

学位論文

**「Prognostic significance of promoter DNA hypermethylation of
cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in primary breast cancer」**

(原発性乳癌における *CDO1* 遺伝子メチル化と臨床病理学的因子の検討)

DM 13036 南谷 菜穂子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程

外科学群 外科学

指導教授 渡邊 昌彦

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】

乳癌は、世界における癌罹患率が第2位、癌関連死が第5位と頻度の高い疾患である。特に、ホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER)陰性、プロゲステロン受容体 (PgR)陰性、HER2 陰性であるトリプルネガティブ乳癌は、最も予後が悪く、予後不良因子や治療の標的となるバイオマーカーを同定することが、予後向上のために重要である。

CDO1 遺伝子は、cysteine を cysteine sulfinic acid (CSA) に変換する非ヘム鉄酵素をコードする遺伝子である。*CDO1* 遺伝子は、大腸癌株化細胞を用いた cDNA マイクロアレイの結果、癌抑制遺伝子と同定された。これまでに、乳癌症例の *CDO1* 遺伝子のメチル化と、予後に関する報告は少なく、サブタイプを含めた臨床病理学的因子との研究は報告されていない。

今回われわれは、乳癌手術症例における *CDO1* 遺伝子のメチル化と、臨床病理学的因子、予後との関連につき検討を行った。

【対象と方法】

7 種類の乳癌株化細胞 (MCF7, SK-BR3, YMB1, CRL, YMB1E, MDA-MB453, MDA-MB231) と、1995 年 1 月から 1999 年 12 月の間に、当院で手術を施行した stage I-III 乳癌組織 172 例を対象とした。

株化細胞と乳癌組織より、DNA を抽出した。抽出した株化細胞の DNA を用いて direct sequencing をおこない、CpG island におけるシトシン塩基のメチル化を確認した。*CDO1* 遺伝子のメチル化分析は、TaqMan プローブを用いた定量的 methylation 特異的 PCR (Q-MSP)により定量化した。Q-MSP 値を、 β -actin 値で割り、100 を乗算した値を TaqMeth 値とした。

CDO1 遺伝子の TaqMeth value と、臨床病理学的因子との関係は、Student's t-test および χ^2 二乗検定を用い、予後は、Kaplan-Meier 法で disease specific survival (DSS)を算出し、log-rank 検定により解析した。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い予後に関連する因子を同定した。

【結果】

CDO1 遺伝子は、すべての乳癌株化細胞 (MCF7, YMB1, CRL, YMB1E, MDA-MB453, MDA-MB231) で発現を認めなかった。SK-BR3 以外の乳癌株化細胞は、direct sequence および Q-MSP によりメチル化が確認できた。

乳癌組織 172 例の TaqMeth 値の中央値 58.0 (0-351.1) で、高メチル化群 (86 例) と、低メチル化群 (86 例) とに分けた。高メチル化群はリンパ節転移陽性例が多く、pStage が進行していた。10 年 DSS は、高メチル化群で 67%、低メチル化群で 87% であり、高メチル化群は有意に予後不良であった。多変量解析の結果、Ki-67 陽性 (Hazard ratio : 5.2, $p < 0.0001$)、ホルモン受容体陰性 (Hazard ratio : 3.2, $p = 0.006$)、*CDO1* 遺伝子プロモーター高メチル化群 (Hazard ratio : 2.4, $p = 0.01$) が、独立予後因子であった。

サブタイプ別に解析すると、トリプルネガティブ乳癌症例において、特に高メチル化群が低メチル化群に対し予後不良であった ($p = 0.007$)。

【考察】

本研究は、172 例の乳癌組織を用いて、*CDO1* 遺伝子の promoter 領域のメチル化レベル (TaqMeth 値) を調べた。その結果、高メチル化群では、リンパ節転移陽性が多く、進行したステージであった。多変量解析の結果、*CDO1* 遺伝子の高メチル化群は、Ki-67 陽性、ホルモン受容体陰性と同様に独立予後因子であり、*CDO1* 遺伝子のメチル化は乳癌の予後の指標になりうると考えられた。特に、一般的に予後不良とされるトリプルネガティブ乳癌では、*CDO1* 遺伝子のメチル化と予後に強い関連を認めた。

本研究では、乳癌組織の *CDO1* 遺伝子のメチル化と予後との関連を明らかにすることができた。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 対象と方法	
2-1. 乳癌株化細胞-----	2
2-2. 乳癌組織-----	3
2-3. DNA のバイサルファイト処理と DNA メチル化解析-----	3
2-4. TaqMan methylation specific PCR (Q-MSP) -----	3
2-5. RNA の抽出と発現解析-----	4
2-6. 統計学的解析-----	4
3. 結果	
3-1. 癌株化細胞における <i>CDO1</i> 遺伝子の発現-----	4
3-2. 癌株化細胞における <i>CDO1</i> 遺伝子メチル化解析-----	5
3-3. 乳癌組織における <i>CDO1</i> 遺伝子 TaqMeth 値 と臨床病理学的因子	5
3-4. 乳癌組織における <i>CDO1</i> 遺伝子 TaqMeth 値 と再発-----	5
3-5. 乳癌組織における <i>CDO1</i> 遺伝子 TaqMeth 値 と予後-----	6
3-6. サブタイプ別の <i>CDO1</i> 遺伝子 TaqMeth 値 と予後-----	6
4. 考察-----	6
5. 総括-----	8
6. 今後の課題-----	8
7. 謝辞-----	9
8. 引用文献-----	10
9. 業績目録-----	14
10. 図表-----	17

1. 序論

乳癌は、世界における癌罹患率が第2位、癌関連死が第5位と頻度の高い疾患である。

乳癌は腫瘍不均一性 (tumor heterogeneity) の特性を持ち、ホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER) やプロゲステロン受容体 (PgR)、HER2 の発現状況により luminal タイプ、HER2 タイプ、トリプルネガティブタイプにサブタイプ分類され、サブタイプごとにホルモン剤、分子標的治療薬、化学療法を組み合わせた個別化治療が行われている [1-3]。特に、乳癌の約15%を占める、ER 陰性、PgR 陰性、HER2 陰性であるトリプルネガティブ乳癌は、ホルモン剤や分子標的治療薬は無効であり、最も予後が悪い [4-6]。予後不良因子や治療の標的となるバイオマーカーを同定することが、予後向上のために重要と考えられている。

癌の発生は、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常によって起こる。遺伝子の異常には、変異や欠失による遺伝子構造異常 (genetic alterations)、DNA のメチル化などの遺伝子機能異常 (epigenetic alterations) がある [7]。ヒトの遺伝子の発現を調節するプロモーター領域には、限局的に CpG に富む領域が存在し、癌細胞では癌抑制遺伝子のプロモーター領域で、CpG が高頻度にメチル化され遺伝子発現が減弱していることが知られている [8-11]。

Cysteine dioxygenase 1 (CDO1) 遺伝子は、cysteine を cysteine sulfinic acid (CSA) に変換する非ヘム鉄酵素をコードする遺伝子である [12-15]。cysteine は、glycine と glutamate と共に、glutathione (GSH) を構成するアミノ酸であり、細胞内の cysteine 濃度は GSH 濃度を調節している [16]。

癌組織において、*CDO1* 遺伝子の promoter 領域のメチル化により、CSA の合成が抑制

された結果、glutathione (GSH)の合成が促進されると考えられている (Figure 1)。

GSH は、活性酸素の産生を抑制するトリペプチドであり、癌細胞において GSH が合成されることにより、活性酸素の産生が抑制され、その結果、癌細胞が増殖する[16]。すなわち、*CDO1* 遺伝子メチル化による GSH の合成促進は、癌細胞の生存に有利になると考えられる。乳癌組織で、*CDO1* 遺伝子の高メチル化が起こっていることは報告されている [17]が、乳癌症例の *CDO1* 遺伝子のメチル化と、予後に関する報告は少なく、サブタイプを含めた臨床病理学的因子との研究は報告されていない。

今回われわれは、乳癌手術症例における *CDO1* 遺伝子のメチル化と、臨床病理学的因子、予後との関連につき、検討を行った。

2. 対象と方法

2-1. 乳癌株化細胞

7 種類の株化細胞 (MCF7, SK-BR3, YMB1, CRL, YMB1E, MDA-MB453, MDA-MB231) を用いた。*CDO1* 遺伝子メチル化の positive control として大腸癌株化細胞 (DLD1) を、negative control として肝癌株化細胞 (HepG2) を用いた。MCF7, SK-BR3, YMB1, CRL, YMB1E は RPMI 1640 Medium (GIBCO, Carlsbad, CA) を用い、MDA-MB453 は L-15 (GIBCO) を用い、MDA-MB231 は DMEM (Sigma Aldrich, USA) を用いて培養した。すべての培養液に 10% fetal bovine serum と、Penicillin-Streptomycin (GIBCO) を混注し使用した。

2-2. 乳癌組織

1995 年 1 月から 1999 年 12 月の間に、当院で手術を施行した stage I-III 乳癌組織 253 例のうち、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から DNA が抽出可能であった 172 例を使用した。術前化学療法施行例、両側乳癌、重複癌は除外した。172 例の患者背景は Table1 に示した。臨床病期分類 (TNM) 分類は第 7 版 Union for International Cancer Control (UICC) を用いた。サブタイプは、luminal タイプをホルモン受容体陽性 / HER2 陰性、HER2 タイプをホルモン受容体に問わず HER2 陽性、トリプルネガティブタイプをホルモン受容体陰性 / HER2 陰性と分類した。

2-3. DNA のバイサルファイト処理と DNA メチル化解析

株化細胞より QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, MD)、乳癌組織より QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) を用い、DNA を抽出した。バイサルファイト処理は、Methylation-Gold Kit (QIAGEN) を使用した。抽出した株化細胞の DNA を用い、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた direct sequencing をおこない、CpG island におけるシトシン塩基のメチル化を確認した。

2-4. TaqMan methylation specific PCR (Q-MSP)

CDO1 遺伝子のメチル化分析は、TaqMan プローブを用いた定量的 methylation 特異的 PCR (Q-MSP)により定量化した。バイサルファイト処理をした DNA100ng と、プライマー各 300nmol/l、プローベ 200nmol/l、iQTM supermix 25μl を混注し、反応液を調製した。プライマーおよびプローベの配列は、Table 2 に示す。反応条件は、95℃で 3 分間反

