

日本人骨髄増殖性腫瘍患者における
JAK2 46/1 ハプロタイプの検討

山口大学大学院医学系研究科応用医工学系専攻
病態制御内科学 博士後期課程

田中 真由美

平成 26 年 1 月

目次

第 1 章 緒言	p.3
1.1 背景	p.3
1.2 本研究の目的	p.3
第 2 章 方法	p.3
2.1 患者背景	p.3
2.2 一塩基多型・JAK2 V617F 変異の検出方法	p.4
2.3 統計学的検討方法	p.4
第 3 章 結果	p.5
3.1 骨髄増殖性腫瘍患者での JAK2 V617F 変異とアレル量	p.5
3.2 JAK2 rs10974944 の一塩基多型の頻度	p.5
3.3 骨髄増殖性腫瘍患者での JAK2 rs10974944 一塩基多型	p.8
第 4 章 考察	p.9
謝辞	p.11
参考文献	p.11

第 1 章 緒言

1.1 背景

骨髄増殖性腫瘍は、クローン性の造血と主に成熟末梢血細胞の増加を特徴とする複数の血液悪性腫瘍を含んでいる。最も一般的な BCR-ABL 陰性の骨髄増殖性腫瘍には真性多血症、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症がある。いくつかの研究グループから真性多血症のほとんど、および本態性血小板血症および原発性骨髄線維症の約半分で janus kinase 2 (JAK2) をコードする遺伝子に変異が起きていることが報告された¹⁾⁵⁾。JAK-STAT シグナル経路は、骨髄系細胞の分化と生存に欠かせない重要な要素である。JAK2 617 番目のフェニルアラニンがバリンに置換した点突然変異は骨髄増殖性腫瘍に特異的であり、最新の WHO 分類による真性多血症、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症の診断基準の一部となっている⁶⁾。

北アメリカやヨーロッパにおいて、JAK2 遺伝子の「46/1」や「GGCC」と呼ばれるハプロタイプと JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍の発症に強い相関があることが報告された⁷⁾⁹⁾。

1.2 本研究の目的

日本人患者において 46/1 ハプロタイプと JAK2 V617F 変異陽性の骨髄増殖性腫瘍との関連についての報告はほとんどない。そこで、本邦の 46/1 ハプロタイプと JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍との関連について検討することとした。

第 2 章 方法

2.1 患者背景

最新の WHO 分類による、真性多血症 19 名、本態性血小板血症 61 名、原発性骨髄線維症 10 名、骨髄増殖性腫瘍分類不能型 18 名の合計 108 名の日本人患者について検討を行った。患者は 17 歳から 84 歳の 59 名の男性 (54.6 %)、

49名の女性(45.4%)であり、年齢中央値は62.5歳であった。コントロールとして、104名の年齢及び性別を一致させた健康な日本人ボランティアを用いた。今回の研究は、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会による審査を経ており、研究参加に当たり書面による同意を得た。

2.2 一塩基多型・JAK2 V617F 変異の検出方法

DNA抽出、遺伝子型決定のため参加者から末梢血検体を集め、白血球DNAをヨウ化ナトリウム法で抽出した。一塩基多型は、TaqManアッセイを用いて同定した。プライマーと蛍光プローブのセットはrs3780367、rs10974944、rs12343867、rs1159782を増幅するようにそれぞれTaqMan SNP genotyping assayのC_27515396_10、C_31941696_10、C_31941689_10、C_14171119_10を用いて検出した(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。TaqManアッセイで決定した遺伝子型はダイレクトシーケンス法でも確認を行った。シーケンス反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いて行い、反応生成物の解析はABI 3100-Avant Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて行った。JAK2 V617F変異量は80ngの末梢血中白血球から精製したゲノムDNAで定量的real time PCR法を用いて測定した。PCR産物の検出はApplied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いた。サイクルは95°Cで10分間の後、95°C15秒間と60°C60秒間を40サイクル行った。変異部位を含むプライマーの設定は、フォワードプライマーは5'-AAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTT-3'、リバースプライマーは5'-AGGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTT-3'とした。ともに用いた、TaqManプローブは、野生型はVIC-5'-CTCCACAGACACATACT-3'、JAK2変異についてはFAM-5'-CTCCACAGAAACATACT-3'を用いた。アリル量については変異アリルと野生型アリルをreal time PCRを用いて、蛍光シグナルを標準化して決定した。

