HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるosimertinib耐性とNotch経路の関わりに関する研究
Author(s)	髙橋, 宏典
Description	配架番号：2734
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15203号
Issue Date	2022-09-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15203
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87696
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAHASHI_Hirofumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における

osimertinib 耐性と Notch 経路の関わりに関する研究

(Studies on Notch pathway regulates osimertinib drug-tolerant

persistence in *EGFR*-mutated non-small cell lung cancer)

2022 年 9 月

北　海　道　大　学

髙橋　宏典

学　位　論　文

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における

osimertinib 耐性と Notch 経路の関わりに関する研究

(Studies on Notch pathway regulates osimertinib drug-tolerant

persistence in EGFR-mutated non-small cell lung cancer)

2022 年 9 月

北　海　道　大　学

髙橋　宏典

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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　7頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　21頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　27頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　49頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・　53頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　54頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　55頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　56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.

1. Hirofumi Takahashi, Jun Sakakibara-Konishi, Megumi Furuta, Tetsuaki Shoji, Kosuke Tsuji, Daisuke Morinaga, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Takuro Noguchi, Kanako C Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Naofumi Shinagawa, Satoshi Konno
   Notch pathway regulates osimertinib drug-tolerant persistence in *EGFR*-mutated non-small cell lung cancer.
   Cancer science

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Hirofumi Takahashi, Jun Sakakibara-Konishi, Shotaro Ito, Kosuke Tsuji, Eiki Kikuchi, Junko Kikuchi, Naofumi Shinagawa, Satoshi Konno
   Notch pathway regulates proliferation of osimertinib drug-tolerant cells in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer.
   American Association for Cancer Research, April 10-15, 2021, Virtual Meeting

本研究の一部は以下の学会で発表予定である.

1. 髙橋　宏典、榊原　純、古田　恵、庄司　哲明、辻　康介、森永　大亮、菊地　英毅、菊地　順子、野口　卓郎、畑中　佳奈子、畑中　豊、品川　尚文、今野　哲
   *EGFR*変異陽性非小細胞肺癌における osimertinib 耐性と Notch 経路の関わり
   第 63 回日本肺癌学会学術集会、2022 年 12 月 1 日、福岡

要旨

【背景と目的】Osimertinib は第三世代の上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor：EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬（tyrosine kinase inhibitors：TKIs）であり、前世代の EGFR-TKIs に起因する *EGFR*-T790M 変異の有無にかかわらず *EGFR* 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌（non-small cell lung carcinoma：NSCLC）患者に対して著しい抗腫瘍効果を示す。しかしこれらの効果は一過性であり、大多数の患者はいずれ耐性を獲得する。Osimertinib 治療後の耐性機序は多岐にわたり、さらに約 50%は耐性機序が不明である。このため前世代 EGFR-TKIs とは異なり、osimertinib 獲得耐性後の治療は困難なことが多く、耐性獲得を克服または遅らせることが重要である。近年、抗癌剤治療初期に細胞集団の大部分が急速に死滅する薬剤濃度条件下でも生存能力を維持する可逆性薬剤耐性持続性（Drug-tolerant persister：DTP）細胞が検出された。この DTP 細胞は、標的薬剤に対する感受性が著しく低下した細胞の小さな亜集団として定義され、EGFR-TKIs に対する早期の非遺伝的獲得抵抗性として注目されている。Notch は腫瘍形成に重要な役割を果たす膜貫通型受容体であり、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。我々は以前に、NSCLC において Notch 経路と EGFR 経路の間に有意なクロストークが存在することを報告している。また Notch 経路の活性化が、前世代 EGFR-TKIs 耐性に関与していることが報告されているが、osimertinib 治療における Notch の役割は十分に理解されていない。本研究では、osimertinib DTP 細胞の発生、増殖における Notch 経路の関与を評価した。

【対象と方法】*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株は PC-9（exon19 deletion）、H1975（L858R point mutation/T790M）、HCC827（exon19 deletion）を使用した。Osimertinib、Notch 経路阻害剤γ-secretase inhibitor（GSI）を実験に使用した。細胞株は既報に基づき IC_{50} の 100 倍の濃度である osimertinib 3 μmol/L に 9 日間曝露したものを osimertinib DTP 細胞と定義した。MTT proliferation assay を用いて薬剤抗腫瘍効果を確認した。Clonogenic assay にてコロニー形成速度を確認した。RNA sequencing を用いて親株と DTP 細胞における遺伝子プロファイリングを行った。EGFR、Notch 関連タンパク、mRNA の発現をウエスタンブロット法、quantitative reverse transcription polymerase chain reaction（qRT-PCR）法にて検討した。5 週齢の雌のヌードマウス（nu+/nu+）に PC-9 または H1975 細胞を皮下注射し、osimertinib（5 mg/kg/日）を週 5 日経口投与、GSI（3.3 mg/kg/日）を週 4 日腹腔内注射し、腫瘍体積を測定した。2015 年 1 月から 2020 年 12 月までに北海道大学病院呼吸器内科にて EGFR-TKIs 治療を受け、かつ EGFR-TKIs 治療前後で分析可能な病理組織を有する 17 症例について、Notch1 および HES1 の免疫組織染色を行った。Notch1、HES1 の発現と生存期

間との関連について統計学的に解析した。

【結果】Osimertinib 投与による DTP 細胞は親細胞と比較して有意に osimertinib の IC_{50} が上昇しており、osimertinib に対する耐性を認めた。Osimertinib 曝露中止後は時間経過とともに DTP 細胞は osimertinib に対する感受性を回復した。また PC-9 DTP 細胞は親株と比較して細胞周期は G1 期にとどまっており DTP 細胞の特色として矛盾しないものであった。RNA sequencing の結果、PC-9 DTP 細胞は親株と比較して *NOTCH1* 応答性遺伝子の一部がアップレギュレーションしていた。Osimertinib DTP 細胞は、時間経過とともに再増殖を認めたが GSI の併用により DTP 細胞の再増殖が抑制された。また clonogenic assay でも同様に、GSI の併用により osiemrtinib よりも強くコロニー形成を阻害した。DTP 細胞における EGFR 経路の発現を検討したところリン酸化 EGFR の発現は抑制されていたが、リン酸化 ERK の発現は低下していなかった。一方で GSI を併用した DTP 細胞ではリン酸化 ERK の発現が低下した。次に DTP 細胞における Notch 経路の発現を検討したところ Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain : NICD) 1 と Notch 標的遺伝子である HES1 と HEY1 の発現が上昇していたが、GSI の併用により低下を認めた。*NOTCH1*、*HES1*、*HEY1* の mRNA 発現結果においても同様の結果であった。また Notch 経路とともに EGFR 経路への関与することが報告されている dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) は、GSI 併用にて顕著に発現が上昇した。

PC-9 と H1975 細胞を皮下接種したマウスモデルにおいて osimertinib は投与初期では腫瘍縮小を認めたが、30 日後には腫瘍再増殖を認めた。Osimertinib と GSI の併用では、30 日後でも腫瘍の増殖を有意に抑制していた。治療 9 日目のマウスの腫瘍を切除し EGFR 経路と Notch 経路の発現を検討したところ、osimertinib、併用治療ともにリン酸化 EGFR 発現が低下していた。Osimertinib 単剤ではリン酸化 ERK 発現は低下していなかったが、GSI 併用にてリン酸化 ERK 発現が低下した。また DUSP1 は osimertinib 単剤投与と比べて GSI 併用でより増強された。Osimertinib 投与により NICD1、HES1、HEY1 の発現が上昇したが、GSI 併用によりそれらの発現が有意に抑制された。これらのデータは *in vitro* の所見と一致していた。

次に 17 症例の *EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者における EGFR-TKIs 治療前後の腫瘍組織を用いて Notch1 と HES1 の発現を免疫組織学的に検討した。それぞれ 9 症例で EGFR-TKIs 治療後に Notch1 と HES1 発現が上昇していた。Notch1 発現上昇群の全生存期間中央値は25.5カ月であったのに対し、非上昇群では29.5カ月であった(p=0.38)。HES1 発現上昇群の全生存期間中央値は24.3カ月であったのに対し、非上昇群では29.5カ月であった (p=0.91)。

【考察】本研究において、osimertinib DTP 細胞では Notch 経路が活性化されており、osimertinib と GSI の併用によって *in vitro* および *in vivo* での腫瘍増殖が抑制されることを明らかにした。

Erlotinib 投与により Notch3 がβ-catenin を制御し DTP 細胞を誘導することが報告されているが、本研究では osimertinib DTP 細胞で Notch1 の発現上昇は認めたが Notch3 の発現変化はなかった。肺癌における Notch 経路の働きはしばしば状況依存的であり、肺癌の腫瘍形成において Notch1 と Notch2 が逆の役割を担っていることや、NSCLC 細胞では Notch3 ではなく Notch1 が放射線で活性化されることも報告されている。今回の結果と既報の違いについては、DTP 細胞における個々の Notch 受容体の役割は完全には解明されておらず、使用した EGFR-TKIs や活性化された Notch 受容体の違いがこれら状況依存性と関連している可能性が考えられた。

Osimertinib DTP 細胞ではリン酸化 EGFR 発現が低下しているにもかかわらずリン酸化 ERK 発現は低下しておらず、GSI の併用がリン酸化 ERK の発現を低下させ腫瘍増殖を抑制している可能性が考えられた。さらに osimertinib と GSI の併用において DUSP1 が亢進しており、DUSP1 を介してリン酸化 ERK の発現が一部抑制されている可能性が示唆された。しかし他の経路が osimertinib と GSI の併用に関連しているかどうか、さらなる検討を重ねることが重要である。

ヒト腫瘍組織において EGFR-TKIs 治療後に Notch1 (p=0.04) と HES1 (p=0.03) が高発現していた。症例数は少ないが EGFR-TKIs の前後で特に Notch1 の発現を比較検討した報告は今までになく、今回が初めての検討となる。ヒト組織における結果は上述した *in vitro*, *in vivo* のデータをさらに深めるものであると考えられる。

【結論】Osimertinib DTP 細胞の出現に Notch 経路が極めて重要な役割を果たしており、osimertinib と GSI の併用は、*EGFR* 遺伝変異陽性 NSCLC 患者における治療戦略の一つであることが示唆された。

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。

ALDH	aldehyde dehydrogenase
ASCL-1	achaete-scute complex-like-1
CAF	cancer-associated fibroblasts
CoA	coactivator
CoR	corepressor
DTP	drug-tolerant persister
DUSP1	dual specificity phosphatase 1
EBB	endobronchial biopsy
EBUS-GS	endobronchial ultrasonography with a guide sheath
EBUS-TBNA	endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed and paraffin-embedded
FGFR	fibroblast growth factor receptors
GEO	Gene Expression Omnibus
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSI	γ-secretase inhibitor
HES	hairy and enhancer of split
HEY	hairy/enhancer of split related with YRPW
HGF	hepatocyte growth factor
IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NICD	notch intracellular domain
NIH	National Institutes of Health
NSCLC	non-small cell lung carcinoma
PBS	phosphate buffered saline
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RNA-seq	RNA sequencing
RTK	receptor tyrosine kinase

SCLC	small cell lung carcinoma
TBB	transbronchial biopsy
TBST	tris buffered saline with tween 20
TCA	tricarboxylic acid cycle
TKIs	tyrosine kinase inhibitors
TME	tumor microenvironment
TV	tumor volume

緒言

1) *EGFR*遺伝子変異陽性肺癌について

肺癌は世界中で毎年約100万人が死亡しており、全世界の悪性新生物に関連した死亡率の第一位を占めている（Bray et al., 2018; Howlader et al., 2020)。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が約80%を占める(Rothschild, 2015; Siegel et al., 2017)。さらにNSCLCは腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌に分けられ、それぞれ肺癌全体の約40%、30%、10%を占めている。上皮成長因子受容体（*epidermal growth factor receptor*：*EGFR*）遺伝子変異は、欧米諸国では肺腺癌患者の約20%、本邦を含むアジア諸国では約50%の患者にみられ、*EGFR*遺伝子の約90%を占める。最も一般的な変異はexon19の欠失とexon21のL858R変異である（Kosaka et al., 2004)。チロシンキナーゼ阻害薬（tyrosine kinase inhibitors：TKIs)の開発により、これら患者群の生命予後は劇的に改善された(Mitsudomi et al., 2010; Sequist et al., 2013; Zhou et al., 2011)。

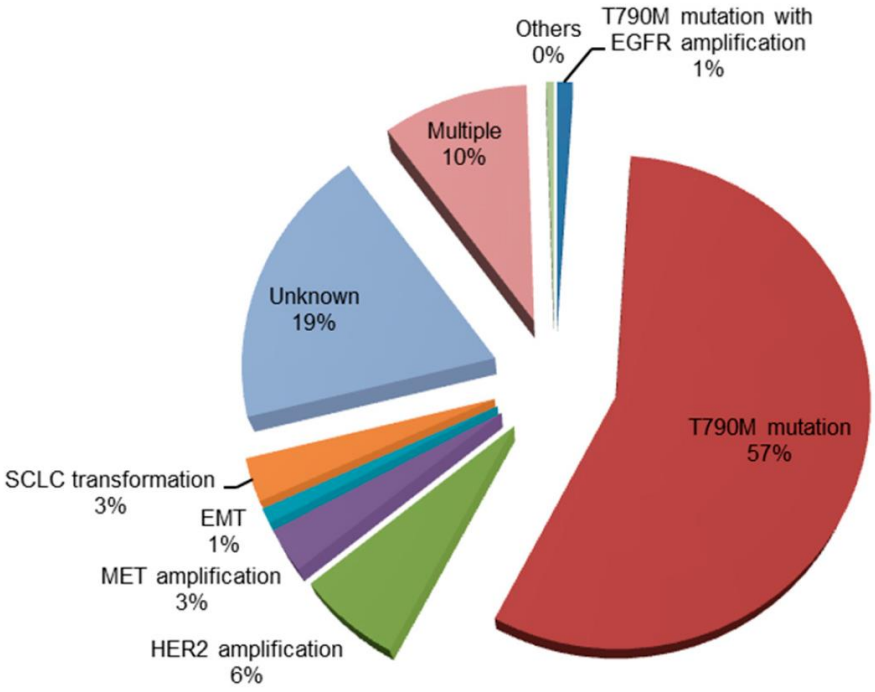
2) EGFR-TKIsについて

EGFR-TKIsは標的治療の最も成功した例の一つである。前世代のEGFR-TKIs（gefitinib、erlotinib、afatinib）は*EGFR*遺伝子変異を有するNSCLC患者の多くで優れた治療効果を示すが、最終的には治療抵抗性となり無増悪生存期間は約12ヶ月程度である(Kobayashi et al., 2015)。

前世代のEGFR-TKIsの後天的耐性獲得症例においてEGFR依存的な耐性機序としては約60%で*EGFR*-T790M変異を認める（Nagano et al., 2018; Sequist et al., 2011; Wu et al., 2016)。他にもEGFR非依存性の耐性機序として*MET*遺伝子増幅や(Engelman et al., 2007; Kong-Beltran et al., 2006）、HGF過剰発現（Nagano et al., 2018; Yano er al., 2008）が認められる。**(図1)**。近年、*EGFR*-T790M変異を標的とするosimertinibなどの第三世代EGFR-TKIsが、前世代EGFR-TKIs治療後にこの変異を有する患者に対して非常に良好な治療効果を示した（Mok et al., 2017; Page et al., 2022)。さらに未治療*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLC患者を対象としたFLAURA試験において、osimertinib投与群はgefitinibまたはerlotinib投与群と比較して有意に無増悪生存期間を延長することが示された（Ramalingam et al., 2020; Soria et al., 2018)。 現在ではFLAURA試験の結果に基づき、未治療*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLC患者に対する標準治療の第一選択はosimertinibになっている（Ramalingam et al., 2020; Soria et al., 2018)。しかしながら他のEGFR-TKIsで観察されたのと同様に、osimertinib投与患者においても後天的獲得耐性が出現することが認められた。osimertinibでの一次治療、二次治療を受けた患者の耐性機構としては*MET*増幅や

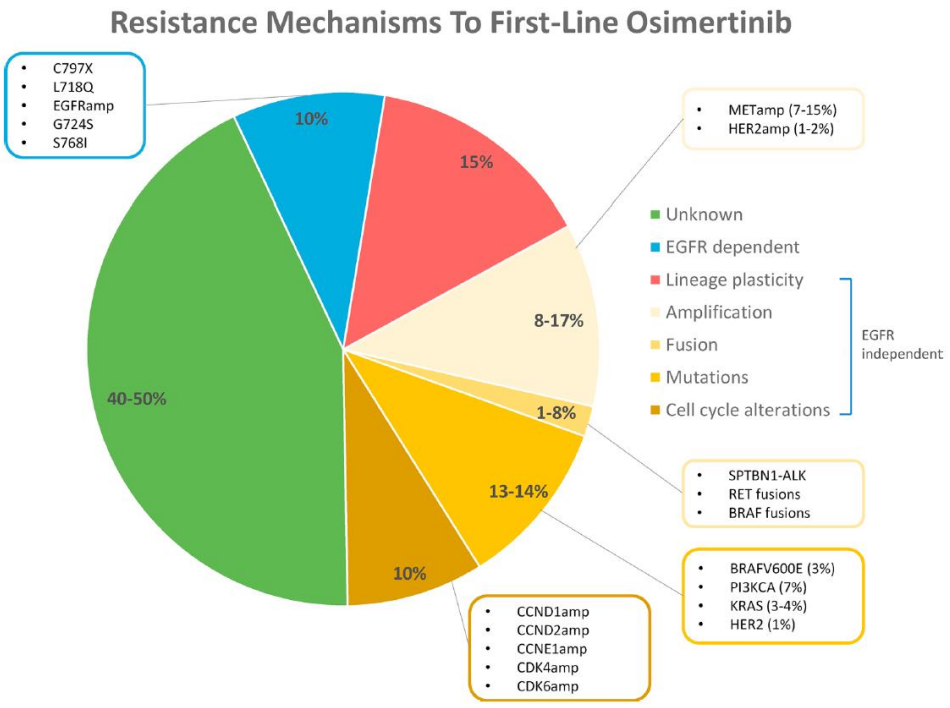
EGFR-C797S 変異が認められるが(Oxnard et al., 2018; Papadimitrakopoulou et al., 2020; Thress et al. 2015)、osimertinib による獲得耐性の約 50%は機序不明である (Schmid et al., 2020) **(図 2)**。このため前世代 EGFR-TKIs とは異なり、osimertinib 耐性機序は非常に多様であり耐性獲得後の治療はしばしば困難となることもある。

図 1



第一世代 EGFR-TKIs (gefitinib、erlotinib) による一次治療の獲得耐性メカニズム。
参考文献：Nagano, T. *et al. Cells* (2018) より引用

図 2



Osimertinib での一次治療患者における耐性獲得メカニズム。
参考文献：Schmid, S. *et al. Lung Cancer* (2020)より引用

3) DTP 細胞について

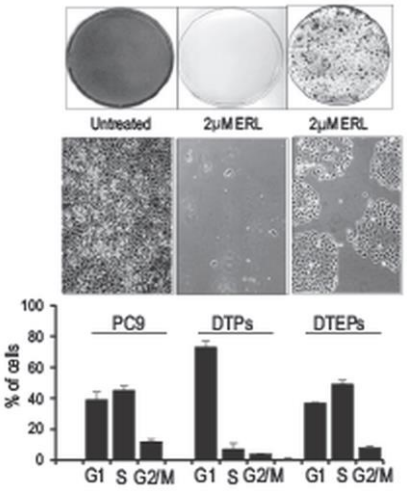
近年、薬物耐性の非遺伝子的機序が注目されている。実際に臨床での癌治療において、EGFR-TKIs が奏効し、その後に病勢進行を認めた患者の一部で、drug holiday 後の EGFR-TKIs 再治療に良好な治療効果を示すことが認められており (Kurata et al., 2004; Yano et al., 2005)、このような患者では抗癌剤に対する可逆的な薬剤耐性状態が関与していることが示唆されるが、その機序はまだ確立されていない。

近年、薬剤感受性ヒト癌細胞株において、細胞集団の大部分が急速に死滅するような薬剤濃度条件下でも生存能力を維持する、薬剤感受性が 100 倍以上低下した可逆性の薬剤耐性持続性 (Drug-tolerant persister：DTP) 細胞が検出された (Sharma et al., 2010)。DTP 細胞の概念は微生物学に由来している。細菌亜集団において、遺伝的耐性機構を持たずに抗生物質からを生き延びるパーシスター細菌が存在する。このパーシスター細菌は非増殖性または低増殖性で、代謝活性が低下しており、抗生物質の殺傷効果を回避することができる (Fisher et al., 2017)。この細菌の性質を元に、DTP 細胞は抗癌剤に耐えるための遺伝子変化を持たない低増殖性持続性状態の表現型として考えられた。

