

## ヒト胎盤絨毛組織中の生長促進物質の精製

中村 一江, 家本 敦子\*

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 \*現兵庫医科大学遺伝学教室)

### Purification of cell growth stimulation peptide from human placental chorionic tissue

Kazue Nakamura and Atsuko Iemoto\*

*Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,*

*Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663, Japan*

*\*Department of Genetics, Hyogo College of Medicine,  
Nishinomiya, Hyogo 663, Japan*

The purification of cell growth stimulation peptide from human placental chorionic tissue that controls the division of a normal human skin fibroblast (NLF) and several human cell lines maintained in tissue culture is reported. This cell growth stimulation peptide is about 15kDa by polyacrylamide gel electrophoresis and gel chromatography. The yield of cell growth stimulation peptide is 1.2mg per 100g of human placental chorionic tissue. Growth stimulating activity of DNA synthesis in NLF cells at concentration of 0.5 $\mu$ g/ml is equal to activity of 10% FBS.

#### はじめに

ヒト胎盤絨毛組織に関して、我々はその抽出液中のアミノ化合物の分析を行ってきた<sup>1)2)</sup>。細胞の生存、増殖などに関与する因子の研究は、1939年脳抽出液中のマイトジェン活性の発見<sup>3)</sup>以来、1960年代末から1970年代にかけて脳下垂体、ついで脳から3T3細胞に対する分裂促進活性のあるポリペプチドが見いだされ、FGF(fibroblast growth factor:線維芽細胞増殖因子)と命づけられた<sup>4)5)6)</sup>。また、その後ECGF(endothelial cell growth factor:血管内皮細胞増殖因子)<sup>7)8)</sup>など、多くのペプチド性増殖因子が見いだされている。しかし、ヒト胎盤絨毛組織中の線維芽細胞増殖因子についての報告は見られず、今回、胎盤絨毛組織中に存在する可溶性成分の精製と種々のヒト細胞に対する生長促進効果の検討を行った。

#### 材料と方法

##### 1. 材料

兵庫医科大学産婦人科において正常分娩により得られた胎盤を、脱血後、絨毛組織のみを採取し、これを実験材料として用いた。

##### 2. 硫酸分画

ヒト胎盤1体から平均170gの絨毛組織が得られ、これに2倍量の0.15M硫酸アンモニウムを加えてホモジナイズし、13,000 $\times$ g、20分間遠心分離後、上清を塩酸でpH4.5に調整して23,000 $\times$ g、45分間遠心分離を行った。得られた上清を1N水酸化ナトリウムでpH7.0に調整した後、終濃度が2.5Mになるように330g/lの硫酸アンモニウムを添加、23,000 $\times$ g、20分間遠心分離を行い2.5M硫酸分画部の沈殿を得た。上清には130g/

1の硫酸アンモニウムを添加, 遠心分離して3.5M 硫酸分画部を得, さらに, この上清に130 g/lの硫酸アンモニウムを添加して4.5M 硫酸分画部を得た. 各硫酸分画部は冷水に対して透析を行った後凍結乾燥をした(Fig.1.).

### 3. カラムクロマトグラフィー

CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィー: 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で調整したカラム(2.5×60cm)を用い, 0.1から0.5Mの塩化ナトリウムを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で段階的に溶離した. 流速は20ml/時間, 4℃で行った.

CM-Cellulose CM52 クロマトグラフィー: 0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.5)で調整したカラム(2×20cm)を用い, 0.01から0.1Mの炭酸アンモニウムで段階的に溶離した. 流速は40ml/時間, 4℃で行った.

Q-Sepharose クロマトグラフィー: 0.02M トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で調整したカラム(1.8×18cm)を用い, 0.02M トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)中の塩化ナトリウムの濃度を0.5Mにまでリニアグラジエント, 流速40ml/時間, 4℃で溶離した.

Mono Q: ファルマシア FPLC の Mono Q HR 5/5 カラムを用い, 溶媒 A: 0.02M トリス-塩酸緩衝液(pH7.5), 溶媒 B: 溶媒 A + 0.5M 塩化ナトリウム, 流速1ml/分で行った.

Superose 12: ファルマシア FPLC, Superose 12 HR 10/13 カラムを用い, 0.1M 炭酸水素アンモニウム, 流速1ml/分で行った.

