

骨髄増殖性腫瘍の遺伝子検査

Genetic testing of myeloproliferative neoplasms

とう だ しゅう じ
東 田 修 二
Shuji TOHDA

はじめに

骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms: MPN) は、2017 年改訂 (2016 年に Blood 誌に概要が発表され、書籍は 2017 年に発刊) の WHO 分類第 4 版^{1,2)} では、慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML)、真性多血症 (polycythemia vera: PV)、本態性血小板血症 (essential thrombocythemia: ET)、原発性骨髄線維症 (primary myelofibrosis: PMF)、慢性好中球性白血病 (chronic neutrophilic leukemia: CNL)、慢性好酸球性白血病 - 非特定期型 (chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified: CEL, NOS)、分類不能の MPN (MPN-U) からなる。2001 年に WHO 分類第 3 版が発表された時は、これらの中で疾患特異的な遺伝子異常がわかっているのは CML の *BCR-ABL1* 融合遺伝子だけで、他の病型には特異的な遺伝子所見の記述はなかった。その後の次世代シーケンサなどの遺伝子解析技術の急速な進歩に伴い、疾患特異的な遺伝子異常が次々と発見された。さらには、遺伝子異常に対応した分子標的治療薬が開発され臨床応用されるようになり、MPN の的確な診断や治療には遺伝子検査が不可欠になっている。

I. 慢性骨髄性白血病

CML の診断には、t(9;22) の染色体転座もしくは *BCR-ABL1* 融合遺伝子の検出が必須である。*BCR* 遺伝子の切断点は、エクソン 12 ~ 16 領域の major breakpoint cluster region (M-BCR) に集中している

が、まれに、エクソン 1 ~ 2 領域の minor breakpoint cluster region (m-BCR) やエクソン 17 ~ 20 領域の micro breakpoint cluster region (μ -BCR) で切断される症例もある (図 1)。遺伝子検査として定性および定量 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法によってこれらを検出する場合は、これらの切断点に応じた PCR プライマーを用いる必要がある。

CML と診断されたら、治療として *BCR-ABL1* 融合蛋白に結合するニロチニブやダサチニブなどのチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が用いられる。TKI による治療効果を判定するために、血液検体中の *BCR-ABL1* mRNA のコピー数の定量検査を経時的に行う。日本では TMA (transcription-mediated amplification) 法による Amp-CML が広く利用されていたが、最近では international scale (IS) に基づいて標準化された高感度定量 RT-PCR 検査キットによる検査が行われている。IS とは、欧米で行われた IRIS 試験³⁾での未治療 CML30 例の末梢血での *BCR-ABL1* のコピー数を内部標準遺伝子 (当初は *BCR*、現在は

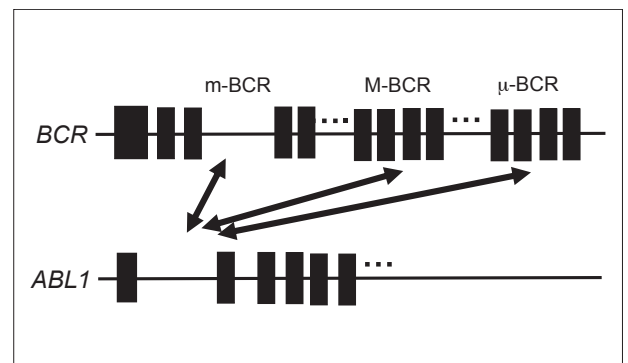


図 1 慢性骨髄性白血病における *BCR-ABL1* 融合遺伝子の切断点

ABL1) のコピー数で割った値の平均値を 100% と定め、各検体でこの比率を求め、これに各検査施設ごとの測定値のばらつきを補正するための conversion factor を掛け合わせた数値が IS (%) となる。検体中の CML 細胞比率を示す値ではない。微少残存 CML 細胞の検出限界は、従来の検査法では 0.1–0.01% 程度であったが、この高感度定量 RT-PCR は IS として 0.0007% 前後まで検出でき、CML の診療に必須の検査になっている。

TKI に対して治療抵抗性となる最も大きな原因は、*ABL1* 遺伝子領域の変異による TKI の結合阻害である。この遺伝子変異を検出するには、変異を生じる領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって決める。変異のタイプによって、現在 5 種類ある TKI のうち、どれが有効でどれが無効かを推測できる⁴⁾。例えば、T315I 変異があれば、ボナチニブ以外の TKI は全て無効である。

II. 真性多血症、本態性血小板血症、 原発性骨髄線維症

2005 年に PV、ET、PMF に特異的な遺伝子異常として、*JAK2* 遺伝子の V617F 活性型変異が報告された⁵⁾。*JAK2* とはエリスロポエチンなどのサイトカインの受容体に会合するチロシンキナーゼであり、V617F 変異があるとサイトカイン刺激がなくても恒常的に活性化して、シグナルを下流に送るようになる。さらに、これらの疾患がありながら、この変異がみられない症例の DNA 解析から、*JAK2* 遺伝子の exon12 変異⁶⁾、*MPL* 遺伝子変異⁷⁾、*CALR* 遺伝子変異⁸⁾ が同定された。Misawa らの報告⁹⁾ では日本人の MPN 患者で、これらの変異が表 1 に示す割合で検出される。*JAK2* 遺伝子の exon12 変異は、K537 から E543 の領域でのアミノ酸の置換や欠失をきたす。トロンボポエチン受容体をコードする *MPL* 遺

表 1 MPN の日本人患者における *JAK2*、*MPL*、*CALR* 遺伝子変異の頻度

遺伝子変異 (%)	PV	ET	PMF
<i>JAK2</i> V617F	91.6	59.9	53.8
<i>JAK2</i> exon12 変異	5.4	—	—
<i>MPL</i> 変異	—	4.7	1.5
<i>CALR</i> 変異	—	26.9	27.7
3 種とも陰性	3.0	8.5	16.9

(文献 9 のデータを引用して作成)

伝子の変異では、W515 などのアミノ酸置換がみられる。小胞体に局在する分子シャペロンをコードする *CALR* 遺伝子の変異は exon9 に集中しており、52 塩基の欠失もしくは 5 塩基の挿入によるフレームシフトが起きる。これにより C 末端に、両者とも同一の新たなアミノ酸配列が生じ、この変異型 *CALR* がトロンボポエチン受容体に結合して恒常的に活性化させると考えられている。

これらの遺伝子変異を検出する標準的な検査法は、ダイレクトシーケンス法による塩基配列決定である。一方、*JAK2* 遺伝子の V617F のように決まった一塩基置換の場合は、図 2 に示すようなアレル特異的 PCR 法 (AS-PCR)、PCR 制限酵素断片長多型解析法 (PCR-RFLP)、高解像度融解曲線分析法 (HRM)、Quenching プローブ法 (QP) などを用いることによって、簡便かつ高感度に変異を検出できることをわれわれは報告した¹⁰⁾。最近では、*JAK2* 遺伝子の V617F 変異アレルの比率の多寡と、血栓症の合併や骨髄線維症への移行との関連性が報告されたため、デジタル PCR 法を用いて、変異アレル比率を定量的に正しく検査する方法が開発されている。近年、PV や PMF に対して *JAK2* 阻害薬ルキソリチニブが治療薬として用いられるようになった。CML に対する TKI 治療とは異なり、ルキソリチニブを投与しても *JAK2* 変異アレルの著明な減少はみられないようである。

III. 慢性好中球性白血病

CNL は成熟好中球がクローン性に増加するが、*BCR-ABL1* 融合遺伝子を有さない疾患である。2013 年に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体をコードしている *CSF3R* 遺伝子の変異が CNL にみられることが報告され¹¹⁾、WHO 分類の CNL の診断基準に、*CSF3R* 遺伝子の T618I 変異、あるいは他の活性型変異を認める、という項目が加わった。なお、*CSF3R* 遺伝子変異は、“非定型慢性骨髄性白血病 *BCR-ABL1* 陰性” の症例の 1 割弱でも認められる。

IV. 慢性好酸球性白血病

CEL は成熟好酸球がクローン性に増加する病型であり、病型特異的な遺伝子所見はない。*PDGFRA*、

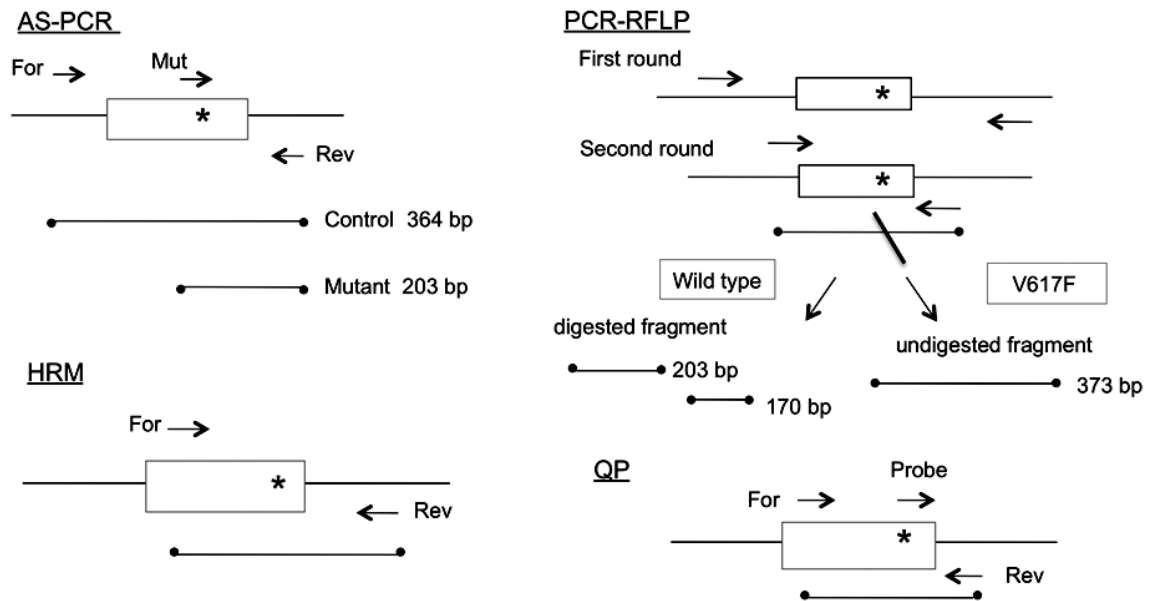


図2 *JAK2* 遺伝子 V617F 変異を検出するアレル特異的 PCR 法 (AS-PCR)、PCR 制限酵素断片長多型解析法 (PCR-RFLP)、高解像度融解曲線分析法 (HRM)、Quenching プロブ法 (QP) の概略 (文献 10 より引用)

For: forward primer, Rev: reverse primer, Mut: mutation に対応した primer

PDGFRB、*FGFR1* 遺伝子の再構成に起因する好酸球増多が知られているが、これらが認められた症例は現行の WHO 分類では“*PDGFRA*、*PDGFRB*、*FGFR1* の再構成または *PCMI-JAK2* を有する好酸球増多を伴う骨髄系/リンパ系腫瘍”のカテゴリーに含まれることになり、CEL とは診断されない。ちなみに *PDGFRA* 再構成を伴う骨髄系/リンパ系腫瘍では、*FIP1L1-PDGFRB* 融合遺伝子を有する症例が多い。この融合遺伝子は染色体 4q12 の微小欠失によって形成されるが、ギムザ分染法による染色体検査では、この欠失領域が小さくて検出できないため、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いてこの融合遺伝子を検出する。この融合遺伝子が検出されれば、TKI 薬であるイマチニブが適用となる。なお、*PDGFRB* や *FGFR1* の再構成と *PCMI-JAK2* は染色体検査で検出可能である。

おわりに

ここに示した遺伝子異常の所見は、MPN 各病型の正しい診断、予後予測、治療薬の選択に重要な根拠となるため、これらの検査が適切に実施できる検査体制を作ることが望まれる。

文 献

- 1) Swerdlow SH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon. IARC. 2017.
- 2) 宮崎泰. WHO分類2016年改訂 骨髄系腫瘍分類の概要. 日本検査血液学会雑誌 2017; 18: 1-9.
- 3) Hughes TP et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2003; 349: 1423-1432.
- 4) Redaelli S et al. Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors. Am J Hematol. 2012; 87: E125-128.
- 5) Levine RL, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 2005; 7: 387-397.
- 6) Scott LM, et al. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med. 2007; 356: 459-468.
- 7) Pardanani AD, et al. *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood. 2006; 108: 3472-3476.
- 8) Klampfl T, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2013; 369: 2379-2390.

- 9) Misawa K, et al. Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol.* 2018 ; **107** : 673-680.
- 10) Ono A, et al. Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2 V617F mutation. *Oncol Lett.* 2012 ; **4** : 205-208.
- 11) Maxson JE, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med.* 2013 ; **368** : 1781-1790.