

学 位 論 文 要 旨

氏 名 牛久 秀樹



論 文 題 目

「Promoter DNA methylation of *CDO1* gene and its clinical significance in
esophageal squamous cell carcinoma

(食道扁平上皮癌における *CDO1* 遺伝子プロモーター領域の
DNA メチル化とその臨床的意義)」

指 導 教 授 承 認 印

渡邊昌彦



Promoter DNA methylation of *CDO1* gene and its clinical significance
in esophageal squamous cell carcinoma
(食道扁平上皮癌における *CDO1* 遺伝子プロモーター領域の
DNA メチル化とその臨床的意義)

氏名 牛久 秀樹

【背景】

食道癌は世界で 8 番目に多い悪性疾患（456000 例，2012 年）であり，癌関連死（400000 人の死亡者数，2012 年）は第 6 位である．東洋における食道癌においては扁平上皮癌（SCC）が多くを占め，食道扁平上皮癌（ESCC）は集学的治療の発展にも関わらず，予後不良である．日本において，根治切除例もしくは根治切除を目指す症例における 5-FU/CDDP を用いた術後または術前補助化学療法がより良い結果をもたらすとされ，cStageII/III の ESCC における補助療法の有用性が確定している．しかし，ESCC における予後予測マーカーはほとんど報告されていない．

DNA メチル化とヒストン・アセチル化はヒトの癌で最も高頻度に認められるエピジェネティックな変化である．遺伝子の 5'末端に存在する遺伝子発現調節領域すなわちプロモーターDNAには CpG アイランドとして知られている CG 豊富な領域がある．この領域のシトシンがメチル化を受けるとクロマチンが凝縮し転写因子が近寄れなくなり遺伝子発現が低下する．癌抑制遺伝子では癌特異的にこのメチル化が起り，遺伝子発現が低下していることが繰り返し確認されてきた．

Pharmacological unmasking microarray(PUM)という独自のアルゴリズムを用いて，我々は多くの癌抑制遺伝子候補をヒト ESCC におけるプロモーターDNA メチル化の癌特異性に着目して同定してきた．我々は予後予測マーカーとしてのポテンシャルを秘める遺伝子を絞ってきており，癌遺伝子の中でも最も頻繁な異常が検出されている *CDO1* 遺伝子（システイン・ジオキシゲナーゼ type1）に特に着目している．

CDO1 遺伝子の機能には，活性酸素（ROS）の生成と癌細胞の化学療法感受性等有关について明らかにされているが，要するに *CDO1* 遺伝子はシステイン代謝において中心的な役割をすると考えられている．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，原発食道癌における *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，ESCC の *CDO1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の臨床意義について予後も含めて検討した．

【対象と方法】

1996 年から 2007 年に北里大学病院上部消化管外科で食道手術が施行された 169 例の原発 ESCC 患者を対象とした．観察期間中央値は 71.5 ヶ月であり，1.3～193 ヶ月の範囲であった．

治療方針は原発 ESCC の臨床病期で決定しており、cStage I では、リンパ節郭清を伴う食道切除術を選択し、cStage II/III では、手術前または手術後に、放射線療法を含む集学的治療とリンパ節郭清を伴う食道切除術を選択した。

術後補助化学療法 (Adj) として、JCOG9204 レジメン (シスプラチン 80mg/m² + 5-FU800mg/m²) を用い、術前化学放射線療法 (NAC CRT) では、シスプラチン 80mg/m² + 5-FU800mg/m² と同時に放射線療法 (計 40Gy) を施行した。放射線療法が禁忌であった cT4 疑い患者には、術前補助化学療法のみを施行した。ここでは NAC CRT と術前補助化学療法は、同じ NAC 治療として検討した。

169 例の原発食道癌の組織標本から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Sciences, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA) を用いて bisulfite 処理を行い、bisulfite 処理した DNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に使用した。

iQ Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた iCycler iQ Real-Time PCR Detection System にて、定量的 TaqMan メチル化特異的 PCR (TaqMan-MSP) を施行した。プライマーとプローブのシーケンスはすでに発表された論文から用いた。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 β -actin の蛍光強度で除算したものに 100 倍して算出した。

