

골수형성이상증후군과 이로부터 진행된 이형성연관변화 급성골수성백혈병의 *FLT3*-ITD 및 *NPM1* 변이 연속 측정결과와 이에 따른 임상양상에 관한 분석

Serial Determination of *FLT3*-ITD and *NPM1* Mutations and Its Clinical Significance in Patients with MDS at Diagnosis and After Progression to AML with Myelodysplasia-related Changes

정재우 · 지현숙 · 이은혜 · 장성수 · 서울주 · 박찬정

Jae-Woo Chung, M.D., Hyun-Sook Chi, M.D., Eun-Hye Lee, M.D., Seongsoo Jang, M.D., Eul-Ju Seo, M.D., Chan-Jeoung Park, M.D.

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background: Accumulation of genetic aberrations in MDS is closely associated with progression to AML. *FLT3*-ITD is commonly found in AML and less frequently in MDS. *FLT3*-ITD in MDS is associated with a high risk of transformation to AML. Recently, significant interaction of *NPM1* and *FLT3*-ITD was described in AML. This study was conducted to investigate the incidence and prognostic role of *FLT3*-ITD and *NPM1* mutations (*NPM1^{mt}*) on paired samples at diagnosis of MDS and AML.

Methods: Patients who were diagnosed as MDS transforming to AML were included. *FLT3*-ITD was detected by PCR, and *NPM1^{mt}* was confirmed by direct sequencing after screening for NPM by immunohistochemistry.

Results: AML developed in 12.0% (43/357) of MDS patients. *FLT3*-ITD was detected in none of MDS and 14.7% (5/34) of AML. *NPM1^{mt}* was detected in 2.4% (1/41) of MDS and 11.6% (5/43) of AML. One patient with type B *NPM1^{mt}* at MDS transformed to type A *NPM1^{mt}* at AML. *FLT3*-ITD positive AML showed a tendency of shorter survival and a significantly longer time to achieve complete remission than *FLT3*-ITD negative AML ($P=0.007$). Normal karyotype AML with *FLT3*-ITD showed shorter overall survival than that group of AML without *FLT3*-ITD ($P=0.017$).

Conclusions: MDS patients acquired *FLT3*-ITD during AML transformation, and *FLT3*-ITD positive AML, especially that with normal karyotype, predicted a poor outcome. *NPM1^{mt}* was identified in both MDS and AML. *NPM1^{mt}* was rarely found in MDS patients, and mostly was acquired after AML transformation. Clonal evolution of *NPM1^{mt}* subtype was found in one patient during acute transformation.

Key Words: MDS, AML, *Fms*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*), Nucleophosmin (NPM)

서론

Corresponding author: Hyun-Sook Chi, M.D.

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine,
Asan Medical Center, Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-4502, Fax: +82-2-478-0884, E-mail: hschi@amc.seoul.kr

Received: November 18, 2010

Revision received: March 2, 2011

Accepted: March 2, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2011, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

골수형성이상증후군은 말초혈액의 혈구 감소를 나타내며, 골수에서는 무효조혈(ineffective hematopoiesis)과 무질서한 조혈세포의 증가를 특징으로 하는 클론성 조혈모세포질환으로서, 약 15-30%에서 급성골수성백혈병으로 진행된다[1]. 급성골수성백혈병으로의 전환에 어떤 요인이 관여하는지는 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, 최근까지의 연구 결과들은 골수형성이상증후군에서 유전학적인 변화의 축적이나 단계적인 변이가 급성골수성백혈병으로의 전환에 밀접한 관계가 있음을 시사하고 있다[2, 3].

Fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)는 조혈과정에 중요한 역할을 담당하는 class III receptor tyrosine kinase를 부호화(encoding)하고 있는 유전자로서[3], *FLT3* 변이는 악성혈액질환에서 발견되는

분자유전학적 변화 중 비교적 흔하게 발견되는데, 급성골수성백혈병에서는 25-40%, 골수형성이상증후군에서는 이보다 낮은 2.5-8.8%의 빈도로 변이가 보고되고 있다[2]. *FLT3* 변이는 juxtamembrane domain의 internal tandem duplication (ITD)과 tyrosine kinase domain (TKD)의 점돌연변이(point mutation)의 두 종류가 있는데[2], 이 중 *FLT3*-ITD 변이가 골수형성이상증후군에서 발견될 경우, 변이가 나타나지 않은 골수형성이상증후군에 비해, 급성골수성백혈병으로의 전환 가능성이 보다 높고, 전환까지의 기간이 짧으면서, 불량한 예후를 가지며[4], 급성골수성백혈병으로 진행되었을 때의 *FLT3* 변이의 빈도가 골수형성이상증후군 진단 당시보다 증가한다는 연구 결과들이 보고된 바 있다[5].

Nucleophosmin (NPM)은 주로 핵소체에 존재하며, 핵과 세포질 사이를 빠르게 이동하는 인단백질로 세포성장 및 증식 및 형질전환을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [6-9]. 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이는 NPM 단백질의 N 말단 영역에 NPM-RAR α , NPM-ALK, NPM-MLF1 등의 융합단백질의 형성이나, exon 12의 변이로서 나타나며, 이들 변이는 NPM 단백질의 세포질로의 전위를 일으키기 때문에 항 NPM 단백을 항체를 이용한 면역조직화학 염색법으로 확인이 가능하다[10, 11]. 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이 양성인 세포질 내 발현 양성 NPM (positive for cytoplasmic NPM, NPMc⁺)의 빈도는 약 35%로, 특히 정상핵형을 가진 군에서는 60%로 높게 나타나며, 정상형(wild type)인 세포질 발현 음성(negative for cytoplasmic NPM, NPMc⁻)인 군에 비해 양호한 임상경과를 갖는 것으로 밝혀져 있다[10-14]. 또한 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이와 *FLT3*-ITD 간에 연관이 있고[14], *NPM1* 변이 양성인 *FLT3*-ITD 음성인 급성골수성백혈병 환자군이 다른 환자군에 비해 양호한 경과를 나타낸다고 알려져 있다[15]. 그러나 골수형성이상증후군에서 *NPM1* 변이에 대한 연구는 제한적으로, *NPM1*변이의 빈도가 낮다고 발표되어 있다[16-19].

