

学位論文

「Tumor microenvironment-mediated immune profiles and efficacy of anti-PD-L1 antibody plus chemotherapy stratified by DLL3 expression in small-cell lung cancer」

(小細胞肺癌における DLL3 発現で層別化した腫瘍免疫微小環境プロファイルと抗 PD-L1 抗体＋化学療法の有効性)

指導教授名 猶木 克彦

申請者氏名 白澤 昌之

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

1 背景と目的

小細胞肺癌（SCLC）は、原発性肺癌の約 15%を占め、予後不良の神経内分泌腫瘍である。SCLC の治療法は限られており、近年、免疫療法である抗 PD-L1 抗体併用療法の効果が実証され、プラチナ製剤+エトポシド+抗 PD-L1 抗体による化学免疫療法が標準治療となったが効果は限定的であり、新規薬剤の開発が求められている。

近年、デルタ様リガンド 3（DLL3）を標的とする T 細胞エンゲージャー療法が開発され、前臨床・臨床試験で有望な結果が得られている。DLL3 は、神経内分泌分化の制御に重要な役割を担っている Notch シグナル伝達経路の抑制性リガンドであり、Notch シグナル伝達を抑制し SCLC の分化に関わる。しかし、DLL3 高発現 SCLC の臨床的および生物学的特性、腫瘍微小環境、治療効果との関連については不明であるために検討を行った。

2 対象と方法

国立がん研究センター中央病院で 2008 年 1 月から 2018 年 12 月までに病理学的に完全切除された SCLC 患者を限局型（LS）-SCLC コホートとし、2019 年 10 月から 2022 年 4 月までに SCLC と診断され、カルボプラチン+エトポシド（PE）および抗 PD-L1 抗体による化学免疫療法を受けた患者を進展型（ES）-SCLC コホートとし、後ろ向き研究を行った（国立がん研究センター中央病院倫理委員会承認番号 2005-109, 2019-123）。LS-SCLC コホートでは、外科切除検体を用いて、全エクソームシーケンス（WES）により遺伝子変異、Tumor mutation burden（TMB）、腫瘍抗原を検索し、RNA シーケンス（Seq）により Gene Ontology（GO）、腫瘍免疫微小環境を解析し、また、無再発生存期間（RFS）を DLL3 発現の高い群と低い群の 2 群で検討した。ES-SCLC コホートでは、化学免疫療法の無増悪生存期間（PFS）と DLL3 発現との関連を調査した。

3 結果

LS-SCLC コホート（n=59）では、トランスクリプトーム発現にて、DLL3 の中央値（log2 [TPM + 1]） 1.94 にて層別化し、DLL3 High 群（29 例）と DLL3 Low 群（30 例）の 2 群を定義した。DLL3 High 群と DLL3 Low 群で RFS に差は認めなかった（RFS ; DLL3 High 群 vs. DLL3 Low 群: 16.7 ヵ月 vs. NR、p=0.25）。

WES 解析では、遺伝子変異、TMB では、DLL3 High 群と DLL3 Low 群で有意差を認めなかった。一方で、腫瘍抗原は、DLL3 High 群では DLL3 Low 群よりも有意に高かった（MHC-Class I and II: 76 vs. 48, p=0.003）。RNA-Seq の GO 解析では、DLL3 High 群では E2F target が有意に活性化され、腫瘍免疫関連経路、樹状細胞能が有意に抑制されていた。免疫微小環境は CIBERSORT を用いて解析し、DLL3 High 群では DLL3 Low 群に比べ T 細胞、マクロファージ、樹状細胞が有意に低かった。

ES-SCLC コホート（30 例）では、DLL3 の中央値（log2 [TPM + 1]） 3.27 にて層別化し、DLL3 High 群（15 例）と DLL3 Low 群（15 例）の 2 群を定義した。DLL3 High 群における PE+抗 PD-L1 抗体の PFS は、DLL3 Low 群よりも有意に短かった（4.7 カ

月 vs. 7.4 カ月、 $p = 0.01$)。

4 考察

本研究は、DLL3 発現が SCLC に与える影響を研究し、DLL3 高発現が腫瘍免疫抑制と関連し、PE+抗 PD-L1 抗体併用療法による PFS が有意に短いことを示した。この結果から DLL3 発現が SCLC の腫瘍免疫状態や化学免疫療法の効果を予測する可能性が示唆された。

TMB と腫瘍抗原は、固形腫瘍の免疫療法の効果予測因子として知られており、SCLC は TMB が高いために強力な T 細胞応答を誘発することが期待されるが、TMB が ES-SCLC における免疫療法の効果とは関連がないことが第Ⅲ相試験により明らかとなっている。このことは、本研究から得られた「腫瘍抗原が高い SCLC は DLL3 High 腫瘍であり、DLL3 High 腫瘍では抗原提示能の抑制により腫瘍免疫が抑制されている」ことと合致する。

DLL3 を標的とする T 細胞エンゲージャー療法は、T 細胞受容体の認識に依存せず、T 細胞応答を誘導するために開発された。本研究では、DLL3 High の SCLC では抗原提示能が阻害されているため T 細胞エンゲージャー療法が有用である可能性が示唆された。

5 結論

DLL3 高発現 SCLC では、腫瘍抗原が高いにもかかわらず、腫瘍免疫の抑制により化学免疫療法に抵抗性を示すという特徴が示された。

目次

頁

1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 患者選択 -----	1
2-2. 組織標本の作製 -----	2
2-3. 免疫組織化学染色 (IHC) -----	2
2-4. IHC の評価方法 -----	2
2-5. DNA 抽出と全エクソームシーケンシング (WES)解析 -----	2
2-6. Oncogenic/Pathogenic Mutations の同定 -----	3
2-7. Mutation Signature 解析 -----	3
2-8. HLA タイピングと腫瘍抗原解析 -----	3
2-9. RNA シーケンシングとデータ解析 -----	3
2-10. 遺伝子セットのエンリッチメント解析(GSEA) -----	4
2-11. RNA-Seq に基づくスコアリング -----	4
2-12. CIBERSORT 解析 -----	4
2-13. 統計分析 -----	4
3. 結果	
3-1. LS-SCLC コホートにおける DLL3 発現で層別化した患者背景と臨床転 帰 -----	5
3-2. DLL3 発現による、遺伝子変異、腫瘍変異負荷 (TMB)、腫瘍抗原、 Mutation Signature の影響 -----	5
3-3. DLL3 発現による、RNA-Seq 解析 -----	6
3-4. DLL3 発現と Rb-E2F 軸と、抗原提示能の関連 -----	6
3-5. ES-SCLC コホートにおける DLL3 発現と化学免疫療法の有効性の関連--	6
4. 考察 -----	7
5. 総括 -----	8
6. 将来展望 -----	8
7. 謝辞 -----	9
8. 引用文献 -----	10
9. 業績目録 -----	15
10. 図表 -----	19

1. 序論

小細胞肺癌（SCLC）は原発性肺癌の約 15%を占め、予後不良の神経内分泌腫瘍である[1]。IMpower 133 試験および CASPIAN 試験では、抗プログラム細胞死リガンド 1 (PD-L1) 抗体 (atezolizumab または durvalumab) をプラチナ製剤およびエトポシド (PE) 化学療法併用後に、抗 PD-L1 抗体単独による維持療法を行うことで、PE 療法と比較して進展型 SCLC (ES-SCLC) 患者の生存率が有意に改善した[2, 3]。しかしながら、抗 PD-L1 抗体の生存利益は限定的であり、ほとんどの SCLC 患者で 1 次治療中に増悪を認める。さらに、治療歴のある SCLC 患者の治療選択肢は限られており、本邦では topotecan、amrubicin のみが承認された治療薬である。そのため ES-SCLC の治療には臨床的に有効な新規薬剤の開発が急務である。

SCLC では Notch シグナル伝達経路は神経内分泌分化の調整に重要である。Delta-like protein 3 (DLL3) は Notch シグナル伝達を制御する Notch シグナル伝達経路の阻害性リガンドである。DLL3 は神経内分泌腫瘍で高発現しており、80%以上の SCLC で免疫組織化学染色 (IHC) で DLL3 陽性である[4-6]。さらに、DLL3 は、神経内分泌分化を介して腫瘍の成長、遊走、浸潤を促進する SCLC の転写因子かつ腫瘍形成ドライバーである ASCL1 によって制御されている[7-11]。

DLL3 は神経内分泌腫瘍の治療標的として注目されている。Rovalpituzumab Tesirine (Rova-T) などの DLL3 標的抗体薬物複合体 (ADC) は第一相臨床試験で奏効を示していた[12]。しかし、Rova-T の 2 つの第三相臨床試験では標準治療と比較して生存利益が示されず、Rova-T の開発は中止された[13, 14]。最近、SCLC やその他の神経内分泌腫瘍に対して tarlatamab (AMG757)、HPN328、BI764352 などの DLL3 を標的とする T 細胞エンゲージャー療法が開発されている[15-17]。前臨床モデルでは、これらの薬剤は T 細胞の活性化を誘導し T 細胞を腫瘍細胞に直接誘導することで、DLL3 陽性腫瘍において有意な腫瘍退縮と完全奏効を促進させる[16]。したがって、DLL3 標的 T 細胞エンゲージャー療法は現在、ES-SCLC 患者の単剤療法として研究されている。しかし、DLL3 高発現 SCLC における、免疫関連腫瘍微小環境 (TME) を含む臨床的および生物学的特徴は不明のままである。

本研究では、DLL3 発現と SCLC マーカーの相関関係と、DLL3 発現が生物学的差異や免疫関連 TME にどのような影響を与えるのかについて調査した。

2. 方法

2-1. 患者選択

本研究では、国立がん研究センター中央病院（東京）で病理学的に SCLC と診断された患者を登録した。限局型 SCLC (LS-SCLC コホート) には、2008 年 1 月から 2018 年 12 月の間に外科的切除を受けた患者、ES-SCLC コホートには、2019 年 10 月から 2022 年 4 月の間に PE+抗 PD-L1 抗体の治療を受けた患者を登録した。収集した臨床データ

は TNM 分類（第 8 版）、年齢、性別、喫煙状況、Eastern Cooperative Oncology Group のパフォーマンスステータス（PS）を調査した。客観的奏効率（ORR）は Response Criteria in Solid Tumors (RECIST) (1.1 版) を用いて評価した[19]。2023 年 2 月 20 日をデータカットオフ日とした。本研究は国立がん研究センター中央病院の倫理委員会（2005-109、2019-123）で承認された。

2-2. 組織標本の作製

外科的に切除した標本を用いて組織マイクロアレイ（TMA）を作成した。TMA は、TMA Master® (Becher Biotech) を利用し、各症例から採取した代表的な 2 領域の 2 mm のコアを使用して作成した。各症例の各コアの組織型は肺専門の病理学者が評価した。

