

培養血管内皮細胞の老化に伴い発現レベルが変化する遺伝子の検索

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室 (主任 押村光雄)

山本康孝・栗政明弘

Altered gene expression during aging in cultured human umbilical cord vein endothelial cells

Yasutaka YAMAMOTO, Akihiro KURIMASA

*Department of Molecular and Cell Genetics, School of Life Sciences, faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683, Japan***ABSTRACT**

Atherosclerosis increases with age, and the main cause of atherogenesis is considered to be an endothelial cellular dysfunction with aging. In this study, we searched for genes, whose expression levels were different between cultured endothelial cells (ECs) at early (E) and late (L) passages with a differential hybridization screening method. Two cDNAs with significantly different expression were obtained. One was a mitochondria-coded gene for NADH dehydrogenase subunit-1 (ND-1), and the other was the elongation factor 1- α (EF-1 α). Alterations of RNA expression during cellular aging was demonstrated by Northern blot analyses. The expressions of the ND-1 and the EF-1 α were elevated in the L-ECs and in the E-ECs, respectively. These genes have previously been reported to play important roles to maintain normal cellular functions and alter the expression during aging in other cell systems. The results suggest that the two genes may be markers for aging of ECs, and further indicate that the differential hybridization is useful to isolate new marker genes for atherosclerosis.

(Accepted on December 20, 1994)

Key words : Atherosclerosis

Human umbilical cord vein endothelial cells

Aging

Differential hybridization method

はじめに

虚血性心疾患および脳血管障害は今日の死亡原因の多くを占め、予防的治療の研究が望まれる成

人病である。動脈硬化はこれらの疾患の発生に大きく関与しており、この動脈における病理学的変化は加齢とともに進行することが明らかにされている¹⁾。血管内皮細胞 (ECs) は加齢とともに機

械的刺激・高脂血症・高血圧・免疫学的刺激・細胞毒性刺激等の様々な刺激に暴露され、これらの刺激による内皮細胞障害が動脈硬化症発症の契機となる^{25)~28)}。この障害は、内皮細胞の抗血栓性機能・選択的透過性・血管作動性物質の産生・分裂能の保持等の正常機能に異常をきたし、また、障害により失われた内皮細胞周囲の内皮細胞は血管内膜が露呈しないように分裂をし、血管内腔表面を覆う²²⁾。慢性的刺激の加わる血管部位ではこのような細胞分裂が繰り返され、ついには細胞の老化を引き起こす結果となる。そして、正常機能の失われた老化内皮細胞は動脈硬化をさらに進行させると考えられている。これらの事実より、血管内皮細胞の老化は動脈硬化発症の重要な原因の一つであると考えられている。

血管内皮細胞の老化と動脈硬化との関連を議論する上で重要な現象の1つに、*in vitro*および*in vivo*での内皮細胞の形態学的変化が挙げられる。大動脈の非硬化部における典型的内皮細胞は、単核で、円～紡錘形の細胞質を持ち、周囲の細胞と密に接着している。ところが、動脈硬化巣の内皮細胞は典型的な形態をとどめておらず、細胞面積や形態も不均一である²⁹⁾。これらの細胞は多核性で、細胞面積も大きく、時には典型的内皮細胞の3～5倍の面積を有することもある。さらに細胞接着に関しても、周囲の細胞とは比較的疎に接することが多い³⁴⁾。これらの形態学的特徴は長期継代培養を行った培養内皮細胞と類似しており⁸⁾、細胞増殖速度の低下・細胞面積の増大・多核性などの特徴を示す²⁴⁾。これらの形態学的観察より、動脈硬化巣の内皮細胞は老化した内皮細胞であり³³⁾、内皮細胞の老化が動脈硬化の要因として考えられている。しかし、この分野に関する分子生物学的研究は少なく、動脈硬化進展を内皮細胞老化関連遺伝子の発現変化と結び付けて実証しようとする研究はほとんど行われていない状況である。2, 3の生化学的および形態学的な内皮細胞老化関連事項は提唱されているが⁴⁾⁸⁾¹³⁾³²⁾³³⁾、動脈硬化巣形成への関与は明らかにされていない¹⁵⁾。そのため、内皮細胞の加齢とともに変化し、動脈硬化巣形成に関与するような分子マーカーが必要とされている。

本実験では、内皮細胞老化関連遺伝子(マーカー)を単離するため、培養老化内皮細胞を動脈硬化巣の内皮細胞のモデルとして用い、細胞老化

とともに発現量の変化する遺伝子をディファレンシャルハイブリダイゼーション法により単離した。さらに、継代数の異なる培養内皮細胞において、これらの遺伝子の発現量の変化を検索し、細胞の増殖との関わりについても検討した。

材料および方法

内皮細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)は、分娩直後の新鮮な臍帯静脈よりJaffeらの修正法¹¹⁾を用いて得た。内皮細胞(ECs)はトリプシン処理によって血管より剝離し、φ100mmコラーゲンコートディッシュに播種した(25020COL1; CORNING)。培地は199培地(05909, Nissui Pharmaceutical CO., LTD)に10%ウシ胎児血清、50μg/ml内皮細胞増殖補助因子(ECGS; Collaborative Research Inc.)、100μg/mlのヘパリンおよび抗菌剤(100 unit/ml ペニシリンGおよび100μg/ml ストレプトマイシン)を加えたものを使用した¹⁸⁾。継代は、細胞が70～80%飽和密度の状態に達した時点でPBS(-)で2度洗浄し、0.1%トリプシン/0.04% EDTAにてディッシュより剝離し、1ディッシュあたり 3×10^5 細胞を10mlの培地で継代培養した。培地は3日おきに交換し、5%CO₂湿度調整インキュベーターにて37℃で培養した。細胞数の算定はコバスライド(HYCOR BIOMEDICAL INC.)を使用した簡便法にて行った。内皮細胞の確認は、凝固系第Ⅷ因子関連抗原の検出および形態学的特徴により判断した¹¹⁾[#55348, Fluorescein-conjugated rabbit IgG fraction to goat IgG(whole molecule), Cappel; Goat IgG(H+L) to human Factor VIII, Nordic immunological laboratories]。細胞倍加数(PDs)は以下の公式で求めた。

