

만성 골수성 백혈병에 있어서 병기에 따른 bcr-abl mRNA 유형별 출현 빈도와 Polymerase Chain Reaction을 이용한 미세 잔류 백혈병의 증명

가톨릭대학 의학부 내과학교실 혈액 종양학과

한치화 · 이종욱 · 진종률 · 민우성
박종원 · 김춘추 · 김동집

임상병리학교실

김 원 일

임상의학 연구소

유 주 연 · 양 일 호

서 론

만성 골수성 백혈병은 만성기에 진단되고 평균 2~3년 후에 급성기로 전환되어 항백혈병 복합 요법에도 불구하고 수개월내에 사망하는 난치성 혈액종양이다^{1,2)}. 인터페론이 만성 골수성 백혈병의 새로운 치료방법으로 소개되어 있으나 아직도 골수이식만이 질병의 자연경과를 저지하고 완치시킬 수 있는 유일한 방법이다^{3,4)}.

9번 염색체와 22번 염색체 사이에 역전위(reciprocal translocation)가 일어난 것을 Philadelphia (Phl) 염색체라고 하며, 만성 골수성 백혈병은 95% 이상, 급성 임파구성 백혈병의 소아형은 5%, 성인형은 15~20% 그리고 급성 골수성 백혈병의 소수에서 나타난다^{5,6)}. 급성기에는 Phl 염색체 이외에도 새로운 염색체의 이상소견들이 발견된다고 하지만 이러한 소견들이 급성기의 예측 지표로 사용되기에는 미흡하다⁷⁾.

9번 염색체의 c-abl 유전자가 22번 염색체에 위치하는 M-bcr 유전자의 중간부위로 이동하므로서 5'쪽은 bcr 유전자의 일부로 그리고 3'쪽은 c-abl 유전자의 일부로 구성된 "bcr-abl 융합유전자(fusion gene)"가 Phl 염색

체의 유전자 구조적 특징이며 이로부터 8.5 kilobase 크기의 mRNA가 전사(transcription)되고 최종 산물로 tyrosine kinase 활성을 갖는 210 kilodalton 크기의 단백질이 생성된다⁸⁾.

Schaefer-Rego 등이 만성 골수성 백혈병에 있어서 M-bcr 유전자의 제 3 intron 내에 위치한 Hind III 절단부위(소위 "central H")를 중심으로 3'쪽에 재배열이 존재하는 것이 급성기의 유전자적인 특징이라고 발표한 이래⁹⁾, 질병의 시기와 M-bcr 유전자의 재배열 부위간에 연관성이 있다는 다수의 보고들이 있어 급성기로의 전환을 예측할 수 있는 새로운 유전자 지표로서의 가능성을 기대하게 되었다^{10~14)}. 그러나 이들과 상반된 의견들도 적지않은 것은 Southern blot 분석방법이 M-bcr 유전자 내의 정확한 절단부위(breakpoint)를 확인하기보다 제한효소에 의해 결정된 제한구역(restricted zone)만을 제시하는 단점을 가지고 있어 유전자적으로 만성기라고 정의된 환자들 중 절단부위가 bcr exon 3의 말미로부터 "central Hind III" 사이에 존재하는 경우들이 고려되지 않았기 때문이라고 생각된다. 만성 골수성 백혈병세포에서 생성되는 mRNA는 M-bcr 유전자의 절단위치와 무관하게 splice I 과 II 중의 하나이며, 거의 모든 경우 절단부위가 intron 2 또는 intron 3 내에 존재하므로 절단부위가 intron 2에 있으면 bcr exon 2와 c-abl 유전자의 exon 2가 연결된 mRNA (splice II)가 생성되고,

接 受 : 91年 8月 14日

*본 논문은 1989년도 가톨릭중앙의료원의 중점 지원 연구비로 이루어 졌음.

intron 3에서 절단이 일어날 경우 "alternative splicing"이 발생하지 않는한 bcr exon 3와 c-abl 유전자의 exon 3가 연결된 mRNA (splice I)가 생성된다(Fig. 1)^{9,14,15,26)}.

이러한 구조적 차이가 cDNA 합성후 polymerase chain reaction 방법(cDNA-PCR)으로 정확하게 구별될 수 있어¹⁶⁾, 저자들은 만성 골수성 백혈병의 병기(病期)와 bcr-abl mRNA의 종류 사이에 연관성이 있는지를 비교하였다. 또한 성공적인 인터페론이나 골수이식 치료후에 bcr-abl mRNA를 표현하는 만성 골수성 백혈병 세포가 잔존하는지 여부와 급성 백혈병의 경우에도 M-bcr 유전자와 c-abl 유전자 사이에 재배열이 있는지를 검토하여 몇가지 의미있는 결과를 얻었다.

대상 및 방법

1. 대 상

1987년 11월부터 1990년 9월까지 성모병원에 입원하여 만성 골수성 백혈병으로 진단된 48명의 환자와 동일 병명으로 동종 골수이식을 받은 7명, 그리고 인터페론 치료를 받고 있으며 혈액학적으로 관해 상태에 있는 환자들중 PhI염색체가 음성으로 전환된 7명을 대상으로 하였다. 질병 대조군으로는 급성 임파구성 백혈병 19명과 급성 골수성 백혈병 14명을 선택하였다.

