

博士論文

小細胞肺癌における抗体薬物複合体の新規治療標的の探索

氏名 四元 拓真

# 目次

略語表・・・ 4

要旨・・・ 6

## 序文

1. 小細胞肺癌診療の現状・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8

2. ADC について・・ 10

3. ADC の臨床応用について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

4. 小細胞肺癌に対する ADC の先行研究について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14

## 方法

1. 候補遺伝子の選別・・ 17

2. 細胞株と臨床検体における遺伝子発現解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

3. cDNA のクローニング・・ 23

4. 強制発現ベクターの作成・・ 28

5. NRXN1 遺伝子ノックアウト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

6. フローサイトメトリーを使用した細胞表面蛋白の検出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

7. 細胞毒性試験・・・ 38

8. アポトーシスアッセイ・・ 41

9. 統計解析	43
結果	
1. National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus と Cancer Cell Line Encyclopedia の解析	44
2. 細胞株における候補遺伝子の発現解析	46
3. 細胞毒性試験	52
4. 臨床検体と正常臓器における NRXN1 発現解析	56
5. アポトーシスアッセイ	58
考察	62
結語	74
謝辞	75
参考文献	76

## 略語表

ADC, Antibody-drug conjugate

ALK, anaplastic lymphoma kinase

ANOVA, analysis of variance

ASCL1, achaete-scute homolog 1

bFGF, basic fibroblast growth factor

Cas9, CRISPR-associated proteins 9

CCLE, Cancer Cell Line Encyclopedia

cDNA, complementary deoxyribonucleic acid

CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CSC, cancer stem cell

Cy, cyanine

DLL3, delta-like ligand 3

EGF, epidermal growth factor

EGFR, epidermal growth factor receptor

EZH2, enhancer of zeste homolog 2

FITC, fluorescein isothiocyanate

GABA, gamma-aminobutyric acid

GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GEO, Gene Expression Omnibus

HER2, erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

KRAS, kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue

mAb, monoclonal antibody

MYC, cellular myelocytomatosis oncogene

NCBI, National Center for Biotechnology Information

NEUROD1, Neurogenic differentiation 1

NRXN1, Neurexin 1

PARP, poly-ADP- ribose polymerase

PBS, phosphate buffered saline

PI, propidium iodide

PI3K, phosphoinositide 3 kinase

POU2F3, POU class 2 homeobox 3

PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10

RB1, retinoblastoma

SCLC, small cell lung carcinoma

TP53, tumor suppressor protein p53

TROP2, Trophoblast cell surface antigen 2

YAP1, Yes-associated protein 1

## 要旨

[Rationale] Small cell lung cancer (SCLC) remains one of high-grade malignancies. Novel driver mutation has not been identified through genome-wide sequence analyses, resulting in invariable therapeutic strategy for SCLC. Thus, Antibody-drug conjugates (ADCs) is the key technique. We aimed to search new therapeutic targets for ADCs toward a paradigm shift in treatment and research of SCLC.

[Methods] By investigating gene expression profile of 51 SCLC cell lines and 30 normal lung tissue samples available in Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) and National Center for Biotechnology Information (NCBI), thirty one genes coding transmembrane proteins were overexpressed in SCLC cell lines. According to RNA sequence data in NCBI, six genes out of the 31 genes were expressed in limited organs. We examined these genes by evaluating *in vitro* cytotoxicity of corresponding monoclonal antibodies followed by secondary ADC comprising PNU-159682, a derivative of nemorubicin.

[Results] Secondary ADC following monoclonal antibody targeting neurexin-1 (NRXN1), one of the candidate molecules, showed specific cytotoxicity in a concentration-depending manner. NRXN1-mediated ADC demonstrated significantly greater potency than that using murine IgG isotype control as a primary antibody. Conversely, knockout of NRXN1 showed explicit loss of the cytotoxicity. The expression of NRXN1 in normal tissues was exclusively lower in many organs than in brain.

[Conclusion] We successfully estimated new targets for ADCs by investigating transmembrane proteins with a computational-biological approach. Through *in vitro*

cytotoxicity assays, NRXN1-mediated ADC exhibited specific potency against NRXN1-enriched cell lines, suggesting NRXN1 can be a potential target of ADCs.

# 序文

## 1. 小細胞肺癌診療の現状

小細胞肺癌は世界的に肺癌の中の 10-15%程度を占め、2 年生存率 7%程度と、非常に悪性度の高い腫瘍であり[1]、多数の小細胞肺癌患者が転移を来しているなど進行した状況で新規診断される[2]。近年、非小細胞肺癌に対する EGFR, KRAS, ROS1 などのドライバー遺伝子変異や ALK 融合遺伝子が同定され、対応する分子標的薬による治療や研究が進んでいる。また、腫瘍環境における免疫に関する研究の進歩により免疫チェックポイント阻害薬が開発され、従来の化学療法に加えてバイオマーカーを用いながら特定の群に対してはこれらの治療薬が優先的に投与されるまでになっている。しかし、小細胞肺癌については 20 年ほど、標準治療は従来のエトポシド/イリノテカンにプラチナ製剤を組み合わせる化学療法からほぼ不変である。近年、未治療進展型の小細胞肺癌において抗 PD-L1 抗体であるテセントリクが一次治療におけるカルボプラチン、及びエトポシドとの併用で全生存期間を延長するとともに、(OS 中央値：12.3 ヶ月 vs 10.3 ヶ月、ハザード比:0.70, 95%CI: 0.54-0.91,  $p=0.0069$ )、無増悪生存期間の延長を示し承認を得た(PFS 中央値：5.2 ヶ月 vs 4.3 ヶ月、ハザード比：0.77, 95%CI: 0.62-0.96,  $p=0.017$ ) [3]。また、これも抗 PD-L1 抗体であるイミフィンジが第III相試験においてカルボプラチン、エト

ポシドとの併用群で化学療法単独群に比して全生存期間を延長した結果を示し、厚生労働省より承認を取得した(OS 中央値：13.0 ヲ月 vs 10.3 ヲ月、ハザード比:0.73, 95%CI: 0.59-0.91,  $p=0.0047$ ) [4]。しかし、いずれも生存期間の延長は僅かであり、また限局型の小細胞肺癌に対しては適応がない。

小細胞肺癌についても幅広く遺伝子解析が為されたが、TP53 や RB1 など癌抑制遺伝子の変異が認められるものの治療標的となり得るようなドライバー遺伝子変異は同定されていない[5]。

このように小細胞肺癌に関しては非小細胞肺癌に比して内科的治療選択肢が限られ膠着状態にあり、一方で診断時に病期が進行している症例が多数を占めるため外科的切除の適応は極一部の早期症例に限られる[6]。

手術適応となる症例が少ないために標本サンプルが希少であることから研究解析も進行しづらいのが実情と考えられる。近年、小細胞肺癌に関連して新規治療標的となり得る分子に対する研究が進み、癌抑制遺伝子 PTEN の異常が PI3 キナーゼを活性化させることによるシグナル伝達異常、Aurora キナーゼの過剰発現による細胞分裂異常など、小細胞肺癌に限らない癌化に関わる分子が標的として期待されている[7]。また、DNA 修復に関与する PARP 遺伝子を標的とし、これを阻害することにより腫瘍細胞死を誘導することで治療効果を発揮する PARP 阻害薬の

臨床試験が進行中である[8-10]。その他にも、遺伝子の転写を不活化させるヒストンメチル基転移酵素のひとつである EZH2(enhancer of zeste homolog 2)が小細胞肺癌で過剰発現していることが網羅的遺伝子解析で同定され、この分子を阻害することにより TGF- $\beta$  に対する応答性が回復し、腫瘍抑制性に働くことが報告されており、治療標的となり得る[11]。ただしいずれも実臨床に導入されるまでには多くの段階と時間を費やすことは明らかであり、新規治療を多角的に模索し効力を持つモダリティの実臨床における活用を現実化することが世界的に喫緊の課題である。

## 2. ADC について

抗体薬物複合体(Antibody-Drug Conjugate, ADC)は抗体に化学的に殺細胞性化合物を結合させたモダリティである[12-14]。抗原特異的に結合するモノクローナル抗体、殺細胞性化合物とそれらを繋げる化学的リンカーの 3 つのコンパートメントで構成されている。ADC は抗体部分が標的とする抗原に結合した後、細胞内にインターナライゼーションを起こすことで内在化される。その後リンカーの性質により、主として(1) 細胞質内のプロテアーゼで切断される、又は(2) リソソームに運搬された後にリソソーム内のプロテアーゼで切断される、に分かれる[15]。

また抗体にリンカーを介して実装されるペイロードと呼ばれる殺細胞性化合物については、微小管重合阻害剤である T-DM1, MMAF, MMAE や DNA へのインターカレーターである PBD, トポイソメラーゼ阻害剤である PNU などが代表的である。近年では化合物合成技術の進歩により、リンカーを接続する抗体の部位や、接続部のアミノ酸を変更することでプロテアーゼとの親和性を上昇させるなど ADC の精製過程が微細高度化されており、ADC の感受性向上への寄与が期待される。

上述したリンカーの性質、ペイロードの作用機序や個々の細胞での運搬、分解など種々の要因によって ADC の効力は左右される。また他に ADC の効力や副作用に影響を及ぼす因子として、抗体単位で実装するペイロードの分子数である薬物抗体比、DAR(Drug-to-Antibody Ratio)がある。一般的に、DAR が大きい程、効力が期待できるが副作用の懸念が増加し、小さい程、効力が低下するため、ADC の精製にあたっては重要な要素である[16]。

従来の化学療法は組織中の正常細胞に対しても毒性を示すことにより薬物投与量に制約が生まれるが、抗体に搭載することにより腫瘍特異的に殺細胞性化合物を送達し、従って正常組織への毒性を可及的に減少させることで腫瘍組織への毒性蓄積が理論上期待できる。小細胞肺癌が一般的に化学療法に感受性が高いことを考慮すると、ADC による選択的な腫瘍への送達は有力な効力を発揮することが

見込まれる[17]。

### 3. ADC の臨床応用について

現状、米国 FDA に承認を受け上市されている ADC 製品が以下の種 5 類である。

(1) brentuximab vedotin (ホジキンリンパ腫) [18], (2) ado-trastuzumab emtansine (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2(HER2)陽性転移性乳癌) [19, 20], (3) inotuzumab ozogamicin (急性リンパ芽球性白血病) [21], (4) gemtuzumab ozogamicin (CD33 陽性急性骨髄性白血病) [22], (5) trastuzumab deruxtecan (2 つ以上の抗 HER2 療法治療歴を有する HER2 陽性の手術不能あるいは転移性乳癌) [23]。各 ADC のターゲット分子、リンカーの性質、殺細胞性化合物の一覧を表 1 に示す。5 種中、3 種が血液腫瘍に対する ADC として認可されている。固形癌に対しては現時点で米国食品医薬品局に認可された ADC は上記(2)の HER2 陽性転移性乳癌に限定されているが、乳癌以外にも、腫瘍特異的な抗癌剤の送達が見込まれる ADC の固形癌に対する臨床応用へ向けた基礎研究、臨床研究が進められている。

表 1. 上市されている ADC とその構成因子

ADC	疾患	標的分子	リンカー	ペイロード
Brentuximab vedotin (Adcetris)	ホジキンリンパ腫	CD30	Cleavable	MMAE (tubulin inhibitor)
Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla)	HER2 陽性転移性乳癌	HER2	Noncleavable	DM1 (tubulin inhibitor)
Inotuzumab ozogamicin (BESPOUSA)	急性リンパ芽球性白血病	CD22	Acid-labile hydrazine linker	Calicheamicin (DNA synthesis inhibitor)
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	急性骨髄性白血病	CD33	Acid-labile hydrazine linker	Calicheamicin derivative (DNA synthesis inhibitor)
Trastuzumab deruxtecan (Enhertu)	転移性乳癌に対し 2 以上の抗 HER2 療法を受けた HER2 陽性手術不能/転移性乳癌	HER2	cleavable tetrapeptide-based linker	camptothecin analog exatecan derivative (topoisomerase I inhibitor)

#### 4. 小細胞肺癌に対する ADC の先行研究について

これまで転移性乳癌以外の固形腫瘍に対する ADC が臨床上の有用性を明確に示すに至った報告はないのが現状である[24-32]。小細胞肺癌に対する ADC の先行研究として代表的なものに DLL3 (Delta-like ligand 3) に対する ADC (Rovalpituzumab Tesirine, Rova-T) がある[33]。DLL3 は様々な細胞の発生、分化、増殖過程に関与するシグナル伝達経路である Notch pathway のカスケード上に位置し、Notch 受容体に対するリガンドの 1 種である。正常肺組織では発現を認めないが、小細胞肺癌において高発現している[34]。また神経内分泌細胞への誘導に関与する古典的な内分泌マーカーである Achaete-scute complex-like-1(ASCL1) の下流のターゲットであり、両者は mRNA の発現に相関関係があることが報告されている[35]。小細胞肺癌において、DLL3 は他のリガンドと異なり、Notch pathway を阻害して腫瘍抑制性に作用することが報告されており[36]、腫瘍の発生、分化、増殖に関与している可能性が示唆される。転移性悪性黒色腫、多形膠芽腫、一部の前立腺癌、膵臓癌、結腸直腸癌を含む複数の癌腫において、DLL3 を発現している癌細胞で Rova-T が有用となる可能性が示されている[37]。Rova-T は DLL3 陽性の再発難治性小細胞肺癌(n=339) に対する 3 次治療以降として、6 週間を 1 サイクルとして 1 日目に Rova-T 0.3mg/kg 単剤療法を 2 サイクル投与し、主要評価項目として客観的奏効率、

全生存期間を検証した単アームの第 2 相試験において、全患者群での客観的奏効率 12.4%(95%信頼区間：9.1-16.4%)、全生存期間中央値は 5.6 ヶ月(95%信頼区間：4.9-6.1 ヶ月)と有用性が示唆される結果が報告された[38]。しかし進行性小細胞肺癌に対する一次治療後の維持療法として Rova-T をプラセボと比較した第 3 相試験の中間解析で有効な生存期間延長効果を示すことができず、IDMC(Independent Data Monitoring Committee)の勧告によって臨床試験は中止となった[39]。

他に小細胞肺癌に対する ADC に Trop-2 を標的とした Sacituzumab Govitecan がある[40]。Trop2 は多くの癌種で細胞表面に強発現しており、ADC のターゲットとして期待されている。Sacituzumab Govitecan のリンカーは細胞質内のプロテアーゼで分解される”cleavable”な性質であり、これによって抗 Trop2 抗体にペイロードとしてイリノテカンの活性代謝物である SN-38 を 8 分子結合させた製剤である[41]。Sacituzumab Govitecan に関連して、既治療転移性小細胞肺癌症例に対する 21 日を 1 サイクルとし、1 日目と 8 日目で 8 あるいは 10mg/kg 投与で客観的奏効率 14%、無増悪生存期間中央値 3.7 ヶ月、全生存期間中央値 7.5 ヶ月と報告されている[42]。また内分泌腫瘍の代表的な接着細胞分子である CD56 を標的とした ADC である Promiximab-duocarmycin が前臨床試験での有望な結果と共に報告されている[43]。

本研究では、計算生物学的に小細胞肺癌に強発現しており、かつ血液脳関門の存

在する脳以外の正常臓器で低発現であると推定された膜タンパクに着目し、*in vitro*での効力を評価することでADCの新規標的となり得る分子を探索することを目的とした。複数の候補遺伝子をターゲットとしたADCによる細胞毒性を評価するため、候補分子を認識する一次抗体の存在下にペイロードが結合された二次抗体をsecondary ADC (2<sup>nd</sup> ADC)として投与し、スクリーニング形式で細胞毒性試験を行った(図1)。

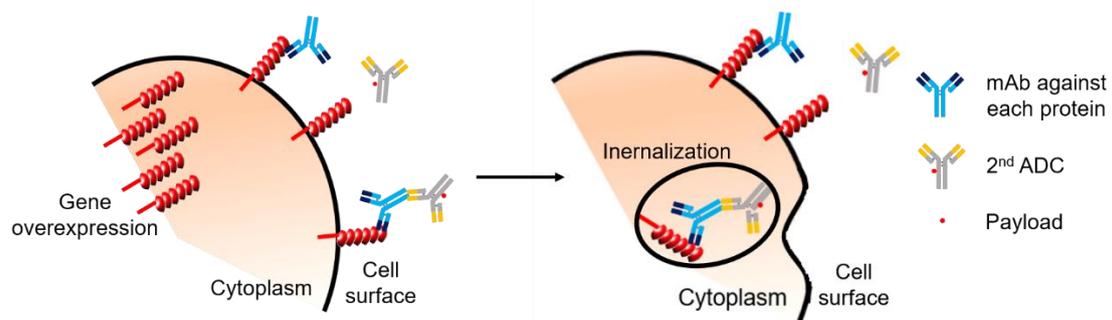


図1. 一次抗体と secondary ADC の細胞内在化

## 方法

### 1. 候補遺伝子の選別

小細胞肺癌遺伝子の発現を評価するために、公開されているマイクロアレイデータを統計プラットフォーム R3.1.1 (<https://www.r-project.org/>) および生物データ解析パッケージ Bioconductor (<https://www.r-project.org/>) を用いて評価をした。

Affymetrix GeneChipR Human Genome U133 Plus 2.0 Array (NCBI の gene expression omnibus プラットフォーム ID: GPL570) から解析されたデータを用いた。小細胞肺癌 51 例は dataset record GSE36139-36189 に含まれるものを用いた [44]。正常対照群として 30 サンプルは GSE8581(COPD の study)から 18 サンプル、GSE16538 (サルコイドーシスの study) から 6 サンプル、GSE24206 (間質性肺炎の study) から 6 サンプルを用いた[45, 46]。Gene Ontology を用いて膜タンパクに関連し、小細胞肺癌で高発現する 565 遺伝子について検討した。この中で補正後の蛍光シグナル値の平均値の差が 3 以上を示したものが 31 遺伝子であった。さらにこれらの中で NCBI より提供されている RNA シークエンスデータを参照し、発現が脳あるいは生殖器に限局した 6 遺伝子中、ADC の抗体が結合する細胞外ドメインを明確に持つ 5 遺伝子を新規治療標的の候補として同定した。しかしこの中で SYT11 は細胞外ドメインが N 末端より 1-15 アミノ酸と短く、またフローサイトメトリーでの細

胞表面での発現検証や細胞毒性試験で使用するタンパクの細胞外ドメインに対する一次抗体が確立されていないため、候補から除外し、本研究においては最終的に DLK1, SYT1, NRXN1, TRPM8 の 4 遺伝子を候補とした。

