



Title	小細胞肺癌におけるMidkineの発現と機能に関する研究
Author(s)	伊藤, 祥太郎
Description	配架番号 : 2933
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16542号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16542
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95979
Type	doctoral thesis
File Information	ITO_Shotaro.pdf



学 位 論 文

小細胞肺癌における Midkine の 発現と機能に関する研究

(Studies on the expression and function of Midkine in
small cell lung cancer)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

伊藤 祥太郎

学 位 論 文

小細胞肺癌における Midkine の 発現と機能に関する研究

(Studies on the expression and function of Midkine in
small cell lung cancer)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

伊藤 祥太郎

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	16 頁
実験結果	24 頁
考察	52 頁
総括および結論	55 頁
謝辞	56 頁
利益相反	57 頁
引用文献	58 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した。

1. Shotaro Ito, Jun Sakakibara-Konishi, Mineyoshi Sato, Tetsuaki Shoji, Megumi Furuta, Hirofumi Takahashi, Kosuke Tsuji, Daisuke Morinaga, Masahiro Kashima, Hidenori Kitai, Junko Kikuchi, Eiki Kikuchi, Kanako C Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Kyoko Hida, Takuro Noguchi, Satoshi Konno
Midkine promotes tumor growth and attenuates the effect of cisplatin in small cell lung cancer
Cancer Medicine

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 伊藤 祥太郎、榊原 純、高橋 宏典、辻 康介、森永 大亮、嘉島 相裕、庄司 哲明、北井 秀典、菊地 英毅、菊地 順子、前田 真希枝、畑中 佳奈子、畑中 豊、今野 哲
小細胞肺癌における MDK の機能の検討
第 64 回日本肺癌学会学術集会、2023 年 11 月 3 日、千葉
2. Shotaro Ito, Jun Sakakibara-Konishi, Megumi Furuta, Tetsuaki Shoji, Mineyoshi Sato, Hirofumi Takahashi, Kosuke Tsuji, Daisuke Morinaga, Masahiro Kashima, Hidenori Kitai, Junko Kikuchi, Eiki Kikuchi, Kanako C Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Satoshi Konno
MDK promotes tumor growth and cisplatin resistance through AKT pathway activation in small cell lung cancer
第 21 回日本臨床主要学会、2024 年 2 月 22 日、名古屋
3. 伊藤 祥太郎、榊原 純、佐藤 峰嘉、庄司 哲明、高橋 宏典、辻 康介、森永 大亮、嘉島 相裕、古田 恵、北井 秀典、菊地 英毅、菊地 順子、前田 真希枝、畑中 佳奈子、畑中 豊、今野 哲
小細胞肺癌における MDK の機能の検討
第 64 回日本呼吸器学会学術講演会、2024 年 4 月 7 日、横浜

要旨

【背景と目的】小細胞肺癌（small cell lung carcinoma : SCLC）は肺癌の 15%を占める。SCLC は増殖が早く多くの症例において診断時に転移を伴っており、また治療後一時的に奏効を認めても再発し治療抵抗性となるため予後不良である。近年 SCLC は転写因子の発現によりサブグループ分類され、そのそれぞれに特異的な薬剤脆弱性があることが判明している。しかしながら現状 SCLC における targeted therapy は確立されておらず、SCLC における unmet needs である。近年、ヘパリン結合性成長因子である Midkine（MDK）は様々な悪性腫瘍において発現亢進が認められることが報告されている。MDK は可溶性分泌タンパク質であり、血清 MDK 値の測定が悪性腫瘍の診断マーカーとして着目されている。また MDK は様々な癌種において細胞増殖亢進、上皮間葉転換亢進、化学療法耐性亢進など多くの影響を与えることが報告されており治療ターゲットとしても注目されている。さらに、MDK は様々な化学療法の耐性に関連するとされ、SCLC の標準治療薬である cisplatin の耐性獲得に関連しているという報告も存在する。しかしながら SCLC における MDK の発現や機能、血清 MDK 値上昇の有無についての報告は極めて限られている。現状唯一の SCLC における MDK についての報告は、マウス SCLC モデルにおいて非神経内分泌（Non-NE）型 SCLC が MDK を分泌することで神経内分泌（NE）型 SCLC の増殖を増強することを示唆した報告のみである。本研究では小細胞肺癌における MDK の発現や血清 MDK 値上昇の有無について、及び小細胞肺癌における MDK の腫瘍への影響について評価した。

【対象と方法】2020 年から 2023 年に北海道大学病院呼吸器内科にて治療導入した 45 人の SCLC 患者から血清を採取し ELISA 法にて血清 MDK 値を解析した。血清は初回治療前、化学療法 2 コース後、4 コース後、腫瘍増大時に解析した。治療前血清 MDK 値の中央値を cut off 値として高値群を High MDK expression group、低値群を Low MDK expression group と定義した。また SCLC 腫瘍量の評価として治療前の標的病変の長径和である baseline sum of the longest diameter of the target lesion（BSLD）を使用し腫瘍量と血清 MDK 値の相関を評価した。またコントロールとして 10 名の健常人より血清採取し血清 MDK 値を測定した。北海道大学病院において外科的切除された SCLC4 検体を用い、MDK、achaete-scute complex-like-1（ASCL1）、Neurogenic differentiation 1（NEUROD1）、POU Class 2 Homeobox 3（POU2F3）、yes-associated protein 1（YAP1）、Synaptophysin（SYP）、RE1-silencing transcription factor（REST）の免疫組織染色を行なった。次に SCLC 細胞株を用いて MDK 阻害薬及び MDK の shRNA による knockdown（shMDK）及び MDK プラスミド導入による overexpression を行い、MDK の腫瘍増殖、遊走能における機能変化及び cisplatin の効果に与える影響を確認した。細胞増殖能及び MDK 阻害薬や cisplatin の効果は MTT assay を用いて測定した。cisplatin と MDK

阻害薬の併用効果は CalcuSyn2.1 software を使用した combination index 法を用いて評価した。SCLC 細胞株の MDK の発現の評価はウェスタンブロット法、quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法、細胞培養上清液に対しての ELISA 法で評価した。SCLC 細胞株の ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1、SYP、REST の発現及び細胞内シグナルの変化はウェスタンブロット法で評価した。MDK と Notch 経路の関連についてもウェスタンブロット法で評価した。*in vivo* モデルとして 5 週齢の雌のヌードマウス (nu+/nu+) に SCLC 細胞株を皮下注射してゼノグラフトモデルを作成した。MDK の sh RNA による knockdown した細胞株を皮下注射し腫瘍体積を測定した。また MDK 強発現細胞株を皮下注射し腫瘍が規定の大きさに達した後、cisplatin (1mg/kg/日) を週 1 回腹腔内注射、MDK 阻害薬 (9mg/kg/日) を週 3 回腹腔内注射し腫瘍体積を測定した。

【結果】SCLC 患者の血清 MDK 値は健常人と比較して有意に高値であった。血清 MDK 値は BSLD 高値集団において BSLD 低値集団と比較し有意に上昇していた。High MDK expression group において血清 MDK 値は治療により低下し、病状増悪時に増加する傾向を認めた。外科的切除された SCLC4 検体による解析では 1 症例において MDK は広範な腫瘍細胞において強発現を認め、残りの 3 症例では MDK 発現陽性細胞と陰性細胞が混在していた。一方で正常肺組織では MDK の発現は認められなかった。SCLC 手術検体に対する免疫組織染色及び SCLC 細胞株に対するウェスタンブロットの結果からは MDK の発現と SCLC の特徴との間に明らかな相関関係は認められなかった。SCLC 細胞株において MDK を knockdown すると細胞増殖能及び遊走能は低下し cisplatin の効果は増強した。逆に MDK を overexpression すると細胞増殖能及び遊走能は増強し、cisplatin の効果は減弱した。MDK 発現を認める SCLC 細胞において cisplatin と MDK 阻害薬は相乗効果を認めた。SCLC 細胞株に MDK を knockdown するとリン酸化 AKT (P-AKT) の発現は低下し、MDK を overexpression することで P-AKT の発現は上昇していた。ゼノグラフトモデルにおいて、shMDK により MDK を knockdown することで腫瘍増殖は抑制された。また cisplatin と MDK 阻害薬は単剤でも腫瘍増殖を抑制したが、併用によりその効果は増強された。

【考察】我々は SCLC 細胞が MDK を発現・分泌し SCLC の細胞増殖や cisplatin 耐性を増強することを *in vitro* 及び *in vivo* の両方で示した。本研究は SCLC における MDK の発現及び機能を評価した初めての報告である。SCLC はサブグループ毎に特異的な薬剤脆弱性が認められるにも関わらずその腫瘍不均一性のために targeted therapy の確立には至っていない。マウスモデルでは MDK は Non-NE 型 SCLC により分泌され NE 型 SCLC の増殖を亢進させることが示唆されていたため、我々は MDK をターゲットにすることで分泌細胞である Non-NE 型 SCLC 及び MDK のターゲットとなる NE 型 SCLC の両方を治療できる可能性があると考えた。しかしながら本研究

においては MDK の発現と SCLC の NE 傾向やサブグループの間に明らかな相関は認められなかった。本研究は細胞株・手術検体ともに少数での検討であり、今後さらなる検討が求められる。我々は健常人と比較して SCLC 患者にて血清 MDK 値が上昇しており、その値は腫瘍量と相関することを明らかにした。また、治療経過中腫瘍増大を認める前に血清 MDK 値の上昇を認める症例が存在することも判明した。血清 MDK 値は悪性腫瘍の診断や予後マーカーとして注目されているが SCLC においても有望である可能性がある。MDK は悪性腫瘍において AKT 経路や ERK 経路などの細胞内シグナルの活性化をすることで細胞増殖亢進・細胞遊走亢進など様々な機能を示すことが知られている。また AKT 経路は SCLC において腫瘍不均一性を亢進し化学療法の耐性を誘導することが知られている。我々は SCLC において MDK が AKT 経路を活性化することで細胞増殖能及び細胞遊走能を亢進し、cisplatin の耐性能を増強することを示した。また、*in vitro* 及び *in vivo* の両方において MDK 阻害薬は SCLC の標準治療薬である cisplatin と相乗効果を示すことを明らかにした。以上より MDK は SCLC の治療ターゲットになり得る可能性があり今後さらなる検証が求められると考える。

【結論】 SCLC において MDK は AKT 経路の活性化を介して細胞増殖や cisplatin 耐性を誘導し、治療ターゲットになり得る可能性がある。

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。

ASCL1	achaete-scute complex-like-1
AKT	protein kinase B
AURK	aurora kinase
BSLD	baseline sum of the longest diameter of the target lesion
c-caspase3	cleaved caspase3
c-PARP	cleaved poly adenosin diphosphate-ribose polymerase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
ES-SCLC	Extensive-stage small cell lung cancer
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed and paraffin-embedded
HES1	hairy and enhancer of split 1
HEY1	hairy/enhancer of split related with YRPW 1
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 α
ICI	immune checkpoint inhibitor
iMDK	MDK inhibitor
LS-SCLC	Limited-stage small cell lung cancer
LRP-1	low-density lipoprotein receptor-1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDK	MDK
MDSC	meloid-derived suppressor cell
mTOR	mammalian target of rapamycin
NE	neuroendocrine
NEUORD1	Neurogenic differentiation 1
NICD	Notch intracellular domain
Non-NE	Non-neuroendocrine
NSCLC	non-small cell lung carcinoma
NF-kB	nuclear factor <i>kappa</i> -light-chain-enhancer of activated <i>B</i> cells
OE	overexpression
OS	overall survival
PARP	poly adenosin diphosphate-ribose polymerase

PBS	phosphate buffered saline
PD-L1	Programmed death ligand 1
PFS	progression-free survival
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
POU2F3	POU Class 2 Homebox 3
PTP ζ	receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ
P-AKT	Phosphorylated-protein kinase B
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RECIST	evaluation criteria for solid tumors
REST	RE1-silencing transcription factor
SCLC	small cell lung carcinoma
shRNA	short hairpin RNA
SYP	synaptophysin
s-MDK	serum MDK concentration
TBST	tris buffered saline with tween 20
TME	tumor microenvironment
YAP1	yes-associated protein 1

緒言

1) 小細胞肺癌について

肺癌は世界中で毎年約 179 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(Ferlay et al, 2021)。肺癌の約 13-15%を占める小細胞肺癌 (small cell lung carcinoma : SCLC) は増殖速度が早く診断時に転移を伴うことが多く、また化学療法に奏効しても速やかに耐性を獲得するため予後不良である。(Gazdar et al, 2017; Megyesfalvi et al, 2023)。SCLC の腫瘍遺伝子変異プロファイリングよりタバコに含まれる発癌物質が発症に関与していることが判明しており、また、腫瘍抑制遺伝子である TP53 と RB1 遺伝子の機能喪失が遺伝子的な特徴とされている (George et al, 2015)。SCLC は病変が片側胸郭に限定され縦隔肺門リンパ節病変も含めて根治照射可能な限局型小細胞肺癌 (Limited-stage small cell lung cancer: LS-SCLC) と広範囲に病変が認められる進展型小細胞肺癌 (Extensive-stage small cell lung cancer: ES-SCLC) に区別される(Jackman and Johnson, 2005)。LS-SCLC の標準治療はこの 20 年以上にわたり cisplatin+etoposide をベースとした放射線化学療法であり、その生存期間 (overall survival: OS) 中央値は 25-30 ヶ月程度とされている(Bogart et al, 2022)。一方で ES-SCLC においては 30 年以上にわたりプラチナ化学療法 (cisplatin あるいは carboplatin) に etoposide を併用した治療が標準療法でありその OS 中央値は 10 ヶ月程度と不良であった(Rossi et al, 2012)。最近、標準療法であるプラチナ化学療法と etoposide に免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) である Atezolizumab あるいは Durvalumab を上乗せし、化学療法終了後も ICI による維持療法を行うことで OS 中央値が 10 ヶ月程度から 13 ヶ月程度まで延長することが示され ES-SCLC の新たな標準治療となったが、長期奏効を得られる患者はごく限られた一部の集団のみであるのが現状である(Goldman et al, 2021; Liu et al, 2021)。Driver 遺伝子変異毎に targeted therapy が確立するなど治療の進歩が著しい非小細胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma : NSCLC) (Tan and Tan, 2022)と比較すると ES-SCLC の予後は不良であり、さらなる治療の進歩が求められている。

2) SCLC におけるサブグループ及び targeted therapy について

SCLC は現在も臨床的には単一の疾患として治療として行われている。その一方で SCLC は 4 つの転写因子 achaete-scute complex-like-1 (ASCL1)、Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1)、POU Class 2 Homeobox 3 (POU2F3)、yes-associated protein 1 (YAP1) の発現によりサブグループ分類されることがわかってきた。ASCL1 または NEUROD1 を優位に発現している SCLC が神経内分泌腫瘍の特徴を持つ一方で、それらの発現が乏しい腫瘍では SCLC にもかかわらず神経内分泌形質が乏しいことが知られている。(Rudin et al, 2019) (図 1)。ASCL1 優位の神経内分泌型 (neuroendocrine : NE) SCLC に

Myc や Notch 経路が活性化されることでより非神経内分泌（non-neuroendocrine : Non-NE）形質の強い腫瘍へ変化していくことが報告されており、SCLC は同一の症例においても複数の性質・サブグループを用いる非常に不均一性の強い腫瘍であるということが知られている(Ireland et al, 2020)（図 2）。

近年それぞれの SCLC のサブグループには特異的な薬剤脆弱性があることがわかってきた。ASCL1 優位の SCLC では BCL2 阻害薬、NEUROD1 優位の SCLC では Aurora kinase (AURK) 阻害薬、POU2F3 優位の SCLC では poly adenosin diphosphate-ribose polymerase (PARP) 阻害薬、ASCL1/NEUROD1/POU2F3 陰性の Inflamed type と呼ばれる集団には ICI の効果が期待できるという報告が存在する(Frese et al, 2021)（図 3）。その一方で、おそらくは SCLC が持つ高い不均一性などが原因で SCLC に対する targeted therapy は実用化には至っていないのが現状である(Ireland et al, 2020; Zhang et al, 2018b)。SCLC に対する targeted therapy の確立は unmet needs であると言える。我々は広いサブグループ、あるいは神経内分泌形質の有無にかかわらず SCLC の増殖に作用する物質があれば SCLC の targeted therapy の候補物質になり得ると考えた。

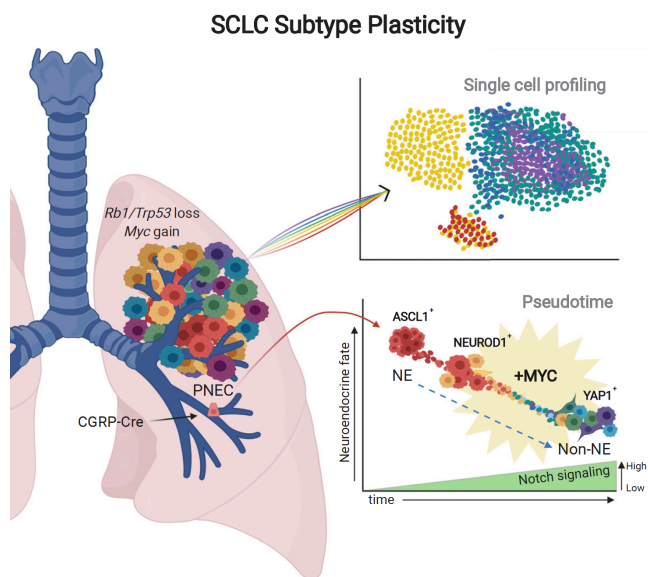
(図 1)

	Classification			
	NE		Non-NE	
Carney et al. (1985)	Classic	Variant		
Poirier et al. (2013)	ASCL1-high	NeuroD1-high		
Poirier et al. (2015)	SC-E2	SC-E1	SQ-P	
George et al. (2015)	Group II		Group I	
Borromeo et al. (2016)	ASCL1-high	NeuroD1-high	Double negative	
Mollaoglu et al. (2017)	Group A	Group C	Group B	
McColl et al. (2017)	INSM1		YAP1	
Huang et al. (2018)				POU2F3
Wooten et al. (2018)	NE	NEv2	NEv1	Non-NE
Proposed nomenclature	SCLC-A		SCLC-N	SCLC-Y SCLC-P

SCLC のサブグループ分類の変遷。

参考文献：Rudin CM *et al*, 2019 より引用

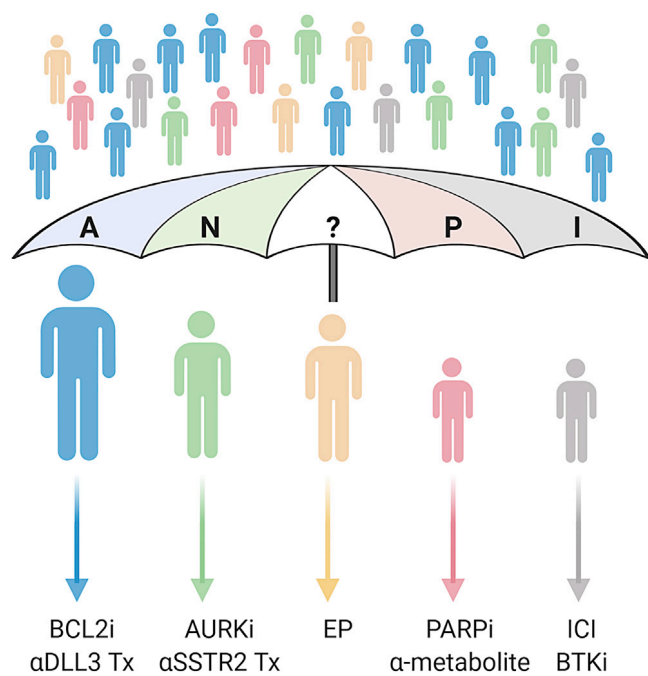
(図 2)



SCLC の不均一性と可塑性。

参考文献：Ireland AS, *et al. Cancer Cell* (2020)より引用

(図 3)



