

# 鶏胚及び成鶏筋上清中に存在する 細胞増殖促進因子について

岡山大学医学部第一生理学教室（主任：堀泰雄教授）

高 橋 史 生

（昭和55年2月27日受稿）

**Key words:** 鶏胚線維芽細胞, 細胞増殖促進因子.

## 緒 言

細胞分裂の調節機構の解明は生体の発生、分化、生長、老化、あるいは組織再生や癌化等多くの生体制御機構を知る上で極めて重要であり、これまでも数多くの報告がなされている。

一定の環境下にある細胞が分裂したり休止状態を維持するためには制御機構の一員である体液性因子と臓器性因子の関与が必要である。前者についてはインシュリン<sup>1)</sup>、ハイドロコチゾン<sup>2)</sup>、血漿や血小坂からのポリペプチド<sup>3),4)</sup>、成長ホルモン<sup>5)</sup>、顎下腺因子<sup>6)</sup>、Epidermal Growth Factor (EGF)<sup>7)</sup>、Nerve Growth Factor (NGF)<sup>8),9)</sup>、や Fibroblast Growth Factor (FGF)<sup>10),11)</sup>等が報告されている。一方、後者については Szent-Györgyi のプロミンレチン<sup>12)</sup>、Bullough のカローン<sup>13)</sup>、あるいは西田ら<sup>14)</sup>の コルニン等が報告されている。しかしながらこれら臓器由来の因子に関しては主に細胞分裂抑制物質としての検索が主体であり、細胞分裂調節機構の解明にはまだ多くの研究を必要としている。1966年、Coon<sup>15),16)</sup>や Cahn<sup>17)</sup>らは鶏胚抽出物中に細胞増殖及び細胞分化を促進する物質が存在していることを報告しているが、しかし、その物質についての詳しい物性や機能、あるいは精製について今だ暗箱の中にある。

本報告では細胞の分化と臓器性細胞分裂調節因子の相関性について、さらにその因子の物性と作用機作について検索することを目的とし、鶏胚及び同一系統の成鶏筋上清中から種々の方

法により調節因子の抽出を試みた。その結果、各々の上清中には、Serum、インシュリン、ハイドロコチゾン等の補助物質を何ら加えることを必要とせず鶏胚線維芽細胞の増殖を低濃度で非常に強く促進する因子が2つ以上存在していることを確認した。さらにこれら因子の一つは蛋白性成分を有していること、さらにまた分化・発育と促進因子の物性・機能の動態変化についても知見を得たので報告する。

## 材料及び実験方法

### I. 細胞

白色レグホーン(N-101)の10日卵鶏胚からVogt<sup>18)</sup>の方法に従って鶏胚線維芽細胞(CEF)を調製し37℃のCO<sub>2</sub>ガスインキュベーター中で培養した。初代培養には10% Triptose-Phosphate-Broth (TPB, DIFCO)、10%牛血清及び0.5%鶏血清を含む Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, 大五)混合培地を用いた。活性検索には初代培養細胞をトリプシン処理後培養液を休止培養液(RM: 2% TPBのみを含む MEM 混合培地)と交換し活性検索を開始した。RMに交換して48時間後、トリプシン処理して Coulter Counter (Coulter Electronics Inc. USA) で細胞数を計数した。なお、この時の細胞数測定過程における標準偏差は平均値の7.5%以下である。

### II. 細胞増殖促進因子の抽出と分画

N-101の10日卵鶏胚(Em)及び同系の10週令成鶏(M)の大腿筋組織を用いて冷STE溶液(0.25M

Sucrose, 10mM Tris-HCl buffer, pH7.5, 1mM Ethylene-Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)) で洗滌して血液の夾雑を充分除去後, Warring Blender で破碎しテフロンホモゲナイザーでホモゲナイズ後5M KOHでpH7.4に調整した。これを10,000×g, 10分間遠心して核及びミトコンドリア画分を沈澱除去し, さらに105,000×g, 60分間遠心してマイクロゾーム画分を沈澱除去した。鶏胚からの105,000×gの上清(EmS2)と成鶏筋からの105,000×g上清(MS2)を1mM 2-Mercaptoethanol(2-Met)を含む1mM Tris-HCl buffer, pH7.4, (MT溶液)で充分透析後ポリエチレングリコール(#20,000)で濃縮し, 凍結乾燥して保存, あるいは濃縮溶液のまま以下の分画操作に使用した。

#### II-1. 硫安分画

固形硫安を最終濃度が30%になるようにEmS2あるいはMS2にゆっくりと加え60分間攪拌し, 10,000×g, 10分間遠心後の沈澱を30%硫安画分(鶏胚よりのものをEmA30, 成鶏筋よりのものをMA30)とした。さらにその上清に固形硫安を同様な操作で最終濃度が60%になるまで加えて遠心後の沈澱を60%硫安分画(EmA60あるいはMA60)とした。なお, 遠心後得られた上清液はEmSupあるいはMSupとした。これら画分をMT溶液で充分透析後, 凍結乾燥して使用直前に溶解して用いた。

#### II-2. エタノール分画

EmS2あるいはMS2に1mM 2-Metを含む冷エタノール(-15°C)を最終濃度が50%になるまで徐々に攪拌しながら加え60分間静置後, 10,000×g, 10分間遠心して得られた沈澱を50%画分(鶏胚よりのものをEm50, 成鶏筋よりのものをM50)とした。さらにその上清に同上のエタノールを最終濃度が70%になるまで加え10,000×g, 10分間遠心後得られた沈澱を70%画分(Em70あるいはM70)とした。これを充分MT溶液で透析後凍結乾燥して使用直前に溶解して用いた。

