



# HLA-DR과 CD34 음성인 급성골수성백혈병의 빈도 및 특징: 전형적 급성골수성백혈병과 급성전골수구백혈병 사이의 중간적 특질

## Frequency and Distinct Characteristics of Acute Myeloid Leukemia Lacking HLA-DR and CD34 Expression: Features Intermediate between Typical Acute Myeloid Leukemia and Acute Promyelocytic Leukemia

이혜영 · 조영욱 · 유은경 · 장성수 · 서을주 · 박찬정

Hye-Young Lee, M.D., Young-Uk Cho, M.D., Eunyoung You, 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 and Asan Medical Center, Seoul, Korea

**Background:** The objective of this study was to investigate the frequency and characteristics of HLA-DR/CD34<sup>-</sup> acute myeloid leukemia (AML) also known as acute promyelocytic leukemia (APL)-like AML.

**Methods:** This study included 683 newly diagnosed patients with AML. After exclusion of 211 patients with recurrent genetic abnormalities, one with acute panmyelosis with myelofibrosis, two with myeloid leukemia associated with Down syndrome, and two devoid of metaphase cells, we classified the remaining 467 patients as follows: group 1, HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (typical AML); group 2, HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> or HLA-DR/CD34<sup>+</sup>; group 3, APL-like AML.

**Results:** Group 1 comprised 294 patients, group 2 comprised 133, and group 3 comprised 40. Therefore, the frequency of APL-like AML among 683 unselected patients with AML was 5.9%. Group 3 patients had significantly higher leukocyte counts and bone marrow (BM) blast percentages, higher frequencies of normal karyotypes and *NPM1* mutation, higher fractions of CD33-positive cells, higher concentrations of fibrin degradation products and D-dimers, lower frequencies of complex karyotypes, monosomal karyotypes and poor cytogenetic risk, lower fractions of CD13-positive cells, and lower fibrinogen concentrations, compared with group 1 patients. The values of the BM blast percentage, number of CD33-positive cells, and DIC score of the patients with APL-like AML were intermediate between those of the patients with typical AML and APL.

**Conclusions:** This study demonstrates that APL-like AML is not uncommon, and it has characteristics distinguishable from those of typical AML. APL-like AML may have some pathophysiological relationships with APL, which need further investigation.

**Key Words:** Acute promyelocytic leukemia, Acute myeloid leukemia, HLA-DR, CD34, Immunophenotype, DIC, *NPM1* mutation

## 서론

**Corresponding author:** Young-Uk Cho

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, 88 Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea

Tel: +82-2-3010-4501, Fax: +82-2-478-0884, E-mail: yucho@amc.seoul.kr

Received: August 22, 2016

Revision received: December 24, 2016

Accepted: January 4, 2017

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

© 2017, 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/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

급성전골수구백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)의 전형적인 면역표현형은 HLA-DR과 CD34의 소실, 균질하면서도 강한 CD33의 발현, 그리고 CD33에 비해 상대적으로 약하고 불균질한 CD13의 발현으로 요약된다[1]. APL은 파종혈관내응고(disseminated intravascular coagulation, DIC)를 잘 동반하므로, 신속한 진단을 통해 치명적인 출혈합병증을 예방하여 초기 사망률을 낮추는 것이 중요하다[2]. 다변량유세포분석을 이용한 면역표현형 검사는 검사소요시간이 짧고, 폭넓게 보급되어 있으며, APL의 특징적인 소견이 이미 확립되어 있어 APL의 예비진단에 충분히 활용될 수 있다. 그러나 APL의 대표적 면역표현형인 HLA-DR과 CD34의

소실은 *PML-RARA* 유전자 재배열을 보이지 않는 AML에서도 관찰될 수 있음이 알려져 있다[1-7].

대부분의 이전 연구는 HLA-DR 음성인 AML을 대상으로 하였다. 지금까지 알려진 HLA-DR 음성인 APL이 아닌 AML의 특징으로는 높은 CXCR-4 발현율, 껍모양의 핵, CD34 및 CD2의 소실, 증가된 백혈구와 혈소판 수, 그리고 *FLT3*-ITD와 *NPM1* 돌연변이와의 연관성 등이 있다[3-7]. 그러나 HLA-DR/CD34<sup>+</sup> AML 환자군만을 분석한 보고는 하나밖에 없었다[8]. 이 연구에 따르면 HLA-DR/CD34<sup>+</sup> 이면서 *NPM1* 돌연변이 양성인 AML이 APL과 구분되는 특징적인 면역표현형을 보였다고 하였다. 그러나 대상 환자수가 적어 전체 AML 환자군에서 APL이 아니면서도 HLA-DR/CD34<sup>+</sup>인 AML의 정확한 빈도를 파악하기 어렵고, 면역표현형 외 다른 특징에 대한 기술이 없었다는 제한점이 있다.

