

# 論文要旨

## Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer

(前立腺癌における ADAM-10 の細胞内局在と病理学的悪性度との関連)

有馬 隆司

### 【序論および目的】

A disintegrin and metalloprotease (ADAM) はメタロプロテアーゼファミリーに属し様々なサイトカインやレセプターの細胞外ドメインの切断 (shedding) に関与し、これらの分泌や発現の調節に関与している。従って、それらの局在は通常細胞膜にあると考えられている。これまでに種々の癌腫において ADAM の発現が亢進しているとする報告がなされてきたが、最近 high grade の前立腺癌 (PC) において ADAM ファミリーの一つである ADAM-10 が核に集積しているとの報告がなされた (McCulloch DR et al. Clin Cancer Res 2004)。

我々は細胞膜から核への ADAM10 の局在変化が前立腺癌の進行や悪性度に関与しているのではないかと仮定し、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP および前立腺針生検により得られた臨床検体を用いて以下の実験を行った。

### 【材料および方法】

1. 細胞株: ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP は 10% FBS を添加した RPMI1640 培地で培養した。
2. イムノブロット法: 5-dihydrotestosterone (DHT) 添加による ADAM10 発現実験では、10cm dish に 70% confluent となった細胞に各濃度の DHT を添加した。24 時間後に培地を交換して、同じ濃度の DHT を添加しさらに 24 時間培養した後に細胞を回収した。蛋白分画を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後 PVDF 膜に転写し、3% skim milk でブロックした。1000 倍希釈の polyclonal anti-ADAM-10 抗体と 4°C overnight で反応させた後、二次抗体 (anti-rabbit polyclonal IgG-HRP conjugate) を室温 1 時間で反応させ ECL detection system により検出した。
3. 免疫蛍光細胞染色: poly-L-lysine-coated chamber glass に monolayer に増殖した細胞をアセトン固定した。500 倍希釈の polyclonal anti-ADAM-10 抗体と 4°C overnight で反応させた後、FITC-labeled second antibody と室温 1 時間で反応させ蛍光顕微鏡で観察した。
4. MTT assay: フェノールレッド未添加で活性炭処理された RPMI-1640 を使って  $1 \times 10^4$  個の LNCaP 細胞を 96-well プレートに撒き、8 時間後に si-ADAM-10 および si-Control をトランスフェクションさせた。さらに 24、48、72、96 時間培養後に MTT を添加し 4 時間後に生成された formazan を Micro Plate Reader で解析した。
5. 免疫共沈降実験: polyclonal anti-ADAM-10 抗体をリンクさせたビーズをタンパク溶解液と反応させて ADAM-10 タンパクを回収した。これを SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後 PVDF 膜に転写し、3% skim milk でブロックした。1000 倍希釈の monoclonal

anti-androgen receptor (AR) antibody 抗体と4°C overnight で反応させた後、二次抗体 (anti-mouse polyclonal IgG-HRP conjugate) を室温 1 時間で反応させ ECL detection system により検出した。

6. 免疫組織学的染色: 前立腺癌 64 検体および前立腺肥大症 20 検体のパラフィン包埋切片を脱パラ・抗体賦活化後に 1000 倍希釈の polyclonal anti-ADAM-10 抗体と4°C overnight で反応させた後、ABC 法によりタンパク発現を検出した。

#### 【結果】

まず始めに DHT 添加による ADAM-10 の発現の変化を Western blot 法で検討したところ、全細胞分画では DHT 添加による ADAM-10 の発現に変化は見られなかったが、核分画では DHT の濃度が上昇するに従い ADAM-10 の発現が増加し、逆に細胞膜・細胞質分画では減少していた。免疫蛍光細胞染色では DHT 添加後に ADAM-10 の核への集積が見られた。免疫共沈降実験では核分画において ADAM-10 と AR との結合が認められたが、細胞膜・細胞質分画では両者の結合は認められなかった。MTT assay では ADAM-10 ノックダウン LNCaP 細胞はコントロールに比べて細胞増殖が低下し、DHT 添加の下ではその差はさらに拡大した。臨床検体の免疫組織染色では、ADAM-10 の細胞膜の染色強度は PC の方が BPH に比べて低く ( $P=0.0017$ )、逆に核の染色強度は PC の方が高かった ( $P<0.0001$ )。PC の検体では ADAM-10 の核への集積は、細胞異型の高い群で ( $P<0.0001$ )、局所進行癌の方が限局癌に比べて ( $P=0.004$ )、さらに前立腺特異抗原 PSA 値の高い群で ( $P<0.0001$ ) 有意に強く認められた。

#### 【結論及び考察】

これまでの知見では ADAM-10 は細胞膜に発現し様々なサイトカインやレセプターの細胞外ドメインの切断 (shedding) に関与しているとされたが、今回の研究により、前立腺癌においては DHT の刺激により ADAM-10 は核内に移行することが明らかになった。良性疾患である前立腺肥大症においては ADAM-10 の発現は細胞膜に限局していた。また ADAM-10 の核における発現強度は前立腺癌の病理学的悪性度と相関することから、ADAM-10 は前立腺癌の増殖や進行に関与することが考えられる。免疫共沈降実験では核内における ADAM-10 とアンドロゲンレセプター (AR) の結合が確認されたことから、2つのタンパクは complex を形成して転写促進へ働くことが考えられた。しかしながら、細胞質や細胞膜分核では ADAM-10-AR complex は観察されないことから、この complex の形成には核内に局在する別のタンパクの存在が必要であると推測される。

(Cancer Science 2007; 98: 1720-1726 掲載)

# 論文審査の要旨

報告番号	医論第 1462 号	氏名	有馬 隆司
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	金蔵 拓郎	堂地 勉

## Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer

(前立腺癌における ADAM-10 の細胞内局在と病理学的悪性度との関連)

A disintegrin and metalloprotease(ADAM)はメタロプロテアーゼファミリーに属する蛋白であり、その局在は通常細胞膜にある。ADAM は細胞膜においてサイトカインやレセプター、増殖因子など様々な蛋白の細胞外ドメインの切断に関与し、これらの分泌や機能を調節している。これまでに乳癌や肺、胃、大腸、子宮、卵巣癌など種々の癌腫において ADAM の発現亢進に関する報告がなされてきた。最近、high grade の前立腺癌(PC)において ADAM ファミリーの一つである ADAM-10 が核に集積しているとの報告がなされた(McCulloch DR et al. Clin Cancer Res 2004)。今回、学位申請者らは細胞膜から核への ADAM10 の局在変化が前立腺癌の進行や悪性度に関連しているのではないかと仮定の下に、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP および前立腺針生検により得られた臨床検体(前立腺癌(PC)64 例、前立腺肥大症(BPH)22 例)を用いて実験を行った。

LNCaP 細胞に 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT)を添加したことによる ADAM-10 発現の変化を Immunoblotting 法で検討した。全細胞分画では DHT 添加の有無や添加した DHT の濃度差による ADAM-10 の発現の差は見られなかった。次に細胞の分画ごとに検討したところ、核分画では DHT の濃度が上昇するにつれて ADAM-10 の発現が増加したが、対照的に細胞膜・細胞質分画では DHT の濃度が上昇するにつれて ADAM-10 の発現が減少した。免疫蛍光細胞染色では DHT 添加後に ADAM-10 の核への集積が観察された。共免疫沈降実験では核分画において ADAM-10 とアンドロゲンレセプター (AR)との結合が認められたが、細胞膜・細胞質分画では両者の結合は全く認められなかった。RNA 干渉による ADAM-10 ノックダウン細胞を用いた MTT assay では、ノックダウン細胞はコントロール細胞に比べて細胞増殖能が低下し、この増殖能の低下は DHT の存在下でより強く認められた。臨床検体を用いた免疫組織染色では、ADAM-10 の細胞膜の染色強度は PCの方が BPHに比べて低く、逆に核の染色強度は PCの方が BPHよりも高かった。PCの検体では ADAM-10 の核における染色強度は、Gleason Score の高い群で、臓器限局癌よりも被膜外浸潤癌において、さらに前立腺特異抗原 PSA 値の高い群に強く認められた。

