

(様式 甲5)

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
白石 奈々子	主査 教授 勝 健 一 副査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 古 谷 榮 助
主論文題名 Effects of γ -Aminobutyric Acid (GABA) on Proliferation of the Gastric Cancer Cell Line, KATO III (γ -アミノ酪酸(GABA)による胃癌細胞株 KATO IIIの増殖効果について)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>γ-アミノ酪酸(GABA)は成熟哺乳類の中樞神経系における主要な抑制性神経伝達物質であるが、胎児期から新生児期の哺乳動物においては神経細胞の分裂や移動、成長、生存などに関与すると考えられている。GABA は中枢神経系に限らず末梢神経系にも分布しており、消化管、膵臓、肝臓などの消化器系を含めた多くの非神経組織にも分布している。腫瘍細胞においてもGABA濃度やGABA合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)活性の上昇が認められており、GABA受容体やその mRNA などの発現が腫瘍細胞において増加していることも確認されている。以上のことはGABAやその合成酵素であるGAD、およびGABA受容体を含めた、いわゆるGABAシステムが腫瘍細胞において何らかの生理機能を有していることを示すものと考えられる。</p> <p>そこで本研究は、ヒト胃癌印環細胞株 KATO IIIを用い、GABAシステムの発現とGABAの増殖効果について検討を行った。</p> <p>《方法》</p> <p>(1)ヒト胃癌印環細胞株 KATO IIIから mRNA 調整および cDNA 合成を行い、GAD65、GAD67、GABA_A受容体と GABA_B受容体のサブユニットの mRNA 発現を RT-PCR 法により検討した。</p> <p>(2)GAD65、GAD67、GABA および GABA 受容体サブユニットの KATO III細胞での発現を、免疫組織化学的に検討した。GAD 染色の為に一次抗体としてウサギ抗 GAD65 抗体、ウサギ抗 GAD67 抗体、ウサギ抗 GABA 抗体を用い、4℃にて 18 時間反応後 Alexa Fluor488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と室温にて 1 時間の反応を行った。GABA 受容体サブユニット染色の為にヤギ抗 GABA_A受容体 α 2 サブユニット、β 1、β 2、γ 3 抗体を用い、4℃にて 18 時間反応後 Alexa Fluor488 ロバ抗ヤギ IgG 抗体と室温にて 1 時間の反応を行った。</p> <p>(3)GABA および GABA_A受容体の特異的アゴニストである muscimol の KATO III細胞に対する増殖効果を 5-bromodeoxyuridine(BrdU)の取り込み量により検討した。KATO III細胞を 5000 個/well の細胞密度になるように 96 穴マイクロプレートに分注し、その培地に種々の濃度の GABA あるいは GABA_A受容体アゴニストである muscimol を添加し 2 日間培養した。また、GABA_A受容体アンタゴニストである bicuculline および Cl⁻チャネルブロッカーである picrotoxin の添加は GABA_A受容体アゴニスト投与の 2 時間前に行なった。BrdU の取り込み量は Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) kit を用いて測定した。</p>	

《結果》

(1) KATO III 細胞における GAD65、GAD67、GABA_A 受容体および GABA_B 受容体のサブユニットの mRNA 発現を RT-PCR 法により確認したところ、GAD65 の発現は認められたが、GAD67 の発現は認められなかった。GABA_A 受容体サブユニットの中で $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、および $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ サブユニットの mRNA 発現が認められた。GABA_B 受容体のサブユニットに関しては、R1a、R1b および R2 何れの発現も認めなかった。

(2) RT-PCR 法により mRNA 発現が認められた GABA_A 受容体サブユニットのうち、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ および $\gamma 1$ サブユニットについて免疫染色を行ったところ、すべて陽性であった。

(3) *In vitro* において GABA および GABA_A 受容体の特異的アゴニストである muscimol の KATO III 細胞に対する増殖効果を検討したところ、GABA は 100 μ M、10 μ M および 1 μ M 添加では KATO III 細胞への BrdU 取り込みを有意 ($P < 0.05$) に増大させた。muscimol では 10 μ M および 1 μ M の添加は KATO III 細胞への BrdU 取り込みを有意 ($P < 0.05$) に増大させた。GABA_A 受容体アンタゴニストである bicucullin あるいは picrotoxin を予め添加し、その後 muscimol を加えた群では KATO III 細胞への BrdU 取り込みに有意な変化はみられなかった。

《考察》

本研究によってヒト胃癌印環細胞株 KATO III はグルタミン酸を脱炭酸させ GABA を産生する酵素 GAD を発現し、GABA も免疫組織学的に検出できたことから、KATO III 細胞自らが GABA を作り出せることが確認された。GABA は GABA 受容体に結合することでその機能を発揮するが、KATO III 細胞は GABA_A 受容体の $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ および $\gamma 1$ サブユニットの mRNA および蛋白を発現していた。GABA_A 受容体は 4 回膜貫通型サブユニットからなる 5 量体で、Cl⁻チャネルを内蔵した、いわゆるイオンチャネル型受容体である。これまでの研究結果では機能的に作用する GABA_A 受容体は少なくとも 1 つずつの α 、 β 、 γ サブユニットを含んでいるか、 γ サブユニットの代わりに δ 、 ϵ 、 π や θ サブユニットを含んでいなければならない。今回検討した KATO III 細胞は GABA_A 受容体の $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ および $\gamma 1$ サブユニットを発現していたので、機能的な GABA_A 受容体が構成されていると考えられる。さらに、GABA および GABA_A 受容体のアゴニストである muscimol を添加した BrdU の取り込み実験では GABA_A 受容体アンタゴニストである bicucullin および Cl⁻チャネルブロッカーである picrotoxin を予め添加した群に比べ有意の BrdU の取り込みの増加が認められた。このことは GABA が GABA_A 受容体を介して特異的に KATO III 細胞の増殖を促進することを意味し、KATO III 細胞自らが GABA 合成能を有していることを考え併せると、GABA はオートクラインあるいはパラクライン的に細胞増殖を引き起こすと考えられる。

(様式 甲6)

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	白石 奈々子
論文審査担当者		主 査 教 授	勝 健 一
		副 査 教 授	花 房 俊 昭
		副 査 教 授	林 秀 行
		副 査 教 授	谷 川 允 彦
		副 査 教 授	古 谷 榮 助
主論文題名			
Effects of γ -Aminobutyric Acid (GABA) on Proliferation of the Gastric Cancer Cell Line, KATOIII (γ -アミノ酪酸(GABA)による胃癌細胞株 KATOIIIの増殖効果について)			
論文審査結果の要旨			
<p>中枢神経系では主要な抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)は様々な末梢非神経組織にも分布しており、神経伝達物質以外の組織特異的な生理機能を有している。腫瘍細胞においてもGABA濃度やGABA合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)活性の上昇が認められており、神経芽細胞腫、肝臓癌、乳癌などではGABA受容体やそのmRNAなどの発現が増加していることも確認されている。以上のことはGABAやその合成酵素であるGAD、およびGABA受容体を含めた、いわゆるGABAシステムが腫瘍細胞において何らかの生理機能を有していることを示すものと考えられる。</p> <p>胃癌細胞においてもGABAシステムが癌の増殖に関与する可能性が考えられ、申請者はヒト胃癌印環細胞株KATOIIIを用いGABAシステムの発現とGABAの増殖効果について検討し、以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none">① KATOIII細胞はGAD65のmRNAを発現しており、免疫染色でもGAD65蛋白が陽性であった。② GABAについてKATOIII細胞で免疫染色を行なったところ陽性であった。③ KATOIII細胞はGABA受容体のうちGABA_A受容体を発現していた。mRNAと免疫染色での陽性反応により発現が確認されたのはGABA_A受容体サブユニットのうちα2、β1、β3、γ1サブユニットであった。④ <i>In vitro</i>において、GABAおよびGABA_A受容体アゴニストであるmuscimolを用いた5-bromodeoxyuridine(BrdU)の取り込み実験では、GABA_A受容体アンタゴニストであるbicucullinあるいはpicrotoxinを予め添加し、その後muscimolを加えた群に比べ、有意のBrdUの取り込み増加が認められた。 <p>申請者は、KATOIII細胞ではGAD65によってKATOIII細胞自身が合成したGABAがオートクラインあるいはパラクライン的にKATOIII細胞に発現するGABA_A受容体を介して細胞の増殖を促進することを明らかとした。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条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> BULLETIN OF THE OSAKA MEDICAL COLLEGE 53(1): 33-43, 2007</p>			