2-3. 免疫組織化学染色（IHC）

免疫組織化学染色（IHC）は以下のモノクローナル抗体を用いて自動的に実施した (Autostainer Link 48 and Omnis Staining Platform; Dako、Glostrup、Denmark): synaptophysin (27G12; Nichirei、Tokyo、Japan)、chromogranin A (DAK-A3; Dako/Agilent、Santa Clara、CA、USA)、CD56 (1B6; Leica、Wetzlar、Germany)、Ki-67 (MIB1; Dako/Agilent)、ASCL1 (clone 24B72D11.1; BD Biosciences、Franklin Lakes、NJ、USA)、および DLL3 (CST #78110; Cell Signaling、Danvers、MA、USA)。

2-4. IHC の評価方法

IHC は陽性細胞の割合（1～100%）と標識強度（1=弱い、2=中程度、3=強い）の 2 つのパラメーターを用いて H-score にて評価を行った[20]。Ki-67 index は陽性細胞の割合として評価し、DLL3、synaptophysin、chromogranin A、CD56、および ASCL1 発現を評価した。SCLC と NSCLC の要素がある combined SCLC では SCLC 要素のみの発現を評価した。すべての病理学的評価は Indica Labs Halo プラットフォームを用いて実施し、すべての評価は 2 人の独立した観察者が確認した。

2-5. DNA 抽出と全エクソームシーケンシング（WES）解析

WES は LS-SCLC 患者から得た急速凍結癌検体および非癌組織検体から単離した 200 ng のゲノム DNA を用いて実施した。エクソームは SureSelect Human All Exon Exome Capture Kit (バージョン 4 または 6、Agilent Technologies Japan、Tokyo) を用いて実施した。シーケンシングは Illumina HiSeq 2500 プラットフォームで 2×75bp/2×100bp を使用したペアエンド法、または NovaSeq6000 プラットフォーム (Illumina、San Diego、CA、USA) で 2×150bp を使用したペアエンド法で実行し[21、22]、100 倍までのゲノムカバレッジを得た。基本的なアライメントとシーケンシングの品質管理は、GATK4 のベストプラクティスパイプラインに従って実施した[23]。得られたリードは参照として UCSC ヒト

ゲノム 38 (hg38) に対してアライメントした。体細胞一塩基変異体および挿入/欠失変異は、双方向リードに存在する変異のための Mutect2 を用いて同定した (BROAD Institute、<http://www.broadinstitute.org/gatk/>)。

2-6. Oncogenic/Pathogenic Mutations の同定

体細胞変異を以下の基準を用いて選択した: (1) 腫瘍細胞における体細胞変異の対立遺伝子頻度が 1% 超であること、(2) NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP6500) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) または Integrative Japanese Genome Variation Database (iJGVD, 20181105) (<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>) で対立遺伝子頻度閾値が 0.01 以上の場合は一塩基多型の除去、および (3) ClinVar に「pathogenic/likely pathogenic variants」または OncoKB データセット (<http://oncokb.org>) (oncokb-annotator を使用; 8910b65 決定日 2019 年 6 月 29 日、実施日 2020 年 3 月 25 日) に「oncogenic/likely oncogenic variants」と登録されている。最後に、選択したすべての変異を Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.94 で確認した[24, 25]。オンライン画像は ComplexHeatmap(v.2.6.2)と circlize (v.0.4.13) パッケージを用いて構築した。

2-7. Mutation Signature 解析

非負値行列因子分解 (NMF) を用いて変異シグネチャーを検出した[26]。得られたシグネチャーのプロファイルを COSMIC シグネチャー (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>) と比較した[26]。Signature Estimation R パッケージを利用して NMF を用いて特定したシグネチャーに各サンプルの変異を割り当てた[27]。

2-8. HLA タイピングと腫瘍抗原解析

WES から得たシーケンスリードを用いた遺伝子型 ヒト白血球抗原 (HLA) 対立遺伝子は、HLA-HD (バージョン 1.4.0) を利用して特定した。さらに、3 つの HLA-Class I 遺伝子 (HLA-A、HLA-B、および HLA-C) と 5 つの HLA-Class II 遺伝子 (HLA-DRB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1、および HLA-DPB1) を推定した。腫瘍抗原は pVACSeq (v4.0.10) のパイプラインを利用して予測を行った[28]。NetMHCpan アルゴリズム[29]を利用して結合親和性を推定した。推奨どおり、Ensembl のバリエーション効果予測因子 (VEP、v86)[30]を利用して、野生型および変異ペプチド配列にアノテーションを付けた。結合親和性阻害濃度 (IC50) 50 nM 以下のものは強い結合親和性を有するとみなし同定した。遺伝子発現レベルが Transcripts Per Million (TPM) 1 未満の腫瘍抗原は除外した。

2-9. RNA シーケンシングとデータ解析

TRIzol 試薬 (Invitrogen、Waltham、MA、USA) または AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen、Venlo、Netherlands) を使用して、凍結腫瘍検体から RNA を抽出した。RNeasy

Kit (Qiagen) を使用して精製し、精製したサンプル (200 ng) を用いて TruSeq RNA Sample Prep Kit または TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) で RNA シーケンシングライブラリを調製した。得られたライブラリは HiSeq 2500 で 75 bp リードのペアエンドシーケンシング、または NovaSeq6000 システム (Illumina) で 150 bp リードのペアエンドシーケンシングを行った。生のリードは参照ヒトゲノム (UCSC-Build38) にアライメントした[31]。リードマッピングは、ヒトゲノム (GRCh38) とトランスクリプトームデータ (GENCODE バージョン 31)[32]を参照データセットとして STAR (バージョン 2.4.2a)[31]を用いて解析した。StringTie[33]は、STAR で作成した BAM ファイルを用いて、各転写産物アイソフォームの発現レベルを推定するために使用した。ヒートマップは、heatmap R パッケージ (バージョン 1.0.12)を使用して描画した。

2-10. 遺伝子セットのエンリッチメント解析 (GSEA)

Hallmark 遺伝子セット、バイオプロセス (BP)、および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) のエンリッチメント解析と可視化は、clusterProfiler R パッケージ (<http://www.bioconductor.org/>) および GSEA ツール (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) を使用して実行した[34]。両群間の有意に濃縮された遺伝子発現は Deseq2 パッケージ (v.1.10.1) を用いた遺伝子発現差解析によって検出した[35]。有意な GSEA の結果は adjusted $P < 0.05$ をカットオフ値とした。

2-11. RNA-Seq に基づくスコアリング

遺伝子発現スコアは、引用論文を参考に、以下に示す転写遺伝子発現データを用いて算出した。以下の遺伝子シグネチャーは以前に発表されたデータに基づいて使用した: 腫瘍内 T cell gene expression profiles (GEP) (<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016094377&tab=PCTCLAIMS>)[36]およびケモカインシグネチャー[37]。

2-12. CIBERSORT 解析

CIBERSORTx (<https://cibersortx.stanford.edu/>) を用いて、DLL3High 群と DLL3Low 群の免疫細胞の差異を比較した。RNA-seq データ (TPM) の免疫細胞デコンボリューションは、CIBERSORTx[38]を用いて、1000 以上の順列で LM22 シグネチャーを用いて絶対モードで実行した。

2-13. 統計分析

両群間のカテゴリーデータおよびデータの差異をフィッシャーの正確確率検定および Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。すべての生存解析は Kaplan-Meier 法を用いて実施した。さらに、予後因子に基づく群間の生存期間の差をログランク検定で比較した。すべての分析は、R バージョン 4.0.5 (www.r-project.org) および GraphPad Prism 8

(GraphPad Software, Inc.) を使用して実行した。

3. 結果

3-1. LS-SCLC コホートにおける DLL3 発現で層別化した患者背景と臨床転帰

LS-SCLC コホートの 59 人の患者がこの研究に登録された (図 1)。患者背景を表 1 に示す。DLL3 発現と従来の神経内分泌マーカー (synaptophysin [SYP1]、chromogranin A [CGA]、CD56 [NCAM])、Ki-67 (MKi67)、および ASCL1 などの SCLC の診断マーカーの発現との相関を評価した。トランスクリプトーム発現に基づく DLL3 発現レベルの中央値 (\log_2 [TPM+1]) は 1.94 であった。

DLL3High 群 (N = 29) は DLL3 発現の中央値 (\log_2 [TPM+1]) 以上 (≥ 1.94)、DLL3Low 群 (N=30) は DLL3 発現の中央値 (\log_2 [TPM+1]) 未満 (< 1.94) と定義した。トランスクリプトーム発現では、DLL3High 群は、DLL3Low 群よりも MKi67、SYP1、CGA、NCAM、および ASCL1 の発現が有意に高かった (図 2A、B)。IHC では、DLL3 の発現は、synaptophysin、chromogranin A、CD56、ASCL1 の発現と有意に正の相関があった (図 2C、D)。また、神経内分泌マーカーの発現は、IHC とトランスクリプトーム発現の間に有意な正の相関を示した (図 3)。

LS-SCLC 患者 (n=57) における DLL3 発現および臨床転帰については、DLL3High 群と DLL3Low 群の間で患者背景、全生存期間 (OS)、無再発生存期間 (RFS) に差は認められなかった (図 2E、表 1、図 4) (2 名の患者は術後すぐに転院したために生存解析からのぞいた)。

3-2. DLL3 発現による、遺伝子変異、腫瘍変異負荷 (TMB)、腫瘍抗原、Mutation Signature への影響

遺伝子変異、TMB、腫瘍抗原、Mutation Signature と DLL3 発現との関連を解析した。LS-SCLC コホートで、最も頻繁に認められた遺伝子変異は TP53 (91%) であり、次いで RB1 (57%)、KMT2D (18%)、PTPRT (7%)、NOTCH1 (5%)、STK11 (5%) であった (図 5A)。TMB 中央値は、 6.5 ± 5.9 mut/Mb で、15 人の患者 (26%) が $TMB \geq 10$ mut/Mb、43 人 (74%) が $10 \text{ mut/Mb} < TMB$ であった。TMB と遺伝子変異は、DLL3 発現 (TMB: $6.6 \text{ vs } 6.5$ mut/Mb、 $P=0.26$) による差は認めなかったが、DLL3High 群では DLL3Low 群よりも Rb1 変異の頻度が高い傾向を示した ($69\% \text{ vs. } 45\%$; $P=0.11$; 図 5A、B、表 2)。一方で、Mutation Signature では、喫煙に関連する SBS signature 4 は、DLL3Low 群よりも DLL3High 群で有意に高頻度であった ($43\% \text{ vs. } 28\%$ 、 $P=0.02$ 、図 5C) [26]。

次に、腫瘍抗原と DLL3 発現との関連を解析した。DLL3High 群において、DLL3Low 群よりも、MHC-Class I、MHC-Class II、および MHC-Class I+II では、腫瘍抗原が有意に高かった (MHC-Class I: DLL3High vs. DLL3Low [77 vs. 48]、 $P=0.004$; MHC-Class II: DLL3High vs. DLL3Low [51 vs. 31]、 $P=0.003$; MHC-I+II: DLL3High vs. DLL3Low [76 vs.

