

尿路上皮発癌の Initiation としての第9染色体の異常

秋田大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 加藤哲郎教授)

羽瀨 友則, 加藤 哲郎

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 小川 修教授)

高橋 毅, 小川 修

SIGNIFICANCE OF CHROMOSOME 9 ALTERATIONS AS AN INITIAL STEP IN UROTHELIAL CARCINOGENESIS

Tomonori HABUCHI and Tetsuro KATO

From the Department of Urology, Akita University School of Medicine

Takeshi TAKAHASHI and Osamu OGAWA

From the Department of Urology, Kyoto University Graduate School of Medicine

One of the most important features of urothelial cancers of the bladder and upper urinary tract is metachronous and/or synchronous multifocal occurrence with high frequency. Since such multifocal recurrent tumors are derived from a common transformed cell, the chronological tracing of genetic alterations in such multifocal tumors may reveal the precise timing and role of genetic alterations in urothelial carcinogenesis.

In this study, we tested the presence of microsatellite alterations in synchronous and/or metachronous multifocal urothelial cancers to examine the chronological genetic alterations for the presence of hierarchy of genetic alterations in urothelial cancer development. Genetic alterations at 20 microsatellite loci on 8 chromosomal arms (2q, 4p, 4q, 8p, 9p, 9q, 11p, and 17p) were tested. Judging from the patterns of allelic deletion and microsatellite shifts, multifocal tumors in at least 21 (81%) of the 26 evaluable patients were considered to be derived from a single progenitor cell. In patients with multifocal tumors of an identical clonal origin, discordant microsatellite alterations were observed at significantly lower frequencies on chromosome 9 compared with those on the other chromosomes tested. The heterotopic spread and genetic divergence may occur long before the clinical manifestation of multiplicity from a single transformed cell. The data strengthens the previous view that heterotopic spread of transformed progenitor cells and genetic divergence occur after chromosome 9 alterations in most of urothelial cancers.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 749-755, 2000)

Key words: Bladder cancer, Molecular genetics, Multifocality, Tumor suppressor gene, Chromosome 9

緒 言

近年泌尿生殖器癌を含めた多くのヒト癌で多段階発癌と進展のメカニズムが分子遺伝学・生物学的研究により解明されてきた。従来の研究は、様々な病期の腫瘍を解析し、初期病変でもしばしば検出される異常を、early event または rate limiting な異常とみなし、進行癌で検出されるが初期病変で検出されない異常を、進展に関与する late event の異常と想定してきた^{1,2)} すなわちさまざまな病期、異型度の腫瘍の遺伝子異常を解析し対比することで、あたかも遺伝子異常の蓄積と腫瘍の進展が呼応しているような図式が示されてきた¹⁾ しかし、これらは腫瘍の成長段階での single point で採取された検体データを基に推論さ

れた結果であり、経時的にヒト癌の遺伝子変化を追跡したデータは数少ない。

一方、尿路上皮癌には同時性、異時性の多発性という特徴があり、特に膀胱癌では内視鏡的治療がしばしば行われるため、遺伝子異常を経時的に追跡できる可能性がある。しかし、この解析には異所性・異時性再発が同一クローン (single progenitor cell) 由来であることを明確にしておかないと結果の解釈が困難となる。

本研究は microsatellite marker を用いた分子遺伝学的解析を同時性・異時性の多発尿路上皮癌を対象として行い、多発腫瘍のクローンの起源を明らかにしておき、それらの遺伝子変化の経時的追跡により、遺伝子変化の hierarchy の存在を検討した。さらに mic-

rosatellite の異常とは別の genetic marker として、第9染色体の CpG methylation の異常についても検討した。

対象と方法

1 対象

1990年5月から1999年10月までの期間に京都大学、秋田大学および関連施設において、尿路上皮癌に対して手術や剖検を施行された64例から得られた127検体の腫瘍組織および良性疾患の患者または腎移植ドナーからの11例の正常尿路上皮組織を対象とした。このうち30例からは93検体の同時性・異所性多発尿路上皮癌組織を解析した。コントロールとして患者の末梢血または正常腎組織を用いた。