## 2. 細胞株と臨床検体における遺伝子発現解析

### 2-1. 遺伝子発現の定量法

マイクロアレイ解析から ADC の新規治療標的候補として同定した、4 遺伝子について定量的 reverse transcription (RT)-PCR 法によって定量を行った。細胞株と臨床検体から抽出した total RNA 1 $\mu$ g を DNase で室温 15 分間処理後に 25mM EDTA 1 $\mu$ L を加え、65°C 15 分間の heat inactivation を行った。次に Random Primer 0.5 $\mu$ L (Promega, Fitchburg, WI, USA), 20mM dNTP 0.5 $\mu$ L, DEPC 処理水 1 $\mu$ L を加えて計 13 $\mu$ L とし、65°C で 5 分間、on ice で 1 分間 incubate した。これに、Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムによりリアルタイム PCR を行った。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとした。リアルタイム PCR に用いたプライマーを表 2 に示す。

表 2. リアルタイム PCR に用いたプライマー

遺伝子名		Primer (5' to 3')
DLK1	Forward primer	CCTGGACGATGGCCTCTATGA
	Reverse primer	GAAGTCGCCCCCAATGTCAG
	Product	262 base pairs
SYT1	Forward primer	AATTTGAGACAAAAGTCCACCGA
	Reverse primer	GTCACGCCATTTCCTCAGTTACA
	Product	207 base pairs
NRXN1	Forward primer	GATTCTTACCACAACGGGCTACA
	Reverse primer	GGGTTTCAAAGGTGATTGGGTC
	Product	279 base pairs
TRPM8	Forward primer	CTCCTGCTGTTTGCCTACGTG
	Reverse primer	TTATTAGAAGAGTGGAGCCGAAAT
	Product	221 base pairs
GAPDH	Forward primer	CACCACCAACTGCTTAGCAC
	Reverse primer	TGGCAGGTTTTTCTAGACGG
	Product	305 base pairs

リアルタイム PCR 後の遺伝子発現量の定量方法としては、ターゲット遺伝子と GAPDH の Ct 値の差分である  $\Delta$ Ct 値を比較する相対定量法 (ddCt法)を用いた[47]。

標的遺伝子や GAPDH に対する最適化したプライマー設計は、プライマー解析ソ

フトウェア (OLIGO; Molecular Biology Insights, Inc. version 6.71) を用いてデザインし、primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて他に相同性のある配列が存在しないことを確認した。また、40 cycle 終了後に解離曲線分析による PCR 産物の検証を行った。

## 2-2.細胞株

ヒト小細胞肺癌細胞株はマイクロアレイ解析で候補遺伝子の高発現を示した SHP77 と、候補遺伝子の発現が低から中等度の発現を示した NCI-H526 を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。コントロールの細胞株として HEK293 細胞株も同様に ATCC より購入した。また Lenti-X 293T 細胞は Takara Bio USA, Inc. (Mountain View, CA, USA) から得た。SHP77, NCI-H526 については液体培地として Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium with L-Glutamine and Phenol Red (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) に 10% ウシ胎児血清 (FBS, Biowest, Nuaille, France)、5% Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) としたものをを使用した。HEK293 と HEK293-NRXN1 細胞については Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with L-Glutamine and Phenol Red (Wako Pure Chemical Industries) に 10% ウシ胎児血清 (Biowest), 5% Antibiotic-

Antimycotic Mixed Stock Solution (Nacalai Tesque)としたものを使用したとしたものを使用した。

東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会に「小細胞肺癌患者の末梢血循環腫瘍細胞の培養方法の確立および、末梢血循環腫瘍細胞を用いた新規治療法の開発」と題して申請し(受付番号:10154)、承認を受け、気管支鏡下生検にて小細胞肺癌と診断された呼吸器内科入院中の84歳男性患者よりインフォームドコンセントを書面で得た上で末梢血より抽出した循環腫瘍細胞の細胞株樹立に成功した。この細胞株を本論文で Patient-derived cell line(PDC 株)と呼称する。循環腫瘍細胞株については全血を RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail Containing Anti-CD56 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)を用いてネガティブセレクションを行い細胞分離した。培地は上述した小細胞肺癌の細胞株と同様の RPMI-1640 に bFGF Recombinant Human Protein (Thermo Fisher Scientific) 20µg/L, EGF Recombinant Human Protein (Thermo Fisher Scientific) 20µg/L と B-27™ Supplement (Thermo Fisher Scientific) を加えたものを用い、Coster 24 Well Clear Flat Bottom Ultra Low Attachment Multiple Well Plates (Corning, Corning, NY, USA)上で培養した[48]。

レンチウイルスベクターの作成用に使用した Lenti-X 293T 細胞株 (Takara Bio

USA, Inc.)は D-MEM (Wako Pure Chemical Industries)に 10%ウシ胎児血清(FBS, Biowest), 5% Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (Nacalai Tesque)とした増殖培地で培養した。

全ての細胞株は CO<sub>2</sub> incubator で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養し、3 ないし 4 日毎に継代を行った。

### 2-3.臨床検体

2007 年 3 月から 2019 年 12 月までに東京大学医学部附属病院呼吸器外科で手術を行い、病理学的に小細胞性肺癌を含有すると診断された 7 症例(うち combined SCLC and Large cell neuroendocrine carcinoma: 3 例、combined SCLC and Squamous cell carcinoma: 1 例を含む)の切除検体から採取したサンプルを解析に用いた。研究計画については東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会に「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査」を申請し(受付番号:1069)、承認を受けており、全患者より術前にインフォームドコンセントを書面で得た。RNA 抽出用の臨床検体は、検体採取後一部を切り分けて、1.5 mL エッペンドルフチューブに RNA later (Thermo Fisher Scientific) 700 $\mu$ L とともに入れ 4°Cで一晩保管し、空の 1.5mL エッペンドルフチューブに移した後に抽出までの間、-20 °C で保管した。

## 2-4. RNA 抽出処理

臨床検体からの total RNA は以下のようにして抽出した。癌組織あるいは非癌肺組織をオートクレーブ滅菌したハサミで細切してから、RNAiso Plus (Takara Bio) 1 mL とともにセラミックビーズ入りチューブ (CK Mix, Bertin instruments, France) に加え、組織破碎装置 Precellys 24 (Bertin instruments) で破碎、懸濁した。遠心後の上清にクロロホルム 200  $\mu$ L (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) を加え懸濁、遠心ののち水相を回収し、イソプロパノール 500  $\mu$ L (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を加えた後に沈殿物を 80% エタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) で洗浄し回収した。回収した RNA は DEPC 処理水に溶解し、-80  $^{\circ}$ C で保管した。

## 3. cDNA のクローニング

候補遺伝子の中で、FirstChoice® Total RNA Survey Panel (Thermo Fisher Scientific) キット中のヒト脳、胎盤、前立腺由来の RNA 1 $\mu$ g から 2-1 で述べた方法で cDNA を合成した。DLK1 については胎盤由来の RNA から合成した cDNA を、TRPM8 については前立腺由来の RNA から合成した cDNA をテンプレートとし、SYT1, SYT11, NRXN1 については脳由来の RNA から合成した cDNA をテンプレートとして、各

遺伝子の coding DNA site を含むように設計したプライマーを用いて PCR を行った。プライマー用のオリゴマーは Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)社製のものを使用した。

PCR にはすべて耐熱性ポリメラーゼである KOD-plus-Ver.2 (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用し、添付文書に沿って 25 $\mu$ L の系で反応させた。NRXN1 と TRPM8 については脳由来の RNA から合成した cDNA からは増幅が困難であったため、SHP77 細胞株より抽出した RNA から合成した cDNA をテンプレートとして PCR を行った。DLK1, NRXN1, TRPM8 遺伝子は増幅効率が不良であったことから、約 50 塩基対が重複するように前半部と後半部に分けて増幅することとした。また TRPM8 については coding DNA sequence の開始コドン前後の CG 含有率が高く、さらに前半部について増幅効率を高めるためさらに約 50 塩基対が重複するように前後半に分けて増幅を行った。最終的に coding DNA sequence の増幅に成功したプライマーの配列を表 3 に示す。

表 3. クローニングに使用したプライマーの配列

遺伝子配列		Primer (5' to 3')
DLK1 前半	Forward primer	AGCCCTGGCTTTCCCCTCGC
	Reverse primer	TCAGTGCAGACGCCGTCGTTCTC
	Product	693 base pairs
DLK1 後半	Forward primer	GCACCTGCGTGGATGATGAG
	Reverse primer	AAAGATTAGGACAGACCGCGTATAG
	Product	807 base pairs
SYT1 nested PCR 前	Forward primer	TCCAGAATTCCTAATAGAACACTTC
	Reverse primer	AATTAAAACAGGATTCCAAGTACC
	Product	1450 base pairs
SYT1 nested PCR	Forward primer	TCTACAGCTGCTGCCTCGGTA
	Reverse primer	GAGAAGAACAGGATTAGTACTCGC
	Product	1399 base pairs
NRXN1 前半	Forward primer	TCCCGCCTTTCCCCTTAC
	Reverse primer	GCTGGAATTACAGTTAATCCTGATAC
	Product	2620 base pairs
NRXN1 後半	Forward primer	GGAGCATGTTTATGAAAATTCAG
	Reverse primer	CATTCCCTGTCTTCTTTTGTATG
	Product	2474 base pairs

表 3. (続き)

遺伝子配列	Primer (5' to 3')	
TRPM8 前	Forward primer	AGATGTCCTTTTCGGGCAGCCAGGCTCA
	Reverse primer	AAGCACCTTTGGACTGCGCGATGTAGATG
	Product	536 base pairs
TRPM8 中	Forward primer	GGCACCTGAAAACACCCAACCTG
	Reverse primer	GACAAACGTGAGGAGGGGCATCATTATAG
	Product	1170 base pairs
TRPM8 後	Forward primer	TTCAGCACGCTTGTGTACC
	Reverse primer	ATTGTTTCATCAGCATTCCTTA
	Product	1891 base pairs

また表 4 に PCR 反応条件を示す。

表 4. PCR 反応条件

配列	PCR サイクル	Polymerase
DLK1 前半	94°C, 2 分 → (98°C, 10 秒 → 60°C, 30 秒 → 68°C, 50 秒) × 40 cycle → 68°C, 5 分	KOD-Plus-Ver.2
DLK1 後半	94°C, 2 分 → (98°C, 10 秒 → 60°C, 30 秒 → 68°C, 60 秒) × 40 cycle → 68°C, 5 分	KOD-Plus-Ver.2
SYT1 nested PCR 前	94°C, 2 分 → (98°C, 10 秒 → 60°C, 30 秒 → 68°C, 90 秒) × 40 cycle → 68°C, 5 分	KOD-Plus-Ver.2
SYT1 nested PCR	94°C, 2 分 → (98°C, 10 秒 → 60°C, 30 秒 → 68°C, 90 秒) × 40 cycle → 68°C, 5 分	KOD-Plus-Ver.2
NRXN1 前半	94°C, 2 分 → (98°C, 10 秒 → 60°C, 30 秒 → 68°C, 180 秒) × 40 cycle → 68°C, 5 分	KOD-Plus-Ver.2

NRXN1 後半	94°C, 2分→(98°C, 10秒→60°C, 30秒→68°C, 150秒) × 40 cycle→68°C, 5分	KOD-Plus-Ver.2
TRPM8 前	94°C, 2分→(98°C, 10秒→60°C, 30秒→68°C, 40秒) × 40 cycle→68°C, 5分	KOD-Plus-Ver.2
TRPM8 中	94°C, 2分→(98°C, 10秒→60°C, 30秒→68°C, 90秒) × 40 cycle→68°C, 5分	KOD-Plus-Ver.2
TRPM8 後	94°C, 2分→(98°C, 10秒→60°C, 30秒→68°C, 120秒) × 40 cycle→68°C, 5分	KOD-Plus-Ver.2

DLK1, NRXN1, TRPM8 については分割して行った PCR 産物をテンプレートとする polymerase reaction を行うことで coding DNA sequence の合成を行った[49]。

<Polymerase reaction 反応液の調整>

前方の DNA	X $\mu$ L (4.32nM)
後方の DNA	Y $\mu$ L (4.32nM)
KOD-plus	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ buffer	2.5 $\mu$ L
2mM dNTPs	2.5 $\mu$ L
25mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 $\mu$ L
DW	(18-X-Y) $\mu$ L
<hr/>	
計	25 $\mu$ L

反応条件は 94°C, 2 分→(98°C, 10 秒→68°C, elongation time) ×30 cycle→4°C hold とし、elongation time はそれぞれ DLK1: 60 秒, NRXN1: 2 分 30 秒, TRPM8 (前+中): 1 分 10 秒, TRPM8 ((前+中)+後): 2 分とした。

合成した coding DNA sequence の全長を含む cDNA を pGEM-T Easy vector (Promega) に TA クローニングした。その後 DH5α 20 μL に約 5ng のライゲーション反応物を加え、30 分氷上で incubate した後、42°C 45 秒のヒートショックを行い、その後 2 分間氷上に置いた。SOC 培地を加え、37°C で 1 時間 incubate した後に 50μg/mL のアンピシリン入り LB 固形培地に播種し、37°C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、LB 液体培地に浮遊させ 37°C, 220 振盪/分で一晩培養した後、PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) を用いて、付属の protocol に従い精製した。得られたプラスミドの塩基配列の解析を外注で依頼し、正しい塩基配列であることを確認した。

#### 4. 強制発現ベクターの作成

HEK293 細胞株への強制発現には cDNA 発現用ウイルスベクター pcDNA™ 3.1/Zeo(+) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。サイトメガロウイルスプロモーター領域を内包し、Multiple cloning site に *NotI* 認識配列を持つ。TA クローニングした

pGEM-候補遺伝子配列プラスミドをテンプレートとし、強制発現用の Forward primer と *NotI* 認識配列を負荷した Reverse primer を用いて、候補遺伝子-*NotI* を PCR で増幅した。この PCR 産物と、制限酵素 *NotI* で切断した後に 5'末端をリン酸化処理した pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/*Zeo*(+)ベクターを ligation した。NRXN1 については *NotI* 認識配列をコーディングシーケンス内に認めるため、*NheI* 認識配列と *XhoI* 認識配列を組み込んだプライマーを作成してこれらの配列を組み込んだ NRXN1 コーディングシーケンスを増幅した。これを *NheI* と *XhoI* で double digestion した pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/*Zeo*(+)ベクターと ligation した。

これらの産物を DH5 $\alpha$  20  $\mu$ L に添加し、30 分氷上で incubate した後、42°C 45 秒のヒートショックを行い、その後 2 分間氷上に置いた。SOC 培地を加え、37°C で 1 時間 incubate した後に 50 $\mu$ g/mL のアンピシリン入り LB 固形培地に播種し、37°C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、LB 液体培地に浮遊させ 37°C, 220 振盪/分で一晩培養した後、PureYield<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep System (Promega) を用いて、付属の protocol に従い精製した。得られたプラスミドを制限酵素 *ApaI* で切断した fragment を電気泳動で確認した。目的の方向に候補遺伝子配列が ligation されたと考えられるプラスミドを塩基配列解析に外注で依頼し、目的遺伝子が発現される向きにクローニングされていることを確認した。

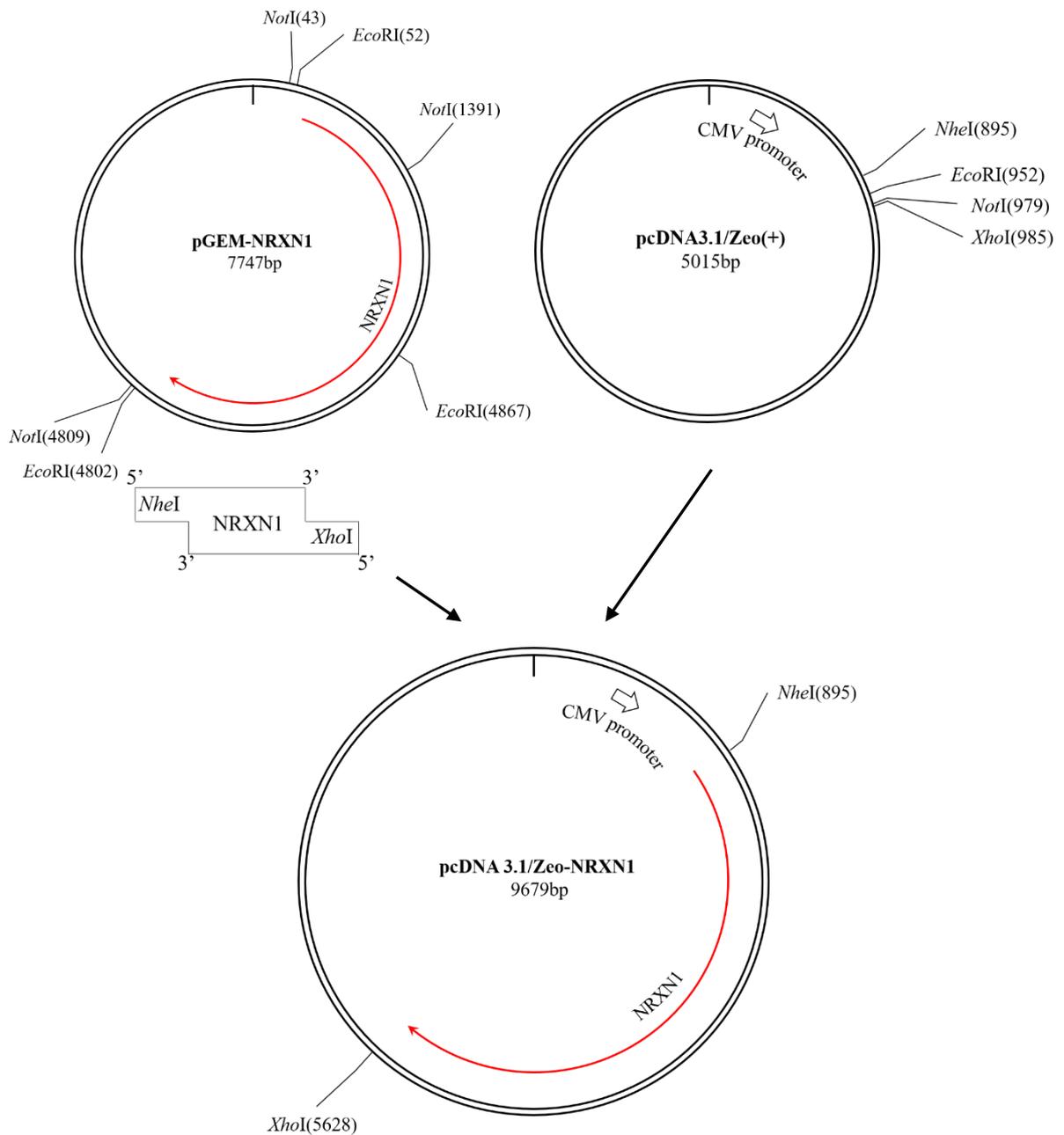


図2. 強制発現ベクターの作成

pcDNA3.1/Zeo(+)に NRXN1 の coding sequence を挿入したベクターマップを示す。

CMV: Human cytomegalovirus immediate early promoter

目的のプラスミドが transform された DH5 $\alpha$  のコロニーをピックアップし、アンピシリン入り LB 液体培地内で 37°C 下に一晚培養した後、PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega)を用いて、ミディプレップを行い、候補遺伝子のウイルス発現ベクターを得た。コントロールとして、緑色蛍光色素(GFP)カセットを挿入したプラスミドも作成した。

