

## 15 - 20 がんの早期診断及び予後の予測を目指したヒト多段階発がん過程における DNA メチル化の変化に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 金井 弥 栄

### 研究成果の要旨

DNA メチル化の変化に着目したがんの早期診断・病態診断の実用化を目指して研究を進めた。Wnt シグナル伝達系の負の制御遺伝子 SFRP1・低酸素誘導性アポトーシス関連遺伝子 BNIP3 等が、大腸がん等において DNA メチル化により不活化されていることを示した。胃がんで DNA メチル化が亢進する遺伝子として CHFR を、DNA メチル化が減弱する遺伝子として SNCG を同定した。DNMT1 の発現亢進とがんの CpG アイランドメチル化形質の相関を証明し、DNMT1 発現の評価が膵がん患者の予後予測に有用である可能性を示した。FLNc 遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの中心部と p41Arc 遺伝子非プロモーター領域 CpG アイランドの 5'領域における DNA メチル化は、胃がん手術材料より得られた非がん胃粘膜において非胃がん症例胃粘膜に比して有意に亢進しており、胃発がんのリスク評価の指標となると考えられた。「DNA メチル化診断チップ」の開発に着手し、限界希釈メチル化特異的 PCR (MSP)法・リアルタイム定量 MSP 法でがん特異的メチル化 DNA を検出することにより、がんの血清診断の感度を飛躍的に向上させた。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
金井 弥 栄	国立がんセンター研究所 部長	ヒト多段階発がんにおける DNA メチル化の変化
豊田 実	札幌医科大学 講師	DNA メチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の解析
田村 元	山形大学医学部 助教授	がんならびに前がん病変における DNA メチル化の変化
三原 真美	*1国立がんセンター研究所 研究員	胃がんにおける DNA メチル化
守口 和基	*2国立がんセンター研究所 研究員	胃がんにおける DNA メチル化
北澤 莊平	神戸大学大学院 助教授	DNA メチル化解析のヒトがん病理組織標本への展開
日比 健志	名古屋大学大学院 助手	血清中がん特異的メチル化 DNA の検出によるがんの早期診断
井村 穰二	茨城県立中央病院・地域がんセンター 医長	膵がんにおける種々の関連遺伝子の methylation 状態と生物学的特性の比較検討

\*1：平成16年4月1日～平成16年9月30日

\*2：平成16年10月1日～平成17年3月31日

### 総括報告書

#### 1 研究目的

本研究では、DNAメチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定を進める。諸臓器の前がん状態・前がん病変ならびにがんにおけるDNA メチル化の変化やその背

景にあるDNAメチルトランスフェラーゼの異常を包括的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に記載して、ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化の変化の意義を見極める。以上より、DNAメチル化の変化に着目して症例の病態を把握し、適切な治療法を選択したり予後を予測出来るようにする。更に、DNAメチル化診断チップ開発・血清中メチル化DNA検出などにより、高い感度と特異性を兼ね備えた低侵襲性の検査法を確立し、発がんリスクの評価やがんの早期診断の実用化をめざす。

具体的には、以下の各項について研究を進める。

#### (1) DNAメチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定

分担研究者がゲノム規模でDNAメチル化の変化をスクリーニングする方法として開発したメチル化CpGアイランド増幅法 methylated CpG island amplification (MCA) 法により、がんにおいてメチル化が変化しているDNA断片を同定し、同定されたクローンの近傍に存在しがんににおいて不活化されている遺伝子の解析を進める。がんにおいてDNAメチル化により不活化されると予測される細胞周期調節遺伝子の中でも、特にこれまで報告の少ない分裂期チェックポイント遺伝子の異常について解析を行う。更に、腫瘍免疫が働く際に免疫担当細胞が腫瘍細胞を認識するのに必要な、腫瘍抗原の発現異常におけるDNAメチル化の役割についても検討する。

