

【トピックス】日本基礎老化学会第33回大会奨励賞受賞者

癌抑制・細胞老化因子ARFが引き起こす血管新生抑制及び疾患との関わり

川岸 裕幸¹⁾、丸山 光生¹⁾、高木 正稔²⁾、杉本 昌隆¹⁾

¹⁾ 国立長寿医療研究センター研究所 老化機構研究部 ²⁾ 東京医科歯科大学 発生発達病態学

1. はじめに

哺乳動物の体細胞は試験管内で培養すると、ある一定回数の分裂を繰り返した後に細胞老化と呼ばれる恒久的な増殖停止状態に陥る[1]。細胞老化を起こすまでの期間(分裂寿命)はドナーとなる生物種の寿命と強い相関を示すことから、個体の寿命を規定する一因子であると考えられてきた。細胞老化は細胞内外からのストレスによって特異的な細胞周期のチェックポイント機構が活性化された結果引き起こされる現象である。このようなチェックポイントではp53を含む複数の癌抑制タンパク質が作用しており、実際に細胞老化が生体において極めて重要な癌に対する防御機構として機能していることが知られている。

p19^{ARF}(ヒトではp14^{ARF})はp53の上流因子として機能する癌抑制タンパク質である。ARFノックアウト(KO)マウスは早期に癌が多発し、その繊維芽細胞は分裂寿命を持たず無限に増殖する[2]。p19^{ARF}はp53の抑制因子であるユビキチンリガーゼMdm2に結合してその活性を阻害することにより、p53タンパク質を活性化する[3]。しかしながら近年、ARFの癌抑制機能が単純にp53だけに依存しないことが示されている[4]。

本稿では我々が発見したp19^{ARF}がp53非依存的に血管形成因子VEGFA(vascular endothelial growth factor A)のmRNA翻訳を負に制御すること、また生体内においてVEGFA依存的な血管新生を抑制するという知見について紹介する[5]。

2. ARFタンパク質によるVEGFAの発現抑制

p19^{ARF}による癌関連因子の発現に対する影響を調査したところ、レトロウイルスを用いてp19^{ARF}を発現させたマウス繊維芽細胞ではVEGFAタンパク質の発現が低下していることを発見した(図1A)。しかし図1Bに示すように、VEGFA mRNAの発現はp19^{ARF}による影響を受けなかった。従ってp19^{ARF}はVEGFAの発現を転写後調節により制御していることが考えられた。そこでp19^{ARF}がVEGFA mRNAの翻訳に影響を与えるかについて調べるために、p19^{ARF}発現細胞および非発現細胞からポリソーム/非ポリソーム画分をショ糖密度勾配法により調製し、VEGFA mRNAの局在をノーザンブロットにより解析し

た。p19^{ARF}非発現細胞では殆どのVEGFA mRNAはポリソーム画分に見られ、VEGFA mRNAは積極的に翻訳されていることが示された(図1C)。これに対しp19^{ARF}発現細胞では大部分のVEGFA mRNAは非ポリソーム画分に局在していることから、VEGFA mRNAの翻訳が特異的にp19^{ARF}によって抑制されることが示された。これらの現象は同様にARF/p53 KOマウス繊維芽細胞を用いた実験系でも見られることから、p19^{ARF}の持つp53非依存的機能の一つであることが示唆された。

3. ARFタンパク質とmRNAの翻訳抑制

VEGFA mRNAは、5'-UTR(untranslated region: 非翻訳領域)に存在するIRES(internal ribosome entry site)によって翻訳制御されていることが知られている[6]。そこでp19^{ARF}によるVEGFAの翻訳抑制にIRESが関与するかを調べるために、ルシフェラーゼを用いたVEGFA-IRESレポーターアッセイを行った。その結果、p19^{ARF}はVEGFAのIRES活性を顕著に抑制することを見出した(図2)。従ってp19^{ARF}によるVEGFAの発現抑制は、少なくとも一部はIRES活性の調節を介していることが示唆された。

