

学位論文

口腔癌の発生と進展に対する  
ヒストンのアセチル化と DNA のメチル化の役割に関する研究

学位申請者

小野 重弘

広島大学歯学部顎口腔医療学講座（口腔外科学第二）

（主任：石川武憲 教授）

2001 年度

本論文の内容の一部は、以下の雑誌に投稿された。

Shigehiro ONO, Naohide OUE, Hiroki KUNIYASU, Tetsuo SUZUKI, Reiko ITO,  
Keisuke MATSUSAKI, Takenori ISHIKAWA, Eiichi TAHARA, Wataru YASUI

Acetylated histone H4 is reduced in human gastric adenomas and carcinomas. *J  
Exp Clin Cancer Res.*, 2001, in press

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始懇切なるご指導と御校閲を賜った広島大学歯学部顎口腔医療学講座（口腔外科学第二）石川武憲教授に深甚なる謝意を表すとともに、貴重なる御助言、御校閲を賜った本学基礎口腔医学講座（口腔生化学）加藤幸夫教授と本学顎口腔医療学講座（口腔病理学）高田 隆教授に深謝致します。

さらに本研究の遂行および論文の作成にあたり、ご指導、御助言を賜りました広島大学医学部田原榮一名誉教授、広島大学医学部病理学第一講座安井 弥教授、横崎 宏助教授、奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学国安弘基教授に謹んでお礼を申し上げます。また、多大なご支援をいただきました本学顎口腔医療学講座（口腔外科学第二）の杉山 勝助教授、同講座の諸先生方に感謝致します。

最後に、陰ながら私を支えてくれた家族に心から感謝します。

本論文の要旨の一部は、以下の学会で発表した。

第 89 回 日本病理学会総会 1999 年 4 月 6 日-8 日, 東京

第 58 回 日本癌学会総会 1999 年 9 月 29 日-10 月 1 日, 広島市

第 90 回 日本病理学会総会 2000 年 4 月 5 日-7 日, 大阪市

第 59 回 日本癌学会総会 2000 年 10 月 4 日-6 日, 横浜市

第 48 回 国際歯科学研究学会(IADR)日本部会(JADR)総会 2000 年 12  
月 2 日-3 日, 松戸市

第 60 回 日本癌学会総会 2001 年 9 月 26 日-28 日, 横浜市

第 46 回 日本口腔外科学会総会 2001 年 10 月 25 日-26 日, 鹿児島  
市

## 目 次

I.	緒 言.....	1
II.	実験材料と方法	
	1. 材 料.....	4
	2. 方 法.....	6
	1) 免疫組織化学的検索法	
	2) Western blot 法	
	3) 細胞培養法	
	4) RT-PCR 法	
	5) DNA 抽出と MSP (Methylation specific PCR)法	
	6) 5-aza-2'-deoxycytidine 処理	
	7) 統計処理	
III.	実験結果.....	10
	1. アセチル化ヒストン H4 の免疫組織化学的検索結果	
	1) 口腔癌	
	2) 胃癌 (Western blot 法の結果を含む)	
	3) 大腸癌	
	2. MGMT の役割に関する検索結果	
	1) 細胞株における RT-PCR 法と Western blot 法による検索結果	
	2) 細胞株における MGMT のメチル化に関する結果	
	3) OSCC における MGMT のメチル化に関する結果	
	4) MGMT のメチル化と臨床病理学的事項との相関性	
IV.	考 察.....	27
	1. 口腔癌, 胃癌および大腸癌におけるヒストンのアセチル化状態の意義	
	2. 頭頸部癌由来細胞株における MGMT 発現とプロモーター領域のメチル化	
	3. 口腔扁平上皮癌組織における MGMT のメチル化の意義	
	4. ヒストンのアセチル化と DNA のメチル化を標的とした化学療法の可能性	
V.	結 論.....	36
VI.	文 献.....	37

## I. 緒 言

癌の発生や進展には、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が多段階的に蓄積することが重要である。APC や p53 などの癌抑制遺伝子が、遺伝子の発現を正または負に調節するマスター遺伝子であることが明らかになり、遺伝子発現の調節異常は発癌に重要な役割を果たすと考えられている。近年、この遺伝子発現調節機構の異常の原因として、ヒストンのアセチル化や DNA のメチル化のようなエピジェネティックな変化が注目されている。

ヒト DNA はクロマチンと呼ばれる高次構造に折りたたまれ、遺伝子発現が制御されている。クロマチン構造の最小単位であるヌクレオソーム構造はヒストン H2A, H2B, H3, H4 の各 2 分子ずつが集合して、構成されるコアヒストン 8 量体からなり、その周囲を 146bp の DNA が左巻に 1.75 回転巻いている<sup>1), 2)</sup>。このヌクレオソーム構造による転写抑制を活性化するためには、転写活性化因子が DNA に結合し、整然と配列していたヌクレオソーム構造が部分的に排除されるなどの変化を受ける必要がある<sup>3)</sup>。その一つにヒストンのアセチル化が挙げられる<sup>4)</sup>。ヒストンのアセチル化は、CBP (CREB binding protein) や p300 のようなヒストンアセチルトランスフェラーゼ (Histone acetyltransferase: HAT) 活性を持つ転写コアクチベーター<sup>5)-7)</sup> とヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase: HDAC)<sup>8)-14)</sup> によりアセチル化・脱アセチル化が生じるとされている。ヒストンのアセ

チル化レベルはそのバランスにより調節され、さらに遺伝子発現を調節していると考えられる。最近、ヒストンのアセチル化を標的とした薬剤の研究が盛んに行われるようになり、我々の研究グループでも HDAC 阻害剤である Trichostatin A (TSA) が新規の抗癌剤となる可能性を報告した<sup>15)</sup>。しかし、癌におけるヒストンのアセチル化の状態に関する報告はほとんどない。

一方、遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化が、癌抑制遺伝子不活化の機構として注目されている<sup>16)</sup>。DNA の CpG 部位の約 70% はメチル化を受けており、生理的条件下では、X 染色体の不活化やインプリンティングなどに関与していることが知られている<sup>16)</sup>。通常、遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドにおいては、正常組織ではメチル化を受けない<sup>17)</sup>。しかし、癌では異常メチル化がみられ、癌抑制遺伝子の不活化に関係すると考えられている。これらは、遺伝子の変異や欠失と並んで、遺伝子の発現を抑制することにより発癌に関与する。Von Hippel-Lindau 病の原因遺伝子 VHL は腎臓癌において高頻度に変異しているが、Herman らは遺伝子変異やアレルの欠失がないにもかかわらず、VHL タンパク質の発現を認めない腫瘍の解析を行ったところ、VHL 遺伝子のプロモーター領域が高度にメチル化されていることを発見した。しかも、脱メチル化薬剤の処理で VHL 遺伝子のメチル化が解除されて再発現することも確認された<sup>18)</sup>。これは、DNA メチル化が直接的に癌抑制遺伝子の不活性化に関与していることを証明したことになる。さらに、

肺癌と脳腫瘍の癌抑制遺伝子 p16<sup>19)</sup>, 乳癌と前立腺癌の E-カドヘリンの遺伝子のプロモーターのメチル化の報告<sup>20)</sup>を契機として, その頻度に差はあるものの, 種々の癌抑制遺伝子がメチル化によって不活性化されている報告がなされている。

最近, DNA のメチル化解析は癌治療の示標として脚光を浴びている。47 症例のグリオーマにおいて, DNA 修復に働く O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチル基転移酵素 (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase: MGMT) の遺伝子プロモーターのメチル化の有無とアルキル化抗癌剤 carmustine の感受性の関連性が検索された。メチル化の認められなかった 28 例では抗癌剤の効果があった例は 1 人 (4%) であったのに対し, メチル化を認めた 19 例では 12 人 (64%) で効果があり, その生存率もメチル化を示した被験群で有意に高い結果が得られた<sup>21)</sup>。一方で, 口腔腫瘍における MGMT のメチル化についての検討は十分ではない。

本研究では, 口腔扁平上皮癌, 胃癌および大腸癌の発生, 浸潤, 転移におけるヒストンのアセチル化状態について検討を行った。また, 頭頸部癌由来細胞株における癌抑制遺伝子 MGMT 発現とメチル化の役割や意義に関して検討し, さらに口腔扁平上皮癌の発生, 浸潤, 転移における MGMT のメチル化の状態について検討した。



## II. 実験材料と方法

### 1. 実験材料

口腔扁平上皮癌(OSCC), 胃癌および大腸癌におけるアセチル化ヒストン H4 の発現状況を検索するとともに, その発現と臨床病理学的事項との関係を検討するため, 広島大学歯学部附属病院, 広島大学医学部附属病院およびその関連病院で手術時や生検時に得られた組織を用い, 免疫組織化学的検索を行った. 対照となる正常扁平上皮における発現は, 標本内に含まれる正常粘膜上皮を用いて検索した. 各症例の内訳は図 1 に示す通りである. また, 胃癌に関しては, さらに手術的に得られた新鮮凍結材料 18 例 (癌部, 非癌部) からタンパクを抽出し, Western blot 法を行い, アセチル化ヒストン H4 の発現を検討した.

