



| | |
|---------------------|---|
| 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 |
| Author(s) | 古田, 恵 |
| Description | 配架番号 : 2477 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第13463号 |
| Issue Date | 2019-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k13463 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/76141 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Megumi_Furuta.pdf |



学 位 論 文

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

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

目 次

| | |
|---------------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 | 1 頁 |
| 要旨 | 2 頁 |
| 略語表 | 4 頁 |
| 諸言 | 5 頁 |
| 実験方法 | 15 頁 |
| 実験結果 | 20 頁 |
| 考察 | 40 頁 |
| 総括および結論 | 43 頁 |
| 謝辞 | 44 頁 |
| 利益相反 | 45 頁 |
| 引用文献 | 46 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投稿中である.

The Oncologist

Cancer science

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Megumi Furuta, Jun Sakakibara-Konishi, Tetsuaki Shoji, Yuta Takashima, Hajime Kikuchi, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Ichiro Kinoshita, Hirotoshi Dosaka-Akita, Masaharu Nishimura
DLL3 regulates migration and invasion of small cell lung cancer
American Association for Cancer Research, April 17, 2018, Chicago
2. 古田 恵、榊原 純、庄司 哲明、高島 雄太、菊池 創、菊地 英毅、菊地 順子、木下 一郎、秋田 弘俊、西村 正治
小細胞肺癌の遊走能・浸潤能における DLL3 の機能解析
第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2018 年 7 月 19 日、神戸
3. 古田 恵、榊原 純、庄司 哲明、高島 雄太、菊池 創、菊地 英毅、菊地 順子、木下 一郎、秋田 弘俊
小細胞肺癌の遊走能・浸潤能における DLL3 の機能解析
第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 29 日、大阪
4. 古田 恵、榊原 純、菊池 創、横内 浩、西原 広史、峯村 浩之、原田 眞雄、山崎 成夫、秋江 研志、藤田 結花、高村 圭、小島 哲弥、原田 敏之、南 幸範、渡部 直己、大泉 聡史、鈴木 弘行、西村 正治
小細胞肺癌切除検体における DLL3、ASCL1 に関する検討
第 59 回日本肺癌学会学術集会、2018 年 11 月 29 日、東京

要旨

【背景と目的】 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小細胞肺癌 (small cell lung cancer : 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 陽性 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 細胞株を用いて、DLL3 の small interfering RNA による knockdown 及び 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。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が多かった。次に、SCLC 細胞株で 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 SCLC 細胞株で 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。SCLC 細胞株で 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、NOTCH1 を knockdown しても DLL3 knockdown で生じたような遊走能・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 させた細胞株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。両者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。更に DLL3 は EMT を調節する転写因子である 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。DLL3-Snail による遊走能・浸潤能亢進の更なる機序の解明は必要ではあるが 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。

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 | antibody-drug conjugate |
| ASCL-1 | achaete-scute complex-like-1 |
| cN | clinical lymph node status |
| CoA | coactivator |
| CoR | corepressor |
| cStage | clinical disease stage |
| DLL3 | delta-like protein 3 |
| OE | overexpression |
| ECOG PS | eastern cooperative oncology group performance status |
| EMT | epithelial-mesenchymal transition |
| FBS | fetal bovine serum |
| FFPE | formalin-fixed and paraffin-embedded |
| HES | hairy and enhancer of split |
| HEY | hairy/enhancer of split related with YRPW |
| LCNEC | large cell neuroendocrine carcinoma |
| NICD | notch intracellular domain |
| NSCLC | non-small cell carcinoma |
| PBD | pyrrolbenzodiazepine |
| PDX | patient-derived xenograft |
| Poly-HEMA | poly 2-hydroxyethyl methacrylate |
| qRT-PCR | quantitative reverse transcription polymerase chain reaction |
| Rova-T | rovalpituzumab tesirine |
| SCLC | small cell lung cancer |
| siRNA | small interfering RNA |
| TBST | tris Buffered Saline with Tween 20 |

緒言

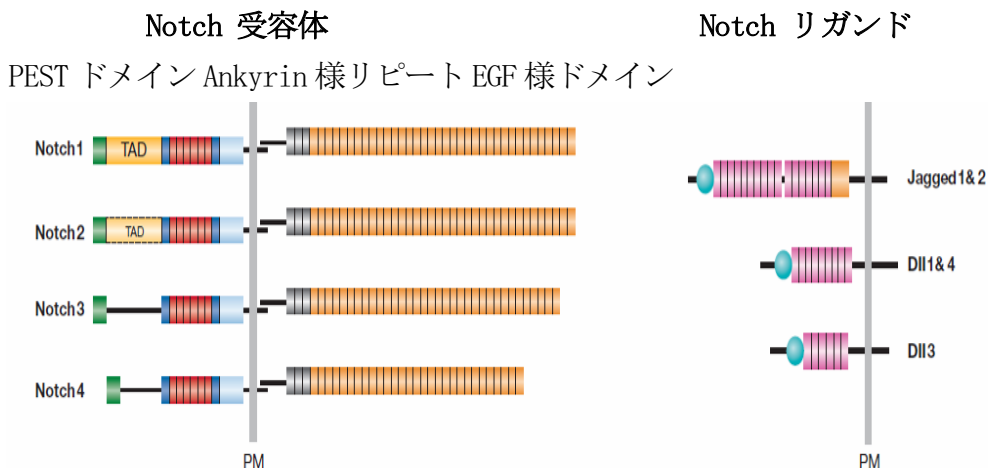
1) 小細胞肺癌について

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、小細胞肺癌 (small cell lung cancer: SCLC) はそのうち約15%を占める (Kalemkerian et al., 2013; Siegel et al., 2017)。SCLCは、原発部位の局在、縦隔・肺門リンパ節の有無、ならびに遠隔転移の有無により限局型小細胞肺癌と進展型小細胞肺癌に区別される。SCLCは手術可能な早期の状態で見られることは少ないが、一般的に放射線治療・化学療法に比較的感受性が高い。しかし、多くは再発し治療抵抗性となるため予後不良であり、限局型、進展型小細胞肺癌の生存期間中央値はそれぞれ約23-27か月 (Takada et al., 2002; Turrisi et al., 1999)、13-18か月 (Noda et al., 2002)である。未だ十分な成績とは言えず、新しい治療の開発が急務となっている (Puglisi et al., 2010)。

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。哺乳動物においては、4つの Notch 受容体ファミリー (NOTCH1-NOTCH4) と2つのリガンドファミリーの Jagged (JAG1, JAG2) と Delta-like ligands (DLL1, DLL3, DLL4) の存在が示されている (Fiuza and Arias, 2007)。Notch 受容体は1回膜貫通蛋白質であり、細胞膜を介し細胞外ドメインと細胞内ドメイン (Notch intracellular domain: NICD) 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 (Radtke et al., 2005) (図1)。

図1

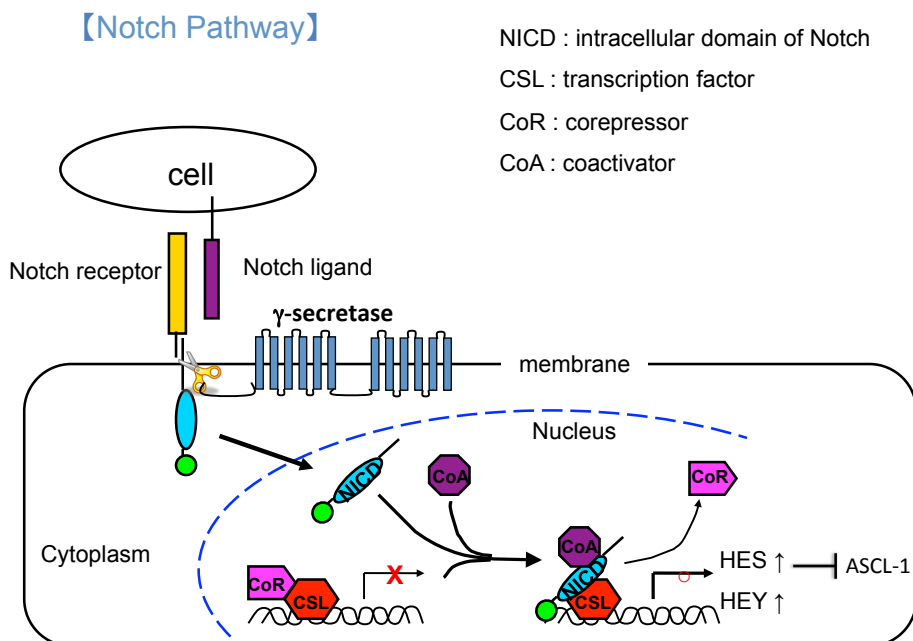


参考文献 : Radtke, F. *et al. EMBO reports* (2005) より引用。

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 -secretase 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、HES1 は Notch1 に誘導され、HEY1 は Notch3 に強く誘導されると報告されている (Beatus *et al.*, 1999; Iso *et al.*, 2003)。

また、Notch1 は神経内分泌細胞の分化に関与しており、HES1 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 (Borges *et al.*, 1997; Kunnimalaiyaan and Chen, 2007)。

図 2

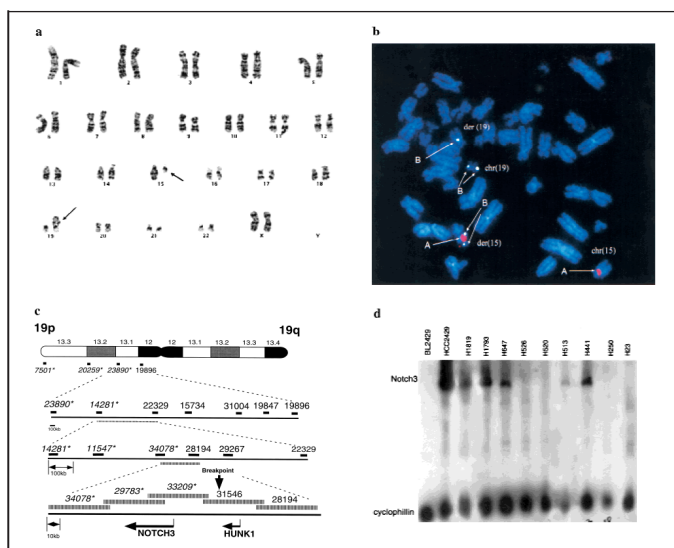


3) 癌と Notch との関係について

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た (Ellisen et al., 1991)。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 もしくは suppressor として機能すると報告されている (Lobry et al., 2011; Previs et al., 2015)。

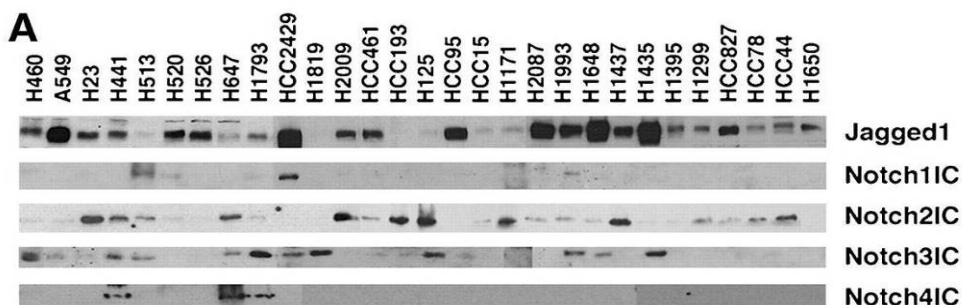
肺癌と Notch との関連については、共同研究者の Thao P. Dang らによって 2000 年に最初の報告がされている。進行の速い非喫煙女性の肺腺癌において t(15;19) の転座を認め、Notch3 がコードされている領域の 50kb 上流に 19 番短腕の break point を確認した。この腫瘍から樹立した細胞株、HCC2429 は 19 番染色体の遺伝子異常をもつ他の NSCLC 細胞株と比べ、NOTCH3 の過剰発現を認めた (Dang et al., 2000) (図 3)。また我々は、NOTCH3 が非小細胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma : 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 (Konishi et al., 2007) (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 (Westhoff et al., 2009)。一方で、肺扁平上皮癌においては 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 (Wang et al., 2011)。

図 3



- a) 女性肺腺癌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 : Dang, T.P. et al. *J. Natl. Cancer. Inst.* (2000) より引用。

図 4

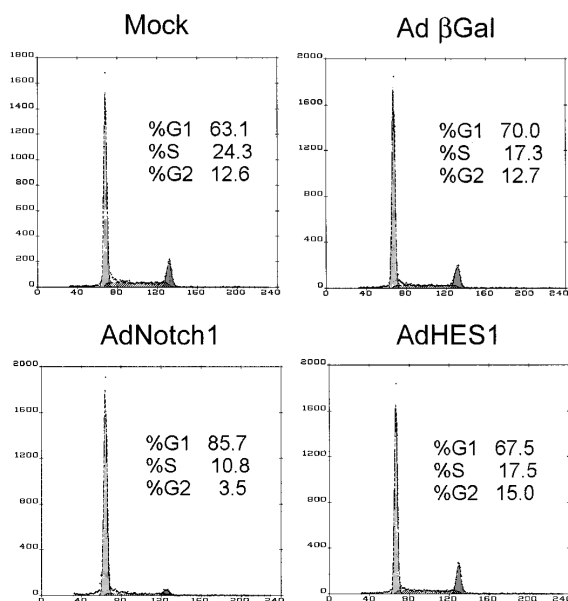


29 例の肺癌細胞株の Notch レセプターとリガンドのウエスタンブロット法による検討結果 24 例でリガンドである Jagged1 の発現を認めた。Notch レセプターは Notch2 が 18 例 (62%)、Notch3 が 12 例 (41%) であった。Notch1、Notch4 は数例の発現のみであった。

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

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 (Hassan et al., 2014; Sriuranpong et al., 2001; Wael et al., 2014) (図 5)。また、我々は外科的切除された SCLC 組織 127 例を使用し Notch1 の発現と臨床病理学的因子の検討を行なったところ、Notch1 高発現群では低発現群と比較して予後が良好であり、Notch1 は既報と同様に腫瘍抑制的に機能する可能性が示唆された (Kikuchi et al., 2017) (図 6)。さらに、genomic profile の解析では 25% の SCLC で *NOTCH* ファミリーの遺伝子変異を認め、その多くは 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 (George et al., 2015) (図 7)。一方で Notch が活性化した SCLC は化学療法抵抗性で細胞の増殖を促進したという報告もあり、SCLC において Notch シグナルは非常に複雑に機能している可能性が示唆されている (Gazdar et al., 2017; Lim et al., 2017)。

