

## 健常人における *JAK2* 遺伝子の変異

菅谷 麻希<sup>\*1</sup>, 関 佳織<sup>\*2</sup>

The mutation of *JAK2* gene in peripheral blood with normal healthy volunteers

Maki SUGAYA<sup>\*1</sup>, Kaori SEKI<sup>\*2</sup>

**ABSTRACT** :We performed DNA sequencing of the *JAK2* exon 12, related to polycythemia vera (PV), after TA-cloning in normal healthy subjects to identify clonal expansion of exon 12 mutations. We analyzed at least 8 clones obtained from each individual and found that non-clonal nucleotide substitutions in two normal subjects (N542S and Q534R). Since allele-specific polymerase chain reaction (PCR) is able to amplify only the limited region which contains known mutations with gain-of-function, we need to clarify the biological implications of unknown single nucleotide substitution of the *JAK2* exon 12.

**Keywords** : polycythemia vera (PV), *JAK2* exon 12, V617F, TA-cloning

(Received September 29, 2008)

### 1. 緒 論

真性多血症 (polycythemia via, PV) は、造血幹細胞の異常による赤血球、白血球および血小板の増加と脾腫を伴う疾患である。急性骨髄性白血病や骨髄繊維症などに移行することもあるため、臨床上的診断が重要な疾患である。近年、PV の新しい分子マーカーとして *Janus kinase 2* (*JAK2*) 遺伝子の変異が注目されている。*JAK2* 遺伝子はヒト染色体 9p24 に 28 個の exon を含む 143.5 kbp もの長い DNA として存在し、そこから 1132 個のアミノ酸からなるチロシンキナーゼ (EC2.7.10.2) が翻訳される。*JAK2* の 617 番目のアミノ酸が Val (V) から Phe (F) に変異する V617F 変異は、WHO が提唱する PV の診断基準である(1)。しかし、V617F 変異が確認されない PV 患者も少なからず存在することが明らかになり、これら患者において、*JAK2* 遺伝子の exon 12 に特徴的な 4 種類の変異が確認された(2-9)。これら変異は exon 14 上の変異である V617F とともに PV の分子マーカーとして定着すると考えられ、現状では PV の診断マーカーとして定義されている (2-9)。しかし、それでもまだ全ての

PV 患者が 5 種類の変異のいずれかを有するわけではないことが大屋敷らにより示唆されるに至った(10)。そこで、大屋敷らと我々は V617F 変異を持たない PV 患者における *JAK2* exon 12 配列を調査し、新しい変異を複数同定した (11)。新たに発見された変異は従来の変異とその変異場所や変異塩基が似ているものの、hot spot 以外の変異も確認され、PV 患者における exon 12 変異の多様性が示唆されるに至った。患者における *JAK2* 遺伝子変異は別稿に譲る(11)として、本稿では PV 患者における新たな変異を発見した過程において、健常人において興味深い遺伝子変異を発見したので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 被験者

被験者は年齢 21-23 才、男性 2 名、女性 2 名の 4 名である。いずれも赤血球、白血球および血小板の数が基準値内にあり、BMI から判断して適正体重である。また、細菌やウイルス感染が認められず、家族性の遺伝病を伴わない。被験者である健常人 4 名には事前にインフォームドコンセントを行った後、全血 7 mL を採血し、以下の実験に用いた。

<sup>\*1</sup> : 物質生命理工学科助教(msugaya@st.seikei.ac.jp)

<sup>\*2</sup> : 物質生命理工科学部生

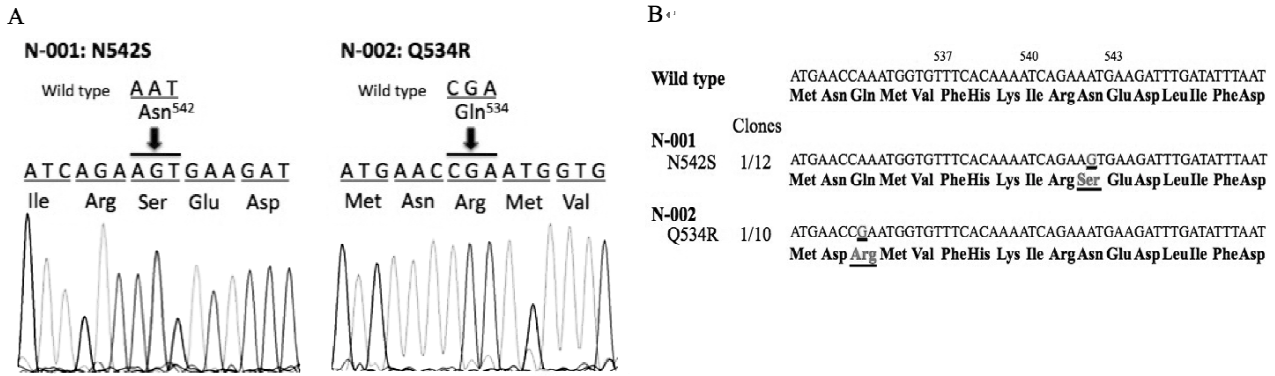


Figure 1. Mutations of *JAK2* exon 12 in normal healthy volunteers.

