대한진단검사의학회지 제29권 제3호 2009
Korean J Lab Med 2009;29:243-8
DOI 10.3343/kjlm.2009.29.3.243

실시간 반정량 PCR, JAK2 Muta*Screen*™ kit를 이용한 *JAK2* V617F 유전자 변이 선별검사의 유용성

채효진[1] · 이제훈[1] · 임지향[1] · 정승원[1] · 김명신[1] · 김용구[1] · 한경자[1] · 조병식[2] · 조석구[2] · 이종욱[2] · 민우성[2]

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실[1] · 내과학교실 혈액내과[2]

Usefulness of Real-time Semi-quantitative PCR, JAK2 MutaScreen™ Kit for JAK2 V617F Screening

Hyojin Chae, M.D.[1], Je-Hoon Lee, M.D.[1], Jihyang Lim, M.D.[1], Seung-Won Jung, M.D.[1], Myungshin Kim, M.D.[1], Yonggoo Kim, M.D.[1], Kyungja Han, M.D.[1], Byoung-Sik Cho, M.D.[2], Seok-Goo Cho, M.D.[2], Jong-Wook Lee, M.D.[2], and Woo-Sung Min, M.D.[2]

Departments of Laboratory Medicine[1] and Division of Hematology[2], Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background : Real-time PCR for quantification of *JAK2* V617F has recently been introduced and used to evaluate the importance of mutant allele burden in both diagnosis and disease progression in myeloproliferative diseases (MPDs). We evaluated the usefulness of JAK2 Muta*Screen*™ kit that uses a real-time semiquantitative PCR method and has been designed to screen *JAK2* V617F mutant allele burden.

Methods : Forty MPD patients were included in this study. We screened *JAK2* V617F and determined the mutant allele burden using JAK2 Muta*Screen*™ kit. The mutant allele burden was estimated by six-scaled standards of *JAK2* V617F mutant allele (2%, 5%, 12.5%, 31%, 50%, and 78%). For evaluation of test performance, an allele-specific PCR (AS-PCR) was carried out in all samples by using Seeplex *JAK2* Genotyping kit. We assessed the clinical differences in distinct disease entities of MPDs according to *JAK2* V617F mutant allele burden.

Results : *JAK2* V617F mutation was detected in 30 cases, including 10 of 11 cases (91%) of polycythemia vera (PV), 13 of 20 cases (65%) of essential thrombocythemia (ET), and 2 of 3 cases (67%) of chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). The concordance rate between the two tests was 95% (38/40). *JAK2* V617F mutant allele burden was greater than 50% in 17 cases, and 10 of them (59%) were PV. In contrast, mutant allele burden was less than 50% in 13 cases and 11 of them (85%) were ET.

Conclusions : JAK2 Muta*Screen*™ kit that utilizes a real-time semi-quantitative PCR method is a useful tool for diagnosing MPDs precisely. It can be used to assess the grade of mutant allele burden as well as to screen *JAK2* V617F simultaneously. ***(Korean J Lab Med 2009;29:243-8)***

Key Words : *JAK2 V617F; Myeloproliferative disease; Real-time PCR; Allele burden*

Received : May 18, 2008 Manuscript No : KJLM2132
Revision received : April 24, 2009
Accepted : May 7, 2009
Corresponding author : Jihyang Lim, M.D.
Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
Tel : +82-2-2258-1643, Fax : +82-2-2258-1719
E-mail : ljh117@catholic.ac.kr

서 론

야누스 티로신키나제 2 (Janus Tyrosine Kinase 2, *JAK2*) V617F 유전자 변이는 2005년에 골수증식질환(myeloproliferative diseases, MPDs)의 발생에 관여하는 중요한 유전자 변이로 처음 보고된 뒤[1-4], 다양한 MPDs에서 수많은 연구가 이루

어져 왔으며 그 결과 MPDs 진단에 유용한 분자유전학적 표지자로 인정되어 2008년 개정된 WHO 분류에 포함되었다[5].

JAK2 V617F 유전자 변이는 보고에 따라 다소 차이가 있지만 대체로 진성적혈구증가증(polycythemia vera, PV)의 90-95%, 진성고혈소판증(essential thrombocythemia, ET)의 35-70%, 만성특발성골수섬유증(chronic idiopathic myelofibrosis, CIMF)의 50% 정도에서 검출된다[4, 6, 7].

