

学位論文

「Differential Prognostic Relevance of Promoter DNA Methylation of  
*CDO1* and *HOPX* in Primary Breast Cancer」

(乳癌における癌特異的 *Cysteine dioxygenase type1 (CDO1)* 遺伝子および *Homeobox only protein (HOPX)* 遺伝子のメチル化に基づく臨床病理学的意義の解析検討)

DM16020 田中 蓉子

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 比企 直樹

## 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

*Cysteine dioxygenase type 1 (CDOI)* 遺伝子および *homeobox only protein homeobox (HOPX)* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化は、ともに癌特異的であり、乳癌の予後因子として臨床的に重要な意義を持つことは、以前の研究で報告した。本研究では、2つの遺伝子を統合解析し、原発乳癌の予後解析、および *CDOI* 遺伝子の機能特性について検討した。

メチル化値は、TaqMan methylation-specific PCR を用いて 133 人の原発乳癌患者と 7 つの乳癌細胞株についてのメチル化を定量化し、解析を行った。

133 人の原発乳癌患者のメチル化値は、*CDOI* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子間で相関を認めた ( $r^2 = 0.072$ ,  $p = 0.002$ )。多変量解析では、*CDOI* 遺伝子の高メチル化と Ki-67 陽性が、疾患特異的生存に関連する独立予後因子として特定された (それぞれ  $p = 0.016$ ,  $p < 0.001$ )。乳癌細胞株における *CDOI* 遺伝子強制過剰発現株は、足場非依存性増殖能力を抑制させた。

乳癌に関わるメチル化遺伝子はいくつか報告されているが、今回の統合解析の結果、*CDOI* 遺伝子が、強く予後に関わる遺伝子であった。また、*CDOI* 遺伝子の機能解析の結果、乳癌細胞の増殖に関わることが明らかとなった。

## 目次

	頁
1. 序論 .....	1
2. 対象と方法	
2-1. 対象患者 .....	2
2-2. 乳癌株化細胞 .....	2
2-3. RNA 精製および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) .....	2
2-4. プラスミド精製と一過性遺伝子導入 .....	2
2-5. 足場非依存性コロニー形成実験 .....	2
2-6. 細胞増殖実験 .....	3
2-7. 細胞浸潤実験 .....	3
2-8. 統計学的解析 .....	3
3. 結果	
3-1. 原発乳癌患者 133 人の予後と <i>CD01</i> 遺伝子, <i>HOPX</i> 遺伝子のメチル化の関係	4
3-2. 原発乳癌患者 133 人の <i>CD01</i> 遺伝子メチル化値と <i>HOPX</i> 遺伝子メチル化値の 関連 .....	5
3-3. カットオフ値を用いた予後と <i>CD01</i> 遺伝子, <i>HOPX</i> 遺伝子のメチル化の検討	5
3-4. Ki-67 陽性乳癌における <i>CD01</i> 高メチル化の意義 .....	5
3-5. 乳癌株化細胞における <i>CD01</i> 遺伝子の腫瘍抑制機能について .....	6
4. 考察 .....	7
5. 総括 .....	8
6. 引用文献 .....	9
7. 謝辞 .....	12
8. 図表 .....	13



## 1. 序論

乳癌は、女性で最も罹患率の高いがんであり、国際がん研究機関（IARC）による最近の推定では、世界中の女性のすべてのがん症例の約4分の1を占めている[1]。寿命の延長、都市化、ライフスタイルの西洋化により、乳癌の罹患率は世界的に増加しており、今後も増加の一途を辿ると予想される。したがって、診断および生存率を改善するための早期発見や、個別化治療は重要であり、新しいアプローチがさらに必要である。

乳癌治療は、遺伝子発現に基づいた2011年のSt. Gallenコンセンサス会議でサブタイプ分類が提案され、個別化治療が確立されている[2, 3]。サブタイプ分類に不可欠な因子であるホルモン受容体、HER2受容体およびKi-67の発現は、現在の治療法の選択において重要な決定因子である。

乳癌のゲノムイベントは他の癌よりも少ない[4]。山下らは以前に、エピジェネティックなサイレンシングの薬理的な反転を開発し[5]、消化器癌における*PGP9.5*遺伝子[6]、*NMDAR2B*遺伝子[7]、*DFNA5*遺伝子[8]、および*HOPX*遺伝子[9]などの多くの腫瘍抑制遺伝子を明らかにした。原発乳癌において、新規メチル化遺伝子として*CDO1*遺伝子および*HOPX*遺伝子が報告され[10, 11]、われわれはこの2つの遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化が、原発乳癌の予後因子であることを報告した。特にトリプルネガティブタイプ乳癌の*CDO1*高メチル化[12]とHER2陰性タイプ乳癌の*HOPX*高メチル化[11]が、予後因子であることを明らかにした。

一方、DNAメチル化と乳癌の予後に関する報告は、2018年までに約700件あり、200以上の遺伝子が報告されているが、このうち48論文の31遺伝子で、癌特異的メチル化定量PCR（Q-MSP）について報告している。また48論文のうち、*CDO1*遺伝子[12, 13]、*PITX2*遺伝子[14, 15]および*HOPX*遺伝子[11]の3遺伝子のみが、多変量解析を用いて、独立予後因子であることを証明している。これまで、これらの遺伝子を統合解析した報告はない。

