

Title	神経芽細胞腫由来の細胞（N-18）におけるヒスタミン代謝とヒスタミンのポリアミン代謝におよぼす影響に関する研究
Author(s)	尾崎, 哲
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33326
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	尾崎哲
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5916 号
学位授与の日付	昭和 58 年 3 月 3 日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	神経芽細胞腫由来の細胞 (N-18) におけるヒスタミン代謝とヒスタミンのポリアミン代謝におよぼす影響に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 西村 健 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ヒスタミン (HA) はシナプス形成前の胎児脳内に高濃度に含まれていることが知られている。しかし、その意義についての知見は少なく、HA がポリアミンを介して神経芽細胞の分裂増殖に関与しているのではないかと推測されているにすぎない。本論文の目的はこの点をさらに詳細に検討することにある。胎生期の分裂している神経芽細胞の実験モデルとして、また外的環境を自由に設定でき且つ均一化した実験細胞集団として、マウス神経芽細胞腫由来の N-18 クローンを選択し、まず HA の取り込み実験により HA の代謝経路を明らかにし、次に HA のポリアミン代謝への影響を調べて、HA とポリアミンと細胞の分裂増殖との関連を明らかにしようとした。

〔方法ならびに成績〕

1) 放射性 HA の N-18 細胞への取り込み実験と HA 代謝物質の同定

播種後 1, 3, 5, 7, 9 日目の各培養時期の N-18 細胞を用い、 ^3H -HA を $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 含む培養液で 2 時間培養した。培養液を除去した後、細胞成分を 5% トリクロロ酢酸 (TCA) で抽出し、遠沈後、TCA 可溶性分画を得た。これを Amberlite IR120 カラムに通し、酸性・中性分画と塩基性分画に分けた。各分画の放射能を計測し、さらにペーパークロマトグラフィーを用いて各分画に含まれる HA 代謝物を調べた。

^3H -HA の取り込みは分裂増殖の活発な培養初期 (対数増殖期) に著しく高く、分裂増殖が緩徐となるにつれて低下し、定常期では初期の $\frac{1}{4}$ になった。このことは HA がとくに分裂に関りをもつことを示している。

N-18細胞に取り込まれた³H-HAの約2/3は酸性・中性分画に移行し、イミダゾール酢酸に代謝された。酵素阻害実験により、この代謝にはジアミン酸化酵素 (DAO) が関与していることが確認された。残りの放射能は塩基性分画に含まれており、その約2/3は未代謝のHAであり、約1/3は未同定物質に代謝されていた。未同定物質の酸水解により放射能のピークがHAの位置に移行することから、この物質はHAが何らかの物質と結合した誘導体であることが明らかになった。

2) N-18細胞におけるプトレスチン代謝に及ぼすHAの影響

細胞に取り込まれたプトレスチン (Put) はGABA, スペルミジン (Spd), スペルミン (Spm) に代謝されることがわかっている。播種後5日目の対数増殖期のN-18細胞を用い、培養液を仔牛血清を含まないものに交換した後、1 mMのHAを添加したHA処理群とHAを添加していない対照群の2群に分け、同時に各群に¹⁴C-Putを0.2 μ Ci/ml添加し24時間まで培養した。1)と同様の方法でTCA可溶性分画を得、Dowex 50 \times 2 カラムで酸性・中性分画と塩基性分画に分けた。前者にはGABAのみ存在した。また後者にはPut, Spd, Spmが存在しており、高圧濾紙電気泳動によりこれらのポリアミンを分離した。

HAがPutの代謝経路に及ぼす影響を検討するために、GABA, Spd, Spmの形成率を求めた。形成率はGABA, Spd, Spmの比放射能をPutの比放射能で割り算出した。PutよりGABAへの形成率は、最初の3時間では対照群、HA処理群ともに低下傾向を示し、6時間以降ではHA処理群が対照群と比べて抑制された。PutよりSpdへの形成率はGABA同様両群ともに最初の3時間低下傾向を示した。しかし、6~9時間目でHA処理群のSpd形成率は対照群を上回り、12時間以降24時間までは対照群と同値になった。

次に、対照群のGABA, Spd, Spmの形成率を100%とした場合のHA処理群の相対的形成率を求めた。この結果、GABA形成は最初の1時間は対照群とほとんど差が見られず、3時間以降は約1/2に抑制された。Spd形成は初期より上昇傾向を示し、6時間目でピークとなり2~3倍に達し、その後12時間目でほぼ対照群の値に戻った。Spmでは、ほとんど差が認められなかった。

さらに、HAのPut代謝への影響が最も大きい6時間目において、HA濃度変化によるPut代謝動態への影響を調べた。GABA形成抑制はHA濃度が 10^{-6} M以上でみられ、Spd形成促進は 10^{-4} M以上でみられた。

〔総括〕

- 1) ³H-HAはN-18細胞の分裂増殖の著しい時期に多く取り込まれる。
- 2) N-18細胞に取り込まれたHAの大部分はDAOによりイミダゾール酢酸へ代謝され、残りの一部分はHAと何らかの物質が結合した未同定物質に代謝された。
- 3) N-18細胞に取り込まれたPutの代謝はHAの影響を受け、HA添加細胞ではPutからGABAへの形成が抑制され、PutからSpdへの形成が促進する。
- 4) 以上の成績は、HAが胎生期において増量することによりPutの代謝経路に変化を生ぜしめること、およびこの現象が神経細胞の分裂増殖の制御機構に関与する可能性を示唆している。

論文の審査結果の要旨

本研究は、神経芽細胞腫由来のN-18細胞を胎生期神経芽細胞の実験モデルとして用い、ヒスタミン（HA）が分裂増殖期のN-18細胞に多量に取り込まれること、増殖期のN-18細胞に取り込まれたプトレスチン（Put）の代謝はHAの影響を受けPutからGABAへの形成が抑制され、Putからスペルミジン（Spd）への形成が促進されることを明らかにした。

すでに、胎児脳でHAが高濃度に存在する時期にSpdが増量することが知られており、両物質が神経芽細胞の増殖に関与する可能性が示唆されていたが、その証明はなされていない。本研究は、HAが胎生期において増量することにより、Putの代謝経路に変化を生ぜしめ、かつ神経芽細胞の分裂増殖に関与する可能性を明らかにした点で意義があり、胎児脳における神経細胞の分裂増殖の制御機構解明に寄与するものと考えられる。