応させた後、95℃で 20 秒、60℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 40 サイクル反復し増幅させた。PCR 装置は C1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96 Real Time System (Bio-Rad) を使用した。Q-MSP 値を定量化し、Q-MSP 値を β -actin 値で割り、100 を乗算した値を TaqMeth 値とした。

2-5. RNA の抽出と発現解析

株化細胞より、Rneasy Mini Kit (QIAGEN)を用い RNA を抽出した。RNA を cDNA 化し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を行った。プライマーの配列は Table 2 に示す。PCR 産物を用いて 1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子発現を調べた。

2-6. 統計学的解析

CDO1 遺伝子の TaqMeth 値と、臨床病理学的因子との関係は、Student's t-test および χ^2 二乗検定を用いた。予後は、Kaplan-Meier 法で Recurrence free survival (RFS)および、disease specific survival (DSS)を算出し、log-rank 検定により解析した。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い予後に関連する因子を同定した。 p 値は 0.05 未満を統計学的有意と判断した。すべての統計学的解析は、SAS software package (JMP Pro11, SAS Institute, Cary, NC)を用いて行った。

3. 結果

3-1. 癌株化細胞における *CDO1* 遺伝子の発現

CDOI 遺伝子は、すべての乳癌株化細胞で発現を認めなかった (Figure 2)。

3-2. 癌株化細胞における *CDOI* 遺伝子メチル化解析

SK-BR3 以外の乳癌株化細胞は、direct sequence および Q-MSP により *CDOI* 遺伝子のメチル化が確認できた (Figure 3) (Figure 4)。SK-BR3 はメチル化を認めないにも関わらずその発現を認めなかった。サブタイプによるメチル化の違いについては、明らかでなかった(Figure 4)。

3-3. 乳癌組織における *CDOI* 遺伝子 TaqMeth 値と臨床病理学的因子

乳癌組織 172 例の *CDOI* 遺伝子 TaqMeth 値の中央値は、58.0 (0-351.1)だった。

TaqMeth 値は、腫瘍径 (pT)、リンパ節転移 (pN)、ステージ(pStage)、ホルモン受容体の発現、HER2 発現、Ki-67 の発現との関連性を認めなかった。(t-test)

TaqMeth 値の中央値 (58.0)で、高メチル化群 (86例)と低メチル化群 (86例)とに分け、臨床病理学的因子との関連につき解析した (Table 3)。高メチル化群は、リンパ節転移陽性例が多く ($p=0.01$)、pStage が進行していた ($p=0.02$)。 (χ 二乗検定)

3-4. 乳癌組織における *CDOI* 遺伝子 TaqMeth 値と再発

単変量解析の結果、年齢 51 歳未満 ($p=0.002$)、pT3,4 ($p=0.0004$)、pN 陽性 ($p=0.002$)、pStage 進行例 ($p=0.0003$)、Ki-67 陽性 ($p<0.0001$)、*CDOI* 遺伝子プロモーター高メチル化群 ($p=0.0002$)が予後不良因子であった (Table 4)。多変量解析を行った結果、Ki-67 陽性 (Hazard ratio : 3.4, $p=0.0001$)、*CDOI* 遺伝子高メチル化群 (Hazard ratio : 2.6, $p=0.001$)、

年齢 51 歳未満 (Hazard ratio : 2.2, $p=0.005$)が、独立予後因子であった (Table 4)。

3-5. 乳癌組織における *CDO1* 遺伝子 TaqMeth 値と予後

10 年 DSS は、高メチル化群で 67%、低メチル化群で 87%であり、高メチル化群は予後不良であった ($p=0.004$) (Figure 5)。

単変量解析の結果、年齢 51 歳未満 ($p=0.03$)、pT3,4 ($p<0.0001$)、pN 陽性 ($p=0.002$)、pStage 進行例 ($p<0.0001$)、Ki-67 陽性 ($p<0.0001$)、ホルモン受容体陰性 ($p=0.0006$)、*CDO1* 遺伝子プロモーター高メチル化群 ($p=0.004$)、HER2 陽性 ($p=0.03$) が予後不良因子であった (Table 5)。多変量解析を行った結果、Ki-67 陽性 (Hazard ratio : 5.2, $p<0.0001$)、ホルモン受容体陰性 (Hazard ratio : 3.2, $p=0.006$)、*CDO1* 遺伝子高メチル化群 (Hazard ratio : 2.4, $p=0.01$) が、独立予後因子であった (Table 5)。

3-6. サブタイプ別の *CDO1* 遺伝子 TaqMeth 値と予後

サブタイプ別 (Luminal タイプ, HER2 タイプ, トリプルネガティブタイプ) に解析すると、いずれのサブタイプにおいても高メチル化群が低メチル化群に比べ、予後不良であった。特にトリプルネガティブ乳癌症例において、高メチル化群 (14 例)が低メチル化群 (20 例)に対し予後不良であった ($p=0.007$) (Figure 5)。

4. 考察

CDO1 遺伝子は、大腸癌株化細胞を用いた cDNA マイクロアレイを行った結果、癌抑制遺伝子と同定された[17]。本研究の結果、乳癌株化細胞および乳癌組織において、*CDO1*

