

급성골수구성백혈병의 미세잔존질환 추적관찰을 위한 정량적 *WT1* 유전자 측정의 유용성

김혜란¹ · 신정환^{1,2} · 이정녀^{1,2} · 이은엽³

인제대학교 의과대학 부산백병원 진단검사의학교실¹, 인제대학교 백인제기념 임상의학연구소², 부산대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실³

Clinical Significance of Quantitation of *WT1* Gene Expression for Minimal Residual Disease Monitoring of Acute Myelogenous Leukemia

Hye Ran Kim, M.D.¹, Jeong Hwan Shin, M.D.^{1,2}, Jeong Nyeo Lee, M.D.^{1,2}, and Eun Yup Lee, M.D.³

Department of Laboratory Medicine¹, Busan Paik Hospital, College of Medicine; Paik Institute for Clinical Research², Inje University, Busan;
Department of Laboratory Medicine, Pusan National University School of Medicine³, Busan, Korea

Background : Following induction chemotherapy for AML, a sensitive determination of minimal residual disease (MRD) in patients achieving complete remission (CR) should enable the detection of early relapse. This study was designed to verify if quantitative assessment of the Wilms' tumor (*WT1*) gene by real time polymerase chain reaction (RQ-PCR) can be used as a marker for MRD detection during the monitoring of AML.

Methods : *WT1* gene expression was quantified by RQ-PCR in 31 patients with AML at diagnosis (27 patients) and during follow-up (29 patients) relative to *ABL* control gene. In four patients, the *WT1* gene expression was analyzed in comparison to a second PCR marker, *PML-RARA* fusion transcript. Prognostic significance of *WT1* gene expression was analyzed at diagnosis and at the primary CR evaluation. Longitudinal *WT1* gene analysis was performed in 17 AML patients.

Results : At diagnosis, *WT1* gene expression exceeded the control level in all of the patients. Higher levels of *WT1* gene expression were not associated with shorter event free survival or overall survival at diagnosis. Higher levels of *WT1* gene expression were associated with shorter event free survival after induction chemotherapy. Relapse was observed in eight of 17 patients analysed longitudinally, and an increase of *WT1* gene expression preceded morphologic relapse in four patients with the fusion transcript negative. Concomitant monitoring of *PML-RARA* fusion transcript reveals the lack of a significant correlation with *WT1* gene expression.

Conclusions : Quantitation of *WT1* gene expression could be used for MRD monitoring of AML and for the early detection of relapse, especially in patients lacking specific molecular markers. (*Korean J Lab Med* 2007;27:305-12)

Key Words : *WT1* gene expression, Real time quantitative PCR, Acute myelogenous leukemia, Minimal residual disease

접 수 : 2007년 3월 20일 접수번호 : KJLM2029
수정본접수 : 2007년 7월 6일
게재승인일 : 2007년 8월 10일
교 신 저 자 : 이 정 녀
우 614-110 부산광역시 부산진구 개금2동 633-165
인제대학교 의과대학 부산백병원 진단검사의학교실
전화 : 051-890-6862, Fax : 051-893-1562
E-mail : jeong418@medimail.co.kr

*본 논문은 2004년도 백인제 기념 임상의학연구소 연구비 보조에 의한 것임.

서 론

급성골수구성백혈병(AML) 환자의 경과 관찰 중 완전관해상태의 평가와 재발을 조기에 발견하는 지표로서 미세잔존병 진단의 중요성이 점차 강조되고 있다. 염색체 검사나 형태학적으로 검출 불가능한 미세잔존병을 민감하게 검사할 수 있는 방법은 형

광양의 변화를 판독하는 것을 기초로 하는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, RQ-PCR)의 발달에 따라 최근 많은 발전이 이루어졌다[1-3]. RQ-PCR법을 이용한 미세잔존병에 관한 연구는 만성골수구성백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML) 환자에서 동종 조혈모세포 이식을 받은 후 주기적으로 *BCR-ABL* 융합 유전자의 양을 측정하여 완전관해 상태를 평가하고 재발을 조기에 발견할 수 있다는 보고들이 있다[4, 5]. 그러나 AML에서 미세잔존병에 대한 연구는 상대적으로 어려운데 가장 큰 이유는 AML이 CML보다 세포 형태나 질병 생성 과정이 훨씬 다양하기 때문이며[6] 또 환자의 대부분에서 *BCR-ABL* 융합 유전자를 가지고 있는 CML과는 달리 AML 환자의 약 40%에서만 미세잔존병 측정의 표적이 되는 *AML1-ETO*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARA*, *MLL* 등의 융합 유전자를 가지고 있기 때문이다[7]. CML의 만성기 아세포보다 AML 아세포의 성장속도가 빨라 분자유전학적 재발을 진단할 수 있는 시기가 매우 짧으므로 더 자주 미세잔존병 검사를 해야 한다는 점도 연구를 어렵게 하는 원인의 하나이다[6].

