

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390075

研究課題名（和文）増殖因子による幹細胞並びに個体発生の動態制御のシステム生物学的解析

研究課題名（英文）Systems biological analysis of dynamic regulation of stem cells and development by growth factors

研究代表者

後藤 典子（GOTOH NORIKO）

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：10251448

研究成果の概要（和文）：

増殖因子が幹細胞を制御する分子機構や、増殖因子を介して各組織や臓器が発生する分子機構の解明を、新規バイオインフォマティクスを用いて目指した。研究代表者がこれまでに作製した増殖因子 FGF の細胞内司令塔分子 FRS2alpha の変異マウスの解析から、神経幹細胞の自己複製能の鍵分子 Hes1、心臓の発生パスウェイの鍵として FRS2alpha-Shp2-Tbx2 が明らかになった。さらに、乳腺幹細胞並びに乳癌幹細胞の自己複製能の鍵分子、NFkB が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to clarify molecular mechanisms how growth factors regulate self-renewing activity of tissue type specific stem cells by using novel bioinformatics. As a result, we identified Hes1 as a key molecular target of self-renewal of neural stem cells and FRS2alpha-Shp2-Tbx2 pathway as a key pathway for development of cardiac progenitor cells. Moreover, we identified NFkB as a key molecular target for self-renewing mammalian stem cells as well as breast cancer stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：①細胞・組織 ②シグナル伝達 ③マイクロアレイ ④発生・分化

⑤システム生物学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な組織に幹細胞が存在することが明らかになり、これを分離同定し、*in vitro*で至適な条件で培養し、生体内へ戻すことが理論的に可能になってきた。そのため、様々な疾病や事故などにより傷害を受けた脳神経系や心臓などの臓器を、幹細胞を用いて再生させようとする再生医療が、大変注目されている。しかし現時点で、実際に実用化に至っている再生医療はごく限られたものにとどまっており、克服されなければならない重要な問題点がいくつか存在する。

第一に、組織幹細胞を *in vitro* で未分化能を保持しながら大量培養するためには、増殖因子が必須である。中でも、22 種存在する **Fibroblast growth factor (FGF)1-23** は、神経幹細胞始め様々な組織幹細胞に用いることが可能な増殖因子として、研究代表者のこれまでの報告も含め、注目されている (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 102, p15983, 2005*)。しかし、種々の増殖因子が幹細胞を制御する分子機構が未だ不明な点が多く、効率的な幹細胞の増殖法が確立しづらい点があげられる。第二に、個々の組織や臓器を再生させるためには、それが発生する分子機構が理解されていることが重要であるが、現時点では、各組織や臓器が発生する分子機構は、未だ不明な点が多いこともあげられる。ここでも、FGFs が、脳神経系、眼を始めとする様々な組織、臓器の発生に重要な役割を果たしていることは、研究代表者のこれまでの報告も含め、よく知られている (*Mol. Cell. Biol., 25 p4105, 2005; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101, p17144, 2004*)。

発生生物学は、100 年以上の長い歴史のある学問分野であり、ここ十数年は、分子生物学的視点による要素還元的アプローチの飛躍的発達の恩恵を受けて、分子のレベルでか

なりることがわかってきた。しかし、発生という複雑で巧緻な現象を統合的に理解するためには、新たな視点からの解析が必要になっている。また、増殖因子による幹細胞の制御機構についても、その複雑な分子機構を包括的に解析し、統合的に理解するための方法論の確立が必要な段階になっている。

