

(第1回訂正原稿)

臨床研究

i-densy IS-5320 (QP-Tm 法)と allele-specific 定量 PCR 法による *JAK2V617F* アレル量の相関性の検討

山田聖子¹⁾, 近藤敏範¹⁾, 内田圭一¹⁾, 廣瀬 匡¹⁾, 竹内麻子¹⁾, 清水里紗¹⁾,
松橋佳子¹⁾, 近藤英生¹⁾, 通山 薫²⁾, 和田秀穂¹⁾

1) 川崎医科大学 血液内科学

2) 川崎医科大学 検査診断学 (病態解析)

Evaluation of the correlation between *JAK2V617F* allele burden by i-densy (QP-Tm method) and AS-qPCR method.

Seiko Yamada¹⁾, Toshinori Kondo¹⁾, Keiichi Uchida¹⁾, Tadashi Hirose¹⁾, Asako Takeuchi¹⁾, Risa Shimizu-Koresawa¹⁾, **Yoshiko Matsuhashi¹⁾**, Eisei Kondo¹⁾, **Kaoru Tohyama²⁾**, Hideho Wada¹⁾

1) Department of Hematology, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan

2) Department of Laboratory medicine, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan

本文 : 4880 文字 和文抄録 : 394 文字 英文抄録 : 154 words

図 : 3 点 表 : 1 点

Corresponding author : 近藤 敏範

住所 : 〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577

電話 : 086-462-1111 FAX : 086-464-1194

e-mail : kondot@med.kawasaki-m.ac.jp

【和文抄録】

JAK2V617F 変異は *BCR-ABL1* 陰性の骨髄増殖性腫瘍の原因遺伝子であり、変異アレル量は合併症リスクや予後を予測する因子となりうる。本邦では Quenching Probe-Tm 法 (QP-Tm 法) を用いた遺伝子解析装置 i-densy™, IS-5320 による V617F 変異アレル量測定が行われてきたが、2020 年以降 allele specific 定量 PCR 法 (AS-qPCR 法) による解析が保険適応となった。我々は両者の測定結果を用いて QP-Tm 法による変異アレル量の有用性について検証した。*JAK2V617F* 変異陽性患者検体 (n=35) において両方法で測定した変異アレル量には良好な相関関係 ($P<0.001$, $rs=0.952$) を認めた。QP-Tm 法による変異アレル量は ET 群よりも PV 群で有意に高かった。QP-Tm 法による変異アレル量測定は、今後も臨床における補助検査として有用であると考えられる。

【Abstract】

The *JAK2V617F* mutation is a driver mutation of myeloproliferative neoplasms (MPN), and V617F allele burden is considered to be a risk factor for complications and a predictor of prognosis. In Japan, V617F allele burden has been measured in laboratory settings by using the i-densy™ IS-5320 genetic analyzer with the Quenching Probe-Tm (QP-Tm) method. However, since 2020, allele-specific quantitative PCR (AS-qPCR) has been performed in a clinical setting. We evaluated the V617F allele burden measured by both methods to investigate the clinical usefulness of the QP-Tm method in patients with MPN. A good correlation was observed between the V617F allele burden determined using QP-Tm and that determined using AS-qPCR ($P<0.001$, $rs=0.952$). The median mutant allele burden, as determined by using the QP-Tm method, was significantly higher in the patients with polycythemia vera than in those with essential thrombocythemia. The measurement of the V617F allele burden by the QP-Tm method will continue to be useful as a clinical test.

