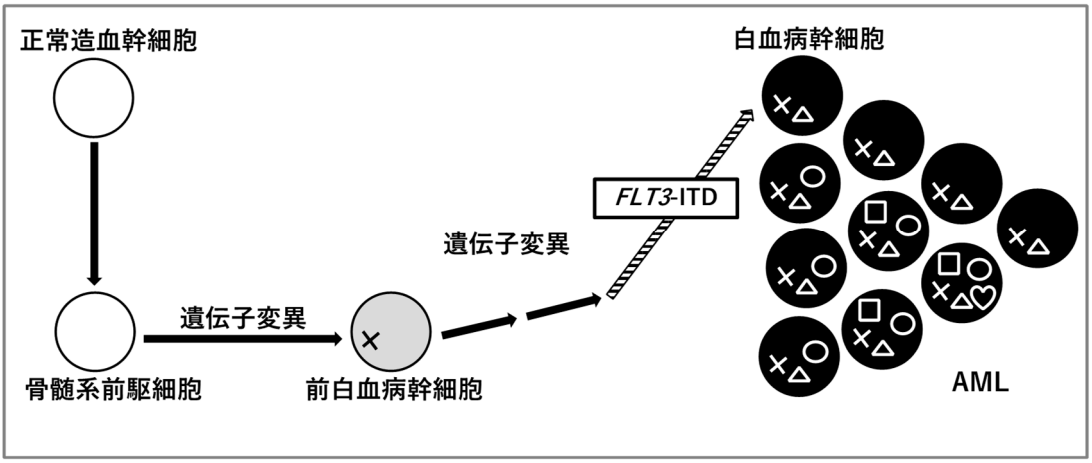
176　*FLT3*-ITD変異による幹細胞活性獲得機序の解明	大森　郁子

【目的】*FLT3*の遺伝子内縦列重複（internal tandem duplication：*FLT3*-ITD）変異陽性白血病は、急性骨髄性白血病（AML）の中でも、特に予後不良として知られている。近年、白血病幹細胞に関する研究が進み、幹細胞活性は、エピゲノム変化によるものであり、遺伝子変異とは独立した予後不良因子であることが明らかになった。本研究では、「*FLT3*-ITD 変異が、何らかのエピゲノムの変化をもたらし、幹細胞活性を付与することにより、*FLT3*-ITD 変異陽性白血病の難治性をもたらす」という仮説の検証、機序の解明を目的とした。

【方法】まず表面抗原として白血病幹細胞分画を有する白血病細胞株に野生型 *FLT3*、*FLT3* のチロシンキナーゼドメイン：*FLT3*-TKD）変異、*FLT3*-ITD 変異を導入した。そして、それらの細胞の性質をシグナル伝達経路、増殖能、幹細胞活性の観点から検証した。

【結果】*FLT3*-ITD 変異は、野生型 *FLT3*、*FLT3*-TKD 変異と異なり、白血病細胞株に幹細胞活性を誘導した。しかし、その機序に関しては未だ不明である。

概念図：AML における白血病幹細胞の発生起源と *FLT3*-ITD 変異



176. *FLT3*-ITD 変異による幹細胞活性獲得機序の解明

大森　郁子

*日本医科大学 血液内科

Key words：*FLT3*-ITD 変異，白血病幹細胞，白血病，エピジェネティクス

緒　言

FLT3-ITD 遺伝子変異は、AML において約 20%と高頻度に認められる遺伝子変異であり、独立した予後不良因子として知られている。この変異により、リガンド非依存的なチロシンキナーゼの活性化が起こり、様々なシグナル伝達経路が活性化されて、白血病細胞の増殖、分化抑制、生存に働くと言われている。*FLT3*-ITD 変異の有無に加えて、ITD／Wild type のアレル比（AR）、*NPM1* 変異の有無、ITD の塩基サイズ、ITD の挿入部位などが予後に影響することも報告されている。FLT3 阻害剤が開発され、2018 年より再発・難治 *FLT3* 遺伝子変異陽性 AML に対し、gilteritinib や quizartinib が本邦で保険適用となった。従来の化学療法と比較すると良好な治療成績が示されているものの、耐性化が問題となっており、効果は一時的であるため、現在においても *FLT3*-ITD 陽性 AML の根治的治療は造血幹細胞移植であると考えられている。

白血病幹細胞の生物学的特性として、その多くが正常造血幹細胞と同一の表面形質 $CD34^{+}CD38^{-}$をもち、細胞周期が G0 期にあることから、従来の化学療法に対して抵抗性を持つことが知られていたが、近年、分子標的薬に対しても抵抗性を持つことが示されてきた。また、*in vivo* で再構築能力の高い AML に特異的に高発現し、幹細胞活性を規定する遺伝子群が同定され、それら 17 遺伝子の発現をスコア化すること（LSC17）によって、ゲノム変異とは独立した予後予測が可能であるという報告がされた。さらに、LSC17 ハイスコア群においては、*FLT3*-ITD 変異陽性の割合が有意に多いことも示された［1］。また AML の患者検体を用いて、scRNA-seq を行ったところ、*FLT3*-ITD 変異陽性の検体では造血幹細胞や骨髄系前駆細胞の様の未分化な特徴が見られたという報告がある［2］。さらに、*FLT3*-ITD 変異、*DNMT3A* 変異、*NPM1* 変異陽性の triple-mutated AML の検体を解析したところ、LSC 分画が多かったことも報告されている［3］。これらはすなわち、*FLT3*-ITD 変異陽性白血病の難治性は、その幹細胞性によるところが大きく、*FLT3*-ITD 変異がエピゲノムの変化を引き起こすことによって幹細胞性を誘導するという仮説を導く。本研究の目的は、*FLT3*-ITD 変異陽性白血病の難治性を幹細胞活性の観点から検証することである。

方　法

1. *FLT3*-ITD 陽性白血病細胞の作製

白血病細胞株に、野生型 *FLT3*（WT）と 3 種類の *FLT3*-ITD 変異（JMDS : 傍細胞膜ドメインに短い変異、TKDS : チロシンキナーゼドメインに長い変異、JMDL : 傍細胞膜ドメインに長い変異）を導入した。白血病細胞株としてはもともと $CD34^{+}CD38^{-}$の白血病幹細胞分画を有するものを用いた。

2. FLT3 の活性化、下流のシグナル伝達経路の検証

Western blotting を用いて、1.で作製した *FLT3*-ITD 導入細胞株における FLT3 のリン酸化やその下流のシグナル伝達経路（PI3K 系、RAS-MAPK 系、JAK-STAT 系）について検証した。

3. 増殖能の検証

1 日おきにトリパンブルー染色を用いて生細胞数をカウントした。

*現在の所属：東京大学 大学院薬学系研究科 分子腫瘍薬学

4. 幹細胞性の検証 - 表面抗原の観点から -

FCM を用いて、1.で作製した細胞株における $CD34^{+}CD38^{-}$ 細胞分画の割合を比較した。

結　果

1. *FLT3*-ITD 変異のシグナル伝達経路への影響（図 1）

まず、*FLT3*- WT、3 種類の ITD の過剰発現を確認した。さらに *FLT3*- ITD を発現させた場合には、FLT3 のリン酸化が強くなっていることも確認できた。これまでの報告では、*FLT3*- ITD が発現すると主に JAK-STAT 経路、PI3K 経路、MAPK 経路の活性化が起こるとされている。しかし本研究では、特に ITD 変異の中でも TKDL において、わずかに STAT5 のリン酸化、ERK のリン酸化の上昇を認める程度であった。

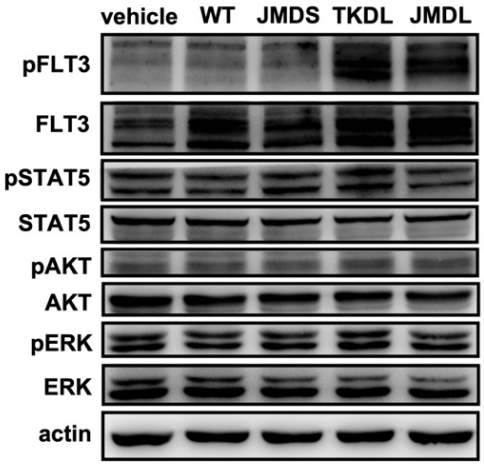


図 1. *FLT3*-ITD 変異のシグナル伝達経路への影響
FLT3-ITD 変異体は強くリン酸化されていたが、WT と比較してシグナル伝達経路に変化を与えなかった。

2. *FLT3*-ITD 変異の増殖能への影響（図 2）

FLT3- WT を過剰発現させた場合には vehicle よりも増殖が速かった。さらに *FLT3*- ITD を発現させた場合には、WT と比較して増殖能が高かった。

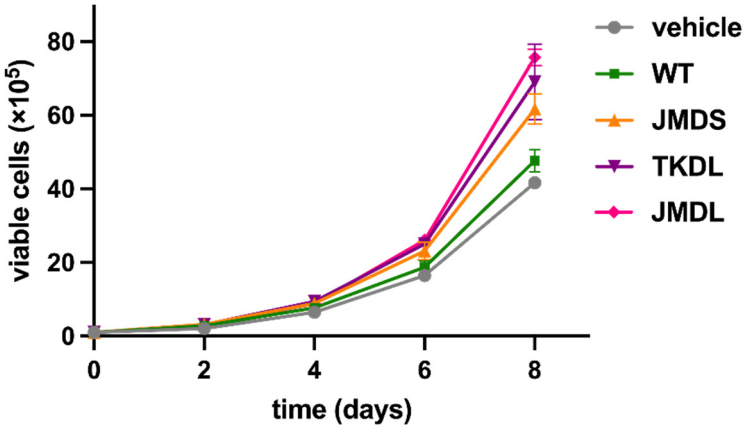


図 2. *FLT3*-ITD 変異の増殖能への影響
FLT3-ITD 変異体は、WT よりも大きな増殖能を示した。

3. *FLT3*-ITD 変異よる幹細胞性誘導の検証 - 表面抗原の観点から - （図 3）

FLT3- WT を過剰発現させた場合には vehicle と比較して $CD34^{+}CD38^{-}$の幹細胞分画に差はなかった。*FLT3*-ITD を導入した場合には、WT と比較して幹細胞分画の増大を認めていた。

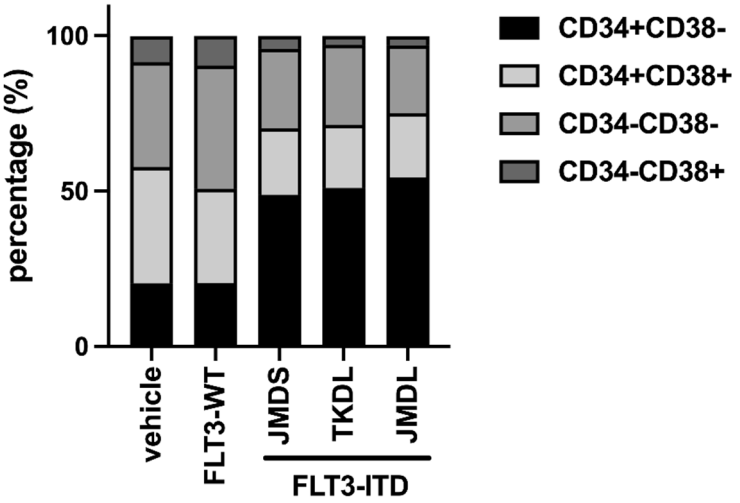


図 3. *FLT3*-ITD 変異の幹細胞分画への影響
FLT3-ITD 変異体では、WT よりも幹細胞分画の増大を認めた。

考　察

これまでの報告によると、シグナル伝達経路に関しては、*FLT3* 遺伝子に ITD 変異が起こると自己リン酸化の亢進、さらにその下流では PI3K 系や JAK-STAT 系、MAPK 系が亢進していることが報告されている。しかし、今回、*FLT3*- ITD を過剰発現させた場合には、*FLT3*- WT を発現させた場合と比較して、FLT3 のリン酸化の著明な増大を認めただけで、その下流のシグナル伝達経路に関してはほとんど差がなかった。その一方で、表現型に関しては、*FLT3*- ITD が発現しているとその増殖能が高いこと、幹細胞分画が増加していることが観察された。これらの結果から、*FLT3*- ITD の過剰発現で見られる表現型は、今回検証した主要なシグナル伝達経路によるものだけで生じているのではないことが示唆された。また今回、幹細胞分画の増加を示したが、これはあくまで細胞表面抗原よる分類であり、それらの細胞群の幹細胞活性を示すものではない。現在、幹細胞分画に存在する細胞が、実際に幹細胞性を有するのか、コロニーアッセイやマウスへの移植実験を行い、検証しているところである。

文　献

1） Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, Arruda A, Popescu A, Gupta V, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, Bullinger L, Herold T, Görlich D, Büchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wörmann B, Cheok M, Preudhomme C, Dombret H, Metzeler K, Buske C, Löwenberg B, Valk PJ, Zandstra PW, Minden MD, Dick JE, Wang JC. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. Nature. 2016 Dec 15;540(7633):433-437. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27926740. DOI: 10.1038/nature20598.

2) van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth Ii MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, Verga JA, Stephansky J, Pastika TJ, Lombardi Story J, Pinkus GS, Pozdnyakova O, Galinsky I, Stone RM, Graubert TA, Shalek AK, Aster JC, Lane AA, Bernstein BE. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. Cell. 2019 Mar 7;176(6):1265-1281.e24. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30827681. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.031.

3) Garg S, Reyes-Palomares A, He L, Bergeron A, Lavallée VP, Lemieux S, Gendron P, Rohde C, Xia J, Jagdhane P, Müller-Tidow C, Lipka DB, Imren S, Humphries RK, Waskow C, Vick B, Jeremias I, Richard-Carpentier G, Hébert J, Sauvageau G, Zaugg JB, Barabé F, Pabst C. Hepatic leukemia factor is a novel leukemic stem cell regulator in DNMT3A, NPM1, and FLT3-ITD triple-mutated AML. Blood. 2019 Jul 18;134(3):263-276. Epub 2019 May 10. PMID: 31076446. DOI: 10.1182/blood.2018862383.