2. 방 법

1) 시료의 채취

진단시 또는 추적검사 기간중에 채혈된 말초혈액이나 골수로부터 "Ficoll-Hypaque gradient방법"을 이용하여 단핵세포(mononuclear cell)를 분리하여 실험에 사용하였거나, 또는 초저온 냉동보관(programmed cryo-preservation)하였다가 필요한 경우 급속해동(thawing)시켜 사용하였다¹⁷⁾.

2) Oligonucleotide Primer 및 Probe의 합성

두쌍의 primer들과 M-bcr exon 2(또는 exon 3)와 c-abl exon 2의 융합부위를 포함하는 2개의 서로 다른 oligoprobe를 Gene Assembler (Pharmacia, Sweden)로 합성하였다. primer A, B, probe 1과 2의 염기배열은 Kawasaki 등이 사용한 것과 동일하였으며, nested PCR을 위한 primer A'과 B'의 염기배열은 이미 알려진 cDNA 염기배열 자료를 토대로 저자들이 선정하였다¹⁶⁾. 즉, bcr-abl mRNA의 증폭산물에 bcr exon 3가 포함된 것은 200 bp로 그리고 bcr exon 3가 포함되지 않고 bcr exon 2로만 되어있는 것은 125 bp로 서로 75 bp크기의 차이가 나도록 계획하였다(Fig. 2).

3) cDNA의 합성과 Nested PCR (Nested cDNA-PCR)

실험의 양성 대조로는 급성기 만성 골수성 백혈병 유래의 K562 세포주를 사용하였으며 cDNA합성은 Ferre 등의 방법에 따라 시행하였다¹⁸⁾. 약술하면 2×10^6 개의

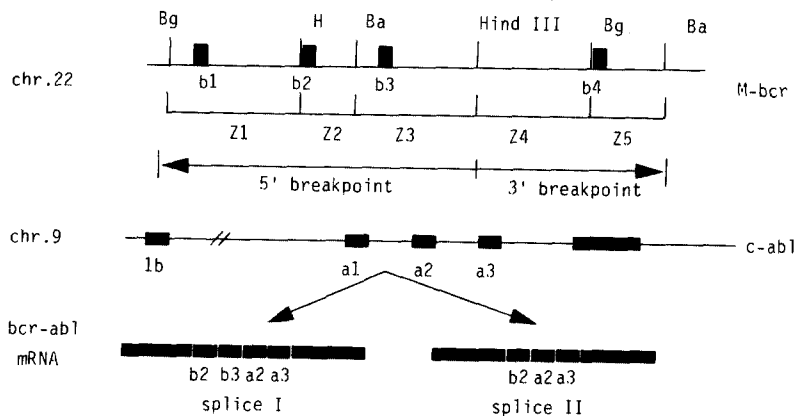


Fig. 1. A scheme of the genomic structure of M-bcr and c-abl and their hybrid mRNAs. Each block filled with black color represents the exon that will be present in the processed mRNA. The "Z" represents each zone defined by various restriction enzymes.

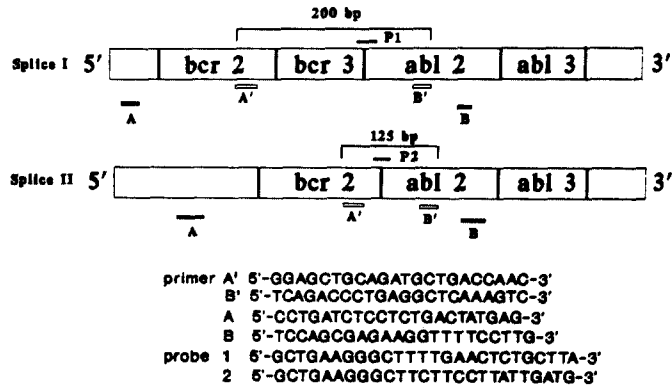


Fig. 2. Structure of CML mRNA and location of diagnostic oligonucleotides.

분리된 단핵세포들을 100 μ l의 DEPC처리된 증류수에 재부유 시켜 끓는 수조에서 5분간 처리하고 즉시 얼음속에서 급속 냉각시킨 다음 30초동안 원심분리하여 상층액만을 취하였다. cDNA의 합성을 위해 모든 시약들은 0°C 상태로 준비하였으며 11 μ l의 RNA 상층액에 2 μ l의 10 \times PCR용액 [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% W/V gelatin, 0.1% Tween 20, 0.1% NP40]과 각각 1 mM씩의 dATP, TTP, dGTP, dCTP 그리고 20 pmol B primer, RNasin 20 단위, 10 mM DTT, 20 단위의 reverse transcriptase (AMV 형, Boehringer-Mannheim)를 넣어 총 20 μ l를 만들었다. 이를 42°C에서 1시간 동안 반응시키고 얼음속에 넣어 더이상의 반응을 정지시켰다. 여기에 2 단위의 Taq polymerase와 80 μ l의 1 \times PCR용액, 30 pmol B primer, 50 pmol A primer 그리고 1 mM씩의 dATP, TTP, dGTP, dCTP를 혼합하였으며 100 μ l의 mineral oil로 상층액을 만들었다. 이를 95°C 1분, 55°C에서 30초간 변성시킨 다음 자동온도 변환장치 (Hybaid, England)에서 72°C 1분, 94°C 30초, 55°C 30초로 30주기 동안 반응시키고 72°C에서 1분간 그리고 75°C에서 온도를 정지시켰다.

nested PCR을 위해 1차 증폭된 반응액의 5 μ l를 취하여 95 μ l의 1 \times PCR 용액과 50 pmol A' primer, 50 pmol B' primer, 1 mM씩의 dATP, TTP, dGTP, dCTP와 혼합한 다음 다시 상층액으로 100 μ l의 mineral oil을 넣고 94°C 1분, 55°C 30초간 변성시켜서 2단위의 Taq polymerase를 혼합한 후 동일한 온도조건으로 30주기의 유전자 증폭을 시행하였다.