前日に継代した HEK293 細胞を 6 ウェルプレートに  $5.0 \times 10^5$  cells で播種し、一晚増殖培地で培養した後、精製した強制発現用プラスミドとともに Hilymax (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いてリポフェクションした。リポフェクションは Hilymax の添付文書に従い、無血清培地は Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific)を使用し、次の protocol に従って調整して 1mL の増殖培地の入ったウェルに添加した。添加 4 時間後に増殖培地 2mL に交換した。24 時間、48 時間、72 時間培養した細胞の標的遺伝子発現をリアルタイム PCR で評価し、また 48 時間培養した細胞について細胞表面の標的タンパク発現をフローサイトメトリーで評価した。

<リポフェクション試薬の調整>

pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/Zeo(+)-xxx	2μg	(xxx: 各遺伝子)
無血清培地	10μL	
Hilymax	120μL	室温 15 分

## 5. NRXN1 遺伝子ノックアウト

小細胞肺癌の細胞株や標的遺伝子を強制発現させた HEK293 株において、細胞表面のタンパク発現がフローサイトメトリーで確認できた NRXN1 に関し、NRXN1 が高発現している小細胞肺癌の細胞株 SHP77 に対して NRXN1 遺伝子の CRISPR/Cas9 システムを介してノックアウトを行った。

CHOPCHOP [50]と CRISPRdirect [51]にて提示された NRXN1 のパリンドローム配列上流の 20 塩基の候補の中からガイド RNA (gRNA)配列を定めて Merck 社にこの sequence を外注した。表 5 にこの標的配列を示す。

表 5. gRNA の 20 塩基対先導配列デザイン

gRNA	配列 (5' to 3')
gRNA	GAGCTGATTCTGACGCGCGG

この 2 候補の gRNA を Cas9 の発現ベクターである Cas9 SmartNuclease All-in-one Vector (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) に制限酵素 *BsaI* を使用してクローニングした。その後、gRNA と Cas9 の Coding sequence を制限酵素 *EcoRI* で切断して電気泳動後、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) を用いて抽出、精製した。この産物をレンチウイルスベクターである CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd (RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Japan) の multiple cloning site を制限酵素 *EcoRI* で切断した産物と ligation した。図 3 に CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd ベクターマップを示す。このベクターは blasticidin 耐性遺伝子を含有しており、発現細胞の blasticidin によるセレクションが可能である。

Cas9 と gRNA をコードした遺伝子配列は単一制限酵素で切断したため粘着断端ではなく、CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd に ligation した後にコンピテントセル DH5 $\alpha$  20  $\mu$ L に添加して 3 と同様の方法で transform し、一晚培養後に精製したプラスミドを制限酵素 *ApaI* で切断して電気泳動し、目的の方向に ligation されていると考えられるプラスミドを選択した。ligation 部分の配列を外注のシーケンス配列解析で実際に発現される方向に目的の配列が ligation されていることを確認した。

この Cas9 と gRNA の遺伝子配列のクローニングされた発現ベクターをミニプレップにて精製した。

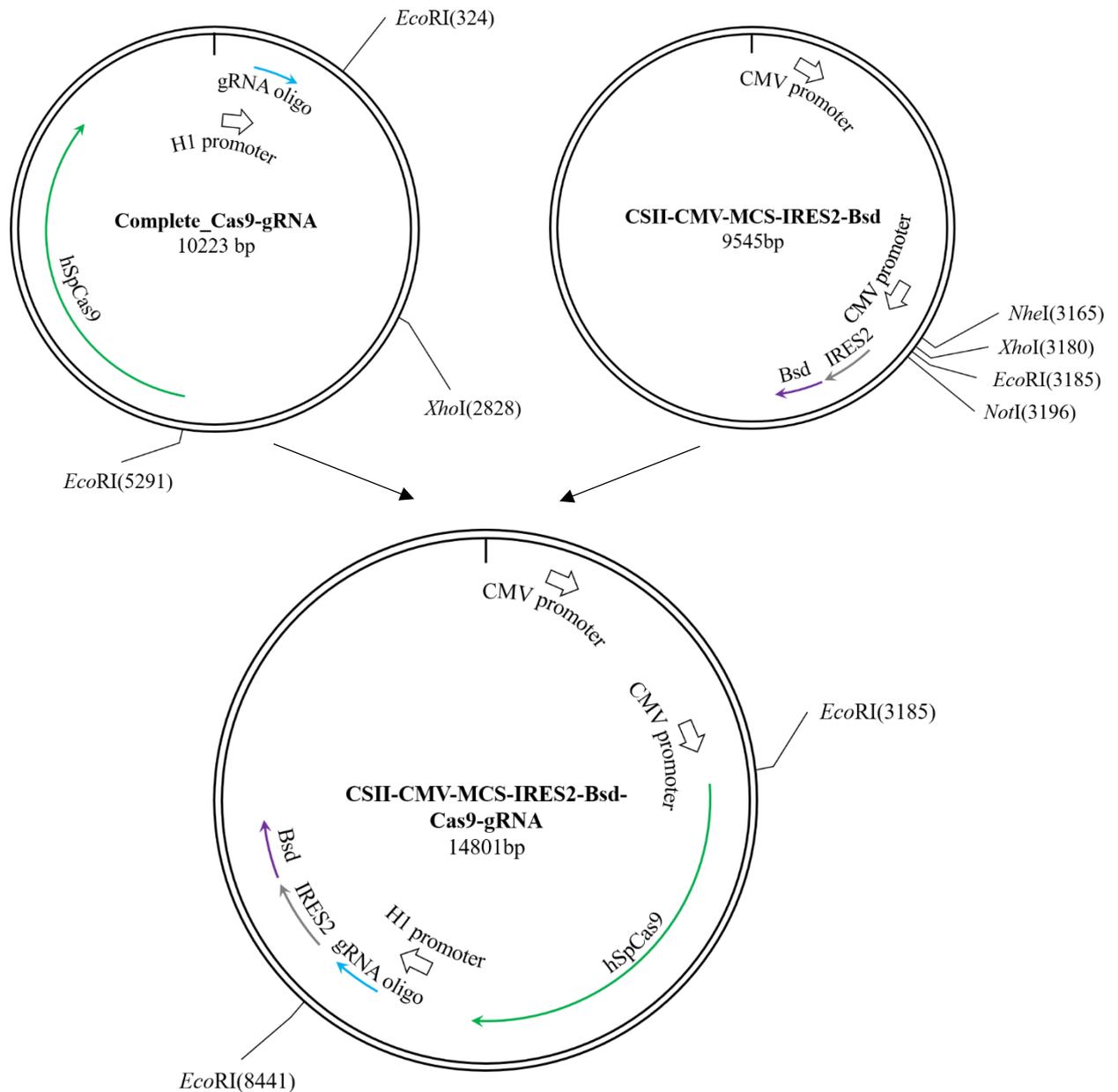


図 3. Cas9/gRNA 強制発現ベクターの作成

*EcoRI* で Cas9-gRNA カセットを切り出し、レンチウイルスベクターに挿入した。

CMV: Human cytomegalovirus immediate early promoter,  
 IRES2: Encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site,  
 Bsd: Blasticidin resistance gene.  
 hSpCas9: Human codon-optimized *Streptococcus pyogenes* Cas9

前日に継代した Lenti-X 293T 細胞を 10cm 培養シャーレに  $4.5 \times 10^6$  cells を播種し、

一晩培養した後に、理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けたパッ

ケーシングプラスミド (pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev) と共に Hilymax (Dojindo) を用いてリポフェクションした。リポフェクションは Hilymax (Dojindo) の添付文書に従い、無血清培地は Opti-MEM™ Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) を使用し、下記の protocol に従って調整して 10mL の増殖培地の入った 10cm 培養シャーレに加えた。16 時間培養後に 7.5µg の forskolin (Wako Pure Chemical Industries) を添加した 7.5mL の増殖培地に交換し、さらに 48 時間培養した。この培養上清をウイルス液として回収し、0.45µm の Millipore filter で濾過し、分注して 80°C で保管した。

<リポフェクション試薬の調整>

CSII-CMV-Cas9-gRNA-IRES2-Bsd	14µg
pCAG-HIVgp	8µg
pCMV-VSV-G-RSV-Rev	8µg
無血清培地	up to 900µL
Hilymax	100µL 室温 15 分

前日に SHP77 細胞を 6well プレートに  $2.5 \times 10^5$  cells/well で播種し一晩増殖培地で培養した後、ウイルス液と増殖培地を 750µL ずつ混合しプロブレン (Sigma-Aldrich) を 12µg 加えた培地に交換した。さらに翌日より blasticidin (Kaken Pharmaceutical co.,

Ltd., Tokyo, Japan)を 10 $\mu$ g/mL になるよう加えて 2 週間培養を行い、ベクター発現細胞として選択した。このようにして得られた細胞株は SHP77 KO と名付けた。

SHP77 KO における NRXN1 の mRNA 発現を HEK293 での相対的発現を 1 とした ddCt 法にて SHP77 と比較した結果を図 4、細胞表面における NRXN1 発現を FC500

flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)にて計測した結果を図 5 に示す。

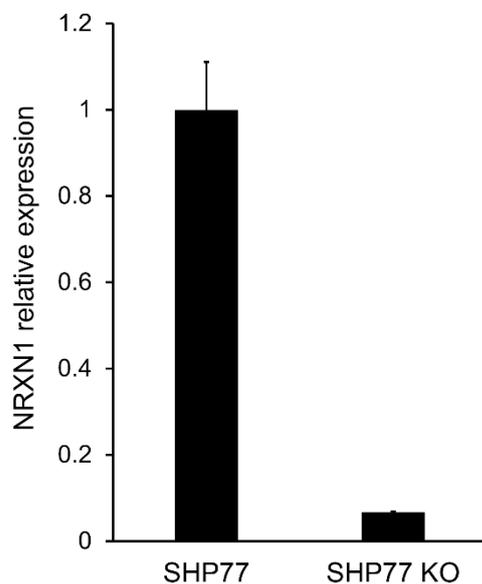
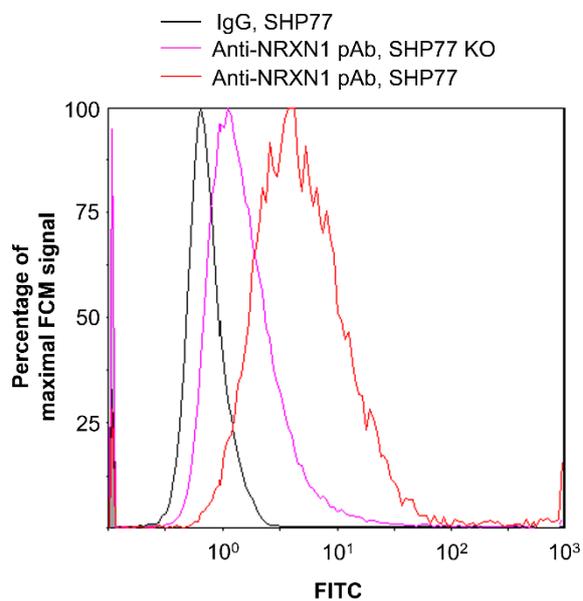


図 4. SHP77 と SHP77 KO における NRXN1 mRNA 発現の比較



## 図 5. SHP77 と SHP77 KO における細胞表面 NRXN1 蛋白発現の比較

一次抗体として抗 NRXN1 ポリクローナル抗体(ANR-031; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), 二次抗体 goat anti-rabbit IgG FITC conjugate (ab97050; Abcam, Cambridge, United Kingdom)を使用した。

## 6. フローサイトメトリーを使用した細胞表面蛋白の検出

各候補について、市販の研究用抗体を選定し、以下のように購入した。

### DLK1:

Anti-DLK1 Monoclonal Antibody raised in mouse(3A10) (MA5-15915, Thermo Fisher Scientific)

Anti-human Pref-1 (DLK-1) mAb (PF13-3) (AG-20A-0069-C05, AdipoGen, San Diego, CA, USA)

Anti-human Pref-1 (DLK-1) mAb (PF299-1) (AG-20A-0070-C05, AdipoGen)

### SYT1:

Anti-Synaptotagmin 1 Monoclonal Antibody raised in mouse (8G11B10) (MA5-15466, Thermo Fisher Scientific)

### NRXN1:

Anti-NRXN1 $\alpha$  polyclonal antibody raised in rabbits (ANR-031, Alomone Labs) against amino acid residues 546-560 of rat NRXN1 $\alpha$

### TRPM8:

Anti-TRPM8 polyclonal antibody raised in rabbits (ACC-049, Alomone Labs) against amino acid residues 917-929 of human TRPM8

1.0 × 10<sup>5</sup> cells/100 μL PBS+2% FBS に調整した細胞にそれぞれの蛋白に対する一次抗体あるいはアイソタイプコントロール IgG を添加し、暗室内に 30 分間 on ice で静置した。PBS+2%FBS にて 2 回洗浄した後、同バッファーで再懸濁し、goat anti-rabbit IgG FITC conjugate (Abcam) 2 μL を添加してさらに暗室内、on ice で 30 分間静置した。PBS+2%FBS で 2 回洗浄した後、同バッファーで再懸濁し、PI (Biolegend, San Diego, CA, USA) 2 μL を添加して 15 分後に FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) で測定した。細胞株ごとに、前方散乱光(FS)-側方散乱光(SS)の 2 パラメーターヒストグラムでゲーティングをかけた細胞群に対し、FITC-PI の 2 パラメーターヒストグラムでクアドラントリージョンを作成し、FITC 陽性、PI 陰性の細胞割合を測定した。

## 7. 細胞毒性試験

細胞毒性試験に使用する目的で購入した一次抗体は下記の通りである。

NRXN1:

Mouse anti-NRXN1α monoclonal antibody (sc-136001, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) recognizing amino acids 1063-1184 of rabbit NRXN1α

TRPM8:

Anti-TRPM8 polyclonal antibody raised in rabbits (ACC-049, Alomone Labs) against amino acid residues 917-929 of human TRPM8

また各一次抗体に続いて投与する 2<sup>nd</sup> ADC は、Moradec (San Diego, CA, USA) 社の製品から  $\alpha$  MFc-CL-PNU (AM-102-PN)を選定した。一次抗体の host に整合するポリクローナル抗体とし、リンカーは細胞内で分解される cleavable linker、ペイロードは小細胞肺癌に従来使用されているトポイソメラーゼII阻害薬であるネモルビシン誘導体である PNU-159682 とした(図 6)。

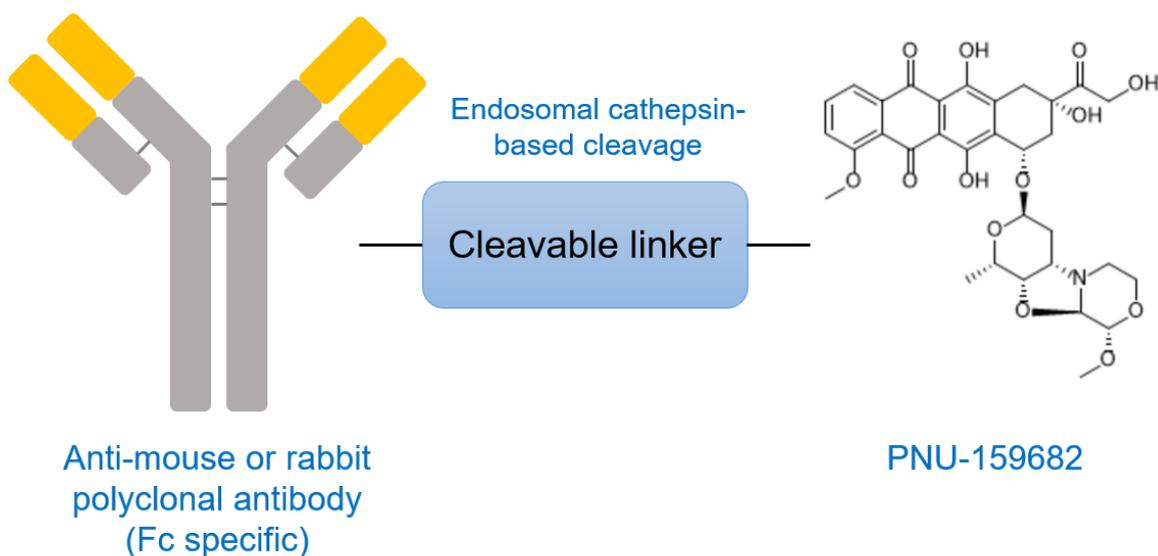


図 6. 細胞毒性試験で使用した 2<sup>nd</sup> ADC の構成因子

抗マウスまたはラビットポリクローナル抗体にカテプシンにより切断されるケミカルリンカーを介してトポイソメラーゼII阻害薬であるネモルビシンの誘導体である PNU-159682 がペイロードとして結合されている。NRXN1 と TRPM8 を標的とした細胞毒性試験では一次抗体としてそれぞれマウス由来、ラビット由来の抗体を用いており、それぞれに整合した 2<sup>nd</sup> ADC を使用した。

以下に NRXN1, TRPM8 に対し ADC を使用した細胞毒性試験の protocol を記載する。

Day1 に小細胞肺癌株である SHP77, NCI-H526 と HEK293, HEK293 に候補遺伝子を強制発現させた細胞を 96 ウェルプレート上で 1 ウェルにつき、培地 50 $\mu$ L あたり 1000 細胞ずつ播種した。PDC については 1 ウェルにつき、培地 50 $\mu$ L あたり 2500 細胞を播種した。Day2 に 1 次抗体(抗 NRXN1 モノクローナル抗体あるいは抗 TRPM8 ポリクローナル抗体、又はアイソタイプコントロール IgG)を含む培地 50 $\mu$ L あるいは培地のみ 50 $\mu$ L を当該ウェルに添加し、10 分間の静置、培養した。PBS を用い、13.2nM から順に 0.41nM まで 2<sup>nd</sup> ADC の 1/2 希釈系列を各 2 $\mu$ L として作成し、当該ウェルに添加した。一次抗体と 2<sup>nd</sup> ADC の濃度比は NRXN1 についてはモル比で 2:1、TRPM8 については購入可能な製品でモノクローナル抗体がなく、ポリクローナル抗体を使用してモル比で 3:1 となるように添加した。図 7 に各アッセイのシェーマを示す。PDC 以外の細胞株については 72 時間培養し、PDC については 7 日間培養した後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を 10 $\mu$ L/well 添加し、2 時間後に microplate reader ARVOX (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) 用いて吸光度を測定して細胞生存率を算出した。各 treatment は 1 回の assay で 3 ウェルずつに適用し、また assay は独立して 3 回行った。

