HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肺癌の組織型によるNotch1/Numb発現とNumbの機能の違いに関する研究
Author(s)	菊池, 創
Description	配架番号：2373
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12994号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12994
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71026
Type	doctoral thesis
File Information	Hajime_Kikuchi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

肺癌の組織型による Notch1/Numb 発現と

Numb の機能の違いに関する研究

(Studies on the expression of Notch1/Numb and distinct

function of Numb in different histological types of lung

cancer)

2018 年 3 月

北　海　道　大　学

菊　池　創

学　位　論　文

肺癌の組織型による Notch1/Numb 発現と

Numb の機能の違いに関する研究

（Studies on the expression of Notch1/Numb and distinct function of Numb in different histological types of lung cancer）

2018 年 3 月

北　海　道　大　学

菊　池　創

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・　１頁

諸言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１５頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１６頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２３頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５０頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・　５２頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５３頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５４頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Kikuchi H, Sakakibara-Konishi J, Furuta M, Yokouchi H, Nishihara H, Yamazaki S, Uramoto H, Tanaka F, Harada M, Akie K, Sugaya F, Fujita Y, Takamura K, Kojima T, Harada T, Higuchi M, Honjo O, Minami Y, Watanabe N, Oizumi S, Suzuki H, Ishida T, Dosaka-Akita H, Isobe H, Munakata M, Nishimura M.
Expression of Notch1 and Numb in small cell lung cancer.
Oncotarget. 8, 10348-10358 (2017).

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

Oncotarget

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Hajime Kikuchi, Jun Sakakibara-Konishi, Yasuyuki Ikezawa, Taichi Takashina, Hidenori Mizugaki, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Naofumi Shinagawa, Satoshi Oizumi, Yasuhiro Hida, Kichizo Kaga, Ichiro Kinoshita, Hirotoshi Dosaka-Akita, Masaharu Nishimura
Expression of Notch1, Numb, and Musashi1 in Non-small Cell Lung Cancer
American Association for Cancer Research, April 18, 2016, New Orleans

2. Hajime Kikuchi, Jun Sakakibara-Konishi, Megumi Furuta, Hiroshi Yokouchi, Hiroshi Nishihara, Shigeo Yamazaki, Hidetaka Uramoto, Fumihiro Tanaka, Masao Harada, Kenji Akie, Fumiko Sugaya, Yuka Fujita, Kei Takamura, Tetsuya Kojima, Toshiyuki Harada, Mitsunori Higuchi, Osamu Honjo, Yoshinori Minami, Naomi Watanabe, Satoshi Oizumi, Hiroyuki Suzuki, Takashi Ishida, Hirotoshi Dosaka-Akita, Hiroshi Isobe, Mitsuru Munakata, Masaharu Nishimura
Expression of Notch1 and Numb in Small Cell Lung Cancer
American Association for Cancer Research, April 4, 2017, Washington, D.C.

3. 菊池　創、榊原　純、池澤　靖元、高階　太一、水柿　秀紀、菊地　英毅、菊地　順子、品川　尚文、大泉　聡史、樋田　泰浩、加賀　基知三、木下　一郎、秋田　弘俊、西村　正治
ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)における Numb に関する研究
第 56 回日本肺癌学会学術総会，2015 年 11 月 28 日，横浜

4. 菊池　創、榊原　純、池澤　靖元、高階　太一、水柿　秀紀、菊地　英毅、菊地　順子、品川　尚文、大泉　聡史、樋田　泰浩、加賀　基知三、木下　一郎、秋田　弘俊、西村　正治
非小細胞肺癌における Notch1，Numb の発現
第 75 回日本癌学会学術総会，2016 年 10 月 6 日，横浜

5. 菊池　創、榊原　純、横内　浩、西原　広史、浦本　秀隆、原田　眞雄、山崎　成夫、秋江　研志、菅谷　文子、藤田　結花、荻　喬博、小島　哲弥、原田　敏之、樋口　光徳、本庄　統、南　幸範、渡部　直己、鈴木　弘行、棟方　充、西村　正治
小細胞肺癌における Notch1、Numb に関する検討
第 57 回日本肺癌学会学術総会，2016 年 12 月 20 日，福岡

緒言

1)肺癌について

肺癌は全世界的に悪性新生物に関連した死亡率の第1位を占め、その罹患率は増加傾向にある。日本においても肺癌が1998年に癌死亡原因の第1位となってから既に10年以上が経過し、2014年の死亡数に関しても全癌死亡に対し男性24%、女性14%ともっとも頻度の高い癌の一つとなっている。

肺癌は病理学的に非小細胞肺癌（non small cell lung carcinoma：NSCLC）と小細胞肺癌（small cell lung carcinoma：SCLC）の2つに大別され、NSCLCが80%以上を占める。また、NSCLCには腺癌（adenocarcinoma：ADC）と扁平上皮癌（squamous cell carcinoma：SCC）の2つの主な組織型が含まれている。これらは異なった分子生物学的な特性を持っており、発生起源や発生機序に関わる遺伝子異常が異なると考えられている。SCLCは神経内分泌分化を示す神経内分泌癌であり、主に神経内分泌細胞が主な発生起源と考えられているが、Ⅱ型肺胞上皮細胞から発生する機序も報告されている。これらの細胞に癌抑制遺伝子であるTP53・Retinoblastoma（Rb）遺伝子の不活化が関与しSCLCが発生するとされている[1,2]。NSCLCに分類されているADCとSCCも発生起源・機序が異なっており、ADCはⅡ型肺胞上皮細胞やクララ細胞にKRASやepidermal growth factor receptor（EGFR）遺伝子などの変異が、SCCは基底細胞やクララ細胞、Ⅱ型肺胞細胞にTP53やCDKN2A・Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10（PTEN）・SOX2などの遺伝子の関与が加わり発生する[3-5]。

また治療に対する感受性においては、一般にSCLCは放射線治療・化学療法に比較的感受性が高く、一方NSCLCは感受性が比較的低いとされる。しかし、近年NSCLC、特にADCにおいて、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬やanaplastic lymphoma kinase（ALK）阻害薬などを含めた幾つかの分子標的治療薬の有効性が報告され、EGFR遺伝子変異陽性例またALK融合遺伝子陽性例に対してEGFRチロシンキナーゼ阻害薬やALK阻害薬は優れた治療効果を示している[6,7]。

このように、1つの臓器である肺を起源とする癌であっても、組織型によって大きく性質が異なることからシグナルの機能の違いを検討し、組織型に基づいた標的治療開発や薬剤耐性獲得機序を考えていくことが重要である。

2)Notch pathwayについて

Notch遺伝子は1917年にショウジョウバエにおいて最初に発見された。Notch遺伝子の欠損が生じたショウジョウバエの羽にNotch（切れ込み）が

みられたことからその名前に由来する。Notch は様々な組織（リンパ組織、神経、毛髪、感覚器、血管系等）の分化において必須なシグナルである。血管系の分化おいては胎生期・幼若期にその発現が増強し、成熟期においては発現が低下することが報告されている[8-10]。Notch ファミリーは 4 つの Notch 受容体ファミリー(Notch1-4)と Jagged(Jagged1,2)と Delta-like(Dll1,3,4)の 5 つのリガンドの存在が示されている。Notch 受容体は 300kDa にも及ぶ巨大な 1 回膜貫通蛋白質であり、細胞膜を介し約 200kDa の細胞外ドメインと約 100kDa の細胞内ドメインから形成されている。細胞外ドメインには EGF 様ドメインがあり、細胞内ドメインは 6 個の ankyrin 様リピートと PEST ドメインにより構成される[11,12]（図 1）。

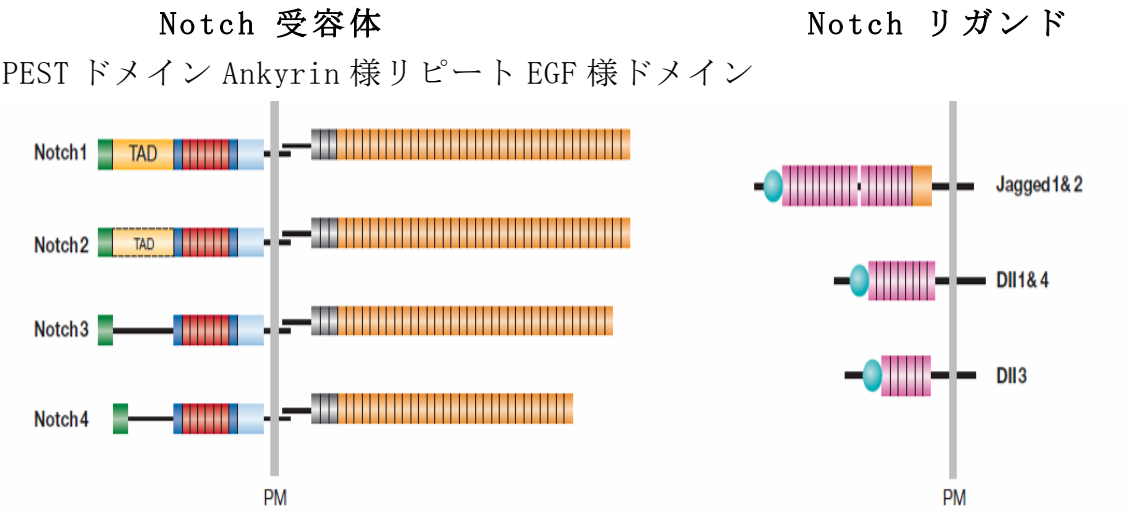


図 1
Notch 受容体と Notch リガンド
EMBO reports(2005) 6.より引用。

Notch pathway の活性化の機序としては、Notch 受容体の細胞外ドメインとリガンドが結合すると γ-secreatase と呼ばれるプロテアーゼにより Notch 受容体が分解され、分解された活性型の細胞内ドメイン（Notch intracellular domain:NICD)は細胞膜より核内へ移行する。転写因子(CBF1、Sel、 Lag-1：CSL）には通常、転写抑制因子（corepressor：CoR）が結合し転写活性が抑制されている。核内に移行した NICD は転写活性因子（coactivator：CoA）と CoR の置換を誘導し、NICD/CSL/CoA 複合体を形成することで、標的遺伝子（hairy and enhancer of split ：HES、hairy/enhancer of split related with YRPW ：HEY）の転写活性が行われ

る（図 2）。HES, HEY は bHLH loop 蛋白であり、正常組織においては神経細胞や表皮細胞の分化において抑制的に作用し、HES は Notch1 に誘導され、HEY は Notch3 に強く誘導されると報告されている [12,13]。

また、Notch1 は神経内分泌細胞の分化に関与しており，HES により転写抑制される achaete-scute complex-like-1（ASCL-1）が神経内分泌分化を誘導することが報告されている [14,15]。

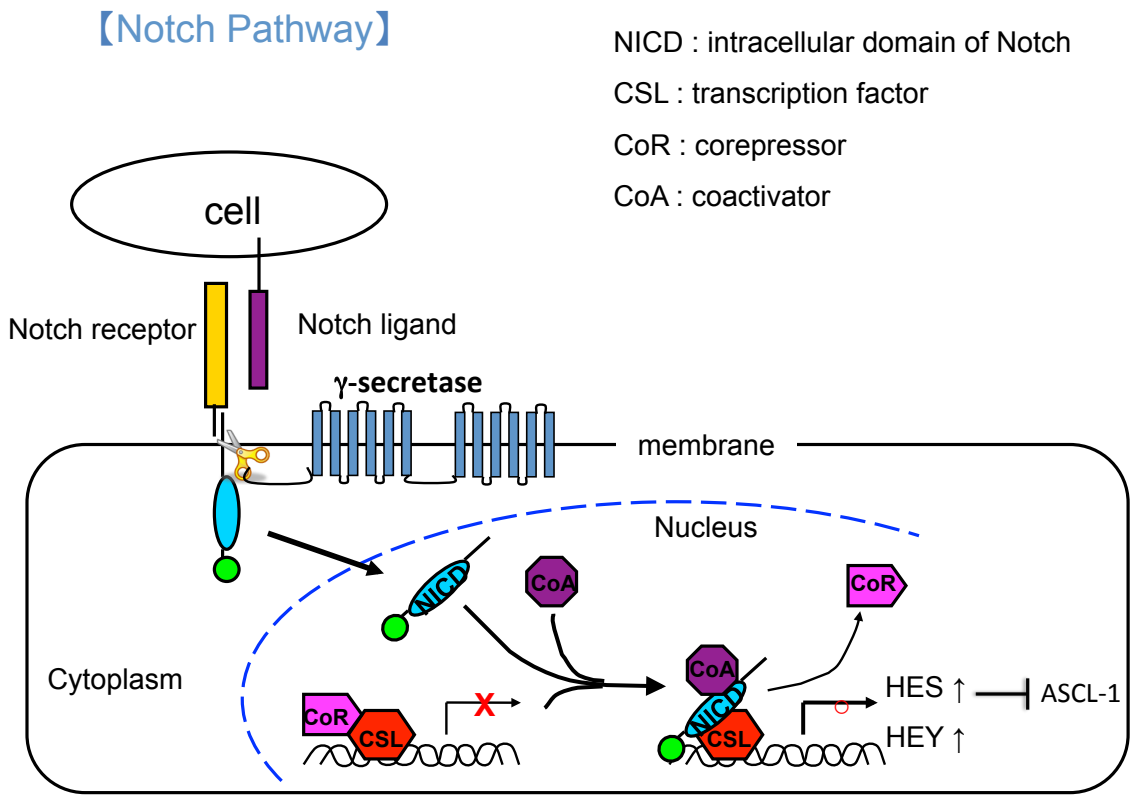


図 2

Notch 経路

3）癌と Notch との関連について

Notch と発癌の関連については、1991 年に Ellisen らによって、急性 T 細胞リンパ球性白血病において、遺伝子 t(7;9)転座により恒常的に活性化状態にある Notch1 の発現が増強し、癌化に結びついていることが報告され [16]、その後多くの癌種において Notch pathway の異常活性と癌化に密接な関連があり、癌種によって activator または suppressor として機能すると報告されている [17-21]。

肺癌と Notch との関連については、共同研究者の Thao P. Dang らによっ

て 2000 年に最初の報告がされている。進行の速い非喫煙女性の肺 ADC において t(15;19)の転座を認め、Notch3 がコードされている領域の 50kb 上流に 19 番短腕の break point を確認した。この腫瘍から樹立した細胞株、HCC2429 は 19 番染色体の遺伝子異常をもつ他の NSCLC 細胞株と比べ、Notch3 の過剰発現を認めた[22] (図 3)。 また我々は、Notch3 が NSCLC 細胞株の約 40%に過剰発現していることを報告している[23](図 4)。さらに、NSCLC において Notch1 の active mutation が 10%前後に認められ、Notch1 の発現の上昇が予後の悪化と関連することが報告されている[24]。一方で、肺 SCC においては inactive mutation が報告されており、Notch が癌増殖において抑制的に働くことが報告されている[25]。

また、SCLC に関しては、*in vitro*、*in vivo* で Notch1 が G1 cell cycle arrest を誘導し細胞増殖や上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition：EMT）を抑制することが報告されている[26-28](図 5)。さらに、genomic profile の解析では、SCLC において認められた Notch damaging mutation の多くは Notch 受容体の細胞外ドメインに存在しており、Notch 遺伝子が腫瘍抑制的に機能していることが示唆された[1]。

以上から、Notch pathway は癌種によってだけではなく、組織型によってもその機能・役割は異なっていると考えられる。

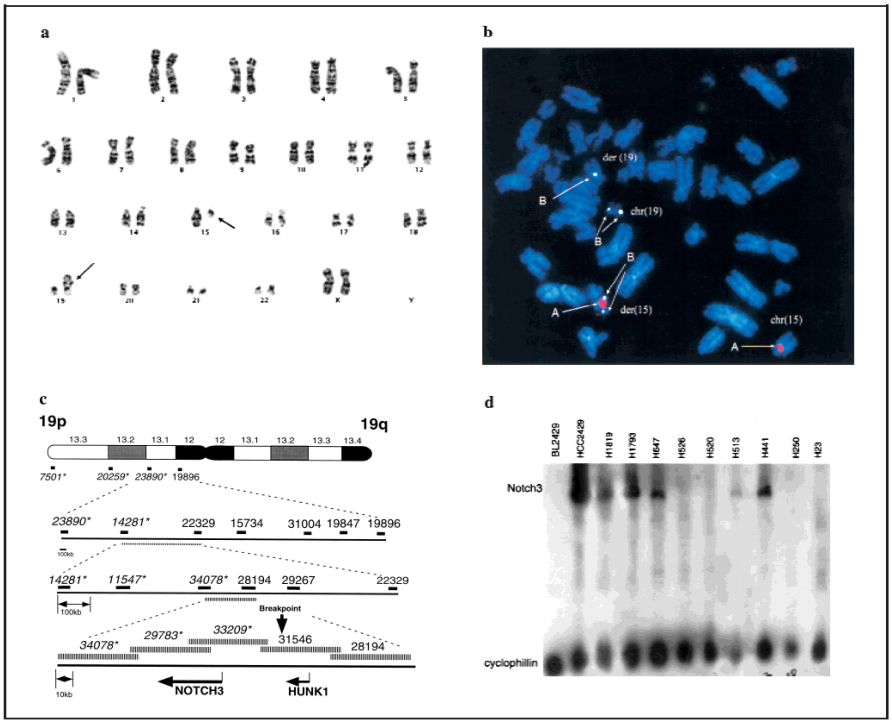


図 3

a) 女性 ADC 患者の腫瘍の核型で 15 番、19 番に転座を認める（矢印)、46,XX,t(15;19)(q11;p13)。

b) FISH 解析で 15 番、19 番(R31546 cosmid probe)の break point を認める（A：15 番、B：19 番)。

c) 19 番短腕上の break point は Notch3 の 50kb 上流に存在する。

d) 19 番染色体の遺伝子異常をもつ細胞株は Notch3 の mRNA の発現が高い。

参考文献 22：Dang, T.P. *et al. J. Natl. Cancer. Inst.*(2000)より引用。

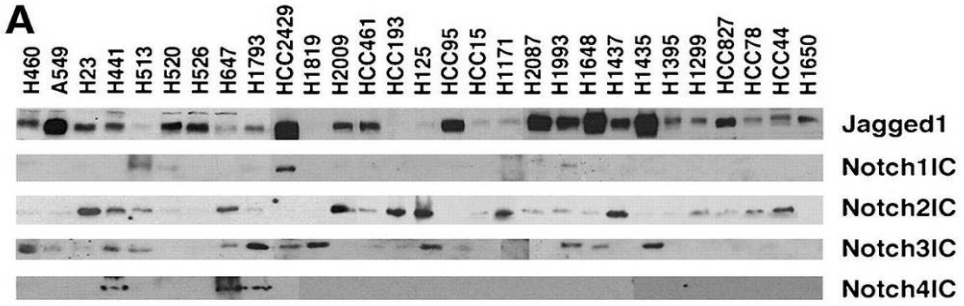


図 4

29 例の肺癌細胞株の Notch レセプターとリガンドのウエスタンブロッド法による検討結果 24 例でリガンドである Jagged1 の発現を認めた。Notch レセプターは Notch2 が 18 例(62%)、Notch3 が 12 例(41%) であった。Notch1,4 は数例の発現のみであった。

