

FLT3阻害薬とその遺伝子検査の現状

The FLT3 inhibitors and the laboratory test for detecting *FLT3* mutations

ある が ゆう まつ した ひろ みち
有 賀 祐：松 下 弘 道
Yu ARUGA Hiromichi MATSUSHITA

はじめに

造血器腫瘍は早くから分子メカニズムが明らかにされてきた腫瘍の1つである。明らかにされてきた遺伝子異常の一部は、臨床検査として広く利用されている。これらの遺伝子解析の結果は、各疾患における詳細な病型診断のほか、予後の推定や分子標的薬の適応の判定に使用されてきた。

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) では、約 30% の症例で FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) 遺伝子に変異が認められることが報告されている。このうち遺伝子内縦列重複 (internal tandem duplication, ITD) 変異は治療抵抗性や予後不良に関与することが示されており、同種造血幹細胞移植術を含めた治療方針の決定には不可欠となっている¹⁾。

最近では分子医薬の研究開発が進み、複数の *FLT3* 阻害薬がアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) で承認されている。本邦でも、2018 年 12 月に再発・難治性 *FLT3* 遺伝子変異を有する成人 AML の治療薬として、日本で初めて *FLT3* 阻害薬のギルテリチニブ (Gilteritinib) がそのコンパニオン診断薬とともに保険収載された。

本稿では、*FLT3* 阻害薬とその遺伝子検査の現状について概説する。

I. *FLT3* と機能について

FLT3 遺伝子は染色体上では 13q12 に位置しており、24 のエクソンから構成される。*FLT3* 遺伝子産物は FLK-2 (fetal liver kinase 2)、STK-1 (stemcell

tyrosine kinase 1)、CD135 とも呼ばれ、受容体型チロシンキナーゼの1つであるクラスⅢ受容体型チロシンキナーゼ (classⅢ receptor tyrosine kinase, RTKⅢ) に属する²⁾。RTKⅢは5つの免疫グロブリン様ドメインを含む細胞外ドメイン (extracellular domain, ECD) と、膜貫通ドメイン (transmembrane domain, TMD)、傍膜貫通ドメイン (juxtamembrane domain, JMD)、2つのチロシンキナーゼドメイン (tyrosine kinase domain, TKD) とその間にあるキナーゼ挿入ドメイン (kinase insertion domain, KID) によって構成される (図 1)。RTKⅢには、*FLT3* のほか KIT (CD117)、CSF1 (colony-stimulating factor 1) 受容体、PDGF (platelet-derived growth factor) 受容体などのサイトカイン受容体が含まれる³⁾。

FLT3 は CD34 陽性造血前駆細胞に発現しており、造血前駆細胞の増殖および分化に重要な役割を果たす。骨髄のストローマ細胞で産生された *FLT3* ligand (FL) が細胞外ドメインに結合すると、*FLT3* の二量体化が促進されることで自己リン酸化を介して TKD 周辺の立体構造が不活性型から活性型に変化し、*FLT3* のチロシンキナーゼ活性が誘導される。その結果、下流に存在する RAS/MAPK、PI3K/AKT/mTOR、JAK/STAT などのシグナル伝達経路が活性化され、細胞の増殖、アポトーシスの抑制に働く^{1,2)}。