#### (2) 多段階発がん過程におけるDNAメチルトランスフェラーゼの異常ならびにDNAメチル化の変化の意義の解明

病理アーカイブズに蓄積された莫大な量の生検・手術材料のホルマリン固定・パラフィン包埋標本から、諸臓器の正常組織・前がん状態にある組織・前がん病変ならびに難治がんである膵がんをはじめとする諸臓器のがん組織を、その形態学的多様性等を顕微鏡下に観察しながらマイクロダイセクション法により選択的に採取する。分担研究者らが昨年度までに開発した微量検体からメチル化シトシンを検出する先進的な技術を更に改良してこのマイクロダイセクション検体に適用し、手術材料から採取した新鮮凍結標本も検討の対象に加え、多数のがん関連遺伝子あるいはその他の遺伝子のプロモーター領域内外の多数のCpGアイランドにおけるDNAメチル化亢進・減弱あるいはDNAメチル化の組織特異性の消失の有無を解析する。DNAメチル化の変化の要因となりうるDNAメチルトランスフェラーゼの発現等の異常についても、諸臓器の前がん状態にある組織・前がん病変ならびにがん組織において解析し、これらの異常とがんにおけるDNAメチル化のパターンの変化との関連を検討する。DNAメチルトランスフェラーゼの異常を伴うDNAメチル化の変化と、組

織型・深達度・転移の有無・治療反応性・予後などの臨床病理学的因子との相関を詳細に検討する。もって多段階発がん過程におけるDNAメチル化の変化の意義の理解を更に進め、いかなるDNAメチルトランスフェラーゼの異常やDNAメチル化プロファイルが発がんリスクの評価・がんの早期診断・病態把握・予後予測の指標となるかを同定する。

#### (3) DNAメチル化の変化を指標とする胃がん発生リスク評価

わが国において罹患率の高い胃がん発生のリスクを予測できるようにするために、インフォームドコンセントを得て非胃がん症例（検診症例）から採取された胃粘膜・胃がん症例の手術材料から得られた非がん胃粘膜・胃がんの新鮮凍結標本において、多数のがん関連遺伝子あるいはその他の遺伝子のプロモーター領域内外の多数のCpGアイランドにおけるDNAメチル化亢進の有無を詳細に解析する。非がん胃粘膜の解析によって胃がん症例と非胃がん症例を分別できるようなDNAメチル化プロファイルと同定し、胃粘膜に蓄積したDNAメチル化の変化と胃発がんリスクの関連の有無を明らかにして、検診時等に採取した胃生検標本における発がんリスク評価を実用化できるようにする。

#### (4) DNAメチル化の変化を指標とする診断技術の確立

DNAメチル化の変化を指標とする発がんリスク評価・がんの早期診断・病態診断の実用化に向け、(2)・(3)で同定したDNAメチル化プロファイルを有するかどうかを多数の臨床症例の微小な生検標本等において効率的に評価できるようにするために、多数のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の状態を同時に解析できるような「DNAメチル化診断チップ」を開発し、安定的な反応条件等を決定してその有用性を検証する。

昨年度までに本研究班では、メチル化特異的PCR(MSP)法が、がんに対する特異性・感度共に高く血清中に存在する微量のがん細胞由来DNAを同定する方法として適していることを証明してきた。本年度は更に、限界希釈MSP法ならびにリアルタイム定量MSP法を開発・改良し、特異度を保ったままでもがんの血清診断の検出感度を向上させることを目指す。

## 2 研究成果

#### (1) DNAメチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定

分担研究者がゲノム規模でDNAメチル化の変化をスク

リーニングする方法として開発した MCA 法により、胃がん・口腔扁平上皮がん・腎がん・前立腺がんにおいて DNA メチル化により不活化している遺伝子をスクリーニングした。これまで約 300 以上の遺伝子断片を同定し、ヒトゲノムプロジェクトにより決定されたゲノム配列と比較することにより、その染色体上の位置および近傍のゲノム配列の情報を得た。これらの遺伝子情報を用いて、エクソン予測プログラムや EST データベース解析により、がん DNA メチル化の標的となっている遺伝子の同定を行った。

同定された遺伝子のひとつである HRK は、Bcl-2 遺伝子ファミリーの中の BH3 only サブファミリーに属している。がん細胞株において、HRK 遺伝子の DNA メチル化が亢進するとヒストン脱アセチル化と発現の消失が起こることを示した。検討の対象とした大腸がん症例の 24% と胃がん症例の 17% に HRK 遺伝子の DNA メチル化亢進を認め、同遺伝子の DNA メチル化ががんの CpG アイランドメチル化形質と有意に相関することがわかった。DNA メチル化阻害剤である 5-アザデオキシシチジン処理により HRK 遺伝子の発現の回復を認め、5-アザデオキシシチジンによる抗腫瘍効果に HRK 遺伝子の再発現が関与すると考えられた。HRK 遺伝子の DNA メチル化亢進は p53 遺伝子異常を示さない腫瘍において高頻度に認められ、その不活化は p53 の異常を介さないがん化経路に重要であると考えられた。

