

表 題 ゲノム全域の DNA 異常低メチル化は染色体不安定性を介して  
膵癌の浸潤能を増加させ潜在性転移及び予後を予測する

論 文 の 区 分 博士論文

著 者 名 遠藤 裕平

担当指導教員氏名 力山 敏樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
総合医学 分野  
外科系総合医学

2022年1月7日申請の学位論文

## 目次

はじめに	P 3-5
研究対象と方法	P 6-14
結果	P 15-31
考察	P 32-36
結論	P 37
謝辞	P 38
参考文献	P 39-45

## はじめに

膵癌は、進行が早く予後不良な癌種であり、患者の 70%以上が診断時には主要血管に浸潤する局所進行、または転移を有する状態で発見される(1)。外科的切除が唯一の治癒可能な治療法であるが、術前の画像検査では小さな腹膜播種結節や肝転移巣の有無を正確に評価するのは困難であり(2-4)、根治手術を企図して開腹した患者のうち一定の割合(20~40%)で、術中はじめてみつかった遠隔転移(潜在性転移: occult distant metastasis)や、局所進行が原因で切除不能と判断される(2, 5-8)。潜在性転移がある場合、手術による生存期間延長は望めないため、結果的に不必要な開腹手術となり、ひいては術後合併症や創傷治癒までの期間を要するために、化学療法といった必要な治療導入を遅らせ、予後の悪化をもたらす(5, 9, 10)。したがって、不必要な開腹を避け、予後の改善を図るために、潜在性転移を有する可能性が高い膵癌患者を特定し、これらの患者に適切な治療を適時に提供することが重要である。

エピジェネティック異常は、癌の発生と進行に関連する、ヒトの癌種で頻繁に認められる分子的特徴である(11, 12)。主要なエピジェネティック異常の一つが DNA メチル化であり、これは DNA 配列中のシトシン環第 5 位の炭素にメチル基が付加されることを指す。プロモーター領域の CpG アイランドの DNA 高

メチル化異常は、癌抑制遺伝子の転写抑制につながり多段階発癌に関与している。一方、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化は、通常はメチル化されている DNA 反復配列が脱メチル化されることで生じる、もう一つのエピジェネティック異常である。DNA 反復配列は、ヒトゲノムに広く分布しており、DNA 異常低メチル化の理想的なターゲットである。これらの配列は、卵巣癌や肝細胞癌の腫瘍進行に関与すると報告されている(13, 14)。LINE-1 (Long interspersed nucleotide element-1) は、ヒトゲノム中に存在する反復配列からなるレトロトランスポゾンの一類である。LINE-1 は、ヒトゲノムの約 17%を占め(15-18)、LINE-1 のメチル化レベルは、ゲノム全体の DNA メチル化レベルと相関することが知られている(18-21)。LINE-1 の異常低メチル化は、複数の癌種において予後不良との関連が報告されている(21, 22)。

染色体不安定性 (CIN: chromosomal instability) は、腫瘍進展の主要な促進因子であり、癌の特徴ともされる。CIN は有糸分裂時の染色体分離における継続的なエラーに起因する(23, 24)。マウスモデルを用いた実験では、複数の癌種においてゲノム全域の DNA 異常低メチル化が CIN を引き起こすことが示されている(11, 25)。また、CIN の進行は、腫瘍の転移と関係することも報告されている(26, 27)。LINE-1 の異常低メチル化は、消化管間質性腫瘍の CIN と有意に関連することが報告されている(28)。実際、我々は以前にゲノム全域の DNA 異

常低メチルおよび DNA のコピー数変化との関連が、結腸および胃癌の予後不良と関連していることを報告している(29, 30)。さらに、レトロウイルス発現ベクターによって反復配列の転写産物を過剰発現させると、特定の染色体でコピー数が増加することも示した(31)。これらのデータは、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体の安定性の維持に影響を与えることによって、がんの表現型をより侵襲的なものにすることを示唆している。しかしながら、CINに関連した膵癌の生物学的挙動に対するゲノム全域の DNA 異常低メチル化の影響を明らかにしようとした研究は今までにない。

本研究は、ヒト膵癌細胞においてゲノム全域の DNA 異常低メチル化が CIN を介して浸潤能を増加させることを明らかにし、さらに、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、潜在性転移や予後といった膵癌の生物学的挙動と関連することをはじめて明らかにした。

## 研究対象と方法

### 細胞株と細胞培養

ヒト膵癌細胞株である PANC-1 および Capan-1 (ATCC, Manassas, VA, USA) を用いて検討した。PANC-1 は RPMI1640 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) に 10% 牛胎児血清 (FBS ;GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) を添加した細胞培養液、Capan-1 は IMDM (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) に 20% FBS を添加した細胞培養液で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養を行った。継代は 0.25% トリプシン/EDTA 溶液を用いて行った。

### 臨床検体

2010 年 9 月から 2017 年 7 月までの間に自治医科大学附属さいたま医療センターで膵癌に対して手術を施行した症例のうち、遺伝子解析研究の同意が得られた 49 例を臨床検体の対象症例とした。いずれも術前検査において遠隔転移が認められず、根治手術を企図された症例で、術前化学療法施行例は含まれていない。これらの原発切除検体、または、潜在性転移症例では転移巣検体を用いて解析を行った。各々の症例の臨床データは診療録より抽出した。術前因子として性別、年齢、血清 CEA 値、血清 CA19-9 値、血清 DUPA-2 値、腫瘍部位、腫瘍径、

臨床ステージ（UICC：Union for International Cancer Control 7th edition (32)による分類）、術中因子として潜在性転移の有無、また、手術日からの生存期間（OS：overall survival）を解析した。本研究は自治医科大学遺伝子解析倫理委員会において承諾を得た（承認番号：第遺 21-変 09）。本研究において使用した検体を提供する全ての患者に対して、研究内容について書面および口頭で説明を行い、研究に関する同意を書面で得た。

### **膵癌細胞株の 5-Aza-dC 処理**

DNA異常低メチル化誘導剤（脱メチル化剤）である5-aza-2'-deoxycytidine（5-Aza-dC）をWako Pure Chemical Industries（Osaka, Japan）から入手した。PBSで1 mMに溶解希釈して-20℃で分割保存し、使用直前に解凍、細胞培養液で希釈し濃度調整した。膵癌細胞播種24時間後に、異なる濃度、期間での5-Aza-dCを含む細胞培養液での培養を開始した。培地は24時間ごとに交換した。5-Aza-dC非投与群をコントロールとした。

### **MTT 細胞生存アッセイ**

PANC-1およびCapan-1細胞を96ウェルプレートに、1ウェルあたり5000細胞ずつ播種した。播種から24時間後、細胞を0.1、1、5、10、20  $\mu$ Mの5-Aza-dCを含

む細胞培養液で培養した。培地は24時間ごとに交換し、5-Aza-dC投与開始から1〜7日後まで、24時間ごとに解析を行った。細胞生存率は、MTTアッセイキット（TOX-1 ; Sigma-Aldrich, USA）を用いてメーカープロトコールに従い、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）を測定することにより行った。測定するウェルにMTT試薬を加えた後、細胞を37°Cで4時間インキュベートし、MTT solubilizing bufferを加え攪拌した後、マイクロプレートリーダー（Varioskan LUX multimode reader; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA）で570 nmの吸光度を測定した。570nmの測定値から690nmのバックグラウンド吸光度を差し引き、コントロールに対する細胞生存率を算出した。実験は、各条件につき3回実施した。

### **DNA 抽出と Bisulfite 変換**

1  $\mu$ M の 5-Aza-dc で 3 日間処理した PANC-1、Capan-1 細胞及び非処理細胞（コントロール）からは EZ1 Advanced XL（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて、臨床検体からは QIAamp DNA FFPE Tissue Kit（Qiagen）を用いて、メーカープロトコールに従いゲノム DNA を抽出した。Nano-Drop ND-1000 spectrophotometer（NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA）を用いて、DNA 調製サンプルの吸光度 A260/A280 比を測定し、DNA の品質および収量を評価した。