2. DNA 抽出

新鮮凍結組織ならびに末梢血から proteinase-K 処理、phenol/chloroform 抽出により DNA を得た。腫瘍組織は DNA 抽出に供する部に隣接するスライスをホルマリン固定、HE 染色し、正常細胞の混入の少ないことを確認した。

3. microsatellite analysis

microsatellite marker を用いた LOH (loss of heterozygosity) と microsatellite shift (instability) 検出の詳細は他論文に記載済みである^{3,4)}。6つの染色体上の20のマーカーを用いたが、これらは現在までの尿路上皮癌を対象とした分子遺伝学的解析によりしばしば異常の検出されてきた染色体である^{2,3,5-7)}。さらに一部の症例では第9染色体上の詳細な欠失領域を限定するために、数個のマーカーを追加した。20のマーカーの概略は以下の如くである。D2S206 (2q), D2S336 (2q), D4S404 (4p), D4S1546 (4p), D4S426 (4q), D4S171 (4q), D8S261 (8p), D8S520 (8p), D9S171 (9p), D9S126 (9p), D9S1749 (9p), D9S736 (9p), D9S66 (9q), D9S1848 (9q), D9S1793 (9q), GSN (9q), D11S907 (11p), D11S922 (11p), D17S796 (17p), D17S1176 (17p)。マーカーの詳細は Genome Database (<http://gdbwww.gdb.org/>) から得た。マーカープライマーの片方を ³²P でエンドラベルし、ポリアクリルアミドゲル泳動後、通常のX線フィルムで像を得た。

4. 9q32-33 での CpG methylation 異常の解析

尿路上皮癌の抑制遺伝子の候補領域である 9q32-33 に位置する DBCCR1 の exon 1 は CpG island の条件を満たしている^{8,9)}。この exon 1 の20カ所の CpG site (シトジン-グアニン配列) のメチレーションを評価した。ゲノム DNA を bisulfite にて化学修飾すると、メチル化されていないシトジン (Cyt) はウラシル (Ura) に変化するが、メチルシトジン (M-Cyt) は変化しない¹⁰⁾。PCR プライマーを CpG site を避

けるように設定すれば CpG site のメチル化に左右されず増幅可能で、増幅された領域内の CpG site のメチル化の状態を PCR 産物の direct sequence により評価できる。このとき Ura は PCR 増幅により、チミン (Thy) となる。genomic DNA の bisulfite 処理は Frommer らの方法により行った¹⁰⁾。PCR にて DBCCR1-exon 1 内の 218 bp のフラグメントを増幅後、アガロースゲルで泳動後に抽出し、同じプライマーで Sequencer (ABI 377) を用いてシーケンスを行った。メチレーションの程度は CpG site の Cyt と Thy のシグナル比で評価した。メチレーションスコアとして、シーケンスのカーブの Cyt の強度が Thy の 20% 未満の CpG site を "0" (= no methylation), Cyt の強度が Thy の 20~50% を "1" (= minor methylation), Cyt の強度が Thy の 50~200% を "2" (= partial methylation), Cyt の強度が Thy の 200% 以上を "4" (= complete methylation) と定義した。

