

審査の結果の要旨

氏名 町田 雪乃

本研究は EGF/ErbB2 シグナルの活性化に伴いリン酸化 ERK の核移行を抑制する働きをもつ FRS2 $\beta$  アダプター蛋白の乳癌における役割を明らかにするため、FRS2 $\beta$  ノックアウト(KO)マウスと乳腺特異的に ErbB2 を過剰発現し乳癌を発症する MMTV-neu マウスを掛け合わせた。家島らが、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO マウスでは MMTV-neu/FRS2 $\beta$  野生型 (WT) と比較し癌の増殖が著しく遅くなることを示している (未発表)。本研究は乳癌発症における FRS2 $\beta$  の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. FRS2 $\beta$  の mRNA 発現が最も高い乳癌発症前授乳期乳腺の免疫染色を行った。FRS2 $\beta$  を発現する細胞は数%にすぎず、乳腺上皮細胞マーカーの Cytokeratin 18 と共陽性を示した。一方、筋上皮細胞マーカーの Cytokeratin 14 とは共陽性を示さなかったことから、FRS2 $\beta$  は一部の乳腺上皮細胞に発現していることが示された。発症前乳腺を CD24 抗体と CD49f 抗体で染色しフローサイトメトリー解析したところ、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO で CD24<sup>high</sup>CD49f<sup>+</sup> の乳腺前駆細胞を含む乳腺上皮細胞集団が減少した。一方、2D マトリゲルアッセイにより乳腺上皮細胞コロニー、混合型コロニー、筋上皮細胞コロニーの形成率を調べたところ、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ WT と MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO は3種のコロニー形成が同程度にみられたため、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO マウスの乳腺幹細胞分化機能は正常であることが示された。このことから、FRS2 $\beta$  が乳腺前駆細胞の機能維持に重要な役割を果たす可能性が考えられた。
2. 発症期乳腺の乳腺幹細胞/前駆細胞の指標となる sphere assay を行ったところ、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO では sphere 形成率の減少がみられ、さらに sphere の DNA マイクロアレイ解析と Gene set enrichment analysis により、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO では幹細胞シグネチャーと炎症性サイトカインシグネチャーの低下がみられ、また MEK-ERK 経路シグネチャーの上昇がみられた。炎症性サイトカインの中で間質誘導因子の CXCL12 (SDF-1)、自己複製を誘導する IGF1、マクロファージ誘導因子の CCL3 (MIP1 $\alpha$ ) を qRT-PCR によ

り発現解析したところ、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO でそれらの発現は低下していた。また、分化マーカーの Cytokeratin 8/18、Cytokeratin 14 の qRT-PCR を行ったところ、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO で発現上昇がみられた。さらに、NF $\kappa$ B 阻害薬である DHMEQ の添加により CXCL12 と IGF1 の mRNA 発現が抑制されることから、両者は NF $\kappa$ B によって発現調節されていると考えられた。

3. 乳癌発症後に癌幹細胞/前駆細胞の指標となる sphere assay を行ったところ、FRS2 $\beta$ KO では sphere 形成率の低下がみられ、qRT-PCR により MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO における CXCL12、IGF1、CCL3 の発現低下がみられた。また、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ WT に IGF1 受容体阻害薬である AEW-541、Linstinib を sphere 培養液に添加すると sphere の形成率は 1 $\mu$ M で半数以下に著しく減少するのに対し、EGF 受容体と ErbB2 受容体阻害薬の Lapatinib、EGF 受容体阻害薬の Gefitinib では 1 $\mu$ M で sphere の形成率が 8 割程度にとどまった。このことから IGF1-IGF1R シグナリングが MMTV-neu/FRS2 $\beta$ WT の乳癌幹細胞の維持に重要であることが示された。
4. 病理組織学的解析により、MMTV-neu/FRS2 $\beta$ KO マウスの乳癌は MMTV-neu/FRS2 $\beta$ WT と同様、Cytokeratin 18 陽性、Cytokeratin 14 陰性の luminal タイプの乳癌であった。また、癌関連線維芽細胞のマーカーである alpha smooth muscle Actin の免疫染色により、FRS2 $\beta$ KO の腫瘍巣内には癌関連線維芽細胞の浸潤が少ない傾向であった。
5. ヒト乳癌臨床検体 No.1 と No.2 を、CD24 抗体と CD44 抗体で染色、フローサイトメトリー解析した。検体 No.1 については、CD24<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> の癌幹細胞集団を分取し qRT-PCR を用いて FRS2 $\beta$  転写産物の発現解析を行った。その結果、癌幹細胞集団では FRS2 $\beta$  転写産物の発現が高かった。検体 No.2 については、FRS2 $\beta$  抗体の細胞内染色を加えフローサイトメトリー解析を行った。その結果、CD24<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> の癌幹細胞集団で FRS2 $\beta$  の蛋白レベルの発現も高いという結果を得た。

以上、本論文は MMTV-neu マウス乳癌モデルにおいて、FRS2 $\beta$  が癌発症時期に乳腺上皮前駆細胞に発現し、IGF1、CXCL12 などの炎症性サイトカインの産生を誘導することで癌幹細胞の自己複製を促すとともに、癌間質などが構成する癌幹細胞ニッチ環境を整えて、癌幹細胞をふやし癌の増殖を促進することが示唆された。またヒト臨床検体を用いた解析で、FRS2 $\beta$  が乳癌幹細胞集団

に発現していることが示された。本研究は乳癌幹細胞とニッチ形成の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。