



# 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 [全文の要約]
Author(s)	横山, 翔大
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2721 他
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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/86126">https://hdl.handle.net/2115/86126</a>
Type	doctoral thesis
File Information	YOKOYAMA_Shota_summary.pdf



# 学位論文（要約）

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)

2022年3月

北海道大学

横山翔大



# 学位論文（要約）

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)

2022年3月

北海道大学

横山翔大

## 【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する多様性に富む血液疾患である。骨髄における白血病細胞の異常な増殖の結果、正常な造血機能は著しく障害され、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】

アガロースゲル電気泳動法で FLT3-ITD 変異陽性と診断された AML25 症例と FLT3-ITD 変異陰性と診断された 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、Cas9 タンパクとヒト FLT3 exon 14 を標的とするガイド RNA をトランスフェクションした。DNA の切断は二重鎖切断 1 箇所、単鎖切断 1 箇所、単鎖切断 2 箇所の 3 パターンで行い、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 に Cas9 タンパクとマウス Flt3 exon 14 を標的とするガイド RNA をトランスフェクションした。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 plasmid にクローニングされた FLT3 exon14-15 領域を 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、切断された plasmid を 293T にトランスフェクション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

な同一アレルに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の殆どが変異アレル頻度の高い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が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の染色体上の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。

#### 【考察と結論】

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箇所でITDとして修復される比率やITD長を比較した実験は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を切断する実験においても更に検証していく必要がある。

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。