4) PCR생성물의 확인 및 검정

60회 nested PCR증폭된 시료 10 μ l를 123 bp 크기표지 (BRL)와 함께 2% agarose minigel에서 전기영동한 후 (10 mA, 150 volt, 30분) ethidium bromide 용액 (0.5 μ g/ml)으로 20분간 염색하여 자외선 투과기 위에서 125 bp 또는 200 bp크기의 형광밴드를 확인하고 폴라로이드 카메라로 촬영하였다.

이렇게 나타난 생성물이 과연 원하는 유전자 부분인지를 확인하기 위하여 전기영동된 agarose gel을 0.4 M NaOH로 20분간 처리하고 5 \times SSC로 1분간 세척하여 Hybond-N⁺ membrane (Amersham, England)으로 Southern transfer하였다. 이어서 membrane을 γ -³²P-dATP와 T, polynucleotide kinase로 5'-end labeling시킨 oligoprobe와 30% formamide가 포함된 hybridization용액에서 12시간 반응시킨 후, 42°C에서 2 \times SSC/0.1% SDS혼합용액으로 15분씩 2회 그리고 50°C에서 0.5 \times SSC/0.1% SDS 혼합용액으로 15분씩 2회 세척한 다음 X-ray 필름(Hyperfilm-MP, Amersham)에 20분간 노출시켰다^{19,20}.

결 과

1. Nested cDNA-PCR의 예민도와 특이도

10배씩 연속희석시킨 K562세포를 2 \times 10⁶개의 정상 단핵세포들과 혼합하여 K562세포가 최저 세포농도를 검사한 결과 splice I임을 의미하는 200 bp의 크기의 형광밴드가 2 \times 10² 농도까지 육안적으로 관찰되었다(Fig. 3).

cDNA-PCR 검사의 특이도를 결정하기 위하여 만성 골수성 백혈병 환자들중 125 bp 크기의 형광밴드를 보인 경우와 200 bp 크기의 형광밴드를 보인 시료를 전기영동하여 Southern blot분석을 시행한 결과 splice I과 II에 각각 고유한 교잡음영이 나타났다(Fig. 4). 따라서 125와 200 bp크기의 증폭산물이 최초 계획하였던 염기배열임을 확인할 수 있었다.

2. 만성골수성 백혈병 환자들에 있어서 병기에 따른 Splice I 및 II의 출현빈도

48명의 만성 골수성 백혈병 환자들을 대상으로 nested cDNA-PCR 검사를 실시한 결과 splice I 또는 splice II가 각각 단독으로 나타난 경우와 splice I과 II가

함께 나타난(이하 splice I&II) 3가지 유형으로 나눌 수 있었다(Fig. 5).

급성기 환자들중 splice I의 출현빈도는 62.5%(10), splice II는 25%(4) 그리고 splice I&II는 12.5%(2)로서 splice I의 출현빈도가 splice II보다 약 2배 높게 나타났다. 그러나 만성기의 경우도 splice I은 56.3%(18), splice II는 34.4%(11) 그리고 splice I&II는 9.3%(3)로 splice I의 출현빈도 역시 splice II에 비해 높게 나타났으므로 병기에 따른 splice I 또는 II의 출현빈도의 통계적 차이는 없었다($p > 0.01$) (Table 1).

3. 인터페론 요법 또는 골수이식 이후 bcr-abl mRNA의 출현율

α - 또는 γ -인터페론을 6개월 이상 투여받고 혈액학적 관해상태에 있는 환자들중 Ph1염색체가 음성으로 전환된 7명을 대상으로 혈액내 단핵세포에 bcr-abl mRNA가 존재하는지 여부를 확인한 결과 2명은 음성으로, 나머지 5명은 양성으로 나타났다(Table 2).

그러나 동종골수 이식을 받은 7명의 환자들중 2년 이상 재발의 증거가 없는 5명은 모두 음성이었으며, 이식 후 혈액학적 및 세포 유전학적으로 재발한 2명은 양성으로 나타났다(Table 3). 이렇게 재발된 환자들에게 인터페론 치료를 시도하여 2명 모두 수개월 이내에 임상적 관해가 유도되었다. 그러나 bcr-abl mRNA가 음성으로 전환된 1명은 이후 관해상태가 계속 유지되고 있으나, 지속적으로 bcr-abl mRNA가 검출된 1명은 결국 수개월내에 재발되어 사망하였다.

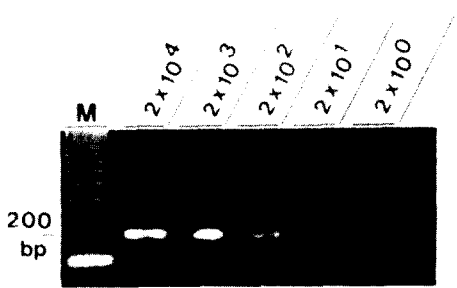


Fig. 3. Sensitivity of nested cDNA-PCR. K562 cells, serially diluted by 10 fold manner, were mixed with 2×10^6 normal mononuclear cells. After synthesis of cDNA and subsequent nested PCR, discrete fluorescent bands of expected size (200 bp) could be seen in the lanes which correspond to 2×10^2 or more K562 cells.

