

JAK2遺伝子検査の臨床的意義

Clinical Implication of JAK2 assessment

おおやしき かず ま
大屋敷 一馬
Kazuma OHYASHIKI

はじめに

慢性骨髄増殖性疾患 (chronic myeloproliferative disorder: CMPD) は Damscheck により提唱され、真性赤血球増加症 (polycythemia vera: PV)、本態性血小板血症 (essential thrombocythemia: ET)、慢性原発性骨髄線維症 (chronic idiopathic myelofibrosis: CIMF) などを包括する疾患群と定義され、互いに病型移行がみられることからオーバーラップする病態が想定されていた。2005年に JAK2^{V617F} 変異が報告され、チロシンキナーゼの活性化を呈する疾患群として責任遺伝子が明らかになり 2008年の WHO 分類ではチロシンキナーゼの恒常的活性化による病態をまとめる形で骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasia: MPN) が提唱され、これには古典的 CMPD と共に Ph 陽性慢性骨髄性白血病、好酸球増加症候群、慢性好中球性白血病、マスト細胞症および分類不能型も包括された^{1,2)}。

I. JAK2^{V617F} 変異の意義

JAK2^{V617F} 変異とは、JAK2のJH2部分(pseudokinase domain)の1849番目のG(グアニン)がT(チミン)に変換する1塩基置換により、617番目のV(バリン)がF(フェニールアラニン)に変化することである(図1)。このことにより、本来JH1に対して抑制的に働いているJH2が、JAK2^{V617F} 変異により抑制解除の状態になり下流のSTAT系(signal transducers and activators of transcription)へのシグナル伝達を開始する。この一連の変化がMPNの病態を担っ

ているとされている。従来の報告をまとめたものでは、JAK2^{V617F} 変異はPVの96%、ETの55%、CIMFの65%に検出される。報告による検出頻度の差は診断基準の差によるものの他に、JAK2^{V617F} 変異の検出方法にも依存すると推定される。JAK2^{V617F} 変異は1塩基置換であることよりPCR direct sequenceによる検出が可能であるが、体細胞変異と異なり正常細胞と変異をもつ腫瘍細胞の混在、およびmitotic recombinationによると考えられるJAK2 exon 14でのGT変異(片アレル変異)とTT変異(両アレル変異)の混在の可能性がある(図2)³⁾。実際PCR direct sequence法による検出ではJAK2^{V617F} 変異を有する細胞の割合によっては判定が困難なこともあり、現在ではallele specific PCR (AS-PCR)法が汎用されている⁴⁾。

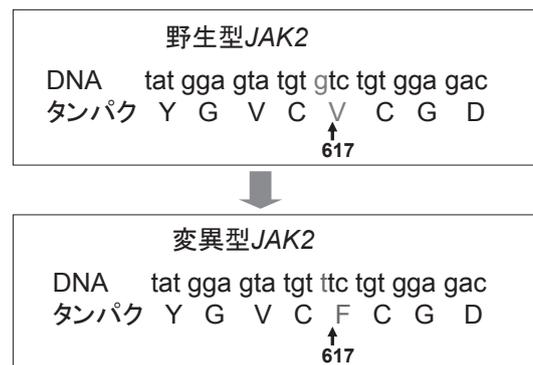


図1 JAK2アレル変異のタンパク質翻訳

9番染色体短腕(9p24)に座位するJAK2遺伝子のJH2部分の1849番目のG(グアニン)がT(チミン)に変換する1塩基置換により、617番目のタンパク質のV(バリン)がF(フェニールアラニン)に変化することがJAK2-V617Fである。

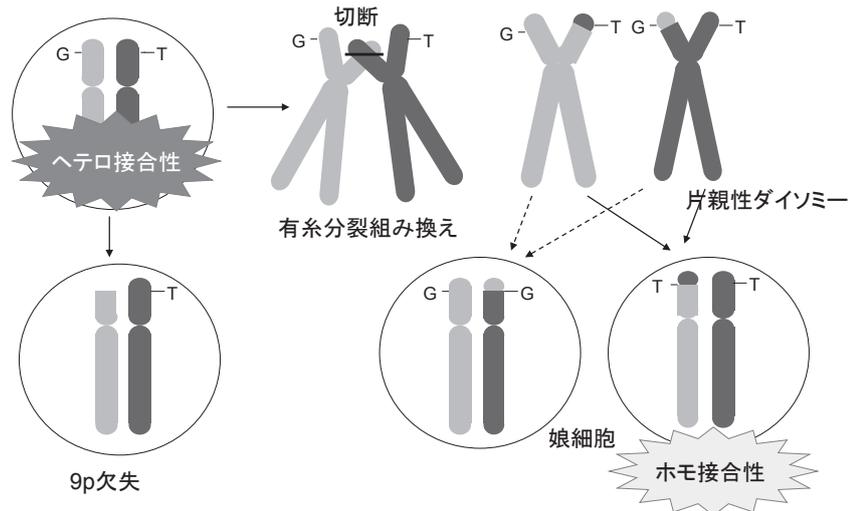


図2 9番染色体短腕のヘテロ接合性消失の発生機序

JAK2^{V617F} 変異発生様式の模式図。片アレルでG→Tに変換する場合(片アレル変異: heterozygous)や uniparental disomyにより両アレル変異(homozygous)としてみられることがある。また、9p24(JAK2遺伝子部位)の欠失(9p deletion)の可能性も想定されている。いずれにしてもJAK2^{V617F} 変異陽性率は腫瘍量を反映すると考えられる。

Copyright © 2005 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.
Translated with permission. (文献3)より

II. JAK2^{V617F} 変異の検出方法

JAK2^{V617F} 変異は当初 PCR direct sequence 法で確認されていたが、この検出方法では目視による変異の検出に頼らざるを得ないこと、大量の臨床検体を処理するにはそぐわないことなどが挙げられる。つまり体細胞変異と異なり、低頻度の腫瘍細胞での検出やヘテロ型 JAK2^{V617F} 変異の検出には不利である。AS-PCR法とは、PCR用のプライマーは3'末端塩基が違っていると増幅されないという原理を利用する方法である。そこで、変異アレルと内部コントロールである正常アレルを同時に行う AS-PCR法により、半定量的な検出法が用いられている。すなわち、同一の reverse primer と、正常アレルと変異アレルの2種類の異なる forward primer を使い、PCR反応を競合する事により、1塩基変異である JAK2^{V617F} 変異を半定量的に測定する(図3)⁴⁾。通常 PCR 反応では特定の遺伝子配列を検出するために、reverse primer と forward primer を用いて特定の遺伝子部分を増幅し、それとは別にコントロール遺伝子との比較により量的検定を行う⁵⁾。AS-PCR法では変異アレルと正常アレルの両者を同時に増幅させる事により簡便な半定量性を可能にしている。

III. 真性赤血球増加症における JAK2^{V617F} 変異の臨床応用

JAK2^{V617F} (JAK2 の exon 14) 変異の検出は MPN の診断に重要な意義をもつ事は前述した。ことに PV では95%の患者でこの JAK2^{V617F} 異常が検出され、残りの患者では JAK2 の exon 12 の変異(K537からE543に集中してミスセンス、欠失、挿入など)がみられる。JAK2 の exon 12 変異の PV は若年者に多く、白血球数および血小板数は正常範囲内、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値は JAK2^{V617F} 変異(exon 14 の変異)例よりも高く、骨髄での赤血球系細胞の増殖を特徴とする。JAK2^{V617F} 変異が検出されない例でも、PV が強く疑われる例では臨床血液学的所見より JAK2 exon 12 変異を疑うことも大切である。一般的に PV での AS-PCR 法による JAK2^{V617F} 変異の割合は病勢を反映すると考えられるため、血栓症リスクや抗腫瘍薬投与の指標にもなりうる。JAK 阻害薬であるルキシソリチニブ(JAK1 および JAK2 サブタイプ選択的阻害薬: ジャカビ[®]) は本邦では既存治療が効果不十分または不適当な PV に保険適応がある。PV では様々な臨床血液学的パラメーターにより、瀉血、ハイドロキシウレアで代表される抗

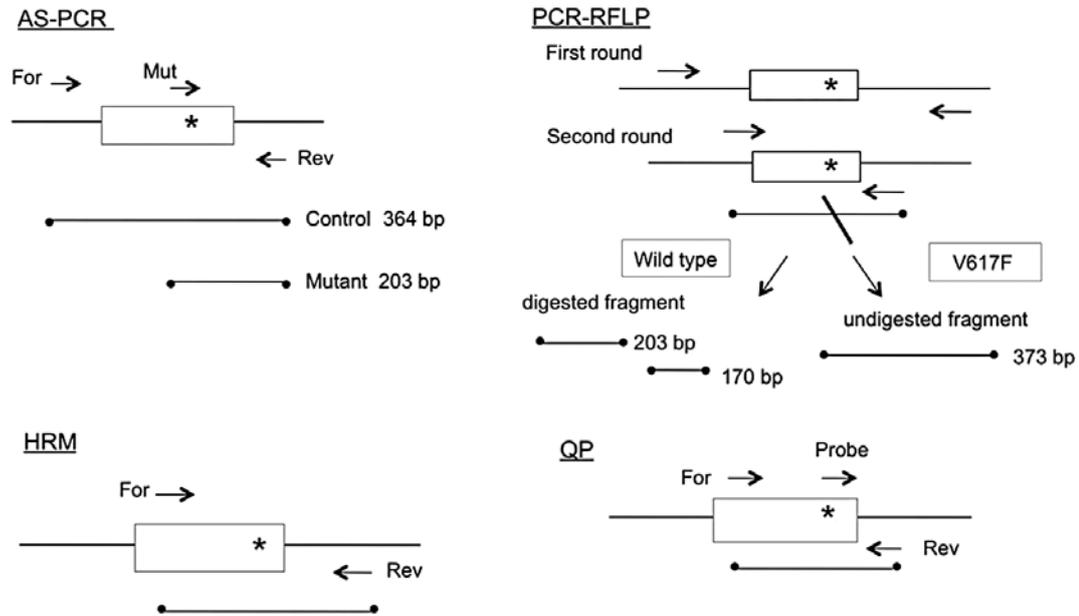


図3 allele specific PCR (AS-PCR) 法の原理

同一のreverse primerと、正常アレルと変異アレルの2種類の異なるforward primerを用い、PCR反応を競合する事により1塩基変異であるJAK2^{V617F}変異を半定量的に測定する。通常PCR反応では特定の遺伝子配列を検出するために、共通のreverse primer (Rev)とmutation対応primer (Mut)を用いて特定の遺伝子部分を増幅し、同時にコントロール遺伝子検出のForward primer (For)とreverse primerによる増幅産物の比較により量的検定を行う。PCR制限酵素断片多型解析法 (PCR-RFLP)、高解像度融解曲線分析法 (HRM)、Quenchingプローブ法 (QP) 法 (文献4)より引用)。

腫瘍薬、さらに分子標的薬であるルキソリチニブが用いられる。AS-PCR法によるJAK2^{V617F}変異の半定量解析は、「既存治療が効果不十分または不適当なPV」に対して適切な時期に治療の変更を可能にする客観的情報をもたらしてくれる。

IV. 原発性骨髄線維症における JAK2^{V617F} 変異の臨床応用

JAK阻害薬であるルキソリチニブは原発性骨髄線維症 (CIMF) にも保険適応がある。CIMF患者では診断および治療効果判定に臨床所見 (血液所見や臓器腫脹など) や骨髄生検による線維化の確認が必要であるが、JAK2^{V617F}変異陽性例では遺伝子変異の推移が治療効果の目安になるかは不明である。CIMFでは65%の患者にJAK2^{V617F}変異が認められ、診断的意義を持つ。JAK2^{V617F}変異の量的意義および治療後の経過における量的変動による治療効果判定は困難であるが、CIMFではJAK2^{V617F}変異陽性例の約30%に血栓症の発生を認め、JAK2^{V617F}変異のアレルバーデンが50%以上の例では血栓症リスクが高

まるとされている。CIMFの予後判定としてThe Dynamic International Prognostic Scoring System-plus (DIPSS-plus)では年齢65歳以上、ヘモグロビン値10g/dL未満、白血球数25,000/ μ L以上、末梢血芽球1%以上、臨床症状、輸血依存、血小板数10万/ μ L未満、予後不良核型 (複雑型染色体異常や+8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, あるいは11q23での異常を含む2個の染色体異常) が挙げられ、さらにASXL1やSRSF2変異も予後不良因子と考えられているが、JAK2^{V617F}変異の有無については言及されていない⁶⁾。

V. 本態性血小板血症における JAK2^{V617F} 変異の臨床応用

JAK2^{V617F}変異は一部のETでも検出される。ETにおけるJAK2^{V617F}変異陽性例では血栓症の発症頻度が高いことが知られ、重要な血栓予測因子となりうる。JAK2^{V617F}変異陽性例では変異陰性例に比べ優位に高齢者、白血球数増多、血色素量およびヘマトクリット高値を示すが、血小板数に違いはみられず、

JAK2^{V617F} 変異量 (allele burden) は白血球数増加と関係するが、血球増加や血小板増加とは関係がなかった。われわれの検討では JAK2^{V617F} 変異量は血栓形成と関係し、血栓症の発症は血小板数とは無関係で患者の年齢 (70 歳以上でオッズ比 2.575)、白血球数 9000/ μ L 以上 (オッズ比 2.743)、男性 (オッズ比 2.5)、JAK2^{V617F} 変異陽性 (オッズ比 4.628) が血栓発症リスク因子であることが判明した⁷⁾。ET 患者では二次的骨髄線維症に進行することがあるが、ET 診断時における JAK2^{V617F} 変異との関係は必ずしも明らかでない。

おわりに

骨髄増殖性腫瘍では JAK2^{V617F} 変異の検出は、赤血球増加症の診断、原発性骨髄線維症の補助診断、本態性血小板血症における血栓症のリスク因子など治療に直結する情報として重要な位置を占めている。現在、allele-specific PCR 法による JAK2^{V617F} 変異の検出は保険収載 (血液学的検査実施料 2504 点) され、身近な検査として定着している。また、骨髄増殖性腫瘍では互いに病型移行 (二次的骨髄線維症への移行)、白血病化への進展と長い経過の中での病態の変化がみられる。特に骨髄線維症では、急性

白血病への移行との鑑別が必要なほどの末梢血への芽球の増加を来すこともままあり、AS-PCR 法による JAK2^{V617F} 変異の検出のみならず、付加的な遺伝子変化の情報が必要なこともあるが、JAK2^{V617F} 変異の検討は骨髄増殖性腫瘍における基本的かつ重要な情報である。

文 献

- 1) Swerdlow SH, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon. IARC. 2017.
- 2) 慢性骨髄性白血病/骨髄増殖性腫瘍：日本血液学会増血器診療ガイドライン・2018年版
- 3) Kralovics R, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005; **325** (17): 1779-1790.
- 4) 東田修二. 骨髄増殖性腫瘍の遺伝子検査. *Modern Media.* 2019; **65**: 119-122.
- 5) Ono A, et al. Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2V617F mutation. *Oncol Lett.* 2012; **3**: 205-208.
- 6) Tefferi A, et al. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2016; **91**: 1262-1271.
- 7) 岩渕多光子, ほか：本態性血小板血症における JAK2-V617F 変異の臨床的意義：初診時の白血球増加と JAK2-V617F 変異が有意な血栓症発症リスクである. *東京医科大学雑誌.* 2012; **70**: 205-214.