SCLC におけるサブグループ毎の薬剤脆弱性。

参考文献：Fress KK, *et al. Cancer Cell* (2021)より引用

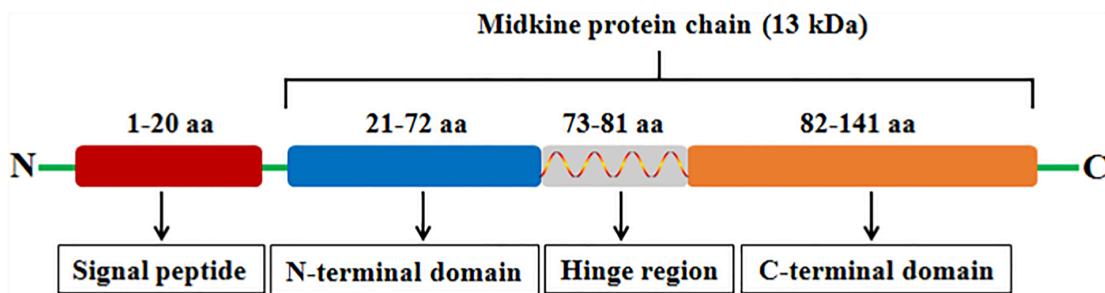
3) Midkine について

ヘパリン結合性成長因子である Midkine (MDK) は 1988 年にマウス胎児性癌におけるレチノイン酸誘導性遺伝子産物として発見された(Kadomatsu et al, 1988)。MDK は同じくヘパリン結合性成長因子である pleiotrophin とタンパク質ファミリーを形成しており、この 2 つの物質は 50% の配列が同一である(Muramatsu, 1993)。ヒト MDK 遺伝子は 4 つの coding exon からなり、そのプロモーター領域には nuclear factor- κ B (NF- κ B) や hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) の機能的結合部位が存在しており、炎症や低酸素条件が MDK の発現増加と関連しているとされている(Kaname et al, 1993; Muramatsu, 2014; Uehara et al, 1992)。ヒトの MDK タンパク質は 121 のアミノ酸残基からなり、シグナル配列切断後の分子量は 13kDa である。(Tsutsui et al, 1991)。MDK は Signal peptide、N-terminal domain、a hinge region、C-terminal domain の 4 領域からなるが、C-terminal domain が MDK の機能に関与し、N-terminal domain はその安定性及び二量体形成に関与するとされている(Fabri et al, 1993; Kojima et al, 1997; Muramatsu, 2002) (図 4)。

MDK は胚発生期、特に妊娠中期に高発現し神経発生、上皮間葉転換、中胚葉リモデリングに関与していることが示唆されており、実際に血清 MDK 値は幼児において最も高く、年齢とともに減少していくことが知られている(Jee et al, 2019; Kadomatsu et al, 1990; Mitsiadis et al, 1995)。一方で成人においては、気道上皮や皮膚において発現を認めるという報告や(Frick et al, 2011; Nordin et al, 2013a)、上記の通り低酸素や炎症によって発現が誘導されることが示されており、嚢胞性線維症や心筋虚血で発現亢進が認められるという報告も存在する(Nordin et al, 2013b; Takenaka et al, 2009)。

MDK の受容体としては receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ (PTP ζ)、low-density lipoprotein receptor-1 (LRP-1)、syndecan、integrin、anaplastic lymphoma kinase (ALK)、Notch2 などが報告されている。MDK は受容体と結合後 protein kinase B (AKT) や nuclear factor *kappa*-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) などの下流シグナルを活性化し様々な生物学的機能を示すことが知られている(Cohen et al, 2012; Huang et al, 2008; Lee et al, 2012; López-Valero et al, 2020; Muramatsu et al, 2004) (図 5)。また、MDK は受容体を介したシグナル伝達に加えて核内で直接生物学的効果を発揮できるという報告も存在する(Dai et al, 2008; Salama et al, 2001)。

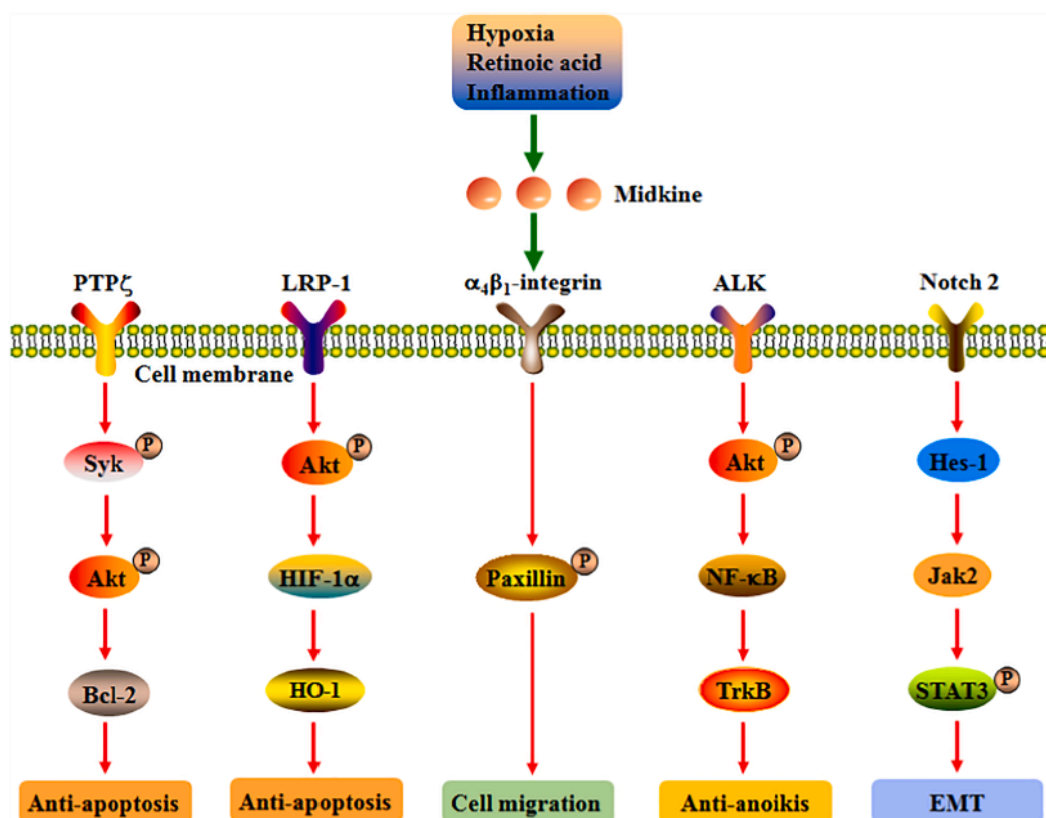
(図 4)



MDK タンパク質の構造。

参考文献：Zhang,ZZ. *et al. Clin Chin Acta* (2021)より引用

(図 5)



MDK の受容体と下流シグナル。

参考文献：Zhang,ZZ. *et al. Clin Chin Acta* (2021)より引用

4) 悪性腫瘍における MDK

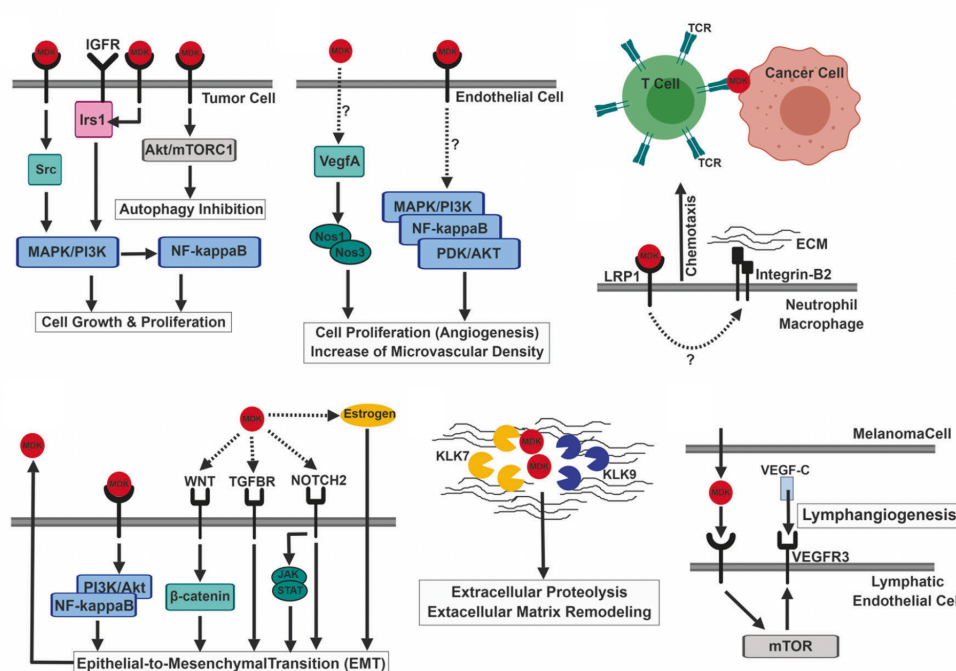
MDK は様々な悪性腫瘍において発現が亢進していることが知られている(Garver et al, 1994; Konishi et al, 1999; Ye et al, 1999)。また血漿分泌タンパク質であるため様々な悪性腫瘍患者の血中や尿中で濃度の上昇が認められることが報告されており、(Ikematsu et al, 2000)血清や尿中の MDK は悪性腫瘍の診断や予後マーカーとしても着目されている(Jing et al, 2017; Zhang et al, 2018a)。実際に非小細胞肺癌においては結核や肺良性腫瘍と比較してより高い血清 MDK 値を示し、その値は腫瘍量と相関傾向を認めるとい報告が存在する(Stern et al, 2021; Xia et al, 2016)。非小細胞肺癌以外でも膀胱癌や乳癌など様々な悪性腫瘍において診断や予後のマーカーとして注目されている(Ibusuki et al, 2009; Vu Van et al, 2016)。

MDK は悪性腫瘍においても AKT 経路や NF- κ B 経路などの細胞内シグナルを活性化することで細胞増殖、細胞遊走、上皮間葉転換、血管新生などの悪性腫瘍の特徴を増強させることが知られている(Filippou et al, 2020; Grupp et al, 2018; Lautz et al, 2018; Lorente et al, 2011a; Owada et al, 1999) (図 5,6)。

もう 1 つの悪性腫瘍における着目すべき MDK の機能として、様々な機序を介した化学療法耐性増強がある。例を挙げれば、Notch1/p-JNK 経路を活性化することで細胞増殖や幹細胞能を増強し化学療法耐性を獲得するという報告や(Yu et al, 2022)、AKT 経路や extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 経路の活性化や、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) を促進することで adriamycin や cisplatin などの化学療法の耐性を獲得するという報告が存在する(Xu et al, 2012; Yang et al, 2022)。また MDK は小細胞肺癌を含む様々な悪性腫瘍において標準治療となっている ICI に対して、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment : TME) において骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell : MDSC) を刺激し殺細胞 T リンパ球の機能を抑制することで耐性を誘導することが報告されている(Cerezo-Wallis et al, 2020; Ding et al, 2023)。基礎研究レベルにおいては標準治療薬に MDK 阻害を併用した治療法の有用性は複数報告されており(Dai et al, 2007; Tian et al, 2017)、cisplatin を含む白金製剤と ICI が標準治療である SCLC において MDK が機能しているのであれば、標準治療と MDK 阻害薬の併用療法は有望な治療となり得る可能性がある。

このように様々な悪性腫瘍において MDK の発現や生物学的な機能が示されている一方で小細胞肺癌における MDK の発現や機能に関する研究はほとんど存在しない。我々が知る限り、マウスモデルにおいて Non NE 型 SCLC が NE 型 SCLC の増殖を促進する trophic 効果を示し、その原因物質の候補が MDK であることを示唆した報告が SCLC における唯一の MDK に関する報告である(Lim et al, 2017) (図 7)。

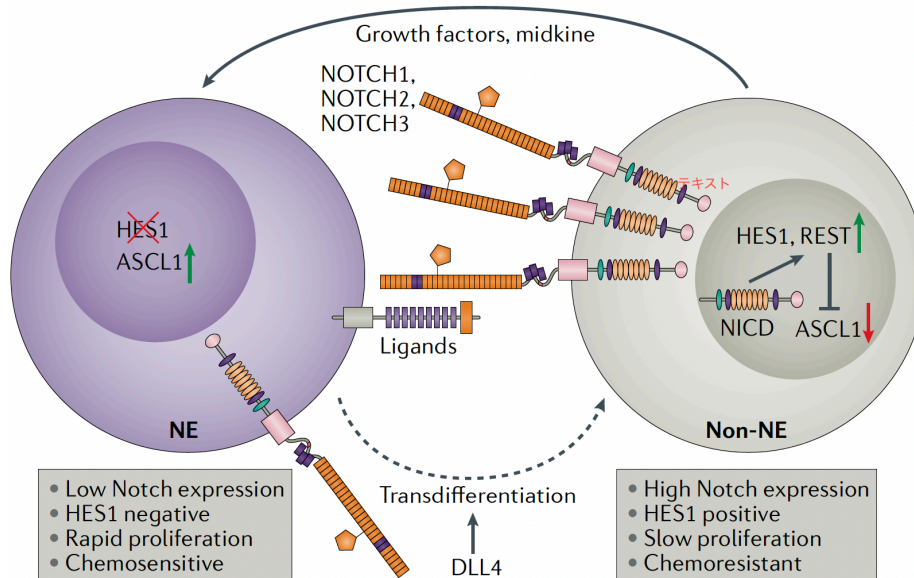
(図 6)



悪性腫瘍における MDK の機能のまとめ。

参考文献：Filippou PS. *et al. Oncogene*.(2020)より引用

(図 7)



SCLC における MDK の機能の仮説。

Non-NE 型 SCLC は MDK を分泌して NE 型 SCLC の増殖を促進する可能性がある。

参考文献：Majumder S. *et al. Nat Rev Drug Discov*.(2021)より引用

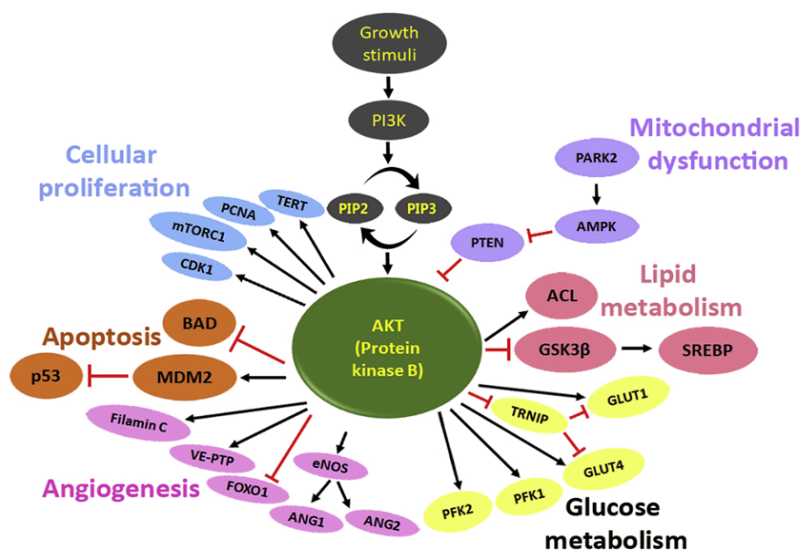
5) MDK 阻害薬について

低分子 MDK 阻害薬 (iMDK) は *in vitro* 及び *in vivo* の両方において MDK タンパク発現を抑制することが確認されている薬剤である(Hao et al, 2013; Masui et al, 2016)。主に悪性腫瘍に対する基礎実験において使用されている薬剤であり、*in vitro*・*in vivo* の両方において MDK の発現抑制を介した AKT 経路を抑制による細胞増殖能抑制・アポトーシス誘導効果や CD31 の発現抑制による血管新生抑制による殺細胞効果が示されている(Hao et al, 2013; Masui et al, 2016)。

6) AKT 経路について

AKT は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) における PI3K のエフェクターとして知られており、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌など様々な癌種の少なくなり割合の症例にて発現亢進が認められることが知られている (Bellacosa et al, 2005; Liu et al, 2018)。AKT 経路においては多くの oncoprotein 及びがん抑制因子が交差しており、細胞増殖、分化、アポトーシスの抑制、Actin 骨格の再配列、細胞遊走など多くの機能を示す(Li et al, 2005; Revathidevi and Munirajan, 2019; Ward et al, 2011)(図 8)。興味深い知見として LS-SCLC の診断時と再発時の検体及び cell free DNA、ES-SCLC のうち化学療法感受性を認めた患者集団と化学療法抵抗性であった患者集団の検体に対してそれぞれ whole-exome sequencing とプロテオミクス解析を行なったところ、SCLC の化学療法耐性集団においては AKT 経路の遺伝子に変異や copy number variant が認められたという報告が存在する(Jin et al, 2022)。また、SCLC において PI3K/AKT/mTOR 経路が活性化すると NE 型である浮遊型の SCLC は化学療法により耐性とされる Non-NE 型である半接着/接着型の SCLC へと性質が変化することが報告されており、PI3K/AKT/mTOR 経路は SCLC における不均一性の上昇や化学療法耐性獲得に重要な役割を示すと言える。実際に SCLC において化学療法に AKT 阻害薬を併用すると相乗的に殺細胞効果を示しており有望な治療ターゲットであると言える (Li et al, 2021)。一方で AKT 経路は上記の通り糖代謝など正常組織においても細胞生存に重要な役割を担っており、乳癌領域において適応となった AKT 阻害薬 Capivasertib は Grade3 以上の毒性として高血糖 (20-24%) や下痢 (14-17%) などが認められ決して毒性が低い薬剤とは言えないのが現状である(Andrikopoulou et al, 2022)。

(図 8)



悪性腫瘍における AKT の機能。

参考文献：Revathidevi S and Munirajan AK. *Semin Cancer Biol.*(2019)より引用

7) 本研究の仮説

SCLC はサブグループ毎に薬剤脆弱性があるにも関わらず、その高い不均一性のために Targeted therapy は確立していない。ヒト SCLC における MDK の発現や機能を評価した報告は存在しないが、MDK の発現が認められるのであればその抑制により細胞増殖・細胞遊走能の低下や化学療法の効果の向上が期待できる。また SCLC 腫瘍細胞で MDK の発現が認められれば血清 MDK 値は SCLC の腫瘍量を反映し腫瘍マーカーのような役割を示せる可能性がある。

8) 本研究の目的

SCLC の手術検体及び細胞株における MDK、SCLC のサブグループマーカー (ASCL1/NEUROD1/POU2F3/YAP1)、NE マーカー-Synaptophysin (SYP)、Non-NE マーカー-RE1-silencing transcription factor (REST) の発現を評価し SCLC における MDK の発現と MDK 発現 SCLC 細胞の性質を評価する。SCLC 患者における血清 MDK 値を ELISA 法にて測定し、健常人との比較や腫瘍量との相関関係の有無の評価を行う。MDK を overexpression または knockdown し、SCLC の細胞増殖能や細胞遊走能、細胞内シグナルが変化するかを評価する。SCLC の標準治療薬であり MDK による耐性獲得の報告がある cisplatin と iMDK の併用効果を評価する。

実験方法

患者情報及び臨床検体

2020年4月から2023年12月までに北海道大学病院病理診断科にてSCLCの病理診断を受け、北海道大学病院呼吸器内科にて化学療法あるいは放射線化学療法が適応となる症例の血清を採取しELISA法を用いて血清MDK濃度を測定した。ICI併用患者も許容した。患者血清は診断後初回治療導入前、化学療法2コース投与後、4コース投与後、腫瘍増大時に採取し分注の上-30℃で保管した。一部の症例は術後再発症例であり、MDK、ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1、SYP、RESTの発現を免疫組織染色にて検討した。人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守し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SCLCと確定し、治療導入時に病変が残存しており、細胞障害性化学療法やICIを使用予定の患者とした。最終的に血清MDK濃度の測定には45症例が組み入れられた。免疫染色の対象となった術後再発患者は4症例であった。SCLC患者血清MDK値の比較対照群として10人の健常人から血清を採取した。健常人の年齢中央値は35.6歳で喫煙歴や悪性腫瘍治療歴はなかった。免疫組織染色で使用する切片はFormalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) 組織ブロックを5µm厚にスライスし、コートスライドグラスに固着して作成した。

SCLC患者の腫瘍量はTNM病期分類(8版)を用いた病期及びbaseline sum of the longest diameter of the target lesion (BSLD)を使用して評価した。BSLDはevaluation criteria for solid tumors (RECIST) に従い最大で5つ、1臓器からは2病変までの標的病変の長径和(リンパ節病変は短径和)の径和で評価した。BSLDの中央値(80.12 mm)をcut offとし高腫瘍量集団と低腫瘍量集団の2群に分類して血清MDK濃度の比較を行った。

細胞株と薬剤

細胞株はSCLC細胞株(SBC5、SBC3、MS1、RERF-LC-MA、H1688、H592、H209、H82、H69)を用いた。SBC5、SBC3、MS1、RERF-LC-MAはJapanese Collection of Research Bioresources Cell Bank(大阪、日本)から購入し、H1688、H69、H82、H209、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℃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SBC5、SBC3、RERF-LC-MAを、Roswell Park Memorial Institute mediumでMS1、H1688、H592、H209、H82、H69はそれぞれ

培養を行なった。細胞株の培養上清液は採取後分注し-30°Cで保管した。

iMDK は Merck (508052, Merck, Darmstadt, Germany)、Recombinant human Midkine (rhMDK) は Peprotech (450-16, Rocky Hill, NJ, USA)、cisplatin は日本化薬株式会社（東京、日本）より購入した。

