

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 高精度エピゲノム胃がんリスク診断の確立と多層的食道がんリスク診断の開発
(英語) Highly accurate epigenetic risk diagnosis for gastric cancer and multiomics risk diagnosis for esophageal cancer
- 研究開発担当者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人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 牛島 俊和
(英語) Toshikazu Ushijima, Chief
Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute
- 実施期間： 平成 26 年 5 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) ・ピロリ菌除菌後健常者の中の胃がん高危険度群の高精度捕捉の前向き臨床研究 (研究総括、DNA メチル化解析)
・食道がん高危険度群捕捉の多層的リスクマーカーの開発
(英語) ・ Multicenter prospective cohort study to identify high-risk group for primary gastric cancer using DNA methylation levels in normal-appearing gastric tissues in healthy people after *Helicobacter pylori* eradication (Research management and DNA methylation analysis)
・ Multiomics risk diagnosis for esophageal cancer
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人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 牛島 俊和
(英語) Toshikazu Ushijima, Chief
Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute

- 分担研究
開発課題名： (日本語) ピロリ菌除菌後健常者の中の胃がん高危険度群の高精度捕捉の前向き臨床研究 (症例集積と追跡)
- (英語) Multicenter prospective cohort study to identify high-risk group for primary gastric cancer using DNA methylation levels in normal-appearing gastric tissues in healthy people after *Helicobacter pylori* eradication (Recruitment and follow-up)
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 中央病院 内視鏡科
医長 中島 健
- (英語) Takeshi Nakajima, Assistant Chief
Endoscopy Division, National Cancer Center Hospital
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 公立大学法人和歌山県立医科大学 医学部 内科学第二教室
講師 前北 隆雄
- (英語) Takao Maekita, Assistant Professor
Second Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Wakayama Medical University
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人東京大学 医学部附属病院 消化器内科
助教 山道 信毅
- (英語) Nobutake Yamamichi, Assistant Professor
Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人富山大学 大学院医学薬学研究部
消化器造血器腫瘍制御内科学 (内科学第三講座) 教授 杉山 敏郎
- (英語) Toshiro Sugiyama, Professor
Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine and
Pharmaceutical Sciences University of Toyama
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人大分大学 医学部 消化器内科学講座
教授 村上 和成
- (英語) Kazunari Murakami, Professor
Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine,
Oita University
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 消化器内科 (胃腸)
部長 貝瀬 満
- (英語) Mitsuru Kaise, Director
Department of Gastroenterology, Toranomom Hospital

- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人浜松医科大学 医学部附属病院 臨床研究管理センター
所属 役職 氏名 : 病院教授 古田 隆久
(英 語) Takahisa Furuta, Professor
Center for Clinical Research, Hamamatsu University School of
Medicine
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人広島大学 病院 消化器・代謝内科
所属 役職 氏名 : 准教授 伊藤 公訓
(英 語) Masanori Ito, Associate Professor
Department of Gastroenterology and Metabolism, Hiroshima
University
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人滋賀医科大学 医学部附属病院 光学医療診療部
所属 役職 氏名 : 准教授 杉本 光繁
(英 語) Mitsushige Sugimoto, Associate Professor
Division of Digestive Endoscopy, Shiga University of Medical Science
Hospital
- 分 担 研 究 (日本語) ピロリ菌除菌後健常者の中の胃がん高危険度群の高精度捕捉の前向き臨
開 発 課 題 名 : 床研究 (統計学的解析)
(英 語) Multicenter prospective cohort study to identify high-risk group for
primary gastric cancer using DNA methylation levels in
normal-appearing gastric tissues in healthy people after *Helicobacter
pylori* eradication (Statistical analysis)
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 社会と健康研究センター 予
所属 役職 氏名 : 防研究部 予防評価研究室
室長 島津 太一
(英 語) Taichi Shimazu, Section Head
Division of Prevention, Center for Public Health Sciences
National Cancer Center
- 分 担 研 究 (日本語) ピロリ菌除菌後健常者の中の胃がん高危険度群の高精度捕捉の前向き臨
開 発 課 題 名 : 床研究 (検体採取方法の検討)
(英 語) Multicenter prospective cohort study to identify high-risk group for
primary gastric cancer using DNA methylation levels in
normal-appearing gastric tissues in healthy people after *Helicobacter
pylori* eradication (Sampling method consideration)

