

学 位 論 文 題 名

創傷治癒における解糖系の役割と
解糖系酵素 PFK-2/PFKFB3の関与

学位論文内容の要旨

創傷治癒過程は病理学的に、炎症期、増殖期、再生期の3つのステージで構成される。

Epidermal growth factor(EGF)はケラチノサイトの遊走・増殖に関与し、創傷治癒過程で重要な役割を担うとともに、線維芽細胞の解糖系を活性化することが報告されている。

解糖系の律速酵素は 6-phosphofructo-1-kinase(PFK-1)であるが、PFK-1 の活性化因子として Fructose-2,6-bisphosphate(F2,6BP)が発見された。F2,6BP は 6-phosphofructo-2-kinase(PFK-2)により Fructose-6-phosphate(F6P)から合成され、ATP による PFK-1 の活性の阻害に拮抗し、解糖系を強く活性化させる。PFK-2 は同一分子内にフォスファターゼドメインも持つ二機能性酵素で、少なくとも 4 つの遺伝子座でコードされており(PFKFB1~4)、各アイソフォーム間でキナーゼとフォスファターゼの活性比や、プロテインキナーゼによる活性調節機序が異なる。

PFKFB3 蛋白はキナーゼ活性が最も高く、胎盤などの増殖が盛んな臓器やエネルギー代謝を解糖系に依存している脳に発現している。PFKFB3 遺伝子は 19 のエクソンで構成され、エクソン 13 から 19 は選択的スプライシングにより組織特異的な発現様式を示す。PFKFB3 はヒト腫瘍で高発現し低酸素やインスリンによって発現が誘導され、腫瘍細胞の増殖に重要な役割を果たすと考えられ、解糖系の亢進における最も重要な PFK-2 アイソフォームである。

ヒトの類上皮癌細胞の細胞株を EGF で刺激すると、F2,6BP の増加並びに PFK-2 の活性が上昇することが知られている。また、EGF は線維芽細胞における F2,6BP の増加を介して解糖系を活性化し細胞増殖を促進する事も報告されている。

このように細胞増殖には解糖系の関与が重要であり、創傷治癒には細胞増殖が不可欠であるが、創傷治癒と解糖系の関連性については明白ではない。解糖系と創傷治癒・ケラチノサイトの増殖の関連性を明らかにするため、解糖系を促進させる重要な酵素である PFK-2/PFKFB3 のケラチノサイトにおける発現と EGF の関連に着目し、創傷治癒における解糖系の役割と解糖系酵素 PFK-2/PFKFB3 の関与についての検討をおこなった。

ケラチノサイトにおける解糖系と細胞増殖の関連性を検討するために、HaCaT 細胞に 2-

deoxyglucose(2-DOG)を作用させ解糖系を抑制し、細胞増殖に対する影響を検討した。2-DOG はグルコースに比べ6時間、12時間後に有意に HaCaT 細胞の増殖を抑制した。

ヒトケラチノサイトにおける選択的スプライシングによる PFKFB3 アイソフォームの発現様式を解析するためエクソン 13 から 19 を特異的に増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行った。新生児ケラチノサイトでは、二種類のアイソフォームが発現し PFKFB3-ACG、PFKFB3-AG と命名した。HaCaT 細胞でもケラチノサイトと同様のアイソフォームの発現を確認した。

非腫瘍細胞であるケラチノサイトにおける F2,6BP 量に与える EGF の効果を検討した結果、EGF の濃度依存性に F2,6BP の量は増加し、解糖系が促進していることが明らかとなった。

EGF の PFKFB3 mRNA の発現に対する影響を検討するため HaCaT 細胞を EGF で刺激し、リアルタイム RT-PCR で PFKFB3 mRNA の発現を定量した。EGF 刺激により時間依存性に PFKFB3 mRNA の発現誘導が認められた。また、PFKFB3 mRNA の発現は EGF の濃度依存性に増加した。

EGF の刺激による HaCaT 細胞における PFKFB3-ACG、PFKFB3-AG の発現の差を比較するためエクソン 13 から 19 を特異的に増幅するプライマーを用いて RT-PCR を施行した。EGF の刺激で PFKFB3-ACG が PFKFB3-AG に比べ発現が強く認められた。

In vivo におけるケラチノサイトでの PFKFB3 蛋白の発現を確認するため、マウスの皮膚創傷部での PFKFB3 蛋白の発現を抗 PFKFB3 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。12 週・雄の C57BL/ KSJ マウスに傷を作成し免疫染色を行った。3 日目の創傷部における再生上皮のケラチノサイトに PFKFB3 の発現が多く認められた。

PFKFB3 蛋白は誘導型 PFK-2 と命名され、アンチセンスオリゴヌクレオチドで発現を抑制すると、F2,6BP の減少とともに細胞増殖も抑制されるが、今回の実験から、in vivo,in vitro ともにケラチノサイトの増殖に PFKFB3 を介する解糖系の活性化が重要で特に創傷治癒過程における増殖期に重要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 助 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

創傷治癒における解糖系の役割と 解糖系酵素 PFK-2/PFKFB3の関与

解糖系の律速酵素は 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) であるが、PFK-1 の活性化因子として Fructose-2, 6-bisphosphate (F-2, 6-BP) が発見された。F-2, 6-BP は 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) により Fructose-6-phosphate (F-6-P) から合成され、解糖系を強く活性化させる。PFK-2 は同一分子内にフォスファターゼドメインも持つ二機能性酵素で、少なくとも 4 つの遺伝子座でコードされており (PFKFB1-4)、各アイソフォーム間でキナーゼとフォスファターゼの活性比や、プロテインキナーゼによる活性調節機序が異なる。PFKFB3 蛋白はキナーゼ活性が最も高く、解糖系の亢進における最も重要な PFK-2 アイソフォームである。PFKFB3 遺伝子は 19 のエクソンで構成され、エクソン 13 から 19 は選択的スプライシングにより組織特異的な発現様式を示す。増殖能が高いヒト腫瘍細胞や癌組織で解糖系の律速酵素である誘導型 PFK-2 (iPFK-2) が高発現している事が報告され、iPFK-2 は PFKFB3 にコードされ、細胞増殖において重要であることが示唆されている。

また、Epidermal growth factor (EGF) は、ケラチノサイトの遊走・増殖に関与し、創傷治癒過程で重要な役割を担うことが報告されているが、ヒトの類上皮癌細胞の細胞株や線維芽細胞の F2, 6BP の増加並びに PFK-2 の活性の上昇を介して解糖系を活性化し細胞増殖を促進する事も報告されている。

糖尿病患者における創傷治癒の遅延は、種々の面から重要な問題で、糖尿病慢性合併症の原因として、高血糖による細胞内の解糖系亢進に起因する細胞内代謝異常が重要であると考えられている。そこで、糖尿病における創傷治癒遅延の原因を解明するため、ケラチノサイトにおける解糖系の調節機序を明らかにすることを目的とし、以下の事実を明らかにした。

- ・ ヒトケラチノサイトの cell line である HaCaT 細胞において、2-deoxy-D-glucose を用いた解糖系の抑制に伴い細胞増殖の抑制が認められた。
- ・ EGF で HaCaT 細胞を刺激した結果、PFKFB3-ACG、PFKFB3-AG の 2 種類の選択的スプライシングによる PFKFB3 アイソフォームが認められた。
- ・ EGF で HaCaT 細胞を刺激した結果、解糖系の中間代謝産物である F-2, 6-BP の量が EGF の濃度依存性に増加した。
- ・ EGF で HaCaT を刺激した結果、PFKFB3 mRNA の発現は時間、濃度依存性に増加を認め、2 つのアイソフォーム間では、キナーゼ活性の調節に必要なリン酸化部位を含む PFKFB3-ACG が強く発現が誘導された。
- ・ マウスに傷を作成し抗 PFKFB3 抗体を用いて免疫染色を行った結果、創傷治癒過程で増殖

期の創傷部の辺縁のケラチノサイトで、PFKFB3 の発現を認めた。

以上より、in vivo, in vitro とともにケラチノサイトの増殖に PFKFB3 を介する解糖系の活性化が重要で特に創傷治癒過程における増殖期に重要であることが示唆された。

糖尿病患者の創傷治癒遅延はファイブロブラストの増殖遅延も関与するが、keratinocyte を用いた理由としては、創傷部の keratinocyte において PFKFB3 が高発現したためと回答した。マウスの皮膚の免疫染色で創傷部に PFKFB3 の高発現を認めたが、正常組織の提示の必要性に関する指摘をいただいた。EGF が PFKFB3 を高発現させたのは直接作用か細胞増殖による結果かという質問には、双方考えられ得ると回答した。keratinocyte と HaCaT を両方用いた理由についての質問があり、keratinocyte は継代により角化するため、keratinocyte と HaCaT のアイソフォームが同じであることを確認した後、HaCaT を使用したが、keratinocyte の角化防止には Ca 濃度を下げる事の必要性について指摘をいただいた。PFKFB3-ACG と PFKFB3-AG の違いについては、リン酸化部位である Ser461 の存在の有無であるが、酵素活性の違いについて詳細は不明であることを述べた。in vitro での創傷治癒モデルに関する実験の施行の有無については、施行したが明らかな結果はえられなかったと述べた。EGF レセプターから AMPK に対するシグナルの存在の有無については、不明であると述べた。また、PFKFB3 抗体はリン酸化に重要な Ser461 が存在するエクソン C に含まれる配列を用いて作製したが、PFKFB3-ACG 以外に対しての認識の可能性については、PFKFB3-AG は認識しないものの、他の選択的スプライシングアイソフォームは認識する可能性があり得ると回答した。糖尿病との関連について今後の方針に対しては、糖尿病の動物を使用し実験を行う必要性、in vitro の創傷治癒モデルを作成し実験を継続する事が望ましいと述べた。

この論文は創傷治癒における解糖系の関与について解明し、高く評価され、創傷治癒における糖尿病コントロールの重要性を解糖系の観点から再確認し、今後、創傷治癒において解糖系が新たな治療の助勢となる可能性がある点で期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。