



Title	急性骨髄性白血病におけるFLT3-ITD変異の生成機構の検討
Author(s)	吉田, 匠汰
Description	配架番号 : 2963
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16653号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16653
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98263
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIDA_Shota.pdf, 全文



学位論文

急性骨髄性白血病における *FLT3*-ITD 変異の生成機構の検討

(The mechanism of *FLT3*-ITD generation in acute myeloid leukemia)

2025 年 9 月

北 海 道 大 学

吉田 匠汰

学位論文

急性骨髄性白血病における *FLT3*-ITD 変異の生成機構の検討

(The mechanism of *FLT3*-ITD generation in acute myeloid leukemia)

2025 年 9 月

北 海 道 大 学

吉田 匠汰

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	11 頁
結果	21 頁
考察	46 頁
総括と結論	51 頁
謝辞	53 頁
利益相反	54 頁
引用文献	55 頁

【発表論文目録および学発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

著者：Shota Yoshida, Masahiro Onozawa, Shota Yokoyama, Toshihiro Matsukawa, Hideki Goto, Shinsuke Hirabayashi, Takeshi Kondo, Daigo Hashimoto, Yasuhito Onodera, Takanori Teshima

論文タイトル：Peposertib suppresses generation of FLT3-internal tandem duplication formed by contralateral double nicks

学術雑誌名：Experimental Hematology Volume 149, September 2025

PMID: 40456437, DOI: 10.1016/j.exphem.2025.104819

要 旨

【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造血器腫瘍である。*FLT3* (Fms-like tyrosine kinase 3) -ITD (internal tandem duplication, 遺伝子内縦列重複) は傍膜貫通領域のタンパク伸長を来す変異であり、AML で最も多く認めるドライバー変異である。*FLT3*-ITD 陽性 AML は *FLT3* 阻害剤により予後の改善が期待されるものの依然として再発率が高い。また、1 症例に長さや変異アレル頻度 (variant frequency, VAF) の異なる複数の *FLT3*-ITD クローンがオリゴクローナルに存在し、一部の ITD クローンのみが再発に関与する。これまでに *FLT3*-ITD の生成機構は解明されておらず、新規 ITD クローン生成の抑制を期待できる薬剤は存在しない。*FLT3* exon 14 には *FLT3*-ITD のクラスター領域が存在することが知られており、同部位の塩基配列には回文様配列を認める。我々は *FLT3* exon 14 は回文様配列を有することで DNA 損傷を受けやすく、その修復過程で *FLT3*-ITD が生成されるのではないかと仮説を立てた。*FLT3*-ITD の生成機構を解明するために、*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の *FLT3* exon 14-15 領域のディープシーケンシングおよび複数の細胞株において人工的に *FLT3*-ITD を生成し、DNA 損傷形態の違いや DNA 損傷修復経路の障害により ITD の生成効率が変化するかどうかを検証した。

【対象と方法】 2017 年 1 月から 2021 年 2 月までに「急性白血病における遺伝子変異と治療反応性・白血病発症機序の解明」に登録された症例のうち、アガロースゲル電気泳動法で *FLT3*-ITD 陽性と診断された AML20 症例を無作為に抽出し、NGS (Next-generation sequencing) によるディープシーケンシングにて *FLT3* 変異を解析した。また、ヒト上皮細胞、ヒト白血病細胞およびマウス血液細胞においてトランスポゾン法を用いてドキシサイクリン誘導性 Cas9 発現細胞株を樹立し、ヒト *FLT3* exon 14 の回文様配列、またはマウス *Flt3* exon 14 の回文様配列の隣接領域を標的とする guide RNA をトランスフェクションし、標的部位のゲノム損傷による *FLT3*-ITD 生成システムを構築した。DNA 損傷形態による変異生成効率を比較するために、通常の Cas9-nuclease に加え、Nickase 改変型 Cas9-D10A、Cas9-H840A を用いて一箇所の上鎖切断 (double strand break, DSB)、二箇所の上鎖切断、一箇所の下鎖切断 (single strand break, SSB)、二箇所の下鎖切断を施した。また、下鎖切断修復経路を阻害するために olaparib、上鎖切断修復経路を阻害するために peposertib を投与した上で人工的に DNA 損傷を与え、ITD 生成効率が変化するかどうかを検証した。

【結果】 *FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の *FLT3* exon 14-15 領域を NGS にてディープシーケンシングを行った結果、*FLT3*-ITD 陽性 AML には 1 症例に VAF や長さの異なる多様な ITD および欠失変異、挿入変異を *FLT3* exon14-15 領域の回文様配列の近傍に認めた。*FLT3*-ITD の重複結合部分の塩基配列を解析し、1)

重複結合部に塩基挿入 (filler) や微小相同配列 (microhomology) を有さない *FLT3*-ITD、2) 重複結合部に filler を有する *FLT3*-ITD、3) 重複結合部に microhomology を有する *FLT3*-ITD に分類した。CRISPR/Cas9 システムを用いて、HEK293T、K562、TF-1、Ba/F3 に作出した *FLT3*-ITD は、*FLT3* exon 14 の回文様構造近傍で対側鎖における二箇所の単鎖切断を施すことにより、一箇所の二重鎖切断よりも高率に生成された。人工的 *FLT3*-ITD は臨床検体の ITD と類似し、断端結合部分に microhomology を有さないクローンが多くを占めた。人工的 *FLT3*-ITD 配列の開始位置と終了位置は切断部位に完全に一致するのではなく、切断点間の内側で形成された。さらに、HEK293T、K562 において、olaparib の投与下でも *FLT3*-ITD は高率に生成されたが、peposertib の投与下では変異頻度および *FLT3*-ITD の変異比率が統計学的に有意に低下した。また、K562 において DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) をノックアウトした結果、peposertib の投与時と同様、変異頻度および *FLT3*-ITD の比率が統計学的に有意に低下した。

【考察】*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の解析にて、回文様配列近傍に *FLT3*-ITD と欠失変異を認めたが、これはクラスター領域である *FLT3* exon 14 の DNA 損傷により変異生成が行われていることを示唆した。これまで、tandem duplication は、対側鎖に位置する DNA 断端が microhomology を手掛かりに結合し、ずれた状態で修復される、DNA 複製スリッピングにより形成され则认为されてきた。しかし、*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の解析及び人工的 *FLT3*-ITD の解析により重複結合部分の配列には microhomology を有しない ITD が大多数であり、ごく一部だけが ITD の重複結合部位で微小相同性を持つことから、DNA 複製スリッピングによる生成機構の関与は乏しいと考えられた。対側鎖での二箇所の単鎖切断で効率よく *FLT3*-ITD が生成されたこと、ITD 配列の開始位置と終了位置は切断部位に一致するのではなく、切断点間の内側で生成されたこと、ITD の生成には二重鎖切断修復経路が単鎖切断修復経路よりも重要であったことを考慮すると、対側鎖での二箇所の単鎖切断により形成された突出した DNA 断端では、リーディング鎖の伸長に加え、DNA 断端の削り込みが同時に生じ、DNA 断端の削り込みの速度を DNA 複製の速度が上回ることで、複製フォークがすれ違い、NHEJ (non-homologous end joining) にて断端結合することで *FLT3*-ITD が生成され则认为された。peposertib を使用することで、新たな *FLT3*-ITD クローンの生成を抑制可能であることは、*FLT3*-ITD を生じやすい AML、既に *FLT3*-ITD を認めている AML において予後の改善に寄与する可能性が考えられた。

【結論】我々は、ヒト白血病細胞において、*FLT3*-ITD は対側鎖の二箇所の単鎖切断が生じた際に NHEJ による二重鎖切断修復により高率に生成されることを初めて明らかとした。また、DNA 損傷修復経路を標的とする peposertib による *FLT3*-ITD の生成抑制が可能であることを初めて証明した。*FLT3*-ITD 生成には、

これまで予想されていた DNA 複製スリッピングによる tandem duplication 形成モデルでは焦点が当てられていなかった、断端結合の最終ステップにおいて NHEJ が重要であることを明らかにした。

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AML	acute myeloid leukemia
AS	antisense strand
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins9
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
Del	Deletion
Dox	Doxycycline
DSB	double strand break
ELN	European LeukemiaNet
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
gRNA	guide RNA
HEK293T	Human embryonic kidney 293 T
HR	homologous recombination
Ins	Insertion
ITD	internal tandem duplication
JM	juxtamembrane domain
MMEJ	microhomology-mediated end joining
NGS	next-generation sequencing
NHEJ	non-homologous end joining
Opti-MEM	Opti-minimal essential medium
PAM	protospacer adjacent motif
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
S	sense strand
SSB	single strand break
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TKD	tyrosine kinase domain
TK1	tyrosine kinase 1
TK2	tyrosine kinase 2
VAF	variant allele frequency

【緒言】

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造血器腫瘍の一つである。骨髄における白血病細胞の異常増殖の結果、正常な造血機能が著しく阻害され、適切な治療がなされない場合は感染症や出血により短期間で死に至る。AML の発症機序として、染色体転座や逆位に加えて多くの遺伝子変異が同定されてきた (Abdel-Wahab et al, 2013 ; Dohner et al, 2015 ; Cancer Genome Atlas Research et al, 2013)。The Cancer Genome Atlas では、200 例の AML 症例のゲノムあるいはエクソーム解析を行い、複数例で認められる 23 種類の遺伝子変異を同定するとともに、1 症例あたり 13 種の遺伝子変異が蓄積していることを明らかにしている (Cancer Genome Atlas Research et al, 2013)。

Fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) 遺伝子変異には、*FLT3* 遺伝子内縦列重複 (internal tandem duplication, ITD) と *FLT3*-チロシンキナーゼドメイン (tyrosine kinase domain, TKD) 変異があり、*FLT3*-ITD は AML の 25%、*FLT3*-TKD 変異は 7~10% に認められる (Daver et al, 2019)。*FLT3*-TKD 変異は予後不良因子とされていないが、*FLT3*-ITD は AML で最も多く認めるドライバー変異であり、*FLT3* 阻害剤が導入されるまで、*FLT3*-ITD の存在は予後不良のバイオマーカーとされてきた (Grimwade et al, 2016 ; Papaemmanuil et al, 2016)。AML において、*FLT3*-ITD を伴いやすい他の遺伝子変異として、*NPM1* 変異、*NUP98::NSD1*、*DEK::NUP214*、*UBTF*-ITD が知られている (Sandahl et al, 2014 ; Hollink et al, 2011 ; Kronke et al, 2013 ; Kaburagi et al, 2023)。近年、*FLT3* 阻害剤の上市により *FLT3*-ITD を伴う AML は、European LeukemiaNet (ELN) 2022 リスク分類において予後中間群として分類された (Dohner et al, 2022)。しかし、*FLT3* 阻害剤の効果は一時的であり、治癒は期待できない。*FLT3*-ITD を伴う AML は再発率が高いことから、予後のさらなる改善が望まれる (Rebechi et al, 2017 ; Kiyoi et al, 1999 ; Kottaridis et al, 2001)。

FLT3 遺伝子は染色体の 13q12 に位置しており 24 の exon からなる (Kottaridis et al, 2003)。*FLT3* は受容体型チロシンキナーゼの 1 つであるクラス III 受容体型チロシンキナーゼに属し、5 つの免疫グロブリン様ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン (juxtamembrane domain, JM)、傍膜貫通ドメイン、2 つのチロシンキナーゼドメイン (TKD) とその間にあるキナーゼ挿入ドメインと C 末端ドメインからなる (Kiyoi et al, 1998 ; Litzow, 2005) (図 1)。*FLT3*-ITD は多くが *FLT3* 遺伝子の exon 14 と exon 15 に生じ、*FLT3* 受容体の傍膜貫通ドメインかチロシンキナーゼ 1 ドメインに位置する (Kiyoi et al, 1997 ; Kayser et al, 2009 ; Schnittger et al, 2012)。この結果、恒常的な *FLT3* キナーゼ活性を引き起こし、AML 細胞の増殖、生存を導くとされている (Daver et al, 2019)。*FLT3*-ITD の生じ

る場所と *FLT3*-ITD の重複する塩基の長さは症例により異なるが、常に 3 の倍数 (3N) bp であり、インフレーム変異であることが報告されている (Kiyoi et al, 1997 ; Kiyoi et al, 1998 ; Nakao et al, 1996)。 *FLT3*-ITD の長さは 3 bp から 400 bp と様々である (図 1) (Thiede et al, 2002 ; Ma et al, 2011 ; Litzow, 2005)。その伸長により、 *FLT3* の自己リン酸化を抑制する自己制御領域としての機能を失い、 *FLT3* は恒常的に活性化された状態となり、リガンド非依存性のシグナル伝達と STAT5 リン酸化を介した細胞増殖が引き起こされる (Grundler et al, 2005)。 *FLT3* exon 14 には図 2A に示すような *FLT3*-ITD 発生のクラスター領域が知られており、クラスター領域の塩基配列は図 2B に示すような回文様配列を呈する (Kiyoi et al, 1998 ; Borrow et al, 2019)。また、放射線誘発性 AML および CALM-AF10 トランスジェニックマウスを含むマウス AML モデルにおいて、 *Flt3*-ITD が自然発生したことが報告されている (Finnon et al, 2012 ; Novak et al, 2012)。マウスの *Flt3* exon 14 にもヒトと同じような回文様配列が認められる (図 2C)。回文様配列は短い逆向きの反復配列のことを指し、パリンδροーム様配列とも呼ばれる (Lu et al, 2015 ; Finnon et al, 2012 ; Kiyoi et al, 1998)。回文様配列によって誘導されるヘアピン構造は、遺伝的に不安定で、DNA 損傷を受けやすく、遺伝子変異を生じやすいことが報告されている (Lu et al, 2007 ; Lu et al, 2015)。ヒトの *FLT3* とマウスの *Flt3* の回文様配列には 80% の相同性がある (図 2D)。

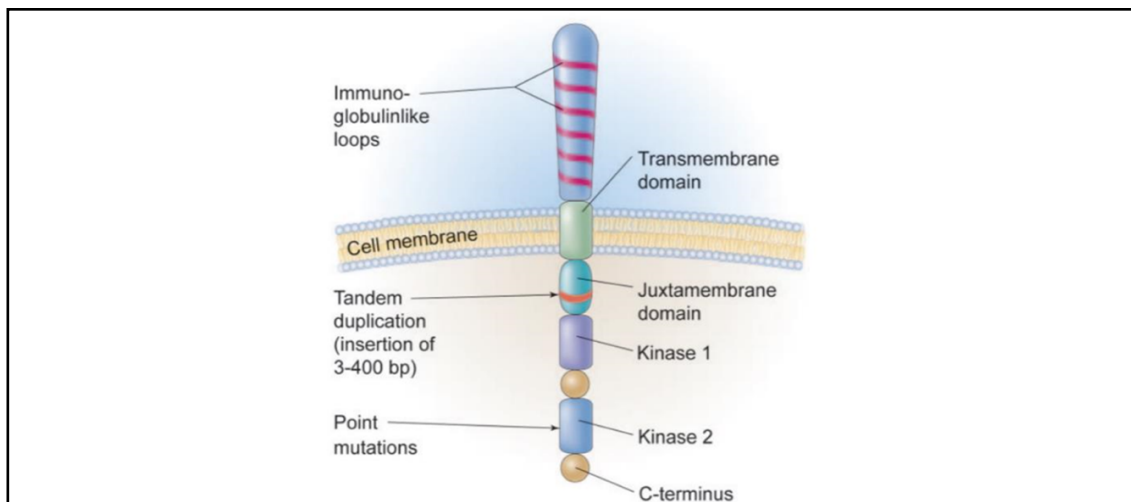
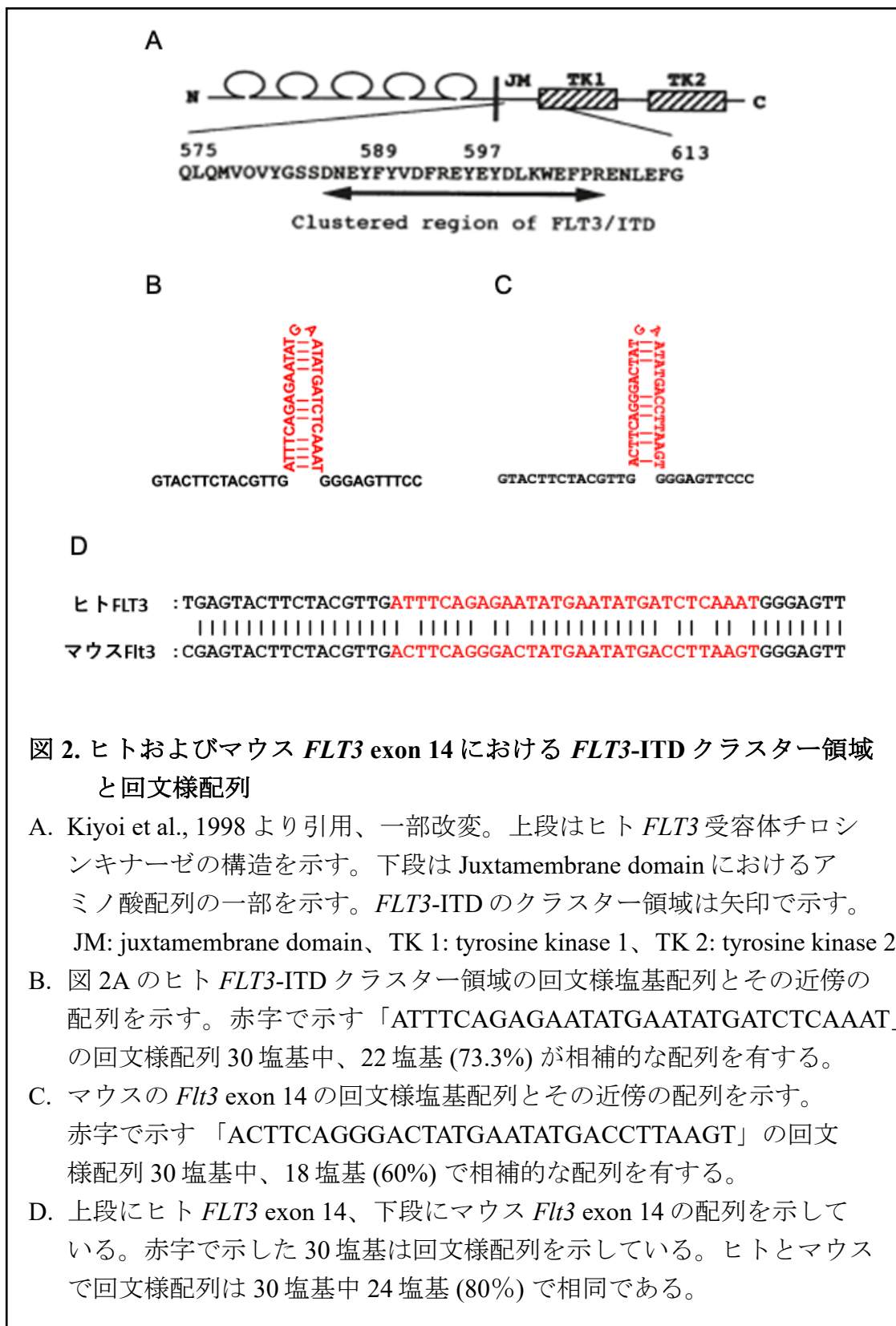
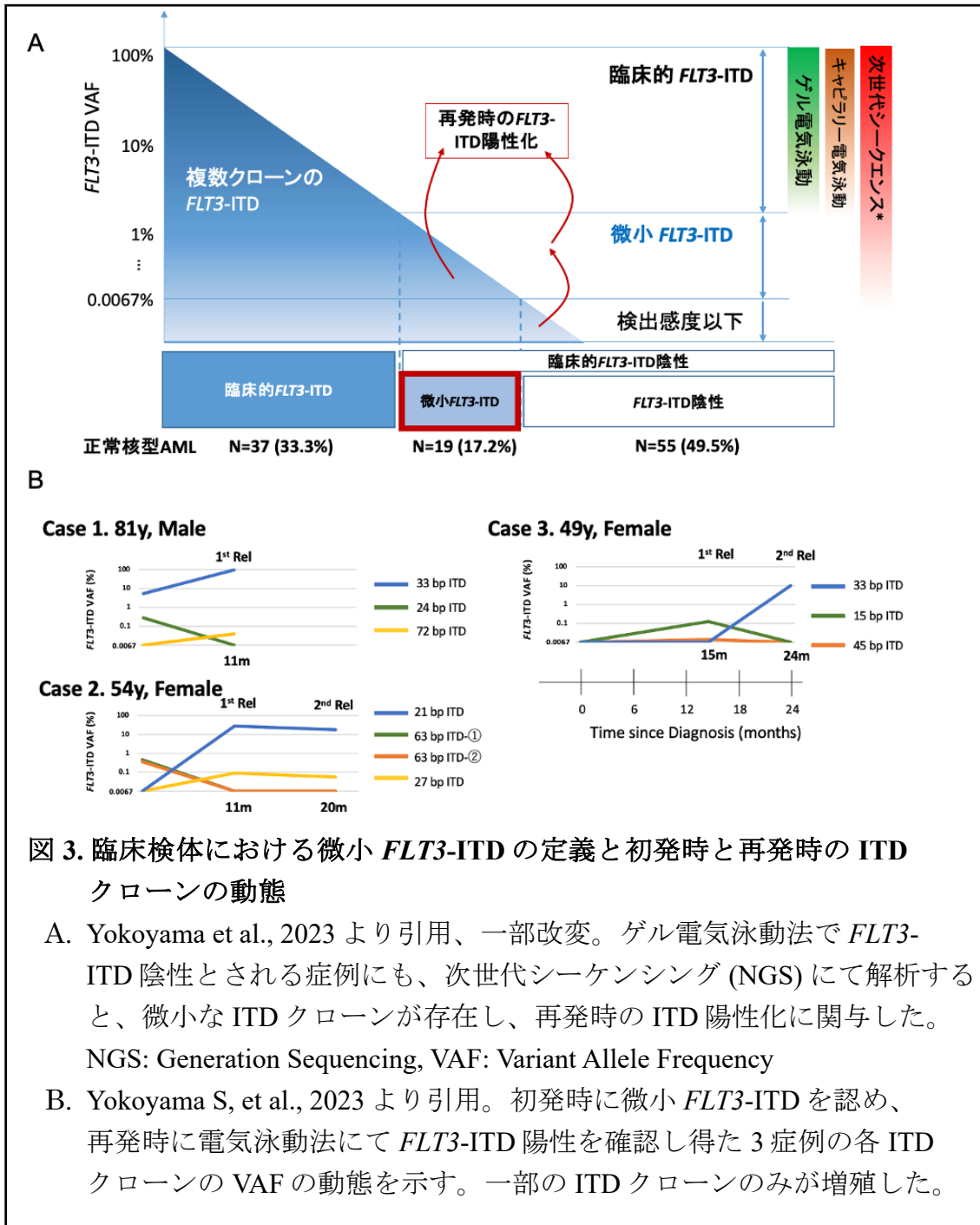