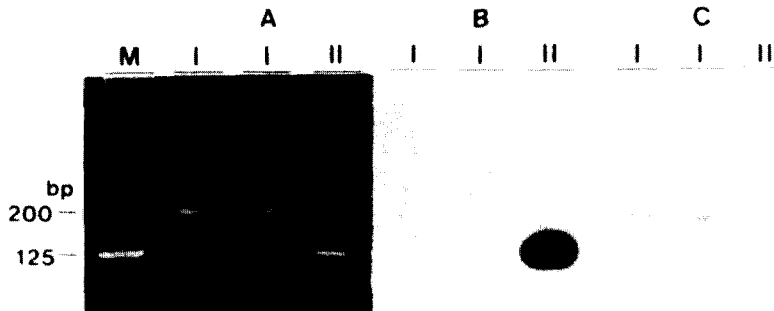


Fig. 4. UV picture(A) and autoradiographs (B&C) of the ethidium bromide stained gel after hybridization of amplified PCR with the splice I-(C) and the splice II-(B) oligonucleotide probe. The splice II-probe detected a fragment of 125 bp, the splice I-probe fragments of 200 bp. "123 bp ladder marker" was used to estimate the relative size of PCR product.

—한치화 외 9인 : 만성 골수성 백혈병에 있어서 병기에 따른 bcr-abl mRNA 유형별 출현 빈도와 polymerase chain reaction을 이용한 미세잔류 백혈병의 증명—

4. 성인형 급성 백혈병 환자들의 bcr-abl mRNA 출현율

급성 임파구성 백혈병 환자는 19명중 6명(31.6%)이

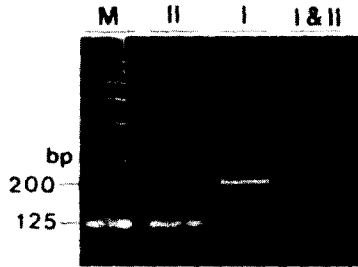


Fig. 5. A UV photograph of the ethidium bromide stained agarose minigel after electrophoresis of a 10 ul aliquot of the nested PCR mixture. Two kinds of bands as expected in figure 1 were identified, but both bands were seen in one lane.

그리고 14명의 급성 골수성 백혈병 환자들중 2명(14.3%)이 splice I 또는 II 형태의 bcr-abl mRNA를 표현하였다(Table 4). 임상적으로도 양성 결과를 보인 증례들은 관해유지 기간이 3개월 이내이었거나 또는 불응성 백혈병으로 음성 결과를 보인 환자들과 비교하여 예후가 매우 불량하였다.

Table 1. Results Obtained from Nested PCR Analysis of bcr-abl cDNA in Patients with Chronic Phase and Blast Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia

	Number of patients	Splice II	Splice I	Splice I & II
Chronic phase	32	11	18	3
Blast crisis	16	4	10	2
	48	15	28	5

Table 2. Clinical and Molecular Details of Interferon – Treated CML Patients

	Age/Sex	Pre – IFN state	Kind of IFN	Result of cDNA – PCR
1 Choi	24/M	CP	alpha	ND
2 Chang	25/F	CP	gamma	ND
3 Kim Y.	20/M	BC	gamma	I
4 Kang	31/F	CP	alpha	I
5 Chung	34/F	CP	alpha → gamma	I
6 Kim H.	43/M	CP	alpha	I & II
7 Eum	60/F	CP	alpha	II

* CP (chronic phase), BC (blast crisis), ND (not detected), I (splice I), II (splice II)

** All of the above patients are in both hematologic and cytogenetic remission.

Table 3. Clinical and Molecular Characteristics of CML Patients Transplanted with HLA – Matched Sibling Donor Marrow

Case	Age/Sex	Pre – BMT state	Current disease state (observation period)	Result of cDNA – PCR
1 Kim J.	33/M	CP	R (16M)	I
2 Park	40/F	CP	DF (34M)	ND
3 Paik	31/M	AC	DF (20M)	ND
4 Seo	33/M	CP	R (18M)	II
5 Oh	38/F	AC	DF (35M)	ND
6 Lee	33/M	CP	DF (38M)	ND
7 Kim E.	20/F	AC	DF (55M)	ND

* R (relapse), DF (disease free), CP (chronic phase), AC (accelerated phase), M (months)

** Two relapsed patients (case 1 & 4) became clinical remission with alpha interferon therapy.

Table 4. Summary of the Results Obtained from cDNA-PCR Analysis of bcr - abl mRNA in Patients with Acute Leukemia

	Number of patients	Splice I	Splice II	Total
ALL	19	4	2	6 (31.6%)
AML	14	—	2	2 (14.3%)
		4	4	8

고 안

22번 염색체에 위치한 M-bcr 유전자와 9번 염색체의 c-abl 유전자간의 재배열로 생겨난 bcr-abl 융합 유전자는 만성 골수성 백혈병의 특징적인 유전자 구조이며, Ph1 염색체(22q-)가 음성인 만성 골수성 백혈병 환자들의 40~100%에서 증명된다^{21~23}.

제한효소 절단실험과 Southern blot 검사를 통해 M-bcr 유전자의 재배열을 확인함으로써 bcr-abl 융합 유전자를 간접적으로 증명할 수 있으나 검사의 예민도가 1% 수준을 넘지 못하고 M-bcr 유전자의 재배열을 찾는 탐식자의 선택이 용이하지 않아 고식적인 염색체 검사법을 대신하기에는 미흡하다²⁴.

M-bcr 유전자의 재배열 부위가 만성 골수성 백혈병의 병기 및 예후와 관련이 있다고 하여^{10~14} 저자들은 만성 골수성 백혈병의 만성기로부터 급성기로 진행되는 현상과 bcr-abl transcript에 bcr exon 3의 포함 여부가 관련이 있는지를 확인할 목적으로 60회 nested cDNA-PCR을 시행하였다. 저자들이 시행한 검사의 예민도는 2×10^2 수준(0.01%)으로 30회 cDNA-PCR 후 동위원소가 표식된 탐식자를 사용한 결과와 동일하였다¹⁶.

급성기 환자들에 있어서 splice I의 출현율이 splice II에 비해 2배이상으로 높게 나타난 결과로 미루어 splice I이 급성기에 고유한 것이며 만성기 환자들의 경우에는 오히려 splice II가 많으리라고 예측하였으나 만성기 역시 급성기와 동일한 결과를 보여 주었기 때문에 M-bcr 유전자의 재배열 부위와 병기사이의 연관성에 대해 부정적인 결론을 내릴 수 있었다^{27~30}. 그러나 Morgan 등의 결과와 마찬가지로 splice I이 급성기적인 유전자 구조의 특징이라고 가정할 경우 splice I을 표현하는 만성기 환자들에 만성기의 후반기적인 특성을

갖기 때문에 splice II만을 표현하는 만성기 환자들에 비해 그 예후가 불량할 것으로 추측된다³¹. 따라서 향후 만성기 환자들을 대상으로 splice I의 표현여부에 따라 예후의 차이가 있는지를 추적조사 하므로서 “molecular staging”의 개념이 도입될 수 있을 것이다.

동일한 환자에 splice I과 II가 동시에 나타난 경우가 5명(7.4%)이었다. 이러한 현상은 첫째, splice II만 가지고 있는 원래의 만성 골수성 백혈병 세포군(leukemic cell clone)에서 splice I을 표현하는 새로운 급성기 세포군이 출현하므로서 두가지 세포가 공존하거나, 둘째 백혈병 세포의 bcr-abl 유전자가 bcr exon 3와 c-abl exon 2로 구성되어 있어 splice I만이 표현되고 있다가 “alternative splicing”에 의해 splice II가 동시에 나타나는 기전으로 설명이 가능하다^{15,31}.

저자들의 경우 냉동보관되었던 만성 골수성 백혈병시료들로부터 원하는 크기의 형광밴드를 얻을 수 없었다. 이는 기술적으로 초저온 냉동 보관되었던 백혈병 세포들의 회수율이 낮았기 때문에 boiling방법으로 추출된 RNA양이 너무 적어 검사의 예민도가 감소된 것으로 생각된다.

인터페론 치료를 받고 있는 환자들중 임상적으로 관해 상태에 있으며 Ph1염색체가 음전된 7명중 5명에서 양성 결과가 나타난 점으로 미루어 Lee 등이 제시한 결과와 같이 미세잔류 백혈병(minimal residual leukemia)이 존재하고 있음을 알 수 있었다³⁴. 그러나 음성 결과를 보인 2예는 최초 진단시의 결과가 없어서 단언할 수는 없지만 M-bcr 유전자의 재배열 부위가 전형적인 위치에서 벗어나 있는 것만 아니라면 적어도 nested cDNA-PCR 검사의 예민도 이하에 있는 미세잔류 백혈병이거나 혹은 완전히 백혈병세포들이 제거된 상태일 것으로 추측된다^{32,33}. 따라서 현재 논란이 되고 있는 만성 골수성 백혈병 환자의 인터페론 투여기간과 자가 골수이식 시기의 결정에 새로운 좌표가 될 수 있을 것으로 기대된다.

동종 골수이식을 받고 2년이상 재발의 증거가 없이 생존하고 있는 환자들은 모두 bcr-abl mRNA 검사가 음성으로 나타났으나, 혈액 및 세포유전학적으로 재발된 경우는 양성결과를 보였다. bcr-abl transcript는 동종 이식후 임상적 재발이 없이도 6개월 내지 1년정도까지 나타날 수 있으며 이러한 결과는 이식후에 잔존하고 있던 환자고유의 임파구생존 기간과 일치하는 것으로 추정

된다^{35,36)}. 그러므로 이 기간 이후에도 지속해서 검출되거나, 이식후 6개월 이전일지라도 일단 완전히 음전되었다가 재출현한 경우와 이식전후의 splice 형태와 전혀 다른 splice가 나타나면 임상적 재발을 조기에 예측할 수 있을 것이다. 이상의 결과로 미루어 현재까지는 골수 이식만이 만성 골수성 백혈병을 완치시킬 수 있는 유일한 방법이며 저자들이 시행한 검사 방법의 예민도는 임상적으로도 미세잔류백혈병의 존재를 증명하기에 충분하다고 판단된다.