Key Words: *JAK2V617F*, allele burden, myeloproliferative neoplasms

緒言

BCR-ABL 陰性の骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms, MPN) は、末梢血または骨髄において血液細胞がクローナルに増殖する造血器腫瘍である。その代表的な疾患として真性赤血球増加症 (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) が挙げられ、これらの疾患は相互に病型移行することが知られている。2005 年に PV, ET, PMF に Janus kinase 2 (*JAK2*) V617F 変異が共通して認められることが報告された^{1,2)}。*JAK2*V617F 変異は疾患特異性が高く、単独で MPN の病態を引き起こすことから 2016 年に改訂された WHO 分類においても診断基準の一つに組み込まれており³⁾、現在の MPN 診断に必要な不可欠な要素となっている。

*JAK2*V617F 変異アレル量は MPN の疾患表現型や白血球数などの検査値、血栓症の頻度などとの関連性が報告され⁴⁻⁸⁾、予後因子となる可能性が示唆されているが、いまだ十分な検討はなされておらず、日常診療において *JAK2*V617F 変異の有無と変異アレル量の評価が簡便にできる検査の導入が望まれていた。そこで、本邦において 2012 年にアークレイ社から Quenching Probe-Tm 法 (QP-Tm 法) を用いた全自動遺伝子解析装置 i-densyTM, IS-5320 (i-densy) が発売された。i-densy はターゲット配列に相補的な DNA 配列を設定した QProbe を用いて様々な遺伝子変異を検出することが可能であり^{9,10)}、*JAK2*V617F 変異解析では変異の有無だけでなく変異アレル量も参考値として自動算出されるよう設定されている¹¹⁾。i-densy はその簡便さから我々の施設を含む国内の大学病院や基幹病院で導入され、*JAK2*V617F 変異解析をはじめ造血器腫瘍の遺伝子解析に用いられてきた。その後、2018 年に allele specific 定量 PCR 法 (AS-qPCR 法) を測定原理とした *JAK2*V617F 変異測定キット (シスメックス社製) を用いた臨床性能試験が行われ¹²⁾、本邦において 2020 年 1 月から同キットを用いた *JAK2*V617F 変異検査が保険適応となった。このような経緯から *JAK2*V617F

変異解析が広く実施される環境が整ってきたが、これまで QP-Tm 法で測定された変異アレル量と AS-qPCR 法で測定した変異アレル量を比較検討した研究はなされていない。

そこで我々は、*JAK2*V617F 変異陽性患者検体における *JAK2*V617F 変異アレル量を QP-Tm 法で測定し、AS-qPCR 法による測定結果との相関性について検討するとともに QP-Tm 法で測定された変異アレル量の臨床的有用性について検討した。

対象および方法

2020年6月から2021年6月までの期間に当院を受診した *JAK2*V617F 変異陽性の患者または *JAK2*V617F 変異陽性が疑われた患者のうち、臨床検査として AS-qPCR 法を実施された患者を対象とした。造血器腫瘍の診断は 2016 年 WHO 分類改訂第 4 版に基づいて行った。なお、本研究は川崎医科大学倫理委員会の承認を受けた上で、患者本人から文書によるインフォームドコンセントを取得して実施した。

AS-qPCR 法と同時に採取した患者末梢血全血を用いて QP-Tm 法で *JAK2*V617F 変異解析を実施した。QP-Tm 法では遺伝子解析装置 i-densy を用い、解析試薬は i-densy Pack Universal (アークレイマーケティング株式会社)、*JAK2*(V617F) QProbe/Primer mix (日鉄住金環境株式会社) を用いて測定した。QP-Tm 法は、ターゲット変異を含む DNA 断片を PCR により増幅し、相補的な配列を持った QProbe と結合させ、相補配列の適合度によって QProbe の解離する温度が異なる性質を利用し、解離して得られる蛍光強度を測定して変異の判定を行う方法である。変異が認められた場合は、変異型と野生型プローブの温度乖離曲線から得られた面積比を演算処理して *JAK2* 全遺伝子量に対する V617F 変異アレル量 (%、有効範囲 5%~80%) が算出される¹¹⁾。本研究では i-densy による変異アレル量測定結果が 5%未満のものは 5%として、80%以上の

