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_Shota_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　横山翔大

主査　　教授　　佐 藤 典 宏
審査担当者　副査　　教授　　真 部 淳
副査　　教授　　園 下 将 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)

審査にあたり、まず副査の園下教授から「Simple ITD が Complex ITD より変異アリル頻度（VAF）が高い症例が多いということは Complex ITD は Simple ITD より増殖アドバンテージを持つわけではないのか。」という質問があり、申請者は「Complex ITD は Simple ITD より増殖アドバンテージを持っているわけではなく、ゲノム損傷が起きやすい環境下にあると VAF の高い Simple ITD を元にして Complex ITD が生じると推測される。」と回答した。また、副査の園下教授からは「細胞に Cas9 タンパクを導入する効率が悪いため FLT3 exon14-15 挿入の plasmid を in vitro で切断し、細胞株に導入するという方法をとったということであったが、細胞株自体に Cas9 タンパクを発現させるという方法はとれないか。FLT3 exon14-15 挿入の plasmid ではヌクレオソーム等の構造が再現できていないのではないか。」と質問があった。申請者は「現在、Cas9 を細胞株に発現させる実験も進めている。FLT3 exon14-15 挿入の plasmid の切断ではヒトの細胞内や細胞株の内因性の FLT3 とは異なった構造をとる可能性はあり、Cas9 を発現させた細胞株の実験の結果とも照らし合わせていきたい。」と回答した。 副査の真部教授からは「今回の臨床検体について、FLT3-ITD 変異陽性・陰性というのは、どのような基準で判断しているのか。」という質問があり申請者は「アガロースゲル電気泳動法で判断している。よって、VAF が 5%以下のクローンや ITD の長さが短いクローンに関しては FLT3-ITD 陽性と判断されない場合がある。」と回答した。また、副査の真部教授から「今回解析した症例の年齢、性別、染色体の核型といった臨床情報はどうなっているのか。」という質問があり、申請者は「今回の症例に関しては年齢・性別・核型もそれぞれ異なっている。FLT3-ITD 陽性の AML は正常核型が多かったが、その他の核型もいた。」と回答した。更に副査の真部教授から「FLT3-ITD 変異は白血病のドライバー変異といえるのか。」という質問があり、申請者は「ドライバー変異と言われる場合もあるが、一症例に複数の ITD クローンがみられること等からは真のドライバー変異とは言い難いと考える。」と回答した。主査の佐藤教授から「FLT3-ITD 陽性 AML で Complex ITD を持つ症例と持たない症例で臨床像、予後に違いはあるか。」という質問があり、申請者は「この 25 症例の中では差がなかった。」と回答した。また、

主査の佐藤教授から「初発時 FLT3-ITD 陽性の AML が再発時に FLT3-ITD 変異陰性となる現象の解釈はどうなっているのか。病期の進行に伴い、変異を獲得するということは理解できるが、喪失するということはどういうことなのか。」 という質問があり、申請者は「FLT3-ITD 変異は芽球の全てに入っているわけではなく、例えば骨髄中の芽球が 90%であっても FLT3-ITD の VAF が 5%であるということもある。よって、治療等により FLT3-ITD を持つクローンの割合が変わり陰性化したようにみえるということも考えられる。そのようなケースでは今回我々が用いた NGS で解析を行うとマイナークローンとして残存する ITD クローンが検出される可能性は十分にある。」と回答した。副査の園下教授から追加で「FLT3-ITD 変異を有しない芽球も存在するのか。その芽球はなぜ増えてくることができるのか。」と質問があった。申請者は「FLT3-ITD は NPM1 変異等の別の遺伝子変異を合併することも多く、ITD 以外の別の変異によって腫瘍化していると思われる。なお、NPM1 変異のみ有する症例は AML の中では予後がよいと言われる。また、NPM1 変異を持たず FLT3-ITD の VAF が高い症例は予後が悪いとされている。」と回答した。その回答を踏まえ、園下教授より「FLT3-ITD は腫瘍化のドライバー変異というよりも悪性化のドライバー変異である可能性がある」とコメントがあった。この論文は、既存の検出方法では検出不能であった、低頻度 ITD クローンの解析法を確立しそれまで知られていなかった FLT3-ITD のクローン進化を明らかにした。また、FLT3-ITD が CRISPR/Cas9 による DNA 損傷により人工的作成が出来ることを示した点において高く評価され、今後の FLT3-ITD 変異の発生機序の解明が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程にける研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。