

氏名	寶子丸 拓示
(ふりがな)	(ほうしまる たくみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第86号
学位審査年月日	令和6年1月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	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
	(Actin Alpha 2, Smooth Muscle (ACTA2)は悪性神経膠腫の遊走能に関与し、再発時の発現増加は予後不良因子である)
論文審査委員	(主) 教授 藤阪 保仁 教授 近藤 洋一 教授 大須賀 慶悟

### 学位論文内容の要旨

#### 【背景】

悪性神経膠腫は浸潤能が高い腫瘍であり、局所だけでなく脳の遠隔部位にも頻繁に再発を起こすことで、根治切除が極めて困難となる。悪性神経膠腫の浸潤メカニズムを解明し、これを抑制する新規治療法の開発が望まれている。過去に我々はアクチン-パラログ遺伝子の一種である actin alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1)が悪性神経膠腫の遊走を促進し、予後不良因子であることを報告した。他のアクチン-パラログ遺伝子に関しても、他癌種では遊走能や予後との関連があることは報告されているが、悪性神経膠腫に関する報告はない。今回我々は actin alpha 2, smooth muscle (ACTA2)が悪性神経膠腫の遊走や遠隔再発を促

進するという仮説を立て実験を行った。

#### 【対象、方法】

I. ヒト悪性神経膠腫細胞株 U251MG を使用、ACTC1, ACTA2 各々の small interfering RNA (siRNA)を用いて、ACTC1, ACTA2 の一方もしくは両方の knockdown (KD)を行った。Negative Control (NC)群を設定して計 4 群に対して以下の実験を行った。(1)各群における ACTC1 と ACTA2 の発現量を droplet digital PCR (dd-PCR)法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として RPL37 (ribosomal protein L37)を測定した。(2)各群の細胞に対して培養をおこないながら 18 時間 Time-lapse 撮影を行い、その間の細胞移動距離の計測を各々行った。(3)各群の同時刻に撮影した明視野顕微鏡画像における葉状仮足形成細胞の割合を各々計測した。

II. (1)2014 年から 2017 年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、連続した患者検体における ACTA2/RPL37 の発現を dd-PCR で測定した。(2)当教室で 2014 年から 2022 年間に手術を行い、HGG (WHO grade 3: 5 例, grade 4: 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患者の初発と再発検体各々12 検体における ACTA2/RPL37 の発現を dd-PCR で測定した。それぞれ ACTA2 の発現と progression-free survival (PFS)、遠隔病変の有無、初発から再発における発現量の変化の関係を調査した。

#### 【結果】

I. (1)ACTC1 と ACTA2 siRNA の transfection により各々の遺伝子の有意な発現低下を認めた。各遺伝子の KD は確認できたと判断し、以下各 KD 群を ACTC1-KD、ACTA2-KD、ACTC1/ACTA2-KD (ACTC1 and ACTA2 double KD)と表記する。transfection 96 時間後に ACTC1-KD 群は ACTA2 の発現増加、ACTA2-KD 群は ACTC1 の有意な発現増加を認めた。(2)ACTC1-KD、ACTA2-KD、ACTC1/ACTA2-KD 群で NC 群と比較して細胞移動距離の低下を認めた (ACTC1-KD:  $81.3 \pm 3.9 \mu\text{m}$ , ACTA2-KD:  $73.8 \pm 3.6 \mu\text{m}$ , ACTC1/ACTA2-KD:  $75.6 \pm 5.1 \mu\text{m}$ , NC:  $111.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ )。 (3)ACTC1-KD、ACTA2-KD、ACTC1/ACTA2-KD 群で葉状仮足の有意な形成低下を認めた。

II. (1)初発 HGG において WHO grade 4 では grade 3 と比較して 4 倍近く ACTA2 の発現量が高かった ( $p = 0.002$ )。また ACTA2 高発現群 ( $n = 16$ )では低発現群 ( $n = 34$ )と比較して初診時における画像所見上の遠隔病変が約 3.5 倍多くみられた。(2) HGG 腫瘍検体において再発例では同患者の初発例と比較して 2 倍近い ACTA2 の発現増加を認め ( $p = 0.012$ )、再発時 ACTA2 増加群では PFS が有意に短かった (増加群: 5.5 (4 - 13) months, 不変/低下群: 13.5 (8 - 31) months、 $p = 0.011$ )。

