

FLT3-ITD 검출을 위한 절편분석법: 일반 중합효소연쇄반응 및 직접염기서열분석법과의 비교

Fragment Analysis for Detection of the *FLT3*-Internal Tandem Duplication: Comparison with Conventional PCR and Sanger Sequencing

이건동¹ · 김정은¹ · 이상윤¹ · 장우리^{1,2} · 박준홍^{1,2} · 채효진^{1,2} · 김명신^{1,2} · 김용구^{1,2}

GunDong Lee, M.T.¹, Jeongeun Kim, M.T.¹, SangYoon Lee, M.T.¹, Woori Jang, M.D.^{1,2}, Joonhong Park, M.D.^{1,2}, Hyojin Chae, M.D.^{1,2}, Myungshin Kim, M.D.^{1,2*}, Yonggoo Kim, M.D.^{1,2*}

가톨릭유전진단검사센터¹, 가톨릭대학교 진단검사의학교실²

Catholic Genetic Laboratory Center¹, College of Medicine, Seoul St Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, Seoul; Department of Laboratory Medicine², College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: We evaluated a sensitive and quantitative method utilizing fragment analysis of the *fms*-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication (*FLT3*-ITD), simultaneously measuring mutant allele burden and length, and verified the analytical performance.

Methods: The number and allelic burden of *FLT3*-ITD mutations was determined by fragment analysis. Serial mixtures of mutant and wild-type plasmid DNA were used to calculate the limit of detection of fragment analysis, conventional PCR, and Sanger sequencing. Specificity was evaluated using DNA samples derived from 50 normal donors. Results of fragment analysis were compared to those of conventional PCR, using 481 AML specimens.

Results: Defined mixtures were consistently and accurately identified by fragment analysis at a 5% relative concentration of mutant to wild-type, and at 10% and 20% ratios by conventional PCR and direct sequencing, respectively. No false positivity was identified. Among 481 AML specimens, 40.1% (193/481) had *FLT3*-ITD mutations. The mutant allele burden (1.7–94.1%; median, 28.2%) and repeated length of the mutation (14–153 bp; median, 49 bp) were variable. The concordance rate between fragment analysis and conventional PCR was 97.7% (470/481). Fragment analysis was more sensitive than conventional PCR and detected 11 additional cases: seven had mutations below 10%, three cases represented conventional PCR failure, and one case showed false negativity because of short ITD length (14 bp).

Conclusions: The new fragment analysis method proved to be sensitive and reliable for the detection and monitoring of *FLT3*-ITD in patients with AML. This could be used to simultaneously assess ITD mutant allele burden and length.

Key Words: *FLT3*-ITD, Quantitative fragment analysis, Mutant allele burden, ITD length, Acute myeloid leukemia, Analytical performance

Corresponding author: Myungshin Kim

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 16591, Korea
Tel: +82-2-2258-1645, Fax: +82-2-2258-1719, E-mail: microkim@catholic.ac.kr

Corresponding author: Yonggoo Kim

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 16591, Korea
Tel: +82-2-2258-1642, Fax: +82-2-2258-1719, Email: yonggoo@catholic.ac.kr

*These authors contributed equally to this work.

Received: December 8, 2015

Revision received: April 20, 2016

Accepted: April 29, 2016

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.

서론

Fms-like tyrosine kinase (*FLT3*) 유전자는 class III tyrosine kinase 수용체의 일종으로 13번 염색체 장완(13q12)에 위치하며 정상적으로는 조혈모세포에 선택적으로 발현되어 티로신키나아제 단백을 만들고 조혈모세포의 증식, 분화와 생존에 관여한다. *FLT3* 유전자 돌연변이는 급성골수구성백혈병(acute myeloid leukemia, AML)의 20-40%에서 관찰되며 tyrosine kinase domain (TKD) 돌연변이에 비하여 internal tandem duplication (ITD) 돌연변이가 높은 빈도로 보고된다(32% vs. 12%) [1, 2]. 이 *FLT3*-ITD 돌연변이가 존재하면 정상적인 인산화의 자동억제조절기능을 상실하게 되어 *FLT3* 단백질의 constitutive activation을 유발하고 세포의 자율적인 증식이 초래되어 백혈병 유발에 관여하게 되는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 *FLT3*-ITD 돌연변이는 성인 AML 환자의 15-35%에서

