

論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌における Notch3 蛋白発現の臨床病理学的意義

氏名 小澤 毅士

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、分化のみならず、発癌、癌の進展にも関与することが示唆されている。その中で、Notch シグナルが大腸癌を含む様々な癌種において、その発癌、進展に中心的な役割を果たしていることが示唆されている。

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、Notch1~4 の 4 種類が存在する。Notch シグナルは、細胞同士が直接接触しリガンドと受容体が結合することで、細胞質内ドメイン(NICD : Notch intracellular domain)が遊離され核に移行し、HES (hairly 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される。

正常腸管上皮細胞において Notch シグナルは幹細胞の維持や分化において重要な役割を担うことが示唆されている。一方、1991 年に Ellisen らにより T-cell acute lymphatic leukemia において Notch シグナルが発癌に関与していることが報告されたのち、様々な癌種において Notch シグナルの異常がその発癌、癌の進展に影響を与えていることが示唆されるようになった。しかし、その役割は臓器間や、それぞれの Notch 受容体でも異なることが示唆されている。

癌における Notch1 シグナルの役割の検討においては、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌などにおいて、腫瘍増殖的に作用することが示唆されている一方、皮膚やケラチノサイトにおいては、Notch1 シグナルの欠損が基底細胞癌様腫瘍の発育を促進すると報告されており、腫瘍抑制的に働くことが示唆されている。

また、癌における Notch3 シグナルの役割の検討においては、膵臓癌では Notch1 と同様腫瘍増殖的に働くことが示唆されている一方、食道癌においては、Notch3 シグナルは腫瘍抑制的な作用を持つとの報告がなされており、同腫瘍において腫瘍増殖的である Notch1 シグナルと逆の作用を持つことが示唆されている。

大腸癌においても Notch シグナルが検討されており、既存の報告から Notch1 シグナルが腫瘍増殖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。

一方、大腸癌における Notch3 シグナルについては Serafin らが *in vitro*、*in vivo* での検討を報告しており、大腸癌細胞株、マウスを用いた *xenograft* モデルにおいて Notch3 シグナルが腫瘍増殖的な役割を持つことが示唆された。しかし、同報告において、Notch の ECD (extracellular domain) に対する抗体を用いて、大腸癌切除標本 158 症例における Notch3 蛋白発現を検討しているが、臨床病理学的因子との間に相関は認められなかった。

我々は、既存の報告から、Notch3 蛋白発現が大腸癌における予後因子となり得ると考えたが、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、ECD ではなく、NICD に対する抗体を用いた免疫組織染色で大腸癌における Notch3 蛋白発現を評価し、臨床病理学的因子と比較することで、Notch3 シグナルの大腸癌における臨床的意義を検討することを今回の研究の目的とした。

方法は、2000 年～2007 年の間に東京大学腫瘍外科において根治切除された Stage II 164 症例、Stage III 141 症例の大腸癌切除検体を用いて、Notch3 蛋白発現、Notch1 蛋白発現を組織免疫染色の手法を用いて検討し、細胞質、核での発現をそれぞれ別々に評価した。細胞質における Notch 蛋白発現は染色陽性強度で弱、中、強発現の 3 段階に分類し評価し、核における Notch 蛋白発現は陽性割合が 20%以上の症例を陽性とし、陰性、陽性に分類し評価し、それぞれ臨床病理学的因子、再発、予後との相関を検討した。加えて、public database を用いて Notch3 mRNA、Notch1 mRNA 発現と再発、予後との相関を検討した。

結果、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($P = 0.010$)、細胞質 Notch3 蛋白発現は静脈侵襲と正の相関を認め($P = 0.036$)、核 Notch1 蛋白発現はリンパ節転移と($P = 0.011$)、細胞質 Notch1 蛋白発現は組織学的分化度($P = 0.038$)、静脈侵襲($P = 0.005$)と正の相関を認めた。