동종 골수이식후에 재발된 환자들을 인터페론으로 치료를 시도한 결과 모두 혈액학적 관해가 되었으며 1명은 bcr-abl mRNA 검사도 음성으로 전환되었기 때문에 비록 적은 경험이었지만 Arcese 등이 보고한 바와 같이 골수이식후 재발된 만성 골수성 백혈병 환자에게 재이식을 고려하기 전에 인터페론 치료가 우선 권장될 수 있는 방법임을 재확인할 수 있었다³⁷⁾.

bcr-abl mRNA를 대상으로한 cDNA-PCR 검사의 위양성 결과에 대한 문제점들이 지적되고는 있지만^{38~40)} 성인형 급성 임파구성 백혈병 환자들의 31.6%와 급성 골수성 백혈병 환자의 14.3%가 bcr-abl mRNA를 표현하고 있었으며, 그들의 예후가 매우 불량하였기 때문에 급성 백혈병 환자에 있어서 bcr-abl transcript의 출현은 Phl 염색체와 마찬가지로 새로운 고위험 인자라고 생각된다. Phl 염색체가 양성인 급성 임파구성 백혈병은 만성 골수성 백혈병과는 달리 bcr 유전자의 재배열 부위가 M-bcr보다 5' 쪽으로 상당히 떨어져 있는 곳에 위치한다고 알려져 있다³²⁾. 그러나 저자들이 경험한 다수의 급성 백혈병 환자들에서 만성 골수성 백혈병과 동일한 M-bcr 유전자의 재배열이 발견되었기 때문에 이들이 만성 골수성 백혈병에서 유래된 급성 백혈병일 가능성도 배제할 수 없으며 다른 한편으로는 de novo 급성 백혈병에 있어서도 bcr-abl 융합 유전자가 존재하고 있음을 짐작하게 한다⁴¹⁾. 특히 최근에 Maurer등도 성인형 급성 임파구성 백혈병의 17%가 만성 골수성 백혈병에서 발견되는 bcr-abl 유전자를 갖고 있으며 불량한 예후를 보인다는 결과를 보고한 바 있어 향후 급성 백혈병을 대상으로한 확대 연구가 요구된다⁴²⁾.

요 약

만성 골수성 백혈병으로 진단된 48명의 환자와 동일

병명으로 동종 골수이식을 받은 7명, 그리고 인터페론 치료를 받고 있는 환자들중 혈액학적 관해 상태에 있으며 Phl 염색체가 음성으로 전환된 7명을 대상으로 하여 말초 또는 골수 단핵세포에 bcr-abl mRNA에 bcr exon 3가 포함되어 있는지 여부를 60회의 nested cDNA-PCR 방법으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 또한 동일한 방법을 사용하여 급성 백혈병(임파구성 19명, 골수성 14명)의 경우에도 M-bcr 유전자와 c-abl 암유전자 사이에 재배열이 있는지를 검토하였다.

1) K562 세포를 이용한 nested cDNA-PCR 검사의 예민도는 2×10^2 개(0.01%)이었고, ³²P가 표식된 oligo-probe로 Southern blot 분석을 시행한 결과 특이도 역시 매우 높았다.

2) 만성 골수성 백혈병 환자들에서 발견된 bcr-abl mRNA의 유형은 splice I, II 그리고 splice I & II의 3가지이었다. 급성기 환자들에 있어서 splice I의 출현 빈도가 62.5%(10명), splice II는 25%(4명), splice I & II는 12.5%(2명)이었으며 만성기에 환자들의 경우는 splice I이 56.3%(18명), splice II는 34.4%(11명) 그리고 splice I & II는 9.3%(3명)로 splice I의 출현빈도가 급, 만성기 모두 높았으며 병기에 따른 통계적 차이는 없었다($p > 0.01$).

3) 인터페론 치료를 받고 혈액학적 관해 상태에 있으며 Phl 염색체가 음전된 7명중 5명은 계속해서 splice I (3명), splice II(1명) 또는 splice I & II(1명) 형태의 양성 결과 보이고 있으나 2명은 음성으로 나타났다.

동종 골수이식을 받고 2년이상 재발의 증거가 없는 5명은 모두 음성으로 나타났으나 혈액 및 세포유전학적인 재발을 보인 2명은 양성 결과를 보였다. 이들은 모두 인터페론 치료에 의해 관해가 유도 되었으며 nested cDNA-PCR결과가 음성으로 전환된 1명은 계속해서 관해상태로 생존하고 있다.

4) 성인형 급성 백혈병 환자들의 경우에도 임파구성은 31.6%(6명), 골수성은 14.3%(2명)가 양성으로 나타났으며, 임상적으로 양성 환자들은 음성 환자들에 비해 예후가 매우 불량하였다.

결론적으로 첫째, nested cDNA-PCR은 만성 골수성 백혈병 세포를 정확하게 증명할 수 있어 기구설비가 잘 갖추어진 곳이면 Phl 염색체검사 대신에 권장할 만한 새로운 검사법이고, 둘째 저자들이 경험한 환자들의 bcr-abl transcript 결과가 기대했던 대로 나타나는

않았으나 급성기 환자들에서 splice I의 출현빈도가 월등히 높았기 때문에 splice I이 급성기에 고유한 유전자적 특징일 것으로 추측되며, 특히 splice I이 표현되는 만성기 환자들은 splice I을 표현하지 않는 경우에 비해 급성기로의 전환기간이 짧은 것이라고 기대되기 때문에 향후 지속적인 추적관찰이 필요하다. Phl 염색체가 양성인 급성 임파구성 백혈병과 만성 골수성 백혈병 세포의 bcr-abl 유전자로부터 생성된 단백질은 서로 tyrosine kinase 활성 및 세포형질 변환능력에 차이가 있음이 이미 알려져 있으며⁴³⁾, splice I의 최종 생성물은 splice II에 비해 25개의 아미노산이 더 많음에도 불구하고 기능적 차이에 대한 보고가 없으므로 이와 관련된 기초연구, 즉 “in vitro transfection”이나 “transgenic mice 모델” 실험들을 진행시켜야 할 것이다. 셋째, bcr-abl mRNA를 대상으로한 cDNA-PCR검사는 만성 골수성 백혈병 환자들에게 인터페론이나 골수이식 치료를 시행한 후에 치료효과의 판정과 조기재발의 발견 등에 매우 유용하게 이용될 수 있으며, 마지막으로 bcr-abl transcript가 발견된 급성 백혈병 환자들은 Phl 염색체가 양성인 경우들과 마찬가지로 1차 완전관해 시기에 동종 또는 자가골수이식 등의 보다 적극적인 치료가 필요할 것으로 사료된다.

