

## 급성골수성백혈병의 예후적 인자로서 *FLT3* 유전자 변이

장순희<sup>1</sup> · 이난영<sup>2</sup> · 김동환<sup>3</sup> · 손상균<sup>3</sup> · 서장수<sup>4</sup>

대구파티마병원 진단검사의학과<sup>1</sup>, 성윤검사센터 진단검사의학과<sup>2</sup>, 경북대학교 의과대학 혈액종양내과학교실<sup>3</sup>, 임상병리학교실<sup>4</sup>

### *FLT3* Gene Mutations as a Prognostic Factor for Acute Myeloid Leukemia

Soon Hee Chang, M.D.<sup>1</sup>, Nan Young Lee, M.D.<sup>2</sup>, Dong Hwan Kim, M.D.<sup>3</sup>, Sang Kyun Sohn, M.D.<sup>3</sup>, and Jang Soo Suh, M.D.<sup>4</sup>

Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Daegu Fatima Hospital, Daegu; Sungyoon Reference Laboratory<sup>2</sup>, Daegu; Departments of Hematology/Oncology<sup>3</sup> and Clinical Pathology<sup>4</sup>, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

**Background :** Two distinct types of *fms*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) gene mutations have been identified in acute myeloid leukemia (AML): D835 and internal tandem duplication (ITD) mutations. These mutations are known to cause the proliferation of leukemic cells and inhibit the apoptosis of leukemic cells due to ligand-independent activation of their receptors. Therefore, the current study attempted to investigate the frequency of *FLT3* gene mutations and their prognostic implications for AML in terms of treatment response, survival, and relapse.

**Methods :** Polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect D835 and ITD mutations in 84 newly diagnosed AML patients from February 2001 to October 2004. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and direct sequencing were performed to analyze the D835 mutations. The results were examined based on a comparison with previously known prognostic factors, and the treatment outcomes analyzed according to the existence of the mutations in relation to the event free survival (EFS), overall survival (OS), and complete remission (CR) rates.

**Results :** D835 and IDT mutations were detected in 4.7% (4/84) and 19.0% (16/84), respectively, of the AML patients. The *FLT3* gene mutations were not found to be associated with previously known prognostic factors, such as the WBC count, age, and cytogenetic risk group, but were associated with the lactate dehydrogenase levels. The EFS and OS rates were also significantly lower in the *FLT3* gene mutation group, especially in AML with normal karyotypes.

**Conclusions :** *FLT3* gene mutations were observed in 23.8% of AML patients and appeared to have a prognostic implication on patient survival. Accordingly, the presence of *FLT3* gene mutations, which could be tested easily by using PCR/RFLP methods, should be investigated routinely at the time of diagnosis. (*Korean J Lab Med* 2006;26:233-40)

**Key Words :** *FLT3*, Acute myeloid leukemia, Prognostic implications

## 서 론

급성골수성백혈병에서 유전자 변이는 진단이나 잔류병소의 검출

뿐만 아니라 치료에 대한 반응이나 재발 유무, 생존율과 같은 예후를 예측하는 데에 이용될 수 있으며, 이러한 유전자로는 French-American-British (FAB) 분류에 따른 아형에서 특징적으로 나타나는 t(8:21), t(15:17), t(9:11), inv(16) 등[1]과 그 외 *fms*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)[2], *N-RAS*[2], *p53*[3], Wilms' 종양 유전자[4] 등 현재까지 약 110여 종이 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 *FLT3*는 stem cell tyrosine kinase-1 (STK-1) 혹은 fetal liver tyrosine kinase-2 (FLK-2)로도 알려져 있으며, KIT (CD117), FMS, 혈소판유래성장인자(platelet derived growth-

접 수 : 2005년 11월 15일      접수번호 : KJLM1903  
수정본접수 : 2006년 4월 20일  
게재승인일 : 2006년 5월 28일  
교신저자 : 서 장 수  
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕 2가 50  
경북대학교병원 진단검사의학과  
전화 : 053-420-5293, Fax : 053-426-3367  
E-mail : suhjs@mail.knu.ac.kr

th factor) 수용체와 함께 class III tyrosine kinase 수용체에 속하고, 특징적인 구조적 상동성을 가진다. 즉, 세포의 부위에 5개의 면역글로불린이 고리 형태를 이루는 영역, 세포내 막결(juxtamembrane) 영역, 2개의 tyrosine kinase 영역(tyrosine kinase domains; TKD)으로 구성되며[5], 조혈모세포에 현저하게 표현되어 세포의 생존, 증식, 분화, 세포자멸사 등에 관여한다[6-8]. 관련 유전자는 13번 염색체의 장완(q12)에 위치하며, 24개의 엑손(exons)으로 구성된다[9].

*FLT3* 유전자 변이는 급성골수성백혈병에서 가장 흔한 것으로 세포내 두 번째 TKD (D835) 돌연변이와 internal tandem duplication (ITD) 변이의 두 가지 형태가 알려져 있다. D835 돌연변이는 exon 20에서, ITD 변이는 exon 14와 exon 15 사이에서 나타나며[10-20], 모두 체세포돌연변이로 서로 독립적으로 발생하고 같이 나타나는 경우에도 서로 다른 대립형질에서 발생하는 것으로 보고되고 있다[11, 12]. 이러한 *FLT3* 유전자 변이는 조혈계의 많은 세포들에서 생성되는 배위자(ligand)에 의존하지 않는 수용체 활성을 유발하여 세포 증식을 초래할 뿐만 아니라 세포자멸사를 억제하는 데도 관여한다[6-8].

