

論 文 要 旨

Phosphorylation of Smad2/3 at specific linker threonine indicates slow-cycling intestinal stem-like cells before reentry to cell cycle

(Smad2/3 蛋白の特定のリンカー部スレオニンリン酸化が細胞周期再進入前の slow-cycling な腸管幹細胞様細胞を特定する)

関西医科大学内科学第三講座
(指導：岡崎和一教授)

岸本真房

【研究目的】

腸管における幹細胞は、多分化能や自己修復能をもつ未分化な細胞で、小腸では+4 position または CBC (crypt base columnar) 細胞に、大腸では crypt base に存在するといわれている。静止状態では、幹細胞の細胞分裂は強く抑制され、細胞周期上の 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。CDK4・cyclinD 複合体は、Rb 蛋白 (増殖抑制作用) 以外に Smad3 もリン酸化し、G1 期から S 期への進行に関与している。今回用いた anti-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 蛋白に特異的に結合し、この抗体で認識されるリン酸化部位は CDK4 にてリン酸化され細胞周期を促進する部位と一致する。この細胞周期の観点から anti-pSmad2/3L-Thr 抗体にて認識される腸管細胞 (以下 Smad 陽性細胞) を同定し、幹細胞マーカーの可能性を検討する。

【研究方法】

1) 正常マウスの小腸切片と大腸切片において、蛍光二重染色を行い、Ki67 陰性かつ Smad 陽性細胞を検出する。2) 正常マウスの小腸切片と大腸切片において、anti-pSmad2/3L-Thr 抗体と腸管粘膜構成細胞マーカー (Cytokeratin8, Chromogranin A), 細胞周期マーカー (CDK4), これまでに提唱されている消化管上皮幹細胞マーカー (DCAMKL1, MSI-1) で二重染色を施行する。3) 消化管上皮幹細胞のマーカーとされる Lgr5 を発現した細胞が GFP にて発色するように改変されたマウス (Lgr5 GFP Knock in mouse) の小腸切片と大腸切片を免疫染色し、Smad 陽性細胞との相違を確認する。4) 正常マウスに BrdU を腹腔内投与、Label retaining assay を行い、Smad 陽性細胞における BrdU の残存を確認する。5) DSS 腸炎モデルマウスにおいても同様の細胞を検索し、びらん部と再生部の Smad 陽性細胞を検討する。

【結果】

正常マウスの小腸では+4 position 付近と一部の CBC 細胞に Ki67 陰性の Smad 陽性細胞を認め、大腸では crypt base に Ki67 陰性の Smad 陽性細胞を認めた。小腸と大腸で Smad 陽性細胞は、cytokeratine 8 陽性、Chromogranin A 陰性であり、CDK4 が強く発現していた。小腸と大腸の Smad 陽性細胞は DCAMKL1 陰性であり、小腸の Smad 陽性細胞は、MSI-1 陽性細胞領域に発現していた。Lgr5 GFP Knock in mouse において、小腸で+ 4 position 付近の大部分の Smad 陽性細胞は Lgr5 陰性、CBC 細胞領域の一部の Smad 陽性細胞は Lgr5 陽性であり、一方大腸では、大部分の Smad 陽性細胞は Lgr5 陽性であった。BrdU 腹腔内投与を行ったマウスの小腸と大腸で、BrdU 投与後 15 日目まで Smad 陽性細胞に BrdU の残存を認めた。DSS 腸炎の大腸では、びらん部は Ki67 と Smad 陽性細胞は認めず、再生部は Ki67 陽性細胞と Smad 陽性細胞の有意な増加を認めた。

【考察】

Smad 陽性細胞が上皮由来の slow-cycling な組織幹細胞である可能性を確認した。リンカー部の Thr リン酸化は、CDK4 によりリン酸化され、幹細胞が Ki67 陰性の休止期から再び G1 期に入る時期に強く発現し、組織再生において重要な働きをしていると考えられた。Smad 陽性細胞は多臓器においても組織幹細胞の可能性があり、リン酸化前後の詳細なメカニズムの解析が今後必要と考えられた。