HPLC: COSMOSIL-5C<sub>18</sub>-AR-300 を用い, 移動相 A: 0.05% トリフルオロ酢酸/2% アセトニトリル, 移動相 B: 0.05% トリフルオロ酢酸/70% アセトニトリル, A100%→B100% 30分間直線グラジエント, 流速1ml/分で行った.

### 4. 電気泳動

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は, 15% ポリアクリルアミドゲル ATTO パジェル低分子量用(SPU-15S) 20mA 120分間泳動および5~20% ATTO パジェル(SPG-520L) 20mA 70分間泳動を行い, クマシーブリリアントブルーで染色した. 分子量マーカーはファルマシアの電気泳動用カリプレイションキットを使用した.

### 5. アミノ酸分析

試料を6N 塩酸で封管, 110℃, 24時間加水分解した後, 日立835型アミノ酸アナライザーで分析を行った.

### 6. 細胞増殖, DNA 合成

細胞: 線維芽細胞 NLF は, 正常なヒトの皮膚から初代培養した. ヒト乳がん細胞株 MDA-MB453, MCF7, ヒト膀胱がん細胞株 J82, HTB9, ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa は ATCC (American Type Culture Collection) から得た.

細胞培養: NLF は MEM (Gibco-BRL) に牛胎児血清 (FBS, HyClone) を 10% 加えて培養した. MDA-MB453, MCF7, J82, HTB9 は RPMI (Gibco-BRL) に FBS を 10% 加えて培養した. HeLa は MEM に 5% FBS を加えて培養した. 以下の実験には対数増殖期の細胞を用いた.

細胞増殖: NLF 細胞  $1 \times 10^5$  個を 10% FBS を含む MEM で 60mm プラスチックデイツシュに播き, 24時間培養, 0.5% FBS を含む MEM に置き換えて2日間培養, これに各種濃度の試料を加え, 3日ないし4日培養, 細胞数を数えた.

DNA 合成: NLF 細胞  $3 \times 10^4$  個を 10% FBS を含む MEM で 30mm プラスチックデイツシュに播いた. 24時間培養後, PBS(-) に対して透析した FBS を 0.5% 加えた MEM 1ml に置き換えて2日間培養した. これに各種濃度の試料を添加し, 21時間培養後, [<sup>3</sup>H]-Thymidine (Amersham) (10 $\mu$ Ci/ml) 50 $\mu$ l を添加, 3時間培養した. ついで MEM で2回リンスした後, 非透析の FBS を 10% 加えた MEM で3時間培養した. その後, PBS(-) で洗浄, 細胞をトリプシン-EDTA 溶液ではがし, FBS を含む MEM にけん濁させ, Whatman GF/C フィルター上に吸引して集め, 5% トリクロロ酢酸で固定, 100% メタノールで乾燥した. これを Liquid Scintillation Spectrophotometer 2450 (Packard) で測定した(Fig.2.). なお, FBS を 10% に添加した場合の測定値を1単位とした.

## 結果および考察

### 1. 抽出および精製

硫酸分画法により得られた各分画部の収量は絨毛組織 100 g あたり 2.5M 分画部 410mg, 3.5M 分画部 170mg, 4.5M 分画部 60mg であった. 各分画部について, それぞれ 50 $\mu$ g/ml の濃度で DNA 合成

の活性を測定すると、2.5 および 4.5M 分画部には活性は認められず、3.5M 硫安分画部に活性が認められるので、この 3.5M 硫安分画部を以下の実験に用いた。

3.5M 硫安分画部を 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) で平衡化した CM-Sephadex C-50 カラムに吸着させ、同緩衝液の塩化ナトリウム濃度を 0, 0.1, 0.5, 1.0M とステップワイズにあげて溶出し、各フラクションについて 50 $\mu$ g/ml の濃度で DNA 合成の活性を測定すると、Fig.3.(A) に示したように 0.5M 塩化ナトリウム溶出フラクションに活性が認められた。次いで、この 0.5M 塩化ナトリウム溶出フラクションを CM-Cellulose CM52 カラムに吸着させ、炭酸アンモニウム濃度を 0.01, 0.1M とステップワイズにあげ、溶出した各フラクションを 50 $\mu$ g/ml 濃度で DNA 合成の活性を測定すると、Fig.3.(B) に示したように 0.01M の溶出フラクションに活性が認められ、このフラクションをさらに Q-Sepharose カラムを用いて分画し、得られた各フラクションを 10 $\mu$ g/ml 濃度で検討すると、Fig.3.(C) に示したように 120~160ml の溶出部に活性が認められた。次に、このフラクションについてファルマシア FPLC を用いて精製を進めた。まず、Mono Q HR 5/5 カラムで分離し、溶出フラクションを 5 $\mu$ g/ml 濃度で検討すると、Fig.4.(A) に示したように 11~13ml のフラクションに活性が認められた。次いでこのフラクションを Superose 12 HR 10/30 にかけて、溶出フラクションを 2 $\mu$ g/ml 濃度で活性を測定すると Fig.4.(B) に示したように 21, 22ml のフラクションに活性が認められた。このフラクションは HPLC で 1 ピーク (吸光度 230nm) を示した。

この精製の各段階における絨毛組織 100 g からの活性画分の収量は Table 1 に示した。また、3.5M 硫安分画部から Superose 12 カラム (活性画分) までの各精製段階での DNA 合成の活性は Fig.5 に示した。

この精製によって、細胞の増殖を刺激する活性は FBS を 10% に添加した MEM で培養した時の DNA 合成の値を 1 単位として比較すると、Superose 12 カラムの活性画分は 3.5M 硫安分画部の比活性の 100 倍以上となった。

また、精製段階の Q-Sepharose カラムから得られた活性画分を用いて、NLF 細胞の増殖を検討し、その結果を Fig.6. に示した。すなわち、Q-

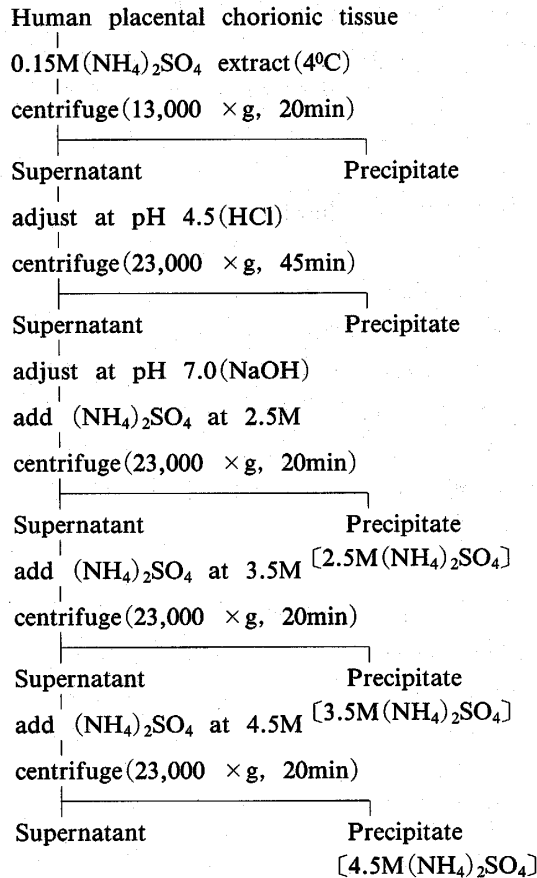
Sepharose 活性画分を 10 $\mu$ g/ml の濃度で添加したとき、FBS を 10% に添加したときと同程度の活性を示し、さらに、活性画分 10 $\mu$ g/ml と FBS10% を同時に添加すると活性は倍増した (Fig.6.)。

## 2. 分子量およびアミノ酸組成

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行うと、3.5 M 硫安分画部にあった 7 バンドが、Q-Sepharose カラム (活性画分) で 3 バンド、Superose 12 HR 10/30 (活性画分) で 1 バンドに精製された。この分子量は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (Fig.7.) およびゲルろ過 (データは示さず) から約 15kDa と推定され、アミノ酸組成は Table 2 に示した。