遺伝子のメチル化が起こっていることが証明された。乳癌組織の他、大腸癌組織、食道癌組織、肺癌組織、膀胱癌組織、胃癌組織で、*CDO1* 遺伝子の高メチル化が起こっていることが報告されている[17][18]。

乳癌では、*CDO1* 遺伝子の高メチル化が起こっており、*CDO1* 遺伝子のメチル化は癌細胞内の活性酸素の産生を抑制することで、腫瘍の増殖に関連しているという報告がある[19]。また、ホルモン受容体陽性でリンパ節転移陽性乳癌において、*CDO1* 遺伝子の高メチル化群が低メチル化群に比べ、再発率が高いという報告がある[20]。しかし、乳癌のサブタイプを含めた臨床病理学的因子と *CDO1* 遺伝子メチル化の関連や、メチル化と予後との関連についての報告は本研究が初である。

本研究は、172 例の乳癌組織を用いて、*CDO1* 遺伝子の promoter 領域のメチル化レベル (TaqMeth 値)を調べた。その結果、高メチル化群では、リンパ節転移陽性が多く、進行したステージであった。多変量解析の結果、高メチル化群は、Ki-67 陽性、ホルモン受容体陰性と同様に独立予後因子であった。乳癌のサブタイプは、Ki-67、ホルモン受容体の発現、HER2 の発現を用いて分類している。Ki-67 は、2011 年ザンクトガレンで行われたコンセンサスミーティングにおいて、新たに乳癌のサブタイプ分類に導入することが提言された予後予測因子であり[1]、本研究でも、重要な因子であることを確認した。さらに、*CDO1* 遺伝子のメチル化レベルが高くなるにつれて予後が不良であったため、*CDO1* 遺伝子のメチル化は、乳癌の予後の指標になりうると考えられた。

サブタイプ別に予後を比較すると、一般的に他のサブタイプに比べて予後不良とされるトリプルネガティブ乳癌では、高メチル化群が、低メチル化群に比べ、予後が不良で

あった。トリプルネガティブ乳癌における、システイン代謝の役割については現在研究が進められており[21-23]、トリプルネガティブ乳癌における *CDO1* 遺伝子の機能解析を行うことで、治療標的が解明されていないトリプルネガティブ乳癌の予後改善につながる可能性がある。

本研究では、術前化学療法を施行していない乳癌組織の *CDO1* 遺伝子のメチル化と、予後との関連を明らかにすることができた。しかし、現在の乳癌診療では、臨床病理学的に再発のリスクが高い症例に対して、術前化学療法を施行する症例が多い。また、近年化学療法に使用する薬剤の種類も多様化している。*CDO1* 遺伝子のメチル化は、癌細胞内の活性酸素の抑制に関わっており、*CDO1* 遺伝子にメチル化が起こると、乳癌の標準治療に使用するアンスラサイクリン系抗癌剤への抵抗性を示すことが報告されている[19]。今後、*CDO1* 遺伝子メチル化と、薬剤感受性および予後との関係を明らかにする必要があると考えられる。

5. 総括

本研究では、乳癌組織の *CDO1* 遺伝子のメチル化と、予後との関連を明らかにすることができた。特に、トリプルネガティブ乳癌では、*CDO1* 遺伝子のメチル化と予後に強い関連を認めた。

6. 今後の課題

術前化学療法を施行した乳癌における、*CDO1* 遺伝子のメチル化と薬剤感受性およ

び、予後との関連を明らかにすること。さらに、*CDOI* 遺伝子のメチル化が臨床応用可能か検討することが課題である。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、このような貴重な研究の機会を与えて下さいました、北里大学 外科 渡邊昌彦教授に厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行にあたり、北里大学 外科 藁谷美奈先生、小坂愉賢先生、山下継史先生、諸先生方には丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。そして、実験技術及び結果解析などについて、丁寧なご指導ご協力を頂きました北里大学外科教室の皆さまに心より感謝いたします。

8. 引用文献

1. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. 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: 1736–47.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–52.
3. Sueta A, Ito H, Kawase T, Hirose K, Hosono S, Yatabe Y, et al. A genetic risk predictor for breast cancer using a combination of low-penetrance polymorphisms in a Japanese population. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 711–21.
4. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer* 2009; 45 Suppl 1: 27–40.
5. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007; 109: 1721–28.
6. 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: 1160–7.

7. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683–92.
8. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209–13.
9. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res* 2008; 647: 30–8.
10. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome—components and functional correlates. *Genes Dev* 2006; 20: 3215–31.
11. Stefansson OA, Moran S, Gomez A, Sayols C, Arribas Jorba C, Sandoval J, et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Mol Oncol* 2014; 9: 555–68.
12. Stipanuk MH, Ueki I, Dominy JE Jr, Simmons CR, Hirschberger LL, et al. Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino Acids* 2009; 37: 55–63.
13. Oien DB, Moskovitz J. Ablation of the mammalian methionine sulfoxide reductase A affects the expression level of cysteine dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 556–9.

