

# Growth Promoting Effect of Head Activator in Chick Embryo Brain Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7959">http://hdl.handle.net/2297/7959</a>

## Head activator のニワトリ胚脳細胞に及ぼす成長促進効果

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

梶原 莊平

(昭和62年5月26日受付)

Head activator (HA) の中枢神経細胞に対する成長促進効果を検討するためにニワトリ胚脳細胞を用いて precursor uptake, cyclic nucleotides の変化,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 濃度, GABA 結合能を *in vitro*, *in vivo* で検討した。培養ニワトリ胚脳細胞において HA は  $10^{-10}$  M で [ $^3$ H]thymidine, [ $^3$ H]uridine および [ $^3$ H]leucine の取り込みを促進し, 中でも [ $^3$ H]thymidine の取り込みは HA 添加後 4 時間より増加して 8 時間で添加時の 200% に達しその促進効果は 14 時間まで持続した。これに対し HA の合成アナログである (Arg<sup>1</sup>, Phe<sup>5</sup>)-head activator (AHA) は  $10^{-9}$  M で [ $^3$ H]thymidine の取り込みを添加後 6 時間より抑制し 14 時間まで持続した。同様の抑制は [ $^3$ H]uridine および [ $^3$ H]leucine の取り込みにも認められた。また adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) は HA 添加後 4 時間より増加しはじめ, 6 時間で前値の 170% に達したが, AHA 添加では逆に著明に低下した。次にニワトリ胚脳細胞を用いた *in vivo* の実験系において,  $10^{-10}$  M の HA を胎生 5 日ないし 7 日に卵黄囊中に注入し 12 日目に採取した脳において [ $^3$ H]thymidine の取り込みは対照群の 150% 以上に増加し, cAMP および guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) も各々対照群の 200% 以上, 120% 以上に増加した。また  $10^{-10}$  M HA を胎生 7 日卵黄囊中に注入し 12 日に採取した脳において, そのシナプトソーム分画における GABA 結合能は対照群の 200% 以上に増加し, さらに GABA 含量も増加傾向が認められた。以上より, HA は  $10^{-10}$  M で培養ニワトリ胚脳細胞の DNA, RNA および蛋白合成を促進し, *in vivo* においても脳発育の初期に作用して DNA 合成を促進し, さらに GABA ニューロンの成熟にも関与する可能性が考えられた。また, cAMP が *in vitro* および *in vivo* において神経細胞の発育制薬因子として作用する可能性が示唆された。

---

**Key words** head activator, (Arg<sup>1</sup>, Phe<sup>5</sup>)-head activator, precursor uptake, cyclic nucleotides,  $\gamma$ -aminobutyric acid

---

Head activator (HA) は 1973 年 Schaller<sup>1)</sup>によりヒドラから分離された分子量 1,124, pGlu-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Val-Ileu-Leu-Phe のアミノ酸配列を有するポリペプチドで, その後イソギンチャクやラット, 牛, ブタさらにはヒトの視床下部や腸管にも広く存在していることが明らかにされた。<sup>2)~4)</sup>さらに最近ではヒト血漿中に 20~100 fmol/ml の濃度で存在していることが報告された<sup>5)</sup>が, ヒドラにおいては頭部発育を促進し間質細胞を神経細胞に分化誘導する作用が認められた<sup>1)</sup>ものの, 哺乳動物では *in vitro* でラット臍臓からのアミラーゼ分泌を促進する作用が報

告<sup>6)</sup>されているだけであり, HA の生理的役割, 特に中枢神経系における作用は全く解明されていない。そこで著者は, 中枢神経系に対する HA の生理的作用を研究するためにニワトリ胚脳細胞を用い *in vitro* および *in vivo* の系において DNA・RNA・蛋白合成, cyclic nucleotides の経時的変化,  $\gamma$ -アミノブチル酸  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 結合能および GABA 含量への影響を検討した。

## 材料および方法

I. *in vitro* の実験系

Abbreviations: AHA, (Arg<sup>1</sup>, Phe<sup>5</sup>)-head activator; cAMP, adenosine 3',5'-monophosphate; cGMP, guanosine 3',5'-monophosphate; FCS, fetal calf serum; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; HA, head activator; MEM, modified Eagles medium; PBS, phosphate buffer saline

### 1. 培養ニワトリ胚脳細胞の調整

胎生12日ニワトリ胚より脳を取り出し、ピペットを用いて脳細胞を細分した。細胞分離後直ちに10%ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum, FCS) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) を含む Modified Eagles Medium (MEM) (日水製薬) 2 ml に  $5 \times 10^5$  細胞を浮遊し、35 mm 径の Falcon plastic culture dish (Falcon Plastics, Los Angeles, CA) にて培養をおこなった。培養は  $37^\circ\text{C}$ , 95% air-5%  $\text{CO}_2$  下でおこない、培地は培養3日目に交換して、他の血清因子の影響を最小限にするために培養4日目に無血清培地に再交換し、さらに16時間培養後FCSを含む培地に交換してHAあるいはその合成アナログ (Arg<sup>1</sup>, Phe<sup>5</sup>)-HA (AHA) (北陸大学生物薬品化学科橋本忠博士, 佐倉直樹博士より供与) を添加して各々の作用を検討した。なお、細胞の生存率は0.2%トリパンプルを用いて検討したが、常時90%以上の生存率を示した。

### 2. [<sup>3</sup>H]thymidine, [<sup>3</sup>H]uridine および [<sup>3</sup>H]leucine の取り込みの測定

培地に  $10^{-12}$ – $10^{-9}$  M HA あるいは  $10^{-12}$ – $10^{-8}$  M AHA を添加して経時的に (Methyl <sup>1-3</sup>H)thymidine (2.0 Ci/mmol, New England nuclear Corp. Boston, MA), (<sup>5-3</sup>H)uridine (30 Ci/mmol, Amersham/Seale Corp. Arlington Heights, IL) あるいは DL-(4, 5-<sup>3</sup>H)leucine (32 Ci/mmol, Amersham/Seale Corp. Arlington Heights, IL) を最終濃度が1 ml あたり0.25 あるいは  $0.5 \mu\text{Ci}$  となるように添加した。1時間培養後、直ちに培養細胞を氷冷リン酸緩衝液 (Phosphate buffer saline, PBS) 3 ml で3回洗浄して培養皿より1 ml のPBS中に細胞を浮遊させ、超音波にて細胞融解をおこなった。そのうち200  $\mu\text{l}$  はLowry法<sup>7)</sup>による蛋白定量に使用し、残りは2.4 cm Whatman GF/C ガラスフィルター (ポアサイズ1.2  $\mu$ ) (Whatman Paper Ltd. Maidstone, England) で吸引濾過し、フィルターを脱イオン水5 ml で3回洗浄後、シンチレーター (トルエンIL, POPOP 50 mg, DPO 4 g) 5 ml を加え放射活性をliquid scintillation spectrophotometer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) にて測定した。取り込み率はcpm/mg. protein で表現した。

### 3. 細胞内 adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP), guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) の変動

$10^{-10}$  M の HA を添加あるいは無添加で培養し、4, 6 および8時間目における細胞内cAMP濃度の変化を検討した。さらに培養6時間目に  $10^{-10}$  M の HA あ