培養がん細胞の DNA メチル化阻害剤 5-アザデオキシシチジンならびにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A 処理により発現が誘導される遺伝子として、WNT シグナル伝達系の負の調節遺伝子である、secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) を同定した。同遺伝子は、大腸がんにおいて高頻度に DNA メチル化亢進により不活化されていた。SFRP1 の DNA メチル化亢進は、APC 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子に変異を有する大腸がん細胞株においても認められ、TCF-4 の活性化には、APC 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子の変異に加えて SFRP1 の DNA メチル化による WNT シグナル伝達系の制御異常が寄与することが示唆された。SFRP1 は大腸がんの治療や化学予防の新しい分子標的となる可能性があると考えられた。

細胞周期調節遺伝子の異常に関しては、これまで、p16INK4A・p57KIP2・14-3-3 などの遺伝子が、DNA メチル化により不活化されることを報告してきた。しかし、分裂期チェックポイント遺伝子の異常に関しては従来ジェネティックな異常の頻度が低いと考えられてきた。本年度は、このような従来の認識が妥当であるかどうかを検証するため、CpG アイランドを有する 8 個の分裂期チェックポイント遺伝子のがんにおける DNA メチル化の変

化の有無を解析した。解析した遺伝子のうち前期チェックポイント遺伝子である CHFR が大腸がんにおいて高頻度に DNA メチル化によって不活化されていることがわかった。CHFR 遺伝子が DNA メチル化亢進により不活化されている培養がん細胞においては、ドセタキセルやパクリタキセルなどの微小管阻害剤投与による細胞周期の停止が起こらなかった。CHFR 遺伝子の DNA メチル化を認める腫瘍が微小管阻害剤に高い感受性を示すことと、CHFR 遺伝子の DNA メチル化を指標として抗がん剤感受性の予測が可能になることが期待される。現在、胃がんや口腔扁平上皮がんなど、微小管阻害剤が実際に投与されている臨床例において、CHFR 遺伝子の DNA メチル化と微小管阻害剤感受性に関連を認めるかどうか検討している。

がん細胞はしばしば免疫監視機構を回避する能力を獲得しているが、その分子機構については未知の点が多い。腫瘍免疫には、CD4+細胞が MHC クラス II を介して腫瘍細胞を認識することが重要であることが示唆されている。免疫監視機構回避の分子機構を明らかにする目的で、HLA 関連分子とその転写制御遺伝子の発現および DNA メチル化について解析した。約 40 種類の大腸がん・胃がんおよび白血病細胞株において、MHC クラス II 抗原のひとつである HLA-DR の発現消失を認めた。しかし、HLA-DR 遺伝子のプロモーターには DNA メチル化亢進を認めず、MHC クラス II 分子の転写共役因子である CIITA 遺伝子の発現が、一部のがん細胞で消失していることがわかった。CIITA が発現消失している細胞株では、CIITA 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化亢進を認め、5-アザデオキシシチジン処理によって CIITA ならびに HLA-DR の発現が誘導された。以上の結果より、CIITA 遺伝子の DNA メチル化亢進が、がん細胞が免疫監視機構を回避するのに重要である可能性が示唆された。

がんの結節中心ではしばしば十分な血流を維持できず低酸素状態に陥るが、低酸素誘導性のアポトーシスを回避する能力を獲得した腫瘍細胞は増殖を続ける。消化器がんにおいて低酸素誘導性アポトーシスに関連する遺伝子 BNIP3・APAF-1・カスパーゼ-3・カスパーゼ-9 に関して DNA メチル化亢進の有無を解析したところ、BNIP3 のみが胃がん・膵がん細胞株ならびに臨床検体において高頻度に DNA メチル化を受けていることがわかった。BNIP3 遺伝子の DNA メチル化が亢進しているがん細胞株では遺伝子発現の消失もしくは低下を認め、5-アザデオキシシチジン処理による再発現が確認された。BNIP3 遺伝子がメチル化され発現が消失している細胞株では、その 5' 領域のヒストン脱アセチル化を認めた。