Sharma らは *EGFR* 遺伝子変異陽性ヒト肺腺癌細胞株 PC-9 を用いて、IC_{50} の 100 倍以

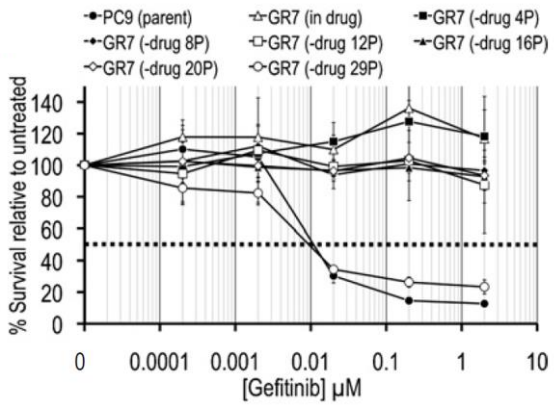
上という高濃度の erlotinib 投与下では数日以内にほとんどの細胞が死滅するが、9日後でも極一部の細胞が生存していること確認し、これを DTP 細胞と定義した。DTP 細胞では G1 期でほとんどの細胞が静止していること、薬剤投与下でも長期培養に伴い増殖を再開すること、薬剤非投与下では時間経過とともに薬剤感受性を回復すること、後天的な EGFR-TKIs 耐性遺伝子である *EGFR*-T790M や *MET* 遺伝子増幅は認められないことなどを明らかにした（Sharma et al., 2010）**(図 3、図 4)**。

図 3



PC-9 細胞を未処理（左）、2 μmol/L erlotinib（ERL）で 9 日間（中央）、または 2 μmol/L ERL で 33 日間（右）処理した。各細胞のギムザ染色（上段）、顕微鏡画像（中段）、細胞周期相のパーセンテージ（下段）を示す。
参考文献：Sharma, S.V. *et al. Cell* (2010)より引用

図 4



PC-9 細胞および gefitinib 由来の PC-9 DTP 細胞（GR7）を、gefitinib で 72 時間処理した後の MTT 法による細胞増殖抑制評価。数字は gefitinib 休薬後の継代数（P）を示している。
参考文献：Sharma, S.V. *et al. Cell* (2010)より引用

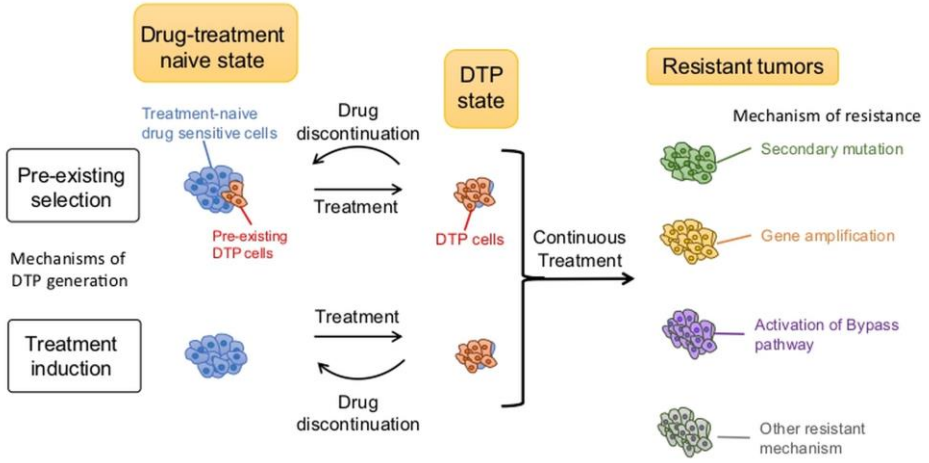
4）DTP 細胞の生物学的特徴

DTP 細胞の発生については現状では2つの仮説が考えられている。一つ目の仮説は、DTP 細胞の特徴を持つ癌細胞亜集団が未治療の腫瘍に最初から存在し、抗癌剤治療から生き延びるという仮説である。二つ目の仮説は投与された薬物治療によって腫瘍細胞の表現型が DTP 細胞へと移行するという仮説である（Echeverria et al., 2019; Shaffer et al., 2017）（**図 5**）。

DTP 細胞に共通する表現型の特徴として、細胞周期と増殖活性の遅延、および可逆的な薬物耐性状態が挙げられる。そのため DTP 細胞は薬剤中止後しばらくすると、増殖再開および最初の薬剤に対する感受性再獲得を認める。しかし継続的な薬物治療の結果、最終的には薬剤に対する可逆性を失い、二次変異や遺伝子増幅を伴う不可逆的な耐性細胞へと移行する。

またもう一つの生物学的特徴として、aldehyde dehydrogenase（ALDH）高発現や上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition：EMT）マーカーの発現上昇などが DTP 細胞内で共存していることが挙げられる。これらはエピジェネティック、転写制御機構、腫瘍微小環境（Tumor Microenvironment：TME)、代謝リモデリングによって制御されている。

図 5



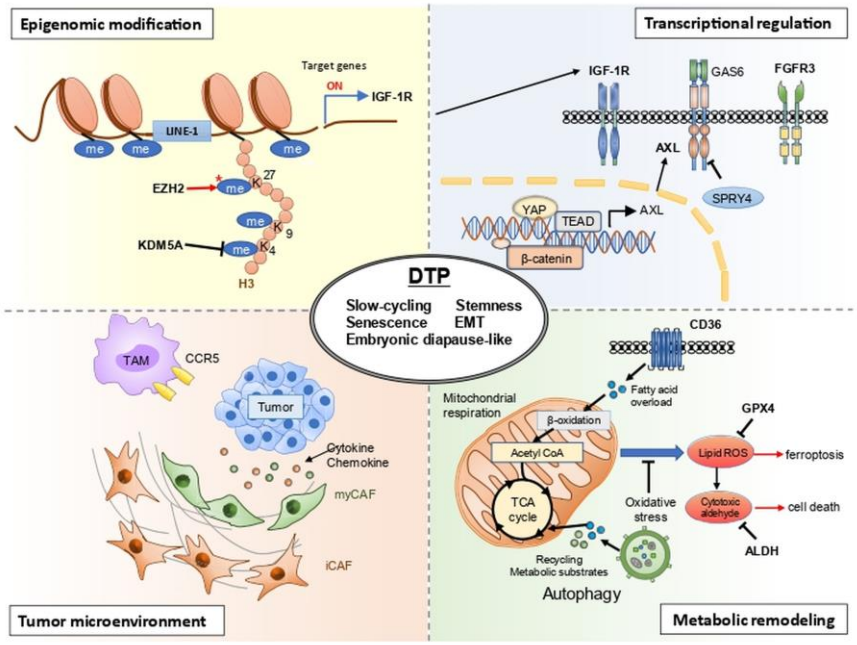
DTP 細胞の発生と薬剤抵抗性獲得における 2 つの仮説。
既存細胞選択説（上)、治療誘導機構説（下)。
参考文献：Mikubo, M. *et al. J. Thorac. Oncol.* (2021)より引用

5）DTP 細胞の制御メカニズム

これまでの研究により DTP 細胞 の一般的な特徴および維持の主要な制御メカニズムとして a)エピジェネティック、b)転写制御機構、c)TME、d)代謝リモデリングが報

告されている（Mikubo er al., 2021）(図 6)。

図 6



DTP 細胞の生物学的特徴と制御機構。エピジェネティック（左上)、転写制御機構（右上)、腫瘍微小環境（左下)、代謝リモデリング（右下)。
参考文献：Mikubo, M. *et al. J. Thorac. Oncol.* (2021)より引用

a）エピジェネティック：DTP 細胞において、KDM5A などのエピジェネティック制御因子の発現が上昇し、ヒストンのメチル化が抑制されて静止期になることが報告されている。（Sharma et al., 2010)。KDM5 阻害剤は、肺癌や乳癌などの複数の癌細胞株において、標準化学療法または標的薬による DTP 細胞を抑制する。また KDM5 を介して IGF-1R 活性化が起こることでも DTP 細胞は制御されている（Sharma et al., 2010)。これらの実験結果から KDM5 が DTP 細胞の発生に重要であることが示唆されている（Vinogradova et al., 2016; Mitsui et al., 2019)。

b) 転写制御機構：治療前後の腫瘍をトランスクリプトーム解析で比較することで、キナーゼ受容体遺伝子（IGF-1R、AXL など）や転写活性化経路（Wnt/β-catenin、YAP/TEAD など）が DTP 細胞では活性化していることが判明している（Arasada et al., 2018; Kurppa et al.,2020; Taniguchi et al., 2019)。

c）TME：DTP 細胞における TME の役割を報告した研究は少ないが、線維芽細胞やマクロファージが DTP 細胞に影響を与えることが報告されている（Sosa et al., 2014; Ferguson et al., 2021)。EGFR-TKIs 治療時に癌関連線維芽細胞（cancer-associated fibroblasts：CAF）から分泌される肝細胞成長因子（hepatocyte growth factor：HGF）

が MET 受容体と相互作用し、mitogen-activated protein kinase (MAPK) および PI3K/AKT 経路のバイパス活性によって薬剤耐性を誘導することが報告されている (Wang et al., 2009)。

d) 代謝リモデリング：DTP 細胞では薬物曝露環境に適応するために、エネルギー代謝を変化させる必要があると考えられている。通常の癌細胞で見られる嫌気的解糖とは異なり、DTP 細胞ではミトコンドリア呼吸鎖によるエネルギー産生に依存し、脂肪酸などを燃料として tricarboxylic acid cycle 回路 (TCA 回路) によりエネルギーが産生されている (Shen et al, 2020)。そのため DTP 細胞ではミトコンドリア呼吸による酸化ストレスに対する抗酸化能力を有している (Raha et al., 2014)。

6) EGFR-TKIs における DTP 細胞について

これまでの EGFR-TKIs 投与における DTP 細胞の報告として、Arasada らは erlotinib 投与下において Notch3 依存的にβ-catenin が制御され、erlotinib 治療中に DTP 細胞を誘導すると報告している (Arasada et al., 2018)。以前から EGFR-TKIs 耐性における β-catenin の関与は報告されていた (Blakely et al., 2017) がその機序は明らかではなかった。上記研究において EGFR-TKIs 投与によって Notch3 が活性化されること、Notch1 の活性化が Wnt/β-catenin 経路を阻害すること (Kwon et al., 2009) などに着目し、Notch3 とβ-catenin が DTP 細胞の誘導に関与し、EGFR-TKIs と β-catenin 阻害剤併用が DTP 細胞の発生を抑制することを明らかにした。Sharma らは DTP 細胞の発生には IGF-1R 活性化およびヒストン脱メチル化酵素 KDM5A によるクロマチン変化が重要であることを報告している (Sharma et al., 2010)。元々 IGF-1R 活性化は EGFR-TKIs の薬物耐性および予後不良に関連しており (Buck et al., 2008)、EGFR-TKIs が KDM5A を介して IGF-1R を活性化させることで DTP 細胞の発生を抑制することを明らかにした。Taniguchi らは osimertinib により活性化された AXL が DTP 細胞の発生に関与していることを報告している (Taniguchi et al., 2019)。Osimertinib が AXL のリン酸化を抑制する SPRY4 の負のフィードバックを阻害することで AXL を活性化させ、その結果 AXL が活性化した細胞では EGFR-TKIs 耐性となる。AXL 阻害剤を投与した細胞では EGFR-TKIs に再感作するようになり、AXL 阻害剤と EGFR-TKIs の併用は DTP 細胞の発生を制御することを明らかにした。

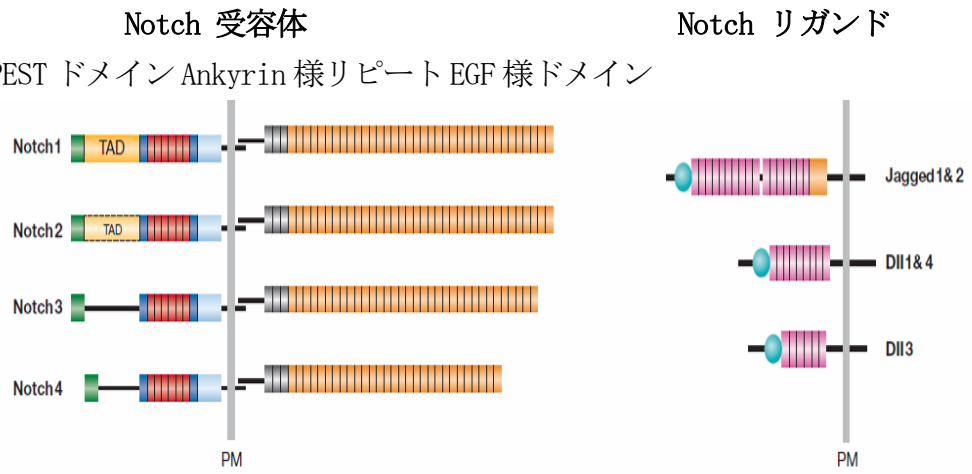
これら DTP 細胞発生における誘導因子の違いは使用している EGFR-TKIs の違いだけではなく、腫瘍不均一性 (heterogeneity) が影響を与えている可能性がある。実際に多くの研究はバルク細胞や検体を用いて行われている。Kashima らは single-cell を用いた RNA sequencing を行うことでより正確な DTP 細胞誘導因子を同定しようと試みた。結果、新たな DTP 細胞誘導因子として CD74 を同定し、実際に *in vitro*、*in vivo* ともに CD74 の過剰発現が DTP 細胞の発生に関与することを明らかにした (Kashima et

al., 2021)。

7) Notch 経路について

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では Notch（切れ込み）が認められたことがその名前の由来である。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）が存在している(Fiúza and Arias, 2007)。Notch 受容体は 1 回膜貫通蛋白質であり、細胞膜を介して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ている(Radtke et al., 2005)（図 7）。

図 7



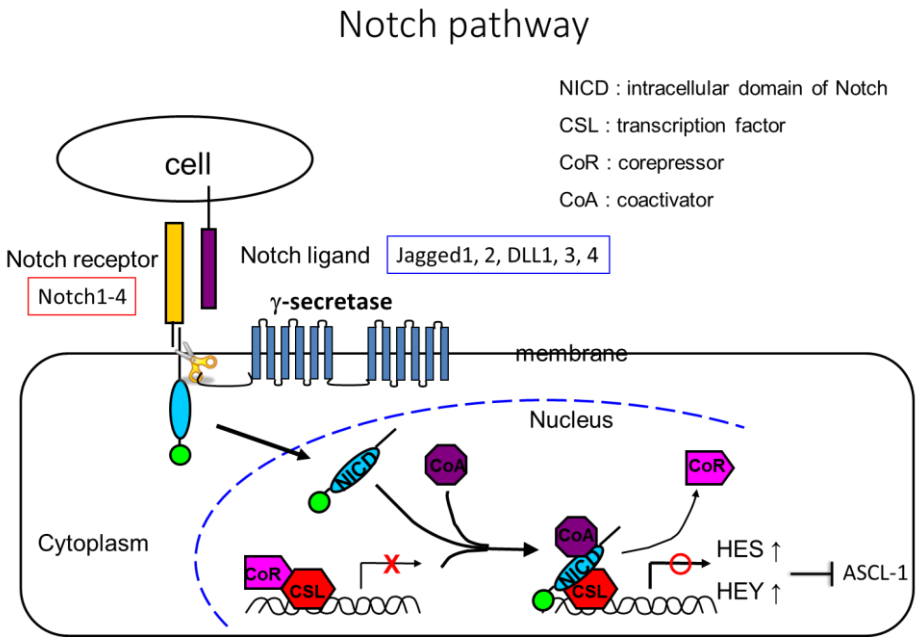
参考文献：Radtke, F. *et al. EMBO reports* (2005)より引用。

Notch 経路の活性化機序は、最初に Notch 受容体の細胞外ドメインとリガンドが結合し、次に γ-secretase と呼ばれるプロテアーゼによって 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が細胞膜より核内へと移行する。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

写活性を行う（図 8）。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する。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 8



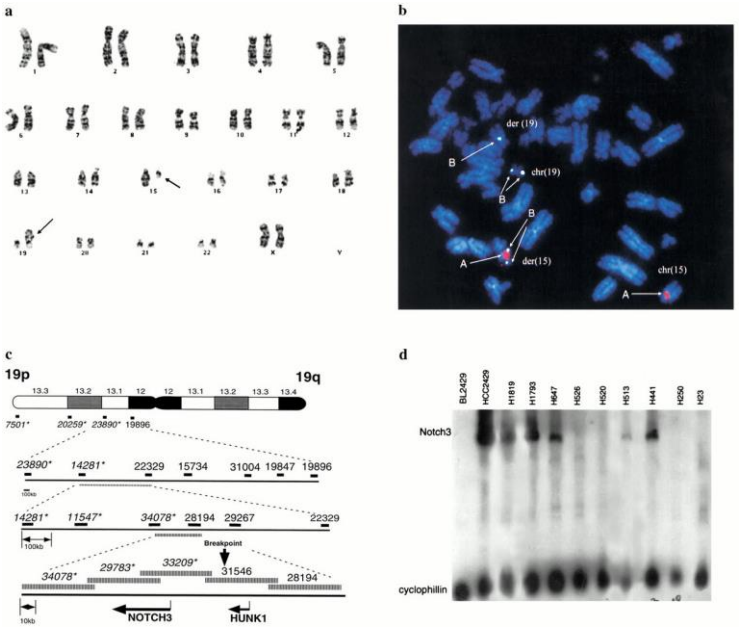
8）癌と Notch との関連について

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た(Ellisen et al., 1991)。その後も多くの癌種において、Notch 経路の異常活性と癌化には密接な関連があり、癌種によって activator もしくは suppressor として機能することが報告されている(Lobry et al., 2011; Previs et al., 2015)。

肺癌と Notch との関連については、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 9）。 また我々

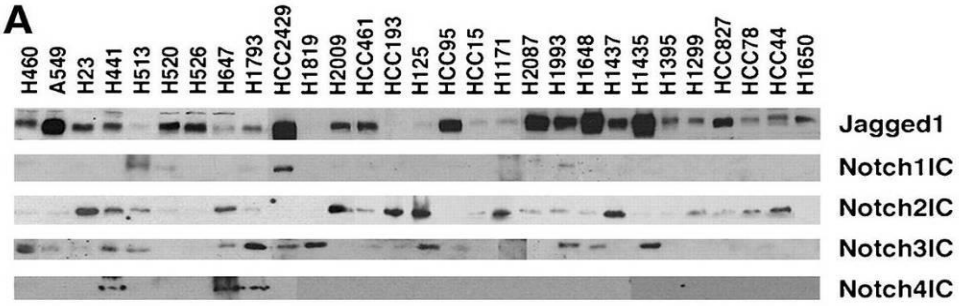
は、NOTCH3 が NSCLC 細胞株の約 40%に過剰発現していることを報告している(Konishi et al., 2007) (図 10)。他に Ye らは NSCLC 患者検体を用いて、隣接する正常組織と比較して腫瘍組織では Notch3 が約 50%の患者で高発現していることを報告している (Ye et al., 2013)。さらに NSCLC において NOTCH1 の active mutation が 10%前後に認められることが報告されている (Westhoff et al., 2009) 。一方で、肺扁平上皮癌においては inactive mutation が報告されており、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 9



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。

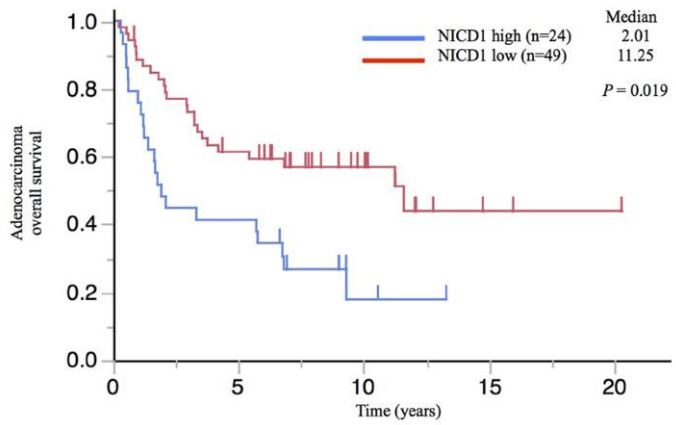
図 10



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、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。

