



國立臺灣大學醫學院轉譯醫學博士學位學程

博士論文

Ph.D. Program in Translational Medicine
College of Medicine
National Taiwan University
Doctoral Dissertation

長鏈非編碼核糖核酸*HOXB-AS3*在急性骨髓性白血病及骨
髓分化不良症候群患者之角色

The role of long non-coding RNA *HOXB-AS3* in patients with
acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome

黃懷萱

Huai-Hsuan Huang

指導教授：田蕙芬 教授 Hwei-Fang Tien, M.D., Ph.D.

Advisors 陳瑞華 教授 Ruey-Hwa Chen Ph.D.

鄭安理 教授 Ann-Lii Cheng, M.D., Ph.D.

中華民國 112 年 07 月

July 2023

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書
PhD DISSERTATION ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

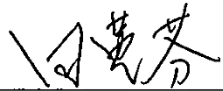
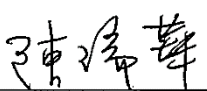
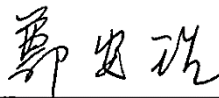
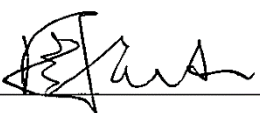
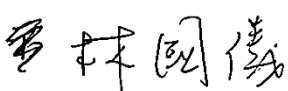
長鏈非編碼核糖核酸 HOXB-AS3 在急性骨髓性白血病及
骨髓分化不良症候群患者之角色

The role of long non-coding RNA HOXB-AS3 in patients with acute
myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome

本論文係 黃懷萱 (姓名) D01456001 (學號) 在國立臺灣大學 轉譯醫學博士學位學程 (系/所/學位學程) 完成之博士學位論文，於民國 112 年 7 月 12 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Ph.D. Program in Translational Medicine on 12th (date) July (month) 2023 (year) have examined a PhD dissertation entitled above presented by 黃懷萱 (name) D01456001 (student ID) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

		
(指導教授 Advisor)	(指導教授 Advisor)	(指導教授 Advisor)
		
<u>周文堅</u>		

系主任/所長 Director: 周祖述



誌謝

每件事能完成，要感謝的人很多。

首先我要感謝三位指導老師。感謝田蕙芬教授，平時在臨床上的指導，讓我學會如何照顧血液科病人。當遇到疑難雜症時，也能適時地指引我方向。這個研究裡，臨床病人的資訊也是靠田教授多年來的累積，才能有這些病人資料及檢體，完成如此完整的分析。另外，我也想感謝學程另一位指導老師陳瑞華教授。當年推甄上台大醫學系時，第一次有了一個長達 4、5 個月的暑假。當時正苦惱著如何安排暑假活動時，剛好，台大提供了我們到學校實驗室裡當 summer student 的機會，很榮幸當時有機會到陳老師在分醫所的實驗室學習。那兩個月裡，認識了許多學長姊，讓我對實驗室的一切都感到興趣。後來，唸完醫學系、完成住院醫師訓練後，很感謝陳老師又讓我有機會到她的實驗室學習，最後還完成這個研究。也同時要感謝鄭安理教授，有了鄭教授的幫忙，我才能順利畢業。

感謝學程助理涂珮琪小姐，這幾年來的協助。學程和研究所不同，比較不會有同一個系所的人聚在一起的機會。再加上行政流程上的複雜，有了涂小姐的幫忙，才能順利處理許多複雜的事情。

想感謝的人實在太多，很難在短短篇幅裡寫下，但若是沒有大家的幫忙，我沒有辦法完成這個研究。最後，感謝家人支持，我才能專心在工作和研究上，順利完成博士學位。

黃懷萱 謹誌

國立臺灣大學醫學院、中央研究院合辦 轉譯醫學博士學位學程

中華民國 一一二年 七月

中文摘要

背景資料

在細胞內的轉錄物 (transcripts) 裡，長鏈非編碼核糖核酸 (Long non-coding RNAs, lncRNAs) 佔了一大部分，也在造血作用 (hematopoiesis) 的過程中扮演重要角色。然而，長鏈非編碼核糖核酸對於血液惡性疾病，如：急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 和骨髓分化不良症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS)，有何重要影響，目前所知有限。

在這個研究裡，我們研究的主角是 *HOXB-AS3*，一個在人類 *HOXB* 群組基因裡的長鏈非編碼核糖核酸；研究其在骨髓性細胞株裡的特性，及在急性骨髓性白血病患者和骨髓分化不良症候群患者裡，他們的臨床表徵及預後。

研究方法

我們利用短髮夾核糖核酸 (short hairpin RNA, shRNA) 去抑制 *HOXB-AS3* 在細胞株裡的表現，並觀察細胞生長情形，再使用微陣列 (microarray) 的方式，來分析及找尋細胞內被影響的基因，接著利用定量即時聚合酶鏈鎖反應 (quantitative polymerase chain reaction) 的方式來驗證。另外，我們也利用溴化去氧尿嘧啶流式細胞儀分析 (BrdU flow assay)，顯示 *HOXB-AS3* 對細胞生長分裂的影響。

更進一步地，我們回溯性研究 *HOXB-AS3*，對於 193 位急性骨髓性白血病患者及 157 位骨髓分化不良症候群患者，其表現量與臨床表現及預後之影響。

研究結果

在急性骨髓性白血病細胞株 OCI-AML3 內，降低 *HOXB-AS3* 的表現，會抑制細胞的生長。在微陣列的分析中，*HOXB-AS3* 不影響 *HOX* 基因的表現，反而會影響細胞周期及去氧核糖核酸複製相關的基因表現。

在急性骨髓性白血病患者裡，*HOXB-AS3* 高表現的患者，其預後較低表現患者差 (高表現者的整體存活期中位數為 17.7 個月，相較於低表現者為未達到， $P < 0.0001$ ；高表現者的無復發存活期中位數為 12.9 個月，相較於低表現者為未達到， $P = 0.0070$)。在骨髓分化不良症候群患者裡，也可看到類似狀況 (高表現者的整體存活期中位數為 14.6 個月，相較於低表現者為 42.4 個月， $P = 0.0018$)。我們的分

析結果，使用美國癌症基因體圖譜計畫急性骨髓性白血病患者群（TCGA AML cohort）及本院另外一組骨髓分化不良症候患者群，作為驗證組，也能重現。在骨髓分化不良症候群患者的次族群分析裡，在國際預後評分系統（international prognostic scoring system，IPSS）低風險及中低風險的患者中，*HOXB-AS3* 高表現能預測患者有較差的預後（高表現者的整體存活期中位數為 29.2 個月，相較於低表現者為 77.3 個月， $P=0.0194$ ）；然而在高風險患者中，則無太大差異。

結論

本研究發現，*HOXB-AS3* 在骨髓惡性疾病裡所扮演的角色，也進一步展現出，*HOXB-AS3* 的表現量，對於急性骨髓性白血病患者及骨髓化不良症候群患者，在預後上的影響。

關鍵詞

HOXB-AS3，急性骨髓性白血病，骨髓分化不良症候群，長鏈非編碼核糖核酸，細胞生長

英文摘要

Background

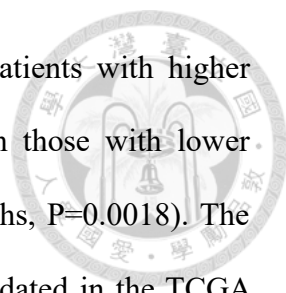
Long non-coding RNAs (lncRNAs) represent the majority of cellular transcripts and play pivotal roles in hematopoiesis. However, their clinical relevance in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) remains largely unknown. Here, we investigated the functions of *HOXB-AS3*, a lncRNA located at human *HOXB* cluster, in the myeloid cells, and analyzed the prognostic significances in patients with AML and MDS.

Methods

We used shRNAs to downregulate lncRNA *HOXB-AS3* in the cell lines, and then observed the cell growth. We investigated the downstream genes by microarray analysis, and validated the results with quantitative polymerase chain reaction. We also illustrated the effects of lncRNA *HOXB-AS3* in the myeloid cell lines by BrdU proliferation flow assay. Further, we retrospectively analyzed lncRNA *HOXB-AS3* expression in 193 patients with AML and 157 with MDS by microarray analysis and evaluated its clinical significance.

Results

Downregulation of lncRNA *HOXB-AS3* suppressed cell proliferation in the myeloid cell line, OCI-AML3. In the microarray analysis, lncRNA *HOXB-AS3* potentiated the expressions of several key factors in cell cycle progression and DNA replication without affecting the expressions of *HOX* genes. In AML, patients with higher *HOXB-AS3* expression had shorter survival than those with lower *HOXB-AS3* expression (median overall survival (OS), 17.7 months versus not reached, $P < 0.0001$; median relapse-free



survival, 12.9 months versus not reached, $P=0.0070$). In MDS, patients with higher *HOXB-AS3* expression also had adverse prognosis compared with those with lower *HOXB-AS3* expression (median OS, 14.6 months versus 42.4 months, $P=0.0018$). The prognostic significance of lncRNA *HOXB-AS3* expression was validated in the TCGA AML cohort and another MDS cohort from our institute. The subgroup analyses in MDS patients showed that higher *HOXB-AS3* expressions could predict poor prognosis only in low and low-intermediate IPSS risk groups (median OS, 29.2 months versus 77.3 months, $P=0.0194$), but not in high and intermediate-high IPSS risk groups.

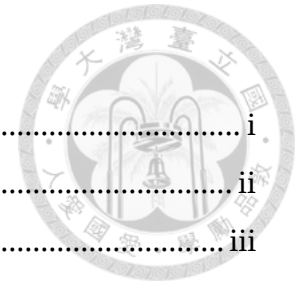
Conclusions

This study uncovers a promoting role of lncRNA *HOXB-AS3* in myeloid malignancies and identifies the prognostic value of lncRNA *HOXB-AS3* expression in AML and MDS patients, particularly in the lower-risk group.

Key words

HOXB-AS3, acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, long non-coding RNA, proliferation

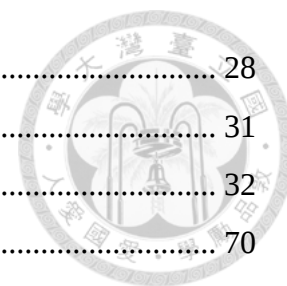
目錄



口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	v
目錄	vii
圖目錄	x
表目錄	xii
附圖目錄	xiii
附表目錄	xiv
縮寫及翻譯名稱列表	xv
第一章 研究背景	1
1.1 骨髓惡性疾病簡介	1
1.1.1 急性骨髓性白血病簡介	1
1.1.2 骨髓分化不良症候群簡介	2
1.1.3 小結	3
1.2 長鏈非編碼核糖核酸在骨髓惡性疾病裡的發現	3
1.2.1 長鏈非編碼核糖核酸簡介	3
1.2.2 長鏈非編碼核糖核酸在急性骨髓性白血病裡所扮演的角色	4
1.3 <i>HOX</i> 群組基因在急性骨髓性白血病之角色	5
1.4 研究目的	6
第二章 研究方法	7
2.1 病患臨床相關資料收集與實驗	7
2.1.1 研究案中收錄患者之選擇 (Patient selection)	7
2.1.2 染色體變化及基因突變之分析 (Cytogenetic abnormalities and gene mutations)	8
2.1.3 微陣列實驗及分析 (Microarray experiments and analysis)	8
2.1.4 <i>HOXB-AS3</i> 表現量與基因突變關係圖	9
2.2 細胞株相關實驗	9
2.2.1 細胞株和細胞培養 (Cell lines and cell cultures)	9

2.2.2 短髮夾核糖核酸及長鏈非編碼核糖核酸之慢病毒載體設計及製造 (Constructions of lentiviral vectors with shRNA and lncRNA, and lentiviral production)	10
2.2.3 由慢病毒來製成穩定表現之細胞株 (Lentivirus infection to generate stable cell lines)	11
2.2.4 溴化去氧尿嘧啶流式細胞儀實驗 (BrdU flow assay)	11
2.2.5 細胞生長實驗 (Proliferation assay)	12
2.2.6 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR)	12
2.2.7 核細胞質分離實驗 (Nuclear-cytoplasm fractionation)	13
2.3 統計分析 (Statistical analysis)	14
第三章 研究結果 Results	16
3.1 找尋與急性骨髓性白血病相關之長鏈非編碼核糖核酸	16
3.1.1 影響急性骨髓性白血病預後之長鏈非編碼核糖核酸	16
3.1.2 <i>HOXB-AS3</i> 在人類基因內的位置	16
3.1.3 <i>HOXB-AS3</i> 為一跨物種且持續存在之基因	17
3.2 <i>HOXB-AS3</i> 在細胞內所扮演之角色	17
3.2.1 在骨髓性細胞株裡，抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現，會抑制細胞生長	17
3.2.2 <i>HOXB-AS3</i> 不影響 <i>HOX</i> 基因群的表現	18
3.2.3 <i>HOXB-AS3</i> 對於細胞周期之影響與生長分裂相關基因之表現	18
3.2.4 <i>HOXB-AS3</i> 位在細胞質內為主	19
3.3 <i>HOXB-AS3</i> 對於急性骨髓性白血病患者之重要性	20
3.3.1. <i>HOXB-AS3</i> 在急性骨髓性白血病患者之表現及其臨床表徵	20
3.3.2. <i>HOXB-AS3</i> 對急性骨髓性白血病患者之預後之影響	21
3.4 <i>HOXB-AS3</i> 對於骨髓分化不良症候群患者之重要性	22
3.4.1 <i>HOXB-AS3</i> 在骨髓分化不良症候群患者之表現	22
3.4.2 骨髓分化不良症候群患者之臨床表徵	22
3.4.3 <i>HOXB-AS3</i> 對骨髓分化不良症候群患者之預後之影響	23
第四章 討論	25
4.1 <i>HOXB-AS3</i> 在急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群所扮演的角色	25
4.2 本研究之局限	26
4.3 本研究發表後，其他 <i>HOXB-AS3</i> 相關研究之討論	27

4.4 長鏈非編碼核糖核酸將來可能的臨床應用	28
第五章結論	31
圖	32
表	70
參考文獻	78
附錄	83
附圖	83
附表	87
R 語法	93
原始已發表之論文	95
修業期間發表之論文	96



圖目錄

圖 1. <i>HOXB-AS3</i> 與臨近基因的相對位置及各變體相對應的外顯子。.....	32
圖 2. 與急性骨髓性白血病預後相關之長鏈非編碼核糖核酸。.....	33
圖 3. 利用 PhyloCSF 分析 <i>HOXB-AS3</i> 轉譯成蛋白質的能力。.....	34
圖 4. 老鼠 <i>HOXB</i> 群組基因內的 <i>Hoxb5os</i> 。.....	35
圖 5. 老鼠 <i>Hoxb5os</i> 與人類 <i>HOXB-AS3</i> 之比較。.....	36
圖 6. 抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現，會抑制細胞生長。.....	37
圖 7. 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，會減少進入細胞周期 S 期的細胞。.....	38
圖 8. 在骨髓性細胞株 TF-1 抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，會減少進入細胞周期 S 期的 細胞。.....	39
圖 9. 骨髓性細胞株 OCI/AML3 和 TF-1 之 <i>HOXB-AS3</i> 表現。.....	40
圖 10. 在骨髓性細胞株 TF-1 增加 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，會增加進入細胞周期 S 期 的細胞比例。.....	41
圖 11. 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，並不影響 HOX 群組 基因的表現。.....	42
圖 12. 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，仍造成部分基因表 現受影響。.....	43
圖 13. 基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。.....	44
圖 14. Cell cycle pathway from Wikipathway analysis。.....	45
圖 15. DNA replication pathway from Wikipathway analysis。.....	46
圖 16. G1-S pathway from Wikipathway analysis。.....	47
圖 17. RB pathway from Wikipathway analysis。.....	48
圖 18. 抑制 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，利用定量 PCR 來確認 <i>HOXB-AS3</i> 下游受影響的 基因表現。.....	49
圖 19. 增加 <i>HOXB-AS3</i> 表現後，利用定量 PCR 來確認 <i>HOXB-AS3</i> 下游受影響的 基因表現。.....	50
圖 20. 核質分離。.....	51
圖 21. <i>HOXB-AS3</i> 在急性骨髓性白血病患者之表現量。.....	52

圖 22. 急性骨髓性白血病患者 <i>HOXB-AS3</i> 表現量與基因突變之間的關係。.....	53
圖 23. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，整體存活期分析。.....	54
圖 24. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，無復發存活期分析。.....	55
圖 25. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，整體存活期及無復發存活期分析。..	56
圖 26. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，整體存活期之次族群分析。.....	57
圖 27. 美國癌症基因圖譜 (TCGA) 急性骨髓性白血病患者，整體存活期分析。	58
圖 28. 非急性前髓性白血病之急性骨髓性白血病患者 (non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia, non-APL AML) 與健康成年人，比較其 <i>HOXB-AS3</i> 表現量。.....	59
圖 29. 非急性前髓性白血病之急性骨髓性白血病患者 (non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia, non-APL AML) 之整體存活分析。..	60
圖 30. 骨髓分化不良症候群患者與健康成年人，比較其 <i>HOXB-AS3</i> 表現量。.	61
圖 31. 骨髓分化不良症候群患者 <i>HOXB-AS3</i> 表現量與基因突變之間的關係。.	62
圖 32. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析。.....	63
圖 33. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析。.....	64
圖 34. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析。.....	65
圖 35. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析 (驗證組)。.....	66
圖 36. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析 (驗證組)。.....	67
圖 37. 骨髓分化不良症候群患者，整體存活之次族群分析。.....	68
圖 38. <i>HOXB-AS3</i> 不同變體在細胞株內之相對比例。.....	69

表目錄

表 1. 急性骨髓性白血病患者之長鏈非編碼核糖核酸.....	70
表 2. 依 <i>HOXB-AS3</i> 表現量，將原發型急性骨髓性白血病患者分組，並比較臨床表現之差異	71
表 3. 依 <i>HOXB-AS3</i> 表現量，將原發型急性骨髓性白血病患者分組，並比較基因突變之相關性	72
表 4. 急性骨髓性白血病患者之單變項及多變項整體存活期分析	73
表 5. 依 <i>HOXB-AS3</i> 表現量，將骨髓分化不良症候群患者分組，並比較臨床表現之差異	74
表 6. 依 <i>HOXB-AS3</i> 表現量，將骨髓分化不良症候群患者分組，並比較基因突變之相關性	75
表 7. 骨髓分化不良症候群患者之單變項及多變項整體存活期分析	76
表 8. <i>HOXB-AS3</i> 在各種癌症之研究	77

附圖目錄

附圖 1. 國際共識分類組織 (International Consensus Classification, ICC) 之急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群分類原則.....	83
附圖 2. <i>HOX</i> 群組基因	84
附圖 3. <i>HOXB-AS3</i> 之 PCR 引子與外顯子相對位置圖。.....	85
附圖 4. <i>HOXB-AS3</i> 在帶有 <i>NPM1</i> 突變急性骨髓性白血病細胞內之功能。.....	86

附表目錄

附表 1. 世界衛生組織（World Health Organization，WHO）2022 年發表之血液惡性 疾病分類，急性骨髓性白血病（acute myeloid leukemia，AML）.....	87
附表 2. 國際共識分類組織（International Consensus Classification，ICC）2022 年 發表之血液惡性疾病分類，急性骨髓性白血病（acute myeloid leukemia， AML）	88
附表 3. 歐洲白血病治療聯盟（European Leukemia Net，ELN）非急性前髓性白血 病之急性骨髓性白血病患者（non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia，non-APL AML）風險分群	89
附表 4. 世界衛生組織（World Health Organization，WHO）2022 年發表之血液惡 性疾病分類，骨髓分化不良症候群（myelodysplastic syndrome，MDS）	90
附表 5. 國際共識分類組織（International Consensus Classification，ICC）2022 年 發表之血液惡性疾病分類，骨髓分化不良症候群（myelodysplastic syndrome，MDS）	91
附表 6. 骨髓分化不良症候群（myelodysplastic syndrome，MDS）之國際預後評分 系統(international prognostic scoring system，IPSS)及其修正版本(Revised IPSS)	92

縮寫及翻譯名稱列表



異體造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)

急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML)

急性前髓性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL)

骨髓 (bone marrow, BM)

互補 DNA (complementary DNA, cDNA)

歐洲白血病治療聯盟 (European Leukemia Net, ELN)

綠色螢光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP)

基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)

國際共識分類組織 (International Consensus Classification, ICC)

國際預後評分系統 (international prognostic scoring system, IPSS)

長鏈非編碼核糖核酸 (Long non-coding RNAs, lncRNAs)

骨髓分化不良症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS)

主要組織相容性複合物 (major histocompatibility complex, MHC)

骨髓增生性疾病 (myeloproliferative neoplasm, MPN)

信使核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)

非急性前髓性白血病之急性骨髓性白血病患者 (non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia, non-APL AML)

整體存活期 (overall survival, OS)

無復發存活期 (relapse free survival, RFS)

美國癌症基因圖譜 (The Cancer Genome Atlas, TCGA)

美國藥物食品管理局 (U.S. Food and Drug Administration, U.S. FDA)

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO)

第一章 研究背景

1.1 骨髓惡性疾病簡介

骨髓惡性疾病源自於骨髓性造血細胞，按照臨床上不同的表現，可以大致分成：骨髓性白血病，包括急性骨髓性白血病（acute myeloid leukemia, AML）及慢性骨髓性白血病（chronic myeloid leukemia, CML），骨髓分化不良症候群（myelodysplastic syndrome, MDS），以及骨髓增生性腫瘤（myeloproliferative neoplasm, MPN）三大類[1-3]。近年來分子生物學的技术不斷進步，對於骨髓惡性疾病之染色體變化及基因突變，瞭解愈來愈廣泛。部分染色體變化及基因突變，在急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群患者身上均可發現[4]。部分骨髓分化不良症候群患者，在經過一段時間後，會轉變成急性骨髓性白血病。依照國際衛生組織（World Health Organization, WHO）血液惡性疾病分類，自 2008 年版本開始，已定義骨髓血或是周邊血液內含有超過 20% 不成熟芽細胞時，即為急性白血病（acute leukemia）[2]。

本研究主要著眼於急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群患者，接下來，將對這兩個疾病作進一步的介紹。

1.1.1 急性骨髓性白血病簡介

當骨髓內骨髓性芽細胞比例大於 20%，即定義為急性骨髓性白血病。按照病人的病史不同，可分為原發型及次發型[2, 3]。急性骨髓性白血病患者的骨髓內，不但骨髓性芽細胞比例大於 20%，而且骨髓性細胞亦呈現分化停止的現象；進而使得病人成熟的血球數目減少。臨床上，當紅血球減少時，病人會有貧血的症狀；血小板減少時，病人會容易有出血、流血；而正常的白血球減少時，病人容易發生感染發燒等症狀；另外，隨著骨髓性芽細胞的數目增加，周邊血液裡也可以發現芽細胞出現。近幾十年來的研究發現，急性骨髓性白血病患者常見某些染色體變化及基因突變；不同的染色體變化及基因突變，也對患者的用藥選擇及預後，亦有著不同的影響[5]。

世界衛生組織（World Health Organization, WHO）於 2022 年發表之血液惡性疾病分類（附表 1）[2]，目前的分類著重於染色體變化及基因突變。有些染色體變化及基因突變只存在急性骨髓性白血病患者身上，故當病人的骨髓細胞帶有這些

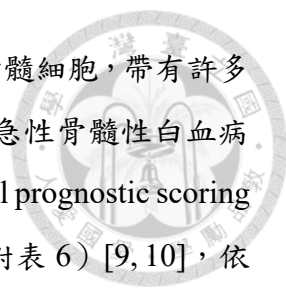
分子生物學變化時，芽細胞不用達到 20%，只需比正常人多，即可診斷為急性骨髓性白血病。國際共識分類組織（International Consensus Classification，ICC）亦於 2022 年發表血液惡性疾病之分類（附表 2）[3]。ICC 分類與 WHO 分類大致相似，都著重於染色體變化與基因突變。此外，ICC 分類更強調 *TP53* 突變；這是由於過去的研究顯示，帶有 *TP53* 突變的急性骨髓性白血病患者，對治療的效果較差，疾病復發率較高[6, 7]。

同時，歐洲白血病治療聯盟（European Leukemia Net，ELN）亦於 2022 年發佈新版治療準則，依照患者帶有不同的染色體變化和基因突變，可以將非急性前髓性白血病之急性骨髓性白血病患者（non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia，non-APL AML），進一步分成低風險、中風險、及高風險三個族群（附表 3）[5, 8]。中、高風險之急性骨髓性白血病患者，單純接受化學治療復發率高，在經過標準的化學治療及標靶治療後，若能達到第一次完全緩解，建議接受異體造血幹細胞移植，作為鞏固治療的一部分。隨著對急性骨髓性白血病的了解更加深入，近幾年美國藥物食品管理局（U.S. Food and Drug Administration，U.S. FDA）陸續通過許多標靶藥物，可用於治療帶有特定基因突變之急性骨髓性白血病患者[8]。

1.1.2 骨髓分化不良症候群簡介

骨髓分化不良症候群，是骨髓性前趨細胞在分化時出現錯誤，進而骨髓性前趨細胞會啟動細胞凋亡，在分化成成熟細胞前死亡。在臨床上，患者的正常血球數目會低下，紅血球數目減少會造成貧血、血小板數目減少會造成出血、正常的白血球數目減少時會造成感染發燒；大多數病人骨髓內的細胞總數增加，有部分分化但分化異常；部分骨髓細胞的型態有特殊變化，與正常造血細胞不同；症狀與急性骨髓性白血病十分類似，但病程較為緩和。

世界衛生組織（WHO，附表 4）[2]與國際共識分類組織（ICC，附表 5）[3]各自分別於 2022 年發表新版的血液惡性疾病分類，其中關於骨髓分化不良症候群的部分，按照患者不同系列血球低下的狀況、骨髓中芽細胞數目的比例、及不正常的骨髓性細胞所帶有的染色體變化及基因突變，可以將患者分成不同細分類的診斷[2, 3]。其中，芽細胞較多的 MDS, IB-1 與 MDS, IB-2 (WHO)，與急性骨髓性白血病時常是一線之隔；這兩類病人，若不及時給於合適的治療，平均於六個月後，會演變成急性白血病。



近十年來的研究也陸續發現，骨髓分化不良症候群患者的骨髓細胞，帶有許多的染色體變化及基因突變，其中一大部分的分子生化學變化與急性骨髓性白血病患者相似[4]。目前臨床上，會使用國際預後評分系統(international prognostic scoring system，IPSS，附表 6)及修正版本(revised IPSS，IPSS-R，附表 6)[9, 10]，依照病人之血球低下的程度、芽細胞數目、及染色體變化，為患者做風險評估，IPSS 將病人分成低風險、中低風險、中高風險、及高風險等四個組別；IPSS-R 則將人分成非常低風險、低風險、中風險、高風險、及非常高風險者等五個組別(附表 6)[9, 10]。臨床上會依照患的風險高低給予不同的治療建議[11]。風險較低的患者，建議以支持性療法為主[11]；若血球低下時，可使用血球生長激素，增加血球數目，減少臨床症狀[11]；若有第五對染色體丟失(deletion 5 or deletion 5q)的患者，對於 lenalidomide 有著十分良好的治療效果，不但可以減緩症狀，也可以延緩變成急性骨髓性白血病的時程[12]。然而風險較高的患者，若不治療，平均六個月左右會轉變成急性骨髓性白血病；一般而言，會建議患者接受去甲基化藥物(hypomethylating agents)治療[11]，延緩其轉變成急性骨髓性白血病的時程；同時，若病人體力狀況許可，建議儘早安排異體造血幹細胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation，allo-HSCT)[11]。

1.1.3 小結

急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群，皆屬於骨髓性惡性疾病。有些染色體變化及基因突變，在兩者皆可以發現。為了診斷分類上的方便，歐洲白血病治療聯盟(ELN)2022 年的治療指引內，建議在診斷時可以按照流程(附圖 1)[5]，將患者作合適的診斷及分類，進而接受適當的治療。

1.2 長鏈非編碼核糖核酸在骨髓惡性疾病裡的發現

雖然我們對於染色體變化及基因突變，在急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群所扮演之功能，瞭解漸趨深入；但對長鏈非編碼核糖核酸(long non-coding RNAs，lncRNAs)在骨髓惡性疾病裡所扮演的角色，目前仍所知有限。

1.2.1 長鏈非編碼核糖核酸簡介

生物體的基因會先轉錄成 RNA，只有一部分的 RNA 會進一步再轉譯成蛋白

質。而另一部分未轉譯成蛋白質的 RNA，則稱之為非編碼核糖核酸。依據長度及功能之不同，非編碼核糖核酸在細胞內扮演著各式各樣不同的角色。lncRNA 是為一群長度大於 200 個核苷酸的 RNA 分子，雖然與轉譯成蛋白質的 RNA 型態類似，但不具有蛋白質轉譯的能力[13]。過去認為 lncRNA 是細胞內的垃圾基因，或是轉錄時的雜訊，然而，隨著時代與科技的進展，我們對 lncRNA 瞭解更加深入。目前認為，lncRNA 在細胞內多扮演著基因表現調節的角色。lncRNA 與蛋白質表現 RNA 一樣，是由 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 轉錄出來，轉錄成 RNA 後，甚至也會經過修飾，例如：RNA 前方加入蓋帽修飾 (capping)、中間經過剪接修飾 (splicing)、後方加入多腺苷酸化修飾 (polyadenylation)[13]。經過修飾後的 lncRNA，會進一步發揮其功能。

目前已知的 lncRNA 相當地多樣性，目前已知的功能有[13]：

- (1) lncRNA 可以引導轉錄調節相關的蛋白質聚合體，至其目標基因，進而調節目標基因表現，而 lncRNA 與目標基因的相對位置，可以是位在同一條染色體上 (*cis*-regulation 如：*XIST*、*HOTTIP*)，也可以是位於不同的染色體 (*trans*-regulation 如：*HOTAIR*)；
- (2) lncRNA 可以調控蛋白質的生成及降解；
- (3) lncRNA 可以當作是個小分子核糖核酸 (microRNA, miRNA) 的海綿體 (miRNA sponge)，與 miRNA 結合並抑制其功能，使原本被 miRNA 抑制的 RNA 能順利轉譯出更多的蛋白質，進而增加其表現量。

1.2.2 長鏈非編碼核糖核酸在急性骨髓性白血病裡所扮演的角色

由於 lncRNA 的功能繁多，目前也知道它在許多人類疾病上扮演重要角色。其中，癌症相關的研究更是如雨後春筍般，在近十年來大幅增加。在本研究開始之初，當時為 2012 年，對 lncRNA 所知有限，當時最有名的 lncRNA 為 *HOTAIR*[14]及 *HOTTIP*[15]。後來，陸續有相關研究開始探討 lncRNA 在血液疾病裡的功能及預後。本研究發表於 2019 年，時至今日 2023 年，可以看到，在這數年間，關於 lncRNA 在血液疾病的相關研究一日千里 (表 1)。

除了研究 lncRNA 的功能，亦有研究嘗試將數個與預後相關之 lncRNA 的表現量結合在一起，做成評分系統[16]，進而預測急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群患者的預後。



1.3 *HOX* 群組基因在急性骨髓性白血病之角色

HOX 群組基因在人類有四組，分別為 *HOXA*、*HOXB*、*HOXC*、*HOXD*，分別位在人類不同的染色體上（*HOXA* 在染色體 7p15，*HOXB* 在染色體 17q21，*HOXC* 在染色體 12q13，*HOXD* 在染色體 2q31；附圖 2）[17, 18]。其最主要的功能猶如生物體內的導航器，藉由不同 *HOX* 基因的表現量，讓細胞知道它位在身體那一個位置，需要表現什麼樣的基因，變成什麼樣的細胞，執行什麼功能。同樣地，*HOX* 群組基因也在造血幹細胞分化成成熟血球的過程中，扮演重要角色。*HOXA* 群組基因常在骨髓性細胞表現，*HOXB* 群組基因常在紅血球細胞中表現，*HOXC* 群組基因則常在淋巴性細胞表現[16, 18]；其中，*HOXA7*、*HOXA9*、*HOXA10*、*HOXB3*、*HOXB4*、*HOXB6*、*HOXC3*、*HOXC4*、*HOXC8*[17, 18]都曾被仔細探討，其在血球分化過程中的重要性。*HOX* 群組基因的過度表現，在急性白血病裡，也曾被報告過，尤其與 *NPM1* 與 *KMT2A* 之基因突變相關[19]。

HOX 群組基因裡，除了正向的 *HOX* 基因以外，還有數個反向的 lncRNA。最早被研究功能的為 *HOTAIR*[14]及 *HOTTIP*[15]。*HOTAIR* 是位在 *HOXC* 群組基因裡的反向 lncRNA，*HOTAIR* 會導引 PRC2 蛋白質群組到 *HOXD* 群組基因，抑制 *HOXD* 群組基因表現[14]。*HOTTIP* 是位在 *HOXA* 群組基因末端附近的 lncRNA[15]。*HOTTIP* 會引導 WDR5/MLL 蛋白質群組至 *HOXA13* 基因，促進 H3K4 trimethylation，促進 *HOXA13* 的表現[15]。*HOTAIRM1* 在 *HOXA* 群組基因裡，位於 *HOXA1* 與 *HOXA2* 之間[20, 21]；在帶有 *NPM1* 基因突變的急性骨髓性白血病裡表現較高[22]。細胞核內的 *HOTAIRM1* 會與 MDM2-EGR1 結合，促進 EGR1 的降解[22]。細胞質內的 *HOTAIRM1* 會與 miR-152-3p 結合，使得 *ULK3* 之信使核糖核酸（messenger RNA，mRNA）不再被 miR-152-3p 抑制，進而使得 *ULK3* 蛋白質表現量上升，促進細胞自噬反應（autophagy）[22]。*HOXA10-AS* 在 *HOXA* 群組基因裡，位於 *HOXA9* 與 *HOXA10* 之間[23]。*HOXA10-AS* 在 *KMT2A* rearrangement 的急性白血病裡，表現較高，會影響 NF- κ B 相關基因的表現[23]。

近年來的研究，讓我們對 *HOX* 群組基因的了解更加深入，除了瞭解 *HOX* 基因在造血作用和急性白血病裡扮演的角色，也更讓我們發現，隱身於 *HOX* 基因群裡的 lncRNA，也在血液相關系統及癌症方面扮演重要角色。

1.4 研究目的

在本研究裡，我們將著眼於 *HOXB* 基因群組內之 lncRNA—*HOXB-AS3*，探討其功能與在血液惡性疾病的重要性。*HOXB-AS3* 位於 *HOXB5* 及 *HOXB6* 之間，且轉錄的方向與 *HOXB5* 及 *HOXB6* 相反（圖 1）。經由不同的替代性剪接（alternative splicing）後，*HOXB-AS3* 可以產生 8 種不同的序列（圖 1）。過去，我們對 *HOXB-AS3* 所知有限，只有一篇文獻討論 *HOXB-AS3* 在大腸癌之功能與角色[24]；然而，*HOXB-AS3* 在血液疾病裡的功能，在本研究發表前，尚無相關文獻。我們的研究發現，*HOXB-AS3* 會影響骨髓性細胞株之細胞生長，且臨床上 *HOXB-AS3* 的表現也與急性骨髓性白血病患者及骨髓分化不良症候群患者的預後相關。



