腸炎関連大腸癌モデルマウスにおける Smad2/3 リンカー一部リン酸化の発癌との関連性についての検討

鈴木 亮, 福井 寿朗, 岡崎 和一

関西医科大学内科学第三講座

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

Ryo Suzuki, Toshiro Fukui, Kazuichi Okazaki

Division of Gastroenterology and Hepatology, Third Department of Internal Medicine, Kansai Medical University

Received 3 July, 2017 / Accepted 3 July, 2017

Abstract:

Background and Aims: Epithelial cells affected by somatic mutations undergo transition from tumor-suppressive to carcinogenic Smad pathway during sporadic colorectal carcinogenesis, and the specific linker threonine phosphorylation of Smad2/3 in colon epithelial cells indicates stem-like cells. This study extends previous our observations (Cancer Res 2005; 65: 157–65, Cancer Res 2007; 67: 5090–6, Dig Dis Sci 2015; 60: 362–74) to a model of colitis-associated colorectal cancer. **Methods:** After Crl:CD-1 mice received an intraperitoneal administration of azoxymethane (AOM), the mice were given dextran sodium sulfate (DSS) for seven days. AOM/DSS-treated mice (AOM/DSS mice) were killed at 10 or 20 weeks. After macroscopic observations, a histopathological analysis was conducted. Immunohistochemical staining was performed using the avidin-biotin immunoperoxidase method (pSmad3C-Ser, pSmad3L-Ser, c-Myc) and immunofluorescent methods (Ki67, β -catenin, CDK4, cyclin D1, Sox9, pSmad2/3L-Thr).

Results: Colons from AOM/DSS mice were shorter than those from control mice. The number of colon tumors at week 20 was higher than at week 10. Inflammation scores for AOM/DSS mice were greater than those for control mice. Immunostaining-positive cells {staining by Ki67, β -catenin (nuclear and cytoplasmic), cyclin D1, and Sox9} were diffusely distributed in colon tumors. The percentage of pSmad3L-Ser-positive cells in colon tumors was higher than in sites of colitis, and that in sites of colitis was higher than in control mice. pSmad2/3L-Thr-positive cells were sparsely detected around crypt bases in non-neoplastic colon epithelia and at the tops of tumors, and immunohistochemical co-localization of pSmad2/3L-Thr with Ki67 was not observed. Immunohistochemical co-localization of pSmad2/3L-Thr with β -catenin and CDK4 was observed.

Conclusions: pSmad3L-Ser signaling is an early event in colitis-associated colorectal cancer, and pSmad2/3L-Thr immunostaining-positive cells might be cancer stem cells.

Key words: mouse model, colitis-associated colorectal cancer, carcinogenesis, cancer stem cell, Smad, phosphorylation

要旨:

【背景・目的】 Smad2/3 蛋白は TGF- β 受容体において C 末端が, MAP キナーゼや CDK4 でリンカー一部がリン酸化される。散発性大腸癌では変異を起こした癌細胞は腫瘍抑制性 (pSmad3C-Ser) から腫瘍原性 (pSmad3L-Ser) の Smad 経路を示し, Smad2/3 蛋白の特定のリンカー部スレオニンがリン酸化 (pSmad2/3L-Thr) された正常大腸上皮細胞は幹細胞様形質を示すことがこれまでの我々の検討により明らかになった。腸炎関連大腸癌モデルマウスを作製し, これらにつき検討した。

【方法】 アゾキシメタン (AOM) と DSS を ICR マウスに投与し (AOM/DSS マウス), 10・20 週後に組織を回収した。肉眼・組織像を観察後, 切片を作製し (蛍光) 免疫染色法 (pSmad3C-Ser, pSmad3L-Ser, c-Myc, Ki67, β -catenin, CDK4, cyclinD1, Sox9, pSmad2/3L-Thr) にて蛋白発現を検討した。

