

学位論文要旨

氏名 森 瑛子



論文題目

「麻黄のチロシンキナーゼ型受容体に対する効果の解析」

1. 非小細胞肺癌由来 H1975 細胞に発現する活性型変異を有する EGFR と c-Met に対する麻黄エキスの効果、及び、オシメルチニブとの併用効果
2. FGFR2 過剰発現胃癌由来 KATOIII 細胞に対する麻黄エキスの効果

指導教授承認印

猶木 克彦



「麻黄のチロシンキナーゼ型受容体に対する効果の解析」

1. 非小細胞肺癌由来 H1975 細胞に発現する活性型変異を有する EGFR と c-Met に対する麻黄エキスの効果、及び、オシメルチニブとの併用効果
2. FGFR2 過剰発現胃癌由来 KATOIII 細胞に対する麻黄エキスの効果

氏 名 森 瑛子

【背景及び目的】

麻黄 (Ephedra Herb) は、漢方医学で広く用いられてきた頻用生薬の一つであり、医療用漢方エキス製剤 16 品目に配合されている。日向らは、麻黄エキス (Ephedra Herb extract : EHE) がヒト乳癌由来 MDA-MB-231 細胞において肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : HGF) により誘導される c-Met のリン酸化と細胞運動を抑制することを報告した¹⁾。さらに、c-Met 過剰発現が原因でチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor : TKI) 耐性となった非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer : NSCLC) への EHE の応用を検討するため、NSCLC 由来エルロチニブ耐性 c-Met 過剰発現 H1993 細胞を用いて解析した結果、EHE は c-Met のリン酸化を阻害するだけでなく、c-Met 及び上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) をダウンレギュレーションし、エルロチニブ耐性から回復させることを明らかにした²⁾。

一方で、エルロチニブのような EGFR-TKI は、EGFR に活性型変異を有する NSCLC に対し適応になる³⁾。前述の研究で用いられた H1993 細胞の EGFR は野生型であり、活性型変異を有する EGFR を発現した NSCLC に対して、EHE が有効であるかどうかは不明であった。そこで本研究では、L858R と T790M の突然変異を有する EGFR と、c-Met を発現している NSCLC 由来 H1975 細胞を用いて⁴⁾、EHE の効果を明らかにすることにした。さらに、現在、EGFR-T790M 及び L858R 変異を有する NSCLC の患者に対し臨床的に広く使用されている第 3 世代 EGFR-TKI のオシメルチニブと EHE の併用効果の解析を行った。なお、オシメルチニブは EGFR の細胞内ドメインの ATP 結合ポケット内の Cys797 に共有結合してチロシンキナーゼ活性を阻害するが⁵⁾、オシメルチニブによる治療においても、NSCLC は耐性を獲得することが知られており、その原因の一つに c-Met の過剰発現が報告されていることから⁶⁾、オシメルチニブと EHE の併用効果の解析は重要であると考えた。

EHE は c-Met 及び EGFR のダウンレギュレーションを誘発することが報告されているが、これら以外のチロシンキナーゼ型受容体 (Receptor tyrosine kinase : RTK) に対する作用は不明である。そこで、c-Met や EGFR 以外の RTK に対する EHE の効果を検証するため、線維芽細胞増殖因子受容体 2 (fibroblast growth factor receptor 2 : FGFR2) を過剰発現している胃癌細胞株 KATOIII⁷⁾ を用いて解析した。

1. 非小細胞肺癌由来 H1975 細胞に発現する活性型変異を有する EGFR と c-Met に対する麻黄エキスの効果、及び、オシメルチニブとの併用効果⁸⁾

【方法】

〈細胞と試薬〉 H1975 細胞 : American Type Culture Collection (ATCC) (VA, USA) より購入、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を含む RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。試薬 : 抗体は Cell Signaling Technology Japan, K.K. (Tokyo, Japan)、EHE は Tsumura Co. (Tokyo, Japan)、オシメルチニブは MedChem Express Co. (NJ, USA) より購入した。

(1) H1975 細胞における活性型変異を有する EGFR と c-Met に対する EHE の効果

H1975 細胞に 100 µg/ml EHE を添加して 0~24 時間培養後、あるいは、H1975 細胞に 25~200 µg/ml EHE を添加して 4 時間培養後、c-Met、pMet (c-Met のリン酸化体)、及び EGFR、pEGFR (EGFR のリン酸化体) の発現量を、ウエスタンブロット後 ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Tokyo, Japan) を用いて解析した。