48]、 $P=0.003$ 、図 5D)。

これらの結果から、DLL3High 群は、SBS signature 4 の割合、腫瘍抗原が高いことが示されたが、DLL3 発現は TMB と関連しなかった。

3-3. DLL3 発現による RNA-Seq 解析

トランスクリプトーム発現に基づいて、DLL3High 群と DLL3Low 群の TME の免疫プロファイルの違いを解析した。GSEA 解析では、DLL3High 群で pancreas beta cells (神経内分泌因子を含む) および E2F targets が有意に活性化されていた。一方、DLL3Low 群では腫瘍免疫関連経路が有意に活性化されていた (IFN γ response、TNF α signaling via NF- κ B、inflammatory response、IL6 JAK STAT3 signaling、IFN α response; 図 6A、B)。T cell GEP スコアは、DLL3High 群で DLL3Low 群よりも有意に低かった[36]。

さらに、CIBERSORT を用いて DLL3 発現における免疫細胞分画の関連を解析した (図 6C)。DLL3High 群は、DLL3Low 群よりも T 細胞、マクロファージ、および 樹状細胞 (DC) が有意に低かった (図 6C)。次に、DLL3High 群の T 細胞の輸送と浸潤に不可欠な役割を果たす 12 種類のケモカインの発現を評価した[37]。12 種類のケモカインとケモカイン signature の発現は、DLL3High 群では有意に制御されていた (図 6D、E)。これらの結果は、DLL3High 群で、T 細胞の輸送と浸潤を阻害することにより腫瘍免疫を抑制することを示している。

3-4. DLL3 発現と Rb-E2F 軸と、抗原提示能の関連

次に、DLL3High 群は腫瘍抗原が高いにもかかわらず腫瘍免疫抑制を示したため、DLL3High の腫瘍が抗原提示能に影響を与えるかどうかを調べた。GSEA 解析では、DLL3High 群で DC 機能 (DC differentiation, DC antigen processing and presentation, DC migration) が有意に抑制され、I 型インターフェロン (Type I IFN) に対する応答 (response to IFN α and β) が有意に抑制され (図 7A、B)、CIBERSORT に基づくマクロファージおよび DC が有意に低かった (図 6C)。

さらに、Rb-E2F 軸は、初期腫瘍免疫 (Type I IFN) を活性化し、腫瘍の認識、感知、およびその後の獲得免疫系の活性化に重要な役割を果たす IFN 遺伝子 (STING) 経路の刺激因子を抑制することが報告されている[39–41]。本研究では、DLL3High 群は Rb1 および STING 発現が有意に低く、E2F 発現が有意に高かった。GSEA 解析では、DLL3High 群は DLL3Low 群と比較して、E2F targets と Cell cycle が有意に活性化されていた (図 7C–E)。これらの結果は、DLL3High 群では、Rb-E2F 軸を活性化し、STING 経路を抑制し、抗原提示を阻害することを示唆している。

3-5. ES-SCLC コホートにおける DLL3 発現と化学免疫療法の有効性の関連

次に、DLL3 発現が ES-SCLC コホートにおける化学免疫療法の効果と関連しているかど

うかを評価した。PE+抗 PD-L1 抗体併用療法を受けた 30 人の患者が ES-SCLC コホートに登録された (図 1)。患者背景を表 3 にまとめた。

トランスクリプトーム発現にて、DLL3 発現レベルの中央値 (\log_2 [TPM+1]) は 3.27 であった。DLL3High 群 (N=15) は DLL3 発現の中央値 (\log_2 [TPM+1]) 以上 (≥ 3.27)、DLL3Low 群 (N=15) は DLL3 発現の中央値 (\log_2 [TPM+1]) 未満 (< 3.27) と定義した。DLL3High 群と DLL3Low 群で PE+抗 PD-L1 抗体併用療法の ORR に差はなかったが、DLL3High 群における PE + 抗 PD-L1 抗体併用療法の無増悪生存期間 (PFS) は DLL3Low 群よりも有意に短かった (4.7 ヶ月 [95%信頼区間 [CI], 3.9-5.4 ヶ月] vs. 7.4 ヶ月 [95%CI 4.2-10.6 ヶ月]; $P=0.01$) (図 8A、表 4)。また、PFS が 12 ヶ月以上の DLL3High 患者はいなかった。さらに、ES-SCLC コホートにおいても、GSEA 解析で、DLL3High 群では腫瘍免疫経路が有意に抑制され (IFN γ and α response, TNF α signaling via NF- κ B, inflammatory response, and IL6 JAK STAT3 signaling)、E2F targets が活性化されており、LS-SCLC コホートの結果と一致していた (図 8B、C)。

4. 考察

本研究では DLL3 発現が免疫関連 TME にどのような影響を与えるかを調べ、DLL3 高発現 SCLC が腫瘍免疫抑制と関連していることを見出した。さらに、DLL3 高発現症例は DLL3 低発現症例と比較して、PE+抗 PD-L1 抗体併用療法の PFS が有意に短いことが示された。これらの結果は DLL3 発現が SCLC における腫瘍免疫状態および免疫化学療法の有効性を予測できうることを示した。

DLL3 は Notch 経路の阻害性リガンドであり、SCLC における神経内分泌分化の調節因子である ASCL1 によって転写制御されている。SCLC 腫瘍の 80%以上で発現しており、正常組織での発現はほとんどなく、治療標的として研究開発されている [42、43]。前臨床モデルでは腫瘍の増殖、遊走、浸潤の促進における DLL3 の役割が示された。一方で、いくつかの研究では LS および ES-SCLC 症例で DLL3 および ASCL1 発現が生存と関連していないことが示されている [4、8]。今回の研究結果では DLL3 発現は LS-SCLC の予後と関連していないことが示された。近年、主要な転写調節因子の相対的発現に基づく SCLC の分子サブタイプ分類が提案された [11]。以前の報告では、神経内分泌マーカーである ASCL1/NEUROD1 発現の二重陰性腫瘍で完全に DLL3 発現が陰性であったのに対し、ASCL1 群と NEUROD1 群の両方で DLL3 は高発現であった [6]。したがって、DLL3 陽性腫瘍は ASCL1 および NEUROD1 の SCLC サブタイプに含まれる SCLC である。

TMB と腫瘍抗原は固形腫瘍に対する免疫療法の有効性を予測することが報告されている [44、45]。SCLC は TMB が高いため強い T 細胞応答を誘導することが期待される。しかし、第三相臨床試験の CASPIAN および IMpower 133 試験では、ES-SCLC 患者における TMB は化学療法+抗 PD-L1 抗体併用療法の有効性と関連していないことが示された [2、46]。これは、腫瘍抗原の多い SCLC が DLL3 高発現の腫瘍であり、抗原提示能を阻害すること

で腫瘍免疫を抑制するためと考えらる。

DLL3 は神経内分泌腫瘍、特に SCLC の治療標的として注目されている。DLL3 を標的とする T 細胞エンゲージャー療法は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) および T 細胞受容体認識とは無関係に T 細胞応答を誘導するために開発された。さらに、共刺激により、T 細胞プライミング、輸送、または抗原提示なしに、細胞傷害性 T リンパ球の活性化が可能になる[47]。DLL3 高発現 SCLC は、Rb-E2F 軸を活性化して STING 経路を抑制し、抗原提示能と T 細胞輸送を阻害することで腫瘍免疫を阻害することを示した。したがって、DLL3 高発現 SCLC 症例に DLL3 を標的とする T 細胞エンゲージャー療法を投与することは腫瘍免疫の観点からも妥当と考えられる。実際、DLL3 を標的とした T 細胞エンゲージャー療法の臨床試験では、以前に治療を受けた SCLC 患者で有望な有効性が示された (tarlatamab: PFS 3.7 ヶ月 [95%CI: 2.1-5.4]、ORR 23.4% [95%CI: 15.7-32.5])[48]。

この研究にはいくつかの限界がある。まず、この後ろ向き研究は単一施設で実施され、登録された患者は少数であった。次に、ES-SCLC 患者ではサンプルへのアクセスが困難であったため、RNA-seq の方法が両コホートで異なっており、ES-SCLC コホートと LS-SCLC コホートの間で DLL3 発現のカットオフ値が異なっていた。よって LS-SCLC と ES-SCLC のトランスクリプトーム解析は別々に行ったが、LS-SCLC コホートと ES-SCLC コホートでは同様の結果が得られた。そのため大規模での SCLC 患者に対する RNA-seq の分析的妥当性と臨床応用を含むさらなる調査が必要である。

結論として、DLL3 高発現の SCLC では、腫瘍抗原が高いにもかかわらず、腫瘍免疫の抑制により化学免疫療法に対する抵抗性を有しているという特徴が明らかになった。今回の研究のデータは DLL3 高発現の SCLC において DLL3 を標的とする T 細胞エンゲージャー療法の開発を支持するエビデンスとなる。

5. 総括

SCLC において DLL3 発現と免疫関連 TME および化学免疫療法の効果に関連していることを報告した。DLL3 高発現 SCLC は、腫瘍抗原が高いにもかかわらず、腫瘍免疫の抑制により化学免疫療法に対する抵抗性を特徴としていた。このことから DLL3 は SCLC の腫瘍免疫微小環境、化学免疫療法の有効性を予測しうることを示した。

6. 将来展望

今回は臨床検体を用いてトランスレーショナルリサーチを行ったが、DLL3 による腫瘍免疫微小環境への影響については *in vitro*、*in vivo* でのさらなる検証を検討したい。また、T 細胞エンゲージャー療法は T 細胞の活性化をするために、現在の標準治療である化学免疫療法との相乗効果が考えられ、今後の臨床試験での検討が望まれる。

7. 謝辞

本研究にご協力をいただいた、患者さんに感謝申し上げます。また、本試験にご協力いただきました国立がん研究センター中央病院、研究所の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

8. 引用文献

1. Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer* 17, 725–737 (2017) doi 10.1038/nrc.2017.87.
2. Horn, L., Mansfield, A.S., Szczesna, A., Havel, L., Krzakowski, M., Hochmair, M.J., et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 379, 2220–2229 (2018) doi 10.1056/NEJMoa1809064.
3. Paz-Ares, L., Dvorkin, M., Chen, Y., Reinmuth, N., Hotta, K., Trukhin, D., et al. 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) doi [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32222-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32222-6).
4. Tanaka, K., Isse, K., Fujihira, T., Takenoyama, M., Saunders, L., Bheddah, S., et al. Prevalence of Delta-like protein 3 expression in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer* 115, 116–120 (2018) doi <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.11.018>.
5. Morgensztern, D., Besse, B., Greillier, L., Santana-Davila, R., Ready, N., Hann, C.L., et al. 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) doi 10.1158/1078-0432.Ccr-19-1133.
6. Baine, M.K., Hsieh, M.S., Lai, W.V., Egger, J.V., Jungbluth, A.A., Daneshbod, Y., et al. SCLC subtypes defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: a comprehensive immunohistochemical and histopathologic characterization. *J Thorac Oncol*. 15, 1823–1835 (2020) doi 10.1016/j.jtho.2020.09.009.
7. Chapman, G., Sparrow, D.B., Kremmer, E., Dunwoodie, S.L. Notch inhibition by the ligand Delta-like 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Hum Mol Genet*. 20, 905–916 (2011) doi 10.1093/hmg/ddq529.
8. Furuta, M., Kikuchi, H., Shoji, T., Takashima, Y., Kikuchi, E., Kikuchi, J., et al. DLL3 regulates the migration and invasion of small cell lung cancer by modulating Snail. *Cancer Sci*. 110, 1599–1608 (2019) doi <https://doi.org/10.1111/cas.13997>.
9. Jiang, T., Collins, B.J., Jin, N., Watkins, D.N., Brock, M.V., Matsui, W., et al. Achaete-scute complex homologue 1 regulates tumor-initiating capacity in human small cell lung cancer. *Cancer Res*. 69, 845–854 (2009) doi 10.1158/0008-5472.Can-08-2762.
10. Henke, R.M., Meredith, D.M., Borromeo, M.D., Savage, T.K., Johnson, J.E. Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Dev Biol*. 328, 529–540 (2009) doi <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.007>.

