

## 慢性骨髄増殖性疾患の最新検査～JAK2遺伝子変異～

大屋敷 一馬<sup>1</sup>、大屋敷 純子<sup>2</sup>

1 東京医科大学 内科学第1講座(血液内科)教授、2 東京医科大学 難病治療研究センター

## Summary

骨髄増殖性腫瘍における JAK2V617F (exon 14 変異) の診断的価値は極めて高いと同時に、今後の標的療法におけるパラメーターとしての位置付けも確実なものになりつつある。当初から JAK2V617F 変異の量的意義 (tumor burden) に注目が集まり、JAK2V617F は一塩基の置換による異常 (G1849T) であることからさまざまな検出方法が提案された。さらに、赤血球増加症における JAK2 exon 12 変異の全貌が明らかになりつつあり、WHO 分類での骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の確固たる診断基準の一つとして見逃せない検査でもある。

## Key words

慢性骨髄増殖性疾患、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、JAK2

## 1. はじめに

1951年、Dameshek博士は、多系統の血球増加がみられ、病型移行が相互にみられる一群をまとめ骨髄増殖性症候群 (myeloproliferative syndromes) と呼ぶことを提唱した。当初、この概念には慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML)、真性赤血球増加症 (polycythemia vera; PV)、本態性血小板血症 (essential thrombocytosis; ET)、原発性骨髄線維症 (primary myelofibrosis; PMF)、赤白血病の5疾患がまとめられていたが、後に赤白血病は急性骨髄性白血病に分類され、残りの4疾患が慢性骨髄増殖性疾患 (chronic myeloproliferative disorders; CMPD) と命名された。いわゆる古典的 CMPD と呼ばれるもので、この基本的な概念は現在まで継承され、WHO-2008 分類

でもこれら4疾患が CMPD の中心に位置していることに変わりはない。

CMLをはじめとする CMPD は、造血幹細胞の異常により多系統の増殖がみられるクローン性疾患であり、WHO-2001 分類では、CMPD はチロシンキナーゼの恒常的な活性化を病態とする疾患群としてまとめることが提唱された。この背景には、CML における 9; 22 転座 (BCR-ABL 転座) によるチロシンキナーゼの活性化と、治療薬であるイマチニブの登場が大きくかかわっている。WHO-2001 分類では古典的 CMPD のほかに、慢性好酸球性白血病・好酸球増加症候群 (chronic eosinophilic leukemia/hypereosinophilic syndrome; CEL/HES)、HES および分類不能型が含まれ、その後の分子病態の解明に拍車がかかった。すなわち、2003年には CEL/HES における FIP1L1/PDGFA 融合遺伝子の発見とイマチニブ有効性の評価へと進むことになる。

## PROFILE

おおやしき かずま  
大屋敷 一馬

1978年 東京医科大学卒業  
1983年 東京医科大学大学院修了  
1984～1986年 米国 Roswell Park Memorial Institute 留学  
1987年 東京医科大学・内科学第1講座講師  
1999年 東京医科大学・内科学第1講座主任教授

## 2. 古典的 CMPD における

## 恒常的なチロシンキナーゼの活性化

CML においては分子病態や治療薬開発の進歩がめざましいのに対して、そのほかの CMPD の分子病態に関しては長年不明の点が多かった。しかし、2005年に古典的 CMPD における JAK2V617F 変異が相次いで報告され<sup>1,5)</sup>、またたく間に、生物学のおよび臨床血液学的意義

について解析が進められた<sup>14)</sup>。すなわち、エリスロポエチン受容体のシグナルをつかさどる *JAK2* (Janus activating kinase 2) の 1,849 番目のグアニンがチミンに 1 塩基置換 (exon 14 G1849T) することにより、617 番目のフェニルアラニンがバリンに置換した (*JAK2V617F*) 結果、野生型ではエリスロポエチン刺激により初めて生じるシグナル伝達が、エリスロポエチンの非存在下でシグナル伝達が進行するようになり、細胞増殖を促すことが明らかにされた (図 1)。

いいかえれば、*JAK2V617F* は機能獲得型の後天的体細胞変異であり、恒常的な受容体型チロシンキナーゼの活性化の本態といえる。*JAK2* exon 14 の G1849T の 1 塩基置換のみで CMPD における血液学的多様性をすべて説明できるのかとする疑問もあるものの、*JAK2V617F* は WHO-2008 分類でも PV の診断基準に取り入れられ、その重要性を増している。*JAK2V617F* は PV では 95 % 以上の患者に検出され、ET および PMF でも 50 % 程度の患者に検出される。PV では両側のアレル変異 (ホモ型) の症例が 3 分の 2 を占め、腫瘍量 (tumor burden) を判

定する根拠となる。一方、ET や PMF での検出頻度は半数程度であり、そのほとんどが片側のアレルのみの変異 (ヘテロ型) であることが知られている。そこで本稿では、変異検出法を含めた *JAK2* 変異の臨床検査としての意義について概説する。

### 3. PV における *JAK2* 変異

2005 年、*JAK2V617F* の異常が CMPD の中心的な異常であることが、世界 5 か所より相次いで報告され、半世紀前に Dameshek 博士が提唱した疾患概念が分子病態として実証されたことは、近代血液学におけるエポックであった<sup>15)</sup>。

当初、PV における *JAK2V617F* 検出の頻度にはばらつきがみられた。この原因には、方法論的な問題に加えて PV の診断基準が関与している。また、初期の報告では PCR ダイレクトシーケンスを用いており変異検出感度が低い。その後、exon 14 の G1849T は 1 塩基置換であることから、*JAK2V617F* はアレル特異的 PCR 法によ

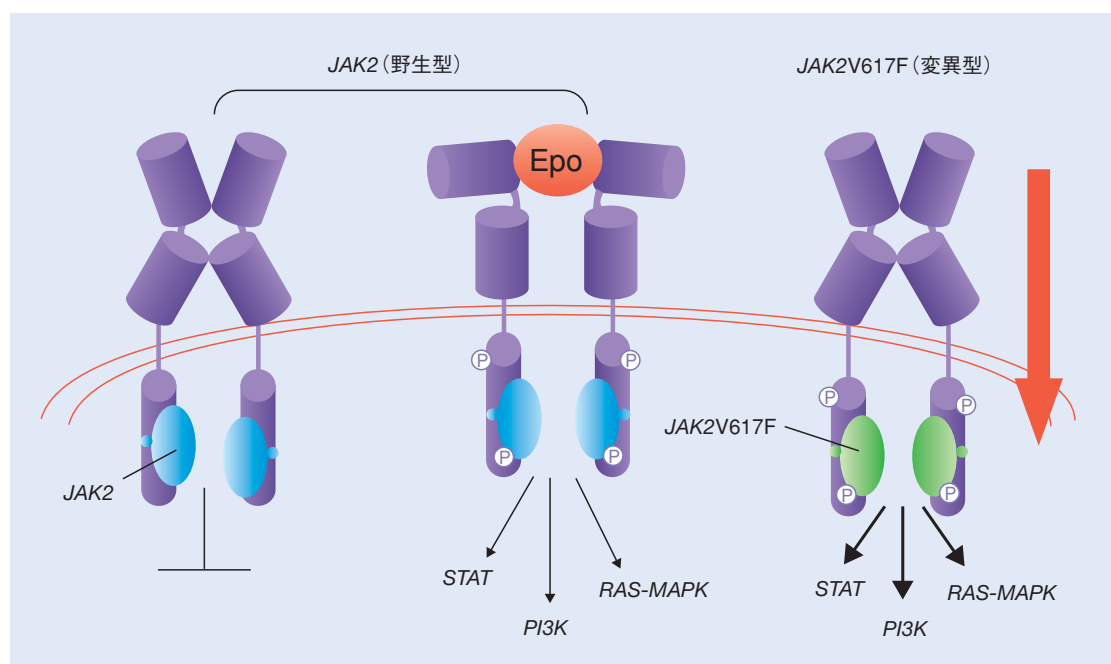
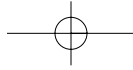


図 1 *JAK2V617F* とエリスロポエチン非依存性シグナル伝達経路

*JAK2* が野生型の場合、エリスロポエチン非存在下では赤血球増殖のシグナルは伝達されない (左)。エリスロポエチンが一旦受容体に結合すると、下流へと増殖シグナルが伝達されるため、赤血球の増殖が起こる (中)。このように正常では赤血球の増殖はエリスロポエチンによって厳密に制御されている。一方、*JAK2V617F* を有する場合は、エリスロポエチンの制御を逸脱しており、エリスロポエチン非存在下でも恒常的に *STAT*、*PI3K*、*RAS-MAPK* などが活性化され、赤血球の増殖が起こる (右)。PV 患者の骨髄細胞でコロニー形成能を検討するとエリスロポエチンを添加しなくても赤芽球コロニーができる (spontaneous erythroid colony formation) のはこのためである。増殖因子とその受容体という観点から見ると、同様のメカニズムは血小板系 (トロンボポエチン受容体)、顆粒球系 (G-CSF 受容体) にも存在し、増殖因子非依存性血球増殖が CMPD の分子病態の本質であると考えられている。



る検出が主流となり、95%以上のPVでJAK2V617Fが検出されるようになった。

また、PVの診断自体がPolycythemia Vera Study Group (PVSG)からエリスロポエチン濃度やエリスロポエチン非存在下の赤芽球コロニー形成能などクローン性の証明などが加味されたWHO分類へと移行したため、どの診断基準を用いるかによってもJAK2V617Fの検出頻度は異なる。現在ではWHO-2001分類によるものとして、これに合致しない基礎疾患のみられない赤血球増加は特発性赤血球増加症と診断し、さらにエリスロポエチン濃度が低下しているか、正常範囲内かで2分して論じられることが多い。

