

論文の内容の要旨

論文題目 増殖因子受容体アダプター蛋白 FRS2 β の乳がんにおける役割と制御機構

氏 名 木村 奈津子

乳癌には多くの癌遺伝子が見つかっており、受容体型チロシンキナーゼ ErbB2 (HER2/neu) もその一つである。ErbB2 の細胞内ドメインには、ドッキングたんぱく質 FRS2 β が結合することが知られている。FRS2 β の主な機能として ERK の核移行阻害が分かっているが、FRS2 β が乳癌に及ぼす影響は不明である。そこで、MMTV-neu 乳癌モデルマウス (FRS2 β WT) ならびに MMTV-neu マウスと FRS2 β ノックアウトマウスを掛け合わせたマウス (FRS2 β KO) を用いて、乳癌の発症及び進展過程における FRS2 β の役割を検討した。まず、FRS2 β の乳腺における発現部位を調べるためにフローサイトメトリー解析を行った結果、管腔上皮細胞特異的に発現し、かつ一部が管腔上皮前駆細胞分画に発現していることが分かった。次に FRS2 β WT と FRS2 β KO マウスの乳癌の発症から腫瘍の増大過程を観察した結果、KO では WT に比べ腫瘍の増大が著しく遅れ、約 10 週ほど小さい腫瘍のままとどまっていた。その後 FRS2 β KO でも腫瘍の増大をみた。この腫瘍増大過程の違いの分子機構を調べるため、FRS2 β WT と KO 癌発症前の乳腺細胞を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。パスウェイ解析の結果、FRS2 β WT 乳腺では、KO 乳腺に比較して炎症性サイトカインや幹細胞シグナルが亢進していることが示唆された。これらのことから、正常乳腺前駆細胞を含む乳腺上皮細胞に発現する FRS2 β により炎症性サイトカイン産生が上昇し、癌が育ちや

すい乳腺環境を構築している可能性が考えられた。これを検証するために、まず FRS2 β WT と KO の雌マウスの正常乳腺部位に FRS2 β WT の乳癌細胞を移植する実験を行った。その結果、FRS2 β WT の乳腺内では腫瘍が急速に増大したのに対し、FRS2 β KO の乳腺内では腫瘍がほとんど増大しなかった。次に FRS2 β WT の乳腺内で発現が上昇している炎症性サイトカインの中でも、癌組織増大をサポートする癌間質線維芽細胞(cancer associated fibroblast:CAF)を含む微小環境を作るのに重要な CXCL12、また、癌幹細胞の維持に重要な IGF1 に注目した。In vitro で、FRS2 β WT の正常乳腺細胞は、FRS2 β KO に比較して CAF を有意に強く遊走させた。癌幹細胞の性質の指標の一つである in vitro スフィア形成能を調べたところ、FRS2 β WT の乳癌細胞のスフィア形成能は、IGF1 中和抗体の添加により、強く低下した。CXCL12、IGF1 の上流の誘導因子として NF κ B が報告されている。FRS2 β WT と KO の正常乳腺細胞を用いて NF κ B 活性を比較したところ、FRS2 β WT 正常乳腺細胞は、FRS2 β KO 正常乳腺細胞に比較して、有意に NF κ B の活性が高いことが分かった。さらに、DHMEQ (NF κ B inhibitor) を投与すると、FRS2 β WT の癌発症前の正常乳腺細胞内の CXCL12、IGF1 の発現が減少した。以上より、正常乳腺前駆細胞を含む乳腺上皮細胞に発現する FRS2 β により NF κ B の活性が上昇し、CXCL12、IGF1 の発現が上昇することにより、炎症性サイトカイン依存性の FRS2 β WT 乳癌が育ちやすい乳腺環境が構築され、FRS2 β WT 乳癌は急速に増大することが示された。

次に癌自体の性質をみるために、炎症性サイトカイン豊富な乳腺環境を排除した同系雄

マウスの皮下に FRS2 β WT と KO の乳癌細胞を移植すると、FRS2 β WT の腫瘍は増大をみない一方、KO の腫瘍は急速に増大した。さらに、FRS2 β KO の腫瘍は tumor initiating activity も高く、癌幹細胞性も高いことが示された。また、悪性度の指標の一つである肺転移についても FRS2 β WT と KO で違いがないか調べてみた。その結果、FRS2 β WT で 40%、KO で 60%のマウスに肺転移が確認され、驚いたことに KO の方が高頻度の転移率を示した。

これらのことから FRS2 β KO の乳癌は FRS2 β WT 乳癌とは異なり、乳腺環境に非依存的に増大し、癌幹細胞性や転移能が高く、より悪性であると言える。この原因を調べるため、癌発症前乳腺細胞、primary の癌細胞、移植癌細胞を用いてマイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を行った。パスウェイ解析の結果、FRS2 β KO の癌発症前乳腺細胞で TGF β シグナルが高くなっていること、また、primary の癌細胞と移植癌細胞で上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) シグナルが亢進していることが示唆された。FRS2 β KO 正常乳腺細胞では、FRS2 β による ERK の核移行抑制が解除されるが、阻害剤を用いた検証の結果、このことが FRS2 β KO で TGF β が転写促進される原因であることも分かった。これらのことから、FRS2 β KO では WT に比べ ERK を介する転写が活性化して乳腺細胞内で TGF β が発現上昇し、その下流で EMT マーカーの発現が上昇する可能性が考えられる。これらの結果より、TGF β 活性の上昇が FRS2 β KO マウスに悪性の癌が形成される原因の一つである可能性が示された。

本研究の前半では乳腺前駆細胞が、炎症性サイトカイン産生を介して腫瘍を強く増大させる微小環境を構築することを示した。これまで腫瘍増大を支持する微小環境として、CAFや血管細胞などが知られていたが、組織を構成する前駆細胞が、微小環境構築に重要な役割を果たす事は、本研究が初めての報告となる。前駆細胞が産生する炎症性サイトカインを標的とする新たなコンセプトの治療戦略が期待される。

後半では乳腺前駆細胞内で $FRS2\beta$ 欠損により ERK による転写誘導能が上昇した結果、時間はかかるが微小環境に依存しない悪性の癌が形成されることを示した。ERK により $TGF\beta$ の発現が上昇し、その下流で EMT が起きることが、悪性の癌を形成する分子機構の一つである可能性が考えられた。 $FRS2\beta$ KO マウスは、治療抵抗性の悪性の乳癌の良いモデルであり、今後新たな治療標的を探索するツールとしての活用も期待できる。