11. Rudin, C.M., Poirier, J.T., Byers, L.A., Dive, C., Dowlati, A., George, J., et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer* 19, 289–297 (2019) doi 10.1038/s41568-019-0133-9.
12. Rudin, C.M., Pietanza, M.C., Bauer, T.M., Ready, N., Morgensztern, D., Glisson, B.S., et al. 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.* 18, 42–51 (2017).
13. Blackhall, F., Jao, K., Greillier, L., Cho, B.C., Penkov, K., Reguart, N., et al. 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.* 16, 1547–1558 (2021) doi <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.02.009>.
14. Johnson, M.L., Zvirbule, Z., Laktionov, K., Helland, A., Cho, B.C., Gutierrez, V., et al. Rovalpituzumab tesirine as a maintenance therapy after first-line platinum-based chemotherapy in patients with extensive-stage-SCLC: results from the Phase 3 MERU Study. *J Thorac Oncol.* 16, 1570–1581 (2021) doi <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.03.012>.
15. Molloy, M.E., Valenzuela, L.B., Basak, P.E., Law, C.L. Abstract 1573: Combinatorial antitumor effects of CD3-based trispecific T cell activating constructs (TriTACs) and checkpoint inhibitors in preclinical models. *Cancer Res.* 81, 1573 (2021) doi 10.1158/1538-7445.Am2021-1573.
16. Giffin, M.J., Cooke, K., Lobenhofer, E.K., Estrada, J., Zhan, J., Deegen, P., et al. 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.* 27, 1526–1537 (2021) doi 10.1158/1078-0432.Ccr-20-2845.
17. Johnson, M.L., Sanborn, R.E. Interim results of an ongoing phase 1/2a study of HPN328, a tri-specific, half-life extended, DLL3-targeting, T-cell engager, in patients with small cell lung cancer and other neuroendocrine cancers. *Headache* 3, 17 (2022).
18. Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W.E., et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 11, 39–51 (2016) doi 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
19. Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45, 228–247 (2009) doi 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
20. Fedchenko, N., Reifenrath, J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol.* 9, 221 (2014) doi 10.1186/s13000-014-0221-9.

21. Saito, M., Shimada, Y., Shiraishi, K., Sakamoto, H., Tsuta, K., Totsuka, H., et al. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. *Cancer Res.* 75, 2264–2271 (2015) doi 10.1158/0008-5472.Can-14-3282.
22. Honda, T., Sakashita, H., Masai, K., Totsuka, H., Motoi, N., Kobayashi, M., et al. Deleterious pulmonary surfactant system gene mutations in lung adenocarcinomas associated with usual interstitial pneumonia. *JCO Precis Oncol.* 2, 1–24 (2018) doi 10.1200/po.17.00301.
23. DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 43, 491–498 (2011) doi 10.1038/ng.806.
24. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P. Integrative genomics viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14, 178–192 (2013) doi 10.1093/bib/bbs017.
25. Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 29, 24–26 (2011) doi 10.1038/nbt.1754.
26. Alexandrov, L.B., Kim, J., Haradhvala, N.J., Huang, M.N., Tian Ng, A.W., Wu, Y., et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* 578, 94–101 (2020) doi 10.1038/s41586-020-1943-3.
27. Huang, X., Wojtowicz, D., Przytycka, T.M. Detecting presence of mutational signatures in cancer with confidence. *Bioinformatics* 34, 330–337 (2018) doi 10.1093/bioinformatics/btx604.
28. Hundal, J., Carreno, B.M., Petti, A.A., Linette, G.P., Griffith, O.L., Mardis, E.R., et al. pVAC-Seq: a genome-guided in silico approach to identifying tumor neoantigens. *Genome Med.* 8, 11 (2016).
29. Hoof, I., Peters, B., Sidney, J., Pedersen, L.E., Sette, A., Lund, O., et al. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* 61, 1–13 (2009).
30. McLaren, W., Gil, L., Hunt, S.E., Riat, H.S., Ritchie, G.R., Thormann, A., et al. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* 17, 122 (2016).
31. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21 (2013) doi 10.1093/bioinformatics/bts635.
32. Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A.M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res.* 47, D766–D773 (2019) doi 10.1093/nar/gky955.
33. Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T., Salzberg,

- S.L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 33, 290–295 (2015) doi 10.1038/nbt.3122.
34. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci. USA* 102, 15545–15550 (2005) doi 10.1073/pnas.0506580102.
 35. Love, M.I., Huber, W., Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550 (2014) doi 10.1186/s13059-014-0550-8.
 36. Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., Kaufman, D.R., et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 127, 2930–2940 (2017) doi 10.1172/JCI91190.
 37. Coppola, D., Nebozhyn, M., Khalil, F., Dai, H., Yeatman, T., Loboda, A., et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol.* 179, 37–45 (2011) doi <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.007>.
 38. Newman, A.M., Steen, C.B., Liu, C.L., Gentles, A.J., Chaudhuri, A.A., Scherer, F., et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol.* 37, 773–782 (2019) doi 10.1038/s41587-019-0114-2.
 39. Mahadevan, N.R., Knelson, E.H., Wolff, J.O., Vajdi, A., Saigí, M., Campisi, M., et al. Intrinsic immunogenicity of small cell lung carcinoma revealed by its cellular plasticity. *Cancer Discov.* 11, 1952–1969 (2021) doi 10.1158/2159-8290.Cd-20-0913.
 40. Hubaux, R., Thu, K.L., Coe, B.P., MacAulay, C., Lam, S., Lam, W.L. EZH2 promotes E2F-driven SCLC tumorigenesis through modulation of apoptosis and cell-cycle regulation. *J Thorac Oncol.* 8, 1102–1106 (2013) doi <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318298762f>.
 41. Sen, T., Rodriguez, B.L., Chen, L., Corte, C.M.D., Morikawa, N., Fujimoto, J., et al. Targeting DNA damage response promotes antitumor immunity through STING-mediated T-cell activation in small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 9, 646–661 (2019) doi 10.1158/2159-8290.Cd-18-1020.
 42. Saunders, L.R., Bankovich, A.J., Anderson, W.C., Aujay, M.A., Bheddah, S., Black, K., et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med.* 7, 302ra136 (2015) doi 10.1126/scitranslmed.aac9459.
 43. Augustyn, A., Borromeo, M., Wang, T., Fujimoto, J., Shao, C., Dospoy, P.D., et al. ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proc Natl Acad Sci. USA* 111, 14788–14793 (2014) doi

doi:10.1073/pnas.1410419111.

44. Rudin, C.M., Poirier, J.T., Byers, L.A., Dive, C., Dowlati, A., George, J., et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer* 19, 289–297 (2019) doi 10.1038/s41568-019-0133-9.
45. Schumacher, T.N., Schreiber, R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69–74 (2015) doi 10.1126/science.aaa4971.
46. Newell, F., Pires da Silva, I., Johansson, P.A., Menzies, A.M., Wilmott, J.S., Addala, V., et al. Multiomic profiling of checkpoint inhibitor-treated melanoma: identifying predictors of response and resistance, and markers of biological discordance. *Cancer Cell* 40, 88–102.e7 (2022) doi <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.11.012>.
47. Goldman, J.W., Garassino, M.C., Chen, Y., Reinmuth, N., Hotta, K., Poltoratskiy, A., et al. LBA86 Durvalumab (D) ± tremelimumab (T) + platinum-etoposide (EP) in 1L ES-SCLC: Characterization of long-term clinical benefit and tumour mutational burden (TMB) in CASPIAN. *Ann Oncol.* 31, S1212–S1213 (2020) doi <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.2328>.
48. Horn, L., Mansfield, A.S., Szczesna, A., Havel, L., Krzakowski, M., Hochmair, M.J., et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 379, 2220–2229 (2018) doi 10.1056/NEJMoa1809064.
49. Slaney, C.Y., Wang, P., Darcy, P.K., Kershaw, M.H. CARs versus BiTEs: A comparison between T cell–redirection strategies for cancer treatment. *Cancer Discov.* 8, 924–934 (2018) doi 10.1158/2159-8290.Cd-18-0297.
50. Paz-Ares, L., Champiat, S., Lai, W.V., Izumi, H., Govindan, R., Boyer, M., et al. Tarlatamab, a first-in-class DLL3-targeted bispecific T cell engager, in recurrent small-cell lung cancer: an open-label, phase 1 study. *J Clin Oncol.* 41, 2893–2903 (2023) doi 10.1200/jco.22.02823.

9.業績目録

(I) 原 著

- ◎1. Shirasawa M, Yoshida T, Shiraishi K, Goto N, Yagishita S, Imabayashi T, Matsumoto Y, Masuda K, Shinno Y, Okuma Y, Goto Y, Horinouchi H, Yotsukura M, Yoshida Y, Nakagawa K, Naoki K, Tsuchida T, Hamamoto R, Yamamoto N, Motoi N, Kohno T, Watanabe S, Ohe Y. Tumor microenvironment-mediated immune profiles and efficacy of anti-PD-L1 antibody plus chemotherapy stratified by DLL3 expression in small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2023. (In press)
- 2. Shirasawa M, Yoshida T, Shiraishi K, Takigami A, Takayanagi D, Imabayashi T, Matsumoto Y, Masuda K, Shinno Y, Okuma Y, Goto Y, Horinouchi H, Yotsukura M, Yoshida Y, Nakagawa K, Tsuchida T, Hamamoto R, Yamamoto N, Motoi N, Kohno T, Watanabe S, Ohe Y. Identification of inflamed-phenotype of small cell lung cancer leading to the efficacy of anti-PD-L1 antibody and chemotherapy. *Lung Cancer*. 2023;179:107183.
3. Higashiyama M, Motoi N, Yotsukura M, Yoshida Y, Nakagawa K, Yagishita S, Shirasawa M, et al. Clinicopathological characteristics and molecular analysis of lung cancer associated with ciliated muconodular papillary tumor/bronchiolar adenoma. *Pathol Int*. 2023;73(5):188-97.
4. Higashiyama RI, Yoshida T, Yagishita S, Ohuchi M, Sakiyama N, Torasawa M, Shirasawa M, et al. Safety Implications of Switching Pembrolizumab Dosage From 200 mg Every 3 Weeks to 400 mg Every 6 Weeks in Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2022;17(10):1227-32.
5. Shimoda Y, Shibaki R, Yoshida T, Murakami S, Shirasawa M, Torasawa M, et al. Concurrent High PD-L1 Expression and CD8(+) Immune Cell Infiltration Predict PD-1 Blockade Efficacy in Advanced EGFR-Mutant NSCLC Patients. *Clin Lung Cancer*. 2022;23(6):477-86.
6. Torasawa M, Yoshida T, Yagishita S, Shimoda Y, Shirasawa M, Matsumoto Y, et al. Nivolumab versus pembrolizumab in previously-treated advanced non-small cell lung cancer patients: A propensity-matched real-world analysis. *Lung Cancer*. 2022;167:49-57.
7. Kumagai S, Koyama S, Itahashi K, Tanegashima T, Lin YT, Togashi Y, Kamada T, Irie T, Okumura G, Kono H, Ito D, Fujii R, Watanabe S, Sai A, Fukuoka S, Sugiyama E, Watanabe G, Owari T, Nishinakamura H, Sugiyama D, Maeda Y, Kawazoe A, Yukami H, Chida K, Ohara Y, Yoshida T, Shinno Y, Takeyasu Y, Shirasawa M, Nakama K et al. Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. *Cancer Cell*. 2022;40(2):201-18.e9.
8. Shirasawa M, Yoshida T, Imabayashi T, Okuma K, Matsumoto Y, Masuda K, et al. Baseline PD-L1 expression and tumour-infiltrated lymphocyte status predict the efficacy of

durvalumab consolidation therapy after chemoradiotherapy in unresectable locally advanced patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2022;162:1-10.

9. Goto Y, Arakawa S, Shirasawa M, Higashiyama R, Baba K, Masuda K, et al. Performance of Japanese patients in registrational studies. *Jpn J Clin Oncol*. 2022;52(1):53-64.

10. 東山量子, 吉田達哉, 白澤昌之, 荒川さやか, 新野祐樹, 大熊裕介, et al. Current Status Concerning the Retention of a Second Opinion in Patients with Thoracic Malignancies. *肺癌*. 2021;61:939-945

○11. Shirasawa M, Yoshida T, Shimoda Y, Takayanagi D, Shiraishi K, Kubo T, Mitani S, Matsumoto Y, Masuda K, Shinno Y, Okuma Y, Goto Y, Horinouchi H, Ichikawa H, Kohno T, Yamamoto N, Matsumoto S, Goto K, Watanabe S, Ohe Y, Motoi N. Differential Immune-Related Microenvironment Determines Programmed Cell Death Protein-1/Programmed Death-Ligand 1 Blockade Efficacy in Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2021;16(12):2078-90.

12. Shimoda Y, Yoshida T, Shirasawa M, Mizuno T, Jo H, Matsumoto Y, et al. Smoking History Predicts High Presence of TILs and Efficacy of PD-1 Blockade in PD-L1 Expression-negative Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Anticancer Res*. 2021;41(11):5739-47.

13. Morita C, Yoshida T, Shirasawa M, Masuda K, Matsumoto Y, Shinno Y, et al. Clinical characteristics of advanced non-small cell lung cancer patients with EGFR exon 20 insertions. *Sci Rep*. 2021;11(1):18762.

14. Shirasawa M, Yoshida T, Takayanagi D, Shiraishi K, Yagishita S, Sekine K, et al. Activity and Immune Correlates of Programmed Death-1 Blockade Therapy in Patients with Advanced Large Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2021 Feb 8:S1525-7304(21)00026-7.

○15. Shirasawa M, Yoshida T, Horinouchi H, Kitano S, Arakawa S, Matsumoto Y, Shinno Y, Okuma Y, Goto Y, Kanda S, Watanabe R, Yamamoto N, Watanabe S, Ohe Y, Motoi N. Prognostic impact of peripheral blood neutrophil to lymphocyte ratio in advanced-stage pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma and its association with the immune-related tumor microenvironment. *Br J Cancer*. 2021 Mar;124(5):925-932.

○16. Shirasawa M, Yoshida T, Matsumoto Y, Shinno Y, Okuma Y, Goto Y, Horinouchi H, Yamamoto N, Watanabe S, Ohe Y, Motoi N. Impact of chemoradiotherapy on the immune-related tumour microenvironment and efficacy of anti-PD-(L)1 therapy for recurrences after chemoradiotherapy in patients with unresectable locally advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2020;140:28-36.

17. Shirasawa M, Fukui T, Kusuhashi S, Harada S, Nishinarita N, Hiyoshi Y, et al. Prognostic differences between oligometastatic and polymetastatic extensive disease-small cell lung cancer. *PloS One*. 2019;14(4):e0214599.

18. Shirasawa M, Fukui T, Kusuhara S, Hiyoshi Y, Nakahara Y, Nishinarita N, et al. Efficacy and risk of cytotoxic chemotherapy in extensive disease-small cell lung cancer patients with interstitial pneumonia. *BMC Cancer*. 2019;19(1):163.
19. Shirasawa M, Fukui T, Kusuhara S, Hiyoshi Y, Ishihara M, Kasajima M, et al. Prognostic significance of the 8th edition of the TNM classification for patients with extensive disease small cell lung cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6039-47.
20. Igawa S, Shirasawa M, Fukui T, Nishinarita N, Sone H, Ozawa T, et al. Efficacy of Platinum-Based Chemotherapy for Relapsed Small-Cell Lung Cancer after Amrubicin Monotherapy in Elderly Patients and Patients with Poor Performance Status. *Oncology*. 2018;94(4):207-14.
21. Igawa S, Shirasawa M, Ozawa T, Nishinarita N, Okuma Y, Ono T, et al. Comparison of carboplatin plus etoposide with amrubicin monotherapy for extensive-disease small cell lung cancer in the elderly and patients with poor performance status. *Thorac Cancer*. 2018;9(8):967-73.
22. Igawa S, Sasaki J, Otani S, Shirasawa M, Niwa H, Kusuhara S, et al. Smoking History as a Predictor of Pemetrexed Monotherapy in Patients with Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology*. 2016;91(1):41-7.

(II) 著 書

1. 白澤 昌之、河野 隆志：がん免疫ペディア，羊土社，2022
2. 白澤 昌之、後藤 悌：呼吸器内科 Respiratory medicine / 呼吸器内科編集委員会 編 36 (3)，科学評論社 2019-09

(III) 総説・講座

1. Shirasawa M, Yoshida T, Ohe Y. Biomarkers of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2023 (In press)

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. Arakawa S, Yoshida T, Shirasawa M, Takayanagi D, Yagishita S, Motoi N, et al. RB1 loss induced small cell lung cancer transformation as acquired resistance to pembrolizumab in an advanced NSCLC patient. *Lung Cancer*. 2021;151:101-3.
2. Inaba-Higashiyama R, Yoshida T, Jo H, Shirasawa M, Motoi N, Ohe Y. Clinical outcomes of pembrolizumab therapy in advanced-NSCLC patients with poor performance status (≥ 3) and high PD-L1 expression (TPS $\geq 50\%$): A case series. *Thorac Cancer*. 2020;11(12):3618-21.
3. Nakahara Y, Fukui T, Shirasawa M, Harada S, Kusuhara S, Takakura A, et al. Intracranial

Response to Nivolumab in a Patient with PD-L1-negative Lung Adenocarcinoma. Intern Med (Tokyo, Japan). 2018;57(21):3149-52.

4. 白澤 昌之, 久保田 勝, 笠島 真志, 日吉 康弘, 中原 善郎, 益田 典幸: 多臓器に病変を有し急性増悪をきたしたサルコイドーシスの 1 例: 日本呼吸器学会誌 7 巻 1 号 Page49-53 (2018)

5. Shirasawa M, Kubotaa M, Harada S, Niwa H, Kusuhara S, Kasajima M, Hiyoshi Y, Ishihara M, Igawa S, Masuda N: Successful oral desensitization against skin rash induced by alectinib in a patient with anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinoma: A case report. Lung Cancer , 99:66~68,2016.

6. Shirasawa M, Nakahara Y, Niwa H, Harada S, Ozawa T, Kusuhara S, et al. Interstitial pneumonia following administration of pegfilgrastim during carboplatin and etoposide chemotherapy for small-cell lung cancer. Mol Clin Oncol. 2016;5(6):714-6.

7. Katono K, Shirasawa M, Harada S, Niwa H, Nakahara Y, Igawa S, et al. Endobronchial involvement of mantle cell lymphoma: A case report. Respir Med Case Rep. 2016;19:77-9.

10. 图表

表 1 Patient characteristics in the LS-SCLC group (N=59)

	All patients N=59	DLL3 _{High} N=29	DLL3 _{Low} N=30	p
Age, median (range), years	68 (49–89)	67 (49–82)	70 (56–89)	0.06
Age, N (%)				
<75 years	46 (78)	24 (83)	22 (73)	0.53
≥75 years	13 (22)	5 (17)	8 (27)	
Gender, N (%)				
Male	48 (81)	23 (79)	25 (83)	0.75
Female	11 (19)	6 (21)	5 (17)	
Smoking status, N (%)				
Never	1 (2)	0 (0)	1 (4)	1.00
Former/Current	55 (98)	28 (100)	27 (96)	
Unknown	3	1	2	
ECOG PS, N (%)				
0	46 (78)	23 (80)	23 (77)	1.00
1	11 (19)	5 (17)	6 (20)	(0 vs. 1 and 2)
2	2 (3)	1 (3)	1 (3)	
Stage, N (%)				

I	34 (58)	18 (62)	16 (53)	0.60
II	20 (34)	9 (31)	11 (37)	(I vs II and III)
III	5 (8)	2 (7)	3 (10)	
Histology, N (%)				
SCLC	48 (81)	24 (83)	24 (80)	1.00
Combined SCLC	11 (19)	5 (17)	6 (20)	
Surgery method, N (%)				
Lobectomy	50 (85)	25 (87)	25 (83)	1.00
Limited	7 (12)	3 (10)	4 (13)	(Lobectomy vs. Limited)
Pneumonectomy	2 (3)	1 (3)	1 (4)	
Adjuvant chemotherapy, N (%)				
Done	38 (64)	20 (69)	18 (60)	0.59
None	21 (36)	9 (31)	12 (40)	
Recurrence, N (%)				
Yes	27 (46)	11 (38)	16 (53)	0.30
No	32 (54)	18 (62)	14 (47)	

LS-SCLC, limited-stage-small-cell lung cancer; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology

Group performance status

表 2 Association between DLL3 status and mutation profiles (N=58)

	All patients	DLL3 _{High}	DLL3 _{Low}	p
	N=58	N=29	N=29	
<hr/>				
<i>TP53</i> , N (%)				
Positive	53 (91)	27 (93)	26 (90)	0.68
Negative	5 (9)	2 (7)	3 (10)	
<i>Rb1</i> , N (%)				
Positive	33 (57)	20 (69)	13 (45)	0.11
Negative	25 (43)	9 (31)	16 (55)	
<i>KMT2D</i> , N (%)				
Positive	9 (16)	3 (10)	6 (21)	0.47
Negative	49 (84)	26 (90)	23 (79)	

表 3 Patient characteristics in the ES-SCLC group (N=30)

	All patients N=30	DLL3 _{High} N=15	DLL3 _{Low} N=15	p
Age, median (range), years	70 (37–86)	67 (37–86)	74 (56–83)	0.23
Age, N (%)				
<75 years	20 (67)	11 (73)	9 (60)	0.70
≥75 years	10 (33)	4 (27)	6 (40)	
Gender, N (%)				
Male	23 (77)	13 (87)	10 (67)	0.39
Female	7 (23)	2 (13)	5 (33)	
Smoking status, N (%)				
Never	2 (7)	1 (7)	1 (7)	1.00
Former/Current	28 (93)	14 (93)	14 (93)	
ECOG PS, N (%)				
0	10 (33)	6 (40)	4 (26)	0.70

1	16 (53)	7 (47)	9 (60)	(0 vs. 1, 2,
2	3 (10)	2 (13)	1 (7)	and 3)
3	1 (4)	0 (0)	1 (7)	
Stage, N (%)				
III	1 (4)	0 (0)	1 (7)	
IV	26 (86)	14 (93)	12 (80)	-
Recurrence	3 (10)	1 (7)	2 (13)	
Chemotherapy regimens, N (%)				
CBDCA+ETP+Atezolizumab	22 (73)	13 (87)	9 (60)	0.21
CBDCA+ETP+Durvalumab	8 (27)	2 (13)	6 (40)	

ES-SCLC, extensive-stage-small-cell lung cancer; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology

Group performance status; ETP, etoposide

表 4 Efficacy of platinum doublet plus anti-PD-L1 antibody according to DLL3 expression

(N=30)

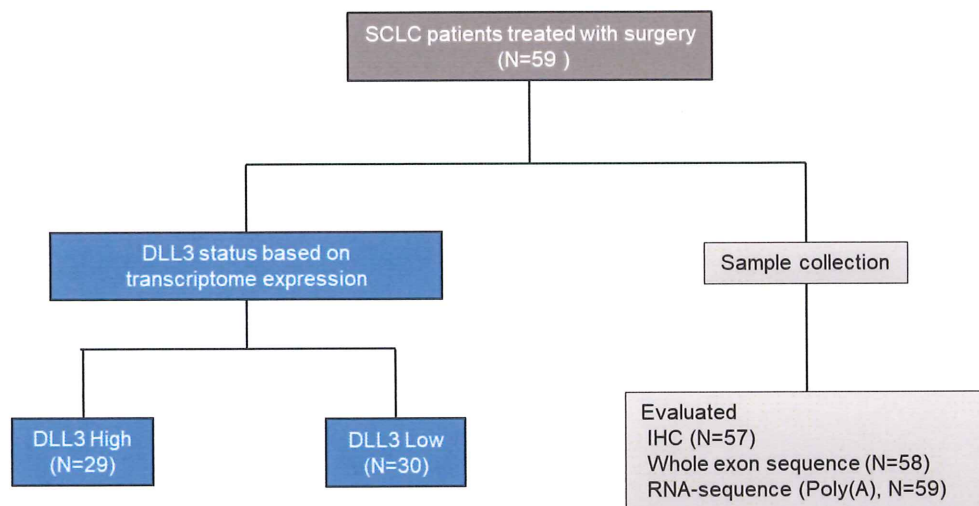
	PR	SD	PD	NE	p
All patients	21 (72%)	3 (10%)	5 (18%)	1	
Patients with DLL3 _{High}	11 (74%)	2 (13%)	2 (13%)	0	1.00*
Patients with DLL3 _{Low}	10 (71%)	1 (7%)	3 (22%)	1	

PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; NE, not evaluated

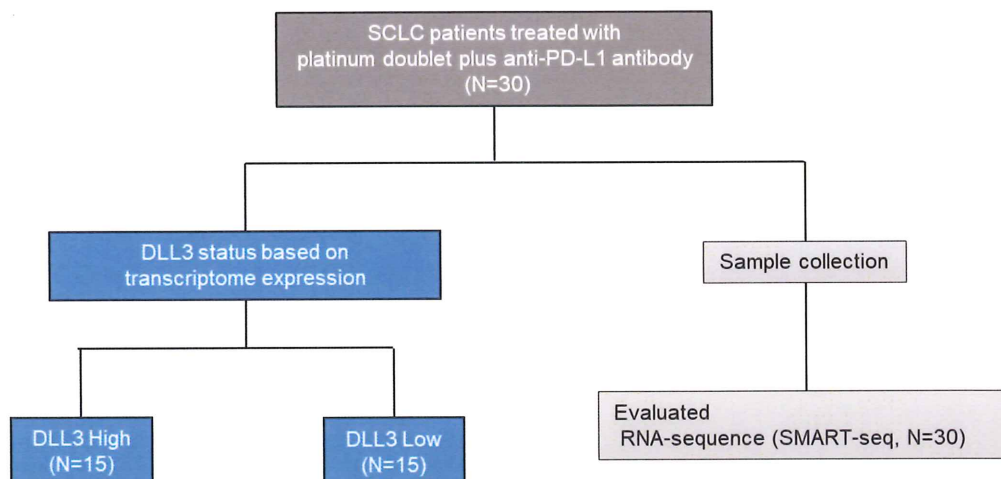
* Fisher test comparing PR vs. SD and PD.

図 1.

A. LS-SCLC cohort

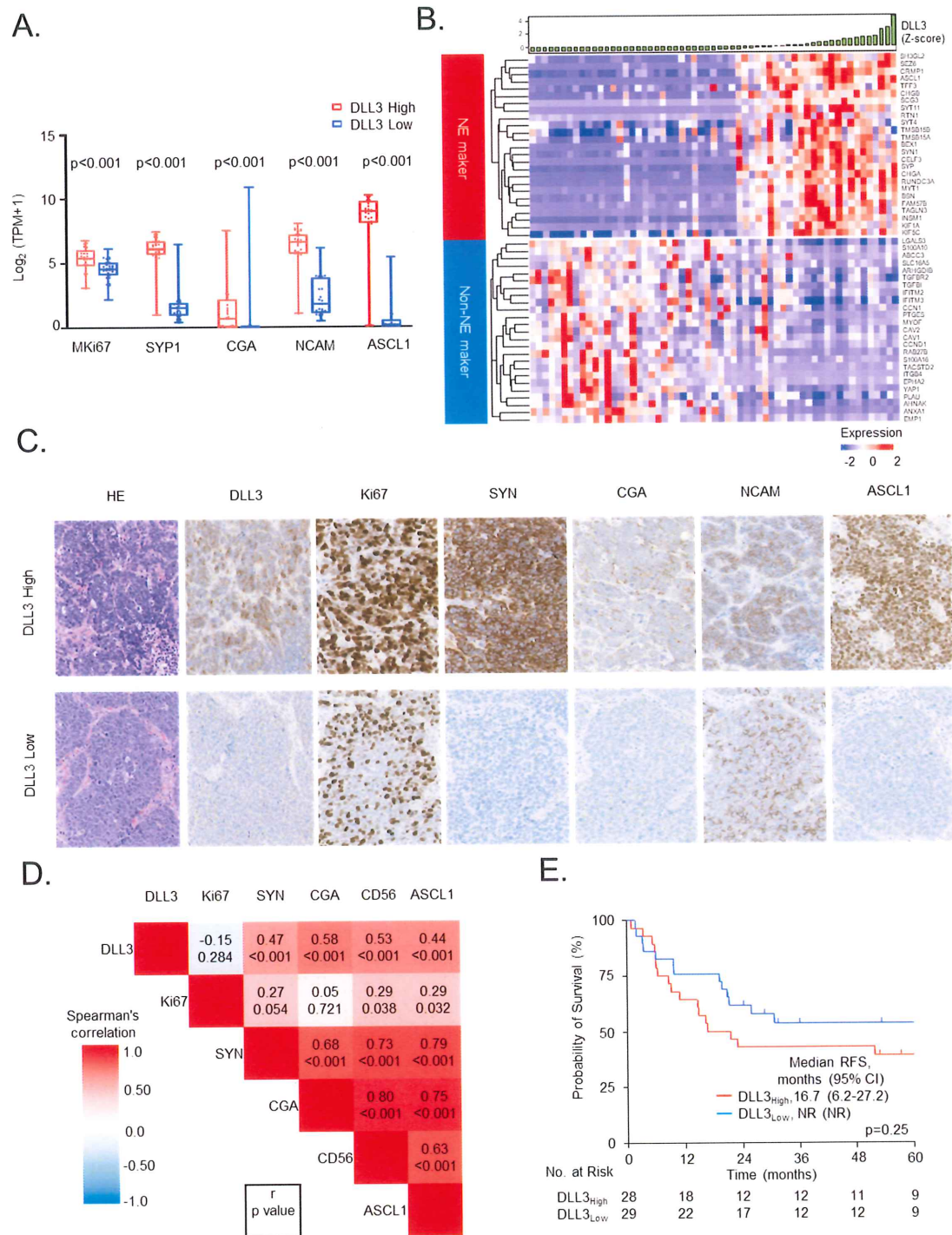


B. ES-SCLC cohort



本試験に登録された患者のコンソートダイアグラム。(A) 限局型小細胞肺癌 (LS-SCLC) と (B) 進展型小細胞肺癌 (ES-SCLC) のコホート。

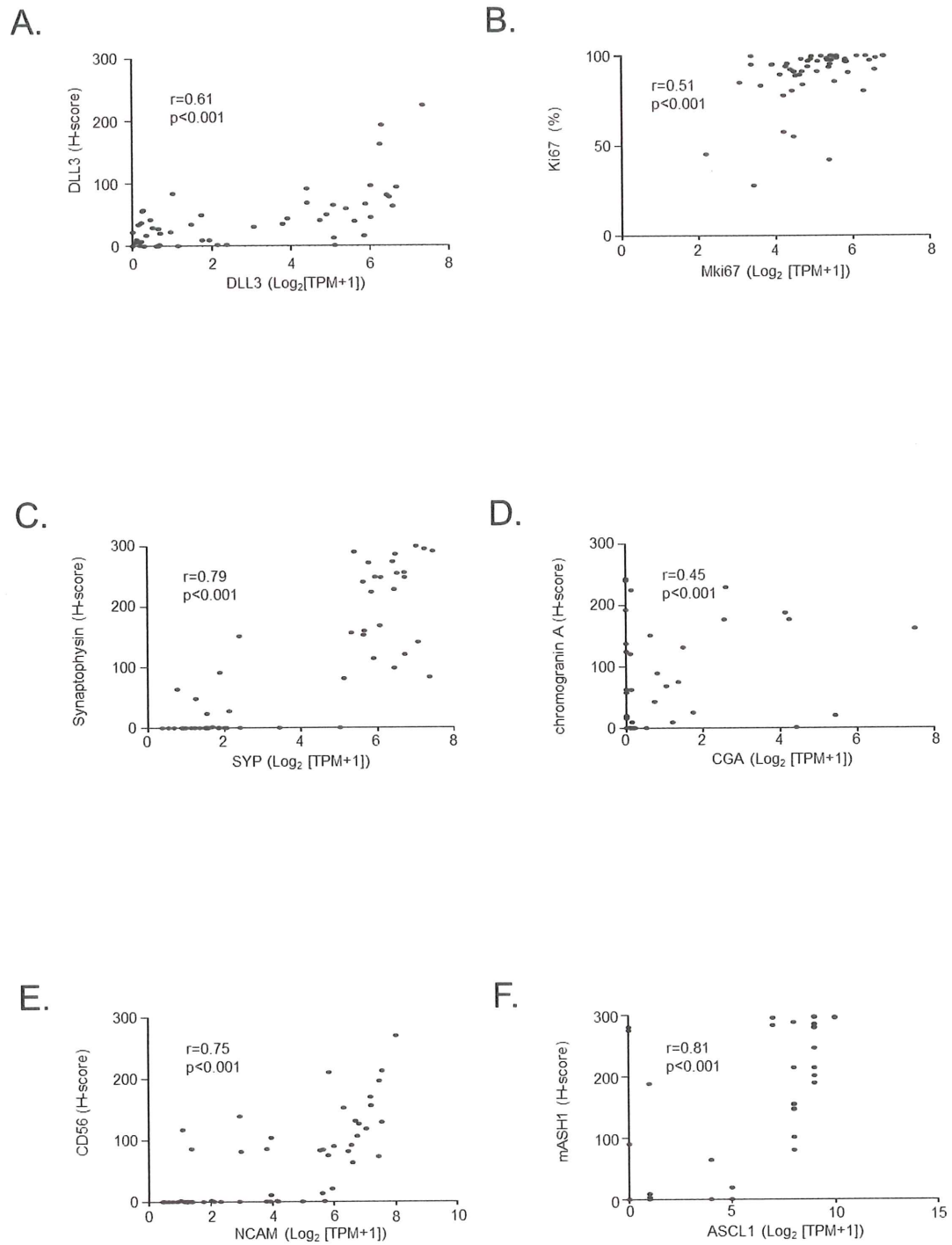
図 2.



(A) MKi67、SYP1、CGA、NCAM、ASCL1のDLL3High群とDLL3Low群との比較。
 (B) ヒートマップ：DLL3発現に応じた神経内分泌（NE）マーカーおよび非NEマーカーの発現プロファイル。
 (C) 組織像。DLL3High群とDLL3Low群の各免疫組織化学（IHC）

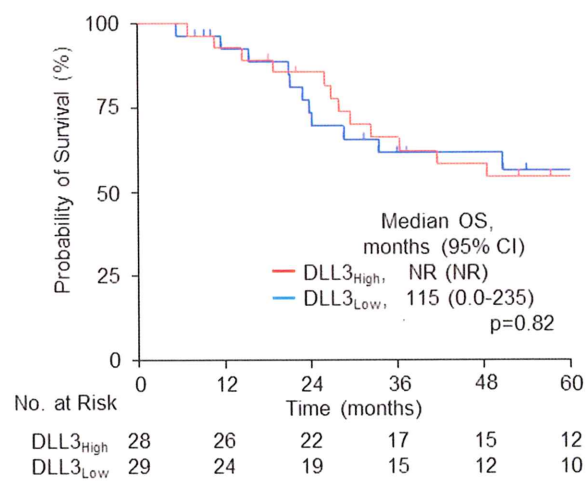
(DLL3、Ki67、synaptophysin、chromogranin A、CD56、ASCL1) の例を示す。DLL3高発現小細胞肺癌 (SCLC) (上段) は、DLL3低発現SCLC (下段) に比べ、Ki-67が高く、NE分化マーカーが高発現している (全画像、倍率40倍)。(D) IHCに基づくDLL3とSCLCマーカーとの相関。(E) DLL3発現による無再発生存率 (RFS) (DLL3High群 [赤線] とDLL3Low群 [青線])。

図 3.



免疫組織化学に基づく H スコアとトランスクリプトーム発現との関係。(A) DLL3、(B) Ki67 と MKi67、(C) synaptophysin と SYP、(D) chromogranin A と CGA、(E) CD56 と NCAM、(F) mASH1 と ASCL1

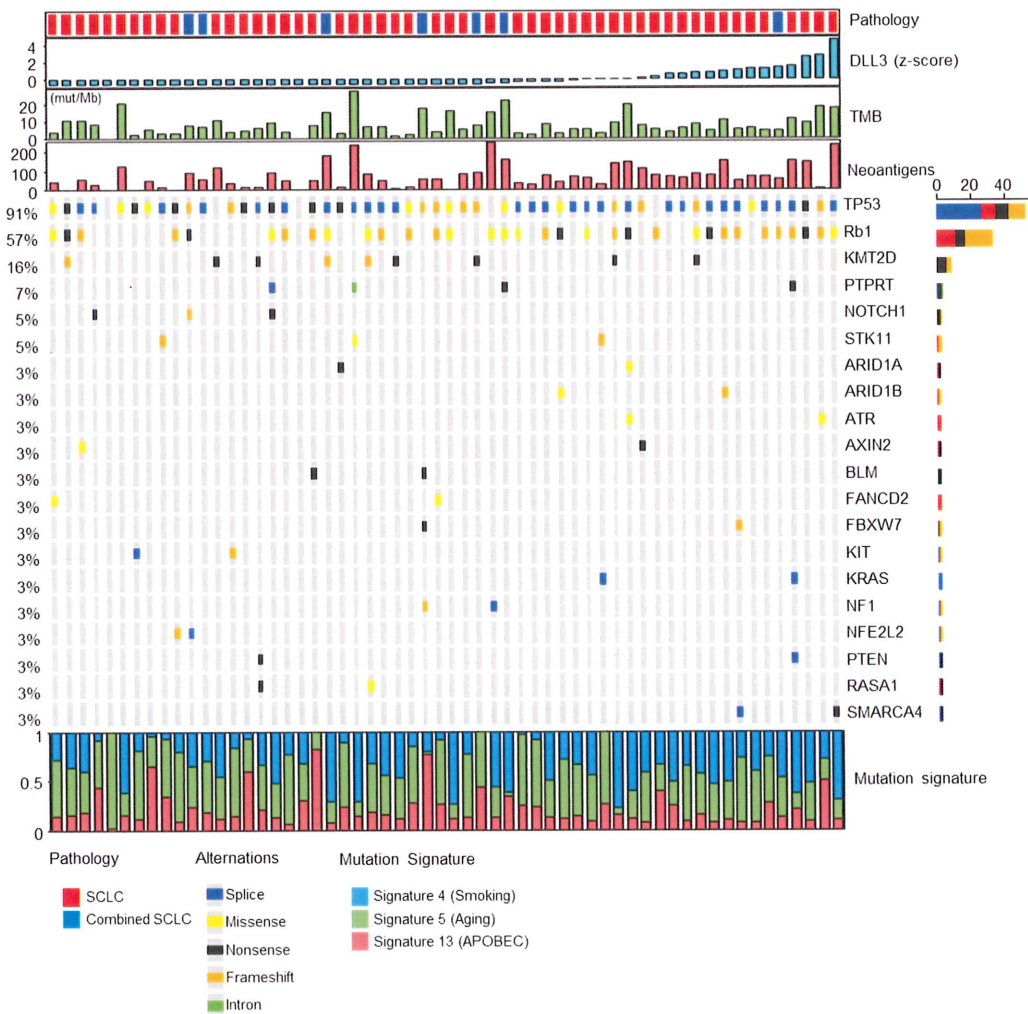
図4.



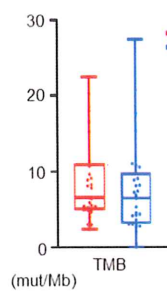
DLL3発現による全生存期間（OS）（DLL3High群〔赤線〕とDLL3Low群〔青線〕）。

図5.

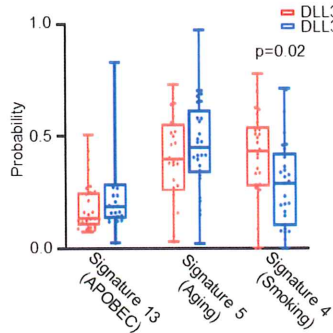
A.



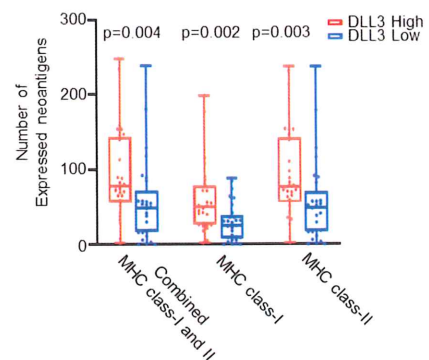
B.



C.



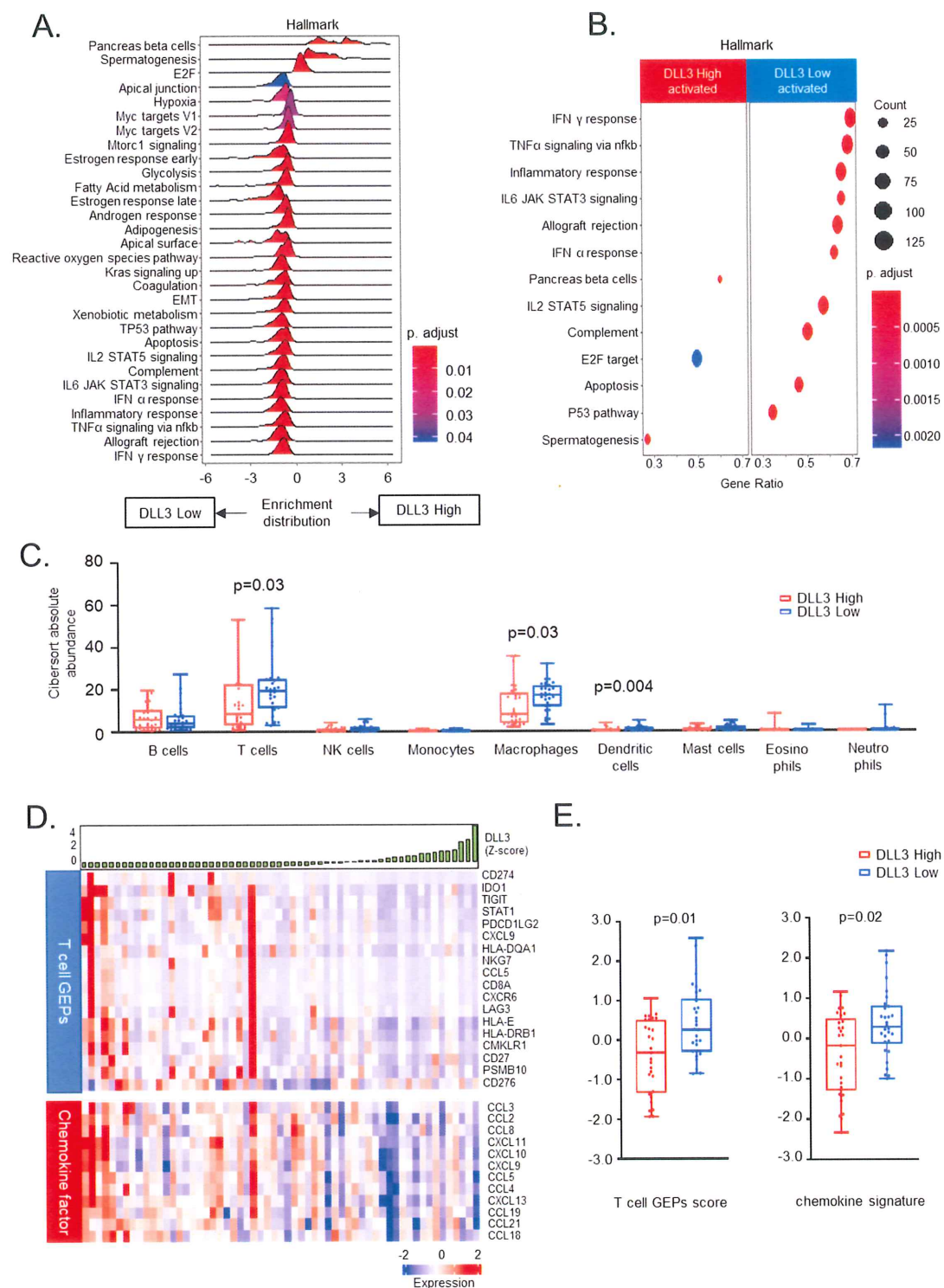
D.



