

学位論文題名

Phosphorylation of the 6-Phosphofructo-2-kinase/  
Fructose-2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 Family of  
Glycolytic Regulators in Human Cancer

(ヒト癌組織における6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-  
ビスホスファターゼ/PFKFB3ファミリーのリン酸化について)

学位論文内容の要旨

癌組織では、たとえ酸素の存在下でも解糖系は亢進する (Warburg 効果)。これまで Warburg 効果についてはその機序は明らかではない。解糖系律速酵素 6-Phosphofructo-1-kinase (PFK-1) は fructose 2,6-bisphosphate (F2,6BP) によってアロステリックに活性化され、その合成酵素は 6-Phosphofructo-2-kinase (PFK-2) である。PFK-2 は同一分子内にホスファターゼドメイン (Fructose-2,6-bisphosphatase; FBPase) をあわせもつ二機能性酵素であり、4つのアイソフォーム (PFKFB1-4) が報告され、このうち PFKFB3 アイソフォームは、最もキナーゼ活性が高くユビキタスに発現し、特に炎症部位、癌組織などに高発現している。同酵素はセリン 461 のリン酸化によりキナーゼ活性がさらに亢進し、細胞内 F2,6BP が増加することが知られているが、癌組織における PFK-2/PFKFB3 のリン酸化に関する報告はないことから、本研究は癌細胞及び癌組織における PFK-2/PFKFB3 のリン酸化とその意義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。

- (1) 培養腫瘍細胞において PFKFB3-AG, PFKFB3-ACG の二種類のアイソフォームが発現し、セリン 461 を含む PFKFB3-ACG がより高発現していた。
- (2) 癌組織で PFKFB3 mRNA が高発現しており、PFKFB3-ACG が高発現していた。
- (3) PFK-2/FBPase/PFKFB3 の活性変異体をコードする PFKFB3-ACG<sup>S461E</sup> を COS-7 に強制発現させ、細胞増殖アッセイを行ったところ PFKFB3-ACG<sup>S461E</sup> を高発現した COS-7 では PFKFB3-ACG 及び Empty Vector を導入したものと比較し有意に細胞増殖が亢進した。
- (4) オリゴマイシンで RAW264.7 を刺激し、抗リン酸化 PFK-2/PFKFB3 抗体でウェスタンブロッティングを行ったところオリゴマイシン存在下では PFK-2/FBPase/PFKFB3 はリン酸化し F2,6BP 濃度も増加していた。
- (5) 抗 PFK-2/PFKFB3 抗体及び抗リン酸化 PFK-2/PFKFB3 抗体を用い、免疫組織学的に正常大腸組

織と大腸癌組織、正常乳腺組織と乳癌組織の PFK-2/FBPase/PFKFB3 の発現及びそのリン酸化を比較したところ、癌組織において高発現しリン酸化も増加していた。

以上より培養腫瘍細胞や癌組織ではセリン 461 を含む PFKFB3-ACG が高発現し、セリン 461 のリン酸化が細胞増殖や、低酸素に対する代謝応答に深く関与することが示唆された。したがって PFK-2/FBPase/PFKFB3 の高発現とリン酸化が癌の進展に重要な役割を担う可能性があると考えられた。

PFKFB3 の Ser461 に着目した理由については、他のアイソフォームのキナーゼ/ホスファターゼ活性比が 100 倍以下であるのに対し、PFKFB3 アイソフォームのキナーゼ/ホスファターゼ活性比は数千倍と非常にキナーゼ/ホスファターゼ活性比が高いということを述べた。

PFKFB3-ACG を不活性化する方法についての質問には、PFKFB3 のアミノ酸残基をフェニルアラニンへ変換することによる、抑制型の変異体が作製可能であると言われ、これによる、PFKFB3 蛋白活性の阻害が考えられると解答した。

F2,6BP 量については、EV、WT 導入時に上昇、461E で低下していることについて、解糖系が著明に亢進することによって、ネガティブフィードバックがかかることが予測される。

抗リン酸化 PFK-2 抗体の認識部位に関する質問があり、PFK-2/PFKFB3 のリン酸化部位(Ser 461)を認識していると解答した。

血管内皮と平滑筋が抗リン酸化 PFK-2 抗体で認識されているという結果については、腫瘍組織における血管新生について検討予定であったが、今回抗リン酸化 PFK-2 抗体で認識されている血管については皮下組織の血管で、構造的に正常血管でも同様の結果が得られる可能性があり、今後検討の余地があると考えられた。治療に用いる場合、PFKFB3 の抑制変異体をウイルスベクターに導入し、局所注射によって、腫瘍の部位に注射することが現時点における一つの方法であるということが考えられた。PFKFB3 のアイソフォームについては、今回の質疑応答の結果 Ser461 がキナーゼドメインではなく、いわゆる調節部位に存在することが明らかとなった。また PFKFB3 のリン酸化部位が Ser461 以外にも存在するものの、Ser461 のキナーゼ/ホスファターゼ活性比が非常に高く、PFKFB3 の活性化には最も重要である。

この論文は、癌組織における解糖系の亢進について解明し、高く評価され、今後、癌治療の一助となる可能性があると言う意味で期待される。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。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