Q-MSPは、メチル化の有無ではなく、最適化されたカットオフ値を用いることにより予後が評価される。本研究は、いくつかの最適化されたカットオフ値を使用し、*CDO1*遺伝子と*HOPX*遺伝子の2つの腫瘍抑制遺伝子を統合解析し、原発乳癌の予後因子としての有用性を確認した。さらに、この研究によって決定されたより強力な予後因子である*CDO1*遺伝子の機能解析を行い、原発乳癌における*CDO1*高メチル化の分子生物学意義を明らかにすることを目的とした。

## 2. 対象と方法

### 2-1. 対象患者

1995年1月1日から1999年12月31日の期間に、北里大学病院で原発乳癌の外科的切除を施行された、化学療法歴のない172例の原発乳癌患者のうち[9, 10], *CDO1* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子両方のメチル化値が測定可能であった133例を対象として、後ろ向きに検討を行った。この研究は、北里大学医学部倫理委員会の承認を得て実施された (B15-161)。TNM分類は、UICC (Union for International Cancer Control) (第7版) に基づき診断した。

### 2-2. 乳癌細胞株

乳癌細胞株は7種類 (MDA-MB231, YMB-1, YMB-1E, MDA-MB453, MCF-7, SK-BR3, CRL) を用いた[10]。コントロール群として、東北大学加齢医学研究所生物医学研究センターから提供された大腸癌細胞株 DLD1 と、理研バイオリソースセンターから購入した肝細胞癌細胞株 HepG2 を用いた。

### 2-3. RNA 精製および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

RNeasy Mini Kit および RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して、各細胞株からの total RNA を抽出した。SuperScriptIII reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて total RNA を逆転写し、RT-PCR で増幅した PCR 産物を 1.5~2.0% のアガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで可視化した[10]。

### 2-4. プラスミド精製と一過性遺伝子導入

PCR にて遺伝子の完全長 cDNA を単離し、変異がないことを確認した後、pcDNA<sup>TM</sup>3.1D/V5-His-TOPO vector にサブクローニングした (Invitrogen)。コントロールには self-ligation のあるベクターを用いた。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、7種類の乳癌細胞株にプラスミドベクターを一過性に遺伝子導入した。

### 2-5. 足場非依存性コロニー形成実験

足場非依存性の細胞増殖は、6 ウェルプレートを用いて、 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$  の細胞を含む 0.36% top agarose (Bacto<sup>TM</sup> Agar, Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を 0.72% bottom agarose の表面に散布し、解析した。軟寒天溶液は、2~3 週培養した後、エチジウムブロマイドで細胞を可視化した。2つの独立した実験を行い、各実験は3回ずつ施行し平均値を算出した。

## 2-6. 細胞増殖実験

細胞増殖と生存率は、96 ウェルプレート (細胞  $1.0 \times 10^5$  個/well) で Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara Bio, Tokyo, Japan) を使用して測定した。蛍光は 450nm で示し、実験は 3 回繰り返して平均値を算出した。

## 2-7. 細胞浸潤実験

細胞の浸潤特性は、CytoSelect™ 96-well Cell Invasion Assay Kit (CELL BIOLABS, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。各細胞を膜チャンバー内の無血性培地に  $1.0 \times 10^5$  個/ml の密度で播種した。10%ウシ胎児血清を含む培地を feeder tray に加え、膜チャンバーを feeder tray に戻した。24 時間の培養後にメインチャンバーを固定し、4X Lysis Buffer/CyQuant® GR dye solution で染色した。蛍光は 480/520nm で測定され、実験は 3 回繰り返して平均値を算出した。

## 2-8. 統計学的解析

連続変数は Student's-t 検定もしくは分散分析 (ANOVA) を用いて評価し、名義変数は Fisher 正確確率検定またはカイ二乗検定を用いて評価した。p 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。プライマリーエンドポイントは疾患特異的生存 [Disease Specific Survival (DSS)] とし、フォローアップ期間は手術日から死亡または術後 10 年までで計算した。予後は Kaplan-Meier 法によって計算され、ログランク検定で評価した。単変量解析で予後と関連する因子を共変量とし、Cox 比例ハザードモデルを使用した多変量解析を行った。すべての解析に JMP® 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。



### 3. 結果

#### 3-1. 原発乳癌患者 133 人の予後と *CDO1* 遺伝子, *HOPX* 遺伝子のメチル化の関係

以前の報告[11,12]で得られた *CDO1* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子のメチル化値から, 両方の遺伝子のメチル化値の情報が得られた原発乳癌患者 133 例の予後と比較した. 133 例の臨床病理学的特徴は表 I に示す. 予後解析では, 3 種類のカットオフ値 (高値, 中央値, 低値) を使用した.

*CDO1* 遺伝子の場合, ログランクプロット分析による高メチル化群と低メチル化群で予後の統計的有意性を示したため, 今回, 既報の如くカットオフ中央値である 58 を最終的な予後カットオフ値として使用した[12].

*CDO1* 遺伝子高メチル化群 ( $n=62$ ) は, *CDO1* 遺伝子低メチル化群 ( $n=71$ ) よりも予後不良であった ( $p=0.009$ ) (図 1A).

