

---

## 受賞記念総説

---

# FLT3 遺伝子変異の発見と新しい白血病治療薬の誕生

横 田 昇 平\*

京都府立医科大学大学院医学研究科血液内科学

## FLT3 Mutation in Leukemia and the Emerging Targeting Therapies

Shohei Yokota

*Department of Hematology and Oncology,*

*Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

### 抄 録

FLT3 (FMS-like receptor tyrosine kinase 3) は KIT, FMS, PDGFR などⅢ型チロシンキナーゼ (TK) ファミリーのひとつで、造血細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが知られている。1996年私たちはこの膜型 TK の細胞膜貫通部の近傍の遺伝子配列が重複するという珍しい型の変異を発見した。驚くべきことにこの変異は急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia AML) の 25~30% の高率に認められ、さらに小児 AML で FLT3 変異群が予後不良であることが明らかになった。その後、多くの多施設共同治療研究を通じて、成人 AML でもこの遺伝子変異は高頻度で最大の予後不良因子であることが判明した。In vitro での解析から重複変異をもつ FLT3 キナーゼは FLT3 リガンド非依存性に恒常的なリン酸化活性を持つようになり、細胞の増殖を引き起こしていることがわかった。

発見直後からキナーゼ阻害薬の登場が待ち望まれたが、20年が経過しようやく国内で再発・難治 AML の治療薬として認可された。単独投与では耐性を生じることが多いが、今後は多剤併用寛解導入や地固め療法など初期治療、移植治療後の維持治療など幅広い分野での応用が期待されており、耐性を克服した新たな FLT3 阻害薬の開発や DNA メチル化阻害剤など他の作用機序の薬剤との併用でさらに予後は改善されていくであろう。

キーワード：FLT3, 急性骨髄性白血病, 重複変異, チロシンキナーゼ阻害薬。

### Abstract

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) is a type III receptor kinase. The family includes KIT, FMS and PDGFR. FLT3 is an important protein for the proliferation and differentiation of hematopoietic cells. In 1996 genetic mutation of the unusual style was found in the FLT3 gene of an acute myelogenous leukemia (AML) cells. Internal tandem duplications in the juxtamembrane domain of FLT3 (FLT3-ITD) are found 25-30% of AML patients. The other group found a point mutation in the tyrosine kinase domain (TKD) in 8% of AML patients.

---

令和2年12月1日受付 令和2年12月1日受理

\*連絡先 横田昇平 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地

syokota@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.130.01.003

FLT3-ITD is a common driver mutation that presents with a high leukemic burden and confers a poor prognosis in patients with AML. Mutated FLT3 are activated through ligand-independent dimerization and trans-phosphorylation. Although the clinical importance of FLT3-TKD uncertain, ITD mutation is associated with poor prognosis owing to a high relapse rate. High ratio of FLT3-ITD/FLT3-wild type mRNA expression leads to a poor prognosis.

Search of inhibitors of FLT3 kinase started just after the discovery of this genetic mutation. After more than 20 years of the discovery, considerable efforts have brought growing numbers FLT3 inhibitors for the AML therapy in recent years. In addition to the single use of the FLT3 inhibitors, the combination with the conventional remission induction or consolidation therapy may prove the better prognosis. Although resistance to the FLT3 inhibitors have been reported, it may be cleared by the combination of other drugs or newly developed next-generation FLT3 inhibitors.

**Key Words:** FMS-like tyrosine kinase, Acute myeloid leukemia, Tandem duplication, Tyrosine kinase inhibitor.

## はじめに

白血病をはじめとする造血器腫瘍の研究分野では他の悪性腫瘍に先駆けて、染色体転座、遺伝子変異などが発見され、その分子病態が明らかになり、診断的検査や分子標的治療薬などの開発が進んできた。これは白血病細胞が血液や骨髄から単離しやすかったこと、遺伝子異常が固形腫瘍に比べ単純でわかりやすかったことなどの優位性があったからである。慢性骨髄性白血病（CML）に特異的な9:22転座は当初フィラデルフィア染色体と命名され、BCR遺伝子とABL遺伝子が融合し、キメラmRNA、キメラ蛋白を生じ、恒常的に活性化したABLキナーゼとして機能し、細胞増殖に寄与することが分かった。この染色体異常をFISH法で検出し、キメラmRNAをPCR法で増幅し、さらに定量することも可能になった。CMLの診断と治療効果判定のために臨床現場で大いに役立つことになった。さらにX線でABL分子の立体構造を解析し、そのキナーゼ活性を抑制するために、ATP結合部位に競合する物質を化学合成し分子標的治療薬を創薬できるに至った<sup>1)</sup>。

1996年、私たちはAML症例でKIT、FMS、PDGFRなどと同じくⅢ型チロシンキナーゼ（TK）ファミリーのひとつであるFLT3遺伝子に重複変異があることを世界で初めて発見した<sup>2)</sup>。このユニークな遺伝子異常はAML患者の約25%に存在し、のちにAML最大の予後不

良因子であることがわかった。先のBCR/ABLキメラ蛋白に対する拮抗薬と同様の道筋でFLT3に対するキナーゼ阻害薬の探索が始まった。発見から約20年を経てようやく効果のある薬剤が続けて臨床現場に供されることになった。一部の薬剤は国内の製薬企業もかわり、世界に先駆けて日本で治療に使用されることになった。

現在は再発難治性のAMLに対する適応のみであるが、将来は初発時の多剤併用療法の一つとして、あるいは骨髄移植後の再発予防薬としての効果が期待されている。

## FLTの構造と機能について

FLT3は細胞表面に存在する膜型のチロシンキナーゼであり、FLT3リガンドと結合することにより二量体を形成し、これによりA-loopによるキナーゼ触媒領域が開き、アデノシン三リン酸（ATP）と基質蛋白の結合を促し、A-loopの共リン酸化と触媒領域の活性化が維持される<sup>2)3)</sup>。これに基づくチロシン残基リン酸化はFLT3キナーゼの活性化を来し、STAT5、RAS/MEKを始めとする細胞内シグナル伝達系のカスケード内分子を次々とリン酸化させることで活性化し、最終的に血液細胞の増殖、アポトーシスと分化をコントロールしている（図1）。幹細胞レベルの造血細胞（CD34陽性細胞）ではFLT3活性化が自己複製を促していると考えられている。なおFLT3リガンドは骨髄のス