A260/A280 比が 1.8 以上の DNA サンプルのみ以降の実験に使用した。

EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA のバイサルファイト変換を行った。100 ng の DNA を、メーカープロトコールに従い処理した。バイサルファイト処理でメチル化されていないシトシンがウラシルに変換され、その後の PCR 中にチミジンに変換される。このプロセスにより、メチル化 DNA と非メチル化 DNA との間で配列の相違が現れることになる。

### **MethyLight 法を用いた DNA メチル化レベルの定量**

以前我々が報告したように、バイサルファイト変換したゲノム DNA を用いて、MethyLight 法にて DNA メチル化レベルを評価した(20, 31, 33)。メチル化レベル測定の標的配列である LINE-1 の非メチル化配列（バイサルファイト変換後）に結合するプライマーセットとプローブ、内因性コントロール配列である Alu-C に結合するプライマーセットとプローブをそれぞれ用いた。プライマーおよびプローブの詳細は表 1 に記す。

表 1. MethyLight 法に用いたプライマーと TaqMan プローブ

Target	Sequence (5'-3')
Alu-C	Forward: GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTGTAAATTTAGTA
	Reverse: ATTAATAAATAATCTTAACTCCTAACCTCA
	Probe: FAM-CCTACCTTAACCTCCC-MGB
LINE-1	Forward: TTTATTAGGGAGTGTTAGATAGTGGGTG
	Reverse: CCTTACACTTCCCAAATAAAACAATACC
	Probe: FAM-CACCCTACTTCAACTCATAACAATAACACACACCC-MGB

Human Genomic DNA (Promega, Madison, USA) から、全ゲノム増幅法により完全に脱メチル化された DNA を作成し、相対的脱メチル化レベル (RDL: relative demethylation level) を求めるためのコントロール DNA として用いた。ゲノム全域の DNA 異常低メチル化レベルを表す LINE-1 RDL は以前に報告したものと同様に以下のように定義した(31, 33)。

$$\text{LINE-1 RDL} = \frac{\frac{\text{サンプル DNA}}{\text{Alu-C reaction}}}{\frac{\text{コントロール DNA}}{\text{Alu-C reaction}}} \times \frac{\text{LINE-1 reaction}}{\text{LINE-1 reaction}}$$

各 MethyLight 反応には 1  $\mu$ L のバイサルファイト変換 DNA 液を使用した。

PCR は Premix Ex Taq (Takara Bio, Inc., Otsu, Japan)、各プライマー 600 nM、およびプローブ 200 nM を含有する 20  $\mu$ L の反応容量で、QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)で行った。反応条件は 95°C 10 秒の後、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 50 サイクルとした。

### アレイ CGH 解析

アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH: comparative genomic hybridization) 解析は SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit 8 x 60 K (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いて行った。メーカープロトコール (Protocol v8.0) に従って、SureTag DNA Labeling kit および Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization kit (いずれも Agilent Technologies Inc.) を用いて標識およびハイブリダイゼーション反応を行った。実験手順は以下の通りである。1  $\mu$ M、3 日間 5-Aza-dc 処理した PANC-1 及び Capan-1 培養細胞から抽出された 0.2  $\mu$ g の DNA および等量のコントロール DNA を、Alu I および Rsa I の制限酵素で 37°C、2 時間処理した。ランダムプライミングを用いて DNA 標識、さらに Cy5-dUTP および Cy3-dUTP で対象 DNA およびコントロール DNA をそれぞれ標識した。

Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore, Billerica,

MA, USA) を用いて標識生成物を精製し、9.5  $\mu$ L に濃縮した。濃縮後、各サンプルの標識色素取り込み率および DNA 収量を NanoDrop ND-1000 分光光度計を用いて確認した。両者とも、プロトコールに規定された基準値以上のサンプルのみ、ハイブリダイゼーション緩衝液に溶解したヒト Cot-1 DNA (Agilent Technologies Inc.) と混合し、CGH マイクロアレイに 67 °C で 24 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer (Agilent Technologies Inc.) でマイクロアレイを洗浄した。Agilent Technologies Microarray スキャナーでマイクロアレイスライドのスキャンを行った後、Feature Extraction v.12.0.3.1 (Agilent Technologies Inc.) でマイクロアレイ画像を解析し、Agilent Cytogenomics v5.1 ソフトウェアに得られたデータをインポートし可視化した。

### 免疫細胞染色

24 ウェルプレート、カバーガラス上で細胞を培養した。細胞播種から 24 時間後、400 ng/ml の Nocodazole (#ab120630; Abcam, Cambridge, UK) で 18 時間処理し、細胞周期を有糸分裂期に同期させた(34-36)。Nocodazole を含まない細胞培養液にて 40 分培養した後、カバーガラスを 4%パラホルムアルデヒド/PBS で室温にて 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。0.1% Triton X-100 (Agilent Technologies Inc.)を用いて室温で 10 分間透過処理した後、10% Normal Goat Serum (Thermo

Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) にて室温で 30 分間ブロッキングした。PBS で 3 回洗浄した後、抗  $\alpha$ -tubulin (#ab7291; Abcam, Cambridge, UK; 1:500 希釈) 及び抗  $\gamma$ H2AX (#ab11174; Abcam, Cambridge, UK; 1:1000 希釈) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。PBS で十分に洗浄した後、Alexa-594-conjugated antimouse IgG secondary antibody (#ab150120; Abcam; 1:200 希釈) 及び Alexa-488-conjugated antirabbit IgG secondary antibody (#ab150081; Abcam; 1:200 希釈) を用いて室温で 60 分間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、VECTASHIELD Vibrance Antifade Mounting Medium with DAPI (#H-1800; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入し核染色を行った。作成したプレパラートは Keyence BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察・解析した。

### 浸潤能アッセイ

膵癌細胞の浸潤能は、Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber assay (Corning® 354480, Corning, NY, USA) を用いてメーカープロトコールに従い評価した。1  $\mu$ M の 5-Aza-dC で 3 日間処理した PANC-1、Capan-1 細胞及び非処理細胞（コントロール）を 24 ウェルプレートの上部インサートに無血清細胞培養液と共に 1 ウェルあたり 25000 細胞ずつ播種した。下部チャンバーには化学誘引物質として 10% FBS を含む細胞培養液を使用した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 22 時間インキュベート

した後、インサート内の細胞培養液を除去し、浸潤細胞を固定、透過処理し、簡易迅速染色液 Diff-Quick<sup>®</sup> (SYSMEX CORPORATION, Hyogo, Japan) を用いてメーカープロトコールに従い染色した。Keyence BZ-X700 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて浸潤細胞を観察した (1 ウェルあたり 5 か所以上のランダム視野、4 回の独立した実験)。ImageJ ソフトウェア (ImageJ v.1.52a, National institute of Health) を用いて浸潤細胞数を測定した。

### 統計学的解析

統計学的解析には EZR version 1.41 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University) と R commander (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 3.6.1) を用いた(37)。連続変数は Shapiro-Wilk 検定後、パラメトリック検定には Student の t 検定、ノンパラメトリック検定には Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 検定を用いた。カテゴリーデータ解析にはロジスティック回帰分析を用いた。相関関係は Spearman の順位相関係数を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法でグラフを作成し log-rank 検定を用いて評価した。OS と臨床因子との関連は Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて、単変量および多変量解析を行い評価した。両側で  $P < 0.05$  のものを統計的有意ありとした。

## 結果

### 5-Aza-dC 投与細胞の生存率解析

まず最初に、本研究を行う上での最適な 5-Aza-dC の投与濃度と期間を決定するため、Capan-1 と PANC-1 に複数の濃度と期間で 5-Aza-dC を投与し細胞生存率を評価した。両細胞株の生物学的特性として、ヌードマウスに皮静脈内投与した際、前者は遠隔転移形成を起こしたが（9 例中 5 例; 56 %で転移形成）、後者は遠隔転移を認めなかった（10 例中 0 例; 0 %）という報告があることから (38)、転移能を有する Capan-1 と、有さない PANC-1 の 2 細胞株を本研究に用いた。MTT 生存アッセイによる測定の結果、5-Aza-dC の投与量が 1  $\mu$ M、投与期間が 3 日以内であれば、細胞生存率は用量依存的に徐々に低下するが、5-Aza-dC の投与量が 1  $\mu$ M より大きく、投与期間が 4 日以上になると顕著な細胞毒性を示すことがわかった（図 1A および 1B）。以上より、本研究では、5-Aza-dC を 1  $\mu$ M で 3 日間投与することとした。

