

学位論文要旨

氏名 田中 蓉子



論文題目

「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)

指導教授承認印

比企直樹



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)

氏名 田中 蓉子

【背景】

日本人における乳癌罹患率は 11 人に 1 人とされており、臓器別罹患率では第 1 位である。年間死亡者数も多く、年々罹患率、死亡率ともに増加傾向である。近年乳癌における早期診断、個別化治療が世界中で様々な方面から研究されている。

当教室では癌特異的メチル化によって不活化される癌抑制遺伝子候補を modified pharmacological unmasking microarray 法を用いて数多く同定してきた。新たな予後診断アプローチとして、様々な癌腫において癌特異的メチル化が研究され、メチル化が予後因子となることが証明されている。乳癌に関連する遺伝子のメチル化に関して、*CDO1* については南谷ら、*HOPX* については菊池らによって報告され、各々で高メチル化が有意に予後不良と関連していた。今回、各々の報告にて最適化されたメチル化のカットオフ値を使用し、2 つの遺伝子を統合分析して、原発乳癌の予後予測マーカーとしての有用性と予後的寄与について検討した。

【対象と方法】

1. 1995 年 1 月 1 日から 1999 年 12 月 31 日までに北里大学病院で原発乳癌の外科的切除を受けた化学療法歴のない患者 133 人を対象とした。この研究は、北里大学医学部倫理委員会の臨床研究ガイドライン (B15-161) に従って実施された。
2. 当教室にある乳癌細胞株 7 種類 (MDA-MB231, YMB-1, YMB-1E, MDA-MB453, MCF-7, SK-BR3, CRL) を用いた。コントロールとして大腸癌細胞株 DLD1, 肝細胞癌細胞株

HepG2 を用いた。

3. RNA purification and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Rneasy Mini Kit および RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し、細胞株からの total RNA を抽出した。SuperScriptIII 逆転写酵素キット (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、total RNA を逆転写した。

4. Plasmid and transient transfection

pcDNATM3.1D / V5-His-TOPO ベクターにサブクローニングした。Lipofectamine 2000 試薬 (Invitrogen) を使用して、プラスミドベクターを一時的に乳癌細胞株にトランスフェクトした。

5. Anchorage-independent colony formation assay

0.72% ボトムアガロースの表面に乳癌細胞を含む 0.36% トップアガロース (BactoTM Agar, Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を作成し、培養後、細胞を可視化し測定した。

6. Proliferation assay

Premix WST-1 細胞増殖アッセイシステム (Takara Bio, Tokyo) を使用し、細胞増殖と生存率を測定した。

7. Invasion assay

CytoSelectTM96 ウェル細胞浸潤アッセイキット (CELL BIOLABS, San Diego, CA, USA) を使用し測定した。

8. 統計学的解析

連続変数は Student' s-t 検定を用いて評価し、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、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 Disease Specific Survival (DSS) とし、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。すべての解析は JMP[®] 11 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

【結果】

1. 原発乳癌患者 133 人の予後と *CD01*, *HOPX* のメチル化の関係

各々のメチル化値のカットオフは *CD01* では中央値 58.0, *HOPX* では高カットオフ値 24.0, 低カットオフ値 4.3 を用いた. 高カットオフ値と低カットオフ値は, メチル化値のログランクプロット分析に従ってプロットされた p 値と相対リスクによって決定された. 予後解析では, *CD01* は高メチル化群 (n=71) が低メチル化群 (n=62) と比較して, 著しく予後不良であった ($p=0.009$).

単変量解析では, pT 因子, pN 因子, ホルモン受容体, Ki-67, サブタイプ, 術後補助療法, アントラサイクリン化学療法, ホルモン療法および *CD01* メチル化が, 有意に予後と関連する因子であった. これらを共変量とした多変量解析では, Ki-67 陽性と *CD01* 高メチル化が, 原発乳癌患者の独立した予後因子であった ($p<0.001$, $p=0.016$).

2. 原発乳癌患者 133 人の *CD01* と *HOPX* のメチル化値の関連

CD01 のメチル化値の降順に症例を並べ, 同一症例の *HOPX* のメチル化値を並べ比較すると, *CD01* と *HOPX* の間にメチル化値の有意な正の相関があり ($p=0.002$, $r^2=0.072$), 各遺伝子のメチル化中央値を用いた比較においても, *CD01* メチル化と *HOPX* メチル化は顕著に関連していた ($p<0.001$).