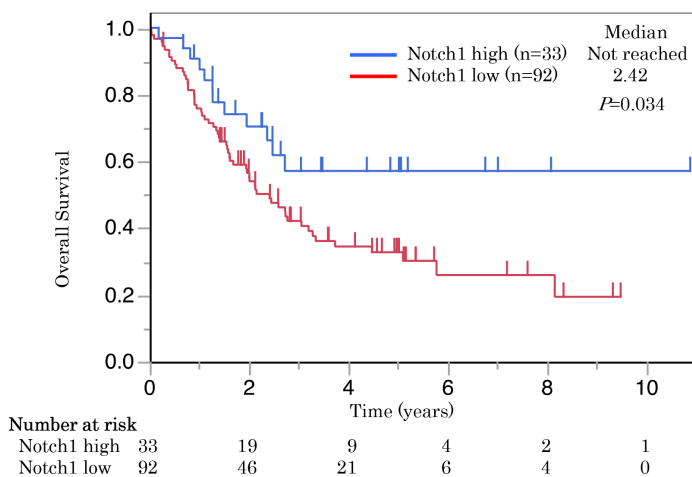
図 5



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

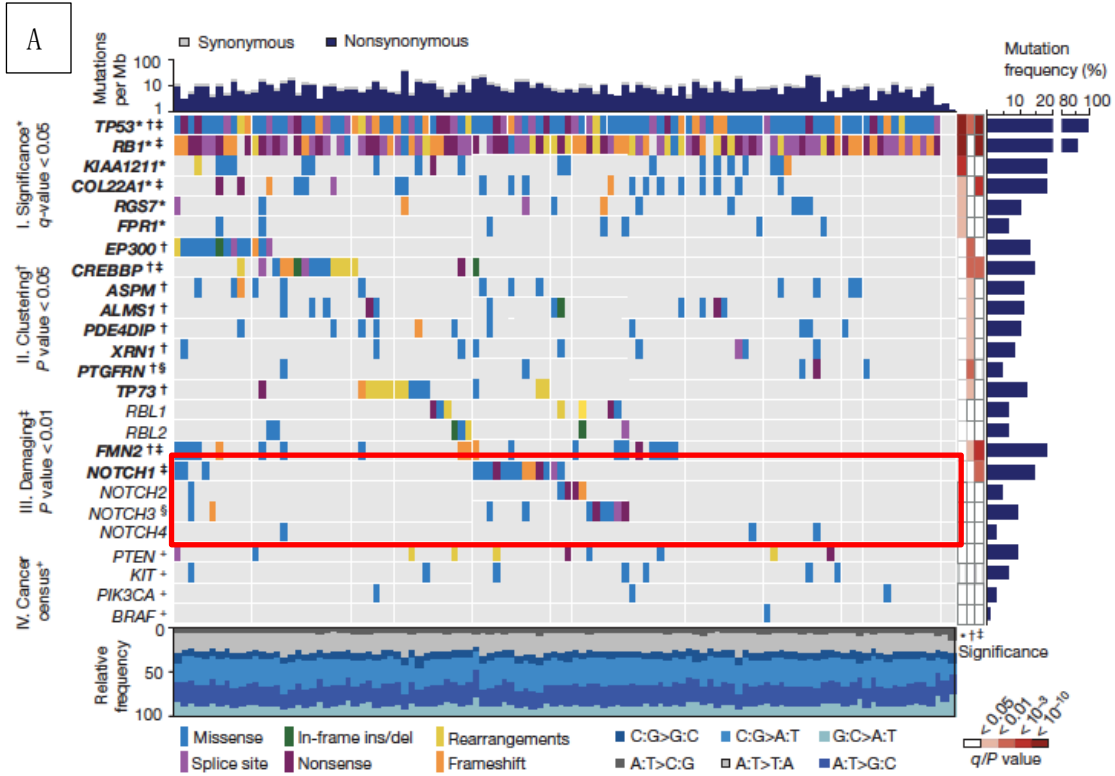
図 6



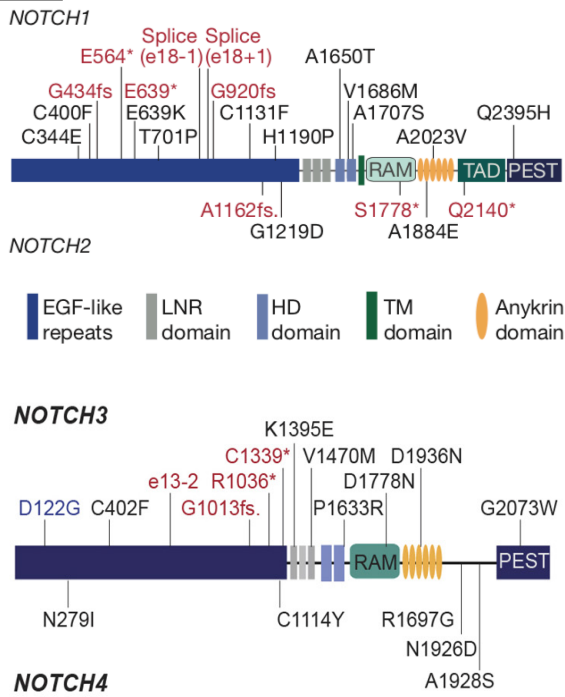
SCLC 組織 127 例を使用した Notch1 発現と臨床病理学的因子の検討。Notch1 高発現群では低発現群と比較して予後が良好であった。

参考文献 : Kikuchi, H. *et al. Oncotarget* (2017) より引用。

7



B



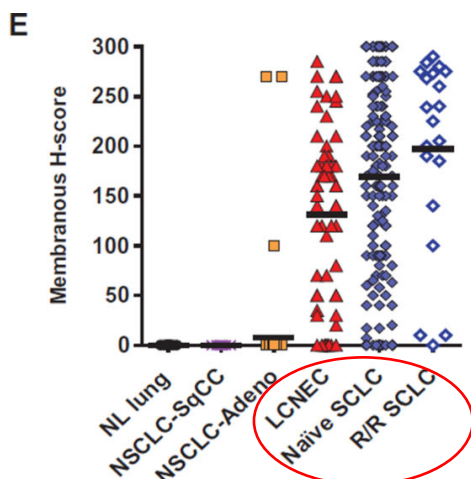
- A) SCLC の腫瘍検体のゲノム解析。SCLC の 25%で *NOTCH* ファミリーの遺伝子変異を認めた (赤枠)。
- B) *NOTCH1-4* の遺伝子変異の発現部位。*NOTCH* の damaging もしくは missense mutation の多くが Notch 受容体の細胞外ドメインに存在した。
- 参考文献 : George, J. *et al. Nature* (2015) より引用。

4) Delta-like protein 3 (DLL3) について

Delta-like protein 3 (DLL3) は Notch のリガンドの一つであり、正常な体節形成に重要な役割を果たし、DLL3 遺伝子変異は常染色体劣性異常脊椎肋骨異骨症患者において肋骨欠損と脊椎分裂を引き起こす (Bulman *et al.*, 2000)。他のリガンドとは異なり、DLL3 は異なる細胞に発現している Notch 受容体に結合せず、同一細胞上に発現する Notch の活性化を阻害するとの報告がある (Ladi *et al.*, 2005)。更に、ゴルジ体やエンドソーム・リソソームに存在し、同一細胞内に存在する Notch1 の full-length を分解し、Notch1 の細胞表面への発現や他のリガンドとの結合を阻害し、Notch シグナルの活性化を阻害するとの報告がある (Chapman *et al.*, 2011; Geffers *et al.*, 2007)。

また、SCLC を含めた神経内分泌腫瘍において DLL3 は高発現する一方で肺正常組織には発現しないと報告されている (Saunders *et al.*, 2015) (図 8)。

図 8



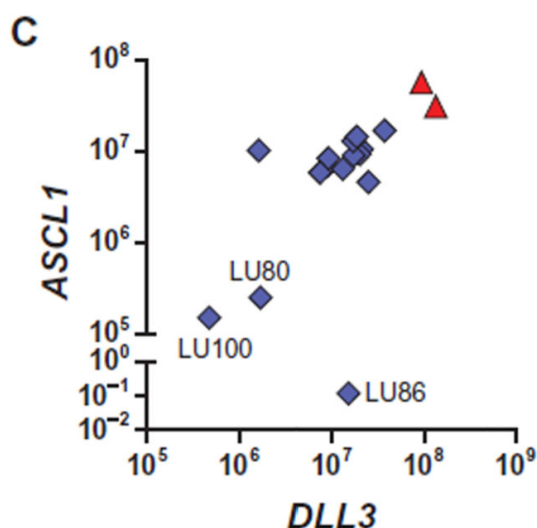
免疫組織染色における DLL3 の発現。SCLC を含めた神経内分泌腫瘍では DLL3 が高発現している。

参考文献 : Saunders, LR. *et al. Sci. Transl. Med.* (2015) より引用。

5) DLL3 と ASCL1 の関連について

ASCL1 は肺の神経内分泌細胞の分化に関与する転写因子で、SCLC や大細胞神経内分泌癌 (large cell neuroendocrine carcinoma : LCNEC) といった神経内分泌腫瘍において高発現し、これらの腫瘍における神経内分泌形態を維持することが知られている (Borges et al., 1997)。ASCL1 をノックアウトすると G2-M 期の cell cycle arrest と apoptosis を誘導し、SCLC 細胞株の増殖能を抑制することが *in vitro*、*in vivo* ともに示されており、ASCL1 は SCLC において腫瘍増殖性に機能することが報告されている (Osada et al., 2005)。DLL3 は ASCL1 の下流のターゲットであり、神経内分泌腫瘍において ASCL1 と DLL3 の mRNA の発現は相関を認めることが報告されているが (図 9)、詳細な検討は少ない。

図 9



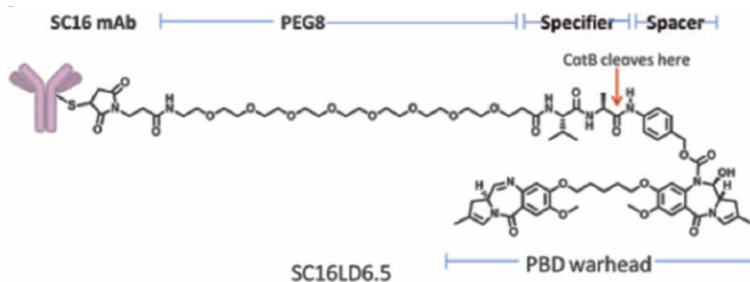
SCLC と LCNEC の patient-derived xenograft (PDX) における DLL3 と ASCL1 の mRNA の発現。両者の発現には相関を認めた (Pearson $\gamma^2 = 0.66$ 、 $P < 0.0001$)。
参考文献 : Saunders, LR. *et al. Sci. Transl. Med.* (2015) より引用。

6) Rovalpituzumab tesirine (Rova-T) について

近年、細胞障害活性を持った薬物と腫瘍細胞に高発現している抗原を認識する抗体をリンカーでつないだ antibody-drug conjugate (ADC) が開発されている。Rovalpituzumab tesirine (Rova-T) は DNA-damaging pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimer toxin とヒト抗 DLL3 モノクローナル抗体とが複合体を形成した ADC であり (図 10)、SCLC の *in vivo* mouse model では DLL3 陽性の tumor initiating cell

(TIC)に対して、Rova-T は腫瘍縮小効果、再発抑制効果を示した(Saunders et al., 2015) (図 11)。Rova-T については既治療 SCLC における第 I 相試験が施行され、Rova-T は忍容性を認め、奏効率は全体で 18%、腫瘍細胞の DLL3 発現が 50%以上の症例 38% とより高い奏効率を示した(Rudin et al., 2017) (図 12)。

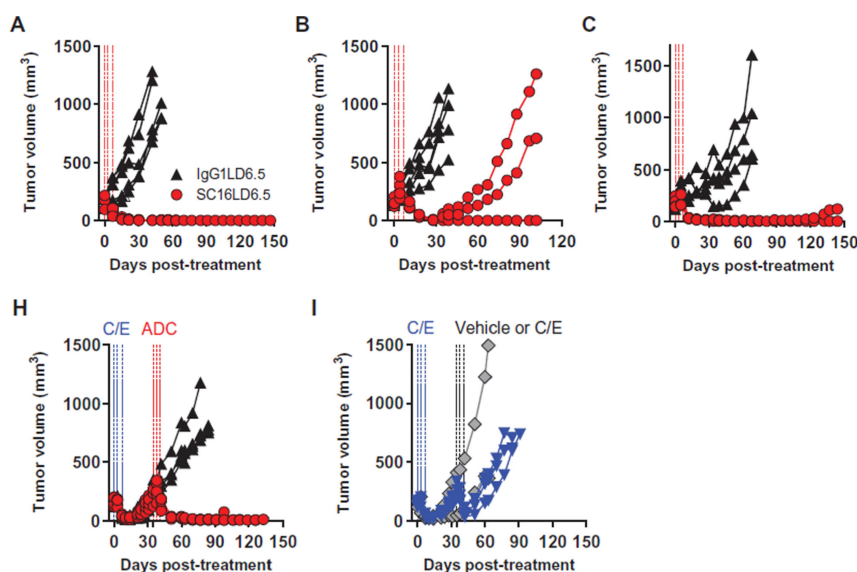
図 10



Rova-T の模式図。

参考文献：Saunders, LR. *et al. Sci. Transl. Med.* (2015)より引用。

図 11



Rova-T (SC 16LD6.5) の *in vivo*での効果。

A-C) マウスに投与した3種のSCLCのPDX腫瘍をRova-Tで治療したところ腫瘍縮小効果を認めた。

シスプラチン+エトポシド (C/E) で治療後の再発時にRova-T (SC 16LD6.5) で治療

(H) もしくはC/Eを再投与 (I) したところRova-T群では腫瘍縮小効果を認めた。

参考文献：Saunders, LR. *et al. Sci. Transl. Med.* (2015)より引用。

図 12

| | Investigator-assessed | | | Central review | | |
|---|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | All patients (n=60) | DLL3 expression 0-49% (n=8) | DLL3 expression ≥50% (n=26) | All patients (n=56) | DLL3 expression 0-49% (n=6) | DLL3 expression ≥50% (n=26) |
| Confirmed objective response (complete response and partial response) | 11 (18%) | 0 (0%) | 10 (38%) | 9 (16%) | 0 (0%) | 8 (31%) |
| Confirmed disease control (complete response, partial response, and stable disease) | 41 (68%) | 4 (50%) | 23 (88%) | 36 (64%) | 2 (33%) | 22 (85%) |
| Duration of response (months) | 5.6 (2.5-8.3) | 0 | 4.3 (2.2-15) | 4.4 (2.2-6.5) | 0 | 4.6 (2.2-6.9) |
| Progression-free survival (months) | 2.8 (2.5-4.0) | 2.2 (1.3-2.5) | 4.3 (2.8-5.6) | 4.0 (2.6-4.8) | 2.2 (1.1-3.7) | 4.6 (4.0-5.7) |

Data are number of patients (%) or median (95% CI). Responses reflect confirmed responses according to RECIST version 1.1, based on two consecutive assessments at least 4 weeks apart, in patients treated with 0.2 mg/kg or 0.4 mg/kg every 3 weeks or 0.3 mg/kg or 0.4 mg/kg every 6 weeks. RECIST=Response Evaluation Criteria in Solid Tumors.

