

学位論文

「大腸癌 adenoma-carcinoma sequence における
cysteine dioxygenase type1 遺伝子
プロモーター領域のメチル化の関与」

DM15010 小 嶋 慶太

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 外科学
指導教授 渡邊 昌彦

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

【背景・目的】

大腸癌は欧米だけでなく、日本において癌死亡の主要な原因疾患である。大腸癌の発生にはジェネティックな異常と、エピジェネティック異常の蓄積が関与しているとされている。代表的な発癌経路として adenoma-carcinoma sequence 説 (ACS) がある。ACS では多段階発癌モデルとして、低異型性腺腫→高異型性腺腫→粘膜内癌→浸潤癌という進展過程が提唱されており、遺伝子異常のほかにエピジェネティック異常の関与も報告されている。

大腸癌に関連するエピジェネティック異常として、これまで我々は Cysteine dioxygenase type1 (CDO1) 遺伝子のメチル化異常を報告している。CDO1 はヒト癌におけるメチル化特異的遺伝子と同定された遺伝子で、腫瘍抑制遺伝子として機能する。CDO1 のプロモーター領域のメチル化異常は消化器癌などで広く認められており、癌特異的バイオマーカーとしてもその有用性が期待される。

CDO1 のメチル化異常は発癌に関与していることは明らかとなっているが、癌化のどの段階で起こっているのかは解明されていない。本研究では CDO1 のメチル化異常が大腸癌の発癌過程にどのように関与しているのかを明らかにし、その臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

また、血清中の DNA のメチル化を利用した大腸癌診断技術で現在臨床応用されている SEPT9 遺伝子と CDO1 を比較し、CDO1 の臨床診断応用の可能性についても検討を行う。

【対象と方法】

2000 年 1 月 1 日から 2000 年 12 月 31 日までに北里大学病院で、大腸癌の診断で手術治療を受けた 107 例の癌組織および非癌粘膜を対象とした。発癌経路の機構を理解するために、2000 年に内視鏡的切除を受けた 90 例の腺腫も対象とした。腺腫は細胞異形と構造異型によって従来の分類の軽度 (mild atypia)、中等度 (moderate atypia)、高度異型 (severe atypia) に分類した。さらに現行の分類である軽異型度腺腫 (low grade adenoma) と、高異型度腺腫 (high grade adenoma) に分類し評価した。Mild atypia が 30 例、moderate atypia が 30 例、severe atypia が 30 例だった。同様に、low grade adenoma が 60 例、high grade adenoma が 30 例だった。すべての検体はホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織 (FFPE 検体) を使用した。

臨床病理学的因子の解析には年齢、性別、組織型 (分化型、未分化型)、腫瘍の占拠部位、腫瘍径、肝転移の有無、Dukes 分類、また、第 7 版 the American Joint

Committee on Cancer/International Union Against Cancer staging system に基づいた深達度，リンパ節転移，遠隔転移，病期，リンパ管侵襲，静脈侵襲，さらに第 8 版大腸がん取り扱い規約に基づいた浸潤増殖様式を用いた。

メチル化の解析には FFPE 検体から DNA を抽出し，バイサルファイト処理した検体を用いて定量的 TaqMan メチル化特異的 PCR (Q-MSP) を行った。メチル化の定量値として，対象遺伝子の初期量平均値を β -actin で除算し，100 倍した値 (TaqMeth V) を用いた。

CDO1 の機能解析として，足場非依存的増殖能の解析には *CDO1* 導入を行った大腸癌細胞株を混ぜたアガロースを作成し，anchorage-independent colony formation assay を行った。培養から 2 週間後に細胞数 100 個以上のものを 1 コロニーとし，10 視野におけるコロニー数を計測した。

CDO1 蛋白発現の確認には，一次抗体に rabbit *CDO1* polyclonal antibody (12589-1-AP) (proteintech, Rosemont, IL)を用いて免疫染色を行った。

統計解析には，JMP (version 11, SAS Institute INC., Cary, NC, USA) を用い，統計学的な有意水準は P 値 0.05 未満とした。

【結果】

(1) 大腸癌組織での *CDO1* TaqMeth V 中央値は 34.8 (0-100.3) であり，非癌粘膜では 4.3 (0-35.5) であった。TaqMeth V の比較では，癌組織では有意に非癌粘膜に比べメチル化が高度に認められた ($p < 0.0001$)。この結果から，大腸癌組織と非癌粘膜とを区別する最適なカットオフ値を ROC 曲線を用いて算出すると，*CDO1* TaqMethV のカットオフ値は 15.6 (AUC=0.96, 感度 95%, 特異度 90%) であった。

(2) 大腸癌組織での *SEPT9* TaqMeth V 中央値は 3.17 (0-17.74) であり，非癌粘膜では 0 (0-4.25) であった。*SEPT9*でも大腸癌組織では有意に非癌粘膜に比べメチル化が高度に認められた ($p < 0.0001$)。癌組織と非癌粘膜とを区別する最適な *SEPT9* TaqMethV のカットオフ値は 0.06 (AUC=0.96, 感度 94%, 特異度 95%) だった。

(3) 癌組織における *CDO1* のメチル化異常の臨床病理学的特徴では，加齢 ($p = 0.006$; $R = 0.26$)，組織型 ($p = 0.03$)，腫瘍径 ($p = 0.04$; $R = 0.19$)，肝転移 ($p = 0.02$) で有意差を認めた。また，*SEPT9* の臨床病理学的特徴は有意差を示すものはなかった。

(4) *CDO1* の発現のない大腸癌細胞株である HCT116、Colo205 に *CDO1* を強制発現させ soft-agar colony formation assay を行った。結果は，moc に比べ有意に *CDO1* 導入の細胞でコロニー形成が減少した ($p = 0.0007$)。

(5) *CDO1* のメチル化異常と *CDO1* 蛋白の発現を免疫染色で評価した。低メチ

ル化検体 10 例（平均 TaqMethV = 0）と高メチル化検体 10 例（TaqMethV = 75.4）を用い、免疫染色を行った。Score 0 は染色を認めない、Score 1 は散在性の染色または淡い染色に留まる、Score 2 は瀰漫性の濃染を認めると定義し、Score 0~2 の 3 段階に分け評価した。各検体での染色結果は、低メチル化群では全例が Score 2 だった。高メチル化群では Score 0 が 25%、Score 1 が 55%、Score 2 が 25%であり、有意に低メチル化群で *CDO1* の高発現を認めた ($p < 0.0001$)。

(6) 非癌粘膜、腺腫、癌組織とで *CDO1* のメチル化の程度を比較すると、異型度の進行に伴ってメチル化の上昇を認めた ($p < 0.0001$)。非癌粘膜と mild atypia では有意に腺腫でのメチル化が高度であった ($p < 0.0001$)。また、high grade adenoma は low grade adenoma に比べ有意に高度にメチル化を認めた ($p = 0.001$)。 *SEPT9* でも同様に腺腫を含む組織間で TaqMethV の解析を行うと、*CDO1* と同様に異型度の進行に伴ってメチル化の上昇を認めていた。 *SEPT9* では非癌粘膜と mild atypia では有意差を示さなかったが ($p = 0.06$)、high grade adenoma と癌組織では有意差を認めた ($p < 0.0001$)。

【考察】

本研究では、大腸癌組織における *CDO1* のメチル化異常と臨床病理学的特徴を明らかにするとともに、*CDO1* のメチル化異常と ACS との関連を明らかにした。

癌組織での *CDO1* のメチル化異常の臨床病理学的特徴は、加齢による上昇、分化型組織での上昇、腫瘍径の増大に伴う上昇、肝転移群での上昇だった。この結果から、*CDO1* のメチル化異常が悪性形質転換に関与していることが推測された。そこで、anchorage-independent colony formation assay を行い *CDO1* の機能解析を行うと、*CDO1* の導入により細胞増殖抑制が起きることが確認された。

また、*CDO1* のメチル化異常とタンパクの発現に関して免疫染色を行った結果、高メチル化群での発現抑制の結果が得られており、*CDO1* タンパクの発現が *CDO1* のメチル化異常により制御されている可能性が示唆された。

次に、大腸癌発生過程への *CDO1* のメチル化異常の関与について解析を行うと、非癌粘膜から腺腫、癌への進行に伴ってその値は上昇しており、最も注目されたのは、非癌粘膜と mild atypia で有意差を認めたことである。この結果は *CDO1* のメチル化異常が腺腫発現に関与していることを推測させる。更に、low grade adenoma と high grade adenoma で有意差を示していたことから、腺腫の増大と、異型度の増加への関与と考えられる。また、肝転移陽性癌組織では、陰性癌組織に比べ高メチル化を示しており、*CDO1* のメチル化異常が腫瘍細胞の遊走、浸潤能の獲得に寄与していることが推測された。

以上の結果は、*CDO1* のメチル化異常は細胞異型を誘導し、さらにその蓄積増加が癌を発生させるものと推測できる。また、これまで大腸癌発生の主経路として主

張されてきた ACS に新たな根拠を加えることが出来たといえる。

DNA メチル化は安定した修飾であり，その安定性から疾患マーカーとして注目されている．*CDO1* のメチル化異常が癌組織はもちろん，腺腫の段階で非癌粘膜と区別可能であったという結果は，各組織間のメチル化異常の差を利用した大腸癌検出のバイオマーカーとしての有用性が期待できるものといえる．引き続き，本研究結果の臨床応用に向けてさらなる検証を進めていく予定である．

目次

	頁
1. 序文	1
2. 対象と手法	
2-1. 症例と対象組織.....	2
2-2. 臨床病理学的因子.....	2
2-3. 細胞株.....	2
2-4. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR).....	3
2-5. DNA 抽出とバイサルファイト処理.....	3
2-6. 定量的メチル化特異的 PCR (Q-MSP).....	3
2-7. バィサルファイトシーケンス解析.....	4
2-8. プラスミドトランスフェクション.....	4
2-9. 足場非依存性コロニー形成アッセイ.....	4
2-10. CDO1 の免疫染色.....	4
2-11. 統計解析.....	5
3. 結果	
3-1. 大腸癌組織における <i>CDO1</i> , <i>SEPT9</i> のプロモーター領域のメチル化.....	5
3-2. 大腸癌組織での <i>CDO1</i> , <i>SEPT9</i> の TaqMeth V と臨床病理学的因子との関係	5
3-3. <i>CDO1</i> トランスフェクション後の腫瘍抑制活性.....	6
3-4. 大腸組織における CDO1 免疫染色.....	6
3-5. 大腸癌における <i>CDO1</i> TaqMeth V の予後因子の可能性.....	6
3-6. 腺腫における <i>CDO1</i> と <i>SEPT9</i> のメチル化異常.....	6
4. 考察.....	8
5 参考文献.....	11
6. 謝辞.....	14
7. 図表	
Fig. 1.....	15
Fig. 2.....	16
Fig. 3.....	17
Fig. 4.....	18
Fig. 5.....	19
Fig. 6.....	20

Fig. S1-----	21
Fig. S2-----	22
Fig. S3-----	24
Table 1-----	25
Table 2-----	26
Table S1-----	27
Table S2-----	28

1. 序文

大腸癌は欧米で主要な癌死亡の原因疾患であり(1), 日本においても 2014 年には 2 番目に多い癌死亡の原因となっている(2). 大腸癌の発生には遺伝子変異, 欠失などのジェネティックな異常と, DNA のメチル化異常などのエピジェネティック異常の蓄積が原因とされている. これまで発癌経路として大きく 2 つの経路が唱えられており, 一つは, 最初に腺腫が発生し, 腺腫の増大に伴い腺腫内に癌が発生するという adenoma-carcinoma sequence 説(ACS) (3,4), もう一つは腺腫を介さず正常大腸粘膜から直接発癌するという de novo carcinoma 説とがある(5). ACS は国際的に広く認知されており, 1988 年に Vogelstein らは, 腺腫から複数の遺伝子変化が集積した結果, 低異型性腺腫, 高異型性腺腫, 粘膜内癌, 浸潤癌と進展していく, ACS に従う多段階発癌モデルを提唱している(6). ACS に関与する遺伝子はこれまでも報告されてきており, エピジェネティック異常もそれに関与していることが報告されている(7).

