

정상 핵형을 가진 급성골수성백혈병의 예후적 인자로서 *FLT3* Internal Tandem Duplication의 유용성

인제대학교 의과대학 부산백병원 ¹진단검사의학교실, ²내과학교실, ³백인제기념임상의학연구소
이자영¹ · 주영돈² · 오승환¹ · 신정환^{1,3} · 김혜란¹ · 이상민² · 이정녀^{1,3}

Prognostic Significance of *FLT3* Internal Tandem Duplication in Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype

Ja Young Lee, M.D.¹, Young Don Joo, M.D.², Seung Hwan Oh, M.D.¹, Jeong Hwan Shin, M.D.^{1,3}, Hye Ran Kim, M.D.¹, Sang Min Lee, M.D.² and Jeong Nyeo Lee, M.D.^{1,3}

Departments of ¹Laboratory Medicine and ²Internal Medicine, ³Paik Institute for Clinical Research
Busan Paik Hospital, Inje University College of Medicine, Busan, Korea

Background: Activating mutations of the *fms*-like tyrosine kinase 3 gene (*FLT3*) by internal tandem duplication (ITD) in the juxtamembrane region are found in 20~30% of the adults with acute myeloid leukemia (AML). The allelic ratio of *FLT3*/ITD (ITD-AR), as assessed by Genescan analysis, has been reported to carry prognostic significance in AML patients who have normal karyotype.

Methods: *FLT3*/ITD was studied by PCR in 113 adults with AML including 55 patients with normal karyotype. Genescan analysis was performed for the PCR products to determine the allelic distribution. The results were correlated with the prognostic factors.

Results: *FLT3*/ITD was found in 23% of the total AML patients and in 32.7% of those patients with normal karyotype. The mutation was related to a high WBC count, a high serum LD level and a low percentage of CD34 positive cells. The ITD-AR ranged from 0.05 to 8.27 (median, 0.61). The patients with a high ITD-AR (≥ 0.7) had significantly higher WBC count and LD level than those without *FLT3*/ITD. On multivariate analysis, a high ITD-AR as well as *FLT3*/ITD were confirmed to be independent adverse prognostic factors for AML patients with normal karyotype.

Conclusion: This study demonstrated that a high ITD-AR and *FLT3*/ITD had major adverse impacts on the prognostic relevance for AML patients with normal karyotype. (*Korean J Hematol* 2009;44:74-81.)

Key Words: Acute myeloid leukemia, Normal karyotype, *FLT3* internal tandem duplication

접수 : 2009년 2월 26일, 수정 : 2009년 6월 1일
승인 : 2009년 6월 5일
교신저자 : 이정녀, 부산시 부산진구 개금동 633-165
☎ 614-735, 인제대학교 의과대학 부산백병원 진단
검사의학교실
Tel: 051-890-6862, Fax: 051-893-1562
E-mail: jeong418@medimail.co.kr

Correspondence to : Jeong Nyeo Lee, M.D., Ph.D.
Department of Laboratory Medicine, Inje University College of
Medicine, Busan Paik Hospital
633-165, Gaegum-dong, Busanjin-gu, Busan 614-735, Korea
Tel: +82-51-890-6862, Fax: +82-51-893-1562
E-mail: jeong418@medimail.co.kr

본 연구는 2007년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의
한 것임.

서 론

fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)는 stem cell tyrosine kinase-1 (STK-1) 혹은 fetal liver tyrosine kinase-2 (FLK-2)로 알려져 있으며, KIT, FMS, 혈소판유래성장인자 (platelet-derived growth factor, PDGF) 수용체와 함께 class III tyrosine kinase 수용체에 속한다.¹⁾ *FLT3* tyrosine kinase 수용체 영역은 *FLT3* 리간드와 결합하여 이량체 형성 과정을 통해 활성화되며 주로 조혈모세포에서 발견되어 이들 세포의 증식, 분화와 생존에 관여한다.²⁾ 급성골수성백혈병(Acute myeloid leukemia, AML)세포에서 *FLT3*는 변종의 *FLT3* 리간드가 발현되거나 혹은 *FLT3* 유전자 자체의 gain-of-function 변이에 의해 *FLT3* 신호체계에 변화가 생겨 AML 세포의 분화 및 생존을 강화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³⁾ *FLT3* 유전자는 13번 염색체의 장완(q12)에 위치하며 24개의 엑손으로 구성되어 있다.^{4,5)} AML에서 흔히 나타나는 *FLT3* 유전자 변이로는 internal tandem duplication (ITD)와 tyrosine kinase 영역 (TKD)의 D835 돌연변이, 두 가지 형태가 알려져 있다.