초기에는 CML에서의 *BCR-ABL* 유전자처럼 *JAK2* V617F 유전자 변이 유무가 질환의 특성을 결정짓고 치료의 직접적인 표적이 될 것으로 생각하였으나, 많은 연구를 통하여 *JAK2* V617F 유전자 변이가 검출되는 환자에서 PV, ET, CIMF 등의 다양한 임상 양상으로 표현되고, 동일한 진단의 환자군 내에서도 일부에서만 *JAK2* V617F 유전자 변이가 검출되며 또한 유전자 변이가 있다고 하더라도 각 환자마다 검출되는 *JAK2* V617F 유전자 변이의 양이 서로 다르다는 사실이 밝혀지게 됨에 따라 새로이 *JAK2* V617F 유전자 변이의 의미를 분석하기 위한 연구들이 활발하게 시도되고 있다. *JAK2* V617F 유전자 변이 검출에는 다양한 검사방법이 사용되고 있는데, 직접염기서열분석법은 해당부위가 어떤 염기로 치환되었는지를 직접 확인하고 동반된 변이를 동시에 찾는 데 유용하다는 장점이 있으나 환자별로 차이가 나는 다양한 유전자 변이의 양을 모두 검출하기에는 민감도가 떨어지므로 일차 선별 검사로는 더 예민한 검사방법이 필요하다. 이러한 이유로 *JAK2* V617F 유전자 변이의 선별검사에 중합효소연쇄반응-제한효소절단길이다형성법(PCR-RFLP), 대립유전자 특이 중합효소연쇄반응(Allele specific PCR, AS-PCR)법 등이 사용되고 있다.

저자들은 최근 실시간 PCR법을 이용한 반정량적 *JAK2* V617F 유전자 변이 선별검사법인 JAK2 Muta*Screen*™ kit (Ipsogen, Marseille, France)를 이용하여 MPDs 환자에서 *JAK2* V617F 유전자 변이량의 분포를 알아보고 선별검사로써의 유용성을 평가해보았다.

대상 및 방법

1. 대상

가톨릭대학교 성모병원에서 골수 검사상 MPDs로 진단받은 40명의 환자를 대상으로 하였으며 검사전 유전자 검사동의서를 받았다. PV 11예, ET 20예, CIMF 3예, 미분류골수증식질환(myeloproliferative disease, unclassifiable, MPD-U) 5예, 미분류골수형성이상/골수증식질환(myelodysplastic/ myeloproliferative disease, unclassifiable, MDS/MPD-U) 1예였으며, 남자 16명(나이 35-74, 평균 58세), 여자 24명(나이 24-78세, 평균 55세)이었다(Table 1).

2. 방법

1) DNA 분리

대상환자의 말초혈액 또는 골수 검체에서 백혈구층을 분리한 후 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hamburg, Germany)로 genomic DNA를 추출하였다. 분광광도계(ND-100, Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정한 DNA의 농도는 100-400 ng/μL 범위였다.

2) AS-PCR법을 이용한 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출

AS-PCR법을 이용한 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출에는 Seeplex *JAK2* Genotyping kit (Seegen, Seoul, Korea)를 사용하였다. 10-20 ng/μL 범위로 희석한 DNA 3 μL와 kit내 *JAK2* 시발체 혼합액, PCR master mix 및 8-MOP 용액을 혼합하여 최종 20 μL로 검사를 시행하였다. PCR은 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 장비를 사용하여, 94℃에서 15분 반응시킨 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분 과정을 35회 반복하였고 마지막으로 72℃에서 5분간 반응시켰다. PCR 결과물은 2% 아가로즈겔에 100 V에서 15분 동안 전기영동을 시행하여 813 bp의 내부대조 증폭산물을 확인

Table 1. Clinical characteristics of 40 MPDs patients according to *JAK2* V617F mutation status determined by *JAK2* Muta*Screen*™ kit

Characteristics	*JAK2* V617F	
	Present (N=30)	Absent (N=10)
Diagnosis		
PV (N=11)	10 (91%)	1 (9%)
ET (N=20)	13 (65%)	7 (35%)
CIMF (N=3)	2 (67%)	1 (33%)
MPD-U (N=5)	5 (100%)	0 (0%)
MDS/MPD-U (N=1)	0 (0%)	1 (100%)
Complications*	8	7
Abnormal karyotype	2	1
Palpable spleen	8	0
Cytoreductive treatment	22	5

*, Complications included secondary bone marrow fibrosis, hemorrhage, thromboembolic event, and acute leukemia conversion.
Abbreviations: PV, polycythemia vera; ET, essential thrombocythemia; CIMP, chronic idiopathic myelofibrosis; MPD-U, myeloproliferative disease, unclassifiable; MDS/MPD-U, myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable.

한 뒤, 543 bp 위치에서 정상 대립유전자를, 352 bp 위치에서 *JAK2* V617F 변이 대립유전자의 유무를 확인하였다. 본 검사에 사용된 AS-PCR법의 검출민감도는 *JAK2* V617F mutant 양이 100%로 확인된 환자의 말초혈액과 정상인의 말초혈액을 백혈구 수를 고려하여 계대 희석하여 확인한 결과 5%였다.

3) Real-time PCR법을 이용한 반정량적 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출

Real-time PCR법을 이용한 반정량적 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출에는 JAK2 Muta*Screen*™ kit (Ipsogen)를 사용하였다. 방법은 상기 AS-PCR 검사에서 사용되었던 동일한 DNA 검체 5 μL와 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 kit내 시발체, 소식자, 증류수를 혼합하여 최종 25 μL로 검사를 시행하였다. 실시간 PCR에는 Rotor-Gene™ 3000 (Corbett, Sydney, Australia) 장비를 사용하여, 50℃에서 2분 및 95℃에서 10분 반응시킨 후, 92℃ 15초, 60℃ 1분 과정을 50회 반복하였다. 유전자 변이 검출을 위하여 TaqMan 소식자를 이용하였으며, 5′ 말단에는 reporter dye로 *JAK2* V617F 변이 대립유전자(mutant allele)와 결합하는 소식자에는 FAM을, 정상 대립유전자(wild type allele)와 결합하는 소식자에는 VIC을 사용하였으며, 3′ 말단에는 quencher dye로 두 소식자 모두 Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine (TAMRA)을 사용하였다. *JAK2* V617F 유전자 변이의 반정량적 검출을 위하여 양성대조물질(100% *JAK2* V167F) 및 음성대조물질 (0% *JAK2* V167F)과 함께 *JAK2* V617F 변이 대립유전자 양이 2%, 5%, 12.5%, 31%, 50%, 78%, 100%인 6개의 표준물질 ("Reference scale")을 증폭시킨 후 분석프로그램상에서 계산된 FAM/VIC 형광량 비율을 기준으로 <2%, 2-5%, 5-12.5%, 12.5-31%, 31-50%, 50-78%, 78-100%의 7단계 유전자 변이량 구간을 결정한다. 이와 동시에 증폭시킨 환자 검체에서 계산된 FAM/VIC 형광량 비율이 표준물질로 결정된 유전자 변이량 구간 중 어디에 해당하는지를 정하여 이를 대상 검체의 유전자 변이량으로 표시하였다.

3. 결과 분석 및 통계

두 검사방법으로 얻어진 결과의 상관성을 비교분석하고, JAK2 Muta*Screen*™ kit로 측정된 7단계에 해당하는 유전자 변이량 각 구간에 해당하는 골수 진단별 분포를 분석하였다. *JAK2* V617F 유전자 변이 유무에 따른 임상적인 특징과의 연관성을 진단, 나이, 성별, 합병증(골수섬유화, 출혈, 혈전색전증, 급성백혈병으로의 전환), 핵형 이상(abnormal karyotype), 비장비대, 세포감량 치료 유무에 대해 조사하였다.

MPDs 질환군별 *JAK2* V617F 유전자 변이량의 비교에는 MedCalc software (MedCalc®, Mariakerke, Belgium)를 사용하여 Kruskall-Wallis test와 사후검정으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다.

결 과

1. 실시간 반정량 PCR법, JAK2 Muta*Screen*™ kit의 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출률

40명의 MPDs 환자 중 *JAK2* V617F 유전자 변이 양성이 30예, 음성이 10예였다. 동일 검체에서 AS-PCR법과 실시간 반정량 PCR법 간의 검사결과는 40예 중 38예의 결과가 일치하였다 (일치율 95%). *JAK2* Muta*Screen*™ kit 검사상 *JAK2* V617F 양성이었던 30예 중 1예에서 AS-PCR에서 음성이었고, JAK2 Muta*Screen*™ kit 검사상 음성이었던 10예 중 1예에서 AS-PCR에서 양성으로 나타났다(Table 2).

2. MPDs 질환군별 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출 빈도 및 임상 특징 분석

JAK2 Muta*Screen*™ kit로 시행한 *JAK2* V617F 유전자 변이 검출 빈도는 PV 91% (10/11), ET 65% (13/20), CIMF 67% (2/3), MPD-U 100% (5/5), MDS/MPD-U 0% (0/1)였다.

JAK2 V617F 유전자 변이 유무와 임상적인 특징과의 연관성을 나이, 성별, 합병증(골수섬유화, 출혈, 혈전색전증, 급성백혈병으로의 전환), 핵형 이상, 비장비대, 세포감량 치료 여부에 대해 조사하였으며 *JAK2* V617F 유전자 변이 양성군에서 비장비대 및 세포감량 치료의 빈도가 높았고, 합병증의 경우에도, 출혈과 혈전색전증이 동반된 2예 및 2차 섬유화와 급성백혈병이 동

Table 2. Comparison of *JAK2* V617F mutation results determined by JAK2 Muta*Screen*™ Kit and Allele-specific PCR

Characteristics	JAK2 Muta*Screen*™		Total
	Present	Absent	
Allele-specific PCR			
Present	29	1	30
Absent	1	9	10
Total	30	10	40

Weighted kappa statistics, 0.87.

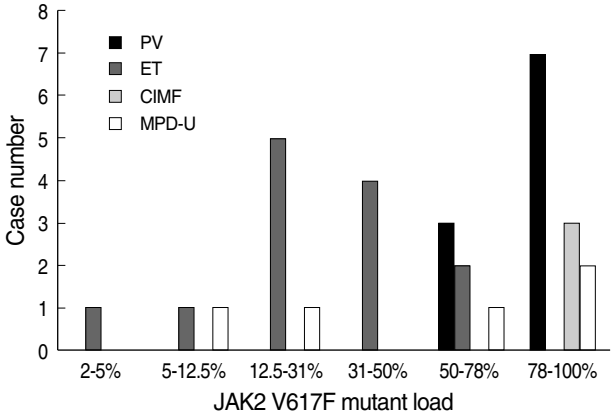

Fig. 1. Distribution of *JAK2* V617F allele burden determined by JAK2 Muta*Screen*™ kit in 30 cases of *JAK2* V617F positive MPDs. Abbreviations: PV, polycythemia vera; ET, essential thrombocythemia; CIMP, chronic idiopathic myelofibrosis; MPD-U, myeloproliferative disease, unclassifiable.

반된 1예는 모두 *JAK2* V617F 유전자 변이 양성군에 속하였다 (Table 1).

3. MPDs 질환군별 *JAK2* V617F 유전자 변이량 분포

JAK2 Muta*Screen*™ kit 검사상 양성이었던 30예의 검체에서 측정된 *JAK2* V617F 유전자 변이량을 MPDs 진단명에 따라 살펴보면, *JAK2* V617F 변이 대립유전자가 50% 이상으로 나타난 17예 중 PV가 10예로(59%) 가장 많았으며 대부분이 78-100% 구간에 속하였고, MPD-U가 3예, ET와 CIMF가 각각 2예를 차지하였다. 반면에 *JAK2* V617F 변이 대립유전자가 50% 이하인 13예 중에서는 ET가 11예로 대부분을 차지하였으며(85%) 2예는 MPD-U였다. 또한 10예의 *JAK2* V617F 음성 검체에서는 ET가 7예(70%)로 가장 많았다(Fig. 1).

고 찰

1951년 Dameshek은 PV, ET, CIMF 및 CML을 포괄하는 MPDs의 개념을 처음 제시하면서 이 질환들은 다양한 임상적, 혈액학적 소견을 보이나 그 병태생리가 서로 연관되어 있을 것이라고 하였다[8]. CML의 *BCR-ABL* 유전자를 제외하고는 다른 MPDs의 진단은 주로 임상양상을 통한 감별진단과 추적검사 등의 비특이적인 방법으로 이루어져왔다. 2005년 비슷한 시기에 PV, ET, CIMF의 일부에서 *JAK2* 유전자의 엑손 14번 1,849번째 염기가 guanine (G)에서 thymine (T)로 변하여 617번째 아미노산이 valine (V)에서 phenylalaine (F)로 치환되는 *JAK2* V617F 유전자 변이가 여러 연구자들에 의해 보고되었다[1-4]. 이 부위는 *JAK2* 단백의 pseudokinase autoinhibitory JH2 domain에 해당하며[9], 이 돌연변이에 의한 *JAK2* 티로신키나제의 구조적 활성화(constitutive activation)가 성장인자와 무관하게 세포의 증식을 일으키는 것이 확인되었으며[1], 동물 모델을 사용한 *JAK2* V617F 유전자 형질 전환 실험에서 사람의 PV과 유사하면서, 골수섬유화가 동반되는 MPD를 유발하는 것으로 밝혀졌다[10].

JAK2 V617F 유전자 변이의 검출방법에는 직접염기서열분석법 및 PCR-RFLP, AS-PCR, ARMS법, 실시간 정량 PCR법 등이 있으며[11]. 각 방법 별 검출민감도는 다양하여 직접염기서열분석법은 25%, PCR-RFLP, AS-PCR, amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR법은 약 3%로 보고되어 있으며[12], 실시간 정량 PCR법의 검출 민감도는 AS-PCR, 또는 ARMS-PCR법과 비슷하거나[13] 보다 높은 1% 미만으로 보고하고 있다[11]. 본 연구에서 AS-PCR법과 실시간 반정량 PCR법간에 2예에서 불일치 결과를 나타내였는데, 1예는 AS-PCR법에서 음성이었으나 실시간 반정량 PCR에서 5-12.5%의 *JAK2* V617F 변이 유전자가 검출되었으며 ET가 의심되는 MPD-U 환자였다. 다른 1예는 실시간 반정량 PCR에서는 변이 유전자가 2% 미만으로 제조사에서 제시한 기준에 의하여 음성으로 판정하였으나 AS-PCR에서 매우 약한 PCR 밴드로 확인되어 양성으로 판정한 예였으며 골수진단명은 ET였다. 이 경우 2% 미만의 유전자 변이를 가지고 있는 *JAK2* V617F 표준물질을 이용하여 확인하는 것이 검사방법의 정확한 검출민감도를 결정하는데 도움이 될 것으로 생각되었으나 검증된 표준물질의 확보가 불가능하여 시행하지 못하였다. 그러나 환자의 임상양상을 고려할 때 장기간의 추적검사를 통한 클론 증식 유무의 확인이 필요할 것으로 생각되었다. MPDs에서 *JAK2* V617F 유전자 변이는 보고에 따라 다소 차이가 있지만 PV의 90-95%, ET의 35-70%, CIMF의 50% 정도에서 검출된다고 하며[4, 6, 7] 국내 보고에서도 ET의 *JAK2* V617F 유전자 변이 빈도는 약 50%였다[14]. 본 연구 결과에서는 PV 중 91%, ET 중 65%, CIMF 중 67%가 *JAK2* V617F 양성으로 기존 보고와 유사하였다. *JAK2* V617F 유전자변이의 유무와 임상적 특징과의 연관성은 증례수가 충분하지 않아 통계적 유의성을 결론 지을 수 없었으나 *JAK2* V617F 유전자 변이 양성군에서 비장비대 및 세포감량 치료의 빈도가 높은 경향을 보였다. 합병증의 경우에도 출혈과 혈전색전증이 동반된 2예 및 2차 섬유화와 급성백혈병이 동반된 1예는 모두 *JAK2* V617F 유전자 변이 양성군에 속하는 것으로 볼 때 *JAK2* V617F 유전자 변이가 임상 양상과 어느 정도 연관성이 있음을 시사하

는 것으로 생각된다.