予後との比較においては、細胞質 Notch3 蛋白発現、細胞質 Notch1 蛋白発現共に全生存率(OS: overall survival)、遠隔無再発生存率(dRFS: distant relapse-free survival time)と有意な相関は認められなかった。一方、核 Notch3 蛋白発現、核 Notch1 蛋白発現は OS とは有意な相関は認めなかったものの、核 Notch3 蛋白発現、核 Notch1 蛋白発現共に、dRFS において陰性群が陽性群と比較して有意に良好であるという結果を得た(それぞれ $P = 0.005$ 、 $P = 0.031$ 、log rank test)。

さらに Stage 別の検討においては、核 Notch3 蛋白発現、核 Notch1 蛋白発現共に Stage III 症例においては OS、dRFS と有意な相関が認められなかったものの、Stage II 症例では核 Notch3 蛋白発現、核 Notch1 蛋白発現共に、陰性群において陽性群と比較して有意に dRFS が良好であるという結果を得た(それぞれ $P = 0.002$ 、 $P = 0.020$ 、log rank test)。

次に、核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白の両者の発現と、予後との相関を、核 Notch3 蛋白、核 Notch1 蛋白共陽性群(Notch3(+)/Notch1(+))群)、どちらか片方が陽性の群(核 Notch3 or

Notch1(+群)、両者共に陰性の群(核 Notch3(-)/Notch1(-)群)と分類して比較検討すると、OS においては相関が認められなかったものの、dRFS においては、核 Notch3(+)/Notch1(+群)と比較して、核 Notch3(-)/Notch1(-)群において有意に良好であり(P = 0.001)、核 Notch3 or Notch1(+群)においても良好な傾向を認めた(P = 0.065)。

さらに、dRFS に影響を与える因子を Cox ハザードモデルを用いて検討したところ、単変量解析において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: 1.72, 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 つの因子が有意な因子として認められ、それらの因子を多変量解析すると、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 つが有意な因子であった。

Stage 別に同様の検討をすると、Stage III 症例においては単変量解析で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。Stage II 症例では静脈侵襲陽性(HR: 5.13, 95%CI: 1.75-21.9, P = 0.002)、核 Notch1 蛋白発現陽性(HR: 2.66, 95%CI: 1.12-6.39, P = 0.027)、細胞質 Notch3 蛋白発現陽性(HR: 5.32, 95%CI: 1.11-95.4, P = 0.034)、核 Notch3 蛋白発現陽性(HR: 3.60, 95%CI: 1.54-9.01, P = 0.003)の 4 つが有意な因子であり、それらの因子を多変量解析すると、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 つが有意な因子であった。また、多変量解析で Stage II、III 全体において Notch3(+)/Notch1(+群)は核 Notch3(-)/Notch1(-)群と比較して、HR: 2.48 (CI: 1.44-9.22, P = 0.006)であり、Stage II においては HR: 4.99 (CI: 1.72-16.3, P = 0.003)であった。

最後に NCBI (National Center for Biotechnology Information)における GSE14333、GSE17538 の 2 つの public database を用いて Notch3 mRNA 発現、Notch1 mRNA 発現と予後との相関を検討したところ、Notch3 mRNA 発現は、GSE14333 においては、Notch3 mRNA 発現陰性群において陽性群と比較して有意に無再発生存率(DFS: disease free survival)が良好であり(P = 0.004, log rank test)、GSE17538 においては、Notch3 mRNA 発現陰性群において陽性群と比較して OS が良好な傾向を認め(P = 0.115)、また DFS は有意に良好であった(P = 0.001)。一方、Notch1 mRNA 発現は、GSE14333 においては Notch1 mRNA 発現陽性群で陰性群と比較して、有意に DFS が良好であり(P = 0.004, log rank test)、GSE17538 では OS、DFS ともに有意な相関は認められなかった。

結論、核 Notch3 蛋白発現は Stage II 大腸癌において遠隔再発と正の相関を認めることが示され、Stage II 大腸癌における遠隔再発高危険群を予測する因子となり得ることが示唆された。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。

今後、他のコホートを用いた validation study や prospective study による十分な検討が必要であると考えられる。