るいは  $10^{-9}$  M の AHA 添加による細胞内cAMPおよびcGMP濃度の変化を検討した。細胞は0.02%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む0.1%トリプシンで遊離させ、氷冷PBSにて3回洗浄後、1 ml の氷冷PBS中に細胞を浮遊させ超音波破砕をおこなった。そのうち200  $\mu\text{l}$  はLowry法<sup>7)</sup>による蛋白定量に用い、残りはcAMPあるいはcGMPキット (ヤマサ醤油) にてcAMPあるいはcGMPの測定に用いた。

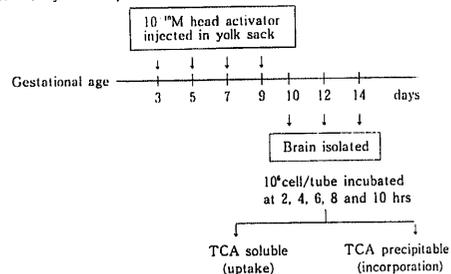
## II. in vivo の実験系

### 1. ニワトリ胚脳細胞の調整

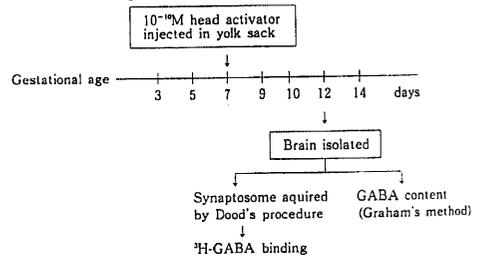
図1に示すように  $10^{-10}$  M の HA あるいは生理的食塩水 (生食) を胎生3, 5, 7, 9日のニワトリ胚卵黄囊中に注入し、 $37^\circ\text{C}$  の孵卵器中に孵置して各々胎生10, 12, 14日に脳を採取し、それぞれについて [<sup>3</sup>H]thymidine uptake と incorporation を検討した。また、 $10^{-10}$  M の HA あるいは生食を胎生7日のニワトリ胚卵黄囊中に注入し、 $37^\circ\text{C}$  の孵卵器中で孵置して各々胎生12日に採取した脳について [<sup>3</sup>H]GABA 結合能と GABA 濃度を検討した。さらに  $10^{-10}$  M の

#### Experimental protocol

##### 1. <sup>3</sup>H thymidine uptake and incorporation



##### 2. <sup>3</sup>H-GABA binding and GABA content



##### 3. cAMP and cGMP content

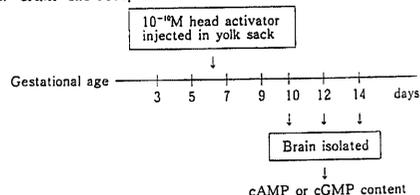


Fig. 1. Experimental protocol.

HA あるいは生食を胎生 7 日のニワトリ胚卵黄囊中に注入し、37°C の孵卵器中で孵置して各々胎生 10, 12, 14 日に採取した脳について cAMP の変化を検討した。また胎生 7 日のニワトリ胚卵黄囊中に HA あるいは生食を注入し、胎生 12 日に採取した脳では cGMP も検討した。

## 2. [<sup>3</sup>H]thymidine uptake と incorporation の測定

無菌的に採取した脳をピペッティングにより脳細胞を細分し、無血清 MEM 培地に 1 ml 中  $2 \times 10^6$  細胞となるように浮遊させて 0.5 ml ずつ polypropylene Falcon tube (12×75 mm) (Falcon Plastics, Los Angeles, CA) に分注した。37°C, 95% air-5% CO<sub>2</sub> 下で培養を行い、2, 4, 6, 8, 10 時間後に各々 [<sup>3</sup>H]thymidine を培地 1 ml につき 1.0 μCi 添加して 1 時間培養した。その後各々につき 3 ml の無血清 MEM 培地を加え、4°C, 1000 g で 5 分間冷却遠心して上清を除去した後、さらに同様の操作を 2 回繰り返した。得られた細胞塊に 10% トリクロル酢酸 (TCA) 0.5 ml と 1.2% 牛血清アルブミン (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 0.1 ml を加え、4°C で一晚静置後遠心して上清を酸可溶性分画 (uptake) とした。また、沈渣は 5% TCA 3 ml で 2 回洗浄後、1 N NaOH 0.5 ml に溶解して酸不溶性分画 (incorporation) とした。両分画に各々 10 ml の Aqueous counting scintillant (ACS II, Amersham/Seale Corp. Arlington heights, IL) を加え、liquid scintillation spectrophotometer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) にて放射活性を測定した。Uptake および incorporation は cpm/10<sup>6</sup> cell で表現した。

## 3. [<sup>3</sup>H]GABA 結合能の測定

採取した脳を大脳+間脳と小脳+脳幹に 2 分し、各々につきシヨ糖密度勾配を応用した Dodd らの迅速法<sup>9)</sup>によりシナプトソーム分画を得た。このシナプトソーム分画を蛋白量 10 mg/ml となるように調整し、その 0.1 ml に 50 mM トリス・クエン酸緩衝液 (pH 7.1) 0.7 ml を加え、終末濃度が 25 nM となるように調整した γ-(2,3-<sup>3</sup>H) aminobutyric acid ([<sup>3</sup>H]GABA, 比活性 34.7 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) 0.1 ml, 脱イオン水 0.1 ml を加え計 1 ml として、45 分間氷水中で反応させた。反応後速やかに 2.4 cm Whatman GF/C ガラスフィルター (ポアサイズ 1.2 μ) で吸引濾過し、フィルターを脱イオン水 5 ml で 3 回洗浄後、シンチレーター (トルエン IL, POPOP 50 mg, DPO 4 g) 5 ml を加え Beckman liquid scintillation spectrophotometer にて放射活性を測定し、これを総結合量とした。上記脱

イオン水の代わりに 4-アミノ-n-酪酸 (GABA, 和光純薬) (最終濃度 1 mM) 0.1 ml を加えたものを非特異的結合とし、総結合量よりこれを差引いた値を特異的結合とした。

## 4. GABA 濃度の測定

採取した脳のうち大脳+間脳について水冷 75% エタノールで抽出後凍結乾燥により得た分画に含まれる GABA 濃度を、Graham らの酵素的微量測定法<sup>9)</sup>で測定した。

## 5. 脳細胞内 cAMP および cGMP 濃度の測定

採取した脳を大脳+間脳および小脳+脳幹に 2 分し、0.1 N 塩酸にて煮沸抽出後、各々についてヤマサ cAMP および cGMP キットを用いて細胞内 cAMP, cGMP 濃度を測定した。

## 6. 神経細胞およびグリア細胞分画による差違の検討

10<sup>-10</sup> M HA あるいは生食を胎生 7 日ニワトリ胚卵黄囊中に注入し、胎生 12 日に無菌的に採取した脳について、無血清 MEM 培地中でピペッティングにて脳細胞を分離し、37°C, 95% air-5% CO<sub>2</sub> 下で 2 時間培養後、[<sup>3</sup>H]thymidine を 2 μCi 投与して 1 時間培養した。その後、Nagata らのフィコールを用いた bulk separation<sup>10)</sup>により神経細胞とグリア細胞を分離し、各々について [<sup>3</sup>H]thymidine の放射活性を Beckman liquid scintillation spectrophotometer にて測定し、cpm/tube で表わした。