JAK2 V617F 유전자 변이의 유무가 생물학적 또는 임상적으로 뚜렷한 차이를 보이는 진단 분류 기준이 될 수 있는지에 대한 연구는 현재에도 계속되고 있으며[9], *JAK2* V617F 유전자 변이 양성군에서 질환의 이환 기간이 길며, 골수섬유화, 급성백혈병으로의 전환, 혈전증, 고령 및 세포감량 치료의 빈도가 더 증가한다는 보고도 있으나 *JAK2* V617F 유전자 변이와 임상 양상은 연관성이 없다는 보고도 있다[4, 6, 15].

최근에는 *JAK2* V617F 유전자 변이 음성인 MPDs에서 티로신키나제의 구조적 활성화를 유발하는 다른 돌연변이들이 보고되고 있으며, 대표적인 예로 *JAK2* V617F 유전자변이 음성인 PV에서 *JAK2* 유전자의 12번 엑손에 새로운 돌연변이가 발견되었다[16]. 따라서 *JAK2* V617F 유전자변이 유무만으로 MPDs의 임상적 특성을 분석하는 것보다는 *JAK2* V617F 음성인 예에서는 반드시 다른 돌연변이의 존재 유무를 고려해야 할 것으로 생각된다. 본 연구에 포함된 11예의 PV 검체 중 10예는 *JAK2* V617F 유전자 변이량이 모두 50% 이상(7예 78-100%, 3예 50-78%)으로 다른 MPDs에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. PV 중 *JAK2* V617F 음성이었던 1예는 환자의 임상소견 및 골수 검사 소견상 명백한 PV로 판단되었으며 다음 단계로 JAK2 exon12의 유전자변이 유무에 대한 확인이 반드시 필요한 것으로 사료되었다.

JAK2 V617F 유전자 변이의 획득에 뒤이어, 유사분열 재배열(mitotic recombination) 과정 중 변이 유전자의 중복(duplication)에 의해 이종접합결실(loss of heterozygosity, LOH)이 일어날 수 있으므로[4, 15] 정상 대립 유전자에 대한 *JAK2* V617F 유전자 변이량은 0%에서부터 100%에 이르는 값을 가질 수 있다. 본 연구에서 MPDs 진단별 *JAK2* V617F 유전자 변이량은 CIMF, PV, ET 순으로 높았으며 이는 기존 보고와도 일치한다[17-19]. *JAK2* V617F 유전자 변이량 50%를 기준으로 추정하였을 때 CIMF와 PV는 *JAK2* V617F 유전자 변이 양성인 모든 예에서 동종접합으로 생각되며, ET의 경우는 15%가 동종접합, 85%가 이종접합으로 추정된다. 이는 기존 보고와 마찬가지로 ET에서는 동종접합의 비율이 낮고 CIMF과 PV에서는 동종접합의 비율이 높은 경향을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 *JAK2* V617F 유전자의 6단계 변이량 구간에 따른 MPDs 진단별 빈도가 뚜렷이 구분되는 양상을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과로 볼 때 *JAK2* V617F 유전자변이를 검출하기 위한 선별검사로 실시간 반정량 PCR법인 JAK2 Muta*Screen*™ kit를 사용하면 *JAK2* V617F 유전자변이를 예민하게 검출할 수 있을 뿐 아니라 동시 측정되는 유전자 변이량 정도에 따라 앞으로 진행될 가능성이 있는 MPDs 질환군을 어느 정도 예측할 수 있어 각 환자의 상황에 맞는 보다 정밀한 추적 검사가 가능할 것으로 생각되었다.

