

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590896

研究課題名(和文)c-Met阻害作用を有する漢方薬の肺がん分子標的治療への応用

研究課題名(英文)Application to molecular targeted therapy for non-small-cell lung cancer of kampo medicines having c-Met inhibitory activity

研究代表者

花輪 壽彦(Hanawa, Toshihiko)

北里大学・東洋医学総合研究所・教授

研究者番号：40164892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺がんのEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)に対する耐性が問題となっている。その原因のひとつにMet過剰発現が報告され、EGFR-TKIとMet阻害剤の併用が有効であると考えられているが、Met阻害剤は医薬品化されていない。私たちはこれまでに漢方薬の構成生薬である麻黄がMetのリン酸化を阻害することを見出している。本研究では、Erlotinib及び麻黄の併用が、Metを過剰発現しているヒト非小細胞肺がん細胞株H1993の増殖をin vitro及びin vivoで有意に抑制することを明らかにし、さらに、麻黄が過剰発現した受容体の発現そのものを低下させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) such as erlotinib have shown marked therapeutic effects against non-small-cell lung cancer with activated EGFR. However, almost the tumors acquire resistance to EGFR-TKIs after a few years. One of the mechanisms for acquired resistance is Met gene amplification. The combination of EGFR-TKI and Met inhibitor is considered to be effective against the EGFR-TKI resistant tumor, but the Met inhibitors have not yet been pharmaceuticals. We have previously clarified that Ephedra herb, a component of kampo medicines, inhibits the tyrosine phosphorylation of Met. In this study, we revealed that the combination of erlotinib and Ephedra herb prevented the growth of the EGFR-TKI resistant non-small-cell lung cancer H1993 cells in vitro and in vivo. Furthermore, we found that Ephedra herb reduced the expression levels of both Met and EGFR in H1993 cells.

研究分野：東洋医学

キーワード：漢方薬 麻黄 薬剤耐性肺がん エルロチニブ Met EGFR

1. 研究開始当初の背景

我が国のがん死亡原因の1位は肺がんであり、日本のがん死亡対策の中で最も大きなインパクトを示す¹⁾。肺がんの治療では、非小細胞肺癌患者のEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)による分子標的治療が成果を上げているが、EGFR-TKIに対する耐性が問題となっている。その原因のひとつとしてMet過剰発現が報告され、EGFR-TKIとMet分子標的治療薬の併用が有効であると考えられている。しかし、現在、Met標的治療薬は臨床試験段階であり、医薬品化されたものはない。

私たちはこれまでに、漢方薬の麻黄湯が、MET阻害作用を有することを見出した。麻黄湯は、HGFによって誘導されるMetのチロシンリン酸化を抑制することにより、がん細胞の細胞運動、細胞分散、細胞増殖を抑制した。また、麻黄湯のMet阻害作用は、構成生薬の麻黄に由来することを突き止め、麻黄がMetのチロシンキナーゼ活性を直接阻害することを明らかにした²⁾。これらのことから、麻黄を含有する漢方薬は、がんのMet標的治療薬となる可能性が極めて高く、いち早く臨床に提供できるものと期待された。

そこで本研究では、麻黄を含有する漢方薬をMet標的治療薬として非小細胞肺癌分子標的治療へ応用するために、耐性獲得非小細胞肺癌に対する麻黄とEGFR-TKI併用の効果を明らかにする。

2. 研究の目的

麻黄含有漢方薬とEGFR-TKI併用が、EGFR-TKI耐性獲得非小細胞肺癌の治療に応用可能であるかどうかを明らかにすることを目的とし、麻黄とEGFR-TKIの併用効果を詳細に解析した。

(1) EGFR-TKI耐性の非小細胞肺癌細胞株のうち、MET過剰発現細胞株を選択し、

細胞増殖に対する麻黄とエルロチニブ(製品名:タルセバ)の併用効果を明らかにする。

(2) MET過剰発現細胞株移植ヌードマウスの腫瘍増殖に対する麻黄とエルロチニブの併用効果を明らかにする。

(3) 麻黄とエルロチニブのMET及びEGFRのリン酸化に対する作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株: ヒト非小細胞肺癌細胞株(HCC827, H1993, A549, H1975)はAmerican Type Culture Collection(ATCC)より分譲された。各細胞株は10%FCS-RPMI培地で培養した。

