

# 급성골수성백혈병과 골수이형성증후군 환자를 대상으로 한 NGS 골수성 패널 검사: 단일 상급종합병원에서의 경험

## Next-Generation Sequencing Myeloid Panel Test for Patients with AML and MDS: Experience in a Tertiary Care Hospital

문선호 · 서현석 · 전창호 · 이아진 · 유은형 · 김상경

Seon-Ho Mun, M.D., Hun Suk Suh, M.D., Chang-Ho Jeon, M.D., A-Jin Lee, M.D., Eun-Hyung Yoo, M.D., Sang-Gyung Kim, M.D.

대구가톨릭대학교병원 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Daegu Catholic University School of Medicine, Daegu, Korea

**Background:** Next-generation sequencing (NGS) technology can be used for detecting gene mutations in various patients. The NGS myeloid panel test can be specifically used for patients with a myeloid neoplasm. In this study, the NGS myeloid panel test was used for patients with AML and MDS, and the results are summarized and reported retrospectively.

**Methods:** Thirty-two NGS myeloid panel test results were reviewed retrospectively. Oncomine Myeloid Research Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) and Ion Torrent S5 XL (Thermo Fisher Scientific) were used for sequencing, and variant annotation was performed using Ion Reporter Software (Thermo Fisher Scientific). Filtered variants were classified into tiers 1, 2, and 3, according to the Association for Molecular Pathology guidelines.

**Results:** Eighty-seven variants were detected from 32 cases, and 30 cases (94%) had at least 1 variant classified into tier 1 or 2. The most frequently detected mutated gene in patients with AML was *DNMT3A* (N=8) and that in patients with MDS was *U2AF1* (N=4). Gene mutations were not detected in patients with MDS with single lineage dysplasia.

**Conclusions:** Clinically useful genetic mutations were found in patients with AML and MDS through an NGS myeloid panel test. Although there are limitations to this study due to the small number of cases, some differences were found between the results of this study and the genetic profiles of AML patients in other studies. Further evaluation of the genetic profile of myeloid neoplasm is needed, and the NGS myeloid panel test can be useful for this.

**Key Words:** Next-generation sequencing (NGS), Acute myeloid leukemia (AML), Myelodysplastic syndrome (MDS)

## 서론

급성골수성백혈병(AML)과 골수이형성증후군(MDS)은 골수성 악성 종양에서 가장 흔하게 나타나는 두 가지 질환이다[1]. 이 질환들의 진단법은 세포유전학, 중합효소연쇄반응(PCR) 기반의 분자

진단, 그리고 직접염기서열분석법(Sanger sequencing) 등이 활용되면서 빠르게 발전하였다[2]. 하지만 이런 고비용적인 방법들은 노동력 및 시간이 많이 들고, 잘 알려지지 않은 클론을 검출하기에는 부적합하다[3]. 최근에 개발되어 활용되고 있는 차세대 염기서열 분석법(next-generation Sequencing, NGS)은 한 번 분석에 여러 환자와 많은 종류의 유전자에 대해 동시에 검사가 가능하다[4].

AML은 분화되지 않은 골수 전구 세포의 클론성 증식이 특징으로, 이로 인해 조혈 기능에 장애가 생기게 된다[5]. AML에서의 염색체 구조 변이는 오랜 기간 연구 끝에 진단과 예후 판정의 표지자로 잘 활용되고 있다. 하지만 약 50%의 AML 환자는 염색체 구조 변이가 없는 정상 핵형을 가지고 있어 기존의 핵형 분석을 이용한 진단과 예후 분류는 어려웠다[6]. 최근에는 NGS가 개발되어 동시에 여러 가지 유전자 변이를 쉽게 검출할 수 있게 되면서 세계보건기구(WHO)와 European Leukemia Network (ELN)는 AML의 분류에 유전자 변이 여부를 활용하고 있다[7-9]. 2016 WHO 분류에서는 *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*, *RUNX1* 등의 유전자 변이들의 중요성

Corresponding author: Sang-Gyung Kim, M.D.

<https://orcid.org/0000-0001-6596-4175>

Department of Laboratory Medicine, Daegu Catholic University School of Medicine, 33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu 42472, Korea  
Tel: +82-53-650-4145, Fax: +82-53-653-8672, E-mail: sgkim@cu.ac.kr

Received: May 25, 2020

Revision received: August 30, 2020

Accepted: September 2, 2020

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

© 2021, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에 대해서 강조하였고, 2017 ELN에서는 *NPM1*, *FLT3-ITD*, *ASXL1*, *TP53*, *RUNX1* 등의 유전자 변이들이 환자의 예후에 영향을 준다고 분류하였다[3, 8, 9]. 이 외에도 유전자 변이는 치료에도 영향을 주는데, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* 등의 유전자 변이에 대한 표적 치료가 효과가 있는 것으로 알려져 있다[10].