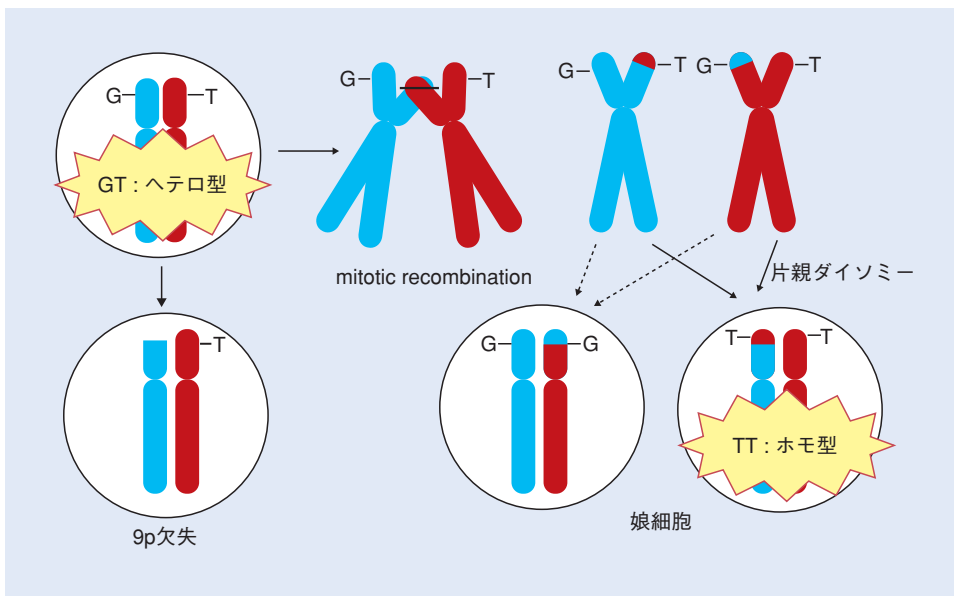
WHO-2001分類によるPVでは95%以上の症例でJAK2V617Fが検出され、WHO-2008分類では診断根拠の一つとしている。JAK2V617Fが検出されるPVの約3分の2はホモ型JAK2V617Fで残りの3分の1はヘテロ型である。このJAK2V617Fの量的検討はJAK2 exon 14のG1849T変異を量的に解析することによる解釈であり、JAK2 exon 14のG1849T変異アレルがmitotic recombinationにより両方の染色体上のアレルとして存在すると考えられている(図2)。すなわち、ヘテロ型と解釈される場合でも両アレルにJAK2 exon 14のG1849T変異をもつ細胞と片側アレルのみに変異を示す細胞の両者が混在する可能性は否定できない。したがってJAK2 exon 14のG1849T変異に関しては単に変異

の有無ではなく、変異アレルの量的変化を評価する必要がある。JAK2 exon 14のG1849T変異導入マウス細胞では、JAK2の下流のシグナルであるSTAT5の発現亢進によるspontaneous erythroid colonyの形成がみられることから、JAK2 exon 14のG1849T変異がPVの病態形成にきわめて深くかかわっていることが知られている。

JAK2V617F陽性のPVでは、JAK2V617F陰性の症例に比べ、高齢者で男性が多く、有意な白血球数および血小板数の増加、ヒドロキシウレアを含む抗悪性腫瘍薬による治療の必要度が高く、骨髄線維化や白血病への移行頻度が高いことが知られている。すでに述べたように真性多血症の診断基準にも依存するが、JAK2V617Fの有無により臨床像も大きく異なる。

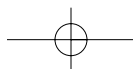
JAK2V617Fが検出されないPVは存在しないとする意見もあるなかで、2007年にScottらは、JAK2V617Fが検出されない一部のPVおよび特発性赤血球増加症でJAK2 exon 12の変異を報告した<sup>7)</sup>。この報告では、PVの73例中2例にJAK2V617F変異およびJAK1、JAK3、TYK2、STAT5A、STAT5Bでの変異は検出されず、唯一、JAK2 exon 12で1,611から1,666までの6塩基のin-frame deletionの結果によるF537-K539delinsLが、ほかの1例では1,614のCAA→ATT変異によるH538QK539L変異がみられた。

この事実をもとに、さらにJAK2V617F陰性のPVの9例を検討したところ、8例にJAK2 exon 12の変異がみら



がん抑制遺伝子と異なり、がん遺伝子の変異は1アレルの変異で起こるが、PVではしばしば両アレルの変異(TT型)を示す。原因としては第一段階でTアレルの変異が起こるが、その後、野生型のアレルが欠失(9p欠失)した場合のほかに、mitotic recombinationの結果、片親ダイソミーが起こる場合もある。この変化はPV発症の比較的早期に起こると考えられ、正常クローンが多い場合はTT型がマスクされ、GT型と判定される可能性もある。

図2 JAK2V617Fにおける変異Tアレルの意義



れ、すべて K537 から E543 までの部位に集中していた。さらに、この *JAK2* exon 12 の変異は *JAK2V617F* 陽性の PV、ET および PMF ではみられず、*JAK2V617F* 陰性の PV および特発性赤血球増加症の一群にみられる特定の異常であることを発見した。さらに、*JAK2* exon 12 の変異トランスフェクションマウスでは spontaneous erythroid colony の形成およびシグナル伝達の下流にある *STAT5*、*Erk2* のリン酸化が証明され、病態形成に関与していることが証明された。