研究開発分担者 (日本語) 学校法人聖マリアンナ医科大学 医学部 内科学 (消化器・肝臓内科)
所属 役職 氏名 : 教授 伊東 文生
(英 語) Fumio Itoh, Professor
Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal
Medicine, St. Marianna University School of Medicine

分 担 研 究 (日本語) ピロリ菌除菌後健康者の中の胃がん高危険度群の高精度捕捉の前向き臨
開 発 課 題 名 : 床研究 (病理学的解析)
(英 語) Multicenter prospective cohort study to identify high-risk group for
primary gastric cancer using DNA methylation levels in
normal-appearing gastric tissues in healthy people after *Helicobacter
pylori* eradication (Pathological analysis)

研究開発分担者 (日本語) 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学 医学部 病理学教室
所属 役職 氏名 : 専任講師 新井 恵吏
(英 語) Eri Arai, Assistant Professor
Department of Pathology, Keio University School of Medicine

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

1) ピロリ菌除菌後健康人の中の胃がん高危険度群の高精度捕捉の前向き臨床研究

急増する除菌後健康人に対する定期的な内視鏡観察は個人・社会の大きな負担となっており、除菌後健康人の中での高リスク群捕捉技術の早期確立が強く求められている。我々は、これまで胃発がんにおける DNA メチル化異常の重要性、胃粘膜 DNA メチル化異常の程度と発がんリスクとの強い相関を明らかにし、多施設共同前向き臨床研究により胃がん患者における異時性胃がんのエピゲノムリスク診断の POC を取得した。

本研究では、ピロリ菌除菌後健康人を対象としたエピゲノムリスク診断の臨床実用化を目指して、全国 66 施設の研究ネットワークを構築し、初発胃がんリスク予測の多施設共同前向き臨床研究を開始した。高度萎縮性変化を有する除菌後健康人を対象とし、胃の 2 定点より採取した生検サンプルを用いてメチル化レベルを計測し、その後 5 年間にわたり毎年の内視鏡による胃がん発生をイベントとした経過観察を行うものである。予定登録数は 2,000 人で、2015 年 6 月から H28 年度末までに 1,141 例を登録した。また臨床実用化に向けた企業への導出のため、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析による新規 DNA メチル化マーカーを開発し、2016 年 9 月に特許出願を行った。

2)食道がん高危険度群捕捉の多層的リスクマーカーの開発

食道がんは、胃がんと同様に早期病変に対する内視鏡治療の発達により早期発見の重要性が高まっているものの、多彩な発がん因子を背景とするためにエピゲノムマーカーのみによるリスク予測は臨床応用化に不十分であった。

そこで我々は、正常上皮におけるジェネティック異常（突然変異）とエピジェネティック異常（DNAメチル化異常）の蓄積を評価する多層的リスク診断を可能にすべく、 $10^{-6}/\text{bp}$ 程度の微量の点突然変異をシーケンサーと区別して定量する新規測定技術を開発した。この新技術を用いて、リスクレベル毎に分類された食道粘膜の生検検体について点突然変異頻度を測定した。その結果、点突然変異頻度は発がんリスクに相関して上昇することが示された。食道発がん因子に曝露された健康人と食道がん患者とを区別するROC解析ではROC曲線下面積（AUC）が0.79と高い食道がん患者予測能を示し、既知の発がん因子を含めた多変量解析においても突然変異頻度は最も強い食道発がん危険因子であった。この点突然変異頻度と我々の分離したDNAメチル化マーカーとの組み合わせによる多層的リスクマーカーはメチル化マーカー単独の場合と比べ、高危険度群捕捉力の有意な向上を示し（ $P=0.006$ ）、その有効性が示された。

英文

1) Multicenter prospective cohort study to identify high-risk group for primary gastric cancer using DNA methylation levels in normal-appearing gastric tissues in healthy people after *Helicobacter pylori* eradication

Periodic surveillance is recommended for explosively increasing healthy people after *Helicobacter pylori* (HP) eradication, and is becoming a burden for both individuals and health insurance systems. Therefore, in order to promote efficient secondary prevention of gastric cancer, establishment of risk stratification for HP-eradicated healthy people is highly needed. We have shown the deep involvement of aberrant DNA methylation in gastric carcinogenesis and a close correlation between the degree of aberrant DNA methylation in gastric mucosae and cancer risk. We conducted a multicenter prospective cohort study to predict the risk of metachronous gastric cancer in endoscopically treated gastric cancer patients, resulting in the achievement of the first POC of epigenetic cancer risk diagnosis.

