

## 만성 골수성 백혈병(CML)에서 염색체의 변화\*

계명대학교 의과대학 해부학교실

### 이인환 · 최인장 · 장성익

#### =Abstract=

#### Chromosomal Characteristics of Chronic Myelocytic Leukemia (CML)

Ihn Hwan Lee, MD; In Jang Choi, Sung Ik Chang, MD

Department of Anatomy, Keimyung University

School of Medicine, Taegu, Korea

This article documents the cytogenetic findings in 43 patients with chronic myelocytic leukemia (CML). Short term culture (3hr) of bone marrow of 26 males and 17 females were studied with different banding techniques. 8 cases were studied during blastic phase (BP), and the others were during chronic phase (CP). Typical Philadelphia ( $\text{Ph}^1$ ) chromosomes [ $t(9:22)(q34:q11)$ ] were present in 20 cases (47%). Variant was  $t(14:22)(q32:q11)$ , additional findings were +8, -22q, -22, i(17q), hyperdiploidy. In BP, 2 cases were hyperdiploid, 2 cases were mosaic pattern, 2 cases had  $\text{Ph}^1$  and additional findings (complex translocation), the others had typical  $\text{Ph}^1$  alone.

Authors discussed the relevance of chromosome change and break point. Certain chromosome regions are more often affected. These might contain genes of critical importance for the final malignant progression. Molecular biology may provide insight on the nature and expression of involved genes.

#### 서 론

대부분의 악성 종양에서는 염색체에서 특별한 band 혹은 segment의 결절이나 전좌가 나타난다. 즉 특별한 염색체의 특별한 위치에 있는 DNA-sequence의 결절이나 전형(transformation)이 종양에 밀접한 관계가 있으며 그 위치에 있는 유전인자의 활성의 변화라기 보다는 기능의 상실로 추측되고 있다.(Yunis, 1983) 즉 종양의 형성은 염색체에서의 유전인자 혹은 암유전자(oncogene)의 변화로 여겨지고 있다,

많은 종양중 조혈세포의 악성 종양인 만성 골수성 백혈병(CML)에서의 해형 연구는 일찍부터 시작되어 1960년 Nowell과 Hungerford에 의해 세

염색체가 발견됨으로써 처음 기술되었으며 후에 Baikie 등에 의해 미세 염색체는 동원체가 말단에 있는 채 염색체에서 기원하며 이를 Philadelphia ( $\text{Ph}^1$ ) 염색체라 칭하게 되었다(Sandberg, 1983). 이로서 다른 종양의 해형에도 변화가 있을 것이라는 가정 하에 많은 연구가 진행되어 왔다.

골수뿐만 아니라 말초혈액과 비장등 골수외의 조혈기관에도 과립성 백혈구의 수가 증가하는 CML에서는 표지 염색체(maker chromosome)가 되는  $\text{Ph}^1$  염색체는 Yunis(1984)에 의해  $t(9:22)(q34.1:q11.2)$ 으로 밝혀졌으며 Sasaki(1982)는 이 염색체의 기원이 B-임파구라고 보고하고 있다. 그러나 이전 전형적인  $\text{Ph}^1$  염색체 외에도 많은 variant  $\text{Ph}^1$  염색체가 보고되어 있으며 단순 전좌일 경우 22번

\* 본 논문은 1986년도 계명대학교 윤종 연구비 및 출판비로 조사원 1명으로 이루어졌다.

염색체의 장원이 1번, 4번, 5번, 8번, 18번, 20번 그리고 Y 염색체를 제외한 모든 염색체로 전파된 보고가 있고(Yunis, 1984) 복합 전자일 경우 더욱 다양하여 12번, 16번, 20번, 그리고 Y 염색체를 제외한 모든 염색체로 전파된 보고가 있다(Sandberg, 1985).

저자들은 43명의 CML 환자(남자 26명, 여자 17명)에 대해 끌수의 단기간 배양과 high-resolution banding 기법으로 핵형을 분석하고 Ph<sup>1</sup>염색체의 출현 번도와 그 변형(varient)은 주로 어느 염색체에서 일어나는가 또 blastic phase와 chronic phase에 따른 핵형 변화는 어떤 차이가 있는가를 조사하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료:** 임상적으로 CML로 진단이 붙은 환자(남자 26명, 여자 17명)에서 끌수 철자 혹은 생검으로 취한 2 ml의 끌수세포를 사용하였다.

#### 실험방법 :

1) 단시간 배양법 : 20% FBS가 들어 있는 RPMI 1640 배지 9 ml에 끌수세포 1 ml를 침가하여 3~4시간 배양 후 colcemid 처리하고 3시간후 세포를 거두어 저장액에 15분간 거친 후 고정하여 slide를 제작하고 공기중에 3일간 완전히 전조시킨 후 G-banding 하였다.

