

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 家島 大輔

本研究は EGFR ファミリー分子に結合するアダプター分子である FRS2 $\beta$  の個体レベルでの機能を明らかにするため、FRS2 $\beta$  欠損マウスを用いた系により機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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、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を用いて選別した。選別した ES 細胞株を E3.5 の C57BL/6 マウス胚へ導入し、キメラマウスを作製した。このキメラマウスと Wild type のマウスを交配させ、ヘテロマウス (FRS2 $\beta$  (+/-)) を作製し、さらにヘテロマウス同士を交配させ、FRS2 $\beta$  欠損マウス (FRS2 $\beta$  (-/-)) を作製した。作製したマウスについては、PCR によるタイピング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。
2. 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、目立った組織や臓器の異常も見られなかった。また、誕生後の体重変化や、産仔数などにも異常は見られなかった。
3. 作製した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、マウス個体における FRS2 $\beta$  の発現部位の特定を行った。FRS2 $\beta$  (+/-)マウスを用いて *LacZ* 染色を行った結果、大脳皮質、海馬 CA2 領域、視床、視床下部、小脳プルキンエ細胞層、腎臓近位尿細管、精巣ライディッヒ細胞、胃壁主細胞、乳腺上皮細胞に *LacZ* 染色陽性の部位を確認し、これらの部位に FRS2 $\beta$  が発現していることが示唆された。
4. FRS2 $\beta$  が、乳癌との関連が深い ErbB2 のシグナルの抑制分子であることと、乳腺上皮細胞に FRS2 $\beta$  が発現していることから、乳癌と FRS2 $\beta$  の関係に着目して実験を行った。ErbB2 依存型の乳癌モデルマウスである MMTV-neu(+)と FRS2 $\beta$  (-/-)を交配させ、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (+/+)と、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (-/-)を作製し、双方の発癌傾向を比較した。その結果、MMTV-neu(+)/FRS2 $\beta$  (-/-)の実験群で、有意に乳癌の発症が早まることから、FRS2 $\beta$  が乳癌の発症を抑制している可能性があることが示唆された。
5. FRS2 $\beta$  を欠損させることにより、乳癌の発症が早まることから、乳癌発症前の授乳期の乳腺に着目し、解析を行った。その結果、FRS2 $\beta$  は乳腺上皮の Luminal cells

全体の 5~8%に特異的に発現しており、FRS2 $\beta$  の欠損によって、発癌前の乳腺組織において、Luminal cells の増殖亢進、ERK の核移行の亢進が起こっており、これらに起因して乳癌の発症が早まる可能性が示唆された。

6. FRS2 $\beta$  を発現している Luminal cells が全体の 5~8%で、このわずかな細胞で発現している FRS2 $\beta$  を欠損させることによって乳癌の発症時期が大きく変化することから、幹細胞や前駆細胞の関与を予想した。FRS2 $\beta$  と幹細胞・前駆細胞の関係を調べるため、スフィア培養による解析を行った。その結果、FRS2 $\beta$  (-/-)の実験群で、乳腺の前駆細胞の増殖亢進が観察され、乳腺前駆細胞の異常が乳癌の発症促進に寄与している可能性が示唆される結果が得られた。

以上、本論文は FRS2 $\beta$  欠損マウスを作製し、それをモデルとして、FRS2 $\beta$  の欠損が ErbB2 依存型の乳癌の発症に寄与していることを明らかにしたものである。また逆に、論文提出者は FRS2 $\beta$  の欠損が発症後期の癌の形成に抑制的であることも観察しており、その知見に基づいた興味深い考察を展開している。これまでに、FRS2 $\beta$  欠損マウスの作製事例はもとより、FRS2 $\beta$  の個体レベルにおける機能に関しては殆ど報告がなかった。また、本研究によって、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、今回新たに得られた知見、ならびに作製したモデル動物が、今後の乳癌研究に重要な役割を担う可能性が考えられる。さらに本論文から、論文提出者は研究者として十分な見識と技能を備えていると判断でき、博士(医学)の学位を授与されるに相応しいと認める。