#### II-3. 等電沈澱分画

EmS2あるいはMS2に1N Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>をゆっくりと混和しpH4.0に調整し60分間静置後遠心分離して得られた沈澱の鶏胚よりのものをEm-pH4, 成鶏筋よりのものをMpH4とし, その上

清をpH7.0に調整したものをEm7SupあるいはM7Supとした。これらをMT溶液に対して充分透析した後凍結乾燥し, 使用直前に溶解して用いた。

#### III. クロマトグラフィーによる分画

イオン交換クロマトグラフィーにはDEAE-Cellulose カラム(直径2.5cm, 長さ10cm)とCM-Sephadex c-25カラム(直径2.0cm, 長さ15cm)を用いた。前者のカラムの場合, 凍結乾燥していたEm70及びM70を0.5mM 2-Metを含む10mM Tris-HCl buffer, pH7.8, (M2T溶液)に溶解しホモゲナイズ後10,000×g, 10分間遠心して不溶性成分を除去し, 同上溶液で平衡化したカラムに各試料を吸着させた。充分量のM2T溶液で非結合画分を流出させEmFr.1あるいはMFr.1とした。さらに0.1M NaClを添加したM2T溶液で溶出してきた画分をEmFr.2あるいはMFr.2とした。さらに1.0M NaClを前段階の溶液に加えて溶出してきた画分をEmFr.3あるいはMFr.3とした。各画分はMT溶液で充分透析後, 濃縮, 凍結乾燥して保存し実験に供した。

CM-Sephadex c-25によるクロマトグラフィーは凍結乾燥したEmS2を5mM 2-Metを含む10mM Phosphate buffer, pH6.0, に溶解してホモゲナイズ後10,000×g, 10分間遠心して不溶性成分を除去し, 同上溶液で平衡化したカラムに試料を吸着させた。この時溶出してきた非結合画分をCM-I画分とした。次に1.0M NaClを添加した5mM 2-Met, 0.2M Phosphate buffer, pH7.9, で溶出してきた結合画分をCM-II画分とした。

CM-I及びCM-II画分を共に5mM 2-Metを含む多量の1mM Tris-HCl buffer, pH7.8, (M3T溶液)で充分透析後濃縮して凍結乾燥した。さらにCM-I及びCM-II各画分をクロマト的に精製する時にはSephadex G-200カラム(直径2.6cm, 長さ40cm)を使用してM2T溶液で溶出させた。溶出した各画分(I-P-1, I-P-2, I-P-3, I-P-4及びII-P-1, II-P-2, II-P-3, II-P-4)はM3T溶液で充分透析後濃縮, 凍結乾燥して保存して実験に供した。以上の操作はDEAE-Cellulose分画とCM-II分画の場合(室温)を除きすべて0~4°C下で行なった。

IV. 各試料の使用法と促進率

各凍結乾燥試料を Phosphate Buffered Saline [PBS(-)]に溶解しホモゲナイズ後、10,000 × g, 10分間遠心して得られた上清をミリポアフィルター(タイプHA, Millipore Corp.)で濾過滅菌して使用した。

各蛋白濃度はBSAを標準としてLowry法<sup>19)</sup>により測定した。各試料の検定には3枚の同一プラスチックシャーレ(直径3.0cm)を用いて検索し細胞数の平均値を出して促進率の計算に用いた。促進率は休止培養系(RM)の細胞数を100%とする次式により算出した。

$$\text{促進率(\%)} = (\text{実験群の細胞数}) / (\text{RM中の細胞数}) \times 100$$

V. 核酸・蛋白質各合成の測定

直径6cmのプラスチックシャーレに休止培養液RMを満した上にCEFを植込み48時間後に試料添加培養液と交換した<sup>20)</sup>。さらに16時間後に一定量の<sup>3</sup>H-Thymidine<sup>21)</sup>, <sup>3</sup>H-Uridine<sup>21)</sup>, あるいは、<sup>14</sup>C-Leucine<sup>22)</sup>を加え各々2時間ラベルし細胞の不溶画分に取りこまれたそれぞれの放射活性をScintillation Counter (Packard, Model 3320)で測定した<sup>23)</sup>。なお、一試料の値は3枚のシャーレから得た値の平均を求めて表示した。

VI. Polyacrylamide gel 電気泳動

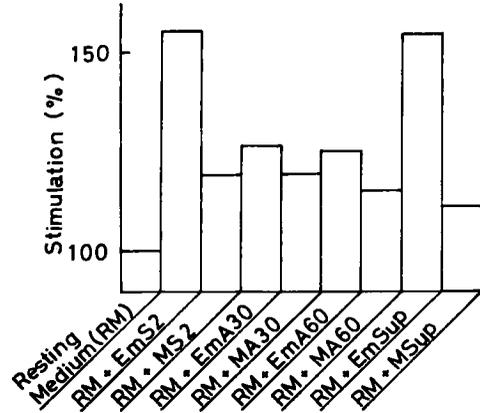
Davis<sup>24)</sup>の原法に基づいてgelを作製し一カラム当り2mAで泳動した。0.1%SDSを含むPolyacrylamide gel電気泳動法はWeberら<sup>25)</sup>の方法に従って行った。どちらのgelも0.25% Coomassie Brilliant Blue, 50% Methanol, 9% Acetic Acid混液で固定、染色した。脱色はMethanol, Acetic Acid混液で行ない、最終的には7.5% Acetic Acid中に保存した。

