

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09359

研究課題名（和文）神経膠腫の浸潤機序解析と浸潤能を標的とした先駆的治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of glioma invasion mechanisms and development of pioneering therapies targeting invasive potential

研究代表者

鰐淵 昌彦（Wanibuchi, Masahiko）

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：30343388

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫は集学的治療を行っても治癒が困難であり、その理由としてこれらの腫瘍が示す高い浸潤能が挙げられる。本研究では、グリオーマにおけるACTC1の発現に關与する遺伝子パスウェイとしてRap1, Hippo, Relaxin, Apelin, Sphingolipid, C-type lectin receptor及びOxytocinのシグナルパスウェイを同定し、さらに アクチンに属するACTA2が、ACTC1と同様、悪性グリオーマの浸潤能・予後に關与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫の中でも膠芽腫（WHO grade 4）の5年生存率は10%未満と極めて予後不良であるが、その理由の一つとして同腫瘍の高い浸潤能が挙げられる。本研究で得られた知見により、ACTC1と同じく、アクチンに分類されるACTA2が、グリオーマの遊走能や予後に關与していることが明らかとなり、さらにACTC1、ACTA2どちらか一方の発現が抑制されると、もう一方のアクチンの発現量が相補的に上昇することが判明した。グリオーマの浸潤に關与している、これら2種類のアクチンを同時に抑制する治療法を確立することで、悪性グリオーマの予後を改善できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Malignant gliomas are challenging to cure even with multimodality treatment because of their highly invasive potential. In this study, we identified the signaling pathways Rap1, Hippo, Relaxin, Apelin, Sphingolipid, C-type lectin receptor, and Oxytocin as gene pathways involved in ACTC1 expression in gliomas. We also found that ACTA2, which also belongs to  $\alpha$ -actin, is involved in the invasive potential and prognosis of malignant gliomas, as is ACTC1.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：malignant glioma glioblastoma meningioma ACTC1 ACTA2 invasion migration prognosis

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマが有する高い浸潤能はこの腫瘍に対する根治手術の達成を難しくしており、本疾患の再発率が極めて高い原因の一つである。

アクチンは、6つのアイソフォーム（正確にはパラログ遺伝子）が知られ、これらは $\alpha$ -アクチン (ACTC1, ACTA1, ACTA2)、 $\beta$ -アクチン (ACTB)、 $\gamma$ -アクチン (ACTG1, ACTG2) の3つのグループに分類される。このうち $\alpha$ -アクチンは細胞内の微小管や中間径フィラメントと協働することで、細胞の遊走や浸潤、細胞分裂、細胞内輸送、細胞接着といったさまざまな細胞機能にも関与していることが知られているが、 $\alpha$ -actin は主に心筋・骨格筋・平滑筋などの筋細胞において強発現しており、 $\alpha$ -アクチンは家族性筋ジストロフィーや心室中隔欠損症の責任遺伝子として知られているものの、中枢神経細胞における $\alpha$ -actinの発現量は筋細胞の10,000分の1以下と非常に少ない。そのため、他の非筋細胞と同様、グリオーマの浸潤機構を支えるactin線維の主役は、発現量が多い $\beta$ -actinや $\gamma$ -actinと見なされ、発現の乏しい $\alpha$ -actinは研究対象としてほとんど注目されてこなかった。これに対し我々は、 $\alpha$ -actinのパラログ遺伝子の一つであるACTC1 (actin, alpha cardiac muscle 1) がグリオーマ細胞におけるlamellipodiaの形成と浸潤能の高低に直接的に関与していることを実験的に証明し、かつ臨床グリオーマにおいて $\alpha$ -actinが高発現している症例では腫瘍の対側浸潤や遠隔転移をきたす頻度が有意に高いことなどを見出し報告した (Ohtaki S, et al. ACTC1 as an invasion and prognosis marker in glioma. *J Neurosurg.* 2017 126(2):467-475., Wanibuchi M, et al. Actin, alpha, cardiac muscle1 (ACTC1) knockdown inhibits the migration of glioblastoma cells in vitro. *J Neurol Sci.* 2018 15;392:117-121)。

