

学位論文

「Cancer-specific DNA methylation of *Cysteine dioxygenase type 1*
(*CDO1*) gene as an important prognostic marker of gastric cancer
(胃癌予後マーカーとしての *CDO1* 遺伝子 DNA メチル化の意義)」

DM16025 原田 宏輝

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 上部消化管外科学
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

背景：胃癌における予後予測マーカーとしてコンセンサスを得たものはほとんど無い。本研究では、ヒト胃癌における *Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1)* 遺伝子の DNA メチル化レベルの臨床的意義を検討し、予後予測マーカーとしての臨床的ポテンシャルについて検証した。

方法：2005 年 1 月から 2005 年 12 月までの期間で、北里大学病院で手術を施行された 138 例の胃癌患者を対象とし、予後を含めた臨床病理学的解析を Learning set として行った。その後、Expanding set として 2000 年 1 月から 2010 年 12 月までの間の術後補助化学療法が施行されていない pStage II/III 進行胃癌の症例 154 例について検証した。定量法としては TaqMan メチル化特異的 PCR を施行し、メチル化の比率 (TaqMan methylation value, TaqMeth V) を算出して、予後を含めた臨床病理学的因子と比較した。*CDO1* 遺伝子をプラスミドベクターにクローニングし、その強制発現による足場非依存性増殖能の変化を調べた。

結果：(1) *CDO1* TaqMeth V の中央値は 25.6 (範囲 0-120.9) であった。病理学的 Stage (pStage) の進行に伴って *CDO1* TaqMeth V は高値となる傾向にあった。(2) 至適カットオフ値は死亡イベントを予測する ROC 曲線にて 32.6 と決定した。至適カットオフ値における高メチル化群は低メチル化群に比較して有意に予後不良であった ($P<0.0001$)。 (3) 多変量予後解析では、pStage ($P<0.0001$) と *CDO1* TaqMeth V ($P=0.0326$) が独立した予後因子であった。(4) pStage II/III の術後補助化学療法未施行例における Expanding set では、Learning set で確認された予後の再現性を確認できた。pStage III では、*CDO1* 高メチル化群の 5 年全生存率は有意な差をもって低メチル化群より予後不良であった ($P=0.0065$)。pStage III 原発胃癌における *CDO1* 高メチル化群では低メチル化群に比較して有意に異時性血行性転移が多かった ($P=0.0075$)。 (5) 胃癌株化細胞 Kato III においては *CDO1* 遺伝子の強制発現により足場非依存性増殖能が低下した。*CDO1* 遺伝子のメチル化は胃癌の遠隔転移能に関与している可能性が示唆された。

結論：*CDO1* 遺伝子は原発胃癌において遠隔転移に関わる重要な予後予測マーカーであると考えられた。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 対象と方法	
2-1. 組織検体と胃癌細胞株	2
2-2. 細胞株	2
2-3. DNA 抽出と Bisulfite 処理	2
2-4. 全 RNA 抽出と逆転写 PCR (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)	2
2-5. 定量的メチル化特異的 PCR (Methylation specific PCR, MSP)	2
2-6. 5-Aza-dC および TSA 処理	3
2-7. <i>CDO1</i> 遺伝子の免疫組織学的染色	3
2-8. 細胞株の形質転換のためのプラスミド構築	3
2-9. ウエスタンブロッティング	3
2-10. 細胞増殖能検査	3
2-11. 足場非依存性コロニー形成アッセイ	4
2-12. 統計学的解析	4
3. 結果	
3-1. 胃癌における <i>CDO1</i> 遺伝子プロモーター領域のメチル化の定量	5
3-2. 胃癌における <i>CDO1</i> TaqMeth V による予後解析	5
3-3. 胃癌における <i>CDO1</i> 遺伝子の機能解析	6
4. 考察	8
5. 総括	9
6. 引用文献	11
7. 謝辞	14
8. 図表	15

1. 序論

胃癌は世界で5番目に頻度が高い悪性疾患（952,000例（癌罹患全体の6.8%），2012年）であり、癌関連死（723,000例（癌死亡全体の8.8%），2012年）は第3位である¹。固有筋層以深の浸潤が見られる進行胃癌では、臨床的有効性が既に示されている術後補助化学療法を行ってもなお予後不良であり^{2,3}、再発をきたすハイリスクな症例を予測し病態の原因を説明する予後因子が求められている。いくつかの予後バイオマーカーとして、免疫組織化学染色法^{4,5}またはmRNA定量^{6,7}について報告が散見されるが、それらにおいても十分なコンセンサスを得ているとは言い難い。前者は、腫瘍内の不均一性と陽性例と陰性例間の明確なカットオフラインの設定という懸念事項があり、後者は元来不安定な分子であり、通常検査には適していないという問題がある。このような事情を背景として、DNAマーカーのような安定してより客観的な指標となる分子を用いた検査方法の開発が求められているのが現状である⁸。

遺伝子プロモーター領域DNAのCpGアイランドのシトシン分子過剰メチル化による癌抑制遺伝子の発現抑制は、ヒトがんに共通してみられる特徴だが、一方でそのようながん特異的なメチル化は非常にまれなイベントである^{8,9}。我々は、癌特異的なメチル化という特徴について着目し包括的遺伝子探索を精力的に行い、様々なヒト原発癌で多くの癌抑制遺伝子を発見し報告してきた¹⁰⁻¹³。そして、胃癌に関しては原発胃癌組織において高頻度にプロモーター領域DNA過剰メチル化をきたす*Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1)* 遺伝子を最終的に同定した¹⁴。

CDO1は、システインの代謝産物であるシステインスルフィン酸（CSA）への変換に関与する非ヘム構造の鉄含有金属酵素であり、乳癌細胞でのグルタチオン生成の抑制により活性酸素を増加させることでアポトーシスを促進する作用が報告されている¹⁵。乳癌^{15,16}に加えて、*CDO1* 遺伝子のプロモーター領域DNA過剰メチル化は癌細胞に非常に特異的であることが報告され⁸、食道癌^{17,18}、肺癌¹⁹、大腸癌²⁰、胆嚢癌²¹、腎臓癌²²などの癌において予後不良因子であることが報告されている。

しかし、原発性胃癌における*CDO1* 遺伝子のDNAメチル化の臨床的意義に関する報告はない。本研究では、*CDO1* 遺伝子DNAプロモーター領域の過剰メチル化と原発性胃癌の詳細な臨床病理学的因子との関係を初めて明らかにし、胃癌診療における臨床的意義を明らかにした。

2. 対象と方法

2-1. 原発胃癌対象症例

2005 年 1 月 1 日から 2005 年 12 月 31 日までの期間に、北里大学病院で原発胃癌に対して手術を施行された 138 例を対象とし、予後を含めた臨床病理学的解析を行った (Learning set)。予後解析を行うにあたり十分な観察期間を得る必要があることや、予後を修飾する可能性のある術後補助化学療法施行例を可能な限り少なくすることを目的として条件に当てはまる 2005 年の症例を対象とした。観察期間の中央値は 100.5 か月 (範囲 2-148 か月) であった。

Learning set で得られた所見を検証するために、Expanding set として 2000 年 1 月 1 日から 2010 年 12 月 31 日までの間に原発胃癌に対して手術を施行された 1673 例のうち、術後補助化学療法が施行されていない pStage II/III 進行胃癌の症例 154 例も解析対象とした。

原発胃癌に対する病期の決定には日本胃癌取り扱い規約第 14 版を用いた²³。本研究は北里大学倫理委員会の了承を得て行われた (B17-251)。

2-2. 胃癌細胞株

胃癌細胞株は北里大学外科学研究室に保管してある 6 株 (Kato III、KE-97、MKN74、SH-10-TC、NUGC4、MKN7) を用いた²⁴。すべての細胞株には培養液として 10%FBS (fetal bovine serum) を加えた RPMI-1640 (GIBCO, Carlsbad, CA) を使用した。*CDO1* 遺伝子 DNA メチル化の Negative control としては Hep G2 肝細胞癌株を、Positive control としては DLD-1 大腸癌細胞株を用いた²⁵。

2-3. DNA 抽出と Bisulfite 処理

138 例の原発胃癌の組織標本から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Sciences, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。使用した DNA は、生検検体ではなく、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織から抽出した。新鮮な凍結サンプルとは異なり、ホルマリン固定パラフィン包埋組織は RNA の劣化を示すことが実証されている²⁶。一方で、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した DNA メチル化分析の検証では、凍結サンプルに遜色のない安定した結果が得られることが報告されている²⁷。そのため、この研究ではホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した。EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA) を用いて Bisulfite 処理を行い、Bisulfite 処理後の DNA を PCR に使用した。

2-4. 全 RNA 抽出と逆転写 PCR (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

全 RNA 抽出は RNeasy mini Kit (Qiagen) を用いて行った。RNA 濃度は

NanoDrop-1000 を用いて測定した。SuperScript III 逆転写酵素 (Invitrogen) および Oligo (dT) プライマー (Invitrogen) を使用して、RNA (2 μ g) から cDNA を合成した。RT-PCR は、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) を使用して実施した。*CDO1* および *β -actin* のプライマー配列は以前に報告されたものを使用した²¹。

2-5. 定量的メチル化特異的 PCR (Methylation specific PCR, MSP)

iQ Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた CFX96 real-time systems にて、定量的 TaqMan メチル化特異的 PCR (TaqMan MSP) を施行した。

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²¹。すべての反応は Triplicate で行われた。

2-6. 脱メチル化処理

10cm dish に細胞を散布した後に 24 時間ごとに 5 μ M に 50%酢酸で希釈した 5-Aza-dC (5-aza-2'-deoxycytidine)、もしくは mock として 50%酢酸に PBS を加えた溶液を 4 日間投与した。Trichostatin A (TSA; 300 nM; Sigma Aldrich, Inc, St Louis, MO, USA) は最後の 24 時間で培地に混入した。5 日目に細胞を回収し mRNA を抽出して RT-PCR 法にて遺伝子の再発現を確認した。

2-7. 原発胃癌組織における CDO1 遺伝子の免疫組織学的染色

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を厚さ 4 μ m に薄切し、以前に報告されているように免疫組織化学染色を実施した²¹。免疫組織化学染色において、一次抗体は rabbit CDO1 polyclonal antibody (12589-1-AP) (proteintech, Rosemont, IL; 1:100) を用いて 4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体反応は、Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI) キット (ニチレイ, 東京, 日本) を使用して実施した。Mayer's のヘマトキシリン溶液を使用して核を染色した。

2-8. 細胞株の形質転換のためのプラスミド構築

完全長 *CDO1*cDNA を pcDNA3.1 myc-His C 発現ベクター (Invitrogen) に挿入した²⁰。プラスミドベクターの細胞株への遺伝子導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) と Opti-MEM (Invitrogen) を用いて行った。

2-9. ウェスタンブロッティング解析

60 μ g の蛋白質を NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) にアプライし、電気泳動の後に PVDF membrane (Invitrogen) に転写した。一次抗体として抗 myc 抗

体、抗 β -actin 抗体を用いてメンブレンを染色した²⁸。さらに二次抗体として Western breeze (Invitrogen) を用い、アルカリフォスファターゼ標識された抗マウス免疫グロブリンとアルカリフォスファターゼに反応する蛍光化学物質によって発光させた。蛍光シグナルは ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, CT, USA) を用いて検出した。

2-10. 細胞増殖能検査

細胞増殖能検査は CytoSelect water-soluble tetrazolium salt (WST-1) Cell Proliferation Assay Reagent (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いた。1 日目に 1000 個の細胞を 96-well plate に散布し、2 日目に *CDO1* の遺伝子導入を行った。3 日目に 450nm の光学濃度を計測することで細胞増殖能を計測した。

2-11. 足場非依存性コロニー形成アッセイ

6-well plate を用いて、0.72%アガロース (Bacto Agar; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) を底に敷き、上層のアガロースは *CDO1* を遺伝子導入した 1×10^5 個の細胞と混合したアガロースで作成した。3 週間の培養後、細胞数が 100 を超えるコロニーを 10 視野でカウントした。同実験を 2 回繰り返し行い再現性の確認をした。

2-12. 統計学的解析

すべての統計分析は、JMP 11 ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用した。連続変数は、Student's t 検定である ANOVA によって評価された。カテゴリ変数は、Fisher の正確検定またはカイ 2 乗検定によって適切に評価された。全生存率 (Overall survival, OS) は、死亡日から測定されるか、最後の追跡評価の日に打ち切られた。生存率は Kaplan-Meier 法を使用して推定し、ログランク検定で比較した。両側 P 値が 0.05 未満の場合、比較の差は有意とみなされる。