발견되며[2, 3], 치료실패의 위험을 증가시키고 불량한 예후를 보이기 때문에[2, 4] 이 변이를 가진 대부분의 AML 환자는 조혈모세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)이 필요한 것으로 보고되었다[5, 6]. 또한 총 ITD 변이의 양(mutant allele burden)이 50% 이상인 환자에서 더욱 뚜렷하게 불량한 임상적 예후가 나타나며[7], FLT3-ITD 변이의 중복된 염기의 길이(length)가 길면 길수록 임상적 예후가 나쁘다[8, 9]. 이러한 연구들은 FLT3-ITD의 존재 유무도 예후와 관련이 있지만 변이된 양 또는 중복 삽입된 염기의 길이 차이가 환자의 치료성적 및 예후와 더욱 밀접하게 연관 있다는 의미로서 검사실에서 FLT3-ITD 변이 검사 시 변이된 양과 중복 삽입된 길이를 함께 측정할 수 있는 검사 방법의 도입은 필수적이라 할 수 있다. 현재 유전자의 돌연변이 검사에 주로 사용되고 있는 방법에는 일반 중합효소연쇄반응(PCR) 후 전기영동(gel electrophoresis)으로 관찰하는 방법, 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), 직접염기서열분석법(Sanger-sequencing), 절편 분석법(fragment analysis) 등이 있다. 이 중 일반 PCR 후 전기영동을 이용하는 방법은 FLT3-ITD의 예상되는 돌연변이 영역이 국한되어 있기 때문에 한 쌍의 시발체(primer) 만으로도 충분히 돌연변이를 검출이 가능하고 PCR 장비와 전기영동장치 외에는 특별한 고가의 장비들이 필요하지 않아 손쉽게 검사가능하며 재료가 적게 드는 등의 장점이 있어 FLT3-ITD 검사에 널리 이용되었다[10]. 그러나 이 방법은 눈으로 직접 판독해야 하는 검사방법의 특성상 돌연변이 양이 적은 경우 희미한 band를 나타내기 때문에 위음성의 가능성이 높고 변이의 양 측정이 불가능하다는 단점을 가진다. 실시간 중합효소연쇄반응은 증폭 과정을 실시간으로 모니터링하여 돌연변이를 검출과 함께 증폭되는 형광량을 정량화할 수 있는 방법으로 정량 PCR (quantitative PCR)법이라고도 불리는데 분석과정에서 오염률이 낮고, 짧은 시간 안에 결과 분석이 가능하며, 민감도와 특이도가 높은 장점이 있다. 그러나 FLT3-ITD 돌연변이는 예상되는 변이의 영역에 중복되는 돌연변이의 위치와 수, 그리고 중복된 염기길이가 다양하기 때문에, 많은 수의 probe 제작이 필요하고[11] 이로 인해 재료가 많이 올라가게 되는 등의 제한점이 있어 임상검사실에서 Real-time PCR 방법으로 FLT3-ITD 정량검사를 시행하기는 쉽지 않다. 직접염기서열분석법은 유전자의 돌연변이를 검출하는데 사용하는 가장 표준화된 방법이다. 하지만 검사 과정이 복잡하고 검사소요 시간이 길며 돌연변이 검출 민감도는 약 10-20%로 낮아 FLT3-ITD 돌연변이 검출에 효과적으로 사용되지 않을 수 있다. 절편분석법은 형광이 붙은 시발체를 이용하여 모세관 전기영동법으로 도출된 절편을 분석하는 검사법으로 전기영동장비가 필요하지만 일반 PCR 방법에 비해 쉽고 빠르게 자동화된 결과를 얻을 수 있고 민감도가 우수하며 실시간 중합효소연쇄반응 방법에 비하여 재료가 적게 드는 등의 장점을 가진다.

본 연구자들은 절편분석법을 이용하여 FLT3-ITD 분석을 수행하고 이 방법의 분석적 성능을 평가하였다. 또한 AML 환자의 골수 검체에서 FLT3-ITD 돌연변이의 중복된 돌연변이의 길이와 수(number), 양을 측정하고 그 결과를 기존의 일반 PCR, 직접염기서열검사와 비교 분석하여 임상적 유용성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2009년 4월부터 2014년 3월까지 가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과에 FLT3 유전자, ITD 검사가 의뢰된 390명의 환자로부터 수집한 481건의 골수 검체를 대상으로 하였다. 이중 59명의 환자에서는 두 번 이상의 추적조사(follow up)를 위하여 의뢰된 83검체가 수집되었다. 본 연구는 서울성모병원 임상연구심사위원회의 승인을 받아 수행되었다.

2. 방법

1) DNA 추출

골수 검체에서 Qiagen DNA blood kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사 지침에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA)로 측정하여 확인하고 최종 DNA 농도를 약 50-100 ng/ μ L가 되도록 희석하였다.

2) Fragment analysis를 이용한 FLT3-ITD 분석

절편분석법을 이용한 FLT3-ITD 분석은 문헌을 참고하여 제작한 시발체(forward: 5'-6-FAM-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3', reverse: 5'-HEX-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3')를 사용하여 수행하였다[12]. 시발체의 위치는 forward-chr13:28,608,330-28,608,352 reverse- chr13:28,608,024-28,608,046이며 Korean Reference Genome DB에서 검색한 결과 사용한 시발체 부위에서는 한국인에서 호발하는 single nucleotide variant (SNV)는 관찰되지 않았다. PCR 반응물은 10X 완충액(MgCl₂포함), 10 mM 각 dNTP, 20 μ M Primer mix, 5U HotstarTaq (QIAGEN)에 증류수를 넣어 총 20 μ L를 만들고 여기에 추출된 DNA 5 μ L를 첨가하였다. PCR은 Thermal cycler (C1000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 95°C 10분 후, 95°C 30초, 56°C 1분, 72°C 2분을 35번 반복하고 60°C에서 30분간 반응하는 조건으로 진행하였다. PCR이 종료된 산물은 증류수로 10배 희석한 후 1 μ L를 GeneScan 500 Liz size standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 HiDi formamide (Applied Biosystems) 혼합물 10 μ L에 첨가하여 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)에 장착하고 모세관 전기영동 하였다.