ものは 80%として解析した。

AS-qPCR 法の測定結果および検討に必要な病歴や診断時の臨床検査結果等は患者診療録から抽出した。

2 群間の有意差検定には Mann-Whitney U 検定を用い、相関性については Spearman 順位相関係数を用いて解析した。解析には統計解析ソフト SPSS ver.20 (IBM, Tokyo, JAPAN) を用いた。

結果

研究期間中に同意が得られた 43 症例が登録された。そのうち 8 例は QP-Tm 法と AS-qPCR 法でともに $JAK2V617F$ 陰性であり、 $JAK2V617F$ 陰性の造血器疾患と診断されたため、35 症例が解析対象となった。解析対象症例の背景を Table.1 に示す。女性 12 例、男性 23 例、年齢中央値は 71 歳 (range;48-91) であった。疾患の内訳は PV10 例、ET23 例、MDS/MPN と PMF が 1 例ずつであった。血栓症の既往歴は 13 例 (37%) に認められた。

QP-Tm 法と AS-qPCR 法で測定した $JAK2V617F$ アレル量の中央値はそれぞれ 23% (range;5-80) と 36.13194% (range;1.783-92.999) で、両者の間に有意な差は認められなかった ($P=0.810$)。2 つの方法による測定値の間には有意な強い相関関係 ($P<0.001$, $r_s=0.952$) を認めた (Fig.1)。

次に QP-Tm 法による $JAK2V617F$ 変異アレル量と患者の臨床的特徴との関連性について検討した。疾患別に検討した結果では、PV 群 ($n=10$) と ET 群 ($n=23$) の変異アレルの中央値はそれぞれ 65.5% (range;13-80) と 19% (range;5-80) で、PV 群で有意に高値であった ($P=0.011$) (Fig.2)。変異アレル量と末梢血検査所見の相関を検討したところ、白血球数、ヘモグロビン値 (Hb 値)、ヘマトクリット値との間に有意な相関は認められなかったが、血小板数については有意な中等度の負の相関関係を認めた ($P=0.017$, $r_s= - 0.401$) (Fig.3)。他に血清 LD 値、好中球アルカリフォスファターゼ指数 (NAP score) について

検討したが、有意な相関は認められなかった。また、血栓症の既往歴を有する群 (n=13) と既往の無い群 (n=22) における変異アレル量の中央値はそれぞれ 25% (range:5-80) と 21% (range:5-80) で、両群間に有意な差は認められなかった ($P=0.775$)。

考察

MPN における *JAK2V617F* 遺伝子変異は、現在 WHO の診断基準にも採用され診断に必須な因子である³⁾。*JAK2V617F* 変異は初期の腫瘍細胞においては片側アレルにのみ変異が加わる heterozygous 変異として形成され、その後の細胞分裂の過程で loss of heterozygosity により homozygous 変異をもった腫瘍細胞が発生してくると考えられており、個々の MPN 患者によって正常造血細胞と heterozygous 変異細胞, homozygous 変異細胞の存在する比率が異なるため、*JAK2V617F* 変異アレル量は患者ごとに異なる²⁾。また、ひとりの患者においても罹病期間が長期になると変異アレル量が増加してくることも報告されている⁴⁾。これまでの研究で V617F 変異アレル量は ET よりも PV や PMF において高値であり⁴⁻⁶⁾、白血球数や Hb 値、血小板数などの患者臨床像との関連が認められている^{4,5,13)}。我々の過去の検討でも変異アレル量が高いほど白血球数や Hb 値、NAP score が高く、血小板数は低くなる相関関係がみられており¹⁴⁾、諸家の報告と一致する。また、Vannucchi らは、PV において変異アレル量が 75% 以上の症例は 25% 以下の症例に比して血栓症のリスクが 3.56 倍であると報告している¹⁵⁾。臨床経過中の変異アレル量の増加が ET から PV, PV から post-PV MF への進行と関連しているとする報告¹⁶⁾や、診断時に変異アレル量の高い症例は post-ET/PV MF へ移行しやすいという報告⁷⁾もあり、変異アレル量は患者の疾患予後を予測する因子になる可能性も指摘されている。

今回我々が解析に用いた i-densy は、QP-Tm 法を用いて既知の遺伝子変異を検出する全自動遺伝子解析装置である。MPN に関連する遺伝子変異としては

JAK2V617F 変異だけでなく *CALR* (type1,2) 変異や *MPL-W515L/K* 変異も同時に解析することが可能である。血液疾患以外にも肺癌や大腸癌における *KRAS*, *BRAF* の変異検索などにも利用されており¹⁷⁾, 100 μ l 程度の全血を用いて約 90 分で解析結果を入手することができる簡便さから、本邦では多くの基幹病院で利用されてきた。また、*JAK2V617F* 変異解析についてはこれまで確立された標準的検査法がなかったことも、i-densy による *JAK2* 変異解析が汎用されてきた背景の一つである。しかし、QP-Tm 法による V617F 変異アレル量測定は、変異型と野生型プローブの温度乖離曲線によって得られる面積比から算出されたものであり実測値とは異なる。この点について 2017 年に松本らが QP-Tm 法による V617F 変異アレル量とダイレクトシーケンス法の変異型ピークの比率を比較検討した結果、良好な相関性があったと報告しているが¹¹⁾, 他の定量的測定法との比較検討はされていない。

今回の我々の検討で QP-Tm 法で測定した V617F 変異アレル量は AS-qPCR 法で測定した結果と有意に強い相関関係があることが証明された。この結果は、これまでに広く測定されてきた QP-Tm 法による変異アレル量が妥当であったことを裏付ける根拠となるとともに、今後蓄積されていく AS-qPCR 法による測定結果との関連性を検討していくうえで重要な知見であると考えられる。また、QP-Tm 法で測定された変異アレル量は ET 群よりも PV 群で有意に高値であり血小板数とは負の相関関係を認めたことは、これまでの報告^{4-6,13,15)}と同様の結果が示され、臨床的にも有用であることが確認された。

しかし、本研究ではいくつかの問題点も明らかとなった。ひとつは QP-Tm 法による変異アレル量の測定可能範囲は 5%から 80%までであり、その範囲を超える数値に関しては検討が不可能な点である。AS-qPCR 法においてはその制限はなく、より詳細な検討が可能であると考えられる。ふたつ目は白血球数や Hb 値、血栓症の有無などに関して有意な相関が得られなかった点である。この点については AS-qPCR 法でも同様に相関は得られなかったことから、本研究が単施設

における少数例での検討となったことが一因と考えられる。

最近の報告では *JAK2V617F* 陽性 MPN 患者に対する ruxolitinib や pegylated interferon- α 治療によって変異アレル量の減少が認められたとする報告もあり^{18, 19)}、今後の MPN 診療では変異アレル量のモニタリングが、疾患進行だけでなく治療効果の指標としても重要となってくる可能性が示唆されている。QP-Tm 法を用いた i-densy による *JAK2V617F* 変異アレル量測定は、簡便かつ短時間で解析が可能であり、今後も実臨床において補助的な検査として有用であると考えられる。

著者の COI(conflicts of interest)開示: 山田聖子, 近藤敏範, 内田圭一, 廣瀬 匡, 竹内麻子, 清水里紗, 松橋佳子, 近藤英生, 和田秀穂; 奨学寄付金 (中外製薬株式会社, 協和キリン株式会社, 小野薬品工業株式会社, 武田薬品工業株式会社), 近藤英生; 講演料など (大日本住友製薬株式会社, 武田薬品工業株式会社)

文献

1. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365: 1054-1061.
2. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*. 2005; 352: 1779-1790.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127: 2391-2405.
4. Alvarez-Larran A, Bellosillo B, Pereira A, et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Clinical usefulness for

predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *American Journal of Hematology*. 2014; 89: 517-523.

5.Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, et al. JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. *International Journal of Hematology*. 2014; 99: 625-634.

6.Misawa K, Yasuda H, Araki M, et al. Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Hematology*. 2018; 107: 673-680.

7.Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010; 24:1574-1579.

8.Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017; 129: 680-692.

9.Suzuki S, Komori M, Hirai M, Ureshino N, Kimura S. Development of a Novel, Fully-Automated Genotyping System: Principle and Applications. *Sensors*. 2012; 12: 16614-16627.

10.加藤 潤一, 鈴木 俊一, 平井 光春, 東野 功嗣. 遺伝子関連検査に関わる自動化機器の進歩 遺伝子解析装置「i-densy IS-5320」(アイデンシーIS-5320)の特長と応用例. *臨床病理*. 2018; 66: 536-342.

11.松本 信也, 野田 望, 古賀 結, ほか. 全自動車遺伝子解析装置 i-densy IS-5320 を用いた JAK2 遺伝子 V617F 変異、CALR 遺伝子変異同時検出試薬の検討. *日本臨床検査自動化学会会誌*. 2017; 42: 612-618.

12.桐戸 敬太, 小池 道明, 野口 雅章, ほか. 骨髄増殖性腫瘍症例および健常者を対象にした新規 JAK2V617F 変異量測定キットの臨床性能試験. *臨床血液*.

2018; 59: 669-674.

13.Okabe M, Yamaguchi H, Usuki K, et al. Clinical features of Japanese polycythemia vera and essential thrombocythemia patients harboring CALR, JAK2V617F, JAK2Ex12del, and MPLW515L/K mutations. *Leukemia Research*. 2016; 40: 68-76.

14.Kondo T, Tasaka T, Tomioka N, et al. Low neutrophil alkaline phosphatase score is a new aspect of calreticulin-mutated myeloproliferative neoplasms. *Springerplus*. 2016; 5: 1146.

15.Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia*. 2007; 21: 1952-1959.

16.Shirane S, Araki M, Morishita S, et al. Consequences of the JAK2V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *International Journal of Hematology*. 2015; 101: 148-153.

17.赤木 究, 新井 吉子. Quenching probe を用いた Tm 解析法による簡便で迅速な KRAS、BRAF 遺伝子変異同時測定に関する検討. *臨床病理*. 2011; 59: 757-762.

18.Vannucchi AM, Verstovsek S, Guglielmelli P, et al. Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study. *Annals of Hematology*. 2017; 96: 1113-1120.

19.Czech J, Cordua S, Weinbergerova B, et al. JAK2V617F but not CALR mutations confer increased molecular responses to interferon-alpha via JAK1/STAT1 activation. *Leukemia*. 2019; 33: 995-1010.

Figure legend

Figure 1. Correlation between the *JAK2V617F* allele burden measured by using QP-Tm and AS-qPCR methods.

Solid line means the calculated regression line.

Figure 2. Comparison of *JAK2V617F* allele burden measured by disease phenotype.

(A)The *JAK2V617F* allele burden measured by the QP-Tm method. Median *V617F* allele burden were PV 65.5% (range;13-80), ET 19.0% (range;5-80).

(B)The *JAK2V617F* allele burden measured by the As-qPCR method. Median *V617F* allele burden were PV 53.765% (range;19.246-75.616), ET 22.359% (range;1.783-92.999).

Boxes represent the interquartile range containing 50 % of the subjects. The open symbol indicates the mean value, the horizontal line inside box marks the median, and the bars show the upper and lower range of values. The number of patients in the polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) groups was 10 and 23, respectively. The probability was calculated using the Mann-Whitney U test.

Figure 3. Correlation between the *JAK2V617F* allele burden measured by using QP-Tm method and platelet count.

Solid line means the calculated regression line.