본 연구에서는 HLA-DR과 CD34를 모두 발현하지 않으면서 *PML-RARA* 재배열 또는 t(15;17)(q22;q12)를 보이지 않는 AML (APL-유사 AML)의 빈도와 임상적 그리고 병리학적 특성을 분석하고자 하였다. 더 나아가 APL과 HLA-DR 및 CD34 모두 양성인 전형적 AML 환자군과의 특성을 비교함으로써 APL-유사 AML이 두 아형 사이의 연속선상에 있는 중간적 특질을 띠는지 여부도 조사하여 병태생리학적 연관성을 유추해보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2011년 1월부터 2015년 12월까지 서울아산병원에서 새로 진단 받은 683명의 AML 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자 중 남자는 387명(56.7%), 여자는 296명(43.3%)이었고, 연령의 중앙값은 54세였다. AML의 진단은 2008년 WHO 진단기준에 의거하였다. 전체 AML 환자군을 대상으로 APL-유사 AML 환자군의 빈도를 계산하였다. 그러나 HLA-DR과 CD34의 발현양상에 따른 환자군 분류와 각 군 간의 특성 비교에는 반복유전자이상 AML (N=211), 골수섬유증 동반 급성범골수증(N=1), 다운 증후군 관련 골수성 백혈병(N=2) 환자는 제외하였다. 왜냐하면 각 아형마다 그 자체만으로 고유한 특성을 가지므로 APL-유사 AML 환자군의 특징을 도출하는데 바이어스로 작용할 수 있기 때문이다. 또한 중기분열세포를 얻지 못해 핵형분석을 실시하지 못한 2명의 환자도 비교분석에서 제외하였다. 결과적으로 총 467명의 환자를 HLA-DR과 CD34의 발현양상에 따라 다음과 같이 세 군으로 분류하였다: 제1군, HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (전형적 AML); 제2군, HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> 또는 HLA-DR<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>; 제3군, HLA-DR<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup> (APL-유사 AML). 환자군의 인구학적 특성, 임상적 및 검사실적 소견, 면역표현형, 세포유전학적 소견 그리고 돌연변이 결과는 의무기록을 통해 후향적으로 조사하였다.

본 검사실의 AML에 대한 진단적 접근은 다음과 같다. 면역표현형 검사, 다중역전사효소 PCR, 핵형검사, *FLT3*-ITD는 모든 환자에서 기본적으로 시행하였다. 그러나 *NPM1*, *CEBPA*, 그리고 *MLL*-PTD와 같은 돌연변이 검사는 다중역전사효소 PCR에서 반복유전자이상 AML에 해당하는 융합유전자가 검출되지 않는 경우에만 시행하였다. 본 검사실에서 *CEBPA* 돌연변이 검사는 2012년 5월부터, *MLL*-PTD는 2013년 9월부터 시작하였다. 본 연구는 본원 임상연구심의위원회의 승인(2017-0118)을 받은 후 진행되었다.

### 2. 면역표현형검사

면역표현형 분석은 주로 진단 당시 적혈구를 용해시킨 골수검체를 이용하였다. 세포의 수는 각 시험관마다  $1 \times 10^6$ 개로 조정하였다. 백혈병세포의 항원 발현은 다변량유세포분석기인 FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 사용된 형광색소는 fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll protein (PerCP), allophycocyanin (APC)이었다. 형광색소에 접합된 단클론항체들의 조합(FITC/PE/PerCP/APC)은 다음과 같다: CD14/CD33/CD41/CD45, CD19/CD13/CD7/CD45, CD56/CD117/CD34/CD45, CD65/CD10/CD3/CD45, CD15/CD2/-/CD45, HLA-DR/-/CD45, -/MPO/-/CD45, TdT/cyCD22/cyCD3/CD45. 각 시험관마다 최소한 50,000개의 형광발현(event)을 측정하였으며, CD45와 side scatter cytogram 패턴에 따라 백혈병세포군을 지정(gating)하여 분석하였다. 양성 기준은 20%로 설정하였으며, TdT의 경우 10% 이상을 양성으로 판정하였다.

### 3. 분자유전 및 세포유전검사

*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, *MLL3-MLL*, 그리고 *BCR-ABL1*과 같은 반복유전자재배열은 다중역전사효소 PCR (HemaVision multiplex RT-PCR kit, DNA Diagnostic, Risskov, Denmark)을 통해 선별하였다. *FLT3*-ITD, *NPM1* 돌연변이, *CEBPA* 돌연변이, *MLL*-PTD는 기존 방법을 사용하여 검출하였다[9-12]. 세포유전검사는 표준 G-분열법을 사용하였고, 염색체 이상은 분열 중기세포에서 관찰하였다. 세포유전학적 이상에 따른 위험군은 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 체계에 따라 분류하였다[13]. 이에 따라 복잡핵형(complex karyotype)은 클론성의 염색체 이상이 3개 이상 관찰되는 경우로 정의하였다. 단일염색체핵형(monosomal karyotype)은 상염색체의 단일염색체(monosomy)가 2개 이상 관찰되거나 1개의 단일염색체가 최소한 1개 이상의 구조적 이상과 동반될 때로 정의하였다[14].

#### 4. 통계분석

각 환자군 간 연속변수는 Wilcoxon rank-sum test로, 범주변수는  $\chi^2$  test를 이용하여 비교하였다. 환자군 비교는 각각 1군 vs. 2군, 1군 vs. 3군, 2군 vs. 3군, 1군 vs. APL군, 2군 vs. APL군, 3군 vs. APL군으로 나누어 시행하였다. 특정 변수의 각 환자군 간 빈도의 경향성은  $\chi^2$  test for trends를 이용하여 검정하였다. 통계 프로그램은 MedCalc program version 14.12.0 (MedCalc Software, Acaciaaan, Belgium)을 이용하였다.  $P < 0.05$ 를 통계적으로 의미가 있다고 해석하였다.