이에 본 연구에서는 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로 진행된 환자군의 짝지은 검체 혹은 결과를 이용하여 첫째, *FLT3*-ITD와 *NPM1* 변이의 빈도를 알아보고, 급성골수성백혈병으로 진행되면서 변이의 빈도가 누적되는지를 확인하며, 둘째, *FLT3*-ITD와 *NPM1* 변이군이 *FLT3* 자연형 및 *NPM1* 자연형 군에 비해 각각 급성골수성백혈병으로의 전환까지 걸리는 시간과 총 생존 기간 및 급성골수성백혈병 전환 후 생존기간에 어떠한 차이를 나타내는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상

1989년 8월부터 2006년 6월까지 서울아산병원에서 골수검사를

시행하여 WHO 기준[20]에 따라 골수형성이상증후군으로 진단받은 환자를 대상으로 연구를 진행하였다. 이들 중 골수형성이상증후군 진단 전에 다른 악성질환을 진단받았다거나 치료에 의해 이차적으로 골수형성이상증후군이 발생한 경우와 외부 병원에서 골수형성이상증후군이나 급성골수성백혈병을 진단받은 환자는 대상에서 제외하였다. 환자들의 임상정보, 임상병리 검사결과와 유전학 검사결과는 후향적으로 의무기록을 조사하여 얻었다.

2. *FLT3*-ITD의 확인

골수형성이상증후군 및 급성골수성백혈병 진단 당시 *FLT3*에 대한 중합효소연쇄반응 검사가 시행된 경우, 의무기록조치를 통해 변이 여부를 확인하였다. 검사가 시행되지 않았던 경우에는 진단 혈액 검사실에 염색되지 않은 상태로 실온에서 보관되고 있던 골수흡입 도말 슬라이드에서 DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 골수흡입 도말 슬라이드를 이용한 DNA 추출이 불가능할 경우에는 진단 당시 염색체 검사를 위해 RPMI 1640 media에 배양 후, colcemid와 0.075M KCl 저장용액 처리를 거쳐, 3:1 메탄올-빙초산(methanol-acetic acid) 혼합액으로 고정하여 -20°C에 보관되어 있었던 검체를 이용하여 DNA 추출하였다. DNA 추출은 phenol-chloroform 방법에 의거하였으며[21], *FLT3*-ITD 중합효소연쇄반응은 Kiyoi 등[22]의 방법을 따랐다. 추출된 DNA는 260 nm와 280 nm에서의 흡광도의 비가 1.6에서 2.0의 범위 내에 있음을 확인하여 100 μ g을 중합효소연쇄반응에 사용하였다. 시발체(primer) (Bioneer, Daejeon, Korea)는 11F (5' GCAATTTAGGTATGAAAGCC3'), 11R (5'CAAACCTCTAAATTTTCTCT3'), 12R (5'CTTTCAGCATTTTGACGGCA3')이었고, PTC-2000 DNA engine version 3.0 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)을 이용하였다.

3. *NPM1* 변이의 확인

골수생검조직이나 응고절편의 포르말린 고정 파라핀 묻힘 조직(formalin-fixed paraffin embedded tissue) 절편을 xylene과 95% ethanol을 이용하여 검체를 탈파라핀화 시킨 후, 일차 항체로 mouse anti-NPM monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 peroxidase-antiperoxidase, avidin-biotin-complex의 NPM 면역조직화학염색을 선별검사를 시행하였다. 판독한 결과에서 NPMc⁻인 군을 제외시키고, NPMc⁺이거나 세포 수가 적어서 해석이 용이하지 않은 경우 등을 선별하여, 해당 검체 및 짝지은 검체를 대상으로 BenchMark XT (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA)를 이용하여 면역조직화학염색을 재검하였고, 최종적으로 *NPM1* exon12에 대한 염기서열분석을 통해 *NPM1* 변이 유무를 판단하였다. 염기서열분석은 *FLT3*-ITD에서와 같은 방법으로 DNA를 추출한 후, NPM-sF (5'-GTT TCT TTT TTT TTT CCA

GGC TAT TCA AG-3')와 5'에 형광을 붙인 NPM-Rhex (5'-HEX-CAC GGT AGG GAA AGT TCT CAC TCT GC-3')를 시발체로 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행한 후[23], 증폭산물 0.1 μ L과 Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 10 μ L, GeneScan-500LIZ Size Standard (Applied Biosystems) 0.2 μ L 혼합물을 ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems)에 장착하여 변이 유무를 일차적으로 확인하였다. 변이가 나타날 경우 이차적으로 염기서열분석을 통해 변이형을 분석하였고[10], 이때에는 NPM-12F (5'-GAT GTT GAA CTA TGC AAA GAG ACA-3')와 NPM-12R (5'-CAC GGT AGG GAA AGT TCT CA-3') 시발체와, Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)를 사용하였다.

4. 통계 분석

골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병 전환된 후의 짝지은 검체에서 *FLT3*-ITD와 *NPMc*⁺의 빈도의 비교는 paired samples T test를 통해 실시하였고, 각 군 간의 생존기간의 비교는 Mann-Whitney U-test와 Kaplan-Meier analysis로 분석하였다. 모든 통계 처리는 SPSS Statistical software version 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 통계적 유의수준은 $P < 0.05$ 으로 하였다.

