

博士論文

大腸癌における Notch3 蛋白発現の

臨床病理学的意義

小澤 毅士

目次

| | |
|--|----|
| 1. 要旨..... | 4 |
| 2. 序文..... | 5 |
| 3. 目的..... | 15 |
| 4. 方法..... | 16 |
| 4.1 対象..... | 16 |
| 4.2 免疫組織化学染色..... | 17 |
| 4.3 病理組織学的評価..... | 18 |
| 4.4 Public database を用いた mRNA 発現の検討..... | 21 |
| 4.5 統計学的解析..... | 21 |
| 5. 結果 (1)..... | 23 |
| 5.1 患者背景..... | 23 |
| 5.2 免疫組織染色による Notch3、Notch1 蛋白発現..... | 25 |
| 5.3 Notch 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 5.3.1 Notch3 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関..... | 27 |
| 5.3.2 Notch1 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関..... | 29 |
| 5.4 Notch 蛋白発現と全生存期間、遠隔無再発生存期間との相関..... | 31 |
| 5.4.1 Notch3 蛋白発現と生存曲線..... | 31 |
| 5.4.2 Notch1 蛋白発現と生存曲線..... | 37 |
| 5.5 小括 (1)..... | 43 |
| 6. 結果 (2)..... | 44 |
| 6.1 核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共発現と臨床病理学的因子の相関..... | 44 |
| 6.2 核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共発現と生存曲線..... | 47 |
| 6.3 小括 (2)..... | 50 |
| 7. 結果 (3)..... | 51 |
| 7.1 遠隔無再発生存率の単変量解析..... | 51 |
| 7.2 遠隔無再発生存率の多変量解析..... | 57 |
| 7.3 小括 (3)..... | 60 |
| 8. 結果 (4)..... | 61 |

| | |
|--|----|
| 8.1 患者背景..... | 61 |
| 8.2 Notch3 mRNA、Notch1 mRNA 発現と再発、生存率との相関..... | 61 |
| 8.2.1 GSE14333 における検討..... | 61 |
| 8.2.2 GSE17538 における検討..... | 62 |
| 8.3 小括 (4)..... | 69 |
| 9. 考察..... | 70 |
| 10. 結論..... | 83 |
| 11. 謝辞..... | 84 |
| 12. 引用文献..... | 85 |

1. 要旨

Notch を介したシグナルが様々な癌種で発癌、進展に関与していることが示唆されており、本研究では Notch3 蛋白発現の大腸癌進展への関与を中心に検討を行った。

Stage II、III 大腸癌根治切除症例 305 例を対象に、組織免疫染色法を用いて Notch3 蛋白、Notch1 蛋白発現と臨床病理学的因子との相関を検討した。

腫瘍細胞の核における Notch3、Notch1 蛋白発現は、それぞれ遠隔無再発生存期間と負の相関を認め、多変量解析にて遠隔臓器再発の危険因子であった。

Notch3 蛋白、Notch1 蛋白発現は、大腸癌における予後マーカーや再発危険因子として有用である可能性が示唆された。

2. 序文

大腸癌は近年増加傾向をたどっており、2009年における日本の癌統計では、男性における癌罹患率において、大腸癌は、胃癌、肺癌に次いで第3位であり、また女性においても乳癌に次いで第2位と、非常に重要視されている疾患である [1]。また世界的に見ても、2012年における統計では、大腸癌は140万人の罹患患者と、69万3900人の死亡患者が生じると見込まれており、日本と同様、世界でも男性では癌罹患率の第3位、女性では第2位の位置を占めている [2]。

近年、分子生物学の発達とともに、様々な分子シグナルが研究対象とされ、正常組織の機能維持、分化、そして腫瘍細胞の発現、維持、進展にも関与することが示唆されている。大腸癌における発癌経路は大きく、adenoma-carcinoma sequence、de-novo 発癌、microsatellite instability 発癌、そして炎症性発癌に分類される [3-6]。その経路で中心となる遺伝子変化については、未だ完全には明らかでない。さらに、発癌には genetic な変化に加え、epigenetic な変化による修飾が大きく関与していることが解っており、特に CpG (5' cytosine-phospho-guanine) island におけるメチル化 cytosine と microsatellite instability は大腸癌の発癌、進展に大きく関与していることが示唆されている [7-10]。また以前は機能を持たないと考えられていた蛋白質を code しない non coding RNA が messenger RNA に働きかけることで、その翻訳に大きく関与していることも報告されている [11-13]。このように大腸癌の発癌、進展にはさまざまな因子が複雑に相互作用することが解ってきているが、その中の1つのシグナルである Notch シグナルが、近年、大腸癌を含む様々な癌種におい

て、その発癌、進展に重要な役割をしていることが、多くの報告から示唆されている [14-19]。

Notch は、1920年代に T.H Morgan らがショウジョウバエにおいて初めて発見した遺伝子であり、その欠損に伴い羽に鋸歯状構造を生じることから *Notch* と命名された [20]。

Notch は細胞膜を貫通する I 型膜貫通型蛋白質として存在する受容体であり、細胞外ドメイン(ECD: extracellular domain)、膜内ドメイン(intramembrane domain)、そして細胞内ドメイン(ICD: intracellular domain)に分類される [17]。Notch 受容体は Notch1~4 の 4 種類が存在し、リガンドは DLL1、DLL3、DLL4、JAG1、そして JAG2 の 5 種類が報告されている [21]。

Notch シグナルは、Notch 受容体がリガンドと結合することで、Notch 細胞内ドメイン(NICD)が、ADAM (a disintegrin and metalloprotease)、 γ -secretase により離断され、さらに核内に移行し、RBP-J κ (recombining binding protein suppressor of hairless)、MAML (mastermind-like) 蛋白などの翻訳因子と結合し、HES (hairy enhancer of split) や HEY (hes-related repressor proteins with Y-box) などのターゲット遺伝子の発現を引き起こす [22]。HES、HEY は様々な器官において転写抑制因子として働くことがわかっており、これらは homodimer を形成して働くのみならず、HES-HEY といった heterodimer を形成しても働くことが知られている [23] (図 1 参照)。

Notch 受容体はグリコシル化やリン酸化などと、翻訳後修飾を受けることが解っており、リン酸化した NICD は Su(H) と結合し易くなり、NICD/Su(H) は NICD の細胞内における位置

を決定する [24]。さらに、Notch シグナルを調節する因子として NUMB、NUMBL (Numbl-like) が存在し、細胞質の Notch シグナルを阻害する働きを持つ [25]。一方、FBXW7 (F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase) は NICD 結合蛋白であり、ユビキチンリガーゼの構成因子として働き、核 NICD を分解する働きを持つ [21]。

4 種類の Notch 受容体は、それぞれ構造や機能、発現の分布においても異なっていることが示唆されており、正常腸管上皮細胞においては、Notch 受容体、リガンドは腸管上皮に広く存在するが、Notch1 受容体が腸管全体に認められるのに対して、Notch2 受容体は小腸陰窩上皮、平滑筋細胞に散在性に存在する。一方、Notch3、Notch4 受容体は血管内皮や間質においてもその発現が認められる [17, 26]。

正常腸管上皮細胞における Notch 受容体の機能については、幹細胞の維持、分化に重要な役割を持つことが示唆されている。正常腸管上皮細胞においては、陰窩底部に存在する自己増殖能と分化能を兼ね備えた幹細胞が TA 細胞 (Transient amplifying cell) を経て、徐々に陰窩上方へと移動しながら分化した細胞となり、陰窩上皮を形成する。TA 細胞は大きく、吸収上皮細胞、分泌上皮細胞に分けられ、さらに分泌上皮細胞は、粘液産生をつかさどる Goblet 細胞、リゾチーム産生をつかさどる Paneth 細胞、消化管ホルモン産生をつかさどる腸管内分泌細胞から構成される [17]。腸管陰窩におけるシグナルのうち、WNT (wingless-related integration site)、HH (Hedgehog)、BMP (bone morphogenic protein)、そして Notch などは、陰窩底部と陰窩上方でその発現に段階的な変化を認める。

図1 Notch シグナル伝達

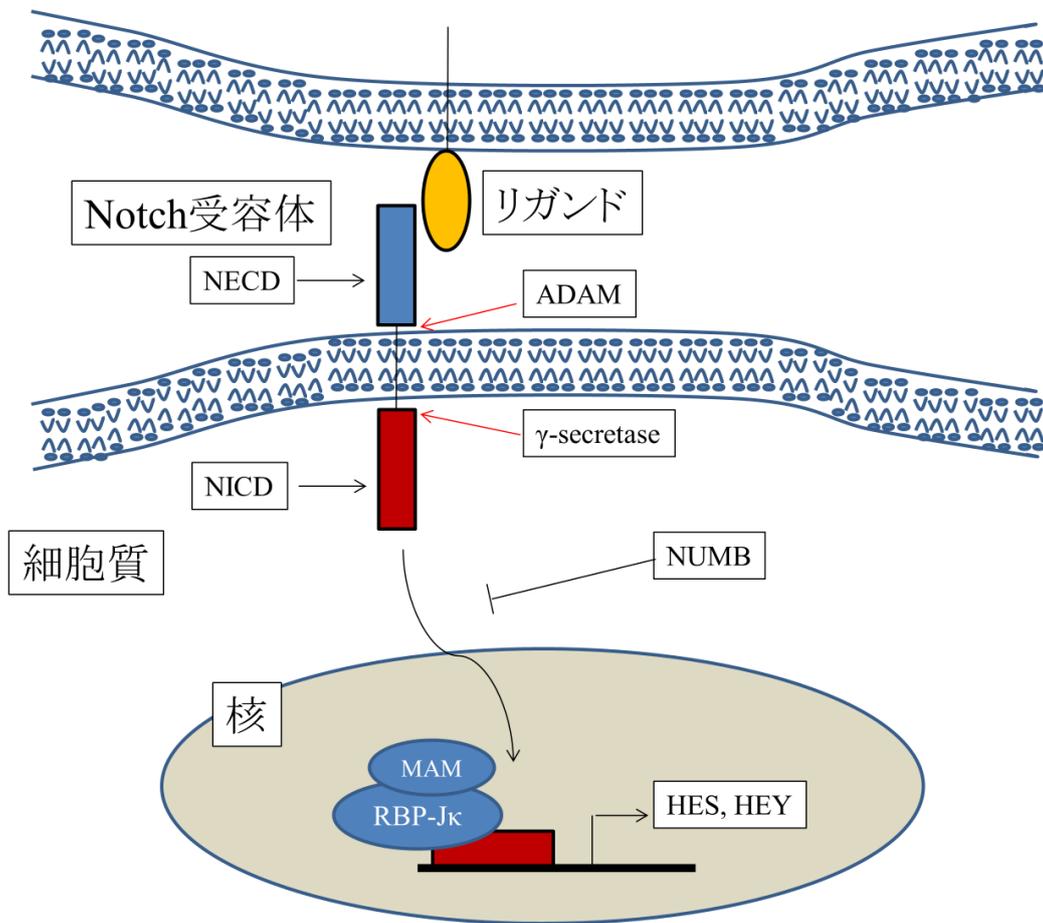


図1

細胞同士が直接コンタクトすることでリガンドが Notch 受容体と結合しシグナルが開始される。ADAM や γ -secretase が活性化されることで NICD が切離され、細胞質から核に移行、MAM や RBP-J κ などの翻訳因子と結合し、最終的に HES や HEY などの target 遺伝子の転写が開始される。

NECD: Notch extracellular domain、NICD: Notch intracellular domain

ADAM: a disintegrin and metalloprotease、MAM: mastermind-like

RBP-J κ : recombining binding protein suppressor of hairless

HES: hairy enhancer of split、HEY: hes-related repressor proteins with Y-box

WNTとNotchシグナルが陰窩底部の細胞で最も高発現であり、上方に行くにつれて徐々に低下するのに対して、BMP、HHシグナルは分化した細胞で発現が強い(図2参照)[16]。また、NotchとWntには相互作用があることも示唆されており、NotchはWntシグナルの機能を保つのに必要であるとの報告がなされている[14]。このように様々なシグナルが相互作用し、幹細胞の自己増殖、分化が起こり、Notchはその一端の役割を担う。すなわち正常腸管上皮においてNotchシグナルを抑制するとgoblet cellへの分化が即されることが報告されており、一方、NICDを高発現させると、吸収上皮前駆細胞の増殖と、腺腫の増殖を認めることが報告されている[27]。

癌細胞におけるNotchシグナルの関与を示唆する報告は、1991年にEllisonらによりT-ALL(T-cell acute lymphatic leukemia)において初めてなされた[28]。Ellisonらは、3症例のT-ALLにおいて、染色体転位部位がNotchをコードする遺伝子の100bp以内に認められたことから、染色体転座に伴うNotch翻訳産物の異常がT-ALLの発癌に関わるのではないかと推察したが、1996年になりPearらはマウスの骨髄移植モデルを用いて、Notch蛋白発現がT細胞に腫瘍形成的に働くことを示した[29]。その後、肺癌において染色体転位によるNotch3シグナルの活性化が、髄芽腫、卵巣癌においてそれぞれNotch2、Notch3の遺伝子増幅が、乳癌において、JAG1/Notch1の発現増加もしくはNUMBの発現低下が報告されており、種々の癌種でNotchシグナルの異常活性化が腫瘍促進的な作用に関与していることが示唆されるようになった[30-33]。

図2 正常大腸組織における Notch シグナルの役割

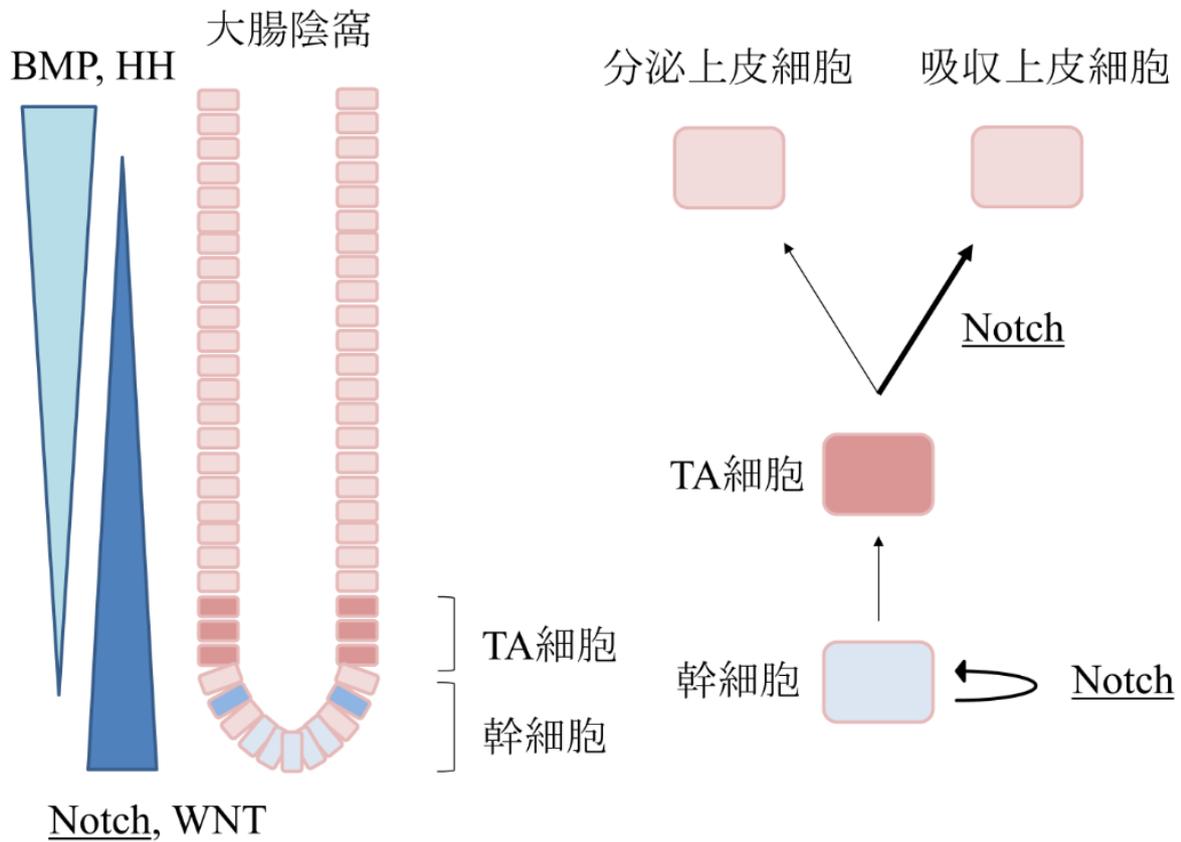


図2

大腸陰窩では、幹細胞が存在する底部で Notch シグナルが強く、上方に行くにつれて徐々にシグナルが低下する。Notch シグナルは幹細胞の維持、TA 細胞の吸収上皮細胞への分化に関与することが示唆されている。

TA 細胞: Transient amplifying 細胞
 WNT: Wingless-related integration site
 BMP: Bone morphogenic protein
 HH: Hedgehog

このように、Notch シグナルは発癌、癌の進展において重要な役割を果たしていると考えられるが、その役割はそれぞれの臓器、そして同一の臓器においても、それぞれの Notch 受容体において異なっていることが示唆されている (表1参照)。

Notch1 シグナルと癌の検討においては、胃癌では Notch1 の NICD が COX-2 の promoter に結合することで COX-2 の発現を増強し、胃癌細胞の増殖に関与しているとの報告がなされている [34]。膵臓癌では Notch1 シグナルが miR-21 の発現を増強させる一方、miR-200、let-7 の発現を減少させ、その結果 EMT(Epithelial-mesenchymal transition)の獲得を引き起こすと報告されている [35, 36]。さらに、肝臓癌では Notch1 蛋白発現が予後と負の相関をし、MMPs (matrix metalloproteinases)、uPA (urokinase-type plasminogen activator)、ERK1/2 シグナルを増強させ腫瘍促進的な作用を持つとの報告を認める [37]。また、食道癌において Notch1 の発現が組織学的に低分化な細胞に多く、予後と負の相関関係を認め、また 5-FU(fluorouracil)耐性に関与し、腫瘍促進的な作用を示すとの報告がある [38]。

その一方、マウスモデルにおいて、皮膚やケラチノサイトにおける Notch1 シグナルは β カテニンシグナルを抑制しており、Notch1 シグナルの欠損が基底細胞癌様腫瘍の発育を促進したと報告されており、Notch1 シグナルが tumor suppressor gene としての働きを持つことが示唆されている [39]。

Notch3 シグナルと癌の検討では、膵臓癌では Notch3 と HEY-1 の核における発現が再発、予後と有意に負の相関をしたと報告されており、Notch1 と同様腫瘍促進的に働くことが

示唆されている [35, 36]。また、肝臓癌においても、Notch3 シグナルが上記した肝臓癌における Notch1 と同様の作用を示すことが示唆されている [37]。一方、食道癌においては、Notch3 シグナルは EMT の獲得に重要な役割を持つ ZEB(zinc finger E-box-binding) 蛋白の発現を抑制し、腫瘍抑制的な作用を持つとの報告がなされており、腫瘍促進的である Notch1 シグナルと逆の作用を持つことが示唆されている [38, 40]。

大腸癌においても Notch シグナルが検討されており、Zhang らは *in vitro* モデルで、Notch1 シグナルが大腸癌細胞株において腫瘍促進的な働きをしていることを示唆する報告をしている [41]。また、Chu らは大腸癌切除検体において Notch1 蛋白発現を検討し、腫瘍深達度、リンパ節転移、進行度、予後との間に有意な正の相関を認めたと報告している [42]。また、Chu らは別の大腸癌を用いた検討で Notch1 シグナルが p65 発現増強を介し、NF- κ B(nuclear factor κ B)を活性化させることで腫瘍促進的な作用を持つと報告をしている [43]。既存の報告から、大腸癌においては Notch1 シグナルが腫瘍促進的な作用を持つことが示唆されている一方、Notch2 シグナルは腫瘍抑制的な作用を持つことが示唆されている [41, 42, 44-46]。Chu らは大腸癌切除検体において Notch1 蛋白発現と同時に Notch2 蛋白発現を検討し、Notch2 蛋白発現が Notch1 蛋白発現と逆に、腫瘍深達度、リンパ節転移、進行度、予後との間に有意な負の相関を認め、腫瘍抑制的な作用を持つと報告している [44]。

表 1 様々な固形癌における Notch シグナル

| 癌種 | 腫瘍抑制的 | 腫瘍促進的 | Reference |
|-------|--------|-----------------|----------------|
| 脳腫瘍 | Notch1 | Notch2 | [31] |
| 基底細胞癌 | Notch1 | | [39] |
| 肺癌 | | Notch1, 3 | [30] [47] [48] |
| 乳癌 | | Notch1, 3, 4 | [32] [49] [50] |
| 食道癌 | Notch3 | Notch1 | [38] [40] |
| 胃癌 | Notch3 | Notch2, 4 | [19] [34] [51] |
| 膵癌 | Notch1 | Notch1, 2, 3 | [35] [35, 52] |
| 肝細胞癌 | | Notch1, 2, 3, 4 | [37] [53, 54] |
| 大腸癌 | Notch2 | Notch1 | [41-46] |

このように大腸癌においては Notch1、Notch2 シグナルの役割については臨床的な検討を含めいくつかの報告がなされているものの、Notch3 シグナルの役割については Serafin らの報告を認めるのみであった。Serafin らは、Microarray のデータで Notch3 発現が正常腸管粘膜と比較して大腸癌において有意に上昇していることから、Notch3 シグナルが腫瘍促進的に働くと考え、in vitro、in vivo モデルにおいて、Notch3 シグナルの役割を検討している。その結果、大腸癌細胞株で Notch3 シグナルは DLL4 を介して細胞促進的に働き、マウスを用いた xenograft モデルにおいても同様に Notch3 シグナルが大腸癌においては腫瘍促進的な役割を持つことを報告している。その一方、同報告において、大腸癌切除標本 158 症例における Notch3 蛋白発現が検討されているが、臨床病理学的因子との間に相関は認められなかった [55]。

