

学 位 論 文 要 旨

氏 名 五十嵐 一晴



論 文 題 目

「Prognostic Significance of Promoter DNA Hypermethylation of the
Cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in Primary Gallbladder Cancer and
Gallbladder Disease

(胆嚢癌および胆嚢疾患における CDO1 遺伝子プロモーター領域の
DNA メチル化とその臨床的意義)」

指 導 教 授 承 認 印

渡邊昌彦



Prognostic Significance of Promoter DNA Hypermethylation of the Cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in Primary Gallbladder Cancer and Gallbladder Disease

(胆嚢癌および胆嚢疾患における CDO1 遺伝子プロモーター領域の

DNA メチル化とその臨床的意義)

氏名 五十嵐 一晴

【背景】

胆嚢癌は、SS 以深浸潤、リンパ節転移の有無が予後因子として報告されており、根治切除後も高率な局所再発、遠隔転移によりその予後は不良である。そのため有効な術後補助療法が期待されるが、現時点では胆嚢癌に対するエビデンスの高い補助化学療法は乏しく、臨床試験がすすめられている。このことから胆嚢癌に対する早期診断、あるいは予後予測因子、補助療法の効果予測に関連した分子マーカーが必要と考えられる。

DNA メチル化とヒストン・アセチル化はヒトの癌で最も高頻度に認められるエピジェネティックな変化である。遺伝子の 5'末端に存在する遺伝子発現調節領域すなわちプロモーター領域 DNA には CpG アイランドとして知られている CG 豊富な領域がある。この領域のシトシンがメチル化を受けるとクロマチンが凝縮し転写因子が近寄れなくなり遺伝子発現が低下する。癌抑制遺伝子では癌特異的にこのメチル化が起こり、遺伝子発現が低下していることが繰り返し確認されてきた。我々は癌細胞株の脱メチル化処理後遺伝子発現をマイクロアレイで包括的に検索し、多くの新規かつ独自のメチル化遺伝子を同定し報告してきたが、特に優れた癌抑制遺伝子候補として Cysteine dioxygenase type1 (CDO1) に注目している。様々なヒト癌組織において CDO1 遺伝子の プロモーター領域 DNA が癌特異的にメチル化されていることが報告され、さらに乳癌、食道扁平上皮癌、バレット食道癌において予後との相関を示した。

今回我々は胆嚢癌、および胆嚢良性疾患における CDO1 遺伝子プロモーター領域 DNA メチル化の臨床的意義について予後も含めて検討した。

【対象と方法】

胆嚢癌細胞株2株(G-415、TGBC2TKB)を用いて *CDO1* 発現解析を行った。Rneasy Mini Kit (QIAGEN、Hilden、Germany) を用いて RNA を抽出し、Super Script III reverse transcriptase kit (Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて cDNA に逆転写した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行った後、電気泳動にて発現の有無を定性評価した。さらに 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) (Sigma-Aldrich)、histone

deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) (Sigma-Aldrich) を用いて脱メチル化処理を行い、*CDO1* の再発現の有無を RT-PCR で定性評価した。

1986 年から 2014 年に当院で外科切除が施行され、手術時の組織検体の同意が得られた胆嚢癌症例 99 例、および胆嚢良性疾患症例 26 例（慢性胆嚢炎 10 例、胆嚢腺筋腫症 9 例、黄色肉芽腫性胆嚢炎 7 例）を対象とした。

臨床病理学的因子は TMN 分類に関して癌取り扱い規約第 6 版(胆道癌)を用いた。術式は切除範囲により、胆嚢摘出術、拡大胆嚢摘出術（胆嚢床切除, S4/5 下切除）、拡大手術の 3 つに分類した。術後補助療法は一定のレジメンはなく、各術者、あるいは外来主治医の判断で行った。

本研究では、パラフィン包埋ホルマリン固定検体〔胆嚢癌腫瘍組織（癌部）99 検体、胆嚢癌非癌粘膜組織（非癌部）78 検体、胆嚢良性疾患組織（良性組織）26 検体〕から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Sciences, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA) を用いて bisulfite 処理を行い、さらに bisulfite 処理した DNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に使用した。iQ Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた iCycler iQ Real-Time PCR Detection System にて、定量的 TaqMan メチル化特異的 PCR (TaqMan-MSP) を施行した。プライマーとプローベのシーケンスはすでに発表された論文から用いた。大腸癌細胞株の DLD-1 を positive control、肝細胞癌細胞株の HepG2 を negative control として用いた。メチル化の比率 (TaqMan methylation value, TaqMeth V) は *CDO1* の蛍光強度を β -actin の蛍光強度で除算したものに 100 倍して算出した。

免疫組織化学 (IHC) において、免疫染色では、1 次抗体は rabbit *CDO1* polyclonal antibody (ATLAS ANTIBODIES, Bromma, Sweden, dilution of 1:100) を用いて 4℃で一晩インキュベートした。検出は Histofine Simple Stain PO (M) kit (Nichirei, Tokyo, Japan) を用い、DAB2 分にて発色させた。

統計学的解析では、名義変数にはカイ二乗検定、連続変数には Student's-t 検定や分散分析 (ANOVA) を行った。5 年生存率 (OS) は Kaplan-Meier 法で推定し、log-rank 検定で有意差を検定した。単変量解析で予後因子となった ($P < 0.05$) 因子をコックス比例ハザード回帰モデルで多変量解析を行った。 $P < 0.05$ は有意差ありと判定した。すべての解析は SAS software package JMP, version 11.0 (SAS Institute, Tokyo, Japan) にて行った。