D835 돌연변이는 835번 codon이 정상적으로는 'GAT'로 aspartic acid를 만들게 되나 이 부위가 결손 됨에 따라 aspartic acid가 결손 되거나 혹은 'TAT' 등으로 돌연변이가 생김에 따라 tyrosine, histidine, valine, glutamate 등으로 치환되며, 836번 codon의 isoleucine이 결손 되거나 methionine 등으로 치환되는[6, 10-13] 과오돌연변이로 정상인에서는 발견되지 않는다[10-12]. 이를 분석하는 방법으로는 유전자 부위를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법으로 증폭 후 제한효소분절길다형성 분석과 염기서열을 분석하는 방법이 이용되며[10-13, 15], 급성골수성백혈병에서 이 변이의 의미는 백혈병유발에 관여하거나 질환의 진행에 어떤 역할을 할 것으로 보고되었으며[10], 백혈구 수나 백혈병 세포의 백분율과 관련되는 보고[13]도 있으나 흔히 생존율에 영향을 미치는 예후적 의미는 없는 것으로 보고되고 있다[10-12].

ITD 변이는 막결 영역에서 발생하는데 exon 14와 exon 15 사이에서 나타나며[9], 그 크기나 위치는 다양한 것으로 알려져 있다. 대개 그 크기는 12-204 bp로 보고되며, 흔히 발견되는 염기서열은 없으나 589, 591, 597, 599번 tyrosines 중 적어도 하나를 포함하는 것으로 알려져 있고 하나 이상의 ITD 변이가 존재하는 경우도 보고되고 있다[2, 6, 14, 17]. 이 변이를 분석하는 방법으로는 유전자 부위를 PCR법으로 증폭 후 염기서열을 분석하는 방법이 이용된다[12, 13, 15-20]. 이 변이의 처음 발견 시 백혈병유발과 관련되거나[17] 백혈병의 진행에 중요한 역할을 할 것으로 보고되었다[18]. 그 후 여러 연구에서 백혈구증가증, 백혈병 세포 백분율이 높은 것과 관련되거나[6, 12, 13, 18], 전체 생존율, 무병 생존율, 재발과 관련되는 등의 예후적 의미를 가지는 것으로 보고되고 있어[2, 12-14, 16, 19, 20] 급성골수성백혈병에서 통상적인 검사로 시행되어야 한다는 주장도 있다[20].

또한 이 두 가지 변이는 염색체 분석 결과, 정상 핵형인 경우 좀 더 흔히 관찰되므로 이러한 환자 군에서 위험도를 예측할 수 있는데 더욱 예후적 의미를 가진다[12, 13, 20].

그러나, 한국인을 대상으로 한 백혈병에서의 *FLT3* 유전자 변이의 예후적 의미에 관한 연구가 없기에 저자들은 급성골수성백혈병에서 *FLT3* 유전자의 D835 돌연변이와 ITD 변이 두 가지를 분석하여 그 빈도를 알아보고 유전자 변이 유무에 따른 예후적 인자 및 생존율, 치료에 대한 반응과의 관련성을 분석하여 그 예후적 의미를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2001년 2월부터 2004년 10월까지 급성골수성백혈병으로 처음 진단 받은 환자 84명을 대상으로 하였으며, 평균연령은 47.5 (15-86)세였고, 여자 39명, 남자 45명이었다. FAB 분류에 따른 환자의 분포는 M0 5명, M1 2명, M2 42명, M3 7명, M4 11명, M5 9명, M6 5명, M7 3명이었다. 이 중 치료를 시행한 환자군은 63명이었다.

### 2. 방법

#### 1) DNA 추출

환자의 진단 당시 채취한 골수 검체에서 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 단핵세포들을 분리하고 단백분해효소 K를 처리한 후 phenol-chloroform법으로 DNA를 추출하였다. 일부 환자에서는 진단 당시의 골수 도말 슬라이드에서 동일한 방법으로 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA는 PCR 검사 전까지 -80°C에 냉동 보관하였다.

#### 2) D835 돌연변이 분석

*FLT3* 유전자의 exon 20 부위를 증폭하도록 Yamamoto 등[12]이 고안한 시발체를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응액 구성은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 시발체를 각각 20 pM씩, DNA는 약 500 ng 정도 넣고 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) (Amresco, Solon, OH) 처리한 Q-water (Merck, Darmstadt, Germany)로 총량 20  $\mu$ L로 맞추었다. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA)을 이용하여 94°C에 7분간 사전 변성시킨 후 94°C에 45초간 변성반응, 60°C에 45초간 결합반응, 72°C에 60초간 연장반응을 30회 반복 후 72°C에 10분간 추가 연장반응을 시행하였다.

PCR 산물 5  $\mu$ L를 2% agarose gel에 110 V에서 30분간 전기영동 후 UV 하에서 114 bp의 띠를 확인한 후 PCR 산물 5-10  $\mu$ L에 *EcoRV* 제한효소(Roche diagnostics, Penzberg, Germany)

5 U와 완충액, 0.1% DEPC (Amresco) 처리한 Q-water (Merck)를 넣어 총량 25  $\mu$ L가 되도록 하여 37°C에 1시간 항온 한 후 3% Low Melt agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) gel에 110 V에서 45분간 전기영동하였다. 야생형은 68 bp와 46 bp의 두 개의 띠로 나타나는 반면, 변이형은 잘려지지 않은 114 bp의 띠로 나타난다[12]. 이 잘려지지 않은 띠를 포함한 겔을 오려내어 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics)를 사용하여 정제한 후 한국생명공학연구원(Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다.

### 3) Internal Tandem Duplication (ITD) 분석

*FLT3* 유전자의 exon 14와 exon 15 부위를 증폭하도록 Nakao 등[17]이 고안한 시발체를 변형한 Tiesmeier 등[16]의 시발체를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응액 구성은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer)에 시발체를 각각 20 pM씩, DNA는 약 500 ng 정도 넣고 0.1% DEPC (Amresco) 처리한 Q-water (Merck)로 총량 20  $\mu$ L로 맞추었다. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)을 이용하여 94°C에 2분간 사전 변성시킨 후 94°C에 30초간 변성반응, 56°C에 30초간 결합반응, 72°C에 30초간 연장반응을 37회 반복 후 72°C에 5분간 추가 연장반응을 시행하였다.

PCR 산물 10  $\mu$ L를 2% agarose gel에 110 V에서 30분간 전기영동을 실시한 후 UV 하에서 띠를 확인하였다. 328 bp의 하나의 띠만 관찰되는 경우는 ITD 변이가 없는 것으로 보았으며, 이러한 예 중 무작위로 7예를 선택하여 이 띠를 포함한 겔을 오려내어 상기와 동일한 방법으로 PCR 산물을 정제하여 염기서열분석을 의뢰하였다. 328 bp 이외에 더 긴 분절의 띠가 동시에 관찰되는 경우 ITD 변이가 있는 것으로 보고 다시 3% Low Melt agarose gel (Bio-Rad)에 110 V에서 45분간 전기영동하여 띠를 확인하였다.

### 4) 생존율 및 예후 인자

완전 관해는 치료 후 골수 도말 검사 상 백혈병 세포가 5% 미만이면 적혈구, 백혈구, 거핵세포 생성이 정상적인 소견을 보이고, 적어도 4주 이상 말초혈액 세포가 정상 소견을 보이는 시기로 하였다. 무병 생존율(event free survival, EFS)은 치료 일로부터 재발이나 질환의 지속 혹은 사망까지로 하였으며, 전체 생존율은 진단 일로부터 어떠한 원인으로든 사망까지로 정의하였다.

예후적 인자로는 이미 알려져 있는 것과 같이 진단 시 백혈구 수를 50,000/ $\mu$ L 이상과 미만으로, 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LD)치를 1,000 U/L 이상과 미만으로, 나이를 50 세 이상과 미만으로 나누었다. 염색체 결과에서 t(15;17), t(8;21), inv(16)/del(16q)은 예후가 좋은 군으로, -7, del(7q), -5, del(5q), 11q23 이상, 3q21과 3q26 이상, 복잡한 핵형을 보이는 경우는 예후가 나쁜 군으로 분류하였으며, 정상 핵형을 포함한 그 외에는 모두 중간군으로 나누었다[1].

### 5) 통계

SPSS (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 *FLT3* 유전자 변이 유무에 따라 예후 인자들과의 관련성을 분석하였는데 빈도 분석을 통해 실시하였으며, 카이 제곱 검정을 시행하였다.

단변량 관련성 분석은 Fisher 정확 검정으로 분석하였으며, 독립적으로 관련된 예후 인자에 대해서는 다변량 회귀 분석을 시행하였다.

*FLT3* 유전자 변이 유무에 따른 생존율 분석은 치료가 다른 M3를 제외하고 Kaplan-Meier 분석을 실시하였다.

*P*값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. D835 돌연변이 분석 결과

변이형이 관찰된 경우는 4.8% (4/84)였으며, M1 1명, M2 1명, M3 1명, M5 1명이었다(Table 1, Fig. 1). 이 4예 중 염기서열분석 결과를 얻을 수 있었던 3예 모두 'GAT'가 'TAT'로 돌연변이가 일어난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 2. ITD 분석 결과

변이형이 관찰된 경우는 19.0% (16/84)였으며, M2 7명, M3 2명, M4 4명, M5 2명, M6 1명이었다. 이 변이가 관찰된 예 중 D835 변이가 동시에 검출된 예는 없었다(Fig. 3, Table 1). 염기서열분석을 의뢰했던 7예 모두에서 변이가 일어나지 않은 야생형임을 확인할 수 있었다.

**Table 1.** Results of analysis for D835 and ITD mutations in the *FLT3* gene

Subtype of AML	N of patient	<i>FLT3</i> mutations (%)	D835 mutations (%)	ITD mutations (%)
M0	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)
M1	2	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0)
M2	42	8 (19.0)	1 (2.4)	7 (16.7)
M3	7	3 (42.9)	1 (14.3)	2 (28.6)
M4	11	4 (36.4)	0 (0)	4 (36.4)
M5	9	3 (33.3)	1 (11.1)	2 (22.2)
M6	5	1 (20.0)	0 (0)	1 (20.0)
M7	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	84	20 (23.8)	4 (4.8)	16 (19.0)

Abbreviations: *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3; AML, acute myeloid leukemia; ITD, internal tandem duplication.

### 3. *FLT3* 유전자 변이 유무에 따른 예후 인자들과의 관련성 분석 결과

*FLT3* 유전자 변이를 예후 인자들과 분석한 결과, 백혈구 수, 나이, 염색체 분석 결과와는 상관관계가 없었으나, LD치와는 순 상관관계가 있는 것으로 나타났다( $P=0.013$ ) (Table 2).

### 4. *FLT3* 유전자 변이 유무에 따른 생존율 분석

치료를 시행한 환자군에서 M3를 제외한 51명에 대해서 분석한

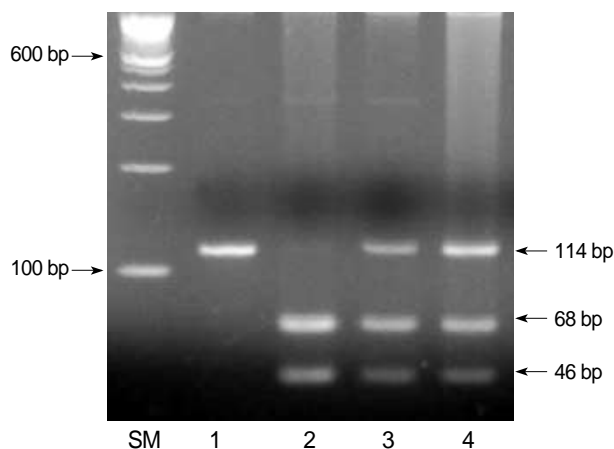


Fig. 1. Results of D835 mutations in the *FLT3* gene. The amplified product (lane 1) of wild type was digested to two bands (68 bp and 46 bp) by *EcoRV* in lane 2. When amplified products contained D835 mutations, undigested bands (114 bp) were visualized on low melting point agarose gel electrophoresis (lane 3 and 4). Lane SM, molecular size markers (100 bp DNA ladder). Abbreviation: *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3.

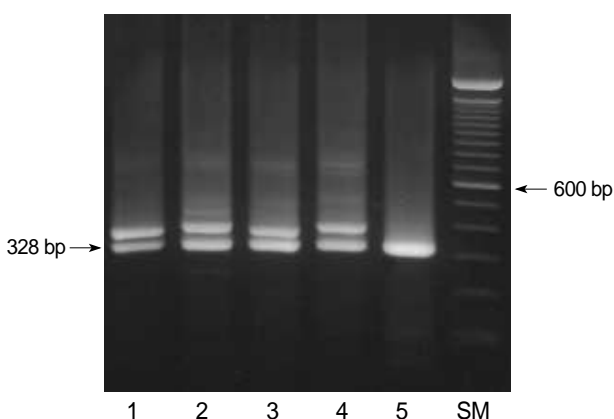


Fig. 3. Results of ITD mutations in the *FLT3* gene. The amplified product of wild type was shown in lane 5. When amplified products contained ITD mutations, another bands were visualized on low melting point agarose gel electrophoresis (lane 1-4). Lane SM, molecular size marker (100 bp DNA ladder). Abbreviations: *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3; ITD, internal tandem duplication.

결과, 무병 생존율에서 D835 돌연변이 유무는 유의한 차이를 보이지 않았으며, ITD 변이가 없는 군에 비해 있는 군에서 유의하게 낮은 결과를 보였다( $P=0.015$ ). 전체 생존율이나 완전 관해율은 두 가지 각각의 변이 유무에 따라 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 *FLT3* 유전자 변이의 존재는 무병 생존율( $P=0.018$ )과 전체 생존율( $P=0.007$ )에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Table 3, Fig. 4).

### 5. 예후 인자들과 생존율간의 다변량 회귀 분석 결과

사용한 변수들은 *FLT3* 유전자 변이, 염색체 분석 결과, 진단 당시 백혈구 수, LD치, 나이였다. 무병 생존율에 대해서는 *FLT3*

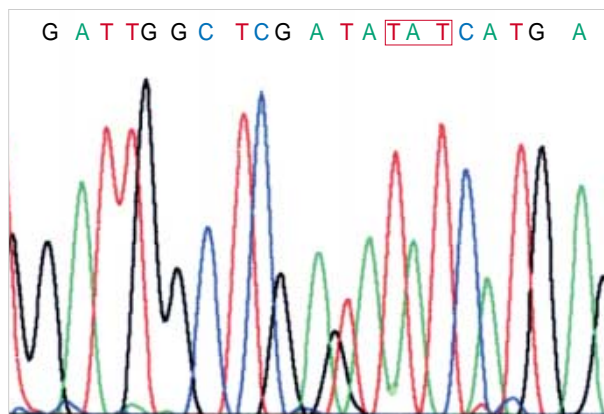


Fig. 2. Sequence analysis in 3 patients with D835 mutations in the *FLT3* gene. The results revealed that the first nucleotide G of codon 835 was substituted with T. Abbreviation: *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3.