결과는 GeneMapper ver.4.1 프로그램(Applied Biosystems)을 이용하여 전기이동그램(electropherogram)에 있는 mutant peak의 수, 길이, 면적(area), 높이(height)를 분석하였다. *FLT3* wild type peak의 길이(329 ± 1 bp)보다 큰 size의 peak이 존재하는 경우 *FLT3*-ITD 양성으로 판정하였고 *FLT3*-ITD의 정량계산은 *FLT3*-ITD mutant peak의 면적 또는 높이를 전체 *FLT3* 양으로 나눈 백분율로 계산(mutant peak 면적 또는 높이/(wild type peak 면적 또는 높이 + mutant peak 면적 또는 높이) $\times 100$)하였다.

3) 분석적 성능평가(analytical performance)

절편분석법의 특이도(specificity)를 알아보기 위해 정상공여자 50명의 골수에서 추출한 50개의 검체를 이용하여 위양성 여부를 확인하였다. 절편분석법이 *FLT3*-ITD 돌연변이를 어느 농도 수준에서부터 검출할 수 있는지 최소검출한계(limit of detection, LoD)를 평가하기 위하여 *FLT3* wild type과 길이가 다른 세 종류의 *FLT3*-ITD mutant type (32 bp, 66 bp, 100 bp)을 각각 cloning하여 표준 물질을 제조하였다. Cloning은 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사가 권장하는 과정에 따라 형질 전환한 후 *FLT3* wild type과 세 종류의 *FLT3*-ITD mutant type의 plasmid DNA를 각각 추출하였다. 추출된 plasmid DNA copy 수는 분광광도계(ND-1000 Spectrophotometer)로 측정한 plasmid DNA농도에 6.022×10^{23} 을 곱하고 이 값을 cloning kit 벡터 크기값(bp)에 $1 \times 10^9 \div 650$ 을 곱한 값으로 나누어 계산하였다. 계산 공식은 $\text{DNA copy 수} = \text{DNA 농도}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 6.022 \times 10^{23} / \text{벡터 크기값}(\text{bp}) \times 650 \times 10^9$ 이었다. 계산된 각각의 plasmid DNA는 먼저 μL 당 10^8 copies로 DNA copy 수를 맞춘 후 1 copy까지 $1 \times \text{TE buffer}$ 로 10 배 계대희석하여 제조하였다($1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$ copies). 그 다음으로 각각의 plasmid DNA 10^3 copies를 조합하여 길이가 다른 3가지 *FLT3*-ITD mutant type의 함유량이 100%에서 1%까지 되도록 혼합제조 하였다($1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100\%$). 세 가지 *FLT3*-ITD mutant type 각각의 최소검출 한계를 설정하기 위하여 저농도의 표준 물질을 각각의 mutant type 별로 6일에 걸쳐 하루 2회, 두 번 반복 시행하여 총 24회 측정하였고, SPSS 12.0.1 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA)으로 probit 분석을 시행하고 95% 신뢰수준에서 최소 검출 농도를 예측하였다.

4) 검사법간 비교

(1) 직접염기서열 분석법

위에서 수행한 1차 PCR 증폭산물을 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing 키트(Applied Biosystems)를 이용하여 양방향으로 염기서열분석을 시행하였다. 직접염기서열분석은 분석적 성능 평가를 위해 계대희석하여 제조한 시료를 대상으로 하였다. 사용된

장비는 ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)이며 크로마토그램(chromatogram)결과는 Sequencer software ver.4.9 (Gen codes, Ann Arbor, MI, USA)와 *FLT3* 유전자 참고서열 NM_004119.2를 이용하여 분석하였다.

(2) 일반 PCR 후 전기영동법

PCR을 이용한 *FLT3*-ITD 분석은 *FLT3*-ITD/TKD PCR kit (Biosewoom, Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR 마스터혼합물 16 μL 와 DNA 4 μL 를 섞은 후 Thermal cycler (Bio-Rad)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 95°C 10분 후, 94°C 30초, 64°C 30초, 72°C 30초로 40번 반복하고 72°C 에서 5분간 진행하였다. 1차 PCR이 끝난 증폭산물 4 μL 를 2% 아가로즈겔에 150v 30분 전기영동 후 Gel-Doc image analyzer (Bio-Rad)로 분석하였다. *FLT3* wild type band (329 bp)만 나타나면 음성으로 판정하였고 wild type band 보다 위쪽에 *FLT3*-ITD band가 함께 나타나면 양성으로 판정하였다.