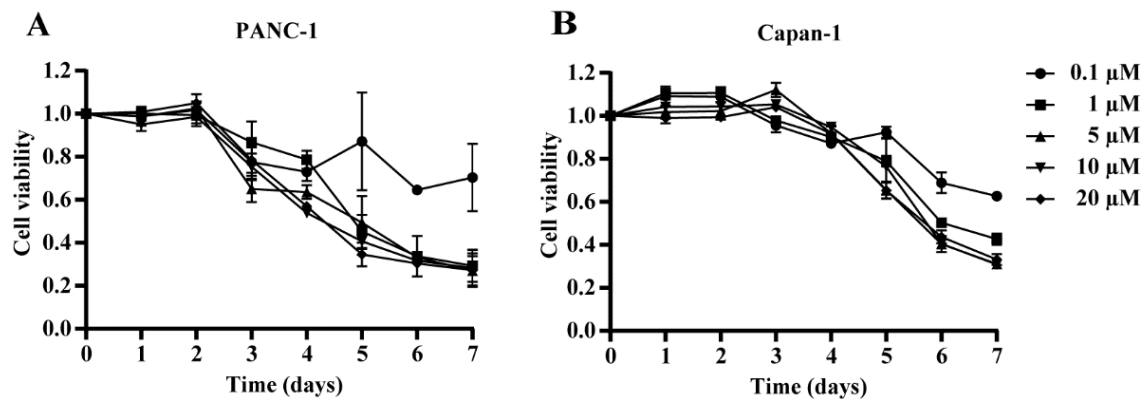


図 1. 5-Aza-dC 投与における膵癌細胞の生存曲線

(A) PANC-1 および (B) Capan-1 における、5-Aza-dC の濃度および時間依存的細胞毒性の評価。MTT アッセイにてそれぞれの濃度、期間における細胞生存率を評価した（いずれもコントロールに対する生存率）。データは 3 回の独立した実験の結果で、平均±標準偏差（SD）で表している。

### 5-Aza-dC によるゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導

次に、5-Aza-dC 投与が膵癌細胞のゲノム全域の DNA 異常低メチル化を誘導するかを検証した。PANC-1 と Capan-1 に 1 μM の 5-Aza-dC を投与し 3 日間培養した。コントロールとして 5-Aza-dC 非投与細胞を各々用意した。MethyLight 法により LINE-1 RDL を算出し、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化レベルを評価した (18-21)。LINE-1 RDL は PANC-1、Capan-1 とともに 5-Aza-dC 処理後で有意に上昇した（PANC-1;  $0.19 \pm 0.097$  to  $0.44 \pm 0.067$ ,  $P = 0.00002$ , Capan-1;  $0.28 \pm 0.024$  to  $0.53 \pm 0.066$ ,  $P = 0.000005$ , 図 2A および 2B）。



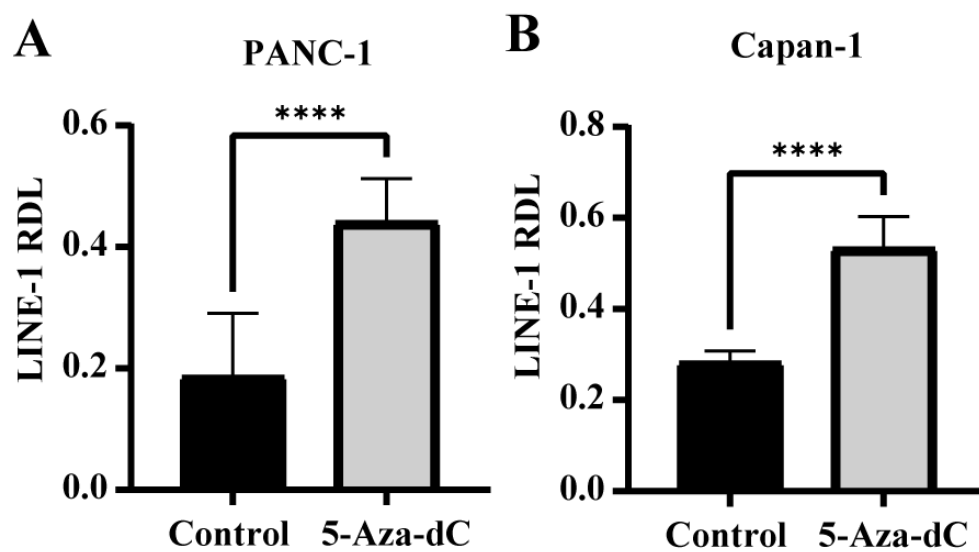


図 2. 5-Aza-dC によるゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導

(A) PANC-1 と (B) Capan-1 における、5-Aza-dC 処理細胞と非処理細胞（コントロール）のゲノム全域の DNA 異常低メチル化レベルを LINE-1 RDL を用いて評価した。

\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。データは 4 回の独立した実験の結果で、平均  $\pm$  SD で表している。

### ゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導細胞の染色体不安定性解析

CIN の原因となる染色体分離異常及び DNA ダメージを検出するために、免疫細胞染色を行った。DNA ダメージは、抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞数で評価した。5-Aza-dC 処理した PANC-1 では非処理細胞に比べて、Micronuclei、lagging、anaphase bridge、multiple nuclei といった染色体分離異常を示す細胞数が有意に増加し ( $3.9 \pm 2.7\%$  to  $12.5 \pm 3.6\%$ ,  $P = 0.0005$ 、図 3A-E)、抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞数も有意に増加した ( $15.1 \pm 3.2\%$  to  $55.6 \pm 7.9\%$ ,  $P = 0.028$ 、図 3F)。Capan-1 では、細胞同士が融合し染色体分離異常数の評価は困難であったが、抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞数が有意に増加した ( $47.8 \pm 8.4\%$  to  $58.9 \pm 8.8\%$ ,  $P = 0.0032$ 、図 3G)。図 3H は抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞を表す。染色体分離異常及び抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞の計測は、1 サンプルあたり 100 以上の有糸分裂細胞を観察し、3 回の異なる実験から行った。