第二章 研究方法

2.1 病患臨床相關資料收集與實驗

2.1.1 研究案中收錄患者之選擇 (Patient selection)

我們回溯性地收集，於西元 1992 年至 2010 年之間，在國立台灣大學附設醫院（以下簡稱台大醫院）新診斷之骨髓分化不良症候群及原發性急性骨髓性白血病的患者；總共收集了 157 位骨髓分化不良症候群患者，及 193 位原發性骨髓性白血病患者，這些患者有保存初診斷時的骨髓血液細胞，可用於 RNA 分析，且有詳盡的臨床資料，可用於比較臨床表徵及存活分析。美國癌症基因圖譜（The Cancer Genome Atlas, TCGA）急性骨髓性白血病人群（TCGA AML cohort）之資料，亦可由美國癌症基因圖譜網站(<https://cancergenome.nih.gov/>)上取得，作為驗證群組；另外 30 位骨髓分化不良症候群患者之資料，為西元 2011 年一月至 2012 年五月之間於台大醫院診斷治療之患者；這些病人資料做為驗證群組，驗證在訓練群體發現之現象。

台大醫院急性骨髓性白血病患者，除去急性前髓性白血病（acute promyelocytic leukemia, APL）患者，共有 174 位患者收錄在本研究中，患者皆接受標準劑量之引導性化學治療（Idarubicin 每日使用 12 mg/m^2 ，使用二至三日；Cytarabine 每日使用 100 mg/m^2 ，使用五至七日）；若引導性治療後達完全緩解，會再接受二至四回合之鞏固性化學治療[25]。另外 19 位急性前髓性白血病患者，則接受 all-trans retinoic acid (ATRA) 及 Idarubicin 或 Mitoxantrone 當作引導性治療；若達到完全緩解，會再接受 ATRA 及 Idarubicin、Mitoxantrone 或高劑量 Cytarabine 當作鞏固性化學治療。若是患者復發、對治療效果不佳、或是有不良預後因子，如：高風險之染色體變化或是基因突變，且患者有合適的造血幹細胞捐贈者，會安排患者進行異體造血幹細胞移植。

在台大醫院骨髓分化不良症候群患者群體裡，70.7%的病人只接受支持性治療，8 位患者(5.1%)接受與急性骨髓性白血病類似強度之化學治療，18 位患者(11.5%)接受去甲基化藥物治療（hypomethylating agent，包含 azacitadine 和 decitabine），20 位患者（12.7%）接受異體造血幹細胞移植。

患者之骨髓檢體都在初診斷時收集，且經由 Ficoll-Hypaque gradient centrifugation 分離出單核細胞，並冰凍保存[26]。另有 20 位健康成年人，為異體造

血幹細胞移植之捐贈者，他們的骨髓細胞亦以同樣方式收集，作為正常檢體，與急性骨髓性白血病和骨髓分化不良症候群患者作為比對。本研究案已經台大醫院研究倫理委員會同意（IRB 案號為 201507084RINA 和 201503072RINC）。



2.1.2 染色體變化及基因突變之分析 (Cytogenetic abnormalities and gene mutations)

用於分析染色體變化及基因突變之患者的骨髓細胞，都是直接收集後使用，或是經由一至三天之培養後再用於實驗及分析。染色體變化是利用 G-banding 方法，再進一步做核型分析[27]。另外，也利用 Sanger 定序的方式分析以下的基因突變：*NPM1*[26]、*AML1 (RUNX1)*[28]、*ASXL1*[29]、*DNMT3A*[25]、*EZH2*[30]、*IDH2*[31]、*NRAS*[32]、*KRAS*[32]、*TP53*[33]、*SETBP1*[34]、*SRSF2*[35]、*TET2*[36]、*MLL/PTD*[37]、*SF3B1*[38]、*U2AF35*[38]和*ZRSR2*[38]。

2.1.3 微陣列實驗及分析 (Microarray experiments and analysis)

美國癌症基因圖譜急性骨髓性白血病病人群的資料，及微陣列資料，均來自其網站（TCGA website，<https://cancergenome.nih.gov/>）。

台大醫院急性骨髓性血病患者及骨髓分化不良症候群患者之檢體，我們將用 TRIzol 保存的患者骨髓血分離出之單核細胞，使用 Nucleospin® RNA purification kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany)，萃取出 RNA，且同時去除 DNA。萃取出之 RNA，分別送至台灣國家衛生研究院（National Health Research Institutes, Taiwan）及台灣中央研究院之 Affymetrix 基因表現核心實驗室（Affymetrix Gene Expression Service Lab, Academia Sinica, Taiwan），進行微陣列實驗。RNA 濃度及品質會先經由 Bioanalyzer 測定；接著依照 Affymetrix GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) 手冊中的操作步驟，將全 RNA (total RNA) 合成 cDNA，並將以標記。標記後的 cDNA 會利用 Hybridization Oven 645，在 45°C 的環境下，與 GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 混合 16 小時。接著再使用 Affymetrix Fluidics Station 450，將微陣列晶片沖洗及呈色。最後，使用 GeneChip® Scanner 7G 掃描微陣列晶片上之訊號，同時使用 Affymetrix GeneChip Command Console 分析訊號。

微陣列晶片所輸出之原始資料，會先使用 Affymetrix® Expression Console™ Software，先將資料做正常化分佈之轉換（normalization with Robust Multichip Analysis (RMA) algorithm）。正常化析後的資料，再利用以下三種軟體做進一步分析：

(1) Affymetrix 所提供之 Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) software (http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod760001/AFFY/Transcriptome+Analysis+Console+%28TAC%29+Software#1_1),

(2) 美國國家衛生研究院國家癌症研究中心所提供之 BRB-Array Tools v4.5.0 stable (provide by National Cancer Institute, National Institutes of Health; <https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>)

(3) 路徑分析 (pathway analysis) 是使用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 軟體 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). [39, 40]

在 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 微陣列中，TC17002254.hg.1 和 TC17002858.hg.1 兩個轉錄子可用於代表 *HOXB-AS3* (NCBI Reference Sequence: NC_000017.11) 之表現。其中，TC17002254.hg.1 可偵測 *HOXB-AS3* 的 variants 1 至 5，TC17002858.hg.1 可偵測 *HOXB-AS3* 所有的 variants。因為 TC17002858.hg.1 可偵測所有的 variants，且兩者表現相似，故本研究使用 TC17002858.hg.1 的表現量，做為分類標準。

2.1.4 *HOXB-AS3* 表現量與基因突變關係圖

將患者按照 *HOXB-AS3* 表現量分成高低兩組，再將患者基因突變的資料一起分析。先由 Bioconductor 網站 (<https://bioconductor.org/install/>) 下載 R package — ComplexHeatmap 及 circlize，並安裝之。使用的 R 版本為 version 4.3.1。詳細語法見附錄 R 語法。

2.2 細胞株相關實驗

2.2.1 細胞株和細胞培養 (Cell lines and cell cultures)

OCI/AML3 和 TF-1 是人類骨髓性白血病細胞株。TF-1 細胞株 (BCRC number 60323) 是於西元 2014 年 09 月 29 日自台灣生物資源保存及研究中心 (Bioresource

Collection and Research Center (BCRC), Hsinchu, Taiwan (BCRC 立; <http://www.bcrc.firdi.org.tw/>) 購入。台灣生物資源保存及研究中心是一國家級細胞保存中心，它提供保存、鑑定、及販售細胞株之服務。OCI/AML3 是 2008 年源自 Dr. Minden (Ontario Cancer Institute/Princess Margaret Hospital, Canada) 之實驗室。

TF-1 細胞株，培養於加入 10% 熱去活化胎牛血清 (heat-inactivated fetal bovine serum, FBS) 的 RPMI 1640 medium (ATCC Modification, Gibco®)，並另外於培養時每 1 milliliter 加入 100 單位 penicillin、100 micrograms streptomycin (Gibco®) 及 4 nanograms GM-CSF (GM-CSF Recombinant Human Protein, Gibco® PHC2011)。OCI/AML3 細胞株，則培養於加入 10% 熱去活化胎牛血清的 RPMI 1640 medium (ATCC Modification, Gibco®)，並另外於培養時每 1 milliliter 加入 100 units penicillin 及 100 micrograms streptomycin (Gibco®)。兩個細胞株，均於二至四日，視細胞生長的密度，進行繼代培養。

2.2.2 短髮夾核糖核酸及長鏈非編碼核糖核酸之慢病毒載體設計及製造 (Constructions of lentiviral vectors with shRNA and lncRNA, and lentiviral production)

核糖核酸抑制實驗之試劑及載體，購入自中央研究院 RNAi 核心實驗室 (RNAi Core Lab, Academia Sinica, Taiwan; National Core Facility for Manipulation of Gene Function by RNAi, miRNA, miRNA sponges, and CRISPR/Genomic Research Center, Academia Sinica, Taiwan, supported by the National Core Facility Program for Biotechnology Grants of MOST; MOST 104-2319-B-001-001)，包含 pLKO_AS1010 載體用於短髮夾核糖核酸 (short hairpin RNA, shRNA) 實驗、pLAS5w.Pbsd 載體用於表現 lncRNA、pCMV-ΔR8.91 和 pMD.G 用於慢病毒製造之包裝及外封套。實驗設計及 shRNA 和 cDNA 結構設計，是按照中央研究院 RNAi 核心實驗室建議之步驟。

簡而言之，先利用 PCR 的方式複製人類 *HOXB-AS3* variant 2 (GenBank accession code: NR_033202.2)，並插入 pLAS5w.Pbsd 載體的 *NheI* 和 *PmeI* 兩酵素切點之間。*HOXB-AS3* 之 shRNA 是按照 Broad Institute 的 RNAi Consortium shRNA Library 之流程。設計正向及反向的寡核苷酸序列，先利用溫度變化的方式將兩者黏合，再嵌入 pLKO_AS1010 載體 *AgeI* 和 *EcoRI* 酵素切點之間。因為急性骨髓

性白血病多表現 *HOXB-AS3* 的外顯子 (exon) 4 和 6，故我們針對外顯子 4 和 6 分別設計 shRNA，同時使用 shLacZ 當作無作用標地之對照組。shRNA 的序列如下（位置如附圖 3）：

shHOXB-AS3#1: GGACCCACCAACCAAGGAGCT （針對 *HOXB-AS3* 外顯子 4）

shHOXB-AS3#2: GGCACCTCACTTGCAGACATCA （針對 *HOXB-AS3* 外顯子 6）

shLacZ: CGCGATCGTAATCACCCGAGT （無作用標地之對照組）

慢病毒的製造，是按照中央研究院 RNAi 核心實驗室之建議步驟。病毒製造後，利用 Lentix-X solution (Clontech©) 純化之。濃縮後的慢病毒，保存於 DMEM 培養液中，培養液中亦包含 20% 熱去活化胎牛血清；若當天未使用，則冰凍保存於 -80°C 冰箱，於兩個月內使用。

2.2.3 由慢病毒來製成穩定表現之細胞株 (Lentivirus infection to generate stable cell lines)

濃縮的慢病毒液與細胞混合均勻，並加入 8 micrograms per milliliter 的 polybrene 來增加慢病毒感染細胞之效率。混合後的慢病毒和細胞，置於 37°C 培養 24 小時。之後，將培養後的細胞及慢病毒混合液在室溫中使用 1000 rpm 離心 5 分鐘；離心後，將上清液去除，留下底部沉澱的細胞。底部沉澱的細胞再利用原本培養用的培養液溫和地回沖，以細胞原本的培養條件繼續培養。七天後，待細胞重新恢復生長分裂的活性後，再於培養液中加入 blasticidin 或 puromycin，用於藥物挑選。被慢病毒感染之細胞，因帶有抗藥性基因，故在加入 blasticidin 或 puromycin 後，會繼續存活；未被感染的細胞則死亡。經過七天的藥物挑選培養，存活的細胞，再繼續用於之後的實驗。

2.2.4 溴化去氧尿嘧啶流式細胞儀實驗 (BrdU flow assay)

我們使用 BD Pharmingen™ APC BrdU Flow Kits (Cat. NO. 552598)，操作溴化去氧尿嘧啶流式細胞儀實驗 (BrdU flow assay)。細胞先培養於 37°C 的狀況下，在培養液中加入 10 μM BrdU，三小時後收集細胞進行下一步。詳細的實驗步驟見於 BD Pharmingen™ APC BrdU Flow Kits 之實驗手冊。流式細胞儀的機器是使用台大

醫院流式細胞儀核心實驗室之 LSR II (BD Bioscience, San Jose, CA)及台灣大學台成幹細胞研究中心分子及免疫功能實驗室之 FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA)。



2.2.5 細胞生長實驗 (Proliferation assay)

先用帶有 shRNA 的慢病毒，感染 OCI/AML3 細胞株；經過一晚的培養後，用離心的方式去除帶有慢病毒的培養液，再使用細胞原本的培養液培養兩天，讓細胞回復生長分裂的活性；兩天後做一次繼代培養。培養兩天後，利用中央研究院生命醫學研究所流式細胞儀核心設施所提供之 BD FACSJazz 流式細胞儀，將帶有綠色螢光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 之細胞分離出來 (用於 shRNA 慢病毒製作之 pLKO_AS1010 載體，帶有 GFP 螢光)。分離出細胞的日期訂為第 0 天，每 1×10^6 個帶有 GFP 的細胞，培養於 5 mL 培養液裡，每一組有三重覆。在接下來連續的六天裡，將細胞與培養液混合均勻後，取出部分細胞及培養液做細胞計數，並畫出細胞的生長曲線圖。

2.2.6 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR)

我們用 Nucleospin® RNA kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany) 萃取出全 RNA；取 2 microgram RNA 當作模版，使用 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc)，來製作互補 DNA (complementary DNA, cDNA)。再使用 LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche) 和 Roche LightCycler 480 II 儀器進行即時定量聚合酶連鎖反應實驗。引子的黏合溫度為 60°C。引子的序列如下：

β2 microglobulin forward: 5'-AGCAGCATCATGGAGGTTTG-3';

β2 microglobulin reverse: 5'-AGCCCTCCTAGAGCTACCTG-3';

18s rRNA forward: 5'-ACGAAAGTCGGAGGTTTCGAA-3';

18s rRNA reverse: 5'-GTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAG-3';

GAPDH forward: 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3';

GAPDH reverse: 5'-ATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAG-3';

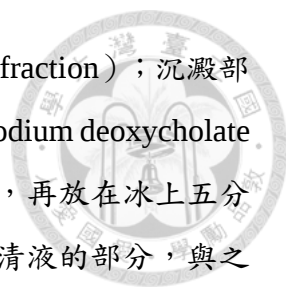
MALAT1 forward: 5'-GAATTGCGTCATTTAAAGCCTAGTT-3';

MALAT1 reverse: 5'-GTTTCATCCTACCACTCCCAATTAAT-3';
NEAT1 forward: 5'-TCGGGTATGCTGTTGTGAAA-3';
NEAT1 reverse: 5'-TGACGTAACAGAATTAGTTCTTACCA-3';
HOXB-AS3 variant 2/3/5 forward: 5'-ACAACCGAGTGGAAGTACG-3';
HOXB-AS3 variant 2/3/5 reverse: 5'-AAGCCAAGGCTGTTCAAGGT-3' (targeting exon 6, 附圖 3);

HOXB-AS3 variant 1/4 forward: 5'-GGCCCTATAGAAACCAGGACG-3';
HOXB-AS3 variant 1/4 reverse: 5'-GAAGGGAATGAGTCCGGGAG-3' (附圖 3);
MCM3 forward: 5'-TCTGGGACCTTCAGGACTGT-3';
MCM3 reverse: 5'-TTGATGTCCCCACGGATGTG-3';
MCM4 forward: 5'-GATTCCCGAGATGCAGGAGG-3';
MCM4 reverse: 5'-GCACAGCTCGATAGATGCCT-3';
MCM6 forward: 5'-TCCAAGCTTAGCACACCAGG-3';
MCM6 reverse: 5'-GAACGCCACCAAAGAGCATC-3';
PCNA forward: 5'-GGCCGAAGATAACGCGGATA-3';
PCNA reverse: 5'-TGTCACCGTTGAAGAGAGTGG-3';
CKD1 forward: 5'-ACAGGTCAAGTGGTAGCCAT-3';
CKD1 reverse: 5'-CCATGTACTGACCAGGAGGG-3';
CCNB2 forward: 5'-CACTCTTGCCCTTCCCCGTC-3';
CCNB2 reverse: 5'-AGCTACTTGTGCTGCTCTGG-3';
CDC25A forward: 5'-GCAACCACTGGAGGTGAAGA-3';
CDC25A reverse: 5'-TCATCTGGGTTCGATGAGCTG-3'.

2.2.7 核細胞質分離實驗 (Nuclear-cytoplasm fractionation)

詳細的細胞核／細胞質分離 RNA 實驗可參考過去的文獻[41]。簡而言之，使用 1×10^6 至 1×10^7 個細胞，並用磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, 簡稱為 PBS) 清洗兩回。接著，使用 1 milliliter RSB (10 mM Tris, pH 7.4; 10 mM NaCl; 3mM $MgCl_2$) 將細胞重新懸浮，將細胞置於冰上三分鐘，在 4 °C 的狀況下使用 4000 rpm 將細胞離心三分鐘。去除上清液後，將細胞用慢速吸放定量管的方式 (slow pipetting)，重新懸浮於四倍體積的裂解緩衝液 RSBG40 (10 mM Tris, pH 7.4; 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$; 10% glycerol; 0.5% Nonidet P-40; 0.5 mM dithiothreitol (DTT); and 100 units per milliliter rRNasin (Promega,WI))，再使用 7000 rpm 離心三



分鐘。上清液的部分收集起來，並標為細胞質部分 (cytoplasmic fraction)；沉澱部分，使用 RSBG40 加入十分之一體積的 detergent (3.3% (wt/wt) sodium deoxycholate and 6.6% (vol/vol) Tween 40) 用渦流的方式 (vortex) 重新懸浮，再放在冰上五分鐘，接著用 7000 rpm 離心三分鐘，將細胞核再次沉澱下來。上清液的部分，與之前細胞質部分合併。細胞核沉澱物再利用 RSBG40 清洗，用 10,000 rpm 離心五分鐘。利用顯微鏡確認細胞被裂解的狀態，觀察是否符合需求。細胞核沉澱物使用 250 microliters 裂解緩衝液 RSBG40 重新懸浮，並加入 1 milliliter TRIzol。取出 250 microliters 細胞質部分，與 1 milliliter TRIzol 使用 vortex 方式混合。與 TRIzol 的混合液靜置室溫五至十分鐘。接著使用 TRIzol 的方式萃取細胞核及細胞質內的 RNA，用於接下來的實驗。

2.3 統計分析 (Statistical analysis)

我們使用曼惠特尼檢定 (Mann-Whitney test)，來分析計算非常態分佈之連續型變數；使用多樣本中位數差異檢定 (Kruskal-Wallis test) 來比較兩組及兩組以上數據的差異，是否具有統計上意義。卡方檢定 (Chi-square test) 用於計算 *HOXB-AS3* 的表現量與其他分類別變數是否相關，如：性別、國際預後評分系統之風險分群、國際衛生組織診斷分類、染色體變化、和基因突變。當列聯表內任何一個期望值小於五時，將改用費雪正確概率檢定 (Fisher exact test) 來分析。

對於原發性急性骨髓性白血病患者，整體存活期 (overall survival, OS) 的定義為從診斷日期至病人最後追蹤日期或死亡日期。若在最後追蹤日時患者仍然存活，則患者會記為設限資料 (censored)；若患者因任何原因造成死亡，則患者會記為事件 (event)。至於無復發存活期 (Relapse free survival, RFS)，則定義為患者達到完全緩解的日期至疾病復發日期、最後追蹤日期、或死亡日期。若患者在最後追蹤日時仍保持疾病狀態為完全緩解且存活，則無復發存活期定義至最後追蹤日，且患者會記為設限資料 (censored)；若患者發生疾病復發，則無復發存活期定義至復發日期，且患者會記為事件 (event)；若患者未發生疾病復發，但因其他原因造成死亡，則無復發存活期定義至死亡日，且患者會記為事件 (event)。

對於骨髓分化不良症候群之患者，整體存活期定義為診斷日至最後追蹤日期或死亡日期。若患者在最後追蹤日時仍然存活，則患者會記為設限資料 (censored)；若患者因任何原因造成死亡，則患者會記為事件 (event)。

我們使用 Kaplan-Meier (KM) 分析來繪製存活曲線，對數等級檢定 (log-rank tests) 來計算整體存活期及無復發存活期在不同組別之間差異是否具有統計學意義。中位數追蹤期，則使用反 KM 分析來估算。多變數 Cox 比例風險模式 (Multivariate Cox proportional hazard regression analysis)，用於分析整體存活期之獨立預後因子。當 P 值小於 0.05 時，定義為統計上有意義。所有的統計相關分析，皆由 MedCalc® 15.6.1 software (<https://www.medcalc.org/>) 完成。



第三章 研究結果 Results

3.1 找尋與急性骨髓性白血病相關之長鏈非編碼核糖核酸

3.1.1 影響急性骨髓性白血病預後之長鏈非編碼核糖核酸

為了找尋在急性骨髓性白血病裡重要的 lncRNA，我們利用兩個急性骨髓性白血病患者群的資料，一是台大醫院急性骨髓性白血病患者群的資料，二是美國癌症基因圖譜急性骨髓性白血病患者群的資料[42]，來做為分析基礎。我們先利用這兩個資料庫分析，找出對於急性骨髓性白血病患者預後相關的基因表現；我們發現，美國癌症基因圖譜急性骨髓性白血病患者群有 2824 個探針 (probes) 與預後相關，台大醫院急性骨髓性白血病患者群則有 4454 個轉錄子 (transcript clusters)，對於急性骨髓性白血病患者預後有重要影響 (圖 2)。在這兩個患者群裡，同時對預後有影響的有 907 個，其中有 11 個為 lncRNA (圖 2)。其中，*BZRAP1-AS1*、*LINC00926*、*LOC646762*、*TRAF3IP2-AS1*、*ZSWIM8-AS1* 這五個 lncRNA 表現量較高時，預後較好；*A2M-AS1*、*HOXB-AS3*、*LINC00299*、*LINC00899*、*LINC00963*、*LINC00982* 表現量較高時，預後較差 (圖 2)。

這十一個 lncRNA 裡，我們對 *HOXB-AS3* 特別有興趣，因為之前的研究已知，*HOX* 群組基因對於細胞生長 (cell proliferation)、造血作用 (hematopoiesis)、及白血病致病機轉 (leukemogenesis)，均有重要影響[43, 44]；此外，*HOX* 群組基因裡的 lncRNA 也會影響造血細胞[21]。也因此，我們將研究的重點放在 *HOXB-AS3*。

3.1.2 *HOXB-AS3* 在人類基因內的位置

HOXB-AS3 是個位在人類 *HOXB* 群組基因裡的 lncRNA，位在人類染色體 17q21.32，經由剪接修飾 (splicing)，*HOXB-AS3* 有 8 個不同的變體 (transcriptional variants) (圖 1)。*HOXB-AS3* 在染色體上的位置，與 *HOXB5* 和 *HOXB6* 有重疊，但轉錄的方向是相反 (圖 1)。除了 *HOXB-AS3* 第二個外顯子 (exon) 與 *HOXB5* 有重疊，*HOXB-AS3* 其他的外顯子與 *HOXB5* 和 *HOXB6* 沒有重疊 (圖 1)。

PhyloCSF 是一個軟體，可用來估算一個長段核糖核酸是否具有轉譯成蛋白質的能力。以 PhyloCSF 來計算，*HOXB-AS3* 被預測為一個非編碼核糖核酸 (圖 3)。用另一個計算軟體 Coding Potential Assessment Tool (CPAT) 來計算，*HOXB-AS3* 的轉譯預測能力很低，只有 0.126[45]。因此，我們預估，*HOXB-AS3* 是一個位在 *HOXB*

群組基因裡的反向 lncRNA，與 *HOXC* 群組基因裡的 *HOTAIR*、*HOXA* 群組基因裡的 *HOTTIP*[15]、*HOXA10-AS*[23]和 *HOTAIRMI*[20]，在人類基因體上的相對位置類似；*HOXB-AS3* 可能也會有著與他們類似的功能。



3.1.3 *HOXB-AS3* 為一跨物種且持續存在之基因

老鼠的 *HOXB* 群組基因位在第 11 條染色體 (NCBI Reference Sequence: NC_000077.6 Chromosome 11 Reference GRCm38.p4 C57BL/6J)，在與 *HOXB-AS3* 類似的位置也有個反向 lncRNA，名為 *Hoxb5os* (NCBI Reference Sequence: NR_131758.1)，依軟體分析也是非編碼核糖核酸 (圖 4)。我們將人類 *HOXB-AS3* 與老鼠 *Hoxb5os*，利用 plalign (<http://fasta.bioch.virginia.edu/>) 來比對兩者，可以發現兩者有兩段類似的序列 (圖 5)，分別位在 *HOXB-AS3* 第一個及第六個外顯子 (圖 5)。這分析暗示著，*HOXB-AS3* 是個在哺乳類演化上持續存在的基因。

3.2 *HOXB-AS3* 在細胞內所扮演之角色

3.2.1 在骨髓性細胞株裡，抑制 *HOXB-AS3* 表現，會抑制細胞生長

為了進一步研究 *HOXB-AS3* 的功能，我們利用帶有 shRNA 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 OCI/AML3，建立兩株帶有抑制 *HOXB-AS3* 的 shRNA 及一株對照組的穩定細胞株；這些被慢病毒感染過的細胞，會表現綠色螢光 GFP，可用於接下來的實驗與分析。

我們先將被感染過慢病毒的穩定細胞株，利用流式細儀分離出來，再培養數日後，開始做細胞計數。我們發現，帶有抑制 *HOXB-AS3* 的 shRNA 的細胞，生長速度比對照組緩慢許多 (圖 6)。這結果表示，抑制 *HOXB-AS3* 的表現，會抑制骨髓性細胞株生長。

為了進一步了解它的影響方式，我們在兩個骨髓性細胞株 OCI/AML3 和 TF-1 裡，抑制 *HOXB-AS3* 的表現 (圖 7，圖 8)。在細胞株 OCI/AML3 裡，使用 shRNA 抑制 *HOXB-AS3* 的表現，會抑制細胞進入細胞周期中生長分裂的 S 期 (圖 7)，進而使得細胞生長變慢。另外，我們在另一個骨髓性細胞株 TF-1 裡，同樣使用 shRNA 抑制 *HOXB-AS3* 的表現，也會看到類似現象，進入細胞周期 S 期的細胞數目減少 (圖 8)。在細胞株 OCI/AML3 裡，抑制 *HOXB-AS3* 的效果比較明顯；在細胞株 TF-

1 裡，抑制 *HOXB-AS3* 的效果則相較沒那麼顯著，可能是因為 *HOXB-AS3* 在細胞株 TF-1 的表現較少所致（圖 9）。

此外，我們也在骨髓性細胞株 TF-1 內，利用慢病毒感染，建立過度表現 *HOXB-AS3* 的穩定細胞株。可以發現，當細胞內 *HOXB-AS3* 的表現增加時，也會增加進入細胞周期 S 期的細胞比例（圖 10）。

以上的實驗結果顯示，*HOXB-AS3* 的表現，會增加骨髓性細胞株進入細胞周期 S 期，進而促進細胞生長。

3.2.2 *HOXB-AS3* 不影響 *HOX* 基因群的表現

為了進一步研究 *HOXB-AS3* 對於細胞生長所造成的影響，我們利用微陣列分析來找尋 *HOXB-AS3* 所影響的基因。我們在骨髓性細胞株 OCI/AML3 上，分別使用了兩組 shRNA 來抑制 *HOXB-AS3* 的表現 (sh*HOXB-AS3*#1 和 sh*HOXB-AS3*#2)，另外再使用兩組不影響細胞內基因的 shRNA 當作對照組 (shLacZ 和空的 pLKO vector 不含 shRNA)。

因為，之前的研究發現，在 *HOX* 群組基因裡的 lncRNA，多藉由 *cis*-regulation 或 *trans*-regulation 的調控，來控制 *HOX* 基因的表現[14, 15] (*cis*-regulation 指 lncRNA 調控同一組內的 *HOX* 基因，*trans*-regulation 指 lncRNA 調控跨組的 *HOX* 基因)，我們在利用 shRNA 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 *HOXB-AS3* 表現後，首先觀察 *HOX* 群組基因的表現量。然而，我們發現，*HOX* 群組基因的表現量並未因 *HOXB-AS3* 被抑制而受到影響（圖 11）。

因此，我們猜測，*HOXB-AS3* 的功能與機轉，可能與 *HOTAIR*[14] 及 *HOTTIP*[15] 不同，可能是藉由其他機轉影響細胞生長，而非經由 *HOX* 基因群的調節。

3.2.3 *HOXB-AS3* 對於細胞周期之影響與生長分裂相關基因之表現

為了找尋可能受 *HOXB-AS3* 影響的基因，我們利用 BRB array tool，先將基因表現做 log2-transformed；若基因表現的平均值，在兩組內變化差異 1.5 倍以上，且 P 值小於 0.05，則視為此基因有受到 *HOXB-AS3* 影響。我們發現 147 個基因及 790 個轉錄子 (transcript clusters)，在兩組 (抑制 *HOXB-AS3* 組相較於對照組) 之間表現有差異（圖 12）。再利用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)，我們發現，這些受 *HOXB-AS3* 影響的基因，大多與細胞周期的進展 (cell cycle

progression) 及 DNA 複製 (DNA replication) 相關 (圖 13)。

由 Affymetrix® TAC 所提供之 Wikipathway 分析, 也發現這些受 *HOXB-AS3* 影響的基因, 與細胞周期 (cell cycle pathway, 圖 14)、DNA 複製 (DNA replication, 圖 15)、G1-S 細胞周期轉化 (G1-S transition, 圖 16)、及 RB 細胞傳導途徑 (RB pathway, 圖 17) 相關。這些受 *HOXB-AS3* 影響的基因, 當 *HOXB-AS3* 被抑制時, 他們的表現量大部分都降低; 與之前實驗中發現, *HOXB-AS3* 會影響細胞生長的現象, 是一致的。

我們也進一步用定量反轉錄 PCR (RT-qPCR) 的方式, 來確認這些基因於 *HOXB-AS3* 被抑制時表現, 如: 影響細胞生長的基因 (*CDK1*、*CCNB2* 和 *CDC25A*)、影響 DNA 複製的基因 (*PCNA*)、及複製前複合物 (pre-replicative complex) 的集合 (*CDC6*、*MCM3*、*MCM4* 和 *MCM6*) (圖 18)。相對地, 當 *HOXB-AS3* 在細胞內被過度表現時, 這些基因表現量也隨之上升 (圖 19)。

這些結果表示, *HOXB-AS3* 會促進這些與細胞生長和 DNA 複製相關的基因表現, 進而影響骨髓性細胞的生長分裂。

3.2.4 *HOXB-AS3* 位在細胞質內為主

為了瞭解 lncRNA *HOXB-AS3* 在細胞內的位置, 我們利用核質分離的實驗, 先將細胞核和細胞質分離, 再萃取細胞質或細胞核的 RNA, 利用定量反轉錄 PCR, 來定量 lncRNA *HOXB-AS3* 在細胞質和細胞核中的量。我們的結果顯示, 大部分的 *HOXB-AS3* 位在細胞質, 與過去已知位在細胞核的 lncRNA *MALAT1*[46, 47] 和 *NEAT1*[47], 相當地不同 (圖 20)。因此, 由我們的實驗發現, *HOXB-AS3* 可能是藉由其他間接的方式影響這些基因的表現, 與目前已知位在 *HOX* 群組基因裡的 lncRNA, 如: *HOTAIR*[14] 和 *HOTTIP*[15], 藉由轉錄的調節影響 *HOX* 基因表現, *HOXB-AS3* 的作用機轉是不同的。

由此可知, *HOXB-AS3* 是個位於細胞質內的 lncRNA, 且藉由影響細胞周期與 DNA 複製來促進細胞生長



3.3 *HOXB-AS3* 對於急性骨髓性白血病患者之重要性

3.3.1. *HOXB-AS3* 在急性骨髓性白血病患者表現及其臨床表徵

為瞭解 *HOXB-AS3* 在原發型急性骨髓性白血病的臨床重要性，我們進一步分析台大醫院急性骨髓性白血病患者群的臨床資料和微陣列資料；同時，使用美國癌症基因圖譜急性骨髓性白血病患者群的資料[42]作為驗證組別。

在台大醫院急性骨髓性白血病患者群的資料內，我們使用 TC17002858.hg.1 當作 *HOXB-AS3* 的表現量，這個轉錄子在 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 微陣列的設計上，能代表所有的 *HOXB-AS3* 因不同剪接修飾後產生的變體。按照 *HOXB-AS3* 的表現量，我們使用二分法，將病人分成高表現量和低表現量兩組。*HOXB-AS3* 高表現量的患者，與正常成年人的骨髓細胞相比，他們的 *HOXB-AS3* 表現量比正常人高（圖 21； $P < 0.000001$ ）；表現低的患者，其表現量與正常成年人類似（圖 21）。

按照 *HOXB-AS3* 表現量將急性骨髓性白血病患者分組後，分別比較其臨床表徵差異（表 2）。帶有高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，平均診斷年齡為 52.7 歲；與低 *HOXB-AS3* 表現的患者相比（平均診斷年齡為 42.8 歲），年齡較長（表 2； $P = 0.0010$ ）。性別分佈部分，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者女性比例較高；低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，則是男性比例較高（表 2； $P = 0.0120$ ）。初診斷時，低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，診斷時血小板數目略低於高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者（表 2； $P = 0.0449$ ）；其他項目，如：血球計數、骨髓內芽細胞比例、與周邊血芽細胞比例兩組皆相似（表 2）。

至於染色體變化風險分組部分，兩組病人也相當地不同（表 2； $P < 0.0001$ ）。高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，中風險及高風險的患者比例，都較低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者高；低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，低風險比例較高（表 2； $P < 0.0001$ ）。整體而言，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，較常帶有高風險之染色體變化。

治療效果部分，兩組的完全緩解率差不多，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，在接受引導性化療後，完全緩解率為 76.0%；低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者裡，完全緩解率為 83.5%（表 2）。然而，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，復發率較高，有 47.9%；低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓

性白血病患者，復發率較低，只有 37.1% (表 2; $P = 0.0306$)。

基因突變部分 (表 3)，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，較常帶有 *NPM1* 突變 ($P < 0.0001$)、*FLT3*-ITD ($P = 0.0047$)、*DNMT3A* 突變 ($P < 0.0001$)、*RUNX1* 突變 ($P = 0.0062$)、*IDH1* 突變 ($P = 0.0348$)、*MLL*-PTD ($P = 0.0007$)、及 *PTPN11* 突變 ($P = 0.0007$)；但較少帶有 *CEBPA* 雙重突變 ($P = 0.0004$) 及 *KIT* 突變 ($P = 0.0003$)。高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，也較常為 *NPM1* 突變/原生型 *FLT3* (mutated *NPM1* without *FLT3*-ITD; $P < 0.0001$)。基因突變與 *HOXB-AS3* 表現量之關係，詳見圖 22。