결 과

1. 분석적 성능평가

절편분석법으로 정상 공여자 50검체를 분석한 결과 모두 음성으로 나타났다. Cloning을 통해 추출한 plasmid DNA를 계대희석하여 절편분석법을 시행한 결과, *FLT3* wild type과 3가지 *FLT3*-ITD mutant type의 최소 검출 DNA copy는 각각 10 copy였다. *FLT3* wild type DNA와 *FLT3*-ITD DNA를 혼합희석한 시료를 측정하여 구한 세가지 *FLT3*-ITD mutant type (32, 66, 100 bp)의 최소검출농도는 각각 2.78%, 5.15%, 3.46%였다.

혼합희석한 시료를 이용한 직선성(Linearity)평가에서는 *FLT3*-ITD 돌연변이백분율을 peak의 면적으로 계산한 경우 $r^2=0.993$, peak의 높이로 계산한 경우 $r^2=0.990$ 이었다. 두 계산 방법 간 상관도는 $r^2=0.998$ 로 높았다(Fig. 1). 이 결과를 바탕으로 ITD 돌연변이 정량은 면적의 비율로 계산하기로 하였다.

동일 검체의 절편분석법의 재현성을 평가하기 위해 24개의 서로 다른 환자 검체를, 서로 다른 검사차례 간 1회씩 측정하여 면적 비율값의 비정밀도를 SD로 산출한 결과, SD는 면적 비율값과 무관하게 평균 0.8의 분포를 보였다(범위: 0.1-4.9). 검체별 평균 area ratio의 값에 따른 SD의 분포는 Fig. 2와 같았다.

2. 검사법 간 비교

혼합희석 시료를 사용하여 직접염기서열분석을 시행한 결과 *FLT3*-ITD 돌연변이의 최저검출농도는 약 20%였다. 일반 PCR 후 전기영동방법으로 측정한 최저농도는 10%로 두 방법 모두 절편분석법에 비하여 낮은 민감도를 보였다(Fig. 3).

전체 481검체 중 절편분석법에서 *FLT3*-ITD 양성은 193검체이었다. 두 검체에서는 *FLT3*-ITD peak가 두 개 관찰되었고 나머지 191 검체에서는 하나의 peak가 관찰되었다. *FLT3*-ITD 돌연변이 길이의 분포는 중앙값 49 bp (14 bp-153 bp)이었고(Table 1), ITD 돌연변이 정량은 중앙값 28.2% (1.7-94.1%)였다. 절편분석법에서 양성을 보인 검체 중 182건이 일반 PCR방법에서 양성(94.8%)이었으며 11건은 일반 PCR 방법에서 ITD band가 관찰되지 않았다. 절편분석법에서 음성인 288 검체는 일반 PCR 방법에서 모두 음성이었다. 따라서 두 검사방법 간 일치도는 97.7%였다(Table 2). 두 방법 간

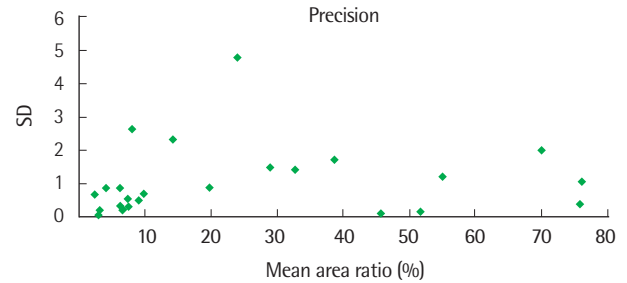


Fig. 2. Distribution of standard deviation (SD) values of the mean area ratio by fragment analysis, using patient specimens.

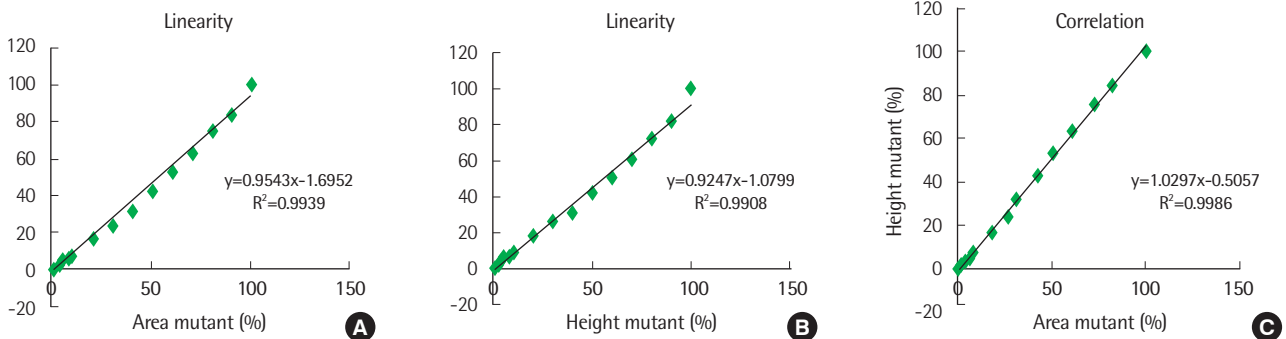


Fig. 1. (A) Linearity of fragment analysis using standard material (66 bp-type), calculating percent ratio for area of peak. (B) Linearity of fragment analysis using standard material (66 bp-type), calculating percent ratio for height of peak. (C) Correlation for fragment analysis using methods (A) and (B).