*FLT3/ITD*는 막결 영역의 엑손 14와 15사이에서 주로 나타나는데 그 크기나 위치는 다양한 것으로 알려져 있으며 성인 AML 환자에서 20~30% 빈도로 나타난다.⁶⁾ *FLT3/ITD*는 리간드에 독립적인 수용체 이량화 및 TKD의 지속적인 인산화를 유발하여 RAS, mitogen-activated protein kinase (MAPK), signal transducer & activator of transcription 5 (STAT5) 등의 신호체계가 활성화되어 세포의 자율적인 증식으로 인해 AML 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)} *FLT3/ITD*는 백혈구 증가증 및 골수모세포율이 높은 것과 관련되어 있으며 t(8;21), inv(16)의 핵형을 가지는 AML 환자에서 빈도가 낮고, t(15;17)이나 정상 핵형을 가진 환자에서 빈도가 높은 것으로 알려져 있다.^{6,9)}

FLT3 TKD내 Asp835의 점 돌연변이는 성인 AML 환자의 7%에서 발견되며 *FLT3/ITD*처럼 수용체의 지속적인 활성화 및 관련 세포의 자율적인 증식으로 인해 백혈병 유발에 관여하는 것으로 보고 있다.^{10,11)} *FLT3/ITD*처럼 백혈구수나 골수모세포율과 관련되는 보고는 있으나 생존율에 영향을 미치는 예후적 의미는 명확하지 않다.^{10,11)}

*FLT3/ITD*는 대부분의 연구에서 성인 AML 환자의 치료 성적 및 생존율에 영향을 미치는 불량한 예후 인자로 보고되어 왔다.¹²⁻¹⁶⁾ 특히 *FLT3/ITD*는 정상 핵형

을 가진 AML 환자의 임상적 예후를 예측하는데 유용하다고 알려져 있다. 최근 유전자스캔 분석을 통해 산출된 *FLT3/ITD*의 대립 유전자 비율(ITD allelic ratio, ITD-AR)이 정상 핵형을 가진 AML 환자의 예후 분석에 있어 *FLT3/ITD*와 함께 유용한 예후인자로 보고되고 있다.^{9,17,18)}

저자는 정상 핵형을 가진 성인 AML환자를 대상으로 *FLT3/ITD*를 분석하여 그 빈도를 살펴보고 *FLT3/ITD* 유무에 따른 예후 인자들과의 관련성을 분석하여 예후적 의미를 알아보고자 하였다. 또한 유전자스캔 분석을 통해 *FLT3/ITD*의 야생형 대 변이형의 비를 산출하여 정상 핵형을 가진 AML 환자에서 *FLT3/ITD*와 함께 ITD-AR의 예후인자로서의 유용성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

2000년 1월부터 2007년 12월까지 형태와 면역 표현형에 따라 AML을 진단받고 경과 관찰한 환자들 중 골수검체가 보관 가능하였던 113명의 123검체를 대상으로 하였다. 환자는 남자 55명, 여자 58명이었으며 평균 연령은 51세(범위 20~85세)였다. FAB 분류에 따른 환자의 분포는 Table 1에 기술하였으며 염색체 핵형에 따라 t(15;17), t(8;21), inv(16)/t(16;16)의 핵형은 예후가 좋은 군으로, -7, del(11)(q23), t(3;3) 및 3개 이상의 복합 염색체 이상을 보이는 경우는 예후가 나쁜 군으로, 정상 핵형을 포함한 그 외의 핵형은 모두 중간 예후군으로 분류하였다.¹⁹⁾ 이 중 정상 핵형을 가진 AML 환자는 52명이었다(Table 2).

2. 연구방법

1) DNA 분리

진단 당시의 골수검체에서 Ficoll-Paque™ Plus (1.077 g/L; GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 사용하여 단핵세포를 분리한 다음 -70°C에서 냉동보관하였다. DNA 분리는 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 추출하였다.