## 2. 研究の目的

今回我々は、悪性神経膠腫における $\alpha$ アクチンの役割を解明し、同腫瘍の浸潤能を抑制するための治療薬開発に繋がる新規知見を得るため本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト悪性神経膠腫細胞株 U251MG を使用し、ACTC1, ACTA2 に対する各々の small interfering RNA を用いて、ACTC1 および ACTA2 のノックダウン (KD) を行なった。各群の細胞を各々16時間 Time-lapse 撮影し、細胞形態の変化と細胞の運動速度を解析した。特に細胞の遊走・浸潤を担う細胞膜の突起様構造のうち、“lamellipodia”は「葉状仮足」と呼ばれる薄いベール状の細胞突起であり、その形成はグリオーマ細胞の浸潤においても重要である (Mair DB, et al. *Mol Biol Cell.* 2018.)。そのため U251 細胞を対象に ACTC1 および ACTA2 の細胞免疫染色を行い、その細胞内局在・分布を検討すると共に、ACTC1 あるいは ACTA2 を KD した際の lamellipodia 形成能について検討した。

(2) 当教室で2014年から2022年の間に手術を行い、HGG (High Grade Glioma, WHO grade III 5例, IV 7例)と診断された症例の中で、腫瘍再発時に再手術を施行した12例の患者の初発時および再発時検体におけるACTA2/RPL37の発現をdigital droplet PCRで測定し、その発現と予後との関係について解析を行なった。

(3) 米国NIHが公開しているがんゲノムアトラス (TCGA) のPanCancer Cell line Atlasに登録されている1,156種類のがん細胞株における遺伝子発現データを用いて、ACTC1と有意な発現

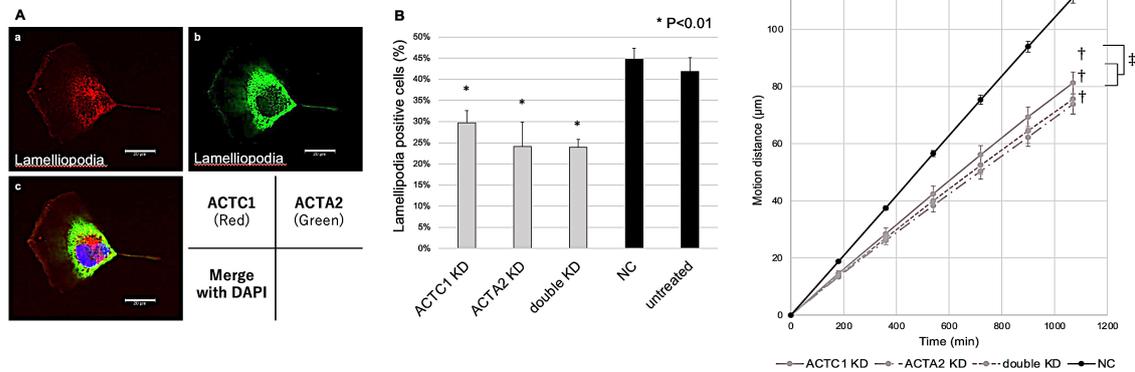
相関を示す遺伝子を抽出すると共に、転写因子のデータベースを用いて ACTC1 のプロモータ配列に対し特に親和性の高い転写因子の探索を in silico にて行なった。

(4) ヒトグリオーマ細胞株 8 株を用いて網羅的な transcriptome 解析を実施し、ACTC1 の発現量と統計学的に有意な共変動を示す遺伝子を対象にパスウェイ解析を実施し、特に ACTC1 によって高発現で有意な impact を受ける遺伝子パスウェイの抽出を試みた。

#### 4. 研究成果

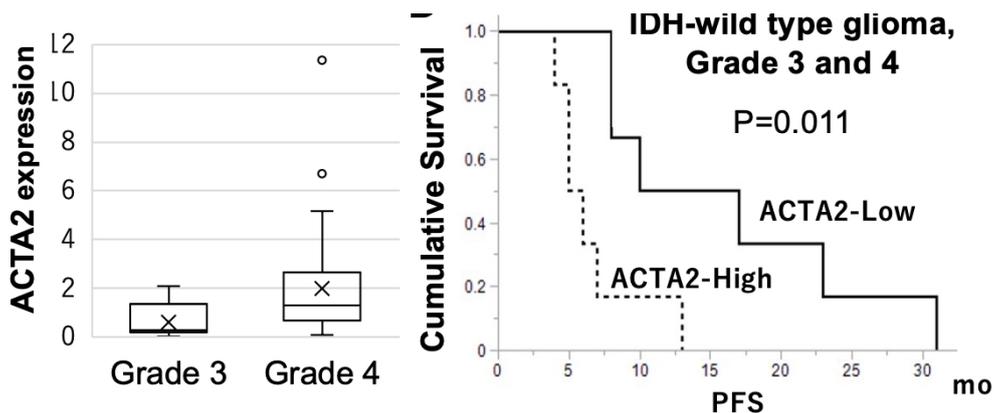
(1)  $\alpha$ -actin である ACTC1 ならびに ACTA2 がグリオーマ細胞の lamellipodia 辺縁部に沿って点状に高発現していることが判明した (Fig. 1A)。また ACTC1, ACTA2 を KD した群はともに、Control 群と比較して、形態学的に仮足 (pseudopodia) 様構造の形成が抑制され、運動速度の有意な低下が認められた (ACTC1 KD:  $1.18 \pm 0.06$  nm/sec, ACTA2 KD:  $1.08 \pm 0.09$  nm/sec, Negative Control:  $1.64 \pm 0.02$  nm/sec,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1B, C)