Table 2. Relationship between known prognostic factors and the *FLT3* mutations

Prognostic factors	N of patient	<i>FLT3</i> mutations		<i>P</i> value
		Positive	Negative	
WBC ( $\mu$ L)				
≥50,000	22	5	17	NS
<50,000	62	11	51	
LD (U/L)				
≥1,000	33	12	21	0.013
<1,000	43	5	38	
Age (years)				
≥50	35	6	29	NS
<50	49	14	35	
Cytogenetic findings*				
Favorable group	17	6	11	NS
Intermediate group	45	11	34	
Unfavorable group	15	3	12	

\*Favorable group: t(15;17), t(8;21), and inv(16); intermediate group: normal karyotype and other karyotypes; unfavorable group: -7, -5, del(11q23), and complex karyotype.

Abbreviation: NS, not significant.

**Table 3.** Comparison of survivals and complete remission rates excluding M3 according to the *FLT3* mutation status

	<i>FLT3</i> mutations		<i>P</i> value
	Positive (N=9)	Negative (N=42)	
EFS			
Median (days)	135	429	0.018
1 YEFS rate (%)	0	57.0±8.5*	
OS			
Median (days)	336	793	0.007
1 YOS rate (%)	45.7±16.6	67.8±8.0	
CR			
Rate (%)	77.8	71.4	NS

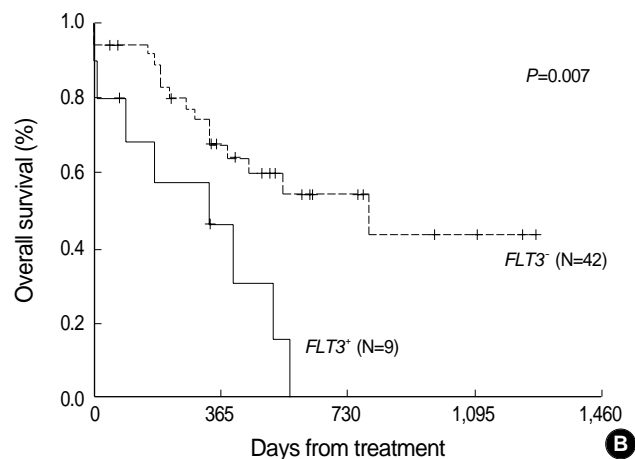
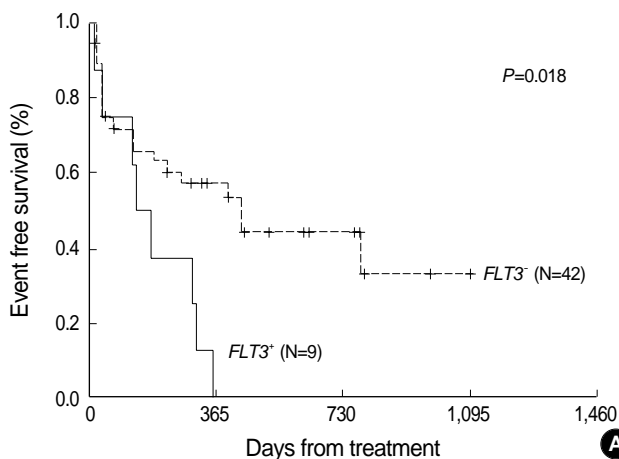
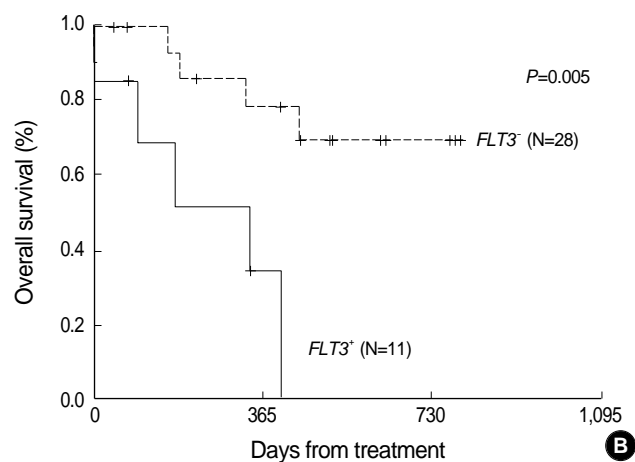
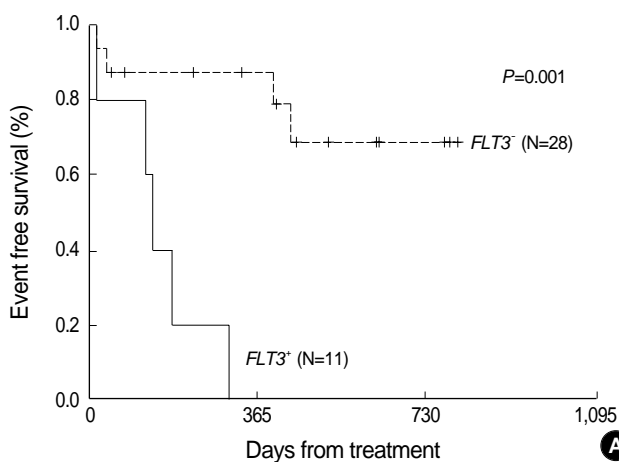
\*Mean±SD.