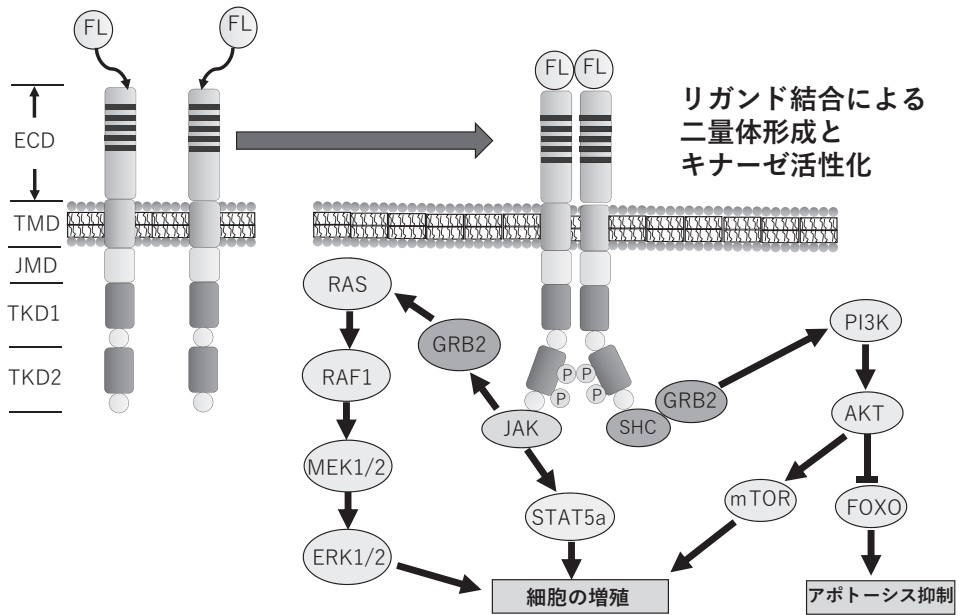


図1 FLT3 受容体と細胞内シグナル伝達系の活性化

FLT3 受容体は細胞膜に存在し、FLT3 リガンドと ECD に結合することで二量体を形成する。TMD の下にある JMD は単量体のときは下流の TK に対して抑制的に働いているが、二量体になることでこの抑制が低下してキナーゼが活性化し、細胞内シグナル伝達系の JAK、STAT5、GRB2、RAS、PI3K などが活性化されるカスケードが進み、細胞の増殖とアポトーシスの抑制がかかることされる。FLT3-ITD は JMD に、FLT3-TKD は TKD2 の部位に発生し、FL リガンドの結合なしにキナーゼを恒常的に活性化する。

ECD (extracellular domain)：細胞外ドメイン，TMD (transmembrane domain)：膜貫通ドメイン，JMD (juxtamembrane domain)：傍膜部ドメイン，TKD (tyrosine kinase domain) チロシンキナーゼドメイン。

トローマ細胞が産生している<sup>4)</sup>。

FLT3 遺伝子は 13 番染色体長腕 (13q12) に座位し、24 の exon からなる。遺伝子レベルでは、他の RTK III と同様、細胞外に 5 個の免疫グロブリン (Ig) 様領域をもち、細胞内は傍膜貫通領域 (juxtamembrane domain, JMD)、チロシンキナーゼ領域 (tyrosine kinase domain, TKD)、C 末端ドメインから構成されている<sup>5)6)</sup>。

## FLT3 変異の発見

### 1. FLT3-ITD 変異

FLT3 遺伝子の重複変異というユニークな異常がどのように発見されたかを語ることは私たちだけである。なぜならこの変異は京都府立医科大学で白血病の微小残存病変のマ

ーカーを探す過程で発見されたものだからである。

急性白血病は初発時に  $10^{12}$  程度の細胞が患者体内にすでに存在しており、多剤併用化学療法によりほとんどの症例がいったん完全寛解に至る。しかしながら 2 年間の継続した化学療法によって治癒に至る症例があるものの半数以上で再発するほか、後遺症を残すケースも少なからずあることが知られ、再発や後遺症のない適切な治療を提供することが課題であった。

こうした課題への対応をモチベーションとして、著者は 1989 年ドイツウルム大学で急性リンパ性白血病 (ALL) 細胞が持つクローン性の T 細胞受容体遺伝子再構成 (TCR) や免疫グロブリン遺伝子 (Ig) 再構成を白血病細胞のマーカーとして化学療法後も体内に存在する微小残

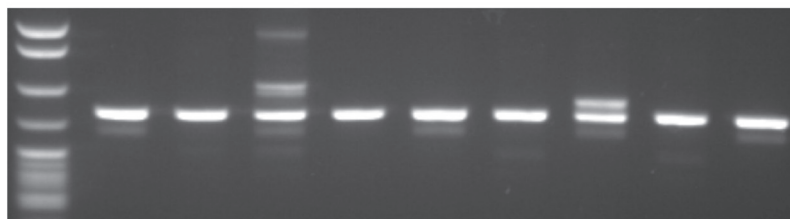
存病変 (MRD) を 10 万個に 1 個の高い感度で診断する方法を開発した<sup>7)</sup>. TCR $\gamma$ ,  $\delta$  のほか Ig $\kappa$  などの再構成を標的とすることで最終的にこの方法は ALL のほとんどの症例を対象にして MRD を検出することができるようになるのだが<sup>8)</sup>, 急性骨髄性白血病 (AML) には応用できず, 新たなマーカーを探すことが次の課題となった. 当時の AML では KIT などのチロシンキナーゼの発現が増加していることが報告されていた. そこで私たちは白血病の病勢に応じてこれらの遺伝子の発現も変化して MRD の診断ができるのではないかと考えて初診時の白血病細胞を使ってさまざまな TK 遺伝子 mRNA 発現を調べていくことにした. FLT3 もこの時の研究標的のひとつであった. すでに白血病を対象にこれらキナーゼ遺伝子の発現量を調べた報告は存在していたが, 多くの研究がキナーゼ領域の mRNA を増幅するようプライマーを設定していた. 私たちはたまたまこの部位を外して

FLT3 分子が細胞膜を貫通する部位にプライマーを設定して発現量を見た. 他の研究者と同じ部分を増幅しても同じ結果になるだろうから少し場所を変えてみようと考えただけで, 変異を探すことを目的としたわけではなかった.

