

論文内容の要旨

Protein interaction networks characterizing the A549 cells Klotho transfected are associated with activated pro-apoptotic Bim and suppressed Wnt/ β -catenin signaling pathway

A549 細胞を用いたタンパク質相互作用ネットワーク解析によると Klotho はアポトーシス促進因子の Bim を活性化し Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を抑制する

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器外科学分野

大学院生 松本 充生

Scientific Reports 第 14 巻 第 1 号 (2024) 掲載

【背景】

Klotho 遺伝子は、加齢と加齢関連疾患の発症を制御するアンチエイジング遺伝子として知られているが、癌の増殖や浸潤との関連が報告されてきた。我々は、GFP-Klotho 遺伝子を肺腺癌細胞 (A549) に導入し、klotho タンパク質が安定して高発現する細胞株 (A549/KL) を樹立した。A549/KL は、親株 A549 に比べ、上皮間葉転換 (EMT) 関連タンパク質である N-カドヘリンの発現が完全に抑制されることを報告した。この結果から Klotho は肺癌細胞の転移浸潤能を抑制するのではないかと仮説を立てた。本研究では、Klotho の転移浸潤能の有無とそのメカニズム解析を行うことを目的とした。

【方法】

A549 および A549/KL 細胞 3.0×10^5 個を用いて浸潤アッセイにより *in vitro* で浸潤能について検討した。A549 および A549/KL 細胞 2×10^4 個/ $10 \mu\text{l}$ を、それぞれ 3 匹ずつ BALB/cSlc-nu/nu マウス (雌 5 週齢) に対して尾静脈投与し、8 週間後に肺を摘出し、肺転移数について病理学的に検討した。3 匹のマウスの肺組織をそれぞれ 5 断面ずつ計 15 断面評価し、転移病巣数について比較した。

A549 および A549/KL 細胞の LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析を行った。得られたタンパク質データを用いて Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) を行い、タンパク質相互作用ネットワークを明らかにし、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) や GeneMANIA を用いてアップストリーム解析を行った。

【結果】

細胞の浸潤アッセイにより浸潤細胞の平均値を比較した結果、A549 群は 4992 ± 716.33 、A549/KL 群は 3333 ± 253.85 と A549 と比較して有意に A549/KL の浸潤能が低下していることがわかった ($p=0.036$)。 *in vivo* における肺転移モデルの解析の結果、A549 群は 15 断面中 11 断面に肺転移を認めたが、A549/KL 群は全く肺転移を認めず、有意に A549/KL で転移能が抑制されていた ($p=0.0217$)。

A549 および A549/KL の LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析の結果、6994 個のタンパク質が同定され、そのうち 6958 個 (99.49%) は両者に共通していたが、Volcano plots を作成したところタンパク質の発現レベルは両者で大きく異なっていることがわかった。このタンパク質データを用いて WGCNA を 2 度行い、A549/KL と最も有意に関連をもつ 582 個のタンパク質が同定された。IPA や GeneMANIA を用いてアップストリーム解析を行った結果、BCL2 like 11 (Bim) と BCL2 binding component 3 (PUMA) が上流制御因子である可能性が示唆された。このことを検証するために、ウェスタンブロットを施行し、A549/KL において Bim の発現上昇を認めたが、PUMA の発現は確認できなかった。以上より、Bim が Klotho の機能を制御する master regulator の可能性が示唆された。

また、A549 および A549/KL で発現が上昇した接着関連タンパク質およびアポトーシス関連タンパク質に注目し、GeneMANIA を用いて解析を行ったところ、Wnt/ β カテニンシグナル伝達経路を抑制することが示唆された。

【考察】

Klotho 発現により肺癌細胞の転移・浸潤能が抑制されることが、浸潤アッセイおよび肺転移モデルマウスの実験結果から明らかになった。また、WGCNA によるタンパク質相互作用ネットワーク解析やアップストリーム解析により Bim が重要な Klotho の制御因子であることが確認された。GeneMANIA による解析の結果、A549 の浸潤や転移は Wnt シグナル伝達経路の関与が関係していると考えられるが、A549/KL ではその伝達経路が抑制されており、その原因は PCDH9 と FAT 1 の発現のよるとも考えられた。

本研究から、Klotho が Wnt/ β カテニンシグナル伝達経路を抑制し、FGF-FGFR シグナル伝達における MEK/ERK の下流のリン酸化を止めることで、Bim と相乗的に Wnt 受容体のリン酸化を抑制すると考えられた。すなわち、Klotho は Bim を活性化し Wnt/ β カテニンシグナル伝達経路を抑制することにより、肺癌の転移浸潤能を抑制する可能性が示唆された。

【結論】

Klotho 発現により肺癌細胞の転移浸潤能の抑制効果を示すこと、Klotho と Bim および Wnt/ β カテニンシグナル伝達との関連性について、今回初めて明らかにした。