また, OSCC における MGMT の役割を検討するため, Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)より分与された口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC3, HSC4, KB および当科で樹立した唾液腺腺様嚢胞癌由来細胞株 KSA を用いた. さらに, 癌組織での MGMT の役割を検討するために, 手術時に得られた OSCC 組織の新鮮材料 22 例とこれらの対照となる非癌部組織 3 例, および健常人の歯肉組織 1 例を用いた.

図1 免疫組織化学的検索に用いた組織

分類	口腔粘膜	胃粘膜	大腸粘膜
正常粘膜組織	39	65	90
前癌病変 (白板症/腺腫)	19	13	17
癌組織	37	57	85

(例数)

## 2. 方 法

1) 免疫組織化学的検索法； 免疫組織化学的検索は、4.5 $\mu$ 厚切片のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、酵素抗体法で行った<sup>22)</sup>。すなわち、組織切片を脱パラフィンし、pH6.0リン酸緩衝液に浸漬し、5分間のマイクロウェーブ処理を3回行った。次いで、0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノール溶液に浸漬し、内因性のペルオキシダーゼを除去した後、1/100に希釈した一次抗体を1時間反応させ、続いて二次抗体を1時間反応させた。さらに、DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride)で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。一次抗体には、Anti-acetylated histone H4 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)を用い、また二次抗体としては Peroxidase-coupled goat anti-rabbit antibody (MBL, Nagoya, Japan)を使用した。

2) Western blot 法； 細胞株と新鮮凍結材料から、lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 7.4), 125mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 5mM EDTA, 0.1M NaF, 10 $\mu$ g/ml leupeptin (Sigma Chemical Co.), 0.1 $\mu$ g/ml trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.), 50 $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (WAKO Biochemicals, Osaka, Japan)]により抽出したタンパクの濃度を BSA (Bovine Serum Albumin)を規準として Bradford protein assay (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)によって測定し、50 $\mu$ g量のタンパクを10% SDS-polyacrylamide gelに泳動し、その後、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキングは5%ミルク含有 PBS buffer (137mM NaCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.68mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)で行い、

一次抗体を作用させた後に、二次抗体によって各一時間処理した。ECL Western blotting detection system (Amasham, UK)を用いて X 線フィルム上で感光し、アセチル化ヒストン H4 および MGMT(O<sup>6</sup>-methylguanine DNA-methyltransferase)の発現変化を検索した。一次抗体には Anti-acetylated histone H4 (Santa Cruz Biotechnology)または Anti- MGMT (NeoMarkers, CA, USA) を用い、また、二次抗体としては、Peroxidase-coupled goat anti-rabbit/mouse antibody (MBL)を使用した。

3) 細胞培養法； 頭頸部癌から得られた培養細胞 4 株（扁平上皮癌 3 株，唾液腺腺様嚢胞癌 1 株）を仔牛血清を 10%含有するように調整した RPMI1640 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 培養液にペニシリン (Meijiseika K. K., Tokyo, Japan; 100U/ml) ，ストレプトマイシン (Meijiseika K. K.; 0.05mg/ml) を添加したものを培養液として用い、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

4) RT-PCR 法； MGMT mRNA の発現を検索するために、RNeasy Mini Kit (QUIAGEN, Germany)を用いて、各種細胞から total RNA を抽出した。この total RNA 1 $\mu$ l を鋳型として、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia-LKB, Sweden)を用いて cDNA を合成した。次いで、合成した cDNA の 5 $\mu$ g に MGMT のプライマー\*を加えて Programmable thermal Controller (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)で PCR 反応を行った。増幅された PCR 産物を 1.5%寒天ゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下

で検出した。なお、PCR 法の条件は Esteller<sup>23)</sup>らの方法に準じた。

\*Upper primer: 5'-GCC GGC TCT TCA CCA TCC CG-3'

Lower primer: 5'-GCT GCA GAC CAC TCT GTG GCA CG-3'

5) **MSP (Methylation specific PCR)法**<sup>24)</sup> ; 各種細胞および凍結新鮮材料から, genomic DNA purification kit (Promega K. K., Tokyo, Japan)によって DNA を抽出した。次いで, 抽出した DNA 2 $\mu$ g に混合液 (10mM hydroquinone; 30ml +3M sodium bisulfite; 520ml: pH5) を加え, 24時間, 50 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。さらに, Wizard PCR Preps DNA purification System (Promega)で精製した。次いで, 処理した 50ng の DNA にプライマーを加え, PCR を行った。プライマー\*\*と PCR の条件は, OUE<sup>25)</sup>らの方法に準じた。

\*\*Unmethylated type

Upper primer: 5'-TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3'

Lower primer: 5'-AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A-3'

Methylated type

Upper primer: 5'-TTT CGA CGT TCG TCG TAG GTT TTC GC-3'

Lower primer: 5'-GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G-3'

6) **5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza)処理** ; 10cm dish で培養中の各細胞株を 1mM の 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma Chemical Co.)で 5日間処理した。

7) **統計処理** ; 各群の相関性を検討するため Mann-Whitney 検定法, Kruskal-Wallis 検定法または Spearman's rank correlation

coefficient 検定法を用いた.

### III. 実 験 結 果

#### 1. アセチル化ヒストン H4 の免疫組織化学的検索結果

1) 口腔癌； 正常口腔扁平上皮では、扁平上皮と結合組織中のリンパ球などのすべての細胞にアセチル化ヒストン H4 が検出された (図 2A) . 口腔白板症では、正常粘膜と同程度にアセチル化ヒストン H4 が強く発現し (図 2B) , 一部の口腔白板症では、アセチル化ヒストン H4 の発現が減弱していた (図 2C) . 高分化型 OSCC (図 2D) と低分化型 OSCC (図 2E) では、結合組織中のリンパ球と比較してアセチル化ヒストン H4 の発現は著明な減弱を示した. 上記の免疫組織化学的検索結果を臨床病理学的に検討した (図 3) . 判定基準は、一検討視野で 30%以上の上皮細胞に免疫活性が低下を示した場合、高度減弱 (markedly reduced), 5~30%を軽度減弱 (reduced), 5%以下を正常範囲内 (preserved)と規定し、10 視野での平均値を比較検討した. この結果、口腔癌組織では 37 例中 24 例 (65%) でアセチル化ヒストン H4 が発現の低下を示した. 一方、癌組織の分化度、ステージ別進行度および転移有無により分類し、アセチル化ヒストン H4 の発現の相関関係を検討したが一定の傾向はみられなかった. 前癌病変とされている白板症では 19 例中 12 例 (63%) がアセチル化ヒストン H4 の発現を保持していたが、19 例中 7 例 (37%) では、アセチル化ヒストン H4 の発現レベルが低下を示した.

2) 胃癌； Western blot 法により，癌部組織と非癌部組織でアセチル化ヒストン H4 タンパクの発現を検討し（図 4），検索した 18 例中 13 例（72%）の症例では非癌部のその発現が保持されていたのに対し，癌化部で発現の低下がみられた。

OSCC と同様な免疫組織化学的検索を行った胃の正常粘膜は，腺窩上皮から固有胃腺，間質のリンパ球などの全細胞でアセチル化ヒストン H4 が検出された（図 5A）。胃癌の前癌性病変である胃腺腫では，アセチル化ヒストン H4 の発現が保持されている例（図 5B）や減弱している例（図 5C）を認めた。胃癌組織では OSCC と同様に，間質のリンパ球は正常粘膜のリンパ球と同様に，アセチル化ヒストン H4 の発現レベルは高かったが，癌細胞の核には発現の減弱がみられた（図 5D, E）。胃癌の発生母地である腸上皮化生では，一部アセチル化ヒストン H4 の減弱を認めた（図 5F）。さらに上記の結果を臨床病理学的に解析を行い（図 6），胃癌では 72% の例でアセチル化ヒストン H4 の発現は低下し，特に 26% の例で著明な発現の低下を認めた。また，アセチル化ヒストン H4 の発現低下と深部への浸潤（ $p=0.0072$ ），ステージの進行（ $p=0.0240$ ）およびリンパ節転移の有無（ $p=0.0006$ ）には有意な相関性を認めた。一方，正常粘膜のすべては，アセチル化ヒストン H4 の高発現を示し，前癌性病変と考えられる腺腫でも，54% は高発現を示したが，約 40% の例では，発現の減弱がみられた。



3) 大腸癌；大腸の正常粘膜では，胃と同様，すべての細胞にアセチル化ヒストン H4 の高発現を示した (図 7A)．腺腫では，高発現例 (図 7B)，一部に減弱した例 (図 7C) があった．大腸癌では，結合組織中のリンパ球と比較して発現の減弱した例が認められた (図 7D, E, F)．さらに，これらの結果を，臨床病理学的に解析し (図 8) 正常粘膜の全細胞でアセチル化ヒストン H4 は高発現したが，腺腫では 30%，癌では 80%の例にその発現が減弱していた．また，アセチル化ヒストン H4 の発現の減弱は，ステージの進行 ( $p=0.00098$ )，深部への浸潤 ( $p=0.00526$ ) と有意な相関性を示した．

## 2. MGMT の役割に関する検討

1) 細胞株における **RT-PCR** 法と **Western blot** 法による結果  
HSC3, HSC4, KB 株では MGMT mRNA の発現を示したが, KSA 株では発現は認められなかった. 同じ細胞株で Western blot 法により MGMT タンパクの発現をみると, KSA 株では MGMT タンパクの発現が認められなかった (図 9).