In this study, aiming clinical application of epigenetic cancer risk diagnosis, we initiated a multicenter cohort study to predict the risk of primary gastric cancer in healthy individuals after HP eradication. A nation-wide research organization consisting of 66 institutions in Japan was established, and an online registration system has been launched since 2015. From June, 2015 to March, 2017, 1,141 healthy volunteers have been registered. Also, for clinical application, we developed novel epigenetic markers with intellectual property.

2) Multiomics risk diagnosis for esophageal cancer

In esophageal cancer, similar to gastric cancer, improvement of endoscopic treatment has increased importance of early detection. However, DNA methylation marker did not have a sufficient power for risk diagnosis. Therefore, to provide a better risk diagnosis, we need to

evaluate both genetic and epigenetic burdens, namely point mutations and aberrant DNA methylation, in human normal esophageal mucosae.

In this study, we developed a novel technology to quantify rare base substitution mutations at the 10^{-6} in DNA samples. Using normal-appearing esophageal mucosae collected from individuals without exposure to risk factors (low risk), those with exposure (intermediate risk), and esophageal squamous cell cancer patients (high risk), their mutation frequencies were analyzed using the new technology. We found that mutation burden clearly increased according to the risk levels in esophageal mucosae (AUC = 0.79). To assess impacts of mutation and methylation burdens upon traditional risk factors, a multivariate logistic regression analysis was conducted and showed that mutation burden is the strongest risk factor for esophageal squamous cell cancer. Combination of mutation and methylation burdens significantly improved the prediction of cancer risk in comparison with methylation burden solely, suggesting the usefulness of multiomics risk diagnosis.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 14 件）

1. Hattori N, Ushijima T. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications. *Genome Med.* 2016, 8, 10.
2. Nakazato H, Takeshima H, Kishino T, Kubo E, Hattori N, Nakajima T, Yamashita S, Igaki H, Tachimori Y, Kuniyoshi Y, Ushijima T. Early-stage induction of SWI/SNF mutations during esophageal squamous cell carcinogenesis. *PLoS One.* 2016, 11, e0147372.
3. Zong L, Hattori N, Yoda Y, Yamashita S, Takeshima H, Takahashi T, Maeda M, Katai H, Nanjo S, Ando T, Seto Y, Ushijima T. Establishment of a DNA methylation marker to evaluate cancer cell fraction in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2016, 19, 361-369.
4. Mori G, Nakajima T, Asada K, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Yokoi C, Fujishiro M, Gotoda T, Ichinose M, Ushijima T, Oda I. Incidence of and risk factors for metachronous gastric cancer after endoscopic resection and successful *Helicobacter pylori* eradication: results of a large-scale, multicenter cohort study in Japan. *Gastric Cancer.* 2016, 19, 911-918.
5. Yamamoto H, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Maehata T, Yasuda H, Itoh F. BARHL2 methylation using gastric wash DNA or gastric juice exosomal DNA is a useful marker for early detection of gastric cancer in an *H. pylori*-independent manner. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016, 7, e184.
6. Miyamoto S, Watanabe Y, Oikawa R, Ono S, Mabe K, Kudo T, Yamamoto H, Itoh F, Kato M, Sakamoto N. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes in clinical gastric wash samples. *Tumour Biol.* 2016, 37, 10123-10132.
7. Muhammad JS, Zaidi SF, Zhou Y, Sakurai H, Sugiyama T. Novel epidermal growth factor receptor pathway mediates release of human β -defensin 3 from *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Pathog Dis.* 2016, 74, ftv128.
8. Maeda M, Moro H, Ushijima T. Mechanisms for the induction of gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection: aberrant DNA methylation pathway. *Gastric Cancer.* 2017, 20, Suppl 1, 8-15.

