

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09190

研究課題名（和文）悪性髄膜腫における浸潤能とACTC1の関連、およびその分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the relationship between infiltration ability and ACTC1 and its molecular mechanism in malignant meningioma

研究代表者

矢木 亮吉（Yagi, Ryokichi）

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：00632283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：in vitroでは、悪性神経膠腫細胞株にてACTC1やACTA2の遺伝子抑制を行い、ACTC1-KD株、ACTA2-KD株、ACTC1/ACTA2-KD株はいずれも、コントロール群と比較して細胞遊走能および葉状仮足形成能が抑制されていた。臨床例では、悪性神経膠腫におけるACTA2発現量が、初発例ではWHO grade 4はgrade 3と比較して高く、再発例では初発時よりも高値であった。以上より、ACTA2は悪性神経膠腫細胞における葉状仮足形成と細胞遊走に関与し、臨床検体においても再発時腫瘍におけるACTA2発現の上昇が悪性神経膠腫患者における予後不良因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人神経膠腫の40%を占める悪性神経膠腫はWHO Grade4に分類される原発性脳腫瘍であり、最も予後不良な悪性腫瘍のひとつである。本研究では、悪性神経膠腫における腫瘍浸潤や再発に関与する遺伝子として、ACTC2が関与している可能性を示した。今後、ACTC2に関与する遺伝子を検索することが、意義のある研究であることを示す根拠となったと考える。またACTC2を標的とした薬剤を開発する事により、悪性神経膠腫の長期生存を実現させる可能性があるため、有用な研究結果と考える。

研究成果の概要（英文）：In vitro, ACTC1 and ACTA2 gene suppression was performed in malignant glioma cell lines, and ACTC1-KD, ACTA2-KD, and ACTC1/ACTA2-KD lines all showed suppressed cell migration and lobar pseudopodia formation compared to controls. In clinical cases, ACTA2 expression in malignant gliomas was higher in WHO grade 4 than in grade 3 in first-episode cases, and higher in recurrent cases than in first-episode cases. In conclusion, ACTA2 is involved in lobar pseudopodia formation and cell migration in malignant glioma cells, and in clinical specimens, elevated ACTA2 expression in tumors at recurrence is a poor prognostic factor in patients with malignant gliomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 ACTC1 ACTC2 細胞遊走能 葉状仮足形成能

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高悪性度神経膠腫 (high-grade glioma : 以下 HGG) は高い浸潤能を有するために外科的な根治切除が極めて困難な脳腫瘍であり、同腫瘍の治療成績を改善する為にも、その浸潤機序の解明は喫緊の課題である。アクチンには 6 種類のアイソフォームが存在するが、脳組織での発現が乏しい γ -アクチンについては、HGG を対象とした研究がなされて来なかった。我々は γ -アクチンに分類される actin alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1) が、HGG の遊走能や脳内遠隔転移に関わり、その高発現は有意な予後因子であることを世界に先駆けて報告した。

2. 研究の目的

本研究では、もう一つの γ -アクチン遺伝子である actin alpha 2, smooth muscle (ACTA2) が、HGG の遊走能や浸潤能に関与しているとの仮説を立て、これを検証する目的で本研究を行った。

3. 研究の方法

in vitro

ヒト悪性神経膠腫細胞株である U251MG を対象に、small interfering RNA (siRNA) を用いて ACTC1 と ACTA2 に対して knockdown (KD) を行い、ACTC1 単独 KD、ACTA2 単独 KD、ACTC1・ACTA2 双方の同時 KD を行った発現抑制株をそれぞれ作成した。これに対して sham-KD を行った細胞を陰性対照 (NC) 株とし、計 4 株で以下の実験を行った。

- (1) 各群における ACTC1 と ACTA2 の遺伝子発現量を、RPL37 (ribosomal protein L37 : ハウスキーピング遺伝子) に対する発現比として droplet digital PCR (dd-PCR) 法で測定。
- (2) 各群細胞を 6-well プレートに 1.0×10^5 個ずつ播き、72 時間培養した。その後各群の細胞数を計測して倍加時間を計測。
- (3) 各群の細胞を対象に連続 18 時間 time-lapse 撮影を行い、その間の細胞移動距離を定量測定。
- (4) 各群の明視野顕微鏡画像を基に、葉状仮足の形成が見られる細胞の割合 (%) を算出。
- (5) U251MG 細胞内における ACTC1 と ACTA2 の発現分布を評価するため、各々の特異的抗体を用いて細胞免疫染色を実施し、共焦点顕微鏡で観察。