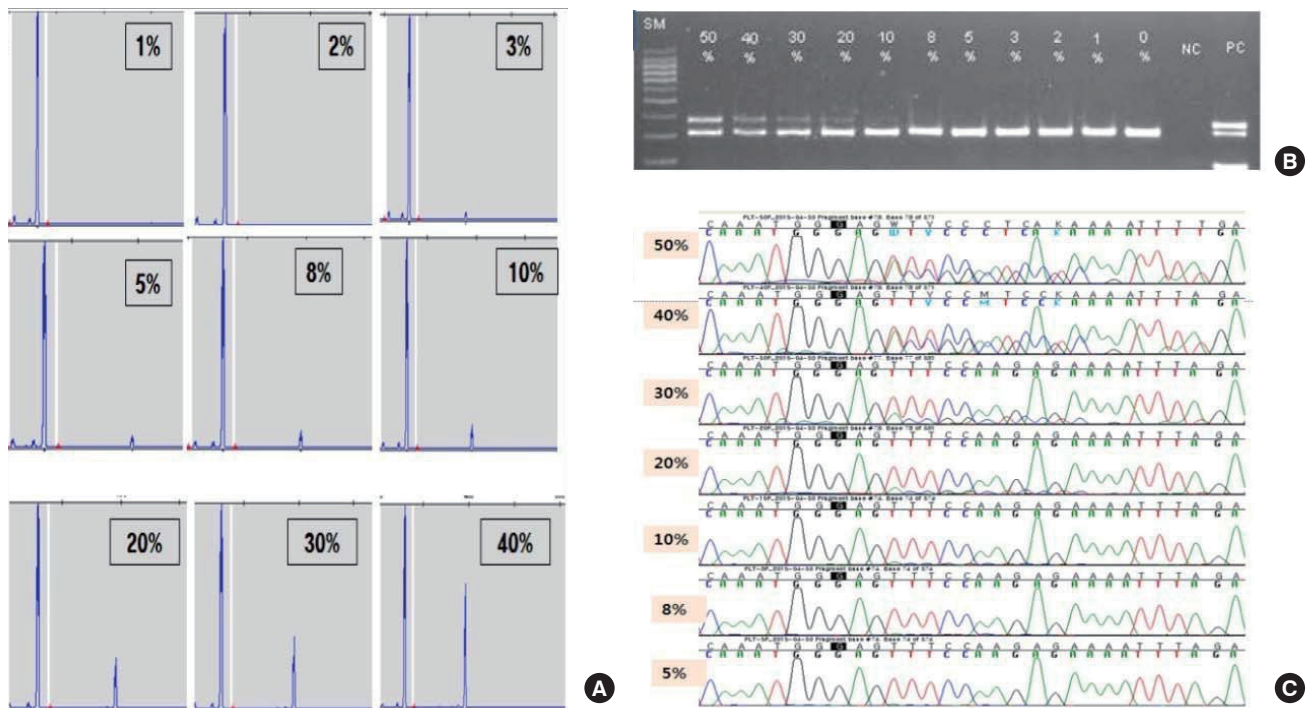


Fig. 3. Representative examples of limit of detection for each method; the results of fragment analysis [(A) was 3%], conventional PCR [(B) was 10%], Sanger sequencing [(C) was 20%].

결과가 일치하지 않은 11검체 중 7검체는 일반 PCR 방법에서 *FLT3*-ITD band가 거의 관찰되지 않거나 매우 희미하게 보이는 경우였고 재검으로 확인하여도 재검 전과 비슷하게 band의 존재유무를

Table 1. Distribution and length of *FLT3*-ITD mutations found in 193 samples by fragment analysis

<i>FLT3</i> -ITD Length (bases)	Number of positive samples	Number of positive patients
1-19	13	10
20-29	35*†	29
30-39	27*	21
40-49	25	21
50-59	22	19
60-69	34†	22
70-79	14	11
80-89	9	7
90-99	8	6
100-109	3	3
≥ 110	5	5

*One sample contained two ITD products with lengths of 25 and 37 bases; †One sample with ITD mutations yielded two peaks (20 and 63 bases).

