

역전사중합효소연쇄반응과 염기순서분석에서 *PML/RARA* 재배열이 검출되나 핵형분석과 형광동소교잡법에서 t(15;17) 결여된 미세과립형 급성전골수구성백혈병 1예 보고

김경은¹ · 우광숙¹ · 김성현² · 한진영¹

동아대학교 의과대학 진단검사의학과교실¹ · 내과학교실²

Detection of *PML/RARA* Rearrangement by Reverse Transcriptase-PCR and Sequencing in a Case of Microgranular Acute Promyelocytic Leukemia Lacking t(15;17) on Karyotype and FISH

Kyung-Eun Kim, M.D.¹, Kwang-Sook Woo, M.D.¹, Sung-Hyun Kim, M.D.², and Jin-Yeong Han, M.D.¹

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

We report a case of morphologically microgranular acute promyelocytic leukemia with *PML/RARA* fusion transcripts demonstrated by reverse transcriptase-PCR and cDNA sequencing, and no *PML/RARA* fusion detected by karyotype and FISH analyses. Karyotype was 47,XX,+8[19]/46,XX[1]. Although the newer FISH probes provide more accurate detections of t(15;17), it would be necessary to perform other molecular tests to further identify the masked *PML/RARA* fusions. (*Korean J Lab Med* 2009;29:379-83)

Key Words : *Cryptic PML/RARA rearrangement, Acute promyelocytic leukemia, RT-PCR, PML/RARA, Trisomy 8*

서 론

급성전골수구성백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)은 임상적으로 파종성혈액내응고의 발생 위험이 높고 all-trans retinoic acid (ATRA) 치료에 잘 반응하므로 다른 급성골수성 백혈병(AML) 아형과의 감별이 필요하다. 특징적으로 APL은

70~90%에서 t(15;17)(q22;q21)이 관찰되며 15q22의 전골수성 백혈병(promyelocytic leukemia, *PML*) 유전자와 17q21의 retinoic acid receptor alpha (*RARA*) 유전자의 재배열에 의한 *PML/RARA* 융합유전자가 생성된다[1-4]. 드물게 분자유전학적 방법으로는 *PML/RARA* 융합유전자가 검출되지만, 전통적인 염색체 검사에서 t(15;17)이 결여되고 정상 15와 17번 염색체를 갖는 경우가 보고되고 있다. 이는 15 및 17번 염색체를 포함한 세 개 이상의 염색체 간 복합전위(complex chromosomal translocation)에 의한 것이나, *PML*의 일부분이 *RARA*에 초현미경적 미세(submicroscopic) 삽입되거나 반대로 *RARA*의 일부분이 *PML*에 초현미경적 미세 삽입되어 발생한 것으로 생각되며, 후자는 잠재성 혹은 미세재배열성(masked or cryptic) t(15;17)이라고도 표현한다[1-5].

미세재배열성 t(15;17)의 분자유전학적인 확인 방법으로는 형

Received : October 1, 2008
Revision received : August 10, 2009
Accepted : August 21, 2009
Corresponding author : Jin-Yeong Han, M.D.
Department of Laboratory Medicine, Dong-A University
College of Medicine, 1 3-ga, Dongdaesin-dong, Seo-gu, Busan
602-715, Korea
Tel : +82-51-240-5323, Fax : +82-51-255-9366
E-mail : jyhan@dau.ac.kr

*본 연구는 보건복지부 보건과학기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A050099).

광동소교잡법(FISH), 서던블롯시험(Southern blotting), 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcriptase [RT]-PCR), 그리고 염기순서분석(sequencing)법이 주로 사용되고 있다. FISH 검사의 민감성 및 특이성 증가로 인해 미세재배열성 t(15;17)의 83-98%에서 *PML/RARA* 융합 형광신호를 검출할 수 있으나 [3, 5, 6], 드물게 염색체 검사뿐만 아니라 FISH 검사에서도 음성이나 RT-PCR 혹은 염기순서분석에서 *PML/RARA* 융합유전자가 검출된 6예[1, 2, 5, 7, 8]가 전 세계적으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 형태학적으로 미세과립형(microgranular)의 APL이며 RT-PCR 및 cDNA 염기순서분석 검사에서는 *PML/RARA* 융합 유전자가 증명되었으나 핵형검사상 47,XX,+8[19]/46,XX[1]이며, FISH에서 *PML/RARA* 융합 형광신호가 없는 미세재배열성 t(15;17)을 경험하였고 국내 보고는 없는 것으로 사료되어 이를 보고하는 바이다.