結 果

1. 多発尿路上皮癌症例のクローン由来—A Single Progenitor Hypothesis vs Field Defect Hypothesis—

同時性や異時性の多発尿路上皮癌30例からの93検体について、多発症例のどの程度が同一クローン由来 (a single progenitor cell origin) か、または field defect による複数クローン由来 (multiple progenitor cell origins) かをマイクロサテライトマーカーを用いて解析した。今回の解析では89/93 (96%) が grade 1~2, Ta~T1 の腫瘍であった。これは low grade/low stage の腫瘍に異時性多発の機会が多かったためと考えられる。複数の腫瘍が同一クローン由来かの判定は、microsatellite shift の一致 (Fig. 1), アレルの部分欠失領域 (partial deletion または subchromosomal allelic deletion) の一致, アレルの欠失のパターン (2本のアレルのどちらかが欠失しているか) の一致, とアレル欠失の頻度 (Fig. 1) などの遺伝子変化が、腫瘍間で偶然に一致する確率が、過去の文献より 5% 未満とされる場合を同一クローン由来と判定した⁴⁾。遺伝子異常がまったく認められない症例はこの判定より除外した。これらの判定基準により、多発腫瘍が同一クローン由来と判定されたのは、26例の評価可能症例中、21 (81%) であった。遺伝子異常が検出できなかった例を考慮すると、同一クローンと判定できる割合はさらに増える可能性があると考えられた。

2. 多発尿路上皮癌の経時的観察—第9染色体の重要性—

先の解析で多発腫瘍が同一クローンと判定された21症例のうちについて、調べたどの染色体の異常に一

致, 不一致が認められるかを検討した. 1例を Fig. 2 に示す (Fig. 2). この例では4腫瘍のいずれにも9p,

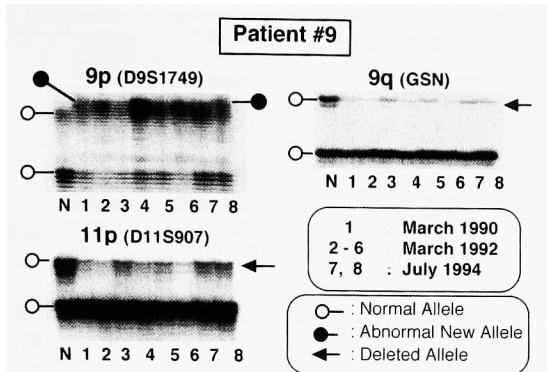


Fig. 1. Concordant microsatellite alterations on 9p (D9S1749), 9q (GSN), and 11p (D11S907) in 8 multifocal tumors of the bladder. A complete identical microsatellite shift pattern was detected at D9S1749, which suggests that the multifocal tumors were derived from an identical progenitor cell. All were grade 1-2, Ta-1 papillary bladder tumors and they are treated by transurethral resection. ○: normal allele, ●: microsatellite shift, Horizontal arrow: common deleted allele.

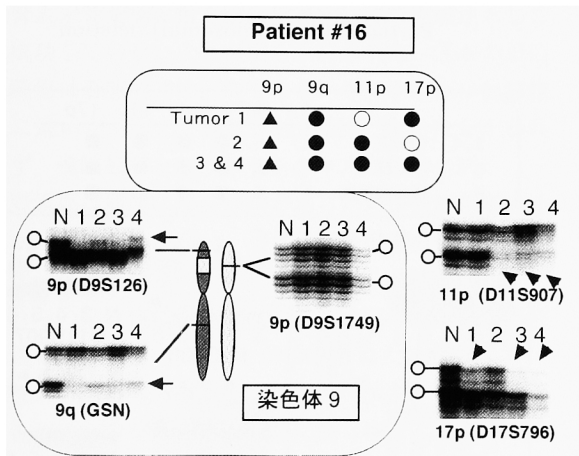
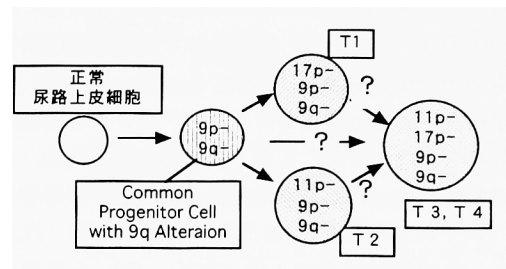


Fig. 2. Discordant microsatellite alterations in 4 multifocal tumors with a presumable identical progenitor cell in Patient #16. The deletion of an identical allele at D9S126 and GSN with retention of heterozygosity at D9S1749 was found. The deletion of one allele at D17S1176 was found in tumors #1, #3 and #4. At D11S907, the deletion of one allele was found in tumors #2, #3 and #4. Since the partial deletion on the identical 9p allele is considered to be a rather rare event, the four tumors were considered to have been derived from a common progenitor cell and to have acquired genetic divergence during multifocal tumor development. ○: normal allele, ◑: lost allele, Horizontal arrow: common deleted allele.