14. Joseph CA, Maroney MJ. Cysteine dioxygenase: structure and mechanism. *Chem Commun* 2007; 28: 3338–49.
15. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 922–35.
16. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H. 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.
17. 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
18. 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
19. 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.
20. 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

21. McClelland ML, Adler AS, Shang Y, Hunsaker T, Truong T, Peterson D, et al. An integrated genomic screen identifies LDHB as an essential gene for triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 2012; 72: 5812–23.

22. Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, Louie RJ, Padro M, Daemen, A et al. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell* 2013; 24: 450–65.

23. Wang F, Yang Y. Suppression of the xCT-CD44v antiporter system sensitizes triple-negative breast cancer cells to doxorubicin. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 147: 203–10.

9. 業績目録

(I) 主学術論文

1. Minatani N, Waraya M, Yamashita K, Kikuchi M, Ushiku H, Kojo K, Ema A, Nishimiya H, Kosaka Y, Katoh H, Sengoku N, Tanino H, Sidransky D, Watanabe M : Prognostic significance of promoter DNA hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) gene in primary breast cancer. PLoS One, 19;11(1), e0144862, 2016

(II) 原 著 (主学術論文を除く)

1. Ushiku H, Yamashita K, Kawamata H, Waraya M, Katoh H, Yokoi K, Tanaka T, Ishis S, Nishizawa N, Kikuchi M, Minatani N, Kojo K, Tajima H, Nishiyama R, Kaizu T, Kumamoto Y, Watanabe M : Homeobox-Only Protein Expression Is a Critical Prognostic Indicator of Pancreatic Neuroendocrine Tumor and Is Regulated by Promoter DNA Hypermethylation. Pancreas, 45(9) : 1255-62, 2016

2. Ushiku H, Yamashita K, Katoh H, Ema A, Minatani N, Kikuchi M, Kojo K, Yokoi K, Tanaka T, Nishizawa N, Ishis S, Hosoda K, Moriya H, Mieno H, Katada N, Kikuchi S, Watanabe M : Promoter DNA methylation of CDO1 gene and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. Dis Esophagus, 2016

3. Kikuchi M, Yamashita K, Waraya M, Minatani N, Ushiku H, Kojo K, Ema A, Kosaka Y, Katoh H, Sengoku N, Emonoto T, Tanino H, Sawanobori M, Watanabe M : Epigenetic

regulation of ZEB1-RAB25/ESRP1 axis plays a critical role in phenylbutyrate treatment-resistant breast cancer.

Oncotarget, 7(2) : 1741-53, 2016

4. Kosaka Y , Tanino H , Sengoku N , Minatani N , Kikuchi M , Nishimiya H , Waraya M , Katoh H , Enomoto T , Sato T , Kuranami M , Watanabe M : Phase II randomized, controlled trial of 1 day versus 3 days of dexamethasone combined with palonosetron and aprepitant to prevent nausea and vomiting in Japanese breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy. Support Care Cancer, 24(3) : 1405-11, 2015

5. Minatani N , Tanino H , Kosaka Y , Kikuchi M , Nishimiya H , Waraya M , Katoh H , Emonoto T , Sengoku N , Watanabe M : Clinicopathological Evaluation and Prognostic Analysis in Breast Cancer Patients with Brain Metastasis. JCT , 6;8 727-34,2015

6. Ema A , Yamashita K , Ushiku H , Kojo K , Minatani N , Kikuchi M , Mieno H , Moriya H , Hosoda K , Katada N , Kikuchi S , Watanabe M : Immunohistochemical analysis of RTKs expression identified HER3 as a prognostic indicator of gastric cancer. Cancer Sci, 105(12) : 1591-1600, 2014

7. Kikuchi M, Tanino H, Kosaka Y, Sengoku N, Yamashita K, Minatani N, Nishimiya H, Waraya M, Katoh H, Enomoto T, Kajita S, Woodhams R, Watanabe M : Usefulness of MRI of

microcalcification lesions to determine the indication for stereotactic mammotome biopsy.

Anticancer Res, 34(11) : 6749-53, 2014

8. Nishimiya H, Kosaka Y, Yamashita K, Minatani N, Kikuchi M, Ema A, Nakamura K, Waraya M, Sengoku N, Tanino H, Kuranami M, Watanabe M : Prognostic significance of Ki-67 in chemotherapy-naïve breast cancer patients with 10-year follow-up. Anticancer Res, 34(1) : 259-68, 2014

9. 南谷菜穂子、小坂 愉賢、仙石 紀彦、菊池真理子、西宮 洋史、藁谷 美奈、榎本 拓茂、谷野 裕一、渡邊 昌彦 : Nab—Paclitaxel 投与中に顔面神経麻痺を認めた 1 例. 癌と化学療法、40(12) : 2375-7, 2013