### 【考察】

今回の実験では U251MG において ACTC1 または ACTA2 を KD すると、葉状仮足の形成が低下し細胞の移動距離が低下することがわかった。細胞運動の一種である間葉系遊走は葉状仮足により誘発されることが知られており、葉状仮足の形成低下が細胞移動距離の低下に関与していることが考えられる。また臨床検体を用いた実験では悪性神経膠腫において WHO grade 4 では grade 3 と比較して ACTA2 の発現が高く、ACTA2 高発現群では遠隔病変がより多くみられた。以上より ACTA2 が悪性神経膠腫における遊走に関与することが示唆された。

今回の実験結果からは、悪性神経膠腫において初発から再発までの間に ACTA2 の発現は増加を認め、その増加が多いほど再発までの期間が短く、ACTA2 が悪性神経膠腫における再発に関与していることが示唆された。その機序については、ACTA2 は HGG の脳内浸潤や再発に対して促進的に関与しており、ACTA2 の発現が高い HGG ほど、腫瘍が見つかった時点で既に腫瘍本体から離れた脳深部へと腫瘍細胞が浸潤しているために、腫瘍再発までの期間が短くなるのではないかと我々は推測している。

また今回の実験では ACTC1 または ACTA2 の KD により他方のアクチンの発現が上昇することがわかった。このことから ACTC1 と ACTA2 遺伝子の発現が相補的に制御されていることが考察される。

### 【結語】

本研究により、ACTA2 が悪性神経膠腫における重要な遊走因子であり、再発に関与していることが明らかになった。悪性神経膠腫における遊走メカニズムの解明は、今後の治療法

の開発において極めて重要であり、ACTA2 は治療標的として有望な候補である。さらに、がんにおけるアクチン-パラログ遺伝子間の相互作用を確認することができた。アクチン-パラログ遺伝子間の相互作用のメカニズムを探ることは、悪性神経膠腫を含む癌の遊走・増殖機構を理解する手がかりになると考える。

## 論文審査結果の要旨

悪性神経膠腫は浸潤能が非常に高く、局所だけでなく脳の遠隔部位にも頻繁に再発を起こすことが知られている予後不良な疾患である。悪性神経膠腫の浸潤、再発の制御機構の解明は予後改善に有益あると考えられており、過去に我々は6種類存在するアクチン-パラログ遺伝子の一種である actin alpha, cardiac muscle 1 (ACTC1)の発現レベルが悪性神経膠腫の遊走や脳内遠隔再発を促進する因子であることを報告した。他のアクチン-パラログ遺伝子に関しては、悪性神経膠腫において遊走や予後との関連の報告はなく、本研究ではアクチン-パラログ遺伝子の一種である actin alpha 2, smooth muscle (ACTA2)が悪性神経膠腫の遊走や再発を促進するという仮説を立て検証した。

悪性神経膠腫細胞株である U251MG を用いて、ACTA2 knockdown が細胞遊走に与える影響について評価したところ、遊走能の低下を認めた。また ACTC1 knockdown 群も同時に設定して ACTC1 と ACTA2 の発現の関係を検証したところ、一方のアクチンの knockdown が他方のアクチンの発現を増加させ、両者には相補的な発現制御があることが示唆される結果となった。また患者から採取した初発と再発の悪性神経膠腫腫瘍検体における ACTA2 の発現を測定したところ、ACTA2 高発現群では初診時の頭部 MRI で遠隔病変を有している割合が高かった。さらに同一患者の初発時と再発時の検体で ACTA2 の発現量の平均値を比較したところ、再発時検体では ACTA2 の発現量増加を認めており、再発時 ACTA2 増加群では ACTA2 低下/不変群と比較して再発期間が短いことが分かった。以上の結果から ACTA2 は悪性神経膠腫の遊走や再発の促進因子であること、また ACTC1 と ACTA2 の発現には相補的な発現制御が存在することが示唆された。

本研究は悪性神経膠腫の遊走、再発の新たな制御機構を明らかにした点で意義の深い研究であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第13条第1項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Brain Sciences

13(10): 1477, 19 Oct. 2023