(2) 試薬: 麻黄エキスは(株)ツムラより、ErlotinibはLC Laboratoriesより、SU11274はSigma-Aldrichより購入した。

(3) 細胞増殖: 1×10^4 個の各細胞株に種々濃度のErlotinibあるいは麻黄エキスを添加し、10%FCS-RPMI培地中で24, 48, 72時間培養した後、Cell counting kit-8(同人化学研究所)によって生細胞を検出した。

(4) Western-blotting: 各細胞のMET、リン酸化MET(pMET)、EGFR、リン酸化EGFR(pEGFR)の発現は、各分子特異的抗体(Cell Signaling Technology)を用いたWestern-blottingにより解析した。

(5) 腫瘍増殖: H1993細胞を移植したヌードマウス(チャールスリバー)に、麻黄エキス、Erlotinibi, 麻黄エキスとErlotinibiを経口投与し、腫瘍サイズ及びマウス体重を経時的に測定した。約2週間後にマウスを過麻酔下に屠殺し、腫瘍を摘出し免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

(1) Erlotinib感受性とMET発現: EGFR-TKI耐性非小細胞肺癌細胞株のErlotinibに対する感受性及びEGFR及びMet発現を解析した結果、H1993細胞はEGFR発現及びMETやpMET発現が最も高く、Erlotinibに対して耐

性を示すことがわかった (図 1)。そこで、解析には H1993 細胞を用いることにした。

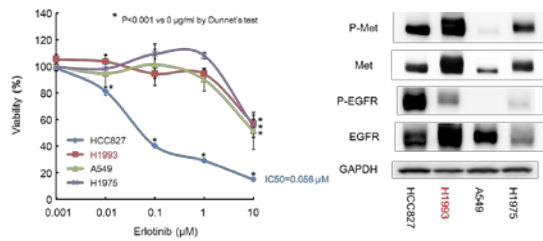


図 1. Erlotinib 感受性及び Met, EGFR の発現

(2) H1993 細胞の増殖に対する麻黄と Erlotinib の併用効果：麻黄及び Erlotinib を各々単独あるいは同時に種々の濃度で H1993 細胞に添加し、10 日後の細胞数から増殖に対する影響を解析した(図 2)。麻黄の添加によって Erlotinib に対する感受性が増加した (Erlotinib 単独の IC50: 8.6 μM、75 μg/ml 麻黄の併用で IC50: 6 μM、150 μg/ml 麻黄の併用で IC50: 1.6 μM)。麻黄の IC50 は 169 μg/ml であった。したがって、Erlotinib と麻黄の併用は有効であることが示唆された。

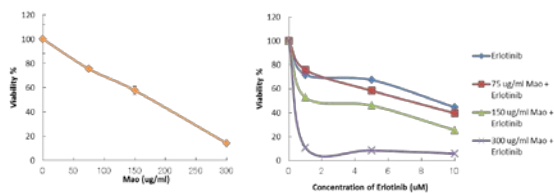


図 2. 麻黄及び Erlotinib の増殖抑制効果

(3) 腫瘍増殖に対する効果：H1993 細胞を移植したヌードマウスに、vehicle、Erlotinib (100 mg/kg、ヒトの 40 倍量)、麻黄 (350 mg/kg、ヒトの 20 倍量)、Erlotinib と麻黄を 2 週間経口投与した。Erlotinib と麻黄の併用投与マウスの腫瘍サイズは、有意に抑制された (図 3)。