我々は、Notch シグナルは NICD が核に移行することで活性化することから、Serafin らが Notch の ECD に対する抗体を用いて検討したことが、Notch3 蛋白発現と臨床病理学的因子との間に相関が認められなかった一因と考え、ICD に対する抗体を用いた再評価が必要であると考えた。そのため本研究では、大腸癌における Notch3 蛋白発現を Notch3 蛋白の NICD に対する抗体を用いて評価することで、Notch3 シグナルが大腸癌でどのような役割を果たすのかを検討した。

3. 目的

Notch3 シグナルは *in vitro*、*in vivo* において腫瘍促進的な役割を持つことが示唆されているがその発現の臨床病理学的側面は明らかではない。そこで本研究では、Stage II、Stage III 大腸癌切除標本における Notch3 蛋白の発現を検討し、Notch3 シグナルの臨床病理学的因子との相関を検討すること、また、Notch1 蛋白発現を併せて検討し、Notch3 蛋白発現と Notch1 蛋白発現の大腸癌の進展における関与を検討すること、さらには public database を用いて Notch3 mRNA、Notch1 mRNA と予後、再発の相関を検討することを目的とした。

4. 方法

4.1 対象

2000年1月から2007年12月までに東京大学医学部附属病院大腸肛門外科にて、外科的根治切除術が施行された Stage II 164 症例、Stage III 141 症例の大腸腺癌患者、全305 症例を対象とした。Stage I 症例は殆ど再発を認めず、Stage IV 症例は転移臓器、個数などにおいて不均一な患者集団であるため、本研究に不適と考え除外した。術前放射線療法や化学療法が施行された患者(74 症例)は Notch 蛋白発現への影響を考慮し、多発性大腸癌患者(28 症例)、他臓器癌の既往を認める患者(31 症例)は予後への影響を考慮し、家族性大腸腫瘍患者(3 症例)、そして炎症性腸疾患合併患者(3 症例)は発癌経路が異なることを考慮し、除外対象とした。

全ての症例における外科的切除標本は 10%ホルマリンを用いて固定されたのち最深部を含む腫瘍部分が切り出され、パラフィン包埋後、東京大学附属病院病理部にて病理組織学的評価がなされた。臨床病期および病理組織学的病期は AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer/ International Union Against Cancer) 第7版にて定義された TNM (Tumor, Node, Metastasis)分類にもとづいて最終病理診断がなされた。

本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認の下、全ての患者に対して研究内容を提示し、同意書による同意を得た上で実施された (倫理審査番号: 3252-(1))。

4.2 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色(以下、免疫染色)を用いて、切除標本上の腫瘍細胞における Notch1 蛋白、Notch3 蛋白の発現を評価した。

標本は、外科的切除された原発巣の最深部を含むホルマリン固定、パラフィン包埋されたブロックから、5 μm スライス厚で切り出した未染スライドを作製し、使用した。

免疫染色に用いた抗体は、それぞれ、

抗 Notch3 抗体: Santa Cruz Biotechnology 社 (ウサギポリクローナル抗体、Anti-Notch3-antibody [M-134: sc-5593])

抗 Notch1 抗体: Abcam 社 (ウサギポリクローナル抗体、Anti-activated Notch-1 antibody [ab8925])

であり、抗 Notch3 抗体は 1:100 の濃度で、抗 Notch1 抗体は 1:300 の濃度で使用した。

免疫染色は、ストレプトアビジン-ビオチン法にて、以下に示す手順によって施行した。非特異的反応のブロッキング抗体、ビオチン標識二次抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンに関しては、SAB-PO (R)キット (ヒストファインキット、ニチレイ)を用いた。

未染スライド標本に対して、まずキシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンおよび脱水処理を施行した。次いで、クエン酸バッファー(pH6)を用いて、オートクレーブにて 120 $^{\circ}\text{C}$ ・5 分間の加熱を行い、抗原賦活化処理を施行した。その後、0.3% 過酸化水素水を添加したメタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化処理を施行した。さらに、標本に対して 10% ヤギ正常血清を用いて非特異的反応のブロッキング反応を行った

後、それぞれ上記一次抗体を用い、冷暗所にて一晩反応させた。翌日、標本に対して二次抗体 (ビオチン標識抗ウサギ抗体) 反応施行後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた。その後 3,3'-ジアミノベンジン溶液中にて 6 分間反応させ、最終的に、マイヤー・リリーマイヤー混合ヘマトキシリン溶液にて染色し、封入した。

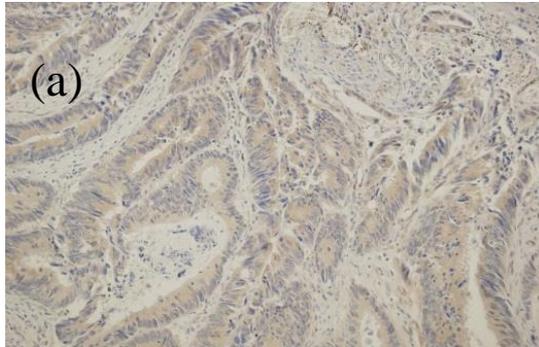
4.3 病理組織学的評価

免疫染色を行った標本につき、Notch3、Notch1 のいずれにおいても、腫瘍が均一かつ最も濃染色された領域を観察対象とし、Notch3 については著者(T.O)と病理専門医(T.M)の 2 人によりそれぞれ個別に評価した。また 2 観察者間での評価の一致度を検定した。2 観察者間での評価不一致症例については、著者の評価を用いた。Notch1 については著者のみで評価を行った。

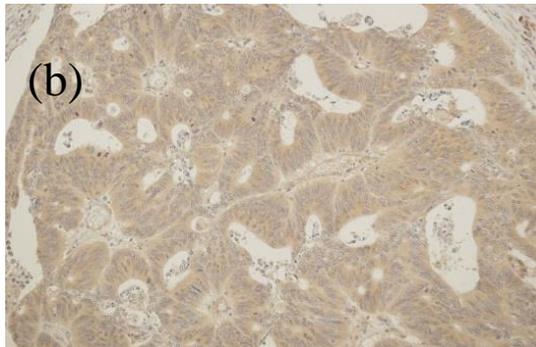
評価方法は、腫瘍細胞の細胞質における染色と、核における染色をそれぞれ分けて観察、任意の部位にて評価し、細胞質における染色は 200 倍の倍率下で観察し、発現強度を低発現、中発現、高発現の 3 段階に分類し評価した。最終的に低発現の症例を細胞質 Notch 蛋白発現陰性とし、中発現、高発現の症例を細胞質 Notch 蛋白発現陽性と定義、分類した(図 3a-f)。一方、核における染色は 400 倍の倍率下で観察し、100 個の腫瘍細胞中の陽性率を評価し、その平均値をもとに、cut-off 値を設定し、染色が cut-off 値以上を占める症例を核 Notch 蛋白発現陽性、cut-off 値未満である症例を核 Notch 蛋白発現陰性と定義した(図 4a-d) [56]。

図3 免疫組織染色を用いた細胞質 Notch3 蛋白、細胞質 Notch1 蛋白発現

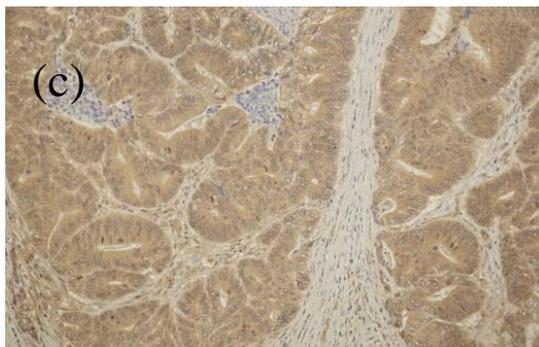
細胞質 Notch3 蛋白発現



低発現

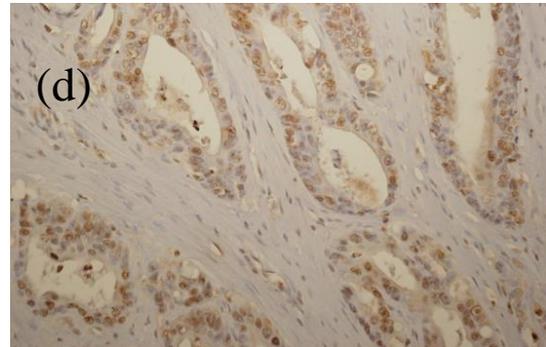


中発現

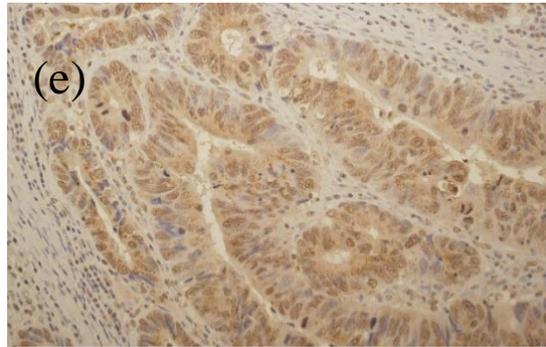


高発現

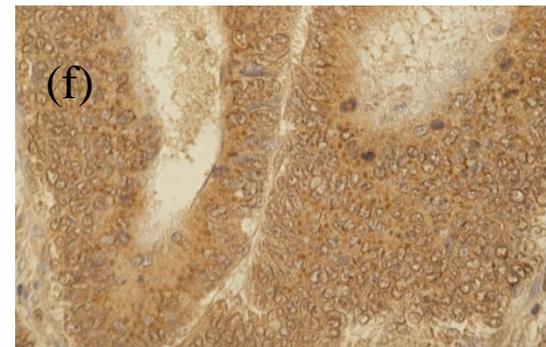
細胞質 Notch1 蛋白発現



低発現



中発現

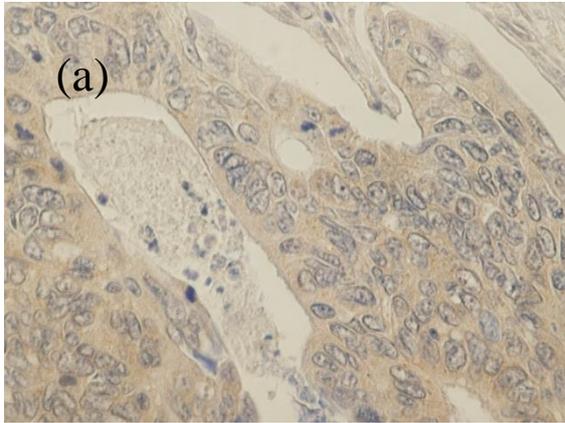


高発現

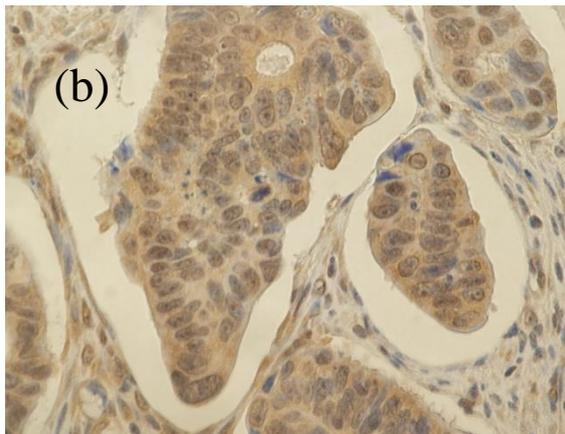
図3 (a)~(c) 大腸癌における細胞質 Notch3 蛋白発現。それぞれ(a) 低発現、(b) 中発現、(c) 高発現の代表症例を示す。(×200倍)
(d)~(f) 大腸癌における細胞質 Notch1 蛋白発現。それぞれ(d) 低発現、(e) 中発現、(f) 高発現の代表症例を示す。(×200倍)

図 4 免疫組織染色を用いた核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白発現

核 Notch3 蛋白発現

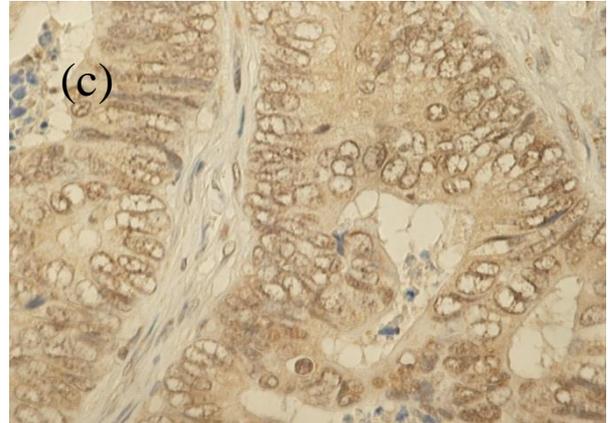


陰性

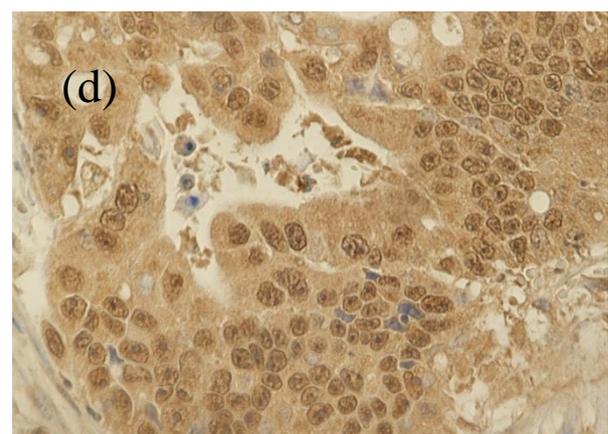


陽性

核 Notch1 蛋白発現



陰性



陽性

図 4 (a)、(b) 大腸癌における核 Notch3 蛋白発現。400 倍にて観察し、核における染色を認めるものをカウントした。それぞれ (a) 陰性、(b) 陽性の代表症例を示す。(×400 倍) (c)、(d) 大腸癌における核 Notch1 蛋白発現。同じく 400 倍にて観察し、核における染色を認めるものをカウントした。それぞれ(c) 陰性、(d) 陽性の代表症例を示す。(×400 倍)

4.4 Public Database を用いた mRNA 発現の検討

NCBI (National Center for Biotechnology Information)における 2 つの public database (GSE14333、GSE17538)を用いて、Notch1、Notch3 の mRNA 発現と、予後、再発との相関について検討した[57, 58]。再発に関しては Stage II、III の症例のみを解析の対象とし、予後、再発についての情報が得られない患者は対象から除外した。予後に関しては Stage II-III と Stage IV 別々に解析した。GSE14333 は 185 症例 (Stage II: 94 症例、Stage III: 91 症例)が、GSE17538 は 204 症例 (Stage II: 72 症例、Stage III: 76 症例、Stage IV: 56 症例)が解析対象となった。また、GSE17538 では Stage 別の mRNA 発現量を比較検討した。

Notch1 mRNA 値、Notch3 mRNA 値の cut-off はそれぞれ中央値とし、中央値より mRNA 値が低い症例を mRNA 低発現群、高い症例を high mRNA 高発現群と定義し、2 群に分け、生存曲線を比較した。

4.5 統計学的解析

統計学的解析は全て JMP pro 10 statistical software (SAS Institute)を用いて施行した。

免疫染色における観察者間一致度については、 κ 係数を用いて評価した。

Notch3、もしくは Notch1 の発現と臨床病理学的因子の相関について評価し、質的データの解析には Pearson のカイ二乗検定、または Fisher の正確確率検定を用いた。さらに、根治的手術から、最終生存確認までの期間を全生存時間 (OS: overall survival time)、また再発のうち、局所再発 (吻合部再発、直腸癌における骨盤内再発)を除く再発を遠隔臓器再

発と定義し、初発の遠隔臓器再発を認めるまでの期間を遠隔無再発生存時間(dRFS: distant relapse-free survival time)と定義し、Kaplan-Meier 法、Log rank test を用いて生存曲線を解析、評価した。

また、dRFS に影響を与える臨床病理学的因子を、Cox の比例ハザードモデルを用いて検討した。単変量解析にて $P < 0.05$ を満たした因子を多変量解析にエントリーした。

上記いずれの解析においても、 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

5. 結果(1)

5.1 患者背景

本研究で Notch 蛋白発現を評価した患者の背景は表 2 に示す通りであった。5-FU(5-fluouracil)をベースとした術後補助化学療法の施行は Stage II 症例のうち 8 名(5%)に、Stage III 症例のうち 51 名(36%)に認めた。経過観察期間 69 ヶ月(中央値、1-149 ヶ月)において、75 名(25%)に局所または遠隔再発を認めた。Stage 別で見ると、Stage II 症例では 23 名(14%)に、Stage III 症例では 52 名(37%)に局所または遠隔再発を認めた。再発臓器の内訳は、肝臓 38 名(51%)、肺 22 名(29%)、局所 11 名(15%)、腹膜播種 7 名(9%)、その他(子宮、卵巣、脳、脾臓、頸部リンパ節、傍大動脈リンパ節) 14 名(19%)であった(以上、重複あり)。

表 2 患者背景

| 臨床病理学的因子 | | n |
|-------------------|-----------|-----------|
| 性別 | | |
| | 男性 | 182 (60%) |
| | 女性 | 123 (40%) |
| 年齢 (歳) (平均± 標準偏差) | | 68 ± 11 |
| 腫瘍占拠部位 | | |
| | 右側結腸 | 109 (36%) |
| | 左側結腸 | 110 (36%) |
| | 直腸 | 86 (28%) |
| 腫瘍深達度 | | |
| | T1-2 | 20 (7%) |
| | T3-4 | 285 (93%) |
| 組織学的分化度 | | |
| | 高分化 | 149 (49%) |
| | 中分化 | 130 (43%) |
| | 低分化 | 26 (9%) |
| リンパ管侵襲 | | |
| | 陰性 | 212 (70%) |
| | 陽性 | 93 (30%) |
| 静脈侵襲 | | |
| | 陰性 | 100 (33%) |
| | 陽性 | 205 (67%) |
| リンパ節転移の有無 | | |
| | 陰性 | 164 (54%) |
| | 陽性 | 141 (46%) |
| 再発部位 | | |
| | 遠隔再発のみ | 64 (21%) |
| | 局所再発のみ | 7 (2%) |
| | 遠隔再発+局所再発 | 4 (1%) |

5.2 免疫組織染色による Notch3、Notch1 蛋白発現

Notch3 蛋白発現は、腫瘍細胞の細胞質、あるいは核に認められ(図 3、4)、細胞質の染色は全く染色されない症例は認めず、低発現が 72 症例(24%)、中発現が 150 症例(49%)、そして高発現が 83 症例(27%)であった。

一方、核における染色は平均して 19 (Range: 0-89) /100 腫瘍細胞であった(図 5)。このため、我々は 20/100 腫瘍細胞以上の核で染色を認める症例を核 Notch3 蛋白陽性と定義した。この定義に従うと、115 症例(38%)が核 Notch3 蛋白陽性と分類された。

Notch1 蛋白発現も Notch3 と同様に腫瘍細胞の細胞質、あるいは核に認めた。細胞質における染色は、低発現 95 症例(31%)、中発現 194 症例(64%)、高発現 16 症例(5%)であった(図 3)。核における染色は平均して 16 (Range: 0-75) /100 腫瘍細胞であったため、Notch3 同様、20/100 腫瘍細胞以上の核で染色を認める症例を核 Notch1 蛋白陽性と定義した(図 5)。核 Notch1 蛋白陽性症例は 113 症例(37%)に認めた(図 4)。

Notch3 蛋白発現について、2 観察者間での一致率は細胞質 Notch3 蛋白発現においては 0.86 ($\kappa = 0.63$ 、 $P < 0.0001$) であり、核 Notch3 蛋白発現においては 0.88 ($\kappa = 0.73$ 、 $P < 0.0001$) であった。

図5 全症例における核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白陽性細胞の割合

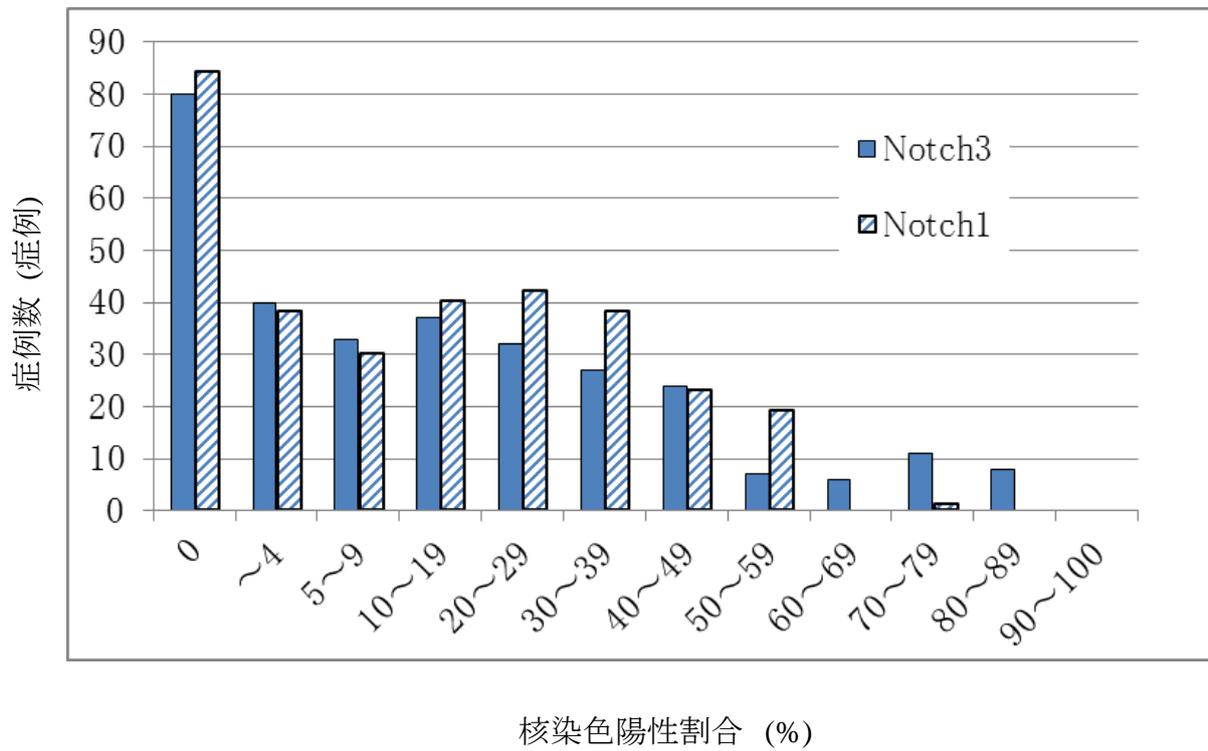


図5
免疫染色標本における核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白陽性率の分布を表わしたグラフ。横軸は核における染色陽性の割合、縦軸は症例数を示す。