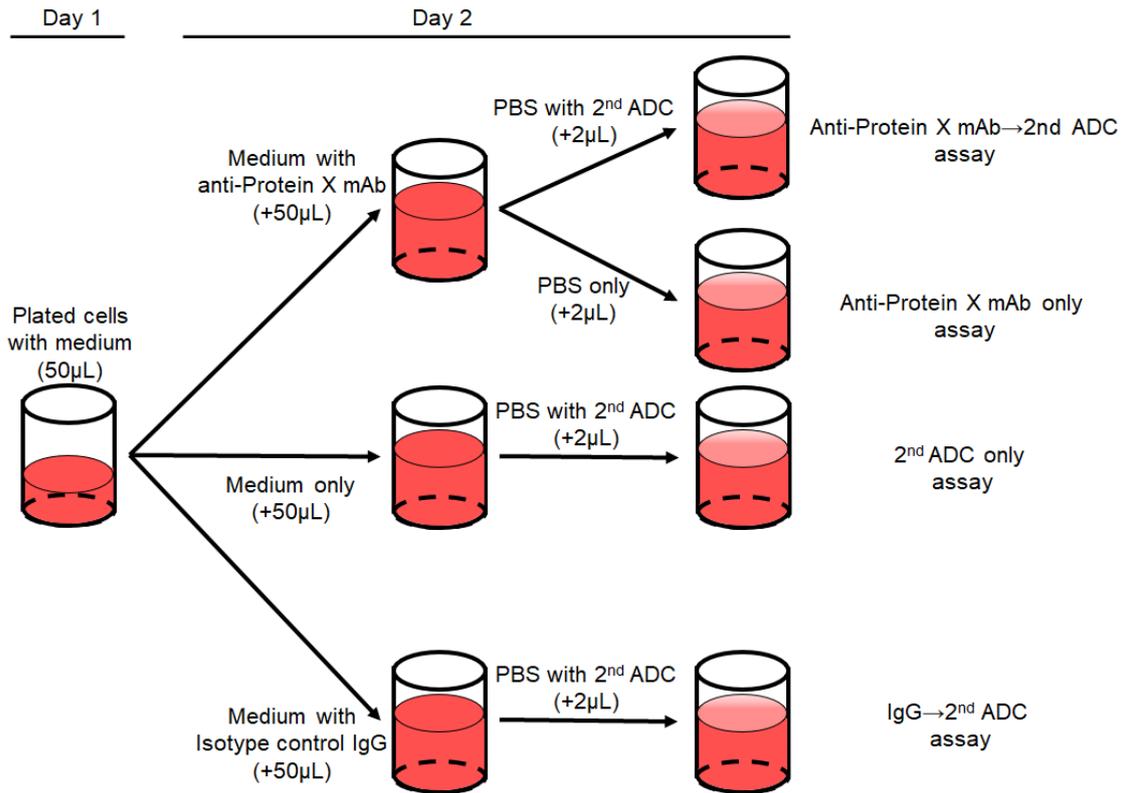


図 7. 各ウェルに対する薬剤添加の略図

Day 1 に各細胞株を 50 μL の培地に播種し、Day 2 に各アッセイに対応した薬剤と培地を追加投与した。各アッセイで添加薬剤について希釈列を作製し、希釈列毎に 3 ウェルずつに対して対応した薬剤を添加した。mAb; monoclonal antibody.

## 8. アポトーシスアッセイ

細胞毒性試験で NRXN1 を介在したと考えられる細胞毒性を確認した。実際に細胞死が誘導されたかを確認するため、それぞれの treatment でのアポトーシスアッセイを行った。

SHP77, SHP77 KO, NCI-H526, PDC, HEK293, HEK293-NRXN1 のそれぞれの細胞株につき、細胞毒性試験と同様の細胞濃度にて細胞を 24 ウェルプレート上で培

養し、抗体の添加も同様のタイミングとそれぞれの細胞毒性試験で算出された抗 NRXN1 モノクローナル抗体+2<sup>nd</sup> ADC の IC<sub>50</sub> で行った。IC<sub>50</sub> は 9 で述べた方法で算出し、SHP77 KO, HEK293 に対してはそれぞれ SHP77, HEK293-NRXN1 の IC<sub>50</sub> を適用した。細胞株毎にコントロール(抗体無添加)、抗 NRXN1 モノクローナル抗体のみ添加、2<sup>nd</sup> ADC のみ添加、Isotype control IgG + 2<sup>nd</sup> ADC 添加、抗 NRXN1 モノクローナル抗体 + 2<sup>nd</sup> ADC 添加の 5 ウェルの細胞群について以下の手順で細胞死が誘導された割合を測定した。ウェルごとに細胞をエッペンチューブに回収し、洗浄後 Annexin V buffer に再懸濁した。各エッペンチューブに Cy7 が結合した Annexin V (Biolegend) 5 $\mu$ L と PI (Biolegend) 2 $\mu$ L を添加し、室温にて 15 分間静置した後に FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) で測定した。死細胞は前方散乱光(FS)と側方散乱光(SS)の 2 パラメーターヒストグラムでゲーティングをかけた細胞群における Annexin V と PI 共に陽性の後期アポトーシス細胞の割合を測定した。データの解析は FC500 解析ソフト (Beckman Coulter) を用いて行った。assay は独立して 3 回行った。

## 9. 統計解析

CCLE と NCBI GEO から得た遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイ解析については統計解析ソフトウェア R 3.1.1(R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [<http://www.r-project.org>])と Bioconductor パッケージを用いた。フローサイトメトリーで検出した NRXN1 陽性細胞割合、細胞毒性試験、アポトーシスアッセイにおける解析については JMP Pro 14.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。細胞毒性試験における細胞生存曲線は 4 パラメーター非線形ロジスティック回帰モデルにて描き、 $IC_{50}$  を算出した。

NRXN1 陽性細胞割合については一元配置分散分析後、Tukey's post hoc test を、細胞毒性試験における細胞生存率については二元配置分散分析後、Tukey's post hoc test を、またアポトーシスアッセイにおける死細胞割合については細胞株ごとに、一元配置分散分析後、no-treatment 群、2<sup>nd</sup> ADC 群をコントロールとした Dunnett's post hoc test をそれぞれ行った。いずれも P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。それぞれの実験では 3 回以上の独立した実験を行い、データはその結果の平均値±標準誤差で示した。

## 結果

### 1. National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus と Cancer Cell Line Encyclopedia の解析

Bioconductor を用いて肺小細胞癌で高発現、かつ正常肺組織で低発現であった 31 遺伝子を heatmap 上に抽出した(図 8)。

ADC の属性として分子量が大きく血液脳関門を通過しないと考えられること、副作用の観点から重要臓器での発現が乏しいことを必要条件と考え、先の 31 遺伝子の各候補に対し、NCBI の RNA sequence データを参照して重要臓器での発現が乏しい、あるいは脳での発現に限局していることを条件として 6 遺伝子(ADCY1, DLK1, NRXN1, SYT1, SYT11, TRPM8)に絞り込んだ。このうち、ADCY1 は ADC の標的となる細胞外ドメインがないことを確認した。さらに SYT11 については細胞外ドメインが N 末端より 1-15 アミノ酸と短く、これらをエピトープとする一次抗体が検索した範囲で見出すことができないため、ADC の標的対象から除外した。

以上より、*in silico* での解析でフローサイトメトリーを用いた発現検証、細胞毒性試験を実施する候補遺伝子は DLK1, NRXN1, SYT1, TRPM8 とした。

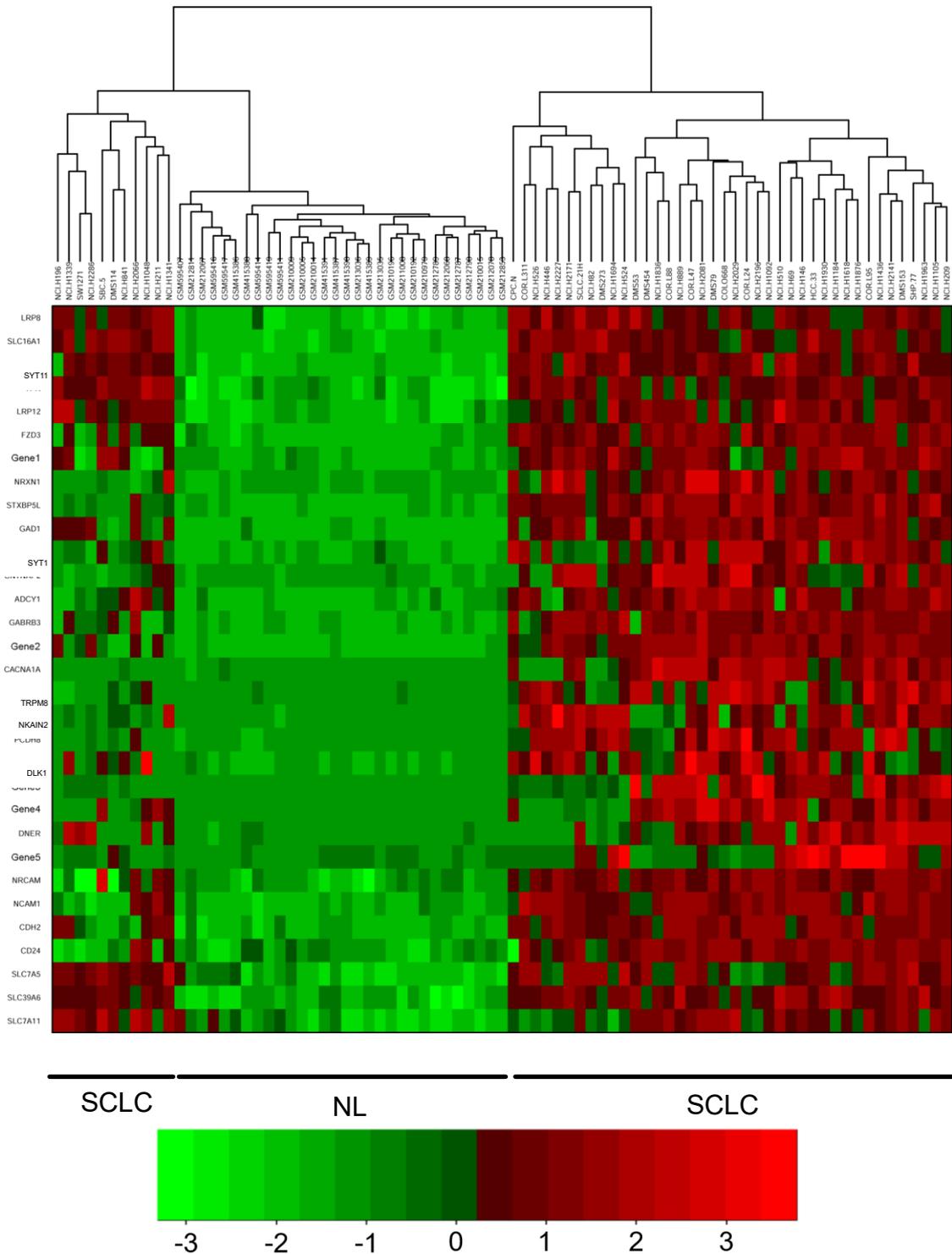


図 8. 膜タンパク質のマイクロアレイ解析結果  
 肺小細胞癌細胞株 51 株(GSE36139-36189)と正常肺組織 30 例(GSE8581, GSE16538, GSE24206)のデータセットの発現プロファイルを用いて heatmap を作成した。  
 SCLC=小細胞肺癌株、NL=正常肺組織症例。

引用：Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array

## 2. 細胞株における候補遺伝子の発現解析

### 2-1. 細胞株における候補遺伝子の mRNA 発現

細胞株ごとに候補遺伝子の mRNA 発現を ddCt 法にて解析し、図 9 に示した。

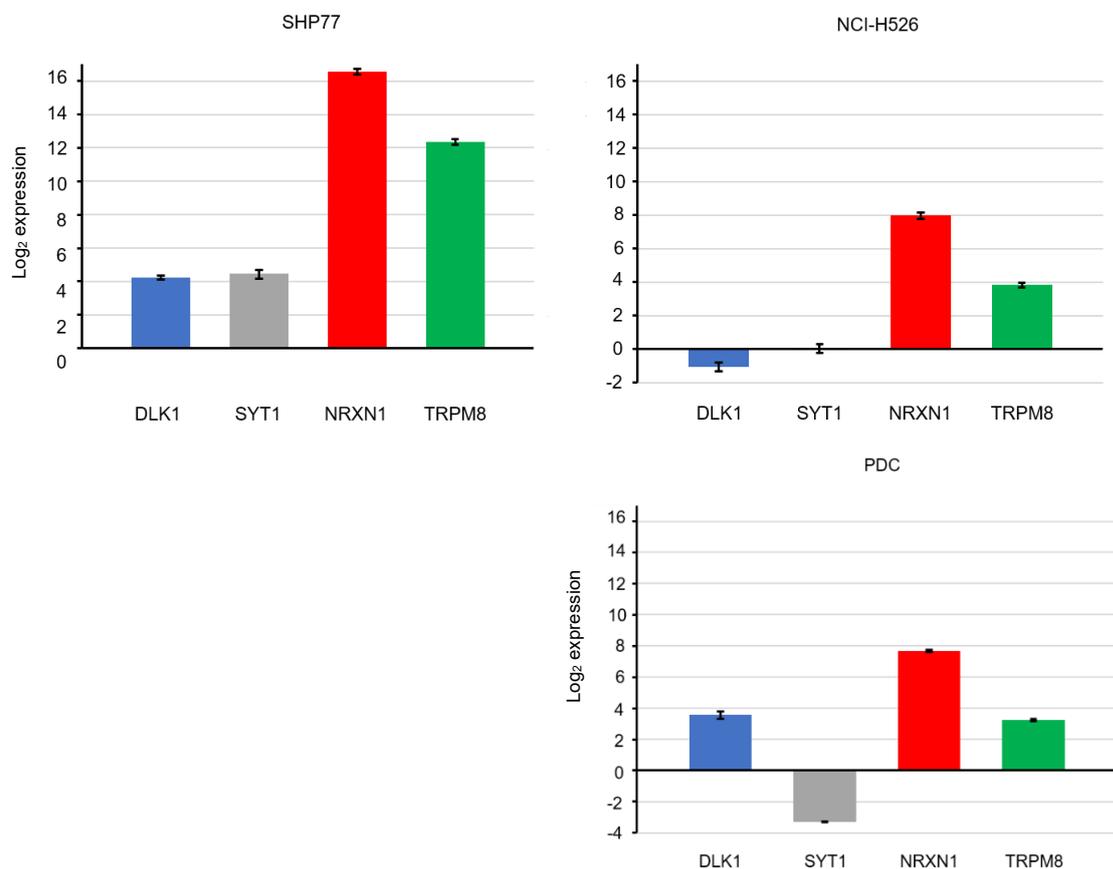


図 9. SHP77, NCI-H526, PDC における候補遺伝子の mRNA 発現強度  
HEK293 における発現を 1 とし、相対発現強度を図示した。

HEK293 における発現に比して、SHP77 では特に NRXN1, TRPM8 が高度に発現しており、NCI-H526 においても NRXN1, TRPM8 は発現しているものの、SHP77 に比して発現強度は低かった。PDC においては NRXN1, TRPM8 の mRNA 発現強度は NCI-H526 と同程度であった。

## 2-2. フローサイトメトリーを用いた細胞表面における各遺伝子の発現解析

DLK1 に関して、SHP77 で明かな陽性細胞は検出されず、またポジティブコントロールとして DLK1 を強制発現させた HEK293 に対する同様の解析でも検出されなかった。SYT1 についても同様に解析を行ったが、SHP77, SYT1 を強制発現させた HEK293 いずれにおいても明らかな陽性細胞は検出できなかった。

