

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：32607
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07790
研究課題名（和文）麻黄による増殖因子受容体発現低下の分子メカニズム解明と耐性肺がん治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of growth factor receptors downregulation by Ephedra Herb and application to molecular target drug-resistance non-small cell lung cancer

研究代表者
日向 須美子（Hyuga, Sumiko）
北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：60353471
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：麻黄エキス（EHE）が非小細胞肺がん（NSCLC）細胞に過剰発現しているc-Metや野生型EGFRのダウンレギュレーションを誘発することを見出し、臨床において分子標的治療薬の対象となるのは活性型変異EGFRを発現したNSCLC患者であることから、活性型変異EGFRを発現するNSCLC細胞を用いてEHEの効果を解析した。EHEは活性型変異EGFRをダウンレギュレーションし、さらに活性型変異EGFRを不可逆的に阻害する分子標的治療薬・オシメルチニブとの併用では、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され、がん細胞の増殖抑制効果が有意に高くなることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：がん細胞に過剰発現したc-Met、EGFR、及び、活性型変異EGFRをダウンレギュレーションするような分子の報告はなく、EHEの作用は新規作用であると考えられる。麻黄は細胞表面に発現する分子に作用して、細胞機能の調整を行っている可能性があり、本研究は漢方薬の薬効解明の糸口になると考えられる。

社会的意義：活性型変異を有するEGFR発現NSCLCには分子標的治療薬が有効であるが、c-Metを発現すれば薬剤耐性を引き起こす。EHEは活性型変異EGFRとc-Metの両方に作用することから、再発抑制に有効な併用薬となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have found that Ephedra Herb extract (EHE) induces downregulation of overexpressed c-Met and wild type EGFR in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. Clinically, NSCLC patients who are eligible for EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment are those with detected EGFR with activating mutations. Therefore, in this study, the effect of EHE on EGFR with activating mutations was investigated. EHE induced downregulation of overexpressed EGFR with activating mutations. Moreover, we examined the combined effects of EGFR-TKI, osimertinib, and EHE, because the advanced NSCLC patients are widely treated with osimertinib which binds covalently to the kinase domain of EGFR. EHE downregulated the expression of EGFR bound by osimertinib, and the combination suppressed the proliferation of NSCLC cells more effectively than did osimertinib alone. These results suggested that this combination may be effective in treating patients with advanced NSCLC with EGFR mutation.

研究分野：薬理学

キーワード：麻黄 c-Met EGFR ダウンレギュレーション 分子標的治療薬 漢方薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)に活性型変異を生じた非小細胞肺癌(non-small-cell lung cancer: NSCLC)は、分子標的治療薬のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)が著効するが、数年後にほぼ全員がEGFR-TKIに対する耐性によってがんが再燃する。EGFR-TKI耐性の原因のひとつに肝細胞増殖因子(HGF)受容体c-Metの過剰発現がある。c-Met阻害作用を有する麻黄エキス(EHE)¹⁾とEGFR-TKIの併用は耐性NSCLCの治療に有用であると考へて、c-Met過剰発現EGFR-TKI耐性NSCLC細胞に対するEHEとEGFR-TKIの併用効果を*in vivo*及び*in vitro*において調べた結果、がんの増殖は有意に抑制された。さらにEHEはc-Metのリン酸化を阻害するだけでなく、過剰発現したc-Metや野生型EGFRの発現をダウンレギュレーションすることを見出した²⁾。臨床でEGFR-TKIの対象となるNSCLCは活性型変異を有するEGFRを発現するNSCLC患者であるが、EHEが活性型変異を有するEGFRを発現したNSCLCに有効かどうかは不明である。

2. 研究の目的

(1) EHEが活性型変異を有するEGFR発現NSCLCに有効であるのかどうかを明らかにするために、L858R及びT790M変異を有するEGFRとc-Metを過剰発現するH1975細胞を用いてEHEの有効性を検証した。

(2) EHEは過剰発現し自己リン酸化されている受容体をダウンレギュレーションするののかどうかを明らかにするため、c-Metを自己リン酸化されていない程度に発現しているMDA-MB-231細胞を用いて、EHEの作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 活性型変異を有するEGFRとc-Metを過剰発現するH1975細胞に対するEHEの効果

ヒトNSCLC由来H1975細胞はthe American Type Culture Collectionから、EHEは(株)ツムラから、オシメルチニブはMedChemExpressから購入した。抗体はCell Signaling Technology Japan, K.K.から購入した。① H1975細胞に100 µg/ml EHEを添加し0、2、4、8、24時間培養後、あるいは、25、50、100、200 µg/ml EHEを添加し4時間培養後、細胞溶解液を回収しウエスタンブロットを行った。② H1975細胞に16 nM オシメルチニブを添加し0、4、8、12、24時間培養後、あるいは、4、8、16、32 nM オシメルチニブを添加し20時間培養後、細胞溶解液を回収しウエスタンブロットを行った。③ H1975細胞に8、16 nMのオシメルチニブを添加し20時間培養し、そこに150、200 µg/mlのEHEを添加してさらに4時間培養し、細胞溶解液を回収してウエスタンブロットを行った。④ H1975細胞を24時間培養後、0、4、8、16 nMのオシメルチニブまたは0、75、150、200、250 µg/mlのEHEをday 0、2、4に添加し、Cell counting Kit-8 (CCK)を用いてday 5のH1975細胞の生存能を解析した。⑤ H1975細胞を24時間培養後、day 0、2、4に0、

4、8、16 nM のオシメルチニブと 0、75、150、200、250 $\mu\text{g/ml}$ の EHE を併用添加し、day3、5 に CCK-8 を用いて H1975 細胞の増殖を解析した。

(2) 自己リン酸化が起きない程度に c-Met 発現している MDA-MB-231 細胞に対する EFE の効果
 ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞は American Type Culture Collection より、EHE は (株) ツムラから購入した。抗体は Cell Signaling Technology Japan, K.K. から購入した。① HGF で誘導される c-Met のリン酸化に対する EHE の効果：細胞に 50 ng/ml HGF あるいは 50 ng/ml HGF と 100 $\mu\text{g/ml}$ EHE を添加し 0-24 時間後、細胞溶解液を回収し p-Met 及び c-Met 発現量をウエスタンブロット法により解析した。さらに、細胞に 50 ng/ml HGF あるいは 50 ng/ml HGF と 0.005-100 $\mu\text{g/ml}$ EHE を添加し 30 分後、細胞溶解液を回収し p-Met 及び c-Met 発現量をウエスタンブロット法により解析した。② 無血清下での EHE の効果：無血清下で細胞に 100 $\mu\text{g/ml}$ EHE を添加し 0-24 時間培養後、細胞溶解液を回収し p-Met 及び c-Met 発現量をウエスタンブロット法により解析した。また、無血清下で細胞に 0-100 $\mu\text{g/ml}$ EHE を添加し 2 時間培養後、細胞溶解液を回収し p-Met 及び c-Met 発現量をウエスタンブロット法により解析した。③ 細胞増殖に対する EHE の効果：細胞に 0-400 $\mu\text{g/ml}$ EHE を添加し、0、1、3、6 日目に Cell Counting Kit-8 を用いて細胞の生存率を測定した。

4. 研究成果

(1) 活性型変異を有する EGFR と c-Met を過剰発現する H1975 細胞に対する EHE の効果

① 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た。また、これらの発現量は EHE の濃度依存的に低下した (図 1)。よって、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となった。さらに、EHE の濃度依存的に pMet/c-Met 比が有意に低下 ($P < 0.05$) したが、pEGFR/EGFR 比は変化しなかったことから (図 1)、EHE は c-Met の自己リン酸化を特異的に阻害することが明らかになった。

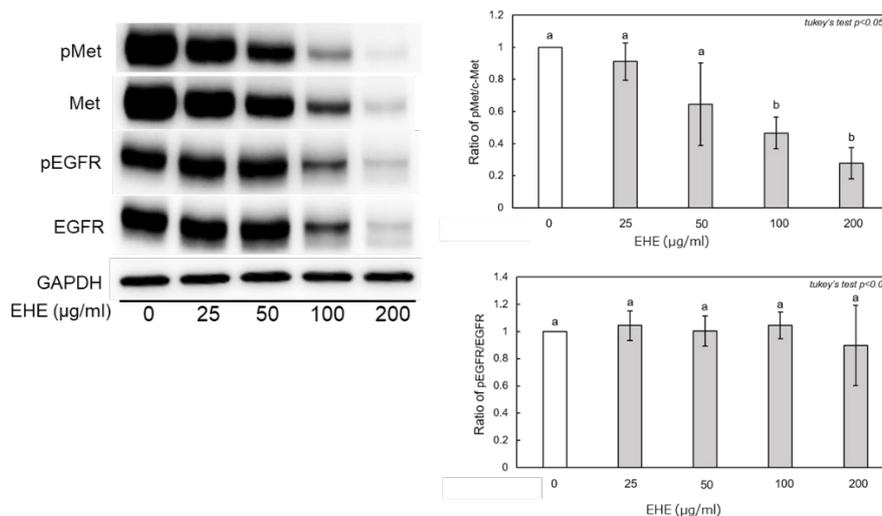


図 1 過剰発現し自己リン酸化した c-Met 及び活性型変異を有する EGFR に対する EHE の効果

② オシメルチニブの濃度依存的に EGFR の自己リン酸化は阻害され、添加後 12~24 時間で

pEGFR/EGFR 比が有意に低下した ($P < 0.05$)。

③ EHE とオシメルチニブの併用により、各々を単独で添加するよりも、c-Met、EGFR、およびそのリン酸化体の発現が効果的に抑制された。

④ 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、50%阻害濃度 (IC₅₀ : 5.54 nM) 付近の効果はほぼプラトーに達した。EHE は濃度依存的に H1975 細胞の生存率を低下させ (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。

⑤ オシメルチニブと EHE の併用による増殖抑制効果は、オシメルチニブ単独と比較して有意に高くなった ($P < 0.05$) (図 2)。

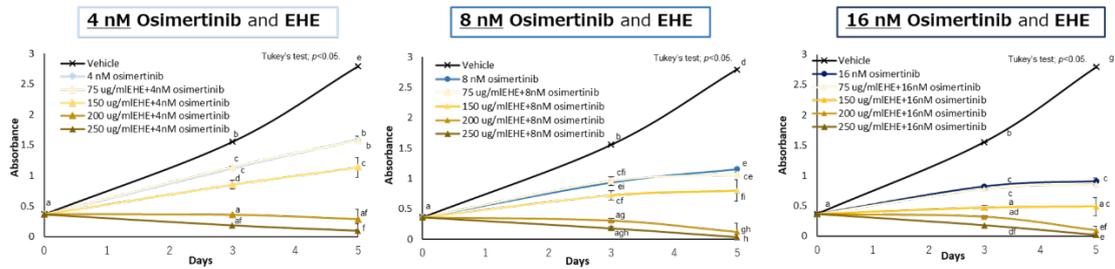


図 2 H1975 細胞の増殖に対する EHE とオシメルチニブの併用効果

以上の結果から、オシメルチニブと EHE の併用は、活性型変異を有する EGFR と c-Met を過剰発現する NSCLC 患者の治療に有用であることが示唆された³⁾。

