

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
玉山卓己	主査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 阿部 宗昭 副査 教授 林 秀行 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 黒岩 敏彦
主論文題名 Expression of GABA _A and GABA _B Receptors in Rat Growth Plate Chondrocytes: Activation of the GABA Receptors Promotes Proliferation of Mouse Chondrogenic ATDC5 cells (ラット成長軟骨細胞の GABA _A および GABA _B 受容体の発現: GABA 受容体刺激はマウス軟骨 分化細胞の増殖を促進する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>成長軟骨板は長幹骨の長軸成長の主要部位である。成長軟骨板の軟骨細胞は増殖、成熟した後、肥大細胞へと分化する。この成長・分化は全身性および局所性増殖因子やホルモンによって調節されている。我々はこれまでにラット成長軟骨細胞にγ-アミノ酪酸(GABA)およびその合成酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)が存在することを報告し、GABA が軟骨細胞の成長・分化に関与している可能性を示唆した。GABA はイオンチャネル型の GABA_{A/C} 受容体または代謝調節型の GABA_B 受容体に結合することによって機能を発揮する。そこで本研究はラット成長軟骨細胞での GABA 受容体発現を検討し、マウス由来軟骨分化細胞を用いて GABA および GABA 受容体作動薬刺激が細胞の増殖に与える影響について検討を行なった。</p> <p>《実験材料と方法》</p> <p>材料: ラット(Wistar 系、雄、4-5 週齢)、ATDC5(マウス軟骨分化細胞)</p> <p>方法</p> <p>(1) Total RNA 抽出と Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ラット成長軟骨板および ATDC5 細胞より total RNA を抽出した。逆転写酵素より cDNA を作成後、GABA_A および GABA_B 受容体サブユニットに対するプライマーを用いて PCR を行なった。</p> <p>(2) 免疫染色 ラット脛骨近位端の 10μm 凍結切片を作製した。切片を一次抗体(抗-GABA_A または GABA_B 受容体サブユニット)および蛍光標識二次抗体で反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ATDC5 細胞についても同様の操作を行なった。</p> <p>(3) 細胞増殖 ATDC5 細胞を用いて bromodeoxyuridine (BrdU) の取込みを測定することにより行なった。GABA、muscimol (GABA_A 受容体作動薬)または baclofen (GABA_B 受容体作動薬)を培養液に添加することによって刺激し、BrdU 取込みを酵素免疫測定法(ELISA)によって定量した。</p> <p>5) 統計学的処理 測定結果は mean ± SE で表し、ANOVA (LSD) 検定により、p < 0.05 を有意差ありとした。</p>	

《結果》

(1) RT-PCR

成長軟骨板において GABA_A 受容体 $\alpha 1-4$, $\alpha 6$, $\beta 1-3$, δ サブユニットおよび GABA_B 受容体 R1a, R1b, R2 サブユニット mRNA が発現していた。ATDC5 細胞においては GABA_A 受容体 $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ および GABA_B 受容体受容体 R1a, R1b, R2 サブユニット mRNA が発現していた。

(2)免疫染色

GABA_A 受容体 $\alpha 1-4$, $\alpha 6$, $\beta 1-3$, δ サブユニットおよび GABA_B 受容体 R1a, R1b, R2 サブユニットが成長軟骨板の増殖層および肥大層に観察された。ATDC5 細胞では GABA_A 受容体 $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 3$ および GABA_B 受容体 R1, R2 サブユニットが発現していた。

(3)細胞増殖

ATDC5 細胞において BrdU の取込みは対照群に対して、100 μ M GABA で 17%、5, 50 μ M muscimol で 14%、10 μ M baclofen で 17%、100 μ M baclofen で 26%の増加を示した ($p < 0.01$)。

《考察》

以前我々は GABA が成長板肥大層において局所的に産生されていることを示した。今回、免疫染色の結果より GABA 受容体サブユニットが成長板の増殖層および肥大層に観察されたことから GABA はこれら両層の軟骨細胞においてオートクライン・パラクライン様に軟骨細胞の増殖、成熟・分化に寄与する可能性が考えられた。そこで増殖について軟骨分化細胞である ATDC5 細胞で検討したところ GABA が促進的に働くことが示された。またこの作用に GABA_A および GABA_B 両受容体の関与が示された。これらの結果は成長軟骨板において GABA が GABA 受容体を介して細胞増殖を調節する可能性を示唆する。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	玉山卓己
論文審査担当者		主査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 阿部 宗昭 副査 教授 林 秀行 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 黒岩 敏彦	
主論文題名 Expression of GABA _A and GABA _B Receptors in Rat Growth Plate Chondrocytes: Activation of the GABA Receptors Promotes Proliferation of Mouse Chondrogenic ATDC5 cells (ラット成長軟骨細胞の GABA _A および GABA _B 受容体の発現: GABA 受容体刺激はマウス軟骨分化細胞の増殖を促進する)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者はラット成長軟骨板およびマウス由来軟骨分化細胞(ATDC5)の GABA 受容体発現を検討した。さらに ATDC5 細胞を用いて GABA および GABA 受容体作動薬刺激が細胞の増殖に与える影響についても検討を行ない、以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 成長軟骨板において GABA_A 受容体 α1-4, α6, β1-3, δサブユニットおよび GABA_B 受容体 R1a, R1b, R2 サブユニット mRNA とタンパクが発現していた。ATDC5 細胞においては GABA_A 受容体 α1, α5, β1, β3 および GABA_B 受容体 R1a, R1b, R2 サブユニット mRNA と α5 以外のタンパクが発現していた。 成長軟骨板での免疫染色像より GABA_A および GABA_B 受容体サブユニットは増殖層と肥大層の両方に発現していた。 ATDC5 細胞について BrdU の取込みを検討した結果、GABA, GABA_A 受容体作動薬 (muscimol) および GABA_B 受容体作動薬 (baclofen) はそれぞれ BrdU の取込みを増加させた。 <p>以上の結果から、申請者はラット成長軟骨細胞および ATDC5 細胞に GABA_A および GABA_B 受容体サブユニットが発現していることを示し、ATDC5 細胞を用いて機能的検討を行なった結果、GABA 刺激が増殖に対し促進的に働くことを示した。この増殖促進作用に GABA_A および GABA_B 両受容体が関与していると結論づけている。すなわち軟骨細胞の増殖において GABA の機能に新しい知見を与えている。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Molecular and Cellular Biochemistry 273: 117-126, 2005</p>			