(2) H1975 細胞における活性型変異を有する EGFR と c-Met に対するオシメルチニブと EHE の併用効果

オシメルチニブ単独の効果を確認するため、H1975 細胞に 16 nM オシメルチニブを添加して 0~24 時間培養後、あるいは、H1975 細胞に 4~32 nM オシメルチニブを添加して 20 時間培養後、c-Met、EGFR 及びそのリン酸化体の発現量を解析した。続いて EHE とオシメルチニブの併用効果の解析のために、オシメルチニブを添加し 20 時間培養後、EHE またはオシメルチニブ、あるいはオシメルチニブと EHE の両方を含有する 4ml の培地を添加して 4 時間培養し、c-Met、EGFR 及びそのリン酸化体の発現量を解析した。各試薬の効果が最も強く発現する培養時間として、EHE は添加後 4 時間、オシメルチニブは添加後 20~24 時間だったことから、オシメルチニブを先に添加しておき、EHE を後から添加するというプロトコールを採用した。

(3) H1975 細胞の増殖に対する EHE の効果、及び、オシメルチニブとの併用効果

EHE の効果を解析するために、H1975 細胞を 24 時間培養し、この時点を目録 Day0 とした。Day0~4 に 0~250 µg/ml EHE を添加し、Day3 及び Day5 に Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 溶液を加え、1.5 時間培養後に生成したホルマザンの吸光度 (450 nm) を、iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で測定した。

オシメルチニブの効果を解析するために、H1975 細胞を 24 時間培養し、Day0~4 に 4~16 nM オシメルチニブを添加し培養後、CCK-8 を添加し 1.5 時間後に吸光度を測定した。EHE とオシメルチニブの併用効果を解析するために、H1975 細胞を 24 時間培養し、Day0~4 に EHE (75~250 µg/ml) とオシメルチニブ (4~16 nM) を混合し添加して培養後、CCK-8 を添加し 1.5 時間後に吸光度を測定した。

【結果及び考察】

- (1) H1975 細胞において c-Met は過剰発現しており、c-Met と EGFR は自己リン酸化されていた。100 µg/ml EHE 添加の 2 時間後から c-Met、EGFR 及びそのリン酸化体の発現量は経時的に低下し、pMet と c-Met の発現は 24 時間後に回復傾向を示した。pMet/c-Met 比は、EHE 添加後経時的に減少する傾向を示し、24 時間後に回復傾向を示したが、pEGFR/EGFR 比は変化しなかった。また、25~200 µg/ml EHE 添加の 4 時間後に、c-Met、EGFR、及びそのリン酸化体の発現レベルは、EHE の濃度依存的に減少した。pMet/c-Met 比は EHE 添加濃度依存的に有意に低下し ($p < 0.05$)、pEGFR/EGFR 比は変化しなかった。これらの結果から、EHE は活性型変異を有する EGFR もダウンレギュレーションすることが明らかになり、さらに EHE は c-Met の自己リン酸化を特異的に阻害することが示唆された。
- (2) オシメルチニブ (8 または 16 nM) を先に添加し 20 時間培養した後、EHE (150 または 200 µg/ml) とオシメルチニブ (8 または 16 nM) を添加し、さらに 4 時間培養した結果、いずれの場合も、c-Met、EGFR、及びそのリン酸化体はほとんど検出されなかった。これらの結果から、EHE はオシメルチニブが共有結合した EGFR もダウンレギュレーションすることが示唆された。
- (3) H1975 細胞の増殖に対して EHE は濃度依存的に生存率を低下させ [50% 阻害濃度 (IC₅₀): 166.6 µg/ml]、150~250 µg/ml の濃度で高い増殖抑制効果を示した。オシメルチニブは濃度依存的に H1975 細胞の生存率を低下させたが、IC₅₀ (5.54 nM) 付近の濃度で効果はほぼプラトーに達した。これは、オシメルチニブ存在下でも増殖できる細胞が一定数存在することを示唆し、この状態が続くとオシメルチニブ耐性細胞のセレクションが起きる可能性が考えられた。次に 75~250 µg/ml EHE と 4~16 nM オシメルチニブを併用すると、H1975 細胞の増殖は、150 µg/ml 以上の EHE 及び 4 nM 以上のオシメルチニブによって濃度依存的に有意に阻害された ($p < 0.05$)。よって、オシメルチニブと EHE の併用は互いの増殖抑制効果に干渉せず、オシメルチニブ耐性細胞のセレクションを防止する可能性もあり、有効であると考えられた。

