

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on EGFR- or fusion gene-driven lung cancer cells

(上皮成長因子受容体活性型変異及び融合遺伝子活性型変異を有する肺癌細胞における EGCG の効果)

本多宣裕、瀧川奈義夫、市原英基、二宮 崇、久保寿夫、越智宣昭、八杉昌幸 村上斗司、山根弘路、谷本光音、木浦勝行

Acta Medica Okayama (掲載予定)

平成 25 年 4 月 第 104 回 米国癌学会発表

平成 29 年 4 月 第 57 回 日本呼吸器学会学術講演会発表

# 主 論 文

Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on EGFR- or fusion gene-driven lung cancer cells

(上皮成長因子受容体活性型変異及び融合遺伝子活性型変異を有する肺癌細胞における EGCG の効果)

## [緒言]

茶は世界で最もポピュラーな飲料であり、茶の木はツバキ科に属している。茶に含まれるカテキンにはエピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートの4種類があり光学異性体を含めると計8種類が存在している。これらのカテキン類の中で生理活性作用が最も強力であるのがエピガロカテキンガレート (EGCG) である (Fig. 1)。肺腺癌には様々なオンコジーンドライバが存在し、それに対する分子標的薬が開発されている。その中でも2002年、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) チロシンリン酸化酵素阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) であるゲフィチニブによる劇的な治療効果が報告されたが、その詳細な作用機序は不明であった。2004年に Lynch らによって EGFR タンパクのチロシンキナーゼドメインの変異がゲフィチニブの著効した非小細胞肺癌患者に多く認められ、*in vitro*の実験においてもその感受性との関連性が報告された。EGFR-TKI は、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に対して著効するものの、約10ヵ月程度で耐性化することが知られている。その耐性機序の約50%がEGFRのエクソン20の2次変異 (T790M 変異) である。我々は、EGFR 遺伝子変異を有しEGFR-TKI に対し高感受性である肺腺癌細胞株 (PC-9) と EGFR-TKI 耐性株の (RPC-9、H1975) および活性型融合遺伝子を有する肺癌細胞株 (H2228、HCC78) に対するEGCGの効果を検討した。

## [材料と方法]

### 細胞株

PC-9 はEGFR 遺伝子のエクソン19欠失変異を有するヒト非小細胞肺癌細胞株である。RPC-9 は我々の研究室で樹立した T790M 変異を獲得した耐性株であり、親株である PC-9 と比較してゲフィチニブに約400倍の耐性をもっている。H1975は活性型変異であるL858R変異にT790M耐性化変異を有するEGFR-TKI耐性株である。H2228はEML4-ALK融合遺伝子を、HCC78はSLC34A2-ROS1融合遺伝子を有する細胞株である。

### 感受性試験

薬剤感受性試験はMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイ法により、50%増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を決定した。

### ウェスタンブロット法

細胞株をRIPAバッファーにて溶出し、遠心分離にてタンパクを抽出した。SDS-PAGEゲルにて泳動分離を行い、ニトロセルロース膜へ転写後に特異抗体で免疫しHRPを介した化学発光を用いて各タンパクの発現を検出した。

### 異種移植片モデル

メスの6週齢のBALB/c nu/nuマウスの背部に $2.0 \times 10^6$ 個のPC-9、RPC-9、H1975、H2228、およびHCC78細胞を皮下に移植し、コントロール群 (水投与群) とEGCG (0.5%) 投与群による比較を行った。腫瘍抑制効果の判定には、定期的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積の計測には「腫瘍体積 = 長径 × 短径<sup>2</sup> / 2」の近似式を用いた。また、全ての動物実験は岡山大学動物資源部門のガイドラインを遵守し、岡山大学動物実験委員会の許可と指導に基づいて行った。

## 免疫組織化学染色

BALB/c nu/nuマウスの背部に移植し腫大した組織を採取した。血管内皮に広く存在するCD31に対する抗体を用い、切片をヘマトキシリン-エオジン染色で対比染色した。3つの組織を選択し各組織の10か所をランダムに選択し200倍率でCD31陽性血管を計測し、それぞれの血管数を平均してコントロール群とEGCG群とで比較を行った。

