

# 研究報告書

## 「がんの組織多様性に関わるエピジェネティクス可塑性とその制御機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 近藤 豊

### 1. 研究のねらい

がんは日本において死亡原因の第一位を占める疾患である。特に組織多様性を示す腫瘍が少なからず存在し、高転移能、高浸潤能、治療抵抗性をもった細胞群が腫瘍内に存在すると、現在の治療法では根治に至ることがきわめて困難となる。

近年のマイクロアレイやシーケンス技術の進歩により、個々のがん症例における詳細なエピゲノム異常の網羅的な評価が可能となった。遺伝子変異に加えてエピゲノムの変化は、発がんの様々な過程に関与しており、発がん機構の理解、がんの分類、診断マーカーの開発などに多くの情報をもたらした。しかし一方で、周囲環境に適応してがんが細胞の表現形を変化させ、組織多様性を獲得していく際に変化するエピゲノム情報についてはほとんど解明されていない。我々はがんが腫瘍内に治療感受性や転移能の異なる細胞集団を獲得する背景に、幹細胞様がん細胞(がん幹細胞)の存在とそのエピジェネティクス制御機構が鍵となると考え、ヒト膠芽腫のがん幹細胞(Glioma Stem cell, GSC)の分化誘導モデルを樹立した。GSCの分化誘導時に変化するエピゲノムの網羅的解析とその制御に関わるシグナルネットワークの包括的解明を試みた。さらに発がん初期の腫瘍が高悪性度の腫瘍に変化するエピジェネティックな過程を解析するため Mosaic Analysis with Double Markers (MADM)法を利用した Nf1、p53 欠損-脳腫瘍発症マウスモデルを用いて解析した。このモデルでは、Nf1 と p53 がホモ接合型欠失した細胞のみ緑色に蛍光を発する特徴を持っており、早期のがん細胞から高悪性度のがん細胞に変化する過程を追うことが可能である。

本研究では、がん細胞がエピジェネティクス可塑性を利用して、周囲環境との相互作用から組織多様性を獲得し、高悪性度の腫瘍に変化していく機構を明らかにすることを目的とした。さらにその分子基盤を標的とした、小分子化合物によるエピジェネティクスの人為的な制御を目指した。がんの可塑性を制御する新規化合物の同定はエピジェネティクス治療の可能性を拡大するばかりでなく、がん治療法としての新しい作用点を築くことが期待できる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

がん細胞には様々なエピジェネティクス異常が蓄積している。このうちヒストン修飾による遺伝子発現制御機構は可逆性が高い。ポリコームタンパク複合体 2 (polycomb repressive complex, PRC2) は、構成タンパクであるヒストンメチル化酵素 EZH2 を介してヒストン H3 リシン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) 修飾を誘導する。PRC2-H3K27me3 は、胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化制御に関わっており、発生分化過程に重要な役割を果たしている。がん細胞では EZH2 の発現亢進や遺伝子変異に伴う機能異常がしばしばみられ、また H3K27me3 の修飾異常が様々な遺伝子領域で観察される。

がん組織には ES 細胞や体性幹細胞などの幹細胞に見られる自己複製能と多分化能という二つの特徴を持つがん幹細胞が、がん組織の中に存在する。可塑性を持ったがん細胞は、周囲環境に適応し増殖・浸潤すると考えられるが、その背景には、動的で可塑性のあるエピゲノム制御が重要な働きをしている可能性が高い。がん細胞の可塑性は組織の多様性に関わり、腫瘍内に高い転移能・浸潤能を伴った細胞集団を形成することにつながる。

我々は、がんが組織多様性を形成する背景に、がん幹細胞の存在と可塑性の高いエピゲノム機構、特に PRC2-H3K27me3 が関与すると考え、腫瘍内で多彩な組織像を呈するグリオブラストーマ(GBM)に着目して解析を進めた。

解析には、GBM 症例から樹立したがん幹細胞(GSC)を用いた分化誘導モデルと、Mosaic Analysis with Double Markers (MADM)法を利用した Nf1、p53 欠損-脳腫瘍発症マウスモデルを用いて、以下の4つのテーマについて研究を行なった。

- A. がん幹細胞の可塑性に関わる基盤的データの構築
- B. がん幹細胞の分化を制御するエピゲノム機構の解析
- C. EZH2(H3K27 メチル化酵素)の阻害剤の探索
- D. 脳腫瘍発生マウスモデルを用いた、脳腫瘍形成に関わるエピゲノム解析