Table 1 Clinical characteristics of the subjects

	ALL (N=35)	PV (N=10)	ET (N=23)
Sex (M/F)	23/12	6/4	15/8
Age (years), median (range)	71 (48-91)	72.5(63-84)	71(48-91)
Laboratory data, median (range)			
WBC (/μl)	11,020 (8,545-3,510)	11,310 (9,600-18,490)	10,900 (6,730-42,330)
Hb (g/dl)	15.3 (13.9-16.5)	16.8 (14.7-20.7)	14.9 (12.1-17.4)
Ht (%)	46.1 (43.1-50.8)	55.1 (49.0-65.4)	44.7 (36.9-51.2)
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	72 (52.5-104.8)	53.4 (28.1-128.0)	81.1 (39.1-259.9)
LD (U/l)	249 (219-334)	269.5 (163-617)	241 (154-928)
NAP score	272.5 (244-296)	303.5 (253-363)	269 (195-348)
Thrombosis history (N)	13	2	10

PV: polycythemia vera

ET: essential thrombocytosis

N: number of patients

NAP score: neutrophil alkaline phosphatase score

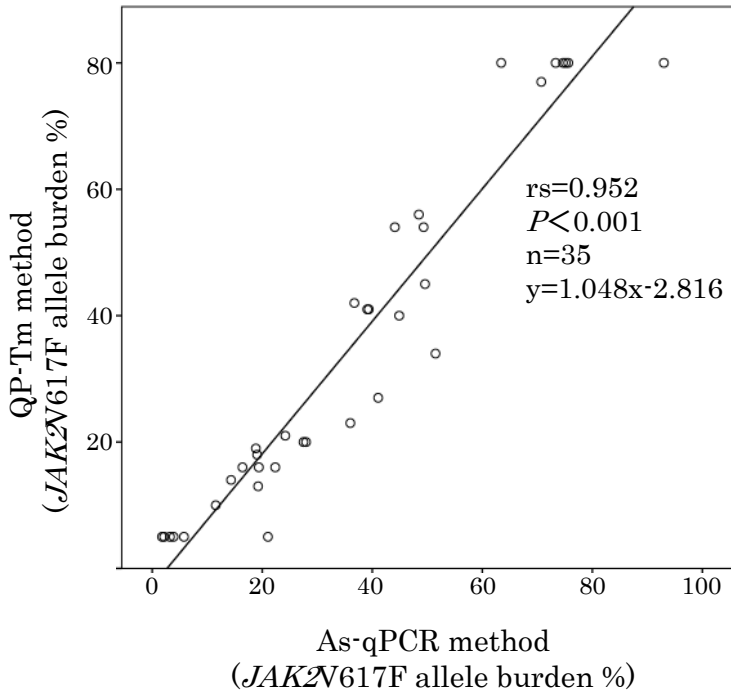


Fig. 1 Correlation between the JAK2V617F allele burden measured by using QP-Tm and As-qPCR methods. Solid line mean the calculated regression line.

