



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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



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 吉田 匠汰

学 位 論 文 題 名

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)

【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 損傷修復経路の阻害により 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 Cas9-nuclease に加え、Nickase 改変型 Cas9-D10A、Cas9-H840A を用いて一箇所の二重鎖切断 (double strand break, DSB)、二箇所の二重鎖切断、一箇所の単鎖切断 (single strand break, SSB)、二箇所の単鎖切断を施した。また、単鎖切断修復経路を阻害するために Olaparib、二重鎖切断修復経路を阻害するために Pposertib 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) 重複結合部分に塩基挿入 (filler) や微小相同配列を有さない *FLT3*-ITD、2) 重複結合部分に filler を有する *FLT3*-ITD、3) 重複結合部分に微小相同配列を有する *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、断端結合部分に微小相同配列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 断端が微小相同配列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られてきた。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微小相同配列を有しない 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、対側鎖において突出した 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 が生成され则认为られた。Peposertib を使用することで、新たな *FLT3*-ITD クロ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にした。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。