4. 腫瘍組織におけるARFによる血管形成阻害

VEGFAは血管形成において重要な役割を持つ因子であり、血管形成は腫瘍の発達に重要な現象である。そこでp19^{ARF}によるVEGFAの抑制が、生体における腫瘍内の血管形成に及ぼす影響について調べた。Ras(V12)により形質転換したp53/ARF KOマウス繊維芽細胞にp19^{ARF}を発現させたものとさせてないものをヌードマウスに移植し、移植腫瘍組織内の血管形成について血管内皮細胞マーカーであるCD31染色により評価を行った。図3Aに示したとおり、p19^{ARF}発現細胞を移植した群では非発現細胞を移植した群と比べ、有意に腫瘍組織内の血管密度が低かった。この血管形成の阻害は外来性VEGFAを発現することで見られなくなることから、p19^{ARF}はVEGFA依存的に血管形成を阻害することが示唆された。

ヒトの癌においても、遺伝子の変異やサイレンシングによりARFの失活が見られる。そこでヒトの腫瘍組織(colon carcinoma)においてもARFによる血管形成の阻害が見られるかを確認するために、p14^{ARF}の発現と血管密度の関連について調べた。その結果、p14^{ARF}の発現が見られない腫瘍組織では血管密度が高い傾向にあることが示され、ARFによるVEGFA抑制機構がヒトにおいても同様に保存されていることが示唆された(図3B)。

連絡先：〒474-8522

愛知県大府市森岡町源吾35

Tel : 0562-46-2311 内線5115

Fax : 0562-46-8461

Email : msugimot@ncgg.go.jp, kawa13@ncgg.go.jp

腫瘍組織内では酸素や栄養を供給するために血管が発達し、これが腫瘍の発育や転移を促すことから、ARFは少なくともVEGFA発現抑制を介して腫瘍内血管形成を阻害し、非細胞自立的な癌抑制機能を持つことが考えられる。

5. おわりに

今回我々はARFがp53非依存的にVEGFAの発現を翻訳レベルで抑制し、その機能が生体内においては血管形成の阻害を引き起こすことを示した。詳細な分子メカニズムに関しては不明であるが、細胞内でARFがMdm2以外にも複数のタンパク質と相互作用することが報告されていることから[4,7]、これら新規経路を介してVEGFAの発現抑制を行っていると考えられる。我々の実験ではARFの癌抑制因子としての面を主に解析したが、癌以外の生命現象においてもこの制御機構が役割を持つことが考えられる。

野生型マウスでは発生過程において、眼球組織内でARFによるPDGF受容体などの血管形成因子の発現抑制により血管の退縮が起こるが、ARF KOマウスでは血管の退縮が正常に起こらないために盲目になる[8]。我々が今回得た知見から考えて、VEGFAの転写後発現制御もこの現象に関与している可能性がある。更に我々が行った実験から、p19^{ARF}の老齢個体組織での発現上昇が確認されている(未発表データ)。加齢は虚血性血管疾患のリスクファクターとなるが、この原因の一つとして老化組織では虚血部位においてVEGFAの発現が低下していることが報告されており[9]、造血系や内皮細胞でのVEGFAの発現低下が加齢に伴い腎機能を悪化させるといった報告もされている[10]。もしこれらの現象が、老化組織で発現が亢進したARFによるVEGFA等の発現抑制によるものであるとすれば、それはARFの持つ細胞老化因子としての機能が個体の老化や老齢疾患に関与しているということなのかもしれない。今後の細胞老化研究では個体老化との相互関係を調査することが重要であり、これらを解析することにより個体老化の機構解明へと繋がることを期待される。

追記 学会発表した研究成果は現在論文を作成しているため、編集部の手承を得て異なる内容を掲載させて頂きました。

Reference List

- Hayflick, L. and Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25: 585-621, 1961.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grossveld, G., and Sherr, C. J. Tumor suppression

