

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101
 研究種目：奨励研究
 研究期間：2022～2022
 課題番号：22H04384
 研究課題名 Vault RNAと造血能の関連性

研究代表者

畑山 祐輝 (HATAYAMA, Yuki)

鳥取大学・医学部附属病院・臨床検査技師

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 460,000 円

研究成果の概要：骨髄検査を実施した患者における骨髄Cellularityと血清vtRNA1-1との関連について調査した。本研究において血清vtRNA1-1は末梢血白血球数や単球数、リンパ球数と有意に相関を認めた。骨髄検査で得られた骨髄Cellularityや総有核細胞数、骨髄単球数とも有意な相関を認めた。また、重回帰分析の結果より、骨髄Cellularityを最も説明可能な因子はvtRNA1-1であることが明らかとなった。以上のことから、vtRNA1-1は骨髄Cellularityの推定に有用である可能性があり、骨髄抑制期や生着遅延症例における非侵襲的な検査としての応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄検査は血液疾患の診断や治療効果判定に必須な検査であるが、侵襲性が高く、頻繁な検査の実施は患者への負担が大きい。造血幹細胞移植後の生着遅延や化学療法による骨髄抑制の際に、造血能の評価を目的に骨髄検査が実施されることがあり、侵襲性の低い検査が求められる。血清vtRNA1-1の測定は骨髄中の造血細胞量を反映する可能性があり、骨髄抑制期や生着遅延症例における非侵襲的な検査としての応用が期待される。

研究分野：臨床検査医学

キーワード：Vault RNA1-1 骨髄cellularity 造血器腫瘍

1. 研究の目的

Vault RNA (vtRNA1-1) は、RNA ポリメラーゼ III によって転写される 98 塩基の小さな非翻訳 RNA である。多くの真核生物で保存され、薬剤耐性、アポトーシス、オートファジーおよびウイルス感染に関連していることが報告されている。細胞外にも分泌されているが、詳細な分子機能は未だ不明である。申請者らは血液疾患患者における血液中 vtRNA1-1 を解析したところ、リンパ球と単球に多く存在するとともに血清にも存在することを確認した。さらに化学療法を実施中の患者血清 vtRNA1-1 が低値となり、活動性の造血器腫瘍患者や G-CSF 投与患者において高値となることを見出している。本研究では、血清 vtRNA1-1 と骨髄密度との関連について検討することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 画像解析ソフトを用いた骨髄 Cellularity の自動定量方法の構築

血清 vtRNA1-1 と骨髄 Cellularity を比較するため、画像解析ソフトを用いた骨髄 Cellularity の自動定量方法の構築を試みた。2020 年から 2022 年に当院血液内科で骨髄検査を実施された患者の骨髄生検およびクロットの HE 標本を使用した。撮像は Cellsens (OLYMPUS) をし、画像解析ソフトは WinRoof2015 (三谷商事) を使用した。解析方法は、非脂肪領域を Cellularity の定量値とする方法 (A 法) と、画像をモノクロ化した後、判別分析法で細胞の核面積を定量し、Cellularity を算出する方法 (B 法) について検討した。B 法では、正形成骨髄の非脂肪領域面積と画像中の細胞の核面積比から得られた 4.8 を校正係数とし、細胞の核面積に乗ずることで Cellularity を算出した。病理診断レポートで報告された Cellularity の評価を参照し比較した。

対象は 54 症例で 91 枚の HE 標本を使用した。男女比は 29:25、生検標本は 38 件、クロット標本は 53 件含まれた。低形成が 17 件、正形成が 44 件、過形成が 30 件含まれた。病理診断との比較は、A 法と B 法の相関係数はそれぞれ 0.80、0.85 であった。低形成判定を目的変数とした受信者動作特性曲線 (ROC) 解析では、B 法の曲線下面積 (AUC) が有意に高かった (0.95 vs 0.88, $P < 0.01$)。過形成判定を目的変数とした ROC 解析では、A 法と B 法で AUC に有意差を認めなかった (0.96 vs 0.93, $P = 0.18$) が、B 法では過形成症例において定量値が過大評価される傾向を認めた。B 法による Cellularity 定量の中央値は 33.9% であったため、B 法で 33.9% 未満であれば B 法による定量値を、それ以上であれば A 法による定量値を採用するプログラムを構築し C 法とした。C 法の測定値と病理診断結果と比較したところ、相関係数が 0.88、低形成および過形成判定における AUC はそれぞれ 0.94、0.97 であった。

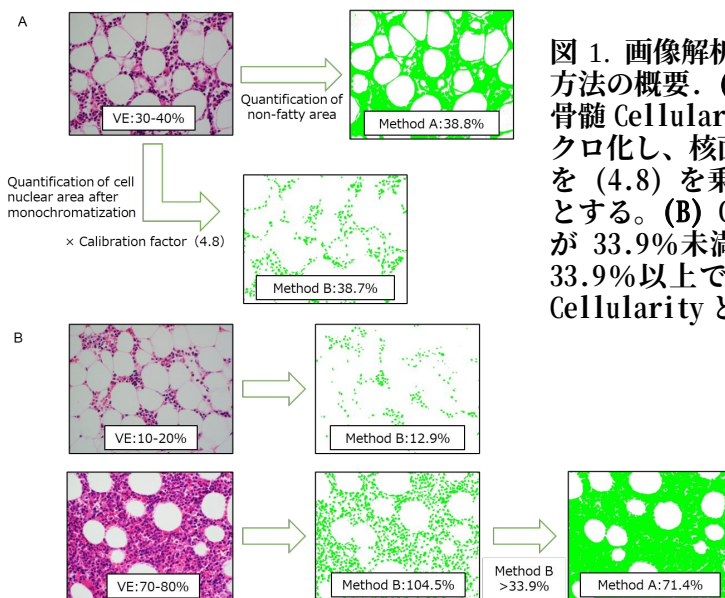


図 1. 画像解析による骨髄 Cellularity 定量方法の概要。(A) A 法は非脂肪領域を定量し骨髄 Cellularity とする。B 法は画像をモノクロ化し、核面積を抽出、定量後、校正係数を (4.8) を乗ずることで骨髄 Cellularity とする。(B) C 法の概要。B 法による定量値が 33.9% 未満であれば B 法の定量値を、33.9% 以上であれば A 法の定量値を骨髄 Cellularity とする。

A 法による定量値は、低形成標本において細胞が含まれない非脂肪領域も解析に含まれるため過大評価された。B 法では過形成標本において過大評価される傾向を認め、これは正形成骨髄標本から得られた校正係数を使用していることに起因しており、定量値が 100% を超える症例も認められた。これらの方法を複合した方法では、もっとも病理診断の結果に適合した結果を得ることが可能であった。以降の骨髄 Cellularity は C 法を用いて算出し、vtRNA1-1 と比較した。

(2) 血清 vtRNA1-1 と骨髄 Cellularity との関連

当院血液内科で骨髄検査を実施され、標準治療を受けた患者 48 名の検査終了後の血液残余検体を使用した。患者の年齢中央値（範囲）は 72.5（29-91）歳、男女比は 33：15 であった。疾患の内訳は急性骨髄性白血病（N=9）、骨髄異形成症候群（N=3）、再生不良性貧血（N=2）、骨髄増殖性腫瘍（N=8）、成熟 B 細胞性腫瘍（N=11）、成熟 T 細胞性腫瘍（N=5）、急性リンパ性白血病（N=2）、特発性血小板減少症（N=3）、不明（N=5）であった。血清から RNA を抽出し、リアルタイム定量 RT-PCR で vtRNA1-1 を定量した。血清 vtRNA1-1 の定量値の中央値（範囲）は 8.13（6.95-9.85）Log₁₀ copies/mL であった。画像解析による骨髄 Cellularity と血清 vtRNA1-1 は有意に正に相関を認めた（rs=0.32, P=0.031）。また、末梢血の白血球数（rs=0.67, P<0.001）、リンパ球数（rs=0.30, P=0.03）、単球数（rs=0.50, P<0.001）、好中球数（rs=0.36, P=0.011）、骨髄有核細胞数（rs=0.40, P=0.004）、骨髄単球数（rs=0.46, P<0.001）と有意に相関を認めた。

表 1. 血清 vtRNA1-1 と血液検査あるいは骨髄検査との関連

	Spearman 相関係数 (rs)	P 値
年齢	-0.035	0.81
骨髄検査		
Cellularity (%)	0.31	0.031
総有核細胞数 (個/uL)	0.39	<0.01
巨核球数 (個/uL)	0.15	0.28
リンパ球数(個/uL)	0.10	0.48
単球数(個/uL)	0.46	<0.01
血液検査		
白血球数 (10 ³ /uL)	0.67	<0.01
リンパ球数 (10 ³ /uL)	0.30	0.03
単球数 (10 ³ /uL)	0.49	<0.01
好中球数 (10 ³ /uL)	0.36	0.011
ヘモグロビン値 (g/dL)	0.073	0.61
血小板数 (10 ³ /uL)	0.035	0.81
生化学検査		
アルブミン (g/dL)	0.064	0.67
ALT (U/mL)	-0.013	0.93
CRP (mg/dL)	0.16	0.26
LD (U/mL)	0.19	0.17

また、骨髄 Cellularity を目的変数、末梢血リンパ球数と単球数、好中球数、CRP、LD、血清 vtRNA1-1 を説明変数とし、重回帰分析を実施した。AIC によるステップワイズ法では、リンパ球数と LD、vtRNA1-1 の組み合わせで AIC が最小となり、P 値によるステップワイズ法では、vtRNA1-1 のみが選択された（表 2）。

表 2. 骨髄 Cellularity を目的変数とした重回帰分析結果

	選別無し		AIC による ステップワイズ法		P 値による ステップワイズ法	
	回帰係数	P 値	回帰係数	P 値	回帰係数	P 値
(切片)	-0.35	0.67	-0.05	0.91	-0.16	0.72
リンパ球数	0.06	0.66	0.15	0.13	NS	
単球数	0.04	0.49	NS		NS	
好中球数	-0.08	0.34	NS		NS	
CRP	-0.05	0.24	NS		NS	
LD	0.29	0.03	0.23	0.05	NS	
vtRNA1-1	0.15	0.12	0.13	0.05	0.21	0.0004

【考察】

骨髄検査を実施した患者における骨髄 Cellularity と血清 vtRNA1-1 との関連について調査した。本研究において血清 vtRNA1-1 は末梢血白血球数や単球数、リンパ球数と有意に相関を認めた。骨髄検査で得られた骨髄 Cellularity や総有核細胞数、骨髄単球数とも有意な相関を認めた。また、重回帰分析の結果より、骨髄 Cellularity を最も説明可能な因子は vtRNA1-1 であることが明らかとなった。以上のことから、vtRNA1-1 は骨髄 Cellularity の推定に有用である可能性があり、骨髄抑制期や生着遅延症例における非侵襲的な検査としての応用が期待される。

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 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Hatayama	4. 巻 in press
2. 論文標題 Construction of an Automatic Quantification Method for Bone Marrow Cellularity Using Image Analysis Software	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2023.05.011	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------