参考文献 23：Konishi, J. *et al. Cancer. Res.*(2007)より引用。

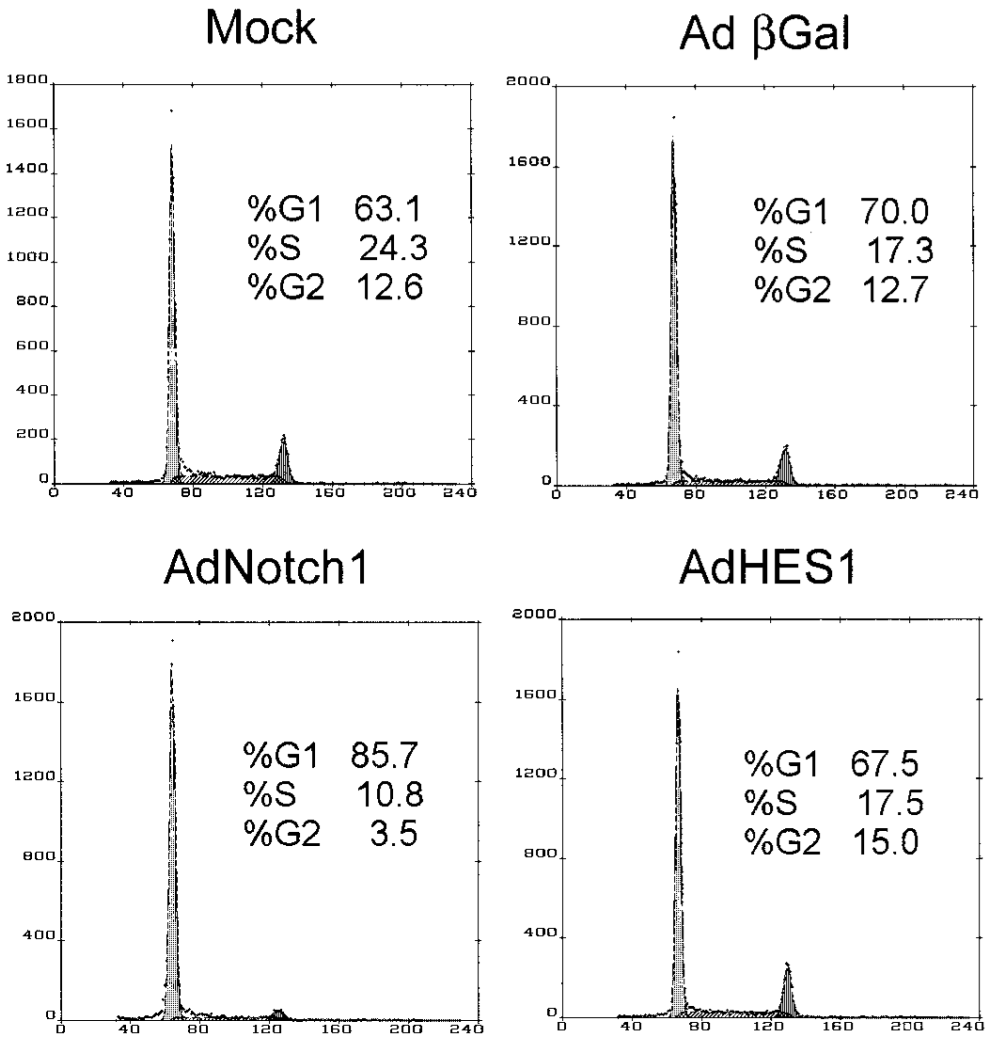


図 5

SCLC 細胞株（DMS53）に Notch1 を導入することで G1 cell cycle arrest が誘導された（左下）。

参考文献 26：Sriuranpong, V. *et al. Cancer. Res.* (2001)より引用。

4)Numb について

Numb もまたショウジョウバエで同定された遺伝子であり [29]、非対称性細胞分裂の制御や細胞の接着や遊走の調節といった細胞の運命決定における重要な役割を果たしている [30-32]。

Numb の主な機能として Notch シグナルの抑制がある [33]。Numb は E3 ユビキチンリガーゼである Itch と相互作用し Notch 受容体または NICD のユビキチン化・分解を引き起こし、また NICD に直接結合しその核移行を阻害することで Notch シグナルを抑制する [34,35]（図 6）。その他に、Numb には Hedgehog シグナルのターゲットである Gli1 のユビキチン化 [36] や p53 のユビキチン化

阻害[37]、E-cadherin や integrin との相互作用[38]といった様々な機能があることが報告されている。

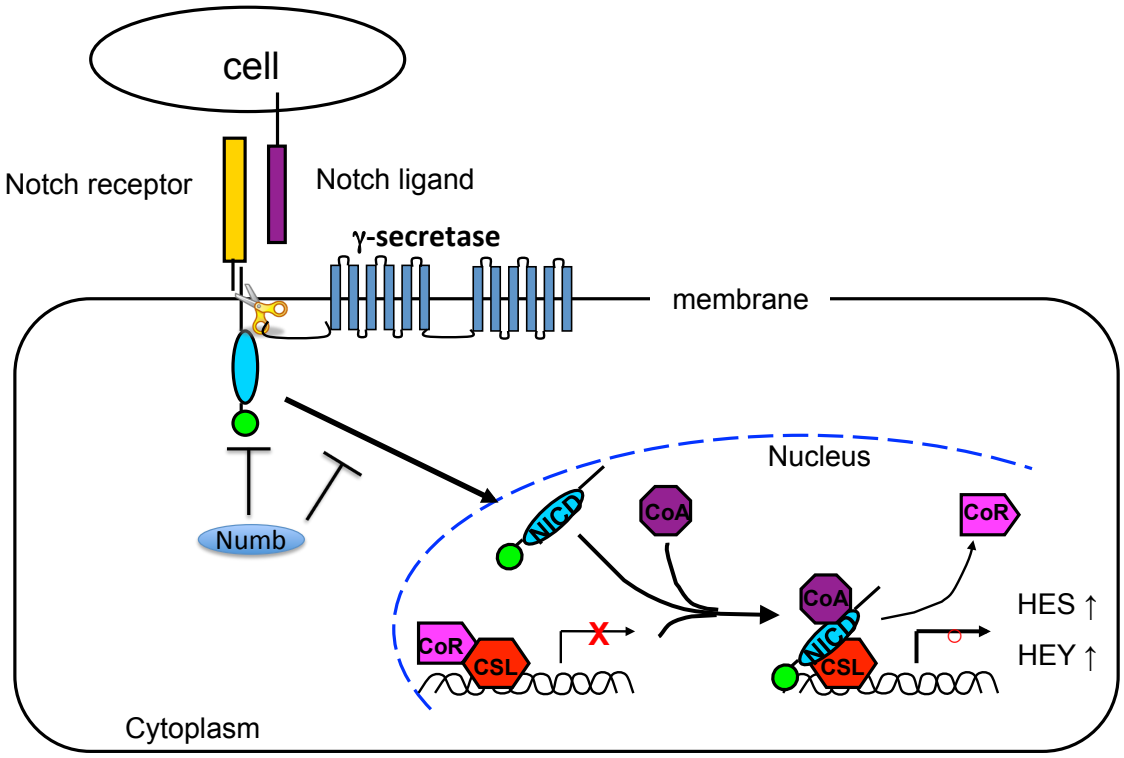


図 6

Notch 経路に対する Numb の機能

5)癌と Numb の関連について

食道癌や乳癌において、Numb の過剰発現は Notch シグナルを抑制することで腫瘍細胞増殖や EMT を抑制し（**図 7**）、さらに Numb 低発現が予後不良と相関していることが報告されている[39,40]（**図 8**）。一方で、肝細胞癌においては、Numb は細胞増殖を促進し Numb 高発現が予後不良と関連していることが示されている[41]。

NSCLC においては Numb 発現の低下や Numb 発現と Hes1 発現に負の相関があることが報告されている[24]（**図 9**）が、NSCLC 腫瘍発生における Numb の役割や Numb 発現と予後との関連については不明である。また、Numb と神経内分泌分化や SCLC を含めた神経内分泌腫瘍との関連を検討した研究は現時点ではまだない。

Numb の Notch シグナル抑制作用と Notch の癌種や組織型による機能の違いを考慮すると、Numb は肺癌の組織型により機能が異なっている可能性が

考えられる。

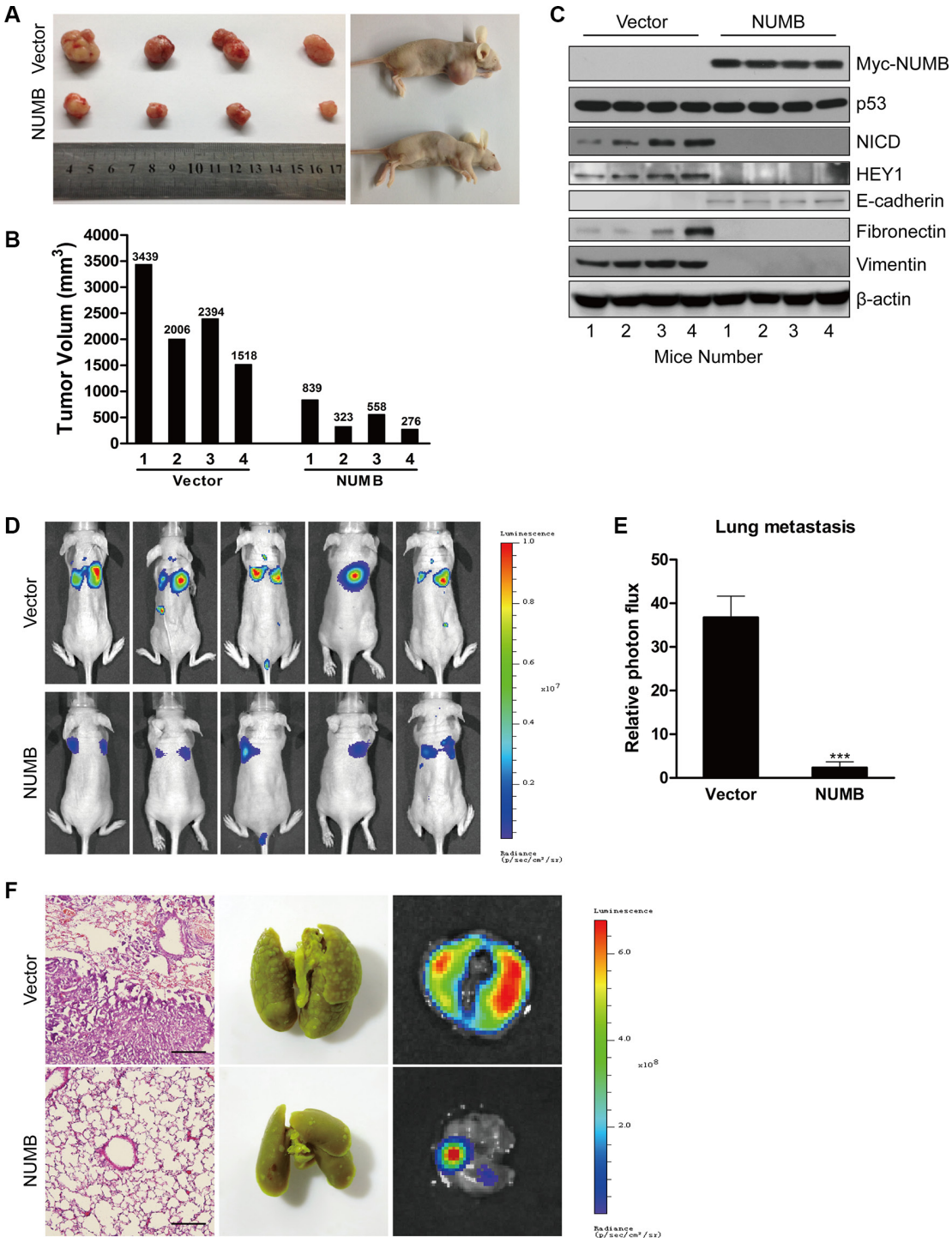


図 7

A,B) Numb overexpression ベクターまたは empty control ベクターを乳癌細胞株（MDA-MB-231）に導入し、各細胞をマウスに皮下注射した。Numb

overexpression 腫瘍は増殖能が低下していた。
C) 形成腫瘍検体を用いて Numb、NICD、EMT マーカー発現をウエスタンブロット法で検討した。Numb overexpression 腫瘍で Notch シグナル・EMT は抑制されていた。
D,E,F) 上記細胞をマウス尾静脈に静脈注射し肺転移能を比較した。Numb overexpression 細胞では肺転移能が低下していた。
参考文献 40：Zhang, J. *et al. Oncotarget.* (2016)より引用。

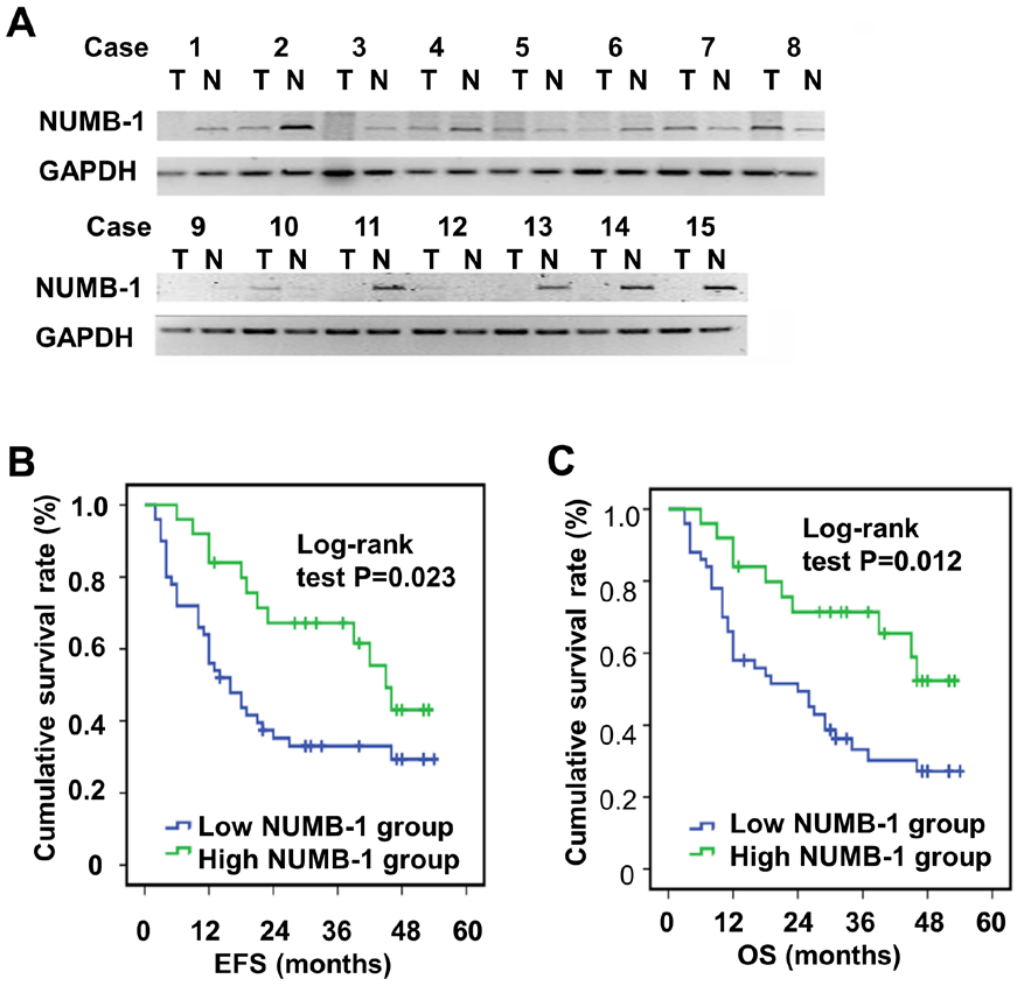
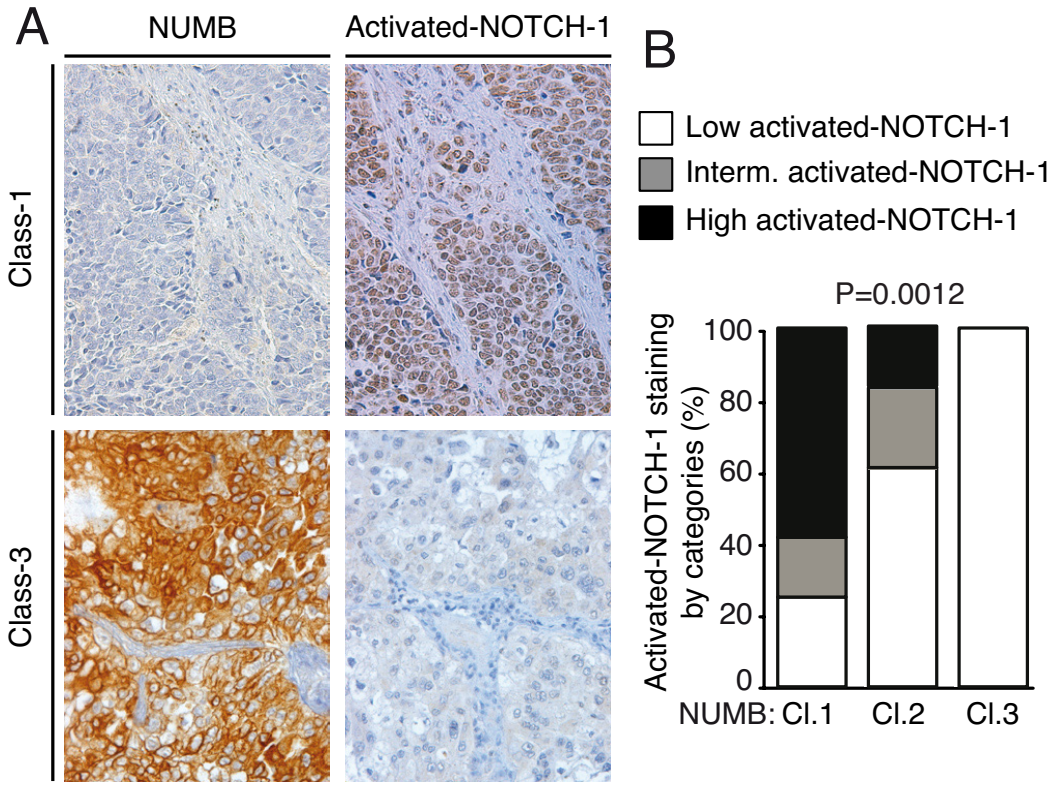
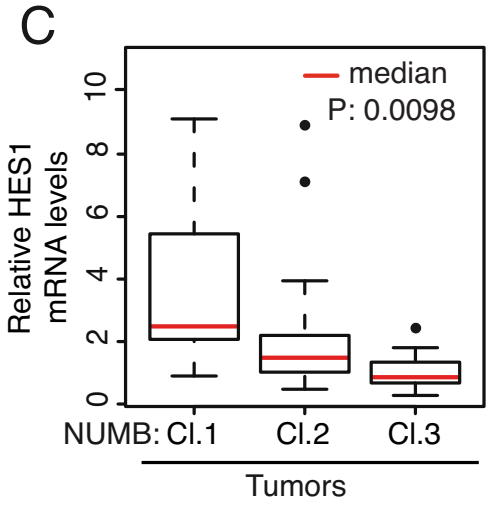


図 8
A) 食道癌検体と近傍正常組織における Numb mRNA 発現の比較。15 症例中 10 症例で食道癌検体において Numb 発現が低下していた。
B,C) 食道癌症例において Numb 高発現群は有意に予後が良好であった（EFS: event free survival、OS: overall survival)。
参考文献 39：Hong, J. *et al. Oncotarget.* (2014)より引用。





D

Patient	NUMB Class	HES1 levels
50	1	4.7
51	1	3.8
52	1	2.1
53	1	3.1
54	1	2.2
55	1	2.6
56	2	0.4
57	2	1.4
58	3	0.9
59	3	1.2

Primary cell lines

図 9

A,B) NSCLC 検体において Numb 発現と活性型 Notch1 発現に負の相関を認めた。

C,D) Numb 高発現腫瘍では HES1 mRNA 発現が有意に低かった。

参考文献 24：Westhoff, B. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (2009) より引用。

6）本研究の課題

上記をふまえ、我々は肺癌における組織型による Notch pathway の機能の違いに着目し、SCLC・NSCLC 臨床検体における活性型 Notch である NICD1 や Numb の発現を評価し予後との関連について検討した。さらに、肺 ADC 細胞株と肺 SCC 細胞株を用い、Numb knockdown・Numb overexpression による増殖能・移動能・浸潤能の変化を *in vitro* 及び *in vivo* において検討した。また、その際の Notch pathway および EMT マーカーの変化に関して検討した。

