施設内でキックオフミーティングが予定されている。他の2施設でもIRB申請準備が終了した。承認を行い、試験実施準備、症例登録を行う。他の治験実施予定2施設についてもIRB審査プロセスに進んでいる。

② 奏効の分子機構と治療効果マーカー

奏効の分子機構解明のために、神経芽腫のマウス移植腫瘍を用い、低容量TBT(0.2 mg/kg)投与でも著しい腫瘍減少の作用を確認した。TBT投与移植腫瘍内での分化マーカーの発現上昇を確認した。

奏効性マーカーの開発としては、各濃度のDACや投与スケジュールを用いた*in vitro*脱メチル化処理プロトコルを検討、プロトコルにより大きな治療効果の違いがあることを確認し、最適条件を決定した。また、CIMPの標的遺伝子として*RASSF1A*, *RARG*, *BMP4*などを確認・同定した。

治験においてDAC治療後の血中遊離DNAでのDNAメチル化解析を目的として、がん細胞を*in vitro*でDAC処理後、DNA脱メチル化効果を生存細胞とメディアウム中の遊離DNAで測定する系を確立した。

D. 考察

(1) 医師主導治験

TBTは、神経芽腫においてハイリスク集学的治療後症例での再発予防として確立している分化誘導療法のドラッグラグ解消としても期待されるが、レチノイドは他の小児固形がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、滑膜肉腫、ラブドイド腫瘍、腎腫瘍、髄芽腫、膠芽腫、胚細胞性腫瘍などでも分化誘導効果を示すとの基礎検討がある。TBT単剤第I相では、神経芽腫以外のこれらの疾患も登録をすすめることで、他疾患の開発にもつながることが期待される。

(2) 奏効の分子機構の解明と治療効果マーカーの開発

神経芽腫のマウス移植腫瘍へのTBT投与の結果、腫瘍減少の作用および腫瘍中での分化マーカーの発現を確認したことから、TBTの奏効機構のひとつとして、神経芽腫細胞の分化誘導が示された。今後は、TBTの分化誘導効果を最大限発揮するような、DACの濃度およびプロトコルを検討する必要がある。

E. 結論

CIMPをもつ難治神経芽腫に対し、TBTによる分化誘導とDACとの併用は、治療効果を発揮すると期待

される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Hattori N. and Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 455: 3-9, 2014.

本研究費に密接に関係するもの

1. Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y and Oda Y. Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: *miR193a-5p* is suggested to downregulate *SMARCB1* mRNA expression. **Mod Pathol**, 27: 832-839, 2014.
2. Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y and Oda Y. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. **Hum Pathol**, 45: 1900-1909, 2014.
3. 田口智章. 小児血液・がんの治療としての外科的移植・再生医療. 日本小児血液・がん学会雑誌, 51: 311-318, 2014.

2. 学会発表

1. Ushijima T. Establishment of a high-throughput detection system for epigenetic mutagens. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. Kolkata, December, 2014. (口頭)
2. Ushijima T, Hattori N, Wakabayashi M, Mori A and Okochi-Takada E. Establishment and use of a cell line for high-throughput screening of DNA demethylating agents. 45th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS). Orlando, September, 2014. (ポスター)
3. Hattori N, Mori A, Asada K, Kawamoto H and Ushijima T. Development of DNA demethylating therapy for neuroblastoma. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月. (ポスター)
4. Taguchi T, Kinoshita Y, Souzaki R, Kawakubo N, Yosue R and Ieiri S. Current status in pediatric surgical oncology. 20th Annual Conference of Cambodian Society of Surgery. Phnom Penh, November, 2014. (口頭)
5. Souzaki R, Koga Y, Minoru Y, Yanai F, Ueda K,

Zaizen Y, Inomata Y, Shinkoda Y, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Oda Y, Hara T and Taguchi T. The differences in the clinical and biological characteristic of neuroblastomas detected during and after a period of mass screening of six-month-old infants in the Kyushu area of Japan: a report from the study group for pediatric solid tumors in the Kyushu area, Japan. PAPS2014. Banff, May, 2014. (口頭)

6. Taguchi T, Kinoshita Y, Souzaki R, Ieiri S and Kawakubo N. Surgical aspects in pediatric oncology in Japan. 8th SIOP Asia. Seoul, April, 2014. (口頭)
7. Souzaki R, Ieiri S, Kawakubo N, Kinoshita Y,

Hashizume M and Taguchi T. Endoscopic surgery for neuroblastoma treated at a single institution. 8th SIOP Asia. Seoul, April, 2014. (ポスター)

- H. 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

委託業務成果報告（業務項目）

医師主導治験に関する研究

担当責任者	河本 博	国立がん研究センター中央病院小児腫瘍科 医長
	仁谷 千賀	大阪市民病院機構大阪市立総合医療センター小児血液腫瘍科 医長
	吉村 健一	金沢大学附属病院先端医療開発センター 特任教授
	野村 尚吾	国立がん研究センター研究支援センター生物統計部 研究員
	木村 利美	東京女子医科大学病院薬剤部 部長
	尾崎 雅彦	国立がん研究センター東病院治験管理室 治験事務局長
	佐藤 暁洋	国立がん研究センター研究支援センター研究企画部 部長
	濱田 哲暢	国立がん研究センター研究所臨床薬理部門 部門長
	原 純一	大阪市民病院機構大阪市立総合医療センター 副院長
	田口 智章	九州大学大学院医学研究院小児外科学分野 教授

研究要旨

難治性神経芽腫に対して、難治例の大半が高度な DNA メチル化異常（CpG アイランドメチル化形質；CIMP）をもち、DNA 脱メチル化剤 decitabine (DAC) と分化誘導剤で国内臨床導入可能な合成レチノイド tamibarotene (TBT) がそれぞれに神経芽腫細胞株に対する高い分化誘導能をもち、併用による効果増強を確認している。本研究では、TBT との併用下での DAC 療法の臨床開発を行う。本年度は、開発戦略を確定し、TBT の小児用製剤の準備を完了、最初の治験の試験資料を作成した。1 施設での IRB 承認を得て、他 2 施設での IRB 審査申請を行い、治験開始届けを終了した。登録システム、症例報告フォーム、データベース作成（EDC 利用）、モニタリングおよび監査計画の作成など、試験管理準備も完了した。

A. 研究目的

本研究分担は、難治性神経芽腫に対して、分化誘導療法併用下でのエピジェネティック治療の医師主導治験を実施し、難治例の大半が高度な DNA メチル化異常（CpG アイランドメチル化形質；CIMP）をもつ神経芽腫に対するエピジェネティック治療の確立と同時に、15 年来のドラッグ・ラグである神経芽腫に対しての分化誘導剤の国内導入を目指す。

B. 研究方法

(1) プロジェクトの総合推進

これまでの非臨床・臨床検討からエピジェネティック治療として最も有望と考えられる治療法は、脱メチル化剤を、脱メチル効果が最大となる投与量、投与方法で使用しながら、血液毒性が DLT である脱メチル化剤と毒性プロファイルが重ならない（主たる DLT が非血液毒性である）抗腫瘍薬との併用療法である。脱メチル化剤の開発は、ほとんどが造血器腫瘍（急性骨髄性白血病（APL）や骨髄異型症候群（MDS）など）を対象としているが、APL では分化誘導療法が確立しており ATRA が用いられることから、併用薬と