9q の同じアレルに部分欠失が認められた. 染色体9の詳細な欠失マッピングのデータより, こういった同じ部分欠失が同じアレルに偶然生じる確率は非常に低いと考えられる^{3,11)}. したがってこれらの4腫瘍は同一クローン由来とみなされる. とところが他の11pや17pの異常には不一致が認められる. しかも第9染色体に異常をきたした細胞が腫瘍として臨床的に検出されるかなり以前より clonal expansion をきたしたと考えられた (Fig. 3). 同様な解析により21例を検討すると, 他の染色体異常に比べて第9染色体の異常は多発腫瘍間で非常に一致率が高いことがわかった (Fig. 4). このうち13例は再発例 (異時性多発腫瘍) であり, 時間的な隔たりがあっても同様の傾向があることがわかった. 以上の結果より, 経時的観察によっても第9染色体の異常が尿路上皮発癌の非常に初期に起こることが示された. さらに第9染色体の異常だけでは腫瘍形成に至らないが, この細胞は多発腫瘍を形成するかなり以前に, 尿路内を播種または上皮内進展している可能性があると思われる.

3. 転移巢の origin の分子遺伝学的解析

第9染色体の異常を尿路上皮癌細胞のクローン由来



T 1: January 1997, T-2, 3, 4: August 1997

Fig. 3. Schematic model of the accumulation of genetic alterations in Patient #16. T #1=G2-T2 ureteral tumor. T #2, #3, #4=G2-papillary Ta-1 superficial bladder tumor.

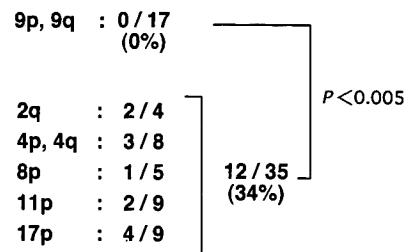


Fig. 4. The significantly low rate of discordant genetic alterations on chromosome 9 compared with alterations on the other chromosomes. Note the pattern of chromosome 9 alterations was consistent between multifocal tumors in each patient. Therefore, chromosome 9 alterations are considered to be a good key molecular marker for monitoring the recurrence of urothelial cancer.

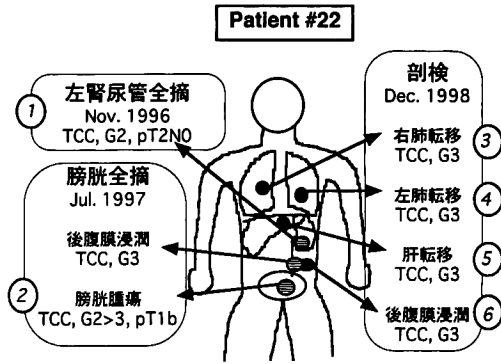


Fig. 5. Schematic view of clinical course and tumors tested in patient #22.

同定のマーカーとして、その他の染色体異常を進展にかかわる異常として解析を行うことで、従来の病理学的診断では明確にできなかった多発尿路上皮癌の進展、転移のシナリオが明確にできる例もある。