5.3 Notch 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関

5.3.1 Notch3 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関

細胞質 Notch3 蛋白発現、核 Notch3 蛋白発現と、臨床病理学的因子との相関は表 3 に示す。

まず、細胞質 Notch3 蛋白発現と、臨床病理学的因子の相関について検討すると、細胞質 Notch3 蛋白発現陰性症例では静脈侵襲陽性症例が 72 症例中 41 症例(57%)であったのに対して、細胞質 Notch3 蛋白発現陽性症例では 233 症例中 164 症例(70%)と、後者で有意に多いという結果であった($P = 0.036$)。その他の因子に関しては、細胞質 Notch3 蛋白発現と統計学的に有意な相関を持つものは認められなかった。

次に、核 Notch3 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関について検討すると、組織学的分化度において、核 Notch3 蛋白発現陰性症例では 190 症例中、高分化型腺癌 104 症例(55%)、中分化型腺癌 74 症例(39%)、低分化型腺癌 12 症例(6%)であったのに対して、核 Notch3 蛋白発現陽性症例では、115 症例中、高分化型腺癌 44 症例(38%)、中分化型腺癌 56 症例(49%)、低分化型腺癌 15 症例(13%)と、後者で組織学的分化度が有意に低いという結果であった($P = 0.010$)。また、統計学的に有意ではなかったものの、核 Notch 蛋白発現陽性症例において、静脈侵襲陽性症例が多い傾向を認めた($P = 0.050$)。その他の因子に関しては、核 Notch3 蛋白発現と統計学的に有意な相関を持つものは認められなかった。

表 3 核 Notch3 蛋白発現、細胞質 Notch3 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関

| 臨床病理学的因子 | 核 Notch3 | | | 細胞質 Notch3 | | |
|-----------|-----------|-----------|-------|------------|-----------|-------|
| | 陰性 | 陽性 | P 値 | 陰性 | 陽性 | P 値 |
| 全症例 | 190 (62%) | 115 (38%) | | 72 (24%) | 233 (76%) | |
| 性別 | | | 0.740 | | | 0.417 |
| 男性 | 112 (59%) | 70 (61%) | | 32 (44%) | 91 (39%) | |
| 女性 | 78 (41%) | 45 (39%) | | 40 (56%) | 142 (61%) | |
| 年齢 (歳) | | | | | | |
| 平均±(標準偏差) | 67 ± 11 | 68 ± 11 | 0.205 | 67 ± 11 | 68 ± 11 | 0.765 |
| 腫瘍占拠部位 | | | 0.072 | | | 0.813 |
| 右側結腸 | 62 (33%) | 47 (41%) | | 28 (39%) | 81 (35%) | |
| 左側結腸 | 66 (35%) | 44 (38%) | | 25 (35%) | 85 (36%) | |
| 直腸 | 62 (33%) | 24 (21%) | | 19 (26%) | 67 (29%) | |
| 腫瘍深達度 | | | 0.795 | | | 0.689 |
| T1-2 | 13 (7%) | 7 (6%) | | 4 (6%) | 16 (7%) | |
| T3-4 | 177 (93%) | 108 (94%) | | 68 (94%) | 217 (93%) | |
| 組織学的分化度 | | | 0.010 | | | 0.647 |
| 高分化 | 104 (55%) | 44 (38%) | | 36 (50%) | 112 (48%) | |
| 中分化 | 74 (39%) | 56 (49%) | | 28 (39%) | 102 (44%) | |
| 低分化 | 12 (6%) | 15 (13%) | | 8 (11%) | 19 (8%) | |
| リンパ管侵襲 | | | 0.595 | | | 0.145 |
| 陰性 | 130 (68%) | 82 (71%) | | 45 (63%) | 167 (72%) | |
| 陽性 | 60 (32%) | 33 (29%) | | 27 (38%) | 66 (28%) | |
| 静脈侵襲 | | | 0.050 | | | 0.036 |
| 陰性 | 70 (37%) | 30 (26%) | | 31 (43%) | 69 (30%) | |
| 陽性 | 120 (63%) | 85 (74%) | | 41 (57%) | 164 (70%) | |
| リンパ節転移 | | | 0.105 | | | 0.123 |
| 陰性 | 109 (57%) | 55 (48%) | | 33 (46%) | 131 (56%) | |
| 陽性 | 81 (43%) | 60 (52%) | | 39 (54%) | 102 (44%) | |
| 再発 | | | | | | |
| 無し | 155 (82%) | 75 (65%) | | 58 (81%) | 172 (74%) | |
| 有り | 35 (18%) | 40 (35%) | | 14 (19%) | 61 (26%) | |

5.3.2 Notch1 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関

細胞質 Notch1 蛋白発現、核 Notch1 蛋白発現と、臨床病理学的因子の相関は表 4 に示す。

まず、細胞質 Notch1 蛋白発現と、臨床病理学的因子の相関について検討すると、細胞質 Notch1 蛋白発現陰性例 95 症例中、高分化型腺癌 52 症例(55%)、中分化型腺癌 31 症例(33%)、低分化型腺癌 12 症例(13%)であったのに対して、細胞質 Notch1 蛋白発現陽性症例 210 症例中、高分化型腺癌 96 症例(46%)、中分化型腺癌 99 症例(47%)、低分化型腺癌 15 症例(7%)であり、前者で有意に組織学的分化度が低いという結果であった($P = 0.038$)。また、静脈侵襲について、細胞質 Notch1 蛋白陰性例では 53 症例(56%)が陽性であったのに対して、細胞質 Notch1 蛋白陽性例では 152 症例(72%)であり、後者で有意に多いという結果であった($P = 0.005$)。その他の臨床病理学的因子に統計学的に有意な相関を持つものは認められなかった。

次に、核 Notch1 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関について検討すると、リンパ節転移の有無について、核 Notch1 蛋白発現陰性症例 192 症例中、78 症例(41%)が陽性であったのに対して、核 Notch1 蛋白発現陽性症例 113 症例中、63 症例(56%)が陽性であり、後者において有意にリンパ節転移が多いという結果であった($P = 0.011$)。その他の臨床病理学的因子に統計学的に有意な相関を持つものは認められなかった。

表 4 核 Notch1 蛋白発現、細胞質 Notch1 蛋白発現と臨床病理学的因子の相関

| 臨床病理学的因子 | 核 Notch1 | | | 細胞質 Notch1 | | |
|------------|-----------|-----------|-------|------------|-----------|-------|
| | 陰性 | 陽性 | P 値 | 陰性 | 陽性 | P 値 |
| 全症例 | 192 (63%) | 113 (37%) | | 95 (31%) | 210 (69%) | |
| 性別 | | | 0.285 | | | 0.109 |
| 男性 | 73 (38%) | 50 (44%) | | 63 (66%) | 119 (57%) | |
| 女性 | 119 (62%) | 63 (56%) | | 32 (34%) | 91 (43%) | |
| 年齢 (歳) | | | | | | |
| 平均± (標準偏差) | 67 ± 11 | 68 ± 12 | 0.527 | 67 ± 11 | 68 ± 12 | 0.659 |
| 腫瘍占拠部位 | | | 0.894 | | | 0.289 |
| 右側結腸 | 67 (35%) | 42 (37%) | | 40 (42%) | 69 (33%) | |
| 左側結腸 | 71 (37%) | 39 (35%) | | 30 (42%) | 80 (38%) | |
| 直腸 | 54 (28%) | 32 (28%) | | 25 (26%) | 61 (29%) | |
| 腫瘍深達度 | | | 0.451 | | | 0.386 |
| T1-2 | 11 (6%) | 9 (8%) | | 8 (8%) | 12 (6%) | |
| T3-4 | 181 (94%) | 104 (92%) | | 87 (92%) | 198 (94%) | |
| 組織学的分化度 | | | 0.106 | | | 0.038 |
| 高分化 | 98 (51%) | 50 (44%) | | 52 (55%) | 96 (46%) | |
| 中分化 | 82 (43%) | 48 (42%) | | 31 (33%) | 99 (47%) | |
| 低分化 | 12 (6%) | 15 (13%) | | 12 (13%) | 15 (7%) | |
| リンパ管侵襲 | | | 0.363 | | | 0.993 |
| 陰性 | 137 (71%) | 75 (66%) | | 66 (69%) | 146 (70%) | |
| 陽性 | 55 (29%) | 38 (34%) | | 29 (31%) | 64 (30%) | |
| 静脈侵襲 | | | 0.990 | | | 0.005 |
| 陰性 | 63 (33%) | 37 (33%) | | 42 (44%) | 58 (28%) | |
| 陽性 | 129 (67%) | 76 (67%) | | 53 (56%) | 152 (72%) | |
| リンパ節転移 | | | 0.011 | | | 0.331 |
| 陰性 | 114 (59%) | 50 (44%) | | 55 (58%) | 109 (52%) | |
| 陽性 | 78 (41%) | 63 (56%) | | 40 (42%) | 101 (48%) | |
| 再発 | | | | | | |
| 無し | 152 (79%) | 78 (69%) | | 74 (78%) | 156 (74%) | |
| 有り | 40 (14%) | 35 (31%) | | 21 (22%) | 54 (26%) | |

5.4 Notch 蛋白発現と全生存期間、遠隔無再発生存期間との相関

5.4.1 Notch3 蛋白発現と生存曲線

Notch3 蛋白発現と、OS、dRFS の相関を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。細胞質 Notch3 蛋白発現陽性群と陰性群で、5 年全生存率はそれぞれ 89%、88%であり、OS に統計学的有意差は認められなかった ($P=0.927$ 、log rank test、図 6a)。同様に、5 年遠隔無再発生存率においても細胞質 Notch3 蛋白発現陽性群と陰性群でそれぞれ 75%、78%であり、細胞質 Notch3 蛋白発現と dRFS との間に、統計学的有意差は認められなかった ($P=0.397$ 、log rank test、図 7a)。一方、核 Notch3 蛋白発現においては、陽性群と陰性群で、5 年全生存率はそれぞれ 88%、89%と OS に統計学的有意差は認められなかったもの ($P=0.152$ 、log rank test、図 6b)、5 年遠隔無再発生存率はそれぞれ 66%、82%と、核 Notch3 蛋白発現陰性群で dRFS が有意に良好であるとの結果であった ($P=0.005$ 、log rank test、図 7b)。

次に Stage ごとの検討を行った。Stage II 症例において核 Notch3 蛋白陽性群と陰性群で 5 年全生存率はそれぞれ 89%、93%であり、OS に統計学的有意差は認められなかったもの ($P=0.523$ 、log rank test、図 8a)、遠隔無再発生存率はそれぞれ 63%、93%と、核 Notch3 蛋白発現陰性群で dRFS が有意に良好であった ($P=0.002$ 、log rank test、図 9a)。一方、stage III 症例においては、核 Notch3 蛋白陽性群と陰性群で 5 年全生存率はそれぞれ 85%、87%であり、核 Notch3 蛋白発現と OS の間に統計学的に有意な相関は認められず ($P=0.279$ 、log rank test、図 8b)、また 5 年遠隔無再発生存率はそれぞれ 63%、69%と、核

Notch3 蛋白発現と dRFS の間にも統計学的に有意な相関は認められなかった ($P = 0.405$ 、
log rank test、図 9b)。

図 6 Notch3 蛋白発現と全生存率との相関: Kaplan-Meier 法

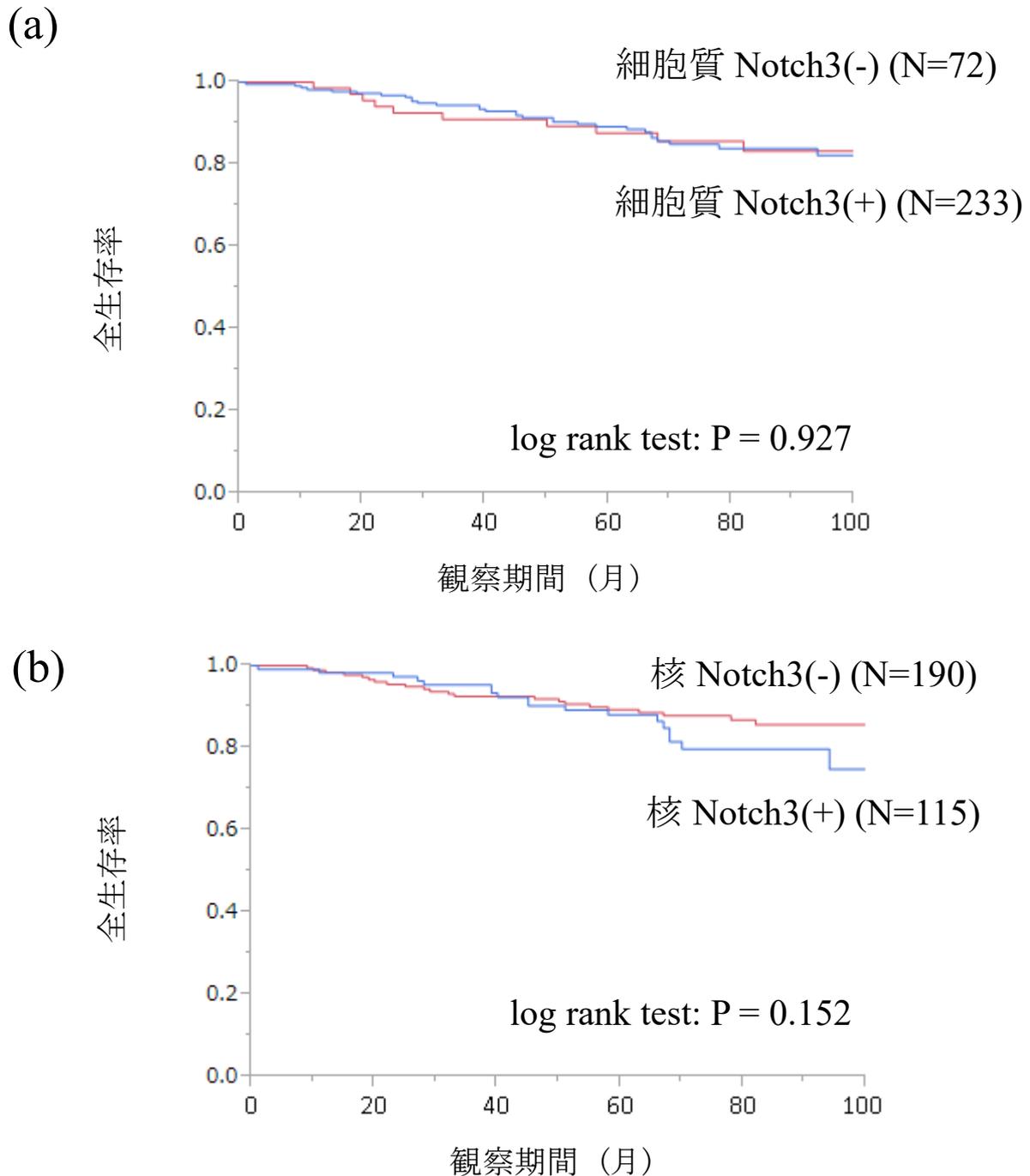
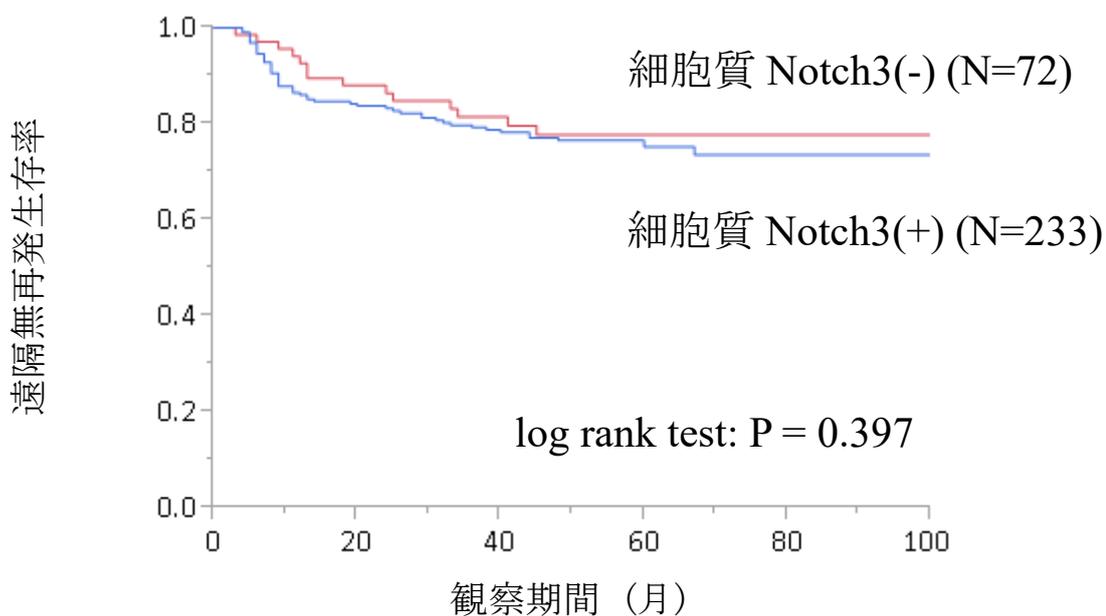


図 6 (a) 細胞質 Notch3 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.927、log rank test)

(b) 核 Notch3 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.152、log rank test)

図 7 Notch3 蛋白発現と遠隔無再発生存率との相関:Kaplan-Meier 法

(a)



(b)

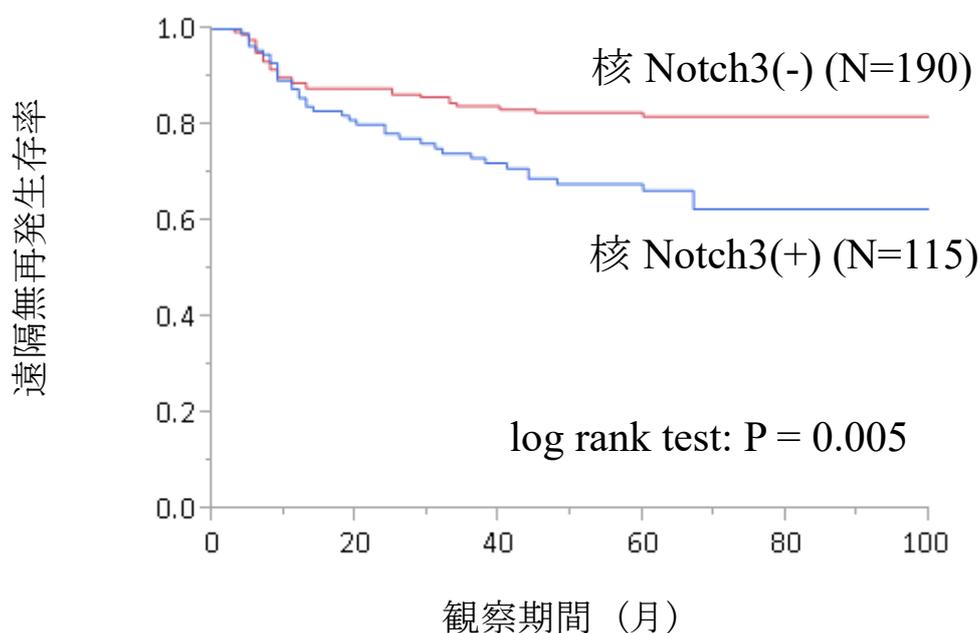


図 7 (a) 細胞質 Notch3 蛋白発現と遠隔無再発生存率の間に統計学的に有意な関係は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.397、log rank test)
(b) 核 Notch3 蛋白発現陰性群は陽性群と比較して有意に遠隔無再発生存率が良好であった (Kaplan-Meier 法、P = 0.005、log rank test)

図 8 Notch3 蛋白発現と全生存率との相関: Stage ごと、Kaplan-Meier 法

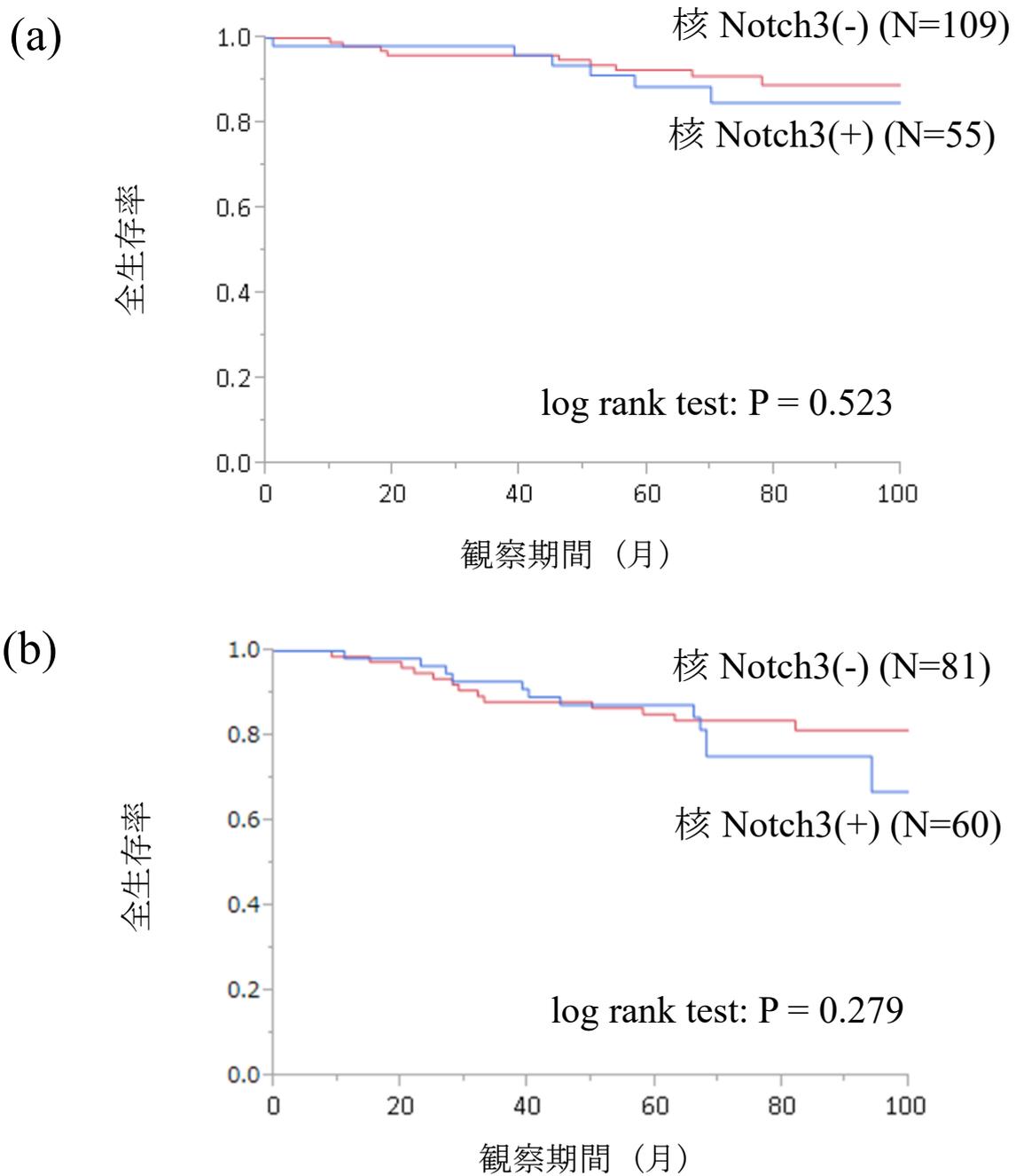


図 8 (a) Stage II 症例において、核 Notch3 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.523、log rank test)
(b) Stage III 症例において、核 Notch3 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.279、log rank test)

図9 Notch3 蛋白発現と遠隔無再発生存率との相関:Stage ごと、Kaplan-Meier 法

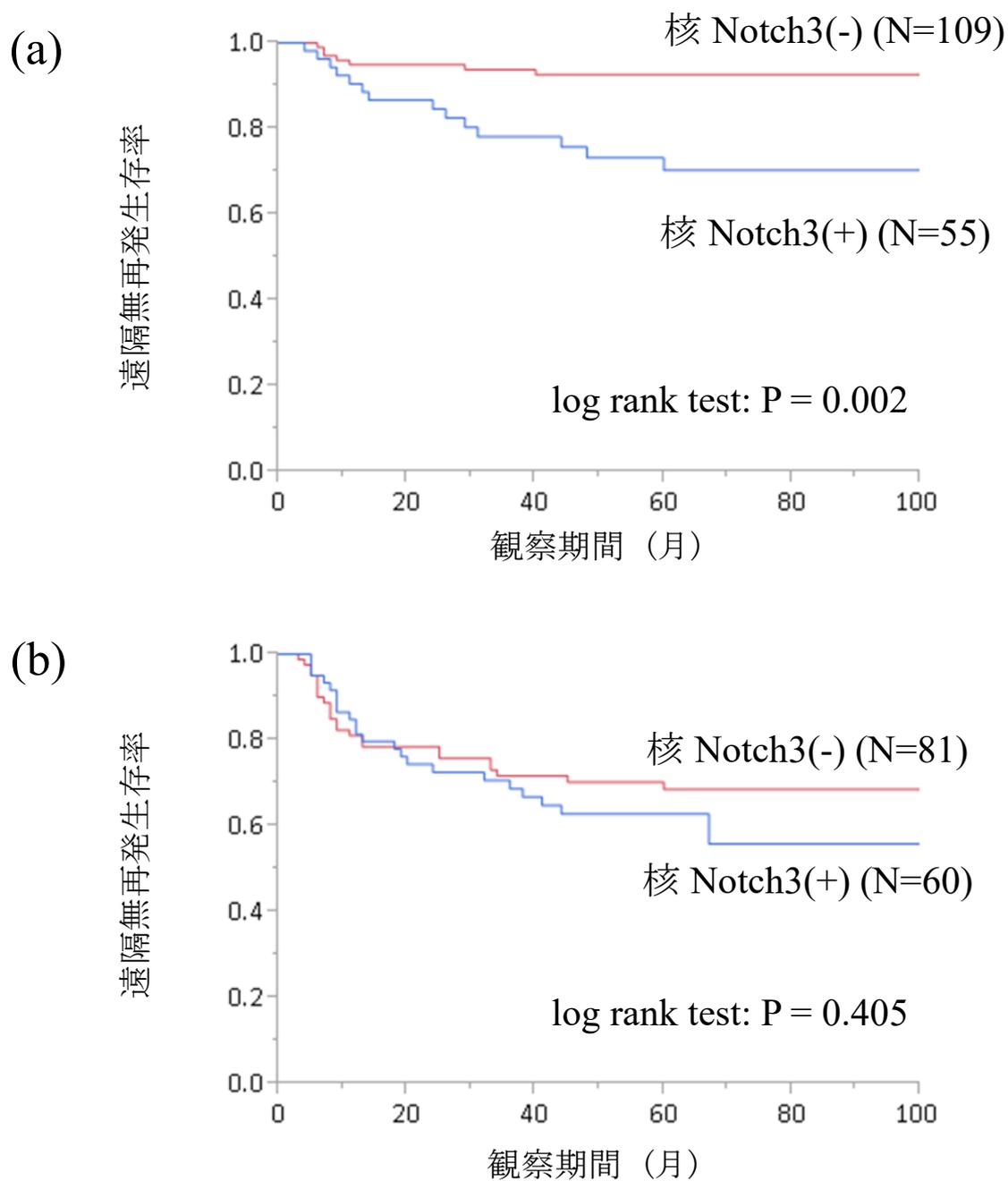


図9 (a) Stage II 症例においては、核 Notch3 蛋白発現陰性群は陽性群と比較して有意に遠隔無再発生存率が良好であった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.002$ 、log rank test)
(b) Stage III 症例においては、核 Notch3 蛋白発現と遠隔無再発生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.405$ 、log rank test)

5.4.2 Notch1 蛋白発現と生存曲線

同様に、Notch1 蛋白発現と、OS、dRFS の相関を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。細胞質 Notch1 蛋白発現陽性群と陰性群で、5 年全生存率はそれぞれ 90%、87%であり、OS に統計学的有意差は認められなかった($P = 0.900$ 、log rank test、図 10a)。また、5 年遠隔無再発生存率においても細胞質 Notch1 蛋白発現陽性群と陰性群でそれぞれ 75%、79%であり、dRFS との間にも、統計学的有意差は認められなかった($P = 0.397$ 、log rank test、図 11a)。一方、核 Notch1 蛋白発現においては、陽性群と陰性群で、5 年全生存率はそれぞれ 86%、91%と OS に統計学的有意差は認められなかったもの($P = 0.127$ 、log rank test、図 10b)、5 年遠隔無再発生存率はそれぞれ 69%、80%と、核 Notch1 蛋白発現陰性群で dRFS が有意に良好であるとの結果であった($P = 0.031$ 、log rank test、図 11b)。

さらに Stage ごとの検討を行った。Stage II 症例において核 Notch1 蛋白陽性群と陰性群で 5 年全生存率はそれぞれ 88%、93%であり、OS に統計学的有意差は認められなかったもの($P = 0.693$ 、log rank test、図 12a)、核 Notch1 蛋白陽性群と陰性群で 5 年遠隔無再発生存率はそれぞれ 66%、90%と、核 Notch1 蛋白発現陰性群で dRFS が有意に良好であった ($P = 0.020$ 、log rank test、図 13a)。一方、Stage III 症例においては、核 Notch1 蛋白陽性群と陰性群で 5 年全生存率はそれぞれ 87%、85%であり、OS に統計学的有意差は認められず($P = 0.308$ 、log rank test、図 12b)、また核 Notch1 蛋白陽性群と陰性群で 5 年遠隔無再発生存率は共に 66%であり、核 Notch1 蛋白発現と dRFS の間にも統計学的に

有意な相関は認められなかった ($P = 0.660$ 、log rank test、図 13b)。

図 10 Notch1 蛋白発現と全生存率との相関:Kaplan-Meier 法

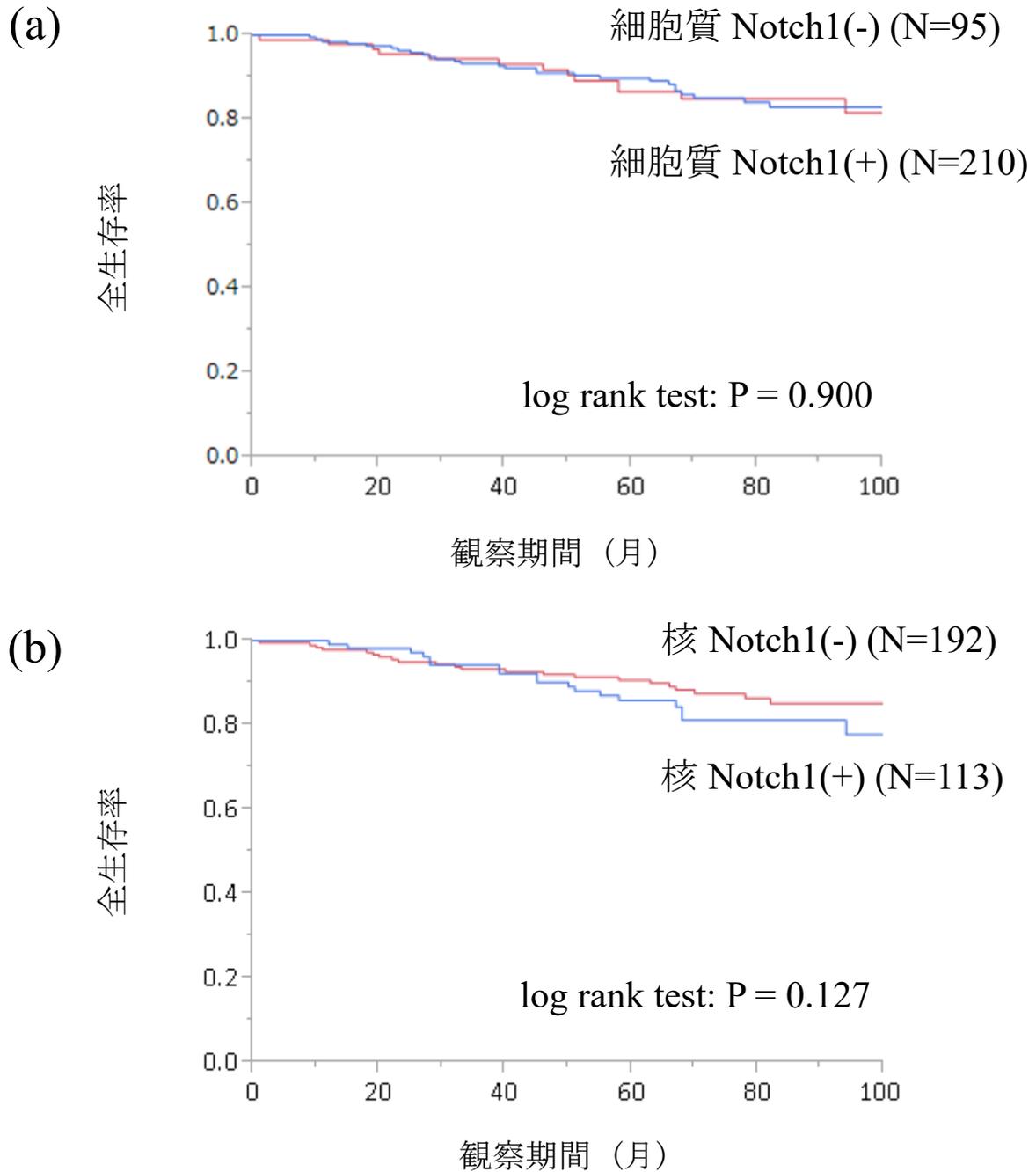


図 10 (a) 細胞質 Notch1 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.900、log rank test)

(b) 核 Notch1 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.127、log rank test)

図 11 Notch1 蛋白発現と遠隔無再発生存率との相関:Kaplan-Meier 法

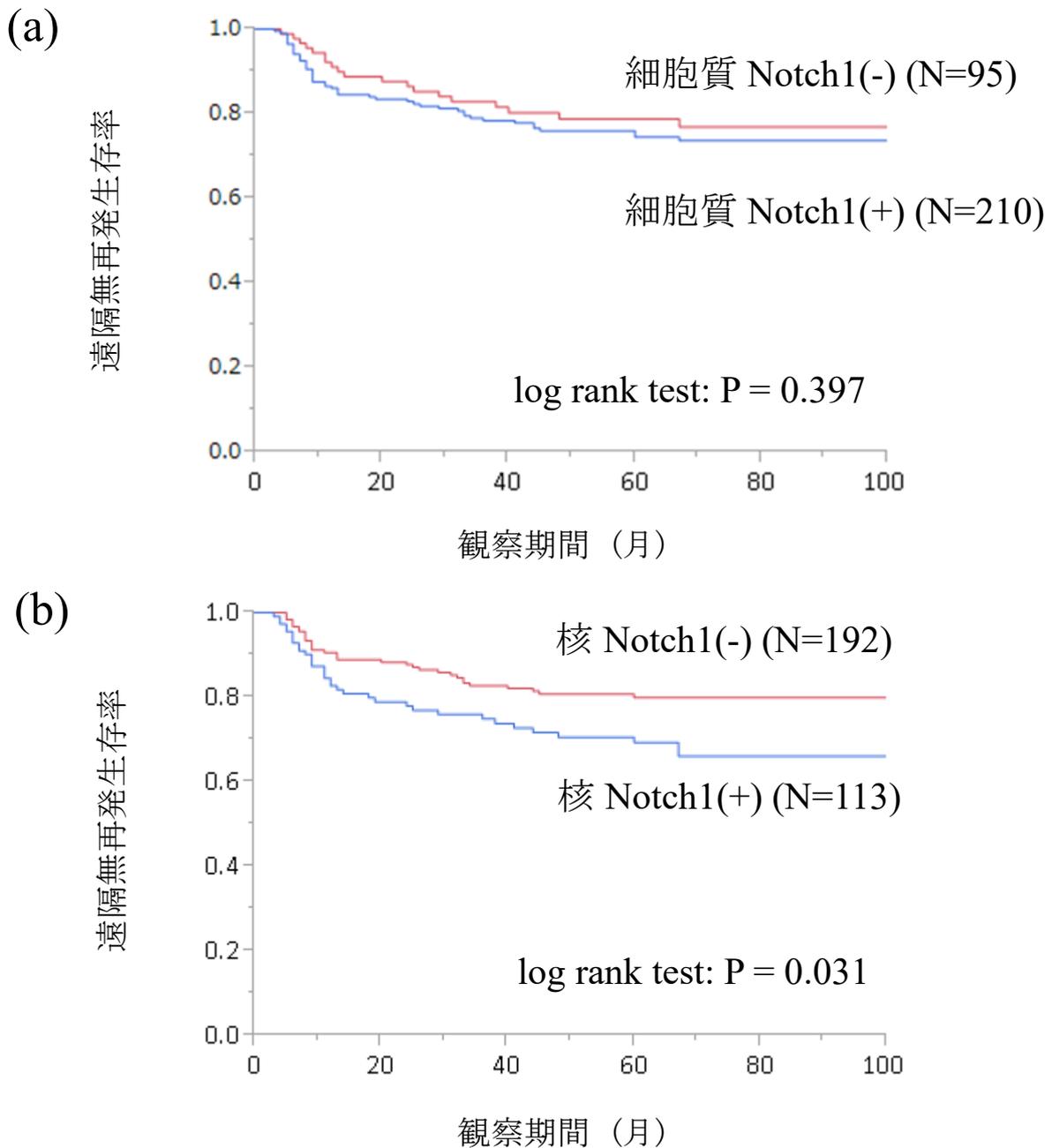


図 11 (a) 細胞質 Notch1 蛋白発現と遠隔無再発生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.397$ 、log rank test)
(b) 核 Notch1 蛋白発現陰性群は陽性群と比較して有意に遠隔無再発生存率が良好であった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.031$ 、log rank test)

図 12 Notch1 蛋白発現と全生存率との相関:Stage ごと、Kaplan-Meier 法

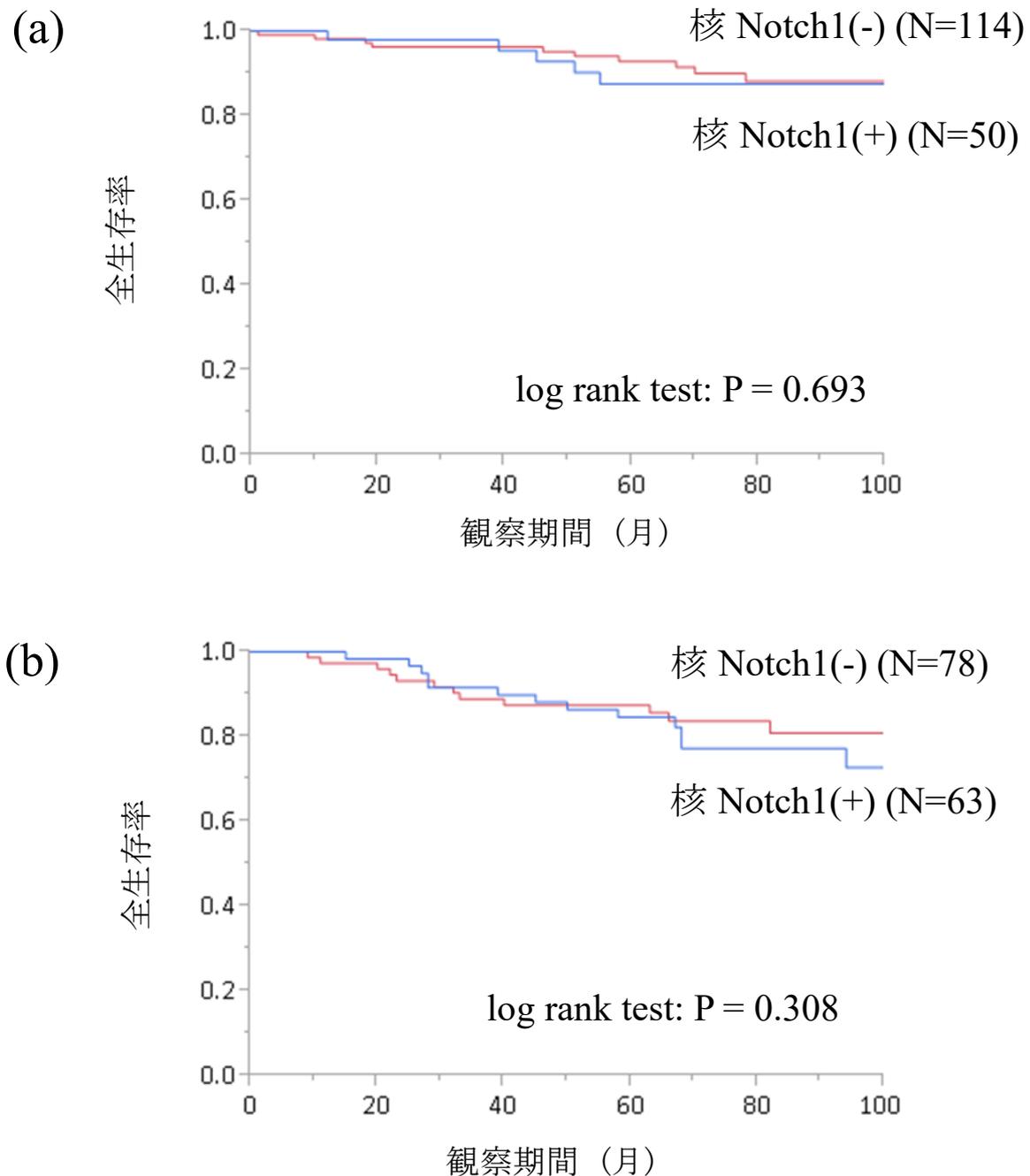


図 12 (a) Stage II 症例において、核 Notch1 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.693$ 、log rank test)
(b) Stage III 症例において、核 Notch1 蛋白発現と全生存率の間に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.308$ 、log rank test)

図 13 Notch1 蛋白発現と遠隔無再発生存率との相関: Stage ごと、Kaplan-Meier 法

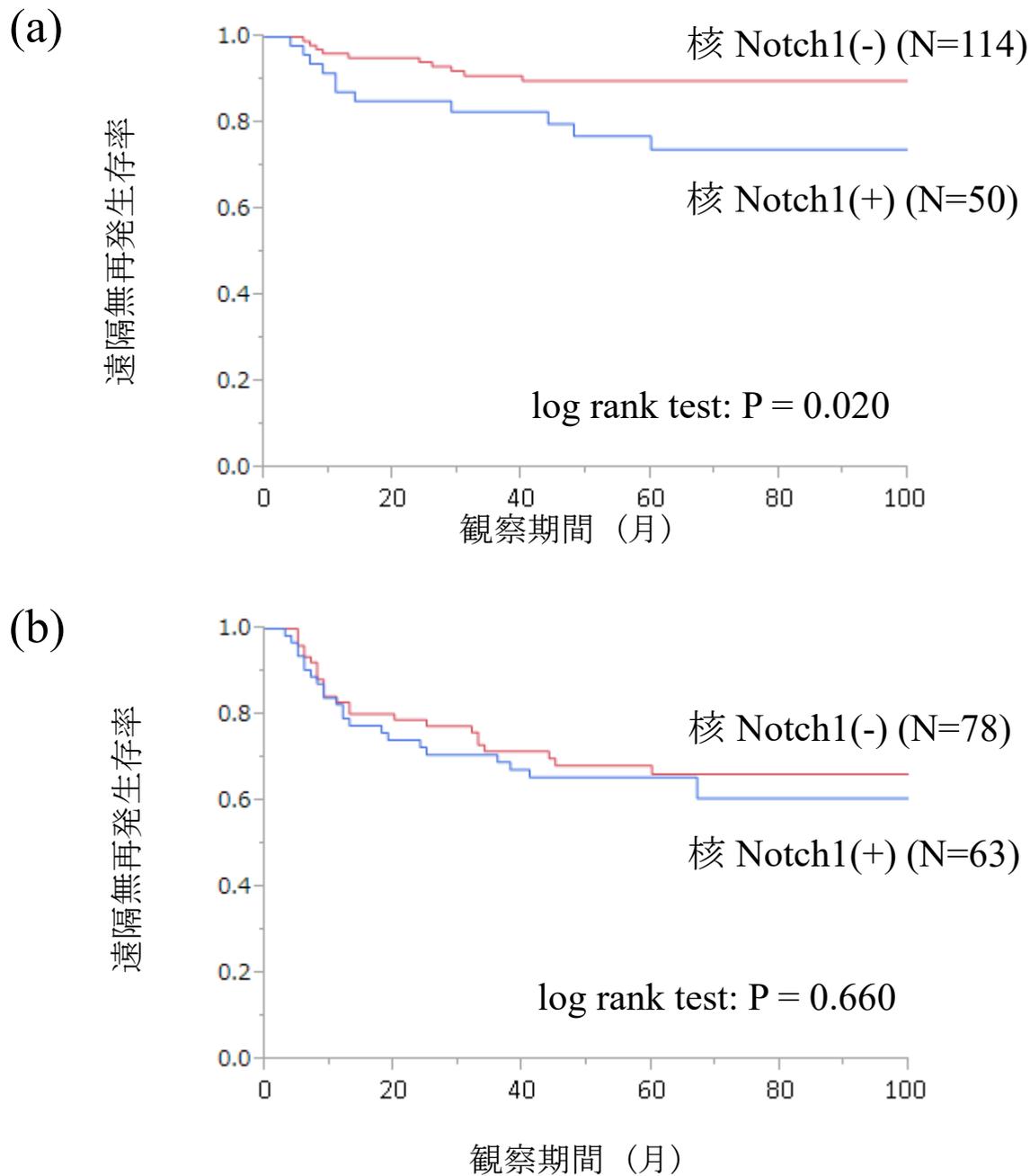


図 13 (a) Stage II 症例においては、核 Notch1 蛋白発現陰性群は陽性群と比較して有意に遠隔無再発生存率が良好であった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.020$ 、log rank test)

(b) Stage III 症例においては、核 Notch1 蛋白発現と遠隔無再発生存率の間に統計学的に有意な関係は認められなかった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.660$ 、log rank test)

5.5 小括(1)

- (1) 核における Notch3 蛋白、Notch1 蛋白は、20%を cut-off とすると、それぞれ 38%、37%の症例で陽性であった。
- (2) 臨床病理学的因子との比較においては、核 Notch3 蛋白発現は組織学的分化度と負の相関を認め、核 Notch1 蛋白発現はリンパ節転移と正の相関を認めた。一方、細胞質 Notch3 蛋白発現は、静脈侵襲と正の相関を認め、細胞質 Notch1 蛋白発現は静脈侵襲と正の相関を、組織学的分化度と負の相関を認めた。
- (3) 予後との比較においては、細胞質 Notch3、細胞質 Notch1 蛋白発現は全生存率、遠隔無再発生存率ともに統計学的な相関は認められなかった。

一方、核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白は共に遠隔無再発生存率と負の相関を認め、また Stage III 症例では統計学的に有意な相関は認められなかったものの、Stage II 症例において、遠隔無再発生存率と負の相関を認めた。全生存率とはいずれも統計学的に有意な相関は認められなかった。

6. 結果(2)

核 Notch3、核 Notch1 蛋白発現が共に dRFS と統計学的に有意な相関を認めたことから、核 Notch3、核 Notch1 蛋白共に陽性である症例(以下、核 Notch3(+)/Notch1(+群)と、核 Notch3 蛋白もしくは核 Notch1 蛋白のどちらか片方が陽性の群(以下、核 Notch3 or Notch1(+群)、核 Notch3、核 Notch1 蛋白共に陰性である症例(以下、核 Notch3(-)/Notch1(-群)の 3 群を比較検討した。

6.1 核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共発現と臨床病理学的因子の相関

核 Notch3 蛋白発現陽性 115 症例中、核 Notch1 蛋白発現症例は 67 症例(58%)であった一方、核 Notch3 蛋白発現陰性 190 症例中、核 Notch1 蛋白発現陽性症例は 46 症例(24%)であり、核 Notch3 蛋白発現と核 Notch1 蛋白発現に有意な正の相関を認めた($P < 0.0001$)。

核 Notch3(+)/Notch1(+群)は 67 症例(22%)に、核 Notch3 or Notch1(+群)は 94 症例(31%)に、核 Notch3(-)/Notch1(-群)は 144 症例(47%)に認めた。核 Notch3(+)/Notch1(+群、核 Notch3 or Notch1(+群、核 Notch3(-)/Notch1(-群)の臨床病理学的因子の相関は以下の表 5 に示す通りであった。

核 Notch3(-)/Notch1(-群、核 Notch3 or Notch1(+群と比較して、核 Notch3(+)/Notch1(+群では組織学的分化度が低い症例を有意に多く認めた($P = 0.031$)。また、核 Notch3(-)/Notch1(-群と比較して、核 Notch3 or Notch1(+群、核 Notch3(+)/Notch1(+群でリンパ節転移を有意に多く認めた($P = 0.015$)。さらに、遠隔再発の有無においては、核

Notch3(-)/Notch1(-)群では 18%に認めたのに対して、核 Notch3 or Notch1(+)群では 24%に、核 Notch3(+)/Notch1(+)群では 39%に認め、後者で有意に多いという結果であった(P = 0.006)。その他の臨床病理学的因子に統計学的に有意な相関は認められなかった。

表 5 核 Notch3、核 Notch1 蛋白共発現と臨床病理学的因子の比較検討

| 臨床病理学的因子 | 核 Notch3/核 Notch1 | | | P 値 |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| | 核 Notch3(-)/ 核 Notch1(-) | 核 Notch3 or 核 Notch1 (+) | 核 Notch3(+)/ 核 Notch1(+) | |
| 全症例 | 144 (47%) | 94 (31%) | 67 (22%) | |
| 性別 | | | | 0.707 |
| 男性 | 55 (38%) | 41 (44%) | 27 (40%) | |
| 女性 | 89 (62%) | 53 (56%) | 40 (60%) | |
| 年齢 (歳) | | | | |
| 平均±(標準偏差) | 67 ± 11 | 65 ± 11 | 69 ± 12 | 0.750 |
| 腫瘍占拠部位 | | | | 0.524 |
| 右側結腸 | 50 (35%) | 37 (39%) | 23 (34%) | |
| 左側結腸 | 47 (33%) | 35 (37%) | 27 (40%) | |
| 直腸 | 47 (33%) | 22 (23%) | 17 (25%) | |
| 腫瘍深達度 | | | | 0.188 |
| T1-2 | 7 (5%) | 10 (11%) | 3 (4%) | |
| T3-4 | 137 (95%) | 84 (89%) | 64 (96%) | |
| 組織学的分化度 | | | | 0.031 |
| 高分化 | 81 (56%) | 40 (43%) | 27 (40%) | |
| 中分化 | 55 (38%) | 46 (49%) | 29 (43%) | |
| 低分化 | 8 (6%) | 8 (9%) | 11 (16%) | |
| リンパ管侵襲 | | | | 0.973 |
| 陰性 | 101 (70%) | 65 (69%) | 46 (69%) | |
| 陽性 | 43 (30%) | 29 (31%) | 21 (31%) | |
| 静脈侵襲 | | | | 0.176 |
| 陰性 | 49 (34%) | 35 (37%) | 16 (24%) | |
| 陽性 | 95 (66%) | 59 (63%) | 51 (76%) | |
| リンパ節転移 | | | | 0.015 |
| 陰性 | 90 (63%) | 43 (46%) | 31 (46%) | |
| 陽性 | 54 (38%) | 51 (54%) | 36 (54%) | |
| 再発 | | | | |
| 無し | 118 (82%) | 71 (76%) | 41 (61%) | |
| 有り | 26 (18%) | 23 (24%) | 26 (39%) | |

6.2 核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共発現と生存曲線

核 Notch3、Notch1 蛋白共発現と、OS、dRFS の相関を Kaplan-Meier 法を用いて検討し、核 Notch1 蛋白発現が核 Notch3 蛋白発現に上乗せ効果が認められるかを検討した。核 Notch3(+)/Notch1(+)_群、核 Notch3 or Notch1(+)_群、核 Notch3(-)/Notch1(-)_群の 3 群を比較検討した。

核 Notch3(+)/Notch1(+)_群、核 Notch3 or Notch1(+)_群、核 Notch3(-)/Notch1(-)_群で、5 年全生存率はそれぞれ 88%、85%であり、91%であり、OS に統計学的有意差は認められなかった($P = 0.186$ 、log rank test、図 14)。一方、5 年遠隔無再発生存率は、核 Notch3(+)/Notch1(+)_群、核 Notch3 or Notch1(+)_群、核 Notch3(-)/Notch1(-)_群でそれぞれ 62%、76%、83%であり、核 Notch3(-)/Notch1(-)_群で有意に dRFS が良好であるとの結果であった($P = 0.005$ 、log rank test、図 15)。また核 Notch 3 or Notch1(+)_群と核 Notch3(+)/Notch1(+)_群のみを比較すると、統計学的有意差は認められなかったものの、核 Notch3(+)/Notch1(+)_群と比較して核 Notch3 or Notch1(+)_群で dRFS が良好な傾向を認めた ($p = 0.065$ 、log rank test、図 15)。

図 14 核 Notch3、Notch1 蛋白発現と全生存率との相関:Kaplan-Meier 法

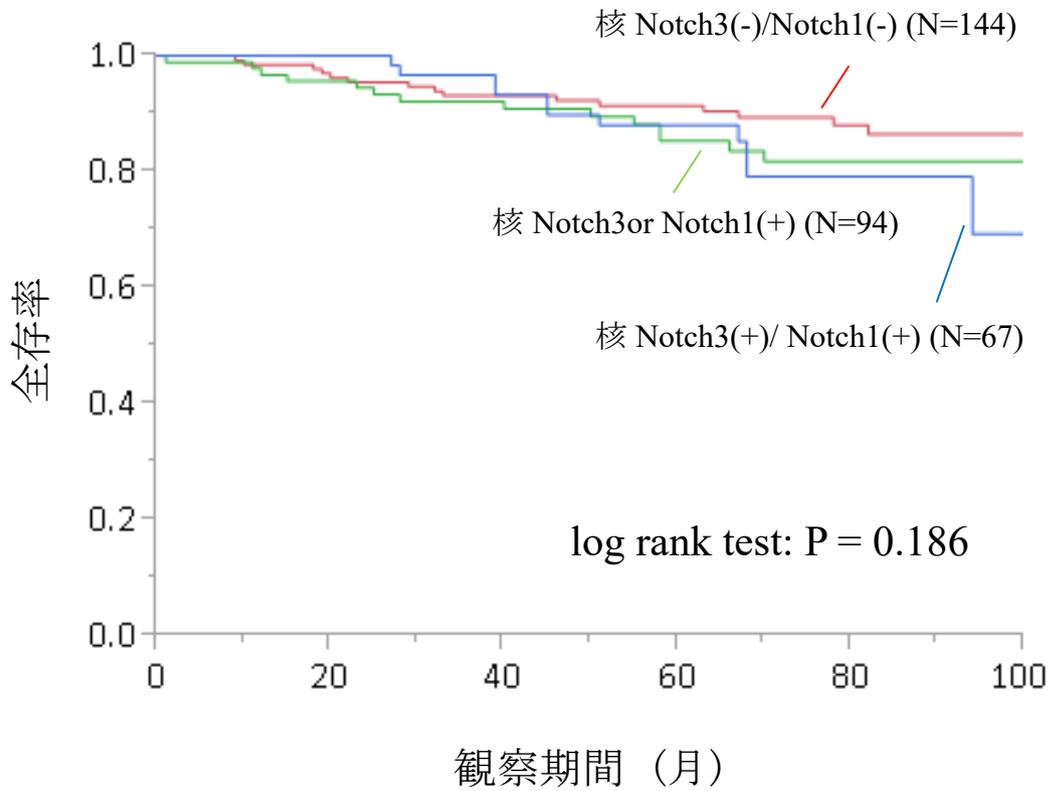


図 14 核 Notch3 蛋白、核 Notch1 共に陽性群、どちらか片方が陽性の群、共に陰性群それぞれの全生存率を描いたグラフ。
それぞれの群で全生存率に統計学的有意差は認められなかった
($P = 0.186$, log rank test)

図 15 核 Notch3、Notch1 蛋白発現と遠隔無再発生存率との相関:Kaplan-Meier 法

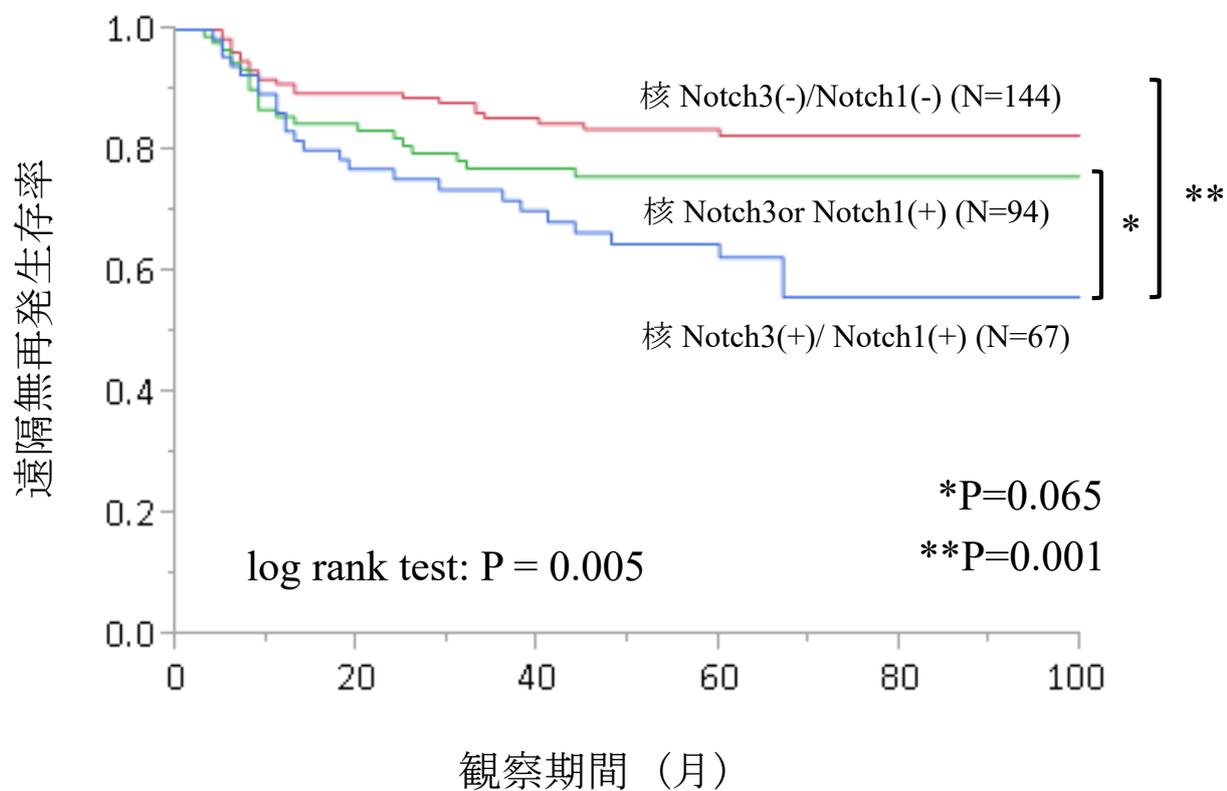


図 15 核 Notch3 蛋白、核 Notch1 共陽性群、どちらか片方が発現している群、共に陰性群それぞれの遠隔無再発生存率を描いたグラフ。
共発現群と比較して、共陰性群では有意に遠隔無再発生存率が良好であった(P = 0.001)。どちらか片方が陽性の群は遠隔無再発生存率が良好である傾向を認めた(P = 0.065)。

6.3 小括(2)

- (1) 核 Notch3、核 Notch1 蛋白が共に陽性の症例は 22%に、どちらか片方が陽性の症例は 31%に、共に陰性の症例は 47%に認めた。
- (2) 臨床病理学的因子との比較において、核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共陽性は組織的分化度と負の相関を、リンパ節転移と正の相関を認めた。
- (3) 予後との比較において、核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共陽性群は共陰性群と比較して遠隔無再発生存率と負の相関を認めた。また、どちらか片方が陽性の群においても共陰性群と比較して遠隔無再発生存率が良好である傾向を認めた。全生存率とは統計学的に有意な相関は認められなかった。

7. 結果(3)

7.1 遠隔無再発生存率の単変量解析

遠隔無再発生存率に影響を与える因子を、全体、Stage II、Stage III のそれぞれにおいて、Cox ハザードモデルを用いて検討した。まず、全体において単変量解析にて検討すると、表 6 に示す結果が得られた。統計学的に有意な臨床病理学的因子は、リンパ管侵襲陽性(HR: 1.68、95%CI: 1.03-2.69、P = 0.036)、静脈侵襲陽性(HR: 3.77、95%CI: 1.97-8.15、P < 0.0001)、リンパ節転移陽性(HR: 2.65、95%CI: 1.62-4.48、P < 0.0001)、核 Notch1 蛋白発現陽性(HR: 1.71、95%CI: 1.07-2.76、P = 0.026)核 Notch3 蛋白発現陽性(HR: 1.92、95%CI: 1.20-3.09、P = 0.007)の 5 つの因子であった。

次に Stage II 症例、Stage III 症例それぞれにおいて同様に単変量解析で検討したところ、表 7 に示す結果を得た。Stage II では統計学的に有意な臨床病理学的因子は、静脈侵襲陽性(HR: 5.13、95%CI: 1.75-21.9、P = 0.002)、細胞質 Notch3 蛋白発現陽性(HR: 5.32、95%CI: 1.11-95.4、P = 0.034)、核 Notch1 蛋白発現陽性(HR: 2.66、95%CI: 1.12-6.39、P = 0.027)、核 Notch3 蛋白発現陽性(HR: 3.60、95%CI: 1.54-9.01、P = 0.003)の 4 つの因子であった。一方 Stage III では統計学的に有意な臨床病理学的因子は、静脈侵襲陽性(HR: 2.26、95%CI: 1.04-5.92、P = 0.039)のみであった。

また表には示していないものの全体において、核 Notch3(+)/Notch1(+)^{は核 Notch3(-)/Notch1(-)}と比較して、単変量解析にて HR: 2.53 (95%CI: 1.43-4.49、P = 0.002)であり、Stage II、III 別々に検討すると、Stage II 症例では HR: 5.56 (95%CI: 1.92-18.12、P =

0.002)と統計学的に有意な因子であったが、Stage III 症例では HR: 1.38 (95%CI: 0.70-2.71、P = 0.353)であり、統計学的に有意な因子ではなかった。

表 6 遠隔無再発生存率の単変量解析 (全体)

| 臨床病理学的因子 | HR | 95% CI | P 値 |
|---------------|------|-------------|--------|
| 性別 | | | |
| 男性 | 1 | - | - |
| 女性 | 0.93 | 0.57 - 1.49 | 0.753 |
| 年齢 (歳) | | | |
| < 60 | 1 | - | - |
| ≥ 60 | 0.86 | 0.51 - 1.51 | 0.862 |
| 腫瘍占拠部位 | | | |
| 右側結腸 | 1 | - | - |
| 左側結腸 | 0.90 | 0.51 - 1.59 | 0.722 |
| 直腸 | 1.03 | 0.57 - 1.84 | 0.916 |
| 腫瘍深達度 | | | |
| T1-2 | 1 | - | - |
| T3-4 | 0.69 | 0.32 - 1.78 | 0.405 |
| 組織学的分化度 | | | |
| 高分化/中分化 | 1 | - | - |
| 低分化 | 0.98 | 0.38 - 2.09 | 0.968 |
| リンパ管侵襲 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.68 | 1.03 - 2.69 | 0.036 |
| 静脈侵襲 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 3.77 | 1.97 - 8.15 | <.0001 |
| リンパ節転移 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 2.65 | 1.62 - 4.48 | <.0001 |
| 術後補助化学療法 | | | |
| 無し | 1 | - | - |
| 有り | 0.95 | 0.51 - 1.66 | 0.867 |
| 細胞質 Notch1 蛋白 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.25 | 0.75 - 2.17 | 0.403 |
| 核 Notch1 蛋白 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.72 | 1.07 - 2.76 | 0.026 |

| | | | |
|---------------|------|-------------|-------|
| 細胞質 Notch3 蛋白 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.26 | 0.72 - 2.36 | 0.431 |
| 核 Notch3 蛋白 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.92 | 1.20 - 3.09 | 0.007 |

表 7 遠隔無再発生存率の単変量解析 (Stage 別)

| 臨床病理学的因子 | Stage II | | | Stage III | | |
|---------------|----------|-------------|-------|-----------|-------------|-------|
| | HR | 95%CI | P 値 | HR | 95%CI | P 値 |
| 性別 | | | | | | |
| 男性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 女性 | 0.95 | 0.39- 2.21 | 0.910 | 0.96 | 0.52- 1.70 | 0.887 |
| 年齢 (歳) | | | | | | |
| < 60 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| ≥ 60 | 0.60 | 0.25 - 1.57 | 0.282 | 1.07 | 0.57- 2.21 | 0.833 |
| 腫瘍占拠部位 | | | | | | |
| 右側結腸 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 左側結腸 | 1.52 | 0.57 - 4.48 | 0.408 | 0.72 | 0.35 - 1.42 | 0.340 |
| 直腸 | 1.24 | 0.39 - 3.98 | 0.705 | 0.94 | 0.47 - 1.85 | 0.863 |
| 腫瘍深達度 | | | | | | |
| T1-2 | | | | 1 | - | - |
| T3-4 | | | | 1.09 | 0.50 - 2.85 | 0.850 |
| 組織学的分化度 | | | | | | |
| 高分化/中分化 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 低分化 | 0.44 | 0.02 - 2.10 | 0.362 | 1.4 | 0.48 - 3.22 | 0.495 |
| リンパ管侵襲 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 0.42 | 0.07 - 1.45 | 0.191 | 1.76 | 1.00 - 3.16 | 0.051 |
| 静脈侵襲 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 5.13 | 1.75 - 21.9 | 0.002 | 2.26 | 1.04 - 5.92 | 0.039 |
| 術後補助化学療法 | | | | | | |
| 無し | | | | 1 | - | - |
| 有り | | | | 0.65 | 0.34 - 1.18 | 0.162 |
| 細胞質 Notch1 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 0.68 | 0.29 - 1.67 | 0.389 | 1.13 | 0.64 - 2.00 | 0.662 |
| 核 Notch1 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 2.66 | 1.12 - 6.39 | 0.027 | 1.62 | 0.84 - 3.45 | 0.154 |
| 細胞質 Notch3 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 5.32 | 1.11 - 95.4 | 0.034 | 1.04 | 0.56 - 2.03 | 0.912 |

| | | | | | | |
|-------------|------|-------------|-------|------|-------------|-------|
| 核 Notch3 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 3.60 | 1.54 - 9.01 | 0.003 | 1.27 | 0.72 - 2.24 | 0.411 |

7.2 遠隔無再発生存率の多変量解析

まず全体において単変量解析にて P 値 < 0.05 を得たリンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、リンパ節転移の有無、核 Notch1 蛋白発現の有無、核 Notch3 蛋白発現の有無の 5 つの臨床病理学的因子を、Cox ハザードモデルを用いて多変量解析したところ、表 8 に示す結果を得た。最終的に静脈侵襲陽性(HR: 2.85、95%CI: 1.47-6.25、P = 0.001)、リンパ節転移陽性(HR: 2.09、95%CI: 1.24-3.63、P = 0.005)の 2 つの臨床病理学的因子が統計学的に有意に遠隔無再発生存率に影響を与える因子であるという結果であった。

次に Stage II 症例において同様に、単変量解析にて P 値 < 0.05 を得た静脈侵襲の有無、核 Notch1 蛋白発現の有無、細胞質 Notch3 蛋白発現の有無、核 Notch3 蛋白発現の有無の 4 つの臨床病理学的因子を、Cox ハザードモデルを用いて多変量解析したところ、表 9 に示す結果を得た。Stage II 症例においては、静脈侵襲陽性(HR: 3.90、95%CI: 1.30-16.8、P = 0.013)、核 Notch3 蛋白発現陽性(HR: 2.78、95%CI: 1.01-8.13、P = 0.049)の 2 つの臨床病理学的因子が統計学的に有意に遠隔無再発生存率に影響を与える因子であるという結果であった。

また、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、リンパ節転移の有無、核 Notch3/Notch1 共発現の 4 つの臨床病理学的因子を、Cox ハザードモデルを用いて多変量解析すると、核 Notch3(+)/Notch1(+)¹は核 Notch3(-)/Notch1(-)²と比較して、HR: 2.48 (CI: 1.44-9.22、P = 0.006)であった。さらに Stage II において、静脈侵襲の有無、核 Notch3/Notch1 共発現の 2

つの臨床病理学的因子を多変量解析すると、核 Notch3(+)/Notch1(+)
は核 Notch3(-)/Notch1(-)と比較して、HR: 4.99 (CI: 1.72-16.3、P = 0.003)であった。

表 8 遠隔無再発生存率の多変量解析 (全体)

| 臨床病理学的因子 | HR | 95% CI | P 値 |
|-------------|------|-------------|--------------|
| リンパ管侵襲 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.25 | 0.75 - 2.04 | 0.387 |
| 静脈侵襲 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 2.85 | 1.47 - 6.25 | 0.001 |
| リンパ節転移 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 2.09 | 1.24 - 3.63 | 0.005 |
| 核 Notch1 蛋白 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.29 | 0.77 - 2.15 | 0.330 |
| 核 Notch3 蛋白 | | | |
| 陰性 | 1 | - | - |
| 陽性 | 1.57 | 0.94 - 2.62 | 0.083 |

表 9 遠隔無再発生存率の多変量解析 (Stage 別)

| 臨床病理学的因子 | Stage II | | | Stage III | | |
|---------------|----------|-------------|--------------|-----------|-------------|--------------|
| | HR | 95% CI | P 値 | HR | 95% CI | P 値 |
| 静脈侵襲 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| 陽性 | 3.90 | 1.30 - 16.8 | 0.013 | 2.26 | 1.04 - 5.92 | 0.039 |
| 核 Notch1 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | - | - | - |
| 陽性 | 1.60 | 0.61 - 4.32 | 0.339 | - | - | - |
| 細胞質 Notch3 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | - | - | - |
| 陽性 | 3.75 | 0.77 - 67.8 | 0.117 | - | - | - |
| 核 Notch3 蛋白 | | | | | | |
| 陰性 | 1 | - | - | - | - | - |
| 陽性 | 2.78 | 1.01 - 8.13 | 0.049 | - | - | - |

7.3 小括(3)

- (1) Stage II、Stage III 全症例において、遠隔無再発生存率に影響を与える因子は多変量解析で、静脈侵襲、リンパ節転移の2つであった。
- (2) Stage II 症例においては、遠隔無再発生存率に影響を与える因子は多変量解析で、静脈侵襲、核 Notch3 蛋白発現の2つであった。
- (3) Stage III 症例においては、遠隔無再発生存率に影響を与える因子は静脈侵襲のみであった。
- (4) 遠隔再発において、核 Notch3、核 Notch1 共陽性群は Stage II、Stage III 全症例において独立した因子であり、さらに Stage II においても HR 4.99 と核 Notch3 蛋白発現単独と比較して高く、核 Notch3、核 Notch1 蛋白の両者の発現をみることで上乗せ効果があると考えられた。

8. 結果(4)

8.1 患者背景

GSE14333、Stage II-III 185 症例(Stage II: 94 症例、Stage III:91 症例)の患者背景は男性 98 症例(53%)、女性 87 症例(47%)で、癌占拠部位は右側結腸 85 症例(46%)、左側結腸 77 症例(42%)、直腸 22 症例(12%)、部位不明 1 症例(1%)であった。そのうち Stage II 14 症例(15%)、Stage III 34 症例(37%)に再発を認めた。GSE17538、Stage II-III 148 症例(Stage II: 72 症例、Stage III:76 症例)の患者背景は男性 73 症例(49%)、女性 75 症例(51%)であり、組織学的分化度は、高分化型腺癌 11 症例(6%)、中分化型腺癌症例 105 症例(71%)、低分化型腺癌 19 症例(13%)、不明 13 症例(9%)であった。さらに追跡期間の中央値は 50.5 ヶ月であり、Stage II 11 症例(15%)に、Stage III 21 症例(28%)に再発を認めた。GSE17538、Stage IV 56 症例の患者背景は男性 30 症例(54%)、女性 26 症例(46%)であり、組織学的分化度は、高分化型腺癌 1 症例(2%)、中分化型腺癌症例 39 症例(70%)、低分化型腺癌 11 症例(20%)、不明 5 症例(9%)であった。

8.2 Notch1 mRNA、Notch3 mRNA 発現と再発、生存率との相関

Notch mRNA 発現と、OS、無再発生存期間(DFS:disease-free survival)の相関を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。

8.2.1 GSE14333 における検討

GSE14333 においては、DFS のみ検討が可能であった。

Notch3 mRNA 高発現群と低発現群において 5 年無再発生存率はそれぞれ 62%、84% であり、Notch3 mRNA 低発現群において有意に DFS が良好であるとの結果であった($P = 0.004$, log rank test、図 16a)。一方、Notch1 mRNA 高発現群と低発現群において 5 年無再発生存率はそれぞれ 82%、62% であり、Notch1 mRNA 高発現群で統計学的に有意に DFS が良好であるとの結果であった($P = 0.004$, log rank test、図 16b)。

8.2.2 GSE17538 における検討

GSE17538 における Stage 別の Notch3 mRNA 発現量は図のようであった。Stage I と比較して、Stage III、Stage IV で Notch3 mRNA 発現量が増加する傾向が認められたものの、統計学的に有意ではなかった(それぞれ $P = 0.058$ 、 $P = 0.082$ 、Student-t test、図 17)。

GSE17538 においては、OS、DFS 両方の情報を得ることができた。

Stage II-III での Notch3 mRNA 高発現群と低発現群における 5 年全生存率はそれぞれ 76%、87% であり、Notch3 mRNA 低発現群で、高発現群と比較して OS が良好な傾向を認めた($P = 0.115$, log rank test、図 18a)。一方、Notch1 mRNA 高発現群と低発現群において 5 年全生存率はそれぞれ 78%、85% であり、Notch1 mRNA 発現と OS に統計学的に有意な相関は認められなかった($P = 0.322$ 、log rank test、図 18b)。

Stage II-III での Notch3 mRNA 高発現群と低発現群における 5 年無再発生存率はそれぞれ 65%、90% であり、Notch3 mRNA 低発現群において有意に DFS が良好であるとの結果であった($P = 0.001$, log rank test、図 19a)。一方、Notch1 mRNA 高発現群と低発現群に

において5年無再発生存率はそれぞれ71%、82%であったが、Notch1 mRNA 発現とDFSに統計学的に有意な相関は認められなかった($P = 0.223$ 、log rank test、図 19b)。

Stage IV での Notch3 mRNA 高発現群と低発現群における5年無再発生存率はそれぞれ11%、20%であり、Notch3 mRNA 低発現群において有意にDFSが良好であるとの結果であった($P = 0.046$ 、log rank test、図 20a)。一方、Notch1 mRNA 高発現群と低発現群における5年無再発生存率はそれぞれ19%、15%であり、Notch1 mRNA 発現とOSに統計学的に有意な相関は認めなかった($P = 0.275$ 、log rank test、図 20b)。

図 16 GSE14333 における Notch3 mRNA 発現、Notch1 mRNA 発現と
無再発生存率の相関: Kaplan-Meier 法

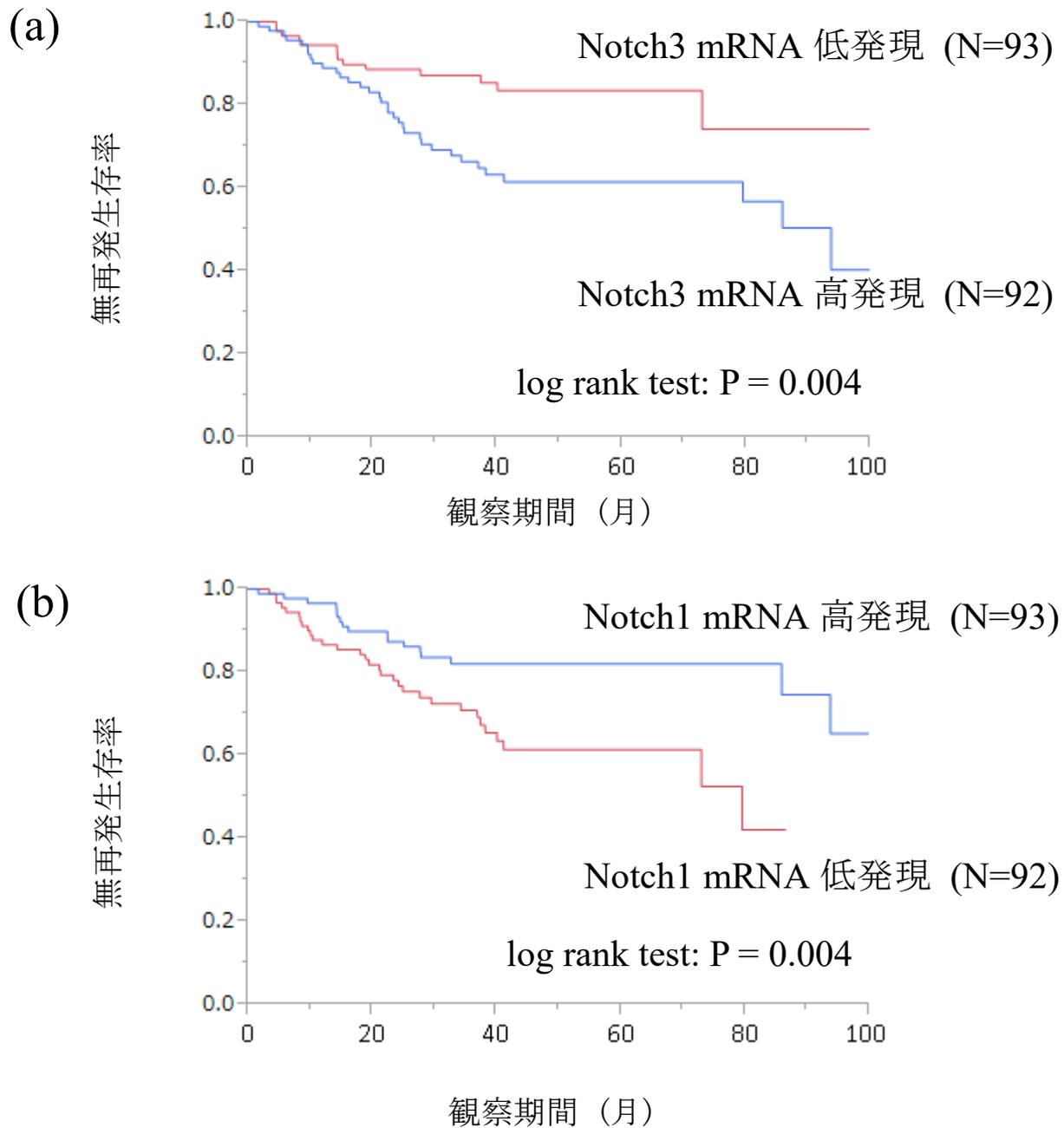


図 16 (a) Notch3 mRNA 高発現群は低発現群と比較して有意に無再発生存率が不良であった (Kaplan-Meier 法、P = 0.004、log rank test)
(b) Notch1 mRNA 高発現群は低発現群と比較して有意に無再発生存率が良好であった (Kaplan-Meier 法、P = 0.004、log rank test)

図 17 GSE17538 における Stage ごとの Notch3 mRNA 量

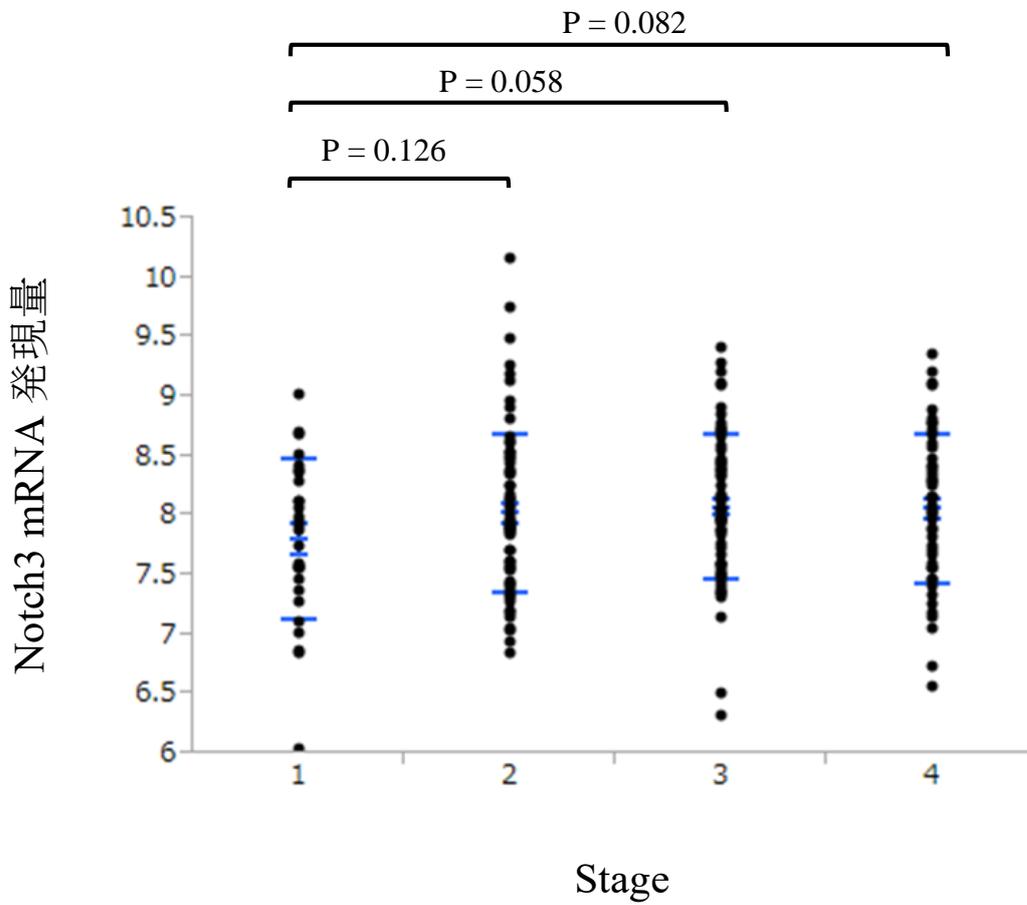


図 17 GSE17538 における Stage ごとの Notch3 mRNA 発現量を比較したところ、Stage I と比較して、Stage III、Stage IV で Notch3 mRNA 発現量が増加する傾向が認められたものの、統計学的に有意ではなかった(それぞれ $P = 0.058$ 、 $P = 0.082$ 、Student-t test)。

図 18 GSE17538 における Notch3 mRNA 発現、Notch1 mRNA 発現と全生存率の相関: Kaplan-Meier 法 (Stage II-III)

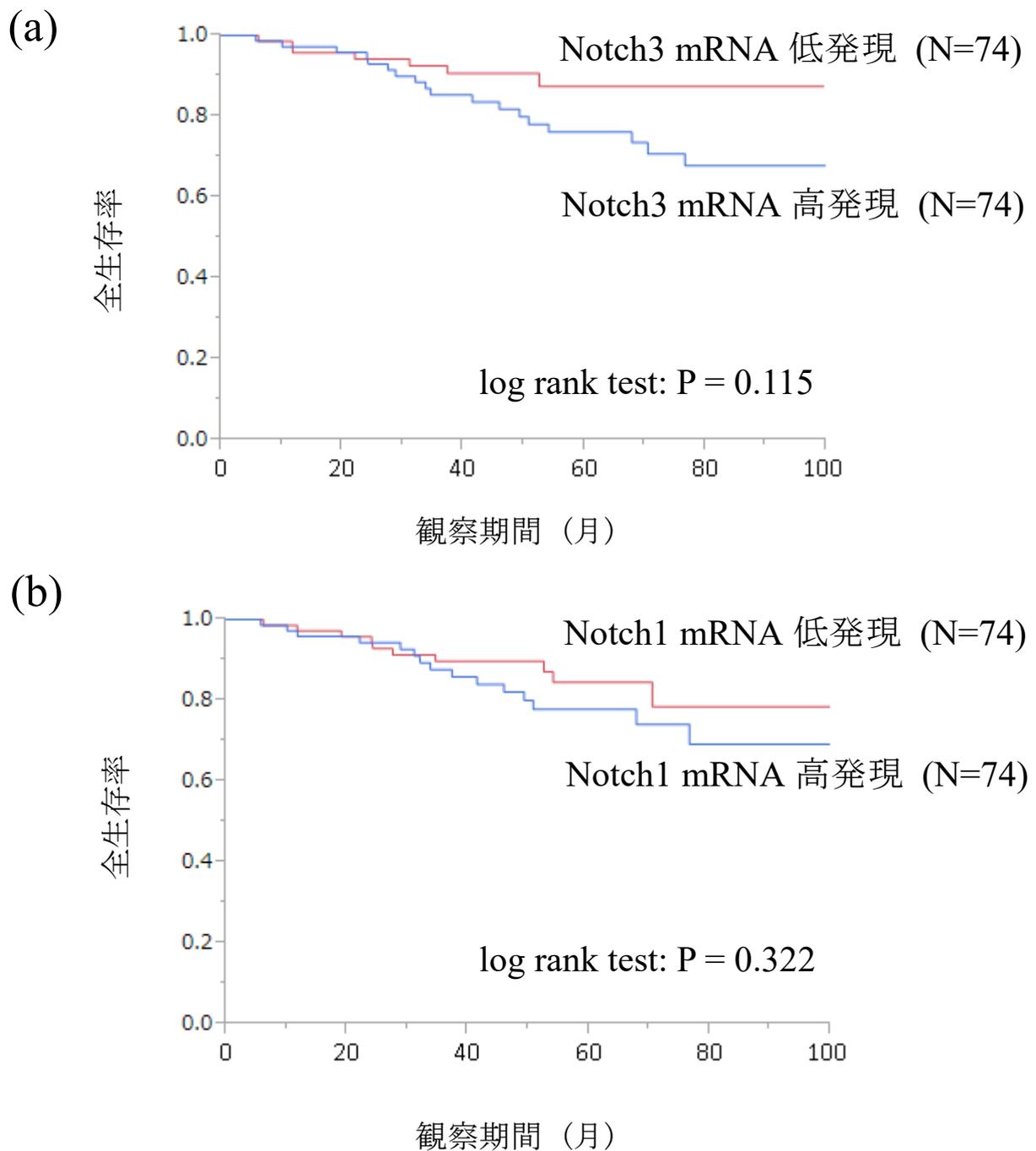


図 18 (a) Notch3 mRNA 低発現群は高発現群と比較して全生存率が良好な傾向を認めた (Kaplan-Meier 法、P = 0.115、log rank test)。
(b) Notch1 mRNA 発現と全生存率に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.332、log rank test)。

図 19 GSE17538 における Notch3 mRNA 発現、Notch1 mRNA 発現と
無再発生存率の相関: Kaplan-Meier 法 (Stage II-III)