JAK2 V617F 유전자 변이량과 골수증식을 반영하는 지표들의 상관성에 관한 연구는 논문마다 다양한 결과를 나타내고 있지만[20, 21] *JAK2* V617F 변이는 MPDs의 발생기전에 있어 가장 중요한 유전자 변이일 뿐 아니라, 여러 가지 *JAK2* 억제제가 전임상 시험 중이거나 임상 시험 중이므로[22] 앞으로 이러한 표적 치료제의 임상적 효과 추적에는 정량 검사가 반드시 필요할 것으로 생각되며, 또한 최근 *JAK2* V617F 유전자 변이 양에 따른 임상적 특성의 차이에 관한 연구가 활발히 이루어 지고 있으므로 앞으로 *JAK2* V617F 유전자 변이 검사에 실시간 정량 PCR법의 중요성이 더욱 부각될 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 최근 *JAK2* V617F 유전자 변이에 실시간 정량 PCR법을 이용한 검사법이 소개되어 MPDs의 진단과 질환의 진행에 있어 유전자 변이량 측정의 중요성 평가에 사용되고 있다. 저자들은 *JAK2* V617F 유전자 변이 선별을 위해 새로이 고안된 실시간 반정량 PCR법인 JAK2 Muta*Screen*™ kit의 유용성을 평가하였다.

방법 : 40예의 MPDs 환자를 대상으로 JAK2 Muta*Screen*™ kit를 이용하여 *JAK2* V617F 선별 및 유전자 변이량을 측정하였다. JAK2 V617F 유전자 변이량 측정에는 6단계의 표준물질을 사용하였다(2%, 5%, 12.5%, 25%, 31%, 50%, 78%). 검사 수행능의 평가를 위하여 동일한 모든 검체에 대하여 Seeplex *JAK2* Genotyping kit을 이용한 AS-PCR법으로 시행한 검사 결과와 비교하였다. 또한 각 MPDs의 질환군과 유전자 변이량에 따른 임상적 특성의 차이를 분석하였다.

결과 : 30예에서 *JAK2* V617F 유전자 변이가 검출되었으며 각 질환별 양성률은 PV 91% (10/11), ET 65% (13/20), CMIF 67% (2/3)였다. 두 검사방법 간의 일치율은 95%였다(38/40). *JAK2* V617F 유전자 변이량이 50% 이상인 17예 중 10예가 PV였으며, *JAK2* 유전자 변이량이 50% 이하인 13예 중에서는 11예가 ET였다(85%).

결론 : 실시간 반정량 PCR법을 이용한 검사법인 *JAK2* V617F Muta*Screen*™ kit는 유전자 변이 검출 및 유전자 변이량의 동시 측정이 가능하므로 보다 정밀한 MPDs의 진단에 유용한 검사방법으로 생각된다.

참고문헌

1. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005;434:1144-8.
2. 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;365:1054-61.
3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005;7:387-97.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005;352:1779-90.
5. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui 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.
6. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005;7:387-97.
7. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood 2005;106:2162-8.
8. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood 1951;6:372-5.
9. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. Blood 2005;105:4187-90.
10. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood 2006;108:1652-60.
11. Poodt J, Fijnheer R, Walsh IB, Hermans MH. A sensitive and reliable semi-quantitative real-time PCR assay to detect JAK2 V617F in blood. Hematol Oncol 2006;24:227-33.
12. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. Blood 2007;110:840-6.
13. Wolstencroft EC, Hanlon K, Harries LW, Standen GR, Sternberg A, Ellard S. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for the detection of the JAK2 V617F mutation. J Mol Diagn 2007;9:42-6.
14. Ahn JY, Yoo SJ, Bang SM, Park PW, Seo YH, Shin DB, et al. JAK2^{V617F} mutation in Korean patients with essential thrombocythemia. Korean J Lab Med 2007;27:77-82. (안정열, 유수진, 방수미, 박필환, 서일혜, 신동복 등. 한국인 본태성혈소판혈증 환자에서 JAK2^{V617F} 유전자 변이. 대한진단검사의학회지 2007;27:77-82.)
15. 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;365:1054-61.
16. 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.
17. Larsen TS, Pallisgaard N, Møller MB, Hasselbalch HC. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. Eur J Haematol 2007;79:508-15.
18. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. Blood 2006;107:3676-82.
19. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2006;108:1865-7.
20. Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antoniolo E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK^{V617F} mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. Leukemia 2006;20:1055-60.
21. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. Cancer 2006;106:631-5.
22. Pardanani A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. Leukemia 2008;22:23-30.