

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名      原田 宏輝



論 文 題 目

「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)」

指 導 教 授 承 認 印

比 企 通 樹



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)

氏名 原田 宏輝

【背景】

胃癌は世界で 5 番目に多い悪性疾患 (952,000 例 (6.8% of the total), 2012 年) である。癌関連死 (723,000 例 (8.8% of the total), 2012 年) は第 3 位であり、東アジアでは第 1 位と高率である。しかし、胃癌における予後予測マーカーについての再現性を確認された利用可能な報告は少ない。

癌抑制遺伝子では癌特異的に DNA メチル化が起こり、遺伝子発現が低下していることが繰り返して確認されてきた。Pharmacological unmasking microarray (PUM) という独自のアルゴリズムを用いて、我々は *Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1)* 遺伝子をヒト胃癌におけるプロモーター領域 DNA メチル化の癌特異性に着目して同定した。

*CDO1* 遺伝子はシステイン代謝において中心的な役割を担うと考えられている。癌幹細胞においてはシステイン代謝の異常が報告されていることなどから、癌抑制遺伝子としての役割が注目されている。しかし、原発胃癌における *CDO1* 遺伝子メチル化の臨床的意義について検討した報告は認めない。今回の研究では、胃癌の *CDO1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の臨床病理学的意義について検討し、予後予測マーカーとして適当かを確認した。

【対象と方法】

対象となる組織検体

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 検体を対象とし、予後を含めた臨床病理学的解析の learning set とした。Validation 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 例も対象とした。観察期間の中央値は 100.5 か月 (範囲 2-148 か月) であった。

定量的メチル化特異的 PCR 法を用いて *CDO1* 遺伝子のメチル化を定量

原発胃癌の組織標本からゲノム DNA を抽出した。Bisulfite 処理を行い、Bisulfite 処理した DNA を iQ Supermix を用いた iCycler iQ Real-TimePCR Detection System にて、定量的 TaqMan メチル化特異的 PCR (TaqMan-MSP) を施行した。大腸癌細胞株の DLD-1 を positive control、肝細胞癌細胞株の HepG2 を negative control として用いた。メチル化の比率 (TaqMan methylation value, TaqMeth V) は *CDO1* の蛍光強度を  $\beta$ -actin の蛍光強度で除算したものに 100 倍して算出した。

胃癌細胞株を用いた *CDO1* 遺伝子の機能解析

胃癌細胞株は北里大学外科学研究室にて保管してある 6 株 (Kato III、KE-97、MKN74、SH-10-TC、NUGC4、MKN7) を用いた。5-Aza-dC および TSA 処理を行い、*CDO1* 遺伝子の再発現を確認した。細胞増殖能検査は WST-1 アッセイを用いた。*CDO1* の遺伝子導入を行った細胞の細胞増殖能を計

測した。足場非依存性コロニー形成アッセイを用いて *CDO1* 遺伝子導入胃癌細胞における足場非依存性増殖能の検討を行った。

## 【結果】

### 胃癌における *CDO1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化の定量

*CDO1* 遺伝子のメチル化の定量のため胃癌検体 138 例に TaqMan MSP を施行した。メチル化値 (TaqMeth V) の中央値は 25.6 で、0-120.9 の範囲であった。また、pStage が上がるごとに *CDO1* TaqMeth V は高値となる傾向にあった。

### 胃癌における *CDO1* TaqMeth V と臨床病理学因子との関連性

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 ( $P<0.0001$ )、同時性胃癌 ( $P=0.012$ )、腫瘍最大径 ( $P=0.0001$ )、肉眼型 ( $P=0.001$ )、pT 因子 ( $P=0.001$ )、pN 因子 ( $P=0.0017$ )、P 因子 ( $P<0.0001$ )、CY 因子 ( $P=0.0002$ )、ly 因子 ( $P=0.0003$ )、v 因子 ( $P<0.0001$ ) であった。一方で、性別、組織型には有意な差を認めなかった。

### 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、全生存率 (Overall survival; 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 の値は 32.59 であった。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  $\geq 32.6$ , 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%,  $P<0.0001$ )。

### 単変量・多変量解析による予後因子の同定

単変量解析にて、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解析をした結果、pStage と *CDO1* TaqMeth V が独立した予後因子であった (pStage/*CDO1* TaqMeth V:  $P<0.0001/P=0.0326$ )。

### 胃癌病理 Stage における *CDO1* TaqMeth V の予後解析

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 ( $P=0.2846$ ,  $P=0.6200$ )。pStage II/III では *CDO1* TaqMeth V 高値は有意に予後不良であった ( $P=0.0077$ )。

pStage II/III 胃癌の術後補助療法のない症例における予後的意義の結果を検証するために、2000 年から 2010 年の期間に集積された pStage II/III の術後補助療法未施行例 154 例における予後解析を validation 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%,  $P=0.0067$ )。