증 례

50세 여자가 내원 한 달 전부터 발생한 기침, 발열, 전신쇠약으로 인근병원을 방문하여 시행한 일반혈액검사에서 심한 백혈구증가증 및 혈소판감소증으로 인해 백혈병이 의심되어 본원으로 전원 되었다. 신체검사상 간과 비장 종대를 제외하고 특이소견은 없었다. 일반혈액검사에서 백혈구 수 101,730/ μ L, 혈색소 9.9 g/dL, 혈소판 수 16,000/ μ L이었으며 말초혈액의 백혈구 감별계산에서 전골수구 95%, 호중구 1%, 림프구 2%, 단구 1%, 호염구 1%로 나타났다(Fig. 1A). 응고검사상 프로트롬빈시간 13.7초(참고치 9.8-13.5), 활성화부분트롬보플라스틴시간 22.3초(참고치 21.0-32.0)였고, 감소된 섬유소원(196.5 mg/dL)과 증가한 섬유소원/섬유소원분해산물(39.9 μ g/mL) 및 D-이합체

(7.2 μ g/mL), 그리고 정상 항트롬빈 III (109%) 소견을 보였다.

골수천자도말검사에서 세포충실도는 90%로 증가되어 있었고 미세과립형의 비정상 전골수구가 총 유효세포 수의 87.8%를 차지하였다(Fig. 1B). 비정상 전골수구는 거의 이분엽이거나 뇌화되어 있었으며 세포질은 비교적 풍부하고 때때로 미세한 과립 및 Auer rods를 포함하고 있었다. 또한 거핵구, 과립구계와 적혈구계 전구세포는 상당히 감소되어 있었다. 세포화학 염색에서 골수세포형과산화효소(myeloperoxidase, MPO), periodic acid Schiff 염색 및 수단블랙 B 염색(Sudan black B)에서 양성으로 염색되었고 비특이 esterase 염색(non-specific esterase)에서 음성을 보였다. 골수 흡인 검체로 유세포 분석을 시행한 결과 면역표현형검사상 CD13 (96.0%), CD33 (87.4%), CD117 (25.5%), MPO (99.7%), CD7 (24.6%)은 양성이고, HLA-DR (0.0%)과 CD34 (0.0%)는 음성이었다. 따라서 환자는 형태학적으로 APL, microgranular type으로 진단되었다.

염색체 검사는 골수 세포에 메토포렉세이트를 첨가하고 24시간 및 48시간 동기화 배양을 시행하였다. 배양 후 세포를 수확하고 트립신 처리 후 G-분염법으로 염색하였다. 20개의 분열 중기세포 핵형은 47,XX,+8[19]/46,XX[1]이었고 15와 17번의 염색체는 정상이었다(Fig. 2).

미세재배열성 t(15;17)을 검출하기 위해 *PML/RARA* dual color, dual fusion 탐색자(Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 Vysis사의 사용지침에 따라 골수 세포로 FISH 검사를 시행하였다. 염색체 15와 17에서 두 개의 오렌지색 *PML*과 녹색 *RARA* 형광신호가 각각 관찰되었으며, 노란색 *PML/RARA* 융합 형광신호는 검출되지 않았다(Fig. 3A). 이에 *RARA* dual color, break apart 재배열 탐색자(Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA)로 *RARA*의 재배열이나 삽입을 검사하였으나