## 統計解析

各群間の比較にはStudent's t検定を用いた。

## **[結果]**

### EGCG感受性とシグナル

5つの細胞株のIC<sub>50</sub>は22~57 μMとEGCG感受性は同等であった。ウェスタンブロット法にてEGFR、ALK、ROS1とその下流シグナルの評価を行った。EGCG(50 μM、100 μM)を負荷することによってPC-9ではEGFRのリン酸化およびその下流シグナルが抑制された。またT790M変異をもつEGFR-TKI耐性株(RPC-9、H1975)に対してもEGFRの下流シグナルは抑制された。同様に融合遺伝子をもつH2228とHCC78においても、EGCGはALKとROS1のリン酸化およびその下流シグナルを抑制した(Fig. 2A、B)。

### 異種移植片モデルでのEGCGによる腫瘍抑制

異種移植片モデルにおいて、PC-9およびそのEGFR-TKI耐性株(RPC-9、H1975)においてEGCG群はコントロール群と比較して有意な腫瘍縮小効果を示した。また、H2228とHCC78においてもEGCG群はコントロール群と比較し有意に腫瘍縮小効果を確認した(Fig. 3)。これらすべての細胞株で、0.5%EGCG群とコントロール群の間で有意な体重減少は認められなかった(Fig. 4)。これらの実験から、*in vivo*においてもEGCGはこれらドライバー遺伝子を有する肺癌細胞株に対して抗腫瘍効果が認められた。

### 異種移植片モデルの腫瘍組織を用いた新生血管阻害

次に異種移植片モデルに使用した細胞株5種の腫瘍組織を用いてEGCGによる血管新生阻害作用を検証した。腫瘍組織のCD31陽性血管数(リング状に染色された血管を一つと判定)を計測し、コントロール群とEGCG群での陽性数を比較した。いずれの細胞株においてもCD31陽性血管はEGCG群で有意に減少していた(Fig. 5A、B)。さらにこれらの肺癌細胞株を用いて低酸素誘導因子(HIF-1α)の抑制効果を検証した。HIF-1αは腫瘍の急速な増大による組織内の低酸素状態により活性化され、血管新生を促進すると考えられているが、HIF-1αの発現はEGCG群で有意に抑制されていた。(Fig. 6)

## **[考察]**

本研究において、EGCGがEGFR、ALKおよびROS1依存性の細胞増殖を抑制することを示した。また、T790M変異を有するEGFR-TKI耐性細胞においてもEGCGの増殖抑制効果が認められた。T790M変異を有するEGFR-TKI耐性肺癌には、オシメルチニブが近年承認されたものの、その他に有効な治療選択肢が無いのが現状である。そのような患者にもEGCGが良い適応となる可能性ある。クリゾチニブ耐性のALK陽性肺癌に対してもセリチニブが臨床的に使用可能となったが、EGCGはそのような患者にも有効である可能性がある。異種移植片モデルでのEGCGの腫瘍増殖抑制効果は、HIF-1α抑制に基づく血管新生阻害によることが示唆された。EGCGによる血管新生阻害にはHIF-1αの他にも、VEGFR、METあるいはFGFRなどの抑制によるメカニズムが想定されている。EGCGは、EGFRへのEGFの結合を阻害すること、EGCGが細胞膜構成を変化させEGFRの二量体化および活性化を阻害すること、あるいはEGFRの細胞膜の弾性変化に影響を与えることなどが報告されており、今後の検討課題である。

## **[結論]**

EGFR 遺伝子変異を有する PC-9、RPC-9 および H1975、ALK 融合遺伝子を有する H2228、および ROS1 融合遺伝子を有する HCC78 細胞において、EGCG は同等の感受性を示した。異種移植片モデルにおいて、EGCG は HIF-1 $\alpha$  に起因する血管新生を抑制することにより増殖抑制効果をもたらしたと考えられた。分子標的薬に耐性化した肺癌に対する EGCG の効果について、さらに研究を進めていきたい。