血管内皮細胞の老化とエンドセリンおよび フィブロネクチン遺伝子の発現亢進*

三井 洋司** 熊崎 努***

I. はじめに

線維芽細胞が分裂寿命を有することは、ヒトの培養線維芽細胞を用いた研究により確立されている。またその培養系での分裂寿命の長さと、細胞の供与者の年齢との間に負の相関が存在することは、生体内細胞加齢を研究するためのモデルとして培養線維芽細胞を用いることを支持している。しかし、多くの研究がなされたにもかかわらず、細胞老化の機構については、生体内のみならず培養系でも明らかとはなっていない。

一方、ヒトは血管の老化とともに老いるといわれることもあるように、血管の加齢変化は、生体内のほとんどすべての器官の機能に影響をおよぼす。血管内壁を覆う血管内皮細胞が有限寿命を示すことが明らかとなっている。内皮細胞を高年齢から分離して培養した場合大型化した細胞が観察されるが、それは培養系で老化した細胞の特徴でもある。そして、そういった大きな細胞が、高齢者の血管壁に並んでいる一層の内皮細胞層においては多数を占めるようになっている。培養系での寿命の長さと細胞供与者の年齢の間に負の相関のあることは、内皮細胞についても観察されている。これらのことは、生体内の内皮細胞が培養系で加齢させた細胞と同様の仕方で加齢していることを示唆している。したがって、いろいろな年齢の血管から内皮細胞を分離して生体外での加齢について研究することは、細胞老化 (一般的) 機能解明に役立つだけでなく、生体内での血管の老化による機能変化に関してより広い知識をもたらすものと期待される。

われわれは、血管内皮細胞の老化に伴い、エンドセリン-1 およびフィブロネクチンの遺伝子に発現の亢進が

起こることをみいだしている。以下、それについて述べる。

II. エンドセリン

エンドセリン-1 は 21 アミノ酸からなるペプチドで、血管内皮細胞の培養上清から最初に発見された新規の血管収縮因子である。エンドセリン-1 は肺、腎臓、脳など多くの臓器において検出されており、血管収縮のみならず多様な生物学的機能を持っている。エンドセリンは血管平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、色素細胞等々にチミジンの取り込みを促進することから、一種の細胞増殖因子としての機能を持つことが示唆されている。一方、血管平滑筋細胞や他の細胞に対して、エンドセリンが DNA 合成や細胞増殖効果を示さないとの報告や、チミジン取り込みを抑制するとの報告もあり、エンドセリンの細胞増殖に対する効果はまだ結論を出すには至っていない。われわれは以下に述べるように、フィブロネクチンの発現が細胞老化に伴って高まることを明らかにしているが、フィブロネクチンの発現は細胞増殖が停止したときにも高まることが知られている。最近、エンドセリン-1 が平滑筋細胞のフィブロネクチンの産生を促進することが報告されていることから、エンドセリンの増殖抑制活性とフィブロネクチン遺伝子の発現亢進の間に何らかの関係があることが示唆される。

われわれは、内皮細胞のエンドセリン-1 mRNA の発現がヒト胎児大動脈では検出できないが、20 歳以上のヒトの大動脈では検出できることを示し、個体の加齢に伴いエンドセリンの発現が高まることを示した¹⁾。われわれはまた、ヒト血中エンドセリンの濃度が、50 歳以上の高齢者において高い傾向があることを報告している。この原因については、高齢者の血管内皮細胞がより多くのエンドセリンを産生するようになっているためではないかと考えられた。そこで、いろいろな年齢のヒト大動脈から血管内皮細胞を分離して培養し、それらが培地中へ

* 1994 年 6 月、第 26 回日本動脈硬化学会総会 (横浜) において発表

** 工業技術院生命工学工業技術研究所

*** 広島大学原爆放射能医学研究所

Fig. 1 Secretion of endothelin by aortic endothelial cells aged *in vivo*. (cited from ref. 1).