3. 結果

3-1. 胃癌における *CDO1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の定量

CDO1 遺伝子のメチル化の定量のため胃癌検体 138 例に TaqMan MSP が施行された。TaqMeth V の中央値は 25.6 で、0-120.9 の範囲であった (Fig 1A)。また、pStage が上がるごとに *CDO1* TaqMeth V は高値となる傾向にあり、pStage IV と pStage I/II/III の間には有意な差を認めた ($P<0.0001/0.01/0.03$) (Fig 1B)。Student's t 検定や ANOVA にて *CDO1* TaqMeth V と臨床病理学的因子を比較した。有意差があったものは年齢 (Fig 1C, $P<0.0001$)、同時性胃癌 (Fig 1D, $P=0.012$)、腫瘍最大径 (Fig 1E, $P=0.0001$)、肉眼型 (Fig 1F, $P=0.001$)、pT 因子 (Fig 1G, $P=0.001$)、pN 因子 (Fig 1H, $P=0.0017$)、P 因子 (Fig 1I, $P<0.0001$)、CY 因子 (Fig 1J, $P=0.0002$)、ly 因子 (Fig 1K, $P=0.0003$)、v 因子 (Fig 1L, $P<0.0001$) であった。一方で、組織型 (Fig 1M, $P=0.2208$) と性別 (Fig 1N, $P=0.6822$) には有意な差を認めなかった。

3-2. 胃癌における *CDO1* TaqMeth V による予後解析

より詳細な予後解析のため、OS に対する至適カットオフ値は死亡イベントを予測する ROC 曲線にて決定した。カットオフ値として AUC 0.70、 $P<0.0001$ 、感度 76.6%、特異度 56.8%における TaqMeth V は 32.59 であった (Fig 2A)。至適カットオフ値 32.59 を用いて胃癌症例を H 群: *CDO1* 高 TaqMeth V 群 (TaqMeth V ≥ 32.6 , 47 例) と L 群: *CDO1* 低 TaqMeth V 群 (TaqMeth V <32.6 , 91 例) の 2 群に分けた。H 群は L 群と比べて有意に予後不良であった (H/L 5 年 OS 49.5%/82.0%, $P<0.0001$) (Fig 2B)。単変量予後解析にて、年齢、胃切除範囲、リンパ節郭清範囲、根治切除、腫瘍位置、病理学的肉眼型、pStage、*CDO1* TaqMeth V が予後因子となった。これらの予後に有意差があった因子 ($P<0.05$) を胃癌におけるコックス比例ハザード回帰モデルに適応し多変量予後解析をした。単変量予後解析で予後因子となったもののうち、pStage と *CDO1* TaqMeth V が独立した予後因子であった (HR 2.28, CI 1.07-4.95, $P=0.033$) (Table 1)。

L 群と H 群を臨床病理学的因子の Stage において比較すると、H 群で有意に各因子の Stage が進んでいた ($P=0.0006$, Table 2)。次に、pStage 毎における予後解析を行った。pStage I、pStage IV においては H 群と L 群の間に予後の有意差は見られなかった ($P=0.2846$, $P=0.62$) (Fig 2C)。pStage II/III では *CDO1* TaqMeth V 高値は有意に予後不良であった ($P=0.0077$) (Fig 2D)。pStage II/III 症例は術後補助化学療法によって予後が修飾されている可能性がある²⁹。pStage II/III 症例における術後補助化学療法を施行しなかった症例 39 例において、H 群 ($n=16$)、L 群 ($n=23$) での予後解析を行った。

その結果、H 群 (5 年 OS 37.7%) は L 群 (5 年 OS 81.7%) に比べて有意に予後不良であった (Fig 2D, $P=0.0011$)。

pStage II/III 胃癌の術後補助化学療法未施行例における予後の差を検証するために、2000 年から 2010 年の期間に集積された pStage II/III の術後補助化学療法未施行例 154 例における予後解析を Expanding set として行った。結果は Learning set と同様であり、再現性があることも確認され、*CDO1* メチル化は pStage II/III 胃癌の Natural history の悪性予後を予測できる可能性が示された (H/L 5 年 OS 53.8%/76.3%)($P=0.0067$)(Fig 2E)。次に、同 154 例を pStage II と pStage III に分けて *CDO1* メチル化の状況による OS を解析すると、pStage II は 10%ほどの差は認めるものの H 群と L 群とでは有意な差は認めなかった (Fig 2E, $p=0.3735$)。pStage III では H 群の 5 年 OS は 40.1%、L 群では 71.3%と有意な差をもって L 群で予後良好であった (Fig 2E, $P=0.0065$)。

CDO1 メチル化による予後不良の原因を明らかにすべく、同症例における pStage II, III の再発形式を解析した。再発を来した症例は pStage II では 8 例 (14.0%)、pStage III では 43 例 (44.3%) に認められ、有意に pStage III 症例に再発が多かった ($P<0.0001$)。その内訳は、リンパ節転移再発が pStage II/III で 15 例 (9.6%)、血行性再発が 25 例 (15.9%)、播種性再発が 22 例 (14.0%)、局所再発が 3 例 (1.9%) であった。H 群と L 群に分け pStage II, III ごとの再発形式を解析した。pStage III では H 群で有意に再発が多いという結果であり、なかでも血行性転移が有意に多かった ($P=0.0075$)(Table 3)。

3-3. 胃癌における *CDO1* 遺伝子の機能解析

胃癌細胞株 6 株における *CDO1* 遺伝子の発現を確認するも、mRNA レベルでの発現は全 6 株で認められなかった (Fig 3A)。Bisulfite 処理を行った後に MSP を用いることで胃癌細胞株の DNA メチル化を定量し、全 6 株で DNA メチル化を確認した (Fig 3B)。5-Aza-dC と Trichostatin A を用いた脱メチル化処理により全 6 株にて再発現を確認した (Fig 3C)。よって、*CDO1* 遺伝子はメチル化で発現が抑制されている可能性が示唆された。*CDO1* タンパク質の免疫染色により、非癌性胃粘膜腺細胞 (data not shown) または *CDO1* 遺伝子メチル化の値が低い癌細胞 (L 群) の細胞質への局在が確認された (Fig 3D)。一方、H 群の代表的な標本は、*CDO1* のタンパク発現が弱陽性であった (Fig 3D)。

胃癌細胞株 6 株に *CDO1* 遺伝子を transfection し、RT-PCR、Western blotting にて発現を確認した (Fig 3E)。MKN7、SH-10-TC、NUGC-4、Kato III において発現を認めた (Fig 3E)。以降の遺伝子導入実験は同 4 株の胃癌細胞株を用いて行った。細胞数の計測では NUGC-4 において有意に *CDO1* 遺伝子導入細胞が減少していた (Fig 3F, $P=0.026$)。細胞生存能を計測するため WST-1 assay を用いて実験を

行った。NUGC-4 では *CDO1* 遺伝子導入細胞で有意に蛍光度が低下していた (Fig 3G, $P=0.003$)。足場非依存性増殖能の実験では、Kato III のみが足場非依存性コロニー形成を示した。*CDO1* 遺伝子腫瘍抑制活性を実証するために、Kato III 細胞のみが適切であると考えられた。*CDO1* 遺伝子導入細胞は、Kato III で MOC 導入細胞と比較して足場非依存性増殖能が有意に抑制された (Fig 3H, $P=0.0245$)。

