creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265887

2017 년 2 월

박사학위논문

JAK2 V617F 음성 만성골수증식성질환의 임상적 및 검사실적 특징

조선대학교 대학원

의 학 과

최 병 석

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

JAK2 V617F 음성 만성골수증식성질환의 임상적 및 검사실적 특징

Clinical and Laboratory characteristics in JAK2 V617F negative MPN

2017 년 2 월 24 일

조선대학교 대학원

의 학 과

최 병 석

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

JAK2 V617F 음성 만성골수증식성질환의 임상적 및 검사실적 특징

지도교수 박치영

이논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함

2016 년 10 월

조선대학교 대학원

의 학 과

최 병 석

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

최병석의 박사학위논문을인준함

위원장	조선대학교교수	박상곤	(인)
위원	조선대학교교수	박치영	(인)
위원	조선대학교교수	김현리	(인)
위원	조선대학교교수	김동민	(인)
위원	조선대학교외래교수	박유환	(인)

2016 년 12 월

조선대학교대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 대상및방법, 통계 ····· 4

1. 대상 ····· 4

2. 방법 ····· 5

1) DNA 추출 ····· 5

2) JAK2 V617F 돌연변이검출 ····· 5

3) JAK2 엑손 12 돌연변이검출 ····· 5

4) MPL 엑손 10 돌연변이검출 ····· 6

5) CALR 엑손 9 돌연변이검출 ····· 7

3. 통계 ····· 8

Ⅲ. 결과 ····· 9

1. JAK2 엑손 10, MPL 과 CALR 돌연변이빈도 ····· 9

2. 각유전자돌연변이유무에따른임상적특징비교 ····· 10

Ⅳ. 결론 ····· 12

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅴ. 고찰 ····· 13

Ⅵ. 요약 ····· 19

【참고문헌】 ····· 30

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure1. Types of mutation in 18 JAK2 V617F negative ET(number)·····21

Figure 2. The frequencies(%) of CALR mutation reported by previous studies·····22

Figure 3. The three types of calreticulin(CALR) mutations identified in this study. ·····23

Figure 4. The two types of Myeloproliferative leukemia gene(MPL) mutations identified in this study.·····24

Figure 5. The mutation of JAK2 exon 12 in Polycythemia vera ·····25

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. World Health Organization 2008 diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasm·····26

Table 2. The frequency of JAK2, MPL, and CALR mutations in 25 JAK2 V617F negative MPN·····27

Table 3. Clinical characteristics of JAK2 V617F negative ET and PMF·····28

Table 4. Comparison of clinical and laboratory characteristics between patients with CALR mutation positive ET and triple negative ET·····29

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Clinical and Laboratory characteristics in JAK2 V617F negative MPN

Byung-seok, Choi

Advisor : Prof. Chi young park M.D.& Ph.D.

Department of Medicine,

Graduated school of chosun university

Background: Calreticulin (CALR) mutations were recently discovered in patients with myeloproliferative neoplasm (MPN). We investigated the frequency of CALR, Janus kinase 2 (JAK2) exon 10, and myeloproliferative leukemia gene (MPL) mutation and their clinical characteristics in 25 patients with JAK2 V617F negative MPN.

Methods: A total of 25 patients (18 Essential thrombocythemia [ET], 5 Primary myelofibrosis [PMF], and 2 Polycythemia vera [PV] were included in the study. CALR, JAK2 exon 10, and MPL mutation were analyzed by the direct sequencing method.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Results: In 25 patients, three types of CALR mutation were detected including type 1, 2 and 34. Type 1 mutation is the most common in 5cases, and type 2 and 34 mutation were found in 1case, respectively. In 18 ET patients, 5 patients had CALR mutations, 2 patients had MPL mutation, and 11 patients were triple mutation(JAK2, MPL, and CALR) negative. In 5 PMF patients, only 1 patient had CALR mutation. JAK2 and MPL mutation negative patients were 16 ET and 4 PMF. Five of the 16 ET patients(31.3%) were positive for CALR mutation, and 4 for PMF had one CALR mutation(25%).Patients with CALR mutation had higher platelet counts(1,263 $x10^3/mm^3$vs941 $x10^3/mm^3$)compared with triple mutation negative ET patients.

Conclusion: Because the CALR mutation was the most frequent mutation in JAK2 V617F negative ET and PMF, genotyping for CALR could be a useful diagnostic tool for JAK2 V617F negative ET and PMF. CALRmutation may be a distinct disease group, with different hematological characteristics than that of triple mutation negative MPN.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

서 론

골수증식성종양(Myeloproliferative neoplasm, MPN)은 클론성 조혈모세포의 지속적이며 비조절된 증식으로 인해 한 종류 이상의 골수세포(과립구계, 적혈구계, 거대핵세포, 비만세포)가 증가하는 질환이다.[1] 만성골수성백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML), 진성적혈구증다증(polycythemia vera, PV), 원발성골수섬유증(Primary myelofibrosis, PMF), 진성고혈소판혈증(essential thrombocythemia, ET), 만성중성구백혈병(chronic neutrophilic leukemia, CNL), 만성호산구백혈병(chronic eosinophilic leukemia, CEL), 비만세포증(mastocytosis), 미분류만성골수증식성질환(myeloproliferative neoplasm, unclassified, MPN-u) 등으로 분류된다.

CML에서 필라델피아 염색체(philadelphia, 이하 Ph)가 발견되어 염색체 변이가 암을 일으킬 수 있음이 처음으로 증명되었고 또한 BCR/ABL 융합 유전자가 발견되어 이를 진단과 치료에 이용하게 되었다.[1, 2]

2005년 Janus kinase 2(JAK2)의 617번 아미노산이 발린에서 페닐알라닌으로 치환되는 점돌연변이인 JAK2 V617F가 발견되었다, 이는 MPN과 밀접한 연관성이 있음이 증명되어 2008년 WHO진단기준에 추가되었고,[1, 3, 4] 항JAK2제제인 ruxolitinib이 개발되어 임상에서

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

사용되고 있다.[5, 6] PV환자의 95%이상에서 JAK2 V617F 돌연변이 양성을 보이지만, ET와 PMF환자의 약 50%에서만 양성을 보였다. 이에 JAK2 돌연변이 음성 MPN의 발생기전에 대한 연구가 진행되어 왔다.

최근 JAK2 V617F 음성 MPN환자에서 Myeloproliferative leukemia gene(이하, MPL)과 Calreticulin(이하, CALR) 돌연변이가 발견되었다. MPL 엑손 10에 위치한 5개의 아미노산 모티브가 MPL단백의 자발적 활성을 억제한다. 515번째 코돈인 트립토판이 다른 아미노산으로 치환되는 MPL W515 기능획득돌연변이가 발생하면 MPL단백에 구조적 활성화가 일어나 지속적인 신호전달을 유발하는 것이 밝혀졌다.[7-9] MPL W515 돌연변이가 ET와 PMF에서 각각 1%/5-7%에서 보고되었고, JAK2 V617F 음성 ET와 PMF에서 각각 1-24%/7-25%로 다양하게 보고되었다.[7, 10-12]

CALR 돌연변이발현에 따른 MPN의 발병기전은 명확히 밝혀지지는 않았다. CALR 돌연변이중 52개 염기가 결실되면서 틀이동변이가 발생하는 Type 1 돌연변이가 50%로 가장 흔하고, 5개의 염기가 삽입되는 type 2 돌연변이가 30%에서 관찰되는 것으로 보고되었다.[13, 14]JAK2와 MPL, CALR 돌연변이가 없는 Triple negative MPN과 CALR 돌연변이 양성 MPN과의 임상적인 특성에도 차이가 있다는 보고들이 있다.[13, 15]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

이에 본 연구에서는 JAK2 V617F 돌연변이 음성 MPN환자에서 JAK2 엑손 10, MPL과 CALR 돌연변이 빈도와 돌연변이 유무에 따른 임상적 특성의 차이를 살펴보고자 한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

대상 및 방법

1. 대상

MPN 으로 진단받고 JAK2 V617F 돌연변이 음성을 보인 환자로 골수, 말초혈액이 이용가능한 환자를 대상으로 하였다. MPN 진단은 2008 년 WHO 진단 기준에 따랐으며(table 1), 임상 및 검사 정보는 병원 전산 기록을 이용하였다.

JAK2 V617F 돌연변이 음성 MPN 환자는 총 25 명이였으며, ET 가 18 명, PMF 가 5 명, PV 가 2 명이였다. 환자의 성별 구성은 남성 15 명, 여성 10 명이었고 연령의 중앙값은 58.5 세(26-82 세)였다. 백혈구수치는 평균 6,538/mm^3(4,500-42,350/mm^3), 헤모글로빈 9.9g/dL(6.6-20.7g/dL), 혈소판수치 759x10^3/mm^3(90-1,535 x10^3/mm^3)였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 방법

1) DNA 추출

환자의 골수나 말초혈액검체에서 백혈구층을 분리 한후 QIAamp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, Hamburg, Germany)를 이용하여 genomic DNA 를 추출하였다.

2) JAK2 V617F 돌연변이 검출

JAK2V617F 변이 유무는 대립유전자특이중합효소연쇄반응법(allele-specific PCR)을 이용하여 판정하였다. Hot start PCR 반응 혼합액인 2× Anydirect Max Red premix (BioQuest, Seoul, Korea) 10 mL, 시발체 혼합물 2 mL, 그리고 DNA 2 mL 를 사용하고 최종 반응량이 20 mL 가 되도록 물을 첨가하여 PCR 반응물을 조제하였다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94℃에서 5 분 반응시키고 94℃에서 30 초, 60℃에서 30 초, 72℃에서 30 초를 40 회 반복하고 72℃에서 5 분간 연장반응을 시켰다.[18)]

3) JAK2 엑손 12 돌연변이 검출

V617F 음성 MPN 환자에 대해 JAK2 엑손 12 변이 유무를 PCR-직접염기순서분석법을 실시하였다. PCR 증폭을 위해 Je12F (5′-ctcctctttggagcaattca-3′)와 Je12R (5′-gggagttgcgatataggtctt-3′)를 이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

용하였으며 염기순서분석을 위해 Je12sF (5′-ctttggagcaattcatacttt-3′)와 Je12sR (5′-agttgcgatataggtctttg-3′)를 이용하였다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf)와 AnyDirect Max Red premix (BioQuest)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94℃에서 5 분 반응시키고 94℃에서 30 초, 50℃에서 30 초, 72℃ 에서 30 초를 35 회 반복하고 72℃에서 5 분간 연장반응을 시켰다. 정제된 증폭산물을 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 염기순서분석을 시행하였다.[18)]

4) MPL 엑손 10 돌연변이 검출

JAK2 V617F 돌연변이 음성 MPN 환자에서 MPL 엑손 10 변이 유무를 PCR 직접 염기서열순서분석법을 실시하였다. PCR 증폭을 위해 F: 5'-tgggccgaagtctgacccttt-3'와 R: 5'-acagagcgaaccaagaatgcctgt-3' 을 이용하였다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf)와 AnyDirect Max Red premix (BioQuest)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94℃에서 5 분 반응시키고 94℃에서 30 초, 50℃에서 30 초, 72℃ 에서 60 초를 35 회 반복하고 72℃에서 60 초, 72℃에서 7 분간 연장반응을 시켰다. 정제된 증폭산물을 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 염기순서분석을 시행하였다.[31)]