放出するエンドセリンの量を測定したところ、実際に 50 歳以上のヒトからの細胞で、エンドセリンの産生量が高いことが示された (Fig. 1)。したがって、生体内で内皮細胞がその個体の加齢とともに老化していて、老化した細胞はエンドセリンの産生を高めているということが示唆された。すでに血管内皮細胞が培養系において有限寿命を示すことが知られているが、培養系で老化した細胞の特徴と高齢者に由来する細胞の特徴とはよく似ている。そこで、培養系で加齢させたヒト臍帯静脈由来の内皮細胞についてもエンドセリン産生量を測定したところ、加齢するにつれてエンドセリンの産生が高まることが示された。したがって上述の仮説、個体の加齢に伴って血管内皮細胞も加齢し、老化した内皮細胞がエンドセリンの産生を高めるために、高齢者における血中エンドセリン濃度が高まることが強く示唆された。

このエンドセリンの発現増加が、遺伝子の転写のレベルで制御されているのか、あるいは翻訳のレベルで制御されているのかについて検討した²⁾。Northern hybridization 法を用いてヒト臍帯静脈由来内皮細胞について調べた結果、老化した細胞においてエンドセリン-1 mRNA の発現亢進がみられ、特に培養寿命の末期において急激な発現亢進がみられた (Fig. 2)。残念ながら、高齢者由来の細胞は増殖させることが困難で、Northern hybridization を行うに十分な mRNA を得ることはできなかった。しかし、個々の細胞レベルで mRNA の発現量を検討できる *in situ* hybridization 法によって、エンドセリン-1 mRNA 発現量を調べることができた。まず、培養系でいろいろな老化段階にあるヒト臍帯静脈由来内皮細胞について *in situ* hybridization を行い、細胞上に観察された銀粒子数をエンドセリン-1 mRNA 発現量として比較した。

Fig. 2 Expression of endothelin-1 mRNA by umbilical vein endothelial cells aged *in vitro*. (Analyzed by Northern hybridization) (cited from ref. 2).

Fig. 3 Expression of endothelin-1 mRNA by umbilical vein endothelial cells aged *in vitro*. (Analyzed by *in situ* hybridization) (cited from ref. 2).

その結果、mRNA 発現量は若いときからかなり老化するまで変化しないが、寿命末期には急激な発現増加を示した (Fig. 3)、これは Northern hybridization 法によって得られた結果とよく似ている。同様に、いろいろな年齢のヒトから分離した大動脈由来内皮細胞について解析した結果、5 歳から 50 歳ではほとんど変化がみられないが、76 歳の細胞ではエンドセリン-1 mRNA の発現が亢進していることが観察された (Fig. 4)、これらの結果は、上述したペプチドレベルでの解析による産生上昇のパターンとよく似ており、エンドセリンの発現がおもに

Fig. 4 Expression of endothelin-1 mRNA by aortic endothelial cells aged *in vivo*. (Analyzed by *in situ* hybridization) (cited from ref. 2).

mRNA の発現レベルで制御されていることを示している。

細胞が老化すると、いくら増殖因子を与えて刺激しても増殖することができなくなることから、老化に伴うエンドセリンの発現亢進は増殖停止に付随しておこっているのであって、細胞老化とリンクしているわけではない可能性がある。この点についても検討した。増殖期からコンフルエントの増殖停止に至るいろいろな増殖状態にある内皮細胞について、その培地中へのエンドセリン放出量を測定した結果、細胞の増殖が盛んなときにエンドセリン産生量が高く、増殖が停止したコンフルエントの状態ではエンドセリン産生量は少なくなっていた。さらに、細胞周期の S 期とそれ以外の期 (G1, G2, M) についてエンドセリン-1 mRNA 発現量を *in situ* hybridization により調べた結果、S 期の細胞でより多くの mRNA を発現していることがわかった。したがってエンドセリン合成は、増殖の盛んなときに亢進される機構と、老化に伴って亢進される機構との少なくとも二つの異なった機構によって制御されていることが明らかとなった。エンドセリンの発現が TGF- β , TPA, インシュリンや張り応力などによっても誘導されることが知られており、実際エンドセリン-1 遺伝子の上流域にこうした刺激に対する応答に必要な配列が存在することが確認されたり、示唆されたりしている。増殖期にエンドセリンの産生が高まることには、これらの配列が関与しているのかも知れないし、さらに別の配列が関与しているのかも知れない。

