

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007 ～ 2008
課題番号：	19590739
研究課題名(和文)	GABAの胃癌細胞増殖作用およびその産生酵素の消化器系癌組織における発現様式
研究課題名(英文)	Proliferative effect of GABA on gastric cancer and expression profile of Glutamic acid decarboxylase in various cancers.
研究代表者	
	前村 憲太郎 (Maemura Kentarou)
	大阪医科大学・医学部・講師
	研究者番号： 50281506

研究成果の概要：ヒト胃印環細胞癌株である KATO-III 細胞は、抑制性神経伝達物質である γ-アミノ酪酸 (GABA) の産生酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) および GABA A 受容体を発現していた。今回の検討では GABA が KATO-III 細胞の増殖能および浸潤能に及ぼす影響を調べた。①GABA および GABA A 受容体アゴニストの投与により KATO-III 細胞の増殖能の亢進がみられた。また GABA の投与は、MAP kinase のうち ERK 1/2 のリン酸化の増強およびサイクリン D1 の発現増強がみられた。一方、GABA は KATO-III 細胞の浸潤能に対して影響は及ぼさなかった。また matrix metalloprotease-2, 9 の産生能に対しても影響を与えなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	700,000	210,000	910,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器学（食道、胃、小腸、大腸）

1. 研究開始当初の背景

γ-アミノ酪酸 (GABA) は成熟哺乳動物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。しかしながら GABA は神経系のみならず消化管、膵臓、肝臓などの消化器系を含む非神経系組織にも分布している。また胃癌、大腸癌、乳癌などの腫瘍組織中の GABA 含有量の増加や GABA 産生酵素であるグルタ

ミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 活性の上昇など腫瘍と GABA の関連性も指摘されている。我々は、GABA が軟骨様細胞 (ATDC5) の増殖能を亢進することや、前立腺癌細胞の Matrix metalloprotease の産生亢進を介して転移能の促進することなどを報告してきている。

2. 研究の目的

受容体を含めた GABA システムと癌（特に消化器系）の増殖・進展に関する研究を推し進める一環として、ヒト胃印環細胞癌株である KATO-III 細胞を用いた。KATO-III 細胞は GAD および GABA A 受容体を発現しており、GABA を外来性（培地中）に投与すると KATO-III 細胞の増殖能の亢進がみられることが予備実験で判明した。そこで平成 19 年度には、研究 I. GABA の KATO-III 細胞増殖能および浸潤能におよぼす影響を詳細に調べることを、平成 20 年度には 研究 II. 胃癌を含めた様々な癌における GAD の発現様式を網羅的に調べることを目的とする。

3. 研究の方法

研究 I.

KATO-III 細胞の培地中に、GABA あるいは GABA A 受容体アゴニスト (muscimol)、GABA A 受容体アンタゴニスト (bicucullin) を投与して以下の検討をおこなった。

- ① 細胞増殖能の変化 (BrdU 取り込み法) : GABA 投与 48 時間後に BrdU の取り込み率を ELISA にて測定した。
- ② GABA 投与による Mitogen-activated protein kinases (MAP Kinase) (ERK 1/2, JNK, p38) 活性化の変化を、リン酸化特異的抗体を用いて Western blotting 法を行い検討した。
- ③ GABA 投与による G1 期から S 期の移行に重要な細胞周期関連分子のサイクリン D1 の発現変化を Western blotting 法にて調べた。
- ④ GABA 投与による細胞浸潤能の変化を、invasion chamber を使い、細胞をトルイジンブルーあるいはヘマトキシリン染色することにより検討した。
- ⑤ GABA 投与による Matrix Metalloprotease (MMP)-2, MMP-9 産生能の変化を ELISA 法にて検討した。

研究 II.

癌組織アレイおよび癌プロファイリング cDNA アレイを用いた GABA および GAD65 の発現に関する網羅的検討を以下の方法にておこなった。

- ① 多臓器癌組織アレイ (Oligene 社製) : このアレイには肝臓、腎臓、膵臓、前立腺、食道、胃、結腸、肺、乳腺の正常組織および癌組織切片が含まれている。
- ② 大腸癌組織アレイ (Super Bio Chips Laboratories 社製) : このアレイは一枚のスライド上に、大腸癌 40 症例、59 組織がマウントされている。

上記①、②の切片を使用し、GAD65 の発現を、GAD65 特異的抗体を使用した免疫組織学的手法 (間接蛍光抗体法) にて検出した。

③ 癌プロファイリング cDNA アレイ (clontech 社製)

このアレイには各患者の癌組織と正常組織を対応させた 13 種類 (乳癌、頸部癌を含む子宮癌、結腸癌、腎臓癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、小腸癌、胃癌、甲状腺癌) の組織由来する計 241 組のサンプルから作成した cDNA をナイロンメンブレン上にペアにしてスポットしている。

また GAD65 cDNA プローブの作成は、human brain cDNA library を鋳型に、GAD65 cDNA の断片を PCR で増幅し、random prime labeling kit でラベル後、ハイブリダイゼーションを行い、シグナルをルミノ・イメージアナライザーで検出した。

4. 研究成果

研究 I.

- ① 1-100 μM の濃度の GABA の投与により KATO-III 細胞の BrdU 取り込みが有意に上昇した。その効果は 1 あるいは 10 μM の GABA で最も強かった (Fig-1a)。また 1 μM の濃度の Muscimol 投与で BrdU の取り込み増加が見られ、この効果は bicucullin の前投与で阻害された。 (Fig-1a, b)
- ② 1 μM の GABA 投与は ERK 1/2 の発現を 130%、113% に増加し、リン酸化率を 126%、121% に増加した。JNK と p38 においては特に変化は見られなかった。 (Fig-2)
- ③ 1 μM の GABA 投与はサイクリン D1 の発現を 125% に増加した。 (Fig-3)
- ④ KATO-III 細胞は GABA 投与群、GABA 非投与群いずれの群でも明らかな浸潤を示さなかった。
- ⑤ KATO-III 細胞の培養上清中の MMP-2、MMP-9 濃度は GABA 投与により有意な変化は見られなかった。

研究 II.

- ① GAD65 の発現を免疫染色法で調べた結果、卵巣癌、胃癌で弱陽性を、膵臓癌、結腸癌で中等度陽性を示した。肝臓癌、腎臓癌、前立腺癌、食道癌、肺癌、乳癌では発現は弱いか見られなかった。正常組織においては、膵臓、胃、大腸で弱陽性を示し、他の組織では発現は見られなかった。
- ② 大腸癌組織アレイの結果は、正常大腸では 9 例中 3 例が陽性であったが、その発現はいずれも弱かった。原発性大腸癌組

織においては 40 症例中 21 症例で陽性であった。発現の強さは、21 例中 8 例が弱陽性、6 例が中等度陽性、7 例が弱陽性であった。

癌の占拠部位別に GAD65 の陽性率をみると、盲腸 67%(3 例中 2 例)、上行結腸 33%(9 例中 3 例)、横行結腸 75%(4 例中 3 例)、下行結腸 50%(2 例中 1 例)、S 状結腸 53%(15 例中 8 例)、直腸 57%(7 例中 4 例)であった。

癌の分化度別の GAD65 の陽性率は、高分化型 40%(10 例中 4 例)、中分化型 58%(26 例中 15 例)、低分化型 0%(1 例中 0 例)、粘液癌 67%(3 例中 2 例)であった。

癌の進行度別の GAD65 の陽性率は、IIA 64%(11 例中 7 例)、IIB 50%(2 例中 1 例)、IIIB 45%(11 例中 5 例)、IIIC 38%(8 例中 3 例)、IV 50%(8 例中 4 例)であった。