大腸癌に関連するエピジェネティック異常として, これまで我々は cysteine dioxygenase type 1(CDO1)遺伝子のメチル化異常を報告してきている(8). *CDO1* は pharmacological unmasking microarray 法を用いたメチル化遺伝子同定法により, ヒト癌におけるメチル化特異的遺伝子として同定された遺伝子であり(8,9), ヒト癌において腫瘍抑制遺伝子として機能している.

CDO1 のプロモーター領域のメチル化異常は, 食道癌(8,10), 胃癌(8), 大腸癌(8), 胆管癌(11), 肺癌(8,12), 乳癌(8), 膀胱癌(8), 前立腺癌(13), 子宮内膜癌(14), B 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌(HBV 関連 HCC)(15)などで認められている. メチル化異常と悪性度または癌の進行との関連に関しては, 胆嚢癌(16), バレット食道癌(17), 食道扁平上皮癌(10), HBV 関連 HCC(15)で認められている. また, 乳癌(18), 胆嚢癌(16), 腎明細胞癌(19), 食道扁平上皮癌(10), 肺癌(20)では, *CDO1* のメチル化異常が予後因子となることが報告されている. このように, *CDO1* のメチル化異常は, その蓄積が癌の進行を示すだけではなく, 悪性度にも関与している. また, 昨今では臨床応用を目指し, 肺癌(21), 胃癌(22), 大腸癌(23), HBV 関連 HCC(15), 胆管癌(24)でバイオマーカーとしての研究が行われている.

CDO1 は非ヘム鉄酵素で, システインをシステインスルフィン酸(CSA)へ変換している(8,25,26). CSA は細胞内のミトコンドリアから細胞内区画へ H^+ の流出を抑制して, ミトコンドリア膜電位の維持を誘導している(27). 一方で, システインからグルタチオン生成は抑制され, 活性酸素の増加を導きアポトーシスを促進する(28).

このように *CDO1* のメチル化異常が発癌に関与していることは明らかとなっているが, 癌化のどの段階で起こっているのかは解明されていない. そこで, 本研究では *CDO1* のメチル化異常が大腸癌の発癌過程にどのように関与しているのかを明らかにし, また *CDO1* のメチル化異常と大腸癌の臨床病理学的背景を明らかにすることを目的とした.

また, エピゲノミクスに基づいた大腸癌診断技術で, 現在臨床応用されている代表として Epi proColon®がある. これは血清 DNA の *SEPT9* のメチル化を利用した大腸癌診断方法であり, 2016 年に Food and Drug Administration に承認され, 複数の論文で大腸癌バイオマーカーとしての有用性が証明されている(29,30). そこで, 既存の有力なバイオマーカーである *SEPT9* と *CDO1* の比較

をすることで、*CDOI* のメチル化異常を利用しての臨床応用の可能性についても検討を行った。

2.対象と手法

2-1 症例と対象組織

2000 年 1 月 1 日から 2000 年 12 月 31 日までに北里大学病院で、大腸癌の診断で手術治療を受けた 107 例を対象とした(Table 1)。検体は患者の癌組織およびそれに対応する同一患者の病理学的に異型性を認めない正常粘膜を対象とした。対象患者は術前化学放射線治療を受けていないが、41 名が術後補助化学療法を施行された。

発癌経路の機構を理解するために、2000 年に内視鏡的切除を受けた 90 例の腺腫も対象とした。

腺腫はまず、大腸癌取扱い規約第 7 版に従って、細胞異形と構造異型によって軽度、中等度、高度異型に分類した(31)。さらに大腸癌取扱い規約第 8 版に従って、軽度異型と中等度異型は軽異型度腺腫に、高度異型腺腫を高異型度腺腫に分類し評価した(32)(Fig. 1 A-C)。軽度異型腺腫が 30 例、中等度異型腺腫が 30 例、高度異型腺腫が 30 例だった。

すべての検体はホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織(FFPE 検体)を使用した。FFPE 検体は新鮮凍結検体と異なり、DNA の質の低下が指摘されている(33)。しかし、FFPE 検体を使用しメチル化解析をすることの検証はこれまでもされており、その有用性は指摘されている(34)。そのため、本研究においても FFPE 検体から DNA 抽出を行いメチル化解析を行った。

試料収集前にすべての患者からインフォームドコンセントを得た。この研究はヘルシンキ宣言に従って行われ、Kitasato University Medical Ethics Organization の承認に基づいて行った(承認番号 B17-004)。

2-2 臨床病理学的因子

評価対象の臨床病理学的因子には、年齢、性別、組織型(分化型として腺癌、乳頭癌とした。未分化型としては未分化癌、粘液癌とした)、腫瘍占拠部位、腫瘍径、肝転移の有無、深達度(T)、リンパ節転移(N)、遠隔転移(M)、病期(Stage)、リンパ管侵襲(ly)、静脈侵襲(v)、Dukes 分類、浸潤増殖様式(INF)を用いた。T, N, M, Stage, ly, v は the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer (7th UICC) staging system を使用した。INF は大腸癌取扱い規約第 8 版に従って分類した(32)。

2-3 細胞株

大腸癌細胞株の DLD-1 は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクより購入した。また、大腸癌細胞株の HCT116、肝細胞癌細胞株の HEPG2 は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。

DLD-1, HCT116 は RPMI 培地(Gibco, Carlsbad, CA, USA)で、HepG2 は DMEM 培地で培養を行

った。すべての培地には 10%ウシ胎児血清とペニシリン-ストレプトマイシン(GIBCO)を加えた。

2-4 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

細胞株から全 RNA を RNeasy mini Kit (Qiagen)を用いて抽出した。NanoDrop-1000 を用いて RNA 濃度を測定し、抽出精度は A260/A280 での解析と RT-PCR での β -actin の結果が明瞭であることを確認した。続いて、SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), および Oligo(dT) primers (Invitrogen) を用いて 2 μ g の RNA から cDNA を合成した。サンプルは 65°C で 5 分間加熱後、速やかに氷上に移し、サンプルに 200 単位の Superscript III と反応液を加え 50°C で 30 分間、70°C で 15 分間反応させた。

これらで得られた cDNA を RT-PCR に使用した。RT-PCR は Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) を製造元のプロトコールに従って行った。PCR 条件は、95°C で 5 分間の後、続けて 95°C で 1 分間、アニーリング温度は 58°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を計 30 サイクル行い、その後、72°C で 5 分間のインキュベーションを行った。

プライマー配列は Table S1 に示した。CDO1 の発現に関する陽性対照は DLD1 であり、陰性対照は HepG2 を使用した。CDO1 に対するこれらの対照は、我々のこれまでの報告に基づいて選択した(8,16,18)。

2-5 DNA 抽出とバイサルファイト処理

FFPE 検体は 10 μ m 厚で薄切したものを 10 枚用い、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色をし、対象組織のみメスをを用いて鋭的に取り出した。QIAamp DNA FFPE Kit (Qiagen)を使用し、プロトコールに則ってゲノム DNA を抽出した。細胞株からは、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用いてゲノム DNA を抽出した。

DNA 濃度は NanoDrop 1000 を用いて計測し、2 μ g のゲノム DNA を EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research)を用いてバイサルファイト処理した。

2-6 定量的メチル化特異的 PCR (Q-MSP)

Q-MSP はバイサルファイト処理済の DNA, TaqMan probe, そして iQ Supermix (Bio-Rad)を用い、機器には iCycler iQ リアルタイム PCR 解析システム(Bio-Rad)を使用して、リアルタイム PCR を行った。すべての反応は 3 回行った。

PCR 条件は、95°C で 3 分間加熱し、続いて 95°C で 20 秒間加熱の後、アニーリング温度(60°C)で 30 秒間、72°C で 30 秒間の工程を 40 サイクル行った。PCR は 1 μ L のバイサルファイト処理ゲノム DNA, 300 nmol/L の各プライマー, 200 nmol/L の TaqMan プローブ, および 12.5 μ L の iQ Supermix の計 25 μ L の反応容量で行った。プライマーおよびプローブの配列は Table S1 に示す。

CDO1 のメチル化の陽性対照は DLD-1, そして陰性対照は HepG2 を用いた。これらのコントロールは、我々がこれまでにクローン化シーケンスで解析を行った結果、DLD-1 は全メチル化領域の 95%がメチル化されており、HepG2 では 4%のみがメチル化されていたため、陽性および陰性対照として使用した(8, 23)。

SEPT9 のコントロールは、大腸癌に関する先行研究で報告されているプライマー領域で、バイサルファイトクロン化シーケンスを行い決定した(30).

メチル化の定量値(TaqMeth V)は、対象遺伝子の蛍光強度の量を β -actin の蛍光強度で除し、100倍したものとして定義した(35).

2-7 バィサルファイトシーケンス解析

まず、*SEPT9* の Q-MSP を細胞株に対して行い、バイサルファイトシーケンス解析は、TaqMeth V 高値を示す DLD-1 と、TaqMeth V が 0 であった HepG2 に対して行った. Q-MSP では先行研究で報告されている *SEPT9* のプライマーを引用し(30), バィサルファイトシーケンス用のプライマーを、この *SEPT9* の Q-MSP プライマーの解析領域を含むように作成した(Table S1). バィサルファイトシーケンス解析は、我々がこれまでに報告している手法で行った(23). まず、ゲノム DNA のバイサルファイト処理を行い、上記プライマーを用いて PCR で増幅した. QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて DNA 精製し、TOPO TA Cloning Kit for Sequence (Invitrogen)を用いて pCR4-TOPO vector に挿入した. クローニングした後にシーケンス解析(eurofins Genomics)を行った. 一つの細胞株あたり 10 個のクローンを解析し、メチル化の割合を算出した.

2-8 プラスミドトランスフェクション

CDO1 の full-length cDNA を精製し、pcDNA3.1 myc-His C 発現ベクター(Invitrogen)に制限酵素を用いてライゲーションした. プラスミドベクターの細胞株への遺伝子導入は、Opti-MEM(Invitrogen)と Lipofectamine 2000(Invitrogen)を使用して、HCT116 に対して行った.

2-9 足場非依存性コロニー形成アッセイ

6-well プレートの下層寒天に 0.72%のアガロース(Becton, Dickinson and Company)を作成し、上層寒天には 1×10^5 個の *CDO1* をトランスフェクションした HCT116 を混ぜた 0.36%のアガロースを作成して解析を行った. 培養から 2 週間後に細胞数 100 個以上のものを 1 コロニーとし、10 視野におけるコロニー数を計測した. 実験は 2 回実施した.

2-10 CDO1 の免疫染色

FFPE ブロックを 4 μ m 厚に薄切し、キシレンで脱パラフィン処理し、エタノールで脱水した. 抗原活性化のために切片を pH6 のクエン酸緩衝液に浸して電子レンジで 15 分間煮沸した. 次いで切片を 15 分間 3%過酸化水素水溶液に浸透させ、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した. 一次抗体には抗 CDO1 ポリクローナル抗体(免疫動物: Rabbit) (12589-1-AP) (proteintech)を用いて、4°C で一晩インキュベートした. Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI) kit (Nichirei)をプロトコールに従って使用して二次抗体反応を実施した. ImmPACT DAB (Vector Laboratories)を用いて 5 分間で発色させた. マイヤーヘマトキシリン溶液を用いて核染色した.

免疫染色の評価は以下のように定義した. スコア 0 は染色されていないもの、スコア 1 は散在性または淡染色を示すもの. スコア 2 は瀰漫性または濃染色を示すものとした. 各切片は任意の

2 視野で評価した。

2-11 統計解析

CDOI TaqMeth V と臨床病理学的因子との関係の解析は、スチューデントの *t* 検定、マン・ホイットニーの *U* 検定、テューキーの HSD 検定、分散分析、Kruskal-Wallis の検定をそれぞれ適切なものを用いて行った。等分散性の確認は *F* 検定および Levene 検定を用いた。

5 年無再発生存期間(RFS)および全生存期間(OS)を Kaplan-Meier 法で算出し、統計学的有意差はログランク検定で行った。RFS と OS は手術日からイベント日または最終追跡調査日までとした。単変量解析で予後因子として有意差を示した変数は、Cox 比例ハザード回帰モデルを用いた多変量解析にかけた。 $P < 0.05$ を統計学的な有意水準と定義した。全ての統計解析は SAS software package JMP, version 11 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。

3. 結果

3-1 大腸癌組織における *CDOI*, *SEPT9* のプロモーター領域のメチル化

大腸癌組織および同一患者の非癌粘膜の *CDOI* のプロモーター領域のメチル化異常について解析した。大腸癌組織における *CDOI* TaqMeth V の中央値は 34.8 (0-100.3)であった。同様に、大腸非癌粘膜では *CDOI* TaqMeth V の中央値は 4.3 (0-35.5)であった。二群間の *CDOI* TaqMeth V について比較をしたところ、癌組織で有意に高値を示した($p < 0.0001$)。この結果から、大腸癌組織と非癌粘膜とを区別可能な *CDOI* TaqMeth V のカットオフ値が得られるか、受信者動作特性(ROC)曲線を用いて求めた。その結果、*CDOI* TaqMeth V の最適なカットオフ値として 15.6 (ROC 曲線下面積(AUC) : 0.96, 感度 : 95%, 特異度 : 90%)を得た(Fig 1D)。

また、*SEPT9* に関しては癌組織の *SEPT9* TaqMeth V = 3.17 (0-17.74), 非癌粘膜の *SEPT9* TaqMeth V = 0 (0-4.25)であり、これまでの報告と同様に(30), 有意に癌組織での高度なメチル化異常を認めた($p < 0.0001$)。大腸癌組織と非癌粘膜とを区別可能なカットオフ値として *SEPT9* TaqMeth V のカットオフ値は 0.06(AUC : 0.96, 感度 : 94.4%, 特異度 : 95.3%)を得た(Fig. S1A)。

SEPT9 のバイサルファイトシーケンスの結果は、DLD1 で 99.2%と高メチル化を示し、HepG2 で 0%と低メチル化を示した(Fig. S2)。

3-2 大腸癌組織での *CDOI*, *SEPT9* の TaqMeth V と臨床病理学的因子との関係

次に、大腸癌組織の TaqMeth V と臨床病理学的因子との関連を調べた。結果を Table 1 と Fig. 2 に示す。有意差を認めたのは年齢($p = 0.006$, $R = 0.26$), 組織型($p = 0.03$), 腫瘍径($p = 0.04$, $R = 0.19$), 肝転移($p = 0.02$)であった。また、有意傾向であったのは pT($p = 0.07$), Dukes 分類($p = 0.10$), v($p = 0.07$)であった。

同様に、癌組織における *SEPT9* TaqMeth V と臨床病理学的因子とで解析を行ったが、*SEPT9* TaqMeth V では有意さを示す因子は見られなかった。特に、*CDOI* TaqMeth V では肝転移の有無で

有意差を認めたが、*SEPT9* TaqMeth V では肝転移の有無での有意差は認められなかった($p=0.54$).

3-3 *CDO1* トランスフェクション後の腫瘍抑制活性

上記、臨床病理学的因子の解析によって *CDO1* のメチル化異常の蓄積が肝転移へ関与している可能性が示唆された. そこで足場非依存性コロニー形成アッセイを用いて、*CDO1* による細胞増殖の制御に関して解析を行った. まず RT-PCR で *CDO1* の発現していないことを確認した HCT116 に *CDO1* をトランスフェクションした. 結果は moc に比べ、有意に *CDO1* 導入細胞でコロニー形成が減少した($p=0.0007$) (Fig. 3).

3-4 大腸組織における *CDO1* 免疫染色

CDO1 プロモーター領域のメチル化とタンパク質発現との関係性を評価するために、低メチル化検体 10 例(平均 *CDO1* TaqMeth V = 0), 高メチル化検体 10 例(平均 *CDO1* TaqMeth V = 75.4)を用いて免疫染色を行った. *CDO1* タンパクの免疫染色では腺上皮細胞と癌細胞の細胞質が染色された. 各検体での染色結果は、低メチル化群では全例がスコア 2 であった. 高メチル化群ではスコア 0 が 25%, スコア 1 が 55%, スコア 2 が 20%であり、有意に低メチル化群で *CDO1* タンパクの高発現を認めていた($p<0.0001$) (Fig. 4).

3-5 大腸癌における *CDO1* TaqMeth V の予後因子の可能性

大腸癌において *CDO1* TaqMeth V が予後因子となるか、log-rank plot 法を用いて適切な生存カットオフ値を OS と RFS でそれぞれ求めた. OS に対しては *CDO1* TaqMeth V が 20.5 をカットオフ値としたときに、 $p=0.04$, 相対危険度 2.05 で最適なカットオフ値となった. RFS に対しては *CDO1* TaqMeth V が 44.8 をカットオフ値としたときに、 $p=0.04$, 相対危険度 = 2.08 で最適なカットオフ値となった(Fig. 5).

このカットオフ値で二群に分けた因子 [*CDO1* high TaqMeth V グループ(TaqMeth V \geq カットオフ値), *CDO1* low TaqMeth V グループ(TaqMeth V < カットオフ値)]と、その他の臨床病理学的因子とで、OS, RFS それぞれについて単変量解析を行った.

まず、OS において単変量解析で予後因子となったのは、pT, pN, pM, pStage(Dukes 分類), ly, v, INF, *CDO1* TaqMeth V であった. pT, pN, pM は pStage の構成因子となるため、続く解析には pStage を用いた. 単変量解析で有意差を示した因子を多変量コックス比例ハザードモデルで解析したところ、pStage が独立した予後因子となった(Table 2).

同様に、RFS でも pStage0~III を対象に予後解析をした. 単変量解析では腫瘍占拠部位, pT, pN, pStage(Dukes 分類), v, INF, *CDO1* TaqMeth V が予後因子となった. 多変量解析では pStage が独立した予後因子となった(Table S2).

3-6 腺腫における *CDO1* と *SEPT9* のメチル化異常

腺腫のサイズは軽度異型腺腫が $2.7\pm1.2\text{mm}$, 中等度異型腺腫が $4.7\pm2.9\text{mm}$, 高度異型腺腫が $7.5\pm4.3\text{mm}$ であり、そのサイズに有意差を認めた($p<0.0001$).

次に腺腫の *CDOI* TaqMeth V を算出した。軽度異型腺腫が 14.1(0-80.0), 中等度異型腺腫が 19.3(0.8-72.2), 高度異型腺腫が 25.5(0-183.6)であった。また軽異型度腺腫は 17.2(0-80.0)であった。癌組織同様に腺腫の臨床的背景を調べると, 年齢に伴って TaqMeth V は上昇傾向を認めた($p=0.06$, $R=0.20$)。

腺腫を軽度, 中等度, 高度異型腺腫に分類し, さらに非癌粘膜と癌組織をあわせた五つの群で *CDOI* TaqMeth V を比較すると有意差を認めた($p<0.0001$)(Fig. 6A)。詳細は以下の通りで, 非癌粘膜と軽度異型腺腫($p<0.0001$), 軽度異型腺腫と高度異型腺腫($p=0.01$), 中等度異型腺腫と癌組織($p<0.0001$)で有意差を認めた。中等度異型腺腫と高度異型腺腫とでは有意傾向であった($p=0.06$)。軽度異型腺腫と中等度異型腺腫($p=0.36$), また, 高度異型腺腫と癌組織($p=0.22$)とでは有意差は認めなかった。

さらに癌組織を肝転移の有無で分類し *CDOI* TaqMeth V を比較した。高度異型腺腫は肝転移を認めない群とで有意差は得られなかったが($p=0.53$), 肝転移を認める群とでは有意差を認めた ($p=0.03$)。

次に現行の分類に基づいて, 腺腫を軽異型度腺腫と高異型度腺腫に分類して *CDOI* TaqMeth V を比較した。非癌粘膜と軽異型度腺腫($p<0.0001$), 軽異型度腺腫と高異型度腺腫($p=0.01$), 軽異型度腺腫と癌組織($p<0.0001$)で有意差を認めた(Fig.6)。

このように, 非癌粘膜と腺腫と癌組織のそれぞれの *CDOI* TaqMeth V は, 異型度が進行するに従い上昇傾向を認めていた。

低異型度腺腫と正常粘膜とを区別する *CDOI* TaqMeth V のカットオフ値が算出できるか, ROC 曲線を用いて解析した。結果は *CDOI* TaqMeth V のカットオフ値として 13.0(AUC : 0.80, 感度 : 93%, 特異度 : 63%)を得た(Fig.1E)。低異型度腺腫と高異型度腺腫とを区別する *CDOI* TaqMeth V のカットオフ値は 20.4(AUC : 0.67, 感度 : 62%, 特異度 : 70%)だった(Fig.1F)。

続いて *SEPT9* でも同様に各異型度における腺腫での *SEPT9* TaqMeth V の解析をした。各 *SEPT9* TaqMeth V は, 軽度異型腺腫で 0(0-2.41), 中等度異型腺腫で 0.20(0-8.62), 高度異型腺腫が 1.04(0-7.29)であった。また軽異型度腺腫は 0.02(0-8.62)であった。*CDOI* と同様に異型度の進行に伴ってメチル化の上昇を認めていた。*CDOI* では非癌粘膜と軽度異型腺腫で有意差を認めたが, *SEPT9* では有意差を認めなかった($p=0.06$)。しかし, 非癌粘膜と軽異型度腺腫では有意差を示していた($p<0.0001$)。*CDOI* では軽異型度腺腫と高異型度腺腫で有意差を認めたが, *SEPT9* では有意差を認めなかった($p=0.10$)。また, *CDOI* では高異型度腺腫と癌組織では有意差を認めなかったが, *SEPT9* では有意差を認めた($p<0.0001$) (Fig. S3)。

CDOI と同様に ROC 曲線を用いて非癌粘膜と軽異型度腺腫を区別する *SEPT9* TaqMeth V のカットオフ値を算出すると, カットオフ値として 0.01 (AUC : 0.73, 感度 : 52%, 特異度 : 95%)を得た。また, 軽異型度腺腫と高異型度腺腫を区別する *SEPT9* TaqMeth V のカットオフ値は 0.34(AUC : 0.73, 感度 : 80%, 特異度 : 67%)であった(Fig. S1)。

4. 考察と結語

本研究では初めて大腸癌における *CDO1* のメチル化異常の臨床病理学的特徴を明らかにし、また、*CDO1* のメチル化異常と ACS との関連を明らかにできた。