결 과

1. 대상군의 특성

연구 대상 환자는 357명이며 이 중 43명(12.0%)에서 급성골수성 백혈병으로 전환되었고 남자는 26명(60.5%), 여자는 17명(39.5%)이었으며, 골수형성이상증후군 진단 시 연령은 43.8세(1.7-79.4세)이었다. 최초 골수형성이상증후군 진단을 WHO 기준[20]에 따라 분류하면, 각각 불응성빈혈(refractory anemia, RA) 4명, 다계열형성 이상 불응성혈구 감소증(refractory cytopenia with multilineage dysplasia, RCMD) 7명, 모세포증가불응성빈혈-1 (refractory anemia with excess blast-1, RAEB-1) 10명, 모세포증가불응성빈혈-2 (RAEB-2) 22명이었다(Table 1). 골수형성이상증후군 진단 시 염색체검사가 시행된 30명 중 11명(36.7%)에서 이상핵형이 관찰되었고(Table 2), International Prognostic Scoring System (IPSS)에 따른 분류[24]상 저위험군 1명(3.3%), 중등도위험군 26명(86.7%), 고위험군 3명(10.0%)이었다. 급성골수성백혈병으로 전환된 시점에서는 32명에서 염색체검사가 시행되었으며, 이 중 15명(46.9%)에서 이상핵형이 관찰되었다. 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병 모두에서 염색체검사가 연속해서 이루어진 25명 중 11명(44.0%)은 두 시점 모두에서 정상핵형을 나타냈고, 5명(20.0%)은 연속 검사 결과 모두에서 동일한 이상핵형을 나타냈다. 이외에 골수형성이상증후군 당시 정상핵형에서 급성골수성백혈병으로 전환되면서 새

Table 1. Characteristics of different subtypes of MDS patients according to WHO classification

Patients	All	RA	RCMD	RAEB-1	RAEB-2
Number	43	4	7	10	22
Median age (yr, range)	43.8 (1.7-79.4)	46.0 (30.5-60.5)	63.8 (5.9-65.8)	34.9 (1.7-65.4)	42.9 (3.2-79.4)
Sex (male/female)	26/17	3/1	6/1	6/4	11/11
WBC (μ L)	9.4 \pm 20.6	2.3 \pm 0.9	3.6 \pm 2.1	6.1 \pm 5.5	14.0 \pm 24.0
Hemoglobin (g/dL)	7.8 \pm 2.7	8.4 \pm 0.9	8.9 \pm 2.5	7.7 \pm 2.6	7.4 \pm 3.0
Platelet (μ L)	91.7 \pm 71.4	79.0 \pm 22.7	91.3 \pm 52.7	96.0 \pm 85.1	92.2 \pm 78.7
Blasts in PB (%)	2.4 \pm 3.5	0	0.1 \pm 0.4	2.1 \pm 1.4	3.8 \pm 4.3
Blasts in BM (%)	8.8 \pm 5.1	1.7 \pm 0.8	3.1 \pm 1.4	7.2 \pm 1.1	12.7 \pm 3.7
Myeloid/erythroid	3.8 \pm 5.7	0.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.5	6.5 \pm 9.4	3.9 \pm 4.3
Dysmegakaryopoiesis (%)	74.4	0	85.7	80	77.3
Dysgranulopoiesis (%)	81.4	0	100	100	77.3
Dyserythropoiesis (%)	95.3	100	100	90	95.5
Cellularity (%)	70.6 \pm 24.0	63.8 \pm 14.9	61.4 \pm 16.5	85.5 \pm 18.5	67.9 \pm 27.5
Time to AML (mon)	11.6 \pm 16.4	3.5 \pm 1.9	19.5 \pm 20.0	15.5 \pm 26.4	8.8 \pm 8.7
Abnormal karyotype at MDS (%)	11/30 (36.7)	0/1 (0.0)	3/6 (50.0)	3/7 (42.9)	5/16 (31.3)
IPSS N (%)					
Low	1 (3.3)	-	1 (16.7)	-	-
Intermediate-1	14 (46.7)	1 (100.0)	4 (66.7)	5 (71.4)	4 (25.0)
Intermediate-2	12 (40.0)	-	1 (16.7)	2 (28.6)	9 (56.3)
High	3 (10.0)	-	-	-	3 (18.8)

Abbreviations: RA, refractory anemia; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, refractory anemia with excess blasts; WBC, white blood cell; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; IPSS, international prognostic scoring system.

롭게 이상형형이 발견된 경우가 4명(16.0%), 급성골수성백혈병에서 클론진화(clonal evolution)가 나타난 경우가 2명(8.0%)이었다.

2. 골수형성이상증후군 진단 및 급성골수성백혈병으로 전환 시의 *FLT3*-ITD와 *NPM1* 변이의 빈도

골수형성이상증후군 진단 시점의 검체로 시행된 *FLT3*-ITD 검사의 33예 모두에서 변이를 확인할 수 없었다. 반면, 급성골수성백

Table 2. Results of chromosomal analysis in patients with paired samples at MDS and AML stages

Age	Sex	Initial diagnosis	Karyotype	
			MDS	AML
41	M	RA	Normal	Normal
66	M	RCMD	Normal	Normal
25	M	RAEB-1	Normal	Normal
48	M	RAEB-1	Normal	Normal
65	F	RAEB-1	Normal	Normal
3	F	RAEB-2	Normal	Normal
25	F	RAEB-2	Normal	Normal
29	M	RAEB-2	Normal	Normal
42	F	RAEB-2	Normal	Normal
54	M	RAEB-2	Normal	Normal
60	F	RAEB-2	Normal	Normal
35	M	RAEB-1	+8	Normal*
51	F	RAEB-2	-7, +21	-7,+21
27	M	RAEB-1	del (9q)	del (9q)
15	M	RAEB-2	t (6;9)	t (6;9)
27	M	RAEB-2	t (6;11)	t (6;11)
44	F	RAEB-2	t (6;9)	t (6;9)
48	F	RAEB-1	i (17),+9,+13	i (17)
51	F	RAEB-2	+8,-X	+8
6	M	RCMD	Normal	del (7q)
55	M	RCMD	Normal	del (20q)
57	M	RAEB-2	Normal	add (16),-17
59	F	RAEB-2	Normal	+9,i (17)
46	F	RCMD	+8,der (20;21),+del (22q)	Complex
65	M	RCMD	+8	+8,+8
64	M	RCMD	Complex	NT
2	F	RAEB-1	Normal	NT
4	M	RAEB-2	Normal	NT
21	F	RAEB-2	Normal	NT
47	M	RAEB-2	Normal	NT
31	F	RA	NT	Normal
61	M	RA	NT	Normal
65	M	RCMD	NT	del (12q)
40	M	RAEB-2	NT	t (6;9)
42	F	RAEB-2	NT	inv (3),del (5q)
43	M	RAEB-2	NT	Normal
79	M	RAEB-2	NT	Normal

*In 1995, initial MDS had been diagnosed and hematopoietic stem cell transplanted. After 8 years, AML transformation was confirmed.