がんの組織多様性の制御に関わるエピゲノム可塑性の制御機構を明らかにし、がん治療を画期的に変革する新しい治療の開発につなげたいと考え研究を展開した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「がん幹細胞の可塑性に関わる基盤的データの構築」

#### 1. 脳腫瘍がん幹細胞(GSC)の樹立および分化誘導

GBM 3症例から、GSC を樹立した。GSC を血清存在下の分化誘導培地で培養すると、細胞はディッシュの底に接着し、形態を紡錘状に変化させる (Serum exposed brain tumor cell、以下 S-BTC)。これら紡錘状細胞では、Nestin の発現低下、および分化マーカーである GFA P、 $\beta$ -tubulin III(Tuj1)、OSP(oligo-specific protein)の誘導が観察された。興味深いことに GSC を血清で刺激すると、24 時間以内に EZH2 および EED、SUZ12 が核内へ顕著に流入することを見出した。PRC2 は分化誘導時のエピゲノム変化に関与する可能性が示唆された。さらに GSC から S-BTC への変化は可逆性のある変化であり、分化  $\rightleftharpoons$  脱分化の関係にあることを見出した。

#### 2. GSC の分化誘導時におけるエピゲノム変化

GSC から S-BTC に変化する過程におけるエピジェネティクス変化について、3 患者から樹立した 3 株の GSC を用い、クロマチン免疫沈降-マイクロアレイ法(ChIP-chip 法)により H3K27me3 の標的遺伝子を解析した。その結果、GSC と S-BTC の共通標的 193 遺伝子、GSC 特異的 H3K27me3 標的 19 遺伝子(Nanog, Wnt1 etc.)、S-BTC 特異的 H3K27me3 標的 105 遺伝子(BMP5 etc.)を同定した(GSC 3 株で共通)。

#### 3. GSC のがん形質を制御する PRC2-H3K27me3

GSC において EZH2、Nanog、Wnt1 の抑制もしくは BMP5 の過剰発現は、血清刺激による GSC の分化誘導および Brain Slice Culture による GSC の浸潤能を阻害した。

H3K27me3 修飾による遺伝子制御は GSC の腫瘍進展の過程で重要な役割を演じていると考え、GSC での EZH2 の阻害による腫瘍形成能への影響について解析した。EZH2 を含む PRC2 複合体を阻害する小分子化合物 3-Deazaneplanocin A (DZNep) もしくは shRNA による EZH2 の阻害により、細胞増殖の抑制と分化誘導の阻害が確認された。さらに EZH2 阻害による抗腫瘍効果は、NOD-scid マウスを用いた xenograft モデルでも観察された。

以上の結果からがん幹細胞が周囲環境に適応して浸潤する際に、PRC2-H3K27me3 によるエピジェネティック機構は必須であり、その際に EZH2 の細胞内局在が重要な役割を演じていると考えた (*Cancer Res* 2013)。

## 研究テーマ B 「がん幹細胞の分化を制御するエピゲノム機構の解析」

### 1. EZH2 の細胞内局在に関わる解析

EZH2 には nuclear localization signal or sequence (NLS) が存在する。この領域を欠失変異させた EZH2 発現コンストラクトを作成して GSC に遺伝子導入し、その分化誘導に与える影響を解析した。NLS 欠失 EZH2 を過剰発現させた GSC では、血清刺激により EZH2 は核内に移動せず、分化誘導も阻害された (Tuj1 陰性、GFAP 陰性)。

### 2. がん幹細胞の分化過程における非翻訳 RNA の網羅的解析

GSC から S-BTC の変化過程で発現変動する RNA をマイクロアレイ、および RNA-sequencing で解析した。

#### ① がん幹細胞の分化過程に関わる micro-RNA(miR)の解析

GSC の 2 株で S-BTC に分化誘導時に共通して増減する miR をそれぞれ 12、63 個同定した。各 miR について in silico で標的遺伝子の検索を行ない、神経分化に関わる遺伝子を標的とし、且つ PRC2-H3K27me3 で制御される miR-1275 を同定した。miR-1275 は、神経髄鞘の形成に必須なタンパクである Oligodendrocyte Specific Protein (OSP/CLDN11) の発現制御に関わっており、GSC の分化誘導時には H3K27me3 による miR-1275 の発現抑制と OSP/CLDN11 の発現上昇が誘導されることを見出した (*JBC* 2012)。