$PDs = \log_2(\text{細胞収穫数} / \text{細胞播種数})$

そして、その累計を累積細胞倍加数(cumulative PDs; CPDs)とした。

RNAの抽出

トータルRNAとメッセンジャーRNA(mRNA)は細胞寿命の34%を経過(20CPDs)した継代初期細胞(Early passage cells; E細胞)、および細胞寿命の99%を経過(56CPDs)した細胞寿命直前の細胞(Late passage cells; L細胞)より抽出した。RNA抽出12時間前に培地を全交換し、サ

ブコンフルエントの状態の単層細胞よりRNA抽出を行った。トータルRNAは、グアニジンチオシアネート法により処理を行い抽出した³⁾。ポリ(A)+RNAはFast track mRNA isolation kit(K1593-02, INVITROGEN)により抽出した。RNAの保存状態はエチジウムブロマイド染色ホルムアルデヒドゲル上の28Sおよび18SリボソームRNAのバンドの状態で評価した。

cDNAライブラリーの作成

二本鎖cDNAはE細胞のポリ(A)+RNAよりcDNA synthesis system plus(RPN.1256, Amersham)を用いて作成した。まず、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈をプライマーとして用い、逆転写酵素・RNaseH・DNAポリメラーゼにより反応を行った。T4 DNAポリメラーゼにて平滑末端を形成し、ECoR I-Not I-BamH Iアダプター(4510, Takara)をライゲーション後、リン酸化反応を行った。その後、0.8%アガロースゲル/0.5×TBEバッファー、0.5×TBEバッファー中にて600bp~10kbpの大きさのみを選択分離し、 λ -ZAP IIベクター(236211, Predigested Lamda ZAP II/ECoR I cloning kit;203003, DNA ligation kit;Stratagene)に組み込んだ。Giga-Pack II Packaging extract(20214, Stratagene)にてパッケージングを行い、コンピテント大腸菌細胞(XL1-Blue;236211, Stratagene)にトランスファーした。ライブラリーをアガープレート上でコンフルエントの飽和密度になるまで増殖させ、SMバッファーで再懸濁した。

ディファレンシャルプラークハイブリダイゼーション法

E細胞とL細胞とのmRNA発現の差異を検索するためにディファレンシャルプラークハイブリダイゼーション法を用いた。その概略を図1に示した。インサートを含む 2×10^4 プラークを、12枚の ϕ 128-mmナイロンメンブレンフィルターにそれぞれトランスファーし、それらのレプリカフィルターも作成した。E細胞とL細胞に由来するプローブは以下のように作製した。2 μ gのポリ(A)+RNAに対し0.5 μ gのオリゴヘキサマーを使用し、1×Reverse Transcriptase(RT)バッファー、1.2mMジチオトレイトール、1mM非標識dATP・dGTP・dTTP、4 μ Mの非標識dCTP、50

μ Ci[α -³²P]-dCTP(>3000Ci/m mol)の混合溶液中で37°C、90分、200unitのsuperscript TM RNaseH⁻ Reverse transcriptase(GIBCO)で反応した。ポリ(A)+RNAをアルカリで分解した後、フェノール/クロロホルム抽出にて精製後、Sephadex G-50スピニングカラムで非結合ヌクレオチドを除いた。これをスクリーニングのプローブとして用いた。各メンブレンを、同じ放射活性量のE細胞由来およびL細胞由来のプローブにて、ハイブリダイズした。メンブレンは、プレハイブリダイゼーションバッファー(5×SSC/0.1% SDS/5mM EDTA/50%ホルムアミド/5×Denhardt液/200 μ g/ml サケ精子DNA)にて42°C、12時間放置後、放射活性プローブおよび最終濃度10%となる量の硫酸デキストランを加え、42°C、48時間ハイブリダイズした。2×SSC/0.1%SDSにて65°C、5分間、続いて0.1%SDS/0.1×SSC 65°C、10分間洗浄し、-80°Cにて48時間オートラジオグラフィーを行った。その結果より、それぞれの細胞に優位な発現を示したプラークを選択した。セカンドスクリーニングに際し、それぞれのファージ溶液を ϕ 82-mmナイロンフィルターメンブレン(Hybond N+;Amersham)に200プラークを形成するようにトランスファーした。そして、ファーストスクリーニングと同様にプレハイブリダイゼーション・ハイブリダイゼーション・洗浄そしてオートラジオグラフィーを行った。そして、それぞれの細胞に優位に発現したプラークを増殖し、small-scale preparation法¹⁰⁾にてプラスミドDNAを抽出した。このプラスミドDNAを制限酵素ECoR IもしくはNot Iでダイジェストし、1%アガロースゲル/0.5%TBE中にて電気泳動することによりインサートDNAを分離し、フェノール/クロロホルム抽出にて精製した。

ノーザンプロテイング

E細胞とL細胞より抽出したそれぞれのトータルRNA 10 μ gを50%ホルムアミド中、65°C、5分にて変性した後、急冷し、MOPSバッファー(0.02M MOPS/0.1M 酢酸ナトリウム/0.02M EDTA)中で1%アガロース/ホルムアルデヒドゲル(SeaKem GTG)にて泳動した。RNAはナイロンメンブレンにトランスファーした。プローブは、スクリーニングにて選択したインサートDNAを鋳型に、ランダムプライミング法により

作製した。メンブレンは、5×SSPE/50%ホルムアミド/0.5%SDS/200μg/mlサケ精子DNA溶液中に42℃、4～8時間インキュベートした後、放射線標識プローブを最終線量1×10⁶cpm/mlになるように加え、42℃、12時間ハイブリダイズした。0.1%SDS/0.1×SSCにて65℃、10分の洗浄を2回行った。泳動したトータルRNA量を確認するために、1度ハイブリダイズしたメンブレンを煮沸した0.1%SDS中で洗浄しプローブを剝がした後、内因性コントロールとしてGAPDHプローブのハイブリダイズを行った。オートラジオグラフィはデンストメーターにてシグナルの強

度を測定した。そして、サンプルのシグナル強度/GAPDHのシグナル強度比をそれぞれの発現レベルとした。これにより、差を認めたクローンを、以下のノーザンプロットにも使用した。

さらに、内皮細胞老化に伴うこれらの遺伝子の発現の変化を検索した。12, 17, 29, 42, 49 CPDsのそれぞれサブコンフルエント状態の内皮細胞より抽出したトータルRNAを用いノーザンプロットングを行った。

DNAシーケンスと相同性の検索

スクリーニングにより得たcDNAは pBluescript II

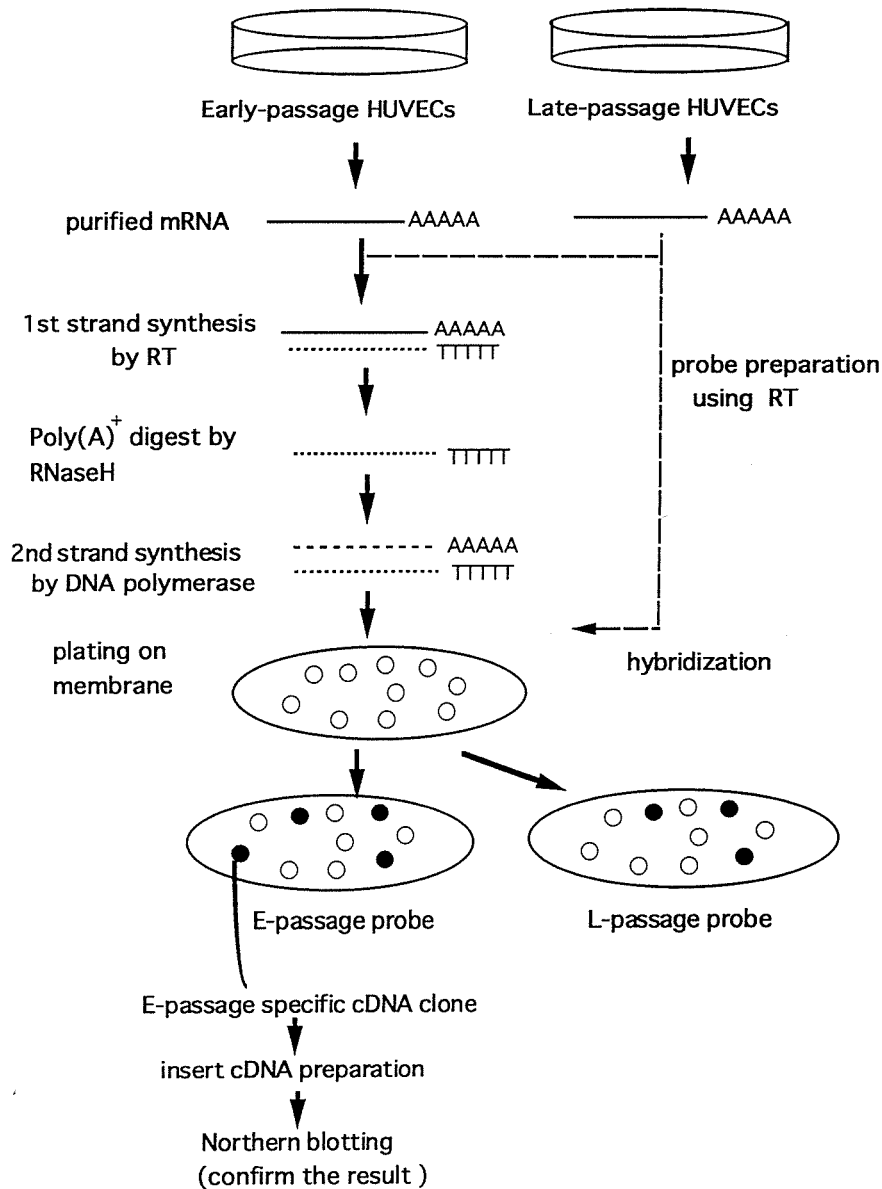


図1 ディフェレンシャルハイブリダイゼーション法の概略

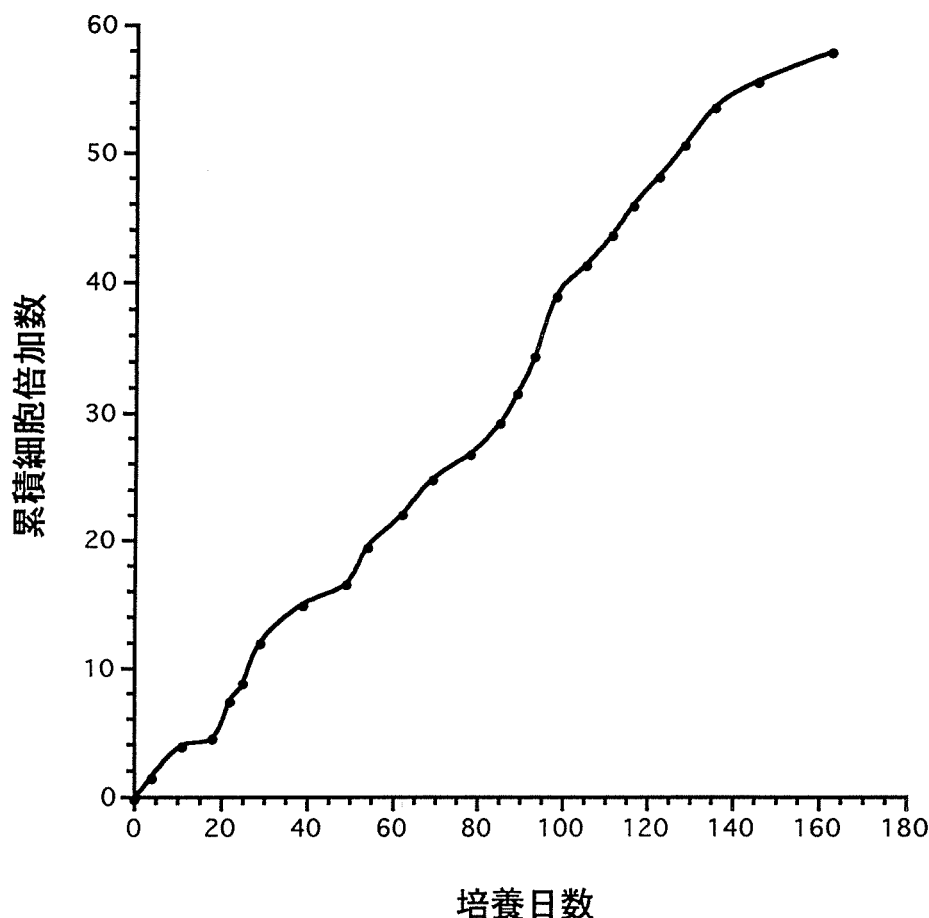


図2 血管内皮細胞の増殖曲線

SK(-)ベクター (Stratagene)にサブクローン化し, BcaBESTジデオキシシークエンシングキット (6017, 宝酒造)によりジデオキシ法により塩基配列を決定した. その相同性の検索はGenBank(バージョン 77.0)を用いた.

結果

細胞培養

累積細胞倍加数 (CPDs)と培養日数との関係は図2に示した. 細胞寿命に近づくとつれ, 継代間隔は次第に伸びる兆候を示した. 寿命の約75%を経過すると, 増殖速度が低下した. 58CPDsに達した時点で, 内皮細胞は継代後3週間を経過してもコンフルエントに達せず, 形態学的にも多核を持つ細胞の率が高まりこのCPDsを内皮細胞の寿命と結論した (図3).

細胞は, 生化学的・形態学的に内皮細胞と考えられた. 細胞は, 小さな円~多角形を示し, 数石状配列を示した [図3(a)]. また, 凝固系第Ⅷ因子関連抗原に対する蛍光免疫染色により, 典型的

内皮細胞と同様に核周囲の細胞質が染色された (図4). 対照としてヒト線維芽細胞の染色も施行したが, 染色性は認めなかった (データは示していない).

ディファレンシャルハイブリダイゼーション

E細胞とL細胞に優位に発現するシグナルを検索した. ファーストスクリーニングより34クローンを選択した. 7クローンは, E細胞で優位に, 27クローンはL細胞で優位に発現するものであった. さらにセカンドスクリーニングにより最終的に13クローンが選択された. 7クローンがE細胞, 6クローンはL細胞に優位に発現するクローンであった (図5). この13プラスミドDNAからインサートDNAを切り出し, 25プローブDNAを得た.

ノーザンブロットティング

セカンドスクリーニングの結果を, ノーザンブロットティングを用いて確認した. 25プローブDNAのうち, 5クローンが実際に発現に差異の

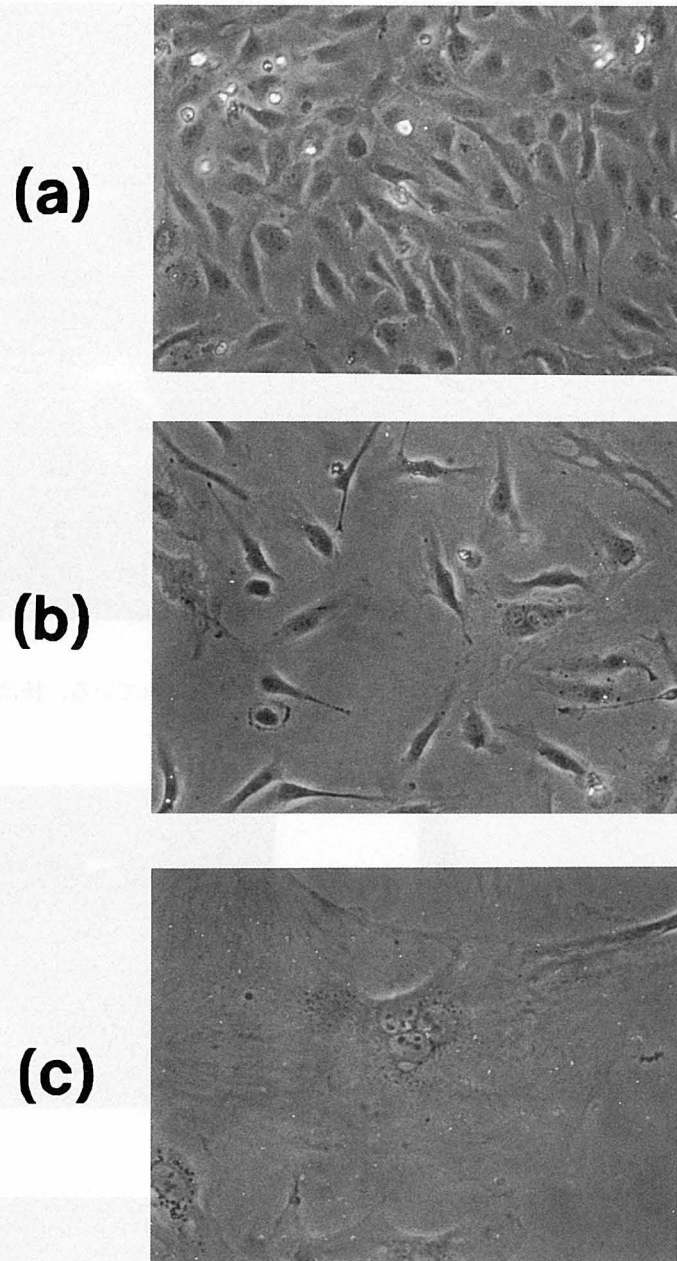


図3 血管内皮細胞

(a)培養初期内皮細胞：多角形～球形の細胞質を持ち，核／細胞質比が大きい．

(b)老化内皮細胞：不整形の細胞質を持ち，核／細胞質比が小さい．

(c)異型細胞：老化および動脈硬化巣によく見られる内皮細胞であり多角を有し，大きな細胞質を特徴とする．図の細胞は培養老化細胞で多数見られた．

見られるものであった（表参照）．4プローブDNAは，E細胞に優位に，1プローブDNAはL細胞に優位に発現を示していた．結果は図6に示した．ECD-8によるシグナルは1.0kbのRNAサイズを示し，L細胞に優位な発現を示した．ECD-17によるシグナルは2.1kbのRNAサイズを示し，

E細胞に優位な発現を示した．

老化に伴うこれらの遺伝子の発現レベルの変化は図7に示した．ECD-8によるシグナルは，老化とともにその強さを増し，49CPDsで低下を示した．ECD-17によるシグナルは，老化とともにその強さを急激に低下させ，29CPDsを経過する

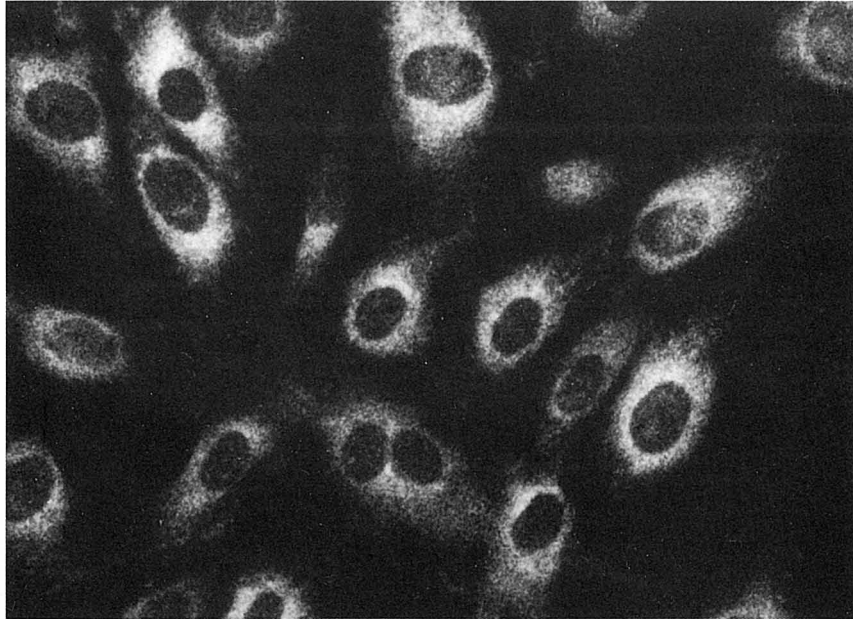


図4 抗第Ⅷ因子関連抗体による内皮細胞の蛍光染色
凝固第Ⅷ因子は細胞質に存在し、蛍光染色でよく染色されている。核は染色されない。

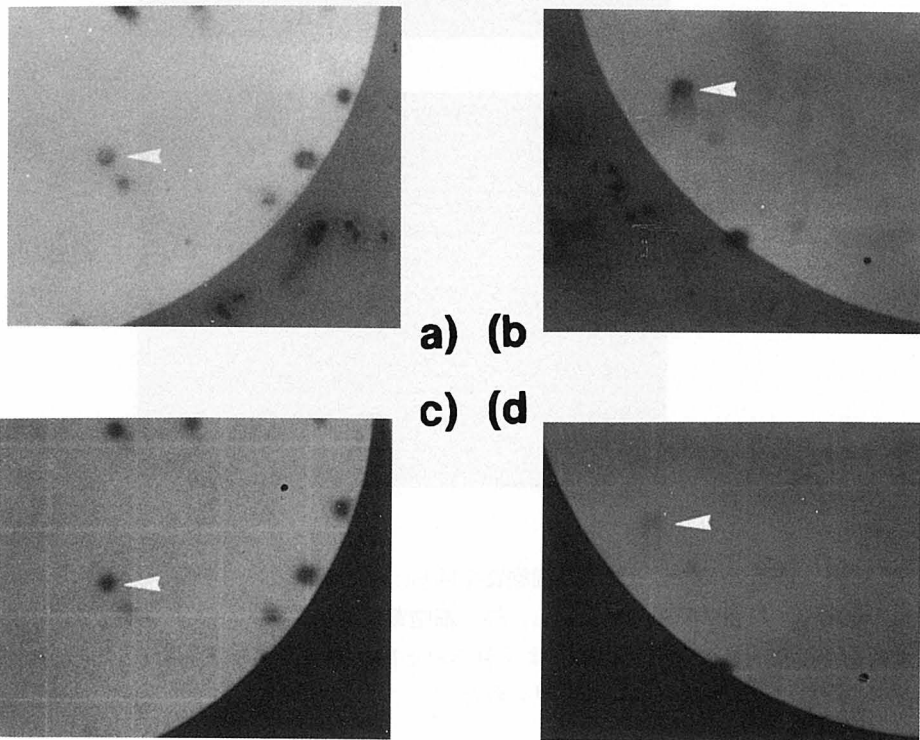


図5 セカンドスクリーニングのオートラジオグラフィー
a, cおよびb, dは同一のプレートのレプリカである。a, bはEarly passage cells (E細胞) をプローブとしてスクリーニングを行い, c, dはLate passage cells (L細胞) をプローブとしてスクリーニングを行った。bで示した矢印のシグナルは, E細胞に優位に発現しており, このクローンをECD-17とした。cで示した矢印のシグナルは, L細胞に優位に発現しており, このクローンをECD-8とした。

表 細胞間で発現に差の見られた5クローンの解析結果

Clone	cDNA Length (bp)	RNA Length (kb)	RNA abundance Ratio (Early/Late)	Sequence data
ECD-1	700	1.7	1.39	-
ECD-3	500	1.9	1.77	-
ECD-5	1000	2.05	1.97	-
ECD-8	950	1.0	0.47	+
ECD-17	1100	2.0	9.29	+