4. 考察

CDO1 遺伝子プロモーター領域の DNA は、胃癌¹⁴を含むヒト癌において非癌組織と比較して高メチル化を示し、これまでに知られていないほど高いパフォーマンスを有する癌特異的高頻度メチル化を示した (AUC 0.95)⁸。腫瘍組織において 60% 以上の高メチル化は、highly relevant methylation genes (HRMG) として定義され、腫瘍マーカーとして極めて有望である⁸。*CDO1* 遺伝子は、そのようなメチル化遺伝子 (HRMG) の中にあっても、最もパフォーマンスが高く、さらにほとんどの癌腫において共通にみられる癌マーカーである。

癌組織のメチル化頻度を非癌組織と最も高いパフォーマンスで区別できる値で検討すると、*CDO1* 遺伝子の過剰メチル化頻度は癌腫によって 72~91% に異常 (高メチル化) を認める^{14, 18, 21, 30}。これらの頻度は、癌組織と対照非癌組織の比較に基づいて決定されたカットオフ値を用いるため、非癌組織のメチル化レベルの影響を受ける。例えば、胆嚢癌に対応する非癌組織は、*CDO1* 遺伝子が比較的高度にメチル化されているため至適カットオフ値が高くなり、癌組織のメチル化頻度が過小評価される²¹。したがって、実際の絶対的なメチル化頻度は報告よりも高いと考えてよい (メチル化値のカットオフ値を共通の 1 に統一すると、ほとんどのヒト癌で~90%)。*CDO1* 遺伝子の癌特異的メチル化は、ヒト癌に共通の特徴といえることができる。

本研究は原発性胃癌における *CDO1* 遺伝子プロモーター領域 DNA メチル化の臨床病理学的関連性と予後を検討した最初の報告である。*CDO1* 高メチル化は胃癌を含む様々なヒト癌の組織において見られているが、*CDO1* メチル化と悪性腫瘍との予後の関係性については、乳癌^{15, 16}、食道扁平上皮癌^{17, 18}、腎細胞癌²²、HPV 関連悪性腫瘍³¹、前立腺癌³²、胆嚢癌²¹、大腸癌²⁰で最近の報告がある中、原発胃癌についての報告はなかった。

本研究では、*CDO1* メチル化値が原発性胃癌の予後因子として Learning set および Expanding set で検証された。最も重要なことは、術後補助化学療法未施例の pStage II/III 胃癌患者における予後の関連性について、その再現性を示すことが出来たということである。現在の術後補助化学療法は pStage II/III 進行胃癌に効果的であるため、予後の観点から、補助化学療法施行例と未施行例の違いを明確に認識する必要がある^{2, 3}。本研究では化学療法による修飾のない臨床経過をたどる進行胃癌における *CDO1* 遺伝子の生物学的役割を知るために、患者を限定したが、今後は補助化学療法を受けた患者にも対象を拡大してその意義を検討したい。本研究においては、*CDO1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化は胃癌の進行とともに増加し、pStage III 胃癌の遠隔臓器転移初発再発と有意に関連していた。*CDO1* 遺伝子は、実際に Kato III 細胞の遠隔転移能と関連するといわれている足場非依存性

増殖能を抑制し、胃癌の遠隔転移において機能的に重要な役割を果たすことを示唆していた。

予後に関して最適化された至適カットオフ値はメチル化値 32.6 に決定された。この予後に関する至適カットオフ値は、癌と対照非癌組織を最適に区分するカットオフ値よりも常に高いことが報告されている（約数倍以上異なる）^{14, 17, 20, 21}。さらに、*CDO1* 遺伝子の過剰メチル化を有する癌患者は、免疫組織化学染色法において *CDO1* タンパク発現の低下を示す^{20, 21}。*CDO1* 遺伝子の高メチル化は遺伝子発現低下と確かに関連している。

胃癌を含むほとんどの癌細胞株は *CDO1* 遺伝子の発現を認めないため、siRNA を使用した RNA 干渉によって *CDO1* 遺伝子の発現を抑制する実験を行うことは困難である。Brait M¹⁴ は、肝臓癌細胞株である Hep G2 のみが *CDO1* 遺伝子を発現し、RNA 干渉による *CDO1* 遺伝子の抑制が癌の浸潤能を増大させたと報告している。この機能的実験に反映されているように、*CDO1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化は癌の悪性度を反映する予後マーカーである可能性がある。

CDO1 遺伝子メチル化は 臨床応用にとってこれまでの癌分子マーカーとは一線を画した優れた分子マーカーであると考えられる。その最も重要な特徴は、あらゆる環境化で安定している分子である DNA マーカーであること、そして免疫組織化学染色法等とは異なり MSP 法により定量化が可能であり客観性が担保されることによる。

また、胃癌の *CDO1* メチル化値は、腹膜での初期再発に有意な差を認めなかったが、その癌特異性を利用した癌検出マーカーとして腹膜診断にも用いることができる¹⁴。我々は最近、胃癌の腹水洗浄液を用いた DNA 細胞検査で *CDO1* 遺伝子メチル化を用いた DNA 診断の有用性を報告している³³。腹水洗浄液の DNA 細胞診は、従来の細胞診検査と比較して、明らかに高い診断能を有していた。現在、その臨床的有用性を検証するために前向き研究を進めている（UMIN000026191）。

癌幹細胞と Cysteine Biology の関係が、近年注目されている³⁴。CD44 変異体は、グルタミン酸-シスチン輸送体である xCT と相互作用し、炎症プロセスに関連する幹細胞を保護するグルタチオンの細胞内増加を可能にする。CD44 の欠損は、細胞表面からの xCT の喪失を誘発し、腫瘍成長を抑制する。*CDO1* タンパクは、システインの CSA への酸化を触媒し³⁵、細胞内システイン濃度を低下させ、続いてグルタチオンを低下させる。この分子メカニズムは、*CDO1* 遺伝子の腫瘍抑制能と関連している可能性がある¹⁵。

5. 総括

CDO1 遺伝子 DNA メチル化は原発胃癌において有用な予後予測因子である。

CDO1 遺伝子 DNA メチル化は遠隔転移に関与し、予後不良に関わる可能性がある。異時性の遠隔転移を予測することが可能であれば、術後補助化学療法の長期投与や、より強力な化学療法のレジメン選択の必要性などについての個別化医療への展望が望めると考えている。