II. *FLT3* 遺伝子変異について

FLT3 遺伝子変異は2種類に大別される。

1つは ITD 変異で、JMD の一部が重複して繰り返されるものであり、AML の約 20 ~ 30% に認められる。JMD にはキナーゼ活性による自己リン酸

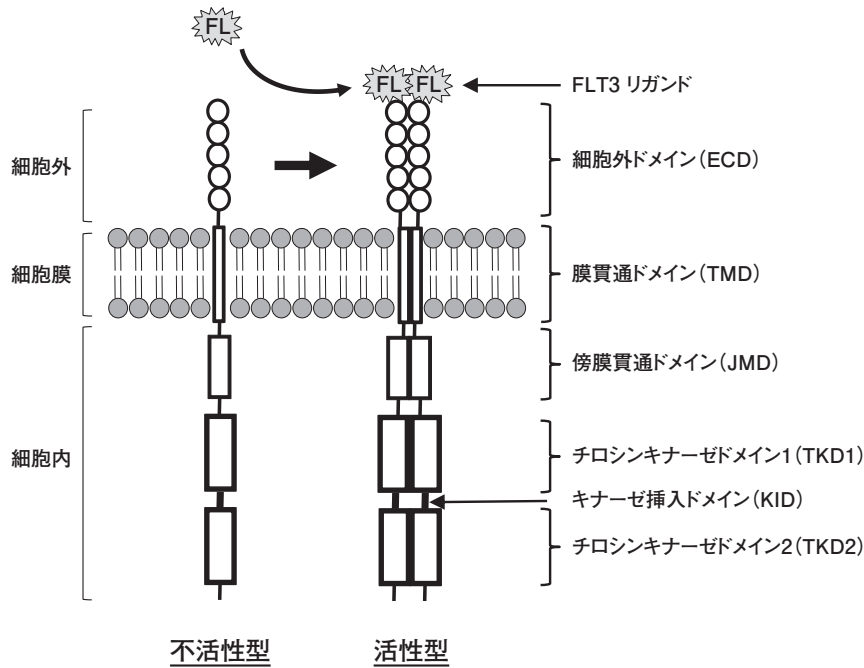


図1 FLT3の構造

化を抑制制御する機能があるが、ITD変異が生じることによりその部分に構造変化が生じ、自己リン酸化が促進される^{1,4)}。

もう1つは、C末端側のTKD2内に存在するA-loop (activation-loop)に位置する835番目のアスパラギン酸残基(D835)やその周辺のアミノ酸残基における点突然変異・欠失によって生じるTKD変異である。TKD変異はAMLの約5~10%に認められる^{1,4)}。

これらの変異によりFL非依存的にFLT3のチロシンキナーゼ活性が誘導され、下流分子のチロシン残基の恒常的リン酸化が引き起こされる。結果として下流シグナル伝達系は恒常的に活性化し、細胞の自律性増殖の誘導およびアポトーシス抑制を介して白血病発症・維持に寄与する^{2,4,5)}。

予後との関係については、ITD変異が予後不良に関与することは広く知られている。2017年に新たに発表されたEuropean LeukemiaNet (ELN)の遺伝子異常に基づくリスク層別化では、ITD変異の野生型FLT3に対するアレル比が0.5より大きくNPM1遺伝子が野生型の場合には、adverse riskとされる⁶⁾。TKD変異については、一般的に予後に影響しないとされる^{7,8)}。

Ⅲ. FLT3 阻害薬について

2000年代に入り分子標的薬という概念が普及し、これに伴ってFLT3遺伝子変異に対する阻害薬の開発が進められてきた(表1)^{1,5,9)}。FLT3遺伝子変異産物の立体構造は変異の種類によって異なり、ITD変異では不活性型構造を、TKD変異では活性型構造をとる。FLT3阻害薬は標的となる構造により、活性型と不活性型の両者に作用するType Iと不活性型にのみ作用するType IIの2つに分けられる⁹⁾。

当初、FLT3阻害薬の開発はそれまでに開発されていたチロシンキナーゼ阻害薬の中からFLT3に対して阻害活性を有するものを選択して行われていた。そのため、FLT3に対する特異性は必ずしも高くなかった。これらの第1世代FLT3阻害薬には、ミドスタウリン(Midostaurin)やソラフェニブ

表1 FLT3阻害薬

Type	阻害薬(開発コード)	世代
I	ミドスタウリン(PKC412)	第1世代
	レスタウルチニブ(CEP701)	
	ギルテリチニブ(ASP2215)	第2世代
II	クレノラニブ(ARO-002)	第1世代
	ソラフェニブ(BAY 43-9006)	
	キザルチニブ(AC220)	第2世代

(文献5,9を参考に作成)

(Sorafenib)が含まれる。単剤での有効性は認められなかったが、最近 *FLT3* 遺伝子変異陽性初発 AML に対するミドスタウリン併用標準化学療法の有用性が示された¹⁰⁾。その結果、ミドスタウリンは2017年4月に *FLT3* 阻害薬として米国で初めて承認を受けた。

第2世代 *FLT3* 阻害薬では、多くが *FLT3* を分子標的とする構造最適化が実施されており、第1世代に比し *FLT3* 選択性および阻害活性の向上が図られた。第2世代 *FLT3* 阻害薬には Type I のギルテリチニブ、クレノラニブ (Crenolanib)、Type II のキザルチニブ (Quizartinib) が含まれる (表 1)。これらの薬剤については、化学療法併用のほか単剤での効果に対する評価が進行中である^{11,12)}。

IV. *FLT3* 遺伝子検査について

FLT3 遺伝子の2種類の変異解析を1つの検査系で行うことは難しく、それぞれに対して検査系を構築し測定・解析を行う必要がある。

ITD 変異の検出は、JMD 内の exon14 と exon15 に設計したプライマーによる polymerase chain reaction (PCR) を用いて行うことが多い⁴⁾。ITD 変異が存在すると増幅産物の長さが野生型より3~400塩基長くなる(40~60塩基であることが多い)ため、長さの差異をキャピラリー電気泳動法などで検出する。一方、TKD 変異は点突然変異あるいは塩基の小さな欠失や消失によるものであり、1~数塩基レベルの検出が必要となる。具体的には、サンガー法や次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析 (Sequencing) のほか、PCR-制限酵素断片長多型法 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) や熱変性高速液体クロマトグラフィー法 (denaturing high-performance liquid chromatography, dHPLC)、allele specific PCR や特異的な probe を利用した PCR 法などで検出する^{4,13)}。

従来は、主に第一寛解期における同種造血幹細胞移植の必要性について検討する目的で、AML 発症時に ITD 変異の検索が行われてきた。これらの検出系でこれまで体外診断用医薬品と認められたものはなく、各施設で開発された方法 (laboratory developed test, LDT) で検査が行われており、検体検査管理加算 (II) の施設基準を満たしている場合に保

険算定が可能であった。しかし *FLT3* 阻害薬の登場により、その治療適応の判定手段としての意義が加わり、特に Type I の *FLT3* 阻害薬では、ITD 変異だけでなく TKD 変異を検索する必要性が出てきた。2018年12月に *FLT3* 変異検査薬として初めて薬価収載された「リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査」は、ギルテリチニブのコンパニオン診断薬である。ITD 変異は異なる蛍光物質で標識した順行プライマーと逆行プライマーを用いた PCR 法で、TKD 変異は *EcoRV* を利用した PCR-RFLP 法でそれぞれ検索を行うというように、2つの変異が解析できるように設計されている。

おわりに

近年の分子標的療法の普及により、AML に対する治療法のパラダイムは大きく変化しつつある。BCL2 阻害薬である Venetoclax と Azacitidine・Decitabine・低用量 AraC のいずれかの組み合わせの有効性が示され¹⁴⁾、新たに IDH (isocitrate dehydrogenase) 1/2 阻害薬の開発が進みつつある¹⁵⁾。*FLT3* 阻害薬については、*FLT3* 変異陰性例での有効性が示される一方で¹⁶⁾、投与に伴う耐性機序として TKD 変異の誘導が報告されており¹⁷⁾、より有効性の高い *FLT3* 阻害薬の開発が進行する可能性がある。これらの情報が蓄積されるに伴い、AML の治療法や予後推定、診断薬のあり方は大きく変わる可能性がある。今後とも最新の動向に注目していく必要がある。

文 献

- 1) Daver N, Schlenk RF, Russell NH, et al. Targeting *FLT3* mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019; **33**(2): 299-312.
- 2) 横田昇平. *FLT3* 遺伝子異常と白血病. 谷脇雅史, 横田昇平, 黒田純也 編著. 造血器腫瘍アトラス 改訂第5版 形態、免疫、染色体から分子細胞治療へ. 東京: 日本医事新報社; 2016. 253-260.
- 3) 湯沢聡, ジョセフシュレシンジャー. 受容体型チロシンキナーゼ Kit の構造生物学. *生化学*. 2008; **80**(2): 94-104.
- 4) 庄司月美, 喜田優人, 一山智, ほか. 急性骨髄性白血病における *FLT3* 遺伝子変異. *臨床病理*. 2017; **65**(1): 44-51.
- 5) 足立佳也, 清井仁. *FLT3* 阻害薬. *がん分子標的治療*. 2018; **16**(1): 52-56.
- 6) Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommenda-

- tions from an international expert panel. *Blood*. 2017 ; **129**(4): 424-447.
- 7) Bacher U, Haferlach C, Kern W, et al. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML : the combination matters-an analysis of 3082 patients. *Blood*. 2008 ; **111**(5) : 2527-2537.
 - 8) Li W, Zhang L, Huang L, et al. Meta-analysis for the potential application of FLT3-TKD mutations as prognostic indicator in non-promyelocytic AML. *Leuk Res*. 2012 ; **36**(2): 186-191.
 - 9) Larrosa-Garcia M, Baer MR. FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia : Current Status and Future Directions. *Mol Cancer Ther*. 2017 ; **16**(6): 991-1001.
 - 10) Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*. 2017 ; **377**(5): 454-464.
 - 11) Altman JK, Foran JM, Pratz KW, et al. Phase 1 study of quizartinib in combination with induction and consolidation chemotherapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2018 ; **93**(2): 213-221.
 - 12) Perl AE, Altman JK, Cortes J, et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukemia : a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*. 2017 ; **18**(8): 1061-1075.
 - 13) Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, et al. Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *J Mol Diagn*. 2003 ; **5**(2): 96-102.
 - 14) Rowe JM. Progress and predictions : AML in 2018. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018 ; **31**(4): 337-340.
 - 15) Stein EM, Dinardo CD, Fathi AT, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*. 2019 ; **133**(7): 676-687.
 - 16) Usuki K, Sakura T, Kobayashi Y, et al. Clinical profile of gilteritinib in Japanese patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia : An open-label phase 1 study. *Cancer Science*. 2018 ; **109**(10): 3235-3244.
 - 17) Alvarado Y, Kantarjian HM, Luthra R, et al. Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations. *Cancer*. 2014 ; **120**(14): 2142-2149.