10. 図表

Table1. Clinicopathologic characteristics of the 172 patients

Factors	No.	%
Patient	172	100.0
Age (median)	51(22-84)	
Gender		
Female	171	99.4
Male	1	0.6
Operation method		
Lumpectomy	50	29.1
Mastectomy	122	70.9
pT factor*		
T1	82	47.7
T2	72	41.9
T3	14	8.1
T4	4	2.3
pN factor*		
N0	88	51.2
N1	42	24.4
N2	23	13.4
N3	19	11.0
M factor*		
M0	172	100.0
M1	0	0.0
pStage*		
1	51	29.7
2	76	44.2
3	45	26.1
Pathological type		
Invasive ductal carcinoma	160	93.0
Others	12	7.0
Hormone receptor (IHC)		
Positive	118	68.6
Negative	54	31.4
HER 2 (IHC)		
Positive	38	22.1
Negative	134	77.9
Ki-67 (IHC)		
Positive	31	18.0
Negative	141	82.0
Subtype		
Luminal type	100	58.1
HER2 type	38	22.1
Triple negative type	34	19.8
Postoperative adjuvant hormone therapy		
Yes	64	37.2
No	108	62.8
Postoperative adjuvant chemotherapy		
Yes	102	59.3
No	70	40.7
Recurrence		
Yes	56	32.6
No	116	67.4
Death		
Yes	36	20.9
No	136	79.1

* : 7th edition of the Union for International Cancer Control (UICC)

Table 2. PCR production and sequence of primers and fluorescent probe

Method	Gene	Forward primer (5'>3')	Fluorescent probe (5'>3')	Reverse primer (5'>3')
RT-PCR	<i>CDO1</i>	TCTCTGTTGGGGTGAAGGAC		AGTGAAGGCTCACAGCAGGT
	β actin (cell line)	TCACCCACACTGTGCCATCTACGA		CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
	β actin (tissue)	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC		GGCATCCTCACCTGAAGTA
Bisulfite-Sequencing	<i>CDO1</i>	TAGTAGAGGGTGTTTTAGGGG		AGGGTGTTTTAGGGGAGTATT
Q-MSP	<i>CDO1</i>	CCACAACGACGAAAATAAAACG	FAM-TTAACGGCGCGTTTTAGTCGTTTCG-TAMRA	TCGGCGTTTTAGGGATCGCG
	β actin	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	FAM-ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

Table 3. Correlation of clinicopathologic characteristics and *CD01* methylation

	CD01 TaqMeth value						
	low (< 58.0)			high (> 58.0)			
	(n = 86)			(n = 86)			
Factors	No.	%		No.	%	<i>p</i>	
Age (median)	51.1 (22-77)			51.1 (29-84)			0.48
Operation method						0.31	
Lumpectomy	28	56.0		22	44.0		
Mastectomy	58	47.5		64	52.5		
pT factor*						0.29	
T1	47	57.3		35	42.7		
T2	30	41.7		42	58.3		
T3	7	50.0		7	50.0		
T4	2	50.0		2	50.0		
pN factor*						0.01	
N0	52	59.1		36	40.9		
N1	21	50		21	50.0		
N2	5	21.7		18	78.3		
N3	8	42.1		11	57.9		
pStage*						0.02	
1	31	60.8		20	39.2		
2	40	52.6		36	47.4		
3	15	33.3		30	66.7		
Pathological type						0.55	
Invasive ductal carcinoma	79	49.4		81	50.6		
Others	7	58.3		5	41.7		
Hormone receptor (IHC)						0.32	
Positive	56	47.5		62	52.5		
Negative	30	55.6		24	44.4		
HER 2 (IHC)						0.14	
Positive	15	39.5		23	60.5		
Negative	71	53.0		63	47.0		
Ki-67 (IHC)						0.32	
Positive	13	41.9		18	58.1		
Negative	73	51.8		68	48.2		
Subtype						0.25	
Luminal type	51	51.0		49	49.0		
HER2 type	15	39.5		23	60.5		
Triple negative type	20	58.8		14	41.2		

* : 7th edition of the Union for International Cancer Control (UICC)

Table 4. Univariate and multivariate analysis for recurrence free survival (RFS)

Factors	RFS					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	patient number	RFS (%)	<i>p</i>	HR*	95%CI	<i>p</i>
Age			0.002	2.2	1.3-3.8	0.005
51>	86	54				
51<	86	74				
Gender			0.35	—	—	—
Female	171	64				
Male	1	100				
pT factor			0.0004	—	—	—
T1,2	154	69				
T3,4	18	28				
pN factor			0.002	—	—	—
negative	88	76				
positive	84	54				
pStage (7 th UICC)			0.0003			
1	51	76		Reference		
2	76	71		1.1	0.5-2.3	0.8
3	45	41		1.9	0.9-4.2	0.08
Ki-67			<0.0001	3.4	1.9-5.9	0.0001
negative	141	71				
positive	31	35				
Hormone receptor			0.08	—	—	—
negative	54	60				
positive	118	67				
TaqMeth value			0.0002	2.6	1.4-4.8	0.001
58<	86	51				
58>	86	79				
HER2			0.48	—	—	—
positive	38	64				
negative	134	65				
Subtype			0.11	—	—	—
Luminal type	100	68				
HER2 type	38	64				
Triple negative type	34	55				

* HR : Hazard Ratio

Table 5. Univariate and multivariate analysis for disease specific survival (DSS)