#### ② GSC 分化誘導時における lncRNA の発現解析

長鎖非翻訳 RNA (large non-coding RNA, lncRNA) の一部は、ヒストン関連タンパク等の複数のタンパクの結合の足場 (scaffold) となり、標的遺伝子領域にリクルートされることによりその領域における転写を制御することが報告されている。すなわちどの領域のエピゲノムを特異的に変化させるかの機序について明らかにできる可能性があると考えた。GSC 2 株を用いて分化誘導時における lncRNA の発現変動を RNA-sequencing 法で解析した。共通して発現が増減する lncRNA をそれぞれ 181、170 遺伝子同定した。

これらの lncRNA のうち polycomb タンパクとの結合が報告されている linc-A についての解析を進めた。

#### ③ GSC 分化誘導時における linc-A の役割

linc-A に対する阻害を、siRNA を用いて行った結果、pluripotent-associated genes および neural stem cell (NSC) markers (Nanog, SOX2, Nestin, CD15) の低下と共に sphere の崩壊が観察された。

次に linc-A が enrich される DNA 領域を網羅的に解析するため、5-Bromo-UTP (BrUTP)

標識 linc-A RNA を合成し細胞内に導入した後、抗 BrdU 抗体を用いた BrU-ChIP-chip を行なった。GSC 2 株で共通して 630 遺伝子領域で linc-A の enrichment が観察された。ジーンオントロロジー解析から、特に神経分化に関わる遺伝子領域で enrich されていた。linc-A が結合する DNA 領域のヒストン修飾を解析した結果、多くの領域で H3K27me3 修飾が見られた。さらに linc-A のノックダウンにより、同領域の H3K27me3 修飾の解除が観察された。linc-A と EZH2 および SUZ12 の結合をウェスタンブロットで確認した。

以上の結果から、GSC の分化誘導時には linc-A—PRC2 による遺伝子制御が重要な役割を果たしていると考えた。

#### 研究テーマ C 「EZH2 (H3K27 メチル化酵素) の阻害剤の探索」

H3K27me3 標的遺伝子のプロモーターを SEAP 遺伝子上流に組み込んだベクターを前立腺がん細胞株に導入し、PRC2-H3K27me3 を阻害する化合物のスクリーニングするシステムを開発した。本アッセイ系は PRC2 の阻害剤のみではシグナルの上昇が乏しいため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (trichostatin A) と組み合わせることで感度を上げるための最適化を行なった。15,000 の小分子化合物のスクリーニングを行い 10 の候補化合物を同定したが、いずれも true hit ではなかった。

#### 研究テーマ D 「脳腫瘍発生マウスモデルを用いた、脳腫瘍形成に関わるエピゲノム解析」

発がん初期の腫瘍が高悪性度の腫瘍に変化する過程に関わるエピゲノムを解析するため Mosaic Analysis with Double Markers (MADM) 法を利用した Nf1、p53 欠損-脳腫瘍発症マウスモデルを用いた。このモデルでは、p53 と Nf1 がホモ接合型欠失した細胞が緑色に蛍光を発するため、前がん細胞から高悪性度のがん細胞に変化する過程を追うことが可能である。

##### 1. 正常脳神経細胞の樹立および MDAM マウスモデルからの腫瘍細胞の樹立

正常神経細胞のエピゲノム変化を観察するため E15.5 の胎生マウスより Neural Stem Cell (NSC) を樹立した。また MADM マウスの P8 より immunopanning 法を用いて OPC 様前がん細胞を樹立し、さらに P150 (腫瘍形成後) の細胞を樹立した。

##### 2. MDAM マウスモデルから樹立した腫瘍細胞のエピゲノム解析

ChIP-chip 法を用いて、P8 と P150 細胞の H3K4me3 標的遺伝子、H3K27me3 標的遺伝子、および RNA polymerase II (Pol II) 結合領域の解析を行った (全 25,840 遺伝子)。P8 では H3K4me3 修飾を認める遺伝子は 3,473 遺伝子、H3K27me3 修飾は 1,720 遺伝子であり、P150 では H3K4me3 修飾は 4,921 遺伝子、H3K27me3 修飾は 2,318 遺伝子であった。両方の修飾を受ける bivalent 遺伝子は、P8 では 100 遺伝子であるのに対して、P150 では 796 遺伝子と多く認め、P150 はより未分化な状態の細胞が増殖していた。

二次性膠芽腫の発がんには中枢神経系細胞の分化異常が寄与すると予測されており、我々はエピゲノム異常による分化異常が膠芽腫形成に重要な役割を果たしていると考えた。腫瘍形成後 (P150) では腫瘍形成前 (P8) と比較して、多くの神経分化に関わる遺伝子が H3K27me3 修飾を受けており、p53、Nf1 異常に続くエピジェネティクス異常が、中枢神経系細胞の分化や発達を抑制することで膠芽腫の形成を引き起こすことが示唆された。



### 3. 今後の展開

動的にがん細胞を制御するエピゲノム機構についての見解を得つつある。エピゲノムの遺伝子への書き込みには、幹細胞ニッチを含めた細胞外環境からのシグナルを含め複雑な要素が関わっていると予測される。幹細胞ニッチからのシグナルによるエピゲノム関連タンパクの制御や非翻訳 RNA とエピゲノム修飾タンパクとの相互作用、さらにゲノム情報との相互作用などエピゲノムの書き込みに及ぼす作用とその機構について統合的に解明を試みる。今後の研究展開は以下の方向で行う。

#### A. がん幹細胞の分化を制御するエピゲノム機構の解析

現在がん幹細胞の周囲環境シグナルと非翻訳 RNA により制御されるエピゲノム誘導の機序を明らかにしつつある。マウスモデルやヒトがん幹細胞モデル等を用いて解析する。

#### B. PRC2-H3K27me3 修飾に関わるパスウェイを阻害する化合物の探索

今回のプロジェクトで、PRC2-H3K27me3 を阻害する化合物のスクリーニングするシステムを開発した。本システムは別のプログラムでさらに多くの化合物スクリーニングに応用が可能であった。複数のヒット化合物が得られており、詳細に解析を行なっている。

本研究プロジェクトを推進し、EZH2/PRC2 を介した H3K27me3 修飾はがん幹細胞の維持のみならず、その進展・増殖過程に深く関与していると考えた。本研究から、腫瘍形成過程における新たなエピジェネティクスの関わりを明らかにするとともに、エピジェネティクスを標的とした新しいがんの治療法の可能性が見出すことができた。可塑性をもって様々に変化するがん細胞を標的とするためには、エピゲノムを何らかの形でフリージングすることが必要であると考え。よりがん細胞特異的な治療法の開発を目指し研究を発展していきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

一般に固形がんの組織内に見られる腫瘍細胞は分化度の異なる細胞が不均一に存在する。本研究ではこの組織多様性の背景に、がん組織中に存在する分化能をもったがん細胞が、外部からのシグナルに応じて核内のエピジェネティクスネットワークを再構築し、周囲環境に適応可能ながん細胞へと変化していくことによると考え、脳腫瘍幹細胞モデルを用いて解析を行った。がん幹細胞は可塑性を伴った細胞であることを明確に示すことができ、当初の目的の一部は解明できたと考える。さらに研究を進めていく過程で、非翻訳 RNA を介した新たなエピゲノム機構を明らかにすることができた。今後の遺伝子領域特異的なエピゲノム・リプログラミング法の解明の一助となる可能性を秘めており、研究の進展が期待できる。

また、がんの発生を考える上で、そのゲノム・エピゲノム異常の蓄積様式の解明は極めて重要である。本研究でMADMマウスモデルを使うことにより、p53 遺伝子、Nf1 遺伝子の欠失に続いて起こる普遍的なゲノム・エピゲノム異常の蓄積様式を少しずつ解明しつつある。そのような研究を進展できたことは評価できると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

膠芽腫から樹立した幹細胞(GSC)の血清による分化誘導は分化⇔脱分化の関係にあり、この過程にポリコム複合体(PRC2)が関与することを示し、がん細胞の浸潤にはPRC2-H3K27me3が必須であることを明らかにした。ついで、lincRNAの一つがPRC2のリクルートメントに重要であること、このRNAを抑制することでがん幹細胞の増殖が抑制されることを見出した。さらに、脳腫瘍発症モデルマウスを用いた解析では、エピジェネティック異常が膠芽腫の形成を引き起こすことを示した。

がんの組織多様性に関わるエピジェネティクスの可塑性に関して、様々な角度からPRC2の関与が重要であることを示した。特に脳腫瘍幹細胞の解析から、がん細胞のエピゲノム制御についてlincRNAの関与ははじめ新たな知見を見出し多くの成果を得た。このテーマ全体に関しては、今後がんのエピゲノム変化の作用と機構についてその統合的理解に向けた作業仮説が必要であろう。今後lincRNAの機能の分子機構をさらに明らかにし、将来的にはがん治療につながるような研究に発展させることを期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Natsume A, Ito M, Katsushima K, Ohka F, Hatanaka A, Shinjo K, Sato S, Takahashi S, Ishikawa Y, Takeuchi I, Shimogawa H, Uesugi M, Okano H, Kim SU, Wakabayashi T, Issa JPJ, Sekido Y, Kondo Y. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* 2013, 73, 4559–70.
2. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis Virus Infection Affects DNA Methylation in Mice with Humanized Livers. *Gastroenterology*. in press
3. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Kondo Y. Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *J Biol Chem.* 2012, 287, 27396–406 .
4. Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *Gut.* 2012, 61, 392–401.
5. Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2012, 33, 1277–85.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演・海外】

