

## 奨励賞受賞者論文

# 癌における新規バイオマーカーとしての遺伝子メチル化異常

田原 智満・平田 一郎<sup>1</sup>・柴田 知行・大宮 直木

(藤田保健衛生大学医学部・消化管内科学教室)

(<sup>1</sup> 谷向病院・消化器内科)

## 諸 言

DNA の配列異常を伴うジェネティックな異常のみならず DNA の配列の変化を伴わないエピジェネティックな異常が発癌において重要であることがわかっている。DNA の配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御するエピジェネティックな機構には DNA メチル化とヒストン修飾がある。DNA メチル化とは、DNA のシトシンとグアニンのホスホジエステル結合 (CpG 配列) が連続している部分のシトシン塩基の 5 位炭素原子にメチル基が付く化学修飾であり、X 染色体の不活性化、遺伝子刷り込み、個体発生におけるリプログラミングといった重要な生命現象に関わっている<sup>1,2</sup>。ヒトでは全ゲノムのうち約 70% の CpG 配列はメチル化されていることがわかっているが、非メチル化 CpG 配列の約半数は遺伝子の上流のプロモーター付近 0.3 ~ 2 kb の領域に CpG 配列がクラスターする CpG アイランド (CGIs) と呼ばれる部位に認められる<sup>3,4</sup>。さらに、CGIs の半数は遺伝子のプロモーター領域外にも認めるがその生物学的意義は明らかではない。いずれにしても、これら CGIs は X 染色体の不活性化、遺伝子刷り込みといった特殊な状況を除けば通常は非メチル化の状態が保たれている。

ヒストンは DNA に結合するタンパク質であり、この周りに DNA が巻き付きヌクレオソームを形成し、DNA 分子を折り畳んで核内に収納する役割をもつとともに遺伝子発現制御に重要な役割を担っている<sup>5</sup>。ヒストンの化学修飾はプロモーター CGI のメチル化と相互に作用し癌抑制遺伝子を不活化することにより発癌をきたす。DNA メチル化による遺伝子不活化機構の代表的なものとして、①メチル化 DNA の競合による直接的な転写因子の結合障害、② MeCP2 に代表されるメチル化 CpG 結合蛋白とメチル化 DNA との結合によりヒストン脱アセチル酵素 (HDAC) のリクルー

トを介した遺伝子発現の抑制が挙げられる (図 1)。<sup>7-9</sup>

癌におけるエピジェネティック異常の研究は、技術的な難易度から、DNA メチル化異常の解析がより先行している。正常組織に比較し、癌組織由来の DNA はゲノム全体のメチル化シトシン量の低下 (Global hypomethylation) と一部の遺伝子プロモーター領域 CGIs のメチル化シトシン量の増加 (Regional hypermethylation) が認められ、この両者が腫瘍化、癌の発育進展に重要性である<sup>10</sup>。癌抑制遺伝子プロモーター領域の高メチル化は癌抑制遺伝子不活化の重要なメカニズムであり、一方ゲノム全体の DNA 低メチル化は染色体不安定性を惹起し発癌をきたす原因となる。

上記に示すような遺伝子メチル化異常は発癌早期、あるいは前癌病変にも認めることより異常な細胞のクローナルな腫瘍性増殖に重要な役割を持っていると考えられる<sup>12</sup>。さらに、遺伝子メチル化異常は正常組織においても加齢により認められ (Age-related methylation)<sup>13</sup>、潰瘍性大腸炎<sup>14</sup>、慢性ウイルス性肝炎<sup>15</sup>、Helicobacter pylori (H. pylori) 感染胃粘膜<sup>16</sup>、バレット上皮<sup>17</sup>など炎症組織において特に顕著である。この炎症組織

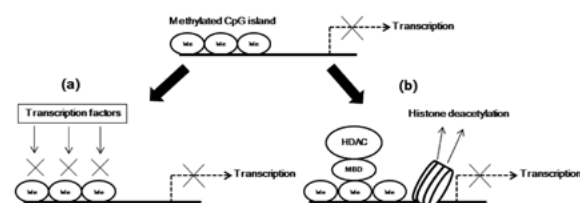


図 1 DNA メチル化による遺伝子不活化機構

ヒストンの化学修飾はプロモーター CGI のメチル化と相互に作用し癌抑制遺伝子を不活化することにより発癌をきたす。DNA メチル化による遺伝子不活化機構の代表的なものとして、(a) メチル化 DNA の競合による直接的な転写因子の結合障害、(b) メチル化 CpG 結合蛋白 (MBD) とメチル化 DNA との結合によりヒストン脱アセチル酵素 (HDAC) のリクルーを介した遺伝子発現の抑制が挙げられる。