図 1. *FLT3* 受容体チロシンキナーゼと *FLT3*-ITD、*FLT3*-TKD 変異の模式図
Litzow et al., 2005 より引用、一部改変。 *FLT3* 受容体は 5 つの免疫グロブリン様ドメインを含む細胞外ドメイン (Immunoglobulinlike loops)、膜貫通ドメイン (Transmembrane domain)、傍膜貫通ドメイン (Juxtamembrane domain)、2 つのチロシンキナーゼドメイン (Kinase 1、2) とその間にあるキナーゼ挿入ドメインと C 末端ドメイン (C-terminus) から構成される。図の Tandem duplication が *FLT3*-ITD、図の Point mutations が TKD 変異を示す。



FLT3-ITD はオリゴクローナルに存在し、1 症例に複数の長さや変異アレル頻度 (variant frequency, VAF) の異なる *FLT3*-ITD クローンが存在することが報告されている (Yokoyama et al, 2023 ; Rebechi et al, 2017)。一部の症例では診断時に *FLT3*-ITD が陰性と判断されたにもかかわらず、再発時に *FLT3*-ITD を獲得することがある (Shih et al, 2002 ; Wakita et al, 2013 ; McCormick et al, 2010)。我々は、VAF が低く、臨床的に *FLT3*-ITD 陰性とされる症例にも、次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing, NGS) にて解析すると、微小 *FLT3*-ITD クローンが存在し、再発時の *FLT3*-ITD 陽性化に関与することを明らかにした (図 3A) (Yokoyama et al, 2023)。日常診療で施行している電気泳動法では、VAF が 1-5% 以上の *FLT3*-ITD を検出可能である。しかしながら、電気泳動法では検出されないものの、NGS にて検出可能な VAF の低い ITD が存在することを明らかにした。正常核型 AML111 例のうち、37 症例は診断時に *FLT3*-ITD 陽性であったが、陰性と判断された 74 例中、19 例 (初発時陰性症例の 25.7%) で微小 *FLT3*-ITD を認めた。また、初発時に微小 *FLT3*-ITD を認め、経時的に *FLT3*-ITD クローンの VAF を解析できた症例において、再発時に VAF が増加する ITD クローンの他、VAF が低下する ITD クローンも存在した (図 3B) (Yokoyama et al, 2023)。*FLT3*-ITD クローンを複数有する症例において、一部の ITD クローンのみ増殖することが判明した。このことから、*FLT3*-ITD の生成機構と特定の *FLT3*-ITD クローンの選択的増殖機構には、別の機序が存在することが示唆された。

これまでに、*FLT3*-ITD 陽性 AML の予後や *FLT3* 阻害剤の治療効果などは詳細に研究されてきているが、*FLT3*-ITD 生成の根底にある分子機構は解明されていない。そこで、我々は *FLT3*-ITD の生成機構を解明するために、*FLT3*-ITD を有する AML20 症例を NGS におけるディープシーケンシングを行い、*FLT3*-ITD の長さや位置、VAF、重複結合部分の塩基配列の特徴を詳細に解析することとした。また、clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / Cas9 システム (Jinek et al, 2012) を用いて、ヒト上皮細胞株、白血病細胞株およびマウス血液細胞株において人工的に *FLT3*-ITD を生成するシステムを構築し、DNA 損傷形態の違いにより変異生成効率が変わるか、DNA 損傷修復経路を阻害することで *FLT3*-ITD の生成を抑制可能かどうかを検証することとした。



【方法】

1. 倫理・コンプライアンス

ヒト白血病検体を用いた検討においては、「ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に則り、臨床試験「急性白血病における遺伝子変異と治療反応性・白血病発症機序の解明」において同意のもとで採取された検体を使用した。研究担当者は、審査委員会で承認の得られた同意説明文書を研究対象者に渡し、文書及び口頭による十分な説明を行い、研究対象者の自由意思による同意を文書で取得した。本研究は北海道大学病院の自主臨床研究審査委員会の承認を得ている (自 015-0334)。

2. 患者検体

2017年1月から2021年2月までに北海道白血病ネット (HLN)、「急性白血病における遺伝子変異と治療反応性・白血病発症機序の解明」に登録された症例のうち、アガロースゲル電気泳動法で *FLT3*-ITD 陽性と診断された AML20 症例 (初発検体) を無作為に抽出し、NGS によるディープシーケンシングにて *FLT3* 変異を解析した。HLN は、北海道全土を対象とする北日本血液学研究会 (NJHSG) の関連病院から急性白血病サンプルを収集する多施設前向き観察コホート研究である (UMIN000048611)(Yoshida et al, 2023)。

3. 細胞培養・試薬

Human embryonic kidney 293 T (HEK293T、ヒト胎児腎臓細胞) および K562 (慢性骨髄性白血病細胞) は、JCRB (Osaka, Japan) から購入した。TF-1 (ヒト骨髄赤白血病細胞) および Ba/F3 (マウス B 細胞由来細胞) は ATCC (Manassas, VA) から購入した。HEK293T は 10% ウシ胎児血清 (FCS) および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン (PS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。K562 は 10% FCS および 1% PS を含む RPMI1640 培地で培養した。TF-1 は 10% FCS、1% PS、および 2 ng/mL のヒト組換え顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF、Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) を含む RPMI1640 培地で培養した。Ba/F3 は 10% FCS、1% PS、および 10 ng/mL の組換えマウス IL-3 (BioLegend, San Diego) を含む RPMI1640 培地中で培養した。各細胞株は 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C で培養した。

ドキシサイクリン (Doxycycline, Dox) (Apollo Scientific, Cheshire, UK) をテトラサイクリン誘導性発現細胞株に使用した。ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) 阻害剤である olaparib (AZD2281) は Chemexpress (Shanghai, China) から購入し、DNA 活性化プロテインキナーゼ (DNA-PK) 阻害剤である peposertib (M3814) は Selleckchemicals (Houston, TX) から購入した。各薬剤によ

り DNA 損傷修復経路が阻害されるが、これらの薬剤の存在下・非存在下での人工的 *FLT3*-ITD の生成効率の比較を行った。その際、既報を参考に、人工的に DNA 損傷を与える 48 時間前に olaparib を、45 分前に peposertib を投与した (Haines et al, 2021 ; Garcia et al, 2017 ; Orta et al, 2014)。

4. RT-PCR による各細胞株の内因性 *FLT3* の発現の確認

人工的 *FLT3*-ITD 生成の実験を開始する前に、HEK293T、K562、TF-1、Ba/F3 が内因性に *FLT3* を発現しているのかどうかを reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) にて確認した。

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、US) を使用して、 1×10^6 個の細胞から RNA を生成した。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) を使用した cDNA 生成には、1 μ g の RNA を使用した。生成した cDNA をテンプレートとし、表 1 に示す各プライマーを用いて 98°C、10 秒で変性、60°C、15 秒でアニーリング、68°C、30 秒で伸長反応のサイクルを 34 サイクル行い増幅させた。なお、陽性コントロールとしてヒト *FLT3* 発現細胞株である THP-1 (ヒト急性単球性白血病)、マウス *Flt3* 発現細胞株である C1498 (マウス骨髓性白血病細胞) を用いた。

表 1. 内因性 *FLT3* の発現解析に使用したプライマーリスト

ヒト *FLT3*、ヒト β -actin、マウス *Flt3*、マウス β -actin のプライマーの配列を示す。

Primer name	Oligo
h <i>FLT3</i> exon 12 forward	CTTGGCACATCTTGTGAGACG
h <i>FLT3</i> exon 16 reverse	AGGTTCAACAATATTCTCGTGGC
h β -actin forward	AGGCCGGCTTCGCGGGCGAC
h β -actin reverse	CTCGGGAGCCACACGCAGCTC
m <i>Flt3</i> exon 13 forward	TCCTTCTATGCGACCATTTGG
m <i>Flt3</i> exon 15 reverse	ATGAACGCCACGGCCTATG
m β -actin forward	GATATCGCTGCGCTGGTCGTC
m β -actin reverse	ACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGTGG

5. *FLT3*-ITD 変異陽性 AML20 症例の *FLT3* exon 14-15 領域のディープシーケンシング

FLT3-ITD 陽性 AML 症例 20 例の骨髓または末梢血のゲノム DNA を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN、Hulsterweg、Netherlands) を用いて精製した。このゲノ

ム DNA をテンプレートとし、ヒト *FLT3* プライマーセット (Forward: 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC -3', Reverse: 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC -3') を用いて 98°C、10 秒で変性、60°C、15 秒でアニーリング、68°C、30 秒で伸長反応のサイクルを 34 サイクル行い増幅させた。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan) を使用した。増幅された PCR 産物を、1.5% のアガロースゲルに泳動して目的のバンドをゲルカットし、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。PCR 産物のディープシーケンシングは大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センターゲノム解析室での Miseq (Illumina, San Diego, CA) を用いたディープシーケンシングで行われた。解析深度は 20,000 リード以上になるように設定し、得られた塩基配列は、Human BLAT Search (<http://mgc.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) を用いて、3 bp 以上の塩基の伸長もしくは短縮を来した *FLT3*-ITD・挿入 (Insertion, Ins)・欠失 (Deletion, del) を抽出した。

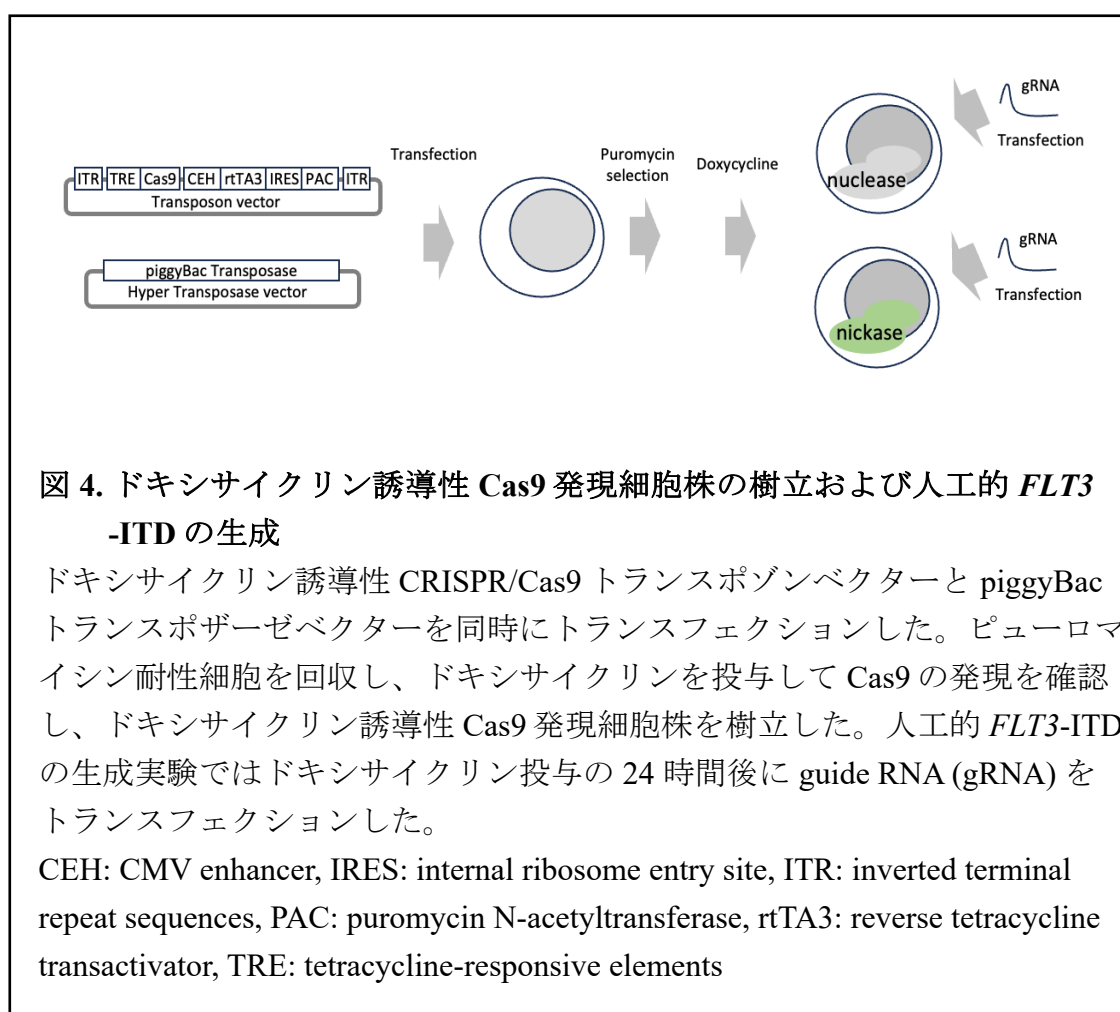
6. トランスポゾン法を用いたドキシサイクリン誘導性 Cas9 発現細胞株の樹立と、ヒト・マウス細胞株における人工的 *FLT3*-ITD の生成

PiggyBac Transposon Vector system とは、ヒト、マウス、ラット由来細胞で使用可能なトランスポゾンベクターを用いることで、10-100 kb の分子量の DNA 配列の導入や複数のベクターを同時に組み込むことを可能とする (Kim et al, 2011)。細胞株に分子量の大きい Cas9 を発現させ、分子量の小さい gRNA のみをトランスフェクションする手法をとることで、人工的 DNA 損傷による変異形成の効率を向上させられると考え、トランスポゾン法を用いることとした。トランスフェクション効率の高い HEK293T に加え、骨髄性白血病細胞株である K562、TF-1、マウス血液細胞である Ba/F3 でも検証した。

Cas9 ヌクレアーゼは 2 つのヌクレアーゼドメイン (RuvC 様ドメインと HNH モチーフ) で二本鎖 DNA を切断することができ、その結果、Cas9 ヌクレアーゼ (野生型; Cas9-nuclease) は二重鎖切断 (double strand break、DSB) を生成する (Zhang et al, 2014)。さらに、RuvC 様ドメインの触媒残基に不活化点変異を含む Cas9-D10A や HNH モチーフに不活化点変異を含む Cas9-H840A も使用した。これらはニッカーゼとして機能し、単鎖切断 (single strand break、SSB) を生成する (Mali et al, 2013)。ドキシサイクリン誘導性 Cas9 発現プラスミド DNA を以下のように樹立した。

化膿連鎖球菌由来の野生型 Cas9 ヌクレアーゼの cDNA は遺伝子合成サービスを利用して取得した。SV40 NLS (PKKKRKV) およびヌクレオプラスミン NLS (KRPAATKKAGQAKKKK) をコードする配列を、それぞれ Cas9 cDNA の N

末端および C 末端に追加した。Western blotting による検出のために、HA エピトープをコードする配列も N 末端に追加した。D10A、H840A 変異は、PCR によって導入した。得られた Cas9 cDNA (ヌクレアーゼおよび D10A、H840A) を piggyBac トランスポゾンベクター、pPB-TRE3G-MCS-CEH-rtTA3-IP にサブクローニングした (図 4) (Onodera et al, 2018)。これらの Cas9 をコードするトランスポゾンベクターは、リポフェクションにて HEK293T に、エレクトロポレーションにて K562、TF-1 および Ba/F3 に一時的に発現させるための過活性 piggyBac トランスポザナーゼベクター (Onodera et al, 2018) と同時にトランスフェクションした。



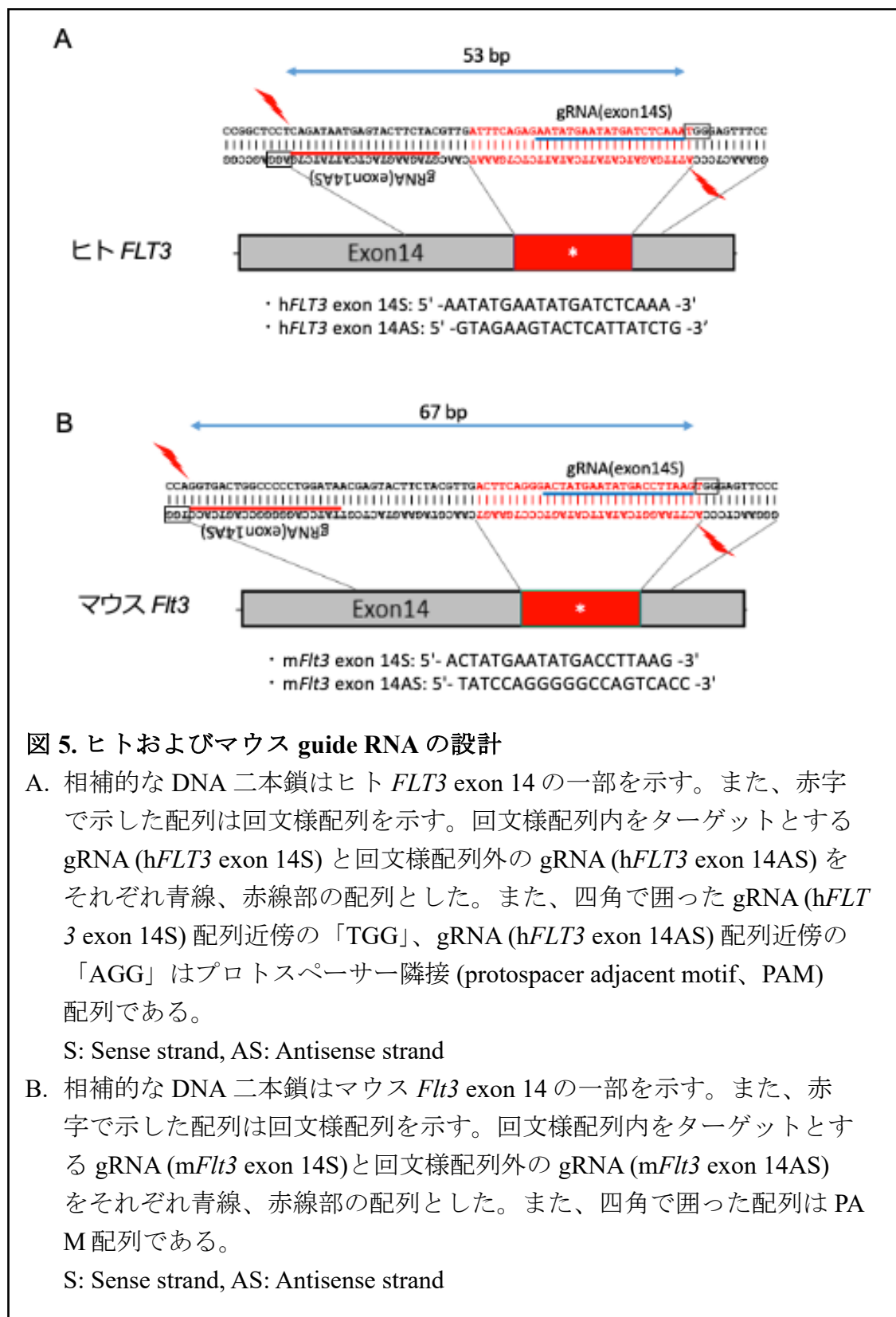
リポフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen、Carlsbad、CA) を使用した。トランスフェクション前日に、 0.8×10^6 個の HEK293T を 6 well plate に撒き、培地は抗生剤フリーとした。当日に Opti-minimal essential medium (Opti-MEM、Thermo Fisher Scientific) 250 μ L と Lipofectamine 10 μ L の混合物、Opti-MEM 250 μ L と Cas9 (ヌクレアーゼ、D10A または H840A) 1430 ng、過活性

piggyBac トランスポザーゼ 570 ng の混合物を室温で 5 分間インキュベートした。

その後両者を混合し、室温で 20 分間インキュベートした後、各 well に滴下した。一方、エレクトロポレーションには Amaxa Nucleofector 2b (Lonza, Basel, Switzerland) を使用した。K562、Ba/F3 には Kit V、TF-1 には Kit T を使用した。2×10⁶ 個の細胞を回収し、100 μL の Cell Line Nucleofector Solution で懸濁した。その懸濁液に Cas9 (ヌクレアーゼ、D10A または H840A) 1430 ng と過活性 piggyBac トランスポザーゼ 570 ng を混合し、エレクトロポレーションを施行し、12 well の培地へ播種した。エレクトロポレーションのパルス条件は K562 では T-003、TF-1 では T-001、Ba/F3 では V-001 を用いた。Cas9 導入ピューロマイシン耐性細胞を選択的に回収するために、各 well の細胞に 1 μg/mL のピューロマイシン (InvivoGen, Sandiego) を曝露し、生細胞の増殖後、50 ng/mL のドキシサイクリンを投与することによって Cas9 を発現させた細胞を 24 時間後に回収し、Western blotting で Cas9 が発現しているかどうかを確認した。

HEK293T はトリプシン/ Ethylenediaminetetraacetic acid で剥がして回収した。

次に、上記手法で樹立した Cas9 発現細胞株に、ヒト *FLT3* exon 14 の回文様配列、または、マウス *Flt3* exon 14 の回文様配列の隣接領域を標的とする guide RNA (gRNA, Invitrogen) をトランスフェクションした (図 5A、B)。HEK293T には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。トランスフェクション 2 日前に、0.5×10⁶ 個の HEK293T を 6 well plate に撒き、培地は抗生剤フリーとした。トランスフェクション前日にドキシサイクリン 50 ng/mL を投与し、24 時間インキュベートした。当日に Opti-MEM 250 μL と Lipofectamine 2000 5 μL の混合物、Opti-MEM 250 μL と gRNA (h*FLT3* exon 14S または h*FLT3* exon 14AS) 500 ng の混合物を室温で 5 分間インキュベートした。その後両者を混合し、室温で 20 分間インキュベートした後、各 well に滴下した。一方、K562、TF-1、Ba/F3 には Amaxa Nucleofector 2b (Lonza) を使用した。K562、Ba/F3 には Kit V、TF-1 には Kit T を使用した。トランスフェクションの 24 時間前にドキシサイクリン 50 ng/mL を投与し、当日に 2×10⁶ 個の細胞を回収し、100 μL の Cell Line Nucleofector Solution で懸濁した。その懸濁液に gRNA (h*FLT3* exon 14S または h*FLT3* exon 14AS) 500ng を混合し、エレクトロポレーションを施行し、12 well plate へ播種した。エレクトロポレーションのパルス条件は K562 が T-003、TF-1 が T-001、Ba/F3 が V-001 を用いた。各 Cas9 (ヌクレアーゼ、D10A、H840A) と各 gRNA の様々な組み合わせにより一箇所の二重鎖切断、二箇所の二重鎖切断、一箇所の単鎖切断、二箇所の単鎖切断による DNA 損傷形態を施し、生成される変異の解析を行なった (図 6)。



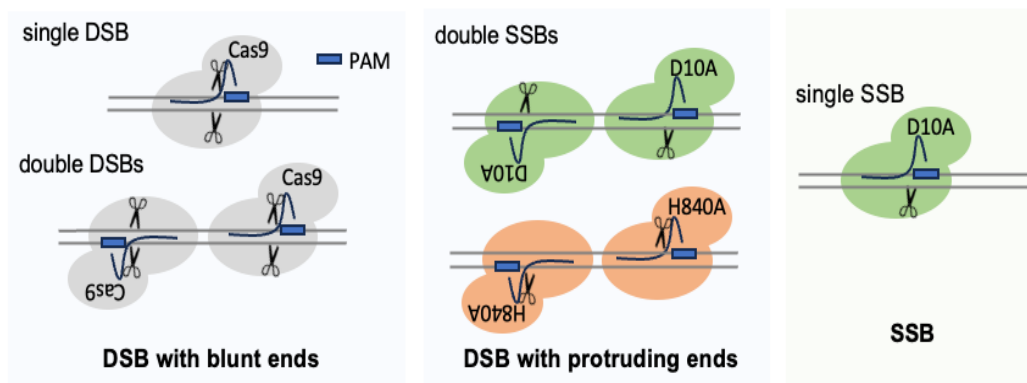


図 6. 異なる人工的 DNA 損傷形態

人工的に DNA 損傷を与える際の異なる DNA 損傷形態の模式図を示す。一箇所での二重鎖切断 (single DSB)、二箇所での二重鎖切断 (double DSBs) には Cas9-nuclease および一種類もしくは二種類の gRNA(図 5)を用いた。一箇所での単鎖切断では Cas9-D10A および一種類の gRNA を用いた。また、二箇所での単鎖切断 (double SSBs) では Cas9-D10A もしくは Cas9-H840A および二種類の gRNA を用いた。

PAM: protospacer adjacent motif

7. CRISPR/Cas9 システムを用いて各細胞株に生成した人工的 *FLT3*-ITD の *FLT3* exon 14-15 領域のディープシーケンシング

各細胞株で生成した人工的 *FLT3*-ITD の解析では、DNA 損傷を与えた 48 時間後に細胞を回収し、ゲノム DNA (> 100 ng) を各細胞株から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製したゲノム DNA をテンプレートとし、ヒト *FLT3* プライマーセット (Forward: 5'- GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC -3' および Reverse: 5'- CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC -3') または、マウス *Flt3* プライマーセット (Forward: 5'- CTCTGCAGCGCTGCTGACC -3' および Reverse: 5'- CTCTGAGGGACTTTGCTGAG -3') を用いて、98°C、10 秒で変性、60°C、15 秒でアニーリング、68°C、30 秒で伸長反応のサイクルを 34 サイクル行い増幅させた。Thermus aquaticus DNA ポリメラーゼとして PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA BIO INC.) を使用した。増幅された PCR 産物を、1.5% のアガロースゲルに泳動し目的のバンドをゲルカットし、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。PCR 産物のディープシーケンシングは大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センターゲノム解析室で Miseq (Illumina, San Diego, CA) を用いたディープシーケンシングで行われた。解析深度は

20,000 リード以上になるように設定し、PCR で増幅した。PCR 産物の参照配列は、ヒト *FLT3* については 329 bp、マウス *Flt3* については 400 bp であった。得られた塩基配列は、Human BLAT Search を用いて、3 bp 以上の塩基の伸長もしくは短縮を来たした *FLT3*-ITD・挿入・欠失を抽出した。2 リード以上を持つクローンを解析対象とした。解析では、「変異頻度」を総リード数に対する総変異クローンのリードの割合として定義し、「変異比率」を総変異クローン中の各変異カテゴリーのクローンのリードの割合として定義した。

8. ドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現 K562 細胞株の DNA-PKcs ノックアウト細胞株の樹立

K562 で樹立したドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 細胞株にドキシサイクリンを曝露せずに、Amaya Nucleofector 4D (LONZA) を使用して gRNA (5'-GCACGCGCGGGAGCGGGACT-3'および 5'-GCAGCGGTCCGCAGCGGACA-3') 各 400 ng および TrueCut™ Cas9 Protein v2 (Invitrogen) 800 ng を同時にエレクトロポレーションにてトランスフェクションした (protocol: FF-120)。48 時間後、細胞を 96 well plate で 0.8 細胞/well (100 μ L/well) に希釈し、single clone の取得を試みた。3 週間後に増殖した細胞を Western blotting にて分析し、DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) の発現を確認し、ノックアウト細胞株を取得した。さらに、ゲノム DNA を抽出し、サンガーシーケンスを行って、切断部位間の In-Del の存在を確認した (Forward: 5'-TAGGGGCATTTCCGGGTC -3'、Reverse: 5'-AGAACGACTCGGGAAGCCAG -3')。

9. RT-PCR による AML 症例 (*FLT3*-ITD 陽性 20 症例、陰性 20 症例、*NPM1* 陽性 20 症例、陰性 20 症例) の NHEJ (non-homologous end joining) 関連因子の発現の比較

臨床検体において、DNA-PKcs、Ku80、Ku70、LIG4 といった NHEJ (non-homologous end joining、非相同末端結合) 関連因子の発現が、*FLT3*-ITD や ITD を併存しやすい *NPM1* 変異の有無により差が生じるかどうかを検証した。

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) を使用して、 1×10^6 個の細胞から RNA を生成した。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) を使用した cDNA 生成には、1 μ g の RNA を使用した。生成した cDNA をテンプレートとし、表 2 に示す各プライマーを用いて 98°C、10 秒で変性、60°C、15 秒でアニーリング、68°C、30 秒で伸長反応のサイクルを 34 サイクル行い増幅させた。

表 2. NHEJ 関連因子の発現解析に使用したプライマーリスト

DNA-PKcs、Ku80、Ku70、LIG4 および β -actin のプライマーの配列を示す。

Primer name	Oligo
DNA-PKcs forward	GCGCCATATCTGTCATCTGCTG
DNA-PKcs reverse	TTATAGCGGCGCTTCAGGTCGA
Ku80 forward	GTTCTAAAGGTCTTTGCAGCAAGA
Ku80 reverse	AAAAGCCACGCCGACTTGAGGA
Ku70 forward	GGTTTCAAGCCGTTGGTACTGC
Ku70 reverse	CTCCAGACACTTGATGAGCAGAG
LIG4 forward	CAGCAGAGATCGTACCCAGTGA
LIG4 reverse	TGCGAGCTTACCAGATGCCTTC
β -actin forward	AGGCCGGCTTCGCGGGCGAC
β -actin reverse	CTCGGGAGCCACACGCAGCTC

10. Western blotting

回収した細胞を RIPA 緩衝液 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche, Basel, Switzerland) に懸濁し、15 分間氷上で静置した。溶解物を 4~15% Mini-PROTEAN TGX ゲル (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) 上で分離し、Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories, Inc.) に転写した。メンブレンに一次抗体 (抗 HA タグモノクローナル抗体 (MBL, Nagoya, Aichi, Japan)、抗 β -アクチンマウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、抗 phospho-H2AX (Ser139) 抗体 (Sigma-Aldrich)、DNA-PKcs ポリクローナル抗体 (Proteintech, IL, USA)、抗 DNA PKcs (phosphor 2056) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、Cleaved Caspase-3 (Asp175) 抗体 (Cell signaling technology, Danvers, MA) を結合させ、4°Cで一晩インキュベートした。PBS / ポリオキシエチレンソルビタン (Sigma-Aldrich) で 3 回洗浄した後、メンブレンに二次抗体 (ウサギ抗マウス IgG H&L (HRP) (Abcam) または抗ウサギ IgG、HRP 結合抗体 (Cell Signaling, Technology, Danvers, MA, USA)) を結合させ、1 時間インキュベートした。その後 Image Lab Touch Software (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用してバンドを検出した。

11. 細胞増殖アッセイ

olaparib、peposertib による細胞増殖アッセイを施行した。5.0×10⁵ 細胞/mL で調製した細胞懸濁液をそれぞれ 90 μ L で 96 well plate に播種した。10 μ L の olaparib の投与から 96 時間後、10 μ L の peposertib の投与から 48 時間後に、10

μL の Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を各 well に添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後各 well の吸光度を、Promega GloMax-Multi Detection System (Promega, Madison, WI) を使用して測定した。olaparib 投与後 4 日目、peposertib 投与後 2 日目に生細胞をカウントした。各薬剤濃度の検証に独立した 3 well の細胞を使用し、triplicate した。薬剤曝露のない細胞の生細胞数を基準とした各薬剤濃度の相対的な生細胞割合を平均値 ± SD として示した。

12. フローサイトメトリーによるアポトーシスアッセイ

上述した細胞増殖アッセイにて検証した olaparib 20 μM、peposertib 2 μM の濃度でアポトーシスが生じているかどうかを、フローサイトメトリーで検証した。olaparib 20 μM、peposertib 2 μM を投与したドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現 HEK293T 細胞株、ドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現 K562 細胞株を各 5×10^5 cells 回収した。各細胞ペレットを 500 μl の AnnexinV binding buffer (BD Biosciences, San Jose, CA) で懸濁し、4°C、2000 rpm、2 min で遠心分離した。上澄みを吸引し、50 μl の AnnexinV binding buffer と 2 μl の Annexin V-APC (BD Biosciences) を混合し、vortex を行ったのちに室温で 15 分間インキュベートした。その後 250 μl の AnnexinV binding buffer と 1.25 μg の Propidium iodide (PI, Dojindo, Kumamoto, Japan) を混合した。解析は BD FACSCantoII (BD Biosciences) および FlowJo software (BD Biosciences) で施行した。

13. 統計解析

臨床検体における *FLT3*-ITD クローンと欠失クロンの VAF の比較や 5 末端突出型 DNA 損傷と 3 末端突出型 DNA 損傷による人工的 *FLT3*-ITD の長さの比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。人工的 DNA 損傷形態の違いによる *FLT3* 変異頻度や変異比率の検証、DNA 損傷修復経路阻害による *FLT3*-ITD 生成効率の検証や細胞増殖アッセイにおける生細胞数の検証においては、複数回施行した測定値を用いて、t 検定により 2 群間の平均値を比較した。P 値 < 0.05 を有意とした。これらの統計学的解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR ver 1.52 (自治医科大学埼玉医療センター) を使用して施行した (Kanda, 2013)。

【結果】

1. *FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の *FLT3* exon14-15 のディープシーケンシング

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 AML20 症例の *FLT3* exon 14-15 領域の NGS によるディープシーケンシングの結果を解析した。表 3 に 20 症例の患者背景を示す。年齢の中央値は 65 歳 (21~90 歳) で、男性が 11 例、女性が 9 例であり、18 例が正常核型であった。

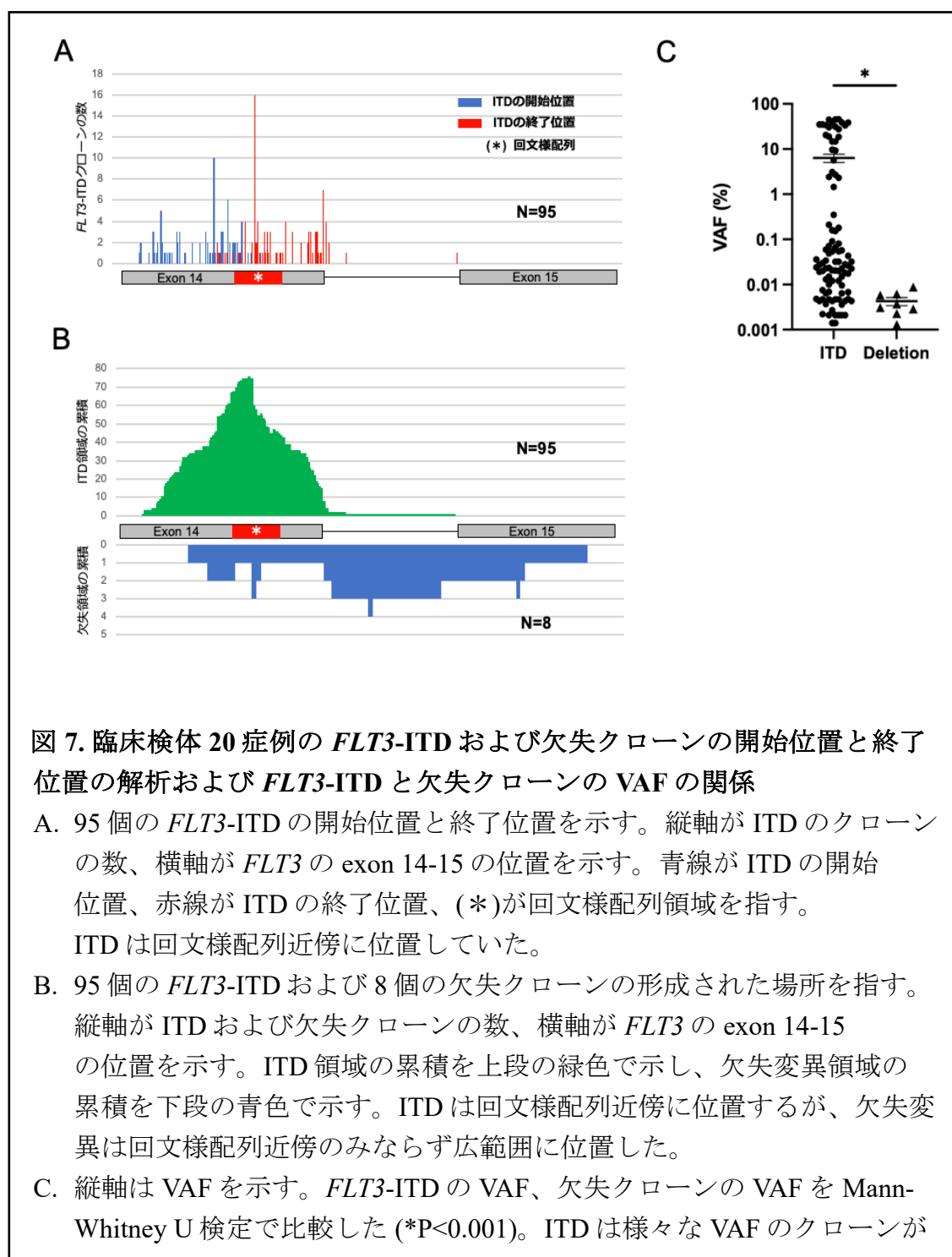
表 3. *FLT3*-ITD 陽性 AML 20 症例の患者背景

左から症例、年齢、性別、核型、芽球割合 (%), *FLT3*-ITD クローン数、*FLT3*-ITD クローンの VAF、挿入クローン数、挿入クローンの VAF、欠失クローン数、欠失クローンの VAF を示す。

VAF: Variant Allele Frequency

症例	年齢	性別	核型	芽球 (%)	<i>FLT3</i> -ITD クローン数	<i>FLT3</i> -ITDクローン のVAFの中央値(%)	挿入 クローン数	挿入クローンのVAF の中央値(%)	欠失 クローン数	欠失クローンの VAFの中央値(%)
1	83	M	46,XY	98.5	13	0.0043 (0.0014-33.9)	0		0	
2	49	M	46,XY	40	6	0.096 (0.0037-38.4)	0		1	0.0037
3	73	F	46,XX	100	1	39	0		1	0.0058
4	58	F	46,XX	86.5	2	22.656 (0.012-45.3)	0		1	0.0029
5	68	F	46,XX	71	3	2.7 (0.026-45.7)	0		0	
6	44	F	46,XX,t(6;9)(p23;q34.1)	82	2	15.668 (0.036-31.3)	0		0	
7	61	M	46,XY	50.2	7	0.0546 (0.0068-14.7)	0		0	
8	73	F	46,XX	90	3	0.066 (0.0022-14.81)	0		1	0.0088
9	60	F	46,XX	74	10	0.0236 (0.0047-18.9)	0		1	0.0023
10	85	M	46,XY	82	2	15.1758 (0.057-30.3)	0		1	0.0031
11	49	M	46,XY	99	7	0.034 (0.0048-33.2)	1	0.0024	0	
12	49	M	46,XY	26	10	0.0067 (0.0021-38.4)	0		0	
13	90	M	46,XY	86.5	2	17.5837 (0.0803-35.087)	0		0	
14	69	M	46,XY	98	2	13.771 (0.012-27.53)	0		1	0.0062
15	80	F	46,XX	97.5	7	0.0201 (0.0075-9.34)	0		0	
16	68	M	47,XY,+mar[1]/46,XY[19]	92.4	1	34.9	0		0	
17	73	M	46,XY	84	4	2.8595 (0.0206-20.36)	0		0	
18	57	M	46,XY	69.5	6	0.0267 (0.01-18.6)	0		0	
19	34	F	46,XX	34.5	3	0.032 (0.013-9.71)	0		0	
20	21	F	46,XX	89	4	0.0948 (0.0027-44.7)	0		1	0.0013

FLT3-ITD を伴う AML20 例において、合計 95 個の *FLT3*-ITD クローン、1 個の挿入 (ins) クローンおよび 8 個の欠失 (del) クローンが検出された (表 3)。*FLT3*-ITD 領域の開始位置と終了位置は、ほぼ全てのクローンが *FLT3* exon 14 領域に認められた (図 7A)。*FLT3*-ITD のクラスター領域の中央部分は、30 bp にわたる回文様配列近傍に該当した (図 7A)。



存在するが、欠失クローンのは全て 0.01%未満であった。

VAF: variant frequency

1 症例当たり中央値 3.5 個の *FLT3*-ITD クローンが検出され、最大 13 個、最小 1 個であった。各 *FLT3*-ITD クローンは VAF も長さも異なり、一症例にオリゴクローナルに存在することが明らかとなった。また、ディープシーケンシングにより、*FLT3*-ITD のみならず、*FLT3* exon 14-15 領域には欠失クローンも認めた (図 7B)。欠失変異は少なく、一症例に複数クローンを認めることはなかった。*FLT3*-ITD クローンの VAF は 0.0014~45.7% であり、欠失クローンの VAF は常に 0.01% 未満であり、ITD クローンよりも有意に少なかった (図 7C)。*FLT3*-ITD は一部のクローンが拡大してくるが、欠失クローンには増殖アドバンテージがないことを示している。

FLT3-ITD の長さの中央値は 51 bp (6~192 bp) であった (図 8A)。21~30 bp の *FLT3*-ITD を最も多く認めた。*FLT3*-ITD は、VAF が 0.01% 未満の 1 つの 3N+1 bp のクローンを除いて、すべて 3N bp のインフレーム変異であった (図 8B)。さらに、各 *FLT3*-ITD クローンの重複結合部の塩基配列を解析し、次の 3 つの配列パターンに分類した: 1) 重複結合部に塩基挿入 (filler) や微小相同配列 (microhomology) を有さない *FLT3*-ITD (N=51、53.7%)、2) 重複結合部に filler を有する *FLT3*-ITD (N=40、42.1%)、3) 重複結合部に microhomology を有する *FLT3*-ITD (N=4、4.2%) (図 9、10)。

以上より、臨床検体では *FLT3* exon 14 の回文様配列部位に ITD、欠失変異が存在し、一部の ITD が増殖することが示唆された。また、*FLT3*-ITD の重複結合部分の塩基配列の解析から、DNA 損傷修復により ITD が生成されるという仮説を立てた。

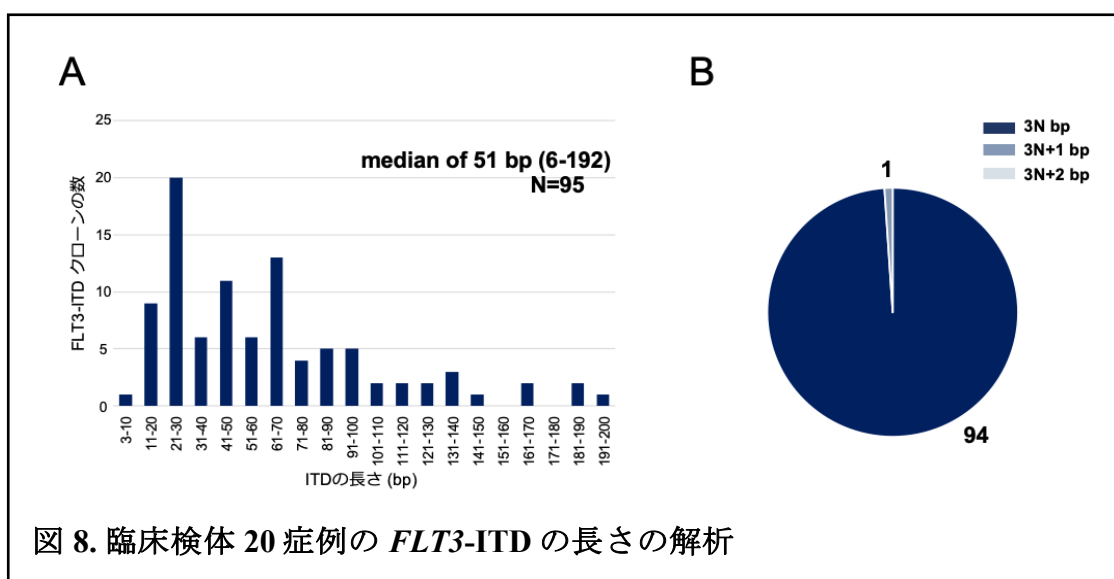


図 8. 臨床検体 20 症例の *FLT3*-ITD の長さの解析

- A. 95 個の *FLT3*-ITD の長さの分布を示す。縦軸が *FLT3*-ITD クローンの数、横軸が 10 bp 毎の ITD の長さを示す。
- B. *FLT3*-ITD の長さが 3 の倍数 (3N) か否かを示す。94 クローンは 3 の倍数の長さであった。

1) 重複結合部にmicrohomologyや塩基挿入 (filler) を認めないITD



2) 重複結合部にfillerを認めるITD



3) ITDの5末端と終了直後の配列にmicrohomologyを認めるITD

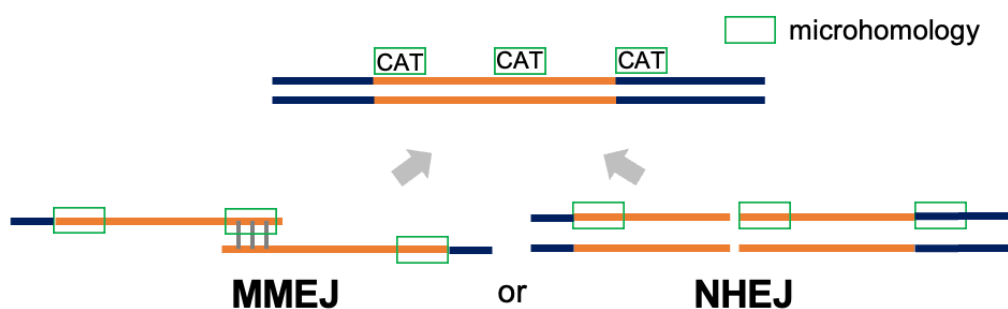
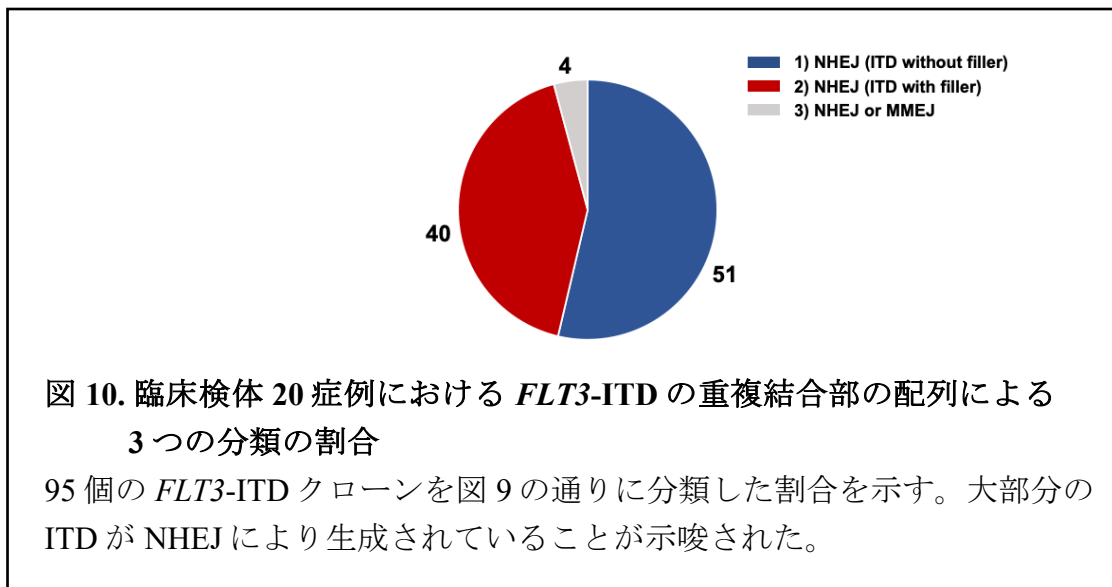


図 9. *FLT3*-ITD の重複結合部の配列による 3 つの分類の説明

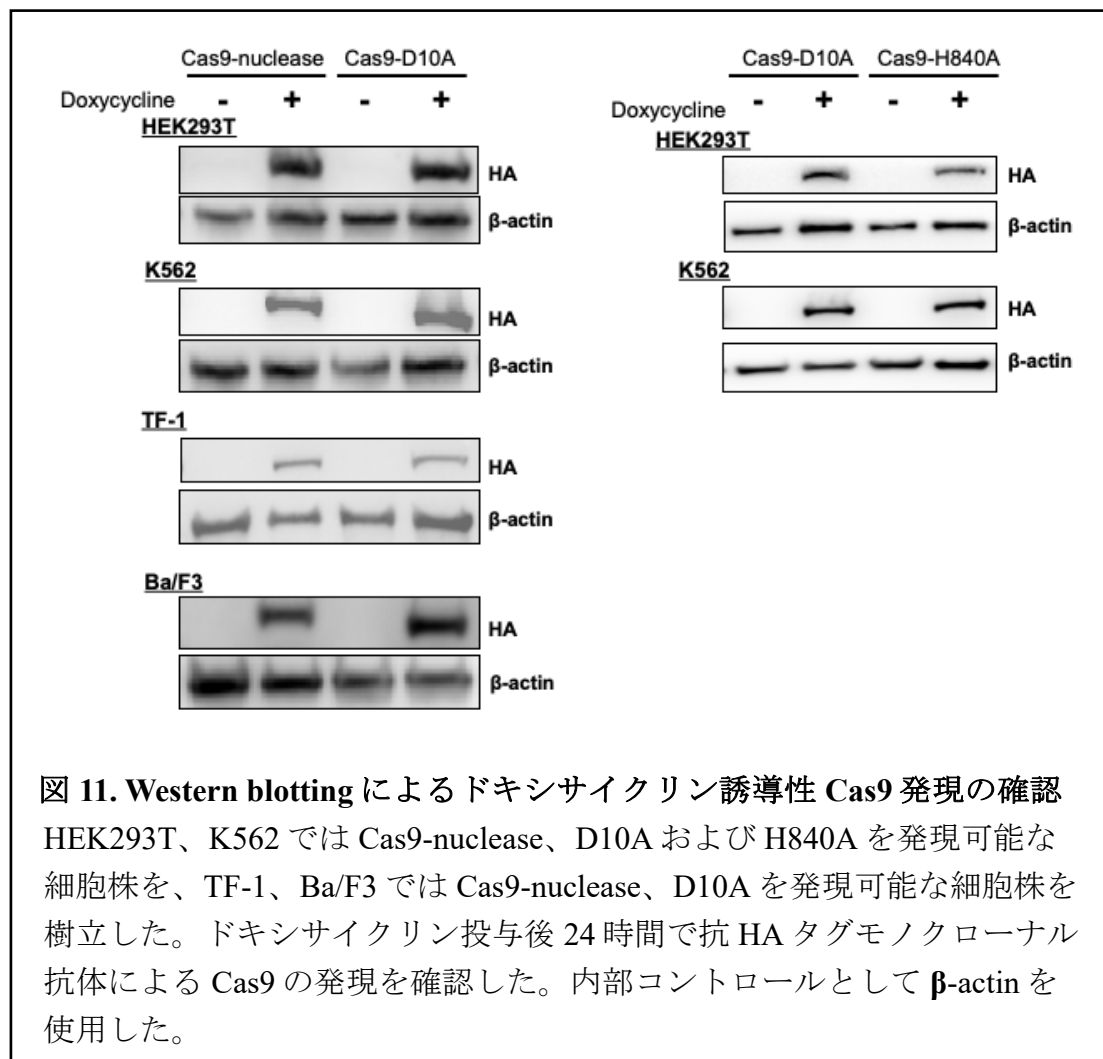
橙色線は *FLT3*-ITD の部分を示し、NNN は filler、緑枠字は微小相同配列 (microhomology) を指す。

NHEJ: 非相同末端結合, non-homologous end joining、MMEJ: マイクロホモロジー媒介末端結合, microhomology-mediated end joining

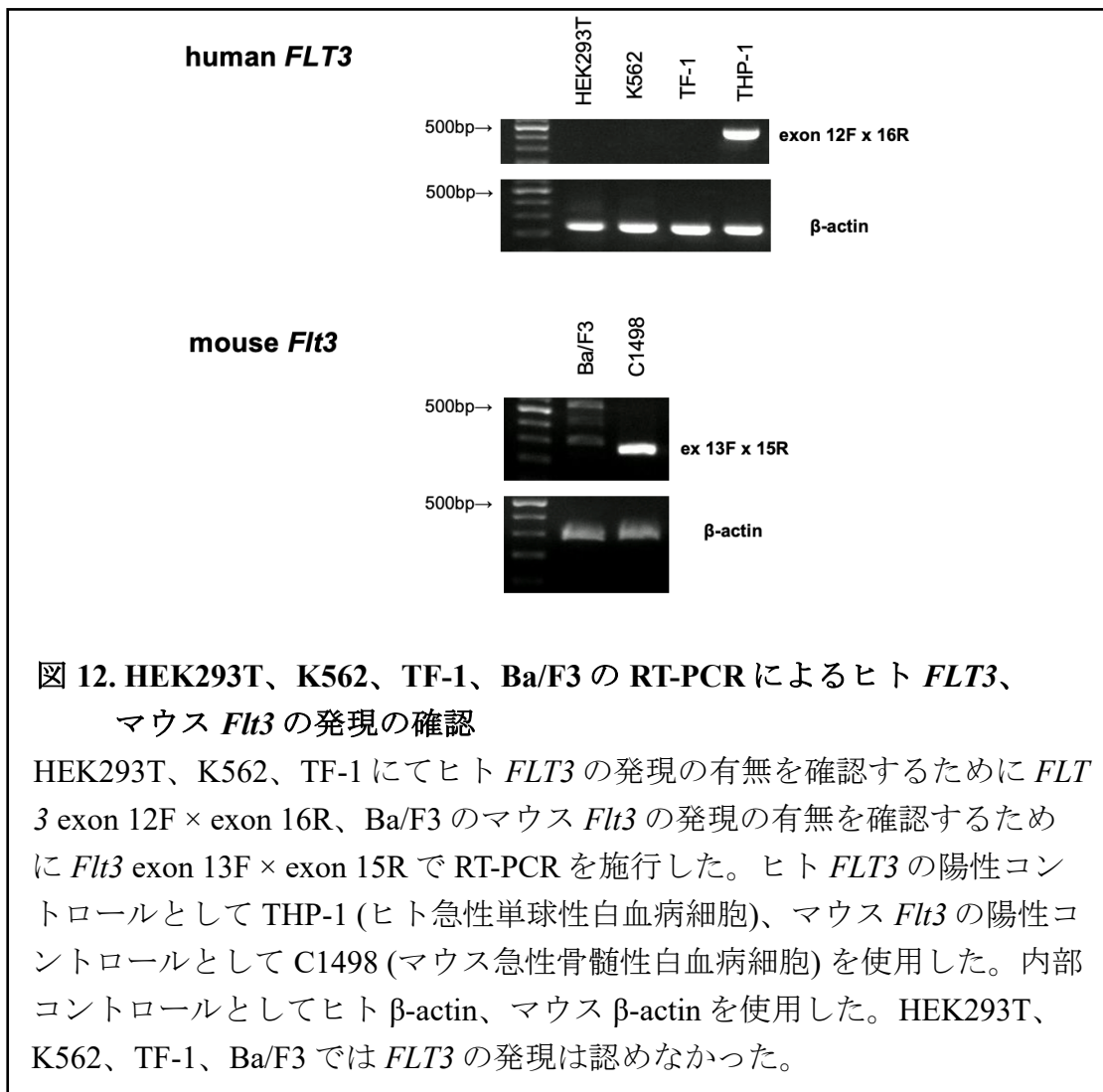


2. CRISPR/Cas9 システムにより様々な形態で DNA 損傷を与え、生成された人工的 *FLT3*-ITD の解析

ゲノム DNA の二重鎖切断 (DSB) は主に欠失や挿入によって修復されるが、tandem duplication によって修復されることは稀である (Onozawa et al, 2014)。我々は、piggyBac トランスポゾンベクターを使用して、CRISPR/Cas9 システムによるドキシサイクリン誘導性 Cas9-nuclease による二重鎖切断またはドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A、H840A による単鎖切断を施すことが可能な細胞株を樹立した。各細胞株に対しドキシサイクリンを 50 ng/ml 投与した 24 時間後に Western blotting にて抗 HA タグモノクローナル抗体によるバンドを検出し、ドキシサイクリン誘導性に Cas9 タンパク質が発現していることを確認した (図 11)。



また、樹立した細胞株がヒト *FLT3* またはマウス *Flt3* を内因性に発現しているかどうかを RT-PCR にて確認したところ、HEK293T、K562、TF-1、Ba/F3 はいずれもヒト *FLT3* またはマウス *Flt3* の発現を認めず、既報通りであった (図 12) (Luo et al, 2023)。



Cas9、gRNA の組み合わせにより、一箇所の二重鎖切断 (DSB)、二箇所の二重鎖切断、一箇所の単鎖切断 (SSB)、二箇所の単鎖切断の 3 つの DNA 損傷形態による変異形成効率を比較した。単一の gRNA (h*FLT3* exon 14S または h*FLT3* exon 14AS) をドキシサイクリン誘導性 Cas9-nuclease 発現細胞株にトランスフェクションすることで一箇所の二重鎖切断を、二種の gRNA (h*FLT3* exon 14S および h*FLT3* exon 14AS) をドキシサイクリン誘導性 Cas9-nuclease 発現細胞株にトランスフェクションすることで二箇所の二重鎖切断を、単一の gRNA (h*FLT3* exon 14S または h*FLT3* exon 14AS) をドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現細胞株にトランスフェクションすることで一箇所の単鎖切断を、二種の gRNA (h*FLT3* exon 14S および h*FLT3* exon 14AS) をドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現細胞株にトランスフェクションすることで二箇所の単鎖切断を施した (図 6)。その結果、HEK293T、K562 において、対側鎖の二箇所の単鎖切断は、一箇所の

二重鎖切断や二箇所での二重鎖切断、一箇所の単鎖切断よりも高率に *FLT3*-ITD を生成可能であった (図 13)。一箇所もしくは二箇所での二重鎖切断は、ほとんどが欠失により修復された。また、二箇所の二重鎖切断は一箇所の二重鎖切断よりも変異頻度は高かった (図 13)。一箇所での単鎖切断による変異生成は、二重鎖切断や二箇所の単鎖切断よりも著明に少なく、変異を残さずに効率的に完全修復されていることが示唆された (図 13)。変異頻度は TF-1、Ba/F3 では低い結果であった。HEK293T は上皮細胞でかつ接着細胞であり、効率的なトランスフェクションが可能であり、K562 は血液細胞株であるが、比較的トランスフェクション効率がよく、既報においてもトランスフェクションによく使用されている (Karnan et al, 2021)。TF-1 や Ba/F3 は変異生成効率は低いものの、単回の検証にて HEK293T、K562 と同様の傾向が認められた (図 13)。

二箇所の単鎖切断により生成された *FLT3*-ITD のクラスター領域は、回文様配列近傍に位置した (図 14)。また、*FLT3*-ITD は対側鎖に施した二箇所の単鎖切断部位間距離に一致した形成は認めず、切断部位の内側に位置した (図 14)。各細胞株に二箇所の単鎖切断を人工的に施すことにより作出した *FLT3*-ITD の長さの分布は、臨床検体の *FLT3*-ITD の長さの分布と類似していた (図 8A、図 15)。HEK293T の *FLT3*-ITD の長さは中央値 18 bp (3-84 bp)、K562 の *FLT3*-ITD の長さは中央値 22 bp (3-75 bp)、TF-1 の *FLT3*-ITD の長さは中央値 24 bp (3-44 bp)、Ba/F3 の *Flt3*-ITD の長さは中央値 24 bp (3-74 bp) であった。また、*FLT3*-ITD の長さは、3 の倍数の長さ (3N) のインフレーム変異のみならず、3N+1 bp、および 3N+2 bp の *FLT3*-ITD も認め、いずれも均等に生成されていた (図 16)。

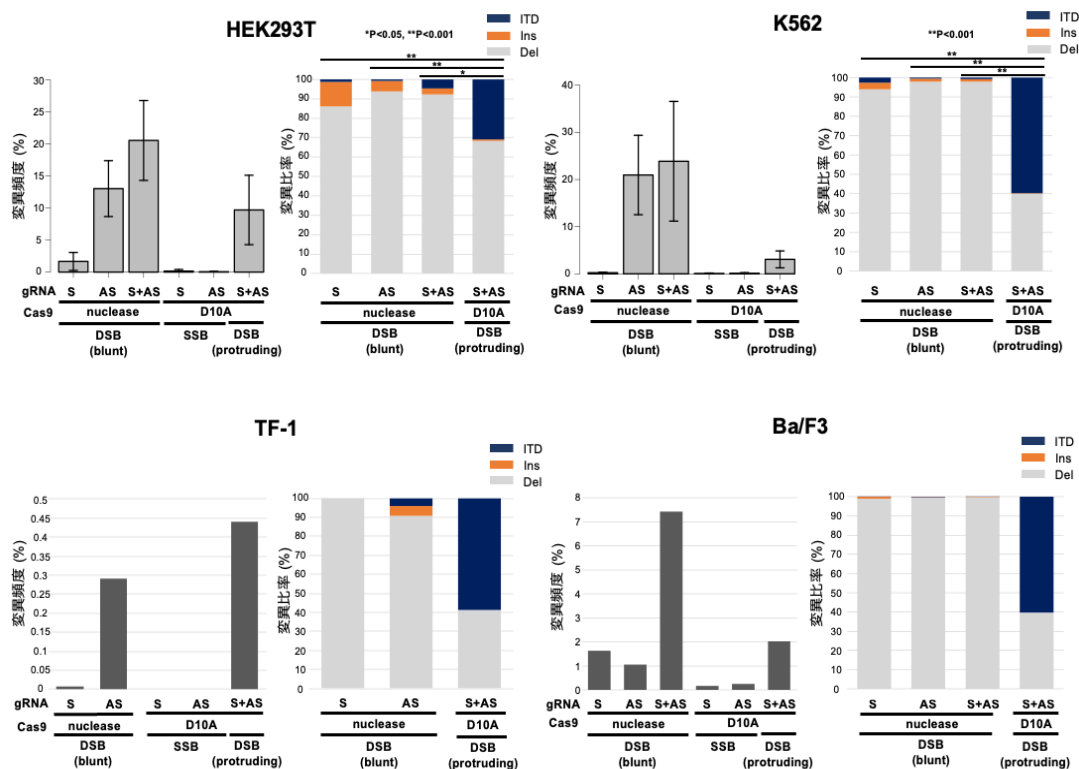


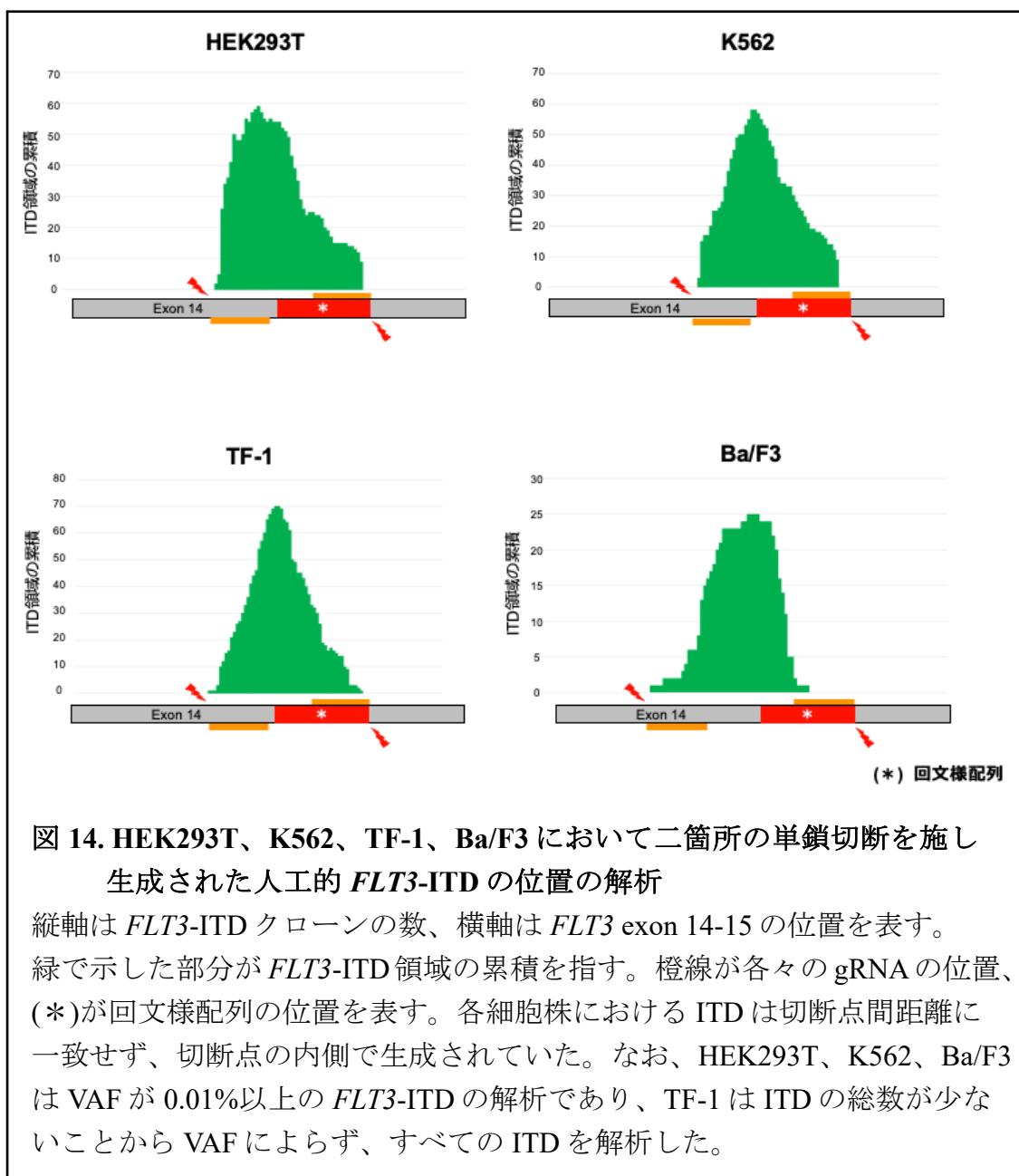
図 13. HEK293T、K562、TF-1、Ba/F3 における異なる DNA 損傷形態による変異形成効率の比較

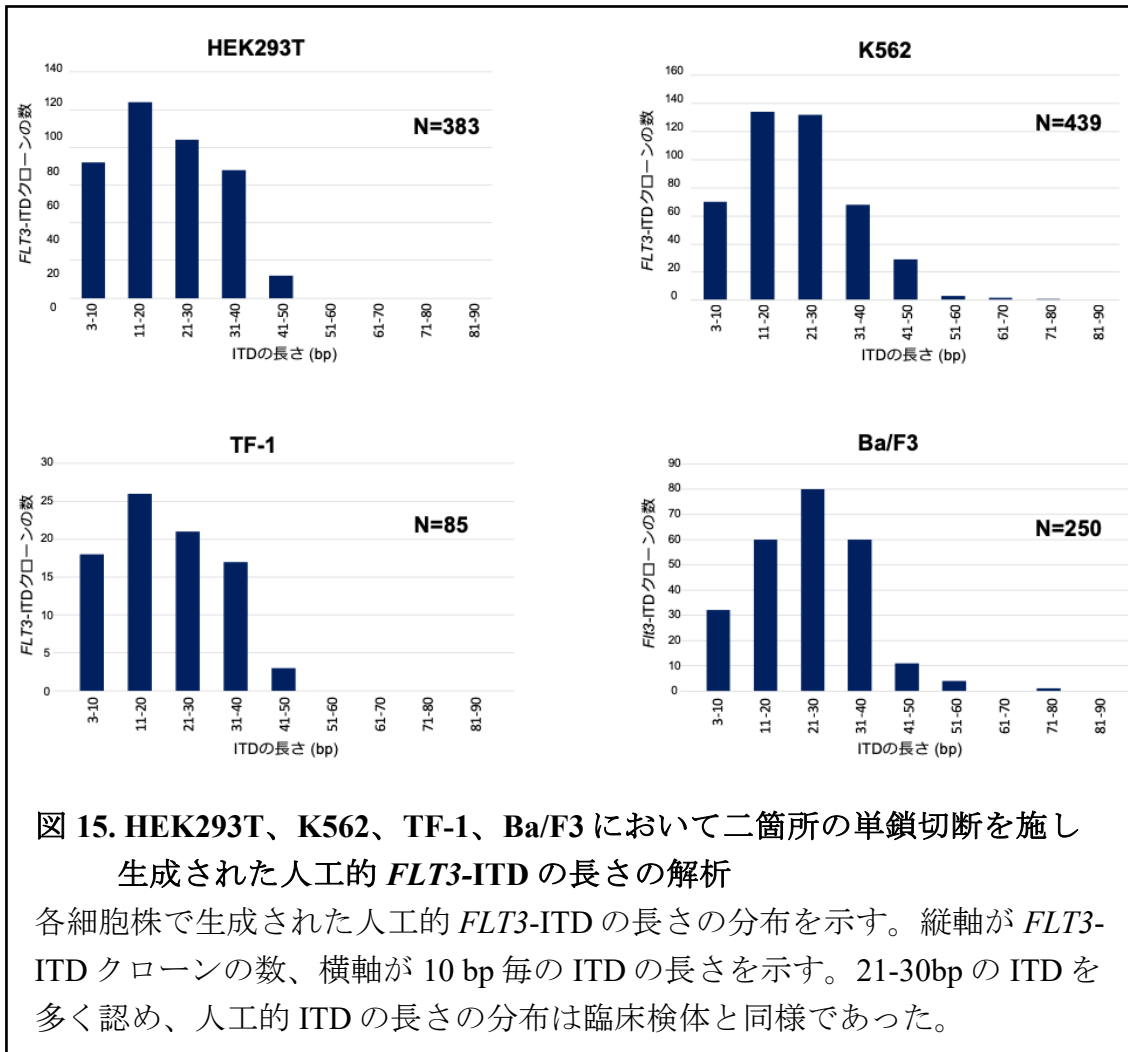
各細胞の左側の図の縦軸は変異頻度、右側の図の縦軸は変異比率を表す。横軸は異なる DNA 損傷形態を示す。HEK293T、K562 の左図の 1 列目は Cas9-nuclease および gRNA: *hFLT3* exon 14S により一箇所の二重鎖切断を施した細胞、2 列目は Cas9-nuclease および gRNA: *hFLT3* exon 14AS により一箇所の二重鎖切断を施した細胞、3 列目は Cas9-nuclease および gRNA: *hFLT3* exon 14S および *hFLT3* exon 14AS により二箇所の二重鎖切断を施した細胞、4 列目は Cas9-D10A および gRNA: *hFLT3* exon 14S により一箇所の単鎖切断を施した細胞、5 列目は Cas9-D10A および gRNA: *hFLT3* exon 14AS により一箇所の単鎖切断を施した細胞、6 列目は Cas9-D10A および gRNA: *hFLT3* exon 14S および *hFLT3* exon 14AS により二箇所の単鎖切断を施した細胞を示す。単鎖切断では変異はほとんど認められず、二重鎖切断で変異が生じやすいことが明らかとなった。右図は生成された変異クローンの中での ITD、挿入 (Ins)、欠失 (Del) の割合を示す。一箇所の単鎖切断では変異頻度が低く、変異比率は示していない。いずれの細胞株においても二箇所の単鎖切断を施した場合に高率に *FLT3*-ITD が生成された。独立した実験を 3 回施行し、変異頻度は平均値 ± 標準偏差 (SD) として示す。TF-1、Ba/F3 は単回の実験であり、TF-1 では二箇所の二重鎖切断の検証は施行し

ていない。

S: Sense strand、AS: Antisense strand、DSB: double strand break、

SSB: single strand break





さらに、二箇所の単鎖切断により、HEK293Tで生成された383個の*FLT3*-ITD クローンと K562 で生成された 439 個の *FLT3*-ITD クローン、TF-1 で生成された 85 個の *FLT3*-ITD クローン、Ba/F3 で生成された 250 個の *Flt3*-ITD クローンの重複結合部分の配列を検証した (図 17)。HEK293T の 296 個 (77.3%)、K562 の 314 個 (71.5%)、TF-1 の 66 個 (77.6%)、Ba/F3 の 174 個 (69.6%) の *FLT3*-ITD クローンは、microhomology や filler を認めなかった。Filler を有する *FLT3*-ITD は HEK293T で 59 個 (15.4%)、K562 で 86 個 (19.6%)、TF-1 の 9 個 (10.6%)、Ba/F3 の 28 個 (11.2%) の *FLT3*-ITD クローンで認めた。また、microhomology を有する *FLT3*-ITD は HEK293T で 28 個 (7.3%)、K562 で 39 個 (8.9%)、TF-1 の 10 個 (11.8%)、Ba/F3 の 48 個 (19.2%) の *FLT3*-ITD クローンで認めた (図 17)。いずれの細胞株においても microhomology を有する *FLT3*-ITD は少なく、臨床検体での解析と同様の結果であった。K562 で作出した人工的 *FLT3*-ITD の配列の一部を図 18 に示す。MMEJ よりも NHEJ により *FLT3*-ITD が生成されることが示唆された。

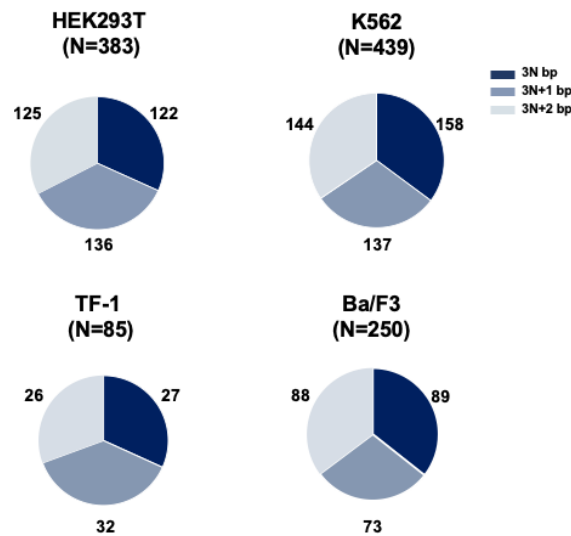


図 16. HEK293T、K562、TF-1、Ba/F3 において二箇所の単鎖切断を施し生成された *FLT3*-ITD がインフレーム変異か否かの解析
各細胞株の人工的 *FLT3*-ITD の長さが 3 の倍数 (bp) か否かを示す。臨床検体の ITD とは異なり、3 の倍数以外の長さの ITD も均等に生成されていた。

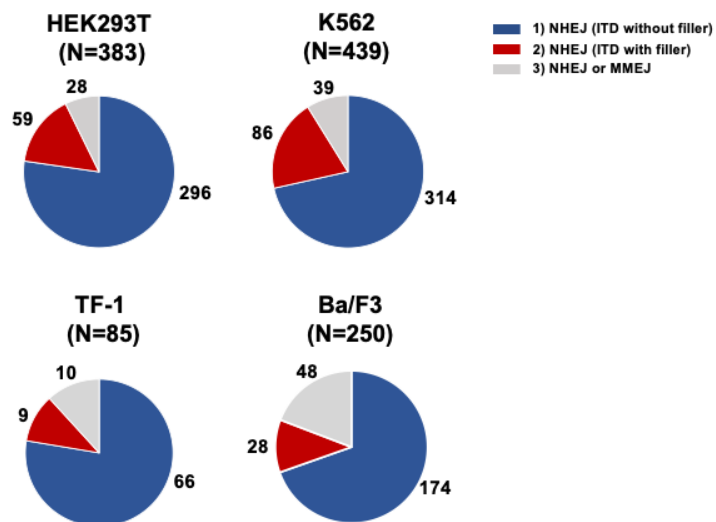


図 17. HEK293T、K562、TF-1、Ba/F3 において二箇所の単鎖切断を施し生成された *FLT3*-ITD の重複結合部の配列
図 9 の分類に基づき解析した *FLT3*-ITD の重複結合部の分類を示す。臨床検体と同様、人工的 ITD は NHEJ により生成されていることが示唆された。
NHEJ: non-homologous end joining、MMEJ: microhomology-mediated end joining

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (24bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (30bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (42bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (26bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (43bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (47bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (27bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (35bp)

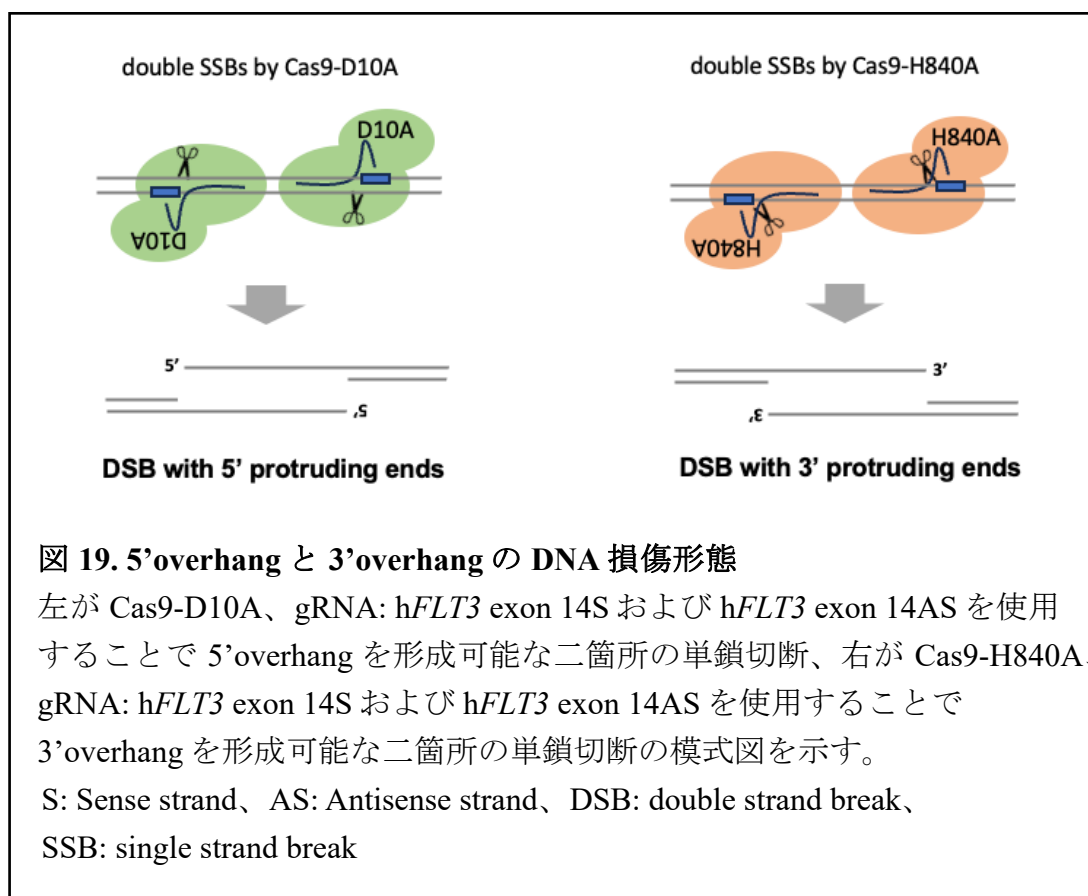
CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (24bp)

CCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAAATGGGAGTTTCC (31bp)

■ PAM ■ Filler ■ microhomology

図 18. K562 で作出した人工的 *FLT3*-ITD クローンのシーケンス結果
 図 9 の 3 つの分類に該当する 10 個の *FLT3*-ITD クローンの実際のシーケンス結果を示す。上から 6 つが NHEJ: ITD without filler、その下段の 2 つが NHEJ: ITD with filler、下から 2 つが NHEJ or MMEJ に該当する。下線を引いた赤字および黄色字が ITD の配列、背景が青い配列は PAM、黄色が filler、黄緑が microhomology を指す。
 NHEJ: non-homologous end joining、MMEJ: microhomology-mediated end joining、PAM: protospacer adjacent motif

これまでの検証で最も効率よく *FLT3*-ITD を生成可能であったのはどの細胞においても Cas9-D10A および二種の gRNA を導入して対側鎖に二箇所の単鎖切断を施した場合であった。この場合、5 末端突出型 (5'overhang) の DNA 損傷となる。既報において、マウスの胚性幹細胞に対し、対側鎖に二箇所の単鎖切断を施したところ、3 末端突出型 (3'overhang) の DNA 損傷が 5'overhang よりも tandem duplication の生成効率が高いことが報告されている (Schimmel et al, 2021)。しかし、ヒト細胞における検証はなされていない。そこで、2 種の Cas9-nickase: Cas9-D10A または Cas9-H840A を利用して 5'overhang と 3'overhang での変異生成効率につき検証した (図 19)。



効率よく変異生成可能な HEK293T、K562 での検証を行った結果を図 20 に示す。5'overhang を施した方が 3'overhang を施すよりも変異頻度が有意に高かった。この違いは Cas9-D10A と Cas9-H840A をトランスフェクションした別個の細胞株での比較あり、人工的 DNA 損傷を導入する効率に差が生じている可能性が考えられた。変異比率は、HEK293T では、3'overhang を施した場合に有意に *FLT3*-ITD の比率が高く、K562 では有意差はないものの、3'overhang で *FLT3*-ITD 比率が高い傾向があった (図 20)。また、生成された *FLT3*-ITD の長さを統計学的に解析した (図 21)。既報にてマウス胚性幹細胞では 3'overhang では DNA 断端の削り込みを抑制する分子機構が 5'overhang よりも効率よく機能することで Tandem duplication 形成効率が高まることが報告されている (Schimmel et al, 2021)。重複する配列の長さの比較は 5'overhang と 3'overhang で比較されていないが、DNA 断端の削り込みが抑えられる 3'overhang の方が重複配列が長くなることが予想される。HEK293T、K562 で人工的に生成された *FLT3*-ITD の長さを比較したところ、3'overhang の方が ITD の長さの平均値が有意に長かった (図 21)。欠失クローンの長さに関しては、両細胞株にて有意差は認めなかった (図 21)。

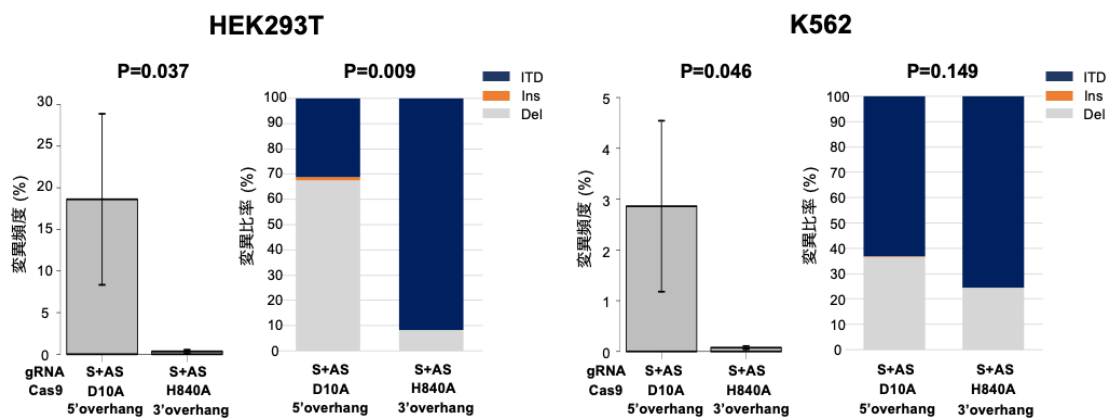


図 20. HEK293T、K562 において 5'overhang、3'overhang での二箇所の単鎖切断を施して生成された変異の頻度・比率の解析

各細胞の左側の図の縦軸は変異頻度、右側の図の縦軸は変異比率を示す。横軸の左列は Cas9-D10A と gRNA: *hFLT3* exon 14S と *hFLT3* exon 14AS を導入し 5'overhang を導入した細胞、右列は Cas9-H840A と gRNA: *hFLT3* exon 14S と *hFLT3* exon 14AS を導入し 3'overhang を導入した細胞を示す。変異頻度は低いものの、3'overhang で ITD 比率は高かった。独立した実験を 3 回施行し、変異頻度は平均値 ± 標準偏差 (SD) として示す。S: Sense strand、AS: Antisense strand

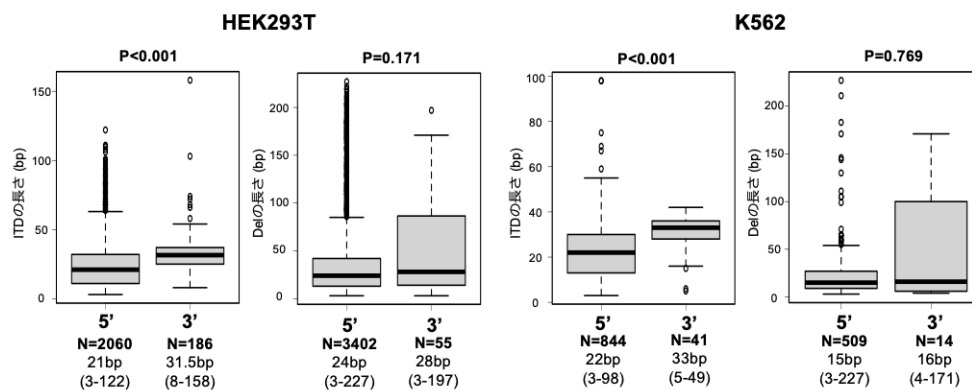
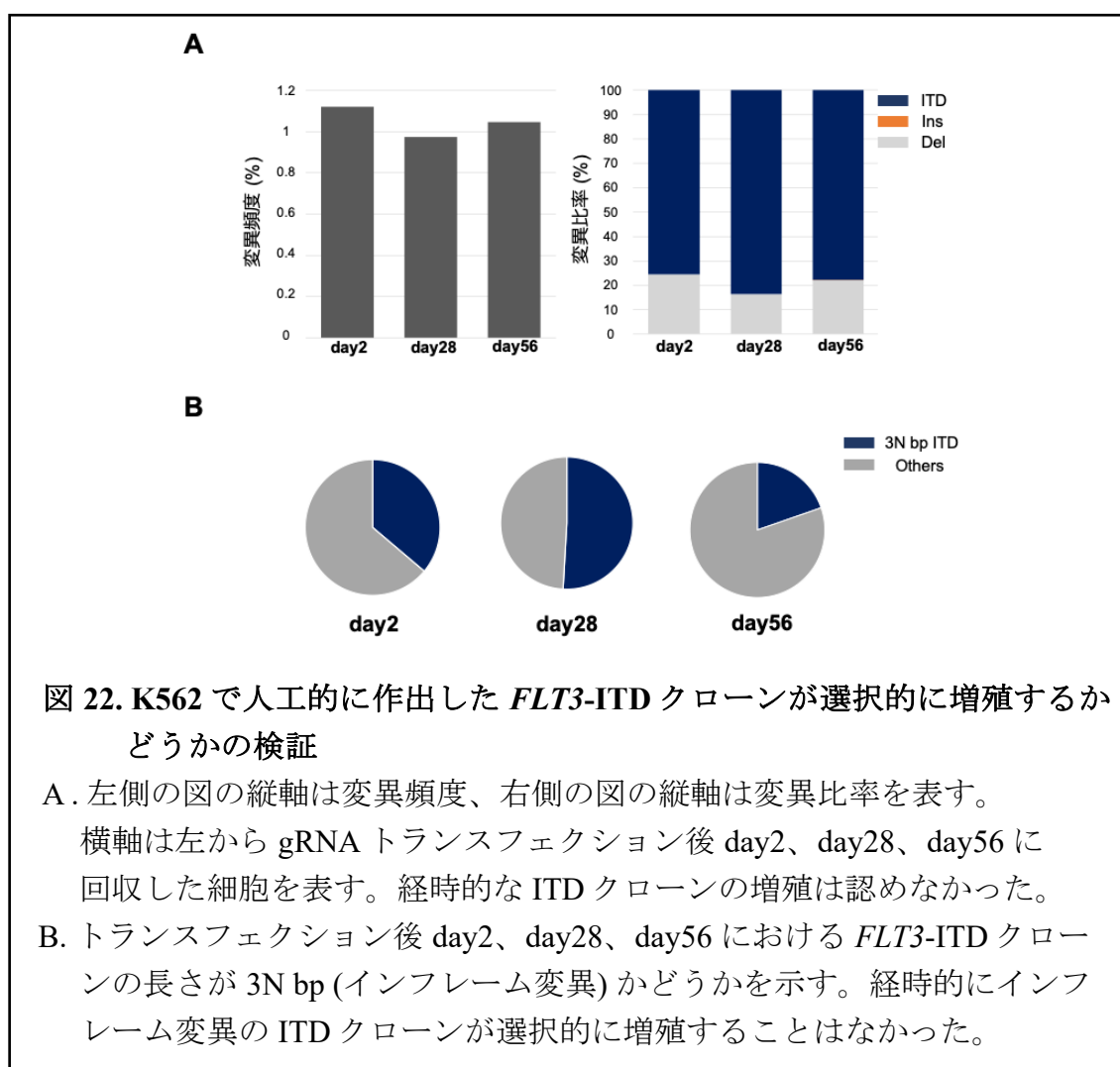


図 21. HEK293T、K562 において 5'overhang、3'overhang での二箇所の単鎖切断を施して生成された変異の長さの解析

5'overhang と 3'overhang で作出した全 *FLT3*-ITD クローンの長さ及び欠失変異の長さを Mann-Whitney U 検定で比較した結果を示す。3'overhang で ITD の長さが有意に長かったが、欠失変異の長さに有意差はなかった。欠失変異クローンは少ないので、HEK293T の 3'overhang では 10 回分、K562 の 3'overhang では 6 回分の検証結果を対象とした。