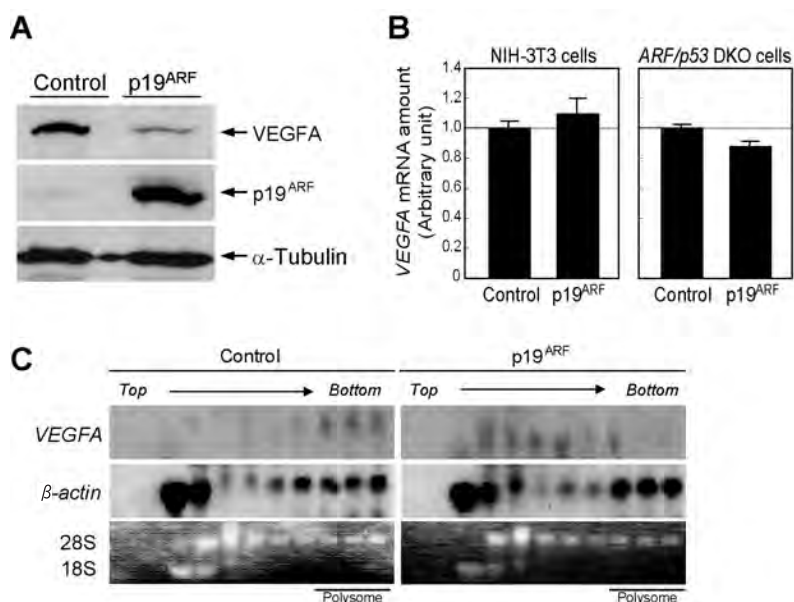


図1 p19^{ARF}によるVEGFAの発現抑制

(A) VEGFAタンパク質のウェスタンブロットティング。
(B) リアルタイムPCR法によるトータル VEGFA mRNAの定量。
(C) ノーザンブロットティングによるポリソーム/非ポリソーム画分における VEGFA mRNAの分布解析。

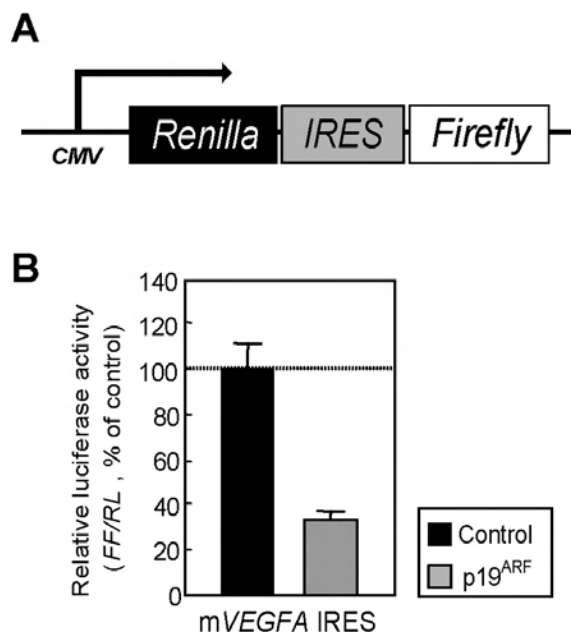


図2 VEGFA mRNAのIRES活性への影響

(A) アッセイに用いたIRESレポーターベクターの模式図。
(B) レポーターアッセイによる VEGFA IRESの活性測定。FF: Fireflyルシフェラーゼの活性、RL: Renillaルシフェラーゼの活性。

at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91: 649-659, 1997.

- Honda, R. and Yasuda, H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.*, 18: 22-27, 1999.
- Sherr, C. J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat. Rev. Cancer*, 6: 663-673, 2006.