一方、数年前ヒトゲノム解読は一定の成果を収め、その情報を数理統計学的に解析するバイオインフォマティクス分野の発展が最近著しい。ここ数年、分子生物学者とバイオインフォマティクスの専門家の有機的な連携による、「システム生物学」が新たな学問分野として注目されつつある。研究者人口は、国内はまだ少数であるが、国外ではふえつつあり、これからの発展が期待されている。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、FGF の下流で働くドッキング/アダプター分子 **FRS2alpha** の変異マウス(2F マウス及び 4F マウス)を、ターゲティングにより作製し、解析を行ってきた。その結果、これらのマウスは、様々な発生異常を起こすとともに、種々の幹細胞にも異常をきたしている (*Dev. Biol., in press; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 102, p15983, 2005; Mol. Cell. Biol., 25 p4105, 2005; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101, p17144, 2004; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 98, p8578, 2001*)。詳細な解析より、これらのマウスは、FGF シグナルの重要なパスウェイを、それぞれ部分的にしかも特異的に欠失した優れたモデルマウスであることが明らかになっている。そこで、研究期間内では、これらのモデルマウスを用いて、これまでの解析により発生生物学的分子生物学的詳細が明らかな表現型を基盤に、システム生物学的解析を行う。その過程で、再生医療に役立つ新規シーズとなる分子の同

定など、再生医療への応用を視野に入れる。同時に、新たなマウス表現型について解析を行う。この成果は新たな系として、システム生物学的解析に供する基盤となる。

- A. FGF による胎児神経幹細胞の増殖制御並びに自己複製能のシステム生物学的解析
- B. 大脳皮質の発生制御のシステム生物学的解析
- C. FRS2alpha 2F 並びに 4F 変異マウスの新規表現型の発生生物学的ならびに分子生物学的解析
- D. 増殖因子による乳腺幹細胞制御のシステム生物学的解析

### 3. 研究の方法

#### 3-1. FGF による神経幹細胞の増殖制御並びに大脳皮質の発生制御のシステム生物学的解析

研究代表者のこれまでの解析により、FRS2alpha 2F マウス由来胎児神経幹細胞は、FGF シグナルの部分的欠失のために、FGF2 を添加して培養すると、増殖に障害がある (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 102, p15983, 2005)。そこで、野生型マウス由来胎児神経幹細胞と比較することにより、FGF2 による神経幹細胞の増殖パスウェイを統合的に明らかにする。具体的には、E12.5 のマウス telencephalon 由来の神経幹細胞を FGF2 で培養し、時系列的に細胞を採取し(約7ポイント)、RNA 及び蛋白質抽出を行う。RNA は、マイクロアレイ(Agilent 社)解析に供し、パスウェイ上で活躍している可能性のある候補遺伝子を数百から 1000 まで抽出する。次に、ABI 社の low density array system を用いて、網羅的 RT-PCR を行う。さらなるバイオインフォマティク

的解析を行い、シグナルパスウェイの解明及び in silico モデルの構築を行う。摂動解析を行い、モデルの検証を分子生物学的実験によって行い、その結果をバイオインフォマティクス解析へ供するというフィードバックを繰り返し、より精度の高いモデル構築を行う。精度の高い in silico モデルが得られたら、その中から、神経幹細胞の増殖パスウェイ上のキーイベントを予測し、脳神経細胞の再生に応用可能な新規シース候補分子を抽出する。

#### 3-2. FRS2alpha 変異マウスの新規表現型の解析

網膜、視神経、心臓などに新規表現型が見いだされたので、それを詳細に解析した。

FRS2alpha 2F マウスは、全例において心奇形を始めとする DiGeorge 症候群と一致する表現形を持っていた。

#### 3-3. 増殖因子によるシグナル伝達のシステム生物学的解析による乳腺幹細胞などの自己複製の解析

### 4. 研究成果

当初予定していた FRS2alpha 変異マウスを中心に用いての FRS2alpha を切り口とした神経や心臓などの組織幹細胞制御の解析を推進し、一定の成果を得た。また、FRS2alpha が神経幹細胞の増殖のみならず、自己複製にも重要であることが見いだされたので、システム生物学的解析の目的を、増殖から自己複製の解析に変更した。その結果、神経幹細胞の自己複製の標的として、Hes1 が明らかになった。

