

総説 (2018年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞論文)

予後不良な小児急性骨髄性白血病の分子基盤

國 本 博 義

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科学

要 旨: 小児急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) は難治性の小児血液がんであり, さらなる分子病態の解明と新規治療法の開発が急務である. 最近の研究により, 小児AMLでみられる分子異常と予後との関連が着目されている. 小児AMLの中でも, 転写因子 *PR domain 16 (PRDM16)* の高発現と受容体型チロシンキナーゼ遺伝子変異 *Fms-like tyrosine kinase 3 -internal tandem duplications (FLT 3 -ITD)* を同時に有する例は極めて予後不良であることが明らかになった. これまでの機能的な解析の結果, *PRDM16* の選択的スプライシングにより形成される *short isoform PRDM16* はAMLにおいてがん遺伝子として作用することが示唆されている. さらにFLT 3 -ITDはFLT 3 の傍膜貫通領域の構造変化を惹起してチロシンキナーゼの自己抑制機能を破綻させ, FLT 3 受容体をリガンド非依存的に活性化させて骨髄球系細胞の増殖を促進することが示唆されている. 2018年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究課題, 「転写因子とシグナル因子異常の協調による難治性小児白血病発症機構の解明と新規治療法の創成」では, *PRDM16* 高発現と *FLT 3 -ITD* が如何に協調して予後不良な白血病の進展に寄与するのか, その詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とする.

Key words: 急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia), *PRDM16*, *FLT 3 -ITD*

I. 緒 言

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) は血液細胞の様々な染色体・遺伝子異常が原因で未成熟な骨髄球系の白血球が骨髄内で無尽蔵に増殖する血液がんであり, 成人例・小児例を問わず治療は抗がん剤を用いた寛解導入療法と寛解後療法が行われる. しかし特に小児AMLは, 未だ5年生存率が約55%と約半数が長期生存できない難治性血液がんであり, 現在の抗がん剤治療では治癒を見込めない小児患者にも有効な新規治療法の開発が急務である¹⁾. 本稿では, 2018年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究課題, 「転写因子とシグナル因子異常の協調による難治性小児白血病発症機構の解明と新規治療法の創成」の研究背景と意義について概説する.

II. 予後と関連する小児AMLの分子基盤

近年, シーケンス技術の進歩と網羅的な遺伝子解析に

より, 小児AMLでみられる分子異常と予後との関連が明らかになりつつある. 一例として, 染色体異常によって生じた *NUP98-NSD 1* 融合遺伝子を有する小児AML症例は予後不良であることが報告されている (Hollink et al. Blood 2011). 最近, 横浜市立大学小児科の柴らの研究グループは, 日本小児白血病研究グループ (Japan Pediatric Leukemia Study Group; JPLSG) の臨床試験に登録された369例の小児AMLの患者検体を解析し, 遺伝子変異や染色体異常と予後との関連を報告した²⁾. *t (8;21)* や *inv (16)* などの染色体異常を有する小児AMLは成人例と同じく予後良好であること, *NUP98-NSD 1* 融合遺伝子を有する小児AMLは予後不良であるとともに転写因子 *PR domain 16 (PRDM16)* が特徴的に高発現していること, *PRDM16* 高発現例の中でも白血病関連受容体型チロシンキナーゼ遺伝子変異 *Fms-like tyrosine kinase 3 -internal tandem duplications (FLT 3 -ITD)* を同時に有する症例は特に予後不良であることが明らかとなった²⁾ (図1). 以上より, 小児AMLも成人例と同じく白血病細胞が有する染

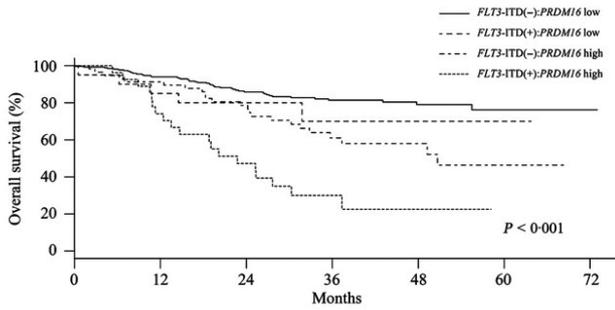


図1. PRDM16発現レベルとFLT3-ITD変異の有無で層別化した小児AMLの全生存曲線

PRDM16高発現とFLT3-ITD変異を同時に有する症例は、いずれかのみ又はいずれも有さない症例に比べて有意に全生存期間が短い。(文献2より引用)

色体異常や遺伝子変異により予後が大きく左右されることが示唆される。次項以降は、予後不良な小児AMLに関連するPRDM16とFLT3-ITDについて概説する。

Ⅲ. PRDM16

PRDM16はN末端にヒストンメチル基転移酵素の相同体であるPRドメインを有するファミリーの一つで、予後不良な小児AMLの一部で発現が高い²⁾。PRDM16(別名MEL1)は1257アミノ酸からなり、ジンクフィンガーを有する転写制御因子であるが、選択的スプライシングの結果N末端のPRドメインを欠損した相同体(short isoform PRDM16, MEL1S)も形成される³⁾(図2)。興味深いことに、同じPRDMファミリーに属するPRDM3は別名MDS1-EVI1であり、同じくN末端のPRドメインを欠損したEVI1は、3番染色体長腕26(3q26)の転座または逆位を有する予後不良な成人AMLで発現が高い³⁾。

造血系及び白血病におけるPRDM16の役割については、いくつかの知見が報告されている。造血系ではPrdm16ノックアウトマウスを用いた解析で、Prdm16を欠失した造血幹細胞は自己複製能と骨髄再構築能が著明に低下していることが報告され、Prdm16は造血幹細胞の自己複製能の維持に必須の因子であると考えられている⁴⁾。一方白血病においては、PRDM16がヒストンメチル基転移酵素活性を介してエピジェネティックにGfi1bの発現誘導とHOXA遺伝子クラスターの発現抑制を起こすことでMLL-AF9による白血病発症を抑制することが報告されており⁵⁾、PRドメインを有するlong isoformのPRDM16はAMLに対してがん抑制的に機能すると考えられている³⁾。これに対してPRドメインを欠損したshort isoformのPRDM16(PRDM16S, MEL1S)はt(1;3)(p36;q21)を有する成人AMLや骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes; MDS)で高発現していること^{6, 7)}、PRDM16S

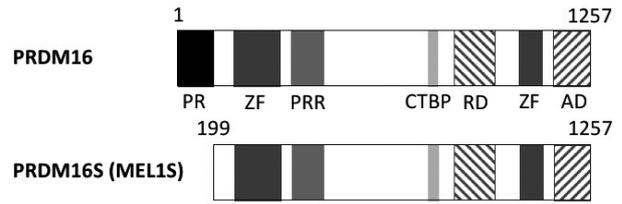


図2. PRDM16とPRDM16Sの模式図

選択的スプライシングにより、N末端にPRドメインを有するPRDM16と有さないPRDM16Sが形成される。PR: PR domain, ZF: zinc finger repeat, PRR: proline-rich region, CTBP: CtBP-binding motif, RD: repressor domain, AD: acidic domain

の過剰発現が骨髄球系への分化抑制やMLL-AF9白血球の病勢進展、さらに巨核球赤芽球前駆細胞を白血病幹細胞へ形質転換させることが報告され⁸⁻¹⁰⁾、PRDM16SはAMLに対してがん遺伝子として作用することが明らかになりつつある。

Ⅳ. FLT3-ITD

Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)は受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外ドメインに5つの免疫グロブリン様ドメインと細胞質ドメインに2つのチロシンキナーゼドメインを有する¹¹⁾。FLT3にFLT3-ligand (FL)が結合すると、受容体同士が2量体を形成して細胞質ドメインの自己リン酸化を介してSHP2, GRB2などのアダプター分子の会合を誘発し、結果としてSTAT5a, PI3KやMAPKを介する細胞内シグナルの活性化を引き起こして細胞の生存、増殖、アポトーシスを誘導することが知られている¹²⁾。正常造血系ではFLT3はCD34陽性の造血前駆細胞に局限した発現を示す¹³⁾。またFlt3ノックアウトマウスは正常に発育するもののBリンパ球系前駆細胞の欠損がみられ、またFlt3欠失造血幹細胞をレシピエントマウスに移植するとTリンパ球と骨髄球系細胞の再構築能の低下を認める¹⁴⁾。以上からFLT3は造血幹細胞とBリンパ球の分化維持に必須の因子と考えられている。白血病においては、1996年に本邦の研究グループがAMLにおいてFLT3の傍膜貫通領域(juxtamembrane domain: JMドメイン)にインフレーム変異がみられることを報告し、FLT3 internal tandem duplications (ITD)変異と名付けられた¹⁵⁾。その後の多数例を対象にした解析の結果、成人de novo AMLでは約24%の症例でFLT3-ITD変異が陽性であり、小児AMLでも10-15%で陽性であることが明らかとなった¹²⁾。

FLT3-ITD変異が細胞に対してどのような生物学的影響をもたらすのかについても、これまで詳細に検討されてきた。1998年に本邦の研究グループがアフリカミドリザル腎組織由来の線維芽細胞株COS7にFLT3-ITD変異を

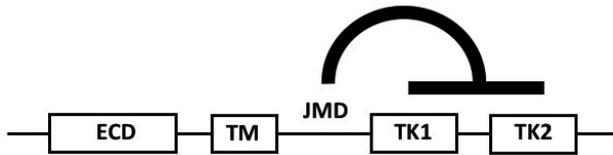


図3. FLT3受容体の模式図

FLT3受容体の傍膜貫通領域(JMD)は2つのチロシンキナーゼドメイン(TK1, TK2)のリン酸化活性を自己抑制している。JMDのインフレーション変異はこの自己抑制機能を破綻させ、結果としてFLT3受容体のリガンド非依存的な活性化をもたらす。ECD: extracellular domain, TM: transmembrane domain, JMD: juxtamembrane domain, TK1/TK2: tyrosine kinase domain

発現させて解析したところ、FL非依存的にFLT3の2量体化と自己リン酸化が引き起こされることを報告した¹⁶⁾。さらにFLT3-ITDはFL非依存的にSTAT5やMAPKなどの下流シグナルの活性化を誘導し、マウス造血細胞株32DをIL-3非依存的に増殖させることが示された¹⁷⁾。レトロウイルスベクターを駆使してFLT3-ITDをマウス骨髄細胞に過剰発現させて放射線照射後のマウスに移植すると、レシピエントマウスは骨髄増殖性疾患様の病態を示したが、AMLの発症には至らなかった¹⁸⁾。以上から、FLT3-ITDはリガンド非依存的なFLT3受容体の活性化を介して造血細胞、特に骨髄球系細胞の増殖を促進することが示唆されたが、そのみではAMLの発症には十分ではなく、付加的な遺伝子異常が必要であると考えられた。

FLT3のJMドメインにインフレーション変異が生じるとどのようなメカニズムでFLT3受容体のリガンド非依存的な活性化が引き起こされるのかについては、これまでFLT3-ITDの正確な結晶構造解析の報告がないため詳細は不明である。しかし、同じくJMドメインを有するEph受容体の解析から、JMドメインは2つのチロシンキナーゼドメインのリン酸化活性を自己抑制していると考えられており、JMドメインのインフレーション変異は同ドメインの構造変化を惹起してチロシンキナーゼの自己抑制機能を破綻させると推測されている^{12, 19)}(図3)。

V. 結 語

これまで述べてきた通り、白血病発症機構においてPRDM16特にPRDM16Sの高発現とFLT3-ITDは各々それぞれががん遺伝子として白血病発症に直接的に関与することが想定される。白血病発症機構におけるPRDM16とFLT3-ITDの特徴的な協調メカニズムを明らかにすることで、予後不良なPRDM16高発現FLT3-ITD陽性小児AMLに対する新規治療法の創成に繋がると期待される。

VI. 謝 辞

本研究の遂行にあたり、横浜市立大学医学部小児科の伊藤秀一先生、柴徳生先生、池田順治先生、宮崎大学小児科の斎藤祐介先生、横浜市立大学医学部免疫学の田村智彦先生、横浜市立大学医学部血液・免疫・感染症内科の中島秀明先生に多大なご支援をいただきました。この場をお借りして深謝いたします。

文 献

- 1) Rubnitz JE, Inaba H: Childhood acute myeloid leukaemia. Br J Haematol, **159**: 259 – 276, 2012.
- 2) Shiba N, Ohki K, Kobayashi T, et al: High PRDM16 expression identifies a prognostic subgroup of pediatric acute myeloid leukaemia correlated to FLT3-ITD, KMT2-PTD, and NUP98-NSD1: the results of the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial. Br J Haematol, **172**: 581 – 591, 2016.
- 3) Morishita K: Leukemogenesis of the EVI1/MEL1 gene family. Int J Hematol, **85**: 279 – 286, 2007.
- 4) Aguilo F, Avagyan S, Labar A, et al: Prdm16 is a physiologic regulator of hematopoietic stem cells. Blood, **117**: 5057 – 5066, 2011.
- 5) Zhou B, Wang J, Lee SY, et al: PRDM16 suppressed MLL1 leukemia via intrinsic histone methyltransferase activity. Mol Cell, **62**: 222 – 236, 2016.
- 6) Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, et al: A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. Blood, **96**: 3209 – 3214, 2000.
- 7) Xiao Z, Zhang M, Liu X, et al: MEL1S, not MEL1, is overexpressed in myelodysplastic syndromes patients with t(1;3)(p36;q21). Leuk Res, **30**: 332 – 334, 2006.
- 8) Nishikata I, Sasaki H, Iga M, et al: A novel EVI1 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. Blood, **102**: 3323 – 3332, 2003.
- 9) Corrigan DJ, Luchsinger LL, Justino de Almeida M, et al: PRDM16 isoforms differentially regulate normal and leukemic hematopoiesis and inflammatory gene signature. J Clin Invest, **128**: 3250 – 3264, 2018.
- 10) Hu T, Morita K, Hill MC, et al: PRDM16s transforms megakaryocyte-erythroid progenitors to acute myeloid leukemia-initiating cells. Blood, 2019 in press.

- 11) Agnes F, Shamoan B, Dina C, et al: Genomic structure of the downstream part of the human FLT 3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, **145**: 283 – 288, 1994.
- 12) Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT 3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, **100**: 1532 – 1542, 2002.
- 13) Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, et al: Human FLT 3 / FLK 2 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Leukemia*, **10**: 238 – 248, 1996.
- 14) Mackaretschian K, Hardin JD, Moore KA, et al: Targeted disruption of the flk 2 /flt 3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*, **3**: 147 – 161, 1995.
- 15) Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al: Internal tandem duplication of the flt 3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **10**: 1911 – 1918, 1996.
- 16) Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al: Internal tandem duplication of the FLT 3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, **12**: 1333 – 1337, 1998.
- 17) Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al: Flt 3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT 5 pathways. *Blood*, **96**: 3907 – 3914, 2000.
- 18) KellyLM, Liu Q, Kutok JL, et al: FLT 3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemia induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, **99**: 310 – 318, 2002.
- 19) Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, et al: Structural basis for autoinhibition of the Ephb 2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*, **106**: 745 – 757, 2001.

Abstract

MOLECULAR BASIS OF HIGH-RISK PEDIATRIC ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Hiroyoshi KUNIMOTO

*Department of Hematology and Clinical Immunology,
Yokohama City University School of Medicine*

We reviewed recent findings of molecular abnormalities in high-risk pediatric acute myeloid leukemia, including PR domain 16 (*PRDM16*) and Fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplications (*FLT3-ITD*) mutations. We also discuss the goals and significance of the award-winning work presented at the 2018 Yokohama City University Medical Association Medical Research Incentive Award.