3.3.2. *HOXB-AS3* 對急性骨髓性白血病患者之預後之影響

存活分析部分，中位數追蹤期為 88.1 個月。高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，整體存活期的中位數為 17.7 個月；低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，整體存活期的中位數在追蹤期結束前仍未達到 (圖 23; $P < 0.0001$)。相較於低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，其整體存活期較短。

無復發存活期分析部分，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，無復發存活期的中位數為 12.9 個月；低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，無復發存活期的中位數在追蹤期結束前仍未達到 (圖 24; $P = 0.0070$)。相較於低 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，高 *HOXB-AS3* 表現的急性骨髓性白血病患者，其無復發存活期亦較短。我們利用另一個能代表 *HOXB-AS3* 的轉錄子 TC17002254.hg.1 來重新分析，所得到的結果也是類似 (圖 25)。

次族群分析裡顯示，先將急性骨髓性白血病患者，按照 cytogenetic group，分成低風險、中風險、高風險三組，再進行次族群分析。我們發現，中風險患者之整體存活分析裡，*HOXB-AS3* 的高表現，是一個預後不佳之因子 (圖 26)。我們將在台大醫院急性骨髓性白血病患者群分析所得的結果，利用美國癌症基因圖譜急性骨髓性白血病患者群的資料作驗證分析[42]，亦發現高表現的 *HOXB-AS3* 為預後不佳因子 (圖 27)。

整體存活期的單變項分析時，我們發現，診斷時的年齡較長、*MLL*/PTD 突變、*RUNX1* 突變、*TP53* 突變、及 *HOXB-AS3* 高表現，均與預後不佳有關。ELN 風險分組為低風險、及 *CEBPA* 雙重突變，則與預後較好相關 (表 4)。多變項分析

(Multivariate analysis) 部分，我們將年齡、ELN 風險分組、有 *NPM1* 突變且無 *FLT3*-ITD 突變、*CEBPα* 雙重突變、*MLL*/PTD 突變、*RUNX1* 突變、*TP53* 突變、及 *HOXB-AS3* 表現，納入分析。結果顯示，診斷時的年齡較長、*MLL*/PTD 突變、*TP53* 突變、及 *HOXB-AS3* 高表現，均為獨立不良預後因子；ELN 風險分組為低風險、有 *NPM1* 突變且無 *FLT3*-ITD 突變、及 *CEBPα* 雙重突變，則為獨立良好預後因子 (表 4)。

我們將台大醫院急性骨髓性白血病患者群的資料，去除掉急性前髓性白血病患者，再依 *HOXB-AS3* 的表現量做分析 (圖 28)。帶有高 *HOXB-AS3* 表現的患者，相較低 *HOXB-AS3* 表現的患者，整體存活期仍然較短 (圖 29a)。次族群分析裡，若將患者按照 2017 年歐洲白血病聯盟 (2017 European LeukemiaNet, ELN) 建議之風險分群，中風險之患者裡，高表現的 *HOXB-AS3* 仍為不良預後因子 (圖 29b)。

3.4 *HOXB-AS3* 對於骨髓分化不良症候群患者之重要性

3.4.1 *HOXB-AS3* 在骨髓分化不良症候群患者之表現

為了研究 *HOXB-AS3* 表現在原發型骨髓分化不良症候群病人，在臨床上的重要性，我們使用了台大醫院骨髓分化不良症候群患者的臨床資訊及微陣列資料，我們以西元 1992 年至 2010 年之間診斷的 157 位患者作為訓練組，以西元 2011 年一月至 2012 年五月診斷的 30 位患者作為驗證組。*HOXB-AS3* 的表現是依據 TC17002858.hg.1 而定。按照 *HOXB-AS3* 的表現，我們可以進一步將病人分成四組，低表現、中低表現、中高表現、和高表現 (圖 30a)。其中，只有高表現組的患者，其 *HOXB-AS3* 的表現量明顯高於正常人 (圖 30a; $P < 0.000001$)；其他三組的 *HOXB-AS3* 的表現，與正常人無異 (圖 30a)。另一個能代表 *HOXB-AS3* 的轉錄子 TC17002254.hg.1 來分析，結果亦類似 (圖 30b)。

3.4.2 骨髓分化不良症候群患者之臨床表徵

將骨髓分化不良症候群患者，按 *HOXB-AS3* 的表現先分成四組，其中，低表現、中低表現、和中高表現之病人，因為其表現量與正常人相似，故全部併為一組，定義為「低表現」；剩下 *HOXB-AS3* 表現最高的患者，定義為「高表現」。分成「低表現」和「高表現」兩組後，再分析病人的基本臨床資料 (表 5)。

HOXB-AS3「低表現」和「高表現」的骨髓分化不良症候群患者，兩組之間，病人的診斷年齡和性別沒有差異（表 5）。血液相部分，*HOXB-AS3* 高表現的骨髓分化不良症候群患者，血色素（表 5； $P=0.0186$ ）及骨髓內芽細胞比例較高（表 5； $P<0.000001$ ）。IPSS 風險分組部分，兩組之間統計上沒有差異（表 5）。國際衛生組織診斷分類部分，因為 *HOXB-AS3* 高表現的骨髓分化不良症候群患者，骨髓內芽細胞比例較高，故在分類上較常被分至高風險的 EB-2 診斷（表 5）。另外，*HOXB-AS3* 高表現的骨髓分化不良症候群患者，轉變成急性白血病的比例為 35.9%；是低表現患者的 16.9%，二倍之高（表 5； $P=0.0130$ ）。

另外，我們也分析，在骨髓分化不良症候群患者中，關於 *HOXB-AS3* 表現量與基因突變之間的關係（表 6）。*HOXB-AS3* 高表現的骨髓分化不良症候群患者，較常帶有：*RUNX1*（ $P=0.0001$ ）、*ASXL1*（ $P=0.0017$ ）、*IDH2*（ $P=0.0178$ ）之基因突變（表 6）。基因突變與 *HOXB-AS3* 表現量之關係，詳見圖 31。

3.4.3 *HOXB-AS3* 對骨髓分化不良症候群患者之預後之影響

存活分析部分，追蹤期的中位數為 39.2 個月。若依 *HOXB-AS3* 表現量將患者分成四組（圖 30），患者的整體存活分析則如圖 32。*HOXB-AS3* 高表現的骨髓分化不良症候群患者，相較於其他三組，整體存活期較短（圖 32）；而低表現、中低表現、和中高表現三組，整體存活期相近，且無統計上之差異（圖 32）。當我們利用另一個能代表 *HOXB-AS3* 表現的轉錄子 TC17002254.hg.1 來分析時，結果類似（圖 33）。再加上之前 *HOXB-AS3* 表現分析中，亦發現低表現、中低表現、和中高表現三組，其 *HOXB-AS3* 表現量與正常人無異，只有高表現量一組較正常人高（圖 30）；因此，後續的存活分析中，我們亦比照臨床表徵分析時的做法，將骨髓分化不良症候群患者，按 *HOXB-AS3* 表現量分成四組；低表現、中低表現、和中高表現之患者併為一組，定義為「低表現」；剩下 *HOXB-AS3* 表現最高的患者，定義為「高表現」。再依「低表現」和「高表現」兩組，分析患者的整體存活分析。*HOXB-AS3* 高表現的骨髓分化不良症候群患者，整體存活期的中位數為 14.6 個月；而 *HOXB-AS3* 低表現的骨髓分化不良症候群患者，整體存活期為 42.4 個月（圖 34）。*HOXB-AS3* 高表現量，為一不良預後因子。

此外，當我們分析骨髓分化不良症候群驗證族群（即西元 2011 年一月至 2012 年五月診斷的 30 位患者）的整體存活分析時，也使用相同的切點，來將患者分成

高表現與低表現兩組，再來比較其存活率（圖 35）。同樣地，驗證了 *HOXB-AS3* 高表現之骨髓分化不良症候群患者，預後較差。利用另一個轉譯子來分析骨髓分化不良症候群驗證族群，結果也類似（圖 36）。

在整體存活率的單變項分析裡，我們納入年齡、IPSS 風險分群、基因突變、及 *HOXB-AS3* 表現量，當作因子來分析（表 7）。結果發現，年齡大於 60 歲、IPSS 風險分群為高風險、*ASXL1* 基因突變、*ZRSR2* 基因突變、*SRSF2* 基因突變、*TP53* 基因突變、及 *HOXB-AS3* 高表現，均為不佳預後的危險因子。（表 7）在多變數分析中，我們發現，IPSS 風險分群為高風險、*TP53* 基因突變、及 *HOXB-AS3* 高表現，為骨髓分化不良症候群之獨立預測預後不良的危險因子（表 7）。

此外，我們進一步分析，不同 IPSS 風險分組的骨髓分化不良症候群患者，*HOXB-AS3* 表現量與整體存活率之間的關係。我們發現，在 IPSS 低及中低風險的骨髓分化不良症候群患者中（low and intermediate-1 risks），高 *HOXB-AS3* 表現的患者其整體存活期較短，只有 29.2 個月；低 *HOXB-AS3* 表現的患者則有 77.3 個月（圖 37a； $P = 0.0194$ ）。另一方面，在 IPSS 中高及高風險的骨髓分化不良症候群患者中（intermediate-2 and high risks），*HOXB-AS3* 的表現量與整體存活期長短無關（圖 37b）。

因此，藉由 *HOXB-AS3* 的表現量，可以將原本預期低風險的骨髓分化不良症候群患者裡，找出風險相對較高的人，進一步加強其治療或更改治療策略，如：儘早安排異體造血幹細胞移植。

第四章 討論

4.1 *HOXB-AS3* 在急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群所扮演的角色

在本研究中，我們探討了 lncRNA *HOXB-AS3* 在原發型急性骨髓性白血病及原發型骨髓分化不良症候群的病人裡，所扮演的角色。我們分成兩個面項來研究：一是 *HOXB-AS3* 的臨床重要性，二是 *HOXB-AS3* 在細胞內所扮演的功能。

臨床方面，我們的研究發現，在原發型急性骨髓性白血病及原發型骨髓分化不良症候群的病人身上，*HOXB-AS3* 的高表現均為危險因子，可預測病人預後較差。本研究發表時，*HOXB-AS3* 是第一個被報告在骨髓分化不良症候群裡，會影響預後的 lncRNA。我們更進一步發現，*HOXB-AS3* 可以讓我們由骨髓分化不良症候群 IPSS 低風險及中低風險的病人裡，找出一群風險相對較高的患者，並給予更積極的治療。在急性骨髓性白血病患者部分，*HOXB-AS3* 的高表現，亦可預測病人預後較差。

為了瞭解 *HOXB-AS3* 表現在骨髓惡性疾病裡的功能，我們進一步去研究 *HOXB-AS3* 的生物相關功能。我們發現，*HOXB-AS3* 會促進骨髓性細胞的生長。之前的研究顯示，在 *HOX* 群組基因裡的反向 lncRNA，大多藉由影響 *HOX* 基因表現，進而造成對細胞生長發育的影響；而影響 *HOX* 基因的機轉，多為 *trans-regulation* 或 *cis-regulation*[14, 15, 25]。例如：*HOTAIR* 是位在 *HOXC* 群組基因內的反向 lncRNA，藉由 PRC2 組合蛋白，調控在另一條染色體上的 *HOXD* 群組基因的表現[10]；*HOTAIRM1* 則是調控在同一 *HOXA* 群組基因內的 *HOXA1* 和 *HOXA4* 基因[20]。由於 *HOX* 基因在細胞生長、造血作用、及白血病致病機轉裡，扮演重要角色[43, 44]，我們原先猜測，*HOXB-AS3* 可能也是藉由調控 *HOX* 基因的表現，進而影響細胞生長。然而，我們先抑制 *HOXB-AS3* 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 內的表現，再利用微陣列實驗，來看 *HOX* 群組基因的表現（圖 11），可以發現，四個 *HOX* 群組基因，均未受到 *HOXB-AS3* 的影響。反而是，*HOXB-AS3* 影響了其他對於細胞生長及 DNA 複製時重要的基因（圖 13），而這些發現，與我們看到 *HOXB-AS3* 表現會促進細胞進入細胞周期 S 期的現象一致（圖 7、圖 8、圖 10）。

過去，*HOXB-AS3* 對於血液疾病的重要性，之前所知有限。之前有一篇研究發現，在急性骨髓性白血病患者中，*HOXB-AS3* 與 *NPM1* 突變相關[48]。而我們的研究裡，不但顯示了，在急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群的患者裡，*HOXB-*

AS3 的高表現與不好的預後相關，*HOXB-AS3* 是一個可預測不良預後的危險因子；除此之外，我們亦發現，在骨髓性細胞株內，*HOXB-AS3* 會促進細胞生長（圖 6）。更進一步地，我們還發現，在骨髓分化不良症候群 IPSS 低風險的患者裡，*HOXB-AS3* 的高表現亦可預測病人的不良預後，但在高風險患者裡則對預後沒有影響。這表示，在骨髓分化不良症候群 IPSS 低風險的患者，其異常的造血細胞內，*HOXB-AS3* 的表現會促進細胞生長，但對於已經有其他危險因子的高風險患者，*HOXB-AS3* 的效果並不顯著。這個結果也暗示著，*HOXB-AS3* 在不同的骨髓惡性疾病裡，其臨床重要性亦不同。

4.2 本研究之局限

所有的研究都有其局限，本研究也不例外。本研究之原始論文，於西元 2017 年開始投稿，被幾個期刊拒絕；最後於西元 2018 年 7 月投稿 BMC Cancer，經過同儕審核及數次修改，於西元 2019 年 6 月間被期刊接受[49]。事隔四年，再回顧當時的研究，覺得有許多可以改進的地方。

首先，我們利用線上及台大的急性骨髓性白血病資料庫分析，找尋在急性骨髓性白血病裡，可能有重要功能的 lncRNA。我們找到了十一個對於急性骨髓性白血病患者預後有影響的 lncRNA（圖 2）。當時因為實驗預算問題，無法將每一個 lncRNA 全部都利用帶有 shRNA 的慢病毒建穩定細胞株，看看不同的 lncRNA 被 shRNA 抑制時，細胞會有什麼形態與功能上的變化。當然，表上所列之 lncRNA，或許可以成為我們未來加以探索的標的。

其次，疾病分析的部分，骨髓性惡性疾病除了急性骨髓性白血病和骨髓分化不良症候群以外，還有另一大類：骨髓增生性疾病，其包含的疾病有：原發性多血症（polycythemia vera）、原發性血小板增多症（essential thrombocythemia）、原發性骨髓纖維化（primary myelofibrosis）等疾病[2, 3]。本研究著重於急性骨髓性白血病和骨髓分化不良症候群患者，未納入骨髓增生性疾病患者。因此，*HOXB-AS3* 在骨髓增生性疾病所扮演的角色，目前我們尚未了解。若是將來有機會利用骨髓增生性疾病患者資料庫做分析，相信能更加增進我們對 *HOXB-AS3* 在骨髓增生性疾病上的瞭解，也能對骨髓性惡性疾病之全貌，有更深入的認識。

關於 *HOXB-AS3* 的致病機轉部分，本研究發現，*HOXB-AS3* 並不會調節 *HOX* 群組基因的表現（圖 11），而是藉由調節其他基因表現（圖 12～圖 19），進而影響

細胞生長（圖 6）。然而，*HOXB-AS3* 是藉由何種機轉來調節這些基因表現呢？本研究並未對此做深入探討。另外，按照基因圖譜，*HOXB-AS3* 在其他物種亦有相對應之基因，在老鼠身上，有相對應的 *Hoxb5os*（圖 5）。這表示，若我們對 *HOXB-AS3* 有更深入的機轉探討時，有機會利用小鼠模型，更進一步地了解 *HOXB-AS3* 的功能。

4.3 本研究發表後，其他 *HOXB-AS3* 相關研究之討論

在本研究發表同時，有另一個研究在探討 *HOXB-AS3* 在大腸癌的重要性。他們發現，*HOXB-AS3* 會製造一小段胺基酸序列，這個胺基酸序列會影響 pyruvate kinase M 的剪接修飾，進而影響大腸癌細胞的生長[24]。另外，在此研究中，*HOXB-AS3* 的表現在大腸癌細胞是減少的，且與較好預後相關。此篇 *HOXB-AS3* 與大腸癌的相關研究，使用的是 *HOXB-AS3* 第一變體（variant 1，NR_033201.2），而其製造出來的一小段胺基酸序列，是來自於最後兩個外顯子。然而，在骨髓性細胞株內，*HOXB-AS3* 第一變體表現較少，是以第二、三、五變體為主（圖 38）。*HOXB-AS3* 第二、三、五變體沒有第一變體的最後兩個外顯子（圖 1），故可推測雖然他們都是 *HOXB-AS3* 的變體，但其表現在不同的組織、不同的癌症是不一樣的，有著不同的角色與功能。

在本研究發表後，有數篇關於 *HOXB-AS3* 在不同癌症的研究，亦陸續發表於西元 2019 年下半年迄今（表 8）。在西元 2019 年下半年，美國另一個研究團隊，有和我們類似的發現。他們也發現，抑制 *HOXB-AS3* 會減少進入細胞周期 S 期的細胞，進而影響骨髓性細胞的生長[50]；他們的發現與我們一致。另外，他們對於致病機轉方面，做了更加深入且細緻的研究。他們發現 *HOXB-AS3* 會結合 EBP1，進而增加 EBP1-NPM1 蛋白結合體的形成（附圖 4）[50]。依照他們的發現，*HOXB-AS3* 會增加 *rRNA* 的轉錄及蛋白質合成[50]。這可以解釋為何 *HOXB-AS3* 會影響細胞生長。

其他的研究，詳見列表（表 8）。雖然大部分的研究並未直接表明，研究標的為 *HOXB-AS3* 那個變體，但由文章內的 PCR 引子，我們仍能夠對此做進一步的判斷。從表 7 可以發現，*HOXB-AS3* 在不同癌症均有其角色。在固態腫瘤，如：大腸癌、肝癌、肺癌等，大多都與 *HOXB-AS3* 第一變體相關，除了大腸癌以外，在其他的癌症裡，*HOXB-AS3* 的高表現，大多與較高的癌症期別（第三期和第四期），及

較差的預後相關（表 8）。關於致病機轉部分，可以發現不同癌症裡所看到的現象不同，甚至同一癌別，也有可能看到不同的功能（表 8）。總而言之，目前已知的 *HOXB-AS3* 功能如下：

- 一、*HOXB-AS3* 第一變體最後兩個外顯子，可以轉譯出一小段胺基酸序列，這個胺基酸序列會影響 TCA 循環，進而使細胞生長變慢。
- 二、*HOXB-AS3* 的 lncRNA，會與不同的蛋白質結合，影響細胞不同的基因及蛋白質表現。同時，也會影響數個與細胞生長分裂相關的細胞傳導路徑。結果均為，*HOXB-AS3* lncRNA 的表現，會促進細胞生長。
- 三、*HOXB-AS3* 的 lncRNA，亦可作為 miRNA 的海綿體，減少某些特定 miRNA 的表現；其結果亦為，*HOXB-AS3* lncRNA 的表現，會促進細胞生長。

由此可見，同一個，當它經由剪接修飾有數個不同變體時，在不同組織細胞內，表現的變體不同；不同的癌症細胞，亦有類似現象。再加上不同細胞內所表現的蛋白質不同，lncRNA 能結合的對象亦不同，有可能會引發不同的效應，對細胞有著不同的影響。

4.4 長鏈非編碼核糖核酸將來可能的臨床應用

近年來，lncRNA 相關研究如雨後春筍般地增加，lncRNA 在細胞內所扮演的功能及角色，也日漸地為大家所熟知。近年來，以核糖核酸為標的之治療（RNA-based therapies），技術也日漸成熟。主要可以分為以下三種[51-53]。

- 一、以 miRNA 類似物為主的設計。miRNA 在細胞內，會與 mRNA 結合，並抑制其轉譯成蛋白質的效率。將人工合成之 miRNA 類似物，以合適的載體帶入細胞內，以抑制標的之 mRNA 轉譯成蛋白質，藉此影響細胞生長。
- 二、核糖適體藥物（RNA aptamer drug）。由 20 至 80 個鹼基構成之核糖核酸，經由修飾成為一具有立體結構之分子。可用於與抗體類似之功能，與細胞表面的受體結合，進而抑制或是促進細胞生長。
- 三、mRNA 疫苗（mRNA vaccine），是這幾年最熱門的設計。將一段 mRNA，可以是病毒或是癌細胞所特有的蛋白質，將這段 mRNA 放入載體內。當載體進入細胞後，這段 mRNA 會被轉譯出蛋白質，並經由細胞之主要組織相容性複合物（major histocompatibility complex, MHC）表現在細胞表

面，接著被淋巴球認識，進而促成抗體之產生及生成對其有攻擊能力之毒殺 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes)；這些抗體及毒殺 T 細胞會認得由這段 mRNA 轉譯出的蛋白質。若是這段 mRNA 是病毒蛋白的片段，則可以讓人體對這個病毒感染產生對抗的能力，使人體不會受到病毒感染。若是這段 mRNA 是癌細胞所特有蛋白質片段，則會協助體內的 T 淋巴球，一起清除殘存癌細胞。

由於新冠肺炎的疫情，使得 mRNA 疫苗第一次有機會大量使用於人類身上。同時，也讓我們觀察到其反應及副作用[54]。近年來，mRNA 疫苗的技術，除了用於感染症的疫苗設計，亦使用於癌症治療[54]。近期最熱門的試驗，莫過於用於胰臟癌的治療[55]。過去，胰臟癌的預後相當差，病人治療效果不佳。這個臨床試驗，預計收案可開刀的胰臟癌患者，開刀後，對切下來的檢體進行分析，找出癌細胞特有的 DNA 片段，並找尋合適的新生抗原 (neoantigens)，設計成個人化新生抗原之 mRNA 疫苗 (Autogene cevumeran) [55]。讓病人在術後第六周接受一個劑量的 atezolizumab (為 PD-L1 抑制劑，可以減少癌細胞抑制 T 細胞之能力)，第九周至第十七周接受個人化新生抗原之 mRNA 疫苗共八劑，第二十一周至第四十三周接受 mFOLFIRINOX 化學治療共十二回合，在第四十六周時再接受一劑個人化新生抗原之 mRNA 疫苗作為加強劑。剛開始收集了 34 位胰臟癌病人，有 28 位順利接受開刀(2 位因不符合收案條件而排除，3 位撤回同意書，1 位疾病惡化無法開刀)，19 位有接受 atezolizumab 治療(9 位無法接受的病人原因為：6 位疾病侵犯過大，1 位術後診斷非胰臟癌，1 位撤回同意書，1 位檢體不足)，16 位病人順利接受個人化新生抗原之 mRNA 疫苗之注射，1 位病人在接受化療前復發，15 位病人有順利接受 mFOLFIRINOX 化學治療。在十八個月的追蹤期裡，能順利產生 T 細胞反應的患者，其復發率幾乎為零；無法產生 T 細胞反應者，中位數無復發存活期為 13.4 個月 ($P=0.003$) [55]。由此可知，mRNA 疫苗的確是一個能讓病人有效產生對抗癌細胞之免疫反應的治療，對於減少疾病的復發，扮演著重要角色。

然而，若是要用類似 mRNA 疫苗的概念來製作針對 lncRNA 的疫苗，我們需要找到一個 lncRNA，在癌細胞內表現時，能抑制癌細胞生長。且我們要能有一個載體系統，能準確地將帶有此 lncRNA 之片段，送入癌細胞內。本研究之 *HOXB-AS3* 高表現時，會促進細胞生長，似乎並不適合當作 RNA 片段，送入癌細胞之內。

反而比較適合使用以 miRNA 類似物為主的疫苗設計，送入 miRNA 抑制癌細胞之 *HOXB-AS3* 表現，進而抑制細胞生長。



第五章結論

我們的研究發現，*HOXB-AS3* 的 lncRNA，在部分的急性骨髓性白血病患者身上，可以看到 *HOXB-AS3* 較高。高表現的 *HOXB-AS3*，在急性骨髓性白血病患者中，與略低的血小板數目、復發率較高，較常帶有 *NPM1* 突變/原生型 *FLT3*(mutated *NPM1* without *FLT3*-ITD mutation)、*MLL*-PTD 突變及 *RUNX1* 突變，但較少帶有 *CEBPAa* 雙重突變。在骨髓分化不良症候群患者身上，當患者的 *HOXB-AS3* 表現較高時，血色素及骨髓內芽細胞比例會較高，且在臨床上，骨髓分化不良症候群較易轉變為急性骨髓性白血病；高 *HOXB-AS3* 表現患者，較常帶有 *RUNX1*、*ASXL1*、*IDH2* 之基因突變。在急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群患者身上，*HOXB-AS3* 表現均為一個獨立預後因子，可以預測 *HOXB-AS3* 較高表現患者，其預後較差。

關於 *HOXB-AS3* 在骨髓性細胞內之功能，*HOXB-AS3* 在細胞內表現時，會藉由調控細胞周期及 DNA 複製相關之基因表現，進而增加骨髓性細胞生長。由其他同時期的研究亦可知，在帶有 *NPM1* 突變的細胞內，*HOXB-AS3* 的 lncRNA 會與 EBP1 蛋白質結合，將更多的 EBP1 蛋白質帶到細胞核內，EBP1 蛋白質會與原生型的 *NPM1* 蛋白質結合，轉錄 *rDNA* 基因，做出更多的 *rRNA*，進而促進細胞生長（附圖 4）[50]。

經由此研究，我們對 *HOXB-AS3* 在骨髓惡性疾病的角色及功能，有了更深入的瞭解。*HOXB-AS3* 不但可用於預測急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候患者之預後，亦有機會可以成為骨髓惡性疾病設計新藥時，一個合適的標的。

圖

圖 1. *HOXB-AS3* 與臨近基因的相對位置及各變體相對應的外顯子。

HOXB-AS3 位在 *HOXB* 群組基因內。由 UCSC genome browser 上，ENCODE project 的資料得知，*HOXB-AS3* 外顯子和八個變體，與 *HOXB5*、*HOXB6*、和 *HOXB7* 相對位置如圖所示。箭號表示基因轉錄的方向。在 *HOXB-AS3* 不同的變體前，我們都將其代表的序列號碼標示在圖上（NCBI Reference Sequence numbers, RefSeq）。

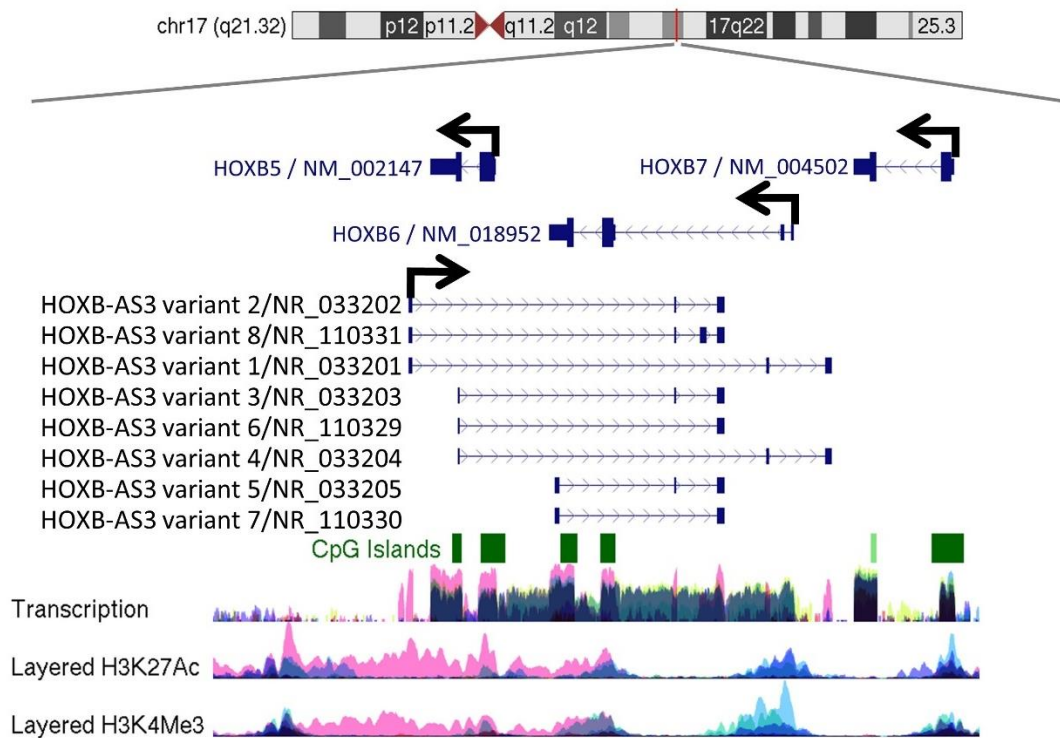


圖 2. 與急性骨髓性白血病預後相關之長鏈非編碼核糖核酸。

從美國癌症基因圖譜急性骨髓性白血病患者群資料庫 (TCGA AML cohort)，及台大醫院急性骨髓性白血病資料庫 (NTUH AML cohort) 的分析中，我們找到 11 個 lncRNA 對預後有影響。

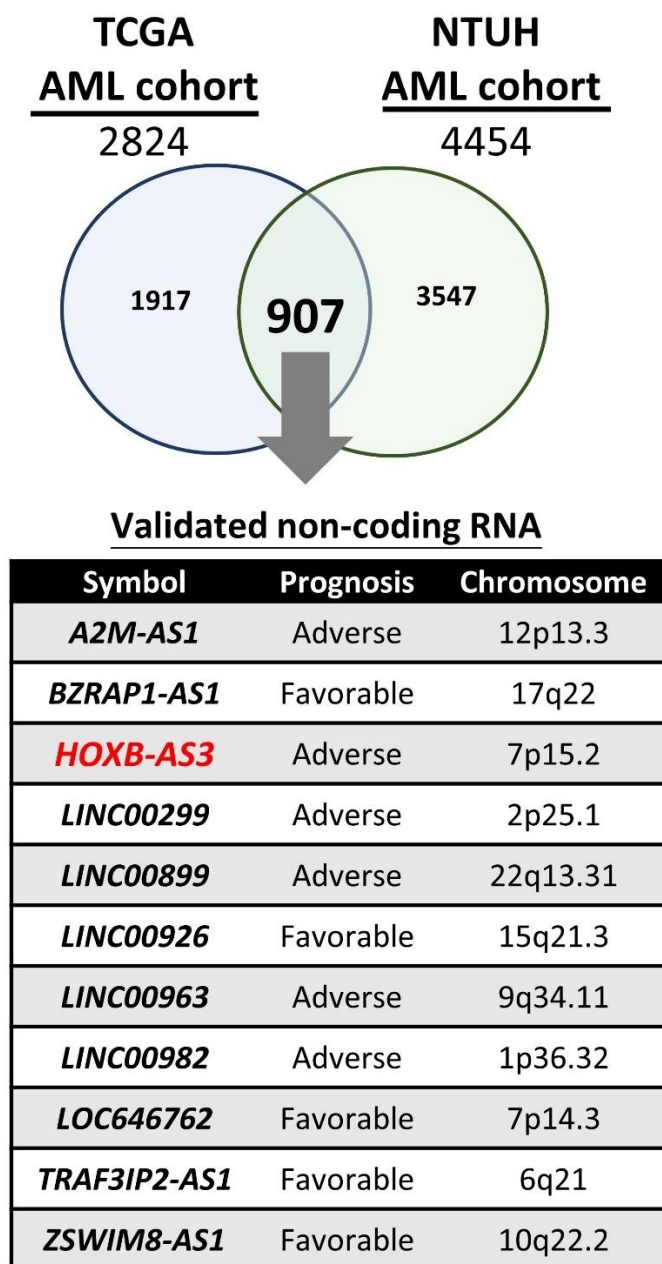




圖 3. 利用 PhyloCSF 分析 *HOXB-AS3* 轉譯成蛋白質的能力。

我們將第一、四、五、六個外顯子放大來看詳細的分數。幾乎全段 *HOXB-AS3* 的 PhyloCSF 分數均為負分。

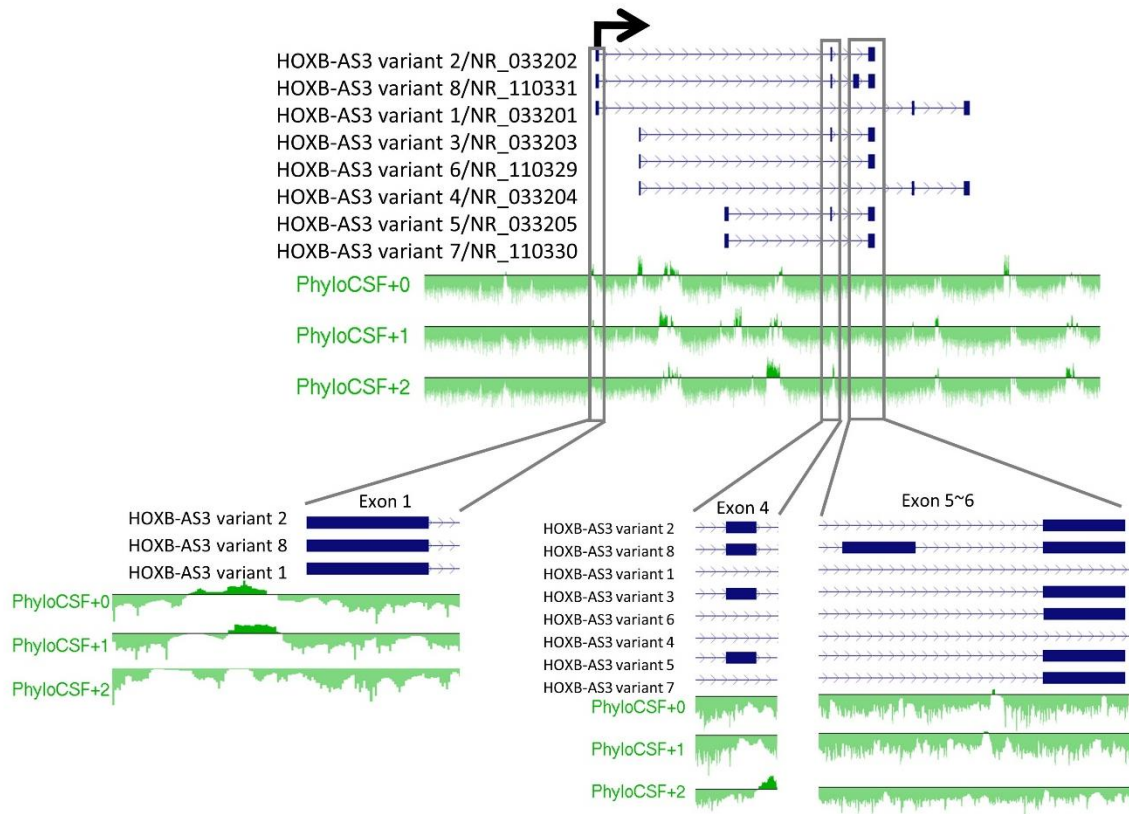




圖 4. 老鼠 *HOXB* 群組基因內的 *Hoxb5os*。

老鼠的 *HOXB* 群組基因在第十一對染色體上，有一個與 *Hoxb5* 和 *Hoxb6* 重疊，但相對於 *Hoxb5* 和 *Hoxb6* 為反向轉錄的序列，名為 *Hoxb5os*。本數據來自於 UCSC 的 ENCODE project。