次に、フローサイトメトリーでの使用がサポートされているポリクローナル抗体が購入可能であった TRPM8, NRXN1 について同様に陽性細胞の検出を行った。

TRPM8 を対象とした解析で SHP77 と TRPM8 を強制発現させた HEK293 で陽性細胞が確認された(図 10)。

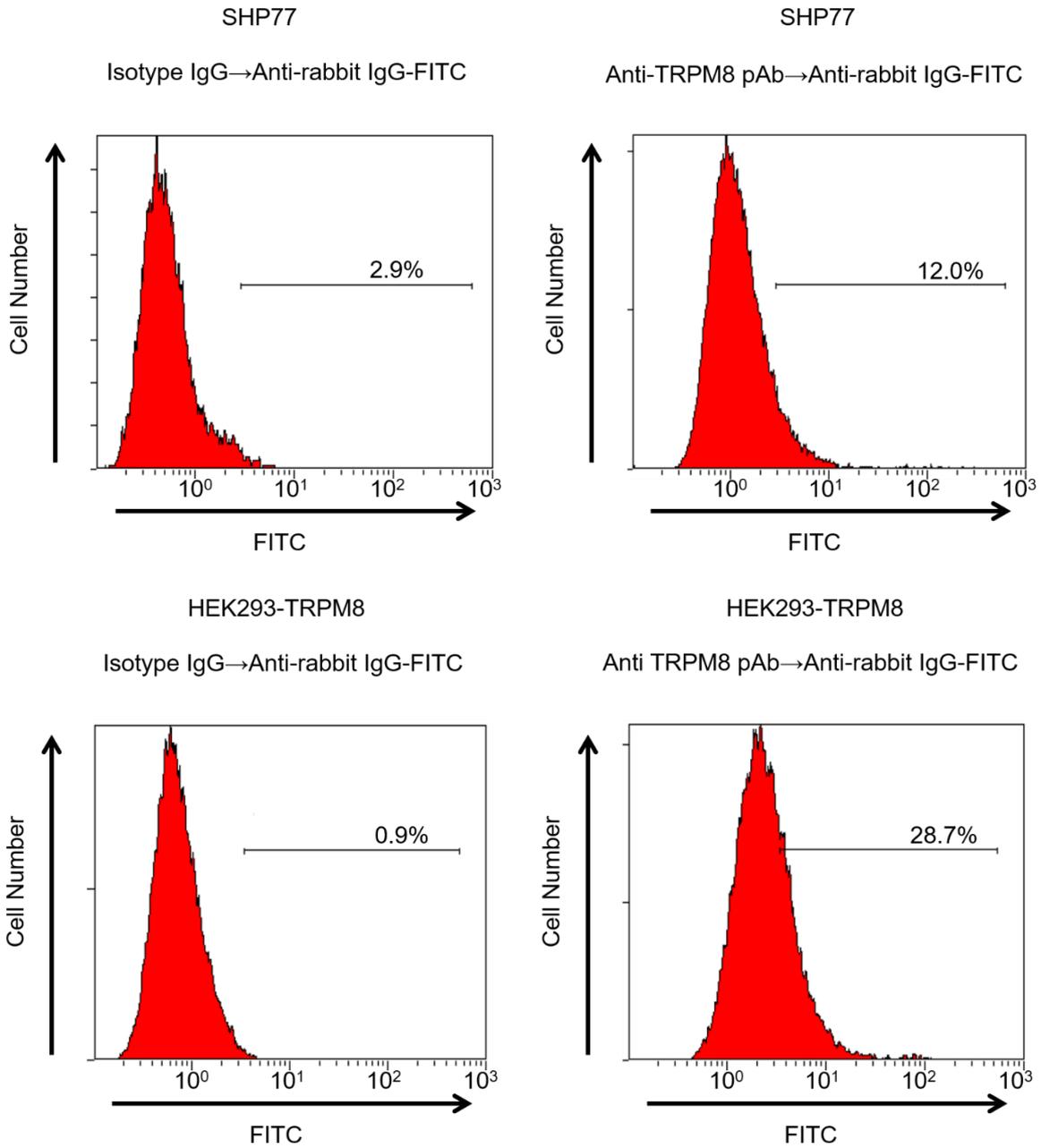


図 10. SHP77 と HEK293-TRPM8 における細胞表面 TRPM8 の発現

同様に、NRXN1 についても SHP77 と HEK293-NRXN1 で陽性細胞が確認できた(図 11)。

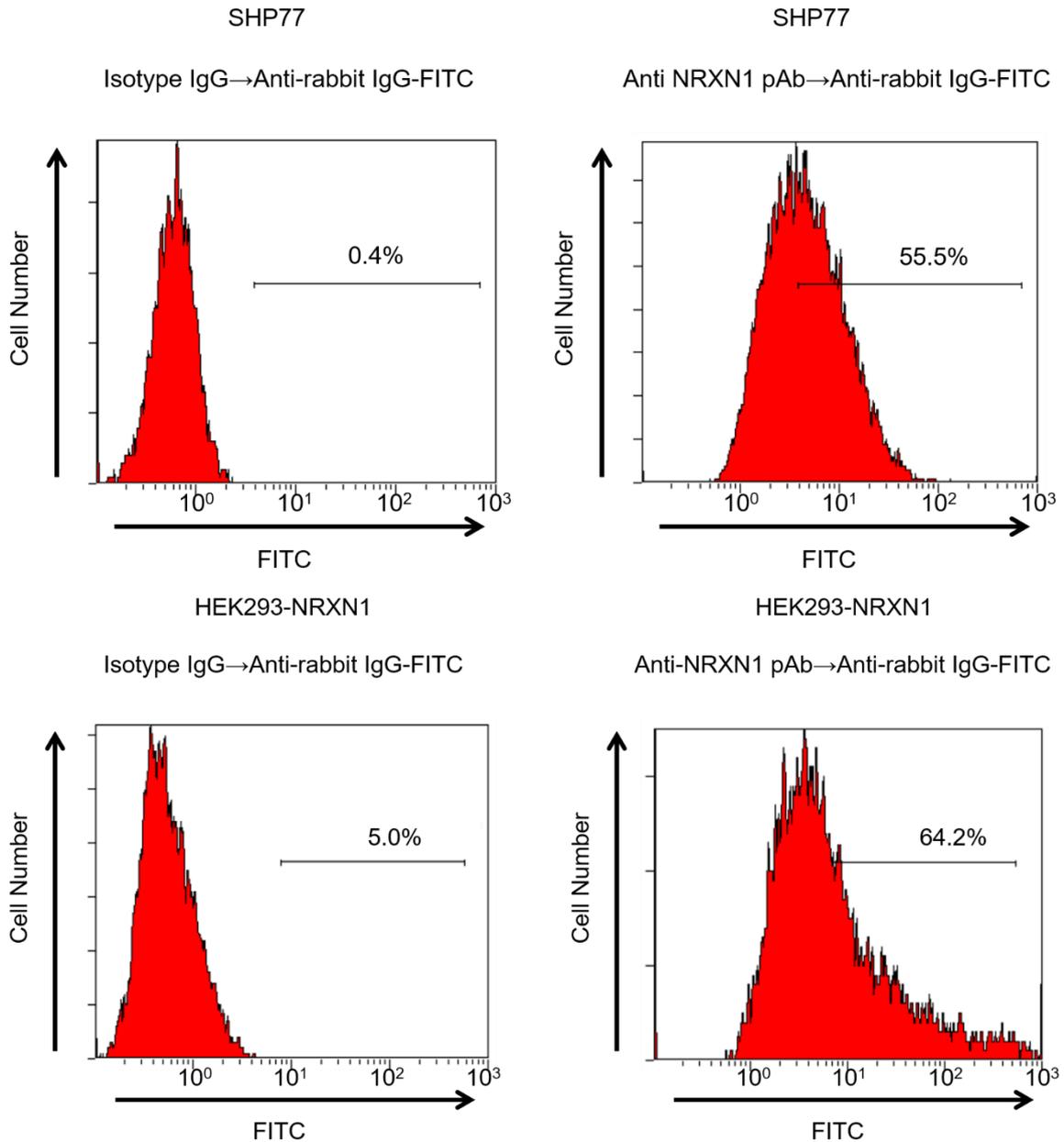


図 11. SHP77 と HEK293-NRXN1 における細胞表面 NRXN1 の発現

細胞毒性試験で殺細胞性を示すことができなかった TRPM8 を除き、NRXN1 に関連して SHP77, NCI-H526, PDC, HEK293, HEK293-NRXN1 における発現をアイソタイプコントロールを使用した場合のヒストグラムと比較した形でフローサイトメトリーで解析した結果を図 12 に示す。

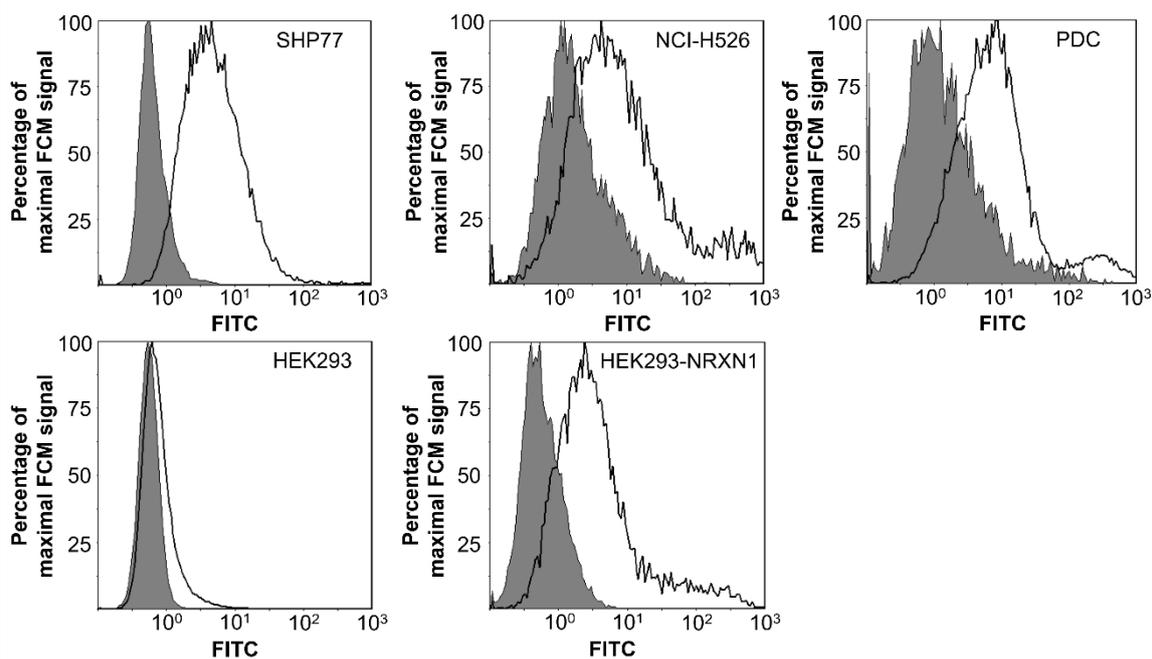


図 12. フローサイトメトリーで計測した各細胞株における NRXN1 の発現  
 一次抗体として抗 NRXN1 ポリクローナル抗体とアイソタイプコントロール  
 IgG、二次抗体として FITC を結合した抗ラビット抗体を用い、フローサイトメト  
 リーで NRXN1 発現を解析した。グレー：アイソタイプコントロール IgG を使  
 用、黒線：抗 NRXN1 ポリクローナル抗体を使用。

またそれぞれの細胞株において n=3 で陽性細胞割合を算出し、統計学的に比較し  
 た(図 13)。

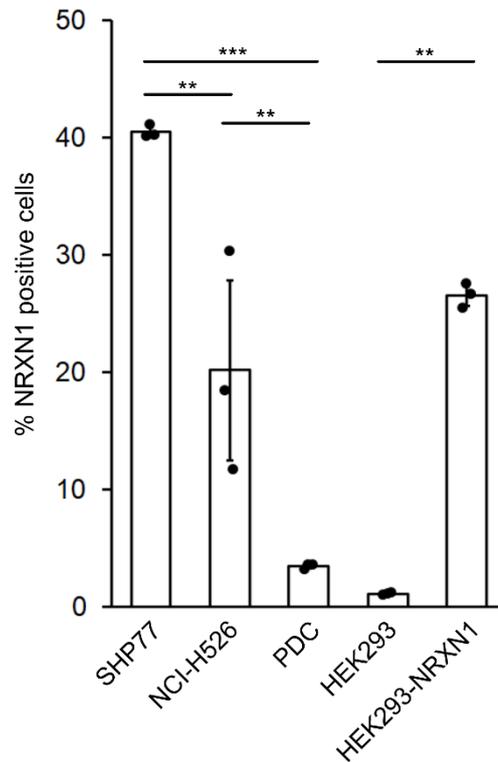


図 13. 各細胞株におけるフローサイトメトリーでの NRXN1 陽性細胞の割合の比較

細胞株間の NRXN1 陽性細胞率の比較は一元配置分散分析の上、Tukey test にて行った(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ ; Tukey test)。各エラーバーは標準偏差を示す。

細胞表面の NRXN1 陽性細胞割合は SHP77 ( $40.5 \pm 0.5\%$ ), NCI-H526 ( $20.2 \pm 7.7\%$ ), PDC ( $3.5 \pm 0.2\%$ ), HEK293 ( $1.1 \pm 0.1\%$ ), HEK293-NRXN1 ( $26.5 \pm 0.8\%$ )であった。小細胞肺癌株である SHP77, NCI-H526, PDC それぞれについて細胞表面の NRXN1 発現に差がある結果となった。また、HEK293-NRXN1 は細胞表面の NRXN1 発現が HEK293 に比して有意に増加していることが確認された。

### 3. 細胞毒性試験

#### 3-1. TRPM8 を標的とした ADC

TRPM8 に対する抗体は購入可能なバイオメーカーの製品において、モノクローナル抗体は見当たらず、ポリクローナル抗体を用いて細胞毒性試験を行った。

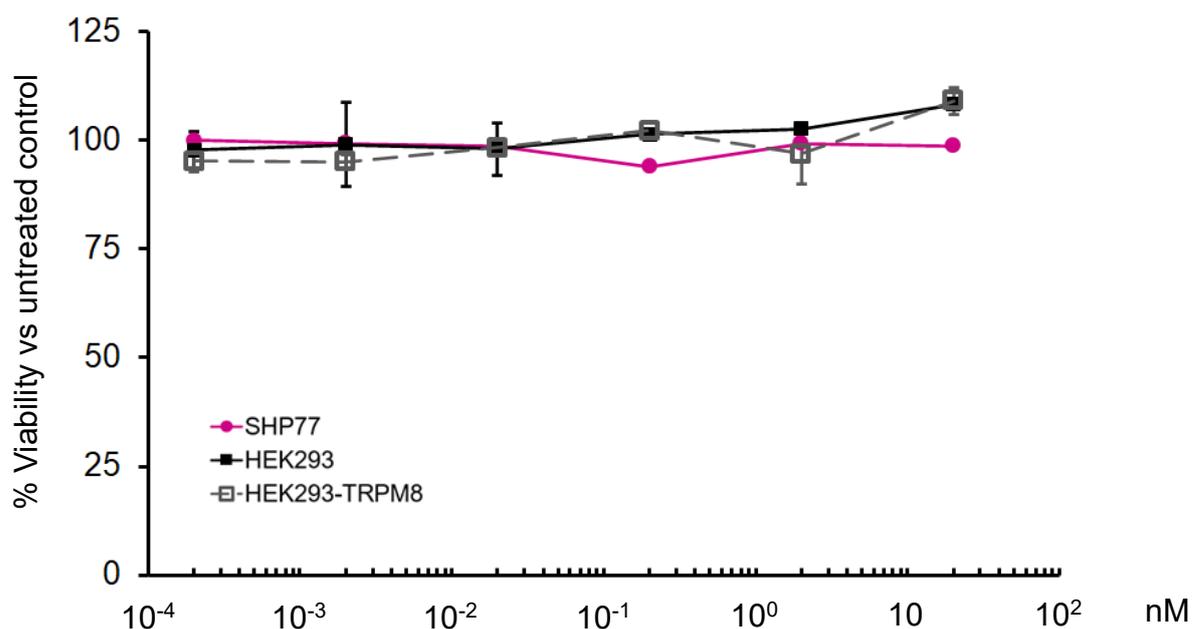


図 14. 抗 TRPM8 ポリクローナル抗体を用いた細胞毒性試験における細胞生存曲線

SHP77 で 2nd ADC を 20nM から 1/10 希釈系列を形成して細胞毒性試験を行ったが、高濃度においても細胞毒性は示唆されなかった。ネガティブコントロールとして HEK293、ポジティブコントロールとして HEK293-TRPM8 を対象として同様に毒性試験を行ったが、いずれも細胞毒性は示さなかった(図 14)。

### 3-2. NRXN1 を標的とした ADC

図 15 に NRXN1 を標的とした抗 NRXN1 モノクローナル抗体と 2nd ADC を添加し観察した細胞毒性試験の結果を示す。

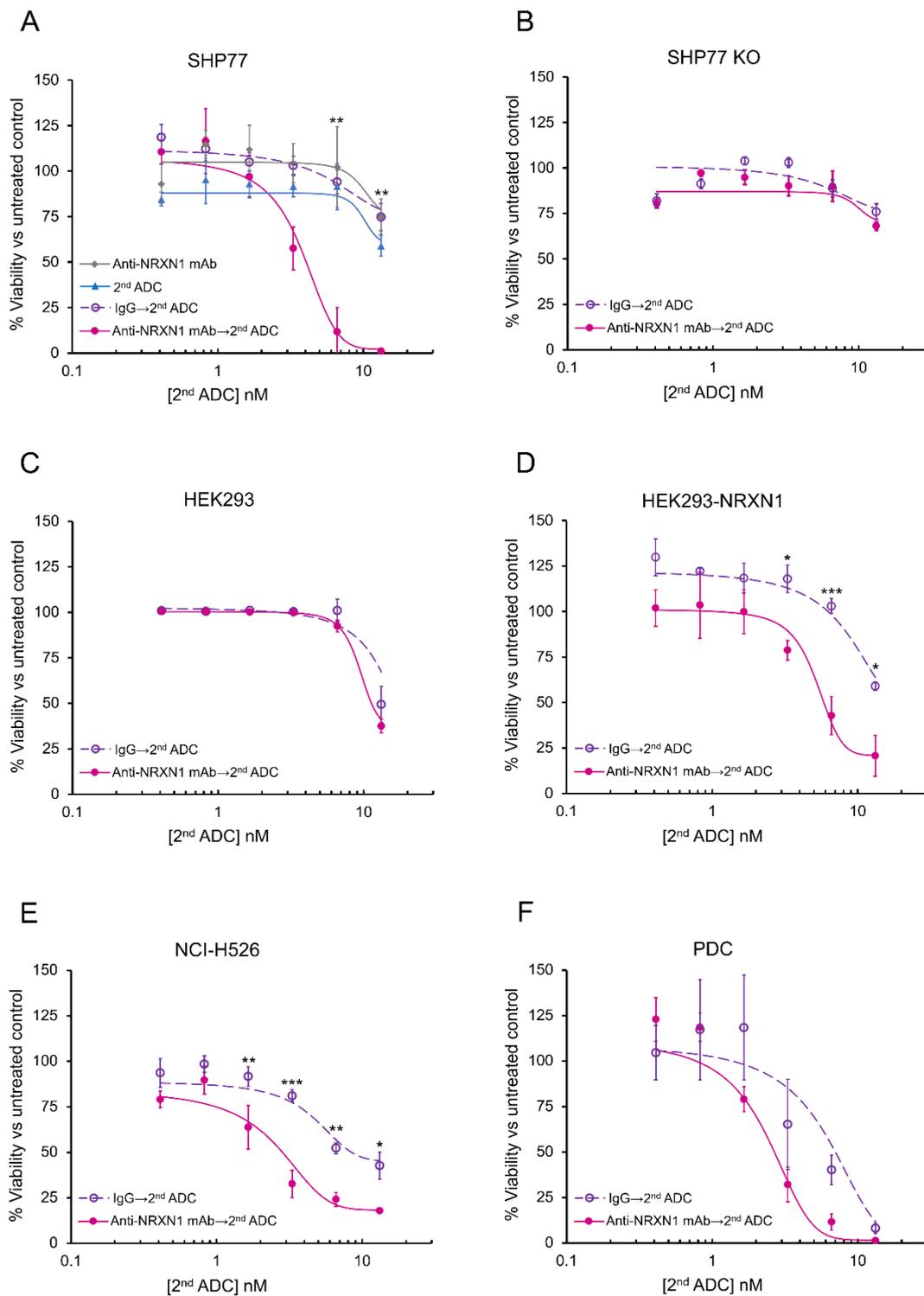


図 15. 抗 NRXN1 モノクローナル抗体と 2<sup>nd</sup> ADC を用いた細胞毒性試験  
 抗 NRXN1 モノクローナル抗体+2<sup>nd</sup> ADC とアイソタイプコントロール IgG+2<sup>nd</sup> ADC  
 の各細胞株に対する細胞毒性をグラフ化し比較した。SHP77 においては抗 NRXN1