— Abstract —

Analysis of the Frequency of Two bcr-abl mRNAs in Each Stage of Chronic Myelogenous Leukemia and Detection of Minimal Residual Leukemia by Polymerase Chain Reaction

Chi Wha Han, M.D., Jong Wook Lee, M.D.
 Jong Youl Jin, M.D., Woo Sung Min, M.D.
 Chong Won Park, M.D., Choon Choo Kim, M.D.
 and Dong Jip Kim, M.D.

Division of Hematology-Oncology, Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Won Il Kim, Ph.D.

Department of Clinical Pathology

Joon Yeon Yoo, M.S., and Il Ho Yang, Ph.D.

Clinical Research Institute

Chronic myelogenous leukemia (CML) can be char-

acterized by a new “bcr-abl fusion gene” from which bcr-abl mRNA and protein are generated. It is suggested that this unique protein (P210) is involved in the pathogenesis of CML. We designed this study to investigate whether the presence (splice I) or absence (splice II) of bcr-abl exon 3 in bcr-abl mRNA is related with the disease status of CML (chronic phase vs blast crisis). The bcr-abl mRNA in mononuclear cells from 48 Philadelphia chromosome positive CML patients were analyzed by the nested PCR (60 rounds). The sensitivity of the test was 2×10^2 (0.01%). Among the 16 samples obtained in blast crisis, 10 patients had the splice I, 4 had the splice II, 2 had both the splice I and splice II.

Among the 32 samples obtained in chronic phase, 18 contained the splice I, 11 contained the splice II, 3 contained both the splice I and splice II.

Minimal residual leukemia was evaluated in CML patients after successful allogeneic BMT and IFN therapy; In 5 patients who were in disease-free state for more than 2 years after BMT, the bcr-abl mRNAs were not detected. Two relapsed cases after BMT expressed bcr-abl mRNA, but they entered into clinical remission by IFN therapy. Of the 7 patients achieved clinical and cytogenetic remission by continued treatment with IFN, 5 expressed bcr-abl mRNAs.

Interestingly, bcr-abl mRNAs were found in 6 of 19 ALL patients and 2 of 14 AML patients. All of the positive cases had poor prognosis. These findings suggest that there is no predication of the specific splice in each phase of CML and that IFN cannot totally eradicate leukemic stem cells. Therefore BMT is the only way to cure CML. Additionally, the presence of bcr-abl mRNA could be a bad prognostic factor in acute leukemia.

Key Words: Chronic myelogenous leukemia, Polymerase chain reaction, bcr-abl mRNA

REFERENCES

- 1) Champlin RE, Golde DW: *Chronic myelogenous leukemia; recent advances. Blood* 65:1039, 1985
- 2) Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, McCredie KB, Freireich EJ: *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. Am J Med* 83:445, 1987
- 3) Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie KB, Keating

- MJ, Trujillo J, Gutterman J: *Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. Blood* 69:1280, 1987
- 4) Thomas ED, Clift RA: *Indications for marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. Blood* 73:861, 1989
 - 5) Priest JR, Robison LL, McKenna RW, Lindquist LL, Warkentin PI, LeBien TW, Woods WG, Kersey JH, Coccia PF, Nesbit ME Jr: *Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood* 56:15, 1980
 - 6) Whang-Peng J, Henderson ES, Knutsen T, Freireich EJ, Gart JJ: *Cytogenetic studies in acute myelocytic leukemia with special emphasis on the occurrence of Ph chromosome. Blood* 36:448, 1970
 - 7) Kurzrock R, Catterman JU, Talpaz M: *The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med* 319:990, 1988
 - 8) Clark SS, Crist WM, Witte ON: *Molecular pathogenesis of Ph-positive leukemias. Ann Rev Med* 40: 113, 1989
 - 9) Schaefer-Rego K, Dudek H, Popenoe D, Arlin Z, Mears JG, Bank A, Leibowitz D: *CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of the bcr. Blood* 70:448, 1987
 - 10) Mills KI, MacKenzie ED, Birnie GD: *The site of the breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. Blood* 72:1237, 1988
 - 11) Birnie GD, Mills KI, Benn P: *Does the site of the breakpoint on chromosome 22 influence the duration of the chronic phase in chronic myelogenous leukemia? Leukemia* 3:545, 1989
 - 12) Grossman A, Silver RT, Arlin Z, Coleman M, Camposano E, Gascon P, Benn PA: *Fine mapping of chromosome 22 breakpoints within the breakpoint cluster region (bcr) implies a role for bcr exon 3 in determining disease duration in chronic myeloid leukemia. Am J Hum Genet* 45:729, 1989
 - 13) Eisenberg A, Silver R, Soper L, Arlin Z, Coleman M, Bernhardt B, Benn P: *The location of breakpoints within the breakpoint cluster region (bcr) of chromosome 22 in chronic myeloid leukemia. Leukaemia* 2: 642, 1988
 - 14) Mills KI, Hynds SA, Burnett AK, MacKenzie ED, Birnie GD: *Further evidence that the site of the breakpoint in the major breakpoint cluster region (M-bcr) may be a prognostic indicator. Leukemia* 3: 837, 1989
 - 15) Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E: *Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. Cell* 47:277, 1986
 - 16) Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP: *Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5698, 1988
 - 17) 김동집, 김춘추, 박종원, 민우성, 한치화, 김학기, 한경자, 김원일 : 난치성 악성 종양의 치료를 위한 자가 골수이식. 대한의학회지 31:318, 1988
 - 18) Ferre F, Garduno F: *Preparation of crude cell extract suitable for amplification of RNA by PCR. Nucl Acids Res* 17:2141, 1989
 - 19) Albretsen C, Haukanes B-I, Aasland R, Kleppe K: *Optimal conditions for hybridization with oligonucleotides: A study with myc-oncogene DNA probes. Anal Biochem* 170:193, 1988
 - 20) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular cloning; a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982*
 - 21) Gale RP, Goldman JM: *Rapid progress in chronic myelogenous leukaemia. Leukaemia* 2:321, 1988
 - 22) van der Plas DC, Hermans ABC, Soekarman HD, Smit EME, de Klein A, Smadja N, Alimena G, Goudsmit R, Grosveld G, Hagemeyer A: *Cytogenetic and molecular analysis in Philadelphia negative CML. Blood* 73:1038, 1989
 - 23) Weideman LM, Karhi KK, Shivji MKK, Rayter SI, Pegram SM, Dowden G, Bevan D, Will A, Galton DAG, Chan LC: *The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and P²¹⁰ phl/abl expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative disease. Blood* 71:349, 1988
 - 24) Sawyers CL, Timson L, Kawasaki ES, Clark SS, Witte ON, Champlin R: *Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad USA* 87:563, 1990
 - 25) Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G: *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell* 36:93, 1984
 - 26) Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A,