2.3 統計学的検討方法

ハーディー・ワインベルク平衡とハプロタイプの頻度についてはSNPAlyse version 2.2 software(BYNACOM, Tokyo, Japan)を用いて検討した。JAK2 V617F変異とJAK2ハプロタイプの相関は、95%信頼区間とオッズ比をカイ二乗検定およびフィッシャーの正確確率検定で検討した。

第3章 結果

3.1 骨髄増殖性腫瘍患者での JAK2 V617F 変異とアリル量

108名の骨髄増殖性腫瘍患者中、59名(54.6%)がJAK2 V617F変異を認めた。真性多血症19名全員(100%)、本態性血小板血症61名中36名(59%)、原発性骨髄線維症10名中3名(30%)がJAK2V617F変異陽性であった。JAK2 V617F陽性の59名中35名(59.3%)はアリル量は50%以上であり、JAK2 V617F陽性真性多血症患者19名中14名(73.6%)、JAK2 V617F陽性本態性血小板血症36名中18名(50%)、JAK2V617F陽性原発性骨髄線維症3名中3名(100%)はアリル量50%以上であった(Table 1)。

Table 1) 骨髄増殖性腫瘍患者の背景

Total number of patients	108		
Male/Female	59/49		
Median age (years)	62.5 (range, 17–84)		
PV	19 (17.6%)		
ET	61 (56.5%)		
PMF	10 (9.3%)		
MPN, unclassifiable	18 (16.7%)		
V617F-positive patients	59 (54.6%)		
	<50% Allele burden	>50% Allele burden	Total 59
PV	5 (26%)	14 (74%)	19
ET	18 (50%)	18 (50%)	36
PMF	0 (0%)	3 (100%)	3
MPN, unclassifiable	1 (100%)	0 (100%)	1

3.2 JAK2 rs10974944 の一塩基多型の頻度

まず最初に、4つのJAK2 46/1ハプロタイプの対象となる一塩基多型(rs3780367、rs10974944、rs12343867、rs1159782)が欧米患者と同様、日本人患者においても強い連鎖不平衡にあることを確認した(Fig. 1)。次に骨髄増殖性腫瘍患者と健常人コントロールでの46/1ハプロタイプとなる代表的な一塩基多型(rs10974944)の頻度を比較した。骨髄増殖性腫瘍患者108名のrs10974944一塩基多型の遺伝子型については、30名(28%)がG/G、41名

(38%) が G/C、37 名 (34%) が C/C であった (Table 2)。一方コントロールの 104 名については、9 名 (9%) が G/G、35 名 (34%) が G/C、60 名 (58%) が C/C であった。46/1 ハプロタイプとされる rs1097944 が G アリルである⁸⁾ 頻度については、骨髄増殖性腫瘍患者、特に JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍患者ではコントロールと比較し高頻度であった。骨髄増殖性腫瘍患者および JAK2 V617F 陽性骨髄増殖性腫瘍患者では rs1097944 が G アリルである、つまり 46/1 ハプロタイプである確率は有意に高く、GG/GC (オッズ比, 3.0; 95%信頼区間, 1.7-5.4; $p < 0.001$)、G アリル (オッズ比, 2.8; 95%信頼区間, 1.8-4.3; $p < 0.001$) どちらも有意に高頻度であった (Table 3)。さらに、G アリルの頻度と JAK2 V617F 変異との相関を検討し、JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍患者とコントロール間 (オッズ比, 3.6; 95%信頼区間, 2.2-5.8; $p < 0.001$) および JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍患者と JAK2 V617F 変異陰性骨髄増殖性腫瘍患者間で有意差 (オッズ比, 2.0; 95%信頼区間, 1.1-3.8; $p = 0.03$) があることを認めた。しかし、JAK2 V617F 変異陰性患者とコントロールの間には強い相関は認められなかった (オッズ比, 1.7; 95%信頼区間, 1.0-2.8; $p = 0.058$) (Table 3)。また、46/1 ハプロタイプと骨髄増殖性腫瘍の各病型、真性多血症、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症、分類不能型をコントロールと比較した。G アリルの頻度はコントロールと比較し、真性多血症 (オッズ比, 6.3; 95%信頼区間, 3.0-29.4; $p < 0.001$)、本態性血小板血症 (オッズ比, 2.0; 95%信頼区間, 1.3-3.3; $p = 0.005$)、原発性骨髄線維症 (オッズ比, 4.4; 95%信頼区間, 1.7-11.3; $p = 0.003$) で有意に高かったが、分類不能型とは有意な差は認めなかった (オッズ比, 1.7; 95%信頼区間, 0.8-3.5; $p = 0.222$)。全員が JAK2 V617F 変異をもっている真性多血症患者では、コントロールに比較して特に G/G、G/C の遺伝子型および G アリルの頻度が高かった。(Table 4)