#### 결 과

##### 1. APL-유사 AML의 빈도 및 특성

HLA-DR과 CD34의 발현패턴에 따라 제1군은 294명, 제2군은 133명, 그리고 제3군은 40명으로 분류되었다. 따라서 APL-유사 AML 환자군(제3군)의 빈도는 683명의 선별되지 않은 전체 환자군에서는 5.9% (40/683), 주로 반복유전자이상 AML을 제외한 467명에서는 8.6% (40/467)이었다. 반복유전자이상 AML 환자들 중 APL은 55명이었다.

**Table 1.** Comparison of demographics, and clinicopathological features among the patient groups

	Group 1* (N = 294)	Group 2† (N = 133)	Group 3‡ (N = 40)	APL (N = 55)	P value					
					1 v 2	1 v 3	2 v 3	1 v APL	2 v APL	3 v APL
Age, yr (range)	56.5 (3–83)	57 (0.1–90)	59 (1–80)	46 (7–74)	0.317	0.767	0.808	<0.0001	0.002	0.012
Pediatric age (%)	16 (5.4)	11 (8.3)	3 (7.5)	2 (3.6)	0.369	0.870	0.862	0.823	0.410	0.713
Male sex (%)	184 (62.6)	72 (54.1)	23 (57.5)	22 (40.0)	0.123	0.654	0.846	0.003	0.109	0.139
WBC count, $\times 10^9/L$ (range)	4.45 (0.5–455)	13.2 (0.3–363.4)	17.8 (1.4–144.3)	5.1 (0.4–196.4)	0.0001	0.0001	0.192	0.842	0.032	0.005
Hemoglobin level, g/dL (range)	8.8 (3.3–17.3)	8.5 (3.7–13.0)	8.75 (4.1–13.5)	8.5 (4.6–11.9)	0.479	0.835	0.595	0.188	0.429	0.327
Platelet count, $\times 10^3/L$ (range)	55.5 (3–1019)	75 (4–796)	58.5 (11–312)	40 (7–135)	0.028	0.477	0.685	0.023	0.0003	0.035
BM blast, % (range)	49.6 (6.6–96.2)	53.2 (3.0–93.2)	73.1 (16.0–94.0)	83.6 (25.6–96.6)	0.573	0.0003	0.0007	<0.0001	<0.0001	0.012
FAB subtype (%)					<0.0001	0.174	0.008			
M0	19 (6.5)	3 (2.3)	2 (5.0)							
M1	89 (30.3)	29 (21.8)	20 (50.0)							
M2	146 (49.7)	43 (32.3)	12 (30.0)							
M4	17 (5.8)	32 (24.1)	3 (7.5)							
M5	3 (1.0)	14 (10.5)	1 (2.5)							
M6	13 (4.4)	7 (5.3)	2 (5.0)							
M7	7 (2.4)	5 (3.8)	0							
WHO subtype (%)					0.0003	0.009	<0.0001			
AML, NOS	145 (49.3)	48 (36.1)	30 (75.0)							
AML with MRC	127 (43.2)	83 (62.4)	8 (20.0)							
tAML	22 (7.5)	2 (1.5)	2 (5.0)							
Cytogenetics (%) <sup>§</sup>										
NK	102/289 (35.3)	63/130 (48.5)	26/37 (70.3)		0.015	0.0001	0.031			
Complex	71/289 (24.6)	17/130 (13.1)	4/37 (10.8)		0.011	0.094	0.932			
MK	63/289 (21.8)	14/130 (10.8)	3/37 (8.1)		0.011	0.084	0.870			
Cytogenetic risk					0.0006	0.008	0.517			
Poor	98/289 (33.9)	22/130 (16.9)	4/37 (10.8)							
Intermediate	191/289 (66.1)	108/130 (83.1)	33/37 (89.2)							
Mutations (%)										
FLT3-ITD	44/291 (15.1)	29/132 (22.0)	9/39 (23.1)	12 (21.8)	0.112	0.299	0.942	0.300	0.864	0.915
NPM1	13/274 (4.7)	42/126 (33.3)	28/37 (75.7)		<0.0001	<0.0001	<0.0001			
CEBPA <sup>  </sup>	17/179 (9.5)	0/80	0/21		0.010	0.288	NA			
MLL-PTD	8/124 (6.5)	6/66 (9.1)	0/11		0.710	0.840	0.664			

All continuous variables are expressed as a median (with range).

\*Group 1 consisted of patients with HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (typical AML); †group 2 consisted of those with either HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>; ‡group 3 consisted of those with HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (APL-like AML); §We excluded eleven cases with suboptimal metaphase (<20 metaphase with no cytogenetic abnormalities) from the analysis; ||Only bi-allelic CEBPA mutations were calculated.

Abbreviations: APL, acute promyelocytic leukemia; v, versus; WBC, white blood cell; BM, bone marrow; FAB, French-American-British; NOS, not otherwise specified; MRC, myelodysplasia-related changes; tAML, therapy-related acute myeloid leukemia; NK, normal karyotype; MK, monosomal karyotype; ITD, internal tandem duplication; NA, not available; PTD, partial tandem duplication.