Abbreviations: *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3; EFS, event free survival; YEFS, year event free survival; OS, overall survival; YOS, year overall survival; CR, complete remission; NS, not significant.

유전자 변이만이 독립적 예후 인자인 것으로 나타났으며 ( $P=0.020$ , HR 0.354 (95% C.I. 0.148-0.851)), 전체 생존율에 대해서도 *FLT3* 유전자 변이만이 독립적인 예후 인자인 것으로 나타났다 ( $P=0.016$ , HR 0.317 (95% C.I. 0.124-0.809)).

**Table 4.** Comparison of survivals excluding M3 according to the *FLT3* mutation status among the patients with a normal karyotype

	<i>FLT3</i> mutations		<i>P</i> value
	Positive (N=11)	Negative (N=28)	
EFS Median (days)	135	NR	0.001
OS Median (days)	336	NR	0.005

Abbreviations: See Table 3. *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3; NR, not reached.**Fig. 4.** Event free (A) and overall (B) survival in patients with AML according to the *FLT3* mutation status.Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3; ITD, internal tandem duplication; *FLT3*<sup>+</sup>, *FLT3* mutation; *FLT3*<sup>-</sup>, no *FLT3* mutation.**Fig. 5.** Event free (A) and overall (B) survival rate in patients with normal karyotype in AML according to the *FLT3* mutation status.Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; *FLT3*, *fms*-like tyrosine kinase 3; ITD, internal tandem duplication; *FLT3*<sup>+</sup>, *FLT3* mutation; *FLT3*<sup>-</sup>, no *FLT3* mutation.

## 6. 정상 핵형인 환자에서 *FLT3* 유전자 변이 유무에 따른 생존율 분석 결과

염색체 분석 결과, 정상 핵형을 보인 환자는 39명이었으며, 이중 치료를 받은 환자는 28명이었다. *FLT3* 유전자 변이가 없는 환자는 28명, 변이가 있는 환자는 11명이었다. *FLT3* 유전자 변이 유무에 따라 무병 생존율과 전체 생존율에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 5).

## 고 찰

급성골수성백혈병에서 가장 흔한 유전자 변이인 *FLT3* 유전자 변이에는 D835 돌연변이와 ITD 변이가 있다. 이는 백혈병 유발이나 질환의 진행, 세포 증식이나 세포자멸사의 억제와 관련되며, 생존율이나 재발과 관련되는 등의 예후적 의미를 가진다[10-14, 16, 19, 20].

D835 돌연변이는 급성골수성백혈병에서 2.7-10.8%로[10-14], 본 연구에서는 4.8% (4/84)로 나타나 국내의 손 등[21]이 보고한 2.9% (2/68)보다는 약간 높게 나타났다. M3에서 분석한 Shih 등[15]은 18.7%로 높게 보고하였으며, 국내의 유 등[22]은 6.9% (6/87)로 보고하였으나 본 연구에서는 M3에서 14.3% (1/7)로 나타났다. Yamamoto 등[12]은 M5에서 22.5% (9/40)로 보고하였으나 본 연구에서는 11.1% (1/9)로 나타났다. 본 연구에서 D835 돌연변이가 있는 4예 중 염기서열분석이 가능했던 3예 모두 'GAT'가 'TAT'로 돌연변이가 일어나 aspartic acid가 tyrosine으로 된 것을 확인할 수 있었으며, 여러 문헌에서 이 돌연변이가 가장 흔한 것으로 보고하고 있다[6, 10-13].

ITD 변이는 급성골수성백혈병에서 13.2-22.6%로[12-20], 본 연구에서도 19.0%로 나타났다. ITD 변이는 막결 영역에서 발생하며, Nakao 등[17]이 exon 11과 exon 12 사이에서 발견되었다고 처음 보고하였으나 후에 각각이 exon 14와 exon 15인 것으로 밝혀졌으며[9], 그 크기에 위치는 다양한 것으로 알려져 있다. M3에서만 분석한 Kiyoi 등[18]은 20.3%로 보고하였는데 본 연구에서는 28.6% (2/7)로 나타났으나 국내의 유 등[22]은 9.2% (8/87)로 낮게 보고하였다. Kiyoi 등[2]은 M4/5에서 35.5% (22/62)로, Nakao 등[17]도 44.4% (4/9)로, Thiede 등[13]은 M5에서 약 40% 정도로 흔히 관찰된다고 하였는데 본 연구에서도 M4/5에서 30% (6/20)로 나타났으며, 이는 단핵구의 분화동안 *FLT3*가 지속적으로 발현됨을 의미한다. 그러나, Abu-Duhier 등[20]은 M4/5에서 18.8% (9/48)로 낮게 보고하기도 하였다.

이와 같이 D835 돌연변이와 ITD 변이의 보고에 따른 검출률의 차이는 검사 방법이 다른 것이 하나의 원인으로 생각되며, 직접염기서열분석이나 폴리아크릴아미드겔 전기영동법 등의 보완적인 방법에 의해 검출률의 향상에 기여할 수 있을 것이다.

Shih 등[10]은 D835 돌연변이가 백혈구 수, 골수의 백혈병 세

포 백분율, 전체 생존율에 유의한 차이가 없다고 하였는데 본 연구에서도 자료는 제시하지 않았으나 이 변이의 유무는 백혈구 수, LD치, 나이, 염색체 분석 결과에 있어서 유의한 차이가 없었다. 그러나, Thiede 등[13]은 D835 돌연변이와 ITD 변이 모두에서 백혈구 수 및 백혈병 세포 백분율과 유의한 관련성을 보고하였다.

ITD 변이는 백혈구 수와 백혈병 세포의 백분율이 유의하게 높은 것과 관련되어 예후가 나쁜 것으로 보고되는데[2, 12, 13], 본 연구에서는 백혈구 수, 나이, 염색체 분석 결과에서 유의한 차이를 보이지 않았으나 질환의 공격성을 보여주는 LD치에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타나 ITD 변이가 불량 예후 인자임을 알 수 있었는데 Kiyoi 등[2]은 야생형 *FLT3*인 경우 LD치가 낮은 경향을 보였다고 하였으며, Yamamoto 등[12]은 야생형 군에 비해 ITD 변이 군에서 LD치가 유의하게 높았으나 D835 돌연변이 군에서는 동일하였다고 보고하였다.

Shih 등[15]과 Kiyoi 등[18]은 M3 환자에서 ITD 변이를 분석한 결과, 전체 생존율과 무병 생존율 및 완전 관해율에 유의한 차이가 없어 예후적 의미가 없는 것으로 보고하여서 본 연구에서도 M3의 경우 치료 방법에서도 다른 아형과는 차이도 나기 때문에 생존율 및 완전 관해율과의 관련성 분석시에는 M3를 제외하고 시행하였다. D835 돌연변이는 생존율에 영향을 미치는 예후적 의미가 없는 것으로 보고되지만[10-12], ITD 변이가 있는 경우에는 생존율이 유의하게 낮거나 재발과 관련되는 등 예후가 나쁜 것으로 보고된다[2, 12-14, 16, 19, 20]. 그러나, Thiede 등[13]은 두 가지 변이 중 어느 변이가 존재하든지 전체 생존율과 무병 생존율에 유의한 차이가 있는 것으로 보고하기도 하였다. 본 연구에서 D835 돌연변이와 ITD 변이 각각의 유무에 대해 생존율과 완전 관해율을 분석한 결과, 무병 생존율에서 ITD 변이가 없는 군에 비해 있는 군에서 유의하게 낮은 결과를 보였다. 또한 Table 3과 같이 *FLT3* 유전자 변이 유무에 따라 분석한 결과, 이 유전자 변이가 존재시 무병 생존율과 전체 생존율이 유의하게 낮은 것을 알 수 있었는데 *FLT3* 유전자 변이는 완전 관해율에는 영향을 미치지 않으면서 생존율에 영향을 미침으로써 예후적인 의미를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

Thiede 등[13]은 급성백혈병 환자 979명에서 *FLT3* 유전자 변이를 분석한 결과, 정상 핵형인 경우에는 37.5% (169/451) 양성을 보인 반면, 염색체 이상이 동반된 경우는 14.6% (65/445) 양성을 보여 정상 핵형에서 더 높은 양성률을 보고하였는데 본 연구에서는 정상 핵형을 가지는 환자군에서 28.2% (11/39) 양성을 보이고 염색체 이상이 동반된 경우도 28.1% (9/32)로 유사한 양성률을 보였다. 그러나, 정상 핵형을 보인 환자군에서 생존율을 분석한 결과, *FLT3* 유전자 변이 유무에 따라 무병 생존율과 전체 생존율에서 유의하게 차이가 나는 것을 알 수 있었는데 이 변이가 존재 시 유의하게 생존율이 감소되어 있어 정상 핵형을 가지는 환자에서 위험도를 예측할 수 있는 인자로서의 가능성을 시사한다.

또 본 연구에는 포함되지 않았지만 최소 잔류 질환의 검출에서 *FLT3* 유전자 변이의 역할에 대해서도 보고가 있었는데, Shih 등

[10]은 재발한 급성골수성백혈병에서 처음 진단 때보다 ITD 변이가 의미 있게 더 높은 빈도로 나타났지만 D835 돌연변이는 빈도가 더 높지 않고 오히려 소실되는 경우도 있어서 진단 시 D835 돌연변이가 있는 환자라도 초기재발이나 최소 잔류 질환을 찾는 데는 적절하지 못하다고 보고하였다. Kottaridis 등[6]은 상당수의 환자에서 재발 시 *FLT3* 유전자 변이가 생기거나 소실되는 경우가 있으며, 진단시 존재하던 ITD 변이가 소실되고 완전히 다른 변이가 생기는 경우도 있다고 보고하여 현재 최소 잔류 질환에서 *FLT3* 유전자 변이의 역할은 확실하지 않으며, 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 급성골수성백혈병 환자에서 *FLT3* 유전자 변이는 생존율과 같은 예후를 예측할 수 있는 인자로 사용될 수 있으므로 *FLT3* 유전자 변이가 있는 경우 동종골수이식 등의 좀더 적극적인 치료가 필요하다는 것을 시사하며, PCR과 제한효소처리의 비교적 쉬운 방법으로 검사를 할 수 있어 통상 검사로 시행할 필요가 있을 것으로 사료되었다. 또한 앞으로는 현재 imatinib mesylate (Gleevec; Novartis, Basel, Switzerland)가 만성골수성백혈병 치료에 사용되는 것처럼 급성골수성백혈병에도 tyrosine kinase 억제제와 같은 치료약제의 새로운 유전자 표적이 될 수 있을 것으로도 기대된다.