Fig. 1 Knockdown of either ACTC1 or ACTA2 significantly reduces lamellipodia formation.



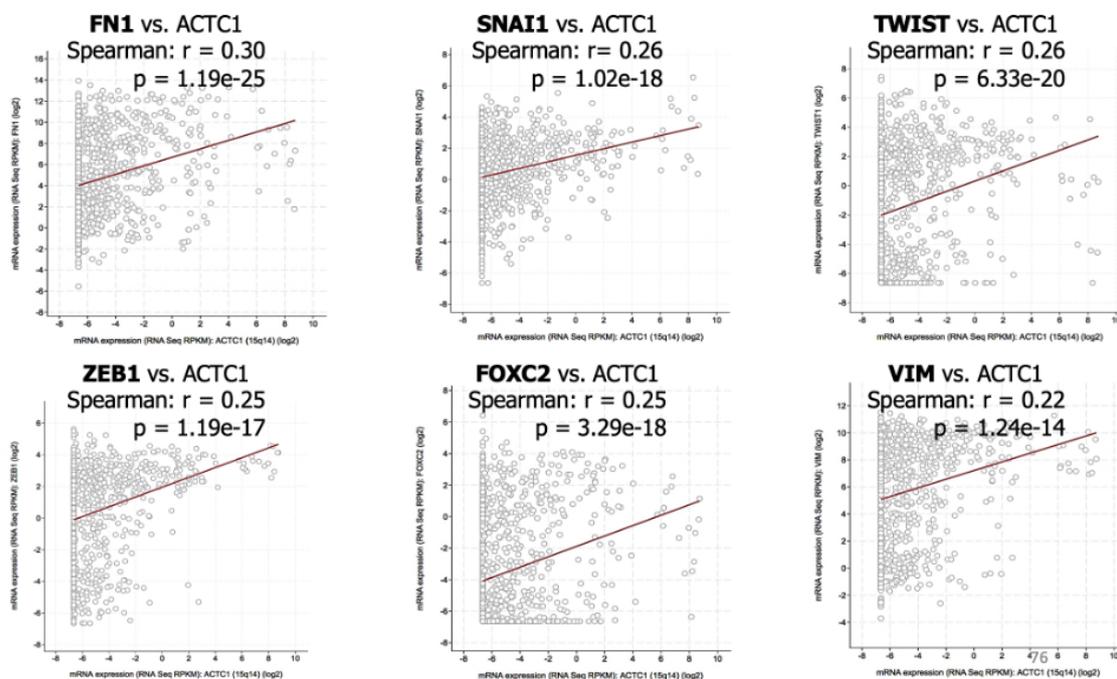
加えてグリオーマ細胞株の ACTC1 を KD すると ACTA2 の発現量が、ACTA2 を KD すると ACTC1 の発現量が、それぞれ有意に上昇することを見出した (>2 fold,  $p < 0.01$ )。この事実はグリオーマ細胞においてこれら 2 つの  $\alpha$ -actin のうち一方の発現が減少した場合に、他方の発現を相補的に増加させる何らかの発現調節機構が存在していることを示唆していると考えられた。

(2) HGG 腫瘍検体において再発例では同患者の初発時と比較して ACTA2 発現の有意な増加を認め (初発: 0.90 (0.09-4.10), 再発: 2.05 (0.12-9.16),  $p = 0.02$ )、初発から再発までに ACTCA2 が増加している症例では再発までの期間が有意に短いことが判明した (増加群: 5.5 (4-13) months, 不変/低下群: 13.5 (8-31) months,  $p = 0.01$ ) (下図)。以上の結果より、 $\alpha$  アクチンに属する ACTC1 と ACTA2 は悪性神経膠腫の遊走・浸潤に関与し、ACTA2 の高発現は悪性神経膠腫の再発に関与していることが臨床検体のデータより強く示唆された。



(3) ACTC1 の発現は「上皮間葉転換」の主要なマーカー遺伝子である FN1、SNAI1、ZEB1、TWIST1、VIM、FOXC2 の発現と有意な正の相関があることが判明した (Fig. 2)。さらに転写因子のデータベースを用いて ACTC1 のプロモータ配列に対し特に親和性の高い転写因子を探索した結果、SMARCA4、RB1、POLR2A、CBFA2T2、WT1、GLIS1 の6つが抽出された。

Fig. 2 ACTC1 と EMT マーカー遺伝子の発現相関



(4) ヒトグリオーマ細胞株8株を用いて網羅的な transcriptome 解析を実施し、ACTC1 の発現量と統計学的に有意な共変動を示す遺伝子を対象にパスウェイ解析を実施した結果、Rap1, Hippo, Relaxin, Apelin, Sphingolipid, C-type lectin receptor, Oxytocin 等の signaling pathway が、ACTC1 高発現株において有意変動を示すパスウェイとして同定され (Table 1)、ACTC1 の高発現には RAS-MEK パスウェイの活性化が関与していることが示唆された (Fig. 3)。

Table 1 ACTC1 の発現に影響するパスウェイ

Pathway name	p-value
Rap1 signaling pathway	0.007
Endocytosis	0.008
Pentose phosphate pathway	0.011
Relaxin signaling pathway	0.011
Purine metabolism	0.011
Ferroptosis	0.015
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.016
Apelin signaling pathway	0.018
Hippo signaling pathway	0.019
C-type lectin receptor signaling pathway	0.024
Sphingolipid signaling pathway	0.039
Oxytocin signaling pathway	0.047



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohei Yoshimura, Shinji Kawabata, Hideki Kashiwagi, Yusuke Fukuo, Koji Takeuchi, Gen Futamura, Ryo Hiramatsu, Takushi Takata, Hiroki Tanaka, Tsubasa Watanabe, Minoru Suzuki, Naonori Hu, Shin-Ichi Miyatake, Masahiko Wanibuchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficacy of Boron Neutron Capture Therapy in Primary Central Nervous System Lymphoma: In Vitro and In Vivo Evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123398	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 -

1. 著者名 Hideki Kashiwagi, Shinji Kawabata, Kohei Yoshimura, Yusuke Fukuo, Takuya Kanemitsu, Koji Takeuchi, Ryo Hiramatsu, Kai Nishimura, Kazuki Kawai, Takushi Takata, Hiroki Tanaka, Tsubasa Watanabe, Minoru Suzuki, Shin-Ichi Miyatake, Hiroyuki Nakamura, Masahiko Wanibuchi	4. 巻 40
2. 論文標題 Boron neutron capture therapy using dodecaborated albumin conjugates with maleimide is effective in a rat glioma model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 255-264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10637-021-01201-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soichi Oya, Fusao Ikawa, Nao Ichihara, Masahiko Wanibuchi, Yukinori Akiyama, Hirofumi Nakatomi, Nobuhiro Mikuni, Yoshitaka Narita	4. 巻 61
2. 論文標題 Nation-wide Brain Tumor Registry-based Study of Intracranial Meningioma in Japan: Analysis of Surgery-related Risks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 98-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2020-0304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soichi Oya, Fusao Ikawa, Nao Ichihara, Masahiko Wanibuchi, Yukinori Akiyama, Hirofumi Nakatomi, Nobuhiro Mikuni, Yoshitaka Narita	4. 巻 153
2. 論文標題 Effect of adjuvant radiotherapy after subtotal resection for WHO grade I meningioma: a propensity score matching analysis of the Brain Tumor Registry of Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 351-360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-021-03775-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Hoshimaru, Naosuke Nonoguchi, Takuya Kosaka, Motomasa Furuse, Shinji Kawabata, Ryokichi Yagi, Yoshitaka Kurisu, Hideki Kashiwagi, Masahiro Kameda, Toshihiro Takami, Yuko Kataoka-Sasaki, Masanori Sasaki, Osamu Honmou, Ryo Hiramatsu, Masahiko Wanibuchi	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
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19件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小坂拓也、池田直廉、金光拓也、矢木亮吉、辻優一郎、木村誠吾、古瀬元雅、野々口直助、川端信司、鱈淵昌彦
2. 発表標題 当院での経鼻内視鏡頭蓋底手術における頭蓋底再建法とその役割-縫合手技の再考-
3. 学会等名 第30回脳神経外科手術と機器学会 (CNTT)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小坂拓也、野々口直助、矢木亮吉、平松 亮、池田直廉、古瀬元雅、川端信司、宮武伸一、廣瀬善信、鱈淵昌彦
2. 発表標題 腫瘍遊走能に関与する可能性がある遺伝子「ACTC1」の髄膜腫における発現の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍病理学会 (WEB開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小坂拓也、野々口直助、矢木亮吉、平松 亮、池田直廉、古瀬元雅、川端信司、宮武伸一、鱈淵昌彦
2. 発表標題 腫瘍遊走能に関与する可能性がある遺伝子Actin Alpha Cardiac Muscle 1 (ACTC1) の髄膜腫における発現の検討
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福尾祐介、香山 諒、柏木秀基、金光拓也、斯波宏行、平松 亮、川端信司、高見俊宏、呼 尚徳、宮武伸一、鱈淵昌彦
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の脊椎・脊髄腫瘍への臨床応用と安全性の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 頭蓋底手術はなにが大変なのか
3. 学会等名 第28回広島頭蓋底研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 傍鞍部髄膜腫の病態と治療
3. 学会等名 第41回日本脳神経外科コンgres（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 Incidental brain tumorへの対応：自然歴と治療介入のタイミングを考える前庭神経鞘腫前提新家に対する方針決定要因
3. 学会等名 第30回日本脳ドック学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 脳神経外科疾患に対する最新の治療
3. 学会等名 第49回日本リハビリテーション医学会近畿地方会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 大後頭孔近傍腫瘍
3. 学会等名 第26回日本脳腫瘍の外科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 脳神経外科医が手術で求めている画像 術者は術前画像で何を見ているのか？
3. 学会等名 第19回マルチモダリティシンポジウム 脳外科手術を画像で支援する（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 頭蓋底外科手術の陰陽
3. 学会等名 第11回 SPEC-UP meeting（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 脳神経外科治療の最前線-てんかんを-含めて
3. 学会等名 第116回大阪脳神経外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 頭蓋底外科手術の良し悪し
3. 学会等名 第17回信州脳神経外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 頭蓋底外科手術の機微
3. 学会等名 第17回日本脳神経外科手術夜話（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鱈淵昌彦
2. 発表標題 頭蓋底手術の効用
3. 学会等名 第25回関西脳神経外科手術研究科医学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村亘平、柏木秀基、川端信司、福尾祐介、竹内孝治、二村 元、平松 亮、渡辺 翼、高田卓志、田中浩基、鈴木 実、宮武伸一、鰐淵昌彦
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法の中樞神経系原発悪性リンパ腫への治療応用に関する橋渡し研究
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村亘平、柏木秀基、川端信司、福尾祐介、竹内孝治、二村 元、平松 亮、呼 尚徳、田中活基、鈴木 実、鰐淵昌彦
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法による中樞神経系原発悪性リンパ腫への適応可能性に関する基礎研究
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村亘平、柏木秀基、川端信司、福尾祐介、竹内孝治、二村 元、平松 亮、呼 尚徳、田中浩基、鈴木 実、宮武伸一、鰐淵昌彦
2. 発表標題 中樞神経系原発悪性リンパ腫に対するホウ素中性子捕捉療法の適応可能性に関する基礎研究
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香山 諒、古瀬元雅、鰐淵昌彦、宮武伸一、小野公二、青井泉樹、平野義明
2. 発表標題 細胞接着因子を介したBNCT用新規ホウ素化合物の開発
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021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	川端 信司 (Kawabata Shinji)  (20340549)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授  (34401)	
研究分担者	佐々木 祐典 (Sasaki Yusuke)  (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授  (20101)	
研究分担者	平松 亮 (Hiramatsu Ryo)  (40609707)	大阪医科薬科大学・医学部・講師  (34401)	
研究分担者	池田 直廉 (Ikeda Naokado)  (50434775)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師  (34401)	
研究分担者	古瀬 元雅 (Furuse Motomasa)  (70340560)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授  (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)	
研究分担者	佐々木 優子 (Sasaki Yuko)  (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教  (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	本望 修  (Honmou Osamu)  (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	

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