

Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1) プロモーター DNA メチル化による
異時性胃癌の予測

氏名 久保田 陽

【背景】

内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic submucosal dissection: ESD) の開発と普及に伴い、ESD は早期胃癌 (Early gastric cancer: EGC) の標準治療として確立している。EGC に対する ESD が普及したことで、ESD 後に異時性胃癌 (Metachronous gastric cancer: MGC) が認められるようになり、時に EGC に対して ESD を施行し完全切除を得た症例の中で、治療後の癒痕上に新たな MGC が発生する症例も経験する。MGC を早期に診断するために 1 年に 1 回の上部消化管内視鏡検査が推奨されている。胃癌の発生には、様々な遺伝子異常が関与しており、発癌に関連する DNA プロモーターメチル化は、癌特異的なバイオマーカーとして注目されている。その中でも、*cysteine dioxygenase type 1 (CDO1)* は、新たな癌抑制遺伝子候補とされているが、ESD 後における MGC の発生と *CDO1* プロモーター DNA メチル化との関連性の報告はない。そこで、ESD 後の癒痕上に発生した MGC の ESD 標本を用いて、MGC の発生予測と *CDO1* プロモーター DNA メチル化との関連性に関して検討を行った。

【方法】

(臨床検体)

2002 年 9 月から 2016 年 12 月にかけて、北里大学病院および北里大学東病院で EGC に対して ESD を受けた患者は合計 2,055 症例の中で、ESD 後 3 年以上経過した時点で、MGC を認めなかった 33 症例 (non-MGC: nMGC 群) と、ESD 後の癒痕上に MGC が発生した 11 症例 (Scar+MGC 群)、計 44 症例を対象とした。さらに Scar+MGC 群のうち、初回の ESD 症例 (Initial 群) と、ESD 後の癒痕上に発生した MGC に対しての 2 回目の ESD 症例 (Additional 群) についても検討した。

(DNA 抽出、バイサルファイト処理、定量的メチル化特異的 PCR)

腫瘍粘膜 (Tumor: T) と非腫瘍粘膜 (Tumor-Adjacent noncancerous Mucosa: TAM) を同定、確認した。その後腫瘍粘膜と非腫瘍粘膜を含む EGC 症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を 10 μ m の厚さで 20 枚にスライスしキシレンを用いて脱パラフィンした。脱パラフィン後、腫瘍粘膜および 4 点の非腫瘍粘膜 (oral TAM, anal TAM, right TAM, left TAM) の組織から DNA を抽出した。抽出した DNA (2 μ g) は、バイサルファイト処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、メチル化 DNA と非メチル化 DNA を区別した。バイサルファイト処理した DNA を用いて、定量的メチル化特異的 PCR

(Quantitative-Methylation-specific PCR: Q-MSP)で増幅した。*CDO1* プロモーターDNA メチル化値は、*CDO1* 増幅シグナル値と β -アクチン値との比として定義し、TaqMeth V と表記した。

【結果】

(臨床病理学的特徴)

EGC 44 症例 (nMGC 群: 33 症例、Scar+MGC 群: 11 症例) の臨床病理学的特徴に関して、中央値は 73 歳 (範囲: 58~85 歳) で、両群間に有意差を認めなかった ($p=0.4319$)。性別に関して男性: 32 名、女性: 12 名であった ($p=0.4569$)。ESD 治療時の *H.pylori* は、全ての症例 (現感染: 16 症例、除菌後: 28 症例) で感染を認めた ($p=1.0000$)。組織型は高分化型腺癌: 39 症例、中分化型腺癌: 5 症例であり有意差を認めなかった ($p=1.0000$)。

(nMGC 群における *CDO1* プロモーターDNA メチル化定量値)

nMGC 群において、*CDO1* TaqMeth V は腫瘍粘膜 (n=33、中央値: 26.0、範囲: 3.1-81.2) と非腫瘍粘膜 (n=132、中央値: 18.3、範囲: 0.0-65.8) の両組織間で有意差を認めた ($p=0.0006$)。また 4 点の非腫瘍粘膜 (oral TAM, anal TAM, right TAM, left TAM) をそれぞれ腫瘍粘膜と比較したところ有意差を認めた ($p=0.0111$, $p=0.0451$, $p=0.0201$, $p=0.0220$)。

(Initial 群における *CDO1* プロモーターDNA メチル化定量値)

Initial 群において、*CDO1* TaqMeth V は腫瘍粘膜 (n=11、中央値: 40.1、範囲: 16.2-85.3) と非腫瘍粘膜 (n=44、中央値: 33.2、範囲: 7.1-100.6) の両組織間で有意差を認めなかった ($p=0.3914$)。また 4 点の非腫瘍粘膜 (oral TAM, anal TAM, right TAM, left TAM) をそれぞれ腫瘍粘膜と比較したところ有意差を認めなかった ($p=0.3606$, $p=0.9999$, $p=0.2535$, $p=0.5242$)。

(Additional 群における *CDO1* プロモーターDNA メチル化定量値)