Cisplatin 耐性細胞株

SCLC 細胞株を培養する際に培地に低濃度のシスプラチンを添加してシスプラチン耐性を誘導し、シスプラチン耐性細胞を作成した。シスプラチン濃度は 0.15 mol/L から開始し、2.0 mol/L まで漸増した。その後、2.0 mol/L で 3 ヶ月間以上培養して得られた細胞をシスプラチン耐性細胞として使用した。得られたシスプラチン耐性細胞は、親細胞の名称の後に R を付して命名した。シスプラチン耐性小細胞肺癌細胞 SBC5R、SBC3R はそれぞれ親細胞 SBC5、SBC3 から作成した。

血清及び細胞上清液の MDK 濃度の測定

SCLC 患者及び SCLC 細胞株の培養上清液を abcam 社の ELISA キット (ab193761: Abcam, Cambridge, UK) を用いて測定した。ELISA 法は abcam 社のプロトコールに従い施行した。

キットに含まれる Pre-coated 96 well マイクロプレートの所定の well に 50 µl のスタンダード及びサンプルを投与した。次に 50 µl の capture antibody、detector antibody、抗体希釈液からなる抗体カクテルを各 well へ 50 µl ずつ投与した。室温で 400 rpm の設定の plate shaker を用いて 1 時間振盪した。各 well を wash buffer を用いて 3 回洗浄した後、100 µl の TMB 溶液を投与し室温暗所で 10 分間振盪した。100 µl の stop solution を投与し Thermo Fisher Scientific 社のマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。血清 MDK 値の中央値 (99pg/ml) を cut off 値とし、それより高い集団を High MDK expression group、低い集団を血清 Low MDK expression group と定義した。

手術検体及び xenograft model 腫瘍検体の免疫組織染色

手術検体に対して MDK、ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1、SYP、REST の発現を、xenograft model の腫瘍検体に対して MDK と phospho (P) -AKT の発現を評価した。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、pH6 のクエン酸 Na を用いたオートクレープで抗原賦活を行った。抗原賦活後 3%の過酸化水素を含んだメタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ除去した。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 MDK 抗体 (1:500 dilution; ab52637, Abcam, Cambridge, UK) ・ 抗 ASCL1 抗体 (1:100 dilution; 556604, BD Pharmingen, Franklin lakes, NJ, USA) ・ 抗 NEUROD1 抗体 (1:50 dilution; ab205300, Abcam, Cambridge, UK) ・ 抗 POU2F3 抗体 (1:600 dilution; sc293402, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TxS, USA) ・ 抗 YAP1 抗体 (1:1250 dilution; sc101199, Santa Cruz Biotechnology) ・ 抗 SYP 抗体 (1:600 dilution; ab32127, Abcam) ・ 抗 REST 抗体 (1:50 dilution; ab211537, Abcam) ・ 抗 phospho (P) -AKT 抗体 (1:100 dilution; #4060, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 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 回洗浄を行い、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。

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 あるいは MES 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 後にボンソ S で染色し蛋白のローディングが均一であることを確認した。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 MDK 抗体 (1:500 dilution; sc-46701, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TxS, USA) ・ 抗 ASCL1 抗体 (1:500 dilution; 556604, BD Pharmingen, Franklin lakes, NJ, USA) ・ 抗 NEUROD1 抗体 (1:1000 dilution; ab109224, Abcam, Cambridge, UK) ・ 抗 POU2F3 抗体 (1:500 dilution; sc293402, Santa Cruz Biotechnology) ・ 抗 YAP1 抗体 (1:1000; #8418; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ・ 抗 SYP 抗体 (1:1000 dilution; ab32127, Abcam) ・ 抗 REST 抗体 (1:1000 dilution; LS-C668231, Lifespan Biosciences, Lynnwood, WA, USA) ・ 抗 phospho (P) -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 (P) -PI3K 抗体 (1:1000 dilution; ab278545, Abcam) ・ 抗 PI3K 抗体 (1:1000 dilution; #4257, Cell Signaling Technology) ・ 抗 P-AKT 抗体 (1:2000 dilution;

#4060, Cell Signaling Technology)・抗 Akt 抗体 (1:1000 dilution; #4691, Cell Signaling Technology)・抗 cleaved poly adenosin diphosphate-ribose polymerase (c-PARP) 抗体 (1:1000 dilution; #5625, Cell Signaling Technology)・抗 cleaved (c-) caspase3 抗体 (1:1000 dilution; #9661, 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。すべて 3 回以上施行しているが本文中の図には代表的な画像を示した。

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。遠心後のフローズロー液と同量の 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、検量線を引きするために 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。*MDK* 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 *MDK* 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。

MDK overexpression

6well プレートに SBC3 を (3×10^5 cells/well)、MS1 を (5×10^5 cells/well) 播種し抗生剤無添加の培養液にて一晩培養を行った。培養後 5 割程度の細胞密度の状態を確認後、MDK の発現プラスミド (MDK-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 OPTIMEMI(Thermo Fisher Scientific)200 μ l と混ぜた後、Turbofectin (OriGene Technologies) 12 μ l を添加し、室温で15 分間静置した混合液を細胞へ添加した。24 時間培養後10 cm dish に移し600 μ g/ml のG418入り培養液でselection を行い、stable clone を作成した。プラスミドの導入確認は蛍光顕微鏡、ウエスタンブロット法を使用した。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。

Short hairpin RNA (shRNA)

6well プレートにSBC5 を (2×10^5 cells/well) 播種し抗生剤無添加の培養液にて一晚培養を行った。培養後5 割程度の細胞密度の状態を確認後、OPTIMEMI(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 250 μ lを溶媒としてMDK shRNA (shMDK)

(MDK Human shRNA plasmid kit ; OriGene Technologies, Rockville, MD,USA) 及び control 用プラスミド (shCtr) (scrambled shRNA control in pRS shRNA Vector ; OriGene Technologies) 4 μ g とTurbofectin (OriGene Technologies) 12 μ l を混合し室温で15分間静置した混合液を細胞へ添加した。24時間培養後10 cm dish に移し12.5 μ g/mlのpuromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 入り培養液でselection を行い、stable clone を作成した。

タンパクを回収しウエスタンブロット法によりMDKの蛋白発現を確認した。

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 rhMDK 投与による細胞増殖能への影響の検討

MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法を用いて評価した。96 well プレートに MDK 弱発現 SCLC 細胞株である SBC3、H1688、H592、H69 及び MDK 発現陰性 SCLC 細胞株である MS1 (いずれも 1000 cells/well) に rhMDK (100 ng/ml) を添加し 96 時間培養した。rhMDK に対するコントロール群としては溶媒である nuclear free water を使用した。MTT 溶液 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 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 MDK overexpression による細胞増殖能への影響の検討

MDK 弱発現 SCLC 細胞株である SBC3 及び MDK 発現陰性 SCLC 細胞株である MS1 に対して上記手法を用いて MDK を overexpression した細胞 (SBC3 OE MDK 及び MS1 OE MDK) と control 用プラスミドを用いて作成した control 細胞 (SBC3 OE Ctr 及び MS1 OE Ctr) を作成した。OE MDK 群はそれぞれ 2 クローン集団を

確立した。96 well プレートにそれぞれの細胞（いずれも 1000 cells/well）を播種し 96 時間培養後、MTT 法を上記同様に施行した。

- ③ MDK shRNA による MDK の knockdown による細胞増殖能への影響の検討 MDK 強発現 SCLC 細胞株である SBC5 に上記手法を用いて MDK を knockdown した細胞（SBC5 shMDK）と control 用プラスミドを用いて作成した control 細胞（SBC5 shCtr）を作成し 96 well プレートに 1000 cells/well の濃度で播種した。96 時間培養後に MTT 法を上記同様に施行した。
- ④ Cisplatin あるいは iMDK の抗腫瘍効果の検討
SBC5 と SBC3 (3000 cells/well)、MS1 と H82(10000 cells/well)、H69 (20000 cells/well) を 96 well プレートに播種して一晩培養後、濃度勾配をつけて cisplatin、iMDK を添加した。72 時間培養後に MTT 法を上記同様に施行した。また各薬剤の 50% 阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration : IC₅₀) を GraphPad Prism v10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて算出した。cisplatin と iMDK の相乗効果は、CalcuSyn 2.1 software (Biosoft, Bengaluru, India) 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。既報に従い CI<1 を synergism、CI=1 を additive effect、CI>1 を antagonism と定義した(Chou, 2010)。

Migration assay

- ① iMDK による MDK knockdown の細胞遊走能への影響の検討
migration assay は 24 well Transwell プレートを使用した。SBC5 細胞 (20×10⁴ cells/well) を含有する 350 μl の 0.1% FBS 含有培養液/well を upper chamber に、20% FBS 含有培養液 500 μl/well を lower chamber に入れた。iMDK 及びコントロールとして溶媒である Dimethyl sulfoxide (DMSO) を 1 μM の濃度となるように SBC5 と共に投与した。播種後 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 BZ-9000 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて強拡大視野/well カウントし評価した。
- ② MDK shRNA による MDK knockdown の細胞遊走能への影響の検討
SBC5 shMDK 及び SBC5 shCtr 細胞 (20×10⁴ cells/well) を含有する 350 μl の 0.1% FBS 含有培養液/well を upper chamber に、20% FBS 含有培養液 500 μl/well を lower chamber に入れ播種後 24 時間後に同様に評価を行なった。
- ③ rhMDK 投与による細胞遊走能への影響の検討
MDK 発現陰性である MS1 細胞 (30×10⁴ cells/well) を用いて行なった。rhMDK は 100 ng/ml の濃度となるように MS1 細胞と共に upper chamber に投与し、コントロールとしては溶媒である nuclear free water を使用した。播種後 48 時間後に同様に評価を行なった。

④ MDK overexpressionによる細胞遊走能への影響の検討

MS1 OE MDK及びMS1 OE Ctr (30×10^4 cells/well) を含有する350 μ l の0.1% FBS 含有培養液/wellをupper chamberに、20% FBS含有培養液500 μ l/wellをlower chamber に入れ播種後48時間後に同様に評価を行なった。

アポトーシスの解析

MEBCYTO Apoptosis Kit (Annexin V-FITC kit) (MBA, Tokyo, Japan) を用いて行った。SBC5 (1×10^6 個)、SBC3 (1×10^6 個)、H69 (1×10^6 個) を 10 cm dish で培養し、24 時間後に iMDK を投与した。48 時間後に接着細胞である SBC5 及び SBC3 はトリプシンで処理し、浮遊細胞である H69 はそのまま回収した。PBS で 2 回洗浄した後 Binding Buffer 85 μ L で再懸濁した。キットに含まれている試薬で Annexin V とプロピジウムイオダイド (propidium iodide: PI) の二重染色を行い、暗所で 15 分間静置した後に測定を行った。測定は BD FACSVerser フローサイトメーター (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, USA) を使用した。

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。SBC5 あるいは SBC5 に shRNA を transfection したもの (SBC5 shCtr 及び SBC5 shMDK) (5.0×10^6 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。デジタルキャリパーで腫瘍を計測し、腫瘍体積 (Tumor Volume : TV) は既報に従い $TV = (Length) \times (Width)^2 / 2$ の計算式を使用した (Takashima et al, 2020)。

in vivo モデルにおける MDK knockdown の腫瘍増殖への影響を評価するために、SBC5shCtr と SBC5shMDK を皮下注射したそれぞれの群の腫瘍体積を比較した。

in vivo モデルにおける iMDK の効果及び cisplatin と iMDK の併用療法の効果を評価するために SBC5 を皮下注射したマウスを DMSO 群、cisplatin 群、iMDK 群、cisplatin+iMDK 群の 4 群に割り付けた。Cisplatin は週 1 日腹腔投与 (1 mg/kg/日) し、iMDK は週 3 日腹腔内注射 (9 mg/kg/日) した。全ての群は $n = 4$ のマウスとした。体重を 2 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 48 時間後に摘出し免疫組織染色法にて MDK 及び P-AKT の発現を評価した。

統計解析

全ての *in vitro* の検討は独立した状態で 3 回以上行った。*in vivo* のマウス実験は各薬剤群を $n = 4$ とし、2 回以上の独立した状態で行った。血清 MDK 値の評価において、

治療経過による血清 MDK 値の変化については Paired t 検定を用いた。その他の連続変数の比較には Welch の t 検定を用いた。

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) SCLC 患者における血清 MDK 値と腫瘍量及び予後との関係の検討

血清 MDK 値は健常人と比較して NSCLC において上昇していることが報告されている(Stern et al, 2021; Xia et al, 2016)が SCLC 患者における血清 MDK 値に関する報告は存在しない。10 人の悪性腫瘍既往のない健常人と 45 人の病理学的に SCLC の診断がついた患者の血清 MDK 値を abcam 社の ELISA キットを用いて測定した。SCLC 患者は全例喫煙歴があり年齢中央値は約 70 歳であった。Low MDK expression group では放射線治療を受けた患者がより多く含まれていた (表 1)。測定の結果 SCLC 患者では健常人と比較して有意に血清 MDK 値が高値であることがわかった (図 9A,9B)。また血清 MDK 値は腫瘍病期が進行するに従い上昇傾向で、腫瘍量を BSLD で評価した際に高腫瘍量集団において有意に高値であった (図 10A,10B)。さらに治療前に血清 MDK 値が高値であった集団において、血清 MDK 値は化学療法により腫瘍が縮小するに従い有意に低下し、腫瘍増大に伴い再上昇する傾向を示した (図 11A,11B)。以上より SCLC 腫瘍量を反映しているため腫瘍細胞が MDK を発現・分泌していることが示唆された。興味深い症例として、殺細胞性抗癌剤による治療中に、腫瘍マーカー上昇や画像上腫瘍増大を認めなかったにもかかわらず血清 MDK 値が上昇し続け、殺細胞化学療法終了直後に腫瘍増大を認めた症例(図 11A の→で示した症例)が存在した。この症例の経過を図 12 に示す。この経過からは、一部の SCLC 患者において血清 MDK 値が鋭敏な腫瘍マーカーとして機能しうる可能性や MDK の発現上昇が SCLC においても化学療法耐性に関与しうる可能性を示唆した。

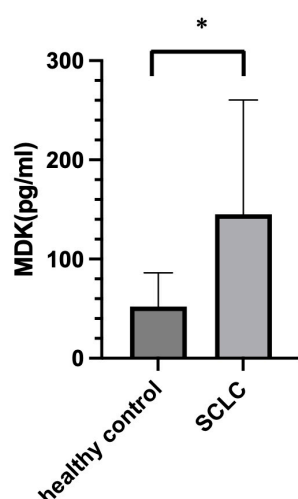
図 10A,10B で示したように病期や腫瘍量で分類しても血清 MDK 値は患者毎に様々な値を示しており、血清 MDK 値は腫瘍量だけでなく腫瘍の MDK 発現/分泌量も反映していると考えられる。Public data である TCGA を用いた解析では、肺癌において MDK 高発現集団の方がより progression-free survival (PFS) を示す傾向があることが示されており (図 13A,13B)、SCLC において MDK の発現が予後と相関するかは興味深い疑問である。しかしながら SCLC は手術症例が少なく腫瘍組織検体が不足しているため、TCGA などの public data での解析はほとんどできないのが現状である。今回我々は本研究で測定した血清 MDK 値を用いて予後解析を行った。その結果、有意差は認めなかったが Low MDK expression 群は High MDK expression 群と比較して PFS、OS とともに良好な傾向を示した (図 14A,14B)。本研究の患者数は 45 名と少数であり、より多くの SCLC 症例での MDK 発現と予後の検討が望まれる。

表 1 血清 MDK 測定患者の特色

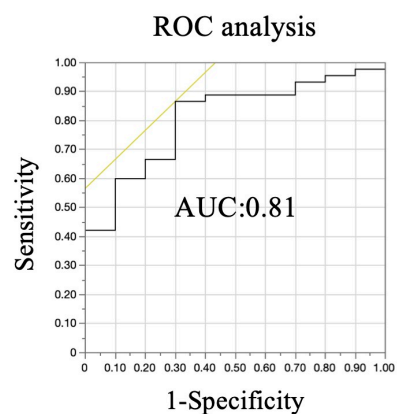
Characteristics	All (n=45)	MDK-high (n=22)	MDK-low (n=23)	p-value
Age, years				
Median (range)	70 (46-80)	70.5 (48-79)	69 (46-80)	0.6956
Smoking status				
Never smoked	0	0	0	
Former smoker	30	16	14	
Current smoker	15	6	9	
Stage				
StageII	5	2	3	
StageIII	18	8	10	
StageIV	18	10	8	
Recurrence	4	2	2	
Treatment				
Chemotherapy	17	7	10	
Chemotherapy+ICI	16	13	3	
Chemotherapy+radiation	12	2	10	

(図 9)

A



B



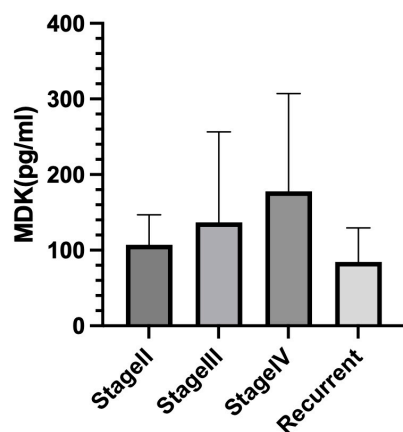
A)健康人と SCLC 患者の血清 MDK 値を測定し比較。

B)ROC 解析の結果

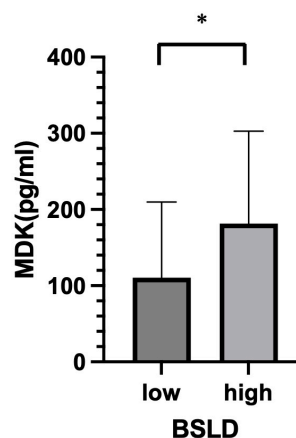
* $p < 0.05$ 。

(図 10)

A



B



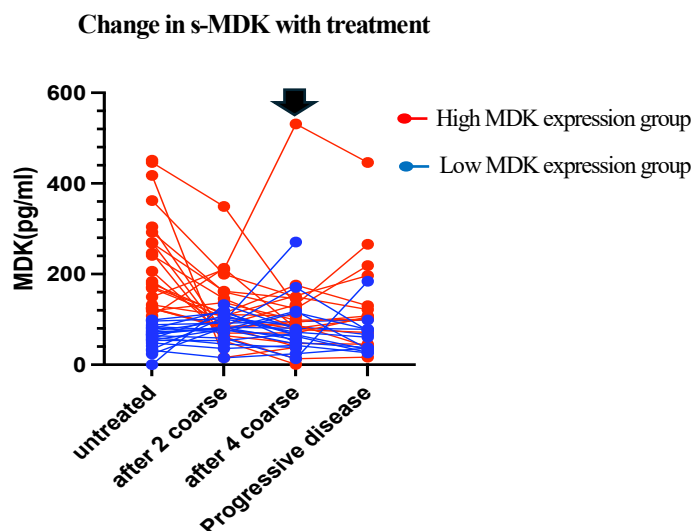
A) SCLC 患者の血清 MDK 値を病期毎に表示。

B) SCLC 患者の血清 MDK 値を高腫瘍量群と低腫瘍量群に分けて表示。腫瘍量は標的病変の径和 (BSLD) で評価し中央値を cut off 値とした。

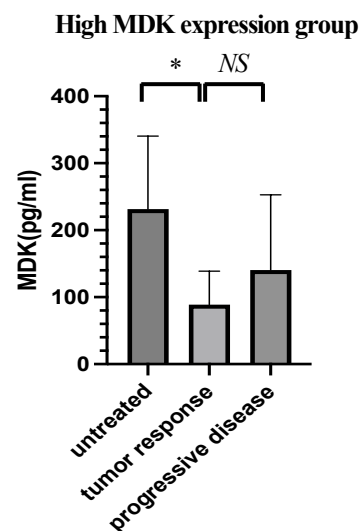
* $p < 0.05$ 。

(図 11)

A



B

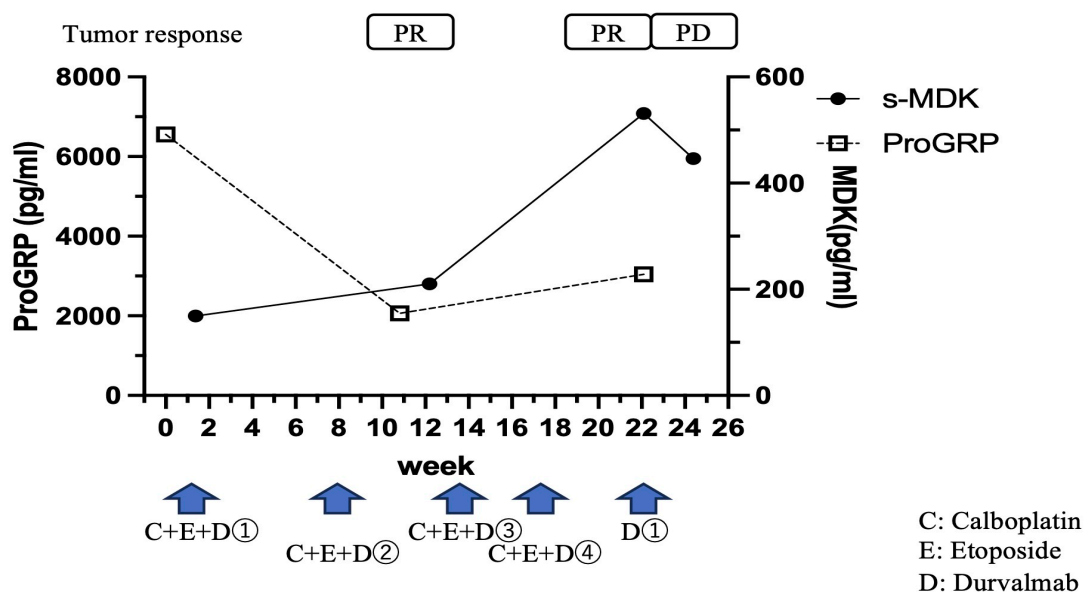


A) SCLC 患者の血清 MDK 値 (s-MDK) の治療経過による推移。

B) High MDK expression group における診断時、治療奏効時、腫瘍増大時の血清 MDK 値を表示。

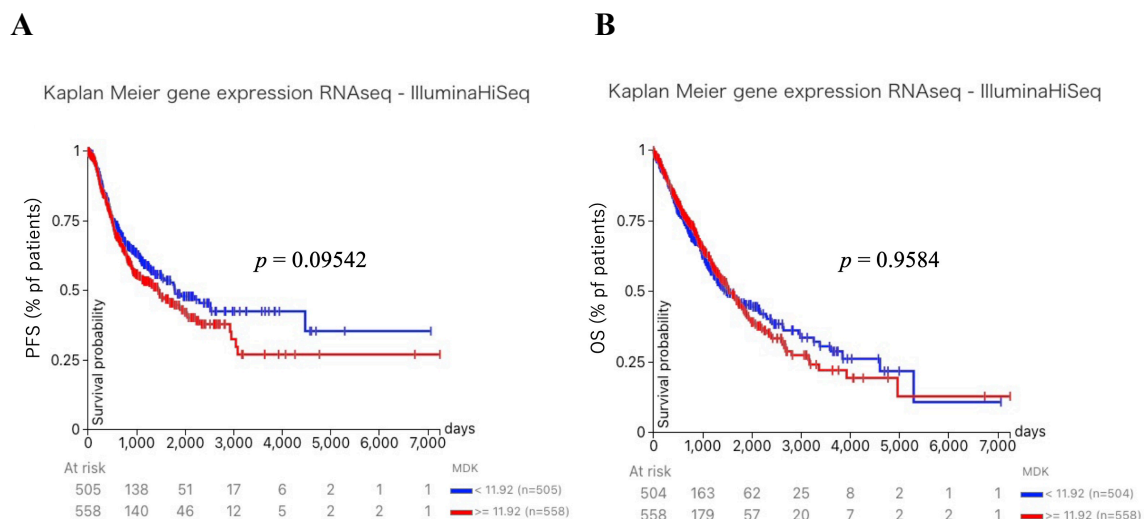
* $p < 0.05$ 。NS > 0.05 。

(図 12)



化学療法施行中 ProGRP の上昇や CT 画像による腫瘍増大より先に血清 MDK 値の上昇を認めた 1 症例の経過。

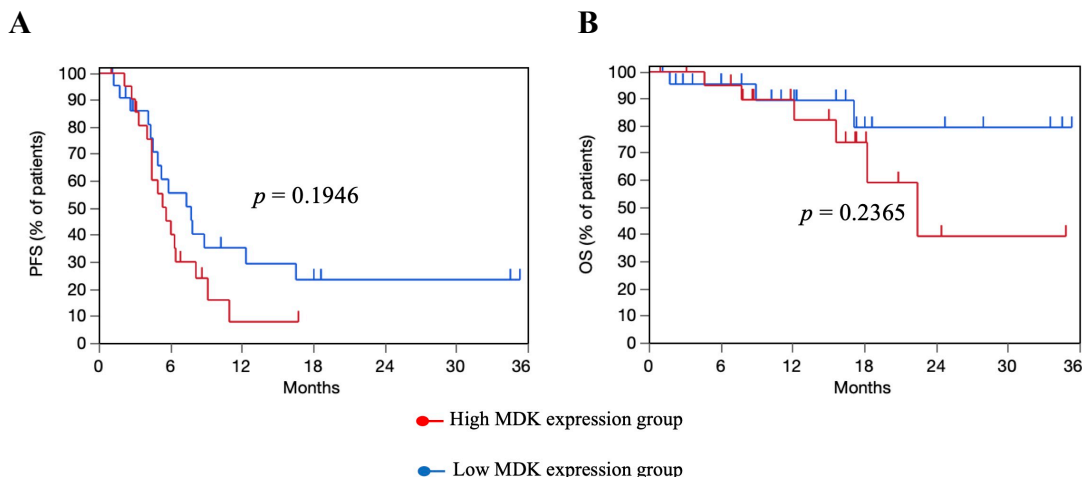
(図 13)



UCSC Xena を用いた public data の解析。TCGA Lung Cancer(LUNG):1325 samples を RNA シークエンスによる MDK RNA 発現量で高発現群と低発現群に分類して予後を解析。

A)PFS B)OS

(図 14)



本研究の SCLC 患者を血清 MDK 高値群 (High MDK expression group) と低発現群 (Low MDK expression group) に分類し予後を解析。

A)PFS, B)OS

2) SCLC 腫瘍細胞における MDK の発現及び MDK 発現 SCLC 細胞の性質の検討

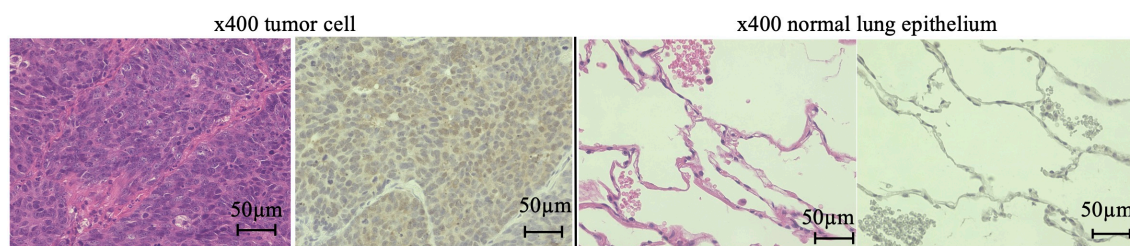
実際に SCLC の腫瘍細胞が MDK を発現しているかを評価するために 4 名の SCLC 患者の手術検体(肺切除検体)を用いて免疫染色を行った。その結果正常肺と比較し、一部の SCLC 腫瘍細胞において強い MDK 発現が認められた (図 15)。SCLC 細胞における MDK 発現細胞の割合や発現強度は症例毎に異なっていたが、いずれの症例においても MDK の発現を認める細胞は存在した。また同一症例の手術検体においても MDK の発現が高い SCLC 細胞と発現が低い/認められない SCLC 細胞が混在しており SCLC 細胞の MDK 発現は患者間/同一患者内の両方において不均一性があることが示唆された (図 16)。

マウスモデルでは Non-NE 型 SCLC が MDK を分泌することが示唆されていた(Lim et al, 2017)。そこで我々は MDK 発現 SCLC の性質を評価するために、SCLC のサブグループマーカーとなる転写因子 ASCL1/NEUROD1/POU2F3/YAP1、NE マーカー-SYP、Non-NE マーカー-REST の発現を MDK と併せて免疫組織染色で行い、MDK 発現 SCLC 細胞の性質を評価した (図 17)。Case1 は ASCL1 優位の神経内分泌型 SCLC であったが、大半を占める ASCL1 陽性の SCLC 細胞では MDK 発現を認めなかった一方で、全てのサブグループマーカー及び SYP 陰性の Non-NE 型と思われる SCLC 細胞が一部混在しており、この SCLC 細胞に MDK の発現を認めた。Case2 は最も強く MDK を発現していた症例であったが、ASCL1 と NEUROD1 を共発現 (NEUROD1 の方がやや有意) している NE 型 SCLC であった。Case3 は有意と断定できるサブグループマ

一カー発現がなく SYP の発現が最も弱い、Non-NE 傾向の強い SCLC であった。MDK 発現陰性の腫瘍細胞と弱発現の腫瘍細胞が混在していた。Case4 は ASCL1 優位の神経内分泌型 SCLC で大半の腫瘍細胞では MDK の発現を認めなかったが、図 16, 図 17 で示したように一部の腫瘍細胞において MDK の発現を認めた。Non-NE 傾向の強い Case3 より ASCL1 と NEUROD1 を共発現した Case2 においての方が MDK 高発現であり、必ずしも既報の Non-NE 型 SCLC において優位に MDK 分泌を認める、という結果と一致しなかった。

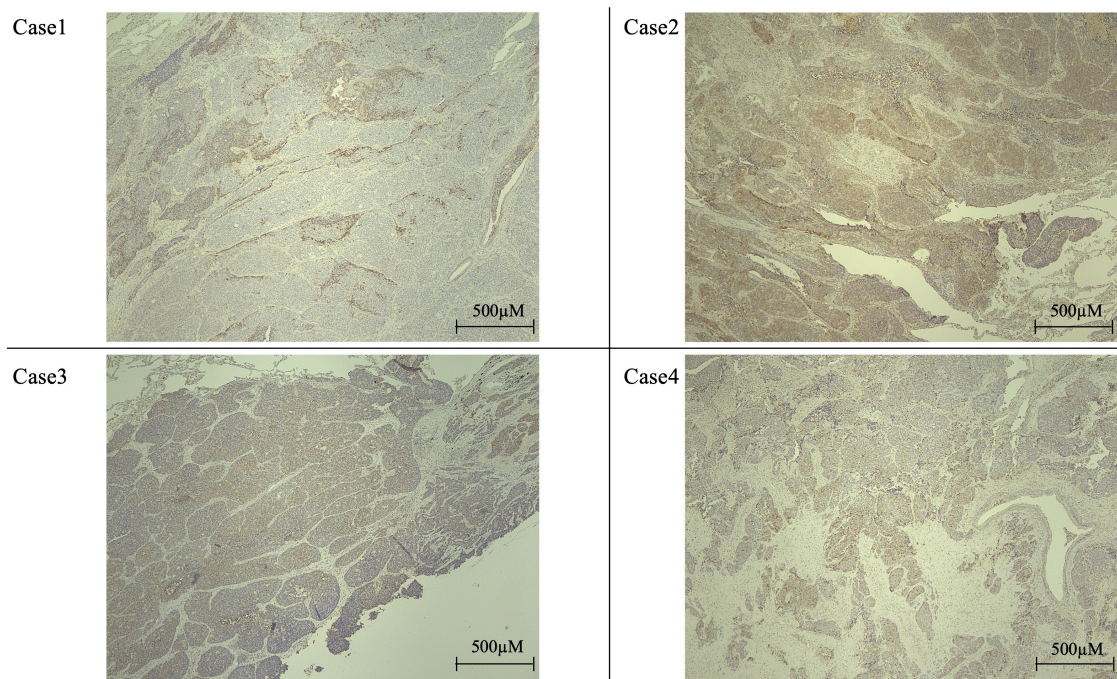
次に、当科で保有している 9 つの SCLC 細胞株における MDK、ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1、SYP、REST の発現をウェスタンブロット法にて評価した (図 18)。MDK の発現は Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 及び培養上清液に対する ELISA 法でも評価した (図 19A, 19B)。その結果 YAP1 陽性で非神経内分泌型 SCLC である SBC5 にて MDK が強発現、NEUROD1 陽性で SYP と REST の両方の発現を認める MS1 にて MDK の発現は陰性であり、その他の SCLC 細胞株における MDK の発現は弱発現であった。本検討では Non-NE 型である SBC5 にて最も強い MDK の発現を認めた一方で NEUROD1 陽性で SYP と REST の両方の発現を認め、NE と Non-NE の中間と言える MS1 では MDK 陰性であった。以上より今回の検討からは SCLC のサブグループや神経内分泌形質と MDK の発現の間に明らかな相関関係は認められなかった。

(図 15)



同一の SCLC 手術検体における腫瘍（左）と正常肺（右）の HE 染色と MDK 免疫染色。代表的な 1 症例のものを提示。

(図 16)



肺切除術を受けた SCLC4 症例の MDK の免疫染色。弱拡大 (x40) で表示。
それぞれの症例における MDK 発現陽性細胞を含む代表的な視野を表示。

(図 17)

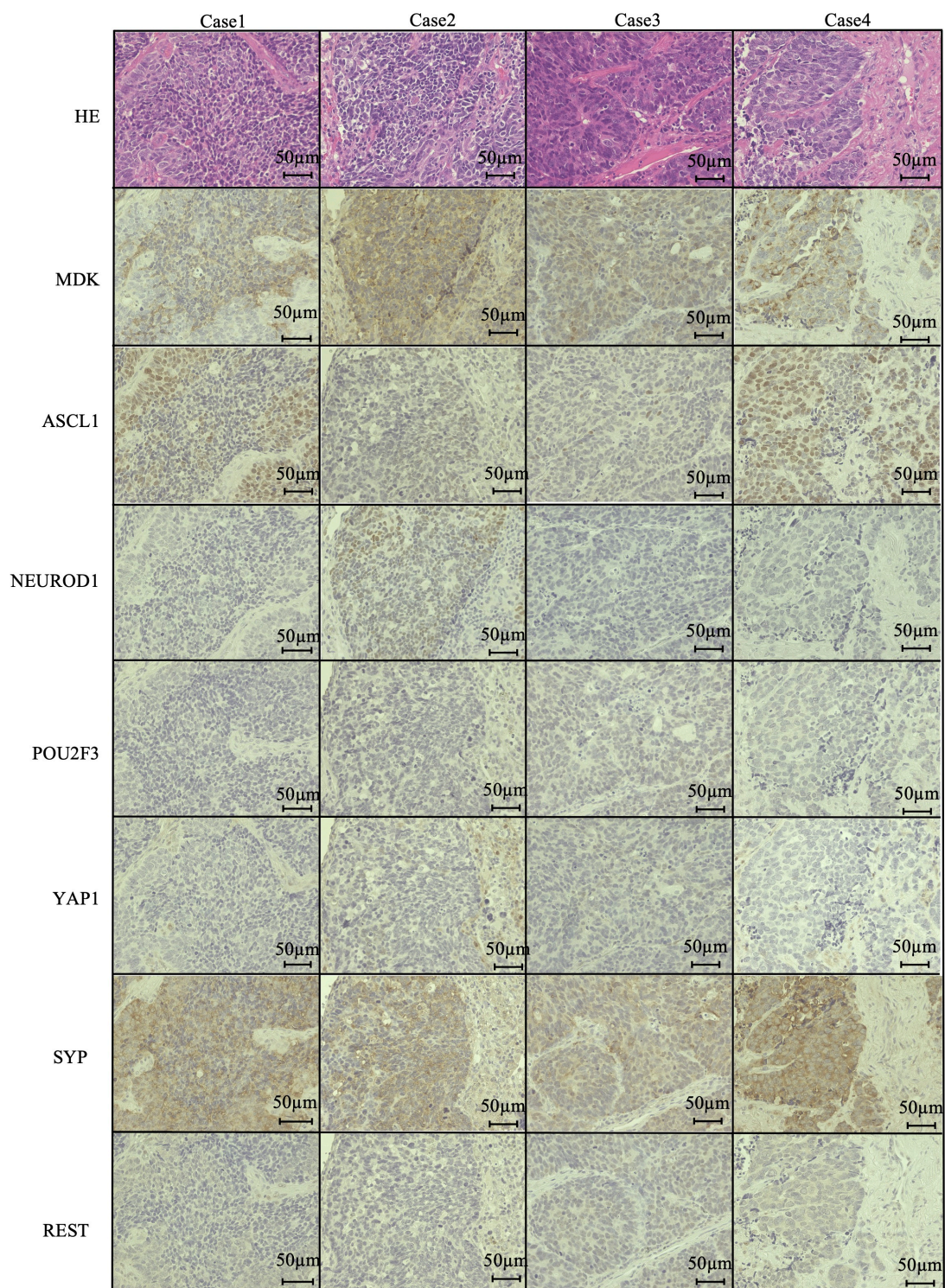
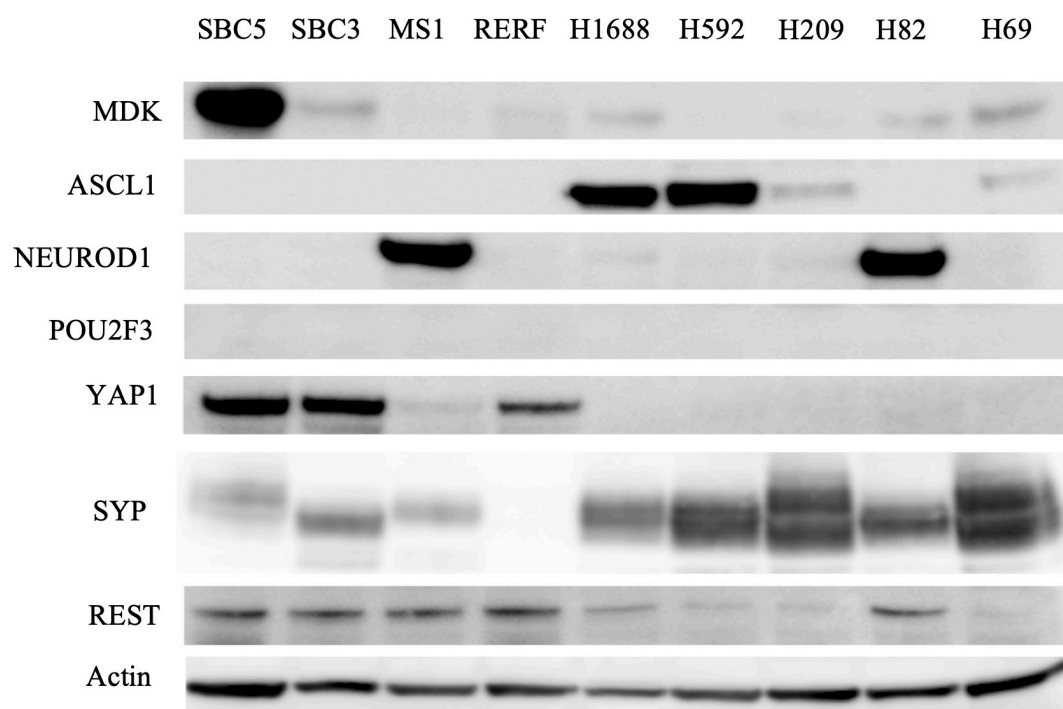


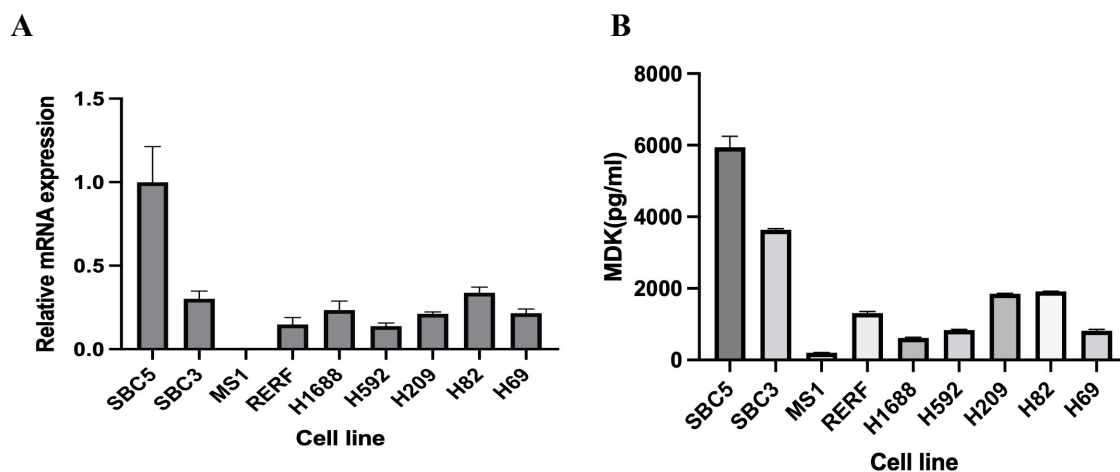
図 15 で示したそれぞれの症例（Case1-4）における MDK 陽性細胞の ASCL1/NEUROD1/POU2F3/YAP1/SYP/REST の免疫染色の結果。強拡大 (x400) で表示。

(図 18)



ウエスタンブロット法による SCLC 細胞株における MDK/ASCL1/NEUROD1/POU2F3/YAP1/SYP/REST/Actin タンパク発現の評価。

(図 19)