### 2) 細胞株における MGMT のメチル化に関する結果

MSP 法により, プロモーター領域のメチル化の有無を検索した結果, KSA ではメチル化を示すバンドが認められた. mRNA, タンパクレベルで発現の認められた KB 株では, 非メチル化を示すバンドのみが認められた (図 10A). さらに, 脱メチル化剤である 5-aza で KSA 株を 5 日間処理すると, MGMT の mRNA の発現が誘導された (図 10B).

### 3) OSCC における MGMT のメチル化に関する結果

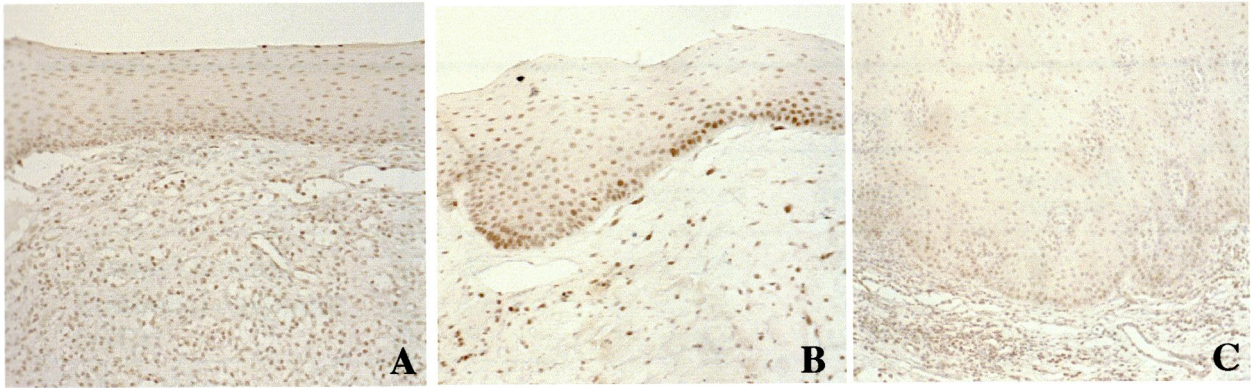
手術時に得られた口腔扁平上皮癌組織の新鮮材料 22 例とその対照となる非癌部組織 3 例, および健常人の歯肉組織 1 例を MSP 法で検索した. N0 は健常人の歯肉組織, N5, N9, N20 は, 対応する症例番号の非癌部組織であるが, メチル化のバンドは認められず, 非メチル化のバンドのみが検出された (図 11A). 一方, 癌組織では白

抜き文字で示すごとく検索した 22 例中 11 例 (50%) の例にメチル化のバンドが認められた (図 11B) .

#### 4) MGMT のメチル化と臨床病理学的事項との相関性

MGMT のプロモーター領域のメチル化の有無と臨床病理学的事項との相関関係は, ステージの進行度と明らかな相関性は示さなかった (図 12A) . さらに, リンパ節転移との相関を検討すると, 0.0019 の危険率をもって, 有意な相関性を認めた (図 12B) .

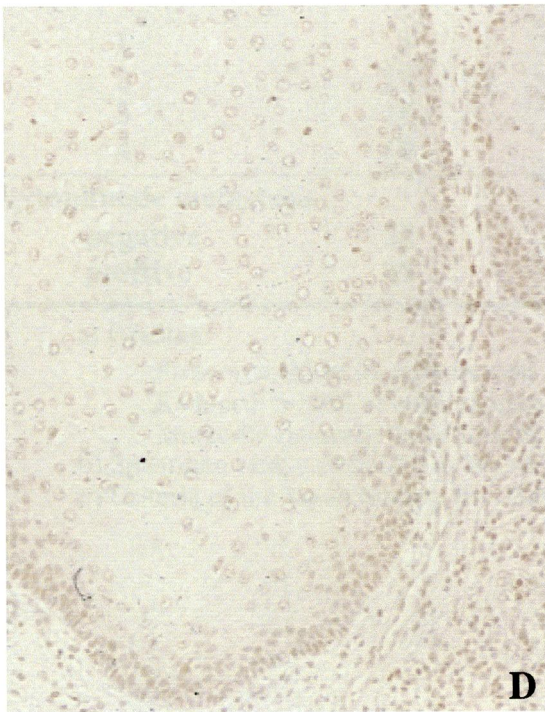
図2 正常口腔粘膜、白板症およびSCCにおける  
アセチル化ヒストンH4の発現様相



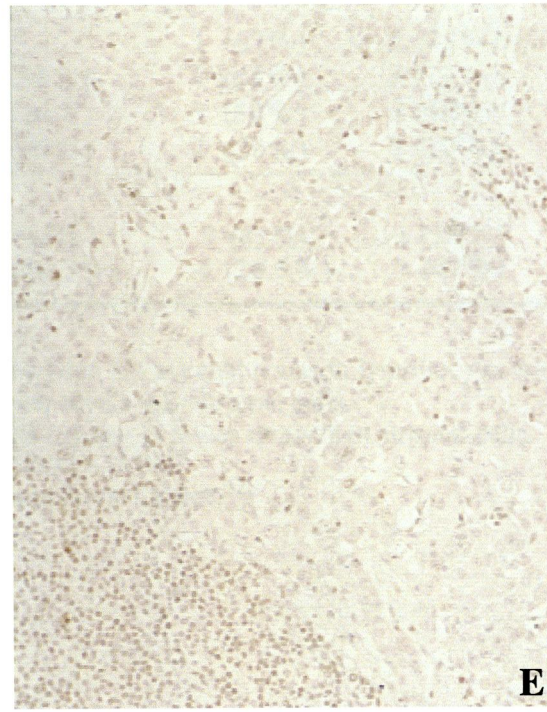
A: 正常組織では全細胞に  
高発現がみられる。

B: 正常組織と同様、全細胞  
に高発現のみられた白板症

C: 間質のリンパ球と比較  
して発現の減弱を認めた  
白板症



D: 発現の減弱のみられた  
高分化型SCC



E: 間質のリンパ球と比較して著明な  
発現減弱のみられた低分化型SCC

図3 口腔癌におけるアセチル化ヒストンH4の発現様式と  
臨床病理学的事項との関係

Classification	Cases	Expression of acetyl-H4 <sup>a)</sup>			p value <sup>b)</sup>
		preserved	reduced	markedly reduced	
Normal mucosa	39	39 (100%)	0	0	< 0.001
Epithelial dysplasia	19	12 (63%)	7 (37%)	0	
OSCC	37	13 (35%)	13 (35%)	11 (30%)	
<b>Histology</b>					0.554
well-diff.	26	8 (40%)	9 (38%)	9 (23%)	
poorly-diff.	11	5 (18%)	4 (47%)	2 (35%)	
<b>Stage<sup>c)</sup></b>					0.080
1	3	0	1 (67%)	2 (33%)	
2	14	5 (36%)	6 (43%)	3 (21%)	
3	10	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	
4	10	7 (70%)	2 (20%)	1 (10%)	
<b>Lymphnode metastasis</b>					0.1769
negative	22	9 (41%)	9 (41%)	4 (18%)	
positive	15	4 (26.5%)	4 (26.5%)	7 (47%)	

a) Grading:

Preserved; Most of cells express acetylated H4 at equal levels to lymphocytes and fibroblasts.

Reduced; 5-30% of cells express lower levels than stromal cells.

Markedly reduced; Over 30% of cells express at lower levels than stromal cells.

b) Spearman rank correlation or Mann-Whitney's U test.

c) Criteria of the Japan Society for Head and Neck Cancer.<sup>52)</sup>

図4 胃癌と正常胃粘膜におけるアセチル化ヒストン H4 の発現 (Western blot法)

