

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08745

研究課題名（和文）難治性白血病発症機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of developing refractory leukemia

研究代表者

小野澤 真弘（Onozawa, Masahiro）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70455632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：FLT3-ITDが形成される機序について、FLT3 exon14に存在する回文様構造が高次構造を生じゲノム損傷を受けやすいことによりITDを生じるという仮説を検証した。ヒトやマウス細胞株で、CRISPRを用いたFLT3-ITD集積部位へのゲノム損傷誘導で、人工的ITDを作成できることを確認した。また臨床検体を用いた解析で、臨床的にFLT3-ITD陰性AMLと判断される症例においても、クローンサイズの小さい微小FLT3-ITDが複数生じていることを明らかにした。経時的なフォローで、再発した一部の症例ではFLT3-ITDクローンが拡大し再発時のFLT3-ITD陽性化が起きていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前は急性骨髄性白血病(AML)においてFLT3-ITD変異が存在すること自体が予後不良と考えられていたが、アリル頻度が高いFLT3-ITDを持つことが予後不良と関連することが知られるようになった。本研究ではAMLの約半数では微小FLT3-ITDを含めたFLT3-ITDが存在することを示し、従来臨床上捉えられていた以上の割合の症例がFLT3-ITDを持つことを明らかにした。FLT3-ITDの生成機構やクローン拡大機構の解明は、疾患発生機序の理解、および最適な治療戦略の開発に重要である。

研究成果の概要（英文）：For the mechanism of FLT3-ITD formation, we tested the hypothesis that palindromic-like structures in FLT3 exon14 form higher structures that are susceptible to genomic damage, thereby giving rise to ITDs. We confirmed that artificial ITDs can be generated in human and mouse cell lines by inducing genomic damage to the FLT3-ITD accumulation site using CRISPR. Using clinical samples, we found that multiple small clone-sized FLT3-ITDs were generated even in patients with clinically FLT3-ITD-negative AML. On follow-up analysis, we found that the FLT3-ITD clones expanded in some cases that relapsed resulting in FLT3-ITD acquisition at relapse.

研究分野：Clinical Hematology

キーワード：FLT3-ITD

1. 研究開始当初の背景

FMS 様チロシンキナーゼ 3 (FLT3) 遺伝子の遺伝子内縦列重複 (ITD) 変異は、急性骨髄性白血病 (AML) において、反復性に認める変異であり、AML の 3 割ほどに認める。FLT3-ITD を伴う AML は予後不良であることが知られており、同種移植を行っても予後は FLT3-ITD 変異陰性のもの比べて有意に不良である。FLT3-ITD 変異とキナーゼドメイン変異である FLT3-TKD 変異は、共に FLT3 の恒常活性化を来す。近年 FLT3 特異的阻害剤が開発され、本邦においてもギルテリチニブが保険承認となったが、単剤で治癒をもたらす効果はない。FLT3-ITD クロンの割合は必ずしも芽球割合に一致せず、一部のクローンのみが FLT3-ITD を有する症例がある (図 1)。また、単一症例に複数の長さの FLT3-ITD 変異が同時に存在することが知られており、FLT3-ITD 変異は AML 発症の後期に起きる変異であり、個体の中で複数の FLT3-ITD 変異クローンを生じていることを示している。また、FLT3-ITD 変異は治療経過の中で途中で消失したり、初発時 FLT3-ITD 陰性の症例で再発時に FLT3-ITD 変異クローンが現れたりすることがある不安定な変異である。FLT3-ITD 陽性 AML クローンが陰性クローンに対して必ずしも増殖優位性を持っていないにも関わらず、初発時の FLT3-ITD 変異陽性が強い予後不良因子となるメカニズムは未解明である。

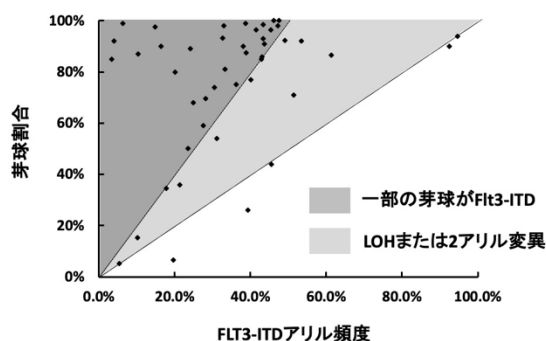


図1 FLT3-ITDアレル頻度と芽球割合

2. 研究の目的

本研究課題では FLT3-ITD 変異を生じるメカニズムに注目して研究を行う。ヒト腫瘍における遺伝子内縦列重複変異 (ITD) は非常にユニークな変異であり、AML における FLT3 でのみ知られている。単一症例の中で複数の FLT3-ITD 変異があることは、FLT3 の ITD 部位に何らかの脆弱性があり、異なる細胞で繰り返し DNA 損傷が起きていることを示している。本研究では複数の FLT3-ITD を生じるような AML では、基盤にゲノム不安定性が存在し、FLT3-ITD はその背景にあるゲノム不安定性を表す代理マーカーになっているという仮説を立てた。

(1) 臨床検体での検討

臨床症例においては、初発時 FLT3-ITD 陰性にも関わらず、再発時に FLT3-ITD 変異クローンが現れる症例があることが知られており、FLT3-ITD 陰性とされる症例にも FLT3-ITD 変異クローンが微量存在する可能性を検証した。

(2) 細胞株での検討

細胞株を用いて CRISPR-Cas9 システムで FLT3-ITD 集積部位に誘導した DNA 損傷が ITD として修復される可能性を検証した。

3. 研究の方法

まず、ヒト FLT3 exon14-15 に存在する ITD 集積部位を PCR 増幅し、次世代シーケンスで PCR プロダクトをディープシーケンスすることで、電気泳動法では検出することのできない微小な FLT3-ITD 変異クローンを検出できる系を確立した (図 2)。ヒト FLT3-ITD 陽性細胞株の段階希釈検体で検討したところ、0.0067% 以上の FLT3-ITD クローンを定量的に検出することができることを確認した。この方法を用いて、臨床的にゲル電気泳動での解析で FLT3-ITD 変異が陰性と判断された正常核型 AML74 症例の初発時検体を検討した。またヒト細胞株を用いて CRISPR で誘導した DNA 損傷がどのように修復されるのかを検証した。

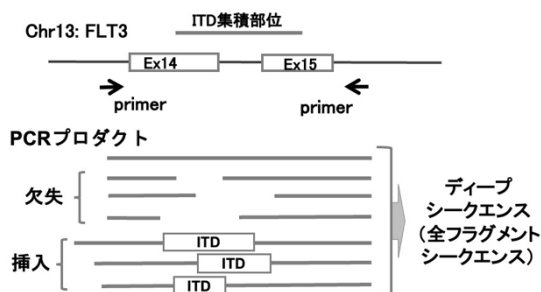


図2 ディープシーケンスによるFLT3-ITDの網羅的解析

4. 研究成果

(1) FLT3-ITD 陰性 AML 症例の検討

臨床的に FLT3-ITD 変異が陰性と判断された正常核型 AML74 症例を解析し、19 症例に微小 FLT3-ITD クローンを検出した。複数の FLT3-ITD クローンを検出する症例もあり、伸長塩基数は全て3の倍数(3N)のインフレーム変異だった。微小 FLT3-ITD クローンを有する症例は、微小 FLT3-ITD クローンを検出しない症例に比べて、芽球割合、白血球数、WT1 発現、NPM1 変異割合が高く、1 年以内の早期再発が多かった。再発検体 18 症例の解析では初発時微小 FLT3-ITD 陽性だった 3 症例中 2 症例が再発時に臨床的な FLT3-ITD クローンの出現を認めた。また初発時微小 FLT3-ITD クローンを認めなかった 15 症例中 2 例が、再発時に微小 FLT3-ITD 陽性となり、そのうち 1 例は再々発時に臨床的な FLT3-ITD クローンの増大を認めた。微小 FLT3-ITD まで含めると、正常核型 AML の約半数が FLT3-ITD クローンを有しており、それらが再発時の FLT3-ITD 変異クローン陽性化に寄与していることが明らかとなった(図 3)(Yokoyama S et al. Br J Haematol 2023)。

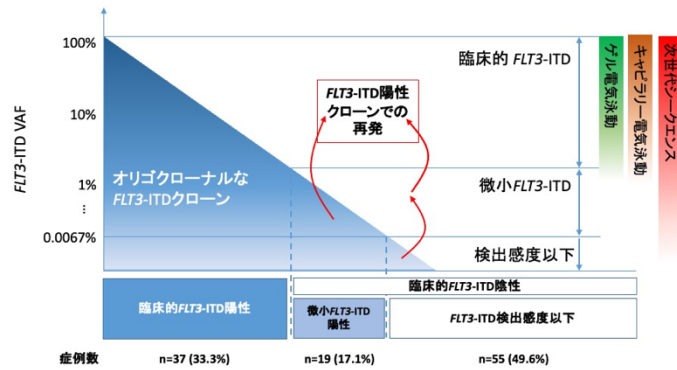


図3 AMLにおけるFLT3-ITD陽性クローンの動態

(2) 細胞株を用いた人工的 FLT3-ITD の作成

ヒト細胞株を用いて CRISPR にて FLT3 の ITD 集積部位である exon14 に gRNA を設定し、DNA 損傷を導入した。ゲノム DNA で ITD 集積部位を PCR 増幅し、ディープシーケンスを行なったところ、欠失クローンとともに FLT3-ITD を作成することができた。FLT3-ITD の伸長塩基数は 3 の倍数以外のものをほぼ均等に含むことを確認した。FLT3-ITD は生成段階では 3N 以外のものも含み、3N のインフレーム変異となったものが選択的に増殖するものと考えられた。ゲノム損傷形態と ITD クローンの作製効率について検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoyama S, Onozawa M, Yoshida S, Miyashita N, Kimura H, Takahashi S, Matsukawa T, Goto H, Fujisawa S, Miki K, Hidaka D, Hashiguchi J, Wakasa K, Ibata M, Takeda Y, Shigematsu A, Fujimoto K, Tsutsumi Y, Mori A, Ishihara T, Kakinoki Y, Kondo T, Hashimoto D, Teshima T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Subclinical minute FLT3-ITD clone can be detected in clinically FLT3-ITD-negative acute myeloid leukaemia at diagnosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.18800.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita N, Onozawa M, Yoshida S, Kimura H, Takahashi S, Yokoyama S, Matsukawa T, Hirabayashi S, Fujisawa S, Mori A, Ota S, Kakinoki Y, Tsutsumi Y, Yamamoto S, Miyagishima T, Nagashima T, Ibata M, Wakasa K, Haseyama Y, Fujimoto K, Ishihara T, Sakai H, Kondo T, Teshima T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Prognostic impact of FLT3-ITD, NPM1 mutation and CEBPA bZIP domain mutation in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Hokkaido Leukemia Net study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03567-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida S, Onozawa M, Miyashita N, Kimura H, Takahashi S, Yokoyama S, Matsukawa T, Hirabayashi S, Mori A, Hidaka D, Minauchi K, Shigematsu A, Hashiguchi J, Igarashi T, Kakinoki Y, Tsutsumi Y, Ibata M, Kobayashi H, Haseyama Y, Fujimoto K, Ishihara T, Sakai H, Ota S, Kondo T, Teshima T.	4. 巻 117(4)
2. 論文標題 Clinical features of complex karyotype in newly diagnosed acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 544-552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-022-03522-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 横山翔大, 小野澤真弘, 高橋承吾, 日高大輔, 藤澤真一, 山本聡, 長谷山美仁, 永嶋貴博, 盛暁生, 太田秀一, 宮城島拓人, 柿木康孝, 黒澤光俊, 小林一, 井端淳, 近藤健, 豊嶋崇徳
2. 発表標題 Highly sensitive FLT3-ITD detection by next generation sequence
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yokoyama S, Onozawa M, Yoshida S, Miyashita N, Kimura H, Takahashi S, Matsukawa T, Fujisawa S, Miki K, Hidaka D, Hashiguchi J, Wakasa K, Ibata M, Takeda Y, Shigematsu A, Fujimoto K, Tsutsumi Y, Mori A, Ishihara T, Kakinoki Y, Kondo T, Teshima T
2. 発表標題 Subclinical Minute FLT3-ITD Clone Can be Detected in Clinically FLT3-ITD-Negative Acute Myeloid Leukemia
3. 学会等名 第64回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyashita N, Onozawa M, Yoshida S, Kimura H, Takahashi S, Yokoyama S, Matsukawa T, Hirabayashi S, Fujisawa S, Mori A, Ota S, Kakinoki Y, Tsutsumi Y, Yamamoto S, Miyagishima T, Nagashima T, Ibata M, Kobayashi H, Haseyama Y, Fujimoto K, Ishihara T, Sakai H, Kondo T, Teshima T
2. 発表標題 Prognostic impact of CEBPA bZIP domain mutation in cytogenetically normal acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第64回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshida S, Onozawa M, Miyashita N, Kimura H, Takahashi S, Yokoyama S, Matsukawa T, Hirabayashi S, Mori A, Kondo T, Hidaka D, Minauchi K, Shigematsu A, Hashiguchi J, Igarashi T, Kakinoki T, Tsutsumi Y, Iwasaki H, Kobayashi H, Haseyama Y, Fujimoto K, Ishihara T, Sakai H, Iyama S, Teshima T
2. 発表標題 Clinical features of complex karyotype in newly diagnosed acute myeloid leukemia
3. 学会等名 第64回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	横山 翔大 (Yokoyama Shota)		
研究協力者	宮下 直樹 (Miyashita Naoki)		
研究協力者	吉田 匠汰 (Yoshida Shota)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------