臨床病理学的因子は、年齢、性別、外科的アプローチ (開胸 vs. 胸腔鏡)、リンパ節郭清 (D1/D2/D3)、手術時間 (分)、出血量 (ml)、腫瘍占拠部位 (Ce/Ut/Mt/Lt/Ae) 組織型、病理学的肉眼型 (0 型 vs 1-5 型)、リンパ管侵襲 (ly)、静脈侵襲 (v)、浸潤増殖様式 (INF) (INF α ; 膨張性増殖で境界明瞭, INF β ; INF α と INF γ の中間, INF γ ; 浸潤性増殖で境界不明瞭)、術前補助化学療法、治療前血清 SCC (正常上限 1.5ng/ml)、病理病期 (UICC6th)、臨床病期 (UICC6th) を調査した。

免疫組織化学 (IHC) において、免疫染色では、1 次抗体は rabbit CDO1 polyclonal antibody (HPA057503) (ATLAS ANTIBODIES, Stockholm, Sweden, dilution of 1:100) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。免疫複合体検出は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA) を用い、DAB 8 分にて発色させた。

統計学的解析では、名義変数にはカイ二乗検定、連続変数には Student's-t 検定や分散分析 (ANOVA) を行った。5 年無再発率 (RFS) は Kaplan-Meier 法で推定し、log-rank 検定で有意差を検定した。単変量解析で予後因子となった ($P < 0.05$) 因子をコックス比例ハザード回帰モデルで多変量解析を行った。 $P < 0.05$ は有意差ありと判定した。すべての解析は SAS software package JMP, version 11.0 (SAS Institute, Tokyo, Japan) にて行った。

【結果】

(1)ESCC における *CDO1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化の定量

TaqMeth V 中央値は 9.42 で、0~279.5 の範囲であった。また、cStageII/III は cStageI に比べて有意に *CDO1* TaqMeth V は高値であった。(P=0.02)

(2)ESCC 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肉眼型 (P=0.02)、リンパ管侵襲 (P=0.02)、臨床病期 (P=0.02) であった。169 例中 41 例が NAC を施行されており、そのうち評価判定 Grade2/3 の割合は、cStageII(3/16, 19%)と比べて cStageIII(9/25, 36%)に多く見られたが、有意差は認められなかった。(P=0.24)

(3)ESCC 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、RFS に対する最適カットオフ値を log-rank plot 法にて決定した。RFS に対するリスク比が最も大きくなる *CDO1* TaqMeth V は 8.9 であり、その P 値は 0.021、相対危険度は 2.31 であった。最適カットオフ値を用いて ESCC 症例を H:*CDO1* 高 TaqMeth V 群 (TaqMeth V \geq 8.9, 81 例) と L: *CDO1* 低 TaqMeth V 群 (TaqMeth V<8.9, 88 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 RFS53.2%:69.4%, P=0.021) H 群と L 群における進行病期の割合は同程度であった。

単変量解析にて、出血量、病理学的肉眼型、組織型、浸潤様式(INF), ly, v, 術前補助療法, *CDO1* TaqMeth V, 病理 Stage, 臨床 Stage 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) を原発 ESCC におけるコックス比例ハザード回帰モデルに適用し解析をした。単変量解析で予後因子となったもののうち、*CDO1* TaqMeth V のみが独立した予後因子であった。(HR2.00, CI 1.09-3.78, P=0.03)

(4)臨床における *CDO1* TaqMeth V の予後因子としての重要性

本研究では cStage II/III (108 例) は cStageI (61 例) と比べ強く予後不良であった。(P<0.0001) cStage0/I においては *CDO1* TaqMeth V 高値と低値の群間に予後の有意差は見られなかったが、cStageII/III において *CDO1* TaqMeth V 高値は有意に予後不良であった。(P=0.035) NAC あり、または NAC なしの cStageII/III ESCC における *CDO1* メチル化の予後関連は認められ、*CDO1* TaqMeth V 高値は有意に予後不良であった。(NAC あり/NAC なし : P=0.27/ P=0.04)

原発腫瘍組織が NAC 治療により修飾されると考えられ、NAC あり症例の腫瘍組織で *CDO1* TaqMeth V を検証した。*CDO1* TaqMeth V を組織学的治療効果判定 Grade に従って検証した。腫瘍組織の *CDO1* TaqMeth V は G1 より G2/3 で有意差をもって低値を示し (P=0.02)、*CDO1* TaqMeth V 低値は食道手術前の NAC によって腫瘍細胞の減少あるいは消滅を示す可能性が示唆された。

(5)ESCC における *CDO1* TaqMeth V と免疫化学による *CDO1* 蛋白の関連

CDO1 高メチル化 10 例と *CDO1* 低メチル化 10 例における免疫組織化学染色により、*CDO1* TaqMeth V と *CDO1* 蛋白との関連性を検証した。*CDO1* 発現は *CDO1* 高メチル化例では 2 例、*CDO1* 低メチル化例では 5 例で見られ、免疫染色における *CDO1* 発現は *CDO1* メチル化と相関する傾向にあった。(P=0.073)

【考察】

本研究において、*CDO1* TaqMeth V は原発 ESCC 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 Q-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。我々の研究において *CDO1* 蛋白発現は ESCC の *CDO1* メチル化レベルと相関関係にあった。(P=0.073) そして、*CDO1* メチル化レベルは少なくとも部分的に *CDO1* 蛋白発現によって測定できるかもしれないことも示唆されたが、免疫染色による発現の有無についての判定は癌の不均一性を考えるとメチル化定量より客観性が低いと考えられる。

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癌抑制機能を有することを示唆し、よって *CDO1* 遺伝子は癌抑制遺伝子であることが予想される。Dietrich らは *CDO1* wild type や *CDO1* mutant type の誘導可能な発現型をもつ MDA-MB231 において、ROS レベルと細胞の生存能力を検証している。ROS 産生は mock 細胞と比較して *CDO1* wild type 誘導細胞で 33% 高く、20% 以下の生存率であった。一方、有意差はなかったが、mock 細胞と *CDO1* mutant type 発現細胞とで ROS 産生はわずかに増加し、細胞生存能力に差はなかった。これらのことより、*CDO1* の酵素活性の発現は、ROS 耐性を低下させることで MDA-MB231 の生存能力を低下させ、*CDO1* は実際ヒト癌細胞において腫瘍抑制を行っていることが判明した。また、*CDO1* はシステイン代謝にも関与している。CD44 バリエント (CD44v) は xCT (グルタミン酸塩/システイン輸送体) と相互作用し、細胞内グルタチオン (GSH) 濃度を制御している。CD44 高発現のヒト癌幹細胞様細胞は、GSH 合成を促進し、ROS への抵抗性を高めていた。CD44 の発現を低下させると xCT の機能が失われ、腫瘍発育を抑制された。これらの結果より、細胞内システイン濃度の上昇は腫瘍発育を増強するものであることが示されている。*CDO1* はシステインをシステインスルフィン酸 (CSA) へと変換するが、この経路は ROS 発生抑制経路と拮抗する経路である。

CDO1 高メチル化は ESCC を含む様々なヒト癌の組織において見られており、微小癌や血液や胆汁などの体液からの検出にも適している。我々の研究で、*CDO1* TaqMeth V は進行 ESCC の方が早期 ESCC より高く、*CDO1* 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、*CDO1* 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。それでも、NAC 後の G2/3 進行 ESCC では *CDO1* メチル化は有意に低値であった。これは NAC 治療により原発組織の癌細胞の死滅を示唆していると考えられた。この仮説を確認するために、今後、我々は NAC 前の生検標本と NAC 後の外科切除標本を比較し、検証したいと考えている。

CDO1 メチル化の予後関連については、乳癌、腎細胞癌、HPV 関連悪性腫瘍で報告があるが、原発 ESCC ではこれまで報告はなかった。本研究で *CDO1* メチル化は原発 ESCC において強力な予後予測因子であり、術後補助化学療法を必要とする患者の治療のガイドとなる大きな可能性を秘めた予後因子である。個別化医療への展望が望める因子であると考ええる。