

## 論文の内容の要旨

論文題目 EGFR ファミリーシグナル抑制分子 FRS2 $\beta$ の個体レベルにおける機能解析

指導教員 後藤 典子 特任准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 家島 大輔

FRS2 ファミリーは、受容体型チロシンキナーゼに作用するドッキングタンパク質で、そのファミリーには、FRS2  $\alpha$  および FRS2  $\beta$  の存在が知られている。

FRS2  $\alpha$  は、FGF 受容体 (FGFR) ファミリーと PTB ドメインを介して結合することが知られており、チロシンリン酸化による Grb2 と Shp2 の結合ドメインを有している。FRS2  $\alpha$  は発生の初期段階から成体に至るまで全身性に発現しており、個体の発生、維持、代謝に必須とされる FGF シグナルの制御に重要な役割を担っている。特に、個体の発生過程において、FRS2  $\alpha$  は重要な役割を担っており、Gotoh らの行った FRS2  $\alpha$  欠損マウスを用いた解析によると、この分子は発生初期における FGF シグナルを介した Trophoblast stem (TS) cell の維持に必須であり、FRS2 $\alpha$  を欠損したマウスでは胚盤胞期の発生過程において、FGF4 シ

グナルの下流にある Cdx2 を介した BMP4 の発現が抑制されることにより、胎生致死になることが報告されている。また、FRS2  $\alpha$  のコンディショナルノックアウトマウスを用いた実験により、FRS2  $\alpha$  が心臓の原器の形成や隔壁の構築の際の FGF シグナルの調節の役割を担っていることも報告されており、FRS2  $\alpha$  は個体の発生レベルで重要な役割を担う分子であることが知られている。

一方、FRS2  $\beta$  は、FRS2  $\alpha$  と類似の構想の分子で、これまでに胎児期のマウスの脳や神経系、肺上皮細胞、成体の海馬、小脳などに組織特異的に発現することが報告されている。FGF シグナルに対しては、FRS2  $\alpha$  と同様に、FGFR と結合し、Grb2、Shp2 の結合を介して、下流の MAPK や PI-3K などのシグナル伝達に寄与することが知られている。また、FRS2  $\beta$  は、FRS2  $\alpha$  と異なり、EGFR ファミリー分子との結合能を有しており、EGFR ファミリーの下流で ERK がリン酸化されると、FRS2  $\beta$  の D domain にリン酸化 ERK が結合する。これにより、EGFR ファミリー分子のチロシンリン酸化が抑制され、ネガティブフィードバックにより、EGFR ファミリーのシグナルが抑制されることが報告されている。このような機能から、FRS2  $\beta$  は、EGFR ファミリーのシグナル伝達において何らかの重要な役割を担っていることが予想されている。

また、Huang らは、FRS2  $\beta$  がこのような EGFR シグナルの抑制に関与していることから、EGFR ファミリーが寄与するタイプの癌の抑制遺伝子の一つとなりうることを報告している。しかし、FRS2  $\beta$  については、現在までに、生体における詳細な発現部位の報告もな

く、*In vivo* の解析もなされていないことから、この分子の生物学的な意義や役割はほとんど分かっていない。

このような背景を踏まえ、本研究では、FRS2 $\beta$  の個体レベルでの機能を明らかにすることを目的として、FRS2 $\beta$  欠損マウスを作製し、個体における FRS2 $\beta$  の機能の解析を行った。

FRS2 $\beta$  欠損マウスの作製については、マウス *Frs2 $\beta$*  遺伝子の第 2 エクソン近傍で相同組み換えを起こして、*Frs2 $\beta$*  遺伝子の第 3 エクソン以降にある、タンパク質のコード領域の転写が欠損するように設計構築したターゲティングベクターを E14-ES 細胞に導入した。正しい位置で組み換えが生じた ES 細胞株を、サザンブロッティングで選別し、この ES 細胞を E3.5 の C57BL/6 マウス胚へ導入することでキメラマウスを作製した。このキメラマウスと Wild type マウスを交配させ、FRS2 $\beta$  ヘテロマウスを作製し、さらにヘテロマウス同士を交配させることで、FRS2 $\beta$  欠損マウスを作製した。作製した FRS2 $\beta$  欠損マウスについては、PCR による Genotype やウェスタンブロッティングにより、遺伝子型や FRS2 $\beta$  タンパク質の発現チェックを行い、作製したマウスが FRS2 $\beta$  欠損マウスであることを確認した。作製した FRS2 $\beta$  欠損マウスは、Wild type のマウスと同様に誕生し、外見上は Wild type との差はみられず、目立った臓器や組織の異常も見られなかった。また、誕生後のマウスの体重変化や生殖能力にも異常は観察されなかった。

FRS2 $\beta$  の機能を解析するにあたり、FRS2 $\beta$  の生体における発現部位が、成体のマウスにおいては、脳組織以外の報告がないことから、ターゲティングベクターに *LacZ* 遺伝子が

組み込まれていることを利用し、作製した FVB/N 系の  $FRS2\beta (+/-)$  マウスを用いて、LacZ 染色により、 $FRS2\beta$  の発現部位を解析した。既出の報告では、 $FRS2\beta$  は脳組織に多く発現しており、特に、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、小脳プルキンエ細胞に多く発現していることが報告されている。今回作製した 1 2 週齢の  $FRS2\beta (+/-)$  マウスより脳組織を摘出し、LacZ 染色を行った結果、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、小脳（プルキンエ細胞）において LacZ 陽性の細胞が確認され、この LacZ 陽性部位は、既知の  $FRS2\beta$  発現部位と合致した。これにより、このマウスの LacZ 陽性部位は  $FRS2\beta$  発現部位をあらわしていることが示唆された。次に、この系を用いて、脳以外の  $FRS2\beta$  の発現確認を行った。 $FRS2\beta (+/-)$  マウスより、肺、肝臓、心臓、腎臓、食道、胃、小腸、大腸、精巣、子宮、乳腺の組織を摘出し、LacZ 染色を行った結果、腎臓の近位尿細管、精巣ライディッヒ細胞、精巣上体上皮細胞、胃底腺主細胞、乳腺上皮細胞で LacZ 陽性の部位を確認した。一方、肺、肝臓、心臓、食道、小腸、大腸、子宮では、LacZ 陽性部位は確認できなかった。