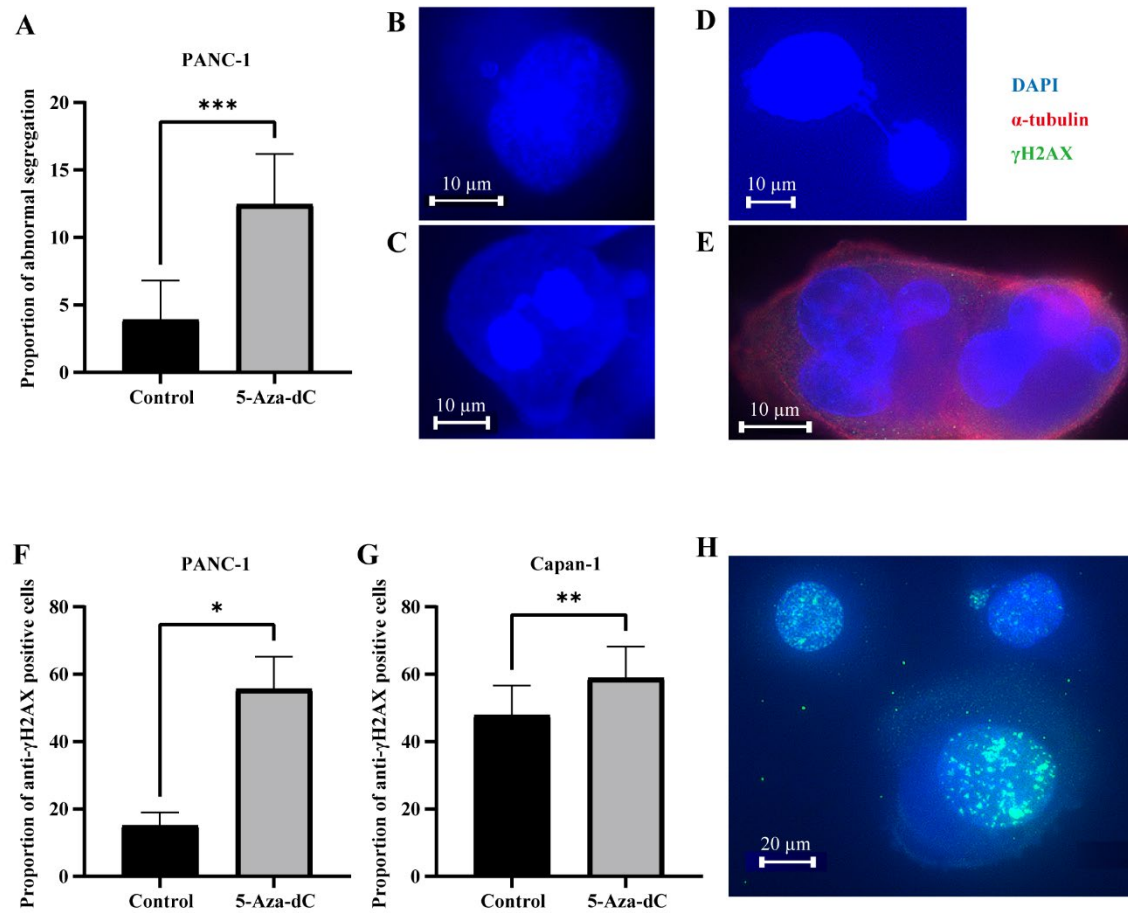


図3. ゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導細胞による染色体分離異常及び DNA ダメージ

(A) PANC-1 における 5-Aza-dC 処理細胞と非処理細胞（コントロール）の染色体異常分離細胞数の比較。(B) micronuclei、(C) lagging、(D) anaphase bridge、(E) multiple nuclei。(F) PANC-1 および (G) Capan-1 における 5-Aza-dC 処理細胞と非処理細胞（コントロール）の DNA ダメージの比較。DNA ダメージは抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞数で評価した。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ 。(H) 抗  $\gamma$ H2AX 陽性細胞のイメージ。

次に、CINを表すDNAコピー数の変化を、比較ゲノムハイブリダイゼーション分析（Array CGH）を用いて解析した。5-Aza-dC 処理によりゲノム全域のDNA 異常低メチル化を誘導した膵癌細胞において、染色体の特定領域でコピー数変化が見られた（図 4A および 4B）。コピー数変化は Capan-1 に比し PANC-1 でより顕著に認められた。これらの結果から、膵癌細胞において、5-Aza-dC によるゲノム全域の DNA 異常低メチル化が CIN を引き起こすことが示された。

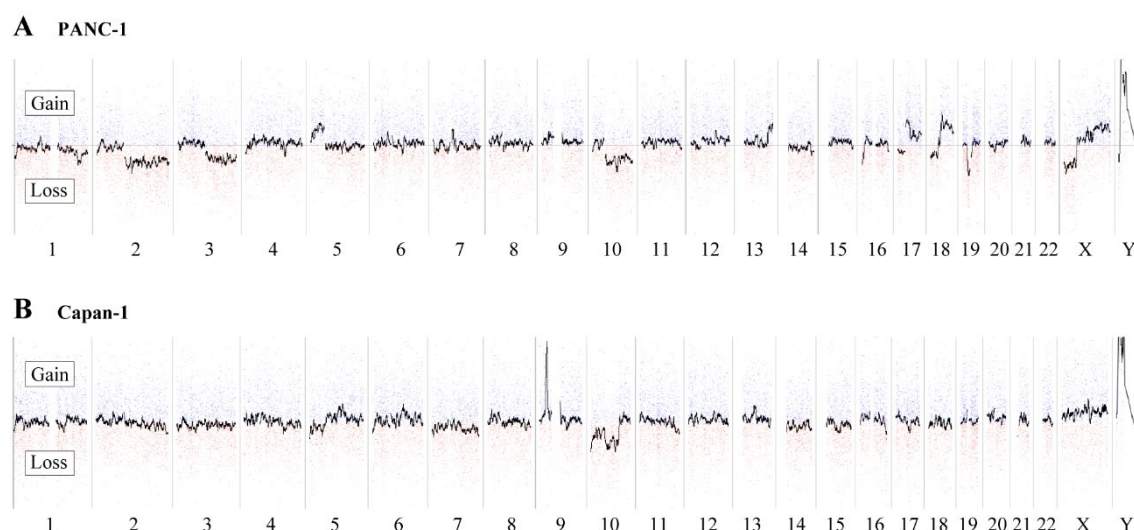


図 4. ゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導細胞による染色体コピー数変化

(A) PANC-1 および (B) Capan-1 における、5-Aza-dC 処理による染色体のコピー数変化をアレイ CGH で検出した。Capan-1 に比し PANC-1 でコピー数変化が見られやすい。上段はコピー数増加、下段は減少を示す。下方の数字は染色体番号を表し、その境界線は垂直線で示される。各染色体の領域では、短腕が左側に、長腕が右側に位置している。

### ゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導細胞の浸潤能解析

Matrigel Invasion Chamber assay を用いて、5-Aza-dC 処理による膵癌細胞の浸潤能の変化を評価した。Matrigel コーティングされた膜を通過した細胞の数（浸潤細胞）は癌細胞の浸潤性や転移性を表すとされる。5-Aza-dC 処理を行った細胞は、非処理細胞に比べて、有意に浸潤細胞数が増加した（PANC-1;  $16.6 \pm 11.9\%$  to  $37.9 \pm 8.0\%$ ,  $P = 0.042$ , Capan-1;  $35.4 \pm 11.4\%$  to  $66.5 \pm 9.7\%$ ,  $P = 0.011$ 、図 5A および図 5B）。興味深いことに、5-Aza-dC で処理した PANC-1 の浸潤細胞数（ $37.9 \pm 8.0\%$ ）は、非処理 Capan-1 の浸潤細胞数（ $35.4 \pm 11.4\%$ ）と同等になり、これは PANC-1 が Capan-1 と同等の転移能を獲得した可能性が示唆される。これらの結果から、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が引き起こす CIN によって膵癌の表現型をより侵襲的なものにすることが示された。

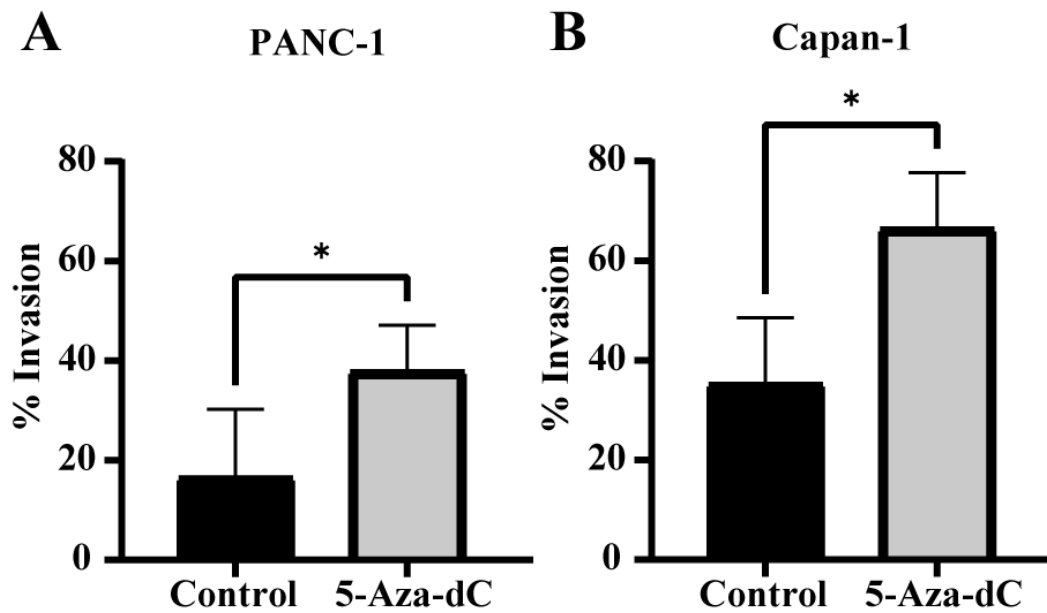


図 5. ゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導細胞と浸潤能

(A) PANC-1 および (B) Capan-1 における、5-Aza-dC 処理細胞と非処理細胞（コントロール）の浸潤能の比較。データは 4 回の独立した実験の結果で、平均  $\pm$  SD で表している。\* $P < 0.05$ 。

