

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Protein interaction networks characterizing the A549 cells Klotho transfected are associated with activated pro-apoptotic Bim and suppressed Wnt/ $\beta$ -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/ $\beta$  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 volume 14, January 25, 2024 掲載

DOI: 10.1038/s41598-024-52616-0

Klotho は、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性が報告されてきた。また、申請者らのグループは、今までに非小細胞肺癌術後の予後因子であることなども報告してきた。そのため、Klotho 発現に係るメカニズム解析を行うために、Klotho を肺腺癌細胞(A549)に導入し、安定的に高発現した細胞株(A549/KL)を樹立した。そして、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。

A549 および A549/KL 細胞を用いて浸潤アッセイにより *in vitro* で細胞の浸潤能について検討した。この検討で浸潤細胞の平均値を比較した結果、A549/KL の浸潤能が親株 A549 と比較して有意に低下していた( $p=0.036$ )。次に、A549 および A549/KL 細胞を、それぞれ 3 匹ずつ BALB/cSlc-nu/nu マウスに尾静脈投与し、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、肺転移数について比較した。この解析の結果、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( $p=0.0217$ )。次に、Klotho が転移浸潤能を制御するメカニズム解析を行うために、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。プロテオーム解析により 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大きく異なっていた。このタンパク質データを用いて WGCNA を 2 回施行し、A549/KL と有意に関連をもつ 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)が上流制御因子であること、Wnt/ $\beta$  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。

本研究では、Klotho と Bim および Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル伝達との関連性について初めて明らかにし、Bim の活性化は EMT 関連蛋白である N カドヘリンの発現を阻害することからカドヘリンスイッチが関与していると考えられた。以上より、Klotho による肺癌細胞の転移浸潤能の抑制は、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル伝達経路とカドヘリンスイッチにより制御されていることが推測された。

第二次審査では、①Klotho が Wnt 経路を抑制するメカニズム、②肺癌と Wnt 経路の関連、③Klotho の臨床への応用、④Bim と肺癌細胞の転移浸潤との関連についてなどの質疑がなされ、いずれも適切な回答が得られた。

本研究は、Klotho が肺癌細胞の転移浸潤能を抑制すること、Bim および Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル伝達経路が関与していることを明らかにした初めての報告であり、臨床的意義は非常に高いと考えられた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。