Abbreviations: M, male; F, female; NT, not tested; Others, See Table 1.

혈병 전환 시 34예 중 5예(14.7%)에서 *FLT3*-ITD가 나타났다. 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병의 모두에서 *FLT3*-ITD 검사가 시행된 31예에서 *FLT3*-ITD의 빈도를 분석한 결과, 급성골수성백혈병 전환 시 *FLT3*-ITD의 빈도가 16.1% (5/31)로 증가하였다 ($P=0.023$).

짝지는 40예의 결과를 포함한 골수형성이상증후군 41예와 급성골수성백혈병 42예를 대상으로 NPM 면역조직화학염색을 실시하였다. 이 중 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병 모두에서 NPMc로 판독된 36명과 급성골수성백혈병에서 NPMc로 확인된 2명 등 38명을 제외한 5명의 짝지는 10검체를 선별하여 *NPM1* exon 12 염기서열분석을 시행하였다(Table 3). 골수형성이상증후군에서는 CATG가 삽입된 B형 변이 1예(2.4%)가, 급성골수성백혈병은 B형 변이 4예 및 TCTG가 삽입된 A형 변이 1예 등 5예(11.6%) 모두에서 *NPM1* 변이가 각각 확인되었다(Fig. 1). 골수형성이상증후군 진단 당시 B형 변이를 보였던 불응성빈혈 1예는 급성골수성백혈병 전환 시 검체에서는 A형 변이로의 전환이 확인되었고, 골수형성이상증후군 진단 시 정상형을 보였던 나머지 4명에서는 급성골수성백혈병 전환된 시점에서 새로운 B형 변이가 나타났다.

3. 급성골수성백혈병으로 전환 시 *FLT3*-ITD와 *NPM1* 변이 양상에 따른 임상 경과의 차이

급성골수성백혈병으로 전환 시의 *FLT3*-ITD 양성인 5명은 Table 4와 같다. *FLT3*-ITD 양성인 군의 수가 적은 한계가 있었지만, Kaplan-Meier 생존분석에서 *FLT3*-ITD 양성군이 음성군($N=29$)에 비해 총생존기간이 짧은 양상이 나타났다($P=0.091$, Fig. 2). 그러나 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로의 진행까지의 기간 및 급성골수성백혈병으로 전환된 후 생존기간의 평균은 두 군 간에 차이가 나타나지 않았다(Table 5). 급성골수성백혈병으로 전환 후 완전관해에 도달한 비율은 *FLT3*-ITD 양성군이 60.0%, *FLT3*-ITD 음성군이 65.5%로 차이가 없었으나, *FLT3*-ITD 음성군의 CR 도달시간의 중앙값이 1.2개월로 *FLT3*-ITD 양성군의 4.7개월

Table 3. Results of immunohistochemistry for NPM and sequencing for exon 12 of *NPM1*

Patients			At MDS		At AML		
Age	Sex	Initial diagnosis	IHC	Sequencing	IHC	Sequencing	
63	M	RA	NPMc ⁺	Type B	NPMc ⁺	Type A	
60	F	RAEB1	NPMc ⁻	Wild	NPMc ⁺	Type B	
43	M	RAEB2	NPMc ⁻	Wild	NPMc ⁺	Type B	
57	M	RAEB2	NPMc ⁺	Wild	NT	Type B	
29	M	RAEB2	NPMc ⁻	Wild	NPMc ⁺	Type B	

Abbreviations: IHC, immunohistochemistry; NPM, nucleophosmin; NPMc⁺, positive for cytoplasmic NPM; NPMc⁻, negative for cytoplasmic NPM; Others, See Tables 1 and 2.

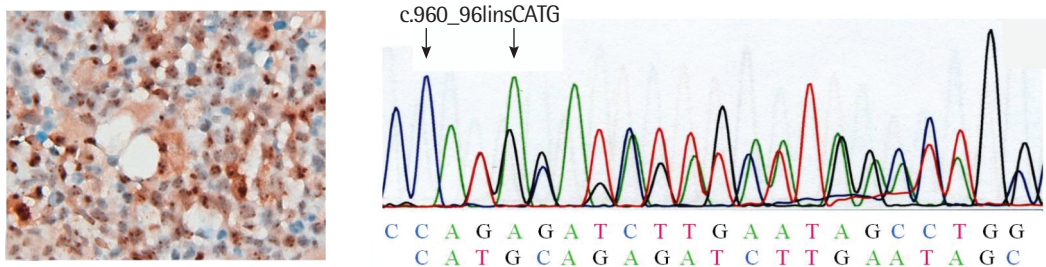


Fig. 1. Results of *NPMc*⁺ and *NPM1* exon 12 type B mutation in a patient with AML M2 transformed from RAEB1. (A) Some dysplastic cells show cytoplasmic expression with blurring margination for NPM. (B) Type B mutation of *NPM1* with CATG insertion (GenBank Accession No. AY740635) was confirmed by sequencing.

Abbreviations: See Tables 1 and 3.