現在、DNA メチル化阻害剤により DNMT3 遺伝子の発現を誘導することにより、がん細胞にアポトーシスを誘導することができるかどうかの検討を行っている。

## (2) 多段階発がん過程における DNA メチルトランスフェラーゼの異常ならびに DNA メチル化の変化の意義

病理アーカイブズに蓄積された莫大な量の生検・手術材料を DNA メチル化の評価に供しうるかどうかも確認するため、ホルマリン固定・パラフィン包埋がメチル化 DNA 検出に及ぼす影響を評価した。サイクリン D1 遺伝子プロモーター領域が DNA メチル化を受けていることが知られているラット白血病細胞株を用いて、種々の固定条件を設定して検討したところ、ホルマリン固定はメチル化シトシンの検出を妨げず、むしろホルマリンによる DNA の断片化がバイサルファイト処理後の PCR 産物の検出効率を高めることがわかった。通常の病理組織検体のうち生検・手術検体の大部分が DNA メチル化解析に使用可能なことが確認された。更に、ホルマリン固定パラフィン包埋標本から形態学的多様性等を顕微鏡下に観察しつつ採取した微量のマイクロダイセクション検体を、効率よく DNA メチル化解析に供するために昨年度までに開発したアガロースビーズ封入バイサルファイト変換法に、更に改良を加えた。同法を適用して、膵がんを高頻度に見られる神経周囲浸潤の分子機構の解明を試みた。末梢神経と腫瘍細胞に発現する神経成長因子 NGF と TrkA の相互作用が神経周囲浸潤の成因となる可能性を考慮し、膵がん症例手術材料より多数のマイクロダイセクション検体を採取して DNA メチル化の状態を詳細に解析した。TrkA 遺伝子発現が、腫瘍浸潤部位局所での非 CpG アイランド領域の AP-1 結合配列の DNA メチル化によって亢進する可能性が示された。

同様に多数の臨床検体における解析から、胃がんにおいても CHFR 遺伝子が高頻度に DNA メチル化を受けていることが明らかになったが、同遺伝子は hMLH1 遺伝子と同時にメチル化されることが多く、染色体不安定性の指標とされるヘテロ接合性喪失の蓄積とは関連しなかった。RUNX3 遺伝子プロモーター CpG アイランド内の 8 領域について MSP 法により胃がん細胞株における DNA メチル化の広がりを検討したところ、転写開始点を含む領域の両アレルがメチル化されている細胞株では mRNA 発現が見られなかったが、1 アレルがメチル化されているか両アレルともメチル化を受けていない細胞株では mRNA 発現が見られた。転写開始点を中心とした領域の DNA メチル化が RUNX3 遺伝子の発現制御に重要であり、同遺伝子の DNA メチル化は CpG アイランドの両端から転写開始点に向か

って次第に拡大することがわかった。臨床検体を用いた検討では、検討の対象とした全領域中転写開始点を含む領域での DNA メチル化亢進のがん特異性が最も高いことが確認された。難治がんである膵がんにおいても、多数のがん関連遺伝子が DNA メチル化亢進によって不活化されることを示した。他方、胃がんでは DNA メチル化が減弱する遺伝子として新たに SNCG 遺伝子を同定した。SNCG 遺伝子の DNA メチル化の減弱は、MAGE 遺伝子群の DNA メチル化の減弱と同様に、進行がんやリンパ節転移陽性例で高頻度に検出された。一連の知見より、DNA メチル化の局所的な亢進は概して多段階発がん過程の極めて早期すなわち前がん段階から継続して検出されるのに対し、DNA メチル化の減弱は特に多段階発がん過程の後期すなわちがんの悪性進展に寄与するケースが多いと理解された。

多段階発がん過程において、DNA メチル化のパターンの変化の背景となる要因として、DNA メチルトランスフェラーゼの異常にも着目してきた。昨年度までの成果として、尿中にある発がん物質に既に暴露されて前がん段階にある可能性のある膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において、細胞増殖活性の亢進に先行して、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の蛋白発現が既に有意に亢進していることを示した。DNMT1 の蛋白発現亢進は、膀胱がんの多段階発生に早期から寄与する可能性があると考えられた。DNMT1 の蛋白発現亢進は、悪性度の高い膀胱の結節状浸潤がんの前駆病変と理解されている広汎進展上皮内がんの成立に寄与する可能性がある。今年度、マイクロダイセクション検体においてがん特異的に DNA メチル化が亢進することが提唱されている C 型 CpG アイランド等多数領域における DNA メチル化の状態を評価したところ、膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において、DNMT1 の蛋白発現亢進と同時に、多数の C 型 CpG アイランド等における DNA メチル化の蓄積が既に起こっていることがわかった。DNMT1 の蛋白発現亢進の有無と DNA メチル化の蓄積は有意に相関し、膀胱がんの多段階発生過程において、DNMT1 の蛋白発現亢進が実際に DNA メチル化の局所的な亢進に帰結している可能性があると考えられた。