SCLC 細胞株における MDK の発現評価。

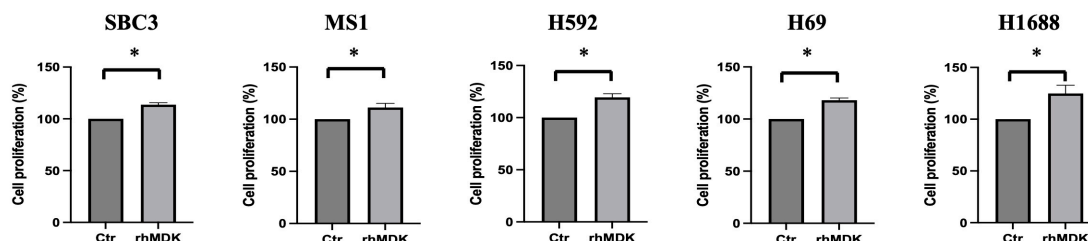
A) qRT-PCR による MDK の mRNA 発現評価。

B) ELISA 法による MDK 分泌の評価。

3) SCLC 腫瘍細胞における MDK の細胞増殖に与える影響の検討

SCLC においても MDK の発現が認められ、少なくともその一部においては発現亢進していることが判明したため SCLC における MDK の機能の評価の研究を進めることにした。SCLC における MDK の細胞増殖能への影響を評価するために、MDK 弱発現あるいは発現陰性 SCLC 細胞株 (SBC3、MS1、H592、H69、H1688) に rhMDK を投与し細胞増殖能の変化を MTT 法を用いて評価した (図 20)。その結果いずれの SCLC 細胞株において増殖能力が有意に上昇した。また MDK 弱発現 SCLC 細胞株 SBC3 と MDK 発現陰性 SCLC 細胞株 MS1 に MDK を overexpression し細胞増殖能の変化を MTT 法で評価すると細胞増殖能は増強し (図 21A,21B,21C,21D)、MDK 強発現 SCLC 細胞株 SBC5 に対して MDK を knockdown した上で細胞増殖能の変化を MTT 法で評価すると細胞増殖能は低下していた (図 22A,22B)。さらに SCLC 細胞株に iMDK を投与し MTT 法を用いて殺細胞効果を評価した所、MDK 発現を認める SCLC 細胞株では濃度依存性に殺細胞効果を認めた一方で MDK 発現陰性の MS1 では効果を認めなかった (図 23A,23B)。以上の結果から、SCLC において MDK は細胞増殖を増強することが示された。

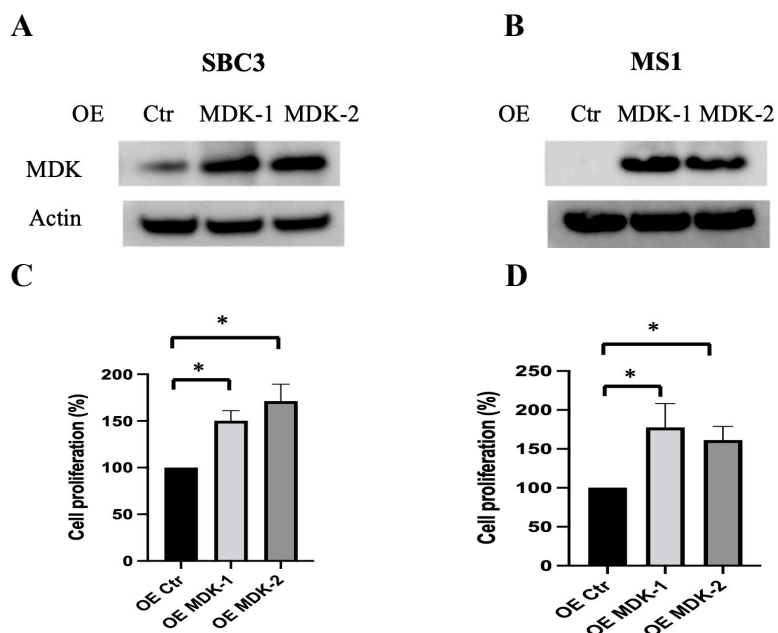
(図 20)



SCLC 細胞株に対する rhMDK の細胞増殖能増強効果を MTT 法を用いて評価。

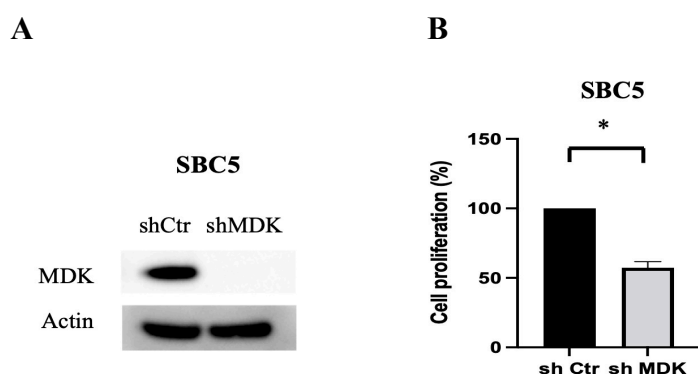
* $p < 0.05$. Ctr, control

(図 21)



A)SBC3 に MDK を overexpression し MDK の発現をウエスタンブロット法で評価。
B)MS1 に MDK を overexpression し MDK の発現をウエスタンブロット法で評価。
C)SBC3 における MDK の overexpression による細胞増殖能の変化を MTT 法で評価。
D)MS1 における MDK の overexpression による細胞増殖能の変化を MTT 法で評価。
増殖能はそれぞれコントロールベクターを transfection させたもの (OE Ctr) をコントロールと設定。* $p < 0.05$ 。OE, overexpression; Ctr, control

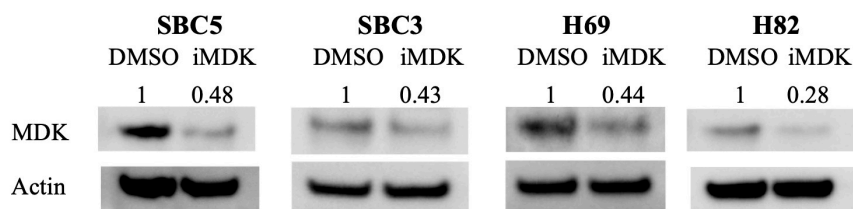
(図 22)



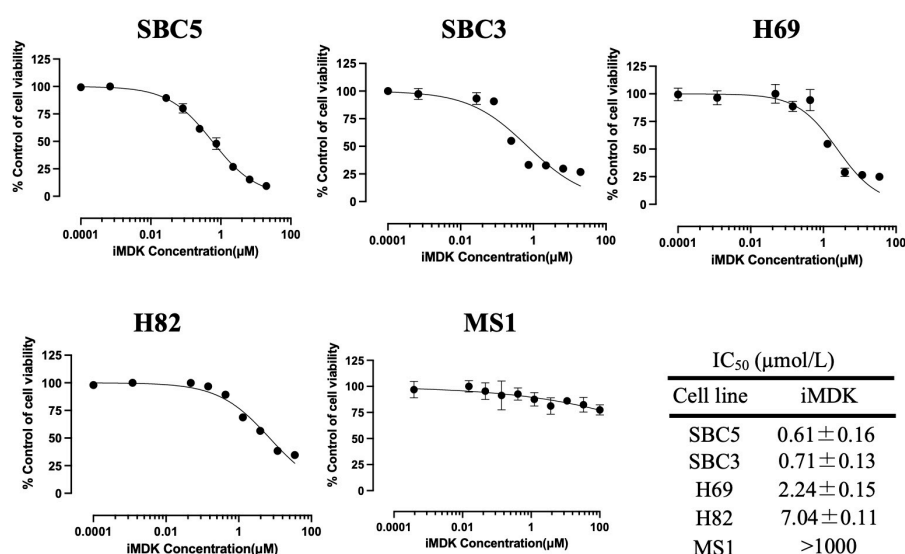
A)SBC5 に対し shMDK を用いて MDK を knockdown し、MDK の発現が抑制されていることをウエスタンブロット法で評価。
B)SBC5 における MDK knockdown による細胞増殖能の変化を MTT 法で評価。
B)は shCtr をコントロールと設定。* $p < 0.05$ 。Ctr, control

(図 23)

A



B

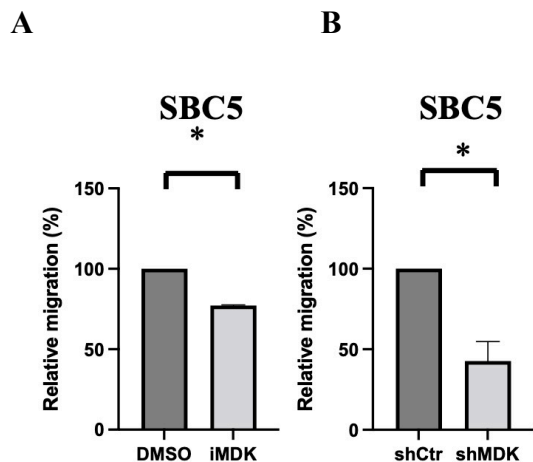


A) SCLC 細胞株における iMDK 投与による MDK の抑制効果をウェスタンブロット法で評価。数字は ImageJ を用いて Actin で補正した MDK の発現を定量化したもの。
 B) SCLC 細胞株における iMDK による殺細胞効果を MTT 法で評価。
 それぞれの細胞株における MDK の発現は図 17 及び 18 を参照。

4) SCLC 腫瘍細胞における MDK の細胞遊走に与える影響の検討

次に SCLC における MDK の遊走能に与える影響を評価した。MDK 強発現 SCLC 細胞株 SBC5 に対して iMDK 及び shMDK を用いて MDK を knockdown し細胞遊走能の変化を migration assay を用いて評価した所、いずれの手法においても遊走細胞数の有意な低下を認めた (図 24A, 24B)。一方で、MDK 発現陰性 SCLC 細胞株 MS1 に対して rhMDK を投与すると遊走細胞数は有意に増加し (図 25A)、MS1 に MDK を overexpression しても遊走細胞数は有意に増加した (図 25B)。以上より SCLC において MDK は細胞増殖能のみならず細胞遊走能も増強することが示された。

(図 24)



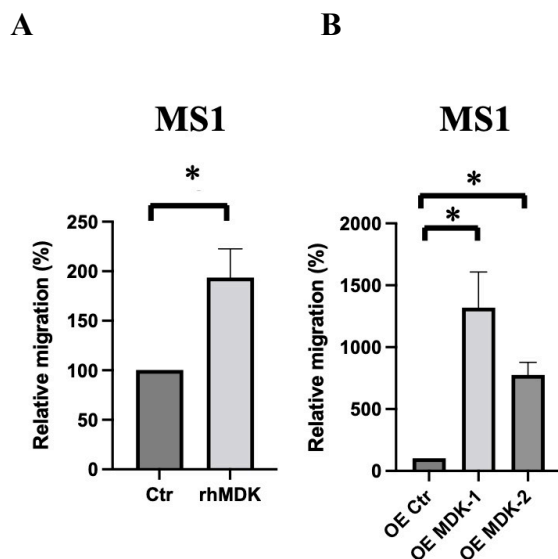
Migration assay を用いて細胞遊走能を評価。

A)SBC5 に iMDK を投与した時の細胞遊走能の変化を評価。

B)SBC5 に shMDK を用いて MDK を knockdown した際の細胞遊走能の変化を評価。

A)DMSO 群、B)shCtrl 群をコントロールと設定。* $p<0.05$ 。Ctrl, control

(図 25)



Migration assay を用いて細胞遊走能を評価。

A)MS1 に rhMDK を投与した時の細胞遊走能の変化を評価。

B)MS1 に MDK を overexpression した時の細胞遊走能の変化を評価。

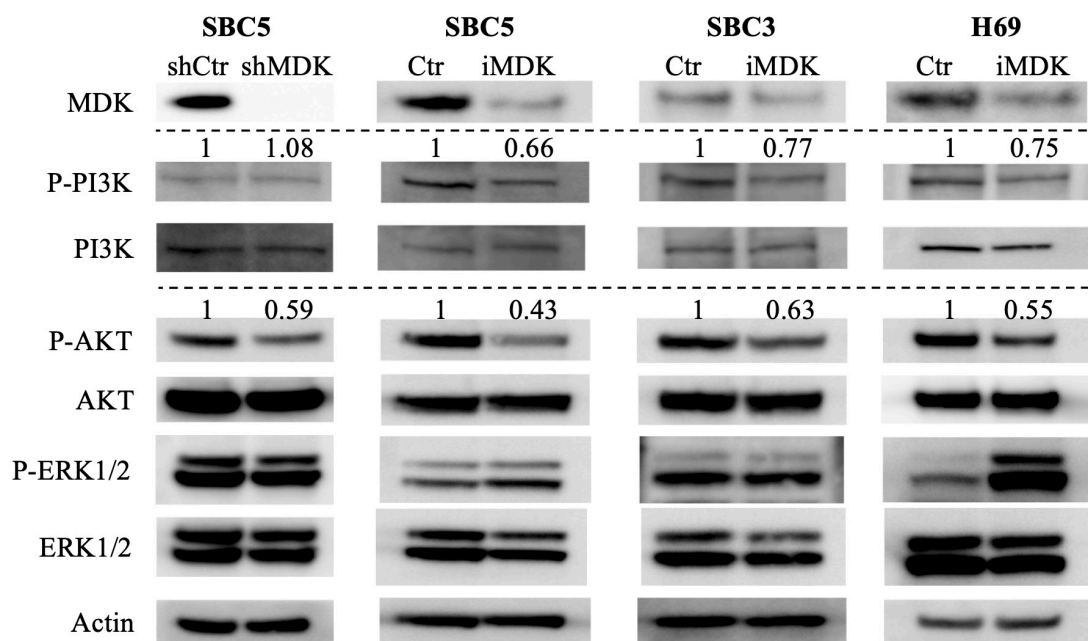
A)生理食塩水投与群、B)OE Ctr 群をコントロールと設定。

* $p<0.05$ 。Ctrl, control; OE, overexpression

4) SCLC 腫瘍細胞における MDK の AKT/ERK 経路に与える影響の検討

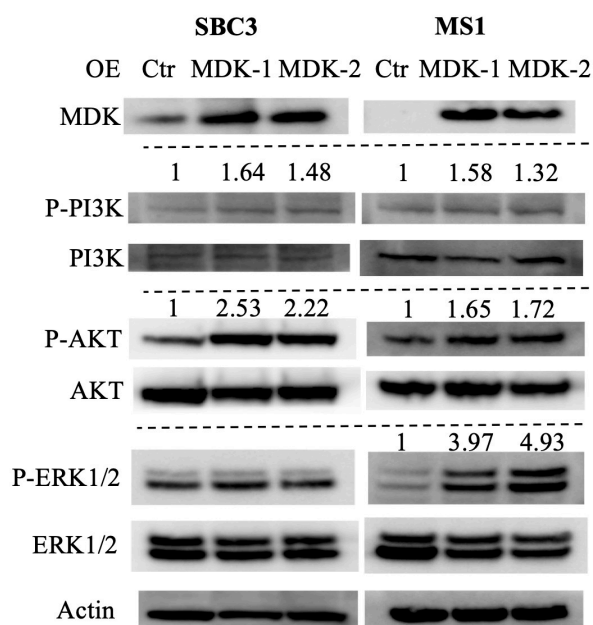
SCLC において MDK が細胞増殖能・遊走能を増強することが示されたため、このメカニズムについて調べていくこととした。MDK は悪性腫瘍において AKT 経路・ERK 経路の活性化や抗アポトーシス作用を示すことが報告されている(Filippou et al, 2020)。今回我々は MDK を knockdown あるいは overexpression した時の AKT/ERK 経路の変化をウェスタンブロット法で評価した。MDK を shMDK の transfection あるいは iMDK の投与によって knockdown すると MDK 発現 SCLC 細胞株である SBC5、SBC3、H69 における P-AKT の発現が低下した。一方で ERK 経路については MDK の knockdown では P-ERK の発現低下は認められず、むしろ H69 においては iMDK の投与により P-ERK の発現は増加していた (図 26)。また、SBC3 と MS1 に MDK を overexpression すると P-AKT の発現はいずれの細胞株においても増強したが、P-ERK の発現は MS1 においてのみ発現増強が認められた (図 27)。以上より、SCLC において MDK は AKT 経路の活性化と関連しており、ERK 経路についてはごく一部の SCLC 細胞においてのみ MDK と関連する可能性があることが示唆された。図 26 で示された H69 における iMDK 投与時の P-ERK 発現増強については AKT 経路抑制に対する代償的な ERK 経路活性化を見ている可能性があると考えられる。

(図 26)



MDK 発現 SCLC 細胞株に対し shMDK transfection あるいは iMDK 投与により MDK を knockdown した際の MDK、P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、P-ERK1/2、ERK1/2、Actin のタンパク発現の変化をウェスタンブロット法で評価。数字は ImageJ を用いて Actin で補正したそれぞれのタンパク発現を定量化したもの。Ctr, control

(図 27)



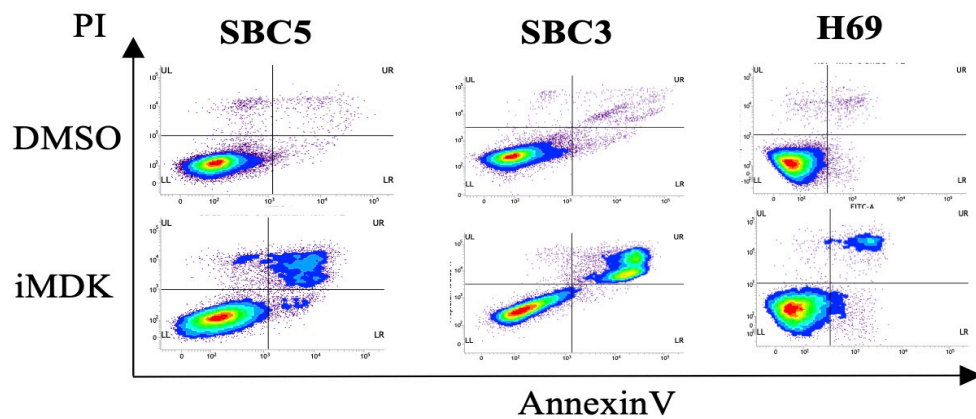
MDK 弱発現 SCLC 細胞株 SBC3 及び MDK 発現陰性 SCLC 細胞株 MS1 に対して MDK を overexpression した時の MDK、P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、P-ERK1/2、ERK1/2、Actin のタンパク発現の変化をウエスタンブロット法で評価。数字は ImageJ を用いて Actin で補正したそれぞれのタンパク発現を定量化したもの。
OE, overexpression; Ctr, control

5) SCLC 腫瘍細胞における MDK のアポトーシスに与える影響の検討

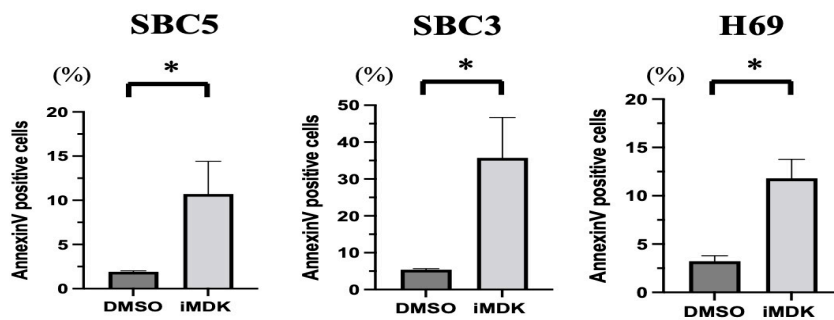
SCLC において MDK は AKT 経路を活性化することが示唆されたが、AKT 経路の活性化はアポトーシスの阻害に働くことが知られている(Revathidevi and Munirajan, 2019)。よって、SCLC における MDK とアポトーシスの関連についても評価することとした。SBC5、SBC3、H69 に iMDK を投与した時のアポトーシス誘導の評価を Annexin V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法を用いて行なった(図 28A,28B)。その結果いずれの細胞株においても iMDK の投与により有意にアポトーシス細胞が増加していた。次に抗 c-PARP 抗体および抗 c-caspase3 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いてアポトーシスの誘導を評価した(図 29)。同様に iMDK の投与によってアポトーシスが誘導されていることが示された。以上の結果より、MDK 発現 SCLC において iMDK の投与はアポトーシスを有意に増強することが示された。

(図 28)