(a) ND-1

(b) EF-1 alpha

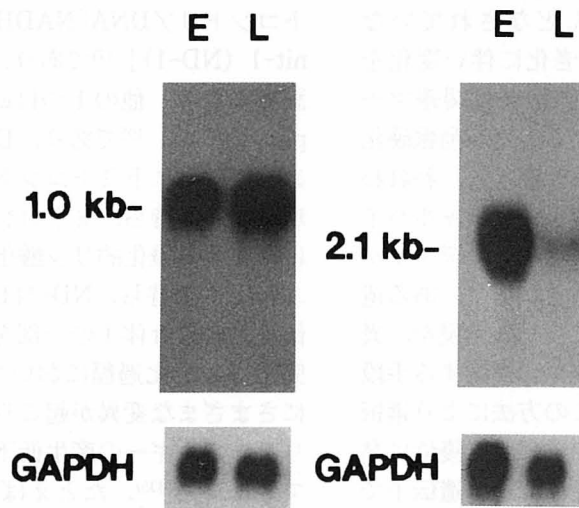


図6 ノーザンブロットによる遺伝子発現量の検討

Early passage cells(E)およびLate passage cells(L)のトータルRNAを電気泳動後、ナイロンフィルターに転写した。(a)ではECD-8 (ND-1) をプローブとしてハイブリダイズし、1kbにL細胞に優位なシグナルを認めた。(b)ではECD-17 (EF-1 alpha)をプローブとしてハイブリダイズし、2.1kbにE細胞に優位なシグナルを認めた。内在対照はGAPDHを用いた。

と一定の発現を示した。

が判明した。

cDNA シークエンス

ECD-8およびECD-17の塩基配列を決定し、その相同性検索の結果、ECD-8はヒトミトコンドリアDNAデヒドロゲナーゼサブユニット1 (ND-1)¹⁷⁾、ECD-17はエロンゲーションファクター1- α メッセンジャーRNA(EF-1 α)¹⁹⁾であること

考 察

動脈硬化巣の血管内皮細胞は分裂を繰り返した老化細胞であり、老化に伴う細胞機能低下は動脈硬化巣進展の大きな誘因の一つであると考えられている。しかし、病理学的、生化学的研究において上述の考えを支持する結果が得られているが、

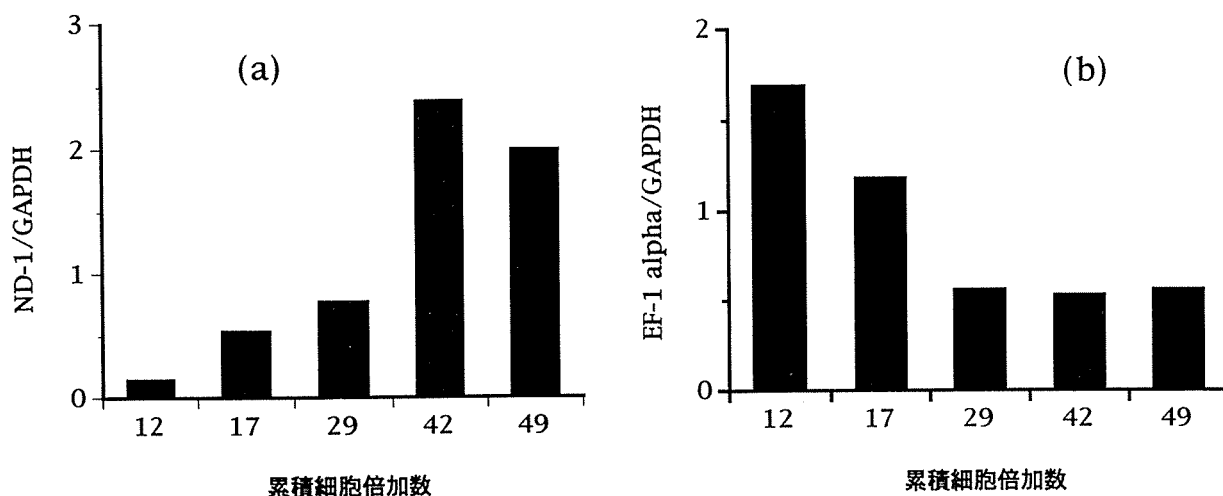


図7 ND-1およびEF-1 alphaの老化にともなう発現量の変化

(a)老化にともなって発現が増加し、42CPDsでピーク、49CPDsではやや減少した。

(b)12~29CPDsにかけて、発現量が減少し、以後ほぼ同様の発現量を維持した。

分子レベルでの実証はほとんどなされていない⁵⁾³⁵⁾³⁶⁾。そのため、内皮細胞老化に伴い変化をきたす遺伝子を単離し、内皮細胞老化関連マーカーとして動脈硬化巣に応用することが動脈硬化進展機構解明のきっかけとなると考えた。われわれは、これらの遺伝子をディファレンシャルハイブリダイゼーション法により検索した。ディファレンシャルハイブリダイゼーション法は、ある遺伝子、もしくは遺伝子のファミリーの発現を、異なる条件下での組織・細胞間から検索する手段の一つである。したがって、この方法により選択された継代初期もしくは老化内皮細胞に優位に発現する遺伝子は動脈硬化巣進展に関わる遺伝子である可能性を持つと考えられる。

継代初期細胞と老化細胞との最大の相違点は細胞の増殖速度であるため、それぞれの細胞の増殖時期において発現量に差が見られる遺伝子は老化に関連した遺伝子であると考えられ、老化のマーカーとして応用しようと考えた。本実験においては増殖状態にあるサブコンフルエントの状態の内皮細胞からmRNAを抽出した。細胞処理の12時間前に培地を全交換することにより細胞を増殖状態におき、細胞周期によらず、細胞老化にのみ依存する遺伝子を単離することができた。