1例を提示する (Fig. 5). 症例 (#22) は男性で、54歳時に左腎盂癌 (TCC, G2, pT2N0M0) に対し腎尿管全摘除術を受けた。8ヵ月後浸潤性膀胱癌が発見され、膀胱全摘除術施行。膀胱癌は G2<3, pT1bであったが、膀胱全摘の際、左腸腰筋から総腸骨動脈付近にびまん性病変があり、生検を行ったところ、G3のTCCであった。この時点でこの後腹膜病変が腎盂癌か膀胱癌由来かは不明であった。その後、全身化学療法、放射線療法を行ったが、18ヵ月後肺転移、肝転移をきたして死亡した。初発時の腎盂腫瘍、その後の膀胱腫瘍、さらに剖検で得られた肺の転移病変2個 (いずれも TCC, G3)、肝転移腫瘍1個 (TCC, G3)、左後腹膜病変部1個 (TCC, G3) を採取し、DNA解析を行った (Fig. 6, 7)。まず、腎盂と膀胱腫瘍の解析では、両腫瘍とも9pは正常、9qには同じアレルに部分的欠失を認めた。しかもこの部分欠失の breakpoint は D9S53 (9q22.1-31) と D9S1848 (9q32-33) の間にあることが判った (Fig. 6)。この部位で移行上皮癌に部分欠失が認められることは非常に稀であり^{3,11)}、両腫瘍が第9染色体の同じアレルに稀な breakpoint を偶然に持つとは考えられないことより、両腫瘍は同じ起源 (クローン) 由来と判定した。他の染色体には不一致が認められ、腎盂腫瘍には17pのみ欠失があり、膀胱癌には2q, 4p, 11p, 17pに欠失があった。特に17pの欠失アレルは両腫瘍間で逆転しており (Fig. 6)、両腫瘍由来の鑑別にきわめて有用であることが判った。次に剖検で得られた腫瘍の解析を行うと、肺転移、肝転移の3つの腫瘍はいずれも膀胱癌とまったく同じ遺伝異常があり、後腹膜転移は17pの欠失アレルから腎盂腫瘍由来であることが判った (Fig. 7)。さらに後腹膜転移には腎盂癌では見られなかった2qと4pの欠失が加わっていた (Fig. 7)。

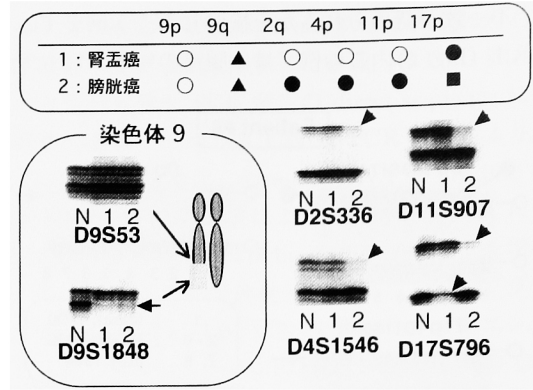


Fig. 6. Microsatellite analysis of the renal pelvic tumor (#1) and bladder tumor (#2) obtained at two independent operations. An identical subchromosomal partial deletion on the identical 9q allele was found in both tumors, therefore indicating that the two tumors shared a common progenitor cell. The deletion of 2q, 4p and 11p were found only in the bladder tumor. The deletion of distinct alleles on 17p was found, which could serve as a unique genetic marker for distinguishing the origin of the following recurrent tumors. ○=Retention of both allele, ●=Allelic deletion (=LOH), ■=Allelic deletion of distinct allele, ▲=Partial (Subchromosomal) deletion.

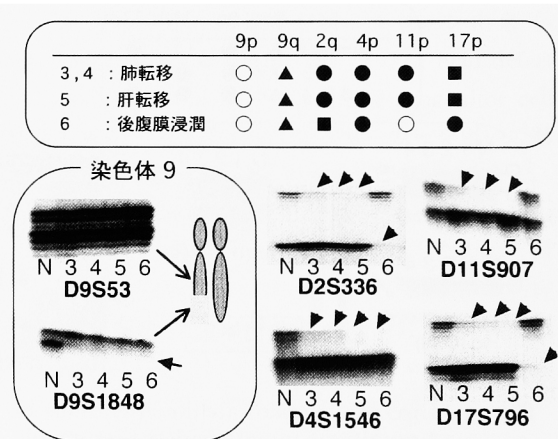


Fig. 7. Microsatellite analysis of the metastatic lung tumors (#3 and #4), a metastatic liver tumor (#5) and an infiltrating tumor (#6) in the retroperitoneum. Based on the pattern of the deleted alleles on 17p, the metastatic lung tumors and metastatic liver tumor were considered to have been derived from the bladder tumor. The retroperitoneal infiltrating tumor was judged to have been from the renal pelvic tumor. Note that the retroperitoneal tumor had additional genetic alterations on 2q and 4p. ○=Retention of both allele, ●=Allelic deletion (=LOH), ■=Allelic deletion of distinct allele, ▲=Partial (Subchromosomal) deletion.

