

## 主論文要旨

論文提出者氏名：

関口 潔

専攻分野：最新医学研究コース

コース：

指導教授：鈴木 真奈絵

主論文の題目：

Effects of Memantine on the Growth and Protein Profiles of Neuroblastoma Cells

(神経芽細胞腫の増殖と蛋白質プロファイルに対するメマンチンの影響)

共著者：Masaaki Sato, Michiyo K. Yokoyama, Toshiyuki Sato, Atsuhiko Tsutiya, Kazuki Omoteyama, Mitsumi Arito, Naoya Suematsu, Tomohiro Kato, Manae S. Kurokawa

緒言

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は、神経細胞の変性を来たし認知症の主要な原因となる疾患である。現在 AD の治療では、コリンエステラーゼ阻害薬と N-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬が使用されている。メマンチンは後者の薬剤であり、記憶の形成や学習において重要な役割を果たすシナプス伝達効率の長期増強 (long-term potentiation, LTP) を保持し、また神経保護に働く。メマンチンは神経細胞の蛋白質発現に影響を及ぼすことが知られており、アミロイド  $\beta$  やその前駆体蛋白質の発現を抑制し、またプロテインホスファターゼ 2A の阻害によるタウ蛋白質の過剰なリン酸化や集積に対し可逆的に働く。マウスやラットの脳由来の細胞におけるメマンチンの影響を見たトランスクリプトミクス及びプロテオミクスは施行されているが、我々が調べた限りヒト神経細胞における網羅的な発現解析は報告されてい

い。我々はヒト神経芽細胞腫を用い、メマンチンがその生存率、増殖率及び蛋白質プロファイルに与える影響を解析した。

#### 方法・対象

ヒト神経芽細胞腫 GIMEN を  $2.2 \times 10^4$  個/ウェルで播種した。1-100  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下または非存在下で 48 時間培養した後、トリパンブルーで染色し生細胞数及び死細胞数を計測した( $n=3$ )。全細胞数に対する生細胞数の割合を生存率として計算した。播種細胞数に対する生細胞数の割合を増殖率として計算した。メマンチン非存在下で培養した GIMEN より RNA を調整し、RT-PCR にて NMDA 受容体のサブタイプの発現を調べた。10  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下または非存在下で 48 時間培養した GIMEN より蛋白質を抽出し、2次元ディファレンシャル電気泳動にて蛋白質を分離し、各蛋白質スポットの強度を比較した( $n=3$ )。強度に 1.2 倍以上の差を認めたスポットについて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析により蛋白質の同定を試みた。10  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下または非存在下の GIMEN の培養上清に含まれる液性因子の濃度差を、サイトカインアレイにより比較した。濃度差がある傾向を示した液性因子について ELISA で定量した( $n=3$ )。統計学的有意差は、Student の t 検定にて計算した。

#### 結果

GIMEN は NMDA 受容体の NR1, NR2A-D, NR3A, B 全てのサブタイプを発現していた。GIMEN の生存率は、1-10  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下においてメマンチン非存在下の 99.0%以上であり、100  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下のみで僅かに低下を認めた(97.5%,  $p < 0.01$ )。これに対して、増殖率はメマンチンの濃度依存性に低下を認めた(2-100  $\mu\text{M}$  85.5-63.0%, 2-10  $\mu\text{M}$   $p < 0.05$ , 20-100  $\mu\text{M}$   $p < 0.01$ )。生存率が十分に高く(99.4%)増殖率が低下した(76.1%)10  $\mu\text{M}$  メマンチンの存在下と非存在下で蛋白質の

プロファイルを検討したところ、全 892 個の蛋白質スポットを見出した。メマンチン存在下で非存在下に比較し 1.2 倍以上の強度を示したスポットを 13 個、-1.2(1/1.2)倍以下の強度を示したスポットを 19 個認められた( $p < 0.05$ )。この 32 個のスポット中 7 個を同定し、 $\beta$  アクチン(-1.21 倍)、 $\gamma$  エノラーゼ (-1.21 倍)、グルタチオン合成酵素(-1.28 倍)を検出した。メマンチンにより分泌量に変化した液性因子は認められなかった。

## 考察

GIMEN は NMDA 受容体のサブタイプを全て発現しており、メマンチンは当該受容体を介して影響すると考えられた。メマンチンは 1-100  $\mu\text{M}$  の範囲では GIMEN の生存率に大きな影響を示さなかったが、増殖率は濃度依存性に低下した(2-10  $\mu\text{M}$   $p < 0.05$ , 20-100  $\mu\text{M}$   $p < 0.01$ )。神経膠腫や肺小細胞癌等は 20-900  $\mu\text{M}$  メマンチンにより増殖が抑制され、これは NMDA 受容体からのシグナルの制御による可能性が高いと考えられている。治療下でのメマンチンの血中濃度は 0.5- 1.0  $\mu\text{M}$  であるが、我々の結果では 1  $\mu\text{M}$  でも増殖率が低下する傾向が見られた(89.1%)。メマンチンが神経芽細胞腫の増殖を抑制する効能が示唆された一方、正常の成体神経幹・前駆細胞等の増殖を抑制する可能性が示された。メマンチンは GIMEN の蛋白質プロファイルを変化させ、 $\beta$  アクチン、 $\gamma$  エノラーゼ、グルタチオン合成酵素の発現を低下させた( $p < 0.05$ )。これら蛋白質は細胞増殖に関与しており、メマンチンはこれらの発現を低下させることにより GIMEN の増殖を抑制する可能性が考えられた。

## 結論

メマンチンは GIMEN の蛋白質プロファイルを変化させた。メマンチンは神経芽細胞腫の増殖を抑制し、これに対して  $\beta$  アクチン、 $\gamma$  エノラーゼ、グルタチオン合成酵素の発現低下が関与する可能性が示された。