結 果

I. 硫酸, エタノール及び等電沈澱各分画法に

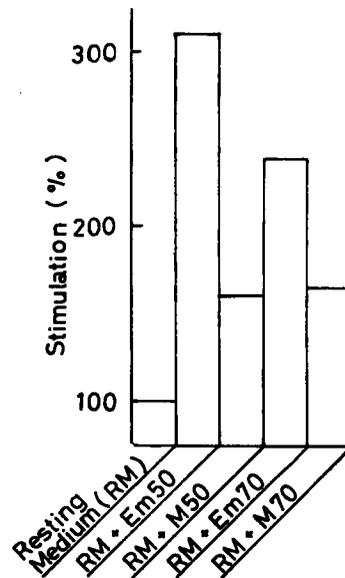
より得られた各画分中の細胞増殖促進効果硫酸分画法によるといづれの画分にも細胞増殖促進効果が認められ、特に鶏胚(Em)系ではEmSup画分により強い促進効果が認められた(図1)。つぎにエタノール分画法によると硫酸分画法に比して各画分ともより強い細胞増殖促

Fig. 1 Growth Promoting Effects of Embryonic and Muscular Fractions obtained by Ammonium Sulfate Fractionation



Assay procedure and calculation formula were described in Materials and Methods. The concentration of samples used was 50µg/ml, and the 100% in resting cell system indicated 5.2 × 10<sup>4</sup> cells per plate.

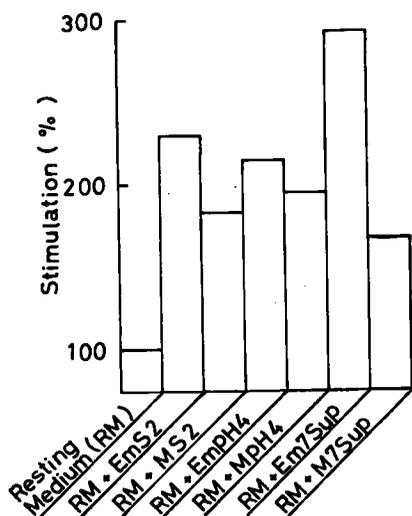
Fig. 2 Growth Promoting Effects of Embryonic and Muscular Fractions obtained by Ethanol Fractionation



Assay procedure and calculation formula were described in Materials and Methods. The concentration of samples used was 50µg/ml, and the 100% in resting cell system indicated 8.8 × 10<sup>4</sup> cells per plate.

進効果が認められたが Em 系では Em50 画分により強い効果が、M 系では M50, M70 ともにほとんど同等の促進効果が検出された(図 2)。また等電沈澱分画法によると Em 系では細胞増殖を促進する効果がいずれの画分にも検出されたが、EmpH4 に比べて Em7Sup の方により強い促進効果がみとめられた。また M 系では M7Sup よりも MpH4 の方により強い促進効果が認められた(図 3)。

Fig. 3 Growth Promoting Effects of Embryonic and Muscular Fractions obtained by Isoelectric Precipitation



Assay procedure and calculation formula were described in Materials and Methods. The concentration of samples used was  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , and the 100% in resting cell system indicated  $3.75 \times 10^4$  cells per plate.

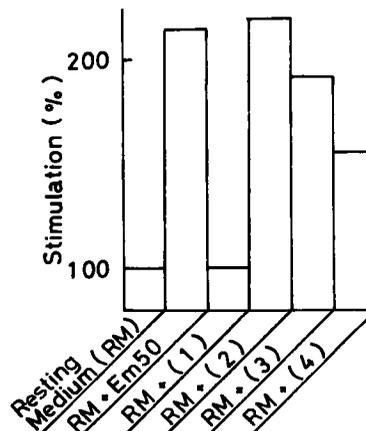
以上のようにそれぞれ異った分画方法を行なった結果は活性の強弱に差はあるものの Em 系、M 系をとわず CEF の細胞増殖促進効果を示す因子が各画分に認められた。このことは二つあるいはそれ以上の促進因子群が各系に存在していることを示している。なお、これら各分画法において Em 系と M 系の細胞増殖促進効果を比較した場合、明らかに Em 系の方が M 系よりもより強い促進効果を示しており、鶏胚から成鶏へと発生、分化、成長する過程において細胞増殖促進因子群の質的変換が起っていることを強く

示唆している。

## II. 細胞増殖促進因子群の物性

エタノール分画法によって得られた Em50 をトリプシンで処理(試料量:トリプシン量=50:1)すると  $37^\circ\text{C}$ , 1 分間で完全に失活した(図 4)。つぎに Em50 を  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間 RNase 処理

Fig. 4 Loss of Growth Promoting Activity of Em50 treated with Trypsin, RNase, NEM, and Heat



Assay procedure and calculation formula were described in Materials and Methods, and the amount of samples used after treatment was  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ . The 100% in resting cell system indicated  $1.87 \times 10^4$  cells per one plate.