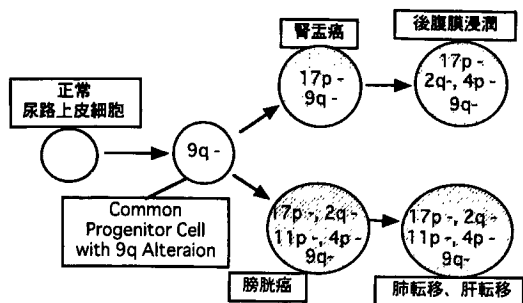


Fig. 8. Schematic model of the accumulation of genetic alterations renal pelvic tumor, bladder tumor and the following metastatic tumors in patient #22. As shown in Fig. 6 & 7, the distinct allele was deleted in renal pelvic tumor and bladder tumor. Therefore, the pattern of deleting on 17p could serve as a clear genetic fingerprint in determining the origin of each metastatic lesion.

この症例は数点で示唆に富んでいる。①腎盂癌や膀胱癌が臨床的に明らかになるかなり前より（少なくとも8カ月）、9qに異常を持つ細胞がなんらかの機序で腎盂と膀胱に進展し、その後、別の遺伝子異常を伴いながら腫瘍を形成したことになる（Fig. 8）。②本例では腎盂尿管全摘除術も膀胱全摘除術も根治療法としては成功していないことが明らかにされた。③おのおの腫瘍は形態的には区別できないが、明らかに転移様式に違いがあった。膀胱癌は病期はT1bにもかかわらず、遠隔転移というポテンシャルは非常に高く、一方腎盂癌は局所に浸潤傾向があったが遠隔転移能は乏しかった可能性が高い。④さらに腎盂癌の後腹膜進展に伴って2qや4pの欠失が加わっていることより、これらの染色体に尿路上皮癌の悪性度に関与する癌抑制遺伝子が存在することが示唆された。⑤最後に、9qに異常のある細胞をなんらかの方法で早期に検出できれば、少なくとも膀胱癌に関して腎盂癌治療の時点で同時に治療を開始できた可能性がある。

4. 染色体9q32-33におけるメチル化異常

以上の結果より、尿路上皮癌の発生、さらには今後分子遺伝学、生物学的手法を利用した診断、治療を考えていく上で第9染色体の異常が重要であることが判った。現在までの諸文献から9p, 9qともに重要な癌抑制遺伝子が存在すると考えられる^{8,11-14)} 9pにはCDKN inhibitorの1つであるp16遺伝子が同定されており、尿路上皮癌の抑制遺伝子として矛盾はない^{12,13)} 一方9qに関しては未だに確定的な抑制遺伝子は同定されていない。筆者のひとり（TH）らは、9q32-33にその候補領域、DBC1 (Deleted in Bladder Cancer 1)があることを同定し^{8,14)}、さらに同領域より新たな遺伝子DBCCR1をクローニングした⁹⁾ このDBCCR1が尿路上皮癌の抑制遺伝子であ

るかは明らかでないが、尿路上皮癌で高率にDBCCR1の5'領域にhypermethylationが起ること、このhypermethylationにより、DBCCR1の発現が抑制されることが判っている⁹⁾ また遺伝子の5'領域に存在するCpG islandのhypermethylationが起ることによって遺伝子の発現異常（低下）やゲノムの不安定性をきたす可能性があるとしてされている^{15,16)} そこでDBCCR1の5'領域のCpG methylationを詳細に調べ、methylationのタイミング、patternを検討した。

