

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390062

研究課題名(和文) 増殖因子による幹細胞制御のシステム統合解析による分子機構の解明

研究課題名(英文) Systems analysis of molecular mechanisms of growth factor regulation of stem cells

研究代表者

後藤 典子 (GOTOH, Noriko)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：10251448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：増殖因子による幹細胞ならびに癌幹細胞の制御を調べるために、その細胞内シグナル伝達を担うFRS2ファミリー分子、FRS2alphaとFRS2betaのノックアウトマウスならびに変異マウスを作成し、解析を行った。その結果、FRS2alphaは、主にFGFシグナルの欠損により、視神経の網膜への投射、内耳の形成ならびに神経の痛み刺激に関わる神経の発達に重要であることがわかった。一方、FRS2betaは、乳癌幹細胞の維持に重要であった。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the molecular mechanisms how growth factor signaling play role s for maintenance of tissue specific stem cells and cancer stem cells, we made mutant mice of FRS2alpha or FRS2beta, mediators for intracellular signaling through FGF or EGF, respectively. We found that FRS2alpha plays important roles for axon path finding of optic nerves, development of inner ears and sensory neuron s. On the other hand, FRS2beta plays important roles for maintenance of breast cancer stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 マイクロアレイ 発生・分化 システム生物学

1. 研究開始当初の背景

近年、生体内の様々な組織幹細胞や iPS 細胞などを利用して、病気や事故などにより傷害を受けた脳神経系などの組織を、幹細胞を用いて再生させようとする再生医療が世界的に注目されている。しかし現時点で、実用化に至っている再生医療はごく限られている。その大きな原因のひとつは、組織幹細胞を幹細胞たらしめている性質—自己複製能（未分化性維持能）と多分化能—の分子機構について未解明な部分が多いことがあげられる。これまでの申請者の研究などから、組織幹細胞は、周囲の微小環境（幹細胞ニッチ）の中に維持され、FGF や EGF などの増殖因子が重要な制御を行っていることが明らかになっているものの、分子機構については不明な部分が多い [reviewed in Gotoh, N., et al., *Curr Stem Cell Res Ther*, 4: 9-15, 2009]。

一方ここ数年、癌分野では、組織幹細胞とは似て非なる「癌幹細胞」が世界的なトピックとなっている。癌幹細胞の維持増殖にも、FGF や EGF など増殖因子の重要性が示唆されているが、分子機構についてはほとんど不明である [reviewed in Hinohara & Gotoh, *Curr Opin Pharmacol*, Sep 1, 2010, Equib ahead of print]。

これまでに申請者は、アダプター FRS2alpha が FGF の細胞内シグナル伝達の司令塔として活躍することを見だし、FRS2alpha の種々変異体マウスの解析から、神経、胎盤、網膜などの組織幹細胞や発生分子機構に迫る、世界をリードする研究成果をあげてきた [reviewed in Gotoh, *Cancer Sci*, 99: 1319-1325, 2008; Murohashi, et al., *Stem Cells*, 28: 113-121, 2010] (図 1)。ごく最近では、FGF による神経幹細胞の未分化性維持の鍵分子として、Hes1 を見いだした [Sato, et al., *Stem Cells*, 28: 1660-1672, 2010]。

また、もうひとつの FRS2 ファミリー分子である FRS2beta が、EGF シグナルを抑制する癌抑制分子であることを見いだすなど、世界をリードする研究を行ってきた。

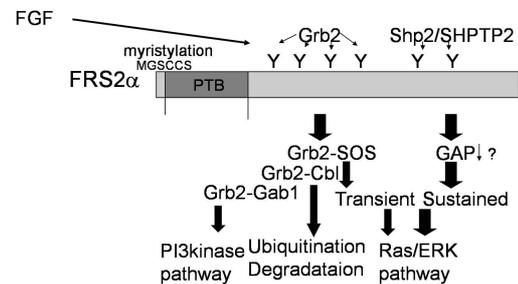
2. 研究の目的

組織幹細胞や癌幹細胞は、FGF や EGF などの増殖因子によって、未分化性、自己複製能や多分化能が制御されていることが知られているが、その分子機構は不明な点が多い。これまでに申請者が作製した FRS2alpha 変異マウスは FGF シグナルが部分的に欠損している一方、FRS2beta 変異マウスは EGF シグナルが増強しており、幹細胞を *in vivo* で解析するための良いモデルマウスである。本研究では、これらのマウスを解析することにより、神経幹細胞や乳腺幹細胞などが *in vivo* で幹細胞ニッチの中で維持されるしくみや、その破綻によって癌幹細胞化する分子機構を明らかにすることを目的とし、再生医療や癌治療に利用可能なシーズの同定を目指す。その際、新規パイオインフォマティクスを用いたシステム生物学的手法を効果的に取り入れ、独創的な手法で目的の達成を図る。同時に、これまで申請者が