意外なことに電気泳動してみると予想した野生型のほか, 数十 bp 程度長い PCR 増幅産物がいくつもみられたのであった. その長さは症例ごとに異なり, 増幅産物の量 (バンドの濃さ) も本来見えるはずの野生型の増幅産物より多いものも少ししか見られないものもあった. また, AML と一部の MDS だけにみられ, ALL や他の造血器腫瘍では観察されなかった<sup>9)</sup>.

さっそく, これらの未知の増幅産物をゲルから切り出して塩基配列を解析した. その結果, 驚いたことに FLT3 の細胞膜貫通部の近傍部分 (JMD) で十~数十塩基の配列が重複する internal tandem duplication (ITD) が起こっていることがわかった (図 2). DNA レベルでは

A



B

Case 134. 42 bp tandem duplication of exon 11

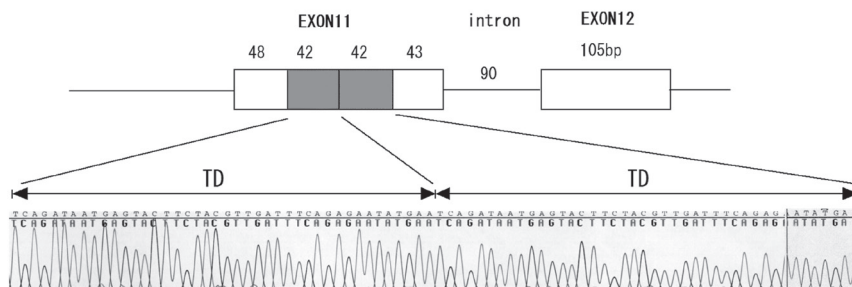


図 2 FLT3 遺伝子の重複変異の一例

JMD を挟んだプライマーを用いて AML 細胞の DNA を増幅すると野生型より数十塩基大きいバンドが観察された. これを切り出し塩基配列の解析を行うと exon11 の一部 (42 塩基) が重複していることがわかった. 文献 33 より引用

これらの重複は JMD に対応する exon11 で head to tail の形で起こっていた。

mRNA だけでなく DNA レベルでも PCR 解析し重複した塩基配列を詳細に検討したところ、重複の起こる部位や長さは症例ごとに異なり規則性は認められなかった。重要なことに、重複した部位を含めた遺伝子配列全体はインフレーム (in frame) すなわちアミノ酸に翻訳可能になっていることがわかった。つまり下流にあるキナーゼの塩基配列を変えて読み取り不能にならないように重複変異が起こっていることが明らかになった。例えば重複した塩基数が 11 個とか 17 個と 3 の倍数でない場合は、重複部位全体が 3 の倍数になるよう数個の塩基の挿入が起こっていることがわかった。しかも読み取り可能な塩基配列で stop codon もないことがわかった (図 3)。なぜこのような現象がおこるのかよくわからなかったが、あとでこの重複変異が予後不良をもたらすことを知り、見えない悪の手が働いているように感じた。

この発見が公にされるとその反響は大きく、FLT3 をはじめとする TK で同じような変異がないか、遺伝子配列全体の塩基配列の解析が行われたが、ITD は FLT3 以外では発見されなかった。のちに FLT3-ITD が生じるメカニズムが提唱された。それによると JMD の D593~K602 に一致する部分に DNA 塩基の回文配列があり、この部分が細胞分裂時に 1 本鎖になるとヘアピン形の二次構造を作ることで重複や塩基の挿入などの複製エラーをきたすためだとされている<sup>10)</sup>。

## 2. FLT3-TKD 点変異

多くの AML 症例の FLT3 遺伝子配列を分析する中で名古屋大学の清井らはキナーゼドメインの activation loop (A-loop) 内の 835 番目のコドンがチロシンからアスパラギン酸に変化するミスセンス変異 (FLT3-TKD) を見出した<sup>11)</sup>。この変異により ATP 結合部が安定化して恒常的なキナーゼ活性化がおこる。この部分のアミノ酸配列は RTK 属でよく保存されており活性

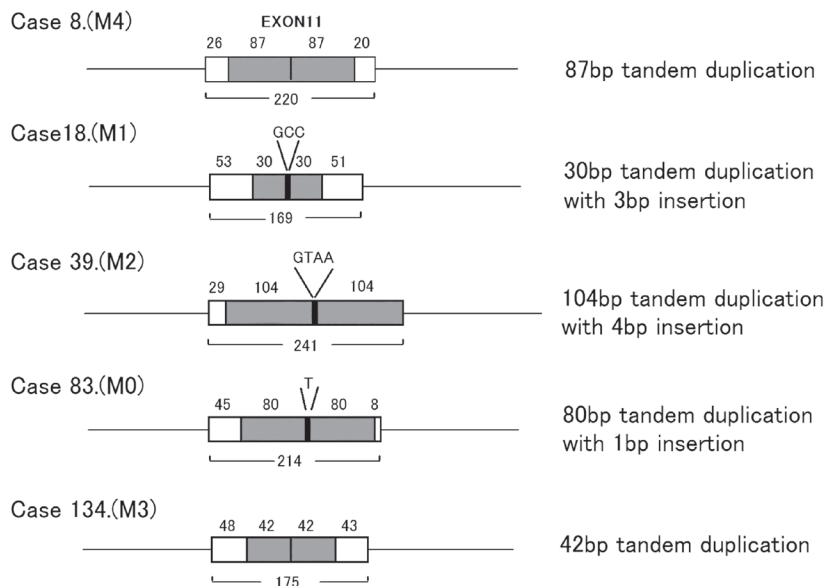


図 3 症例ごとに分析した重複変異

5 例の ITD 陽性例を示す。Case8 と 134 ではそれぞれ 87 塩基、42 塩基の重複配列、Case18 では 30 塩基の重複配列に 3 塩基のランダムな塩基挿入が起こっている。Case39 では 104 塩基が重複し間に 4 塩基が挿入。Case83 では 80 塩基の増幅に 1 塩基の挿入があり、すべての例で増加した塩基数は 3 の倍数になっている。文献 33 より引用



