

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

諸臓器のがんで DNA メチル化により不活化される遺伝子 TCF2・HOXB13 を同定した。DNA メチル化で不活化される RASSF2 遺伝子の強制発現で、アポトーシスが誘導されることを示した。DNMT1 発現亢進を伴う C 型 CpG アイランドの DNA メチル化を示す腎組織は前がん段階にあり、DNA メチル化蓄積を伴う前がん状態からより悪性度の高い腎がんが生じる可能性がある。DNA メチル化蓄積が腎がん症例の予後予測指標となり得る。胃粘膜の DNA メチル化蓄積は、胃がん発生リスク評価の指標となり得る。ヘリコバクターピロリ感染は DNA メチル化を強力に誘発するが、感染例においても HAND1 遺伝子の DNA メチル化は胃発がんリスクを反映する。胆汁検体における CDX2・MUC2 遺伝子の DNA メチル化検出が胆道がんの補助診断手段となることを示した。特異度を保持しつつ血清検体中がん細胞由来メチル化 DNA の検出感度を向上させるため、限界希釈メチル化特異的 PCR 法を改良した。臨床検査としての実用化を目指して開発した「DNA メチル化診断チップ」で、定量判定可能なように反応条件を決定した。

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
前北 隆 雄	国立がんセンター研究所 研究員	発がんリスク評価の指標となる DNA メチル化の変化
北澤 荘 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	聖霊病院 外科部長	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
丸山 理 一郎	国立病院機構九州がんセンター 副部長	重喫煙者等の肺癌高リスク群を対象にした各種癌抑制遺伝子のメチレーション検出によるスクリーニング法の確立と多段階発がん過程における各種癌抑制遺伝子のメチレーションに関する研究
井村 穰 二	茨城県立中央病院・地域がんセンター 部長	膵・胆道がんにおける特異的 DNA メチル化の変化の捕捉と担がん状態の早期診断を目的とした臨床応用
片山 英 樹	国立病院機構山陽病院 医師	悪性胸膜中皮腫由来胸水における DNA メチル化の検討

研究報告

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。さらに、血清中メチル化 DNA 検出・DNA メチル化診断チップ開発などにより、特異性と高い感度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。

2 研究方法

(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・解析

昨年度までに独自に開発したゲノムスクリーニング法であるメチル化 CpG アイランド増幅法により、DNA メチル化により不活化している新規がん関連遺伝子の同定を進めた。昨年度までに、SFRP 遺伝子群や Ras の負の制御因子である RASSF2 遺伝子が、がんにおける DNA メチル化亢進の標的であることを明らかにしている。そこで本年度は、SFRP 遺伝子群や RASSF2 遺伝子の不活化の発がん過程への寄与の実態を解明し、アポトーシス誘導への関与の有無を検証した。

(2) 多段階発がん過程における DNA メチル化の変化の意義の解明

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がん組織において、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、メチル化特異的 PCR 法・バイサルファイト変換制限酵素処理法で評価した。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異常を、免疫組織化学的に評価した。必要に応じて、病理アーカイブズに蓄積された多数の生検・手術材料のホルマリン固定・パラフィン包埋標本から、特徴的病理形態を示す微小な病変部位をマイクロダイセクション法等により選択的に採取し、微量検体からメチル化シトシンを検出するため既に開発したアガロースビーズ封入メチル化特異的 PCR 法の反応条件を改良するなどして適用した。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、症例の予後を含む諸臓器のがんの臨床病理学的因子との相関を詳細に検討した。

(3) 臨床検体における DNA メチル化検出技術の確立

昨年度までに、メチル化特異的 PCR 法ががんに対する特異性・感度共に高く、血清検体中等の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。本年度は特異度を保ったままでさらに検出感度を向上させるため、リアルタイム定量メチル化特異的 PCR 法ならびに限界希釈メチル化特異的 PCR 法を開発・改良した。多数の遺伝子の DNA メチル化亢進あるいは減弱・DNA メチル化パターンの組織特異性の消失等を血清・細胞診・組織検体等において同時に評価するため、繊維型 DNA チップ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た「DNA メチル化診断チップ」を開発してきた（特許申請中）。今年度は、病院検査室において実用化できるよう、定量判定可能なように安定的な反応条件等を決定した。

