

博士論文

論文題目 増殖因子受容体アダプター蛋白 FRS2 β による
癌幹細胞とニッチ制御の分子機構

氏 名 町田 雪乃

目次

要旨	3
略語表	5
序文	7
材料と方法	13
結果	26
考察	34
謝辞	40
参考文献	41
図	46

要旨

癌幹細胞が、癌組織全体を作る元になっているという「癌幹細胞説」が注目されている。受容体チロシンキナーゼシグナルの主要な経路の一つは、ERK を活性化する経路である。我々は、これまでに FRS2 β アダプターが、細胞内で活性化した ERK と結合して、ERK の核移行を阻害するため、ErbB-ERK 経路をフィードバックして抑制する因子であることを示してきた。今回、FRS2 β ノックアウトマウスを作製し、ErbB2 の過剰発現により乳癌を発症する MMTV-neu マウスとの掛け合わせを行い、ErbB2-ERK 経路の過剰な活性化の影響を調べた。その結果、FRS2 β ノックアウトマウスに発症した乳癌は、増殖が遅く、野生型マウスの方が早く死亡した。このことより、FRS2 β が ErbB2 誘導乳癌の発癌において重要な役割を果たしていることが示唆された。実際に、FRS2 β ノックアウトマウスにおいて乳癌細胞の sphere 形成率が下がっていることから、FRS2 β による ErbB の過剰発現の抑制が乳癌幹細胞の維持に必要であることが示唆される。FRS2 β は正常乳腺の腺上皮細胞においてごくわずかに発現している。FACS 解析により、ノックアウトマウスでは乳腺上皮前駆細胞を含む CD24^{high}CD49f⁺細胞分画が減少していた。さらに、FRS2 β ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して乳腺細胞の sphere 形成率が下がっていた。Sphere のマイクロアレイ解析と GSEA 解析により、FRS2 β ノックアウトマウスで幹細胞シグネチャーの低下とインターフェロンシグネチャーの低下、MEK-ERK 経路のシグネチャー上昇がみられた。さらに qRT-PCR により FRS2 β ノックアウトマウスでは IGF1、CXCL12、CCL3 など自己複製やニッチ形成に関わる遺伝子発現の低下、Cytokeratin 8、Cytokeratin 18、Cytokeratin 14 など分化した乳腺細胞に発現する中間径フィラメントの発現上昇が認められた。IGF1、CXCL12、CCL3 は FRS2 β ノックアウトマウスの癌

細胞においても発現低下していた。さらに、FRS2 β ノックアウトマウスでは ErbB2 過剰発現により発症した乳癌で癌関連線維芽細胞の量が少ない傾向にあり、癌幹細胞による炎症性ニッチの形成が出来にくくなったことが示唆された。

そして、ヒト乳癌患者の癌幹細胞分画において FRS2 β がより強く発現していた。以上より、FRS2 β を発現している乳腺前駆細胞が乳癌幹細胞に転換し、乳腺前駆細胞だけでなく癌幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが示唆される。乳癌幹細胞が維持されるためには、ErbB2-ERK 経路が、適度なレベルに調整されることが重要であることがわかった。

略語表

CAF: cancer-associated fibroblast

CCL3: chemokine (C-C motif) ligand 3

CK: cytokeratin

CXCL12/ SDF-1: C-X-C motif chemokine 12 / stromal cell-derived factor 1

EGF: epithelial growth factor

ER: estrogen receptor

ErbB2: v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FGF: fibroblast growth factor

FGFR: fibroblast growth factor receptor

FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2

Grb2: growth factor receptor bound protein 2

HER: human epithelial growth factor receptor

IGF1: insulin-like growth factor-1

IGF1R: insulin-like growth factor-1 receptor

IHC: immunohistochemistry

KO: knock out

MMTV: mouse mammary tumor virus

Neu: neuro/ glioblastoma derived oncogene homolog

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

pIGF1R: phosphorylated insulin-like growth factor-1 receptor

PBS: phosphate buffered saline

PR: progesterone receptor

SH2: src homology 2 domain

SOS: son of sevenless homolog

WT: wild type

序論

癌幹細胞説

癌幹細胞説は急性骨髄性白血病やその他固形癌（乳癌、骨肉腫、膠芽腫）において提唱された（Bonnet et al., 1997; Kondo et al., 2004; Al-Hajj et al., 2003）。癌幹細胞は高い腫瘍形成能、癌幹細胞から非癌幹細胞を生み出す階層性、自己増殖能を有する細胞であると定義される（図 1A）。また、癌幹細胞は比較的増殖能が低い上にストレス抵抗性であるので、増殖能の高い腫瘍細胞を標的とした化学療法や放射線療法に抵抗性をもつとされる（Kondo et al., 2004; Reya et al., 2001）。近年この癌幹細胞を標的とした抗癌剤治療の研究が盛んに行なわれているが、未だにブレイクスルーとなる治療は開発されていない。

正常組織幹細胞および癌幹細胞は sphere という浮遊細胞塊に濃縮される（図 1B）。低接着性ディッシュを用い無血清培地で培養することで sphere という細胞の塊ができ、その中に正常幹/前駆細胞および癌幹細胞が濃縮されているために幹細胞指標として広く用いられている（Alison et al., 2011）。

また癌幹細胞は自己の増殖のためにニッチ（癌幹細胞を取り囲む微小環境。ゆりかごに例えられる）を形成する（図 1C）。癌幹細胞は血管新生をおこない酸素の取り入れ、筋線維芽細胞（癌関連線維芽細胞）を骨髄や肝臓から呼び寄せ共に増殖することが報告されている（Littlepage et al., 2005; Wever et al., 2008; Chen et al., 2014）。

現時点では乳癌のような固形癌において、どのようなメカニズムによって癌幹細胞が発生し、増殖能を獲得するのか不明な点が多い。また、どのようなメカニズムによってニッチが癌幹細胞の増殖に関与するのか、未だ不明な部分が多い。

これらを明らかにすることが、癌幹細胞を標的とした癌を根治させる治療法を開発す

るためには重要であると考えられる。

受容体型チロシンキナーゼとシグナル伝達

EGF、FGF 受容体は、増殖因子をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼで、細胞内にチロシンキナーゼドメインを有し、受容体そのものの自己リン酸化や、下流のシグナル伝達分子のチロシン残基をリン酸化することでシグナルを伝達し、細胞の増殖・分化・アポトーシスを制御する。EGF、FGF 受容体は、リガンドが結合することにより二量体となる。チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化部位には、SH2 ドメインをもつシグナル伝達分子が結合する。SH2 ドメインをもつ Grb2 には恒常的に SOS が結合しており、受容体の自己リン酸化部位に Grb2 が結合することにより細胞膜近傍へ SOS がやってくると、Ras がもつ GDP を GTP に変換し、Ras シグナルを活性化する。Raf 以下は MEK-ERK 経路などのリン酸化カスケードが活性化し、核内の転写が促進される。FGF 受容体には、Grb2 が FRS2 などのドッキング蛋白質を介して結合する。増殖因子の刺激により ERK1/2 が活性化され、c-myc などの転写制御因子や、MNK1 などのプロテインキナーゼのセリン/スレオニン残基がリン酸化され、遺伝子発現変化などを伴って細胞応答が起こる。

EGF 受容体には EGF 受容体/ErbB1/HER1、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3、ErbB4/HER4 の 4 種類がある。なかでも ErbB2 と ErbB3 は特徴的な構造を有している。ErbB2 は増殖因子結合部位を持たないが酵素活性を有する。一方、ErbB3 は増殖因子結合部位をもつが酵素活性を持たない。ヒトの乳癌では約 20% で ErbB2/HER2 過剰発現がみられる。ErbB2 が過剰発現することにより様々なヘテロダイマーを形成するが、ErbB-1/3/4 と ErbB2 の組み合わせのうち ErbB2-ErbB3 のヘテロダイマーにより活性化するシグ

ナルが最も強いと考えられている。HER2 遺伝子の増幅およびそれに伴う受容体型チロシンキナーゼの過剰発現はヒト悪性乳癌の予後と相関する (Andrulis et al., 1988)。

受容体型チロシンキナーゼのアダプター蛋白 FRS2 β

FRS2 ファミリーは FRS2 α /FRS2/SNT1 と FRS2 β /FRS3/SNT2 の二つのメンバーからなる FGF 受容体チロシンキナーゼに結合するアダプター蛋白である (図 2A)。FRS2 β はヒトでは 6 番染色体、マウスでは 17 番染色体に存在する。FRS2 α と FRS2 β は 49% のシーケンス相同性がみられ、N 末端にミリスチル基で細胞膜に結合し、リン酸化チロシン結合 (PTB) ドメインを有し、受容体型チロシンキナーゼと結合する。FRS2 α と FRS2 β は PTB ドメインを介して EGF 受容体に結合し、Ras/ERK シグナルと PI-3 キナーゼ経路を活性化する (Hadari et al., 2001)。FRS2 α にはない FRS2 β 特有の機能として、FRS2 β は ERK 結合ドメインを有し、リン酸化した ERK の CD ドメインを介して結合し、PTB ドメインを介して EGF 受容体ファミリーに属する EGF 受容体、ErbB2 及び ErbB3 と結合することで ERK の核移行を抑制し、細胞増殖を抑制する (図 2B、Iejima et al., 2010) (Minegishi et al., 2013)。

マウス胎児において、胎齢 8.5 日以降、FRS2 α はほとんどの組織に広く発現するが、FRS2 β は胎齢 10.5 日まで発現せず、胎齢 11.5 日以降になると神経上皮と神経節に発現を認めるようになる。FRS2 β は胎齢 14.5 日以降になると肺胞上皮や腎臓尿細管上皮の一部にも発現を認めるようになるが、FRS2 α と異なりその発現部位は限局的である (図 3、Gotoh et al., 2004)。

当研究室で家島らが FRS2 β ノックアウトマウスを作製した (家島ら、未発表)。FRS2 β 遺伝子のエクソン 2 にターゲティングベクターを組み込むことで FRS2 β を欠損させ

た (図 4A、B、C)。FRS2 β ノックアウトマウスは正常に出生、発育し、組織学的にも著変は認められなかった。ターゲティングベクターに LacZ が挿入されているため LacZ 染色をおこなうことで FRS2 β の全身での発現部位を調べた (図 5A)。マウス成体において大脳皮質、海馬、視床、視床下部に存在する神経細胞、小脳プルキンエ細胞、腎臓近位尿細管上皮細胞、精巣ライディッヒ細胞、精巣上体円柱上皮細胞、胃底腺主細胞、乳腺上皮細胞が陽性を示した。乳腺脂肪体のホルマウントによる観察では、FRS2 β WT と FRS2 β KO で乳腺固有構造の違いはみられなかった (図 5B)。授乳期までの乳腺の各ステージにおける FRS2 β の発現を qRT-PCR により調べたところ、FRS2 β は授乳期乳腺において最も高い発現を示した (図 5C)。また家島らは FRS2 β の発現と ERK の核局在の相関を調べた (図 6A)。FRS2 β 陽性細胞では ERK の核局在の割合が少ないことが明らかとなった。さらに、増殖マーカーである phospho-histone (PH)3 と FRS2 β の免疫染色により、FRS2 β 陽性細胞では PH3 陽性率が低いことが分かった (図 6B)。以上、個体レベルで FRS2 β は ERK の核局在を阻害し、細胞増殖を抑制することが確かめられた。

MMTV-NEU マウスの歴史

HER2 過剰発現型乳癌のメカニズム解明のために、約 20 年以上の間様々なマウスモデルが作られてきた (Ursini-Siegel et al., 2007)。ヒト ErbB2 もしくはラット NEU を乳腺特異的に過剰発現させるために、mouse mammary tumor virus-long terminal repeat (MMTV-LTR) promoter が用いられ、変異型 HER2 を過剰発現させた MMTV-NEU-NT; activated oncogene variant マウスが 1988 年 (Muller et al., 1988) に、正常 HER2 を過剰発現させた MMTV-neu; wild type が 1992 年 (Guy et al., 1992) に作出された。当研究

室では Guy らの MMTV-neu と家島らの作製した FRS2 β ノックアウトマウスを掛け合わせて乳癌における FRS2 β の役割を調べた。

乳癌とサブタイプ

乳腺組織は導管を内張りする基底細胞、末端に乳汁を産生・分泌する乳腺上皮細胞 (Luminal cell)、オキシトシンの刺激により収縮し乳汁を外界へ分泌する筋上皮細胞 (Myoepithelial cell) からなる (図 7A、B)。たくさんのヒト乳癌組織を用いた DNA マイクロアレイ解析によって、遺伝子発現の違いによるサブタイプ分類が提唱され、ER+/luminal-like、basal-like、*Erb-B2*+そして normal-like のサブタイプが報告された (Perou et al., 2000)。その後も乳癌サブタイプと予後の関連について多くの研究が行われ、現在では Basal-like、HER2-enriched、Normal breast-like、Luminal A、Luminal B、Claudin-low の 6 つのサブタイプに分類されている (Eroles et al., 2012)。これらの遺伝子発現パターンによるサブタイプ分類が、臨床でも可能な免疫染色による分類とよく相関すること、さらにホルモン療法や HER2 標的療法などの治療に対する反応性ともよく相関することがわかっている。臨床的な免疫染色によるエストロゲン受容体(ER) もしくはプロゲステロン受容体(PR)陽性癌は、Luminal A もしくは Luminal B に相当すると考えられている。またヒト浸潤型乳癌のうち 20%が HER2 過剰発現型であり、下流の PI3K/Akt や Ras/Raf/MEK/MAPK 経路を活性化することにより細胞の成長と分化促進をおこなうことが報告されている (Slamon et al., 1987; Gozalez-Angulo et al., 2009)。そして MMTV-neu マウスモデルは HER2 を MMTV プロモーターにより過剰発現していて、ER 陰性、PR 陰性であるので、遺伝子発現パターンは HER2-enriched タイプに近いのではないかと予想されたが、遺伝子発現解析の結果、むしろ Luminal

A もしくは Luminal B タイプに近いと報告されている (Herschkowitz et al., 2007)。最近、MMTV-neu マウスモデルの乳癌は、乳腺前駆細胞由来であると考えられている。

FRS2 β と MMTV-neu マウスの乳癌

家島らの研究では MMTV-neu+/FRS2 β WT マウスと MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスを 8 週齢でそれぞれ交配させ、出産後 4 週間授乳させた後に離乳し MRI 解析をおこなった (図 8A)。MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスの乳癌は、MMTV-neu+/FRS2 β WT マウスの乳癌と比較して増殖が非常に遅く、数ヶ月の間良性腫瘍のごとくふるまった。一方、MMTV-neu+/FRS2 β WT マウスの乳癌は速く増殖し、マウスは短い期間で死亡した (図 8B, C)。また、木村の実験により MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスの乳癌細胞では ERK の活性が上がっていた (データは未提示、木村、未発表)。FRS2 β KO マウス乳腺組織では ERK が核移行することで細胞増殖が促進されることから、従来の考え方では MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスの癌のほうがより強く増大することが考えられた。しかし、逆の結果が得られたため、新たな仮説が必要となった。私はこれが癌幹細胞説で説明できないかと考え実験を組み立てた。MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスを解析することにより、癌幹細胞化やニッチとの関わりについて解明できる可能性があるのではないかと考えた。

材料と方法

マウス・細胞

FRS2 β ノックアウトマウス（系統 FVB）は Exon2 領域に DT-A/LacZ/PGK-neo をターゲットベクターで挿入しノックアウトした（図 3A、家島ら、未発表）。

MMTV-neu/ErbB2 {FVB/N} マウス（京都産業大学 板野直樹教授（信州大学医学系研究科准教授）より分与）。マウス CD1 胎児大脳皮質神経細胞(TAKARA, A0400)。臨床検体 No.1 と No.2 は当研究室で培養に成功した細胞で、No.1 のサブタイプに関する情報は不明である。No.2 は ER 100%, PR 80%以上、HER2 陰性、ki67 7%の luminal A タイプの乳癌であった。

研究課題 乳癌幹細胞のゲノム解析

承認番号 24-29-1207

動物実験については、東京大学医科学研究所の動物実験倫理委員会規程の審査委員会にて、すでに承認を得ている。

研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）に従った。

ジェノタイピング

マウスのテール 1mm を 1.5 ml チューブに入れ、300 μ l の Cell lysis solution (QIAGEN, 1045696) と 1.5 μ l Proteinase K を加え、一晩 55°C で反応させた。テールが溶けたのを確認した後 100 μ l Protein Precipitation Solution (QIAGEN, 1045697) を加えボルテッ

クス、遠心 15,000rpm、4°C、5 分後上清を新しいチューブに移した。上清に 300 μ l イソプロパノールを加え、転倒混和、遠心 15,000rpm、4°C、5 分。デカントで上清を捨て、300 μ l 70% EtOH を加え、遠心 15,000rpm、4°C、5 分。デカントで上清を捨てた。風乾 20 分後 30-50 μ l の dH₂O に溶解した。PCR の組成は Ex Taq (Invitrogen, RR001B) 0.125 μ l、10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ l、dNTP 2.0 μ l、promer F 0.1 μ l、primer R 0.1 μ l、dH₂O 19.175 μ l、genome DNA 1 μ l。Total 25 μ l /tube。

プライマーのオリゴ配列を以下に記す。

MMTV-neu Primer

Wild type

Forward primer: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT

Reverse primer: GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC

Mutant

Forward primer: TTTCCTGCAGCAGCCTACGC

Reverse primer: CGGAACCCACATCAGGCC

FRS2 β Primer

Wild type

Forward primer: CAGAGGCAAAAAGAGCCAAG

Reverse primer: TAACCCAAGACTCCGTCCAC

Mutant

Forward primer: ATTAGGGCCAGCTCATTC

Reverse primer: TCATTTTCCTTTCCCCAGAG

FRS2 β は 94°C 3 分、①94°C 30 秒 ②58°C 30 秒 ③72°C 1 分、①～③を 43 サイクル、72°C 2 分の後 4°C

Neu は 95°C 3 分、①94°C 30 秒 ②59°C 30 秒 ③73°C 1 分、①～③を 35 サイクル、73°C 2 分の後 4°C

電気泳動は 2 %アガロースゲルで行い、100 bp DNA Ladder (TAKARA BIO INC, 3422A) を参考に増幅された DNA の長さを確認した。

抗体

FRS2 β 抗体 (Minegishi et al., 2009)、Cytokeratin 18 抗体 (abcam, ab52948)、Cytokeratin 14 抗体 (abcam, ab53115)、alpha smooth muscle Actin (abcam, ab5694)、Estrogen Receptor alpha (abcam, ab32063)、Progesterone Receptor (abcam, ab2764)、p63 (abcam, ab124762)、CD24 FITC (BD, 553261)、CD49f PE (aBioscience, 12-0495-81)、CD24 APC (Alexa647) (BD, 561644)、CD44 APC-H7 (BD, 560532)、isotype APC (Alexa647) (BD, 557715)、isotype APC-H7 (BD, 560183)、Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG (Invitrogen, A11029)、Alexa Fluor® 546 Goat Anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11035)、Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG2a Labeling Kit (Invitrogen, Z25102)、EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-mouse (Dako, K4000)、EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako, K4002)

乳腺上皮の培養

EpiCult-B Medium for Mouse Mammary Epithelial Cell Culture (STEMCELL

TECHNOLOGIES, #05610)に 10 ng/ μ l EGF、10 ng/ml bFGF、4 μ g/ μ l Heparin を加えた培地を用意した。乳腺摘出後、PBS 洗浄を行い、メスを用いて 2 mm 大のピースに分けた。10% Collagenase/Hyaluronidase (STEM CELL TECHNOLOGIES, #07912) in Epicult-B medium を加え、37°Cで震盪した。30 分おきにピペッティングし、血球計算板で状態を確認し細胞が 5-6 個の塊になるまで 3-6 時間これを繰り返した。Collagenase 処理は正常乳腺 5 時間、授乳期乳腺 2 時間、乳癌組織 2 時間行なった。Collagenase 処理後は遠心 1,000 rpm、4°C、5 分し、赤血球を除く目的で、HANKS' Balanced Salt Solution Modified (STEM CELL TECHNOLOGIES, #37150) と Ammonium Chloride Solution (STEM CELL TECHNOLOGIES, #07800) の 4:1 混合液を加え、ピペッティング、遠心 1,000 rpm、4°C、5 分。上清を捨てペレットにした。細胞を single cell 化するために 37°C Trypsin EDTA (0.25 %) (ナカライ、32777-44) を 5 ml 添加、2 分間ピペッティング。Cold HANKS' (2 % FBS) を 10 ml 添加し、遠心 1,000 rpm、4°C、5 分、上清を捨てペレットにした。37°C Dispase (STEM CELL TECHNOLOGIES, #07913) (0.1 mg/ml DNaseI (Roshe, 11284932001)) 5 ml 添加、ピペッティング。Cold HANKS' (2% fetal bovine serume [FBS]) を 10 ml 加え、セルストレーナー100 μ m、40 μ m でフィルトレーションした。セルカウント (ワンセルカウンター, 和研薬, CO-C-SO2) を行い、遠心 1,000 rpm、4°C、5 分。上清除去後、 1×10^8 /ml になるよう Cold HANKS' (2% FBS) に懸濁した。

乳腺細胞以外の赤血球、線維芽細胞をネガティブセレクションする目的で、細胞を 5 ml ポリスチレンチューブに入れ、EasySep® Negative Selection Mouse Epithelial Cell Enrichment Cocktail (STEMCELL TECHNOLOGIES, #19758)を 50 μ l /ml 加え、氷上で 15 分反応。EasySep Biotin Selection Cocktail を 100 μ l /ml 加え、氷上で 15 分反応。EasySep Magnetic Nanoparticles を 50 μ l /ml 加え、氷上で 15 分反応。Cold HANKS' (2 %