Panel A shows DNA sequence traces after TA-cloning from peripheral blood. Nucleotides are indicated by capital letters. The traces reveal mutations within the *JAK2* exon 12 (indicated by arrow heads). Panel B shows the alignment of wild-type and mutant exon 12 *JAK2* allele are indicated. Nucleotides are indicated by capital letters, and amino acids by bold capital letters. Normal healthy volunteers with *JAK2* exon 12 mutations are listed (N-001 and N002). Clones indicate number of mutational clone detected per clones analyzed.

## 2. 2 スクリーニング

末梢血から抽出した DNA を鋳型として PCR-direct sequencing を行い *JAK2* 遺伝子領域の DNA 配列を決定した。PCR は Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて 95°C で 30 秒間, 60°C で 40 秒間, 72°C で 30 秒間の反応を 35 サイクル繰り返した。得られた PCR 産物を BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster city, USA) と ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて DNA 配列を決定し, V617F 変異がないことを確認した。

## 2. 3 TA クローニング

*JAK2* exon 12 の PCR 産物を pT7 Blue-2 T-ベクター (Novagen, CA, USA) に挿入し, 大腸菌 JM109 を形質転換させた。得られた大腸菌コロニーから colony-direct PCR により *JAK2* exon 12 領域を増幅させ, BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer を用いて DNA 配列を決定した。

## 3. 結果と考察

4名の健常人における *JAK2* 遺伝子 exon 12 領域を TA-クローニング後に配列決定したところ, 変異を有した健常人が2名確認された。一方の健常人 (N-001) から 12 クローンのうち 1 クローン (8.3%) に 542 番目のアスパラギン残基 (N) からセリン残基 (S) への置換が同定された。また, 他方の健常人 (N-002)では 10 クローンのうち 1 クローン (10%) に 534 番目のグルタミ

ン残基 (Q) からアルギニン残基 (R) への置換が同定された (Figure 1)。

これらのアミノ酸変異はいずれも 1 塩基の置換により誘発されており, PV 患者で同定された変異とは異なる変異であった。患者における変異では, 稀にアミノ酸変異を伴わない silent mutation も確認されたが, 健常人で確認された変異はいずれもアミノ酸変異を誘導する missense mutation であった。これら変異は存在頻度が低いため, PCR-direct sequencing では発見することができない。本研究では TA-クローニング後に配列決定することにより PCR-direct sequencing では確認できない頻度の低い変異が確認可能となった。

PV における遺伝子変異は造血幹細胞から末梢血が産生される過程で誘発していると考えられている。幹細胞からの分化の過程において, 早期の変異発生はほとんどの血球細胞が変異をもつことを意味する。一方, 分化後期の変異発生は少数の血球細胞が変異をもつことを意味する。本研究で発見された変異は極めて頻度が低いため, 血球細胞の分化過程では比較的後期における変異発生と考えられる。また, 遺伝子変異を有する細胞が健常人でも存在したことは, これら変異を有する細胞を排除する機構が存在しない, あるいは存在しても排除能が低いことを意味する。これら変異を有する細胞に分化する前駆体細胞がどのような割合で存在するのか, また, その前駆体細胞がどの程度のクローンを産生するのかは興味深い。なぜなら, 変異を有する前駆体細胞の割合が多くなることで PV が発症するモデルと, 前駆体細胞からのクローン細胞数が多くなることで PV が発症するモデルの2種類の発症モデルが想定できるからであり, モデ

ルによって有効な治療法も異なると考えられる。

健常人において missense mutation が確認されたものの、これら変異は患者で確認されている変異とは全く異なるため、exon 12 の変異が PV の確定診断でないことは明確である。しかし、本研究に協力して頂いた健常人は比較的若年齢であるため、高齢者で発症することの多い PV に加齢により罹患する可能性も考えられる。これら予測も含め、幹細胞あるいは前駆体細胞の PV 診断も診断マーカーやリスク予測マーカーになり得ると考えられた。今後、解析可能な被験者数を増やすことで、健常人による変異と年齢の関係を調査する予定である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり大屋敷一馬教授(東京医科大学第1内科)および大屋敷純子准教授(東京医科大学難治性免疫疾患研究センター)より、多大なるご教示、ご協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

## 参考文献

1. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnica HM, Barbubi T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110: 1092-7.
2. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007, 356: 459-68.
3. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, Green AR, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007, 92: 1607-14.
4. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theodorides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon 12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* 2008, 111: 3863-6.
5. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theodorides A, et al. Somatic mutations of *JAK2* exon 12 in patients with JAK2(V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*, 2008, 111: 1686-9.
6. Pardanani A, Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutation in JAK2 V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007, 21: 1960-3.
7. Martinez-Aviles L, Besses C, Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in patients with polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007, 92: 1717-8.
8. Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, et al. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera patients. *Leukemia* 2008; 22:870-3.
9. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol* 2007; 35: 1641-6.
10. Ohyashiki K, Akahane D, Gotoh A, Ito Y, Tauchi T, Miyazawa K, et al. Uncontrolled thrombocytosis in polycythemia vera is a risk for thrombosis, regardless of JAK2 V617F mutational status. *Leukemia* 2007, 21: 2544-2545.
11. Ohyashiki H, J, Hisatomi H, Shimizu S, Sugaya M, Ohyashiki K. Genetic Diversity of *JAK2* exon 12 Mutations in polycythemia. *Haematologica* 2008 (in press)