最終的に *in vitro* の老化において変化する遺伝子を5つ得た。そのうち、発現量の変化の大きい2つの遺伝子の塩基配列を決定した。1つはミ

トコンドリアDNA[NADH dehydrogenase subunit-1 (ND-1)]¹⁷⁾であり、L細胞で優位な発現が認められた。他の1つはelongation factor 1-alpha(EF-1 α)¹⁹⁾であり、E細胞で優位な発現が認められた。ヒトミトコンドリアDNAは16569bpの環状構造を持ち、ミトコンドリアマトリックス内に存在する酸化的リン酸化反応に関わる13のサブユニットを持ち、ND-1はその1つであり、電子伝達系の複合体Iの一部を形成する³⁵⁾。最近の研究では、老化過程においてミトコンドリアDNAにさまざまな変異が起こり、その結果ミトコンドリアエネルギーの産生低下が起こることが判明してきている⁹⁾³⁵⁾。たとえば、加齢とともにラットの肝臓・心筋ではミトコンドリアDNA量の減少が発生すること¹⁾、ヒト脳・心筋・肝臓では4977bpの欠失が発生することなどが報告されている⁹⁾。mRNAレベルにおいても、ウシの心筋では、早胎期と比して晩胎期や成熟期では2.5~4倍に発現が増加し、老年期では急激に減少することが確認されている²⁰⁾。これらの老化に伴う変化は、結果的にミトコンドリアエネルギーの産生低下を生じると考えられている。また、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法および、サブトラクション法を用いて、ヒト線維芽細胞の老化に伴ってミトコンドリアDNAのチトクロームb・ND-subunit4の発現量が増すことも報告されている⁵⁾。これらの結果は、われわれの結果と一致し、ミト

コンドリアDNAのmRNAレベルでの発現増加はミトコンドリアエネルギーの産生障害の補填の機構とも考えられる。最近、ミトコンドリアDNA異常と老化についての議論が盛んにされており、本研究による結果は、老化に伴う遺伝子発現変化は内皮細胞の機能低下の原因である可能性も示唆される。

EF-1 α は、すべての蛋白質合成に関与する蛋白質である。転写の蛋白伸長過程においてリボソーム上のアミノアシル部位にアミノアシルtRNAを結合させる働きをもつ。ショウジョウバエやマウスでは、加齢とともにEF-1 α がmRNAレベルで減少することがわかっている¹⁶⁾。培養ヒト線維芽細胞でも、EF-1 α の活性レベルが寿命の80~85%までは維持されるものの、その時期を過ぎると急激に低下することも確かめられている²⁾。ラットにおいてもこの加齢に伴う活性低下が認められている。また、EF-1 α 遺伝子を増加発現されたショウジョウバエは対象群と比較して、その寿命が延長したという報告もある³⁰⁾。これまでの報告と合わせ、本研究におけるわれわれの結果から、EF-1 α は*in vivo*および*in vitro*ともに内皮細胞老化過程において重要な働きを示すと考えられる。EF-1 α の老化過程への関与については詳細な説明は現在までなされていないが、最近細胞骨格の再構築にも関与していることが報告されており³¹⁾、細胞増殖・蛋白質合成・細胞周期の調節などの関与から、老化過程を調節する蛋白質である可能性も示唆されてきている⁹⁾。すなわち、この遺伝子の発現低下は細胞の増殖低下、蛋白質合成の低下をきたし、結果として内皮細胞の機能低下をもたらすと考えられる。

ミトコンドリアは、増殖などに関わる細胞のエネルギー供給の器官として機能しており、このDNA変異もしくは欠失は細胞の正常機能の喪失と関連が深い。また、EF-1 α も細胞増殖および蛋白質合成と関連が深い蛋白質である。われわれの得た2つの遺伝子は、内皮細胞の増殖および正常機能を調節するのに不可欠な遺伝子であり、これらの遺伝子の変化は動脈硬化発症に深く関連している可能性もある。これらの内皮細胞老化における生理学的な働きについて明確にすることはできなかったが、内皮細胞老化の良いマーカーとして利用しうると考えられる。今後、*in situ* hybridizationなどにより、動脈硬化巣内皮細胞上でこれら

の遺伝子の発現量を確認することにより、内皮細胞老化と動脈硬化との詳細な関連を示しうると考えられる¹⁶⁾。

ディファレンシャルハイブリダイゼーションにより老化関連遺伝子の単離を試みる研究はこれまでいくつかなされているが、それらは正常ヒト線維芽細胞⁵⁾⁶⁾³⁶⁾、SV40形質転換線維芽細胞²⁹⁾、ワーナー症候群由来線維芽細胞²¹⁾などにより行われていた。今回、われわれは動脈硬化に関連する遺伝子として血管内皮細胞特異的の老化関連遺伝子の単離を目的としたため、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。また、本実験はこのような目的に、ディファレンシャルハイブリダイゼーションを用いた初めてのケースであり、実験系としても老化に関連すると考えられる2つの遺伝子の単離を成功させたことより、この分野の研究に新たな一歩を開拓したと考えている。この実験系は、内皮細胞特異的の老化関連遺伝子を単離し、動脈硬化進展機構の解明に大きく寄与するものと考えられ、今後多くの成果を期待しうる。

結 語

1. ディファレンシャルハイブリダイゼーション法により血管内皮細胞老化において発現量に変化をきたす2つの遺伝子、ND-1およびEF-1 α を単離した。
2. これらの遺伝子は正常内皮細胞機能の維持に不可欠であり、その発現異常は内皮細胞機能低下をもたらすと考えられた。
3. ディファレンシャルハイブリダイゼーション法は、老化に関連する遺伝子を単離しうる有用な実験系であり、今後この方法により動脈硬化に関連する遺伝子を単離し得ると考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会をお与え頂きました鳥取大学医学部第1内科真柴裕人教授、ご指導・御校閲頂きました鳥取大学医学部細胞工学教室押村光雄教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Asano K., Nakamura M., Sato T., Tauchi H., and Asano A. (1993). Age dependency of mitochondrial DNA decrease differs in different tissue of rat. *J Biochem* 114, 303-306.