NSCLC における Notch 経路と予後の関係については様々な報告がある。我々は以前に肺腺癌の外科切除体を用いて Notch1 の発現を免疫組織学的に検討し、Notch1 高発現が予後不良と関連することを報告した（Kikuchi et al., 2018）**（図 11）**。他にも Notch1 の過剰発現が NSCLC の予後不良に関係しているという報告（Andersen et al., 2011; Donnem et al., 2010; Westhoff et al., 2009）がある一方で、Notch1 が腫瘍抑制因子として働くという報告がある（Li et al; 2010）。Notch 経路と予後の関係を明らかにするため、Yuan らは 19 件の研究報告を元に、Notch1 および Notch3 発現と NSCLC 患者の予後に関するメタアナリシスを行った（Yuan et al., 2015）。結果、Notch1 および Notch3 が過剰発現している NSCLC 患者ではリンパ節転移が起こりやすく、全体的な予後不良と関連していることを明らかにした。このメタアナリシスによって Notch 経路が NSCLC 患者の予後を予測するための潜在的なバイオマーカーである可能性が示唆されたが、NSCLC における Notch 経路の働きはまだ十分には明らかになっておらず、Notch 経路と癌の関係を明らかにするには、Notch 経路だけではなく関連するシグナル伝達経路との関係も明らかにする必要がある（Yuan et al., 2015; Zou et al., 2018）。

図 11

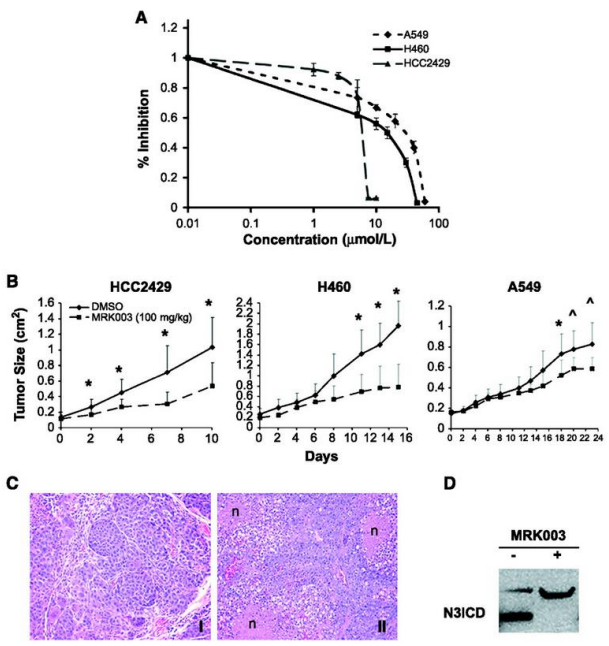


肺腺癌患者における Notch1 発現と予後との関係。免疫染色にて Notch1 高発現群（n=29）と低発現群（n=49）に分け、Notch1 発現と全生存期間の関係を評価した。参考文献：Kikuchi, H. *et al. Oncotarget* (2018)より引用。

9) γ-secreatase inhibitor (GSI) について

GSI はγ-secreatase を阻害することで Notch 経路の活性化を阻止すると考えられている。GSI は元々アルツハイマー病の治療薬として開発された。Amyloid β precursor 蛋白の切断を抑制しamyloid β peptides の脳への蓄積を抑制することで、アルツハイマーによる諸症状の改善が期待されている（Micchelli et al., 2003)。また悪性腫瘍に対してはT-ALL や sarcoma において腫瘍の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されていた（Curry et al., 2005; Micchelli et al., 2003)。肺癌においてドミナント・ネガティブやGSI を用いて Notch3 を抑制すると *in vitro* またマウスモデルにおいて細胞増殖が低下することが報告されている（Haruki et al., 2005; Konishi et al., 2007）**(図 12)**。

図 12



GSI (MRK003) の抗腫瘍効果。
A) *in vitro* における GSI の細胞増殖の抑制
B) ゼノグラフトモデルにおける GSI の腫瘍縮小効果。
C) Control (左) に比べ GSI 投与 (右) マウスの腫瘍組織内には多数の necrosis (n) 部分を認める。
D) GSI は腫瘍組織の NICD3 発現を抑制する。
参考文献：Konishi, J. *et al. Cancer Res.* (2007)より引用。

肺癌細胞の増殖抑制のメカニズムとして、GSI が Notch3 を抑制することで MAPK 経路と Bcl-2 ファミリーを制御し、肺癌細胞のアポトーシスを誘導することを報告した (Konishi et al., 2007)。更に Bcl-2 ファミリー蛋白のサブファミリーである BH3-only 蛋白、Bim が Notch3 依存的なアポトーシスには必須であり、MAPK 経路を介して Bim が誘導されることも示してきた (Konishi et al., 2010)。GSI と細胞周期との関係については、骨肉腫細胞株では G1 arrest、乳癌細胞株では G2/M arrest へ誘導されるとの報告がある (Rasul et al., 2009; Tanaka et al., 2009)。GSI は固形癌を対象とした臨床試験がなされており、Phase Ⅱ試験まで行われている (Katoh and Katoh, 2020; Takebe et al., 2014)。結果としては十分な効果は示せなかったが、いくつかの試験では安定 (stable disease) 状態を長く維持することが確認された。*in vitro* や *in vivo* の実験では GSI と標的薬剤を組み合わせることで腫瘍細胞の増殖抑制効果を認める報告が複数あり、併用療法にて治療効果を認める可能性は十分にある。薬剤有害事象としては下痢や嘔気、嘔吐などの消化管毒性を示すことが多い (Katoh

and Katoh, 2020; Takebe et al., 2014)。副作用に関しては用量依存性に軽減するため、併用療法による相乗効果を認めれば、GSI 用量を減らすことで副作用がより少なくなる可能性がある。

10) Notch 経路と EGFR 経路について

Haruki らはヒトの切除肺検体において Notch3 と EGFR の発現に正の相関があり、Notch3 を阻害することで EGFR-TKIs に対する感受性を高めることを明らかにした (Haruki et al., 2005)。我々は以前に、Notch 経路が EGFR 経路とクロストークして肺癌の増殖を促すことを明らかにしている。NSCLC において Bcl-2 ファミリーである Bim を介して Notch3 と EGFR 経路がクロストークしており、erlotinib と GSI を併用により治療相乗効果を認めることを明らかにした (Konishi et al., 2010)。また Xie らは gefitinib 投与により Notch1 の発現の増強と Notch1 を介して EMT が誘導されることで gefitinib 耐性が誘導されること、さらに GSI を併用することで腫瘍増殖が抑制されたことを明らかにした(Xie et al., 2012; Xie et al., 2013)。他にも Bousquet らは、gefitinib に耐性を示す *EGFR*-T790M 陽性 NSCLC 細胞において Notch1 と Notch3 が HES1 を介して腫瘍増殖に関係していること、*EGFR*-C797S 変異を持つ NSCLC においては osimertinib と GSI の併用が HES1 発現を抑制することで腫瘍増殖を抑制することを明らかにした (Bousquet et al., 2020)。

11) 本研究の目的

Osimertinib 獲得耐性機序は多岐にわたるため獲得耐性ごとに適応した治療を行うことはしばしば臨床的に困難なことも多く、確立していない。Osimertinib の獲得耐性を抑制、または遅延させることは患者の予後延長に貢献すると考えられたため、今回我々は DTP 細胞に着目した。DTP 細胞は癌細胞が薬物療法を生き抜き、その後の病勢進行へと移行するための初期段階と考えられる。そのため DTP 細胞のメカニズムを理解し、標的とすることは、癌治療において臨床的に重要な意味を持つ。また Notch 経路は肺癌増殖において重傷な役割を果たしており、EGFR-TKIs 耐性においても貢献していることが判明している。

上記のように前世代 EGFR-TKIs における、IGF-1 受容体や AXL、WNT/β-catenin を介しての DTP 細胞の分子機構が報告されている。しかし第三世代 EGFR-TKIs の osimertinib による DTP 細胞の出現するメカニズムの報告や Notch 経路との関連についての報告はまだ少ない。本研究は、*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC における osimertinib DTP 細胞の特性や Notch 経路の関与、Notch 経路が治療標的となりうるかについて調べることを目的とした。

実験方法

細胞株と薬剤

細胞株は*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLC細胞株PC-9 (exon19 deletion)、H1975 (L858R point mutation/T790M)、HCC827 (exon19 deletion) を用いた。PC-9 は European Collection of Authenticated Cell Cultures から購入し、H1975 と HCC827 は American Type Culture Collection 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 (fetal bovine serum : FBS) を含めた Roswell Park Memorial Institute medium でそれぞれ培養を行なった。

Osimertinib は Cayman chemical (Ann Arbor, Michigan, USA)、GSI-XX は Calbiochem (San Diego, CA, USA) から購入した。

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 と混合後 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 NICD1 抗体 (1:500 dilution; #3608, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)・抗 NICD3 抗体 (1:1000 dilution; 55114-1-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA)・抗 HES1 抗体 (1:1000 dilution; #11988, Cell Signaling Technology)・抗 HEY1 抗体 (1:500 dilution; ab22614, Abcam plc, Cambridge, UK)・抗 phospho-EGFR 抗体 (1:1000; #3777; Cell Signaling Technology)・抗 EGFR 抗体 (1:1000 dilution; #4267, Cell Signaling Technology)・抗 phospho-p44/42 MAPK 抗体 (1:1000 dilution; #4370, Cell Signaling Technology)・抗 p44/42 MAPK 抗体 (1:1000 dilution; #4695, Cell Signaling Technology)・抗 phospho-Akt 抗体 (1:1000 dilution; #4060, Cell Signaling Technology)・抗 Akt 抗体 (1:1000 dilution; #4691, Cell Signaling Technology)・抗 DUSP1/MKP1 抗体 (1:1000 dilution; #35217, Cell Signaling Technology)・抗 Actin 抗体 (1:1500 dilution;

A2066, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）をそれぞれ使用した。バンド強度は National Institutes of Health (NIH) ImageJ Ver1.52 software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いた定量的デンシトメトリー分析で示し、タンパク発現量のコントロールおよび相対定量のための標準化には同じブロットのアクチンを用いた。

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Fast Gene RNA Premium Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) 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 RL を添加して十分にホモジナイズ後に専用の RNA filter column に注入し、10000 g×60 秒遠心を施行した。遠心後のフロースルー液と同量の 70%エタノールを十分に混合後、専用の RNA binding column に注入し 10000 g×60 秒遠心を施行した。Buffer RW1 でカラムのメンブレンを洗浄してタンパク質を除去し、DNase Ⅰ反応溶液をメンブレンに添加し室温で 10 分間インキュベートした。再度 Buffer RW1 でメンブレンを洗浄し、分解 DNA と酵素を除去後、Buffer RW2 でメンブレンを洗浄し塩類を除去した。メンブレンを乾燥させるためにフルスピードで 60 秒遠心後、Buffer RE を添加し RNA を抽出した。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 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。*NOTCH1*、*HES1*、*HEY1*、*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 *NOTCH1*、*HES1*、*HEY1*、*GAPDH* reagents (Applied Biosystems) と *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。

RNA sequencing

PC-9 および PC-9 osimertinib DTP 細胞から、Fast Gene RNA Premium Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を使用し、RNA を抽出した。サンプルの濃度は 50 ng/μl 以上で、純度は OD260/280 1.7 以上、OD260/230 1.8 以上で、劣化や汚染がないことを確認した。バッファーには RNase-free H_2O を使用した。抽出された RNA はフィルジェン株式会社 (Ehime, Japan) に委託し、メーカーでの品質チェックを通過後、提携先の Novogene (Beijing, China) で RNA sequencing (RNA-seq) が行われた。RNA 配列は、Illumina NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて決定された。発現の違いはボルケーノプロットを用いて可視化した。

MTT proliferation assay

薬剤の抗腫瘍効果を評価するために MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法を用いて細胞増殖抑制効果を測定した。96well プレートにそれぞれ PC-9、PC-9 DTP、H1975、H1975 DTP、HCC827、HCC827 DTP 細胞 (いずれも 3000 cells/well) を各々一晩培養後、濃度勾配をつけて osimertinib、GSI を添加し、72 時間培養した。MTT 溶液 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を各 well に 10 µl 注入し、その 4 時間後に stop solution 90 µl 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。また各薬剤の 50%阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration : IC_{50}) を GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて算出した。osimertinib と GSI の相乗効果は、CompuSyn 1.0 software (ComboSyn, Paramus, NJ) を用いて、Chou と Talalay の中央原理法から適応した combination index (CI) によって定量化した (Chou, 2010)。

Cell proliferation assay

6well プレートで PC-9、H1975、HCC827 細胞 (いずれも 1.0×10^5 cells/well) を各々一晩培養後、vehicle、osimertinib 3µmol/L、GSI 1µmol/L、osimertinib と GSI の両方を添加し、72 時間毎に薬剤を交換しながら 28 日間培養した。生細胞数を測定するため、トリパンブルー色素排除法を行った。0.4%トリパンブルーと細胞懸濁液を混合し、トリパンブルーと細胞の混合液をヘマサイトメーターに滴下した。細胞膜によりトリパンブルー色素が細胞質から排除されている細胞を生細胞とし、生細胞数をカウントした。生細胞数は 72 時間ごとに確認した。

Clonogenic assay

6well プレートで PC-9、H1975、HCC827 細胞 (いずれも 1.0×10^5 cells/well) を各々一晩培養後、vehicle、osimertinib 3µmol/L、GSI 1µmol/L、osimertinib と GSI の両方を添加し、72 時間毎に薬剤を交換しながら 28 日間培養した。細胞はクリスタルバイオレッドに 0.5%濃度で混合したメタノール溶液を用いて固定・染色した。染色後、コロニーの数は目算で算定し、その平均値を採用した。

DTP 細胞

DTP 細胞は標的薬剤薬に曝露後、数日から数週間で生成される薬剤感受性が 100 倍以上低下した可逆性耐性細胞である。通常であれば死滅するような高濃度の薬剤条件

下でも生存能力を維持する（Sharma et al., 2010）。したがって本研究における DTP 細胞の osimertinib 濃度は、親細胞の増殖抑制と EGFR シグナル抑制が十分に可能な濃度として、IC_{50}の 100 倍以上の濃度を設定した（Sharma et al., 2010; Taniguchi et al., 2019）。PC-9、H1975、HCC827 細胞に osimertinib 3μmol/L を添加し、72 時間毎に薬剤を交換しながら 9 日間培養したものを osimertinib DTP 細胞とした。

Cell cycle and assay

Osimertinib DTP 細胞における細胞周期の変化を、フローサイトメトリー法を用いて評価した。PC-9（1.0 × 10^5 cells/dish）を 10 cm ディッシュで一晩培養後、osimertinib 3μmol/L を添加した。72 時間毎に薬剤は交換し、9 日間培養した。培養後にトリプシンで処理し、phosphate-buffered saline（PBS）で 2 回洗浄した後に－20℃下で 70%エタノールを用いて 4 時間固定処理を行なった。遠心し、上清を破棄した後に残ったペレットを PBS で 2 回、Stain Buffer（FBS）（Becton, Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA）で 1 回洗浄し、Alexa Fluor® 647 Rat anti-Histone H3（pS28）20 μl でリン酸化ヒストン H3 を標識した。20 分後に PI/RNase Staining Buffer（Becton, Dickson and Company）500 μl で再懸濁し、DNA を標識した。測定は BD FACSVerse flow cytometer（Becton, Dickson and Company）を使用した。核相が 2 倍体である細胞を G1 期もしくは S 期と定義した。また核相が 4 倍体かつリン酸化ヒストン H3 が陰性である細胞を G2 期、核相が 4 倍体かつリン酸化ヒストン H3 が陽性である細胞を M 期と定義した。

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。PC-9 または H1975（いずれも 3.0 × 10^6 cells）を 200 μl 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。デジタルキャリパーで腫瘍を毎日計測し、腫瘍体積（Tumor Volume：TV）は以下の計算式を用いた。TV＝（Length）×（Width）×（Height）/2 （Taniguchi et al., 2019）。Osimertinib は週 5 日経口投与（5 mg/kg/日）し、GSI は週 4 日腹腔内注射（3.3 mg/kg/日）した（Bousquet et al., 2020）。体重を 3 日毎に測定し、体重の 20%以上の減少、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薬剤投与開始 9 日目に摘出し、Notch 経路、EGFR シグナル発現を評価するためウエスタンブロット法と qRT-PCR 法を試行した。

患者情報及び臨床検体

2015年1月から2020年12月までに北海道大学呼吸器内科にてEGFR-TKIs治療を受け、かつ*EGFR*-T790M検索目的に病理診断を受けた77症例を用いてNotch1およびHES1の免疫組織染色について検討した。北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け、データ取得時に生存していた患者からは書面によるインフォームドコンセントを得た。適格基準は、組織診もしくは細胞診で肺癌と確定し、*EGFR*遺伝子変異陽性の切除不能進行期または術後再発患者とした。最終的に 17 症例が組み入れられた。Formalin-fixed and paraffin-embedded （FFPE）組織ブロックを5 μm厚にスライスし、コートスライドグラスに固着して切片を作成した。

臨床検体の免疫組織染色

Notch1 発現と HES1 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NICD1抗体（1:400 dilution; #3608, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA）・抗HES1抗体（1:400 dilution; #11988, Cell Signaling Technology）を用いた。Over night後、Phosphate 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PBST 5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, Tokyo, Japan）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行った。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。NICD1はγ-secretaseで処理されると細胞膜から遊離し、核に移動して標的遺伝子HES1の転写を活性化する。したがって活性化Notch1発現の評価では、膜染色のみの細胞は陰性とし、細胞質および/または核染色の細胞を陽性とした。HES1 発現の評価では、膜および/または細胞質染色の細胞は陰性とし、核染色のみの細胞を陽性とした（Kikuchi et al., 2017; Kikuchi et al., 2018）。1検体あたり5視野、1視野あたり100個の腫瘍細胞で染色細胞の割合を判定した。免疫染色の評価は2人の研究者が独立して行い、不一致がある場合にはコンセンサスに基づき最終結果を決定した。

*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLC患者におけるEGFR-TKIs治療前後のNotch1およびHES1のタンパク質発現をそれぞれpaired t検定で比較した。患者は、Notch1とHES1のそれぞれについて、治療後に蛋白発現が増加を示したグループと、治療後に蛋白発現が減少または変化を示さなかったグループに分けられた。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、生存分布の差はlog-rank検定を行うことで評価した。有意水準は$P < 0.05$とした。統計解析は、JMPソフトウェア（JMP® Pro 16.1.0; SAS Institute

Inc, Cary, NC, USA) およびGraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行った。

統計解析

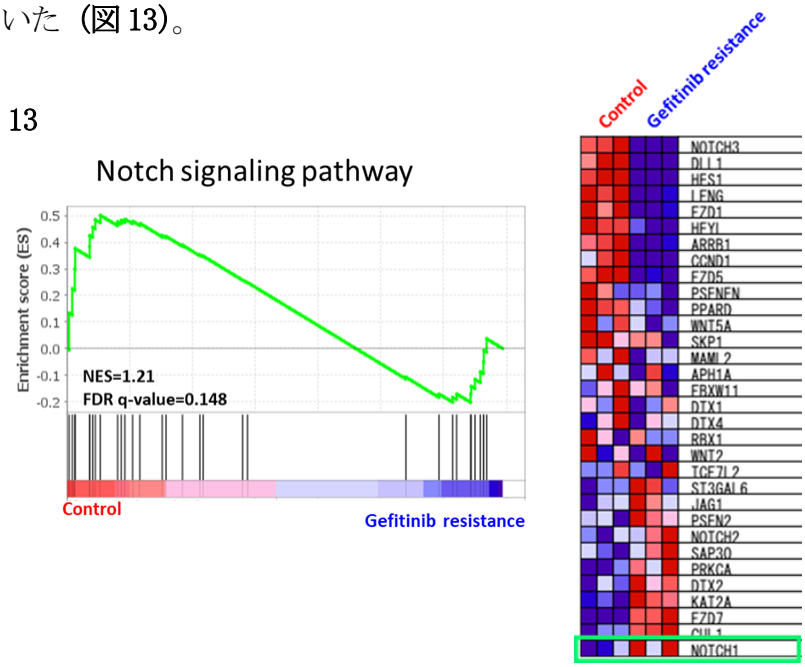
RNA seqを除く全ての*in vitro*の検討は独立した状態で3回以上行った。データの解析は全てStudent *t*検定および多重比較検定を施行した。*in vivo*のマウス実験は各薬剤群をn=6とし、2回の独立した状態で行った。蛋白、RNAの検討は、異なるマウス検体を用いて3回以上行った。データの解析は全てStudent *t*検定および多重比較検定を施行した。臨床検体での蛋白発現差異をpaired *t*検定で評価した。生存曲線はKaplan-Meier法を用いて評価し、群間比較はlog-rank検定で施行した。統計学的有意差はP value < 0.05とした。ソフトウェアはJMP Pro v16.1.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)、GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用した。