*JAK2* exon 12 変異を有する赤血球増加症患者は *JAK2V617F* 陽性の PV に比較し、①若年、②白血球数および血小板数は正常レベル、③ヘモグロビンおよびヘマトクリット高値、④骨髄では巨核球系および顆粒球系細胞の形態異常はなく、赤血球系細胞の過形成、などが共通してみられた。さらに、多数の特発性赤血球増加症での検討ではエリスロポエチン濃度の低い例の 27% に *JAK2* exon 12 の変異が検出されたが、エリスロポエチン濃度が正常範囲内の特発性赤血球増加症では 1 例も *JAK2* exon 12 の変異が検出されず、特発性赤血球増加症での *JAK2* exon 12 の変異の位置付けが明瞭になりつつある。

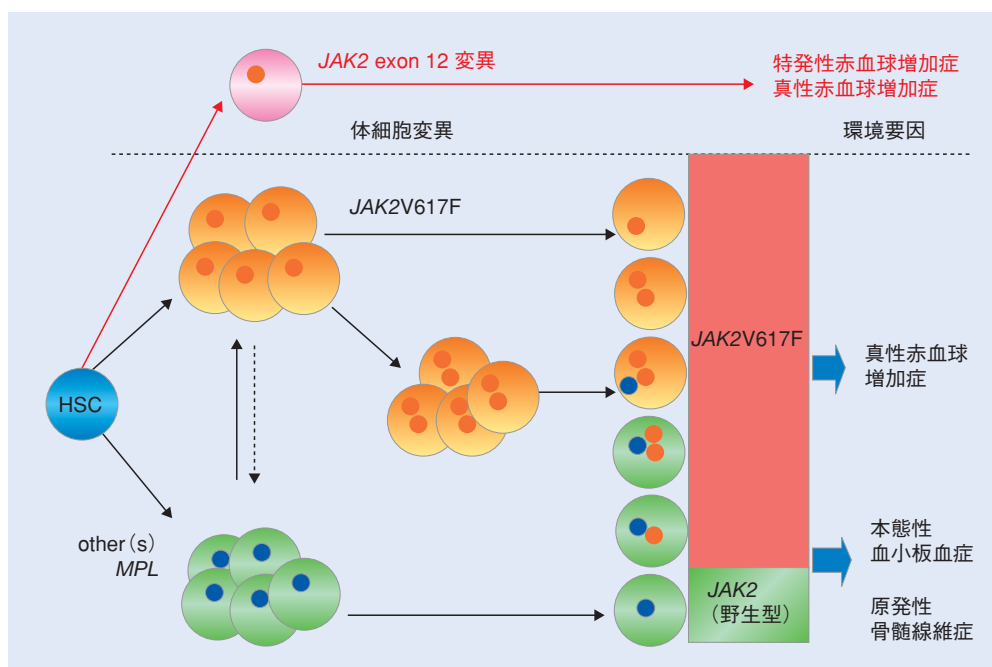
その後も *JAK2* exon 12 変異の報告が散見されるが、*JAK2* exon 12 変異は *JAK2V617F* と異なり、ホットスポット内で変異箇所が複数箇所あり、後述するような方法論

上の問題もある。現在、*JAK2V617F* (*JAK2* exon 14 G1849T) と同様に *JAK2* exon 12 変異も PV の診断根拠として考慮することが WHO-2008 分類には取り入れられているが、検査法も含めて検討の余地がある。

#### 4. ET および PMF における *JAK2* 変異

*JAK2V617F* の発見当初より *JAK2V617F* が ET の約半数の症例に検出され、そのほとんどの症例はヘテロ型であることが知られている。また、1% の患者ではトロンボポエチン受容体である *MPL* の変異がみられる。ET 患者における *JAK2V617F* の臨床的意義、特に血栓症との関係については議論のあるところであったが、最近のメタアナリシスでは *JAK2V617F* と血栓形成との関係がオッズ比 1.84 で示唆されている。われわれの検討でも、ET 患者の診断時の血栓症は白血球数と関係し、観察中の血栓症の発生は *JAK2V617F* と関係していた。すなわち、生物学的意義は明らかにされていないが、*JAK2V617F* の検出は ET 患者における血栓予測因子となりうる可能性が高いと思われ、変異の検出は有用である。

PMF でも 50% の患者では *JAK2V617F* が検出されるが、その臨床的意義は明らかにされていない。以上、*JAK2* を中心に CMPD の分子病態について図 3 にまとめた。



造血幹細胞の異常としての CMPD の位置付けを *JAK2* 変異様式からまとめた。*JAK2V617F* は赤血球系の増殖と密接に関係しており、exon 12 の変異は特発性赤血球増加症や PV に特徴的である。一方、ET や PMF では *MPL* (トロンボポエチン受容体) 変異などほかの遺伝子変異がその本態と考えられているが、*JAK2V617F* との混在も存在し、病像を修飾している。PV において両アレルの変異があることに注目してほしい。