5) CALR 엑손 9 돌연변이 검출

JAK2 V617F 돌연변이 음성 MPN 환자에서 CALR 엑손 9 변이 유무를 PCR 직접 염기서열순서분석법을 실시하였다. PCR 증폭을 위해 F: 5'-cattcatcctccaggtcaag-3'와 R: 5'-aggggaacaaaaccaaaatc-3'을 이용하였다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf)와 AnyDirect Max Red premix (BioQuest)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94℃에서 5 분 반응시키고 94℃에서 30 초, 50℃에서 30 초, 72℃ 에서 60 초를 35 회 반복하고 72℃에서 60 초, 72℃에서 7 분간 연장반응을 시켰다. 정제된 증폭산물을 BigDye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 염기순서분석을 시행하였다.[31)]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 통계

통계분석은 SPSS 12.0 프로그램을 사용하였고, 돌연변이 유무에 따른 환자 두군간의 명목변수비교는 Chi-square test, 평균비교는 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 통계적 검정의 유의 수준은 $P < 0.05$로 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

결 과

1. JAK2 엑손 10, MPL 과 CALR 돌연변이 빈도(Figure 1~5와 Table 2)

JAK2 V617F돌연변이 음성 MPN 25명중 JAK2 엑손 10, MPL 과 CALR 돌연변이 빈도는 각각 1명(4%)/3명(12%)/6명(24%)이였으며, JAK2 엑손 10 돌연변이는 PV에서 관찰되었다.

CALR돌연변이 type중 Type 1 (c.1092_1143del) 4례, type 2 (c.1154_1155insTTGTC)와 type 34 (c.1154delinsCTTGTC) 각각 1례가 발견되었다.

MPL돌연변이 type중 type 3 W515K 2례(ET), type 2 S505N 1례(PMF)가 관찰되었다.

JAK2와 MPL, CALR 돌연변이가 모두 관찰되지 않는 경우를 Triple negative MPN이라고 명명하는데 Triple negative MPN은 15명이였다.

JAK2돌연변이 음성 MPN중 가장 많은 빈도를 차지하는 ET환자(n=18)중 MPL과 CALR 돌연변이 빈도는 2명(11%)/5명(27.8%)이였으며, PMF에서 각각 1명(20%)이였다.

JAK2와 MPL돌연변이 음성 ET와 PMF환자에서 CALR돌연변이 양성은 각각 31.3%(5/16)와 25%(1/4)였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 각 유전자 돌연변이 유무에 따른 임상적 특징 비교(Table 3,4)

ET환자군의 성별 구성은 남성 10명, 여성 8명이었고 평균연령은 58세(26-82세)였다. 백혈구수치는 9,081/mm^3(4,500-13,120/mm^3), 헤모글로빈은 13.8g/dL(12.3-15.7g/dL), 혈소판수치는 1,055 x10^3/mm^3(603 -1,535 x10^3/mm^3)였다. (Table 2)

PMF 의 성별 구성은 남성 3 명, 여성 2 명이었고 연령의 중앙값은 56.2 세(28-73 세)였다. 백혈구수치는 22,542/mm^3 (11,679~42,350/mm^3), 헤모글로빈은 9.7g/dL(6.6~12.0g/dL), 혈소판수치는 563 x10^3/mm^3(90~12,620 x10^3/mm^3)였다.

PMF와 PV환자수가 적어서 돌연변이의 유무에 따른 임상적 특징 비교는 어려웠다. ET환자에서 CALR 돌연변이 양성군의 평균연령은 53세(26~72세), 음성군이 59세(45~82세)로 통계학적인 유의성은 없었다. CALR 돌연변이 양성군의 평균 백혈구수와 헤모글로빈, 혈소판수는 9,824/mm^3(6,500-13,120/mm^3), 13.7g/dL(12.5-15.7g/dL), 1,263 x10^3/mm^3(890-1,535 x10^3/mm^3)였으며, Triple negative MPN의 평균 백혈구수와 헤모글로빈, 혈소판수는 8,345/mm^3(4,500-12,630/mm^3), 14.0g/dL(12.3-15.7g/dL), 941 x10^3/mm^3(603-1,502 x10^3/mm^3)였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

CALR돌연변이 양성 ET환자에서 triple negative ET환자에 비교해서 혈소판수치가 통계적으로 유의하게 높았다(P=0.046). 그 외 나이, 성별, 백혈구수치 및 혈색소수치에서는 통계적 유의성이 없었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 결론

1) JAK2 V617F 돌연변이 음성 MPN 환자(n=25)중 JAK2 엑손 10 과 MPL, CALR 돌연변이의 빈도는 각각 4%(n=1), 12%(n=3), 24%(n=6)으로 CALR 돌연변이 빈도가 가장 높았다.

2) CALR 돌연변이 type 중 type1 이 4 례로 가장 많았다.

3) MPL 돌연변이 type 중 type 3 W515K 가 2 례로 가장 많았다.

4) 환자수가 가장 많아 분석가능했던 JAK2 돌연변이 음성 ET(n=18) 중 CALR 돌연변이는 5 례로 빈도는 27.8%로 높은 빈도를 보이고 있었고 Triple negative MPN 과 비교했을 때 혈소판수치가 통계적으로 유의하게 높은(p=0.046) 임상적 특징을 가지고 있었다.