6. 引用文献

1. Rohrmann S, Linseisen J, Overvad K, Lund Wurtz AM, Roswall N, Tjonneland A, et al. Meat and fish consumption and the risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer*. 2015;136:E423–31.
2. Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, Kinoshita T, Furukawa H, Yamaguchi T, et al. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:4387–93.
3. Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, et al. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:1389–96.
4. Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, et al. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:5992–6000.
5. Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, et al. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18:538–48.
6. Ichikawa W, Terashima M, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, Sakuramoto S, et al. Impact of insulin-like growth factor-1 receptor and amphiregulin expression on survival in patients with stage II/III gastric cancer enrolled in the Adjuvant Chemotherapy Trial of S-1 for Gastric Cancer. *Gastric Cancer*. 2017;20:263–73.
7. Cheong JH, Yang HK, Kim H, Kim WH, Kim YW, Kook MC, et al. Predictive test for chemotherapy response in resectable gastric cancer: a multi-cohort, retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2018;19:629–38.
8. Yamashita K, Hosoda K, Nishizawa N, Katoh H, Watanabe M. Epigenetic Biomarkers of Promoter DNA Methylation in the New Era of Cancer Treatment. *Cancer Sci*. 2018;109:3695-706.
9. Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Kokubo K, et al. Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer. *Oncogene*. 2010;29:3263–75.

10. 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;2:485–95.
11. 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;66:3409–18.
12. Yamashita K, Park HL, Kim MS, Osada M, Tokumaru Y, Inoue H, et al. PGP9.5 methylation in diffusetype gastric cancer. *Cancer Res*. 2006;66:3921–7.
13. 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;27:3624– 34.
14. 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.
15. 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;19:3201–11.
16. 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:e0144862.
17. 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*. 2016;30:1–9.
18. 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;30:1–9.
19. 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;23:7141–52.
20. 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:e0194785.
21. 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:e0188178.
 22. 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;21:3492–500.
 23. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*. 2011;14:101–12.
 24. Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Waraya M, et al. Therapeutic potential of PRL-3 targeting and clinical significance of PRL-3 genomic amplification in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:122.
 25. 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:e113546.
 26. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007;2:e1261.
 27. Kalma 'r A, Pe 'terfia B, Hollo 'si P, Wichmann B, Bodor A, Patai A 'V, et al. Bisulfite-Based DNA Methylation Analysis from Recent and Archived Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Colorectal Tissue Samples. *Pathol Oncol Res*. 2015;21:1149–56.
 28. Katoh H, Yamashita K, Waraya M, Margalit O, Ooki A, Tamaki H, et al. Epigenetic silencing of HOPX promotes cancer progression in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2012;14:559–71.
 29. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med*. 2007;357:1810–20.
 30. Vedeld HM, Andresen K, Eilertsen IA, Nesbakken A, Seruca R, Gladhaug IP, et al. The novel colorectal cancer biomarkers CDO1, ZSCAN18 and ZNF331 are frequently methylated across gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*. 2015;136:844–53.
 31. Feber A, Arya M, de Winter P, Saqib M, Nigam R, Malone PR, et al. Epigenetics markers of metastasis and HPV-induced tumorigenesis in

- penile cancer. Clin Cancer Res. 2015;21:1196–206.
32. 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;11:871–80.
33. 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;20:784–92.
34. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(·) and thereby promotes tumor growth. Cancer Cell. 2011;19:387–400.
35. Prabhu A, Sancar B, Kahali S, Yuan Z, Johnson JJ, Adam KP, et al. Cysteine catabolism: a novel metabolic pathway contributing to glioblastoma growth. Cancer Res. 2014;74:787–96.

7. 謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導を頂いた新世紀医療開発センター先進外科腫瘍学の山下継史教授に心より感謝致します。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂戴いたしました外科学研究室の皆様に深く感謝致します。