図 3 *JAK2* から見た CMPD の相互関係

## 5. その他の疾患における JAK2 変異

JAK2V617F は CMPD の診断、合併症との関係について検討されているが、骨髄異形成症候群 (MDS) の一つである、RARS-T (refractory anemia with ringed sideroblasts with thrombocytosis) の半数でも、この変異が検出される。ET と RARS-T との関係は明らかにされていないが、WHO 分類では RARS-T は分類不能型の MDS/MPD (myelodysplasia/myeloproliferative disorders-unclassifiable) の一つとして分類されている。

## 6. 臨床検査における JAK2 変異の検出

以上のように、JAK2 の変異は、① CMPD において高頻度に認められる JAK2 exon 14 の変異 (JAK2V617F)、② 赤血球系の増殖と関連するまれな JAK2 exon 12 の 2 種類があるが、前者が臨床検査としての意義が大きい。そこで本稿では、①を中心に検査の実際について概説する。

JAK2V617F の検出は確定診断と治療効果判定の両面で実地臨床に直結しているため、検査法の選択には少量の試料から多検体の処理が可能であることが必要条件となる。加えて、変異の有無よりはむしろ変異アレルの

量的推移が診療上有用と考えられ、これは CML において Amp-CML を治療の指針にするのと似ている。検査試料としては全血、分離した白血球、コロニー形成細胞などさまざまであるが、アレル特異的 PCR に準じた検出方法が主流である。そこで、われわれは 100  $\mu$ L の全血から自動抽出装置を用いて DNA を採取し、オリンパス株式会社・ライフサイエンスカンパニー (旧ノバスジーン) との産学連携事業にて、JAK2V617F 変異を診断する蛍光相関分光法 (fluorescent correlation spectroscopy ; FCS) を用いた半定量的アレル分析法を開発した。

FCS とは蛋白、核酸など生体分子の相互作用を解析する手法で、溶液中の微小領域 (約 1 fL) の蛍光のゆらぎを共焦点光学系で観察し、結果を判定する (図 4)。蛋白と核酸の結合、蛋白同士の結合、PCR 反応などにより、蛍光標識した分子が大きくなると液体内での動きが遅くなるため、蛍光強度の変化がゆるやかである (図 4 右上)。一方、遊離のプライマーや核酸や蛋白と結合していない蛋白などは反応産物と比較して分子が小さく細かくブラウン運動するため、蛍光強度の変化が早い (図 4 右下)。FCS を応用した遺伝子解析 (gene analysis by FCS ; gFCS) では蛍光物質で修飾したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 反応の結果を「蛍光ゆらぎ」の測定により判定する。