- 2) Cavallius J., Rattan S. I. S. and Clark B. F. C. (1986). Changes in activity and amount of active elongation factor 1α in aging and immortal human fibroblast cultures. *Exp Gerontol* 21, 149-157.
- 3) Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- 4) Dichek D. and Quertermous T. (1989). Variability in messenger RNA levels in human umbilical vein endothelial cells of different lineage and time in culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 289-292.
- 5) Doggett D. L., Rotenberg M. O., Pignolo R. J., Philips P. D. and Cristofalo V. J. (1992). Differential gene expression between young and senescent, quiescent WI-38 cells. *Mech of Aging Dev* 65, 239-255.
- 6) Giordano T., Kleinsek D., and Foster D. N. (1989). Increase in abundance of a transcript hybridizing to elongation factor 1 alpha during cellular senescence and quiescence. *Exp Gerontol* 24, 501-513.
- 7) Glassberg M. K., Bern M. M., Coughlin S. R., Haudenschild C. C., Hoyer L. W., Antoniadis H. N., and Zetter B. R. (1982). Cultured endothelial cells derived from the human iliac arteries. *In Vitro* 18, 859-866.
- 8) Hasegawa N., Yamamoto M., Imamura T., Mitsui Y. and Yamamoto K. (1988). Evaluation of long-term cultured endothelial cells as a model system for studying vascular ageing. *Mech Ageing Dev* 46, 111-123.
- 9) Hayashi J., Ohta S., Kagawa Y., Kondoh H., Kaneda H., Yonekawa H., Takai D., and Miyabayashi S. (1994). Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 269, 6878-6883.
- 10) Irwin N. (1989). *Molecular cloning*, 2nd ed., 1.25-1.30, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U. S. A.
- 11) Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G., and Minick C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 52, 2745-2756.
- 12) Kaji K., and Matsuo M. (1978). Ageing of chick embryo fibroblasts *in vitro*. Relationship between cell proliferation and increase multinuclear cells. *Mech Ageing Dev* 8, 233-239.
- 13) Kumazaki T., Fujii T., Kobayashi M., and Mitsui Y. (1994). Aging- and growth-dependent modulation of endothelin-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 211, 6-11.
- 14) Kunz J. and Keim U. (1975). On the regeneration of aortic endothelium at different ages. *Mech Ageing Dev* 4, 361-369.
- 15) Kurihara Y., Kurihara H., Suzuki H., Kodama T., Maemura K., Nagai R., Oda H., Kuwaki T., Wei-hua Cao, Kamada N., Jishage K., Ouchi Y., Azuma S., Toyoda Y., Ishikawa T., Kumada M. & Yazaki Y. (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368, 703-710.
- 16) Lee S., Stollar E., and Wang E. (1993). Localization of S1 and elongation factor- 1α mRNA in rat brain and liver by non-radioactive *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 41, 1093-1098.
- 17) Lu, X., Walker T., MacManus, J. P. and Seligy, V. L. (1992). Differentiation of HT-29 human colonic adenocarcinoma cells correlates with increased expression of mitochondrial RNA: effects of trehalose on cell growth and maturation. *Cancer Res* 52, 3718-3725.
- 18) Maciag T., Hoover G. A., Stemerman M. B., and Weinstein R. (1981). Serial propagation of human endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol* 91, 420-426.
- 19) Madsen, H. O., Poulsen, K., Dahl, O., Clark, B. F. C. and Hjorth, J. P. (1990). Retropseudogenes constitute the major part

- of the human elongation factor 1- α gene family. *Nucleic Acids Res* 18, 1513-1516.
- 20) Marin-Garcia J., Ananthakrishnan R., Agrawal N. and Goidenthal M. J. (1994). Mitochondrial gene expression during bovine cardiac growth and development. *J Mol Cell Cardiol* 26, 1029-1036.
- 21) Murano S., R. Thweatt, R. J. Shmookler Reis, R. A. Jones, E. J. Moerman, and S. goldstein(1991). Diverse gene sequences are overexpressed in Werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence. *Mol Cell Biol* 11, 3905-3914.
- 22) Reidy M. A., and Schwatz S. M. (1983). Endothelial injury and regeneration. *Lab Invest* 48, 25-34.
- 23) Repin V. S., Dolgov V. V., Zaikina O. E., Novikov I. D., Antonov A. S., Nikolaeva M. A. and Smirnov V. N. (1984). Heterogeneity of endothelium in human aorta. *Atherosclerosis* 50, 35-52.
- 24) Rosen E. M., Mueller S. N., Noveral J. p., and Levne E. M. (1981). Proliferative characteristics of clonal endothelial cell strains. *J Cell Physiol* 107, 123-137.
- 25) Ross R. and Glomset J. A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 295, 369-377, 420-425.
- 26) Ross R., Glomset J., and Harker L. (1977). Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86, 675-684.
- 27) Ross R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis-An update. *N Engl J Med* 314, 488-500.
- 28) Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis:a perspective for the1990s. *Nature* 362, 801-809.
- 29) Satoh Y., Kashimura M., Kaneko S., Karasaki Y., Higashi K., Gotoh S. (1994). Cloning of cDNAs with possible association with senescence and immortalization of human cells. *Mutat Res* 316, 25-36.
- 30) Shepherd J. C. W., Walldorf U., Hug P., and Gehring W. J. (1989). Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 α live longer. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7520-7521.
- 31) Shiina N., Gotoh Y., Kubomura N., Iwamatsu A., Nishida E. (1994). Microtubule severing by elongation factor 1 α . *Science* 266, 282-285.
- 32) Tokunaga O., Fan J. Watanabe T., Kobayashi M., Kumazaki T., and Mitsui Y. (1992). Endothelin. *Lab Invest* 67, 210-217.
- 33) Tokunaga O., Fan J., and Watanabe T. (1989). Atherosclerosis-and age-related multinucleated variant endothelial cells in primary culture from human aorta. *Am J Pathol* 135, 967-976.
- 34) Tokunaga O. and Watanabe T. (1987). Atherosclerosis and endothelium part 1. A simple method of endothelial cell culture from human atherosclerotic aorta. *Acta Pathol Jpn* 37, 527-536.
- 35) Wallace D. C. (1992). Mitochondrial Genetics:A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256, 628-632.
- 36) Wistrom C. and Villeponteau B. (1992). Cloning and expression of SAG:A novel marker of cellular senescence. *Exp Cell Res* 199, 355- 362.