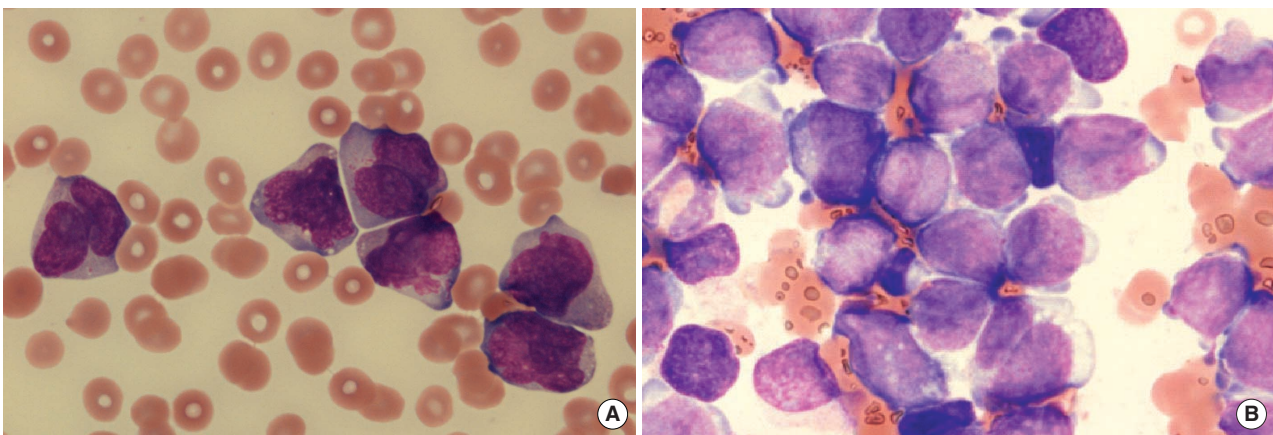


Fig. 1. Abnormal hypogranular or sparsely granular promyelocytes from the peripheral blood smear (A) and bone marrow aspiration smear (B) (Wright-Giemsa stain, $\times 1,000$).

염색체 17번에서 정상적인 오렌지색-녹색 융합형광신호가 관찰되었다(Fig. 3B). 함께 사용한 8번 염색체의 중심질 탐색자(Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA)는 삼염색체 8과 일치하는 세 개의 오렌지색 신호를 나타냈다.

RT-PCR을 시행하기 위해 이전의 연구에서와 같이 골수의 단핵세포로부터 RNA를 추출하고 역전사해서 cDNA를 합성하였고 nested RT-PCR을 위해 각각 3개의 시발체를 사용하였다[1]. PCR 산물을 전기영동한 결과 S-form *PML/RARA* (393 bp)

유전자 재배열을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). PCR 산물은 DYE-dynamic ET Dye Terminator kit (Amersham Biosciences, Cleveland, OH, USA)를 이용하고 자동화된 MegaBACE 1000 DNA Analysis system (Amersham Biosciences, Cleveland, OH, USA) 및 Cimarron 3.12 base Caller (Cimarron Software Inc., Salt Lake City, UT, USA)에서 직접 염기순서를 분석하였다. 그 결과는 *PML* 유전자의 엑손 3와 *RARA* 유전자의 엑손 3에서 재배열이 확인되어 RT-PCR 산물인 S-form 즉

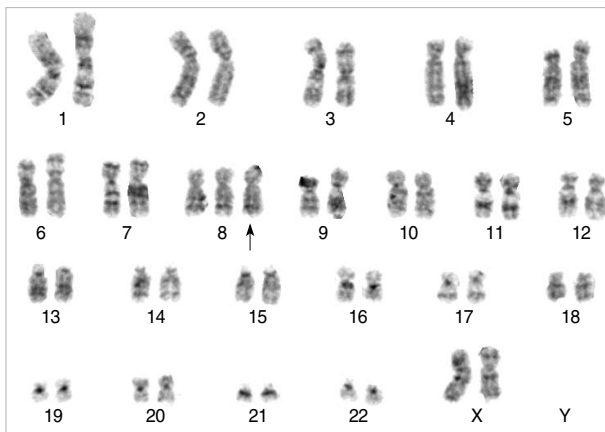


Fig. 2. Giemsa-banded karyotype of bone marrow showing a 47,XX,+8. Trisomy 8 (arrow), and intact chromosomes 15 and 17 are observed.

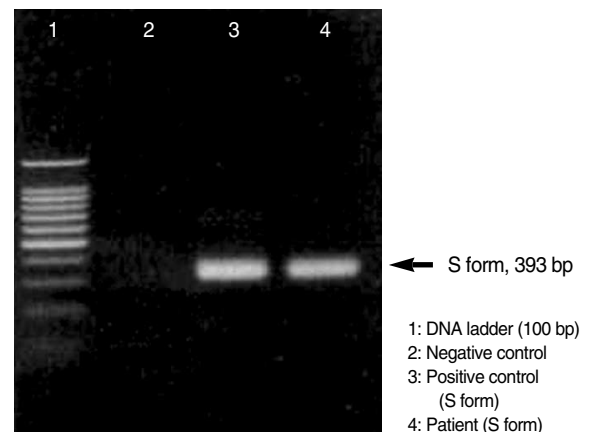


Fig. 4. RT-PCR for *PML/RARA* fusion transcripts. S-form (393 bp) *PML/RARA* chimeric transcripts were amplified. Abbreviation: RT-PCR, reverse transcriptase-PCR.

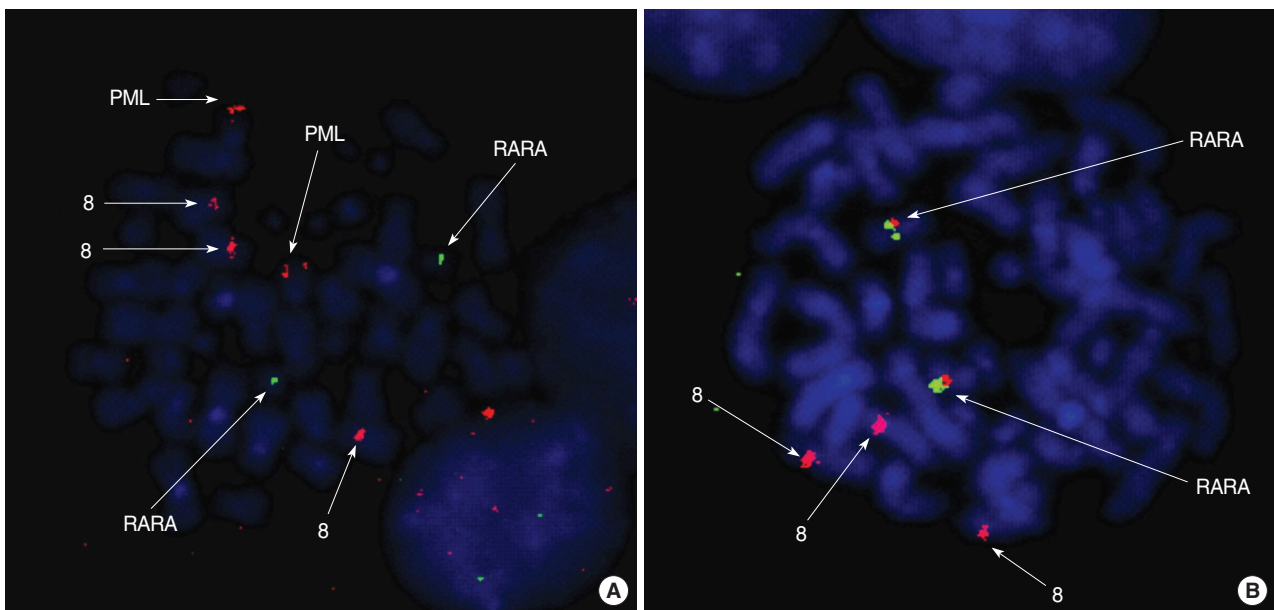


Fig. 3. (A) Cohybridization FISH analysis with LSI *PML/RARA* dual color, dual fusion and chromosome 8 centromeric probes. There are three pink fluorescences on each chromosome 8 centromere, but no *PML/RARA* fusion signals on metaphase. (B) Cohybridization FISH analysis with LSI *RARA* dual color, break apart rearrangement and chromosome 8 centromeric probes. There are three chromosomes 8 but no *RARA* break apart rearrangement signals on metaphase.

bcr3와 일치한 소견이었다. 그러므로 RT-PCR과 염기서열분석에서 *PML/RARA*의 재배열이 확인되어 WHO 분류상 미세과립성 APL로 진단되었다.