【結果】AOM/DSS マウスは正常 ICR マウスと比較し、大腸長は短縮し、炎症スコアは増加していた。20 週後の AOM/DSS マウスでは 10 週後より腫瘍数が増加し、腫瘍には、Ki67、核・細胞質内の β -catenin, cyclinD1, Sox9 が瀰漫性に発現していた。pSmad3L-Ser 陽性細胞数は、正常 ICR マウス、AOM/DSS マウスの非腫瘍部、腫瘍部と次第に増加していた。pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は正常マウスと AOM/DSS マウスの非腫瘍部では腺底部に認められ、腫瘍部では先端付近に多く認められた。腫瘍部の pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は Ki67 陰性、核・細胞質内の β -catenin 陽性、CDK4 陽性であった。

【結論】pSmad3L-Ser シグナルは腸炎関連大腸癌モデルマウスにおいても早期から発現し、pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は腫瘍幹細胞の可能性が示唆された。

キーワード：マウスモデル、腸炎関連大腸癌、癌化、癌幹細胞、Smad、リン酸化

はじめに

潰瘍性大腸炎は大腸癌の危険因子¹⁾であり、有病者数は年々増加²⁾しているが、その病態は不明な点がいまだ多い。1925 年に Crohn と Rosenberg により初めて潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌が報告されて以来、潰瘍性大腸炎関連大腸癌に関する多数の報告がなされている。罹患期間が長期であるほど、炎症が広範囲であるほど³⁾、また組織学的炎症の程度が強いほど⁴⁾大腸癌の発生率が高いと報告されており、慢性炎症の持続により大腸癌が生じると考えられている。

現在、癌を考える上で、癌幹細胞説という概念が提唱されている。癌を構成する細胞は均一ではなく、一部の細胞が癌幹細胞として存在するという概念であり、癌幹細胞は組織幹細胞と類似の性質を示し、腫瘍性増殖や浸潤、転移、癌の再生に関わり、化学療法や放射線などに抵抗性を示す^{5,6)}と考えられている。この治療抵抗性を示す癌幹細胞を含む細胞集団を分離し治療法を開発することは、癌治療の新しい展望となり⁶⁾臨床に大きく貢献できると考えられる。

pSmad3L-Ser と pSmad2/3L-Thr

Smad2 および 3 (2/3) は TGF- β シグナルの下流で中心的な役割を果たし、Mad-homology (MH) 1 domains, MH2 domains とそれらの中央に位置するリンカー部から構成されている^{7,8)}。I 型 TGF- β 受容体にシグナルが入ると、活性化された受容体により Smad2/3 蛋白の MH2 domains の C 末端がリン酸化 (pSmad3C-Ser) され⁹⁾、細胞増殖を抑制する方向に働くことが広く知られている¹⁰⁾。一方、リンカー部が Ras 関連キナーゼである ERK や JNK, CDK4 によってリン酸化 (pSmad2/3L) され¹¹⁻¹⁴⁾、細胞増殖が促進する方向に働くことがわかってきた^{10,15)}。

細胞周期には G0 期、つまり細胞周期を外れ静状態にある細胞が存在し、CDK と cyclin によって各位相が進められ¹⁶⁻¹⁸⁾、G0 期において CDK4・cyclinD 複合

体は Rb 蛋白をリン酸化して細胞周期を促進する^{19,20)}。それ以外に、CDK4・cyclinD 複合体は Smad3 蛋白のリンカー部スレオニンをリン酸化して細胞周期を G1 (または G0) 期から S 期へ促進する^{12,18-20)}。そして、我々は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) 陽性細胞が、マウス大腸組織において組織幹細胞様細胞を示すことを報告した²¹⁾。今回我々は潰瘍性大腸炎関連大腸癌モデルマウスにおける Smad3 蛋白のリンカー部セリンがリン酸化された pSmad3L-Ser 蛋白の発現と、pSmad2/3L-Thr 蛋白が癌幹細胞マーカーとなり得るかどうかの検討を行った。

1. 潰瘍性大腸炎関連大腸癌モデルマウス (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3)

Tanaka らによりアゾキシメタンと DSS による腸炎関連大腸癌モデルマウス²²⁾が作製されている。この方法に準じ、我々は 5 週齢雄の ICR マウスに 10 mg/kg のアゾキシメタンを腹腔内投与し、アゾキシメタン投与一週間後に 2%DSS を 7 日間自由飲水させる方法でマウス大腸炎関連大腸癌モデル (AOM/DSS マウス) を作製し、アゾキシメタン投与 10 週後と 20 週後にマウスを屠殺した。腸管長と腫瘍個数を確認後にホルマリン固定し、腸炎をスコアリングした。

AOM/DSS マウスでは中部から下部大腸を中心に腫瘍形成を認め、アゾキシメタン投与 10 週後では小結節の腫瘍が散在するのに対し、投与 20 週後では結節状、ポリープ状、キャタピラー状の腫瘍を認めた。

Fig. 1. 5 週齢・雄の ICR マウスに 10 mg/kg のアゾキシメタン (AOM) を腹腔内投与し、AOM 投与 1 週後に 2%DSS を 1 週間自由飲水させ、腸炎関連大腸癌モデルマウスを作製した。AOM 投与後 10, 20 週に組織を摘出した。

Fig. 2. AOM 投与後 10, 20 週に摘出した組織のマクロ写真と腸管長, 腫瘍個数.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; N.S., not significant

Fig. 3. 10, 20 週に摘出した切除組織の病理組織と炎症スコア.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; N.S., not significant

腸管長はコントロール群と比較し, AOM/DSS マウスで有意に短縮しており, 腸炎による影響と考えた. AOM/DSS マウスの腫瘍個数は, 10 週後と比較し 20 週後で有意に増加した.

腫瘍の多くは粘膜内に局限していたが, 筋層を超えて浸潤しているものも認めた.

AOM/DSS 腸炎では中部から下部大腸を中心に腺管の短縮, 炎症細胞浸潤や浮腫性変化を認め, 腸炎スコアはコントロール群と比較し, AOM/DSS 腸炎において有意に高値を示した. 10 週後と 20 週後では, 10 週後で炎症スコアが高い結果であったが, 両群間に有意差は認めなかった.

2. Ki67, β -catenin, CDK4, cyclinD1, Sox9 の発現 (Fig. 4)

増殖細胞で陽性となる Ki67²³⁾ の免疫染色は, コントロール群と腸炎部では増殖帯が存在する基底部を中心に陽性細胞を認めた. 一方, 腫瘍部では腫瘍全体に

Ki67 陽性細胞が認められ, 非腫瘍に認められた極性は消失し, 腫瘍全体で細胞増殖の亢進を認めた.

細胞間の接着をコントロールする一方, Wnt-APC シグナルにより発生における細胞の運命の決定や, 癌細胞の増殖性の亢進にかかわる遺伝子発現を引き起こす β -catenin^{24,25)} の免疫染色では, コントロール群と腸炎部では細胞膜のみに強い染色を認めた. 一方, 腫瘍部では腫瘍全体で核と細胞質の染色を認めた.

細胞周期や細胞増殖に関連する CDK4 の免疫染色では, CDK4 を強く発現する細胞はコントロール群と腸炎部では基底部に散在性に認め, 腫瘍部では腫瘍全体に散在性に認めた.

増殖シグナルによって発現が亢進し, 特に癌組織において発現の亢進が認められる cyclinD1²⁶⁻²⁸⁾ の免疫染色では, cyclinD1 陽性細胞はコントロール群と腸炎部では発現を認めなかった. 一方腫瘍部では腫瘍全体に陽性細胞を認めた.

正常粘膜における progenitor 細胞や幹細胞など未熟な細胞, および大腸癌組織において発現が亢進する

Fig. 4. 免疫染色：上から Ki67, β -catenin, CDK4, cyclin D1, Sox9.

Sox9²⁹⁻³¹⁾ の免疫染色では, Sox9 陽性細胞はコントロール群と腸炎部では増殖帯を含む基底部に認められ, 腫瘍部では腫瘍全体に認めた.

3. Smad3C-Ser と Smad3L-Ser, c-myc (Fig. 5)

pSmad3C-Ser 陽性細胞は, コントロール群, 腸炎部, 腫瘍部のどの段階においても多くの陽性細胞が認められ, 陽性細胞数の割合に有意差は認めなかった.

一方, pSmad3L-Ser 陽性細胞は, コントロール群において腺底部を中心に認められ, 腸炎部ではより多くの陽性細胞が認められた. 腫瘍部においては腫瘍全体に陽性細胞が認められた. その割合は腸炎部では 72.26% でコントロール群の 63.62% より有意に高く, さらに腫瘍部では 90.3% と腸炎部よりさらに高い割合で陽性細胞を認めた.

c-myc 陽性細胞はコントロール群では腺底部に少数が認められ, 腸炎部ではより多くの陽性細胞が認められた. 腫瘍部では腫瘍全体に陽性細胞が認められ, その発現様式は pSmad3L-Ser と同様のパターンを示した.

4. pSmad2/3L-Thr (Fig. 6)

Ki67 は静止状態にある細胞ではなく増殖中の細胞で検出される細胞周期関連核蛋白質である²³⁾. コントロール群と腸炎部において pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は Ki67 陽性細胞を多数認める増殖帯近傍の基底部に散在性に認められたが, 二重染色では共染色性は認めなかった. 腫瘍部においては pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は腫瘍上層を中心に散在性に認めた. pSmad2/3L-Thr は腫瘍全体で発現の亢進を認める Ki67 陽性細胞の近傍で発現を認めたが, 二重染色で共染色する細胞は認めなかった.

pSmad2/3L-Thr と β -catenin との二重染色では, pSmad2/3L-Thr 陽性細胞はコントロール群と腸炎部において細胞膜が β -catenin で染色され, 腫瘍部においては細胞質または核が β -catenin で染色された.

CDK4 との二重染色では, コントロール群, 腸炎部, 腫瘍部のいずれにおいても pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は CDK4 を強く発現する細胞の一部と共染色性を示した.

今までに我々が行った検討において, pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は BrdU が長期間残存する slow-cycling な細胞で Ki67 陰性の静止状態にあり, 増殖細胞が多く

Fig. 5. 免疫染色：上から pSmad3C-Ser, pSmad3L-Ser, c-myc. pSmad3C-Ser 陽性細胞と pSmad3L-Ser 陽性細胞。
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$; N.S., not significant

Fig. 6. pSmad2/3L-Thr との免疫蛍光二重染色：上から Ki67, β -catenin, CDK4.
pSmad2/3L-Thr の腫瘍内分布。
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$; N.S., not significant

存在する増殖帯の中で増殖細胞と隣接して存在する細胞である²³⁾。一方 CDK4・cyclinD 複合体は Smad3 蛋白のリンカー部スレオニンをリン酸化して細胞周期を G1 (または G0) 期から S 期へ促進する^{12,18-20)}。これらの細胞が周囲の細胞に比べ pSmad2/3L-Thr を一過性に多く発現するため、pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は G0 期から細胞周期に入るちょうどその時をとらえた細胞であり、胃・小腸・大腸において組織幹細胞様細胞と考えた^{23,32)}。腫瘍部の p-Smad2/3L-Thr 陽性細胞は正常組織幹細胞様細胞と同様の形質を示した。

腫瘍の表層から基底部までを3分割して、pSmad2/3L-Thr 陽性細胞の分布を検討すると、pSmad2/3L-Thr 陽性細胞の 79.7% が上層 3 分の 1 に認められた。

