

学 位 論 文 要 旨

氏 名 南谷 菜穂子



論 文 題 目

「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)

指 導 教 授 承 認 印

濱 邊 昌 幸



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)

南谷 菜穂子

【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。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、化学療法を用いた個別化治療が行われている。特に、ER、PgR、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。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。*CDO1* は、cysteine を cysteine sulfinic acid (CSA) に変換する非ヘム鉄酵素である。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、cysteine 代謝の傍流活性化により glutathione (GSH) の合成が促進される。GSH は、活性酸素産生を抑制するアミノ酸であり、癌細胞で GSH が合成されることにより、癌細胞が活性酸素産生抵抗性に増殖すると考えられている。つまり、炎症性組織の中であって生存に有利になると考えられる。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】

<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。

<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 172 例。術前化学療法施行例、両側乳癌、重複癌は除外した。TNM 分類は第 7 版 Union for International Cancer Control (UICC) を用いた。

<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。*CDO1* 遺伝子のメチル化分析は、C1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96 Real Time System (Bio-Rad) を使用し、TaqMan methylation specific 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 value とした。

<RNA の抽出と発現解析>

株化細胞より Rneasy Mini Kit (QIAGEN)、乳癌組織より RNeasy FFPE Kit (QIAGEN) を用い RNA を抽出した。RNA を cDNA 化し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い、遺伝子発現を調べた。

<統計学的解析>

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。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。

【結果】

(1) 癌株化細胞における *CDO1* 遺伝子の発現 (RT-PCR) およびメチル化解析 (Q-MSP)

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。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。

(2) 乳癌組織における *CDO1* 遺伝子 TaqMeth value と臨床病理学的因子

CDO1 遺伝子 TaqMeth value は、腫瘍径 (pT)、リンパ節転移の有無 (pN)、ステージ (pStage)、ホルモン受容体の有無、HER2 発現の有無、Ki-67 の発現の有無と、有意差を認めなかった。(t-test)

乳癌組織 172 例の TaqMeth value 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) とに分け解析した。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^2 二乗検定)

(3) 乳癌組織における *CDO1* 遺伝子 TaqMeth value 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 ($p=0.004$)。

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 (14 例) が低メチル化群 (20 例) に対し予後不良であった ($p=0.007$)。

【考察】

CDO1 は、システイン代謝に関わっており、システインをシステインスルフィン酸 (CSA) に変換する酵素である。*CDO1* 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。乳癌組織では、*CDO1* 遺伝子の高メチル化が起こっており、乳癌株化細胞で高メチル化が腫瘍の増殖に関連しているという報告がある。

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 value) 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を用いており、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。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、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。*CDO1* 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、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。すなわち、*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。今後、引き続き研究を継続し、*CDO1* 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。