Table 3: Activity outcomes in response-assessable patients treated at active doses, assessed by the investigator and by central review

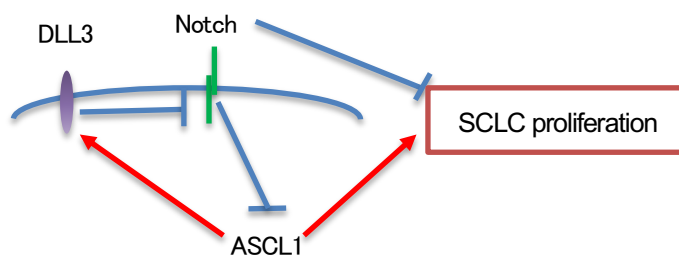
既治療 SCLC における Rova-T の第 I 相試験結果。奏効率は全体で 18%、腫瘍細胞の DLL3 発現が 50%以上の症例で 38%とより高い奏効率を示した。

参考文献：Rudin, CM. *et al. Lancet Oncol.* (2017)より引用。

6) 本研究の目的

以上より DLL3 は SCLC において神経内分泌分化に関与し、更に腫瘍増殖性に機能する可能性が示唆されるがその詳細な機能は不明である。また、SCLC における DLL3 やその上流のターゲットである ASCL1 の発現とその予後や臨床因子との関連性を検討した報告は少ない。そこで、SCLC における DLL3 の発現とその機能を解明することを目的とし本研究を立案した。DLL3 の発現に関しては SCLC 手術検体を用いて DLL3 及び ASCL1 の免疫組織染色を行い、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 の機能に関しては SCLC において腫瘍抑制性に機能するとされる Notch を介して、Notch の阻害作用を持つ DLL3 は腫瘍増殖性に機能すると仮説を立てた (図 13)。更に、DLL3 陽性 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にした。

図 13



実験方法

患者情報及び臨床検体

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17施設にて肺原発巣を完全切除された156症例(Yokouchi et al., 2015)のうち検体量が十分であった11施設から得られた95例のDLL3及びASCL1の免疫組織染色について検討した。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 (2004)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(Travis et al., 2004)。病期はTNM病期分類(7版)を用いて分類した。Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE)組織ブロックを5 μ m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。

これは北海道大学病院自主臨床研究審査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

DLL3発現は抗DLL3抗体(SP347, Spring Bioscience, Pleasanton, CA)を用いて評価した。SP347(0.24 μ g/mL)を1次抗体として使用し、OptiView DAB IHC kit (Ventana, Tucson, AZ)を用いてDLL3の発現を評価した。ASCL1発現は抗ASCL1抗体(SC72.201, Abbvie Stemcentrx, South San Francisco, CA)を用いてVectastain ABC HRP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)で発色させ評価した。判定に関しては4X視野で染色細胞を観察した。DLL3は全腫瘍細胞中の細胞質及び細胞膜に染色を認めたものを陽性と評価した。現在施行中のRova-Tの臨床試験で用いられている基準を参考に75%以上の陽性細胞を認める症例をDLL3-high群とし、75%未満の症例をDLL3-low群とした。DLL3陽性群は1%以上のDLL3陽性細胞を認める症例とした。ASCL1は全腫瘍細胞中5%以上の細胞核内に染色を認める場合をASCL1陽性群とした(Kosari et al., 2014; Shida et al., 2008)。DLL3及びASCL1発現は混合型SCLCにおいては扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌の成分は評価せず、組織学的にSCLCと診断された細胞のみを評価した。

細胞株

細胞株はSCLC細胞株(SBC-3、SBC-5、MS-1、RERF-LC-MA、H69、H82、H209、H592、H1688)を用いた。SBC-3、SBC-5、MS-1、RERF-LC-MAはJapanese Collection of Research Bioresources Cell Bank(大阪、日本)から購入し、H69、H82、H209、H1688はAmerican

Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。H592 は秋田弘俊先生 (北海道大学大学院医学研究院 腫瘍内科学教室) からご提供頂いた。細胞株は 5% CO₂ 下の 37°C 湿潤環境にて 10% の牛胎仔血清 (fetal bovine serum:FBS) を含めた Minimum Essential Media で SBC-3、SBC-5、RERF-LC-MA は、Roswell Park Memorial Institute medium で MS-1、H69、H82、H209、H592、H1688 はそれぞれ培養を行なった。

抗体、ウエスタンブロット法

各種タンパク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 Tris Buffered Saline with Tween 20 (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 DLL3 抗体 (1:750 dilution; ab103102, Abcam, Cambridge, UK) ・抗 NICD1 抗体 (1:500 dilution; #3608, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ・抗 NICD2 抗体 (1:5000 dilution; #5732, Cell Signaling Technology) ・抗 NICD3 抗体 (1:1000 dilution; 55114-1-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA) ・抗 NICD4 抗体 (1:1500 dilution; #2423, Cell Signaling Technology) ・抗 E-cadherin 抗体 (1:200 dilution; sc-8426, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TxS, USA) ・抗 Vimentin 抗体 (1:200 dilution; V6630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ・抗 Snail 抗体 (1:1000 dilution; #3879, Cell signaling Technology) ・抗 ASCL1 抗体 (1:250 dilution; #556604, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) ・抗 Actin 抗体 (1:1500 dilution; A2066, Sigma-Aldrich) をそれぞれ使用した。

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用し、RNA を抽出した。細胞を回収後に 300 g×5 分遠心分離し細胞を沈殿させ、Buffer RLT plus を添加し専用のコレクションチューブに注入し、8000 g×30 秒遠心を施行した。遠心後のフロースロー液と同量の 70% エタノールを混合し専用のスピナラムに注入し 8000 g×15 秒遠

心を施行した。RNase-Free DNase Set を用い DNase 処理を行い、Buffer RW、Buffer RPE でスピニングカラムを洗浄した。RNase free water を添加し 8000 g×1 分遠心を行い コレクションチューブ内に RNA 抽出を行なった。抽出した RNA から High capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて complementary DNA (cDNA) を抽出した。

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* を使用した。*DLL3*、*NOTCH1*、*NOTCH2*、*NOTCH3*、*NOTCH4*、*CDH1*、*VIM*、*SNAIL1*、*ASCL1*、*GAPDH* の mRNA 発現は ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) を施行した。TaqMan Universal PCR Master Mix と *DLL3*、*NOTCH1*、*NOTCH2*、*NOTCH3*、*NOTCH4*、*GAPDH* reagents (Applied Biosystems) もしくは SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) と *CDH1* (forward primer: 5' - CACGGTAACCGATCAGAATG-3' ; reverse primer: 5' - ACCTCCATCACAGAGGTTCC-3')、*VIM* (forward primer: 5' - AATTGCAGGAGGAGATGCTT-3' ; reverse primer: 5' - GAGACGCATTGTCAACATCC-3')、*SNAIL1* (forward primer: 5' - AGGTTGGAGCGGTCAGC-3' ; reverse primer: 5' - CCTTCTCTAGGCCCTGGCT -3')、*ASCL1* (forward primer: 5' -CAAACGCCGGCTCAACTTC-3' ; reverse primer: 5' -TTGACCAACTTGACGCGGTT-3')、*GAPDH* (forward primer: 5' - CTGACTTCAACAGCGACACC-3' ; reverse primer: 5' - TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3') の 特異的なプライマーを用いて施行した。

Small interfering RNA (siRNA)

6well プレートに H69 と H82 (それぞれ 6×10^5 cells/well と 4×10^5 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 割程度の細胞密度の状態を確認後、Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を溶媒として、100 pmol の *DLL3*-siRNA、*SNAIL1*-siRNA、*NOTCH1*-siRNA (いずれも ON-TARGET plus SMART pool, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) 50 μ l 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 72 時間後に mRNA 及びタンパクを回収し qRT-PCR 法もしくはウエスタンブロット法により *DLL3*、*Snail*、*Notch1* の mRNA、蛋白発現を確認した。Control siRNA には ON-TARGET plus Non-targeting pool (Thermo Fisher Scientific) を用いた。北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定に従って実施した。

DLL3 overexpression

DLL3 の発現プラスミド (*DLL3*-ORF plasmid; OriGene Technologies, Rockville, MD,

USA) 及び control 用プラスミド (pCMV6-entry ; OriGene Technologies) 2 μ g を培地 OPTIMEM I (Thermo Fisher Scientific) 250 μ l と混ぜた後、Turbofectin (OriGene Technologies) 12 μ l を添加し、室温で 15 分間静置した。その後、混合液を 6 well プレートで 24 時間培養した SBC-5 細胞に添加した。24 時間培養後 10 cm dish に移し G418 (600 μ g/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、qRT-PCR 法、ウエスタンブロット法を使用した。北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定に従って実施した。

MTT proliferation assay

① DLL3-siRNA もしくは Notch1-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 96 well 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 96 well プレート (poly-HEMA コーティングあり) を使用した。96 well プレート (poly-HEMA コーティングなし、あり) にそれぞれ H69 (いずれも 40000 cells/well)、H82 (いずれも 10000 cells/well) を各々一晩培養後、DLL3-siRNA もしくは NOTCH1-siRNA と control-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 10 μ l 注入し、その 4 時間後に stop solution 90 μ l 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 DLL3 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。96 well プレート (poly-HEMA コーティングなし、あり) に DLL3 overexpression ベクターまたは control ベクターを導入した SBC-5 (4000 cells/well、8000 cells/well) を各々 72 hr 培養後、MTT proliferation assay を上記同様に施行した。

Migration、Invasion assay

① DLL3-siRNA、SNAI1-siRNA、NOTCH1-siRNA による細胞遊走能・浸潤能への影響の検討

migration assay、invasion assay はともに 24 well Transwell プレートをを用い、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 350 μ l/well を upper chamber に、20%FBS 含有培養液 500 μ l/well を lower chamber に入れ、DLL3-siRNA、SNAI1-siRNA、NOTCH1-siRNA または control siRNA

をtransfectionした48 hr後にそれぞれの細胞を回収しmigration assay、invasion assayはH69ではそれぞれ 42×10^4 cells/well、 35×10^4 cells/well、H82ではいずれも 21×10^4 cells/wellずつ撒種し培養した。migration assayは撒種6時間後に、invasion assayはH69では撒種48時間後、H82では撒種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 DLL3 overexpression による細胞遊走能への影響の検討

同様に migration assay、invasion assay を行うためにそれぞれ DLL3 overexpression ベクターまたは control ベクターを導入した SBC-5 をいずれも 21×10^4 cells/well ずつ撒種し培養した。migration assay は撒種4時間後に 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。DLL3 を overexpression した SBC-5 または control SBC-5 (ともに 3×10^6 cells) を 200 μ l の Phosphate buffered saline (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。TV= (Length) \times (Width) \times (Height) /2 (Cao et al., 2004)。体重を2回/週の頻度で測定し、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20日目に摘出し、DLL3及びEMTマーカー発現を評価するためウエスタンブロット法を試行した。北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。

統計解析

DLL3、ASCL1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。DLL3とASCL1の相関関係はSpearmanの相関係数を用いて解析した。*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 v11.0.0; SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用した。

実験結果

1) SCLCにおけるDLL3とASCL1発現

SCLC 外科的切除検体を用いて DLL3 免疫組織染色を行った。SCLC における DLL3 免疫組織染色結果、DLL3 陽性細胞割合の分布を図 14A, 14C に示す。DLL3 は細胞質、膜に局在していた。評価可能であった 93 例中、1%以上の DLL3 陽性群は 77 例 (83%)、75%以上陽性の DLL3 高発現群は 44 例 (47%) であり、clinical disease stage (cStage) I/II の患者に限ると 82 例中陽性群は 66 例 (80%)、高発現群で 35 例 (43%) であった (表 1)。

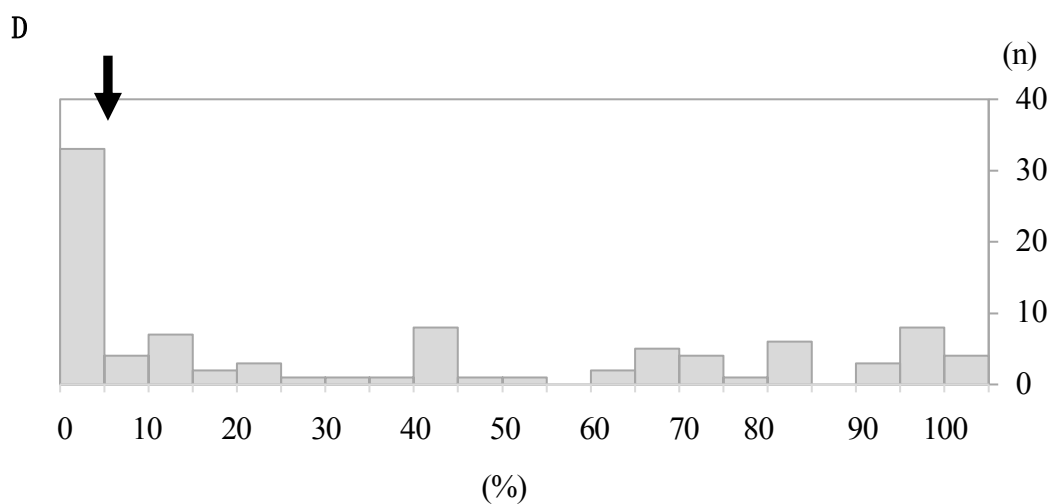
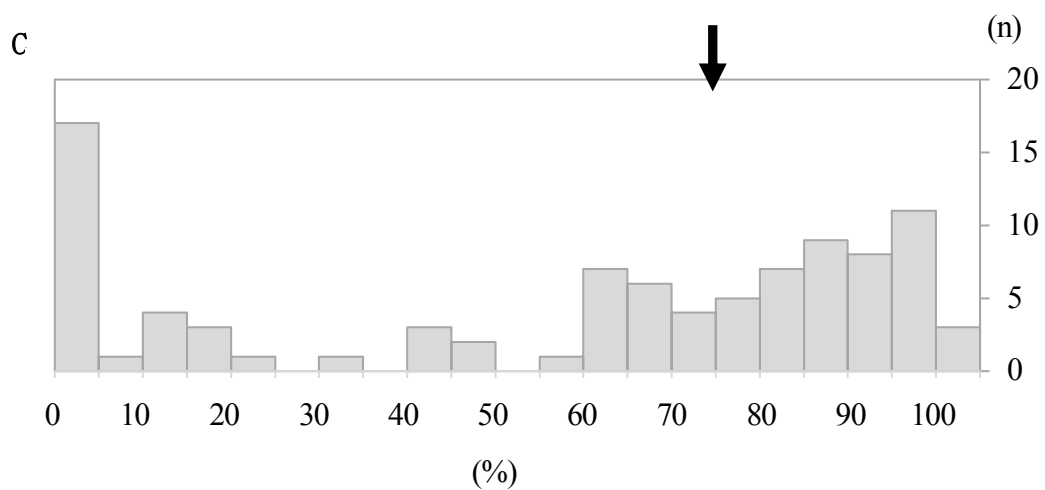
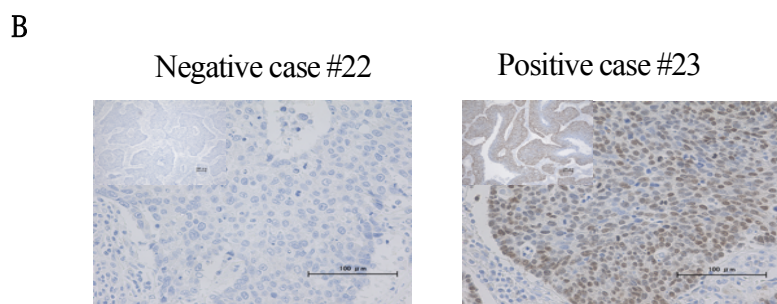
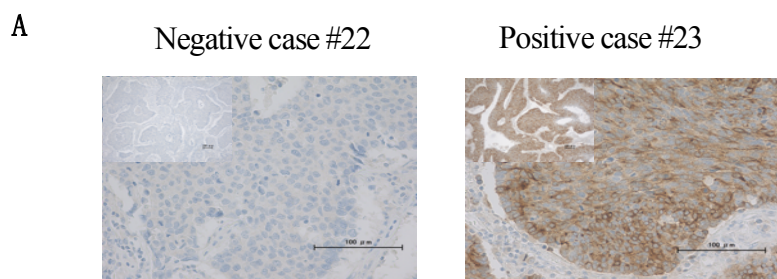
次に、SCLC 外科的切除検体で ASCL1 免疫組織染色を行った。SCLC における ASCL1 免疫組織染色結果、ASCL1 陽性細胞割合の分布を図 14B, 14D に示す。ASCL1 は核に局在していた。評価可能であった 95 例中、5%以上の ASCL1 陽性群は 61 例 (64%) であり、cStage I/II の患者に限ると 84 例中陽性群は 52 例 (62%) であった (表 1)。DLL3 と ASCL1 発現に正の相関関係を認めた ($R = 0.723$, $P < 0.0001$) (図 14E)。