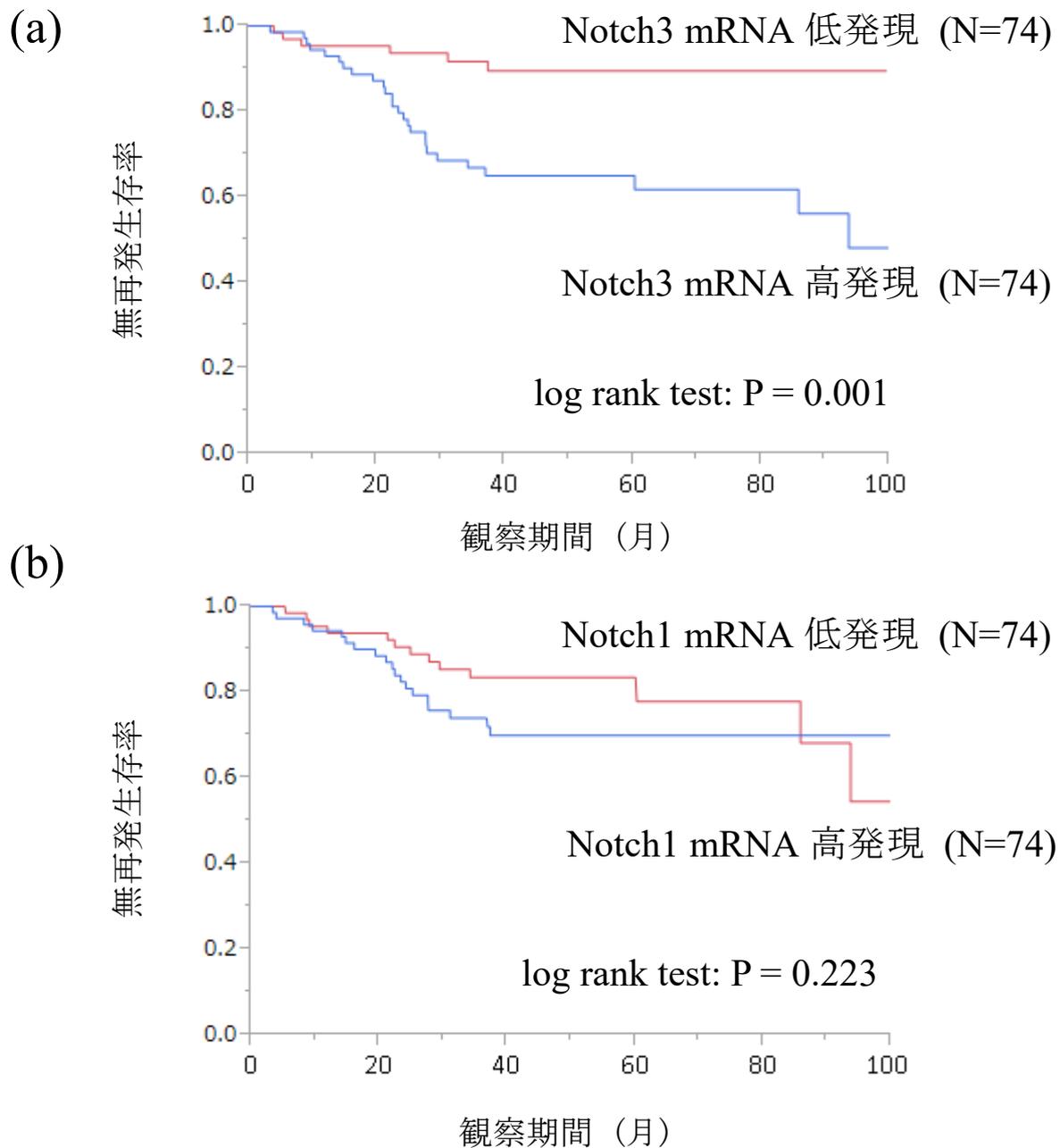


図 19 (a) Notch3 mRNA 低発現群は高発現群と比較して無再発生存率が有意に良好であった (Kaplan-Meier 法、P = 0.001、log rank test)。
(b) Notch1 mRNA 発現と無再発生存率に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、P = 0.223、log rank test)

図 20 GSE17538 における Notch3 mRNA 発現、Notch1 mRNA 発現と
全生存率の相関: Kaplan-Meier 法 (Stage IV)

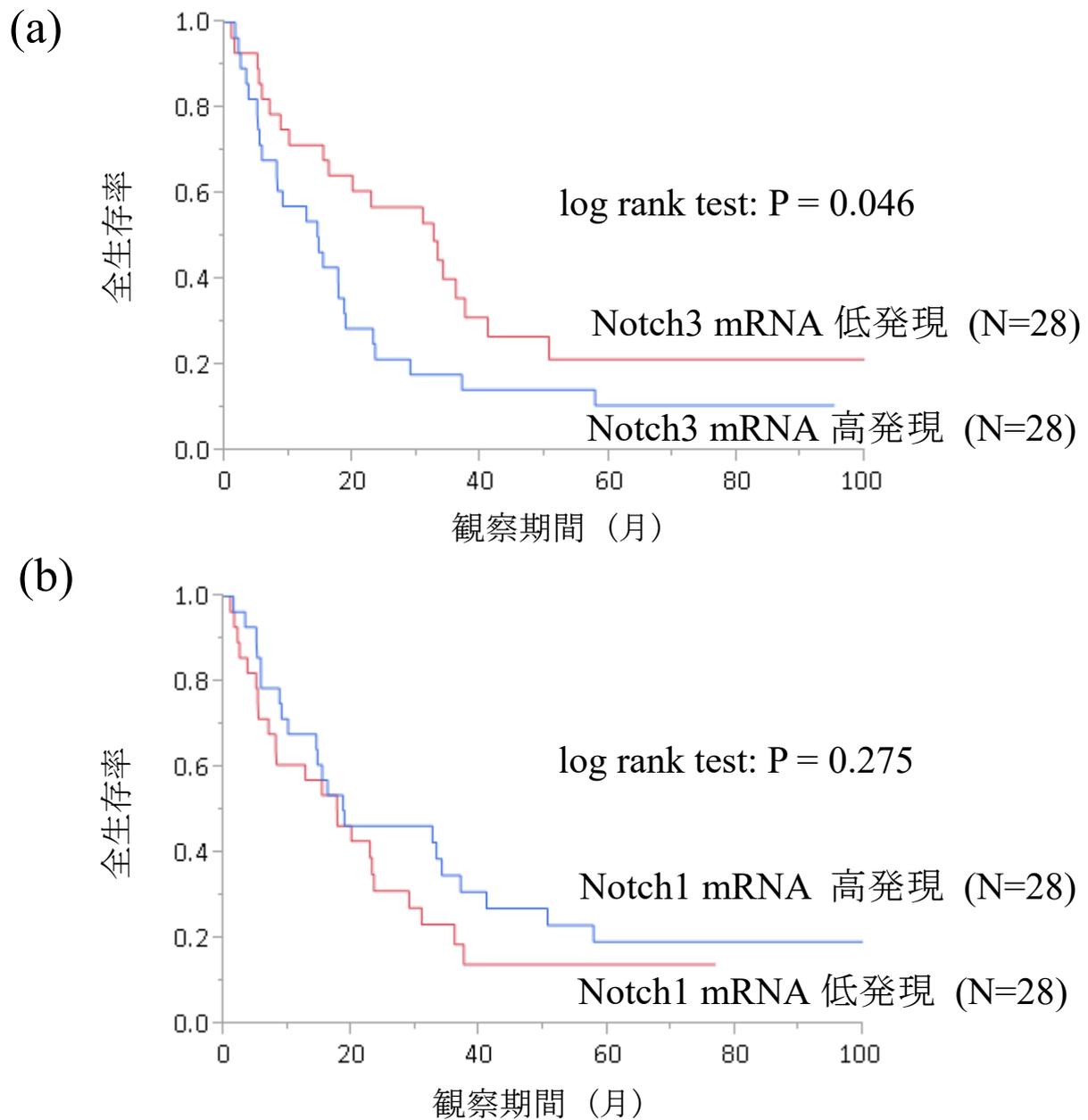


図 20

- (a) Notch3 mRNA 低発現群は高発現群と比較して全生存率が有意に良好であった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.046$ 、log rank test)。
- (b) Notch1 mRNA 発現と全生存率に統計学的に有意な相関は認められなかった (Kaplan-Meier 法、 $P = 0.275$ 、log rank test)。

8.3 小括(4)

- (1) Notch3 mRNA 発現は 2 つの public database で Stage II-III において無再発生存率と負の相関を認めた。全生存率に関しては 1 つの database において統計学的に有意でないものの、負の相関がある傾向を認めた。
- (2) Notch1 mRNA 発現は 1 つの database で Stage II-III において無再発生存率と正の相関を認めたものの、他方においては統計学的に有意な相関は認められなかった。全生存率に関しては統計学的に有意な相関は認められなかった。
- (3) Stage IV において、Notch3 mRNA 発現は全生存率と負の相関を認めた。一方、Notch1 mRNA 発現は全生存率と統計学的に有意な相関は認められなかった。

9. 考察

本研究において、我々は免疫染色の手法を用いて、大腸癌組織標本における Notch3 蛋白、Notch1 蛋白発現を検討したが、その結果、Notch3 蛋白発現は大腸癌において遠隔再発に関与することが示唆された。さらに、細胞質ではなく、核における Notch3 蛋白発現の検討が重要であることが示唆された。このことは、Notch シグナルが核に移行した NICD により target となる遺伝子の翻訳が引き起こされることを考えると、妥当な結果だと考えられる (図 21 参照)。

Serafin らはマウスにおける大腸癌細胞を用いた Xenograft モデルを用いて、Notch3 発現が腫瘍促進的働くことを示したが、今回の我々の検討の結果は、Serafine らの検討を臨床検体において支持する結果となった [55]。

Notch3 シグナルの他の癌種における検討として、Zhou らは肺癌において Notch3 蛋白発現を免疫染色、western blot 法にて検討し、腺癌、扁平上皮癌において周囲組織と比較し有意に発現が高いことを報告している [59]。Yeamin らは、子宮頸癌において免疫染色を用いて核 Notch3 蛋白発現を検討し、核 Notch3 発現を認める症例は認められない症例と比較し有意に予後が悪かったと報告している [60]。また、Docas らは膵臓癌において Notch3 蛋白、STAT3 蛋白、pSTAT3 蛋白、Cyclin D1 蛋白、pAkt 蛋白発現を、免疫染色を用いて検討し、核 Notch3 蛋白発現が有意に予後と逆相関し、また細胞内における Notch3 蛋白発現部位(核もしくは細胞質)と、STAT3 蛋白、pSTAT3 蛋白、pAkt 蛋白発現部位に有意な相関を認めたと報告している [61]。

図 21 Notch シグナルの評価部位

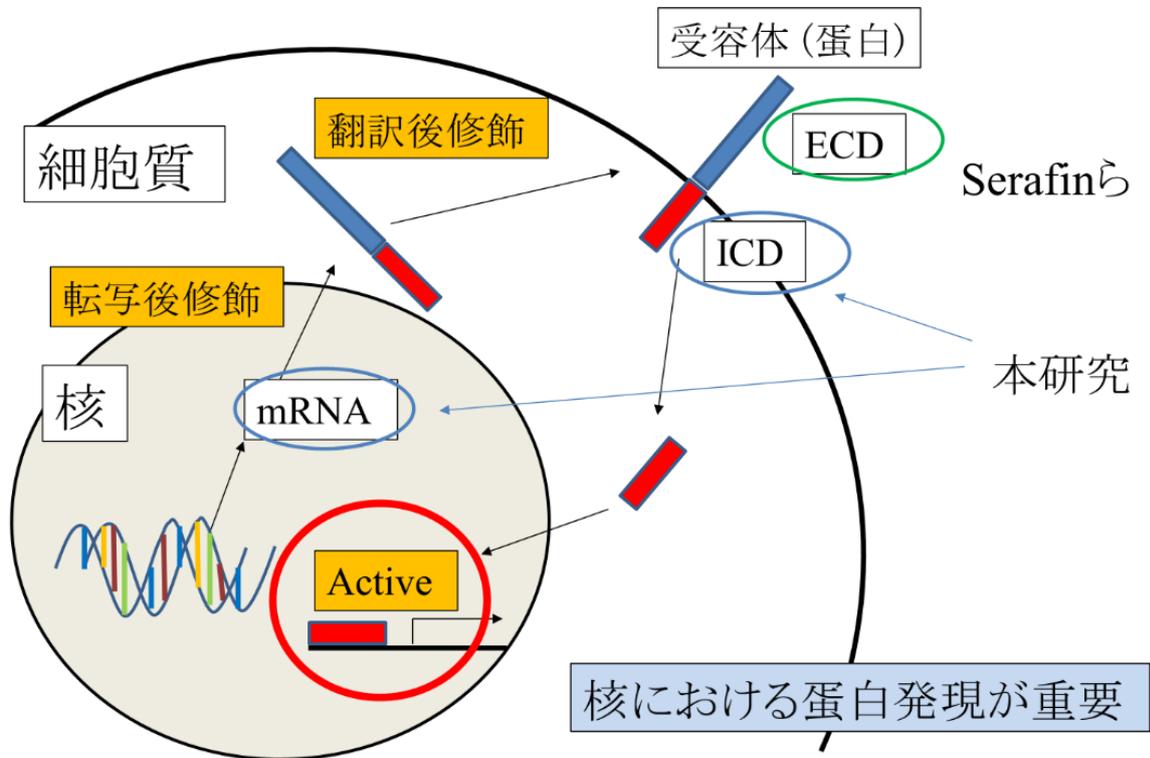


図 21

Notch シグナルと、その評価部位。本研究では、最終産物である核における Notch 蛋白発現を評価することが重要と考え、ICD に対する抗体を用いて評価した。

このように様々な癌種において Notch3 受容体が腫瘍促進的に働くことが報告されているが、本検討では特に遠隔転移再発への関与が認められた。この機序に関して、Sonoshita らは Notch シグナルが腫瘍細胞の局所浸潤と血管外遊走を促し、遠隔転移に関与すると報告している [62]。

また、Notch シグナルが正常腸管細胞において幹細胞の維持に重要な役割を持っていることは前述の通りであり、そこから想定されるように、Notch3 シグナルは癌幹細胞の維持にも重要な役割を果たすことが示唆されている [63-65]。癌幹細胞は化学療法耐性や放射線治療耐性にも関与していることが報告されており、Notch3 シグナルを抑制することで化学療法や放射線治療耐性を克服できる可能性が考えられる [66, 67]。

実際、Notch3 と化学療法耐性の関係については、Park らによる、卵巣癌において Notch3 蛋白発現がカルボプラチンの耐性に関与していることを示す報告や、Eto らによる、切除不可能膵臓癌において EUS-FNA (Endoscopic ultrasound-fine needle aspiration) 標本における Notch3 mRNA 発現が gemcitabine の効果予測に役立つことを示唆させる報告などがなされている [68, 69]。一方、Notch 受容体や、DLL1、DLL4、Jagged1 などの Notch リガンドは血管内膜にも発現しており、正常血管形成において重要な役割を果たすことが知られているが、Nougera-Troise らは、腫瘍組織において VEGF (Vascular endothelial growth factor) シグナルが Notch リガンドである DLL4 の発現を増やし、Notch シグナルを働かせることで腫瘍血管増生に結び付いたと報告している [70, 71]。Serafin らは大腸癌において、DLL4 が Notch3 シグナルに強く働きかけるリガンドであったと報告しており、VEGF を介した

Notch3 シグナルが腫瘍血管を増生させ、最終的に腫瘍増生因子として働くシグナル経路が存在すると想定される [55]。

さらには、Notch シグナルは正常腸管細胞で Wnt シグナルに関与することが示唆されているが、Wnt シグナルは β カテニンの蓄積に関与し、大腸癌の発癌、進展において初期の段階から重要な役割を持つシグナルである [72]。Chen らは卵巣癌での検討で、Wnt/ β カテニンシグナルが Notch リガンドの Jagged1 の発現を増強し、さらに Notch3 発現を増強させたと報告している [73]。また、Gopalakrishnan らは、癌細胞において β カテニンと NICD が細胞内で共局在することが、HES1 や CyclinD1 などのシグナルを発現させるのに重要であると報告している [74]。以上のように、Notch シグナルは他の様々なシグナルとの interaction があることが示唆され、今後のさらなる検討が必要であると考えられる (図 22 参照)。

本研究において我々は、Notch3 蛋白発現を、NICD に対する抗体を使用し、細胞質と核、それぞれ別に検討したが、核 Notch3 蛋白発現が遠隔無再発期間と有意な負の相関を示したのに対して、細胞質 Notch3 蛋白発現は統計学的に有意な相関は認められなかった。同様の結果は、Mann らの膵臓癌における Notch3 蛋白発現の検討でも認める [36]。Mann らは、92 人の膵癌症例において Notch3 蛋白発現を免疫染色にて検討し、細胞質 Notch3 蛋白発現が再発、予後と統計学的に有意な相関は認められなかったが、核 Notch3 蛋白発現は再発、予後と有意な負の相関を認めたと報告している。Mann ら、我々が、NICD に対する抗体を用いて検討した一方、Serafin らの大腸癌 158 症例における

図 22 癌における Notch と様々なシグナルのクロストーク

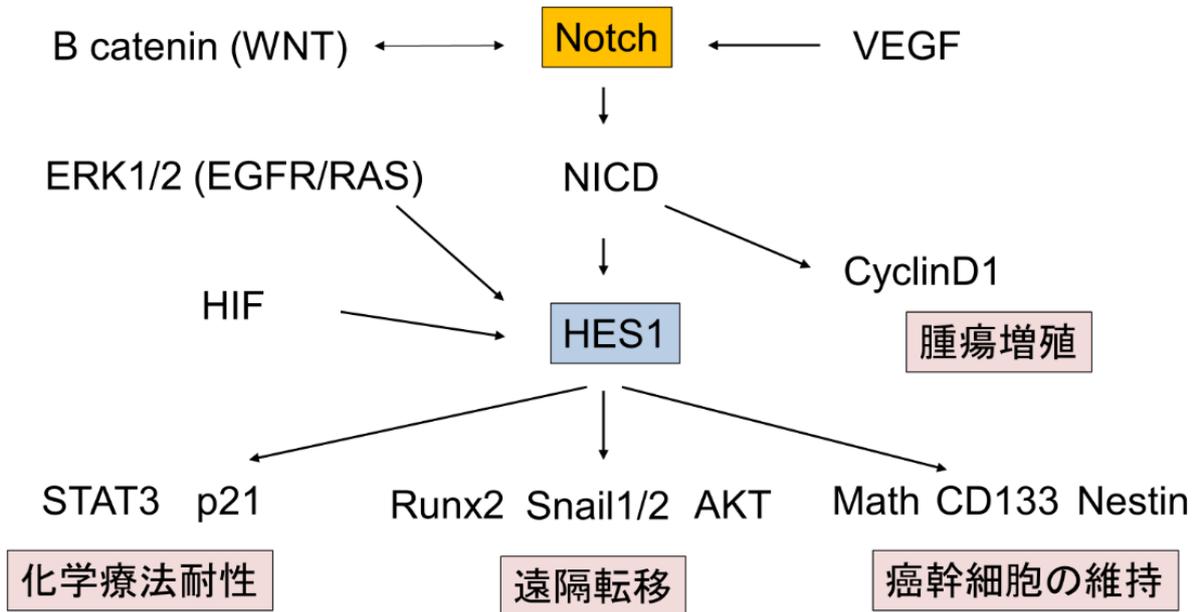


図 22

Notch シグナルは、様々なシグナルとの間にクロストークがあることが示唆されている。

NICD: Notch intracellular domain

VEGF: Vascular endothelial growth factor

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

EGFR: Epidermal growth factor receptor

HIF: Hypoxia-inducible factor

HES: Hairy-enhancer of split

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

Notch3 蛋白発現の検討では NICD ではなく NECD に対する抗体を用いて、核、細胞質 Notch3 蛋白発現を区別することなく検討しており、予後や臨床病理学的因子との相関が認められなかった一因と考えられた [55]。

また、本研究では Notch1 蛋白発現においても、細胞質における発現、核における発現を別々に検討し、Notch3 蛋白発現同様、細胞質における発現は予後との相関は認められなかったものの、核における発現は遠隔再発と有意な負の相関を認めた。既知の大腸癌における Notch1 蛋白発現の検討では、前述の通り Chu らが大腸癌切除検体 223 例において Notch1 蛋白発現を検討し臨床病理学的因子や予後との負の相関を示しているが、この検討では核における発現と細胞質における発現を区別せずに発現強度と範囲で検討している [42]。その後 Chu らはさらに 1003 例の大腸癌切除検体で、Notch1 蛋白発現と Notch2 蛋白発現を同時に検討し、Notch1 蛋白発現が大腸癌において腫瘍促進的に、Notch2 が腫瘍抑制的に働くことを示しているが、この検討においても核における発現と細胞質における発現の区別はなされておらず、さらなる検討の余地があると考えられる [44]。

Stage 別の検討では、核 Notch3 蛋白は Stage II 大腸癌において遠隔再発と有意な負の相関を認めたのに対して、Stage III 大腸癌においては統計学的に有意な相関は認められなかった。Notch シグナルは腺腫や早期段階の大腸癌において高発現しているが、進行した症例や転移を伴う症例など、後期段階においては低発現であることも報告されており、大腸癌において、Notch シグナルは比較的初期の段階で大腸癌の進展に関与しており、さらに進行した段階になると、他のシグナルの影響が強くなる、もしくは Notch シグナルを抑制

する因子の影響が強くなる可能性などが考えられるが、その機序も含め今後のさらなる検討の余地があると考えられる [27]。一方、本検討において public database GSE17538 を用いて Notch3 mRNA 発現量を Stage ごとで比較したが、Stage I 症例と比較して Stage III、Stage IV 症例で高くなる傾向が見られたものの、Stage 間での Notch3 mRNA 発現量に統計学的に有意な相関は認められなかった。

さらに本研究では、Notch3 蛋白発現に加えて Notch1 蛋白発現を評価することで、Notch3 蛋白発現と Notch1 蛋白発現の相関についても検討した。核 Notch3 蛋白発現と、核 Notch1 蛋白発現には有意な相関を認め、大腸癌においては正の相関があると考えられた。既知の報告では、Notch3 と Notch1 の間の相互関係については、controversial であり、Beatus らは Notch3 ICD と Notch1 ICD は RBP-J κ との結合において競合し、HES の翻訳を阻害し合うことを報告している [75]。一方、Ohashi らは、食道扁平上皮の分化において Notch1 ICD が Notch3 ICD の翻訳を直接活性化させ、HES5 や扁平上皮の分化マーカーである involucrin や cytokeratin13 などの発現を上昇させたと報告しており、Notch3 シグナルが Notch1 シグナルを増強することを示唆する報告をしている。同様に、Pasto らは大腸癌の細胞株において、Notch3 の高発現もしくは DLL4 による刺激が Notch1 シグナルを増強したと報告している [76, 77]。本研究では、遠隔再発における検討において、Notch3 蛋白、Notch1 蛋白共陽性群で Notch3 蛋白、Notch1 蛋白共陰性群と比較して有意に無再発生存期間の増悪を認めた他、遠隔無再発生存期間を予測する因子の多変量解析では、核 Notch3 蛋白陽性、核 Notch1 蛋白陽性が共に Stage II、Stage III 全症例で独立した因子で

なかったのに対して、核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共陽性群は独立した因子であり(HR: 2.48, CI: 1.44-9.22, P = 0.006)、さらに Stage II においては、核 Notch3 蛋白発現が HR2.78 (95%PI: 1.01-8.13, P = 0.049)であったのに対して、Notch3 蛋白、Notch1 蛋白共陽性群は核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共陰性群と比較して HR: 4.99 (CI: 1.72-16.3, P = 0.003)であり、核 Notch3 蛋白に加えて、核 Notch1 蛋白発現を検討することで、再発予測に対する上乘せ効果が認められると考えられ、Notch3 蛋白発現と Notch1 蛋白発現の両者を検討することが、臨床的により有用である可能性が示唆された。

加えて、本研究では、public database を元に、Notch3 mRNA 発現、Notch1 mRNA 発現が stage II、stage III 大腸癌の再発、予後に与える影響の検討を行った。結果、Notch3 mRNA 発現は 2 つの public database において共に再発と有意な負の相関を認め、また全生存率とは統計学的に有意な相関は認められず、核 Notch3 蛋白発現での検討と同様の結果となった。一方、Notch1 mRNA 発現は、GSE14333 では mRNA 発現量が高い症例において統計学的に再発が少ないとの結果であり、我々の Notch1 蛋白発現の検討、さらには他文献での検討と逆の結果が認められた。既存の報告では、Chu らが大腸癌における Notch1 mRNA の検討をしており、予後との相関は検討していないものの、Notch1 mRNA 発現が高い症例ほど分化度が低く、さらに腫瘍の進行度が高かったと報告しており、Notch1 mRNA が高い症例ほど予後が悪くなる傾向が示唆された [46]。既存の報告と、database を用いた検討が異なる結果を示した原因としては、cut-off 値の設定の問題や mRNA 測定における手技的な問題、また人種間における Notch 発現の違いなどが原因になり得ると考

えられるが、さらなる十分な検討が必要である。

また、mRNA 発現と蛋白発現の結果が異なる原因としては、本検討で示したように、Notch は核における蛋白発現がシグナルの強さを最も反映すると考えられ、mRNA の発現量では評価しきれないことが一因であると考えられる他、mRNA に対する翻訳後修飾が起きている可能性や、さらには Notch シグナル経路における NUMB などの修飾因子が互いに複雑に相互作用していることが考えられる。翻訳後修飾の例としては、近年 lncRNA (long non coding RNA) や miRNA (micro RNA) などの、以前は役割を果たしていないと考えられていた蛋白をコードしない non coding RNA が mRNA に作用し、その発現に大きく関わっていることが解っており、Notch もその例外ではない [11, 78]。Notch に関与する lncRNA の報告としては、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病において、Notch1 遺伝子近傍に位置する NALT (Notch1 associated lncRNA in T ALL) の発現が Notch1 シグナルを活性化させ、腫瘍増殖効果を持つことが示唆されている [79]。また、miRNA の報告としては、メラノーマにおいて、miR-146a が BRAF、NRAS により高発現され、miRNA-146a が Numb を抑制することで、Notch の発現を修飾することが示唆されている [80]。また、乳癌や膵臓癌、前立腺癌などにおいて、miR-34a が Notch シグナルを抑制し、腫瘍抑制効果を示すことが報告されている [81, 82]。大腸癌においても同様の作用が働いている可能性がある。また、Zhang らは、TCGA の database を用いた解析を行い、mRNA と蛋白発現の相関を検討している。その検討では、87 種類の腫瘍に対して 3764 の遺伝子の mRNA と蛋白発現を比較検討し、89% の遺伝子で mRNA と蛋白の正の相関を認めたが、統計学的に有意なものは 32%

のみで、Spearman の相関係数は平均 0.23 であり、mRNA 量は蛋白発現量を予測することは出来ないと結論付けている [83]。今回の検討結果から、Notch3 と Notch1 の間で、翻訳後に異なった制御メカニズムが働いているという可能性も示唆されるが、このことに関しては更なる検討、もしくは機序の解明が必要であると考えられる。

また本研究における limitation としては、今回我々は免疫染色を用いて、Notch3 蛋白発現を検討したが、免疫染色における検討の問題点として、定量化において一定の基準がないことが挙げられる。既存の研究における、Notch 蛋白発現の免疫染色での検討では、発現の強度と範囲を掛け合わせることで、IRS (immunoreactivity score)として、分類している報告や、強度のみ、範囲のみを検討している報告が認められる。我々は、細胞質は強度で、核は範囲で評価した。細胞質における染色は癌細胞全体にほぼ均一に認められたことから強度のみで、核における染色は 1 つ 1 つの核の強度を分類し数値化することは実質困難であったことから範囲のみでの評価とした。強度のみでの分類においては我々同様 weak、moderate、strong に分類し検討する報告が多く認められた [41, 44, 45]。範囲診断においては、cut-off 値をどのように設定するかが問題となるが、Dacos らは膵臓癌において Notch3 蛋白発現を免疫染色で検討し、5%を cut-off 値として設定しているが、一方 Mann らは同様に膵臓癌において Notch3 蛋白発現の免疫染色を行い、10%を cut-off 値としており、その理由は明確でない [36, 61]。本研究においては核における発現範囲の平均値を元に cut-off 値として 20%を設定したが、cut-off 値の設定含め、染色を十分客観的に判断できる指

標、さらには使用する抗体を含めた染色の方法なども十分に検討をする必要があると考えられる。

さらに免疫染色のような半定量的な検討では、観察者間におけるバイアスも問題となるが、今回の我々の検討では、病理医の協力のもと検討し、2 観察者間での Notch3 蛋白発現の一致率は細胞質 Notch3 蛋白発現においては 0.86 ($\kappa = 0.63$, $P < 0.0001$)、核 Notch3 蛋白発現においては 0.88 ($\kappa = 0.73$, $P < 0.0001$) であり、良好な一致を認めた。

本研究により、Notch3 シグナルが大腸癌の再発において重要な役割を果たすことが示唆され、Notch3 シグナルを抑制することで、大腸癌の再発予防や、分子標的治療が望める可能性が示唆された。現在、様々な癌種で Notch シグナルを抑制する γ -secretase 阻害薬が臨床試験中であり、その一つである RO4929097 の大腸癌における Phase II 試験結果が報告されている。少なくとも既存の化学療法を 2 種類以上実施された遠隔転移を伴う大腸癌患者 37 名に対して RO4929097 が単剤投与されたが、Partial response 以上の効果は認めず、PFS (Progression free survival)の中央値は 1.8 ヶ月、OS の中央値は 6 ヶ月と目覚ましい効果は認めなかった。しかし、大腸癌において現在頻用されている分子標的治療薬 Bevacizumab においても既存の化学療法と組み合わせることでその効果が発揮されることを考えると、投与方法や容量設定などを含め課題は多いと考えられるが、今後のさらなる臨床応用が期待される [84]。また、現在 Notch 受容体特異的阻害薬の研究も行われており、Notch3 受容体特異的阻害剤が、Notch シグナル全体を抑制する γ -secretase 阻害薬と比較して副作用軽減を伴った治療薬として臨床応用される可能性が示唆される [85]。

さらに本研究における Stage 別の検討において、Stage II 大腸癌で核 Notch3 蛋白発現
が再発予測因子となり得ることが示唆されたことは、特に今後の検討に値すると考えられる。
Stage II 大腸癌の予後は比較的良好であるが、その中で、一部に再発 High risk 症例を認
め、そのような症例に Stage III 同様、術後補助化学療法を施行することで、再発を抑えるこ
とが示唆されている [86, 87]。現在、High risk 症例は T4 症例、低分化症例、脈管侵襲陽
性症例、検索リンパ節数 ≤ 12 個の症例、そして術前腸閉塞や穿孔を伴っていた症例、など
の臨床病理学的因子のみに基づいて選別されているが、High risk 症例を同定するバイオ
マーカーの探索は、今後重要な課題であると考えられる [88]。こうした中で、核 Notch3 は
上記臨床病理学的因子に代わり得るバイオマーカーとなり得る可能性があると考えられ、今
後、症例を増やすとともに、他のコホートを用いた validation study、上記臨床病理学的因子
と比較したさらなる検討や、prospective な検討が必要であると考えられる。

一方、本検討では Notch3 蛋白発現、Notch1 蛋白発現が Stage II 大腸癌において遠隔
再発生存率と負の相関を認めたものの、全生存率とは相関を認めなかった。大腸癌におい
ては、再発巣を切除することで全生存率の延長が認められるとの報告もあり、本検討におい
ては、Stage II 再発 23 症例中、10 症例 (43%) で再発巣に対する切除が施行されているこ
とがその一因と考えられる [89]。

また、近年では他臓器転移を伴った Stage IV 大腸癌においても手術で切除可能であっ
た症例の中には予後が十分見込める症例も報告されており、さらには化学療法の発達によ
り、切除不可能症例が切除可能症例となる症例も見受けられるようになった [89]。それに伴

い術後の Stage IV 大腸癌に対する術後補助化学療法必要性も検討されるようになっており、Stage II、Stage III 症例と同じく、再発リスク高値例を特定するバイオマーカーが必要であると考えられる [90, 91]。前述の通り Notch シグナルが 5-FU を含めた化学療法効果判定のバイオマーカーとなる可能性も示唆されていることから、今後 Notch シグナルが Stage IV 大腸癌の予後を予測するバイオマーカーとしての役割を持つかについても検討していく余地が十分あると考えられた。このことに関して、database GSE17538 において、Stage IV 大腸癌で検討をすると、Notch3 mRNA 高発現群は Notch3 mRNA 低発現群と比較して有意に予後が悪いという結果を認めた。転移部位の詳細や、切除範囲、さらには術前、術後の化学療法の有無などの情報が得られないため、十分な検討は出来ないものの、Stage IV 大腸癌においても Notch3 発現を検討する事が臨床的に有用である可能性が示唆され、非常に興味深い結果と考えられた。

10. 結論

Stage II 大腸癌において核 Notch3 蛋白発現、核 Notch1 蛋白発現は遠隔再発と正の相関をすることが示唆され、遠隔再発の予測マーカーとして高危険群を選別するのに有用である可能性が示唆された。また核 Notch3 蛋白発現に加えて、核 Notch1 蛋白発現を同時に検討することで、遠隔再発高危険群をさらに選別できる可能性が示唆された。

11. 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。そして、腫瘍外科学・血管外科学 北山丈二准教授、須並英二講師、石原聡一郎講師、風間伸介先生、山口博紀先生、野澤宏彰先生、川合一茂先生には、実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。また、病理学 深山正久教授、森川鉄平先生には、病理所見の診断一致率の検定に携わって頂くとともに、多大な御指導を賜りました。

さらに、実際の実験に際しては、がん研有明病院消化器外科の秋吉高志先生はじめ、多くの先生方に多大なる御協力を頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。

12. 引用文献

1. Hori M, Matsuda T, Shibata A et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol* 2015; 45: 884-891.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108.
3. Hadac JN, Leystra AA, Paul Olson TJ et al. Colon Tumors with the Simultaneous Induction of Driver Mutations in APC, KRAS, and PIK3CA Still Progress through the Adenoma-to-carcinoma Sequence. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015; 8: 952-961.
4. Goto H, Oda Y, Murakami Y et al. Proportion of de novo cancers among colorectal cancers in Japan. *Gastroenterology* 2006; 131: 40-46.
5. Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT et al. Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1229-1236.
6. Okayasu I. Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence. *Pathol Int* 2012; 62: 368-380.
7. Goel A, Boland CR. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2012; 143: 1442-1460 e1441.

8. Sakai E, Nakajima A, Kaneda A. Accumulation of aberrant DNA methylation during colorectal cancer development. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 978-987.
9. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38: 787-793.
10. Vanderkraats ND, Hiken JF, Decker KF, Edwards JR. Discovering high-resolution patterns of differential DNA methylation that correlate with gene expression changes. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 6816-6827.
11. Nakagawa S, Kageyama Y. Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 215-222.
12. Hur K, Toiyama Y, Schetter AJ et al. Identification of a metastasis-specific MicroRNA signature in human colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107.
13. Ferreira HJ, Heyn H, Moutinho C, Esteller M. CpG island hypermethylation-associated silencing of small nucleolar RNAs in human cancer. *RNA Biol* 2012; 9: 881-890.
14. Qiao L, Wong BC. Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1979-1986.
15. Miyamoto S, Rosenberg DW. Role of Notch signaling in colon homeostasis and carcinogenesis. *Cancer Sci* 2011; 102: 1938-1942.

16. Vinson KE, George DC, Fender AW et al. The Notch pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2015.
17. Vooijs M, Liu Z, Kopan R. Notch: architect, landscaper, and guardian of the intestine. *Gastroenterology* 2011; 141: 448-459.
18. Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ. Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 690-701.
19. Du X, Cheng Z, Wang YH et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9191-9199.
20. Artavanis-Tsakonas S, Muskavitch MAT. Notch: The Past, the Present, and the Future. 2010; 92: 1-29.
21. Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 2007; 30: 247-251.
22. Garcia A, Kandel JJ. Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histol Histopathol* 2012; 27: 151-156.
23. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 2003; 194: 237-255.
24. Kidd S, Lieber T, Young MW. Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes Dev* 1998; 12: 3728-3740.

25. Couturier L, Mazouni K, Schweisguth F. Inhibition of Notch recycling by Numb: relevance and mechanism(s). *Cell Cycle* 2013; 12: 1647-1648.
26. Shimizu K, Chiba S, Saito T et al. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 775-779.
27. Sikandar SS, Pate KT, Anderson S et al. NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 1469-1478.
28. Ellisen LW, Bird J, West DC et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66: 649-661.
29. Pear WS, Aster JC, Scott ML et al. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 1996; 183: 2283-2291.
30. Dang TP, Gazdar AF, Virmani AK et al. Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1355-1357.
31. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I et al. Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64: 7787-7793.

32. Reedijk M, Odorcic S, Chang L et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 2005; 65: 8530-8537.
33. Pece S, Serresi M, Santolini E et al. Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 2004; 167: 215-221.
34. Yeh TS, Wu CW, Hsu KW et al. The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 2009; 69: 5039-5048.
35. Bao B, Wang Z, Ali S et al. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 307: 26-36.
36. Mann CD, Bastianpillai C, Neal CP et al. Notch3 and HEY-1 as prognostic biomarkers in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e51119.
37. Zhou L, Zhang N, Song W et al. The significance of Notch1 compared with Notch3 in high metastasis and poor overall survival in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013; 8: e57382.
38. Liu J, Fan H, Ma Y et al. Notch1 is a 5-fluorouracil resistant and poor survival marker in human esophagus squamous cell carcinomas. *PLoS One* 2013; 8: e56141.
39. Nicolas M, Wolfer A, Raj K et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003; 33: 416-421.

40. Ohashi S, Natsuizaka M, Naganuma S et al. A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2011; 71: 6836-6847.
41. Zhang Y, Li B, Ji ZZ, Zheng PS. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer* 2010; 116: 5207-5218.
42. Chu D, Li Y, Wang W et al. High level of Notch1 protein is associated with poor overall survival in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1337-1342.
43. Chu D, Zhou Y, Zhang Z et al. Notch1 expression, which is related to p65 Status, is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5686-5694.
44. Chu D, Zhang Z, Zhou Y et al. Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 2440-2447.
45. Chu D, Zheng J, Wang W et al. Notch2 expression is decreased in colorectal cancer and related to tumor differentiation status. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 3259-3266.
46. Chu D, Wang W, Xie H et al. Notch1 expression in colorectal carcinoma determines tumor differentiation status. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 253-260.
47. Wael H, Yoshida R, Kudoh S et al. Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung Cancer* 2014; 85: 131-140.

48. Ye YZ, Zhang ZH, Fan XY et al. Notch3 overexpression associates with poor prognosis in human non-small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2013; 30: 595.
49. Nagamatsu I, Onishi H, Matsushita S et al. NOTCH4 is a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Anticancer Res* 2014; 34: 69-80.
50. Yamaguchi N, Oyama T, Ito E et al. NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1881-1888.
51. Qian C, Liu F, Ye B et al. Notch4 promotes gastric cancer growth through activation of Wnt1/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biochem* 2015; 401: 165-174.
52. Mazur PK, Einwachter H, Lee M et al. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 13438-13443.
53. Ahn S, Hyeon J, Park CK. Notch1 and Notch4 are markers for poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013; 12: 286-294.
54. Hayashi Y, Osanai M, Lee GH. NOTCH2 signaling confers immature morphology and aggressiveness in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 2015; 34: 1650-1658.
55. Serafin V, Persano L, Moserle L et al. Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer. *J Pathol* 2011; 224: 448-460.

56. Ozawa T, Kazama S, Akiyoshi T et al. Nuclear Notch3 expression is associated with tumor recurrence in patients with stage II and III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 2650-2658.
57. Jorissen RN, Gibbs P, Christie M et al. Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7642-7651.
58. Smith JJ, Deane NG, Wu F et al. Experimentally derived metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in patients with colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 958-968.
59. Zhou M, Jin WY, Fan ZW, Han RC. Analysis of the expression of the Notch3 receptor protein in adult lung cancer. *Oncol Lett* 2013; 5: 499-504.
60. Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT et al. Expression of nuclear Notch3 in cervical squamous cell carcinomas and its association with adverse clinical outcomes. *Gynecol Oncol* 2010; 117: 409-416.
61. Doucas H, Mann CD, Sutton CD et al. Expression of nuclear Notch3 in pancreatic adenocarcinomas is associated with adverse clinical features, and correlates with the expression of STAT3 and phosphorylated Akt. *J Surg Oncol* 2008; 97: 63-68.
62. Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H et al. Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell* 2011; 19: 125-137.

63. Bolós V, Blanco M, Medina V et al. Notch signalling in cancer stem cells. *Clinical and Translational Oncology* 2009; 11: 11-19.
64. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 460-466.
65. Sansone P, Storci G, Tavolari S et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* 2007; 117: 3988-4002.
66. Avoranta ST, Korkeila EA, Ristamaki RH et al. ALDH1 expression indicates chemotherapy resistance and poor outcome in node-negative rectal cancer. *Hum Pathol* 2013; 44: 966-974.
67. Paldino E, Tesori V, Casalbore P et al. Tumor initiating cells and chemoresistance: which is the best strategy to target colon cancer stem cells? *Biomed Res Int* 2014; 2014: 859871.
68. Park JT, Chen X, Trope CG et al. Notch3 overexpression is related to the recurrence of ovarian cancer and confers resistance to carboplatin. *Am J Pathol* 2010; 177: 1087-1094.
69. Eto K, Kawakami H, Kuwatani M et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 1488-1494.

70. Kofler NM, Shawber CJ, Kangsamaksin T et al. Notch signaling in developmental and tumor angiogenesis. *Genes Cancer* 2011; 2: 1106-1116.
71. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006; 444: 1032-1037.
72. Sawa M, Masuda M, Yamada T. Targeting the Wnt signaling pathway in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 1-11.
73. Chen X, Stoeck A, Lee SJ et al. Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways in ovarian cancer. *Oncotarget* 2010; 1: 210-218.
74. Gopalakrishnan N, Saravanakumar M, Madankumar P et al. Colocalization of beta-catenin with Notch intracellular domain in colon cancer: a possible role of Notch1 signaling in activation of CyclinD1-mediated cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2014; 396: 281-293.
75. Beatus P, Lundkvist J, Oberg C, Lendahl U. The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* 1999; 126: 3925-3935.
76. Ohashi S, Natsuizaka M, Yashiro-Ohtani Y et al. NOTCH1 and NOTCH3 coordinate esophageal squamous differentiation through a CSL-dependent transcriptional network. *Gastroenterology* 2010; 139: 2113-2123.
77. Pasto A, Serafin V, Pilotto G et al. NOTCH3 signaling regulates MUSASHI-1 expression in metastatic colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2014; 74: 2106-2118.

78. Winton DJ. miR-34a sets the "sweet spot" for notch in colorectal cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 499-501.
79. Durinck K, Wallaert A, Van de Walle I et al. The Notch driven long non-coding RNA repertoire in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2014; 99: 1808-1816.
80. Forloni M, Dogra SK, Dong Y et al. miR-146a promotes the initiation and progression of melanoma by activating Notch signaling. *Elife* 2014; 3: e01460.
81. Kang L, Mao J, Tao Y et al. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci* 2015; 106: 700-708.
82. Nalls D, Tang SN, Rodova M et al. Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells. *PLoS One* 2011; 6: e24099.
83. Zhang B, Wang J, Wang X et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2014; 513: 382-387.
84. Strosberg JR, Yeatman T, Weber J et al. A phase II study of RO4929097 in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2012; 48: 997-1003.
85. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010; 464: 1052-1057.

86. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3768-3774.
87. Sargent D, Sobrero A, Grothey A et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2009; 27: 872-877.
88. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1787-1796.
89. Oba M, Hasegawa K, Matsuyama Y et al. Discrepancy between recurrence-free survival and overall survival in patients with resectable colorectal liver metastases: a potential surrogate endpoint for time to surgical failure. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 1817-1824.
90. Mitry E, Fields AL, Bleiberg H et al. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4906-4911.
91. Baba K, Oshita A, Kohyama M et al. Successful treatment of conversion chemotherapy for initially unresectable synchronous colorectal liver metastasis. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 1982-1988.