FBS)を加え、2.5 ml にメスアップ後懸濁し、5 分間静置した。EasySep® Magnet (#18000) に 5 分間静置後、2 ml の Cold HANKS' (2% FBS) で洗浄し、遠心 1,000 rpm、4°C、5 分。再び Cold HANKS' (2% FBS) で 2.5 ml にメスアップし、EasySep® Magnet に静置後遠心、ペレットを回収した。その後フローサイトメトリー解析、接着培養、sphere 培養をおこなった。

マトリゲル培養

15 週齢の MMTV-neu+/FRS2β+/-、MMTV-neu+/FRS2β-/-の乳腺細胞を単離し、一晚 EpiCult medium (2 % FBS)、コラーゲンコートディッシュで培養した後フローサイトメトリーでソーティングした。EpiCult 500 μl に対し、500 細胞ずつマトリゲルマトリックス薄層 24 ウェル (BD, 354605) で培養 (37°C, CO₂ 5 %, O₂ 20 %) し、10 日後に固定、CK18 と CK14 で免疫染色、顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TS100) にて観察した。

sphere 培養

DMEM/F12 (GIBCO, 11330-057)、 B27 Supplement (GIBCO, 12587-010)、 20 ng/ml recombinant human EGF (Millipore. GF144)、 20ng/ml recombinant human basic FGF (PEPRO TECH, 100-18B)、2 mg/ml heparin (STEM CELL TECHNOLOGIES, #07980)、 Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (ナカライ、 26253-84) 混合培地を、ultra-low attachment dish(24 well corning, 3473)で培養した。EGF と FGF については添加したりガンドをグラフの結果に記した。授乳期乳腺と癌組織ともに 2,500 cells/well、7 日間培養し、三次元的に 75 μm 以上の sphere を観察した。

Sphere の継代は medium ごと sphere を回収した後 1,000 rpm、4°C、5 分遠心し、上清を回収しペレットにした後 37°C トリプシンを 500 μ l 加えピペティングした。細胞が単離したのを顕微鏡で確認した後、2% FBS DMEM/F12 を 5 ml 加えトリプシンの反応を止め、1,000 rpm、4°C、5 分遠心し DMEM/F12 を加え細胞をカウント、sphere 培地に細胞を撒き直した。

NF- κ B 阻害薬実験

DHMEQ (Matsumoto et al., 2000) を DMSO に溶解し MMTV-neu+/FRS2 β WT 授乳期乳腺の接着培養細胞に 5 μ g/ml 添加した。インキュベート (37°C、5% CO₂、20% O₂) を 1 時間行なったのち、TRIzol® Reagent (Invitrogen, 15596-018) を添加し RNA を回収し発現解析をおこなった。DHMEQ 処理の時間や濃度に関しては Hinohara らの論文を参考にした (Hinohara et al., 2012)。

IGF1R、HER1、HER2 阻害薬実験

Lapatinib (GW-572016) Ditosylate (Selleckchem, S1028)、NVP-AEW541 (Selleckchem, S1034)、Gefitinib (AstraZeneca, ZD1839) を用いた。

MMTV-neu+/FRS2 β +/- と MMTV-neu+/FRS2 β -/- の乳癌を 10⁴ cells/well で 7 日間 Sphere 培養した (37°C、5% CO₂、O₂ 20%)。培地中に DMSO に溶解した上記薬剤を 0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、10 μ M の濃度で添加した。

マウス脳細胞の培養

培養細胞の FRS2 β 免疫細胞染色の陽性コントロールを作製するために、FRS2 β が高発現するマウス CD1 胎児大脳皮質神経細胞を Poly-D-Lysine / Laminin Coat Slide (BD, 354688) にて、初代神経細胞培地キット: ONGM BulletKit (TAKARA, CC-4461) で 7 日間培養 (37°C、5% CO₂、O₂ 20%) した。培養後細胞は PBS 洗浄後 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS 洗浄後は 4°Cで保存した。

RNA の抽出

Sphere を培地ごと回収し、1,000 rpm、4°C、5 分遠心。TRIzol® Reagent (Invitrogen, 15596-018)を 5×10⁵細胞に対し 100 μ l 加え、液体窒素で凍結後-80°C保存した。後日、サンプルを溶解し 100 μ l の TRIzol に対し 20 μ l のクロロホルムを加え、ボルテックスを 15 秒、室温で 2-3 分反応させた。遠心 12,000 rpm、4°C、5 分ののち、上清を 72 μ l とりイソプロパノール 50 μ l の入ったエッペンチューブに加えた。ボルテックスを行った後、室温にて 10 分反応させた。遠心 12,000 rpm、10 分、4°Cののち、上清を除去し、75% EtOH 1 ml を加え、転倒混和した。遠心 15,000 rpm、4°C、5 分、エタノールを除去し、再び遠心 15,000 rpm、4°C、5 分。エタノールを除去し、風乾を数分間おこなった。最後に Ultra Pure Distilled Water (GIBCO, 10977) を 20 μ l 加え、RNA 濃度を NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC) にて測定後-80°C保存した。

qRT-PCR

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AB, 4368814) で cDNA を合成した。RNA

1 ng/μl に対し、10×RT buffer 2 μl、10×random primers 2 μl、25×dNTP mix 0.8 μl、multiscribe reverse transcriptase 1 μl を加え、RNase-free water で 10 μl にメスアップした。Real-time PCR 装置 (ABI-OneStep PCR system) で RT-PCR を 25°C 10 分、37°C 120 分、85°C 5 秒、4°C で反応させた。

qRT-PCR は 20 倍希釈したサンプルと、検量線を 1、5、25、125、625 倍希釈して作製した。Taqman probe (20×, ABI) と TaqMan Fast Universal PCR master mix (2×applied biosystems, 4352042) と cDNA を混和し、Real-time PCR 装置 (ABI-OneStep PCR system) で 95°C 20 秒、①95°C 1 秒、②60°C 20 秒、①②を 40 サイクル行い、18s リボソームを内在性コントロールとして ΔCt 法で解析を行なった。

用いた TaqMan probe を以下に示す。 18Sr RNA (Hs03928985_g1)、CCL3 (Mm00441259_g1)、CXCL12 (Mm00445553_m1)、IGF1 (Mm00439560_m1)、FRS2β (Hs00183610_m1)、Cytokeratin 18 (Mm01601704_g1)、Cytokeratin 8 (Mm04209403_g1)、Cytokeratin 14 (Mm00516876_m1)

マイクロアレイ

TRIzol® Reagent により得られた total RNA のクオリティチェックを Agilent 2100 Bioanalyzer を用いておこなった。分解度 10 点満点のうち 9.5 点の数値を示した精製度の高いサンプルをマイクロアレイに使用した。マイクロアレイ実験は当研究室の日野原がおこなった。RNA サンプルは Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いてラベリングし、ラベルされた 100ng の RNA にチアミン 3-CTP 処理を施した。ハイブリダイゼーションは Gene expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いておこなった。1.65 mg の cRNA は断片化され (60°C 30 分)、

SuperPrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8×60K (Agilent, G4852A) 上で、ロータリーオープン内 (10 rpm、65°C、17 時間) でハイブリダイズされた。アレイは 60K のプローブを有し、コーディング RNA と lincRNA を含むノンコーディング RNA の転写産物を認識する。アレイスライドは Agilent Gene Expression Wash Buffer 1 と 2 で洗浄し、Agilent DNA Microarray Scanner でスキャンした。異なるチップ間におけるプローブ強度や分布を補正するために、遺伝子発現値の測定と標準化を GeneSpring software (Agilent Technologies)を用いて、第三四分位数値でおこなった。

Gene set enrichment analysis (GSEA)解析は当研究室の西村がおこなった。

フローサイトメトリー解析

Cold HANKS' (2% FBS) 100 μ l (per 1×10^6 細胞) に懸濁し、1.5 μ l エッペンチューブへ移した。氷上で 5 分間静置。抗体 (反応量は表 1 参照) を氷上で 20 分間反応させた。遠心 1,000 rpm、4°C、5 min 後、上清を捨て、ペレットに Cold HANKS' (2% FBS) を 200 μ l 加えた。遠心 1,000 rpm、4°C、5 min 後 Cold HANKS' (2% FBS) を加え洗浄、0.5 μ l / 2×10^6 細胞に懸濁、Propidium Iodide Staining Solution (BD, 51-66211E) を 4 μ l 加えた。セルストレーナーキャップ付 5 ml ポリスチレンラウンドチューブ (BD Falcon, rEF352235) でフィルトレーションし、本学 FACS コアラボにて FACSAria™(BD)を用いた解析を依頼した。FRS2 β は細胞質内蛋白質のため、解析の際には固定、細胞膜を破壊するキット DAKO intrastein (WAKO, K2311) を用いた。表面抗原である CD24 と CD44 を反応させた後、Reagent A 200 μ l / 2×10^6 cells 加え 15 分間常温で反応、細胞膜に穴を開けた後、Reagent B 100 μ l / 2×10^6 cells 加え、zenon のキットを用いて反応させた FRS2 β (FRS2 β を用いた免疫組織化学染色の項参照) と 15 分間常温で反応させ、

Cold HANKS' (2% FBS)を加え洗浄後メッシュに通して FACS コアラボに解析データの取り込みを依頼した。またデータは Flowjo (Tree Star, Inc) にて解析した。

細胞免疫染色

コラーゲン I コートカルチャースライド (BD, 354630) で培養した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 4°C一晩固定後、0.4%Triton-X100 を 20 分反応させ細胞膜に穴を開け、PBS 洗浄した。Protein Block Serum-Free Ready-To-Use (DAKO, x0909) でブロッキングを 30 分行い、一次抗体 CK18、CK14 を 4°C一晩反応させた。PBS 洗浄後二次抗体は 30 分反応させ、PBS 洗浄後 DAPI/PBS を 1 ml 加え、PBS に置換し顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TS100) で鏡検した。

免疫組織化学染色 (パラフィン切片)

マウス臓器は 10%中性緩衝ホルムアルデヒド液 (ナカライ) で一晩室温固定し、本学病理コアラボにてパラフィンブロック包埋を依頼した。包埋後は滑走式マイクロトーム (SAKURA, PTERATOME, CRM-440) で厚さ 3 μm に薄切し MAS コート付 SUPERFROST (MATSUNAMI) に乗せたのち、40°Cの保温装置で乾燥させた。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色は病理コアラボに依頼した。

免疫組織化学染色ではキシレンにて脱パラ 30 分、アルコールの親水 10 分、水洗後必要に応じて Target Retrieval Solution (DAKO, #51700) を用いた前処理を行い (表 1 参照)、PBS 親和 15 分、Protein Block Serum-Free Ready-To-Use (DAKO, x0909) 室温 1 時間、一次抗体 (希釈倍率は表 1 参照) 反応 4°C一晩行った。翌日、PBS で一次抗体

を洗い流し、二次抗体 (DAKO、Envision+) を室温で 40 分反応させた。PBS 洗浄後、DAB (ニチレイ、415171) で発色を行い蒸留水で反応を止めた後、ヘマトキシリンで 1 分間対比染色を行い、流水 10 分で色出しの後、100%アルコールで脱水、キシレン透徹後マルチマウント 480 (松浪硝子工業、FM48005) で封入し顕微鏡 (Nikon ECLIPSE 80i) で観察した。

FRS2 β 抗体を用いた免疫組織化学染色

授乳期乳腺組織を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (ナカライ,09154-14) で 4°C一晩固定し、PBS 洗浄後 20%スクロースに置換し 4°C一晩。OCT コンパウンド (Sakura) に包埋、液体窒素で凍結し、クリオスタッド (LEICA CM3050 S) で厚さ 10 μ m に薄切した。FRS2 β 抗体 (Minegishi et al., 2009) はマウスの組織に非特異を起こすため、Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG2a Labeling Kit (Invitogen, Z25102)を用いて試験管内で一次抗体と二次抗体を反応させてから染色した。20 倍希釈の FRS2 β 抗体に 1:5 で Labeling 抗体と Blocking 抗体を反応させ、室温で 30 分対象と反応させた後 PBS 洗浄、複合体の崩壊を防ぐために PFA 固定をおこない速やかに観察した。

ヒト乳癌臨床検体の解析

検体の初代培養は当研究室の富永が行なった。摘出された検体は RPMI 1640 (ナカライ,30264-14) /10% FBS で輸送し、Accumax (フナコシ) 3 ml (10 cm シャーレ) の中へ検体を移し、メスで 1 mm ピースとなるように細かく刻んだ。さらに Accumax (Innovative cell tech, AM105) 7 ml を加え 10 ml とし、RT で 10 分間反応させた。検体

溶液を 50 ml チューブへ移し、1,000 rpm、5 分でペレットにし、ペレットを 20 ml の PBS で洗い、再度 1,000 rpm、5 分でペレットにした。PBS での洗いは 3 回繰り返した。18 ml の RPMI/10% FBS、2 ml の 20 mg/ml Collagenase A (終濃度 2 mg/ml) (Roshe)、20 μ l の 1 M CaCl₂ (終濃度 1 mM) を混合し、コラゲナーゼ溶液とした。PBS で洗浄した検体のペレットにコラゲナーゼ溶液を加えた。検体溶液を 37°C のエアシェイカーで 100 shake/min 程度で 1.5 時間~2.5 時間震盪した。30 分毎にピペッティングをおこなった。細胞が概ね単離したら DNase を 5 μ g/mg となるように加え、常温で 5 分間静置。細胞溶液を 50 ml チューブ上で 100 μ m セルストレーナー、40 μ m セルストレーナーの順に通した。1,000 rpm、5 分でペレットにし、ペレットを 40 ml の PBS で洗い、再度 1,000 rpm/5 min でペレットにし、細胞をカウントした。MACS Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec, 130-092-211) で赤血球と白血球、Biotin anti-human CD140b (Biolegend, 323604) で線維芽細胞を、Biotin CD31 Antibody (eBioScience, 13-0319-82) で内皮細胞を取り除いた。MACS Lineage Cell Depletion Kit は 400 μ l のバッファーに対し 100 μ l を、線維芽細胞、内皮細胞は乳癌細胞数の 1/5 として加え、4°C 10 分間反応させた。MACS buffer で洗浄した後、ビオチンビーズを加え、4°C 15 分間反応。MACS Buffer を加えて遠心した。ペレットを MACS Buffer 500 μ l で懸濁後、MACS Separation Columns (MACS, 130-042-401)、MagnaBot II Magnetic Separation Device (Promega, V8351)、Magnetic Stand-96 (Ambion, AM10027) で精製。回収したサンプルを 1,000rpm、15 分でペレットにし、細胞数をカウントした。得た細胞を用いて通常の接着培養と浮遊の幹細胞培養を行なった。collagen 10 cm dish (IWAKI, 4020-010) で接着培養をし、培養にはインビトロジェンの HuMEC Ready Medium (GIBCO, 12753-010) を使用した。検体を接着性 dish から剥がす際は Accumax (Innovative cell tech, AM105) を 5 ml/10 cm dish 加え、常温で 10 分間反応させた。2 倍量の PBS で反

応を止め、細胞を回収し解析した。

結果

FRS2 β WT と KO の正常乳腺の解析

FRS2 β が乳腺上皮細胞の一部のみに発現すると報告されている（2010 年度家島大輔博士課程学位論文、図 5A、図 6B、図 7A）。一方、FRS2 β WT マウスと FRS2 β KO マウスの乳腺固有構造は正常（図 5B）で、その子供の成長も FRS2 β WT マウスと FRS2 β KO マウスで差がみられず、正常に授乳できていることが示唆された。FRS2 β をノックアウトすることにより、乳腺上皮細胞集団に軽微な変化があるか調べることにした。

乳腺組織では、筋上皮細胞集団に含まれるごく少数の幹細胞から、乳腺上皮前駆細胞と分化した筋上皮細胞の両方に分化すると考えられている。筋上皮細胞は増殖して、筋上皮細胞集団となる。乳腺上皮前駆細胞は、乳腺上皮細胞集団に含まれ、分化増殖して乳腺上皮細胞となる。

CD24^{high}CD49f⁺分画は少数の乳腺上皮前駆細胞を含む乳腺上皮細胞からなり、CD24^{low}CD49f⁺分画は少数の乳腺幹細胞を含む筋上皮細胞からなることが報告されている（Shackleton et al., 2006; Sleeman et al., 2006）。MMTV-neu マウスの妊娠前乳腺（8 週齢~16 週齢）を single cell 化しフローサイトメーターで CD24 (heat-stable antigen, 神経幹細胞に豊富に含まれ、乳癌にも発現) と CD49f (α 6-integrin、CD29 と結合) で展開した。FRS2 β KO マウスでは FRS2 β WT マウスと比較し CD24^{high}CD49f⁺集団が相対的に減少し、CD24^{low}CD49f⁺集団が相対的に増加していた（図 9A）。つまり FRS2 β KO マウスでは、乳腺上皮前駆細胞を含む乳腺上皮細胞集団が減っていることがわかった。次に私は乳腺幹細胞の機能を調べるために、CD24^{high}CD49f⁺ と CD24^{low}

CD49f⁺の細胞をソーティングし、マトリゲル上で培養した。培養 4 日後、CD24^{high}CD49f⁺の細胞からは乳腺上皮細胞と筋上皮細胞の混在した Mixed colony が認められたのに対し、CD24^{low} CD49f⁺の細胞からは筋上皮細胞のみから成る Myoepithelial colony が散見された (図 9B)。

2D マトリゲルでのコロニーアッセイより、FRS2βWT マウスと FRS2βKO マウス由来の CD24^{high}CD49f⁺ と CD24^{low} CD49f⁺の分画からはほぼ同数のコロニーが形成された (図 10A)。乳腺上皮細胞からなる luminal コロニー、乳腺上皮細胞と筋上皮細胞の混在した mixed コロニー、筋上皮細胞のみからなる myoepithelial コロニーを腺上皮マーカーの CK18 と筋上皮マーカーの CK14 の免疫染色により分類し、細胞の分化能を調べた (図 10B)。この方法は Jeselsohn らの論文を参考にした (Jeselsohn et al., 2010)。結果、FRS2βWT と FRS2βKO で乳腺細胞のコロニー形成能に差はなく、FRS2β ノックアウトは乳腺幹細胞に影響を与えないことが示された (図 10C)。

以上より、FRS2β ノックアウト乳腺では、乳腺上皮前駆細胞が減少しており、その結果乳腺上皮前駆細胞を含む乳腺上皮細胞集団が減っていると考えられる。FRS2β の発現パターンより、FRS2β は乳腺前駆細胞に発現している可能性が考えられる。FRS2β は、正常の乳腺上皮前駆細胞の維持に軽微ながらも関与していると考えられる。

FRS2βWT と KO の授乳期乳腺の解析

家島らのデータから、qRT-PCR で FRS2β の発現は授乳期乳腺で最も高くなることが示されたため (図 5C) 授乳期乳腺を用いて解析を進めた。

授乳期乳腺のヘマトキシリン・エオジン染色組織像では FRS2βWT と FRS2βKO で顕

著な違いは認められなかった (図 11)。筋上皮細胞マーカーである α SMA の免疫染色により、乳汁を分泌するために立方化した乳腺上皮細胞を筋上皮細胞が囲っており、FRS2 β KO マウスにおいて FRS2 β WT マウスと同様の正常な授乳期乳腺固有構造を有していることが示された (図 11)。

FRS2 β の免疫染色を実施するにあたり、私はまず陽性コントロールのマウス脳の切片 (図 12A) 及び脳神経細胞 (図 12B) の培養細胞と陰性コントロール (図 13) の実験をおこない FRS2 β の発現を確認した。授乳期乳腺の免疫染色により、FRS2 β 陽性細胞は非常に数が少ないものの、CK18 陽性の乳腺上皮細胞と共陽性を示す FRS2 β 陽性細胞が認められた (図 14)。一方、FRS2 β と筋上皮細胞マーカーの CK14 の発現は全く一致しなかった (図 15)。よって FRS2 β は筋上皮細胞ではなく乳腺上皮細胞に発現していると結論づけられる。

Sphere 形成能は、幹細胞性のひとつの指標となる。そこで、授乳期乳腺の sphere 形成率を調べた。初代培養では sphere 形成率に差がみられなかったが、細胞を一度単離し再度 sphere 形成率を調べると FRS2 β WT のマウスでは FRS2 β KO よりも高い sphere 形成率を示した (図 16A)。また授乳期乳腺では図 16B のように初期の微小な癌を見つけることができる。この発癌が始まる時期の乳腺における FRS2 β の役割を調べるために、授乳期乳腺 2 代目 sphere から RNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析をおこなったところ、発現に差のある遺伝子は表のようになった (表 2、3)。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析により、FRS2 β WT で幹細胞機能のシグネチャー (BOQUEST_STEM_CELL_UP) と、インターフェロンシグナル伝達のシグネチャー (DURAND_STROMA_MAX_UP) の上昇がみられ、FRS2 β KO で MEK-ERK 経路の活性化を示すシグネチャー (MEK_UP.V1_UP) と Basal 型乳癌のシグネチャー (SMO_BREAST_CANCER_BASAL_UP) が検出された (図 17A, B)。これは FRS2 β WT