### 臨床アウトカムと LINE-1 RDL の関係

根治手術を企図した 49 例の膵癌患者を対象に、LINE-1 RDL による潜在性転移の予測の意義を明らかにした。49 例の膵癌患者の臨床因子と腫瘍サンプルから測定した LINE-1 RDL との関係を表 2 に示す。

表 2. 腭癌症例の臨床的特徴と LINE-1 RDL

Clinical features	Total <i>n</i> (%)	LINE-1 RDL (median)	P-value
All cases	49 (100)	0.045	
Age (years)			0.21
<70	24 (41.0)	0.047	
≥70	25 (49.0)	0.045	
Sex			0.49
Male	25 (49.0)	0.046	
Female	24 (41.0)	0.045	
CEA (ng/ml)			0.058
≤5	39 (79.6)	0.044	
>5	10 (20.4)	0.063	
CA19-9 (U/ml)			0.72
≤37	11 (22.4)	0.044	
>37	38 (77.6)	0.046	
DUPAN-2 (U/ml) <sup>a</sup>			0.12
≤150	28 (57.1)	0.044	
>150	19 (38.8)	0.055	
Tumor size (cm)			0.0011
≤2	18 (36.7)	0.037	
>2	31 (63.3)	0.052	
Clinical stage			0.045
I	15 (30.6)	0.040	
II	33 (67.3)	0.052	
III	1 (2.0)	0.043	
IV	0	NA	
Tumor location			0.42
Head	28 (57.1)	0.048	
Body	11 (22.4)	0.040	
Tail	10 (20.4)	0.045	
Occult distant metastasis			0.034
Absent	42 (86)	0.045	
Present	7 (14)	0.062	

<sup>a</sup>No data was available for two cases.

49 例の腭癌患者のうち 7 名 (14.3%) に潜在性転移を認めた。LINE-1 RDL との関係では、腫瘍径、臨床病期、潜在性転移の有無でそれぞれ有意差が認められた (腫瘍径 ;  $P = 0.0012$ 、臨床病期 ;  $P = 0.045$ 、潜在性転移の有無 ;  $P = 0.034$ )。そこで我々は LINE-1 RDL と潜在性転移の有無との関係に着目し、Receiver operating characteristic (ROC) 解析を行い、潜在性転移のある患者を識別するための LINE-1 RDL のカットオフ値を決定した (図 6A)。その結果、曲線下面積は 0.76 (95%信頼区間 0.58-0.93) で、LINE-1 RDL のカットオフ値は 0.049 (感度 0.86、特異度 0.64) であった。図 6B は、49 例の腫瘍サンプルにおける LINE-1 RDL の分布を高低順に並べたものである。LINE-1 RDL が 0.049 以上の患者は 21 例で、そのうち 6 例が潜在性転移を有していた。一方、LINE-1 RDL が 0.049 未満の患者は 28 例で、そのうち 1 例だけが潜在性転移を有していた。単変量および多変量解析により、LINE-1 RDL は潜在性転移を予測する有意な独立因子であることが示された (表 3)。



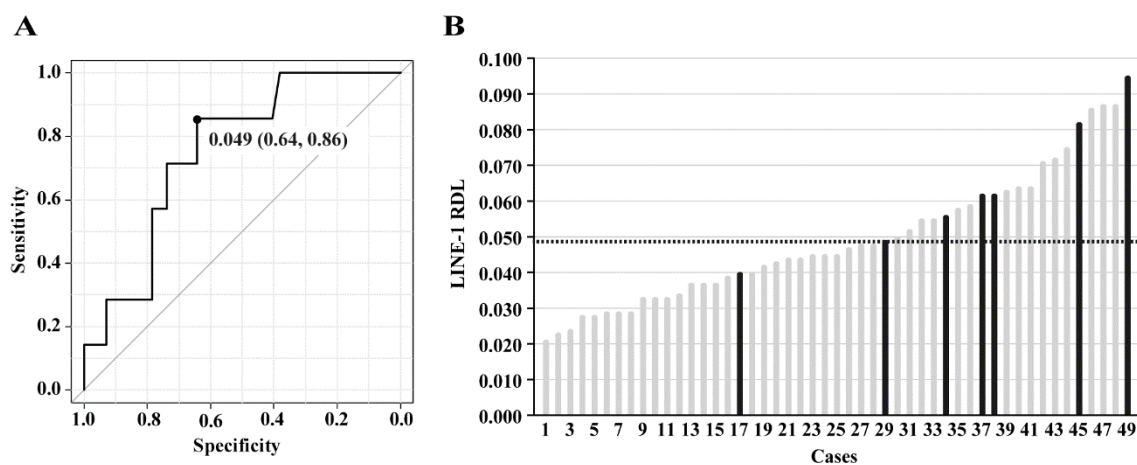


図 6. 潜在性転移と LINE-1 RDL の関係

(A) ROC 曲線：潜在性転移症例を識別するための LINE-1 RDL のカットオフ値 0.049。

(B) 49 症例の LINE-1 RDL 分布。黒グラフは潜在性転移を有する症例を示している。

破線は ROC 解析から得られたカットオフ値 0.049 を示す。

表 3. 潜在性転移の有無に関する単変量/多変量解析

Clinical features	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Age (<70 vs. ≥70)	0.68 (0.14-3.43)	0.64		
Sex (Male vs. Female)	0.68 (0.14-3.43)	0.64		
CEA (ng/ml) (≤5 vs. >5)	1.70 (0.28-10.4)	0.57	0.39 (0.033-4.59)	0.46
CA19-9 (U/ml) (≤37 vs. >37)	2.61e+07 (0-Inf)	0.99	2.33e+08 (0-Inf)	0.99
DUPAN-2 (U/ml) (≤150 vs. >150)	4.64 (0.8-27.1)	0.088	5.07 (0.43-59.8)	0.20
Tumor size (cm) (≤2 vs. >2)	4.08 (0.45-37.0)	0.21	5.71 (0.16-208)	0.34
Clinical stage (I vs. II, III)	3.0 (0.33-27.4)	0.33	0.057 (0.00063-5.14)	0.21
Tumor location (Head vs. Body, Tail)	0.48 (0.084-2.78)	0.42	0.62 (0.069-5.51)	0.66
LINE-1 RDL (<0.049 vs. ≥0.049)	10.8 (1.19-98.4)	0.035	22.2 (1.06-464)	0.046

さらに、予後に対する LINE-1 RDL の影響について検証した。相関係数解析の結果、LINE-1 RDL と 49 例の膵癌患者の OS との間に有意な相関が認められた ( $\rho = -0.37, P = 0.0089$ , 図 7)。多変量解析において、LINE-1 RDL は独立した予後因子であることがわかった (表 4)。

