

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16375

研究課題名（和文）DLL3を基軸とした消化管NETの病態解明と新規創薬への試行

研究課題名（英文）Elucidation of the gastrointestinal NET pathogenesis through the DLL3 and its application to novel drug discovery

研究代表者

谷口 高平（Kohei, Taniguchi）

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：70779686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：当課題では、これまで神経内分泌分化に関与し、肺小細胞がんなどで注目されていたDLL3という分子の消化管神経内分泌腫瘍（消化管NET/NEC）における役割を検討した。研究の遂行から、消化管NECでも発現が著明に亢進していることが明らかとなった。また、DLL3の発現を抑制するとアポトーシスを介した増殖抑制が生じることから、消化管NECの生存に重要な位置付けであることが示唆された。しかし、既存のDLL3抗体薬物複合体は肺小細胞がんでは有用性が示せず、開発が中断していることを考慮し、新たなDLL3を標的とした化合物を選定するためのスクリーニング検証に対する実験系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管神経内分泌腫瘍（癌）は、希少腫瘍に位置付けられ研究の進展が不十分な疾患であると認識している。本研究から、DLL3が同疾患で重要な役割を担っていることが同定され、新たな注目すべき分子を抽出することができた。また、DLL3の発現を抑制する新規化合物の探索するための実験系を構築することに取り組んだことにより、今後、消化管神経内分泌腫瘍の治療開発に繋がる成果を得ることが出来た。本研究から、本疾患の克服につながる土台が病態及び、治療の面から構築されたと考える。

研究成果の概要（英文）：We tried to clarify the gastrointestinal NEC (GI-NEC) pathogenesis through the DLL3 functions in this project. DLL3 has attracted interest as a novel molecular target in neuroendocrine carcinoma of the lung. Our results showed that DLL3 expression was extremely increased in the GI-NEC. Also, the knockdown of DLL3 suppressed the growth through the induction of apoptosis in GI-NEC cells. These findings suggested that DLL3 is one of the crucial molecules in GI-NEC. However, the development of the existing DLL3 antibody-drug conjugate was suspended because of not overcoming standard treatment. Hence, we conducted the establishment of a screening assay to extract the novel compound targeting DLL3.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：DLL3 神経内分泌癌 NET NEC 消化管NET

1. 研究開始当初の背景

2010年に世界保健機構は内分泌細胞由来腫瘍に対し、Neuroendocrine tumor (NET)の名称・疾患概念を提唱した。消化管に発生するNETは未だ有効な治療薬に乏しく、高頻度に肝転移(10-50%)し予後不良な疾患である。しかしながら発症率が10万人に5.25人(国立がんセンターHP参照)と希で、他がん種と比較し研究が進んでいない現状がある。

Notch受容体抑制型リガンドであるDelta-like protein 3 (DLL3)は発生や細胞死など様々な生命現象に必須の分子である。

我々の研究室では主に肝細胞癌におけるDLL3の機能解析を行ってきた¹。一方で、DLL3は肺小細胞癌(SCLC)と大細胞神経内分泌癌(LCNEC)で高頻度に発現が増幅することが知られており、近年、肺小細胞癌に対するDLL3を標的とした抗体薬物複合体(ADC)として、Rovalpituzumab Tesirine (Rova-T)が開発され臨床試験が進行していた²。これらの背景を鑑み、本研究では消化管NET/NEC(GI-NET/NEC)に対するDLL3の機能解析を中心に研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は希少腫瘍であるGI-NECとDLL3の関係性を明らかにし、GI-NECの病態解明の一助とすることである。さらに、Rova-TのGI-NECに対する有効性を検証することを当初の目的に設定し研究を開始した。

3. 研究の方法

先ず初めに、DLL3の消化管における局在や、その位置付けを明確にすることから研究を開始した。DLL3の発現分布を同定するために、免疫組織化学染色法や、蛍光二重免疫染色法を用いた。対象とする組織として胃、十二指腸、空腸、回腸、直腸を選択した。また、代表的内分泌マーカーであるChromogranin A (CHGA)の発現部位と比較した。一方、消化管NECにおけるDLL3の発現や局在を検討する為、CHGA陽性消化器癌症例として、CHGA陽性胃癌4例と胃mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC)2例の切除標本を用いてDLL3の発現を検討した。その内、CHGA陽性胃癌4例については連続切片を用いて、DLL3とCHGAの局在を比較検証した。

続いて、細胞実験を実施した。GI-NEC由来細胞株ECC4(直腸)、ECC10(胃)、ECC12(胃)中のDLL3発現を、mRNA、タンパクレベルで解析した。また、DLL3やCHGAの局在を蛍光二重免疫染色及び、免疫電子顕微鏡実験で検討した。DLL3の発現抑制によってGI-NECに与える影響を検討するため、siRNAの導入により検証した。細胞増殖をトリパンブルー染色法で解析し、シグナル変化をアポトーシス関連分子中心に評価した。また、DLL3ノックダウン時の3次元培養に対する変化をスフェロイドアッセイで評価した。

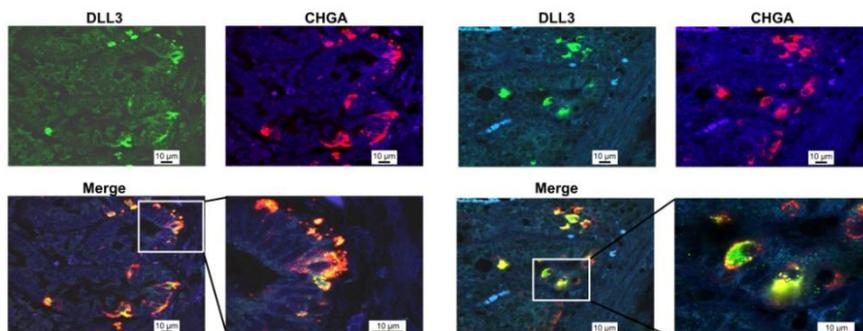
第二の目的である、Rova-TのGI-NECに対する効果の検証であるが、進行SCLCに対して一次治療を対象とした第III相試験(MERU試験、TAHOE試験)でプラセボや、二次治療の標準治療に対して生存期間の延長を認めなかったことを背景に研究開発が中止された³。そこで、本課題ではRova-Tの効果を検証することから、DLL3を標的とする新規化合物を探索することに研究の方針を変更した。先ず、対象疾患を改めて同定する為に、DLL3と癌の関係性が述べられている既報のレビューを行った。更に、DLL3の発現変化をスクリーニングするためのアッセイ系の構築に取り組んだ。

4. 研究成果

正常消化管のDLL3発現は粘膜深層に局在している傾向を認めた。また、連続切片を用いた発現解析では、DLL3とCHGAの発現部位が酷似していた。二重蛍光免疫染色でも、同様に、CHGA陽性細胞にDLL3発現を認めた(図1)。CHGA陽性の胃癌症例では、部分的なDLL3の強発現を認めた。連続切片を用いた検証では癌部でもDLL3とCHGA発現の局在が酷似していた(図2)。以上のことから、DLL3は、内分泌に強く関与することが示唆されたが、具体的なホルモン産生との関わりまでは同定できなかった。

図1：二重蛍光免疫染色による消化管のDLL3および、CHGAの局在実験

左：正常胃組織
右：正常十二指腸



GI-NEC 細胞株中の DLL3 発現は、他癌腫の細胞株と比べ、約 2000~3000 倍の発現増加を認めた。これらは報告されていた SCLC 細胞株の発現と同程度であった。また、蛍光二重免疫染色では、同様に CHGA 陽性細胞に DLL3 が発現していた。GI-NEC 細胞株の特徴として、多数の

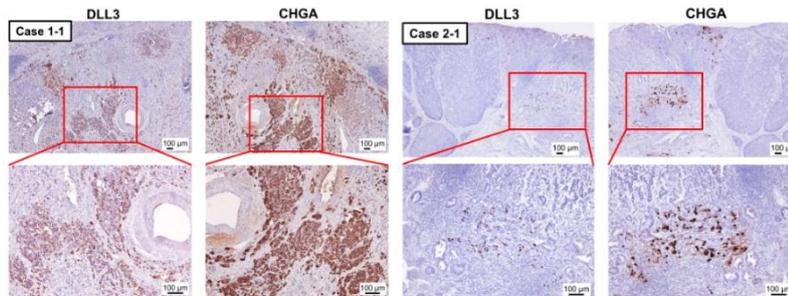


図 2 : CHGA 陽性症例の連続切片を用いた DLL3 および、CHGA の局在実験

内分泌顆粒を認めることが知られているが⁴、今回の免疫電子顕微鏡実験から、顆粒内に DLL3 が発現していることが確認された(図 3)。ECC4 と ECC10 細胞に対して、DLL3 の siRNA を導入したところ、コントロールと比して優れた細胞増殖抑制効果を認めた。また、その機序として、ヘキスト染色による核の断片化や、ポトース関連タンパク質 (cleaved PARP, cleaved casp3, cleaved casp9) の増加を認めたため、内因性アポトースが誘導されていると判断した。また、このアポトース誘導効果はカスパーゼ阻害剤で一部キャンセルされた。3D スフェア形成能の実験では DLL3 ノックダウン群でスフィア形成能の抑制効果を認めた(図 4)。これらの知見をまとめ学術誌に報告した⁵。