癌細胞では DNA のメチル化により、遺伝子の不活化が起こり、さらには癌化が引き起こされる(36)。これまで我々は *CDO1* のメチル化異常が大腸癌組織では非癌粘膜より高度に起きていることを明らかにしてきている(8)。しかし、*CDO1* のメチル化異常と大腸癌の臨床病理学的背景については詳細な検討がなされていなかった。

我々の研究では、癌組織の *CDO1* TaqMeth V は 34.8、非癌粘膜の *CDO1* TaqMeth V は 4.3 で、これら二つの組織を区別する *CDO1* TaqMeth V のカットオフ値は 15.6 であることが明らかにできた。我々が以前報告した結果では *CDO1* TaqMeth V が癌組織で 38.4、非癌粘膜で 5.0、カットオフ値が 12.5 であり、この結果と比較しても近似していた(8)。この二つの研究で使用した検体はそれぞれ別物であるが、大腸癌組織での *CDO1* TaqMeth V の再現性が確認できた。TaqMeth V は Q-MSP の定量的な評価法として高度な再現性と感度を持つ評価法であることが再認識できた(23)。また、FFPE 検体を用いても再現性のある結果が得られることが確認できたといえる。

CDO1 のメチル化異常と *CDO1* タンパクの発現に関しては胆嚢癌においてこれまでに明らかにしている(16)。この研究においても、大腸癌での *CDO1* のメチル化異常とタンパク発現に逆相関が認められた。免疫染色の結果では、癌組織である高メチル化群では多様化を示しながらもその発現が抑制され、低メチル化群では強発現が全例に認められた。この結果は臨床検体においても *CDO1* タンパクの発現がメチル化異常により制御されている可能性を示唆しているものと推測される。また、癌組織での染色性の多様化は、臨床における癌組織が単クローンではなく、多様な変異パターンをもつ癌細胞のヘテロな集団である結果と解釈できる(37)。これらの結果から、*CDO1* の臨床病理学的因子の特徴を、例えば治療前に把握を試みるのであれば、免疫染色で評価を行うことは不向きと考えられ、臨床応用を目指す場合は TaqMeth V を用いた定量化がより有用な結果を得られると考えられる。

そこで、次に大腸癌における *CDO1* のメチル化異常に関する臨床病理学的背景を明らかにすることを試みた。まず、*CDO1* TaqMeth V は癌組織で加齢により上昇していた。これは腺腫および非癌粘膜($p = 0.03$, $R = 0.21$)でも同様の結果だった。遺伝子のメチル化は加齢により増加することと矛盾しない結果といえ(38)、*CDO1* のメチル化も加齢性の変化の一つと位置付けられるだろう。その他では、組織型、腫瘍径、肝転移、pT、Dukes 分類、静脈侵襲との関連を認めた。この結果は臨床的に *CDO1* が腫瘍細胞増殖、細胞遊走、浸潤、コロニー形成に関与する報告を確認できた結果といえる(39)。実際に足場非依存性コロニー形成アッセイでの増殖能の解析では、*CDO1* の大腸癌細胞株への導入により増殖抑制が起きることが示された。このように、我々の基礎実験では *CDO1* のメチル化異常と臨床病理学的背景の関係を確認することができた。また組織型においては、分化型で有意に TaqMeth V 高値を認めた。これは *CDO1* のメチル化異常が大腸癌の分化段階へ関与し、腫瘍進行とともに蓄積していることも推測される結果といえる。

予後に関しては多変量解析で pStage がその意義の通り独立した予後因子となったが、*CDO1* のメチル化異常も OS と RFS 共にカットフ値を得て予後との関連を示していた。*CDO1* のメチル化異常と予後との関連は、腎明細胞癌、乳癌、食道扁平上皮癌などの種々の癌でこれまでも報告がされている(10,18,19)。本研究結果からも *CDO1* のメチル化異常が大腸癌の悪性化への関与が確認できた。

大腸癌発生の主経路について 1950～60 年代には ACS 説と de novo carcinoma 説の主張がみられ、1970 年代になると Morson は “polyp-cancer sequence” という表現で、大腸癌のほとんどが腺腫に由来するとして ACS 説を強く主張している(3)。Fearon(40)や Vogelstein(41)は adenomatous polyposis coli(APC)遺伝子などの多くの遺伝子異常が原因で、腺腫から癌への形態変化が生じることを主張している。その後、大腸癌に関連する様々な遺伝子異常が明らかとなっている。近年では、大腸癌におけるゲノムの塩基配列決定により新しい大腸癌遺伝子が同定された。大腸癌は腫瘍組織の遺伝学的異質性が高く、複合的な遺伝子異常が絡んで発癌していることが明らかにされている(42)。

本研究対象である *CDO1* のメチル化異常も発癌に関与することはこれまでも報告が蓄積されているが、発癌過程については明らかとなっていない。そこで非癌粘膜、腺腫、癌組織を対象にそのメチル化異常の程度を比較した。腺腫を病理学的所見から細胞異型と構造異型から三段階(軽度、中等度、高度異型)に分類し、それぞれで TaqMeth V を測定した。すると、非癌粘膜から腺腫、癌への進行に伴ってその値は上昇していた($p < 0.0001$)。重要な所見としては、正常粘膜と軽度異型腺腫で有意差を認めたことである。これは *CDO1* のメチル化異常が腺腫発現に関与していることを推測させる。更に、*CDO1* TaqMeth V が軽異型度腺腫と高異型度腺腫とで有意差を示していたことから、腺腫の増大と、異型度の増加へも関与していると考えられる。一方で、高異型度腺腫と癌組織とで有意差は得られなかったが、これは臨床上也高異型度腺腫と癌との鑑別、境界病変に診断で悩むことの表れとも考えられる。しかし、肝転移陽性癌組織と肝転移陰性癌組織および肝転移陽性癌組織と高異型度腺腫とでは、肝転移陽性癌組織で高メチル化を示しており、*CDO1* のメチル化は腫瘍細胞の遊走および浸潤能の獲得に寄与していることが推測される。

これまで大腸癌領域で臨床応用されているメチル化異常の遺伝子では *SEPT9* が知られている(29,30)。そこで *CDO1* と同様に *SEPT9* についても解析を行うと、まず *SEPT9* のメチル化異常は癌特異的であることが判明し、AUC は 0.96 だった。*SEPT9* においても大腸癌組織での異型性増大に従って、つまり ACS に伴ってメチル化異常が蓄積することが明らかとなった。しかし、*CDO1* とはメチル化の上昇傾向にわずかな差異を認めていた。*SEPT9* では腺腫間での段階的なメチル化上昇を得るというよりも、腺腫から癌への進行の過程でメチル化の上昇を示していた。また *SEPT9* では癌が発生した後は、遠隔転移が起こってもメチル化の上昇は認めなかった。この結果から、癌検出のマーカーとしては、より *SEPT9* が優れており、腺腫検出のマーカーとしては、より *CDO1* が有用である可能性が示唆された。*CDO1* と *SEPT9* の双方のメチル化異常の利用は腺腫や癌検出に有用な手段となりうるかもしれない。

CDO1 のメチル化の蓄積が腫瘍の進行を導いたのか、またはその結果なのかは結論付けることはできなかったが、これまでに腫瘍進行における *CDO1* の機序は報告され始めている(15,39,43)。

癌細胞では *CDO1* メチル化によって *CDO1* 発現が抑制され、これによりグルタチオンの産生を増加させて活性酸素への抵抗性を高めている(43). また、食道癌細胞株においては *CDO1* の強制発現によって有意に腫瘍細胞増殖、細胞遊走、浸潤、およびコロニー形成の能力を低下させていたことが明らかとなっている(39). また、HBV 関連 HCC においては、慢性肝炎<肝硬変<肝癌の順に *CDO1* のメチル化が上昇していたことが示されている(15). 本研究では *CDO1* のメチル化は腫瘍の進行に従って増加していくことを明らかにした. また、最も高い *CDO1* のメチル化を認めたのは肝転移群であり、興味深いことに脈管侵襲においては有意傾向を示していた.

これまで述べたように、*CDO1* のメチル化異常は、腺腫の発現や増大、異型度の増加、癌化、浸潤、転移に関与していることが推測される. すなわち、*CDO1* のメチル化は細胞異型を誘導し、さらにその蓄積量の増加が癌を発生させたと考えられる. 本研究で使用した検体は全て術前治療を行っていないものであり、*CDO1* の臨床病理学的背景や癌化への関与の点において、非常に重要な結果といえる. また、これまで大腸癌発生の主経路として主張されてきた ACS 説に新たな根拠を加えることが出来た.

DNA メチル化は安定した修飾であり、その安定性から癌検出の有用なマーカーとして注目されている. また、DNA メチル化は組織により特異的であるとも指摘されている(44,45). これまで *CDO1* のメチル化異常を利用した研究として、大腸癌患者の血漿からの検討が報告されているが実用化には至っていない(23). 大腸癌患者における血漿中 *CDO1* のメチル化異常の検出率は 20% であり、血漿中における利用の難しさがある. *CDO1* を臨床応用するには *SEPT9* と異なり、血漿以外の検体からのアプローチが必要と考えられる. 本研究のように摘出検体を用いると、癌組織はもちろん、腺腫の段階で非癌粘膜と区別可能な *CDO1* のメチル化異常が検出できる. この結果は、*CDO1* のメチル化異常の臨床応用では、例えば腫瘍組織が直接混じりうる便検体を用いることによって、血漿中での検出困難さを克服できる可能性を示唆するものと考えられる.

大腸癌は世界的に高い罹患率が続いており、予後改善のために早期発見が欠かせない. 大腸癌検診には便潜血検査が行われているが、偽陰性による癌の進行も後を絶たない. 本研究で明らかとなった非癌粘膜と腺腫および癌組織のメチル化異常の差を利用し、早期発見のために今後更なる大腸癌検出のバイオマーカーとしての研究を行っていく予定である.

5. 参考文献

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277-300.
2. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan. Cancer Registry and Statistics. http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html. Updated May 27, 2016. Accessed July 13, 2016
3. Morson B. President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med.* 1974;67(6 Pt 1):451-7.
4. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 1975;36(6):2251-70.
5. Spratt JS, Ackerman LV, Moyer CA. Relationship of polyps of the colon to colonic cancer. *Ann Surg.* 1958;148(4):682-96.
6. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
7. Lee KH, Lee JS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, et al. Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396(7):1017-26.
8. Brait M, Ling S, Nagpal JK, Chang X, Park HL, Lee J, et al. Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers. *PLoS ONE.* 2012;7:e44951.
9. Yamashita K, Upadhyay S, Oisada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell.* 2002;2(6):485-95.
10. Ushiku H, Yamashita K, Katoh H, Ema A, Minatani N, Kikuchi M, et al. Promoter DNA methylation of CDO1 gene and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* 2017;30(2):1-9.
11. Andresen K, Boberg KM, Vedeld HM, Honne H, Hektoen M, Wadsworth CA, et al. Novel target genes and a valid biomarker panel identified for cholangiocarcinoma. *Epigenetics.* 2012;7(11):1249-57.
12. Wrangle J, Machida EO, Danilova L, Hulbert A, Franco N, Zhang W, et al. Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for the diagnosis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1856-64.
13. Meller S, Zipfel L, Gevensleben H, Dietrich J, Ellinger J, Majores M, et al. CDO1 promoter methylation is associated with gene silencing and is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients. *Epigenetics.* 2016;11(12):871-80.
14. Huang RL, Su PH, Liao YP, Wu TI, Hsu YT, Lin WY, et al. Integrated Epigenomics Analysis Reveals a DNA Methylation Panel for Endometrial Cancer Detection Using Cervical Scrapings. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):263-72.
15. Yang Y, Fan YC, Gao S, Dou CY, Zhang JJ, Sun FK, et al. Methylated cysteine dioxygenase-1 gene promoter in the serum is a potential biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Tohoku*

J Exp Med. 2014;232(3):187-94.

16. Igarashi K, Yamashita K, Katoh H, Kojima K, Ooizumi Y, Nishizawa N, et al. Prognostic significance of promoter DNA hypermethylation of the cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in primary gallbladder cancer and gallbladder disease. PLoS One. 2017;12(11):e0188178.

17. Kojima K, Yamashita K, Ushiku H, Katoh H, Ishii S, Tanaka T, et al. The clinical significance of cysteine dioxygenase type 1 methylation in Barrett esophagus adenocarcinoma. Dis Esophagus. 2017;30(3):1-9.

18. Minatani N, Waraya M, Yamashita K, Kikuchi M, Ushiku H, Kojo K, et al. Prognostic Significance of Promoter DNA Hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) Gene in Primary Breast Cancer. PLoS ONE. 2016;11(1):e0144862.

19. Deckers IA, Schouten LJ, Van neste L, van Vlodrop IJ, Soetekouw PM, Baldewijns MM, et al. Promoter Methylation of CDO1 Identifies Clear-Cell Renal Cell Cancer Patients with Poor Survival Outcome. Clin Cancer Res. 2015;21(15):3492-500.

20. Ooki A, Maleki Z, Tsay JJ, Goparaju C, Brait M, Turaga N, et al. A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non-Small Cell Lung Cancer and Serum DNA. Clin Cancer Res. 2017;23(22):7141-52.

21. Liu D, Peng H, Sun Q, Zhao Z, Yu X, Ge S, et al. The Indirect Efficacy Comparison of DNA Methylation in Sputum for Early Screening and Auxiliary Detection of Lung Cancer: A Meta-Analysis. Int J Environ Res Public Health. 2017;14(7). doi: 10.3390/ijerph14070679.

22. Ushiku H, Yamashita K, Ema A, Minatani N, Kikuchi M, Kojo K, et al. DNA diagnosis of peritoneal fluid cytology test by CDO1 promoter DNA hypermethylation in gastric cancer. Gastric Cancer. 2017;20(5):784-92.

23. Yamashita K, Waraya M, Kim MS, Sidransky D, Katada N, Sato T, et al. Detection of methylated CDO1 in plasma of colorectal cancer; a PCR study. PLoS ONE. 2014;9(12):e113546.

24. Andresen K, Boberg KM, Vedeld HM, Honne H, Jebsen P, Hektoen M, et al. Four DNA methylation biomarkers in biliary brush samples accurately identify the presence of cholangiocarcinoma. Hepatology. 2015;61(5):1651-9.

25. Stipanuk MH, Ueki I, Dominy JE, Simmons CR, Hirschberger LL. Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. Amino Acids. 2009;37(1):55-63.

26. Joseph CA, Maroney MJ. Cysteine dioxygenase: structure and mechanism. Chem Commun (Camb). 2007;(32):3338-49.

27. Prabhu A, Sarcar B, Kahali S, Yuan Z, Johnson JJ, Adam KP, et al. Cysteine catabolism: a novel metabolic pathway contributing to glioblastoma growth. Cancer Res. 2014;74(3):787-96.

28. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radic Biol Med. 1999;27(9-10):922-35.

29. Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, Weiss G, König T, Beck J, et al. Plasma Septin9 versus fecal immunochemical testing for colorectal cancer screening: a prospective multicenter study. PLoS One. 2014;9(6):e98238.

30. Ahmed D, Danielsen SA, Aagesen TH, Bretthauer M, Thiis-Evensen E, Hoff G, et al. A tissue-based comparative effectiveness analysis of biomarkers for early detection of colorectal tumors. *Clin Transl Gastroenterol.* 2012;3:e27.
31. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. General Rules for Clinical and Pathological Studies on Cancer of the Colon, Rectum and Anus. 7th ed. Tokyo: Kanehara syuppan; 2006.
32. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. Japanese Classification of Colorectal Carcinoma. 8th ed. Tokyo: Kanehara syuppan; 2013.
33. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One.* 2007;2(12):e1261.
34. Kalmár A, Péterfia B, Hollósi P, Wichmann B, Bodor A, Patai ÁV, et al. Bisulfite-Based DNA Methylation Analysis from Recent and Archived Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Colorectal Tissue Samples. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(4):1149-56.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
36. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-92.
37. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-892.
38. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994;7(4):536-40.
39. Kwon J, Park M, Kim JH, Lee HW, Kang MC, Park JH. Epigenetic regulation of the novel tumor suppressor cysteine dioxygenase 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(10):7449-56.
40. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
41. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10(8):789-99.
42. Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature.* 2012;488(7413):660-4.
43. Jeschke J, O'hagan HM, Zhang W, Vatapalli R, Calmon MF, Danilova L, et al. Frequent inactivation of cysteine dioxygenase type 1 contributes to survival of breast cancer cells and resistance to anthracyclines. *Clin Cancer Res.* 2013;19(12):3201-11.
44. Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci.* 2010;101:300-5.
45. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2006;12:989-95.

6. 謝辞

英文校正にあたって FORTE Science Communications に感謝いたします.

7. 図表

Fig.1 大腸腺腫のヘマトキシリン-エオジン染色標本の光学顕微鏡所見(40倍)と *CDO1* TaqMeth V の ROC 曲線. A: 軽度異型腺腫, B: 中等度異型腺腫, C: 高度異型腺腫, D: 非癌粘膜と癌組織とを区別する ROC 曲線, AUC は 0.96. E: 非癌粘膜と軽度異型腺腫を区別する ROC 曲線, AUC は 0.80. F: 軽異型度腺腫と高異型度腺腫を区別する ROC 曲線, AUC は 0.67.

Fig. 1

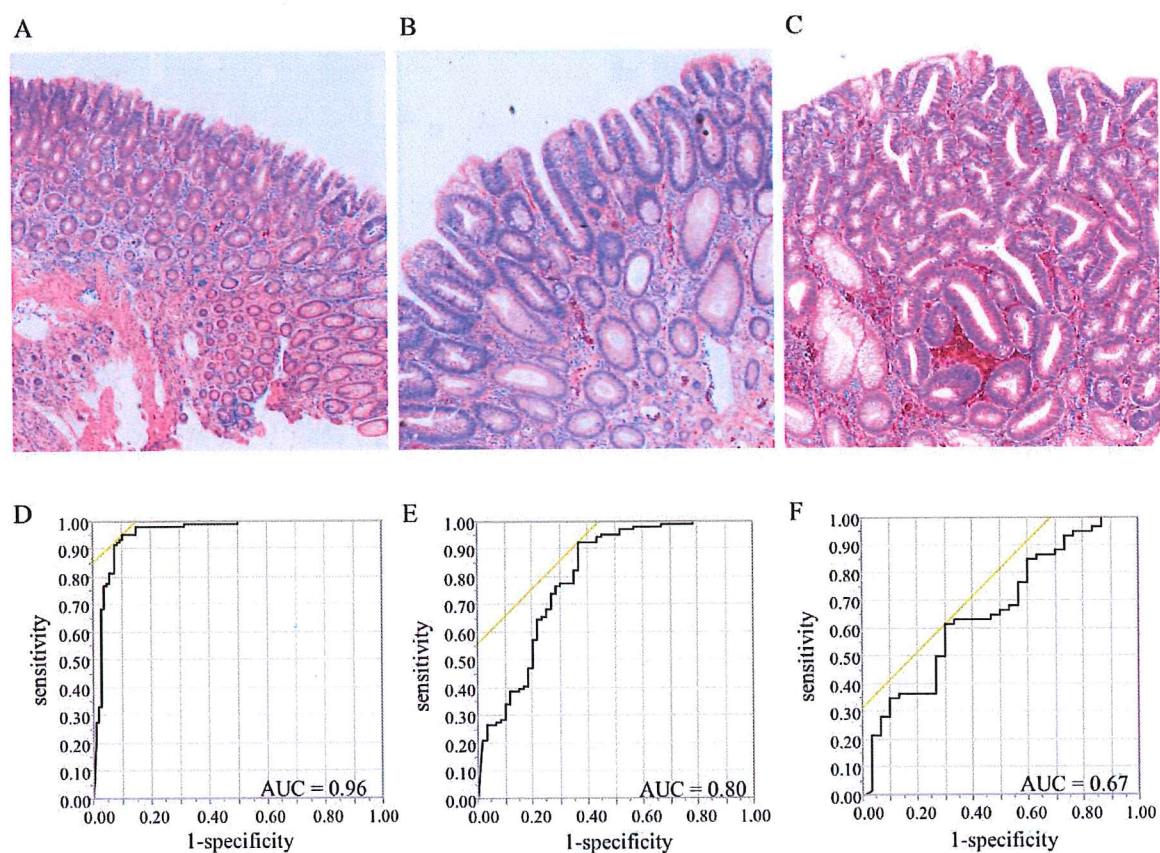


Fig. 2 癌組織における臨床病理学的因子と *CDO1* TaqMeth V との関連. *CDO1* TaqMeth V と, A : 年齢, B : 組織型, C : 腫瘍径, D : 肝転移の有無, E : pT, F : 静脈侵襲, G・H : Dukes 分類.

Fig. 2

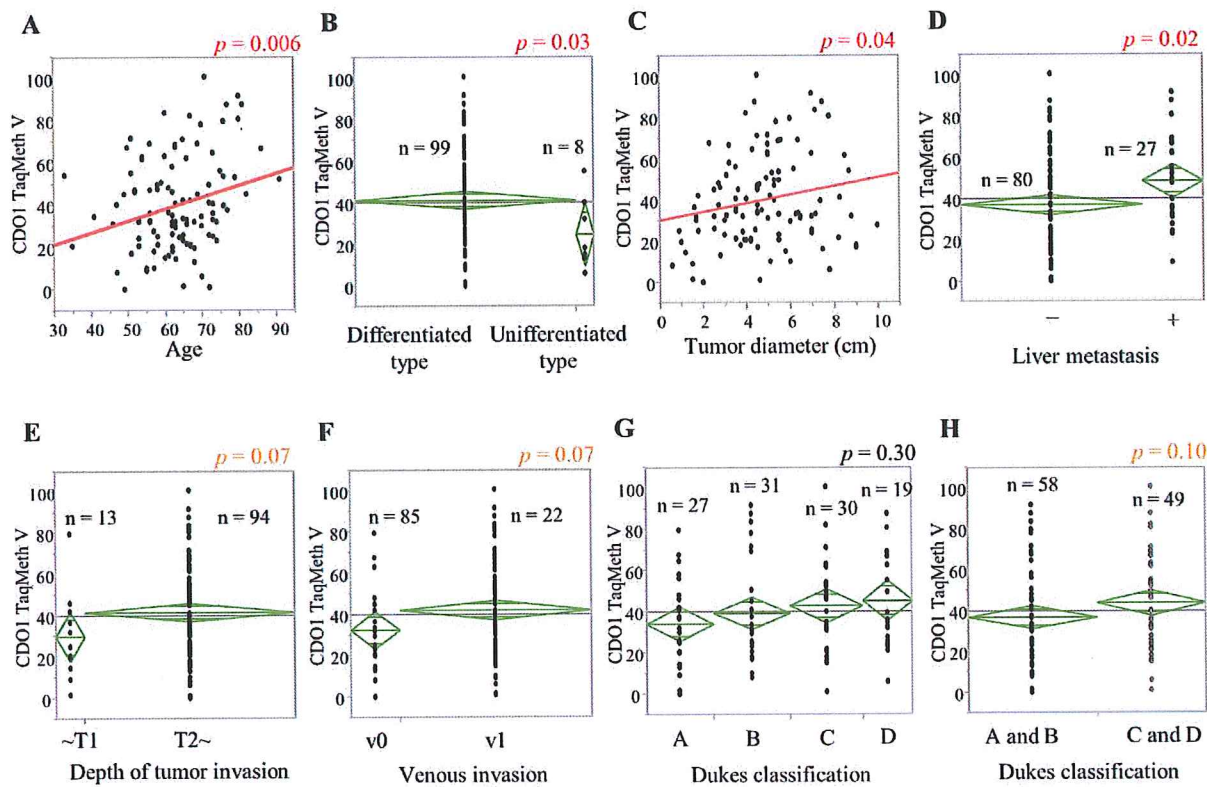


Fig.3 足場非依存性コロニー形成アッセイの結果. A: *CDO1* の RT-PCR の結果を示す. 陽性対象は HepG2, 陰性対象は DLD-1(8,16,18). HCT116 で *CDO1* の発現は見られなかった. B: 左から順にコントロール, moc, *CDO1* 導入細胞の結果を示す. エチジウムブロマイド溶液で染色後にコロニーを紫外線照射下で撮影した. *CDO1* 導入細胞ではコロニー形成が減少していた. C: 各細胞の位相差顕微鏡でのコロニー形成の様子を示す. 倍率はいずれも 100 倍. D: 各細胞のコロニー形成数を示す. *CDO1* 導入を行った HCT116 では細胞増殖抑制がおきた.

Fig. 3

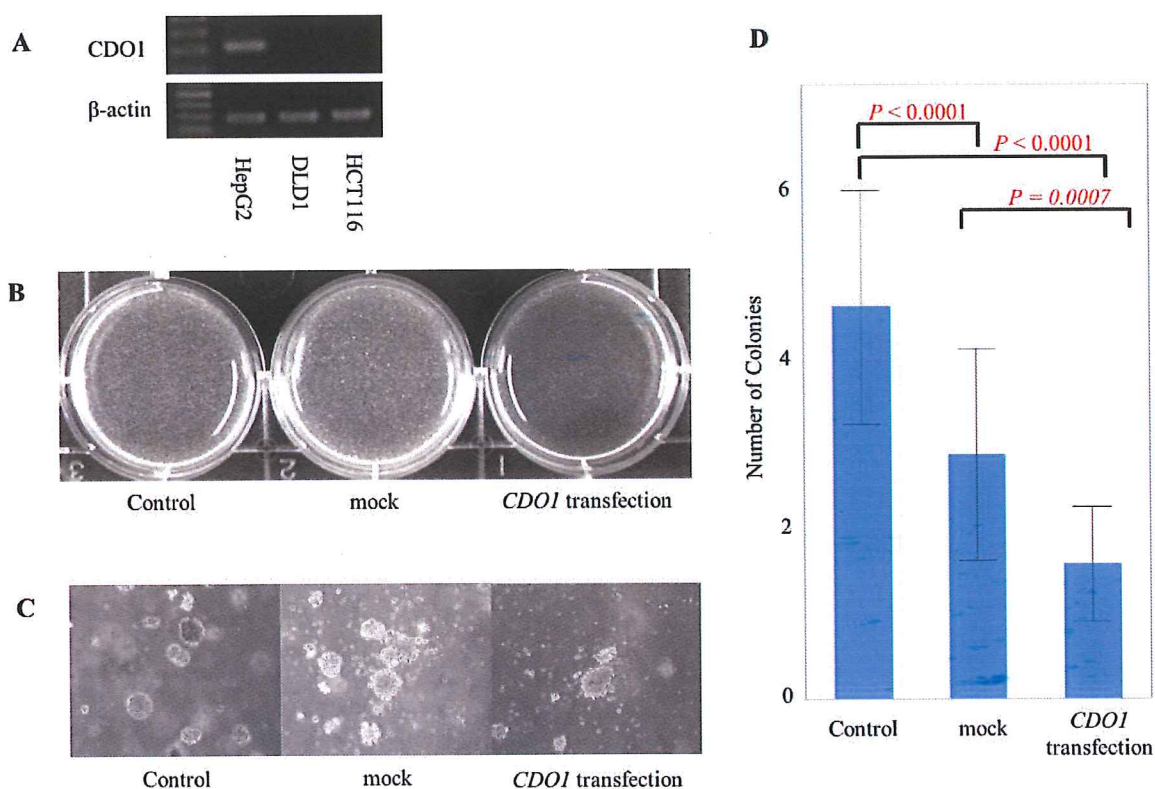


Fig.4 CDO1 免疫染色結果. 染色例として, A:スコア 0, B:スコア 1, C:スコア 2 を示す. D: 癌組織及び非癌粘膜におけるスコアの結果を示す. 非癌粘膜では強染色を認めているが, 癌組織では染色の程度は減弱していた. 両群では染色に有意差を認めていた.

Fig. 4

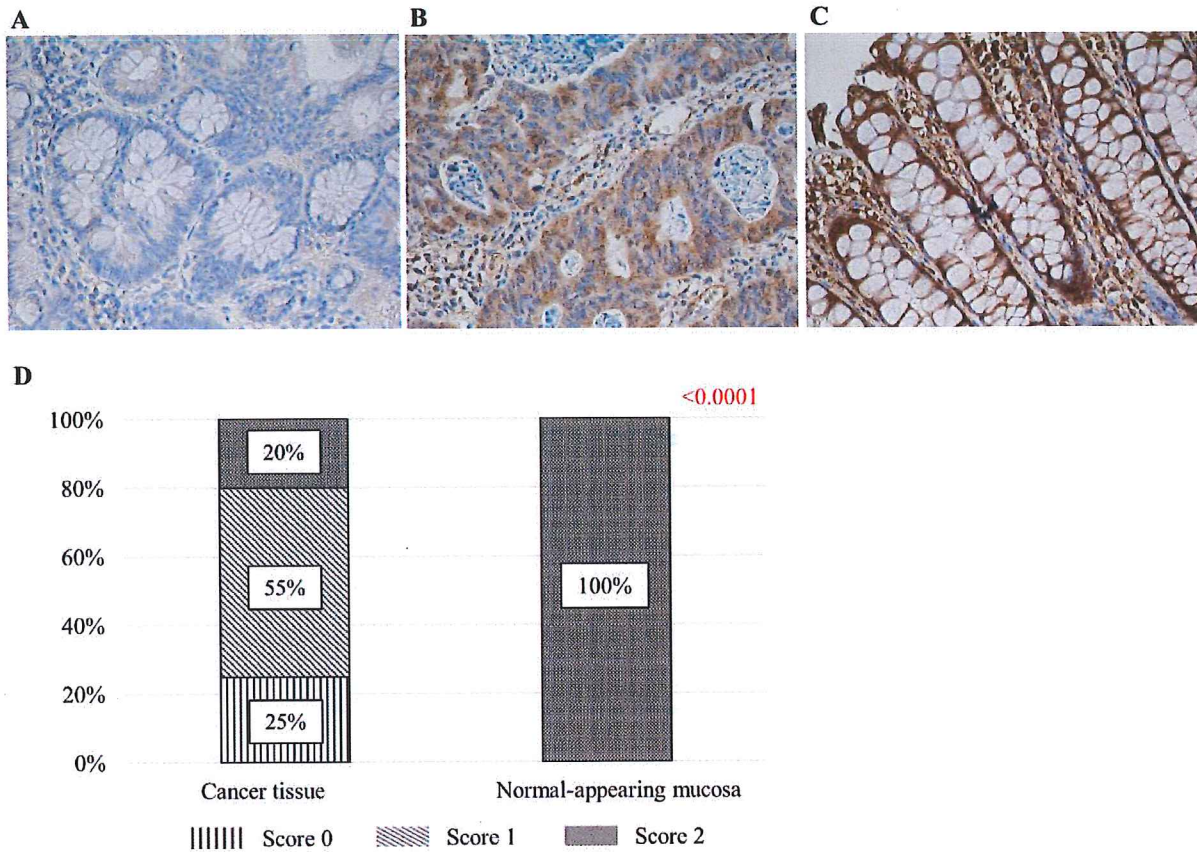


Fig. 5 大腸癌患者における *CDOI* TaqMeth V の OS および RFS のログランクプロット分析と Kaplan-Meier 生存曲線を示す. A, B : OS のログランクプロット分析. C : *CDOI* TaqMeth V のカットオフ値 20.5 とした時の高値群, 低値群の OS における Kaplan-Meier 生存曲線. D, E : RFS のログランクプロット分析. F : *CDOI* TaqMeth V のカットオフ値 44.8 とした時の高値群, 低値群の RFS における Kaplan-Meier 生存曲線.

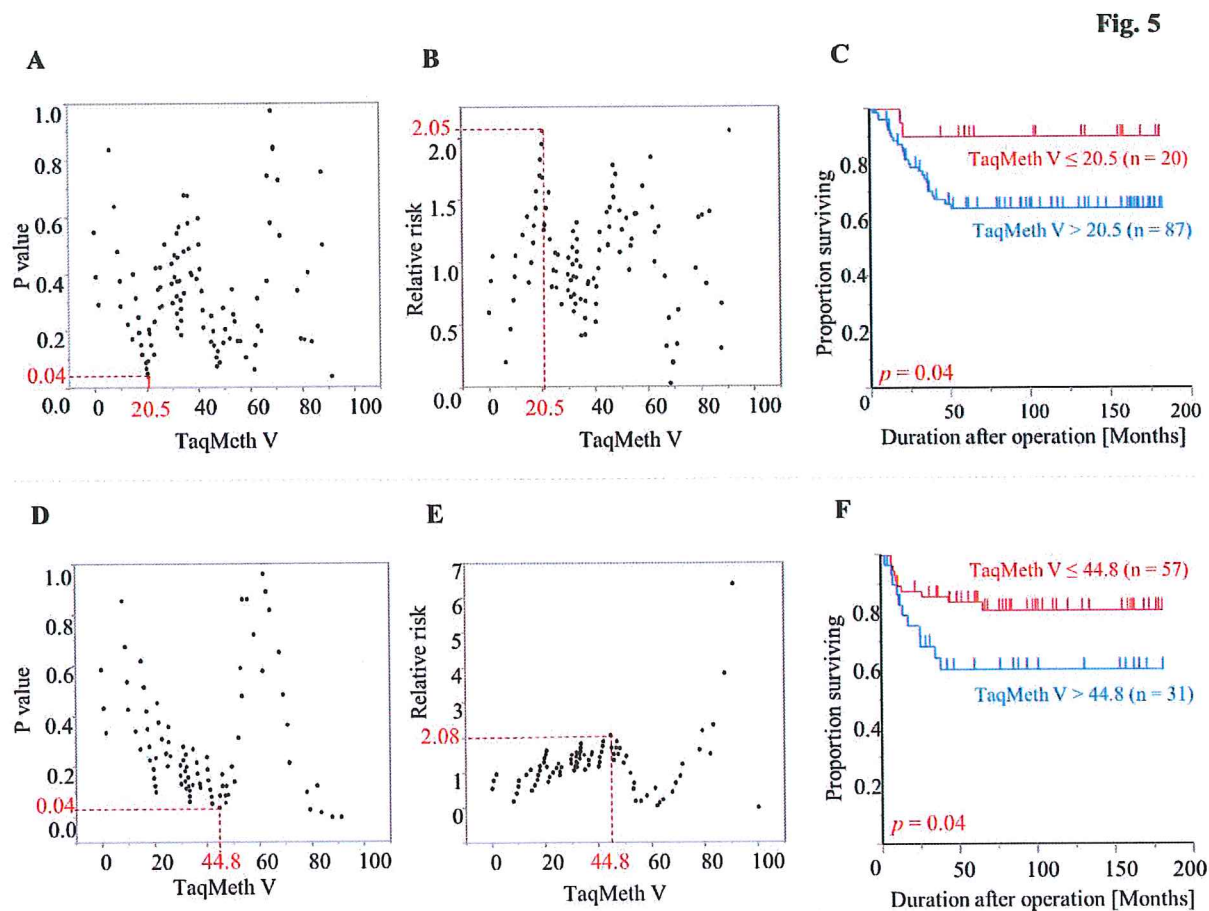


Fig.6 非癌粘膜，腺腫，癌組織における *CDO1* TaqMeth V の解析. A：腺腫を軽度，中等度，高度異型の三段階に分類した. B：腺腫を軽異型度，高異型度腺腫の二段階に分類した.

Fig. 6

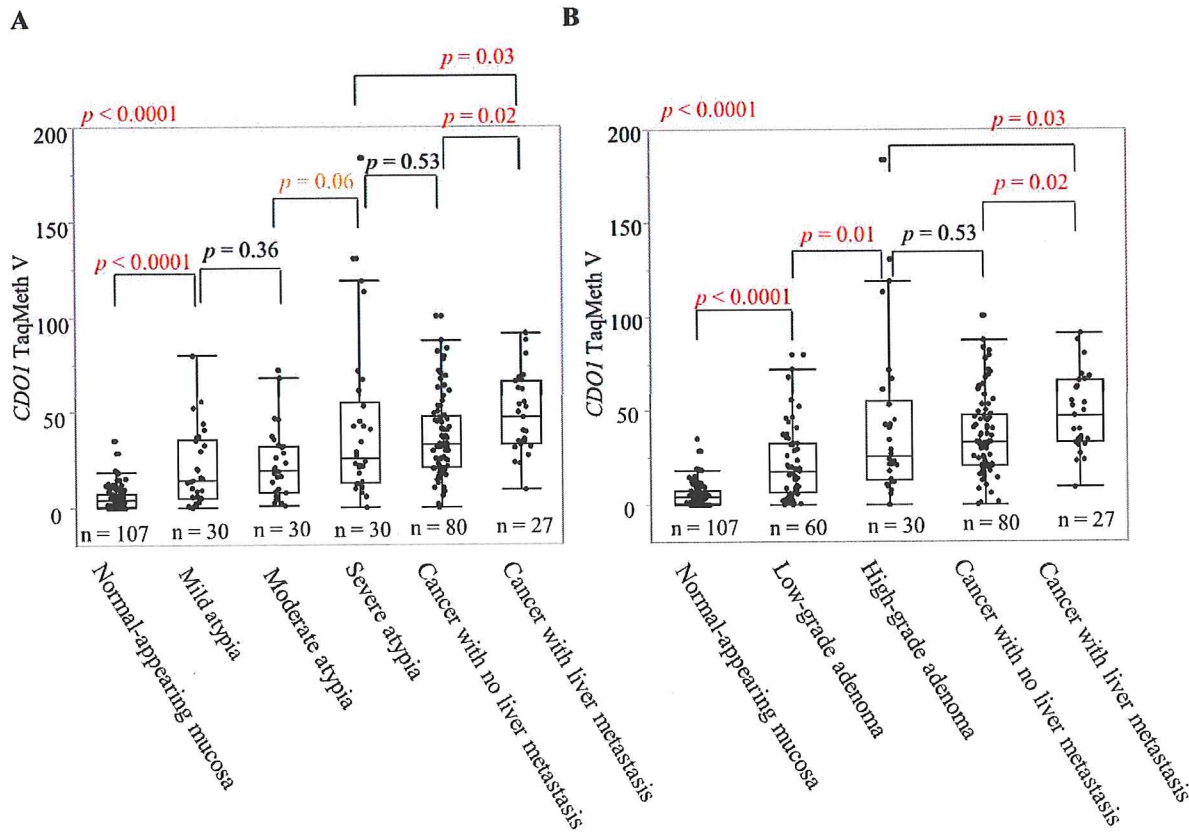


Fig. S1 *SEPT9* TaqMeth V の各組織を識別する ROC 曲線を示す。A：非癌粘膜と癌組織とを区別する ROC 曲線。AUC は 0.96。B：非癌粘膜と軽度異型腺腫を区別する ROC 曲線。AUC は 0.73。C：軽異型度腺腫と高異型度腺腫を区別する ROC 曲線。AUC は 0.73。

Supplementary Fig. S1

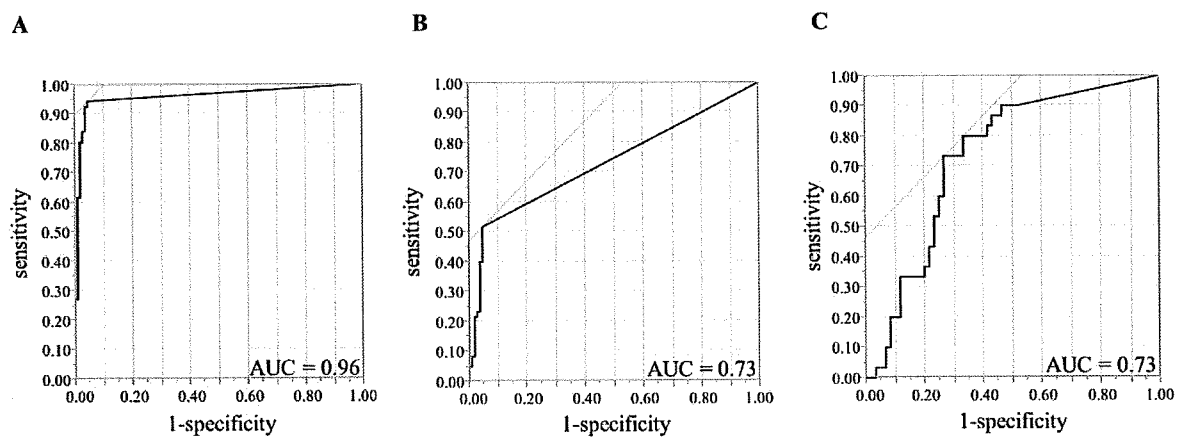
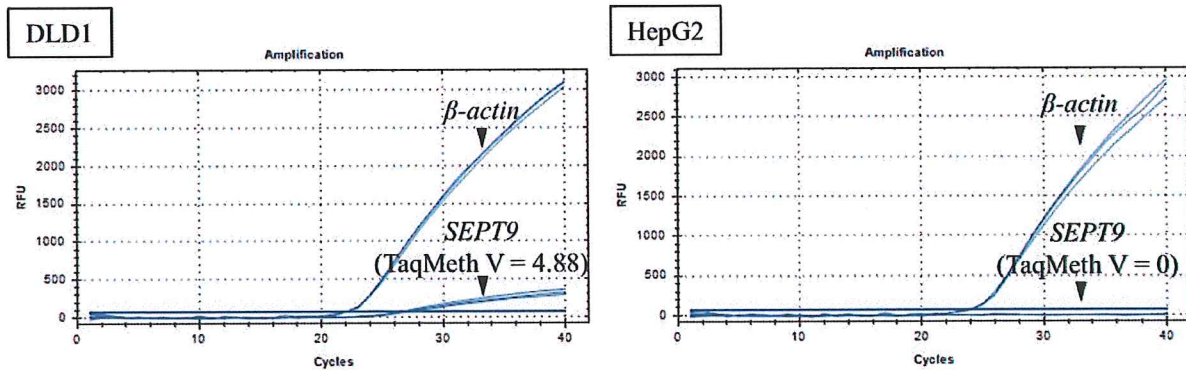


Fig.S2 *SEPT9* のメチル化異常解析のためのコントロールの解析結果. A : DLD-1 と HepG2 の Q-MSP 結果. DLD-1 の *SEPT9* TaqMeth V は 4.9 で H, epG2 は 0 であった. B : *SEPT9* の Q-MSP のプライマー領域を含むように設計されたバイサルファイトシーケンスのプライマー領域を示す (30). バイサルファイトシーケンス用のプライマー作成範囲には 24 個の CpG を含んでいる. C : DLD-1 と HepG2 のクローン化シーケンスの結果を示す. 白丸は非メチル化 CpG, 黒丸はメチル化 CpG を示す. メチル化の割合は, DLD1 で 99.2%, HepG2 細胞で 0% であった. D : DLD-1 の Q-MSP 結果を示す. 段階希釈を行い, 1×10^{-3} までは増幅を認めることができ, 検量線を作成することができた.

Supplementary Fig. S2

A



B

CGGCTAGCTCTGCACTGCAGGAGCGCGGGCGCGGCGCCCCAGCCAGCGCGCAGGGCCCGGGCCCGCGG

Bisulfite-sequencing forward primer

GGGCGCTTCCTCGCCGCTGCCCTCGCGCGACCGCTGCCACCAAGCCATCATGTGGACCCCGCGGTCAA

Q-MSP forward primer

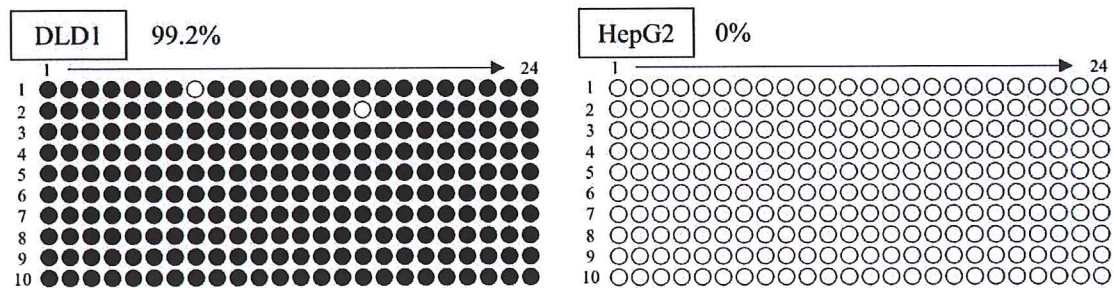
Q-MSP fluorescent probe

CGCGCAGCTGGATGGGATCATTTGGACTTCGAAGGTGGGTGCTGGGCTGGCTGCTG

Q-MSP reverse primer

Bisulfite-sequencing forward primer

C



D

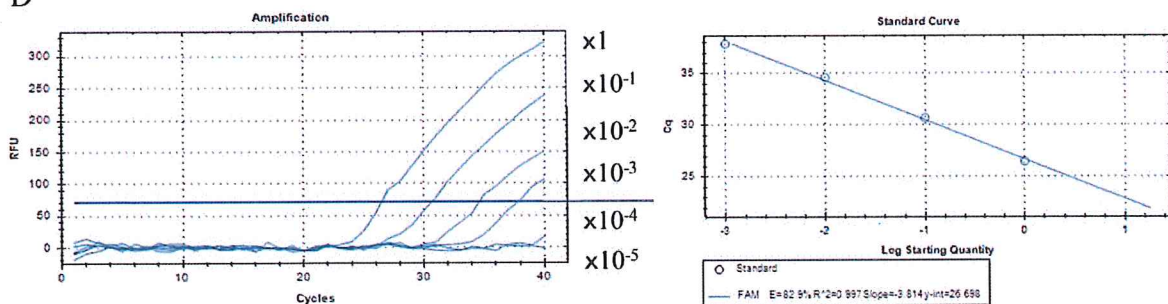


Fig. S3 非癌粘膜, 腺腫, 癌組織における SEPT9 TaqMeth V の解析. A : 腺腫を軽度, 中等度, 高度異型の三段階に分類した. B : 腺腫を軽異型度, 高異型度腺腫の二段階に分類した.

Supplementary Fig. S3

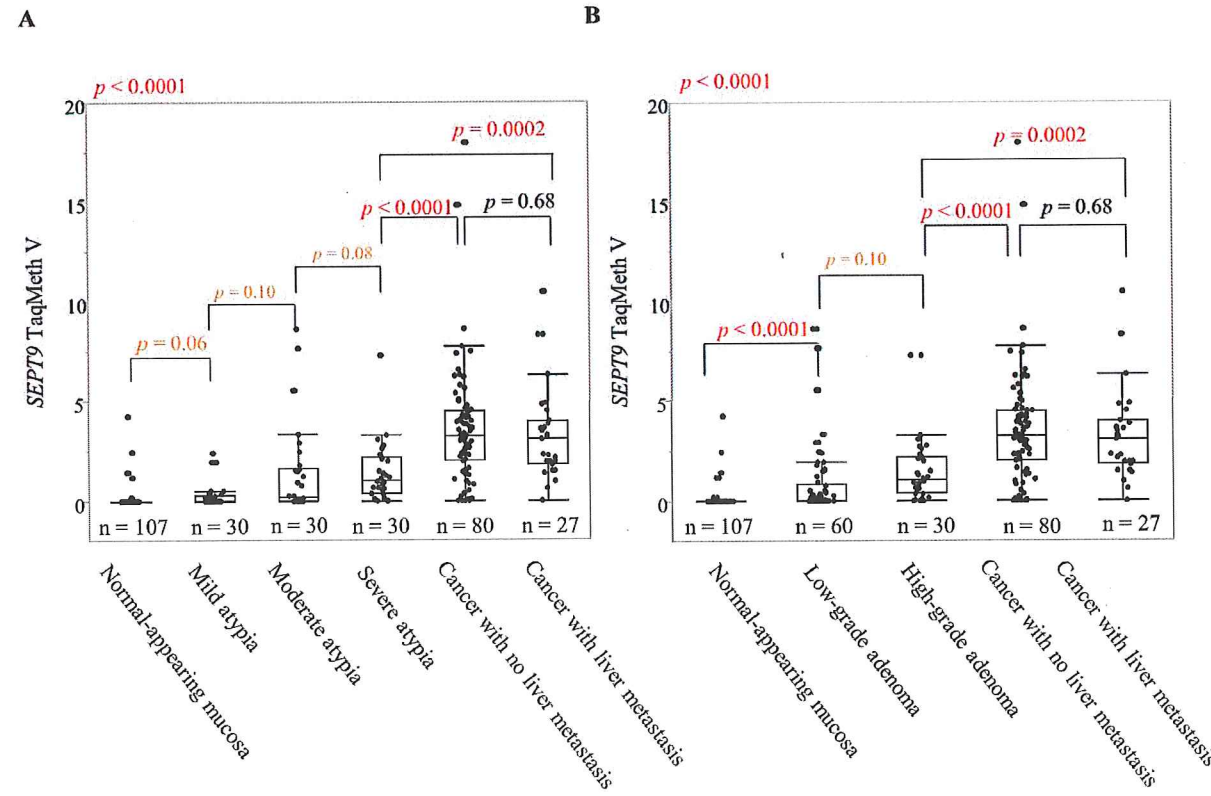


Table 1 癌組織における *CDO1* TaqMeth V と臨床病理学的因子との関係.

Table 1. Relationship with TaqMeth V of <i>CDO1</i> and clinicopathological factors at cancer tissue.					
Clinicopathological factors	Compare items	n	Average of TaqMeth V	P-value	
Age		107	---	0.006	(R ² = 0.070)
Gender	Male	65	40.6 ± 22.9	0.73	
	Female	42	39.1 ± 20.7		
Histological type	Differentiated type	99	41.3 ± 22.0	0.03	
	Undifferentiated type	8	24.7 ± 16.4		
Tumor location	Colon	60	38.7 ± 20.9	0.49	
	Rectum	47	41.7 ± 23.4		
Tumor diameter (cm)		107	---	0.04	(R ² = 0.038)
Liver metastasis	Negative	80	37.2 ± 21.7	0.02	
	Positive	27	48.6 ± 20.8		
Depth of tumor invasion	~sm	13	29.8 ± 20.0	0.07	
	mp~	94	41.5 ± 22.0		
Lymph node metastasis	Negative	60	37.6 ± 21.7	0.19	
	Positive	47	43.2 ± 22.2		
Distant metastasis	Negative	88	38.7 ± 21.7	0.16	
	Positive	19	46.4 ± 22.9		
pStage	0	4	25.4 ± 11.7	0.45	
	I	23	35.6 ± 20.7		
	II	31	39.2 ± 23.3		
	III	30	42.2 ± 21.5		
	IV	19	46.4 ± 22.9		
Dukes classification	A	27	34.1 ± 23.3	0.30	
	B	31	39.2 ± 23.3		
	C	30	42.2 ± 21.5		
	D	19	46.4 ± 22.9		
Dukes classification	A and B	58	36.8 ± 21.7	0.10	
	C and D	49	43.9 ± 21.9		
Lymphatic invasion	Negative	96	30.2 ± 22.0	0.11	
	Positive	11	41.2 ± 21.8		
Venous invasion	Negative	95	32.5 ± 19.4	0.07	
	Positive	22	42.0 ± 22.3		
Infiltrative pattern	a	5	24.4 ± 23.2	0.75	
	b	91	41.7 ± 21.0		
	c	6	41.2 ± 27.9		

Table 2 大腸癌の OS における臨床病理学的因子の単変量および多変量予後解析結果.

Table 2. Univariate and multivariate prognostic analysis of clinicopathological factors for OS in colorectal cancer.

Clinicopathological parameters	Categories	account	Univariate analysis		Multivariate analysis		
			5year OS(%)	p-value	Hazard ratio	95%CI	p-value*
Age	≤ 63	56	67.9	0.50			
	63 <	51	72.4				
Gender	Male	65	74.3	0.37			
	Female	42	63.5				
Histological type	Differentiated type	99	71.7	0.41			
	Undifferentiated type	8	50.0				
Tumor location	Colon	60	76.9	0.13			
	Rectum	47	61.5				
Liver metastasis	Negative	80	84.7	<0.0001	1.62	0.55 - 4.66	0.37
	Positive	27	16.4				
Depth of tumor invasion (pathological)	~sm	13	100	0.02	---		
	mp~	94	65.0				
Lymph node metastasis (pathological)	Negative	60	96.2	<0.0001	---		
	Positive	47	33.1				
Distant metastasis (clinical)	Negative	88	80.6	<0.0001	---		
	Positive	19	7.7				
pStage (Dukes classification)	pStage 0 - I (A)	27	100	<0.0001	1	0.07 - 6.93e ¹¹⁵ 2.62 - 1.14e ⁷⁷ 7.52 - 2.08e ⁶³	<0.0001
	pStage II (B)	31	96.0		5.83×10 ⁸		
	pStage III (C)	30	49.1		7.81×e ⁹		
	pStage IV (D)	19	7.1		2.65×e ¹⁰		
Lymphatic permeation (ly)	ly0	11	100	0.03	0.21	3.4e ⁻¹⁵⁸ - -	1.0
	ly1	96	65.9				
Vascular permeation (v)	v0	22	100	0.002	5.41×10 ⁸	0.43 - -	0.18
	v1	85	61.8				
Infiltrative growth pattern (INF)	INF a, b INF c	96 6	72.9 0	<0.0001	2.87	0.71 - 8.95	0.13
CDO1 TaqMeth Value	≤ 20.5	20	90.0	0.04	1.98	0.47 - 14.0	0.38
	20.5 <	87	64.4				

※Cox proportional-hazards model

Table S1 *CDO1*, *SEPT9*, および β -*actin* の Q-MSP と RT-PCR のプライマー配列とアニーリング温度.

Supplementary Table S1: Q-MSP, bisulfite-sequencing and RT-PCR sequence of primers and annealing temperature.				
Methods	Gene		Sequences	annealing temperature
Q-MSP	<i>CDO1</i>	Forward primer	CCACAACGACGAAAATAAAACG	60°C
		Reverse primer	TCGGCGTTTTAGGGATCGCG	
		Fluorescent probe	FAM-TTAACGGCGCGTTTTAGTCGTTTCG-TAMRA	
	<i>SEPT9</i>	Forward primer	CGCGCGATTCTGTTGTTTATTA	55°C
		Reverse primer	CCAACCCAACACCCACCTT	
		Fluorescent probe	FAM-GGATTTCGCGGTTAAC-TAMRA	
	β - <i>actin</i>	Forward primer	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	
		Reverse primer	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA	
		Fluorescent probe	FAM-ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA	
Bisulfite-sequencing	<i>SEPT9</i>	Forward primer	GGTTAGTTTTGTATTGTAGGAG	55°C
		Reverse primer	AACAACCAACCCAACACC	
RT-PCR	<i>CDO1</i>	Forward primer	TCTCTGTTGGGGTGAAGGAC	58°C
		Reverse primer	AGTGAAGGCTCACAGCAGGT	
	β - <i>actin</i>	Forward primer	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	58°C
		Reverse primer	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	

Table S2 大腸癌(pStage I~III)の RFS における臨床病理学的因子の単変量および多変量予後解析結果.

Supplementary Table S2: Univariate and multivariate prognostic analysis of clinicopathological factors for RFS in colorectal cancer (pStage 0- III).									
Clinicopathological parameters	Categories	account	Univariate analysis		Multivariate analysis				
			5year RFS(%)	p -value	Hazard ratio	95%CI	p -value※		
Age	≤ 63	45	75.4	0.74					
	63 <	43	76.1						
Gender	Male	53	80.6	0.33					
	Female	35	67.8						
Histological type	Differentiated type	83	76.7	0.38					
	Undifferentiated type	5	60.0						
Tumor location	Colon	49	86.8	0.01	2.23	-0.92 to 0.07	0.10		
	Rectum	39	61.9						
Depth of tumor invasion (pathological)	~sm	13	100	0.03	---				
	mp~	75	71.3						
Lymph node metastasis (pathological)	Negative	58	96.2	<0.0001	---				
	Positive	30	39.3						
Distant metastasis (clinical)	Negative	88	75.8	---	---				
	Positive	0	---						
pStage (Dukes classification)	pStage 0 - I (A)	27	100	<0.0001	1 1.20e ⁹ 8.90e ⁹	0.79 to 1.84e ⁶⁴ 7.11 to 2.64e ⁶⁴	<0.0001		
	pStage II (B)	31	93.0						
	pStage III (C)	30	39.3						
Lymphatic permeation (ly)	ly0	11	100	0.05					
	ly1	77	72.1						
Vascular permeation (v)	v0	22	100	0.02	1.13	-1.53 to 0.81	0.91		
	v1	66	68.0						
Infiltrative growth pattern (INF)	INF a, b	86	77.6	<0.0001	3.56	-1.38 to 0.33	0.17		
	INF c	2	0						
CDO1 TaqMeth Value	≤ 44.8	57	83.6	0.04	1.29	-0.58 to 0.32	0.57		
	44.8 <	31	60.4						
※Cox proportional hazards model									

※Cox proportional-hazards model