Mouse

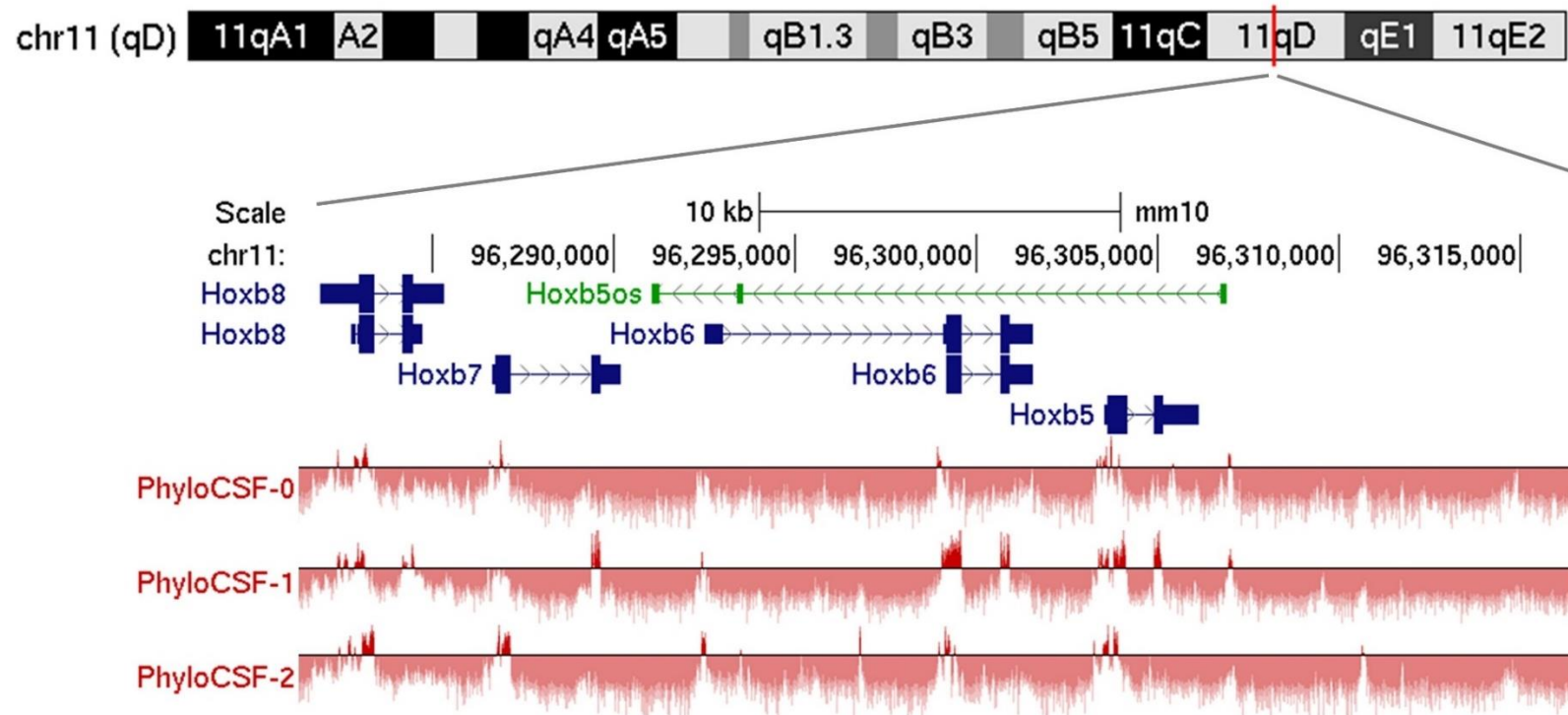
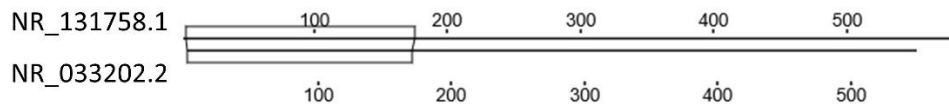
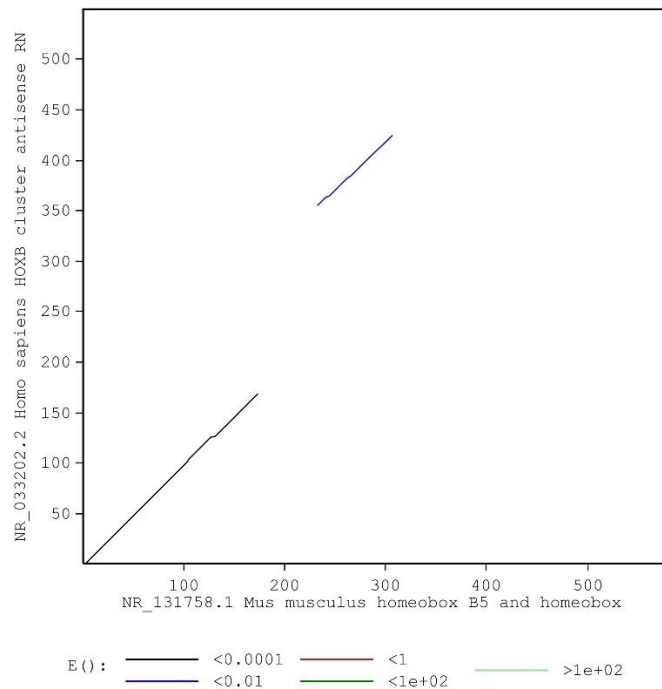
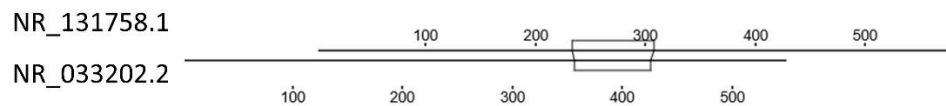


圖 5. 老鼠 *Hoxb5os* 與人類 *HOXB-AS3* 之比較。

將人類 *HOXB-AS3* (NR_033202.2) 與老鼠 *Hoxb5os* (NR_131758.1) 的核酸序列做比較。兩者的相似度是利用 plalign 軟體分析 (<http://fasta.bioch.virginia.edu/>)。



Waterman-Eggert score: 589; 130.5 bits; $E(1) < 1.6e-34$
83.8% identity (83.8% similar) in 173 nt overlap (3-174:1-169)



Waterman-Eggert score: 101; 25.6 bits; $E(1) < 0.0065$
64.5% identity (64.5% similar) in 76 nt overlap (232-307:355-425)

NR_131758.1: mouse *Hoxb5os*
NR_033202.2: human *HOXB-AS3*

圖 6. 抑制 *HOXB-AS3* 表現，會抑制細胞生長。

我們將帶有 pLKO-vector (control)、shHOXB-AS3#1、或 shHOXB-AS3#2 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 OCI/AML3，再觀察其生長曲線。被感染後的細胞會帶有 GFP 螢光，利用流式細胞儀將其分離出來。分離出來的帶有 GFP 螢光的細胞，在第零天時，種到培養液中，以每 5 mL 有 1×10^6 個細胞開始培養。連續六天取部分細胞出來計數。P 值以 Kruskal-Wallis 檢定計算。

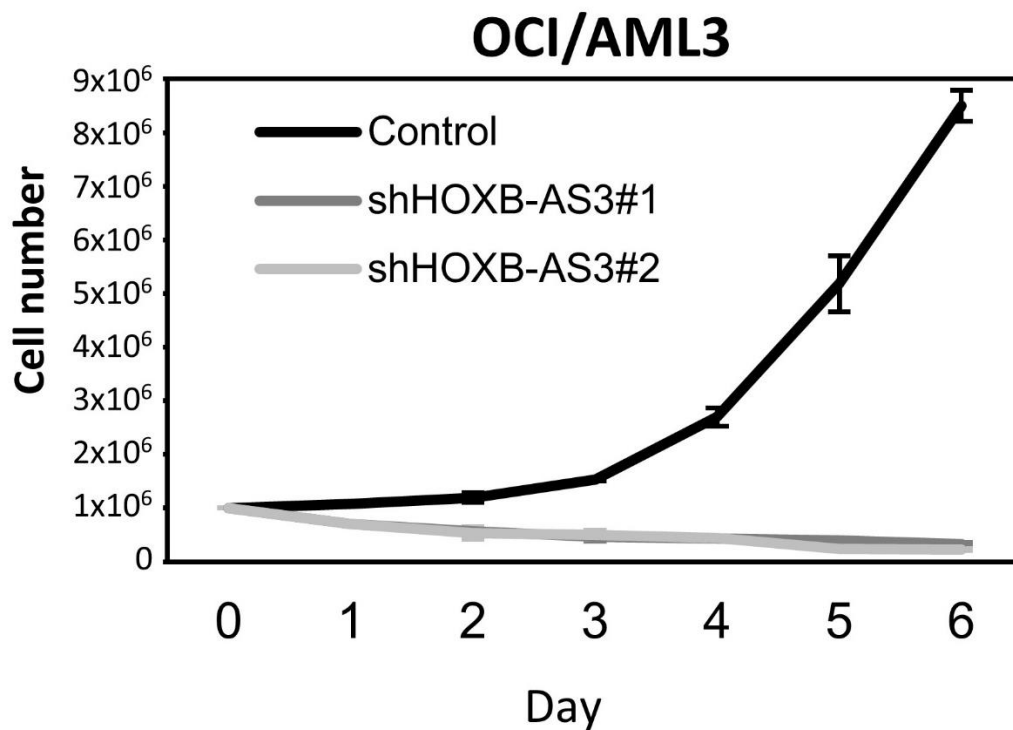


圖 7. 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 *HOXB-AS3* 表現後，會減少進入細胞周期 S 期的細胞。

(a)我們將帶有 pLKO-vector (control)、 shHOXB-AS3#1、或 shHOXB-AS3#2 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 OCI/AML3，建立穩定細胞株 (stable cell lines) 後，再收集足夠的細胞，用定量 PCR，來看 *HOXB-AS3* 的表現量。(b) 在細胞周期 S 期內的細胞比例。(c)利用流式細胞儀來分析細胞周期。每個實驗均有三重覆。P 值以 Kruskal-Wallis 檢定計算。

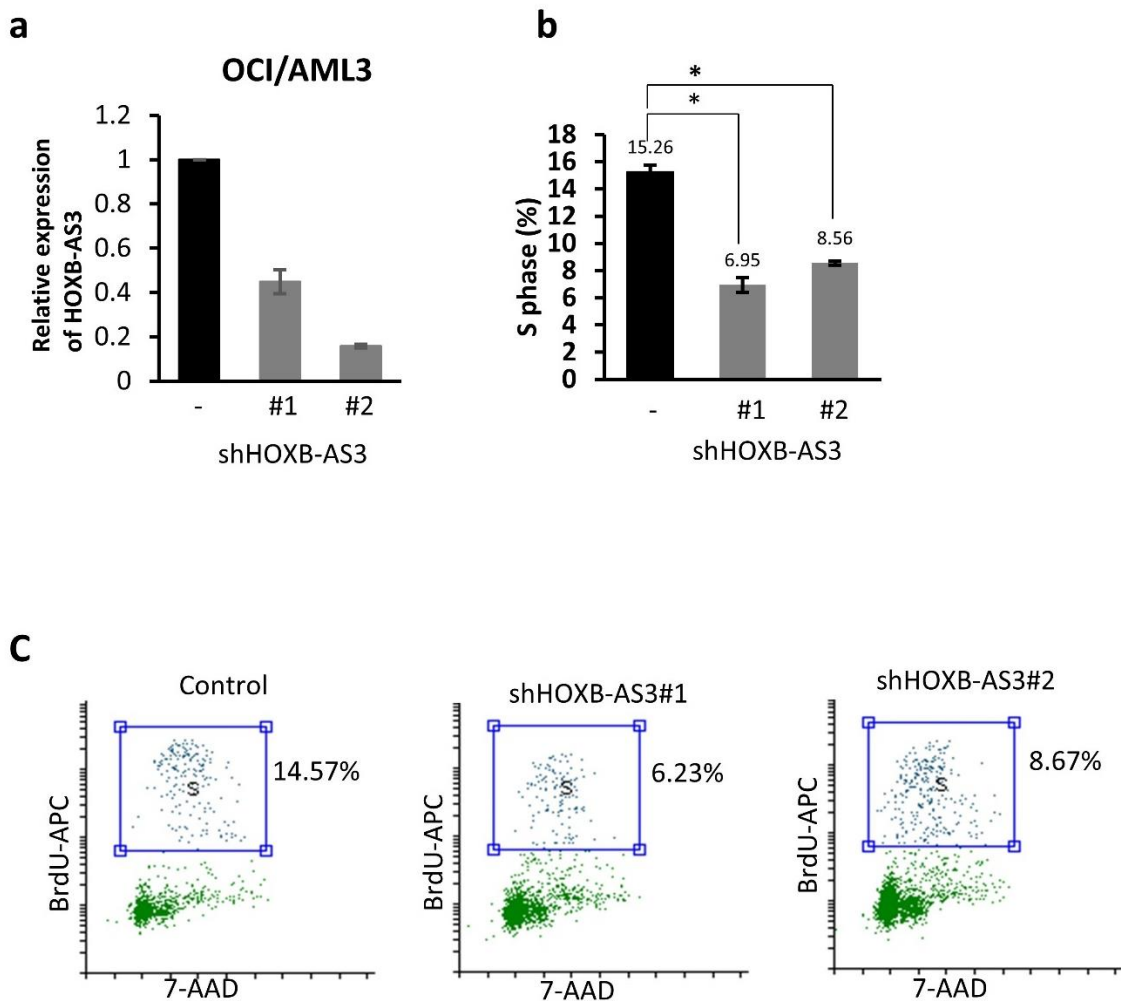


圖 8. 在骨髓性細胞株 TF-1 抑制 *HOXB-AS3* 表現後，會減少進入細胞周期 S 期的細胞。

(a)我們將帶有 pLKO-vector (control)、或 shHOXB-AS3#1 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 TF-1 建立穩定細胞株 (stable cell lines) 後，再收集足夠的細胞，用定量 PCR，來看 *HOXB-AS3* 的表現量。(b) 在細胞周期 S 期內的細胞比例。(c)利用流式細胞儀來分析細胞周期。每個實驗均有三重覆。P 值以 Kruskal-Wallis 檢定計算。

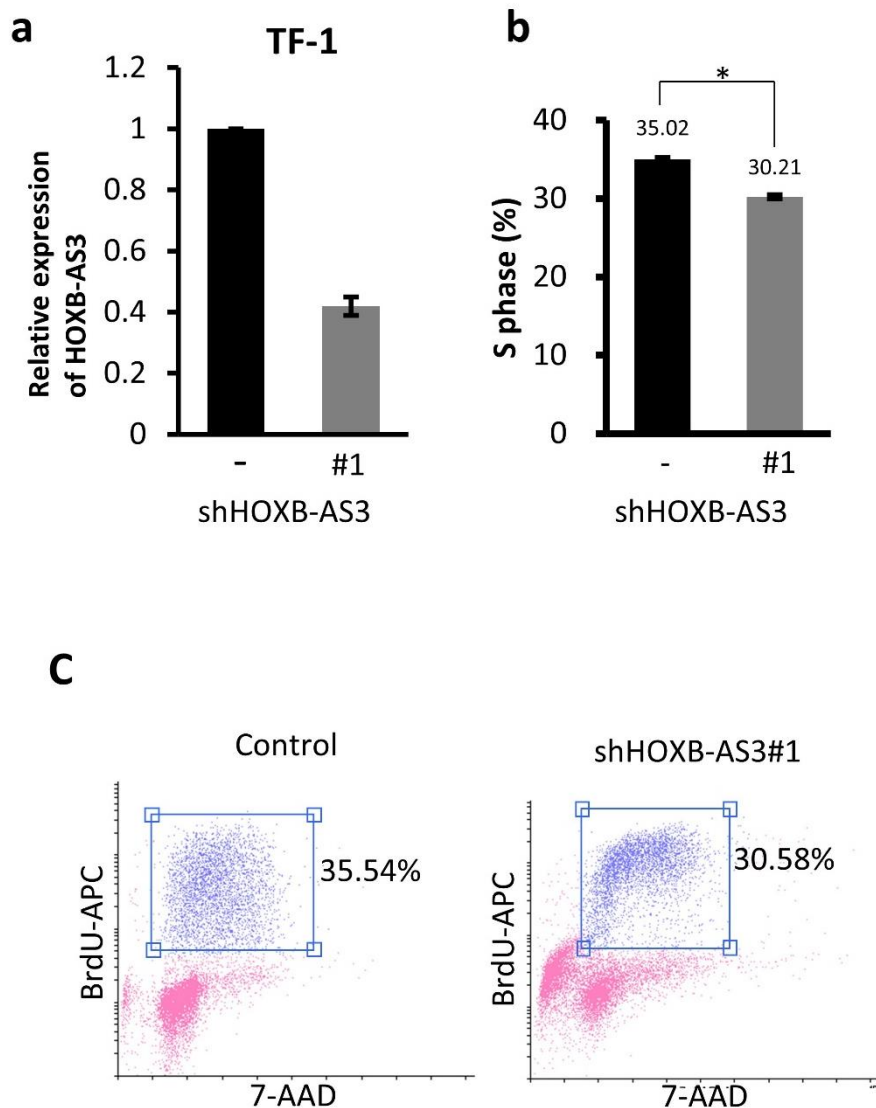


圖 9. 骨髓性細胞株 OCI/AML3 和 TF-1 之 *HOXB-AS3* 表現。

在骨髓性細胞株 OCI/AML3 中 *HOXB-AS3* 的表現，遠高於在 TF-1 中的表現量。

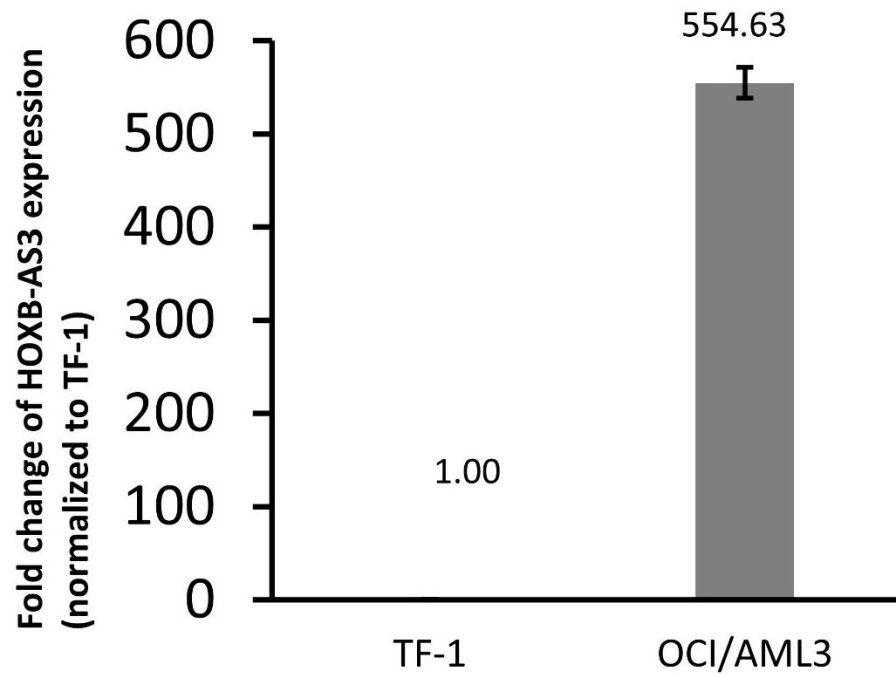


圖 10. 在骨髓性細胞株 TF-1 增加 *HOXB-AS3* 表現後，會增加進入細胞周期 S 期的細胞比例。

(a)我們將帶有 pLAS5w.Pbsd vector (control)、或 pLAS5w.Pbsd-*HOXB-AS3* (*HOXB-AS3* overexpression)的慢病毒，感染骨髓性細胞株 TF-1，建立穩定細胞株 (stable cell lines) 後，再收集足夠的細胞，用定量 PCR，來看 *HOXB-AS3* 的表現量。(b) 在細胞周期 S 期內的細胞比例。(c)利用流式細胞儀來分析細胞周期。每個實驗均有三重覆。P 值以 Kruskal-Wallis 檢定計算。

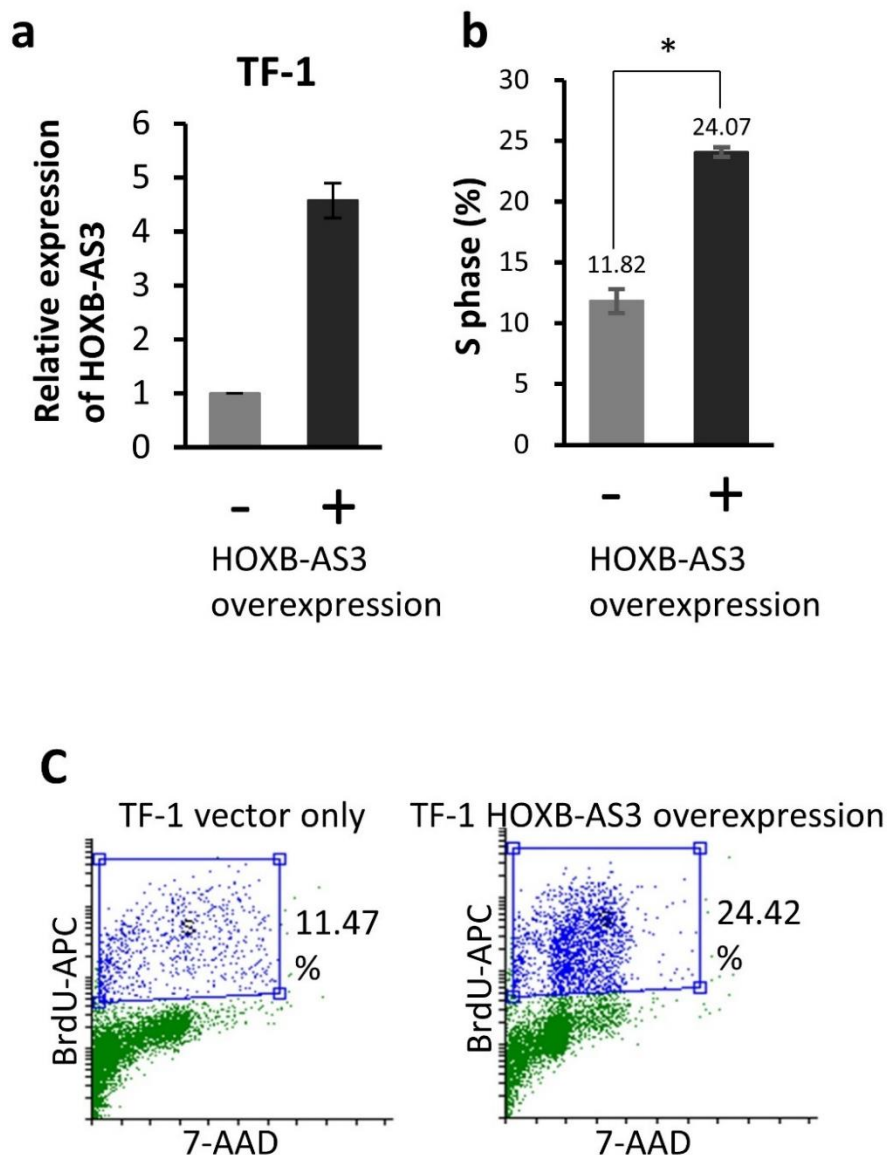


圖 11. 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 *HOXB-AS3* 表現後，並不影響 *HOX* 群組基因的表現。

我們將帶有 pLKO-shLacZ (control#1) 、pLKO-vector (control#2)、 shHOXB-AS3#1、或 shHOXB-AS3#2 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 OCI/AML3。再收集足夠的細胞，進行微陣列實驗，並分析其他基因之表現是否會受 *HOXB-AS3* 影響。我們發現，抑制 *HOXB-AS3* 表現後，並不影響 *HOX* 群組基因的表現。

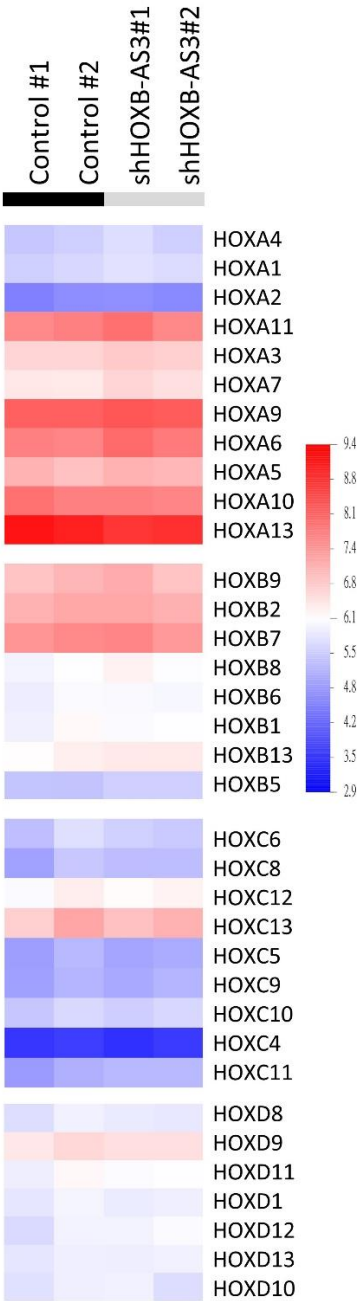


圖 12. 在骨髓性細胞株 OCI/AML3 抑制 *HOXB-AS3* 表現後，仍造成部分基因表現受影響。

我們將帶有 pLKO-shLacZ (control#1) 、pLKO-vector (control#2)、 shHOXB-AS3#1、或 shHOXB-AS3#2 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 OCI/AML3。再收集足夠的細胞，進行微陣列實驗，並分析其他基因之表現是否會受 *HOXB-AS3* 影響。我們發現，抑制 *HOXB-AS3* 表現後，仍有其影響的下游基因。

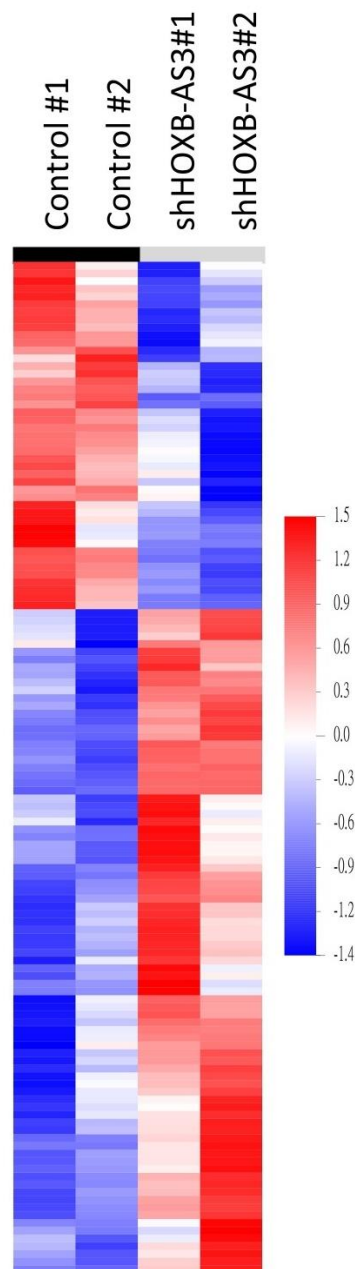


圖 13. 基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。

利用 GSEA 來分析抑制 *HOXB-AS3* 表現後，被影響的基因，參與那些細胞內訊息傳導路徑。所有的圖均由 KEGG、Reactome 和 BioCarta 資料庫而來。

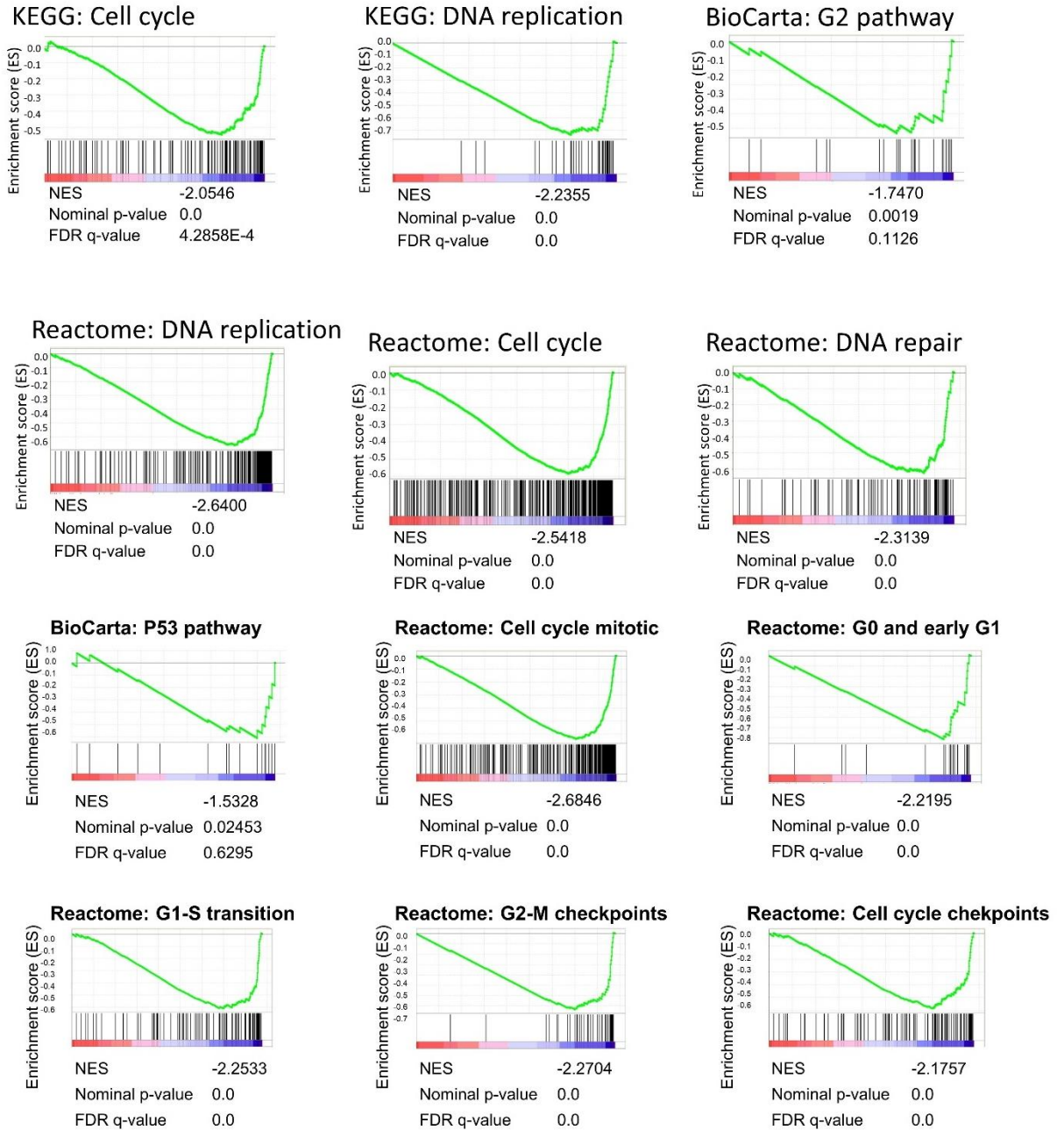




圖 14. Cell cycle pathway from Wikipathway analysis .

抑制 *HOXB-AS3* 表現後，在細胞周期相關路徑中，被影響的基因。圖及分析均藉由 Affymetrix® TAC software 軟體執行。

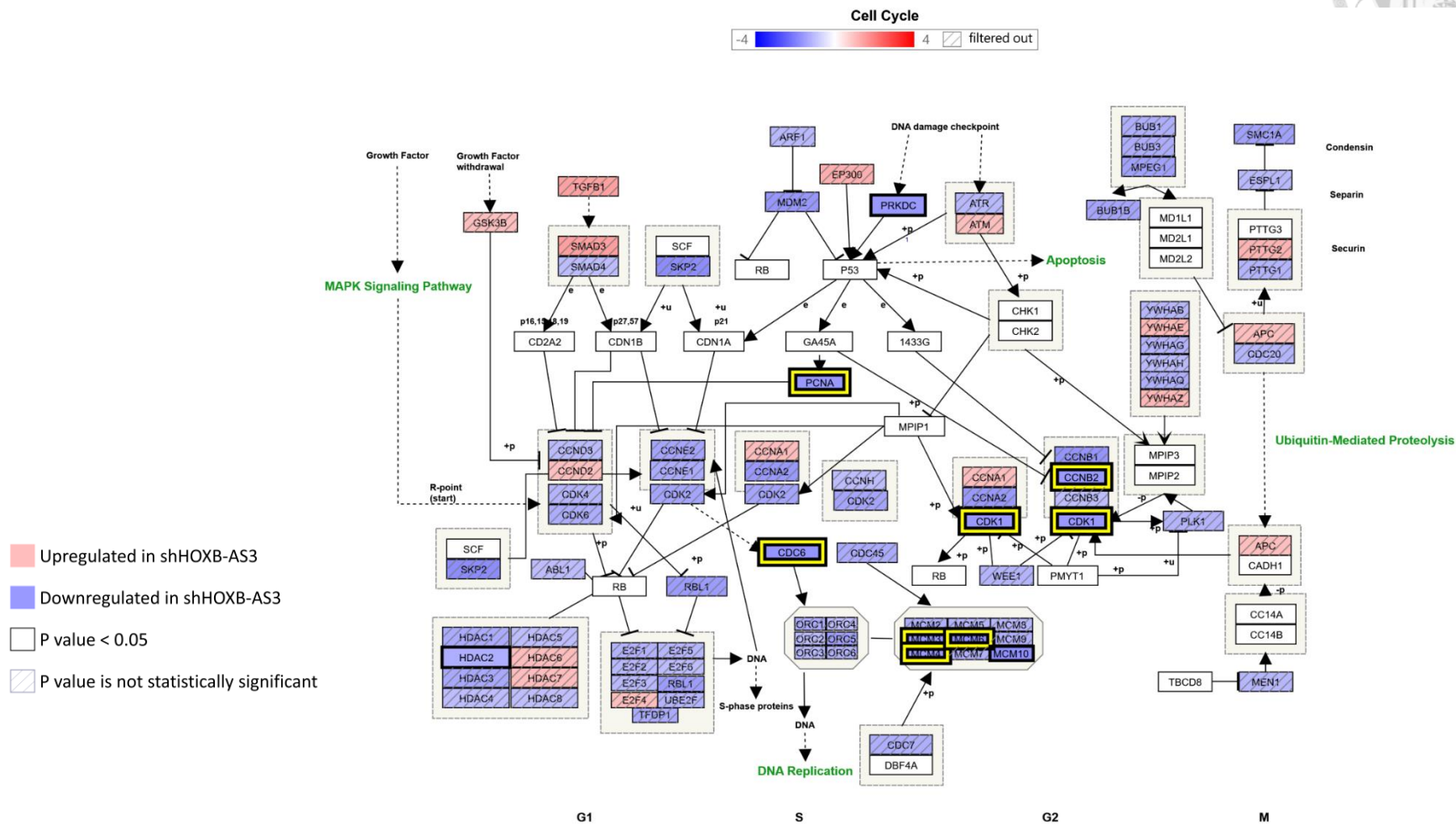




圖 15. DNA replication pathway from Wikipathway analysis。

抑制 *HOXB-AS3* 表現後，在 DNA 複製相關路徑中，被影響的基因。圖及分析均藉由 Affymetrix® TAC software 軟體執行。

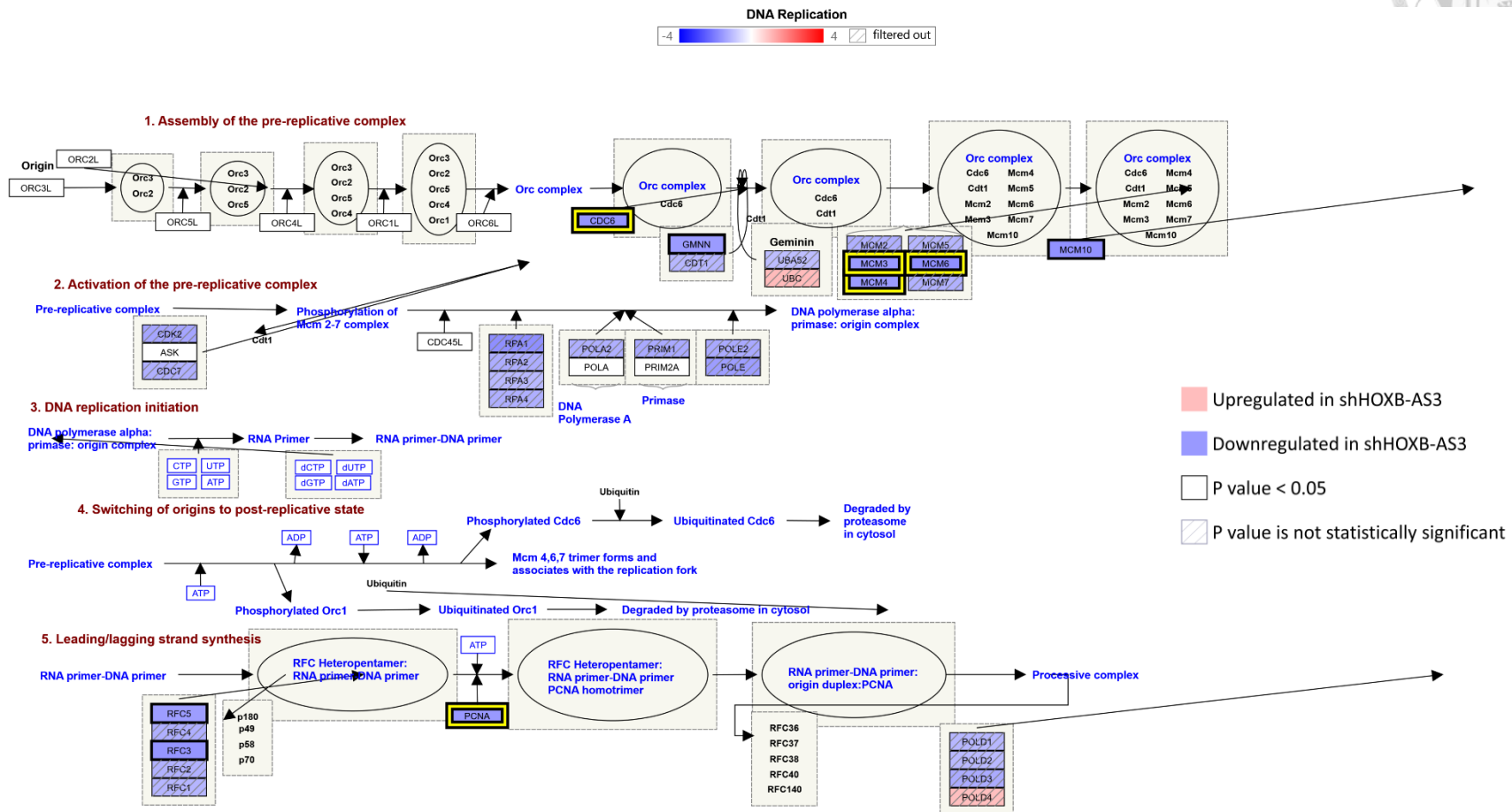


圖 16. G1-S pathway from Wikipathway analysis。

抑制 *HOXB-AS3* 表現後，在 G1-S 細胞周期相關路徑中，被影響的基因。圖及分析均藉由 Affymetrix® TAC software 軟體執行。

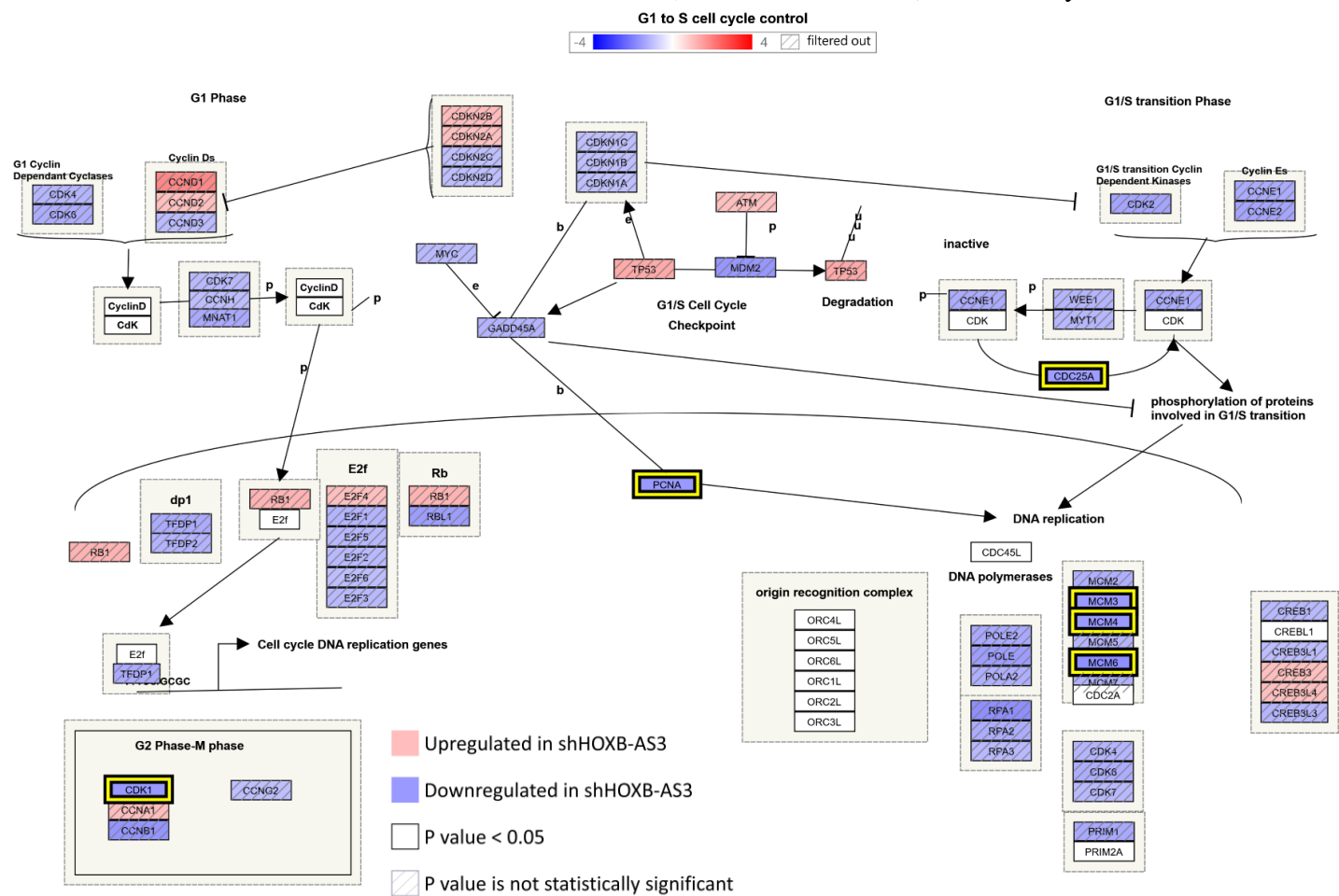


圖 18. 抑制 *HOXB-AS3* 表現後，利用定量 PCR 來確認 *HOXB-AS3* 下游受影響的基因表現。

我們將帶有 pLKO-vector (control)、shHOXB-AS3#1、或 shHOXB-AS3#2 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 OCI/AML3。再收集足夠的細胞，用定量 PCR，來看 *HOXB-AS3* 下游受影響的基因表現量。每個實驗均有三重覆。P 值以 Kruskal-Wallis 檢定計算。

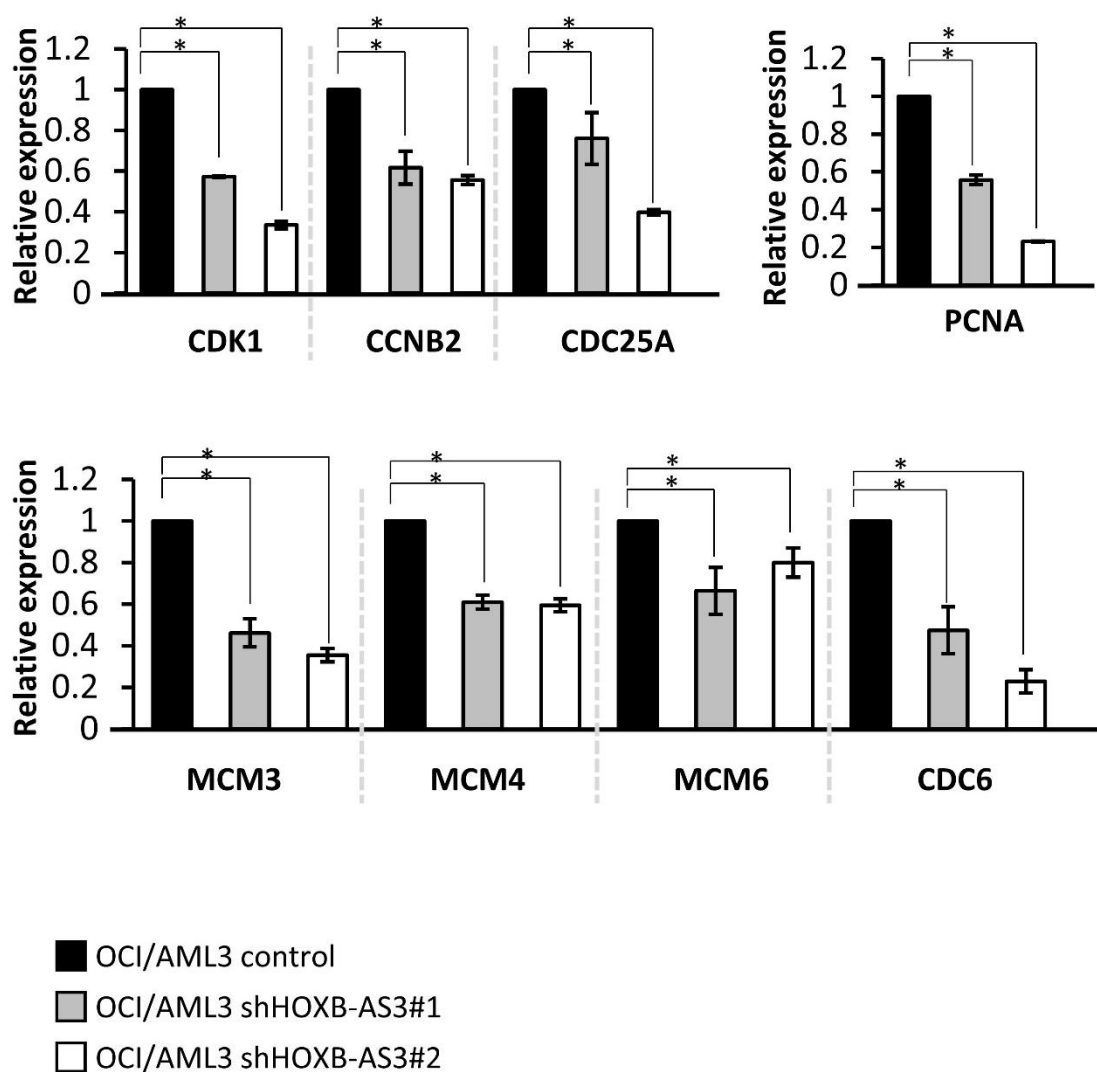


圖 19. 增加 *HOXB-AS3* 表現後，利用定量 PCR 來確認 *HOXB-AS3* 下游受影響的基因表現。

我們將帶有 pLAS5w.Pbsd vector (control)、或 pLAS5w.Pbsd-*HOXB-AS3* (*HOXB-AS3* overexpression) 的慢病毒，感染骨髓性細胞株 TF-1。再收集足夠的細胞，用定量 PCR，來看 *HOXB-AS3* 下游受影響的基因表現量。每個實驗均有三重覆。P 值以 ANOVA 檢定計算。

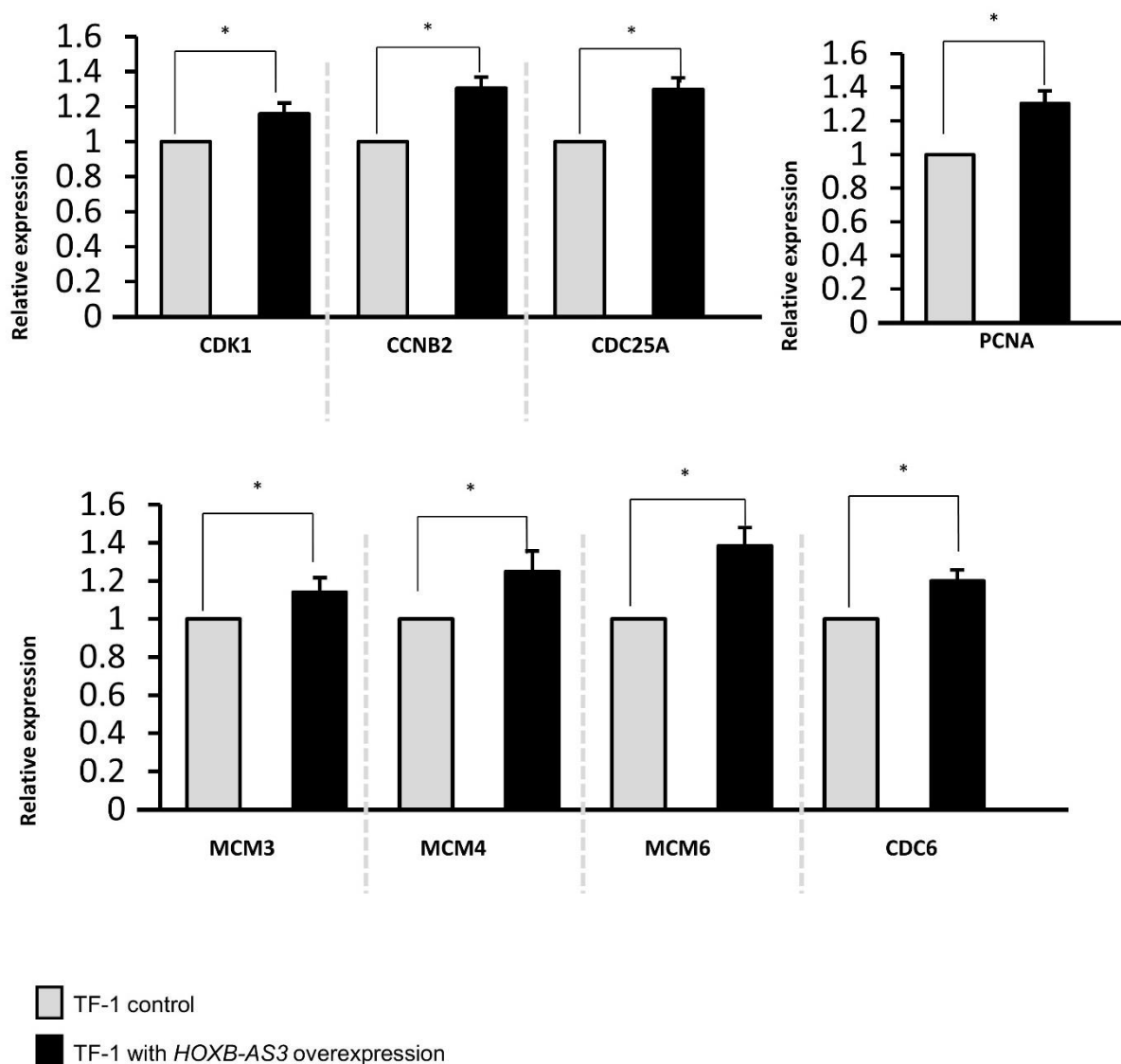


圖 20. 核質分離。

先將骨髓性細胞株 OCI/AML3 做核質分離，再取 RNA 出來做定量 PCR，測定 RNA 的含量。本次分析標的有：*RNA18S5 RNA (18s rRNA)*、*HOXB-AS3*、*MALAT1*、*NEAT1* 和 *GAPDH*。

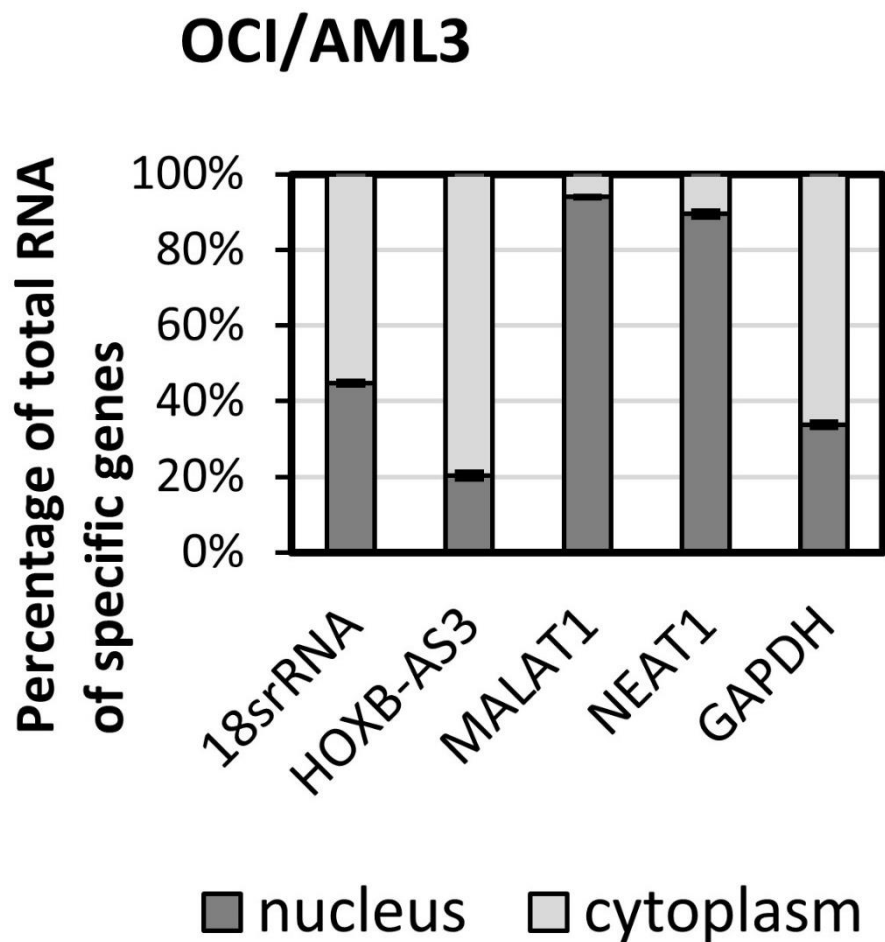


圖 21. *HOXB-AS3* 在急性骨髓性白血病患者之表現量。

(a) 轉錄子: TC17002858.hg.1 , 和 (b) 轉錄子: TC17002254.hg.1 。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays 。

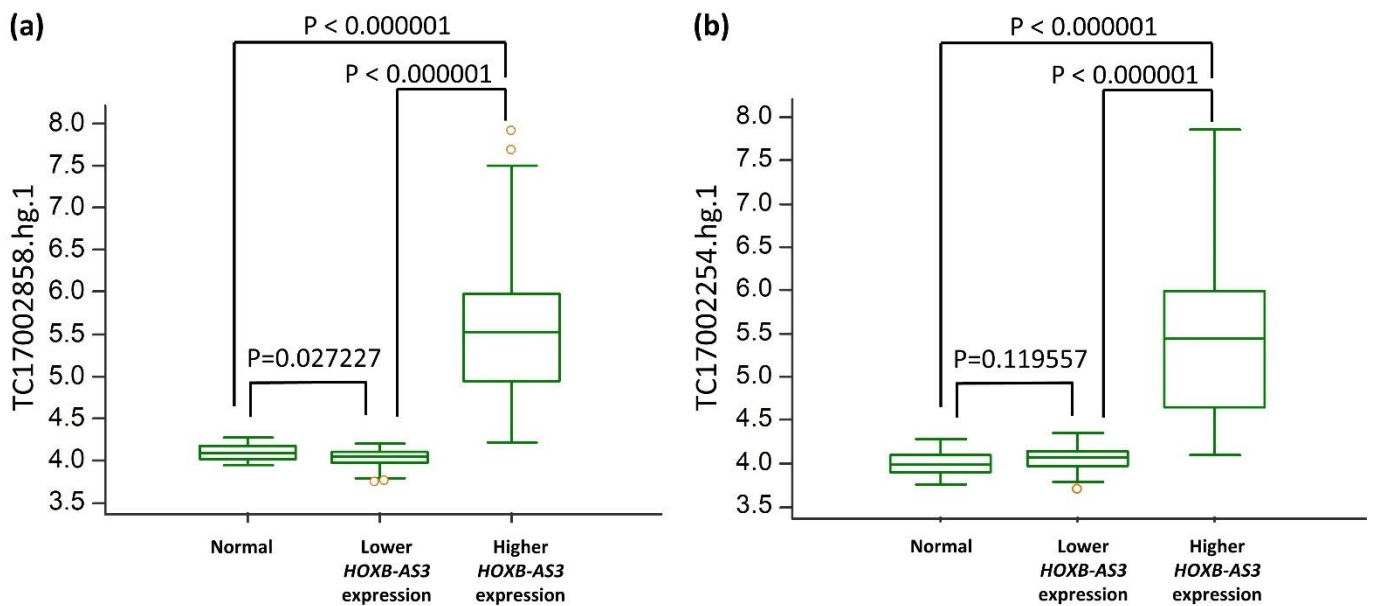




圖 22. 急性骨髓性白血病患者 *HOXB-AS3* 表現量與基因突變之間的關係。

每一直列為一位急性骨髓性白血病之患者。*HOXB-AS3* 該行表示 *HOXB-AS3* 之表現量分組，低表現者為藍色，高表現者為紅色。其他行是基因突變，有基因突變的病人，該基因標示為紫色；無突變則標示為灰色（底色）；無檢體則標示為白色。圖示見圖右側。

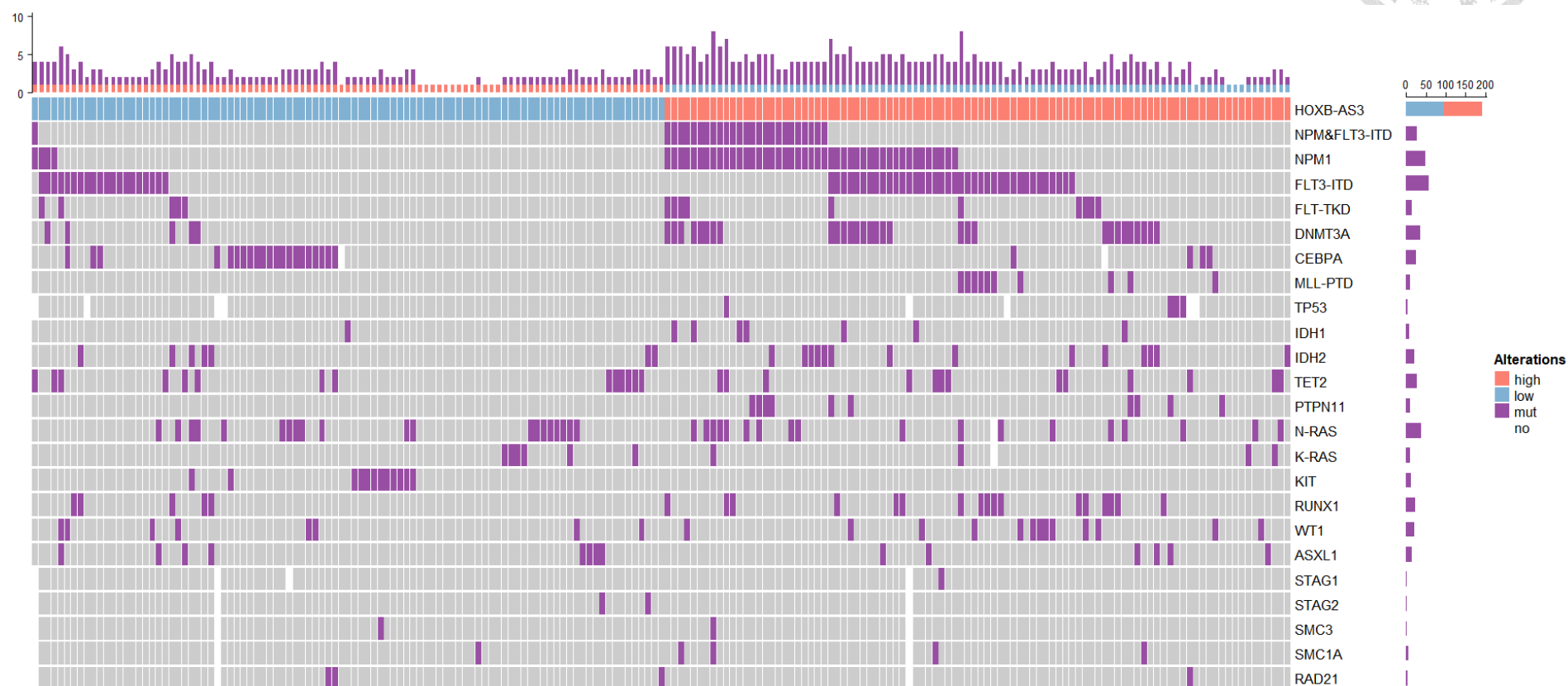
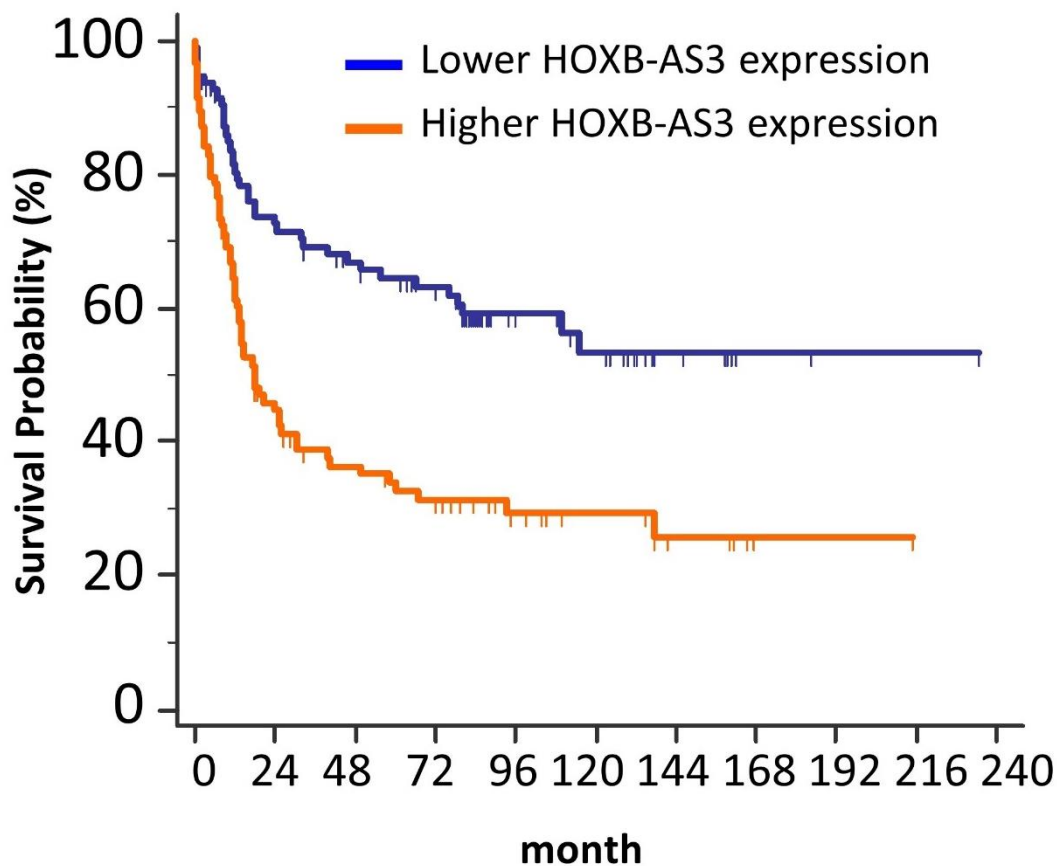


圖 23. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，整體存活期分析。

我們是以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準，微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。 (N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; NR, not reached)



Overall Survival



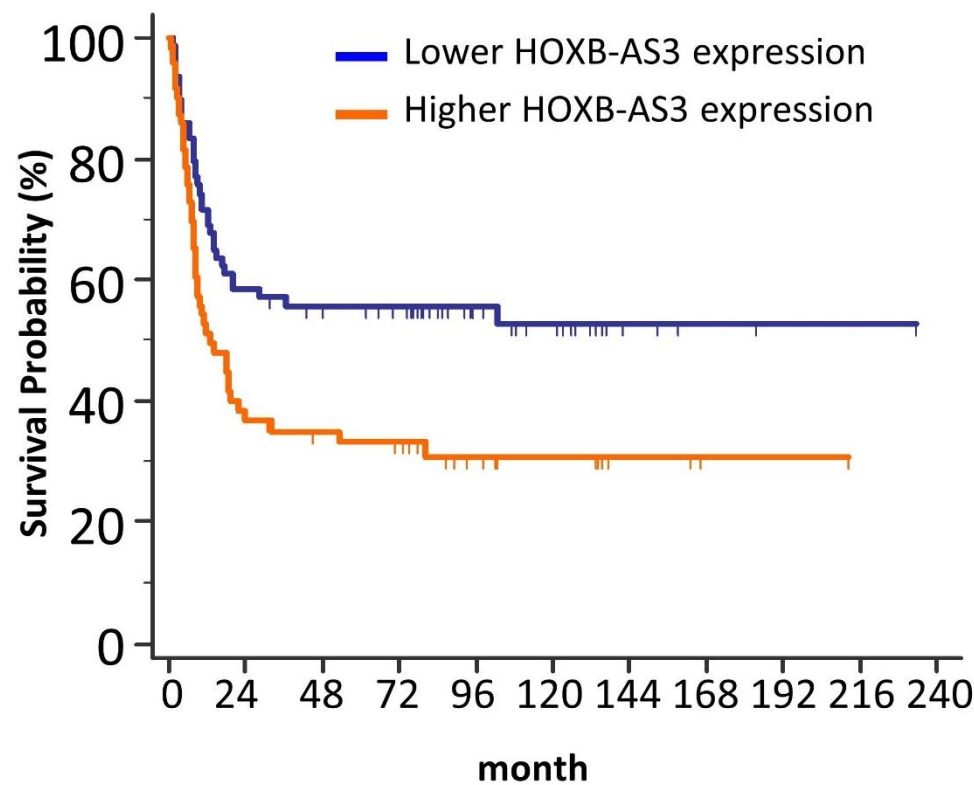
HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	97	NR	<0.0001	1
Higher	96	17.7		2.2729 (1.5351 - 3.3655)
Total patients	193	55.2		

圖 24. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，無復發存活期分析。

我們是以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準，微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。 (N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; NR, not reached)



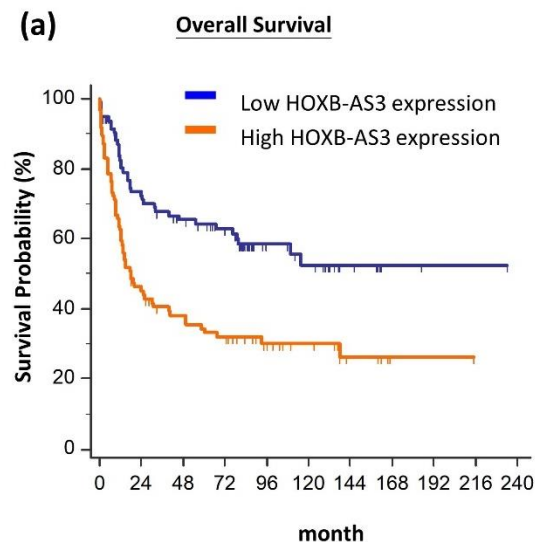
Relapse Free Survival



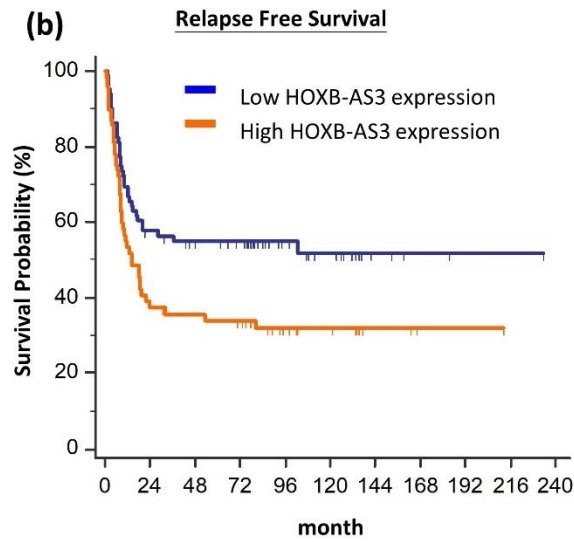
HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	81	NR	0.0070	1
Higher	73	12.9		1.8061 (1.1597 - 2.8126)
Total patients	154	20.2		

圖 25. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，整體存活期及無復發存活期分析。

我們是以轉錄子 TC17002254.hg.1 作為分組標準。(a) 整體存活期分析，(b)無復發存活期分析。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。(N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; NR, not reached)



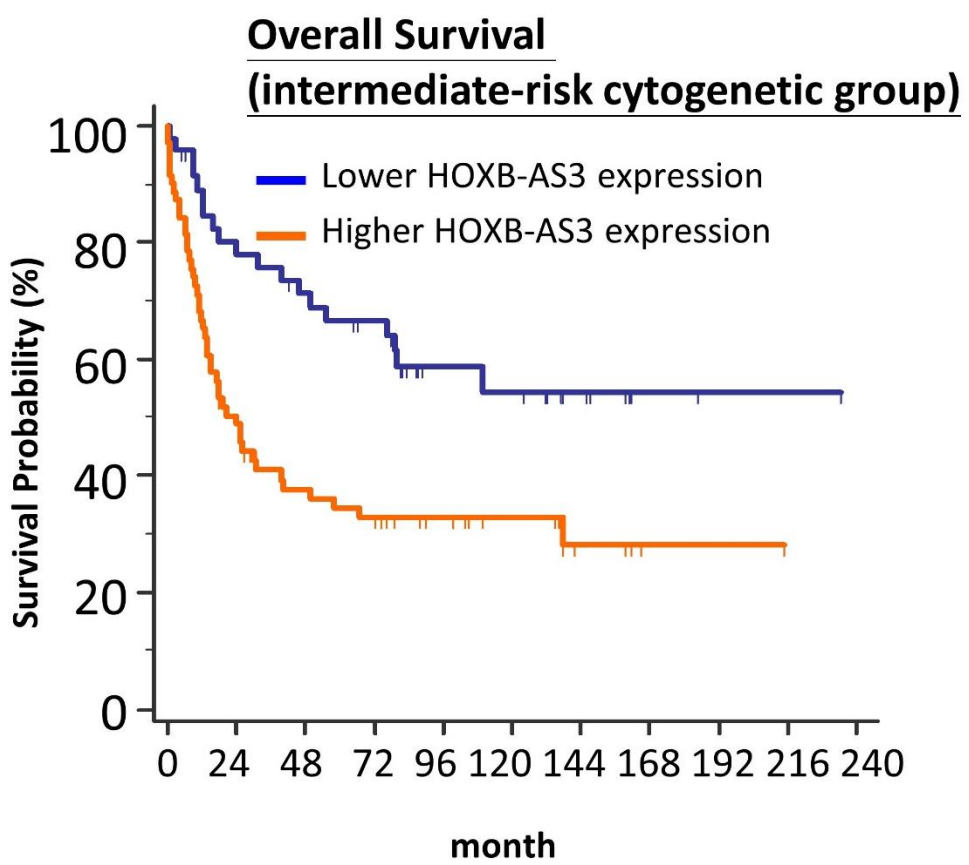
HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	97	NR	0.0001	1
Higher	96	17.7		2.2239 (1.5029 - 3.2909)
Total patients	193	55.2		



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	81	NR	0.0139	1
Higher	73	142		1.7236 (1.1048 - 2.6890)
Total patients	154	20.2		

圖 26. 台大醫院急性骨髓性白血病患者，整體存活期之次族群分析。

在急性骨髓性白血病中風險患者群的整體存活分析裡，*HOXB-AS3* 的高表現，是預後不佳因子。我們是以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。 (N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; NR, not reached)



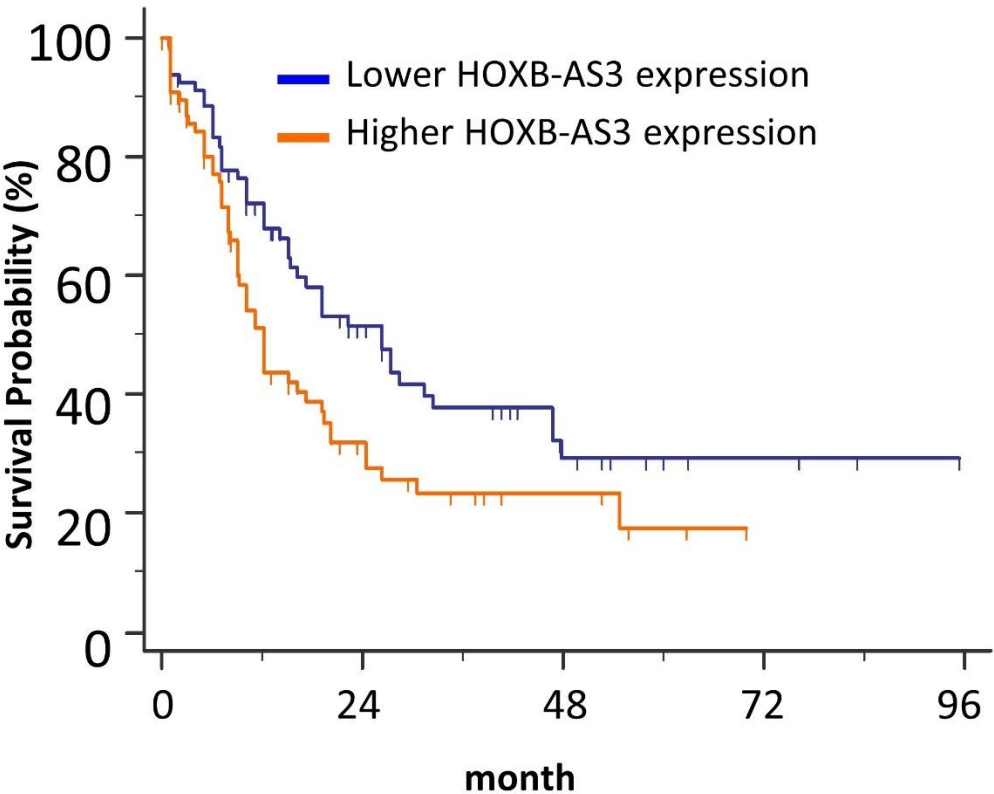
HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	48	NR	0.0013	1
Higher	71	23.8		2.3247 (1.4294 - 3.7807)
Total patients	119	49.5		

圖 27. 美國癌症基因圖譜 (TCGA) 急性骨髓性白血病患者，整體存活期分析。

(N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval)



Overall Survival (TCGA)



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	81	26.4	0.0188	1
Higher	79	12.2		1.6004 (1.0678 - 2.3987)
Total patients	160	17.2		

圖 28. 非急性前髓性白血病之急性骨髓性白血病患者 (non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia, non-APLAML) 與健康成年人, 比較其 *HOXB-AS3* 表現量。

(a) 轉錄子: TC17002858.hg.1, 和 (b) 轉錄子: TC17002254.hg.1。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。

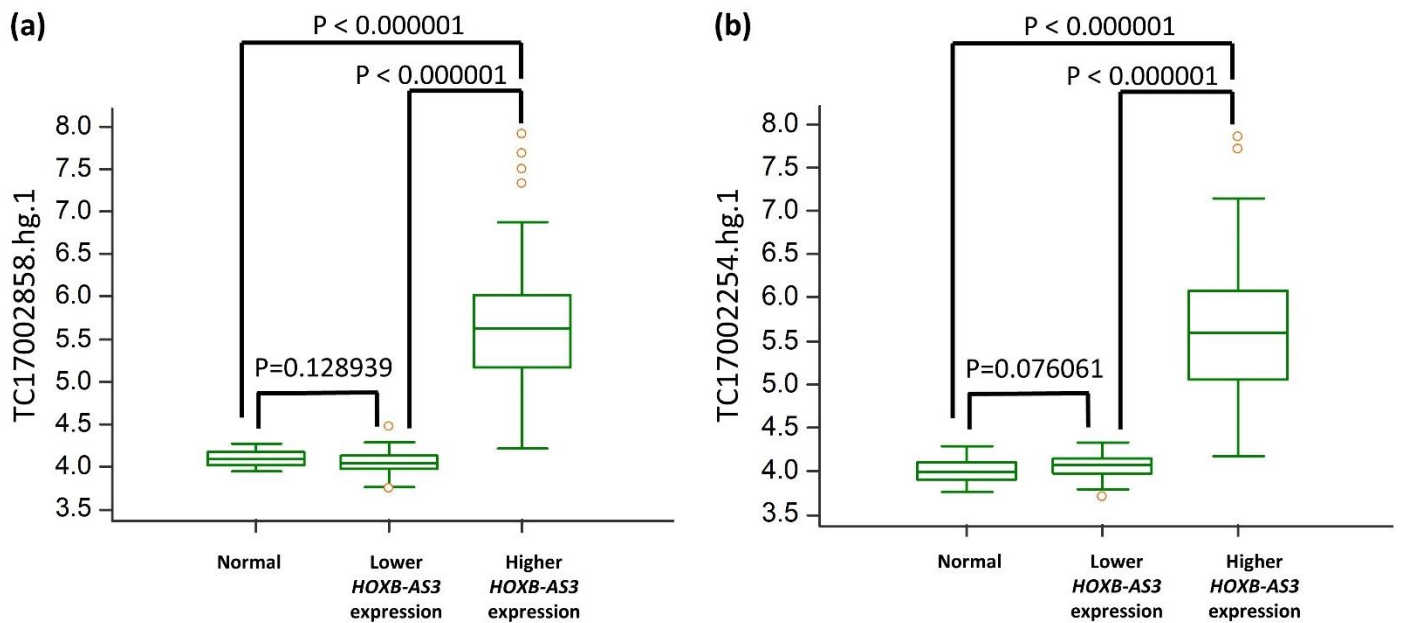
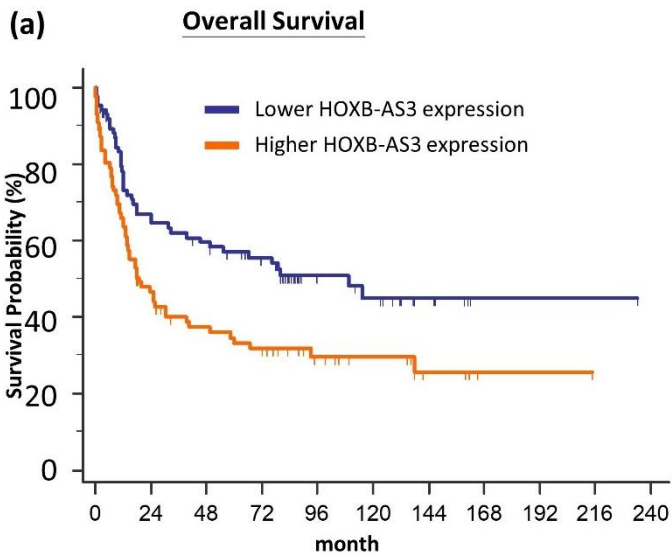
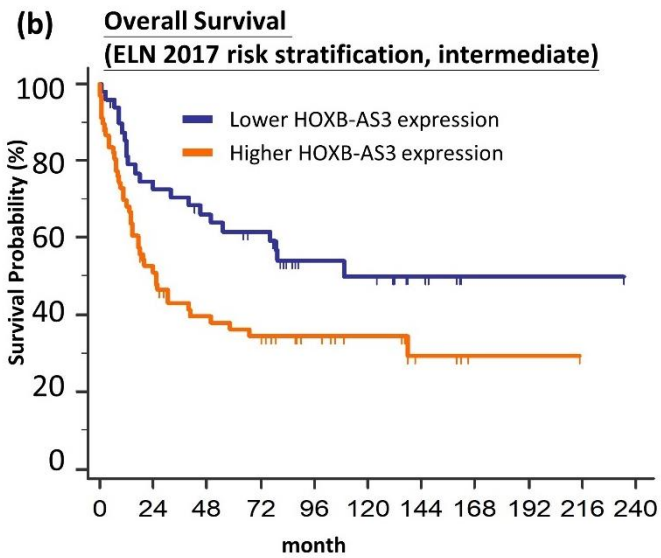


圖 29. 非急性前髓性白血病之急性骨髓性白血病患者（non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia，non-APL AML）之整體存活分析。

(a) 整體存活期分析；(b) 整體存活期之次族群分析。我們是以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。
(N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval)



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	87	109.7	0.0045	1.7671 (1.1888 - 2.6268)
Higher	87	19.13		
Total patients	174	39.7		



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	50	109.7	0.0121	1.9027 (1.1700 - 3.0942)
Higher	68	25.1		
Total patients	118	49.5		

圖 30. 骨髓分化不良症候群患者與健康成年人，比較其 *HOXB-AS3* 表現量。

(a) 轉錄子: TC17002858.hg.1，和 (b) 轉錄子: TC17002254.hg.1。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。

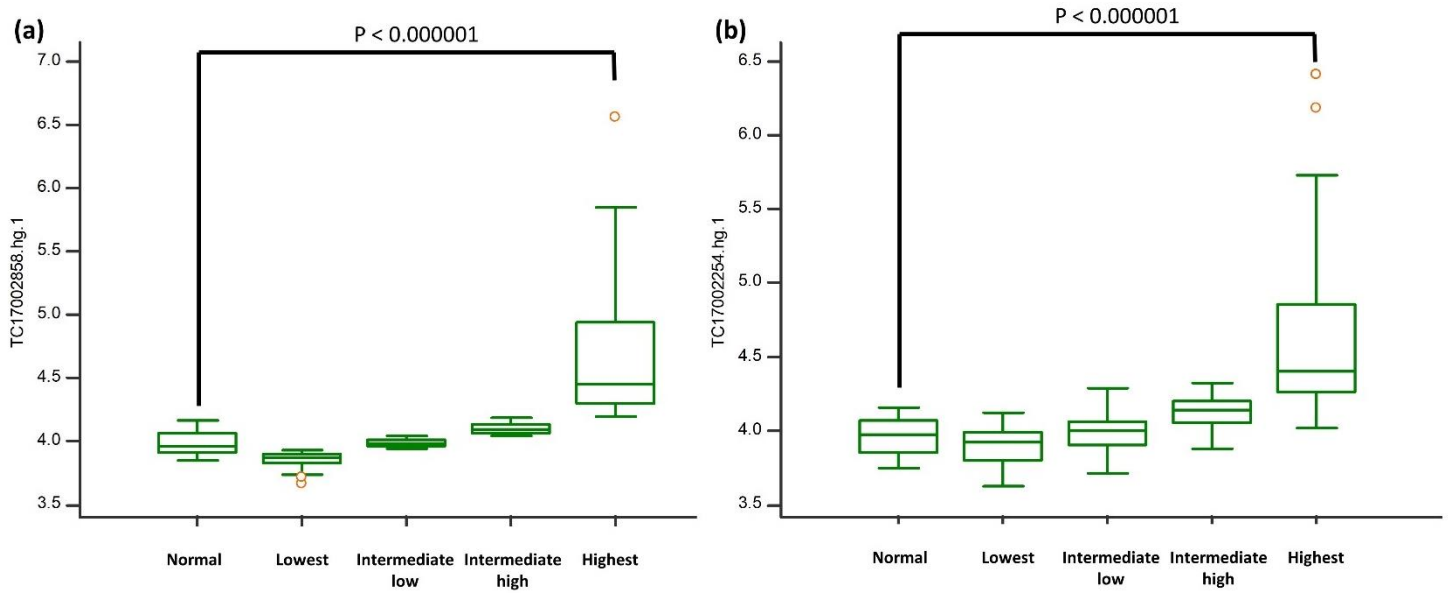




圖 31. 骨髓分化不良症候群患者 *HOXB-AS3* 表現量與基因突變之間的關係。

每一直列為一位骨髓分化不良症候群患者。*HOXB-AS3* 該行表示 *HOXB-AS3* 之表現量分組，低表現者為藍色，高表現者為紅色。其他行是基因突變，有基因突變的病人，該基因標示為紫色；無突變則標示為灰色（底色）；無檢體則標示為白色。圖示見圖右側。

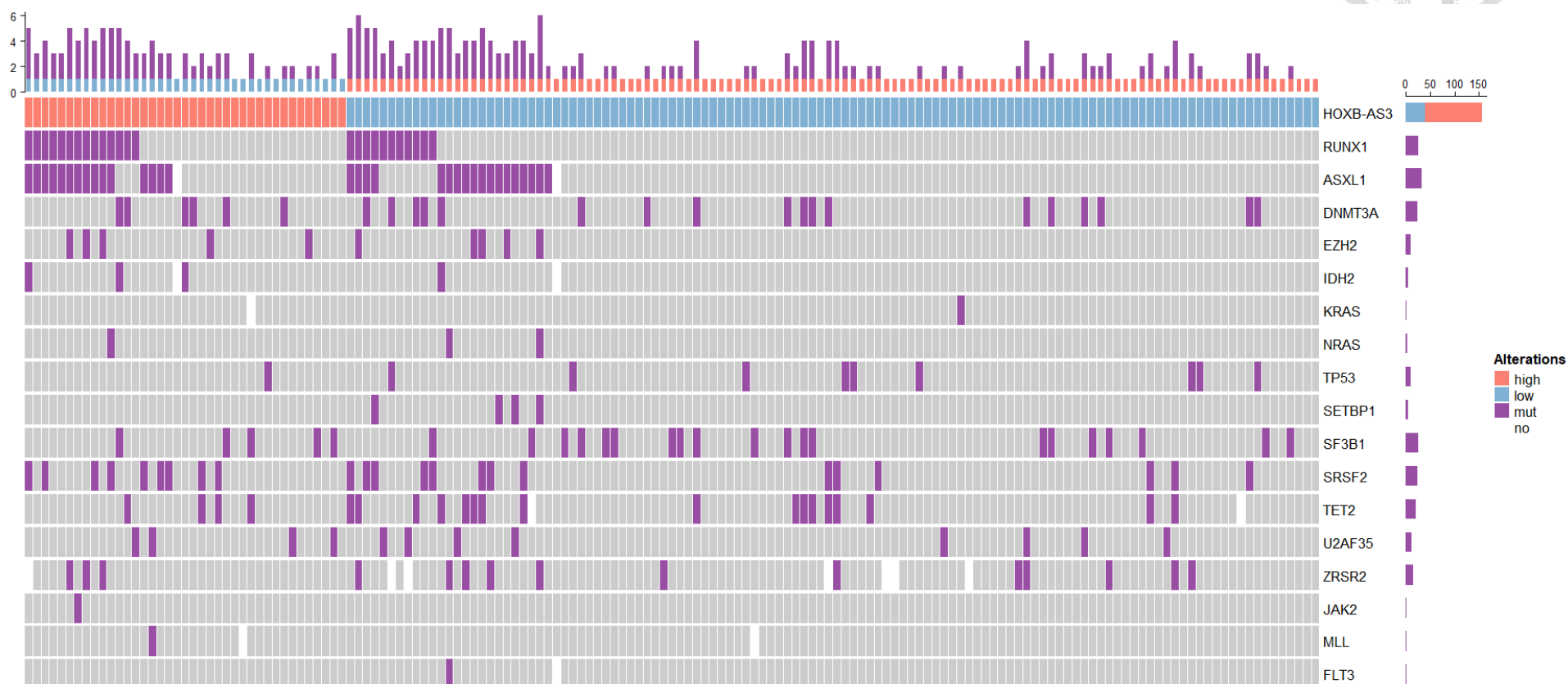
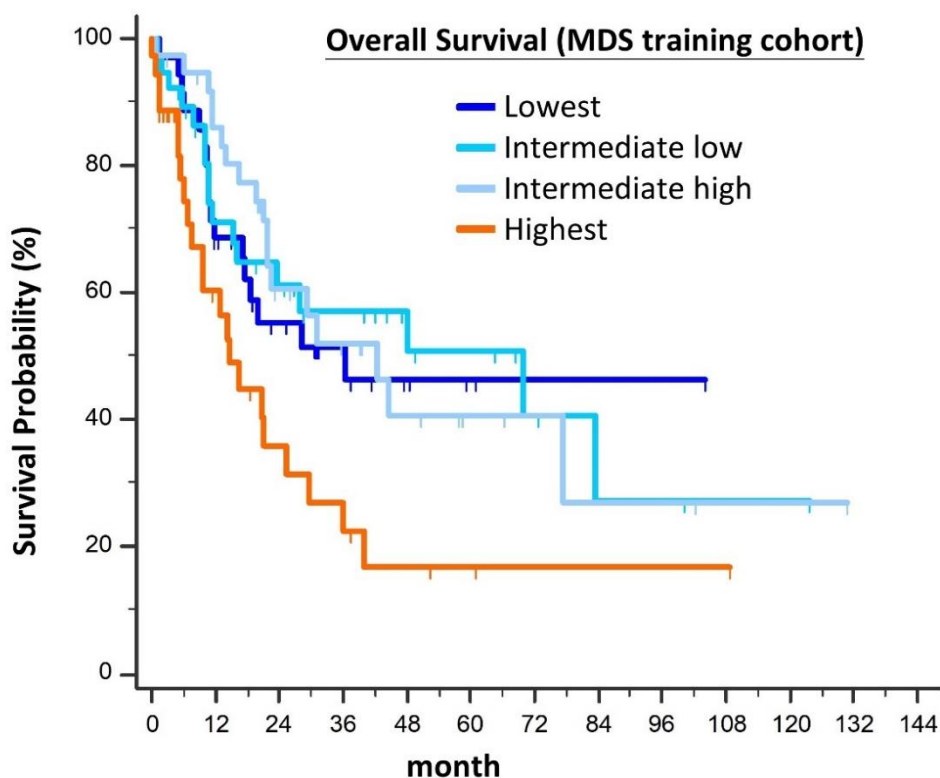




圖 32. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析。

我們依 *HOXB-AS3* 表現量高低分成四組，以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。(N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; OS, overall survival)

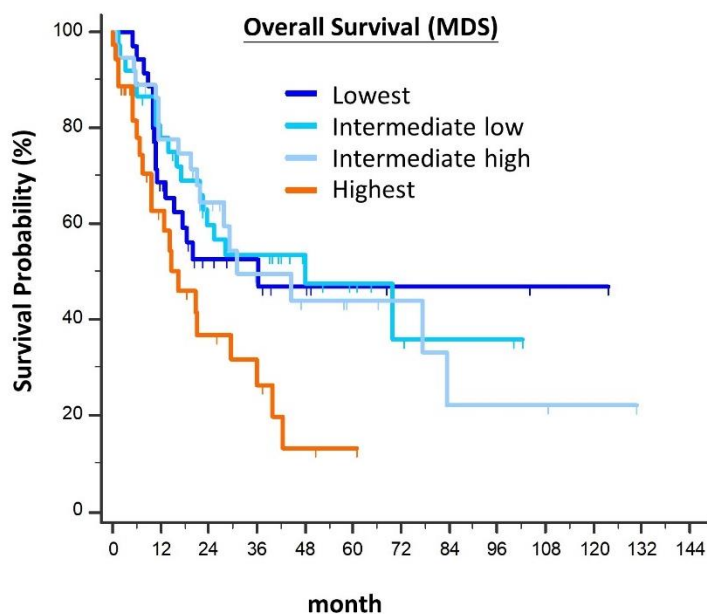


HOXB-AS3 expression	N	Median OS (m)	HR (95% CI)
Lowest	39	36.4	1
Intermediate low	40	69.9	0.8978 (0.4806 - 1.6770)
Intermediate high	39	42.4	0.8820 (0.4773 - 1.6299)
Highest	39	14.6	1.9958 (0.9684 - 4.1131)
Total patients	157	29.1	P value = 0.0282



圖 33. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析。

我們依 *HOXB-AS3* 表現量高低分成四組，以轉錄子 TC17002254.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。(N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; OS, overall survival)

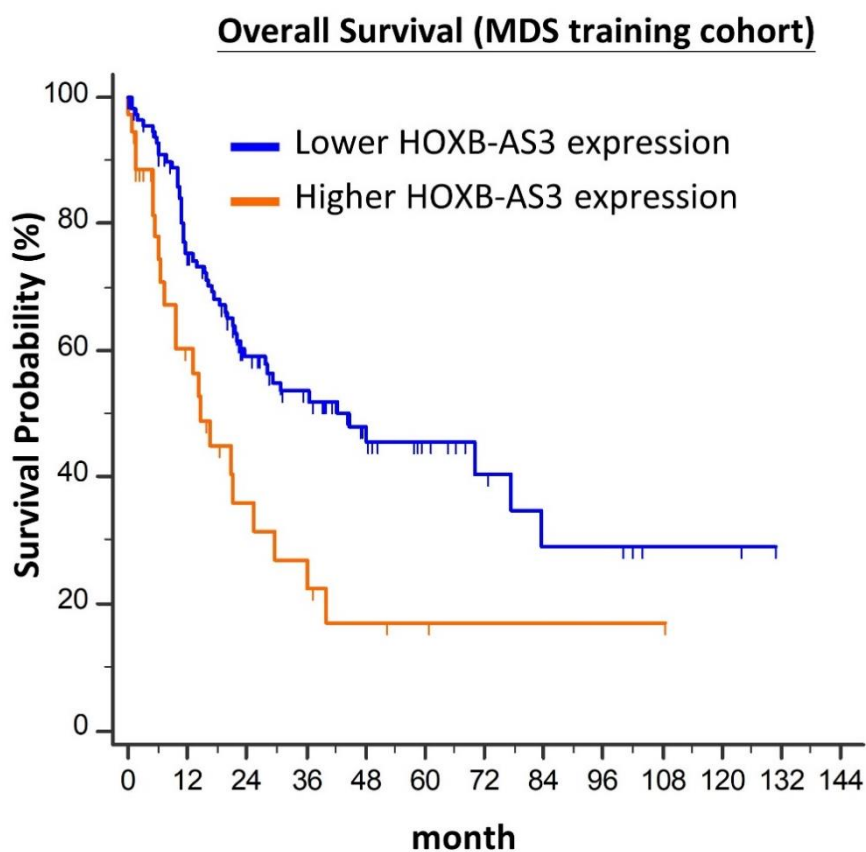


HOXB-AS3 expression	N	Median OS (m)	P value	HR (95% CI)
Lowest	39	36.4	0.0212	1
Intermediate low	40	48.1		0.8633 (0.4671 - 1.5957)
Intermediate high	39	30.9		0.9151 (0.4911 - 1.7055)
Highest	39	16.5		1.9902 (0.9526 - 4.1576)
Total patients	157	29.1		



圖 34. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析。

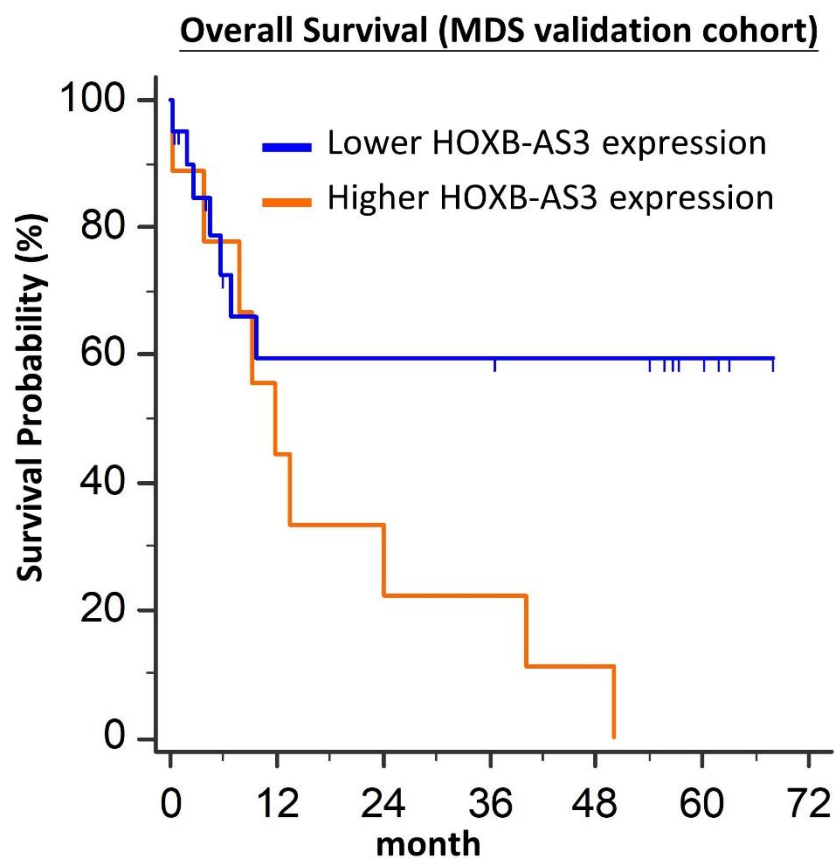
依 *HOXB-AS3* 表現量高低分成兩組，表現量最高的一組，剩下的病人另一組。以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。 (N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval)



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	118	42.4	0.0018	1
Higher	39	14.6		2.1624 (1.1681 - 4.0033)
Total patients	157	29.1		

圖 35. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析（驗證組）。

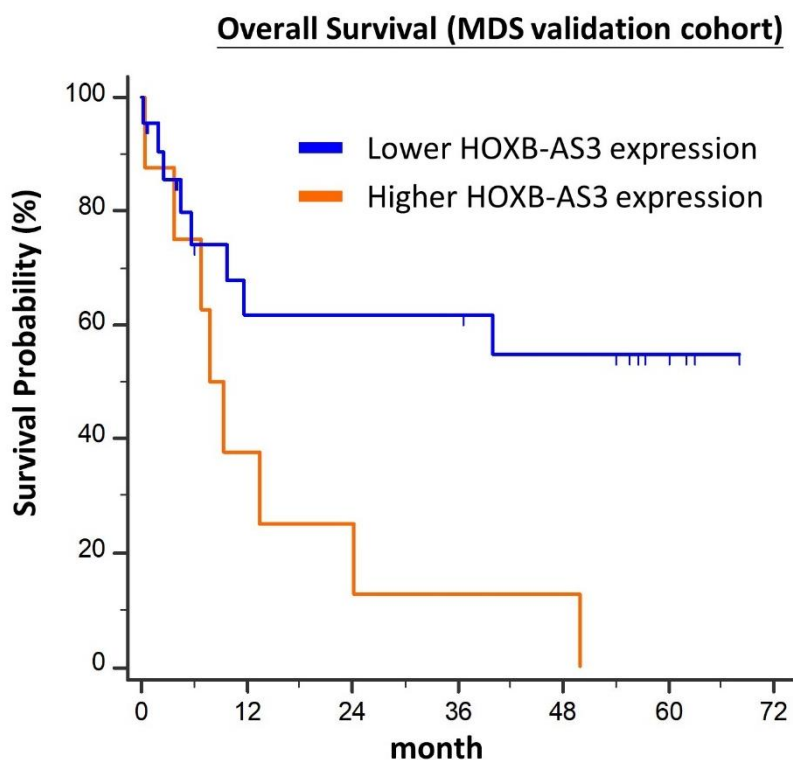
依 *HOXB-AS3* 表現量高低分成兩組。以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。 (N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval)



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	21	NR	0.0285	1
Higher	9	11.8		2.8371 (0.9852 - 8.1705)
Total patients	30	13.5		

圖 36. 骨髓分化不良症候群患者之整體存活期分析（驗證組）。

依 *HOXB-AS3* 表現量高低分成兩組。以轉錄子 TC17002254.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。 (N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval)



HOXB-AS3 expression	N	Median (m)	P value	HR (95% CI)
Lower	21	NR	0.0147	1
Higher	9	7.8		3.1350 (0.9983 - 9.8449)
Total patients	30	13.5		

圖 37. 骨髓分化不良症候群患者，整體存活之次族群分析。

(a) IPSS 風險分組為低風險及中低風險之患者，依 *HOXB-AS3* 表現量分組，再進行整體存活期分析。(b) IPSS 風險分組為中高風險及高風險之患者，依 *HOXB-AS3* 表現量分組，再進行整體存活期分析。以轉錄子 TC17002858.hg.1 作為分組標準。微陣列為 Affymetrix GeneChip® HTA 2.0 arrays。(N, number; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval)

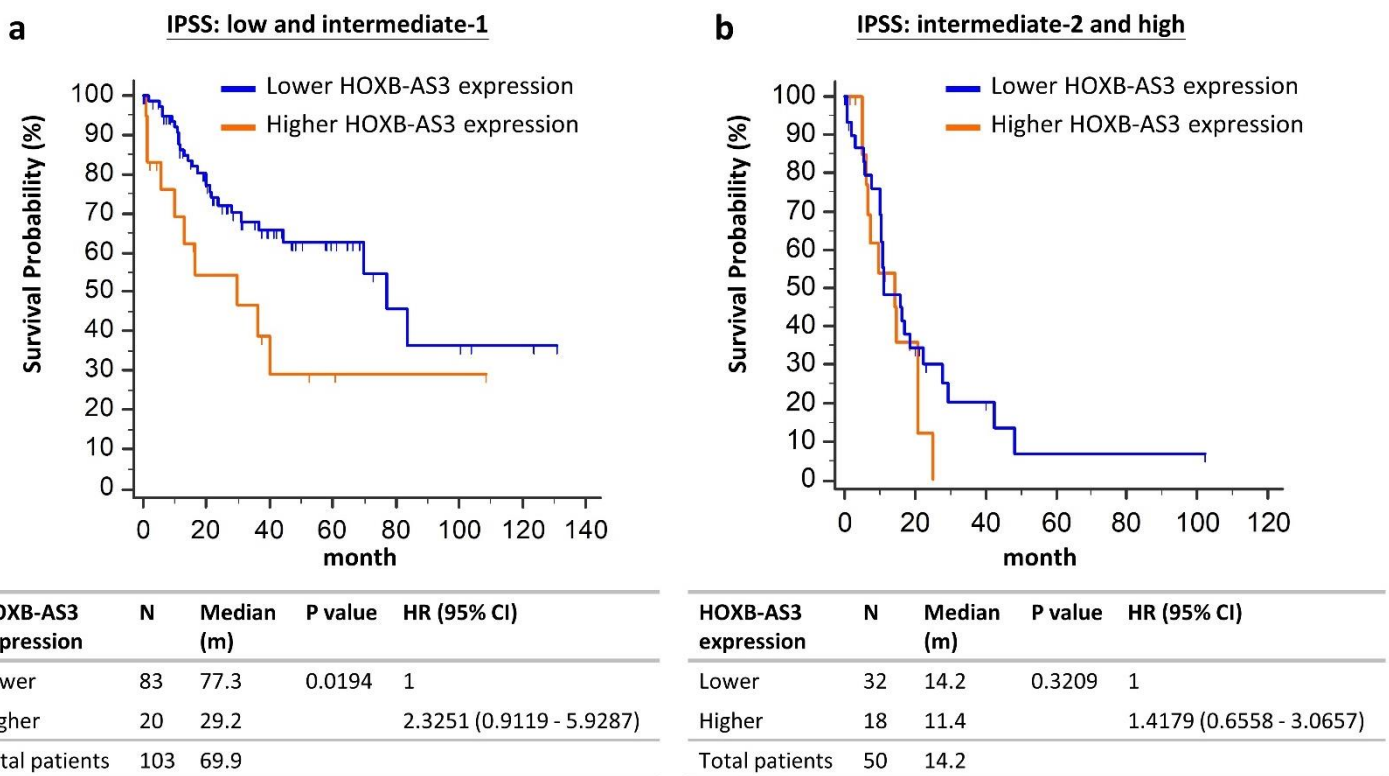
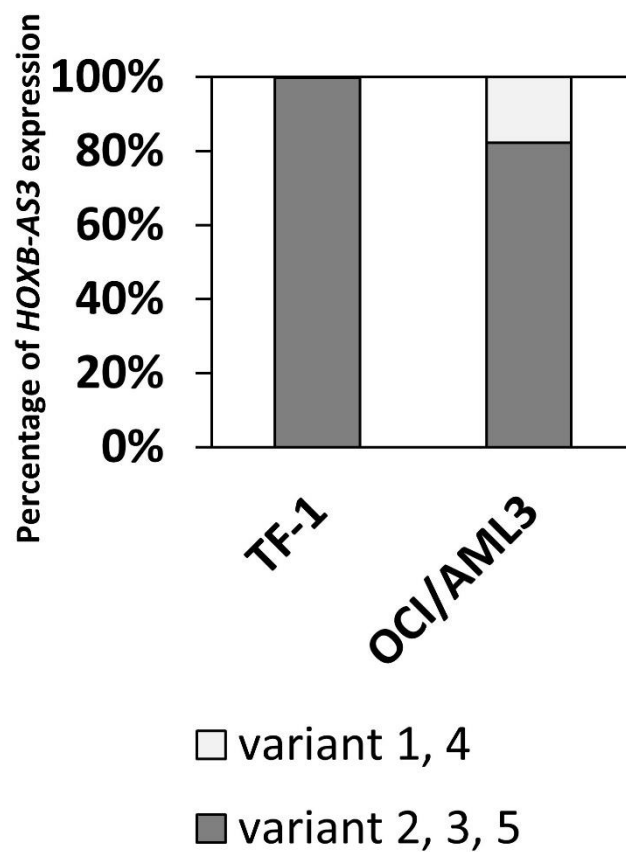
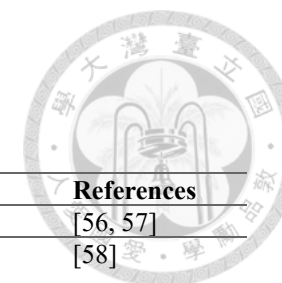


圖 38. *HOXB-AS3* 不同變體在細胞株內之相對比例。

以定量 PCR 的方式分析骨髓性細胞株 TF-1 和 OCI/AML3 內，*HOXB-AS3* 不同變體之相對比例。





表

表 1. 急性骨髓性白血病相關之長鏈非編碼核糖核酸

lncRNA	Mechanism	Expression in AML	Prognosis	References
<i>SBF2-AS1</i>	<i>SBF2-AS1</i> modulate cell proliferation via binding with miR-188-5p.	Upregulated	(NA)	[56, 57]
<i>LOC100506453</i>	(NA)	Downregulated in APL after induction therapy	(NA)	[58]
<i>Lnc-SMIM20-1</i>	(NA)	Upregulated	Adverse	[59]
<i>Lnc-CRNDE</i>	<i>Lnc-CRNDE</i> promotes the proliferation and cell cycle of U937 cells, and inhibits cell apoptosis.	(NA)	(NA)	[60]
<i>Lnc-SOX6-1</i>	<i>Lnc-SOX6-1</i> promotes cell proliferation while inhibits apoptosis.	Upregulated	Adverse	[61]
<i>CCAT1, PVT1</i>	(NA)	Higher levels in t(8;21) positive -AML by 5.3 folds compared to t(8;21) negative group	Adverse	[62]
<i>HOTAIR</i>	Interaction between 12p chromosomal abnormalities Suppress PTEN through DNMT3b	(NA)	(NA)	[63-67]
<i>TUG1</i>	<i>TUG1</i> induces cell proliferation, and represses cell apoptosis via targeting aurora kinase A.	(NA)	Adverse	[68]
<i>HOTAIRM1</i>	Cell differentiation	(NA)	(NA)	[20, 69, 70]
<i>ZEB2-AS1</i>	<i>ZEB2-AS1</i> affects cell proliferation and apoptosis via the miR-122-5p/PLK1 axis.	(NA)	Adverse	[71]
<i>MVIH</i>	● LncRNA <i>MVIH</i> inhibits the malignancy progression through downregulating miR-505 mediated <i>HMGB1</i> and <i>CCNE2</i> ● LncRNA <i>MVIH</i> downregulation reduced KG-1 cell proliferation but increased apoptosis ● LncRNA <i>MVIH</i> upregulation raised HL-60 cell proliferation but decreased apoptosis.	Upregulated	Adverse	[72, 73]
<i>LINC01268</i>	<i>LINC01268</i> positively regulated <i>SOS1</i> expression to promote AML cell viability and cell cycle progression but inhibited apoptosis via sponging miR-217. <i>LINC01268</i> promoted cell growth and inhibited cell apoptosis through modulating miR-217/SOS1 axis in AML.	(NA)	(NA)	[74]
<i>MIR17HG</i>	LncRNA <i>MIR17HG</i> sponges microRNA-21 to upregulate <i>PTEN</i> and regulate homoharringtonine-based chemoresistance of acute myeloid leukemia cells.	(NA)	(NA)	[75]

NA: not available

表 2. 依 *HOXB-AS3* 表現量，將原發型急性骨髓性白血病患者分組，並比較臨床表現之差異

	Total	<i>HOXB-AS3</i> expression		P value
		Higher	Lower	
Patient number (n)	193	96	97	
Sex (n, %)				
Male		42 (43.7%)	60 (61.9%)	0.0120*
Female		54 (56.2%)	37 (38.1%)	
Age (years; median, range)	46.7 (16.1 – 82.7)	52.7 (16.1 – 76.8)	42.8 (18.2 – 82.7)	0.0010*
Laboratory (median, range)				
WBC (k/ μ L)	27.770 (0.380 – 423.000)	35.865 (0.380 – 423.000)	23.530 (0.470–380.180)	0.0684
Hb (g/dL)	7.9 (3.3 – 13.0)	7.7 (3.7 – 12.1)	8.1 (3.3 – 13.0)	0.0946
PLT (k/ μ L)	44.0 (2.0 – 493.0)	52.5 (5.0 – 412.0)	38.0 (2.0 – 493.0)	0.0449*
LDH (U/L)	1019 (280 – 8280)	924 (280 – 7734)	1036 (286 – 8280)	0.4282
Bone marrow blasts (%)	63.0 (16.0 – 98.5)	61.3 (20.5 – 97.5)	65.5 (16.0 – 98.5)	0.1267
Peripheral blood blasts (%)	53.6 (0.0 – 99.0)	55.0 (1.0 – 99.0)	51.8 (0.0 – 95.0)	0.3927
Cytogenetic risk groups (n, %)				< 0.0001*
Favorable	44 (22.8%)	4 (4.2%)	40 (41.2%)	
Intermediate	119 (61.7%)	71 (74.0%)	48 (49.5%)	
Adverse	21 (10.9%)	12 (12.5%)	9 (9.3%)	
Unknown	9 (4.7%)	9 (9.4%)	0 (0.0%)	
Treatment response				
CR rate	154 (79.8%)	73 (76.0%)	81 (83.5%)	0.1978
Relapse rate	82 (42.5%)	46 (47.9%)	36 (37.1%)	0.0306*

* P value < 0.05.

Abbreviations: WBC, white blood cell count; Hb, hemoglobin; PLT, platelet count; LDH, lactic dehydrogenase; CR, complete remission; *MLL*/PTD, partial tandem duplication of *MLL* gene.

表 3. 依 *HOXB-AS3* 表現量，將原發型急性骨髓性白血病患者分組，並比較基因突變之相關性

	Total	<i>HOXB-AS3</i> expression		P value
		Higher	Lower	
Patient number (n)	193	96	97	
<i>NPM1</i> (n, %)	49 25.4(%)	45 (46.9%)	4 (4.1%)	< 0.0001*
<i>FLT3</i> -ITD (n, %)	58 (30.1%)	38 (39.6%)	20 (20.6%)	0.0047*
<i>FLT3</i> -TKD (n, %)	15 (7.8%)	10 (10.4%)	5 (5.2%)	0.1907
Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD	26 (13.5%)	25 (26.0%)	1 (1.0%)	< 0.0001*
<i>ASXL1</i> (n, %)	14 (7.3%)	6 (6.2%)	8 (8.2%)	0.7826
<i>CEBPA</i> double mutation (n, %) [#]	25 (13.1%)	4 (4.2%)	21 (21.9%)	0.0004*
<i>DNMT3A</i> (n, %)	35 (18.1%)	30 (31.2%)	5 (5.2%)	< 0.0001*
<i>RUNX1</i> (n, %)	22 (11.4%)	17 (17.7%)	5 (5.2%)	0.0062*
<i>IDH1</i> (n, %)	8 (4.1%)	7 (7.3%)	1 (1.0%)	0.0348*
<i>IDH2</i> (n, %) [#]	21 (10.9%)	14 (14.6%)	7 (7.2%)	0.1114
<i>TET2</i> (n, %)	27 (14.0%)	13 (13.5%)	14 (14.4%)	1.0000
<i>KRAS</i> (n, %) [#]	10 (5.2%)	4 (4.2%)	6 (6.2%)	0.4979
<i>NRAS</i> (n, %) [#]	38 (19.7%)	18 (18.8%)	20 (20.6%)	0.5769
<i>KIT</i> (n, %)	12 (6.2%)	0	12 (12.4%)	0.0003*
<i>TP53</i> (n, %)	4 (2.2%)	4 (4.3%)	0	0.0591
<i>MLL</i> -PTD (n, %)	10 (5.2%)	10 (10.4%)	0	0.0007*
<i>PTPN11</i> (n, %)	10 (5.2%)	10 (10.4%)	0	0.0007*
<i>RAD21</i> (n, %) [#]	4 (2.1%)	1 (1.0%)	3 (3.1%)	0.5092
<i>SMC1A</i> (n, %) [#]	5 (2.6%)	4 (4.2%)	1 (1.0%)	0.3367
<i>SMC3</i> (n, %) [#]	2 (1.0%)	1 (1.0%)	1 (1.0%)	0.8487
<i>STAG1</i> (n, %) [#]	1 (0.5%)	1 (1.0%)	0	0.3688
<i>STAG2</i> (n, %) [#]	2 (1.0%)	0	2 (2.1%)	0.3089
<i>WT1</i> (n, %)	21 (10.9%)	13 (13.5%)	8 (8.2%)	0.2573

* P value < 0.05, Chi-squared test

[#] Because of the limitation of DNA samples, not all patients had enough genomic DNA samples for analysis of these gene mutations. Nity five patients with high *HOXB-AS3* and 96 with low *HOXB-AS3* had genomic DNA for *CEBPA* mutation analysis, 96 with high *HOXB-AS3* and 97 with low *HOXB-AS3* for *KRAS* and *NRAS* mutation analysis, 92 with high *HOXB-AS3* and 93 with low *HOXB-AS3* for *TP53* mutation analysis, 95 with high *HOXB-AS3* and 95 with low *HOXB-AS3* for *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, and *STAG2* mutation analysis, and 95 with high *HOXB-AS3* and 94 with low *HOXB-AS3* for *STAG1* mutation analysis. All other mutations were analyzed in total cohort.

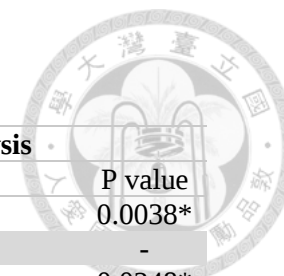


表 4. 急性骨髓性白血病患者之單變項及多變項整體存活期分析

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Age > 60 years	2.7201	1.5917 to 4.6484	<0.0001*	2.0425	1.2585 to 3.3148	0.0038*
WBC > 100k μ/L	1.0529	0.6026 to 1.8399	0.8534	-	-	-
Favorable cytogenetics	0.4552	0.2905 to 0.7133	0.0051*	0.4579	0.2315 to 0.9058	0.0248*
<i>NPM1</i>+/<i>FLT3</i>-ITD-	0.5674	0.3346 to 0.9625	0.0839	0.2972	0.1421 to 0.6216	0.0013*
<i>FLT3</i>-TKD	1.1062	0.5419 to 2.2580	0.7722	-	-	-
<i>CEBPA</i> double mutation	0.3093	0.1839 to 0.5201	0.0030*	0.3893	0.1585 to 0.9561	0.0396*
<i>PTPN11</i> mutation	1.2426	0.5008 to 3.0836	0.6042	-	-	-
<i>KRAS</i> mutation	1.6638	0.6351 to 4.3587	0.1885	-	-	-
<i>MLL</i>/PTD	3.5868	1.0660 to 12.0688	0.0001*	2.3662	1.0555 to 5.3047	0.0365*
<i>KIT</i> mutation	1.0609	0.4827 to 2.3319	0.8797	-	-	-
<i>RUNX1</i> mutation	2.2459	1.1285 to 4.4697	0.0013*	1.2736	0.6998 to 2.3179	0.4285
<i>WT1</i> mutation	1.4062	0.7398 to 2.6728	0.2326	-	-	-
<i>ASXL1</i> mutation	0.8468	0.3932 to 1.8236	0.6921	-	-	-
<i>IDH1</i> mutation	0.5760	0.2364 to 1.4033	0.3395	-	-	-
<i>IDH2</i> mutation	0.9412	0.5109 to 1.7341	0.8492	-	-	-
<i>TET2</i> mutation	1.1970	0.6549 to 2.1879	0.5309	-	-	-
<i>TP53</i> mutation	4.3752	0.5761 to 33.2257	0.0015*	3.1834	1.0992 to 9.2198	0.0328*
<i>DNMT3A</i> mutation	1.3679	0.8133 to 2.3004	0.1908	-	-	-
<i>HOXB-AS3</i> expression	2.3003	1.5530 to 3.4072	< 0.0001*	1.6401	0.9727 to 2.7654	0.0634

Age, elder than 60 years versus younger; WBC, higher than 100k μ /L versus lower; *HOXB-AS3* expression, higher versus lower; *NPM1*+/*FLT3*-ITD-, mutated *NPM1* without *FLT3*-ITD versus others; other mutations, mutation versus wild type; favorable cytogenetics, favorable versus others.

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; *MLL*/PTD, partial tandem duplication of *MLL* gene

* P value < 0.05

表 5. 依 *HOXB-AS3* 表現量，將骨髓分化不良症候群患者分組，並比較臨床表現之差異

	Total	<i>HOXB-AS3</i> expression		P value
		Higher	Lower	
Patient number (n)	157	39	118	
Sex (n, %)				
Male	107 (68.2%)	31 (79.5%)	76 (64.4%)	0.0807
Female	50 (31.8%)	8 (20.5%)	42 (35.6%)	
Age (years; median, range)	69 (19 – 94)	71 (29 – 89)	69 (19 – 94)	0.5209
Laboratory (median, range)				
WBC (k/ μ L)	3.700 (0.490 – 20.440)	3.830 (0.490-20.440)	3.700 (1.210 – 15.010)	0.8892
Hb (g/dL)	8.2 (3.5 – 14.6)	8.7 (5.6 – 13.0)	8.0 (3.5 – 14.6)	0.0186*
PLT (k/ μ L)	85.0 (3.0 – 721.0)	84.0 (9.0 – 721.0)	87.5 (3.0 – 607.0)	0.8374
LDH (U/L)	460 (145 – 2695)	527 (230 – 1481)	453 (145 – 2695)	0.2909
Bone marrow blasts (%)	3 (0 – 18.8)	9 (0.8 – 18.8)	2 (0 – 17.2)	< 0.0001*
Peripheral blood blasts (%)	0 (0 – 16)	0 (0 – 16.0)	0 (0 – 13.0)	0.1037
IPSS risk group (n, %) [#]				0.1513
Low	31 (20.3%)	5 (13.2%)	26 (22.6%)	
Intermediate-1	72 (47.1%)	15 (39.5%)	57 (49.6%)	
Intermediate-2	35 (22.9%)	13 (34.2%)	22 (19.1%)	
High	15 (9.8%)	5 (13.2%)	10 (8.7%)	
WHO 2016 classification (n, %)				0.0077*
MDS with del(5q)	3 (1.9%)	0	3 (2.5%)	
SLD	35 (22.3%)	4 (10.3%)	31 (26.3%)	
MLD	32 (20.4%)	5 (12.8%)	27 (22.9%)	
RS-SLD	11 (7.0%)	3 (7.7%)	8 (6.8%)	
RS-MLD	7 (4.5%)	0	7 (5.9%)	
EB-1	29 (18.5%)	9 (23.1%)	20 (16.9%)	
EB-2	40 (25.5%)	18 (46.2%)	22 (18.6%)	
Leukemia transformation rate (n, %)	34 (21.7%)	14 (35.9%)	20 (16.9%)	0.0130*

* P value < 0.05.

[#] Only 153 patients, including 38 with high *HOXB-AS3* and 115 with low *HOXB-AS3*, had complete hemograms for IPSS calculation.

Abbreviations: WBC, white blood cell count; Hb, hemoglobin; PLT, platelet count; LDH, lactic dehydrogenase; IPSS, International Prognostic Scoring System; SLD, single lineage dysplasia; MLD, multilineage dysplasia; RS-SLD, ring sideroblasts with single lineage dysplasia; RS-MLD, ring sideroblasts with multilineage dysplasia; EB-1, excess blasts-1; EB-2, excess blasts-2.

表 6. 依 *HOXB-AS3* 表現量，將骨髓分化不良症候群患者分組，並比較基因突變之相關性

	Total	<i>HOXB-AS3</i> expression		P value
		Higher	Lower	
Patient number (n)	157	39	118	
<i>RUNX1</i> (n, %)	25 (15.9%)	14 (35.9%)	11 (9.3%)	0.0001*
<i>ASXL1</i> (n, %) [#]	33 (21.3%)	15 (39.5%)	18 (15.4%)	0.0017*
<i>DNMT3A</i> (n, %)	24 (15.3%)	6 (15.4%)	18 (15.3%)	0.9844
<i>EZH2</i> (n, %)	10 (6.4%)	5 (12.8%)	5 (4.2%)	0.0579
<i>IDH2</i> (n, %) [#]	4 (2.6%)	3 (7.9%)	1 (0.9%)	0.0178*
<i>KRAS</i> (n, %) [#]	1 (0.6%)	0	1 (0.8%)	0.5704
<i>NRAS</i> (n, %)	3 (1.9%)	1 (2.6%)	2 (1.7%)	0.7319
<i>TP53</i> (n, %)	10 (6.4%)	1 (2.6%)	9 (7.6%)	0.2632
<i>SETBP1</i> (n, %)	4 (2.5%)	0	4 (3.4%)	0.5628
<i>SF3B1</i> (n, %)	25 (15.9%)	5 (12.8%)	20 (16.9%)	0.5426
<i>SRSF2</i> (n, %)	23 (14.6%)	9 (23.1%)	14 (11.9%)	0.0870
<i>TET2</i> (n, %) [#]	21 (13.5%)	4 (10.3%)	17 (14.7%)	0.4889
<i>U2AF35</i> (n, %)	12 (7.6%)	4 (10.3%)	8 (6.8%)	0.4801
<i>ZRSR2</i> (n, %) [#]	15 (10.0%)	3 (7.9%)	12 (10.7%)	0.6178

* P value < 0.05, Chi-squared test

[#] Because of the limitation of DNA samples, not all patients had enough genomic DNA samples for analysis of these gene mutations. Thirty eight patients with high *HOXB-AS3* and 117 with low *HOXB-AS3* had genomic DNA for *ASXL1* mutation analysis, 38 with high *HOXB-AS3* and 117 with low *HOXB-AS3* for *IDH2* mutation analysis, 38 with high *HOXB-AS3* for *KRAS* mutation analysis, 116 with low *HOXB-AS3* for *TET2* mutation analysis, and 38 with high *HOXB-AS3* and 112 with low *HOXB-AS3* for *ZRSR2* mutation analysis. All other mutations were analyzed in total cohort.



表 7. 骨髓分化不良症候群患者之單變項及多變項整體存活期分析

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Age > 60 years	1.7988	1.1298 to 2.8641	0.0223*	1.5433	0.8392 to 2.8383	0.1628
IPSS	3.4616	1.9730 to 6.0735	< 0.0001*	2.5755	1.4292 to 4.6412	0.0016*
EZH2 mutation	2.0164	0.7036 to 5.7785	0.0709	1.1877	0.4371 to 3.2271	0.7358
RUNX1 mutation	1.6949	0.7996 to 3.5925	0.0880	0.7265	0.3155 to 1.6731	0.4528
ASXL1 mutation	1.9909	1.0927 to 3.6274	0.0059*	1.3616	0.6273 to 2.9554	0.4350
IDH2 mutation	1.5777	0.2748 to 9.0568	0.5195	-	-	-
ZRSR2 mutation	2.5929	1.0588 to 6.3500	0.0016*	1.9474	0.8973 to 4.2263	0.0918
U2AF35 mutation	1.0584	0.4771 to 2.3480	0.8861	-	-	-
TET2 mutation	1.3481	0.6591 to 2.7572	0.3579	-	-	-
SRSF2 mutation	1.9654	0.9379 to 4.1184	0.0196*	1.5304	0.7107 to 3.2954	0.2769
SF3B1 mutation	0.7602	0.4237 to 1.3640	0.3970	-	-	-
TP53 mutation	7.1283	1.2057 to 42.1423	<0.001*	6.1091	2.3732 to 15.7260	0.0002*
DNMT3A mutation	1.2781	0.6513 to 2.5080	0.4344	-	-	-
HOXB-AS3 expression	2.1624	1.1681 to 4.0033	0.0018*	1.8992	1.0606 to 3.4009	0.0309*

Age, elder than 60 years versus younger; *HOXB-AS3* expression, highest versus others; mutations, mutation versus wild type; IPSS, intermediate-2 and high, versus low and intermediate-1.

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval

* P value < 0.05



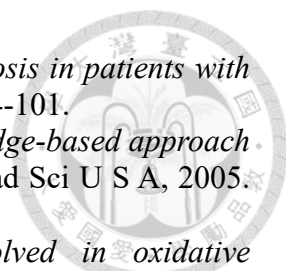
表 8. *HOXB-AS3* 在各種癌症之研究

文獻來源	癌症別	<i>HOXB-AS3</i> 變體	致病機轉	<i>HOXB-AS3</i> 高表現對預後之影響
Huang, JZ, et. al.[24]	大腸癌 (colon cancer)	1	<i>HOXB-AS3</i> 會製造出一小段胺基酸序列，此胺基酸序列會抑制 PKM 的剪接修飾，進而對 TCA 循環造成抑制效果，使細胞生長變慢。	預後較好。
Zhang, XM, et. al. [76]	肝癌 (hepatoma)	1	<i>HOXB-AS3</i> 藉由與 DNMT1 的結合，減少 P53 的表現，來增加細胞生長與減少細胞凋亡。	未分析預後。但期別較高的患者，表現較低期別的患者為高。
Huang, HH. et. al. [49] (即本研究) Papaioannou, D. et. al. [50] Wu, C, et. al. [77]	急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia)	2、3、5[49, 50] 5[77]	<i>HOXB-AS3</i> 會影響細胞周期及 DNA 複製相關的基因表現，進而影響細胞生長。[49] <i>HOXB-AS3</i> 藉由與 EBP1 蛋白的結合，影響 <i>rRNA</i> 基因之表現及蛋白質的合成製造。[50] YTHDC1 會與 <i>HOXB-AS3</i> 結合，並影響其表現。表現 YTHDC1 或 <i>HOXB-AS3</i> 均會促進細胞生長，減少細胞凋亡。[77]	預後較差[49]。
Zhuang, XH, et. al. [78]	卵巢癌 (ovarian cancer)	1[78]	<i>HOXB-AS3</i> 會影響 Wnt/ β -catenin 細胞傳導路徑，進而使得細胞生長受到影響。[78]	預後較差[78, 79]。
Xu, S. et. al. [79]		2、3、5、8[79]	<i>HOXB-AS3</i> 藉由抑制 miR-378-3p 表現，進而減少 LDHA (lactate dehydrogenase A) 的表現，而影響細胞生長。[79]	
Jiang, W, et. al. [80]	肺癌 (lung cancer)	1	<i>HOXB-AS3</i> 影響 PI3K/AKT 細胞傳導路徑，使得肺癌細胞生長受到抑制。	未分析預後。但期別較高的患者，表現較低期別的患者為高。
Leng, F. et. al. [81]	口腔癌 (oral squamous cell carcinoma)	1	<i>HOXB-AS3</i> 直接與 IGF2BP2，進而使得 c-myc 較穩定，使細胞生長較快。	預後較差。期別愈高，表現量愈多。
Xing, Y, et. al. [82] Zhou, Q. et. al. [83]	子宮內膜癌 (endometrial carcinoma)	2、3、5、8[82]	<i>HOXB-AS3</i> 藉由抑制 miR-498-5p 的表現，使得 ADAM9 表現量上升，促進細胞生長。[82] <i>HOXB-AS3</i> 與 PTBP1 蛋白結合，一起調節 SREBP1 蛋白的表現，進而影響癌症細胞的脂肪代謝。[83]	預後較差[82]。

參考文獻

1. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
2. Khoury, J.D., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms*. Leukemia, 2022. **36**(7): p. 1703-1719.
3. Arber, D.A., et al., *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data*. Blood, 2022. **140**(11): p. 1200-1228.
4. Larsson, C.A., G. Cote, and A. Quintas-Cardama, *The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(8): p. 815-27.
5. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN*. Blood, 2022. **140**(12): p. 1345-1377.
6. Bowen, D., et al., *TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 203-6.
7. Najima, Y., et al., *Prognostic impact of TP53 mutation, monosomal karyotype, and prior myeloid disorder in nonremission acute myeloid leukemia at allo-HSCT*. Bone Marrow Transplant, 2021. **56**(2): p. 334-346.
8. DiNardo, C.D. and A.H. Wei, *How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs*. Blood, 2020. **135**(2): p. 85-96.
9. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. Blood, 1997. **89**(6): p. 2079-88.
10. Voso, M.T., et al., *Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database*. J Clin Oncol, 2013. **31**(21): p. 2671-7.
11. Platzbecker, U., *Treatment of MDS*. Blood, 2019. **133**(10): p. 1096-1107.
12. Ades, L., et al., *Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion: results of a phase 2 study*. Blood, 2009. **113**(17): p. 3947-52.
13. Statello, L., et al., *Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 96-118.
14. Rinn, J.L., et al., *Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human *HOX* Loci by Noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-1323.
15. Wang, K.C., et al., *A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 120-4.
16. Yao, C.Y., et al., *A 4-lncRNA scoring system for prognostication of adult myelodysplastic syndromes*. Blood Adv, 2017. **1**(19): p. 1505-1516.
17. Bhatlekar, S., J.Z. Fields, and B.M. Boman, *Role of HOX Genes in Stem Cell Differentiation and Cancer*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 3569493.
18. Alharbi, R.A., et al., *The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia*. Leukemia, 2013. **27**(5): p. 1000-8.
19. Rice, K.L. and J.D. Licht, *HOX deregulation in acute myeloid leukemia*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 865-8.
20. Zhang, X., S.M. Weissman, and P.E. Newburger, *Long intergenic non-coding RNA*

- HOTAIRM1 regulates cell cycle progression during myeloid maturation in NB4 human promyelocytic leukemia cells.* RNA Biol, 2014. **11**(6): p. 777-87.
21. Diaz-Beya, M., et al., *The lincRNA HOTAIRM1, located in the HOXA genomic region, is expressed in acute myeloid leukemia, impacts prognosis in patients in the intermediate-risk cytogenetic category, and is associated with a distinctive microRNA signature.* Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 31613-27.
 22. Jing, Y., et al., *Mutant NPM1-regulated lncRNA HOTAIRM1 promotes leukemia cell autophagy and proliferation by targeting EGR1 and ULK3.* J Exp Clin Cancer Res, 2021. **40**(1): p. 312.
 23. Al-Kersh, S., et al., *The stem cell-specific long noncoding RNA HOXA10-AS in the pathogenesis of KMT2A-rearranged leukemia.* Blood Adv, 2019. **3**(24): p. 4252-4263.
 24. Huang, J.Z., et al., *A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth.* Mol Cell, 2017. **68**(1): p. 171-184 e6.
 25. Hou, H.A., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications.* Blood, 2012. **119**(2): p. 559-68.
 26. Chou, W.C., et al., *Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations.* Leukemia, 2007. **21**(5): p. 998-1004.
 27. Tien, H.F., et al., *Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features, and ras mutation in acute myeloid leukemia. A study of 235 Chinese patients in Taiwan.* Cancer Genet Cytogenet, 1995. **84**(1): p. 60-8.
 28. Chen, C.Y., et al., *RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome.* Br J Haematol, 2007. **139**(3): p. 405-14.
 29. Chou, W.C., et al., *Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations.* Blood, 2010. **116**(20): p. 4086-94.
 30. Ernst, T., et al., *Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders.* Nat Genet, 2010. **42**(8): p. 722-6.
 31. Chou, W.C., et al., *The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2011. **25**(2): p. 246-53.
 32. Chen, C.Y., et al., *Acquisition of JAK2, PTPN11, and RAS mutations during disease progression in primary myelodysplastic syndrome.* Leukemia, 2006. **20**(6): p. 1155-8.
 33. Hou, H.A., et al., *TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution.* Blood Cancer J, 2015. **5**(7): p. e331.
 34. Hou, H.A., et al., *Clinical implications of the SETBP1 mutation in patients with primary myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression.* Am J Hematol, 2014. **89**(2): p. 181-6.
 35. Wu, S.J., et al., *The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution.* Blood, 2012. **120**(15): p. 3106-11.
 36. Chou, W.C., et al., *TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics.* Blood, 2011. **118**(14): p. 3803-10.
 37. Shiah, H.S., et al., *Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23.* Leukemia, 2002. **16**(2): p. 196-202.

- 
38. Hou, H.A., et al., *Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia*. *Oncotarget*, 2016. **7**(8): p. 9084-101.
 39. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
 40. Mootha, V.K., et al., *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes*. *Nat Genet*, 2003. **34**(3): p. 267-73.
 41. Wang, Y., W. Zhu, and D.E. Levy, *Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR*. *Methods*, 2006. **39**(4): p. 356-62.
 42. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
 43. Lebert-Ghali, C.E., et al., *Hoxa cluster genes determine the proliferative activity of adult mouse hematopoietic stem and progenitor cells*. *Blood*, 2016. **127**(1): p. 87-90.
 44. Guenther, M.G., et al., *Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8603-8.
 45. Lin, M.F., I. Jungreis, and M. Kellis, *PhyloCSF: a comparative genomics method to distinguish protein coding and non-coding regions*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(13): p. i275-82.
 46. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. *Mol Cell*, 2010. **39**(6): p. 925-38.
 47. West, J.A., et al., *The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites*. *Mol Cell*, 2014. **55**(5): p. 791-802.
 48. Garzon, R., et al., *Expression and prognostic impact of lncRNAs in acute myeloid leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(52): p. 18679-84.
 49. Huang, H.H., et al., *Long non-coding RNA HOXB-AS3 promotes myeloid cell proliferation and its higher expression is an adverse prognostic marker in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 617.
 50. Papaioannou, D., et al., *The long non-coding RNA HOXB-AS3 regulates ribosomal RNA transcription in NPM1-mutated acute myeloid leukemia*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 5351.
 51. Kim, Y.-K., *RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2022. **54**(4): p. 455-465.
 52. Toden, S., T.J. Zumwalt, and A. Goel, *Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021. **1875**(1): p. 188491.
 53. Zhu, Y., et al., *RNA-based therapeutics: an overview and prospectus*. *Cell Death Dis*, 2022. **13**(7): p. 644.
 54. Fang, E., et al., *Advances in COVID-19 mRNA vaccine development*. *Signal Transduct Target Ther*, 2022. **7**(1): p. 94.
 55. Rojas, L.A., et al., *Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer*. *Nature*, 2023. **618**(7963): p. 144-150.
 56. Tan, F., et al., *LncRNA SBF2-AS1: A Budding Star in Various Cancers*. *Curr Pharm Des*, 2022. **28**(18): p. 1513-1522.
 57. Tian, Y.J., et al., *Long noncoding RNA SBF2-AS1 act as a ceRNA to modulate cell proliferation via binding with miR-188-5p in acute myeloid leukemia*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019. **47**(1): p. 1730-1737.
 58. Wang, G., et al., *Circulating lnc-LOC as a novel noninvasive biomarker in the treatment surveillance of acute promyelocytic leukaemia*. *BMC Cancer*, 2022. **22**(1):

- p. 481.
59. Liu, S., et al., *Prognostic value and potential mechanism of long non-coding RNA Lnc-SMIM20-1 in acute myeloid leukemia*. Expert Rev Anticancer Ther, 2022. **22**(8): p. 875-885.
 60. Wang, Y., Q. Zhou, and J.J. Ma, *High expression of lnc-CRNDE presents as a biomarker for acute myeloid leukemia and promotes the malignant progression in acute myeloid leukemia cell line U937*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(3): p. 763-770.
 61. Guan, X., et al., *Lnc-SOX6-1 upregulation correlates with poor risk stratification and worse treatment outcomes, and promotes cell proliferation while inhibits apoptosis in pediatric acute myeloid leukemia*. Int J Lab Hematol, 2019. **41**(2): p. 234-241.
 62. El-Khazragy, N., et al., *The prognostic significance of the long non-coding RNAs "CCAT1, PVT1" in t(8;21) associated Acute Myeloid Leukemia*. Gene, 2019. **707**: p. 172-177.
 63. El-Khazragy, N., et al., *Interaction between 12p chromosomal abnormalities and Lnc-HOTAIR mediated pathway in acute myeloid leukemia*. J Cell Biochem, 2019. **120**(9): p. 15288-15296.
 64. Gao, S., et al., *Long noncoding RNA HOTAIR promotes the self-renewal of leukemia stem cells through epigenetic silencing of p15*. Exp Hematol, 2018. **67**: p. 32-40 e3.
 65. Hao, S. and Z. Shao, *HOTAIR is upregulated in acute myeloid leukemia and that indicates a poor prognosis*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(6): p. 7223-8.
 66. Hu, L., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR regulates myeloid differentiation through the upregulation of p21 via miR-17-5p in acute myeloid leukaemia*. RNA Biol, 2021. **18**(10): p. 1434-1444.
 67. Zhou, W., et al., *HOTAIR suppresses PTEN via DNMT3b and confers drug resistance in acute myeloid leukemia*. Hematology, 2021. **26**(1): p. 170-178.
 68. Wang, X., et al., *Long non-coding RNA taurine-upregulated gene 1 correlates with poor prognosis, induces cell proliferation, and represses cell apoptosis via targeting aurora kinase A in adult acute myeloid leukemia*. Ann Hematol, 2018. **97**(8): p. 1375-1389.
 69. Wei, S., et al., *PU.1 controls the expression of long noncoding RNA HOTAIRMI during granulocytic differentiation*. J Hematol Oncol, 2016. **9**(1): p. 44.
 70. Chen, L., et al., *HOTAIRMI knockdown enhances cytarabine-induced cytotoxicity by suppression of glycolysis through the Wnt/beta-catenin/PFKFB3 pathway in acute myeloid leukemia cells*. Arch Biochem Biophys, 2020. **680**: p. 108244.
 71. Shi, X., et al., *Overexpression of ZEB2-AS1 lncRNA is associated with poor clinical outcomes in acute myeloid leukemia*. Oncol Lett, 2019. **17**(6): p. 4935-4947.
 72. Jiang, Z., Q. Yu, and X. Luo, *Identification of long non-coding RNA MVIH as a prognostic marker and therapeutic target in acute myeloid leukemia*. J Clin Lab Anal, 2020. **34**(4): p. e23113.
 73. Ke, S. and X. Zhou, *LncRNA MVIH knockdown inhibits the malignancy progression through downregulating miR-505 mediated HMGB1 and CCNE2 in acute myeloid leukemia*. Transl Cancer Res, 2019. **8**(7): p. 2526-2534.
 74. Chen, B., et al., *Long non-coding RNA LINC01268 promotes cell growth and inhibits cell apoptosis by modulating miR-217/SOS1 axis in acute myeloid leukemia*. Braz J Med Biol Res, 2020. **53**(8): p. e9299.
 75. Yan, J., et al., *Long non-coding RNA MIR17HG sponges microRNA-21 to upregulate PTEN and regulate homoharringtonine-based chemoresistance of acute myeloid leukemia cells*. Oncol Lett, 2022. **23**(1): p. 24.
 76. Zhang, X.M., et al., *LncRNA HOXB-AS3 promotes hepatoma by inhibiting p53*

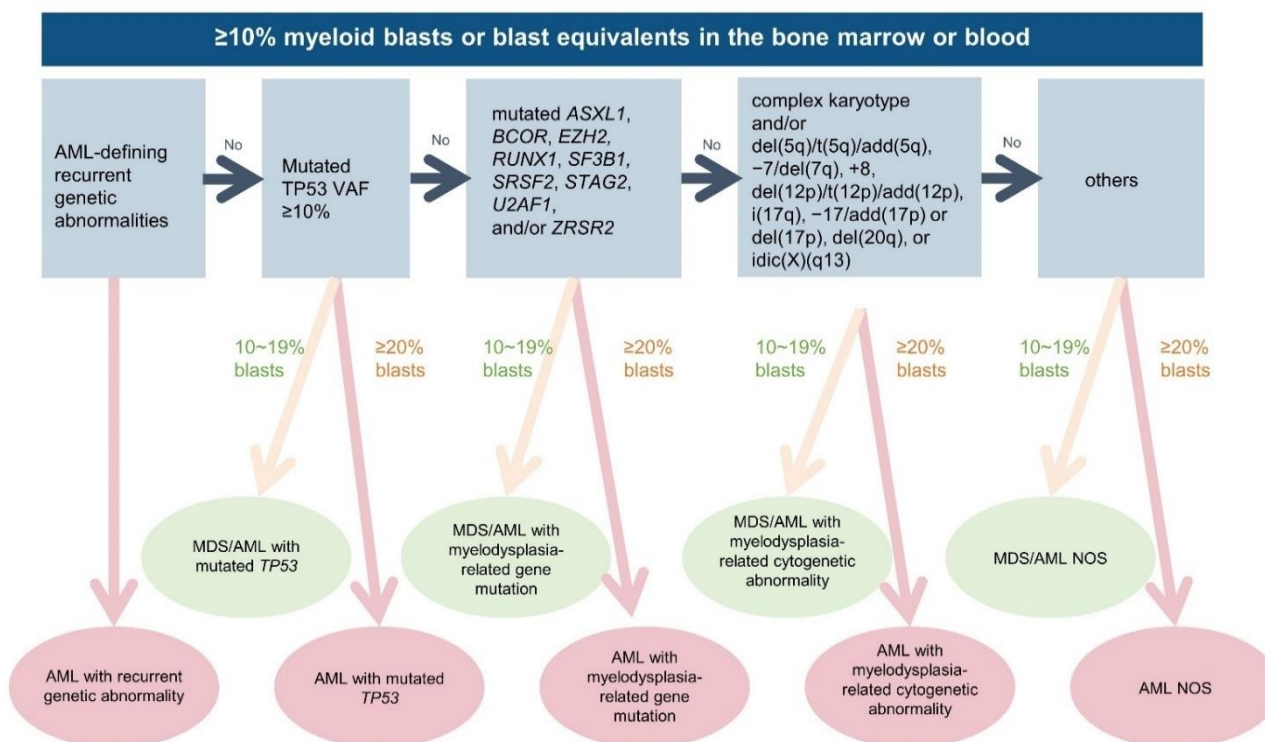
- expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018. **22**(20): p. 6784-6792.
77. Wu, C., et al., *Alternative splicing of HOXB-AS3 underlie the promoting effect of nuclear m6A reader YTHDC1 on the self-renewal of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia*. *Int J Biol Macromol*, 2023. **237**: p. 123990.
78. Zhuang, X.H., Y. Liu, and J.L. Li, *Overexpression of long noncoding RNA HOXB-AS3 indicates an unfavorable prognosis and promotes tumorigenesis in epithelial ovarian cancer via Wnt/beta-catenin signaling pathway*. *Biosci Rep*, 2019. **39**(8).
79. Xu, S., et al., *LncRNA HOXB-AS3 promotes growth, invasion and migration of epithelial ovarian cancer by altering glycolysis*. *Life Sci*, 2021. **264**: p. 118636.
80. Jiang, W., et al., *lncRNA HOXB-AS3 exacerbates proliferation, migration, and invasion of lung cancer via activating the PI3K-AKT pathway*. *J Cell Physiol*, 2020. **235**(10): p. 7194-7203.
81. Leng, F., et al., *A micro-peptide encoded by HOXB-AS3 promotes the proliferation and viability of oral squamous cell carcinoma cell lines by directly binding with IGF2BP2 to stabilize c-Myc*. *Oncol Lett*, 2021. **22**(4): p. 697.
82. Xing, Y., et al., *Long non-coding RNA (lncRNA) HOXB-AS3 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by regulating ADAM9 expression through targeting miR-498-5p in endometrial carcinoma*. *J Int Med Res*, 2021. **49**(6): p. 3000605211013548.
83. Zhou, Q., et al., *LncRNA HOXB-AS3 binding to PTBP1 protein regulates lipid metabolism by targeting SREBP1 in endometrioid carcinoma*. *Life Sci*, 2023. **320**: p. 121512.
84. Eklund, E., *The role of Hox proteins in leukemogenesis: insights into key regulatory events in hematopoiesis*. *Crit Rev Oncog*, 2011. **16**(1-2): p. 65-76.

附錄

附圖

附圖 1. 國際共識分類組織（International Consensus Classification，ICC）之急性骨髓性白血病及骨髓分化不良症候群分類原則

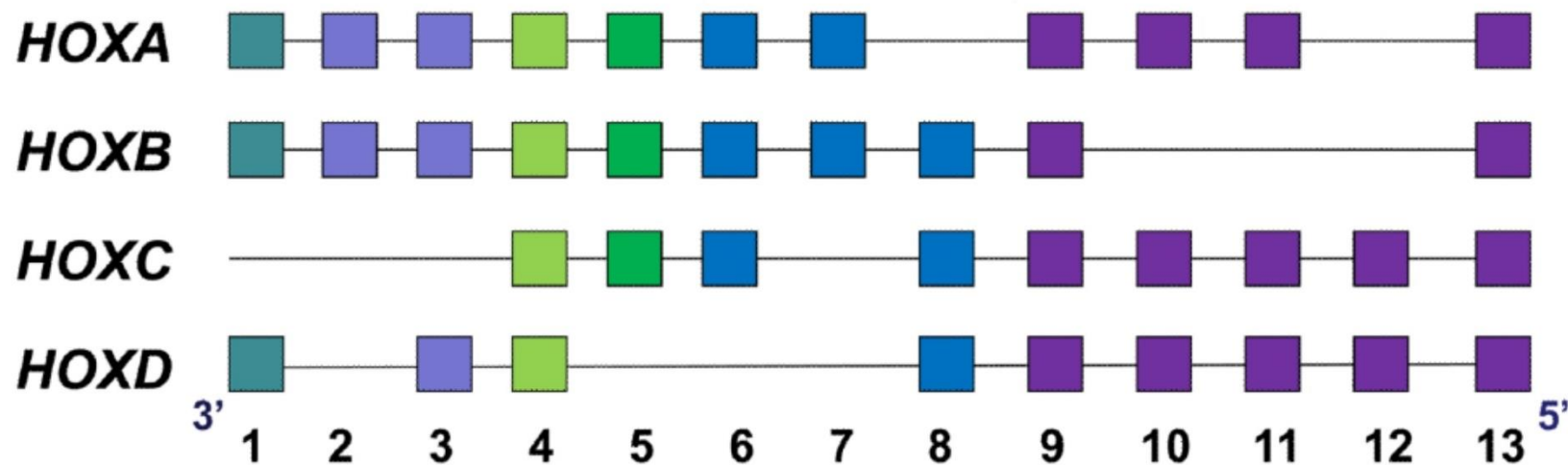
（摘錄自 Dohner, H., et al., Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. Blood, 2022. 140(12): p. 1345-1377） [5]





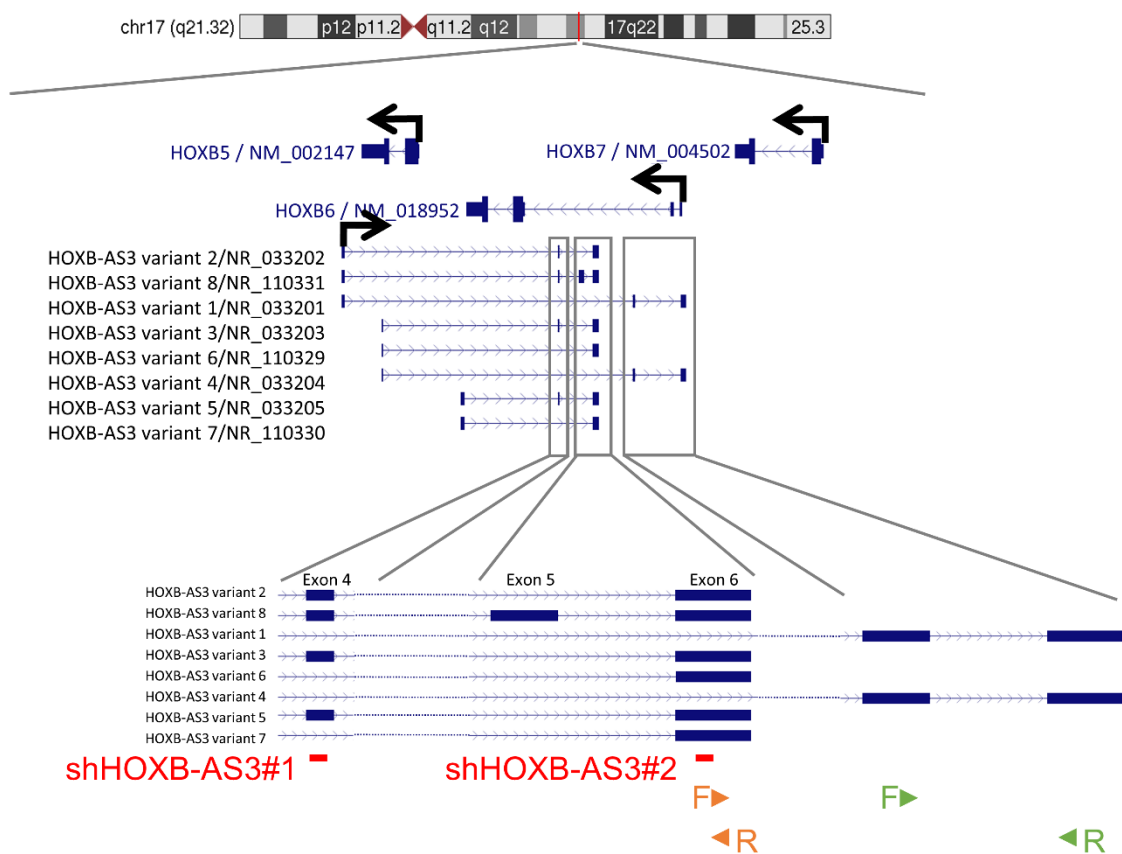
附圖 2. *HOX* 群組基因

(摘錄自 Eklund, E., The role of Hox proteins in leukemogenesis: insights into key regulatory events in hematopoiesis. Crit Rev Oncog, 2011. 16(1-2): p. 65-76.) [84]



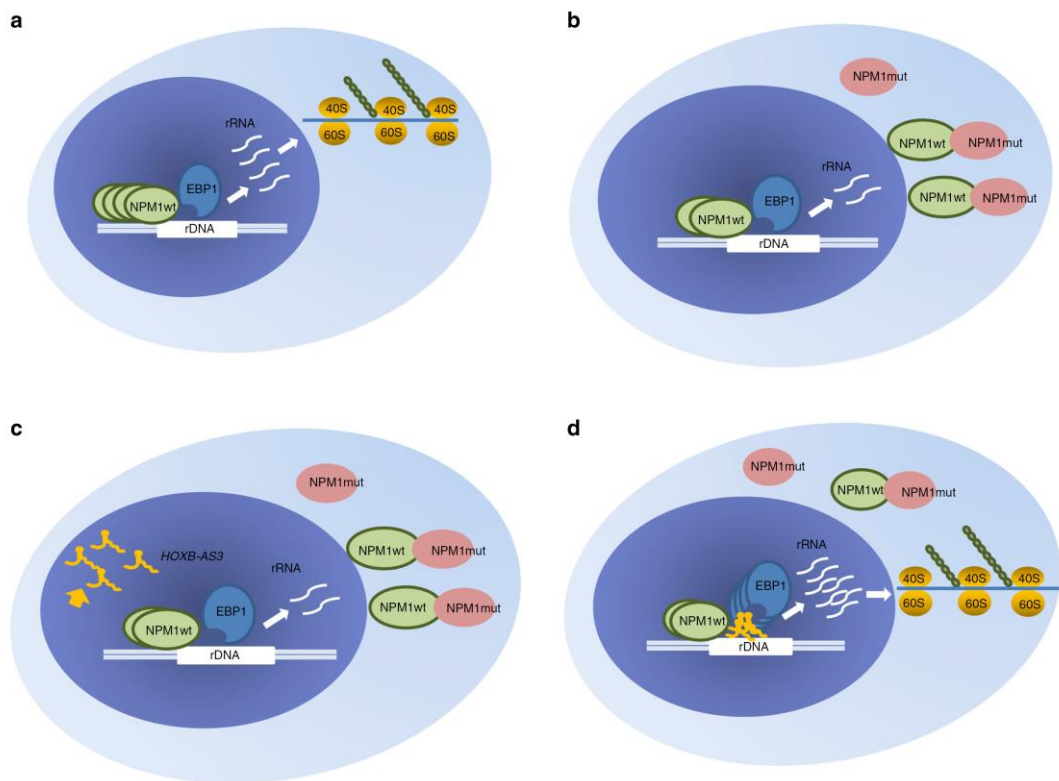
附圖 3. *HOXB-AS3* 之 PCR 引子與外顯子相對位置圖。

黑色箭號表示基因轉錄的方向。在 *HOXB-AS3* 不同的 variant 前，我們都將其代表的序列號碼標示在圖上 (NCBI Reference Sequence numbers, RefSeq)。橘色箭號為 variant 2/3/5 的引子，綠色箭為 variant 1/4 的引子。紅色為 shRNA 的位置。



附圖 4. *HOXB-AS3* 在帶有 *NPM1* 突變急性骨髓性白血病細胞內之功能。

(a) 當 *NPM1* 基因為正常時，NPM1 蛋白質大多位在細胞核內，與 EBP1 蛋白質結合，執行其轉錄 *rDNA* 基因的功能，即轉錄出 *rRNA*。(b) *NPM1* 突變會造成突變的 NPM1 蛋白質將正常的 NPM1 蛋白質一起移動至細胞質，減少轉錄 *rRNA*。(c) *NPM1* 突變會使得 *HOXB-AS3* 表現增加。(d) 增加的 *HOXB-AS3*，會將更多的 EBP1 蛋白質帶到細胞核內，與 NPM1 蛋白質一起促進 *rDNA* 基因的表現，轉錄出更多的 *rRNA*，促進細胞生長分。(摘錄自 Papaioannou, D., et al., The long non-coding RNA *HOXB-AS3* regulates ribosomal RNA transcription in *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia. Nat Commun, 2019. 10(1): p. 5351.) [50]



附表

附表 1. 世界衛生組織（World Health Organization，WHO）2022 年發表之血液惡性疾病分類，急性骨髓性白血病（acute myeloid leukemia，AML）

（節錄自 Khoury, J.D., et al., The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 2022. 36(7): p. 1703-1719.） [2]

Acute myeloid leukaemia with defining genetic abnormalities

- Acute promyelocytic leukaemia with *PML::RARA* fusion
- Acute myeloid leukaemia with *RUNX1::RUNX1T1* fusion
- Acute myeloid leukaemia with *CBFB::MYH11* fusion
- Acute myeloid leukaemia with *DEK::NUP214* fusion
- Acute myeloid leukaemia with *RBM15::MRTFA* fusion
- Acute myeloid leukaemia with *BCR::ABL1* fusion
- Acute myeloid leukaemia with *KMT2A* rearrangement
- Acute myeloid leukaemia with *MECOM* rearrangement
- Acute myeloid leukaemia with *NUP98* rearrangement
- Acute myeloid leukaemia with *NPM1* mutation
- Acute myeloid leukaemia with *CEBPA* mutation
- Acute myeloid leukaemia, myelodysplasia-related
- Acute myeloid leukaemia with other defined genetic alterations

Acute myeloid leukaemia, defined by differentiation

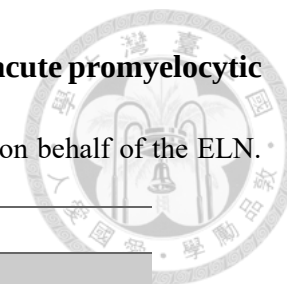
- Acute myeloid leukaemia with minimal differentiation
 - Acute myeloid leukaemia without maturation
 - Acute myeloid leukaemia with maturation
 - Acute basophilic leukaemia
 - Acute myelomonocytic leukaemia
 - Acute monocytic leukaemia
 - Acute erythroid leukaemia
 - Acute megakaryoblastic leukaemia
-

附表 2. 國際共識分類組織 (International Consensus Classification, ICC) 2022 年發表之血液惡性疾病分類, 急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) (節錄自 Arber, D.A., et al., International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. Blood, 2022. 140(11): p. 1200-1228.) [3]

Acute promyelocytic leukemia (APL) with t(15;17)(q24.1;q21.2)/*PML::RARA* $\geq 10\%$
 APL with other *RARA* rearrangements $\geq 10\%$
 AML with t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1* $\geq 10\%$
 AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB::MYH11* $\geq 10\%$
 AML with t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3::KMT2A* $\geq 10\%$
 AML with other *KMT2A* rearrangements $\geq 10\%$
 AML with t(6;9)(p22.3;q34.1)/*DEK::NUP214* $\geq 10\%$
 AML with inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/*GATA2; MECOM(EV1)* $\geq 10\%$
 AML with other *MECOM* rearrangements $\geq 10\%$
 AML with other rare recurring translocations† $\geq 10\%$
 AML with t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1* $\geq 20\%$
 AML with mutated *NPM1* $\geq 10\%$
 AML with in-frame bZIP *CEBPA* mutations $\geq 10\%$
 AML and MDS/AML with mutated *TP53* 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML)
 AML and MDS/AML with myelodysplasia-related gene mutations 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML)
 Defined by mutations in *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, or *ZRSR2*
 AML with myelodysplasia-related cytogenetic abnormalities 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML)
 Defined by detecting a complex karyotype (≥ 3 unrelated clonal chromosomal abnormalities in the absence of other class-defining recurring genetic abnormalities), del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) or del(17p), del(20q), and/or idic(X)(q13) clonal abnormalities
 AML not otherwise specified (NOS) 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML)
 Myeloid sarcoma

†Acute myeloid leukemia (AML) with other rare recurring translocations

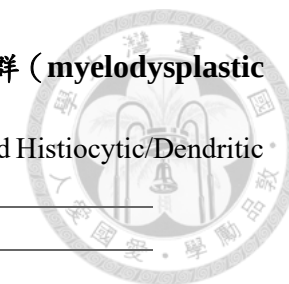
- o AML with t(1;3)(p36.3;q21.3)/*PRDM16::RPN1*
- o AML with t(3;5)(q25.3;q35.1)/*NPM1::MLF1*
- o AML with t(8;16)(p11.2;p13.3)/*KAT6A::CREBBP*
- o AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.1)/*RBM15::MRTF1*
- o AML with t(5;11)(q35.2;p15.4)/*NUP98::NSD1*
- o AML with t(11;12)(p15.4;p13.3)/*NUP98::KMD5A*
- o AML with *NUP98* and other partners
- o AML with t(7;12)(q36.3;p13.2)/*ETV6::MNX1*
- o AML with t(10;11)(p12.3;q14.2)/*PICALM::MLLT10*
- o AML with t(16;21)(p11.2;q22.2)/*FUS::ERG*
- o AML with t(16;21)(q24.3;q22.1)/*RUNX1::CBFA2T3*
- o AML with inv(16)(p13.3;q24.3)/*CBFA2T3::GLIS2*



附表 3. 歐洲白血病治療聯盟 (European Leukemia Net, ELN) 非急性前髓性白血病之急骨髓性白血病患者 (non-acute promyelocytic leukemia acute myeloid leukemia, non-APL AML) 風險分群

(節錄自 Dohner, H., et al., Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. Blood, 2022. 140(12): p. 1345-1377.) [5]

Risk category	Genetic abnormality
Favorable	• t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 • inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/ CBFB::MYH11 • Mutated NPM1 without FLT3-ITD • bZIP in-frame mutated CEBPA
Intermediate	• Mutated NPM1 with FLT3-ITD • Wild-type NPM1 with FLT3-ITD (without adverse-risk genetic lesions) • t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A • Cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	• t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214 • t(v;11q23.3)/KMT2A-rearranged • t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 • t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP • inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ GATA2, MECOM(EVI1) • t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)-rearranged • -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) • Complex karyotype, monosomal karyotype • Mutated ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, and/or ZRSR2 • Mutated TP53



附表 4. 世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 2022 年發表之血液惡性疾病分類，骨髓分化不良症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS)

(節錄自 Khoury, J.D., et al., The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia, 2022. 36(7): p. 1703-1719.) [2]

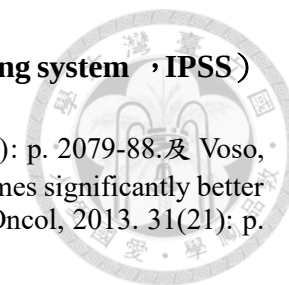
	Blasts	Cytogenetics	Mutations
MDS with defining genetic abnormalities			
MDS with low blasts and isolated 5q deletion (MDS-5q)	<5% BM and <2% PB	5q deletion alone, or with 1 other abnormality other than monosomy 7 or 7q deletion	
MDS with low blasts and <i>SF3B1</i> mutation (MDS- <i>SF3B1</i>)		Absence of 5q deletion, monosomy 7, or complex karyotype	<i>SF3B1</i>
MDS with biallelic <i>TP53</i> inactivation (MDS-bi <i>TP53</i>)	<20% BM and PB	Usually complex	Two or more <i>TP53</i> mutations, or 1 mutation with evidence of <i>TP53</i> copy number loss or cnLOH
MDS, morphologically defined			
MDS with low blasts (MDS-LB)	<5% BM and <2% PB		
MDS, hypoplastic(MDS-h)			
MDS with increased blasts (MDS-IB)			
MDS-IB1	5–9% BM or 2–4% PB		
MDS-IB2	10-19% BM or 5–19% PB or Auer rods		
MDS with fibrosis (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB		



附表 5. 國際共識分類組織（International Consensus Classification，ICC）2022 年發表之血液惡性疾病分類，骨髓分化不良症候群（myelodysplastic syndrome，MDS）

（節錄自 Arber, D.A., et al., International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. Blood, 2022. 140(11): p. 1200-1228.） [3]

	Dysplastic lineages	Cytopenias	Cytoses	BM and PB Blasts	Cytogenetics	Mutations
MDS with mutated <i>SF3B1</i> (MDS- <i>SF3B1</i>)	Typically ≥ 1	≥ 1	0	<5% BM <2% PB	Any, except isolated del(5q), -7/del(7q), abn3q26.2, or complex	<i>SF3B1</i> ($\geq 10\%$ VAF), without multi-hit <i>TP53</i> , or <i>RUNX1</i>
MDS with del(5q) [MDS-del(5q)]	Typically ≥ 1	≥ 1	Thrombocytosis allowed	<5% BM <2% PB	del(5q), with up to 1 additional, except -7/del(7q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i>
MDS, NOS without dysplasia	0	≥ 1	0	<5% BM <2% PB	-7/del(7q) or complex	Any, except multi-hit <i>TP53</i> or <i>SF3B1</i> ($\geq 10\%$ VAF)
MDS, NOS with single lineage dysplasia	1	≥ 1	0	<5% BM <2% PB	Any, except not meeting criteria for MDS-del(5q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i> ; not meeting criteria for MDS- <i>SF3B1</i>
MDS, NOS with multilineage dysplasia	≥ 2	≥ 1	0	<5% BM <2% PB	Any, except not meeting criteria for MDS-del(5q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i> ; not meeting criteria for MDS- <i>SF3B1</i>
MDS with excess blasts (MDS-EB)	Typically ≥ 1	≥ 1	0	5-9% BM, 2-9% PB	Any	Any, except multi-hit <i>TP53</i>
MDS/AML	Typically ≥ 1	≥ 1	0	10-19% BM or PB	Any, except AML-defining	Any, except <i>NPM1</i> , bZIP <i>CEBPA</i> or <i>TP53</i>



附表 6. 骨髓分化不良症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)之國際預後評分系統(international prognostic scoring system, IPSS) 及其修正版本 (Revised IPSS)

(節錄自 Greenberg, P., et al., International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood, 1997. 89(6): p. 2079-88.及 Voso, M.T., et al., Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. J Clin Oncol, 2013. 31(21): p. 2671-7.) [9, 10]

IPSS[9]

Prognostic Variable	Score Value				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
BM blasts (%)	<5	5-10	—	11-20	21-30
Karyotype*	Good	Intermediate	Poor		
Cytopenias	0/1	2/3			

Scores for risk groups are as follows: Low, 0; INT-1, 0.5-1.0; INT-2, 1.5-2.0; and High, ≥ 2.5 .

***Karyotype:** Good, normal, $-Y$, $\text{del}(5q)$, $\text{del}(20q)$; Poor, complex (≥ 3 abnormalities) or chromosome 7 anomalies; Intermediate, other abnormalities.

Revised IPSS[10]

Prognostic variable	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cytogenetics	Very good	—	Good	—	Intermediate	Poor	Very poor
BM blast, %	≤ 2	—	$> 2\% - < 5\%$	—	$5\% - 10\%$	$> 10\%$	—
Hemoglobin	≥ 10	—	$8 - < 10$	< 8	—	—	—
Platelets	≥ 100	$50 - < 100$	< 50	—	—	—	—
ANC	≥ 0.8	< 0.8	—	—	—	—	—

Scores for risk groups are as follows: very low, ≤ 1.5 ; low, $> 1.5 - 3$; intermediate, $> 3 - 4.5$; high, $> 4.5 - 6$; very high, > 6

Cytogenetic Scoring System:

Very good: $-Y$, $\text{del}(11q)$

Good: Normal, $\text{del}(5q)$, $\text{del}(12p)$, $\text{del}(20q)$, double including $\text{del}(5q)$

Intermediate: $\text{del}(7q)$, $+8$, $+19$, $i(17q)$, any other single or double independent clones

Poor: -7 , $\text{inv}(3)/\text{t}(3q)/\text{del}(3q)$, double including $-7/\text{del}(7q)$, complex: 3 abnormalities

Very poor: Complex: > 3 abnormalities

R 語法



```
# install R package
install.packages("ComplexHeatmap")
install.packages("circlize")

# call the package
library(ComplexHeatmap)
library(circlize)

# Read the mutation data table into R (replace 'mutation_data.csv' with your file name)
mutation_data <- read.csv(file.choose(), header = TRUE, row.names = 1)

# Convert the mutation data table into a matrix
mutation_matrix <- as.matrix(mutation_data)

# define the labels
alter_fun = list(
  background = function(x, y, w, h)
    grid.rect(x, y, w*0.9, h*0.9, gp = gpar(fill = "#CCCCCC", col = NA)),
  # red rectangles
  high = function(x, y, w, h)
    grid.rect(x, y, w*0.9, h*0.9, gp = gpar(fill = "#fb8072", col = NA)),
  # blue rectangles
  low = function(x, y, w, h)
    grid.rect(x, y, w*0.9, h*0.9, gp = gpar(fill = "#80b1d3", col = NA)),
  # green rectangles
  mut = function(x, y, w, h)
    grid.rect(x, y, w*0.9, h*0.9, gp = gpar(fill = "#984ea3", col = NA)),
  # white rectangles
  no = function(x, y, w, h)
    grid.rect(x, y, w*0.9, h*0.9, gp = gpar(fill = "#FFFFFF", col = NA))
)
```

```
# draw the gene mutation heatmap
```

```
oncoPrint(mutation_matrix,
```

```
    alter_fun = alter_fun,
```

```
    row_order = 1:nrow(mutation_matrix),
```

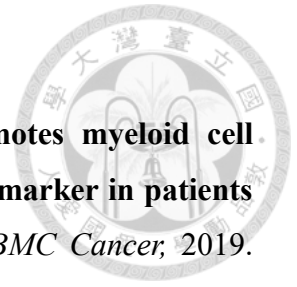
```
    column_order = 1:ncol(mutation_matrix),
```

```
    col = c(mut = "#984ea3", low = "#fb8072", high = "#80b1d3", no =  
"#FFFFFF")  
)
```



原始已發表之論文

Huang, H.H., et al., **Long non-coding RNA HOXB-AS3 promotes myeloid cell proliferation and its higher expression is an adverse prognostic marker in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.** *BMC Cancer*, 2019. 19(1): p. 617.



修業期間發表之論文

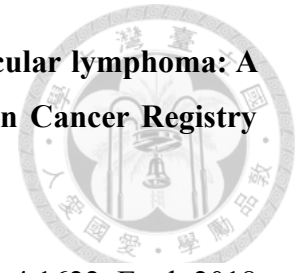
Major publications 主要論文：

1. **Long non-coding RNA HOXB-AS3 promotes myeloid cell proliferation and its higher expression is an adverse prognostic marker in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.**
Huang HH, Chen FY, Chou WC, Hou HA, Ko BS, Lin CT, Tang JL, Li CC, Yao M, Tsay W, Hsu SC, Wu SJ, Chen CY, Huang SY, Tseng MH, Tien HF, Chen RH.
BMC Cancer. 2019 Jun 24;19(1):617. doi: 10.1186/s12885-019-5822-y.
2. **The epidemiology, treatment patterns, healthcare utilizations and costs of Acute Myeloid Leukaemia (AML) in Taiwan.**
Huang HH, Chen CM, Wang CY, Hsu WW, Chen HM, Ko BS, Hsiao FY.
PLoS One. 2022 Jan 21;17(1):e0261871. doi: 10.1371/journal.pone.0261871.
eCollection 2022.
3. **Real-World Outcomes of Patients with Acute Myeloid Leukemia in Taiwan: A Nationwide Population-Based Study, 2011-2015.**
Wang CY, Huang HH (Co-first author), Chen HM, Hsiao FY, Ko BS.
Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2021 Mar 29:S2152-2650(21)00112-9. doi: 10.1016/j.clml.2021.03.010. Online ahead of print.
4. **Antiviral prophylaxis for hepatitis B carriers improves the prognosis of diffuse large B cell lymphoma in Taiwan – a population-based study.**
Huang HH, Hsiao FY, Chen HM, Wang CY, Ko BS.
Br J Haematol. 2021 Jan;192(1):110-118. doi: 10.1111/bjh.17142. Epub 2020 Oct 31.
5. **Frontline treatments in extremely elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study in Taiwan, 2010-2015.**
Huang HH, Ko BS, Chen HM, Chen LJ, Wang CY, Hsiao FY.
Immun Ageing. 2020;17:17. Published 2020 Jun 10. doi:10.1186/s12979-020-00188-8.
6. **Women with Diffuse Large B Cell Lymphoma Benefit More from Rituximab-Containing Chemotherapy.**
Huang HH, Hsiao FY, Chen LJ, Chen HM, and Ko BS.
Journal Of Women 'S Health. 2019 Feb;28(2):203-211. doi: 10.1089/jwh.2018.6949.
Epub 2018 Jun 20.

7. **Rituximab maintenance improves overall survival in follicular lymphoma: A retrospective nationwide real- world analysis from Taiwan Cancer Registry Database.**

Huang HH, Wen YC, Chen HM, Hsiao FY, Ko BS.

Cancer Medicine. 2018 Aug;7(8):3582-3591. doi: 10.1002/cam4.1622. Epub 2018 Jul 15.



Other publications 其他論文：

8. **Bone Marrow Histology in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis.**

Yu SC, Cheng CL, Huang HH, Lo HT, Liu YJ, Hsieh HP, Chao HL, Wang YH, Hsu CA, Teng SC.

Arch Pathol Lab Med. 2022 Jun 23. doi: 10.5858/arpa.2021-0381-OA. Online ahead of print.

9. **Blood cell and marrow changes in patients with Kikuchi disease.**

Yu SC, Huang HH, Chen CN, Chen TC, Yang TL.

Haematologica. 2022 Apr 28. doi: 10.3324/haematol.2022.280746. Online ahead of print.

10. **Management of metastatic renal cell carcinoma following prior vascular endothelial growth factor-targeted therapy: A real-world retrospective study from Taiwan.**

Chung HJ, Chang YH, Huang YH, Lin TP, Wei TC, Lin FJ, Huang HH, Wang HC.

J Chin Med Assoc. 2022 Apr 1;85(4):438-442.

doi: 10.1097/JCMA.0000000000000701.

11. **Tyrosine Kinase Inhibitors and Vascular Adverse Events in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: A Population-Based, Propensity Score-Matched Cohort Study.**

Chen MT, Huang ST, Lin CW, Ko BS, Chen WJ, Huang HH, Hsiao FY.

Oncologist. 2021 Nov;26(11):974-982. doi: 10.1002/onco.13944. Epub 2021 Sep 12.

12. **Busulfan-containing conditioning regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia: A Taiwan observational study.**

Wang YH, Tien FM, Tsai CH, Huang HH, Liu JH, Liao XW, Tang JL, Yao M, Ko BS.

- Cancer Rep* (Hoboken). 2021 Jun 30:e1488. doi: 10.1002/cnr2.1488. Online ahead of print.
13. **Epidemiology, treatment patterns and survival of chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) in Taiwan, 2006-2015.**
Ko BS, Chen LJ, Huang HH, Chen HM, Hsiao FY.
Int J Clin Pract. 2021 Apr 22:e14258. doi: 10.1111/ijcp.14258. Online ahead of print.
14. **False-positive Aspergillus Galactomannan Immunoassays Associated With Intravenous Human Immunoglobulin Administration.**
Liu WD, Lin SW, Shih MC, Su CL, Wang WY, Lin SC, Lee YF, Huang HH, Chou WC, Wu UI, Chen YC, Chang SC.
Clin Microbiol Infect. 2020 Feb 12;S1198-743X(20)30081-1. doi: 10.1016/j.cmi.2020.02.002. Online ahead of print.
15. **Subtype-specific epidemiology of lymphoid malignancies in Taiwan compared to Japan and the United States, 2002-2012.**
Ko BS, Chen LJ, Huang HH, Wen YC, Liao CY, Chen HM, Hsiao FY.
Cancer Medicine. 2018 Nov;7(11):5820-5831. doi: 10.1002/cam4.1762. Epub 2018 Oct 9.
16. **Clinically validated machine learning algorithm for detecting residual diseases with multicolor flow cytometry analysis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.**
Ko BS, Wang YF, Li JL, Li CC, Weng PF, Hsu SC, Hou HA, Huang HH, Yao M, Lin CT, Liu JH, Tsai CH, Huang TC, Wu SJ, Huang SY, Chou WC, Tien HF, Lee CC, Tang JL.
EBioMedicine. 2018 Nov;37:91-100. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.10.042. Epub 2018 Oct 22.
17. **Cervical Papanicolaou Smears in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: High Prevalence of Therapy-Related Atypia during the Acute Phase.**
Yu SC, Huang HH, Li CC, Tang JL, Lee YH, Mao TL, Kuo KT, Lin CT, Liu JH, Ko BS, Yao M.
Biol Blood Marrow Transplant. 2017 Aug;23(8):1367-1373.
18. **A 4-lncRNA scoring system for prognostication of adult myelodysplastic syndromes.**
Yao CY, Chen CH, Huang HH, Hou HA, Lin CC, Tseng MH, Kao CJ, Lu TP, Chou

WC and Tien FT.

Blood Advances. 2017 Aug;1:1505-1516.