モノクローナル抗体単独、2<sup>nd</sup> ADC 単独の treatment での細胞毒性も図示した。抗 NRXN1 モノクローナル抗体+2<sup>nd</sup> ADC とアイソタイプコントロール IgG+2<sup>nd</sup> ADC の 2 群の細胞毒性に関する統計学的な比較は二元配置分散分析に続き、Tukey test で行った (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ )。各エラーバーは標準偏差を示す。

SHP77 に対し抗 NRXN1 モノクローナル抗体の存在下で 2<sup>nd</sup> ADC が細胞毒性を示したのと対照的に、NRXN1 をノックアウトした SHP77 KO では細胞毒性が減弱した。また NRXN1 低発現の HEK293 に対し抗 NRXN1 モノクローナル抗体の存在下で 2<sup>nd</sup> ADC が 6.6nM 以下で細胞毒性を示さなかったのに対し、NRXN1 を強制発現した HEK293-NRXN1 では 6.6nM, 3.3nM の濃度において抗 NRXN1 モノクローナル抗体存在下とアイソタイプコントロール IgG 存在下で 2<sup>nd</sup> ADC の細胞毒性が増強される結果となった。NRXN1 を中等度発現した NCI-H526 に対しても抗 NRXN1 モノクローナル抗体存在下とアイソタイプコントロール IgG 存在下で 2<sup>nd</sup> ADC の細胞毒性に有意な差があることが示唆されたが、一方で PDC に対しては有意な差は示唆されなかった。

#### 4. 臨床検体と正常臓器における NRXN1 発現解析

##### 4-1. 臨床検体における NRXN1 の発現解析

2006 年から 2018 年に外科的切除が行われた肺小細胞癌について、mRNA の発現解析を行った結果を図 16 に示す。

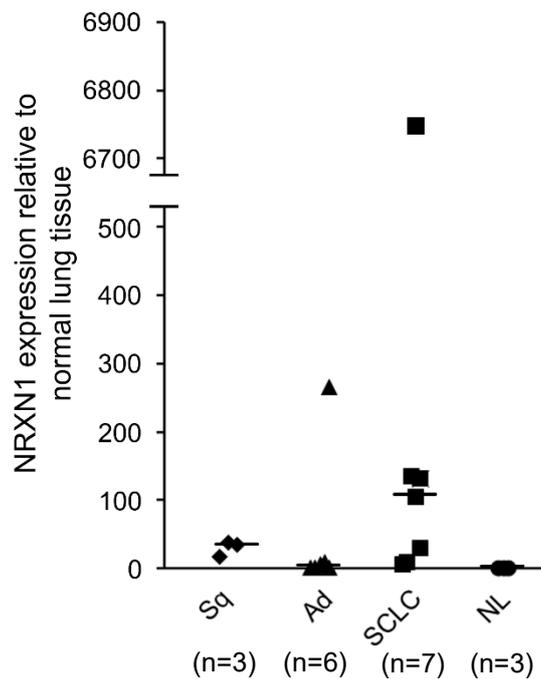


図 16. 手術検体における NRXN1 の mRNA 発現解析

正常肺組織における発現強度を 1 とし、ddCT 法にて算出した。各組織における水平バーは中央値を示す。Sq: 3 症例, Ad: 6 症例, SCLC: 7 例(うち combined SCLC and LCNEC: 3 例、combined SCLC and Sq: 1 例), NL: 3 例。

Ad: Adenocarcinoma, LCNEC: Large cell neuroendocrine carcinoma, NL: Normal lung, SCLC: Small cell lung cancer, Sq: Squamous cell carcinoma

発現強度の中央値は扁平上皮癌組織 38.2, 腺癌組織 3.5, 小細胞肺癌組織 104.6 であり、SCLC で強発現の傾向が観察された。腺癌で 1 例、発現の強い症例が観察された。

## 4-2. 正常組織における NRXN1 の発現解析

ヒト正常組織における NRXN1 の mRNA 発現を ddCT 法にて解析した結果を図 17 に示す。

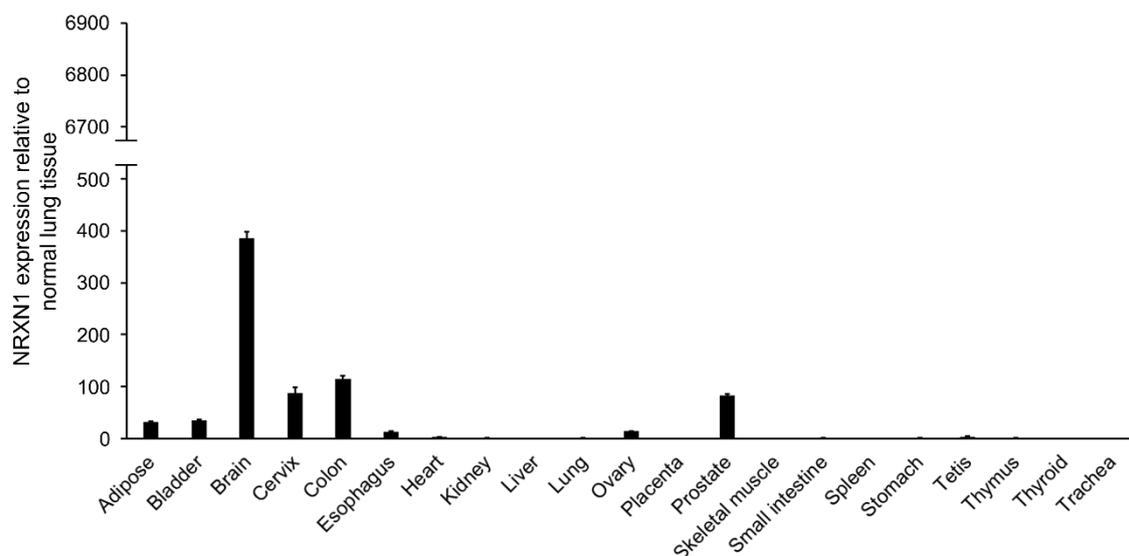


図 17. Human total RNA panel を用いた NRXN1 mRNA 発現解析

正常肺組織における発現を 1 とした相対発現強度を縦軸に示した。縦軸は臨床検体での発現強度と視覚的に比較しやすい様、図 16 と同じ尺度で表示した。

正常組織ではシナプス前末端に発現する NRXN1 は脳での発現が高く、それ以外の正常臓器では脳での発現の 1/3 以下であった。これは NCBI が公表している RNA sequence に基づいたデータと整合的であることが確認された。

## 5. アポトーシスアッセイ

細胞毒性試験で実際に細胞死が誘導されていることを検証するために抗 NRXN1 モノクローナル抗体と 2<sup>nd</sup> ADC における IC<sub>50</sub> 下でアポトーシスアッセイを行った。SHP77 に対する抗 NRXN1 モノクローナル抗体と 2<sup>nd</sup> ADC 添加後に FC500 flow cytometer で解析した結果を図 18 に示す。

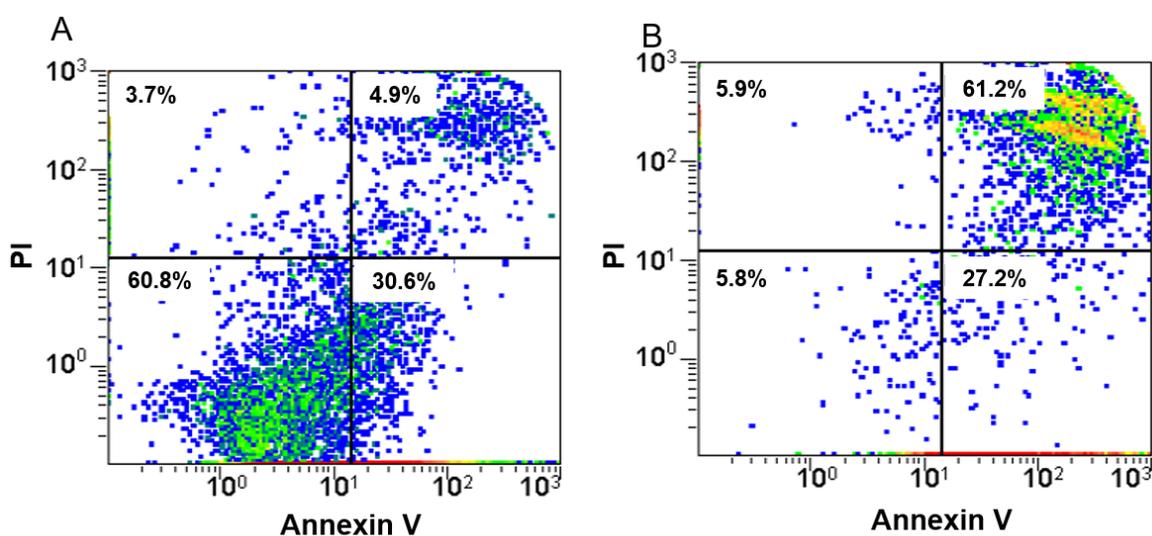


図 18. SHP77 に対する NRXN1-mediated ADC によるアポトーシス

(A) untreated SHP77 における PI, Annexin V 陽性細胞の割合

(B) 抗 NRXN1 モノクローナル抗体存在下で 2<sup>nd</sup> ADC を添加し 72 時間経過した SHP77 における PI, Annexin V 陽性細胞の割合

未治療 SHP77 においては後期アポトーシス細胞割合が 4.9%であったのに対し、NRXN1-mediated ADC 添加後の SHP77 においては後期アポトーシス細胞割合が 61.2%であり、細胞死が誘導されていることが確認された。

本研究で使用した他の細胞株に対しても、それぞれの細胞株において 3 回の独立した細胞毒性試験の細胞生存曲線から算出した IC<sub>50</sub> は表 6 の通りである。

表 6. 細胞生存曲線から算出した抗 NRXN1 モノクローナル抗体+2<sup>nd</sup> ADC の IC<sub>50</sub>

細胞株	IC <sub>50</sub> (2 <sup>nd</sup> ADC), nM
SHP77	3.75±0.41
NCI-H526	4.09±1.11
PDC	3.29±0.46
HEK293-NRXN1	5.20±0.45

表 6 における 2<sup>nd</sup> ADC 濃度での細胞死を検証した結果を図 19 に示す。SHP77 KO, HEK293 に対しては、2<sup>nd</sup> ADC の濃度をそれぞれ SHP77, HEK293-NRXN1 の IC<sub>50</sub> とした。

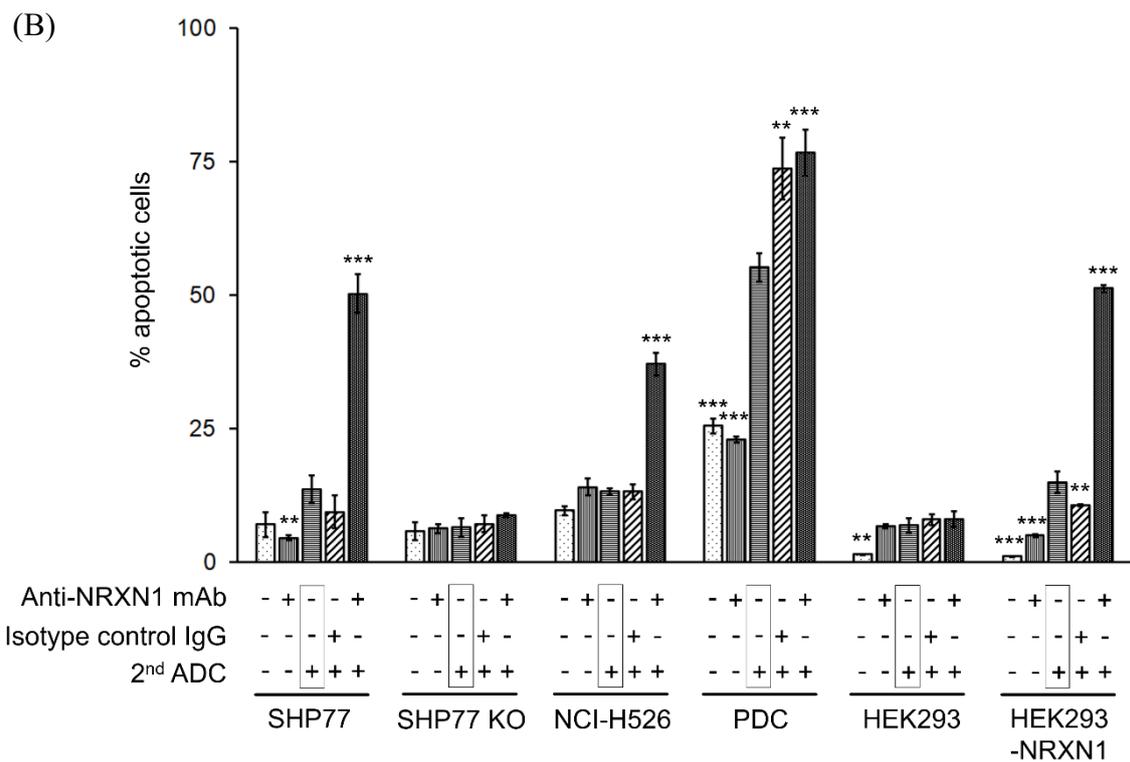
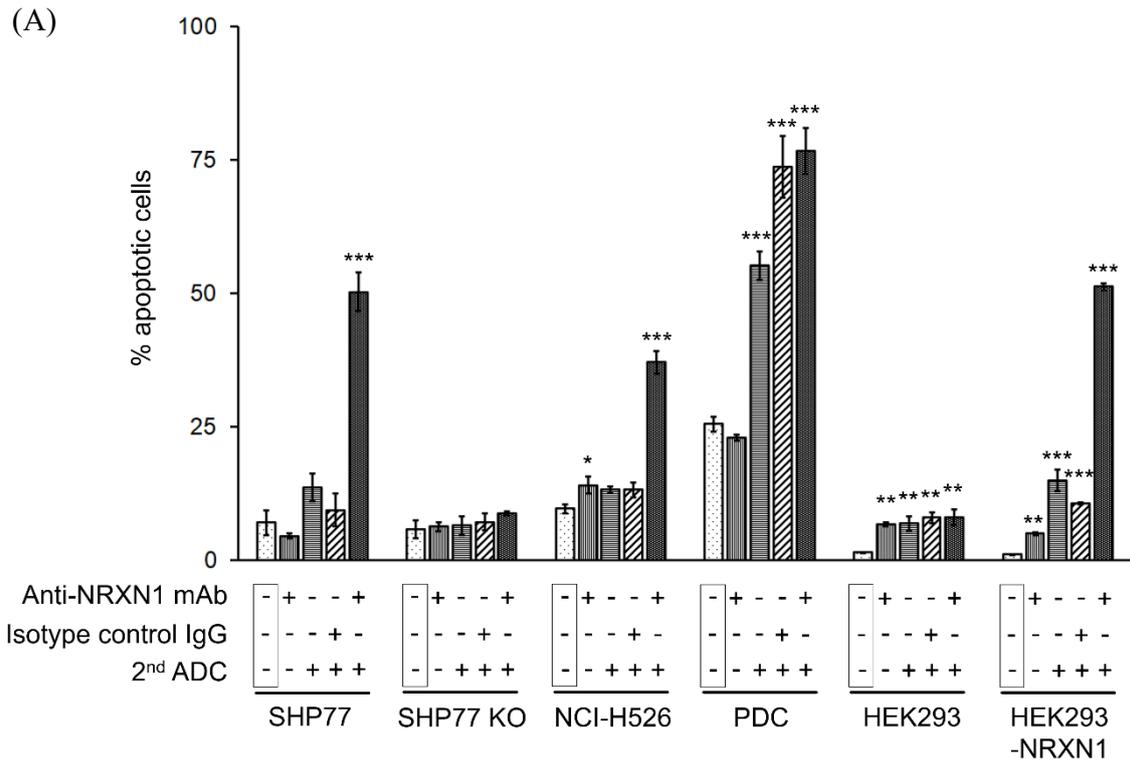


図 19. アポトーシスアッセイ

PI と Annexin-V による染色を行い、いずれも陽性であった細胞の割合を算出した。統計学的な比較は一元配置分散分析に続き Dunnett 検定にて行った(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$  versus (A) no-treatment or (B) 2<sup>nd</sup> ADC only control group; Dunnett test)。各エラーバーは標準偏差を示す。

SHP77 の NRXN1-mediated ADC 群で no-treatment 群に比して有意に増加した死細胞を検出し (no-treatment 群  $7.1 \pm 2.3\%$  vs NRXN1-mediated ADC 群  $50.3 \pm 3.7\%$ ,  $p < 0.0001$ )、SHP77 KO での結果 (no-treatment 群  $5.8 \pm 1.6\%$  vs NRXN1-mediated ADC 群  $8.8 \pm 0.3\%$ ,  $p = 0.325$ ) と対照的であった。NCI-H526 においても同様に NRXN1-mediated ADC 群で死細胞の割合が上昇していた (no-treatment 群  $9.7 \pm 0.8\%$  vs NRXN1-mediated ADC 群  $37.1 \pm 2.1\%$ ,  $p < 0.0001$ )。また HEK293 と HEK293-NRXN1 のいずれにおいても、no-treatment 群に比して他の treatment 群で有意に死細胞の割合は上昇していたが (HEK293, no-treatment 群  $1.5 \pm 0.1\%$  vs NRXN1-mediated ADC 群  $8.1 \pm 1.6\%$ ,  $p = 0.0002$ ; HEK293-NRXN1, no-treatment 群  $1.1 \pm 0.1\%$  vs NRXN1-mediated ADC 群  $51.3 \pm 0.7\%$ ,  $p < 0.0001$ )、HEK293-NRXN1 の NRXN1-mediated ADC 群で死細胞割合は際立って上昇していることが確認された。PDC においては NRXN1-mediated ADC 群に加えて、IgG+2<sup>nd</sup> ADC 群、2<sup>nd</sup> ADC 単独群においても死細胞割合が多く観察された (no-treatment 群  $25.6 \pm 1.4\%$ , 2<sup>nd</sup> ADC 単独群  $55.2 \pm 2.7\%$ , IgG+2<sup>nd</sup> ADC 群  $73.7 \pm 5.7\%$ , NRXN1-mediated ADC 群  $76.7 \pm 4.3\%$ , no-treatment 群 vs NRXN1-mediated ADC 群,  $p < 0.0001$ )。2<sup>nd</sup> ADC においては一定の割合で結合された殺細胞性化合物が遊離していることが想定されるが、それによる感受性が他の細胞株ではみられない濃度においても観察されたと考えられた。

