

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 卷 (2017) 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、phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)系、mitogen-activated protein kinase (MAPK)系、SRC Family Kinase (SFK)系、Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription (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、AML 全体では 4-5%程度にしか認められないが、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であるとの報告とそうでないとの報告があり、そ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*^{D816V}, TF-1 *KIT*^{N822K}, TF-1 *KIT*^{WT})。TF-1 *KIT*^{WT} 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*^{D816V} と TF-1 *KIT*^{N822K} はどちらも増殖因子非依存性の増殖能を獲得した。さらに、その増殖能は TF-1 *KIT*^{D816V} の方が、TF-1 *KIT*^{N822K} に比べて有意に高かった ($p=0.022$)。また、TF-1 *KIT*^{D816V} と TF-1 *KIT*^{N822K} の抗アポトーシス能は、TF-1 *KIT*^{WT} 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、どのような条件においても、TF-1 *KIT*^{D816V} の方が、TF-1 *KIT*^{N822K} よりも抗アポトーシス能は有意に高かった。

次に、TF-1 *KIT*^{D816V} と TF-1 *KIT*^{N822K} 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* で証明したことになる。本研究の結果より、CBF-AML における *KIT* 変異の有無で予後解析を行うのではなく、*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。ただし、本研究では、2 つの *KIT* 変異を単独で TF-1 細胞に導入し、それらの細胞の性質を比較しており、CBF-AML に見られる融合遺伝子との相互作用などは考慮していない。今後は 2 つの *KIT* 変異と CBF-AML の融合遺伝子の両者を、ヒトの造血幹細胞に導入して、D816V と N822K の機能を比較することが必要と考えられた。