

(様式 甲 5)

氏 名	松尾 謙太郎
(ふりがな)	(まつお けんたろう)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲 第 1138 号
学位審査年月日	令和 2 年 1 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Delta-like 3 localizes to neuroendocrine cells and plays a pivotal role in gastrointestinal neuroendocrine malignancy. (DLL3 は内分泌細胞に存在し、 消化管内分泌細胞癌において重要な役割を担う)
論文審査委員	(主) 教授 樋口 和秀 教授 廣瀬 善信 教授 高井 真司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

Delta-like-3 (DLL3) は、notch 受容体リガンドの一つであり発生の過程で骨格形成などに重要な機能を持つ。近年、DLL3 が肺内分泌細胞癌 (肺小細胞癌、大細胞癌) の細胞表面に高発現することが同定され、抗 DLL3 抗体薬物複合体 (Rovalpituzumab Tesirine: ROVA-T) の臨床試験等が進行している。しかし、消化管および消化管内分泌細胞癌に関する DLL3 の知見は明らかになっていない。そこで、本研究では消化管および消化管内分泌細胞癌に対する DLL3 発現および役割について検討した。

《対象と方法》

1 正常消化管 (胃、十二指腸、空腸、回腸、直腸) の DLL3 発現を調べるため、各消化

管切除標本を用いて免疫組織染色（IHC）で DLL3 の発現を解析した。

- 2 正常消化管の DLL3 発現様式を調べるために、消化管切除標本の連続切片を用いて IHC 法で DLL3 と代表的内分泌マーカーである Chromogranin A (CHGA) の発現部位を比較検討した。また、胃および十二指腸の切片を用いて DLL3 と CHGA の蛍光二重免疫染色を実施した。
- 3 CHGA 陽性胃癌症例として、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 IHC 法で検討した。さらに、CHGA 陽性胃癌 4 例の連続切片を用いて、DLL3 と CHGA の局在を比較した。
- 4 消化管内分泌細胞癌由来の細胞株である ECC4（直腸）、ECC10（胃）、ECC12（胃）中の DLL3 発現を、Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)、Western blotting (WB) 法で解析した。また、DLL3 と CHGA の局在を蛍光二重免疫染色で解析した。更に、免疫電子顕微鏡を施行し DLL3 の局在を検討した。
- 5 DLL3 の siRNA を作製し、ECC4、ECC10 に導入した際の効果を検討した。細胞増殖をトリパンブルー染色法で解析した。DLL3 ノックダウン時のシグナル変化をアポトーシス関連分子に注目して WB 法で評価し、Hoechst33342 染色を用いて核の断片化などの形態変化を観察した。更に、DLL3 ノックダウンにカスパーゼ阻害剤（Z-VAD-FMK）を併用した際の細胞増殖能・シグナル変化について解析した。また、siRNA-DLL3 導入後の 3 次元培養における変化をスフェロイドアッセイで評価した。

《結 果》

- 1 正常消化管の検索した全部位で DLL3 の発現を認め、その発現は粘膜深層に多い傾向にあった。
- 2 連続切片を用いた検討では、DLL3 と CHGA の発現部位が類似していた。二重蛍光免疫染色でも、CHGA 陽性細胞に DLL3 発現を認めた。
- 3 CHGA 陽性の胃癌症例で部分的に DLL3 の強発現を認めた。さらに連続切片を用いた検証では癌部においても DLL3 と CHGA 発現の局在が類似していた。MANEC 症例で

は特に発現が亢進していた。

- 4 消化管神経内分泌癌細胞株中の DLL3 mRNA 発現は、他の癌細胞株 (HepG2、肝細胞癌 ; DLD-1、大腸癌) と比べ約 2000~3000 倍の発現増加を認め、タンパク発現も同様の傾向であった。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。免疫電子顕微鏡による検討では、多数認められた内分泌顆粒内に、DLL3 が発現していることが確認された。
- 5 ECC4 と ECC10 細胞で DLL3 の発現をノックダウンすると、細胞増殖抑制効果を認めた。この DLL3 ノックダウン群では、ヘキスト染色で核の断片化がみられ、アポトーシス誘導が示唆された。この細胞では、アポトーシス関連タンパク質 (cleaved PARP, cleaved casp3, cleaved casp9) の発現が WB 法で同定され、この効果はカスパーゼ阻害剤で一部キャンセルされたため、その経路は内因性であることが示唆された。同様に 3D スフェア形成能の実験では、DLL3 ノックダウン群で抑制効果を認めた。

《考 察》

哺乳類には notch 受容体に対する 5 つのリガンド (DLL1、DLL3、DLL4、jagged 1、jagged 2) が存在するが、DLL3 は構造的に他と異なる。他のリガンドが細胞表面に存在するのに対し、DLL3 はゴルジ体に局在していることから、特異的な機能を有することが推測される。本研究で、DLL3 が消化管で内分泌細胞に存在していること、消化管内分泌細胞癌において DLL3 が高発現していることが示唆された。興味深いことに電子顕微鏡による検討では、内分泌顆粒中に DLL3 が発現していた。また、DLL3 をノックダウンすることにより、内因性のアポトーシスが誘導され、細胞増殖能が抑制され、スフェア形成能も抑制された。これらの結果から、DLL3 は原発臓器に関わらず内分泌細胞癌の発癌過程で発現が増加する遺伝子であることに加えて、DLL3 は消化器内分泌癌の治療標的になり得る可能性が示唆される。

《結 論》

本研究結果から、DLL3 は消化器内分泌細胞癌において、その発育・進展・生存に寄与する遺伝子であると考えられる。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

Delta-like-3 (DLL3) は、notch 受容体リガンドの一つであるが、構造や局在が他のリガンドと異なっている。近年、DLL3 を標的とした抗 DLL3 抗体薬物複合体による肺小細胞癌などでの抗腫瘍効果に関する報告が相次いでおり、癌治療の分子標的としても注目されている。申請者は、消化管における DLL3 の知見は乏しいため、特に消化管内分泌細胞癌に注目しながら DLL3 発現および役割について検討している。本研究ではまず、消化管切除標本を用いて正常消化管での DLL3 発現を解析し、DLL3 が消化管粘膜深層に主に存在し、Chromogranin A (CHGA) 陽性細胞に発現することを同定した。また、CHGA 陽性胃癌症例、特に mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC) の症例において、DLL3 が強発現していることを示した。さらに、消化管内分泌細胞癌由来の細胞株中の DLL3 発現も他の細胞株に比べ著明に発現が亢進しており、DLL3 が消化管内分泌細胞癌の発育・進展に重要な分子であることが推測される。電子顕微鏡による検討で、消化管内分泌癌細胞の内分泌顆粒内に DLL3 が発現していたことも、興味深い知見と思われる。また、DLL3 の消化管内分泌細胞癌中での発現は小細胞癌株と同程度であり、DLL3 発現を抑制することにより細胞増殖能が阻害され内因性アポトーシスが誘導されることを確認しており、DLL3 が肺癌同様に消化管内分泌細胞癌においても創薬標的となる可能性を示唆している。消化管内分泌細胞癌は予後不良の希少癌であり、有効な治療の選択肢にも乏しい現状を鑑みると、本研究成果は非常に重要な知見であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Cancer Science 110(10): 3122-3131, 2019 Oct

doi: 10.1111/cas.14157 〈オンライン掲載〉