臨床検体

- (1) 当教室で 2014 年から 2017 年の間に当教室で手術を施行し、High-grade glioma (HGG) (WHO grade 3: 18 例, grade 4: 32 例) と診断された、連続 50 症例の手術検体における ACTA2/RPL37 の遺伝子発現比を dd-PCR で測定。
- (2) 当教室で 2014 年から 2022 年の間に手術を行い、HGG (WHO grade 3: 5 例, grade 4: 7 例) と診断された 12 症例の中で、腫瘍再発時に再手術を施行した患者の初発時と再発時の腫瘍、各 12 検体における ACTA2/RPL37 の発現比を dd-PCR で測定した。その上で腫瘍における ACTA2 遺伝子の発現量と、腫瘍の悪性度 (WHO grade)、遠隔病変の有無、progression-free survival (PFS) との関係について検討。

4. 研究成果

in vitro

- (1) siRNA を用いて作成した U251MG 細胞の ACTC1-KD 株、ACTA2-KD 株、ACTC1/ACTA2-double KD 株においてはいずれも、標的遺伝子の発現量が NC 株と比べて有意に低下していることを確認 ($p < 0.001$)。また ACTC1-KD 株では ACTA2 の発現が、ACTA2-KD 株では ACTC1 の発現が、それぞれ有意に増加 ($p < 0.001$)。
- (2) NC 株との比較で、ACTC1-KD 株の細胞倍加時間は延長したが ($p = 0.027$)、ACTA2-KD 株と ACTC1/ACTA2-KD 株では倍加時間の有意な短縮を認めた ($p < 0.001$, $p = 0.006$)。
- (3) ACTC1-KD 株、ACTA2-KD 株、ACTC1/ACTA2-KD 株はいずれも、NC 群と比較して細胞遊走能の有意な低下が見られ、葉状仮足の形成が有意に抑制された ($p < 0.001$)。
- (4) U251MG 細胞内の ACTC1 および ACTA2 のタンパク発現分布を細胞免疫染色で検討した結果、葉状仮足内の発現分布は同一ではないことが判明した。

臨床検体

- (1) 初発 HGG において WHO grade 4 症例は grade 3 症例と比較して 4 倍近く ACTA2 の発現量が高かった ($p = 0.002$)。また HGG を ACTA2 の発現の多寡で 2 群に分けると、高発現群 ($n = 16$) は低発現群 ($n = 34$) と比べ、初発時に脳遠隔病変を認める症例の割合が有意に高かった。

(2) 再発 HGG 症例 12 例の再発腫瘍における ACTA2 発現量の平均は、同一患者群の初発時 ACTA2 発現量の平均と比べ有意に高値であり ($p = 0.02$)、再発時に ACTA2 が増加していた症例の PFS の方が有意に短かった ($p = 0.01$)。

以上より、ACTA2 が HGG 細胞における葉状仮足形成と遊走能の獲得に関与する分子であることを示した。また臨床 HGG の ACTA2 発現量は腫瘍の悪性度と相関し、かつ再発時の ACTA2 発現上昇は有意な予後不良因子であることを明らかにした。

本研究の結果は -アクチン発現は悪性神経膠腫患者の予後を占う単なるバイオマーカーではなく、治療標的として活用可能な機能分子であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hoshimaru Takumi, Nonoguchi Naosuke, Kosaka Takuya, Furuse Motomasa, Kawabata Shinji, Yagi Ryokichi, Kurisu Yoshitaka, Kashiwagi Hideki, Kameda Masahiro, Takami Toshihiro, Kataoka-Sasaki Yuko, Sasaki Masanori, Honmou Osamu, Hiramatsu Ryo, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Actin Alpha 2, Smooth Muscle (ACTA2) Is Involved in the Migratory Potential of Malignant Gliomas, and Its Increased Expression at Recurrence Is a Significant Adverse Prognostic Factor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 1477 ~ 1477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci13101477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小坂拓也
2. 発表標題 髄膜腫の増殖能・浸潤能に関与する可能性がある遺伝子「ACTC1」の発現の検討
3. 学会等名 第83回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寶子丸拓示
2. 発表標題 悪性神経膠腫の浸潤、再発にAlpha-actinが与える影響について
3. 学会等名 第82回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寶子丸拓示
2. 発表標題 悪性神経膠腫の遊走、再発に関与するActin-Alpha 2, Smooth Muscle(ACTC2)が与える影響について
3. 学会等名 第41回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	鱒淵 昌彦 (Wanibuchi Masahiko) (30343388)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	
研究 分担者	野々口 直助 (Nonoguchi Naosuke) (70388263)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------