(A) 3%以上の頻度を示した遺伝子変異をOncoPrintに示した。各患者の情報は、病理（小

細胞肺癌（SCLC）またはcombined SCLC)、DLL3のトランスクリプトーム発現、tumor mutation burden (TMB)、腫瘍抗原、およびMutation Signatureの割合を示した。(B-D) DLL3High群とDLL3Low群のTMB、Mutation Signatureの割合、腫瘍抗原の比較。

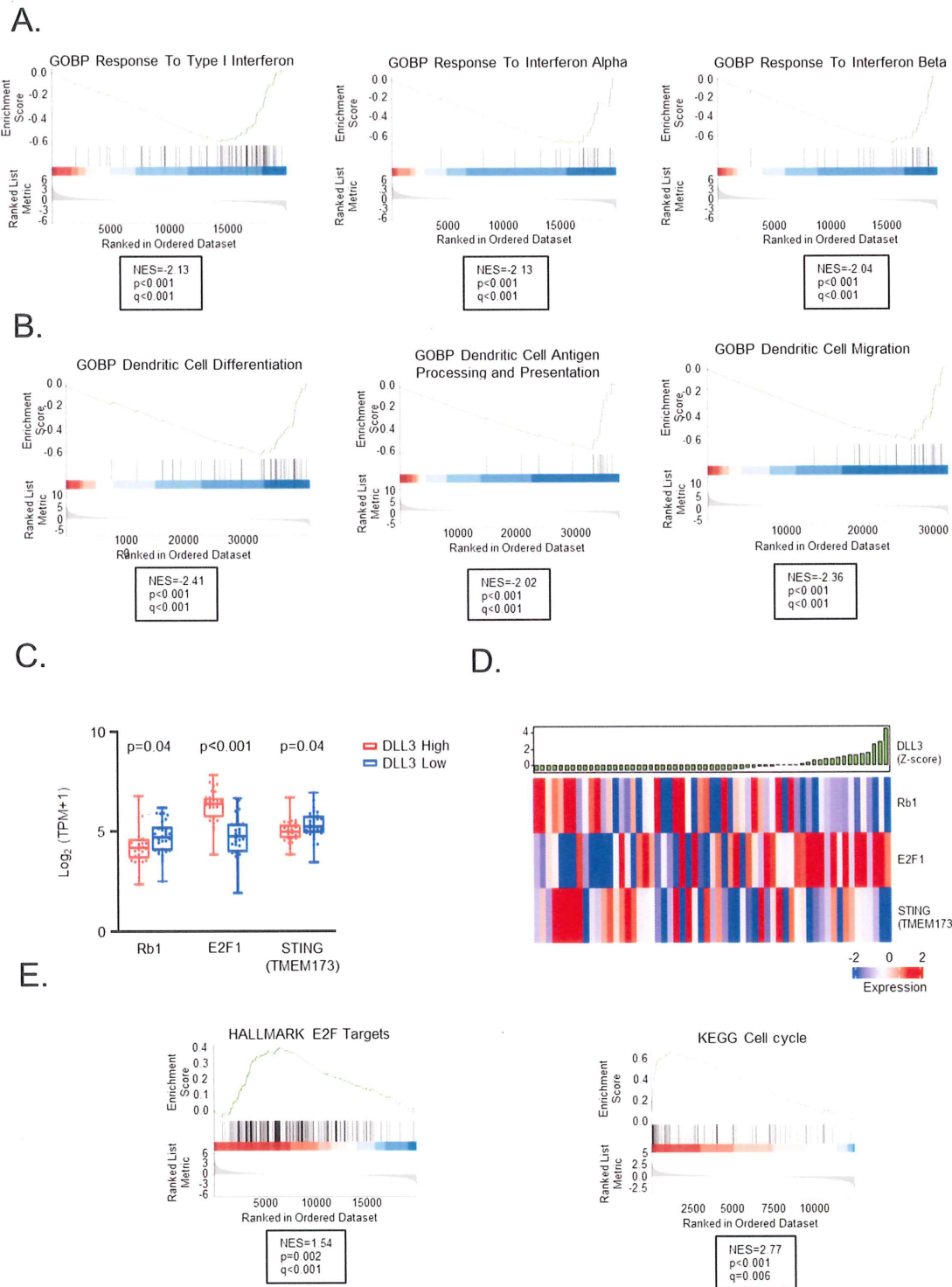
図6.



(AおよびB) 限局型小細胞肺癌コホートにおいてDLL3発現に関連するMSigDB Hallmark

遺伝子セット (adjusted $p < 0.05$)。 (A) RidgeplotはGene Set Enrichment Analysis (GSEA) に基づく normalized enrichment scoreを示す。 (B) Dot plotはGSEAに基づく gene ratioを示す。 (C) DLL3High群とDLL3Low群におけるCIBERSORTx解析。 (D) 上枠は、トランスクリプトーム発現によるDLL3発現 (zスコア) を示す。 ヒートマップ：DLL3高発現腫瘍とDLL3低発現腫瘍の18遺伝子によるT cell gene expression profiles (T Cell GEP) と12ケモカインマーカーの発現を示す。 (E) DLL3High群とDLL3Low群のT cell GEP (左図) およびケモカインシグネチャー (右図) の比較を示す。

図7.

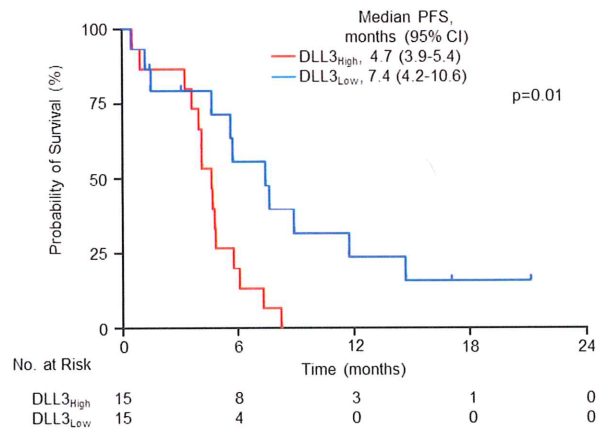


(AおよびB) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) プロットは、I型インターフェロン

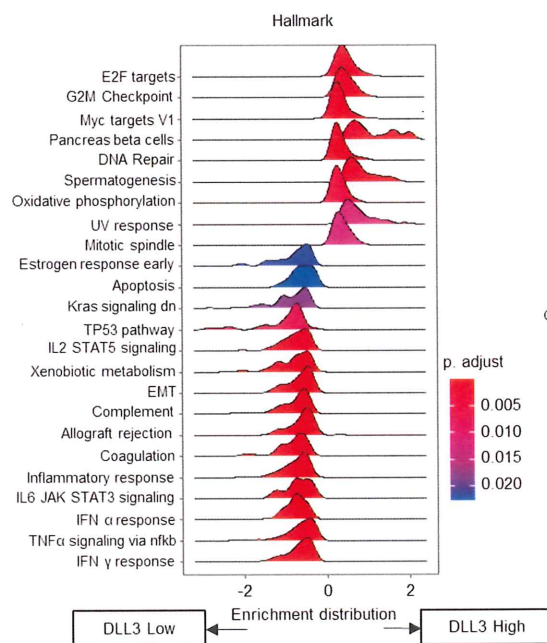
(IFN) に対する応答 (A、左)、IFN- α (A、中)、IFN- β (A、右)、dendritic cell differentiation (B、左)、dendritic cell antigen processing and presentation (B、中)、dendritic cell migration (B、右) のgene enrichment patternを、DLL3High群とDLL3Low群の間で示している。Normalized enrichment score (NES)、q値、p値をプロットに示す。(C) Rb1、E2F、STING (TMEM173) のトランスクリプトーム発現中央値のDLL3High群とDLL3Low群の比較。(D) ヒートマップ：DLL3発現に応じたRb1、E2F、STING (TMEM173) の発現を示す。(E) GSEAプロット。DLL3High群とDLL3Low群のE2F targets (E、左)、Cell Cycle (E、右) のgene enrichment patternを示す。

図8.

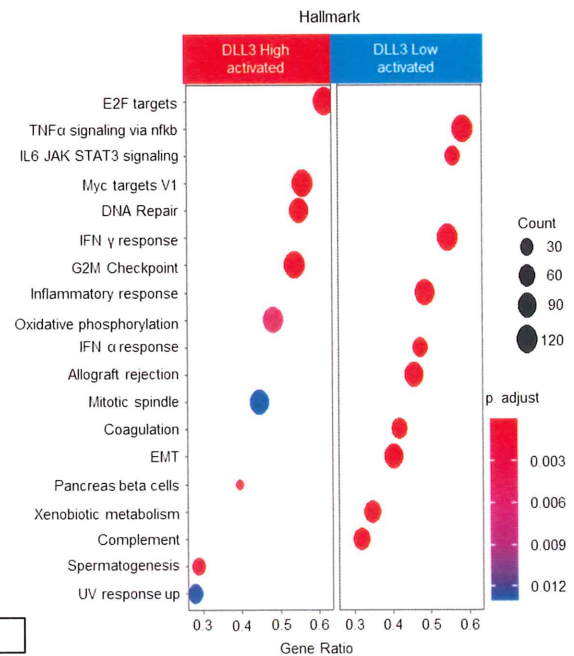
A.



B.



C.



(A) プラチナ製剤とエトポシド (PE) + 抗PD-L1抗体の無増悪生存期間 (PFS) (DLL3_{High}群 [赤線]、DLL3_{Low}群 [青線]) (BおよびC) 進展型小細胞肺癌コホートにおけるDLL3_{High}群に関連するMSigDB Hallmark遺伝子セット (adjusted $p < 0.05$)。 (B) RidgeplotはGene Set Enrichment Analysis (GSEA) に基づくnormalized enrichment scoreを示す。Dot plot (C) はGSEAに基づくgene ratioを示す。