환자의 나이와 성별은 3개의 환자군 간 유의한 차이가 없었다. 그러나 APL 환자군이 다른 군보다 낮은 연령을 보였다(1군 vs. APL 군,  $P<0.0001$ ). 말초혈액의 백혈구 수와 골수의 모세포 수는 제3군에서 다른 환자군보다 유의하게 높았다(1군 vs. 3군, 각각  $P=0.0001$ 과  $P=0.0003$ ). FAB 분류상 제3군에서 상대적으로 M1의 비율이 높았고(2군 vs. 3군,  $P=0.008$ ), 제2군의 경우 M4와 M5의 비율이 높았다(1군 vs. 2군,  $P<0.001$ ). WHO 분류상 제3군에서는 상세포형 AML의 비율이(2군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ), 제2군에서는 골수형성이상 관련 AML의 비율이 유의하게 높았다(1군 vs. 2군,  $P=0.0003$ ). 세포유전학적 이상 측면에서는 제3군에서 정상핵형의 비율이 유의하게 높았고, 복잡핵형과 단일염색체핵형의 비율이 유의하게 낮았다(1군 vs. 3군,  $P=0.0001$ ). 이와 같은 소견이 반영되어 세포유전학적 예후분량군의 비율은 제3군에서 유의하게 낮았다(1군 vs. 3군,  $P=0.008$ ). *NPM1* 돌연변이는 제3군에서 유의하게 높은 빈도로 검출되었다(1군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ). 이와는 반대로 *CEBPA* 돌연변이는 제1군에서만 검출되었고, 제2군과 3군에서는 검출되지 않았다(1군 vs. 2군,  $P=0.01$ ). 각 환자군 간 *FLT3*-ITD와 *MLL*-PTD의 분포는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

## 2. APL-유사 AML의 면역표현형적 특성 및 섬유소용해 표지자와의 상관관계

CD117 (1군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ; 2군 vs. APL군,  $P<0.0001$ )과 CD13 (1군 vs. 2군,  $P=0.014$ ; 2군 vs. APL군,  $P=0.037$ )은 제1군과 APL군에서의 양성률이 유의하게 높았다. CD33의 양성률은 환자군 간

유의한 차이가 없었으나, CD33 양성세포의 비율은 제3군과 APL군에서 유의하게 높았다(1군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ; 1군 vs. APL군,  $P<0.0001$ ). 반면 CD13 양성세포의 비율은 제1군과 APL군에서 유의하게 높았다(1군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ; 2군 vs. APL군,  $P<0.0001$ ). 이러한 소견이 반영되어 CD13 양성세포의 비율에 대한 CD33 양성세포의 비율의 비(ratio)는 제1군에서 가장 낮았고, 제3군에서 가장 높았다(1군 vs. 2군,  $P<0.0001$ ; 1군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ). CD65의 양성률은 제2군과 APL군에서 유의하게 높았고(1군 vs. 2군,  $P<0.0001$ ; 1군 vs. APL군,  $P<0.0001$ ), CD15의 양성률은 제2군에서 유의하게 높았다(1군 vs. 2군,  $P=0.0002$ ). 세포표면항원의 계열교차성 발현(cross-lineage antigen expression) 양상은 CD7이 제1군에서 유의하게 높은 빈도를 보였다(1군 vs. 2군,  $P=0.0003$ ; 1군 vs. 3군,  $P=0.003$ ). CD2의 경우 APL군에서 다른 환자군에 비해 유의하게 높은 빈도를 보였다(1군 vs. APL군,  $P<0.0001$ ; 3군 vs. APL군,  $P=0.0001$ ). CD56과 TdT는 환자군에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2).

섬유소원의 농도는 제3군(1군 vs. 3군,  $P=0.009$ ; 2군 vs. 3군,  $P=0.012$ )과 APL군(1군 vs. APL군,  $P<0.0001$ ; 2군 vs. APL군,  $P<0.0001$ )에서 유의하게 낮았다. 반면 섬유소(원)분해산물(fibrin/fibrinogen degradation products, FDP)의 농도는 제3군(1군 vs. 3군,  $P<0.0001$ ; 2군 vs. 3군,  $P<0.0001$ )과 APL군(1군 vs. APL군,  $P<0.0001$ ; 2군 vs. APL군,  $P<0.0001$ )에서 유의하게 상승하였다. 이러한 유의성을 D-dimer에서도 동일하게 관찰되었다. 이와 같은 소견이 반영되어 세계혈전지혈학회(International Society on Thrombosis and Hemostasis, ISTH)의 DIC 점수[15]가 5점 이상의 빈도는 제1군(1군 vs. 2

Table 2. Comparison of immunophenotypic characteristics among the patient groups

	Group 1* (N=294)	Group 2† (N=133)	Group 3‡ (N=40)	APL (N=55)	P value					
					1 v 2	1 v 3	2 v 3	1 v APL	2 v APL	3 v APL
CD117, N (%)	283 (96.3)	79 (59.4)	31 (77.5)	53 (96.4)	<0.0001	<0.0001	0.058	0.726	0.0001	0.012
CD33, N (%)	277 (94.2)	130 (97.7)	39 (97.5)	55 (100.0)	0.177	0.625	0.610	0.137	0.629	0.872
CD13, N (%)	284 (96.6)	120 (90.2)	37 (92.5)	55 (100.0)	0.014	0.411	0.901	0.343	0.037	0.142
CD33, % (range) <sup>§</sup>	76.65 (0.8–99.5)	91.8 (5.3–99.5)	96.05 (23.2–99.6)	98.6 (48.7–99.9)	<0.0001	<0.0001	0.012	<0.0001	<0.0001	0.0001
CD13, % (range) <sup>§</sup>	81.7 (1.8–99.6)	69.7 (0.9–98.9)	56.8 (3.6–97.9)	93.5 (41.1–99.7)	<0.0001	<0.0001	0.133	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CD33%/CD13%, ratio (range)	1.0 (0–50.7)	1.2 (0.1–60.5)	1.7 (0.3–26.3)	1.0 (0.6–2.4)	<0.0001	<0.0001	0.023	<0.0001	0.009	<0.0001
CD65, N (%)	118 (40.1)	85 (63.9)	14 (35.0)	42 (76.4)	<0.0001	0.652	0.002	<0.0001	0.137	0.0001
CD15, N (%)	158 (53.7)	98 (73.7)	18 (45.0)	27 (49.1)	0.0002	0.384	0.001	0.626	0.002	0.852
CLE <sup>  </sup>										
CD56, N (%)	40 (13.6)	23 (17.3)	11 (27.5)	8 (14.5)	0.397	0.040	0.231	0.978	0.806	0.194
CD2, N (%)	20 (6.8)	5 (3.8)	1 (2.5)	22 (40.0)	0.309	0.481	0.912	<0.0001	<0.0001	0.0001
CD7, N (%)	73 (24.8)	12 (9.0)	1 (2.5)	4 (7.3)	0.0003	0.003	0.303	0.007	0.917	0.573
TdT, N (%)	15 (5.1)	1 (0.8)	0	0	0.055	0.292	0.523	0.177	0.648	NA
Others, N (%)	8 (2.7)	6 (4.5)	1 (2.5)	0	0.504	0.660	0.914	0.455	0.252	0.872