【結論】

本研究により、EHE は活性型変異を有する EGFR もダウンレギュレーションすることが明らかになり、c-Met 発現 EGFR 活性型変異を有する非小細胞肺癌患者に対し EHE とオシメルチニブの併用が有効であることが示唆された。

2. FGFR2 過剰発現胃癌由来 KATOIII 細胞に対する麻黄エキスの効果

【方法】

〈細胞と試薬〉 KATOIII 細胞 : ATCC (VA, USA) より購入。20% ウシ胎児血清 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を含む IMDM 培地 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。試薬及び EHE は、前述の研究と同様のものを用いた。

(1) KATOIII 細胞における FGFR2、c-Met、EGFR に対する EHE の効果

KATOIII 細胞に 100 µg/ml EHE を添加して 0~24 時間培養後、あるいは、25~200 µg/ml EHE を添加して 4 時間培養後、FGFR2、pFGFR2 (FGFR2 のリン酸化体)、c-Met、pMet、EGFR、pEGFR の発現量をウエスタンブロットにより解析した。

(2) KATOIII 細胞の増殖に対する EHE の効果

KATOIII 細胞を 24 時間培養した後 (Day0)、75~300 µg/ml EHE を Day 0~4 に添加し、Day3 及び Day5 に CCK-8 溶液を添加し 1.5 時間培養後に、吸光度 (450 nm) を Varioskan LUX マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて測定した。

【結果及び考察】

(1) KATOIII 細胞における FGFR2、c-Met、EGFR 及びそのリン酸化体の発現量は、EHE 添加 2 時間後から経時的に低下し、24 時間後に回復傾向を示した。また、これらの発現量は EHE の濃度依存的に低下した。これらの結果から、EHE は c-Met や EGFR だけでなく FGFR2 もダウンレギュレーションすることが明らかになった。

(2) KATOIII 細胞の生存能は day3 及び day5 において、EHE の添加濃度依存的に低下した。day5 における EHE の IC₅₀ は 442.3 µg/ml と算出され、EHE は KATOIII 細胞の増殖抑制効果を有することが明らかとなった。

以上より、FGFR2 を発現したがんに対しても、EHE と標準治療との併用が有効である可能性が考えられた。今後、胃癌の標準治療薬と EHE の併用効果について検討する必要がある。

【結論】

EHE は、EGFR と c-Met 以外の RTK である FGFR2 を発現したがんの治療にも有効である可能性が示された。

【参考文献】

- 1) Hyuga S, et al. (2011) Ephedrae herba, a major component of maoto, inhibits the HGF-induced motility of human breast cancer MDA-MB-231 cells through suppression of c-Met tyrosine phosphorylation and c-Met expression. *Journal of Traditional Medicines*. 28:128–138.
- 2) Hyuga S, et al. (2020) Effect of Ephedra Herb on erlotinib resistance in c-Met-overexpressing non-small-cell lung cancer cell line, H1993, through promotion of endocytosis and degradation of c-Met. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020:1–14.
- 3) Akamatsu, et al. (2019) The Japanese Lung Cancer Society Guideline for non-small cell lung cancer, stage IV. *Int J Clin Oncol* 24:731–770.
- 4) Tang Z, et al. (2008) Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br J Cancer* 99:911–922.
- 5) Cross DA, et al. (2014) AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 4:1046–1061.
- 6) Ou SI, et al. (2016) High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression. *Lung Cancer* 98:59–61.
- 7) Kunii K, et al. (2008) FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res* 68: 2340–2348.
- 8) Mori E, et al. (2023) Effects of Ephedra Herb extract on the expression of EGFR-activating mutations and c-Met in non-small-cell lung cancer cell line, H1975, and its combined effects with osimertinib. *Journal of Traditional Medicines*. Doi: 10.1007/s11418-023-01695-w. Epub ahead of print. PMID: 37043119.