AML 환자의 약 40%만이 특정 융합 유전자를 가지므로 융합 유전자가 없는 환자에서 미세잔존병 검사에 필요한 다른 분자학적 표지자에 대한 연구가 활발히 진행되었고 Wilms' tumor (*WT1*) 유전자의 유용성이 보고되었다[8-13]. *WT1* 유전자는 염색체 11번 단완에 위치하며 zinc-finger 전사효소를 암호화하는 유전자로서 태아 시기에는 비뇨생식기 전구 세포에서 높은 수준으로 발현되고 성인에서는 신장, 고환이나 난소 등의 비뇨생식기 세포에서 낮게 발현된다[14]. *WT1* 유전자는 처음에는 소아 신장에 발생하는 종양인 Wilms' tumor의 종양생성과 연관된 암억제 유전자로 알려졌으나 최근의 연구에 의하면 성인의 CD34 양성 조혈전구세포에서 일시적으로 발현되고[15] CML의 급성기 아세포나 급성백혈병 환자에서 높은 수준으로 발현된다고 알려졌다[8-13]. *WT1* 유전자가 세포성장을 촉진시킨다 하기도 하고[9] 방해하기도 한다는 등[16, 17] 백혈병 생성에서의 *WT1* 유전자 역할에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나 특정한 융합 유전자가 없는 AML 환자들의 미세잔존병을 검출하는 표지자로 이용하려는 연구가 계속되고 있다[18, 19]. Ostergaard 등[3]은 경과 관찰 중 측정된 *WT1* 유전자 발현과 임상경과 사이에 유의한 상관성을 제시하였으나 Gaiger 등[20]은 상관성을 증명하지 못하였다. 또 처음 진단 당시의 *WT1* 유전자 발현과 예후와의 연관성에 대해서도 연구자에 따라 상반된 결과를 보고하고 있다[20, 21].

본 연구는 AML의 진단 당시와 경과 관찰 중 측정된 *WT1* 유전자 발현과 임상경과나 예후와의 상관성을 알아보고 특정한 융합 유전자가 없는 AML 환자의 미세잔존병 측정 표지자로서의 유용성을 알아보고자 하였다. 또한 급성 전골수구성 백혈병 환자 군에서는 *PML-RARA* 유전자 발현을 동시에 측정하여 *WT1* 유전자의 유용성을 이미 알려진 미세잔존병 표지자인 *PML-RARA* 유전자와 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2005년 1월에서 2006년 8월까지 인제대학교 의과대학 부산백병원에서 형태와 면역표현형에 따라 AML로 진단되고 경과 관찰한 환자 중에서 골수검체가 보관 가능하였던 31명의 82검체를 대상으로 하였다. 환자는 남자 13예, 여자 18예였으며 연령 분포는 20-86세(중앙값 49세)였다. 이 연구는 인제대학교 의과대학 부산백병원의 임상시험위원회의 승인을 받았다. 환자의 임상적 특징은 Table 1에 기술하였으며 염색체 핵형에 따라 t(15;17), t(8;21), t(16;16)의 핵형은 예후가 좋은 군으로 분류하였고, -7, del(11)(q23), 그리고 3개 이상의 복합 염색체 이상을 나타내는 경우는 예후가 나쁜 군으로, +8, +11, t(12;18) 및 정상 염색체 핵형은 중간 예후군으로 분류하였다[22]. 정상 대조군의 *WT1* 유전자 발현을 측정하기 위하여 정상 성인 20명의 말초혈액과 림프종 병기결정을 위해 골수검사하여 골수침범이 없는 것으로 판정되었던 17명의 골수검체를 사용하였다.

2. *WT1* 유전자 발현 측정 시기 및 횟수

진단 당시에 *WT1* 유전자 측정이 가능하였던 환자는 27명이었고 관해유도 화학요법 후 추적검사가 가능한 경우는 25명이었다. 4명은 진단 당시에는 *WT1* 유전자 측정을 하지 못하였으나 경과 관찰 중에는 검사가 가능하여 모두 29명 환자의 55검체를 대상으로 하였다. *WT1* 유전자 발현량의 변화를 추적하기 위하여 3번 이상 경과 관찰이 이루어진 환자 17명에서 각각 관해유도 화학요

Table 1. Clinical characteristics in patients with acute myelogenous leukemia

Characteristics	N of patients
N of cases	31
Age (yr, median)	20-86 (49)
Male/Female ratio	13:18
FAB subgroup (de novo)	29
M0	3
M1	11
M2	10
M3	4
M4e	1
Secondary AML	2
Cytogenetic prognostic group	
Normal karyotype	16
t(8;21)	4
t(15;17)	4
t(16;16)	1
+8	1
+11	1
t(12;18)	1
-7	1
del(11)(q23)	1
Multiple aberrations	1