환자는 내원 시 심한 백혈구증다증으로 백혈구성분채집술을 3회 시행받았으며 ATRA와 idarubicin으로 관해유도 항암화학치료를 시작하였다. 치료 이틀째 호흡곤란 및 폐부종이 나타나 ATRA 증후군이 발생하였으며 dexamethaxone 투여 후 호전되었다. 관해 유도 후 시행한 추적 골수 검사에서 비정상 전골수가 관찰되지 않고, 염색체 검사, FISH, RT-PCR도 모두 음성으로서 완전 관해 상태를 나타내었다. 현재 진단 후 165일째이며 1차 공고요법 시행 후 완전 관해 상태를 유지하고 있다.

고 찰

APL의 가장 흔한 염색체 이상은 15q22의 *PML* 유전자와 17q21의 *RARA* 유전자의 전좌이며 그 결과 *PML/RARA* 융합유전자가 생성된다. 이는 ATRA 치료의 감수성을 결정하고 APL의 병인으로서 받아들여지고 있기 때문에 특히 중요하다[9]. 또한 t(15;17)에 이차적인 염색체 이상에는 +8, i(17), del(9p)가 있으며[10] 삼염색체 8이 가장 흔하지만, 염색체 15와 17은 정상이며 삼염색체 8만 보인 예는 드물다[1, 3, 11, 12].

APL 중 약 10%에서 염색체 검사상 t(15;17)이 없는 경우가 보고되었고[4, 5], 여기에는 비종양성 클론의 증식과 분열[13], *PML* 이외 유전자와 *RARA*의 재배열이 특징인 APL 변이형, 세 개 이상의 염색체 간 복합전위를 동반한 경우 및 분자유전학적으로 *PML/RARA* 재배열이 확인 가능한 미세재배열성 t(15;17)를 갖는 APL 등이 있다.

PML/RARA dual color, dual fusion 탐색자를 이용한 FISH 검사는 현재 알려진 모든 *PML*의 절단점을 모두 포함하는 범위인 515 kb를 오렌지색 형광신호로 직접 표시하며, *RARA* 또한 700 kb에 달하는 범위를 녹색 형광신호로 표시하여 현미경하에서 관찰되지 않던 *PML*이나 *RARA*의 미세한 삽입이 검출[14]될 뿐만 아니라 APL의 진단 민감도와 특이도를 각각 98-100%와 100%로 증가시켰다[3, 6]. 국내에서도 본 증례와는 다르게 전형적인 APL의 형태를 보이면서 염색체검사서 t(15;17)가 없었으나 RT-PCR이나 FISH로 *PML/RARA* 융합유전자를 검출한 예가 두 예에서 보고되었다[15, 16]. 그러나 본 증례는 형태학적으로 미세과립형 APL이면서 염색체검사서 t(15;17)이 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 FISH 검사에서도 *PML/RARA* 재배열이 음성이었으나, RT-PCR과 염기순서분석법으로 *PML/RARA* 재배열을 검출할 수 있었던 점이 특기할 만하다.