식별하기 어려웠다. 절편분석법으로 측정한 이들 7검체의 *FLT3*-ITD 정량값은 모두 10% 이하였다(3.3-9.5%). 이 중 네 검체는 추적 조사를 위해 의뢰된 검체로서 진단 시 관찰된 돌연변이 위치와 비교한 결과 모두 일치하여 절편분석법에 의해 관찰된 소량의 *FLT3*-ITD가 위양성이 아님을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그리고 한 검체는 일반 PCR 전기영동 사진에서 wild type band가 약간 두껍게 나타난 경우로 절편분석법에서는 ITD 돌연변이 길이가 14 bp로 매우 짧아서 두 개의 band가 뚜렷이 구분되지 않았다. 전기영동 시간을 15분 연장하여 다시 전기영동 한 결과 wild type band와 ITD band

Table 2. Comparison of fragment analysis with conventional PCR for *FLT3*-ITD testing

Variable	<i>FLT3</i> -ITD test	
	Wild type	Mutant type
Normal donor sample (N=50)		
Fragment analysis	50	0
Patient sample (N=481)		
Fragment analysis	288 (59.9%)	193 (40.1%)
Conventional PCR	299 (62.2%)	182 (37.8%)

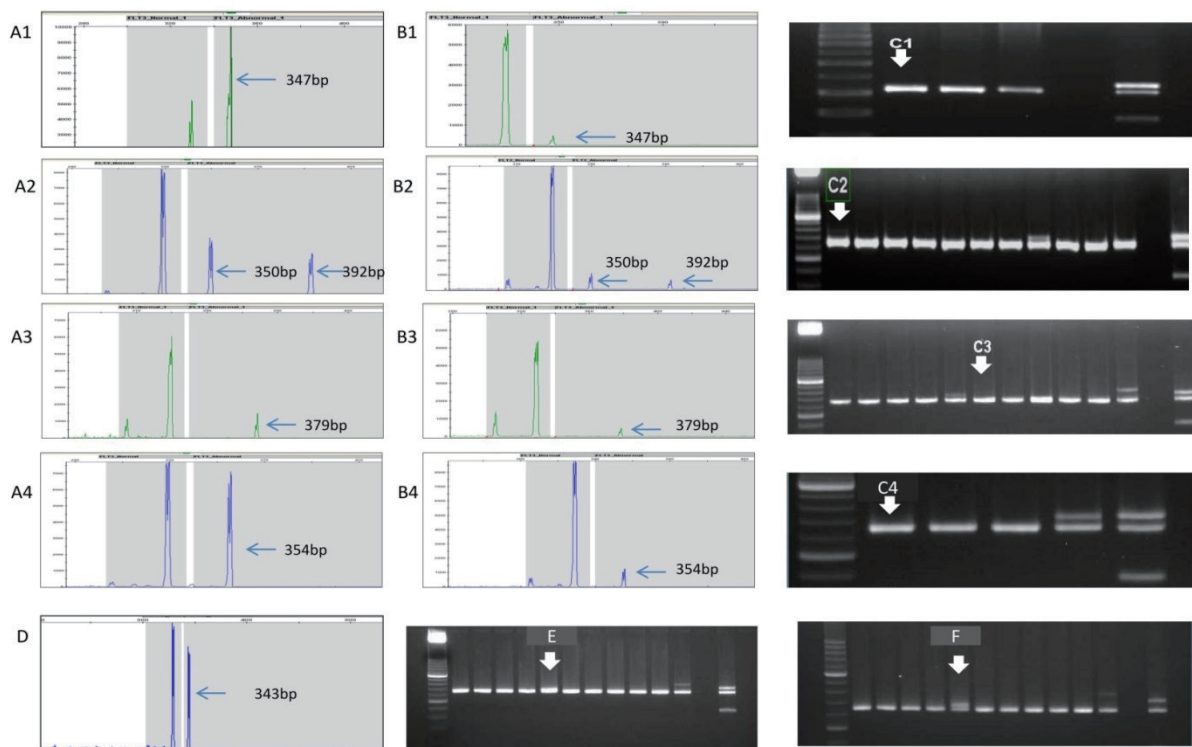


Fig. 4. fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication (*FLT3*-ITD) analysis in acute myeloid leukemia patients: fragment analysis versus conventional PCR in discrepant case. (A) Fragment analysis for initial sample; the arrows indicating peak size are *FLT3*-ITDs. (B) Fragment analysis for follow-up sample of (A); the arrows indicating the smaller peak are the same as the peak size of (A). (C) Conventional PCR for follow-up of sample of (A), which used the same sample as used in (B); In the photographs, it was difficult to identify the existence of an *FLT3*-ITD-positive band. (D) Fragment analysis for short-length ITD. (E) For conventional PCR, this is shown as a slightly thick wild-type band when electrophoresis was performed under typical conditions. (F) To confirm the ITD band, we extended the running time of electrophoresis; in doing this, the wild-type band and ITD band could be distinguished.