表 1 DLL3 発現と ASCL1 発現による症例数のまとめ

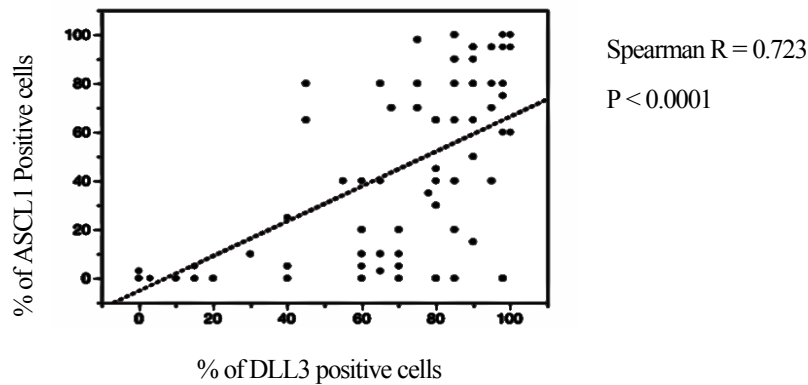
| | All patients | Patients with cStage ^a I/II |
|--|---------------------|--|
| | No. of patients (%) | |
| DLL3 positive cells/total cancer cells | | |
| ≥ 1% | 77/93 (83%) | 66/82 (80%) |
| ≥ 75% | 44/93 (47%) | 35/82 (43%) |
| ASCL1 positive cells/total cancer cells | | |
| ≥ 5% | 61/95 (64%) | 52/84 (62%) |

^aClinical disease stage

图 14



E



- A) SCLCにおけるDLL3の陽性例(98%)と陰性例(0%)の免疫組織染色パターン、scale bar=100 μ m
- B) SCLCにおけるASCL1の陽性例(95%)と陰性例(0%)の免疫組織染色パターン、scale bar=100 μ m
- C) SCLCにおけるDLL3陽性細胞割合の分布、矢印=DLL3高発現のカットオフ値
- D) SCLCにおけるASCL1陽性細胞割合の分布、矢印=ASCL1陽性発現のカットオフ値
- E) SCLCにおけるDLL3とASCL1発現の相関関係。DLL3とASCL1発現は有意な相関関係を認めた ($R = 0.723$, $P < 0.0001$)。

2) SCLCにおけるDLL3・ASCL1発現と臨床病理学的因子との関連

DLL3発現またはASCL1発現臨床病理学的因子との関連の有無について調べた(表2)。DLL3高発現はclinical lymph node status (cN) 0-1と比べcN 2-3の症例で多く認め($P = 0.006$)、cStage I/IIと比べcStage III/IVの症例で多く認めた($P = 0.022$)。DLL3発現はその他の病理学的因子との相関は認めなかった。ASCL1発現はpure SCLCの組織型の症例で多く認めた($P = 0.003$)。

表 2 DLL3・ASCL1 発現と臨床病理学的因子との関連

| Characteristics | DLL3 expressions (n = 93) | | | ASCL1 expressions (n = 95) | | |
|------------------------------|---------------------------|------|----------|----------------------------|----------|----------|
| | No. of Patients | | | No. of Patients | | |
| | Low | High | <i>P</i> | Negative | Positive | <i>P</i> |
| Age (years) | | | | | | |
| < 65 | 13 | 17 | 0.268 | 13 | 18 | 0.494 |
| ≥ 65 | 36 | 27 | | 21 | 43 | |
| Sex | | | | | | |
| Male | 37 | 35 | 0.805 | 27 | 47 | 1.000 |
| Female | 12 | 9 | | 7 | 14 | |
| Smoking (pack-years) | | | | | | |
| < 20 | 7 | 4 | 0.526 | 6 | 5 | 0.198 |
| ≥ 20 | 38 | 37 | | 26 | 51 | |
| Unknown | 4 | 3 | | 2 | 5 | |
| ECOG PS^a | | | | | | |
| 0 | 31 | 28 | 1.000 | 22 | 38 | 0.812 |
| 1 | 14 | 13 | | 9 | 19 | |
| Unknown | 4 | 3 | | 3 | 4 | |
| Histology | | | | | | |
| SCLC ^b | 33 | 31 | 0.824 | 17 | 49 | 0.003 |
| Combined SCLC | 16 | 13 | | 17 | 12 | |
| cT^c | | | | | | |
| T1-2 | 44 | 43 | 0.208 | 30 | 59 | 0.183 |
| T3-4 | 5 | 1 | | 4 | 2 | |
| cN^d | | | | | | |
| N0-1 | 48 | 35 | 0.006 | 32 | 53 | 0.323 |
| N2-3 | 1 | 9 | | 2 | 8 | |
| cStage^e | | | | | | |
| I-II | 47 | 35 | 0.022 | 32 | 52 | 0.317 |
| III-IV | 2 | 9 | | 2 | 9 | |
| Adjuvant chemotherapy | | | | | | |
| Yes | 33 | 26 | 0.518 | 21 | 39 | 0.829 |
| No | 16 | 18 | | 13 | 22 | |

^a Eastern Cooperative Oncology Group performance status

^b Small cell lung cancer

^c Clinical tumor classification

^d Clinical lymph node status

^e Clinical disease stage

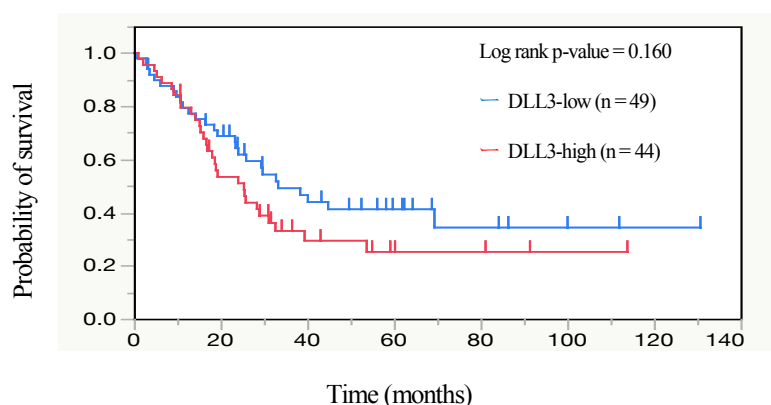
3) SCLCにおけるDLL3・ASCL1発現と予後との関連

DLL3 高発現群 (n = 44)、低発現群 (n = 49) に分け DLL3 発現と全生存期間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 15A)。

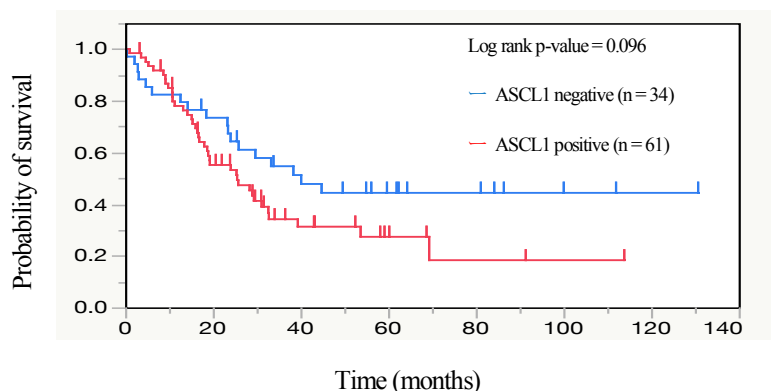
ASCL1 陽性群 (n = 61)、陰性群 (n = 34) に分け ASCL1 発現と全生存期間との関係を評価したが、2 群間に有意な差を認めなかった (図 15B)。

図 15

A



B

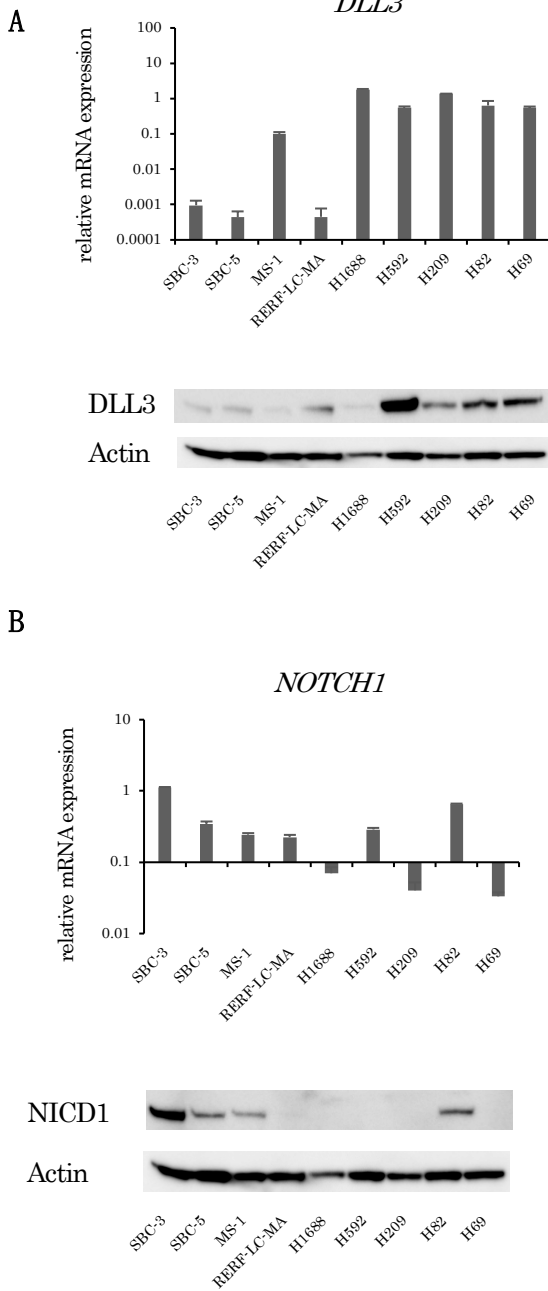


- A) SCLC における DLL3 高発現群と低発現群の全生存期間を比較した Kaplan-Meier 生存曲線。2 群間の予後に有意な差を認めなかった。
- B) SCLC における ASCL1 高発現群と低発現群の全生存期間を比較した Kaplan-Meier 生存曲線。2 群間の予後に有意な差を認めなかった。

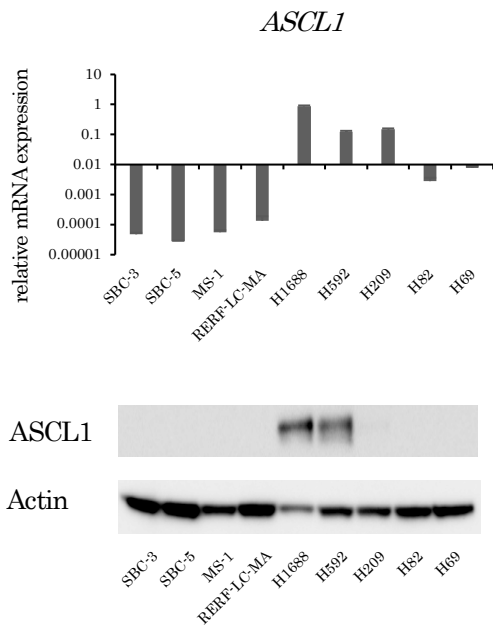
4) SCLC 細胞株における DLL3・Notch1・ASCL1 発現

次に SCLC における DLL3 の機能を検討するために、SCLC 細胞株の DLL3 の発現を確認することとした (図 16A)。9 つの SCLC 細胞株全てで DLL3 の mRNA 及びタンパクの発現を認めた。NOTCH1 タンパクは SBC-3・SBC-5・MS-1・H82 で、ASCL1 タンパクは H1688、H592、H209 で発現を認めた (図 16B, 16C)。

図 16



C



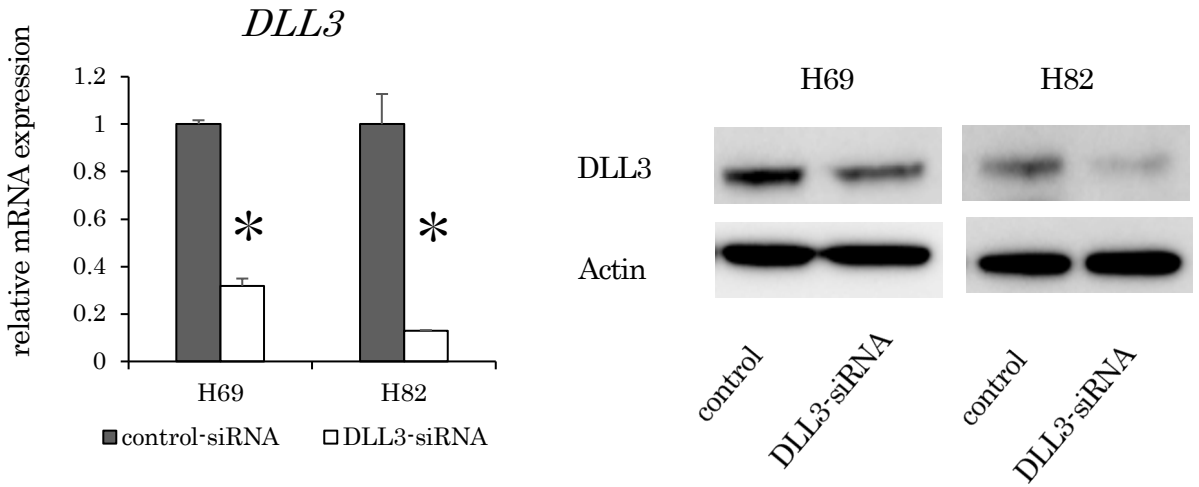
SCLCにおけるDLL3 (A)・NOTCH1 (B)・ASCL1 (C) の mRNA 及びタンパク発現。mRNA は *GAPDH*により補正。

5) SCLC 細胞株における DLL3 knockdown の増殖能や遊走能、浸潤能への影響 (*in vitro*)