## III. 統計学的検討

有意差検定には student's t-test を用いた。

## 成 績

### I. in vitro の実験系

1. [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みに対する HA あるいは AHA の濃度の影響

図 2 に培養 8 時間での [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みに対する 10<sup>-12</sup>~10<sup>-9</sup> M の HA あるいは 10<sup>-12</sup>~10<sup>-8</sup> M の AHA の影響を示した。[<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みは 10<sup>-10</sup> M の HA 添加で対照の  $2.57 \pm 0.07 \times 10^3$  に比し、 $4.14 \pm 0.23 \times 10^3$  cpm/mg.protein と最大に達し、10<sup>-9</sup> M でも対照に比し有意に高かった。これに対し AHA 添加では 10<sup>-9</sup> から 10<sup>-8</sup> M で対照の  $2.98 \pm 0.18 \times 10^3$  に比し、 $2.05 \pm 0.21 \times 10^3$  cpm/mg.protein と最低を示した。従って以下の実験は 10<sup>-10</sup> M の HA と 10<sup>-9</sup> M の AHA の添加によって行うこととした。

2. 10<sup>-10</sup> M HA あるいは 10<sup>-9</sup> M AHA 添加による [<sup>3</sup>H]thymidine, [<sup>3</sup>H]uridine および [<sup>3</sup>H]leucine の取り込みの経時的変化

[<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みに対する 10<sup>-10</sup> M HA

および  $10^{-9}$  M AHA の影響を図 3 に示した。( $^3\text{H}$ )thymidine の取り込みは HA 添加により培養 4 時間より増加し、8 時間で対照の 200% 以上に増加して最大となった。この刺激効果はその後徐々に減少していったが、10~12 時間まで有意に増加していた。これに対して AHA 添加では培養 6 時間より ( $^3\text{H}$ )thymidine の取り込みが低下しはじめ、以後 8 時間低下したままであった、さらに、 $10^{-10}$  M HA の刺激効果は  $10^{-9}$  M AHA の添加によって完全に阻害された。

( $^3\text{H}$ )uridine の取り込みを図 4 に示した。HA 添加により ( $^3\text{H}$ )uridine の取り込みは培養 6 時間より増加しはじめ、その後 4 時間は対照の 150% 以上を維持し、培養 10 時間より徐々に低下した。一方、AHA 添加では培養 6 時間より低下しはじめ、以後 10 時間は対照に比し有意に低値を示した。

図 5 には ( $^3\text{H}$ )leucine の取り込みに対する  $10^{-10}$  M HA および  $10^{-9}$  M AHA の効果を示した。( $^3\text{H}$ )leucine の取り込みに対する HA の刺激効果は他のスクレオシドほど顕著でなく、培養 10~12 時間で対照の 115~120% の増加を示す程度であり、逆に AHA 添加では 80~90% の低下を示す程度であった。

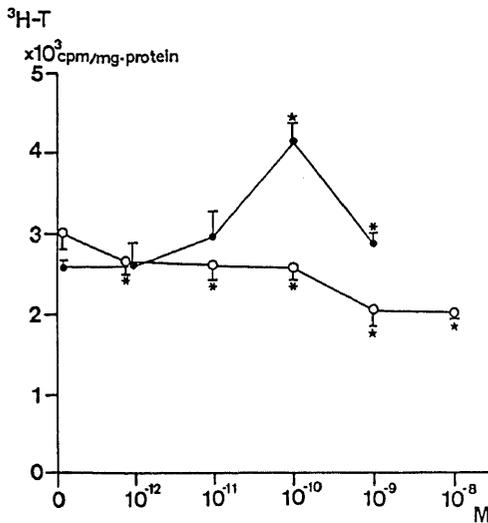


Fig. 2. Response of ( $^3\text{H}$ )thymidine ( $^3\text{H-T}$ ) to graded doses of HA ( $\bullet-\bullet$ ) or AHA ( $\circ-\circ$ ). After 5 days of culture, brain cells were treated with various concentrations of HA or AHA, as indicated. ( $^3\text{H}$ )thymidine was added at a final concentration of  $0.25 \mu\text{Ci/ml}$  8h after HA or AHA addition, and the rate of ( $^3\text{H}$ )thymidine uptake was measured. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 cultures. \*  $p < 0.05$ , \* \*  $p < 0.001$  vs control.

3.  $10^{-10}$  M HA および  $10^{-9}$  M AHA の細胞内 cAMP, cGMP 濃度に及ぼす影響

$10^{-10}$  M HA 添加による cAMP の経時的変化を図 6-A に示した。HA 添加により cAMP は培養 4 時間より上昇しはじめ、6 時には対照の 170% 以上と最大に達し 8 時間でも有意に高値を呈していた。図 6-B には HA あるいは AHA 添加による培養 6 時間での cAMP および cGMP の変化を示した。cAMP は HA 添加で対照の 120% に上昇したが、AHA 添加では逆に対照の 85% に減少した。これに対して cGMP は HA 添加で対照の 65% に減少し、AHA 添加で対照の 130% にまで上昇した。

## II. in vivo の実験系

1.  $10^{-10}$  M HA の ( $^3\text{H}$ )thymidine uptake および incorporation に及ぼす影響

$10^{-10}$  M HA の卵黄囊内投与時期とニワトリ胚脳採

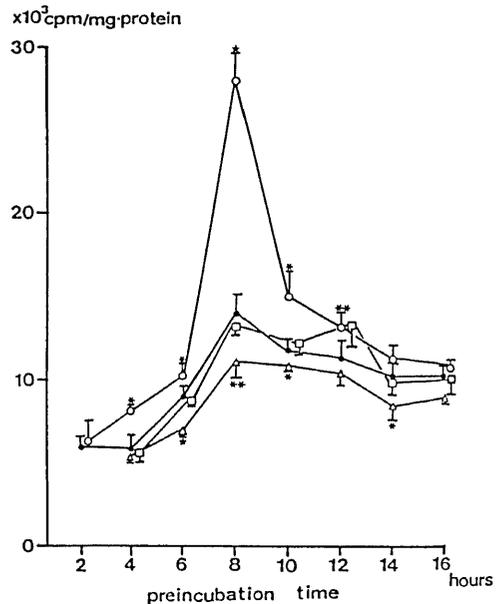


Fig. 3. Time course of ( $^3\text{H}$ )thymidine uptake in cultured chick embryonal brain cells incubated with head activator (HA) or analogue of HA (AHA). After 5 days of culture, cells were incubated with 10% FCS (control,  $\bullet-\bullet$ ), 10% FCS + HA  $10^{-10}$  M ( $\circ-\circ$ ), 10% FCS + AHA  $10^{-9}$  M ( $\triangle-\triangle$ ), or 10% FCS + HA  $10^{-10}$  M + AHA  $10^{-9}$  M ( $\square-\square$ ) for various periods of time, and the rate of ( $^3\text{H}$ )thymidine uptake at a final concentration of  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$  was measured at the end of incubation, as described in Materials and Methods. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 cultures. \*  $p < 0.05$ , \* \*  $p < 0.02$ , \* \* \*  $p < 0.001$  vs control.

取時期による  $[^3\text{H}]$ thymidine uptake および incorporation の変化を図 7, 8 に示した. 図 7 には  $10^{-10}$  M HA を胎生 3, 5, 7, 9 日ニワトリ胚卵黄囊中に注入し, 胎生 12 日に採取した脳についての

$[^3\text{H}]$ thymidine uptake と incorporation を示してあり, 図 8 に  $10^{-10}$  M HA を胎生 7 日ニワトリ胚卵黄囊中に注入し, 胎生 10, 12, 14 日に採取した脳における  $[^3\text{H}]$ thymidine uptake と incorporation を示す.  $10^{-10}$

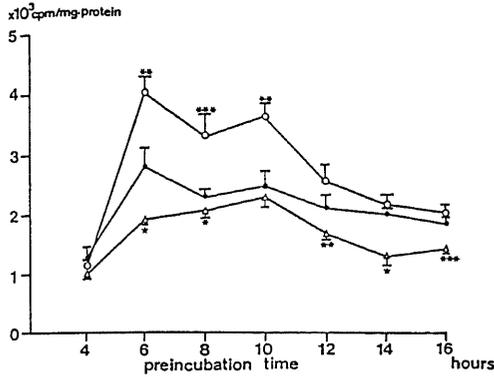


Fig. 4. Time course of  $[^3\text{H}]$ uridine uptake in cultured chick embryonal brain cells incubated with HA or AHA. After 5 days of culture, cells were incubated with 10% FCS (control, ●-●), 10% FCS+HA  $10^{-10}$  M (○-○), or 10% FCS+AHA  $10^{-9}$  M ( $\Delta$ - $\Delta$ ), and the rate of  $[^3\text{H}]$ uridine uptake at a final concentration of  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$  was measured. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 cultures. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$ , \*\*\*  $p < 0.01$ , ★  $p < 0.001$  vs control.

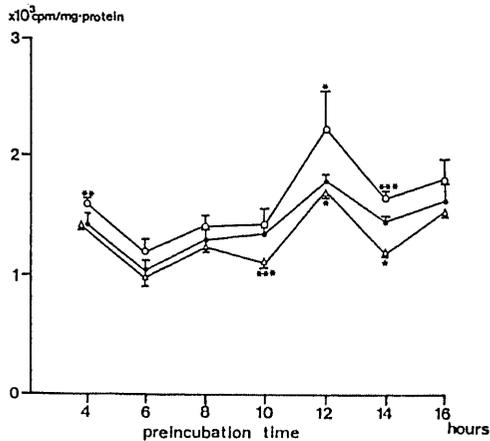


Fig. 5. Time course of  $[^3\text{H}]$ leucine uptake in cultured chick embryonal brain cells incubated with HA or AHA. After 5 days of culture, cells were incubated with 10% FCS (control, ●-●), 10% FCS+HA  $10^{-10}$  M (○-○), 10% FCS+AHA  $10^{-9}$  M ( $\Delta$ - $\Delta$ ), and the rate of  $[^3\text{H}]$ leucine uptake at a final concentration of  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$  was measured. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 cultures. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$ , \*\*\*  $p < 0.01$ , ★  $p < 0.001$  vs control.

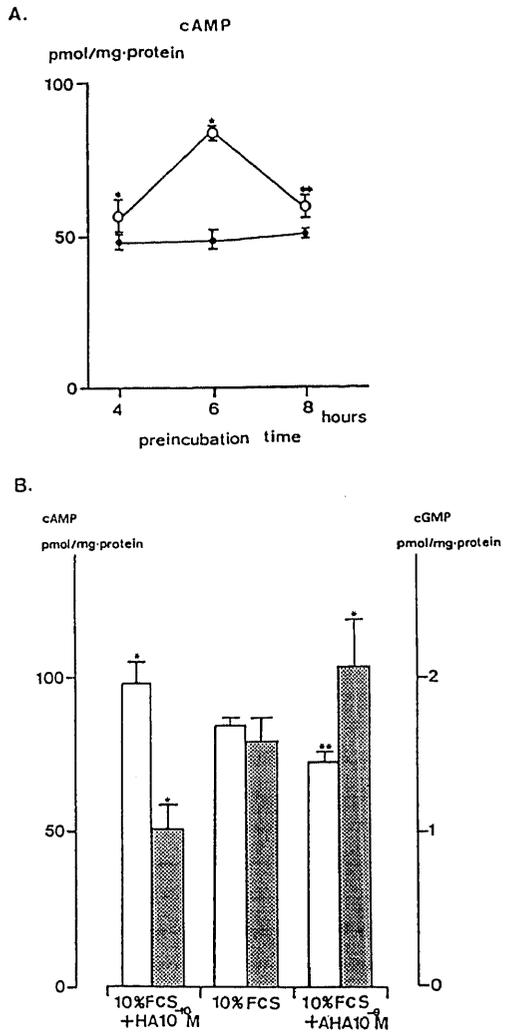


Fig. 6A and B

A) Sequential changes in cAMP contents of cultured chick embryonal brain cells induced by HA. After 5 days of culture, cells were incubated with 10% FCS (control, ●-●) or 10% FCS+HA  $10^{-10}$  M (○-○) for 4, 6 and 8h.  
 B) Cyclic AMP (□ □) and cyclic GMP (■ ■) in cultured chick embryo brain cells after the stimulation of HA or AHA. After 5 days of culture, cells were incubated with 10% FCS, 10% FCS+HA  $10^{-10}$  M, or 10% FCS+AHA  $10^{-9}$  M for 6h. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 cultures. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ★  $p < 0.001$  vs control.

M HA を胎生 5 日卵黄囊中に注入し胎生 12 日に採取した脳で、 $^3\text{H}$ thymidine incorporation は培養 2, 4, 6 時間で  $1.81\sim 1.94 \times 10^3$  cpm/ $10^6$  cell と同日令対照の  $1.48\sim 1.65 \times 10^3$  cpm/ $10^6$  cell に比し有意に高値 ( $p < 0.05 \sim p < 0.001$ ) を呈し、この傾向は  $10^{-10}$  M HA を胎生 7 日卵黄囊中に注入し胎生 12 日に採取した脳でより著明で、培養 2, 4, 6, 8, 10 時間で  $1.95\sim 3.09 \times 10^3$  cpm/ $10^6$  cell と同日令対照の  $1.48\sim 1.65 \times 10^3$  cpm/ $10^6$  cell に比し有意に高値 ( $p < 0.01 \sim p < 0.001$ ) であった。この傾向は  $10^{-10}$  M HA を胎生 7 日卵黄囊中に注入し胎生 14 日に採取した脳についても認められたが、 $^3\text{H}$ thymidine incorporation は低下傾向にあり、 $10^{-10}$  M HA を胎生 9 日卵黄囊中に注入し胎生 12 日に採取した脳においては  $^3\text{H}$

thymidine incorporation の増加傾向は認めなかった。

2.  $10^{-10}$  M HA の  $^3\text{H}$ GABA 結合能に及ぼす影響

図 9-A に胎生 7 日卵黄囊中に  $10^{-10}$  M HA あるいは生食を注入し、胎生 12 日に採取した脳のシナプトソーム分画における  $^3\text{H}$ GABA 結合能を示した。大脳+間脳のシナプトソーム分画では  $10^{-10}$  M HA 投与群で  $21.1 \pm 2.9$  fmol/mg.protein と対照群の  $10.2 \pm 3.4$  fmol/mg.protein に比し有意に高値 ( $p < 0.01$ ) を呈し、小脳+脳幹のシナプトソーム分画でも同様の結果が得られた。

