

# B세포비호지킨림프종 환자의 골수에서 면역글로불린유전자재배열 검사의 임상적 의의

## Clinical Significance of Clonal Rearrangement of the Immunoglobulin Gene in the Bone Marrow of Patients with B-cell Non-Hodgkin Lymphoma

김지현<sup>1</sup> · 이자영<sup>1</sup> · 손종애<sup>1</sup> · 송새암<sup>2</sup> · 오승환<sup>1</sup> · 신정환<sup>1</sup> · 김혜란<sup>1</sup> · 전경란<sup>2</sup> · 이정녀<sup>2</sup>

Ji Hyun Kim, M.D.<sup>1</sup>, Ja Young Lee, M.D.<sup>1</sup>, Jong Ae Son, M.D.<sup>1</sup>, Sae Am Song, M.D.<sup>2</sup>, Seung Hwan Oh, M.D.<sup>1</sup>, Jeong Hwan Shin, M.D.<sup>1</sup>, Hye Ran Kim, M.D.<sup>1</sup>, Kyung Ran Jun, M.D.<sup>2</sup>, Jeong Nyeo Lee, M.D.<sup>2</sup>

인제대학교 의과대학 부산백병원<sup>1</sup> · 해운대백병원<sup>2</sup> 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, Busan Paik Hospital<sup>1</sup>, Haeundae Paik Hospital<sup>2</sup>, Inje University College of Medicine, Busan, Korea

**Background:** In the early stages of non-Hodgkin lymphoma (NHL), it can be difficult to recognize minimal morphological changes in the bone marrow (BM). In particular, when the quality of the BM biopsy is poor, determining BM involvement is limited to microscopic findings on BM aspiration. In this study, we compared the results of clonal immunoglobulin (IG) gene rearrangements with BM morphology results in B-cell NHL patients who underwent BM analysis as a staging workup and evaluated the usefulness of the clonal IG gene rearrangements for staging.

**Methods:** Forty two B-cell NHL patients were analyzed. Clonal rearrangements of the IG heavy chain (*IGH*),  $\kappa$  light chain (*IGK*) and  $\lambda$  light chain (*IGL*) genes were detected using the IdentiClone™ Clonality assay (InVivoScribe Technologies, USA). Clinical characteristics and outcomes were evaluated based on the detection of monoclonal IG gene rearrangements.

**Results:** Monoclonal IG gene rearrangements were found in 9 of 42 patients (21.4%). Microscopic BM involvement was found in only 2 of 42 patients (4.8%). The monoclonality rate of IG genes in BM was correlated with clinical stage and the international prognostic index ( $P < 0.01$ ). Patients with monoclonal IG gene rearrangements in BM had a significantly higher relapse rate ( $P = 0.014$ ) and poorer overall survival at 2 yr ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions:** Clonality analysis of BM in B-cell NHL can contribute to identification of patients with occult BM involvement with a significantly poorer overall survival despite normal BM histology.

**Key Words:** Non-Hodgkin lymphoma, B-cell, B-lymphocyte, Bone marrow, Gene rearrangement

## 서론

비호지킨림프종(Non-Hodgkin lymphoma)은 주로 현미경으로 관찰되는 조직의 형태와 면역표현형 검사에 근거해서 진단 및 분

**Corresponding author:** Ja Young Lee

Department of Laboratory Medicine, Busan Paik Hospital, Inje University College of Medicine, 75 Bokji-ro, Busanjin-gu, Busan 614-735, Korea  
Tel: +82-51-890-8637, Fax: +82-51-893-1562, E-mail: [liring@hanmail.net](mailto:liring@hanmail.net)

Received: September 23, 2013

Revision received: November 7, 2013

Accepted: November 29, 2013

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

© 2014, 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.

류를 하며 비호지킨림프종의 병기 결정은 임상적, 방사선학적, 그리고 골수의 조직학적 소견을 바탕으로 한다[1]. 그러나 전통적인 방법인 현미경을 이용한 조직의 형태 관찰 및 면역표현형 검사만으로 골수에서 림프구증식 시 양성과 악성 여부를 감별하기 어렵다. 특히, 골수생검의 질이 적합하지 않은 경우 골수흡인슬라이드에서 관찰되는 몇몇 미성숙림프구의 존재만으로 비호지킨림프종의 골수 침범 여부를 결정하기는 매우 어렵다.