他方で難治がんである浸潤性膵管がんはしばしば慢性膵炎に引き続いて発生するが、末梢膵管上皮における DNMT1 の蛋白発現は、遷延する炎症の存在を示唆するリンパ球浸潤と腺房の萎縮を伴うとき既に有意に亢進していた。前がん病変とされる PanIN において、その異型度が亢進するとともに DNMT1 蛋白発現陽性率も亢進した。

浸潤性膵管がんにおいても、腫瘍が低分化になるとともに DNMT1 蛋白発現陽性率が段階的に亢進した。浸潤性膵管がんにおける DNMT1 発現レベルは患者の年齢と関連せず、わが国の「膵がん取り扱い規約」における t カテゴリーならびに診断時の病期と有意に相関した。更に、DNMT1 高発現群が有意に予後不良であることがわかった。DNMT1 蛋白発現亢進は、前がん段階から浸潤性膵管がんの悪性進展に到るまで、膵がんの多段階発生過程に継続して寄与する可能性があり、手術材料・生検材料において抗 DNMT1 抗体を用いた免疫組織化学的検討を施行することにより、症例の予後の予測に有益な情報が得られる可能性があると考えられた。

### (3) DNAメチル化の変化を指標とする胃がん発生リスク評価

昨年度までに行った予備検討で、胃がん症例非がん胃粘膜において高頻度に DNA メチル化亢進を認めた p16 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドの辺縁部、HRASLS 遺伝子・FLNc 遺伝子・HAND1 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドの中心部、p41Arc 遺伝子の非プロモーター領域の CpG アイランドの 5'領域と、がん抑制遺伝子 LOX のプロモーター領域の CpG アイランドの中心領域、候補がん抑制遺伝子 TM のプロモーター領域 CpG アイランド辺縁部の合計 7 領域について、DNA メチル化の程度を定量 MSP 法により評価した。胃がん症例非がん胃粘膜ならびに非胃がん症例（検診症例）胃粘膜における DNA メチル化指数（メチル化 DNA 量のメチル化 DNA と非メチル化 DNA 量の総和に対する比）は、それぞれ、p16 遺伝子で 1.8% ならびに 1.1%、HRASLS 遺伝子で 1.1% ならびに 0.8%、FLNc 遺伝子で 3.8% ならびに 2.1%、HAND1 遺伝子で 5.4% ならびに 4.7%、p41Arc 遺伝子で 24.8% ならびに 18.4%、LOX 遺伝子で 17.5% ならびに 12.6%、TM 遺伝子で 8.0% ならびに 6.6% であった。いずれの領域についても、胃がん症例非がん胃粘膜で検診例よりも高いメチル化指数を認めた。特に、FLNc ならびに p41Arc 遺伝子においては、両者の DNA メチル化指数の間に統計学的に有意な差が認められた（それぞれ  $P=0.02$  ならびに  $P=0.04$ ）。これらの領域における DNA メチル化の程度の定量的評価が、胃がん発生のリスク予測に結びつく可能性があると考えられた。他方で、がん抑制遺伝子の不活化に直ちに帰結するようなクリティカルな領域の DNA メチル化は、非がん胃粘膜においては未だ低頻度であり、このような領域は発がんリスク評価の指標として不適切と見られた。がん抑制遺伝子の不活化に直ちに帰結する

ような領域の DNA メチル化とよく相関して、クリティカルな領域よりも非がん胃粘膜においてより高頻度に DNA メチル化を受けるような CpG アイランドの辺縁領域などが、発がんリスク評価の指標になりうると思われた。今後、発がんリスク評価の指標となる領域を更に多数同定し、同定した領域を多数組み合わせることで感度・特異度を向上させることで、検診時等に採取した胃生検標本における発がんリスク評価の実用化に結びつけられると期待される。

更に、胃がん発生の危険因子であるヘリコバクターピロリ感染の有無により、発がんに対する DNA メチル化の変化の寄与の程度が異なっている可能性がある。DNA メチル化に着目した発がんリスク評価の適応となる検診受診者を特定することもリスク評価実現のために重要であるので、更に多くの検体および臨床情報を蒐集している。平成 16 年度末現在、インフォームドコンセントを得た検診症例 86 例（男 51 例、女 35 例、平均年齢 47.6 歳）を蒐集しており、全例においてヘリコバクターピロリ感染の有無が確認されており、53 例が陽性である。蒐集した検体において、指標となる領域における DNA メチル化の状態について解析を進め、ヘリコバクターピロリ感染との相関の有無を検討することを予定している。

### (4) DNA メチル化の変化を指標とする診断技術の確立

「DNA メチル化診断チップ」の基材として、ハイブリダイゼーション効率とチップの均質性に優れた繊維型 DNA チップを採用した。この基材にメチル化特異的および非メチル化特異的プローブを搭載し、蛍光標識した PCR 産物をハイブリダイズしてシグナル強度を定量し、がん検体と非がん検体間等におけるメチル化特異的プローブと非メチル化特異的プローブのシグナル比率を比較するものとする。はじめに、APC・E-カドヘリン・hMLH1・p16・RASSF1A の 5 遺伝子を搭載したチップを試作した。メチル化 DNA (Sss I 処理 DNA) と非メチル化（死産児剖検例）DNA をバイサルファイト処理し、上記 5 遺伝子を多重 PCR 法で増幅してハイブリダイズさせ、予測される結果が得られるように反応条件等を設定した。分化型胃がん症例の臨床検体から抽出した DNA を用いて同様のハイブリダイゼーションを行い、5 遺伝子の DNA メチル化の状態について効率よく正確に評価できたことを確認した。今後、搭載遺伝子数を増やす等の改良を加えることを予定している。現在は、本研究班の成果に基づきその DNA メチル化の状態ががんの早期診断や病態診断の指標となることが期待される遺伝子等を含む 20 遺伝子を搭載した「DNA メチル化診断チップ」の作製に着手してい

る。

がん細胞由来メチル化 DNA の検出によるがんの早期診断を目指し、限界希釈 MSP 法の予備実験を行った。従来の MSP 法では 1:10000 の割合で非メチル化 DNA と混合されたメチル化 DNA の検出までが可能であったが、ここではまず p16 遺伝子がメチル化された DNA とメチル化されていない DNA を 1:100000 の割合で混合した。この混合検体を PCR による増幅が確認できる限界まで希釈し、適切な PCR 条件を設定することにより、非メチル化 DNA に反応阻害を受けることがないようにして、メチル化 DNA を検出できることを確かめた。つづいて、がん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化が検出されることを確認している大腸がん患者血清から抽出した DNA に限界希釈 MSP 法を適用したところ、66%の血清中よりメチル化 DNA を検出し得た。従来の MSP 法に比し検出率は飛躍的に向上したが、陰性対照とした健常者の血清中あるいはがん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化を示さない大腸がん患者血清には DNA メチル化を認めず、がん特異性が完全に保持されていたことが確かめられた。臨床病理学的所見との比較では、stage もしくは Dukes A の段階から大腸がん患者血清よりがん細胞由来 DNA を検出できることがわかったので、限界希釈 MSP 法が血清によるがんの早期発見に有用であると考えられた。リアルタイム定量 MSP 法により血清中のメチル化 DNA と非メチル化 DNA の定量を試みた。偽陽性を生じないまま、がん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化が検出されることを確認している大腸がん患者の 46%を陽性と判定できるように、DNA メチル化指数の閾値を設定することができた。今後、血清診断の指標として有用な遺伝子を複数組み合わせることにより、特異度を保ったまま更に検出感度を向上させ、検診におけるスクリーニングとしての実用化を目指したいと考える。

### 3 倫理面への配慮

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、所属施設の倫理審査委員会の承認を得る等して倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術で摘出した標本を診断のために検索した後に、残余の試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくこと等に関して、患者に説明の上、文書で同意を得た。臨床症例の手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残余の組織を研究に用いることにより患者への不利益はないようにした。組織検体の由来

する患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめ診療録より調査しておき、解析は連結可能匿名化して行い、患者のプライバシーを厳守した。