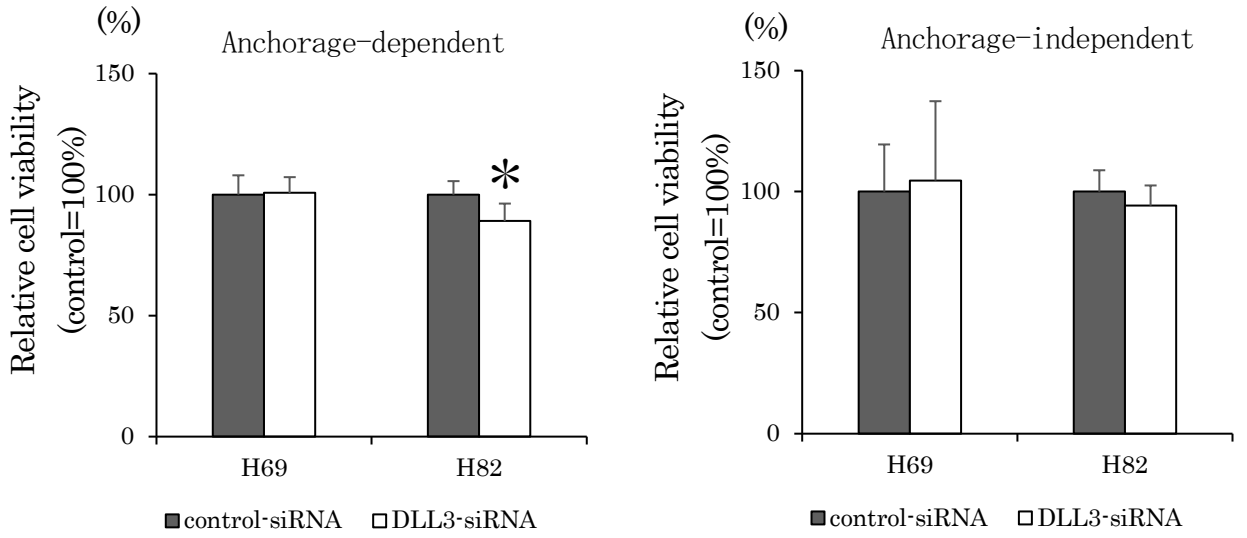
上記の結果から SCLC 細胞株のうち DLL3 が高発現している H69・H82 を用いて細胞実験を進めていくこととした。はじめにこれらの細胞株に DLL3-siRNA を導入したところ、DLL3 の mRNA 及びタンパク発現が低下することを確認した (図 17A)。H82 では足場依存性増殖は control 細胞と比べ DLL3 knockdown 細胞で僅かに低下していたが H69 では特に差は認めなかった。(図 17B)。migration assay において、H69・H82 ともに DLL3 knockdown により migration 細胞数は有意に低下した(図 17C)。さらに、invasion assay においても DLL3 knockdown により invasion 細胞数は低下傾向を認めた (図 17D)。

17

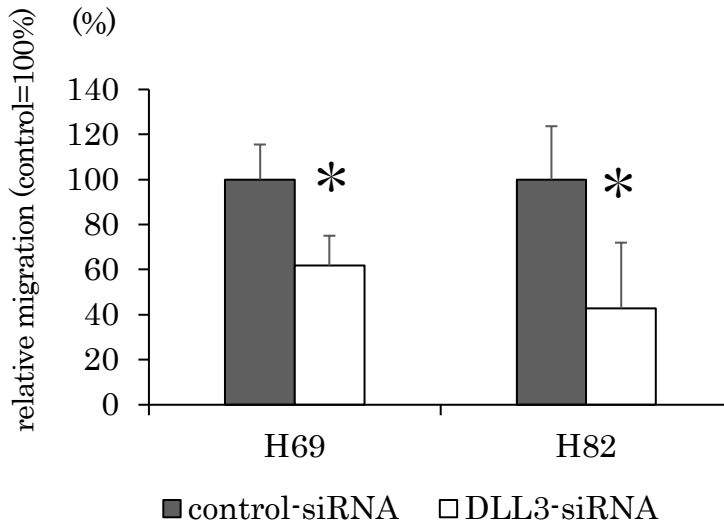
A

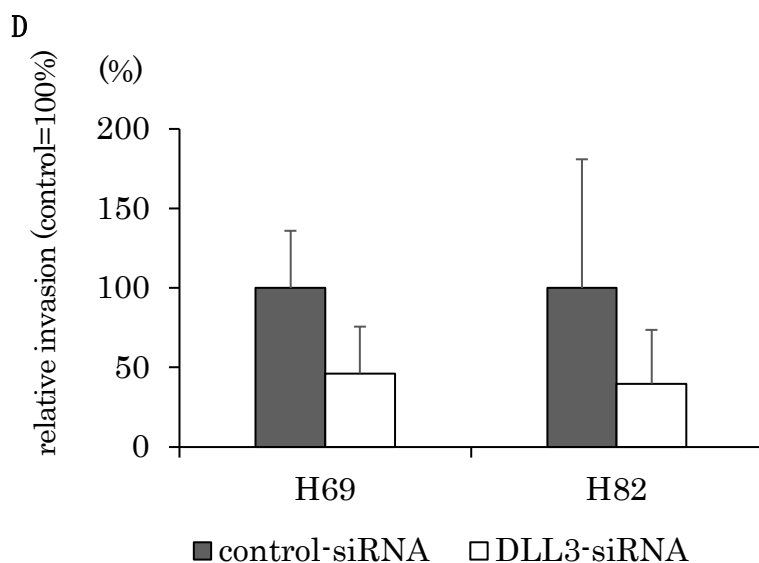


B



C



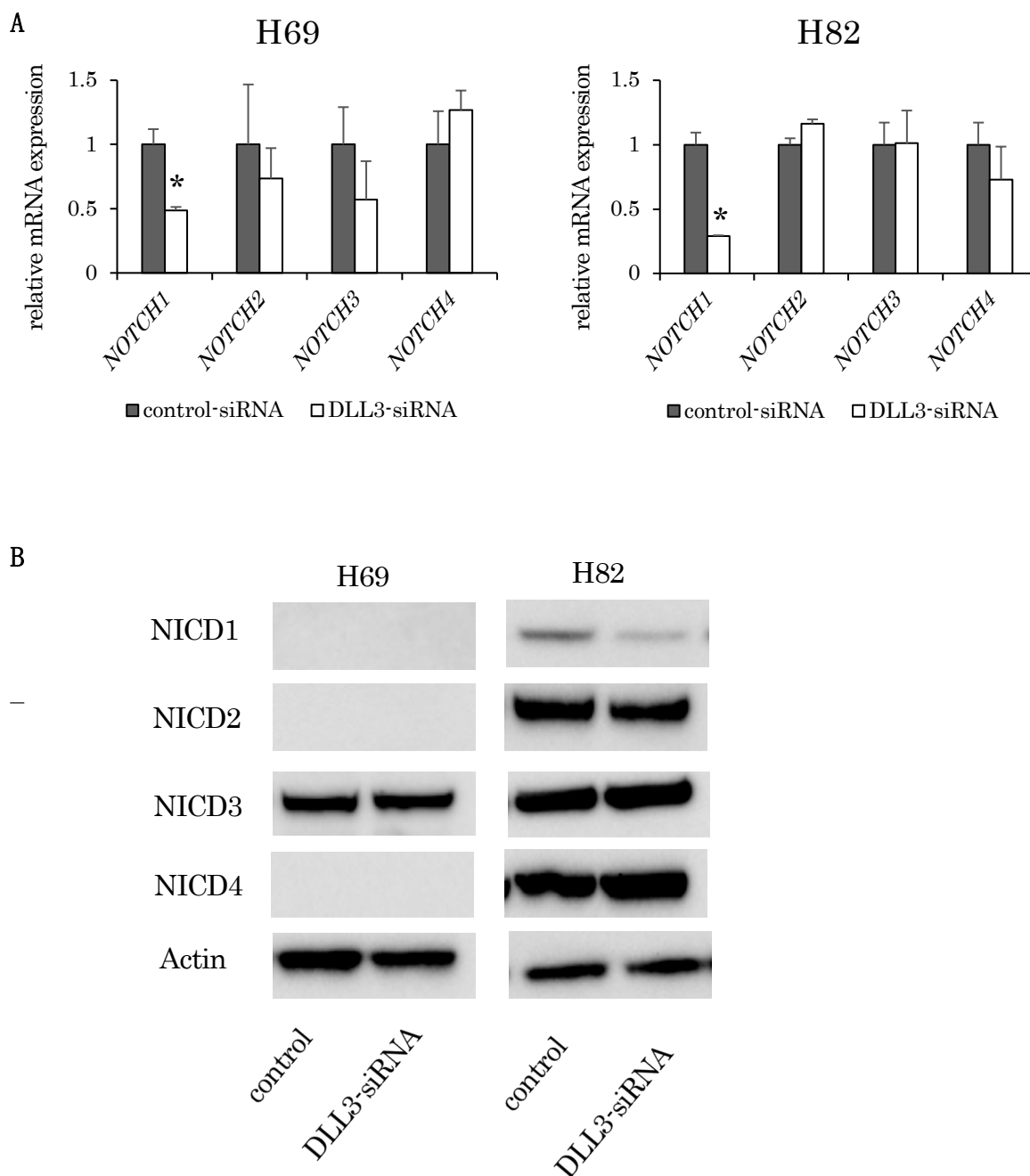


- A) H69・H82 細胞株における DLL3-siRNA による DLL3 mRNA・タンパク発現の変化。DLL3-siRNA による DLL3 発現の低下を確認した。
- B) DLL3 knockdown による足場依存性増殖能 (左)・非依存性増殖能 (右) の変化、* : $P < 0.05$ 。H82 で僅かに足場依存性増殖能の低下を認めた。
- C) DLL3 knockdown による遊走能の変化、* : $P < 0.05$ 。H69・H82 とともに DLL3 knockdown により migration 細胞数が有意に低下した。
- D) DLL3 knockdown による浸潤能の変化。H69・H82 とともに DLL3 knockdown により invasion 細胞数の低下傾向を示した。

6) SCLC 細胞株における DLL3 knockdown の Notch シグナルへの影響 (*in vitro*)

次に DLL3 の抑制が Notch シグナルに与える影響を調べた。DLL3 knockdown により H69・H82 とともに *NOTCH1* の mRNA 発現が低下した (図 18A)。更に、DLL3 knockdown により H82 では NICD1 発現は低下したが、H69 において変化は認めなかった (図 18B)。DLL3 knockdown によって、NICD2-4 発現に有意な変化を認めなかった (図 18A, 1B)。

図 18



A) DLL3 knockdown による *NOTCH1-4* mRNA 発現の変化、* : $P < 0.05$ 。H69・H82 とともに DLL3 knockdown によって *NOTCH1* mRNA 発現が低下した。

B) DLL3 knockdown による NICD1-4 タンパク発現の変化。H82 で DLL3 knockdown により NICD1 発現は低下した。一方、H69 では DLL3 knockdown では NICD1 を含め NICD1-4 タンパク発現の有意な変化を認めなかった。

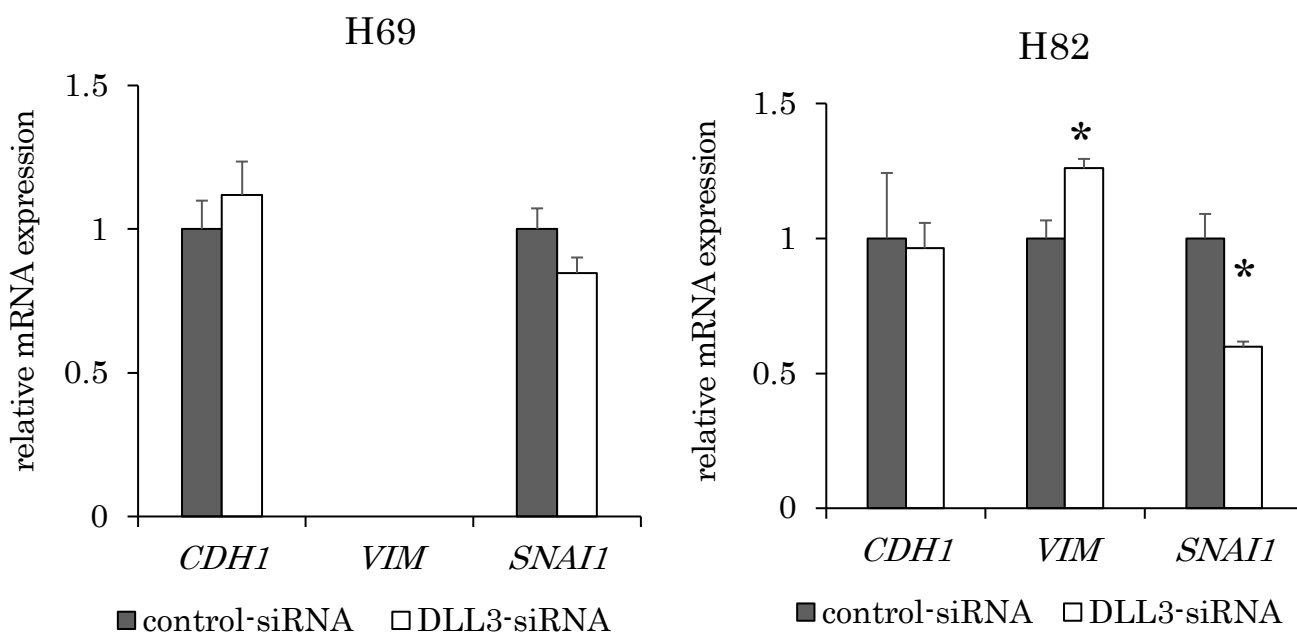
NICD; notch intracellular domain

7) SCLC 細胞株における DLL3 knockdown の EMT マーカーへの影響 (*in vitro*)

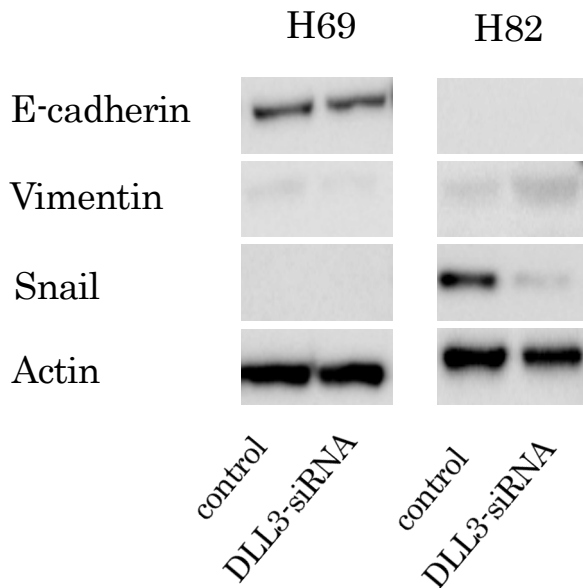
DLL3 knockdown により migration 細胞数・invasion 細胞数の低下を認めたため、この変化のメカニズムについて調べていくこととした。癌細胞は EMT が生じることで遊走能・浸潤能を獲得することが示されており (Wang et al., 2010; Yuan et al., 2014)、EMT マーカーである E-cadherin・Vimentin・Snail の mRNA 及びタンパク発現の変化について検討した。DLL3 knockdown により、H82 で *SNAI1* の mRNA 発現が低下、H69 においても低下傾向であった (図 19A)。Snail のタンパク発現は H82 では低下したが H69 では認めなかった (図 19B)。VIM の mRNA 発現は H82 の DLL3 knockdown で増加したが、タンパク発現には変化を認めなかった。他の EMT マーカーの有意な変化は認めなかった。