3. カットオフ値を用いた予後と *CD01*, *HOPX* のメチル化の検討

133 人の原発乳癌患者を, *CD01*, *HOPX* 各々の検討で決定したカットオフ値 (低値, 中央値, 高値) に基づいて, 3つのパターンに分類した. 各パターンにおいて, *CD01* と *HOPX* のメチル化値を比較し, カットオフ値ごとに 4つのグループ (*CD01/HOPX* メチル化の I:高/高, II:低/高, III:高/低, IV:低/低) に分類した. 3つのパターンの Kaplan-Meier 曲線では, すべてのパターンにおいてグループ I, III (*CD01* 高メチル化群) は, グループ II, IV (*CD01* 低メチル化群) より予後不良を示した (カットオフ値 低 / 中央 / 高: $p=0.013$ / $p=0.072$ / $p<0.001$). これにより, *CD01* メチル化が *HOPX* メチル化の状態に関係なく予後予測マーカーであることが示唆された.

4. Ki-67 陽性乳癌における *CD01* 高メチル化の意義

前述の多変量解析で独立した予後因子であった Ki-67 陽性と *CD01* 高メチル化を組み合わせ検討した。 *CD01* のカットオフ値（低値，中央値，高値）によって3つのパターンに分類し， *CD01* メチル化と Ki-67 について4つのグループ（*CD01* メチル化/Ki-67 I：高/陽性， II：高/陰性， III：低/陽性， IV：低/陰性）に分類した。 3つのパターンの Kaplan-Meier 曲線では，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は最も良い予後を示した（各々， $p < 0.0001$ ）。つまり， *CD01* 高メチル化は，原発乳癌の Ki-67 陽性と組み合わせると，強力な予後指標となることが示された。

5. 乳癌細胞株における *CD01* の腫瘍抑制機能について

臨床結果から得られた，原発乳癌の予後と強く関連する *CD01* の腫瘍抑制機序を明らかにする目的で，乳癌細胞株を用いて *CD01* の発現と機能を調べた。

RT-PCR では， *CD01* は7つの乳癌細胞株全てにおいて発現が認められなかった。そのため全ての乳癌細胞株に *CD01* をトランスフェクションし， *CD01* 過剰発現細胞株を作成した。 YMB-1， YMB-1E および CRL への *CD01* 過剰発現は， Anchorage-independent colony formation assay において，有意にコロニー形成減少と関連していた

($p=0.03$ ， $p=0.005$ ， $p=0.004$)。さらに Proliferation assay において *CD01* 過剰発現は，特に YMB-1E の成長を抑制した ($p=0.021$)。一方， Invasion assay では， *CD01* 過剰発現と腫瘍の浸潤との間に関連性は認めなかった。

【考察】

本研究では，同じ乳癌サンプルを使用して *CD01* と *HOPX*，2つの遺伝子を潜在的な予後予測マーカーとして比較し，最終的に *CD01* 高メチル化に焦点を当てた。両方の遺伝子のメチル化状態は互いに密接に関連していたが，完全な一致では無く，予後の関連性について個別に議論する必要があると考えられた。 Ki-67 は乳癌では周知された予後因子であり，本研究でも *CD01* 高メチル化とともに強力な独立した予後因子であることが再び証明された。乳癌の中で予後不良といわれるトリプルネガティブ乳癌には，他のサブタイプより Ki-67 陽性患者の割合が多いため， *CD01* 高メチル

化が特にトリプルネガティブ乳癌の優れた予後因子となることが明らかになった。

CDO1 の腫瘍抑制機能に関する検討において、ほとんどの乳癌細胞株で足場非依存性増殖が抑制された結果は、癌転移能力への明確な関与を示唆していたが、一方で乳癌細胞株の浸潤能には影響しなかったことは、臨床検体から導かれた強力な予後関連性から予想されるより弱い腫瘍抑制効果であった。この控えめな機能所見は、*CDO1* 高メチル化が予後不良であるという強烈な臨床結果とは矛盾があり、*CDO1* のメチル化値の高さに比例して死亡リスクが高くなることに鑑みると、*CDO1* 高メチル化はがん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。

結論として、*CDO1* は明確な腫瘍抑制遺伝子であり、そのメチル化は原発乳癌の不良な予後と強く関連していた。予後の関連性は機能的関連より予想以上であった。*CDO1* メチル化は機能的に腫瘍の進展に関連すること以上に、がんが発生してからの時間的な経過を反映している可能性がある。