A

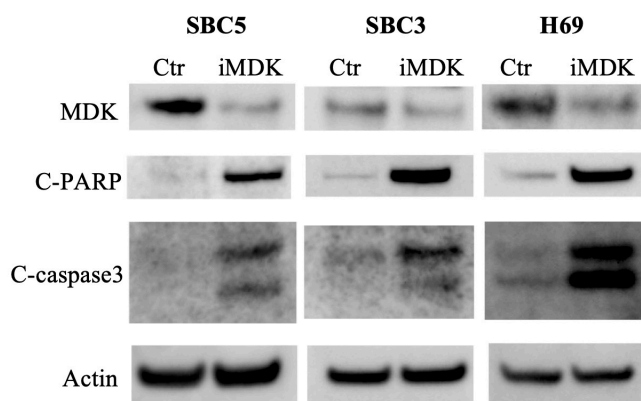


B



A) SBC5、SBC3、H69 に対して DMSO あるいは iMDK を投与した際のアポトーシスの誘導をアネキシン V と PI の二重染色を用いたフローサイトメトリー法で測定した。フローサイトメトリーの代表的な図を示す。
B) アポトーシス細胞 (AnnexinV 陽性細胞) の割合の変化。
* $p < 0.05$ 。

(図 29)



SBC5、SBC3、H69 に対して DMSO あるいは iMDK を投与した際の MDK、cleaved PARP、cleaved caspase3、Actin のタンパク発現の変化をウェスタンブロット法で評価。
Ctr, control

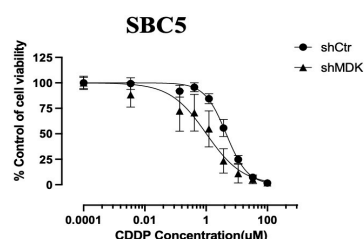
6) SCLC 腫瘍細胞における MDK の cisplatin の効果へ与える影響の検討

SCLC において AKT 経路の活性化は腫瘍不均一性や化学療法耐性を増強するという報告があり (Jin et al, 2022; Li et al, 2021)、また、MDK は他癌種において SCLC の標準治療薬である cisplatin の耐性化を誘導するという報告が存在する (Yang et al, 2022)。以上より我々は、SCLC において MDK が cisplatin の耐性化と関連するかについて評価した。まず MDK 強発現 SCLC 細胞株 SBC5 に shMDK を用いて MDK を knockdown すると cisplatin の効果が増強することを確認した (図 30A,30B)。次に MDK 弱発現 SCLC 細胞株 SBC3 と MDK 発現陰性 SCLC 細胞株 MS1 に MDK を overexpression すると cisplatin の効果が低下することを確認した (図 31A,31B,31C,31D)。さらに MDK 発現 SCLC 細胞株である SBC5、SBC3、H82、H69 に対して cisplatin と iMDK を投与し併用時に相乗効果があるかを CalcuSyn 2.1 software (Biosoft) を用いて CI によって定量化した (図 32)。その結果いずれの細胞株においても cisplatin と iMDK は相乗効果を示した。

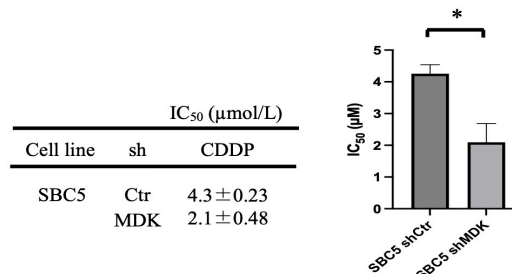
次に cisplatin と iMDK 併用時の細胞内シグナルの変化を評価した。SBC5 に対して cisplatin と iMDK を併用すると cleaved PARP および cleaved caspase3 の発現はより増強しており (図 33A,33B,33C)、iMDK 投与により cisplatin 併用の有無によらず P-AKT の発現は有意に抑制され、P-PI3K の発現も低下傾向を示した (図 34A,34B,34C)。

(図 30)

A



B



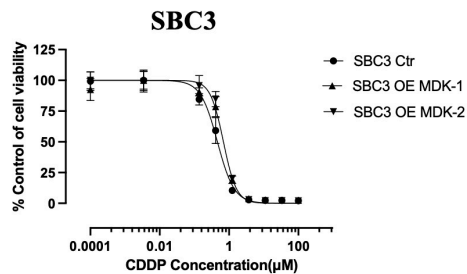
A)SBC5 に対して shMDK にて MDK を knockdown した際の cisplatin による細胞増殖抑制効果の変化を MTT 法を用いて評価。

B)その IC₅₀ を表示。

* $p < 0.05$. Ctr, control; CDDP, cisplatin

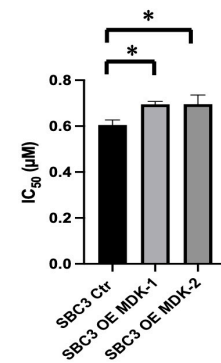
(図 31)

A

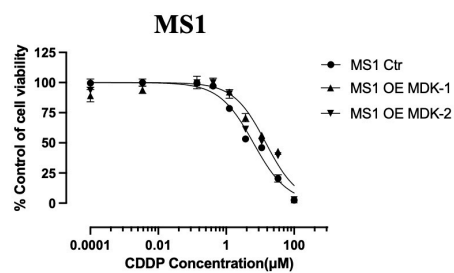


B

Cell line	OE	IC ₅₀ (μmol/L)	
		CDDP	
SBC3	Ctr	0.55 ± 0.07	
	MDK-1	0.7 ± 0.02	
	MDK-2	0.79 ± 0.12	

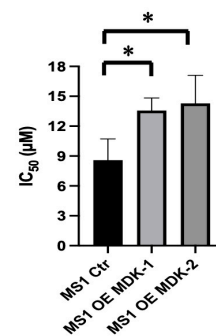


C



D

Cell line	OE	IC ₅₀ (μmol/L)	
		CDDP	
MS1	Ctr	4.5 ± 0.6	
	MDK-1	9.63 ± 3.69	
	MDK-2	12.4 ± 1.28	



A)SBC3 における MDK overexpression による cisplatin による細胞増殖抑制効果の変化を MTT 法を用いて評価。

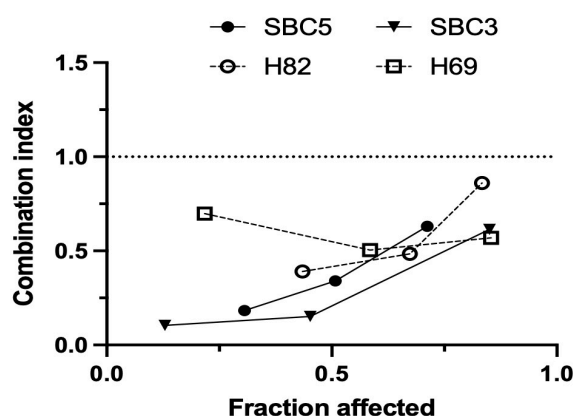
B)A)の IC₅₀ を表示。

C)MS1 における MDK overexpression による cisplatin による細胞増殖抑制効果の 変化を MTT 法を用いて評価。

D)C)の IC₅₀ を表示。

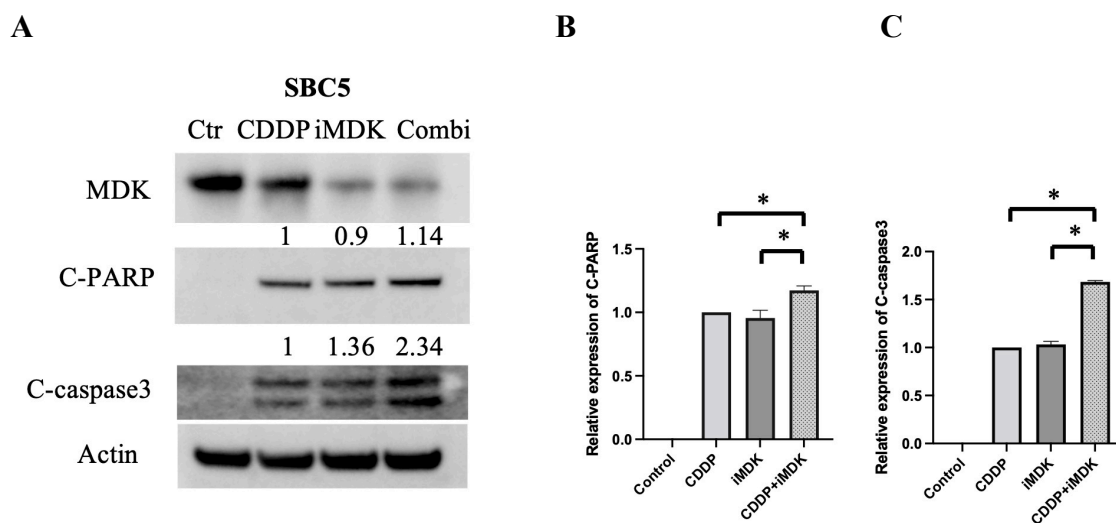
* $p < 0.05$. Ctr, control; OE, overexpression; CDDP, cisplatin

(図 32)



MDK 発現 SCLC 細胞株 SBC5、SBC3、H82、H69 に対し cisplatin と iMDK を投与しその併用効果を combination index (CI) を用いて評価。

(図 33)



SBC5 に対し DMSO を投与した細胞をコントロールとし、cisplatin 単独、iMDK 単独、cisplatin と iMDK 併用療法の 4 群における C-PARP と C-caspase3 のタンパク発現をウエスタンブロット法で評価。

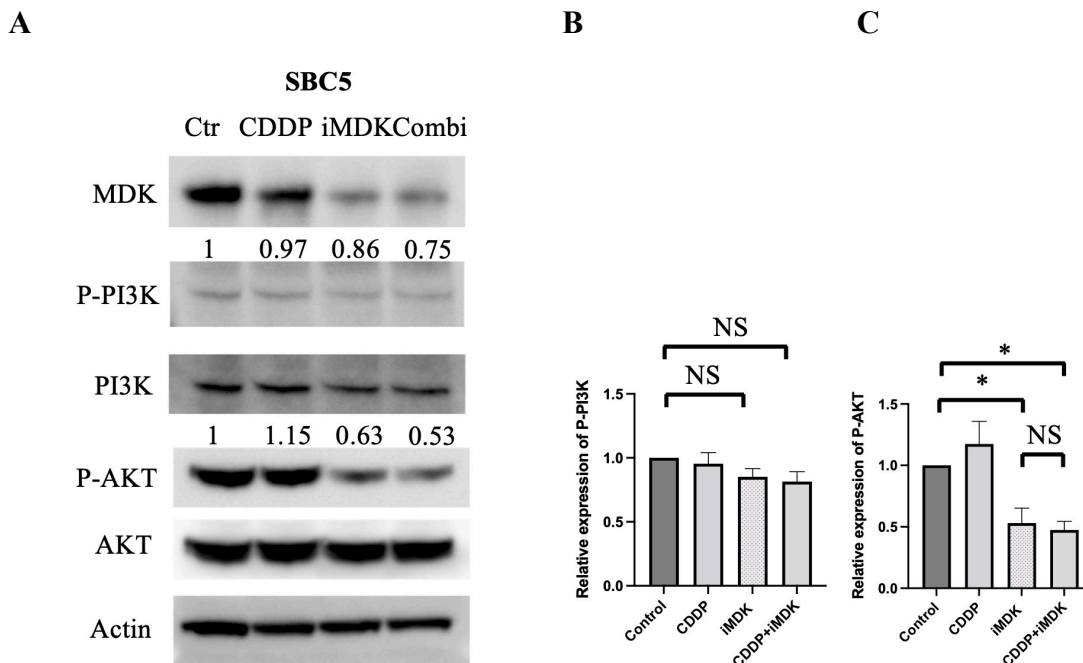
A)代表的なウエスタンブロットの画像を表示。数字は ImageJ を用いて Actin で補正したそれぞれのタンパク発現を定量化したもの。

B)定量化した C-PARP の発現を表示。

C)定量化した C-caspase3 の発現を表示

* $p < 0.05$ 。Ctr, control; CDDP, cisplatin; combi, cisplatin+iMDK

(図 34)



SBC5 に対し DMSO を投与した細胞をコントロールとし、cisplatin 単独、cisplatin と iMDK 併用療法の 4 群における MDK、P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、Actin のタンパク発現をウエスタンブロット法で評価。

A) 代表的なウエスタンブロットの画像を表示。数字は ImageJ を用いて Actin で補正したそれぞれのタンパク発現を定量化したもの。

B) 定量化した P-PI3K の発現を表示。

C) 定量化した P-AKT の発現を表示

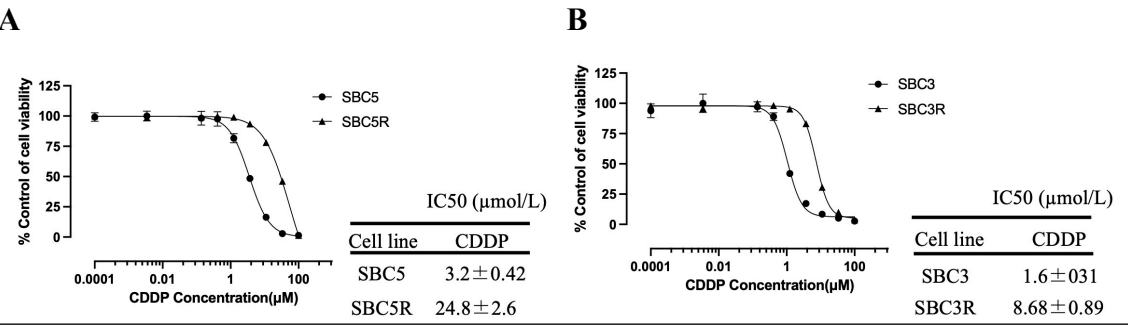
* $p < 0.05$ 。NS > 0.05 。Ctrl, control; CDDP, cisplatin; combi, cisplatin+iMDK

7) cisplatin 耐性獲得 SCLC 腫瘍細胞における MDK の発現変化の検討

MDK が SCLC においても cisplatin 耐性化と関連することが示唆されたため、我々は SCLC が cisplatin 耐性を獲得した際に MDK の発現に変化が認められるかを評価した。SCLC 細胞株 (SBC5、SBC3) を低濃度の cisplatin に長期間曝露することで cisplatin 耐性 SCLC 細胞 (SBC5R、SBC3R) を作成し (図 35A, 35B)、cisplatin 耐性獲得により MDK 及び AKT 経路に変化が認められるかをウエスタンブロット法で評価した (図 36)。その結果 cisplatin 耐性獲得に伴い MDK の発現増加と AKT 経路の活性化が認められた。次に、cisplatin 耐性細胞に iMDK を投与して MDK を knockdown した時の AKT 経路の変化をウエスタンブロット法で評価した (図 37)。その結果 iMDK 投与により MDK の発現低下と AKT 経路の抑制が認められた。SBC5R と SBC3R に cisplatin と iMDK を投与し CI を用いて相乗効果を評価した所、いずれにおいても相乗効果が認め

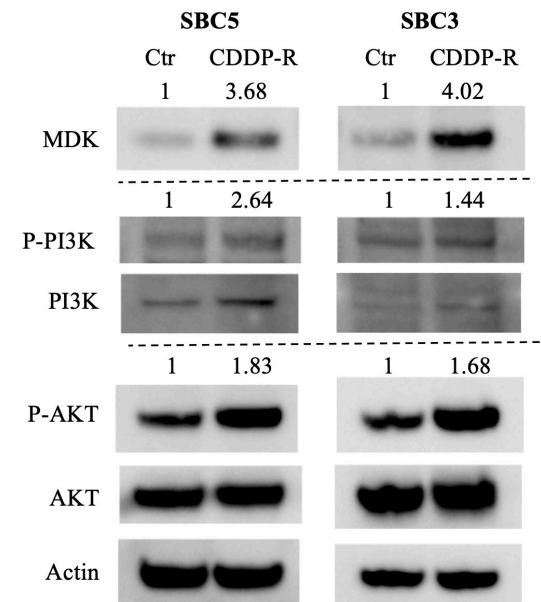
られた (図 38)。以上より、少なくとも一部の SCLC 細胞における cisplatin 耐性獲得の機序の 1 つには MDK 発現上昇による AKT 経路活性化があることが示唆された。

(図 35)



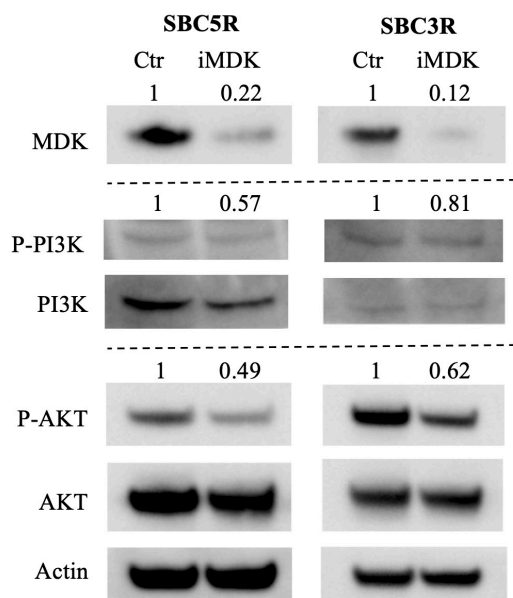
SCLC 細胞株に低濃度の cisplatin を長期間曝露し cisplatin 耐性細胞を確立した。
A)SBC5 と SBC5 から確立した cisplatin 耐性細胞株 SBC5R に対する cisplatin の殺細胞効果を MTT 法で評価。
B)SBC3 と SBC3 から確立した cisplatin 耐性細胞株 SBC3R に対する cisplatin の殺細胞効果を MTT 法で評価。
CDDP, cisplatin

(図 36)



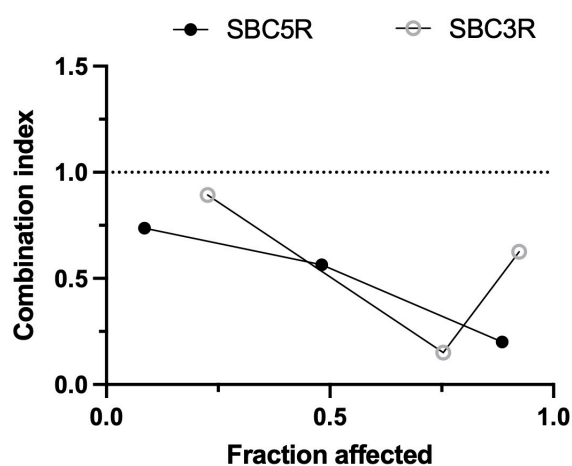
親株と cisplatin 耐性細胞株の MDK、P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、Actin の発現をウェスタンブロット法で評価。数字は ImageJ を用いて Actin で補正したそれぞれのタンパク発現を定量化したもの。親株をコントロール群と設定。
Ctr, control; CDDP, cisplatin; CDDP-R, cisplatin-resistant

(図 37)



cisplatin 耐性細胞株 SBC5R と SBC3R における iMDK 投与時の MDK、P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、Actin の発現をウェスタンブロット法で評価。数字は ImageJ を用いて Actin で補正したそれぞれのタンパク発現を定量化したもの。
DMSO 投与群をコントロールと設定。Ctrl, control

(図 38)

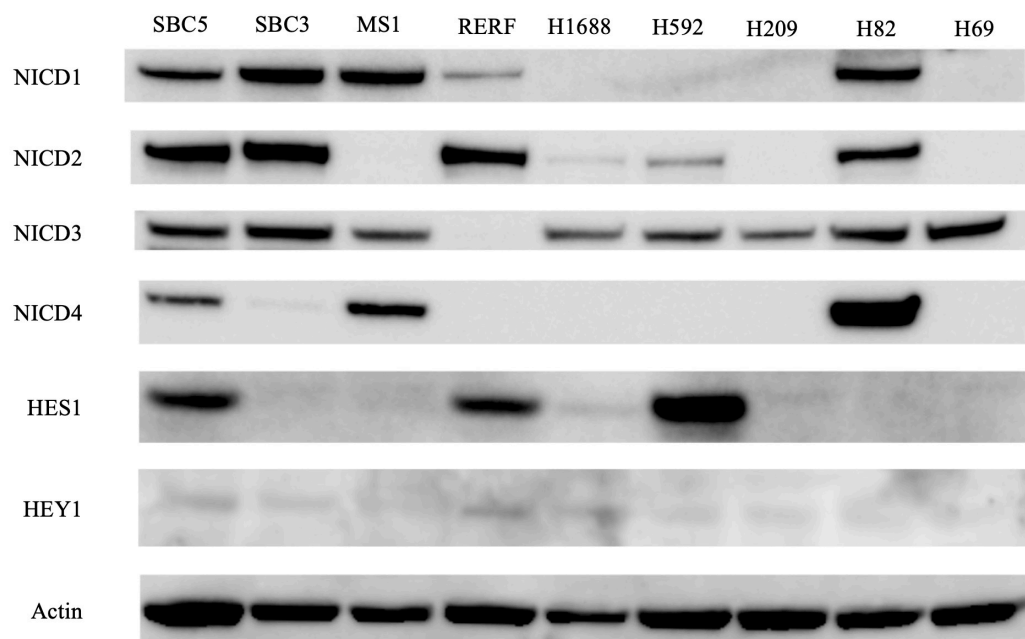


Cisplatin 耐性 SCLC 細胞株 SBC5R 及び SBC3R に対し cisplatin と iMDK を投与し、その併用効果を combination index (CI) を用いて評価。

8)SCLCにおけるMDKとNotch経路の検討

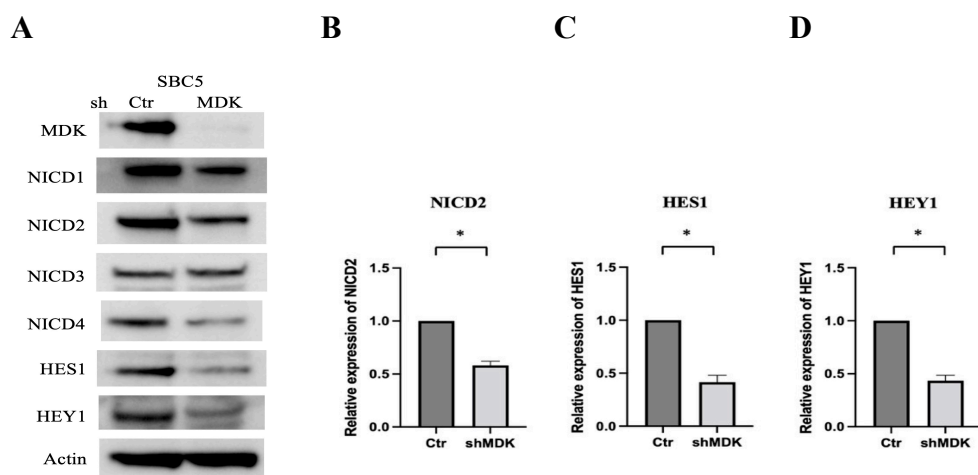
MDKの受容体候補物質はNotch2、LRP1/6、Syndecanなど複数存在する(Weckbach et al, 2018)。その中でもNotch経路の活性化はSCLCの腫瘍不均一性の亢進と重要な役割を示すことが知られており(Ireland et al, 2020)、その中でもMDK受容体候補物質であるNotch2は気道の神経内分泌幹細胞のマーカーであることを示唆した報告が存在する(Ouadah et al, 2019)。そこで我々はSCLCにおけるMDKとNotch経路の関連について評価することにした。Notch経路は細胞膜を介して細胞外ドメインと細胞内ドメイン(Notch intracellular domain: NICD)から形成されている。Notch経路はNotch受容体の細胞外ドメインにリガンドが結合することで γ -secretaseによりNotch受容体が分解されNICDが核内に移行することでhairy and enhancer of split 1 (HES1)やhairy/enhancer of split related with YRPW 1 (HEY1)などの標的遺伝子の転写活性化が行われることによって活性化されることが知られている(Beatus et al, 1999; Iso et al, 2003)。すなわちNICDとHES1やHEY1などの下流シグナルの発現を評価することでNotch経路の活性化を評価できると言える。まず我々は9つのSCLC細胞株におけるNotch1-4のNICD及びNotch経路のメジャーな標的遺伝子であるHES1及びHEY1の発現をウェスタンブロット法で評価した(図39)。その結果H209及びH69以外のMDK発現細胞株においてNICD2の発現が認められた一方で、MDK発現陰性のMS1においてはNICD2の発現が認められなかった。以上よりSCLC細胞株において、MDKの発現とNICD2の発現は概ね一致していたが、全てのMDK発現SCLC細胞株でNotch2受容体の活性化を認めたわけではなかった。次にMDK強発現細胞株であるSBC5のMDKをshMDKでknockdownしNotch経路変化をウェスタンブロット法で評価した(図40A,40B,40C,40D)。その結果MDKのknockdownによりNICD2、HES1、HEY1を含むNotch経路は抑制されていた。一方でNICD2の発現を認めたSBC3及びNICD2の発現を認めなかったMS1においてMDKをoverexpressionしてもNICD2、HES1、HEY1を含むNotch経路の活性化は認められなかった(図41A,41B)。以上よりMDKは一部のSCLCにおいてNotch2を含めたNotch経路と関連する可能性を示したが、少なくともSCLC全体においてMDKとNotch経路の相関が認められるわけではなく、SCLC全体においてMDKの受容体がNotch2である可能性は低いことが示唆された。

(図 39)



SCLC 細胞株における NICD1-4 及び HES1、HEY1 の発現をウェスタンブロット法を用いて評価。

(図 40)



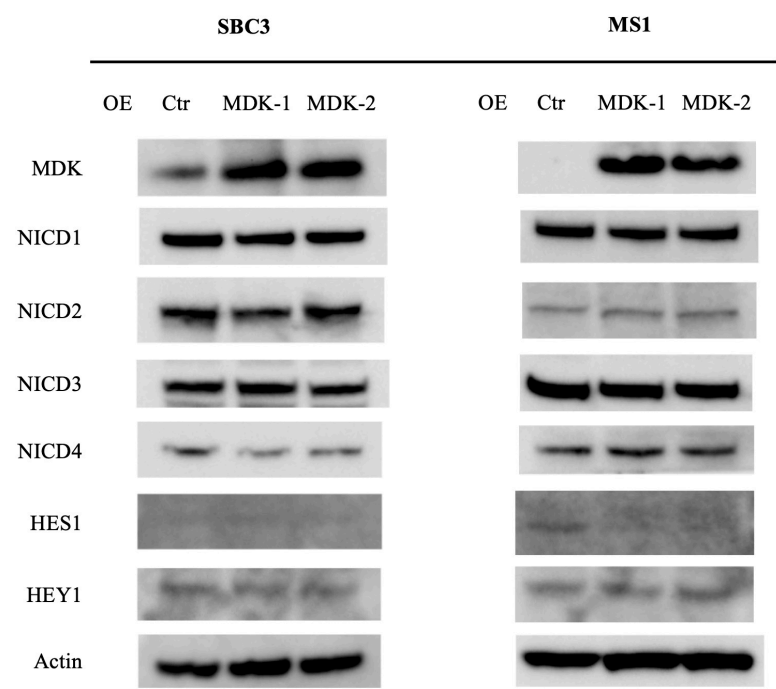
SBC5 に対し shMDK transfection を用いて MDK を knockdown した際の Notch 経路の変化をウェスタンブロット法で評価。

A) 代表的なウェスタンブロットの画像を提示。

B), C), D) SBC5 shCtr 及び SBC5 shMDK における ImageJ を用いて Actin で補正した NICD2、HES1、HEY1 の発現を定量化して評価。

* $p < 0.05$ 。

(図 41)

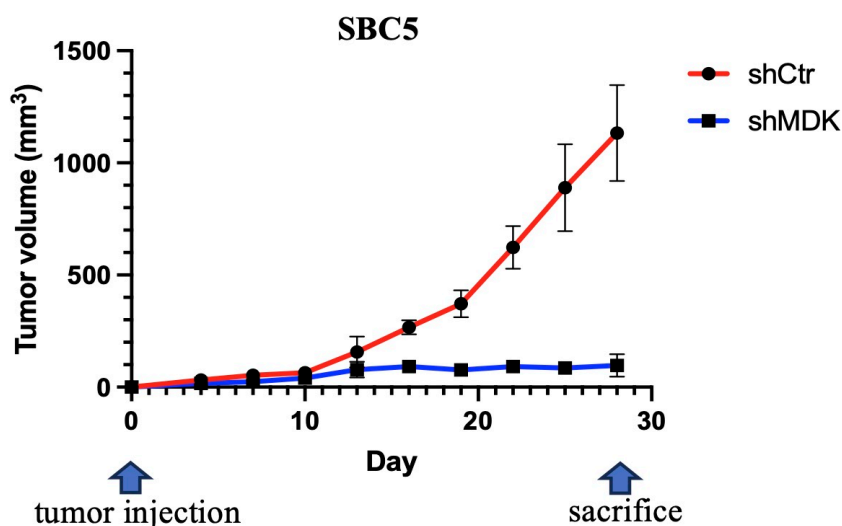


SBC3 及び MS1 に MDK を overexpression した際の Notch 経路の変化をウェスタンブロット法で評価。
それぞれの代表的な画像を提示。

9) SCLC における MDK の細胞増殖能への影響及び cisplatin と iMDK の併用効果の *in vivo* での検討

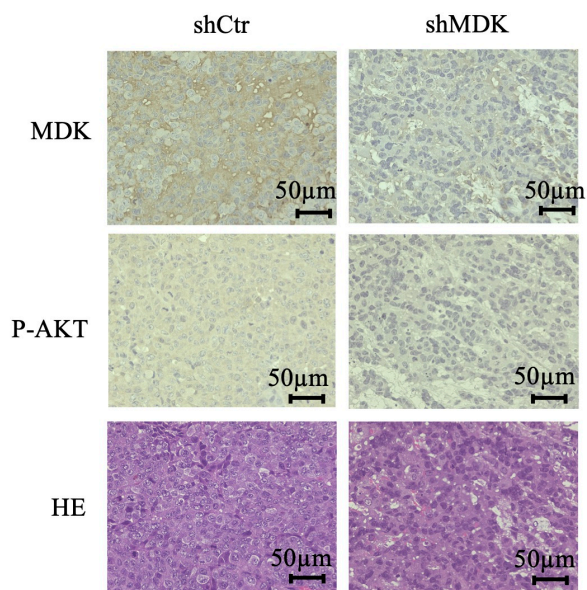
次に、*in vivo* においても *in vitro* と同様の結果が得られるかを検証した。SBC5 shCtr 細胞と SBC5 shMDK 細胞をヌードマウスの右後ろ脚に皮下注射しゼノグラフトマウスモデルを作成した。形成された皮下腫瘍の大きさを測定した所、SBC5 shMDK 細胞群では有意に腫瘍増大が抑制されていた (図 42)。上記マウスにおいて、day28 で腫瘍切除を行い免疫組織染色法を用いて MDK の発現と P-AKT の発現を評価した所、SBC5 shMDK 由来の腫瘍群において発現低下を認めた (図 43)。次に cisplatin と iMDK の併用が *in vivo* での腫瘍増殖にどのような影響を与えるかを検討した。SBC5 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、cisplatin 群、iMDK 群、cisplatin と iMDK 併用群に分けられ、cisplatin (1 mg/kg/日) は週 1 日腹腔注射、iMDK は (9 mg/kg/日) 週 3 日腹腔内注射した。コントロール群においては DMSO を週 3 回腹腔注射した (図 44)。その結果コントロール群に比較し cisplatin 群及び iMDK 群は腫瘍増大が抑制され、併用群ではさらに腫瘍増大抑制効果が強まっていた。それぞれの治療群の体重変化の推移を評価したがいずれの治療においても有意な体重減少も認められなかった (図 45)。次に上記 4 群のマウスの腫瘍を治療開始から 48 時間後に切除し免疫組織染色法を用いて MDK の発現と P-AKT の発現を評価した所 iMDK 単独及び併用群において MDK 及び P-AKT の発現低下を認めた (図 46)。以上より *in vivo* においても *in vitro* と同様の結果が得られた。

(図 42)



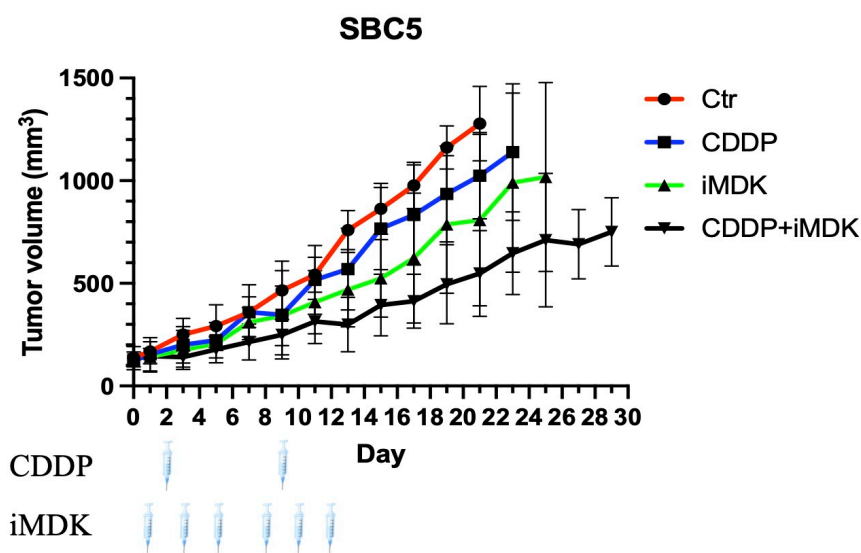
ヌードマウスに SBC5 shCtr または SBC5 shMDK を皮下注射後腫瘍計測し、腫瘍体積の経時変化を示した。マウスは皮下注射から 28 日後に sacrifice した。
1 群 $n=4$ でグラフは平均と標準偏差値を示している。

(図 43)



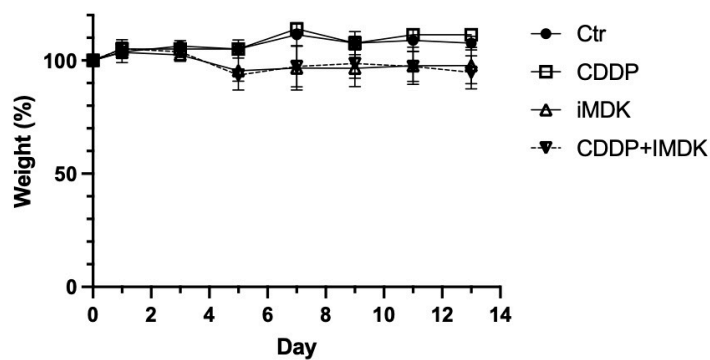
Sacrifice 時 (day 28) におけるマウス皮下腫瘍の MDK と P-AKT の発現を免疫組織染色で評価した。強拡大 (x400) で表示。

(図 44)



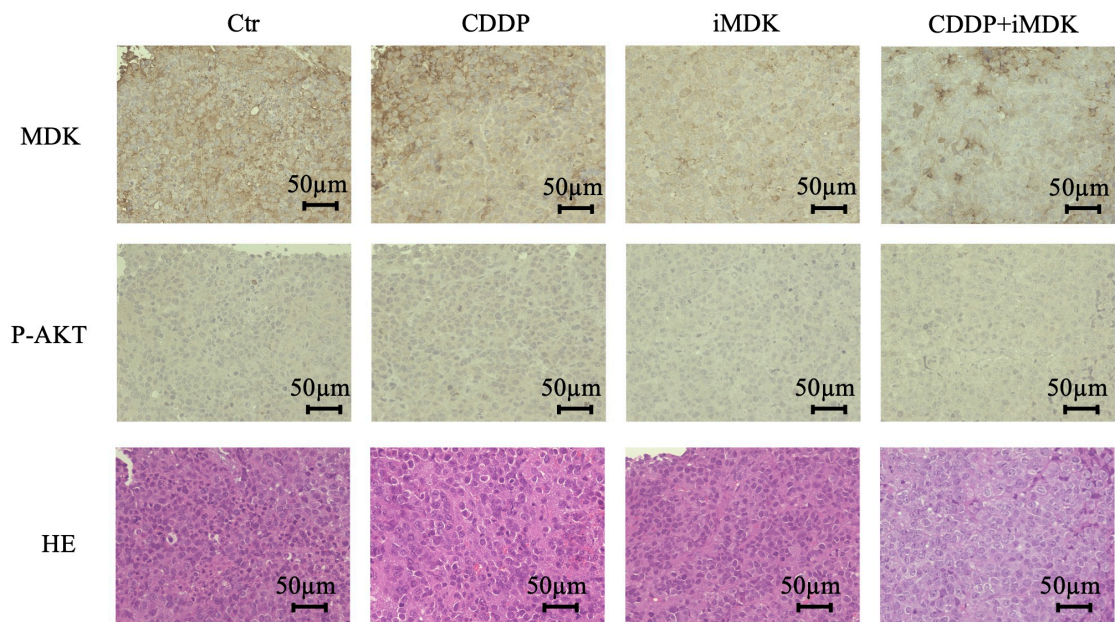
ヌードマウスに SBC5 を皮下注射後、DMSO、cisplatin、iMDK、または cisplatin と iMDK 併用投与を行った。DMSO 群をコントロール群とした。注射の図は薬剤投与日を示している。1)腫瘍体積が 1500mm³ 前後に到達した 2)潰瘍が出現した 3)皮下注射から 30 日経過した のいずれかの時点でその群のマウスを sacrifice した。1 群 $n = 4$ でグラフは平均と標準偏差値を示している。Ctr, control; CDDP, cisplatin

(図 45)



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。
Ctr, control; CDDP, cisplatin

(図 46)



治療開始から 48 時間時点で腫瘍切除し、それぞれの治療群におけるマウス皮下腫瘍の MDK と P-AKT の発現を免疫組織染色で評価した。強拡大 (x400) で表示。

考察

我々はヒト SCLC 細胞が MDK を発現・分泌し SCLC の細胞増殖能や cisplatin 耐性を増強することを *in vitro* 及び *in vivo* の両方で示した。本研究は SCLC における MDK の発現及び機能を評価した初めての報告である。

SCLC はサブグループ毎に特異的な薬剤脆弱性が示されているにも関わらず、臨床応用には至っていない(Poirier et al, 2020)。その一つの原因として、SCLC は不均一性の高い腫瘍であり様々なサブグループの腫瘍細胞が混在して存在しているために十分な *targeted therapy* の効果が期待できないと考えられている(Ireland et al, 2020; Zhang et al, 2018b)。一方で Lim らはマウスモデルを用いて Non-NE 型 SCLC が MDK を分泌し NE 型 SCLC の増殖を亢進させることを示唆した(Lim et al, 2017)。我々は MDK をターゲットとすることで分泌に関わる Non-NE 型 SCLC と MDK が作用する NE 型 SCLC の両方を治療できる可能性があるのではないかと仮定した。しかしながら、細胞株での検討では Non-NE 型の SBC5 で最も強い MDK の発現が認められた一方で、ヒト手術検体の検討では ASCL1 と NEUROD1 を発現した NE 型 SCLC において最も強い MDK の発現が認められていた。また、NEUROD1 優位で NE と Non-NE 両方の特性を併せ持つ SCLC 細胞株である MS1 において MDK が陰性であり、SCLC における MDK の発現と SCLC のサブグループや NE 傾向の間には明らかな相関を見出すことはできなかった。MDK 発現 SCLC の特徴についてはさらなる検討が必要であるが、iMDK は MDK 発現 SCLC において有効性を示しており、MDK 発現が認められる SCLC においては MDK 阻害療法の効果が期待できる可能性がある。

様々な悪性腫瘍において発現亢進の報告がある MDK は分泌型タンパクであり、血中や尿中の MDK 値は悪性腫瘍の非侵襲的な診断や予後マーカーとして注目されている(Garver et al, 1994; Ikematsu et al, 2000; Konishi et al, 1999; Zhang et al, 2018a)。我々は SCLC 患者において血清 MDK 値が上昇を認め、その値は腫瘍量を反映することを示した。SCLC は高い増殖能を持つ悪性度の高い腫瘍であり、多くの症例において診断時に遠隔転移を伴い速やかな治療介入を要する(Gazdar et al, 2017; Megyesfalvi et al, 2023)。本研究において血清 MDK 値の AUC は 0.81 と診断マーカーとして有望な可能性を示しており、また一部の症例においては腫瘍増大の前に血清 MDK 値の上昇が認められ増悪予測マーカーとして有望な可能性を示した。また本研究において SCLC における MDK の発現には腫瘍内に不均一性があることが示されていた。大多数の症例において診断時に手術適応外であり気管支鏡による限られた量の検体を用いて評価せざるを得ない SCLC において血清 MDK 値は MDK 発現評価の代替えとなり得る可能性がある。

MDK は様々な悪性腫瘍において、AKT 経路や ERK 経路などの細胞内シグナルの活性化を誘導することで細胞増殖亢進・上皮間葉転換亢進・血管新生亢進などの機能を示すことが知られている(Filippou et al, 2020)が、SCLC においても細胞増殖能及び細胞遊走能を増強し、cisplatin の耐性を誘導することが示された。我々は SCLC において MDK は AKT 経路の活性化と関連することを示した。AKT 経路は悪性腫瘍において細胞増殖増強、抗アポトーシス作用、血管新生増強など様々な役割を果たすことが知られている(Revathidevi and Munirajan, 2019)。また SCLC においても AKT 経路の活性化は腫瘍不均一性を増強し化学療法耐性を誘導することが報告されている(Jin et al, 2022; Li et al, 2021)。以上より SCLC において MDK は AKT 経路の活性化を介して細胞増殖能及び細胞遊走能を増強し cisplatin の耐性を誘導することが示唆された。一方で MS1 においては MDK の overexpression により AKT 経路だけではなく ERK 経路の活性化も認められており、一部の SCLC 細胞においては AKT 経路だけではなく ERK 経路の活性化を誘導する可能性も否定できず、今後のさらなる検証が求められる。