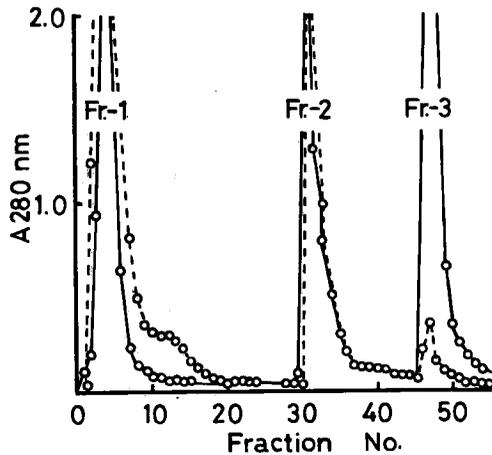
Em50 ( $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was treated by  $10\mu\text{g}$  of trypsin [RM+(1)],  $25\mu\text{g}$  of RNase [RM+(2)],  $25\mu\text{M}$  of NEM [RM+(3)] per ml system for 2 h at  $37^\circ$ , and treated by heat at  $100^\circ$  for 60 sec [RM+(4)], respectively.

(試料量:RNase 量=25:1)してもその活性はなんらの影響をうけなかった(図 4)。一方 N-ethylmaleimide (NEM) (試料量:NEM 量=25:1)により  $37^\circ\text{C}$ , 2 時間 Em50 を処理すると約 20% 失活した(図 4)。さらに  $100^\circ\text{C}$  で 1 分間加熱処理すると約 60% が失活した(図 4)。これらの結果は本報で使用している細胞増殖促進因子群の一つが蛋白性物質を主体として構成されていることを示している。

## III. 細胞増殖促進因子の部分精製

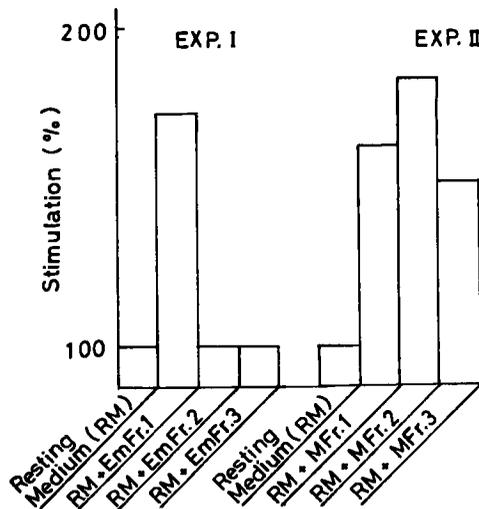
DEAE-Cellulose クロマトグラフィーによりエタノール分画法で得られた Em70 と M70 を用い

Fig. 5 Step-wise Fraction of Em70 and M70 Ethanol Fraction by DEAE-cellulose Chromatography



The solid line(—) indicates the elution pattern of Em70 fraction, and the dotted line(---) indicates that of M70 fraction. Fractionation procedure and nomenclature were described in Materials and Methods.

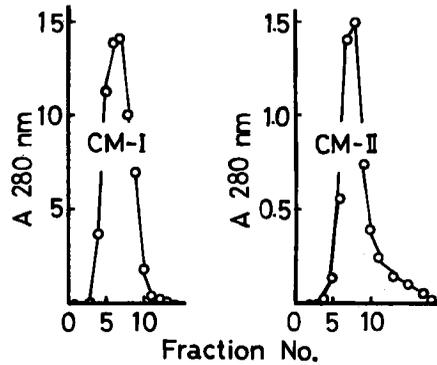
Fig. 6 Growth Promoting Effects of Em70 and M70 Fractions fractionated by DEAE-cellulose Chromatography



Assay procedure and calculation formula were described in Materials and Methods. The concentration of samples used was  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ , except for  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  in M Fr. 3 system. The 100% in resting cell system of Exp. I was  $6.0 \times 10^4$  cells per plate and Exp. II was  $5.3 \times 10^4$  cells per one plate and Exp. II was  $5.3 \times 10^4$  cells per plate. DEAE-cellulose chromatography was described in Materials and Methods, and the fractionated names were also described in the same section.

て細胞増殖促進因子群の部分精製を行った結果(図5), Em及びM系共に DEAE-Cellulose カラムに結合しない画分(EmFr.1およびMFr.1)に強い活性が認められた(図6). さらに DEAE-Cellulose とはイオンチャージが反対の CM-Sephadex c-25 による因子群の精製を行なった. なお, クロマトグラフィー的に各因子の分離・精製することを目的としたため使用した試料は EmS2 のみであった. CM-Sephadex c-25 と結合しないで溶出してきた画分 CM-I と CM-Sephadex c-25 に結合していた CM-II 画分の溶出曲線を図7に示した.

Fig. 7 Elution Pattern of EmS2 by CM-Sephadex c-25 Chromatography



Fractionation procedure and nomenclature were described in Materials and Methods.

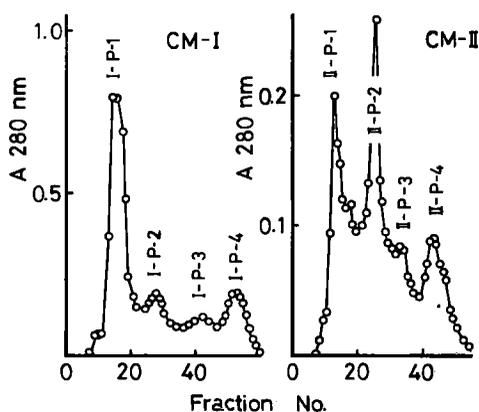
さらに, これら画分中に含まれている細胞増殖促進因子を精製する目的で Sephadex G-200 カラムにより CM-I 及び CM-II 画分を各々分画した. その時の溶出曲線を図8に示した.