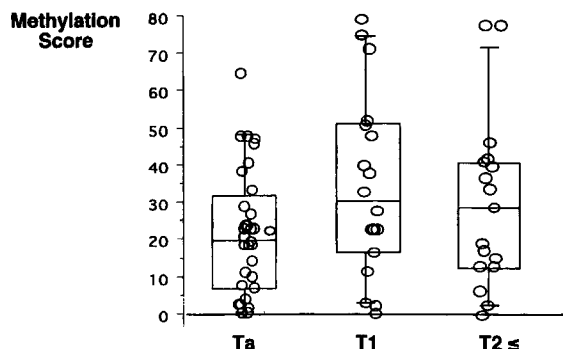
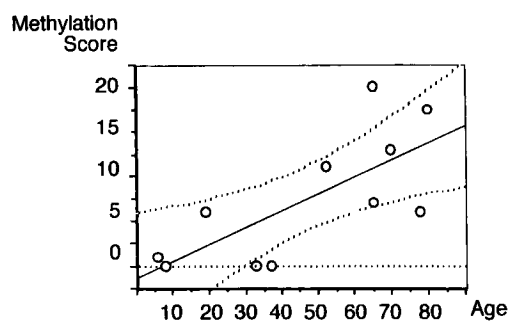


Fig. 9. Abnormal hypermethylation at a 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in urothelial cancer. Methylation analysis at 20 CpG sites of 5'-region of the DBCCR1 gene at 9q32-33 using bisulfite genomic DNA modification technique showed that the hypermethylation at this locus is not associated with tumor progression. No association was found between the hypermethylation and tumor grade (data not shown). The hypermethylation at this locus may be one of the earliest events in urothelial carcinogenesis.



$R = 0.722, Y = -1.35 + 0.187 X, p = 0.0121$
Fig. 10. Aging and hypermethylation at a 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in normal urothelium. Although much weaker than observed in tumor cells, hypermethylation of the 5'-region of the DBCCR1 was found in correlation with aging. Therefore, predominant occurrence of urothelial cancers in aged men and women may be related to hypermethylation at this locus associated with aging.

まず病期, 異型度別に解析を加えたが hypermethylation との関連はなかった (Fig. 9). また hypermethylation の程度と LOH や microsatellite shift など他の遺伝子異常との関係も明らかでなかった. さらに良性疾患患者や腎移植ドナーの正常尿路上皮11例の CpG methylation を解析した. 興味あることに腫瘍に比べて非常にわずかであるが, 加齢と共に正常尿路上皮でも hypermethylation が進んでいく所見が認められた (Fig. 10). 最後に21例, 44の多発尿路上皮癌で解析を行った. 多発腫瘍間で methylation pattern が一致していたのは21例中13 (62%) 例であった. methylation pattern の一致, 不一致は腫瘍が異時性・同時性多発かに関係ないが, 経時的には後発の腫瘍で methylation が進む傾向があった.

考 察

本研究では尿路上皮癌の同時性, 異時性の多発という特徴を生かして, 他のヒト癌では困難な経時的観察を行った.

その結果, 従来の見解どおり尿路上皮癌 進展においては 9p, 9q の異常 (LOH や microsatellite shift) はきわめて初期に起っていることが判った. また 9p や 9q の異常が尿路上皮癌の rate limiting factor であり, この染色体上の抑制遺伝子がいわゆる発癌の gate keeper¹⁷⁾ である可能性が示唆された. さらに多発腫瘍の解析を行うことで以下のことが示唆された. すなわち, ①おもに表在性の多発尿路上皮癌症例では, (少なくとも) 約80%は同一クローン (単一細胞) 由来と考えられる. ②表在性尿路上皮癌の多くは再発を繰り返しても遺伝的には安定であるが, 一部の例では遺伝子異常の多様性が認められる. この遺伝子異常の多様性は第9染色体の異常が生じた後に起る. ③第9染色体の異常が生じて, 臨床的に腫瘍を形成せずに dormant な状態が長期に存在する. ④第9染色体 (遺伝子) に異常をきたした尿路上皮細胞はそれだけでは腫瘍形成に至らなくても, 尿路内を進展, 播種する potential を備えている.