本研究は、これまで細胞膜に発現して機能するとされてきた ADAM-10 が、前立腺癌において DHT の刺激により、その局在を核へ移行させることを明らかにし、また、ADAM-10 が核内で AR と結合して標的遺伝子の転写活性化に関与していることを示唆した。さらに、ADAM-10 の核における発現強度が前立腺癌の病理学的悪性度や腫瘍マーカー値と相関することから、ADAM-10 が前立腺癌の増殖や進行に関与することを明らかにしたもので臨床的にも意義深いものと考えられた。従って、本論文は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 <b>1462</b> 号	氏名	有馬 隆司
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	金蔵 拓郎	堂地 勉
<p>主査および副査の3名は、平成21年4月14日、学位請求者 有馬隆司君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
質問 1)	ADAM-10 は子宮癌や卵巣癌とも関連があると述べているが、具体的にはどのような報告があるのか。		
回答)	子宮癌や卵巣癌においては細胞接着分子 L1 の発現亢進が予後に関連しており、L1 蛋白の細胞外ドメインの切断および活性化に ADAM-10 が寄与しているという報告がある (Fogel M et al. Lancet 2003)。		
質問 2)	前立腺癌の予後規定因子にはどのようなものがあるか。		
回答)	Gleason Score、遠隔転移、精嚢浸潤、surgical margin、神経周囲浸潤などが挙げられている。		
質問 3)	手術症例において、前立腺癌の転移・浸潤と ADAM-10 の発現との間に何らかの関連性が見出せたか。		
回答)	転移の有無と ADAM-10 発現との関連については検討していない。また、今回の研究では前立腺針生検により得られた検体を用いており、前立腺全摘除術による病理標本は用いていないため病理学的深達度 (pathological T) は不明である。しかし、臨床的深達度 (clinical T) と ADAM-10 の核への局在変化には有意な正の相関が認められた。		
質問 4)	ADAM-10 の局在部位に応じて術式や治療法を変更するなど、今後前立腺癌において ADAM-10 を臨床的に応用することは可能か。		
回答)	前立腺癌の治療法は患者の年齢や針生検病理所見、PSA 値、臨床病期などから総合的に判断される。ADAM-10 の局在変化の判定がこれらの診断ツールを凌駕する可能性はあるが、今後さらに症例を集積し検討する必要がある。		
質問 5)	ADAM-10 の核への局在変化は前立腺癌の予後規定因子となりうるか。		
回答)	患者の予後調査を行っていないため不明である。ただし、今回の実験で ADAM-10 の核への移行が予後規定因子とされる Gleason score や T 分類とが相関することは明らかとなった。		
質問 6)	Fig.1 で ADAM-10 が DHT の濃度依存性に核へ移行することを示し「有意」と説明したが、どのような方法で、あるいは何と比較して有意と判定したのか。		
回答)	Immunoblotting で検出されたバンドをデンストメトリーで解析し発現強度を比較した。それぞれ添加した DHT 濃度が異なる (0、0.1、1、10、100nM) 5 つの細胞からなる群において triplicate で実験を行った。得られた結果を Kruskal Wallis test にて統計解析を行った。		
質問 7)	論文では、Immunoblotting に用いた LNCaP 細胞の DHT への暴露時間は 24 時間であるのに、免疫細胞染色に用いた細胞の DHT 暴露時間は 48 時間である。整合性がないように思えるが、この時間的な差異についてどう考えるか。		
回答)	やや記述不足ではあるが、Immunoblotting では各濃度の DHT が入った medium を 24 時間後に交換し、さらに次の 24 時間も DHT 入り medium で培養している。したがって暴露時間は 48 時間である。免疫細胞染色も同様であり整合性は保たれている。		
質問 8)	Immunoblotting では DHT に 24 時間暴露すれば LNCaP 細胞において ADAM-10 が核内に移行することが示されている。一方、MTT assay で細胞増殖に差が見られるのは三日目 (72 時間) 以降である。ADAM-10 が核内に移行してから細胞増殖に影響を及ぼすまでの 48 時間の差をどう解釈するか。		
回答)	質問 7 の回答の通り DHT 暴露は 48 時間である。残りの 24 時間は、ADAM-10 が核内に移行した後に標的遺伝子の転写活性を上げ増殖因子の発現を亢進し、それらの結果が細胞増殖として出現するまでの時間と考えている。		
質問 9)	核内での ADAM-10 と AR との結合を仲介する第三の蛋白の存在を示唆したが、なぜ第三の因子を考える必要があるのか。		
回答)	ADAM-10 と AR は共に細胞質にも存在しており、両者が構造的に直接結合するのであれば細胞質においても結合すると思われる。しかし、両者の結合は核においてのみ見られることから核に限った因子の存在を考えた。この因子の解明は今後の研究課題である。		
質問 10)	LNCaP 細胞の ADAM-10 を knockdown したときの DHT や AR の変化については検討していないか。		
回答)	今回の研究では検討していないが指摘された点は重要であると思われ、今後の研究課題としたい。		
質問 11)	臨床的にアンドロゲン依存性の癌と非依存性の癌とを見分けることは可能なのか。依存性癌だけでなく非依存性癌の臨床検体を用いた実験は行っていないか。		
回答)	アンドロゲン依存性癌か否かは実際に治療を行って見なければわからないが、通常大部分の前立腺癌		

は初期治療としてのホルモン療法に良く反応する。その後、徐々にアンドロゲン非依存性を獲得する。今回の研究に用いたのは新鮮前立腺癌検体であるため、すべてアンドロゲン依存性癌と考えられる。臨床経過上、アンドロゲン非依存性癌検体のサンプリングは困難であり、今回の研究ではアンドロゲン依存性癌と非依存性癌に分けた検討は行っていない。

- 質問 12) PCにおいて、Gleason score など病理学的悪性度が高いほど ADAM-10 の核での染色性が強くなると述べているが、他に同様のことを示した論文はないのか。
- 回答) 以前に報告 (McCulloch DR et al. Clin Cancer Res 2004) はあるが症例数が少なく統計解析は行われていない。今回のように 64 例もの前立腺癌検体において検討を行った報告は初めてである。
- 質問 13) AR や DHT、PSA の免疫染色を行い、これらの蛋白と ADAM-10 の局在変化の関連について検討を行ったか。
- 回答) 今回の研究では検討していないが重要であると思われ、今後の研究課題としたい。
- 質問 14) Fig.5 に示した low grade および high grade PC の、それぞれの Gleason grade はいくらか。
- 回答) low grade PC の Gleason grade は 3、high grade PC は 4 あるいは 5 と判断する。
- 質問 15) 核の染色強度を示した H-score とは具体的にどのようなものか。
- 回答) 癌細胞の核を、Image-J software を用いてマーキングした後ブルーフィルターをかけて画像処理し ADAM-10 の染色強度を調べた。300 個の核を数え、染色強度に negative (0), weak (1), moderate (2), strong (3) と係数をつけ、それぞれの個数に掛け算を行い、その総和により染色強度を評価したものである。
- 質問 16) ADAM-10 と AR との結合を仲介する蛋白の存在を示唆したが、何らかの具体的な蛋白を想定しているのか。
- 回答) 質問 9 の回答の通り、仲介蛋白の存在はあくまでも推測であり今後の研究課題としたい。
- 質問 17) ADAM-10 によって細胞外ドメインを切断された膜貫通蛋白では、残った細胞質側はどのような振る舞いをするのか。細胞内に移行して何らかの機能を発現するという報告はあるか。
- 回答) 細胞外ドメインの切断 (一次切断) に引き続いて二次切断と呼ばれる細胞内配列の切断が起き、切断断片が細胞質内へ放出されることが見出されている。二次切断産物により発現調節される蛋白として Notch 膜受容体や細胞接着分子 CD44 などがある。
- 質問 18) ADAM-10 が核内に移行した後の具体的な機能について、すでに何らかの知見を得ているのか。
- 回答) AR や DHT と複合体を形成しておそらく標的遺伝子の転写促進に機能しているのであろうと考えられた。それ以上の具体的な機能は依然明らかではない。今後の研究課題としたい。
- 質問 19) ADAM family と、同じく活性中心に Zn を含む matrix metalloprotease (MMP) との関連について検討したか。また、ADAM-10 と MMP との関係はどのようなものか。
- 回答) ADAM と MMP はともに細胞外マトリックスの分解に関与する蛋白であるが、そのドメイン構造は異なり、機能解析という点において ADAM は MMP に比べて依然不明な点が多い。今回の研究では、両者の関係について検討は行っておらず今後の研究課題としたい。
- 質問 20) 前立腺癌において ADAM-10 の細胞内局在の変化を評価することで、どのような臨床応用が考えられるか。
- 回答) ADAM-10 の前立腺癌における具体的な機能が解析され症例が蓄積されれば、前立腺癌の予後規定因子となったり、ADAM-10 の発現抑制による遺伝子治療が可能となるかも知れない。ちなみに同じ ADAM family では、尿中 ADAM 12 が乳癌のバイオマーカーとして有用とする報告がある。
- 質問 21) 今回用いた臨床検体の患者の予後調査は行っているか。臨床的な予後と ADAM-10 局在変化との関連は検討したか。
- 回答) 実際に患者が受けた治療法がホルモン療法、放射線治療、手術療法など多岐にわたっているため、予後と ADAM-10 発現との関連性を直接的に単純に比較することは困難と考える。また、前立腺癌の臨床経過は長期に渡り生命予後は良好なことが多い。従って生命予後と ADAM-10 局在変化との関連性を見出すことは短期間には難しい。生物学的再燃 (PSA failure) との関連性については検討可能と思われるが、今後の課題としたい。
- 質問 22) ADAM-10 が細胞膜から核へ局在を変化させると述べたが、細胞膜にある ADAM-10 がほかの蛋白により切断されて、切断されたものが核内へ移行しているのか。細胞膜にある場合と機能が異なるのか。
- 回答) 当初、細胞膜にある ADAM-10 が切断されて核内へ移行するのではないかと考えた。しかし、細胞膜、核のどちらにおいても発現している ADAM-10 は 60kDa と同じ分子量であった。この事実から、細胞質に存在する ADAM-10 が細胞膜へ向かわずに核へ向かうことでその局在を変化させていると考えられた。また、従来の sheddase としての機能以外に、ADAM-10 は核内に移行することで全く別の機能を発現していると考えられる。
- 質問 23) 本日の審査では、ADAM-10 に対する RNA 干渉を knockdown と口演したが、論文要旨では knockout となっている。統一すべきではないか。
- 回答) ある蛋白の発現を遺伝子レベルで抑制することを knockout と呼ぶのに対して、mRNA レベルで抑制する RNA 干渉法では knockdown と呼ぶのが相当である。論文要旨を訂正する。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。