一方, *HOPX* 遺伝子は, ログランクプロット分析により 2 種類のカットオフ値が, 高メチル化群と低メチル化群の間で予後の顕著な関連性を示したため, 既報の高いカットオフ値である 24 と, 今回新たに低いカットオフ値である 4.3 を最終的な予後カットオフ値として使用した[11]. *HOPX* 遺伝子に関して, 高いカットオフ値 24 を用いた場合, *HOPX* 遺伝子高メチル化群 ( $n=45$ ) は, *HOPX* 遺伝子低メチル化群 ( $n=88$ ) よりも予後不良な傾向であったが, 有意差は認めなかった ( $p=0.121$ ). また低いカットオフ値 4.3 を用いても, *HOPX* 遺伝子高メチル化群 ( $n=25$ ) は, *HOPX* 遺伝子低メチル化群 ( $n=108$ ) より予後不良な傾向であったが, 有意差は認めなかった ( $p=0.229$ ). (図 1B).

Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った (表 II). 単変量解析では, 大きい腫瘍径 (pT3) ( $p=0.002$ ), 高度リンパ節転移陽性 (pN2-3) ( $p<0.001$ ), ホルモン受容体陰性 ( $p=0.006$ ), Ki-67 陽性 ( $p<0.001$ ), HER2 タイプ・トリプルネガティブタイプ ( $p=0.002$ ), 術後化学療法施行例 ( $p=0.003$ ), アントラサイクリン化学療法施行例 ( $p=0.006$ ), ホルモン療法未施行例 ( $p=0.002$ ), および *CDO1* 遺伝子高メチル化 ( $p=0.009$ ) が, 予後不良因子であった.

多変量解析では, Ki-67 陽性 ( $p<0.001$ ) および *CDO1* 遺伝子高メチル化 ( $p=0.016$ ) が, 原発乳癌の疾患特異的生存に関連する独立予後因子であった.

### 3-2. 原発乳癌患者 133 人の *CDO1* 遺伝子メチル化値と *HOPX* 遺伝子メチル化値の関連

以前の研究で CpG アイランドのメチル化表現型 (CIMP) が指摘されていたため、133 人の原発乳癌患者における *CDO1* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子間のメチル化値の関連性を調べた [16]。 *CDO1* 遺伝子のメチル化値の降順に症例を並べ (図 2A の上部パネル)、同一症例の *HOPX* 遺伝子のメチル化値を並べた (図 2A の下部パネル)。 *CDO1* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子のメチル化値間に、正の相関を認めた ( $p = 0.002$ ,  $r^2 = 0.072$ ) (図 2B)。各プロモーター DNA のメチル化中央値を用いた比較においても、 *CDO1* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子の両方のメチル化には関連を認めた ( $p < 0.001$ ) (図 2C)。

### 3-3. カットオフ値を用いた予後と *CDO1* 遺伝子、 *HOPX* 遺伝子のメチル化の検討

*CDO1* 遺伝子と *HOPX* 遺伝子のメチル化値の異なる組み合わせにより、133 人の原発乳癌患者の予後を解析した。患者は、カットオフ値 (低値、中央値、高値) に基づいて 3 つのパターンに分類した。カットオフ値ごとに 4 つのグループに分類した。グループ I は *CDO1* 遺伝子 / *HOPX* 遺伝子の高/高メチル化群、グループ II は *CDO1* 遺伝子 / *HOPX* 遺伝子の低/高メチル化群、グループ III は *CDO1* 遺伝子 / *HOPX* 遺伝子の高/低メチル化群、グループ IV は *CDO1* 遺伝子 / *HOPX* 遺伝子の低/低メチル化群とした。3 つのカットオフ値毎の Kaplan-Meier 曲線では、すべてのパターンにおいてグループ I, III (*CDO1* 高メチル化群) は、グループ II, IV (*CDO1* 低メチル化群) より予後不良であった (カットオフ値 低 / 中央 / 高 :  $p = 0.013 / p = 0.072 / p < 0.001$ ) (図 3)。

### 3-4. Ki-67 陽性乳癌における *CDO1* 高メチル化の意義

*CDO1* 遺伝子のメチル化中央値をカットオフ値とし、Ki-67 陰性群 ( $n = 104$ ) および Ki-67 陽性群 ( $n = 29$ ) の生存曲線を調べた。 *CDO1* 遺伝子の高メチル化群は、Ki-67 陽性例で低メチル化群より予後不良であった ( $p = 0.024$ ) (図 4A)。Ki-67 陰性例では、統計学的有意差はなかったが、 *CDO1* 遺伝子の高メチル化群は、術後 4 年目以降の晩期において生存率が下がる傾向であった。さらに、 *CDO1* 遺伝子の 3 つのカットオフ値 (低値、中央値、高値) を用いて、 *CDO1* 遺伝子のメチル化と Ki-67 で 4 つのグループに分類した。グループ I は、 *CDO1* 遺伝子高メチル化 / Ki-67 陽性、グループ II は、 *CDO1* 遺伝子高メチル化 / Ki-67 陰性、グループ III は、 *CDO1* 遺伝子低メチル化 / Ki-67 陽性、グループ IV は、 *CDO1* 遺伝子低メチル化 / Ki-67 陰性と定義した。すべてのカットオフ値においてグループ I は最も予後不良であり、グループ IV が最も予後良好であった (図 4B, それぞれ  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ )。

### 3-5. 乳癌細胞株における *CDO1* 遺伝子の腫瘍抑制機能について

*CDO1* 遺伝子は、RT-PCR によって7つの乳癌細胞株全てにおいて発現を認めなかった (図 5A の左パネル, 陽性コントロールは肝細胞がん細胞株 HepG2, 陰性コントロールは大腸がん細胞株 DLD1). MCF-7, SK-BR3, YMB-1, CRL, YMB-1E, MDA-MB231, MDA-MB453 の7つの乳癌細胞株に *CDO1* 遺伝子プラスミドベクターを導入し、RT-PCR により *CDO1* 遺伝子の発現を確認した (図 5A の右パネル).

YMB-1, YMB-1E および CRL への *CDO1* 遺伝子導入株は、Anchorage-independent colony formation assay において、対照株と比較してコロニー数が減少した (図 5B 左パネル). コロニーの減少率は、対照株のコロニーを 100%として計算し (図 5B 右パネル). MDA-MB231 を除く5種の乳癌細胞株で確認された. MDA-MB453 はコロニーを形成しなかった.

proliferation assay において YMB-1E の *CDO1* 遺伝子導入株は、成長を抑制した ( $p = 0.021$ ) (図 5C 左パネル). 一方, invasion assay では, *CDO1* 遺伝子導入株による腫瘍浸潤と関連性を認めなかった. (図 5C 右パネル).



## 4. 考察

乳癌のエピジェネティックな予後因子について記述している報告は多数あるが [17, 18], 最終的な検証は行われておらず, ホルモン受容体, HER2 受容体, および Ki-67 に加えて, 決定的な予後因子が依然として強く求められている. 本研究では, 同じ乳癌サンプルを使用して *CDO1* 高メチル化と *HOPX* 高メチル化の 2 つの潜在的な予後因子を比較し, *CDO1* 高メチル化に焦点を当てた. 2 つの遺伝子のメチル化は相関関係にあったが, 完全な一致は確認されていないため, 2 つの遺伝子の予後の関連性については個別に議論する必要があると考えられた. いくつかのカットオフ値の組み合わせでの検討では, *HOPX* 遺伝子のメチル化は乳癌患者の予後を層別化できなかった. 以前の報告よりも, 症例数が限られていたことも要因と推察された.

Ki-67 は乳癌でよく知られている予後因子であり, 本研究においても, *CDO1* 高メチル化と同様に, 最も強力な独立予後因子であった. この結果は, 乳癌の予後に関する世界的なコンセンサスと一致している [19, 20]. 南谷らの報告では, *CDO1* 高メチル化は, トリプルネガティブ乳癌の強力な予後因子であったが, 本研究では, 初めて *CDO1* 高メチル化が, Ki-67 陽性例で強力な予後因子であることを明らかにした. ただし, トリプルネガティブ乳癌には, 他のサブタイプ患者よりも Ki-67 陽性例が多く存在することも考慮すべき点ではある [20].

*CDO1* 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化は, ヒトの様々な癌腫で認められており, その高メチル化と予後との関連は, われわれの研究室から乳癌 [12], 食道扁平上皮癌 [21], 食道腺癌 [22], 胆嚢癌 [23], 結腸直腸 [24] で報告している, また他の研究グループからは乳癌 [13, 25], 前立腺癌 [26], 腎癌 [27], および肺癌 [28] など, 多くの癌種で報告されている. これらは, *CDO1* 高メチル化が, ヒトの癌の共通した予後因子であることを示している.

*CDO1* 遺伝子が, 乳癌細胞にどのように関与しているかを調べるため, *CDO1* 遺伝子を 7 種類の乳癌細胞株に一過性導入させた. その結果, 乳癌細胞株の足場非依存性増殖を抑制することが明らかとなった. 一方, 乳癌細胞株の浸潤能への影響は認めなかった. 南谷らの報告 [12] では, *CDO1* 高メチル化は, リンパ節転移陽性例に多く認められたことから, *CDO1* 遺伝子が乳癌細胞の増殖機能, およびリンパ節転移に関わることで, 予後に影響したと考えられた.

*CDO1* 遺伝子メチル化に関して, どのカットオフ値を用いても, *CDO1* 高メチル化群は予後不良であった (図 3), さらに, *CDO1* 遺伝子メチル化値が高くなるほど死亡リスクが増加した [10]. すなわち, *CDO1* 高メチル化状態は, タイムキーパーのようにがんの発生からの時間を表している可能性があると考えられた.

*CDO1* 高メチル化は、リンパ節転移[13]、アントラサイクリン治療の抵抗性[25]、トリプルネガティブタイプ[10]、さらに、Ki-67 陽性の乳癌における重要な予後因子であることが実証された。乳癌に対する現在の治療戦略は、ルミノールタイプ、HER2 タイプ、トリプルネガティブタイプなどのサブタイプに基づいているため、このサブタイプと *CDO1* 遺伝子メチル化の予後関連性を検証する必要がある。ルミノールタイプの場合、他のサブタイプに比し予後良好だが、乳癌患者の中で最も多いため、再発例も多い。ルミノールタイプでは、Ki-67 陽性と陰性とで化学療法の治療選択に関わるが、Ki-67 に代わる予後予測マーカーは強く求められている。本研究では、Ki-67 陰性群でも、*CDO1* 高メチル化が予後不良の傾向であった(図 4A)。さらに晩期再発と予後に関わる可能性も示唆されることより、ルミノールタイプの乳癌において、*CDO1* 遺伝子メチル化が予後予測に有用かを検証していきたい。

