

## 【14】

氏 名	なが さわ ふさ こ 永 澤 英 子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第658号
学位授与の日付	平成27年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項 (内科学（血液・腫瘍）)
学位論文題目	<b>Overexpression of <i>MIR9</i> indicates poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia</b> (ALLにおいて <i>MIR9</i> 過剰発現は予後不良因子である)
論文審査委員	(主査) 教授 麻 生 好 正 (副査) 教授 増 田 道 明 教授 黒 澤 秀 光

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

成人急性リンパ性白血病（acute lymphocytic leukemia：ALL）は予後不良な疾患である。近年様々なmicroRNAが造血器悪性腫瘍の発症と予後に関連していることが報告されている。当研究室では成人急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia：AML）において*MIR9*過剰発現が予後不良因子であることを報告している。

#### 【目 的】

ALLにおいても*MIR9*過剰発現が予後因子となり得るかどうかを検討するため、*MIR9*の発現レベルと治療効果及び予後との相関の有無を解析した。

#### 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学の生命倫理委員会で承認され、全ての患者から文書による同意を取得した。

2001年から2011年の間に当院で診断・治療をしたALL32例を対象とした。骨髓全有核細胞からRNAを抽出し、*MIR9*発現レベルを解析した。*MIR9*発現量はcycle threshold（CT）値を用いて定量化し、CT値は2つのsmall nuclear RNA（snRNA）を対象として標準化した。正常骨髓検体の*MIR9*発現レベルの平均+2×standard deviationをカット・オフ値として、発現群（6例）と非発現群（26例）に分類し、臨床的特性、寛解導入率及び予後との相関の有無を検討した。

統計解析にはSPSS 19.0を使用した。発現群と非発現群の比較にはPearsonの $\chi^2$ 検定とMann-

Whitney検定を用いた。全生存率（overall survival：OS）や非再発生存率（relapse free survival：RFS）の比較にはKaplan-Meier法を用い、*MIR9*発現の有無による生存分布の差異解析にはlog-rank検定を使用した。OS及びRFSにおける予後予測因子の抽出のために、既存の予後因子に加え*MIR9*発現に対してCox比例ハザードモデルを使用した単変量及び多変量解析を行った。 $P$ 値 $<0.05$ を有意とした。

## 【結 果】

*MIR9*発現群と非発現群で性別、年齢、初発時白血球数、末梢血芽球比率、骨髓中芽球比率、LDH値、表面マーカー、染色体異常、Notch1変異の有無及び移植施行の有無に差を認めなかった。*MIR9*の発現の有無は、完全寛解（complete remission：CR）導入率（ $P=0.451$ ）、RFS率（ $P=0.781$ ）及びOS率（ $P=0.259$ ）にも統計学的有意差をもたらさなかった。

さらに、全症例を移植施行群と非施行群に分類し、各集団において*MIR9*発現群と非発現群で予後と比較した。移植非施行群において、*MIR9*発現群は非発現群と比較して有意にOSが低かった（ $P=0.001$ ）。RFSも*MIR9*発現群で低い傾向にあった（ $P=0.105$ ）。一方、移植施行群においてはRFS及びOSともに*MIR9*の発現有無との相関を認めなかった（ $P=0.386$ ,  $P=0.953$ ）。

予後因子については、単変量解析では初発時白血球（white blood cell：WBC）数 $\geq 3$ 万/ $\mu\text{l}$ のみがOS及びRFSにおける有意な予後因子であった（HR=10.017,  $P=0.003$ ；HR=3.821,  $P=0.017$ ）。多変量解析においても、OS・RFSともに初発時WBC数は有意な予後因子であり（HR=21.175,  $P=0.001$ ；HR=3.821,  $P=0.017$ ）、OSにおいては*MIR9*発現も有意な予後因子であった（HR=7.042,  $P=0.008$ ）。さらに、全症例を初発時WBC $<3$ 万/ $\mu\text{l}$ かつ*MIR9*非発現群（A群）、初発時WBC $\geq 3$ 万/ $\mu\text{l}$ かつ*MIR9*発現群（C群）、初発時WBC数 $\geq 3$ 万/ $\mu\text{l}$ あるいは*MIR9*発現群（B群）の3群にわけてOSと比較した。3群間で有意差をもって生存曲線が分離し、A群が最も予後良好であり、C群が最も予後不良であった。以上より、*MIR9*発現は初発時WBC数とは独立した予後因子であることが示された。

## 【考 察】

造血幹細胞及びリンパ球分化制御における*MIR9*の機能は不明である。ALLにおいては、*MIR9*プロモーターのメチル化とそれに伴う遺伝子発現の低下が予後不良因子であるとの報告がある。本報告では、*MIR9*の発現レベルを正常対照と比較しており、メチル化状態は検討していない。*MIR9*非発現群には高メチル化群と低メチル化群が混在している可能性があり、この差により予後が異なる可能性がある。*MIR9*過剰発現症例も低メチル化症例も、いずれも予後不良であると考えられる。一方、*MIR9*過剰発現の分子機構は未解明であり、*MIR9*発現群と非発現群におけるプロモーターのメチル化状態、ヒストン修飾の種類、及び転写因子の発現レベルを比較することにより、手がかりが得られると考えられる。

## 【結 論】

成人ALLの予後は化学療法単独では不良であり、リスク分類に基づき造血幹細胞移植を検討する必要がある。本研究で、ALLにおいてもAML同様*MIR9*発現は予後不良因子となることが示された。しかしながら、*MIR9*の発現は非移植群のみでOS及びRFSを不良とし、移植群ではそうではないこと

から、移植治療は*MIR9*発現群の予後を改善する可能性がある。今後、既知の予後因子である初発時WBC数や遺伝学的異常に*MIR9*発現の有無を加えることにより、より詳細な層別化治療が可能になると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### 【論文概要】

成人急性リンパ性白血病（acute lymphoblastic leukemia：ALL）は一般的には予後不良な疾患であり、予後不良因子を保有する症例は造血幹細胞移植の適応となる。本研究では、*MIR9*過剰発現がALLの予後因子となり得るかどうかを検討するため、*MIR9*の発現レベルと治療効果及び予後との相関の有無を後方視的に解析した。対象は2001年から2011年の間に獨協医科大学病院で診断・治療をした成人ALL 32例である。骨髓全有核細胞からRNAを抽出し、*MIR9*の発現レベルを解析した。*MIR9*発現量はcycle threshold（CT）値を用いて定量化し、CT値は2つのsnRNAを対照として標準化した。正常骨髓検体の*MIR9*発現レベルの平均+2SDをカット・オフ値とした所、6例が発現群、26例が非発現群に分類された。*MIR9*の発現の有無は、完全寛解（complete remission：CR）導入率（ $P=0.451$ ）、非再発生存（relapse free survival：RFS）率（ $P=0.781$ ）及び全生存（overall survival：OS）率（ $P=0.259$ ）に統計学的有意差をもたらさなかった。さらに、全症例を移植施行群と非施行群に分けて解析した所、移植非施行群においては、*MIR9*発現群は非発現群と比較して有意にOS率が低かった（ $P=0.001$ ）。RFSも*MIR9*発現群で低い傾向にあった（ $P=0.105$ ）。一方、移植施行群においては、RFS率及びOS率ともに*MIR9*の発現の有無との相関を認めなかった（ $P=0.386$ 、 $P=0.953$ ）。予後因子については、単変量解析では初発時白血球（white blood cell：WBC）数 $\geq 3$ 万/ $\mu\text{l}$ のみがOS率及びRFS率における有意な予後因子であった（HR=10.017、 $P=0.003$ ；HR=3.821、 $P=0.017$ ）。多変量解析においても、OS率及びRFS率ともに初発時WBC数は有意な予後因子であり（HR=21.175、 $P=0.001$ ；HR=3.821、 $P=0.017$ ）、OS率においては*MIR9*発現も有意な予後因子であった（HR=7.042、 $P=0.008$ ）。本研究によって、成人ALLでは*MIR9*発現は予後不良因子となることが示された。しかしながら、*MIR9*の発現は非移植群のみでOS率及びRFS率を不良とし、移植群ではそうではないことから、移植治療は*MIR9*発現群の予後を改善する可能性が示唆された。今後、既知の予後因子である初発時WBC数や遺伝学的異常に*MIR9*発現の有無を加えることにより、より詳細な層別化治療が可能になると考えられた。

### 【研究方法の妥当性】

本研究においては確立された定量PCR法によって、*MIR9*の発現レベルを解析している。発現レベルはCT値で示されるが、標準的コントロールである小分子RNAのCT値を引いた相対発現（ $\Delta\text{CT}$ ）で評価されている。この系はmicroRNA（miRNA）の発現レベルに関して、極めて安定した結果をもたらす。また、*MIR9*の発現レベルの対照は既報に記載をした正常骨髓細胞における発現であり、発現のカット・オフ値としては平均+2SDを採用した。さらに、統計学的手法に関しては、発現群と非発現群の比較にはPearsonの $\chi^2$ 検定とMann-Whitney検定、OS率及びRFS率の比較にはKaplan-

Meier法、*MIR9*発現の有無による生存分布の差異解析にはlog-rank検定、OS率及びRFS率における予後予測因子の抽出のためには単変量及び多変量解析を採用しており、妥当な手法であると考えられた。

#### 【研究結果の新奇性・独創性】

近年、特別なmiRNAの過剰発現が白血病の予後と関連するとの知見が蓄積しているが、*MIR9*に関する報告は少ない。申請者らの教室では、*MIR9*の過剰発現が成人急性骨髄性白血病における予後不良因子であることを報告しているが、ALLに関しては*MIR9*のプロモーターのメチル化状態の亢進が予後不良因子であるとの報告があるのみである。この結果は本研究の結果と矛盾するように見えるが、本研究は特に正常骨髄細胞に対する過剰発現に注目したものであり、解析結果は妥当なものである。症例を移植群と非移植群に分けて解析したことにより、予後不良因子としての*MIR9*の過剰発現は造血幹細胞移植によってキャンセルされる可能性を示しており、新奇性のある独創的な結果となっている。

#### 【結論の妥当性】

本研究の実験系は確立した定量PCR法であり、データの解析にも妥当な統計学的手法が用いられている。

#### 【当該分野における位置付け】

本研究の結果、*MIR9*の過剰発現がALLの予後不良因子として確立すれば、造血幹細胞移植の適応となる予後不良群の層別化の精度がさらに増すことが期待される。これに伴い、ALL全体としての予後が改善する可能性がある。

#### 【申請者の研究能力】

探求心を持って真摯な態度で実験に取り組み、データ解析も多数の論文を参考にしながら精力的に行った。高い研究能力を認めた。

#### 【学位授与の可否】

本論文は独創性に富み、研究方法、解析方法、考察ともに適切に行われていることから、博士（医学）の学位授与に相応しいものと判定した。

（主論文公表誌）

Leukemia & Lymphoma

55 : 78-86, 2014