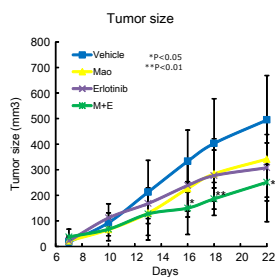


図 3. 腫瘍サイズ

また、投与 2 週間後の腫瘍重量は Erlotinib と麻黄の併用で、有意に抑制された。Erlotinib

投与マウスの体重は有意に減少したが、麻黄の併用により回復した (図 4)。

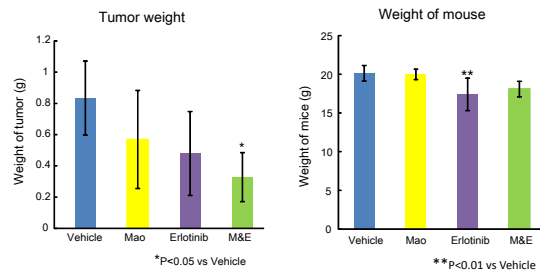


図 4 腫瘍重量及びマウスの体重

腫瘍組織の免疫組織化学染色を行った結果、Erlotinib と麻黄の併用によって、腫瘍内の MET 及び EGFR のリン酸化が低下傾向を示した (図 5)。

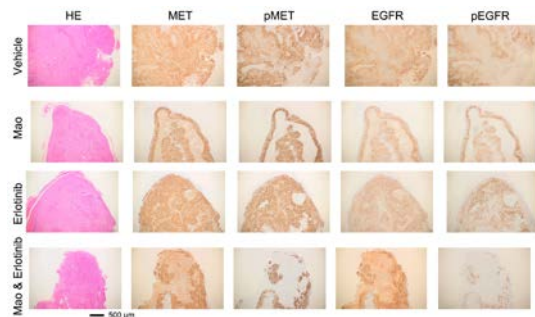


図 5 腫瘍組織の HE 染色及び免疫組織化学染色

これらの結果から、in vivo においても Erlotinib と麻黄の併用は有効であることが明らかになった。

(4) Met 及び EGFR のリン酸化に対する効果：H1993 細胞に麻黄、Erlotinib、あるいは両者を添加した後の効果を解析した。H1993 細胞は増殖因子の刺激なしで、自己リン酸化によって Met 及び EGFR がリン酸化されていた。これらのリン酸化は麻黄の添加によって抑制された。さらに、麻黄は驚くべきことに MET 及び EGFR の発現も低下させた。一方、Erlotinib は、EGFR のリン酸化を抑制しなかった (図 6A)。

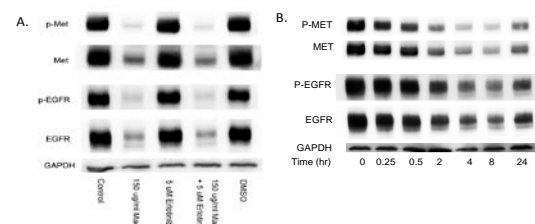


図6 Met及びEGFRの発現とリン酸化に対する効果

そこで、麻黄 (100 μ g/ml)による Met 及び EGFR の発現に対する効果を経時的に調べた。麻黄の添加 30 分後から、両受容体ともに、リン酸化とタンパク質の発現が低下し、リン酸化レベル、タンパク質レベルとも 8 時間後に最も低下した (図 6B)。また、麻黄の抑制作用は、Met に対する作用の方が顕著であった。次に、Met 阻害剤 SU11274 及び、麻黄の成分 Herbacetin の作用を解析した結果、SU11274 は Met 及び EGFR のリン酸化を抑制したが、分子そのものの発現レベルには影響を与えないことがわかった。また、Herbacetin は HGF によって誘導される Met のリン酸化を抑制するが³⁾、H1993 細胞のような自己リン酸化に対しては影響しないことがわかった(図 7)。

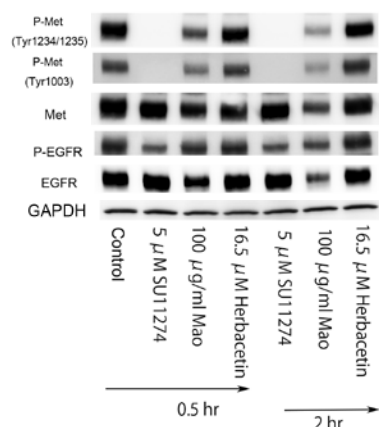


図 7. Met 阻害剤及び Herbacetin の効果

本研究結果から、麻黄は過剰発現している Met や EGFR のリン酸化だけでなく、分子そのものの発現も抑制することを初めて明らかにした。Met 阻害剤 SU11274 は、Met や EGFR の発現には影響を与えないことから、麻黄は、既存のチロシンキナーゼ阻害剤とは異なる作用を有することが示唆された。また、麻黄の成分 Herbacetin に Met や EGFR の発現低下作用がないことから、麻黄中の他の成分による作用であると予想された。