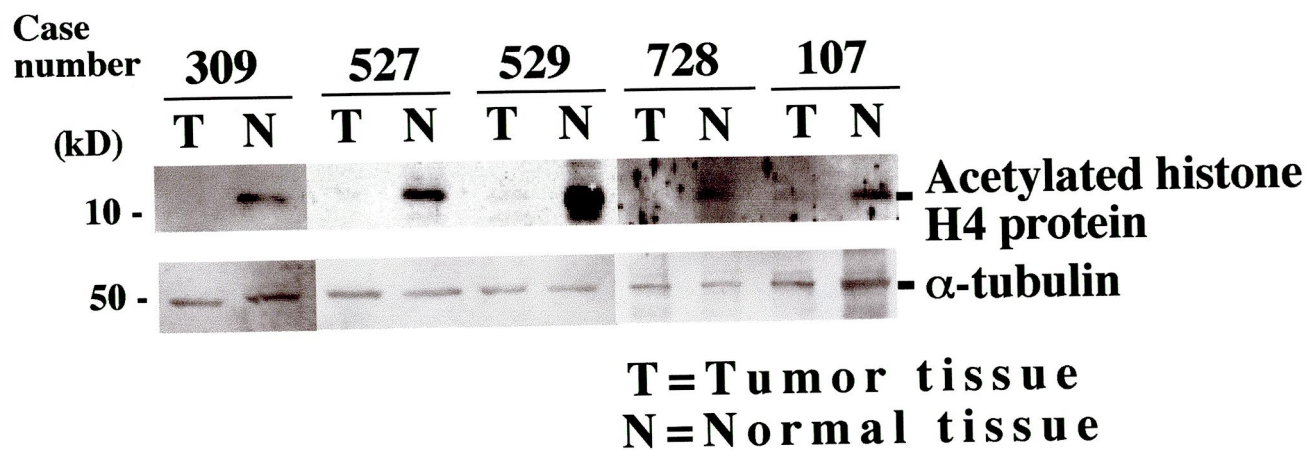
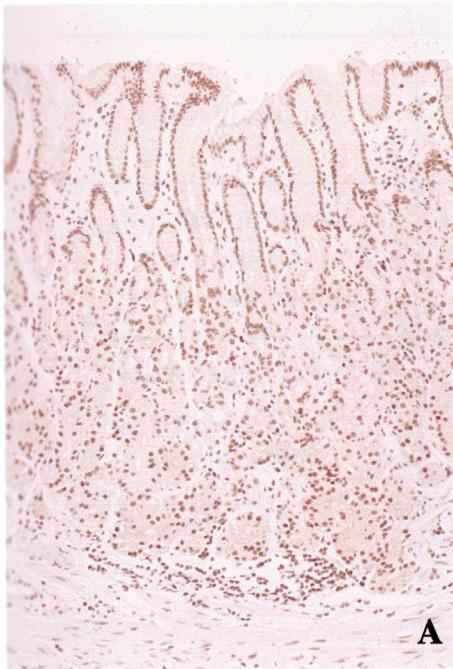
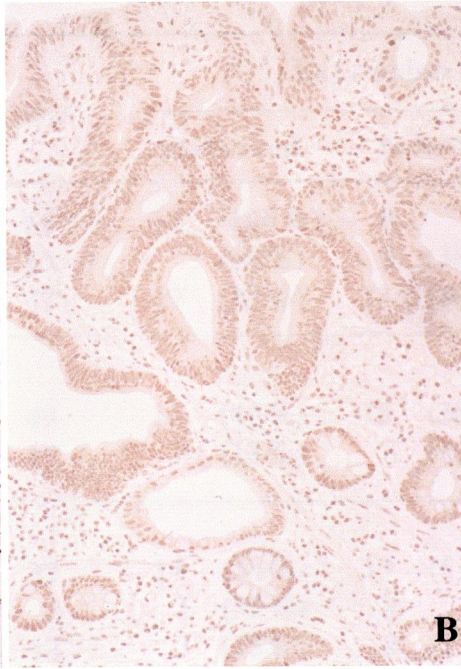


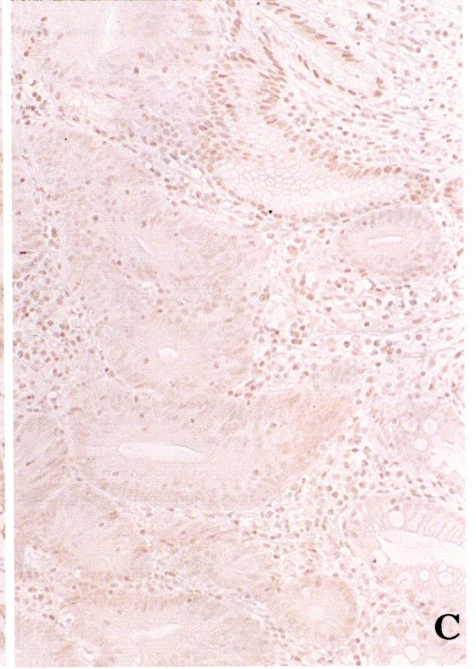
図5 正常胃粘膜、胃腺腫、胃癌および腸上皮化生におけるアセチル化ヒストンH4の発現様相



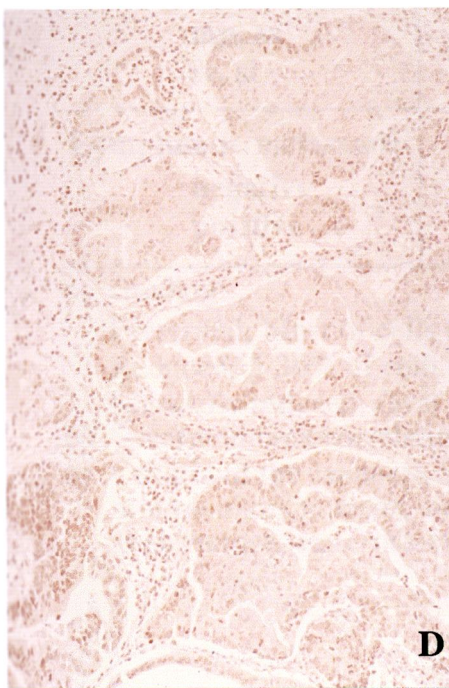
A: 正常組織では全細胞に高発現がみられる。



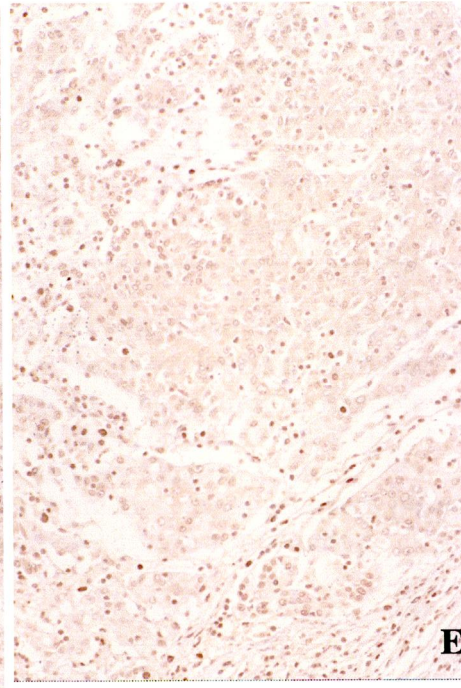
B: 正常組織と同様、全細胞に高発現のみられた腺腫



C: 間質のリンパ球と比較して発現の減弱を認めた腺腫



D: 発現の減弱のみられた高分化型腺癌



E: 間質のリンパ球と比較して著明な発現減弱のみられた低分化型腺癌



F: 一部に発現減弱がみられた癌近傍の腸上皮化生

図6 胃癌におけるアセチル化ヒストンH4の発現様式と臨床病理学的事項との関係

Classification	Cases	Expression of Act-H4 <sup>a)</sup>			p value <sup>b)</sup>
		preserved	reduced	markedly reduced	
Normal mucosa	65	65 (100%)	0	0	< 0.0001
Adenoma	13	7 (54%)	5 (38%)	1 (8%)	
Adenocarcinoma	57	19 (33%)	23 (40%)	15 (26%)	
<b>Histology</b>					0.2465
well-diff.	40	16 (40%)	15 (38%)	9 (23%)	
poorly-diff.	17	3 (18%)	8 (47%)	6 (35%)	
<b>Stage<sup>c)</sup></b>					0.0240
1	37	14 (38%)	19 (51%)	4 (11%)	
2	2	1 (50%)	0	1 (50%)	
3	12	3 (25%)	2 (17%)	7 (58%)	
4	6	1 (17%)	2 (33%)	3 (50%)	
<b>Depth of invasion<sup>c)</sup></b>					0.0072
m, sm	34	14 (41%)	17 (50%)	3 (9%)	
mp, ss	8	1 (13%)	3 (38%)	4 (50%)	
se, si	15	4 (27%)	3 (20%)	8 (53%)	
<b>Lymphnode metastasis</b>					0.0006
negative	38	15 (39%)	19 (50%)	4 (11%)	
positive	19	4 (21%)	4 (21%)	11 (58%)	

a) Grading:

Preserved; Most of cells express acetylated H4 at equal levels to lymphocytes and fibroblasts.  
 Reduced; 5-30% of cells express lower levels than stromal cells.  
 Markedly reduced; Over 30% of cells express at lower levels than stromal cells.