미세재배열성 t(15;17)을 동반한 APL에서 민감도와 정밀도가 향상된 FISH 검사법으로 *PML/RARA* 융합 형광신호나 초현미경적 미세 삽입을 검출할 수 없었던 예로서는 본원에서 이전 경험하였던 1예[1]와 Huh 등[2]의 1예 및 Kim 등[5]의 2예의 보고가 있다. Brockman 등은 *PML/RARA* dual color, dual fusion 탐색자의 민감도와 특이도를 산출하기 위해 이미 진단된 APL 검체에 대해 이중 맹검법으로 FISH 검사를 시행하였는데, 1차 검사에서는 38예 중 한 예에서 간기와 중기세포에서 *PML/RARA* 융합형광신호를 검출할 수 없었으나, 다시 재검한 결과, 간기세포에서 녹색 형광필터 단독 검경에서 *RARA*의 정상적인 녹색 형광신호 외에 미세 형광신호가 관찰되었고, 비록 그 형광신호가 너무 작아서 이중 필터로는 노란색 융합신호를 검출할 수 없었으나 녹색 형광필터와 오렌지색 형광필터를 바꾸면서 관찰한 결과 그 위치에서 오렌지색의 *PML* 형광신호가 확인되어 *PML/RARA* 융합을 증명할 수 있었다고 하였다[3]. 그러나 최근 보고된 Huh 등[2]의 증례는 *RARA* FISH뿐 아니라 단색 필터로도 미세 형광신호를 확인할 수 없었던 예다. 과거 본원에서 보고한 증례 또한 RT-PCR로 *PML/RARA* 재배열에 대한 정보를 얻은 후 *PML/RARA*와 *RARA* FISH로 단색 필터를 사용하여 재검한 결과, 역시 15q에서 *PML/RARA* 재배열을 확인할 수 없었다[1]. 이번 증례의 경우에서도 *PML/RARA*와 *RARA* FISH를 시행하였고 형광필터를 교환해가며 확인하였으나 어떠한 미세 형광신호도 확인할 수 없었다.

초현미경적으로 미세 삽입되는 *RARA*나 *PML*의 유전자 양이나 크기를 정확하게 알 수는 없으나 분명 t(15;17)이 동반된 전형적인 APL보다는 감소되었을 것으로 예측된다. 같은 방법의 FISH 검사를 시행하지는 않았으나 본 증례처럼 미세재배열성 t(15;17)이면서 FISH 음성인 또 다른 두 예에서 RT-PCR 산물의 종류는 각각 L-form (bcr1)과 S-form (bcr3)이었다[7, 8]. 본 증례와 Kim 등[5]의 예는 S-form (bcr3)이고, Huh 등[2]의 예는 L-form (bcr1)이었다. 총 6예 중 S-form과 L-form이 각각 4 (67%)예, 2 (33%)예로서 S-form의 RT-PCR 산물이 FISH 결과 음성의 예에서 더 흔히 관찰되고 있다. 증례의 수가 적어 그 의미를 도출하기는 어려우나 FISH 음성인 미세재배열성 t(15;17)을 동반한 APL에 대한 더 많은 증례 보고가 이루어진다면 초현미경적 삽입과 그 병인에 대한 연구에 도움이 될 것이다.

결론적으로 형태학적으로 APL이 의심되지만 염색체 검사에서 15와 17번 염색체가 정상이면서, 본 증례와 같이 드물게는 FISH 검사에서도 *PML/RARA* 융합 형광신호가 음성일 수 있으므로, 진단 초기에 *PML/RARA*에 대해 RT-PCR을 시행하고 염기순서분석도 병행하는 것이 필요하다고 생각된다.

요 약

형태학적으로 미세과립형의 급성전골수구성백혈병이며 역전사중합효소연쇄반응 및 cDNA 염기순서분석 검사에서는 PML/RARA 융합 유전자가 증명되었으나, 핵형 및 형광동소교잡법에서는 PML/RARA 융합이 없는 증례를 경험하였기에 보고하고자 한다. 핵형은 47,XX,+8[19]/46,XX[1]이었다. 비록 새로워진 FISH 소식을 이용하여 더욱 정확하게 t(15;17)을 검출할 수 있으나, 잠재성 PML/RARA 융합을 동정하기 위해서는 다른 분자유전학적 검사 또한 동시에 시행할 필요가 있다고 생각된다.