における Age-related methylation の蓄積は発癌リスクと相関するため、癌リスク群の絞り込みに有用であることが示唆される。一方、大腸癌において腫瘍特異的な遺伝子メチル化の蓄積を示す一群である CpG island methylator phenotype (CIMP) の概念が提唱され、臨床病理学的背景との関連が検討されている。<sup>18-20</sup>

近年のマイクロアレイや次世代シーケンサーを用いた解析技術の進歩により各種癌においてゲノムスケールでの遺伝子メチル化異常が明らかとなり、遺伝子変異などほかの分子異常との組み合わせにより分子サブタイプとして個々の腫瘍を分類する試みがなされている。このような解析が従来の臨床因子のみでは明らかにできなかった癌患者の予後や薬剤反応性、発癌リスクに関与する因子の同定に寄与することが期待でき、さらにエビジュネティックな異常は可逆的な変化であることより分子標的治療を考えるうえでも有用な知見となる。本総説では癌におけるエビジュネテクス研究に関し、特に遺伝子メチル化にお焦点をおき概説する。

#### 大腸癌における CpG island methylator phenotype (CIMP) と、癌におけるメチル化プロファイリング

大腸癌における遺伝子メチル化の解析により、腫瘍特異的なプロモーターCGI 高メチル化の蓄積を認める一群が報告され CpG island methylator phenotype (CIMP) の概念が提唱された。<sup>18,19</sup> CIMP 陽性大腸癌の分子メカニズムの詳細は明らかではないが、これらの腫瘍は *BRAF*, *KRAS* 遺伝子変異が高率であり、高齢発症、深部大腸に好発、粘液産生、低分化傾向を示すなどの臨床病理学的特徴を有する。CIMP 陽性大腸癌はさらに CIMP1, CIMP2 といった2つの分子サブタイプに分類され、それぞれが特有の遺伝子異常を有することから異なる発癌ルートにより発生することが示唆されている。CIMP 陽性例のなかでもより高度な遺伝子メチル化を有する CIMP1 はミスマッチ修復遺伝子 *MLH1* のエビジュネティックなサイレンシング、マイクロサテライト不安定性 (MSI), *BRAF* 遺伝子変異を高頻度に認める。<sup>19</sup> エクソムシーケンシングによる解析により CIMP1 大腸癌において *CHD7*, *CHD8* をはじめ、クロマチンリモデリング遺伝子の高頻度変異を認めることが報告された。<sup>21</sup> CIMP2 大腸癌は遺伝子メチル化の程度は CIMP1 大腸癌に比較し低く、*KRAS* 遺伝子変異を高頻度に認める。一方、CIMP 陰性大腸癌ではメチル化されている遺伝子の頻度は低く、*TP53* 遺伝子変異、染色体不安定性を高頻度に認める。<sup>19,20</sup> 大腸前癌病変である腺腫のなかでも、大腸锯齿状腺腫は主に深部大腸に好発し *BRAF* 遺伝子変異、CIMP 形質を高率に認めることから CIMP1 大腸癌の

前癌病変であることが示唆されている。<sup>22</sup> よって、CIMP 陽性大腸癌は通常と異なる前癌病変から発症していると考えられる。さらに、ミスマッチ修復蛋白をコードする *MLH1* 遺伝子のメチル化は CIMP 陽性大腸癌における MSI と強い相関を示す。<sup>19</sup> 一般に CIMP 陽性大腸癌は CIMP 陰性大腸癌に比較し予後は良いとされる。<sup>23</sup> しかし CIMP 陽性大腸癌では 5-FU による治療効果が乏しいとの報告もある。<sup>24</sup> このように、遺伝子メチル化、遺伝子変異の組み合わせによる大腸癌の分子サブタイプは各々の癌の発癌メカニズムを知るのみでなく治療の個別化、予後予測など臨床上也有用な情報をもたらすと考えられる。