次に、同 154 例を pStage II と pStage III に分けて *CDO1* メチル化状況による 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 ( $P=0.3735$ )。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 ( $P=0.0065$ )。pStage III における L 群の術後補助療法の重要性が示唆された。

*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 ( $P=0.0075$ )。

#### 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 positive control である HepG2 に比べ、全 6 株で認められなかった。Bisulfite 処理を行った後に Q-MSP を用いることで胃癌細胞株の DNA メチル化を定量した。全 6 株で DNA メチル化を確認した。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。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。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 ( $\beta$ -actin も入れる)。MKN7、SH-10-TC、NUGC-4、Kato III において発現を認めた。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* 導入細胞が減少していた ( $P=0.0260$ )。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 ( $P=0.0030$ )。反対に SH-10-TC では *CDO1* 遺伝子導入細胞の蛍光度が有意に増加していた ( $P=0.0015$ )。足場非依存性増殖能の実験では、*CDO1* 遺伝子導入細胞において MOC 細胞と比較して有意に細胞増殖能が低下していた ( $P=0.0245$ )。

#### 【考察】

*CDO1* 遺伝子は PUM 法により、癌特異的メチル化遺伝子として同定され、ヒトの癌においてこれまでにない高い頻度での異常を示した。癌特異的なメチル化という特徴は強力な癌抑制機能を有することを示唆し、*CDO1* 遺伝子は癌抑制遺伝子であることが示唆されている。メチル化の高い症例では、発現が抑制されていることが想定され、癌抑制遺伝子であるという仮説に矛盾しない。また、*CDO1* 遺伝子は、活性酸素耐性を低下させることで MDA-MB231 の生存能力を低下させ、ヒト癌細胞において腫瘍抑制を行っているという報告がある。*CDO1* 遺伝子は、近年注目されている癌細胞と Cysteine Biology の中心的役割を果たす代謝酵素であるとの報告もある。

*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関連については、乳癌、食道扁平上皮癌、バレット食道癌、腎細胞癌、HPV 関連悪性腫瘍、前立腺癌で最近の報告があるが、原発胃癌ではこれまで全く報告はなかった。

今回の研究では、*CDO1* TaqMeth V は進行胃癌の方が早期胃癌より高く、病理学的因子との関係

においても各因子の Stage が進行すると共に *CDOI* TaqMeth V は高値となった。*CDOI* メチル化は癌の進行過程によって蓄積されることが示唆された。この結果は、*CDOI* メチル化がヒト癌組織に特徴的であることを示している以前の報告と一致する。

予後との相関が最も得られるカットオフ値を *CDOI* TaqMeth V 32.6 と設定した高値/低値での生存率の差は、高メチル化群で極めて不良であり、低メチル化群との差が大変大きいものとなった。術後の補助療法による予後への修飾を除くため、通常、術後補助療法を行う Stage である pStage II/III における術後補助療法を施行しなかった症例での解析も行ったが、結果は同様であり、高メチル化群は低メチル化群と比べ極めて予後不良であった。また、この結果を裏付けるために validation set を組み、2000 年から 2010 年の間に集積した pStage II/III の術後補助療法未施行群 154 例での再解析においても結果は今回の研究と同様であり再現性を確認した。この明確な差は、*CDOI* 遺伝子のメチル化が予後を規定する原因である可能性を示唆する。

Validation set における pStage III の予後不良な高メチル化群における再発形式を解析すると血行性再発が有意に多いという結果になった。原発胃癌の *CDOI* 遺伝子メチル化と異時性遠隔転移が強い相関を持ったことは興味深いが、*CDOI* の機能が浸潤転移に関わっているかどうかを検討した報告は少ない。今回の研究において、*CDOI* 遺伝子を一過性導入した胃癌細胞株 (Kato III) は足場非依存性増殖能を有意に低下させた。この結果から、*CDOI* 遺伝子のメチル化が遠隔転移能に関与している可能性があると考えられた。

一方で、血行性再発頻度の 15.9%と同様に腹膜播種再発も 14.0%と多く認められた。我々は胃癌腹水洗浄細胞診における *CDOI* 遺伝子を用いた DNA 診断の有用性を retrospective に証明している。通常の洗浄細胞診に比し、DNA 腹水洗浄細胞診は 2 倍の診断能を有していた。現在、prospective に症例を集積しており結果が待たれる (UMIN000026191)。

本研究において、*CDOI* TaqMeth V は原発胃癌において重要な予後因子の可能性があると同定された。DNA 定量化性の高い定量的 TaqMan MSP によって TaqMeth V を算出したが、この分析は原発腫瘍組織における分子機序の臨床的評価へ大きな可能性を有すると我々は考えている。また、*CDOI* のメチル化が遠隔転移能に関与することで、予後不良となると考えられた。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、より強力なレジメンの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因子であると考えられた。