MDS는 골수 전구 세포의 이형성과 조혈 기능의 장애로 인한 말초혈액의 혈구감소증을 특징으로 하는 클론성 골수 종양 질환으로[8], 성인에서의 후천적 골수 부전의 가장 흔한 원인으로 알려져 있다[11]. 차세대 염기서열 분석으로 MDS 환자의 약 90%에서 유전자 변이가 발견되었는데, *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53* 등의 변이가 흔한 걸로 알려져 있다[8]. 이 중 *SF3B1* 변이는 환형 철적혈모구와의 연관성이 있다고 밝혀졌다[11]. MDS의 예후 판정은 일반적으로 핵형 분석을 통한 염색체 변이를 기반으로 한 International Prognostic Scoring System (IPSS)을 흔하게 이용하지만, 이 내용과 독립적으로 *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, *ASXL1* 등의 유전자 변이가 좋지 않은 예후를 보인다는 것이 밝혀졌다[12, 13].

NGS는 골수 종양 질환을 대상으로 하는 연구에서 많이 이용되었고, 수백개의 유전자를 대상으로 하는 패널들을 사용하였다[4, 14]. 하지만 이러한 패널들은 연구 목적에는 적합하지만, 실제 임상에서 진료에 도움을 주기에는 많은 양의 정보를 분석하기 때문에 복잡하면서 진단을 늦출 수 있고, 획득한 추가 자료들도 대부분 임상 결정에는 영향을 주지 못하는 단점이 있다[3]. 따라서 NGS를 실제 임상에서 이용하기 위한 골수 종양 질환에 특이적인 유전자들을 대상으로 하는 다양한 종류의 상업적 NGS 골수성 패널 검사가 등장하였다. 이 패널 검사는 targeted sequencing을 기반으로 하고 있으며, 대개 25-50개의 유전자를 대상으로 한다[15].

본 연구에서는 이러한 상업적 NGS 골수성 패널 검사를 AML 및 MDS 환자들을 대상으로 활용하고 나온 결과들을 후향적으로 정리해보았다. 그 결과 AML 및 MDS 환자들에게서 각각 의미 있는 유전자 변화를 검출할 수 있었고, 저자들의 병원에서는 임상에서 잘 이용하고 있기에 문헌 고찰과 함께 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 환자와 검체

2018년 10월부터 2019년 10월까지 1년 동안 본원 진단검사의학과로 NGS 검사 시행을 위해 의뢰된 골수 검체 중 AML로 진단받은 20례와 MDS로 진단을 받은 12례를 포함하는 총 32례 환자들의 분석결과를 대상으로 후향적으로 분석하였다. AML 20명은 2016 세계보건기구 기준에 따른 아형으로 분류하면 Acute myelomonocytic leukemia (AMMoL) 4명, AML with maturation 4명, AML with

myelodysplasia related change (AML-MRC) 3명, AML without maturation 3명, AML with mutated *NPM1* 2명, AML with *RUNX1* 2명, AML with biallelic mutation of *CEBPA* 1명, pure erythroid leukemia 1명이었다. MDS 환자 12명은 MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD) 2명, MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD) 3명, MDS with excess blasts 1 (MDS-EB1) 4명, MDS with excess blasts 2 (MDS-EB2) 2명, MDS with isoated del(5q) 1명이었다. 일부 AML 환자에서는 고식적 유전자(*NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*) 변이 검사도 시행되었다[8]. 이 32명의 환자는 남성 11명과 여성 21명으로 구성되어 있으며, 평균 연령은 66세(범위 37-84세)였다.

DNA는 각 환자들의 골수 검체에서 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였고, Qubit ds-DNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)과 Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량화되었다.

### 2. NGS 라이브러리(library) 제작과 염기서열 분석

각 환자들의 검체들은 Oncomine Myeloid Research Assay (Thermo Fisher Scientific)와 Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조사의 가이드라인을 따라 타겟 증폭을 하였다. Oncomine Myeloid Research Assay는 526개의 amplicon을 포함하고 40개의 유전자를 타겟으로 하며, 이 유전자들은 full coding exon을 확인하는 17개의 유전자(*ASXL1*, *BCOR*, *CALR*, *CEBPA*, *ETV6*, *EZH2*, *IKZF1*, *NF1*, *PHF6*, *PRPF8*, *RB1*, *RUNX1*, *SH2B3*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, and *ZRSR2*)와 hotspot을 확인하는 23개의 유전자(*ABL1*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *FLT3*, *GATA2*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *MYD88*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, and *WT1*)로 구성되어 있다. 준비된 DNA 라이브러리는 Ion Torrent S5 XL (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 염기서열 분석을 진행하였다.

### 3. 결과 해석

Human genome build 19를 레퍼런스로 하여 Torrent Suite Software version 5.10 (Thermo Fisher Scientific)을 이용해 base calling과 alignment를 시행하였다. 변이에 대한 주석을 다는 과정은 Ion Reporter Software version 5.10.1.0 (Thermo Fisher Scientific)을 이용해 수행하였다. 주석이 달린 변이들은 임상적으로 의미 있는 변이를 가려내기 위해 SNV indel(5.6) filter chain과 Oncomine Variants(5.10) filter chain을 적용해 필터링하였고, 추가적으로 synonymous, intronic, 그리고 다형성인 변이들을 제외하였다. COSMIC database (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)와 ClinVar database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)에서 양성으로 확인된 변이

들도 제외하였다. 필터링을 거친 각 변이들은 Integrative Genomics Viewer (IGV)를 사용해 검토하였고[16], 최종적으로 나온 결과를 Association for Molecular Pathology에서 정한 가이드라인에 따라 임상적 의의가 강한 변이를 의미하는 Tier 1, 임상적 의의가 있을 수 있는 변이를 의미하는 Tier 2, 임상적 의의가 불분명한 변이를 의미하는 Tier 3으로 분류하였다[17]. Tier 1이나 Tier 2에 해당하는 변이가 1개 이상 발견된 환자는 해당 검사를 의뢰한 주치의에게 NGS 검사에서 임상적 의의가 있는 유전자 변이(clinically significant variant)가 발견되었다고 보고하였다. 양성 혹은 양성 가능성이 높은 변이를 의미하는 Tier 4는 필터링 과정에서 이미 제외되었기에 따로 분류하지 않았다.

## 결 과

총 32명 환자 중 30명(94%)의 환자에서 최소 1개 이상의 변이가 발견되었으며(Fig. 1), 환자 1명당 평균 약 2.7개의 변이가 발견되었다(범위 0-6개). 변이가 1개 이상 발견된 30명에서 총 87개의 변이가 확인되었고, 이 변이들을 Association for Molecular Pathology에서 정한 가이드라인에 따라 분류했을 때[17], Tier 1 변이가 39개(45%), Tier 2 변이가 30개(34%), Tier 3 변이가 18개(21%)인 것으로 나타났다(Table 1). 검사 대상 환자들 중 Tier 1이나 Tier 2에 해당하는 변이가 최소 1개 이상 발견된 환자는 29명(91%)이었다.

총 20명의 모든 AML 환자에서는 최소 1개 이상의 변이가 발견되

었으며(Fig. 1, Table 1), 환자 1명당 평균 3.2개의 변이가 발견되었다(범위 1-6개). AML 환자에서 가장 빈번하게 나타난 변이된 유전자는 *DNMT3A* (N=8)였고, 그 뒤를 이어 *TET2* (N=7), *IDH2* (N=5), *NRAS*, *RUNX1* (모두 N=4), *ASXL*, *CEBPA*, *FLT3*, *GATA2*, *NPM1*, *WT1* (모두 N=3), *PHF6*, *SF3B1* (모두 N=2), *BCOR*, *CSF3R*, *KRAS*, *MPL*, *NF1*, *SRSF2*, *TP53*, 그리고 *ZRSR2* (모두 N=1) 유전자 변이가 나타났다(Fig. 2A). AML 환자 총 13명에서는 *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*

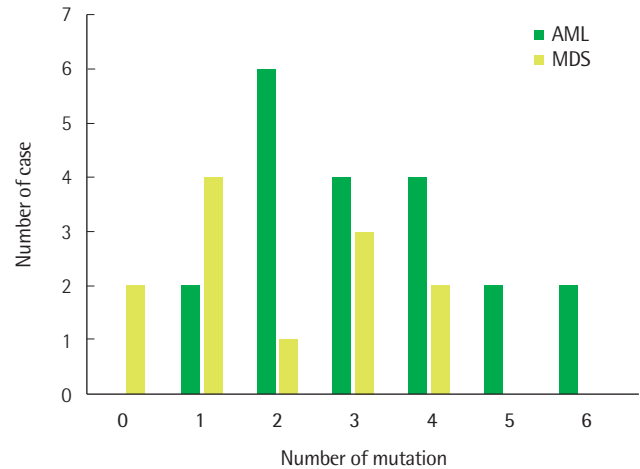


Fig. 1. Number of mutations per patient detected using the NGS myeloid panel test. Data include those for 20 patients with AML and 12 patients with MDS.

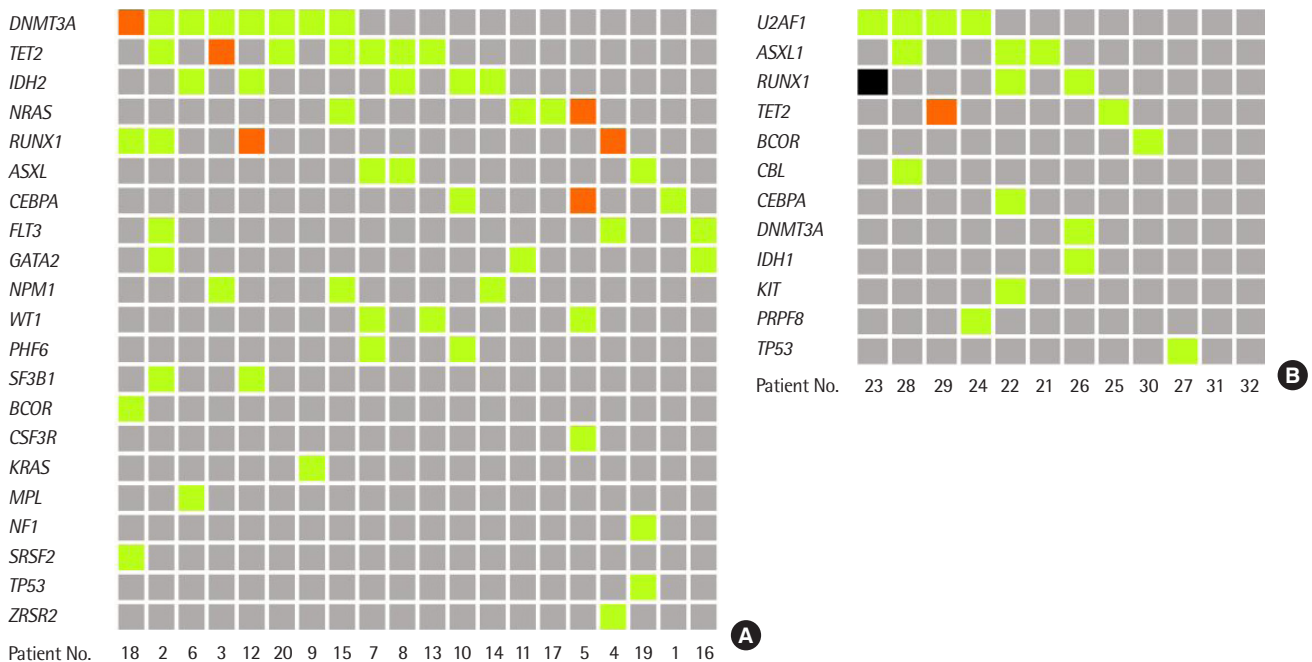


Fig. 2. Mutation status matrix. 87 detectable mutations are represented by colored boxes (green, orange, and black for tiers 1, 2, and 3 mutations, respectively). (A) Includes 20 patients with AML (B) Includes 12 patients with MDS.

Table 1. Summary of the 32 patients in this study

No.	Sex/ Age	Subtype*	Tier 1 variant <sup>†</sup>	Tier 2 variant <sup>†</sup>	Tier 3 variant <sup>†</sup>	Karyotype	Conventional genetic test results
1	F/77	AMMoL	<i>CEBPA</i> p.E148fs	Not detected	Not detected	Normal	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> +
2	M/59	AMMoL	<i>FLT3</i> ITD (33 bp) <i>RUNX1</i> p.D198G	<i>DNMT3A</i> p.D531fs	<i>GATA2</i> p.G320S <i>TET2</i> p.S69R	Normal	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> +, <i>CEBPA</i> -
3	F/83	AMMoL	<i>NPM1</i> p.W289fs	<i>DNMT3A</i> p.R882C <i>TET2</i> p.Q916*	<i>TET2</i> p.C1273F	Normal	<i>NPM1</i> +, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
4	M/73	AMMoL	<i>FLT3</i> ITD (24 bp) <i>RUNX1</i> p.R107G <i>RUNX1</i> p.G87fs	<i>ZRSR2</i> p.E118fs	Not detected	Normal	Not tested
5	F/57	AML with biallelic mutation in <i>CEBPA</i>	<i>CEBPA</i> p.P23fs <i>CEBPA</i> p.L315_ E316insT	<i>NRAS</i> p.Q61H <i>NRAS</i> p.G13D <i>WT1</i> p.R462W	<i>CSF3R</i> p.T648I	+21	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> +
6	F/66	AML with maturation	<i>IDH2</i> p.R140Q	<i>DNMT3A</i> p.R882C	<i>MPL</i> p.*G36Wext*13	add(22p)	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
7	F/75	AML with maturation	<i>ASXL1</i> p.Q588*	<i>TET2</i> p.E1411fs <i>WT1</i> p.A382fs	<i>PHF6</i> p.E152*	Normal	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
8	F/65	AML with maturation	<i>IDH2</i> p.R172K <i>ASXL1</i> p.E635fs	<i>TET2</i> p.S1758*	Not detected	Normal	Not tested
9	M/73	AML with maturation	<i>DNMT3A</i> p.R882H	<i>KRAS</i> p.G12D	Not detected	-7, add(8q)	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
10	F/37	AML with minimal differentiation	<i>CEBPA</i> p.K298N <i>IDH2</i> p.R172K	Not detected	<i>PHF6</i> p.L324P	t(1;2)	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> +
11	F/68	AML-MRC	Not detected	<i>NRAS</i> p.G12D	<i>GATA2</i> p.L359V	del(5q)	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
12	M/79	AML-MRC	<i>IDH2</i> p.R140Q <i>RUNX1</i> p.I342fs <i>RUNX1</i> p.S322*	<i>DNMT3A</i> p.F827fs <i>SF3B1</i> p.K700E	Not detected	Normal	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
13	F/51	AML-MRC	Not detected	<i>TET2</i> p.F868L	<i>WT1</i> p.H465R	Normal	Not tested
14	F/79	AML with mutated <i>NPM1</i>	<i>IDH2</i> p.R140Q <i>NPM1</i> p.W288fs	Not detected	Not detected	Normal	<i>NPM1</i> +, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
15	F/84	AML with mutated <i>NPM1</i>	<i>NPM1</i> p.W288fs	<i>NRAS</i> p.G13D <i>DNMT3A</i> p.R659P	<i>TET2</i> p.L1899H	Normal	Not tested
16	M/77	AML with <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	<i>FLT3</i> ITD (39 bp)	Not detected	<i>GATA2</i> p.A372T	-Y, t(8;21)	Not tested
17	F/54	AML with <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Not detected	<i>NRAS</i> p.G13D	Not detected	t(8;21)	Not tested
18	F/77	AML without maturation	<i>RUNX1</i> p.A149E	<i>BCOR</i> p.K1972fs <i>DNMT3A</i> p.R882H <i>DNMT3A</i> p.W860R <i>SRSF2</i> p.P95L	Not detected	Normal	Not tested
19	M/66	AML without maturation	<i>ASXL1</i> p.E705*	<i>NF1</i> p.S2597fs	<i>TP53</i> p.E271K	add(7q), add(17p)	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
20	F/66	Pure erythroid leukemia	Not detected	<i>DNMT3A</i> p.R729W <i>TET2</i> p.D1587fs	Not detected	Complex >3 abnormality	<i>NPM1</i> -, <i>FLT3</i> -, <i>CEBPA</i> -
21	F/47	MDS with isolated del(5q)	<i>ASXL1</i> p.D1000G	Not detected	Not detected	del(5q)	Not tested
22	M/62	MDS-EB1	<i>ASXL1</i> p.A640fs <i>KIT</i> p.D816V <i>RUNX1</i> p.Q185fs	Not detected	<i>CEBPA</i> p.Q83fs	Normal	Not tested
23	F/58	MDS-EB1	<i>RUNX1</i> p.S293fs <i>RUNX1</i> p.P263fs	<i>U2AF1</i> p.Y158_E159dup	Not detected	+1, der(1;7)(q10;p10)	Not tested
24	M/60	MDS-EB1	<i>U2AF1</i> p.Q157P	Not detected	<i>PRPF8</i> p.I1571M	Normal	Not tested
25	F/70	MDS-EB1	Not detected	<i>TET2</i> p.F868L	Not detected	Normal	Not tested
26	F/70	MDS-EB2	<i>RUNX1</i> p.R107C	<i>IDH1</i> p.R132C	<i>DNMT3A</i> p.R882H	Normal	Not tested
27	M/77	MDS-EB2	<i>TP53</i> p.R273H	Not detected	Not detected	Complex >3 abnormality	Not tested
28	F/74	MDS-MLD	<i>ASXL1</i> p.Y591* <i>CBL</i> p.P417S <i>U2AF1</i> p.Q157P	Not detected	Not detected	Normal	Not tested
29	M/76	MDS-MLD	<i>U2AF1</i> p.Q157H	<i>TET2</i> p.Q831*	<i>TET2</i> p.K944del	Normal	Not tested
30	F/60	MDS-MLD	Not detected	Not detected	<i>BCOR</i> p.E630K	Normal	Not tested
31	F/50	MDS-SLD	Not detected	Not detected	Not detected	Normal	Not tested
32	M/58	MDS-SLD	Not detected	Not detected	Not detected	Complex >3 abnormality	Not tested

\*Subtypes at diagnosis were established according to the 2016 World Health Organization classification [8]. <sup>†</sup> Variants were classified according to the Association of Molecular Pathology guidelines [16].

Abbreviations: AMMoL, acute myelomonocytic leukemia; AML-MRC, AML with myelodysplasia related change; MDS-EB, MDS with excess blasts; MDS-MLD, MDS with multilineage dysplasia; MDS-SLD, MDS with single lineage dysplasia.



유전자를 대상으로 하는 고식적 유전자 변이 검사가 시행되었고, NGS myeloid 패널 검사 결과와 차이를 보이지 않았다(Table 1).

MDS 환자에서는 12명 중 10명(83%)에게서 1개 이상의 변이가 발견되었고(Fig. 1, Table 1), 환자 1명당 평균 약 1.9개의 변이가 발견되었다(범위 0-4개). MDS 환자에서 가장 빈번하게 나타난 변이된 유전자는 *U2AF1* (N=4)였고, 그 뒤로 *ASXL1*, *RUNX1* (모두 N=3), *TET2* (N=2), *BCOR*, *CBL*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *IDH1*, *KIT*, *PRPF8*, *TP53* (모두 N=1) 유전자 변이가 나타났다(Fig. 2B). 2명(17%)의 MDS 환자가 MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD) 아형으로 분류되었는데, 이 2명 모두 NGS 검사에서 변이가 발견되지 않았다(Table 1). 나머지 10명(83%)의 다른 MDS 아형을 가진 환자들은 모두 최소 1개 이상의 변이가 발견되었다.

## 고 찰

골수성 종양 환자를 대상으로 진단을 위한 NGS 검사를 시작한 후 약 1년간 의뢰를 받았던 32례의 검사 결과를 후향적으로 분석하였고, 적은 증례 수로 인한 한계점이 있지만 여러 의미 있는 결과들을 얻을 수 있었다. 먼저 검사 대상 중 94% (30명)에서 최소 1개 이상의 변이를 발견했으며, 91% (29명)의 환자들은 임상적으로 의의가 있다고 볼 수 있는 Tier 1 혹은 Tier 2 변이가 최소 1개 이상 검출되었다. Levy 등은 380명의 골수성 종양 환자를 대상으로 NGS myeloid 패널 검사를 하였는데, 192명(50.5%)의 환자에서 Tier 1 혹은 Tier 2 변이가 나타났다고 보고하였다[18]. 본 연구 결과와 큰 차이를 보이는데, 이는 Levy 등이 진행한 연구에서는 골수 증식성 질환이나 만성 골수성 백혈병, 재생 불량성 빈혈 등 다양한 종류의 골수성 종양 질환을 가진 환자들을 대상으로 하였으나, 본 연구는 AML과 MDS 환자들에 대해서만 분석하였기에 차이가 나타난다고 추측된다. 실제로 Levy 등이 보고한 결과에서 AML 환자군에서는 80.8%, MDS 환자군에서는 67.8%에서 Tier 1 혹은 Tier 2 변이가 검출되어 다른 골수성 종양 질환들에 비해 높게 나타났다[18]. 따라서 골수성 종양 질환, 특히 AML 및 MDS 환자들에 대해서는 NGS myeloid 패널 검사가 임상적으로 유용하다고 할 수 있겠다.

본 연구에서는 AML 환자들에서 *DNMT3A*, *TET2*, *IDH2* 순으로 변이가 자주 나타났다. 특히 *DNMT3A*의 변이가 AML 환자 중에서 가장 자주 나타났는데(8명, 40%), *DNMT3A*는 DNA 메틸화에 관련된 유전자로 잘 알려져 있다[6]. 현재 세계보건기구 진단 기준에 *DNMT3A*의 변이 여부는 관련이 없으며[8], 일부 연구에서 *DNMT3A* 변이가 나쁜 예후를 보였다고 보고하였으나[19], 반대로 *DNMT3A* 변이와 함께 *NPM1* 및 *NRAS* 변이가 동반되는 경우에는 오히려 좋은 예후를 보였다는 보고도 있어 *DNMT3A* 변이의 예후에 관해서도 아직 논란 중이다[5]. Ley 등이 분석한 200명의 AML

환자군에서는 *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A* 순으로 유전자 변이가 자주 나타나는 것으로 보고되었고[6], Alonso 등이 분석한 162명의 AML 환자군에서는 *NPM1*, *DNMT3A*, *FLT3* 순으로 자주 변이가 자주 나타났다[3]. 두 연구에서 자주 나타났다고 보고된 유전자 변이는 본 연구와 많은 차이를 보였는데, 그 원인으로 본 연구의 적은 증례 수로 인한 한계가 가장 가능성이 높다. 하지만 Ley 등[6]은 미국, Alonso 등[3]은 스페인에서 진행한 연구이기 때문에 한국에서 진행한 본 연구와 비교했을 때 인종 차이로 인한 가능성도 배제할 수 없다. 한국 내 AML 환자들을 대상으로 한 유전적 프로파일 관련 연구에서는, Shin 등이 분석한 114명의 AML 환자군에서는 *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A* 순으로 변이가 자주 나타나 해외의 연구들과 비슷한 양상을 보였으나[20], Kim 등이 215개 유전자를 타겟으로 하는 차세대 염기서열 분석법으로 분석한 95명의 AML 환자군에서는 *FLT3*, *NPM1*, *ASXL1* 순으로 변이가 자주 나타나 해외의 연구들과 차이를 보였다[14]. 본 연구 및 한국 내 AML 환자들을 대상으로 한 다른 연구들의 결과가 서로 상이한 양상이 나타났으며[14, 20], 따라서 차세대 염기서열 분석법을 활용하여 한국인 AML 환자들에 대한 유전적 프로파일에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다.

본 연구에서 MDS 환자군에서는 *U2AF1*, *ASXL1*, *RUNX1* 순으로 변이를 자주 나타내는 것으로 나왔다. *U2AF1* 변이는 연구 대상 MDS 환자의 33% (4명)에서 나타났는데, *U2AF1*은 스플라이소솜(spliceosome)을 이루는 구성 요소로 알려져 있다[21]. 특히 *U2AF1*, *SF3B1*, *SRSF2*와 같은 스플라이소솜 구성 요소들에 나타나는 변이는 AML과 비교했을 때 특히 MDS에 특이적이라고 알려져 있다[21]. *U2AF1* 변이의 예후에 관해서는 논란 중이나, 최근에 발표된 2013년에서 2019년까지의 MDS 환자의 *U2AF1* 변이 관련 연구 및 증례 보고들을 메타 분석한 연구에서 *U2AF1* 변이가 안 좋은 예후를 보인다고 보고하였다[22]. Papaemmanuil 등이 738명의 MDS 환자를 대상으로 한 연구에서는 *SF3B1* 변이가 가장 흔하게 나타났고, 그 뒤로 *TET2*, *SRSF2* 등의 변이가 자주 나타났다[23]. 한국 내 MDS 환자들의 유전적 프로파일에 대해서는 아직 보고된 바 없어 인종 차이로 인한 가능성을 배제할 수는 없으나 증례 수가 매우 적은 관계로 추가적인 증례가 더 필요하다.

본 연구에서 MDS-SLD로 분류된 환자 2명은 모두가 NGS myeloid 패널 검사에서 변이가 검출되지 않았다. MDS의 유전적 프로파일에 대해서 분석한 Papaemmanuil 등의 연구와 Haferlach 등의 연구에서는 MDS 환자의 약 10-26%에서 변이가 1개도 검출되지 않아 본 연구 결과와 비슷한 양상을 보였다[23, 24]. 또한 이 연구들은 MDS의 아형을 2008년 세계보건기구 분류 기준에 따라 분류하였는데, MDS-SLD와 진단 기준이 가장 비슷한 아형인 MDS with refractory anemia의 약 40-50%에서 변이가 1개도 발견되지 않았다고 보고하였다[23, 24]. 따라서 MDS-SLD 아형으로 진단된 환자에

대해서는 NGS myeloid 패널 검사의 비용을 고려하여 검사의 필요성에 대해 추가적인 연구를 통해 판단을 해야 한다고 생각한다.

본 연구의 결과를 종합하면, 1년 동안 시행한 32예의 AML 및 MDS 환자들에 대한 NGS 골수성 패널 검사를 통해 임상적으로 유용하다고 알려진 유전자 변이들이 발견되었는데, MDS보다는 AML에서 더 많은 변이가 있었고, AML 환자의 경우 20명 환자 모두에서 Tier 2 이상의 변이가 나왔고, MDS의 경우 MDS-SLD에서는 변이가 나오지 않았다. AML 환자에서 가장 자주 발견된 변이 유전자인 *DNMT3A*는 DNA 메틸화에 관련된 유전자이며, MDS 환자에서는 스플라이소솜(spliceosome)을 이루는 구성 요소인 *U2AF1* 유전자의 변이가 가장 자주 발견되어 AML과 MDS 환자들 유전자 변이가 차이가 있음을 알 수 있었다. 비록 적은 수의 증례이나 본원에서 시행한 NGS 골수성 패널 검사 결과를 토대로 국내 및 해외 연구들에서 나타난 AML 및 MDS 유전자 프로파일을 비교해 보았는데, AML 환자에 대해서는 유전자 프로파일에 일부 차이가 나타났으며, 국내 MDS 환자들에 대한 유전자 프로파일에 대해서는 보고된 바가 없어 이 질환들의 유전자 프로파일에 대해 국내 환자들을 대상으로 한 추가 연구가 필요하다. 이를 위해서는 AML 및 MDS 국내 환자들의 유전자 변이에 대한 임상 데이터가 많이 필요하며, 이를 위해서는 NGS 골수성 패널 검사가 도움이 될 것으로 판단된다.

## 요 약

**배경:** 차세대 염기서열 분석법(NGS)은 최근에 다양한 환자들을 대상으로 유전자 변이를 검출하는데 사용되며, NGS 골수성 패널 검사는 골수 종양 질환을 가진 환자들에 특이적이다. 본 연구에서는 NGS 골수성 패널 검사를 급성골수성백혈병(AML) 및 골수이형성증후군(MDS) 환자들을 대상으로 활용하고 나온 결과들을 후향적으로 정리하여 보고하고자 한다.

**방법:** 총 32명 환자의 NGS 골수성 패널 검사 결과를 후향적으로 검토하였다. OncoPrint Myeloid Research Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)와 Ion Torrent S5 XL (Thermo Fisher Scientific)이 염기서열 분석에 사용되었고, 변이에 대한 주석을 다는 과정은 Ion Reporter Software (Thermo Fisher Scientific)로 시행하였다. 필터링을 거친 각 변이들은 Association for Molecular Pathology에서 정한 가이드라인에 따라 Tier 1, 2 그리고 3으로 분류하였다.

**결과:** 32명 환자에서 총 87개의 변이가 확인되었고, 30명(91%)의 환자에서 Tier 1 혹은 2로 분류되는 변이가 최소 1개 이상 발견되었다. AML 환자에서 가장 빈번하게 나타난 변이된 유전자는 *DNMT3A* (N=8)였고, MDS 환자에서는 *U2AF1* (N=4)의 변이가 가장 빈번하게 나타났다. MDS with single lineage dysplasia 환자에서는 변이가 검출되지 않았다.

**결론:** NGS 골수성 패널 검사를 통해 AML과 MDS 환자에서 임상적으로 유용한 유전자 변이들이 발견되었다. 비록 적은 증례 수로 인한 한계는 있지만, 본 연구에서 나온 결과와 타 연구들에서 나타난 AML 환자의 유전적 프로파일에 일부 차이가 나타났다. 골수 종양 질환의 유전적 프로파일에 대한 추가 연구가 필요하며, 이를 위해 NGS 골수성 패널 검사가 도움이 될 것으로 판단된다.

## 이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

## REFERENCES

1. Duncavage EJ and Tandon B. The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol* 2015;37:115-21.
2. Shumilov E, Flach J, Kohlmann A, Banz Y, Bonadies N, Fiedler M, et al. Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. *Blood Rev* 2018;32:508-19.
3. Alonso CM, Llop M, Sargas C, Pedrola L, Panadero J, Hervás D, et al. Clinical utility of a next-generation sequencing panel for acute myeloid leukemia diagnostics. *J Mol Diagn* 2019;21:228-40.
4. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: advantages and challenges. *Cancers (Basel)* 2015;7:2023-36.
5. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L1, Gaidzik V11, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016;374:2209-21.
6. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:2059-74.
7. Docking TR and Karsan A. Genomic testing in myeloid malignancy. *Int J Lab Hematol* 2019;41(S):117-25.
8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405.
9. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424-47.
10. Stein EM. Molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015;2015:579-83.

11. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D et al. Somatic *SF3B1* mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med* 2011;365:1384-95.
12. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011;364:2496-506.
13. 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.
14. Kim B, Lee H, Jang J, Kim SJ, Lee ST, Cheong JW, et al. Targeted next generation sequencing can serve as an alternative to conventional tests in myeloid neoplasm. *PLoS ONE* 2019;14:e0212228.
15. Bacher U, Shumilov E, Flach J, Porret N, Joncourt R, Wiedemann G, et al. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood Cancer J* 2018;8:113.
16. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;14:178-92.
17. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4-23.
18. Levy MA, Santos S, Kerkhof J, Stuart A, Aref-Eshghi E, Guo F, et al. Implementation of an NGS-based sequencing and gene fusion panel for clinical screening of patients with suspected hematologic malignancies. *Eur J Haematol* 2019;103:178-89.
19. 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.
20. Shin SY, Lee ST, Kim HJ, Cho EH, Kim JW, Park S, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of *DNMT3A* mutations. *Oncotarget* 2016;7:54825-37.21. Kennedy JA and Ebert BL. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2017;35:968-74.
22. Li B, Zou D, Yang S, Ouyang G, Mu Q. Prognostic significance of *U2AF1* mutations in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2019;11:300060519891013.
23. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;122:3616-27.
24. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014;28:241-7.