- Grosveld G: *Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature* 315: 758, 1985
- 27) Morris SW, Daniel L, Ahmed CMI, Elias A, Lebowitz P: *Relationship of bcr breakpoint to chronic phase duration, survival and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia presenting in early chronic phase. Blood* 75:2035, 1990
- 28) Tien HF, Wang CH, Chen YC, Shen MC, Wu HS, Lee FY, Chuang SM, Liu CH: *Chromosome and bcr rearrangement in chronic myelogenous leukemia and their correlation with clinical states and prognosis of the disease. Br J Haematol* 75:469, 1990
- 29) Shtalrid M, Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian H, Trujillo J, Gutterman J, Yoffe G, Blick M: *Analysis of breakpoints within the bcr gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. Blood* 72:485, 1988
- 30) Shtivelman E, Gale RP, Dreazen O, Berrebi A, Zaizov R, Kubonishi I, Miyoshi I, Canaani E: *bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. Blood* 69:971, 1987
- 31) Morgan GJ, Hernandez A, Chan LC, Hughes T, Martiat P, Wiedemann LM: *The role of alternative splicing patterns of BCR/ABL transcripts in the generation of the blast crisis of chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol* 76:33, 1990
- 32) Hermans A, Heisterkamp N, von Lindern M, van Baals S, Meijer D, van der Plas D, Wiedemann LM, Groffen J, Bootsma D, Grosveld G: *Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. Cell* 51:33, 1987
- 33) Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rego-Cambrin G, Mazza U, Gavosto F: *New types of BCR/ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Blood* 76:1819, 1990
- 34) Lee M-S, LeMaistre A, Kantarjian HM, Talpaz M, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA: *Detection of two alternative bcr/abl mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. Blood* 73:2165, 1989
- 35) Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM: *Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia; Role of polymerase chain reaction in predicting relapse. Blood* 77:874, 1991
- 36) Gabert J, Thuret I, Lafage M, Carcassonne Y, Maraninchi D, Mannoni P: *Detection of residual bcr/abl translocation by polymerase chain reaction in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. Lancet* i:1126, 1989
- 37) Arcese W, Mauro FR, Alimena G, Coco L, De Cuia MR, Screnci M, Iori AP, Montefusco E, Mandelli F: *Interferon therapy for Ph' positive CML patients relapsing after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant* 5: 309, 1990
- 38) Hughes T, Jassen JWG, Morgan G, Martiat P, Saglio G, Pignon JM, Pignatti FP, Mills K, Keating A, Gluckman E, Bartram CR, Goldman JM: *False-positive results with PCR to detect leukaemia-specific transcript. Lancet* 335:1037, 1990
- 39) Hughes T, Goldman JM: *Improved results with PCR for chronic myeloid leukaemia. Lancet* 335:812, 1990
- 40) Kwok S, Higuchi R: *Avoiding false positives with PCR. Nature* 339:237, 1989
- 41) de Klein A, Hagemeijer A, Bartram CT, Houwen T, Hoesfsroot L, Carbonell F, Chan L, Barnett M, Greaves M, Kleihauer E, Heisterkamp N, Groffen J, Grosveld G: *bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. Blood* 68:1369, 1986
- 42) Maurer J, Jassen JWG, Thiel E, van Denderen J, Ludwig W-D, Aydemir U, Heinze B, Fonatsch C, Harbott J, Reiter A, Riehm H, Hoelzer D, Bartram CR: *Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. Lancet* 337:1055, 1991
- 43) Lugo TG, Pendergast A-M, Muller AJ, Witte ON: *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science* 247:1079, 1990