に重要な役割を果たす。その後 FLT3 の同じ部位でのミスセンス変異は数多く発見されており、D835 と I836 残基での突然変異が恒常的なキナーゼ活性化をもたらす。なお、成人 AML における FLT3-TKD の頻度は約 7% である。ITD と合わせると AML の約 30% で FLT3 遺伝子の変異がみられることがわかった。

### ITD や TKD による

#### FLT3 キナーゼ活性化のメカニズム

ITD 変異が生じることで FLT3 蛋白は JMD の部分だけが長くなるが、これにより FLT リガンドの結合なしにホモダイマーを形成し、チロシン残基の恒常的なリン酸化を起こす<sup>12)</sup>。また、ITD 変異をもつ分子と変異のない野生型のヘテロダイマーの形成が見られることもわかった。キナーゼ分子のなかで JMD 領域はキナーゼの自己リン酸化を抑制する役割をもつが、ITD 変異で JMD 領域が分断されることにより、恒常的なキナーゼ活性化がおこるといわれている<sup>13)</sup>。

*In vitro* での研究により、ITD や TKD 変異により FLT3 がマウスインターロイキン 3 依存性細胞株で、Ba/F3, FDC-P1, 32D など、STAT5, MAP キナーゼ, SHC, AKT, BAD などシグナル伝達分子が活性化し、自律増殖することがあきらかになった。

このように、FLT3 変異はシグナル伝達系を活性化し、細胞の自律性増殖、分化障害、アポトーシス抑制をおこす AML における最も重要なドライバー突然変異の一つであることが明らかになった。

#### FLT3 遺伝子変異の臨床的意義

ITD と TKD を含めた FLT3 変異はもっぱら AML と骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) の myeloid malignancy にみられ、ALL にはまれである<sup>9)</sup>。また、MDS 由来の AML や治療関連性 AML では de novo AML よりも頻度が低い。

MDS 全体では、FLT3-ITD, FLT3-TKD 変異はおよそ 3% であるが、芽球が増加して病期

が進行するにつれその頻度が上がり、MDS 由来 AML ではおよそ 15% となる<sup>14)</sup>。

また ITD 変異は加齢とともに増加する傾向がある。成人全体では 25% であるが、55 歳以上では 31.4% と頻度が高い。一方、小児ではおよそ 10% にとどまる<sup>15)</sup>。乳児の AML では 4~5% と低頻度である。このように、FLT3-ITD 変異は病型と年齢の分布に特徴があることが分かった。

FLT3-ITD 変異は正常核型や中間危険群の染色体異常、15;17 転座をもつ AML で頻度が高いが、予後良好群として知られる core binding factor 遺伝子を含む 8;21 転座や inv (16) などでは頻度が低い<sup>16)</sup>。

1999 年私たちは愛知医科大学小児科藤本孟男教授 (昭和 35 年本学卒業) が主催する小児がん白血病研究グループ (CCLSG) の多施設共同研究に登録された小児 AML 症例を対象として FLT3-ITD 変異を持つ症例と持たない症例での予後を比較し、ITD 変異が予後不良因子であることを初めて報告した<sup>15)</sup>。その後成人 AML で FLT3-ITD 変異が予後不良因子であることは数多くの臨床研究で証明されている<sup>17)</sup>。

ITD 変異の有無による寛解導入率に差はないが、ITD 変異症例では再発率が有意に高く、再寛解導入率も低いことがわかった。ITD の重複する塩基配列の部分が長い症例や両アリルともに ITD 変異を持つ症例<sup>18)</sup>、そして変異した FLT3 発現量の高い症例でも予後が悪いことが明らかになった<sup>19)</sup>。

AML では染色体転座や遺伝子変異の分析が固形癌やその他病型の造血管腫瘍と比較してもっとも進んできたが、これらの異常と FLT3 変異が共存することで、治療効果や予後に影響を及ぼすことが明らかになった。

NPM1, CEBA, IDH1, IDH2, DNMT3A などの遺伝子変異は FLT3 変異とともに白血病の予後に影響を及ぼす。NPM1 は核小体内のシャトル蛋白をコードする遺伝子だが、AML では 37~46% と FLT3 より高率で変異しており、変異することで寛解導入率、生存率が高くなることがわかった<sup>20)</sup>。他の遺伝子変異は予後不良に

働くのであるが、この遺伝子変異は反対に白馬の騎士の働きをするのである。

CEBPA (CCAAT/エンハンサー結合蛋白) は顆粒球分化にかかわる遺伝子の上流の CCAAT 塩基配列に結合してその発現を調節するが、AML の 7~11% にこの遺伝子の変異がみられる。2 か所変異を起こしやすい hot spots があるが、2 か所に同時に変異があると予後がよくなる<sup>21)</sup>。

NPM1 や CBPA 変異例は予後がよいはずだが、FLT3-ITD 変異を同時に持つことでこの効果も打ち消されるようである<sup>22)</sup>。

FLT3-ITD などの複数の遺伝子変異や染色体転座の有無を複合的に解析することで、AML のリスク分類を行うことができるようになった。NCCN (National Comprehensive Cancer Network) や ELN (European Leukemia Net) はガイドライン策定し、正常核型で FLT3-ITD 陰性かつ NPM1 もしくは CEBPA 変異陽性例、両方のアレルで CEBPA 変異を単独変異として持つものを予後良好群としている。ELN では染色体正常で NPM1 変異の有無にかかわらず、FLT3-ITD 変異陽性の症例、NPM1 変異陰性かつ FLT3-ITD 変異陰性の症例を中間リスク群としている。一方、NCCN では染色体正常の FLT3-ITD 変異陽性例はなお予後不良群とされ、早期に同種造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation HSCT) や FLT3 阻害薬投与を推奨していた。