(4) DNA メチル化の変化を指標とする発がんリスク評価・がんの診断

わが国において罹患率の高い胃がん発生のリスクと胃粘膜に蓄積した DNA メチル化の変化の関連を明らかにするために、健常者 154 例の胃粘膜ならびにヘリコバクターピロリ感染の有無が判明している分化型胃がん症例 72 例の非がん部胃粘膜より、胃体上部小弯と前庭部小弯の 2 カ所をインフォームドコンセントを得て内視鏡的に採取した。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し、胃がん症例の非がん部胃粘膜と年齢を適合させた健常者の胃粘膜を分別できるような DNA メチル化プロファイルを同定した。ヘリコバクターピロリ感染が、胃粘膜の DNA メチル化に及ぼす影響についても検証した。喀痰・気管支擦過細胞診検体や変性著明で診断に難渋することの多い胆汁細胞診検体における多数の遺伝子の DNA メチル化の変化の検出が、それぞれ、喫煙等に関連する肺がん発生リスク評価の指標や胆道がんの補助診断手段として、有用であるかどうか検証した。

3 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・解析

メチル化 CpG アイランド増幅法により、大腸がん・胃がん・卵巣がん・腎がんにおいて DNA メチル化亢進を来す遺伝子断片を多数同定し、これらの遺伝子断片の近傍より、DNA メチル化により不活化されている遺伝子として、TCF2・HOXB13 遺伝子等を同定した。TCF2 遺伝子の DNA メチル化を、卵巣がん等において、実際に高頻度に検出した。現在、これらの遺伝子の機能解析をすすめている。

胃がんにおいては、 β -カテニン蛋白の核への局在や β

-カテニン/TCF 系の活性化を高頻度に認めたが、frizzled 蛋白類似ドメインを有し Wnt シグナル伝達系の負の制御因子となる SFRP ファミリーのうち、SFRP1・SFRP2・SFRP5 遺伝子が DNA メチル化によって高頻度に不活化されていた。大腸がん細胞株に SFRP2 遺伝子を強制発現したところ、Wnt シグナルの標的遺伝子群の発現低下と、アポトーシス関連遺伝子の発現亢進を認めた。SFRP2 遺伝子の DNA メチル化による不活化は、APC・ β -カテニン遺伝子変異の頻度が低い胃がんにおいて、Wnt シグナル伝達系活性化に寄与する可能性が示唆された。

RAS の負の制御因子である RASSF ファミリーの RASSF2 遺伝子が、大腸がん・胃がんにおいて DNA メチル化により不活化されていることを昨年度までに示している。今年度、培養がん細胞に RASSF2 遺伝子を強制発現すると、Rho の活性化が抑制されてストレスファイバーの消失を伴う細胞形態の変化を来し、アポトーシスが誘導されることがわかった。RASSF2 遺伝子を RNA 干渉により発現抑制すると、p42/ERK のリン酸化と K-ras による細胞のトランスフォーメーションが増強した。RASSF2 は、Ras による細胞増殖・細胞生存や細胞形態を制御する因子である可能性が示唆された。RASSF2 遺伝子の不活化は、K-ras あるいは BRAF の遺伝子変異を示す大腸がんにおいて、変異を示さない大腸がんに比して有意に高頻度に認められ、Ras シグナルの活性化には、がん遺伝子の活性化と、それを負に制御する遺伝子の不活化の、両方が重要であると考えられた。

(2) 多段階発がん過程における DNA メチル化の変化の意義の解明

腎腫瘍（通常型腎細胞がん・嫌色素性腎細胞がん・乳頭状腎細胞がん・集合管がん・オンコサイトーマ）94 症例より得られた非腫瘍部腎組織・腫瘍組織ならびに非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織において、加齢の影響を受けずがん特異的に DNA メチル化が亢進することが一般に提唱されている C 型 CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積の状態を、メチル化特異的 PCR 法で評価した。メチル化された CpG アイランド数は、腎腫瘍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腫瘍部腎組織において、非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して既に有意に増加し、腎腫瘍においてさらに有意に増加した。DNA メチル化の観点から、腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織は既に前がん段階にあるといえる。組織学的に前がん状態に特異な所見をとらえがたく明確な前がん状態を論じられることが少ない腎腫瘍症例においてすら、その非腫瘍部腎組織は DNA メチル化の