3. HA の GABA 濃度に及ぼす影響

図 9-B に胎生 7 日卵黄囊中に  $10^{-10}$  M HA あるいは

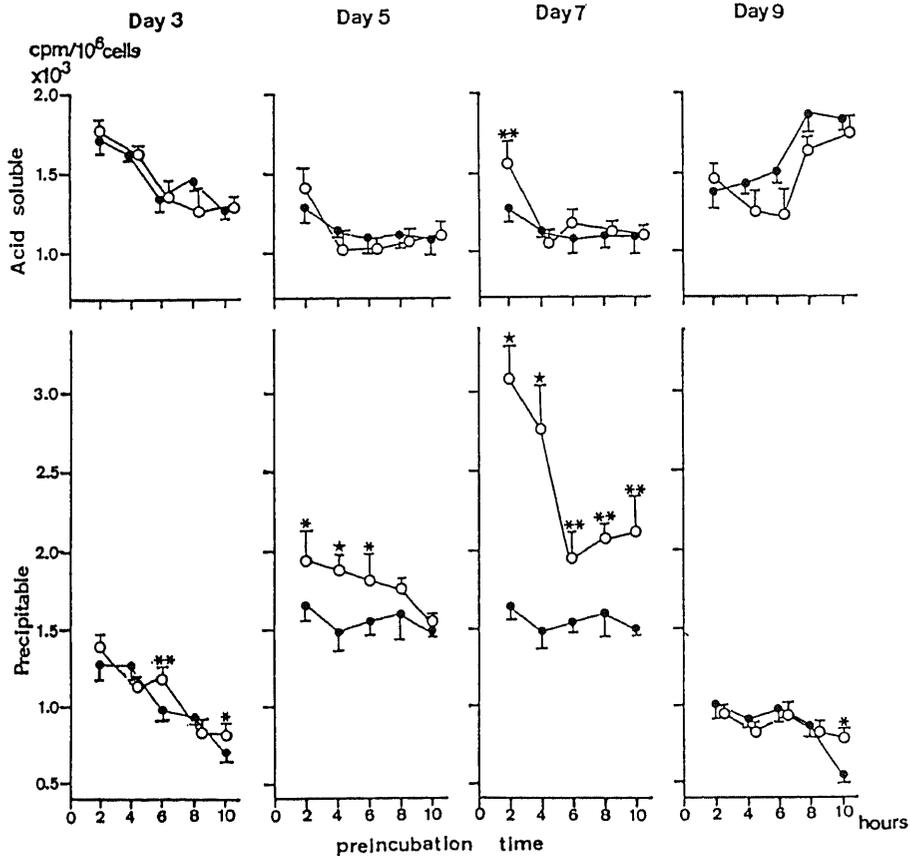


Fig. 7. Time course of  $^3\text{H}$ thymidine uptake or incorporation in chick embryonal brain cells pretreated with HA ( $\circ-\circ$ ) or normal saline ( $\bullet-\bullet$ ). After  $10^{-10}$  M HA or normal saline was injected in yolk sack of 3, 5, 7 or 9 day old chick embryo, and the rate of  $^3\text{H}$ thymidine uptake or incorporation at a final concentration of  $1.0 \mu\text{Ci/ml}$  was measured at the end of incubation, as described in Materials and Methods. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 materials. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs control.

生食を注入し、胎生 12 日に採取した脳の大脳+間脳における GABA 濃度を示した。10<sup>-10</sup> M HA 投与群で 15.1±2.5 μg/g.tissue と対照群の 10.4±3.4 μg/g.tissue に比べて有意差は認めないものの高い値向を示した。

#### 4. HA の cyclic nucleotides に及ぼす影響

図10-A に胎生 7 日卵黄囊中に 10<sup>-10</sup> M HA あるいは生食を注入し、胎生 12 日に採取した脳の大脳+間脳および小脳+脳幹における cAMP, cGMP の変化を、図 10-B に胎生 7 日卵黄囊中に 10<sup>-10</sup> M HA あるいは生食を注入し胎生 10, 12, 14 日に採取した脳について cAMP の変化を図示した。胎生 12 日に採取した脳の大脳+間脳について cAMP は HA 投与群 4.36±0.17 pmol/mg.protein, 生食投与群 1.92±0.11 pmol/mg.protein と HA 投与群が有意に高値 (p<0.001) を呈し、cGMP も HA 投与群 144.3±15.9 fmol/mg.protein, 生食投与群 107.6±12.7 fmol/mg.protein と

HA 投与群が有意に高値 (p<0.01) を呈した。小脳+脳幹においても同様の結果が得られた。次に cAMP の経時変化では、HA 投与群で 1.57±0.13 → 4.96±0.13 → 3.77±0.21 pmol/mg.protein, 生食投与群で 1.51±0.12 → 3.92±0.34 → 3.87±0.39 pmol/mg.protein と、胎生 12 日採取脳においてのみ HA 投与群で有意に高値 (p<0.01) を呈した。

#### 5. 神経細胞およびグリア細胞における HA 効果の差違

Bulk separation<sup>10)</sup>による神経細胞分画およびグリア細胞分画における [<sup>3</sup>H]thymidine uptake & incorporation を図 11 に示した。神経細胞分画における [<sup>3</sup>H]thymidine uptake & incorporation は HA 投与群 2.07±0.18×10<sup>3</sup> cpm/tube, 生食投与群 1.30±0.25×10<sup>3</sup> cpm/tube と HA 投与群において有意に高値 (p<0.02) を示したが、グリア細胞分画における [<sup>3</sup>H]thymidine uptake & incorporation は HA

