

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860416

研究課題名(和文) 真性赤血球増加症の診断確定のためのJAK2変異探索

研究課題名(英文) Exploring novel JAK2 mutations for definitive diagnostics of polycythemia vera

研究代表者

森下 総司 (Morishita, Soji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10635866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍(MPN)には、主として真性赤血球増加症(PV)、本態性血小板血症(ET)、原発性骨髄線維症(PMF)などが含まれる。我が国のMPN症例におけるJAK2遺伝子変異の陽性率はPVが94.4%、ETが51.9%、PMFが54.7%であった。PVと診断されたにも関わらずJAK2遺伝子変異が陰性であった5例について、JAK2の全エクソンを次世代シーケンサーで解析したところ、共通する遺伝子変異を2つ同定できた。これらはアジア人に特有のSNPであったが、アミノ酸の置換を伴わない変異であった。以上のことから、我が国におけるPV診断ではJAK2遺伝子変異検査が重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of diseases characterized by a clonal expansion of the hematopoietic/progenitor stem cells and an overproduction of blood cells, and mainly consists of polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). The JAK2 mutation positivity in these diseases was 94.4% in PV, 51.9% in ET, and 54.7% in PMF. In the mutant JAK2 negative PV cohort, 2 recurrent SNPs were identified using next generation sequencing based technique targeting whole JAK2 exons. These SNPs are specifically identified in Asians; however, both of the two are silent-mutations. For the diagnostic of PV, detecting the positivity of JAK2 mutations should be considered.

研究分野：病態検査医学

キーワード：真性赤血球増加症 骨髄増殖性腫瘍 JAK2遺伝子 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍は、造血幹細胞の異常により、骨髄系細胞が無尽蔵に増殖する疾患群を指し、主に赤血球が増加する真性赤血球増加症 (PV)、血小板が増加する本態性血小板血症 (ET)、骨髄の線維化をきたす原発性骨髄線維症 (PMF) が含まれる。欧米の報告によれば、特に PV において、およそ 90% に JAK2V617F 点突然変異、5% に JAK2 エクソン 12 変異が見られるのみならず、JAK2V617F 変異の存在率 (allele burden) が予後不良の線維症への移行と相関することから、JAK2 遺伝子変異の検出と、その存在率を定量することが PV の診断、予後予測に極めて重要とされる。しかしながら、我が国において PV と診断された症例を対象に JAK2 遺伝子変異の有無を調べると、欧米の報告と大きく異なり変異陽性率が約 60% 程度に留まり、日本人の大規模コホートを対象とした解析を通して、我が国における PV の診断基準を策定する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、PV における変異の様態は人種により異なる可能性が疑われた。そこで本研究では、日本人の PV 症例を対象とした大規模コホートを背景に、JAK2V617F 変異陽性率、JAK2 エクソン 12 変異陽性率を再評価するとともに、JAK2 遺伝子変異陰性の PV 症例を抽出し、この集団における新たな JAK2 遺伝子変異がないか探索し、我が国における PV の実態と、その診断基準を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

日本全国の 100 弱の医療機関の協力のもと、4000 弱もの骨髄増殖性腫瘍が疑われる症例を収集し、そこから WHO2008 分類の診断基準に照らし、PV、ET、PMF と確定される症例を抽出した。この作業と併行して、JAK2V617F 変異陰性の PV を正確に選別するために、JAK2V617F 変異を極めて高感度に、かつ、正確に検出できる技術を構築した。構築した技術を用いて、抽出した症例における JAK2V617F 陽性率と、JAK2V617F allele burden と線維症への移行との関わりを調査した。続いて、JAK2V617F 変異陰性であった PV について、内因性赤芽球コロニーアッセイを実施し、形成されたコロニーにおける JAK2 エクソン 12 変異の有無を調べた。また、JAK2 遺伝子変異以外の既報の変異として、MPL 遺伝子変異と CALR 遺伝子変異についても独自の検出系を構築し、PV、ET、PMF を対象に変異の有無を同定することで、我が国の骨髄増殖性腫瘍患者における変異のスペクトラムを決定するとともに、それぞれの変異陽性例に共通する臨床的特徴を調査した。

以上の探索を経てなお、変異が見出されなかった PV を対象に、JAK2 遺伝子の全エクソン配列を次世代シーケンス技術により解

読し、共通する変異が存在するか解析した。

4. 研究成果

4.1. 我が国における骨髄増殖性腫瘍患者の変異スペクトラム

本研究において確立された JAK2V617F 変異検出技術は、変異率 0.05% までの感度において偽陽性を生じることなく正確に変異を検出できた (図 1)。このときの変異遺伝子数は 1 コピーと見積もられ、本技術によれば、1 コピーの変異を偽陽性なく検出できることがわかった。本技術を用いて、WHO2008 分類で PV と診断された症例 66 例の JAK2V617F 変異陽性数を調査したところ、62 例 (93.9%) において変異が陽性であった。残り 4 例のうち、内因性赤芽球コロニーアッセイにより形成された赤芽球コロニーをピックアップし、ダイレクトシーケンス法により JAK2 エクソン 12 変異の有無を調べたところ、3 例において陽性を認めた。

