



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	小細胞肺癌におけるDLL3/ASCL1の発現とDLL3の機能に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	古田, 恵
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2477 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13463号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74729
Type	doctoral thesis
File Information	Megumi_Furuta_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

小細胞肺癌における DLL3/ASCL1 の発現と DLL3 の

機能に関する研究

(Studies on the expression of DLL3/ASCL1 and function of

DLL3 in small cell lung cancer)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

古田 恵

学 位 論 文 (要約)

小細胞肺癌における DLL3/ASCL1 の発現と DLL3 の

機能に関する研究

(Studies on the expression of DLL3/ASCL1 and function of

DLL3 in small cell lung cancer)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

古田 恵

【背景と目的】小細胞肺癌（small cell lung cancer : SCLC）は一般的に放射線療法・化学療法に感受性が高いが、多くは再発し治療抵抗性となるため予後不良であり新たな治療の開発が急務となっている。Notch シグナルは細胞の発生、分化、増殖に関与しており、癌種によって腫瘍増殖性もしくは腫瘍抑制性に機能する。Delta-like protein 3 (DLL3) は Notch のリガンドの一つであり、正常肺組織では発現を認めないが SCLC において高発現している。更に DLL3 は神経内分泌誘導に関与する achaete-scute complex-like-1 (ASCL1) の下流のターゲットであり、mRNA の発現において両者は相関関係にあることが報告されている。また、SCLC において Notch は腫瘍抑制性に機能し DLL3 は他のリガンドとは異なり Notch を阻害するという報告があることから、DLL3 は Notch の阻害を介して腫瘍の発生や分化、増殖に関与していることが示唆される。更に近年、SCLC の治療として DLL3 を抗体とした antibody-drug conjugate である Rovalpituzumab tesirine (Rova-T) が開発され、DLL3 高発現群でより高い奏効率が認められた。以上から DLL3 は SCLC において神経内分泌分化に関与し、腫瘍増殖性に機能することが示唆されるが詳細な機能は不明である。また、SCLC における DLL3 と ASCL1 のタンパク発現と予後、臨床因子との関連性を検討した報告は少ない。そこで SCLC 手術検体を用いて DLL3 及び ASCL1 の免疫組織染色でそのタンパク発現や臨床病理学的因子との関連を検討することとした。DLL3 の機能解析として DLL3 高発現 SCLC 細胞株の DLL3 を knockdown した場合及び低発現細胞株で DLL3 を overexpression させた場合の Notch 関連因子の変化、腫瘍増殖能、遊走能、浸潤能の変化を調べることを本研究では目的とした。

【対象と方法】北海道肺癌臨床研究会、福島県肺癌研究会に所属する施設で外科的切除された SCLC95 検体を用い、DLL3 と ASCL1 の免疫組織染色を行なった。DLL3、ASCL1 の発現と臨床病理学的因子・生存期間との関連について統計学的に解析した。次に SCLC 細胞株（SBC-3、SBC-5、MS-1、RERF-LC-MA、H1688、H592、H209、H82、H69）を用いて、DLL3 の mRNA 及びタンパク発現を確認した。DLL3 高発現細胞株に対して DLL3 の small interfering RNA による knockdown 及び DLL3 低発現 SCLC 細胞株に対して DLL3 プラスミド導入による overexpression を行い、DLL3 の腫瘍増殖、浸潤能、遊走能における機能変化を確認した。DLL3、Notch レセプター（NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4）、上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition : EMT）マーカー（E-cadherin、Vimentin、Snail）の発現は quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-

PCR) 法とウェスタンブロット法で確認した。足場依存性・非依存性増殖能は MTT assay を用いて測定した。遊走能・浸潤能は transwell assay を用いて調べた。*In vivo* における腫瘍増殖はゼノグラフトマウスモデルに DLL3 を overexpression した SCLC 細胞株を皮下注射し腫瘍サイズ、増大スピードを測定した。

【結果】免疫組織学的に評価可能であった 93 検体のうち DLL3 陽性細胞が 1%以上の陽性群は 77 検体 (83%)、75%以上の高発現群は 44 検体 (47%) であった。ASCL1 が 5%以上発現している陽性群は 95 検体中 61 検体 (64%) であった。DLL3 と ASCL1 発現に正の相関を認めた。非小細胞肺癌成分を含む combined SCLC と比べ pure SCLC で有意に ASCL1 陽性群が多かった。DLL3 と ASCL1 の発現と予後にはそれぞれ相関は認めなかったが、DLL3 高発現群はリンパ節転移や進行した臨床病期の症例で多かった。次に、9 つの SCLC 細胞株で DLL3 の mRNA 及びタンパク発現を確認したところ、全てで DLL3 発現が認められた。そのうち DLL3 高発現 SCLC 細胞株の H69 及び H82 で DLL3 を knockdown すると遊走能・浸潤能が低下し、Snail の発現は減弱した。逆に DLL3 低発現 SCLC 細胞株である SBC-5 で DLL3 を overexpression すると増殖能・遊走能は亢進し、Snail の発現は増加した。一方で DLL3 を knockdown 及び overexpression させても E-cadherin、Vimentin といった他の EMT マーカーの有意な変化は認めなかった。H82 で Snail を knockdown すると遊走能・浸潤能は DLL3 を knockdown した場合と同様に抑制された。NOTCH1 発現は DLL3 knockdown では低下、overexpression では亢進していたが、H82 で NOTCH1 を knockdown しても DLL3 knockdown で生じた遊走能・浸潤能の変化は認めず Snail 発現の低下も認めなかった。ゼノグラフトマウスモデルを用いて評価した腫瘍増殖は DLL3 を overexpression させた SBC-5 でコントロールと比較して亢進した。

【考察】SCLC 切除検体において DLL3 と ASCL1 は高発現しており、両者の発現は正の相関関係を認めた。今回の結果は mRNA 発現レベルで DLL3 と ASCL1 が正の相関を認め、DLL3 が ASCL1 の下流のターゲットであるという既報と矛盾しない結果であった。ASCL1 発現により SCLC は classic SCLC と variant SCLC の 2 つに分類され細胞増殖速度や神経内分泌マーカーの発現が異なり、治療反応性も異なると報告されている。ASCL1 陽性群が pure SCLC で多く認めたことから ASCL1 は分子学的な違いのみならず組織学的な違いをもたらす因子である可能性が示唆された。DLL3 と ASCL1 の発現は予後とは有意な相関は認めなかったが DLL3 高

発現群では低発現群と比較してリンパ節転移や進行期の症例が多かった。細胞実験において DLL3 は遊走能・浸潤能亢進に寄与しており、DLL3 の免疫組織染色の結果を支持していた。Snail は上皮系因子を抑制することで EMT を誘導する転写因子の一つである。本研究では E-cadherin、Vimentin の有意な変化を認めなかったが、他の EMT 関連因子が寄与し DLL3 は Snail を介して遊走能・浸潤能亢進に関与している可能性が考えられた。一方で DLL3 は NOTCH1 発現を促進していたが、NOTCH1 knockdown では DLL3 knockdown と同様の機能変化を認めず、DLL3 の遊走能・浸潤能亢進に機能する機序として NOTCH1 非依存性である可能性が示唆された。SCLC において DLL3 は治療の標的の一つとなり、特に転移や再発例において DLL3 を標的とした治療は効果が期待されると考えられた。

【結論】切除 SCLC 検体において DLL3、ASCL1 は高発現しており、DLL3 は Snail を介して遊走能・浸潤能亢進に機能していた。SCLC において DLL3 は治療標的となり得ると考える。