図 19

A



B

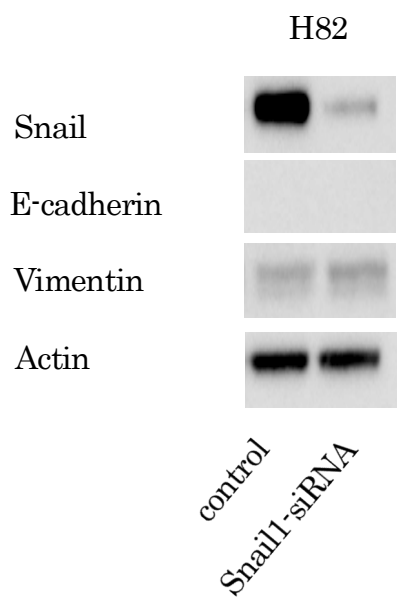


- A) DLL3 knockdown による EMT マーカーの mRNA 発現の変化、* : $P < 0.05$ 。H69・H82 ともに *SNAI1* mRNA 発現が低下した。
- B) DLL3 knockdown による EMT マーカーのタンパク発現の変化。Snail のタンパク発現は H82 では低下したが H69 では認めなかった。

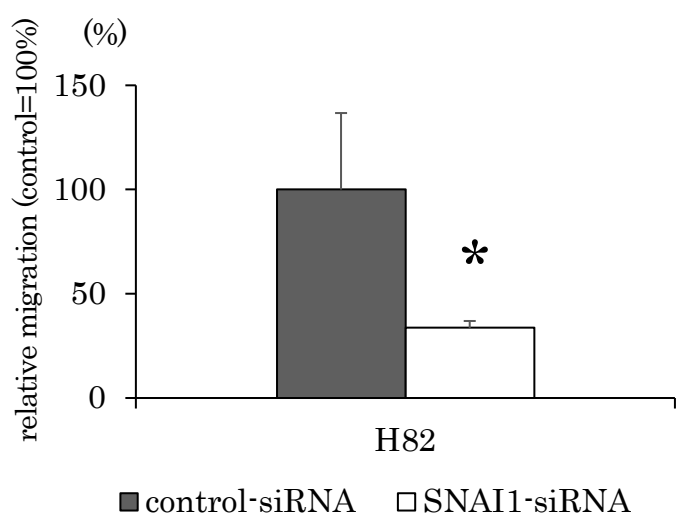
8) H82 細胞株における Snail knockdown と Notch1 knockdown の遊走能・浸潤能の影響 (*in vitro*)

DLL3 knockdown により Snail の発現が低下したことから、DLL3 が Snail を介して遊走能、浸潤能を誘導するかを調べるために、*SNAI1*-siRNA を用いて H82 の Snail knockdown を行なった (図 20A)。Snail knockdown により、H82 の遊走細胞数・浸潤細胞数は低下した (図 20B, 20C)。DLL3 knockdown により *NOTCH1* 発現の低下を認めたことから、*NOTCH1*-siRNA を用いて H82 の *NOTCH1* knockdown を行い、細胞増殖能・遊走能・浸潤能の変化を検討したが、knockdown 細胞と control 細胞では変化は認めなかった (図 20D, 20F)。さらに *NOTCH1* knockdown では Snail の発現の変化も認めなかった (図 20E)。

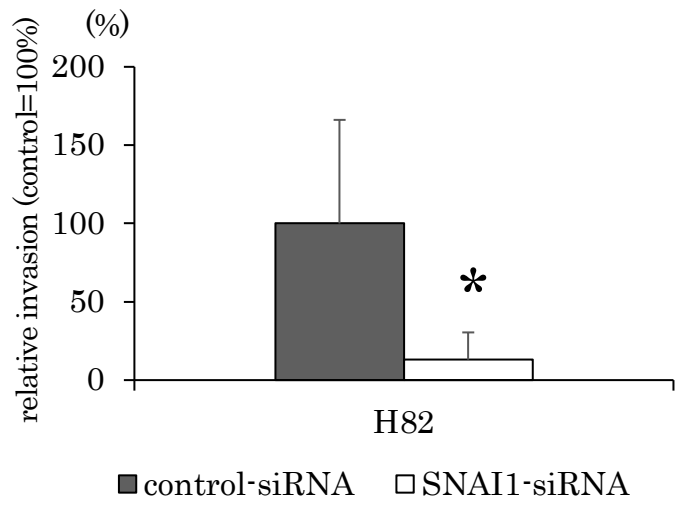
A

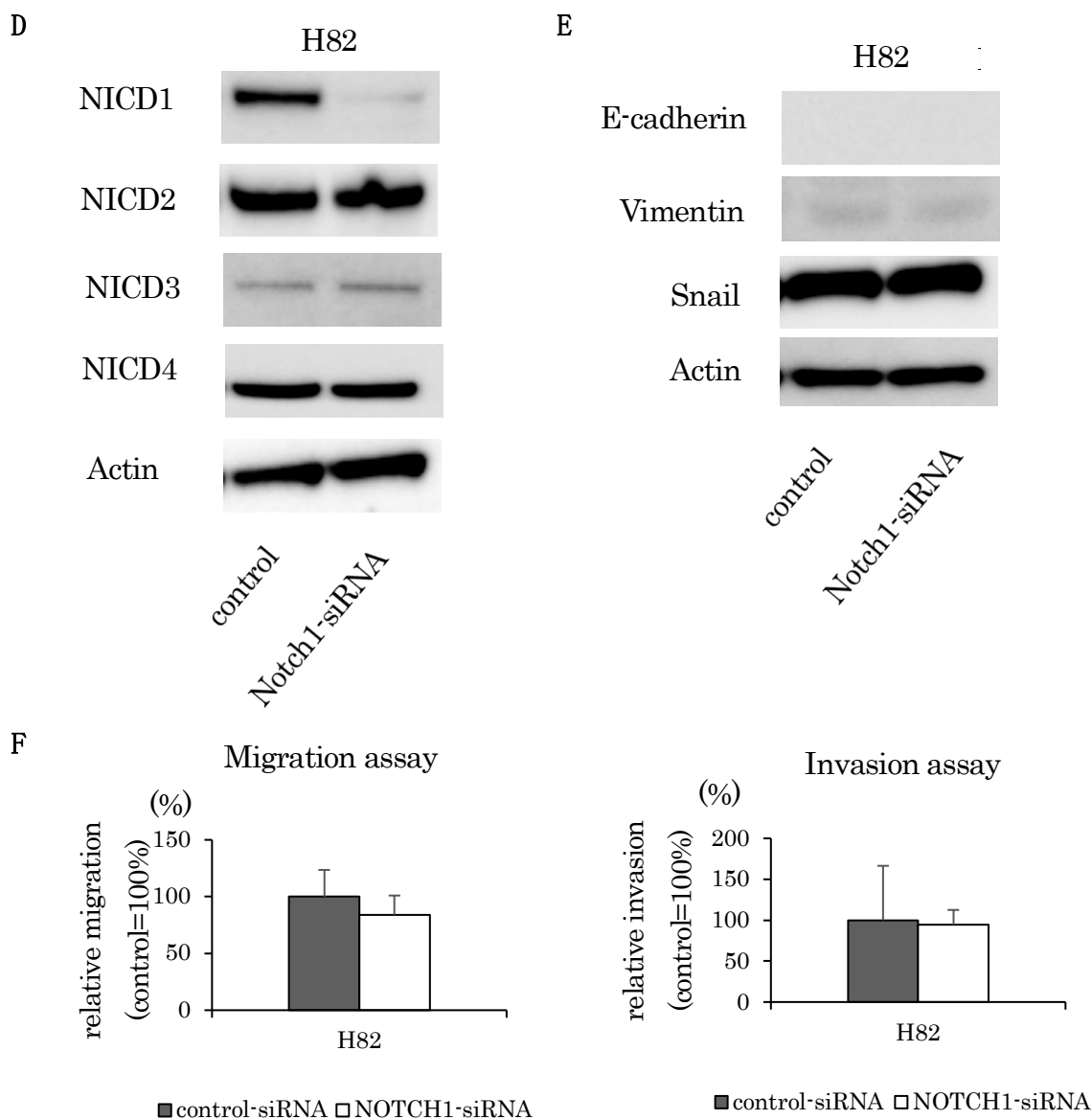


B



C





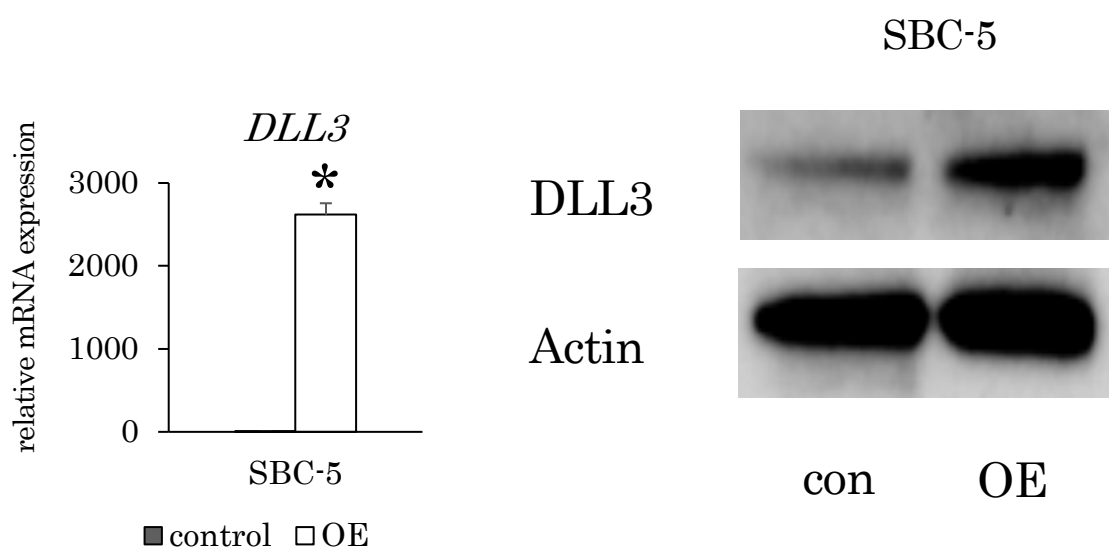
- A) H82 細胞株における Snail knockdown による Snail・E-cadherin・Vimentin タンパク発現の変化。Snail knockdown による Snail 発現の低下を確認した。
- B) Snail knockdown による遊走能の変化、* : $P < 0.05$ 。Snail knockdown により遊走細胞数が有意に低下した。
- C) Snail knockdown による浸潤能の変化。Snail knockdown により浸潤細胞数が有意に低下した。
- D) H82 細胞株における NOTCH1 knockdown による NICD1-4 タンパク発現の変化。NOTCH1 knockdown による NICD1 発現の低下を確認した。
- E) H82 細胞株における NOTCH1 knockdown による EMT マーカーのタンパク発現の変化。NOTCH1 knockdown では変化は認めなかった。
- F) NOTCH1 knockdown による遊走能 (左)・浸潤能 (右) の変化。NOTCH1 knockdown では変化を認めなかった。
- NICD: Notch intracellular domain

9) SCLC 細胞株における DLL3 overexpression による増殖能や遊走能、浸潤能への影響 (*in vitro*)

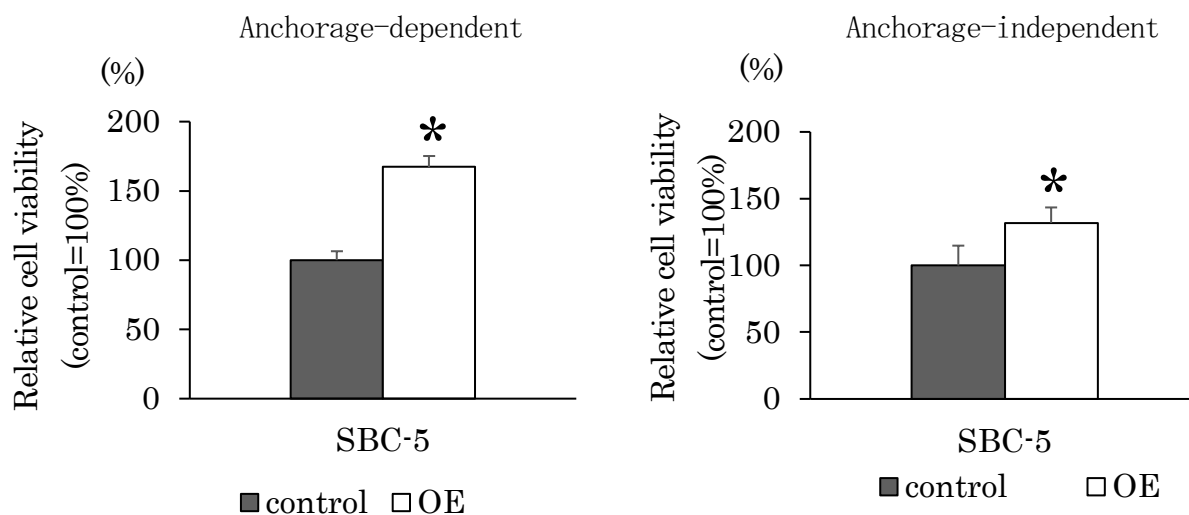
次に、DLL3 を overexpression することにより DLL3 knockdown と逆の結果を示すかどうか検討を行った。DLL3 発現の弱い SBC-5 を使用し DLL3 overexpression 細胞を作成した (図 21A)。SBC-5 では、DLL3 overexpression により足場依存性増殖能・足場非依存性増殖能ともに有意に亢進し (図 21B)、同様に遊走能も亢進した (図 21C)。浸潤能に関しては測定困難であったため評価できなかった。

図 21

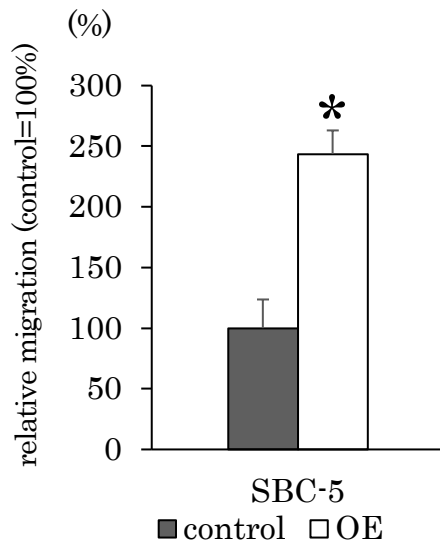
A



B



C



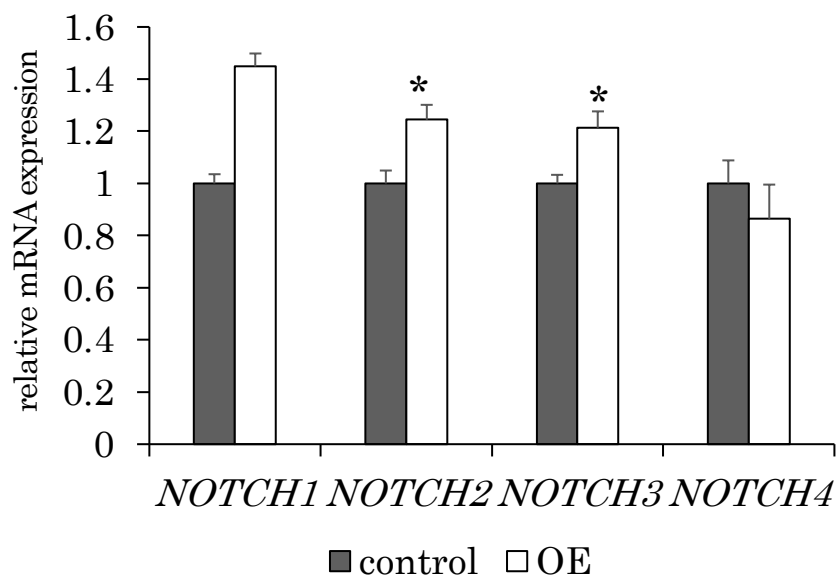
- A) SBC-5 細胞株における DLL3 overexpression の確認 (qRT-PCR 法・ウエスタンブロット法)。DLL3 発現の増加を確認した。
- B) DLL3 overexpression による足場依存性増殖能 (左)・足場非依存性増殖能 (右) の変化、* : $P < 0.05$ 。SBC-5 では DLL3 overexpression により足場依存性増殖能・足場非依存性増殖が有意に増加した。
- C) DLL3 overexpression による遊走能の変化、* : $P < 0.05$ 。SBC-5 では DLL3 overexpression により遊走能が有意に亢進された。
- OE: DLL3 overexpression

10) SCLC 細胞株における DLL3 overexpression による Notch シグナルや EMT マーカーへの影響 (*in vitro*)

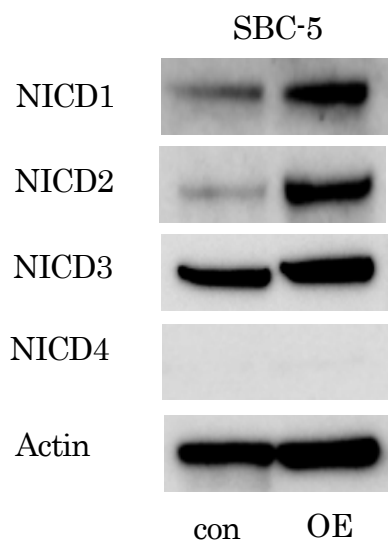
次に、DLL3 overexpression が Notch シグナルや EMT マーカーに与える影響について調べた。SBC-5 で DLL3 overexpression をすると、NOTCH4 以外のレセプターの mRNA 及びタンパク発現が増加した (図 22A, 22B)。DLL3 overexpression では DLL3 knockdown で抑制された Snail の発現は増加した (図 22C, 22D)。CDH1 mRNA 発現は overexpression で抑制されたが、E-cadherin の発現は SBC-5 では認めなかった。

☒ 22

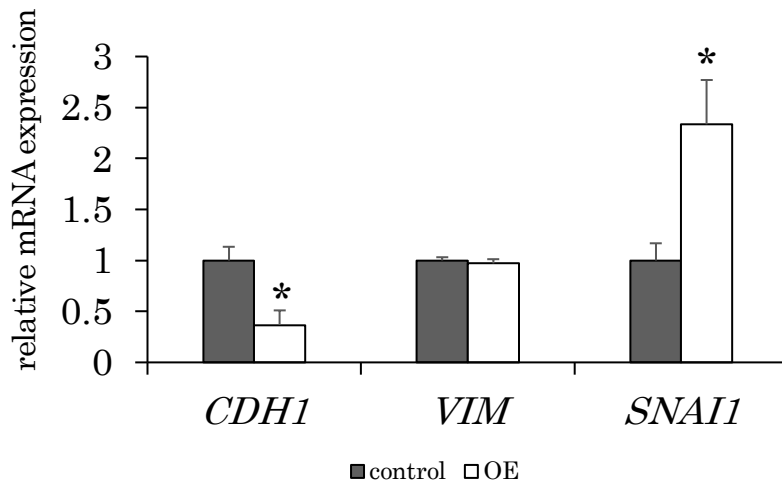
A



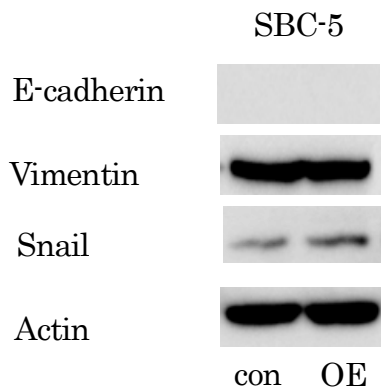
B



C



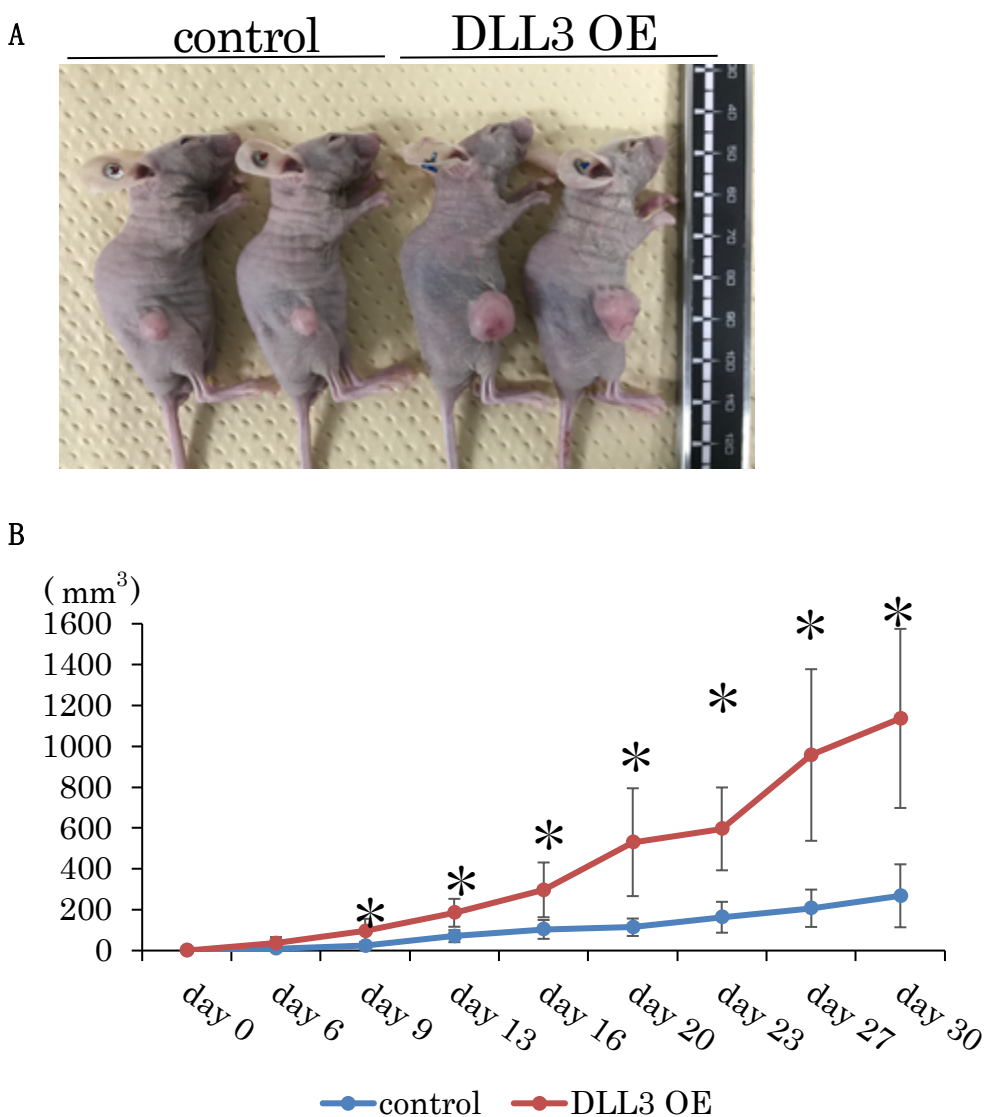
D



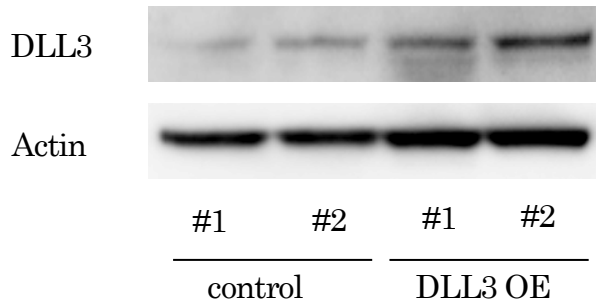
- A) DLL3 overexpression による *NOTCH1-4* mRNA 発現の変化。DLL3 overexpression により *NOTCH4* 以外の mRNA 発現が有意に増加した
- B) DLL3 overexpression による NICD1-4 タンパク発現の変化。mRNA 発現と同様に DLL3 overexpression により NICD4 以外のタンパク発現が増加した。
- C) DLL3 overexpression による EMT マーカーの mRNA 発現の変化、* : $P < 0.05$ 。DLL3 overexpression により *SNAI1* 発現は有意に増加し、*CDH1* 発現は低下した。
- D) DLL3 overexpression による EMT マーカーのタンパク発現の変化。DLL3 overexpression により Snail の発現が増加したが、他の EMT マーカーのタンパク発現の変化は認められなかった。
- OE: DLL3 overexpression

11) DLL3 overexpression SCLC 細胞由来マウス皮下腫瘍の増殖やDLL3・Snail タンパク発現の検討

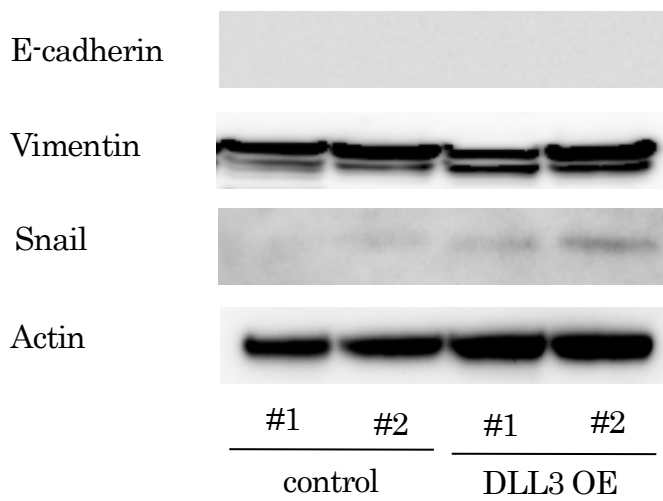
SBC-5 の DLL3 overexpression 細胞と control 細胞をヌードマウスの右鼠径部に皮下注射し、形成された皮下腫瘍の大きさを比較した。その結果として DLL3 overexpression 群において control 群と比較し腫瘍増殖能の有意な亢進を認めた (図 23A, 23B)。また経過中両群ともに明らかな体重減少は示さなかった。上記マウスにおいて皮下注射 20 日後に切除した腫瘍検体を用いてウェスタンブロット法にて DLL3 と EMT マーカーの発現を検討した。免疫組織染色・ウェスタンブロット法ともに、DLL3 overexpression 群腫瘍では DLL3 発現の上昇が維持されており、また Snail 発現は control 群腫瘍と比べ発現が増加していた (図 23C, 23D)。



C



D



- A) 腫瘍細胞皮下注射 20 日後。DLL3 overexpression 群では control 群と比べ形成された皮下腫瘍は大きかった。
- B) マウス皮下腫瘍の増殖能比較 (各群 5 匹ずつ)、* : $P < 0.05$ 。DLL3 overexpression 群において control 群と比較し腫瘍増殖能の有意な増大を認めた。
- C) マウス皮下腫瘍 (day 20) における DLL3 タンパク発現の比較。DLL3 overexpression 群腫瘍では DLL3 発現の上昇が維持された。
- D) マウス皮下腫瘍 (day 20) における EMT マーカータンパク発現の比較。DLL3 overexpression 群腫瘍では Snail 発現の増加を認めた。
- DLL3 OE: DLL3 overexpression

考察

1) SCLCにおけるDLL3・ASCL1発現と予後との関連

① DLL3とASCL1の発現、既報との比較について

SCLC手術検体におけるDLL3とASCL1発現とSCLCの予後を検討した報告は現時点ではなく、本研究が初めての報告である。今回SCLC切除症例においてDLL3とASCL1は高発現していた。更に、DLL3とASCL1発現には正の相関関係を認め、DLL3がASCL1の下流のターゲットであり(Augustyn et al., 2014; Henke et al., 2009)、mRNA発現において両者の相関を認めたという報告(Saunders et al., 2015)と矛盾しない結果であった。今回のSCLC切除検体でDLL3高発現例は44例(47%)で認めており、これはRova-Tの第1相試験での報告における67%(Rudin et al., 2017)、日本で施行されたDLL3の免疫組織染色の研究報告における32%(Tanaka et al., 2018)と同程度の結果であった。

② DLL3とASCL1発現と予後、リンパ節転移、ステージとの関連について

Rova-TにおいてDLL3発現が治療効果と関連があると報告されているため(Rudin et al., 2017)、本研究を含めたDLL3免疫染色の結果はDLL3をターゲットとした治療開発に役立つと考えられる。また、限局型と進展型のSCLCのDLL3発現を検討した既報(Tanaka et al., 2018)と同様に本研究でもDLL3発現は予後と関連が認められなかった。これらの報告からはDLL3自体はSCLC患者の予後に与える影響は少ないと考えられる。しかし、今回の研究では症例数は少ないものの、DLL3高発現群ではリンパ節転移や進行期の症例で多く認められ、DLL3が転移や腫瘍増殖に寄与する可能性は示唆された。

③ Pure SCLCとcombined SCLCのsubtypeの違いにおけるASCL1の発現について

SCLCは組織学的にpure SCLCと扁平上皮癌、腺癌など非小細胞癌の成分を含むcombined SCLCに分類され(Travis et al., 2004)、本研究ではcombined SCLCと比べpure SCLCで有意にASCL1陽性群が多かった。SCLCは進行期で発見されることが多く手術等によって十分な大きさの組織を得ることが難しいため、今回のpure SCLCとcombined SCLCにおけるASCL1の解析は我々が知る限りでは初めての報告である。SCLC細胞株においては細胞増殖速度や神経内分泌マーカーの発現によってclassic SCLCとvariant SCLCに分類され研究が進められてきた(Carney et al.; Gazdar et al., 1985)。近年、SCLC細胞株や遺伝子改変マウスモデルの網羅的な分子学的研究が進められ、SCLCはASCL1とNeuroD1の発現によって2つのグループに分類でき、ASCL1高発現群

は classic SCLC、NeuroD1 高発現群は variant SCLC と関連があるということが明らかとなってきた (Borromeo et al., 2016; Mollaoglu et al., 2017)。本研究では ASCL1 陽性群が pure SCLC で多く認めたことから、ASCL1 は classic 及び variant といった分子学的な分類のみならず SCLC において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。更に両因子の発現の違いは治療反応性にも影響を及ぼしており、ASCL1 高発現腫瘍においては Bcl2 阻害剤への感受性が高いという報告や、MYC 増幅した variant SCLC では Aurora kinase 阻害剤の効果が高いとの報告がある (Borromeo et al., 2016; Cardnell et al., 2017; Mollaoglu et al., 2017)。現在は SCLC の組織型の違いによって治療戦略が異なることはなく、組織学的な違いと SCLC 細胞株でのサブタイプとの関連は不明ではあるものの、pure SCLC は ASCL1 の発現に基づく治療を選択していくことが有効である可能性が示唆された。

2) SCLC における DLL3 の機能について

本研究では DLL3 が SCLC において増殖能・遊走能・浸潤能を促進することを示した。更に、Snail が DLL3 による遊走能・浸潤能促進に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