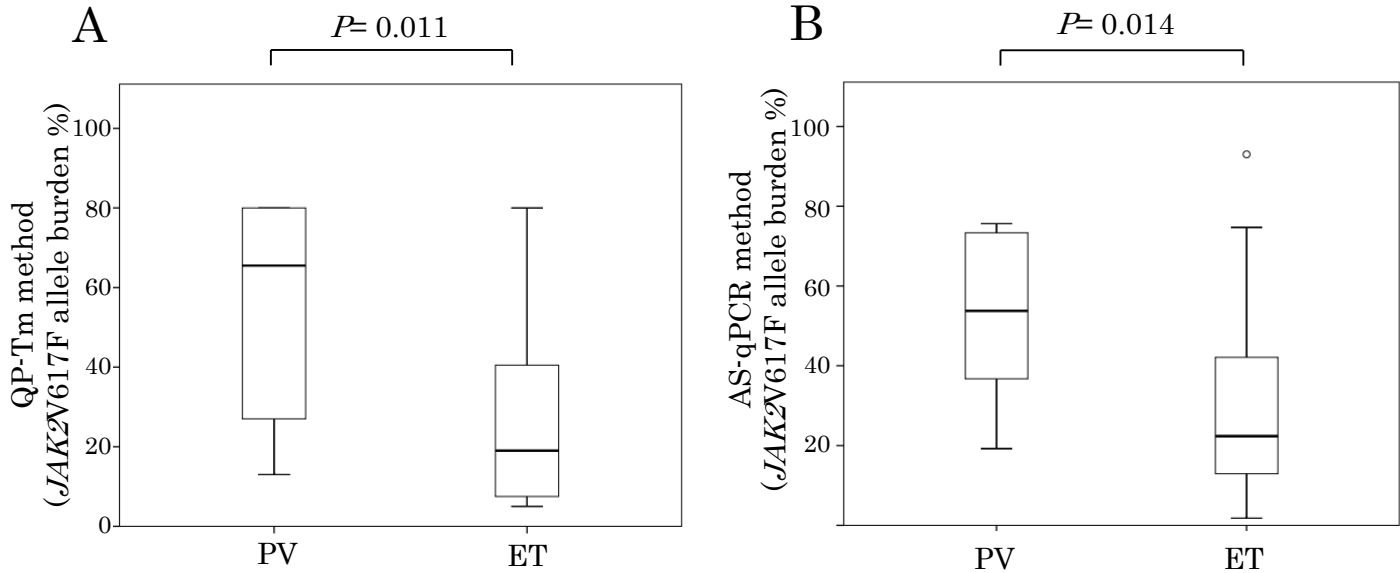


Fig. 2 Comparison of *JAK2V617F* allele burden measured by disease phenotype.

(A)The *JAK2V617F* allele burden measured by the QP-Tm method. Median V617F allele burden were PV 65.5% (range;13-80), ET 19.0% (range;5-80).

(B)The *JAK2V617F* allele burden measured by the As-qPCR method. Median V617F allele burden were PV 53.765% (range;19.246-75.616), ET 22.359% (range;1.783-92.999).

Boxes represent the interquartile range containing 50 % of the subjects. The open symbol indicates the mean value, the horizontal line inside box marks the median, and the bars show the upper and lower range of values. The number of patients in the polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) groups was 10 and 23, respectively. The probability was calculated using the Mann-Whitney *U* test.

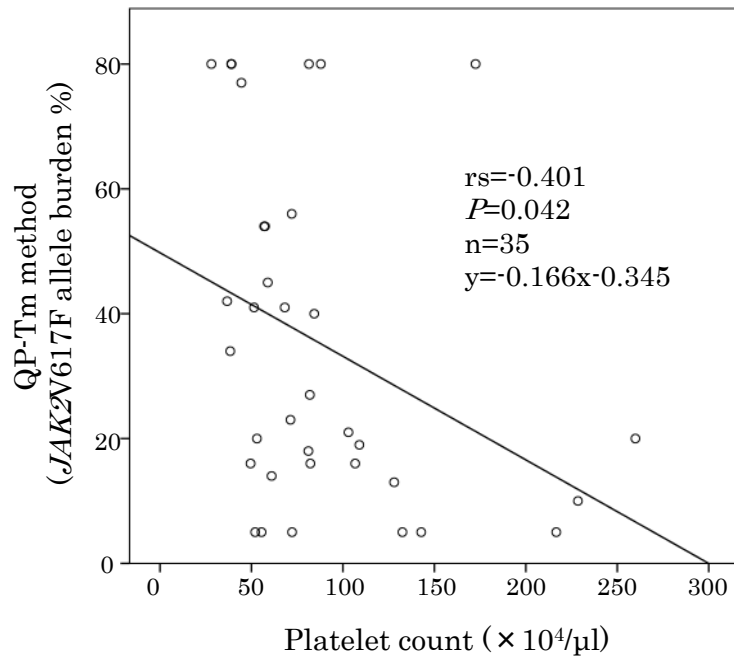


Fig. 3 Correlation between the *JAK2V617F* allele burden measured by using QP-Tm method and platelet count. Solid line mean the calculated regression line.