Table 4. Characteristics of patients with *FLT3*-ITD at AML transformation

Age (yr)/sex	Initial MDS subtype	Karyotype		IPSS	<i>FLT3</i> -ITD		NPM		Time to AML (mon)	Overall survival (mon)	Survival after AML (mon)
		MDS	AML		MDS	AML	MDS	AML			
60/M	RA	NT	Normal	-	Negative	Positive	<i>NPMc</i> ⁻	<i>NPMc</i> ⁻	3.6	7.1	3.6
5/M	RCMD	NT	del(7q)	0.5	Negative	Positive	<i>NPMc</i> ⁻	<i>NPMc</i> ⁻	6.3	46.3	41.9
34/M	RAEB-1	NT	Complex	-	Negative	Positive	<i>NPMc</i> ⁻	<i>NPMc</i> ⁻	17.8	25.4	7.6
28/M	RAEB-2	Normal	Normal	2	Negative	Positive	<i>NPMc</i> ⁻	<i>NPMc</i> ⁻	2.2	6.1	3.9
14/M	RAEB-2	t(6;9)	t(6;9)	2.5	Negative	Positive	<i>NPMc</i> ⁻	<i>NPMc</i> ⁻	3.6	9.1	5.5

Abbreviations: *FLT3*-ITD, Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication; mon, month; Others, See Table 1.

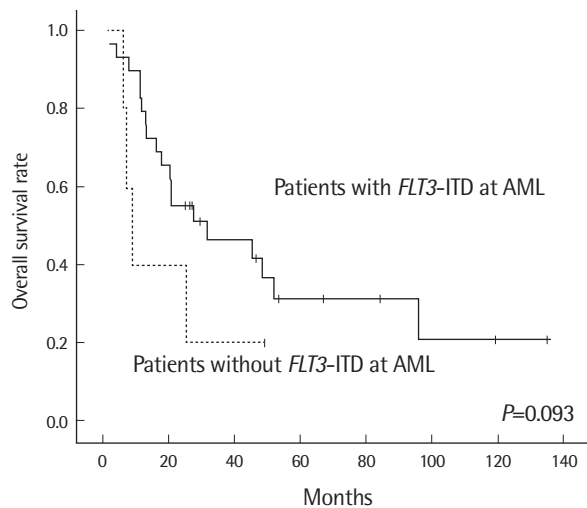


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves. MDS patients with *FLT3*-ITD (N=5, straight line) or without *FLT3*-ITD (N=29, dotted line) at AML transformation.

Abbreviations: See Table 1.

보다 유의하게 짧았다($P=0.007$).

동일한 분석을 급성골수성백혈병으로의 전환 시 정상핵형이었던 16명을 대상으로 시행하였다. 총 생존기간은 *FLT3*-ITD 양성군과 음성군에서 중앙값이 각각 6.6개월과 26.7개월로 양성인 군에서 통계적으로 유의하게 짧았지만($P=0.017$), 급성골수성백혈병으로 전환되는 기간 및 급성골수성백혈병 전환 후 생존기간은 두 군

Table 5. Relationship between *FLT3*-ITD results at AML transformation and clinical characteristics.

	<i>FLT3</i> -ITD at AML transformation		P value
	Positive (N=5)	Negative (N=29)	
Time to AML (mon)*	3.6 (3.6-4.4)	9.2 (4.1-18.2)	0.232
N of CR achievement (%)	3 (60.0)	19 (65.5)	0.274 [†]
Time to CR achievement (mon)*	4.7 (3.7-5.1)	1.2 (1.1-1.6)	0.007
Duration of CR (mon)* [‡]	2.7 (2.4-21.4)	5.7 (3.9-28.3)	0.573
Survival rate (%)	1/5 (20.0)	6/25 (24.0)	0.671 [†]
Overall survival (mon)*	9.1 (7.1-25.4)	26.3 (13.1-48.5)	0.163
Survival after AML (mon)*	5.5 (3.9-7.6)	9.4 (2.3-30.9)	0.888

*Values represent median (25-75 percentile), P value calculated by Mann-Whitney U-test, [†]P value calculated by Fisher's exact test, [‡]Values are defined by duration from CR to relapse or death.

Abbreviations: CR, complete remission; others, See Table 1.

간 유의한 차이를 나타내지 않았다($P=0.150$, $P=0.267$).

급성골수성백혈병 전환 시 *NPM1* 변이군 5예와 *NPMc*⁻인 38예의 Kaplan-Meier 생존분석은 차이가 없었고($P=0.873$), 골수형성 이상증후군에서 급성골수성백혈병으로의 진행기간 및 급성골수성백혈병으로 전환 후 생존기간 역시 차이가 없었다($P=0.940$, $P=0.880$, respectively).

고찰

최근 발전된 분자생물학적 분석기법은 정상핵형 *de novo* 급성골수성백혈병에서 기존에 알려졌었던 *CBFB*, *RUNX1*, *MLL* 등의