2) *FLT3* 유전자의 중합효소연쇄반응

FLT3 유전자의 시발체는 Zwann 등¹⁸⁾의 방법에 따라 선택하였고, 5'-시발체에는 6-carboxy-fluorescein (FAM) 형광색소를 부착하였다. 시발체의 염기서열은 11F, 5'-6 FAM-GCA-ATTTAGGTATGAAAGCCAGC-

Table 1. Clinical characteristics of total AML patients including patients with *FLT3/ITD* and distribution of patients with *FLT3/ITD*

Characteristics	Total patients	<i>FLT3/ITD</i>
No. of cases	113	26
Age (yr, median)	20~85 (51)	20~80 (54)
Male : Female	55 : 58	13 : 13
FAB subgroup (de novo, N)		
M0	8	1
M1	32	8
M2	41	7
M3	21	6
M4e	5	2
M5	2	1
M6	0	0
M7	1	0
Unclassified*	2	1
Secondary AML	1	0

*Bone marrow aspiration is inadequate for FAB classification of AML because of dry tap.
Abbreviations: *FLT3/ITD*, *fms*-like tyrosine kinase internal tandem duplication; AML, acute myeloid leukemia.

3', 12R, 5'-CCTTCAGCATTGACGGCAACC-3'이다. PCR 반응물 조제 시 10×반응 완충액, 2.5 μM dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 2.5U Taq DNA polymerase (Promega), 시발체(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)를 각각 10pmol/μl 씩 넣고 DNA 주형 5 μl를 사용하여 최종 반응량은 50 μl가 되도록 하였다. PCR 반응 기기는 GeneAmp 9700 System (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)로 94°C에서 5분간 반응시키고 94°C에서 30초, 66°C에서 1분, 72°C에서 2분간 35회 실시한 다음 72°C, 10분 동안 연장반응시켰다. 2% 아가로오즈겔을 사용하여 PCR 산물 3 μl를 전기영동하여 증폭 여부를 확인하였다.

3) *FLT3/ITD*의 유전자스캔 분석

PCR 산물을 증류수로 100배 희석하고 1 μl를 취하여 10 μl의 formamide와 0.5 μl의 size standard에 희석시킨 후 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 유전자스캔을 시행하였다. 유전자스캔 결과는 GeneMapper Software ver. 3.7로 분석하여 야생형과 변이형의 bp 및 봉우리 높이를 확인하였다. 변이형 봉우리 높이를 야생형 봉우리 높이로 나누어 *ITD-AR*을 산출하였으며 변이형 봉우리가 2개 이상일 경우 변이형 봉우리 높이를 모두 더하여 야생형 봉우리 높이로 나누었다.

Table 2. Cytogenetic classification of total AML patients including patients with *FLT3/ITD* and distribution of patients with *FLT3/ITD*

Cytogenetic prognostic group	Total patients	<i>FLT3/ITD</i>	
		N	%
Favorable	32	6	18.8
t(8;21)	12	2	16.7
t(15;17)	16	3	18.8
inv(16)/t(16;16)	4	1	25.0
Intermediate*	71	20	28.8
Normal karyotype	52	17	32.7
Numerical aberration	11	3	27.3
Balanced structural rearrangement	2	0	0.0
Unbalanced structural rearrangement	6	0	0.0
Unfavorable	10	0	0.0
-7	5	0	0.0
Complex chromosomal abnormalities	2	0	0.0
Others [†]	3	0	0.0

*Numerical aberration, +8, +11, +21, -X, -Y; Balanced structural rearrangement, t(1;19), t(7;11); Unbalanced structural rearrangement, add(1p), del(9q), del(12q), del(15q), del(17q), der(14q). [†]Others are included in t(3;3), del(11)(q23).

3. 통계

전체 AML 환자를 대상으로 진단 당시 환자의 나이, 말초혈액 백혈구수, 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LD) 수치, 골수모세포율, CD34양성 세포수 등의 예후인자들을 조사하여 *FLT3/ITD* 유무 및 *ITD-AR*에 따른 예후인자들과의 연관성을 Mann-Whitney *U* test를 사용하여 분석하였다. 60세 미만 정상 핵형을 가진 환자들을 대상으로 Cox proportional hazard regression을 통해 예후인자들과 생존율간의 다변량 회귀 분석을 실시하였다. 무병 생존율(disease free survival)은 완전 관해를 진단받은 날부터 재발 혹은 사망까지의 기간을, 전체 생존율은 진단일로부터 어떠한 원인이든 사망까지의 기간으로 정의하였다. 통계분석은 MedCalc 9.0 소프트웨어(MedCalc, Mariakerke, Belgium)를 이용하였으며 *P*값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특징 및 *FLT3/ITD* 분석 결과