가 분리되었으며 일반 PCR에서 위음성이 나온 이유가 ITD의 길이가 짧기 때문임을 알 수 있었다(Fig. 4). 다른 불일치 세 검체는 일반 PCR 전기영동 사진에서 *FLT3* wild type band가 약하게 보여 PCR 억제(inhibition)가 의심되었다. 추출된 DNA를 희석하여 일반 PCR을 재 수행한 결과 이들 세 검체 모두 양성결과를 보여 일반 PCR방법에서 위음성이 나온 이유는 inhibitor의 영향임을 알 수 있었다.

고 찰

AML환자에서 *FLT3*-ITD 돌연변이 유무 검출은 통상적인 검사로 시행되고 있으며, 그 결과는 진단뿐만 아니라 생존율, 재발 유무와 같은 예후의 지표로서 사용되고 있다[12]. 그러나 돌연변이 검출 방법은 다양하고 각각 민감도에 차이가 있어 사용된 방법에 따라 결과에 차이를 보일 수 있다. 최근 연구에서는 *FLT3*-ITD 돌연변이 유무보다는 정량 분석으로 측정된 돌연변이 allele burden이 환자의 예후와 더욱 밀접하게 연관이 있는 것으로 보고되고 있어 유전자의 변이 양을 측정하는 것이 필요해졌다[9, 13]. 하지만 현재 우리나라 검사실에서는 유전자변이의 정량적 측정을 아직까지 통상적인 검사로서 시행하고 있지 않다.

본 연구에서는 *FLT3*-ITD 변이를 정량적으로 측정하기 위하여 절편분석법을 고안하여 평가하였다. 돌연변이 최소 검출 농도는 기존 측정방법인 직접염기서열분석법의 20%, 일반 PCR 후 전기영동법의 10%에 비해 높은 민감도를 보였고 정상 공여자 검체를 이용하여 평가한 검사의 특이도(specificity)는 100%였다. 전체 481 검체를 일반 PCR 방법과 비교한 결과 방법 간 일치도는 97.7%였다. 두 방법간 결과가 일치하지 않은 경우는 11건이었으며, 확인 결과 모두 일반 PCR 방법이 위음성인 것으로 나타났다. 원인으로는 mutant allele burden이 낮은 검체에서 전기영동 사진에서 육안으로 돌연변이 band가 관찰되지 않은 경우가 가장 많았다. 그 다음으로는 PCR inhibitor의 영향으로 일반 PCR 방법에서 위음성 결과를 보인 경우가 있었다. 다른 원인으로는 돌연변이 중복 길이가 매우 짧은 경우 mutant type과 wild type의 PCR 산물의 길이 차이가 크지 않아 전기영동 사진으로 뚜렷이 구분되지 않는 경우였다. 이러한 불일치 검체 중 inhibitor의 영향에 의한 위음성은 DNA를 희석하여 재검하여 양성임을 확인할 수 있으며, 돌연변이 중복 길이가 짧은 것에 기인한 위음성은 전기영동 시간을 보다 길게 시행하면 양성임을 알 수 있었다. 그러나 낮은 mutant allele burden에 의한 경우는 일반 PCR 방법으로는 확인되지 않으며, 위의 두 가지 원인에 의한 경우도 검사자가 위음성의 가능성을 의심하여 주의 깊게 관찰해야 하며 반드시 확인을 위한 재검사가 필요하므로 검사 과정이 간편하고 위음성이 낮은 절편분석법이 일반 검사실에서 사용하기에 우수한 검사법으로 생각된다.

절편분석법으로 mutant type과 wild type 면적을 측정하여 계산한 정량값의 직선성은 결정계수가 0.99 이상으로 전체 범위 내에서 우수하게 유지되어 이 방법이 ITD 돌연변이 정량 분석에 유용함을 알 수 있었다. 환자 검체에서 분석한 *FLT3*-ITD 돌연변이 정량값은 1.7%에서 94.1%로 다양한 분포를 보였으며 전체 범위에서 양호한 재현성을 나타냈다. 기존 연구 결과에서 진단 시 돌연변이 정량값이 50% 이상인 경우 불량한 예후를 보인다고 하였으며[7, 14] 본 연구에서 절편분석법으로 측정한 정량값이 cut-off 근처에서 우수한 재현성을 보여 *FLT3*-ITD 정량 분석에 임상적으로 이용하기에 적절한 방법으로 판단된다. 또한, 절편분석법으로 돌연변이 정량과 함께 길이도 동시에 측정할 수 있어 중복된 염기의 길이를 손쉽게 보고할 수 있는데 이는 중복된 길이가 70 bp보다 길수록 더 나쁜 예후와 관련이 있다는 기존의 보고들과 연관 지어 볼 때 또 하나의 유용한 점이었다[9]. *FLT3*-ITD 돌연변이 길이의 분포는 14 bp에서 153 bp였고 진단 시 검출된 ITD 돌연변이 길이를 추적 조사 시와 비교한 결과, 100% 일치하여 예후 예측 및 추적 검사를 위해서 돌연변이 길이분석이 도움이 되는 것을 알 수 있었다. 특히 완전 관해 상태에서 *FLT3*-ITD 돌연변이 검출 여부가 이후 치료 성적과 연관이 있으므로 적은 양의 변이를 반드시 검출할 필요가 있다[9]. 직접염기서열 분석은 20%, 일반 PCR 방법은 10% 이하의 변이를 검출하지 못하므로 추적 검사에는 적당하지 않으며 절편분석법을 이용한 *FLT3*-ITD 정량은 낮은 값도 정확하게 측정되므로 추적 검사에도 적합한 방법이라고 할 수 있겠다. 또한 정상 핵형을 갖는 AML 환자에서는 *FLT3*-ITD 돌연변이 양이 50% 이내로 낮은 경우에도 생존율(overall survival, OS) 및 무병생존율(disease free survival, DFS)이 나쁜 것으로 알려져 있어[14] 민감도가 높은 검사법으로 돌연변이 유무를 정확하게 진단하는 것이 반드시 필요하다.

결론적으로 절편분석법은 중복 삽입된 염기의 길이가 다양한 *FLT3*-ITD 돌연변이의 정량값과 중복된 길이를 동시에 측정할 수 있는 검사법으로, 기존의 일반 PCR 방법 및 직접염기서열 분석법에 비해 민감도가 우수하며 재현성이 높아 AML 환자의 진단 및 예후 예측, 추적 검사에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry for Health and Welfare, Korea (HI14C3417).

요 약

배경: 저자들은 *FLT3*-ITD (fms-like tyrosine kinase-internal tan-

dem duplication) 돌연변이의 정량 및 반복 염기 길이를 동시에 측정하는 정량 절편 분석법(fragment analysis)의 민감도를 평가하고, 분석적 성능을 검증하였다.

방법: *FLT3*-ITD 돌연변이의 정량과 수는 절편분석법으로 측정하였다. 변이 대립유전자와 정상 대립유전자를 혼합한 계대희석 표준물질로 절편 분석법, 일반 PCR법, 염기서열분석법의 *FLT3*-ITD 변이 검출한계를 측정하였다. 정상 공여자 50검체를 이용하여 특이도를 평가하였다. 급성골수성백혈병 환자의 481검체에 대하여 절편 분석법과 일반 PCR법으로 검사를 시행하고 그 결과를 비교 분석하였다.

결과: 절편 분석법의 돌연변이 최소 검출 농도는 5%였으며, 일반 PCR 검사법과 직접염기서열분석법은 각각 10%, 20%의 결과를 보였다. 급성골수성백혈병 환자의 481 검체를 분석한 결과, *FLT3*-ITD는 40.1% (193/481)에서 양성이었다. 변이 대립유전자의 정량값은 1.7-94.1% (중앙값 28.2%)로 다양하였으며, 반복 염기의 길이의 범위는 14bp-153 bp (중앙값 49bp)였다. 일반 PCR 검사법과 비교한 결과 방법간 일치도는 97.7% (470/481)였다. 절편 분석법이 일반 PCR 검사법에 비해 더 높은 민감도를 보였고, 11건의 돌연변이가 더 검출되었다. 이 중 7검체는 변이 대립유전자의 양이 10% 미만으로 일반 PCR 검사에서 검출되지 않았다(3.3-9.5%). 또 다른 불일치 세 검체에서는 PCR inhibitor의 영향으로 일반 PCR 방법에서 위음성 결과를 보였으며, 다른 한 검체는 돌연변이 중복 길이가 14 bp로 매우 짧아 일반 PCR에서 정상 밴드와 구별되지 않는 경우였다.

결론: 본 연구에서 저자들이 사용한 절편 분석법은 *FLT3*-ITD 돌연변이의 정량값과 중복된 길이를 동시에 측정할 수 있는 검사법으로, 민감하고 정확하여 급성골수성백혈병 환자에서 *FLT3*-ITD의 진단 및 추적 검사에 유용할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, et al. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12:1333-7.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1909-18.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2012;115:453-74.
- Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, et al. Prevalence and prognostic significance of *Flt3* internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:89-94.
- Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2013;88:318-27.
- O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute myeloid leukemia, version 2.2013. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11:1047-55.
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:2776-84.
- Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Boggon TJ, Gerbing RB, Rocnik JL, et al. Structural and numerical variation of *FLT3*/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008;111:4930-3.
- Kim Y, Lee GD, Park J, Yoon JH, Kim HJ, Kim M, et al. Quantitative fragment analysis of *FLT3*-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J* 2015;e336.
- Shires IS and Gerdener T. *FLT3* ITD detection: a closer look at the options. *Med Technol SA* 2011;25:39-46.
- Beretta C, Gaipa G, Rossi V, Bernasconi S, Spinelli O, Dell'Oro MG, et al. Development of a quantitative-PCR method for specific *FLT3*/ITD monitoring in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004;18:1441-4.
- Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, et al. Detection of *FLT3* internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn* 2003;5:96-102.
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011; 29:475-86.
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:2776-84.