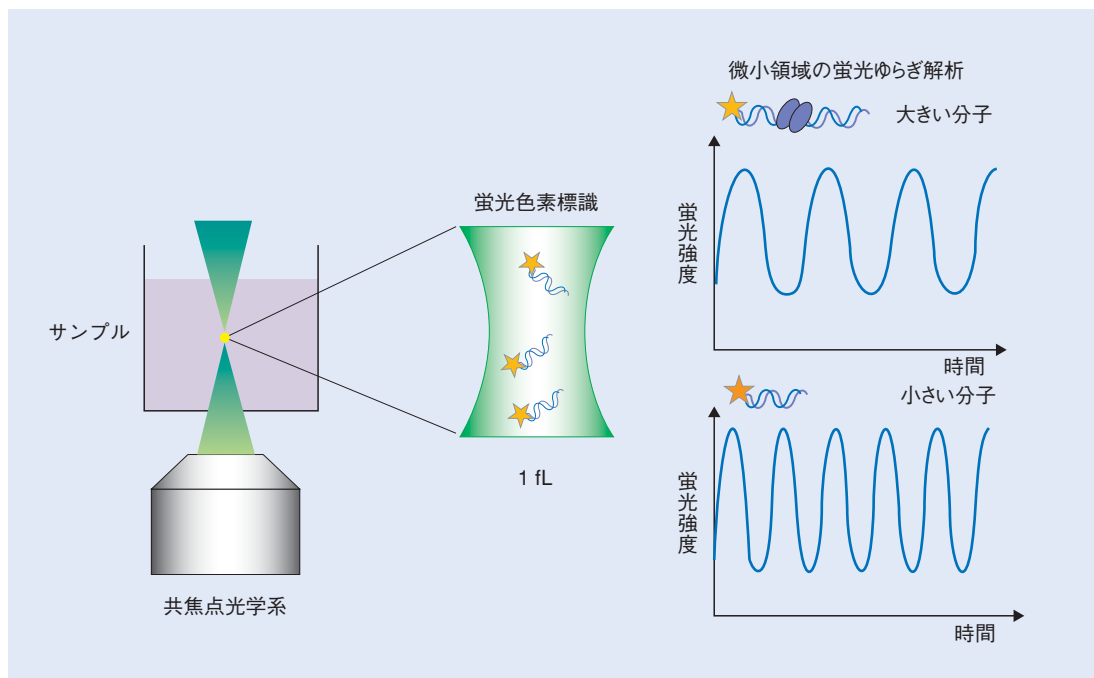


図 4 蛍光相関分析法の原理

サンプル中の分子の大きさによって並進拡散時間が異なることより大きい分子と小さい分子を分類できる。

gFCS法はSNP解析の一手法として、Bannaiらによりすでに報告されているが<sup>8)</sup>、*JAK2V617F*細胞の変異であるため、われわれは定量系を導入して実用化を目指した<sup>9)</sup>。gFCSによる*JAK2V617F*の検出方法の概略を図5に示す。まず、1回目のPCRで*JAK2* exon 14 G1849Tを挟んだ共通部分を増幅する。2回目のPCRでは野生型の配列をもつTAMRA標識プライマーと変異型の配列をもつCy5標識プライマーを用いて遺伝子を増幅する。このときPCRで増幅されればプライマーが伸長して分子として大きくなり、観察領域中の大きい分子の比率(K2%)として測定される。

一方、遊離のプライマーは観察領域中の小さい分子の比率(K1%)として測定される。定量の際のリファレンスとして野生型*JAK2*を組み込んだプラスミド、変異型*JAK2*を組み込んだプラスミドを用いて定量性について検討した結果、gFCS法は変異型アレル、野生型アレルの比率を反映すると考えられた(図6)。

実際の患者試料で解析するにあたっては、①PVでは両アレルの変異を有する症例が少なからずあること、②白血病と異なり、正常クローンと異常クローンの混在の

可能性があることを考慮し、本法は変異型アレルの比率に重点を置いた検出系である(図7)。リファレンスの混合実験の結果ではホモ型(TT型)では変異アレルのK2%が90%を占め、野生型(GG型)のそれは0%である。しかしながら、サンプルの不均一性を反映して、いわゆるヘテロ型(GT型)は広く分布し、変異アレルの混入率は5~80%である。

しかも、変異アレル比率の高いヘテロ型とホモ型の境界は明瞭ではなく、便宜上ホモ型、ヘテロ型という言葉を用いているが、体細胞変異である*JAK2V617F*についてはこの表現が不適切かもしれない。むしろ診断の見地からは変異アレル混入率5%というラインが重要で、同様に治療による変異型アレルの比率の推移はフォローアップに欠かせない検査となるであろう。

図8にPVとETにおけるgFCS法による*JAK2V617F*変異の検出結果を示す。PVにおいてもETにおいても、野生型とGT型またはTT型の差は明瞭であるが、変異アレルの比率という点から見ると、PVのほうがTT型が多く、変異アレルの比率も高い<sup>10)</sup>。