총 113명의 AML 환자 중 26명(23%)에서 *FLT3/ITD*

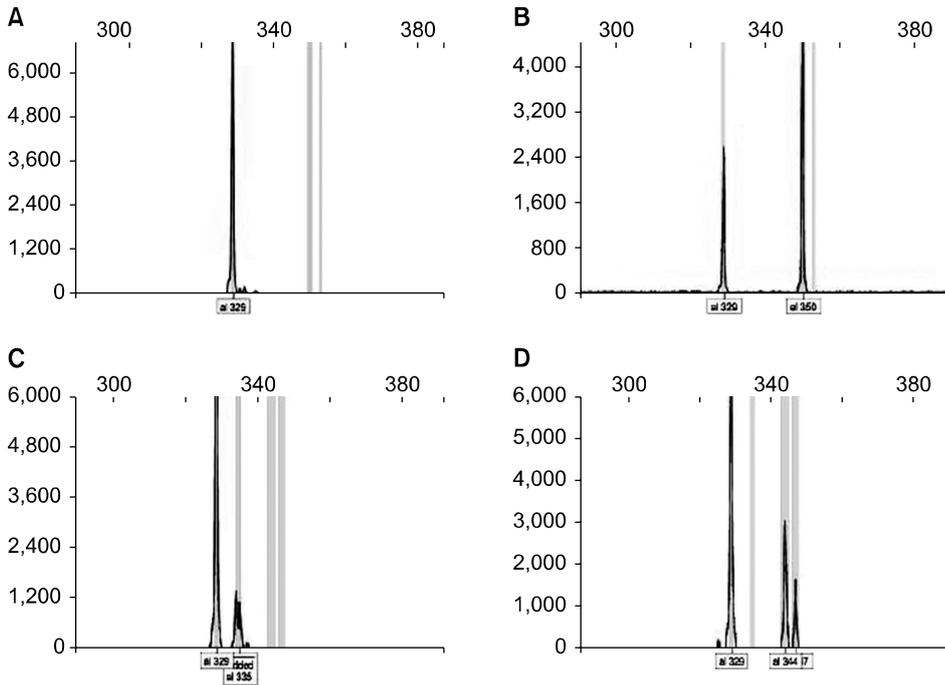


Fig. 1. Genescan analysis of *FLT3/ITD* levels in AML patients. (A) wild type of *FLT3* gene, (B~D) wild type and various size of ITD in *FLT3* gene. Abbreviations: *FLT3*, fms-like tyrosine kinase; ITD, internal tandem duplication; AML, acute myeloid leukemia.

가 검출되었으며 재발한 환자 검체 10개 중 2개에서 *FLT3/ITD*가 검출되었다. FAB 분류에 따른 AML 아형 별로 보면 M0 1명(12.5%), M1 8명(25%), M2 7명(17.1%), M3 6명(28.6%), M4e 2명(40%)이었고 M5 아형 2명 중 1명이 양성으로 검출되었다(Table 1).

염색체 이상에 따른 *FLT3/ITD* 분포를 보면 정상 핵형을 가진 52명 환자의 32.7% (17/52)에서 검출되었고, t(8;21)를 보이는 환자의 16.7% (2/12), t(15;17)를 보이는 환자의 18.8% (3/16), inv(16)/t(16;16)을 보이는 환자의 25.0% (1/4)에서 검출되었다(Table 2).

2. 대상 환자의 *FLT3/ITD* 유전자스캔 분석 결과

PCR 산물을 이용한 유전자스캔 분석에서 야생형 87예의 경우 329bp의 단일 봉우리가 관찰되었으며 변이형 26예는 329bp의 봉우리와 함께 335~439bp의 봉우리가 동시에 검출되었다(Fig. 1). 2명의 환자에서는 3개의 봉우리가 동시에 검출되었는데 329-344-347bp, 329-353-382bp였다. 야생형과 변이형의 봉우리 높이를 구하여 야생형 대 변이형 비인 ITD-AR을 산출하였는데 0.05~8.27 (중앙값, 0.61)의 값을 보였다. 10명의 재발 환자 중 2명에서 *FLT3/ITD*가 검출되었는데 처음 진단 당시 검출된 *FLT3/ITD*와 같은 위치에 봉우리가 관찰되었으며 처음 진단 당시 ITD-AR (각각 0.72, 1.44)보다 재발 시 측정된 ITD-AR (3.20, 1.72)이 증가된 값을 보였다(Table 3).