참고문헌

- Han JY, Kim KE, Kim KH, Park JI, Kim JS. Identification of PML-RARA rearrangement by RT-PCR and sequencing in an acute promyelocytic leukemia without t(15;17) on G-banding and FISH. *Leuk Res* 2007;31:239-43.
- Huh J, Moon H, Chi H, Chung W. Acute promyelocytic leukemia with i(17)(q10) on G-banding and PML/RARA rearrangement by RT-PCR without evidence of PML/RARA rearrangement on FISH. *Int J Lab Hematol* 2009;31:372-4.
- Brockman SR, Paternoster SF, Ketterling RP, Dewald GW. New highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect PML/RAR α fusion in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;145:144-51.
- Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Français d'Hématologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood* 2000;96:1297-308.
- Kim M, Lim J, Kim Y, Han K, Lee DH, Chung NG, et al. The genetic characterization of acute promyelocytic leukemia with cryptic t(15;17) including a new recurrent additional cytogenetic abnormality i(17)(q10). *Leukemia* 2008;22:881-3.
- Wan TS, So CC, Hui KC, Yip SF, Ma ES, Chan LC. Diagnostic utility of dual fusion PML/RAR α translocation DNA probe (D-FISH) in acute promyelocytic leukemia. *Oncol Rep* 2007;17:799-805.
- Yamamoto K, Hamaguchi H, Kobayashi M, Tsurukubo Y, Nagata K. Terminal deletion of the long arm of chromosome 9 in acute promyelocytic leukemia with a cryptic PML/RAR α rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;113:120-5.
- Emillia G, Marasca R, Longo G, Ferrari MG, Notohamiprodjo M, Temperani P, et al. Detection of PML-RAR α fusion transcript in Ph positive leukemia with acute promyelocytic phenotype lacking the t(15;17) cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;80:95-9.
- Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Micléa JM, Chastang C, et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995;85:2643-53.
- Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemia. *Leukemia* 1994;8:953-62.
- Fusita K, Oba R, Harada H, Mori H, Niikura H, Ioyama K, et al. Cytogenetics, FISH, and RT-PCR analysis of acute promyelocytic leukemia: structure of the fusion point in a case lacking classic t(15;17) translocation. *Leuk Lymphoma* 2003;44:111-5.
- Ikeda K, Sasaki K, Tasaka T, Nagai M, Kawanishi K, Takahara J, et al. Detection of PML-retinoic acid receptor- α fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia with trisomy 8 but without t(15;17). *Am J Hematol* 1994;45:212-6.
- Berger R, Bernheim A, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G. Cytological types of mitoses and chromosome abnormalities in acute leukemia. *Leuk Res* 1983;7:221-36.
- Schoch C, Schnittger S, Kern W, Lengfelder E, Löffler H, Hiddemann W, et al. Rapid diagnostic approach to PML-RAR α -positive acute promyelocytic leukemia. *Hematol J* 2002;3:259-63.
- Kim KH, Won JH, Jeung KJ, Lee SC, Kim HJ, Bae SB, et al. Novel PML-RARA fusion gene on chromosome 17 in acute promyelocytic leukemia with normal chromosome 15 and 17. *Korean J Hematol* 2007;42:296-300. (김경하, 원종호, 정기주, 이상철, 김현정, 배상명 등. 정상 핵형을 보인 급성전골수구성백혈병 환자의 17번 염색체에서 발견된 PML-RARA 융합유전자. *대한혈액학회지* 2007;42:296-300.)
- Oh SJ, Kim H, Ahn MJ, Kim IS, Jeong TJ, Choi IY, et al. A case of acute promyelocytic leukemia with 46, XX, del(5)(q23)/47, XX, del(5)(q23), +8 but without (15;17) translocation. *Korean J Hematol* 2000;35:174-8. (오석중, 김혁, 안명주, 김인순, 정태준, 최일영 등. t(15;17)전위 동반 없이 46, XX, del(5)(q23)/47, XX, del(5)(q23), +8 염색체 이상을 보인 급성전골수구성 백혈병(M3) 1예. *대한혈액학회지* 2000;35:174-8.)