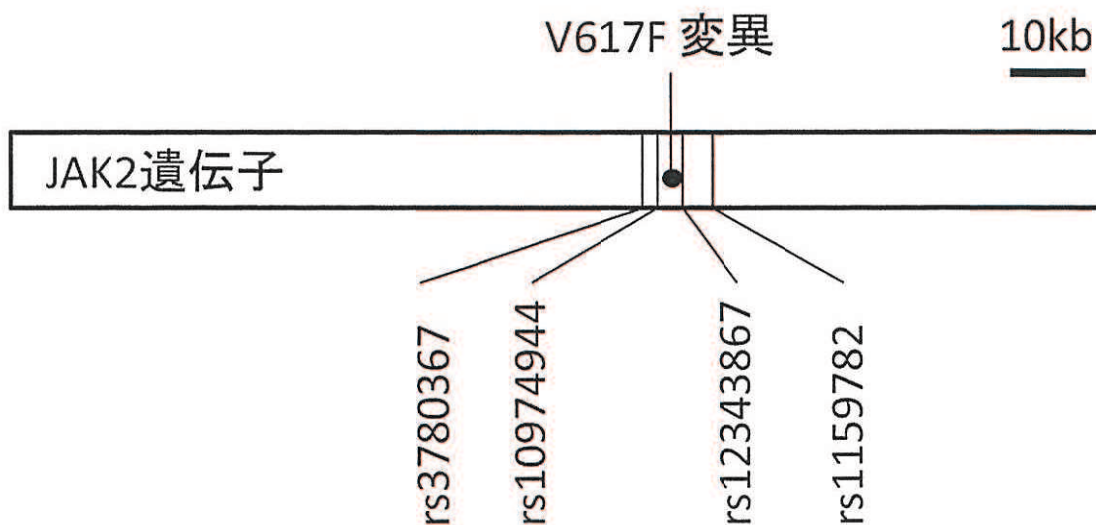


Fig.1) JAK2 遺伝子中での V617F 変異および一塩基多型の関係

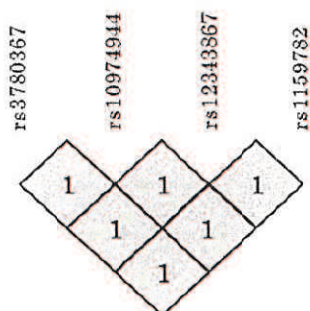


Fig.2) 264 名の骨髄増殖性腫瘍患者およびコントロールの 4 つの一塩基多型での連鎖不均衡。すべての一塩基多型は完全連鎖不均衡である。(D 値はそれぞれの一塩基多形間の係数である)

Table 2) 骨髓増殖性腫瘍患者の rs10974944 の遺伝子型

	Overall	rs10974944		
		G/G	G/C	C/C
All MPN patients	108	30 (28%)	41 (38%)	37 (34%)
V617F-positive	59	22 (37%)	21 (36%)	16 (27%)
V617F-negative	49	8 (16%)	20 (41%)	21 (43%)
Control	104	9 (9%)	35 (34%)	60 (58%)
PV patients	19	9 (47%)	8 (42%)	2 (11%)
ET patients	61	13 (21%)	24 (39%)	24 (39%)
V617F-positive	36	11 (31%)	12 (33%)	13 (36%)
V617F-negative	25	2 (8%)	12 (48%)	11 (44%)
PMF patients	10	5 (50%)	2 (20%)	3 (30%)
V617F-positive	3	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)
V617F-negative	7	3 (43%)	2 (29%)	2 (29%)
MPN, unclassifiable	18	3 (17%)	7 (39%)	8 (44%)
V617F-positive	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
V617F-negative	17	3 (18%)	6 (35%)	8 (47%)

3.3 骨髓増殖性腫瘍患者での JAK2 rs10974944 一塩基多型

rs10974944 における G アリルの頻度は、V617F 変異陽性患者で変異アリル量が 50%以上の患者と 50%以下の患者を比較し有意に 50%以上の患者の方が高かった (オッズ比, 4.7; 95%信頼区間, 2.1-10.4; $p < 0.001$)。変異アリル量 50%以上とアリル量 50%以下の患者比較で、真性多血症 (オッズ比, 4.5; 95%信頼区間, 1.5-13.6; $p < 0.001$) および本態性血小板血症 (オッズ比, 4.0; 95%信頼区間, 1.5-10.7; $p < 0.001$) でも同様の結果が得られた (Table 5)。このことから、46/1 ハプロタイプの頻度は JAK2 V617F 変異量と相関することが示された。