Factors	DSS					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	patient number	DSS (%)	<i>p</i>	HR*	95%CI	<i>p</i>
Age			0.03	1.7	0.8-3.6	0.14
51>	86	70				
51<	86	83				
Gender			0.61	—	—	—
Female	171	77				
Male	1	100				
pT factor			<0.0001	—	—	—
T1,2	154	82				
T3,4	18	35				
pN factor			0.002	—	—	—
negative	88	87				
positive	84	67				
pStage (7 th UICC)			<0.0001			
1	51	87		Reference		
2	76	85		1.0	0.4-3.0	1.0
3	45	51		2.8	1.2-7.9	0.02
Ki-67			<0.0001	5.2	2.7-10.2	<0.0001
negative	141	87				
positive	31	38				
Hormone receptor			0.0006	3.2	1.4-7.5	0.006
negative	54	62				
positive	118	84				
TaqMeth value			0.004	2.4	1.2-5.4	0.01
58<	86	67				
58>	86	87				
HER2			0.03	1.4	0.6-3.1	0.45
positive	38	65				
negative	134	80				
Subtype			0.0004	—	—	—
Luminal type	100	88				
HER2 type	38	65				
Triple negative type	34	60				

* HR : Hazard Ratio

Figure 1. Cysteine metabolism in cancer cells.

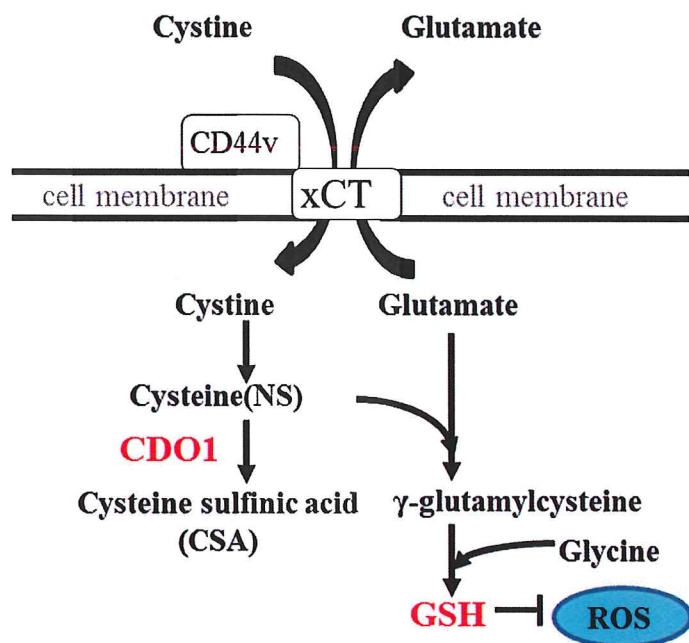


Figure 2. *CDO1* mRNA expression in BC cell lines was assessed by semi-quantitative reverse transcribed PCR (RT-PCR).

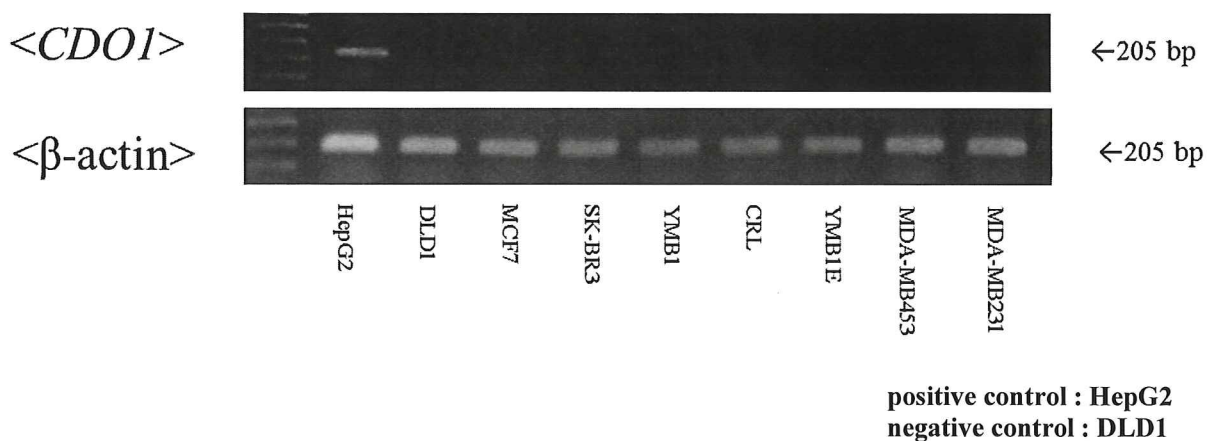


Figure 3. Representative direct bisulfite sequence results in SK-BR3 cells (unmethylation) and other cells (methylation).