して ATRA での検討が多くみられる。

一方、神経芽腫もハイリスク集学的治療寛解例に 13-*cis*-retinoic acid というレチノイドを用いた分化誘導療法が、再発予防効果をもつことが臨床的に検証されている。そのため血液毒性が非常に少ない TBT と DAC 併用療法が神経芽腫に対するエピジェネティック治療として効果を最大化することのできる一つの治療と考えた。また、両薬剤とも神経芽腫に適応がない（TBT は APL に承認のある適応外薬、DAC は MDS に国内開発はなされたが未承認の薬剤）ため、併用療法としての効果が確認できれば 2 剤同時に承認を目指せることから、TBT+DAC 療法の開発を行うこととした。これについては、既に医薬品医療機器総合機構（PMDA）の対面助言を受けている。なお、TBT は腸管吸収および体内薬物動態が不安定なレチノイドの中で、腸管吸収、薬物動態ともに安定した薬剤で、成人では投与量と薬物動態に線形がある。また、成人でも MTD が同定されていない。そのため、TBT の成人適応量内での、単剤増量試験を第 I 相として行い、用量の最適化を行った後、TBT 推奨用量下に DAC の用量探索および両剤の推奨用量での安全性、有

効性確認試験（併用第 I/II 相試験）を承認前試験とすることとした。

当該年度は第 I 相試験の治験開始準備完了を目指す。

(2) 試験資料作成と治験開始届け提出

研究分担者間で連携しながら、治験薬提供者から情報を得ながら、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP）および関連法省令、通知に適合するように、必要な試験資料を作成する。

(3) 調整業務・試験管理準備と実施

国立がん研究センター研究支援センター（研究分担：佐藤）の支援の下、CRO および治験薬提供者、輸送業者等、治験実施予定施設との間での調整業務を開始し、試験管理準備を行う。

(4) 各施設での試験実施準備と実施

国立がん研究センター中央病院での IRB 承認、治験開始準備を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は医師主導治験としての臨床開発を行うため、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP）および関連する法、省令、通知に適合するように試験資料を作成し、モニタリング、監査体制を構築、効果安全性評価委員会の設置を行い、施設 IRB の承認を得た後、医薬品医療機器総合機構（PMDA）に初回治験届けを行った（TBT は小児用製剤を新たに製造して実施するため）。

なお、TBT 単剤第 I 相試験は神経芽腫を主とする小児固形がんを対象とするため、多くの例が小児例となることに対して子供用説明文書とアセントを用意した。また、TBT がビタミン A の誘導体であり、非臨床で催奇形性が確認されていることから、避妊に対するの対策と指導の徹底を実施計画書、説明同意文書において計画している。初年度は治験準備で患者登録がないことから、直接の被験者への倫理的配慮については発生していない。

C. 研究結果

(1) プロジェクトの総合推進

TBT 単剤第 I 相試験を開始するに当たって、他の研究分担者、治験薬提供者と連携して、準備を進めた。

TBT は小児用製剤をもちいることから、新剤型となることを PMDA に確認し、治験としては初回届けとなること、そのため治験薬概要書について、承認薬の錠剤での情報を参考情報として掲載しながら、新たな薬剤として作成した。また溶出試験にて治験開始要件は満たすが、薬剤の安定性試験が必要となるため、治験薬についてラベルや提供数、提供方法検討とともに、治験薬提供者との間で、来年度から治験

薬が治験実施予定施設 3 施設で使用できるよう準備完了した。

具体的には以下の(2)、(3)、(4)である。なお、「薬物血中濃度測定準備と実施」については、研究分担者（濱田）との間で進捗を共有し、GLP 準拠で薬物測定および結果報告を得るための CRO 契約、採血後の検体輸送方法の確定および輸送業者の確保、それらの標準手順書（SOP）の GCP 適合を確認した。

なお試験資料作成後、IRB 提出前に研究班全体としてのキック・オフミーティングを 2015 年に行った。

(2) 試験資料作成と治験開始届け提出

GCP に従って、治験実施計画書、同意説明文書・アセント文書、各種標準手順書を作成した。

第 I 相であるため、「抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドライン」に従い、安全性に配慮して一施設から開始し、初期の安全性が確かめた後に他の 2 施設が開始となるように国立がん研究センター中央病院で IRB 承認を 3 月までに得て、治験開始届けを提出、現在 PMDA での 30 日調査中であり、照会事項対応を行っている。他の治験実施予定 2 施設についても IRB 審査プロセスに進んでいる。

(3) 調整業務・試験管理準備と実施

データマネジメント計画を作成すると同時に、登録システム、症例報告フォームの作成とデータベース作成（EDC 利用）を行った。モニタリングおよび監査計画の立案も終了した。いずれも国立がん研究センター研究支援センターによるため CRO 契約は不要であった。治験開始後については、定期 web ミーティングを治験実施施設間で、2 週に 1 回を目途に行うなど運用についても確定し、ウェブ上に治験実施施設、研究支援センターが共有できる情報共有サイトを作成した。

(4) 各施設での試験実施準備と実施

治験管理室に 2015 年 1 月に支援申し込みを行い、国立がん研究センター中央病院では 2 月に IRB 審査申請、大きな問題無く、3 月には IRB 承認がえられた。

PMDA からの照会事項を受けて、試験資料改訂予定であり、試験資料確定後 4 月に施設内でのキック・オフミーティング予定である。

(5) 薬物血中濃度測定

薬物血中濃度測定に関して、DAC、TBT の PK 解析のために質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた分析方法の検討を進めた。TBT、TBT 安定同位体の合成を終了し、DAC を入手した。TBT、DAC の同時定量法を検討し、予備的測定条件を決定した。

D. 考察

TBT は、神経芽腫においてハイリスク集学的治療後

症例での再発予防として確立している分化誘導療法のドラッグラグ解消としても期待されるが、レチノイドは他の小児固形がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、滑膜肉腫、ラブドイド腫瘍、腎腫瘍、髄芽腫、膠芽腫、胚細胞性腫瘍などでも分化誘導効果を示すとの基礎検討がある。TBT 単剤第 I 相では、神経芽腫以外のこれらの疾患も登録をすすめることで、他疾患の開発にもつながることが期待される。

E. 結論

TBT 単剤第 I 相試験について試験準備を進め、国立がん研究センター中央病院で IRB 承認がえられ、治験開始届けを提出した。研究の当初計画にほぼ遅れなく研究進捗が得られた。来年度からは登録を開始する。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

該当無し

本研究費に密接に関係するもの

1. Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y and Oda Y. Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: *miR193a-5p* is suggested to downregulate *SMARCB1* mRNA expression. **Mod Pathol**, 27: 832-839, 2014.
2. Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y and Oda Y. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. **Hum Pathol**, 45: 1900-1909, 2014.
3. 田口智章. 小児血液・がんの治療としての外科的移植・再生医療. 日本小児血液・がん学会

雑誌, 51: 311-318, 2014.

2. 学会発表

1. Taguchi T, Kinoshita Y, Souzaki R, Kawakubo N, Yosue R and Ieiri S. Current status in pediatric surgical oncology. 20th Annual Conference of Cambodian Society of Surgery. Phnom Penh, November, 2014. (口頭)
2. Souzaki R, Koga Y, Minoru Y, Yanai F, Ueda K, Zaizen Y, Inomata Y, Shinkoda Y, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Oda Y, Hara T and Taguchi T. The differences in the clinical and biological characteristic of neuroblastomas detected during and after a period of mass screening of six-month-old infants in the Kyushu area of Japan: a report from the study group for pediatric solid tumors in the Kyushu area, Japan. PAPS2014. Banff, May, 2014. (口頭)
3. Taguchi T, Kinoshita Y, Souzaki R, Ieiri S and Kawakubo N. Surgical aspects in pediatric oncology in Japan. 8th SIOP Asia. Seoul, April, 2014. (口頭)
4. Souzaki R, Ieiri S, Kawakubo N, Kinoshita Y, Hashizume M and Taguchi T. Endoscopic surgery for neuroblastoma treated at a single institution. 8th SIOP Asia. Seoul, April, 2014. (ポスター)

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

奏効の分子機構と治療効果マーカーに関する研究

担当責任者 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
服部奈緒子 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 研究員