## FLT3 阻害薬の開発と臨床応用

イマチニブをはじめとする TK 阻害薬の多くはキナーゼの ATP 結合部に競合することで自己リン酸化とこれに続く細胞内シグナル伝達系の活性化を抑制し抗腫瘍効果を発揮する。この例に倣い FLT3 阻害薬の開発にも拍車がかかることになった。しかし、実際に臨床医が薬剤を手にするまでには 20 年の長い時間が必要であった。これは TKI 薬の FLT3 への低選択性に基づく効果不足や QT 延長など特有の副作用の問題があったからである。

## 1. キナーゼ分子内の作用点の違いから分類される FLT3 阻害薬

TKI はキナーゼの ATP 結合部位が活性化されている (A-loop がリン酸化されている) 場合に作用するタイプ I と、ATP 結合部位の近傍に別の結合部位をもち、キナーゼが非活性状態のとき作用するタイプ II に分類される<sup>23)</sup> (図 4)。

これまでの FLT3 白血病治療に導入されたソラフェニブやキザルチニブなどの TKI はタイプ II 阻害薬であり、非活性型の FLT3 キナーゼに作用するため、ITD 変異に対する選択性が高かった。これに対し、タイプ I 阻害薬に属するクレノラニブは ITD と D835 の KDM の両者に作用するので、キザルチニブ耐性となった白血病細胞にも効果が期待できる<sup>24)</sup>。この KDM をもつ再発・難治性 AML 症例に対する治験が始まっている。また、タイプ I と II を併用した治療も提案されている。表 1 にタイプ、世代別の主な FLT3TKI を示した。

## 2. 第 1 世代 FLT3 阻害薬

既知の TK 阻害薬、多くは KIT, PDGFR, JAK2, など複数の TK を阻害するいわゆるマルチチロシンキナーゼ阻害薬 (MTKI) である。スニチニブ、ソラフェニブ、ミドスタウリン、レスタウリチニブなどであり、これらの薬剤を使った治療研究がまず初めに始まった。

固形がんでの実績のあるスニチニブは単剤では AML には一時的な効果がみられたただだが、他剤との併用で高齢者 AML には一定の効果が見られた<sup>24)</sup>。

現在国内で腎、肝、甲状腺がん保険適応のあるソラフェニブは ITD 変異陽性例で白血病細胞を減らす効果が確認された。また、再寛解導入後の HSCT への導入や移植後の寛解維持に効果があると報告され、追試が行われている。

ミドスタウリンは、MTKI の中でひとときわ FLT3 への特異度が高い薬剤である。FLT3 変異をもつ未治療 AML 患者 717 人でプラセボとの無作為試験で通常化学療法と併用して、ITD 変異陽性もしくは TKD 変異陽性例で 92%、陰性例でも 74% の寛解が得られた。観察期間中

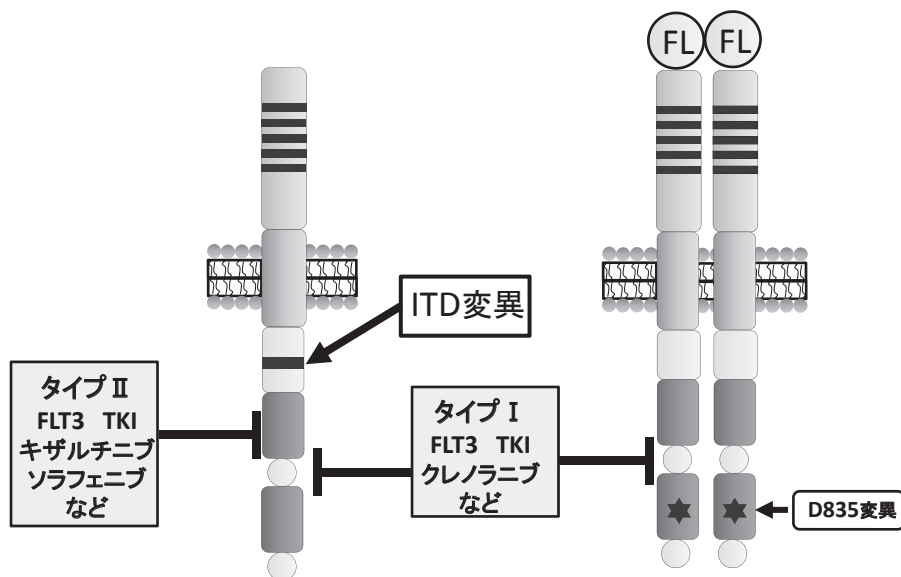


図4 FLT3 阻害薬の分類

タイプIの阻害薬はITDやTKDで活性化した受容体のATP結合部もしくはAループ部位に結合して阻害する。

タイプIIのTKIは非活性化状態のキナーゼのATP結合部位に隣接する部位に結合してITDによるリン酸化を阻害する。したがってTKD変異による活性化には影響しない。

表1 実用化が進む主なELT3阻害薬

タイプ	阻害薬名	世代
I	ミドスタウリン	第1世代
	レスタウルチニブ	
	ギルテリチニブ	第2世代
	クレノラニブ	
II	ソラフェニブ	第1世代
	キザルチニブ	第2世代

中央値53.9か月の時点で、全生存期間(OS)の中央値はミドスタウリン群で74.7ヶ月、プラセボ群で25.6ヶ月となった。イベントフリー生存期間(EFS)の中央値は、ミドスタウリン群で8.2ヶ月(95%CI, 5.4~10.7)、プラセボ

群で3.0ヶ月(95%CI, 1.9~5.9)であった。なお、この治験に参加した患者のうち、57%が移植治療に移行している。ミドスタウリン群の死亡リスクはプラセボ群よりも24.3%低かった<sup>25)</sup>。



これらの結果を受けて米国 FDA は FLT3 変異を有する AML の治療において、第一選択の導入化学療法として標準的なシタラビンおよびダウノルビシンの併用、および第二選択の強化化学療法としてシタラビンとの併用を承認している。またソラフェニブ同様、HSCT 前後に用いて移植成績を向上させる試験も行われている。