All continuous variables are expressed as a median (with range).

\*Group 1 consisted of patients with HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (typical AML); †group 2 consisted of those with either HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>; ‡group 3 consisted of those with HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (APL-like AML); §The percentage (%) indicates the proportion of CD33 or CD13-positive cells among the total number of cells tested; ||The distributions of cross-lineage antigen expression may overlap with each other. For example, the patient expressing both CD56 and CD7 was categorized as CD56 and CD7.

Abbreviations: APL, acute promyelocytic leukemia; v, versus; N, number of a positive case; CLE, cross-lineage expression; NA, not available.



Table 3. Comparison of concentration of markers for fibrin formation and fibrinolysis among the patient groups

	Group 1* (N=294)	Group 2 <sup>†</sup> (N=133)	Group 3 <sup>‡</sup> (N=40)	APL (N=55)	P value					
					1 v 2	1 v 3	2 v 3	1 v APL	2 v APL	3 v APL
Fibrinogen (mg/dL) <sup>§</sup>	350 (54-845)	367 (28-907)	308 (52-771)	123.5 (5-384)	0.669	0.009	0.012	<0.0001	<0.0001	<0.0001
FDP (μg/mL) <sup>  </sup>	5.1 (0-87.6)	6.3 (0-120.0)	33.45 (4.2-102.9)	47.95 (5.6-130.1)	0.094	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.011
D-dimer (μg/mL FEU) <sup>¶</sup>	1.14 (0.06-39.50)	1.765 (0.16-59.10)	15.25 (0.27-321.0)	18.95 (2.12-494.0)	0.016	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.534
DIC score ≥ 5, N (%)**	23 (12.3)	21 (23.6)	17 (51.5)	38 (70.4)	0.026	<0.0001	0.006	<0.0001	<0.0001	0.123

All continuous variables are expressed as a median (with range).

\*Group 1 consisted of patients with HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (typical AML); <sup>†</sup>group 2 consisted of those with either HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> or HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>; <sup>‡</sup>group 3 consisted of those with HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (APL-like AML); <sup>§</sup>Test results were available for 190 patients of group 1, 89 of group 2, 34 of group 3, and 54 of APL; <sup>||</sup>Test results were available for 167 patients of group 1, 83 of group 2, 30 of group 3, and 52 of APL; <sup>¶</sup>Test results were available for 197 patients of group 1, 98 of group 2, 33 of group 3, and 54 of APL; \*\*Scoring results were available for 187 patients of group 1, 89 of group 2, 33 of group 3, and 54 of APL.

Abbreviations: APL, acute promyelocytic leukemia; v, versus; FDP, fibrin/fibrinogen degradation products; FEU, fibrinogen-equivalent units; DIC, disseminated intravascular coagulation.

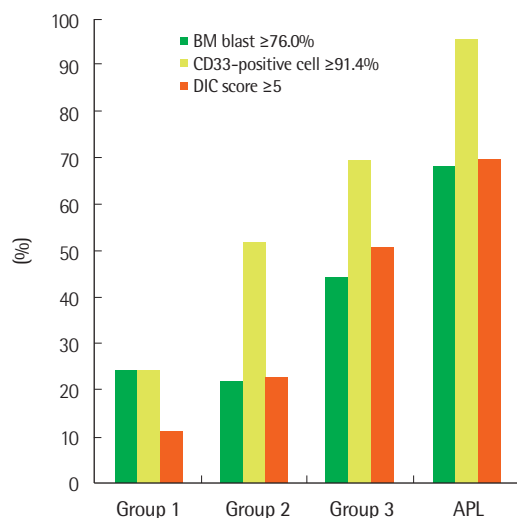


Fig. 1. The distribution and frequency of cases with high bone marrow blasts, CD33-positive cells, and DIC score. Patients with APL-like AML (group 3) showed an intermediate feature between HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (group 1) and true APL cases. The cut-off values for bone marrow blasts (76.0%) and CD33-positive cells (91.4%) were derived from values corresponding to the 75 percentile of patients with group 1. The cut-off value for DIC score (5) was based on the ISTH consensus proposal. The frequencies of BM blast ≥76.0% were 25.2% in group 1, 22.6% in group 2, 45.0% in group 3, and 69.1% in APL. The frequencies of CD33-positive cell ≥91.4% were 25.2% in group 1, 52.6% in group 2, 70.0% in group 3, and 96.3% in APL. The frequencies of ISTH DIC score ≥5 were 12.3% in group 1, 23.6% in group 2, 51.5% in group 3, and 70.4% in APL. All of these three variables (BM blast, CD33-positive cell, DIC score) were significant (each,  $P < 0.001$ ) by Chi-square test for trends.

