

## 論文審査の結果の要旨

### **D816V mutation in the *KIT* gene activation loop has greater cell-proliferative and anti-apoptotic ability than N822K mutation in core-binding factor acute myeloid leukemia**

#### **CBF Leukemia における *KIT* 遺伝子 activation loop の D816V 変異は N822K 変異よりも細胞増殖能や抗アポトーシス能が高い**

日本医科大学大学院医学研究科 血液内科学分野

大学院生 大森郁子

Experimental Hematology 第 52 巻 56-64 頁、2017 年 掲載

*KIT* は III 型受容体チロシンキナーゼであり、造血幹細胞に発現している。リガンドである stem cell factor (SCF) の結合によって *KIT* 受容体はリン酸化し、PI3K 系、MAPK 系、SRC SFK 系、JAK/STAT 系などの細胞内シグナル伝達経路を活性化し、分化や増殖や自己複製に重要な役割を果たしている。*KIT* 変異は Core binding factor-acute myeloid leukemia (CBF-AML) においては、30-40% と高頻度に認められる。しかし、CBF-AML における *KIT* 変異は予後不良因子としての意義は確立されていない。これまでに我々は、*KIT* 変異のなかでもチロシンキナーゼ領域の activation loop に存在する *KIT* D816V と *KIT* N822K では、*KIT* D816V の方が *KIT* N822K よりも、再発率が高く、予後不良であることを報告した。本研究の目的は、CBF-AML の予後への影響が異なる *KIT* D816V と *KIT* N822K の二つの *KIT* 変異の機能の違いを *in vitro* で明らかにすることである。

最初に、これらの *KIT* D816V、*KIT* N822K と野生型の *KIT* を、pMXs レトロウイルスベクターを用いてマウスの IL-3 依存性白血病細胞株 TF-1 細胞に導入し、3 種類の TF-1 細胞を作製した (TF-1 *KIT*<sup>D816V</sup>, TF-1 *KIT*<sup>N822K</sup>, TF-1 *KIT*<sup>WT</sup>)。TF-1 *KIT*<sup>WT</sup> が増殖因子依存的にしか増殖しなかったのに対して、TF-1 *KIT*<sup>D816V</sup> と TF-1 *KIT*<sup>N822K</sup> はどちらも増殖因子非依存性の増殖能を獲得した。その増殖能は TF-1 *KIT*<sup>D816V</sup> の方が、TF-1 *KIT*<sup>N822K</sup> に比べて有意に高く ( $p=0.022$ )、TF-1 *KIT*<sup>D816V</sup> と TF-1 *KIT*<sup>N822K</sup> の抗アポトーシス能は、TF-1 *KIT*<sup>WT</sup> よりも有意に高く、Ara-C 添加によっても同様であった。さらに、TF-1 *KIT*<sup>D816V</sup> の方が、TF-1 *KIT*<sup>N822K</sup> よりも抗アポトーシス能は有意に高かった。

次に、TF-1 *KIT*<sup>D816V</sup> と TF-1 *KIT*<sup>N822K</sup> の増殖能や抗アポトーシス能の違いが、何に起因するのかを明らかにするために、シグナル伝達経路を調べた。*KIT* 野生型は SCF 刺激によってのみリン酸化され、MAPK 系が活性化された。一方、*KIT* D816V と *KIT* N822K は、増殖因子非存在下で、自己リン酸化されたが、そのリン酸化の程度は *KIT* D816V の方が *KIT* N822K よりも優位に高かった。さらにその下流は、*KIT* D816V では JAK/STAT 系に加えて SFK 系が活性化されたのに対し、*KIT* N822K では JAK/STAT 系に加えて MAPK 系が活性化された。

以上より、D816V と N822K は *KIT* 受容体のチロシンキナーゼ領域の activation loop 上で近接する変異にも関わらず、D816V の方が N822K よりもより大きな細胞増殖能、抗アポトーシス能を有することが明らかになった。さらに *KIT* D816V の方が *KIT* N822K よりも強くリン酸化されているものの、その下流のシグナル伝達経路も異なっていることがわかった。

以前我々は D816V を有する CBF-AML は N822K に比べて予後が悪いことを示したが、今回の解析結果はそのことを *in vitro* で証明し得た。本研究の結果より、CBF-AML においては *KIT* D816V と N822K の変異にわけて予後解析を行い、予後の層別化を進めることが重要と考えられた。

2 次審査において導入 TF-1 細胞のクローニングの有無やソーティング法、CBF-AML に見られる融合遺伝子との相互作用などの考察、臨床応用などに関して質問がなされたが的確な回答が得られ、申請者が本研究に関連する知識を十分に有していることが示された。以上の結果から、学位論文として十分価値のあるものと認定した。