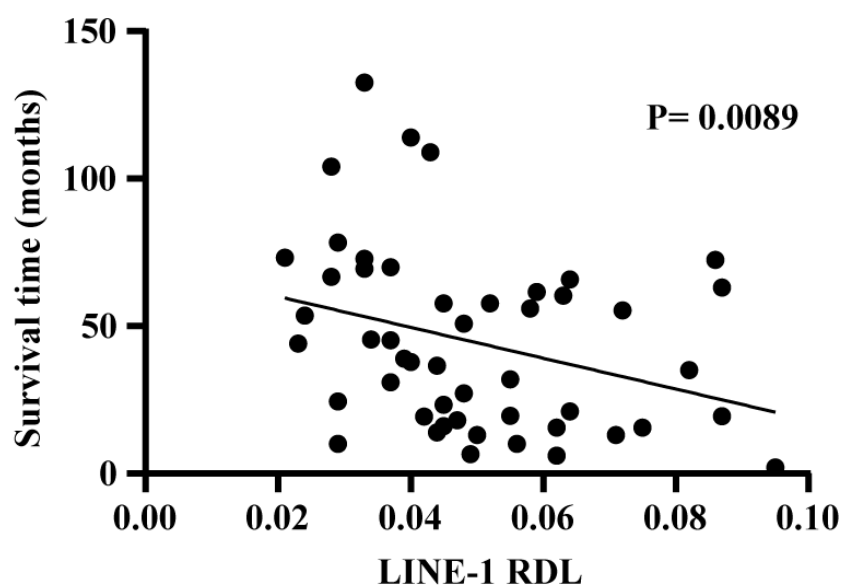


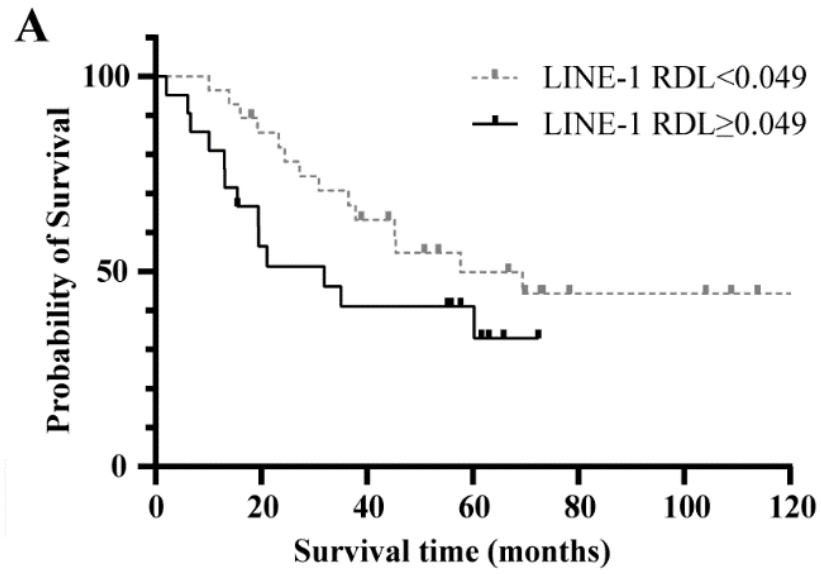
図 7. LINE-1 RDL と生存期間との相関

49 例の膵癌患者の LINE-1 RDL と OS との相関係数解析 (Spearman の順位相関係数 :  $\rho = -0.37, P = 0.0089$ )。

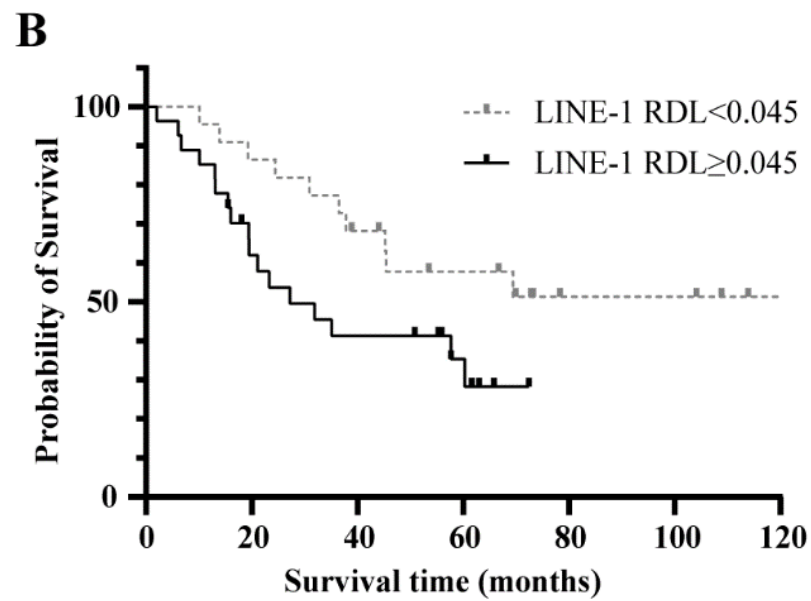
表 4. 生存期間に対する単変量/多変量解析

Prognostic factors	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
Age (<70 vs. ≥70)	1.13 (0.53-2.40)	0.76		
Sex (Male vs. Female)	0.90 (0.42-1.94)	0.79		
CEA (ng/ml) (≤5 vs. >5)	0.60 (0.21-1.76)	0.53	0.33 (0.076-1.39)	0.13
CA19-9 (U/ml) (≤37 vs. >37)	1.45 (0.55-3.84)	0.45	2.03 (0.66-6.26)	0.22
DUPAN-2 (U/ml) (≤150 vs. >150)	1.03 (0.47-2.28)	0.93	1.04 (0.39-2.77)	0.93
Tumor size (cm) (≤2 vs. >2)	0.79 (0.37-1.68)	0.54	0.88 (0.32-2.39)	0.80
Clinical stage (I vs. II, III)	0.85 (0.38-1.90)	0.69	0.48 (0.15-1.59)	0.23
Tumor location (Head vs. Body, Tail)	0.68 (0.32-1.48)	0.33	0.49 (0.21-1.15)	0.099
LINE-1 RDL (<0.049 vs. ≥0.049)	1.80 (0.84-3.85)	0.13	3.40 (1.23-9.38)	0.018

しかしながら、Kaplan-Meier 解析では、LINE-1 RDL が高い症例 ( $\geq 0.049$ ) は低い症例 ( $< 0.049$ ) より OS が短い傾向にあったが有意差は認めなかった (OS 中央値 ; 31.9 カ月 vs. 57.7 カ月,  $P = 0.13$ , 図 8A)。そこで、49 症例の LINE-1 RDL の中央値である 0.045 をカットオフ値として解析したところ、LINE-1 RDL が高い症例 ( $\geq 0.045$ ) は低い症例 ( $< 0.045$ ) よりも有意に OS が短いことが示された (OS 中央値 ; 27.2 カ月 vs. not reached,  $P = 0.048$ , 図 8B)。



	Median	95% CI	P-value
LINE-1 RDL<0.049 (n=28)	57.7	30.9-NA	0.13
LINE-1 RDL≥0.049 (n=21)	31.9	13.1-NA	



	Median	95% CI	P-value
LINE-1 RDL<0.045 (n=22)	NA	36.5-NA	0.048
LINE-1 RDL≥0.045 (n=27)	27.2	16.0-60.3	

図 8. LINE-1 RDL と生存曲線

(A) ROC 解析にて潜在性転移の有無から導いた LINE-1 RDL カットオフ値 0.049 を用いた Kaplan-Meier 解析 ( $P=0.13$ )。 (B) 49 症例の LINE-1 RDL 中央値 0.045 をカットオフ値に用いた Kaplan-Meier 解析 ( $P=0.048$ )。

## 考察

本研究は、5-Aza-dC により誘導されるゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、CIN を介して膵癌細胞の表現型をより侵襲的にすることを初めて明らかにし、さらに、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化の程度を表す LINE-1 RDL が、潜在性転移の有無や予後といった膵癌の生物学的挙動に関連していることも明らかにした。これらの結果から、LINE-1 RDL は、根治手術を企図する患者において、潜在性転移の有無を予測する有力なエピジェネティックバイオマーカーとなりうることを示した。

本研究では、ヒト膵癌細胞株に 5-Aza-dC を投与することでゲノム全域の DNA 異常低メチル化を誘導した。転移能を有する Capan-1 と有さない PANC-1 のいずれにおいても誘導されることが確認された。我々は以前に、大腸癌細胞株に 5-Aza-dC 投与し、MS-AFLP (methylation-sensitive amplified fragment-length polymorphism) 法を用いて DNA 異常低メチル化が誘導されることを報告している(39, 40)。5-Aza-dC にてゲノム全域の DNA 異常低メチル化が誘導されることは膵癌以外のいくつかの癌種では報告があり、多くは LINE-1 のメチル化レベルによって評価されている(12, 41-44)。膵癌における同様の報告は本研究が初めてである。



マウスモデルでの実験でゲノム全域の DNA 異常低メチル化が CIN を誘導することが報告され(11, 25)、大腸癌細胞に 5-Aza-dC 投与することでゲノム全域の DNA 異常低メチル化を導入し染色体の異数性が増加するという報告がなされたが(12)、膵癌におけるゲノム全域の DNA 異常低メチル化と CIN の関係を明らかにした研究は今までにみられなかった。本研究では、膵癌細胞でのゲノム全域の DNA 異常低メチル化の誘導に成功し、染色体の分離異常や DNA ダメージ、染色体のコピー数変化を確認し、CIN が引き起こされたことを明らかにした。さらに、PANC-1 は Capan-1 と比較し、5-Aza-dC 投与による染色体コピー数変化がより顕著にみられた。これは、転移能を持たない、侵襲性が低い膵癌細胞の方が、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化によって誘導される CIN から、より影響を受けやすく、侵襲性が増加しやすい事が示唆された。