법 후 관해판정(14-60일), 관해유지 화학요법 후 판정(61-112일), 치료 종결 후 재발 여부 확인(120-699일)을 위하여 경과 관찰하였으며, 경과 관찰 횟수는 3-7회였다. 진단 당시와 경과 관찰 중 염색체 검사와 *AML1-ETO*, *PML-RARA*, *CBFβ-MYH11*, *MLL* 등의 융합 유전자에 대한 역전사 중합효소연쇄반응 검사를 하였고 *PML-RARA* 융합 유전자가 양성인 경우에는 발현량을 측정하였다.

3. WT1 유전자의 실시간 중합효소연쇄반응

골수검체는 Ficoll-Hypaque (비중 1.077)을 이용하여 단핵구층을 분리하였으며 RNA 추출 전까지 DMSO 혼합 후 즉시 -70°C에 냉동보관하였다. RNA는 상품화된 RNA Bee용액(TEL-TEST, Friendswood, TX, USA)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 추출하였고 역전사 반응을 시행하여 cDNA를 합성하였다. RQ-PCR과 형광량의 측정은 ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. WT1 유전자의 시발체와 소식자는 Ogawa 등[6]의 방법을 따랐으며 소식자는 5'말단에는 reporter dye로서 6-carboxy fluorescein (FAM)을 3'말단에는 quencher dye로서 6-carboxy tetramethy rhodamine (TAMRA)을 결합시켰다. 모든 시발체와 소식자는 PE Applied Biosystems에서 제작하였으며 염기서열은 Table 2와 같이 구성하였다. 대조유전자로는 *ABL* 유전자를 사용하였고 *ABL* 유전자의 시발체와 소식자는 Gabert 등[23]의 방법에 따랐다. WT1 유전자의 중합효소연쇄반응 반응액은 5 μ L의 cDNA (100 ng의 RNA에 해당), 1 \times Taqman Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)와 500 nM의 시발체, 250 nM의 소식자로 구성되어 증류수를 이용하여 모두 25 μ L로 하였다. 중합효소연쇄반응은 50°C에서 2분간 반응시킨 다음 95°C에서 5분간 반응시키고 이후는 95°C에서 15초, 60°C에서 60초의 반응주기를 45회 반복하였다. 양성대조의 표준곡선을 얻기 위하여 K562 세포주를 사용하였으며 K562 세포

서 만든 cDNA를 5 로그 단계로 연속 희석하여 측정한 결과 10^{-5} 배까지 검출이 가능하였다. 이 K562 cDNA 표준희석액은 -20°C에 보관하였으며 환자의 검체에서 WT1 유전자의 양을 측정하는 실험마다 함께 증폭하여 생성된 K562 표준곡선에 따라 WT1 유전자의 양을 결정하였다. 대조유전자로는 *ABL* 유전자를 사용하였고 *ABL* 유전자도 같은 방법으로 측정하였으며 모든 검체는 WT1 유전자와 *ABL* 유전자를 동시에 측정하였다. 최종적으로 WT1 유전자의 양은 WT1 유전자 양을 *ABL* 유전자의 양으로 나눈 비율인 WT1/*ABL*로 표현하였다[24].

4. PML-RARA 융합 유전자 실시간 중합효소연쇄반응

PML-RARA 융합 유전자의 실시간 중합효소연쇄반응은 Cassinat 등[25]이 기술한 방법으로 하였고 시발체와 소식자의 염기서열은 Table 2와 같이 구성하였다. NB-4 세포주를 이용하여 표준곡선을 형성하였으며 연속 희석실험에서 10^{-5} 배까지 검출이 가능하였다. 대조 유전자로는 *ABL* 유전자를 사용하였고 *PML-RARA/ABL* 비율로 *PML-RARA* 융합 유전자의 양을 표현하였다.

5. 통계

환자의 병록지를 찾아서 WT1 유전자 발현과 임상 경과와의 상관성을 분석하였다. 통계는 MedCalc version 9 (MedCalc®, Mariakerke, Belgium)를 사용하였다. AML의 각 분류별 WT1 유전자 발현의 차이는 Mann-Whitney U test를 사용하여 분석하였다. WT1 유전자 발현의 연속적인 변화와 예후와의 관계는 Fisher 정확 검정으로 분석하였으며 Kaplan-Meier 법을 이용해 생존곡선을 그렸다. *P* 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 의미있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. K562 세포주를 이용한 WT1 유전자의 표준곡선

K562 cDNA를 이용한 WT1 유전자 증폭실험에서 증폭주기가 증가함에 따라 표적 중합효소연쇄반응 산물의 양에 비례하여 형광강도가 증가하였고 Ct 값은 비례하여 감소되었다. K562 cDNA를 통한 표준곡선 형성에서 Ct값과 K562 cDNA 농도의 로그값 사이에 직선의 상관성이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 급성골수구성백혈병 환자에서 진단 당시의 WT1 유전자 발현

정상 대조군에서 말초혈액의 WT1 유전자는 0.01인 1명을 제

Table 2. Primers and probes

Primers and probes*	Sequence ; 5' - 3'
WT1 forward primer	GAT AAC CAC ACA ACG CCC ATC
WT1 reverse primer	CAC ACG TCG CAC ATC CTG AAT
WT1 probe	ACA CCG TGC GTG TGT ATT CTG TAT TGG
ABL forward primer	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG
ABL reverse primer	GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA
ABL probe	CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T
bcr 3 forward primer	AGC TCT TGC ATC ACC CAG GGG A
bcr 1 forward primer	GTC TTC CTG CCC AAC AGC AAC C
common reverse primer	CTC ACA GGC GCT GAC CCC ATA GT
<i>PML-RARA</i> probe	CAG CCC TCC CTC GCC ACC CCC TCT A

*, All primers and probes were purchased from PE Applied Biosystems, USA.

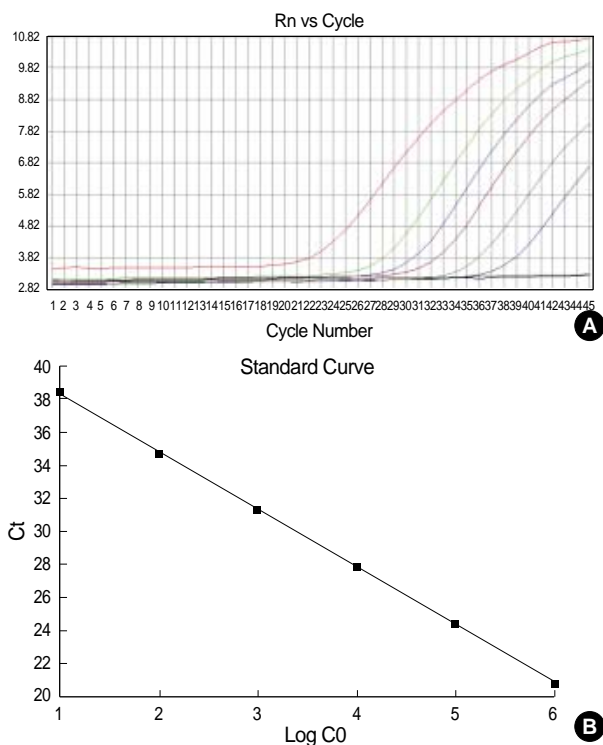


Fig. 1. WT1 amplification plot and standard curve. (A) Amplification plot of a 10-fold serial dilution of standard K562 cDNA (ranging from 10^5 to 10^0). The amplification plot shows an increase of reporter fluorescence during amplification. (x-axis, number of cycle; y-axis, relative fluorescence intensity). (B) Standard curve of K562 cDNA dilution for real-time PCR. The standard curve shows a linear correlation between the Ct value (y-axis) and the logarithm of the initial concentration of the standard K562 cDNA (x-axis).

외하고는 19명에서 검출되지 않았고 골수에서는 0-0.19 (중앙값: 0.001)로 발견되어 0.24-173.4 (중앙값 23.6)인 환자군에 비하여 낮게 발견되었다($P=0.01$). 환자에서 WT1 유전자 발현은 골수의 백혈병 세포 비율이나 CD34 양성세포의 비율과는 유의한 상관성이 없었으며 WT1 유전자 발현 정도가 매우 다양하여서 FAB 아형이나 융합 유전자군, 그리고 같은 아형이나 융합 유전자군 내에서도 다양한 분포를 나타내었다(Fig. 2, 3). 염색체 핵형에 따른 예후군에서 WT1 유전자 발현은 정상염색체를 포함하는 중간 예후군에서 높은 경향을 보였다($P=0.014$) (Table 3). 장기간의 추적 임상경과와 WT1 발현량의 관계를 관찰하였을 때 진단 당시의 WT1 발현 정도와 무병생존율 및 전체생존율은 유의한 상관성이 없었다.

3. 관해유도 화학요법 후의 WT1 유전자 발현의 변화와 예후와의 관계

25명의 환자가 관해유도 화학요법 후에 검사가 가능하였다. 경과관찰기간이 1년으로 짧았지만 무병생존율은 WT1 유전자 발현이 정상 대조군의 발현 수준인 0.001 이하인 군에서 의미있게 길

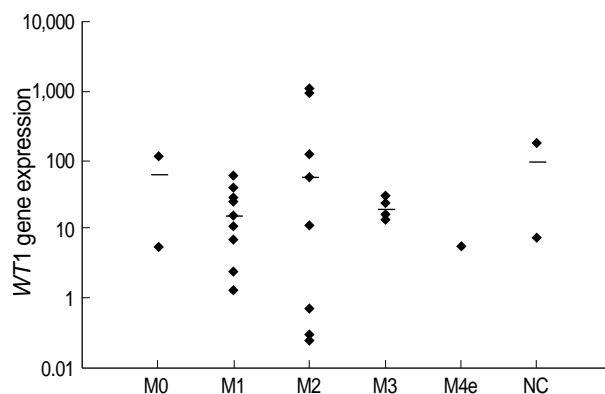


Fig. 2. WT1 expression at diagnosis (N=27) according to FAB subtypes. Abbreviations: NC, Not classifiable by FAB classification.

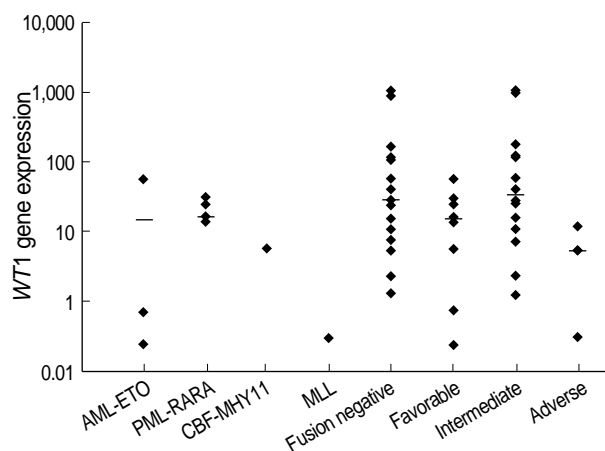


Fig. 3. WT1 expression at diagnosis (n=27) according to different molecular or cytogenetic prognostic subgroups of AML. Favorable: t(15;17), t(8;21), t(16;16); Intermediate: +8, +11, t(12;18) and normal karyotype; Adverse: -7, del(11)(q23), and complex karyotype as the presence of 3 or more abnormalities.

었지만(Fig. 4) 전체생존율과 재발률에는 유의한 차이가 없었다(Table 3). 25명 환자에 대하여 형태학적 완전관해와 WT1 유전자 발현 0.001 이하를 기준으로 하는 분자유전학적 관해를 비교했을 때 형태학적 완전관해는 25명 중 20명(80%)에서 얻어졌으며 이들 중 14명(56%)에서만 WT1 유전자가 0.001 이하로 분자유전학적인 관해를 보였다. 일치하지 않는 6명 중 3명은 WT1 유전자 발현이 점차 감소되어 완전관해 상태로 잘 유지되었으나 3명은 각각 4, 18, 14주 후에 재발하였다. 이들 6명은 모두 정상 핵형이었고 융합 유전자도 검출되지 않았다.

4. WT1 유전자 발현정도의 개인의 추적 연구

시간적 경과에 따른 개인의 경과 추적이 가능하였던 17명의 환자 중 진단과 재발 시기에 WT1 유전자 측정이 가능했던 환자는 3명이었고 모두 진단 당시보다 재발 당시의 검체에서 WT1 발현

Table 3. Prognostic significance of WT1 expression above or below 0.001 following induction chemotherapy (N=25)

	WT1 expression		P value
	<0.001	>0.001	
N of patients	14	11	
Median WT1 level	0.001	2	
EFS			
Median (days)	372.5	126	
1 yr EFS rate (%)	85.7	27.3	0.005
OS			
Median (days)	NR	NR	
1 yr OS rate (%)	92.9	54.5	0.056
Relapse rate (%)	14.3	66.7	0.119

Abbreviations: EFS, event free survival; EFS, event free survival; OS, overall survival; OS, overall survival; NR, not reached.

의 증가가 관찰되었다. 또한 재발한 8명의 경우를 보면 4명은 WT1 유전자 발현이 지속되거나 증가되는 양상을 보여 형태학적 재발보다 선행되어 분자유전학적 재발이 관찰되었고(Fig. 5) 나머지 4명은 재발 직전의 WT1 유전자검사에서 분자유전학적으로 관해를 보였지만 각각 9, 47, 42, 40주 후에 재발하였다.

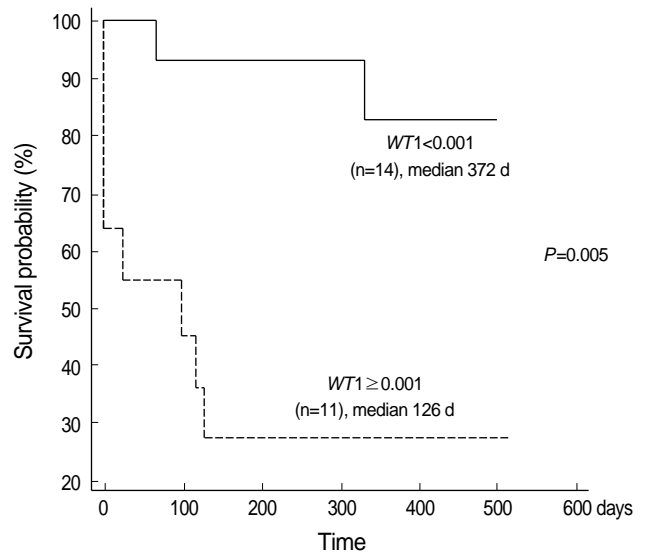
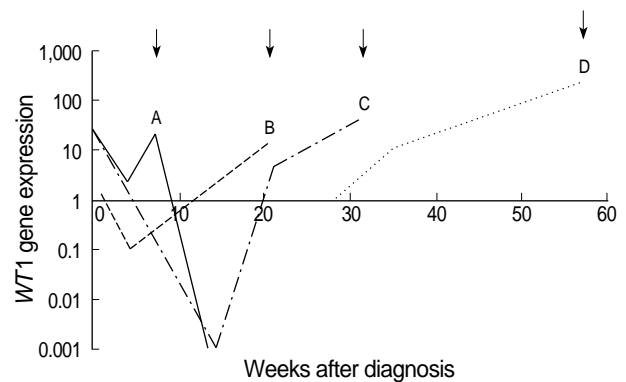
5. WT1 유전자와 PML-RARA 융합 유전자 발현과의 상관성

진단 당시 PML-RARA 융합 유전자 양성인 환자는 4명이었다. 4명의 환자에서 경과 관찰을 포함하여 모두 20개의 골수검체에서 WT1 유전자와 PML-RARA 융합 유전자의 정량검사가 가능하였다. 진단 당시에는 PML-RARA 융합 유전자와 WT1 유전자발현이 모두 높았으나 경과 관찰 중 측정된 16검체 중 15검체에서는 검출되지 않았고 모두 형태학적 완전관해 상태였다. 나머지 한 검체의 WT1 유전자 발현은 0.1이었고 PML-RARA 융합 유전자 발현은 1.2였으며 형태학적 부분관해 상태였다.

고 찰

AML은 높은 재발률 때문에 성공적인 환자치료를 위해 치료 효과의 판정이나 경과 관찰 중 미세잔존병을 민감하게 검출할 수 있는 분자유전학적 검사법이 절실하게 요구되어 왔다. 그러나 AML 환자의 약 50% 이상이 미세잔존병 검사의 표적이 되는 특정한 융합 유전자가 없다고 보고되고 있으며[7] 본 연구에 포함된 환자의 67% (18/27명)에서도 융합 유전자가 검출되지 않았다. 그러므로 WT1 유전자가 대부분의 AML 환자에서 정상 대조군보다 높은 수준으로 발현된다면 특정한 융합 유전자가 없는 환자의 경과 관찰 중 미세잔존병을 검출하는 표지자로 사용할 수 있는 가능성이 있을 것이다.

본 연구에서 진단 당시의 WT1 유전자 발현은 모든 AML 환자의 골수에서 정상 대조군보다 높게 발현되었으나 FAB 아형이

**Fig. 4.** Kaplan-Meier plot of event free survival of patients with WT1 expression above or below 0.001.**Fig. 5.** Longitudinal monitoring of WT1 level in four exemplary patients with relapse. Arrows on the top of the graph indicate the time points of hematologic relapse.

나 융합 유전자군, 염색체 핵형에 의한 예후군에 따라 매우 다양한 분포를 나타내었다. 단지 정상 염색체를 포함하는 중간 예후군에서만 통계적으로 의미있게 높은 경향을 보였으므로 이들 환자의 경과 관찰에 WT1 유전자가 유용하게 이용될 수 있으리란 가능성을 확인하였다고 생각되었다.

이미 알려진 미세잔존병 표지자인 PML-RARA 융합 유전자와 WT1 유전자의 발현을 비교하였을 때 환자수와 경과 관찰 횟수가 적고 재발한 환자가 없어 화학요법 후나 재발 시에 어떤 표지자가 더 민감하게 변화하는지는 비교할 수 없었다. 그러나 진단 당시에 두 표지자 모두 높게 측정되고 형태학적 완전관해 상태에서는 모두 검출되지 않은 점, 부분관해 환자에서 모두 낮은 수준으로 발현된 점 등을 확인할 수 있었다.

관해유도 화학요법 후 관해여부를 판정할 때 분자유전학적 관해의 기준(molecular remission)에 대해서는 연구자에 따라 다르게 보고하고 있다. Cilloni 등[26]이나 Ogawa 등[6]은 정상 대

조군의 WT1 유전자 발현 수준을 기준으로 제시하였고 Garg 등 [19]은 처음 진단 당시보다 WT1 유전자 발현이 2 로그 이상 감소되었는지를 판정기준으로 하였다. 본 연구에서는 2 로그 이상의 감소는 되었으나 WT1 유전자가 0.001 이상인 1명만이 두 기준에 따른 차이를 보였는데 이 환자는 예후를 추정하는데 WT1 유전자 발현을 정상 대조군과 비교하는 것이 더 유용하였으므로 본 연구에서는 이 기준만을 적용하였고 특히 진단 당시 WT1 유전자 측정결과가 없는 경우 화학요법 후의 결과만을 대상으로 적용하고자 했을 때 유용할 것으로 생각되었다. 관해유도 화학요법 후 형태학적 관해 판정과 WT1 유전자 발현을 기준으로 한 분자유전학적 관해 판정에 이견을 보이는 환자는 6명이었다. 이들 중 3명에서 재발하였는데 이들은 모두 정상 핵형이었고 융합 유전자도 검출되지 않아 WT1 유전자 발현을 이용한 분자유전학적 관해 판정이 민감하고 유용한 방법임을 확인할 수 있었으나 관해상태가 잘 유지된 나머지 3명도 모두 정상 핵형이었으며 융합 유전자도 검출되지 않았으므로 WT1 유전자를 미세잔존병 검출의 표적으로 삼아 관해를 판정할 때 주의를 요함을 알 수 있었다.

시간적 경과에 따른 WT1 유전자 발현의 변화를 추적 관찰했을 때 형태학적 재발보다 WT1 유전자 발현의 증가 혹은 지속이 선행된 환자는 본 연구에서 4명이었다. 이들 중 2명(Fig. 5A, B)은 재발직전의 골수검사에서 형태학적 완전관해는 되었으나 WT1 유전자 발현이 진단 후 계속 0.001 이상으로 높아 분자유전학적 관해가 되지 않은 상태에서 재발한 경우라 할 수 있을 것이다. 또한 1명(Fig. 5C)은 분자유전학적 완전관해가 된 후 재발직전의 검사에서 형태학적 재발보다 WT1 발현의 증가가 선행된 경우였고, 나머지 한명(Fig. 5D)은 관해유도 화학요법 후 WT1 유전자 측정을 하지 못해 분자유전학적 관해가 된 상태였는지 확인할 수 없었으나 WT1 유전자 발현이 경과 관찰 중 10배 이상 두 번 연속 증가하거나 10배 이하의 증가가 3번 연속될 때 분자유전학적 재발이라는 기준[24]에 합당하였으므로 역시 분자유전학적 재발이 선행된 경우였다. 이들 4명은 모두 형태학적 재발에 앞서 WT1 유전자가 정상 대조군보다 높게 발현되었으므로 이 시기에 미세잔존병의 존재를 확인하고 이에 대하여 치료할 기회를 제공한다는 점에서 경과 관찰 중 정기적인 WT1 유전자의 정량적 측정의 중요성이 강조되어야 할 것이다. 또한 이들은 모두 특정한 융합 유전자가 검출되지 않았던 환자들이어서 WT1 유전자를 미세잔존병 검출의 표적으로 사용하는 것이 재발의 조기 검출에 매우 유용함을 알 수 있었다. 그리고 WT1 유전자 발현 증가와 재발이 동시에 관찰된 4명은 재발 직전과 재발 간의 검사 간격이 너무 길었으므로 짧은 간격으로 검사를 했었다면 WT1 유전자 발현 증가가 선행되었을 가능성이 높았다고 생각되었다.

본 연구에서는 정상 대조군의 WT1 유전자 발현을 측정할 때 건강한 성인의 골수검체를 얻을 수 없어 림프종 병기 결정을 위해 골수검사를 시행하여 골수침범이 없는 것으로 판정되었던 17명의 골수를 검사하였다. 림프종에서의 WT1 유전자 발현에 대해서는 잘 알려지지 않았으나[27] 본 연구에서는 0.001로 매우

낮게 검출되었다. 정상 대조군의 WT1 유전자 발현 수준이 분자학적 완전관해의 평가나 재발의 기준으로 매우 중요하므로 여기에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

결론적으로, WT1 유전자가 급성골수구성백혈병 환자마다 진단 당시 과발현 정도가 매우 다양하고 정상 골수에서도 낮은 수준으로 발현되는 것이 단점이 될 수 있으나 특정한 융합 유전자가 없는 환자군의 미세잔존병 측정의 표적으로 사용할 경우 예후를 예측하는 지표로서 유용하였고 경과 추적 중 형태학적 재발에 앞서 분자유전학적 재발을 검출함으로써 이에 대한 치료를 할 수 있는 기회를 제공한다는 점에서 경과 관찰 중 정량적 WT1 유전자 측정의 중요성이 강조되어야 할 것으로 생각되었다.

요 약

배경 : 급성골수구성백혈병 환자는 완전관해 후 재발을 조기에 검출할 수 있는 민감한 미세잔존병 검사가 필수적이다. 본 연구는 급성골수구성백혈병 환자의 경과 관찰 중 정량적 WT1 유전자 발현 측정의 미세잔존병 표지자로서의 유용성을 알아보고자 하였다

방법 : 31명의 급성골수구성백혈병 환자를 대상으로 진단 당시 (27명)와 경과 관찰 중(29명) WT1 유전자 발현을 정량적 실시간 중합효소연쇄반응을 이용하여 측정하였으며 모두 ABL 유전자와 동시에 측정하여 보정하였다. 4명의 환자는 PML-RARA 융합 유전자의 정량적 발현을 동시에 측정하여 WT1 유전자와 비교하였다. 진단 당시와 관해유도 화학요법 후 처음으로 완전관해를 평가할 때 WT1 유전자 발현과 예후와의 관계를 분석하였다. 17명의 환자에 대하여 WT1 유전자 발현의 변화를 개인별로 추적하여 임상 경과와 비교하였다.

결과 : 진단 당시 모든 환자의 WT1 유전자 발현이 정상 대조군보다 높은 수준으로 측정되었다. 진단 당시의 WT1 유전자 발현과 무병생존율이나 전체생존율은 관계가 없었다. 관해유도 화학요법 후 WT1 유전자 발현이 높은 환자군은 무병생존율이 의미있게 짧았다. 개인별로 경과 추적한 17명 중 8명의 환자가 재발하였고 이중 4명의 환자에서는 형태학적 재발에 앞서 WT1 유전자 발현의 증가가 선행되었으며 모두 융합 유전자를 가지고 있지 않았던 환자들이었다. 경과 관찰 중 WT1 유전자와 동시에 측정했던 PML-RARA 융합 유전자 발현 사이에는 유의한 상관성이 관찰되지 않았다.

결론 : 급성골수구성백혈병 환자의 경과 관찰 중 미세잔존병 추적 관찰을 위한 정량적 WT1 유전자 측정은 예후 예측의 지표로 사용할 수 있으며 특히 융합 유전자를 가지고 있지 않은 환자군에서 재발의 조기 발견에 유용한 지표로 이용할 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;29:23-39.
2. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.
3. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients-results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004;125: 590-600.
4. Lin F, van Rhee F, Goldman JM, Cross NC. Kinetics of increasing *BCR-ABL* transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87: 4473-8.
5. Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, Kaeda J, Rezvani K, Cwynarski K, et al. Early detection of *BCR-ABL* transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:1560-5.
6. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, et al. The usefulness of monitoring *WT1* gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003;101:1698-704.
7. Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92:574-88.
8. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, et al. *WT1* as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84:3071-9.
9. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (*WT1*) in human leukemia. *Blood* 1997;89:1405-12.
10. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (*WT1*) in human leukemias. *Leukemia* 1992;6:405-9.
11. Miyagi T, Ahuja H, Kudota T. Expression of the candidate Wilms' tumor gene, *WT1*, in human leukemia cells. *Leukemia* 1993;7:970-7.
12. Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* 1994;8:2138-43.
13. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (*WT1*) transcripts and the *WT1* nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1060-7.
14. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990;343:774-8.
15. Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol* 1997;25:945-50.
16. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. A *WT1* antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 1996;12: 1005-14.
17. Svedberg H, Chylicki K, Baldetorp B, Rauscher FJ 3rd, Gullberg U. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (*WT1*) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene* 1998;16:925-32.
18. Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tisljar K, Kusec R, Geissler K, et al. Prognostic significance of *WT1* gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:639-43.
19. Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of quantitative analysis of *WT1* gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:49-59.
20. Gaiger A, Linnerth B, Mann G, Schmid D, Heinze G, Tisljar K, et al. Wilms' tumour gene (*WT1*) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* 1999; 63:86-93.
21. 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.
22. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322-33.
23. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17:2318-57.
24. Weissor M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of

- WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1416-23.
25. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, Barbay C, Rain JD, Fenaux P, et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia* 2000;14:324-8.
26. Cilloni D and Saglio G. Usefulness of quantitative assessment of Wilms tumor suppressor gene expression in chronic myeloid leukemia patients undergoing imatinib therapy. *Semin Hematol* 2003; 40:37-41.
27. Spinsanti P, de Grazia U, Faggioni A, Frati L, Calogero A, Ragona G. Wilms' tumor gene expression by normal and malignant human B lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 2000;38:611-9.