5) JAK2 와 MPL 돌연변이 음성 ET(n=16)와 PMF(n=4)중 CALR 돌연변이 양성은 각각 31.3%(n=5)와 25%(n=1)였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

고 찰

골수증식질환(Myeloproliferative neoplasm, 이하 MPN)에는 만성골수성백혈병(chronic myeloid leukemia), 만성호중구백혈병(chronic neutrophilic leukemia), 만성호산구백혈병(chronic eosinophilic leukemia), 진성적혈구증가증(Polycythemia vera, 이하 PV), 일차골수섬유증(Primary myelofibrosis, 이하 PMF), 본태성혈소판증가증(Essential thrombocytosis, 이하 ET), 그리고 MPN, unclassifiable 로 이루어져 있다.[1, 2] 약 50 년전 t(9;22)에 의한 필라델피아(Philadelphia, 이하 Ph) 염색체가 발견되면서 Ph 양성 만성골수성백혈병과 Ph 음성 MPN 으로 분류되었다.[1, 2]

2005 년 Ph 음성 MPN 에서 Janus kinase 2(이하, JAK2)유전자의 1849G>T 점돌연변이에 의해 617 번째 아미노산이 발린에서 페닐알라닌으로 치환되는 V617F 돌연변이가 발견되었다.[3, 4] JAK2 V617F 돌연변이 발견 외에도 여러가지 분자유전학적 발전에 의해 MPN 의 이해와 진단에 진보를 이뤘다.[17, 18] 이에 따라 2008 년 World Health Organization 분류에서도 임상적, 혈액학적 특성을 바탕으로 한 기존의 진단기준에 JAK2 V617F 돌연변이를 진단의 필수적인 검사로 포함시켰다.[1]

Ph 음성 MPN 질환에서 JAK2 V617F 돌연변이가 다양한 빈도로 보고

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

되었다. PV 에서 JAK2 V617F 돌연변이가 약 95%에서 발견되어 만성골수성백혈병에서 Ph 염색체와 같은 진단적가치가 매우 높은 유전자변이로 인식되었다.[3, 4, 18] 나머지도 이와 기능적으로 유사한 JAK2 엑손 12번 돌연변이가 발견되고 있으며, c.1624_1629delAATGAA, c.1627_1632delGAAGAT, c.1622_1627delGAAATG 등 다양한 형태의 돌연변이가 관찰된다. 반면 PMF 의 50%, ET 의 35~70%정도에서만 JAK2 V617F 돌연변이가 발견되었으며 비만세포증, 만성호중구백별병, 골수형성이상증후군과 같은 질환에서도 낮은 빈도이지만 보고가 되었다.[19]

Myeloproliferative leukemia gene(이하, MPL)단백은 트롬보포이에틴 신호전달에 관여하는 세포막수용체로서 거대핵세포의 분화와 혈소판 증식을 조절하는데 관여한다. MPL 유전자 엑손 10 번에 위치한 5 개의 아미노산 모티브는 MPL 단백의 자발적활성화를 억제하는데 중요한 역할을 담당한다.[7-9] 515 번째 코돈인 트립토판이 다른 아미노산으로 치환되는 MPL W515 기능획득 돌연변이가 발생하면 MPL 단백의 구조적 활성화를 유도하여 지속적인 신호전달을 유발한다. 트립토판이 치환되는 아미노산의 종류에 따라 루신으로 치환되는 W515L, 라이신으로 치환되는 W515K 돌연변이가 가장 흔하게 발견된다.[20-22] 이외에도 알라닌으로 치환되는 W515A, 아스파라긴으로 치환되는 W515R 이 발견되기도 하며,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

드물게는 T487A, Y252N, S505N 등 다양한 형태의 돌연변이가 발견된다.[22] 국내외 보고에 따르면 ET 환자에서 W515L 이 가장 흔하게 발견되었으며, W515 돌연변이를 가진 군이 그렇지 않는 군에 비해서 백혈구수와 혈색소가 낮은 소견을 보였다.[9, 23, 24] 본 연구에서는 ET 에서 MPL type 4 돌연변이인 W515K 2 례, PMF 에서 type 2 돌연변이인 S505N 1 례가 관찰되었다. Type 2 돌연변이의 경우는 주로 유전성 혈소판증가증(Hereditary thrombocytosis)에서 관찰되는 돌연변이로 체세포돌연변이(Somatic mutation)는 극히 드물게 발견된다. 본 연구에서는 PMF 환자에서 관찰되었으며, 혈액학적 질환의 가족력은 없었고, 기존에 ET 의 병력이 없어서 ET 에서 이차적으로 발생된 MF 인지 일차성 MF 인지 감별은 어려웠다.

ET 와 PMF 중 JAK2 와 MPL 돌연변이가 발견되지 않는 경우가 약 40-50%정도 된다. 최근에 Calreticulin(이하, CALR)유전자 엑손 9 번 돌연변이가 MPN 에서 JAK2 유전자 돌연변이 다음으로 흔하게 발견되는 분자유전학적 이상으로 알려지고 있다.[13, 14] ET 와 PMF 환자에서 각각 25%, 35%에서 발견되는 것으로 보고되고있지만 CALR 돌연변이발현에 따른 MPN 의 발병기전은 명확히 밝혀지지는 않았다. CALR 유전자 이상을 보인 경우 중 52-bp deletion(c.1092_1143del)을 보인 type 1 돌연변이가 53.0%, 5-bp insertion(c.1154_1155insTTGTC)을 보인 type 2

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

돌연변이가 31.7%를 차지하였고, 그 밖에 여러 종류의 다른 돌연변이는 드물게 관찰되었다.[13, 14, 25] Kim 등[26]의 국내보고를 보면 CALR 돌연변이 중 type 1 이 16/25(64%), type 2 가 9/25(36%) 관찰되었다. Type 1 은 ET 에서 9 례(56.3%), PMF 에서 6 례(37.5%)에서 관찰되었고, type 2 는 ET 에서 5 례(55.0%), PMF 와 MPN-u 에서 각각 2 례(22.2%)가 관찰되었다. JAK2 나 MPL 돌연변이에서 음성을 보인 ET 와 PMF 에서 CALR 돌연변이의 발현은 다양한 빈도로 보고되었다.[13~15, 20, 27] ET 에서는 48.9~71%, PMF 에서는 33.3~88%까지 보고되었으나 본 연구에서는 다소 낮은 31.3%와 25%의 빈도를 보였다. Type 1 돌연변이 4 례, type 2 돌연변이 1 례가 관찰되어 type 1 돌연변이가 가장 많았으며, type 34 돌연변이 (c.1154delinsCTTGTC)도 ET 에서 1 례가 관찰되었다.

CALR 돌연변이 검출방법에는 직접염기서열분석, 고해상도용융분석(High resolution melting analysis)등이 있는데 각 검사방법에 따라 민감도의 차이가 있다.[28]현재 가장 많이 사용되고 있는 직접염기서열분석은 통상적으로 15-20%이상의 돌연변이가 포함되어야 검출이 가능하기때문에 드물게 이보다 적은 돌연변이가 포함된 경우 위음성이 나올수 있다. 반면 high resolution melting analysis 와 같은 검사들은 더 적은 돌연변이가 포함되어 있어도 검출되기때문에 검사방법에 따라 양성률에 차이가 있을수 있다. JAK2

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V617F 돌연변이 양성인 군에서 CALR 돌연변이 양성을 보이는 경우가 1%미만으로 보고되었는데 Lim 등의 보고에 의하면 6.8%로 보고되었다.[29, 30)]

ET 에서 CALR 돌연변이 양성군이 JAK2 돌연변이 양성군에 비해 진단 당시 백혈구와 헤모글로빈 감소경향을 보이고 혈소판은 증가되는 소견을 보였다.[13, 14)] PMF 에서도 CALR 돌연변이 양성이 JAK2 돌연변이 양성군에 비해 백혈구는 감소하고 혈소판은 증가되는 소견을 보였다. CALR 돌연변이 양성군이 Triple negative 군에 비해 백혈구가 낮고 LDH 가 증가한다고 보고하였으나, 본 연구에서는 triple negative ET 에 비해 CALR 돌연변이 양성 ET 가 혈소판이 상승되는 소견을 보였고 백혈구와 헤모글로빈치에서는 차이가 없었다.

JAK2 , MPL, CALR 돌연변이군간의 혈전증 위험도와 생존율에 대한 연구에서 CALR 돌연변이 군과 triple negative 군이 다른 군에 비해서 혈전증의 위험이 감소되었다고 보고하였다.[13, 14)] 하지만 Finazzi 등은 1,150 명의 ET 환자들을 대상으로 한 연구에서 CALR 돌연변이가 혈전증 위험도를 평가하는데 독립적인 변수로 기여하지 않을수 있다고 보고하였다.[31)] 그리고 CALR 돌연변이가 전체 생존율의 차이를 가져온다는 증거는 없지만 CALR 돌연변이 군과 triple negative 군이 다른 군에 비해서 혈전증이 없는 생존율에서는 통계적으로 유의하게

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

좋았다. 본 연구에서는 ET 환자군에서 질병과 관련된 사망이 없어서 돌연변이유무에 따른 생존율의 비교를 할수 없었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

요 약

배경: 최근 골수증식성종양(MPN)에서 Calreticulin (CALR) 돌연변이가 발견되었다. 이에 저자는 JAK2 V617F 음성 MPN 환자 25 명에서 CALR, Janus kinase 2 (JAK2) exon 10, myeloproliferative leukemia gene(MPL) 돌연변이의 빈도와 임상 양상을 조사하였다.

대상과 방법 : 총 25 명중 Essential thrombocythemia (ET) 18 명, Primary myelofibrosis (PMF) 5 명, Polycythemia vera (PV)2 명이였다. CALR, JAK2 exon 10, MPL 돌연변이를 직접 염기 서열 분석을 통해 분석하였다.

결과 : 전체 25 명 환자에서 1,2 및 34 형을 포함한 3 가지 유형의 CALR 돌연변이가 발견되었다. 1 형 돌연변이가 5 례로 가장 흔하고 2 와 34 형 돌연변이는 각각 1 례씩 발견되었다. 18 명의 ET 환자중 CALR 돌연변이와 MPL 돌연변이는 각각 5 명과 2 명에서 관찰되었고, JAK2, MPL 과 CALR 돌연변이 음성을 보이는 triple 음성환자는 11 명이였다. 5 명의 PMF 환자중 1 명만 CALR 돌연변이가 관찰되었다. JAK 또는 MPL 돌연변이 음성 환자는 ET 16 명, PMF 4 명이였다. 이중 CALR 돌연변이 양성의 빈도는 ET 에서는 5 명(31.3 %), PMF 에서는 1 명 (25 %)이였다. ET 환자에서 CALR 돌연변이 양성 환자군이 triple

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

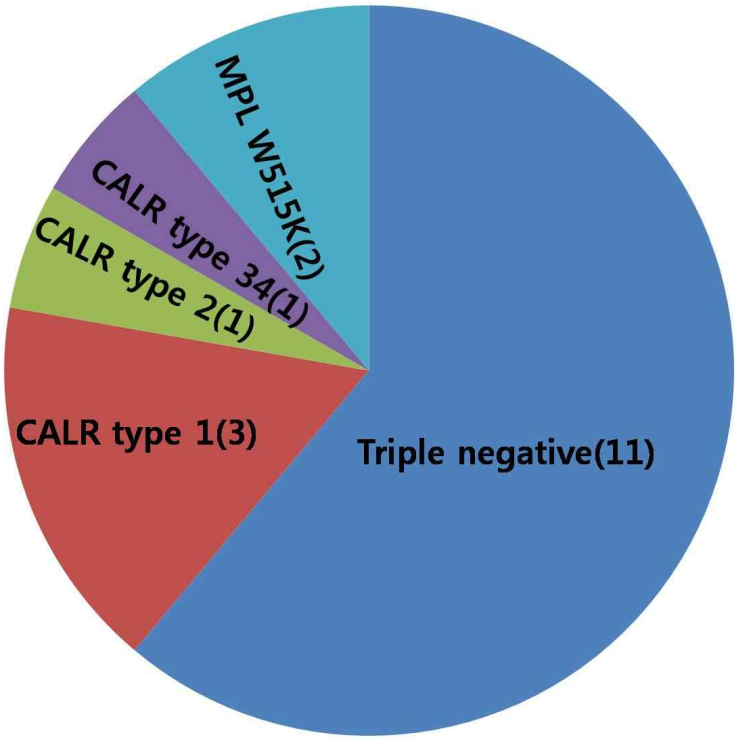
돌연변이음성 환자에 비해 혈소판 수치가 더 높았다 (1,263 x 10^3 / mm^3 vs 941 x 10^3 / mm^3).

결론 : CALR 돌연변이가 JAK2 V617F 음성 ET 와 PMF 에서 가장 빈번한 돌연변이 였기 때문에, CALR 에 대한 유전자형 분석은 JAK2 V617F 음성 ET 와 PMF 에 유용한 진단 도구가 될 수있다. CALR 돌연변이 군은 triple negative 군과 다른 혈액학적 특징을 가졌다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 1. Types of mutation in 18 JAK2 V617F negative ET(number)

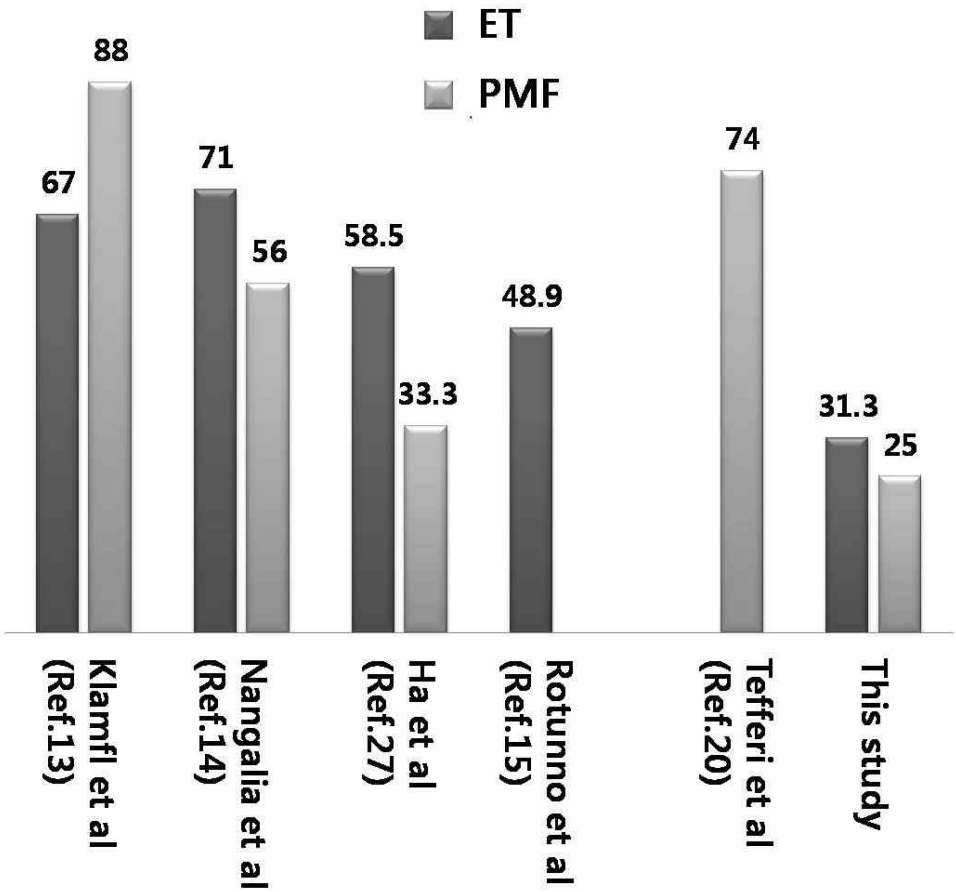


JAK2, Janus kinase2; ET, Essential thrombocythemia; MPL, Myeloproliferative leukemia gene; CALR, Calreticulin

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 2.The frequencies(%) of CALRmutation reported by previous studies



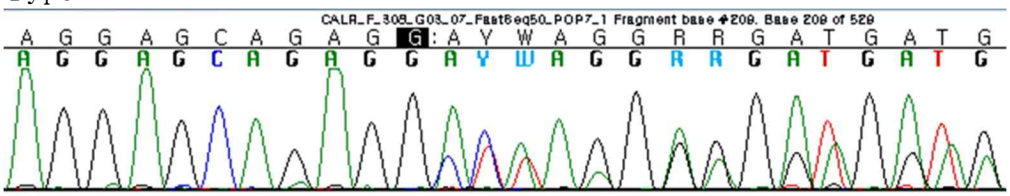
ET, Essential thrombocythemia; PMF, Primary myelofibrosis; CALR, Calreticulin

Collection @ chosun

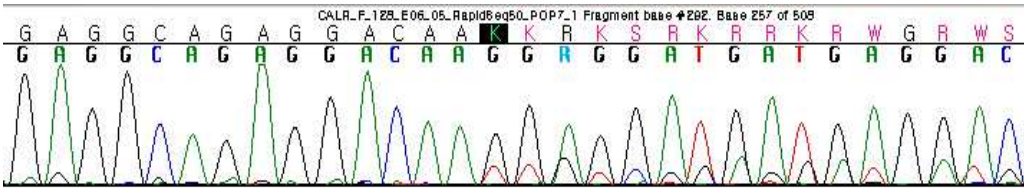
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 3. The three types of calreticulin(CALR) mutations identified in this study.

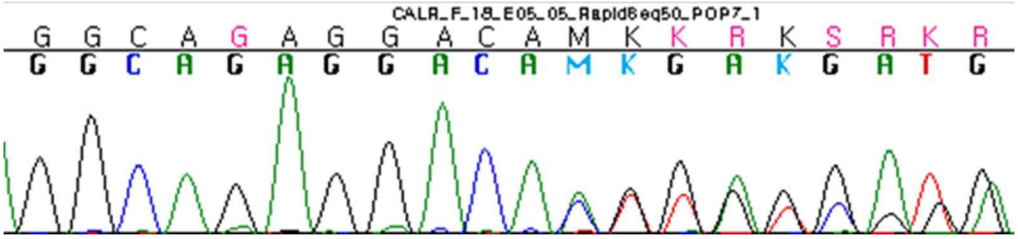
Type 1



Type 2



Type 34

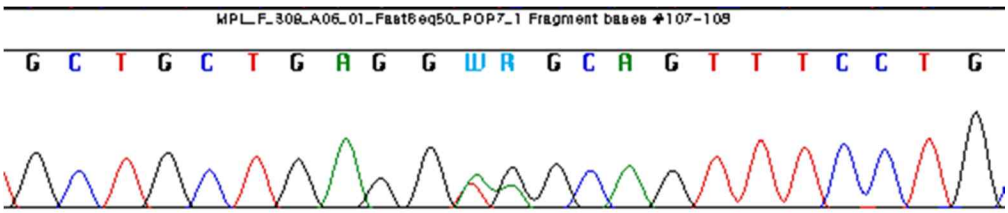


Collection @ chosun

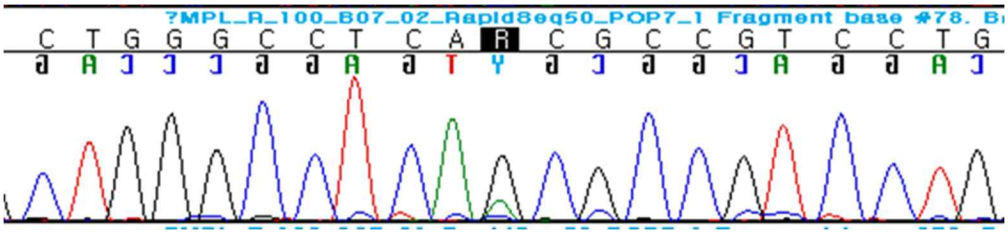
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 4.The two types of Myeloproliferative leukemia gene(MPL) mutations identified in this study.

MPL W515K



MPL S505N

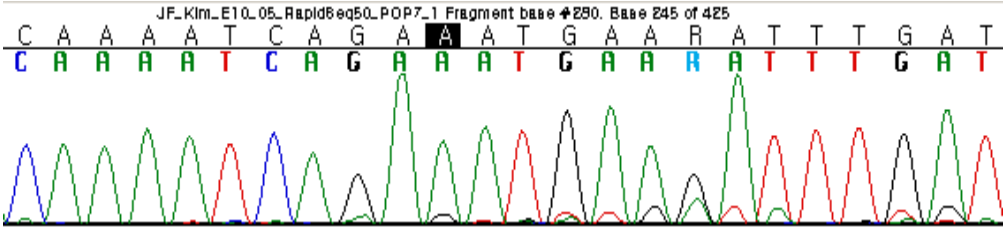


Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 5. The mutation of JAK2 exon 12 in Polycythemia vera

JAK2 c.1624_1629delAATGAA (p.N542_E543del)



Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1.World Health Organization 2008 diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasm

Criterion	Polycythemia vera	Primary myelofibrosis	Essential thrombocythemia
Major	Hemoglobin > 18.5 g/dL (men), > 16.5 g/dL (women) or[a] Presence of *JAK2* V617F or *JAK2* exon 12 mutation	Megakaryocyte proliferation and atypia[b], accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis, or[c] Not meeting WHO criteria for PV, CML, MDS, or other myeloid neoplasm Demonstration of *JAK2* V617F or other clonal marker or no evidence of bone marrow fibrosis	Sustained platelet count > 450 × 10^9/L Proliferation of megakaryocytes with enlarged, mature morphology Not meeting WHO criteria for PV, PMF, CML, MDS or other myeloid neoplasm Demonstration of *JAK2* V617F or other clonal marker, or no evidence for reactive thrombocytosis
Minor	BM hypercellularity with trilineage myeloproliferation Subnormal serum erythropoietin level Endogenous erythroid colony formation *in vitro*	Leukoerythroblastosis Increase in serum LDH level Anemia Splenomegaly	

PV diagnosis requires meeting either both major criteria and one minor criterion or the first major criterion and two minor criteria. Essential thrombocythemia diagnosis requires meeting all four major criteria. PMF diagnosis requires meeting all three major criteria and two minor criteria.

JAK2, Janus kinase 2; WHO, World Health Organization; PV, polycythemia vera; CML, chronic myelogenous leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; PMF, primary myelofibrosis; BM, bone marrow; LDH, lactate dehydrogenase.

[a]OrHb or Hct> 99th percentile of reference range for age, sex, or altitude of residence or Hb> 17 g/dL in men, 15 g/dL in women if associated with a sustained increase of ≥ 2 g/dL from baseline that cannot be attributed to correction of iron deficiency, or elevated red cell mass > 25% above mean normal predicted value.

[b]Small to large megakaryocytes with an aberrant nuclear/cytoplasmic ratio and hyperchromatic, bulbous or irregularly folded nuclei and dense clustering.