유전자 이상 이외에도, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3*, *IDH1* 등의 새로운 이상을 밝혀냈고, 이들 이상이 질병의 발병과 경과진행에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다[20, 25-27]. 골수형성이상증후군의 주요 특징 중 하나인 급성골수성백혈병으로의 진행에도 단계적인 핵형 또는 유전자 변이의 축적이 중요한 인자로 예상되나, 정확한 분자·유전학적 모델은 아직 확립되어 있지 않다[28]. 현재까지 골수형성이상증후군과 속발 급성골수성백혈병에서 DNA의 과메틸화(hypermethylation) 현상에 대한 보고가 있었고[29], *FLT3* 변이의 축적과 질병의 진행과의 연관성을 알아보고자 하는 시도들이 있었다[29-31]. 이러한 관점의 연장선상으로 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병의 연속 검체를 대상으로 한 *FLT3-ITD*에 관한 연구가 일부에서 수행되어 58예의 골수형성이상증후군 중 *FLT3-ITD*가 확인된 2예(3.5%)에서 1-3개월 내 급성골수성백혈병으로의 진행이 관찰되었고, 골수형성이상증후군에서 진행된 또 다른 급성골수성백혈병 2예에서 *FLT3-ITD*를 확인하였다는 보고가 있었다[32]. 그러나 골수형성이상증후군 단계에서 *FLT3-ITD*가 확인된 예는 RAEB in transformation (RAEB-t), 만성골수단구성백혈병으로서, 새로 개편된 골수형성이상증후군의 WHO 분류[20]에 해당되지 않는 질환군이었고, 급성골수성백혈병 단계에서 *FLT3-ITD*가 확인된 경우에는 골수형성이상증후군 진단 당시 *FLT3-ITD* 검사를 수행하지 못했다는 한계가 있었다. 이후, Shih 등[5]이 골수형성이상증후군과 이로부터 진행된 급성골수성백혈병의 짝지는 70명을 대상으로 *FLT3-ITD* 빈도 및 예후에 관한 연구를 수행하였으나, *FLT3-ITD*가 확인된 환자 구성이 골수형성이상증후군 단계에서는 3예 모두, 급성골수성백혈병 단계에서도 3예를 제외한 나머지 7예가 RAEB-t와 만성골수단구성백혈병과 관련된 환자이었다. 이에 본 연구에서는 WHO 분류[20]에 만족하는 골수형성이상증후군 환자군만을 대상으로 한 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병의 짝지는 검체에서 *FLT3-ITD*의 빈도와 이에 따른 임상 경과의 차이를 확인하고자 하였으며, 동시에 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이와 *FLT3-ITD* 간에 연관이 있다는 보고[14]에 기초하여, 같은 환자군을 대상으로 *NPM1* 변이의 빈도 및 이에 따른 임상 경과의 차이에 대한 연구도 병행하였다.

본 연구에서 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병의 짝지는 31예 중 *FLT3-ITD*는 급성골수성백혈병에서만 5예에서 확인되었는데 이는 기존의 결과[5, 32, 33]와 유사하였다. *FLT3-ITD*의 양성 급성골수성백혈병은 각각 RA와 RCMD에서 진행된 1예씩과 RAEB-1과 RAEB-2에서 진행된 1예와 2예에서 보였는데, 이 결과를 좀 더 진행된 골수형성이상증후군에서 기원한 급성골수성백혈병의 경우 *FLT3-ITD* 빈도가 높다는 최근의 보고[33]에 적용시키기에는 본 연구에 포함된 RA나 RCMD의 수가 RAEB에 비해 적어 무리가 있었다.

짝지는 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병에서 *FLT3-ITD*에 관한 연구 중 골수형성이상증후군 진단 당시 *FLT3-ITD*가 확인된 것은 Georgiou 등의 보고가 유일하며, 42명의 짝지는 검체 중 3예(7.1%)에서 *FLT3* 변이는 ITD 1예, TKD 1예, ITD와 TKD가 1예씩이었고, 이러한 *FLT3* 변이는 급성골수성백혈병 단계에서도 그대로 유지되고 있었다[34]. 이와 더불어 RCMD 진단 당시에는 *FLT3-ITD*가 나타나지 않았으나, 6개월 후 8%의 골수세포에서 *FLT3-ITD*가 확인되고 2개월 후 급성골수성백혈병으로 전환되었을 때에는 85%의 골수세포에서 *FLT3-ITD*가 확인되었다는 또 다른 연구보고[35]에 기초했을 때, 골수형성이상증후군에서 *FLT3-ITD* 빈도는 매우 낮지만, 급성골수성백혈병으로의 진행에 중요한 예측인자일 가능성이 높다고 판단된다. 아울러 생존기간은 골수형성이상증후군 진단 당시 *FLT3* 변이가 나타난 군에서 그렇지 않은 군에 비해 유의하게 짧아[34] 예후예측인자로서도 중요성이 높을 것으로 판단된다. 본 연구에서는 급성골수성백혈병 전환 시점에서 측정된 *FLT3-ITD*에 따라서도 임상 경과에 차이를 확인한 결과 *FLT3-ITD*가 발현된 경우에는 한 예를 제외하고 3.6-7.6개월의 짧은 생존기간을 가졌다. 급성골수성백혈병 전환 시 *FLT3-ITD* 양성군에서 완전관해까지의 도달 기간이 *FLT3-ITD* 음성군에 비하여 유의하게 길었으며($P=0.007$), 생존기간도 *FLT3-ITD* 양성군에서 짧은 경향이 나타났다($P=0.093$). 또한, 급성골수성백혈병 전환 시 정상핵형을 가진 환자 중 *FLT3-ITD* 양성군의 총 생존기간은 6.6개월로 음성군의 26.7개월로 통계적으로 유의하게 짧았다($P=0.017$). 특히, *FLT3-ITD* 양성군 중 1예에서 불량한 예후를 나타낸다고 보고된 *del(7q)* [36]의 소견을 가지고 있었음에도 40개월 이상의 긴 생존기간을 가진 예를 통하여 예후에 다른 유전자가 관여할 것으로 추정되며 이러한 것들이 반영되어 *FLT3-ITD* 양성군과 음성군의 임상양상을 비교한다면 더욱 의미 있는 차이를 확인할 수 있을 것이라고 예상할 수 있었다.

최근 여러 연구에 의해 정상핵형인 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이가 관찰되는 환자군은 양호한 임상경과를 나타낸다는 것이 밝혀졌다[10, 12, 14, 15]. *NPM1* 변이를 의미하는 *NPMc⁺*는 *de novo* 급성골수성백혈병에서 빈도가 높고, 속발 급성골수성백혈병, 골수형성이상증후군에서는 매우 드물다고 알려져 있어서[10, 18], 현재까지 골수형성이상증후군에서의 *NPM1* 변이의 확인은 38예를 대상으로 중합효소연쇄반응으로 확인한 2예(5.2%)의 보고가 유일하다[19]. 본 연구에서는 일차적으로 면역조직화학염색에서 *NPMc⁺*가 의심되는 증례에서 염기서열분석으로 *NPM1* 변이를 확인하는 방법을 통해 골수형성이상증후군 41예 중 *NPM1* type B 변이 1예(2.4%)를 확인하였다. 이 증례는 급성골수성백혈병으로 전환되면서 *NPM1* 변이의 type A 전환이 나타났다. *NPM1* 변이의 변화는 상대적으로 안정적이어서 급성골수성백혈병의 재발 시 같은

변이가 재발했거나 혹은 변이가 소실되었다는 기존의 보고와는 다른 결과로서[37, 38] 지금까지 보고된 바 없는 아형 전환이다. 본 연구에서 급성골수성백혈병 단계에서 5예(11.6%)의 *NPM1* 변이를 확인하였으며 이는 이차 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이가 드물다는 일련의 보고들에 비해 높은비율의 *NPM1* 변이다[10, 15]. 속발급성골수성백혈병에서 18.2%의 *NPMc+* 발현 비율을 보고한 연구가 있었으나, 속발급성골수성백혈병 33예에는 6예의 골수형성 이상증후군/골수증식질환이 포함되어 있었다는 한계가 있었다[39]. 따라서, 이번 연구 결과를 통해 골수형성이상증후군으로부터 진행한 급성골수성백혈병에서 확인된 11.6%의 *NPM1* 변이 비율은 Konoplev 등[39]의 연구 결과를 뒷받침하는 동시에, 이차 급성골수성백혈병의 선행 질환을 WHO 진단기준[20]에 부합한 골수형성이상증후군에 국한시켰다는 점에서 의미가 있다. 아울러 골수형성이상증후군 진단 시 *NPM1* 정상형이었던 4명에서 급성골수성백혈병 전환 시 새로운 *NPM1* 변이를 분자유전학적으로 확인한 점은 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로의 전환에 유전학적 변화의 축적과 관련이 있다는 기존의 보고를 간접적으로 뒷받침할 수 있는 분석결과이었다[2, 3].

골수형성이상증후군 진단 당시 NPM 면역화학조직화학염색에서 *NPMc+*로 선별되었던 1예에서는 염기서열분석에서 *NPM1* 변이를 확인할 수 없었다. 최근 총 104예의 급성골수성백혈병 중 NPM 면역조직화학 염색과 *NPM1* 염기서열분석 결과의 불일치율이 17.3%이었다는 발표가 있었지만, 급성골수성백혈병을 대상으로 했다는 점에서 이번 연구결과와는 차이가 있었다[39]. 골수형성이상증후군에서 *NPMc+*와 *NPM1* 변이 결과의 불일치는 골수모세포의 비율이 낮고, 여러 종류의 세포가 섞여 있는 골수형성이상증후군의 특성상, 일부 NPM 면역조직화학염색에서 나타날 수 있는 판독상 어려움이 원인이 있을 것으로 생각한다. 따라서 NPM에 대한 면역조직화학염색시 세포의 판독에 주의가 필요할 것으로 생각되며, 본 연구에서와 같이 *NPMc+*가 확실한 증례를 먼저 선별하여 제외한 후, 나머지 증례를 대상으로 염기서열분석을 통해 재확인하는 프로토콜을 통해 결과를 확정하는 것이 판독 오류를 방지할 수 있는 방법으로 판단된다.

저자들은 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로 진행한 환자를 대상으로, *FLT3*-ITD 및 *NPM1* 변이의 빈도 및 임상경과에 대한 후향적 연구를 시행하였다. 급성골수성백혈병으로 진행되면서 골수형성이상증후군보다 *FLT3*-ITD의 빈도가 증가하는 것으로 나타났고, *FLT3*-ITD인 급성골수성백혈병은 완전관해까지의 도달 기간이 *FLT3*-ITD 음성군에 비해 길었다. 또한 정상핵형을 갖는 급성골수성백혈병 환자에서 *FLT3*-ITD가 양성인 경우, 그렇지 않은 군에 비해 총 생존기간이 짧은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 골수형성이상증후군 단계에서 *FLT3*-ITD를 확인하지는 못

했지만, 급성골수성백혈병으로의 전환 시 *FLT3*-ITD 양성 빈도가 누적되었다는 점 및 다른 문헌 보고[33, 35]를 종합했을 때 골수형성이상증후군의 추적 관찰 시에 *FLT3*-ITD 및 NPM 검사를 병행한다면, 급성골수성백혈병으로의 전환을 예측할 수 있는 지표 및 예후인자로서 활용할 수 있을 것으로 판단하였다. 또한, 골수형성이상증후군과 이로부터 진행한 급성골수성백혈병-MRC에서 NPM 면역화학조직염색을 통해 *NPMc+*를 선별하여 제외한 후, *NPM1* exon 12 염기서열분석을 시행하는 방법을 이용하여 5예의 *NPM1* 변이를 확인하였다.

요 약

배경: 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로의 진행에는 분자 유전학적인 변화의 축적과 단계적인 변이가 영향을 미치는 것이 밝혀지고 있다. 그중 하나인 *FLT3* 변이는 골수형성이상증후군에서는 드물게 나타나는 반면, 급성골수성백혈병에서는 빈번히 나타나며, 골수형성이상증후군에서 *FLT3*- internal tandem duplication (ITD)가 나타날 경우 급성골수성백혈병으로의 진행 가능성이 보다 높다고 알려져 있다. 또한 급성골수성백혈병에서 nucleophosmin (NPM) 유전자(*NPM1*) 변이와 *FLT3*-ITD 간의 상관관계가 최근 보고되고 있다. 본 연구에서는 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로 진행된 환자들의 연속 검체를 대상으로, *FLT3*-ITD와 *NPM1* 변이의 빈도를 확인하고, *FLT3*-ITD와 *NPM1* 변이군과 그렇지 않은 군 간의 급성골수성백혈병으로의 진행기간과 생존기간이 어떠한 차이를 나타내는지 분석하고자 하였다.

방법: 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로 진행된 환자를 대상으로 *FLT3*-ITD의 확인은 중합효소연쇄반응으로, *NPM1* 변이는 NPM 면역조직화학염색법에서 세포질내 NPM의 발현의 음성을 선별하여 제외한 후 나머지 증례를 대상으로 염기서열분석을 실시하여 확인하였다.

결과: 골수형성이상증후군 환자 357명 중 43명(12.0%)에서 급성골수성백혈병으로 전환이 확인되었다. *FLT3*-ITD는 검사가 이루어진 골수형성이상증후군 단계의 33예 모두에서 관찰할 수 없었고, 급성골수성백혈병 전환 단계에서는 14.7% (5/34)에서 확인되었다. *NPM1* 변이는 골수형성이상증후군과 급성골수성백혈병에서 각각 2.4% (1/41)와 11.6% (5/43)로 나타났고, 골수형성이상증후군의 1예에서는 진단시 B형 변이가 급성골수성백혈병으로 전환하면서 A형 변이로 변화되었다. 급성골수성백혈병 전환 시의 *FLT3*-ITD 양성군은 음성군에 비해 총 생존기간이 짧은 양상이 나타났고, 급성골수성백혈병 전환 후 완전관해로 도달기간이 음성군보다 짧았다($P=0.007$). 급성골수성백혈병으로의 전환 시 정상 핵형인 16명에서 *FLT3*-ITD 양성군의 총 생존기간이 음성군보다 짧았다($P=0.017$).

결론: 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로 진행됨에 따라 *FLT3*-ITD의 빈도가 증가하고, 급성골수성백혈병 단계에서 *FLT3*-ITD인 경우에는 상대적으로 불량한 임상경과를 나타냈다. 골수형성이상증후군에서 *NPM1* 변이는 드물게 관찰되었으나 급성골수성백혈병에서 *NPM1* 변이를 획득하는 경우가 더 많았으며 골수형성이상증후군에서 급성골수성백혈병으로 전환 시 *NPM1* 변이의 아형이 변하는 예를 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Hofmann WK, Lubbert M, Hoelzer D, Phillip Koeffler H. Myelodysplastic syndromes. *Hematol J* 2004;5:1-8.
- Morgan MA and Reuter CW. Molecularly targeted therapies in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Ann Hematol* 2006;85:139-63.
- Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, et al. Human *FLT3/FLK2* gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993;82:1110-9.
- Shih LY, Lin TL, Wang PN, Wu JH, Dunn P, Kuo MC, et al. Internal tandem duplication of *fms-like tyrosine kinase 3* is associated with poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2004; 101:989-98.
- Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P, et al. Acquisition of *FLT3* or *N-ras* mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004;18:466-75.
- Yun JP, Chew EC, Liew CT, Chan JY, Jin ML, Ding MX, et al. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* 2003;90:1140-8.
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 1989;56:379-90.
- Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, Tease LA, et al. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 1989; 28:1033-9.
- Feuerstein N, Chan PK, Mond JJ. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. *J Biol Chem* 1988;263:10608-12.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005;352:254-66.
- Falini B, Martelli MP, Bolli N, Bonasso R, Ghia E, Pallotta MT, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (*NPM*) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;108:1999-2005.
- Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, Giarin E, Masetti R, Rossi V, et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005;106:1419-22.
- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. Analysis of *FLT3* length mutations in 1003 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.
- Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:2854-61.
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740-6.
- Falini B. Any role for the nucleophosmin (*NPM1*) gene in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities? *Leuk Lymphoma* 2007;48:2093-5.
- Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, et al. Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely occurs in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2008;49:2359-64.
- Shiseki M, Kitagawa Y, Wang YH, Yoshinaga K, Kondo T, Kuroiwa H, et al. Lack of nucleophosmin mutation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. *Leuk Lymphoma* 2007;48:2141-4.
- Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. *NPM1* mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res* 2007;31:109-11.
- Swerdlow SH, Campo E, et al. eds. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008.
- Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *Br J Haematol* 1998;101:349-51.
- 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.
- Huang Q, Chen W, Gaal KK, Slovak ML, Stein A, Weiss LM. A rapid,

- one step assay for simultaneous detection of *FLT3*/ITD and *NPM1* mutations in AML with normal cytogenetics. *Br J Haematol* 2008;142:489-92.
24. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-88.
 25. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2010;22:646-55.
 26. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363:2424-33.
 27. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361:1058-66.
 28. Steensma DP and Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006;81:104-30.
 29. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy TE, Paietta E, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* 2009;114:3448-58.
 30. Horiike S, Misawa S, Nakai H, Kaneko H, Yokota S, Taniwaki M, et al. N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1994;8:1331-6.
 31. Tien HF, Tang JH, Tsay W, Liu MC, Lee FY, Wang CH, et al. Methylation of the *p15(INK4B)* gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2001;112:148-54.
 32. Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, et al. Tandem duplications of the *FLT3* receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* 1997;11:1442-6.
 33. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92:744-52.
 34. Georgiou G, Karali V, Zouvelou C, Kyriakou E, Dimou M, Chrisochou S, et al. Serial determination of *FLT3* mutations in myelodysplastic syndrome patients at diagnosis, follow up or acute myeloid leukaemia transformation: incidence and their prognostic significance. *Br J Haematol* 2006;134:302-6.
 35. Pinheiro RF, de Sa Moreira E, Silva MR, Alberto FL, Chauffaille Mde L. *FLT3* internal tandem duplication during myelodysplastic syndrome follow-up: a marker of transformation to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;183:89-93.
 36. Visani G, Bernasconi P, Boni M, Castoldi G, Ciolli S, Clavio M, et al. The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia--analysis of 848 patients. *Leukemia* 2001;15:903-9.
 37. Palmisano M, Grafone T, Ottaviani E, Testoni N, Baccarani M, Martinelli G. *NPM1* mutations are more stable than *FLT3* mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92:1268-9.
 38. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with *NPM1* mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol* 2009;144:517-23.
 39. Konoplev S, Huang X, Drabkin HA, Koeppen H, Jones D, Kantarjian HM, et al. Cytoplasmic localization of nucleophosmin in bone marrow blasts of acute myeloid leukemia patients is not completely concordant with *NPM1* mutation and is not predictive of prognosis. *Cancer* 2009;115:4737-44.