実験結果

1) Gefitinib 耐性細胞では Notch 経路がアップレギュレーションされている

Notch 経路は前世代 EGFR-TKIs 耐性 NSCLC でアップレギュレーションされることが報告されている（Arasada et al., 2014; Xie et al., 2013)。実際に National Center for Biotechnology Information （NCBI） の Gene Expression Omnibus （GEO, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）のデータベースを用いて EGFR-TKIs と Notch 経路に関する遺伝子発現の検索を行った。番号 GSE123066 は gefitinib 耐性の *EGFR* 遺伝子変異陽性 HCC4006 細胞株を用いたトランスクリプトーム解析であり、耐性機序の分子標的を見つけることを目的としている。NCBI GEO に寄託されているこのデータベースを用いて、遺伝子発現を Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ソフトウェアを用いて評価した。*EGFR* 遺伝子変異陽性 HCC4006 細胞と、その gefitinib 耐性細胞を比較すると、gefitinib 耐性細胞では Notch 経路の一部がアップレギュレーションされていた（図 13)。

図 13



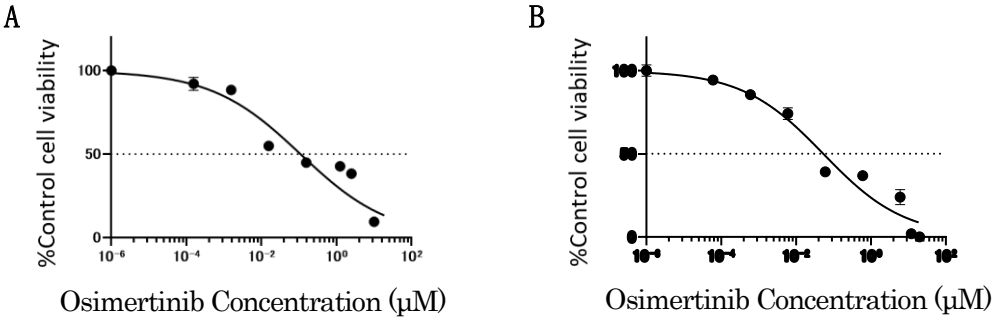
NCBI GEO Series 番号 GSE123066 の GSEA 解析。*EGFR* 遺伝子変異陽性 HCC4006 細胞と HCC4006 Gefitinib 耐性細胞の比較。

2) Osimertinib DTP 細胞の特色

EGFR-TKIs 耐性機序への Notch 経路の関与が考えられたため、osimertinib DTP 細胞における Notch 経路の活性化、耐性に対する関与の研究を進めることにした。DTP 細胞作成にあたり、*EGFR* 遺伝子変異陽性細胞に対して十分に増殖抑制が可能な

osimertinib 濃度を設定する必要があるため、最初に *EGFR* 遺伝子変異陽性 PC-9 と H1975 細胞における osimertinib の IC_{50} を MTT 法を用いて測定した（**図 14A, 14B**）。Osimertinib の PC-9 細胞における IC_{50} は 0.02±0.00 μmol/L、H1975 細胞における IC_{50} は 0.05±0.01 μmol/L であった。

図 14

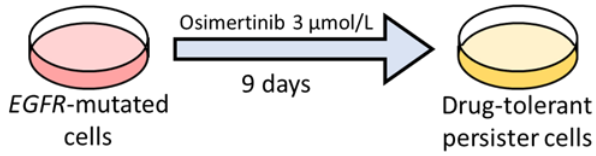


	IC_{50} (μmol/L) ± SD
Cell line	Osimeritinib
PC9	0.02 ± 0.00
H1975	0.05 ± 0.01

A）PC-9 細胞に対する osimertinib の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。
B）H1975 細胞に対する osimertinib の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。
グラフは平均と標準偏差値を示す。

DTP 細胞は標的に曝露後、数日から数週間で生成される薬剤感受性が 100 倍以上低下した可逆性耐性細胞であるとされている。これまでの報告（Sharma et al., 2010; Taniguchi et al., 2019）と、osimertinib の IC_{50} の結果に基づき、DTP 細胞を作成するための osimertinib 濃度を 3 μmol/L に設定した。Osimertinib 添加後、72 時間毎に薬剤を交換しながら 9 日間培養したものを DTP 細胞と定義した（**図 15**）。

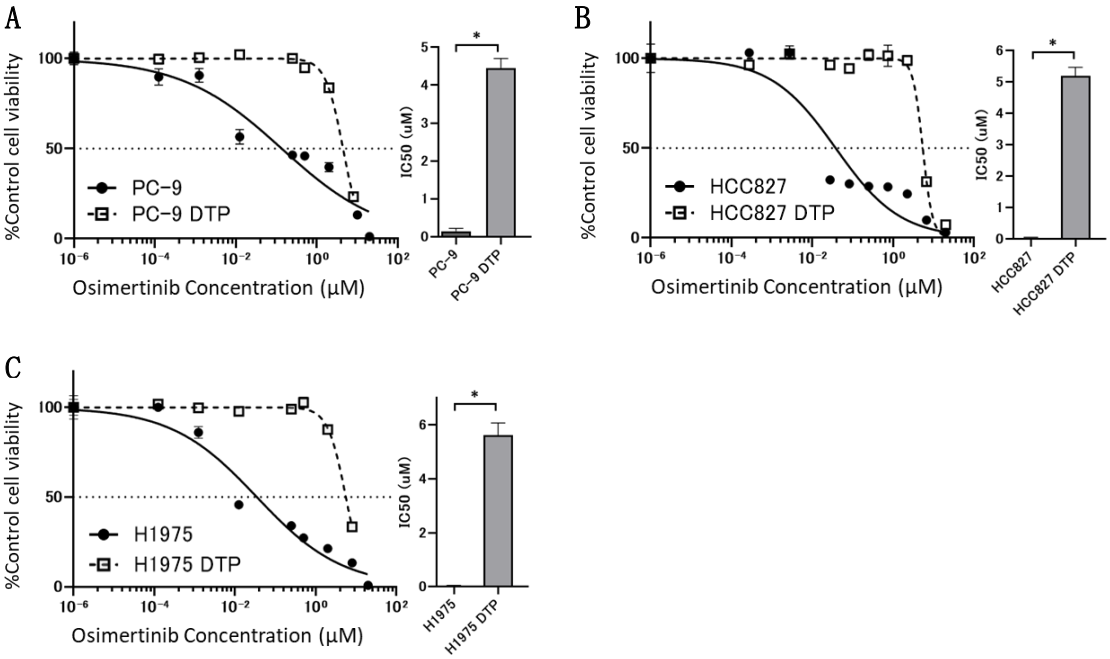
図 15



PC-9、H1975、HCC827 細胞に osimertinib 3 μmol/L を加え、72 時間毎に薬剤を交換しながら 9 日間培養したものを DTP 細胞と定義した。

Osimertinib DTP 細胞の性質を調べるため、PC-9、H1975、HCC827 細胞を osimertinib 3 μmol/L に 9 日間暴露し、それぞれの DTP 細胞を作成した。MTT 法にて osimertinib による細胞増殖抑制効果を確認すると、これまでの報告（Sharma et al., 2010）と同様、PC-9、H1975、HCC827 の DTP 細胞は親細胞株と比較してそれぞれ osimertinib に対する IC_{50} が高く、DTP 細胞が osimertinib に対して抵抗性を示すことが示された（図 16A, 16B, 16C）。

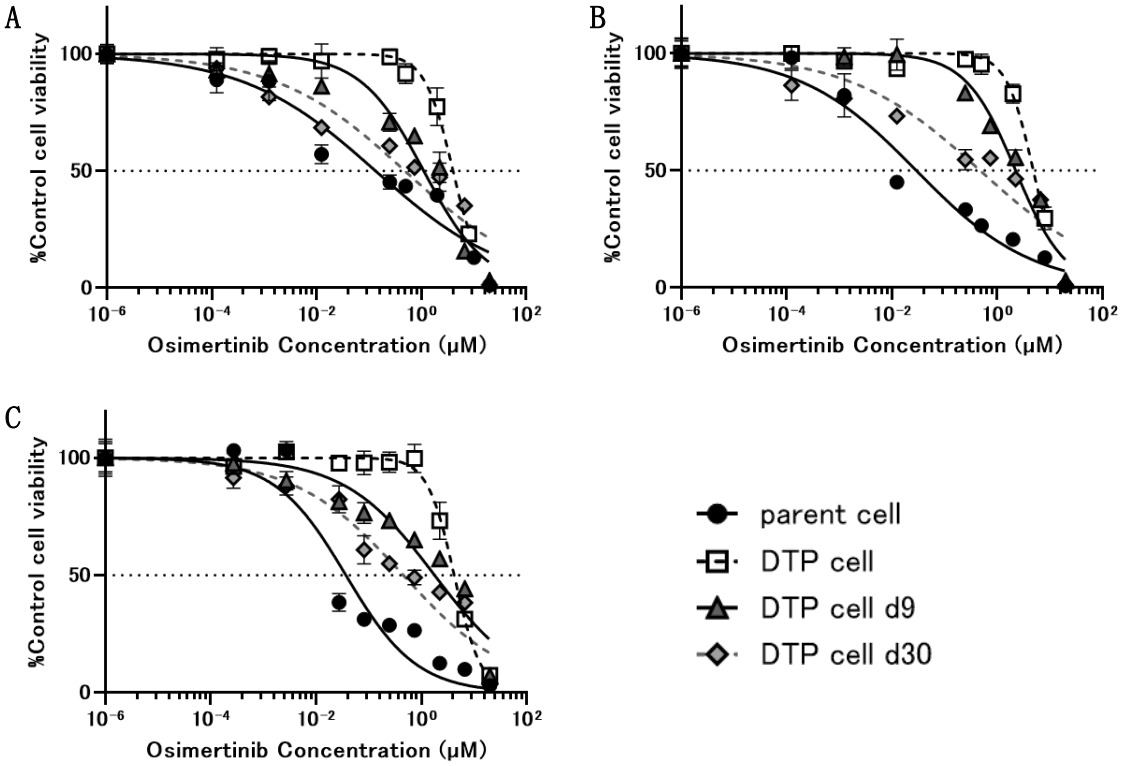
図 16



親細胞と osimertinib DTP 細胞を osimertinib で 72 時間処理し、細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。グラフは平均と標準偏差値を示す。＊ P＜0.05。
A）PC-9 細胞と DTP 細胞の比較。
B）H1975 細胞と DTP 細胞の比較。
C）HCC827 細胞と DTP 細胞の比較。

DTP 細胞の薬剤耐性は可逆的であり、薬剤を除いた培地で培養することで速やかに薬剤感受性を再獲得することが報告されている（Sharma et al., 2010; Taniguchi et al., 2019）。Osimertinib DTP 細胞完成後に osimertinib を取り除いた培地で DTP 細胞を培養し、9 日目と 30 日目の DTP 細胞における osimertinib の細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、osimertinib DTP 細胞を薬剤を除いた培地で培養すると、時間経過によって osimertinib に対する薬剤耐性が弱まる事が分かった（図 17A, 17B, 17C）。

図 17



親細胞と osimertinib DTP 細胞、9 日間または 30 日間 osimertinib を休薬した osimertinib DTP 細胞を osimertinib で 72 時間処理し、細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。グラフは平均と標準偏差値を示す。

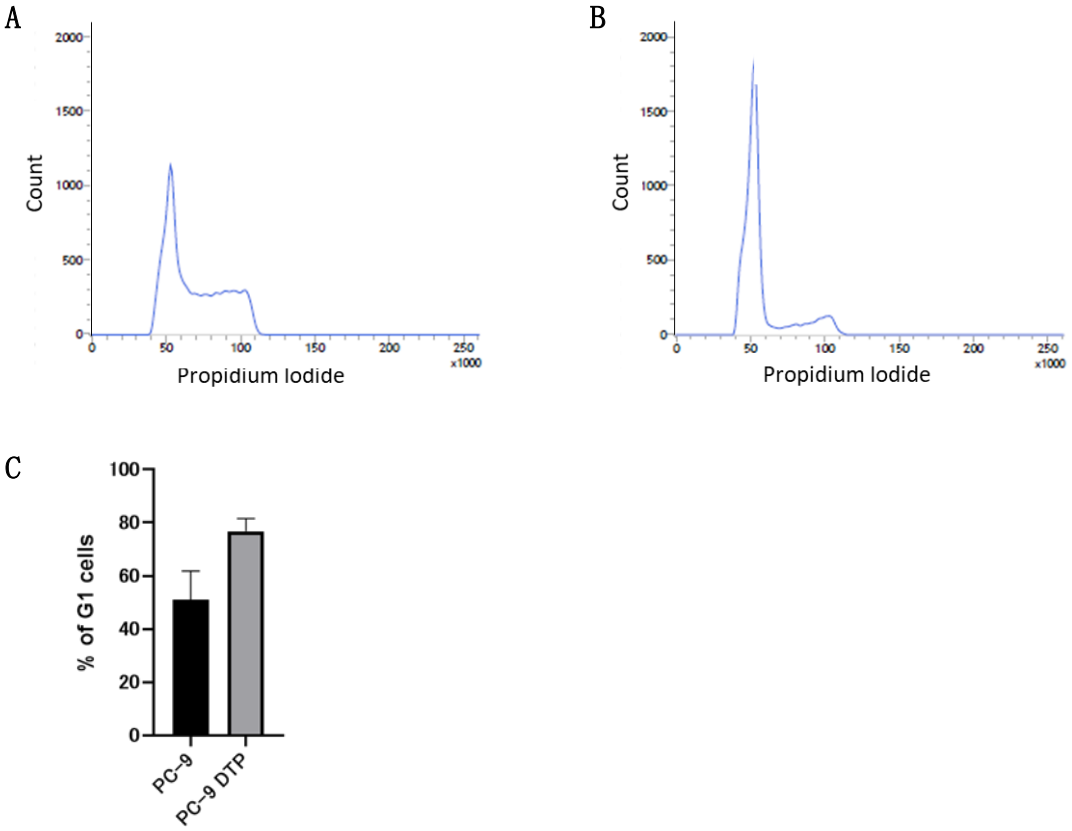
A) PC-9 細胞と各 DTP 細胞の比較。

B) H1975 細胞と各 DTP 細胞の比較。

C) HCC827 細胞と各 DTP 細胞の比較。

また DTP 細胞の特性として PC-9 細胞を 9 日間 erlotinib に曝露させて作成した erlotinib DTP 細胞では、G1 静止期の細胞が生き残り、最終的に薬剤耐性を獲得して標的薬剤の存在下でも増殖を再開することが報告されている（Sharma et al., 2010)。本研究においても、PC-9 を用いて作成した osimertinib DTP 細胞では、PC-9 細胞と比較して細胞周期の G1 期で静止している細胞を多く認めた（図 18A, 18B, 18C)。

図 18



PC-9 と PC-9 osimertinib DTP 細胞における細胞周期の比較。
A) PC-9 細胞の細胞周期。
B) PC-9 osimertinib DTP 細胞の細胞周期。
C) 細胞周期における G1 期の細胞の相対評価。

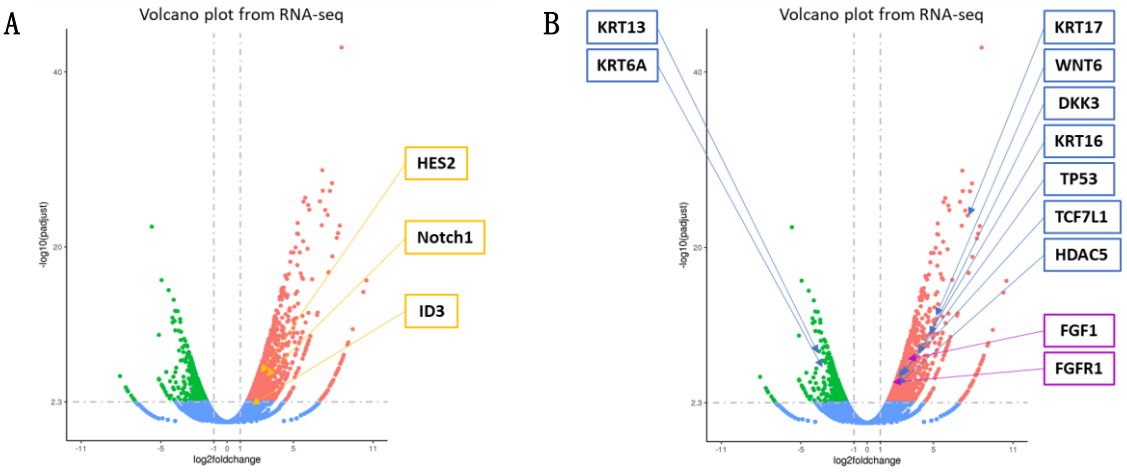
3) Osimertinib DTP 細胞では Notch 経路がアップレギュレーションされている

前世代 EGFR-TKIs 耐性の NSCLC に関して、Notch 経路の活性化が薬剤耐性と関連することが報告されている (Xie et al.,2012; Xie et al., 2013)。Notch 経路が osimertinib DTP 細胞の耐性にも関与しているかを検討した。

PC-9 細胞と、PC-9 osimertinib DTP 細胞から RNA を抽出し、RNA-seq による遺伝子プロファイリング解析を行った。RNA 配列は Illumina NovaSeq6000 (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA)を用いて決定され、発現差異をボルケーノプロットを用いて可視化した。その結果、親細胞と比較して osimertinib DTP 細胞では *NOTCH1* や *HES2*、*ID3* といった *NOTCH1* 応答性遺伝子の一部がアップレギュレーションされており **(図 19A)**、osimertinib の早期の獲得耐性に Notch 経路が関与していることが示唆された。また DTP 細胞では、一部の β-catenin 応答性遺伝子や FGFR 経路関連遺伝子の発現上

昇も観察され、これまでの報告（Arasada et al., 2018; Raoof et al., 2019）と一致していた（**図 19B**）。

図 19



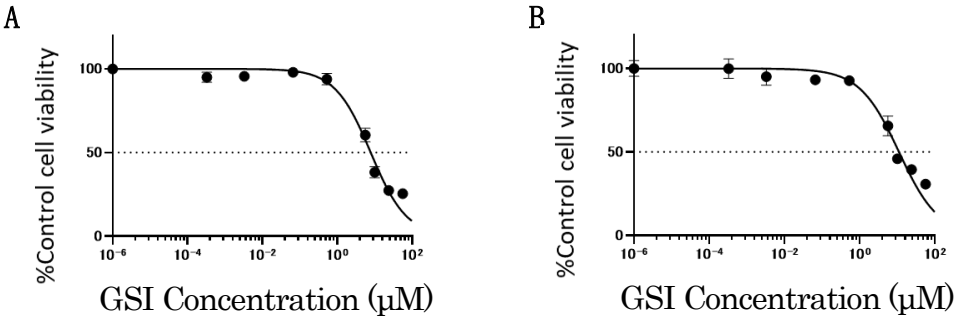
PC-9 と PC-9 osimertinib DTP 細胞を RNA-seq で解析し、遺伝子発現の差異をボルケーノプロットで示した。
A）*NOTCH1* 応答性遺伝子（オレンジ色）の発現差異。
B）β-catenin 応答性遺伝子（青色）および FGFR 経路関連遺伝子（紫色）の発現差異。

4）親株において osimertinib と GSI の併用効果を認める

RNA-seq の結果において osimertinib DTP 細胞で *NOTCH* 関連遺伝子の上昇を認めた。EGFR-TKIs と Notch 経路についての報告は多く、Konishi らは erlotinib と GSI 併用（Konishi et al., 2010）について、Xie らは gefitinib と GSI 併用（Xie et al., 2012; Xie et al., 2013）についての治療効果を明らかにした。また Bousquet らは、gefitinib に耐性化した *EGFR*-C797S 変異陽性 NSCLC において osimertinib と GSI 併用が腫瘍増殖を抑制することを明らかにした（Bousquet et al., 2020）。今回、*EGFR* 遺伝変異陽性 NSCLC 細胞株における osimertinib と GSI 併用効果について改めて検討した。

最初に PC-9 と H1975 細胞における GSI の IC_{50} を MTT 法を用いて測定した（**図 20A, 20B**）。GSI の PC-9 細胞における IC_{50} は 10.08±0.69 μmol/L、H1975 細胞における IC_{50} は 10.72±1.22 μmol/L であった。