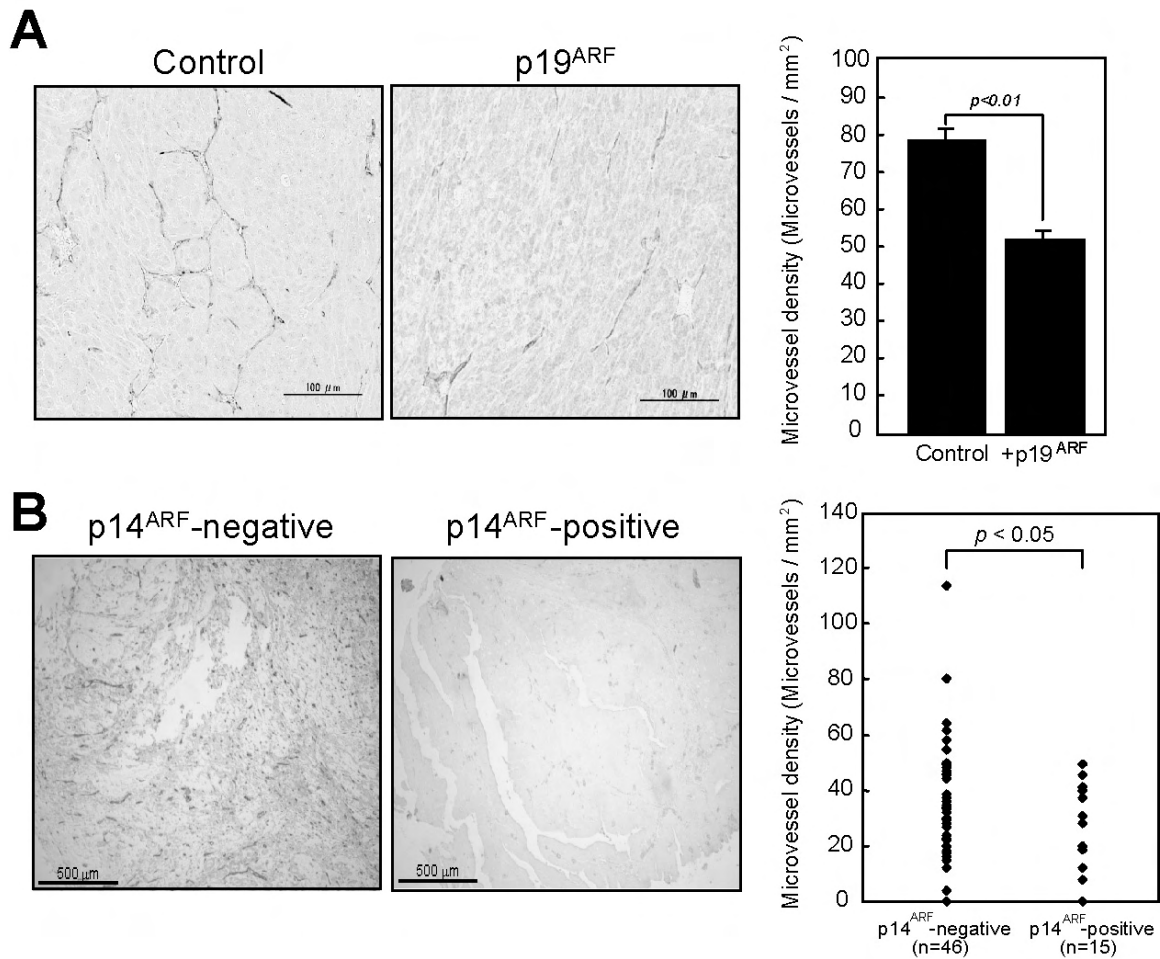


図3 腫瘍組織内におけるARFタンパク質による血管形成の抑制

(A)細胞移植後14日目における腫瘍組織切片を血管内皮細胞のマーカーであるCD-31で免疫染色した図。右のグラフは、血管密度を示したもの。

(B)ヒト大腸癌組織切片のCD-31免疫染色。右グラフはARFポジティブ/ネガティブの癌組織内の血管密度を示したもの。

5. Kawagishi, H., Nakamura, H., Maruyama, M., Mizutani, S., Sugimoto, K., Takagi, M., and Sugimoto, M. ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res.*, 70: 4749-4758, 2010.
6. Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S. Y., Elroy-Stein, O., and Levi, B. Z. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, 17: 227-236, 1998.
7. Chen D., Shan J., Zhu, W. G., Qin, J., and Gu, W. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature*, 464: 624-627, 2010.
8. Silva, R. L., Thornton, J. D., Martin, A. C., Rehg, J. E., Bertwistle, D., Zindy, F., and Skapek, S. X. Arf-dependent regulation of Pdgf signaling in perivascular cells in the developing mouse eye. *EMBO J.*, 24: 2803-2814, 2005.
9. Rivard, A., Fabre, J. E., Silver, M., Chen, D., Murohara, T., Kearney, M., Magner, M., Asahara, T., and Isner, J. M. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*, 99: 111-120, 1999.
10. Yamaji, M., Bielby, H., Licence, D., Cheng, C. W., Cook, E., Smith, S. K., Print, C. G., and Charnock-Jones, D. S. VEGF-A Loss in the Haematopoietic and Endothelial Lineage Exacerbates Age-Induced Renal Changes. *Microvasc.Res.*, 2010.