## 5. 総括

腫瘍抑制遺伝子である *CDO1* 遺伝子は、そのメチル化が予後と密接に関わっていることが明らかとなった。乳癌細胞の増殖に関わっていたが、浸潤能には関連を認めなかった。今後、*CDO1* 遺伝子高メチル化状態が、がんが発生してからの時間を反映しているのか、薬剤耐性能と併せて、研究を推進していきたい。



## 6. 引用文献

1. International Agency for research on cancer, World Health Organization, Breast Cancer Awareness Month 2018. at <https://www.iarc.fr/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2018/>
2. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al.: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8418-23.
3. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al.: Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1160-7.
4. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al.: The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318(5853):1108-13.
5. Yamashita K, Upadhyay S, Osada 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.
6. Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, Nomoto S, Sun DI, Xiao Y, et al.: Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. *Cancer Res* 2004;64(17):5982-7.
7. Kim MS, Yamashita K, Baek JH, Park HL, Carvalho AL, Osada M, et al.: N-methyl-D-aspartate receptor type 2B is epigenetically inactivated and exhibits tumor-suppressive activity in human esophageal cancer. *Cancer Res* 2006;66(7):3409-18.
8. Kim MS, Chang X, Yamashita K, Nagpal JK, Baek JH, Wu G, et al.: Aberrant promoter methylation and tumor suppressive activity of the DFNA5 gene in colorectal carcinoma. *Oncogene* 2008;27(25):3624-34.
9. Yamashita K, Kim MS, Park HL, Tokumaru Y, Osada M, Inoue H, et al.: HOP/OB1/NECC1 promoter DNA is frequently hypermethylated and involved in tumorigenic ability in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 2008;6(1):31-41.

10. 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(9):e44951.
11. Kikuchi M, Katoh H, Waraya M, Tanaka Y, Ishii S, Tanaka T, et al.: Epigenetic silencing of HOPX contributes to cancer aggressiveness in breast cancer. *Cancer Lett* 2017;384:70-78.
12. 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.
13. Dietrich D, Krispin M, Dietrich J, Fassbender A, Lewin J, Harbeck N, et al.: CDO1 promoter methylation is a biomarker for outcome prediction of anthracycline treated, estrogen receptor-positive, lymph node-positive breast cancer patients. *BMC Cancer* 2010;10:247.
14. Nimmrich I, Sieuwerts AM, Meijer-van Gelder ME, Schwoppe I, Bolt-de Vries J, Harbeck N, et al.: DNA hypermethylation of PITX2 is a marker of poor prognosis in untreated lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111(3):429-37.
15. Harbeck N, Nimmrich I, Hartmann A, Ross JS, Cufer T, Grützmann R, et al.: Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2008;26(31):5036-42.
16. Issa JP: CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4(12):988-93.
17. Rose M, Klotten V, Noetzel E, Gola L, Ehling J, Heide T, et al.: ITIH5 mediates epigenetic reprogramming of breast cancer cells. *Mol Cancer* 2017;16(1):44.
18. Zhang H, Zhang N, Liu Y, Su P, Liang Y, Li Y, et al.: Epigenetic regulation of NAMPT by NAMPT-AS drives metastatic progression in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 2018;78(18):3418.

19. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members.: Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22(8):1736-47.
20. Nishimiya H, Kosaka Y, Yamashita K, Minatani N, Kikuchi M, Ema A, et al.: Prognostic significance of Ki-67 in chemotherapy-naive breast cancer patients with 10-year follow-up. *Anticancer Res* 2014;34(1):259-68.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Kojima K, Nakamura T, Ohbu M, Katoh H, Ooizumi Y, Igarashi K, et al.: Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1) gene promoter methylation during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *PLoS One* 2018;13(5):e0194785.
25. 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.
26. 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):871-880.

27. Deckers IA, Schouten LJ, Van Neste L, van Vloderop 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.
28. 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):7141-7152.