【結果】

1. 胆嚢癌症例 99 例の平均年齢は 67 歳、R0 切除率は 76% であった。再発率は 46% で観察期間中央値は 32 ヶ月であった。
2. 胆嚢癌細胞株 2 株を用いた *CDO1* 発現解析では、いずれの細胞にも *CDO1* の発

現を認めなかった。胆嚢癌細胞株より抽出した DNA から TaqMan-MSP を行い、*CDO1* の高メチル化を確認した。脱メチル化処理により、*CDO1* の再発現を認めた。

3. 胆嚢癌症例および胆嚢疾患症例の組織を用いた解析では、TaqMeth V の中央値は癌部；16.5 (0-106)、非癌部；2.3 (0-72)、良性組織；0 (0-5.3) であった。
4. 癌部における TaqMeth V は非癌部と比し、有意に高値であった ($p<.0001$)。
5. 癌部における TaqMeth V は良性組織と比し、有意に高値であった ($p<.0001$)。腫瘍診断に関する ROC 解析では AUC が 0.89、TaqMeth value cut off 値 5.4 において、感度は 70%、特異度は 100% であった。
6. 非癌部における TaqMeth V は良性組織と比し、有意に高値であった ($p=0.023$)。
7. 良性胆嚢疾患において、黄色肉芽腫症の TaqMeth value は慢性胆嚢炎および胆嚢腺筋腫症と比し、有意に高値であった ($p=0.0010$)。
8. 胆嚢癌症例において、TaqMeth V は pStage ($p=0.027$)、T 因子 ($p=0.0060$)、肉眼増殖形式 ($p=0.044$)、静脈侵襲 ($p=0.0082$) と統計学的有意な相関を認めた。pStage において pStageI とそれ以外の pStage の間でのみ有意差を認めた ($p=0.018$)。
9. 胆嚢癌症例に関する予後解析では、より詳細な予後解析のため、OS に対する最適カットオフ値を log-rank plot 法にて決定した。OS に対するリスク比が最も大きくなる TaqMeth V は 17.7 であった (RR:2.5)。最適カットオフ値を用いて胆嚢癌症例を *CDO1* 高 TaqMeth V 群 (TaqMeth V ≥ 17.7 , 47 例) と *CDO1* 低 TaqMeth V 群 (TaqMeth V < 17.7 , 52 例) の 2 群に分けた。*CDO1* 高 TaqMeth V 群 (5 年生存率 34%) は *CDO1* 低 TaqMeth V 群 (5 年生存率 69%) に比し有意に予後不良であった ($p=0.0023$)。
10. *CDO1* 高 TaqMeth V 群のうち 10 例、*CDO1* 低 TaqMeth V 群のうち 10 例における免疫組織化学染色により、*CDO1* TaqMeth V と *CDO1* 蛋白との関連性を検証した。*CDO1* 低 TaqMeth V 群では 10 例全てに *CDO1* の強発現を認めたが、*CDO1* 高 TaqMeth V 群では 3 例のみ *CDO1* 強発現を認め、7 例は *CDO1* 弱陽性であり、免疫染色における *CDO1* 発現強度は *CDO1* メチル化と有意に相関した ($p=0.0002$)。
11. 胆嚢癌症例 99 例の 5 年生存率は 52% であった。OS に関する単変量解析では術前血清 CA19-9、術前炎症、T 因子、リンパ節転移、遠隔転移、stage、組織型、組織学的浸潤形式、肉眼所見、リンパ管侵襲、静脈侵襲、腫瘍遺残度が予後不良因子であった。
12. Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量予後解析 (OS) では *CDO1* 高メチル化 (≥ 17.7)、リンパ管侵襲あり ($p=0.028$)、腫瘍遺残あり (R1/2) ($p=0.042$) は独立した予後不良因子であった。
13. *CDO1* 高メチル化 (TaqMeth V ≥ 17.7) は T 因子 (T2 以深)、浸潤様式 (IFN β γ)、

リンパ管高度浸潤 (ly2、3)、静脈浸潤(v2、3)と相関を認めた。

14. 予後に関するサブ解析では、*CDO1* 高メチル化は特に stageII 症例において予後不良と相関していた。

【考察】

CDO1 遺伝子は Pharmacological unmasking microarray (PUM) を用いて様々な癌腫において癌特異的メチル化遺伝子として特定され、その分子学的特徴は癌抑制の機能を有し、癌抑制遺伝子であることが示唆されている。

胆嚢疾患において *CDO1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を癌特異的に認めた。一方、胆嚢癌非癌粘膜組織（非癌部）にも良性組織と比べて有意に *CDO1* 遺伝子 DNA メチル化を認めた事は、癌組織周囲に広がる前癌病変の存在を示唆している可能性がある。

CDO1 遺伝子高メチル化は悪性形質獲得との相関を認め、Stage とは独立した予後不良因子であった。

StageII において *CDO1* 遺伝子 DNA 高メチル化は予後不良であり、術後補助療法導入においてハイリスク症例を同定する予後マーカーとなる可能性が示唆された。