研究要旨

難治例神経芽腫の大半が高度な DNA メチル化異常（CIMP）をもつこと、その細胞株に対して DNA 脱メチル化剤 decitabine（DAC）と分化誘導剤 13-*cis*-RA の併用が神経芽腫細胞株に高い分化誘導能を示すこと、更に、国内開発合成レチノイド tamibarotene（TBT）はより強い分化誘導能と DAC との併用効果をもつことを、業務主任者は見いだしてした。本研究では、将来の TBT との併用下での DAC 療法の投与方法最適化や新しい DNA 脱メチル化剤への置換のために、奏効の分子機構の解明と治療効果マーカーの開発を行う。本年度は、移植腫瘍を用いて低用量 TBT が著しい腫瘍増殖抑制効果と分化誘導能を示すことを確認した。また、神経芽腫奏効性マーカーの開発のため、CIMP の新たな標的遺伝子を同定し、腫瘍から遊離 DNA を用いた DNA メチル化解析が有用である可能性を示した。

A. 研究目的

エピジェネティック治療承認後の投与方法最適化や新しい DNA 脱メチル化剤への置換を視野に入れ、奏効の分子機構の詳細な解明と治療効果マーカーの開発を行う。

B. 研究方法

(1) 治療標的となりうる遺伝子の同定

CIMP の標的となることを見出した遺伝子 200 個から、治療標的となり得る遺伝子という視点で、分化誘導・細胞増殖抑制に重要と考えられるもの 3 個以上を同定する。

(2) 奏効性マーカーの開発

治験登録症例について、骨髄中に残存する神経芽細胞腫に加え、血中遊離 DNA を収集する。また、マウス移植腫瘍治療モデルについても、残存する腫瘍細胞と血中遊離 DNA とを回収する。

(3) 治験における POC 取得

上記で DNA 脱メチル化のマーカーとして最適と考えられた材料・遺伝子について、治験症例での POC を取得する。

（倫理面への配慮）

本研究は医師主導治験での実施を計画しているため、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP）および関連する法、省令、通知に適するよう

なプロトコールと倫理審査委員会の承認を得て実施している。

個人情報保護のため、データの取り扱いについては、患者氏名など直接本人が識別できる情報を用いず、治験管理室での連結匿名を徹底する。薬物動態測定とメチル化測定では検体の授受が発生するため、これについても個人情報の取り扱いに気をつけ SOP での対応を徹底する。

C. 研究結果

(1) 奏効の分子機構の解明

奏効の分子機構解明のために、神経芽腫のマウス移植腫瘍を用い、低用量 TBT(0.2 mg/kg)投与でも著しい腫瘍増殖抑制効果を確認した。TBT 投与による移植腫瘍内での分化マーカーの発現上昇を確認した。

(2) 治療中の奏効性マーカーを開発

奏効性マーカーの開発として、各濃度の DAC や投与スケジュールを用いた *in vitro* 脱メチル化処理プロトコールを検討、プロトコールにより大きな治療効果の違いがあることを確認した。また、CIMP の標的遺伝子として *RASSF1A*, *RARG*, *BMP4* などを確認・同定した。

治験において DAC 治療後の血中遊離 DNA での DNA メチル化解析を目的として、がん細胞を *in vitro* で DAC 処理後、DNA 脱メチル化効果を生存細胞とメディアウム中の遊離 DNA で測定する系を確立した。その系を用いて、遊離 DNA の方が脱メチル化効果が大きい

ことを確認した。

学会年会, 2014年11月.(ポスター)

D. 考察

(1) 奏効の分子機構の解明

マウス移植腫瘍を用いた TBT 投与により、腫瘍中での分化マーカーの発現を確認したことから、TBT の奏効の分子機構のひとつとして、分化誘導効果が示された。今後は、TBT の分化誘導効果を最大限発揮するような DAC の濃度およびプロトコルを検討する必要がある。

(2) 治療中の奏効性マーカーを開発

細胞培養上清中の遊離 DNA を抽出する方法は、DAC 治療後の血中遊離 DNA も応用可能である。

がん細胞を *in vitro* で DAC 処理した場合、遊離 DNA の方が、生存細胞の DNA よりも脱メチル化効果が顕著だったことから、治療中の血中遊離 DNA 測定が奏効の判断には有用であることが示された。

E. 結論

CIMP をもつ難治神経芽腫に対し、TBT による分化誘導と DAC との併用は、治療効果を発揮すると期待される。また、DAC 治療の最適プロトコルの確立及び奏効に関与する遺伝子、開発する正確な治療効果マーカーは、今後、他の腫瘍でのエピジェネティック治療開発の基盤となると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Hattori N and Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 455: 3-9, 2014.

本研究費に密接に関係するもの

該当無し

2. 学会発表

1. Ushijima T. Establishment of a high-throughput detection system for epigenetic mutagens. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. Kolkata, December, 2014. (invited) (口頭)
2. Ushijima T, Hattori N, Wakabayashi M, Mori A and Okochi-Takada E. Establishment and use of a cell line for high-throughput screening of DNA demethylating agents. 45th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS). Orlando, September, 2014. (ポスター)
3. Hattori N, Mori A, Asada K, Kawamoto H and Ushijima T. Development of DNA demethylating therapy for neuroblastoma. 第37回日本分子生物

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

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「難治性神経芽腫に対する分化誘導療法併用下でのエピジェネティック治療開発」

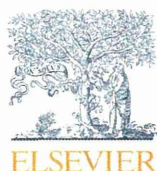
機関名 独立行政法人国立がん研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Establishment of a high-throughput detection system for epigenetic mutagens (口頭)	Ushijima T	4th Asian Conference on Environmental Mutagens	2014年12月	国外
Establishment and use of a cell line for high-throughput screening of DNA demethylating agents (ポスター)	Ushijima T, Hattori N, Wakabayashi M, Mori A and Okochi-Takada E	45th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS)	2014年9月	国外
Development of DNA demethylating therapy for neuroblastoma (ポスター)	Hattori N, Mori A, Asada K, Kawamoto H and Ushijima T	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月	国内
Current status in pediatric surgical oncology (口頭)	Taguchi T, Kinoshita Y, Souzaki R, Kawakubo N, Yosue R and Ieiri S	20th Annual Conference of Cambodian Society of Surgery	2014年11月	国外
The differences in the clinical and biological characteristic of neuroblastomas detected during and after a period of mass screening of six-month-old infants in the Kyushu area of Japan: a report from the study group for pediatric solid tumors in the Kyushu area, Japan (口頭)	Souzaki R, Koga Y, Minoru Y, Yanai F, Ueda K, Zaizen Y, Inomata Y, Shinkoda Y, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Oda Y, Hara T and Taguchi T	PAPS2014	2014年5月	国外
Surgical aspects in pediatric oncology in Japan (口頭)	Taguchi T, Kinoshita Y, Souzaki R, Ieiri S and Kawakubo N	8th SIOF Asia	2014年4月	国外
Endoscopic surgery for neuroblastoma treated at a single institution (ポスター)	Souzaki R, Ieiri S, Kawakubo N, Kinoshita Y, Hashizume M and Taguchi T	8th SIOF Asia	2014年4月	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer	Hattori N and Ushijima T	Biochem Biophys Res Commun	2014	国外
Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: <i>miR193a-5p</i> is suggested to downregulate <i>SMARCB1</i> mRNA expression	Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y and Oda Y	Mod Pathol	2014	国外
Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma	Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y and Oda Y	Hum Pathol,	2014	国外
小児血液・がんの治療としての外科的移植・再生医療	田口智章	日本小児血液・がん学会雑誌	2014	国内



Review

Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer



Naoko Hattori, Toshikazu Ushijima*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2014

Available online 4 September 2014

Keywords:

Cancer

Epigenetics

DNA methylation

Histone modification

ABSTRACT

Epigenetics now refers to the study or research field related to DNA methylation and histone modifications. Historically, global DNA hypomethylation was first revealed in 1983, and, after a decade, silencing of a tumor suppressor gene by regional DNA hypermethylation was reported. After the proposal of the histone code in the 2000s, alterations of histone methylation were also identified in cancers. Now, it is established that aberrant epigenetic alterations are involved in cancer development and progression, along with mutations and chromosomal losses. Recent cancer genome analyses have revealed a large number of mutations of epigenetic modifiers, supporting their important roles in cancer pathogenesis. Taking advantage of the reversibility of epigenetic alterations, drugs targeting epigenetic regulators and readers have been developed for restoration of normal pattern of the epigenome, and some have already demonstrated clinical benefits. In addition, DNA methylation of specific marker genes can be used as a biomarker for cancer diagnosis, including risk diagnosis, detection of cancers, and pathophysiological diagnosis. In this paper, we will summarize the major concepts of cancer epigenetics, placing emphasis on history.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	3
1.1. Global hypomethylation in cancer	4
1.2. Regional DNA hypermethylation in cancer	5
1.3. The CpG island methylator phenotype	5
1.4. Discovery of 5-hydroxymethylcytosine and the role of TET proteins in cancer	5
1.5. Aberrant histone modifications in cancers	5
1.6. Mutations of epigenetic regulators in cancer	6
1.7. Histone H3.3 mutations in malignant glioma	6
1.8. Clinical application as epigenetic cancer therapy	6
1.9. Clinical applications as epigenetic cancer diagnosis	6
2. Conclusion	7
Disclosure of potential conflicts of interest	7
Acknowledgments	7
References	7

1. Introduction

Epigenetics referred to the study or research field for heritable modifications that regulated gene expression without changes in DNA sequences. The main mechanisms of epigenetic inheritance are recognized to be DNA methylation and histone modifications,

Abbreviations: K, lysine; ac, acetylation; me1, mono-methylation; me2, di-methylation; me3, tri-methylation; DNMT, DNA methyltransferase; FDA, U.S. Food and Drug Administration; POC, proof-of-concept.

* Corresponding author. Fax: +81 3 5565 1753.

E-mail address: tushijim@ncc.go.jp (T. Ushijima).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.140>

0006-291X/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

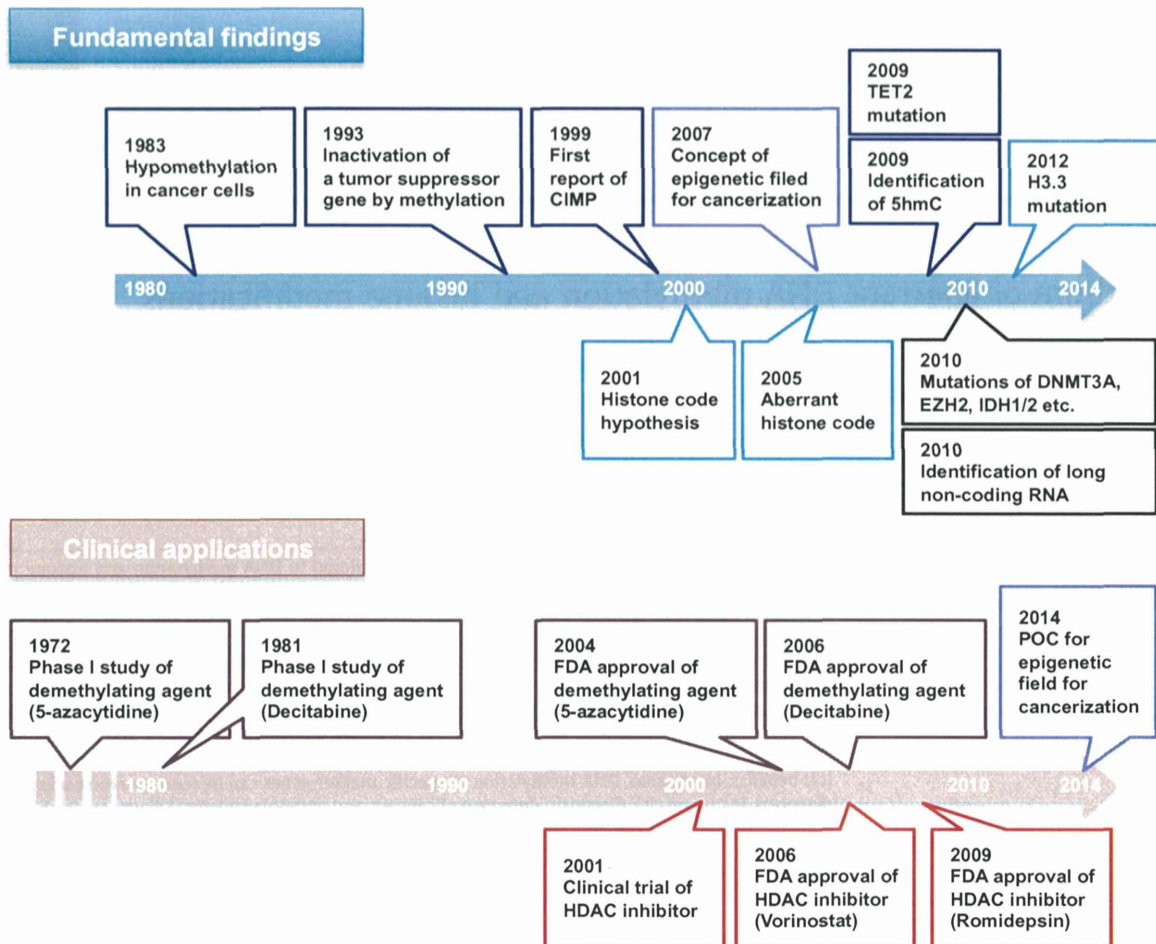


Fig. 1. History of cancer epigenetics. An overview of cancer epigenetics is shown focusing on fundamental findings and clinical applications.

and epigenetics now mainly refers to the study or research field related to DNA methylation and histone modifications. In mammals, epigenetic inheritance is important for pre-implantation development [1], fetal development [2], cell differentiation [3] and tissue differentiation [4]. It is also involved in gametogenesis and cellular reprogramming during the generation of cloned animals and iPS cells [5].

At the same time, aberrant epigenetic modifications (epigenetic alterations) are now considered to be involved in the pathogenesis of several diseases, including pediatric tumors [6]. Especially, aberrant DNA methylation is deeply involved in cancer development and progression because DNA methylation pattern is inherited with a high fidelity in somatic cells [7]. Once aberrant DNA methylation is induced, it is accurately transmitted to daughter cells after cell division. Aberrant DNA methylation is one of the major mechanisms of inactivation of tumor-suppressor genes, along with mutations and chromosomal losses [8].

Historically, the first discovery of epigenetic alterations in cancer goes back to 1983 when global DNA hypomethylation was reported [9]. After a decade, regional DNA hypermethylation was demonstrated to cause silencing of a tumor suppressor gene [10]. The CpG island methylator phenotype (CIMP) was reported first in colorectal tumors in 1999 [11], and thereafter, the presence of CIMP has become known in other types of cancers [12]. As for histone modifications, the impact of histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACis) on cancer cell proliferation was known in the

1990s [13]. After the proposal of the “histone code” [14], its disturbances have been reported in various types of cancer. Most recently, cancer genome analyses revealed the presence of mutations of epigenetic regulators, including those of *TET* and *IDH* genes [15]. Epigenetic drugs, such as DNA demethylating agents and HDACis, have already become an option for cancer treatment [16].

In this review, we will summarize an overview and trends of cancer epigenetics according to its history (Fig. 1).