7）本研究の結論

SCLC において、NICD1 高発現群は予後が良好であり、これは Notch 遺伝子が腫瘍抑制的に機能しているとする既報に矛盾しない結果であった。一方、Numb 発現と予後に有意な関連を認めなかった。NICD1 発現と Numb 発現にも有意な相関を認めず、SCLC において Numb は Notch1 以外の Notch 受容体、もしくはその他の経路との関連が強い可能性が考えられた。

NSCLC においては、肺 ADC では NICD1 低発現・Numb 高発現は予後良好因子であったが、肺 SCC では NICD1 高発現は予後良好と関連していると考えられたが Numb 発現と予後に有意な関連を認めなかった。これらの結果から組織型により Numb がそれぞれ異なった機能を持つ可能性が考えられた。特に NSCLC における Numb の機能の違いに着目し細胞実験を進めたところ、肺 ADC において Numb は腫瘍増殖・EMT を抑制し、その機序として Numb の Notch シグナル抑制作用が関与していることが示された。一方、肺 SCC において Numb は腫瘍増殖を促進している可能性が考えられた。これらの結果から Numb は肺 ADC 患者に対する新たな治療戦略の標的の 1 つとなる可能性が考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ADC	adenocarcinoma
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ASCL-1	achaete-scute complex-like-1
CoA	coactivator
CoR	corepressor
Dll	Delta like ligand
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FBS	fatal bovine serum
HE	hematoxylin and eosin staining
Hes	hairy and enhancer of split
Hey	hairy/enhancer of split related with YRPW
NICD	Notch intracellular domain
NSCLC	non small cell lung carcinoma
Numb OE	Numb overexpression
Numb si	Numb siRNA
PBST	Phsophate Buffered Saline with Tween 20
poly-HEMA	poly 2-hydroxyethyl methacrylate
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10
Rb	Retinoblastoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SCC	squamous cell carcinoma
SCLC	small cell lung carcinoma
siRNA	small interfering RNA

実験方法

臨床検体（SCLC cohort）

2003 年 1 月から 2013 年 1 月までに北海道肺癌臨床研究会(HOT)もしくは福島県肺癌研究会(FIGHT)に所属する 16 施設にて肺原発巣を完全切除された SCLC 125 症例について検討した[42]。インフォームドコンセントは症例集積時点（2013 年 2 月から 2014 年 1 月）で生存していた症例からのみ取得した。適格基準は、原発巣を完全切除されていること、中央判定（北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座にて臨床情報を知らない複数の病理医師により行われた）により the 2004 World Health Organization classification[43]において SCLC または混合型 SCLC と病理診断されていることとした。FFPE 組織ブロックを 3μm 厚にスライス、コートスライドグラスに固着し、切片を作成した。

これは北海道大学医学部倫理委員会の承認を受けた研究である。

臨床検体（NSCLC cohort1,2）

1982 年から 1994 年までに北海道大学病院にて肺原発巣を完全切除された NSCLC143 例のうち腺扁平上皮癌 6 例、大細胞癌 2 例を除いた NSCLC（ADC または SCC）135 症例（cohort1）と 1996 年から 2004 年までに北海道大学病院にて肺原発巣を完全切除された NSCLC191 例のうち腺扁平上皮癌 3 例、大細胞癌 6 例を除いた NSCLC（ADC または SCC）182 症例（cohort2）について検討した。インフォームドコンセントは全ての症例から取得した。組織型は the 1982 World Health Organization criteria により評価された。cohort1 では、FFPE 組織ブロックを 3μm 厚にスライス、コートスライドグラスに固着し、切片を作成した。cohort2 では tissue microarray を用いた。

これらは北海道大学医学部倫理委員会の承認を受けた研究である。

臨床検体の免疫組織染色

SCLC cohort では Numb 発現と NICD1 発現を、NSCLC cohort1 では Numb 発現と NICD1 発現を、NSCLC cohort2 では Numb 発現を評価した。

スライドはキシレンとエタノールで脱パラフィン化を施行し､オートクレーブで抗原賦活を行った｡抗原賦活後メタノールと過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼ除去及び他種血清を用いて非特異的ブロッキング施行したのち 1 次抗体を添加し over night とした。1 次抗体に関しては抗 Numb 抗体 (1:500 dilution; ab14140, Abcam, Cambridge, UK) または抗 NICD1

抗体（1:400 dilution; #3608, Cell Signaling, Danvers, MA, USA）を用いた。Over night 後、Phsophate Buffered Saline with Tween 20（PBST）にて 5 分×3 回洗浄後、2 次抗体添加（30 分）し再度 PBST5 分×3 回洗浄行い、発色試薬(ヒストファイン DAB 基質キット;ニチレイバイオサイエンス)を用いて発色させた。その後 milli Q にて洗浄し、ヘマトキシリンで核染色施行した後に再度洗浄をおこなった。透徹を施行した後封入剤(マリノール)を用いてスライドガラスに封入した。

判定に関しては強拡大（400X）で細胞を観察した。Numb、NICD1 ともに positive control を気道上皮細胞とし、positive control より強く染まった細胞を strong、同等だった細胞を moderate、弱く染まった細胞を weak、染まらなかった細胞を negative と評価した。1 検体あたり 5 視野、1 視野あたり 100 腫瘍細胞で染色強度・染色細胞の割合を判定し、それぞれの平均を算出した。moderate-strong 細胞を陽性細胞とした。

細胞株

細胞株は NSCLC 細胞株（ADC：A549、PC9、SCC：H1520、H1703）を用いた。A549、H520、H1703 は American Type Culture Collection から購入し、PC9 は European Collection of Authenticated Cell Cultures から購入した。細胞株は 5% CO_2 下の 37℃湿潤環境にて 10%の牛胎仔血清（fatal bovine serum：FBS）を含めた Roswell Park Memorial Institute medium（RPMI）で培養した。

抗体、ウエスタンブロット法

各種蛋白の発現はウエスタンブロット法を用いて検討した。ウエスタンブロット法は NuPAGE プロトコールに従い施行した。

注入タンパク量を決定し、蛋白濃度より loading sample 量を計算後、メルカプトエタノール、LDS sample buffer と混合し GEL にそれぞれ注入し、泳動した。この際 Running Buffer は MOPS を使用した。泳動後 Trans-buffer を用いてメンブレンへ Transfer（60 分）を行い、Transfer 後にポンソ S で染色し蛋白のローディングが均一であるかを確認した。確認後 TBST で 5 分×3 回の洗浄施行後、5%スキムミルクを用いて blocking を行い、再度 TBST で 5 分×3 回洗浄し、1 次抗体添加し over night とした。

次に TBST で 5 分×6 回の洗浄施行後、2 次抗体を 60 分添加。再度 TBST で 5 分×6 回洗浄して撮影を行った。感光液は ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent（GE Healthcare）を用いた。1 次抗体に関しては抗 Numb

抗体（1:1000 dilution; ab14140, Abcam, Cambridge, UK)・抗 NICD2 抗体（1:5000 dilution; #5732, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)・抗 NICD3 抗体（1:500 dilution; ABP-PAB-10683, Allele Biotechnology, San Diego, CA, USA)・抗 E-cadherin 抗体（1:200 dilution; sc-7870, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)・抗 Actin 抗体（1:1500 dilution; A2066, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）はラビットポリクローナル抗体を、抗 NICD1 抗体（1:1000 dilution; #3608, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)・抗 Snail 抗体(1:1000 dilution; #3879, Cell signaling, Danvers, MA, USA)はラビットモノクローナル抗体を、抗 NICD4 抗体(1:1500 dilution; #2423, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)・抗 Vimentin 抗体（1:200 dilution; V6630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）はマウスモノクローナル抗体をそれぞれ使用した。

Real time Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

以下の処理はすべて RNAase free の器具を使用して行った。

1. RNA 抽出

RNA easy MINI Kit（Qiagen, Valencia, CA, USA）を使用し、そのプロトコールに従い施行した。一晩培養後の細胞をトリプシン処理・細胞回収後 300g×5 分遠心分離施行し細胞を沈殿させ、Buffer RLT plus を添加後シリンジにて細胞の破砕を行い専用のコレクションチューブに注入し 8000g×30 秒遠心施行。遠心後フロースルー液と同量の 70%エタノールを混合し専用のスピンカラムに注入し 8000g×30 秒遠心を施行。その後 Buffer RW 及び Buffer RPE を用いてスピンカラムを洗浄したのち RNAase free の水を添加し 8000g×1 分遠心行いコレクションチューブ内に RNA 抽出を行った。

2. Reverse transcription（TaqMan Reverse Transcription Reagants を使用）

1.にて抽出した RNA に上記 Kit 内の試薬（10× TaqMan RT Buffer、$MgCl_2$（25mM)、dNTP Mixture、Random Hexamer(50μM)、RNase Inhibitor(20U/μl)を混合・添加後、逆転写を行い（incubation(25℃×10 分)⇒Reverse transcription （48℃×30 分）⇒inactivation（95℃×10 分)) DNA 抽出した。

3. Real-time PCR

Standard として測定物質の発現が確認されている細胞の DNA を使用し、検量線を引くために DNA は濃度勾配を付けて Standard とした。内因性の control としては GAPDH（Applied Biosystems, Waltham, MA, USA）を使用

した。測定項目の溶液調整に関しては、Primer：Master mix：sample= 1：10：9 の割合で調整した(total 20μl/well)。GAPDH に関しては probe：forward primer：reverse primer：水：Master mix：sample=1：1：1：2：25:20(total 20μl/well)で調整した。sample 溶液調整後 ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を用いて RT-PCR(50℃/2min⇒95℃/10min⇒95℃/0.15min(40 サイクル)⇒60℃/1min) を施行した。

Small interfering RNA (siRNA)

6well プレートに A549・PC9・H520・H1703(いずれも 1.5×10^5 cells/well)を抗生剤無添加の培養液にて一晩培養を行った。培養後 3-5 割程度のコンフルエントの状態を確認後、Opti-MEM (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を溶媒として、50pmol Numb-siRNA (ON-TARGET plus SMART pool L-015902-00) (GE HealthCare Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, Waltham, MA, USA) 50μl と混合し、細胞へ添加しいずれかの siRNA を導入し培養開始、各 48 時間後に蛋白を回収しウエスタンブロット法により Numb 蛋白発現を確認した。Scrambled siRNA には ON-TARGET plus Non-targeting pool D-001810-10-05 (GE HealthCare Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を用いて control とした。

Numb overexpression

Numb の発現プラスミド (Numb-ORF plasmid；OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) 及び control 用プラスミド (pCMV6-entry；OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) 2μg を培地 OPTIMEM Ⅰ(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)250μl と混ぜた後、Turbofectin (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) 12μl を添加し、室温で 15 分間静置した。その後、混合液を 6well プレートで 24 時間培養した A549 細胞・H520 細胞に添加した。24 時間培養後 10cm dish に移し G418 (1000μg/ml) 入り培養液で selection を行い、stable clone を作成した。プラスミドの導入確認は蛍光顕微鏡、ウエスタンブロット法、RT-PCR を使用した。

MTT proliferation assay

① Numb-siRNA による細胞増殖能への影響の検討

足場依存性増殖の評価に 96well プレート (poly 2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) コーティングなし) を、足場非依存性増殖の評

価に 96well プレート（poly-HEMA コーティングあり）を使用した。96well プレート（poly-HEMA コーティングなし、あり）にそれぞれ A549（6000 cells/well、9000 cells/well)、PC9（4000 cells/well、9000 cells/well)、H520（8000 cells/well、12000 cells/well)、H1703（5000 cells/well、9000 cells/well）を各々一晩培養後、Numb-siRNA または Scrambled siRNA を transfection し、さらに 72 時間培養した。細胞増殖活性の検討のために Dye solution を各 well に 10μl 注入し、その 4 時間後に stop solution 90μl を注入し、さらにその 1 時間後に MTT proliferation assay を施行した。MTT proliferation assay においては Thermo Fisher Scientific 社のマイクロプレートリーダー（Varioskan Flash）を使用して解析した。

② Numb overexpression による細胞増殖能への影響の検討

同様に足場依存性増殖・足場非依存性増殖を評価した。96well プレート（poly-HEMA コーティングなし、あり）に Numb overexpression ベクターまたは control ベクターを導入した A549(3000 cells/well、6000 cells/well)、H520（6000 cells/well、12000 cells/well）を各々72hr 培養後、MTT proliferation assay を上記同様に施行した。

Migration、Invasion assay

① Numb-siRNA による細胞移動能・浸潤能への影響の検討

migration assay、invasion assayはともに24well Transwellプレートを用い、invasion assayにはマトリゲル(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA）を使用した。

0.1%FBS含有培養液350μl/wellをupper chamberに、10%FBS含有培養液500μl/wellをlower camberに入れ、Numb-siRNAまたはScrambled siRNAをtransfection した48hr後にそれぞれの細胞を回収しmigration assay、invasion assayそれぞれA549（14000 cells/well、35000 cells/well)、PC9（14000 cells/well、35000 cells/well)、H520（56000 cells/well、70000 cells/well)、H1703（28000 cells/well、70000 cells/well）づつ撒種し培養した。migration assayは撒種4時間後に、invasion assayは撒種24時間後にそれぞれmembraneをDiff-Quik染色で染め、染色された細胞数を強拡大5視野/wellカウントし評価した。

② Numb overexpression による細胞移動能・浸潤能への影響の検討

同様にmigration assay、invasion assayそれぞれNumb overexpression

ベクターまたはcontrolベクターを導入したA549（14000 cells/well、35000 cells/well)、H520（56000 cells/well、70000 cells/well）づつ撒種し培養した。migration assayは撒種4時間後に、invasion assayは撒種24時間後にそれぞれmembraneをDiff-Quik染色で染め、染色された細胞数を強拡大5視野/wellカウントし評価した。

ゼノグラフトマウスモデル

動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に基づき施行した。5 週齢の雌のヌードマウス（nu+/nu+）を異種移植モデルに使用した。Numb overexpression A549 または control A549（ともに 1×10^6 cells）を 200μl の PBS で希釈し、ヌードマウスの右後ろ脚に皮下注射で移植した。2 回/週デジタルキャリパーで腫瘍を計測した。大きさ（Tumor Volume: TV）は以下の計算式を用いた [44]。TV= （Length）×（Width）×（Height）/2 [45]。治療の副作用の有無の確認のために体重を 2 回/週の頻度で測定した。体重の 20%以上減少、腫瘍の潰瘍化、壊死、歩行障害などを認めた場合は安楽死とした。

また一部のゼノグラフトモデルの腫瘍を細胞移植 15 日目に摘出し、Numb・Notch1 発現を評価するためウエスタンブロット法、免疫組織染色を行った。

マウス皮下腫瘍の免疫組織学的染色

治療開始 15 日目に、一部のゼノグラフトモデルの腫瘍を摘出し、腫瘍をパラフィン包埋後に切片を作製。その後キシレンとエタノールで脱パラフィン化施行後、オートクレーブで抗原賦活を行った。抗原賦活後メタノールと過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼ除去及び他種血清を用いて非特異的ブロッキング施行したのち 1 次抗体を添加し over night とした。1 次抗体に関しては抗 Numb(1:500 dilution; ab14140, Abcam, Cambridge, UK) 及び抗 Notch1(1:400 dilution; #3608, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) を用いた。Over night 後、PBST にて 5 分×3 回洗浄後、2 次抗体添加（30 分）し再度 PBST5 分×3 回洗浄行い、発色試薬（ヒストファイン DAB 基質キット；ニチレイバイオサイエンス）を用いて発色させた。その後 milli Q にて洗浄し、ヘマトキシリンで核染色施行した後に再度洗浄をおこなった。透徹を施行した後封入剤(マリノール)を用いてスライドガラスに封入した。評価に関しては強拡大（400X）で細胞を観察した。

統計解析

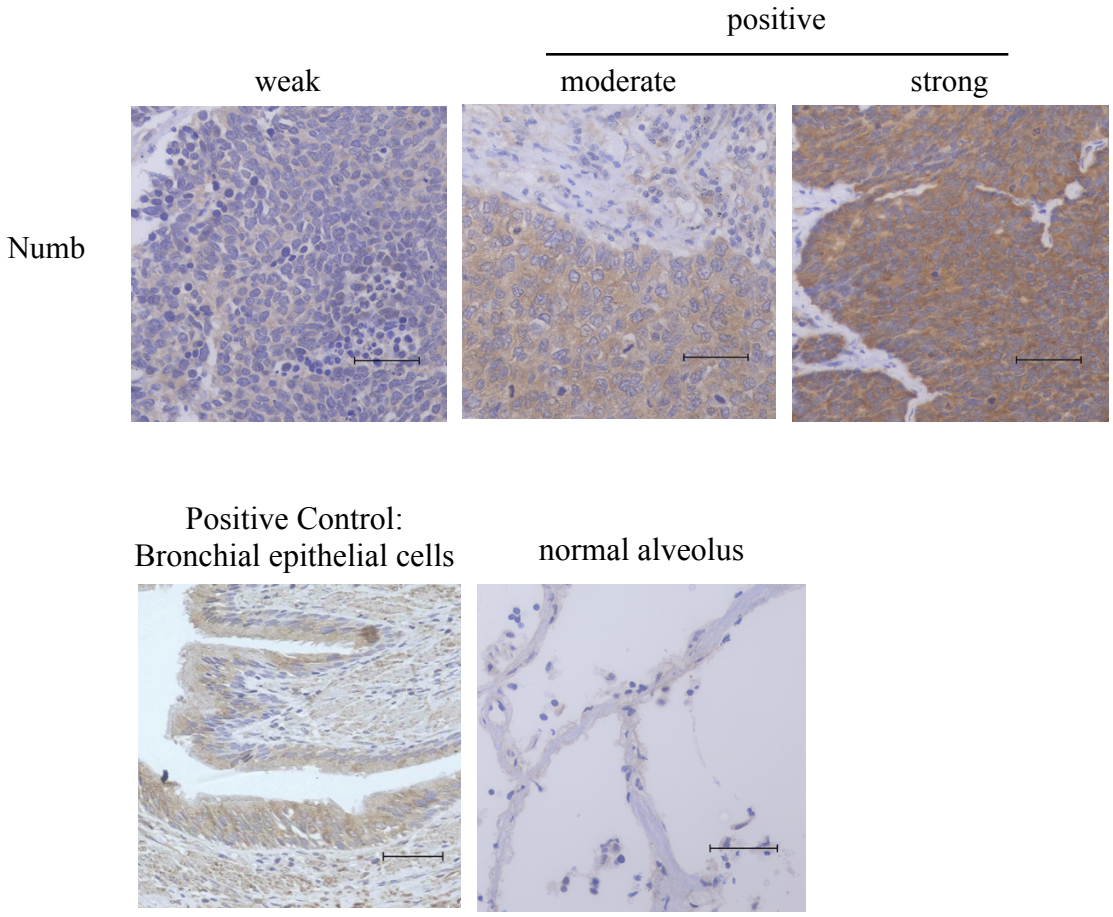
Notch1、Numb 発現と臨床病理学的因子との関連の解析はχ^2検定または Fisher 正確検定で施行した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて評価し、群間比較はログランク検定で施行した。予後関連因子の検討には Cox 比例ハザードモデルを使用した。*in vitro*、*in vivo* データの解析は全て Student t 検定で施行した。統計学的有意差は P value < 0.05 とした。ソフトウェアは JMP software (JMP® Pro 11.0.0; SAS Institute Inc, USA)を使用した。

実験結果

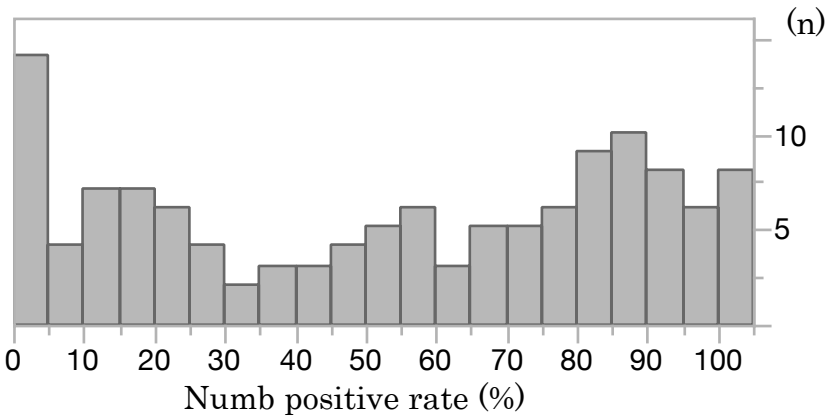
1）SCLC における Numb 発現と予後との関連

SCLC Cohort で Numb 免疫組織染色を行った。SCLC における Numb 免疫組織染色結果、Numb 陽性細胞割合の分布を図 10A, 10B に示す。Numb 陽性細胞割合中央値は 57.8% (95%CI:46.6-70.8)であった。中央値をカットオフとし Numb 高発現群 (n=63)、低発現群(n=62)に分け Numb 発現と全生存期間との関係を評価したが、2 群間に有意な差を認めなかった（図 10C)。

A



B



C

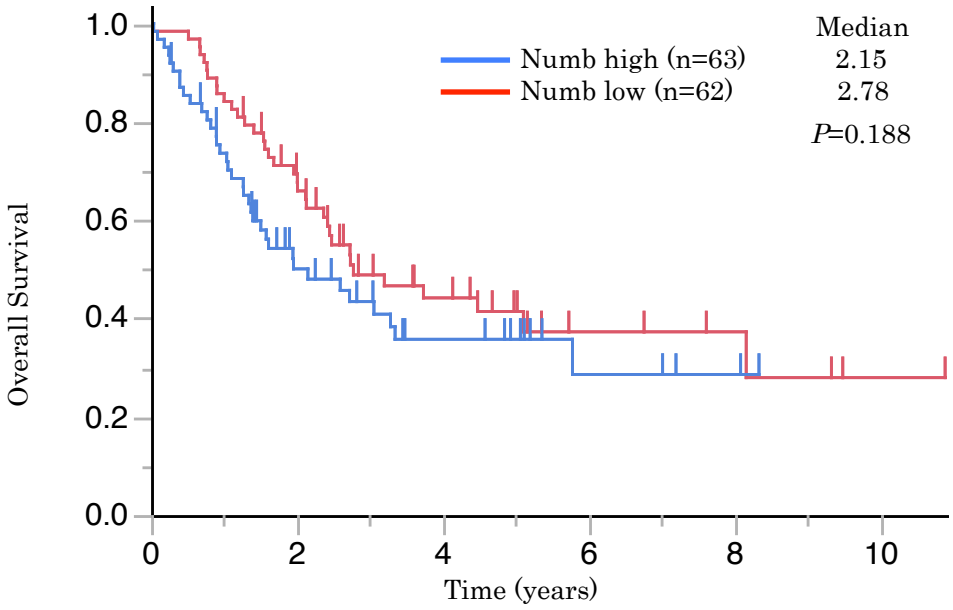


図 10

A) SCLC における Numb の免疫組織染色パターン、scale bar=50μm

B) SCLC における Numb 陽性細胞割合の分布

C) SCLC における Numb 高発現群と低発現群の全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線。2 群間の予後に有意な差を認めなかった。

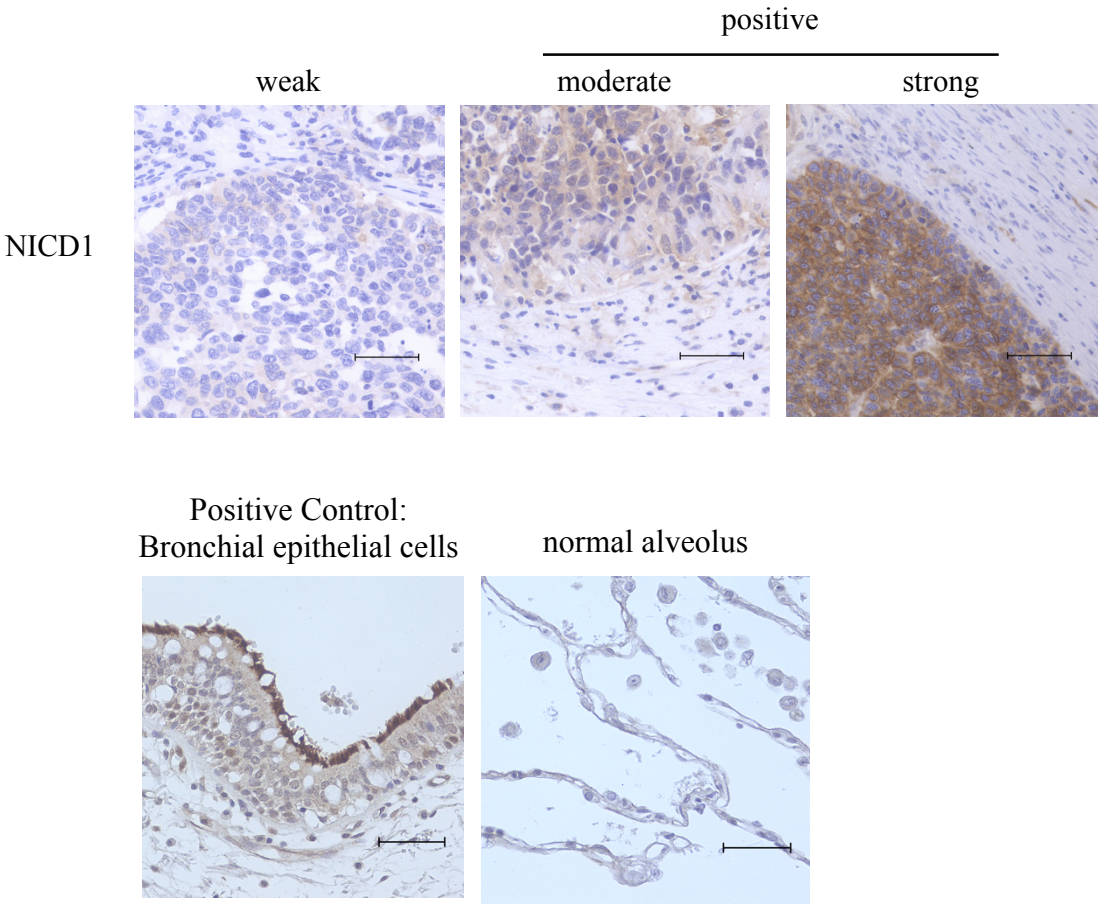
2) SCLC における NICD1 の発現と予後・Numb 発現との関連

次に、SCLC Cohort で NICD1 免疫組織染色を行った。SCLC における NICD1 免疫組織染色結果、NICD1 陽性細胞割合の分布を図 11A, 11B に示す。Notch1 受容体はγセクレターゼにより切断され、NICD1 が細胞膜から核へ移行し標的遺伝子の転写が活性化する。よって、NICD1 免疫組織染色において活性型 Notch1 を評

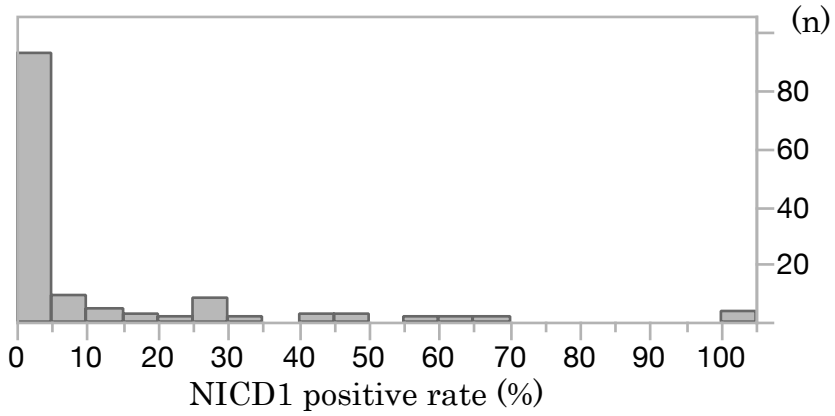
価するため細胞質または核が moderate-strong に染まっている細胞を陽性細胞と判断し、膜のみが染まった細胞は陰性細胞と判断した[24,46]。SCLC の検討では膜のみが染色された症例はなかった。NICD1 陽性細胞割合中央値は 0%(95%CI:0-0.6)であった。5%をカットオフとし NICD1 高発現群 (n=33)、低発現群(n=92)に分け NICD1 発現と全生存期間との関係を評価したところ、NICD1 高発現群は低発現群と比べ有意に全生存期間が長かった(図 11C)。

NICD1 発現と Numb 発現の関連を検討したが、NICD1 発現と Numb 発現に有意な相関を認めなかった(Table 1)。

A



B



C

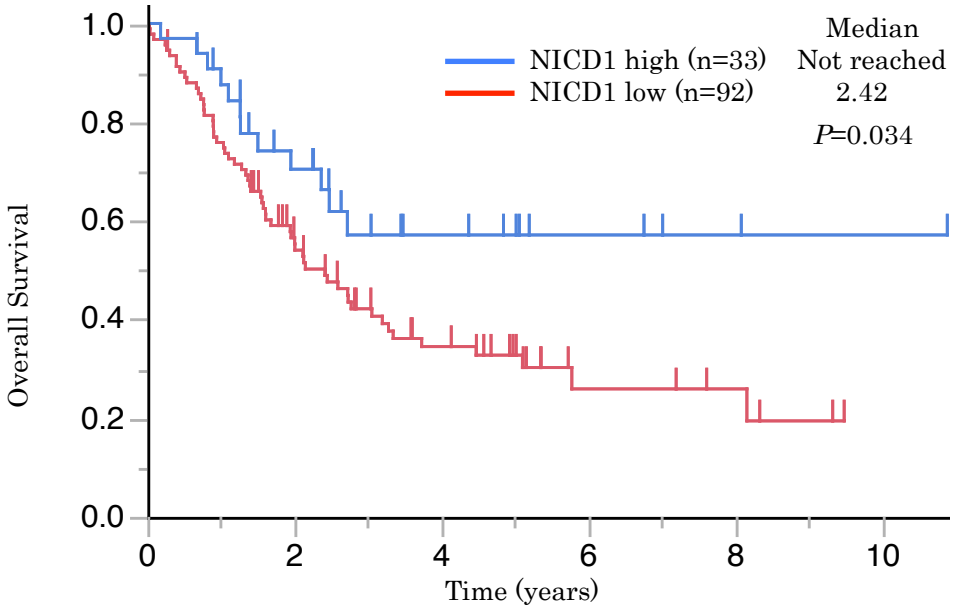


図 11

A) SCLC における NICD1 の免疫組織染色パターン、scale bar=50μm

B) SCLC における NICD1 陽性細胞割合の分布

C) SCLC における NICD1 高発現群と低発現群の全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線。NICD1 高発現群は有意に予後が良好であった。

Table 1　NICD1 発現と Numb 発現との相関

	NICD1 expression		
	Low	High	*P*
Numb expression			
Low	51	12	0.070
High	41	21	

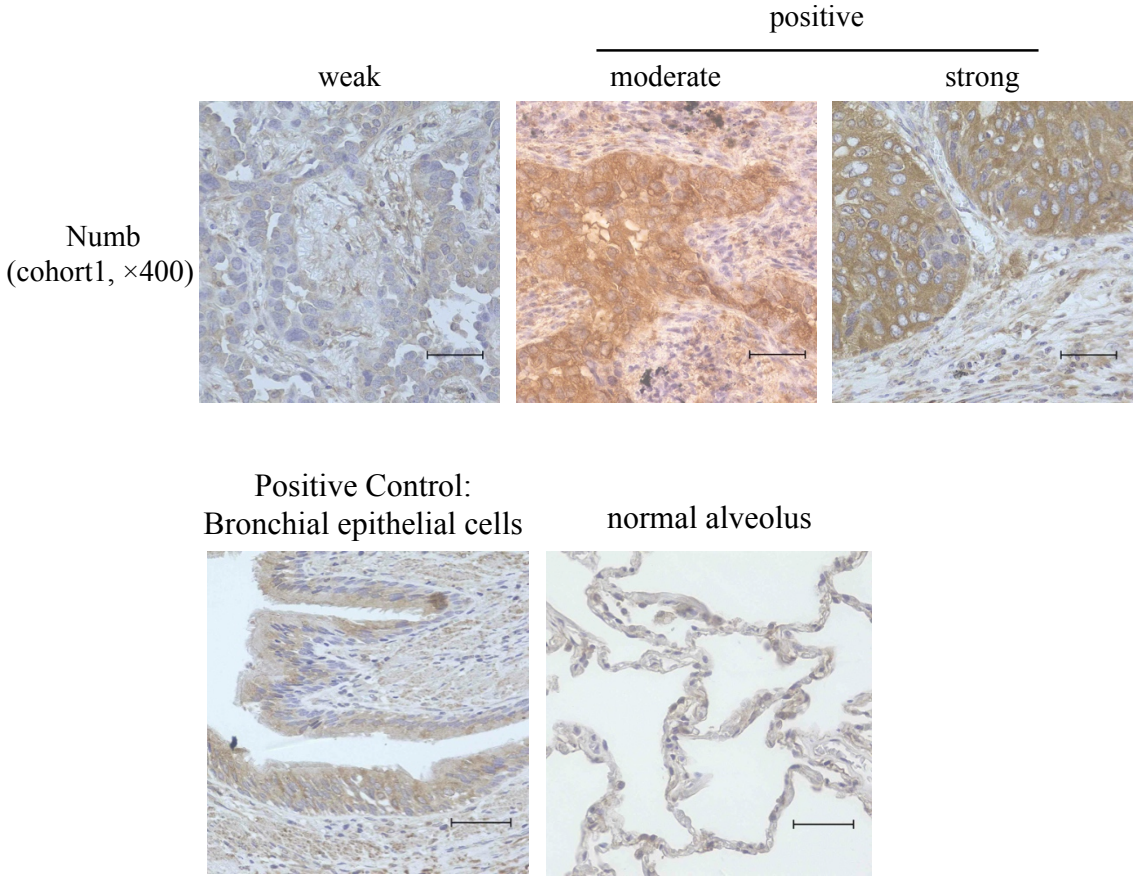
3) NSCLC における Numb 発現と予後との関連

次に NSCLC cohort1、cohort2 で Numb の発現を評価した。Numb は正常気道上皮細胞を免疫組織染色における positive control とした。肺胞上皮細胞は weak の染色を示した（**図 12A**)。Numb は主に腫瘍細胞の細胞質で染色された(**図 12A,12C**)。cohort1 の Numb 陽性細胞割合の分布を**図 12B** に、cohort2 の Numb 陽性細胞割合の分布を**図 12D** に示す。中央値はそれぞれ 75.1% (95%CI:70.0-80.0)、88.5% (95%CI:86.5-90.0)であった。ADC・SCC それぞれにおける Numb 発現と予後との関連をより正確に評価するため、2 つの cohort を統合解析し検討することとした。それぞれの中央値をカットオフとし肺 ADC Numb 高発現群 (n=111)、低発現群(n=86)に、肺 SCC Numb 高発現群 (n=48)、低発現群(n=72)に分け、予後との関連について検討を行った。

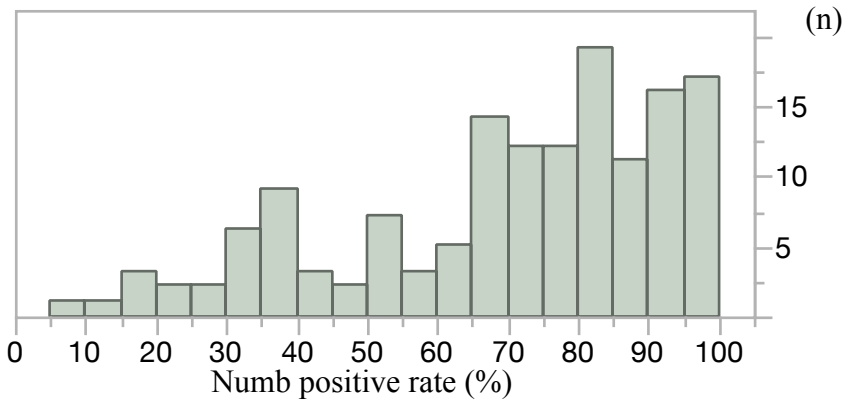
ADC 症例においては、Numb 高発現群は低発現群と比較し有意に予後が良好であったが、SCC 症例では 2 群間に有意な差を認めなかった（**図 12E,12F**)。

これらの結果から、Numb が NSCLC において組織型により異なった機能を持っており、肺 ADC においては Numb が tumor suppressor として機能している可能性が考えられた。

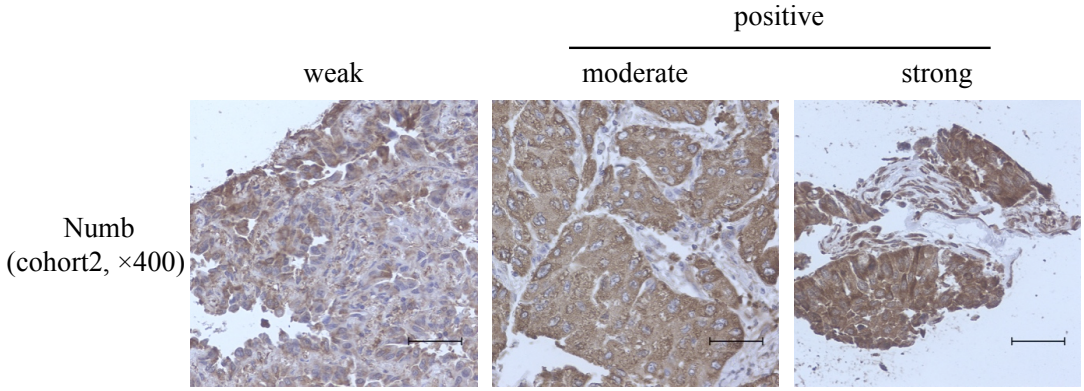
A


positive
weak
moderate
strong
Numb
(cohort1, ×400)
Positive Control:
Bronchial epithelial cells
normal alveolus

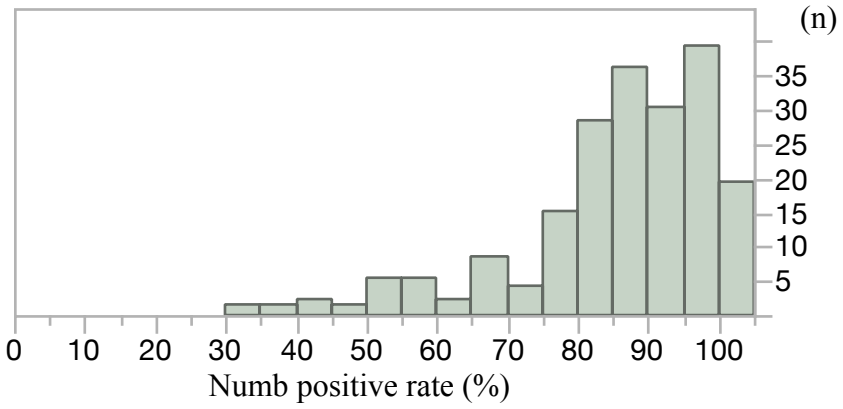
B


(n)
15
10
5
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Numb positive rate (%)

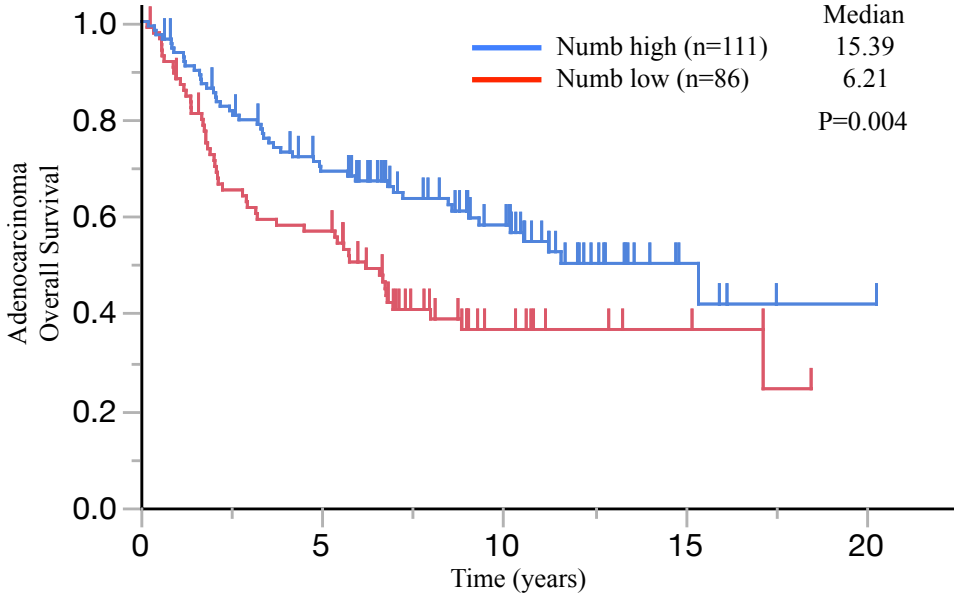
C


positive
weak
moderate
strong
Numb
(cohort2, ×400)

D


(n)
35
30
25
20
15
10
5
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Numb positive rate (%)

E


Median
Numb high (n=111)
15.39
Numb low (n=86)
6.21
P=0.004
Adenocarcinoma
Overall Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
Time (years)

F

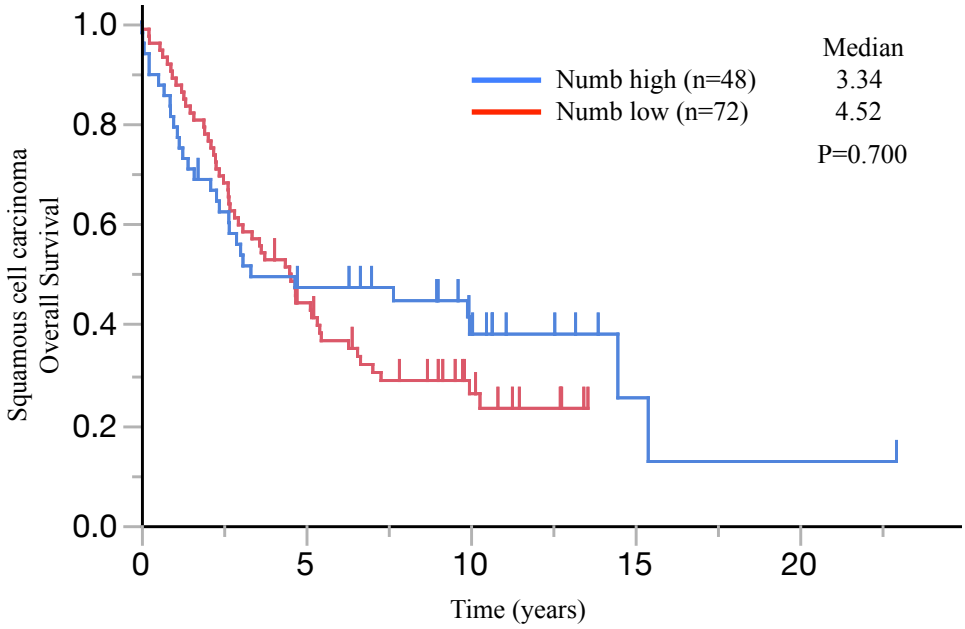


図 12

A) NSCLC cohort1 の Numb 免疫組織染色、scale bar=50μm

B) NSCLC cohort1 の Numb 陽性細胞割合分布

C) NSCLC cohort2 の Numb 免疫組織染色、scale bar=50μm

D) NSCLC cohort2 の Numb 陽性細胞割合分布

E) ADC 症例における Numb 高発現群と低発現群の全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線。Numb 高発現群は有意に予後が良好であった。

F) SCC 症例における Numb 高発現群と低発現群の全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線。2 群間の予後に有意な差を認めなかった。

4) NSCLC における NICD1 の発現と予後・Numb 発現との関連

NSCLC cohort1 で NICD1 の免疫組織染色を行った。NICD1 は正常気道上皮細胞を免疫組織染色における positive control とした。肺胞上皮細胞は weak の染色を示した（**図 13A**）。SCLC cohort の NICD1 評価と同様に細胞質または核が moderate-strong に染まっている細胞を陽性細胞と判断し、膜のみが染まった細胞は陰性細胞と判断した(**図 13B**)[24,46]。NICD1 陽性細胞割合の分布を**図 13C** に示す。中央値は 10%（95%CI:6.0-13.2)であった。中央値をカットオフとし肺 ADC NICD1 高発現群（n=29)、低発現群(n=53)に、肺 SCC NICD1 高発現群（n=41)、低発現群(n=21)に分け、検討を行った。

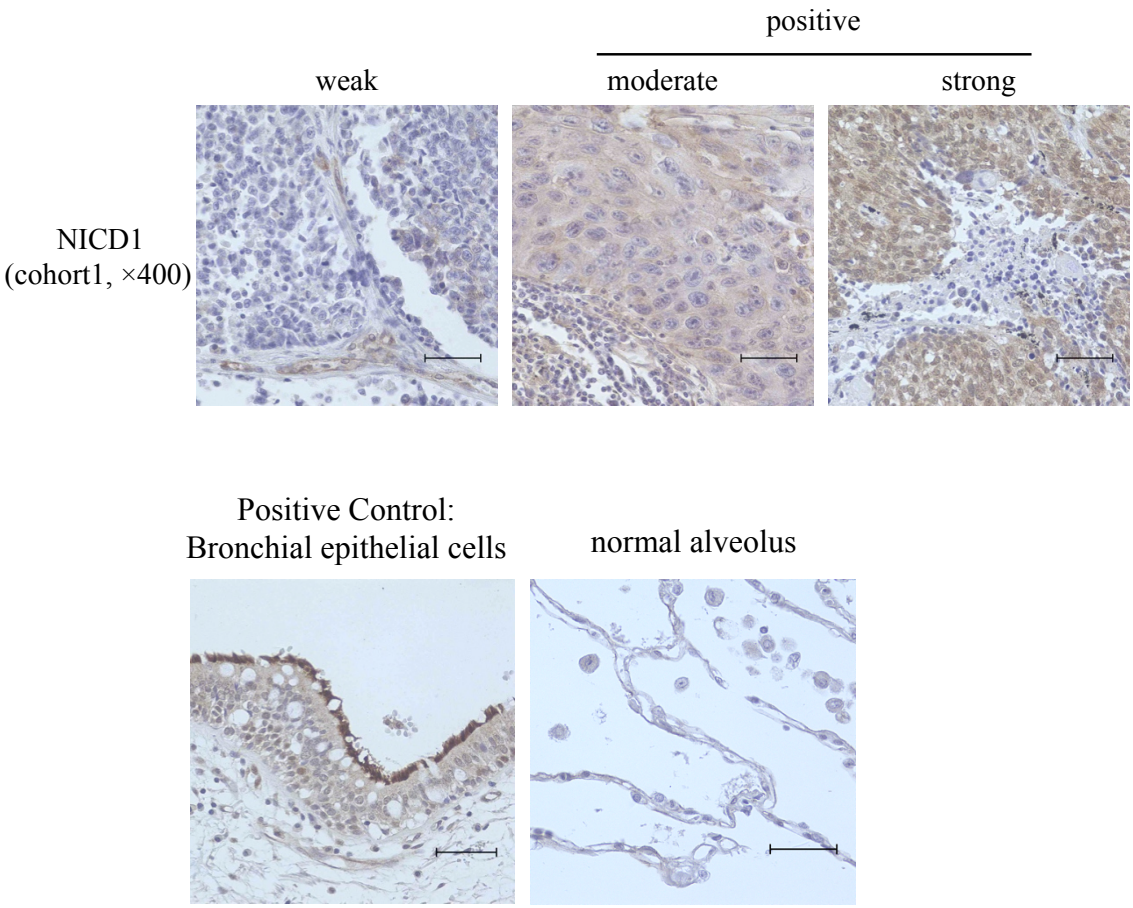
ADC 症例において、NICD1 高発現群が低発現群と比較し有意に予後が悪かった

が、SCC 症例では逆に Notch1 高発現群が低発現群と比較し予後がよい傾向を認めた（**図 13D, 13E**）。この結果は肺 ADC と肺 SCC において Notch シグナルと予後との関連が異なるという既報[46]に矛盾ないものであった。

NICD1 発現と Numb 発現の関連を検討したところ、ADC 症例においては NICD1 発現と Numb 発現に有意な負の相関を認めたが、SCC 症例においては有意な相関を認めなかった（**Table 2, 3**）。

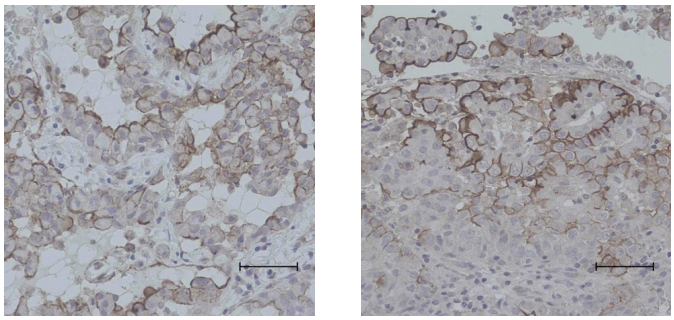
これらの結果・既報から、肺癌において Numb・Notch1 は組織型により異なった機能を持っている可能性が考えられた。

A

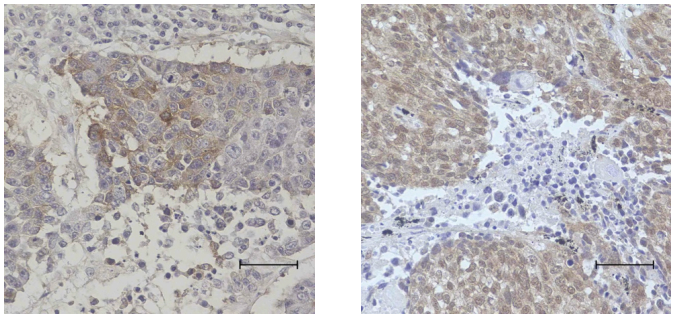


B

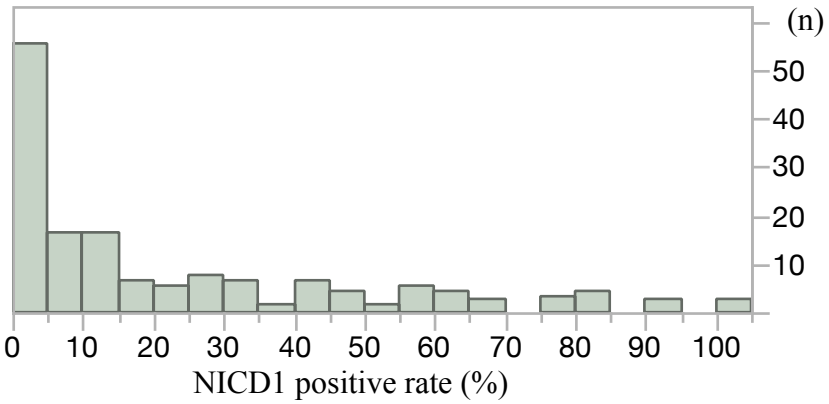
Only membrane
: negative



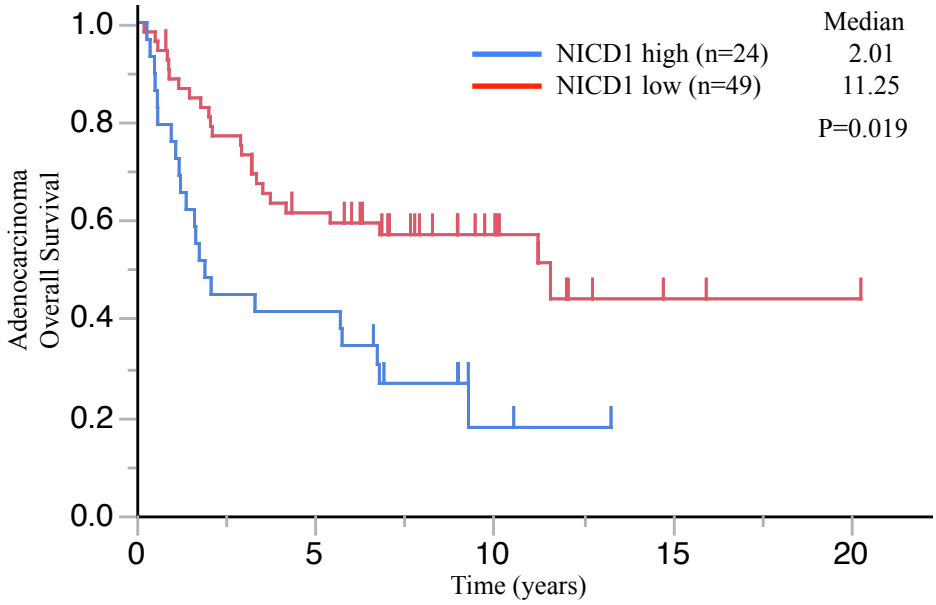
Cytoplasm and/or nuclear
: positive



C



D



E

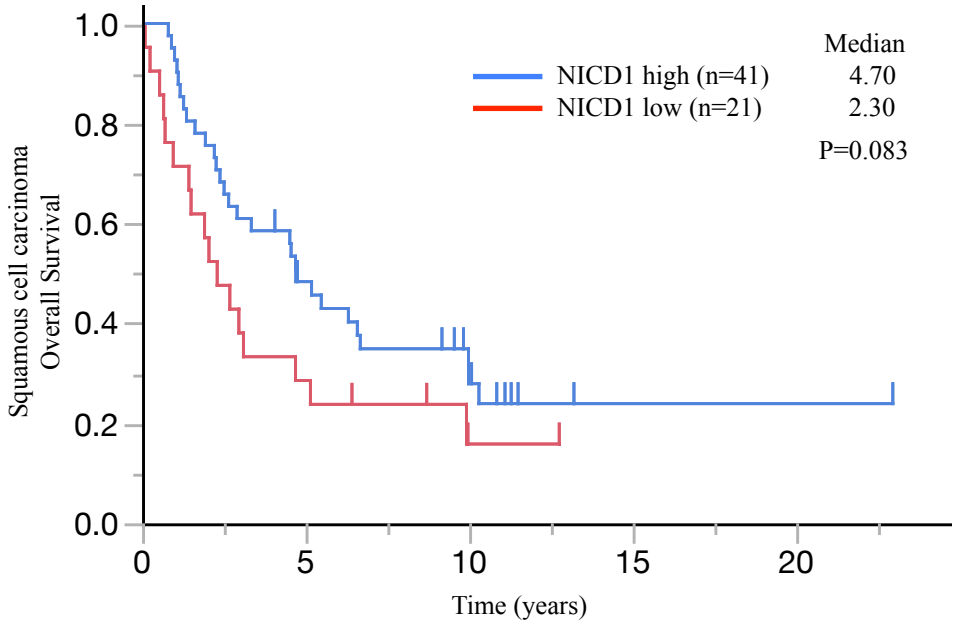


図 13

A) NSCLC cohort1 の NICD1 免疫組織染色、scale bar=50μm

B) NICD1 免疫組織染色の評価方法、scale bar=50μm

C) NSCLC cohort1 の NICD1 陽性細胞割合分布

D) NSCLC cohort1 の ADC 症例における NICD1 高発現群と低発現群の全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線。NICD1 高発現群は有意に予後が不良であ

った。

E) NSCLC cohort1 の SCC 症例における NICD1 高発現群と低発現群の全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線。NICD1 高発現群は予後がよい傾向を認めた。

Table 2 NSCLC cohort1 の ADC 症例における NICD1 発現と Numb 発現の相関

	NICD1 expression		
	Low	High	*P*
Numb expression			
Low	14	15	0.010
High	35	9	

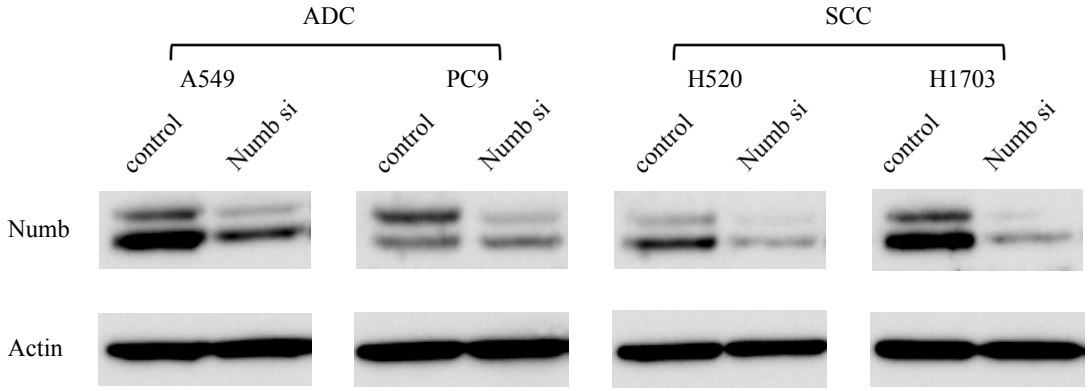
Table 3 NSCLC cohort1 の SCC 症例における NICD1 発現と Numb 発現の相関

	NICD1 expression		
	Low	High	*P*
Numb expression			
Low	12	26	0.784
High	9	15	

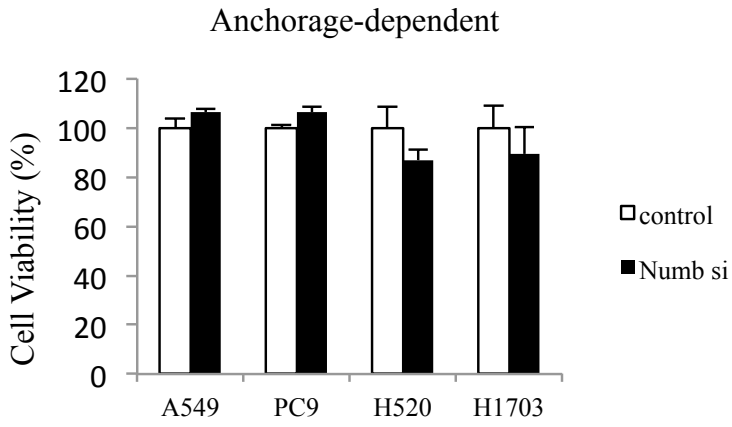
5) NSCLC 細胞株における Numb knockdown の増殖能や移動能、浸潤能への影響 (in vitro)

これまでの免疫組織染色の結果に基づき肺 ADC と SCC における Numb の機能の違いを検討するために、肺 ADC 細胞株 A549・PC9 と肺 SCC 細胞株 H520・H1703 を用いて細胞実験を進めていくこととした。はじめにこれらの細胞株に Numb-siRNA を導入したところ、Numb タンパク発現が低下することを確認した(**図 14A**)。いずれの細胞株でも足場依存性増殖は control 細胞と Numb knockdown 細胞に有意な差を認めなかった (**図 14B**) が、Numb knockdown ADC 細胞は control 細胞と比べ足場非依存増殖が有意に増加した (**図 14C**)。逆に肺 SCC 細胞においては、Numb knockdown により足場非依存性増殖が有意に低下した (**図 14C**)。さらに migration assay・invasion assay において、肺 ADC 細胞では Numb knockdown により migration 細胞数・invasion 細胞数が増加したが、肺 SCC 細胞では減少した (**図 14D,14E**)。