の初発の乳癌を含む授乳期乳腺において、で幹細胞もしくは前駆細胞の活性が上昇していること、また炎症応答に近い反応がおきていることを示唆している。また FRS2 β KO で MEK-ERK 経路が活性化しており、FRS2 β ノックアウトで ERK の核移行が活性化されるという報告に一致する (Iejima et al., 2010)。また、乳癌のサブタイプに関わるシグネチャーに関して、MMTV-neu では luminal タイプの遺伝子発現パターンを示すことが報告されているが、FRS2 β をノックアウトすることにより basal タイプに遺伝子発現パターンが変化する可能性が示唆された。

qRT-PCR によりマイクロアレイ解析で発現差のあったサイトカインである IGF1、CXCL12、CCL3、分化マーカーの中間径フィラメントである CK8, CK18, CK14 の発現を調べた。IGF1、CXCL12、CCL3 の発現は FRS2 β WT で上昇していた (図 17C)。CXCL12 (SDF-1) は癌細胞が間質を誘導する際に分泌されるサイトカインとして知られている (Guo et al., *in press*)。IGF1 は自己複製に関わるリガンドで、IGF1-IGF1R 経路は様々な癌で報告されている (Samani et al., 2006)。さらに分化を示す上皮系中間径フィラメントの発現は FRS2 β KO で上昇していた (図 17C)。FRS2 β WT では幹細胞性に関わる遺伝子が、FRS2 β KO では MEK-ERK 経路の活性化と分化した細胞に発現する中間径フィラメント CK8, CK18, CK14 の転写が促進されることが示された。

当研究室より ErbB 受容体型チロシンキナーゼ/NF- κ B シグナルが mammosphere 形成に寄与しているとの報告をしている (Hinohara et al., 2012)。報告によると、転写因子である NF- κ B が下流の IL-8 などのケモカインの発現上昇をおこすことで癌幹細胞のニッチ環境を整える。IGF1 や CXCL12 も NF- κ B によって発現調節されているのではないかと考え、FRS2 β WT の授乳期乳腺に NF- κ B 阻害剤である DHMEQ (Matsumoto et al., 1999) を添加した。コントロールの DMSO 添加細胞と比較し DHMEQ 添加細胞で IGF1 と CXCL12 の発現低下が認められ、IGF1, CXCL12 の発現上昇が NF- κ B の活性

上昇を介しておこっていることが示された (図 18)。

MMTV-neu によって引き起こされる乳癌と FRS2 β WT と KO

家島の実験により、MMTV-neu/FRS2 β ^{+/+}と MMTV-neu/FRS2 β ^{-/-}の癌を計測すると MMTV-neu /FRS2 β ^{+/+}で癌の増殖が速く、早期にマウスが死に至ることが示された (図 8B)。FRS2 β をノックアウトすると MEK-ERK 経路が活性化し細胞の増殖が促進されるため癌の成長が速くなると予想されたが、実際には FRS2 β WT の乳癌の増殖スピードが速かった。私はこの原因を、FRS2 β が MEK-ERK 経路を恒常的に抑制することで癌幹細胞性を上昇させるとともに、癌幹細胞が発生する土壌であるニッチを整えているのではないかと考えた。

癌幹細胞性を調べる有用な手段のひとつは sphere 形成能である。発生初期の乳癌において (図 19A) sphere 形成率は初代 sphere と 2 代目 sphere とともに FRS2 β WT で有意に形成率が高く (図 19B)、授乳期乳腺で発現の高かった幹細胞性に関わるサイトカインである CXCL12、IGF1、CCL3 も高い発現量を示した (図 19C)。また sphere だけではなく、接着培養系の細胞でも CXCL12、IGF1、CCL3 の発現は FRS2 β WT で高かった (図 20A, B)。

IGF1 はそれのみでマウス乳腺幹細胞を生み出せることが報告されている (Booth et al., 2007)。IGF1 シグナルが乳癌の sphere 形成に重要であるかを調べるために、IGF1R 阻害薬 (AEW-541, Linstinib) を乳癌 sphere に添加した。同様に HER1 阻害薬 (Gefitinib)、HER2 阻害薬 (Lapatinib) の投与も行った。すると FRS2 β WT の sphere は HER1、HER2 阻害薬と比較して IGF1R 阻害薬に高い感受性を示した (図 21)。

FRS2 β WT、KO マウス乳癌の病理組織学的探索

MMTV-neu+/FRS2 β WT マウスと MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスの乳癌の病理組織学的解析と免疫組織化学的解析を行なった。

FRS2 β WT では肉眼的に初期の癌において嚢胞状の腫瘍が多く、嚢胞内には赤褐色の粘性のある液体を容れていた。末期の乳癌では乳白色の乳癌実質組織の割合も多かった。病理組織像では初期の乳癌は皮下織で嚢胞状の形態をとることが多く、嚢胞内には赤血球を容れていた (図 22A)。乳腺上皮由来の腫瘍細胞は中等度から高度の異型を示しながら、管状乳頭状に増殖していた (図 22B)。末期の乳癌に進行するにつれ腫瘍細胞の充実性増殖や腫瘍巣内における間質組織の増加が認められた (図 22C、D)。腫瘍細胞の核は大小不同、類円形～楕円形、淡染。核小体明瞭。核分裂像高頻度、異常核分裂も一部認めた。細胞質は広く、弱好酸性。一部の末期乳癌ではリンパ管内浸潤、肺転移所見を認めた。

FRS2 β KO 乳癌では肉眼的に乳白色の乳癌実質組織の増殖が目立った。病理組織像では真皮から皮下織にかけて高度の異型を示す乳腺上皮由来の腫瘍細胞が充実性に増殖 (図 22E) していた。腫瘍細胞の核は大小不同、類円形～楕円形、淡染。核小体明瞭。核分裂像高頻度。細胞質は広く、両染色性 (図 22F)。

免疫組織化学的検索結果を以下に示す。CK18 は乳腺上皮細胞、CK14 は基底細胞と筋上皮細胞に発現する。MMTV-neu の乳癌細胞の細胞質は全て CK18 に強陽性を示し、CK14 は陰性であった (図 23)。このことより、MMTV-neu マウス乳癌の報告どおり乳腺上皮由来の癌であり、FRS2 β KO も同様に乳腺上皮由来の癌であることが分かった。また、FRS2 β WT、FRS2 β KO ともに ER 陰性、PR 陰性を示す (図 23) ことも過去の報告に合致し、HER2 陽性、ER 陰性、PR 陰性の乳腺上皮由来の癌であることが

免疫組織化学的に示された。

α -SMA は平滑筋マーカーであり、正常な線維芽細胞は陰性を示すが筋線維芽細胞（癌関連線維芽細胞 / Cancer-associated fibroblast(CAF)）では陽性を示し、CAF に特異的なマーカーである（図 1C）。乳癌組織における CAF の発現量を調べたところ、FRS2 β KO の乳癌ではほとんど CAF の浸潤が認められないのに対し、FRS2 β WT の乳癌では 1~10%の CAF の浸潤が認められやや多いという傾向にあった（図 24A, B）。CAF によって乳癌幹細胞が増加するという報告がなされており（Huang et al., 2010）、sphere 形成率の違いとも相関すると考えられる。

授乳期乳腺の GSEA 解析において FRS2 β KO で basal type breast cancer のシグネチャーが上昇していた。そこで基底細胞と筋上皮細胞のマーカーである p63 を用いて癌組織の免疫組織化学染色を行った。p63 は TP53 のファミリー分子であり、正常乳腺では乳腺導管の基底細胞と、乳腺腺房の筋上皮細胞の核に発現する（Westfall et al., 2004）。乳癌では basal type で発現することが知られている。FRS2 β WT の乳癌でも一部の細胞が陽性を示したが全く陽性細胞のない乳癌の方が多く、一方 FRS2 β KO の乳癌では 0~1%の細胞が p63 陽性を示す乳癌が多かった。さらに 2 症例で 10%以上の高い発現を示す領域が認められ、basal 細胞への分化傾向を示していたと考えられる（図 25A、B）。私が解析した結果、FRS2 β KO の乳癌は CK18 陽性、CK14 陰性の luminal type の乳癌であることに違いはなく、ヒトの basal type 乳癌の報告のように大部分の細胞が p63 陽性を示しているわけではない。しかし MMTV-neu+/FRS2 β KO マウスの乳癌は通常の MMTV-neu マウスの乳癌とはやや異なる分化傾向を示すのかもしれない。

ヒト乳癌臨床検体の解析

私は No.1 と No.2 の 2 種類のヒト乳癌臨床検体を用いて乳癌幹細胞分画における FRS2 β の発現解析を行なった。

検体 No.1 を表面抗原 CD24 と CD44 でフローサイトメトリー解析と細胞分取を行なった。癌幹細胞分画の CD24^{low}CD44^{high} とそれ以外の非癌幹細胞分画の RNA を抽出し qRT-PCR を行なった。癌幹細胞集団では非癌幹細胞と比較して FRS2 β の mRNA 発現が高かった (図 26A)

CD24^{low}CD44^{high} の癌幹細胞分画の細胞をコラーゲン上で培養すると、2 日目では細胞質の広い大きな細胞が 7 日目にはアメーバ状になり移動傾向を示した。非癌幹細胞分画の細胞は小型の葉状の細胞で 7 日目にはその数を増していた (図 26A)。この所見は癌幹細胞は静止期にあり転移能 (移動能) を有すること、非癌幹細胞は増殖期にあるという既知の事実に一致する。

検体 No.2 はフローサイトメトリー解析で CD24、CD44 に加えて FRS2 β の染色を行なった。CD24^{low}CD44^{high} の癌幹細胞分画で FRS2 β の発現が高いという結果が得られた (図 26B)。

考察

FRS2 β と細胞分化

FRS2 β はマウス胚において胎齢 12 日から 15 日の分化した神経に発現することが示されている (Gotoh et al., 2004; Hryciw et al., 2010)。本研究により乳腺では、幹細胞ではなく一歩分化した乳腺上皮前駆細胞に発現することが明らかになった。

FRS2 β の特徴的な役割は、リン酸化した ERK と結合し核移行を抑制することで細胞増殖を抑制することである。正常細胞では神経細胞以外における FRS2 β の発現が低いいためその役割の研究報告が少ないが、乳癌、肺癌では FRS2 β が過剰発現する症例が少なからず報告されており (Iejima et al., 2010; Minegishi et al., 2013)、癌における FRS2 β の役割解明をしていく必要がある。

私が授乳期乳腺において FRS2 β 抗体を用いて発現解析を行ったところ、乳腺上皮細胞の位置に発現しているがマーカーである CK18 と共発現する細胞は少数であった。CK18 は正常乳腺のほとんど全ての乳腺上皮細胞の細胞質に発現するが、授乳期乳腺の上皮リモデリングが行われている際には一部の細胞しか CK18 が発現しなくなることが報告されている (Michalczyk et al., 2001)。FRS2 β と CK18 の発現が少数の細胞にしか一致しないのは、FRS2 β が未熟な乳腺前駆細胞に発現することの一つの根拠となるかもしれない。

また、FRS2 β KO マウスの解析や乳腺細胞のフローサイトメトリー解析、マトリゲルアッセイにより FRS2 β の欠損は正常乳腺幹細胞にとって致命的ではなく、増殖・分化が正常に行なわれると考えられた。

FRS2 β と乳癌幹細胞

私は HER2 過剰発現乳癌モデルマウスである MMTV-neu マウスと FRS2 β ノックアウトマウスを交配し、乳癌における FRS2 β の機能解析を行った。FRS2 β をノックアウトすることで MEK-ERK 経路が活性化し乳癌の増殖が促進されることが予想されたが、実際には FRS2 β WT で乳癌の増殖が早く、マウスが死に至ることが分かった。

この原因を調べるために、組織切片で微小癌を確認できる授乳期と発生初期の乳癌を用いて sphere assay を行った。すると、二代目 sphere において FRS2 β WT の sphere 形成率が有意に高かった。また、授乳期乳腺 sphere のマイクロアレイ解析、GSEA 解析により FRS2 β WT で、幹細胞やインターフェロンシグナルに関わるシグネチャーの上昇がみられ、発現が上位にある遺伝子の中から IGF1、CXCL12 と CCL3 を選んだ。

幹細胞維持に関わる IGF1 は IGF1R を通して自己複製に関与し、CXCL12 は癌関連線維芽細胞（ニッチ）を誘導し、CCL3 (MIP1 α) はマクロファージを誘導する、いずれも癌幹細胞性を維持するのに必要なサイトカインである (DiPietro et al., 1998, Lee et al., 2000)。また FRS2 β KO の乳腺 sphere においては MEK-ERK 経路のシグネチャーの上昇とともに、上皮細胞分化マーカーである中間径フィラメントの CK18 などが発現上昇していた。この発見を裏付けるように、Kumagai らがおこなった MMTV-neu マウスを用いた細胞イメージング研究により、ERK の活性が高い細胞で癌幹細胞マーカーが発現低下することが示されている (Kumagai et al., 2015)。

IGF1R 阻害薬実験から sphere の維持に IGF1-IGF1R シグナリングが重要な役割を果たすことが示された。MMTV-neu マウスで IGF1R シグナルに関して研究した報告はない。EGFR と HER2 阻害薬の Lapatinib、EGFR 阻害薬の Gefitinib では sphere 阻害傾向が低いことから、これらのシグナルは乳癌幹細胞には効果が低いと考えられる。様々

なサイトカインの発現を促進する NF- κ B の阻害薬である DHMEQ を FRS2 β WT の授乳期乳腺細胞に添加して発現を調べたところ、コントロールの DMSO 添加群と比較して IGF1 と CXCL12 の発現量低下を認めた。また、我々は免疫組織化学的解析によりニッチである CAF の量が MMTV-neu+/FRS2 β で多い傾向にあることを示した。FRS2 β WT において間質を誘導するケモカインの発現は高く、直接的もしくは間接的に FRS2 β によって維持されている癌幹細胞がニッチの形成を行なっているのかもしれない。

FRS2 β は初発癌の癌幹細胞の増殖と維持に重要であることが示唆された。このマウスモデルの癌幹細胞の起源である乳腺上皮前駆細胞内で ErbB2 の過剰発現による活性上昇が起きたとき、FRS2 β によって ERK の活性が低めに抑えられていると、IGF1 や CXCL12 などのサイトカインが NF κ B 依存性に産生される。IGF1 は前駆細胞の自己複製に、CXCL12 は癌間質の増生を起こすことが知られており、癌幹細胞発生の土壌となるニッチ環境を整える。その土壌の中で癌幹細胞が発生すると、腫瘍増殖を促進する。ERK の活性低下が、サイトカイン産生上昇を起こすメカニズムは不明であり、今後の解析が必要である。授乳期乳腺組織における NF κ B の核移行の割合は FRS2 β WT でも KO でも違いは認められなかった (データは未定示)。ERK の活性抑制が正常の種々の幹細胞の未分化性の維持に重要であることは知られており、未分化性などに関わる遺伝子発現が起りやすいクロマチン状態を作り出していると考えられている。本マウスモデルにおいても、FRS2 β WT と KO マウスの乳腺細胞内のクロマチン状態に変化があることを考え、解析を試みている。

一方、FRS2 β をノックアウトしても小さいながらも腫瘍が発生する。このことは、FRS2 β KO の状況で、サイトカインが低下した乳腺組織の環境にあっても、増殖活性の低い癌幹細胞様の細胞は発生しうることを示している。後の解析により、数ヶ月の

潜伏期を得て FRS2 β KO の腫瘍が急激に増大することを観察している（データは未提示）。このことは、サイトカインが低下した環境にアダプテーションして強く増殖する癌幹細胞が新たに発生するか、あるいは増殖の遅い腫瘍を形成していた癌幹細胞が変容し、大きな腫瘍を形成しうることを示している。これまでの解析より、FRS2 β は癌幹細胞の分子標的候補になりえるが、FRS2 β のみを標的とした治療を行っても、癌の根治には至らず再発が起きる可能性が考えられる。

FRS2 β KO の腫瘍が大きくなる前の潜伏期の間、癌を根治することはできないのだろうか。FRS2 β KO 腫瘍内では、MEK-ERK の活性が高くなっている（データは未提示）。FRS2 β を標的とした治療と同時に、MEK 阻害剤を投与する combination therapy を行うことにより、癌を根治させ再発を防ぐことが可能なのではないだろうか。

最新の研究により、再発の原因は癌幹細胞の可塑性のためであると考えられつつある。つまり、組織内の環境にアダプテーションして強く増殖する癌幹細胞へと変容する癌細胞が存在することが、再発の原因であるとする考え方である。癌を根治させるためには、癌幹細胞の可塑性のメカニズムを明らかにすることは重要であり、現在世界中で研究が行われている。

ヒト乳癌と FRS2 β

FRS2 β の癌における発現と予後との関連は肺癌（Iejima et al., 2010）で報告されており、FRS2 β の発現が高い肺癌で発現が低い癌と比較して予後が良くなる。肺癌を除く他の癌において FRS2 β の研究報告は少ない。

本研究ではヒト乳癌臨床検体を用いた乳癌幹細胞の研究から、FRS2 β の mRNA 発現もしくは蛋白発現が癌幹細胞に濃縮される検体があることを示した。さらに

cBioportal (<http://www.cbioportal.org>) でのヒト乳癌の全エクソームシーケンス解析により、約 3%の乳癌で $FRS2\beta$ の過剰発現を認めた(補足図)。興味深いことに、 $FRS2\beta$ と $FRS2\alpha$ の増幅変異が相互排他的であった。 $FRS2\beta$ は乳癌において決して変異頻度の高い遺伝子ではないが、この分子の役割を研究することは将来の癌の個別化医療へ貢献するだろう。

今後の展望

本研究より、FRS2 β は MMTV-ErbB2 マウスの乳癌において ERK の活性を調節することにより癌幹細胞の分化制御に関わっていることが示唆された。FRS2 β を阻害し癌幹細胞を分化させ、ERK の活性が高まっている癌細胞を MEK 阻害剤で抑制することで癌を治療するという戦略が考えられる。

そのためにまず、FRS2 β のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、細胞の癌化後に FRS2 β をノックアウトし ERK の活性による癌幹細胞の分化を促進させる。分化した ERK 活性の高い癌細胞が増えた時点で MEK 阻害剤を投与し、癌細胞を死滅させる。このようなマウスモデルを作製すれば FRS2 β を標的とした治療法の有用性を示していけると考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えてくださいました、金沢大学がん進展制御研究所分子病態研究分野の後藤典子教授に感謝申し上げます。

研究生活をサポートしてくださいました東京大学医科学研究所分子療法分野の東條有伸教授に感謝申し上げます。

NF κ B の実験に関しましてご指導くださいました東京大学医科学研究所分子発癌分野の井上純一郎教授ならびに室員の方々に感謝申し上げます。

プラスミド作製と ChIP-assay および研究内容のご指導をしてくださいました、国立がん研究センター研究所造血器腫瘍研究分野の北林一生分野長、山形和恒研究員、相川祐規子特任研究員に感謝申し上げます。

FACS 解析データの取り込みおよび解析に関するアドバイスをくださいました、東京大学医科学研究所 FACS コアラボラトリーの石井有実子技術職員、藤田梓技術職員に感謝申し上げます。

切片作製とその解析にあたりご助言いただきました、東京大学医科学研究所病理コアラボラトリーの松原大祐講師、河原元技術職員、安藤朋子技術職員に感謝申し上げます。

また研究を進めるうえで様々な助言ならびにサポートをいただきました、東京大学医科学研究所分子療法分野と国立がん研究センター研究所造血器腫瘍研究分野の皆様
に感謝申し上げます。

最後に、研究生活のうえで様々な場面での叱咤激励、ならびに支えになってくれた、東京大学医科学研究所所属の諸先生方、家族、友人にも心より感謝申し上げます。

【引用文献】

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3983-88, 2003.

Alison MR, Lim SML, Nicholson LJ., Cancer stem cells: problems for therapy?, *J. Pathol.* 223: 147-61, 2011.

Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KP, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D., neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group., *J. Clin. Oncol.* 16: 1340-9, 1998.

Bonnet D, Dick JE., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell., *Nat. Med.* 3: 730-37, 1997.

Booth BW, Boulanger CA, Smith GH., Alveolar progenitor cells develop in mouse mammary glands independent of pregnancy and lactation., *J. Cell Physiol.* 212: 729-36, 2007.

Chen WJ, Ho CC, Chang YL, Chen HY, Lin CA, Ling TY, Yu SL, Yuan SS, Chen YJ, Lin CY, Pan SH, Chou HY, Chen YJ, Chang GC, Chu WC, Lee YM, Lee JY, Lee PJ, Li KC, Chen HW, Yang PC., Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signaling., *Nat. Commun.* 25: 3472, 2014.

DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM., MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair., *J. Clin. Invest.* 101: 1693-8, 1998.

Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A., Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways., *Cancer Treat. Rev.* 38: 698-707, 2012.

Gotoh N, Laks S, Nakashima M, Lax I, Schlessinger J., FRS2 family docking proteins with overlapping roles in activation of MAP kinase have distinct spatial-temporal patterns of expression of their transcripts., *FEBS Lett.* 564: 14-8, 2004.

Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR, Meric-Bernstam F, Rakhit R, Cardoso F, Peintinger F, Hanrahan EO, Sahin A, Guray M, Larsimont D, Feoli F, Stranzl H, Buchholz TA, Valero V, Theriault R, Piccart-Gebhart M, Ravdin PM, Berry DA, Hortobagyi GN., High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller., *J. Clin. Oncol.* 27: 5700-6, 2009.

Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W., CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks., *Oncogene. In press*

Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ., Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10578-82, 1992.

Hadari YR, Gotoh N, Kouhara H, Lax I, Schlessinger J., Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8578-83, 2001.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM., Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors., *Genome Biol.* 8:R76, 2007.

Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N., ErbB receptor tyrosine kinase/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6584-9, 2012.

Hryciw T, MacDonald JIS, Phillips R, Seah C, Pasternak S, Meakin SO. The fibroblast growth factor receptor substrate 3 adapter is a developmentally regulated

microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiated neurons., *J. Neurochem.* 112: 924-39, 2010.

Huang M, Li Y, Zhang H, Nan F., Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44⁺CD24⁻ cells through SDF-1/CXCR4 interaction., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22: 80, 2010.