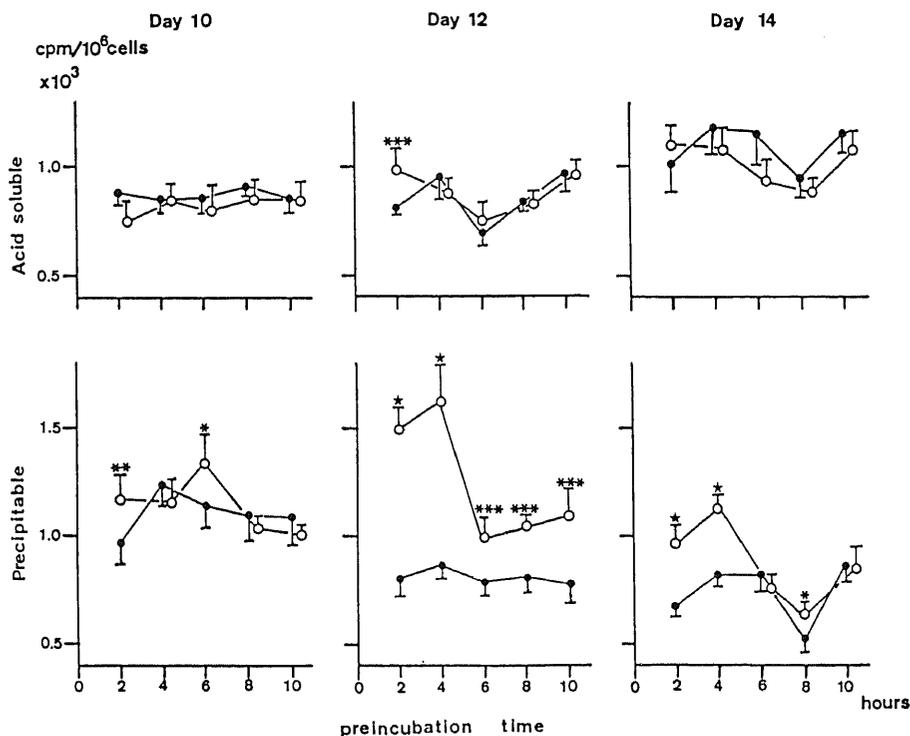


Fig. 8. Time course of [<sup>3</sup>H]thymidine uptake or incorporation in chick embryonal brain cells pretreated with HA (○-○) or normal saline (●-●). After 10<sup>-10</sup> M HA or normal saline was injected in yolk sack of 7 day old chick embryo, brains were isolated from 10, 12 or 14 day old chick embryo, and the rate of [<sup>3</sup>H]thymidine uptake or incorporation at a final concentration of 1.0 μCi/ml was measured. Each point represents mean±SD of 6 materials. \* p<0.05, \*\* p<0.02, \*\*\* p<0.01, ★ p<0.001 vs control.

投与群  $0.63 \pm 0.05 \times 10^3$  cpm/tube, 生食投与群  $0.70 \pm 0.02 \times 10^3$  cpm/tube と両群間に差はなかった。

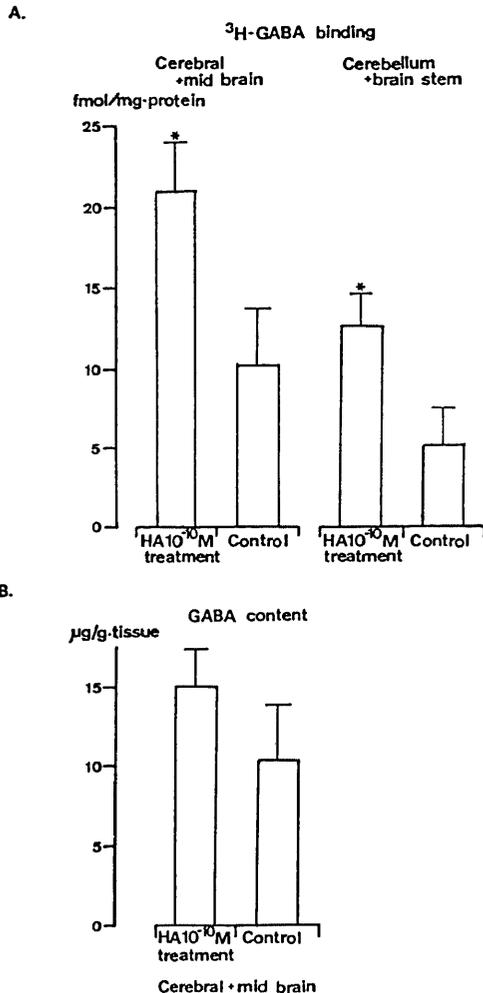


Fig. 9A and B

A) ( $^3\text{H}$ )GABA binding to synaptosome fraction of cerebral plus mid brain or cerebellum plus brain stem section. After  $10^{-10}$  M HA or normal saline was injected in yolk sack of 7 day old chick embryo, brains were isolated from 12 day old chick embryos, and the rate of ( $^3\text{H}$ )GABA binding to synaptosome fraction was measured. Each point represents mean  $\pm$  SD of 4 materials. \*  $p < 0.01$  vs control.

B) GABA content in cerebral plus mid brain section. After  $10^{-10}$  M HA or normal saline was injected in yolk sack of 7 day old chick embryo, and the content of GABA was measured. Each point represents mean  $\pm$  SD of 5 materials.

## 考 察

Head activator はヒドラにおいて間質細胞を神経細胞に分化誘導<sup>1)</sup>し, 哺乳動物では in vitro でラット膵臓よりアミラーゼ分泌を促進<sup>2)</sup>する作用が認められているが, 中枢神経系における作用は依然不明のままである。我々は本研究において HA が神経細胞において成長促進効果を有することを初めて明らかにした。

培養ニワトリ胚脳細胞において HA は ( $^3\text{H}$ )thymidine, ( $^3\text{H}$ )uridine および ( $^3\text{H}$ )leucine の取り込みを

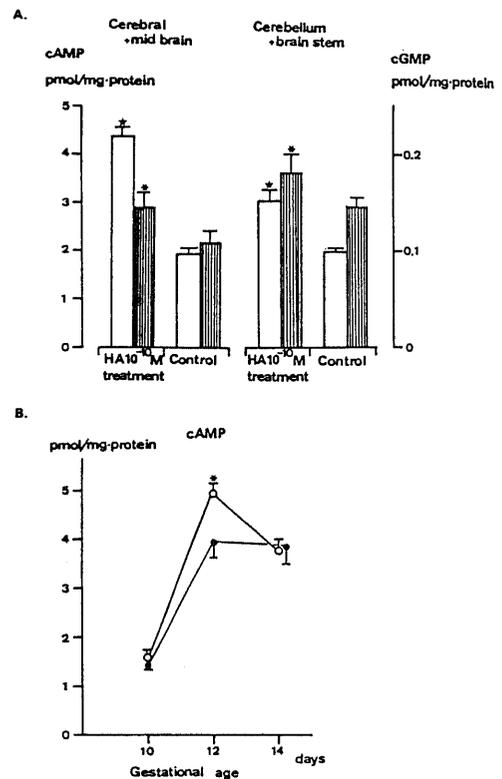


Fig. 10A and B

A) Cyclic AMP (□) and cyclic GMP (▨) in cerebral plus mid brain or cerebellum plus brain stem section of 12 day old chick embryo brain after  $10^{-10}$  M HA or normal saline was injected in yolk sack of 7 day old chick embryo. Each point represents mean  $\pm$  SD of 6 materials. \*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.001$  vs control.

B) Developmental changes in cAMP contents in cerebral plus mid brain section of 10, 12 or 14 day old chick embryo brain after  $10^{-10}$  M HA (○—○) or normal saline (●—●) was injected in yolk sack of 7 day old chick embryo. Each point represents mean  $\pm$  SD of 5 materials. \*  $p < 0.01$  vs control.

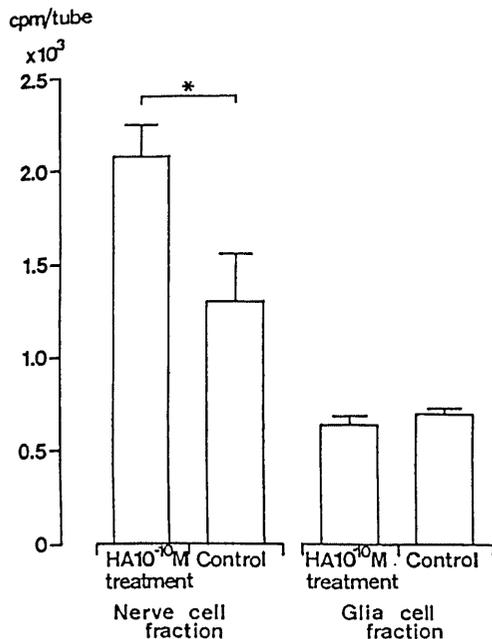


Fig. 11. [<sup>3</sup>H]thymidine uptake and incorporation of nerve cell fraction or glia cell fraction prepared from 12 day old chick embryo brain after 10<sup>-10</sup> M HA or normal saline injection to yolk sack of 7 day old chick embryo. Each point represents mean ± SD of 3 materials. \* p < 0.02 vs control.

促進し, AHA は抑制することが明確に示されたが, HA の刺激効果や AHA の抑制効果は濃度依存性であり, HA は 10<sup>-10</sup> M, そして AHA は 10<sup>-9</sup> M で効果発現が最大であった。さらに HA は 10<sup>-9</sup> M でも刺激効果を有していたが, その刺激効果は 10<sup>-10</sup> M と比べるとかなり弱く, これは Schaller らの報告<sup>11)</sup>にもあるように高濃度では縮小傾向が強くなるために刺激効果が低下するものと考えられる。10<sup>-10</sup> M という HA の濃度はヒト血漿中の濃度やラット腸管内濃度と一致しており, ニワトリ胚脳を用いた *in vivo* の我々の実験においても, 最も DNA 合成の盛んな胎生 5~7 日の卵黄囊中に 10<sup>-10</sup> M の HA を注入し胎生 12 日に採取した脳において [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation は著明に促進されていた。また, 培養ニワトリ胚脳細胞において 10<sup>-10</sup> M HA の刺激効果は 10<sup>-9</sup> M AHA を同時に添加すると完全に阻害されることから, AHA は細胞表面の HA 結合部位に拮抗的に作用することが考えられる。さらに別の機序として HA と AHA のアミノ酸配列の違いが生物学的活性の違いになってあられ, cAMP 産生または [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みに対して全く逆の作用を呈した可能性も考えられる。培養ニワトリ胚脳細胞を用いた *in vitro* の実験系では単一

の脳細胞を使用したわけではないので, HA あるいは AHA がどの脳細胞に特異的に作用したかは特定できなかったが, *in vivo* の実験系で促進効果が特定の発生時期に認められる点, 神経細胞分画で有意差が認められた点より, HA あるいは AHA は主として神経細胞に作用すると考えられる。

*In vitro* において HA あるいは AHA の [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みに対する効果が出現するのに 4 時間の潜時が認められるが, この時間は G<sub>1</sub> 期より S 期に移行する時間とも考えられる。脳細胞の発育に対する HA の作用機構は明らかではないが, Schaller<sup>12)</sup> はヒドラにおいて細胞増殖の G<sub>2</sub> 期に HA は作用してその期間を短縮させ細胞分裂をひきおこすことを示した。我々の *in vivo* の実験においても胎生 5 日および 7 日卵黄囊中に HA を投与すると [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation は著明に増加するが, 9 日卵黄囊中に HA を投与しても増加しないこと, そしてニワトリ胚脳においては胎生 4 日より神経芽細胞の成熟脳における正常位置への移動が開始されて細胞増殖が起こり 9 日に終了するという報告<sup>14)</sup> を考えあわせると, HA は脳細胞の細胞周期に何らかの影響を与えて細胞増殖をひきおこす可能性が考えられる。

ラットでは胎生 15 日に神経化学的に GABA レセプターが認められ, GABA 濃度は成熟ラットの 19%, GABA 結合能も成熟ラットの 5% 程度みられることが報告<sup>15)</sup> されているが, 我々の *in vivo* の実験系においてもニワトリ胚脳シナプトソーム分画の GABA 濃度, GABA 結合能が 10<sup>-10</sup> M HA の卵黄囊中投与により増大し, HA が GABA 系ニューロンの成熟過程に何らかの影響を与えていると考えられた。

*In vitro* の実験系で HA 添加群において cAMP は [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みが増加する 2 時間前より増加し, また *in vivo* の実験系でも [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation が最大となる胎生 12 日に採取した脳において cAMP は HA 投与群で対照に比し有意に高値を呈した。cAMP は細胞増殖において阻害伝達物質であるという報告<sup>16)~22)</sup> が散見されるが, MacManus ら<sup>23)</sup> や Willingham ら<sup>24)</sup> は cAMP は G<sub>1</sub> 期において DNA 合成の開始を制禦することを見出した。3T3 細胞や乳腺上皮細胞における最近の知見<sup>25)~27)</sup> では cAMP は DNA 合成を促進することがいわれている。このような事実を考えあわせると, HA 添加あるいは卵黄囊中投与による [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みや incorporation に対する刺激効果は cAMP の上昇によって惹起されている可能性が考えられる。これに対して cGMP は *in vitro* において HA 添加によって減少し, AHA 添加によって増加するという変動を示し,

この cAMP と cGMP の相反する変化は DNA 合成の促進あるいは抑制と相関するように思われる。しかし、in vivo では HA 投与群で cGMP は in vitro の場合と逆に増加した。これは in vitro においては急性期の変化を、in vivo においては慢性期の変化を示しているとも考えられるが、他方 Goridis ら<sup>28)</sup>が報告したように cGMP の増加は神経系の分化やシナプトソーム形成に関係しており、今回の我々の研究において GABA ニューロンの成熟とも関連していると考えられた。以上より cGMP および cAMP が脳細胞の増殖や分化を誘導する可能性が示唆されたが、その詳細については今後さらに検討が必要である。

### 結 論

HA を培養ニワトリ胚脳細胞およびニワトリ胚脳に投与して脳細胞の増殖および分化について検討し、次の結論を得た。

1. 培養ニワトリ胚脳細胞に対して HA は  $10^{-10}$  M で最も DNA, RNA および蛋白合成を促進して増殖を促し、またニワトリ胚脳細胞に対しても HA は  $10^{-10}$  M で主として神経細胞の DNA 合成を促進し増殖を促す。なお、この効果は胎生 5~7 日のニワトリ胚において神経芽細胞が盛んに細胞増殖をおこしている時期に投与した場合に限られる。また、この増殖には cAMP の上昇が関与している可能性が示唆された。

2. HA はニワトリ胚脳細胞に作用して GABA ニューロンの分化を促し、これに cGMP の上昇が関与している可能性が示唆された。

3. HA の合成アナログである AHA は  $10^{-9}$  M で培養ニワトリ胚脳細胞の DNA, RNA および蛋白合成を抑制し、この効果は  $10^{-10}$  M HA の成長促進効果と拮抗する。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授および佐藤保助教授に心から感謝の意を表します。また御協力下さいました小児科内分泌グループの諸先生に感謝いたします。

なお本論文の一部は第 58 回および 59 回日本内分泌学会学術総会 (1985 年, 1986 年) にて発表した。

### 文 献

- 1) Schaller, HC. & Gierer, A.: Distribution of the head-activating substance in hydra and its localization in membranous particles in nerve cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **29**, 27-38 (1973).
- 2) Bodenmuller, H., Schaller, HC. & Darai, G.: Human hypothalamus and intestine contain a

hydra-neuropeptide. *Neurosci. Lett.*, **16**, 71-74 (1980).

3) Bodenmuller, H. & Schaller, HC.: Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. *Nature*, **293**, 579-580 (1980).

4) Schaller, HC. & Bodenmuller, H.: Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 7000-7004 (1981).

5) Roberge, M., Escher, E., Schaller, HC. & Bodenmuller, H.: The hydra head activator in human blood circulation: degradation of the synthetic peptide by plasma angiotensin-converting enzyme. *FEBS Lett.*, **38**, 287-298 (1984).

6) Feurle, GE., Bodenmuller, H. & Baca, I.: The neuropeptide head activator stimulates amylase release from rat pancreas in vitro. *Neurosci. Lett.*, **38**, 287-289 (1983).

7) Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. & Randall, RJ.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

8) Dodd, PR., Hardy, JA., Oakley, AE., Edwardson, JA., Perry, EK. & Delaunoy, JP.: A rapid method for preparing synaptosome: Comparison with alternative procedures. *Brain Research*, **226**, 107-118 (1981).

9) Graham, LTJr. & Aprison, MH.: Fluorometric determination of aspartate, glutate and  $\gamma$ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Anal. Biochem.*, **15**, 487-497 (1966).

10) Nagata, Y. & Tsukada, Y.: Bulk separation of neuronal cell bodies and glial cells from mammalian brain and some of their biological properties. *Reviews of Neuroscience*, Vol. 3, p.195-221, Raven Press, New York., 1978.

11) Schaller, HC. & Bodenmuller, H.: Role of the neuropeptide head activator for nerve function and development. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 1003-1007 (1985).

12) Bodenmuller, H. & Zachmann, B.: A radioimmunoassay for the Hydra head activator. *FEBS Lett.*, **159**, 237-240 (1983).

13) Schaller, HC.: Action of the head activator on the determination of interstitial cells in hydra. *Cell Differ.*, **5**, 13-20 (1976).

14) Levi-Montalcini, R.: Events in the developing nervous system. *Progress Brain Res.*, **4**, 1-26

(1964).

- 15) **Coyle, JT. & Enna, SJ.** : Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Reseach*, **111**, 119-133 (1976).
- 16) **Ryan, WL. & Heidrick, ML.** : Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, **162**, 1484-1485(1968).
- 17) **Otten, J., Johnson, GS. & Pastan, I.** : Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.*, **247**, 7082-7087 (1972).
- 18) **Carchman, RA., Johnson, GS., Pastan, I. & Scolnick, EM.** : Studies on the levels of cyclic AMP in cells transformed by wild-type and temperature-sensitive Kirsten Sarcoma Virus. *Cell*, **1**, 59-64 (1974).
- 19) **Oey, J., Vogel, A. & Pollack, R.** : Intracellular cyclic AMP concentration responds specifically to growth regulation by serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 694-698 (1974).
- 20) **Ichikawa, A., Esumi, K., Takagi, M., Yatsunami, K., Negishi, M., Yokoyama, K. & Tomita, K.** : Effect of adenosine and adenosine 5'-monophosphate on cell division of cultured mastocytoma P-815 cells. *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 123-135 (1980).
- 21) **Takagi, M., Ichikawa, A., Esumi, K., Yatsunami, K., Negishi, M. & Tomita, K.** : Effect of adenosine 3',5'-monophosphate on growth and several functions of cultured mastocytoma P-815 cells. *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 136-148 (1980).
- 22) **Yatsunami, K., Ichikawa, W. & Tomita, K.** : Accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate induced by prostagrandin E<sub>1</sub>, binding to mastocytoma P-815 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1325-1332 (1981).
- 23) **MacManus, JP. & Whitfield, JF.** : Stimulation of DNA synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Exp. Cell Res.*, **58**, 188-191 (1969).
- 24) **Willingham, MC., Johnson, GS. & Pastan, I.** : Control of DNA synthesis and mitosis in 3T3 cells by cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 743-748 (1972).
- 25) **Rosengurt, E., Legg, A., Strang, G. & Courtenay-Luck, N.** : Cyclic AMP-a mitogenic signal for Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **78**, 4392-4396 (1981).
- 26) **Gilles RJ.** : Calcium, calmodulin and cAMP and the control of cellular proliferation. *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 233-235 (1982).
- 27) **Silverstain, GB., Strickland, P., Trumbour, V., Coleman, S. & Darai, CW.** : In vivo, cAMP stimulates growth and morphogenesis of mouse mammary ducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **81**, 4950-4954 (1984).
- 28) **Goridis, C., Massarelli, R., Sensenbrenner, M. & Mandel, P.** : Guanyl cyclase in chick embryo brain cell cultures. Evidence of neuronal localization. *J. Neurochem.*, **23**, 135-138 (1974).

**Growth Promoting Effect of Head Activator in Chick Embryo Brain Cells** Sohei Kajiwara, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 641—652 (1987)

**Key words :** head activator. (Arg<sup>1</sup>, Phe<sup>5</sup>)-head activator, precursor uptake, cyclic nucleotides,  $\gamma$ -aminobutyric acid

#### Abstract

To investigate the regulatory role of head activator (HA) on brain cell growth, I measured serial uptakes of [<sup>3</sup>H]thymidine, [<sup>3</sup>H]uridine and [<sup>3</sup>H]leucine, changes in cyclic nucleotides content,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content and [<sup>3</sup>H]GABA binding in chick embryonal brain cells. In cultured chick embryonal brain cells, HA stimulated all of these uptakes at a concentration of 10<sup>-10</sup> M, while 10<sup>-9</sup> M (Arg<sup>1</sup>, Phe<sup>5</sup>)-head activator (AHA), which is a synthetic analogue of HA, suppressed them. The stimulatory effect of HA on [<sup>3</sup>H]thymidine uptake was observed after 4 h of the treatment, reached a maximum of 200% of the initial value at 8 h and declined to the pretreatment level at 14 h. In contrast, depression of [<sup>3</sup>H]thymidine uptake by AHA was noted at 6 h and continued for 8 h. Prior to the initiation of HA stimulation, cyclic AMP also began to rise, reaching 170% of the pretreatment level at 6 h. Conversely cAMP in AHA-treated cells at 6 h was significantly lower than that in non-treated cells. In vivo, 10<sup>-10</sup> M significantly stimulated the rate of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in 12 day old chick embryonal brain cells after 10<sup>-10</sup> M HA injection to yolk sack of 7 day old chick embryo, reaching 150% of the level of saline treated controls. Cyclic AMP was increased in HA-pretreated chick embryo brain, followed by an increase in the rate of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. HA also increased [<sup>3</sup>H]GABA binding to the synaptosome fraction, reaching over 200% of the level of saline treated controls, and the content of GABA was elevated. These results indicate that 10<sup>-10</sup> M HA stimulates DNA, RNA and protein synthesis in the early stage of growing brain cells in vitro as well as in vivo, in which cAMP may be involved as a regulator of nerve cell growth, and that 10<sup>-10</sup> M HA may promote a maturation of GABAergic neurons in vivo.