모든 악성세포는 단클론 형성능을 가진다는 사실을 바탕으로 악성림프종과 양성림프구증식증의 감별을 위한 림프조직의 클론성 평가에 대한 연구가 1990년대 초부터 이루어져 왔다[2]. 연구에 따르면 비호지킨림프종의 98% 이상에서 단클론 면역글로불린(Immunoglobulin), 혹은 T 세포수용체(T-cell receptor, TCR) 유전자의 재배열을 관찰할 수 있다. 즉, B 림프구와 T 림프구의 개체발생 및 분화과정 동안 해당 항원수용체 유전자재배열이 일어나고,

각 세포에 특이한 길이와 연쇄를 가진 생산물이 만들어지는 것이다. 따라서 PCR을 이용하여 이런 항원수용체 유전자 위치 내에 존재하는 세포특이유전자재배열을 찾아 림프구의 클론성을 확인할 수 있으며, 반응성림프구증식질환의 경우 다클론 면역글로불린 혹은 T 세포수용체 유전자재배열이 관찰되고 악성림프구증식질환의 경우 면역글로불린 혹은 T 세포수용체 유전자재배열의 단클론성을 확인할 수 있다.

2003년 European BIOMED-2 공동연구에서 기존 면역글로불린 및 T 세포수용체 유전자재배열 연구에 다양하게 이용되던 시동체들을 정리하여 표준화된 multiplex PCR 분석이 정립되면서 비호지킨림프종 진단 시 면역글로불린 및 T 세포수용체 유전자재배열 검사의 활용에 대한 연구가 보다 체계적으로 이루어지기 시작하였다[2]. 뿐만 아니라 말초혈액이나 골수 검체를 이용하여 면역글로불린 및 T 세포수용체 유전자재배열 검사를 함으로써 비호지킨림프종의 분자학적 병기 결정에 대한 연구도 이루어지게 되었다[3]. 그러나 국내에서는 이러한 검사를 통한 비호지킨림프종의 분자학적 병기 결정에 대한 평가가 드물며 예후와 연계된 구체적인 평가는 아직 보고되지 않은 실정이다. 이에 저자들은 병기 결정을 위해 골수 검사를 시행한 B세포 비호지킨림프종 환자에서 면역글로불린 heavy chain (*IGH*), 면역글로불린  $\kappa$  light chain (*IGK*) 및 면역글로불린  $\lambda$  light chain (*IGL*) 유전자재배열 검사를 시행하여 골수의 형태학적 소견과 단클론성 확인검사 결과를 비교하고, 병기 결정에 있어 클론성 면역글로불린유전자재배열 검사의 유용성을 검증하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2010년 10월부터 2012년 12월까지 비호지킨림프종을 진단받고 골수검사를 시행한 환자들 중 B세포비호지킨림프종 환자 42명을 대상으로 하였다. 환자는 남자 25명, 여자 17명이었으며 평균 연령은 62세(범위 19-87세)였다. WHO 분류에 따른 비호지킨림프종의 분류는 Table 1에 기술하였으며 미만성거대B세포림프종이 29예로 가장 많았다.

### 2. 면역글로불린유전자재배열 검사 및 유전자 스캔 분석

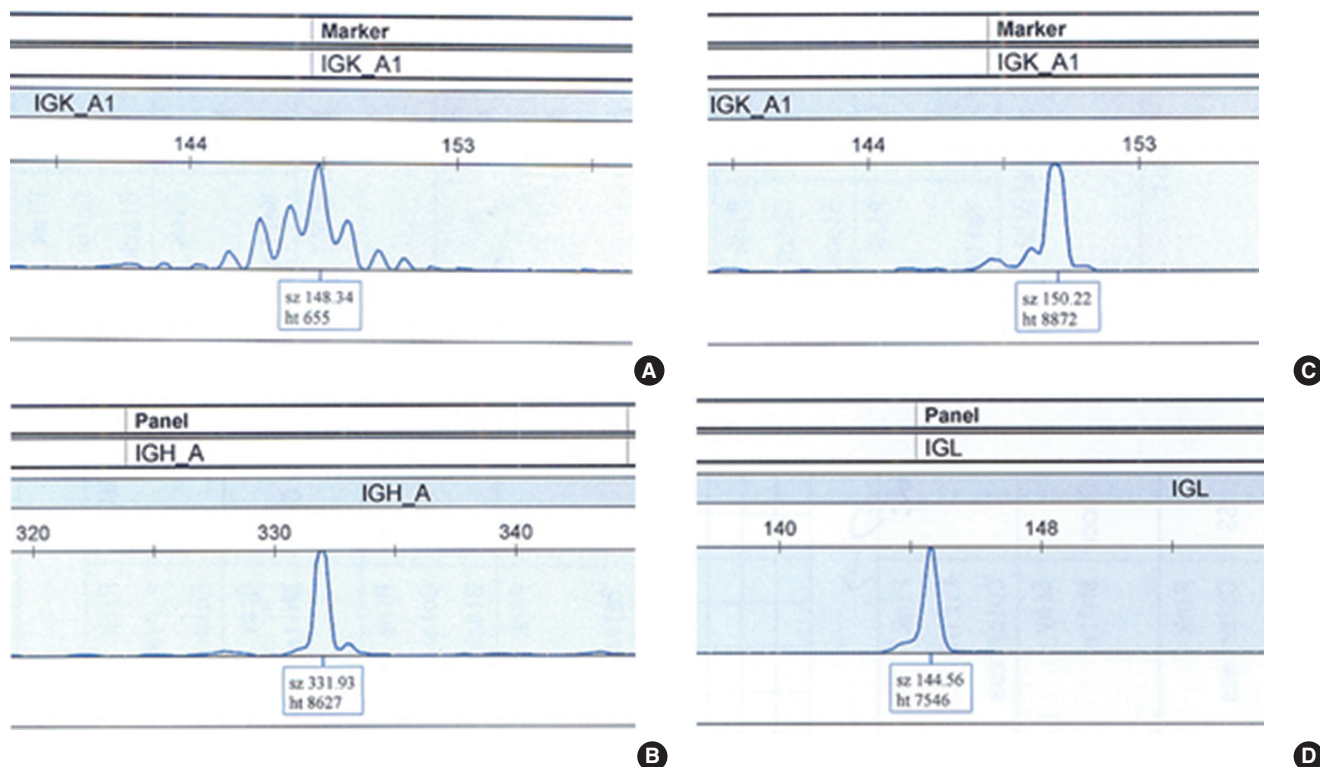
골수흡인 검체의 단핵세포에서 DNA를 분리하고, 이후 과정은 IdentiClone *IGH/IGK/IGL* Gene Clonality Assay (*InVitroScribe* Technologies, San Diego, CA, USA)의 지침에 따라 시행하였다. *IGH* 유전자재배열의 클론성 분석에 쓰이는 시동체 Master mix는 5개이며 *IGK* 유전자는 2개, *IGL* 유전자는 1개이다. 중합효소연쇄반응을 위해 한 반응당 Master Mix 45  $\mu$ L와 Ampli Taq Gold DNA

