

## [課程一2]

### 審査の結果の要旨

氏名 木村 奈津子

本研究は乳癌の癌遺伝子である **ErbB2** のドッキング蛋白質である **FRS2 $\beta$**  の乳癌への影響を明らかとすることを目的とした。**MMTV-neu** 乳癌発症マウスモデルにおいて **FRS2 $\beta$**  をノックアウトしたマウス (**FRS2 $\beta$  KO** マウス) と野生型マウス (**FRS2 $\beta$  WT** マウス) を用いて、**FRS2 $\beta$**  の乳癌における制御機構の解析を試みた。以下、得られた結果を示す。

1. **FRS2 $\beta$**  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、主に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示された。また、乳癌においても免疫細胞染色での解析の結果、未分化マーカーである **SOX2** と共発現しており、乳腺と同様の発現の特徴が示された。
2. **MMTV-neu FRS2 $\beta$  WT** と **FRS2 $\beta$  KO** マウスにおいて、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 $\beta$  KO** でも腫瘍が増大する結果となった。
3. **FRS2 $\beta$  WT** と **KO** マウスにおける腫瘍増大の違いの分子機構を調べるため、**FRS2 $\beta$  WT** と **KO** の癌発症前乳腺細胞を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。マイクロアレイのデータを用いたパスウェイ解析の結果、**FRS2 $\beta$  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、前駆細胞を含む乳腺上皮細胞に発現する **FRS2 $\beta$**  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得られた。
4. **FRS2 $\beta$  KO** に比べ **WT** で癌の育ちやすい乳腺環境が構築されているかを検証するために、**FRS2 $\beta$  WT** と **FRS2 $\beta$  KO** の雌マウスの正常乳腺部位に **FRS2 $\beta$  WT** の乳癌細胞を移植する実験を行った。その結果、**FRS2 $\beta$  WT** の乳腺内では腫瘍が急速に増大したのに対し、**FRS2 $\beta$  KO** の乳腺内では腫瘍がほとんど増大しない結果となった。
5. **FRS2 $\beta$  WT** の微小環境において癌増大をサポートする要因を探るため、**FRS2 $\beta$  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、免疫細胞や癌間質線維芽細胞(cancer associated fibroblast:CAF)などを誘引することが知られている **CXCL12**、また、癌幹細胞の維持に重要な **IGF1** に注目した。In vitro において、**FRS2 $\beta$  WT** の正常乳腺細胞は、**FRS2 $\beta$  KO** 正常乳腺細胞に比較して、CAF を有意に強く遊走させた。次に、癌幹細胞の性質の指標の一つであるスフィア形成能を調べたところ、**FRS2 $\beta$  WT** の乳癌細胞のスフィア形成能が **IGF1** 中和抗体添加により、強く低下した。

6. CXCL12、IGF1の上流の誘導因子としてNF $\kappa$ Bが報告されている。FRS2 $\beta$  WTとKOの正常乳腺細胞を用いてNF $\kappa$ B活性を比較したところ、FRS2 $\beta$  WT正常乳腺細胞は、FRS2 $\beta$  KO正常乳腺細胞に比較して、有意にNF $\kappa$ Bの活性が高いことが分かった。さらに、*in vitro*、*in vivo*において、NF $\kappa$ B阻害剤によりFRS2 $\beta$  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。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 $\beta$ によりNF $\kappa$ 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 $\beta$  WT乳癌が育ちやすい乳腺環境が構築され、FRS2 $\beta$  WT乳癌が急速に増大することが示された。
7. 癌自体の性質を検討するために、乳腺の微小環境を排除した条件下である同系の雄マウスの皮下にFRS2 $\beta$  WTとKOの乳癌細胞を移植した。その結果、FRS2 $\beta$  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 $\beta$  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、癌悪性度の指標の一つである肺転移をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を用いて調べた。その結果FRS2 $\beta$  WTで40%、KOで60%のマウスに肺転移が確認され、KOの方が高頻度の転移率を示した。これらの結果からFRS2 $\beta$  KOの乳癌はFRS2 $\beta$  WT乳癌とは異なり、乳腺環境に非依存的で、癌幹細胞性や転移能が高くより悪性であることを示す結果を得た。
8. FRS2 $\beta$  KOの乳癌が悪性化している原因を調べるため、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 $\beta$  KOの癌発症前乳腺細胞でTGF $\beta$ 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。これらの結果は、qRT-PCR、ウェスタンブロッティングを用いた確認でも同様の結果となった。また、FRS2 $\beta$  KOでは、FRS2 $\beta$ によるERKの核移行抑制が解除されている。このことがTGF $\beta$ の発現の亢進に関与しているかを調べるため、ERK阻害剤であるU0126を用いてFRS2 $\beta$  KOにおけるTGF $\beta$ の発現検討を行ったところ、U0126によりTGF $\beta$ 発現の阻害が起きていた。これらのことから、FRS2 $\beta$  KOにおいて、ERKを介する転写が活性化して乳腺細胞内でTGF $\beta$ 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た。これらの結果より、TGF $\beta$ 活性の上昇がFRS2 $\beta$  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。
9. ヒト乳癌におけるFRS2 $\beta$ の発現と予後や悪性度の関連性を調べるため、ヒトの乳癌データを用いて網羅的マイクロアレイ解析、及びサブタイプ解析を行ったところ、FRS2 $\beta$ の発現が低いほど、予後が悪く、悪性度の高いサブタイプに分けられることが示された。

以上、本論文は、乳腺上皮前駆細胞において、FRS2 $\beta$ がNF $\kappa$ Bの亢進を介して炎症性サイトカインの産生を行い、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の形成源として 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。また、乳腺前駆細胞内での *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。今回乳癌において初めて ERK により TGF  $\beta$  の発現が上昇することが示され、その下流で EMT が起こり悪性の強い癌を形成する分子機構は、未だ有効な薬剤のない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。

これらのことから、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。