Additional 群において、*CDO1* TaqMeth V は腫瘍粘膜 (n=11、中央値: 24.0、範囲: 8.6-47.2) と非腫瘍粘膜 (n=44、中央値: 24.1、範囲: 0.0-56.2) の両組織間で有意差を認めなかった ($p=0.5677$)。また 4 点の非腫瘍粘膜 (oral TAM, anal TAM, right TAM, left TAM) をそれぞれ腫瘍粘膜と比較したところ有意差を認めなかった ($p=0.8779$, $p=0.3751$, $p=0.1948$, $p=0.8386$)。

(Initial 群の TAM における特徴的な *CDO1* プロモーターDNA メチル化定量値)

nMGC 群、Initial 群、Additional 群の *CDO1* TaqMeth V を、腫瘍粘膜 (T) と非腫瘍粘膜 (TAM) に分けて比較検討した。腫瘍粘膜に関して *CDO1* TaqMeth V の中央値は nMGC 群 (n=33): 26.0 (範囲: 3.1-81.2)、Initial 群 (n=11): 40.1 (範囲: 16.2-85.3)、Additional 群

(n=11): 24.0 (範囲: 8.6-47.2)でありそれぞれ有意差を認めなかった ($p=0.1096$, $p=0.6180$, $p=0.6314$)。非腫瘍粘膜に関して *CDO1* TaqMeth V の中央値は nMGC 群 (n=132): 18.3 (範囲: 0.0-65.8)、Initial 群 (n=44): 33.2 (範囲: 7.1-100.6)、Additional 群 (n=44): 24.1 (範囲: 0.0-56.2)であり、Initial 群は nMGC 群および Additional 群の間には有意差を認めたが ($p<0.0001$, $p=0.0041$)、一方で nMGC 群と Additional 群の間には傾向はあるものの、有意差は認めなかった ($p=0.0560$)。さらに Initial 群の非腫瘍粘膜と全ての群の腫瘍粘膜との間には有意差を認めなかった ($p=0.3638$)。

(*CDO1* TaqMeth V を用いた MGC の予測)

MGC を予測するための最適なカットオフ値を明らかにするために、nMGC 群と Initial 群の非腫瘍粘膜 (TAM) を用いて ROC 解析を行った。両群の 4 点の非腫瘍粘膜の中で最も高い TaqMeth V を用いると、最適なカットオフ TaqMeth V は 43.4 (AUC: 0.81, $p<0.0001$ 、感度 81.8%、特異度: 78.8%) であった。

【考察】

萎縮を伴う胃粘膜の発癌過程は、主にエピジェネティックな異常に影響され、加齢や *H.pylori* 感染等の慢性炎症が原因とされている。この原因は、慢性炎症が胃粘膜の DNA にエピジェネティックな異常を引き起こすことで遺伝子発現を変化させる、いわゆる「field cancerization」の根本であると考えられる。本研究では、すべての Scar+MGC 群の Initial 群は初回の ESD による根治切除が病理学的に確認された症例であり、Additional 群は遺残再発癌ではないと考えた。しかし ESD 後瘢痕上という同一部位に新たな癌が発生したことを考慮すると、Initial 群の非腫瘍粘膜は既に腫瘍相当のエピジェネティックな変化が出現していることが強く示唆される。

今回、癌に高い特異性を持つメチル化遺伝子である *CDO1* に着目した。*CDO1* プロモーター DNA メチル化は、小腸癌、大腸癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍などの腫瘍組織は非腫瘍組織と比較して有意に高いことが報告されている。本研究では、EGC の非腫瘍粘膜における *CDO1* プロモーター DNA メチル化が、Initial 群では nMGC 群よりも高頻度に検出されることが明らかになった。また Initial 群は Additional 群との間に有意差を認め、さらに Additional 群と nMGC 群の間には傾向はあるものの有意差を認めなかった。そして Additional 群では、2 回目の ESD 後以降に新たな Scar+MGC の出現を認めなかったことを考慮すると、*CDO1* プロモーター DNA メチル化の過剰な発現が発癌に関与している可能性が考えられた。

さらに Scar+MGC 群では、初回 ESD (Initial 群) と同じ部位に MGC が発生し 2 回目の ESD が施行されていた (Additional 群)。さらに、Additional 群では、2 回目の ESD 後に新たな Scar+MGC の発生は認めなかったことから、nMGC 群、Initial 群、Additional 群の各標本における腫瘍粘膜と非腫瘍粘膜の *CDO1* プロモーター DNA メチル化を測定するこ

とで、EGC に対して初回 ESD が行われた同じ場所で新たな癌の発生を予測できる可能性がある。したがって、Scar+MGC の ESD 検体は MGC の発症を予測するための重要な試料であると考えられる。

【総括】

本研究では Scar+MGC の ESD 検体を用いて *CDO1* プロモーター-DNA メチル化を評価することが可能であり、Initial 群の非腫瘍粘膜は、腫瘍と同程度の DNA メチル化が生じていることが明らかとなった。*CDO1* プロモーター-DNA メチル化が MGC を予測するための重要なバイオマーカーとなる可能性がある。