1.1. Global hypomethylation in cancer

Global hypomethylation in cancer denotes a decrease in overall content of 5-methylcytosine, and was revealed as the first epigenetic abnormality in cancer by Feinberg and Vogelstein in 1983 [9] (Fig. 1). They analyzed DNA methylation in cancerous and non-cancerous tissues by Southern blotting of DNA digested with methylation-sensitive restriction enzymes, and found a substantial reduction in DNA methylation in cancer tissues. Gama-Sosa and colleagues also investigated the difference in DNA methylation level between cancerous and non-cancerous tissues by a high-performance liquid chromatography, and showed a reduction of 5-methylcytosine content in cancer tissues [17]. Such hypomethylation was also found in pre-malignant adenomas [18,19].

Global hypomethylation involves repetitive sequences, which is observed not only in cancers but also in non-cancerous tissues [20], such as normal mucosae exposed to chronic inflammation

[21]. Global hypomethylation also involves promoter regions of cancer-testis antigen genes, such as *MAGE* and *GAGE* [22,23]. Although several studies investigated DNA hypomethylation of oncogenes [24–27], activation of oncogenes by hypomethylation is still controversial because the regions analyzed in most studies were outside the promoter region that control gene expression and some oncogenes do not have CpG islands (CGIs) in their promoter regions. On the other hand, it has been established that DNA hypomethylation leads to chromosomal instability and tumor development, using DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) hypomorphic mouse [11,28,29].

1.2. Regional DNA hypermethylation in cancer

Regional DNA hypermethylation in cancer denotes increased methylation at normally unmethylated CGIs. If a CGI in a gene promoter region is methylated, its downstream gene is consistently inactivated. Therefore, regional hypermethylation in a promoter CGI of a tumor-suppressor gene can inactivate the gene, leading to tumor development and tumor progression [8]. In 1993, inactivation of the *RB* tumor-suppressor gene by DNA hypermethylation of its promoter CGI was reported as the first evidence [10] (Fig. 1). Subsequently, aberrant DNA methylation of other tumor-suppressor genes, such as *CDKN2A* (*p16*) [30], *MLH1* [31] and *CDH1* [32] was also reported as an alternative mode of inactivation to genetic alterations.

As the importance of aberrant DNA methylation was recognized, genome-wide screening techniques to identify aberrantly methylated regions were developed in the late 1990s, including restriction landmark genomic screening (RLGS) [33], methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) [34] and methylation-specific arbitrarily-primed PCR (MS-AP-PCR) [35]. In the 2000s, methods using an antibody against methylated cytosine or methyl-CpG-binding domain protein (MBD) [36] were developed. Now, microarray analysis combined with bisulfite treatment, such as Infinium BeadArray for human sample [37], and next-generation sequencing, such as reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) [38] and whole-genome bisulfite sequencing [39], are widely used. Such genome-wide analyses revealed that a large number of genes with promoter CGIs (from several hundreds to one thousand) are hypermethylated in cancer [40]. Since most of such genes are not expressed or expressed at very low levels in normal cells, they are considered not as “driver genes”, which are causally involved in tumorigenesis, but as “passenger genes”, which are methylated by an accompanying phenomenon of carcinogenesis. Until now, a large number of tumor-suppressor genes have been shown to be potentially silenced by aberrant DNA methylation, and aberrant DNA methylation is the one of the major mechanisms that inactivates tumor-suppressor genes.

1.3. The CpG island methylator phenotype

The “CpG island methylator phenotype (CIMP)” is defined as frequent methylation of multiple CGIs, and was first reported in colorectal cancers by Toyota and colleagues in 1999 [11,41] (Fig. 1). The presence of tumors with the CIMP has been reported in other type of cancers, including neuroblastoma [12], glioma [42,43] and gastric cancer [44,45]. Importantly, the CIMP status is uniquely associated with specific clinicopathological characteristics in individual cancer types, indicating that the CIMP provides information for cancer diagnosis and may be utilized to stratify patients for therapeutic opportunities [46].

For instance, the CIMP of colorectal cancers is associated with tumors in elderly patients, in the right-side colon and in female patients [47]. The CIMP of neuroblastoma is strongly associated

with poor prognosis in patient cohorts from multiple countries, including Japan, Germany, Italy and Sweden. Moreover, CIMP-positive cases include almost all cases with *MYCN* amplification, a prognostic marker used in clinical practice, and the CIMP status provides prognostic information not provided from *MYCN* amplification [48]. In 2014, the analysis of neuroblastoma CIMP has become commercially available in Japan.

The mechanisms for development of CIMP are one of the most discussed topics in the field of cancer epigenetics [49]. Recent studies by Killian and colleagues and by Turcan and colleagues demonstrated an association between specific genomic alterations and the presence of the CIMP [50,51]. In gastrointestinal stromal tumors, cases with mutation of succinate dehydrogenase (SDH) displayed the CIMP phenotype [51]. In gliomas, *IDH1* mutation was shown to be sufficient to establish a glioma with CIMP [50].

1.4. Discovery of 5-hydroxymethylcytosine and the role of TET proteins in cancer

Whether active DNA demethylation is present or not has been a strong debate for a long period as DNA methylation was thought to be a consequence of failure in maintenance methylation after DNA replication. However, finally, a mechanism of active DNA demethylation was proposed by involvement of oxidative demethylation [52]. In 2009, Tahiliani and colleagues showed that the ten-eleven translocation (TET) family proteins could modify 5-methylcytosine to 5-methylhydroxycytosine (5-hmC) by oxidation of the 5-methyl group [53,54]. Now, many investigators trust the presence of active DNA demethylation by TET proteins [55].

TET2, a close relative of TET1, was also reported as an enzyme related with 5-hmC generation. Frequent somatic *TET2* mutations were observed in several hematological cancers, and a low level of 5-hmC was observed in bone marrow samples of patients with *TET2* mutations [56]. As for solid tumors, in 2012, Lian and colleagues demonstrated that loss of 5-hmC was present in melanoma, and that *IDH2* mutations and down-regulation of TET proteins might be the mechanisms of loss of 5-hmC [57]. As genes in which demethylation is important to suppress tumor development and progression, *TIMP2* and *TIMP3* were implicated as TET1-target genes in prostate and breast cancers [58].

1.5. Aberrant histone modifications in cancers

The histone code hypothesis was proposed by Jenuwein and Allis in 2001, to explain how combinations of histone modifications contribute to alterations of chromatin structure and changes of gene expression [14] (Fig. 1). Now, in various cancers, alterations of histone modifications have been reported in both global and gene-specific manners. In 2005, for the first time, Fraga and colleagues reported down-regulation of histone H4K16ac and histone H4K20me3 in colorectal cancer and leukemia [59] (Fig. 1). Importantly, some histone alterations were found to be associated with poor prognosis, such as histone H3K4me1 and H3K9me2, 3 in prostate cancers and histone H3K4me2, H3K9me2 and H3K18ac in pancreatic cancers [60,61]. Gene-specific change of histone marks, such as H3K27me3, H3K9me2 and H3K79me2, inactivated tumor-suppressor genes, resulting in tumor development and progression [62–64].

Before the proposal of the histone code hypothesis, a difference in histone acetylation was reported between cancer and normal tissues [65]. In addition, inhibitors of HDACs were developed and their differentiation induction effect on leukemic cells was noted [66]. The impact of HDACis on cancer cell proliferation was also revealed [13], and now, aberrant histone acetylation in cancer has become a therapeutic target using epigenetic drugs [16].

