

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23903

研究課題名（和文）小細胞肺癌におけるDLL3の機能及び遺伝子異常の検討

研究課題名（英文）Studies on the function and mutations of DLL3 in small cell lung cancer

研究代表者

古田 恵（Furuta, Megumi）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：00848765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：SCLC細胞株でDLL3をknockdownすると遊走能・浸潤能が低下し、Snailの発現は減弱した。逆にDLL3をoverexpressionすると増殖能・遊走能は亢進し、Snailの発現は増加し、DLL3はEMTを調節する転写因子であるSnailを介して遊走能・浸潤能亢進に関与している可能性が考えられた。ゼノグラフトマウスモデルを用いて評価した腫瘍増殖はDLL3をoverexpressionさせたSBC-5でコントロールと比較して亢進しており、摘出腫瘍のSnail発現はコントロール群腫瘍と比べ発現が増加しており、in vitroと同様の結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌ではNotchのリガンドの一つであるDelta-like protein 3 (DLL3) はin vitro、in vivoにおいて腫瘍増殖能、遊走能、浸潤能を促進していた。遊走能、浸潤能促進の機序としてNOTCH1非依存性に上皮間葉転換を誘導に関与する転写因子であるSnailが関与している可能性が考えられた。DLL3を標的とした治療は転移例や再発例において期待されると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To investigate the role of DLL3 in tumorigenesis in SCLC, we performed loss-of-function and gain-of-function assays using SCLC cell lines. In vitro analysis of cell migration and invasion by transwell assay showed that DLL3 knockdown reduced migration and invasion of SCLC cells, whereas DLL3 overexpression increased these activities. In addition, DLL3 positively regulated SNAI1 expression and knockdown of SNAI1 attenuated the migration and invasion ability of SCLC cells. Moreover, upregulated DLL3 expression induced subcutaneous tumor growth in mouse models. These results indicate that DLL3 promoted tumor growth, migration and invasion in an SCLC model by modulating SNAI1/Snail.

研究分野：呼吸器腫瘍

キーワード：DLL3の機能 小細胞肺癌

### 1. 研究開始当初の背景

近年 SCLC の治療として DLL3 を抗体とした antibody-drug conjugate である Rovalpituzumab tesirine (Rova-T) が開発され、DLL3 高発現群でより高い奏効率が認められ、SCLC の治療戦略において DLL3 は重要な役割を果たす可能性がある。SCLC において Notch は腫瘍抑制性に機能し DLL3 は他のリガンドとは異なり Notch を阻害するという報告があることから、DLL3 は Notch の阻害を介して腫瘍の発生や分化、増殖に関与していることが示唆される。これまでの申請者の研究では SCLC の手術検体で DLL3 陽性群は 83%、高発現群は 47% と高発現していた (Furuta et al, Oncologist, in press)。更に DLL3 発現はリンパ節転移や進行した臨床病期と関連を認め、DLL3 は SCLC において腫瘍増殖のみならず転移にも関与する可能性が示唆された。また、申請者は SCLC 組織検体の Notch 関連遺伝子の遺伝子変異について検討したところ DLL3 において細胞外ドメインに遺伝子変異を多く認め、その遺伝子変異と予後に相関があった。以上から、DLL3 は SCLC において神経内分泌分化に関与し、更に腫瘍増殖性に機能する可能性が示唆されるがその詳細な機能は不明である。そこで、SCLC におけるその機能を解明すること、DLL3 遺伝子変異が SCLC の機能に与える影響について調べることを目的とし本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

(1) SCLC において DLL3 は腫瘍増殖性に機能するのか、(2) 肺癌治療において DLL3 は治療標的となるかを検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) DLL3 の腫瘍増殖、遊走能・浸潤能に関する機能の検討

SCLC 細胞株を用いて、DLL3 の small interfering RNA による knockdown 及び DLL3 プラスミド導入による overexpression を行い、DLL3 の発現を mRNA、蛋白レベルで確認する。その後それらの細胞株を使用し DLL3 の腫瘍増殖、浸潤能、遊走能における機能変化を確認する。足場依存性・非依存性増殖能は MTT assay を用いて測定する。遊走能・浸潤能は transwell assay を用いて調べる。DLL3、Notch レセプター (NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4)、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) マーカー (E-cadherin、Vimentin、Snail) の発現は quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法とウェスタンブロット法で確認する。

#### (2) DLL3 と Notch1 及び ASCL1 との関連の検討

DLL3 の機能が Notch1 を介して機能しているかを確認するために Notch1 の knockdown もしくは overexpression を行い DLL3 の機能変化と同様の変化があるかを確認する。

#### (3) DLL3 機能の *in vivo* での検討

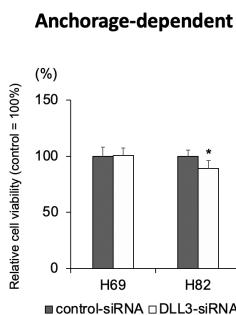
*in vivo* における腫瘍増殖はゼノグラフトマウスモデルに DLL3 を overexpression した SCLC 細胞株を皮下注射し腫瘍サイズ、増大スピードを測定する。その際、形成されたマウスの腫瘍組織を切除し腫瘍組織における DLL3、Notch 関連蛋白、EMT マーカーの発現を確認する。