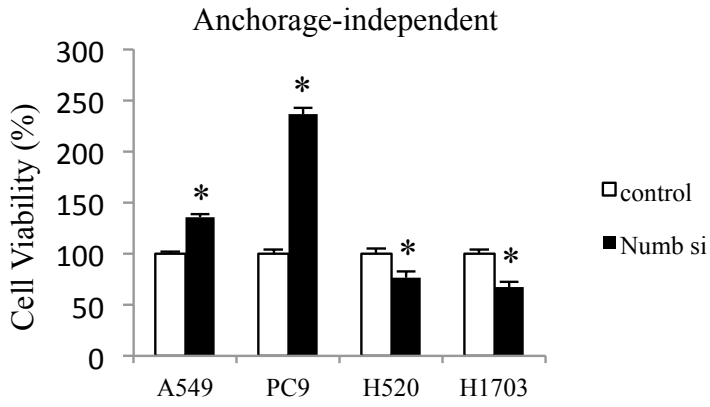
A


ADC
SCC
A549
PC9
H520
H1703
control
Numb si
control
Numb si
control
Numb si
control
Numb si
Numb
Actin

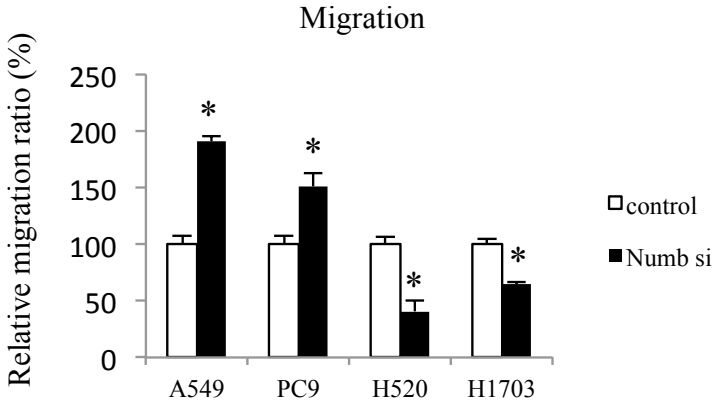
B


Anchorage-dependent
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
A549
PC9
H520
H1703
control
Numb si

C


Anchorage-independent
Cell Viability (%)
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
*
A549
PC9
H520
H1703
control
Numb si

D



E

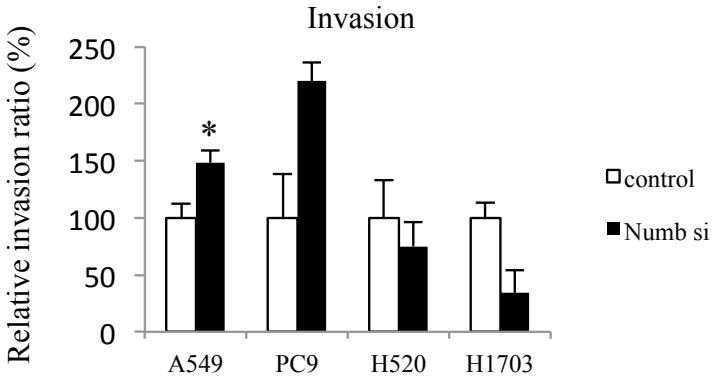


図 14

A) 肺 ADC・SCC 細胞株における Numb siRNA による Numb タンパク発現の変化。Numb siRNA による Numb 発現の低下を確認した。

B) Numb knockdown による足場依存性増殖能の変化、＊：P<0.05。いずれの細胞株においても足場依存性増殖能の変化を認めなかった。

C) Numb knockdown による足場非依存性増殖能の変化、*:P<0.05。Numb knockdown ADC 細胞は control 細胞と比べ足場非依存増殖が有意に増加したが、逆に肺 SCC 細胞においては Numb knockdown により足場非依存性増殖が有意に低下した。

D) Numb knockdown による移動能の変化、＊：P<0.05。肺 ADC 細胞では Numb knockdown により migration 細胞数が増加したが、肺 SCC 細胞では減少した。

E) Numb knockdown による浸潤能の変化、＊：P<0.05。肺 ADC 細胞では Numb knockdown により invasion 細胞数が増加したが、肺 SCC 細胞では減少した。

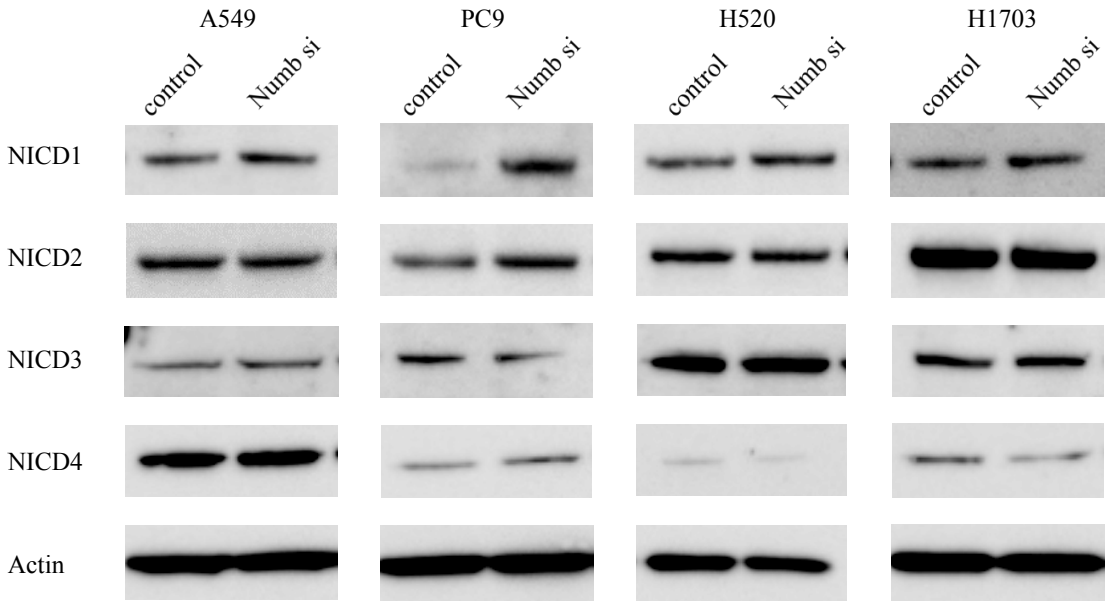
ADC: adenocarcinoma、SCC: squamous cell carcinoma、Numb si: Numb siRNA

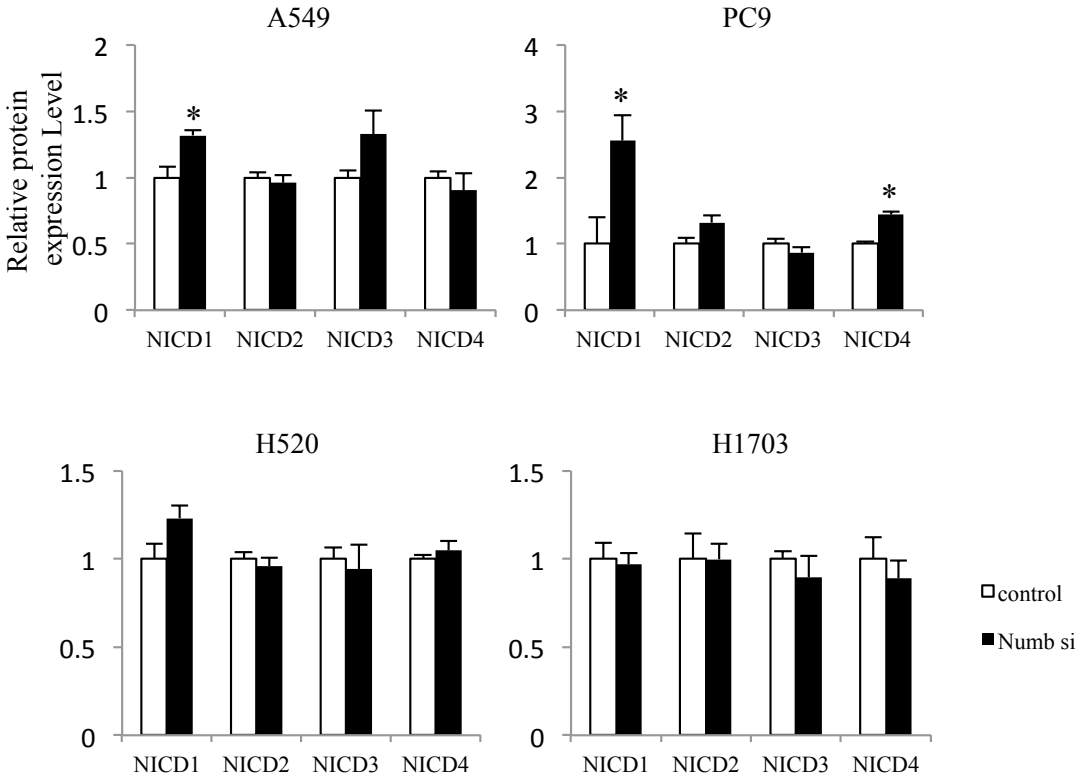
6）NSCLC 細胞株における Numb knockdown の Notch シグナルや EMT マーカーへの影響（in vitro）

次に Numb の抑制が Notch シグナルに与える影響を調べた。ウエスタンブロット法により NICD1-4 発現を、RT-PCR により Notch 標的遺伝子である Hes1・Hey1 発現を評価した。A549 では、Numb knockdown により NICD1 発現は有意に増加したが、NICD2-4 発現に有意な変化を認めなかった。PC9 では、Numb knockdown により NICD1・NICD4 発現は有意に増加したが、NICD2・NICD3 発現に有意な変化を認めなかった（**図 15A**）。さらに、A549・PC9 ともに、Numb knockdown により Hey1 mRNA 発現が有意に増加した（**図 15C**）。一方で、肺 SCC 細胞では Numb knockdown により NICD1-4 タンパク発現、Hes1・Hey1 mRNA 発現いずれも有意な変化を認めなかった（**図 15A-C**）。

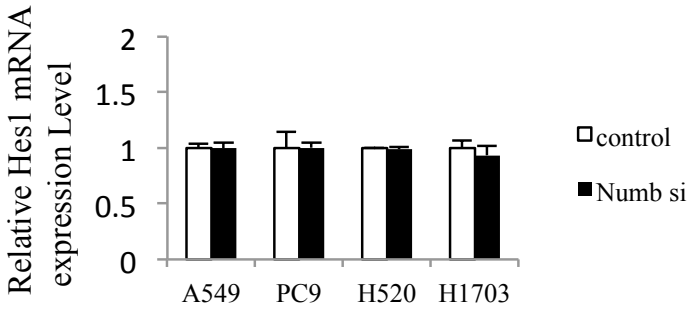
癌細胞は EMT が生じることで移動能・浸潤能を獲得することが示されており[47-50]、EMT マーカーである E-cadherin・Vimentin・Snail のタンパク発現の変化についてウエスタンブロット法を用いて検討した。肺 ADC 細胞において Numb knockdown により E-cadherin の発現は低下傾向を認めた。Vimentin 発現は A549 で有意に増加し、PC9 では増加傾向を認めた。Snail 発現は ADC 細胞ともに増加傾向を認めた。一方、肺 SCC 細胞では H520 細胞での E-cadherin 発現の低下を除いて、Numb knockdown による有意な EMT マーカーの変化を認めなかった（**図 15D**）。

A

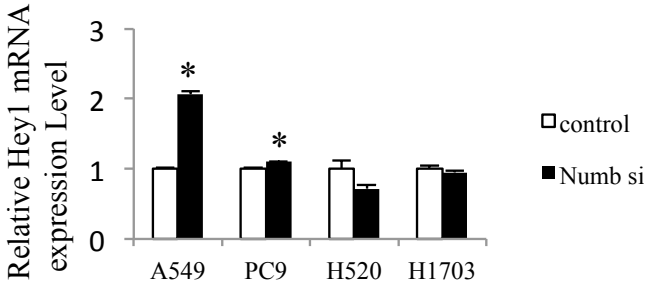



A549
PC9
H520
H1703
Relative protein expression Level
NICD1
NICD2
NICD3
NICD4
control
Numb si

B


Relative Hes1 mRNA expression Level
A549
PC9
H520
H1703
control
Numb si

C


Relative Hey1 mRNA expression Level
A549
PC9
H520
H1703
control
Numb si

D

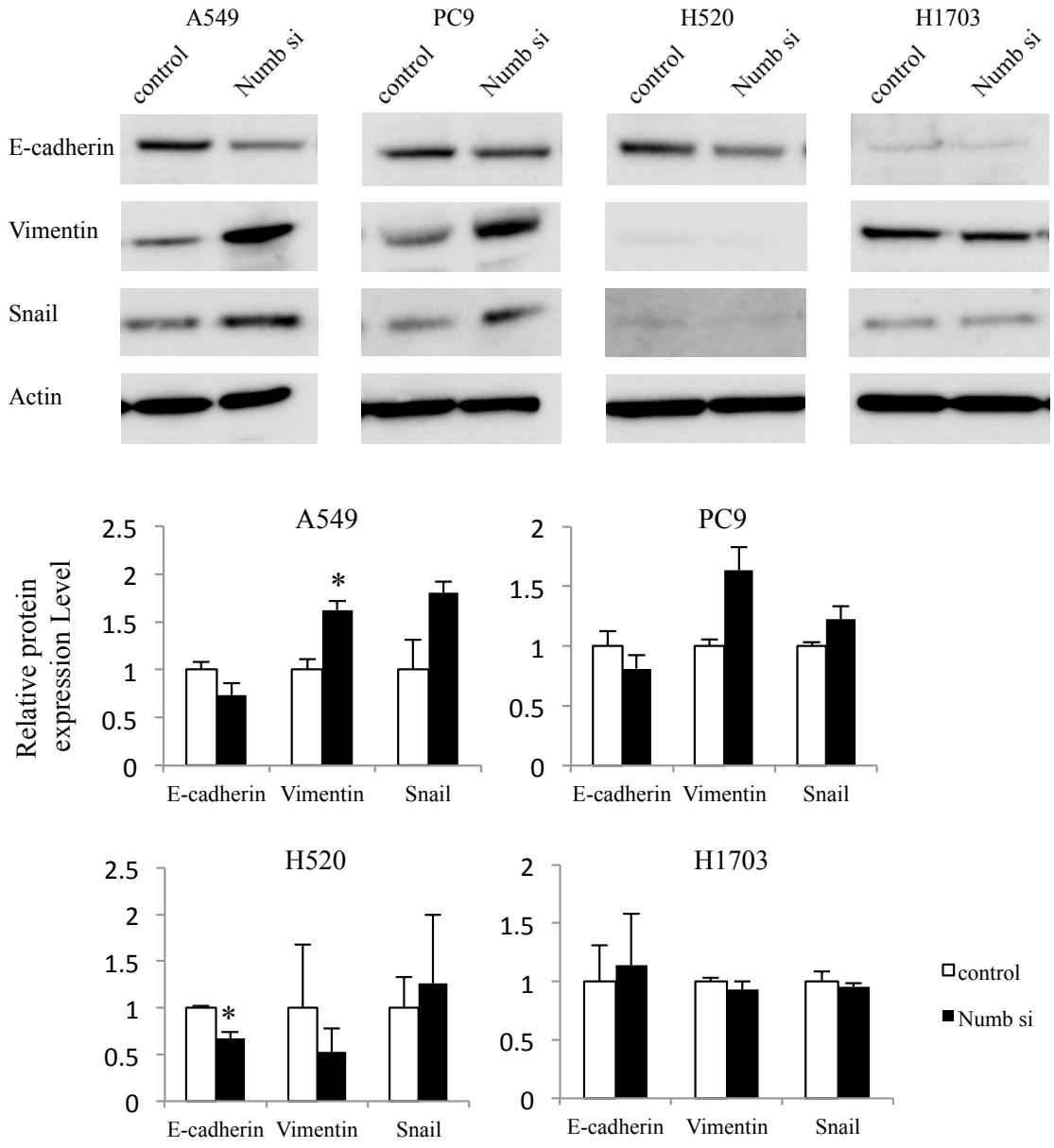


図 15

A) Numb knockdown による NICD1-4 タンパク発現の変化、＊：P<0.05。A549 では Numb knockdown により NICD1 発現は有意に増加し、PC9 では NICD1・NICD4 発現が有意に増加した。一方、肺 SCC 細胞では Numb knockdown による NICD1-4 タンパク発現の有意な変化を認めなかった。

B) Numb knockdown による Hes1 mRNA 発現の変化、＊：P<0.05。肺 ADC 細胞・SCC 細胞いずれにおいても Numb knockdown による Hes1 mRNA 発現の有意な変化を認めなかった。

C) Numb knockdown による Hey1 mRNA 発現の変化、＊：P<0.05。肺 ADC 細胞では

Numb knockdown により Hey1 mRNA 発現が有意に増加したが、肺 SCC 細胞では有意な変化を認めなかった。

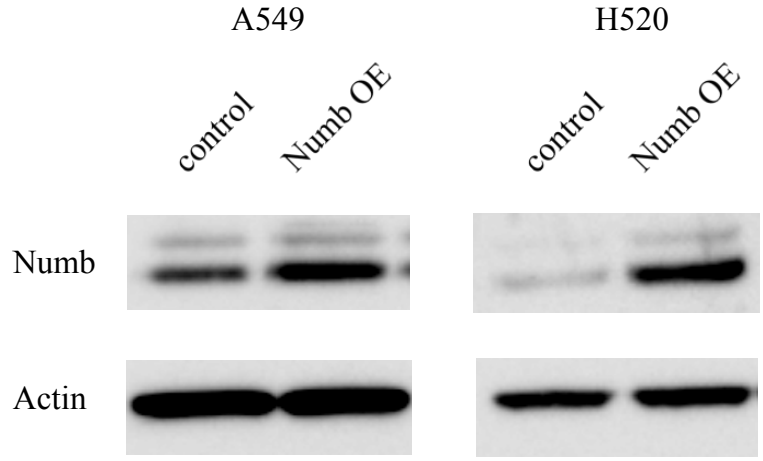
D) Numb knockdown による EMT マーカー発現の変化、＊：P<0.05。肺 ADC 細胞においては Numb knockdown により E-cadherin の発現は低下傾向を認めた。Vimentin 発現は A549 で有意に増加し、PC9 では増加傾向を認めた。Snail 発現は ADC 細胞ともに増加傾向を認めた。一方、肺 SCC 細胞では H520 細胞での E-cadherin 発現の低下を除いて、Numb knockdown による有意な EMT マーカーの変化を認めなかった。

Numb si: Numb siRNA、NICD: Notch intracellular domain

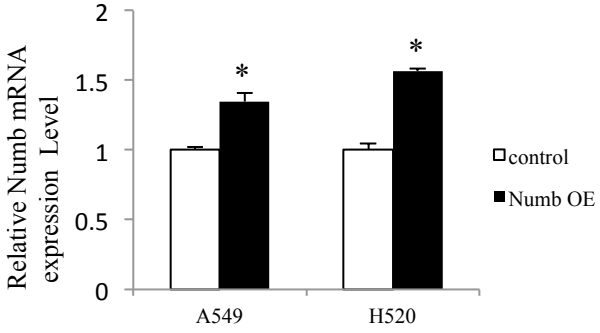
7）NSCLC 細胞株における Numb overexpression による増殖能や移動能、浸潤能への影響（in vitro）

次に、Numb を overexpression することにより Numb knockdown と逆の結果を示すかどうか検討を行った。Numb overexpression 細胞は A549 と H520 でのみ作成可能であった（**図 16A,16B**）。A549 では、Numb overexpression により足場依存性増殖能・足場非依存性増殖能ともに有意に抑制され（**図 16C,16D**）、同様に移動能・浸潤能も抑制された（**図 16E,16F**）。逆に、H520 においては、Numb overexpression により足場依存性増殖能・足場非依存性増殖能ともにやや増加し（**図 16C,16D**）、同様に移動能・浸潤能も誘導された（**図 16E,16F**）。

