



# Akt phosphorylation in human chondrocytes is regulated by p53R2 in response to mechanical stress

川北, 晃平

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5689

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005689>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Akt phosphorylation in human chondrocytes is regulated

#### by p53R2 in response to mechanical stress

ヒト軟骨細胞における Akt のリン酸化はメカニカルストレスにより生じる  
p53R2 により制御される

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

整形外科学

指導教員 黒坂昌弘教授

川北晃平

#### はじめに

関節軟骨は日常生活において常に機械的負荷を受けており、それは軟骨の維持、代謝に不可欠である。しかしながら、過度の機械的負荷が加わると正常軟骨組織の維持ができず、その組成が変わり変形性関節症(OA)へと進行する。がん抑制遺伝子 p53 は細胞に対する内因性、外因性のストレスに対して活性化される。DNA 損傷が起こると p53 はその損傷の程度により修飾をうけタンパクを発現し、細胞周期停止、老化やアポトーシスに導く。

軟骨細胞のアポトーシスは OA の病態の一つとされており、以前我々は、過度の機械的負荷が p53-p53AIP1(apoptosis inducing protein)を介して、軟骨細胞のアポトーシスを生じることが報告した。

一方、リボヌクレオチドリダクターゼの一種である p53R2 も p53 により翻訳される蛋白の一つであり、その働きは DNA に損傷が起こった際に DNA を合成するのに必要な dNTP を供給する役割があると報告されている。

しかしながら軟骨細胞において p53R2 の役割はわかっていない。そこで今回我々は、軟骨細胞にメカニカルストレスを加え p53R2 の発現を検討した。また、p53R2 がメカノトランスダクションにかかわるプロテインキナーゼや軟骨細胞の代謝を制御しているという仮説をたて実験を行った。

#### 材料と方法

##### 軟骨細胞における p53R2 発現の検討

OA 軟骨は全人工膝関節置換術時に得られた大腿骨頭部より採取した。正常軟骨は大腿骨頭部骨折に対して行った人工骨頭置換術時に得られた大腿骨頭部より採取した。組織学的評価として免疫組織染色を行った。また、それぞれの軟骨を分離培養したのち回収したタンパク、mRNA から Western blotting、real-time PCR 法で発現を検討した。

##### メカニカルストレスによる軟骨細胞の p53R2 発現変化、p53 のセリンのリン酸化の検討

Flexcell system を用いて OA 軟骨細胞に 2,5,10%の伸張負荷を 12 時間加え、p53R2 の発現の変化を Western blotting、real-time PCR で検討した。また、p53 のセリン 15,20 のリン酸化を Western blotting で検討した。

##### p53R2 抑制による細胞外器質産生の変化の検討

リポフェクション法を用いて OA 軟骨細胞に p53R2 siRNA を導入した後 5%伸張負荷を加え、タイプ 2 コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現を real-time PCR 法で検討した。また培養液上清を回収し、グリコサミノグリカン定量をおこなった。

##### メカノトランスダクションに関わるプロテインキナーゼの変化の検討

軟骨細胞に5%伸張負荷を12時間加えタンパクを回収しAkt, p38MAPK, ERK, JNKの変化をwestern blottingで検討した。さらに、p53R2 siRNAを導入して前述のプロテインキナーゼの変化を検討した。

#### 統計的検討

データは95%信頼区間で求め、多重比較にはTukey post-hoc test, 2群比較にはMann-Whitney U 検定をおこなった。

それぞれp値 0.05未満と統計的有意差ありとした。

#### 結果

##### 軟骨細胞におけるp53R2発現の検討

免疫組織染色では正常、OA軟骨それぞれの浅層、深層で陽性細胞をカウントして比較した。その結果、OA軟骨では浅層、深層ともに有意に陽性細胞が多く核が染色されていた。Western blottingでも正常軟骨にくらべOA軟骨でp53R2の発現が増加していた。real-time PCR法で遺伝子レベルを比較するとOA軟骨は正常軟骨にくらべ約10倍ほど多く発現していた。