$FRS2\beta$  が乳腺で発現していることから、授乳を介した仔マウスの生育について、親マウスの遺伝子型の違いによる影響を調べた。FVB/N 系のマウスを用いて、 $FRS2\beta (+/+)$  (♀) ×  $FRS2\beta (+/+)$  (♂)、 $FRS2\beta (-/-)$  (♀) ×  $FRS2\beta (+/+)$  (♂) の組み合わせで交配させ、親マウスの遺伝子型の違いによる仔マウスの生育状況を比較した。その結果、いずれの親マウスの組み合わせでも、誕生した仔マウスは、離乳するまでの生後 4 週までは正常に生育し、親マウスの遺伝子型の違いで仔マウスの成長に有意差はなかった。以上の結果から、

FRS2 $\beta$  は発生や仔マウスの生育に対しては、大きな影響を及ぼす分子ではないことが示唆された。

次に、FRS2 $\beta$  が乳癌との関連が深い ErbB2 のシグナルを抑制することと、乳腺上皮細胞に FRS2 $\beta$  が多く発現していることから、本研究では、FRS2 $\beta$  と乳腺および乳癌の関係に着目して実験を行った。まず、作製した FRS2 $\beta$  (-/-) と乳癌モデルマウスである MMTV-neu(+) を交配させ、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (+/+) と MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (-/-) を作製し、MRI を用いて双方の腫瘍の発症傾向を調べた。その結果、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (+/+) では、腫瘍が 18 匹中 15 匹発症し、発症率は 83%であったのに対し、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (-/-) では、17 匹中 15 匹発症し、発症率は 88.2%で、双方の腫瘍の発症率に大きな差はなかった。次に、腫瘍の発症までの経過を MRI で観察し、発症までの期間を計測した結果、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (+/+) では、離乳後、平均 5.3 週で腫瘍形成がみられたのに対し、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (-/-) では、平均 1.4 週で腫瘍の形成が確認できたことから、乳癌のモデルマウスを用いた系において、FRS2 $\beta$  を欠損させた個体群では、腫瘍の発症期間が短くなる結果が得られた。この結果より、FRS $\beta$  は ErbB2 依存型の乳腺腫瘍の発症を抑制することが示唆された。

MRI の結果より、FRS2 $\beta$  が腫瘍の発症に寄与していることが示唆されたことから、腫瘍が発症する前の段階で、FRS2 $\beta$  が強く発現している、授乳期の乳腺に着目して解析を行った。授乳 2 週目の乳腺組織を摘出し、細胞増殖の指標で、細胞分裂の M 期に陽性となる、

リン酸化ヒストン H3 (PH3) と、FRS2 $\beta$  の免疫染色により、腫瘍発症前の乳腺における FRS2 $\beta$  の発現傾向と、さらには FRS2 $\beta$  と細胞増殖の関係を調べた。その結果、FRS2 $\beta$  は乳腺の Luminal cells に特異的に発現しており、Myoepithelial cells にはほとんど発現していなかった。また、FRS2 $\beta$  は、Luminal cells 全体に発現しているわけではなく、FRS2 $\beta$  陽性の細胞は、ごく一部に点在しており、乳腺の Luminal cells 全体の 5~8% の細胞に発現していた。また、PH3 を指標として Luminal cells の細胞増殖の傾向を調べた結果、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (+/+) マウスでは、MMTV-neu(-)/FRS2 $\beta$  (+/+) マウスの乳腺に対して、有意な PH3 陽性細胞の増加を示した。そして、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (-/-) の個体群では、さらなる PH3 陽性細胞の有意な増加を確認した。一方で、Myoepithelial cells では、FRS2 $\beta$  の遺伝子型による、PH3 陽性細胞数の有意な差は見られなかった。また、授乳期の乳腺上皮細胞における ERK の核移行を調べたところ、乳腺の Luminal cells において、FRS2 $\beta$  陽性の細胞で ERK の核移行が有意に抑えられている結果が得られた。

さらに、授乳期の乳腺より乳腺上皮細胞を単離し、スフィア培養により FRS2 $\beta$  (+/+) と FRS2 $\beta$  (-/-) の乳腺幹細胞・前駆細胞を比較した結果、FRS2 $\beta$  (-/-) の実験群において、スフィアの直径が有意に上昇する結果となり、FRS2 $\beta$  欠損マウスの乳腺上皮細胞において、前駆細胞の有意な増殖亢進が起こっていることが示唆された。

以上の結果より、FRS2 $\beta$  が欠損することにより、乳癌の発症が有意に早まることが示された。その要因として、乳癌発症前の授乳期の乳腺においては、Luminal cells の有意な増

殖亢進ならびに ERK の核移行の亢進、さらには乳腺前駆細胞の増殖亢進が起こっていることが示唆された。これにより、これらの要因が乳癌の発症を早める一因となることが考えられ、ErbB2 依存型の乳癌において FRS2 $\beta$  が重要な役割を担っている可能性が示唆された。