3. *FLT3/ITD* 및 ITD-AR과 예후인자의 연관성 분석

정상 핵형을 가진 52명의 환자 중 *FLT3/ITD* 양성군과 음성군 사이에 성별 및 진단 당시의 나이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 *FLT3/ITD* 양성군에서 *FLT3/ITD* 음성군에 비해 진단 당시 말초 혈액의 백혈구수 및 LD 수치가 유의하게 높았다. 또한 골수모세포율은 *FLT3/ITD* 유무에 따라 유의한 차이가 없었으나 CD34양성 세포수는 *FLT3/ITD* 양성군에서 유의하게 적게 나타났다(Table 4).

ITD-AR의 중앙값을 토대로 0.7미만인 *FLT3/ITD* 양성군과 0.7이상인 *FLT3/ITD* 양성군을 나눠 보았을 때 ITD-AR 0.7이상인 군에서 말초혈액 백혈구수 및 LD 수치가 높게 나타났으나 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 ITD-AR 0.7 미만인 *FLT3/ITD* 양성군과 *FLT3/ITD* 음성군은 예후인자들 중 말초혈액 백혈구수가 유의한 차이를 보였다. 또한 ITD-AR 0.7이상인 *FLT3/ITD* 양성군과 *FLT3/ITD* 음성군은 예후인자들 중 말초혈액 백혈구수 및 LD 수치에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 5).

4. 예후 인자들과 생존율의 다변량 회귀분석

60세 미만 정상 핵형을 가진 AML 환자를 대상으로 진단 당시 말초혈액 백혈구수, LD 수치, *FLT3/ITD*,

ITD-AR 등의 예후인자들과 생존율간의 다변량 회귀 분석을 실시한 결과 높은 ITD-AR (≥ 0.7)만이 전체 생

존율 및 무병 생존율에 있어 독립적 예후인자로 나타났다(Table 6).

Table 3. Genescan analysis in patients with *FLT3*/ITD

No.	Allele	<i>FLT3</i> /ITD ratio (mutant/wild)
1	329-393	0.06
2	329-335	0.10
3	329-386	0.18
4	329-402	0.19
5	329-384	0.21
6	329-353	0.31
7	329-379	0.38
8	329-382	0.43
9	329-350	0.50
10	329-376	0.54
11	329-373	0.60
12	329-356	0.60
13	329-350	0.61
14	329-439	0.61
15	329-384	0.70
16	329-411	0.72
17	329-382	0.72
18	329-370	0.72
19	329-390	0.72
20	329-373	0.74
21	329-344-347	0.78
22	329-344	0.83
23	329-353	0.89
24	329-382	1.12
25	329-350	1.44
26	329-353-382	8.27
27*	329-350	1.71
28*	329-382	3.20

*Results from the patients with *FLT3*/ITD in relapse of AML.

고찰

AML 환자에서 핵형은 중요한 예후 인자로 널리 이용되고 있는데 전통적인 염색체 검사를 통해 t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16)이 나타나는 경우 좋은 예후군에 속하고, -5, del(5q), -7, del(11)(q23) 등을 가질 경우 나쁜 예후군에 속한다.¹⁹⁾ 그러나 35~50%의 정상 핵형을 가지는 환자들은 중간 예후군에 속하며 분자학적으로 이질적인 집단이다. 이들 AML 환자에서 치료 성적 및 예후를 예측할 수 있는 특정 유전자 이상은 아직 명확하게 확립되어 있지 않은 상태이다.

FLT3/ITD는 AML 환자에서 가장 흔히 발견되는 유전자 이상으로 성인 AML 환자의 20~30%, 소아 AML 환자의 5~22%에서 검출되며 치료 성적 및 생존율에 영향을 미치는 불량한 예후인자로 알려져 있다.^{6,18)} FAB 아형에 따른 *FLT3*/ITD 검출률에 대한 연구를 살펴보면 M3와 M5에서 빈도가 높는데 M3보다 M3v에서, M5a보다 M5b에서 검출률이 높았다. 또한 M1, M2 및 M6에서는 비교적 검출률이 낮았고 M0 및 M7에서는 거의 검출되지 않았다.^{9,20)} *FLT3* 유전자변이가 M5 같은 단핵구 계열의 AML에서 검출률이 높은 것은 단핵구 분화시 *FLT3*가 지속적으로 발현되고, CD34양성 세포가 단핵구로 분화하는데 *FLT3*-L이 관여하기 때문으로 알려져 있다.²¹⁾ 본 연구에서는 M3 21명 중 6명, M5 2명 중 1명에서 *FLT3*/ITD가 검출되었는데 M3 6명 중 5명이 M3v 아형이었으며 *FLT3*/ITD가 검출된 M5