本研究により、耐性獲得非小細胞肺癌に対して、麻黄と EGFR-TKI 併用の効果が期待

されることを明らかにした。また、麻黄が過剰発現した Met や EGFR の発現を抑制する作用を有することも見出した。最近、私達は、麻黄が、過剰発現した Met のエンドサイトーシスを介したリソソームでの分解を促進することを発見した。今後、麻黄のエンドサイトーシス促進作用の分子メカニズムを解明し、増殖因子受容体を過剰発現するがんの治療へ応用していく予定である。

<引用文献>

- 1) 中山富雄, からだの科学, 270, 5-8, 2011
- 2) Hyuga, et.al, J.Trad.Med., 28, 128-138, 2011
- 3) Hyuga, et.al., Planta Medica, 79, 1525-1530, 2013

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Hyuga, S., Hyuga, M., Yoshimura, M., Amakura, Y., Goda, Y., and Hanawa, T., Herbacetin, a constituent of Ephedrae herba, suppresses the HGF-induced motility of human breast cancer MDA-MB-231cells by inhibiting c-Met and Akt phosphorylation, *Planta Medica*, 査読有, 79, 2013, 1525-1530

DOI:10.1055/s-0033-1350899

② Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Wakana, D., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa T., and Goda, Y., Characterization of Phenolic Constituents from Ephedra Herb Extract, *Molecules*, 査読有, 18, 2013, 5326-5334

DOI:10.3390/molecules18055326

③ Hyuga, S and Hanawa, T.: Basic research on the use of Kampo medicines to protect against cancer recurrence and metastasis, *J. Trad. Med.*, 査読有, 30(1), 2013, 19-26

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jtm/30/1/_contents

④ Hyuga, S., Shiraishi, M., Hori, A., Hyuga, M., and Hanawa, T., Effects of Kampo Medicines on MDR-1-Mediated Multidrug Resistance in Human Hepatocellular Carcinoma HuH-7/PTX Cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 35(10), 2012, 1729-1739

DOI:10.1248/bpb.b12-00371

[学会発表] (計 15 件)

①西村行生、日向須美子、日向昌司、伊藤和幸、花輪壽彦、麻黄は肺癌細胞において HGF 刺激後の MET endocytosis およびその分解を促進する、第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会、2015 年 7 月 23 日、24 日、シテイプラザ大阪 (大阪府・大阪市)

②日向須美子、日向昌司、大嶋直浩、丸山卓郎、袴塚高志、天倉吉章、合田幸広、花輪壽彦、エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFM) の薬理作用、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県・神戸市)

③大嶋直浩、山下忠俊、日向須美子、日向昌司、鎌倉浩之、丸山卓郎、袴塚高志、天倉吉章、花輪壽彦、合田幸広、エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFM) の製造法及びその成分組成について、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県・神戸市)

④高橋純、中森俊輔、小林義典、香川聡子、神野透人、日向昌司、袴塚高志、合田幸広、日向須美子、花輪壽彦、麻黄の capsaicin 誘発性疼痛に関する鎮痛効果、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県・神戸市)

⑤Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T.,

and Goda, Y., Characterization of phenolic constituents from ephedra herba extract, 第 27 回国際ポリフェノール会議、2014 年 9 月 2 日～9 月 6 日、名古屋大学豊田講堂・シンポジオン (愛知県・名古屋市)

⑥日向須美子、日向昌司、天倉吉章、合田幸広、花輪壽彦、Herbacetin の TrkA リン酸化阻害を介した神経突起伸張抑制作用及び疼痛抑制効果、第 131 和漢医薬学会学術大会、2014 年 8 月 30 日～8 月 31 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市)