**Table 1.** Characteristics and outcome of patients according to the clonality of immunoglobulin gene rearrangement in BM

Characteristics	Total patients	Monoclonal IG rearrangement	Polyclonal IG rearrangement	P value
No. of cases	42	9	33	
Age (yr, median)	19-87 (62)	57-87 (68)	19-81 (60)	
Male:Female	25:17	7:2	18:15	
Diagnostic category				
Diffuse large B-cell lymphoma	29	4	25	
B-cell lymphoma, unclassifiable	6	3	3	
Follicular lymphoma	4	2	2	
Extranodal marginal zone B-cell lymphoma	2	0	2	
Nodal marginal zone B-cell lymphoma	1	0	1	
Clinical stage				<0.001 (CS I-III vs IV)
CS I	7	0	7	
CS II	14	0	14	
CS III	5	0	5	
CS IV	16	9	7	
Bone marrow involvement				0.195 (No vs Yes)
No	40	7	33	
Yes	1	1	0	
Inconclusive	1	1	0	
Cytogenetic abnormalities				0.387
No	40	8	32	
Yes	2	1	1	
IPI group (score)				<0.001
Low (0-1)	20	0	20	
Intermediate (2-3)	13	4	9	
High (4-5)	9	5	4	
Complete remission rate				0.418
Complete remission	21	3	18	
No complete remission	15	4	11	
Relapse rate				0.014
Continuous CR	19	1	18	
Relapse	2	2	0	

Abbreviations: IG, immunoglobulin gene; CS, clinical stage; IPI, international prognostic index; BM, bone marrow; CR, complete remission.

polymerase 0.25  $\mu$ L를 넣고 유전체 DNA 5  $\mu$ L를 혼합하여 총 50  $\mu$ L가 되도록 한 후, Thermocycler에서 Ampli Taq Gold의 표준 프로그램에 따라 증폭시켰다. 표준 프로그램은 95°C에서 7분간 한 주기, 이어서 95°C에서 45초, 60°C에서 45초, 72°C에서 90초간 34주기 반응시킨 후 72°C에서 10분간 반응을 연장하는 것이다. *IGH*, *IGK*, *IGL* 유전자재배열 검사 모두 각각 제조사에서 제공하는 양성, 음성 대조군을 사용하였다. 중합효소연쇄반응의 반응 생산물 1  $\mu$ L당 10  $\mu$ L의 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Foster



**Fig. 1.** Clonality analysis of immunoglobulin gene rearrangement in B-cell NHL using BIOMED-2 protocol. (A) Polyclonal rearrangement of *IGK* framework region. (B-D) Monoclonal rearrangement of *IGH*, *IGK*, and *IGL* framework regions. Abbreviations: NHL, non-Hodgkin lymphoma; *IGH*, immunoglobulin heavy chain; *IGK*, immunoglobulin  $\kappa$  light chain; *IGL*, immunoglobulin  $\lambda$  light chain.

City, CA, USA)를 혼합하여 95°C에서 3분간 열변성시킨 후 ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Japan)를 이용하여 유전자 스캔 분석을 시행하였다.

단클론성의 판단은 BIOMED-2 지침에 명시된 대로 기대되는 크기 범위에 나타나는 뚜렷한 하나의 피크가 있거나 또는 배경에 작은 피크가 보일 경우 이보다 3배 이상 높은 피크가 있을 때로 하였다(Fig. 1) [4].

### 3. 통계학적 분석

전자의무기록시스템을 이용하여 전신단층촬영과 양전자단층촬영(Positron emission tomography, PET)결과를 확인하였다. 예후 평가를 위해 진단 당시 환자의 나이, 혈청 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LD)수치, 골수침범유무, 림프절 이외의 장기 침범 유무와 활동도를 바탕으로 International Prognostic Index (IPI) 점수를 계산하였다[5]. 치료에 대한 반응은 Revised response criteria for malignant lymphoma에 따라 완전관해, 부분관해, 재발 등으로 구분하였다[6]. 또한 사망 여부와 전체 생존율을 조사하였으며 전체 생존율은 최초 진단부터 사망이나 마지막 추적 관찰이 이루어진 시점으로 정하였다.

범주형 자료 중 이분 변수는 Fisher's exact test를 이용하고, IPI 점수에 따라 분류한 위험군은 Cochran-Armitage trend test를 이용하여 집단 간의 차이를 비교하였다. 전체생존율은 Kaplan-Meier 법을 이용해 생존 곡선을 그리고 log-rank test로 비교하였다. 모든 통계분석은 MedCalc (version 12.4.0, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)를 이용하여 양측검정을 하였으며,  $P$ 값 0.05 미만을 통계학적인 유의성을 가지는 기준으로 하였다.

## 결 과

### 1. 면역글로불린유전자재배열 결과 및 임상적 병기와의 상관성 분석

대상환자 42명 중 9명(21.4%)이 면역글로불린유전자재배열에서 단클론성을 보였다(Table 2). 9명 중 1명만이 *IGH*, *IGK* 및 *IGL* 유전자 모두에서 단클론재배열을 보였다. 4명의 환자는 *IGH*와 *IGK* 유전자에서 단클론재배열이 나타났고 1명은 *IGK*와 *IGL* 유전자에서 단클론재배열이 관찰되었다. *IGH* 유전자에서만 단클론성을 보인 환자 2명, *IGK* 유전자에서만 단클론재배열을 보인 환자 1명이었으며 *IGL* 유전자에서만 단클론재배열을 보인 경우는 관찰되지 않

Table 2. Results of clonality analysis in 9 cases of B-cell non-Hodgkin lymphoma

Case No.	BIOMED-2 multiplex PCR			Diagnosis	Staging	IPI group (score)	Peripheral blood smear finding	BM aspiration	BM biopsy	Karyotype analysis
	IGH	IGK	IGL							
1	M	P	P	Diffuse large B-cell lymphoma	4	IM (3)	No specific abnormalities	No BM involvement of lymphoma	No available BM tissue	46,XY[20]
2	M	M	P	Follicular lymphoma, grade 1	4	IM (3)	No specific abnormalities	No BM involvement of lymphoma	No BM involvement of lymphoma	46,XX[20]
3	M	M	M	Follicular lymphoma, grade 3a	4	IM (3)	No specific abnormalities	No BM involvement of lymphoma	Insufficient BM tissue for diagnosis	46,XY[20]
4	M	M	P	Diffuse large B-cell lymphoma	4	High (4)	Elevated WBC count with neutrophilia	No BM involvement of lymphoma	No BM involvement of lymphoma	46,XY[20]
5	P	M	P	B-cell lymphoma unclassifiable	4	High (4)	12% of immature lymphocytes	16% of immature lymphocytes	Squeezed BM cells	47,XY,der(3)t(1;3) (q21;q27),del(6) (q15),+12,add(19) (q13.4)[23]/46,XY[2]
6	M	P	P	Diffuse large B-cell lymphoma	4	IM (2)	No specific abnormalities	No BM involvement of lymphoma	No BM involvement of lymphoma	46,XY[20]
7	P	M	M	B-cell lymphoma, unclassifiable	4	High (5)	Leukoerythroblastic reaction	6% of immature lymphocytes	No BM involvement of lymphoma	46,XY[20]
8	M	M	P	Diffuse large B-cell lymphoma	4	High (4)	Bicytopenia	No BM involvement of lymphoma	No BM involvement of lymphoma	46,XX[20]
9	M	M	P	B-cell lymphoma, unclassifiable	4	High (4)	No specific abnormalities	No BM involvement of lymphoma	Scattered BM cells	46,XY[20]

Abbreviations: IGH, immunoglobulin heavy chain; IGK, immunoglobulin kappa light chain; IGL, immunoglobulin lambda light chain; IPI, international prognostic index; BM, bone marrow; M, monoclonal; P, polyclonal; IM, intermediate.

았다. 단클론면역글로불린유전자재배열을 보인 군은 미만성거대B세포림프종이 4예로 가장 많았으며, B세포 계열의 미분류 비호지킨림프종이 3예, 소포림프종 2예가 있었다.

단클론면역글로불린유전자재배열은 모두 병기 4기 환자의 골수 검체에서 관찰되었다( $P<0.001$ , Table 1). 형태학적으로 비호지킨림프종이 골수를 침범한 경우는 1예가 있었으며, 형태학적으로 비호지킨림프종의 골수침범이 의심되는 경우가 1예가 있었다. 형태학적으로 비호지킨림프종이 골수를 침범한 경우(case 5) IGK 유전자 재배열에서 단클론성을 보였고, 형태학적으로 비호지킨림프종의 골수침범이 의심되는 경우(case 7)는 IGK 및 IGL 유전자재배열에서 단클론성이 관찰되었다. 이외에도 형태학적 골수침범이 관찰되지 않았던 40명의 환자 중 7명에서 단클론 면역글로불린유전자재배열이 나타났다.

골수의 세포유전학적 이상은 2명의 환자에서 관찰되었는데, 이 중 1명만이 형태학적 골수침범과 함께 단클론성 IGK 유전자재배열이 관찰되었다. 다른 1명의 환자는 골수흡인 및 생검 조직에서 뚜렷한 골수 침범소견이 관찰되지 않았으나 골수의 염색체 검사상 IGH 유전자 부위인 14q32의 이상을 포함한 복합핵형(50,X,-X,dup(1)(q43q22),+5,+8,+12,+14,add(14)(q32)×2,+19[3]/46,XX[17])을 보였으며 면역글로불린유전자재배열에서 단클론성은 관찰되지 않았다. 이외에 골수의 세포유전학적 이상이 없었던 40명의 환자 중 8명의

면역글로불린유전자재배열 검사에서 단클론성이 관찰되었다.

42명의 B세포 비호지킨림프종 환자 중 IPI 저위험군에서 단클론 면역글로불린유전자재배열은 관찰되지 않았고 IPI 고위험군에서 단클론면역글로불린유전자재배열의 양성률이 높게 나타났다. B세포 비호지킨림프종 환자의 진단 당시 골수검체에서 단클론면역글로불린유전자재배열의 양성률과 IPI 점수 간에 통계적으로 유의한 상관성이 관찰되었다( $P<0.001$ , Table 1).

## 2. 면역글로불린유전자재배열 결과와 치료 반응 및 전체 생존율 분석

B세포비호지킨림프종 진단 후 추적 관찰이 중단된 6명을 제외한 총 36명의 환자 중 21명(58.3%)이 완전관해에 도달하였다. 형태학적으로 B세포비호지킨림프종의 골수침범이 있거나 의심되었고 단클론면역글로불린유전자재배열을 보였던 2명을 포함하여 단클론면역글로불린유전자재배열을 보였던 4명은 완전관해에 도달하지 못했다. 단클론면역글로불린유전자재배열 양성과 음성군으로 구분하였을 때, 단클론면역글로불린유전자재배열 양성군의 완전관해율(42.9%, 3명)이 단클론면역글로불린유전자재배열 음성군의 완전관해율(62.1%, 18명)보다 낮았으나 통계적으로 유의하지 않았다( $P=0.418$ , Table 1).

완전관해에 도달했던 21명의 환자 중 2명의 환자(case 1, 6 in Ta-



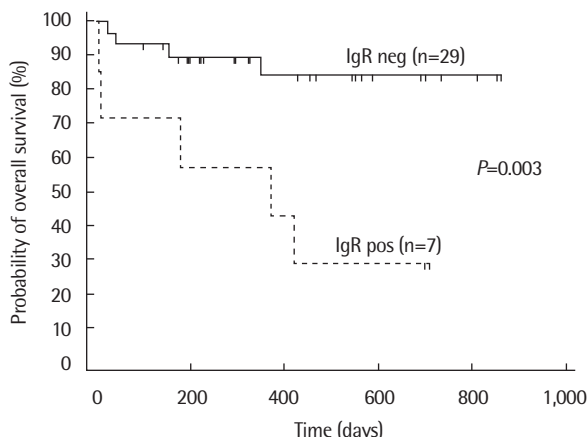


Fig. 2. Kaplan-Meier curves of overall survival of patients according to the detection of monoclonal immunoglobulin gene rearrangements (IgR) in bone marrow.

ble 2)가 재발하였다. 2명 모두 진단 시 형태학적으로 비호지킨림프종의 골수침범은 관찰되지 않았고, 세포유전학적 이상도 없었으나 골수흡인 검체에서 단클론 *IGH* 유전자재배열이 관찰되어 단클론면역글로불린유전자재배열 양성률과 재발률 사이에 통계적으로 유의한 상관성이 관찰되었다( $P=0.014$ , Table 1). 재발한 2명 중 1명(case 1)은 진단 및 재발 시 골수검체를 이용하여 면역글로불린 유전자재배열 검사를 시행하였는데 진단 시 *IGH* 유전자재배열만 단클론성이었던 것에 반해 재발 시 *IGH*뿐만 아니라 *IGK* 유전자재배열에서도 단클론성이 관찰되었다.