Table 4. Characteristics according to *FLT3*/ITD status in AML patients with normal karyotype

Characteristics	Total patients	<i>FLT3</i> /ITD positive	<i>FLT3</i> /ITD negative	P
No. of cases	52	17	35	
Male : Female	24 : 28	9 : 8	15 : 20	0.44
Age (yr, median)	55	60	54	0.36
Range	(20~80)	(20~80)	(22~79)	
WBC count ($\times 10^9/L$, median)	16.2	67.3	12.9	0.003
Range	(0.4~349.9)	(2.0~349.9)	(0.4~204.3)	
LD level (U/L, median)	1,039	1,780	706	0.003
Range	(305~5,401)	(388~5,401)	(305~3,179)	
Bone marrow blasts (% , median)	78.2	86.0	74.7	0.56
Range	(21.5~96.3)	(21.5~94.3)	(27.2~96.3)	
CD34+ cells (% , median)	44.5	20.1	84.6	0.005
Range	(0.03~99.4)	(0.03~68.1)	(0.06~99.4)	

Abbreviation: LD, lactate dehydrogenase.

Table 5. Comparison of characteristics of AML patients with high, low ITD-AR, or ITD wild type

Characteristics	ITD wild type	Low ITD-AR (<0.7)	High ITD-AR (≥0.7)	P		
				Wild vs low	Wild vs high	Low vs high
No. of cases	87	14	12			
Age (yr, median)	49	48	55	0.5	0.36	0.9
Range	(22~85)	(26~80)	(20~67)			
WBC count (×10 ⁹ /L, median)	10.3	38.6	93.9	0.01	<0.0001	0.07
Range	(0.2~204.3)	(4.0~195.2)	(2.0~349.9)			
LD level (U/L, median)	765	1,255	2,055	0.09	<0.0001	0.1
Range	(286~9,319)	(338~6,255)	(709~5,401)			
BM blasts (% , median)	71.1	84.7	81	0.46	0.74	0.86
Range	(0.6~96.6)	(34.6~94.3)	(2.7~91.9)			
BM CD34+ cells (% , median)	80.5	35.2	35	0.41	0.05	0.82
Range	(0.06~99.7)	(0.03~98.4)	(0.58~61.3)			

Abbreviation: ITD-AR, internal tandem duplication allelic ratio.

Table 6. Results of Cox regression analysis of survival in AML patients with normal karyotype

Variable	Overall survival			Disease free survival		
	Hazard ratio	95% CI	P	Hazard ratio	95% CI	P
<i>FLT3/ITD</i>	0.233	0.054~1.000	0.051	0.321	0.060~1.717	0.186
ITD-AR (≥0.7)	3.012	1.274~7.119	0.012	3.505	1.049~11.706	0.042

Abbreviation: CI, confidence interval.

환자도 M5b 아형으로 기존의 연구결과와 일치하는 소견을 보였다. 그러나 M4e의 경우 5명 중에서 2명이 검출되어 기존 연구의 10~20%보다 높은 빈도를 보였는데 환자수가 적어 결과 해석에 한계가 있었다.^{14,20,22)}

염색체 이상에 따른 *FLT3/ITD* 양성 빈도는 정상 핵형을 가진 환자들에서 32.7%로 가장 높은 검출률을 보였다. 전체 AML 환자를 대상으로 하였을 때 예후가 좋은 군에서 18.7%였고 예후가 나쁜 군에서는 검출되지 않았다. t(15;17)의 경우 16명의 환자 중 3명에서 검출되어 기존 연구에서 보고한 20~30%보다 검출률이 18.8%로 낮게 나타났다.^{14,20)} 이는 *FLT3/ITD* 양성인 M3 환자 중 3명이 염색체 검사 결과 정상 핵형으로 나타났기 때문으로 여겨지며 이 환자들은 *PML-RARα* 중합효소연쇄반응 및 FISH 검사에서 양성 소견을 보여 M3로 최종 진단되었다.