[c]Or in the absence of reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity, granulocytic proliferation, and often decreased erythropoiesis (i.e., prefibrotic cellular−phase disease).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2.The frequency of JAK2, MPL, and CALR mutations in 25 JAK2 V617F negative MPN

	ET(18)	PMF(5)	PV(2)
JAK2 exon 12, n(%)			1(50)
MPL, n(%)	2(11)	1(20)	
W515L	0	0	
W515K	2	0	
Others	0	1	
CALR, n(%)	5(27.8)	1(20)	
Type 1	3	1	
Type 2	1	0	
Type 34	1	0	
Triple negative, n(%)	11(61)	3(60)	1(50)

JAK2, Janus kinase2; ET, Essential thrombocythemia; PMF, Primary myelofibrosis; PV, Polycythemia vera; MPL, Myeloproliferative leukemia gene; CALR, Calreticulin

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3.Clinical characteristics of JAK2 V617F negative ET and PMF

	ET	PMF
Number	18	5
Men/Female	10/8	3/2
Age	58(26~82)	56(28~73)
WBC(/mm3)	9,081(4,500~13,120)	22,542(11,679~42,350)
Hb(g/dL)	13.8(12.3~15.7)	9.7(6.6~12.0)
Platelet(x103/mm3)	1,054(603~1,535)	563(90~12,620)

JAK2, Janus kinase2; ET, Essential thrombocythemia; PMF, Primary myelofibrosis; Hb, hemoglobin; WBC, White blood cell

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Comparison of clinical and laboratory characteristics between patients with CALR mutation positive ET and triple negative ET

	CALR mutation(+)	Triple negative	P-value
Number	5	11	
Men/Female	3/2	7/5	
Age(yr)	53 (26~72)	59 (45~82)	0.394
WBC(/mm^3)	9,824 (6,500-13,120)	8,345 (4,500-12,630)	0.283
Hb(g/dL)	13.7(12.5-15.7)	14.0 (12.3-15.7)	0.684
Platelet(x10^3/mm^3)	1,263(890~1,535)	941(603~1,502)	0.046

ET, Essential thrombocythemia; Hb, hemoglobin; WBC, White blood cell

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008.

2. Choi CW, Bang SM, Jang S, et al. Guidelines for the management of myeloproliferative neoplasms. Korean J Intern Med 2015;30:771-788.

3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S- S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. N Engl J Med. 2005; 352(17):1779-1790.

4. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005 Mar 19; 365(9464):1054-1061.

5. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. N Engl J Med 2012;366:799-807.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. N Engl J Med 2012;366:787-798.

7. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006;3:e270:1140-1151

8. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. Leukemia 2008;22:1557-1566.

9. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. Blood 2008;112:141-149.

10. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood 2006;108:3472-3476.

11. Kim HJ, Jang JH, Yoo EH, Kim HJ, Ki CS, Kim JW, et al. JAK2 V617F and MPL W515L/K mutations in Korean patients with essential thrombocythemia. Korean J Lab Med 2010;30:474-476.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

12. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Burkle D, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. Haematologica 2009;94:141−144.

13. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2013 Dec 19; 369(25):2379-2390.

14. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med. 2013 Dec 19; 369(25):2391-2405.

15. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. Blood. 2014;123:1552-1555.

16. Nowell P.C., Hungerford D.A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J. Natl. Cancer Inst. 1960;25:85-109.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

17. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007;356:459-468.

18. JT Kim, YG Cho, SI Choi, YJ Lee, HR Kim, SJ Jang, DS Moon, YJ Park, G Park. JAK2 V617F and Exon 12 Genetic Variations in Korean Patients with BCR/ABL1-negative myeloproliferative Neoplasms. Korean J Lab Med 2010;30:567-574

19. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. Blood 2005;106:1207-1209.

20. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. Leukemia 2010;24:1128-1138.

21. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood 2011;118:1723-1735.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

22. He X, Chen Z, Jiang Y, Qiu X, Zhao X. Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct hematopoietic diseases. J Hematol Oncol 2013;6:1-8.

23. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. Blood 2008;112:844-847.

24. Park SG, Kim KB, Lee W, et al. Frequency and clinicohematologic characteristics of MPL W515 mutations in patients with myeloproliferative neoplasms. Lab Med Online 2015; 5:1-5.

25. Zhiyuan Wu, Chen Zhang, Xiaochao Ma, Ming Guan. Clinical relevance between CALR mutation and myeloproliferative neoplasms.Stem Cell Investig. 2015; 2: 4.

26. Kim SY, Im K, Park SN, Kwon J, Kim JA, Lee DS. CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassifiable. Am J Clin Pathol. 2015 May;143(5):635-644.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

27.Ha JS, Kim YK.Calreticulin exon 9 mutations in myeloproliferative neoplasms. Ann Lab Med. 2015 Jan;35(1):22-27.

28. JH Park, Margaux Sevin, Selim Ramla, Aurélie Truffot, Tiffany Verrier, Dominique Bouchot, Martine Courtois, Mathilde Bas, Sonia Benali, François Bailly, Bernardine Favre, Julien Guy, Laurent Martin, Marc Maynadié, Serge Carillo, François Girodon. CalreticulinMutationsinMyeloproliferativeNeoplasms: Comparison of ThreeDiagnostic Methods. PLoS One. 2015; 10(10): e0141010.

29. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia. 2014;28:1472-1477.

30. KH Lim, YC Chang, C GS Chen, HC Lin, WT Wang, YH Chiang, HI Cheng, NW Su, J Lin, YF Chang, MC Chang, RK Hsieh, YY Kuo, WC Chou. Frequent*CALR*exon9alterationsin*JAK2*V617F-mutatedessential thrombocythemia detected by high-resolution meltinganalysis. Blood Cancer J. 2015 Mar; 5(3): e295.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

31. Kim BH, Cho YU, Bae MH, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Choi Y, Kim DY, Lee JH, Lee JH, Lee KH, Park YM, Lee JK, Park CJ. JAK2 V617F, MPL, and CALR Mutations in Korean Patients with Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. J Korean Med Sci. 2015 Jul;30(7):882-888.

32. Finazzi G, Carobbio A, Guglielmelli P, et al. Calreticulin mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocythemia. Blood 2014;124:2611-2622.

Collection @ chosun