8. 図表

Fig 1

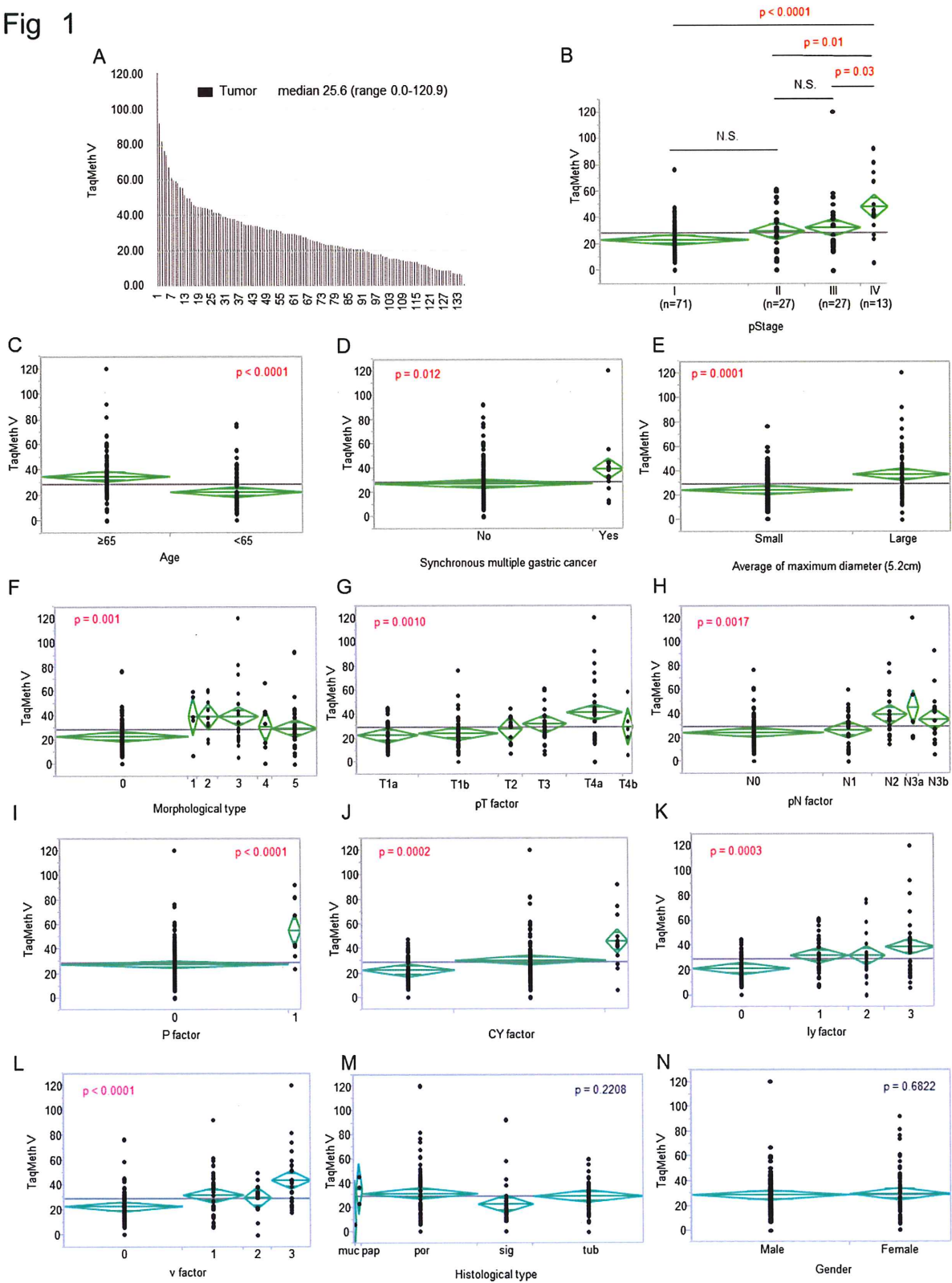


Fig 2

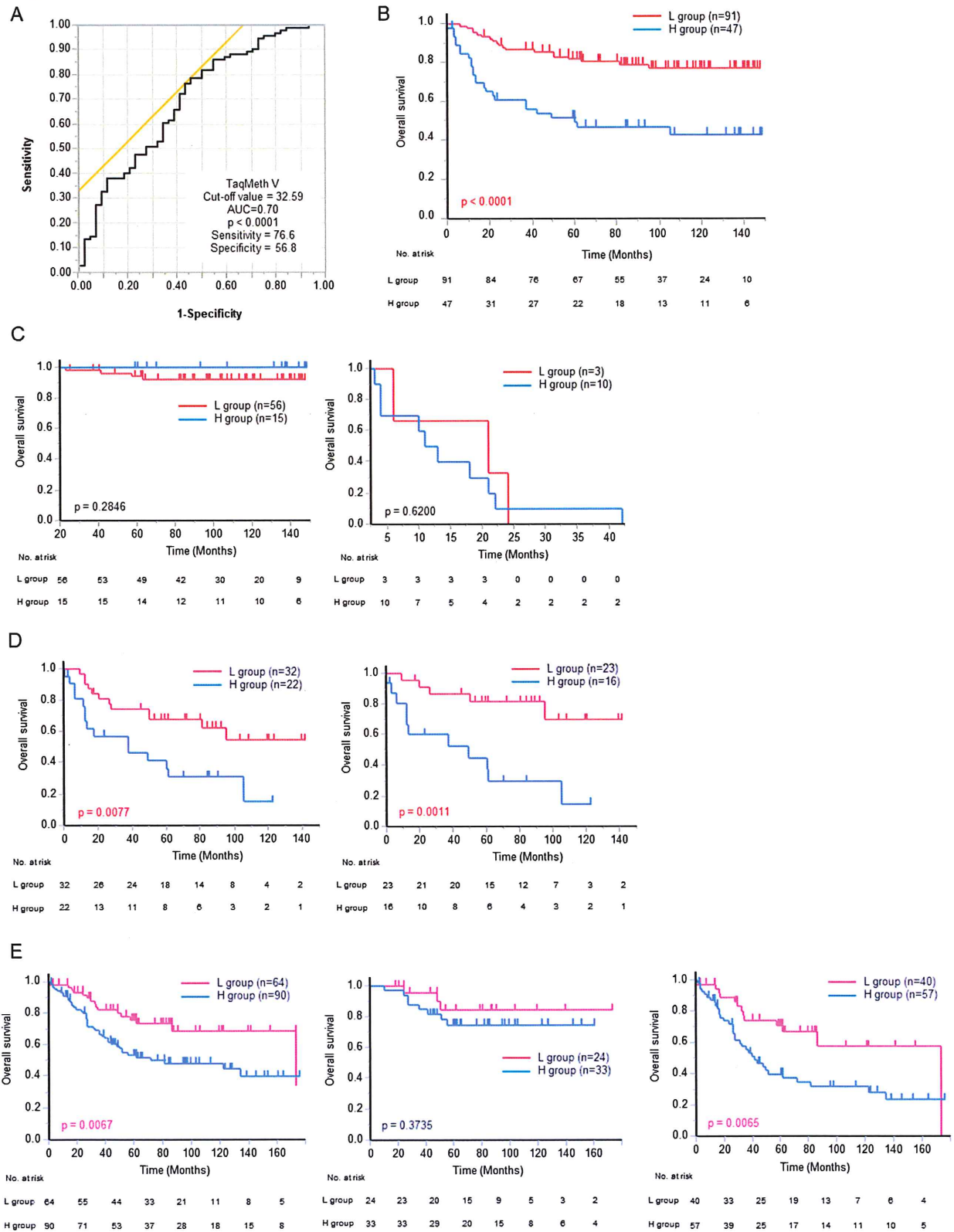
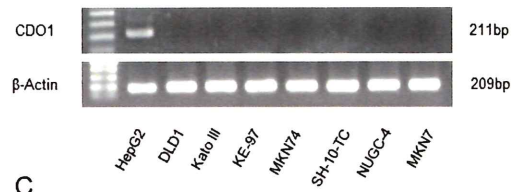
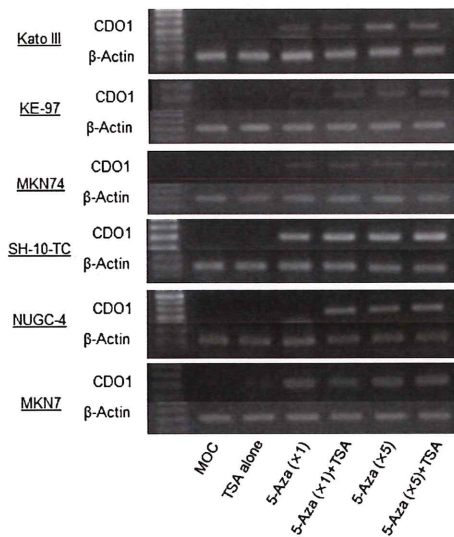


Fig 3

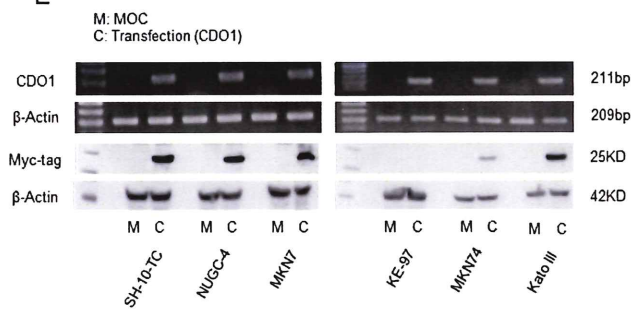
A



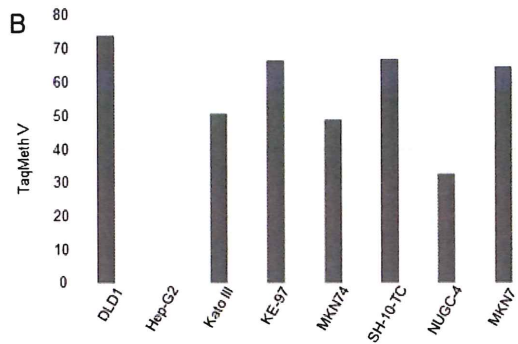
C



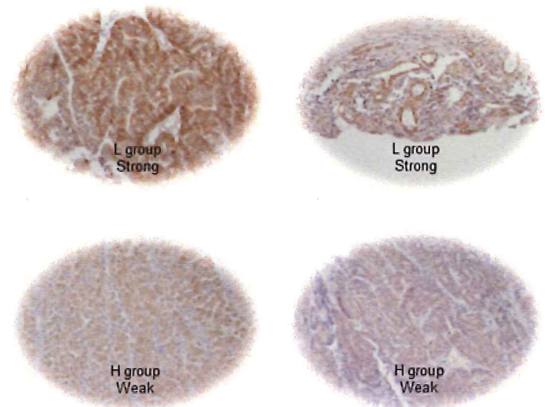
E



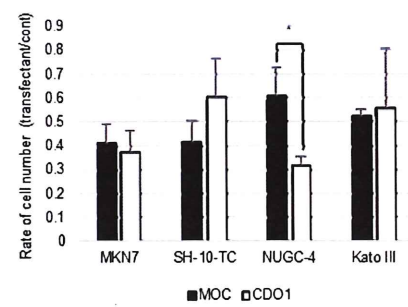
B



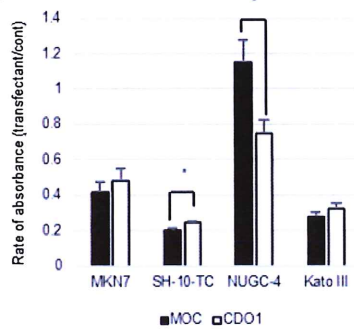
D



F



G



H

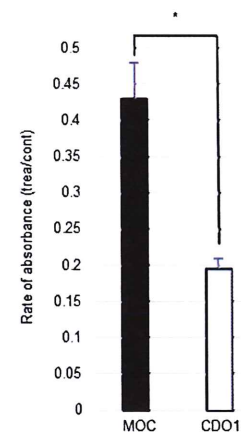
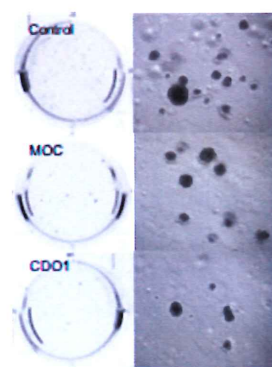


Fig 1. 原発性胃癌における *CDO1* TaqMeth V と臨床病理学的因子との相関関係。

(A) 胃癌組織における *CDO1* TaqMeth V の分布。*CDO1* TaqMeth V の中央値は 25.6 あり、範囲は 0~120.9 であった。以下は *CDO1* TaqMeth V と臨床病理学因子との関係についての ANOVA。(B) pStage IV と pStage I / II / III との間には有意な差を認めた ($p<0.0001$ / $p=0.01$ / $p=0.03$)、(C) 年齢 ($p<0.0001$)、(D) 同時多発性胃癌の有無 ($p=0.012$)、(E) 最大径の平均値 ($p=0.0001$)、(F) 肉眼型 ($p=0.001$)、(G) 深達度 ($p=0.001$)、(H) リンパ節転移 ($p=0.0017$)、(I) 肉眼的腹膜播種 ($p<0.0001$)、(J) 腹腔内洗浄細胞診 ($p=0.0002$)、(K) リンパ管侵襲 ($p=0.0003$)、(L) 静脈管侵襲 ($p<0.0001$)、(M) 組織型 ($p=0.2208$)、(N) 性別 ($p=0.682$)。

Fig 2. 原発性胃癌における *CDO1* TaqMeth V の予後解析。

(A) 死亡イベントにおける *CDO1* TaqMeth V の至適カットオフ値の ROC 曲線。(B) *CDO1* TaqMeth V の至適カットオフ値 32.6 未満 (低メチル化群; L group) の症例と 32.6 以上 (高メチル化群; H group) の症例を比較した全生存率の Kaplan-Meier 曲線 ($p<0.0001$)。(C) pStage I 症例での全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (左のパネル)($p=0.2846$)、pStage IV 症例での全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (右のパネル)($p=0.62$)。(D) pStage II / III 症例での全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (左のパネル)($p=0.0077$)、pStage II / III 症例のうち術後補助化学療法未施行例の全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (右パネル)($p=0.0011$)。(E) Expanding set ($n=154$) における H group と L group の 2 群での全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (左のパネル)($p=0.0067$)、Expanding set における pStage II 症例での全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (中央パネル)($p=0.3735$)、Expanding set における pStage III 症例での全生存率の Kaplan-Meier 曲線 (右パネル)($p=0.0065$)。

Fig 3. 胃癌細胞株に対する *CDO1* 遺伝子一過性導入による機能的評価

(A) mRNA レベルの胃癌細胞株 6 株すべてにおける *CDO1* 遺伝子の発現解析。(B) 亜硫酸水素塩処理後の定量的メチル化特異的 PCR を使用した胃癌細胞株 6 株すべての DNA メチル化レベル。(C) 脱メチル化処理による *CDO1* 遺伝子の再発現の確認。(D) 免疫染色化学染色法では、*CDO1* TaqMeth V 32.6 以上 (高メチル化群; H group) と 32.6 未満 (低メチル化; L group) 2 群の標本を染色し、L group では 2 つの標本が強く陽性であり (上部パネル)、H group では多くが弱く陽性であった (下

部パネル)。(E) *CDO1* 遺伝子を胃癌細胞株 6 株すべてに遺伝子導入し、発現を RT-PCR およびウェスタンブロット法で確認した。(F) 胃癌細胞株に *CDO1* 遺伝子を遺伝子導入した後の細胞数の変化。(G) 胃癌細胞株に *CDO1* 遺伝子を遺伝子導入した後の WST-1 アッセイを用いて評価した細胞生存率。(H) 遺伝子導入を行った細胞を Soft agar 上で培養し、コロニー形成を確認した。*CDO1* 遺伝子を遺伝子導入すると、コロニーの数は対象および MOC と比較して減少した。足場非依存性増殖能は、MOC 遺伝子導入細胞と比較して、Kato III 胃癌細胞の *CDO1* 遺伝子導入細胞のコロニー形成能力を有意に低下させた ($p=0.0245$)。

