

急性骨髄性白血病における NPM、FLT3、CEBPA遺伝子変異の同時検出の試み

藤嶋 ゆみえ 大竹 茂樹* 竹本 賢一**

要 旨

近年、これまで予後中間群とされてきた正常核型の急性骨髄性白血病 (AML) が、いくつかの遺伝子変異の有無により予後の予測ができることが明らかになってきた。この遺伝子変異の中でも nucleophosmin (NPM)、fms-like tyrosine kinase receptor-3 (FLT3)、CCAAT/enhancer-binding protein- α (CEBPA) 遺伝子変異が重要視されている。本研究ではサンプルとして骨髄および末梢血分離細胞から抽出、調整したcDNAとgenomic DNAのみならず、これらの塗抹保存標本から抽出したgenomic DNAを用い、PCR-Gene Scan法によってNPM、FLT3およびCEBPA遺伝子変異の同時検出法の実用化を試みた。プライマーを異なる蛍光色素で標識し、また異なる大きさのPCR産物ができるように設計すると、多種類の遺伝子変異を同時に検出することが確認できた。しかしながら、その感度は白血病細胞が10%程度以上存在することが必要であった。この検査法を用いれば、簡便かつ迅速に白血病の遺伝子検査を実施することができるので、臨床検査法として病院検査部の業務として採用できるようにさらに精度の検討を行っていくことが必要と考えられた。

Key words

acute myeloid leukemia, gene mutation, nucleophosmin
fms-like tyrosine kinase receptor-3, CCAAT/enhancer-binding protein- α

はじめに

急性骨髄性白血病 (AML) の予後分類は今まで染色体異常を中心に行われてきた。しかし近年、これまで予後中間群とされてきた正常核型のAMLがいくつかの遺伝子変異の有無により予後良好群、不良群に細分類できることが明らかになってきた¹⁾。この遺伝子変異の中で比較的検出率が高く、臨床的価値の高いものとして nucleophosmin (NPM) 遺伝子変異、fms-like tyrosine kinase receptor-3 (FLT3) 遺伝子変異の組み合わせ、また CCAAT/enhancer-binding protein- α (CEBPA) 遺伝子変異が注目されている^{2,3)}。NPM 遺伝子変異陽性で FLT3 遺伝子変異陰性の組み合わせの場合に、他の組み合わせと比べて予後良好であると考えられている⁴⁾。そして CEBPA 遺伝子変異が陽性であると、寛解導入率には影響を与えず、全生存率 (Overall Survival, OS)、

無病生存期間 (Disease-Free Survival, DFS)、無再発生存率 (Event-Free Survival, EFS) に対して予後良好因子であるとされている⁵⁾。

NPM分子は核小体に存在するリン酸化蛋白である。NPM遺伝子は、ヒト染色体上の5q35に位置し、12個のエクソンより構成され、主に細胞周期の制御に関する多彩な機能が明らかになっている^{6,7)}。NPMはAMLにおいてエクソン12にフレームシフト型遺伝子変異を起こすと言われており、この遺伝子変異は960番目の塩基部分における4塩基の遺伝子挿入、もしくは965番目の塩基部位における5塩基の欠失と9塩基の挿入によるものがある。挿入塩基の違いによって多くの種類の変異型が報告されている (図1)⁸⁾。

FLT3はタイプⅢに属する受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外に5個の免疫グロブリン様領

金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻博士後期課程

* 金沢大学医薬保健研究域保健学系

** 金沢大学附属病院検査部

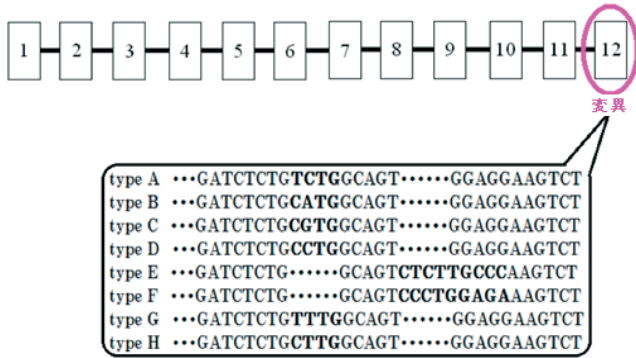


図1. NPMの様々な変異タイプ

エクソン12における遺伝子変異 (type A~H) を上に示す。

域と、細胞内の膜貫通領域 (trans-membrane, TM)、傍膜貫通領域 (juxta-membrane, JM)、チロシンキナーゼ領域 (tyrosine kinase, TK) に分類される。FLT3は主に幼若な造血細胞に発現し、骨髄内皮細胞より産生されるFLT3リガンドが結合することによりチロシンキナーゼが活性化され、造血細胞の分化・増殖や造血幹細胞の自己複製に関与することが知られている^{9,10)}。AMLにおいてFLT3遺伝子のJM領域の一部が重複して繰り返されるFLT3-internal tandem duplication (ITD) 変異が認められる。この変異のサイズや位置は症例によって異なるが、必ずインフレームであること、そしてJM領域に限定されることが特徴である¹¹⁾。

CEBPAは好中球の分化・増殖に関わる重要な転写因子である^{12,13)}。CEBPA遺伝子変異は全領域 (transactivation domains 1, TAD1, transactivation domains 2, TAD2, basic-region-leucine zipper domain, bZIP) に認められているが、N末端領域におけるフレームシフトをもたらす遺伝子挿入・欠失型変異とC末端領域におけるインフレームでの遺伝子挿入・欠失型変異の2種類に分類されている。前者の異常ではフレームシフトがもたらされるだけでなく、120番目のMet残基から始まる短いCEBPAタンパクが過剰合成される。この短縮型CEBPA分子は細胞増殖抑制作用が減弱していると同時に、正常CEBPA分子に対しても標的遺伝子への結合を阻害することが明らかにされている。後者への異常は、ロイシンジッパー領域に起こることにより、CEBPA分子のDNA結合能や2量体化を阻害することが知られている。このようにCEBPA遺伝子変異部位は多岐にわたるものの、結果として好中球分化機構が阻害されることによりAMLの発症に関与している。CEBPA遺伝子変異は、他の遺伝子変異との有意な相関は報告されていない^{2,14)}。

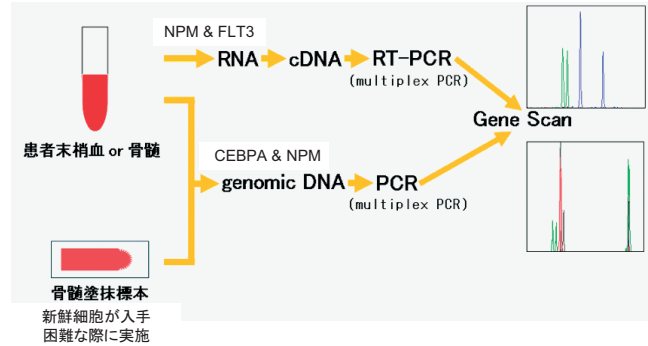


図2. 実験方法の手順

NPMとFLT3-ITD (cDNAを使用)、CEBPAとNPM (genomic DNAを使用) の解析手順を示す。

そこで、本研究ではNPM、FLT3、CEBPA遺伝子変異の有無をpolymerase chain reaction (PCR)-Gene Scan法を用い、同時に検出することを試みた。

方法

1. 対象

金沢大学附属病院血液内科、小児科、ならびにその関連病院にてAMLと診断された患者49例、AML以外の血液疾患32例 (急性リンパ性白血病8例、慢性骨髄性白血病8例、骨髄異形成症候群16例)、健常人21例について解析を行った。実験には金沢大学附属病院検査部で実施されているキメラ遺伝子検査に患者の同意を得て提出された検体の残余検体から、診療科名、疾患名および芽球比率のみが付記された匿名化検体を用いた。

2. NPM、FLT3、CEBPA遺伝子変異の同時検出

実験方法の手順を図2に示す。まず、NPMとFLT3-ITD遺伝子変異の同時検出を試みた。患者末梢血又は骨髄サンプルよりQIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出、逆転写反応によりcDNAを合成後、Applied Biosystemsの2720サーマルサイクラーを用いてmultiplex RT-PCR (熱反応95℃-15分1サイクル、熱反応94℃-30秒 アニーリング58℃-90秒 伸長反応72℃-90秒 27サイクル、伸長反応72℃-10分1サイクル) を行った。用いたプライマー¹⁵⁾は表1に示した。蛍光色素FAMで標識されたFLT3-ITD ForwardプライマーによってFLT3-ITDのピークはブルーで、VICで標識されたNPM ForwardプライマーによってNPMのピークはグリーンで表され識別できる。PCR産物は、Applied BiosystemsのABI PRISM® 310 Genetic Analyzerを用いて泳動し、Gene Mapper®ソフトウェアによって解析した。

表 1. NPM&FLT3 遺伝子変異の同時検出に用いたプライマー

名前		塩基配列	適用
NPM	Forward:	VIC- 5'-ATCAATTATGTGAAGAATTGCTTAC-3'	NPM(349bp)
	Reverse:	5'-ACCATTTCCATGTCTGAGCACC-3'	
FLT3	Forward:	FAM- 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3'	FLT3-ITD(366bp)
	Reverse:	5'-ATCCTAGTACCTTCCCAAACCTC-3'	

表 2. NPM&CEBPA遺伝子変異の同時検出に用いたプライマー

名前		塩基配列	適用
NPM	Forward:	VIC- 5'-AGGACAGCCAGATATCAACTGTTAC-3'	NPM(236bp)
	Reverse:	5'-AGTTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAAA-3'	
TAD1	Forward:	VIC- 5'-TCGGCCGACTTCTACGAGGC-3'	TAD1(326bp)
	Reverse:	5'-GCGCCCGGGTAGTCAAAGT-3'	
TAD2	Forward:	NED- 5'-TACCTGGACGGCAGGCTGGA-3'	TAD2(251bp)
	Reverse:	5'-TGCAGGTGCATGGTGGTCT-3'	
bZIP	Forward:	PET- 5'-AGAAGTCGGTGGACAAGAACAGCAA-3'	bZIP(246bp)
	Reverse:	5'-AGTTGCCCATGGCCTTGAC-3'	

次に、NPMとCEBPA (TAD1、TAD2、bZIP) 遺伝子変異の同時検出を試みた。患者末梢血又は骨髄サンプルよりQIAamp DNA Blood Mini Kitを用いてDNAを抽出し、Applied Biosystems 2720サーマルサイクラーを用いてmultiplex PCR (熱反応95℃-15分1サイクル、熱反応94℃-30秒 アニリング58℃-90秒 伸長反応72℃-90秒 33サイクル、伸長反応72℃-10分1サイクル)を行った。用いたプライマー¹⁶⁾は表2に示した。また、NPMとFLT3-ITDの同時検出と同様に各プライマーに蛍光色素標識し、VICで標識したNPMとTAD1のピークはグリーンで、NEDで標識したTAD2のピークはブラックで、PETで標識したbZIPのピークはレッドで表され識別できる。また、NPMとFLT3-ITDの同時検出と同様に、PCR産物はApplied BiosystemsのABI PRISM® 310 Genetic Analyzerを用いて泳動し、Gene Mapper®ソフトウェアによって解析した。

3. NPM変異の塩基配列の決定

NPM変異が陽性の場合には塩基配列の決定を行い、NPM変異のタイプを調べた。まず、cDNAのPCR (95℃-15分1サイクル、94℃-30秒 58℃-90秒 72℃

-90秒 33サイクル、72℃-10分1サイクル)を行い、Applied Biosystems Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitを用いてPCR産物の塩基配列決定反応 (96℃-1分1サイクル、96℃-10秒 50℃-5秒 60℃-4分25サイクル)を行った。塩基配列決定反応に用いたプライマー¹⁷⁾は表3に示した。反応物はABI PRISM® 310 Genetic Analyzerを用いて泳動し、Seq Scape®ソフトウェアによって解析した。

4. 塗抹標本からの検出

新鮮サンプルの入手が困難な場合は、塗抹標本からgenomic DNAを抽出し、末梢血および骨髄サンプルと同様にPCR-Gene Scan法による同時検出を試みた。塗抹標本からのDNA抽出方法は、まず最初にディスクメスを用いて標本を削り取り、削り取ったものを1.5mlマイクロチューブの中に入れた。その中に1mlの生理食塩水を入れ、十分に混合し、12000rpm、室温で5分間遠心する。上清を捨て、1mlの100%エタノールを加え混合し、12000rpm、室温で5分間遠心した(これを2回繰り返した)。上清を捨て、QIAamp DNA Blood Mini Kitに付属する

表 3. cDNAでのNPMの塩基配列決定に用いたプライマー

名前		塩基配列	適用
NPM_25F	Forward:	5'-GCGCGGTTGTTCTCTGGAGCAGCGTTC-3'	NPM PCR(1088bp)
NPM_1112R	Reverse:	5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTAGGGAA-3'	
NPM1_Dir3	Forward:	5'-CCAGCCAAAAATGCACAAAAGTCA-3'	塩基配列決定
NPM1_Rev3	Reverse:	5'-AACATTTATCAAACACGGTAGGGAA-3'	塩基配列決定

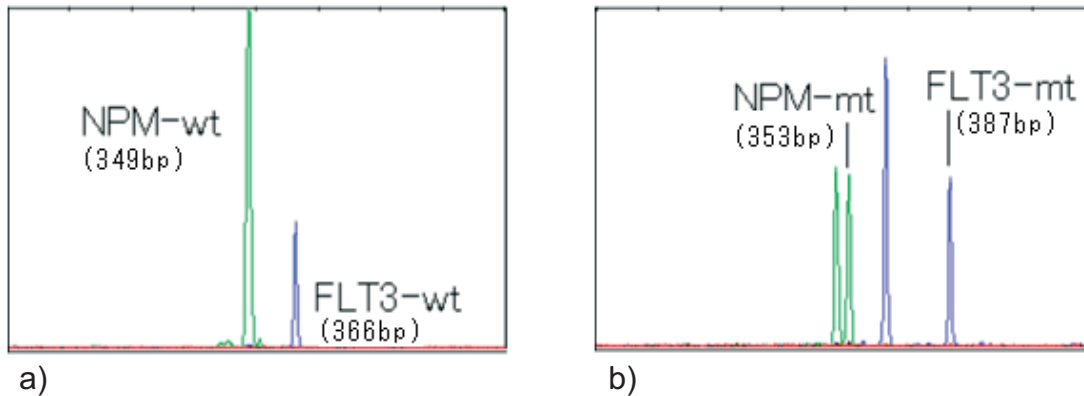


図3. NPMとFLT3遺伝子変異の同時検出の結果
 a) NPM変異陰性、FLT3変異陰性例 b) NPM変異陽性、FLT3変異陽性例

Buffer ALTを180 μ l添加し混合後、Proteinase Kを20 μ l加え、振とう器付きのヒートブロックで56℃一晩インキュベートした。その後は上記のキットのプロトコルに従ってDNAを抽出した。

5. 感度の検討

測定限界の検討は、NPM1遺伝子変異陽性の検体 (genomic DNA 10ng/ μ l) を変異陰性の検体 (genomic DNA 10ng/ μ l) で希釈して行った。変異陽性検体にはNPM1変異陽性白血病細胞90%以上のものを用いた。

結 果

1. PCR-Gene Scan法

NPMとFLT3-ITD遺伝子変異の同時検出の結果を図3に示す。349bpの位置にVICで標識されたNPM-wt (NPM正常型) のグリーンのピークが、366bpの位置にFAMで標識されたFLT3-wt (FLT3正常型) のブルーのピークが確認できる。変異例では、NPMは正常のピークから4 bp離れたところに変異のピークがみられ、FLT3は症例によって位置が異なるが正常ピーク以外に異常ピークが確認できる。

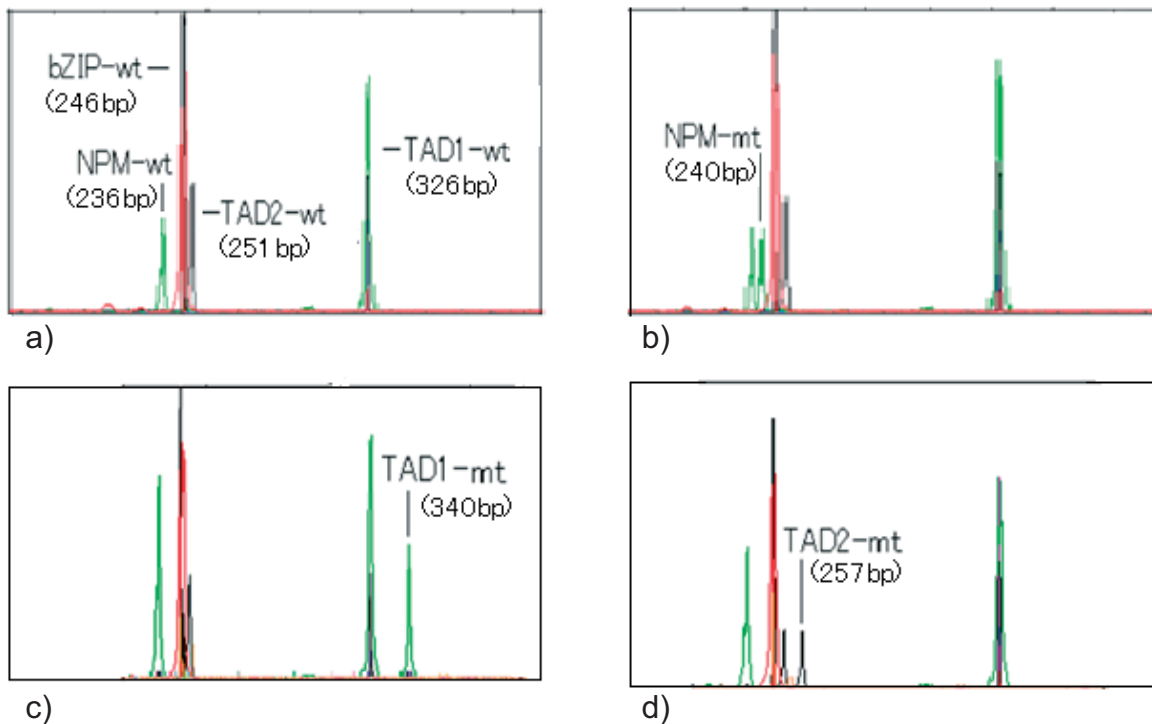


図4. NPMとCEBPA(TAD1、TAD2、bZIP)遺伝子変異の同時検出の結果
 a) NPM陰性、TAD1陰性、TAD2陰性、bZIP陰性例 b) NPM陽性、TAD1陰性、TAD2陰性、bZIP陰性例
 c) NPM陽性、TAD1陽性、TAD2陰性、bZIP陰性例 d) NPM陽性、TAD1陽性、TAD2陽性、bZIP陰性例

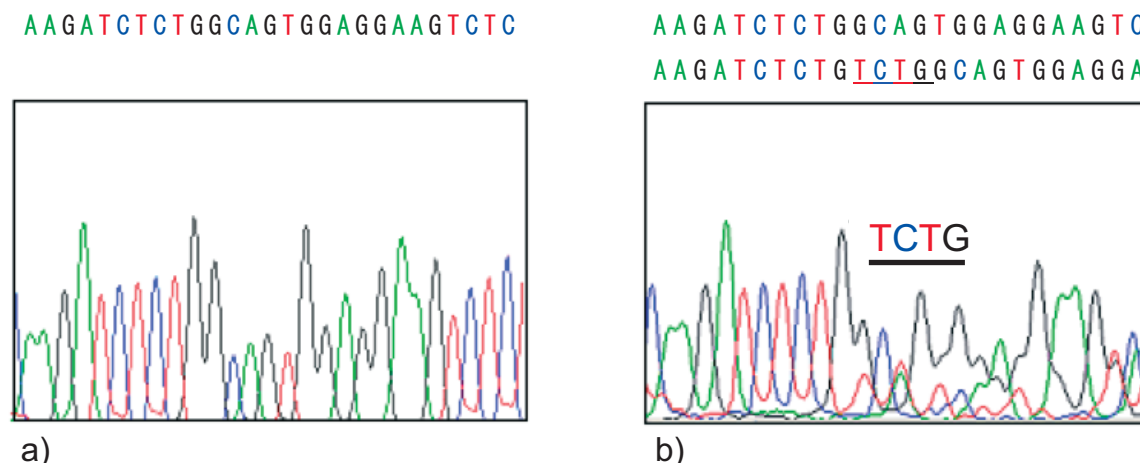


図5. NPMの塩基配列決定結果

a) 正常例の塩基配列 b) type Aの塩基配列（4塩基挿入部分を下線で示す）

NPMとCEBPA（TAD1、TAD2、bZIP）遺伝子変異の同時検出の結果を図4に示す。236bpの位置にVICで標識されたNPM-wtの緑色のピークが、246bpの位置にPETで標識されたbZIP-wt（bZIP正常型）の赤色のピークが、251bpの位置にNEDで標識されたTAD2-wt（TAD2正常型）の黒色のピークが、326bpの位置にVICで標識されたTAD1-wt（TAD1正常型）の緑色のピークが確認できる。変異例では、NPMは正常ピークから4bp離れたところに異常ピークがみられた。CEBPAは症例によって異なるが、変異例では正常ピーク以外にもう1つのピークが見られた。

本研究では49例中、NPM変異陽性が10例（20.4%）、FLT3変異陽性が7例（14.3%）、CEBPAのTAD1変異陽性が1例（2.0%）、TAD2変異陽性が15例（30.6%）、bZIP変異陽性は検出されなかった。TAD2変異陽性の15例中、6bpの塩基の挿入が14例、3bpの塩基の挿入が1例であった。また、AML以外の血液疾患32例ではNPM、FLT3、CEBPAのTAD1およびbZIP変異陽性は検出されなかった。TAD2変異陽性は4例（12.5%）であったが、全て6bpの塩基の挿入のポリモルフィズムであった。健常人21例では、NPM、FLT3、CEBPAのTAD1およびbZIP変異陽性は検出されなかったが、TAD2変異陽性が8例（38.1%）であった。この8例のTAD2変異陽性例も全て6bpの塩基の挿入のポリモルフィズムであった。