Table 3) JAK2 V617F 変異と rs10974944 の遺伝子型の関連

rs1097499 genotype/allele	MPN overall vs. control		V617F-positive NPN vs. V617F-negative MPN		V617F-positive MPN vs. control		V617F-negative MPN vs. control	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
	G/G vs. G/C+C/C	4.5 (2.0–10.1)	<0.001	3.2 (1.1–9.6)	0.034	6.3 (2.6–14.9)	<0.001	2.1 (0.7–5.7)
G/G vs. C/C	6.2 (2.6–14.9)	<0.001	3.6 (1.1–12.1)	0.047	9.2 (3.5–23.7)	<0.001	1.8 (0.9–3.6)	0.141
G/G+G/C vs. C/C	3.0 (1.7–5.4)	<0.001	1.8 (0.7–4.6)	0.240	3.7 (1.8–7.3)	<0.001	2.0 (0.9–7.4)	0.118
G allele vs. C allele	2.8 (1.8–4.3)	<0.001	2.0 (1.1–3.8)	0.030	3.6 (2.2–5.8)	<0.001	1.7 (1.0–2.8)	0.058

Table 4) 骨髄増殖性腫瘍の病型と rs10974944 の遺伝子型の関連

rs1097499 genotype/allele	PV vs. control		ET vs. control		PMF vs. control		MPN, unclassifiable vs. control	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
G/G vs. G/C+C/C	9.5 (3.1–29.4)	<0.001	2.9 (1.1–7.2)	0.031	10.6 (2.6–43.5)	0.002	2.1 (0.5–8.7)	0.383
G/G vs. C/C	30.0 (5.6–161.7)	<0.001	3.6 (1.4–9.6)	0.011	11.1 (2.3–54.7)	0.004	2.5 (0.6–11.2)	0.357
G/G+G/C vs. C/C	11.6 (2.5–52.8)	<0.001	2.1 (1.1–4.0)	0.025	3.2 (0.8–13.0)	0.108	1.7 (0.6–4.7)	0.316
G allele vs. C allele	6.3 (3.0–29.4)	<0.001	2.0 (1.3–3.3)	0.005	4.4 (1.7–11.3)	0.003	1.7 (0.8–3.5)	0.222

Table 5) JAK2 V617F 変異量と rs10974944 の遺伝子型の関連

rs1097499 genotype/allele	MPN > 50% allele burden vs. < 50% allele burden		PV > 50% allele burden vs. < 50% allele burden		ET > 50% allele burden vs. < 50% allele burden	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
	G/G vs. G/C+C/C	30.8 (3.7–254.2)	<0.001	19.0 (0.5–719.7)	0.032	21.3 (2.3–195.8)
G/G vs. C/C	27.0 (2.9–252.6)	<0.001	5.5 (1.2–26.0)	0.182	16.0 (1.5–166.0)	0.013
G/G+G/C vs. C/C	2.7 (0.8–8.6)	0.135	1.0 (0.5–22.2)	0.468	2.1 (0.5–8.3)	0.489
G allele vs. C allele	4.7 (2.1–10.4)	<0.001	4.5 (1.5–13.6)	0.045	4.0 (1.5–10.7)	0.009

第4章 考察

既報にある北アメリカやヨーロッパ患者のデータ⁷⁻¹⁰⁾と同様に、本邦における JAK2 V617F 陽性骨髄増殖性腫瘍と JAK2 46/1 ハプロタイプに相関がある

ことを我々は示した。最近の中国からの研究でも JAK2 46/1 ハプロタイプは明らかに JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍の発症リスクを増加させることを示している¹¹⁾。異なった人種間（アジア、ヨーロッパ、北アメリカ）でも同様の特徴がみられることは、骨髄増殖性腫瘍の発症には遺伝的素因が重要であり、人種背景をこえてこの疾患の発症頻度を規定していることを示している。大屋敷らの報告によれば、JAK2 46/1 ハプロタイプは日本人において JAK2 V617F 変異陽性、陰性を問わず骨髄増殖性腫瘍と関連することが報告されている¹²⁾。今回の我々の研究では、JAK2 46/1 ハプロタイプと JAK2 V617F 変異陰性骨髄増殖性腫瘍が関連する傾向は認められたものの、有意な相関は得られなかった。前述の中国からの報告では JAK2 46/1 ハプロタイプは JAK2 V617F 変異陽性骨髄増殖性腫瘍には影響を与えているが、陰性の骨髄増殖性腫瘍患者とは関連しないと報告されている¹¹⁾。以上のことから、これまでの欧米の研究^{13)・14)}と同様に、JAK2 46/1 ハプロタイプとの関連において JAK2 V617F 変異陰性骨髄増殖性腫瘍は、変異陽性骨髄増殖性腫瘍との相関ほど強い相関を持たないと考えられる。