図 20

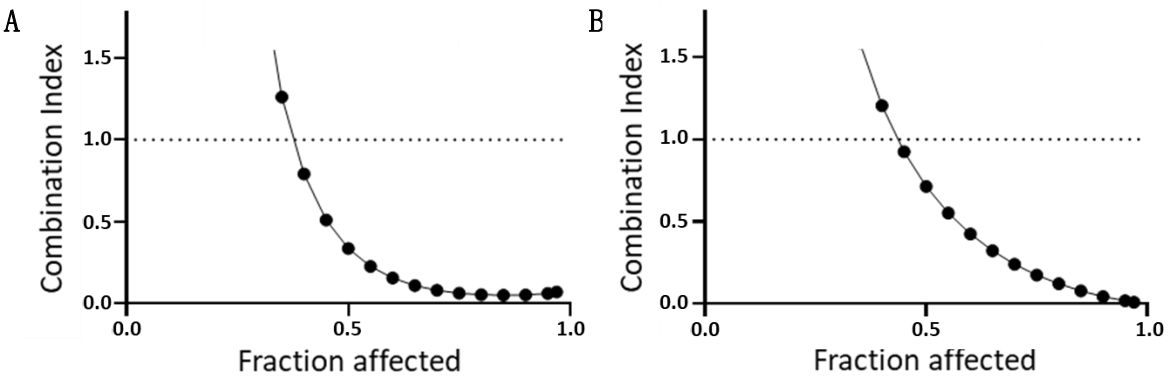


	IC_{50} (μmol/L)±SD
Cell line	GSI
PC9	10.08±0.69
H1975	10.72±1.22

A) PC-9 細胞に対する GSI の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。
B) H1975 細胞に対する GSI の細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。
グラフは平均と標準偏差値を示す。

続いて PC-9 と H1975 細胞における osimertinib と GSI の相乗効果を、CompuSyn 1.0 software (ComboSyn, Paramus, NJ) を用いて、CI によって定量化した (Chou, 2010) **(図 21A, 21B)**。PC-9 と H1975 細胞の両方において、osimertinib と GSI の併用は強い相乗効果を示した。

図 21

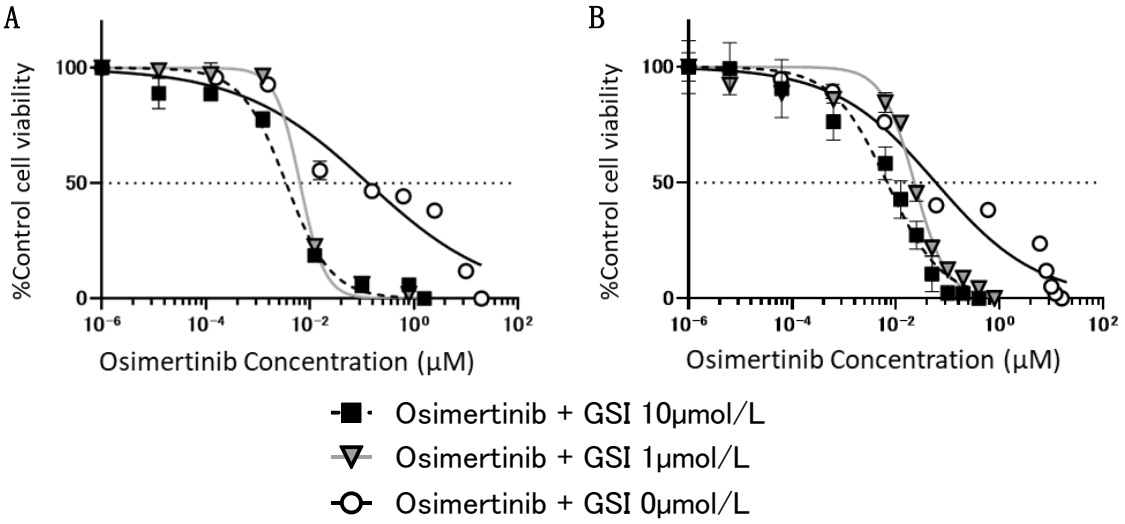


A) PC-9 細胞における osimertinib と GSI の CI プロット。
B) H1975 細胞における osimertinib と GSI の CI プロット。

PC-9 と H1975 細胞における osimertinib と GSI 併用による細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した **(図 22A, 22B)**。PC-9 と H1975 細胞の両方において、osimertinib

と GSI 10 μmol/L（IC_{50}）の併用は osimertinib 単剤よりも強い細胞増殖抑制効果を示した。また osimertinib と GSI 1 μmol/L（IC_{50} の 10 分の 1）の併用においても、osimertinib と GSI の IC_{50} を併用した際と同等の細胞増殖抑制効果が認められた。

図 22



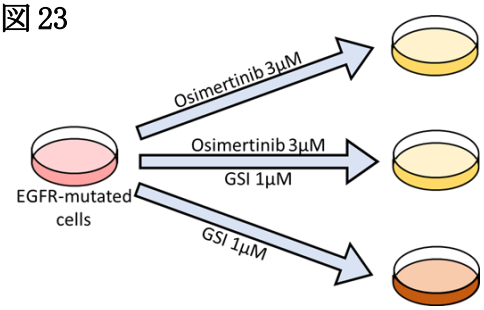
Osimertinib 3 μmol/L と GSI 0、1、10 μmol/L で 72 時間処理し、細胞増殖抑制効果を MTT 法を用いて評価した。グラフは平均と標準偏差値を示す。
A）PC-9 細胞の各 GSI 併用条件での比較。
B）H1975 細胞の各 GSI 併用条件での比較。

5）Osimertinib と GSI の併用は DTP 細胞の再増殖とコロニー形成を阻害する

RNA-seq の結果を踏まえ、Notch 経路が DTP 細胞の発生、維持に関与しているかを確認するため、DTP 細胞における GSI 併用効果を検討した。

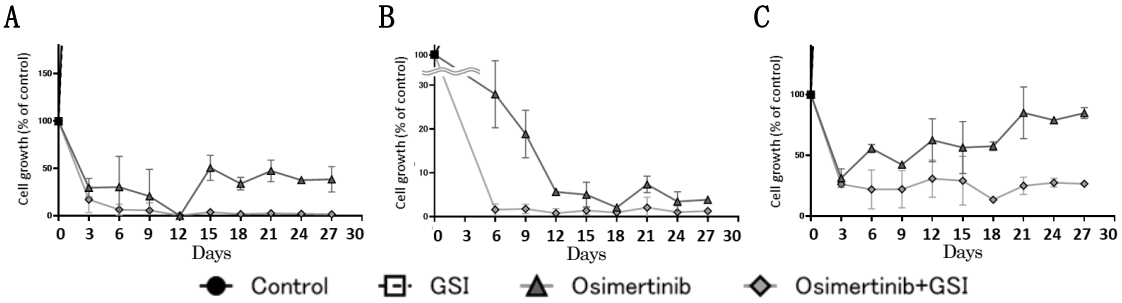
PC-9、H1975、HCC827 細胞に vehicle、osimertinib 3 μmol/L、GSI 1 μmol/L、osimertinib と GSI 併用を添加し、72 時間毎に薬剤を交換しながら 28 日間培養した**（図 23）**。トリパンブルー色素排除法にて 72 時間毎に生細胞をカウントした。Osimertinib DTP 細胞は、PC-9 で 15 日後、H1975 で 21 日後、HCC827 で 18 日後にそれぞれ再増殖を認めた。一方、GSI を併用した群では、3 つの細胞全てで再増殖が抑制されていた。なお GSI 単独療法では増殖抑制効果は認められなかった**(図 24A, 24B, 24C)**。

図 23



PC-9、H1975、HCC827 細胞に osimertinib 3 μmol/L、GSI 1μmol/L、または osimertinib と GSI 併用を加え、72 時間毎に薬剤を交換しながら 28 日間培養した。

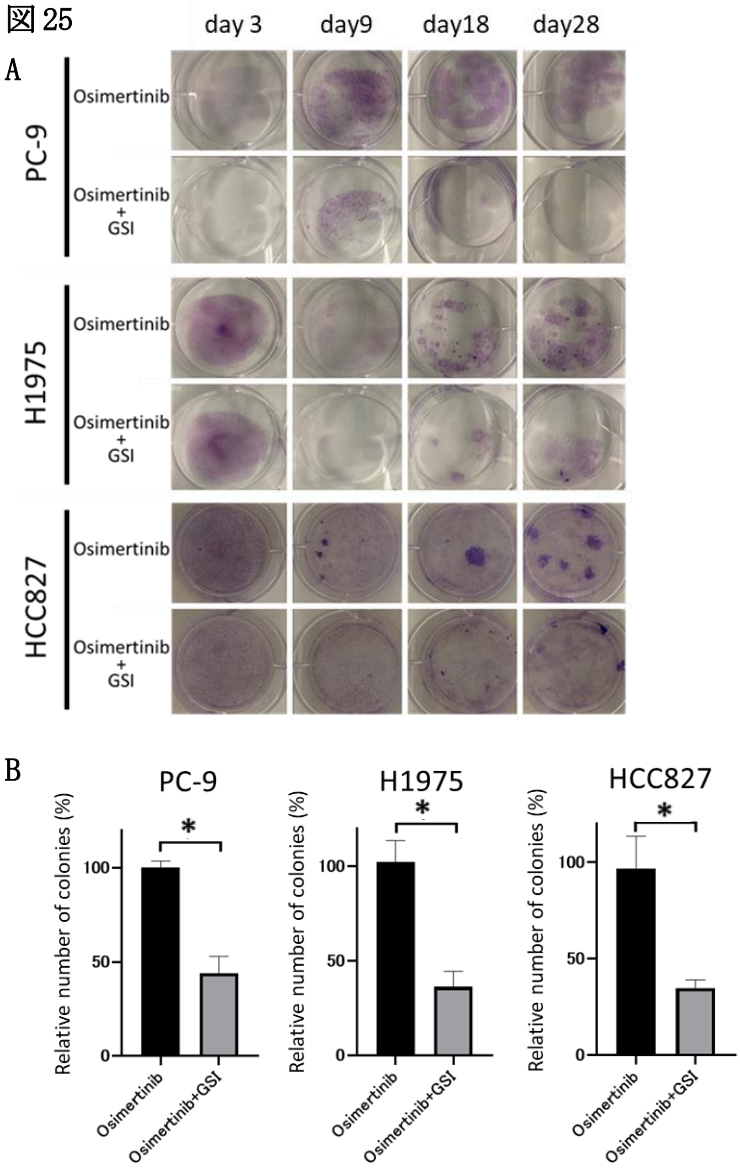
図 24



PC-9、H1975、HCC827 細胞に各薬剤を加えて長期培養し、72 時間毎にカウントした生細胞の割合。グラフは平均と標準偏差値を示す。
A) PC-9 細胞の生細胞の割合。
B) H1975 細胞の生細胞の割合。
C) HCC827 細胞の生細胞の割合。

続いて osimertinib と GSI 併用による阻害効果を確認するために、clonogenic assay を行った。PC-9、H1975、HCC827 細胞に vehicle、osimertinib 3 μmol/L、GSI 1 μmol/L、osimertinib と GSI 併用を添加し、72 時間毎に薬剤を交換しながら 28 日間培養した。72 時間毎に細胞をクリスタルバイオレッドとメタノール溶液で固定・染色した。この assay でも同様に、薬剤投与初期では osimertinib 単剤でもコロニー形成を阻害できたが、時間経過とともにコロニーの再増殖を認めた。一方 osimertinib と GSI の併用では単剤よりも強いコロニー形成阻害効果を示し、Notch 経路の阻害が osimertinib DTP 細胞の再増殖を抑制していることが示唆された（図 25A, 25B）。

図 25



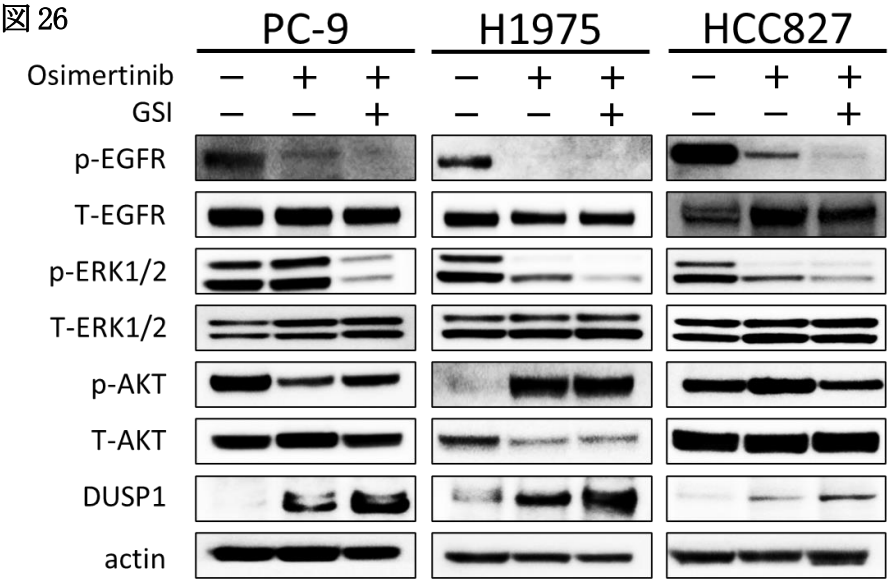
PC-9、H1975、HCC827 細胞に各薬剤を加えて培養し、clonogenic assay を行った。
グラフは平均と標準偏差値を示す。＊ P＜0.05。
A) 3 日目、9 日目、18 日目、28 日目の代表的な画像を示す。
B) 28 日目における osimertinib DTP 細胞のコロニー数を基準とした、GSI 併用 osimertinib DTP 細胞数の相対評価。

6) GSI 併用により osimertinib DTP 細胞のリン酸化 ERK 発現が抑制される

Notch 経路の阻害がどのように osimertinib DTP 細胞の出現を抑制するかを調べるために、PC-9、H1975、HCC827 細胞を用いて、DTP 細胞の EGFR と AKT 下流シグナル伝

達を検討した。それぞれの細胞にosimertinib 3 μmol/L またはosimertinib と GSI 1 μmol/L の併用投与を 9 日間行い、作成した DTP 細胞の蛋白を回収しウエスタンブロット法を行った(図 26)。3 つ全ての DTP 細胞においてosimertinib 投与でリン酸化 EGFR 発現は抑制されたが、リン酸化 ERK 発現は抑制されなかった。一方で GSI を併用した DTP 細胞ではリン酸化 ERK 発現が抑制された。リン酸化 AKT 発現はどの薬剤で処理した細胞においても影響を受けなかった。Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) は ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 などの MAPK の脱リン酸化に関与し、負の制御因子として働く (Patterson et al., 2009)。またNotch 経路は、HES1 による負の調節機構を介して DUSP1 の発現を調節し、EGFR 経路とクロストークすることが報告されている (Baumgart et al., 2015)。Osimertinib DTP 細胞ではDUSP1 発現の上昇を認めるものの、GSI 併用により DTP 細胞での DUSP1 発現がより上昇した。この作用はH1975 DTP 細胞およびHCC827 DTP 細胞ではより顕著であった。

図 26



PC-9、H1975、HCC827 細胞に各薬剤を加えて 9 日間培養し、EGFR 経路や AKT 経路に与える影響をウエスタンブロット法を用いて評価した。

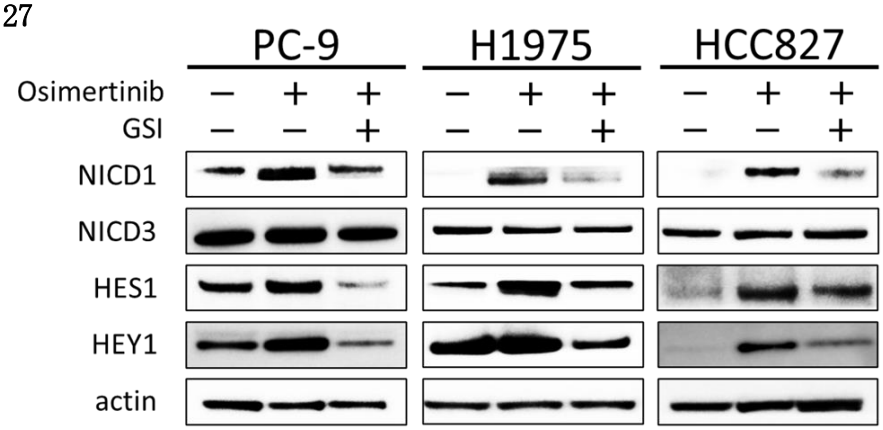
7) GSI 併用により osimertinib DTP 細胞の Notch 経路が抑制される

Osimertinib DTP 細胞ではRNA-seq で *NTCH1* 応答性遺伝子がアップレギュレーションされており、osimertinib DTP 細胞の出現にNotch 経路が関与していることが示されている。そのため、GSI 併用によるNotch 経路の阻害がosimertinib DTP 細胞に与える影響を検討した。PC-9、H1975、HCC827 細胞に、osimertinib 3 μmol/L または

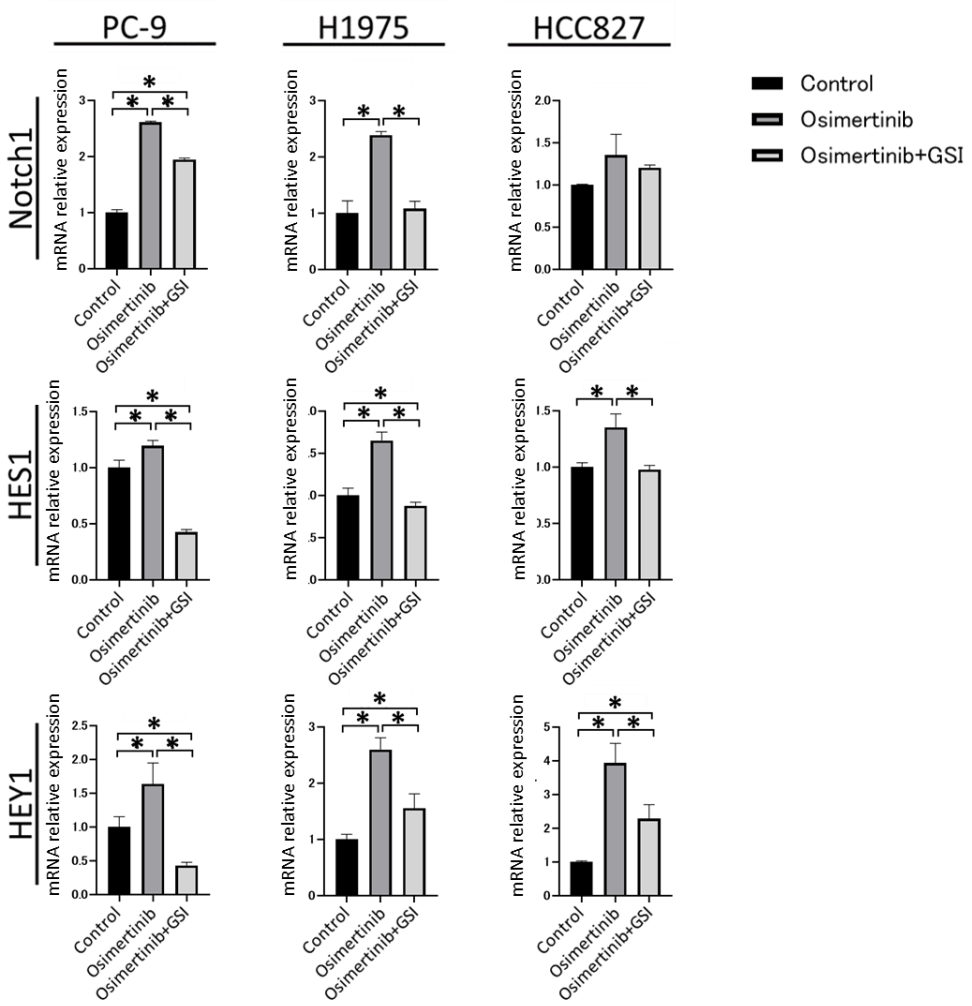
osimertinib と GSI 1 μmol/L の併用投与を 9 日間行い、作成した DTP 細胞の蛋白と RNA を回収し、ウエスタンブロット法と qRT-PCR 法を行った (図 27A, 27B)。親細胞と比較して DTP 細胞では、3 つすべての細胞株で NICD1 がアップレギュレーションされており、この結果は *NOTCH1* mRNA の発現結果とも一致していた。GSI を併用することで DTP 細胞での NICD1 アップレギュレーションは 3 つの細胞株すべてで抑制され、*NOTCH1* mRNA の発現も抑制された。また前世代 EGFR-TKIs 治療では、Notch3 も重要な役割を果たすことを我々や他の研究者は報告しているが (Arasada et al., 2014; Konishi et al., 2010)、いずれの薬剤グループにおいても NICD3 の発現には変化を認めなかった。同様に、Notch 標的遺伝子である HES1 と HEY1 の発現も osimertinib 投与により蛋白、mRNA ともに増加していた。Osimertinib と GSI を併用することで、DTP 細胞で誘導された、HES1, HEY1 の上昇は抑制された。