我々は *in vitro* 及び *in vivo* の両方の SCLC モデルにおいて cisplatin と iMDK が相乗効果を示すことと、cisplatin 耐性 SCLC 細胞株において MDK の発現及び AKT 経路の活性化が増強することを示した。Cisplatin は現在も SCLC の標準治療薬として使用される薬剤であるが、多くの症例において耐性を生じ再発が認められてしまうことが知られている(Gazdar et al, 2017; Megyesfalvi et al, 2023)。MDK は glioma や胃癌において AKT 経路の活性化により化学療法耐性を誘導することが報告されているが(Lorente et al, 2011b; Xu et al, 2012)、上記の通り AKT 経路は SCLC においても化学療法耐性に関連することが報告されている。以上より本研究で示された MDK の阻害による cisplatin の効果増強は AKT 経路の阻害で説明できると考えられる。

MDK は受容体と結合後細胞内シグナルを活性化させるが、その受容体候補物質は Notch2、LRP1/6、Syndecan など複数存在する(Filippou et al, 2020; Weckbach et al, 2018)。その中でも今回我々は気道の神経内分泌幹細胞マーカーの候補物質として知られる Notch2 及び、SCLC の腫瘍不均一性に重要な役割を果たす Notch 経路に着目した(Ireland et al, 2020; Ouadah et al, 2019)。我々の検証では SBC5 においては MDK を knockdown すると NICD2 の発現を含む Notch 経路の抑制が認められたが、SBC3 と MS1 に対して MDK を overexpression しても NICD2 を含む Notch 経路の活性化を認めなかった。また SCLC 細胞株において必ずしも MDK の発現と NICD2 の発現に相関関係は認められなかった。このため本検討からは、一部の SCLC 細胞においては Notch2 が MDK との関連性があるものの、SCLC 全体においては Notch2 が MDK の受容体である可能性は低いことが示唆された。SCLC はサブグループ毎に異なる性質をもち、また、不均一性が高い腫瘍であることが知られており(Ireland et al, 2020;

Rudin et al, 2019)、MDK の受容体においても腫瘍細胞やサブグループ毎に一致していない可能性が考えられる。また Notch 経路以外に報告されている受容体については今回検討できておらず、SCLC における MDK の受容体については今後の検証が必要であると考ええる。

本研究にはいくつかの **limitation** がある。まずは単施設の研究であり少数例の検体評価にとどまっていることが挙げられる。免疫染色を施行できた症例は4例と極めて少数であり MDK 発現 SCLC についての検証が不十分である。また血清 MDK 値の検証においても症例数は十分とはいえず、血清 MDK 値の予後解析において Stage などの交絡因子を揃えることができなかった。次に MDK による SCLC の TME の変化の評価ができていないことが挙げられる。MDK は TME において MDSC を刺激し殺細胞 T リンパ球の機能を抑制することで耐性を誘導することが知られており、肝細胞癌においては MDK 阻害薬の併用は ICI の効果を高めることが報告されている (Cerezo-Wallis et al, 2020; Ding et al, 2023)。白金製剤+Etoposide+ICI が標準治療である SCLC は一般に ICI の効果が乏しい免疫抑制 TME である”cold tumor”として知られているが、Non-NE 型 SCLC の一部を占める Inflamed type として知られるサブグループは免疫原生の高い”hot tumor”でありこの population が優位な患者においては ICI 併用の効果が期待できることが知られている (Gay et al, 2021)。SCLC においても MDK が TME を腫瘍抑制状態へと誘導していることが証明されれば ICI に MDK 阻害薬を併用することでより高い効果が見込める可能性がある。最後に Notch2 以外の MDK 受容体についての評価ができておらず、SCLC における MDK の受容体は未だ不明である。

上記のような **limitation** はあるが、本研究は SCLC における MDK の発現と機能を評価した初めての報告である。SCLC において MDK は治療ターゲットとなり得る可能性があり、SCLC における MDK の発現や機能についてのさらなる検証が必要であると考ええる。

総括及び結論

本研究で得られた新知見として、

- 一部の SCLC 腫瘍細胞において MDK の発現が認められ、MDK 発現 SCLC 腫瘍細胞とその SCLC のサブグループや神経内分泌傾向の間には明らかな相関は認めなかった。
- SCLC において血清 MDK 値は上昇しており腫瘍量を反映することが示された。また血清 MDK は診断や治療予後マーカーとして有望である可能性が示唆された。
- MDK は AKT 経路を活性化することで細胞増殖能や細胞遊走能を増強し cisplatin の耐性化を誘導することが示唆された。

新知見の意義として、我々の知る限り本研究は SCLC における MDK の発現及び機能について評価した初めて報告である。また SCLC 標準治療薬である cisplatin と MDK 阻害薬の併用が相乗的に細胞増殖抑制効果を示すことを初めて報告するものである。近年 SCLC の targeted therapy についての研究が進められているが、今回の我々の結果は MDK 発現 SCLC において cisplatin を含む標準化学療法と MDK 阻害薬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北海道大学病院地域医療連携福祉センター榊原純教授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。北海道大学大学院歯学研究院血管生物分子病理学教室樋田京子教授には小細胞肺癌患者血清検体の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

- Andrikopoulou A, Chatzinikolaou S, Panourgias E, Kaparelou M, Liontos M, Dimopoulos MA and Zagouri F (2022) "The emerging role of capivasertib in breast cancer". *Breast* 63, 157-167.
- 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.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A and Testa JR (2005) Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94, 29-86.
- Bogart JA, Waqar SN and Mix MD (2022) Radiation and Systemic Therapy for Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 40, 661-670.
- Cerezo-Wallis D, Contreras-Alcalde M, Troulé K, Catena X, Mucientes C, Calvo TG, Cañón E, Tejedo C, Pennacchi PC, Hogan S, et al (2020) Midkine rewires the melanoma microenvironment toward a tolerogenic and immune-resistant state. *Nat Med* 26, 1865-1877.
- Chou TC (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 70, 440-446.
- Cohen S, Shoshana OY, Zelman-Toister E, Maharshak N, Binsky-Ehrenreich I, Gordin M, Hazan-Halevy I, Herishanu Y, Shvidel L, Haran M, et al (2012) The cytokine midkine and its receptor RPTP ζ regulate B cell survival in a pathway induced by CD74. *J Immunol* 188, 259-269.
- Dai LC, Shao JZ, Min LS, Xiao YT, Xiang LX and Ma ZH (2008) Midkine accumulated in nucleolus of HepG2 cells involved in rRNA transcription. *World J Gastroenterol* 14, 6249-6253.
- Dai LC, Wang X, Yao X, Lu YL, Ping JL and He JF (2007) Enhanced therapeutic effects of combined chemotherapeutic drugs and midkine antisense oligonucleotides for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 13, 1989-1994.
- Ding L, Wang N, Wang Q, Fan X, Xin Y and Wang S (2023) Midkine inhibition enhances anti-PD-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma via preventing immunosuppressive MDSCs infiltration. *Cell Death Discov* 9, 92.
- Fabri L, Maruta H, Muramatsu H, Muramatsu T, Simpson RJ, Burgess AW and Nice EC (1993) Structural characterisation of native and recombinant forms of the neurotrophic cytokine MK. *J Chromatogr* 646, 213-225.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A and Bray F (2021) Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*.
- Filippou PS, Karagiannis GS and Constantinidou A (2020) Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target. *Oncogene* 39, 2040-2054.
- Frese KK, Simpson KL and Dive C (2021) Small cell lung cancer enters the era of precision medicine. *Cancer Cell* 39,

297-299.

- Frick IM, Nordin SL, Baumgarten M, Mörgelin M, Sørensen OE, Olin AI and Egesten A (2011) Constitutive and inflammation-dependent antimicrobial peptides produced by epithelium are differentially processed and inactivated by the commensal *Finnegoldia magna* and the pathogen *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* 187, 4300-4309.
- Garver RI, Jr., Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR and Milner PG (1994) Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* 74, 1584-1590.
- Gay CM, Stewart CA, Park EM, Diao L, Groves SM, Heeke S, Nabet BY, Fujimoto J, Solis LM, Lu W, et al (2021) Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell* 39, 346-360.e347.
- Gazdar AF, Bunn PA and Minna JD (2017) Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer* 17, 725-737.
- George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G, et al (2015) Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 524, 47-53.
- Goldman JW, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, Statsenko G, Hochmair MJ, Özgüroğlu M, Ji JH, et al (2021) Durvalumab, with or without tremelimumab, plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide alone in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): updated results from a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 22, 51-65.
- Grupp K, Melling N, Bogoevska V, Reeh M, Uzunoglu FG, El Gammal AT, Nentwich MF, Izicki JR and Bogoevski D (2018) Expression of ICAM-1, E-cadherin, periostin and midkine in metastases of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Exp Mol Pathol* 104, 109-113.
- Hao H, Maeda Y, Fukazawa T, Yamatsuji T, Takaoka M, Bao XH, Matsuoka J, Okui T, Shimo T, Takigawa N, et al (2013) Inhibition of the growth factor MDK/midkine by a novel small molecule compound to treat non-small cell lung cancer. *PLoS One* 8, e71093.
- Huang Y, Hoque MO, Wu F, Trink B, Sidransky D and Ratovitski EA (2008) Midkine induces epithelial-mesenchymal transition through Notch2/Jak2-Stat3 signaling in human keratinocytes. *Cell Cycle* 7, 1613-1622.
- Ibusuki M, Fujimori H, Yamamoto Y, Ota K, Ueda M, Shinriki S, Taketomi M, Sakuma S, Shinohara M, Iwase H, et al (2009) Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer Sci* 100, 1735-1739.
- Ikematsu S, Yano A, Aridome K, Kikuchi M, Kumai H, Nagano H, Okamoto K, Oda M, Sakuma S, Aikou T, et al (2000) Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer* 83, 701-706.
- Ireland AS, Micinski AM, Kastner DW, Guo B, Wait SJ, Spainhower KB, Conley CC, Chen OS, Guthrie MR, Soltero D, et al (2020) MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell* 38, 60-78.e12.
- 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.
- Jackman DM and Johnson BE (2005) Small-cell lung cancer. *Lancet* 366, 1385-1396.
- Jee YH, Lee KS, Yue S, Leschek EW, Boden MG, Jadra A, Klibanski A, Vaidyanathan P, Misra M, Chang YP, et al (2019) Plasma midkine concentrations in healthy children, children with increased and decreased adiposity, and children with short stature. *PLoS One* 14, e0224103.
- Jin Y, Chen Y, Tang H, Hu X, Hubert SM, Li Q, Su D, Xu H, Fan Y, Yu X, et al (2022) Activation of PI3K/AKT Pathway Is a Potential Mechanism of Treatment Resistance in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 28, 526-539.
- Jing X, Cui X, Liang H, Hao C and Han C (2017) Diagnostic accuracy of ELISA for detecting serum Midkine in cancer patients. *PLoS One* 12, e0180511.
- Kadomatsu K, Huang RP, Suganuma T, Murata F and Muramatsu T (1990) A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* 110, 607-616.
- Kadomatsu K, Tomomura M and Muramatsu T (1988) cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 1312-1318.
- Kaname T, Kuwano A, Murano I, Uehara K, Muramatsu T and Kajii T (1993) Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 17, 514-515.
- Kojima S, Inui T, Muramatsu H, Suzuki Y, Kadomatsu K, Yoshizawa M, Hirose S, Kimura T, Sakakibara S and Muramatsu T (1997) Dimerization of midkine by tissue transglutaminase and its functional implication. *J Biol Chem* 272, 9410-9416.
- Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, Hiasa Y, Cho M, Uemura H, Hirao Y, Muramatsu T and Kadomatsu K (1999) Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* 57, 253-257.
- Lautz T, Lasch M, Borgolte J, Troidl K, Pagel JJ, Caballero-Martinez A, Kleinert EC, Walzog B and Deindl E (2018) Midkine Controls Arteriogenesis by Regulating the Bioavailability of Vascular Endothelial Growth Factor A and the Expression of Nitric Oxide Synthase 1 and 3. *EBioMedicine* 27, 237-246.
- Lee SH, Suh HN, Lee YJ, Seo BN, Ha JW and Han HJ (2012) Midkine prevented hypoxic injury of mouse embryonic stem cells through activation of Akt and HIF-1 α via low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J Cell Physiol* 227, 1731-1739.
- Li J, Ballif BA, Powelka AM, Dai J, Gygi SP and Hsu VW (2005) Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin β 1 to control cell migration. *Dev Cell* 9, 663-673.
- Li X, Li C, Guo C, Zhao Q, Cao J, Huang HY, Yue M, Xue Y, Jin Y, Hu L, et al (2021) PI3K/Akt/mTOR signaling orchestrates the phenotypic transition and chemo-resistance of small cell lung cancer. *J Genet Genomics* 48, 640-651.

- Lim JS, Ibaseta A, Fischer MM, Cancilla B, O'Young G, Cristea S, Luca VC, Yang D, Jahchan NS, Hamard C, et al (2017) Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature* 545, 360-364.
- Liu HW, Bi WT, Huang HT, Li RX, Xi Q, Feng L, Bo W, Hu M and Wen WS (2018) Satb1 promotes Schwann cell viability and migration via activation of PI3K/AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22, 4268-4277.
- Liu SV, Reck M, Mansfield AS, Mok T, Scherpereel A, Reinmuth N, Garassino MC, De Castro Carpeno J, Califano R, Nishio M, et al (2021) Updated Overall Survival and PD-L1 Subgroup Analysis of Patients With Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer Treated With Atezolizumab, Carboplatin, and Etoposide (IMpower133). *J Clin Oncol* 39, 619-630.
- López-Valero I, Dávila D, González-Martínez J, Salvador-Tormo N, Lorente M, Saiz-Ladera C, Torres S, Gabicagogeasoa E, Hernández-Tiedra S, García-Taboada E, et al (2020) Midkine signaling maintains the self-renewal and tumorigenic capacity of glioma initiating cells. *Theranostics* 10, 5120-5136.
- Lorente M, Torres S, Salazar M, Carracedo A, Hernández-Tiedra S, Rodríguez-Fornés F, García-Taboada E, Meléndez B, Mollejo M, Campos-Martín Y, et al (2011a) Stimulation of ALK by the growth factor midkine renders glioma cells resistant to autophagy-mediated cell death. *Autophagy* 7, 1071-1073.
- Lorente M, Torres S, Salazar M, Carracedo A, Hernández-Tiedra S, Rodríguez-Fornés F, García-Taboada E, Meléndez B, Mollejo M, Campos-Martín Y, et al (2011b) Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death Differ* 18, 959-973.
- Masui M, Okui T, Shimo T, Takabatake K, Fukazawa T, Matsumoto K, Kurio N, Ibaragi S, Naomoto Y, Nagatsuka H, et al (2016) Novel Midkine Inhibitor iMDK Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 36, 2775-2781.
- Megyesfalvi Z, Gay CM, Popper H, Pirker R, Ostoros G, Heeke S, Lang C, Hoetzenecker K, Schwendenwein A, Boettiger K, et al (2023) Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin* 73, 620-652.
- Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, Jalkanen M and Thesleff I (1995) Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development* 121, 37-51.
- Muramatsu H, Zou P, Suzuki H, Oda Y, Chen GY, Sakaguchi N, Sakuma S, Maeda N, Noda M, Takada Y, et al (2004) alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J Cell Sci* 117, 5405-5415.
- Muramatsu T (1993) Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation. *Int J Dev Biol* 37, 183-188.
- Muramatsu T (2002) Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem* 132, 359-371.
- Muramatsu T (2014) Structure and function of midkine as the basis of its pharmacological effects. *Br J Pharmacol* 171,

814-826.

- Nordin SL, Andersson C, Bjerner L, Bjartell A, Mörgelin M and Egesten A (2013a) Midkine is part of the antibacterial activity released at the surface of differentiated bronchial epithelial cells. *J Innate Immun* 5, 519-530.
- Nordin SL, Jovic S, Kurut A, Andersson C, Gela A, Bjartell A, Mörgelin M, Olin AI, Lund M and Egesten A (2013b) High expression of midkine in the airways of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 935-942.
- Ouadah Y, Rojas ER, Riordan DP, Capostagno S, Kuo CS and Krasnow MA (2019) Rare Pulmonary Neuroendocrine Cells Are Stem Cells Regulated by Rb, p53, and Notch. *Cell* 179, 403-416.e423.
- Owada K, Sanjyo N, Kobayashi T, Kamata T, Mizusawa H, Muramatsu H, Muramatsu T and Michikawa M (1999) Midkine inhibits apoptosis via extracellular signal regulated kinase (ERK) activation in PC12 cells. *J Med Dent Sci* 46, 45-51.
- Poirier JT, George J, Owonikoko TK, Berns A, Brambilla E, Byers LA, Carbone D, Chen HJ, Christensen CL, Dive C, et al (2020) New Approaches to SCLC Therapy: From the Laboratory to the Clinic. *J Thorac Oncol* 15, 520-540.
- Revathidevi S and Munirajan AK (2019) Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol* 59, 80-91.
- Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, Rudd RM, Okamoto H, Skarlos DV, Früh M, Qian W, Tamura T, Samantas E, et al (2012) Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *J Clin Oncol* 30, 1692-1698.
- Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, Heymach JV, Johnson JE, Lehman JM, MacPherson D, et al (2019) Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer* 19, 289-297.
- Salama RH, Muramatsu H, Zou K, Inui T, Kimura T and Muramatsu T (2001) Midkine binds to 37-kDa laminin binding protein precursor, leading to nuclear transport of the complex. *Exp Cell Res* 270, 13-20.
- Stern L, Mueller E, Bellon E, Reeh M, Grotelueschen R, Guengoer C, Melling N, Goetz M, Perez DR, Izbicki JR, et al (2021) Serum midkine as non-invasive biomarker for detection and prognosis of non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 11, 14616.
- Takashima Y, Kikuchi E, Kikuchi J, Suzuki M, Kikuchi H, Maeda M, Shoji T, Furuta M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, et al (2020) Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1-inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 146, 1114-1124.
- Takenaka H, Horiba M, Ishiguro H, Sumida A, Hojo M, Usui A, Akita T, Sakuma S, Ueda Y, Kodama I, et al (2009) Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H462-469.
- Tan AC and Tan DSW (2022) Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol* 40, 611-625.

- Tian W, Shen J and Chen W (2017) Suppression of midkine gene promotes the antitumoral effect of cisplatin on human gastric cancer cell line AGS in vitro and in vivo via the modulation of Notch signaling pathway. *Oncol Rep* 38, 745-754.
- Tsutsui J, Uehara K, Kadomatsu K, Matsubara S and Muramatsu T (1991) A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 792-797.
- Uehara K, Matsubara S, Kadomatsu K, Tsutsui J and Muramatsu T (1992) Genomic structure of human midkine (MK), a retinoic acid-responsive growth/differentiation factor. *J Biochem* 111, 563-567.
- Vu Van D, Heberling U, Wirth MP and Fuessel S (2016) Validation of the diagnostic utility of urinary midkine for the detection of bladder cancer. *Oncol Lett* 12, 3143-3152.
- Ward SG, Westwick J and Harris S (2011) Sat-Nav for T cells: Role of PI3K isoforms and lipid phosphatases in migration of T lymphocytes. *Immunol Lett* 138, 15-18.
- Weckbach LT, Preissner KT and Deindl E (2018) The Role of Midkine in Arteriogenesis, Involving Mechanosensing, Endothelial Cell Proliferation, and Vasodilation. *Int J Mol Sci* 19.
- Xia X, Lu JJ, Zhang SS, Su CH and Luo HH (2016) Midkine is a serum and urinary biomarker for the detection and prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7, 87462-87472.
- Xu YY, Mao XY, Song YX, Zhao F, Wang ZN, Zhang WX, Xu HM and Jin F (2012) Midkine confers Adriamycin resistance in human gastric cancer cells. *Tumour Biol* 33, 1543-1548.
- Yang KD, Wang Y, Zhang F, Li QL, Luo BH, Feng DY and Zeng ZJ (2022) CAF-derived midkine promotes EMT and cisplatin resistance by upregulating lncRNA ST7-AS1 in gastric cancer. *Mol Cell Biochem* 477, 2493-2505.
- Ye C, Qi M, Fan QW, Ito K, Akiyama S, Kasai Y, Matsuyama M, Muramatsu T and Kadomatsu K (1999) Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 79, 179-184.
- Yu X, Zhou Z, Tang S, Zhang K, Peng X, Zhou P, Zhang M, Shen L and Yang L (2022) MDK induces temozolomide resistance in glioblastoma by promoting cancer stem-like properties. *Am J Cancer Res* 12, 4825-4839.
- Zhang L, Song X, Shao Y, Wu C and Jiang J (2018a) Prognostic value of Midkine expression in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 9, 24821-24829.
- Zhang W, Girard L, Zhang YA, Haruki T, Papari-Zareei M, Stastny V, Ghayee HK, Pacak K, Oliver TG, Minna JD, et al (2018b) Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Transl Lung Cancer Res* 7, 32-49.