The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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（よし おか やす ひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学 位 記 番 号	第　２４８９７　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-1α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-1βと転写をおこす。HIF-1β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-1β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℃（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-1βは発現したが，32℃（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-1β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-1β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)ヌ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-1β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-1β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. 膵癌における*p53*遺伝子変異の有無と血管新生の関係＞

方法：膵癌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-1α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-1β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-1β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-1αが安定化し、HIF-1β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-1βの発現、HIF-1の転写活性、VEGFの産生が、*in vivo*（ヌードマウス固形腫瘍モデル）ではHIF-1β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-1αに影響する報告はあるが、HIF-1β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考える。