9. Yoshida S, Yamashita S, Niwa T, Mori A, Ito S, Ichinose M, Ushijima T. Epigenetic inactivation of *FAT4* contributes to gastric field cancerization. *Gastric Cancer*. 2017, 20, 136-145.
10. Takeuchi C, Yamamichi N, Shimamoto T, Takahashi Y, Mitsushima T, Koike K. Gastric polyps diagnosed by double-contrast upper gastrointestinal barium X-ray radiography mostly arise from the *Helicobacter pylori*-negative stomach with low risk of gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer*. 2017, 20, 314-321.
11. Ohara K, Arai E, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Tsuta K, Kushima R, Tsuda H, Ojima H, Fujimoto H, Watanabe S, Katai H, Kinoshita T, Shibata T, Kohno T, Kanai Y. Genes involved in development and differentiation are commonly methylated in cancers derived from multiple organs: A single-institutional methylome analysis using 1007 tissue specimens. *Carcinogenesis*. 2017, 38, 241-251.
12. Mihara H, Suzuki N, Muhammad JS, Nanjo S, Ando T, Fujinami H, Kajiura S, Hosokawa A, Sugiyama T. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) silencing in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelium. *Helicobacter*. 2017, 22, e12361.
13. Muhammad JS, Nanjo S, Ando T, Yamashita S, Maekita T, Ushijima T, Tabuchi T, Sugiyama T. Autophagy impairment by *Helicobacter pylori*-induced methylation silencing of *MAP1LC3A1* promotes gastric carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2017, 140, 2272-2283.
14. 村上和成. *Helicobacter pylori* 除菌治療の現状と除菌治療後の諸問題. 日本内科学会雑誌. 2017, 106, 16-22.
15. Maeda M, Nakajima T, Oda I, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Asada K, Yokoi C, Ando T, Yoshida T, Nanjo S, Fujishiro M, Gotoda T, Ichinose M, Ushijima T. High impact of methylation accumulation on metachronous gastric cancer: 5-year follow-up of a multicentre prospective cohort study. *Gut*. online.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Precision cancer risk diagnosis by accumulation of epigenetic alterations, ポスター, Ushijima T, Asada K, Maeda M, Nakajima T, Shimazu T, Annual Meeting of AACR, 2016/4/20, 国外.
2. Induction of aberrant DNA methylation by *H. pylori* infection, and its clinical applications, 口頭, Ushijima T, Nanjing International Congress of Minimal Invasive Surgery (MIS) and Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) 2016, 2016/4/9, 国外.
3. ゲノムワイドDNAメチル化解析(Infinium)のためのWebツールの開発, ポスター, 飯田直子, 第10回日本エピジェネティクス研究会年会, 2016/5/20, 国内.
4. Precision epigenetic risk diagnosis after mass eradication of *H. pylori*, 口頭, Ushijima T, 2nd ARO-Japan and NRPB-Taiwan Workshop, 2016/5/28, 国外.
5. Assessment of methylation and mutation burdens provides precision cancer risk diagnosis, 口頭, Ushijima T, The 35th Sapporo International Cancer Symposium, 2016/6/24, 国内.
6. Assessment of methylation and mutation burdens provides precision cancer risk diagnosis, 口頭, Ushijima T, Yamashita S, 26th Seoul International Cancer Symposium, 2016/6/17, 国外.
7. Assessment of methylation and mutation burdens provides precision cancer risk diagnosis, 口頭, 牛島俊和, 第4回がんと代謝研究会 in 鹿児島, 2016/7/8, 国内.

8. Precision gastric cancer risk diagnosis accumulation of epigenetic alterations, 口頭, Ushijima T, SGCC 9th Annual Scientific Meeting, 2016/7/20, 国外.
9. Methylation burden in normal-appearing tissues: mechanisms for its accumulation and application to precision cancer risk diagnosis, 口頭, Ushijima T, BLUEPRINT/IHEC Conference, 2016/9/7, 国外.
10. 慢性炎症によるエピゲノム異常誘発の分子機構, 口頭, 牛島俊和, 竹島秀幸, 2016/9/26, 国内.
11. Assessment of methylation and mutation burdens provides precision cancer risk diagnosis, 口頭, Ushijima T, The 11th Asian Epigenomics Meeting 2016, 2016/9/30, 国外.
12. エピゲノム異常の蓄積を用いた高精度エピジェネティック発がんリスクマーカー, ポスター, 前田将宏, 山下聡, 竹島秀幸, 中島健, 島津太一, 茂呂浩史, 牛島俊和, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
13. Methylation burden in normal-appearing tissues: mechanisms for its accumulation and application to precision cancer risk diagnosis, 口頭, Ushijima T, The Fifth International Cancer Epigenetics Meeting, 2016/10/22, 国外.
14. Novel technology to measure mutation burden in normal tissue DNA predicts cancer risk, 口頭, Ushijima T, Seoul National University Cancer Hospital (SNUCH) 2nd Precision Medicine Conference, 2016/11/11, 国外.
15. Web ツール Macon: Illumina DNA methylation beadchip を用いた DNA メチル化解析 Web ツールの開発, ポスター, 飯田直子, 第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ, 2016/11/29, 国内.
16. Web ツール Macon: Illumina DNA methylation array を用いた DNA メチル化解析 Web ツールの開発, ポスター, 飯田直子, 山下聡, 前田将宏, 牛島俊和, 2016/12/1, 国内.
17. Genomics and Epigenomics of Gastric Cancer, 口頭, 牛島俊和, 第 89 回日本胃癌学会総会, 2017/3/10, 国内.
18. エピジェネティックマーカーによる異時性胃癌のリスク診断: 多施設共同前向き研究 5 年時解析, 口頭, 茂呂浩史, 浅田潔, 前田将宏, 中島健, 島津太一, 牛島俊和, 第 89 回日本胃癌学会総会, 2017/3/9, 国内.
19. 早期胃がんの分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性, ポスター, 及川律子, 山本博幸, 渡邊嘉行, 森田亮, 吉田良仁, 前畑忠輝, 安田宏, 伊東文生, 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会, 2016/4/15, 国内.
20. 胃洗浄廃液を用いたピロリ菌複数種の混在比検討, ポスター, 渡邊嘉行, 及川律子, 山本博幸, 伊東文生, 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会, 2016/4/15, 国内.
21. Detection of DNA methylation of gastric juice-derived exosomes is useful for early detection of gastric cancer, ポスター, Yamamoto H, Yoshida Y, Morita R, Oikawa R, Maehata T, Watanabe Y, Yasuda H, Itoh F, DDW2016, 2016/5/20, 国外.
22. 内視鏡胃洗浄廃液あるいは胃液エクソソーム DNA を用いた BARHL2 遺伝子メチル化は胃癌診断の有用なマーカーである, 口頭, 山本博幸, 渡邊嘉行, 及川律子, 森田亮, 吉田良仁, 松尾康正, 小澤俊一郎, 佐藤義典, 前畑忠輝, 谷口博昭, 能正勝彦, 安田宏, 伊東文生, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
23. “胃全体の情報を網羅した”次世代の胃癌バイオマーカーの開発と応用, 口頭, 山本博幸, 渡邊嘉行, 伊東文生, 第 58 回日本消化器病学会大会, 2016/11/5, 国内.
24. Genes involved in development and differentiation are commonly methylated in cancers derived from multiple organs: A single-institutional methylome analysis using 1007 tissue

specimens, ポスター, Ohara K, Arai E, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Tsuta K, Kushima R, Tsuda H, Ojima H, Fujimoto H, Watanabe S, Katai H, Kinoshita T, Shibata T, Kohno T, Kanai Y, American Association of Cancer Research Annual Meeting 2017, 2017/4/5, 国外.

25. 次世代シーケンサーを用いた *H.pylori* 除菌後胃癌の網羅的遺伝子解析による除菌後胃癌危険因子の検討, 口頭, 兒玉雅明, 沖本忠義, 村上和成, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016/4/21, 国内.
26. Evaluation of gastric cancer risk by serum markers, 口頭, Ito M, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K, The 22nd annual meeting of the Japanese Society for *Helicobacter* Research, 2016/6/25, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 胃がんから身をまもるには, 古田隆久, 浜松アクトシティー, 2016/11/12, 国内.

(4) 特許出願