1.6. Mutations of epigenetic regulators in cancer

Recent genomic analyses using next generation sequencing discovered mutations of epigenetic regulators in cancers [15,67]. In 2009, Abdel-Wahab and colleagues, along with other groups, found frequent mutations in *TET2* in myeloid malignancies, and showed the association between the mutations and decreased overall survival in AML [68,69]. *IDH1* and *IDH2* mutations are also frequently observed in gliomas, and those mutations were shown to lead to loss of their physiological function, conversion of isocitrate into α -ketoglutarate, and to gain of function to produce 2-hydroxyglutarate (2-HG) [70,71]. The metabolite 2-HG competitively inhibited activity of TET1 and TET2, leading to decrease of 5-hmC. 2-HG also inhibited several histone demethylases, such as KDM2A, leading to genome-wide alterations of histone modifications [72].

Mutations of other epigenetic modifiers, including *DNMT3A*, *EZH2* and *SETD2*, have also been identified. When *DNMT3A* mutation occurs at R882, most frequent in AML, the methyltransferase activity of *DNMT3A* is decreased [73,74]. It has been reported that in lymphoma, *EZH2* mutation at Y641 increased its enzymatic activity, leading to aberrant histone H3K27 methylation [75–77]. An analysis of renal carcinoma showed inactivating mutations of *STED2*, a histone H3K36 methyltransferase, and *KDM5C*, a histone H3K4 demethylase, and *KMD6A*, a histone H3K27 demethylase [78,79]. The investigation of cancer genome accelerated our understanding of cancer epigenome.

1.7. Histone H3.3 mutations in malignant glioma

Specific roles of histone variants in various biological processes were clarified entering the 2010's. In cancers, Schwartzentruber and colleagues demonstrated that 31% of glioblastomas contained somatic mutations in a histone variant, histone H3.3, in 2012 [80]. Mutations in the *H3F3A* gene, K27M and G34R/V, have been identified, leading to amino acid changes in the N-terminal domain of the H3.3 protein. These mutations were mutually exclusive, and the tumors with H3.3 mutation showed distinct profiles of DNA methylation and gene expression [80,81]. Tumors with K27M also displayed a global decrease of H3K27me2 and H3K27me3. These results suggested that the *H3F3A* mutation defined a unique subgroup of gliomas.

1.8. Clinical application as epigenetic cancer therapy

One of the most important characteristics of epigenetic alterations is their reversibility [82]. Drugs targeting epigenetic alterations and regulators have been developed for the purpose of restoration of normal epigenomic pattern, and were shown to have clinical benefits [83]. Two classes of epigenetic drugs, DNMT inhibitors and HDACis, are already in clinical practice.

(a) Development and clinical application of DNA demethylating agents

In 1964, Sorm and colleagues developed 5-azacytidine (azacitidine; 5-Aza; Vidaza[®]) and 2'-deoxy-5-azacytidine (decitabine; 5-aza-CdR; Dacogen[®]) as classical cytostatic agents [84]. The possible anti-cancer activity of azacytidine was reported in 1968 using a mouse model of acute leukemia without attention to its ability of DNA demethylation [85]. In 1979, Taylor and Jones revealed its activity to induce cell differentiation *in vitro* and its involvement in the inhibition of DNA methylation [86].

Nevertheless, the first clinical trial of decitabine in patients with acute leukemia, published in 1981, was conducted without much attention to its epigenetic effects [87]. Although a significant reduction in circulating blasts was observed, the dose determined

based upon the maximum-tolerant dose induced severe and prolonged myelosuppression, possibly due to the cytotoxic effect of high-dose of decitabine. After implementation of a new regimen focusing on their epigenetic action, namely a low dose and a prolonged exposure, the DNA demethylating drugs exhibited a much better anti-cancer effect [88]. Azacytidine and decitabine were approved in 2004 and 2006, respectively, by the FDA for the treatment of myelodysplastic syndrome (MDS) [89,90].

A new generation of DNMT inhibitors, such as SGI-110, is currently being developed in clinical trials [16]. In addition, a combination with an HDACis or another anti-cancer drug is also being attempted. Indeed, a combination of a DNA demethylating agent and an HDACis was shown to be promising in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer [91,92].

(b) Clinical application of HDAC inhibitors

The first clinical trial using HDACis, romidepsin (depsipeptide; Istodax[®]), reported in 2001, demonstrated to be promising [93]. In 2006, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat; Zolinza[®]) was approved by the FDA for the treatment of cutaneous T cell lymphoma (CTCL), and romidepsin was also approved for the same indication in 2009. In human, there are 18 HDAC proteins categorized into four classes, class I, IIa, IIb and III. Romidepsin and SAHA target at least four HDACs across multiple classes, showing no strict specificity in their target HDACs. To reduce toxicity associated with such global HDAC inhibition, novel agents are being developed for selective inhibition of specific HDACs. Entinostat and mocetinostat selectively target class I HDACs, and ACY-1215 is a specific inhibitor of HDAC6. Until now, more than 20 different inhibitors are under investigation in clinical trials for hematological and solid tumors [16,94].

(c) Inhibitors targeting other epigenetic modifiers and readers

Other candidates for epigenetic drugs are inhibitors for histone methyltransferases, histone demethylases, and proteins that recognize histone modifications. Histone H3K9 methyltransferase G9a, overexpressed in several type of cancers, could be inhibited by a chemical compound, BIX-01294 [95]. BIX-01294 showed strong anti-growth ability in cancer cell lines with high expression of G9a [96]. Specific inhibitors of *EZH2*, such as GSK126, have also been developed, and exhibited anti-tumor activity for lymphoma with *EZH2*-activating mutation [97] and rhabdoid tumors with *SMARCB1* mutation [98]. The potent inhibitor of DOT1L, histone H3K79 methyltransferase, could induce selective killing of mixed lineage leukemia cells harboring *MLL* translocation [63]. Bromodomain-containing proteins recognize acetylated histone and function as readers of histone acetylation at super-enhancers [99]. Several inhibitors of such proteins has been developed, and are in phase I trial. For the past few years, the development of epigenetic drugs speeded up across industry and academia, and it is evident that the new epigenetic drugs will be brought into the clinical area.

1.9. Clinical applications as epigenetic cancer diagnosis

DNA methylation of specific marker genes can be used as a biomarker for cancer diagnosis [100]. Generally, cancer diagnosis can be categorized into (a) risk diagnosis, (b) detection of cancers, and (c) pathophysiological diagnosis that estimates cancer responsiveness for therapy and patient prognosis.

(a) Estimation of cancer risk by DNA methylation

Aberrant DNA methylation is observed not only in cancer tissue but also in non-cancerous tissue and pre-cancerous tissue of espe-

cially inflammation-associated cancers, indicating “epigenetic field for cancerization” [101]. Since the epigenetic field reflects the past exposure to carcinogens and/or inflammation, its severity, assessed as aberrant DNA methylation of specific marker genes, can be correlated with cancer risk. As a very convincing prospective cohort study, one report was published in 2014 by Asada and colleagues [102].

(b) DNA methylation markers for cancer detection

For cancer detection markers, samples and sensitivity should be always considered. One of the most promising DNA methylation markers for screening of colorectal cancer is *SEPT9* hypermethylation in blood. In 2011, Warren and colleagues demonstrated that colorectal cancer could be detected in blood-based samples with a sensitivity of 90% and a specificity of 88% [103]. *GSTP1* hypermethylation in urine has been also reported as a promising biomarker to detect prostate cancer with 82% sensitivity and 95% specificity [104].

(c) DNA methylation markers for cancer pathophysiological diagnosis

DNA methylation marker can be used to predict a response to chemotherapy. The promoter hypermethylation of *MGMT*, which codes a DNA repair enzyme, can be used to predict a response of glioma to alkylating agents. In a tumor with unmethylated *MGMT*, its expression can be induced after treatment with an alkylating agent, such as temozolomide, and leads to resistance to alkylating agent. On the other hand, in a tumor with methylated *MGMT*, its expression can never be induced even after the treatment [105].