Clinicopathological factor	Number (%)	Univariate analysis		Multivariate analysis		
		5-year OS	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	95% CI	<i>p</i> -Value
Age (years)			0.0064			0.3479
<65	70 (50.7%)	81.3%		Reference		
≥65	68 (49.3%)	60.6%		1.41	0.69-2.99	
Gender			0.9844			
Male	84 (60.9%)	70.5%				
Female	54 (39.1%)	71.9%				
Procedure of gastrectomy			0.0005			0.5361
Distal gastrectomy	75 (54.3%)	83.8%		Reference		
Total gastrectomy	58 (42.0%)	75.0%		1.49	0.59-3.80	
Proximal gastrectomy	5 (3.7%)	54.0%		2.00	0.10-13.08	
Field of lymph node dissection			0.0315			0.1101
D1/1+ lymph node dissection	86 (62.3%)	77.5%		Reference		
D2 lymph node dissection	52 (37.7%)	60.3%		2.07	0.85-5.33	
Synchronous multiple gastric cancer			0.6854			
Absence	121 (87.7%)	75.0%				
Presence	17 (12.3%)	70.5%				
Resectability			< 0.0001			0.3759
R0	132 (95.7%)	73.5%		Reference		
R1-2	6 (4.3%)	16.7%		1.68	0.51-4.82	
Tumor location			0.0315			0.0906
Lower	27 (19.6%)	76.7%		Reference		
Middle	99 (71.7%)	73.4%		1.37	0.49-3.51	
Upper	12 (8.7%)	35.0%		2.11	0.58-8.11	
Histological type			0.06			
Differentiated type	55 (39.9%)	81.1%				
Undifferentiated type	82 (60.1%)	63.9%				
Morphological type			< 0.0001			0.383
Early cancer	70 (50.7%)	94.1%		Reference		
Advanced cancer	68 (49.3%)	46.6%		2.56	0.28-15.00	
Pathological stage (pStage)			< 0.0001			< 0.0001
pStage I	71 (51.4%)	95.6%		Reference		
pStage II	27 (19.6%)	72.2%		10.52	1.12-80.28	
pStage III	27 (19.6%)	38.1%		43.37	3.91-455.44	
pStage IV	13 (9.4%)	0%		204.91	17.61-2128.60	
<i>CDO1</i> methylation value (ROC 32.6)			< 0.0001			0.0326
<32.6	91 (65.9%)	82.0%		Reference		
≥32.6	47 (34.1%)	49.5%		2.28	1.07-4.95	

Table 2 Correlation of clinicopathologic characteristics and <i>CDOI</i> methylation.					
	<i>CDOI</i> methylation value				<i>p</i> -Value
	Low (<32.6)		High (≥32.6)		
	n=91 (65.9%)		n=47 (34.1%)		
Clinicopathological factors	Number	Percentage (%)	Number	Percentage (%)	
Age (years)					0.0004
<65	56	40.6%	14	10.1%	
≥65	35	25.4%	33	23.9%	
Gender					NS
Male	57	41.3%	27	19.6%	
Female	34	24.6%	20	14.5%	
Histological type					NS
Differentiated carcinoma	35	25.5%	20	14.6%	
Undifferentiated carcinoma	55	40.2%	27	19.7%	
Pathological T factor (pT)					0.0024
pT1a	25	18.1%	6	4.4%	
pT1b	32	23.2%	8	5.8%	
pT2	8	5.8%	4	2.9%	
pT3	13	9.4%	9	6.5%	
pT4a	10	7.3%	18	13.0%	
pT4b	3	2.2%	2	1.4%	
Pathological N factor (pN)					0.0104
pN0	57	41.2%	16	11.6%	
pN1	16	11.6%	9	6.5%	
pN2	7	5.1%	11	8.0%	
pN3a	3	2.2%	3	2.2%	
pN3b	8	5.8%	8	5.8%	
Peritoneal dissemination (P)					0.0031
P0	90	65.2%	41	29.7%	
P1	1	0.7%	6	4.4%	
Cytology of peritoneal lavage (CY)					0.0017
CY0	50	36.2%	28	20.3%	
CY1	3	2.2%	9	6.5%	
CYX	38	27.5%	10	7.3%	
Pathological stage (pStage)					0.0006
pStage I	56	40.6%	15	10.9%	
pStage II	17	12.3%	10	7.2%	
pStage III	15	10.9%	12	8.7%	
pStage IV	3	2.2%	10	7.2%	
Lymph duct invasion (ly)					0.001
ly0	46	33.6%	9	6.6%	
ly1	18	13.1%	15	10.9%	
ly2	14	10.2%	7	5.1%	
ly3	12	8.8%	16	11.7%	
Veinous invasion (v)					< 0.0001
v0	56	40.8%	10	7.3%	
v1	18	13.1%	16	11.7%	
v2	8	5.8%	7	5.1%	
v3	8	5.8%	14	10.2%	
N.S. not significant					

Table 3 Patterns of recurrence after gastrectomy

Recurrences	Pathological stage II				Pathological stage III			
	Low n=24	High n=33	Total n=57	<i>P</i> value	Low n=40	High n=57	Total n=97	<i>P</i> value
Total	3	5	8 (14.0%)	N.S.	11	32	43 (44.3%)	0.0052
Lymph node recurrence (n=15, 9.6%)	0	3	3 (5.3%)	N.S.	4	8	12 (12.4%)	N.S.
Regional	0	0	0		2	2	4 (4.1%)	
Extra regional	0	3	3 (5.3%)		2	6	8 (8.2%)	
Hematogeneous recurrence (n=25, 15.9%)	1	3	4 (7.0%)	N.S.	3	18	21 (21.6%)	0.0075
Liver	1	2	3 (5.3%)		1	9	10 (10.3%)	
Bone	0	0	0		1	4	5 (5.2%)	
Lung	0	0	0		1	1	2 (2.1%)	
Ovary	0	0	0		0	2	2 (2.1%)	
Brain	0	0	0		0	1	1 (1.0%)	
Colon	0	1	1 (1.8%)		0	0	0	
Liver+Lung	0	0	0		0	1	1 (1.0%)	
Peritoneal dissemination recurrence (n=22, 14.0%)	2	2	4 (7.0%)	N.S.	6	12	18 (18.0%)	N.S.
Local recurrence (n=3, 1.9%)	0	0	0	N.S.	0	3	3 (3.0%)	N.S.
N.S. not significant								