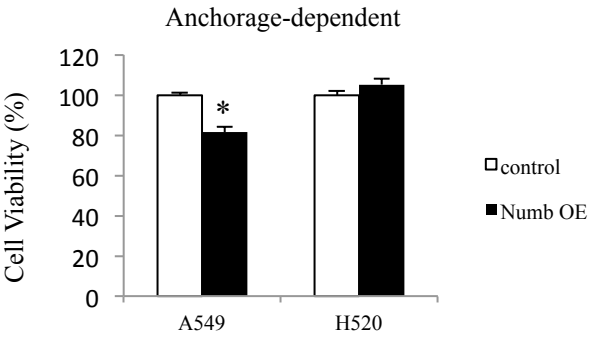
A



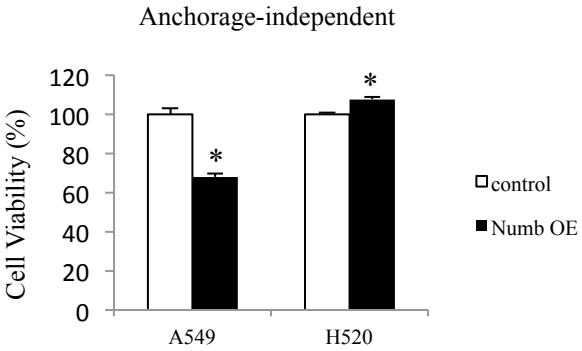
B


Relative Numb mRNA expression Level
2
1.5
1
0.5
0
*
*
A549
H520
control
Numb OE

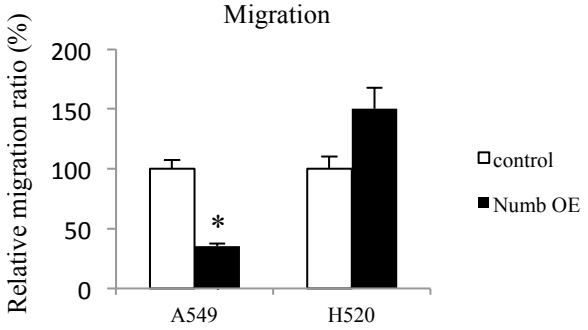
C


Anchorage-dependent
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
A549
H520
control
Numb OE

D


Anchorage-independent
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
A549
H520
control
Numb OE

E



F

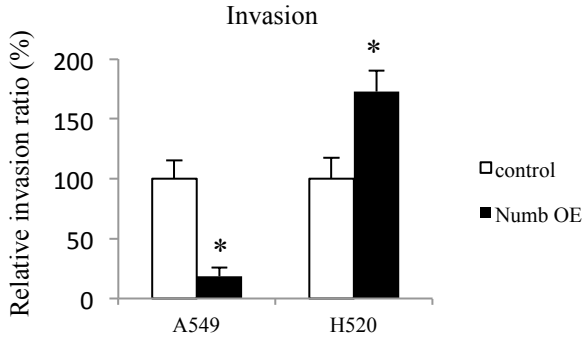


図 16

A) A549・H520 における Numb overexpression の確認（ウエスタンブロット法）。Numb 発現の増加を確認した。

B) A549・H520 における Numb overexpression の確認（RT-PCR）、＊：P<0.05。Numb 発現の増加を確認した。

C) Numb overexpression による足場依存性増殖能の変化、＊：P<0.05。A549 では Numb overexpression により足場依存性増殖能が有意に抑制された。

D) Numb overexpression による足場非依存性増殖能の変化、＊：P<0.05。A549 では Numb overexpression により足場非依存性増殖能が有意に抑制された。一方 H520 では有意に増加した。

E) Numb overexpression による移動能の変化、＊：P<0.05。A549 では Numb overexpression により移動能が有意に抑制された。一方 H520 では増加する傾向を認めた。

F) Numb overexpression による浸潤能の変化、＊：P<0.05。A549 では Numb overexpression により浸潤能が有意に抑制された。一方 H520 では有意に増加した。

Numb OE: Numb overexpression

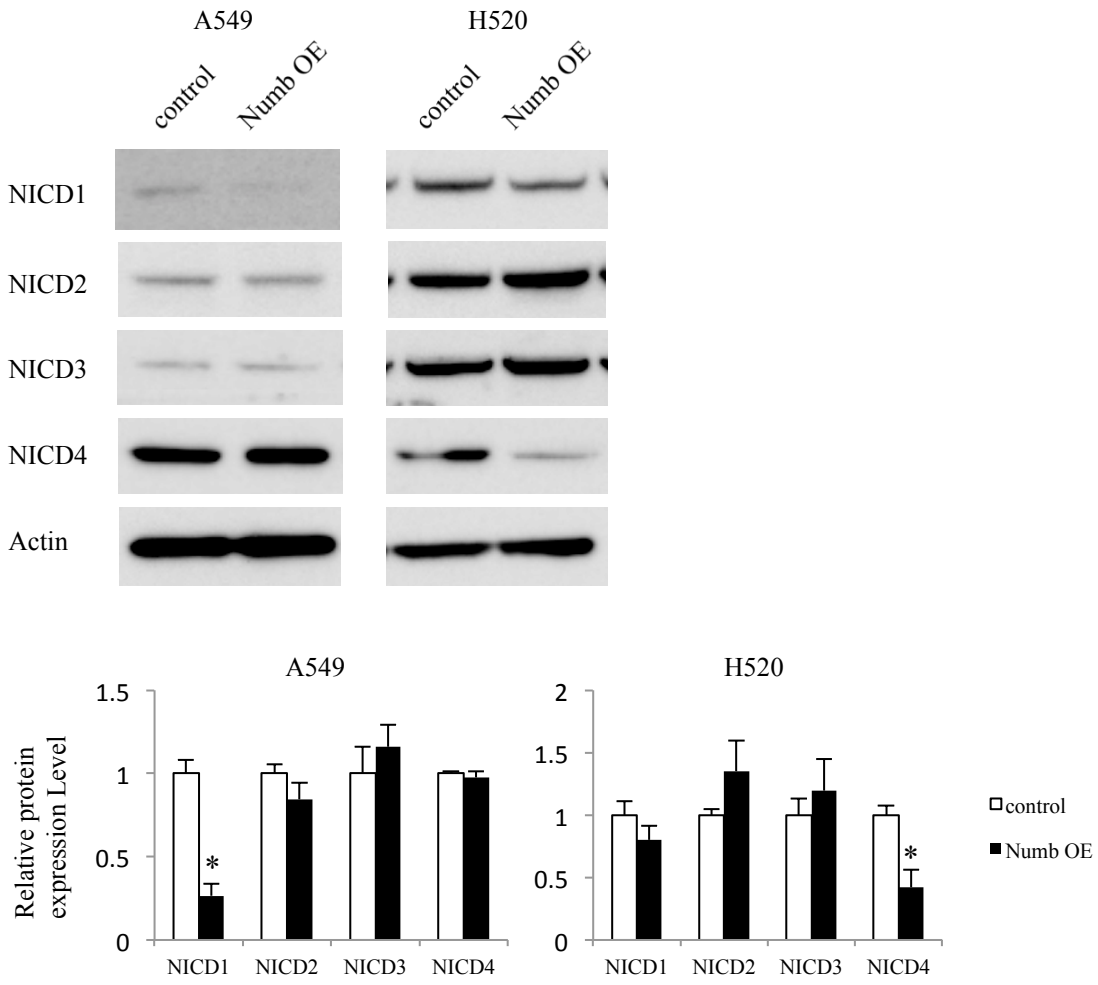
8）NSCLC 細胞株における Numb overexpression による Notch シグナルや EMT マーカーへの影響（in vitro）

次に、Numb overexpression が Notch シグナルや EMT マーカーに与える影響について調べた。A549 細胞では、Numb overexpression は NICD1 タンパク発現を有意に低下した。NICD2-4 タンパク発現は Numb knockdown の際と同様に有意な変化を示さなかった（**図 17A**）。また Hes1 mRNA 発現は変化を認めなかったが、Hey1 mRNA 発現は有意に低下していた（**図 17B,17C**）。さらに Numb overexpression は E-cadherin 発現には有意な変化をもたらさなかったが、Vimentin・Snail 発現は有意に低下した（**図 17D**）。

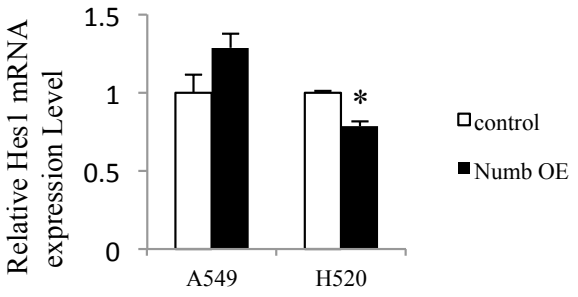
一方、H520 細胞では、Numb overexpression は NICD4 タンパク発現を有意に低下したが、NICD1-3 タンパク発現に有意な変化を認めなかった（**図 17A**）。また Hes1・Hey1 mRNA 発現は有意に低下していた（**図 17B,17C**）。H520 細胞では、今回検討した EMT マーカーはいずれも有意な変化を示さなかった（**図 17D**）。

これらの結果から、肺 ADC と肺 SCC では Numb の機能は異なっており、肺 ADC 細胞では Numb は Notch シグナルの抑制を介して tumor suppressor として機能していることが強く示唆された。一方、肺 SCC 細胞において、Numb は tumor activator として機能している可能性が考えられるが、その機序として Notch シグナルの抑制の関与は限定的かもしれない。

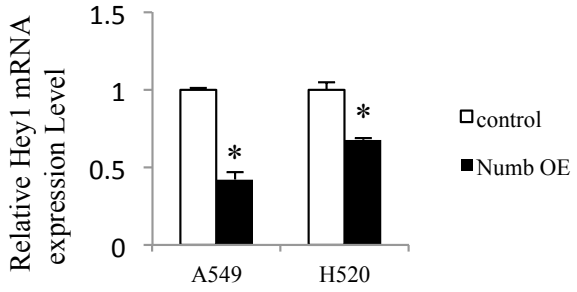
A


A549
H520
control
Numb OE
control
Numb OE
NICD1
NICD2
NICD3
NICD4
Actin
A549
H520
Relative protein expression Level
1.5
1
0.5
0
2
1.5
1
0.5
0
*
*
NICD1
NICD2
NICD3
NICD4
NICD1
NICD2
NICD3
NICD4
control
Numb OE

B


Relative Hes1 mRNA expression Level
1.5
1
0.5
0
*
A549
H520
control
Numb OE

C



D

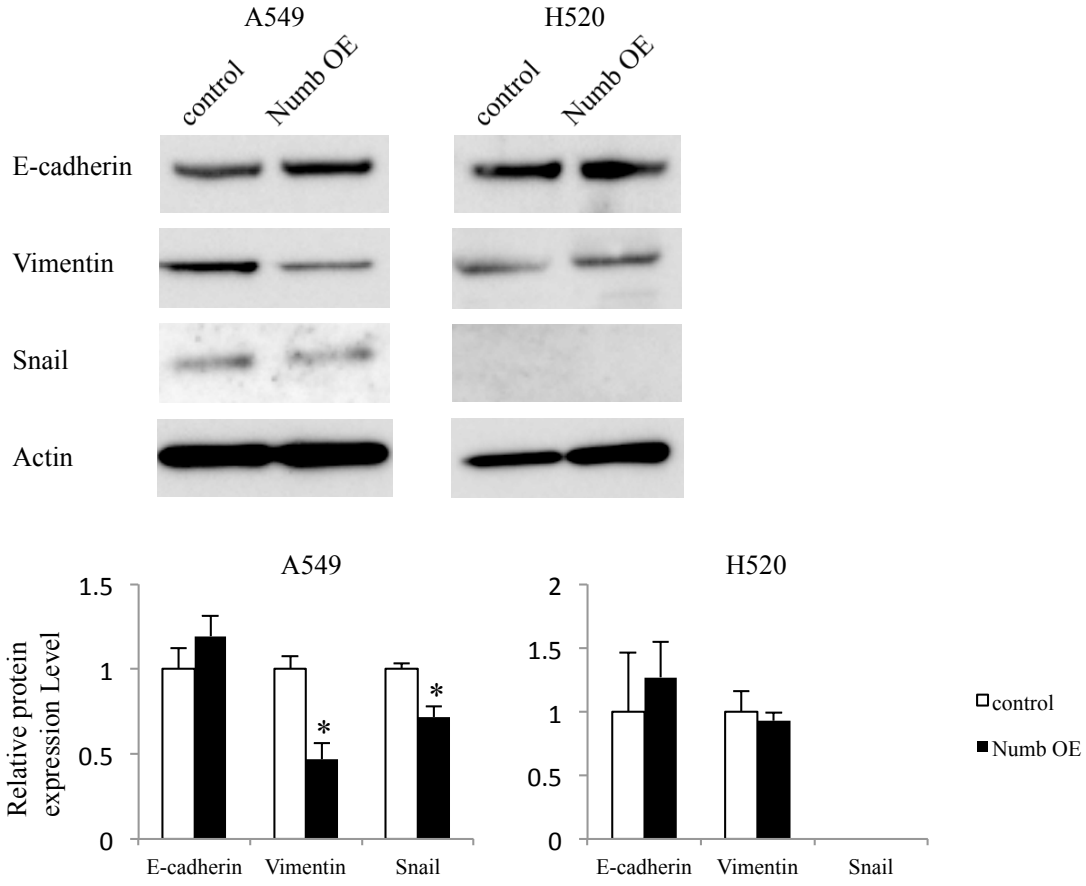


図 17

A) Numb overexpression による NICD1-4 タンパク発現の変化、*：P<0.05。A549 細胞では Numb overexpression により NICD1 タンパク発現が有意に低下した。一方、H520 細胞では Numb overexpression により NICD4 タンパク発現が有意に低下した。

B) Numb overexpression による Hes1 mRNA 発現の変化、*：P<0.05。H520 細胞

ではNumb overexpressionによりHes1 mRNA発現は有意に低下した。

C) Numb overexpressionによるHey1 mRNA発現の変化、*：P<0.05。A549・H520細胞いずれにおいてもNumb overexpressionによりHey1 mRNA発現は有意に低下した。

D) Numb overexpressionによるEMTマーカー発現の変化、*：P<0.05。A549ではNumb overexpressionによりVimentin・Snail発現は有意に低下した。一方H520細胞ではE-cadherin・Vimentin・Snailはいずれも有意な変化を示さなかった。

Numb OE: Numb overexpression、NICD: Notch intracellular domain

9) Numb overexpression肺ADC細胞由来マウス皮下腫瘍の増殖やNumb・Notch1タンパク発現の検討

Numb overexpression細胞とcontrol細胞をマウス右鼠径部に皮下注射し、形成された皮下腫瘍の大きさを比較した。H520ではいずれにおいても腫瘍形成を認めず比較検討ができず、A549でのみ検討した。その結果としてNumb overexpression群においてcontrol群と比較し腫瘍増殖能の有意な低下を認めた（図18A,18B）。また経過中両群ともに明らかな体重減少は示さなかった。上記マウスにおいて皮下注射15日後に切除した腫瘍をHE染色し、病理組織学的に腫瘍形成を確認した（図18C）。また同検体を用いて免疫組織染色法およびウエスタンブロット法にてNumbとNICD1の発現を検討した。免疫組織染色・ウエスタンブロット法ともに、Numb overexpression群腫瘍ではNumb発現の上昇が維持されており、またNICD1発現はcontrol群腫瘍と比べ発現が低下していた（図18C,18D）。

A

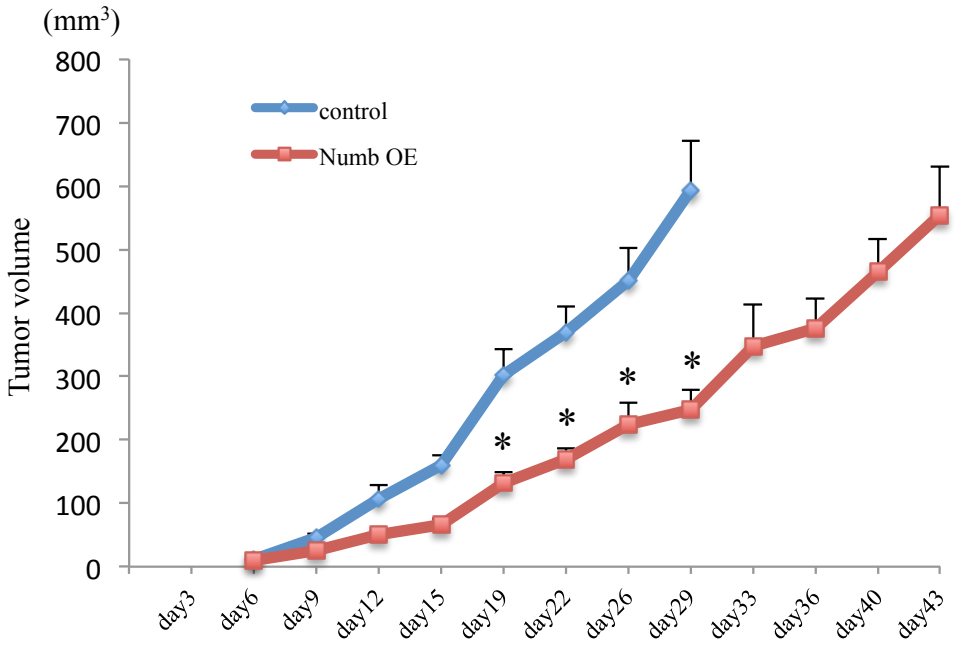
control



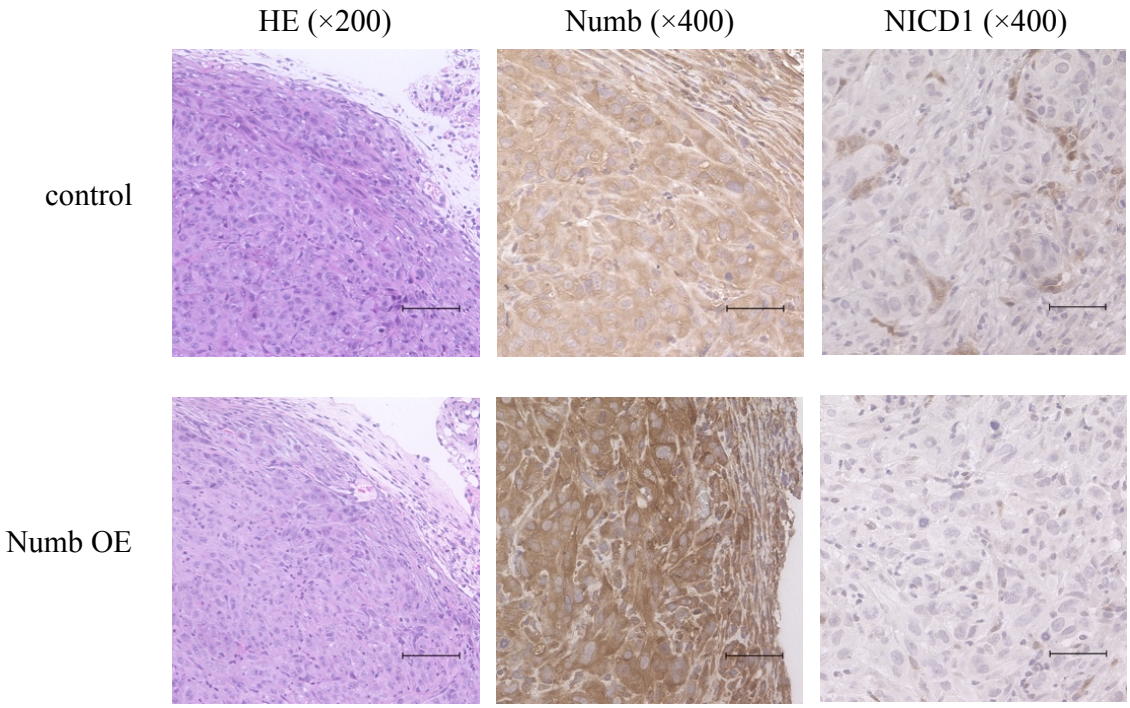
Numb OE



B


(mm3)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Tumor volume
control
Numb OE
*
*
*
*
day3
day6
day9
day12
day15
day19
day22
day26
day29
day33
day36
day40
day43

C


HE (×200)
Numb (×400)
NICD1 (×400)
control
Numb OE

D

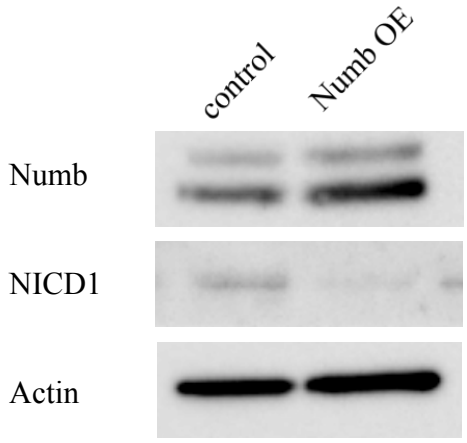


図 18

A) 腫瘍細胞皮下注射 30 日後。Numb overexpression 群では control 群と比べ形成された皮下腫瘍は小さかった。

B) マウス皮下腫瘍の増殖能比較、＊：P<0.05。Numb overexpression 群において control 群と比較し腫瘍増殖能の有意な低下を認めた。

C) マウス皮下腫瘍（day15）の HE 染色（scale bar=100μm)、Numb・NICD1 免疫組織染色（scale bar=50μm)。Numb overexpression 群腫瘍では Numb 発現の上昇が維持されており、また control 群腫瘍と比べ NICD1 発現が低下していた。

D) マウス皮下腫瘍（day15）における Numb・NICD1 タンパク発現の比較。Numb overexpression 群腫瘍では Numb 発現の上昇が維持されており、また control 群腫瘍と比べ NICD1 発現が低下していた。

Numb OE: Numb overexpression、HE: hematoxylin and eosin staining、NICD: Notch intracellular domain

考察

1）SCLC における NICD1・Numb 発現と予後との関連

Notch1 発現と SCLC の予後を検討した報告は現時点ではまだないが､今回 SCLC 症例において NICD1 高発現群は有意に予後が良好であった。SCLC 細胞株において Notch1 過剰発現は G1 cell cycle arrest を誘導し、細胞増殖・EMT・細胞浸潤・転移を抑制することが *in vitro*、*in vivo* で示されている[26-28]。また、SCLC において genomic profile が解析され、認められた Notch damaging mutation の多くは Notch 受容体の細胞外ドメインに存在しており、SCLC において Notch 遺伝子が腫瘍抑制的に機能していることが示唆された[1]。今回の結果はこれら既報と矛盾ないものであった。

今回 Numb 発現と予後に有意な関連を認めなかった。NICD1 発現と Numb 発現にも有意な相関を認めず、SCLC において Numb は Notch1 以外の Notch 受容体、もしくはその他の経路との関連が強い可能性が考えられた。

2）肺 ADC における Numb の機能と Notch pathway との関連

Numbの発現低下が予後不良と関連することは食道癌・悪性胸膜中皮腫・乳癌などの悪性腫瘍で報告されている[39,40,51,52]。NSCLCにおいてもNumbの発現が低下していることは報告されていた[24]が、予後との関連についての報告はなく、今回肺ADC症例においてNumb高発現と予後に有意な相関を認め、Numbが肺ADCにおいて予後良好因子であることが示された。

また、本研究ではNumbが肺ADCにおいて増殖能・移動能・浸潤能を抑制し、EMTを阻害することが示された。さらに、肺ADC臨床検体においてNumb発現とNICD1発現に有意な負の相関を認め、肺ADC細胞株において*in vitro*、*in vivo*ともにNumbはNotch経路を抑制していた。NumbはNotch1受容体のユビキチン化を促進しNICD1の核への移動を阻害することでNotchシグナルを阻害することが報告されている[34,35]。我々は、Notchシグナル阻害薬であるγセクレターゼ阻害薬によるNotchシグナルの抑制がNSCLCの増殖を阻害することを以前示した[23]。さらに、Notch経路はEMTの重要な調節因子であると考えられている[53-56]。これらから、Numbは肺ADCにおいてNotchシグナルの阻害を介して細胞増殖やEMTを抑制していると考えられた。

NumbにはNotchシグナルの抑制の他に、Hedgehogシグナルのターゲットである Gli1のユビキチン化[36]やp53のユビキチン化阻害[37]、E-cadherinやintegrinとの相互作用[38]といった様々な機能があることが報告されている。今回の研究ではNumbとNotch経路の関係について検討したが、Numbの腫瘍抑制作用へのこれらの機能の関与について更なる研究が必要とされる。

3）肺 SCC における Numb の機能と Notch pathway との関連

肺 SCC においては Numb 発現と予後に有意な相関を認めなかった。Notch は肺 SCC においては抑制的に働くことが報告されており[25]、今回の結果においても Notch1 高発現群は予後がよい傾向を認めた。

細胞実験では、Numb は肺 SCC 細胞の増殖能・移動能・浸潤能を促進していたが、今回評価した EMT マーカー（E-cadherin、Vimentin、Snail）の発現は有意な変化を示さなかった。卵巣癌細胞において、N-cadherin や Claudin-1 が E-cadherin などの EMT マーカーの発現を変化することなく移動能を促進したという報告がある[57]。これらのような今回検討していない因子が肺 SCC における Numb による EMT 調節に関与している可能性があり今後検討が必要と考えられた。また、Numb knockdown では Notch シグナルの一貫した変化を認めなかったが、Numb overexpression では NICD4 や Hes1/Hey1 の発現低下を認めた。既報の多くは Numb と NICD1 との相互作用について検討されており[24,34,35,58,59]、NICD2-4 と Numb との相互作用については不明である。今回の結果から、肺 SCC においては Numb による Notch1 以外の Notch 受容体の調節が一部関与している可能性が考えられた。さらに、Numb は肝細胞癌において細胞増殖や cell cycle を促進しており、その機序として p21 の抑制や CDK4・SKP2 の調節が報告されている[41,60]。今回は調べられていないが、Numb は Notch シグナルの抑制に加えて、上記のような cell cycle 関連因子との相互作用を介して肺 SCC の増殖を促進している可能性も考えられた。

総括及び結論

本研究で得られた新知見として

- 肺癌の組織型により NICD1 と Numb の発現と予後との関連は異なっており、ADC と SCC では Numb に異なった機能があることが示唆された。
- SCLC において、NICD1 高発現は予後良好因子であったが Numb 発現と予後に有意な関連を認めなかった。
- 肺 ADC において、NICD1 低発現・Numb 高発現は予後良好因子であり、*in vitro, in vivo* において Numb は Notch シグナルを阻害することにより肺 ADC の腫瘍増殖・EMT を抑制することが示唆された。
- 肺 SCC において、NICD1 高発現は予後良好と関連していると考えられたが Numb 発現と予後に有意な関連を認めなかった。*in vitro* において Numb は肺 SCC 細胞の増殖能・移動能・浸潤能を促進しており、その機序として Notch シグナルの抑制が一部関与している可能性が考えられた。

であった。新知見の意義として、Numb・Notch シグナルが肺癌組織型によりその機能・役割が異なることから組織別に治療標的となるのか、予後予測因子となるかを検討する必要性があることが確認された。今回行った SCLC における NICD1 発現・Numb 発現による予後解析や NSCLC における Numb 発現による予後解析は初めての報告となる。肺 ADC と SCC における Numb の機能解析もまた初めての報告である。組織型による癌の発生機序や関与するシグナルの違いが徐々に解明されてきており、それに伴い異なった治療戦略が求められ近年開発されている。今後更なる実験データや臨床試験が必要であるが、今回の結果から SCLC においては Notch1 が、肺 ADC においては Numb が新たな治療ターゲットとなり得ると考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野　西村正治教授に深謝致します。ならびに、適切な助言と直接の御指導を賜りました榊原純講師に感謝の意を表します。北海道がんセンター呼吸器内科の横内浩先生には小細胞肺癌臨床検体を提供していただきました。北海道大学大学院医学研究科内科学講座腫瘍内科学分野　木下一郎准教授には非小細胞肺癌臨床検体（cohort1）を、北海道大学大学院医学研究科外科学講座循環器・呼吸器外科学分野　樋田泰浩准教授には非小細胞肺癌臨床検体（cohort2）を提供していただきました。この場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

1. George, J. *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 524, 47-53 (2015).
2. Oser, M.G., Niederst, M.J., Sequist, L.V., Engelman, J.A. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet. Oncol.* 16, e165-72 (2015).
3. Collisson, E.A. *et al.* Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 511, 543-550 (2014).
4. Hammerman P.S. *et al.* Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 489, 519-525 (2012).
5. Ferone, G., Song, J.Y., Sutherland, K.D., Bhaskaran, R., Monkhorst, K., Lambooij, J.P., Proost, N., Gargiulo, G., Berns, A. SOX2 Is the Determining Oncogenic Switch in Promoting Lung Squamous Cell Carcinoma from Different Cells of Origin. *Cancer. Cell.* 30, 519-532 (2016).
6. Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., Fujita, Y., Okinaga, S., Hirano, H., Yoshimori, K., Harada, T., Ogura, T., Ando, M., Miyazawa, H., Tanaka, T., Saijo, Y., Hagiwara, K., Morita, S.& Nukiwa, T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* 362, 2380-2388 (2010).
7. Kwak, E.L., Bang, Y.J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.H., Dezube, B.J., Jänne, P.A., Costa, D.B., Varella-Garcia, M., Kim, W.H., Lynch, T.J., Fidias, P., Stubbs, H., Engelman, J.A., Sequist, L.V., Tan, W., Gandhi, L., Mino-Kenudson, M., Wei, G.C., Shreeve, S.M., Ratain, M.J., Settleman, J., Christensen, J.G., Haber, D.A., Wilner, K., Salgia, R., Shapiro, G.I., Clark, J.W.& Iafrate, A.J. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small- cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 1693-1703 (2010).
8. Grego-Bessa, J., Díez, J., Timmerman, L.& de la Pompa, J.L. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell. Cycle.* 3, 718-721 (2004).
9. Huppert, S.S., Ilagan, M.X., De Strooper, B.& Kopan, R. Analysis of Notch function in presomitic mesoderm suggests a gamma-secretase-independent role for presenilins in somite differentiation. *Dev. Cell.* 8, 677-688 (2005).
10. Kiernan, A.E., Cordes, R., Kopan, R., Gossler, A.& Gridley, T. The Notch

ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development.* 132, 4353-4362 (2005).

11. Allenspach, E.J., Maillard, I., Aster, J.C.& Pear, W.S. Notch signaling in cancer. *Cancer. Biol. Ther.* 1, 466-476 (2002).
12. Iso, T., Kedes, L.& Hamamori, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 194, 237-255 (2003).
13. 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.* 126, 3925-3935 (1999).
14. Borges, M., Linnoila, R.I., van de Velde, H.J., Chen, H., Nelkin, B.D., Mabry, M., Baylin, S.B.& Ball, D.W. An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature*. 386, 852-855 (1997).
15. Kunnimalaiyaan, M.& Chen, H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *Oncologist*. 12, 535-542 (2007).
16. Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D.& Sklar, J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 66, 649-661 (1991).
17. Curry, C.L., Reed, L.L., Golde, T.E., Miele, L., Nickoloff, B.J.& Foreman, K.E. Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene.* 24, 6333-6344 (2005).
18. Das, I., Craig, C., Funahashi, Y., Jung, K.M., Kim, T.W., Byers, R., Weng, A.P., Kutok, J.L., Aster, J.C.& Kitajewski, J. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J. Biol. Chem.* 279, 30771-30780 (2004).
19. Duechler, M., Shehata, M., Schwarzmeier, J.D., Hoelbl, A., Hilgarth, M.& Hubmann, R. Induction of apoptosis by proteasome inhibitors in B-CLL cells is associated with downregulation of CD23 and inactivation of Notch2. *Leukemia.* 19, 260-267 (2005).
20. Reedijk, M., Odorcic, S., Chang, L., Zhang, H., Miller, N., McCready, D.R., Lockwood, G.& Egan, S.E. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1

is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer. Res.* 65, 8530-8537 (2005).

21. Previs, R.A., Coleman, R.L., Harris, A.L.& Sood, A.K. Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer. Res.* 21, 955-961 (2015).
22. Dang, T.P., Gazdar, A.F., Virmani, A.K., Sepetavec, T., Hande, K.R., Minna, J.D., Roberts, J.R.& Carbone, D.P. Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 92, 1355-1357 (2000).
23. Konishi, J., Kawaguchi, K.S., Vo, H., Haruki, N., Gonzalez, A., Carbone, D.P.& Dang, T.P. Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer. Res.* 67, 8051-8057 (2007).
24. Westhoff, B., Colaluca, I.N., D'Ario, G., Donzelli, M., Tosoni, D., Volorio, S., Pelosi, G., Spaggiari, L., Mazzarol, G., Viale, G., Pece, S.& Di Fiore, P.P. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 22293-22298 (2009).
25. Wang, N.J., Sanborn, Z., Arnett, K.L., Bayston, L.J., Liao, W., Proby, C.M., Leigh, I.M., Collisson, E.A., Gordon, P.B., Jakkula, L., Pennypacker, S., Zou, Y., Sharma, M., North, J.P., Vemula, S.S., Mauro, T.M., Neuhaus, I.M., Leboit, P.E., Hur, J.S., Park, K., Huh, N., Kwok, P.Y., Arron, S.T., Massion, P.P., Bale, A.E., Haussler, D., Cleaver, J.E., Gray, J.W., Spellman, P.T., South, A.P., Aster, J.C., Blacklow, S.C.& Cho, R.J. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108, 17761-17766 (2011).
26. Sriuranpong, V., Borges, M.W., Ravi, R.K., Arnold, D.R., Nelkin, B.D., Baylin, S.B.& Ball, D.W. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer. Res.* 61, 3200-3205 (2001).
27. Wael, H., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K.& Ito, T. Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung. Cancer.* 85, 131-140 (2014).
28. Hassan, W.A., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K.& Ito, T. Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. *Lung. Cancer.* 86, 304-310 (2014).
29. Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L.Y.& Jan, Y.N. numb, a

gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos. *Cell*. 58, 349-360 (1989).

30. Rhyu, M.S., Jan, L.Y.& Jan, Y.N. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell*. 76, 477-491 (1994).
31. Rasin, M.R., Gazula, V.R., Breunig, J.J., Kwan, K.Y., Johnson, M.B., Liu-Chen, S., Li, H.S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Rakic, P.& Sestan, N. Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat. Neurosci*. 10, 819-827 (2007).
32. Nishimura, T.& Kaibuchi, K. Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev. Cell*. 13, 15-28 (2007).
33. Nishimoto, Y.& Okano, H. New insight into cancer therapeutics: induction of differentiation by regulating the Musashi/Numb/Notch pathway. *Cell. Res*. 20, 1083-1085 (2010).
34. Wakamatsu, Y., Maynard, T.M., Jones, S.U.& Weston, J.A. NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron*. 1, 71-81 (1999).
35. McGill, M.A.& McGlade, C.J. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J. Biol. Chem.* 278, 23196-23203 (2003).
36. Di Marcotullio, L., Greco, A., Mazzà, D., Canettieri, G., Pietrosanti, L., Infante, P., Coni, S., Moretti, M., De Smaele, E., Ferretti, E., Screpanti, I.& Gulino, A. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*. 30, 65-76 (2011).
37. Colaluca, I.N., Tosoni, D., Nuciforo, P., Senic-Matuglia, F., Galimberti, V., Viale, G., Pece, S.& Di Fiore, P.P. NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature*. 45, 76-80 (2008).
38. Sato, K., Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., Yokoi, K., Murase, K., Sugiyama, I., Ozawa, M.& Kaibuchi, K. Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol. Biol. Cell*. 22, 3103-3119 (2011).
39. Hong, J., Liu, Z., Zhu, H., Zhang, X., Liang, Y., Yao, S., Wang, F., Xie, X., Zhang, B., Tan, T., Fu, L., Nie, J.& Cheng, C. The tumor suppressive role of NUMB isoform 1 in esophageal squamous cell carcinoma.

Oncotarget. 5, 5602-5614 (2014).
40. Zhang, J., Shao, X., Sun, H., Liu, K., Ding, Z., Chen, J., Fang, L., Su, W., Hong, Y., Li, H.& Li, H. NUMB negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by antagonizing Notch signaling. *Oncotarget*. 7, 61036-61053 (2016).
41. Wu, J., Shen, S.L., Chen, B., Nie, J.& Peng, B.G. Numb promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *PLoS. One.* 9, e95849 (2014).
42. Yokouchi, H., Ishida, T., Yamazaki, S., Kikuchi, H., Oizumi, S., Uramoto, H., Tanaka, F., Harada, M., Akie, K., Sugaya, F., Fujita, Y., Fukuhara, T., Takamura, K., Kojima, T., Harada, T., Higuchi, M., Matsuura, Y., Honjo, O., Minami, Y., Watanabe, N., Nishihara, H., Suzuki, H., Dosaka-Akita, H., Isobe, H., Nishimura, M.& Munakata, M. Prognostic impact of clinical variables on surgically resected small-cell lung cancer: Results of a retrospective multicenter analysis (FIGHT002A and HOT1301A). *Lung. Cancer*. 90, 548-553 (2015).
43. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart Third Edition. IARC Press 2004.
44. Konishi, J., Yim, F., Chenm, X., Vo, H., Carbone, D.P.& Dang, T.P. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene.* 29, 589-596 (2010).
45. Cao, C., Mu, Y., Hallahan, D.E.& Lu, B. XIAP and surviving as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene.* 23, 7047-7052 (2004).
46. Donnem, T., Andersen, S., Al-Shibli, K., Al-Saad, S., Busund, L.T.& Bremnes, R.M. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch-1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer*. 116, 5676-5685 (2010).
47. Christiansen, J.J.& Rajasekaran, A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer. Res.* 2006;66:8319-8326.
48. Moreno-Bueno, G., Portillo, F.& Cano, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*. 27, 6958-6969 (2008).
49. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 442-454 (2002).

50. Thiery, J.P.& Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 131-142 (2006).
51. Kang, Y., Ding, M., Tian, G., Guo, H., Wan, Y., Yao, Z., Li, B.& Lin, D. Overexpression of Numb suppresses tumor cell growth and enhances sensitivity to cisplatin in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *Oncol. Rep.* 30, 313-319 (2013).
52. Rennstam, K., McMichael, N., Berglund, P., Honeth, G., Hegardt, C., Rydén, L., Luts, L., Bendahl, P.O.& Hedenfalk, I. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 122, 315-324 (2010).
53. Timmerman, L.A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J.M., Díez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisúa-Belmonte, J.C.& de la Pompa, J.L. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes. Dev.* 18, 99-115 (2004).
54. Niessen, K., Fu, Y., Chang, L., Hoodless, P.A., McFadden, D.& Karsan, A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J. Cell. Biol.* 182, 315-325 (2008).
55. Sahlgren, C., Gustafsson, M.V., Jin, S., Poellinger, L.& Lendahl, U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105, 6392-6397 (2008).
56. Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N.& Böttinger, E.P. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO. J.* 23, 1155-1165 (2004).
57. Gao, J., Zhu, Y., Nilsson, M.& Sundfeldt, K. TGF-β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer. Cell. Int.* 14, 72 (2014).
58. Conboy, I.M.& Rando, T.A. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell.* 3, 397-409 (2002).
59. Anderson, A.C., Kitchens, E.A., Chan, S.W., St Hill, C., Jan, Y.N., Zhong, W.& Robey, E.A. The Notch regulator Numb links the Notch and TCR signaling pathways. *J. Immunol.* 174, 890-897 (2005).
60. Xie, C., Lu, Z., Liu, G., Fang, Y., Liu, J., Huang, Z., Wang, F., Wu, X., Lei, X., Li, X., Zhang, Y., Hu, Z., Qian, K., Hu, J., Huang, S., Zhong,

D.& Xu, X. Numb downregulation suppresses cell growth and is associated with a poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 36, 653-660 (2015).