



Title	p53 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Solid Tumor
Author(s)	吉岡, 泰彦
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58942
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【118】

氏 名	吉 岡 泰 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 4 8 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 9 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	p53 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Solid Tumor (p53 は固形腫瘍内の血管内皮増殖因子発現を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 澤 芳樹 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 土岐祐一郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

p53 癌抑制遺伝子は、固形癌で最も変異を認める遺伝子の一つであり、その変異は腫瘍の発育、細胞死等の種々の生物学的反応に影響する。

転写因子である低酸素誘導因子-1 (hypoxia-inducible factor-1 (以後、HIF-1)) は、低酸素環境に対応するために、血管新生因子で最も強力な血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor (以後、VEGF))、赤血球増殖因子、嫌気的な解糖系酵素等の転写をひきおこす。

HIF-1 はヘテロ 2 量体であり、HIF-1 α は通常環境では分解され、低酸素下では分解が抑制され HIF-1 β と転写をおこす。HIF-1 β は、芳香族炭化水素受容体の核内輸送体 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) と同一であり、芳香族炭化水素受容体と薬物代謝酵素を誘導する等、細胞が侵襲をうけた際の種々の生体反応を担う。

HIF-1 の転写活性が p53 により制御されている可能性があるが未だ解明されておらず、本研究ではこれを解明することを目的とする。

〔 方法ならびに結果 〕

< 1. Co^{2+} 下又は低酸素下での VEGF 発現への温度感受性 *p53* の影響 >

方法 : p53 蛋白がない培養ヒト肝癌細胞株 Hep3B に、培養温度が 37℃ で変異型 p53 蛋白を、32℃ で野生型 p53 蛋白を発現させる温度感受性変異 *p53* 遺伝子を導入した。低酸素状態をひきおこす Co^{2+} 下及び低酸素下で、VEGF の産生を酵素結合免疫吸着法、HIF-1 活性をルシフェラーゼレポーター

アッセイ, HIF-1 β の発現レベルをウェスタンブロットで, ベクターのみ導入した株と比較した。
結果: Co^{2+} 及び低酸素下で, 37°C (変異型 p53 蛋白) 下ではベクターのみと同様に VEGF は時間及び用量依存的に産生され, HIF-1 活性は上昇し, HIF-1 β は発現したが, 32°C (野生型 p53 蛋白) 下ではベクターのみに比べ VEGF の産生は少なく, HIF-1 活性は上昇せず, HIF-1 β の発現レベルは抑制された。

< 2. VEGF 発現への種々の変異 p53 の影響 >

方法: Hep3B 株に, 野生型 p53 遺伝子, DNA 結合能を欠く変異 p53 遺伝子 3 種, ベクターのみをそれぞれ導入した。各株間で, Co^{2+} 下での VEGF の産生, HIF-1 活性, HIF-1 β の発現を比較した。
結果: 野生型株では各発現は抑制され, どの変異型株およびベクターのみの株では抑制されなかった。

< 3. *in vivo* 固形癌モデルでの腫瘍発育と血管新生に対する p53 の影響 >

方法: Hep3B 株に, 野生型 p53 遺伝子, ベクターのみをそれぞれ導入した。両株を, BALB/c (nu/nu) スードマウスの皮下に Hep3B 株を注入し腫瘍を形成させる *in vivo* モデルを用い, 腫瘍のサイズ, 血管新生の指標としての血管密度と VEGF の発現とを腫瘍切片の免疫組織染色で, HIF-1 β の発現レベルをウェスタンブロットで比較した。
結果: *In vitro* での両株の増殖速度に差はなかった。*in vivo* では野生型株のほうが, 発育が遅く, 血管密度, VEGF の発現, HIF-1 β の発現レベルは低かった。p53 の欠損したベクターのみの株は VEGF の産生と血管新生が多く, 早い発育を促したと考えられた。

< 4. 膀胱癌における p53 遺伝子変異の有無と血管新生の関係 >

方法: 膀胱癌 16 症例にて, p53 遺伝子の変異の解析結果と, 免疫組織染色による血管密度, VEGF の発現との関係について検討した。
結果: p53 遺伝子の変異の有無と臨床ステージとは関連を認めなかったが, p53 遺伝子の変異症例では血管密度と VEGF の発現とは高かった。

[総 括]

HIF-1 活性を p53 が抑制するという報告とそれを否定する報告があるが, それらは培養環境や細胞の違いによるものではないか考えられる。

そこで, 疑似ヒト固形癌モデルで p53 の役割を検討し, p53 が HIF-1 活性を通じて VEGF の産生と血管新生を抑制していることを見いだした。この結果は, 少なくとも一つの *in vivo* 腫瘍モデル

で, p53 が HIF-1 活性と VEGF 産生を制御できることを示している。

これにより, p53 は, 細胞周期の停止や細胞死の誘導等だけでなく, 血管新生を抑制することで, 発癌を抑制していることになる。

p53 の HIF-1 活性の制御については, p53 と HIF-1 α が直接結合するという報告もある。しかし本研究では, これらの分子の直接の結合は検知できなかったが, p53 が HIF-1 β の発現レベルに影響を及ぼすことを見いだした。このことから HIF-1 β の発現レベルの制御が p53 の主な標的と考えた。その制御のメカニズムはまだ解明されていないが, mdm2 のような他の p53 結合蛋白によるユビキチン化が関係する可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子 p53 の変異は, 細胞死の抑制, 腫瘍細胞の増殖をおこす。また, 固形腫瘍では p53 に変異があると血管が多い傾向にあることも知られている。

固形腫瘍内に血管を誘導する代表的因子が, 低酸素状態の細胞から産生される血管内皮増殖因子 (以後, VEGF) である。さらに VEGF の産生を細胞内で制御するのは低酸素誘導転写因子-1 (以後, HIF-1) であり, α と β とからなっている。低酸素時に HIF-1 α が安定化し, HIF-1 β と結合し, VEGF の転写, 産生を引きおこす。

本研究では, *in vitro* では HIF-1 β の発現, HIF-1 の転写活性, VEGF の産生が, *in vivo* (スードマウス固形腫瘍モデル) では HIF-1 β の発現, VEGF の発現, 腫瘍血管密度, 腫瘍発育が, 正常 p53 下では抑制され, p53 の変異下では抑制されないことを見いだした。

正常 p53 が HIF-1 α に影響する報告はあるが, HIF-1 β を介して VEGF を制御することを示す研究はほとんどなく, 癌抑制の進歩につながることから, 本研究は学位に値するものとする。