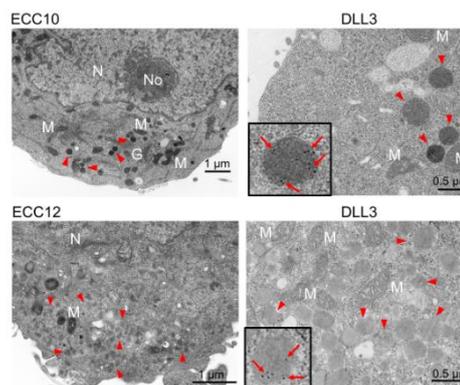


図 3 : 免疫電子顕微鏡による、GI-NEC 細胞中の顆粒における DLL3 の発現

既報文献のレビューでは、DLL3 を標的とした研究や治療が最も進んでいる肺癌の現状として、抗体薬物複合体である Rova-T 以外にも、DLL3 を標的とした薬剤 (近赤外光線免疫療法や、DLL3 を標的とする T 細胞受容体様抗体など) が開発されていることが報告されていた^{6,7}。また、SCLC や GI-NEC 以外の癌腫でも DLL3 の発現亢進が多数示されていた。興味深いこととして、発現亢進が示されている癌腫は、主に内分泌と関連しており、治療法が未確立な疾患で希少腫瘍である傾向であった。レビューした結果をまとめ現在、論文投稿中の段階である。

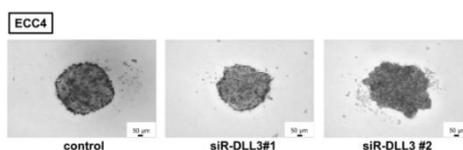


図 4 : DLL3 をノックダウンした際のスフィアアッセイ

また、DLL3 を標的とする新規化合物を同定するためのスクリーニング実験系の構築では、High-Content imager を用いて画像を撮影したものを数値化するスクリーニング系が構築されつつある。今後、構築されたスクリーニングアッセイを用いて、化合物のスクリーニングを実施する計画である。

<参考文献>

①Hiroki Hamamoto, Kentaro Maemura, Kentaro Matsuo, Kohei Taniguchi, Yoshihisa Tanaka, Sugiko Futaki, Atsushi Takeshita, Akira Asai, Michihiro Hayashi, Yoshinobu Hirose, Yoichi Kondo, Kazuhisa Uchiyama.
Delta-like 3 is silenced by HBx via histone acetylation in HBV-associated HCCs.
Sci Rep. 2018 Mar 19;8(1):4842

②Charles M Rudin, M Catherine Pietanza, Todd M Bauer, Neal Ready, Daniel Morgensztern, Bonnie S Glisson, Lauren A Byers, Melissa L Johnson, Howard A Burris 3rd, Francisco Robert, Tae H Han, Sheila Bheddah, Noah Theiss, Sky Watson, Deepan Mathur, Bharathi Vennapusa, Hany Zayed, Satwant Lally, Donald K Strickland, Ramaswamy Govindan, Scott J Dylla, Stanford L Peng, David R Spigel, SCRX16-001 investigators.
Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase 1 study.
Lancet Oncol. 2017 Jan;18(1):42-51.

③Fiona Blackhall, Kevin Jao, Laurent Greillier, Byoung Chul Cho, Konstantin Penkov, Noemi Reguart, Margarita Majem, Kristiaan Nackaerts, Konstantinos Syrigos, Karin Hansen, Wolfgang Schuette, Jeremy Cetnar, Federico Cappuzzo, Isamu Okamoto, Mustafa Erman, Seppo W Langer, Terufumi Kato, Harry Groen, Zhaowen Sun, Yan Luo, Poonam Tanwani, Laura Caffrey, Philip Komarnitsky, Niels Reinmuth.

Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine Compared With Topotecan as Second-Line Therapy in DLL3-High SCLC: Results From the Phase 3 TAHOE Study.

J Thorac Oncol. 2021 Feb 16;S1556-0864(21)01709-3.

④T Fujiwara, T Motoyama, N Ishihara, H Watanabe, T Kumanishi, K Kato, H Ichinose, T Nagatsu.

Characterization of four new cell lines derived from small-cell gastrointestinal carcinoma.

Int J Cancer. 1993 Jul 30;54(6):965-71.

⑤Kentaro Matsuo, Kohei Taniguchi, Hiroki Hamamoto, Yuko Ito, Sugiko Futaki, Yosuke Inomata, Takafumi Shima, Mitsuhiro Asakuma, Sang-Woong Lee, Keitaro Tanaka, Junji Okuda, Yoichi Kondo, Kazuhisa Uchiyama.

Delta-like 3 localizes to neuroendocrine cells and plays a pivotal role in gastrointestinal neuroendocrine malignancy.

Cancer Sci. 2019 Oct;110(10):3122-3131.

⑥Yoshitaka Isobe, Kazuhide Sato, Yuko Nishinaga, Kazuomi Takahashi, Shunichi Taki, Hirotohi Yasui, Misae Shimizu, Rena Endo, Chiaki Koike, Noriko Kuramoto, Hiroshi Yukawa, Shota Nakamura, Takayuki Fukui, Koji Kawaguchi, Toyofumi F Chen-Yoshikawa, Yoshinobu Baba, Yoshinori Hasegawa.

Near infrared photoimmunotherapy targeting DLL3 for small cell lung cancer.

EBioMedicine. 2020 Feb;52:102632.

⑦Michael J Giffin, Keegan Cooke, Edward K Lobenhofer, Juan Estrada, Jinghui Zhan, Petra Deegen, Melissa Thomas, Christopher M Murawsky, Jonathan Werner, Siyuan Liu, Fei Lee, Oliver Homann, Matthias Friedrich, Joshua T Pearson, Tobias Raum, Yajing Yang, Sean Caenepeel, Jennitte Stevens, Pedro J Beltran, Jude Canon, Angela Coxon, Julie M Bailis, Paul E Hughes.

AMG 757, a Half-Life Extended, DLL3-Targeted Bispecific T-Cell Engager, Shows High Potency and Sensitivity in Preclinical Models of Small-Cell Lung Cancer.

Clin Cancer Res. 2021 Mar 1;27(5):1526-1537.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo Kentaro, Taniguchi Kohei, Hamamoto Hiroki, Ito Yuko, Futaki Sugiko, Inomata Yosuke, Shima Takafumi, Asakuma Mitsuhiro, Lee Sang Woong, Tanaka Keitaro, Okuda Junji, Kondo Yoichi, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 110
2. 論文標題 Delta like 3 localizes to neuroendocrine cells and plays a pivotal role in gastrointestinal neuroendocrine malignancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3122 ~ 3131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口高平、内山和久
2. 発表標題 消化管における DLL3 の発現様式と消化管神経内分泌腫瘍における創薬標的への可能性
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾謙太郎、谷口高平、濱元宏喜、猪俣陽介、島卓史、内山和久
2. 発表標題 Delta-like 3の発現様式および消化管内分泌細胞癌における治療的役割
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口高平、松尾謙太郎、濱元宏喜、伊藤裕子、小村和正、朝隈光弘、李相雄、田中慶太郎、奥田準二、内山和久
2. 発表標題 DLL3の消化管内局在と消化管神経内分泌腫瘍における治療標的としての可能性
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾謙太郎、谷口高平、濱元宏喜、川口直、猪俣陽介、内山和久
2. 発表標題 Functional analysis of Delta-like-3 in the neuroendocrine cells of gastrointestinal tract
3. 学会等名 第27回 日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾謙太郎、濱元宏喜、谷口高平、猪俣陽介、内山和久
2. 発表標題 消化管神経内分泌腫瘍におけるDLL3の機能解析
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾謙太郎、濱元宏喜、猪俣陽介、島卓史、谷口高平、内山和久
2. 発表標題 Functional analysis of Delta-like-3 in the neuroendocrine cells of gastrointestinal tract
3. 学会等名 第52回 制癌剤適応研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪医科大学 一般・消化器外科 研究紹介
<https://www.osaka-med.ac.jp/deps/sur/html/laboratory.html>
 大阪医科大学 研究支援センター トランスレーショナルリサーチ部門
<https://www.osaka-medrd.com/transregular/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------