단클론면역글로불린유전자재배열 양성인 군과 음성인 군의 2년간 전체 생존율은 각각 28.6%와 86.2%로 전체생존율은 면역글로불린유전자재배열의 단클론성 유무에 따라 유의한 차이를 보였다( $P=0.003$ , Fig. 2).

B세포비호지킨림프종 진단 당시 PET 검사를 시행한 34명의 환자를 대상으로 PET 검사를 통한 방사선학적 골수침범 유무와 면역글로불린유전자재배열 검사 결과에 따른 2년간 전체 생존율을 비교하였을 때 방사선학적 골수침범과 관계없이 단클론면역글로불린유전자재배열이 관찰되는 군의 전체 생존율이 유의하게 낮게 나타났다( $P=0.003$ , Fig. 3).

## 고 찰

비호지킨림프종 환자에서 진단 시 시행하는 골수검사는 비호지킨림프종의 골수침범 유무 확인 및 병기 결정을 위해 반드시 필요하며 이를 위해 골수를 채취하는 과정에서 적절한 검체 채취가 매우 중요하다. 그러나 비호지킨림프종의 골수침범 여부는 현미경적 소견만으로 확실히 알기 어려우며 림프구증식질환의 5-10%는 반응성 병변과 악성 병변을 조직검사 및 면역표현형검사만으로 구별

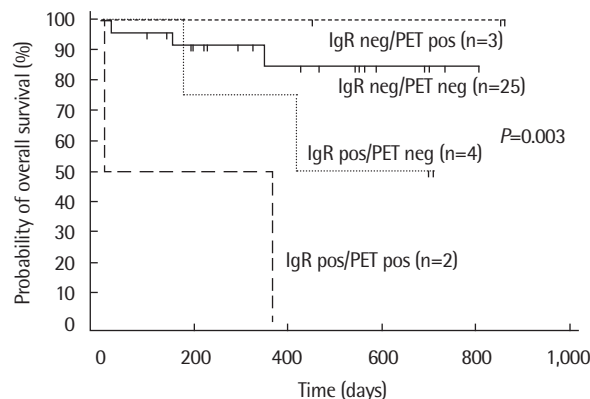


Fig. 3. Kaplan-Meier curves of overall survival of patients according to involvement of bone marrow in positron emission tomography (PET) and the detection of immunoglobulin gene rearrangements (IgR).

하기 어려운 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 이 경우 면역글로불린 혹은 T 세포수용체 유전자재배열 검사를 통해 골수의 클론성을 확인하는 것이 비호지킨림프종의 골수침범 확인에 도움이 될 수 있다[7].

본 연구에서 총 42명의 B세포비호지킨림프종 환자들 중 9명이 단클론면역글로불린유전자재배열 양성소견을 보였으며 이 중 형태학적으로 비호지킨림프종의 골수침범이 관찰되거나 의심되는 환자는 2명뿐이었다. 2명의 환자는 골수흡인에서 미성숙림프구들이 각각 6%, 16%씩 관찰되었으나 골수생검에서 골수세포가 제대로 나오지 않고 골조직만 채워지는 등 진단에 부적합한 골수생검 소견을 보였다. 골수흡인에서 미성숙림프구가 16% 관찰된 환자의 경우 염색체검사에서 복합핵형이 관찰되었고 *IGK* 유전자 재배열에서 단클론성을 보여 B세포비호지킨림프종의 골수침범을 확인할 수 있었다. 골수흡인에서 미성숙림프구가 6%밖에 관찰되지 않은 환자의 경우 염색체검사에서 정상핵형이 관찰되었고 *IGK* 및 *IGL* 유전자재배열 검사에서 단클론성이 관찰되어 비호지킨림프종의 골수침범을 확인할 수 있었다. 따라서 골수생검 조직이 진단에 부적합하거나 골수침범 비호지킨림프종 세포가 골수흡인 슬라이드에서 소수만 관찰될 경우 골수흡인 검체를 이용한 면역글로불린유전자재배열 검사가 부수적으로 비호지킨림프종의 골수침범 유무 결정에 도움을 줄 수 있다.

비호지킨림프종의 예후와 연관된 항목들 중에서 단클론면역글로불린유전자재배열은 임상적 병기 및 IPI 위험군과 유의한 상관성을 보였다. 단클론면역글로불린유전자재배열이 예후에 미치는 영향을 좀 더 정확하게 파악하기 위해서 다른 예후관련인자들과 다변량 분석이 필요하지만 본 연구의 대상자 수가 적어서 통계적 유의성 확보가 어려웠다. 그러나 형태학적으로 B세포비호지킨림프종의 골수침범이 없는 환자군 중에서 단클론면역글로불린유전

자재배열이 관찰된 경우 2년간 전체 생존율이 유의하게 낮았으며, 이러한 결과는 클론성 면역글로불린유전자재배열 검사가 형태학적 및 방사선학적으로 알 수 없었던 잠재적 골수침범에 대한 추가적인 정보를 제공할 수 있음을 시사한다. Mitterbauer-Hohendanner G 등[3]의 연구에 따르면 면역글로불린유전자재배열 검사가 림프종 진단 시 예후와 관련된 분자학적 병기 결정의 한 방법으로 이용 가능할 것으로 생각된다.