クローンの由来を明確にした上で, 経時的な観察を行うことでおのおのの遺伝子異常の意味づけが可能である. 提示した症例 #22 はこの良い例である. また従来の形態病理では明らかになり得なかった転移巣の由来, 治療の正当な評価が明確にできた. さらに, 本例では初発の腎盂腫瘍発見の時点で膀胱にも第9染色体に異常をもった細胞が存在したはずである. もし第9染色体異常をもった細胞を検出できたなら, この時点で治療を開始でき, 患者の延命に寄与できた可能性がある.

第9染色体の LOH や microsatellite shift, さらに癌抑制遺伝子の変異などの遺伝子異常より早期に起

る可能性のある遺伝的異常があるのだろうか. 9q 上のいくつかの癌抑制遺伝子の候補領域の1つである 9q32-33 に存在する DBCCR1 の 5' 領域の methylation を調べると, その程度は腫瘍の異型度, 病期に関係ないが, 加齢に伴い正常尿路上皮でもわずかながら進行していくことが判った. 異常 methylation により, 本来発現すべき遺伝子の発現低下 消失や genomic instability が起りうる可能性があることが知られている^{15,16)} このことより尿路上皮癌発症の基礎として, 加齢に伴う 9q の methylation が関与している可能性が示唆される¹⁸⁾ 健康者でも認められる正常尿路上皮の methylation の程度と尿路上皮発癌との関係は今後興味ある問題である. さらに発癌早期の異常 methylation が 9q だけに生じているものか, その他の進展に関与する染色体では違ったタイミングで起るのかは今後の重要な検討課題と思われる.

結 語

多発尿路上皮癌の経時的な遺伝子解析により, 以下のことが示唆された. ①おもに表在性の多発尿路上皮癌症例では, (少なくとも) 約80%は同一クローン由来と考えられる. ②表在性尿路上皮癌の多くは再発を繰り返しても遺伝的には安定である. ③多発尿路上皮癌の腫瘍間での遺伝子変化の多様性は第9染色体の異常が生じた後に起る. ④第9染色体の異常が生じた後も臨床的に腫瘍を形成せずに dormant な状態が存在する. ⑤第9染色体に異常を持つ細胞はそれ自体では腫瘍形成に至らなくても, 尿路内を播種または上皮内進展する能力をもっている.

文 献

- 1) Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767, 1990
- 2) Dalbagni G, Presti J, Reuter V, et al.: Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* **342**: 469-471, 1993
- 3) Habuchi T, Devlin J, Elder PA, et al.: Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene* **11**: 1671-1674, 1995
- 4) Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, et al.: Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res* **58**: 5835-5841, 1998
- 5) Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, et al.: Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* **50**: 7081-7083, 1990
- 6) Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, et al.: Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer. *Int J Cancer* **53**:

- 579-584, 1993
- 7) Knowles MA, Elder PA, Williamson M, et al.: Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* **54**: 531-538, 1994
 - 8) Habuchi T, Yoshida O and Knowles MA: A novel candidate tumor suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC. *Hum Mol Genet* **6**: 913-919, 1997
 - 9) Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, et al.: Structure and methylation based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* **48**: 277-288, 1998
 - 10) Frommer M, McDonald LE, Miller DS, et al.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA stands. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1827-1831, 1992
 - 11) Keen AJ and Knowles MA: Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder. *Oncogene* **9**: 2083-2088, 1994
 - 12) Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al.: Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nature Genet* **11**: 210-212, 1995
 - 13) Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, et al.: p16(CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet* **4**: 1569-1577, 1995
 - 14) Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, et al.: Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes and Cancer* **26**: 171-175, 1999
 - 15) Jones PA: DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* **56**: 2463-2467, 1996
 - 16) Lenauer C, Kinzler KW and Vogelstein B: DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2545-2550, 1997
 - 17) Kinzler KW and Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-170, 1996
 - 18) Ahuja N, Li Q, Mohan AL, et al.: Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* **58**: 5489-5494, 1998

(Received on September 22, 2000)
(Accepted on October 3, 2000)