### 4. 研究成果

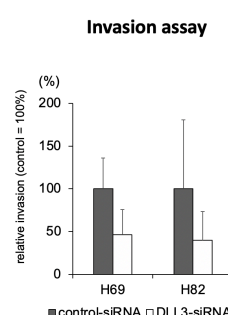
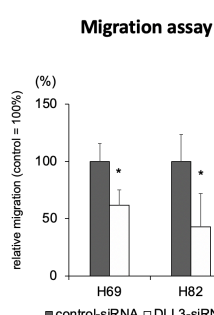
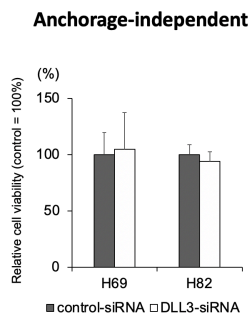
#### (1) SCLC 細胞株における DLL3 knockdown の増殖能や遊走能、浸潤能への影響 (*in vitro*)

DLL3 が高発現している H69・H82 を用いて DLL3 knockdown すると H82 では足場依存性増殖は control 細胞と比べ DLL3 knockdown 細胞で僅かに低下していたが H69 では特に差は認めなかった (図 1)。migration assay において、H69・H82 ともに DLL3 knockdown により migration 細胞数は有意に低下した (図 2)。さらに、invasion assay においても DLL3 knockdown により invasion 細胞数は低下傾向を認めた (図 2)。

(図 1)



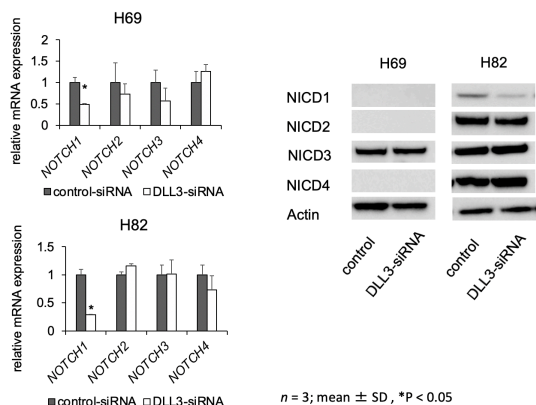
(図 2)



n = 3; mean ± SD, \*P < 0.05

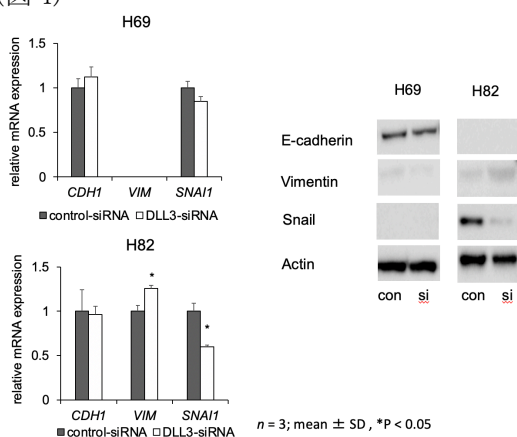
n = 3; mean ± SD, \*P < 0.05

(2) SCLC 細胞株における DLL3 knockdown の Notch シグナルへの影響 (*in vitro*) (図 3)



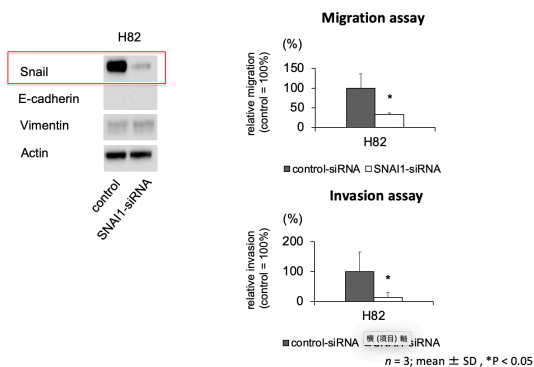
H69・H82 ともに DLL3 knockdown によって *NOTCH1* mRNA 発現が低下、H82 で DLL3 knockdown により NICD1 発現は低下した。一方、H69 では DLL3 knockdown では NICD1 を含め NICD1-4 タンパク発現の有意な変化を認めなかった。(図 3)

(3) SCLC 細胞株における DLL3 knockdown の EMT マーカーへの影響 (*in vitro*) (図 4)