さらに、増殖因子一般による幹細胞の制御という切り口で研究を勧め、システム生物学的解析を組み合わせたところ、乳腺幹細胞やそれが癌化した乳癌幹細胞の自己複製能の分子機構の一旦も明らかになってきた。こち

らは、当初の予定からは想像できなかった新たな方向への研究の進展であり、今後さらなる発展が期待できる。

#### 4-1. FGF による神経幹細胞の増殖制御、自己複製能並びに大脳皮質の発生制御のシステム生物学的解析

4-1-1. 我々の解析より、FRS2alpha は、神経幹細胞の自己複製能にクリティカルであることを見いだした。そこで、その分子機構をシステム生物学的に統合的に理解するため、時系列詳細 DNA マイクロアレイにより遺伝子発現パターンプロファイリングを行い、これをバイオインフォマティクス解析に供した。その結果、神経幹細胞の自己複製の標的として、Hes1 が明らかになった。

#### 4-1-2.

FRS2alpha が、神経の basal progenitor cells の分化を制御する Tbr2 の発現誘導に重要な役割を果たしていることを見いだした。神経の basal progenitor cells の分化を制御する Tbr2 の発現を抑制する分子機構を調べた結果、Hes1 の発現誘導を介することが示唆された。今後 Tbr2 と Hes1 の発現の相互関係について、細胞生物学的な解析を行う予定である。

#### 4-1-3.

時系列詳細 DNA マイクロアレイにより遺伝子発現パターンプロファイリングを行い、これをバイオインフォマティクス解析に供した結果、Hes1-Pax6 シグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。現在 Pax6 の蛋白質レベルの発現、Pax6 関連の遺伝子発現を確認しており、この新規シグナル伝達系の解明につなげる予定である。

#### 4-2 FRS2alpha 2F 並びに 4F 変異マウスの新規表現型の解析

FRS2alpha 2F マウスは、全例において心奇形

を始めとする DiGeorge 症候群と一致する表現形を持っていた。発生生物学的並びに分子生物学的解析より、Shp2-Tbx2 パスウェイの存在が示された。

4-1. ヒト乳癌幹細胞株を用いたシステム生物学的解析より、乳癌幹細胞において、その自己複製能に NFkB パスウェイの活性化が重要であることが示された。

#### 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 25 件)

1.Gotoh, N.: Somatic mutations of the EGF receptor and their signal transducers affect the efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 4; 403-409, 2011.

2.Nasirujjaman K., Kimura-Yoshida, C., Gotoh, N., Hiramatsu, R. and Matsuo I.: A genetic study of the effects of reduced *Frs2alpha* gene dosage in exostoses development and cartilage abnormalities observed in *Ext2* heterozygous mutant mice. *Journal of Osaka Medical Center & Research Institute for Maternal & Child Health.*, in press.

3.Oyama, M., Nagashima, T., Suzuki, T., Kozuka-Hata, H., Yumoto, N., Shiraiishi, Y., Ikeda, K., Kuroki, Y., Gotoh, N., Ishida, T., Inoue, S., Kitano, H., Okada-Hatakeyama, M.: Integrated quantitative analysis of the phosphoproteome and transcriptome in tamoxifen-resistant breast cancer. *J. Biol. Chem.*, 286; 818-829, 2010.

4. Tasaki, S., Nagasaki, M., Kozuka-Hata, H., Semba, K., Gotoh, N., Hattori, S., Inoue, J., Yamamoto, T., Miyano, S., Sugano, S. and Oyama, M. : Phosphoproteomics-based modeling defines the regulatory mechanism underlying aberrant EGFR signaling. *PLoS ONE*, 5(11); e13926, 2010.
5. Hinohara, K. and Gotoh, N.: Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 10; 650-654, 2010. (論文の図がこの号の表紙に採用されました)
6. Shimamura, T., Imoto, S., Nagasaki, M., Yamauchi, M., Yamaguchi, R., Fujita, A., Tamada, Y., Gotoh, N., Miyano, S. Collocation-based sparse estimation for constructing dynamic gene networks. *Genome Inform.*, 24: 164-178, 2010.
7. Sato, T., Shimazaki, T., Naka, H., Fukami, S., Okano, H., Lax, I., Schlessinger, J. and Gotoh, N.: FGF-FRS2 $\alpha$ -Erk axis controls a self-renewal target Hes1 and growth of neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.*, 28: 1661-1672, 2010.
8. Kojima, K., Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T, Ueno, K., Higuchi, T., , Gotoh, N., Miyano, S.: A state space representation of VAR models with sparse learning for dynamic gene networks. *Genome Inform.*, 22, 56-68, 2010.
9. Iejima, D., Minegichi, Y., Takenaka, K., Siswanto, A., Watanabe, M., Huang, L., Watanabe, T., Tanaka, F., Kuroda, M. and Gotoh, N.: FRS2 $\beta$ , a potential prognostic gene for non-small cell lung cancer, encodes a feedback inhibitor for EGF receptor family members via ERK binding. *Oncogene*, 29: 3087-3099, 2010.
10. Murohashi, M., Hinohara, K., Kuroda, M., Isagawa, T., Tsuji, S., Kobayashi, S., Umezawa, K., Tojo, A., Aburatani, H. and Gotoh, N.: Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British J. Cancer*, 102: 206-212, 2010.
11. Murohashi, M., Nakamura, T., Tanaka, S., Ichise, T., Yoshida, N., Yamamoto, T., Shibuya, M., Schlessinger, J. and Gotoh, N.: An FGF4-FRS2 $\alpha$ -Cdx2 axis in trophoblast stem cells induces BMP4 to regulate proper growth of early mouse embryos. *Stem Cells*, 28: 113-121, 2010.
12. Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L.-Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, H., Ozawa, K., Omine, M., Hirai, H., Nakauchi, H., Koefler, P. and Ogawa, S.: Gain-of-function of mutated c-Cbl tumor suppressor in myeloid neoplasms with 11q uniparental disomy. *Nature*, 460, 904-909, 2009.
13. Iejima, D. and Gotoh, N.: FRS2 $\beta$  docking/scaffolding adaptor protein. *Current research in cancer, Research Media, India*, 3, 99-107, 2009.
14. Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki, T. and Gotoh, N.: FRS2 $\alpha$  is required for the separation,

migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus. *Dev. Dyn.*, 238, 503-513, 2009.

15. Yamauchi, M., and Gotoh, N.: Molecular mechanisms determining efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors help to identify biomarker candidates. *Biomark. Med.*, 3, 139-151, 2009.

16. Minegishi, Y., and Gotoh, N.: Frs2beta. *Nature Molecule Pages* doi:10.1038/mp.a004122.01, 2009.

17. Minegishi, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Horii, T., Hoshino, T., Kodama, T., Hamakubo, T. and Gotoh, N.: Prominent expression of FRS2 $\beta$  protein in neural cells and its association with intracellular vesicles. *FEBS lett.*, 583, 807-814, 2009.

18. Sato T. and Gotoh, N.: The FRS2 family of docking/scaffold adaptor proteins as therapeutic targets of cancer treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13, 689-700, 2009.

19. Sato, T. and Gotoh, N.: Frs2alpha. *Nature Molecule Pages*, doi:10.1038/mp.a000967.01, 2009.

20. Gotoh, N.: Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4, 9-15, 2009.

21. Gotoh, N.: Feedback inhibitors of epidermal growth factor receptor signaling pathways. *Int. J.*

*Biochem. Cell Biol.*, 41, 511-515, 2009.

22. Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T., Hatanaka, Y., Ueno, K., Higuchi, T., Gotoh, N. and Miyano, S.: Predicting differences in gene regulatory systems by state space models. *Genome Informatics*, 21, 101-113, 2008.