## 요 약

**배경 :** 급성골수성백혈병에서 *fms*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) 유전자 변이에는 D835 돌연변이와 internal tandem duplication (ITD) 변이의 두 가지 분명한 형태가 있다. 이러한 변이는 배위자(ligand)에 의존하지 않는 수용체 활성을 유발하여 세포 증식을 초래하며, 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 급성골수성백혈병에서 *FLT3* 유전자 변이의 빈도 및 치료에 대한 반응이나 생존율, 재발에 관한 그 예후적 의미를 알아보고자 하였다.

**방법 :** 2001년 2월부터 2004년 10월까지 급성골수성백혈병으로 처음 진단 받은 환자 84명을 대상으로 하여 D835 돌연변이와 ITD 변이에 대한 중합효소연쇄반응을 시행하였으며, D835 돌연변이 분석을 위해서는 제한효소분절길이다형성과 염기서열을 분석하였다. 그 결과와 예후 인자들을 비교 분석하였으며, 이 유전자 변이 유무에 따른 환자의 무병 생존율, 전체 생존율, 완전 관해율에 대한 치료 성적을 분석하였다.

**결과 :** D835 돌연변이는 4.7% (4/84), ITD 변이는 19.0% (16/84)에서 검출되었다. *FLT3* 유전자 변이를 예후 인자들과 분석한 결과, 백혈구 수, 나이, 염색체 분석 결과와는 상관관계가 없었으나, 젖산탈수소효소(LD)치와는 순 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 이 유전자 변이가 존재시 무병 생존율과 전체 생존율이 유의하게 낮은 것으로 나타났으며, 특히 정상 핵형에서 이 유전자 변이 존재시 무병 생존율과 전체 생존율이 유의하게 낮은 것으로

나타났다.

**결론 :** 급성골수성백혈병에서 *FLT3* 유전자 변이는 23.8%에서 나타났으며, 이 변이는 생존율에 영향을 미침으로써 예후적 의미를 가지는 것으로 보였다. *FLT3* 유전자 변이 검사는 PCR과 제한효소 처리의 쉬운 방법으로 시행할 수 있어 진단 시 통상 검사로 시행할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Hutchison RE and Davey FR. Leukocytic disorders. In: Henry JB, ed. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 20th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001:586-622.
2. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of *FLT3* and *N-RAS* gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood 1999;93:3074-80.
3. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. *p53* mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. Blood 1994;84:3148-57.
4. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, et al. High levels of Wilms' tumor gene (*wt1*) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. Blood 1997;90:1217-25.
5. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. Cell 1991;65:1143-52.
6. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. *Flt3* mutations and leukaemia. Br J Haematol 2003;122:523-38.
7. Stirewalt DL and Radich JP. The role of *FLT3* in hematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer 2003;3:650-65.
8. Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V, et al. *Flt3* ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of *Bcl-2* and *Bax*. Blood 1996;88:3987-97.
9. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human *FLT3*: implications for mutational analysis. Br J Haematol 2001;113:1076-7.
10. Shih LY, Huang CF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, 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.
11. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel *FLT-3* Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2001;113:983-8.

12. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood* 2001;97:2434-9.
13. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, 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.
14. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, et al. Detection of *FLT3* internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn* 2003;5:96-102.
15. Shih LY, Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Lin TL, Wu JH, et al. Internal tandem duplication and Asp835 mutations of the *FMS*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) gene in acute promyelocytic leukemia. *Cancer* 2003;98:1206-16.
16. Tiesmeier J, Muller-Tidow C, Westermann A, Czwalinna A, Hoffmann M, Krauter J, et al. Evolution of *FLT3*-ITD and D835 activating point mutations in relapsing acute myeloid leukemia and response to salvage therapy. *Leuk Res* 2004;28:1069-74.
17. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-8.
18. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, et al. Internal tandem duplication of *FLT3* associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho)*. *Leukemia* 1997;11:1447-52.
19. Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, et al. Internal tandem duplication of *FLT3* in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002;100:2387-92.
20. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, et al. *FLT3* internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000;111:190-5.
21. Sohn YH, Chi HS, Joo MY, Huh HJ, Jang S, Park CJ. Investigation of Correlation of the recurrence of acute myelogenous leukemia and *FLT3* mutation. *Korean J Lab Med* 2004;24:S402. (손용학, 지현숙, 주미영, 허희진, 장성수, 박찬정. 급성골수성백혈병의 재발과 *FLT3* 돌연변이의 상관성 조사. 대한진단검사의학회지 2004;24: S402.)
22. Yoo S, Shim EH, Park CJ, Chi HS. The frequency and clinical significance of *FLT3* gene mutation in acute promyelocytic leukemia. *Korean J Lab Med* 2003;23:S174. (유수진, 심은희, 박찬정, 지현숙. 급성 전골수성 백혈병 환자에서 *FLT3* 유전자 변이의 빈도 및 임상적 의미. 대한진단검사의학회지 2003;23:S174.)