

# 論 文 要 旨

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

(特定のリンカー部スレオニンがリン酸化された Smad2/3 蛋白は slow-cycling な食道幹細胞様細胞を示唆する)

関西医科大学内科学第三講座  
(指導： 岡崎 和一 教授)

高 橋 悠

### 【はじめに】

幹細胞は通常状態では細胞分裂は強く抑制され、細胞周期の G0 期にあり免疫組織学的に Ki67 陰性となる。細胞周期は CDK(cyclin-dependent kinase)・cyclin 複合体、CDK に結合して活性を抑制する 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。CDK4・cyclinD 複合体は Rb 蛋白以外に Smad2/3 蛋白などもリン酸化し、G1 (G0) 期から S 期への進行に関与している。抗 pSmad2/3L-Thr 抗体は、Smad2/3 蛋白のリンカー部の Thr がリン酸化された Smad2/3 蛋白のみに特異的に結合する。抗 pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識されるリン酸化 Smad2/3 蛋白のリン酸化部位 (Thr<sup>220</sup>/Thr<sup>179</sup>) は CDK4 にてリン酸化される部位と一致する。以上細胞周期の観点から、pSmad2/3L-Thr は Ki67 と組み合わせれば、組織幹細胞マーカーの候補であることが推測される。

### 【研究目的】

以前より食道上皮幹細胞は粘膜基底層に存在していると考えられており、粘膜恒常性の維持、障害からの治癒機転としての再生のメカニズムに非常に重要な役割を担っている。当研究において最新の幹細胞・細胞周期研究の知見や、我々がこれまで検討してきた胃上皮幹細胞の知見を応用することにより、食道粘膜における抗 pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される細胞を解析し、pSmad2/3L-Thr が食道上皮幹細胞のバイオマーカーになり得るかを検討する。

### 【研究方法】

C57BL/6 マウスより、正常食道と食道炎モデルの組織標本を作成した。マウス食道切片において、Ki67 陰性かつ pSmad2/3L-Thr 強陽性の細胞を検出し、CDK4、食道前駆細胞マーカーである p63・CK14 とともに蛍光二重染色を施行した。染色後、同切片をヘマトキシリンエオジンで染色し、光学顕微鏡下で観察した。BrdU を用い pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞が BrdU 長期陽性細胞かを確認した。BrdU を繰り返し十分量投与し、投与 5 日後、10 日後、15 日後、20 日後の切片を作成し pSmad2/3L-Thr と BrdU の二重染色を施行した。食道炎モデルの粘膜再生期の Ki67 陽性細胞と pSmad2/3L-Thr 陽性細胞の動態を観察し、コントロールマウスとの比較検討を行った。

### 【結果】

食道上皮基底層に pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞が確認された。これらの細胞は、Ki67 陽性細胞に囲まれるように存在したが、Ki67 は必ず陰性であった。CDK4、p63、CK14 とは共に陽性であった。光学顕微鏡下の観察では、未分化な形態学的特徴を示していた。BrdU label-retaining assay では、投与後 20 日まで、BrdU は pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞に残存していた。コントロール群と比較し、塩酸食道炎マウスモデルの粘膜再生期では、pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞は有意に増加していた。(食道炎群 vs. コントロール群 : 6.889 ± 0.676/cm vs. 4.293 ± 0.659/cm; P < 0.001)

### 【考察】

マウス食道上皮における pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞を同定した。抗 pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識されるこの細胞は、slow-cycling な組織幹細胞様細胞であった。上皮幹細胞、再生治癒のメカニズムを解析することにより、今後はヒトにおける上皮恒常性の解明、疾患の予防、新規治療法の確立等につなげていきたいと考えている。