⑦日向須美子、日向昌司、好村守生、天倉吉章、合田幸広、花輪壽彦、Herbacetin による Met 及び Aurora kinase B のキナーゼ活性阻害を介した抗腫瘍効果、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日～3 月 30 日、熊本大学 (熊本市・熊本県)

⑧ Sumiko Hyuga, Masashi Hyuga, Yoshiaki Amakura, Yukihiro Goda, and Toshihiko Hanawa, Herbacetin in Ephedra Herb suppresses motility and growth of cancer cells through inhibition of Met and Aurora kinase B, The 72nd Annual Meeting of Japanese Cancer Association, 2013 年 10 月 3 日～10 月 5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑨日向須美子、日向昌司、天倉吉章、合田幸広、花輪壽彦、麻黄の活性成分・Herbacetin によるがん細胞の運動能、増殖、及び腫瘍増殖の抑制、第 30 回和漢医薬学会学術大会、2013 年 8 月 31 日～9 月 1 日、金沢大学 (石川県・金沢市)

⑩ Sumiko Hyuga, Masashi Hyuga, Yoshiaki Amakura, Yukihiro Goda, and Toshihiko Hanawa, Herbacetin, a biologically active

constituent in Ephedrae herba, suppresses the HGF-induced motility of human breast cancer cells through inhibition of c-Met phosphorylation, The 64th annual meeting of the Japan Society for Oriental Medicine, 3rd Academic Meeting of Global Research Network for Traditional Medicine (GRNTM), May 31, 2013, 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)

⑪ 日向須美子、日向昌司、天倉吉章、合田幸広、花輪壽彦、がん転移抑制効果を有する漢方薬の基礎研究から導き出された活性成分のユニークな薬理作用と臨床応用への可能性、日本薬学会第 28 年会 特別企画シンポジウム 4「今日の漢方治療」、2013 年 5 月 25 日、ウインク愛知 (愛知県・名古屋)

⑫ 日向須美子、日向昌司、好村守生、天倉吉章、合田幸広、花輪壽彦
癌細胞の HGF-c-Met シグナルを阻害する麻黄の活性成分・Herbacetin、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日(水)～3 月 30 日(土)、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑬ 日向須美子、白石真純、日向昌司、花輪壽彦、薬剤耐性がん細胞の抗がん剤に対する感受性を回復させる漢方薬、第 69 回日本東洋医学会関東甲信越支部学術総会、2012 年 10 月 2 日、横浜崎陽軒本店 (神奈川県・横浜市)

⑭ 日向 須美子 (オーガナイザー&シンポジスト)、漢方薬によるがんの再発・転移防止療法をめざして～基礎研究から臨床応用へ～、第 29 回和漢医薬学会学術大会シンポジウム 1「和漢医薬学とがん」、2012 年 9 月 1 日、北里大学 (東京都、港区)

⑮ 日向須美子、白石真純、日向昌司、合田幸広、花輪壽彦、c-Met 発現ヒト癌細胞の HGF

により誘導される細胞運動、細胞分散、及び細胞増殖に対する麻黄湯の抑制効果、
日本薬学会 132 年会、2012 年 3 月 28 日-31 日、北海道大学 (北海道、札幌市)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキスと、その製法及び用途

発明者：花輪壽彦、日向須美子、合田幸広、日向昌司、他 3 名

権利者：学校法人北里研究所国立医薬品食品衛生研究所所長、立崎仁

種類：特許

番号：PCT/JP/ 2014/80605

出願年月日：2014 年 11 月 19 日

国内外の別： 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/touei-ken/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花輪 壽彦 (HANAWA, Toshihiko)

北里大学東洋医学総合研究所・教授

研究者番号：4 0 1 6 4 8 9 2

(2) 研究分担者

日向 須美子 (HYUGA, Sumiko)

北里大学東洋医学総合研究所・室長補佐

研究者番号：6 0 3 5 3 4 7 1

(3) 連携研究者

日向 昌司 (HYUGA, Masashi)

国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

研究者番号：5 0 2 5 1 6 5 8