我々は 46/1 ハプロタイプの G/G の遺伝子型と G アリルの頻度が、V617F 変異アリル量が 50%以下の患者よりも 50%以上の患者において有意に高いことを示した。このことは、JAK2 46/1 ハプロタイプは JAK2 V617F 変異クローンの増加に影響していることを示唆している。Alvarez-Larran A らによる前向き試験において、無治療真性多血症患者で JAK2 46/1 ハプロタイプで G/G の遺伝子型の患者は JAK2 V617F アリル量が経時的に増加していくことが示されている¹⁵⁾。この発見は JAK2 46/1 ハプロタイプが JAK V617F アリル量の自然な増加に何らかの役割を果たしていることを示している。46/1 ハプロタイプが JAK2 V617F 変異誘発に寄与しているのと同時に、骨髄増殖性腫瘍の症状や徴候に影響していることも考えられる。46/1 ハプロタイプは原発性骨髄線維症患者の余命に影響するとの報告¹⁴⁾があるが、今回の我々の研究では骨髄増殖性腫瘍患者の年齢、性別、ヘモグロビン値、末梢血血球数、血管合併症の頻度、白血球化のいずれにも 46/1 ハプロタイプは関与しなかった。骨髄増殖性腫瘍とは別に、JAK2 46/1 ハプロタイプと急性骨髄単球性白血病の発症頻度は相関し、また、正常核型の急性骨髄性白血病患者における感染症による生存率低下にも相関するとの報告がある¹⁶⁾。さらに、ゲノム解析において、JAK2 46/1 ハプロタイプはクローン病のような炎症性腸疾患と関連するとの報告もある¹⁷⁾。JAK2 は様々な骨髄球系およびリンパ球系サイトカイン受容体シグナルにおいて中心的な役割を果たしている。また、他疾患においても 46/1 ハプロタイプと病気との関連が示されていることは、何らかの機能的な違いを示しているかもしれない。46/1 ハプロタイプが骨髄増殖性腫瘍発症や JAK2 変異を起こすメカ

ニズムについては未だに不明である。より詳細かつ大規模な研究を行うことで、JAK2 46/1 ハプロタイプが関与する、骨髄増殖性腫瘍患者での臨床的かつ血液学的特徴について明らかにすることができると思われる。

謝辞

本論文作成にあたり、検体収集にご協力いただきました先生方に心から感謝いたします。JAK2 遺伝子解析にご協力いただきました、自己開発学生 伊藤俊介君、臨床検査部 岡山直子様、日野田裕治先生に心から感謝いたします。日頃より暖かい御指導を賜りました湯尻俊昭先生、谷澤幸生先生に心から感謝致します。また、有益な御意見を頂いた研究室の皆様に感謝致します。

参考文献

- 1) Kralovics R, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine* 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 signaling causes polycythemia 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) Jones AV, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106: 2162 – 2168

- 6) Tefferi A, et al. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009, 115: 3842-3847
- 7) Jones AV, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics* 2009; 41:446–449
- 8) Kilpivaara O, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics* 2009; 41:455–459
- 9) Olcaydu D, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics* 2009; 41:450–454
- 10) Trifa AP, et al. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Annals of Hematology* 2010; 89: 979–983
- 11) Zhang X, et al. The JAK2 46/1 haplotype is a risk factor for myeloproliferative neoplasms in Chinese patients. *International Journal of Hematology* 2012, 96: 611-616
- 12) Ohyashiki JH, et al. The C allele of JAK2 rs44995487 is an additional candidate locus that contrivutes to myeloproliferative neoplasm predisposition in the Japanese population. *BMC Medical Genetics* 2012, 13: 6
- 13) Pardanani A, et al. The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia* 2010, 24: 110-114
- 14) Tefferi A, et al. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Nature Medicine* 2009; 15: 151-158

15) Alvarez-Larran A, et al. Influence of JAK2 46/1 haplotype in the natural evolution of JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research* 2012; 36: 324-326

16) Nahajevszky S, et al. The prognostic impact of germline 46/1 haplotype of Janus kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 1613-1618

17) Barrett JC, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* 2008; 40: 955-962