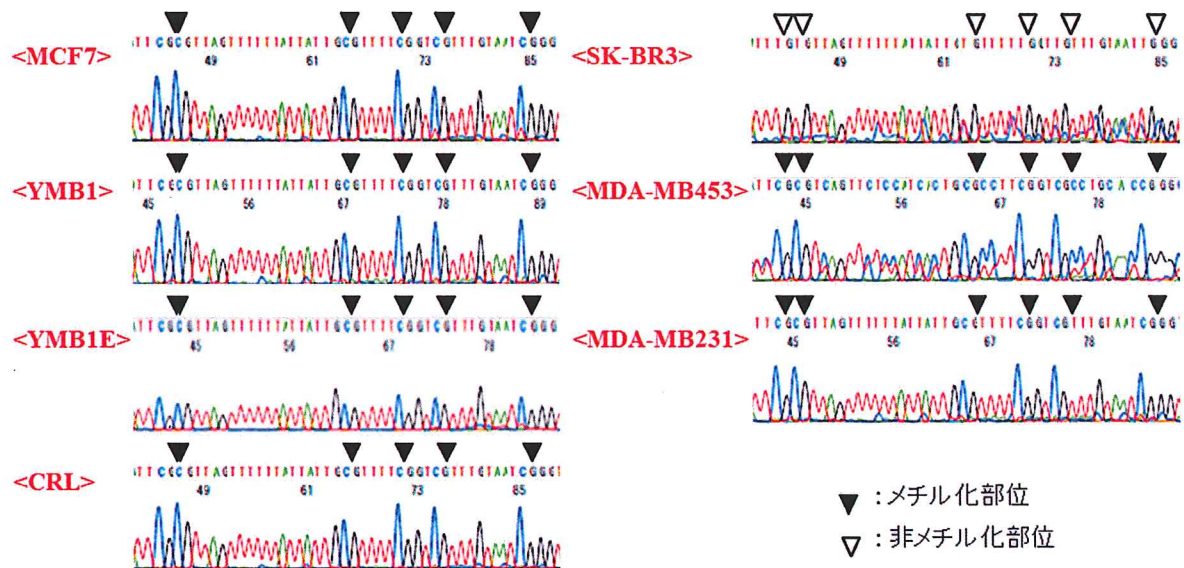


Figure 4.

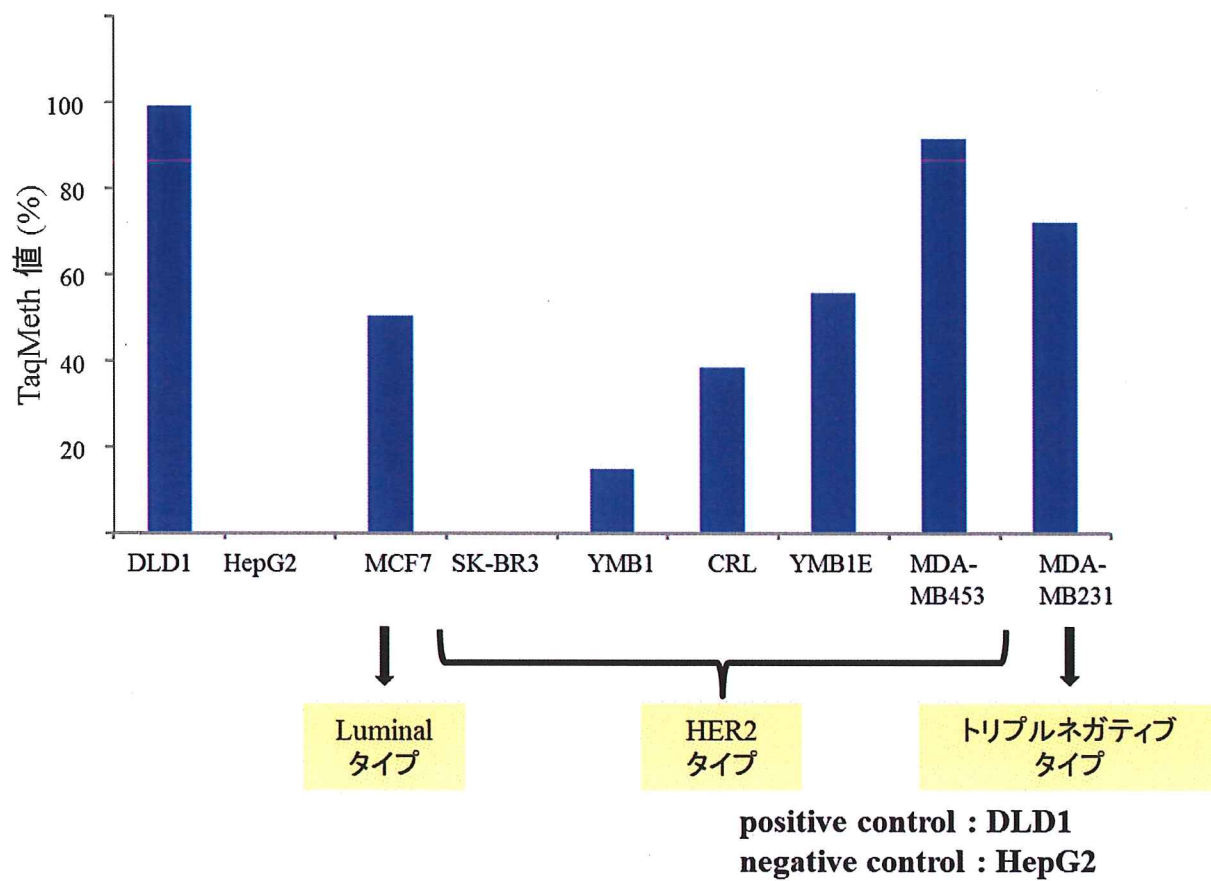


Figure 5. *CD01* gene methylation and prognosis according to BC subtypes.