- ③ 癌プロファイリング cDNA アレイの結果 GAD65 は直腸癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌においてそれぞれの正常組織よりも強い発現がみられた。(Figure 4a, b)

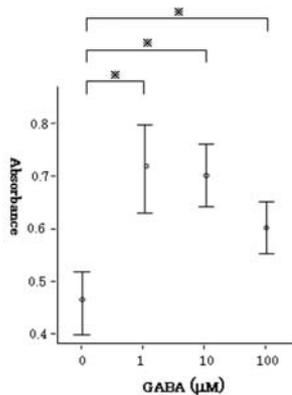


Figure 1a BrdU の取り込み
GABA (1-100 μM)による KATO-III 細胞増殖に及ぼす影響 (* $p < 0.05$).

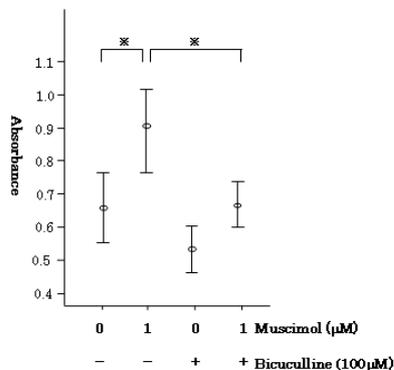


Figure 1b BrdU の取り込み
GABA A 受容体アゴニストの Muscimol によ

る KATO-III 増殖促進効果 (Bicucullin は GABA A 受容体アンタゴニスト) (* $p < 0.05$)

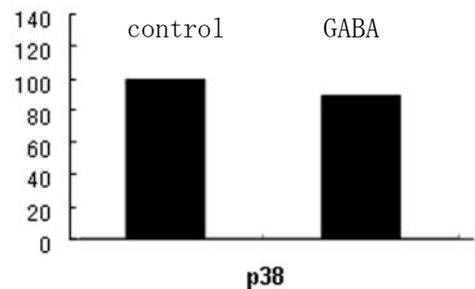
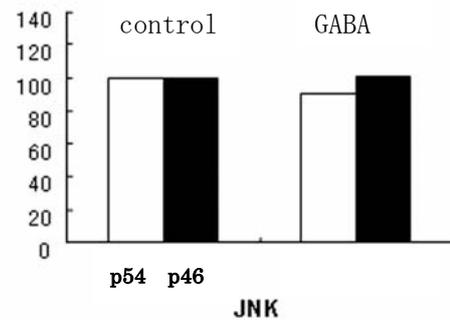
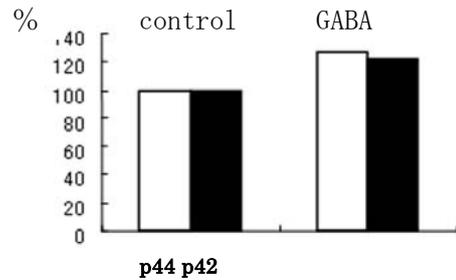


Figure 2 MAP キナーゼのリン酸化率
1 μM GABA 投与後の ERK1/2 (p44/p42), JNK (p54/p46), p38 のリン酸化率の変化 ウェスタンブロッティングによる解析. コントロール (GABA 非投与群) を 100% として相対的に比較した結果.

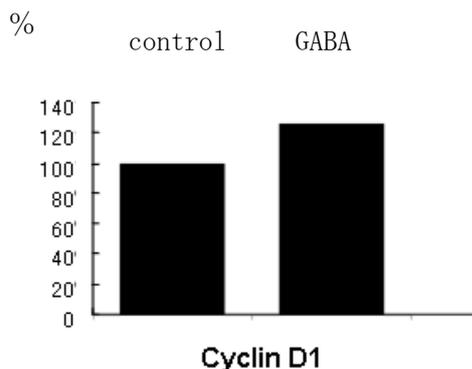


Figure 3 サイクリンD1の発現
ウエスタンブロッティングによる解析.