Sephadex G-200 クロマトグラフィーで溶出してきた4つの主ピークを M3T 溶液で充分透析後, ポリエチレングリコール(#20,000)で濃縮して実験に供した.

CM-I 及び CM-II, さらに Sephadex G-200 クロマトで分画した各ピークの細胞増殖促進効果を検索したのが表1である.

DEAE-Cellulose カラムによる分画法の場合とことなり CM-Sephadex c-25 カラムでは結合画分である CM-II 画分により強い細胞増殖促進効果を認めた. この CM-II 画分をさらに Sephadex

Fig. 8 Elution Pattern of Sephadex G-200 Chromatography of CM-I and CM-II



CM-I and CM-II were obtained by CM-Sephadex c-25 chromatography (see Fig. 2). The procedure is described in Materials and Methods.

Table 1. Fractionated Activity of EmS2 by CM-Sephadex c-25 and Sephadex G-200 Chromatography

Systems	Stimulation in Percent <sup>a</sup>
Resting Medium (RM)	100
RM+EmS2 <sup>b</sup>	174
RM+CM-I	165
RM+CM-II	193
RM+CM-I-G-200-P-1	247
RM+CM-I-G-200-P-2	no stim.
RM+CM-I-G-200-P-3	no stim.
RM+CM-I-G-200-P-4	214
RM+CM-II-G-200-P-1	260
RM+CM-II-G-200-P-2	252
RM+CM-II-G-200-P-3	206
RM+CM-II-G-200-P-4	229

- a. Assay procedure and calculation formula were described in Materials and Methods, and the amount of samples used after elution was  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . The 100% in the resting cell system was  $8.2 \times 10^4$  cells per plate.
- b. Fractionation procedure and nomenclature were described in Materials and Methods and in Fig. 7 or Fig. 8.

G-200 カラムで精製するとピーク 1 (II-p-1) とピーク 2 (II-p-2) 画分により強い活性成分が検出された(表 1)。

#### IV. 核酸・蛋白質合成に及ぼす効果

一定時間休止状態で培養した CEF の培養液を CM-II, II-P-1 あるいは II-P-2 (図 8 参照) を含む休止培養液 (RM) に置換し, 前述 (方法の項参照) の方法で放射活性前駆物質の各ポリマーへの取り込みに対する効果を検索し, その DNA, RNA, 蛋白質各合成に対する促進効果を表 2 に示した。

Table 2. Effect of Sephadex G-200 Fraction on DNA, RNA, and Protein Synthesis

Systems	Stimulation in Percent <sup>a</sup>		
	DNA <sup>c</sup>	RNA <sup>c</sup>	Protein <sup>c</sup>
Resting Medium (RM)	100	100	100
RM+CM-II <sup>b</sup>	206	109	127
RM+CM-II-G-200-P-1	293	170	139
RM+CM-II-G-200-P-2	259	194	114

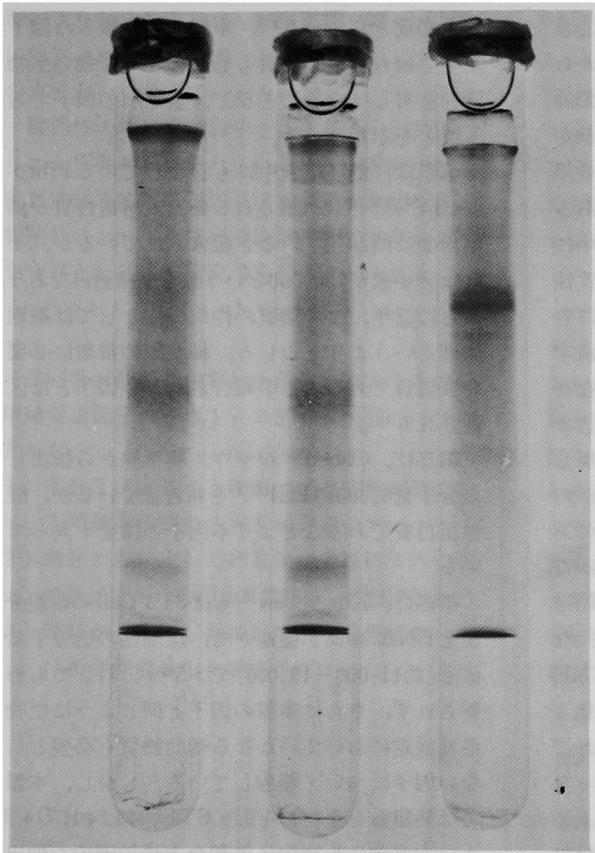
- a. Stimulation percent was calculated by the next formula.  $\{(\text{c. p. m. in sample})/(\text{c. p. m. in resting cells})\} \times 100$ .
- b. Fractionation procedure and nomenclature were described in Materials and Methods and in Fig. 8.
- c. Secondary cultured cells were seeded in the resting medium (RM), and after 48h the RM was replaced with the sample contained medium to turn-on the resting cells<sup>20)</sup>, and after 16h radioactive precursors were added for 2h. The assay of DNA was performed by the method of Schaefer<sup>21)</sup> with  $^3\text{H}$ -thymidine and the assay of RNA and protein synthesis was performed by the method of Rudland<sup>22)</sup> with  $^3\text{H}$ -Uridine, and  $^{14}\text{C}$ -Leucine, respectively. Radioactivity was counted by the method of Kobayashi et. al.<sup>23)</sup>. The concentration of samples used was each  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ , and 100% control indicated 2881 c. p. m./plate in protein synthesis, 641 c. p. m./plate in DNA synthesis, 1026 c. p. m./plate in RNA synthesis, respectively.

II-P-1 あるいは II-P-2 は共に DNA 合成に対して促進効果を示し, ついで RNA, 蛋白質の順に促進効果を示した。

#### V. Polyacrylamide gel 電気泳動法

写真 1 は EmS2, CM-I 及び CM-II (図 8 参照) を Polyacrylamide gel 電気泳動法により得られたパターンである。写真 2 は CM-II 及び II-P-2 を 0.1% SDS を含む Polyacrylamide gel 電気泳動法で検索したパターンである。CM-

Photo. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis  
(-)



(+)

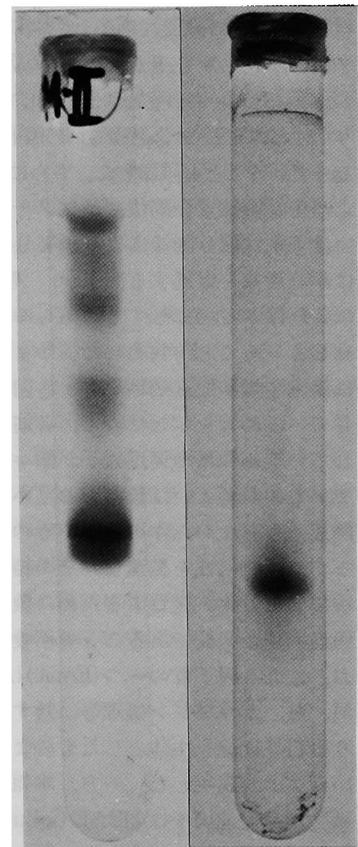
left gel: EmS2, middle gel: CM-I, right gel: CM-II  
Polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis was performed by the method of Davis<sup>24)</sup>. The samples (100  $\mu$ g) were charged on one gel column.

II画分において量的には低分子量側のバンドが多く検出され、この低分子側のバンドが細胞増殖促進効果を表わす因子の一つである可能性が示された。さらに分離・精製して得られたII-P-2画分の構成成分はほとんど低分子側の物質として検出された。

#### 考 察

細胞が静止期(G<sub>0</sub>期又はG<sub>1</sub>期)から増殖状態さらに細胞分裂とサイクルをくり返すためには、適当な環境(pH, 栄養, 呼吸, 湿度, 温度等)以外に細胞増殖促進因子が必要であることはよく

Photo. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
(-)



(+)

left gel: CM-II, right gel: CM-II-G-200-P-2  
SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis was performed by the method of Weber et. al<sup>25)</sup>. The samples (50  $\mu$ g) were charged on one gel column.

知られた事実である。中でも Serumは最もよい増殖調節作用を有しているため細胞培養系における必須成分の一つとして取り扱われている。しかしながら、Serumを用いて細胞増殖調節機構を解明するためには主に以下の2点において非常に大きな困難性を有しているためSerumに代用できる簡略な細胞増殖調節因子の発見とその作用機構の解明が急がれている<sup>26)</sup>。

一つはSerumのもつ構成成分の複雑性である。もう一つはSerum中に存在している活性成分の抽出・濃縮の量的困難性である。

本報では鶏胚から成鶏へと分化、発育していく筋組織上清中にSerum以外の鶏胚線維芽細胞増殖促進因子(臓器性因子)が存在していることを報告した。しかも、鶏胚から抽出した因子は成鶏からの因子に比べて高い生物活性を有しており、予想通り中胚葉の発生・分化過程でこの因子の質的変換が起っていることも確認した。さらに、これら各筋上清中から硫酸分画法、エタノール分画法あるいは等電沈澱分画法により調製した各画分中には細胞増殖を促進する因子が、その生物活性に強弱はあるのにしても、あらゆる画分中に存在していることが判明した。つまり各筋上清中には細胞増殖促進効果を有する因子が複数存在していることを示している。各筋上清中に含まれている細胞増殖促進因子が個々別々に作用しているのかあるいは数種がお互いになんらかの関連をもちながら作用しているのかは不明であるが、生物活性を発現し、その結果、鶏胚から成鶏へと分化、発育するために数種の細胞増殖促進因子が必要であることを示唆している。なお、これら因子群の一つ(Em50)はRNase, NE-M, 熱, トリプシン処理等に対する物性変化より蛋白性成分を主体としたものより構成されていることが判明した。一方、本報で取り扱った細胞増殖促進因子はDEAE-Celluloseカラムでは非結合画分に、CM-Sephadexカラムでは結合画分により強い生物活性を有する因子が抽出されたことにより、かなり塩基性の成分であることが示唆される。この塩基性成分をさらにクロマト法により部分精製した所、細胞の特にDNA合成を促進させる効果を有する低分子量(約1万~2万)成分の存在が電気泳動法より示された。

本報で抽出に成功した細胞増殖促進因子は以下に述べるようにこれまで報告されていたpositiveな成長因子<sup>26)</sup>とは全く異った新しいものである。

まず第一に、本報では因子の抽出操作中に2-Metを含有されて行なったにもかかわらず強い生物活性を保持していることにより2-Metにより失活を示すSerumから取り出された成長因子とは性質を全く異にしている。牛脳下垂体その他の臓器より分離されている分子量13,400のFGFは線維芽細胞の増殖を促進するがしかしその

ためには低濃度のSerumとさらにヒドロコルチゾンとかインシュリンのような補助物質の存在を必要としており<sup>27)</sup>、本報で取り扱った因子が全く何らの補助物質も必要とせず強い生物活性を有していることなど、全く別の因子であることを示している。

第二に、鶏胚細胞中にも存在しているFibronectin<sup>28),29),30)</sup>に代表される細胞表層蛋白質が細胞増殖に関与していると報告されているが、それは分子量が220,000という大きな糖蛋白であり、さらに近年、この物質の作用機作としては細胞増殖というよりもむしろ、細胞間の接着に必要な蛋白質であることが報告され、本因子とは区別される<sup>28)</sup>。

第三に、Cohen<sup>31)</sup>がマウス顎下腺から抽出した分子量6,000のEGF<sup>6),7)</sup>を報告しているが、酸性蛋白質であることより本因子とは全く異っている。

第四に、Klagsbrun<sup>32)</sup>らは3T3 Cellの細胞分裂とDNA合成を促進させ、塩基性の低分子量成分(約11,000~13,000)で2-Metに対しても影響されず、さらに本報の因子と同じように生物活性検定においていかなる補助物質も必要としない因子について報告している。しかし、本報では筋組織を原材料とし、STE溶液、pH7.4、という非常に生理的に温和な方法で因子を抽出したが、上記因子は牛の肩軟骨を原材料とし、IM塩酸グアニジンと0.02M 2(N-Morpholino) Ethane Sulfonic Acid、pH6.0、混液で25℃、24時間処理した後、さらに有機溶媒処理して抽出されてくるポリペプチド生長因子であることにより本因子とは異質のものである可能性が強い。

第五に、細胞増殖促進因子として血液にあるPlasmaやPlatelet由来の因子<sup>3),4)</sup>が報告されているが、これらの生物活性発現にはFGFを必要としている。さらにこの成長因子は低分子量で塩基性のポリペプチドであるが、熱に対して安定であることより本因子とは異っている。

本報での因子が細胞表面で作用機作を発揮しているのか、あるいは直接細胞内に侵入してDNA合成のtriggerとなっているのかはオートラジオグラフィによる形態学的検索、cyclic Nucleotide<sup>33)</sup>あるいはOrnithine Decarboxylase<sup>34)</sup>の

ような細胞内濃度や活性変動の検討を加えなければならぬが、少なくとも鶏胚及び成鶏筋上清中より抽出した細胞増殖促進因子はこれまでに報告された種々の因子とは上述のように多くの点において異っているものである。

臓器性の増殖抑制因子としてカローン<sup>13)</sup>やコルニン<sup>14)</sup>等が報告されているが、本報における臓器性細胞増殖促進因子は前述の抑制因子との相関性において細胞増殖調節機構の解明に重要な一員として今後役立つものと考えられる。

### 結 語

鶏胚及び同系の成鶏筋上清中に存在する細胞増殖促進因子の物性とその部分精製について研究した。

- 1) 鶏胚及び成鶏筋上清中には鶏胚線維芽細胞を増殖さす複数の因子が存在していた。
- 2) 鶏胚から抽出した細胞増殖促進因子の生物活性は成鶏のものより数倍高い活性を示した。
- 3) 鶏胚から抽出した細胞増殖促進因子の一つは蛋白性成分より構成されていた。

4) 部分精製した因子の一つは塩基性の低分子量成分で構成されていた。

5) この因子は細胞のDNA合成に対して最も強い促進効果を示した。

以上述べたことより、鶏胚から成鶏へと分化・成長の過程で細胞増殖促進因子の質的変換が行なわれていること、また、そのような因子は筋組織中に単一成分としてではなく数種のものが存在していることが示された。

稿を終るに当り、御指導、御校閲下された堀泰雄教授、香川医科大学副学長西田勇教授に深く感謝すると共に、終始、御指導、御鞭撻下された畠瀬修講師から多くの貴重な示唆や御教示を頂いたことを深謝します。また、種々の御忠告、御助力を頂いた第一生理学教室員各位に感謝します。最後に本研究が出来る機会と御理解を与えて下さった山陽学園短期大学上代皓三学長に感謝します。

本論の要旨は第47回日本生化学会大会、第35回日本癌学会総会及び第36回日本癌学会総会において発表した。

### 文 献

1. Gospodarowicz, D. and Moran, J.: Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblast growth factor, dexamethasone, and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 4584—4588, 1974.
2. Rudland, P. S. and Gospodarowicz, D.: Growth control in cultured mouse fibroblasts: Induction of the pleiotypic and mitogenic responses by a purified growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 2600—2604, 1974.
3. Gospodarowicz, D., Greene, G. and Moran, J.: Fibroblast growth factor can substitute for platelet factor to sustain the growth of BALB/3T3 cells in the presence of plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 779—787, 1975.
4. Vogel, A., Raines, E., Kariya, E., Rivest, M. J., and Ross, R.: Coordinate control of 3T3 cell proliferation by platelet-derived growth factor and plasma components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2810—2814, 1978.
5. Paschkis, K. E.: Growth-promoting factors in tissues. *Cancer Res.* 18, 981—991, 1958.
6. Moore, J. B.: Purification and partial characterization of epidermal growth factor isolated from male rat submaxillary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 1—7, 1978.
7. Vlodavsky, I., Brown, K. D., and Gospodarowicz, D.: A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells. *J. Biol. Chem.* 253, 3744—3750, 1978.
8. Berger, E. A., and Shooter, E. M.: Biosynthesis of  $\beta$  nerve growth factor in mouse submaxillary glands. *J. Biol. Chem.* 253, 804—810, 1978.

9. Suda, K., Barde, Y. A., and Thoenen, H.: Nerve growth factor in mouse and rat serum: Correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4042—4046, 1978.
10. Holley, R. W. Seifert, W., and Kiernan, J.A.: Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: Serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 2908—2911, 1974.
11. Gospodarowicz, D., Bialecki, H. and Greenburg, G.: Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **253**, 3736—3743, 1978.
12. Szent-Györgyi, A.: Studies on growth. *Curr. Ther. Res.* **14**, 1—32, 1965.
13. Bullough, W. S. and Laurence, E. B.: Epidermal chalone and mitotic control in the VX<sub>2</sub> epidermal tumor. *Nature* **220**, 134—139, 1968.
14. Nisida, I. and Murakami, T. H.: Antimitotic action of cornin as a biologically active polypeptide. I. Biological properties of cornin. *Acta Med. Okayama* **19**, 1—9, 1965.
15. Coon, H. G.: Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**, 66—73, 1966.
16. Coon, H. G. and Cahn, R. D.: Differentiation *in vitro*. Effect of sephadex fractionations of chick embryo extract. *Science* **153**, 1116—1119, 1966.
17. Cahn, R. D. and Cahn, M. B.: Heritability of cellular differentiation: Clonal growth and expression of differentiation in retinal pigment cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 106—114, 1966.
18. Vogt, P. K.: Focus assay of rouse sarcoma virus. In *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel, and N. P. Salzman, Academic Press, New York, pp. 198—211, 1969.
19. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall. R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**, 265—275, 1951.
20. Rubin, H.: Chick embryo cells. In *Tissue Culture*, ed. P. F. Kruse, and Patterson, M. K. Academic Press, New York and London. pp. 119—122, 1973.
21. Schaefer, K.: The RNA synthesizing capacity of nuclei isolated from cultured mouse cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 219—226, 1976.
22. Rudland, P. S.: Control of translation in culture cells; Continued synthesis and accumulation of messenger RNA in nondividing cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 750—754, 1974.
23. Kobayashi, Y. and Maudsley, D. V.: Practical aspects of liquid scintillation counting. *Methods Biochem. Anal.* **17**, 55—133, 1969.
24. Davis, B. J.: Disc electrophoresis II, Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404—427, 1964.
25. Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406—4412, 1969.
26. Rudland, P. S. and Jimeney, D. A. L.: Action of growth factors in the cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta* **560**, 91—133, 1979.
27. Gospodarowicz, D.: Location of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* **249**, 123—127, 1974.
28. Millis, A. J. T. and Hoyle, M.: Fibroblast-conditioned medium contains cell surface proteins required for cell attachment and spreading. *Nature* **271**, 668—669, 1978.
29. Yamada, K. K. and Olden, K.: Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, **275**, 179—184, 1978.
30. Alexander, S. S., Colonna, G., Yamada, K. M., Pastan, I. and Edelhoach, H.: Molecular properties of a

- major cell surface protein from chick embryo fibroblats. *J. Biol. Chem.* **253**, 5820—5824, 1978.
31. Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555—1562, 1962.
  32. Klagsbrun, M., Langer, R., Levenson, R., Smith, S. and Lillehei, C.: The stimulation of DNA synthesis and cell division in chondrocytes and 3T3 cells by a growth factor isolated from cartilage. *Exp. Cell Res.* **105**, 99—108, 1977.
  33. Moriyama, Y., Hasegawa, S. and Murayama, K.: cAMP and cGMP changes associated with the differentiation of cultured chick embryo muscle cells. *Exp. Cell Res.* **101**, 159—163, 1976.
  34. Heller, J. S., Fong, W. F. and Canellakine, E.S.: Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1858—1862, 1976.

**Cell proliferation stimulating factors in the supernatant of embryos  
and adult muscles of chickens**

**Fumio TAKAHASHI**

The 1st Department of Physiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Y. Hori)

Factors stimulating cell proliferation were extracted from the supernatant of chick embryo carcasses and adult chicken leg muscles of the same strain.

Partial purification was done, and the mechanism of stimulation (without supplements) and physicochemical properties were studied.

- 1). There were at least two or more stimulating factors for cell proliferation of chick embryo fibroblasts in the supernatant of embryo carcasses and adult leg muscles of chickens.
- 2). The embryonic stimulating factors were several times more active than the muscular ones.
- 3). One of these stimulants was basic and had a low molecular weight protein-like component.
- 4). One of the partially purified stimulants showed its strongest activity on DNA synthesis in a chick embryo fibroblast system.