大腸癌における CIMP の概念の提唱がきっかけとなり、各々の腫瘍の特性の違いを説明すべく各種癌においてメチル化されている遺伝子のプロファイリングを行う研究が進められた (表1)。胃癌においては CIMP 陽性、陰性腫瘍が大腸癌ほどに明瞭に分類されないものの、CIMP 陽性胃癌における独自の発癌ルートが示唆されている。胃癌における高度メチル化腫瘍 (CIMP-H) の約半数は Epstein-Barr (EB) ウイルス陽性であり胃上部に好発し、未分化な組織型を有し、*TP53*, *KRAS* 遺伝子変異は稀である。一方、EB ウイルス陰性の CIMP-H 胃癌は *MLH1* 遺伝子のメチル化、MSI と強い相関を示す。<sup>25</sup> CIMP-H 胃癌は脈管侵襲が低頻度、生存期間が良好などの臨床的な特徴を認める。<sup>25</sup> 有糸分裂チェックポイント遺伝子 *CHFR* のメチル化は胃癌、大腸癌における微小管阻害剤感受性と関連がある。<sup>26,27</sup> 骨髄異形性症候群 (Myelodysplastic syndromes : MDS) 患者における高度メチル化群は生存期間、無再発期間といった予後因子が不良となる。<sup>28</sup> DNA 修復酵素をコードする *MGMT* の遺伝子メチル化は脳腫瘍患者におけるアルキル化剤の感受性と関連が認められる。<sup>29</sup> *DAPK* 遺伝子のメチル化は膀胱癌の早期再発のリスク因子である。<sup>30</sup> 遺伝子メチル化の解析は腫瘍組織を用いるだけでなく大腸癌や胃癌における内視鏡検査の際の洗浄液、膀胱癌における尿を試料として用いる診断の有用性も報告され、低侵襲かつ低コストな臨床検査として期待される。<sup>31,32</sup>

このように CIMP のようなメチル化形質、あるいは単一遺伝子のメチル化状態が癌の臨床背景に関連があることが示され、臨床上有用なバイオマーカーとして期待されるが、一方、各種癌におけるメチル化形質の検討に関しては各々の研究により解析する遺伝子、解析法に一致した見解がなく、結果の矛盾を生む原因ともなっていることが問題点として挙げられる。<sup>34,35</sup> 少なくともメチル化の状態を共通した遺伝子により定量的に解析した大腸癌、胃癌の検討において CIMP 陽性と、臨床背景との関連はある程度一致しているこ

表1 各種癌においてメチル化されている遺伝子と、臨床背景との関連

癌種またはサンプル	遺伝子	メチル化陽性群と臨床像との関連	Ref.
MDS	10遺伝子 ( <i>CDH1</i> , <i>CDH13</i> , <i>ER-alfa</i> , <i>NOR1</i> , <i>NPM2</i> , <i>OLIG2</i> , <i>p15INK4B</i> , <i>PGR</i> , <i>PGRB</i> , <i>RIL</i> ) の平均値	生存期間、無再発期間の短縮	28
胃癌	CIMP ( <i>MINT1</i> , <i>MINT2</i> , <i>MINT12</i> , <i>MINT25</i> , <i>MINT31</i> のメチル化により定義)	EBウイルス関連胃癌に関連	25
胃液	<i>MINT25</i> , <i>RORA</i> , <i>GDNF</i> , <i>ADAM23</i> , <i>PRDM5</i> , <i>MLF1</i>	胃癌リスクと関連	31
非腫瘍胃粘膜	<i>RASGRF1</i>	胃癌リスクと関連	72
大腸癌	CIMP ( <i>MINT1</i> , <i>MINT2</i> , <i>MINT31</i> , <i>P16</i> , <i>MLH1</i> , <i>P14</i> , <i>WNT5A</i> のメチル化により定義)	深部大腸癌の再発に関連、無再発期間が短縮	20
大腸癌	CIMP ( <i>CACNA1G</i> , <i>P16</i> , <i>CRABP1</i> , <i>IGF2</i> , <i>MLH1</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>RUNX3</i> , <i>SOCS1</i> のメチル化により定義)	大腸癌の癌関連死を有意に低下	23
大腸癌	CIMP ( <i>CACNAG1</i> , <i>SOCS1</i> , <i>RUNX3</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>MLH1</i> のメチル化により定義)	5-FUによる化学療法が不良	24
大腸癌・胃癌	<i>CHFR</i>	微小管阻害剤感受性と有意な関連	26, 27
腸液	<i>mir-34b/c</i>	大腸癌の深部浸潤と関連	32
尿	<i>MYO3A</i> , <i>CA10</i> , <i>SOX11</i> , <i>NKX6-2</i> , <i>PENK</i> , <i>DBC1</i>	膀胱癌のリスクと関連	33
神経膠腫	<i>MGMT</i>	アルキル化剤の感受性に関連	29
膀胱癌	<i>DAPK</i>	膀胱癌再発に関連	30

<sup>19, 20, 25, 36, 37</sup>

とより、他部位の癌においてもメチル化形質を定義する上でのスタンダードといえる遺伝子マーカーパネルの確立が望まれる。

近年、マイクロアレイ、次世代シーケンズ技術を用いたゲノムワイドな遺伝子メチル化の解析方法が発達している。網羅的遺伝子メチル化の利点は候補遺伝子選定のバイアスがないことであり。詳細な遺伝子メチル化のプロファイリングは臨床像に関連する新規バイオマーカーの探索といった点でも有用性が期待される。<sup>38</sup> LiらはIllumina 27Kマイクロアレイを用い乳癌組織の遺伝子メチル化を網羅的に解析した。彼らはメチル化状態がエストロゲンレセプター発現状況に関連する4遺伝子 (*FAM124B*, *ST6GALNAC1*, *NAVI*, *PER1*) 同定した。同様のアプローチを行ったほかの研究においては乳癌の予後不良に関わるRECK遺伝子メチル化が報告されている。<sup>39</sup> FangらはやはりIllumina 27Kマイクロアレイを用い乳癌の転移に関わる遺伝子メチル化の同定を行った。彼らは乳癌において大腸癌と同様のメチル化形質である‘Breast CpG island methylator phenotype’ (B-CIMP) を報告した。B-CIMPは乳癌において転移の低リスクであり予後良好にかかわる独立因子であると結論しており、乳癌における遺伝子メチル化の検索が予後予測因子としての新規マーカーとして有用であることが示唆された。

多くの癌がジェネティックな異常、エピジェネティックな異常の両者を共有していることが報告されている。神経膠腫においてメチル化形質である glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP) は遺伝子コピー数の異常、*IDH1* 遺伝子変異と強い関連が認められる。<sup>41</sup> 多数例の大腸癌の遺伝子変異、メチル化ともにゲノムワイドに検討した報告では、大腸癌のサブ

セットの症例に存在する遺伝子変異が高度な腫瘍 (Hypermutated) を認め、その3/4の症例はMSI, *MLH1* サイレンシングを伴う高度メチル化腫瘍であった。グリア細胞に*IDH1* 遺伝子変異を導入すると、特徴的なヒストン修飾とともにG-CIMPに特異的な遺伝子の高度メチル化がもたらされることより神経膠腫において*IDH1* 遺伝子変異がメチル化形質誘導の分子メカニズムであると考えられ、腫瘍化の分子メカニズムを考えるうえでジェネティックな異常、エピジェネティックな異常の相互作用の重要性を強調する報告といえる。

## 癌リスクマーカーとしての遺伝子メチル化のプロファイリング

DNAメチル化は癌のみならず非腫瘍組織においても加齢により認められる。大腸癌組織で高度にメチル化が亢進している遺伝子は背景非腫瘍においてもメチル化は検出可能なレベルに上昇しており、その程度は加齢と相関する。<sup>13, 44</sup> このような観点より、遺伝子メチル化には加齢によるもの (Age-related methylation: Type A gene) と腫瘍特異的なもの (Cancer-specific methylation: Type C gene) の2つに分かれると考える。Cancer-specific methylationにおける遺伝子のメチル化はほぼ癌組織にのみ限定されage-related methylationに比較し頻度は低いが癌組織の増殖に直結する遺伝子サイレンシングに関与すると考えられる。<sup>41</sup> 一方、Age-related methylationの感受性は組織特異性と密接に関わっている。例えば、エストロゲンレセプターをコードする*ER* 遺伝子のメチル化は健常大腸粘膜に高頻度に認めるものの、食道粘膜ではメチル化は稀である。<sup>13, 17</sup> APC遺伝子のメチル化は健常胃



粘膜で認められるが大腸粘膜では稀である。<sup>45, 46</sup>加齢に伴う遺伝子メチル化は前癌状態にかかわる遺伝子変化をもたらすと考えられるため、Age-related methylation は癌をスクリーニングするバイオマーカーとして有用であることが予想される。潰瘍性大腸炎 (UC) は原因不明の大腸粘膜の非特異的慢性炎症であり、再燃・緩解を繰り返す。<sup>47</sup>UC 患者における異型性 (High grade dysplasia : HGD) や大腸癌組織において Type A gene である *ER* や *MYOD* の高度メチル化が認められるが<sup>14</sup>、これらの遺伝子のメチル化は HGD や大腸癌を有する UC 患者の非腫瘍炎症粘膜においても腫瘍非合併の UC 患者に比較して高いレベルで認められることから、Age-related methylation は各々の症例の発癌感受性に関わる発癌の素地である field defect を規定していると考えられる。<sup>14</sup>Age-related methylation の蓄積は UC 患者における炎症性発癌の重要なメディエーターと考えられ、<sup>48</sup>大腸癌高リスク群の絞り込みに有用なバイオマーカーであることが示唆された。

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染は胃癌発症と密接にかかわっている。*H. pylori* 感染は胃粘膜に慢性炎症をもたらす、好中球やリンパ球の高度な浸潤が認められる。*H. pylori* 感染が胃粘膜では *p16*, *LOX*, *THBD*, *FLNC*, *HAND1*, *CDH1* など多数の遺伝子のメチル化を強力に誘発する。このような *H. pylori* 感染胃粘膜における遺伝子メチル化が胃癌発症リスクや未分化型胃癌に関連する皺襞肥大型胃炎と関わりがあることが報告されている。<sup>16, 50</sup>*H. pylori* 感染そのものによる胃癌リスク患者の絞り込みは感染者が多いアジア地域や *H. pylori* 陰性でも既往感染が高頻度な分化型胃癌患者においては困難であると考えられる。さらに、*H. pylori* 除菌が胃癌発症を抑制すると期待されているが、真の高リスクである高度萎縮性胃炎患者においてはその効果に限界があると考えられる。<sup>51</sup>この観点から、遺伝子メチル化のような分子マーカーを診断に応用することが *H. pylori* 感染状況に関わらず胃癌高リスク群の絞り込みを行ううえで有用であると期待される。

前述のとおり、加齢・炎症に関連する遺伝子メチル化はその標的臓器の癌リスクに関与することが報告されているが、<sup>14, 16, 50</sup>他方、血液など標的臓器とは関係ない組織の遺伝子メチル化の程度も加齢や癌の発症に関わる環境因子の暴露を反映し、癌のリスクと関連することが示唆されている。<sup>52-57</sup>特に血液における遺伝子メチル化による癌リスク群絞り込みの試みは低侵襲かつ簡便な臨床検査として魅力的であると考えられ、実際に全血遺伝子メチル化が膀胱癌、<sup>54</sup>頭頸部癌、<sup>55</sup>乳

癌、<sup>56, 57</sup>胃癌のリスクと関連があることが報告されている。<sup>58</sup>癌患者における非標的組織の遺伝子メチル化の程度は遺伝因子と発癌リスクに関与する環境因子の相互作用を反映していると予想され、興味深いが、多くの研究結果では癌患者における遺伝子メチル化の変化はごくわずかにとどまり、バイオマーカーとしての臨床応用には更なる検討を要する。

## 遺伝子メチル化解析技術の進歩

近年のマイクロアレイ、次世代シーケンシング技術の進歩によりゲノムスケールでの遺伝子メチル化のプロファイリングが可能となり、個々の腫瘍における発癌分子メカニズムの解明、臨床に有用なバイオマーカーの探索に寄与することが期待される。ゲノムワイドなメチル化解析を行う際、メチル化シトシン、非メチル化シトシンを識別するためにメチル化シトシンの分離・精製、あるいはゲノム DNA にバイサルファイト処理を行なうことが必要となる。メチル化シトシンを分離・精製する方法として、メチル化シトシンを認識する抗体を用いた免疫沈降法により 1 本鎖メチル化 DNA を分離・精製する Methylated DNA immunoprecipitation-microarray analysis (MeDIP) 法、<sup>59, 60</sup>メチル化感受性酵素 (HpaII, SmaI など)、メチル化非感受性酵素 (イソ制限酵素 : MspI など HpaII, ネオイソ制限酵素 : XmaI など)<sup>61-63</sup>による処理後 DNA 断片をライゲーション PCR により増幅する方法などがあり、分離・精製した DNA 断片はマイクロアレイや次世代シーケンサーにより解析する。ゲノム DNA のバイサルファイト処理は候補遺伝子のメチル化解析に広く用いる、バイサルファイト処理により非メチル化シトシンはウラシルに変換されるがメチル化シトシンは変換されない。したがって PCR 反応によるウラシルからチミンの変換によりシトシン・チミンの割合により遺伝子メチル化の程度を知ることができる。バイサルファイト処理はパイロシーケンシング<sup>64</sup>、combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法、<sup>65</sup>methylation-specific PCR (MSP) 法と組み合わせることにより候補遺伝子のメチル化を解析することができる。バイサルファイト処理後 DNA をゲノムワイドに解析する方法としてイルミナ社のビーズアレイ次世代シーケンシングによる Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法がある。<sup>68</sup>

近年のゲノムワイド遺伝子メチル化解析技術の進歩により各種癌における臨床因子に関連するメチル化クラスターが報告され、胃癌では発症リスクや、内視鏡手術後の再発を予測し得る遺伝子メチル化が同定された。<sup>69-71</sup>ゲノムワイド遺伝子メチル化解析により人種、性別、<sup>72, 73</sup>精神状態、遺伝因子に関わる変化も同定され疾患

感受性を考察する上で有用な知見と成り得ることが予想される。もともと癌におけるメチル異常の解析は特定の遺伝子のプロモーター領域 CGI 配列など機能的側面が重要かつ予想し易い部位に関し焦点が置かれてきたが、近年の詳細な検討により組織分化に関わる遺伝子メチル化の変化はプロモーター、CGI ではなくプロモーター領域 CGI 近隣 2 kb の 'CGI shores' と規定される部位起こり、遺伝子発現と密接に関わっていることが報告されている。<sup>74,75</sup> 'CGI shores' のメチル化状態は組織特異的に癌とその背景粘膜におけるメチル化とオーバーラップしていることにより、組織分化に関わる 'CGI shores' の遺伝子メチル化制御機構の破綻が癌発症の重要なメカニズムであるという新概念がもたらされた。<sup>76,77</sup>

## 総 括

癌におけるジェネティクス研究に関して、特に遺伝子メチル化に焦点をおき概説した。DNA メチル化異常は、ゲノム全体の多くの遺伝子に存在し、安定した化学修飾であり、前がん病変においても検出できる変化であることから、診断マーカーとして応用できる可能性が高いと考えられる。癌患者における遺伝子メチル化の解析は、従来の臨床因子のみでは明らかにできなかった癌患者の予後や薬剤反応性、発癌リスクに関与する因子の同定に寄与することが期待できる。さらに、DNA メチル化異常は可逆的な変化であり、DNA 脱メチル化剤が骨髄異形成症候群の治療として米国で用いられ、有効な結果を得ていることから、各種癌において見出される特有の DNA メチル化異常、パスウェイの同定が化学予防や分子標的治療につながることで大いに期待される。

## 文 献

- 1) Bird A : DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 ; 16 : 6–21.
- 2) Turker MS : The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin. Cancer Biol.* 1999 ; 9 : 329–337.
- 3) Bestor TH, Gundersen G, Kolsto AB, and Prydz H : CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 1992 ; 9 : 48–53.
- 4) Cross SH and Bird AP : CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995 ; 5 : 309–314.
- 5) Khorasanizadeh S : The nucleosome : from genomic organization to genomic regulation. *Cell.* 2004 ; 116 : 259–272.
- 6) Bird AP and Wolffe AP : Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.* 1999 ; 99 : 451–454.
- 7) Jones PL and Wolffe AP : Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin. Cancer Biol.* 1999 ; 9 : 339–347.
- 8) Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, and Bird A : Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998 ; 393 : 386–389.
- 9) Jones PA and Laird PW : Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* 1999 ; 21 : 163–167.
- 10) Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, and Issa JP : Alterations in DNA methylation : a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 1998 ; 72 : 141–196.
- 11) Santini V, Kantarjian HM, and Issa JP : Changes in DNA methylation in neoplasia : pathophysiology and therapeutic implications. *Ann. Intern. Med.* 2001 ; 134 : 573–586.
- 12) Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, and Rashid A : CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am. J. Pathol.* 2002 ; 160 : 1823–1830.
- 13) Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, and Baylin SB : Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.* 1994 ; 7 : 536–540.
- 14) Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, and Brentnall TA : Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 2001 ; 61 : 3573–3577.
- 15) Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Bolland CR, and Goel A : Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008 ; 47 : 908–918.
- 16) Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arai K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, and Ushijima T : High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin. Cancer*

- Res.* 2006 ; 12 : 989 – 995.
- 17) Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA, and Laird PW : Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001 ; 61 : 3410 – 3418.
  - 18) Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, and Issa JP : CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 ; 96 : 8681 – 8686.
  - 19) Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, and Issa JP : Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 ; 104 : 18654 – 18659.
  - 20) Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, Kim NK, and Issa JP : DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer.* 2011 ; 117 : 1847 – 1854.
  - 21) Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP, and Estecio MR : Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology.* 2014 ; 146 : 530 – 538 e5.
  - 22) Leggett B and Whitehall V : Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010 ; 138 : 2088 – 2100.
  - 23) Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, and Fuchs CS : CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009 ; 58 : 90 – 96.
  - 24) Jover R, Nguyen TP, Perez-Carbonell L, Zapater P, Paya A, Alenda C, Rojas E, Cubiella J, Balaguer F, Morillas JD, Clofent J, Bujanda L, Rene JM, Bessa X, Xicola RM, Nicolas-Perez D, Castells A, Andreu M, Llor X, Boland CR, and Goel A : 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2011 ; 140 : 1174 – 1181.
  - 25) Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, and Tokino T : Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer.* 2006 ; 106 : 1467 – 1479.
  - 26) Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, Ogi K, Kikuchi T, Suzuki H, Mita H, Tanaka N, Itoh F, Issa JP, Jair KW, Schuebel KE, Imai K, and Tokino T : Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 ; 100 : 7818 – 7823.
  - 27) Satoh A, Toyota M, Itoh F, Sasaki Y, Suzuki H, Ogi K, Kikuchi T, Mita H, Yamashita T, Kojima T, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Endo T, Tokino T, and Imai K : Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. *Cancer Res.* 2003 ; 63 : 8606 – 8613.
  - 28) Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, Berry D, Ahmed S, Zhu W, Pierce S, Kondo Y, Oki Y, Jelinek J, Saba H, Estey E, and Issa JP : DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2010 ; 28 : 605 – 613.
  - 29) Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, and Herman JG : Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 2000 ; 343 : 1350 – 1354.
  - 30) Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, and Kuwano M : The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res.* 2002 ; 62 : 4048 – 4053.
  - 31) Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chung W, Estecio MR, Kondo K, Guo Y, Ahmed SS, Toyota M, Itoh F, Suk KT, Cho MY, Shen L, Jelinek J, and Issa JP : Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology.* 2009 ; 136 : 2149 – 2158.
  - 32) Kamimae S, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S,

- Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishiwaki M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, and Toyota M : Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. *Cancer Prev. Res(Phila)*. 2011 ; 4 : 674–683.
- 33) Chung W, Bondaruk J, Jelinek J, Lotan Y, Liang S, Czerniak B, and Issa JP : Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2011 ; 20 : 1483–1491.
- 34) Issa JP : CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2004 ; 4 : 988–993.
- 35) Issa JP : Colon cancer : it's CIN or CIMP. *Clin. Cancer Res.* 2008 ; 14 : 5939–5940.
- 36) Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, and Hirohashi S : DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int. J. Cancer*. 2001 ; 91 : 205–212.
- 37) Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, and Issa JP : Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res.* 1999 ; 59 : 5438–5442.
- 38) Li L, Lee KM, Han W, Choi JY, Lee JY, Kang GH, Park SK, Noh DY, Yoo KY, and Kang D : Estrogen and progesterone receptor status affect genome-wide DNA methylation profile in breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2010 ; 19 : 4273–4277.
- 39) Hill VK, Ricketts C, Bieche I, Vacher S, Gentle D, Lewis C, Maher ER, and Latif F : Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. *Cancer Res.* 2011 ; 71 : 2988–2999.
- 40) Fang F, Turcan S, Rimner A, Kaufman A, Giri D, Morris LG, Shen R, Seshan V, Mo Q, Heguy A, Baylin SB, Ahuja N, Viale A, Massague J, Norton L, Vahdat LT, Moynahan ME, and Chan TA : Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci. Transl. Med.* 2011 ; 3 : 75ra25.
- 41) Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, and Aldape K : Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010 ; 17 : 510–522.
- 42) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 ; 487 : 330–337.
- 43) Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, and Chan TA : IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012 ; 483 : 479–483.
- 44) Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, and Issa JP : Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.* 1998 ; 58 : 5489–5494.
- 45) Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Wilson KT, James SP, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Silverberg SG, Kong D, and Meltzer SJ : Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene*. 2000 ; 19 : 3642–3646.
- 46) Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myohanen S, Paakkonen M, Marin S, Kosma VM, and Janne J : Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer*. 1997 ; 70 : 644–648.
- 47) Head KA and Jurenka JS : Inflammatory bowel disease Part 1 : ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern. Med. Rev.* 2003 ; 8 : 247–283.
- 48) Eaden JA, Abrams KR, and Mayberry JF : The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis : a meta-analysis. *Gut*. 2001 ; 48 : 526–535.
- 49) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, and Schlemper RJ : Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001 ; 345 : 784–789.
- 50) Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y,



- Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Ashida M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, and Shinomura Y : LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in *Helicobacter pylori*-related enlarged-fold gastritis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2008 ; 17 : 2555 – 2564.
- 51) Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, Oda I, Gotoda T, and Ushijima T : Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J. Gastroenterol.* 2010 ; 45 : 37 – 44.
- 52) Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Padbury JF, Bueno R, Sugarbaker DJ, Yeh RF, Wiencke JK, and Kelsey KT : Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* 2009 ; 5 : e1000602.
- 53) Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, Shen H, Campan M, Noushmehr H, Bell CG, Maxwell AP, Savage DA, Mueller-Holzner E, Marth C, Kocjan G, Gayther SA, Jones A, Beck S, Wagner W, Laird PW, Jacobs IJ, and Widschwendter M : Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res.* 2010 ; 20 : 440 – 446.
- 54) Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, Karagas MR, Houseman EA, and Kelsey KT : DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011 ; 29 : 1133 – 1139.
- 55) Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, and Kelsey KT : Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2007 ; 16 : 108 – 114.
- 56) Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, Giles GG, Hopper JL, and Dobrovic A : Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev. Res (Phila)*. 2011 ; 4 : 23 – 33.
- 57) Brennan K, Garcia-Closas M, Orr N, Fletcher O, Jones M, Ashworth A, Swerdlow A, Thorne H, Riboli E, Vineis P, Dorronsoro M, Clavel-Chapelon F, Panico S, Onland-Moret NC, Trichopoulos D, Kaaks R, Khaw KT, Brown R, and Flanagan JM : Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res.* 2012 ; 72 : 2304 – 2313.
- 58) Tahara T, Maegawa S, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Estecio MR, Shibata T, Hirata I, Arisawa T, and Issa JP : Examination of whole blood DNA methylation as a potential risk marker for gastric cancer. *Cancer Prev. Res (Phila)*. 2013 ; 6 : 1093 – 1100.
- 59) Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, and Schubeler D : Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* 2005 ; 37 : 853 – 862.
- 60) Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, and Ecker JR : Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell.* 2006 ; 126 : 1189 – 1201.
- 61) Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiek E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, and Grealley JM : Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation : the HELP assay. *Genome Res.* 2006 ; 16 : 1046 – 1055.
- 62) Estecio MR, Yan PS, Ibrahim AE, Tellez CS, Shen L, Huang TH, and Issa JP : High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. *Genome Res.* 2007 ; 17 : 1529 – 1536.
- 63) Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, and Issa JP : Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet.* 2007 ; 3 : 2023 – 2036.
- 64) Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, and Krahe R : Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG



- sites. *Biotechniques*. 2003 ; 35 : 146 – 150.
- 65) Xiong Z and Laird PW : COBRA : a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997 ; 25 : 2532 – 2534.
- 66) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, and Baylin SB : Methylation-specific PCR : a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 ; 93 : 9821 – 9826.
- 67) Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, and Fan JB : High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* 2006 ; 16 : 383 – 393.
- 68) Meissner A, Wernig M, and Jaenisch R : Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2007 ; 25 : 1177 – 1181.
- 69) Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, Hasegawa K, Kokudo N, Aburatani H, and Kaneda A : Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2010 ; 101 : 1501 – 1510.
- 70) Shin CM, Kim N, Jung Y, Park JH, Kang GH, Park WY, Kim JS, Jung HC, and Song IS : Genome-wide DNA methylation profiles in noncancerous gastric mucosae with regard to *Helicobacter pylori* infection and the presence of gastric cancer. *Helicobacter*. 2011 ; 16 : 179 – 188.
- 71) Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, and Fukayama M : Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res.* 2011 ; 71 : 7187 – 7197.
- 72) Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, and Shinomura Y : Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. *Cancer Prev. Res (Phila)*. 2012 ; 5 : 1203 – 1212.
- 73) Oishi Y, Watanabe Y, Yoshida Y, Sato Y, Hiraiishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M, and Itoh F : Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. *Tumour Biol.* 2012 ; 33 : 383 – 393.
- 74) Fraser HB, Lam LL, Neumann SM, and Kobor MS : Population-specificity of human DNA methylation. *Genome Biol.* 2012 ; 13 : R8.
- 75) Lam LL, Emberly E, Fraser HB, Neumann SM, Chen E, Miller GE, and Kobor MS : Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 ; 109 Suppl 2 : 17253 – 17260.
- 76) Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, and Feinberg AP : The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* 2009 ; 41 : 178 – 186.
- 77) Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, and Feinberg AP : Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 2009 ; 41 : 1350 – 1353.