

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者 氏 名	論 文 審 査 担 当 者
田 村 滋 規	主 査 教 授 佐 浦 隆 一
	副 査 教 授 岡 田 仁 克
	副 査 教 授 朝 日 通 雄
	副 査 教 授 窪 田 隆 裕
主論文題名	
Expression and distribution of GABAergic system in rat knee joint synovial membrane (ラット膝関節滑膜における GABA システムの発現と分布)	
《研究目的》 γ-アミノ酪酸(γ-aminobutyric acid :GABA)は主に中枢神経系に存在する抑制性神経伝達物質である。GABA は生体内でグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamate decarboxylase :GAD)により、グルタミン酸から合成される。GAD には2つのアイソフォーム GAD65 と GAD67 が存在する。GABA は GABA 受容体に結合することによりその作用を発揮する。GABA 受容体にはイオンチャネル型受容体である GABA_A、GABA_C受容体と G 蛋白共役型受容体である GABA_B受容体がある。GABA、GAD、GABA 受容体をまとめて GABA システムと呼ぶ。GABA システムは骨芽細胞や軟骨細胞のほか様々な非神経組織にも存在が確認されている。非神経組織における生理作用としては、細胞の分化や増殖などの機能が知られている。さらに、癌細胞では GABA の含有量が正常細胞に比べ増加している。 本研究は、正常膝関節滑膜における GABA システムの発現とその局在を明確にすることを目的とした。	

《方 法》

1. 実験動物

5 週令の雄性 Lewis 系ラットを用いた。

2. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

実験動物に対しペントバルビタールを皮下注射し麻酔をおこなった後、関節包を含めて関節滑膜を摘出した。Total RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA 合成した。GAD65 GAD67、および GABA_A 受容体・GABA_B 受容体・GABA_C 受容体のサブユニットに対する primer を用いて遺伝子増幅を行った。PCR 産物は電気泳動し、ゲル解析にて発現を検討した。

3. 免疫染色

実験動物に対し、ペントバルビタールを皮下注射し麻酔鎮静下に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定、膝関節を離断した。凍結包埋したのち厚さ 10 μ mの凍結切片を作成した。これら切片に GAD65、GAD67、および GABA_A 受容体・GABA_B 受容体・GABA_C 受容体のサブユニットに対する一次抗体および蛍光標識二次抗体を反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。一部の切片については、滑膜細胞の同定のため、macrophage-like A cell のマーカーである CD68 と fibroblast-like B cell のマーカーである HSP25 (heat shock protein 25)を用いて二重免疫組織染色を行った。

《結 果》

1. GABA 合成酵素である GAD65 が macrophage-like A cell に発現していた。
2. GABA_A 受容体サブユニットの $\alpha 1,2,3,4$ $\beta 1,2$ δ が RT-PCR で検出された。しかし、免疫染色では滑膜表層細胞には免疫陽性細胞を認めず、関節腔内の滑膜表面および滑膜表層下に免疫陽性細胞が見出された。
3. GABA_B 受容体の R1 と R2 が RT-PCR および免疫染色の結果、R1 と R2 サブユニットが macrophage-like A cell に認められた。
4. GABA_C 受容体は、RT-PCR および免疫染色のいずれの方法でも検出されなかった

ことから、滑膜には存在しないと考えられた。

《 考 察 》

本研究は正常関節滑膜であるが、GABA 合成酵素である GAD65 の発現がラット膝関節滑膜表層細胞の macrophage-like A cell に認められ、かつ GABA_B 受容体も、macrophage-like A cell に認められた。このことは、GABA システムがオートクリンあるいはパラクリン的に macrophage-like A cell に作用すると考えられた。関節リウマチのような関節炎に認められる炎症性関節滑膜では、macrophage-like A cell が増殖した滑膜表層細胞の 80% から 100% を占める。また炎症性関節滑膜では正常関節滑膜に比べ GABA が高濃度に抽出されている。

さらに、近年 GABA_B 受容体からの伝達は p38 MAP kinase 抑制機構を介して interleukins や MMP などの産生を抑制することが報告されている。本研究において正常関節滑膜細胞での GABA システムの局在と分布が詳細に確認されたことは、関節滑膜炎における GABA システムの解明に道が開かれたと考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	田村 滋規
論文審査担当者			主査教授 佐浦 隆一	
			副査教授 岡田 仁克	
			副査教授 朝日 通雄	
			副査教授 窪田 隆裕	
主論文題名				
Expression and distribution of GABAergic system in rat knee joint synovial membrane				
(ラット膝関節滑膜における GABA システムの発現と分布)				
論文審査結果の要旨				
γ-アミノ酪酸(γ-aminobutyric acid: GABA)は、主に中枢神経系組織内に存在し、抑制性神経伝達物質として作用している。この他にも末梢神経や様々な非神経組織にも存在し、組織や細胞に対して特異的な機能を持つことが確認されている。 申請者は正常膝関節滑膜における GABA システムの発現とその局在を明確にすることを目的とし、研究を行った。 その結果、正常関節滑膜では、GABA 合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase: GAD)のうち GAD65 の発現がラット膝関節滑膜表層細胞の macrophage-like A cell に認められ、かつ GABA_B 受容体も、macrophage-like A cell に認められた。GABA システムがオートクリンあるいはパラクリンの滑膜表層細胞の macrophage-like A cell において作用していることが明らかとなった。 本研究において正常関節滑膜細胞での GABA システムの局在と分布が詳細に確認されたことは、関節滑膜炎における GABA システムの解明につながり、有意義な研究と考えられた。				

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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。

(主論文公表誌)

Histology and histopathology 24(8): 1009-1019, 2009