## 学 位 論 文 題 名

### Phosphorylation of the 6-Phosphofructo-2-kinase/ Fructose-2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 Family of Glycolytic Regulators in Human Cancer

(ヒト癌組織における6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-  
ビスホスファターゼ/PFKFB3ファミリーのリン酸化について)

癌組織では、たとえ酸素の存在下でも解糖系は亢進する(Warburg 効果)。これまで Warburg 効果についてはその機序は明らかとはされず、解糖系律速酵素 6-Phosphofructo-1-kinase (PFK-1)は fructose 2,6-bisphosphate (F2,6BP)によってアロステリックに活性化され、その合成酵素は 6-Phosphofructo-2-kinase (PFK-2)である。PFK-2 は同一分子内にホスファターゼドメイン(Fructose-2,6-bisphosphatase; FBPase)をあわせもつ二機能性酵素であり、4つのアイソフォーム(PFKFB1~4)が報告され、このうち PFKFB3 アイソフォームは、最もキナーゼ活性が高くユビキタスに発現し、特に炎症部位、癌組織などに高発現している。同酵素はセリン 461 のリン酸化によりキナーゼ活性がさらに亢進し、細胞内 F2,6BP が増加することが知られているが、癌組織における PFK-2/ PFKFB3 のリン酸化に関する報告はないことから、本研究は癌細胞及び癌組織における PFK-2/ PFKFB3 のリン酸化とその意義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。

- (1)培養腫瘍細胞において PFKFB3-AG,PFKFB3-ACG の二種類のアイソフォームが発現し、セリン 461 を含む PFKFB3-ACG がより高発現していた。
- (2)癌組織で PFKFB3 mRNA が高発現しており、PFKFB3-ACG が高発現していた。
- (3)PFK-2/ FBPase/ PFKFB3 の活性変異体をコードする PFKFB3-ACG<sup>S461E</sup>を COS-7 に強制発現させ、細胞増殖アッセイを行ったところ PFKFB3-ACG<sup>S461E</sup>を高発現した COS-7 では PFKFB3-ACG 及び Empty Vector を導入したものと比較し有意に細胞増殖が亢進した。
- (4)オリゴマイシンで RAW264.7 を刺激し、抗リン酸化 PFK-2/ PFKFB3 抗体でウェスタンブロットティングを行ったところオリゴマイシン存在下では PFK-2/ FBPase/ PFKFB3 はリン酸化

し F2,6BP 濃度も増加していた。

(5)抗 PFK-2/ PFKFB3 抗体及び抗リン酸化 PFK-2/ PFKFB3 抗体を用い、免疫組織学的に正常大腸組織と大腸癌組織、正常乳腺組織と乳癌組織の PFK-2/ FB Pase/ PFKFB3 の発現及びそのリン酸化を比較したところ、癌組織において高発現しリン酸化も増加していた。

以上より培養腫瘍細胞や癌組織ではセリン 461 を含む PFKFB3- ACG が高発現し、セリン 461 のリン酸化が細胞増殖や、低酸素に対する代謝応答に深く関与することが示唆された。したがって PFK-2/ FB Pase/ PFKFB3 の高発現とリン酸化が癌の進展に重要な役割を担う可能性があると考えられた。

PFKFB3 の Ser461 に着目した理由については、他のアイソフォームのキナーゼ/ホスファターゼ活性比がせいぜい 100 倍以下であるのに対し、PFKFB3 アイソフォームのキナーゼ/ホスファターゼ活性比は数千倍と非常にホスファターゼ活性比が高いということを述べた。

PFKFB3-ACG を不活性化する方法についての質問には、PFKFB3 のアミノ酸残基をフェニルアラニンへ変換することによる、抑制型の変異体が作製可能であると言われ、これによる、PFKFB3 蛋白活性の阻害が考えられると解答した。

F2,6BP 量については、EV、WT 導入時に上昇、461E で低下していることについて、解糖系が著明に亢進することによって、ネガティブフィードバックがかかることが予測される。

抗リン酸化 PFK-2 抗体については、PFK-2/PFKFB3 のリン酸化部位を認識しているということに宜しいですね。という質問があり、その通りである旨解答した。

血管内皮と平滑筋が抗リン酸化 PFK-2 抗体で認識されているという結果については、腫瘍組織における血管新生について検討予定であったが、今回抗リン酸化 PFK-2 抗体で認識されている血管については皮下組織の血管で、構造的に正常血管でも同様の結果が得られる可能性があり、今後検討の余地があると考えられた。治療に用いる場合、PFKFB3 の抑制変異体をウイルスベクターに導入し、局所注射によって、腫瘍の部位に注射することが現時点における一つの方法であるということが考えられた。PFKFB3 のアイソフォームについては、今回の質疑応答の結果 Ser461 がキナーゼドメインではなく、いわゆる調節部位に存在することが明らかとなった。また PFKFB3 のリン酸化部位が Ser461 以外にも存在するものの、Ser461 のキナーゼ/ホスファターゼ活性比が非常に高く、PFKFB3 の活性化には最も重要である。

この論文は、癌組織における解糖系の亢進について解明し、高く評価され、今後、癌治療の一助となる可能性があると言う意味で期待される。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。