## 3. ヒト細胞に対する生長促進効果

ヒト胎盤絨毛組織からの抽出、精製過程においてその生長促進効果のアッセイには正常な線維芽細胞 NLF を用いたが、種々のがん細胞に対する効果を検討した。すなわち、Q-Sepharose カラムで得られた活性画分を 10 $\mu$ g/ml の濃度に添加し培養した場合の細胞数を、FBS10% 添加した場合、Q-Sepharose (活性画分) または FBS を添加しない場合の細胞数と比較した。NLF 細胞では Q-Sepharose (活性画分) を 10 $\mu$ g/ml の濃度に添加し培養した場合は 10%FBS を加えた場合と同じ効果を示した (Fig.6, Fig.8)。ヒト乳がん細胞株のうち MDA-MB453 に対しては Q-Sepharose (活性画分) は 10%FBS より高い効果を示し、添加しない場合の 5 倍となった (Fig.8)。一方のヒト乳がん細胞株の MCF7 に対しては 10%FBS よりやや効果は低いものの、添加しない場合の 12 倍に細胞数が増加した (Fig.8)。ヒト膀胱がん細胞株 J82 に対しては 10%FBS よりはやや低いものの、添加しない場合の 8 倍に細胞数が増加し、HTB9 に対しては 10%FBS と同等の効果を示した (Fig.8)。また、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に対しても 10%FBS を加えた場合と同じ効果を示した (Fig.8)。以上の検討結果より、ヒト胎盤絨毛組織中に、ヒト線維芽細胞のみならず、種々の組織に由来する細胞に対する生長促進効果のある物質の存在が認められた。

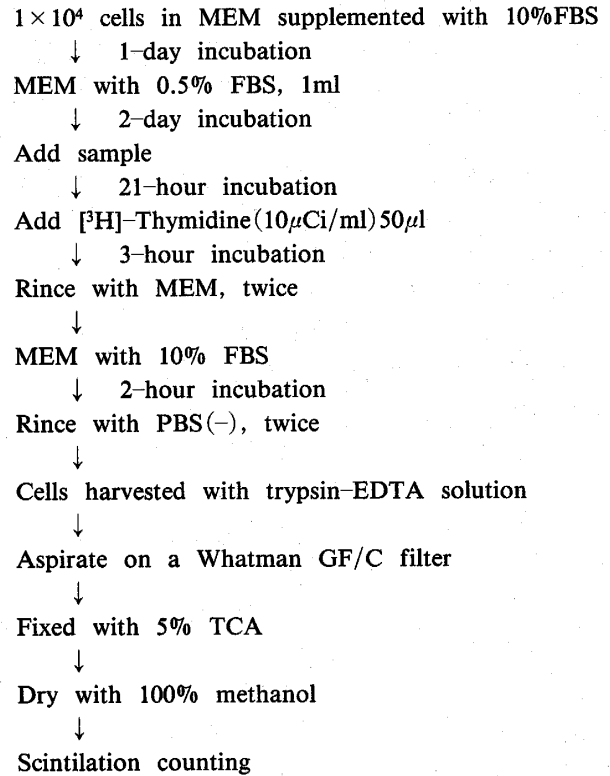


**Fig. 1.** Extraction and ammonium sulfate fractionation of growth stimulation activity from human placental chorionic tissue.

**Table 1.** Recovery of the cell growth stimulation activity from 100g of human placental chorionic tissue.

	Quantity mg	Units* /mg	Total unit
Crude extract	2400		
3.5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt	170	15	2550
CM-Sephadex C-50	34	60	2040
CM-Cellulose CM52	15	130	1950
Q-Sepharose	10	200	2000
Mono Q	2.5	700	1750
Superose 12	1.2	1500	1800

