

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460938

研究課題名(和文) pSmad2/3L-Thrに着目した消化管上皮幹細胞・癌化・再生機構の検討

研究課題名(英文) Analysis of the epithelial stem cell and the regenerative and carcinogenic mechanisms of digestive tract from the point of view of pSmad2/3L-Thr

研究代表者

福井 寿朗 (FUKUI, Toshiro)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60402905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は胃・小腸・大腸上皮における新規幹細胞マーカーとしてSmad2および3のリンカー部スレオニン残基がリン酸化されたpSmad2/3L-Thrを同定し、これまで明らかにしてきた。

本研究ではこの成果を発展させ、食道粘膜においてもpSmad2/3L-Thrが組織幹細胞マーカーになることを確認した。さらに、大腸炎関連性大腸癌モデルマウスを作製し、Smad3のリンカー部セリン残基がリン酸化されたpSmad3L-Serは発癌早期から発現が認められる重要な癌化シグナルであること、また前述のごとくpSmad2/3L-Thrは消化管上皮幹細胞マーカーのみならず、癌幹細胞マーカーとなることも新たに確認できた。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we have identified significant expression of Smad2/3, phosphorylated at the specific linker threonine residues (pSmad2/3L-Thr), in murine gastric, small intestinal, and colon epithelial cells and have suggested these cells are their epithelial stem-like cells.

In this study, we have confirmed that pSmad2/3L-Thr can serve as a biomarker for esophageal stem cells. This investigation of Smad2/3 phosphorylation profiles have also clarified that additional carcinogenic pSmad3L-Ser signaling induced by chronic inflammation is an important early event in colitis-associated colorectal cancers.

Furthermore, this study has confirmed that pSmad2/3L-Thr can serve as a biomarker for cancer stem cells of a mouse model of colitis-associated colorectal cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：消化管上皮幹細胞 粘膜再生 癌化 マウスモデル Smad リン酸化 大腸癌 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜の上皮細胞は増殖・分化・再生・脱落を繰り返し構造的・機能的恒常性を一定の状態に保っている。消化管は粘膜上皮の増殖帯と呼ばれる部位に多くの分裂細胞を有し、特に再生スピードの速い組織である。これらのメカニズムは厳密にコントロールされ、その破綻により時に致命的な異常・疾患を引き起こす。増殖帯は食道では基底層、胃粘膜では峽部付近、小腸では陰窩底部パネート細胞の上方、大腸では陰窩底部に存在する。そこには分裂速度が速く、各細胞への分化能を持つ未熟な前駆細胞 (TA cell; transit-amplifying cell) が存在する。増殖帯で分裂した上皮細胞は、個別の機能をもつ細胞に分化しながら食道では上方、胃では上下両方向、小腸ではパネート細胞以外は上方、大腸では上方に上皮内を移動していく。

これまでの研究により、各組織における組織幹細胞は多分化能・自己複製能を持つ未分化な細胞であり、細胞の分裂サイクルはきわめて遅く、通常は細胞周期の G0 期(静止期)にある細胞であると考えられてきた。しかし近年、後述の腸管幹細胞マーカーとされる Lgr5 の発見などにより、細胞の分裂サイクルの速い組織幹細胞も存在することが提唱され、組織幹細胞の概念は多分化能と自己複製能に限定され解釈されつつある。特に小腸では現在も議論に決着を見ておらず、Pottenらを中心に以前より提唱されてきた細胞の分裂サイクルの遅い幹細胞 (LRCs; label-retaining cells) の存在部位とされる陰窩底部パネート細胞直上の +4 (cell) position の幹細胞マーカーである Bmi1 と、細胞の分裂サイクルが速くパネート細胞の間に存在するとされる CBC (crypt base columnar) 細胞の幹細胞マーカーである Lgr5 の両者が組織幹細胞マーカーとして提唱され、両者とも多分化能を有し小腸の全ての細胞に分化するが、どちらがより上流の幹細胞であるかは明らかになっていない。

細胞周期はセリン/スレオニンキナーゼである CDK (cyclin-dependent kinase)、CDK と結合し酵素活性を発現させる cyclin、CDK に結合してその活性を抑制する CDKI (CDK inhibitor) の組み合わせやバランスによって各位相への移行が正確に制御されている。その中でも活性化された CDK4・cyclinD 複合体は癌抑制遺伝子の一つ、Rb (Retinoblastoma) 蛋白ファミリーをリン酸化し Rb 蛋白の細胞増殖抑制作用を抑制することにより細胞周期の進行や癌化に関与している。また Rb 蛋白以外にも後述の Smad3 蛋白などをリン酸化し、細胞周期の早期である G1 (DNA 合成前期)・G0 期から S 期 (DNA 合成期) への進行に関与している。さらに CDK4 は、G0 期にある CD34 陽性の造血幹細胞中にも唯一認められ、G0 期にある幹細胞が細胞分裂する際に重要な働きを持つと考えられている。

Smad2 および Smad3 (Smad2/3) 蛋白は、MH (Mad homology) 1, MH2 の二つのドメインと、その間を繋ぐリンカー部から構成される。TGF- $\beta$  受容体は Smad2/3 蛋白の C 末端をリン酸化し、細胞増殖を抑制する方向に働くが、ERK (extracellular signal-regulated kinase)・JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) 等の MAP (mitogen-activated protein) キナーゼや CDK4 は Smad2/3 蛋白のリンカー部のセリン・スレオニンをリン酸化して細胞増殖を促進する方向に働くという正反対の作用を持つと考えられている。

### 2. 研究の目的

以上を背景として本研究代表者は、CDK4 にてリン酸化され、Smad2/3 蛋白の細胞増殖作用に最も影響するリンカー部のスレオニン (Thr220/Thr179) がリン酸化された Smad2/3 蛋白 (pSmad2/3L-Thr) を特異的に認識する抗体を用い、pSmad2/3L-Thr が細胞分裂周期に re-entry しようとする G0 期胃粘膜上皮幹細胞のマーカーになることを報告し、さらには小腸・大腸粘膜上皮においても同様に、幹細胞マーカーになることを明らかにした。本研究ではこれらの研究成果を発展させ、組織幹細胞の実用的マーカーがいまだ存在しない食道において pSmad2/3L-Thr が幹細胞マーカーになり得るかどうかを検討し、また炎症・発癌のモデルマウスを作製し、各病態における pSmad2/3L-Thr 陽性細胞を検討することにより、粘膜再生や癌幹細胞の概念を念頭に置いた癌化メカニズムの解析が可能であると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスの食道を摘出・ホルマリン固定・パラフィン包埋し、未染標本を作製する。この切片を pSmad2/3L-Thr と Ki67 に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行する。pSmad2/3L-Thr 陽性の細胞は Ki67 陰性細胞として食道粘膜上皮の増殖帯 (基底層) に Ki67 陽性細胞に挟まれるように検出される (予備実験で確認済み)。蛍光免疫染色後の切片をそのまま HE 染色することにより明視野にて pSmad2/3L-Thr 陽性細胞を確認し、特徴を解析する。

(2) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞が扁平上皮細胞であり、間質の細胞や上皮内に浸潤した免疫担当細胞とは異なることを確認するため、未熟な扁平上皮細胞 (前駆細胞) のマーカーとされる p63 蛋白と pSmad2/3L-Thr に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行する。

(3) pSmad2/3L-Thr のリン酸化に関与する CDK4 と pSmad2/3L-Thr に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行する。

(4) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞が、細胞の分裂サイクルの遅い幹細胞 (LRC) であることを確認

するため、BrdU label-retaining assay を行う。C57BL/6 マウスに体重 10g につき 0.1ml の割合で BrdU 溶液を 7 日間連続腹腔内投与し、投与終了 5・10・15・20 日後に食道を摘出する。摘出した食道を BrdU と pSmad2/3L-Thr に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行する。

(5)C57BL/6 マウスに 0.5M 塩酸を経口投与し食道潰瘍モデルマウスを作成する。投与 3 日後に食道を摘出し、潰瘍部および周囲の粘膜再生部にて pSmad2/3L-Thr と Ki67 に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行する。それぞれの単位長あたりの陽性細胞数をカウントし、正常マウスと比較する。

(6)AOM/DSS 投与 ICR マウス(体重 10g につき 0.1mg の AOM を腹腔内注射、1 週間より 2%DSS を 7 日間自由飲水し、その後 16 週にて完成)の大腸癌モデルマウスから検体を採取する。pSmad2/3L-Thr の免疫染色にて癌部(および正常部)における発現を(比較)検討する。組織切片を CDK4・Ki67・βカテニン等と蛍光二重染色し pSmad2/3L-Thr 陽性細胞の癌幹細胞としての可能性、(炎症性腸疾患からの)発癌メカニズムを解析する。

#### 4. 研究成果

(1)マウス食道にて pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は粘膜基底層に Ki67 陽性細胞に挟まれるように検出された。免疫染色後の切片をそのまま HE 染色することにより pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は特定の分化の特徴を示さない未熟な細胞として基底層に確認された。

(2)pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は基底層の未熟扁平上皮細胞マーカーである p63、基底層の上皮細胞が発現するサイトケラチン 14(CK14)の両者とも陽性であり、未熟な基底層上皮細胞であることが確認された。

(3)pSmad2/3L-Thr 陽性細胞はリン酸化に関与すると考えられる CDK4 を強く発現していた。

(4)pSmad2/3L-Thr 陽性細胞が分裂サイクルの遅い幹細胞であることを確認するため、BrdU label-retaining assay を行った。摘出したマウス食道において BrdU 投与終了後 20 日まで pSmad2/3L-Thr 陽性細胞に BrdU の残存が確認された。

(5)塩酸を経口投与し食道潰瘍モデルマウスを作成、投与 3 日後に食道を摘出した。再生粘膜において pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は Ki67 陽性細胞とともに増加していた。

(6)アゾキシメタン(AOM)/DSS 投与 ICR マウスは、大腸炎を伴う粘膜内に多発性の隆起性病変が出来ており、病理学的にはほとんどの

病変が粘膜内癌であった。一部は漿膜下層まで病変が浸潤していた。時間経過とともに腫瘍の個数が増し、サイズも大きくなっていった。さらに、AOM/DSS マウスはコントロール群と比較し腸管長が有意に短縮し、腫瘍個数は 10 週間後と比較し、20 週間後で有意に増加していた。腸炎スコアはコントロール群と比較し、AOM/DSS マウスにおいて有意に高値であった。

(7)リン酸化 Smad 蛋白や CDK4・Ki67・カテニン・Sox9・cyclin D1・c-Myc 等の免疫染色にて癌部(および正常部)における発現を(比較)検討した。Ki67、-catenin、cyclinD1、Sox9 陽性細胞は腸炎部においては正常部と同様であったが、腫瘍部においてはびまん性に発現が認められた。pSmad3L-Ser 陽性細胞は腸炎部と比較し、腫瘍部において有意に多く発現しており、かつ腸炎部においてはコントロール群正常部と比較すると有意に多く発現していた。pSmad2/3L-Thr 陽性細胞はコントロール群正常部および AOM/DSS マウスの腸炎部においては、腺底部に散在性に発現が認められたが、腫瘍部においては上層に有意に多く発現しており、いずれにおいても Ki67 は陰性であった。pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は正常部と腫瘍部の両者において -catenin(正常部と腸炎部では細胞膜、腫瘍部では核と細胞質に発現)、CDK4 と両陽性を示した。pSmad2/3L-Ser は腸炎関連大腸癌モデルにおいて、発癌早期から発現が認められる重要なシグナルであると考えられた。pSmad2/3L-Thr は正常部では組織幹細胞に発現が認められ、腫瘍部においても同様の形質を示したことから、癌幹細胞のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Phosphorylation of Smad2/3 at the specific linker threonine residue indicates slow-cycling esophageal stem-like cells before re-entry to the cell cycle.

Takahashi Y, Fukui T, Kishimoto M, Suzuki R, Mitsuyama T, Sumimoto K, Okazaki T, Sakao M, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K.

Dis Esophagus. 2016;29:107-115. doi: 10.1111/dote.12277. 査読有

Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer.

Suzuki R, Fukui T, Kishimoto M, Miyamoto S, Takahashi Y, Takeo M, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Uchida K, Nishio A, Okazaki K.

J Crohns Colitis. 2015;9:565-574. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv073. 査読有

Phosphorylation of Smad2/3 at Specific Linker Threonine Indicates Slow-Cycling Intestinal Stem-Like Cells Before Reentry to Cell Cycle.

Kishimoto M, Fukui T, Suzuki R, Takahashi Y, Sumimoto K, Okazaki T, Sakao M, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K.

Dig Dis Sci. 2015;60:362-374. doi: 10.1007/s10620-014-3348-3. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

2015/12/3-6

APDW (Asian Pacific Digestive Week) 2015 (Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan)

Carcinogenic and stem cell-like phenotypes of Smad2/3 linker phosphorylation in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer.

Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Yu Takahashi, Sachi Miyamoto, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki

2015/9/26

第103回日本消化器病学会近畿支部例会(大阪国際交流センター・大阪府・大阪市)ワークショップ 2 次代を担う消化器研究 bench to bed W2-11

特定のリンカー部スレオニンがリン酸化された Smad2/3 蛋白 (pSmad2/3L-Thr) の消化管上皮幹細胞マーカーとしての検討と応用

関西医科大学 内科学第三講座

高橋悠 福井寿朗 岡崎和一

2013/10/12-16

21th United European Gastroenterology Week (Internationales Congress Centrum Berlin, Berlin, Germany)

Phosphorylation of Smad2/3 in Stem Cells of Small Intestine

Yu Takahashi, Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Kazushige Uchida, Koichi Matsuzaki, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki

2013/4/12-13

第50回日本臨床分子医学会学術集会(東京国際フォーラム・東京都・千代田区)

リンカー部スレオニンリン酸化 smad2/3 蛋白発現による腸管幹細胞マーカーの探索

関西医科大学 内科学第三講座

岸本真房 鈴木亮 高橋悠 福井寿朗 坂口雄沢 内田一茂 西尾彰功 岡崎和一

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福井 寿朗 (FUKUI, Toshiro)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60402905

### (2) 研究協力者

岸本 真房 (KISHIMOTO, Masanobu)

関西医科大学・医学部・大学院生

高橋 悠 (TKAHASHI, Yu)

関西医科大学・医学部・大学院生

鈴木 亮 (SUZUKI, Ryo)

関西医科大学・医学部・大学院生

内田 一茂 (UCHIDA, Kazushige)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40411516

西尾 彰功 (NISHIO, Akiyoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50362463

岡崎 和一 (OKAZAKI, Kazuichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70145126