ミドスタウリンは、標準的なシタラビンとダウノルビシンの寛解導入療法、シタラビンによる地固め療法との併用薬として、FLT3-ITD 変異陽性の成人 de novo AML を対象に 2017 年 5 月アメリカとヨーロッパで認可されている。

レスタラウチニブも強く FLT3 キナーゼ活性を抑制する薬剤である。再発難治症例でも 70% の患者で末梢の白血病細胞を半減させる効果を示した。しかし単剤での効果は 2 週から 3 か月程度しか継続しなかった。他剤との併用での再発・難治例での治療試験では有意差はみられなかった<sup>26)</sup>。

これら MTKI を単剤で再発・難治性 AML に投与する研究では十分な治療効果を上げられなかったが、その原因は FLT3 への特異性が十分でなかったこと、キナーゼ領域の A-loop に突然変異がおこり、耐性を生じるためとされ、より特異性の高い薬剤の開発が望まれた。一方で、ミドスタウリンのように多剤併用治療の一部として地位を獲得した薬剤もある。

### 3. 第 2 世代の FLT3 阻害薬

第 1 世代の阻害薬が FLT3 への親和性が弱く単剤での効果を十分に発揮できなかったこともあり、第 2 世代では分子構造の最適化が実施され、選択性と阻害活性の向上がなされた。

キザルチニブとクレノラニブ、ギルテリチニブなど、FLT3 キナーゼへの特異度のより高い第二世代の薬剤の治療が進み、すでに実用化している。主な第 2 世代のうちタイプ I にはギルテリチニブ、クレノラニブ、タイプ II にはキザルチニブが含まれる。

FLT3 遺伝子変異陽性の再発・難治 AML を対象としたギルテリチニブの第 3 相研究である ADMIRAL 試験ではギルテリチニブ単剤投与と

通常のサルベージ化学療法に 2 : 1 で割り付けて治療した。結果は全生存期間の中央値はギルテリチニブ群で 9.3 ヶ月、化学療法群で 5.6 ヶ月と、ギルテリチニブ群で有意に延長した (ハザード比 0.64)。無イベント生存率はそれぞれ 2.8 ヶ月、0.7 ヶ月であり (ハザード比 0.79)、造血機能の部分的な回復を伴う完全寛解率は 34.0 % vs 15.3 %、完全寛解率は 21.1 % vs 10.5% でギルテリチニブが勝った<sup>27)</sup>。

ギルテリチニブは日本で世界に先駆けて承認申請を目指すため「先駆け審査指定制度」の対象品目となり、申請から 6 か月の 2018 年 9 月に国内の希少疾病医薬品に指定され、12 月から再発・難治性 AML の治療薬として臨床使用されている。

キザルチニブは小分子のキナーゼ阻害薬で、FLT3 への特異度が高い。動物実験ではスニチニブより抗腫瘍作用が強く、また、その効果は濃度依存性であった。半減期は長く、血中濃度、薬効の維持にも優れている。

フェーズ II 試験では、キザルチニブ単剤を、コホート 1 : 高齢で寛解導入に失敗した AML 患者、コホート 2 : 成人で再発後 HSCT やサルベージ療法後再発したものとした。コホート 1 (157 人) では FLT3-ITD 変異陽性者で 63/112 人 (56%)、FLT3-ITD 変異陰性者では 16 人 / 44 人 (36%) が複合的完全寛解 (CR もしくは CCR (composite complete remission = 血小板回復を伴わない例を含む完全寛解) に達した。コホート 2 (176 人) では FLT3-ITD 変異陽性の 136 人中 62 人 (46%) が、また FLT3-ITD 変異陰性患者 40 人中 12 人が複合的完全寛解に達した。これらにより、再発・難治性の AML にキザルチニブが有効かつ安全に投与できることが示された<sup>28)</sup>。

QuANTUM-R 試験では 367 人の再発難治 AML に対しキザルチニブ 60mg 単剤投与群と標準的な救援化学療法群を 2 : 1 の比率で割り当てて成績を比較した。観察期間中央値 23.5 か月で全生存期間 (OS) はキザルチニブ 6.2 か月に対し、標準化学療法で 4.7 か月と有意差を認めた。また死亡リスクを統計学的有意

(24%) 減少させ、忍容性にも問題なしとした<sup>29)</sup>。このほか、同種幹細胞移植後の維持療法 (NCT02997202)、寛解導入・地固め療法後の維持療法 (NCT02927262) の臨床研究が進んでいる。QuANTUM-R-First 試験 (NCT02668653) では、未治療の *de novo* AML を対象にキザルチニブを加えた通常の寛解導入+地固め療法にキザルチニブ単独の維持療法を行う double blind で placebo 群と比較する。

このほか、PDGFR 阻害薬のひとつでタイプ I のクレロラニブが ITD 変異の有無にかかわらず、強い FLT3 抑制効果をもつとされている<sup>30)</sup>。

ベキシダルチニブは ITD 特異性の高い FLT3 キナーゼ抑制効果をもつことが *in vitro* で確認されており、ITD 変異陽性 AML を対象とした治験が始まっている<sup>31)</sup>。このほか、G-749, TTT-3002, FLX925, FF-10101 といった新しい薬剤も臨床への応用が期待されている。

なかでも国内企業で創薬された FF-10101 は、FLT3 に含まれる特定のアミノ酸と不可逆的に共有結合することで、FLT3 の働きを選択的かつ高度に阻害することを可能とした新規 FLT3 阻害剤で、実用化されれば他の TKI 耐性になった症例への治療が期待される<sup>32)</sup>。

#### 4. コンパニオン検査

近年多くの分子標的薬が登場し遺伝子変異の有無を正確に診断する必要が生じ、各施設で設定した検査によらず、薬剤投与の可否を決定する正確な診断薬コンパニオン診断薬 (CDx) が必要とされるようになった。本邦でも肺小細胞がんの EGFR 遺伝子変異に対するゲフィチニブなど 26 種の薬剤でコンパニオン検査が承認されている。キザルチニブ、ギルテリチニブ投与の是非も「リユーコストラット CDx FLT3 変異検査」(2018 年 12 月国内薬価収載) という PCR ベースの検査キットを用いて診断しなければならない。このキットでは ITD 変異は異なる蛍光物質で標識した 2 種のプライマーで増幅して判定し、アレル頻度 10% 以上なら ITD 陽性と判定する。TKD 変異は増幅した PCR 産物を制限酵素 ECoRV で消化して D835