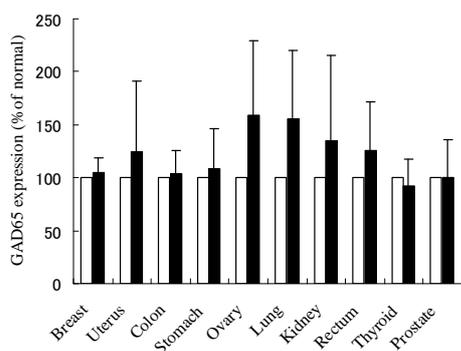
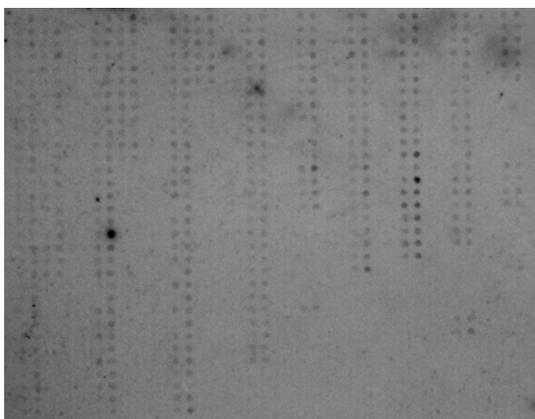


Figure 5 各種癌におけるGAD65の発現
癌プロファイニング cDNA アレイによる解析.
下段は上段の結果をデンシトメーターで数値化した結果.

以上の検討から、GABA はイオンチャンネル型の GABA A 受容体を介して胃癌細胞株である KATO-III 細胞の増殖を促進した。そしてこのメカニズムに MAP キナーゼ (特に ERK 1/2) の活性化が関与していることがわかった。また、他の臓器発生の癌においても GAD の発現

増強が見られ、GABA システムが癌の発育・進展に関与している可能性が示唆された。今後さらに症例を増やし、詳細な検討を行えば、その関連がより明らかになると考えられる。

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 3 件)

- ① Proliferative effects of γ -aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. Kentaro Maemura, Nanako Shiraiishi, Kumiko Sakagami, Ken Kawakami, Takuya Inoue, Mitsuyuki Murano, Masahito Watanabe, and Yoshinori Otsuki. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 査読有 24: 688-696 2009
- ② Expression of GABAergic system in pulmonary neuroendocrine cells and airway epithelial cells in GAD67-GFP knock-in mice. Yasuaki Yabumoto, Masahito Watanabe, Yumi Nakamura, Yuko Itoh, Kentaro Maemura, Yuchio Yanagawa, Kunihiro Obata, Katsuya Watanabe, and Yoshinori Otsuki. *Med. Mol. Morphol.* 査読有 41:20-27 2008
- ③ Cells expressing GABA synthetic enzyme, glutamate decarboxylase, in stomach and intestine: RT-PCR and immunohistochemistry studies. Kanako Akamatsu, Yumi Nakamura, Hana Hayasaki, Kiyoto Kanbara, Kentaro Maemura, Yuchio Yanagawa, Kunihiro Obata, Masahito Watanabe, and Hiroshi Ueno. *J. Biol. Macromol.* 査読有 7 :55-62 2007

[学会発表] (計 3 件)

①前村憲太郎ら. 大腸腫瘍における γ -アミノ酪酸 A 受容体・サブユニット発現に関する検討. 第 114 回日本解剖学会総会. 2009 年 3 月 30 日 岡山理科大学.

②前村憲太郎ら. GABA による胃癌細胞株 KATO-III の増殖効果は MAP kinase の活性化を伴う. 第 113 回日本解剖学会総会. 2008 年 3 月 28 日. 大分大学医学部.

③渡辺正仁ら. 肺の神経内分泌細胞は GABA を産生する. 第 113 回日本解剖学会総会. 2008 年 3 月 28 日. 大分大学医学部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前村 憲太朗 (Maemura Kentarou)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：50281506