図 27

A



B

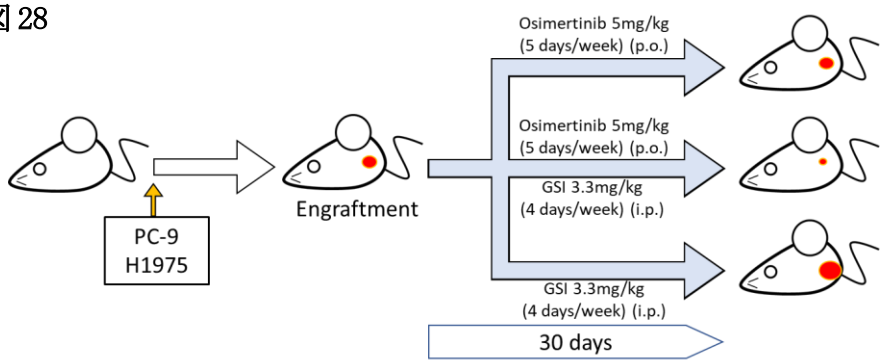


PC-9、H1975、HCC827 細胞に各薬剤を加えて 9 日間培養し、Notch 経路に与える影響をウエスタンブロット法と qRT-PCR 法を用いて評価した。
グラフは平均と標準偏差値を示す。＊ P＜0.05。
A) ウエスタンブロット法
B) qRT-PCR 法

8) Osimertinib と GSI の併用は *in vivo* での腫瘍増殖を抑制する

次に、osimertinib と GSI の併用が *in vivo* での腫瘍増殖にどのような影響を与えるかを検討した。PC-9 と H1975 細胞をヌードマウスの右後ろ脚に皮下注射し、形成された皮下腫瘍の大きさを測定した。マウスは control 群、GSI 群、osimertinib 群、osimertinib と GSI 併用群に分けられ、osimertinib (5 mg/kg/日) は週 5 日経口投与、GSI (3.3 mg/kg/日) は週 4 日腹腔内注射した (図 28)。

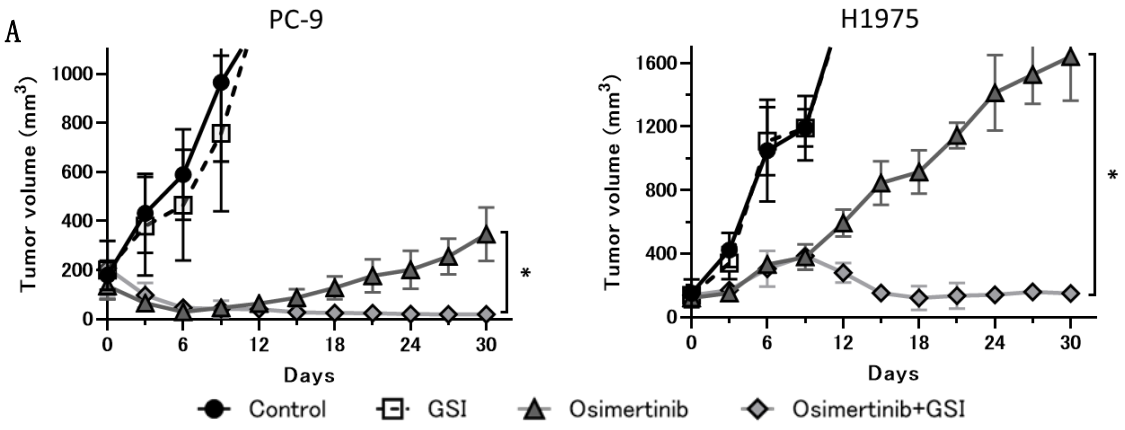
図 28



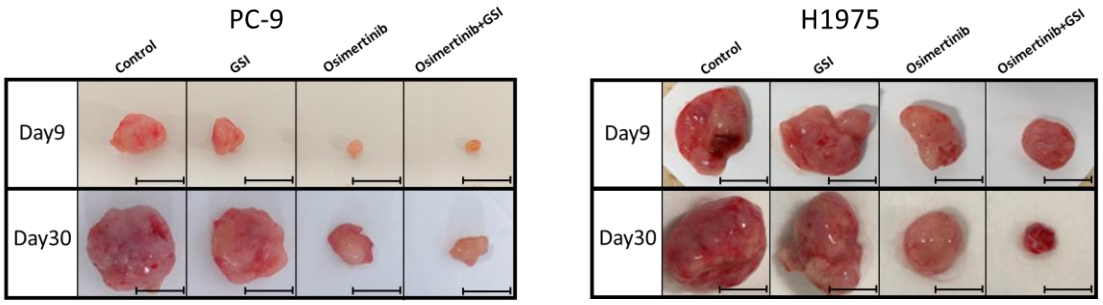
マウスモデルの模式図。PC-9 または H1975 細胞を皮下注後、vehicle、osimertinib、GSI、または osimertinib と GSI 併用投与を 30 日間行った。
p.o.： per os。経口投与。
i.p.： intraperitoneal。腹腔内注射。

Osimertinib 群では投与初期段階の PC-9 では腫瘍縮小、H1975 では増殖抑制を認めたが、PC-9 と H1975 の両方において投与 30 日後では腫瘍の有意な再増大を認めた。Osimertinib と GSI 併用群では、PC-9 と H1975 細胞のいずれも投与初期段階では osimertinib 群と同様の腫瘍縮小／増殖抑制を認めるが、osimertinib 群とは違い投与 30 日後でも腫瘍増殖を有意に抑制していた。一方 control 群と GSI 群では、腫瘍増殖抑制効果は認めなかった（図 29A, 29B）。GSI の副作用として下痢があり、消化管杯細胞の過形成を引き起こすことが原因であると報告されているため（Samon et al., 2012; van Es et al., 2005）、薬剤投与マウスの腸管を periodic acid schiff 染色したが腸管杯細胞の過形成は認められなかった（図 30）。また投与期間中の有意な体重減少も認められず、薬剤投与による重篤な有害事象は認められなかった（図 31）。

図 29

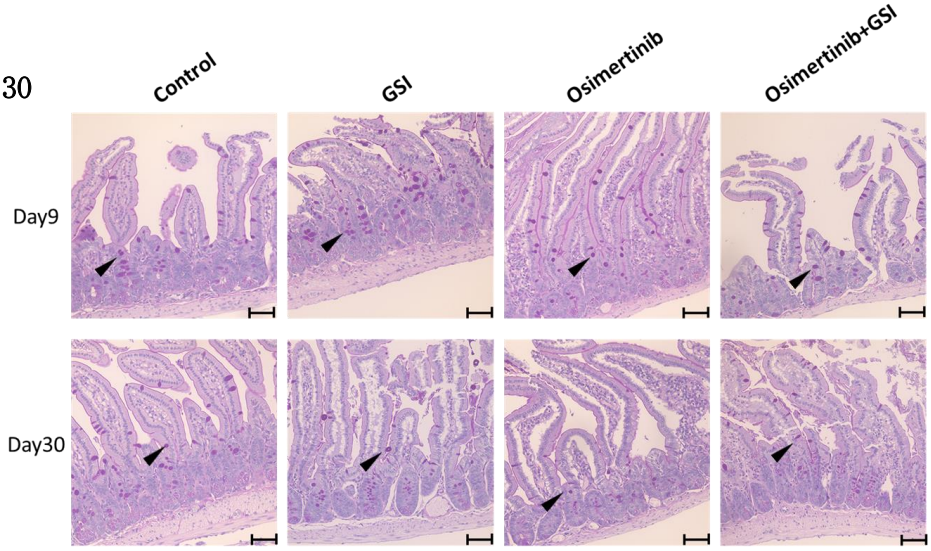


B



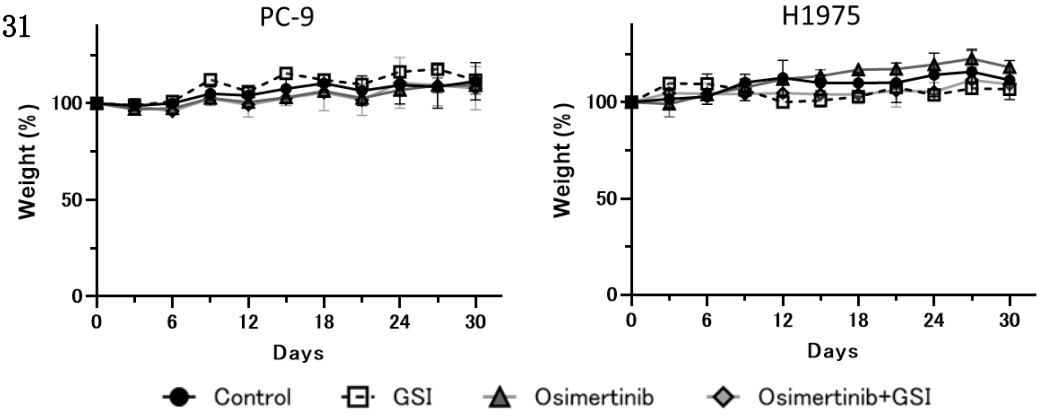
A）腫瘍体積の経時変化を示す。グラフは平均と標準偏差値を示す。＊ P＜0.05。
B）治療 9 日目および 30 日目の代表的な腫瘍写真を示す（スケールバー＝10 ㎜）。

図 30



各薬剤を投与したマウス腸管の periodic acid schiff 染色。
腸管杯細胞を矢印で示す（スケールバー＝50 μm）。

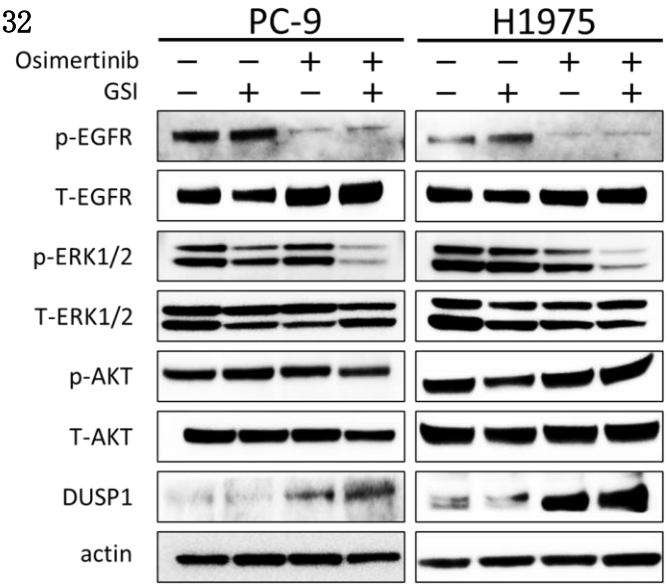
図 31



各薬剤を投与したマウス体重の経時変化。グラフは平均と標準偏差値を示す。

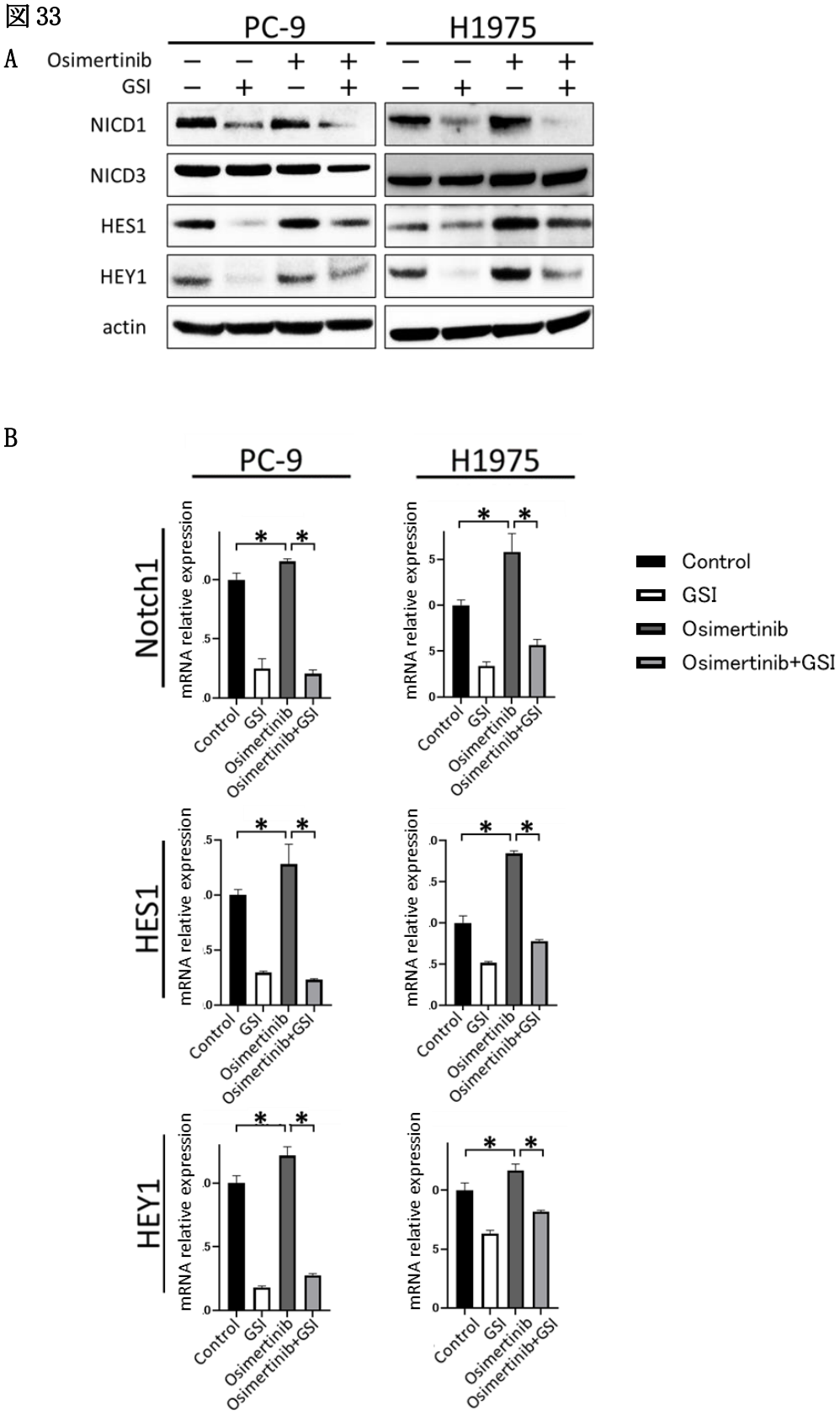
上記マウスにおいて、薬剤投与開始9日目に切除した腫瘍検体を用いてウエスタンブロット法でEGFR経路を検討した。Osimertinib群とGSI併用群の両方の腫瘍で、リン酸化EGFR発現が抑制された。Osimertinib群でリン酸化ERKは抑制されなかったが、併用群ではリン酸化ERK発現は有意に抑制されていた。リン酸化AKTはどの治療群でも影響を受けなかった。DUSP1はosimertinib群に比べ、併用群でより増強された（図32）。これらのデータは*in vitro*の所見と一致していた。次にウエスタンブロット法とqRT-PCR法を用いてNotch経路の発現を検討した。タンパク、mRNAともに、osimertinib群の腫瘍ではNICD1、HES1、およびHEY1発現が増強していた。GSI併用群ではosimertinibによって誘導されるこれらのアップレギュレーションを有意に減少させた（図33A, 33B）。

図32



各薬剤投与9日目のマウス皮下腫瘍におけるEGFR経路やAKT経路への影響をウエスタンブロット法を用いて評価した。

図 33


A
PC-9
H1975
Osimertinib
GSI
NICD1
NICD3
HES1
HEY1
actin
B
PC-9
H1975
Notch1
HES1
HEY1
mRNA relative expression
Control
GSI
Osimertinib
Osimertinib+GSI

各薬剤投与9日目のマウス皮下腫瘍におけるNotch経路への影響をウエスタンブロット法とqRT-PCR法を用いて評価した。
グラフは平均と標準偏差値を示す。＊ P＜0.05。
A) ウエスタンブロット法
B) qRT-PCR法

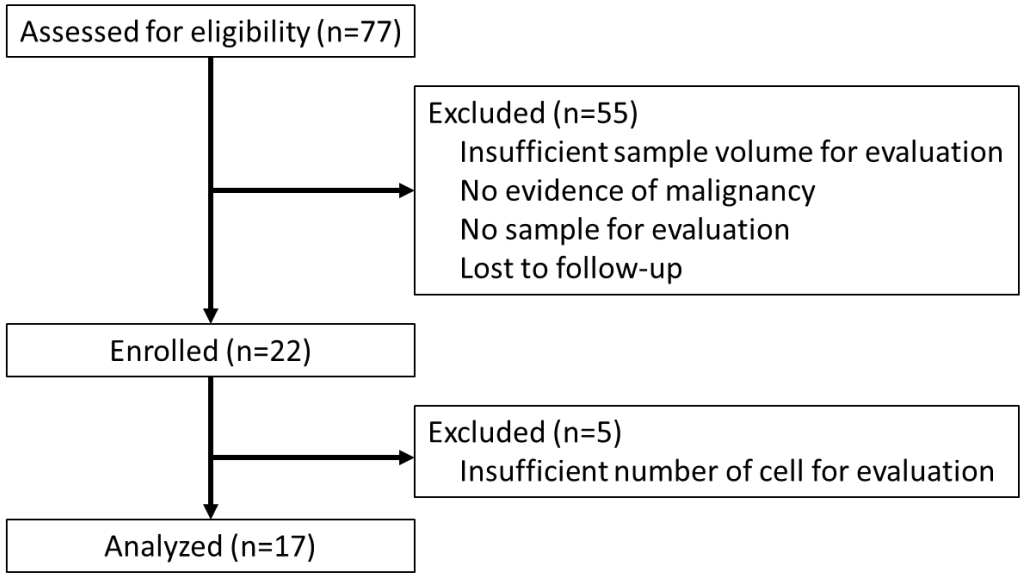
9) EGFR-TKIs治療後の患者におけるNotch1とHES1発現と予後の関連

第一、二世代EGFR-TKIs (gefitinib、erlotinib、afatinib) 治療を受け、かつ*EGFR*-T790M検索目的に病理診断を受けた77症例を用いて、Notch1およびHES1の発現について検討した。免疫染色を行うにあたり、事前に55症例が腫瘍検体量の不足、追跡調査不能などで除外された。22症例についてFFPE組織ブロックを用いて5 μm厚の切片を作成し、免疫染色を行った。5 症例が免疫染色後の細胞数が不十分であったために除外され、最終的に17症例について評価した**(図34)**。**表1**に患者の特徴を示す。なお本研究は、EGFR-TKIs耐性後の二次変異であるEGFR-T790M検索目的の症例を使用しているため、使用したEGFR-TKIsにosimertinibは含まれていない。

NSCLCにおけるNotch1とHES1染色の陽性例と陰性例を図に示す**(図35A)**。Notch1発現の評価では、膜染色のみの細胞は陰性とし、細胞質および/または核染色の細胞を陽性とした。HES1 発現の評価では、膜および/または細胞質染色の細胞は陰性とし、核染色のみの細胞を陽性とした。

*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLC患者におけるEGFR-TKIs治療前後のNotch1およびHES1発現を対応のある*t*検定で比較した。線グラフの各線はそれぞれ1人の患者に対応しており、EGFR-TKIs治療前後のNotch1およびHES1の発現の変化を示している**(図35B)**。赤線は治療後にNotch1またはHES1レベルが有意に増加を示した患者を、黒線は治療後にNotch1またはHES1レベルが変化を示さなかったか減少した患者を表している。Notch1発現は17症例例中9症例で上昇し、治療前の平均が12%であるのに対して治療後のNotch1レベルは平均29%であった (p=0.04)。HES1発現は17症例中9症例で上昇し、治療前の平均が22%であるのに対して治療後のHES1レベルは平均32%であった (p=0.03)。

図 34



EGFR-TKIs 治療を受け、かつ *EGFR*-T790M 検索目的に病理診断を受けた症例に対するフローチャート

表１　患者の特色

Characteristics　(n=17)	
Sex	
Male	7 (41.2%)
Female	10 (58.8%)
Age, year	
Median	69
Range	50-86
≧65 y	12 (70.6%)
Smoking status	
Never	8 (47.0%)
Smoker	9 (53.0%)
Biopsy (after EGFR-TKIs therapy)	
EBUS-GS-TBB	4 (23.5%)
EBUS-TBNA	5 (29.4%)
EBB	1 (6.0%)
Cell block (pleural effusion)	4 (23.5%)
Percutaneous needle biopsy	3 (17.6%)
***EGFR*- mutated status**	
Exon 19del	8 (47.0%)
Exon 21 L858R	9 (53.0%)
EGFR-TKIs (first line)	
Gefitinib	9 (53.0%)
Erlotinib	4 (23.5%)
Afatinib	4 (23.5%)

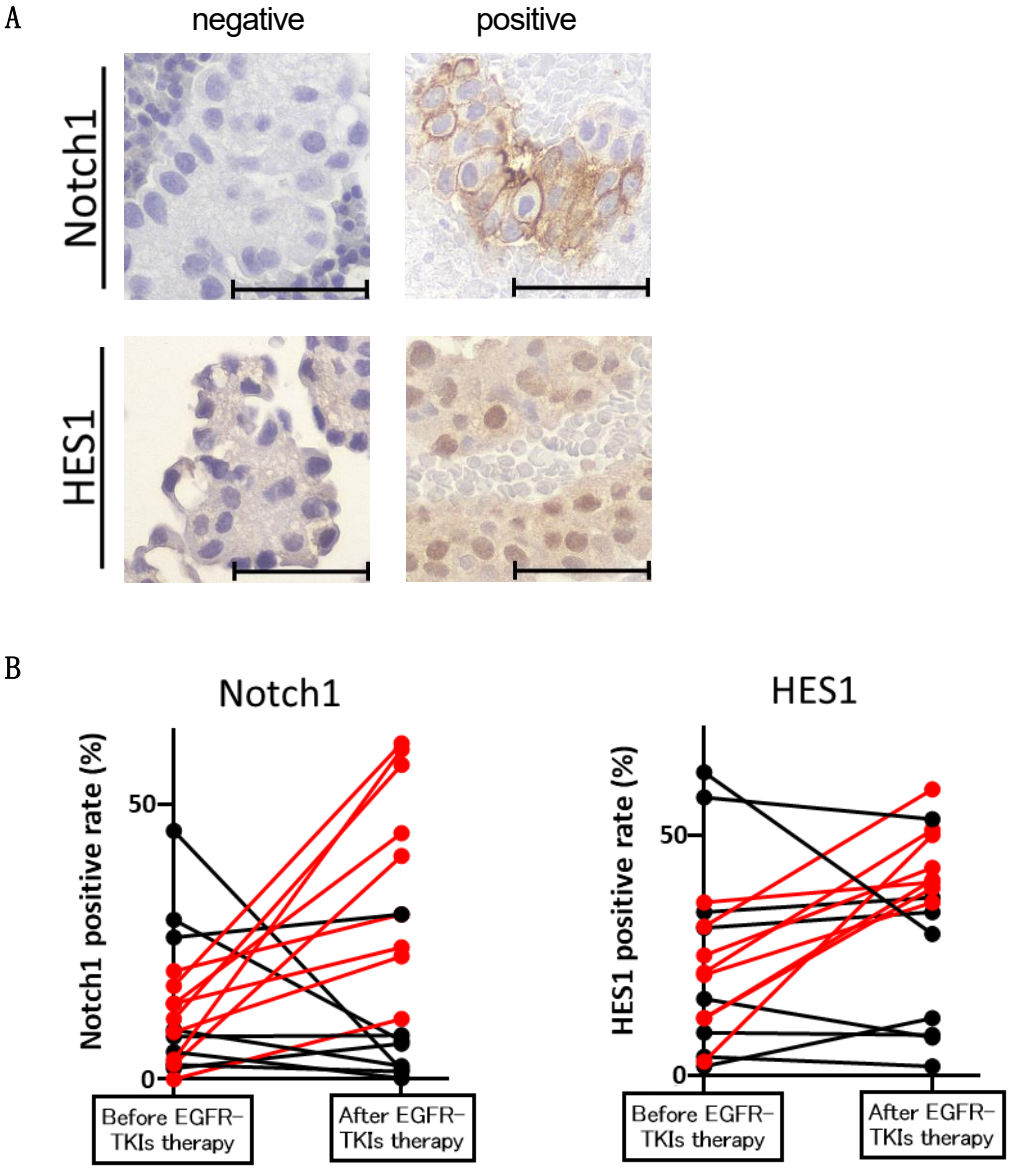
EBUS-GS：endobronchial ultrasonography with a guide sheath

TBB：transbronchial biopsy

EBUS-TBNA：endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration

EBB：endobronchial biopsy

図 35

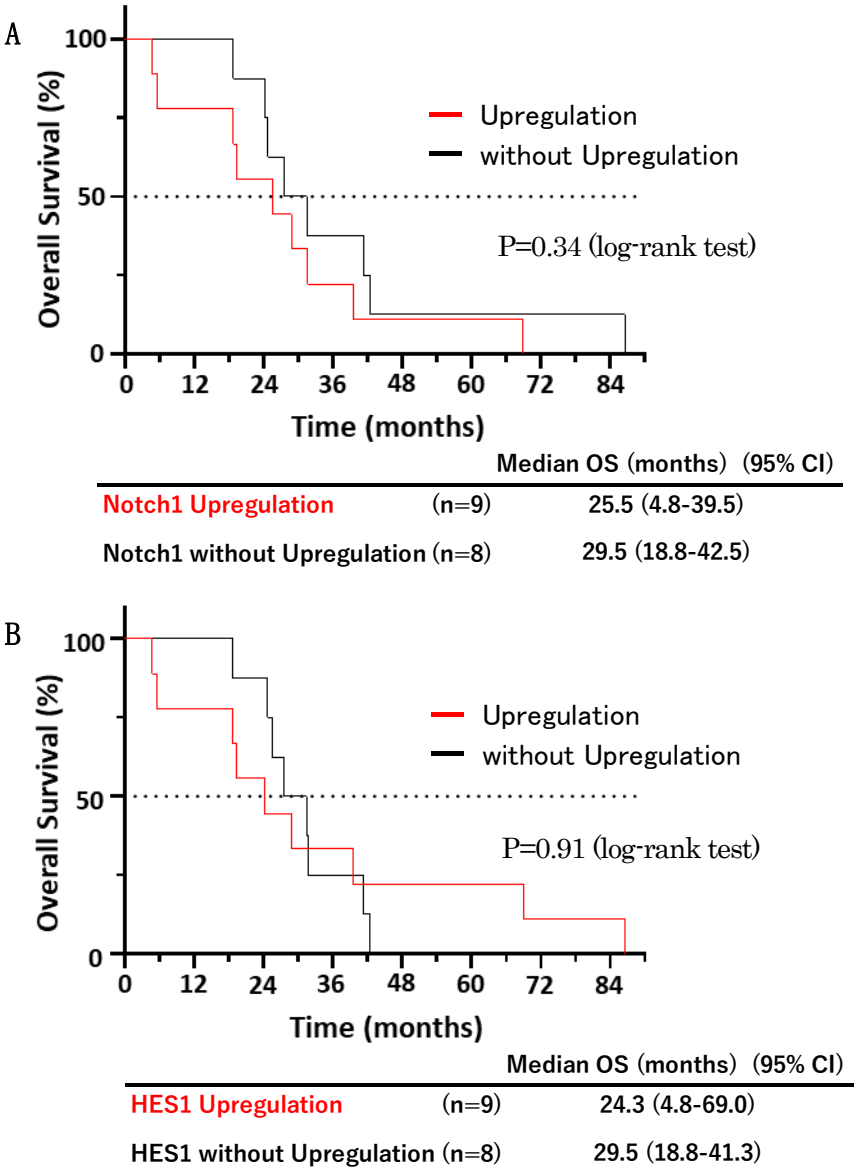


A) Notch1 と HES1 の免疫組織染色の陽性例と陰性例（スケールバー＝50 μm)。
B) *EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者における EGFR-TKIs 治療前後の Notch1 および HES1 発現の比較。

全生存期間は治療開始日からの期間と定義した。Notch1 発現上昇群（n=9）と有意上昇なし群（n=8）に分け Notch1 発現と全生存期間の関係を評価した。結果、全生存期間の中央値は Notch1 発現上昇群では 25.5 ヵ月、発現上昇なし群では 29.5 ヵ月であった（p=0.38）**(図 36A)**。2 群間に有意な差は認められなかった。HES1 発現上昇群

（n=9）と有意上昇なし群（n=8）に分け HES1 発現と全生存期間の関係を評価した。全生存期間の中央値は HES1 発現上昇群では 24.3 ヵ月、発現上昇なし群では 29.5 ヵ月であった（p=0.91）**(図 36B)**。2 群間に有意な差は認められなかったが、EGFR-TKIs 治療後に HES1 発現上昇が認められた患者では、発現上昇を認められなかった。

図 36



A) Notch1 発現上昇群（n=9）と有意上昇なし群（n=8）の全生存期間を比較した Kaplan-Meier 曲線。
A) HES1 発現上昇群（n=9）と有意上昇なし群（n=8）の全生存期間を比較した Kaplan-Meier 曲線。

考察

1) Osimertinib DTP 細胞における Notch 経路の働きについて

本研究では、osimertinib DTP 細胞で Notch 経路が活性化されており、osimertinib と Notch 経路阻害剤である GSI の併用によって *in vitro* および *in vivo* での増殖が抑制されることを明らかにした。Osimertinib と GSI 併用による osimertinib DTP 細胞の増殖抑制効果は、我々の知る限り初の報告である。Osimertinib の耐性獲得を阻害することを目的とした我々の研究は意義のあるものである。

① EGFR-TKIs 治療と Notch 経路の活性化について

Notch 経路の活性化は、前世代 EGFR-TKIs に対する獲得抵抗性と関連することが報告されているが (Xie et al.,2012; Xie et al., 2013)、第三世代 EGFR-TKIs である osimertinib における Notch 経路の役割に関する報告はほとんどない。Gefitinib の耐性細胞では Notch1 が活性化され、gefitinib と GSI の併用で腫瘍の増殖が抑制されることが報告されている (Xie et al.,2012; Xie et al., 2013)。Bousquet らは、gefitinib に耐性を示す *EGFR*-T790M 陽性 NSCLC 細胞において、Notch1 と Notch3 が HES1 を介して腫瘍の進行に寄与していることを明らかにした。さらに osimertinib に対する耐性遺伝子変異 C797S を持つ *EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC においては、osimertinib と GSI の併用が HES1 発現を抑制することで腫瘍の増殖を抑制することを明らかにした (Bousquet et al., 2020)。今回我々は耐性獲得前の親株において oseimrtinib と GSI 併用治療が相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを初めて報告した。

② DTP 細胞における Notch 経路の活性化について

前世代 EGFR-TKIs が一次治療の耐性獲得症例では、約 60%でゲートキーパー変異である T790M 変異を認めるが (Nagano et al., 2018; Sequist et al., 2011; Wu et al., 2016)、それと比較して一次治療が osimertinib の場合の獲得耐性症例では多くの耐性機序が報告されている。一次治療が osimertinib の耐性獲得症例では、大別して EGFR 依存性と EGFR 非依存性の耐性機序が報告されている。EGFR 依存的な耐性機序である C797S などの後天的 *EGFR* 変異や *EGFR* 増幅は osimertinib 耐性症例の約 5～10%に認められる。EGFR 非依存的な耐性機序として前世代 EGFR-TKIs で多く認めた *MET* 増幅は、osimertinib 耐性症例では 7%程度と報告されている (Oxnard et al., 2018; Papadimitrakopoulou et al., 2020; Thress et al. 2015)。他には *RET* 融合遺伝子、*KRAS* 変異、*PI3KCA* 変異、*BRAF* V600E 変異、*HER2* 増幅など (Mehlman et al., 2019; Piotrowska et al.,

2018; Schoenfeld et al., 2020) が見られるが、残りの約 50%が機序不明である (Schmid er al., 2020)。そのため osimertinib 治療後の獲得耐性症例に対する個別治療の選択はしばしば困難である場合が多い (Brown et al., 2019; Kashima et al., 2021)。このような理由から osimertinib 耐性を克服または遅延することを目的として、今回我々は osimertinib 治療における薬剤耐性状態、DTP 細胞に着目した。

Osimertinib DTP 細胞において RNA-seq の結果 Notch1 を含む *NOTCH* 関連遺伝子の上昇を認めることを今回見いだした。Osimertinib DTP 細胞における Notch 経路の役割については、ほとんど報告がない。Arasada らは、Notch3 が β-catenin を制御し、erlotinib 治療中に DTP 細胞を誘導すると報告している (Arasada et al., 2018)。本研究では osimertinib 治療中に DTP 細胞で Notch1 が発現上昇したが、しかし Notch3 や他の Notch 受容体の発現変化を認めなかった。さらに GSI 併用により osimertinib によって上昇した Notch1 の発現や Notch の標的遺伝子の低下を認めており Notch1 を介した Notch 経路の制御が osimertinib DTP 細胞に関与していることが示された。肺癌における Notch 経路の働きはしばしば状況依存的であり、肺癌の腫瘍形成において Notch1 と Notch2 が逆の役割を担っていること (Baumgart et al., 2015) や、我々は NSCLC 細胞において放射線治療後に Notch3 ではなく Notch1 が活性化され放射線治療抵抗性に関わっていること (Mizugaki et al., 2012) を報告している。DTP 細胞における個々の Notch 受容体の役割は完全には解明されていないが、EGFR-TKIs の違いがこれら状況依存性と関連している可能性がある。

2) Osimertinib DTP 細胞における EGFR 下流シグナルの変化について

Osimertinib DTP 細胞ではリン酸化 EGFR 発現が低下しているにもかかわらず、リン酸化 ERK 発現が低下していなかった。これまでの報告では、EGFR シグナルの阻害が ERK の再活性化を引き起こし、その結果 DTP 細胞の発生に貢献していることが示唆されており (Raoof et al., 2019)、今回の結果と一致している。今回の報告の重要な点としては、osimertinib と GSI の併用により、ERK の再活性化が抑制され、DTP 細胞の出現が抑制されることが明らかになったことである。さらに GSI を併用した osimertinib DTP 細胞では DUSP1 の亢進を認めた。DUSP1 は、ERK を脱リン酸化することで MAPK 経路の負の調節因子として機能している (Owens and Keyse, 2007)。肺癌の他に、前立腺癌、結腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌など多くの癌腫で DUSP1 の発現、機能について報告されている (Haagenson and Wu, 2010; Loda et al., 1996)。MAPK 経路は細胞の増殖や分化において重要なシグナル伝達経路の一つであり、腫瘍細胞内では MAPK 経路が

活性化されている（Haagenson and Wu, 2010）。そのためDUSP1の発現上昇によるMAPK経路の抑制は、腫瘍細胞の増殖抑制をもたらすことが報告されている（Haagenson and Wu, 2010）。Harukiらは、ヒトNSCLC細胞株において、NotchがDUSP1を調節することによりMAPK 経路に影響を与えることを報告している（Haruki et al., 2005）。同様に、Notchの標的遺伝子であるHES1は、*KRAS*変異陽性NSCLC においてDUSP1を転写的に抑制し、リン酸化ERK発現を増強することが報告されている（Baumgart et al., 2015; Maraver et al., 2012）。

今回の結果ではosimertinibによりDUSP1発現が亢進している。*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLCでは正常組織と比較してERKが活性化されており（Chitale et al., 2009; Vicent et al., 2004）、ERK活性の負の調節因子であるDUSP1は（Owens and Keyse, 2007）、*EGFR*遺伝子変異陽性NSCLCでは発現が上昇していることが報告されている（Chitale et al., 2009; Maraver et al., 2012; Vicent et al., 2004）。そのため今回osimertinibによるDUSP1の発現亢進は反応性にDUSP1発現が亢進した結果の可能性がある。GSI併用によりDUSP1がさらに亢進した点についても反応性の亢進である可能性もあるが、Notch経路がDUSP1を制御している既報から一部DUSP1がEGFR経路の阻害に関与していると考えられた。

今回検討されていないがDTP細胞におけるHES1とDUSP1の関与に関して今後の検証が必要であると考えられる。MaraverらはHES1をノックダウンすることで細胞増殖が抑制されることと、DUSP1のmRNAと蛋白発現が上昇することを報告している（Maraver et al., 2012）。またChoiらはDUSP1をノックダウンすることでリン酸化ERK発現が上昇することを報告している。（Choi et al., 2006）。他にChenらはgefitinib耐性株でDUSP1を過剰発現させると、gefitinibに対する感受性が回復することや細胞増殖が阻害されること、リン酸化ERKの発現を抑制することを報告している（Chen et al., 2020）。今後osimertinib DTP細胞において、HES1を過剰発現させた状態でGSI併用した場合に、DUSP1の増加が抑制されるか、リン酸化ERKの増加やDTP細胞の増殖促進が起きるか、について確認する必要がある。またDUSP1をノックダウンした状態でGSIを併用した場合に、DTP細胞の増殖速度やリン酸化ERK発現の増加の有無について検討する必要がある。またDUSP1以外の分子や他の経路がosimertinibとGSIの併用に関連しているかどうか、さらなる検討を重ねることが重要である。

3）ヒト腫瘍組織におけるEGFR-TKIs治療前後のNotch1またはHES1発現の比較と予後の関係

我々は以前に原発巣を完全切除された肺腺癌患者における Notch1 発現と予後との関連について検討した（Kikuchi et al., 2018)。その結果、全生存期間の中央値は Notch1 高発現群は 2.01 年、低発現群は 11.25 年（p=0.019）であり、Notch1 高発現群が低発現群と比較して有意に予後が悪かった（Kikuchi et al., 2018)。

本研究では、ヒト *EGFR* 遺伝子変異陽性腫瘍組織の半数以上で、EGFR-TKIs 投与前と比較して EGFR-TKIs 治療後に Notch1 発現が上昇していた。さらに EGFR-TKIs 投与後に Notch1 の発現が上昇した患者では、Notch1 の発現が上昇しなかった患者に比べて、有意ではないが予後が悪い傾向があった。本研究の制限として、EGFR-TKIs 耐性後の二次変異である *EGFR*-T790M 検索目的の症例を使用しているため使用した EGFR-TKIs に osimertinib が含まれていないこと、症例数が少ないことがあげられる。このため今後 osimertinib 後の検体を含めたさらなるデータの蓄積が必要である。しかし本研究は我々の知る限り *EGFR* 遺伝子変異 NSCLC における Notch1 発現を評価し、EGFR-TKIs 治療前後の Notch1 の発現を比較した最初の研究である。さらに HES1 も EGFR-TKIs 投与前と比較して、EGFR-TKIs 投与後の組織で発現が増加しており、これは先行研究（Bousquet et al., 2020; Codony-Servat et al., 2019）と同様であった。こちらも予後と HES1 発現変化に有意な相関は得られなかったが HES1 発現の増加した症例では予後が不良な傾向にあった。

我々の免疫染色の結果は Notch 経路が EGFR-TKIs に対する抵抗性と関連しているという考えを支持するものである。

総括及び結論

本研究で得られた新知見として、

- Osimertinib と GSI を併用することで、*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株に対して相乗的に抗腫瘍効果をもたらすことを示した。
- Osimertinib DTP 細胞において *NOTCH1* および Notch 標的遺伝子（*HES1* および *HEY1*）の発現が上昇しており、Notch 経路が osimertinib DTP 細胞の発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。
- Osimertinib DTP 細胞に GSI を併用することで、osimertinib への薬剤耐性持続性状態が *in vitro* および *in vivo* で解除されることを示した。
- *EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者における EGFR-TKIs 治療前後での Notch1 と HES1 発現の変化を免疫染色にて評価し、予後との関連を評価した。発現の差と予後に有意な関係は認められなかったが、発現が増加した症例では予後が不良な傾向が認められた。

新知見の意義として、我々の知る限り本研究は osimertinib と GSI 併用による osimertinib DTP 細胞の増殖抑制効果を初めて報告するものである。また *EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞に対する osimertinib と GSI 併用による相乗効果も初めての報告である。近年、薬剤耐性における Notch 受容体ファミリーと、それに関連するシグナル経路が徐々に明らかになってきている。今回の我々の結果は、DTP 細胞における Notch 経路の関連を明らかにし EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者において osimertinib と GSI の併用が治療選択肢の一つとなりうることを示した。

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今野哲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。また日々の実験をサポートして頂いた前田真希枝実験助手に感謝の意を表します。北海道大学大学院医学研究院腫瘍内科学教室野口卓郎助教には *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌検体を一部ご提供頂きました。北海道大学病院医療・ヘルスサイエンス研究開発機構先端診断技術開発センター畑中佳奈子特任講師と北海道大学病院ゲノム･コンパニオン診断研究部門畑中豊特任准教授には免疫染色についてご助力を頂きました。この場を借りて感謝の意を表します。そして本研究を理解し、協力して頂いた患者の皆様に心から感謝します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aissa, A.F., Islam, A.B.M.M.K., Ariss, M.M., Go, C.C., Rader, A.E., Conrardy, R.D., Gajda, A.M., Rubio-Perez, C., Valyi-Nagy, K., Pasquinelli, M., *et al.* (2021). Single-cell transcriptional changes associated with drug tolerance and response to combination therapies in cancer. Nat. Commun. *12*, 1628.

Andersen, S., Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Stenvold, H., Busund, L.T., and Bremnes, R.M. (2011). Correlation and coexpression of HIFs and NOTCH markers in NSCLC. Anticancer Res. *31*, 1603-1606.

Arasada, R.R., Amann, J.M., Rahman, M.A., Huppert, S.S., and Carbone, D.P. (2014). EGFR blockade enriches for lung cancer stem-like cells through Notch3-dependent signaling. Cancer Res. *74*, 5572-5584.

Arasada, R.R., Shilo, K., Yamada, T., Zhang, J., Yano, S., Ghanem, R., Wang, W., Takeuchi, S., Fukuda, K., Katakami, N., *et al.* (2018). Notch3-dependent beta-catenin signaling mediates EGFR TKI drug persistence in EGFR mutant NSCLC. Nat. Commun. *9*, 3198.

Baumgart, A., Mazur, P.K., Anton, M., Rudelius, M., Schwamborn, K., Feuchtinger, A., Behnke, K., Walch, A., Braren, R., Peschel, C., *et al.* (2015). Opposing role of Notch1 and Notch2 in a Kras(G12D)-driven murine non-small cell lung cancer model. Oncogene *34*, 578-588.

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.

Blakely, C.M., Watkins, T.B.K., Wu, W., Gini, B., Chabon, J.J., McCoach, C.E., McGranahan, N., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Olivas, V.R., *et al.* (2017). Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. Nat. Genet. *49*, 1693-1704.

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.

Bousquet-Mur, E., Bernardo, S., Papon, L., Mancini, M., Fabbrizio, E., Goussard, M., Ferrer, I., Giry, A., Quantin, X., Pujol, J.L., *et al.* (2020). Notch inhibition overcomes resistance to tyrosine kinase inhibitors in EGFR-driven lung adenocarcinoma. J. Clin. Invest. *130*, 612-624.

Britson, J.S., Barton, F., Balko, J.M., and Black, E.P. (2009). Deregulation of DUSP activity in EGFR-mutant lung cancer cell lines contributes to sustained ERK1/2 signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. *390*, 849-854.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Cancer J. Clin. *68*, 394-424.

Brown, B.P., Zhang, Y.K., Westover, D., Yan, Y., Qiao, H., Huang, V., Du, Z., Smith, J.A., Ross, J.S., Miller, V.A., *et al.* (2019). On-target resistance to the mutant-selective EGFR inhibitor osimertinib can develop in an allele-specific manner dependent on the original EGFR-activating mutation. Clin. Cancer Res. *25*, 3341-3351.

Buck, E., Eyzaguirre, A., Rosenfeld-Franklin, M., Thomson, S., Mulvihill, M., Barr, S., Brown, E., O'Connor, M., Yao, Y., Pachter, J., *et al.* (2008). Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors. Cancer Res. *68*, 8322-8332.

Chen, Z., Chen, Q., Cheng, Z., Gu, J., Feng, W., Lei, T., Huang, J., Pu, J., Chen, X., and Wang, Z. (2020). Long non-coding RNA CASC9 promotes gefitinib resistance in NSCLC by epigenetic repression of DUSP1. Cell Death Dis. *11*, 858.

Chitale, D., Gong, Y., Taylor, B.S., Broderick, S., Brennan, C., Somwar, R., Goals, B., Wang, L., Motoi, N., Szoke, J., *et al.* (2009). An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. Oncogene *28*, 2773-2783.

Choi, B.H., Hur, E.M., Lee, J.H., Jun, D.J., and Kim, K.T. (2006). Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. J. Cell Sci. *119*, 1329-1340.

Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. *70*, 440-446.

Codony-Servat, J., Codony-Servat, C., Cardona, A.F., Giménez-Capitán, A., Drozdowskyj, A., Berenguer, J., Bracht, J.W.P., Ito, M., Karachaliou, N., and Rosell, R. (2019). Cancer stem cell biomarkers in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer. Clin. Lung Cancer *20*, 167-177.

Curry, C.L., Reed, L.L., Golde, T.E., Miele, L., Nickoloff, B.J., and Foreman,

K.E. (2005). Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. Oncogene *24*, 6333-6344.

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. J. Nat. Cancer Inst. *92*, 1355-1357.

Donnem, T., Andersen, S., Al-Shibli, K., Al-Saad, S., Busund, L.T., and Bremnes, R.M. Cancer. (2010). 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.

Echeverria, G.V., Ge, Z., Seth, S., Zhang, X., Jeter-Jones, S., Zhou, X., Cai, S., Tu, Y., McCoy, A., Peoples, M., *et al.* (2019). Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. Sci. Transl. Med. *11*, eaav0936.

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.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science. *316*, 1039-1043.

Ferguson, L.P., Diaz, E., and Reya, T. (2021). The role of the microenvironment and immune system in regulating stem cell fate in cancer. Trends Cancer *7*, 624-634.

Fisher, R.A., Gollan, B., and Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. Nat. Rev. Microbiol. *15*, 453-464.

Fiúza, U.M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. J. Endocrinol. *194*, 459-474.

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*, 725-737.

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.

Haagenson, K.K., and Wu, G.S. (2010). Mitogen activated protein kinase

phosphatases and cancer. Cancer Biol. Ther. *9*, 337-340.
Haruki, N., Kawaguchi, K.S., Eichenberger, S., Massion, P.P., Olson, S., Gonzalez, A., Carbone, D.P., and Dang, T.P. (2005). Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. Cancer Res. *65*, 3555-3561.
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.
Hata, A.N., Niederst, M.J., Archibald, H.L., Gomez-Caraballo, M., Siddiqui, F.M., Mulvey, H.E., Maruvka, Y.E., Ji, F., Bhang, H.E., Krishnamurthy, Radhakrishna, V., *et al.* (2016). Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. Nat. Med. *22*, 262-269.
Howlader, N., Forjaz, G., Mooradian, M.J., Meza, R., Kong, C.Y., Cronin, K.A., Mariotto, A.B., Lowy, D.R., and Feuer, E.J. (2020). The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. N. Engl. J. Med. *13*, 640-649.
Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. J. Cell Physiol. *194*, 237-255.
Kashima, Y., Shibahara, D., Suzuki, A., Muto, K., Kobayashi, I.S., Plotnick, D., Udagawa, H., Izumi, H., Shibata, Y., Tanaka, K., *et al.* (2021). Single-cell analyses reveal diverse mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. Cancer Res. *81*, 4835-4848.
Katoh, M., and Katoh, M. (2020). Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). Int. J. Mol. Med. *45*, 279-297.
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.
Kikuchi, H., Sakakibara-Konishi, J., Furuta, M., Kikuchi, E., Kikuchi, J., Oizumi, S., Hida, Y., Kaga, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., *et al.* (2018). Numb has distinct function in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Oncotarget *9*, 29379-29391.
Kobayashi, Y., Togashi, Y., Yatabe, Y., Mizuuchi, H., Jangchul, P., Kondo, C., Shimoji, M., Sato, K., Suda, K., Tomizawa, K., *et al.* (2015). EGFR exon 18 mutations in lung cancer: Molecular predictors of augmented sensitivity to

afatinib or neratinib as compared with first- or third-generation TKIs. Clin. Cancer Res. *21*, 5305-5313.

Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., et al. (2006). Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. Cancer Res. 66, 283-289.

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.

Konishi, J., Yi, F., Chen, X., Vo, H., Carbone, D.P., and Dang, T.P. (2010). Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. Oncogene *29*, 589-596.

Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. Cancer Res. *64*. 8919-8923.

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

Kurata, T., Tamura, K., Kaneda, H., Nogami, T., Uejima, H., Asai, Go Go, Nakagawa, K., and Fukuoka, M. (2004). Effect of re-treatment with gefitinib ('Iressa', ZD1839) after acquisition of resistance. Ann. Oncol. *15*, 173-174.

Kurppa, K.J., Liu, Y., To, C., Zhang, T., Fan, M., Vajdi, A., Knelson, E.H., Xie, Y., Lim, K., Cejas, P., *et al.* (2020). Treatment-induced tumor dormancy through YAP-mediated transcriptional reprogramming of the apoptotic pathway. Cancer Cell *37*, 104-122.e12.

Kwon, C., Qian, L., Cheng, P., Nigam, V., Arnold, J., and Srivastava, D. (2009). A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate. Nat. Cell Biol. *11*, 951-967.

Li, Y., Burns, J.A., Cheney, C.A., Zhang, N., Vitelli, S., Wang, F., Bett, A., Chastain, M., Audoly, L.P., and Zhang, Z.Q. (2010). Distinct expression profiles of Notch-1 protein in human solid tumors: Implications for development of targeted therapeutic monoclonal antibodies. Biologics. *4*, 163-71.

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. J. Exp. Med. *208*, 1931-1935.

Loda, M., Capodieci, P., Mishra, R., Yao, H., Corless, C., Grigioni, W., Wang, Y., Magi-Galluzzi, C., and Stork, P.J. (1996). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. Am. J. Pathol. *149*, 1553-1564.

Mehlman, C., Cadranel, J., Rousseau-Bussac, G., Lacave, R., Pujals, A., Girard, N., Callens, C., Gounant, V., Théou-Anton, N., Friard, S., *et al.* (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer: A multicentric retrospective French study. Lung Cancer 1*37*, 149-156.

Micchelli, C.A., Esler, W.P., Kimberly, W.T., Jack, C., Berezovska, O., Kornilova, A., Hyman, B.T., Perrimon, N., and Wolfe, M.S. (2003). Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in Drosophila. F.A.S.E.B. J. *17*, 79-81.

Mikubo, M., Inoue, Y., Liu, G., and Tsao, M.S. (2021). Mechanism of Drug Tolerant Persister Cancer Cells: The landscape and clinical implication for therapy. J. Thorac. Oncol. *16*, 1798-1809.

Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., Seto, T., Satouchi, M., Tada, H., Hirashima, T., *et al.* (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. *11*, 121-128.

Mitsui, E., Yoshida, S., Shinoda, Y., Matsumori, Y., Tsujii, H., Tsuchida, M., Wada, S., Hasegawa, M., Ito, A., Mino, K., *et al.* (2019). Identification of ryuvidine as a KDM5A inhibitor. Sci. Rep. *9*, 9952.

Mizugaki, H., Sakakibara-Konishi, J., Ikezawa, Y., Kikuchi, J., Kikuchi, E., Oizumi, S., Dang, T.P., and Nishimura, M. (2012). γ-Secretase inhibitor enhances antitumour effect of radiation in Notch-expressing lung cancer. Br. J. Cancer *106*, 1953-1959.

Mok, T.S., Wu, Y.L., Ahn, M.J., Garassino, M.C., Kim, H.R., Ramalingam, S.S., Shepherd, F.A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W.S., *et al.* (2017). Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. N. Engl. J. Med. *376*, 629-640.

Nagano, T., Tachihara, M., and Nishimura, Y. (2018). Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy. Cells *7*, 212.
Niederst, M.J., and Engelman, J.A. (2013). Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. Sci. Signal. *6*, re6.
Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. Oncogene *26*, 3203-3213.
Oxnard, G.R., Hu, Y., Mileham, K.F., Husain, H., Costa, D.B., Tracy, P., Feeney, N., Sholl, L.M., Dahlberg, S.E., Redig, A.J., *et al.* (2018). Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib. J.A.M.A. Oncol. *4*, 1527-1534.
Page, R.D., Drusbosky, L.M., Dada, H., Raymond, V.M., Daniel, D.B., Divers, S.G., Reckamp, K.L., Villalona-Calero, M.A., Dix, D., Odegaard, J.I., *et al.* (2022). Clinical outcomes for plasma-based comprehensive genomic profiling versus standard-of-care tissue testing in advanced non-small cell lung cancer. Clin. Lung Cancer *23*, 72-81.
Palomero, T., Sulis, M.L., Cortina, M., Real, P.J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S.L., *et al.* (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. Nat. Med. *13*, 1203-1210.
Papadimitrakopoulou, V.A., Han, J.Y., Ahn, M.J., Ramalingam, S.S., Delmonte, A., Hsia, T.C., Laskin, J., Kim, S.W., He, Y., Tsai, C.M., *et al.* (2020). Epidermal growth factor receptor mutation analysis in tissue and plasma from the AURA3 trial: Osimertinib versus platinum-pemetrexed for T790M mutation-positive advanced non-small cell lung cancer. Cancer *126*, 373-380.
Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., and Daly, R.J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. Biochem. J. *418*, 475-489.
Piotrowska, Z., Isozaki, H., Lennerz, J.K., Gainor, J.F., Lennes, I.T., Zhu, V.W., Marcoux, N., Banwait, M.K., Digumarthy, S.R., Su, W., *et al.* (2018). Landscape of acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant NSCLC and clinical validation of combined EGFR and RET inhibition with osimertinib and BLU-667 for acquired RET fusion. Cancer Discov. *8*, 1529-1539.
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. Clin. Cancer Res. *21*, 955-961.
Radtke, F., Schweisguth, F., and Pear, W. (2005). The Notch 'gospel' - Workshop on Notch signalling in development and cancer. EMBO Rep. *6*, 1120-1125.
Raha, D., Wilson, T.R., Peng, J., Peterson, D., Yue, P., Evangelista, M., Wilson, C., Merchant, M., and Settleman, J. (2014). The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. Cancer Res. *74*, 3579-3590.
Ramalingam, S.S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B.C., Gray, J.E., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., *et al.* (2020). Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. N. Engl. J. Med. *382*, 41-50.
Raoof, S., Mulford, I.J., Frisco-Cabanos, H., Nangia, V., Timonina, D., Labrot, E., Hafeez, N., Bilton, S.J., Drier, Y., Ji, F., *et al.* (2019). Targeting FGFR overcomes EMT-mediated resistance in EGFR mutant non-small cell lung cancer. Oncogene *38*, 6399-6413.
Rasul, S., Balasubramanian, R., Filipović, A., Slade, M.J., Yagüe, E., and Coombes, R.C. (2009). Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells. Br. J. Cancer *100*, 1879-1888.
Rothschild, S.I. (2015). Targeted therapies in non-small cell lung cancer-beyond EGFR and ALK. Cancers (Basel) *7*, 930-949.
Samon, J.B., Castillo-Martin, M., Hadler, M., Ambesi-Impiobato, A., Paietta, E., Racevskis, J., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Jakubczak, J., Randolph, S., *et al.* (2012). Preclinical analysis of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in combination with glucocorticoids in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Mol. Cancer Ther. *11*, 1565-1575.
Schmid, S., Li, J.J.N., and Leighl, N.B. (2020). Mechanisms of osimertinib resistance and emerging treatment options. Lung Cancer *147*, 123-129.
Schoenfeld, A.J., Chan, J.M., Kubota, D., Sato, H., Rizvi, H., Daneshbod, Y., Chang, J.C., Paik, P.K., Offin, M., Arcila, M.E., *et al.* (2020). Tumor analyses reveal squamous transformation and off-target alterations as early resistance mechanisms to first-line osimertinib in EGFR-mutant lung cancer. Clin. Cancer Res. *26*, 2654-2663.
Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A.B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A.T., Gettinger, S., Cosper, A.K., *et al.*

(2011). Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. Sci. Transl. Med. *3*, 75ra26.

Sequist, L.V., Yang, J.C., Yamamoto, N., O'Byrne, K., Hirsh, V., Mok, T., Geater, S.L., Orlov, S., Tsai, C.M., Boyer, M., *et al.* (2013). Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J. Clin. Oncol. *31*, 3327-3334.

Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., *et al.* (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. Nature *546*, 431-435.

Shah, K.N., Bhatt, R., Rotow, J., Rohrberg, J., Olivas, V., Wang, V.E., Hemmati, G., Martins, M.M., Maynard, A., Kuhn, J., *et al.* (2019). Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer. Nat. Med. *25*, 111-118.

Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., *et al.* (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. Cell *141*, 69-80.

Shen, S., Vagner, S., and Robert, C. (2020). Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. Cell *183*, 860-874.

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

Soria, J.C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K.H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., *et al.* (2018). Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. *378*, 113-125.

Sosa, M.S., Bragado, P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. Nat. Rev. Cancer *14*, 611-622.

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.

Takebe, N., Nguyen, D., and Yang, S.X. (2014). Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. Pharmacol. Ther. *141*, 140-149.

Tanaka, M., Setoguchi, T., Hirotsu, M., Gao, H., Sasaki, H., Matsunoshita, Y., and Komiya, S. (2009). Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. Br. J. Cancer *100*, 1957-1965.

Taniguchi, H., Yamada, T., Wang, R., Tanimura, K., Adachi, Y., Nishiyama, A., Tanimoto, A., Takeuchi, S., Araujo, L.H., Boroni, M., *et al.* (2019). AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. Nat. Commun. *10*, 259.

Thress, K.S., Paweletz, C.P., Felip, E., Cho, B.C., Stetson, D., Dougherty, B., Lai, Z., Markovets, A., Vivancos, A., Kuang, Y., *et al.* (2015). Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. Nat. Med. *21*, 560-562.

Trumpp, A., and Wiestler, O.D. (2008). Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin. Nat. Clin. Pract. Oncol. *5*, 337-347.

van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., *et al.* (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature *435*, 959-963.

Vicent, S., Garayoa, M., López-Picazo, J.M., Lozano, M.D., Toledo, G., Thunnissen, F.B., Manzano, R.G., and Montuenga, L.M. (2004). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. Clin. Cancer Res. *10*, 3639-3649.

Vinogradova, M., Gehling, V.S., Gustafson, A., Arora, S., Tindell, C.A., Wilson, C., Williamson, K.E., Guler, G.D., Gangurde, P., Manieri, W., *et al.* (2016). An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. Nat. Chem. Biol. *12*, 531-538.

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. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 17761-17766.

Wang, R., Yamada, T., Kita, K., Taniguchi, H., Arai, S., Fukuda, K., Terashima, M., Ishimura, A., Nishiyama, A., Tanimoto, A., *et al.* (2020). Transient IGF-

1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer. Nat. Commun. *11*, 4607.

Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Matsumoto, K., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Kayano, Y., Nishioka, Y., Sone, S., *et al.* (2009). Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Clin. Cancer Res. *15*, 6630-6638.

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. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106, 22293-22298.

Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., *et al.* (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors.
Nature *487*, 505-509.

Wu, S.G., Liu, Y.N., Tsai, M.F., Chang, Y.L., Yu, C.J., Yang, P.C., Yang, J.C., Wen, Y.F., and Shih, J.Y. (2016). The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. Oncotarget *7*, 12404-13.

Xie, M., Zhang, L., He, C.S., Xu, F., Liu, J.L., Hu, Z.H., Zhao, L.P., and Tian, Y. (2012). Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. J. Cell Biochem. *113*, 1501-1513.

Xie, M., He, C.S., Wei, S.H., and Zhang, L. (2013). Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. Eur. J. Cancer *49*, 3559-3572.

Yano, S., Nakataki, E., Ohtsuka, S., Inayama, M., Tomimoto, H., Edakuni, N., Kakiuchi, S., Nishikubo, N., Muguruma, H., and Sone, S. (2005). Retreatment of lung adenocarcinoma patients with gefitinib who had experienced favorable results from their initial treatment with this selective epidermal growth factor receptor inhibitor: a report of three cases. Oncol. Res. *15*, 107-111.

Yano, S., Wang, W., Li, Q., Matsumoto, K., Sakurama, H., Nakamura, T., Ogino, H., Kakiuchi, S., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., *et al.* (2008). Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. Cancer Res. *68*, 9479-

9487.
Ye, Y.Z., Zhang, Z.H., Fan, X.Y., Xu, X.L., Chen, M.L., Chang, B.W., and Zhang, Y.B. (2013). Notch3 overexpression associates with poor prognosis in human non-small-cell lung cancer. Med. Oncol. *30*, 595.
Yuan, X., Wu, H., Xu, H., Han, N., Chu, Q., Yu, S., Chen, Y., and Wu, K. (2015). Meta-analysis reveals the correlation of Notch signaling with non-small cell lung cancer progression and prognosis. Sci. Rep. *5*, 10338.
Zhou, C., Wu, Y.L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.Q., Wang, C., Zhang, S., Wang, J., Zhou, S., Ren, S., *et al.* (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol. *12*, 735-742.
Zou, B., Zhou, X.L., Lai, S.Q., and Liu, J.C. (2018). Notch signaling and non-small cell lung cancer. Oncol. Lett. *15*, 3415-3421.