군,  $P = 0.026$ ; 1군 vs. 3군,  $P < 0.0001$ )에서 가장 낮았고, APL군에서 가장 높았다(1군 vs. APL군,  $P < 0.0001$ ; 2군 vs. APL군,  $P < 0.0001$ ; Table 3).

### 3. APL-유사 AML의 중간적 특징

APL-유사 AML의 일부 지표들은 HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (제1군) 환자

군과 APL 사이의 중간적 특징을 나타내었다. 예를 들면 골수에서의 모세포 백분율, CD33 양성세포 비율, 섬유소원, FDP, D-이합체의 농도 등이 제1군에서 APL로 갈수록 일정한 방향성을 유지하며 유의하게 증가하거나 감소하는 양상을 보였다(Tables 1-3). 이를 도식화한 Fig. 1에서는 골수에서의 모세포 백분율, CD33 양성세포 비율, 그리고 ISTH 체계의 DIC 점수 모두 전형적 AML인 제1군에서 가장 낮았고, APL에서 가장 높았으며, APL-유사 AML은 그 두 군 사이의 중간값을 가지는 양상을 확인할 수 있다. 이러한 양상은 통계적으로 유의하였다(3개의 변수 모두  $\chi^2$  test for trends에 의한  $P < 0.001$ ).

## 고찰

HLA-DR과 CD34는 조혈전구세포(hematopoietic progenitor)에서 발현되는 대표적인 세포표면항원이다. 특히 골수모구(myeloblast)는 CD34와 HLA-DR을 비롯하여 CD117, CD38, CD13, 그리고 CD33을 발현하며, CD34는 초기 골수모세포에서부터 발현된다. 호중구로의 성숙이 진행될수록 일부 항원은 소실되고, 일부 항원은 획득된다. 전골수구 단계에서 HLA-DR과 CD34가 소실되고, 골수구 단계에서 CD117이 소실된다. 반면 CD11b와 CD11c는 골수구 단계에서 획득된다[15]. 그러므로 HLA-DR과 CD34의 소실은 APL을 강하게 시사하는 면역표현형 소견으로 간주된다. 하지만 다수의 이전 연구들을 통해 HLA-DR/CD34<sup>+</sup> AML이 반드시 APL을 의미하는 것이 아님이 알려졌다, 그 빈도는 대상 환자군에 따라 매우 다양하였다[3-7]. 그러나 대부분의 이전 보고들은 HLA-DR 음성 AML을 대상으로 하여 HLA-DR/CD34<sup>+</sup> AML만의 빈도와 특성을 도출하기 어려웠다. 단, 최근 이루어진 한 연구에 따르면 HLA-DR/CD34<sup>+</sup> *NPM1* 돌연변이 양성 AML은 APL에 비해 CD2 발현이 없고, CD33의 발현 강도가 유의하게 낮고, CD110 발현율이 유의하게 높았다[8]. 하지만 이 연구는 분석대상자의 수가 적었고(40명의 APL과 12명의 *NPM1* 돌연변이 양성 환자), 두 군 간의 면역표현형만을

비교하였기 때문에 변수의 종류가 매우 제한적이었을 뿐 아니라 *NPM1* 돌연변이 양성 환자에 국한하였기 때문에 HLA-DR/CD34<sup>+</sup>인 APL-유사 AML의 특성이 전반적으로 반영되었다고는 볼 수 없다. 본 연구는 선별되지 않은 연속 환자 683명을 일차적인 분석 대상으로 삼았을 뿐 아니라 기본적인 임상적, 병리학적 소견에서부터 섬유소용해 지표까지 보다 다양한 변수들을 비교하여 APL-유사 AML의 특성을 포괄적으로 제공하였다는 장점이 있다.

먼저 APL-유사 AML의 빈도는 선별하지 않은 전체 AML 환자군에서 5.9%이었고, 주로 반복유전자이상 AML을 제외한 환자군에서는 8.6%에 이르렀다. 거의 대부분의 반복유전자이상 AML은 HLA-DR과 CD34 중 하나 이상에서 양성을 보이므로[1], 반복유전자이상 AML에서 HLA-DR/CD34의 빈도는 매우 미미할 것으로 생각된다. 그러므로 전체 AML의 약 6%에서 APL-유사 AML 양상을 보인다고 해도 무리가 없다고 할 수 있다. 선별하지 않은 성인 일차성 AML 환자 350명을 대상으로 한 초창기 연구에서도 본 연구에서의 APL-유사 AML과 매우 유사한 면역표현형(HLA-DR/CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD13<sup>low</sup>/56<sup>+</sup>/CD11a<sup>+</sup>/CD15<sup>low</sup>/CD16<sup>+</sup>) 패턴을 보이는 AML이 6%에서 관찰되었다고 하였다[17]. 이러한 상황은 혈액병리 전문의로 하여금 중요한 임상적 판단을 요구한다. 왜냐하면 APL과 APL-유사 AML의 구분은 치료방침 결정에 핵심적인 역할을 하기 때문이다.

HLA-DR과 CD34 모두 양성인 전형적인 AML과 대비되는 APL-유사 AML의 특성은 다음과 같다. 첫째, APL-유사 AML의 절반은 FAB M1 아형에 속하였다. 이로 인해 APL-유사 AML 환자는 제1군에 비해 유의하게 높은 골수모구의 백분율을 보였다. 둘째, APL-유사 AML의 약 76%에서 예후 양호인자인 *NPM1* 돌연변이가 양성 있었고, 이는 제1군에 비하면 압도적으로 높은 빈도이다. APL-유사 AML 환자군의 세포유전학적 특성(높은 정상핵형 빈도, 낮은 복잡 핵형 및 단일염색체핵형의 빈도, 낮은 세포유전학적 예후 불량군의 비율)은 모두 *NPM1* 돌연변이 양성 AML의 특징과 연관된다. HLA-DR 음성 환자군을 대상으로 한 이전 연구에서 유의하게 높은 *NPM1* 돌연변이의 빈도는 반복적으로 확인된 결과이다[6-8]. *NPM1* 돌연변이 양성 AML의 가장 현저한 유전자 발현패턴은 *HOX*와 같은 전사인자 유전자의 활성화와 *CD34*와 *CD133*과 같은 조혈모세포-연관 유전자의 억제이다[18, 19]. 몇몇 *HOX* 유전자들의 발현 정도는 조혈모세포에서 높고, 세포가 분화할수록 감소한다. 그러므로 *NPM1* 돌연변이 양성 세포에서의 *HOX* 유전자 활성화는 줄기세포 표현형을 유지하는 데 관여한다고 할 수 있다[18]. 셋째, APL-유사 AML의 가장 현저한 면역표현형적 특징은 HLA-DR/CD34 외에도 CD33 양성 세포의 비율이 높은 반면 CD13 양성 세포의 비율은 매우 낮다는 점이다. 이는 CD33의 발현이 CD13에 비해 상대적으로 강하고 균질한 상태를 의미한다. 이러한 패턴은 APL의 주요한 면역표현형적 특징이므로 APL-유사 AML을 면역표현형

분석을 통해 실제 APL과 구분하는 것이 결코 용이하지 않음을 시사한다. 그러므로 APL에 비해 APL-유사 AML에서 CD2 발현이 거의 없다는 사실이 두 질환을 구분하는 데 도움이 될 것으로 생각한다[8].

본 연구결과 가장 주목할 만한 소견은 APL-유사 AML의 중간적 또는 과도기적(transitional) 특질이다. 특히 섬유소분해 지표(섬유소원, FDP, D-이합체)와 이에 근거한 DIC 점수의 중간적 특성은 임상적으로도 중요한 의미를 지닌다. 왜냐하면 DIC는 기저질환과 상관없이 그 자체만으로 치명적일 수 있으므로 임상상의 감별진단에 포함되어 예방적 조치를 취하는 것이 중요하기 때문이다. 이와 같은 측면에서 본다면 DIC는 일반적으로 APL과 연관되는 임상 양상으로 인식되어 있으므로 APL이 아닌 일반적인 AML에서는 저평가되어 있을 가능성이 높다. 실제로 NCCN 지침에 따르면 임상적으로 그리고 병리학적으로 APL이 의심되는 환자에서는, 비록 APL의 분자유전학적 확진 결과가 없더라도, ATRA를 초기에 투여하여 치명적인 출혈 부작용을 예방할 것을 권고하고 있다[13]. 따라서 면역표현형적으로 APL-유사 AML 패턴이 관찰되면 검사실과 임상과의 활발한 의사소통을 통해 *PML-RARA* 재배열 여부와 관계없이 반드시 DIC 진단을 위한 검사를 시행하고, ATRA의 초기 투여를 적극적으로 검토해야 할 것으로 생각한다.

일부 연구자들은 *NPM1* 돌연변이 양성 환자에서 ATRA와 arsenic oxide (ASO)가 표준 항암치료의 보완요법으로 유효함을 보고 하였다[8-10]. APL-유사 AML 환자의 많은 수에서 *NPM1* 돌연변이가 양성이고, 면역표현형을 비롯한 여러 지표에서 APL과 유사점을 보인다는 점을 고려하면 *NPM1* 돌연변이 양성 AML 환자가 APL 치료에 사용되는 약제에 반응한다는 사실이 흥미롭다. APL 환자치료에서 ATRA의 주요 역할은 *PML-RARA*에 의해 억제된 전사과정을 재활성화시켜 세포의 분화를 유도하는 것이다. 또한 ATRA와 ASO는 모두 *PML-RARA* 융합단백 자체를 분해함으로써 결국 *PML-RARA*에 매개되는 전사억제 기능을 무력화시킨다[22]. *NPM1* 돌연변이 양성 AML에서의 ATRA와 ASO의 항백혈병 효과의 기전도 약제에 의한 *NPM1* 중량단백의 분해로 설명된다. *NPM1* 돌연변이 단백질과 *PML-RARA* 융합단백의 시스테인(cysteine)에 ATO가 결합하면 산화스트레스에 민감해지고, 산화된 단백질은 proteasome 기제의 최종 목표가 되므로 결국 단백질의 분해로 이어지게 된다[21]. 최근에는 단순히 중량단백의 분해로 인한 효과뿐 아니라 *NPM1* 돌연변이 양성 AML에서의 *PML* 단백질의 변화로 ATRA와 ATO의 항백혈병 기전을 설명하려는 시도가 제시되었다[21]. 그러나 *NPM1* 돌연변이 단백질과 *PML* 단백질의 상호작용에 대해서는 향후 보다 심도있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 국내에서는 처음으로 대규모 환자군을 대상으로 HLA-DR과 CD34가 모두 음성인 APL-유사 AML의 빈도와 특성을 보고

하였다. APL-유사 AML은 전체 AML의 약 6%를 차지하여 적지 않은 빈도임을 알 수 있었다. APL-유사 AML은 전형적 AML과 구별되는 특성을 가지고 있었고, 일부 지표는 전형적 AML과 APL 사이의 중간적 특질을 보였다. 특히, DIC와의 높은 연관성은 검사실과 임상과의 적극적인 의견교환이 필요함을 시사한다. 본 연구 결과와 관련 참고문헌 리뷰를 통해 APL-유사 AML과 APL 사이에 병태생리적 공유점이 있을 것으로 추측되지만, 향후 심화 연구가 필요한 상황이다.

## 요 약

**배경:** 본 연구의 목적은 HLA-DR/CD34<sup>+</sup> AML (APL-유사 AML)의 빈도와 특성을 분석하고자 하였다.

**방법:** 새로 진단받은 683명의 AML 환자를 대상으로 하였다. 211명의 반복유전자이상 AML, 1명의 골수섬유증동반 급성범골수증, 2명의 다운증후군관련골수성백혈병, 그리고 중기분열세포를 획득하지 못한 2명의 환자를 제외한 나머지 467명을 다음과 같이 분류하였다: 제1군, HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> (전형적 AML); 제2군, HLA-DR<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> 또는 HLA-DR/CD34<sup>+</sup>; 제3군, APL-유사 AML.

**결과:** 제1군은 294명, 제2군은 133명, 제3군은 40명으로 분류되었다. 따라서 선별되지 않은 683명의 AML 환자군에서의 APL-유사 AML의 빈도는 5.9%이었다. APL-유사 AML은 제1군에 비해 백혈구수와 골수의 모세포 분율, 정상핵형과 *NPM1* 돌연변이의 비율, CD33 양성세포의 분율, 섬유소(원)분해산물 및 D-이합체의 농도가 유의하게 높았으며, 복잡핵형, 단일염색체핵형, 세포유전학적 예후불량군의 빈도, CD13 양성세포의 분율, 그리고 섬유소원의 농도가 유의하게 낮았다. 골수 모세포 분율, CD33 양성세포 분율, 파종혈관내응고 점수의 경우 APL-유사 AML에서 전형적 AML과 APL 사이의 중간값을 보였다.

**결론:** 본 연구는 APL-유사 AML이 드물지 않고, 전형적 AML과 구별되는 특성을 보임을 제시하였다. APL-유사 AML과 APL 사이에는 병태생리적 공유점이 있을 것으로 추측되지만 심화 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 명시함.

## REFERENCES

- Arber DA, Vardiman JW, Brunning RD, Porwit A, Le Beau MM, Thiele J, et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: Swerdlow SH, Campo E, et al. eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008:110-23.
- Park JH, Qiao B, Panageas KS, Schymura MJ, Jurcic JG, Rosenblat TL, et al. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. *Blood* 2011;118:1248-54.
- Wetzler M, McElwain BK, Stewart CC, Blumenson L, Mortazavi A, Ford LA, et al. HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:707-15.
- Moon H, Lee S, Huh J, Chung WS. Characteristics of acute myeloid leukemia without HLA-DR expression. *Korean J Lab Med* 2007;27:313-7.
- Syampurnawati M, Tatsumi E, Furuta K, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, et al. HLA-DR-negative AML (M1 and M2): FLT3 mutations (ITD and D835) and cell-surface antigen expression. *Leuk Res* 2007;31:921-9.
- Syampurnawati M, Tatsumi E, Ardianto B, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, et al. DR negativity is a distinctive feature of M1/M2 AML cases with NPM1 mutation. *Leuk Res* 2008;32:1141-3.
- Oelschlaegel U, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Kroschinsky F, Illmer T, et al. HLA-DRneg patients without acute promyelocytic leukemia show distinct immunophenotypic, genetic, molecular, and cytomorphic characteristics compared to acute promyelocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:321-7.
- Ferrari A, Bussaglia E, Ubeda J, Facchini L, Aventin A, Sierra J, et al. Immunophenotype distinction between acute promyelocytic leukaemia and CD15- CD34- HLA-DR- acute myeloid leukaemia with nucleophosmin mutations. *Hematol Oncol* 2012;30:109-14.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2011;98:1752-9.
- 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.
- Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009;113:3088-91.
- Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T,

- et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000;14:796-804.
13. NCCN, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia. Version 2. 2016. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf).
  14. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008;26:4791-7.
  15. Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M; Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327-30.
  16. Gorczyca W, Sun ZY, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic pattern of myeloid populations by flow cytometry analysis. *Methods Cell Biol* 2011;103:221-66.
  17. Scott AA, Head DR, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Theil KS, Grever MR, et al. HLA-DR<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>- myeloid/natural killer cell acute leukemia: a previously unrecognized form of acute leukemia potentially misdiagnosed as French-American-British acute myeloid leukemia-M3. *Blood* 1994;84:244-55.
  18. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 2005;106:899-902.
  19. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 2009;114:3024-32.
  20. Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, Del Valle F, et al. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* 2009;94:54-60.
  21. Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, Milano F, Pierangeli S, Mulas F, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood* 2015;125:3455-65.
  22. de The H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V. The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol* 2012;198:11-21.