(2) 自己リン酸化が起きない程度に c-Met 発現している MDA-MB-231 細胞に対する EHE の効果

① Control では HGF 添加 5 分後に c-Met はリン酸化され、2 時間後にはリン酸化 Met のダウンレギュレーションが起きた。一方、EHE の添加により 5 分後からリン酸化は阻害され、30 分後にはリン酸化されていない c-Met のダウンレギュレーションが誘発された。0.001-10 μg/ml EHE は、HGF で誘発されるリン酸化を濃度依存的に阻害し、50-100 μg/ml EHE はリン酸化の阻害とダウンレギュレーションを誘発した。

② 無血清下で 100 μg/ml EHE は、リン酸化されていない c-Met を経時的にダウンレギュレーションした。さらに、25-100 μg/ml EHE は濃度依存的にリン酸化されていない c-Met をダウンレギュレーションした。

③ 細胞増殖は EHE 添加濃度依存的に有意に抑制された。

以上の結果から、HGF 存在下において、低濃度の EHE は HGF で誘発されるリン酸化を抑制し、50 μg/ml 以上の EHE は c-Met のリン酸化阻害とダウンレギュレーションを誘発することが明らかになった。さらに無血清下の解析から、EHE はリン酸化されていない c-Met をダウンレギュレーションすることが確認された。

生理的な受容体のダウンレギュレーションは、受容体の細胞内ドメインのリン酸化が引き金となって惹起される。これは不要なシグナルが細胞内に入り続けることを防ぐためである。増殖因子受容体のダウンレギュレーションに異常をきたし過剰発現すると、シグナルが入り続けてがん化を引き起こすことがある。一方、EHE はリン酸化されていない c-Met をダウンレギュレ

ーションしたことから、上記の生理的なダウンレギュレーションとは異なるメカニズムを介している可能性が高い。このような現象は報告がないことから、今後、メカニズムについて解析する必要がある。

<引用文献>

- 1) 特許第5786164号, 発明の名称「麻黄を成分とするMET阻害剤」, 発明者: 花輪壽彦、日向須美子、日向昌司, 特許権者: 学校法人北里研究所、国立医薬品食品衛生研究所長, 登録日: 2015年8月7日
- 2) Sumiko Hyuga, Masashi Hyuga, Yoshiaki Amakura, Jinwei Yang, Eiko Mori, Takashi Hakamatsuka, Yukihiro Goda, Hiroshi Odaguchi, Toshihiko Hanawa, Effect of Ephedra Herb on erlotinib-resistance in c-Met-overexpressed non-small cell lung cancer, H1993 cells, through facilitation of endocytosis and degradation of c-Met, *eCAM*, vol. 2020, Article ID 7184129, 2020. doi.org/10.1155/2020/7184129.
- 3) Eiko Mori, Sumiko Hyuga, Toshihiko Hanawa, Katsuhiko Naoki, and Hiroshi Odaguchi, 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, *J Nat Med*, in press, <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01695-w>
- 4) 織田更紗, 日向須美子, 佐藤俊哉, 小田口浩, 麻黄エキスによるヒト乳がん由来MDA-MB-231細胞の c-Met のダウンレギュレーション誘発と増殖抑制, 日本薬学会第 143 年会, 2022 年 3 月 25 日～3 月 28 日, 札幌, 口頭発表

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hyuga Sumiko, Nakamori Shunsuke, Amakura Yoshiaki, Hyuga Masashi, Uchiyama Nahoko, Kobayashi Yoshinori, Hakamatsuka Takashi, Goda Yukihiro, Odaguchi Hiroshi, Hanawa Toshihiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Analgesic effects of Ephedra herb and ephedrine alkaloids-free Ephedra herb extract (EFE)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Treatments, Mechanisms, and Adverse Reactions of Anesthetics and Analgesics	6. 最初と最後の頁 385 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-820237-1.00034-X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hyuga Sumiko, Hyuga Masashi, Amakura Yoshiaki, Yang Jinwei, Mori Eiko, Hakamatsuka Takashi, Goda Yukihiro, Odaguchi Hiroshi, Hanawa Toshihiko	4. 巻 2020
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/7184129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Morio, Amakura Yoshiaki, Hyuga Sumiko, Hyuga Masashi, Nakamori Shunsuke, Maruyama Takuro, Oshima Naohiro, Uchiyama Nahoko, Yang Jinwei, Oka Hideki, Ito Hideyuki, Kobayashi Yoshinori, Odaguchi Hiroshi, Hakamatsuka Takashi, Hanawa Toshihiko, Goda Yukihiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Quality Evaluation and Characterization of Fractions with Biological Activity from Ephedra Herb Extract and Ephedrine Alkaloids-Free Ephedra Herb Extract	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 140 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huang Xuedan, Hyuga Sumiko, Amakura Yoshiaki, Hyuga Masashi, Uchiyama Nahoko, Hakamatsuka Takashi, Goda Yukihiro, Odaguchi Hiroshi, Hanawa Toshihiko, Kobayashi Yoshinori	4. 巻 301
2. 論文標題 Overlooked switch from transient sedation to sustained excitement in the Biphasic effects of Ephedra Herb extract administered orally to mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 115827 ~ 115827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2022.115827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uema Masashi, Hyuga Masashi, Yonemitsu Kenzo, Hyuga Sumiko, Amakura Yoshiaki, Uchiyama Nahoko, Mizoguchi Kazushige, Odaguchi Hiroshi, Goda Yukihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Antiviral Effect of Ephedrine Alkaloids-Free Ephedra Herb Extract against SARS-CoV-2 In Vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 534 ~ 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11020534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Eiko, Hyuga Sumiko, Hanawa Toshihiko, Naoki Katsuhiko, Odaguchi Hiroshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 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	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-023-01695-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 日向須美子	4. 巻 54
2. 論文標題 麻黄の新しい薬効の発見から新規生薬エキス・EFEの開発へ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 808-811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sumiko Hyuga
2. 発表標題 Development of ephedrine alkaloids-free Ephedra Herb extract (EFE), a novel crude drug extract with therapeutic effects against pain, cancer, and early-stage viral infections
3. 学会等名 CSPS-PSJ-CC-CRS SYMPOSIUM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日向須美子
2. 発表標題 がん転移を抑制する漢方薬の基礎研究から新規生薬エキスEFEの開発へ～基礎研究成果の臨床応用を目指して～
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日向須美子、森瑛子、花輪壽彦、小田口浩
2. 発表標題 c-Met過剰発現EGFR-TKI耐性非小細胞肺癌に対するerlotinibと麻黄の併用効果
3. 学会等名 第17回北里研究所病院研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森瑛子、日向須美子、花輪壽彦、小田口浩
2. 発表標題 非小細胞肺癌の発現する活性型変異を有するEGFRの麻黄エキスによるダウンレギュレーション
3. 学会等名 第17回北里研究所病院研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森瑛子、日向須美子、花輪壽彦、小田口浩、
2. 発表標題 EGFR活性型変異を有する分子標的治療薬耐性非小細胞肺癌由来H1975細胞に対する麻黄の効果
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mor, E., Hyuga, S, Hanawa, T., Odaguchi, H.
2. 発表標題 The combined effects of osimertinib and Ephedra Herb against H1975 cells, NSCLC cell line with EGFR-activating mutations
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 織田更紗, 日向須美子, 佐藤俊哉, 小田口浩
2. 発表標題 麻黄エキスによるヒト乳がん由来MDA-MB-231細胞のc-Metのダウンレギュレーション誘発と増殖抑制
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部附属東洋医学総合研究所 漢方臨床研究室 HP https://www.kitasato-u.ac.jp/pharm/research/laboratory/laboratory-detail/?lab_pk=1673500399
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森 瑛子 (Mori Eiko)	北里大学・大学院医療系研究科・大学院生 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------