## 考察

### 1. 本研究の意義

本研究では計算生物学的アプローチによって小細胞肺癌細胞株に有意に高発現している膜タンパクをコードした遺伝子を絞り込み、ADC の新規治療標的としての可能性を探索した。具体的には商用の一次抗体を用いて共通の二次抗体を使用するスクリーニング的手法を用いることで新規治療標的を絞ることが可能となり、最終的に NRXN1 発現依存性の細胞毒性を *in vitro* で示すことができた。Secondary ADC を用いることで、既存の一次抗体を使用して候補遺伝子の有効性をスクリーニングすることが可能であった。直接ペイロードを結合した ADC を作製する様々なコストやリスクを考慮すると、今後の ADC の新規治療標的検索の際にも同様の手法は有効であると考えられる。

本研究において計算生物学的に候補に挙げた膜タンパク質の中で、NRXN1 以外の膜タンパク質に対してはフローサイトメーターで検出不能あるいは *in vitro* で ADC の殺細胞性を示すことができなかった。理由としてはフローサイトメーターあるいは細胞毒性試験で使用した一次抗体が機能しなかった、フローサイトメーターでの検出閾値や細胞毒性試験で効力を発揮する閾値に達することが可能な発現強度ではない、細胞内への移行や分解が不十分であった、ペイロードが殺細胞性

を発揮しなかった、など検証すべき点が多い。DLK1, TRPM8 については細胞免疫染色で発現は視覚的に確認でき、さらに TRPM8 に関してはフローサイトメーターにて SHP77, NCI-H526 とともに検出可能であった。しかし、TRPM8 の細胞外ドメインをエピトープとするモノクローナル抗体が上市されておらず、ポリクローナル抗体と 2<sup>nd</sup> ADC を用いて細胞毒性試験を行ったが、有意な細胞毒性は示さなかった。選択性の高いモノクローナル抗体を用いれば、細胞毒性を発揮する余地はあると考える。また、脳で低発現である DLK1, TRPM8 については CAR(Chimeric antigen receptor)-T 細胞療法の候補となる余地があると考えられる。キメラ抗原受容体とは、抗体の抗原結合部位と T 細胞活性化レセプターの細胞内ドメインを、遺伝子組み換え技術を用いて結合させたものであり、この CAR 遺伝子を遺伝子導入技術によって T 細胞に導入したものが CAR-T 細胞である[52]。FDA が 2017 年に再発・難治びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)を対象に、CD19 CAR-T 細胞製剤 2 製剤(Kymriah, Yescarta) [53, 54]を薬事承認し、本邦では 2019 年 3 月に厚生労働省が再発・難治性 CD19 陽性 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)と DLBCL を対象として Kymriah を承認した。CAR-T 細胞は抗原認識に HLA 分子の介在を必要としないため、腫瘍免疫回避機構のため HLA 発現を消失させた腫瘍細胞に対しても効果を発揮する。また生体内の T 細胞では免疫を獲得し難い糖鎖・糖脂質に対

しても免疫応答することが可能である。ADC、CAR-T 細胞いずれも細胞表面に発現した抗原を標的とする点で共通している。CAR-T 細胞は血液脳関門を通過するが、ADC はその分子量から血液脳関門は通過しないと考えられる。脳での発現が低く、CAR-T 細胞で新規治療標的となる可能性がある複数の分子が本研究で捉えられたことは今後の研究対象となり得る点で本研究の成果の 1 つであると考えられる。

## 2. NRXN1 について

NRXN1 は NRXN ファミリー(NRXN1, NRXN2, NRXN3)の中の 1 つであり、中枢神経系においてはシナプス前末端に発現する 1 回膜貫通型タンパク質である。シナプス後部に発現する NRXN1 の内因性リガンドである同じく 1 回膜貫通型タンパク質であるニューロリジンと結合することでシナプス前末端内の伝達物質放出や接着細胞因子として働き、シナプスの成熟や機能に関与していることが知られている[55]。

NRXN の転写は少なくとも 2 つのプロモーター(上流の  $\alpha$  プロモーター、下流の  $\beta$  プロモーター)により制御を受けてそれぞれのアイソフォームを形成するが(図 20)、さらに様々なスプライシングバリエントが報告されており、結果的に NRXN のバリエントは 1000 に達するとされる[56, 57]。

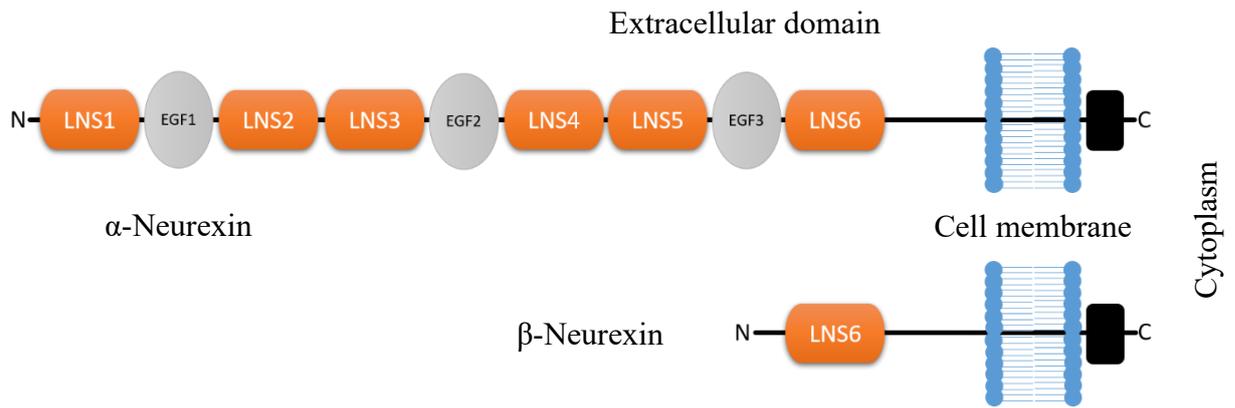


図 20. Neurexin におけるプロモーター別のドメイン  
 LNS; laminin, neurexin, sex-hormone binding protein domain  
 EGF; epidermal growth factor-like repeat

NRXN1 やニューロリジンの SNP を始めとする様々な遺伝子異常が自閉症や統合失調症などの精神疾患に関与しているとする研究が多数報告されているが[58]、腫瘍における NRXN1 の機能や役割については知見がなく、本研究の結果を受けて、小細胞肺癌における NRXN1 の機能をはじめとする役割を研究することは小細胞肺癌の発生、増殖や転移様式などの解明に寄与する可能性があり意義は深いと考えられる。

### 3. 研究の限界と今後の発展の方向性

NRXN1 の発現についてはサイズの視点から ADC が血液脳関門を通過しないと考えられることから候補分子検索の段階では脳での高発現を許容した。NRXN1 と同様、神経内分泌細胞系の細胞接着因子である CD56 を標的とした ADC の前臨

床試験に関する報告では、マウスに対する ADC 投与後に脳神経症状の出現や病理学的な脳組織の異常は観察されていない[43]。しかし NRXN1 を標的とする ADC で中枢神経に対する副作用や損傷の有無については前臨床試験以降で検討する必要がある。また同様に、他の臓器での NRXN1 発現は脳での発現に比して低いと考えられるが、副作用出現を否定する要素と断言することはできず、この点においても今後の研究に委ねられる。

細胞株と同様、小細胞肺癌の手術検体においても NRXN1 高発現を示唆する標本が存在し、臨床応用が有効である可能性を示唆する。実臨床における小細胞肺癌の NRXN1 発現強度やその分布を確認するために、当院病理診断科に御協力を賜り、小細胞肺癌の Tissue Microarray を作成し、複数の抗 NRXN1 抗体を購入して染色を試みたが、非特異的な染色がみられるか、mRNA レベルで高発現が確認されたコントロールの切片においても染色がみられないかのいずれかであった。他に検索した範囲で免疫組織染色での使用がサポートされた抗 NRXN1 抗体が上市されていないため、臨床における小細胞肺癌の NRXN1 発現強度を検討することができず、従って実臨床上での NRXN1 を標的とした ADC の展望を示すことは叶わなかった。NRXN1 感受性を示す腫瘍を効率的に選別する観点からも NRXN1 に対する高精度の抗体の精製が望まれる。

本研究では複数の候補タンパク質に対する *in vitro* での ADC の効力を見るために共通の 2<sup>nd</sup> ADC を用い、各タンパク質に対する商用の一次抗体を購入して使用した。そのため細胞内にインターナライゼーションされる抗体のサイズは大きく、またエピトープの検討もなされていない。他にもペイロードの種類やリンカーの性状、DAR など本研究で未検討であるが最適化すべき項目は多岐に渡る。ペイロードが直接結合され、包括的に最適化されたモノクローナル抗体が作製されれば、小細胞肺癌細胞株に対する殺細胞性をさらに特異的に増強させ、従って副作用を軽減しながら投与量を増量可能となる大きな余地があると考えられる。

本研究では、NRXN1 に結合した一次抗体である抗 NRXN1 モノクローナル抗体と二次抗体である 2<sup>nd</sup> ADC が細胞内に内在化されることと細胞内 trafficking について、pH 依存性 dye や蛍光物質で標識された三次抗体を用いて検証することはしなかった。理由として、(1)三次抗体を使用する場合、まず抗体同士の結合効率次第で 3 抗体で構成される複合体が形成される割合が非常に低い可能性が考えられること、(2)複合体の分子量が著明に増大するため、細胞内への内在化が妨げられる要因となり得ると予想され、仮に内在化がみられたとしてもそれが NRXN1 を介在した真の挙動を示していると判断することが困難と考えられること、(3) 2<sup>nd</sup> ADC

の host 種を製作会社である Moradec 社に問い合わせたが、秘匿事項との回答であったこと、を挙げた。ただし NRXN1 を介した細胞内在化については ADC を最適化した段階で直接検証する必要がある。本研究では NRXN1 高発現株である SHP77 に対して抗 NRXN1 モノクローナル抗体存在下で 2<sup>nd</sup> ADC が殺細胞性を示すと同時に、NRXN1 を knockout した SHP77 KO に対して同様の条件で殺細胞性が低下したことから、NRXN1 発現が中等度である NCI-H526, PDC、また NRXN1 発現が非常に弱い HEK293 に対して殺細胞性を示さず、逆に HEK293 に NRXN1 を強制発現させた細胞株に対して殺細胞性を示したことから、NRXN1 依存性に ADC の効力が発揮されており、従って間接的に NRXN1 を介した抗体の細胞内在化を示していると考えた。

近年、Rudin *et al* が小細胞肺癌に対して 4 つの key promotor として ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1 が排他的に発現していることを細胞株とオープンソースの臨床データベースを用いた解析で示しており、新たな分類として提唱している [59]。ASCL1, NeuroD1 についてはこれまでの報告で典型的な内分泌腫瘍のマーカーとして認識されている分子である [60, 61]。ASCL1, NeuroD1 を発現する小細胞肺癌の割合が 8 割程度を占めると報告されている [59]。膜タンパク質の候補選択のた

めに本研究でオープンソースのデータベースから遺伝子プロファイルを抽出した小細胞肺癌細胞株においては、NRXN1 の発現分布は ASCL1 と NeuroD1 の発現と大半が一致し、逆に POU2F3, YAP1 を発現している細胞株では NRXN1 の発現は非常に弱いかみられなかった。図 21 にマイクロアレイデータをクラスター分析したヒートマップ上の細胞株名に沿って前述した 4 種の key promotor の発現を色分けして示す。NRXN1 が CNS で発現しており、正常臓器においては神経系に比較的特異的に発現している状況からは小細胞肺癌細胞株における NRXN1 の発現分布が古典的な神経内分泌マーカーの発現にほぼ一致していることは妥当な結果である。

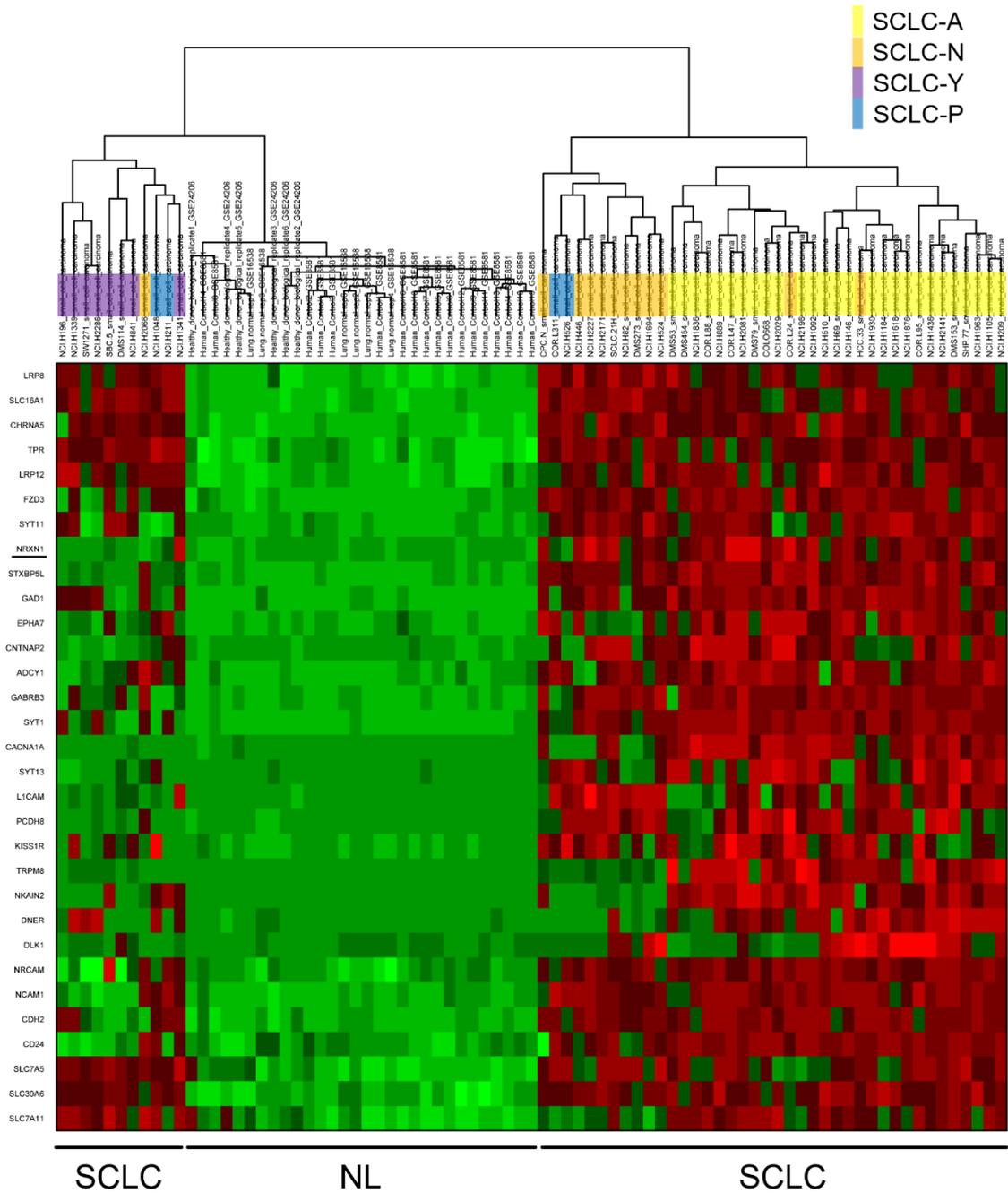


図 21. *In silico* でヒト正常肺組織と比較し小細胞肺癌細胞株において強発現がみられた遺伝子群とそのヒートマップ

Rudin *et al* が提唱した、4つの転写因子発現による SCLC の分類に従って今回用いた小細胞肺癌細胞株を色分けした。本研究で扱った SHP77 は SCLC-A type, NCI-H526 は SCLC-P type に属する。

A, ASCL1. N, NeuroD1. Y, YAP1. P, POU2F3.

小細胞肺癌で特異的に発現していることが判明している DLL3 に対する ADC であるロバリシズマブ(Rova-T)は第 2 相試験で有望な結果を示したが[38]、セカンドラインでの投与効果を検討した第 3 相試験の中間解析でプラセボに比して予後改善効果を示すことができず、試験は中止となった[39]。Rudin *et al* らは DLL3 について、発現は特異的であるが、発現量は他の HER2 など代表的な腫瘍関連バイオマーカーに比して低い傾向にあること、また ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1 の 4 key promotor 遺伝子発現との関連で、DLL3 を発現する小細胞肺癌の約 75%が ASCL1 を発現しており、偏在があることが指摘されている[59]。NRXN1 は先述のヒートマップ上、ASCL1 発現株に加え、NeuroD1 発現株においても高発現株が多いと考えられ、Rova-T でカバーされない一部の群で NRXN1 を介した ADC の恩恵を受ける可能性がある。

また序文において触れた TROP2 に対する ADC である Sacituzumab Govitecan については治療歴のある転移性非小細胞肺癌 54 症例に対する投与後の効果について検証した単アーム試験があり、客観的奏効率 19%、無増悪生存期間中央値 5.2 ヶ月、全生存期間中央値 9.5 ヶ月であった[62]。先述した小細胞肺癌 53 症例に対する臨床試験の客観的奏効率 14%、無増悪生存期間中央値 3.7 ヶ月、全生存期間中央値 7.5 ヶ月を踏まえると、単純な比較は困難だが小細胞肺癌群で大きな恩恵を受ける

かはさらなる検討が必要である。また肺癌の組織型別に TROP2 の発現強度を検討した報告では、高発現を示した症例割合が腺癌の 64%(172/270)、扁平上皮癌の 75%(150/201)に対し、小細胞肺癌では 9.4%(7/74)に留まった。また同報告で小細胞肺癌症例においては TROP2 高発現群で低発現群より癌特異的生存率が有意に高い結果であり、腺癌と逆の結果を示した[63]。小細胞肺癌では TROP2 高発現症例が他の組織型に比して少なく、また TROP2 高発現群で予後を改善する余地が相対的に少ない可能性があり、TROP2 の生物学的役割についてさらなる研究が待たれる。

NRXN1 を標的とする ADC については Rudin らの報告を受けて ASCL1、NeuroD1 高発現群で恩恵を受ける可能性があり、DLL3, TROP2 に加えて SCLC に対する新たな治療標的となることが期待される。ADC の投与後、腫瘍細胞膜表面での標的抗原の発現が低下することで ADC に対する耐性を獲得する機序が想定されるため、ADC の標的分子の候補は多いことが望ましいと考える。

一方で、POU2F3 や YAP1 発現株など、NRXN1 低発現株が少なからず存在していることも事実である。前臨床試験においても NRXN1 発現腫瘍に対して有望な結果が得られる場合、NRXN1 を介した ADC の恩恵を受ける群の選択に NRXN1 をバイオマーカーとして使用することが考えられる。NRXN1 発現株の検出手段として、患者末梢血を用いたフローサイトメトリーでの検出や生検組織に対する細胞

免疫染色などの手法が考えられるが、本研究では、今後のさらなる研究において侵襲や時間的コスト低減の観点により、フローサイトメトリーを用いて患者血液から標的蛋白を検出することを念頭に置いていた。いずれにしても NRXN1 に対する検出精度の高い抗体を精製し、上記の課題を検証していくことが本研究のさらなる発展のために肝要である。

## 結語

NRXN1 に対する ADC は NRXN1 を発現する小細胞肺癌に対する有望な治療モダリティとなり得る。NRXN1 の機能解析を始めとして、今後のさらなる研究に値すると思う。

## 謝辞

本研究にあたり、多大なるご高配と御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科呼吸器外科中島淳教授に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始直接の御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学医学部附属病院検査部高井大哉講師に深く感謝いたします。

本研究の終わりに臨み、本研究に数々の御助言、御協力を賜りました東京大学医学部附属病院呼吸器内科 305 研究室の諸氏に深く御礼申し上げます。

本研究の内容は、*Oncotarget* に原著論文として掲載された(2020年9月)。

## 引用文献

1. Travis WD. Pathology and diagnosis of neuroendocrine tumors: lung neuroendocrine. *Thorac Surg Clin.* 24: 257-266; 2014.
2. Parsons HM, Harlan LC, Stevens JL, Ullmann CD. Treatment of small cell lung cancer in academic and community settings: factors associated with receiving standard therapy and survival. *Cancer J.* 20: 97-104; 2014.
3. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, Huemer F, Losonczy G, Johnson ML, Nishio M, Reck M, Mok T, Lam S, Shames DS, Liu J, Ding B, Lopez-Chavez A, Kabbinavar F, Lin W, Sandler A, Liu SV. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 379: 2220-2229; 2018.
4. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, Statsenko G, Hochmair MJ, Özgüroğlu M, Ji JH, Voitko O, Poltoratskiy A, Ponce S, Verderame F, Havel L, Bondarenko I, Kazarnowicz A, Losonczy G, Conev NV, Armstrong J, Byrne N, Shire N, Jiang H, Goldman JW. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 394: 1929-1939; 2019.
5. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G, Müller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbel JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Pützer B, Bos M, Michels S, Vlastic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmüller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I,

- Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kontic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castaños-Vélez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Köhler J, Schuler M, Botling J, Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansén S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nürnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Büttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage J, Thomas RK. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 524: 47-53; 2015.
6. Kalemkerian GP, Loo BW, Akerley W, Attia A, Bassetti M, Bumber Y, Decker R, Dobelbower MC, Dowlati A, Downey RJ, Florsheim C, Ganti AKP, Grecula JC, Gubens MA, Hann CL, Hayman JA, Heist RS, Koczywas M, Merritt RE, Mohindra N, Molina J, Moran CA, Morgensztern D, Pokharel S, Portnoy DC, Rhodes D, Rusthoven C, Sands J, Santana-Davila R, Williams CC, Hoffmann KG, Hughes M. NCCN Guidelines Insights: Small Cell Lung Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw*. 16: 1171-1182; 2018.
7. Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Baxevanos P, Tolia M, Tsapakidis K, Galanopoulos M, Lontos M, Kyrgias G. Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Ann Transl Med*. 6: 145; 2018.
8. Atrafi F, Groen HJM, Byers LA, Garralda E, Lolkema MP, Sangha RS, Viteri S, Chae YK, Camidge DR, Gabrail NY, Hu B, Tian T, Nuthalapati S, Hoening E, He L, Komarnitsky P, Calles A. A Phase I Dose-Escalation Study of Veliparib Combined with Carboplatin and Etoposide in Patients with Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 25: 496-505; 2019.
9. Owonikoko TK, Dahlberg SE, Sica GL, Wagner LI, Wade JL, 3rd, Srkalovic G,

- Lash BW, Leach JW, Leal TB, Aggarwal C, Ramalingam SS. Randomized Phase II Trial of Cisplatin and Etoposide in Combination With Veliparib or Placebo for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: ECOG-ACRIN 2511 Study. *J Clin Oncol.* 37: 222-229; 2019.
10. Pietanza MC, Waqar SN, Krug LM, Dowlati A, Hann CL, Chiappori A, Owonikoko TK, Woo KM, Cardnell RJ, Fujimoto J, Long L, Diao L, Wang J, Bensman Y, Hurtado B, de Groot P, Sulman EP, Wistuba, II, Chen A, Fleisher M, Heymach JV, Kris MG, Rudin CM, Byers LA. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Temozolomide in Combination With Either Veliparib or Placebo in Patients With Relapsed-Sensitive or Refractory Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 36: 2386-2394; 2018.
11. Gardner EE, Lok BH, Schneeberger VE, Desmeules P, Miles LA, Arnold PK, Ni A, Khodos I, de Stanchina E, Nguyen T, Sage J, Campbell JE, Ribich S, Rekhtman N, Dowlati A, Massion PP, Rudin CM, Poirier JT. Chemosensitive Relapse in Small Cell Lung Cancer Proceeds through an EZH2-SLFN11 Axis. *Cancer Cell.* 31: 286-299; 2017.
12. Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet.* 394: 793-804; 2019.
13. Polakis P. Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Pharmacol Rev.* 68: 3-19; 2016.
14. Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell.* 9: 33-46; 2018.
15. Chalouni C, Doll S. Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 37: 20; 2018.
16. Sun X, Ponte JF, Yoder NC, Laleau R, Coccia J, Lanieri L, Qiu Q, Wu R, Hong E,

- Bogalhas M, Wang L, Dong L, Setiady Y, Maloney EK, Ab O, Zhang X, Pinkas J, Keating TA, Chari R, Erickson HK, Lambert JM. Effects of Drug-Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody-Maytansinoid Conjugates. *Bioconjug Chem.* 28: 1371-1381; 2017.
17. Deneka AY, Boumber Y, Beck T, Golemis EA. Tumor-Targeted Drug Conjugates as an Emerging Novel Therapeutic Approach in Small Cell Lung Cancer (SCLC). *Cancers (Basel).* 11; 2019.
  18. Senter PDSievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol.* 30: 631-637; 2012.
  19. Lambert JMChari RV. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *J Med Chem.* 57: 6949-6964; 2014.
  20. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 68: 9280-9290; 2008.
  21. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, Gökbuget N, O'Brien S, Wang K, Wang T, Paccagnella ML, Sleight B, Vandendries E, Advani AS. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 375: 740-753; 2016.
  22. Appelbaum FRBernstein ID. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood.* 130: 2373-2376; 2017.
  23. Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, Andre F, Iwata H, Ito

- Y, Tsurutani J, Sohn J, Denduluri N, Perrin C, Aogi K, Tokunaga E, Im SA, Lee KS, Hurvitz SA, Cortes J, Lee C, Chen S, Zhang L, Shahidi J, Yver A, Krop I. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 382: 610-621; 2020.
24. Abrams T, Connor A, Fanton C, Cohen SB, Huber T, Miller K, Hong EE, Niu X, Kline J, Ison-Dugenny M, Harris S, Walker D, Krauser K, Galimi F, Wang Z, Ghoddusi M, Mansfield K, Lee-Hoeflich ST, Holash J, Pryer N, Kluwe W, Ettenberg SA, Sellers WR, Lees E, Kwon P, Abraham JA, Schleyer SC. Preclinical Antitumor Activity of a Novel Anti-c-KIT Antibody-Drug Conjugate against Mutant and Wild-type c-KIT-Positive Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 24: 4297-4308; 2018.
25. Damelin M, Bankovich A, Bernstein J, Lucas J, Chen L, Williams S, Park A, Aguilar J, Ernstoff E, Charati M, Dushin R, Aujay M, Lee C, Ramoth H, Milton M, Hampl J, Lazetic S, Pulito V, Rosfjord E, Sun Y, King L, Barletta F, Betts A, Guffroy M, Falahatpisheh H, O'Donnell CJ, Stull R, Pysz M, Escarpe P, Liu D, Foord O, Gerber HP, Sapra P, Dylla SJ. A PTK7-targeted antibody-drug conjugate reduces tumor-initiating cells and induces sustained tumor regressions. *Sci Transl Med.* 9; 2017.
26. Gan HK, van den Bent M, Lassman AB, Reardon DA, Scott AM. Antibody-drug conjugates in glioblastoma therapy: the right drugs to the right cells. *Nat Rev Clin Oncol.* 14: 695-707; 2017.
27. Merlino G, Fiascarelli A, Bigioni M, Bressan A, Carrisi C, Bellarosa D, Salerno M, Bugianesi R, Manno R, Bernadó Morales C, Arribas J, Dusek RL, Ackroyd JE, Pham PH, Awdew R, Aud D, Trang M, Lynch CM, Terrett J, Wilson KE, Rohlf C, Manzini S, Pellacani A, Binaschi M. MEN1309/OBT076, a First-In-Class

- Antibody-Drug Conjugate Targeting CD205 in Solid Tumors. *Mol Cancer Ther.* 18: 1533-1543; 2019.
28. Puca L, Gavyert K, Sailer V, Conteduca V, Dardenne E, Sigouros M, Isse K, Kearney M, Vosoughi A, Fernandez L, Pan H, Motanagh S, Hess J, Donoghue AJ, Sboner A, Wang Y, Dittamore R, Rickman D, Nanus DM, Tagawa ST, Elemento O, Mosquera JM, Saunders L, Beltran H. Delta-like protein 3 expression and therapeutic targeting in neuroendocrine prostate cancer. *Sci Transl Med.* 11; 2019.
  29. Purcell JW, Tanlimco SG, Hickson J, Fox M, Sho M, Durkin L, Uziel T, Powers R, Foster K, McGonigal T, Kumar S, Samayoa J, Zhang D, Palma JP, Mishra S, Hollenbaugh D, Gish K, Morgan-Lappe SE, Hsi ED, Chao DT. LRRC15 Is a Novel Mesenchymal Protein and Stromal Target for Antibody-Drug Conjugates. *Cancer Res.* 78: 4059-4072; 2018.
  30. Sano R, Krytska K, Larmour CE, Raman P, Martinez D, Ligon GF, Lillquist JS, Cucchi U, Orsini P, Rizzi S, Pawel BR, Alvarado D, Mossé YP. An antibody-drug conjugate directed to the ALK receptor demonstrates efficacy in preclinical models of neuroblastoma. *Sci Transl Med.* 11; 2019.
  31. Sau S, Petrovici A, Alsaab HO, Bhise K, Iyer AK. PDL-1 Antibody Drug Conjugate for Selective Chemo-Guided Immune Modulation of Cancer. *Cancers (Basel).* 11; 2019.
  32. Wong OK, Tran TT, Ho WH, Casas MG, Au M, Bateman M, Lindquist KC, Rajpal A, Shelton DL, Strop P, Liu SH. RN765C, a low affinity EGFR antibody drug conjugate with potent anti-tumor activity in preclinical solid tumor models. *Oncotarget.* 9: 33446-33458; 2018.
  33. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K, Desai R, Escarpe PA, Hampl J, Laysang A, Liu D, Lopez-Molina J, Milton M, Park

- A, Pysz MA, Shao H, Slingerland B, Torgov M, Williams SA, Foord O, Howard P, Jassem J, Badzio A, Czapiewski P, Harpole DH, Dowlati A, Massion PP, Travis WD, Pietanza MC, Poirier JT, Rudin CM, Stull RA, Dylla SJ. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med.* 7: 302ra136; 2015.
34. Owen DH, Giffin MJ, Bailis JM, Smit MD, Carbone DP, He K. DLL3: an emerging target in small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 12: 61; 2019.
35. Furuta M, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi H, Yokouchi H, Nishihara H, Minemura H, Harada M, Yamazaki S, Akie K, Fujita Y, Takamura K, Kojima T, Harada T, Minami Y, Watanabe N, Oizumi S, Suzuki H, Nishimura M, Dosaka-Akita H, Isobe H. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer (HOT1702). *Oncologist.* 24: e1172-e1179; 2019.
36. Furuta M, Kikuchi H, Shoji T, Takashima Y, Kikuchi E, Kikuchi J, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Sakakibara-Konishi J. DLL3 regulates the migration and invasion of small cell lung cancer by modulating Snail. *Cancer Sci.* 110: 1599-1608; 2019.
37. Lashari BH, Vallatharasu Y, Kolandra L, Hamid M, Uprety D. Rovalpituzumab Tesirine: A Novel DLL3-Targeting Antibody-Drug Conjugate. *Drugs R D.* 18: 255-258; 2018.
38. Morgensztern D, Besse B, Greillier L, Santana-Davila R, Ready N, Hann CL, Glisson BS, Farago AF, Dowlati A, Rudin CM, Le Moulec S, Lally S, Yalamanchili S, Wolf J, Govindan R, Carbone DP. Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine in Third-Line and Beyond Patients with DLL3-Expressing, Relapsed/Refractory Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase II TRINITY Study. *Clin Cancer Res.* 25: 6958-6966; 2019.
39. Phase 3 Trial of Rova-T as Second-line Therapy for Advanced Small-Cell Lung

Cancer (TAHOE Study) Halted.; Available from:

<https://news.abbvie.com/news/phase-3-trial-rova-t-as-second-line-therapy-for-advanced-small-cell-lung-cancer-tahoe-study-halted.htm>.

40. Sahota SV, Vahdat LT. Sacituzumab govitecan: an antibody-drug conjugate. *Expert Opin Biol Ther.* 17: 1027-1031; 2017.
41. Goldenberg DM, Cardillo TM, Govindan SV, Rossi EA, Sharkey RM. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC). *Oncotarget.* 6: 22496-22512; 2015.
42. Gray JE, Heist RS, Starodub AN, Camidge DR, Kio EA, Masters GA, Purcell WT, Guarino MJ, Misleh J, Schneider CJ, Schneider BJ, Ocean A, Johnson T, Gandhi L, Kalinsky K, Scheff R, Messersmith WA, Govindan SV, Maliakal PP, Mudenda B, Wegener WA, Sharkey RM, Goldenberg DM. Therapy of Small Cell Lung Cancer (SCLC) with a Topoisomerase-I-inhibiting Antibody-Drug Conjugate (ADC) Targeting Trop-2, Sacituzumab Govitecan. *Clin Cancer Res.* 23: 5711-5719; 2017.
43. Yu L, Lu Y, Yao Y, Liu Y, Wang Y, Lai Q, Zhang R, Li W, Wang R, Fu Y, Tao Y, Yi S, Gou L, Chen L, Yang J. Promiximab-duocarmycin, a new CD56 antibody-drug conjugates, is highly efficacious in small cell lung cancer xenograft models. *Oncotarget.* 9: 5197-5207; 2018.
44. Kuner R, Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Bunes A, Xu EC, Schnabel P, Warth A, Poustka A, Sultmann H, Hoffmann H. Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes. *Lung Cancer.* 63: 32-38; 2009.
45. Bhattacharya S, Srisuma S, Demeo DL, Shapiro SD, Bueno R, Silverman EK, Reilly JJ, Mariani TJ. Molecular biomarkers for quantitative and discrete COPD phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 40: 359-367; 2009.

46. Crouser ED, Culver DA, Knox KS, Julian MW, Shao G, Abraham S, Liyanarachchi S, Macre JE, Wewers MD, Gavrilin MA, Ross P, Abbas A, Eng C. Gene expression profiling identifies MMP-12 and ADAMDEC1 as potential pathogenic mediators of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 179: 929-938; 2009.
47. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 7: 33; 2006.
48. Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, Desai R, Zhu H, Comaills V, Zheng Z, Wittner BS, Stojanov P, Brachtel E, Sgroi D, Kapur R, Shioda T, Ting DT, Ramaswamy S, Getz G, Iafrate AJ, Benes C, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science.* 345: 216-220; 2014.
49. Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Watanabe K, Emoto N, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Polymerase reaction without primers throughout for the reconstruction of full-length cDNA from products of rapid amplification of cDNA ends (RACE). *Biotechnol Lett.* 33: 1301-1307; 2011.
50. Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 44: W272-276; 2016.
51. Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics.* 31: 1120-1123; 2015.
52. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res.* 5:

- 22; 2017.
53. Chow VA, Shadman M, Gopal AK. Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 132: 777-781; 2018.
54. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wieszorek J, Go WY. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 377: 2531-2544; 2017.
55. Reissner C, Klose M, Fairless R, Missler M. Mutational analysis of the neurexin/neurologin complex reveals essential and regulatory components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 15124-15129; 2008.
56. Harkin LF, Lindsay SJ, Xu Y, Alzu'bi A, Ferrara A, Gullon EA, James OG, Clowry GJ. Neurexins 1-3 Each Have a Distinct Pattern of Expression in the Early Developing Human Cerebral Cortex. *Cereb Cortex*. 27: 216-232; 2017.
57. Schreiner D, Nguyen TM, Russo G, Heber S, Patrignani A, Ahrné E, Scheiffele P. Targeted combinatorial alternative splicing generates brain region-specific repertoires of neurexins. *Neuron*. 84: 386-398; 2014.
58. Kasem E, Kurihara T, Tabuchi K. Neurexins and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Res*. 127: 53-60; 2018.
59. Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, Heymach JV, Johnson JE, Lehman JM, MacPherson D, Massion PP, Minna JD, Oliver TG,

- Quaranta V, Sage J, Thomas RK, Vakoc CR, Gazdar AF. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer*. 19: 289-297; 2019.
60. Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, He M, Augustyn A, Osborne JK, Girard L, Minna JD, Gazdar AF, Cobb MH, Johnson JE. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep*. 16: 1259-1272; 2016.
61. Zhang W, Girard L, Zhang YA, Haruki T, Papari-Zareei M, Stastny V, Ghayee HK, Pacak K, Oliver TG, Minna JD, Gazdar AF. Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Transl Lung Cancer Res*. 7: 32-49; 2018.
62. Heist RS, Guarino MJ, Masters G, Purcell WT, Starodub AN, Horn L, Scheff RJ, Bardia A, Messersmith WA, Berlin J, Ocean AJ, Govindan SV, Maliakal P, Mudenda B, Wegener WA, Sharkey RM, Goldenberg DM, Camidge DR. Therapy of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With an SN-38-Anti-Trop-2 Drug Conjugate, Sacituzumab Govitecan. *J Clin Oncol*. 35: 2790-2797; 2017.
63. Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Ninomiya H, Sakakibara R, Subat S, Nagano H, Nomura K, Okumura S, Shibutani T, Ishikawa Y. Association of tumor TROP2 expression with prognosis varies among lung cancer subtypes. *Oncotarget*. 8: 28725-28735; 2017.