23. Gotoh, N.: Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci.*, 99, 1319-1325, 2008.

24. Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki T. and Gotoh, N.: FRS2 $\alpha^{2F/2F}$  mutant mice lack the carotid body and exhibit sympathetic ganglia and carotid sinus nerve abnormalities. *Dev. Biol.*, 314, 236-247, 2008.

25. Gotoh, N. and Tsuchida, N.: Membrane-linked docking protein. *Encyclopedia of Cancer, 2<sup>nd</sup> Edition, Springer, Heidelberg, Germany*, 1819-1823, July 4, 2008.

[学会発表] (計 32 件)

#### 1. 後藤典子

“システム生物学的手法による臨床的に有用な予後予測シグネチャー並びに新規分子標的候補の同定”

#### 第 33 回日本分子生物学会年会

2010 年 12 月

神戸

ワークショップオーガナイザー&招待講演

2. 日野原邦彦、室橋道子、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有

伸、油谷浩幸、後藤典子

“Potential roles of NF- $\kappa$ B pathways in breast cancer-initiating cells”

**第32回日本分子生物学会**

2009年12月9日～12日

横浜

口演、ポスター

3.後藤典子

“新規バイオインフォマティクス手法を用いた癌幹細胞内シグナル伝達経路の解明”

創薬薬理フォーラム 第18回シンポジウム

2010年9月

東京

招待講演

4. 峯岸ゆり子、服部成介、後藤典子

“腫瘍抑制候補アダプタータンパク FRS2beta は CIN85/CD2AP と結合し ErbB2 シグナルを減弱化する。”

**第69回日本癌学会学術総会**

2010年9月

大阪

口演

5.Noriko Gotoh

“A key role of NF- $\kappa$ B pathway in breast cancer stem cells for tumorigenesis.

**14<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 12<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine**

2009年10月15日～17日

Loutraki, Greece

招待講演

6.Noriko Gotoh, Mai Yamauchi, Takashi Khono<sup>1</sup>, Jun Yokota<sup>1</sup>

1 Biology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

“Exploration of new biomarkers and molecular targets of lung carcinoma by systems biology approach”

**68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**

**第68回日本癌学会学術総会**

2009年10月1日～3日

横浜

招待講演

7.Noriko Gotoh

“Growth factor signaling systems identify critical genes for survival prediction in lung adenocarcinoma”

**The 16<sup>th</sup> East Asia Joint conference on Biomedical Research**

2009年9月13日～14日、

京都

招待講演

[図書] (計2件)

1.Gotoh, N.: FRS2. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Heidelberg, Germany.

2.Gotoh, N.: Possible signaling pathways in cancer stem cells in breast cancer. In: *Cancer Stem Cells*, Nikolic, A. (Ed.), *ITECH, Vienna, Austria*.

[産業財産権] (計0件)

○出願状況

1. 名称: 癌の予後を予測するためのバイオマーカー

発明者: 後藤典子、山内麻衣、宮野悟、井元

清哉、山口類、横田淳、河野隆志

権利者：

種類：

番号：PCT/JP2009/70386

出願年月日：2009年12月4日

国内外の別：国外

2.名称：固形癌の再発予測のための試験方法及び再発予防剤

発明者：後藤典子、室橋道子、油谷浩幸、砂河孝行、黒田雅彦

権利者：

種類：

番号：特願 2009-023933

特許出願年月日：2009年2月4日

国内外の別：国内

3.名称：癌の予後を予測するためのバイオマーカー

発明者：後藤典子、山内麻衣、宮野悟、井元清哉、山口類、横田淳、河野隆志

権利者：

種類：

番号：特願 2008-311481

出願年月日：2008年12月5日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤 典子 (GOTOH NORIKO)  
東京大学・医科学研究所・特任准教授  
研究者番号：10251448

##### (2) 研究分担者

宮野 悟 (MIYANO SATORU )  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：50128104

##### (3) 連携研究者 なし ( )

研究者番号：