2. NPMの塩基配列決定

NPM-wtとNPM変異陽性例でもっとも多く認められるtype A¹⁷⁾の塩基配列を図5に示す。陰性例に比べ、type Aでは960番目の塩基部分にTCTGの4

塩基の挿入があり¹⁸⁾、960番目以降の塩基配列にフレームシフトが生じていることが確認できる。

NPM陽性例10例中type Aが6例、type Bが1例、type Dが1例、type Gが1例、NPM-wtと同じ配列でタイプが判別できなかったものが1例あった。これまでの報告通り、type Aが多くの割合を占めていることが確認できた¹⁹⁾。

3. 塗抹標本からの検出

塗抹標本からのDNA抽出は、キットのプロトコルに従って行ったところ、収量が1～5ng/μl程度と少なく解析が困難であった。最終ステップでBuffer ALTの添加量を200μlから50μlに減らしたところ、DNAの収量が3～4倍に増加し、NPMとCEBPA遺伝子変異の同時検出が可能であった。なお、Buffer ALTの添加量を減らした以外、その他の過程では通常の添加量通りの手順で行った。

4. 感度の検討

感度の検討結果を図6に示す。白血病細胞の比率が低下するに従って、陽性ピークが低下し、12%では異常ピークとして識別できるが、6%では周囲のノイズと比較して完全には識別できない。本法によるNPM1遺伝子変異の検出限界は変異陽性白血病細胞が10%程度であると思われる。

考 察

本研究では、蛍光標識プライマーを用いたPCR-Gene Scan法によって、NPM遺伝子変異の4bpの差を鋭敏に検出することができた。また、プライマーを異なる蛍光色素で標識し、異なる大きさのPCR産物ができるように設計した結果、NPMとFLT3遺伝子変異の同時検出およびNPMとCEBPA遺伝子変

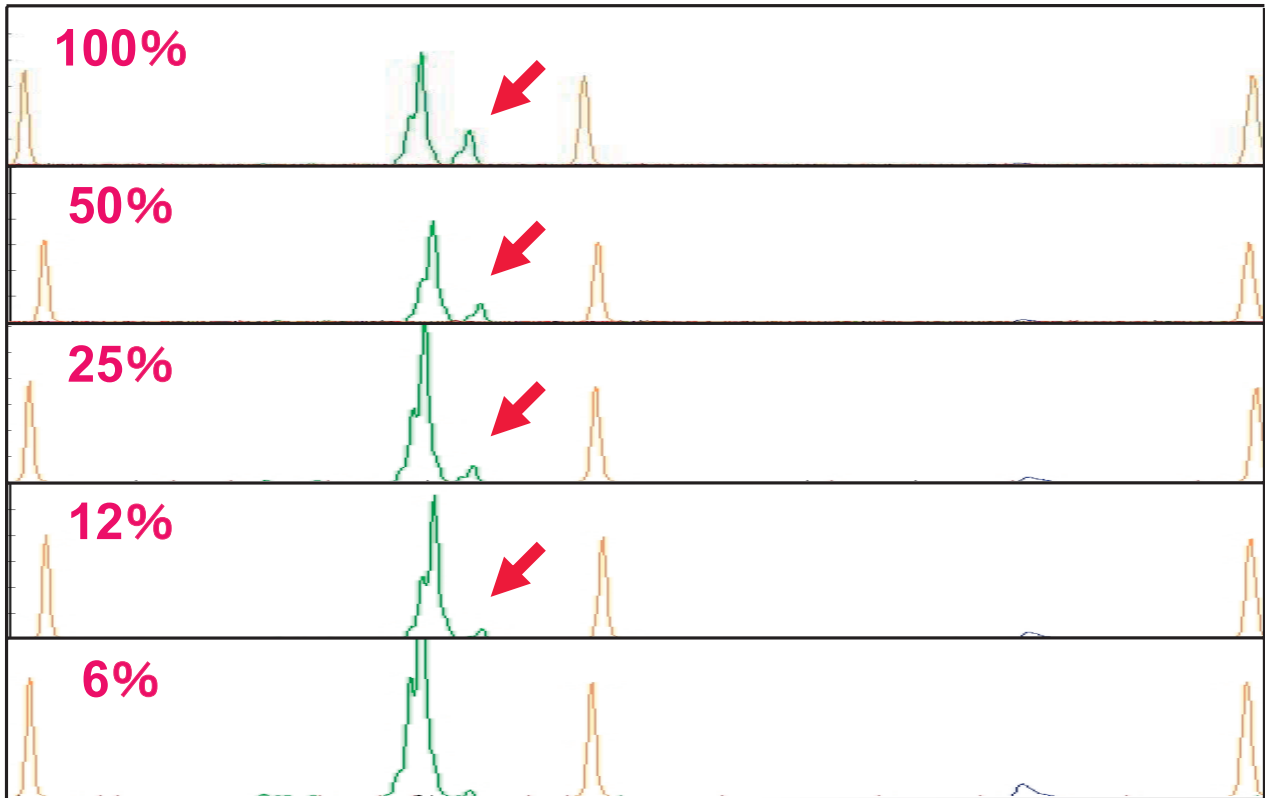


図6. 感度の検討結果
数字は変異検体の割合を表す。異常ピークを矢印で示す。

異の同時検出にも成功した。従来のゲル電気泳動では4bpの違いの検出、複数の遺伝子変異の同時検出が困難だったことに比べ、本研究で用いた方法を使えばより効率良く検出できるものと考えられる。他の検査法としては、直接塩基配列決定法があるが、PCR-Gene Scan法に比べて手技が煩雑で長時間を要する。したがって、NPMの変異のタイプを調べたごとく、PCR-Gene Scan法で陽性だったものだけに塩基配列決定法を行うことによって、手間を省き迅速かつ簡便に検査を行うことができる。また、液体クロマトグラフィーを用いるdenaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC法)による検査法も報告されている²⁰⁾。D-HPLC法での感度はわれわれの方法とほぼ同程度で5~10%の異常クローンが必要といわれており、この方法では複数の遺伝子変異を同時に検出することはできない。

NPM遺伝子変異は成人AMLの35%程度に認められ、特に正常核型の約50%に存在し、年齢別では小児より高齢者に多いことが明らかになっている⁸⁾。また、FLT3変異は加齢と共にその頻度が増加する傾向がみられ、成人AMLの20%に認められる。55歳以上の症例に限れば34%もの症例にみられ、一方小児AMLでは約10%にしかみられないことが明らか

になっている^{5,11)}。一方、本研究ではNPM陽性率とFLT3陽性率は、これまでの報告より低い結果が出たが、これは小児の症例や染色体異常を有する症例も含まれている可能性があるためであり、患者背景が異なることが一因と考えられる。

また、NPMに関してPCR-Gene Scan法と塩基配列決定法で結果が一致しない例があったことから、クローニング法を含む更なる解析が必要な症例があることが考えられる。しかしながら、直接またはクローニング法による塩基配列決定法の測定には20%程度の異常クローンが必要とされており、白血病細胞の比率の少ない場合には、塩基配列決定法で偽陰性になる可能性も考えられる²¹⁾。本法の有用性を明らかにし実用に耐えうる検査法として確立するためには、さらに症例を増やし全例において関連部位の塩基配列決定を行うなど、他の方法との比較検討を行う必要があり、今後の課題として検討中である。

TAD2変異陽性については6bpの塩基の挿入はポリモルフィズムであるとの報告があり²²⁾、今回の検討では、TAD2変異陽性の15例中ポリモルフィズムが14例、ポリモルフィズムではない3bpの塩基の挿入が1例であったため、臨床的に意義のあるTAD2変異陽性は49例中1例(2.0%)であった。過

去の報告によると、TAD1陽性率は10%、ポリモルフィズムではないTAD2陽性率は2%、bZIP陽性率は9%程度である^{16,23)}。本研究では過去の報告より陽性率が少なくなったが、更にAMLの症例数を増やして検討することが今後の課題である。

本研究ではcDNAとgenomic DNAの二種類を用いているが、NPMの変異のタイプを調べるために塩基配列決定法を行う際にgenomic DNAを用いると、イントロンに塩基Tの連続が存在する。一般的に塩基配列決定法を行う際、連続塩基や繰り返し配列は塩基配列決定が困難であると言われており、実際に塩基配列決定法を試みたが成功しなかった。このことから、NPMのタイプの解析にはcDNAを用いる方が有利と考えられた。また、FLT3-ITD遺伝子変異はエクソン14と15に渡って認められるため、cDNAを用いた解析を行うのが一般的である¹⁰⁾。

これらの遺伝子変異と臨床的特徴や予後との関係は、治療法や検査成績を含む患者情報が必要であり、本研究の検査法を検証する目的とは異なるため検討していない。この点については、一様な治療法を受けた患者において更に症例数を増やし検討する必要がある。

Genomic DNAを用いるNPMとCEBPA遺伝子変異の同時検出は、塗抹標本からDNAを抽出して行うことができるため、新鮮細胞が得られない場合であっても保存されている血液または骨髄標本を用いて行うことが可能である。FLT3遺伝子変異においても、genomic DNAを用いて検査することはプライマーを工夫すれば可能である。これらの方法は、染色されて保存されている標本を用いて行うことも可能であり、臨床的な有用性が高いと思われる。

本研究で用いたPCR-Gene Scan法では白血病細胞の割合が10%以上なければ検出できないことから、芽球比率の少ない骨髄異形成症候群の患者における検査には注意を要する。また、急性前骨髄性白血病などに認められるPML/RAR α 遺伝子変異などのキメラ遺伝子を形成する遺伝子変異の検査と異なって、微小残存病変 (minimal residual disease) の検出には利用できないものと考えられる。

以上の結果より、本研究で検証した蛍光標識プライマーを用いたPCR-Gene Scan法は、検体採取から1日程度で検査結果を報告でき、臨床検査法として病院検査部の業務として採用できる可能性が考えられた。

文 献

- 1) Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, et al: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 109: 431-448, 2007
- 2) Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, et al: CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22: 624-633, 2004
- 3) Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358: 1909-1918, 2008
- 4) Thiede C, Creutzig E, Illmer T, et al: Rapid and sensitive typing of NPM1 mutations using LNA-mediated PCR clamping. *Leukemia* 20: 1897-1899, 2006
- 5) 清井仁: 遺伝子変異による正常核型急性骨髄性白血病の層別化, 血液・腫瘍科 58, 1-7, 2009
- 6) Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, et al: Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-390, 1989
- 7) Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al: Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 493-505, 2006
- 8) Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al: Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107: 4011-4020, 2006
- 9) McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al: Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95: 3489-3497, 2000
- 10) Stirewalt DL, Radich JP: The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3: 650-665, 2003
- 11) 清井仁: FLT3分子を標的とした白血病治療の可能性, 臨床血液 46: 187-189, 2005
- 12) Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, et al: CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18: 4301-4314, 1998
- 13) Tenen DG: Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3: 89-101, 2003
- 14) Fröhling S, Schlenk RF, Krauter J, et al: Acute myeloid leukemia with deletion 9q within a noncomplex karyotype is associated with CEBPA loss-of-function mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 427-432, 2005
- 15) Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, et al: Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19: 1479-1482, 2005

- 16) Lin LI, Lin TC, Chou WC, et al: A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias. *Leukemia* 20: 1899-1903, 2006
- 17) Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746, 2005
- 18) Becker H, Marcucci G, Maharry K, et al: Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene-and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 28: 596-604, 2010
- 19) Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352: 254-266, 2005
- 20) Roti G, Rosati R, Bonasso R, et al: Denaturing high-performance liquid chromatography: a valid approach for identifying NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn* 8: 254-259, 2006
- 21) Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al: Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102: 276-283, 2003
- 22) Biggio V, Renneville A, Nibourel O, et al: Recurrent in-frame insertion in C/EBPalpha TAD2 region is a polymorphism without prognostic value in AML. *Leukemia* 22: 655-657, 2008
- 23) Lin LI, Chen CY, Lin DT, et al: Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res* 11: 1372-1379, 2005

Attempt of simultaneous detection of NPM, FLT3 and CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia

Yumie Fujishima, Shigeki Ohtake*, Ken-ichi Takemoto**

Abstract

[Aim] Nucleophosmin (NPM), internal tandem duplications in the *fms*-related tyrosine kinase 3 (FLT3-ITD) and CCAAT/enhancer-binding protein- α (CEBPA) gene mutations have recently attracted considerable attention in acute myeloid leukemia (AML) with normal karyotype. We investigated the method that can easily and simultaneously detect these aberrations.

[Method] Genomic DNA specimens were collected from not only fresh bone marrow or peripheral blood cells but also smears of these samples. We also extracted and synthesized cDNA from these fresh cells. In all samples, presence of NPM, FLT3 and CEBPA gene mutations were examined by multiplex PCR assay using several colored fluorescence labeled primers, followed by capillary electrophoresis using ABI Prism 310 Genetic Analyzer. In order to easily discriminate gene mutations, we used primers that could amplify PCR products of different size. Abnormal profiles of NPM were confirmed by direct sequencing.

[Result] Ten (20%) NPM and 7 (14%) FLT3-ITD mutations were detected in 49 AML patients. One (2.0%) TAD 1, 15 (30.6%) TAD 2 and none bZIP mutations of CEBPA could be detected in these patients. In analysis of sensitivity, leukemic cells had to be present more than 10% in original sample.

This PCR-Gene Scan method is easily and rapidly performed. We suggest that these assays may be introduced in routine analysis of genetic alterations in AML in hospital laboratory after closer examination of accuracy. More samples from uniformly treated patients should be collected to analyze the relationship between these aberrations and the prognosis of them.