Response to a therapy can be associated with DNA methylation of not only a single gene but also multiple genes, namely the CIMP. Jover and colleagues demonstrated that colorectal cancer with the CIMP could be resistant to chemotherapy with 5-fluorouracil [106]. In the case of neuroblastoma, the cases with the CIMP have significantly poorer prognosis than those without. Importantly, the predictive ability of the CIMP of neuroblastoma has been shown to be much stronger than that of *MYCN* amplification applied to clinical situation [12,48].

2. Conclusion

Since global hypomethylation was reported in 1983, approximately 30 years have passed. Meanwhile, a large number of findings in cancer epigenetics have been made, and some were brought into cancer therapy and diagnosis. However, there still remain a lot of issues to be solved in the field of cancer epigenetics, such as how mutations of chromatin remodelers are involved in cancer development and how epigenetic alterations are exactly induced by exposure to inflammation. Fortunately, new technologies are now available for epigenetic and genetic analyses, and our understanding of cancer epigenetics will be accelerated. More findings will be brought into cancer diagnosis and therapy.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-aid for Innovative Cancer Medicine and Practice (to T.U.); and Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (25830094) (to N.H.).

References

- [1] M. Saitou, S. Kagiwada, K. Kurimoto, Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells, *Development* 139 (2012) 15–31.
- [2] W. Reik, W. Dean, J. Walter, Epigenetic reprogramming in mammalian development, *Science* 293 (2001) 1089–1093.
- [3] A. Meissner, Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 1079–1088.
- [4] M.K. Skinner, Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance, *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93 (2011) 51–55.
- [5] D.D. De Carvalho, J.S. You, P.A. Jones, DNA methylation and cellular reprogramming, *Trends Cell Biol.* 20 (2010) 609–617.
- [6] K. Ohnishi, K. Semi, Y. Yamada, Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014). Published Online First: 11 Jul 2014.
- [7] T. Ushijima, N. Watanabe, E. Okochi, et al., Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome, *Genome Res.* 13 (2003) 868–874.
- [8] T. Ushijima, Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 223–231.
- [9] A.P. Feinberg, B. Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature* 301 (1983) 89–92.
- [10] N. Ohtani-Fujita, T. Fujita, A. Aoiike, et al., CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene, *Oncogene* 8 (1993) 1063–1067.
- [11] M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, et al., CpG island methylator phenotype in colorectal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 8681–8686.
- [12] M. Abe, M. Ohira, A. Kaneda, et al., CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas, *Cancer Res.* 65 (2005) 828–834.
- [13] Y. Hoshikawa, H.J. Kwon, M. Yoshida, et al., Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines, *Exp. Cell Res.* 214 (1994) 189–197.
- [14] T. Jenuwein, C.D. Allis, Translating the histone code, *Science* 293 (2001) 1074–1080.
- [15] C. Plass, S.M. Pfister, A.M. Lindroth, et al., Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 765–780.
- [16] V.A. DeWoskin, R.P. Million, The epigenetics pipeline, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 661–662.
- [17] M.A. Gama-Sosa, V.A. Slagel, R.W. Trewyn, et al., The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 6883–6894.
- [18] A.P. Feinberg, C.W. Gehrke, K.C. Kuo, et al., Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia, *Cancer Res.* 48 (1988) 1159–1161.
- [19] S.E. Goetz, B. Vogelstein, S.R. Hamilton, et al., Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms, *Science* 228 (1985) 187–190.
- [20] Y. Matsuda, S. Yamashita, Y.C. Lee, et al., Hypomethylation of Alu repetitive elements in esophageal mucosa, and its potential contribution to the epigenetic field for cancerization, *Cancer Causes Control* 23 (2012) 865–873.
- [21] T. Yoshida, S. Yamashita, T. Takamura-Enya, et al., Alu and Satalpha hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae, *Int. J. Cancer* 128 (2011) 33–39.
- [22] C. De Smet, O. De Backer, I. Faraoni, et al., The activation of human gene *MAGE-1* in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 7149–7153.
- [23] B. Cho, H. Lee, S. Jeong, et al., Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene *CAGE* is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (2003) 52–63.
- [24] M. Cho, H. Uemura, S.C. Kim, et al., Hypomethylation of the *MN/CA9* promoter and upregulated *MN/CA9* expression in human renal cell carcinoma, *Br. J. Cancer* 85 (2001) 563–567.
- [25] Y. Akiyama, C. Maesawa, S. Ogasawara, et al., Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 1911–1919.
- [26] N. Sato, A. Maitra, N. Fukushima, et al., Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 4158–4166.
- [27] M. Nishigaki, K. Aoyagi, I. Danjoh, et al., Discovery of aberrant expression of *R-RAS* by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays, *Cancer Res.* 65 (2005) 2115–2124.
- [28] R.Z. Chen, U. Pettersson, C. Beard, et al., DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates, *Nature* 395 (1998) 89–93.
- [29] F. Gaudet, J.G. Hodgson, A. Eden, et al., Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation, *Science* 300 (2003) 489–492.
- [30] A. Merlo, J.G. Herman, L. Mao, et al., 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers, *Nat. Med.* 1 (1995) 686–692.
- [31] M.F. Kane, M. Loda, G.M. Gaida, et al., Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines, *Cancer Res.* 57 (1997) 808–811.
- [32] K. Yoshiura, Y. Kanai, A. Ochiai, et al., Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7416–7419.
- [33] J. Kawai, S. Hirotsune, K. Hirose, et al., Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 5604–5608.

- [34] T. Ushijima, K. Morimura, Y. Hosoya, et al., Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2284–2289.
- [35] M.L. Gonzalgo, G. Liang, C.H. Spruck 3rd, et al., Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR, *Cancer Res.* 57 (1997) 594–599.
- [36] M. Sonnet, C. Baer, M. Rehli, et al., Enrichment of methylated DNA by methyl-CpG immunoprecipitation, *Methods Mol. Biol.* 971 (2013) 201–212.
- [37] N. Touleimat, J. Tost, Complete pipeline for Infinium(R) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation, *Epigenomics* 4 (2012) 325–341.
- [38] A. Meissner, A. Gnirke, G.W. Bell, et al., Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5868–5877.
- [39] F. Miura, Y. Enomoto, R. Dairiki, et al., Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) e136.
- [40] S. Yamashita, K. Hosoya, K. Gyobu, et al., Development of a novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis, *DNA Res.* 16 (2009) 275–286.
- [41] M. Toyota, C. Ho, N. Ahuja, et al., Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification, *Cancer Res.* 59 (1999) 2307–2312.
- [42] H. Noshmeh, D.J. Weisenberger, K. Diefes, et al., Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma, *Cancer Cell* 17 (2010) 510–522.
- [43] S.C. Mack, H. Witt, R.M. Piro, et al., Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy, *Nature* 506 (2014) 445–450.
- [44] M. Toyota, N. Ahuja, H. Suzuki, et al., Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype, *Cancer Res.* 59 (1999) 5438–5442.
- [45] C. An, I.S. Choi, J.C. Yao, et al., Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 656–663.
- [46] Y. Toiyama, Y. Okugawa, A. Goel, DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455 (2014) 43–57.
- [47] J. Tanaka, T. Watanabe, T. Kanazawa, et al., Left-Sided microsatellite unstable colorectal cancers show less frequent methylation of hMLH1 and CpG island methylator phenotype than right-sided ones, *J. Surg. Oncol.* 96 (2007) 611–618.
- [48] K. Asada, M. Abe, T. Ushijima, Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas, *J. Hum. Genet.* 58 (2013) 428–433.
- [49] H. Suzuki, E. Yamamoto, R. Maruyama, et al., Biological significance of the CpG island methylator phenotype, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014). Published Online First: 10 Jul 2014.
- [50] S. Turcan, D. Rohle, A. Goenka, et al., IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype, *Nature* 483 (2012) 479–483.
- [51] J.K. Killian, S.Y. Kim, M. Miettinen, et al., Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor, *Cancer Discov.* 3 (2013) 648–657.
- [52] S.C. Wu, Y. Zhang, Active DNA demethylation: many roads lead to Rome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 607–620.
- [53] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y. Shen, et al., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324 (2009) 930–935.
- [54] J.J. Waterfall, J.K. Killian, P.S. Meltzer, The role of mutation of metabolism-related genes in genomic hypermethylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014). Published Online First: 8 Aug 2014.
- [55] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, et al., Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* 333 (2011) 1300–1303.
- [56] M. Ko, Y. Huang, A.M. Jankowska, et al., Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2, *Nature* 468 (2010) 839–843.
- [57] C.G. Lian, Y. Xu, C. Ceol, et al., Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma, *Cell* 150 (2012) 1135–1146.
- [58] C.H. Hsu, K.L. Peng, M.L. Kang, et al., TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases, *Cell Rep.* 2 (2012) 568–579.
- [59] M.F. Fraga, E. Ballestar, A. Villar-Garea, et al., Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer, *Nat. Genet.* 37 (2005) 391–400.
- [60] J. Ellinger, P. Kahl, J. von der Gathen, et al., Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence, *Prostate* 70 (2010) 61–69.
- [61] A. Manuyakov, R. Paulus, J. Farrell, et al., Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1358–1365.
- [62] Y. Kondo, L. Shen, A.S. Cheng, et al., Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation, *Nat. Genet.* 40 (2008) 741–750.
- [63] S.Y. Jo, E.M. Granowicz, I. Maillard, et al., Requirement for Dot1l in murine postnatal hematopoiesis and leukemogenesis by MLL translocation, *Blood* 117 (2011) 4759–4768.
- [64] M.W. Chen, K.T. Hua, H.J. Kao, et al., H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM, *Cancer Res.* 70 (2010) 7830–7840.
- [65] K. Horiuchi, D. Fujimoto, M. Fukushima, et al., Increased histone acetylation and deacetylation in rat ascites hepatoma cells, *Cancer Res.* 41 (1981) 1488–1491.
- [66] M. Yoshida, S. Nomura, T. Beppu, Effects of trichostatin on differentiation of murine erythroleukemia cells, *Cancer Res.* 47 (1987) 3688–3691.
- [67] S. Aumann, O. Abdel-Wahab, Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014). Published Online First: 9 Aug 2014.
- [68] A. Tefferi, R.L. Levine, K.H. Lim, et al., Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates, *Leukemia* 23 (2009) 900–904.
- [69] O. Abdel-Wahab, A. Mullally, C. Hedvat, et al., Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies, *Blood* 114 (2009) 144–147.
- [70] K.E. Yen, M.A. Bittinger, S.M. Su, et al., Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities, *Oncogene* 29 (2010) 6409–6417.
- [71] L. Dang, D.W. White, S. Gross, et al., Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature* 462 (2009) 739–744.
- [72] W. Xu, H. Yang, Y. Liu, et al., Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases, *Cancer Cell* 19 (2011) 17–30.
- [73] X.J. Yan, J. Xu, Z.H. Gu, et al., Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia, *Nat. Genet.* 43 (2011) 309–315.
- [74] D.A. Russler-Germain, D.H. Spencer, M.A. Young, et al., The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers, *Cancer Cell* 25 (2014) 442–454.
- [75] C.J. Sneeringer, M.P. Scott, K.W. Kuntz, et al., Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 20980–20985.
- [76] G. Nikoloski, S.M. Langemeijer, R.P. Kuiper, et al., Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes, *Nat. Genet.* 42 (2010) 665–667.
- [77] R.D. Morin, N.A. Johnson, T.M. Severson, et al., Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin, *Nat. Genet.* 42 (2010) 181–185.
- [78] G.L. Dalgliesh, K. Furge, C. Greenman, et al., Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes, *Nature* 463 (2010) 360–363.
- [79] G. van Haften, G.L. Dalgliesh, H. Davies, et al., Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer, *Nat. Genet.* 41 (2009) 521–523.
- [80] J. Schwartzentruber, A. Korshunov, X.Y. Liu, et al., Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma, *Nature* 482 (2012) 226–231.
- [81] D. Sturm, H. Witt, V. Hovestadt, et al., Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma, *Cancer Cell* 22 (2012) 425–437.
- [82] T. Ushijima, K. Asada, Aberrant DNA methylation in contrast with mutations, *Cancer Sci.* 101 (2010) 300–305.
- [83] D. Dhanak, P. Jackson, Development and classes of epigenetic drugs for cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014). Published Online First: 10 Jul 2014.
- [84] F. Sorm, A. Piskala, A. Cihak, et al., 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic, *Experientia* 20 (1964) 202–203.
- [85] F. Sorm, J. Vesely, Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice, *Neoplasma* 15 (1968) 339–343.
- [86] S.M. Taylor, P.A. Jones, Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine, *Cell* 17 (1979) 771–779.
- [87] G.E. Rivard, R.L. Momparler, J. Demers, et al., Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia, *Leuk. Res.* 5 (1981) 453–462.
- [88] J.P. Issa, G. Garcia-Manero, F.J. Giles, et al., Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies, *Blood* 103 (2004) 1635–1640.
- [89] L.R. Silverman, E.P. Demakos, B.L. Peterson, et al., Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 2429–2440.
- [90] H. Kantarjian, J.P. Issa, C.S. Rosenfeld, et al., Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study, *Cancer* 106 (2006) 1794–1803.
- [91] R.A. Juergens, J. Wrangle, F.P. Vendetti, et al., Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer, *Cancer Discov.* 1 (2011) 598–607.
- [92] N. Azad, C.A. Zahnow, C.M. Rudin, et al., The future of epigenetic therapy in solid tumours—lessons from the past, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10 (2013) 256–266.
- [93] R.L. Piekarz, R. Robey, V. Sandor, et al., Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report, *Blood* 98 (2001) 2865–2868.
- [94] A.A. Lane, B.A. Chabner, Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 5459–5468.

- [95] S. Kubicek, R.J. O'Sullivan, E.M. August, et al., Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase, *Mol. Cell* 25 (2007) 473–481.
- [96] H.S. Cho, J.D. Kelly, S. Hayami, et al., Enhanced expression of EHMT2 is involved in the proliferation of cancer cells through negative regulation of SIAH1, *Neoplasia* 13 (2011) 676–684.
- [97] M.T. McCabe, H.M. Ott, G. Ganji, et al., EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations, *Nature* 492 (2012) 108–112.
- [98] S.K. Knutson, N.M. Warholic, T.J. Wigle, et al., Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 7922–7927.
- [99] J. Loven, H.A. Hoke, C.Y. Lin, et al., Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers, *Cell* 153 (2013) 320–334.
- [100] T.M. Barrow, K.B. Michels, Epigenetic epidemiology of cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014). Published Online First: 11 Aug 2014.
- [101] T. Ushijima, Epigenetic field for cancerization, *J. Biochem. Mol. Biol.* 40 (2007) 142–150.
- [102] K. Asada, T. Nakajima, T. Shimazu, et al., Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study, *Gut* (2014). Published Online First: 2 June 2014.
- [103] J.D. Warren, W. Xiong, A.M. Bunker, et al., Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer, *BMC Med.* 9 (2011) 133.
- [104] L. Van Neste, J.G. Herman, G. Otto, et al., The epigenetic promise for prostate cancer diagnosis, *Prostate* 72 (2012) 1248–1261.
- [105] M.E. Hegi, A.C. Diserens, T. Gorlia, et al., MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 997–1003.
- [106] R. Jover, T.P. Nguyen, L. Perez-Carbonell, et al., 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer, *Gastroenterology* 140 (2011) 1174–1181.