##### メカニカルストレスによる軟骨細胞のp53R2発現変化、p53のセリンのリン酸化の検討

Western blotting, real-time PCRともに5%の伸張負荷でp53R2の発現は最も上昇していた。一方、10%の伸張負荷では5%程の上昇はみとめられなかった。また、p53のセリン15のリン酸化も5%の伸張負荷で上昇していた。

##### p53R2抑制による細胞外器質産生の変化

p53R2 siRNA群ではcontrol siRNA群に比べて、有意にタイプ2コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現は上昇していた。またグリコサミノグリカン定量でもp53R2 siRNA群で上昇していた。

##### メカノトランスダクションに関わるプロテインキナーゼの変化の検討

Aktのリン酸化は5%の伸張負荷で減少しており、p53R2とは逆の変化を示した。そのほかのプロテインキナーゼに関しては明らかな変化を認めなかった。一方p53R2の抑制後に5%伸張負荷を加えるとAktのリン酸化は増加していた。

#### 考察

今回我々の結果は、軟骨細胞にp53R2が発現していることを初めて示した。興味深いことに、p53R2はOA軟骨細胞でその発現は増加していた。このことから、p53R2がOAの病

態に関与していることが示唆された。メカニカルストレスはOAの発症、進行に関わっていると考えられており、我々はp53R2は軟骨細胞におけるメカノトランスダクションに関与しているという仮説をたて、軟骨細胞に伸張負荷をかけ発現の変化を検討した。その結果、5%の伸張負荷で最もp53R2の発現は上昇した。

日常生活において関節軟骨は約15%の圧負荷を受けており、それはほぼ5%の伸張負荷に相当する。軟骨細胞に対する負荷が小さいとタイプ2コラーゲンやアグリカンの産生は上昇するが、過度の負荷は産生を阻害して軟骨の破壊が進行する。

我々は以前10%の伸張負荷を軟骨細胞に加えると、修復困難なDNA損傷が生じp53のセリンの46番目がリン酸化され、p53AIP1が発現しアポトーシスが生じることを報告した。一方、DNA損傷後のp53の活性化早期においては、p53のセリンの15番目がリン酸化されp21 waf1/cip1やp53R2といった細胞周期停止、DNA修復を行うタンパクが発現する。p53R2はp53より直接翻訳されるタンパクで細胞周期におけるG1,G2期に働く。

今回、p53R2はOAで増えており5%伸張負荷で上昇することを示した。p53R2はp53のセリン15番目のリン酸化で発現する。

近年、がん抑制遺伝子p53はIGF-1/AktとmTORに対して抑制的に働くことで細胞成長、分裂を抑制していると報告がされている。今回の実験結果ではAktのリン酸化は5%伸張負荷で抑制されp53R2とは逆の変化を示した。p53R2の働きを調べるため、p53R2を抑制したところAktのリン酸化の上昇が認められた。軟骨細胞においてp53R2はp53により翻訳されAktのリン酸化を抑制するタンパクの一つであることを示した。

Aktシグナリングは細胞のメカノトランスダクションに関わっているとされており、さまざまな組織でリン酸化することで活性化されると報告されている。軟骨組織においてはAktシグナリングは細胞外器質産生や細胞生存を促進すると報告されている。今回我々は、p53R2の抑制はAktが関与するメカノトランスダクションを介してアナボリックな変化をもたらすことを報告した。このことからp53R2の抑制がOA治療につながる可能性が示唆された。さらなるp53R2の役割とOAの病態に対する解明が必要と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2308号	氏 名	川北 晃平
論文題目 Title of Dissertation	ヒト軟骨細胞における Akt のリン酸化はメカニカルストレスにより生じる p53R2 により制御される  Akt phosphorylation in human chondrocytes is regulated by p53R2 in response to mechanical stress		
審査委員 Examiner	主 査 中 村 俊 一 Chief Examiner 副 査 平 田 健 一 Vice-examiner 副 査 飯 島 一 郎 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## はじめに