### 研究成果の刊行発表

#### 外国語論文

1. Etoh,T., Kanai,Y., et al., Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am.J. Pathol.*,164:689-699,2004.
2. Nam,J-S, Kanai,Y., et al., 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin.Exp.Metas.*, 21:49-56,2004.
3. KanaiY., et al., Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, during human hepatocarcinogenesis. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 130:636-644,2004.
4. Nakagawa,T., Kanai,Y., et al., DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J.Urol.*, 173:243-246,2005.
5. Nakagawa,T., Kanai,Y., et al., DNA hypomethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J. Urol.*, in press.
6. Chihara,Y., Kanai,Y., et al., Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab.Invest.*, in press.
7. Suzuki,H., Toyota,M., et al., Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive Wnt signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.*, 36:417-422,2004.
8. Satoh,A., Toyota,M., et al., Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with absence of interferon- $\gamma$

- induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene*, 23:8876-8886,2004.
9. Morimoto, Y., Toyota, M., et al., Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon- $\gamma$  in hematopoietic tumor cells. *Br.J.Cancer*. 90:844-852,2004.
  10. Terasawa, K., Toyota, M., et al., Epigenetic inactivation of TMS1/ASC in ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.*, 10:2000-2006,2004.
  11. Ueno, M., Toyota, M., et al., Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumor Biol.*, 25:134-140,2004.
  12. Yamada, Y., Toyota, M., et al., Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer. *Int.J.Cancer* 112:840-845,2004.
  13. Kobatake, T., Toyota, M., et al., Aberrant methylation of p57KIP2 gene in lung and breast cancers and malignant mesotheliomas. *Oncol.Rep.*, 12:1087-1092,2004.
  14. Kaneda, R., Toyota, M., et al., High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones. *Gene Cell*, 9:1167-1174,2004.
  15. Murai, M., Toyota, M., et al., Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin.Cancer Res.*, 11:1021-1027,2005.
  16. Murai, M., Toyota, M., et al., Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in hematopoietic tumors. *Br.J.Cancer*. in press.
  17. Tamura, G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumor-related genes in neoplastic and nonneoplastic gastric epithelia. *Histol.Histopathol.*, 19:221-228,2004.
  18. Honda, T., Tamura, G., et al., Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression. *Br.J.Cancer*, 90:838-843,2004.
  19. Yanagawa, N., Tamura, G., et al., Demethylation of the synuclein gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Clin.Cancer Res.*, 10:2447-2451,2004.
  20. Honda, T., Tamura, G., et al., Promoter hypermethylation of the Chfr gene in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Br.J.Cancer*, 90:2013-2016,2004.
  21. Tozawa, T., Tamura, G., et al., Promoter hypermethylation of DAP-kinase is associated with poor survival in primary biliary tract carcinoma patients. *Cancer Sci.*, in press.
  22. Tsuchiya, T., Tamura, G., et al., Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two novel mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet.Cytogenet.*, in press.
  23. Homma, N., Tamura, G., et al., Hypermethylation of Chfr and hMLH1 in gastric noninvasive and early invasive neoplasias. *Virchows Arch.*, in press.
  24. Kaneda, A., et al., Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci.* 95:58-64,2004.
  25. Fujimoto, M., Kitazawa, S., et al., Methylation adjacent to negatively regulating AP-1 site reactivates TrkA gene expression during cancer progression. *Oncogene*, in press.
  26. Hibi, K., et al., Methylation pattern of CDH13 gene in digestive tract cancers. *Br.J.Cancer*, 91:1139-1142,2004.
  27. Sakai, M., Hibi, K., et al., Frequent promoter methylation and gene silencing of CDH13 in pancreatic cancer. *Cancer Sci.*, 95:588-591,2004.
  28. Hibi, K., et al., CDH13 promoter region is specifically methylated in poorly differentiated colorectal cancer. *Br.J.Cancer*, 90:1030-1033,2004.
  29. Fujitake, S., Hibi, K., et al., Aberrant methylation of SOCS-1 was observed in younger colorectal cancer patients. *J.Gastroenterol.*, 39:120-124,2004.
  30. Uemura, T., Hibi, K., et al., Detection of oncogenic mutation in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *J.Gastroenterol.*, 39:56-60,2004.

31. Hibi, K., et al., Aberrant methylation of HLTF, SOCS-1, and CDH13 genes are shown in colorectal cancers without lymph node metastasis. Dis.Colon Rectum, in press.