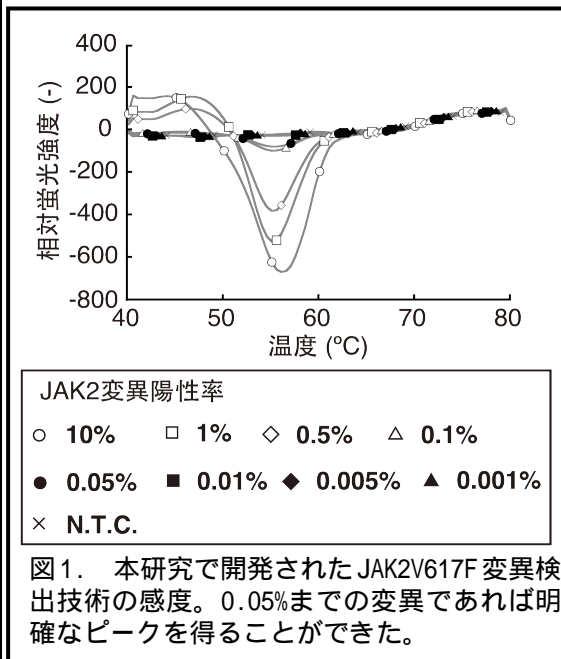


図 1. 本研究で開発された JAK2V617F 変異検出技術の感度。0.05% までの変異であれば明確なピークを得ることができた。

残った 1 例と、その後の検体収集によって新たに JAK2V617F、JAK2 エクソン 12 変異がいずれも陰性であるにも関わらず PV と診断された症例 4 例を加え、JAK2 の全エクソン領域を次世代シーケンス法により解読した。その結果、5 例に共通する遺伝子変異を 2 つ同定できた。ところが、これら 2 つの変異はいずれもアジア人を対象とした 1000 人ゲノムプロジェクトにおいて既に同定された SNP であり、アミノ酸の置換を伴わないサイレント変異であった。上述の通り、アジア人に特有の変異であるため興味深い結果ではあったものの、アミノ酸の置換を伴わないために JAK2 タンパク質へ与える影響は少ないと考えられた。

続いて、ET、PMF における JAK2V617F 変異、

MPL 変異、CALR 変異の陽性率を調べたところ、ET における変異の陽性率はそれぞれ、52.7%、7.1%、18.8%、PMF では 47.8%、4.4%、30.4% であり、PV における変異のスペクトラムも含めて、欧米の報告と差は見られなかった（図 2）。ところが、JAK2 変異、MPL 変異、CALR 変異のいずれもが陰性である症例（triple negative）では、我が国における発症者の平均年齢は欧米のグループによる報告と比較して 10 年以上も若く、人種の違いによる発症メカニズムの違いが示唆された。

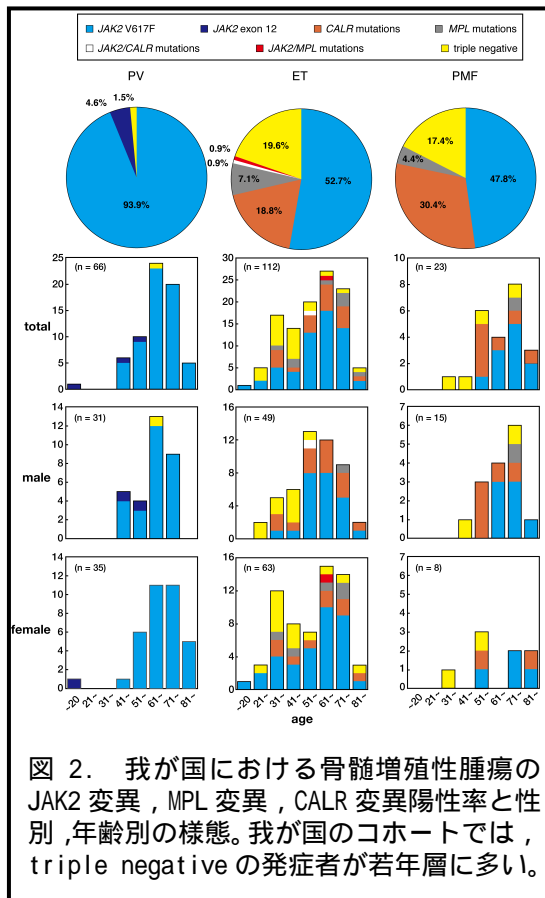


図 2. 我が国における骨髄増殖性腫瘍の JAK2 変異、MPL 変異、CALR 変異陽性率と性別、年齢別の様態。我が国のコホートでは、triple negative の発症者が若年層に多い。

4.2. JAK2V617F allele burden と線維症への移行との関係

JAK2V617F 変異陽性の PV、もしくは ET から 2 次性の線維症へと移行した集団 11 例としなかった集団 23 例を抽出し、初診時と移行後における JAK2V617F allele burden の推移を調べた。初診時の保存検体は、ホルマリン包埋サンプルより抽出したゲノム DNA を用いた。線維症へ移行した集団における JAK2V617F allele burden は、初診時と比較して線維化後で有意に上昇していた ($P=0.004$, 図 3A) が、線維症へ移行しなかった集団では JAK2V617F allele burden の上昇率は線維化を引き起こした群と比較して小さかった ($P=0.014$, 図 3B)。このことから、JAK2V617F allele burden を定量することで線維症への移行を予測できる可能性が示唆され、JAK2V617F 変異は、検出するだけでな

く、その存在率を定期的に定量することで PV の診断のみならず予後予測にも有用であることが明らかとなった。

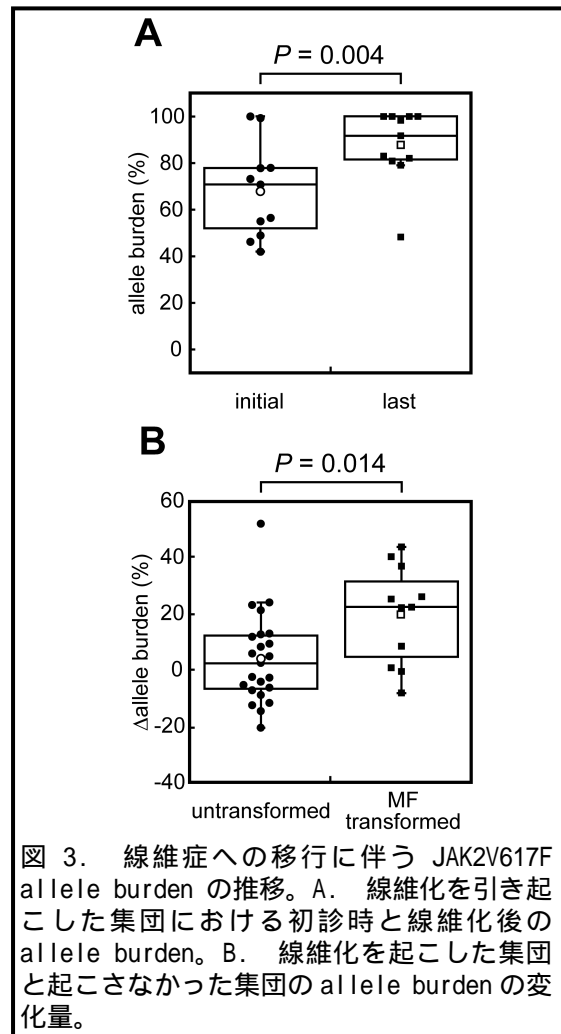


図 3. 線維症への移行に伴う JAK2V617F allele burden の推移。A. 線維化を引き起こした集団における初診時と線維化後の allele burden。B. 線維化を起こした集団と起こさなかった集団の allele burden の変化量。

4.3. 診断未確定 PV における JAK2 変異陽性例の存在

JAK2 遺伝子変異検査を行うことが重要であることを示唆するもう一つの根拠として、本研究において、臨床的には PV と強く疑われるにも関わらず、WHO 診断基準では PV と確定できなかった症例が存在し、そのうちの 40 例が JAK2V617F 変異陽性であったことが挙げられる。これらの症例を詳細に解析したところ、赤血球数は高値を示すがヘモグロビン値が WHO 診断の基準を満たさないために PV と診断されなかった集団であることがわかった。通常、赤血球数の増加に伴いヘモグロビン値も上昇するはずであるが、腫瘍性に過剰な造血が起こっている PV 患者においては、しばしば、造血のスピードに鉄分の供給が追いつかず、通常よりも粒径の小さな赤血球が産生されることがある。この結果、赤血球は高値であるにも関わらずヘモグロビン値が低値を示すこととなり、WHO 診断基準に合致しないことが考えられた。これらの症例は JAK2V617F 変異陽性であることから、腫瘍性

の造血を起こしていることは明らかであるため、診断基準から漏れてしまう PV 症例の診断確定に、本研究で開発されたような JAK2V617F 変異の正確な検出技術が有効であると期待される。

本研究では、以下の点を明らかにした：

我が国における骨髄増殖性腫瘍の遺伝子変異の様態は欧米と差はなく、JAK2 遺伝子変異、MPL 遺伝子変異、CALR 遺伝子変異の検出が診断の際に強力な根拠となり得る。JAK2、MPL、CALR 遺伝子変異いずれも陰性の症例では、発症者の平均年齢が欧米における報告と比べて有意に低く、人種の違いによる発症メカニズムの違いが示唆された。

線維症へと移行した集団では移行前後で JAK2V617F allele burden が上昇する傾向にあり、JAK2V617F allele burden を定量することで、線維症への移行を予測できる可能性がある。

臨床的には PV が強く疑われるにもかかわらず、WHO の診断基準で PV と診断されなかった症例においても、JAK2V617F 変異陽性の症例が存在し、JAK2 遺伝子変異の検査が PV 診断に極めて有効なツールになると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Morishita S, Takahashi K, Araki M, Hironaka Y, Sunami Y, Edahiro Y, Tsutsui M, Ohsaka A, Tsuneda S, and Komatsu N. Melting curve analysis after T allele enrichment (MelcaTle) as a highly sensitive and reliable method for detecting the JAK2V617F mutation. *PLoS ONE* **10**(3): e0122003 (2015) (査読あり)

Shirane S, Araki M, Morishita S, Edahiro Y, Takei H, Yoo Y, Choi M, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Sato E, Ohsaka A, and Komatsu N. Consequences of the JAK2V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Hematol* **101**(2): 148-53 (2014) (査読あり)

Shirane S, Araki M, Morishita S, Edahiro Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Ohsaka A, and Komatsu N. JAK2, CALR, and MPL mutation status in Japanese myeloproliferative neoplasms patients. *Haematologica* **100**(2): e46-8 (2014) (査読あり)
Takei H, Morishita S, Araki M, Edahiro

Y, Sunami Y, Hironaka Y, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, and Komatsu N. Detection of MPLW515L/K mutations and determination of allele frequencies with a single-tube PCR assay. *PLoS ONE* **9**(8): e104958 (2014) (査読あり)

JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, Hironaka Y, Yahata Y, Sunami Y, Shirane S, Tsutsui M, Noguchi M, Koike M, Imai K, Noda N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Araki M, and Komatsu N. *Int J Hematol* **99**(5): 625-34 (2014) (査読あり)

[学会発表](計3件)

Melting curve analysis after T allele enrichment: a highly sensitive and reliable method for detecting the JAK2V617F mutation. Morishita S, Takahashi K, Araki M, Hironaka Y, Sunami Y, Edahiro Y, Tsutsui M, Ohsaka A, Tsuneda S, and Komatsu N. The 6th JSH International Symposium in Karuizawa, Nagano, Japan. May 2015.

A highly specific method for detecting a single copy JAK2V617F mutation. 森下 総司, 荒木 真理人, 弘中 由美, 角南 義孝, 枝廣 陽子, 筒井 深雪, 大坂 顯通, 小松 則夫. 第 77 回日本血液学会学術集会, 石川, 2015 年 10 月

A highly sensitive and reliable JAK2V617F detection method for the diagnostics of MPN. 森下 総司, 高橋 廣智, 弘中 由美, 角南 義孝, 枝廣 陽子, 八幡 悠里子, 荒木 真理人, 大坂 顯通, 関口 勇地, 野田 尚宏, 常田 聡, 小松 則夫. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013 年 10 月.

[図書](計2件)

骨髄増殖性腫瘍の遺伝子診断 第 4 回. 森下 総司, 高橋 廣智, 竹井 拓, 常田 聡, 小松 則夫. *Bio Clinica*, pp93-6 (2013), 北隆館.

骨髄増殖性腫瘍の遺伝子診断 第 5 回. 森下 総司, 高橋 廣智, 竹井 拓, 常田 聡, 小松 則夫. *Bio Clinica*, pp96-8 (2013), 北隆館.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 遺伝子変異の検出方法及びそれに用いる蛍光標識オリゴヌクレオチド
発明者: 山口 正裕, 蔵田 信也, 小松 則夫, 森下 総司
権利者: 同上

種類：特許
番号：PCT/JP2016/060011
出願年月日：平成 28 年 3 月 29 日
国内外の別：国際

取得状況（計 1 件）

名称：遺伝子変異の検出方法及びそれに用いる蛍光標識オリゴヌクレオチド
発明者：山口 正裕，蔵田 信也，小松 則夫，
森下 総司
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 5813263 号
取得年月日：2015 年 10 月 2 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

森下 総司 (MORISHITA, Soji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10635866

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし