

（様式6-C） C. 学位論文（Thesis）で発表論文のない場合

小林 宣彦 氏から学位申請のため提出された論文の審査要旨

題 目       Integrin  $\alpha 7$  and extracellular matrix Laminin 211 interaction promotes proliferation of acute myeloid leukemia cells and is associated with granulocytic sarcoma

（インテグリンアルファ7と細胞外間質であるラミニン211は急性骨髄性白血病細胞の増殖と顆粒球肉腫に関連する）

学位論文（Thesis）

発表予定論文

タイトル(Integrin  $\alpha 7$  and extracellular matrix Laminin 211 interaction promotes proliferation of acute myeloid leukemia cells and is associated with granulocytic sarcoma)

Cancers（雑誌名）（投稿中）

Nobuhiko Kobayashi, Makiko Takizawa, Tsukasa Oda, Takuma Ishizaki, Norifumi Tsukamoto, Akihiko Yokohama, Hisashi Takei, Takayuki Saito, Hiroaki Shimizu, Kazuki Honma, Kei Kimura-Masuda, Yuko Kuroda, Hirokazu Murakami and Hiroshi Handa（著者名全員）

論文の要旨及び判定理由

急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia;以下AML）は造血器悪性腫瘍の一つであり、化学療法または同種幹細胞移植により治療が行われるが予後は不良である。我々は以前に、診断時に顆粒球肉腫(Granulocytic sarcoma;以下GS)という髄外病変が存在すると予後不良であることを報告している。GS形成機序を解明することが新規の治療標的の同定や予後の改善に寄与すると考えられる。本研究ではAMLのITGA7遺伝子発現とECMの役割、インテグリン $\alpha 7$ の予後予測因子としての意義を明らかにする。

本研究は群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得て行われた（2015年4月、第1295号）。GSを有するAML 7例(GS群)と、GSの無いことが確認されたAML 7例(非GS群)からRNAを抽出し、次世代シーケンサーNextSeq500(イルミナ社)を用いてRNAシーケンス(RNA-seq)を行った。更に他の臨床検体を用いてITGA7発現をRT-qPCRで評価し、骨髄液およびGS組織ホルマリン固定パラフィン包埋検体(FFPE)の免疫染色によりインテグリン $\alpha 7$ 蛋白発現の評価を行った。

上記のような臨床検体における検討を踏まえ、AMLにおけるインテグリン $\alpha 7$ の分子レベルでの意義を検証するため、AML細胞株を用いて実験を計画した。AML細胞株はPL21, HL60, THP1を対象とし、ITGA7遺伝子発現をRT-qPCRで評価した。細胞表面の蛋白発現はフローサイトメトリーで検証した。更にECMの刺激で細胞増殖が促進されることを検証するため、ラミニン211, 411, コン

トロールの条件で各細胞株増殖実験を行った。増殖率はcell counting kit 8を使いマイクロプレートリーダーで生細胞数と相関する吸光度を評価した。

RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析とgene set enrichment解析の結果、細胞表面に発現する分子がGS群において有意に発現亢進しており、その中でITGA7遺伝子に着目した。AML臨床検体でのITGA7発現についてRT-qPCRで評価を行ったところ、GSを有する症例で有意に発現が亢進していた。更にGSを有する症例の骨髄およびGS組織のFFPEにおいて、免疫染色を行ったところインテグリン $\alpha 7$ 蛋白の発現が確認できた。またAML細胞株でもITGA7遺伝子発現があることをRT-qPCRで確認し、更にPL21, THP1ではフローサイトメトリーで細胞表面のインテグリン $\alpha 7$ 蛋白発現を確認した。

インテグリン $\alpha 7\beta 1$ を発現した細胞が、そのリガンドであるラミニンによる刺激で増殖すると仮説を立て実験を行った。ラミニンアイソフォームであるラミニン211, 411で覆った培養皿、無処理の培養皿でPL21, THP1, HL60を培養し、細胞数をCCK8で評価し増殖率をFriedman検定で解析した。結果、ラミニン211による刺激でPL21, THP1が有意に増殖していた。ラミニン211で刺激したPL21, THP1は60分の時点でERK1/2のリン酸化が亢進していることがウェスタンブロット法により確認された。

更にITGA7発現と臨床的予後について解析を行った。まず非GS群6例のITGA7/ $\beta$ actin発現の平均を求め、各AMLにおけるITGA7発現を $\Delta \Delta$ Ct法で評価した。その値とGSの有無を用いてROC曲線を描出しカットオフ値を4.4と規定した。ITGA7発現の高低では全生存期間に差はなく、無再発生存期間はITGA7高発現群で低い傾向にあったものの有意差は認められなかった。

我々が今回行った実験はインテグリン $\alpha 7$ を発現したAMLがGSの存在と関連しており、さらにそのリガンドである細胞外マトリックス、ラミニン211がERKシグナルを活性化して細胞増殖を促進することを示した。これはAMLにおけるインテグリン $\alpha 7$ と細胞外マトリックスとの相互作用を示す初めての報告である。

本研究により急性骨髄性白血病と細胞外間質であるインテグリン $\alpha 7$ との相互作用が示された。これは新規性のある報告であり急性骨髄性白血病の病態解明に今後連なるものと認められ、博士（医学）の学位に値するものと判定した。

（審査年月日）平成31年2月7日

審査委員

主査	群馬大学教授（医学系研究科） 臨床薬理学分野担任	山本 康次郎	印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 分子生物学分野担任	石崎 泰樹	印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 腎臓リウマチ内科学分野担任	廣村 桂樹	印

（様式6, 2頁目）

最終試験の結果の要旨

急性骨髄性白血病の予後因子にはどのようなものがあるかについて、および現在臨床応用されている急性白血病に対する分子標的薬にはどのようなものがあるかについて、試問し満足すべき解答を得た。

（試験年月日）平成31年2月7日

試験委員

群馬大学准教授（医学系研究科）

血液内科学分野担任

半田 寛

印

群馬大学教授（医学系研究科）

臨床薬理学分野担任

山本 康次郎

印

試験科目

主専攻分野

血液内科学

A

副専攻分野

臨床薬理学

A