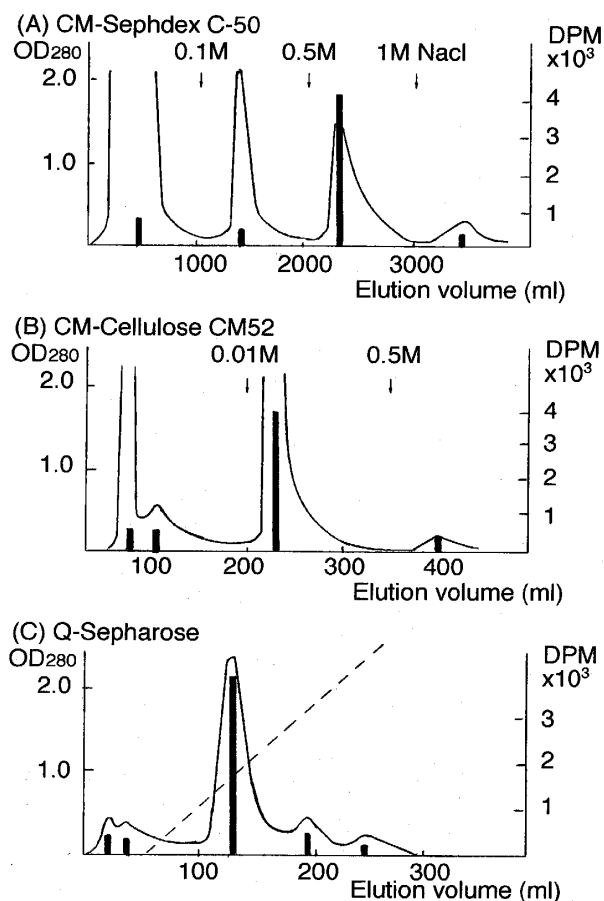
A DNA synthesis assay was performed as described in Fig. 2. \*Unit: growth stimulating activity with 10% FBS.



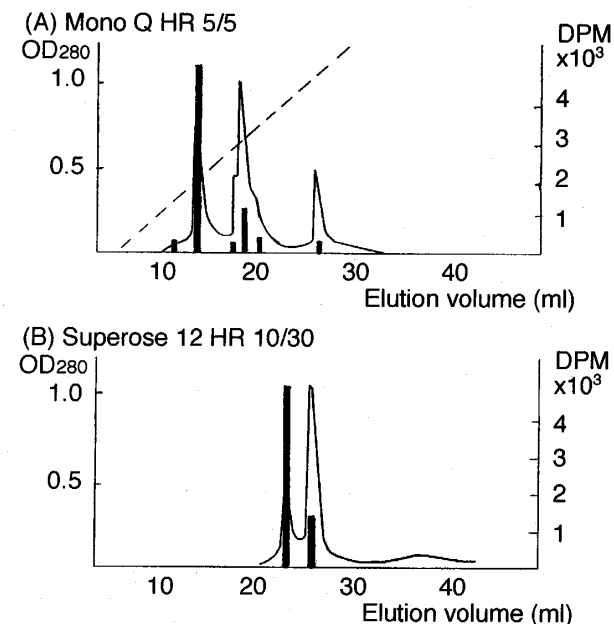
**Fig. 2.** Assay for DNA synthesis of NFL cells.

**Table 2.** Amino acid composition of the cell growth stimulation peptide from human placental chorionic tissue.

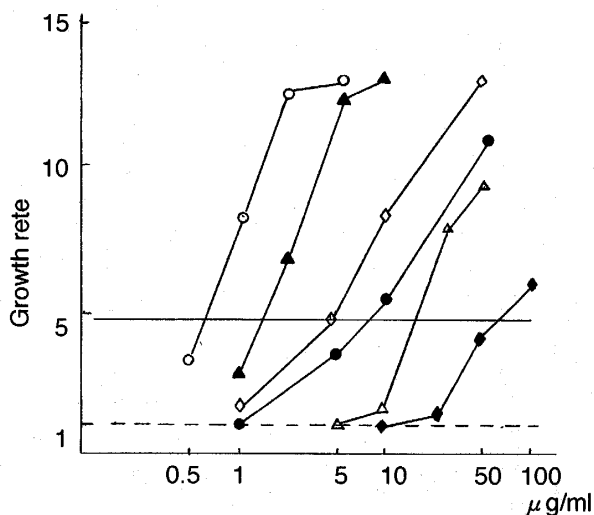
Amino acid	%
Lys	7.9
His	5.7
Arg	2.1
Asp	9.3
Thr	5.7
Ser	6.4
Glu	7.1
Pro	5.0
Gly	7.1
Ala	11.4
Cys	0.7
Val	9.3
Met	1.4
Ile	1.4
Leu	12.1
Tyr	2.1
Phe	5.0