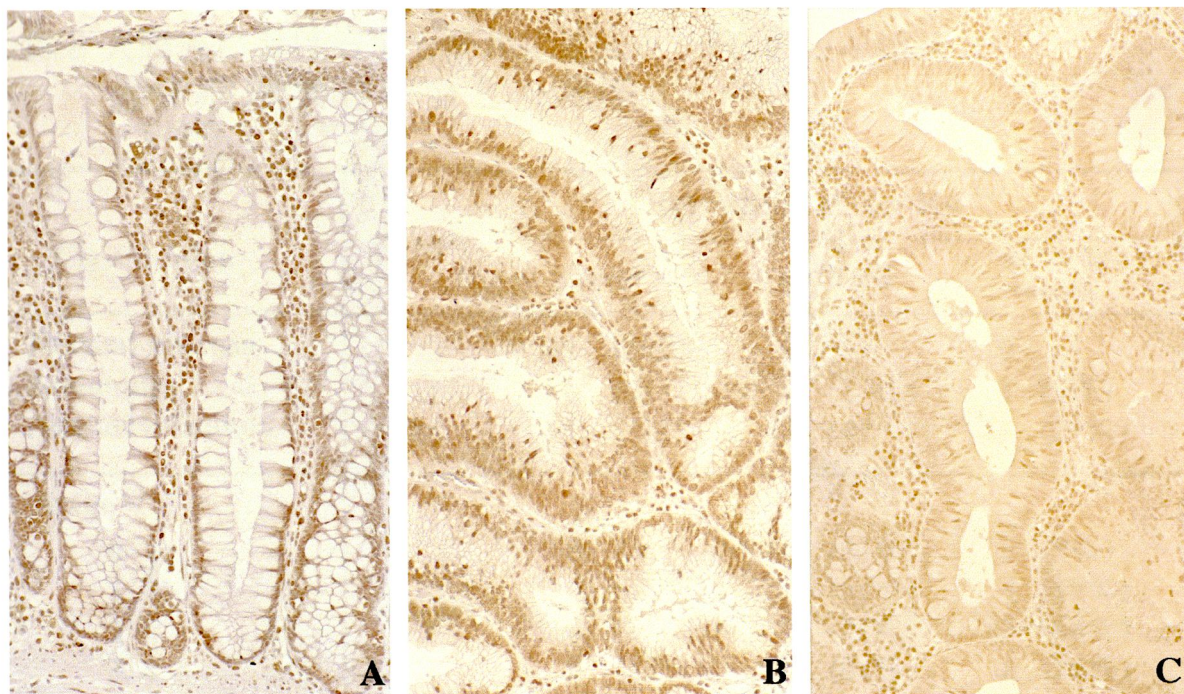
b) Spearman rank correlation or Mann-Whitney's U test.

c) Criteria of the Japanese Society for Gastric Cancer.<sup>53)</sup>

m:mascularis mucosa, sm:submucosa, mp:muscularis propria,  
 ss:subserosa, se:serosa-exposed, si:serosa infiltrating



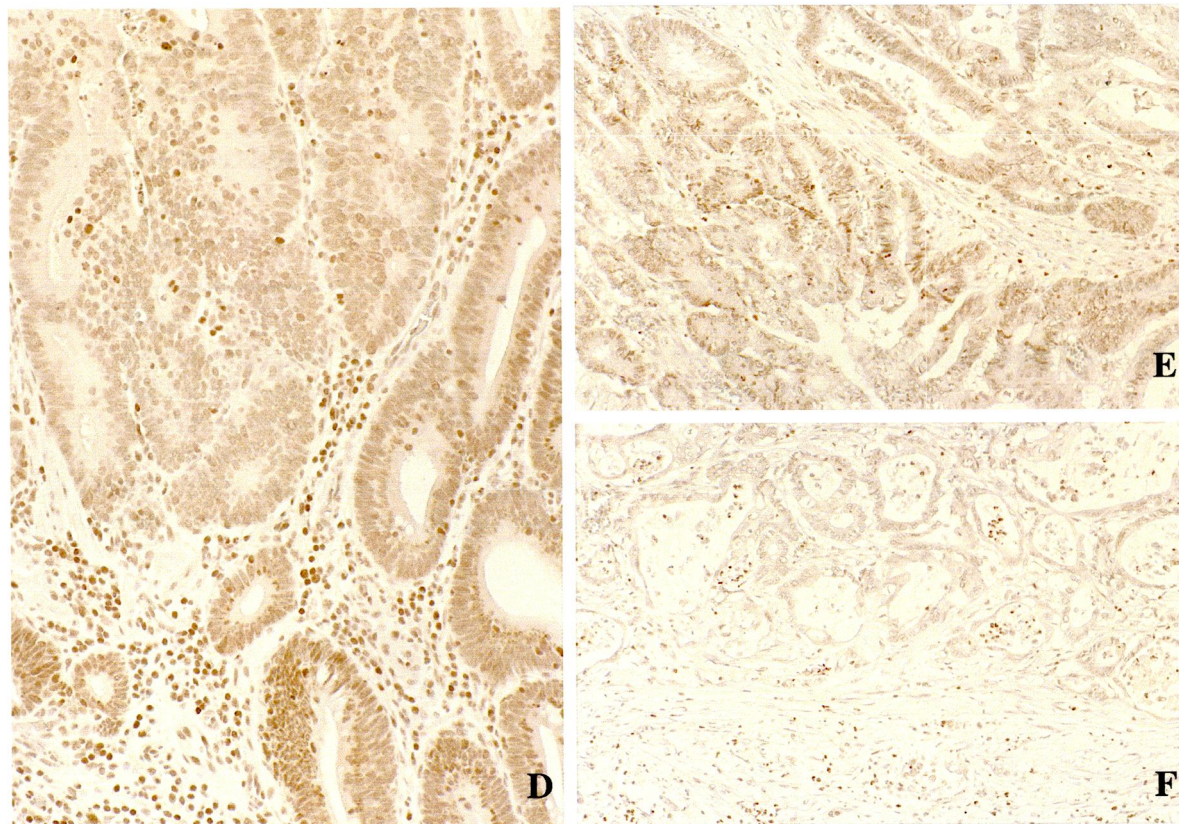
図7 正常大腸粘膜、腺腫および大腸癌におけるアセチル化ヒストンH4の発現様相



A: 正常組織では全細胞に高発現がみられる。

B: 正常組織と同様、全細胞に高発現のみられた腺腫

C: 間質のリンパ球と比較して発現の減弱を認めた腺腫



D, E, F: 間質のリンパ球と比較して著明な発現減弱のみられた腺癌

図8 大腸癌におけるアセチル化ヒストンH4の発現様式と臨床病理学的事項との関係

Classification	Cases	Expression of Act-H4 <sup>a)</sup>			p value <sup>b)</sup>
		preserved	reduced	markedly reduced	
Normal mucosa	90	90 (100%)	0	0	< 0.0001
Adenoma	17	12 (71%)	4 (24%)	1 (6%)	
Adenocarcinoma	85	18 (21%)	42 (49%)	25 (29%)	
Stage <sup>c)</sup>					0.00098
0	22	8 (36%)	12 (55%)	2 (9%)	0.00526
1	21	4 (19%)	13 (62%)	4 (19%)	
2	19	2 (11%)	4 (21%)	13 (68%)	
3, 4	23	3 (13%)	14 (61%)	6 (26%)	
Depth of invasion <sup>c)</sup>					0.32575
m	22	8 (36%)	12 (55%)	2 (9%)	0.32575
sm, mp	23	4 (17%)	15 (65%)	4 (17%)	
beyond mp	40	5 (13%)	16 (40%)	19 (48%)	
Lymphnode metastasis					0.32575
negative	64	15 (23%)	30 (47%)	19 (30%)	0.32575
positive	21	2 (9%)	13 (62%)	3 (29%)	

a) Grading:

Preserved; Most of cells express acetylated H4 at equal levels to lymphocytes and fibroblasts.

Reduced; 5-30% of cells express lower levels than stromal cells.

Markedly reduced; Over 30% of cells express at lower levels than stromal cells.

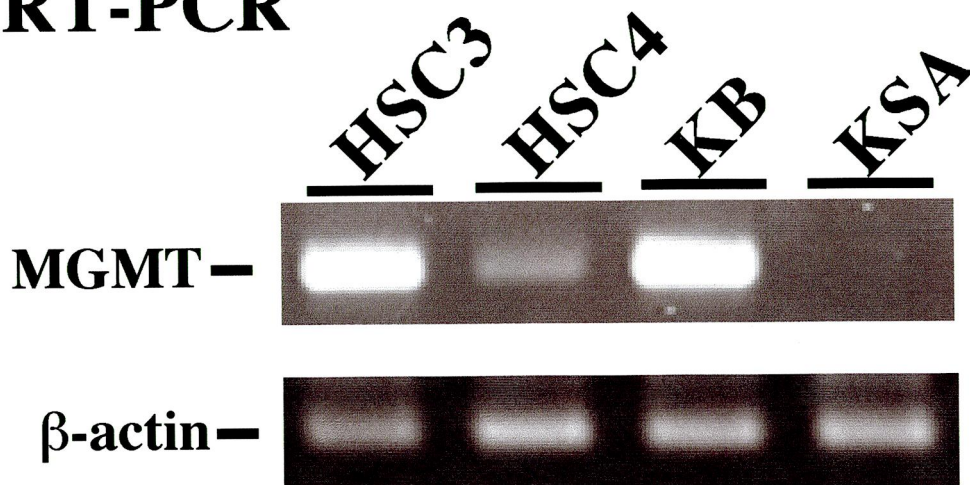
b) Spearman rank correlation or Mann-Whitney's U test.

c) Criteria of the Japanese Reserch Society for Cancer of Colon and Rectum. <sup>54)</sup>

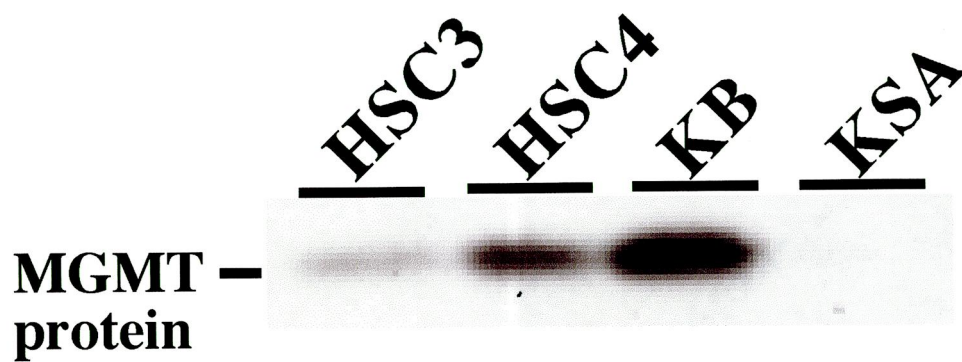
m:mascularis mucosa, sm:submucosa, mp:muscularis propria.

図9 頭頸部腫瘍由来細胞株におけるMGMT mRNAとタンパクの発現

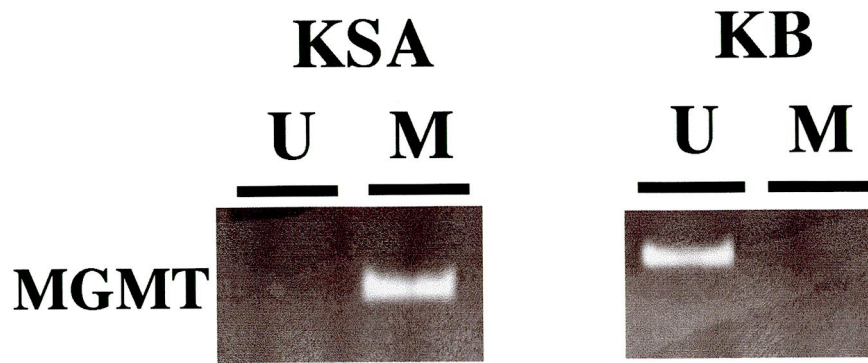
## RT-PCR



## Western blot



## A. Methylation specific PCR



U=unmethylated  
M=methylated

## B. 5-aza treatment+RT-PCR

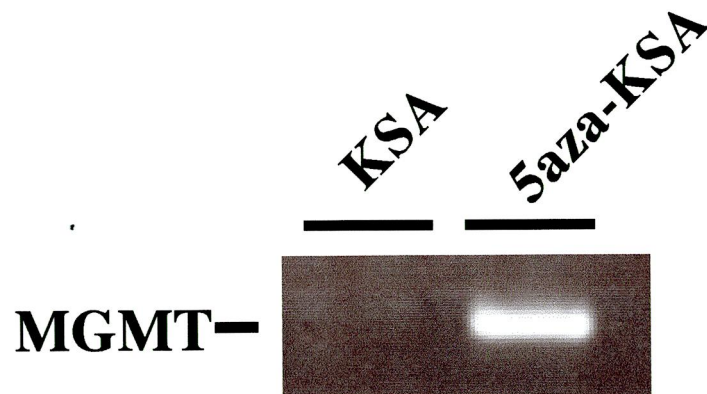
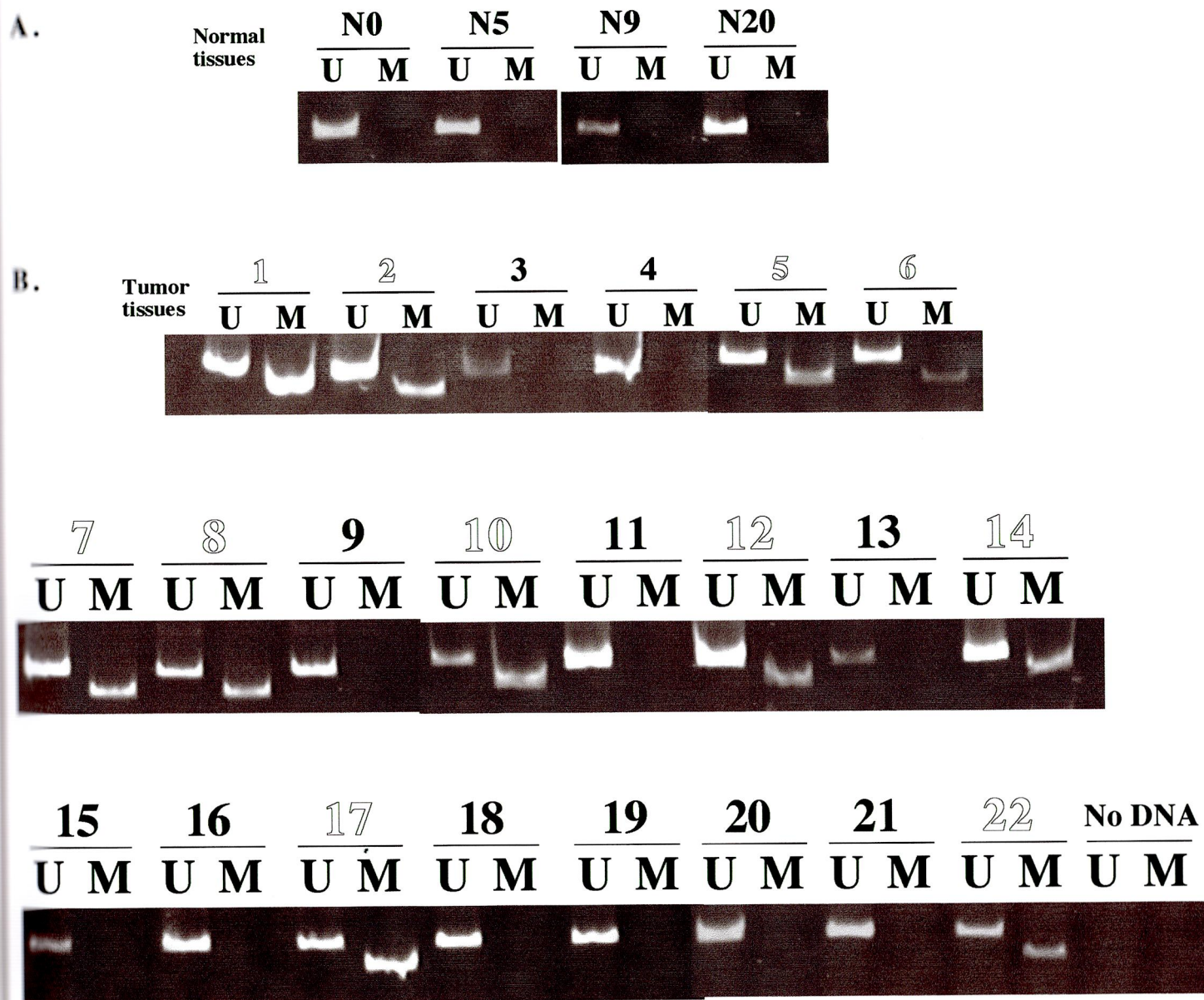


図11 正常口腔粘膜とOSCCにおけるMGMTのメチル化状態



U=unmethylated M=methylated

図12 OSCCにおけるMGMTのメチル化と臨床病理学的事項との関係

A.

Classification	Cases	MGMT promoter		p value*
		Unmethylated	Methylated	
<b>Stage</b>				<b>0.261</b>
1	3	0	3	
2	9	6	3	
3	4	2	2	
4	6	3	3	

\* Spearman rank correlation (<0.05)

B.

Classification	Cases	MGMT promoter		p value**
		Unmethylated	Methylated	
<b>Lymphnode metastasis</b>				<b>0.0019</b>
Negative	11	1	10	
Positive	11	9	2	

\*\* Mann-Whitney's U test

図13 各ヒストンのアセチル化部位

H2A N-SGRGⓀQGGKARAKAKTRSSR---

H2B N-PEPAⓀSAPAPKⓀGSⓀKAVTⓀAQKKGKGERK---

H3 N-ARTKQTARⓀSTGGⓀAPRⓀQLATⓀAARⓀSAP---

H4 N-SGRGⓀGGⓀGLGⓀGGAⓀRHRKVLRDNIQGIT---

転写活性化

ヒストン新生

\*ヌクレオソームコアの各ヒストンのN末端のアミノ酸配列を1文字表記で示す。  
白抜き文字がアセチル化されるリジンを表す。

#### IV. 考 察

##### 1. 口腔癌, 胃癌および大腸癌におけるヒストンのアセチル化状態の意義

ヒストンのアセチル化は HAT と HDAC のバランスにより調節されると考えられている。中谷らによって同定された HAT である PCAF (p300/CBP associated factor) が, アデノウイルスの癌遺伝子産物 E1A と, 他の HAT である p300/CBP との結合に競合し, 結果的に E1A と拮抗する作用をもつとの発見から, ヒストンのアセチル化と癌化の関係が注目されるようになった。すなわち, PCAF や p300/CBP には癌抑制作用のある可能性がある。また, ヒト遺伝病として知られ, 顔, 手足の形成異常と精神発達遅滞を特徴とする Rubinstein-Taybi 症候群 (RTS) には, 癌の発生率も高いことが知られている。この遺伝病は 16p13.3 に転座や欠失が認められる。この領域を調べると, CBP の欠損していることが明らかになった<sup>27)</sup>。すなわち, 正常な 2 コピーの CBP 遺伝子のうち, 一方が機能的に欠損すると RTS を発症する。さらに, 我々は, HDAC 阻害剤が新規の抗癌剤となりうる可能性を報告し, 併せて同剤がヒストンを高アセチル化へと誘導することを報告した<sup>15)</sup>。以上のように, ヒストンのアセチル化の異常が癌と密接に関連していることが推察される。しかし, HAT や HDAC の基質であるヒストンは癌化過程ではどのような状態にあるのかに関する報告はない。ヒストンは, 8 量体を形成して



いるが、各ヒストンの N 末端のアセチル化は、すべてのリジン残基で生じるのではなく、図 13 に示すように特定のリジン残基がアセチル化されることが判明し、そのうち、ヒストン H4 だけが、そのアセチル化の機能的意義が全て解明されている。ヒストン H4 の 8 番目と 16 番目のリジンが転写活性に、5 番目と 12 番目のリジンのアセチル化がヒストンの新生にそれぞれ関わっていることが報告されている<sup>28)</sup>。そこで本研究では、そのヒストン H4 のアセチル化状態について免疫組織化学的検討を行った。

口腔正常粘膜では、全細胞が高アセチル化状態にあると考えられたが、口腔扁平上皮癌では、65%の症例でアセチル化ヒストン H4 の発現の減弱、すなわちアセチル化レベルの低下を示した。さらに、前癌病変である白板症でも 37%の例でアセチル化レベルの低下を示した。これは、癌化の極めて早期からヒストンは低アセチル化状態となり、段階的にアセチル化レベルが低下していると推察される。ヒストンが低アセチル化状態にある場合、転写は抑制されているものと考えられている。しかし、今回のデータから推察すると低アセチル化状態にある癌細胞は、活発に分裂、増殖を続けることになる。これは、一見矛盾した現象のように思えるが、癌にとって不都合な遺伝子を不活化させ、好都合な遺伝子のみを選択し、発現させているのではないかと推測される。一方、OSCC の浸潤や転移には有意な相関は得られなかったが、Tou らは、同じ SCC である食道癌において、ヒストン H4 のアセチル化レベルの低下と癌の浸潤は相関性

を示すことを報告している（私書）。

胃癌でも同様の結果が得られた。正常粘膜では、間質のリンパ球を含めてすべての細胞が高アセチル化状態にあると考えられる。胃癌組織では、組織型に関係なく、72%の例でヒストンの低アセチル化状態を認めた。前癌性病変とされる胃腺腫でも46%の例にヒストンの低アセチル化を示した。また、胃癌の発生母地とされる腸上皮化生でも、一部ではあるがヒストン H4 のアセチル化レベルの低下が確認された。さらに、アセチル化レベルの低下は癌の進行、リンパ節転移にも相関していたことから、ヒストンのアセチル化レベルの低下は、胃癌の発生だけではなく、進展にも強く関与していることが推定される。このような変化は、大腸癌にも確認された。すなわち、大腸腺腫の30%、大腸癌の78%でヒストン H4 のアセチル化レベルが低下し、壁への深達度やステージの進行と有意な相関が認められた。このように、ヒストンのアセチル化レベルの低下は、胃癌・大腸癌で発癌の早期から転移に至るまで、継続的進行性に認められる変化であると考えられ、その意義は大きい。

口腔癌ではヒストンのアセチル化レベルの低下は発癌にのみ関与しているが、胃癌・大腸癌では、発癌と進展に関与していることに関しては、一つに組織特異性が考えられる。我々のグループでは、高分化型胃腺癌由来細胞株 MKN28 と胃腺扁平上皮癌由来細胞株 MKN1 を HDAC 阻害剤である TSA で処理し、マイクロアレイで様々な遺伝子の発現を検索した。MKN1 では、転移関連遺伝子 mn23 に

変化はみられなかったが、MKN28 では発現が誘導されてきた。このことから、癌の組織型により、ヒストンのアセチル化によって制御されている遺伝子に差異のあることが考えられる。

口腔・胃・大腸正常粘膜組織ではヒストン H4 は高アセチル化状態にあり、それぞれの癌組織では低アセチル化状態にあることから、ヒストンのアセチル化を指標とした遺伝子治療や化学療法が考えられる。HAT である p300/CBP や PCAF をウイルスベクターに組み込んで遺伝子導入すれば、ヒストンを高アセチル化状態にできる可能性がある。また、HDAC のアンチセンスを遺伝子導入すれば、高アセチル化にできる可能性がある。しかし、遺伝子治療を可能にするためには、HAT と HDAC のバランスを詳細に解明しなければならない。現在までに、HAT 活性をもつ遺伝子は 20 以上、HDAC は HDAC1 ~ 10<sup>29), 30)</sup>まで報告されており、これらが様々な遺伝子と極めて複雑な複合体を形成することが報告されている<sup>31), 32)</sup>。また、HAT と HDAC のバランスを司る上流の遺伝子に関する報告はほとんどない。これらの遺伝子や機能を解析しない限り、ヒストンのアセチル化を標的とした遺伝子治療は困難かもしれない。一方で、ヒストンのアセチル化を標的とした化学療法は非常に可能性が高い。我々が報告した TSA などの HDAC 阻害剤は抗腫瘍効果を有している。例えば TSA では、低酸素によって誘導される血管新生の抑制と腫瘍増大の抑制、あるいは、レチノイン酸やインターフェロンβに耐性の癌細胞株でのアポトーシス誘導のような抗腫瘍効果が報告されている<sup>33)</sup>。

これら HDAC 阻害剤は既存の抗癌剤とは作用機転が異なることから  
も、癌治療への応用が大いに期待される。

## 2. 頭頸部癌由来細胞株における MGMT 発現とプロモーター領域のメチル化

O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)は突然変異, 細胞の癌化, 細胞死の原因となる O<sup>6</sup>-methylguanine を修復する DNA 修復酵素をコードする遺伝子である<sup>34)-37)</sup>. 近年, 多くの癌関連遺伝子においてプロモーター領域に存在するシトシンの異常なメチル化と遺伝子発現との関連が示されてきている. MGMT は, そのプロモーター領域を含む 5' regulatory region 中に CpG アイランドを有し, これまでにそのメチル化と発現の関連性が示唆されている<sup>38)-40)</sup>. 今回, 検討した頭頸部癌由来細胞株 4 株のうち, KSA 株で, MGMT の mRNA やタンパクのレベルで発現の不活化を認めた. 不活化の原因は MSP の結果から, MGMT のプロモーター領域のメチル化によるものと考えられる. このことは, 脱メチル化剤である 5-aza で処理したところ, MGMT が再発現したことから明らかである. 今回検索した OSCC 由来細胞株では, メチル化による遺伝子の不活化はみられなかったが, Ho1N1, Ho1U1 でメチル化のあることが, 第 60 回日本癌学会総会で Nakagawachi らによって報告されている.

### 3. OSCC 組織における MGMT のメチル化の意義

癌組織における MGMT のメチル化は、これまで、胃癌で 31%<sup>25)</sup>、大腸癌では 38%<sup>23)</sup>あることが報告されている。本研究で検索した OSCC では 50%にメチル化が認められた。メチル化の異常は、エピジェネティックな変化であり、癌化の原因になるのか否かについては、長年議論されてきた。最近、メチル化の異常が起こるプロセスに関する解析が進み、前癌病変におけるメチル化の異常に関する解析がなされている。通常、CpG アイランドのメチル化は正常組織では認められない<sup>17)</sup>。本研究で検索した正常組織でも MGMT のメチル化は認められなかった。しかし、大腸癌の前癌病変である大腸腺腫に、p16<sup>INK4A</sup>、p14<sup>ARF</sup>、APC、MGMT、CACNA1G などの遺伝子にメチル化が報告されている<sup>21), 41)-44)</sup>。また、hMLH1 遺伝子のメチル化がマイクロサテライト不安定性の出現に先行することなどの現象から、メチル化の異常は癌化の初期変化であることが明らかとなった<sup>45)</sup>。以上のことを考察すると、MGMT のメチル化は、口腔粘膜の癌化に重要な役割を果たしていると考えられ、新しい腫瘍マーカーとしての可能性が強く考えられる。

MGMT のメチル化は、癌のステージの進行とは相関性を示さなかったが、転移とは有意な相関性を示した。これは、何らかの転移関連遺伝子がメチル化による MGMT の不活化のために修復されなかったためと考えられる。これまで、MGMT のメチル化により、K-ras 遺伝子の G から A への遺伝子変異が特異的に誘発されることが報告されている<sup>23)</sup>。このことから何らかの転移関連遺伝子に変異している可能性が考えられ、検討の余地が残されている。

前述したごとく、グリオーマでは、MGMT のメチル化が抗腫瘍剤アルキル化薬剤の感受性を左右する可能性がある。Suzuki ら<sup>46)</sup>は、14-3-3σのメチル化

が、アドリアマイシンのような、DNA に損傷を与えるタイプの抗腫瘍剤に対して感受性が高いことを報告している。以上の事実は、メチル化によって規定される腫瘍細胞の生物学的特性を指標とした治療法を選択しうる可能性を示唆している。

#### 4. ヒストンのアセチル化と DNA のメチル化を分子標的とした化学療法の可能性

近年, HDAC1 とメチル化 CpG 結合タンパク (MBD) 等のメチル化関連遺伝子が複合体を形成し, 遺伝子の不活化に大きく関与していることが報告されている<sup>47-49)</sup>. このことは, ヒストンのアセチル化と DNA のメチル化が相互に関連することを意味する. メチル化は, エピジェネティックな変化であり, 可逆的であるため, 5-aza などの脱メチル化剤の投与により, 癌抑制遺伝子の再発現が期待できる. しかし, 通常培養細胞に投与して遺伝子の再発現を誘導しうる 5-aza の濃度を臨床例に用いるには毒性が強く, 実際の癌患者の治療への応用は困難と考えられてきた. Cameron<sup>50)</sup>らは, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を脱メチル化剤と組み合わせることにより, 低濃度でもメチル化した遺伝子の再活性化を誘導しうることを示した. 現在, 毒性の強い TSA 以外に, SAHA, MS-275 などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が開発されており<sup>51)</sup>, 今後ヒストンのアセチル化と DNA のメチル化を分子標的とした新しい癌治療法の開発が期待される.



## V. 結 論

以上の検索によって、次の結果が得られた。

1. 正常口腔粘膜では、全細胞が高アセチル化状態であったが、OSCC では、65%の例でアセチル化ヒストン H4 の発現の減弱、すなわちアセチル化レベルの低下を示した。さらに、前癌病変である白板症でも 37%の例でアセチル化レベルの低下を示した。これは、癌化の極めて早期からヒストンは低アセチル化状態となり、発癌に関与している可能性が示唆された。

2. 正常胃粘膜では、間質のリンパ球を含めてすべての細胞が高アセチル化状態にあると考えられた。胃癌組織では、組織型に関係なく、72%の例でヒストンの低アセチル化状態を認めた。前癌病変とされる胃腺腫でも 46%の例にヒストンの低アセチル化を認めた。また、胃癌の発生母地とされる腸上皮化生でも、一部ではあるがヒストン H4 のアセチル化レベルの低下が確認された。さらに、アセチル化レベルの低下は癌の進行、リンパ節転移にも有意に相関していたことから、ヒストンのアセチル化レベルの低下は、胃癌の発生だけではなく、進展にも強く関与していることが推定された。このような変化は、大腸癌にも確認された。すなわち、大腸腺腫の 30%、大腸癌の 78%でヒストン H4 のアセチル化レベルが低下し、壁深達度やステージの進行と有意な相関が認められた。このように、ヒストンのアセチル化レベルの低下は、胃癌・大腸癌で発癌の早期から転移に至るまで、継続的進行性に認められる変化であると考えられた。

3. DNA 修復遺伝子 MGMT は、KSA 株において、プロモーター領域のメチ

ル化により、mRNA とタンパクレベルで発現が抑制されていた。また、脱メチル化剤（5-aza-2'-deoxycytidine）でその細胞を処理すると、MGMT mRNAの発現が誘導されたことから、MGMT 遺伝子は、プロモーター領域のメチル化により、発現が抑制されていると推定された。

4. OSCC 組織では、検索した 22 例中 11 例（50%）の例で、MGMT のメチル化がみられた、正常口腔粘膜では、メチル化を認めなかったことから、MGMT のメチル化は、OSCC の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、MGMT のメチル化は、リンパ節転移との有意な相関を示し、転移にも関連があることが推定された。

以上の結果、ヒストンのアセチル化レベルの低下が口腔癌の発生および胃癌や大腸癌の発生と進展に関与し、MGMT のメチル化が発癌や転移に関与していることを明らかにした。今後、ヒストンのアセチル化や MGMT のメチル化を分子標的とした化学療法や遺伝子治療の可能性が示唆され、また、これらを示標とした遺伝子診断に基づく医療、すなわちオーダーメイド医療への応用の可能性が強く推測された。

## VI. 文 献

1. Wolffe AP: Chromatin :structure and function, 2nd (Academic Press, San Diego), 1998.
2. Ito T, Tyler JK, Kadonaga JT: Chromatin assembly factors: a dual function in nucleosome formation and mobilization? *Genes. Cells.* 2 (10): 593-600,1997.
3. Verreault A: De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* 14 (12): 1430-1438, 2000.
4. Morales V, Richard-Foy H: Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7230-7237, 2000.
5. Kamei Y, Xu L, Heinzel T et al.: A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 85: 403-414, 1996.
6. Bannister AJ, Kouzarides T: The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature.* 384: 641-643, 1996.
7. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V et al.: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* 87: 953-959, 1996.
8. Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN et al.: Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell.* 89: 341-347, 1997.
9. Laherty CD, Yang WM, Sun JM et al.: Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell.* 89: 349-356, 1997.
10. Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H et al.: Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell.* 89: 357-364, 1997.
11. Kadosh D, Struhl K: Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5121-5127, 1998.
12. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D et al.: Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 89: 373-380, 1997.
13. Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM et al.: A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature.* 387: 43-48, 1997.
14. Alland L, Muhle R, Hou H Jr. et al.: Role for N-CoR and histone deacetylase in

- Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*. 387: 49-55, 1997.
15. Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H et al.: Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*. 88: 992-997, 2000.
  16. Ng HH, Bird A: DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.*9(2):158-163, 1999.
  17. Macleod D, Ali RR, Bird A: An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-Abeta gene: implications for the origin of CpG islands. *Mol. Cell. Biol.* 18(8):4433-4443, 1998.
  18. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, et al.: Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91(21): 9700-9704, 1994.
  19. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D.: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.*, 1(7):686-692, 1995.
  20. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. : E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.*, 55(22):5195-5199, 1995.
  21. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.*, 343(19):1350-1354, 2000.
  22. Kuniyasu H, Yasui W, Shinohara H, et al.: Induction of angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *Am. J. Pathol.*, 157(5):1523-1535, 2000.
  23. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 60(9):2368-2371, 2000.
  24. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(18):9821-9826, 1996.

25. Oue N, Shigeishi H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Kuraoka K, Ito R, Yasui W: Promoter hypermethylation of MGMT is associated with protein loss in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer.* 93(6):805-809, 2001.
26. Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y: A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382(6589):319-324, 1996.
27. Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, et al.: Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature.* 376(6538):348-351, 1995 .
28. Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403(6765):41-45, 2000.
29. Zhou X, Marks PA, Rifkind RA, Richon VM: Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*: 98(19):10572-10577. 2001.
30. Kao HY, Lee CH, Komarov A, Han CC, Evans RM: Isolation and Characterization of Mammalian HDAC10, a Novel Histone Deacetylase. *J. Biol. Chem.* 277(1):187-193, 2002.
31. Chen H, Tini M, Evans RM: HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(2):218-224, 2001.
32. Nakatani Y: Histone acetylases--versatile players. *Genes Cells.* 6(2):79-86, 2001.
33. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, et al.: Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med.* 7(4):437-443, 2001.
34. Lawley PD, Shah SA: Methylation of ribonucleic acid by the carcinogens dimethyl sulphate, N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Comparisons of chemical analyses at the nucleoside and base levels. *Biochem. J.* 128(1):117-132, 1972.
35. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC: Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 51:167-223, 1995.
36. Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S: Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(2):686-690, 1990.

37. Sakumi K, Shiraishi A, Shimizu S, Tsuzuki T, Ishikawa T, Sekiguchi M. Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Res.* 57(12):2415-2418, 1997.
38. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 59(4):793-797, 1999.
39. Herfarth KK, Brent TP, Danam RP, Remack JS, Kodner IJ, Wells SA Jr, Goodfellow PJ: A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol. Carcinog.* 24(2):90-98, 1999.
40. Pieper RO, Patel S, Ting SA, Futscher BW, Costello JF. Methylation of CpG island transcription factor binding sites is unnecessary for aberrant silencing of the human MGMT gene. *J. Biol. Chem.* 271(23):13916-13924, 1996.
41. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP: Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res.* 59(18):4535-4451, 1999.
42. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(2):710-715, 2000.
43. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 60(1):129-133, 2000.
44. Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* 60(16):4366-4371, 2000.
45. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 20(3):329-335, 2001.
46. Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res.* 60(16):4353-4357, 2000.

47. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* 25(3):269-277, 2000.
48. Tatematsu KI, Yamazaki T, Ishikawa F. MBD2-MBD3 complex binds to hemimethylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells.* 5(8):677-688, 2000.
49. Magdinier F, Wolffe AP. Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(9):4990-4995, 2001.
50. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.* 21(1):103-107, 1999.
51. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 92(15):1210-1216, 2000.
52. Japan Society for Head and Neck Cancer: General rules for clinical and pathological studies on head and neck cancer, 2nd edition. Tokyo, Kanehara, 1991.
53. Japanese Society for Gastric Cancer: General Rules for Gastric Cancer, 1st English edition. Tokyo, Kanehara, 1995.
54. Japanese Reserch Society for Cancer of Colon and Rectum: General Rules for clinical and pathological studies on Cancer of Colon, Rectum and Anus, 6th edition. Tokyo, Kanehara, 1998.