Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

PTEN Regulates Matrix Synthesis in Adult Human Chondrocytes Under Oxidative Stress

Iwasa, Kenjiro

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6044号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006044

※ 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

PTEN Regulates Matrix Synthesis in Adult Human Chondrocytes Under Oxidative Stress

PTEN は成人ヒト軟骨細胞において酸化ストレス下に基質の産生を調整する

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）

岩佐　賢二郎

【目的】Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10(PTEN)は癌抑制因子の一つであり、ヒトの癌発生においては p53 についで変異が多いとされている。PTEN の主な作用としては phosphoinositol-3-kinase (PI3K)の抑制である。PI3K は細胞の生存に重要なシグナルであり、細胞の増殖やマトリックス合成にも作用する。Osteoarthritis (OA)は老化に伴う軟骨の変性により起こる疾患である。OA の発症や進行の原因には様々な説があるが、その一つとして酸化ストレスが関与していると考えられている。PTEN は癌細胞においては PI3K を抑制することで細胞の増殖を抑え、apoptosis を誘導するように働くことが知られている。また、PTEN を knock out した mouse の実験や PTEN に変異のある人では成長軟骨層の早期閉鎖などが報告されており、軟骨形成や発達にも重要なことが知られている。しかし、成人の軟骨細胞における作用については未だ解明されておらず、そのため、今回成人ヒト軟骨細胞における酸化ストレス下の PTEN の作用について研究を行った。

【方法】まず、大腿骨頚部骨折に対して人工骨頭置換術を施行した際に切除した大腿骨頭より正常軟骨を採取した。また、変形性膝関節症に対して人工関節置換術を行った際の大腿骨顆部より採取した軟骨を OA 軟骨として用いた。

最初に正常軟骨細胞および OA 軟骨細胞において real-time PCR を用いて PTEN の発現量を測定した。Insuline-like growth facto-1(IGF-1)は細胞増殖や基質産生を増加させる因子であるが、OA 軟骨細胞においてその発現が増加しているが基質産生などの反応性が低下していることが知られている。そこでまず正常軟骨および OA 軟骨に対して IGF-1 で刺激した後の type2 collagen(Col2a1)および aggrecan の発現を real-time PCR を用いて測定した。次に OA 軟骨細胞において tert-butyl hydroperoxide (tBHP)を用いて酸化ストレスを加えた後に Col2a1 および aggrecan の発現を real-time PCR を用いて測定した。さらに IGF-1 および tBHP にて OA 軟骨を刺激し、Col2a1 および aggrecan の発現を real-time PCR を用いて測定した。さらに small interfering RNA (siRNA)を用いて PTEN の発現を抑制した後にも同様の刺激を加え、real-time PCR にて PTEN, Col2a1 および aggrecan の発現量を測定し、Western blotting にて Akt および ERK1/2 のリン酸化を測定した。最後に siRNA を用いて PTEN の発現を抑制した後に IGF-1 および tBHP にて刺激を加え、OA 軟骨細胞からの glycosaminoglycan (GAG)放出量を定量キットを用いて測定した。

【結果】OA 軟骨では正常軟骨と比べ、PTEN の発現が増加していた。IGF-1 で刺激すると正常軟骨細胞では Col2a1 および aggrecan は優位に増加したが、OA 軟骨細胞では増加しなかった。*t*-BHP を用いて酸化ストレスを加えると、Col2a1 および aggrecan の発現は減少し、IGF-1 を共に加えた際にも減少した。siRNA にて PTEN の発現を抑制すると OA 細胞においても IGF-1 に対する反応性が改善し、Col2a1 および aggreacn の発現が増加した。また、酸化ストレス下においても Col2a1 および aggrecan の発現が増加した。この際、Akt のリン酸化は siRNA で PTEN の発現を抑制すると増加していた。酸化ストレス下での GAG 放出量は siRNA で PTEN の発現を抑制すると優位に増加した。

【考察】PTEN は癌抑制以外の作用として血管損傷した際に壁の細胞で発現が増加することが知られているが、今回 OA 軟骨細胞において発現が亢進している事を初めて報告した。

酸化ストレスは OA 発症の原因の一つと考えられており、PI3K/Akt pathway を抑制することで基質の産生を抑制することが知られている。PTEN の主な作用はこの PI3K/Akt pathway の抑制であるが、成人軟骨細胞での作用は未だ解明されておらず、今回酸化ストレス下での PTEN の作用について研究を行った。今回の実験の結果では、OA 軟骨細胞において PTEN の発現を siRNA を用いて抑制すると、酸化ストレス下においても基質の産生が増加することが示された。また、OA 軟骨細胞においては IGF-1 に対する基質産生の反応性が低下していることが知られているが、PTEN を抑制することでこの反応性が改善することが示された。そしてこの際、酸化ストレスによって抑制されている Akt のリン酸化が siRNA を用いて PTEN の発現を抑制することで増加しており、PTEN は PI3K/Akt pathway を通して基質の産生を調整しているものと考えられる。これらのことから PTEN は軟骨組織の変性に重要な役割を担っているものと考えられる。

しかし、PTEN は癌発生にも密接に関わっており、軟骨変性の予防や再生のため臨床応用する際には投与方法について慎重な検討が必要である。

【結論】ヒト軟骨細胞において PTEN は酸化ストレス下での基質産生を調整しており、OA の発症や進行の一因となっている可能性がある。これを抑制することで基質産生の増加や軟骨再生につなげることが出来ると考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2404 号	氏 名	岩佐 賢二郎
論文題目 Title of Dissertation	PTEN regulates matrix synthesis in adult human chondrocytes under oxidative stress PTEN は成人ヒト軟骨細胞において酸化ストレス下に基質の産生を調整する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 平田 健一 副 査 Vice-examiner 匂坂 敏朝 副 査 Vice-examiner 西村 善博		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

癌抑制因子の一つである PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) はヒトの癌発生において p53 についで変異が多いとされている。PTEN は癌細胞においては apoptosis を誘導するように働くことが知られており、軟骨形成や発達にも重要なことが知られているが、成人の軟骨細胞における作用については未だ解明されていない。そこで、申請者らは成人ヒト軟骨細胞において、変形性関節症（OA）発症の原因の一つとされている酸化ストレス下での PTEN の作用について研究を行った。

（方法）

まず正常軟骨細胞およびOA軟骨細胞におけるPTENおよびIGF-1 (insulin-like growth factor)の発現を real-time PCR を用いて解析した。次に正常軟骨細胞および OA 軟骨細胞を IGF-1 で刺激し、2 型コラーゲンおよびアグリカンの発現を real-time PCR を用いて解析した。さらに OA 軟骨細胞に対して tBHP (tert-butyl hydroperoxide)にて酸化ストレスを加え、2 型コラーゲンおよびアグリカンの発現を real-time PCR を用いて解析した。最後に、siRNA を用いて PTEN の発現を抑制した後、OA 軟骨細胞に対して IGF-1 および tBHP にて刺激した後、PTEN、2 型コラーゲン、アグリカンの発現を real-time PCR にて、Akt のリン酸化を Western blotting にて解析した。また、この際のグリコサミノグリカン（GAG)の放出量は検出キットを用いて解析した。

（結果）

OA 軟骨では正常軟骨と比べ、PTEN の発現が増加していた。IGF-1 で刺激すると正常軟骨細胞では Col2a1 および aggrecan は優位に増加したが、OA 軟骨細胞では増加しなかった。*t*-BHP を用いて酸化ストレスを加えると、Col2a1 および aggrecan の発現は減少し、IGF-1 を共に加えた際にも減少した。siRNA にて PTEN の発現を抑制すると OA 細胞においても IGF-1 に対する反応性が改善し、Col2a1 および aggreacn の発現が増加した。また、酸化ストレス下においても Col2a1 および aggrecan の発現が増加した。この際、Akt のリン酸化は siRNA で PTEN の発現を抑制すると増加していた。酸化ストレス下での GAG 放出量は siRNA で PTEN の発現を抑制すると優位に増加した。

（考察）

PTENは血管損傷した際に血管壁の細胞では発現が増加することが報告されているが、今回 OA 軟骨細胞において発現が亢進していることを初めて報告した。酸化ストレスはPI3K/Akt pathway を抑制することで基質の産生を抑制することが知られている。PTENの主な作用はこの pathway の抑制であるが、成人軟骨細胞での作用は未だ解明されていない。今回の実験結果では、OA 軟骨細胞において PTEN の発現を抑制すると、酸化ストレス下においても基質の産生が増加することが示された。また、OA 軟骨細胞においてはIGF-1 に対する基質産生の反応性が低下していることが知られているが、PTEN を抑制することで酸化ストレス下においても IGF-1 に対する反応性を改善させ、基質の産生が増加することを示した。

（結論）

本研究は、PTEN の成人ヒト軟骨細胞における作用について研究したものであるが、OA軟骨細胞において PTEN の発現が増加しており、基質の産生を抑制することで OA 発症の一因となっていることを初めて報告した。新たな治療アプローチと成り得るとした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ものと認める。