及び I836 変異のみを判定する PCR-RFLP 法をとっている。

このように、FLT3 変異に対する分子標的療法を視野に入れてコンパニオン診断を行う体制も整った。

### FLT3 阻害薬の耐性獲得と これからの展望について

CML に対するイマチニブではキナーゼの ATP 結合部位の点変異により構造が変化し、阻害薬がアクセスできずに生じる耐性が問題になり、それを克服するため新たな TKI が次々と開発された。FLT3 阻害薬でも同様の変異による耐性が報告されているが、大きく一次耐性と二次耐性のメカニズムが明らかになっている<sup>23)32)</sup>。一次耐性のひとつは、治療に伴い患者血漿中の FLT リガンドの濃度が上昇する現象によるものである。これにより変異のない FLT3 受容体を通じた活性化がおこり変異をもつ FLT3 キナーゼの阻害効果が希釈される。また、通常の抗がん剤同様、チトクローム P450 A4 (CYP3A4) の増強に伴う代謝亢進によって薬剤濃度の低下も生じる。

二次耐性としては、変異した FLT3 遺伝子に付加的な on-target 変異が生じ、PI3K/AKT や RAS/ MEK/MAPK など新たなシグナル伝達系を活性化させることが報告されている。また RAS/MAPK 経路の RAS, PTPN11 遺伝子や、IDH2, CEBPA など FLT3 遺伝子以外のいわゆる off-target 遺伝子での変異が FLT3 阻害薬投与中に合併するため耐性になることも知られている。これらに対してはエピジェネティック療法、プロテアソーム阻害剤、下流キナーゼ阻害剤、ホスファターゼ活性化剤およびシグナル伝達を変化させる他の薬物との組み合わせが有効かもしれない。

このような変異を克服するため、今後も新たな FLT3 阻害薬の開発が望まれるところだが、本来、副作用の軽減と耐性の克服のため多剤併用を戦略の要としてきた急性白血病治療の歩みを振り返れば、FLT3 阻害薬もその一員として初期寛解導入治療に加えられることで、解決さ

れるであろう。それと同時に FLT3 以外の TKI やその下流のシグナル伝達系経路の蛋白に作用する薬剤、DNA メチル化阻害剤など他の作用機序をもつ薬剤などのより効率的な併用療法の開発によって AML 治療にパラダイムシフトが起こることを期待したい。

## 謝 辞

FLT3 変異の発見とその臨床的な意義について

ての研究成果は 1996 年当時の本学消化器血液内科血液研究室の中尾誠先生、岩井俊樹先生との協同によるものです。また、本学衛生学名誉教授の阿部達生先生、小児がん白血病研究グループの代表であった愛知医科大学小児科学名誉教授藤本孟男先生のご指導に深謝いたします。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

## 文 献

- 1) 造血器腫瘍アトラス—形態, 免疫, 染色体と遺伝子 (改定第 5 版) 東京: 日本医事新報社 阿部達生編 1-2, 2009.
- 2) Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10: 1811-1818, 1996.
- 3) Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene*, 6: 1641-1650, 1991.
- 4) Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM, Civin CI. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 459-463, 1994.
- 5) Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, Downey H, Splett RR, Beckmann MP, McKenna HJ. Cloning of the human homologue of the murine *flt3* ligand: A growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 83: 2795-2801, 1994.
- 6) Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100: 1532-1542, 2002.
- 7) Yokota S, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Raghavachar, Kleihauer AE, Bartram CR. Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood*, 77: 331-339, 1991.
- 8) van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettlinger K, der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*, 352: 1731-1738, 1998.
- 9) Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, 11: 1605-1609, 1997.
- 10) Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12, 1333-1337, 1998.
- 11) Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97: 2434-2439, 2001.
- 12) Moore MA, Dorn DC, Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G. Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*, 35: 105-116, 2007.
- 13) Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*, 13: 169-178, 2004.
- 14) Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, Taniwaki M, Kashima K, Fujii H, Abe T,

- Misawa S. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia*, 11: 1442-1446, 1997.
- 15) Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, Watanabe A, Kikuta A, Tanaka A, Asami K, Sekine I, Mugishima H, Nishimura Y, Koizumi S, Horikoshi Y, Mimaya J, Ohta S, Nishikawa K, Iwai A, Shimokawa T, Nakayama M, Kawakami K, Gushiken T, Hyakuna N, Fujimoto T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia*, 13: 38-43, 1999.
  - 16) Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood*, 111: 2527-2537, 2008.
  - 17) Fröhling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*, 100: 4372-4378, 2002.
  - 18) Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi SI, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 107: 3724-3726, 2006.
  - 19) Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99: 4326-4335, 2002.
  - 20) Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 111: 2776-2784, 2008.
  - 21) Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*, 113: 3088-3091, 2009.
  - 22) Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*, 28: 2739-2747, 2010.
  - 23) Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Molecular targets for therapy Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*, 33: 299-312, 2019.
  - 24) Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, Janning M, Krauter J, Schittenhelm M, Götze K, Weber D, Göhring G, Teleanu V, Thol F, Heuser W, Döhner K, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br J Haematol*, 169: 694-700, 2015.
  - 25) Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Kristina MS, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, Thiede C, Prior TW, Döhner K, Marcucci G, LoCoco F, Klisovic RB, Sanz MA, Brandwein JM, de Witte T, Niederwieser D, Appelbaum FR, Medeiros BC, Martin S, Tallman D, Krauter J, Schlenk RF, Ganser A, Serve H, Ehninger G, Amadori S, Larson RA, Döhner H. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*, 377: 454-464, 2017.
  - 26) Knapper S, Russell N, Gilkes A, Robert K, Hills RK, Gale RE, Cavenagh JD, Jones G, Kjeldsen L, Grunwald MR, Thomas I, König H, Levis MJ, Burnett AK. A randomized assessment of adding the kinase inhibitor lestaurtinib to first-line chemotherapy for FLT3-mutated AML. *Blood*, 129: 1143-1154, 2017.
  - 27) Alexander E, Perl, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, Montesinos P, Baer MR, Larson RA, Ustun C, Fabbiano F, Erba HP. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med*, 381: 1728-1740, 2019.
  - 28) Cortes JE, Tallman MS, Schiller GJ, Trone D, Gammon G, Goldberg SL, Perl AE, Marie JP, Martinelli G, Kantarjian HM, Levis MJ. Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML. *Blood*, 132: 598-607, 2018.
  - 29) Cortes JE, Khaled S, Martinelli, Perl AE, Ganguly