III. フィブロネクチン

フィブロネクチンは細胞外基質の主要な構成要素であ

る。フィブロネクチンはインテグリンと呼ばれるレセプターや膜に組み込まれたヘパラン硫酸プロテオグリカンなどを通じて細胞表面に結合するし、他の細胞外基質構成要素であるコラーゲンなどと結合し、また細胞骨格のアクチンとも間接的ではあるが相互作用することができる。こうした直接的および間接的相互作用を通じてフィブロネクチンは、細胞の接着や伸展、細胞運動および増殖などに重要な役割を演じている。フィブロネクチンは単一の遺伝子から産生されるのであるが、いくつかの異なった形が知られている。フィブロネクチンの機能について多くの研究がなされているが、フィブロネクチンのそれぞれの形の役割についてはよくわかってはいえない。線維芽細胞がフィブロネクチン mRNA のオルタネイティブスプライシング産物を複数産生していることが報告されており、同時にいくつかの形のフィブロネクチンを産生していることが示唆されている。培養系での加齢に伴ってオルタネイティブスプライシングのパターンに変化が生じることも報告されているが、この変化が細胞加齢にとって意義があるかどうかは明らかではない。

われわれや他の研究者によって、線維芽細胞の加齢につれてフィブロネクチンの発現が有意に高まることが示されている³⁾。内皮細胞は、線維芽細胞と同様に、培養系で老化し、細胞加齢の研究のモデルとして使われてきている。そこでいろいろな年齢のヒトからの大動脈由来内皮細胞でのフィブロネクチンの発現を検討することにした⁴⁾。Northern 分析を行ったところ、大動脈由来内皮細胞は臍帯静脈由来内皮細胞よりずっと高いレベルでフィブロネクチン mRNA を発現していることがわかった。すなわち、5 歳の供与者からの大動脈由来内皮細胞は臍帯静脈由来内皮細胞より 3.9 倍のフィブロネクチン mRNA を発現していた。次に、5 歳、50 歳および 76 歳のヒトの大動脈から分離された内皮細胞について、個々の細胞レベルでフィブロネクチンの発現を調べることができた *in situ* hybridization 法によって分析した。用いた細胞の DNA 合成を行っている細胞の割合 (ラベリングインデックス) は 78%, 69% および 23% で、供与者の年齢の増加につれて低下しており、高齢になるほど細胞の DNA 複製活動が活発でなくなることを示している。In *situ* hybridization を行った細胞について、細胞上に観察された銀粒子の数を数えると同時に、細胞の面積を測定した。細胞あたりの銀粒子数 (フィブロネクチンの発現量を表す) と細胞面積の平均をとると、フィブロネクチンの発現量と細胞面積の増加が相関していることが明らかに示された (Fig. 5)。76 歳の細胞のラベリングインデックスは比較的高いことから細胞が十分に老化しているとはいえないが、5 歳の細胞に比べて 2.7 倍のフィブ

Fig. 5 Relationship between mRNA level of fibronectin and cell area in aortic endothelial cells aged *in vivo*. Donor ages of the cells are indicated in the figure. (cited from ref. 4).

Fig. 6 Relationship between mRNA level of fibronectin and cell area in umbilical vein endothelial cells aged *in vitro*. Population doubling levels are shown in the figure. (cited from ref. 4).

ネクチン mRNA を発現していることが示された。

血管内皮細胞は常に血流によって血管壁から剥がれて運び去られてしまう危険に面している。空いたスペースは周りの細胞が分裂することによって補われる。動脈内皮細胞の生体内での老化が分裂寿命の消費によっていることが上述の研究などから示唆されている。そこでこのことを試すために、培養系で加齢した臍帯静脈由来内皮細胞についてフィブロネクチンの発現を調べた。集団倍化数 (PDL) 17, 38 および 67 の細胞について行った Northern 分析の結果では、フィブロネクチン mRNA の発現が 2.1 倍にまで増加することが示された。In situ hybridization により個々の細胞レベルでもフィブロネクチン mRNA の発現を調べた。用いた細胞は PDL 11, 32, 62, 70 および 74 で、PDL の増加に伴ってラベリングインデックスの減少を示し、加齢が進行していることを示していた。PDL の増加につれて明らかなフィブロネクチン mRNA の発現増加と細胞面積の増加が観察された (Fig. 6)。ここで得られた増加のしかたは、大動脈由来内皮細胞の場合と平行関係にあり、生体内での内皮細胞の加齢は分裂能力の消費の結果であることが示された。

さらに、フィブロネクチンの発現については皮膚および胎児肺由来の線維芽細胞を用いて、Northern 分析および in situ hybridization を行い検討した。その結果、どちらも加齢に伴うフィブロネクチン mRNA 発現量の増加を示した。したがって、血管内皮細胞のみならず、線維芽細胞でも同様に加齢に伴いフィブロネクチンの発現が上昇することが明らかとなった。

以上のことから、加齢に伴うフィブロネクチンの発現

上昇は、静脈の内皮細胞でも大動脈の内皮細胞でも、また皮膚の線維芽細胞でも肺の線維芽細胞でも同様におこることが明らかとなった。またこのことが、培養系で加齢した細胞のみならず、生体内で加齢した細胞においてもみられることも明らかとなった。したがって、フィブロネクチンの加齢に伴う発現上昇は一つの細胞種についてだけみられることではなく、多くの種類の細胞においてみられることであり、加齢に伴う共通の現象であると思われる、その重要性が示唆される。

IV. おわりに

エンドセリンは平滑筋細胞でも発現されているが、内皮細胞の方が 10 倍以上多く産生しており、内皮で産生・分泌されたエンドセリンが平滑筋に作用して血管収縮を引き起こしていると考えている。エンドセリンが平滑筋細胞の増殖を促進することが示唆されてもいるが、一方、増殖を抑制するように作用することも報告されている。また最近、エンドセリン-1 が平滑筋細胞のフィブロネクチンの産生を促進するとの報告もされた。フィブロネクチンは細胞が増殖を停止したときにも発現が増加することが知られている。こうしたことを結びつけて考えると、エンドセリンが平滑筋細胞に作用すると、平滑筋の収縮を誘導すると同時に、増殖を抑制し、その増殖抑制に付随してフィブロネクチンの増産を導いている可能性が考えられる。

こうして考えると、フィブロネクチンの老化に伴う発現増加は、老化細胞における増殖停止に付随した現象と

も考えられる。しかし、一つの遺伝子の発現が一つの制御系だけでオン・オフされていることはなく、実際フィブロネクチン遺伝子のプロモーター領域にはいくつかの制御部位が存在していることが明らかとなっている。またわれわれは老化が遺伝的にプログラムされた現象と考えているので、フィブロネクチンやエンドセリンなど老化に伴ってその発現に変化を生じる遺伝子には、老化したときに初めて作動する発現制御機構も備わっているのではないかと考える。したがって、フィブロネクチンの老化に伴う発現亢進にはそれらの制御が働いているものと考え、その制御系の解明を目指しているところである。

謝 辞：ここで述べた成果については藤井崇，小林美枝子氏との共同研究によるものを含む。ここに謝意を表する。

文 献

- 1) Tokunaga O, Fan J, Watanabe T, Kobayashi M, Kumazaki T, and Mitsui Y: Endothelin: Immunohistologic localization in aorta and biosynthesis by cultured human aortic endothelial cells. *Lab Invest*, 67: 210-217, 1992
- 2) Kumazaki T, Fujii T, Kobayashi M, and Mitsui Y: Aging- and growth-dependent modulation of endothelin-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res*, 211: 6-11, 1994
- 3) Kumazaki T, Robetorye RS, Robetorye SC, and Smith JR: Fibronectin expression increases during *in vitro* cellular senescence: Correlation with increased cell area. *Exp Cell Res*, 195: 13-19, 1991
- 4) Kumazaki T, Kobayashi M, and Mitsui Y: Enhanced expression of fibronectin during *in vivo* cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res*, 205: 396-402, 1993

Enhanced Expression of Endothelin-1 and Fibronectin Genes During Aging of Endothelial Cells

Youji MITSUI* and Tsutomu KUMAZAKI**

*National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan

**Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan