

**IDENTIFICATION OF *NPM1* MUTATION AND
ITS PROGNOSTIC IMPACT IN THAI ADULT
ACUTE MYELOID LEUKEMIA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* และความสำคัญในการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยไทยที่เป็น
มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน

(IDENTIFICATION OF *NPM1* MUTATIONS AND ITS PROGNOSTIC IMPACT
IN THAI ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA)

เจษฎา บุญธิมาศ 4737629 SIIM/M

วท.ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จิรายุ เอื้อวรากุล, พ.บ., Ph.D., ชรินทร์ ลิ่มวงศ์, พ.บ.,

วรรณาทองนพคุณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีน Nucleophosmin (NPM) ซึ่งถอดรหัสพันธุกรรมมาจากยีน *NPM1* เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีฟอสฟอรัสเป็น ส่วนประกอบและสามารถพบได้จำนวนมากภายในส่วนนิวเคลียสของเซลล์ และมีการเคลื่อนที่ไปมาระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โปรตีนชนิดนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและโปรแกรมการตายของเซลล์ การกลายพันธุ์ของยีนนี้ที่ exon 12 ได้มีการค้นพบในผู้ป่วย มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลันที่มีโครโมโซมปกติ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุบัติการณ์และชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* และหาความสัมพันธ์ของยีน *NPM1* กับลักษณะต่างๆ ได้แก่ ชนิดย่อยของโรค ลักษณะโครโมโซม ลักษณะทางโพลซัยโตเมทรี และลักษณะทางคลินิกอื่น ๆ ของผู้ป่วยไทยที่เป็น มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน โดยได้ทำการศึกษาความผิดปกติของยีน *NPM1* exon12 ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว มัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน 400 คน ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยตชนิดเฉียบพลัน 30 คน และผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิด เรื้อรัง 30 คน โดยทำการแยกเซลล์นิวเคลียสเดี่ยวจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเซลล์ไขกระดูกหรือเลือดจากการตรวจวินิจฉัยโรคแรกเริ่มเพื่อนำมา วิเคราะห์ชนิดย่อยของโรค ลักษณะโครโมโซม ลักษณะทางโพลซัยโตเมทรี และลักษณะทางคลินิกอื่น ๆ โดยพัฒนาการตรวจการกลาย พันธุ์ของยีนใช้เทคนิค denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) และ Single Stranded Conformational polymorphism (SSCP) ตามด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing)

พบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยตชนิดเฉียบพลันและมัยอีลอยด์ชนิดเรื้อรัง แต่มีการกลาย พันธุ์ 13 แบบในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน 105 คน จาก 400 คน (ร้อยละ 26.2) มีการกลายพันธุ์แบบใหม่ 8 แบบ และการกลายพันธุ์ที่พบเดิมแล้ว 5 แบบ การกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ การเพิ่มขึ้นของคู่เบส 4 ตัว "TCTG" ที่ตำแหน่ง 960 โดยพบใน ผู้ป่วย 81 คน จาก 400 คน (ร้อยละ 20.3) และพบมากในกลุ่มย่อย AML-M2 และ AML-M3 การกลายพันธุ์ของยีนพบมากในผู้ป่วยที่มี โครโมโซมปกติโดยพบมากถึง 90 รายจาก 105 ราย (ร้อยละ 85.7) มีผู้ป่วยเพียง 5 รายที่พบความผิดปกติของโครโมโซมได้แก่ del(9), inv(9), del(10), inv(10), และ t(15;17)(q22;q12) อย่างละราย ลักษณะทางคลินิกที่พบว่าสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีนได้แก่ การกระจาย ตัวของชนิดย่อยของโรค (พบชนิด M1 ถึง M6) ความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น ค่าเม็ดเลือดขาวและค่าเกร็ดเลือดที่สูง และการไม่แสดงออก ของแอนติเจน CD34 นอกจากนี้ยังพบว่าสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* ชนิด ITD เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* (ร้อยละ 56.8 ต่อร้อยละ 25.6) อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติในการ พยากรณ์โรคและอัตราการรอดชีวิต ระหว่างกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* และกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ซึ่งผู้ป่วยเกือบทั้งหมดมี โครโมโซมปกติ การพยากรณ์โรคที่ดีพบในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* เพียงอย่างเดียว เมื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* ชนิด ITD ร่วมด้วย

โดยสรุปการศึกษาและการพัฒนาเทคนิค DHPLC เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* ในการวิจัยนี้นับเป็นครั้งแรกใน ประเทศไทยและพบว่าอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* สูงสุดเท่าที่เคยมีการศึกษาในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอี ลอยด์ชนิดเฉียบพลันที่มีโครโมโซมปกติ การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *NPM1* น่าจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัย คัดแยกพยากรณ์โรค ผู้ป่วย และนำไปสู่การรักษาที่จำเพาะและมุ่งเป้าต่อยีนที่ผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีโครโมโซมปกติ การวิจัยในอนาคตควรมุ่ง ไปที่การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *NPM1* กับตัวชี้วัดทางพันธุกรรมอื่นๆในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน

118 หน้า .

IDENTIFICATION OF *NPM1* MUTATIONS AND ITS PROGNOSTIC IMPACT IN THAI ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA

CHETSADA BOONTHIMAT 4737629 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS : CHIRAYU U AUEWARAKUL, M.D., Ph.D., Dip Amer Brd Int Med, CHANIN LIMWONGSE, M.D., Dip Amer Brd Int Med, Dip Amer Brd Med Genet, WANNA THONGNOPPAKHUN, Ph.D.

ABSTRACT

Nucleophosmin (*NPM1*) encoded from the *NPM1* gene is a ubiquitously expressed nucleolar phosphoprotein which shuttles continuously between the nucleus and cytoplasm. NPM protein plays an important role in cell proliferation and apoptosis. *NPM1* gene mutations at exon 12 represent the hallmark of a large subgroup of AML patients with a normal karyotype worldwide.

This study aimed to determine the frequency and type of *NPM1* mutations in Thai AML patients and to explore if *NPM1* mutation preferentially affects a specific subtype of AML associated with a distinct karyotype, immunophenotype and clinical outcome. *NPM1* mutation at exon 12 was investigated in 400 AML patients, 30 ALL patients, and 30 CML patients. Mononuclear cells were isolated from bone marrow or peripheral blood aspirates at the time of initial diagnosis for immunophenotyping, cytogenetic and molecular analysis. Mutation detection techniques were developed using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) and single stranded conformational polymorphism (SSCP) as mutation screening, followed by sequencing analysis.

NPM1 mutation was not detectable in ALL or CML. Thirteen variants of *NPM1* mutation were detected in 105 (26.2%) of 400 AML patients by DHPLC, including eight novel and five known variants. The most common mutation was TCTG 4 bp insertion at position 960 detected in 81 of 400 cases (20.3%) and was found frequently in M2 and M3 subtypes. *NPM1* mutations were predominantly found in patients with a normal karyotype with the incidence as high as 90 of 105 patients (85.7%). Only 5 out of 105 *NPM1*-mutated cases had an abnormal karyotype: del(9), inv(9), del(10), inv(10), and t(15;17)(q22;q12). Clinical parameters including a wide spectrum of morphologic subtypes of AML (M1-M6), older ages, high WBC and Plt counts, and CD34-negativity were significantly associated with *NPM1* mutation. Moreover, a higher frequency of *FLT3*-ITD mutation in *NPM1* mutation compared to *NPM1* wild-type (56.8% versus 25.6%) was also significant ($p < 0.001$). Although AML patients with a normal karyotype were categorized as an intermediate risk group of the disease, there was no significant difference in survival rate between *NPM1* wild-type and mutant patients who carried a normal karyotype. The better impact of survival also emerged in patients with *NPM1* mutation without *FLT3*-ITD when the data of the two genes was combined.

In conclusion, screening DHPLC-based assay was developed for the first time in Thailand to detect *NPM1* mutations. *NPM1* mutations represent the most frequent molecular events that have ever been identified in Thai AML patients with a normal karyotype. Characterization of *NPM1* mutations should improve the diagnosis and risk stratification of AML patients, especially in patients with a normal karyotype, as well as lead to specific gene-targeted therapy. Further studies are ongoing to determine the relationship of *NPM1* mutations to other genetic markers in Thai AML patients.

KEY WORDS : NUCLEOPHOSMIN (NPM) / *NPM1* GENE / *NPM1* MUTATIONS / ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML)

118 pp.