Iejima D, Minegishi Y, Takenaka K, Siswanto A, Watanabe M, Huang L, Watanabe T, Tanaka F, Kurida M, Gotoh N., FRS2beta, a potential prognostic gene for non-small cell lung cancer, encodes a feedback inhibitor of EGF receptor family members by ERK binding., *Oncogene* 29: 3087-99, 2010.

Jeselsohn R, Brown NE, Arendt L, Klebba I, Hu MG, Kuperwasser C, Hinds PW., Cyclin D1 kinase activity is required for the self-renewal of mammary stem and progenitor cells that are targets of MMTV-ErbB2 tumorigenesis., *Cancer Cell* 17: 65, 2010

Kondo T, Setoguchi T, Taga T., Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 781-6, 2004.

Kumagai Y, Naoki H, Nakasyo E, Kamioka Y, Kiyokawa E, Mastuda M., Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice., *Oncogene* 34: 1051-7, 2015.

Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, Stellato C, Gladue RP, Schleimer RP, Beck LA., Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes., *J. Immunol.* 164: 3392-401, 2000.

Littlepage LE, Egeblad M, Werb Z., Coevolution of cancer and stromal cellular responses., *Cancer Cell* 7: 499-500, 2005.

Matsumoto N, Ariga A, To-e S, Nakamura H, Agata N, Hirano S, Inoue J, Umezawa K., Synthesis of NF- κ B activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 865-9

Matulka LA, Triplett AA, Wagner KU., Parity-induced mammary epithelial cells are multipotent and express cell surface markers associated with stem cells., *Dev. Biol.* 313: 29-44, 2007.

Michalczyk A, Brown RW, Collins JP, Ackland ML., Lactation affects expression of intermediate filaments in human breast epithelium., *Differentiation* 67: 41-9, 2001.

Minegishi Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Horii T, Hoshino T, Kodama T, Hamakubo T, Gotoh N., Prominent expression of FRS2 β protein in neural cells and its association with intracellular vesicles., *FEBS Letter* 583: 807-14, 2009.

Minegishi Y, Shibasaki Y, Mizutani A, Fujita K, Tezuka T, Kinoshita M, Kuroda M, Hattori S, Noriko G., Adaptor protein complex of FRS2 β and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation., *Cancer Sci.* 104: 345-52, 2013.

Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P., Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene., *Cell* 54: 105-115, 1988.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D., Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 406: 747-52, 2000.

Raya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL., Stem cells, cancer, and cancer stem cells., *Nature* 414: 105-11, 2001.

Samani AA, Yaker S, LeRoith D, Brodt P., The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights., *Endocr. Rev.* 28: 20-47, 2006.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE., Generation of a functional mammary gland from a single stem cell., *Nature* 439: 84-8, 2006.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene., *Science* 235: 177-82, 1987.

Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ., CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells., *Breast Cancer Res.* 8: R7, 2006.

Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ., Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer., *Nat. Rev. Cancer* 7: 389-97, 2007.

Valencia T, Joseph A, Kachroo N, Darby S, Meakin S, Gnanapragasam J., Role and expression of FRS2 and FRS3 in prostate cancer., *BMC Cancer* 484: 484, 2011.

Westfall MD, Pietenpol JA., p63: molecular complexity in development and cancer., *Carcinogenesis.*, 25: 857-64, 2004.

Wever OD, Demetter P, Mareel M, Bracke M., Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth., *Int. J. Cancer* 123: 2229-38, 2008.

家島大輔、EGFR ファミリーシグナル抑制分子 FRS2b の個体レベルにおける機能解析、2011 年 3 月、東京大学大学院医学系研究科博士論文

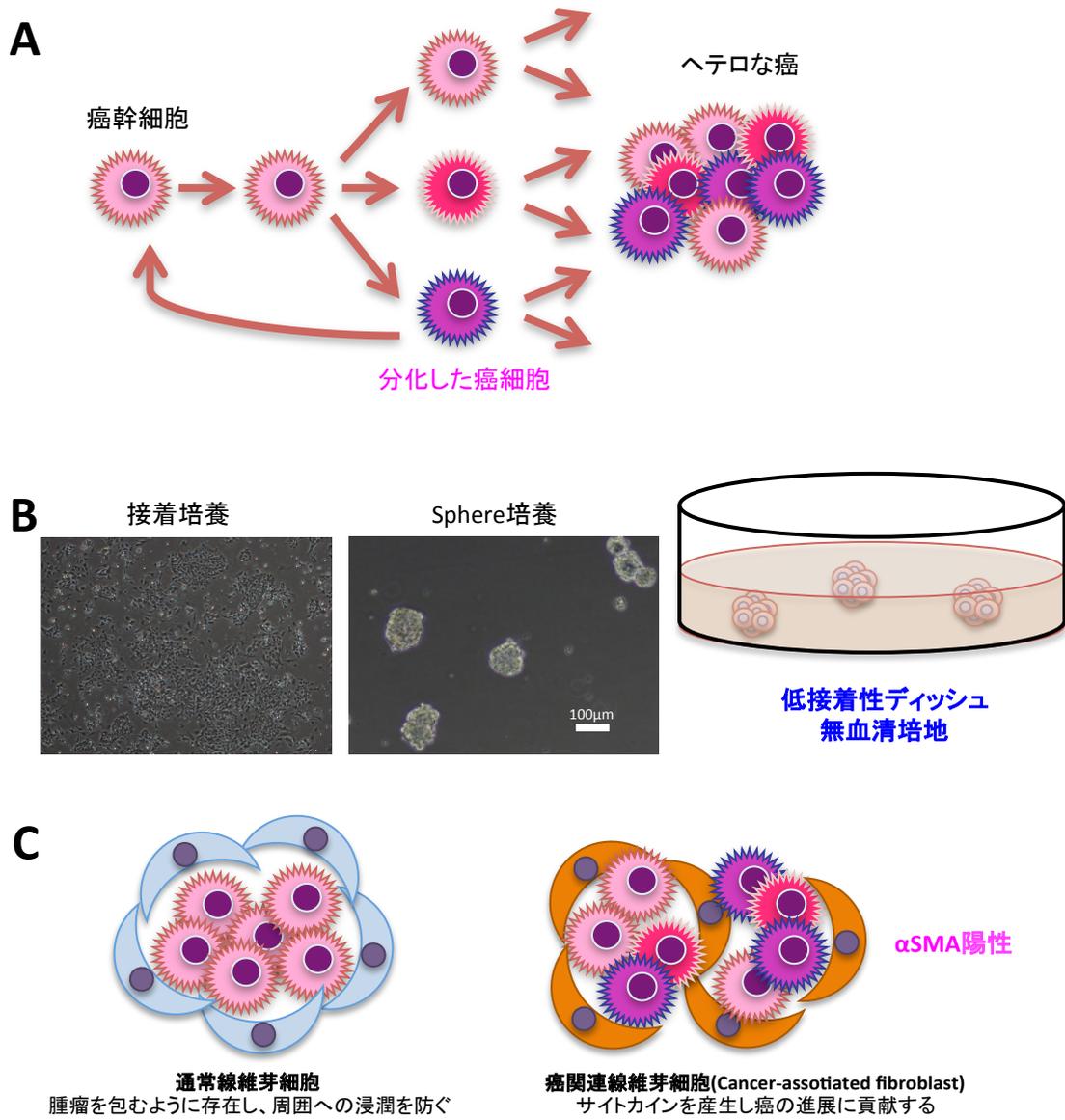


図1: 癌幹細胞

A)癌幹細胞説の模式図、B)MMTV-neu乳癌の接着培養とsphere培養の写真。
低接着性ディッシュ、無血清培地を用いた培養により癌幹細胞がsphereに濃縮される。
C)癌幹細胞と癌関連線維芽細胞の図。

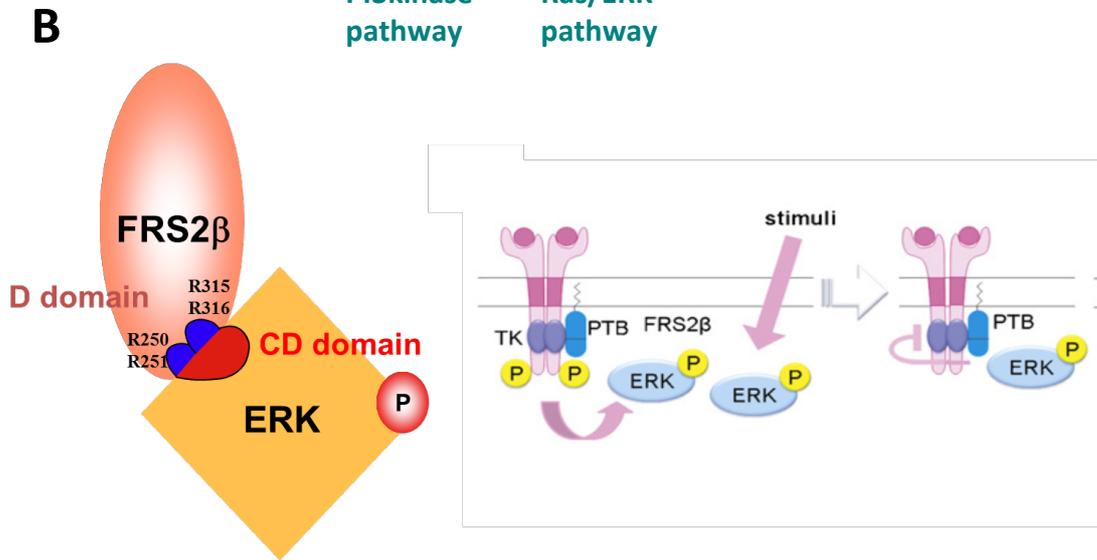
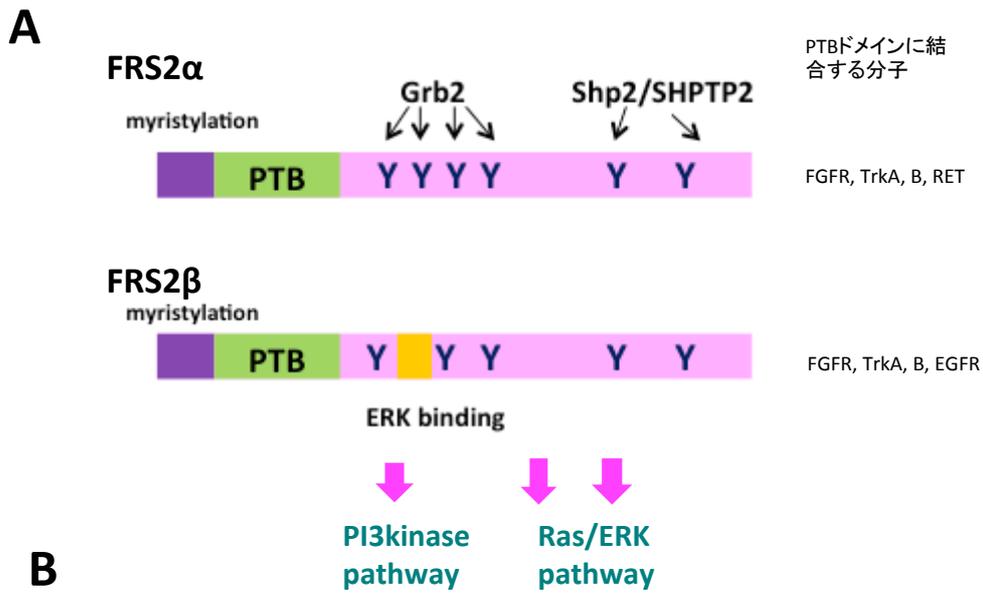


図2: アダプター蛋白FRS2βの機能 (Gotoh et al., 2008)

A) FRS2ファミリーにはFRS2αとFRS2βが存在し、共にFGFシグナルを増強することが報告されている。しかしFRS2βにはERKの結合ドメインがあり、リン酸化したERKとCDドメインを介して結合することが当研究室の研究より明らかとなった (Iejima et al., 2010)。

B) リン酸化ERKと結合したFRS2βがErbBファミリーと結合したERKの核内移行を抑制することで細胞増殖を抑制する。

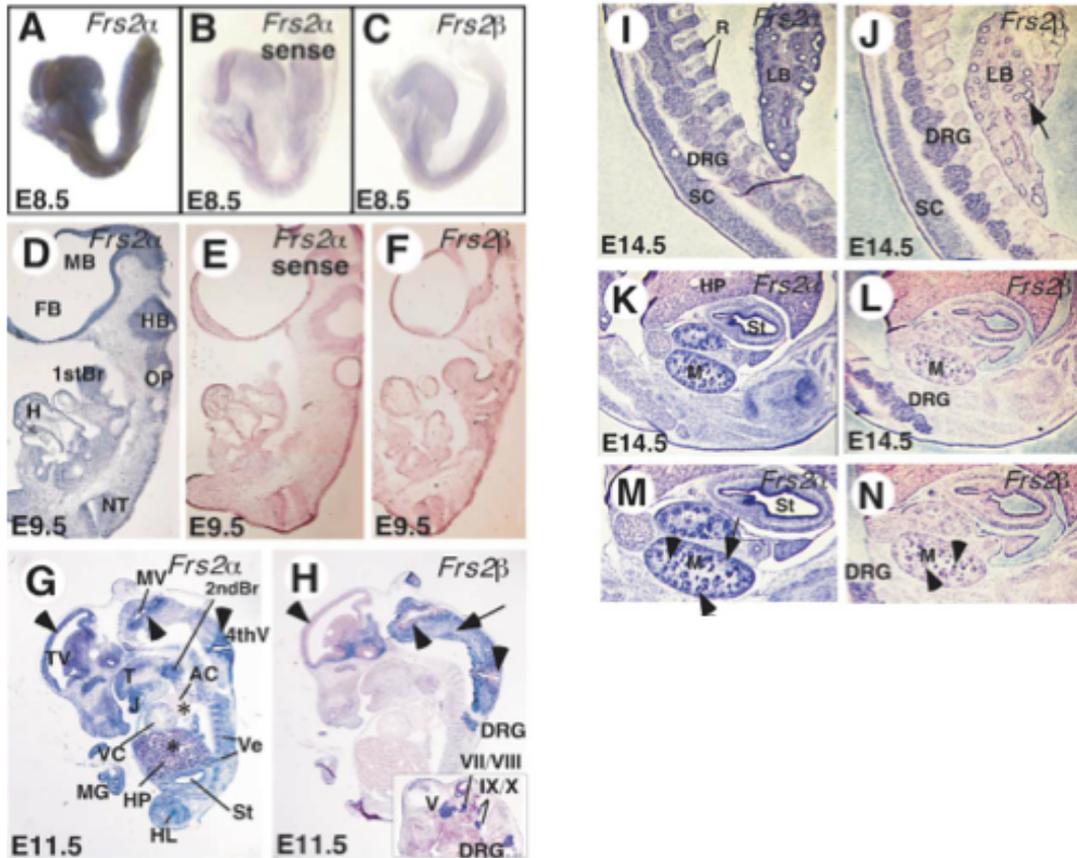


図3: FRS2 α とFRS2 β の発現部位 (Gotoh et al., 2004)

FB:前脳、MB:中脳、HB:後脳、OP:耳窩、1st Br:第一鰓弓、H:心臓、NT:神経管、TV:終脳胞、MV:中脳胞、4th V:第4脳室、T:舌、J:顎、2nd Br:第二鰓弓、AC:心房、VC:心室、Ve:前軟骨原基椎、HP:肝実質、MG:中腸、St:胃、HL:後肢、V:三叉神経節、VII/VIII:顔面/聴神経節複合体、IX/X:舌咽/迷走神経節複合体、R:肋骨軟骨原基、LB:肺芽、SC:脊髄、M:後腎

FRS2ファミリーはMAPキナーゼを活性化させる点において共通の役割を持っているが、その発現パターンには大きな違いがある。

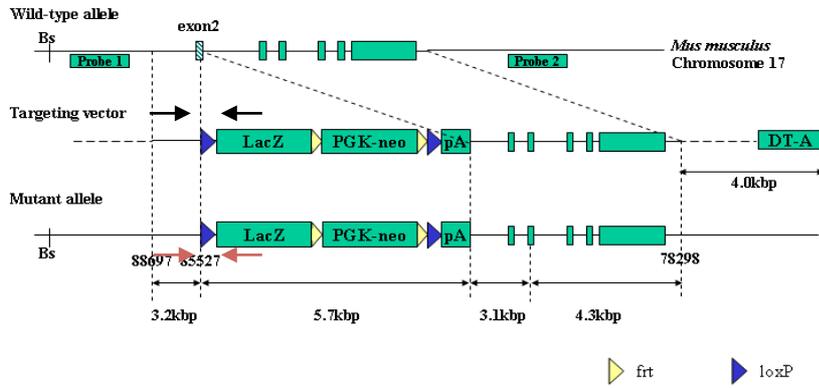
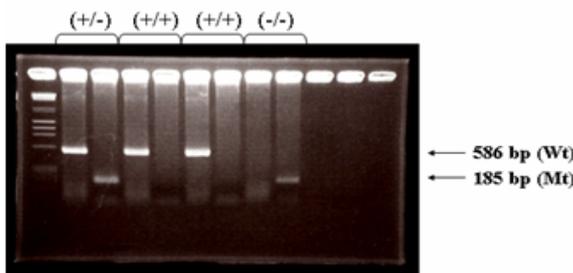
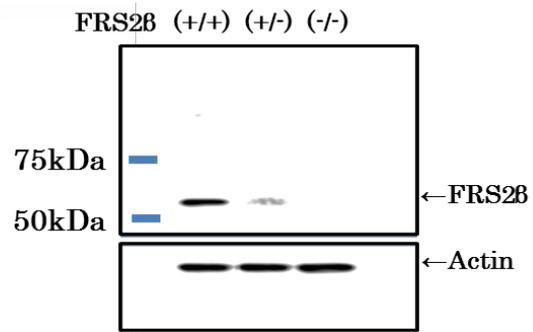
A**B****C**

図4: FRS2βノックアウトマウスの作製(家島ら、未発表)

A)ターゲティングベクターの模式図、B)ジェノタイプング、C)ウェスタンブロットティング

FRS2β遺伝子のエクソン2領域にターゲティングベクターを挿入しノックアウトマウスを作製。

作製したノックアウトマウスは、脳組織の蛋白質ライゼートを用いたウェスタンブロットにより、FRS2βが蛋白質レベルでノックアウトされていることを確認している。

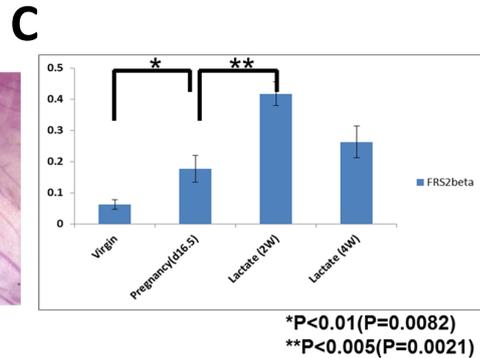
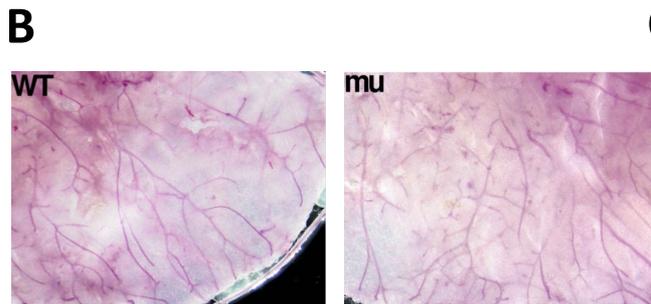
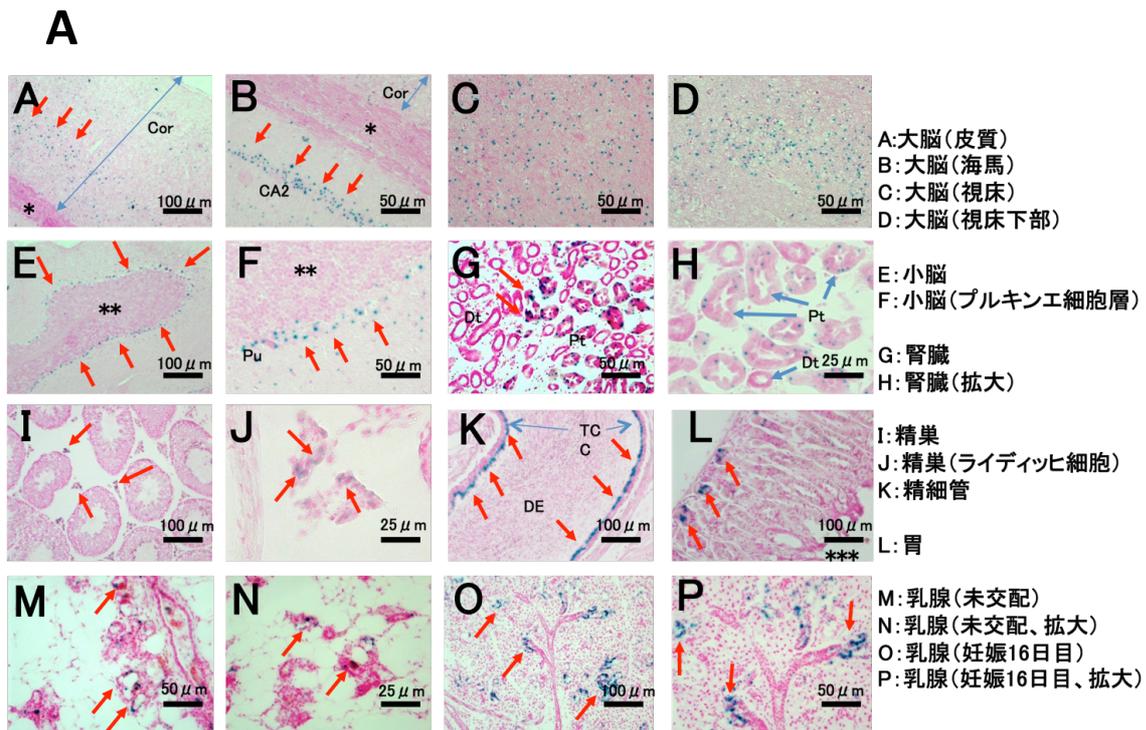


図5: ターゲティングベクターに含まれるLacZ遺伝子の検出によるFRS2βの発現部位(家島ら、未発表)

A) 大脳皮質、海馬、視床、視床下部に存在する神経細胞、小脳プルキンエ細胞、腎臓近位尿管上皮細胞、精巣ライディッヒ細胞、精巣上体円柱上皮細胞、胃底腺主細胞、乳腺上皮細胞がLacZ陽性を示し、FRS2βが発現していることが示される。

B) 乳腺脂肪体のホールマウント。FRS2βWTとFRS2βKOで差は認められない。

C) qRT-PCRによる授乳期にかけての乳腺におけるFRS2βの発現。授乳2週目で最も高い発現を認める。

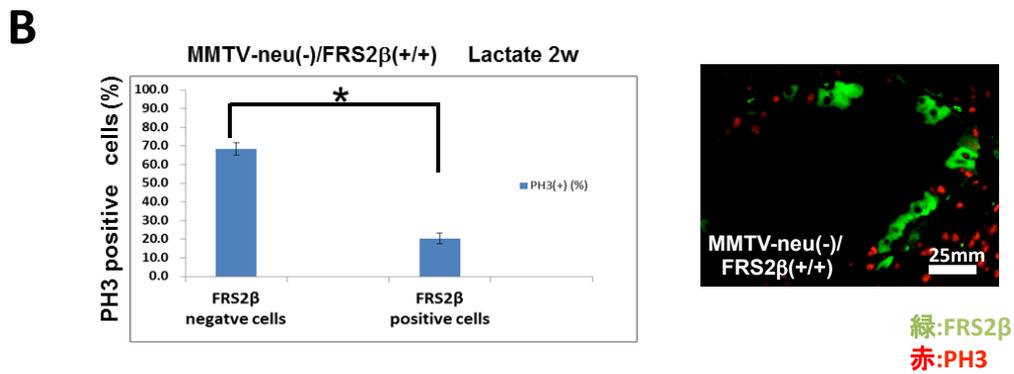
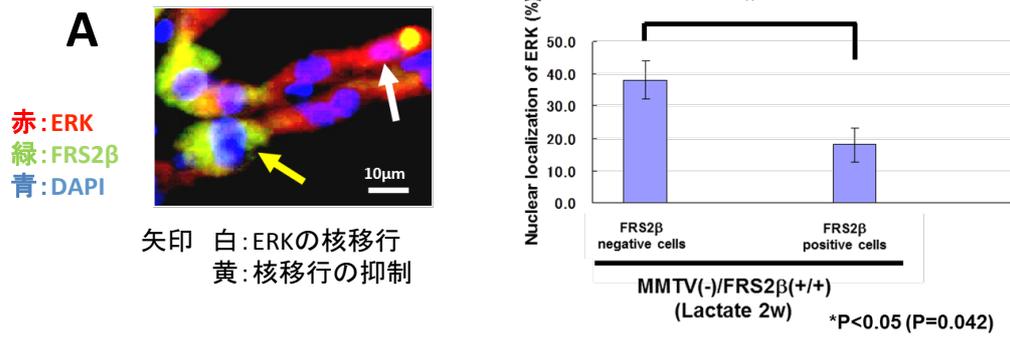
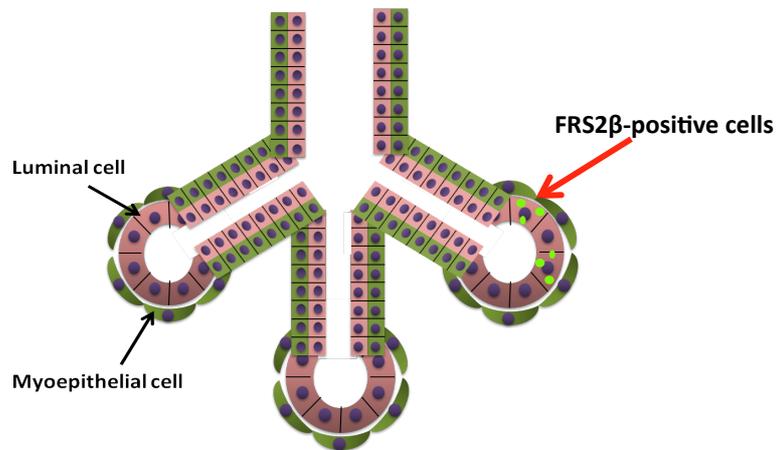


図6: 作出したノックアウトマウスの授乳期乳腺におけるERK核内移行と細胞増殖活性(家島ら、未発表)

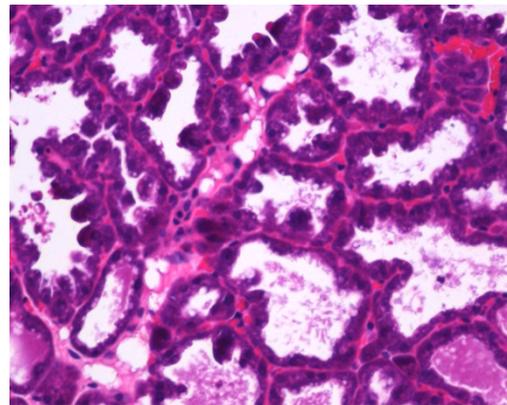
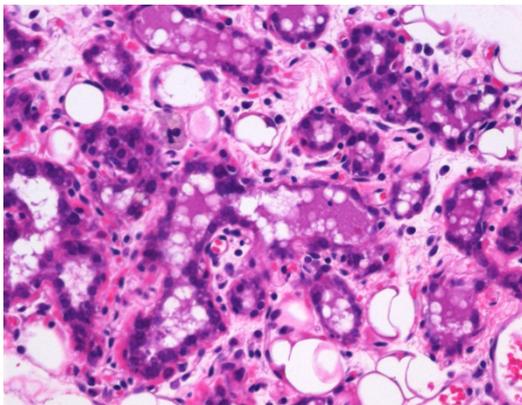
A)FRS2β陽性細胞ではERKの核局在の割合が少ない。

B)FRS2β陽性細胞ではPH3陽性細胞の割合が少ない。

A**B**

乳腺

授乳期乳腺

**図7: 乳腺の構造****A) 乳腺固有構造の模式図**

腺房では乳汁を産生・分泌する乳腺上皮細胞を包むように筋上皮細胞が存在し、オキシトシンの刺激で筋上皮細胞が収縮し乳汁を導管を通して対外へ分泌する。導管では乳腺上皮細胞は導管上皮細胞に、筋上皮細胞は基底細胞になる。

B) 休止期乳腺と授乳期乳腺の組織像

授乳期では乳腺上皮細胞の丈が高くなり、細胞質は好塩基性になる。乳腺全体の構造が肺胞のような構造に再構成される。

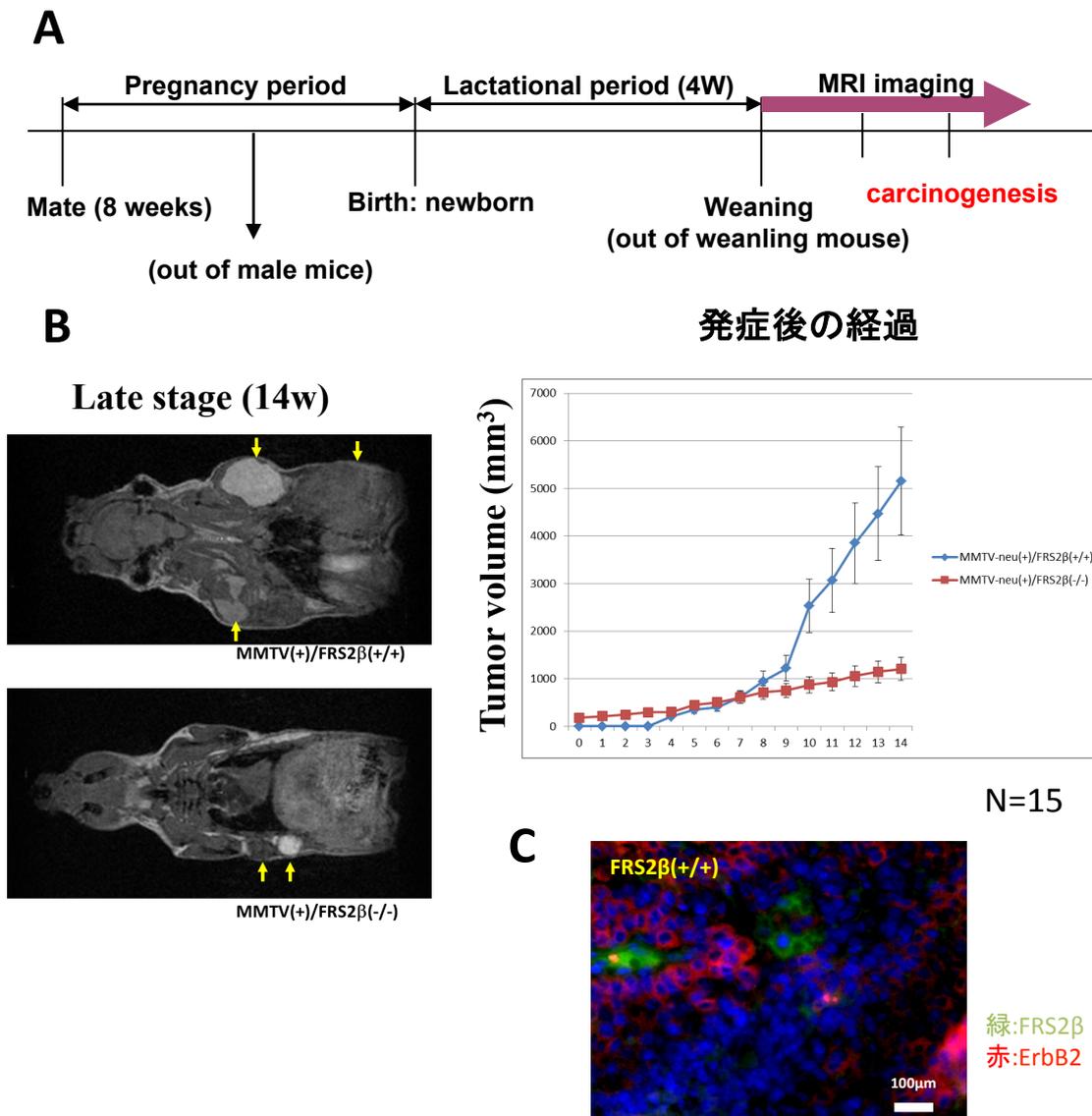


図8: MMTV-neuマウスの乳癌増殖傾向(A-C; 家島ら、未発表)

A)実験の模式図

B)乳癌の計測結果

左:計測開始14週目のMRI画像。

右:離乳後1~2週でKOの個体群で乳癌が発症、4~5週目でWTで乳癌を発症する。

離乳後8週前後で双方の乳癌のサイズが同程度になり、この時期を境にWTとKOで大きさが逆転する。WTが測定開始17~20週で死亡するのに対し、KOでは26~29週で死亡する。

C)MMTV-neuの乳癌のうち一部の細胞がFRS2β陽性を示す。

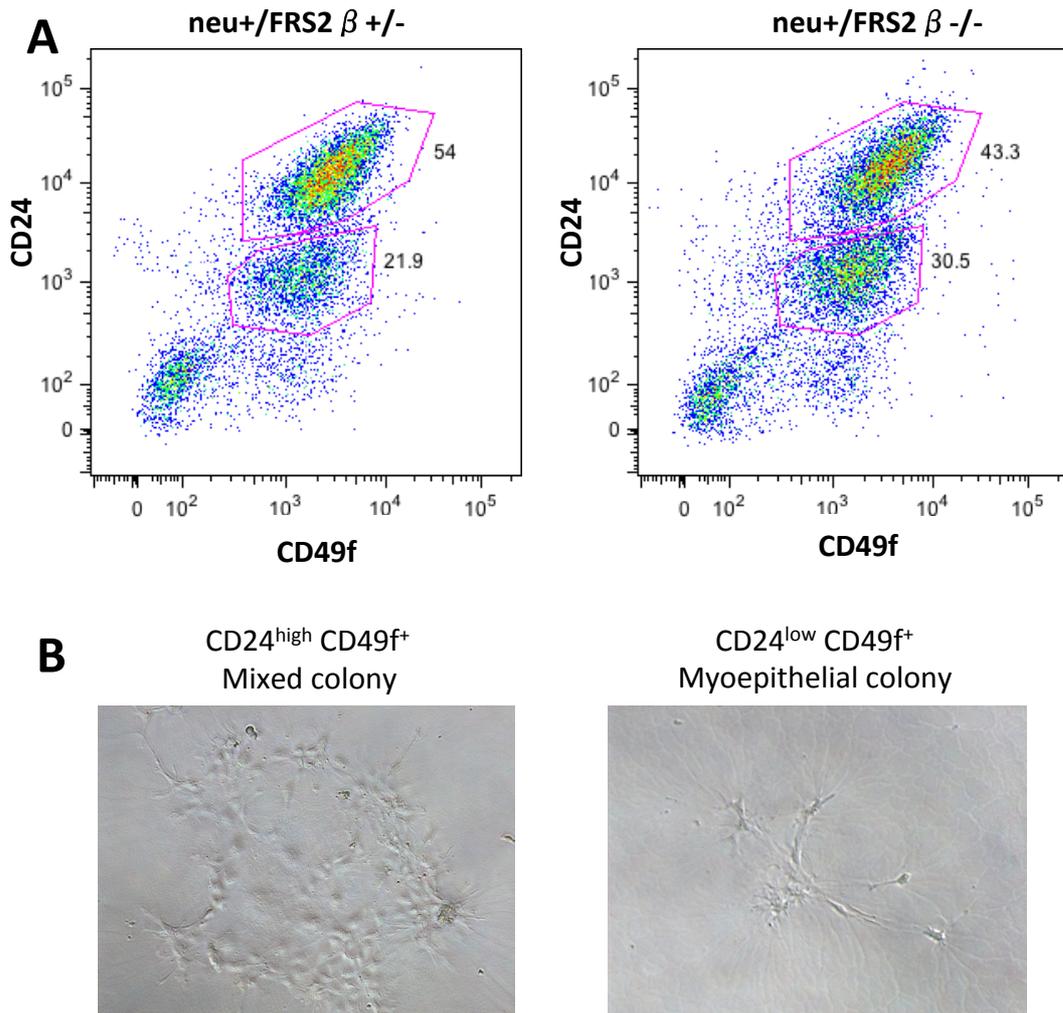


図9: 乳腺細胞のフローサイトメトリー解析

A)15週齢マウス乳腺細胞のフローサイトメトリー解析 (N=3)

B)マトリゲル培養4日目 (neu-/FRS2 β +/+)

細胞をソーティングしマトリゲル上でコロニーアッセイを行った。

CD24^{high} CD49f⁺分画の細胞からは細胞質の広い乳腺上皮様細胞と紡錘形の細胞質をもつ筋上皮様細胞の混在したコロニーが形成される。CD24^{low} CD49f⁺分画の細胞からはアメーバ状の筋上皮様細胞が得られる。

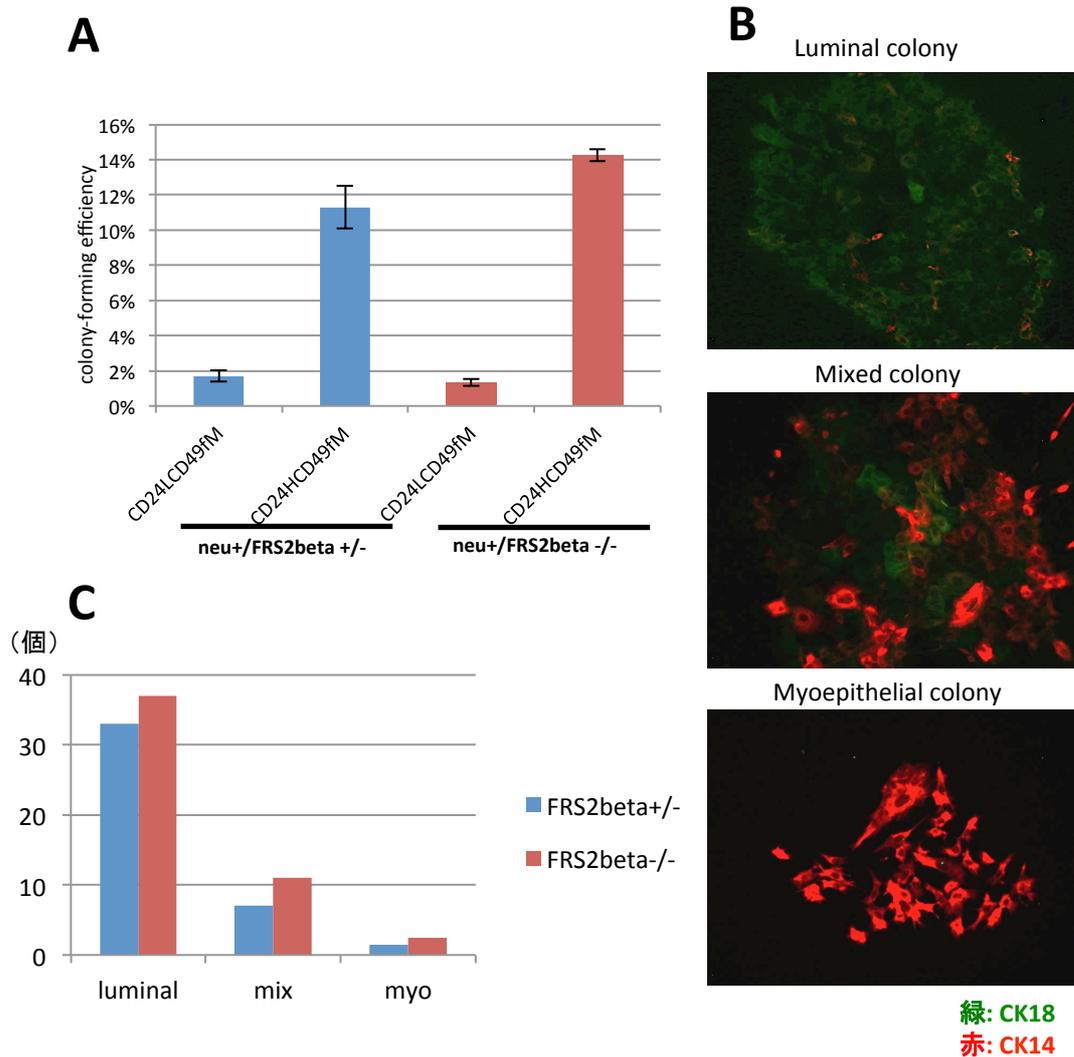


図10: 乳腺細胞のマトリゲル分化アッセイ

A) CD24とCD49fでソーティングした細胞のコロニーアッセイ。

B) LuminalマーカーのCK18とmyoepithelialマーカーのCK14で免疫染色を行いコロニーをluminal colony、mixed colony、myoepithelial colonyに分類。

C) マトリゲル上でコロニーを培養し、luminal colony、mixed colony、myoepithelial colonyの形成率を比較。各コロニー形成率はFRS2βWTとKO間で差が認められない。

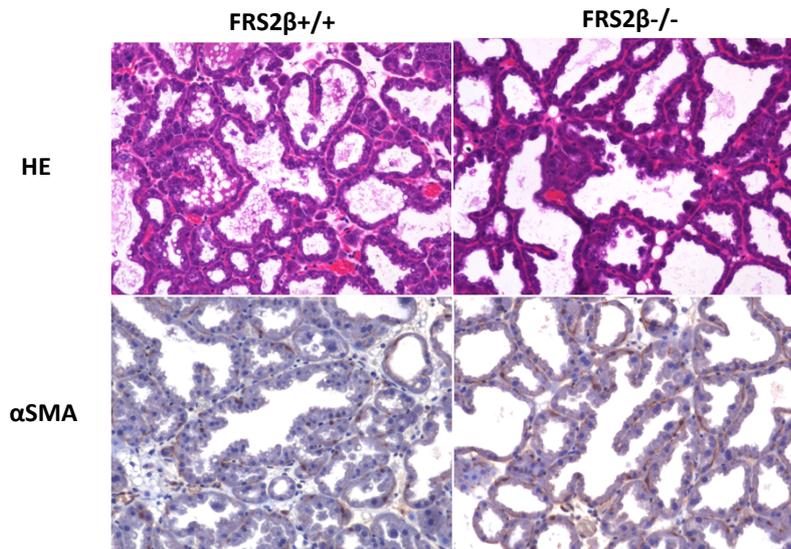


図11: 授乳期乳腺の組織像

授乳期乳腺の組織像。上段; HE染色、下段; αSMAのIHC。FRS2βWTとFRS2βKOで違いは認められない。

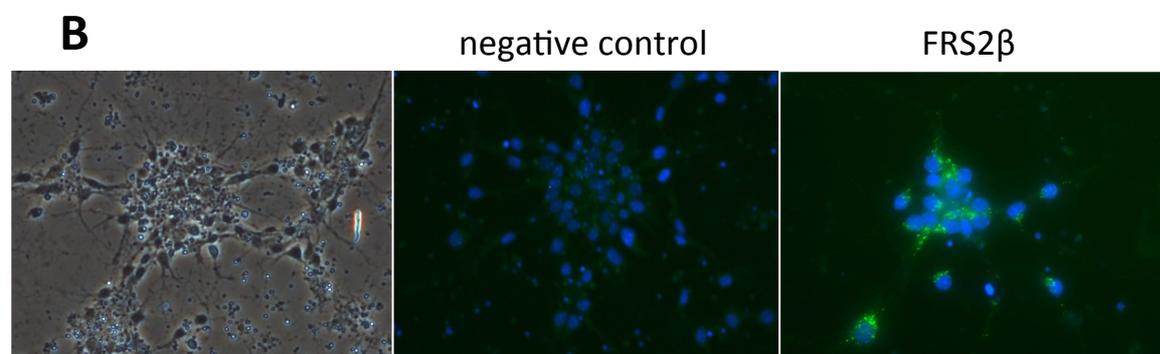
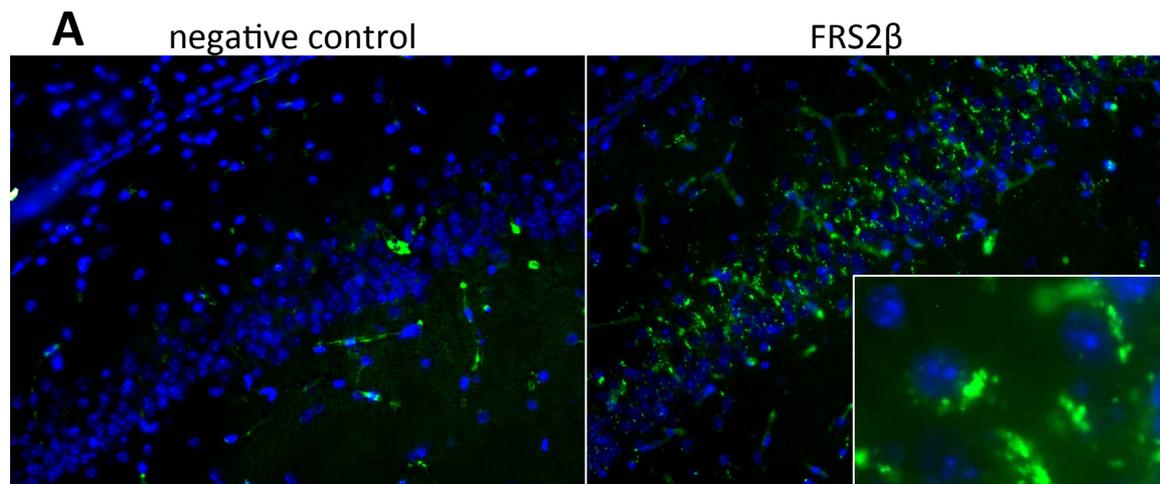


図12: FRS2 β の免疫染色(ポジティブコントロールの検討)

FRS2 β 抗体を用いた免疫染色のポジティブコントロールとして、A)マウスの脳凍結切片(海馬)、

B)マウス的大脑皮質の培養細胞を用いた。

マウスの脳において神経細胞の細胞質が顆粒状に陽性を示し、大脑皮質の培養細胞では全ての細胞の細胞質が顆粒状に陽性を示す。

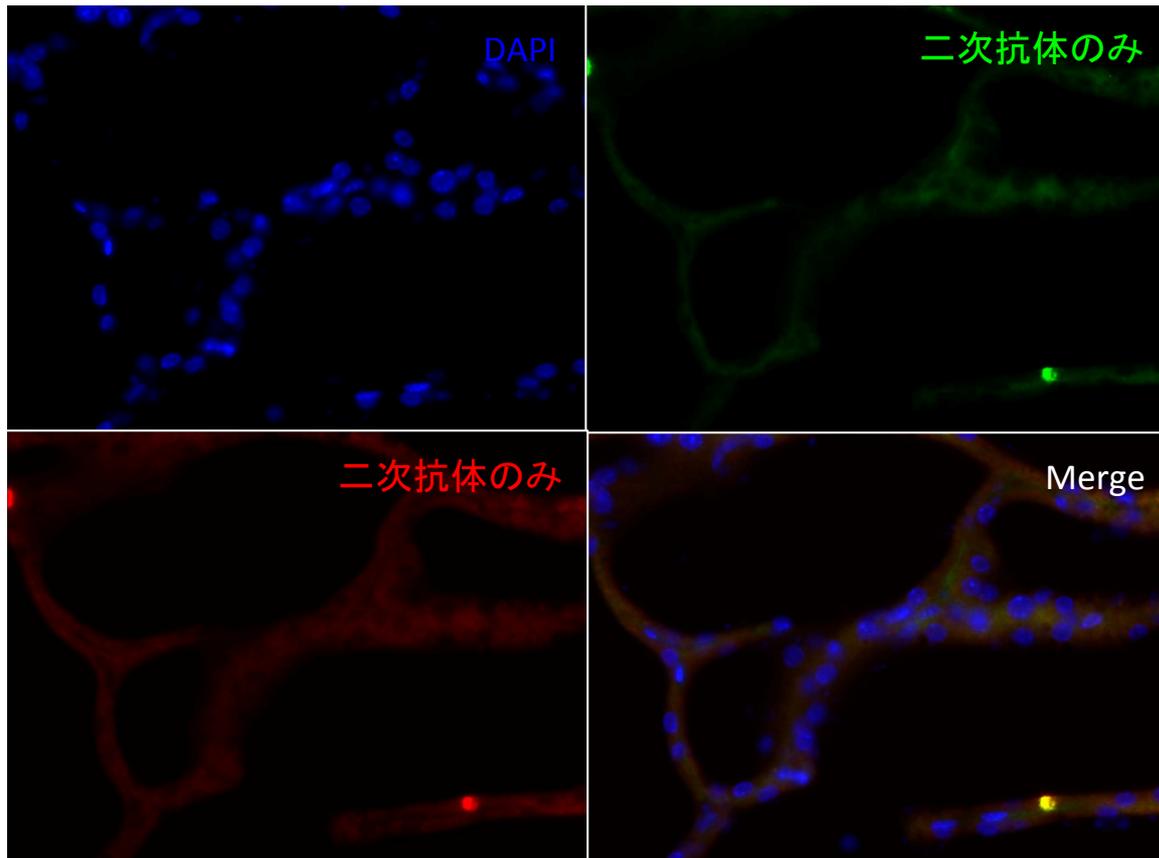


図13: FRS2 β 免疫染色のネガティブコントロール
授乳期乳腺。一次抗体の代わりにPBSを用いた。

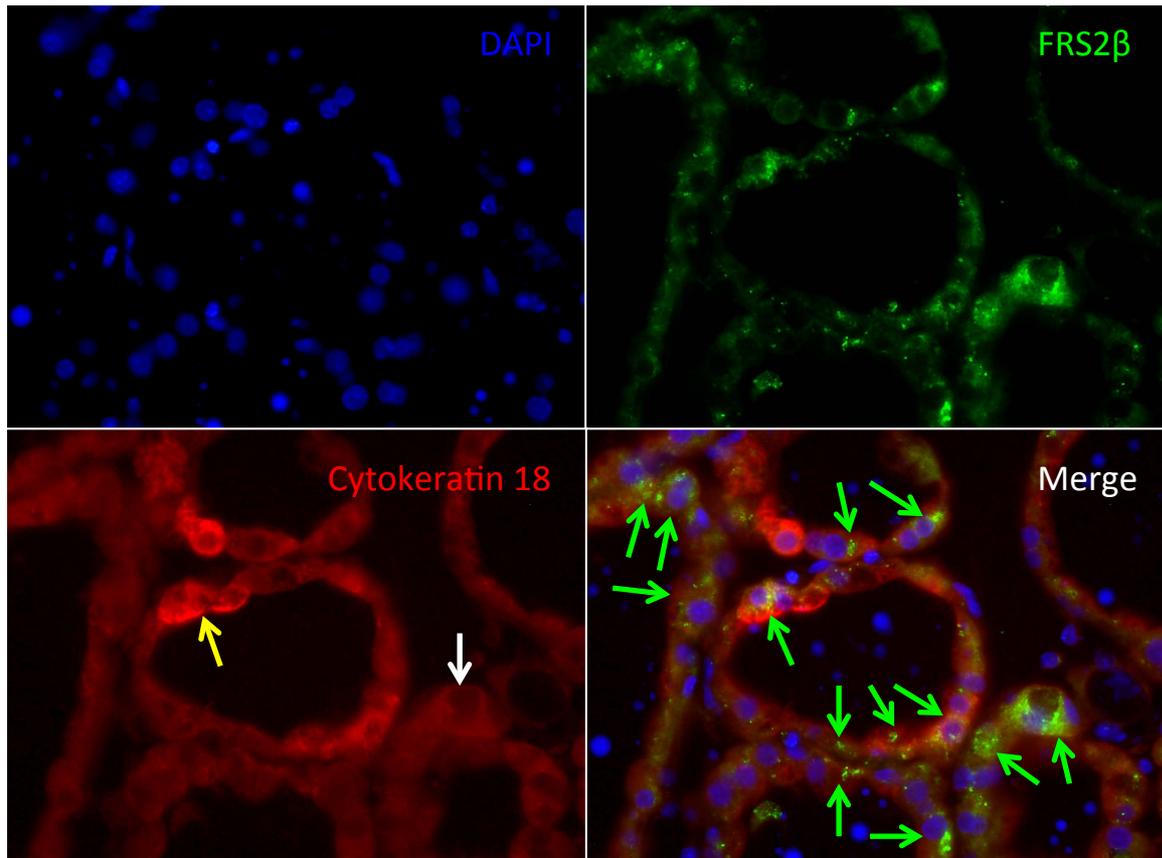


図14: FRS2βの授乳期乳腺における局在(乳腺上皮細胞)

DAPI(blue)、FRS2β(green)、乳腺上皮マーカーのCK18 (red)、Merge。CK18とFRS2βの発現が一致し、FRS2βは乳腺上皮細胞の一部に発現する。

緑矢印はFRS2β陽性細胞。

黄矢印のようにCK18の発現が高い細胞と、白矢印のようにCK18の発現が弱い細胞がある。

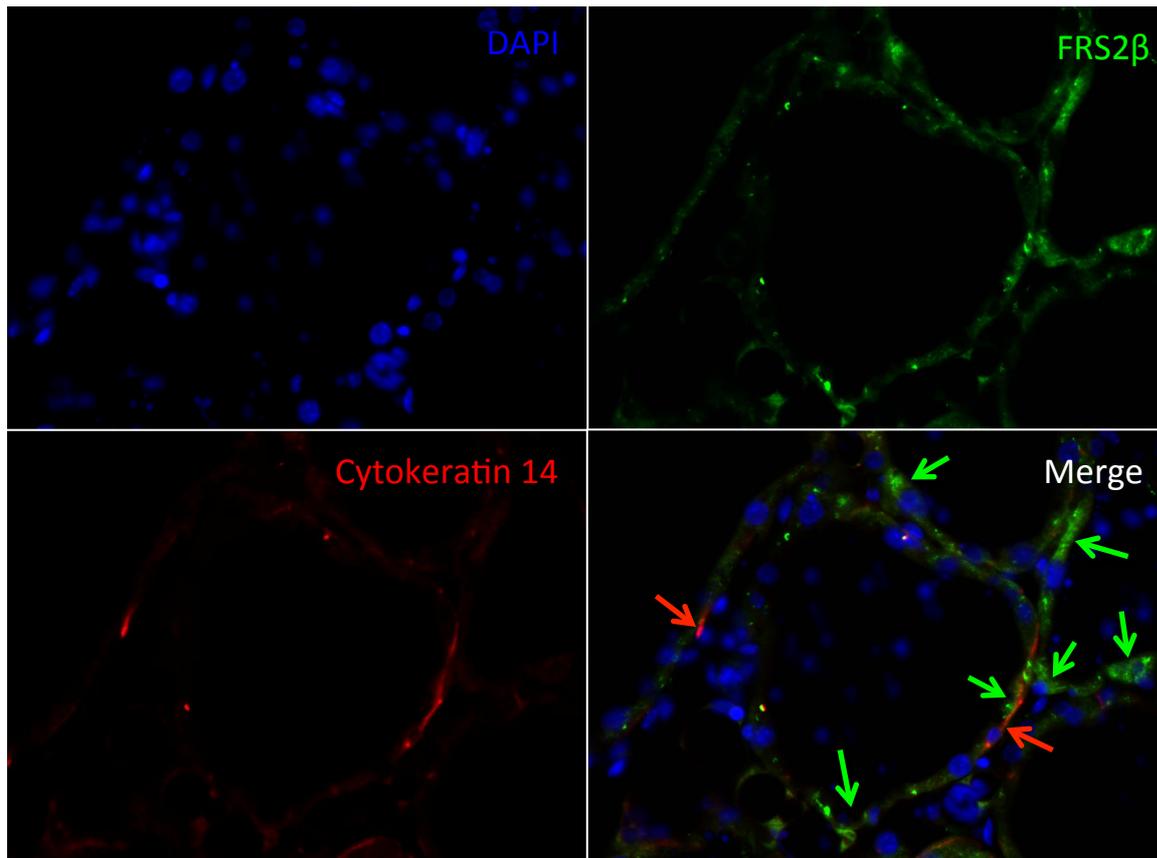


図15: FRS2βの授乳期乳腺における局在(筋上皮細胞)

DAPI、FRS2β (green)、筋上皮マーカーのCK14 (red)、Merge。CK14とFRS2βの発現は一致せず、FRS2βは筋上皮細胞には発現しない。

緑矢印はFRS2β陽性細胞、赤矢印はCK14陽性の筋上皮細胞。

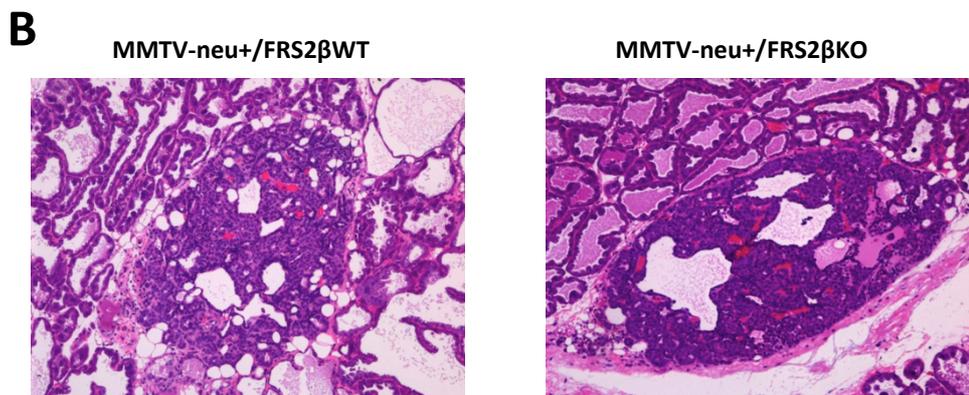
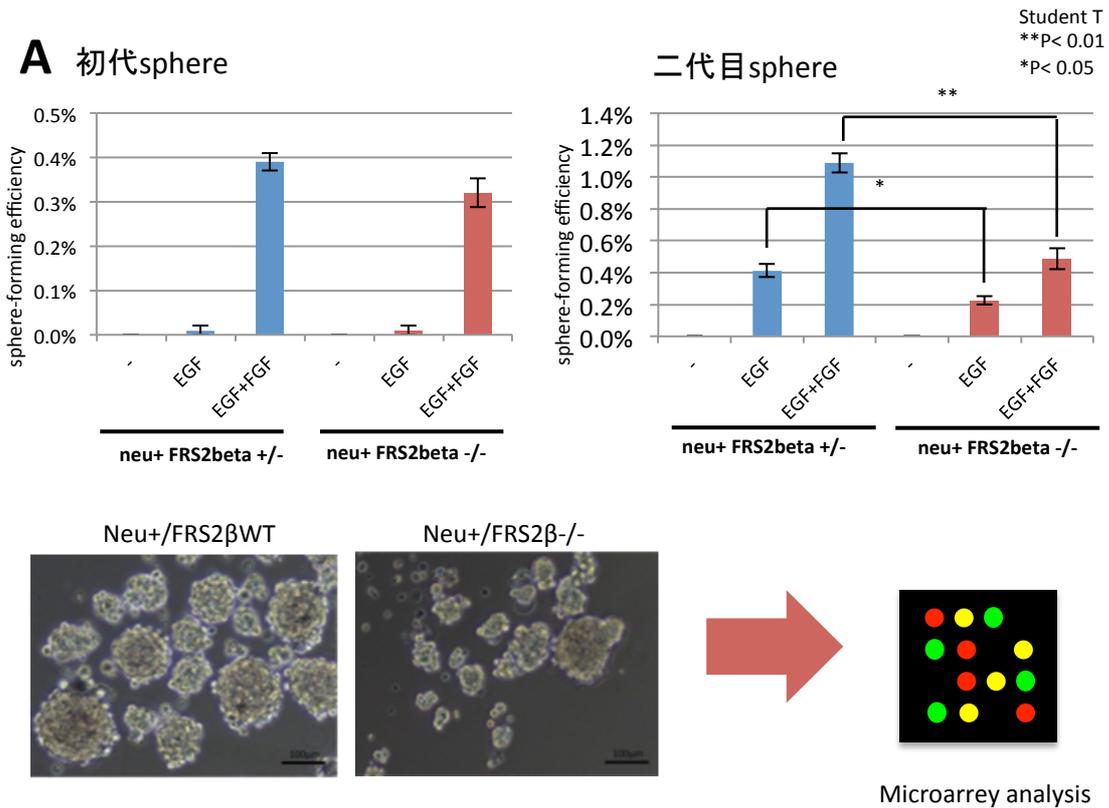


図16: 授乳期乳腺のsphere assayと遺伝子発現網羅的解析

A)20週齢マウスの授乳期乳腺でsphere assayを行い二日目sphereのRNA抽出をし、マイクロアレイを行った。

B)授乳期乳腺の中にはすでに微小な癌が出来はじめている(HE染色)。

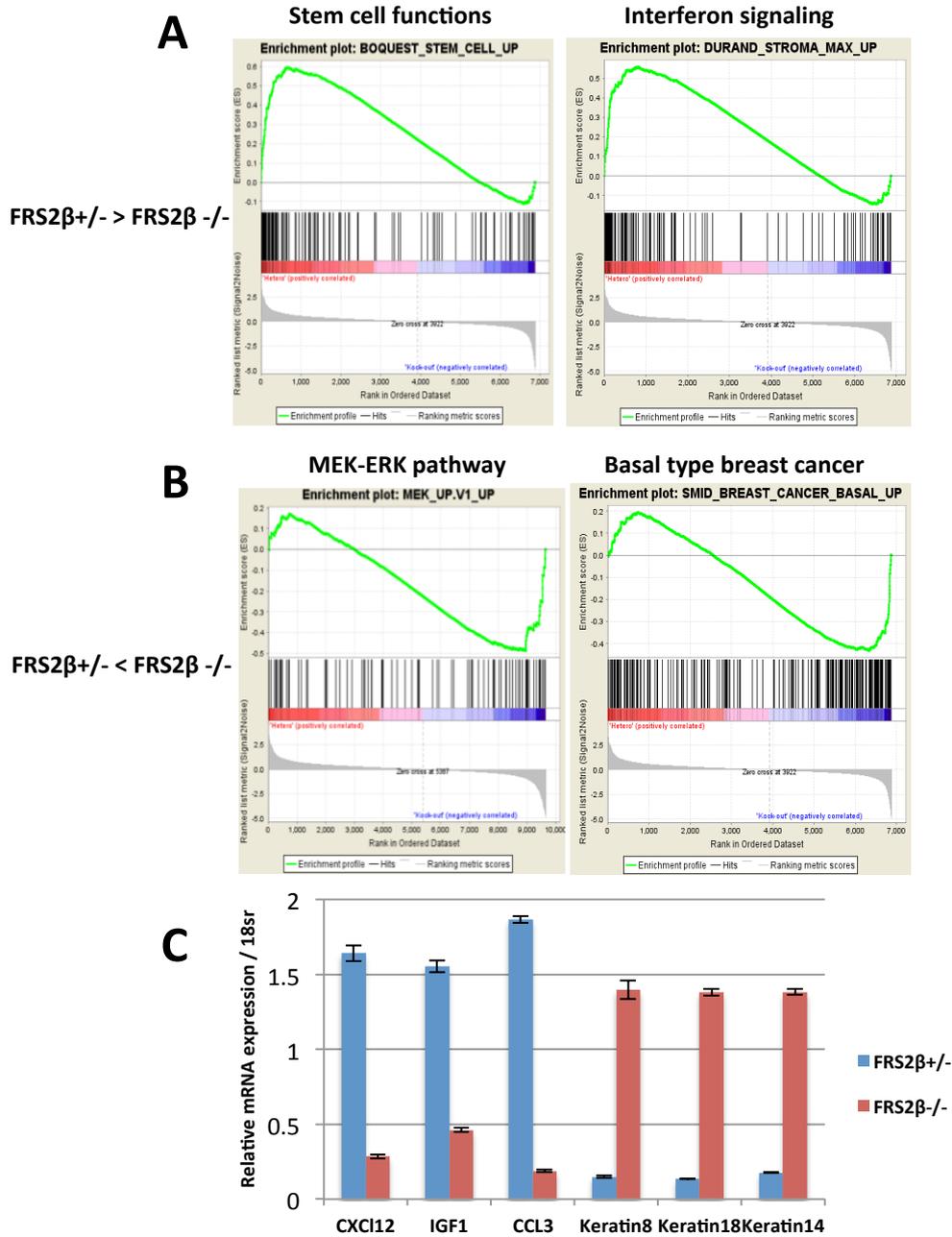


図17: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)解析の結果

A) FRS2 β WT幹細胞やインターフェロニングネチャーが上昇する。

B) FRS2 β KOで上昇していたMEK-ERK経路。

C) pRT-PCRにより各サイトカインがFRS2 β WTで発現上昇し、FRS2 β KOで分化マーカーが発現上昇する。

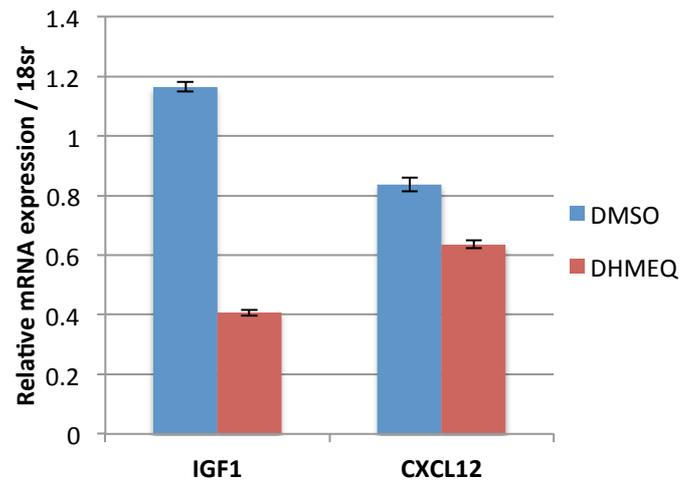


図18: IGF1とCXCL12の転写はNFκBの下流で調整されている
 NFκBの阻害剤であるDHMEQをFRS2βWT授乳期乳腺に添加することで、IGF1とCXCL12の転写が抑制される。

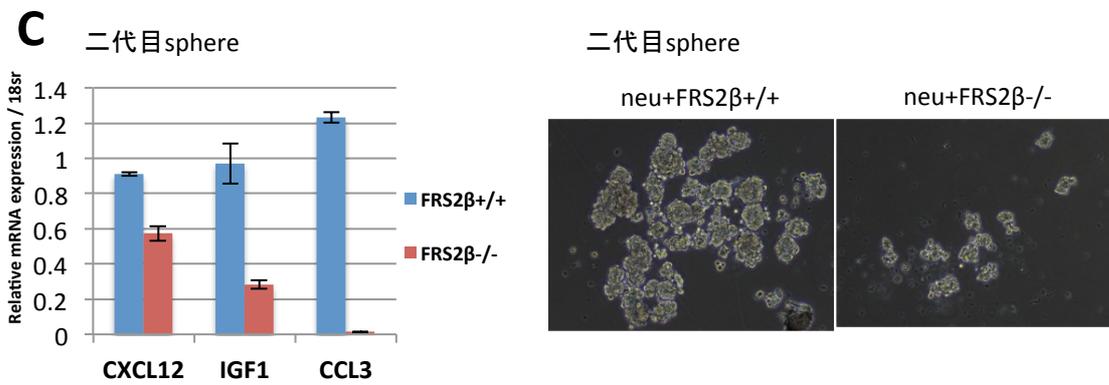
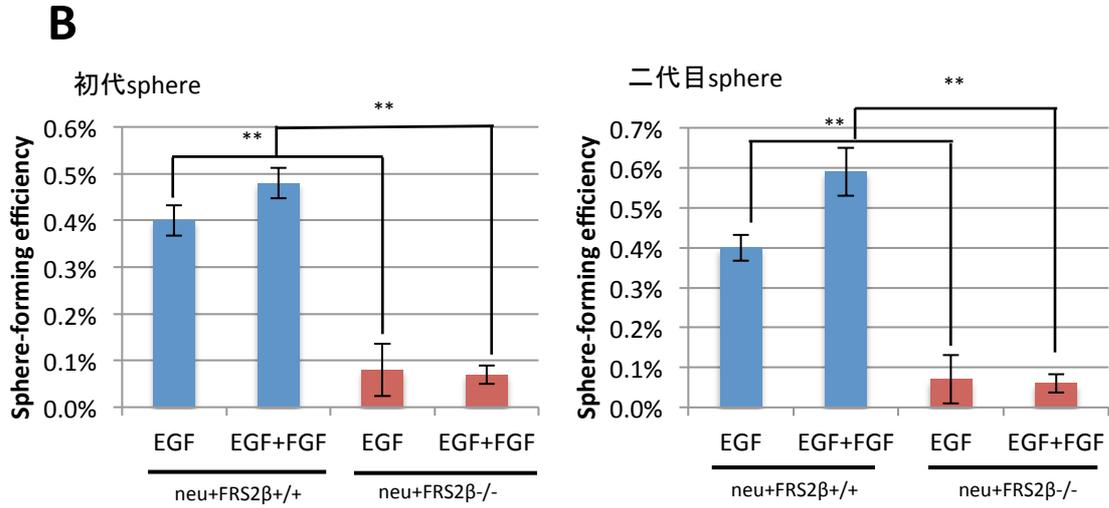
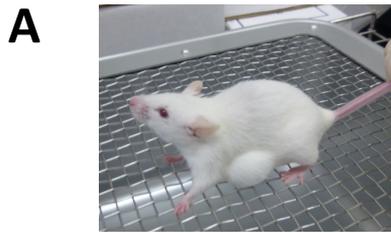
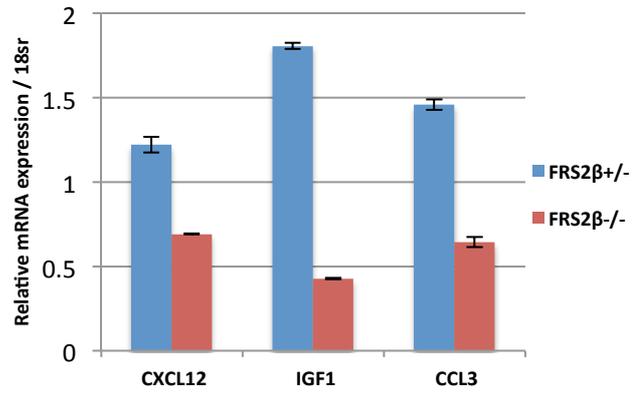
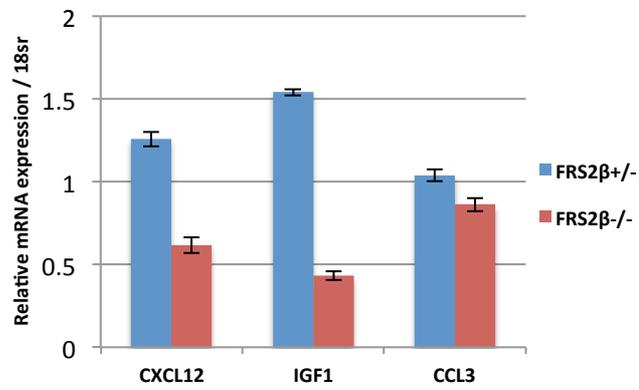


図19: MMTV-neu乳癌のsphere assayとqRT-PCR

A)乳癌を発症したマウス、B)FRS2βWTとFRS2βKOのsphere assay、C)二代目sphereのCXCL12、IGF1、CCL3のmRNA発現レベルと二代目sphereの写真。

A**B****図20: 乳癌接着培養の遺伝子発現**

A)8日目、B) 16日目。

sphereだけではなく接着培養系乳癌においてもFRS2βの発現は各サイトカインの転写に必要である。

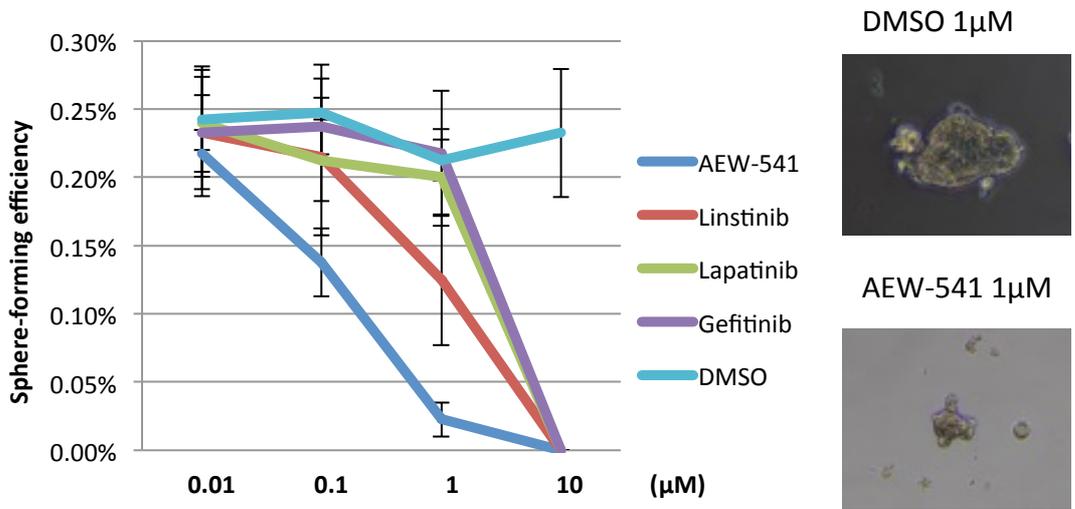


図21: 乳癌sphereに対するIGF1R阻害薬、EGFR阻害薬の効果

MMTV-neu乳癌sphere培養にIGF1R阻害薬のAEW-541とLinstinib、EGFRとHER2阻害薬のLapatinib、EGFR阻害薬のGefitinibを添加した。

MMTV-neu/FRS2β+/-ErbB2過剰発現乳腺癌においてIGF1-IGF1Rシグナリングは乳癌幹細胞の維持に必要である。

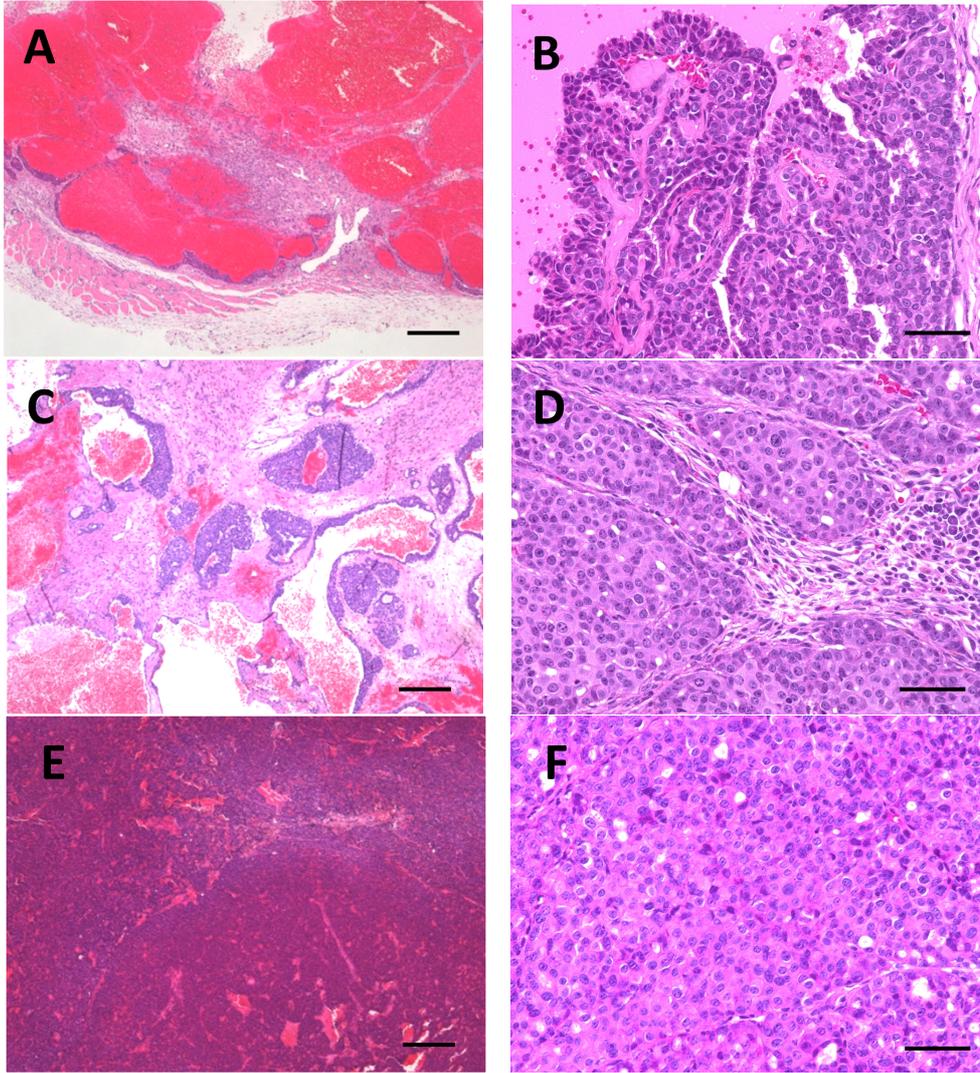


図22: FRS2 β WTとFRS2 β KOの乳癌の病理組織学的解析(ヘマトキシリン・エオジン染色)

- A)WT初期癌(低倍)。腫瘍細胞に内張りされた嚢胞。
 - B)WT初期癌(高倍)。腫瘍細胞が管状乳頭状に増殖。
 - C)WT末期癌(低倍)。腫瘍巣間に間質を多く認める。
 - D)WT末期癌(高倍)。腫瘍細胞が胞巣状に増殖。
 - E)KO癌(低倍)。腫瘍細胞のみが密に増殖する。
 - F)KO癌(高倍)。充実性増殖する腫瘍細胞。
- A)C)E) Bar=100 μ m。 B)D)F) Bar=50 μ m。

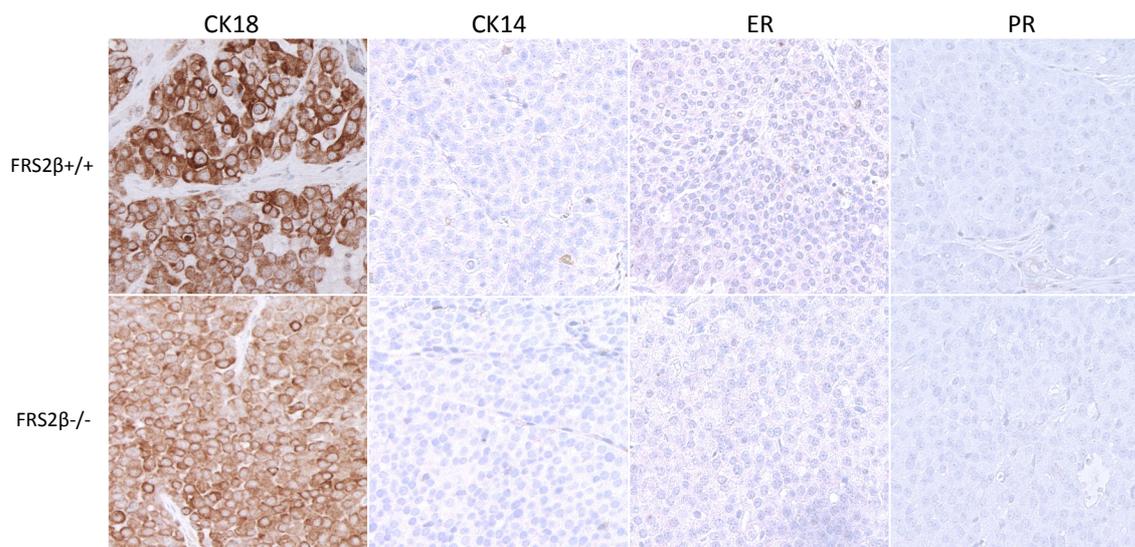


図23: MMTV-neu乳癌の免疫組織化学的検索

MMTV-neuの乳癌はluminalタイプであるとの報告通り、腫瘍細胞は乳腺上皮マーカーのCK18に陽性、筋上皮細胞マーカーのCK14に陰性、ERに陰性、PRに陰性を示した。FRS2 β ノックアウトマウスでも同様である。

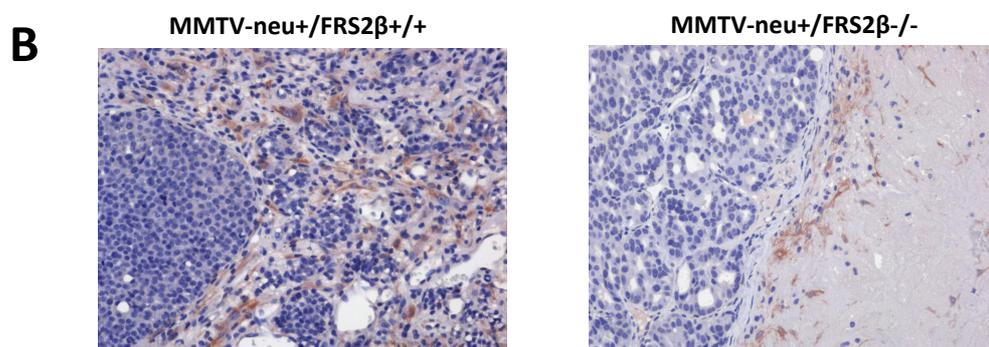
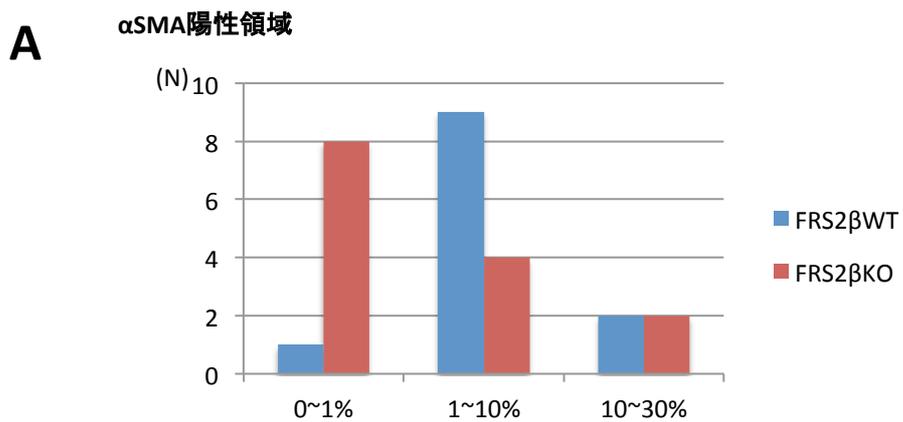
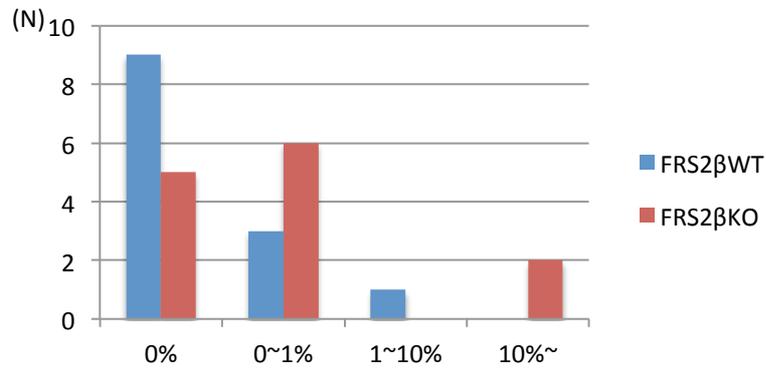