関節軟骨は常に機械的負荷を受けており、それは軟骨の維持、代謝に不可欠である。しかしながら、過度の機械的負荷が加わると正常軟骨組織の維持ができず変形性関節症(OA)へと進行する。一方がん抑制遺伝子 p53 は細胞に対するストレスにより活性化される。DNA 損傷が起こると p53 はその損傷の程度により修飾をうけタンパクを発現し、細胞周期停止、老化やアポトーシスに導く。リボヌクレオチドリダクターゼの一種である p53R2 は p53 により翻訳される蛋白の一つであり、その働きは DNA に損傷が起こった際に DNA を合成するのに必要な dNTP を供給する役割がある。しかしながら軟骨細胞において p53R2 の役割は不明である。今回の本研究の目的は軟骨細胞における p53R2 の役割を解明することである。

## 対象と方法

## (1)軟骨細胞における p53R2 発現の検討

OA 軟骨は全人工膝関節置換術時に得られた大腿骨頭部より採取した。正常軟骨は大腿骨頭部骨折に対して行った人工骨頭置換術時に得られた大腿骨頭部より採取した。組織学的評価として免疫組織染色を行った。また、それぞれの軟骨を分離培養したのち回収したタンパク、mRNA から Western blotting、real-time PCR 法で発現を検討した。

## (2)メカニカルストレスによる軟骨細胞の p53R2 発現変化、p53 のセリンのリン酸化の検討

Flexcell system を用いて OA 軟骨細胞に 2.5, 10% の伸張負荷を 12 時間加え、p53R2 の発現の変化を Western blotting、real-time PCR で検討した。また、p53 のセリン 15, 20 のリン酸化を Western blotting で検討した。

## (3)p53R2 抑制による細胞外基質産生の変化の検討

リポフェクション法を用いて OA 軟骨細胞に p53R2 siRNA を導入した後 5% 伸張負荷を加え、タイプ 2 コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現を real-time PCR 法で検討した。また培養液上清を回収し、グリコサミノグリカン定量をおこなった。

## (4)メカノトランスダクションに関わるプロテインキナーゼの変化の検討

軟骨細胞に 5% 伸張負荷を 12 時間加えタンパクを回収し Akt、p38MAPK、ERK、JNK の変化を western blotting で検討した。さらに、p53R2 siRNA を導入して前述のプロテインキナーゼの変化を検討した。

## 結果

## (1)軟骨細胞における p53R2 発現の検討

OA 軟骨で浅層、深層ともに有意に陽性細胞が多く核が染色されていた。Western blotting でも OA 軟骨で p53R2 の発現が増加していた。real-time PCR 法で遺伝子レベルを比較すると OA 軟骨は正常軟骨とくらべ約 10 倍ほど多く発現していた。

(2)メカニカルストレスによる軟骨細胞の p53R2 発現変化、p53 のセリンのリン酸化の検討

Western blotting、real-time PCR とともに 5% の伸張負荷で p53R2 の発現は最も上昇していた。一方、また、p53 のセリン 15 のリン酸化も 5% の伸張負荷で上昇していた。

(3)p53R2 抑制による細胞外器質産生の変化

p53R2 siRNA 群では control siRNA 群に比べてタイプ 2 コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現は上昇していた。またグリコサミノグリカン定量でも p53R2 siRNA 群で上昇していた。

(4)メカノトランスダクションに関わるプロテインキナーゼの変化の検討

Akt のリン酸化は 5% の伸張負荷で減少しており、p53R2 とは逆の変化を示した。その他のプロテインキナーゼに関しては明らかな変化を認めなかった。一方 p53R2 の抑制後に 5% 伸張負荷を加えると Akt のリン酸化は増加していた。

考察ならびに結論

p53R2 は OA 軟骨細胞でその発現は増加していた。また 5% 伸張負荷で p53 のセリン 15 のリン酸化を介して上昇していた。p53R2 を抑制したところ Akt のリン酸化の上昇が認められた。Akt シグナリングは細胞のメカノトランスダクションに関わっており軟骨組織においては細胞外器質産生や細胞生存を促進する。p53R2 の抑制は Akt のリン酸化を介してアナボリックな変化をもたらした。このことから p53R2 の抑制が OA 治療につながる可能性が示唆された。

本研究は、軟骨細胞における p53R2 の働きを研究したものであるが従来解明されていなかったメカニカルストレスにより生じる p53R2 が Akt のリン酸化を制御しているという重要な知見を得たとともに OA の治療につながる可能性がある点で価値のある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。