また、人工的に作出した *FLT3*-ITD クローンは野生型 *FLT3* クローンよりも増殖能が高く、共培養下で ITD クローンが選択的に増殖していくかどうかを検証した (図 22)。K562 で Cas9-D10A を発現させ、gRNA: h*FLT3* exon 14S および h*FLT3* exon 14AS を導入して生成した *FLT3*-ITD クローンを含む K562 細胞の培養を継続し、トランスフェクション後 day2、day28、day56 でゲノム DNA を精製し、NGS にてディープシーケンスを施行した。その結果、各時点で変異頻度や ITD 比率の増加、インフレーム変異の ITD 比率の上昇は認めなかった (図 22)。これは、K562 自体が *FLT3* を発現しておらず (図 12)、ITD クローンが選択的に増殖能を有していないことが示唆された。



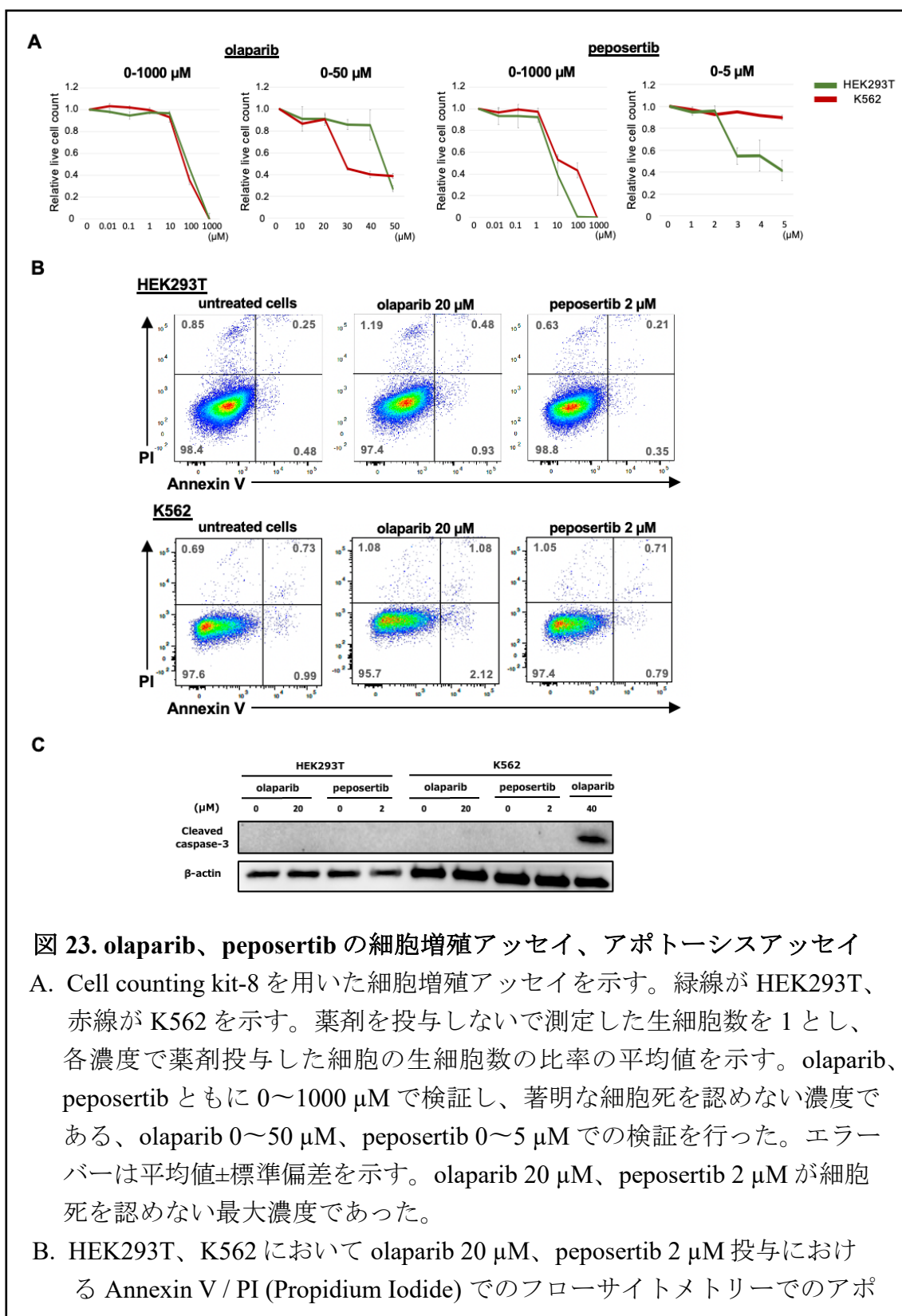
3. DNA 損傷修復経路の障害下での CRISPR/Cas9 システムを用いた人工的 *FLT3*-ITD 生成効率の検証

対側鎖の二箇所単鎖切断による人工的 DNA 損傷により *FLT3*-ITD が効率よく生成されることを明らかにしたが、どのような DNA 損傷修復経路により *FLT3*-ITD が生成されるのかを DNA 損傷修復経路を障害することで検証した。*FLT3*-ITD 生成効率の良い HEK293T、K562 を用いて検証した。

olaparib は単鎖切断の修復に重要なタンパク質である PARP を障害する (Ali et al, 2024)。細胞増殖に悪影響を及ぼさない最大濃度を同定するために、まずは 0-1000 μM にて細胞増殖アッセイを施行したところ、10 μM 以上で細胞増殖の低下が認められた。その後 0-50 μM にて細胞増殖アッセイを施行したところ、細胞増殖に悪影響を及ぼさない最大濃度は 20 μM であった。20 μM の olaparib の投与にて、フローサイトメトリーにてアネキシン V や Western blotting にて cleaved caspase-3 の検証を行い、有意なアポトーシスを誘導しないことを確認した (図 23)。gRNA のトランスフェクションの 48 時間前に olaparib 20 μM を開始し、トランスフェクションの 24 時間前にドキシサイクリンを投与し Cas9-D10A を発現させた (図 24A)。olaparib の投与の影響を確認するために、 γ -H2AX の発現を Western blotting で確認した。HEK293T、K562 共に、olaparib 投与下で二箇所の単鎖切断による DNA 損傷を与えると、 γ -H2AX の発現が増強した (図 24B)。生成された変異クローンの解析を行ったところ、変異頻度、全変異クローンにおける *FLT3*-ITD の比率も、olaparib の有無で統計学的に有意な変化は認めなかった (図 24B)。olaparib による単鎖切断修復経路の障害は、*FLT3*-ITD 生成を抑制しなかった。

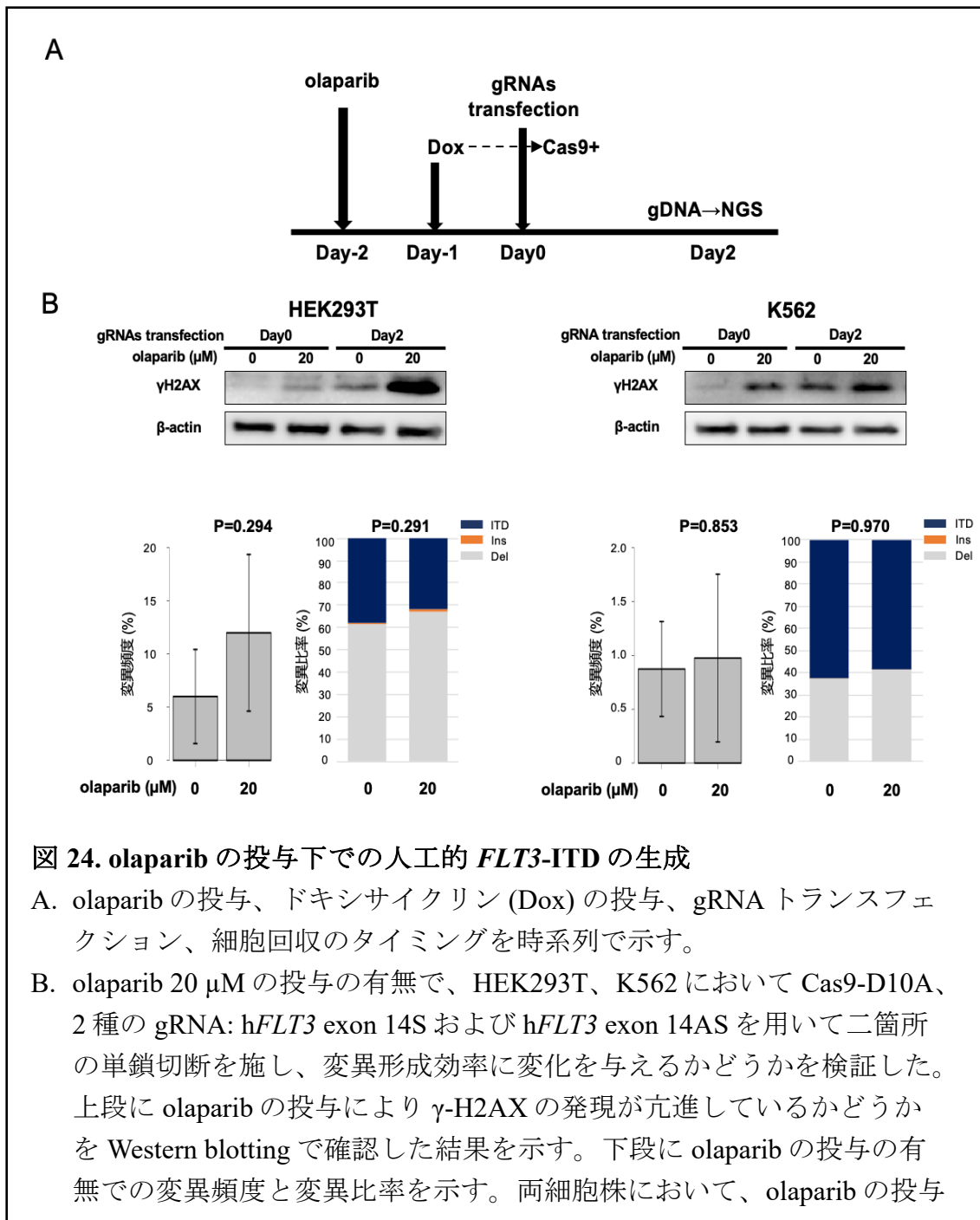
一方、peposertib は DNA-PK に結合してその活性を障害し、NHEJ による二重鎖切断の修復を妨げる (Matsumoto, 2022 ; Schimmel et al, 2023)。細胞増殖に悪影響を及ぼさない最大濃度を同定するために、まずは 0-1000 μM にて細胞増殖アッセイを施行したところ、1 μM 以上で細胞増殖の低下が認められた。その後 0-5 μM にて細胞増殖アッセイを施行したところ、細胞増殖に悪影響を及ぼさない最大濃度は 2 μM であった。2 μM の peposertib の投与にて、フローサイトメトリーにてアネキシン V や Western blotting にて cleaved caspase-3 の検証を行い、有意なアポトーシスを誘導しないことを確認した (図 23)。gRNA のトランスフェクションの 24 時間前にドキシサイクリンを投与し Cas9-D10A を発現させ、45 分前から peposertib 2 μM を投与した (図 25A)。Western blotting にて、peposertib を投与すると DNA-PK 自体は抑制されないものの、DNA-PK のリン酸化は抑制された (図 25B)。生成された変異クローンの解析を行ったところ、HEK293T、K562 共に変異頻度が peposertib の投与により有意に低下した。また、変異比率においても *FLT3*-ITD 生成の割合が有意に低下した (図 25B)。peposertib による

二重鎖切断修復経路の阻害は、*FLT3*-ITD 生成を抑制した。



トーシスアッセイを示す(縦軸が PI、横軸が Annexin V)。olaparib 20 μ M、peposertib 2 μ M 投与にて、アポトーシスの亢進は認めなかった。

C. HEK293T、K562 における Western blotting での cleaved caspase-3 抗体におけるアポトーシス解析を示す。陽性コントロールとして olaparib 40 μ M を投与した K562 の細胞を用いた。olaparib 20 μ M、peposertib 2 μ M 投与にて、アポトーシスの亢進は認めなかった。



で γ -H2AX の発現は亢進するものの、変異頻度や ITD 比率の有意な変化は認めなかった。独立した実験を 3 回施行し、変異頻度のデータは平均値 $\pm$ SD として示す。

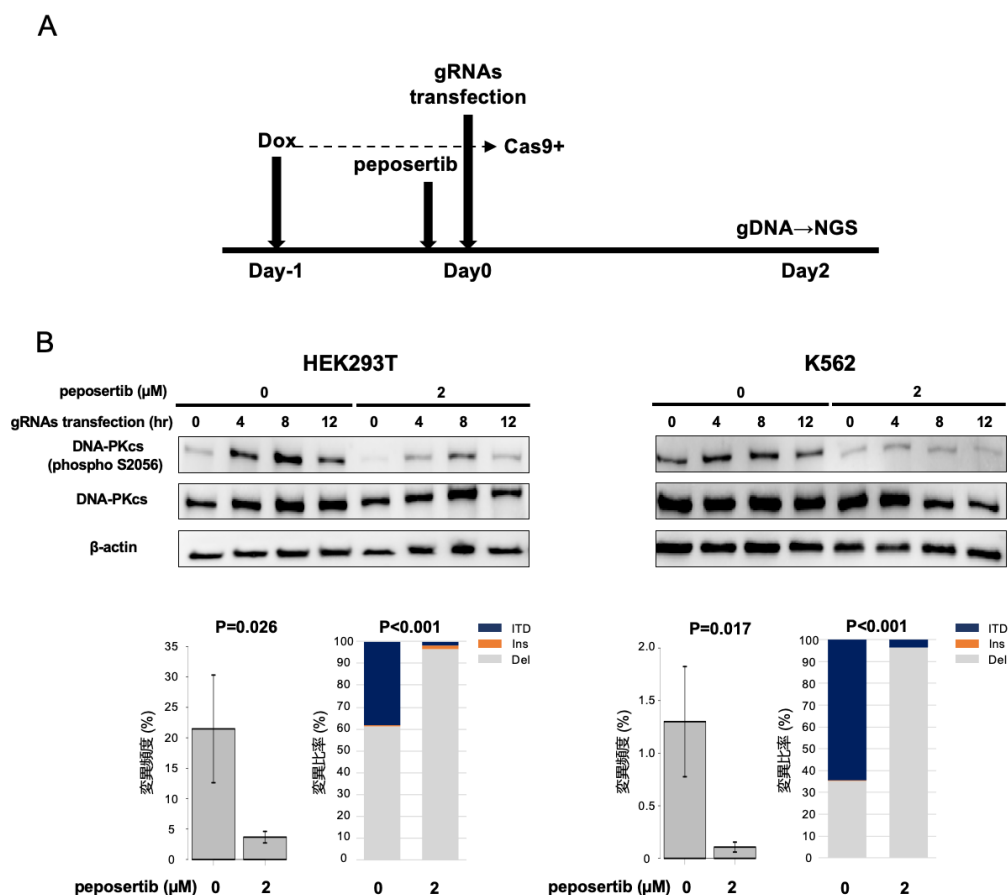


図 25. peposertib の投与下での人工的 *FLT3*-ITD の生成

- A. peposertib の投与、ドキシサイクリン (Dox) の投与、gRNA トランスフェクション、細胞回収のタイミングを時系列で示す。
- B. peposertib 2 μ M の投与の有無で、HEK293T、K562 において Cas9-D10A と 2 種の gRNA: h*FLT3* exon 14S および h*FLT3* exon 14AS を用いて二箇所の単鎖切断を施し、変異形成効率に変化を与えるかどうかを検証した結果を示す。上段に DNA-PKcs および DNA-PKcs のリン酸化の発現の変化を Western blotting で確認した結果を示す。下段に peposertib の投与の有無での変異頻度と変異比率を示す。独立した実験を 3 回施行し、変異頻度のデータは平均値 $\pm$ SD として示す。peposertib により DNA-PKcs のリン酸化は抑制され、変異頻度および ITD 比率は有意に低下した。

さらに、peposertib は用量依存性に *FLT3*-ITD 生成効率を抑制するのかどうかを検証した。前述した検証にて用いた peposertib 2 μ M に加え、1 μ M での検証も行った (図 26)。その結果、HEK293T、K562 において、変異頻度、*FLT3*-ITD の変異比率ともに peposertib の用量に依存して抑制された。また、peposertib の投与下で生成された *FLT3*-ITD の重複結合部の配列を図 9 の分類で解析すると、peposertib の投与の有無によらず、重複結合部に filler や microhomology を有さない *FLT3*-ITD が大多数を占め、*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例での解析と同様の結果であった (図 27)。

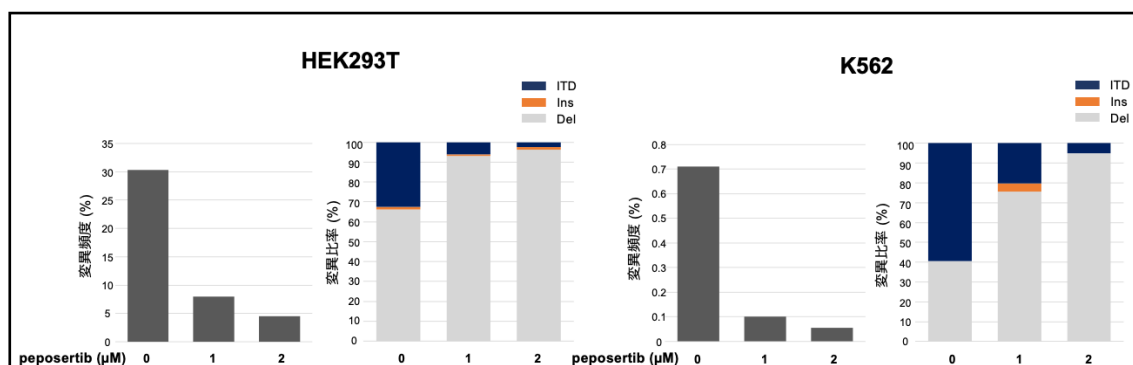


図 26. peposertib の用量依存性の人工的 *FLT3*-ITD 生成抑制

peposertib 0、1、2 μ M 投与下での HEK293T、K562 における、Cas9-D10A、2 種の gRNA: h*FLT3* exon 14S および h*FLT3* exon 14AS を用いて二箇所の単鎖切断を施した際の変異頻度、変異比率の変化を示す。peposertib の用量が高いほど ITD 生成が抑制された。

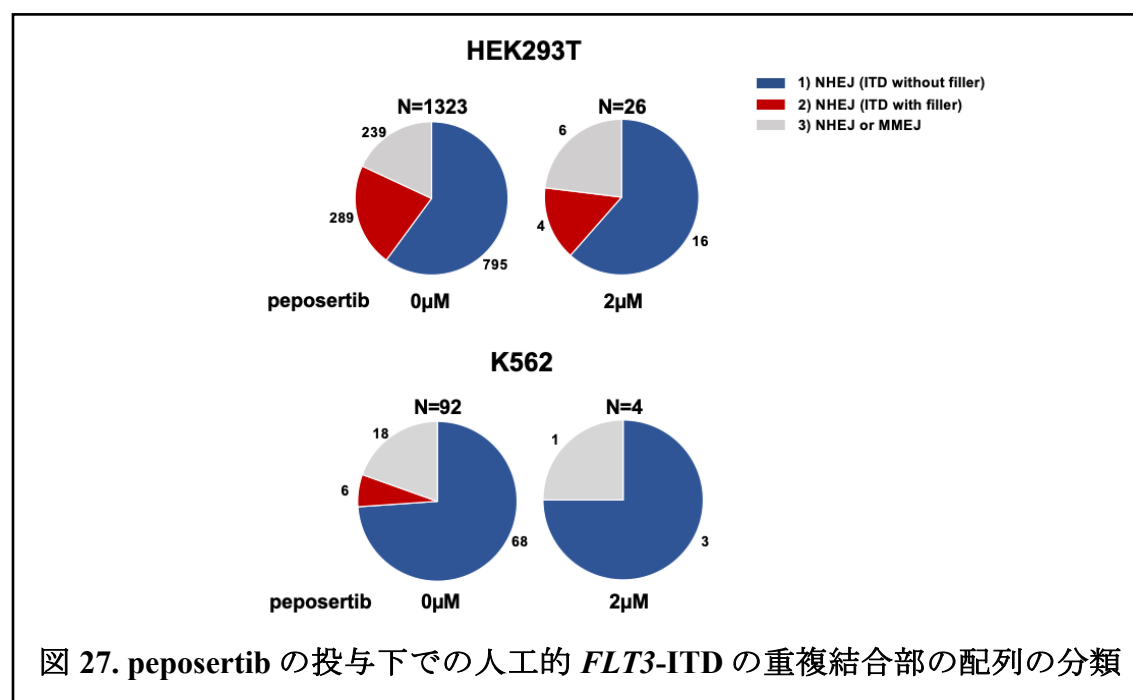
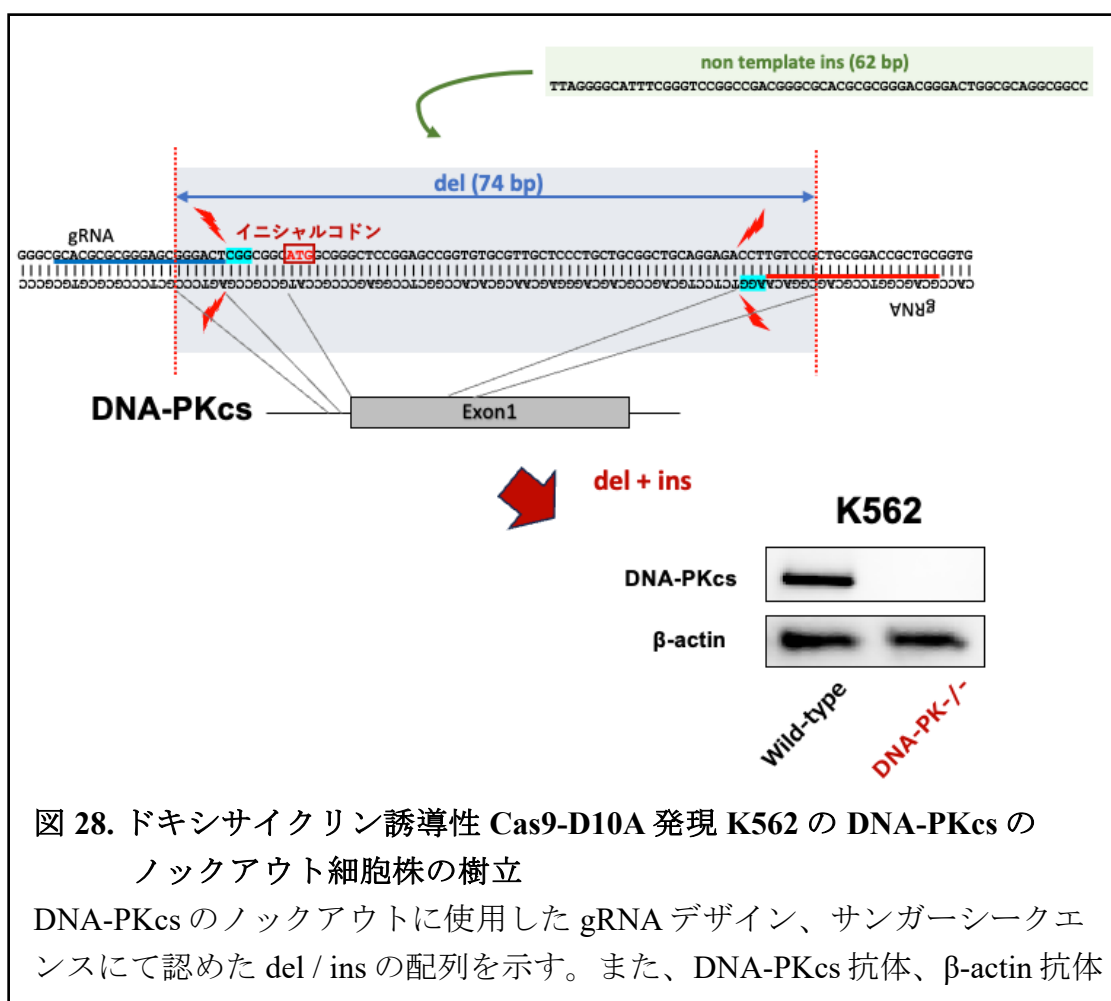