図24: 腫瘍巢内における癌関連線維芽細胞

A) MMTV-neu乳癌を α SMA陽性を示すCAFの腫瘍内の量で分類。

B) α SMA陽性を示すCAFの免染写真。FRS2 β WTの腫瘍で α SMA陽性のCAFが多い傾向にある。

A p63免疫染色結果



B

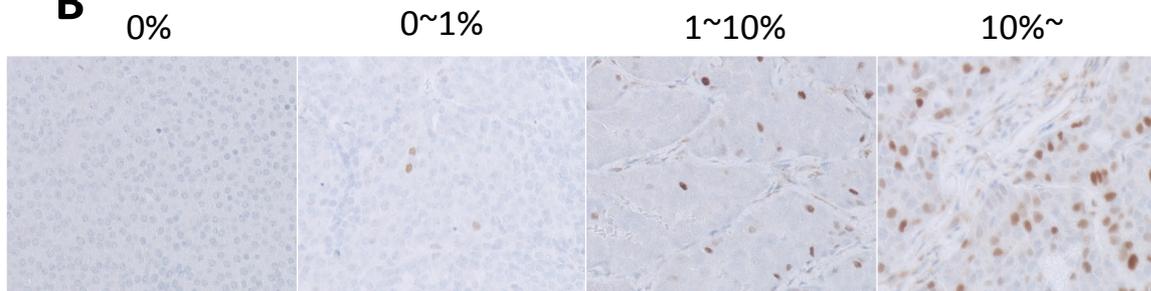


図25: basal marker p63発現と乳癌

A) MMTV-neu乳癌細胞のうち核がp63陽性を示す細胞の割合で分類。

B) 分類した際のp63免疫染色写真。

KOにおいて基底細胞マーカーのp63陽性細胞が多い傾向にあり、luminal typeからbasal typeへ乳癌のサブタイプが移行している傾向がみられる。

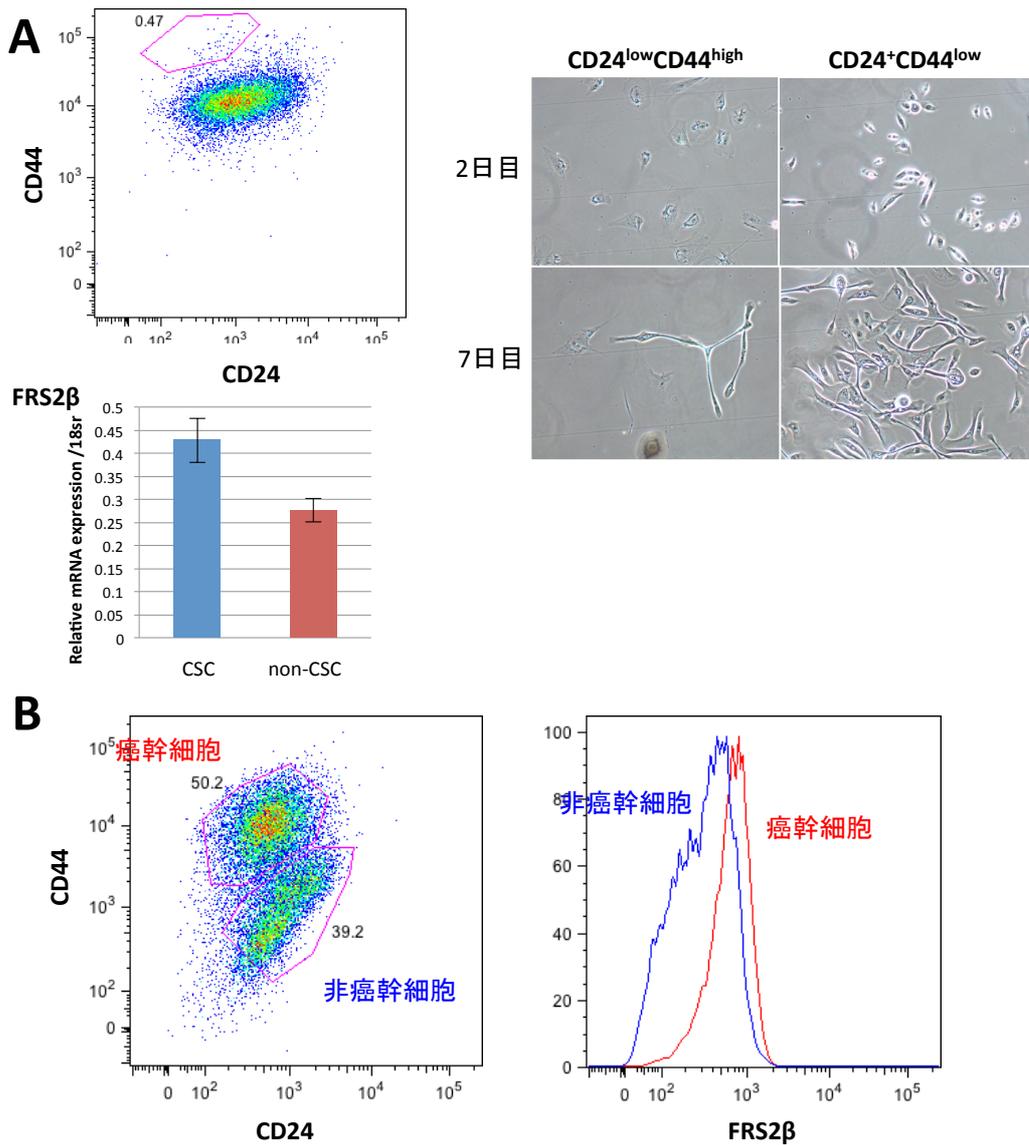


図26: ヒト乳癌患者検体におけるFRS2βの発現

A) 検体No.1をフローサイトメトリー解析で癌幹細胞分画と非癌幹細胞分画に分け、mRNAの発現解析と培養を行なった。mRNAの発現はCSC分画で上昇してる。

B) 検体No.2をフローサイトメトリー解析でCD24、CD44、FRS2βの発現を調べた。癌幹細胞分画でFRS2βの発現が高い。

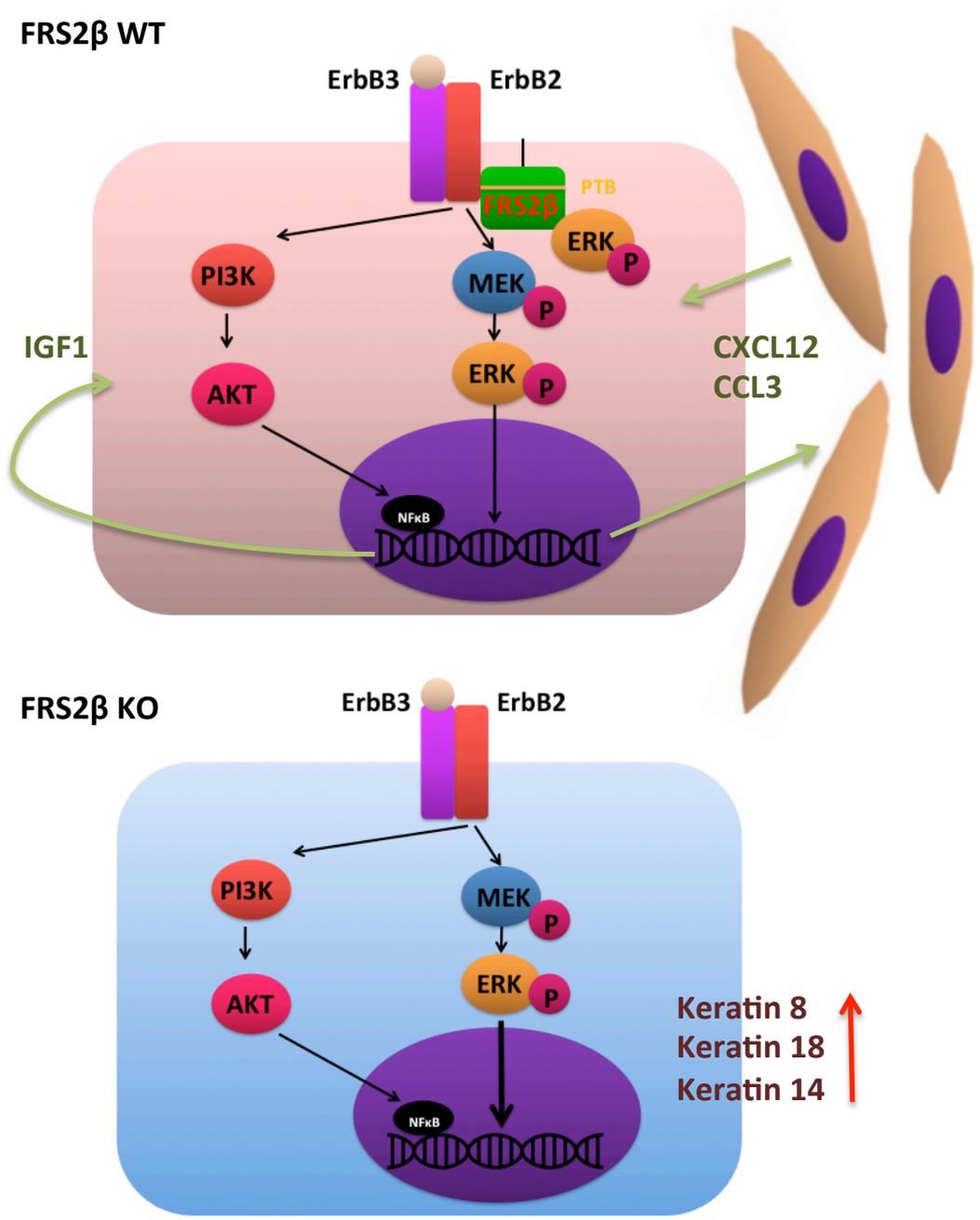


図27:FRS2βの乳癌発症におけるモデル図

FRS2βがERKの活性を恒常的に抑制することで幹細胞性が維持され、サイトカインの産生とニッチの形成が起こる。一方、FRS2βがノックアウトされるとERKの活性が上昇することで細胞分裂が促進、分化が進んでいくと考えられる。

抗原	メーカー	製品番号	希釈倍率	IHC前処理
IHC, IC用抗体				
Cytokeratin 18	abcam	ab52948	1:100	AT 121°C10min pH6.0クエン酸Buffer
Cytokeratin 14	abcam	ab53115	1:100	AT 121°C10min pH6.0クエン酸Buffer
alpha smooth muscle Actin	abcam	ab5694	1:200	なし
Estrogen Receptor alpha	abcam	ab32063	1:50	AT 121°C10min pH6.0クエン酸Buffer
Progesterone Receptor	abcam	ab2764	1:200	AT 121°C10min pH6.0クエン酸Buffer
p63	abcam	ab124762	1:1200	AT 121°C10min pH6.0クエン酸Buffer
FRS2β	Minegishi et. al., 2009		1:20	
抗体量 (per 10 ⁶ cells(μl))				
FACS用抗体				
CD24 FITC	BD	553261		2
CD49f PE	eBioscience	12-0495-81		10
CD24 APC(Alexa647)	BD	561644		20
CD44 APC-H7	BD	560532		5
isotype APC(Alexa647)	BD	557715		5
isotype APC-H7	BD	560183		5

表1:IHC、IC用抗体の希釈倍率とIHCの際の前処理。またFACS抗体の添加量。

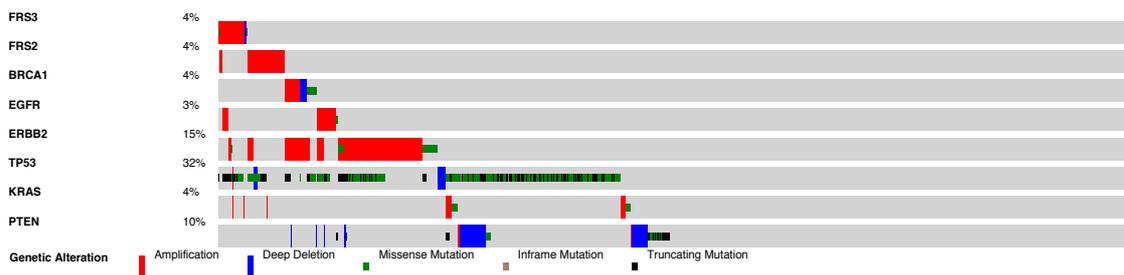
Regulation	Genesymbol	Genedescription	Fold Change	Hetero	KO
down	Kbtbd11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	-55.27519572	5.791824805	0.104781625
down	Vtn	vitronectin	-18.08024474	2.589627351	0.143229662
down	Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-15.08840174	1.366687694	0.090578692
down	Ly6h	lymphocyte antigen 6 complex, locus H	-13.51931463	2.857366525	0.211354392
down	Clec10a	C-type lectin domain family 10, member A	-10.6756034	0.233674582	0.021888653
down	C4b	complement component 4B (Chido blood group)	-8.345178878	28.77252672	3.447802275
down	Adams17	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 17	-7.89936631	0.251302934	0.03181305
down	Efemp1	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-7.535892872	35.80748743	4.751591888
down	C3	complement component 3	-6.789625792	2.353303893	0.349313071
down	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	-6.736947709	267.593303	39.41208414
down	Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	-6.541346987	14.0253045	2.144100371
down	Ch1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	-6.300161395	51.81101632	8.223760167
down	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-6.27539468	35.13298177	5.598529425
down	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	-5.963656404	1.570818491	0.263398557
down	Nppc	natriuretic peptide type C	-5.840546257	0.323560712	0.05539905
down	Sned1	sushi, nidogen and EGF-like domains 1	-5.753120675	33.08862433	5.751421916
down	Rnf144a	ring finger protein 144A	-5.711201157	1.851778724	0.324236299
down	Kng1	kininogen 1	-5.627628645	14.4027201	2.559287581
down	Pira11	paired-Ig-like receptor A11	-5.581904722	0.187934763	0.033668572
down	Emr1	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	-5.578243885	0.569882199	0.102161578
down	Gbp4	guanylate binding protein 4	-5.496806482	0.359803953	0.065456907
down	Nid2	nidogen 2	-5.466598271	13.74361576	2.514107509
down	Plac8	placenta-specific 8	-5.363056272	32.77742461	6.111706264
down	Sphkap	SPHK1 interactor, AKAP domain containing	-5.245335083	0.2240641	0.042716833
down	Saa3	serum amyloid A 3	-5.177225763	465.1503265	89.8454786
down	Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	-5.061931556	9.107475523	1.799209535
down	Wdfy4	WD repeat and FYVE domain containing 4	-4.973096472	0.385223465	0.077461491
down	Gm11428	predicted gene 11428	-4.901592751	20.29573374	4.140640558
down	Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein	-4.837622095	51.86879169	10.72196023
down	Slc16a9	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 9	-4.777652051	0.441711078	0.092453589
down	Lrrc17	leucine rich repeat containing 17	-4.775324682	24.51690003	5.134080228
down	Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	-4.715132215	0.233158229	0.049448927
down	Guca1a	guanylate cyclase activator 1a (retina)	-4.67201782	0.25362649	0.054286285
down	Mnda	myeloid cell nuclear differentiation antigen	-4.460599599	15.72806736	3.525998471
down	Saa1	serum amyloid A 1	-4.397285088	108.9156969	24.76885049
down	Apod	apolipoprotein D	-4.352512612	76.85547016	17.65772486
down	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	-4.25419387	7.983166558	1.876540375
down	Adm	adrenomedullin	-4.247684749	7.86851804	1.852425146
down	C7	complement component 7	-4.243684846	0.135097556	0.031834964
down	Lmx1a	LIM homeobox transcription factor 1 alpha	-4.15005052	0.045380406	0.010934905
down	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	-4.132232355	4.884194656	1.181974835
down	Fgl2	fibrinogen-like protein 2	-4.008469959	10.66708249	2.661135695
down	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	-3.997732691	0.095384412	0.023859627
down	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	-3.975504554	19.96273593	5.021434552
down	Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d	-3.925127739	2.901292573	0.739158765
down	Cx3cr1	chemokine (C-X3-C) receptor 1	-3.860808122	0.125641716	0.032542854
down	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1	-3.836932641	35.21794198	9.178670899
down	Fam13c	family with sequence similarity 13, member C	-3.828961428	0.452987681	0.118305627
down	Wnt16	wingless-related MMTV integration site 16	-3.780639041	0.60852286	0.160957672
down	Npr1	natriuretic peptide receptor 1	-3.768078537	0.038840127	0.010307674
down	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-3.749622537	46.0267355	12.2750317
down	Vav1	vav 1 oncogene	-3.721908692	0.132181597	0.035514465
down	Lyz1	lysozyme 1	-3.716247088	15.50033259	4.170963938
down	Lpxn	leupaxin	-3.674306309	0.28273482	0.07694917
down	Tgfr3	transforming growth factor, beta receptor III	-3.660226594	53.03816686	14.49040531
down	Greb1l	growth regulation by estrogen in breast cancer-like	-3.586029065	0.123399743	0.03441125
down	Folh1	folate hydrolase	-3.583167137	2.136491297	0.596257784
down	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	-3.510204907	0.541306001	0.154209231
down	C2	complement component 2 (within H-2S)	-3.489647285	77.09361131	22.0920927
down	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	-3.489570966	13.49784676	3.868053378
down	March1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	-3.471864364	0.068769616	0.019807691
down	Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	-3.468926872	20.13461817	5.804278646
down	Reg3a	regenerating islet-derived 3 alpha	-3.454890862	0.232899731	0.067411603
down	Srpx	sushi-repeat-containing protein	-3.423699288	29.4988725	8.61608162
down	Igf1	insulin-like growth factor 1	-3.385864343	23.99345923	7.086361648

表2: MMTV-neu/FRS2β+/-のsphereで発現上昇している遺伝子一覧

Regulation	Genesymbol	Genedescription	Fold Change	Hetero	KO
up	Csn1s1	casein alpha s1	79.98888998	0.104380142	8.349251725
up	Fcgbp	Fc fragment of IgG binding protein	70.66261947	0.033231031	2.348191726
up	Clca2	chloride channel calcium activated 2	30.2031486	0.089963884	2.71719257
up	Sftpd	surfactant associated protein D	27.9471028	0.194910937	5.447195989
up	Gjb2	gap junction protein, beta 2	25.65959748	0.020485576	0.525651639
up	Sostdc1	sclerostin domain containing 1	24.37033983	0.062010657	1.511220787
up	Clca1	chloride channel calcium activated 1	23.33233068	0.090115642	2.102607955
up	Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	21.50763592	0.032371446	0.696233284
up	Cbr2	carbonyl reductase 2	20.96674959	0.160697654	3.369307474
up	Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	18.2725137	0.13877701	2.535804809
up	Sostdc1	sclerostin domain containing 1	17.92314077	0.094385078	1.691677036
up	Clc6	chloride intracellular channel 6	17.24857067	0.102391086	1.766099885
up	Krt19	keratin 19	17.00221621	0.305635724	5.196484667
up	Cited4	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4	15.71804725	0.303533827	4.770959041
up	Ano1	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	15.60682553	0.642631899	10.02944392
up	Col4a6	collagen, type IV, alpha 6	15.56330262	0.153117016	2.383006454
up	Tjp3	tight junction protein 3	14.8635162	0.235926873	3.506702895
up	Gjb3	gap junction protein, beta 3	14.19987169	0.232024036	3.294711534
up	Btbtd9	BTB (POZ) domain containing 9	13.82361567	0.183840527	2.541340788
up	BCO21767	cingulin pseudogene	13.46842215	0.035185651	0.473895208
up	Expi	extracellular proteinase inhibitor	13.30165239	9.422097649	125.3294677
up	Myo5b	myosin VB	13.25684034	0.012861765	0.170506368
up	Esy13	extended synaptotagmin-like protein 3	12.8768895	0.146176605	1.882299985
up	Eya2	eyes absent 2 homolog (Drosophila)	12.73233235	0.373588844	4.756657321
up	Grhl2	grainyhead-like 2 (Drosophila)	12.67501297	0.133823226	1.696211123
up	Smoc1	SPARC related modular calcium binding 1	12.60324635	0.098359465	1.239648574
up	Krt7	keratin 7	12.58803241	0.482703678	6.076289537
up	Slc5a8	solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8	11.65784438	0.069218974	0.806944029
up	Elf5	E74-like factor 5	11.59495235	0.168618229	1.955120329
up	Pdzk1ip1	PDZK1 interacting protein 1	11.32415352	0.194505638	2.202611706
up	Tspan8	tetraspanin 8	10.98979286	0.280890733	3.086930973
up	Ripk4	receptor-interacting serine-threonine kinase 4	10.9188858	0.171089768	1.868109638
up	Krt18	keratin 18	10.90488206	6.772115872	73.84912485
up	Eppk1	epiplakin 1	10.80332986	0.129584553	1.399944666
up	Ripk4	receptor-interacting serine-threonine kinase 4	10.57986335	0.201985548	2.136979494
up	Zfp750	zinc finger protein 750	10.55486647	0.02316727	0.244527438
up	Wif1	Wnt inhibitory factor 1	10.52312983	0.056817676	0.597899777
up	Irf6	interferon regulatory factor 6	10.35373648	0.261700891	2.709582066
up	Eppk1	epiplakin 1	10.34810287	0.068441548	0.708240184
up	Ly6g6d	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D	10.21176348	0.024888955	0.254160121
up	Ano9	anoctamin 9	10.20946163	0.02414066	0.246463137
up	St14	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)	10.10149829	0.443910208	4.484158206
up	Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	10.01838177	11.18976471	112.1033348
up	Cldn7	claudin 7	9.958833253	1.351848148	13.46283029
up	Clu	clusterin	9.896602814	18.09018207	179.0313468
up	Al646023	expressed sequence Al646023	9.635518387	0.04048081	0.39005359
up	Dsp	desmoplakin	9.629496773	0.453762217	4.369501804
up	Krt8	keratin 8	9.503308776	1.448219329	13.76287546
up	Ocln	occludin	9.484331908	0.023456672	0.222470861
up	Fermt1	fermitin family homolog 1 (Drosophila)	9.468337301	0.021449102	0.20308733
up	Art4	ADP-ribosyltransferase 4	9.375569336	0.022128286	0.207465284
up	Rab25	RAB25, member RAS oncogene family	9.320592543	0.170559415	1.589714807
up	Capsl	calcyphosine-like	9.304574817	0.021193132	0.197193084
up	Moxd1	monooxygenase, DBH-like 1	9.245937405	0.282839728	2.615118417
up	Cldn4	claudin 4	9.15594629	0.177489231	1.625081862
up	Aim1	absent in melanoma 1	9.099014537	0.388098165	3.531310846
up	Galnt3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	9.062418156	0.221308061	2.005586189
up	Il1f6	interleukin 1 family, member 6	8.835922149	0.028997687	0.256221304
up	Padi3	peptidyl arginine deiminase, type III	8.808924711	0.052818595	0.465275028
up	Tcfap2c	transcription factor AP-2, gamma	8.570372075	0.34554837	2.961478104
up	Lypd6b	LY6/PLAUR domain containing 6B	8.385430575	0.011875459	0.099580839
up	Sox10	SRY-box containing gene 10	8.320499032	0.504435792	4.197157518
up	Anxa8	annexin A8	8.225696151	1.850051164	15.21795874
up	Car12	carbonic anhydrase 12	8.195469269	0.650904454	5.334467449
up	Dmkn	dermokine	7.964748623	0.310467156	2.472792849
up	Oxtr	oxytocin receptor	7.934969071	0.250760473	1.989776598
up	Spnb3	spectrin beta 3	7.848763429	0.021094527	0.165565949
up	Krt14	keratin 14	7.827204886	3.309241276	25.90210949
up	Pthlh	parathyroid hormone-like peptide	7.802459629	0.037649046	0.293755164

表3: MMTV-neu/FRS2β-/-のsphereで発現上昇している遺伝子一覧

TCGA, breast, 963 patient



補足図: 乳癌シーケンス解析によって明らかとなったFRS2βの変異

TCGAデータを用いた乳癌におけるFRS2α (FRS2)とFRS2β (FRS3)の変異解析cBioPortalを用いて解析。乳癌における主要な変異とFRS2β (FRS3)の変異の関係を示す。興味深いことに、FRS2αとFRS2βは相互排他的な変異を認める。