

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20591768
研究課題名（和文）	ヒト軟骨系腫瘍における GABA システムを用いた新たな鑑別診断法と治療法の確立
研究課題名（英文）	New methods of differential diagnosis and treatment by GABA system in human cartilage tumors
研究代表者	
神原 清人	(Kanbara Kiyoto)
大阪医科大学・医学部・講師	
研究者番号：	40298758

研究成果の概要（和文）：

軟骨肉腫における新たな鑑別診断法と治療法の確立をめざし GABA システムとの関与を調べた。RT-PCR にて軟骨肉腫に特異度の高かった GAD65 の Real time PCR を行ったところ軟骨肉腫の標本及び細胞株において GAD65mRNA が強く発現していた。また GABA と GABA 受容体のアゴニスト添加では軟骨肉腫細胞の増殖効果がみられ、一方アンタゴニストの添加では細胞増殖抑制効果がみられた。これらのことから軟骨肉腫において GABA システムの関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated GABA system in human cartilage tumors to establish new methods of differential diagnosis and treatment. We detected strongly GAD65 mRNA in human cartilage tumors and chondrosarcoma cells using real time PCR. BrdU incorporation of the cells treated with GABA and GABA receptor agonist was significantly increased, while that of the cells treated with GABA receptor antagonist was significantly inhibited ($p > 0.01$). Our findings indicate that GABA system is related to the proliferation process in human cartilage tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学、骨・軟部腫瘍学

キーワード：GABA、GABA 受容体、軟骨肉腫、OUMS-27、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

軟骨肉腫は悪性骨腫瘍の約 11%~16%を占め、骨肉腫に次いで多く、腫瘍性の軟骨を形成するが、腫瘍性の骨類骨形成を示さない腫瘍である。軟骨肉腫は良性軟骨系腫瘍と画像所見では判断できない場合があり、また組織的鑑別診断においても grade I~II の異型に留まることが多いため、従来の HE 染色を用いた方法では grade I と内軟骨腫等の良性軟骨系腫瘍との鑑別に難渋する。治療を開始するには、早期に良性か悪性かの適切な診断が必要となる。またその治療として一般に化学療法や放射線療法では効果がなく、外科的切除のみが唯一有効とされる。しかし外科的治療だけでは局所再発や肺などへの遠隔転移を起し、死亡例も少なくない。もし何らかの薬剤投与等によって腫瘍細胞の増殖を抑えられればさらに予後が改善すると思われる。このように軟骨肉腫の予後改善のためには軟骨肉腫の新たな鑑別診断法と治療法の確立が必要されている。

2. 研究の目的

GABA システムによる従来法に比べより特異性が高く簡便で迅速な軟骨肉腫の新規診断法と予後改善が期待できる軟骨肉腫における化学療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

新たな鑑別診断法の確立；手術時に切除した骨軟骨腫 5 例、内軟骨腫 5 例、軟骨肉腫 11 例、正常軟骨 2 例（対照）とヒト軟骨肉腫の細胞株 HCS2/8（高分化型）及び OUMS-27（低分化型）に対して RT-PCR にて GAD65 及び GAD67mRNA の発現を調べ特異度の高い配列を調べた。次にこの配列と GABA 含めた蛍光免疫染色を行い、各腫瘍間で発現様式を比較検討した。さらにこの遺伝子の発現量を Real time PCR により定量比較した。

新たな治療法の確立；ヒト軟骨肉腫細胞（OUMS-27）を用いて GABA_A 受容体サブユニット（ $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , π , θ , ϵ ）、GABA_B 受容体サブユニット（R1, R2）、GAD65、

67 の RT-PCR と GABA を含めた蛍光免疫染色を行った。また BrdU-ELLISA 法を用いて GABA や GABA_A 受容体及び GABA_B 受容体のアゴニストとアンタゴニストの腫瘍増殖における影響について検討した。

4. 研究成果

新たな診断法の確立；RT-PCR にて軟骨肉腫に特異度の高い遺伝子の配列が GAD65 であることがわかった (Fig. 1)。軟骨肉腫における GAD65mRNA の発現量を Real time PCR により定量比較したところ軟骨肉腫標本においては悪性度の違いにより発現量の違いはみられなかったが細胞株においては悪性度が高い OUMS のほうが HCS に比較し GAD65mRNA の発現量が高かった (Fig. 2)。

軟骨肉腫に最も特異度の高いGABA受容体サブユニット及びGADの配列の検討

○: 発現あり
×: 発現なし
△: 不明

	GABA	GAD67	GAD65	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$
軟骨肉腫	○	×	○	○	○	×	○	○	×
OUMS-27	○	×	○	△	○	○	×	○	×
骨軟骨腫	○	×	×	○	○	△	○	○	×
内軟骨腫	○	×	×	×	○	△	○	○	×
正常軟骨	○	×	×	×	○	○	×	○	×

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	δ	ϵ	R1a	R1b	R2
軟骨肉腫	○	×	×	○	×	×	○	○	△	△	△
OUMS-27	○	×	○	×	×	○	△	△	×	○	○
骨軟骨腫	○	△	○	○	×	×	○	△	×	×	×
内軟骨腫	○	×	×	○	○	×	○	○	×	×	×
正常軟骨	○	×	△	○	×	×	○	○	△	○	×

Fig. 1

分化度の異なる軟骨肉腫におけるGAD65mRNA発現量の定量比較

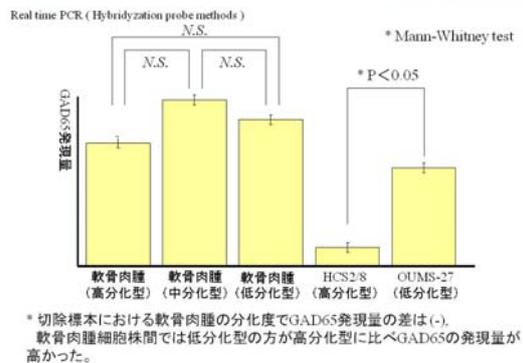


Fig. 2

新たな治療法の確立; 軟骨肉腫細胞は RT-PCR により GAD 65mRNA の発現を認めた。さらに GABA_A 受容体サブユニットでは $\alpha 1, 2, 3, 5, \beta 1, 3, \gamma 1-3, \delta, \theta, \varepsilon$ また GABA_B 受容体では R1 と R2 両方の mRNA 発現を認めた。蛍光免疫染色では GABA と GAD65、GABA_A 受容体及び GABA_B 受容体ともに反応がみられた (Fig. 3, Fig. 4)。GABA と GABA 受容体のアゴニスト添加では腫瘍細胞の増殖効果がみられ、一方アンタゴニストの添加では細胞増殖抑制効果がみられた。このことからヒト軟骨肉腫細胞の増殖過程において GABA 受容体の関与が示唆された (Fig. 5, Fig. 6)。

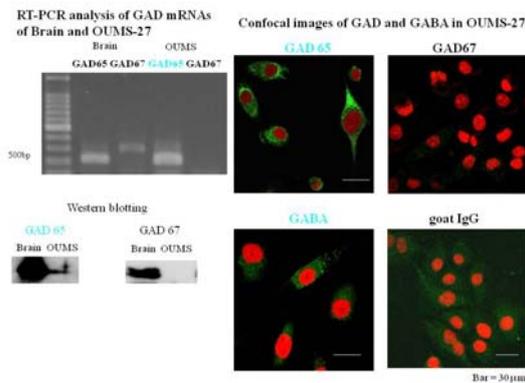


Fig. 3

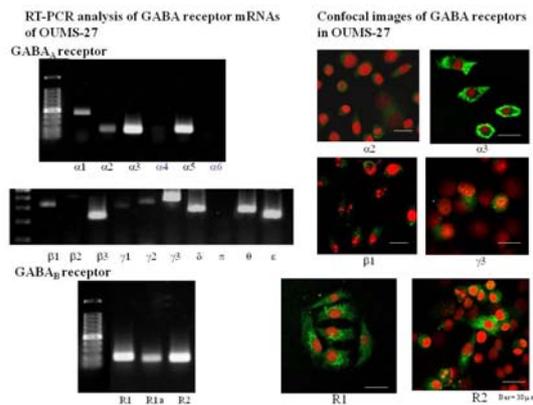


Fig. 4

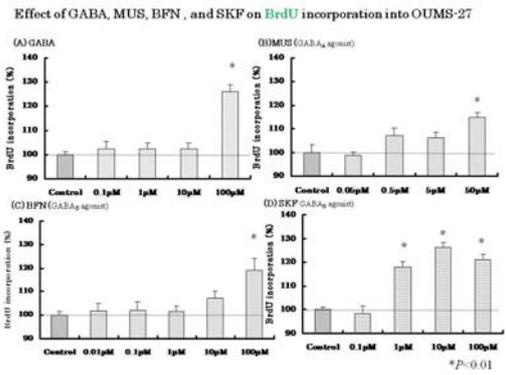


Fig. 5

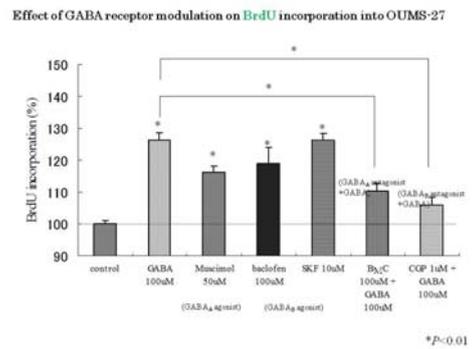


Fig. 6

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 6 件)

- 1) 神原清人、ヒト軟骨肉腫細胞 OUMS-27 における腫瘍細胞増殖に対する GABA 受容体の関与 第 116 回日本解剖学会総会 2011. 3. 29、誌上開催
- 2) 神原清人、ヒト軟骨系腫瘍における GABA 及びその合成酵素 GAD の発現について第 115 回日本解剖学会総会 2010. 3. 28、盛岡市
- 3) 神原清人、ヒト軟骨系腫瘍における GABA 及びその合成酵素の GAD の発現について第 33 回近畿肉腫研究会 2009. 12. 19、大阪
- 4) 柳川哲司、神原清人 ヒト軟骨系腫瘍におけるガンマアミノ酪酸とガンマアミノ酪酸合成酵素の発現 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009. 11. 5、横浜市

5) 神原清人、ヒト軟骨系腫瘍における GABA システムの関与 第 114 回日本解剖学会 総会 2009. 03. 29、岡山市

6) 柳川哲司、神原清人、ヒト軟骨系腫瘍におけるガンマアミノ酪酸 (GABA) システムの存在 第 41 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 2008. 7. 18、浜松市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原 清人 (Kanbara Kiyoto)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40298758

(2) 研究分担者

森 禎章 (Mori Yoshiaki)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70268192