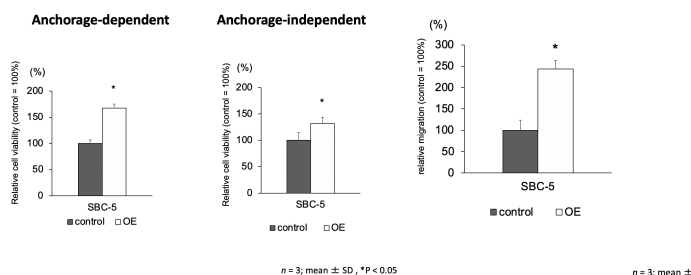
H69・H82 ともに *SNAI1* mRNA 発現が低下し、Snail のタンパク発現は H82 では低下したが H69 では認めなかった (図 4)。

(4) H82 細胞株における Snail knockdown と Notch1 knockdown の遊走能・浸潤能の影響 (*in vitro*) (図 5)



Snail knockdown により遊走細胞数、浸潤細胞数が有意に低下した (図 5)。NOTCH1 knockdown では EMT マーカーのタンパク発現変化は認めず、遊走能、浸潤能変化を認めなかった。

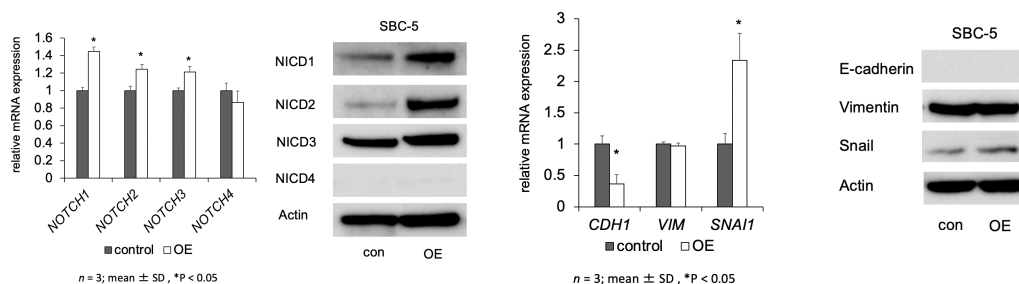
(5) SCLC 細胞株における DLL3 overexpression による増殖能や遊走能、浸潤能への影響 (*in vitro*) (図 7)



SBC-5 を使用し DLL3 overexpression 細胞を作成した。DLL3 overexpression により足場依存性増殖能・足場非依存性増殖能ともに有意に亢進し (図 6)、同様に遊走能も亢進した (図 7)。

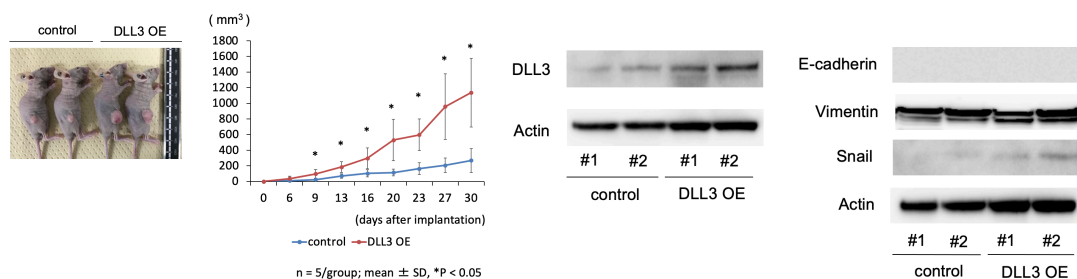
SBC-5 で DLL3 overexpression をすると、NOTCH4 以外のレセプターの mRNA 及びタンパク発現が増加した (図 8)。DLL3 overexpression では DLL3 knockdown で抑制された Snail の発現は増加した (図 9)。

(図 8) (図 9)



SBC-5 の DLL3 overexpression 細胞と control 細胞をヌードマウスの右鼠径部に皮下注射し、形成された皮下腫瘍の大きさを比較した。DLL3 overexpression 群において control 群と比較し腫瘍増殖能の有意な亢進を認めた (図 10)。上記マウスにおいて皮下注射 20 日後に切除した腫瘍検体において、DLL3 overexpression 群腫瘍では DLL3 発現の上昇が維持されており、また Snail 発現は control 群腫瘍と比べ発現が増加していた (図 11)。

(図 10) (図 11)



これらの結果から、SCLC では DLL3 は *in vitro*、*in vivo* において腫瘍増殖能、遊走能、浸潤能を促進していた。遊走能、浸潤能促進の機序として Snail 発現が関与している可能性が考えられた。DLL3 を標的とした治療は転移例や再発例において期待されると考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Shoji Tetsuaki, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Takashima Yuta, Furuta Megumi, Takahashi Hirofumi, Tsuji Kosuke, Maeda Makie, Kinoshita Ichiro, Dosaka-Akita Hirotooshi, Sakakibara-Konishi Jun, Konno Satoshi	4. 巻 85
2. 論文標題 Evaluating the immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small cell and non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 843 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-020-04061-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masahiro Watanabe
2. 発表標題 Analysis of DLL3 and ASCL1 in surgically resected small cell lung cancer (HOT1702)
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Fujita
2. 発表標題 Analysis of DLL3 and ASCL1 in surgically resected small cell lung cancer (HOT1702)
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------