図 27. peposertib の投与下での人工的 *FLT3*-ITD の重複結合部の配列の分類

図 9 の 3 つの分類に基づく解析結果を示す。K562 の peposertib 2 μ M 投与下で生成した *FLT3*-ITD はクローン数が少なく、3 回分の解析としているが、その他の細胞株では 1 回分の解析結果である。peposertib の投与により重複結合部の分類の割合に明らかな変化はなかった。

次に、peposertib によるオフターゲット効果によって *FLT3*-ITD 生成効率が低下している可能性を検証するために、DNA-PKcs のノックアウトにおいても *FLT3*-ITD 生成効率が低下するかどうかを検証した。ドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現 K562 細胞株において、DNA-PKcs をノックアウトし、野生型とノックアウト細胞株において人工的に二箇所の単鎖切断を施し、人工的 *FLT3*-ITD の生成効率が差が生じるかを検証した。K562 において、Cas9-D10A 発現しないように Dox を投与せずに Cas9-nuclease と 2 種の gRNA をトランスフェクションし、DNA-PKcs ノックアウト細胞株を樹立した (図 28)。樹立した細胞株のゲノム DNA を精製し、サンガーシーケンスを行うと、74 bp の欠失及び同部位に 62 bp の挿入配列を認めた (図 28)。



を用いて施行した Western blotting の結果を示す。左列がノックアウトを未施行の細胞、右列が DNA-PKcs をノックアウトした細胞を示す。

樹立した DNA-PKcs ノックアウト細胞株を用いて、DNA-PKcs の存在が *FLT3*-ITD 生成にもたらす影響を検証した。ドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現 K562 細胞株にドキシサイクリンを投与し、24 時間後に gRNA: h*FLT3* exon 14S および h*FLT3* exon 14AS をエレクトロポレーションにてトランスフェクションした。DNA-PKcs 野生型細胞株とノックアウト細胞株における変異生成効率の比較を行った (図 29)。peposertib 2 μ M 投与時と同様に、DNA-PKcs ノックアウト細胞株では、変異頻度および *FLT3*-ITD 比率が統計学的に有意に低下した。これらの結果から、*FLT3*-ITD 生成は対側鎖における二箇所の一鎖切断を生じた際に、NHEJを介して *FLT3*-ITD が生成され、peposertib により抑制可能であることが明らかとなった。

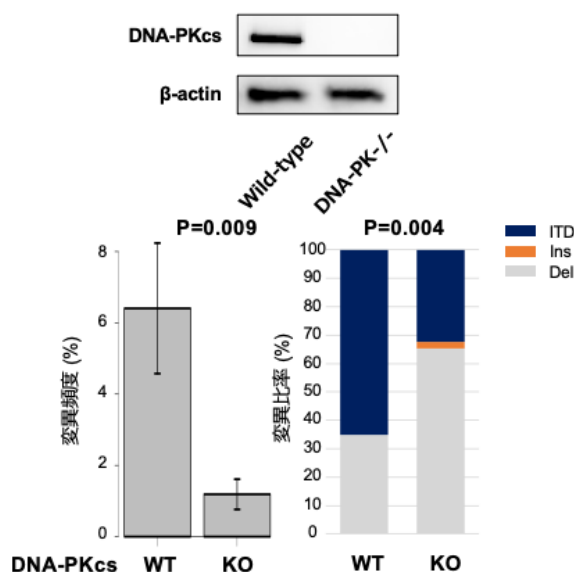


図 29. ドキシサイクリン誘導性 Cas9-D10A 発現 K562 における DNA-PKcs のノックアウトの有無による *FLT3*-ITD 生成効率の比較

野生型 DNA-PKcs 細胞株と DNA-PKcs ノックアウト細胞株の変異頻度、変異比率の結果を示す。独立した実験を 3 回施行し、変異頻度のデータは平均値 $\pm$ SD として示す。peposertib での検証と同様、DNA-PKcs のノックアウトにより、変異頻度、ITD 比率は有意に低下した。

4. 臨床検体における *FLT3*-ITD、*NPM1* 変異の有無での NHEJ 関連因子の発現の比較

NPM1 変異を有する AML では *FLT3*-ITD を併発する頻度が高いことが報告されている (Kronke et al, 2013 ; Bezerra et al, 2020)。このことから、*NPM1* 変異や *FLT3*-ITD を有する AML では NHEJ 経路が活性化されることにより *FLT3*-ITD クローンが新たに生成されやすいのではないかと仮説を立てた。*FLT3*-ITD および *NPM1* 変異の有無に応じて、臨床検体における NHEJ 関連因子 (DNA-PKcs、Ku80、Ku70、LIG4) の発現を RT-PCR で比較した。患者背景を表 4 に示す。*NPM1* 変異陰性かつ *FLT3*-ITD 陰性 AML10 症例、*NPM1* 変異陽性かつ *FLT3*-ITD 陰性 AML10 症例、*NPM1* 変異陰性かつ *FLT3*-ITD 陽性 AML10 症例、*NPM1* 変異陽性かつ *FLT3*-ITD 陽性 AML10 症例を対象とした。患者背景に有意差はなかった。

表 4. *FLT3*-ITD、*NPM1* 変異の有無での NHEJ 関連因子の発現の比較で対象となった臨床検体 40 症例の患者背景

左列から *NPM1* 変異陰性かつ *FLT3*-ITD 陰性 AML10 症例、*NPM1* 変異陽性かつ *FLT3*-ITD 陰性 AML10 症例、*NPM1* 変異陰性かつ *FLT3*-ITD 陽性 AML10 症例、*NPM1* 変異陽性かつ *FLT3*-ITD 陽性 AML10 症例を示す。各行は年齢、性別、核型、芽球割合を示す。

	全症例 (N=40)	<i>FLT3</i> -ITD 陰性 (N=20)		<i>FLT3</i> -ITD 陽性 (N=20)		P value
		<i>NPM1</i> 野生型 (N=10)	<i>NPM1</i> 変異 (N=10)	<i>NPM1</i> 野生型 (N=10)	<i>NPM1</i> 変異 (N=10)	
年齢	65.5 [32-91]	60 [39-90]	71.5 [40-91]	63 [32-85]	70.5 [43-89]	0.644
<性別>						
男性	19	8	3	4	4	0.153
女性	21	2	7	6	6	
<核型>						
正常核型	35	9	10	8	8	0.726
その他	5	1	0	2	2	
芽球 (%)	88.8 [34.5-99]	85 [75.5-95.5]	86 [42-99]	84.9 [34.5-97]	95 [50.4-99]	0.161

RT-PCR の結果、*FLT3*-ITD を有する AML では DNA-PKcs および Ku80 の発現が有意に亢進し、*NPM1* 変異を有する AML では DNA-PKcs および Ku70 の発現が有意に亢進していた (図 30A, B)。さらに、*FLT3*-ITD および *NPM1* 変異の有無に基づいて 4 群に分け、DNA-PKcs の発現を比較したところ、*FLT3*-ITD と *NPM1* 変異がともに陽性の症例で DNA-PKcs の発現が統計学的に有意に亢進していた (図 30C)。上記より、*NPM1* 変異や *FLT3*-ITD を有する AML では DNA 損傷が生じた場合に、NHEJ による DNA 修復機構により新たな *FLT3*-ITD が生じやすいのではないかと考えられた。

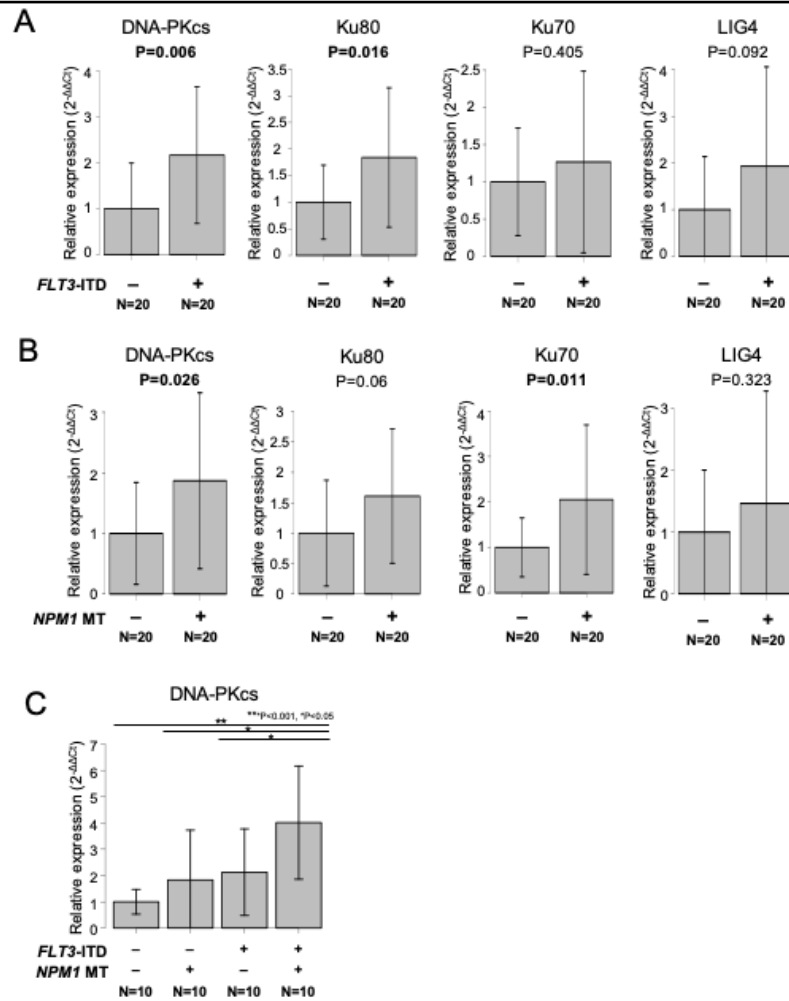


図 30. 臨床検体における *FLT3*-ITD、*NPM1* 変異の有無での NHEJ 関連因子の発現の比較

- A. *FLT3*-ITD 陰性 AML20 症例、*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の DNA-PKcs、Ku80、Ku70、LIG4 の発現を RT-PCR で比較した結果を示す。エラーバーは平均値±標準偏差を示す。ITD 陽性群で DNA-PKcs、Ku80 の発現が有意に亢進していた。
- B. *NPM1* 変異陰性 AML20 症例、*NPM1* 変異陽性 AML20 症例の DNA-PKcs、Ku80、Ku70、LIG4 の発現を RT-PCR で比較した結果を示す。エラーバーは平均値±標準偏差を示す。*NPM1* 変異陽性群で DNA-PKcs、Ku70 の発現が有意に亢進していた。
- C. DNA-PKcs の発現量の比較を *NPM1* 変異および *FLT3*-ITD 陰性、*NPM1* 変異のみ陽性、*FLT3*-ITD のみ陽性、いずれも陽性の AML10 症例ずつを対象に施行した。エラーバーは平均値±標準偏差を示す。*NPM1* 変異および ITD 陽性群で最も DNA-PKcs の発現が亢進していた。

【考察】

FLT3-ITD の長さやアリル比による予後への影響や *FLT3* 阻害剤の治療効果の解析、NGS による微小残存病変 (minimal residual disease、MRD) のモニタリングに関する報告は複数存在する (Perl et al, 2019 ; Cortes et al, 2019 ; Erba et al, 2023 ; Schlenk et al, 2014 ; Kim et al, 2015 ; Dohner et al, 2017 ; Sakaguchi et al, 2018 ; Spencer et al, 2013 ; Schranz et al, 2018 ; Levis et al, 2018)。しかしながら、*FLT3*-ITD の生成機構は未だ明らかではなく、新たな *FLT3*-ITD 生成を抑制する方法は存在しない。

FLT3-ITD の生成機構を解明するため、*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の *FLT3* exon 14-15 領域を NGS にてディープシーケンシングを行った結果、*FLT3*-ITD 陽性 AML には一症例に VAF や長さの異なる多様な *FLT3*-ITD および欠失変異を回文様配列の近傍に認めた。同じ領域に *FLT3*-ITD と欠失変異を認めたということは、クラスター領域である *FLT3* exon 14 の DNA 損傷が変異生成の起点となることが示唆された。また、*FLT3*-ITD の重複結合部の塩基配列により、1) 重複結合部に、塩基挿入 (filler) や microhomology を有さない *FLT3*-ITD、2) 重複結合部に filler を有する *FLT3*-ITD、3) 重複結合部に microhomology を有する *FLT3*-ITD に分類した。1)、2)の配列では、非相同末端結合 (NHEJ) による修復で *FLT3*-ITD が生成されていることが予想されたが、3)の配列では、NHEJ による修復である可能性とマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) による修復で生成された可能性があると考えられた。

これらの結果より *FLT3*-ITD は回文様配列を有することで DNA 損傷を受けやすく、その修復の過程で *FLT3*-ITD が生成されると仮説を立てた。*FLT3* 領域には欠失変異や挿入欠失変異の報告も複数されており (Armstrong et al, 2004 ; Syampurnawati et al, 2007 ; Chang et al, 2010 ; Mullighan et al, 2011 ; Zhang et al, 2011 ; Deeb et al, 2014)、不完全な DNA 損傷修復では *FLT3*-ITD のみならず欠失変異や挿入変異も起こり得ることが示唆された。また、*FLT3*-ITD はゲノム不安定性を有することが知られている (Lobachev et al, 2007 ; Rebecchi et al, 2017 ; Novak et al, 2012 ; Ali et al, 2024)。このゲノム不安定性は、*FLT3*-ITD が生成された結果を指すのではなく、複数の異なる *FLT3*-ITD が生成されうる *FLT3* 遺伝子の環境自体を反映している可能性がある。

CRISPR/Cas9 システムを用いて人工的に対側鎖での二箇所の単鎖切断を施すことにより、マウス胚性幹細胞のヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (*HPRT*) 遺伝子 (Schimmel et al, 2017)、シロイヌナズナの遺伝子領域、遺伝子間領域、およびヘテロクロマチン領域 (Schiml et al, 2016)、およびヒト網膜色素上皮-1 (RPE-1) 細胞の *FLT3* において、tandem duplication を生成可能であることが報告されている (Schimmel et al, 2021)。我々は、HEK293T、K562、TF-

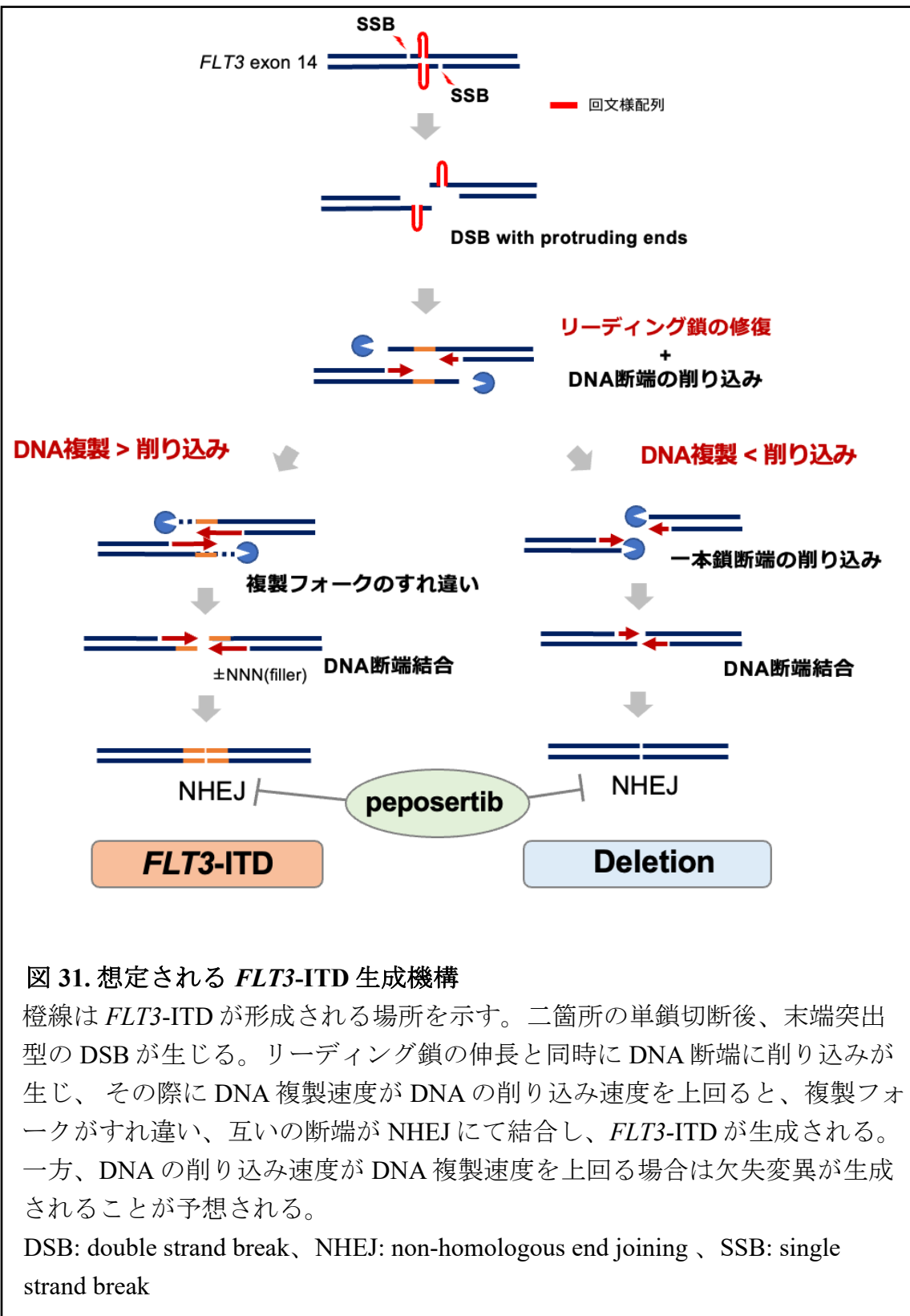
1、Ba/F3において、*FLT3* exon 14の回文様配列近傍で対側鎖における二箇所の単鎖切断を施すことが、一箇所の二重鎖切断や二箇所の二重鎖切断よりも高率に*FLT3*-ITDを生成可能であることを明らかにした。生成された人工的*FLT3*-ITDクローンの長さは臨床検体とは異なり、3N bp、3N+1 bp、および3N+2 bpで偏りなく、均等に存在した。この結果はDNA損傷修復直後にはインフレーム変異以外のITDもランダムに形成され、その後*FLT3*を発現する臨床検体ではインフレーム変異が選択的に増殖していくことが示唆された。また、重複結合部の塩基配列を3つに分類したところ、臨床検体と同様にmicrohomologyを有さないITDが大部分であったことから、NHEJによる*FLT3*-ITD生成機構が示唆された。*FLT3*-ITD陽性AML症例300例のうち114例(38%)でfillerを伴うITDを認めたことが報告されている(Borrow et al, 2019)。Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)がfillerを有する*FLT3*-ITDの生成を促進すると推測されている(Borrow et al, 2019)。我々のモデルでは、4つの細胞株で6.5% ~ 21.8%の割合でfillerを含む人工的*FLT3*-ITDを認めた。

既報では、*HPRT*遺伝子において、NHEJに必須のKu80をノックアウトしたところ、tandem duplicationの形成効率が著明に低下したことが報告されている(Schimmel et al, 2021)。Ku80はDNA切断断端に結合し、Ku70と二量体を形成してNHEJによる修復に関わる。しかし、これらの解析ではDNA損傷修復経路阻害剤を用いた検証はなされていない。そこで、単鎖切断修復を阻害するolaparibと二重鎖切断修復を阻害するpeposertibを用いて人工的DNA損傷を与え、変異形成効率を検証した。olaparibはPARP1の選択的阻害剤であり、卵巣癌、乳癌、前立腺癌などの*BRCA1/2*変異腫瘍に臨床応用されている(Mateo et al, 2020 ; Zheng et al, 2020 ; Pillay et al, 2019)。*BRCA1/2*は、エラーのない相同組換え(homologous recombination, HR)に不可欠である。PARP1の阻害により単鎖切断が修復されず、最終的にDNA複製過程で二重鎖切断に変換された際、*BRCA1/2*変異腫瘍の合成致死がもたらされる(Ali et al, 2024 ; Padella et al, 2022)。我々の実験ではolaparib投与下でHEK293T、K562に人工的にDNA損傷を与えたところ、*FLT3*-ITD生成に影響はなかった。一方、peposertibはNHEJに不可欠なDNA-PKの自己リン酸化を選択的に阻害する(Matsumoto, 2022 ; Schimmel et al, 2023)。一部の悪性腫瘍において未修復の二重鎖切断を蓄積させ、電離放射線やトポイソメラーゼII阻害剤などの抗腫瘍活性を増強する(Haines et al, 2021 ; Gordhandas et al, 2022 ; Patterson-Fortin et al, 2022)。peposertibは現在、進行期固形腫瘍(NCT02516813)および再発・難治性AML(NCT03983824)に対する化学療法との併用の効果を検証するための臨床試験が行われている。我々は、HEK293T、K562において、peposertibの投与により、変異頻度および*FLT3*-ITD変異比率が有意に低下することを示した。これらの

結果は、二箇所の単鎖切断を誘導したにもかかわらず、*FLT3*-ITD の生成には単鎖切断修復経路ではなく、二重鎖切断修復経路が重要であることを示した。

これらの検証結果から、*FLT3*-ITD 生成機構を考察した (図 31)。これまで、tandem duplication は、対側鎖に位置する DNA 断端が microhomology を手掛かりに結合 (MMEJ) し生成される機構である、DNA 複製スリッピングにより形成され则认为られてきた (Borrow et al, 2019 ; Schiml et al, 2016 ; Vaughn et al, 2014)。しかし、*FLT3*-ITD 陽性 AML20 症例の解析及び人工的 *FLT3*-ITD の解析により重複結合部の塩基配列には microhomology を有さない *FLT3*-ITD が大多数であった (図 10, 17)。また、DNA 複製スリッピングでは、MMEJ が起きた後に対側鎖の二箇所の DNA 断端の単鎖切断修復が働く必要があるが、olaparib により単鎖切断修復を阻害しても変わらず *FLT3*-ITD は生成されることから、DNA 複製スリッピングでは *FLT3*-ITD の生成機構の説明はつかないと考えられる。これらの結果から、二箇所の単鎖切断に対する NHEJ による *FLT3*-ITD 生成機構を考察した。人工的 *FLT3*-ITD の配列の開始位置と終了位置は切断部位に一致するのではなく、切断点間の内側で生成される (図 14) ことが明らかとなったことから、リーディング鎖の伸長に加え、対側鎖において突出した DNA 断端の削り込みが同時に生じていると考えられる。DNA 断端の削り込みの速度を DNA 複製の速度が上回ることで、複製フォークがすれ違い、最終的に NHEJ にて断端結合することで *FLT3*-ITD が生成されるという新たな生成機構を想定している (図 31)。

NPM1 変異、*NUP98::NSD1*、*DEK::NUP214* などの特定の遺伝的背景を有する AML は *FLT3*-ITD を効率に伴うことが知られている (Sandahl et al, 2014 ; Hollink et al, 2011 ; Kronke et al, 2013)。 *NPM1* 変異を伴う AML では、*FLT3*-ITD を高率に認め (45.3%、53 例中 24 例)、再発時の *FLT3*-ITD クローンの獲得は最大 40%の症例で認められる (Kronke et al, 2013 ; Bezerra et al, 2020)。 *FLT3*-ITD は白血病クローン進化の過程の後期に起こり得る変異であることが示唆される (Shlush et al, 2012 ; Shouval et al, 2014 ; Morita et al, 2020)。このような、特定の遺伝的背景が *FLT3*-ITD の生成を促進することが予想される場合、peposertib により NHEJ 修復経路を抑制することにより、臨床経過中の新規 *FLT3*-ITD クローンの生成を抑制できる可能性がある。また、複数の *FLT3*-ITD クローンを持つ症例は、単一の *FLT3*-ITD クローンを持つ症例よりも予後不良であることが報告されている (Kottaridis et al, 2001 ; Schranz et al, 2018 ; Gale et al, 2008 ; Borthakur et al, 2012 ; Levis et al, 2025)。化学療法と組み合わせた peposertib による治療は、抗腫瘍効果を増強するだけでなく、新たな *FLT3*-ITD 生成を抑制できる可能性がある。



以上より、我々は、*FLT3*-ITD は対側鎖の二箇所単鎖切断が生じた際に NHEJ による二重鎖切断修復により生成されることを明らかとした。CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した人工的 *FLT3*-ITD は臨床検体の *FLT3*-ITD と類似しており、DNA 損傷修復経路を標的とする *peposertib* を使用し、NHEJ が必須であることを初めて証明した。*FLT3*-ITD 生成には、これまで予想されていたゲノムスリッピングによる *tandem duplication* 形成モデルでは焦点が当てられていなかった、断端結合の最終ステップにおいて NHEJ が重要であることを明らかにした。

【総括と結論】

①本研究全体から得られた新知見

- *FLT3*-ITD 陽性 AML には VAF や長さの異なる多様な *FLT3*-ITD および欠失変異を *FLT3* exon14-15 領域の回文様配列近傍に認める。
- 臨床検体及び人工的 *FLT3*-ITD は重複結合部の配列により、1) 重複結合部に、塩基挿入 (filler) や微小相同配列 (microhomology) を有さない *FLT3*-ITD、2) 重複結合部に filler を有する *FLT3*-ITD、3) 重複結合部に microhomology を有する *FLT3*-ITD、に分類され、microhomology を有さない ITD が大多数である。
- ヒト上皮細胞である HEK293T、ヒト白血病細胞である K562、TF-1、マウス血液細胞である Ba/F3 において、CRISPR/Cas9 システムを用いて人工的に DNA 損傷を与えた際、対側鎖における二箇所単鎖切断において、最も効率よく *FLT3*-ITD が生成される。
- 人工的 *FLT3*-ITD は切断部位間距離に一致した長さではなく、切断部位の内側で生成される。
- 3 の倍数のインフレーム変異のみならず、3N+1 bp、3N+2 bp の *FLT3*-ITD も均等に作出される。
- 5'overhang よりも 3'overhang でより効率よく *FLT3*-ITD が生成される。
- peposertib の投与や DNA-PKcs のノックアウトにより非相同末端結合 (NHEJ) による二重鎖切断修復を阻害すると、*FLT3*-ITD 形成が抑制される。

②新知見の意義

- *FLT3*-ITD 生成にはゲノムスリッピングではなく、NHEJ による断端結合が不可欠であることが示唆され、実臨床において、化学療法とともに peposertib を併用すれば、抗腫瘍効果を高めるのみならず、DNA 損傷を受けた際に新規 *FLT3*-ITD の生成を抑制し、新規クローンでの再発抑制につながる可能性がある。

③本研究から得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

- *FLT3* 発現 AML 細胞株で人工的 *FLT3*-ITD を作出し、増殖アドバンテージを得る ITD クローンの特徴を明らかにするとともに、薬剤感受性や機能的解析を行う。
- *FLT3*-ITD を併発しやすい遺伝子変異 (*NPM1* 変異、*DEK::NUP214*、*NUP98::NSD1* 等) を有する細胞株において、ITD を生じやすい理由を明らかにする。

④今後の課題

- 増殖アドバンテージを得る ITD クローンの特徴を明らかにするために、*FLT3* 発現 AML 細胞株を用いて同様の実験を行い、経時的に細胞を回収し、NGS にて変異解析を行っていく必要がある。
- *FLT3* 発現 AML 細胞株において、Cas9 のトランスフェクションを行う際のトランスフェクション方法や条件の検討が必要である。
- *FLT3*-ITD を併発しやすい遺伝子変異を有する細胞株の樹立及び臨床検体での NHEJ 関連因子の発現量の解析などを行う必要がある。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 豊嶋 崇徳教授に深く感謝いたします。また、直接の御指導を賜りました北海道大学病院臨床研修センター 小野澤 真弘 講師に心より感謝申し上げます。最後に様々な面においてご協力いただいた血液内科学教室の皆様に心よりお礼申し上げます。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はない。

【引用文献】

- Abdel-Wahab O and Levine RL (2013). Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*, 121, 3563-3572.
- Ali U, Vungarala S and Tiriveedhi V (2024). Genomic Features of Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer: Impact on Testing and Immunotherapy. *Genes (Basel)*, 15.
- Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA, Sallan SE and Korsmeyer SJ (2004). FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 103, 3544-3546.
- Bezerra MF, Lima AS, Pique-Borras MR, Silveira DR, Coelho-Silva JL, Pereira-Martins DA, Weinhauser I, Franca-Neto PL, Quek L, Corby A, et al (2020). Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. *Blood*, 135, 870-875.
- Borrow J, Dyer SA, Akiki S and Griffiths MJ (2019). Terminal deoxynucleotidyl transferase promotes acute myeloid leukemia by priming FLT3-ITD replication slippage. *Blood*, 134, 2281-2290.
- Borthakur G, Kantarjian H, Patel KP, Ravandi F, Qiao W, Faderl S, Kadia T, Luthra R, Pierce S and Cortes JE (2012). Impact of numerical variation in FMS-like tyrosine kinase receptor 3 internal tandem duplications on clinical outcome in normal karyotype acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 118, 5819-5822.
- Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ, Jr., Laird PW, et al (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 368, 2059-2074.
- Chang P, Kang M, Xiao A, Chang J, Feusner J, Buffler P and Wiemels J (2010). FLT3 mutation incidence and timing of origin in a population case series of pediatric leukemia. *BMC Cancer*, 10, 513.
- Cortes JE, Khaled S, Martinelli G, Perl AE, Ganguly S, Russell N, Kramer

A, Dombret H, Hogge D, Jonas BA, et al (2019). Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20, 984-997.

Daver N, Schlenk RF, Russell NH and Levis MJ (2019). Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*, 33, 299-312.

Deeb KK, Smoskey MT, DeFedericis H, Deeb G, Sait SN, Wetzler M, Wang ES and Starostik P (2014). Deletion and deletion/insertion mutations in the juxtamembrane domain of the FLT3 gene in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*, 3, 86-89.

Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenau P, Larson RA, et al (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129, 424-447.

Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenau P, Godley LA, Hasserjian RP, et al (2022). Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood*.

Dohner H, Weisdorf DJ and Bloomfield CD (2015). Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 373, 1136-1152.

Erba HP, Montesinos P, Kim HJ, Patkowska E, Vrhovac R, Zak P, Wang PN, Mitov T, Hanyok J, Kamel YM, et al (2023). Quizartinib plus chemotherapy in newly diagnosed patients with FLT3-internal-tandem-duplication-positive acute myeloid leukaemia (QuANTUM-First): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 401, 1571-1583.

Finnon R, Brown N, Moody J, Badie C, Olme CH, Huiskamp R, Meijne E, Suttmüller M, Rosemann M and Bouffler SD (2012). Flt3-ITD mutations in a mouse model of radiation-induced acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 26, 1445-1446.

Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC and

Medical Research Council Adult Leukaemia Working P (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 111, 2776-2784.

Garcia TB, Snedeker JC, Baturin D, Gardner L, Fosmire SP, Zhou C, Jordan CT, Venkataraman S, Vibhakar R and Porter CC (2017). A Small-Molecule Inhibitor of WEE1, AZD1775, Synergizes with Olaparib by Impairing Homologous Recombination and Enhancing DNA Damage and Apoptosis in Acute Leukemia. *Mol Cancer Ther*, 16, 2058-2068.

Gordhandas SB, Manning-Geist B, Henson C, Iyer G, Gardner GJ, Sonoda Y, Moore KN, Aghajanian C, Chui MH and Grisham RN (2022). Pre-clinical activity of the oral DNA-PK inhibitor, peposertib (M3814), combined with radiation in xenograft models of cervical cancer. *Sci Rep*, 12, 974.

Grimwade D, Ivey A and Huntly BJ (2016). Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*, 127, 29-41.

Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C and Duyster J (2005). FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*, 105, 4792-4799.

Haines E, Nishida Y, Carr MI, Montoya RH, Ostermann LB, Zhang W, Zenke FT, Blaukat A, Andreeff M and Vassilev LT (2021). DNA-PK inhibitor peposertib enhances p53-dependent cytotoxicity of DNA double-strand break inducing therapy in acute leukemia. *Sci Rep*, 11, 12148.

Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters ST, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, van Galen JF, Beverloo HB, Sonneveld E, Kaspers GJ, et al (2011). NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*, 118, 3645-3656.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-821.

Kaburagi T, Shiba N, Yamato G, Yoshida K, Tabuchi K, Ohki K, Ishikita E, Hara Y, Shiraishi Y, Kawasaki H, et al (2023). UBTF-internal tandem duplication as a novel poor prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*; 62, 202-209.

Kanda Y (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48, 452-458.

Karnan S, Hanamura I, Ota A, Takasugi S, Nakamura A, Takahashi M, Uchino K, Murakami S, Wahiduzzaman M, Quang Vu L, et al (2021). CD52 is a novel target for the treatment of FLT3-ITD-mutated myeloid leukemia. *Cell Death Discov*, 7, 121.

Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Spath D, Krauter J, Ganser A, et al (2009). Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*, 114, 2386-2392.

Kim A and Pyykko I (2011). Size matters: versatile use of PiggyBac transposons as a genetic manipulation tool. *Mol Cell Biochem*, 354, 301-309.

Kim Y, Lee GD, Park J, Yoon JH, Kim HJ, Min WS and Kim M (2015). Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J*, 5, e336.

Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, et al (1999). Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 93, 3074-3080.

Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, et al (1997). Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*, 11, 1447-1452.

Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H and Naoe T

(1998). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12, 1333-1337.

Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, et al (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 98, 1752-1759.

Kottaridis PD, Gale RE and Linch DC (2003). Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*, 122, 523-538.

Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik VI, Kuhn MW, Rucker FG, Holzmann K, Paschka P, Kapp-Schworer S, et al (2013). Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*, 122, 100-108.

Levis MJ, Hamadani M, Logan BR, Jones RJ, Singh AK, Litzow MR, Wingard JR, Papadopoulos EB, Perl AE, Soiffer RJ, et al (2025). Measurable residual disease and posttransplantation gilteritinib maintenance for patients with FLT3-ITD-mutated AML. *Blood*, 145, 2138-2148.

Levis MJ, Perl AE, Altman JK, Gocke CD, Bahceci E, Hill J, Liu C, Xie Z, Carson AR, McClain V, et al (2018). A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations. *Blood Adv*, 2, 825-831.

Litzow MR (2005). More flitting about FLT3. *Blood*, 106, 3331-3332.

Lobachev KS, Rattray A and Narayanan V (2007). Hairpin- and cruciform-mediated chromosome breakage: causes and consequences in eukaryotic cells. *Front Biosci*, 12, 4208-4220.

Lu L, Jia H, Droge P and Li J (2007). The human genome-wide distribution of DNA palindromes. *Funct Integr Genomics*, 7, 221-227.

Lu S, Wang G, Bacolla A, Zhao J, Spitser S and Vasquez KM (2015). Short Inverted Repeats Are Hotspots for Genetic Instability: Relevance to Cancer Genomes. *Cell Rep*, 10, 1674-1680.

Luo M, Miao YR, Ke YJ, Guo AY and Zhang Q (2023). A comprehensive landscape of transcription profiles and data resources for human leukemia. *Blood Adv*, 7, 3435-3449.

Ma L, Feng DR, Zhong MH, Wang LW, Cai Y, Ma YG and Huang SZ (2011). [Analysis of ITD characteristics in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD positive]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 19, 1161-1165.

Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L and Church GM (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 31, 833-838.

Mateo J, Porta N, Bianchini D, McGovern U, Elliott T, Jones R, Syndikus I, Ralph C, Jain S, Varughese M, et al (2020). Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 21, 162-174.

Matsumoto Y (2022). Development and Evolution of DNA-Dependent Protein Kinase Inhibitors toward Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 23.

McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, Ducker GS, Banerji N, Higgins RR, Mendiola JR and Reinartz JJ (2010). FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. *Arch Pathol Lab Med*, 134, 1143-1151.

Morita K, Wang F, Jahn K, Hu T, Tanaka T, Sasaki Y, Kuipers J, Loghavi S, Wang SA, Yan Y, et al (2020). Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun*, 11, 5327.

Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J, et al (2011). CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*,

471, 235-239.

Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T and Misawa S (1996). Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10, 1911-1918.

Novak RL, Harper DP, Caudell D, Slape C, Beachy SH and Aplan PD (2012). Gene expression profiling and candidate gene resequencing identifies pathways and mutations important for malignant transformation caused by leukemogenic fusion genes. *Exp Hematol*, 40, 1016-1027.

Onodera Y, Nam JM, Horikawa M, Shirato H and Sabe H (2018). Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat Commun*, 9, 2682.

Onozawa M, Zhang Z, Kim YJ, Goldberg L, Varga T, Bergsagel PL, Kuehl WM and Aplan PD (2014). Repair of DNA double-strand breaks by templated nucleotide sequence insertions derived from distant regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 7729-7734.

Orta ML, Hoglund A, Calderon-Montano JM, Dominguez I, Burgos-Moron E, Visnes T, Pastor N, Strom C, Lopez-lazaro M and Helleday T (2014). The PARP inhibitor Olaparib disrupts base excision repair of 5-aza-2'-deoxycytidine lesions. *Nucleic Acids Res*, 42, 9108-9120.

Padella A, Ghelli L, Luserna Di Rora A, Marconi G, Ghetti M, Martinelli G and Simonetti G (2022). Targeting PARP proteins in acute leukemia: DNA damage response inhibition and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol*, 15, 10.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, et al (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 374, 2209-2221.

Patterson-Fortin J, Bose A, Tsai WC, Grochala C, Nguyen H, Zhou J, Parmar K, Lazaro JB, Liu J, McQueen K, et al (2022). Targeting DNA Repair with Combined Inhibition of NHEJ and MMEJ Induces Synthetic

Lethality in TP53-Mutant Cancers. *Cancer Res*, 82, 3815-3829.

Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, Montesinos P, Baer MR, Larson RA, Ustun C, et al (2019). Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med*, 381, 1728-1740.

Pillay N, Tighe A, Nelson L, Littler S, Coulson-Gilmer C, Bah N, Golder A, Bakker B, Spierings DCJ, James DI, et al (2019). DNA Replication Vulnerabilities Render Ovarian Cancer Cells Sensitive to Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Inhibitors. *Cancer Cell*, 35, 519-533 e518.

Rebechi MT and Pratz KW (2017). Genomic instability is a principle pathologic feature of FLT3 ITD kinase activity in acute myeloid leukemia leading to clonal evolution and disease progression. *Leuk Lymphoma*, 58, 1-11.

Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y, Usuki K, Ueki T, Oh I, Mori S, Kawata E, Uoshima N, Kobayashi Y, et al (2018). Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2, 2744-2754.

Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E, Harbott J, Johansson B, Kerndrup G, Adachi S, Auvrignon A, Beverloo HB, Cayuela JM, et al (2014). t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients. *Haematologica*, 99, 865-872.

Schimpl S, Fauser F and Puchta H (2016). Repair of adjacent single-strand breaks is often accompanied by the formation of tandem sequence duplications in plant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 7266-7271.

Schimmel J, Kool H, van Schendel R and Tijsterman M (2017). Mutational signatures of non-homologous and polymerase theta-mediated end-joining in embryonic stem cells. *EMBO J*, 36, 3634-3649.

Schimmel J, Munoz-Subirana N, Kool H, van Schendel R and Tijsterman M (2021). Small tandem DNA duplications result from CST-guided Pol alpha-primase action at DNA break termini. *Nat Commun*, 12, 4843.

Schimmel J, Munoz-Subirana N, Kool H, van Schendel R, van der Vlies S, Kamp JA, de Vrij FMS, Kushner SA, Smith GCM, Boulton SJ, et al (2023). Modulating mutational outcomes and improving precise gene editing at CRISPR-Cas9-induced breaks by chemical inhibition of end-joining pathways. *Cell Rep*, 42, 112019.

Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, Held G, Brossart P, Lubbert M, Salih HR, et al (2014). Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*, 124, 3441-3449.

Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W and Haferlach T (2012). Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer*, 51, 910-924.

Schranz K, Hubmann M, Harin E, Vosberg S, Herold T, Metzeler KH, Rothenberg-Thurley M, Janke H, Braundl K, Ksienzyk B, et al (2018). Clonal heterogeneity of FLT3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 9, 30128-30145.

Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL and Hsu HC (2002). Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*, 100, 2387-2392.

Shlush LI, Chapal-Ilani N, Adar R, Pery N, Maruvka Y, Spiro A, Shouval R, Rowe JM, Tzukerman M, Bercovich D, et al (2012). Cell lineage analysis of acute leukemia relapse uncovers the role of replication-rate heterogeneity and microsatellite instability. *Blood*, 120, 603-612.

Shouval R, Shlush LI, Yehudai-Resheff S, Ali S, Pery N, Shapiro E, Tzukerman M, Rowe JM and Zuckerman T (2014). Single cell analysis exposes intratumor heterogeneity and suggests that FLT3-ITD is a late event in leukemogenesis. *Exp Hematol*, 42, 457-463.

Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM, Payton JE, Szankasi P, Kelley TW, Kulkarni S, Pfeifer JD and Duncavage EJ (2013). Detection of FLT3 internal tandem duplication in targeted, short-read-length, next-generation sequencing data. *J Mol Diagn*, 15, 81-93.

Syampurnawati M, Tatsumi E, Furuta K, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S, Saigo K, Matsui T, Takahashi T, et al (2007). HLA-DR-negative AML (M1 and M2): FLT3 mutations (ITD and D835) and cell-surface antigen expression. *Leuk Res*, 31, 921-929.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, et al (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99, 4326-4335.

Vaughn JN and Bennetzen JL (2014). Natural insertions in rice commonly form tandem duplications indicative of patch-mediated double-strand break induction and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 6684-6689.

Wakita S, Yamaguchi H, Omori I, Terada K, Ueda T, Manabe E, Kurosawa S, Iida S, Ibaraki T, Sato Y, et al (2013). Mutations of the epigenetics-modifying gene (DNMT3a, TET2, IDH1/2) at diagnosis may induce FLT3-ITD at relapse in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 27, 1044-1052.

Yokoyama S, Onozawa M, Yoshida S, Miyashita N, Kimura H, Takahashi S, Matsukawa T, Goto H, Fujisawa S, Miki K, et al (2023). Subclinical minute FLT3-ITD clone can be detected in clinically FLT3-ITD-negative acute myeloid leukaemia at diagnosis. *Br J Haematol*.

Yoshida S, Onozawa M, Miyashita N, Kimura H, Takahashi S, Yokoyama S, Matsukawa T, Hirabayashi S, Mori A, Hidaka D, et al (2023). Clinical features of complex karyotype in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*, 117, 544-552.

Zhang F, Wen Y and Guo X (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 23, R40-46.

Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, Buetow

KH, Carroll WL, Chen IM, Devidas M, et al (2011). Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 118, 3080-3087.

Zheng F, Zhang Y, Chen S, Weng X, Rao Y and Fang H (2020). Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomed Pharmacother*; 123, 109661.