① DLL3 の腫瘍増殖における機能について

DLL3 は NOTCH1 や ASCL1 との関連が示唆されるものの、DLL3 自体の腫瘍形成能については報告が乏しく不明であった。今回、我々は DLL3 overexpression においては *in vitro*、*in vivo* でともに SCLC の腫瘍増殖を促進し、逆に DLL3 knockdown では僅かではあるが腫瘍増殖の抑制したことを示した。一方で肝癌において DLL3 のプロモーター部位のメチル化はアポトーシスを誘導すると報告されており (Maemura et al., 2013)、Notch は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とされていることから、DLL3 も癌種によって機能が異なる可能性が考えられる。

② DLL3 の遊走能、浸潤能に対する役割

今回の細胞実験の結果から DLL3 は SCLC において遊走能・浸潤能を促進することが示された。更に、今回の免疫染色を用いた DLL3 発現の検討で DLL3 高発現群はリンパ節転移や cStage の進行症例と相関しており、細胞実験の結果を支持した。DLL3 を特異的抗体とした antibody-drug conjugate である Rova-T を含めた DLL3 を標的とした治療開発が進んでおり、今回の結果からは特に転移や再発例に対して効果が期待され、今後の治療発展に役立つデータであると考えられる。

③ SCLCにおけるDLL3とNotchとの関係性について

既報を基にSCLCにおいてDLL3はNotch阻害を介して腫瘍増殖性に機能することを仮説として考えたが、今回使用した細胞株ではDLL3はNOTCH1のinhibitorとして機能しておらず、H82におけるNOTCH1のknockdownの結果ではDLL3のknockdownで認めた遊走能・浸潤能の低下は認めなかった。以上よりDLL3の機能においてNotchの関与は限定的であることが示唆された。肝細胞癌ではDLL3は腫瘍抑制的に機能するが、DLL3を強制発現させてもNotch発現に変化がなかったという報告(Maemura et al., 2013)や、DLL3の機能が抑制された遺伝子変異を持つマウスにおいてNotchの標的遺伝子であるHes5の活性が低下したという報告(Dunwoodie et al., 2002)があり、必ずしもDLL3はNotchを阻害しない可能性がある。

④ DLL3はSnailを介して遊走能、浸潤能を亢進することについて

本研究では、E-cadherinやVimentinの有意なタンパク発現変化は認められなかったが、DLL3はSnailを介して遊走能・浸潤能を亢進することが示唆された。SnailはE-cadherin、Occludin、Claudinといった上皮系因子を抑制することでEMT誘導に関与する転写因子の一つで、SCLCを含めた悪性腫瘍において発現の亢進が報告されており、転移や予後不良因子と関係がある(Merikallio et al., 2012; Wu and Zhou, 2010; Yang et al., 2007)。しかしながら、卵巣癌でEMTの誘導が不十分であるにも関わらずN-cadherinが遊走能を誘導したという報告(Gao et al., 2014)や、頭頸部扁平上皮癌においてSnail familyの一つであるSlugが他のEMT関連因子の変化がないものの浸潤能、転移能を誘導したという報告(Chung et al., 2018)があり、必ずしも他のEMT関連因子の変化を認めないもしくは確認できない可能性が示唆される。以上から、遊走能・浸潤能亢進の機序としてVimentinやE-cadherin以外の因子が寄与しDLL3-Snailシグナルによって誘導されている可能性が考えられた。しかし、SnailとDLL3が直接的もしくは間接的に関与しているかは本研究では解明しておらず、更なる研究が必要であると考えられる。

総括及び結論

本研究で得られた新知見として、

- SCLC 切除検体では免疫組織染色における DLL3、ASCL1 のタンパクは高発現しており、両因子の発現は正の相関を示した。DLL3 及び ASCL1 発現と予後に関連は認めなかったものの、DLL3 高発現群はリンパ節転移や病期が進行している症例が多く、DLL3 が転移や腫瘍増殖に寄与する可能性が示唆された。
- SCLC では DLL3 は *in vitro*、*in vivo* において腫瘍増殖能、遊走能、浸潤能を促進していた。遊走能、浸潤能促進の機序として Snail 発現が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、DLL3 が SCLC 手術検体でも高発現しており、神経内分泌誘導に関与する ASCL1 発現とも関連を認めたことから、現在、開発が進められている DLL3 を特異的抗体とした ADC である Rova-T を含め、SCLC において DLL3 は治療のターゲットとなり得ると考えられる。更に、DLL3 の SCLC 細胞実験においても DLL3 の遊走能・浸潤能促進性の機能が確認できたことから、DLL3 を標的とした治療は転移例や再発例において期待されると考える。

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院呼吸器内科学教室西村正治前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)に所属する御施設の先生方には小細胞肺癌臨床検体の提供を、北海道がんセンター呼吸器内科の横内浩先生にはその臨床病理学的情報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。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Augustyn, A., Borromeo, M., Wang, T., Fujimoto, J., Shao, C., Dospoy, P.D., Lee, V., Tan, C., Sullivan, J.P., Larsen, J.E., *et al.* (2014). ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 14788–14793.
- Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C., and Lendahl, U. (1999). The Notch 3 intracellular domain represses Notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* *126*, 3925–3935.
- Borges, M., Linnoila, R.I., van de Velde, H.J., Chen, H., Nelkin, B.D., Mabry, M., Baylin, S.B., and Ball, D.W. (1997). An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature* *386*, 852–855.
- Borromeo, M.D., Savage, T.K., Kollipara, R.K., He, M., Augustyn, A., Osborne, J.K., Girard, L., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Cobb, M.H., *et al.* (2016). ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep* *16*, 1259–1272.
- Bulman, M.P., Kusumi, K., Frayling, T.M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E.S., Krumlauf, R., Hattersley, A.T., Ellard, S., and Turnpenny, P.D. (2000). Mutations in the human Delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nature Genetics* *24*, 438–441.
- Cao, C., Mu Y. Hallahan, D., and Lu, B. (2004). XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer.
- Cardnell, R.J., Li, L., Sen, T., Bara, R., Tong, P., Fujimoto, J., Ireland, A.S., Guthrie, M.R., Bheddah, S., Banerjee, U., *et al.* (2017). Protein expression of TTF1 and cMYC define distinct molecular subgroups of small cell lung cancer with unique vulnerabilities to aurora kinase inhibition, DLL3 targeting, and other targeted therapies. *Oncotarget* *8*, 73419–73432.
- Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bepler, G., Guccion, J.G., Marangos, P.J., Moody, T.W., Zweig, M.H., and Minna, J.D. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Research* *45*, 2913–2923.
- Chapman, G., Sparrow, D.B., Kremmer, E., and Dunwoodie, S.L. (2011). Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Hum Mol Genet* *20*, 905–

916.

Chung, M.K., Jung, Y.H., Lee, J.K., Cho, S.Y., Murillo-Sauca, O., Uppaluri, R., Shin, J.H., and Sunwoo, J.B. (2018). CD271 Confers an Invasive and Metastatic Phenotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through the Upregulation of Slug. *Clinical Cancer Research* *24*, 674–683.

Dang, T.P., Gazdar, A.F., Virmani, A.K., Sepetavec, T., Hande, K.R., Minna, J.D., Roberts, J.R., and Carbone, D.P. (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *92*, 1355–1357.

Dunwoodie, S.L., Clements, M., Sparrow, D.B., Sa, X., Conlon, R.A., and Beddington, R.S.P. (2002). Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene *Dll3* are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* *129*, 1795–1806.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991). *Tan-1*, the Human Homolog of the *Drosophila* Notch Gene, Is Broken by Chromosomal Translocations in T-Lymphoblastic Neoplasms. *Cell* *66*, 649–661.

Fiuza, U.M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of endocrinology* *194*, 459–474.

Gao, J., Zhu, Y., Nilsson, M., and Sundfeldt, K. (2014). TGF- β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int* *14*, 72.

Gazdar, A.F., Bunn, P.A., and Minna, J.D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature* *17*.

Gazdar, A.F., Carney, D.N., Nau, M.M., and Minna, J.D. (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Research* *45*, 2924–2930.

Geffers, I., Serth, K., Chapman, G., Jaekel, R., Schuster-Gossler, K., Cordes, R., Sparrow, D.B., Kremmer, E., Dunwoodie, S.L., Klein, T., *et al.* (2007). Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands *DLL1* and *DLL3* in vivo. *J Cell Biol* *178*, 465–476.

George, J., Lim, J.S., Jang, S.J., Cun, Y., Ozretic, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernandez-Cuesta, L., Bosco, G., *et al.* (2015). Comprehensive

genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* *524*, 47–53.

Hassan, W.A., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., and Ito, T. (2014). Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* *86*, 304–310.

Henke, R.M., Meredith, D.M., Borromeo, M.D., Savage, T.K., and Johnson, J.E. (2009). Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dl13) expression in the neural tube. *Dev Biol* *328*, 529–540.

Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* *194*, 237–255.

Kalemkerian, G.A., W., Bogner, P., Borghaei, H., Chow, L., Downey, R., Gandhi, L., Ganti, A.P., Govindan, R., Grecula, J., Hayman, J., *et al.* (2013). Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* *11*, 78–98.

Kikuchi, H., Sakakibara-Konishi, J., Furuta, M., Yokouchi, H., Nishihara, H., Yamazaki, S., Uramoto, H., Tanaka, F., Harada, M., Akie, K., *et al.* (2017). Expression of Notch1 and Numb in small cell lung cancer. *Oncotarget* *8*, 10348–10358.

Konishi, J., Kawaguchi, K.S., Vo, H., Haruki, N., Gonzalez, A., Carbone, D.P., and Dang, T.P. (2007). Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer Res* *67*, 8051–8057.

Kosari, F., Ida, C.M., Aubry, M.C., Yang, L., Kovtun, I.V., Klein, J.L., Li, Y., Erdogan, S., Tomaszek, S.C., Murphy, S.J., *et al.* (2014). ASCL1 and RET expression defines a clinically relevant subgroup of lung adenocarcinoma characterized by neuroendocrine differentiation. *Oncogene* *33*, 3776–3783.

Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2007). Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. *Oncologist* *12*, 535–542.

Ladi, E., Nichols, J.T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L.T., Boulter, J., Sun, Y.E., Kintner, C., and Weinmaster, G. (2005). The divergent DSL ligand Dl13 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* *170*, 983–992.

Lim, J.S., Ibaseta, A., Fischer, M.M., Cancilla, B., O’Young, G., Cristea, S., Luca, V.C., Yang, D., Jahchan, N.S., Hamard, C., *et al.* (2017). Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature* *545*, 360–364.

Lobry, C., Oh, P., and Aifantis, I. (2011). Oncogenic and tumor suppressor

functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *The Journal of experimental medicine* *208*, 1931–1935.

Maemura, K., Yoshikawa, H., Yokoyama, K., Ueno, T., Kurose, H., Uchiyama, K., and Otsuki, Y. (2013). Delta-like 3 is silenced by methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology* *42*, 817–822.

Merikallio, H., Turpeenniemi-Hujanen, T., Paakko, P., Makitaro, R., Riitta, K., Salo, S., Salo, T., Harju, T., and Soini, Y. (2012). Snail promotes an invasive phenotype in lung carcinoma. *Respir Res* *13*, 104.

Mollaoglu, G., Guthrie, M.R., Bohm, S., Bragelmann, J., Can, I., Ballieu, P.M., Marx, A., George, J., Heinen, C., Chalishazar, M.D., *et al.* (2017). MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer cell* *31*, 270–285.

Noda, W., Nishiwaki, Y., Kawahara, M., Negoro, S., Sugiura, T., Yokoyama, A., Fukuoka, M., Mori, K., Watanabe, K., Tamura, T., *et al.* (2002). Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* *346*, 85–91.

Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Horio, Y., and Takahashi, T. (2005). ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. *Cancer Research* *65*, 10680–10685.

Previs, R.A., Coleman, R.L., Harris, A.L., and Sood, A.K. (2015). Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *21*, 955–961.

Puglisi, M., Dolly, S., Faria, A., Myerson, J.S., Popat, S., and O'Brien, M.E. (2010). Treatment options for small cell lung cancer – do we have more choice? *Br J Cancer* *102*, 629–638.

Radtke, F., Schweisguth, F., and Pear, W. (2005). The Notch 'gospel' – Workshop on Notch signalling in development and cancer. *Embo Reports* *6*, 1120–1125.

Rudin, C.M., Pietanza, M.C., Bauer, T.M., Ready, N., Morgensztern, D., Glisson, B.S., Byers, L.A., Johnson, M.L., Burris, H.A., Robert, F., *et al.* (2017). Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase 1 study. *The Lancet Oncology* *18*, 42–51.

Saunders, L.R., Bankovich, A.J., Anderson, W.C., Aujay, M.A., Bheddah, S., Black, K., Desai, R., Escarpe, P.A., Hampl, J., Laysang, A., *et al.* (2015). A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med* *7*, 302ra136.

Shida, T., Furuya, M., Kishimoto, T., Nikaido, T., Tanizawa, T., Koda, K., Oda, K., Takano, S., Kimura, F., Shimizu, H., *et al.* (2008). The expression of NeuroD and mASH1 in the gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* *21*, 1363–1370.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* *67*, 7-30.

Sriuranpong, V., Borges, M.W., Ravi, R.K., Arnold, D.R., Nelkin, B.D., Baylin, S.B., and Ball, D.W. (2001). Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* *61*, 3200–3205.

Takada, M., Fukuoka, M., Kawahara, M., Sugiura, T., Yokoyama, A., Yokota, S., Niskiwaki, Y., Watanabe, K., Noda, K., Tamura, T., *et al.* (2002). Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: Results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104. *Journal of Clinical Oncology* *20*, 3054–3060.

Tanaka, K., Isse, K., Fujihira, T., Takenoyama, M., Saunders, L., Bheddah, S., Nakanishi, Y., and Okamoto, I. (2018). Prevalence of Delta-like protein 3 expression in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer* *115*, 116–120.

Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H.K., and Harris, C.C. (2004). *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart Third Edition*. IARC Press.

Turrisi, A.T., 3rd, Kim, K., Blum, R., Sause, W.T., Livingston, R.B., Komaki, R., Wagner, H., Aisner, S., and Johnson, D.H. (1999). Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide. *N Engl J Med* *340*, 265–271.

Wael, H., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., and Ito, T. (2014). Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung Cancer* *85*, 131–140.

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., *et al.* (2011). Loss-

of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 17761–17766.

Wang, Z., Li, Y., Kong, D., and Sarkar, F.H. (2010). The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Curr Drug Targets* *11*, 745–751.

Westhoff, B., Colaluca, I.N., D’Ario, G., Donzelli, M., Tosoni, D., Volorio, S., Pelosi, G., Spaggiari, L., Mazzarol, G., Viale, G., *et al.* (2009). Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 22293–22298.

Wu, Y.D., and Zhou, B.H.P. (2010). Snail More than EMT. *Cell Adhesion & Migration* *4*, 199–203.

Yang, M.H., Chang, S.Y., Chiou, S.H., Liu, C.J., Chi, C.W., Chen, P.M., Teng, S.C., and Wu, K.J. (2007). Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. *Oncogene* *26*, 1459–1467.

Yokouchi, H., Ishida, T., Yamazaki, S., Kikuchi, H., Oizumi, S., Uramoto, H., Tanaka, F., Harada, M., Akie, K., Sugaya, F., *et al.* (2015). 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.

Yuan, X., Wu, H., Han, N., Xu, H., Chu, Q., Yu, S., Chen, Y., and Wu, K. (2014). Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J Hematol Oncol* *7*, 87.