정상 핵형을 가진 AML 환자에서 *FLT3/ITD*는 치료 결과 및 생존을 예측에 있어 유용한 예후 인자로 알려져 있다. 기존 예후인자인 나이, 성별, 말초혈액 백혈구 수 및 LD 수치 등과의 연관성을 분석한 보고를 살펴보면 나이 및 성별과는 연관성이 낮았으나 *FLT3/ITD* 양성군에서 *FLT3/ITD* 음성군에 비해 말초혈액 백혈구 수 및 LD 수치가 유의하게 높게 나타났다.^{3,23,24)} 골수모세

포울의 경우 보고자마다 차이가 있어 Frohling 등²³⁾ 및 Thiede 등⁹⁾은 *FLT3/ITD* 유무에 따라 골수모세포울에 유의한 차이가 있다고 보고한 반면 김 등²⁴⁾은 차이가 없다고 하였다. 본 연구에서도 말초혈액 백혈구 수 및 LD 수치는 *FLT3/ITD* 유무에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$). 또한 골수모세포울은 *FLT3/ITD* 유무에 따라 유의한 차이를 보이지 않았으나($P=0.56$) CD34양성 세포수의 경우 *FLT3/ITD* 양성군에서 *FLT3/ITD* 음성군에 비해 CD34양성 세포수가 유의하게 적어 Mori 등²⁵⁾의 연구 결과와 유사한 결과를 보였다. 이는 M1, M2보다 M3, M4 및 M5 아형에서 *FLT3/ITD* 빈도가 높기 때문으로 생각된다.

Thiede 등⁹⁾은 유전자스캔 분석을 통해 *FLT3/ITD*의 대립유전자 비율을 정량적으로 산출하여 ITD-AR이 중앙값(0.78)보다 높은 *FLT3/ITD* 양성군이 *FLT3/ITD* 음성군보다 전체 생존율 및 무병 생존율이 유의하게 낮다고 보고하였다. 이후 소아 AML 환자를 대상으로 ITD-AR에 대한 연구들이 이루어져 Thiede 등⁹⁾의 결과를 뒷받침하였으며 European cooperative protocol, German AML-BFM SC 및 Dutch Childhood Oncology Group에서 ITD-AR 0.4를 소아 AML 환자의 예후 예측에 있어 임상적으로 유용한 역치값으로 정하였다.¹⁷⁾ 그러나 성

인 AML 환자의 경우 소아 AML 환자에서 보고된 ITD-AR (0.01~7.5)보다 넓은 범위(0.03~32.56)를 보여 역치값 설정에 있어 보다 많은 대상을 이용한 연구가 필요하겠다.¹⁷⁾

본 연구에서 *FLT3*/ITD 양성인 26명을 대상으로 산출한 ITD-AR의 중앙값을 토대로 ITD-AR 0.7 이상인 *FLT3*/ITD 양성군과 *FLT3*/ITD 음성군을 나눠 보았을 때 ITD-AR 0.7 이상인 *FLT3*/ITD 양성군이 *FLT3*/ITD 음성군에 비해 말초혈액 백혈구수 및 LD 수치가 유의하게 높은 값을 보여 높은 ITD-AR이 *FLT3*/ITD와 함께 정상 핵형을 가진 AML 환자의 유용한 예후인자임을 알 수 있었다. 또한 다변량 분석 결과 정상 핵형을 가진 60세 미만 AML 환자의 전체 생존율 및 무병 생존율에 있어 높은 ITD-AR이 독립적인 예후인자인 것으로 나타나 유전자스캔 분석을 통해 *FLT3*/ITD 대립유전자 비율을 측정하는 것은 정상 핵형을 가진 AML 환자의 예후를 예측하는데 유용한 방법으로 생각된다.

2명의 AML 환자에서는 처음 진단 및 재발 시 모두 *FLT3*/ITD가 검출되었는데 두 환자 모두 처음 진단 시 ITD-AR이 0.7보다 높았고 처음 진단 시보다 재발 시 측정된 ITD-AR이 증가되는 소견을 보여 정상 핵형을 가진 AML 환자의 재발 예측 및 미세잔존질환의 검출에 있어 *FLT3*/ITD 및 ITD-AR에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 *FLT3*/ITD는 정상 핵형을 가진 AML 환자에서 32.7%로 가장 많이 검출되었으며 기존 예후인자인 말초혈액의 백혈구수 및 LD 수치와 유의한 연관성을 보여 AML의 불량한 예후 인자임을 확인할 수 있었다. 또한 유전자스캔 분석을 통한 *FLT3*/ITD의 대립유전자 비율 측정이 *FLT3*/ITD와 함께 정상 핵형을 가진 AML 환자의 예후 예측 및 치료방향 결정에 유용한 방법으로 생각되었다.