그러나 면역글로불린유전자재배열검사를 판독할 때 단클론성 피크가 단독으로 관찰되지 않고 다클론성 피크 배경과 함께 단클론성 피크가 관찰되거나 올리고클론성 피크를 보이는 경우 Epstein-Barr virus, 거대세포바이러스(cytomegalovirus) 등의 바이러스 감염 및 결핵 등에 의한 반응성림프구증식질환의 가능성도 고려하여야 한다[8]. 이런 경우 반복 검사를 통한 재확인 과정이 반드시 필요하며 면역글로불린유전자재배열검사 결과뿐만 아니라 형태학적 소견, 면역항원표지자 검사 결과, 임상 경과 등을 함께 고려하여 림프종 혹은 반응성림프구증식질환에 대한 감별 진단을 내려야 할 것이다.

세포유전학적 이상이 관찰된 2명의 환자 중 한 명은 형태학적 및 방사선학적으로 뚜렷한 골수침범을 보이지 않았으나 골수 염색체 검사에서 14q32재배열을 포함한 복합핵형이 관찰되었다. 이 환자에서 14q32 재배열이 있음에도 *IGH* 유전자재배열검사에서 단클론성이 검출되지 않은 이유는 복합핵형이 나타난 클론의 수가 적어 다클론성을 가진 정상 B 림프구가 증폭되었을 가능성이나 세포유전학적 이상이 복합적으로 나타난 경우 분자적 절단점이 이질적이어서 *IGH* 유전자재배열검사에 사용되는 시동체로 확인이 안 되었을 가능성을 고려해 볼 수 있다[2, 9].

또한 치료 후 B세포 비호지킨림프종이 재발한 2명의 환자 골수에서 단클론면역글로불린유전자재배열이 관찰되었는데 이 중 한 환자는 진단 시와 동일한 *IGH* 유전자 부위뿐만 아니라 *IGK* 유전자 부위에서도 단클론성이 관찰되었다. 본 연구와 함께 자가 골수 이식 등의 치료 후 면역글로불린유전자재배열을 연속적으로 검사한 결과 단클론면역글로불린유전자재배열을 보인 환자에서 이식 후 재발률이 높게 나왔던 기존의 연구 결과를 고려해 보았을 때 면역글로불린유전자재배열 검사는 B세포비호지킨림프종 치료 후 경과관찰, 재발 감시 및 평가에도 적극적으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다[10].

본 연구에서 *IGH*, *IGK* 및 *IGL* 유전자재배열 검사 시 *IGH* 혹은 *IGK* 유전자에서만 단클론유전자재배열이 관찰되는 경우가 각각 2예, 1예씩 있었으나 *IGL* 유전자 단독으로 단클론유전자재배열은 관찰되지 않았다. 림프구증식질환에서 면역글로불린유전자재배열 검사에 대한 지침서에 따르면 B세포림프구증식질환이 의심되는 경우 첫 번째 과정으로 *IGH* 및 *IGK* 유전자재배열검사를 시행할 것

을 추천하고 있다[11]. *IGH* 유전자부위는 *IGK* 유전자에 비해 체세포 고돌연변이가 많이 일어나 체세포 고돌연변이가 주로 일어나는 배중심(germinal center) 및 후-배중심(post-germinal center)에서 발생하는 B세포비호지킨림프종의 경우 *IGH* 유전자재배열 검사만으로 클론성을 확인하는 것이 어려울 수 있기 때문에 반드시 *IGK* 유전자재배열을 함께 검사하도록 하고 있는 것이다[12, 13]. *IGH* 및 *IGK* 유전자재배열에서 단클론성이 관찰되지 않지만 B세포림프구증식질환이 의심되는 경우 추가로 *IGL* 유전자재배열 검사를 시행하도록 권고하고 있으나 본 연구의 결과에서 보듯이 *IGL* 유전자만 단독으로 단클론유전자재배열을 보일 확률은 낮은 것으로 생각된다. 이전 연구에서도 B세포비호지킨림프종에서 *IGH*와 *IGK* 유전자 조합으로 검사했을 때 단클론성 검출의 민감도와 정확도가 99% 이상 높게 나타나는 결과를 보였다[14, 15]. 따라서 B세포비호지킨림프종의 골수 침범을 확인하기 위한 선별검사로 *IGH* 및 *IGK* 유전자재배열검사를 시행하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

본 연구에서 B세포비호지킨림프종 환자 중 형태학적으로 비호지킨림프종의 골수침범이 관찰되지 않지만 면역글로불린유전자재배열 검사에서 단클론성이 관찰되는 군에서 단클론면역글로불린유전자재배열이 관찰되지 않는 군에 비해 유의하게 낮은 전체 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 클론성 면역글로불린유전자재배열 검사가 B세포비호지킨림프종의 골수침범 여부를 감별하는 데 기여할 수 있음을 검증하였다. 또한 치료 후 경과 관찰 및 재발 감시에 클론성 면역글로불린유전자재배열 검사의 이용 가능성을 확인할 수 있었으며 이는 대규모 환자를 대상으로 추가적인 연구를 통해 검증이 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** 초기 비호지킨림프종(Non-Hodgkin lymphoma, NHL)에서 진단 시 형태학적 관찰을 통해 골수의 미세한 변화를 인지하기 어렵다. 특히 골수생검의 질이 부적합할 경우 골수흡인의 현미경학적 소견에 따라 비호지킨림프종 골수침범 여부 판단이 제한적으로 이루어질 수밖에 없다. 본 연구에서는 병기 결정을 위해서 골수 검사를 시행한 B세포비호지킨림프종 환자를 대상으로 골수의 형태학적 소견과 면역글로불린유전자재배열 검사 결과를 비교하고 병기 결정에 있어 클론성 면역글로불린유전자재배열검사의 유용성을 평가하고자 하였다.

**방법:** 42명의 B세포비호지킨림프종 환자를 대상으로 하였다. IdentiClone™ Clonality assay (InVivoScribe Technologies, USA)를 이용하여 면역글로불린 중쇄(*IGH*), 면역글로불린  $\kappa$  (*IGK*) 및  $\lambda$  (*IGL*) 경쇄 유전자의 클론성 재배열을 확인하였다. 면역글로불린유전자재배열의 단클론성 유무에 따른 환자의 임상적 특성과 치료 반응을

비교하였다.

**결과:** 42명의 환자 중 9명의 환자(21.4%)에서 단클론면역글로불린 유전자재배열이 관찰되었다. 형태학적 골수침범은 2명의 환자(4.8%)에서만 관찰되었다. 골수검체에서 단클론면역글로불린유전자재배열 양성률은 임상적 병기 및 international prognostic index ( $P < 0.01$ )와 유의한 상관성을 보였다. 단클론면역글로불린유전자재배열이 있는 환자는 단클론성이 관찰되지 않는 환자에 비해 유의하게 재발률이 높았으며( $P = 0.014$ ), 2년간 전체 생존율도 낮았다( $P < 0.01$ ).

**결론:** 클론성 면역글로불린유전자재배열 검사는 형태학적으로 정상 골수소견을 보이는 환자에서 유의하게 낮은 전체 생존율과 관련된 잠재적인 비호지킨림프종의 골수침범 여부를 확인하는 데 기여할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2011년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것임.

## REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008.
2. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17: 2257-317.
3. Mitterbauer-Hohendanner G, Mannhalter C, Winkler K, Mitterbauer M, Skrabs C, Chott A, et al. Prognostic significance of molecular staging by PCR-amplification of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Leukemia* 2004;18:1102-7.
4. Chute DJ, Cousar JB, Mahadevan MS, Siegrist KA, Silverman LM, Stoler MH. Detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in classic hodgkin lymphoma using commercially available BIOMED-2 primers. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:65-72.
5. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993;329:987-94.
6. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:579-86.
7. Oh HR, Lee MJ, Park G, Moon DS, Park YJ, Jang SJ. A case of lambda-expressing pulmonary MALT lymphoma with dual clonal rearrangements of kappa and lambda immunoglobulin light chain gene. *Korean J Lab Med* 2009;29:256-61.
8. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, et al. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2007;21:222-9.
9. Macintyre E, Willerford D, Morris SW. Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000:180-204.
10. Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, Gribben JG. Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1996;88: 3314-22.
11. Langerak AW, Groenen PJ, Bruggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012;26:2159-71.
12. Halldorsdottir AM, Zehnbauser BA, Burack WR. Application of BIOMED-2 clonality assays to formalin-fixed paraffin embedded follicular lymphoma specimens: superior performance of the IGH assays compared to IGH for suboptimal specimens. *Leuk Lymphoma* 2007;48: 1338-43.
13. Payne K, Wright P, Grant JW, Huang Y, Hamoudi R, Bacon CM, et al. BIOMED-2 PCR assays for IGH gene rearrangements are essential for B-cell clonality analysis in follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2011; 155:84-92.
14. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007;21:201-6.
15. Sung JY, Kang SY, Kim SH, Kwon JE, Ko YH. Analysis of immunoglobulin gene rearrangement: comparison between BIOMED-2 multiplex PCR and conventional nested PCR. *Lab Med Online* 2011;1:195-201.