- S, Russell NA, Krämer I, Dombret H, Hogge D, Jonas BA, Yu-Hung Leung A, Mehta P, Montesinos P, Radsak M, Sica S, Arunachalam M, Holmes M, Kobayashi K, Namuyinga R, Ge N, Yver A, Zhang Y, Levis MJ. Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20: 984-997, 2019.
- 30) Smith CC, Lasater EA, Lin KC, Wang Q, McCreery MQ, Stewart WK, Damon LE, Perl AE, Jeschke GR, Sugita M, Carroll MM, Kogan SC, Kuriyan J, Shah NP. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 5319-5324, 2014.
- 31) Catherine C. Smith CC, Mark J. Levis MJ, Frankfurt O, John M. Pagel JM, Gail J, Roboz GJ, Stone RM, Eunice S. Wang ES, Severson PL, Brian L. West BJ, Le MH, Kayser S, Lam B, Hsu HH, Zhang C, Bollag G, Perl AE. A phase 1/2 study of the oral FLT3 inhibitor pexidartinib in relapsed/refractory FLT3-ITD-mutant acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 4: 1711-1721, 2020.
- 32) Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci*, 111: 312-322, 2020.
- 33) 横田昇平. B. 急性白血病, 骨髄異形成症候群 各論 8 FLT3 遺伝子異常と白血病 谷脇雅史, 横田昇平, 黒田純也編. 造血器腫瘍アトラス—形態, 免疫, 染色体と遺伝子 (改定第 5 版). 東京: 日本医事新報社, 253-260, 2016.



## 著者プロフィール



## 横田 昇平 Shohei Yokota

所属・職：藤谷医院・院長

京都府立医科大学大学院医学研究科血液内科学・客員講師

略 歴：1981年3月 京都府立医科大学医学部卒業  
 1981年5月 京都府立医科大学医学部附属病院研修医（第三内科）  
 1983年4月 大津市民病院 内科医員  
 1984年4月 京都府立医科大学 大学院 博士課程  
 1988年3月 同上修了（医学博士 甲351）  
 1988年6月 ドイツ連邦共和国 ウルム大学医学部小児科 Alexander von Humboldt 財団給付奨学生

1990年10月 京都府立医科大学 第三内科 助手  
 1991年4月 京都府立与謝の海病院 消化器科 医長  
 1995年4月 京都府立医科大学 第三内科 助手  
 1998年6月 京都府亀岡保健所長（京都府立医科大学第三内科助手併任）  
 1999年7月 京都府立医科大学 第三内科 学内講師  
 2004年4月 京都府南丹保健所長  
 2005年12月 京都府立医科大学 血液・腫瘍内科准教授  
 2011年4月 京都府健康福祉部医療専門監  
 2013年4月 京都府健康福祉部保健医療対策監  
 2014年4月 同上退職  
 2014年6月 医療法人医誠会 理事  
 2016年11月 藤谷医院 院長

専門分野：血液内科

最近興味のあること：地域医療

主な業績：1. 日本癌学会 第10回 JCA-CHAO（Chugai Academy for Advanced Oncology）賞（2020）「FLT3

変異の発見と標的治療薬の研究」

2. 造血器腫瘍アトラス〈第5版〉形態、免疫、染色体から分子細胞治療へ 編著：谷脇雅史、横田昇平、黒田純也 東京：日本医事新報社、2016年。

3. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, Watanabe A, Kikuta A, Tanaka A, Asami K, Sekine I, Mugishima H, Nishimura Y, Koizumi S, Horikoshi Y, Mimaya J, Ohta S, Nishikawa K, Iwai A, Shimokawa T, Nakayama M, Kawakami K, Gushiken T, Hyakuna N, Fujimoto T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia*, **13**: 38-43, 1999.4. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Nakazawa N, Taniwaki M, Kimura T, Sonoda Y, Kaneko H, Okuda T, Azuma H, Oka T, Takeda T, Watanabe A, Kikuta A, Asami K, Sekine I, Matsushita T, Tsuchiya T, Mimaya J, Koizumi S, Ohta S, Miyake M, Takaue Y, Iwai A, Fujimoto T. Frequent aberration of FHIT gene expression in acute leukemias. *Cancer Res*, **58**: 5182-5187, 1998.5. Yokota S, Seriu T, Nakao M, Iwai T, Misawa S. Clinical implication of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Internat. J. Pediat. Hematol/Oncol.* **5** (2-4). 231-249, 1998.6. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, **11**: 1605-1609, 1997.7. Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, Taniwaki M, Kashima K, Fujii H, Abe T, Misawa S. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia*, **11**: 1442-1446, 1997.8. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **10**: 1911-1918, 1996.9. Hansen-Hagge TE, Yokota S, Reuter HJ, Schwarz K, Bartram CR. Human common acute lymphoblastic leukemia-derived cell lines are competent to recombine their T-cell receptor delta/alpha regions along a hierarchically ordered pathway. *Blood*, **80**: 2353-2362, 1992.10. Yokota S, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Raghavachar A, Kleihauer AE, Bartram CR. Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood*, **77**: 331-339, 1991.11. Yokota S, Hansen-Hagge TE, Bartram CR. T-cell receptor delta gene recombination in common acute lymphoblastic leukemia: preferential usage of V delta 2 and frequent involvement of the J alpha cluster. *Blood*, **77**: 141-148, 1991.12. Hansen-Hagge TE, Yokota S, Bartram CR. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood*, **74**: 1762-1767, 1989.