요 약

배경: *fms*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)의 막결 영역 내에 발생하는 Internal tandem duplication (ITD) 변이는 성인 AML 환자의 20~30%에서 발견된다. 유전자스캔 분석을 통해 산출된 *FLT3*/ITD의 대립유전자 비율(ITD allelic ratio, ITD-AR)은 정상 핵형을 가진 AML 환자의 예후 분석에 있어 *FLT3*/ITD와 함께 유용한 예후인자로 보고되고 있다.

방법: 정상 핵형을 가진 52명을 포함한 113명의 AML 환자를 대상으로 중합효소연쇄반응을 실시하여

얻은 산물로 유전자스캔 분석을 시행하여 *FLT3*/ITD의 대립유전자 분포를 확인하고 ITD-AR을 산출하였다. 그 결과와 예후인자들을 비교하여 예후에 미치는 영향을 분석하였다.

결과: *FLT3*/ITD는 AML 환자 113명 중 23%, 정상 핵형을 가진 AML 환자 52명 중 32.7%에서 검출되었다. *FLT3*/ITD 양성군에서 진단 당시 백혈구수 및 LD 수치가 높았으며 CD34양성 세포수는 적게 나타났다. ITD-AR은 0.05~8.27의 값을 보였으며 ITD-AR이 0.7 이상으로 높은 *FLT3*/ITD 양성군에서 *FLT3*/ITD 음성군에 비해 백혈구수 및 LD 수치가 높았다. 다변량 분석을 통해 *FLT3*/ITD 뿐만 아니라 높은 ITD-AR도 정상 핵형을 가진 AML 환자의 불량한 예후 인자로 입증되었다.

결론: 본 연구를 통해 높은 ITD-AR은 정상 핵형을 가진 AML 환자에 있어 *FLT3*/ITD와 함께 불량한 예후 지표임을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Boissel N, Cayuela JM, Preudhomme C, et al. Prognostic significance of *FLT3* internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:1699-704.
- 2) 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* 2000;95:3489-97.
- 3) Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of *FLT3*: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001;61:7233-9.
- 4) Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, et al. Human *FLT3*/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993;82:1110-9.
- 5) Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:459-63.
- 6) Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of *FLT3* mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*

- 2003;44:905-13.
- 7) Fenski R, Flesch K, Serve S, et al. Constitutive activation of *FLT3* in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* 2000;108:322-30.
 - 8) Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated *FLT3* constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19:624-31.
 - 9) Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326-35.
 - 10) Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel *FLT3* Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113:983-8.
 - 11) Shih LY, Huang CF, Wu JH, et al. Heterogeneous patterns of *FLT3* Asp (835) mutations in relapsed de novo acute myeloid leukemia: a comparative analysis of 120 paired diagnostic and relapse bone marrow samples. *Clin Cancer Res* 2004;10:1326-32.
 - 12) Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. *FLT3* internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000;111:190-5.
 - 13) Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of *FLT3* and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3074-80.
 - 14) Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a *FLT3* internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752-9.
 - 15) Lee JN, Kim HR, Shin JH, Joo YD. Prevalence of *FLT3* internal tandem duplication in adult acute myelogenous leukemia. *Korean J Lab Med* 2007;27:237-43.
 - 16) Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *FLT3* gene. *Leukemia* 2000;14:675-83.
 - 17) Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, et al. Clinical implications of *FLT3* mutations in pediatric AML. *Blood* 2006;108:3654-61.
 - 18) Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, et al. *FLT3* internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003;102:2387-94.
 - 19) Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:169-77.
 - 20) Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of *FLT3* length mutations in 1,003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002;100:59-66.
 - 21) Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol* 2002;118:426-31.
 - 22) Colovic N, Tosic N, Aveic S, et al. Importance of early detection and follow-up of *FLT3* mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2007;86:741-7.
 - 23) Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, et al. Prognostic significance of activating *FLT3* mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002;100:4372-80.
 - 24) Kim S, Kim Y, Lee I, et al. *FLT3* Internal tandem duplication in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Korean J Hematol* 2007;42:250-7.
 - 25) Mori Y, Yoshimoto G, Kumano T, et al. Distinctive expression of myelomonocytic markers and down-regulation of CD34 in acute myelogenous leukaemia with *FLT3* tandem duplication and nucleophosmin mutation. *Eur J Haematol* 2007;79:17-24.