**Fig. 3.** Elution patterns of column chromatography. (A) Stepwise elution on CM-Sephadex C-50 of 3.5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ppt. 170mg of 3.5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ppt was applied on a column (2.5×60 cm) equilibrated with 0.1M sodium phosphate pH6.0, and eluted by stepwise increasing the NaCl concentration between 0.1M and 1.0M. (B) Stepwise elution on CM-Cellulose CM52 of the 0.5M NaCl fraction obtained from CM-Sephadex C-50. 34mg of biological active fraction (0.5M NaCl) obtained from CM-Sephadex was applied on a column (2×20 cm) equilibrated with 0.05M ammonium acetate pH6.5, and eluted stepwise by ammonium carbonate between 0.01M and 0.1M. (C) Gradient elution on Q-Sepharose of the 0.01M ammonium carbonate fraction obtained from CM-Cellulose. 15mg of biological active fraction (0.01M) obtained from CM-Sephadex was applied on a column (1.8×18 cm) equilibrated with 0.02M Tris-HCl pH 7.5. The column was eluted with a linear NaCl gradient of 0.02M Tris-HCl pH 7.5 between 0 and 0.5M NaCl (----). (■ : biological activity)



**Fig. 4.** Elution pattern of FPLC. (A) Gradient elution on Mono Q HR 5/5 of the biological active fraction obtained from Q-Sepharose. 10mg of biological active fractions obtained from Q-Sepharose was applied on column, and were eluted with a linear NaCl gradient of 0.02M Tris-HCl pH7.5 between 0 and 0.5M NaCl (----). (B) Elution pattern on Superose 12 HR 10/30 of biological active fraction obtained from Mono Q HR 5/5. 2.5mg of biological active fractions obtained from Mono Q HR 5/5 were applied on column, and were eluted with 0.1M ammonium bicarbonate.



**Fig. 5.** Stimulation of DNA synthesis in NLF cells by the biologically active fractions obtained from each purification step (◆—◆: 3.5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ppt, △—△: CM-Sephadex C-50, ●—●: CM-Cellulose CM52, ◇—◇: Q-Sepharose, ▲—▲: Mono Q HR5/5, ○—○: Superose 12 HR10/30). The levels of DNA synthesis in cells without addition (----) and with addition of 10% FBS (——) were indicated.

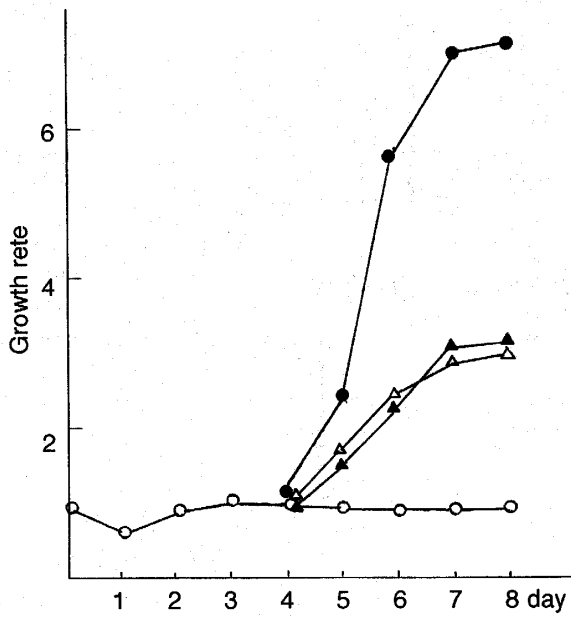


Fig. 6. Stimulation of growth of NLF cells by the active fraction obtained from a Q-Sepharose column.  $1 \times 10^5$  cells were plated in a 60mm culture dish and incubated for 24 hours. On day 1, the medium was renewed with MEM + 0.5%FBS, and cells were incubated for two days. On day 3, FBS at a final concentration of 10% or the Q-Sepharose active fraction at a final concentration of  $10 \mu\text{g/ml}$  was added. On day 4~8, number of cells was counted, and the growth rate was calculated. ○—○ : 0.5%FBS, △—△ : 10%FBS, ▲—▲ :  $10 \mu\text{g/ml}$  of the Q-Sepharose active fraction, ●—● :  $10 \mu\text{g/ml}$  of the Q-Sepharose active fraction + 10%FBS

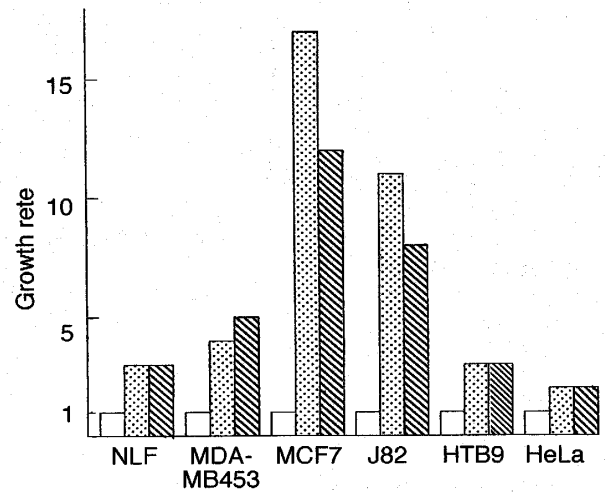


Fig. 8. Growth stimulation effect to various cell lines of  $10 \mu\text{g/ml}$  of the Q-Sepharose active fraction.  $1 \times 10^5$  cells were plated in a 60mm culture dish and incubated for 24 hours. After changing the medium using MEM + 0.1%FBS, cells were incubated for two days. On day 3, FBS at a final concentration of 10% or the Q-Sepharose active fraction at a final concentration of  $10 \mu\text{g/ml}$  was added. On day 7, number of cells was counted, and the growth rate was calculated. □ : 0.1%FBS, ▤ : 10%FBS, ▨ :  $10 \mu\text{g/ml}$  of the Q-Sepharose active fraction.

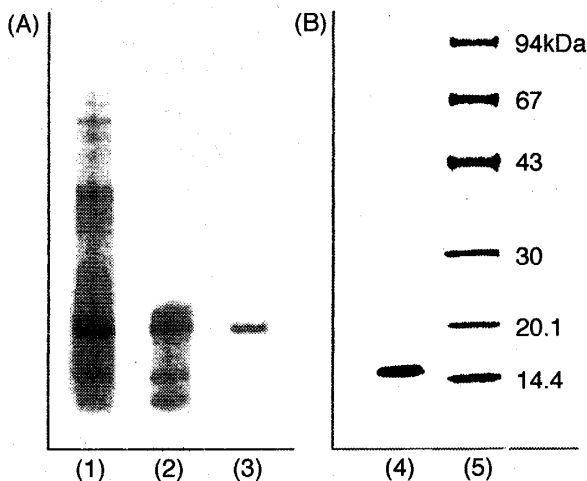


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of the active fraction. (A) was used 15% gel, and (B) was used 5~20% gel. (1):  $3.5\text{M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ppt, (2): Q-Sepharose, (3), (4): Supperose 12, (5): molecular weight marker

### おわりに

この度、ヒト胎盤絨毛組織より精製したペプチド性物質は、正常な細胞に存在し、正常ヒト線維芽細胞の培養において血清と同じような生長促進効果を示し、血清と additive 効果を有することが判った。また、この物質が種々のヒトがん細胞株に対しても生長促進効果を示すことを見いだした。

本研究を行うにあたり、ご指導頂きました兵庫医科大学 遺伝学教室 古山順一教授、玉置(橋本)知子助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 中村一江, 武庫川女子大紀要, **23**, 21-26(1975)
- 2) Tomita, T. and Nakamura, K., *Hope-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, **358**, 413-416(1977)
- 3) Trowell, O.A., Chir, B., Willmer, E.N., *J. Exp.biol.*, **16**, 60-70(1939)
- 4) Armelin, H.A., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **70**, 2702-2707(1973)
- 5) Gospodarowicz, D., Jones, K.L., Sato, G., *Proc.Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **71**, 2295-2299(1979)
- 6) Gospodarowicz, D., Bialecki, H., Greenburg, G., *J.Biol.Chem.*, **253**, 3736(1979)
- 7) Maciag, T., Gerundolo, J., Isley, S., Kelley, P.R., Forand, R., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **76**, 5674-5678(1979)
- 8) Brugess, W.H., Mehlman, T., Friesel, R., Johnson, W.V., Maciag, T., *J.Biol.Chem.*, **260**, 11389-11392(1986)