一方、*JAK2* exon12の変異についてはWHO-2008診

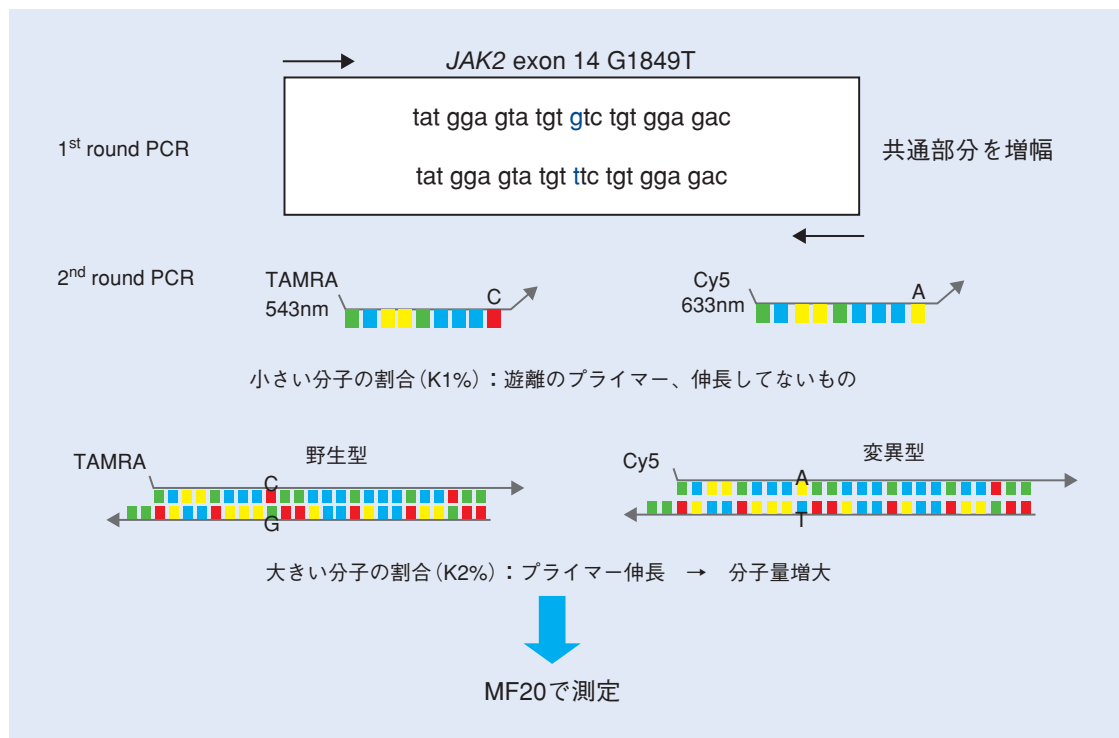


図5 蛍光相関分析法を用いた*JAK2V617F*変異の解析

*JAK2* exon 14 の G1849T を含む領域を PCR で増幅し、波長の違う 2 種類の蛍光色素 (TAMRA と Cy5) で野生型、変異型の配列にそれぞれ特異的なプライマーを用いて解析を行う。遊離のプライマーは小さい分子の K1 % として、PCR 産物は大きい分子の K2 % として測定される。測定にはオリンパス社の MF20 を用いている。

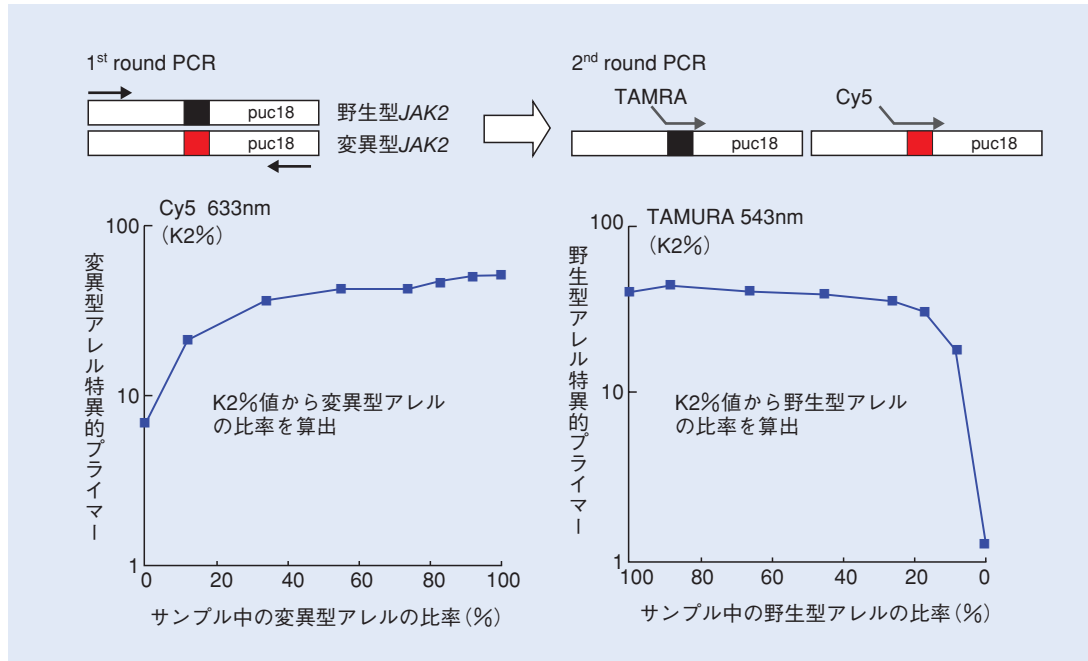


図6 JAK2V617F 変異型アレルの定量

野生型、変異型の配列をもつ2種類のプラスミドをリファレンスとして用いる。

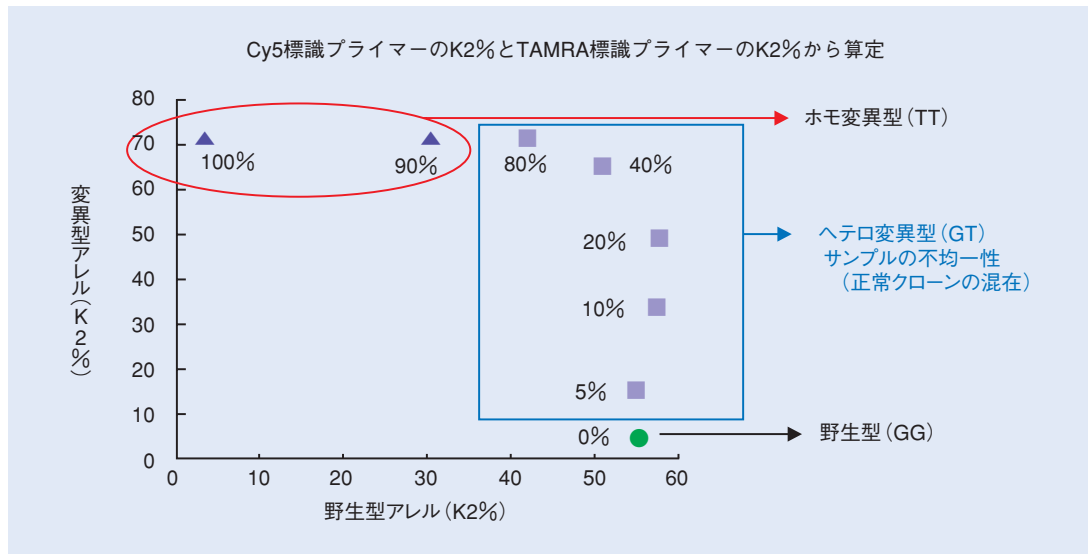


図7 JAK2V617F 解析結果の表示

解析結果はTT型、GT型、GG型に分類されるが、サンプル不均一性のため、GT型の範囲が広く、通常のSNP解析とは異なる。

断基準に入っているものの、検査としての実用化には遠い。これは、① exon 12のホットスポット内で変異がすでに20か所以上報告されており、既知のアレル特異的プライマーでは新たな変異をカバーしきれないこと、②異常を有するクローンの比率が少なく、PCRダイレクトシーケンス法ではしばしば検出不能であること、などに起因している。①に関しては共通領域で1回目のPCRを

かけ、melting analysisで変異の有無をスクリーニングした後、シーケンスを行う方法、変異報告例の多い部分を参考にしてアレル特異的PCR後シーケンスを行う方法などが報告されているが、正常クローンと混在しており、変異の検出は必ずしも容易ではない。われわれは、PCRダイレクトシーケンスでJAK2 exon 12の変異が検出されなかったJAK2V617F陰性のPVについてTAク

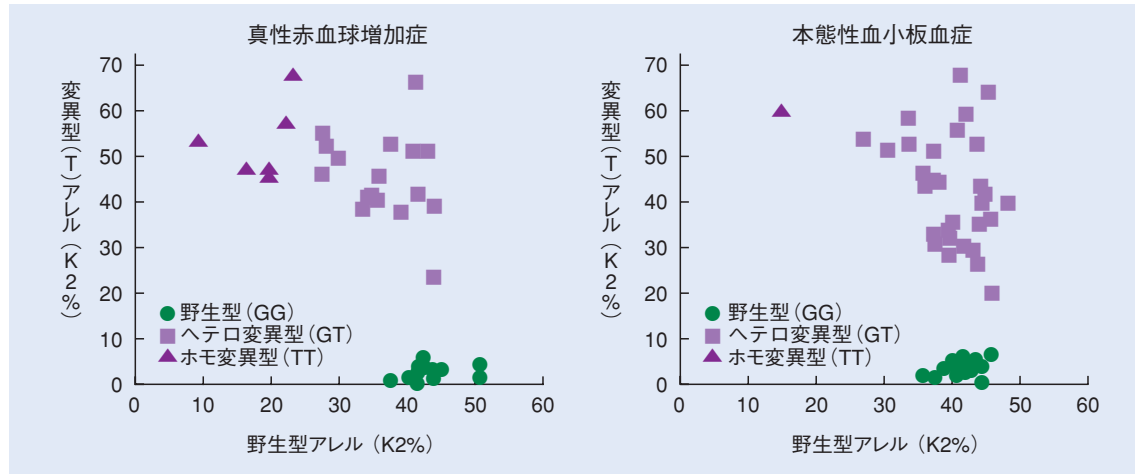


図8 CMPDにおけるJAK2V617F  
左：真性赤血球増加症、右：本態性血小板血症

ローニングを行い、多数のクローン解析した結果、少数の変異クローンを検出し得た経験があるが、この方法は実用的ではない。しかしながらJAK2V617F変異と同じ機能獲得型変異でありながら、なぜ変異クローンの検出率が低いのかと疑問が残る。治療の反応性など臨床像との関係を含めて、今後の課題であろう。

## 7. おわりに

CMPDにおけるJAK2変異は、診断指標としてのみならず、JAK2を分子標的とした治療法の開発につながっ

ている。実際に欧米ではPMFを中心にJAK2を標的とした薬剤の臨床試験が始まっているが、わが国ではJAK2V617F変異検出に関しても一部の施設でしか実施されていないのが現状である。わが国で成人白血病の約20%を占めるCMLは10万人に1人の発症率といわれるが、そのほかのCMPDに関しては疫学的調査がなされていない。欧米の疫学的調査よりそのほかのCMPDはCMLの2～3倍の患者数が想定され、gFCSによる大規模な集学的解析がCMPDの病態解明とともに新たな治療法確立につながるものと期待している。

### 文献

- 1) Kralovics R, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-1790.
- 2) Baxter EJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
- 3) James C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
- 4) 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.
- 5) Zhao R, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005; 280: 22788-22792.
- 6) Campbell PJ, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366: 1945-1953.
- 7) Scott LM, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459-468.
- 8) Bannai M, et al. Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Biochem* 2004; 327: 215-221.
- 9) Ohyashiki K, et al. Automated JAK2<sup>V617F</sup> quantification using a magnetic filtration system and sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 179: 19-24.
- 10) Ohyashiki K, et al. JAK2<sup>V617F</sup> mutational status as determined by semiquantitative sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection assay is linked to clinical features in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2007; 21: 1097-1099.