



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	次世代シーケンシングを用いた急性骨髄性白血病におけるFLT3-ITD変異の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	横山, 翔大
Description	配架番号 : 2721
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14986号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85863
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YOKOYAMA_Shot_a_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 横山翔大

学 位 論 文 題 名

次世代シーケンシングを用いた急性骨髄性白血病における FLT3-ITD 変異の解析
(Next-generation sequencing based analysis of the FLT3-ITD mutation
in acute myeloid leukemia)

【背景と目的】急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML)は分化・成熟能が障害された幼若骨髄系細胞のクローナルな自律性増殖を特徴とし、骨髄における白血病細胞の異常な増殖の結果、致死的な白血球減少、貧血、血小板減少を呈する。AML は様々な染色体異常・遺伝子異常が発症に関与すると考えられている。FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) 遺伝子変異は AML で最もよくみられるドライバー変異であり、AML 患者の約 3 割にみられる。主なものは FLT3-遺伝子内縦列重複 (internal tandem duplication, ITD) 変異であり、AML の予後不良因子である。FLT3-ITD 変異のクラスター領域である FLT3 exon14 の回文様配列の存在や、FLT3-ITD 変異陽性 AML では 1 症例に複数の ITD 変異が生じることが報告されている。これらの事実等より FLT3 遺伝子はゲノム損傷が起きやすいと言われるが、FLT3-ITD の発症機序の詳細は未解明である。これらの背景を踏まえ、AML 検体の FLT3-ITD のクラスター領域を次世代シーケンシング (next-generation sequencing, NGS)を用いて詳細に解析し、FLT3-ITD の発症機序を明らかにすることを目的とした。また、細胞株において実際に FLT3 exon 14 に人工的 DNA 損傷を加えることでどのような DNA 修復が行われるかを解析した。

【材料と方法】FLT3-ITD 変異陽性 AML25 症例と FLT3-ITD 変異陰性 AML20 症例のゲノム DNA をテンプレートとし、FLT3 exon 14-15 領域を polymerase chain reaction, PCR で増幅し、PCR 産物を NGS によるディープシーケンシングで解析した。また、細胞株の FLT3 exon14 の DNA 損傷を行うために clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins9 (CRISPR/Cas9) システムを用いた。まずはヒト細胞株の Human embryonic kidney 293T (293T) における FLT3 exon 14 を二重鎖切断 1 箇所、単鎖切断 1 箇所、単鎖切断 2 箇所の 3 パターンで切断し、ディープシーケンシングで解析した。次にマウス細胞株である NIH-3T3 の Flt3 exon 14 を二重鎖切断 1 箇所、単鎖切断 1 箇所の 2 パターンで切断し、ディープシーケンシングで解析した。最後に FLT3 exon14-15 挿入の plasmid を in vitro で二重鎖切断 1 箇所、単鎖切断 1 箇所、単鎖切断 2 箇所の計 3 パターンで切断し、293T に導入しディープシーケンシングで解析した。

【結果】FLT3-ITD 陽性 AML25 症例のディープシーケンシングを用いた解析では、変異クローンが総計で 206 確認された。FLT3-ITD 変異は 139 クローン確認され、そのうち 33 クローンは一度 ITD が生じた後に、別の ITD が生じた変異クローンであった。我々はこのような同一アリルに 2 度以上の ITD イベントが生じているクローンを Complex ITD と定義し、通常の ITD を

Simple ITD と定義した。Complex ITD の殆どが変異アリル頻度の高い Simple ITD に 2 度目以降の ITD イベントが起きて生じていた。また、欠失変異が 24 症例に計 54 クローン確認された。FLT3-ITD は回文様配列付近に開始・終了ポジションが集中していた。FLT3-ITD 陰性 AML20 症例の解析では変異クローンは 79 確認された。12 症例に計 20 クローンの FLT3-ITD 変異を認めたが、Complex ITD はみられなかった。また、欠失変異は全例に認め、計 53 クローン認めた。FLT3-ITD 変異陽性、陰性で Simple ITD の長さ、発生位置等の特徴に違いはなく、欠失変異も特徴に大きな違いはなかった。FLT3-ITD 変異陽性、陰性の AML とともに回文様配列内に反復性の 6 bp の欠失変異クローンがみられていた。CRISPR/Cas9 システムを用いた 293T、NIH-3T3 の DNA 切断において、二重鎖切断は ITD の形成はなく、単鎖切断でのみ ITD の形成がみられたが全体的に変異クローンの検出数は少なかった。Plasmid を in vitro で切断し、293T にトランスフェクションした実験では二重鎖切断で変異率は高かったが、ITD として修復される割合は低く、また、形成された ITD の長さは短かった。単鎖切断では変異率は二重鎖切断よりは低いものの、1 箇所切断、2 箇所切断ともに塩基が伸長していた変異の多くが ITD として修復されており、ITD 長も二重鎖切断に比べて長く、臨床検体でみられた ITD と似ていた。

【考察】FLT3-ITD 変異陽性 AML にみられた Complex ITD は一度 DNA 損傷を受けた ITD クローンが再び DNA 損傷を受けて生じたと考えられ、FLT3-ITD のクラスター領域が度重なる損傷を受けることを示唆している。欠失変異の存在も FLT3-ITD のクラスター領域が DNA 損傷を受けている証拠であると考えられた。FLT3-ITD の開始、終了ポジションが回文様配列に数多く存在していること、欠失変異の反復性の変異が回文様配列内に存在していることから、変異の形成に回文様配列が深く関わり、FLT3-ITD クラスター領域のゲノム損傷の受けやすさへの寄与が示唆された。我々は FLT3-ITD 変異陰性 AML についても検証を行い、60%の症例に低頻度の ITD クローンを確認した。また、FLT3-ITD 変異陽性 AML と FLT3-ITD 変異陰性 AML に発生する Simple ITD に差は見出せなかった。このことから、ITD 変異が存在していること自体が予後不良なのではなく、ITD 変異クローンが増殖してくることや Complex ITD の有無を含めた ITD 変異の多様性がゲノム不安定性や予後不良に関わっている可能性があると考えられた。細胞株を用いた解析では FLT3 exon 14 の単鎖切断が二重鎖切断よりも効率的に臨床検体に似た ITD 変異を形成した。また、単鎖切断 2 箇所ではなく、単鎖切断 1 箇所でも効率的に ITD が形成された。ただ、今回、DNA 二重鎖切断 1 箇所、単鎖切断 1 箇所、単鎖切断 2 箇所と比較した実験は 293T における plasmid を用いた実験であり、他の細胞株や実際の染色体上の FLT3 exon 14 を切断する検証もしていく必要がある。

【結論】AML 検体のディープシーケンシングで複数回の ITD イベントが生じて形成されたと考えられる変異 (Complex ITD) や欠失変異等の多様なクローンを検出し、FLT3-ITD のクラスター領域がゲノム損傷を絶えず受け、ゲノム脆弱性を有している可能性を示した。また、細胞株での検証では DNA の単鎖切断が FLT3-ITD の形成に深く関与していることが示唆された。