構築してきた増殖因子シグナル伝達のシステム生物学的手法を進展させ、シグナルクロストークの統合解析系の構築を行う。

3. 研究の方法

FRS2alpha 変異マウス(ノックアウトマウス、2F マウス、4F マウス、コンディショナルノックアウトマウス)は、FGF シグナルの全体、あるいは一部のパスウェイを特異的に欠失した優れたモデルマウスである (Murohashi, et al., *Stem Cells*, 28: 113-121, 2010; Sato, et al., *Stem Cells*, 28: 1660-1672, 2010; Kameda, et al., *Dev. Dyn.*, 238: 503-513, 2009; Kameda, et al., *Dev. Biol.*, 314, 236-247, 2008; Yamamoto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102: p15983, 2005; Gotoh et al., *Mol. Cell. Biol.*, 25: p4105, 2005; Gotoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101: p17144, 2004)(図)。



FRS2alpha は FGF の刺激によりチロシンリン酸化し、シグナルを伝える。2F マウスは、Shp2 結合部位を F に置換した変異体を発現するマウス、4F マウスは Grb2 結合部位を F に置換した変異体を発現するマウスである。

(1) FGF による胎児神経幹細胞の未分化性維持並びに増殖制御の解析

すでに申請者が作製の完了した FRS2alpha-lox マウスを用いて、胎児神経幹細胞特異的に FRS2alpha を欠失するコンディショナルノックアウトマウス(nest in-Cre マウスとの掛け合わせ)の作製を行い、その解析を開始する。

(2) EGF シグナルの乳腺幹細胞並びに乳癌幹細胞の制御機構の解析

MMTV- ErbB2 マウスは、マウス乳腺特異的に活性化するプロモーターの下流に ErbB2 遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウスであり、授乳後の乳腺リモデリングの時期に乳癌を自然発症する。このマウスと FRS2beta ノックアウトマウスを交配させたマウス (MMTV-ErbB2/FRS2beta^{-/-}) の解析を行った。その結果、FRS2beta を遺伝子破壊すると、より早期に乳癌を発症したため、FRS2beta が癌幹細胞化を抑制することが示唆されている。正常幹細胞/前駆細胞に発現する FRS2beta の機能と、それがどのように癌幹細胞化を阻止するのかについて、分子機

構を詳細に解析する。

(3) FRS2alpha 変異マウス並びに FRS2beta ノックアウトマウスの脳神経系の解析

申請者のこれまでの実験結果より、FRS2alpha 2Fマウスの視神経及び脊髄の交連神経は、明らかに神経軸索の path finding (ガイドされ、正確な方向へ伸びていくこと) がうまく行われていないことが観察されており、我々に、この分子機構を解明する絶好の機会を提供している。

FRS2beta に結合する新規分子を LC-MS/MS 法により探索した結果、CD2AP とそのファミリー分子 CIN85 が得られた。これを詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) FGF による胎児神経幹細胞の未分化性維持並びに増殖制御の解析

FRS2alpha-lox マウスを用いて、胎児神経幹細胞特異的に FRS2alpha を欠失するコンディショナルノックアウトマウス (nestin-Cre マウスとの掛け合わせ) の作製を行った。マウスは一見健康で、頭や脳の大きさに異常は認められなかった。神経系の解析を行うため、C57BL マウスに 8 回以上バッククロスして、マウス近交系を作出した。いくつかの行動試験を施行した結果、痛みに対する反応が鈍化していることが示唆された。さらなる解析中である。

(2) EGF シグナルの乳腺幹細胞並びに乳癌幹細胞の制御機構の解析

FRS2beta ノックアウトマウスと乳がんモデルマウス MMTV-ErbB2 の掛け合わせマウスの解析を行ってきた。その結果、FRS2beta を遺伝子破壊すると、より早期に乳癌を発症したため、FRS2beta が癌幹細胞化を抑制することが示唆されている。正常乳腺、授乳期乳腺、さらにそこに発症してきた乳ガンのスフェア形成能を調べたところ、いずれにおいても、FRS2beta ノックアウトマウス由来の細胞は、野生型マウス由来の細胞に比較し、スフェア形成能が低下していた。FRS2beta の発現は、正常乳腺でも、癌化した乳腺でも、幹細胞性の維持に重要であることが示唆された。

以上より、がん幹細胞は、FRS2beta による EGF / ErbB2 シグナルのフィードバック抑制機能を利用して、乳がん組織内に間質を増生させ、自らを育てていることが示唆されている。

(3) FRS2alpha 変異マウス並びに FRS2beta ノックアウトマウスの脳神経系の解析

FRS2alpha 2F マウスの視神経及び脊髄の交連神経は、明らかに神経軸索の path finding (ガイドされ、正確な方向へ伸びていくこと) がうまく行われていないことが観察された。また、内耳の形成も不完全

にしか行われていないことがわかった。上流にある FGF シグナルが欠損している FGFR1 のノックアウトマウスと対比から、FGF シグナルの一部の欠損が個体レベルで起こるため、このような表現型が得られていることがわかった。