CIN は、転移形成に寄与すると考えられており(26-28)、転移を認めることが多く予後不良な膵癌患者にとってはこの関連の解明がことさら重要である。

Bakhoun SF らは、乳癌において、CIN が細胞質 DNA に対する腫瘍細胞の自律的な応答を維持することで転移を促進することを実験的に示した(45)。本研究では、5-Aza-dC を投与した PANC-1 の浸潤細胞数 ( $37.9 \pm 8.0\%$ ) は、5-Aza-dC 非投与 Capan-1 の浸潤細胞数 ( $35.4 \pm 11.4\%$ ) と同等まで増加し、これは PANC-1 が Capan-1 と同等の侵襲性を獲得した可能性を示唆する (図 4)。本研究のこ

れまでの結果から、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、CIN の誘導と関連して膀胱癌の表現型をより侵襲的に変化させることが明らかになった。

転移は、臨床において癌患者の最も一般的な死因となり、予後不良の膀胱癌患者に特に当てはまる。術前検査で転移が認められず、根治手術を企図する膀胱癌患者にとって、潜在性転移を予測できるバイオマーカーを同定することは、不必要な開腹を避け、適時、適切な治療を受けるという点からも、予後を改善するために重要となる。本研究の解析では、LINE-1 RDL は臨床因子のうち、腫瘍径、臨床病期、潜在性転移の有無と有意な相関があることが示された。我々はこの中でも潜在性転移の有無と LINE-1 RDL との関連に注目した。そこで、LINE-1 RDL によって評価されるゲノム全域の DNA 異常低メチル化の、潜在性転移の予測因子としての意義を検討した。LINE-1 RDL の解析により、潜在性転移を有する可能性が高い患者を特定することができる優れたバイオマーカーとして機能することが示唆された。これらの結果は、LINE-1 RDL が、テーラード治療を適時に提供するために、不必要な開腹手術を避け、審査腹腔鏡手術が望ましい症例を選択するための有用なエピジェネティックバイオマーカーとなり得ることを示唆している。

LINE-1 の異常低メチル化は、膀胱癌以外の複数の癌種において予後と関連するという報告がある(21, 22)。本研究では、LINE-1 RDL と膀胱癌患者の OS との間

に有意な相関が認められ（図 7）、多変量解析により、LINE-1 RDL は膵癌患者の OS の有意な独立予測因子であることが確認された（表 4）。また、LINE-1 RDL のカットオフ値を前述の 0.049 とした場合、2 群間で OS に有意差は認められなかったが、高い群（ $\geq 0.049$ ）は低い群（ $< 0.049$ ）より OS が短い傾向にあった（OS 中央値；31.9 カ月 vs. 57.7 カ月,  $P = 0.13$ , 図 8A）。そこで、全 49 症例の LINE-1 RDL の中央値である 0.045 をカットオフ値とした場合、2 群間で OS に有意な差を認めた（OS 中央値；27.1 カ月 vs. not reached,  $P = 0.048$ , 図 8B）。Yamamura らは、膵癌患者において LINE-1 異常低メチル化と OS との間に有意な関連は見られなかったと報告している(22)。Yamamura らの検討では予後に影響を及ぼす可能性のあるステージ IV 期症例が約 10%含まれている一方、我々の検討ではステージ IV 期症例を含んでおらず、術前検査において遠隔転移のない根治切除を企図した症例を対象としている。このような患者背景の相違が、LINE-1 異常低メチル化と臨床転帰の関連に影響を及ぼしている可能性がある。

本研究で検討できなかった事項として以下のものが挙げられる。まず、本研究で用いた膵癌細胞株の細胞生存率を損なわない最適な 5-Aza-dC の投与濃度及び期間を決定したが、5-Aza-dC 自体による細胞毒性が CIN の誘導に関連していることを完全に否定することはできない。また、5-Aza-dC 投与によりゲノム

全域の DNA 異常低メチル化が起こり CIN が誘導されたが、これらのうちどちらが、膀胱癌細胞の侵襲性の増加に強く関係しているのかについての厳密な検討、メカニズム解明はできていない。また、本研究において臨床検体の LINE-1 RDL 値はいずれも切除検体から評価したものである。補助実験で術前確定診断時の生検検体からでも LINE-1 RDL は評価可能であることは確認し、同一症例において原発巣と転移巣の LINE-1 RDL 値に差が生じる傾向は見い出されなかったが、症例数を増やして統計学的に差がないか確認する必要があると考えられる。今後、これらの解明を目指した研究を進めることと、さらなる症例の集積により、ステージ IV 期症例も含め、実臨床における LINE-1 異常低メチル化の予後に対する意義の追及を行っていきたい。

## 結語

本研究は、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体不安定性を誘導し膵癌細胞の浸潤能を増加させることを明らかにし、潜在性転移や予後といった膵癌の生物学的挙動に関連することを示した最初の報告である。LINE-1 RDL が、適時適切な治療を受けるため不必要な開腹を回避し審査腹腔鏡手術が望ましい症例を選択するための有力なエピジェネティックバイオマーカーとなり、根治手術を企図する症例の治療戦略の一助となりうると考えられた。

## 謝辞

本研究は、日本学術振興会科研費、財団法人日本自転車振興会からの助成を受けたものであり、ご支援いただいた関係各位 に深く感謝いたします。 本研究を遂行するにあたり、研究全般にわたりご指導いただいた自治医科大学附属さいたま医療センター外科系総合医学 力山敏樹教授、小西文雄前教授、そして終始懇切かつ情熱的なご指導を賜りました同 鈴木浩一准教授に心から感謝申し上げます。そして、研究に付随する事務手続きや実験試薬、器具の準備や実験の補助など、本研究に直接的、間接的に多大な貢献をしていただいた研究補助員の石坂依津子様に厚くお礼申し上げます。

最後に自治医科大学附属さいたま医療センター一般・消化器外科の皆様、同 病理部の皆様、手術部スタッフの皆様、循環器病臨床医学研究所の皆様に深謝いたします

## 参考文献

1. Fong ZV, Alvino DML, Fernández-Del Castillo C, Mehtsun WT, Pergolini I, Warshaw AL, Chang DC, Lillemoe KD and Ferrone CR: Reappraisal of staging laparoscopy for patients with pancreatic adenocarcinoma: A contemporary analysis of 1001 patients. *Ann Surg Oncol* 24: 3203–3211, 2017.
2. Allen VB, Gurusamy KS, Takwoingi Y, Kalia A and Davidson BR: Diagnostic accuracy of laparoscopy following computed tomography (CT) scanning for assessing the resectability with curative intent in pancreatic and periampullary cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2016: CD009323.
3. Vargas R, Nino-Murcia M, Trueblood W and Jeffrey RB Jr: MDCT in Pancreatic adenocarcinoma: prediction of vascular invasion and resectability using a multiphasic technique with curved planar reformations. *AJR Am J Roentgenol* 182: 419–425, 2004.
4. Pietryga JA and Morgan DE: Imaging preoperatively for pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol* 6: 343–357, 2015.
5. Liu X, Fu Y, Chen Q, Wu J, Gao W, Jiang K, Miao Y and Wei J: Predictors of distant metastasis on exploration in patients with potentially resectable pancreatic cancer. *BMC Gastroenterol* 18: 168, 2018.
6. De Rosa A, Cameron IC and Gomez D: Indications for staging laparoscopy in pancreatic cancer. *HPB (Oxford)* 18: 13–20, 2016.
7. Durczynski A, Kumor A, Hogendorf P, Szymanski D, Grzelak P and Strzelczyk J: Preoperative high level of D-dimers predicts unresectability of pancreatic head cancer. *World J Gastroenterol* 20: 13167–13171, 2014.

8. Schlieman MG, Ho HS and Bold RJ: Utility of tumor markers in determining resectability of pancreatic cancer. *Arch Surg* 138: 951–955; discussion 955–956, 2003.
9. Gleisner AL, Assumpcao L, Cameron JL, Wolfgang CL, Choti MA, Herman JM, Schulick RD and Pawlik TM: Is resection of periampullary or pancreatic adenocarcinoma with synchronous hepatic metastasis justified? *Cancer* 110: 2484–2492, 2007.
10. Hackert T, Niesen W, Hinz U, Tjaden C, Strobel O, Ulrich A, Michalski CW and Büchler MW: Radical surgery of oligometastatic pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 43: 358–363, 2017.
11. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H and Jaenisch R: Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300: 489–492, 2003.
12. Costa G, Barra V, Lentini L, Cilluffo D and Di Leonardo A: DNA demethylation caused by 5-Aza-2'-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy. *Oncotarget* 7: 3726–3739, 2016.
13. Itano O, Ueda M, Kikuchi K, Hashimoto O, Hayatsu S, Kawaguchi M, Seki H, Aiura K and Kitajima M: Correlation of postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene* 21: 789–797, 2002.
14. Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Laird PW and Ehrlich M: DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res* 64: 4472–4480, 2004.
15. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA and Kazazian HH Jr: Mobile elements and



- mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 13: 651–658, 2003.
16. Ehrlich M: DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400–5413, 2002.
  17. Cordaux R and Batzer MA: The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10: 691–703, 2009.
  18. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W and Zhang B: The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLOS ONE* 9: e106290, 2014.
  19. Yang AS, Estécio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH and Issa JP: A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 32: e38, 2004.
  20. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M and Laird PW: Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 33: 6823–6836, 2005.
  21. Baba Y, Yagi T, Sawayama H, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N and Baba H: Long interspersed Element-1 methylation level as a prognostic biomarker in gastrointestinal cancers. *Digestion* 97: 26–30, 2018.
  22. Yamamura K, Kosumi K, Baba Y, Harada K, Gao F, Zhang X, Zhou L, Kitano Y, Arima K, Kaida T, Takeyama H, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Tan X and Baba H: LINE-1 methylation level and prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review. *Surg Today* 47: 1450–1459, 2017.
  23. Thompson SL and Compton DA: Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* 180: 665–672, 2008.

24. Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degraffi F and Salmon ED: Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* 153: 517–527, 2001.
25. Eden A, Gaudet F, Waghmare A and Jaenisch R: Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300: 455, 2003.
26. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, Shafi S, Johnson DH, Mitter R, Rosenthal R, Salm M, Horswell S, Escudero M, Matthews N, Rowan A, Chambers T, Moore DA, Turajlic S, Xu H, Lee SM, Forster MD, Ahmad T, Hiley CT, Abbosh C, Falzon M, Borg E, Marafioti T, Lawrence D, Hayward M, Kolvekar S, Panagiotopoulos N, Janes SM, Thakrar R, Ahmed A, Blackhall F, Summers Y, Shah R, Joseph L, Quinn AM, Crosbie PA, Naidu B, Middleton G, Langman G, Trotter S, Nicolson M, Remmen H, Kerr K, Chetty M, Gomersall L, Fennell DA, Nakas A, Rathinam S, Anand G, Khan S, Russell P, Ezhil V, Ismail B, Irvin-Sellers M, Prakash V, Lester JF, Kornaszewska M, Attanoos R, Adams H, Davies H, Dentro S, Tanieri P, O'Sullivan B, Lowe HL, Hartley JA, Iles N, Bell H, Ngai Y, Shaw JA, Herrero J, Szallasi Z, Schwarz RF, Stewart A, Quezada SA, Le Quesne J, Van Loo P, Dive C, Hackshaw A and Swanton C; TRACERx Consortium: Tracking the evolution of Non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 376: 2109–2121, 2017.
27. Turajlic S and Swanton C: Metastasis as an evolutionary process. *Science* 352: 169–175, 2016.
28. Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, Shimizu H, Nojima M, Iwaki H, Nobuoka T, Nishida T, Miyazaki Y, Takamaru H, Yamamoto E, Yamamoto H, Tokino T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Toyota M and Shinomura Y: A novel correlation

- between LINE-1 hypomethylation and the malignancy of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 16: 5114–5123, 2010.
29. Suzuki K, Ohnami S, Tanabe C, Sasaki H, Yasuda J, Katai H, Yoshimura K, Terada M, Perucho M and Yoshida T: The genomic damage estimated by arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting is useful for the prognosis of gastric cancer. *Gastroenterology* 125: 1330–1340, 2003.
  30. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K and Perucho M: Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 9: 199–207, 2006.
  31. Ichida K, Suzuki K, Fukui T, Takayama Y, Kakizawa N, Watanabe F, Ishikawa H, Muto Y, Kato T, Saito M, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Ohmori T, Konishi F and Rikiyama T: Overexpression of satellite alpha transcripts leads to chromosomal instability via segregation errors at specific chromosomes. *Int J Oncol* 52: 1685–1693, 2018.
  32. LH. S, MK. G and C. W: TNM classification of malignant tumours *Wiley-Blackwell, Chichester*, 2010.
  33. Saito M, Suzuki K, Maeda T, Kato T, Kamiyama H, Koizumi K, Miyaki Y, Okada S, Kiyozaki H and Konishi F: The accumulation of DNA demethylation in Sat alpha in normal gastric tissues with *Helicobacter pylori* infection renders susceptibility to gastric cancer in some individuals. *Oncol Rep* 27: 1717–1725, 2012.
  34. Matsui Y, Nakayama Y, Okamoto M, Fukumoto Y and Yamaguchi N: Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: a novel method suitable for examining

- dynamic changes in proteins during mitotic progression. *Eur J Cell Biol* 91: 413–419, 2012.
35. Caravaca JM, Donahue G, Becker JS, He X, Vinson C and Zaret KS: Bookmarking by specific and nonspecific binding of FoxA1 pioneer factor to mitotic chromosomes. *Genes Dev* 27: 251–260, 2013.
  36. Basit A, Cho MG, Kim EY, Kwon D, Kang SJ and Lee JH: The cGAS/STING/TBK1/IRF3 innate immunity pathway maintains chromosomal stability through regulation of p21 levels. *Exp Mol Med* 52: 643–657, 2020.
  37. Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452–458, 2013.
  38. Futagami F: The role of serine proteases in the invasion and metastasis in human pancreatic cancer. *Juzen Soc* 105: 717–724, 1996.
  39. Miyaki Y, Suzuki K, Koizumi K, Kato T, Saito M, Kamiyama H, Maeda T, Shibata K, Shiya N and Konishi F: Identification of a potent epigenetic biomarker for resistance to camptothecin and poor outcome to irinotecan-based chemotherapy in colon cancer. *Int J Oncol* 40: 217–226, 2012.
  40. Alonso S, Suzuki K, Yamamoto F and Perucho M: Methylation-sensitive amplification length polymorphism (MS-AFLP) microarrays for epigenetic analysis of human genomes. *Methods Mol Biol* 1766: 137–156, 2018.
  41. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Savvari P, Cassidy A, Zakopoulou R, Kotsinas A, Gorgoulis V, Field JK and Liloglou T: Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 124: 81–87, 2009.
  42. Hamm CA, Xie H, Costa FF, Vanin EF, Seftor EA, Sredni ST, Bischof J, Wang D,

- Bonaldo MF, Hendrix MJ and Soares MB: Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PLOS ONE* 4: e8340, 2009.
43. Wang X, Gao H, Ren L, Gu J, Zhang Y and Zhang Y: Demethylation of the miR-146a promoter by 5-Aza-2'-deoxycytidine correlates with delayed progression of castration-resistant prostate cancer. *BMC Cancer* 14: 308, 2014.
  44. Zhang C, Fan L, Fan T, Wu D, Gao L, Ling Y, Zhu J, Li R and Wei L: Decreased PADI4 mRNA association with global hypomethylation in hepatocellular carcinoma during HBV exposure. *Cell Biochem Biophys* 65: 187–195, 2013.
  45. Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, Shah P, Sriram RK, Watkins TBK, Taunk NK, Duran M, Pauli C, Shaw C, Chadalavada K, Rajasekhar VK, Genovese G, Venkatesan S, Birkbak NJ, McGranahan N, Lundquist M, LaPlant Q, Healey JH, Elemento O, Chung CH, Lee NY, Imielenski M, Nanjangud G, Pe'er D, Cleveland DW, Powell SN, Lammerding J, Swanton C and Cantley LC: Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 553: 467–472, 2018.