

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58942">https://hdl.handle.net/11094/58942</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	よし おか やす ひこ 吉 岡 泰 彦
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-1 $\alpha$ 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 $\beta$ と転写をおこす。HIF-1 $\beta$ 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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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 $\beta$ 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<sup>2+</sup>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 $\beta$ 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 $\beta$ 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<sup>2+</sup>下でのVEGFの産生、HIF-1活性、HIF-1 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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. 腺癌におけるp53遺伝子変異の有無と血管新生の関係>

**方法:** 腺癌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 $\alpha$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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、 $\alpha$ と $\beta$ とからなっている。低酸素時にHIF-1 $\alpha$ が安定化し、HIF-1 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\alpha$ に影響する報告はあるが、HIF-1 $\beta$ 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。