FRS2beta は、CD2AP あるいは CIN85 と結合するユビキチン E3 リガーゼ Cbl を ErbB2 に呼び込むことにより、ErbB2 蛋白質の分解を促進していることがわかった。これは、FRS2beta による EGF/ErbB2 シグナルのダウンレギュレーションの新たな分子機構である。FRS2beta は、神経系で特異的に発現しているため、特に神経系における FRS2beta の機能について中心に解析する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Ono, K., Kita, T., Sato, S., O'Neill, P., Mak, S.-S., Paschaki, M., Ito, M., Gotoh, N., Kawakami, K. & Ladher, R.K.: Fgfr1-Frs2/3 Signalling Maintains Sensory Progenitors during Inner Ear Hair Cell Formation. *PLoS Genetics.*, 10, e1004118, 2014. 査読有

Li, H., Tao, C., Cai, Z., Hertzler-Schaefer, K., Collins, T.N., Wang, F., Feng, G.-S., Gotoh, N. & Zhang, X.: Frs2alpha and Shp2 signal independently of Gab to mediate FGF signaling in lens development. *J. Cell Sci.*, 127, 571-582, 2014. 査読有
Cai, Z., Tao, C., Li, H., Ladher, R., Gotoh, N., Feng, G.-S., Wang, F. & Zhang, X.: Deficient FGF signaling causes optic nerve dysgenesis and ocular coloboma. *Development*, 140, 2711-2723, 2013. 査読有

Minegishi, Y., Shibagaki, Y., Mizutani, A., Fujita, F., Tezuka, T., Kinoshita, M., Kuroda, M., Hattori, S. & Gotoh, N.: An adaptor protein complex of FRS2beta and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation. *Cancer Sci.*, 104, 345-352, 2013. 査読有

Yamauchi, M., Yamaguchi, R., Nakata, A., Kohno, T., Nagasaki, M., Shimamura, T., Imoto S., Saito A., Ueno, K., Hatanaka, Y., Yoshida, R., Higuchi, T., Nomura, M., Beer, D.G., Yokota, J., Miyano, S. & Gotoh, N.: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of stage I lung adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 7, e43923, 2012. 査読有

Hinorara, K., Kobayashi S.,

Kanauchi, H., Shimizu, S., Nishioka, K., Tsuji, E., Tada, K., Umezawa, K., Mori, M., Ogawa, T., Inoue, J., Tojo, A. & Gotoh, N.: ErbB/NF-kB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 109, 6584-6589, 2012. 査読有
Gotoh, N.: Possible signaling pathways in cancer stem cells in breast cancer. In: *Cancer Stem Cells Theories and Practice*, Chapter 13, Nikolic, A. (Ed.), INTECH, NY, USA, 2011. 査読有

[学会発表](計5件)

後藤典子 増殖因子制御遺伝子による予後予測診断と癌幹細胞の分子標的

Prognostic gene signature and novel molecular targets derived from growth factor signaling

JCA-JSMO 合同シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会

2013年10月3日 横浜

後藤典子 増殖因子制御遺伝子による肺癌の予後予測診断と乳癌幹細胞の分子標的
がん・ゲノム・脳 支援活動 合同シンポジウム

2013年8月6日 東京

後藤典子 「Receptor tyrosine kinase signaling controls breast cancer stem cells and their niche」

第35回日本分子生物学会年会

ワークショップ「がん研究の新局面～Aktシグナルと癌幹細胞」

オーガナイザー

「早期肺がん予後予測シグネチャーと gefitinib 耐性の分子機構」

2012年12月12日 福岡

後藤典子 「増殖因子受容体による癌幹細胞とニッチ制御の分子機構」

“Growth factor receptor signaling controls breast cancer stem cells and their niche”

第71回日本癌学会総会 シンポジウム

「がん幹細胞の分子標的」

2012年9月19日 札幌

後藤典子 “ErbB/EGF receptor signaling is a key pathway for self-renewing breast cancer stem cells”

“Cancer and stem cells”

第34回日本分子生物学会年会

シンポジウム オーガナイザー

2011年12月16日 横浜

[図書](計3件)

「がん幹細胞におけるシグナルと可塑性のシステムの解析」

後藤典子 実験医学、31, p2919, 2013.

「増殖因子による乳がん幹細胞制御の分子機構」

後藤典子 *Cytometry Research*, 23(2), p33-39, 2013.

「神経幹細胞における増殖因子による ERK キナーゼの制御機構」
後藤典子 *Clinical Neuroscience*, 31, p661, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: CXCL1 の発現量に基づく肺癌患者の予後判定方法およびキット

発明者: 後藤典子

権利者: コニカミノルタ株式会社

種類: 特願

番号: 2013-207513

出願年月日: 2013年10月2日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類: 番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/system-seimei/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 典子 (GOTOH, Noriko)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号: 10251448

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: