

## 論文審査の要旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

関口 潔

主論文の題目  
および

掲載誌・審査委員

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)

掲載誌 Integrative Molecular Medicine 2018; 5: 1-8

主査 松井 宏晃

副査 池森 敦子

副査 武半 優子

### [論文の要旨・価値]

メマンチンは、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗を作用機序とする、アルツハイマー型認知症の治療薬であり、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。本研究では、神経細胞におけるメマンチンの新規作用機構を探索する目的で、ヒト神経芽細胞腫 (GIMEN) の生存率、増殖率、蛋白質プロファイルに及ぼす影響について調べた。

GIMEN に発現する NMDA 受容体サブタイプ mRNA を、RT-PCR にて検出した。GIMEN を 1 - 100  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下に 48 時間培養後、生存率 (生細胞数/全細胞数)、増殖率 (生細胞数/播種細胞数) を算出した (n=3)。GIMEN を 10  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下、非存在下に 48 時間培養し、抽出した蛋白質を蛍光標識 2 次元電気泳動で分離後、スポット強度を数値化して定量した (n=3)。強度に、 $\pm 1.2$  倍以上の差を認めたスポットについて、質量分析により蛋白質を同定した。

その結果、GIMEN は、NMDA 受容体の NR1、NR2A-D、NR3A、B、全てのサブタイプを発現した。GIMEN の生存率は、1 - 10  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下で、非存在下の 99% 以上を保ち、100  $\mu\text{M}$  でも 97.5% と殆ど変化しなかった。一方、GIMEN の増殖率は、メマンチン濃度依存性に、有意に抑制された (2 - 100  $\mu\text{M}$ , 85.5 - 63.0%; 2-10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; 20 - 100  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ )。治療下でのメマンチン血中濃度 (0.5 - 1.0  $\mu\text{M}$ ) に相当する、1.0  $\mu\text{M}$  でも、増殖率が低下する傾向を認めた (89.1%)。次に、10  $\mu\text{M}$  メマンチン存在下 (生存率、99.4%; 増殖率、76.1%)、非存在下で培養した GIMEN より蛋白質を抽出し、蛍光標識 2 次元電気泳動を行い、それぞれ、892 の蛋白質スポットを検出した。メマンチン存在下で、蛋白質スポット強度が、 $\pm 1.2$  倍以上変化した 32 個のうち、7 スポットで、caronin-1C (1.44 倍)、 $\beta$ -actin (-1.21 倍) (2 スポットで同定)、 $\gamma$ -enolase (-1.21 倍)、glutathione synthase (-1.28 倍)、spermatogenesis-associated protein 24 (-1.46 倍)、V-set transmembrane domain-containing protein 2B (-1.46 倍) を同定した。

本研究は、メマンチンが神経芽細胞腫 (GIMEN) の蛋白質プロファイルを変化させることを明らかにし、細胞増殖に関与する蛋白質 ( $\beta$ -actin、 $\gamma$ -enolase、glutathione synthase) の発現を減少させることにより、神経芽細胞腫の増殖を抑制する可能性を示唆しており、メマンチンの新規作用機構に関する基礎的知見をもたらした点で、高い価値を有するものと判断された。

### [審査概要]

陪席者は 5 名であった。申請者が PC を用い、25 分間、本研究の背景、方法、結果、考察、関連領域などについて、明快に発表した。続いて、50 分間の質疑応答では、NMDA 受容体の構造・機能特性とメマンチンの作用、GIMEN を選択した理由、生存率・増殖率の評価法、メマンチンによる GIMEN 細胞形態の変化、メマンチンによる GIMEN 増殖抑制の神経生物学的意義、スポット強度が変化した蛋白質のウエスタンブロット法による確認の必要性、同定した蛋白質の機能、本研究成果に基づく今後の研究計画など、多岐にわたる質問に、申請者は、概ね的確に回答した。

## 最終試験結果の要旨

### [研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価]

申請者は、適切な研究戦略を立て、本研究を遂行し、頭書の研究目的を達成したことから、自立して研究を遂行できる能力を備えている。外国語試験では、英文文献の一部を指定し、その場での和訳により十分な英文読解力があると判断した。以上、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、態度、人柄にも優れ、専門分野および関連領域における学識、研究意欲、研究遂行能力などを総合して、申請者は学位授与に値すると評価した。