変化が蓄積する前がん状態にあると認識し得たことは注目に値する。非腫瘍部腎組織の DNA メチル化の蓄積は、その症例に生じた通常型腎細胞がんの組織学的異型度と有意に相関しており、CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積を伴う前がん状態からは、より悪性度の高いがんを生じる可能性があると考えられた。腎細胞がんにおける DNA メチル化の状態について各組織型間で大きな差違を認めず、DNA メチル化の変化の腎細胞がん発生への寄与は組織型に依存しないと考えられた。通常型腎細胞がんにおけるメチル化された CpG アイランド数は、がんの組織学的異型度・進展様式・静脈侵襲と有意に相関した。通常型腎細胞がん症例のうち、がん部において CpG アイランドの DNA メチル化の蓄積の見られた症例は、見られなかった症例に比して無再発生存率が有意に低かった。免疫疫組織化学的に評価した DNMT1 の蛋白発現は、腎腫瘍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腫瘍部腎組織の近位尿細管において、正常腎組織の近位尿細管より既に高い傾向にあり、異型度 G1 の通常型腎細胞がんでは有意な亢進となった。DNMT1 蛋白発現は、通常型腎細胞がんが紡錘細胞がんへ悪性進展を遂げる過程でさらに亢進していた。DNMT1 の蛋白発現亢進を背景とする領域的な DNA メチル化亢進は、腎腫瘍の多段階発生過程に前がん状態から悪性進展に至るまで継続して寄与する可能性があると考えられた。CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積は、腎細胞がん症例の予後予測の指標になり得ると考えられた。

大腸発がん過程の初期変化として、Wnt シグナル伝達系の異常とともに TGF- β シグナル伝達経路の遮断が重要であるが、TGF- β /BMP の偽受容体をコードする BAMBI 遺伝子には TATA-box のほかに CpG が集積している領域があり、この領域の DNA メチル化により発現制御を受けている可能性に着目した。病理組織標本において BAMBI 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の状態の解析を進め、大腸がんの組織形態、特に平坦型大腸がんの形態形成に BAMBI 遺伝子の DNA メチル化が寄与する可能性を示唆する知見を得た。現在、遺伝子改変マウスモデルへの展開を準備している。

(3) 臨床検体における DNA メチル化検出技術の確立

定量メチル化特異的 PCR 法により、p16 遺伝子における DNA メチル化を大腸がん患者血清中に検出する際の、感度の向上を目指した。大腸がん 168 症例手術検体の非がん部粘膜・がん部ならびに術前の血清検体から DNA を抽出し、リアルタイム定量メチル化特異的 PCR 法を施行して DNA メチル化率を算出した。手術検体のがん部に DNA

メチル化を認める大腸がん患者の血清検体において、がん細胞由来メチル化 DNA を検出する特異度を 100%とするよう閾値を設定したところ、感度は 22%であった。血清中の DNA メチル化率・DNA メチル化陽性率（閾値を超える DNA メチル化率を示す検体の割合）はそれぞれ、臨床病期 I で 0.58・19.0%、臨床病期 II で 1.37・17.9%、臨床病期 III で 5.09・26.8%、臨床病期 IV で 5.81・31.6%で、大腸がんの進行度との有意な相関を認めた。さらに、DNA メチル化率の高い大腸がん症例群では、累積生存率が有意に低下した。他の腫瘍マーカーと比較すると、臨床病期 I や Dukes A といった比較的早期の症例群では、血清 CEA 値より高い感度を示し、より予後に強く影響を及ぼすことがわかった。

つづいて、予備検討として 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。前に述べた定量メチル化特異的 PCR 法による検出限界は 1:10000 であったため、従来法ではこの混合検体からメチル化 DNA を検出することはできない。この混合検体を PCR 増幅可能な限界まで希釈し、これを 10 分割して限界希釈メチル化特異的 PCR 法を施行した。同手法においては極微量の DNA を鋳型とするため、至適な PCR 緩衝液を調整し nested PCR 法で増幅を行うことが必須であったが、メチル化 DNA の検出が可能となった。非メチル化 DNA による PCR 反応阻害を受けないためと考えられた。つづいて、手術検体のがん部に DNA メチル化を認める大腸がん 94 症例の術前の血清検体から抽出した DNA を用いて限界希釈メチル化特異的 PCR 法を施行し、感度 31%で血清中にごがん細胞由来メチル化 DNA を検出した。対照とした健常者の血清中には DNA メチル化を認めなかった（特異度 100%）。従来の定量メチル化特異的 PCR 法による p16 遺伝子 DNA メチル化の検出率に比し、限界希釈メチル化特異的 PCR 法により感度を向上させることができた。臨床病期 I もしくは Dukes A の段階の大腸がん患者血清検体よりメチル化 DNA を検出できたので、限界希釈メチル化特異的 PCR 法は血清検体によるがんの早期診断に有用と考えられた。