1. Kondo Y. 「Epigenomic Dysregulation in Cancer」 Epigenetic switch regulates plasticity of cancer stem cell in human glioblastoma. 6th Asian Epigenomics Meeting. 2011. Symposium.
2. Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with clinical outcome of lung adenocarcinoma. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program. 2011. Symposium.
3. Kondo Y. 「Genomic Instability and epigenetics」 Epigenetic networks regulate plasticity of cancer stem cell in glioblastoma. 13th Japanese-German Cancer Workshop. 2011. Workshop.
4. Kondo Y. 「Cancer Genomics and Epigenomics: Towards personalized cancer medicine」 Epigenetic regulatory network in plastic interconvertibility between tumor-initiating cells and non-tumor-initiating cells. US-Japan Cancer Genomics Workshop. 2011. Workshop.
5. Kondo Y. 「Epigenetics in Cancer」 Epigenetic plasticity contributing to establishment of tissue heterogeneity in glioblastoma. The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference. Epigenetics in Cancer. 2012. Symposium.
6. Kondo Y. 「Epigenetics in Diseases」 Polycomb repressive complex 2-mediated epigenetic plasticity contributing to establishment of tissue heterogeneity in glioblastoma. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases. 2012. Symposium.
7. Kondo Y. 「Biomarker in Cancer」 Translational Implications of Epigenetic Changes in Human Malignancies. 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society. 2012. Symposium.
8. Kondo Y. Study of Aberrant DNA Methylation in Human Hepatocyte Chimeric Mice. International Symposium on Genetic Regulation and Targeted Therapy of Cancer and 3rd Symposium of A3 Foresight Program. 2012. Symposium.
9. Kondo Y. 「Translational Genomic Medicine」 Mechanistic Link between Hepatitis Viral Infection and Induction of Aberrant DNA Methylation in Human Hepatocyte Chimeric Mice. The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop. 2012. Workshop.
10. Kondo Y. 「Epigenetics and Cancer Cell States」 Epigenetic plasticity and its clinical implications in human neoplasia. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. 2013. Symposium.

#### 【主要な学会発表】

1. Okamoto Y, Shinjo K, Kataoka H, Joh T, Tanaka Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y, Kondo Y. Analysis of epigenetic alterations in mice with humanized liver after hepatitis virus infection. 102th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2011. Poster.
2. Shinjo K, Kondo Y, Okamoto Y, Yokoyama T, Noriyasu U, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with clinical outcome of lung adenocarcinoma. 102th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2011. AACR-GlaxoSmithKline

Outstanding Clinical Scholar Award. Poster.

3. Katsushima K, Shinjo K, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Natsume A, Kondo Y. Epigenetic regulation of miR-1275 through histone H3 lysine 27 trimethylation during human glioma stem-like cell differentiation. 103th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2012. Poster.
4. Natsume A, Katsushima K, Shinjo K, Ohka F, Hatanaka A, Ichimura N, Kondo Y. Epigenetic Plasticity Regulated by Polycomb Repressive Complex 2 in Human Glioblastoma. Gordon Research Conference “Cancer Genetics & Epigenetics” 2013. Poster.
5. Ohka F, Natsume A, Kondo Y. Loss of p53 and Nf1 and subsequent epigenetic alterations in glioblastoma mouse model. Gordon Research Conference “Cancer Genetics & Epigenetics” 2013. Poster.
6. Shinjo K, Okamoto Y, Tanaka Y, Issa JPJ, Kondo Y. Innate Immune System is Adequate for Induction of DNA Methylation after Hepatitis Viral Infection in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. Gordon Research Conference “Cancer Genetics & Epigenetics” 2013. Poster.

【欧文総説、単行本等】

1. Shinjo K, Kondo Y. Clinical implications of epigenetic alterations in human thoracic malignancies: epigenetic alterations in lung cancer. *Methods Mol Biol.* 2012, 863, 221–39.
2. Okamoto Y, Kondo Y. General Mechanisms of Cancers -Genetic and epigenetic alterations in inflammation-related cancers-. Cho CH, Yu J. *From Inflammation to Cancer: Advances in Diagnosis & Therapy for Gastrointestinal and Hepatological Diseases.* World Scientific Publishing, 29–48. 2012.