まとめ

1. 我々が作製した AOM/DSS マウスは潰瘍性大腸炎関連大腸癌の特徴と類似していた。
2. AOM/DSS マウスで生じた腫瘍は、ヒト大腸癌と類似の蛋白発現を認めた。
3. マウス大腸炎関連大腸癌モデルにおいて pSmad3L-Ser 蛋白は、腫瘍形成前の腸炎の段階から発現の亢進が認められ、早期から腫瘍形成に関わる重要な因子と考えられた。
4. マウス大腸炎関連大腸癌モデルにおいて、腫瘍部の p-Smad2/3L-Thr 陽性細胞は正常組織幹細胞様細胞と同様の形質を示し、癌幹細胞様細胞のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

本論文は、学位論文を基に、第16回関西医科大学医学賞に応募口演（2017年2月17日）し、奨励賞を受賞した際の発表要旨でもある。

文 献

- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48: 526–535, 2001.
- Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323: 1228–1233, 1990.
- Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126: 451–459, 2004.
- Rutter M, Saunders B, Wilkinson K. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126: 451–459, 2004.
- Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6: 2332–2338, 2007.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells — perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339–9344, 2006.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465–471, 1997.
- Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753–791, 1998.
- Wrana JL. Crossing Smads. *Sci STKE* 2000: re1, 2000.
- Sekimoto G, Matsuzaki K, Yoshida K, Mori S, Murata M, Seki T, et al. Reversible Smad-dependent signaling between tumor suppression and oncogenesis. *Cancer Res* 67: 5090–5096, 2007.
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of TGF β Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804–816, 1999.
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 430: 226–231, 2004.
- Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, et al. TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23: 7416–7429, 2004.
- Tarasewicz E, Jeruss JS. Phospho-specific Smad3 signaling: impact on breast oncogenesis. *Cell Cycle* 11: 2443–2451, 2012.
- Yamagata H, Matsuzaki K, Mori S, Yoshida K, Tahashi Y, Furukawa F, et al. Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation via c-Jun NH(2)-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 65: 157–165, 2005.
- Morgan DC. Cyclin-dependent kinase: engines, clocks, and microprocessors. *Cell Dev Biol* 13: 261–291, 1997.
- Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28: 2925–2939, 2009.
- Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18: 2699–2711, 2004.
- Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30: 630–641, 2005.
- Susaki E, Nakayama K, Nakayama KI. Cyclin D2 translocates p27 out of the nucleus and promotes its degradation at the G0-G1 transition. *Mol Cell Biol* 27: 4626–4640, 2007.
- Kishimoto M, Fukui T, Suzuki R, Takahashi Y, Sumimoto K, Okazaki T, et al. Phosphorylation of smad2/3 at specific linker threonine indicates slow-cycling intestinal stem-like cells before reentry to cell cycle. *Dig Dis Sci* 60: 362–374, 2015.
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 94: 965–973, 2003.
- Weidner N, Moore DH, 2nd, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel “paraffin”-reactive MIB1 antibody. *Hum Pathol* 25: 337–342, 1994.
- Miller JR, Moon RT. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 10: 2527–2539, 1996.
- Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch* 441: 1–11, 2002.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7: 812–821, 1993.
- Matsushima H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65: 701–713, 1991.
- Wang QS, Papanikolaou A, Sabourin CL, Rosenberg DW. Altered expression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 in azoxymethane-induced mouse colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 19: 2001–2006, 1998.
- Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43: 34–41, 2011.
- Ramalingam S, Daughtridge GW, Johnston MJ, Gracz AD, Magness ST. Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G10–20, 2012.
- Matheu A, Collado M, Wise C, Manterola L, Cekaite L, Tye AJ, et al. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res* 72: 1301–1315, 2012.
- Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, et al. The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. *J Gastroenterol* 46: 456–468, 2011.