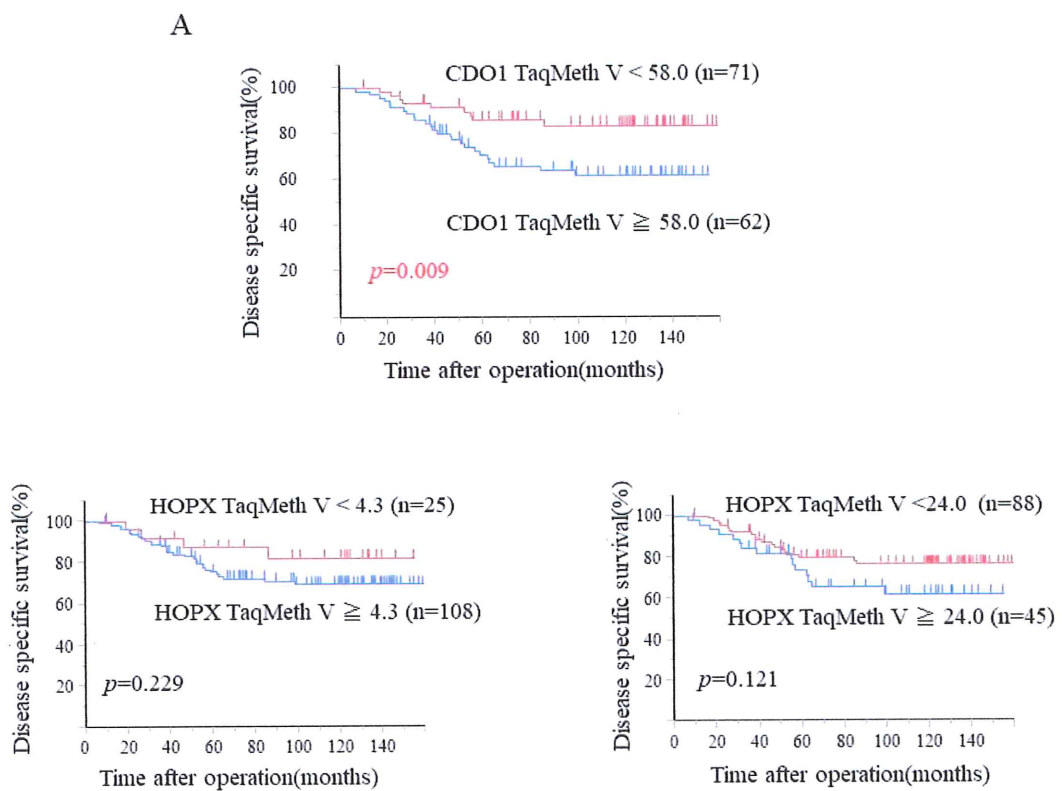
## 7. 謝辞

本研究の完成にあたり、終始変わらぬ御指導と御鞭撻を賜りました北里大学外科学前教授 渡邊昌彦先生、上部消化管外科教授 比企直樹先生に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、直接の御指導と数多くの示唆に富むご助言をいただきました北里大学新世紀医療開発センター 先端腫瘍外科学教授 山下継史先生、同乳腺甲状腺外科学講師 小坂愉賢先生に厚く御礼を申し上げます。



## 8. 図表

**Fig. 1: Kaplan-Meier curves for DSS according to each TaqMeth values in *CDO1* gene (A) and *HOPX* gene (B).** (A) The cut off value was 58.0 which was the median TaqMeth value reported by Minatani ( $p = 0.009$ ). (B) Two cut off values were 4.3 and 24.0 which were each low optimized and high optimized TaqMeth values reported by Kikuchi ( $p = 0.229$ ,  $p = 0.121$ ).

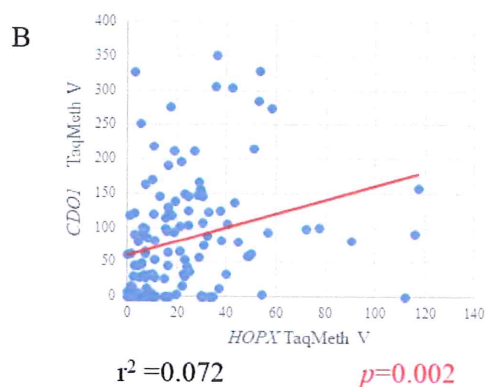
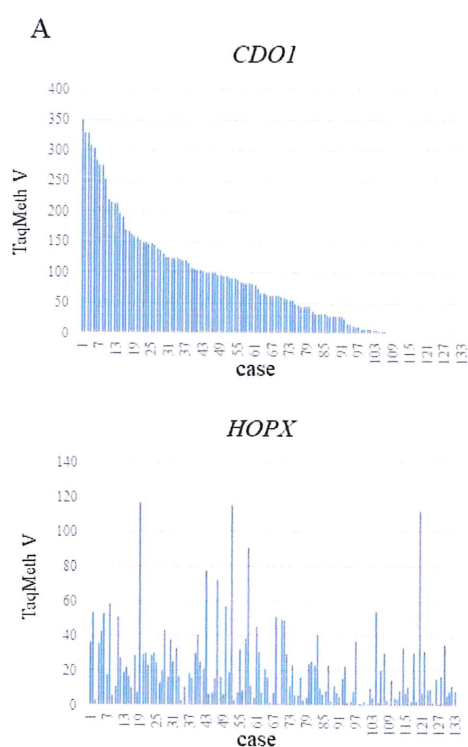


**Fig. 2: The association of TaqMeth values of *CDO1* gene to *HOPX* gene in primary breast cancer patients.**

(A) Cases were arranged from the left in order of *CDO1* hypermethylation, and *HOPX* methylation in the same case was graphed.

(B) In methylation of *CDO1* and *HOPX*, there is no strong correlation, but a significant relationship is recognized ( $r^2 = 0.072$ ,  $p = 0.002$ ).

(C) Strong correlation between TaqMeth values of *CDO1* and *HOPX* in 133 primary breast cancer patients ( $p < 0.001$ ).

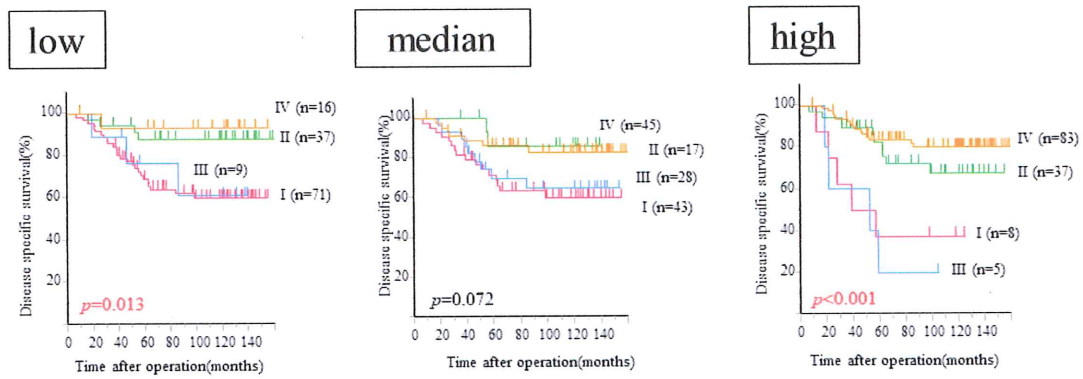


C

		<i>HOPX</i> (median:16.9)	
		high	low
<i>CDO1</i> (median:58.0)	high	43	28
	low	17	45

RR = 4.07 95%CI = 1.95-8.46  $p < 0.001$

**Fig. 3: Kaplan-Meier curves for DSS according to separately defined cut off values.** Groups I and III which showed *CDO1* hypermethylation showed poorer prognosis than other groups with *CDO1* hypomethylation in all patterns ( $p = 0.013$ ,  $p = 0.072$ ,  $p < 0.001$ ) .

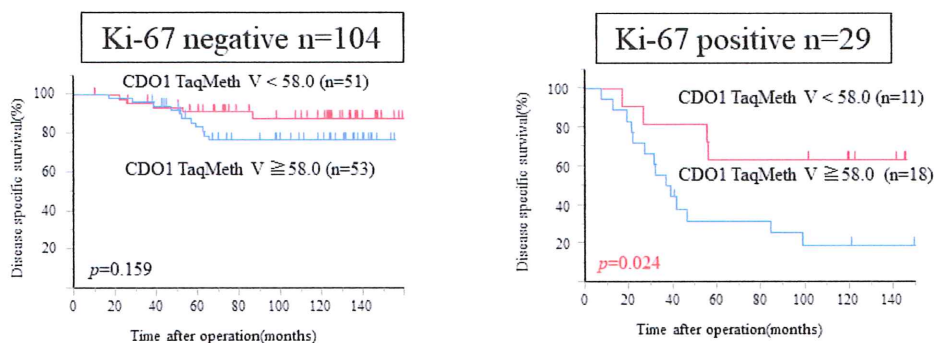


**Fig. 4: Kaplan-Meier curves for DSS according to *CDO1* methylation and Ki-67.**

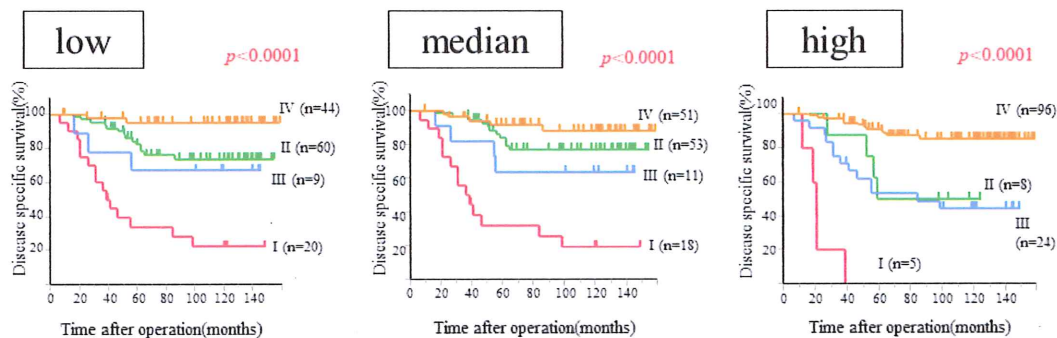
(A) *CDO1* hypermethylation showed poor prognosis regardless of Ki-67 value.

(B) *CDO1* hypermethylation and Ki-67 positivity (group I) showed the poorest prognosis at 3 kinds of separately defined cut off values, and *CDO1* hypomethylation and Ki-67 negativity (group IV) showed the best prognosis ( $p < 0.0001$ ).

A



B



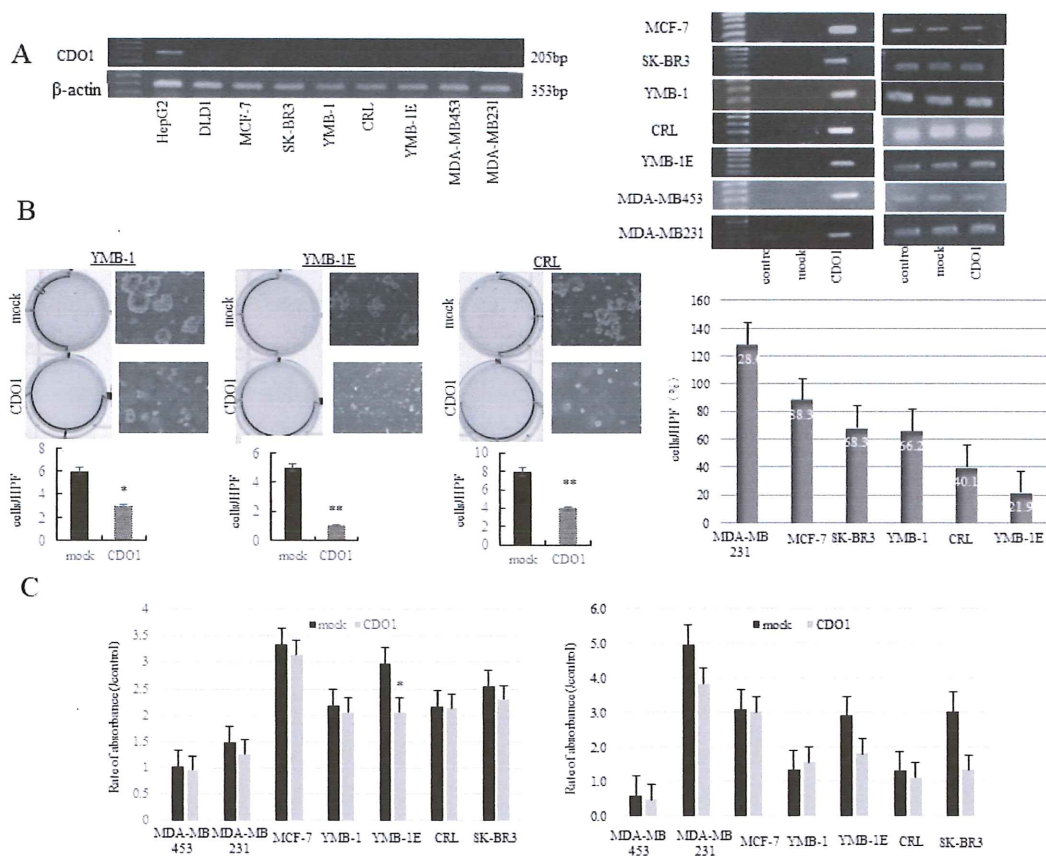


**Fig. 5: Forced expression of *CDO1* gene in breast cancer cell lines.**

(A) *CDO1* mRNA expression was assessed by RT-PCR in 7 breast cancer cell lines (left panel). *CDO1* plasmid was transiently transfected, and *CDO1* gene expression was recognized at mRNA in 7 breast cancer cell lines (right panel).  $\beta$ -actin was used as a loading control.

(B) Anchorage-independent colony formation assay in breast cancer cell lines with enforced expression of *CDO1* gene. Forced expression of *CDO1* gene significantly reduced colonies in YMB1, YMB1-E and CRL cells under a phase-contrast microscope (left panel). Almost breast cancer cell lines showed colony reduction (right panel).

(C) WST-1 assay (left panel) and matrigel invasion assay (right panel) in forced expression of *CDO1* gene.



**Table I Clinicopathological characteristics of the 133 primary breast cancer patients**

Variables		Number	%
Age median (range)		50.2 (22-84)	
Gender	Male	1	0.7
	Female	132	99.3
Operation method	Lumpectomy	36	27
	Mastectomy	97	72.9
Histological type	Invasive ductal carcinoma	126	94.7
	Others	7	5.3
pT factor	T1	61	45.9
	T2	59	44.4
	T3	10	7.5
	T4	3	2.3
pN factor	N0	60	45.1
	N1	36	27.1
	N2	19	14.3
	N3	18	13.5
pStage	I	35	26.3
	II	59	44.4
	III	39	29.3
	IV	0	0
Hormone receptor(IHC)	Positive	89	66.9
	Negative	44	33.1
HER2	Positive	35	26.3
	Negative	98	73.7
Ki-67(IHC)	Positive	29	21.8
	Negative	104	78.2
Subtype	Luminal	74	55.6
	HER2	35	26.3
	Triple negative	24	18
Post-operative adjuvant therapy	Only Chemotherapy	63	47.4
	Only hormone therapy	24	18
	Chemotherapy & hormone therapy	25	18.8
	None	21	15.8
<i>CDO1</i> (58.0)*	High	71	53.4
	Low	62	46.6
<i>HOPX</i> (16.9)*	High	60	45.1
	Low	73	54.9
Reccurence	Yes	51	38.3
	No	82	61.7
Cancer related death	Yes	34	25.6
	No	99	74.4

The median length of follow-up for censored cases was 10.1years.

\*Cut off values of *CDO1* and *HOPX* are previous reported median cut off values.

**Table II Univariate and multivariate prognosis analysis for disease specific survival (DSS)**

Clinicopathological parameters	Number	Univariate		Multivariate			
		DSS (%)	p value*	HR	95% CI	p value#	
pT factor	T1	61	85.2	0.002		NS	
	T2	59	71.2				
	T3	10	30.0				
	T4	3	75.0				
pN factor	N0	60	83.3	<0.001		NS	
	N1	36	83.3				
	N2	19	63.2				
	N3	18	38.9				
Pathological type	Invasive ductal carcinoma	126	74.6	1			
	Others	7	71.4				
Hormone receptor(IHC)	Positive	89	82.0	0.006		NS	
	Negative	44	59.1				
HER2	Positive	35	68.6	0.372			
	Negative	98	76.5				
Ki-67(IHC)	Positive	29	37.9	<0.001	7	2.4-22.1	<0.001
	Negative	104	84.6				
Subtype	Luminal	74	85.1	0.002		NS	
	HER2	35	68.6				
	Triple negative	24	50.0				
Post-operative adjuvant therapy	Only Chemotherapy	63	61.9	0.003		NS	
	Only hormone therapy	24	100.0				
	Chemotherapy & hormone therapy	25	80.0				
	None	21	76.2				
Athracycline chemotherapy	Yes	11	36.4	0.006		NS	
	No	122	77.9				
Hormone therapy	Yes	49	89.8	0.002		NS	
	No	84	65.5				
CDO1 (58.0)	High	71	64.8	0.009	3.6	1.3-11.6	0.016
	Low	62	85.5				
HOPX (16.9)	High	60	70.0	0.322			
	Low	73	78.1				

\*Log-rank test.

#Cox-proportional hazard model.