臨床検査としての実用化を目指して開発してきた「DNA メチル化診断チップ」の運用として、p16・RUNX3・LOX・TIG1 遺伝子を多重 PCR 増幅ならびに蛍光標識し、対照検体（100%メチル化 DNA、75%メチル化 DNA、50%メチル化 DNA、25%メチル化 DNA、0%メチル化 DNA）の蛍光強度から検量線を作成して、メチル化プローブと非メチル化プローブのシグナル比率から DNA メチル化率を算出した。胃がん細胞株 9 株の検討では、いずれの遺伝子につ

いても DNA メチル化率は 1%以下あるいは 99%以上のいずれかであることがほとんどで、heterogenous な DNA メチル化は稀であった。胃がん手術検体については、DNA メチル化率をレベル 1（0-20%）・レベル 2（21-40%）・レベル 3（41-60%）・レベル 4（61-80%）・レベル 5（81-100%）の 5 段階に分けた。がん部ではレベル 3 以上のメチル化が p16 遺伝子で 15%、RUNX3 遺伝子で 23%、LOX 遺伝子で 27%、TIG1 遺伝子で 4%に検出された。一方、非がん部胃粘膜での DNA メチル化は、ほとんどがレベル 1 であったが、レベル 2 も少数症例において観察された。RUNX3 遺伝子について「DNA メチル化診断にチップ」による DNA メチル化率とメチル化特異的 PCR 法の結果を比較すると、胃がんにおける DNA メチル化率は平均 23.1%（0.2-76.5%）で、30%以上の DNA メチル化率は検討の対象とした症例の 38% に検出され、メチル化特異的 PCR 法では検討の対象とした症例の 46% が陽性と判定された。非がん部胃粘膜における DNA メチル化率は平均 5.6%（0.7-25.1%）で、30%以上の DNA メチル化率を認めることはなかったが、メチル化特異的 PCR 法では検討の対象とした症例の 23%が陽性と判定された。DNA メチル化率 10%以上が、メチル化特異的 PCR 法陽性とほぼ対応していた。

「DNA メチル化診断チップ」を用いて DNA メチル化率を定量的に判定することによって、がん特異的な DNA メチル化亢進を識別することが可能であった。また、諸臓器の非腫瘍組織における DNA メチル化率の上昇を検出することによって、「DNA メチル化診断チップ」を発がんリスク評価に用いられる可能性がある」と期待された。今後適切な遺伝子を選択して搭載遺伝子数を増やし、「DNA メチル化診断チップ」の有用性を高めたい。

(4) DNA メチル化の変化を指標とする発がんリスク評価・がんの診断

胃がん発生リスク評価の指標となる CpG 部位を適切に選択できるようにするため、胃がん細胞株において RUNX3 遺伝子プロモーター CpG アイランド内の 10 領域および RASSF2 遺伝子プロモーター CpG アイランド内および近傍の 6 領域についてメチル化特異的 PCR 法を施行し、遺伝子発現抑制に関与する CpG 領域を同定した。つづいて、胃がん症例手術検体の非がん部胃粘膜とがん部において、同じ 16 領域についてメチル化特異的 PCR 法を施行し、DNA メチル化の拡大・進展の程度を評価した。転写開始点を中心とした約 400 bp の領域の DNA メチル化が転写制御に重要であること、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示された。転写開始点近傍で、DNA メチル化のがん特

異性が高いことがわかった。DNA メチル化の検出意義は同一 CpG アイランド内でも検出部位によって大きく異なり、転写開始点近傍の DNA メチル化の検出ががんの存在診断のマーカーとして有用と考えられた。また、複数の領域の DNA メチル化の状態を検索し、DNA メチル化の拡大の程度を評価することで、発がんのリスク評価に応用し得ると考えられた。

上記の結果を踏まえ、昨年度までに胃がん症例非がん部胃粘膜において高頻度に DNA メチル化亢進を認めることを確認していた 7 領域について定量メチル化特異的 PCR 法を施行し、全 DNA 分子中のメチル化 DNA 分子の割合として DNA メチル化レベルを算出した。健常者胃粘膜における DNA メチル化レベルは、胃体上部では、ヘリコバクターピロリ感染陽性者において陰性者に比して、p16 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドの中心部・同辺縁部・LOX・FLNc・HRASLS・HAND1・THBD・p41Arc 遺伝子で、それぞれ、303・20・14・49・13・9.3・11・5.4 倍高値を示した。前庭部でも、6 ないし 54 倍高値を示した。ヘリコバクターピロリ感染は、解析した CpG アイランドに強力に DNA メチル化を誘発する可能性が示された。がん関連遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化誘発が、ヘリコバクターピロリによる胃発がん機構のひとつである可能性が示唆された。次に、ヘリコバクターピロリ感染の有無と年齢を適合させたがん症例非がん部胃粘膜と、健常者胃粘膜の、DNA メチル化レベルを比較した。ヘリコバクターピロリ感染陰性群同士の比較では、発がんリスクが高いと考えられる胃がん症例非がん部胃粘膜の DNA メチル化レベルが、健常者胃粘膜に比して 2 ないし 30 倍高値を示し、全ての領域の DNA メチル化が有意に亢進することがわかった。胃粘膜の DNA メチル化蓄積が、胃がん発生リスク評価の指標となることが確かめられた。ヘリコバクターピロリ感染陽性がん症例非がん部胃粘膜とヘリコバクターピロリ感染陽性健常者胃粘膜の違いは 7 領域では明らかではなく、HAND1 遺伝子における DNA メチル化レベルは、がん症例非がん部胃粘膜において健常者胃粘膜に比し 1.4 倍高値を示した。HAND1 遺伝子は、ヘリコバクターピロリ感染陽性群においても、発がんリスク評価の指標になり得ると期待される。さらに、ヘリコバクターピロリ感染陰性のがん症例は過去にヘリコバクターピロリ感染があった可能性があり、胃粘膜の DNA メチル化レベルは、現にヘリコバクターピロリ感染があると高度上昇するが、感染消退である程度低下すると考えられた。除菌等により一過性の DNA メチル化を除去後測定することで、正確なリスク判定が可能になると考え

られた。

原発性肺がん症例の非がん部肺組織ならびにがん部において、複数の遺伝子の DNA メチル化の状態をメチル化特異的 PCR 法によって評価したところ、RAR β ・H-カドヘリン・RASSF1A 等の遺伝子に関しては非がん部肺組織ならびにがん部における DNA メチル化の状態と喫煙の相関を認めなかったが、p16 遺伝子に DNA メチル化を認める症例の喫煙指数は、DNA メチル化を認めない症例に比して有意に高値であった。p16 遺伝子の DNA メチル化は重喫煙者の非がん部肺組織に特に高頻度に認められたことから、今後、p16 遺伝子の DNA メチル化が喫煙に関連した肺がん発生のリスクを反映する可能性を検証し、喀痰・気管支擦過細胞診検体等からのメチル化 DNA の安定的な検出を目指したい。

昨年度までに膵・胆道がん組織においてその DNA メチル化が亢進することを本研究で確認していた CDX2・MUC2 遺伝子を対象として、胆汁細胞診検体においてメチル化特異的 PCR 法を試みたところ、51%においてメチル化特異的 PCR 法に供しうる質・量の核酸が保持されていることがわかった。評価可能検体の 33%に CDX2 遺伝子の、67%に MUC2 遺伝子の、DNA メチル化を検出した。免疫組織化学的に、正常胆管上皮には CDX2・MUC2 の発現を認め、がん部では両者とも減弱ないし消失していることを確認した。CDX2 遺伝子の DNA メチル化と MUC2 遺伝子の DNA メチル化は、相互に有意に相関した。胆道がんの存在診断について、CDX2 遺伝子の DNA メチル化は特異度と正診率に、MUC2 遺伝子の DNA メチル化は感度に秀でていた。両遺伝子の DNA メチル化をともに検出したとき陽性と判定すると、感度・特異度ともに向上して担がん状態を予測し得た。著明な変性のため胆汁検体を用いた遺伝子検索が良好な結果を得にくいことが周知であるが、本法では過半の症例で解析可能であった。さらに評価可能症例を増やすため、受動的採取にとどまらず胆道の洗浄・擦過材料などからの検体採取を試みれば、胆道がんに対する細胞診検査の診断精度を改善する手段として有用と考えられた。

4 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。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. 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.
2. Nakagawa, T., Kanai, Y., et al., DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J. Urol.*, 173:1767-1771, 2005.
3. Peng, D-F, Kanai, Y., et al., Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci.*, 96:403-408, 2005.
4. 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.*, 85:895-907, 2005.
5. Yamada, D., Kanai, Y., et al., Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 118:916-923, 2006.
6. Arai, E., Kanai, Y., et al., Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding non-tumorous renal tissues. *Int. J. Cancer*, in press.
7. Peng, D-F, Kanai, Y., et al., DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis*, in press.
8. Kanai, Y., et al., Role of immunohistochemical expression of DNA methyltransferase 1 protein in gastric carcinoma. In: *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*. Vol. 4: Molecular Genetics, Gastrointestinal Carcinoma, and Ovarian Carcinoma (ed. Hayat M.A.), Elsevier, CA, in press.
9. Akino, K., Toyota, M., et al., The RAS effector RASSF2 is a novel tumor suppressor in colorectal cancer. *Gastroenterol.*, 129:156-169, 2005.
10. Issa, J.P., Toyota, M., et al., CIMP, at last. *Gastroenterol.*, 129:1121-1124, 2005.
11. Ogi, K., Toyota, M., et al., Small interfering RNA-induced CHFR silencing sensitizes oral squamous cell cancer cells to microtubule inhibitors. *Cancer Biol. Ther.*, 4:773-780, 2005.
12. 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.
13. Koinuma, K., Toyota, M., et al., Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter. *Carcinogenesis*, 26:2078-2085, 2005.
14. Murai, M., Toyota, M., et al., Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in hematopoietic tumors. *Br. J. Cancer*, 92:1165-1172, 2005.
15. Dote, H., Toyota, M., et al., Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumour. *Br. J. Cancer*, 92:1117-1125, 2005.
16. Ikeda, H., Toyota, M., et al., The role of T-fimbrin in the response to DNA damage: Silencing of T-fimbrin by small interfering RNA sensitizes human liver cancer cells to DNA damaging agents. *Int. J. Oncol.*, 27:933-940, 2005.
17. Abe, T., Toyota, M., et al., Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *J. Gastroenterol.*, 40:504-510, 2005.
18. Toyota, M., et al., Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. *Semin. Oncol.*, 32:521-530, 2005.
19. Terasawa, K., Toyota, M., et al., Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and

- various cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, in press.
20. Kusano, M., Toyota, M., et al., Genetic, epigenetic and clinicopathological features of gastric cancers with CpG island methylator phenotype and association to Epstein-Barr Virus. *Cancer*, in press.
 21. Okuda, H., Toyota, M., et al., HOXB13 is epigenetically inactivated in human renal cell carcinoma and may be a tumor suppressor gene. *Oncogene*, in press.
 22. Homma, N., Tamura, G., et al., Hypermethylation of Chfr and hMLH1 in gastric noninvasive and early invasive neoplasias. *Virchows Arch.*, 44:120-126, 2005.
 23. Tsuchiya, T., Tamura, G., et al., Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two novel mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 158:148-155, 2005.
 24. Endoh, M., Tamura, G., et al., RASSF2, a potential tumor suppressor, is silenced by CpG island hypermethylation in gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 93:1395-1399, 2005.
 25. Kato, N., Tamura, G., et al., Involvement of adenomatous polyposis coli (APC) gene in testicular yolk sac tumor of infants. *Hum. Pathol.*, 237:48-53, 2006.
 26. Homma, N., Tamura, G., et al., Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci.*, 97:51-56, 2006.
 27. Tamura, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, 12:192-198, 2006.
 28. Maekita, T., Tamura, G., et al., High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae, and its possible association with gastric cancer risk. *Clin. Cancer Res.*, 12:989-995, 2006.
 29. Fujimoto, M., Kitazawa, S., et al., Methylation adjacent to negatively regulating AP-1 site reactivates TrkA gene expression during cancer progression. *Oncogene*, 24:5108-5118, 2005.
 30. Kitazawa, S., et al., Desmoid tumor with ossification in chest wall: possible involvement of BAMBI promoter hypermethylation in metaplastic bone formation. *J. Bone Miner. Res.*, 20:1472-1477, 2005.
 31. Sakai, M., Hibi, K., et al., Aberrant methylation of the CHFR gene in advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterol.*, 52:1854-1857, 2005.
 32. 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*, 48:1282-1286, 2005.
 33. Imamura, Y., Hibi, K., et al., RUNX3 promoter region is specifically methylated in poorly-differentiated colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 25:2627-2630, 2005.
 34. Hibi, K., et al., Lymph node metastasis is infrequent in patients with highly-methylated colorectal cancers. *Anticancer Res.*, 26:55-58, 2006.
 35. Morioka, Y., Hibi, K., et al., Aberrant methylation of the CHFR gene in digestive tract cancer. *Anticancer Res.*, in press.
 36. Fujii, S., Imura, J., et al., Methylation of the oestrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in long-standing and extensive ulcerative colitis. *Gut*, 54:1287-1292, 2005.