2) 배양없이 직접적인 방법 : 20 ml의 0.075 M KCl에 2 µg/ml colcemid를 3방울 넣고 37°C로 유지한 다음 끌수세포를 3방울 빙어프리 37°C에서 15분간 둔 후 20 ml 고정액을 침가하여 잘 섞어 원심 분리하고 이 고정 과정을 4차례 반복하여 slide를 제작하고 banding 하였다.

3) high-resolution G-banding 법 : 끌수 철자 2 ml 중 남은 1 ml를 ethidium-bromide (EB)를 이용한 H-R G-band를 하였다. 방법을 간략히 기술하면 끌수세포 1 ml를 배지 9 ml에 넣어 70시간 배양 후 EB를 최종 농도가 10 µg/ml 되게 배지에 넣어 1시간 둔 다음 (EB stock solution: 500 µg/ml in medium) colcemid 처리하여 최종 농도가 0.015 µg 되게 하여 1시간 경과 후 저장액 처리와 -20°C에서 고정 과정을 거치고 flame-dry로 slide를 제작하고 3일동안 공기중에서 완전히 말린 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 5분간 처리한 후 흐르는 물에 수세하고 20°C, 0.1% trypsin 용액에 30~40초간 조용히 담구었다가 수세하고 4% Giemsa (pH 6.5)액에 4분간 염색하였다.

### 성 적

CML 환자 43명(남자 26명, 여자 17명)의 끌수 세포 배양 후 핵형을 분리하고 blastic phase(BP)와 chronic phase(CP)에 따라 분류해서 얻은 결과를 표로 작성하면 Table 1, Table 2와 같다. 전체적으로 보아 전형적인 Ph<sup>1</sup>염색체 [t(9:22)(q34:q11)]는 CP에서 16명, BP에서 2명이며 다른 염색체의 이상을 동반한 경우가 BP에서 2명으로 전체의 47%에서 Ph<sup>1</sup>염색체를 나타냈다.

이를 연령별로 분류하여 (Fig. 1) 연령에 따른 Ph<sup>1</sup> 염색체의 출현빈도를 비교하였으나 유의한 차이는 없었다. CP의 경우 14명에서 정상적 핵형을 보이고 있으며(40%) 전형적인 Ph<sup>1</sup>염색체는 16명(46%), 그 밖에 1명에 varient로 14번 염색체의 단위에 전파되었으며 염색체 결실이 12번, 16번, 22번 염색체에서 있었고 비록이 전파가 7번 염색체의 장원과 10번 염색체의 단위사이에서 있었다.

BP의 경우 Ph<sup>1</sup>염색체 단독인 경우가 2명(25%)

Table 1. Cytogeometric features of 35 cases with chronic phase (CP) of CML

Karyotype	Case Number
normal karyotype	14
Ph <sup>1</sup> alone t(9:22)(q34:q11)	16
variant translocation of the Ph <sup>1</sup>	1
t(14:22) (p32:q11)	
t(7:10) (q21:p12)	1
del(12) (q11)	1
del(22)	1
del(16q24)	1

Table 2. Cytogenetic features of 8 cases with blastic phase (BP) of CML

Karyotype	Case Number
Ph <sup>1</sup> alone	2
+8, t(9:22)(q34:q11) i(17q)	1
t(9:22) (q34:q11), t(3:9)	1
(q21:q34), mar(19+?)	
hyperdiploid, mn(47-53)	1
with double minute chromosome	
variable, mn(55-87)	1
mos 46/45, -F47, +C	1
mos 45, -12, -22, -C +2mar	1
/46, -12, -C, +2mar	

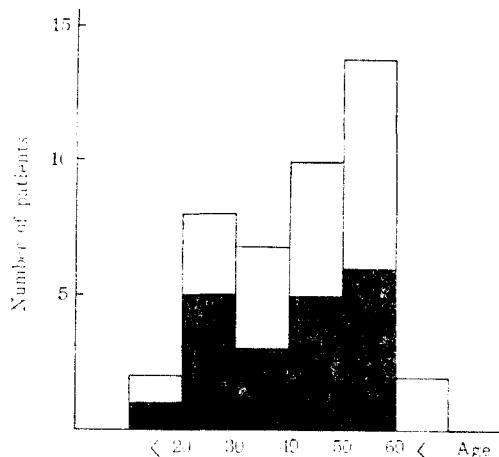


Fig. 1. Age distribution of CML patients. Black bar means  $\text{Ph}^1$ -positive patients with CML.



Fig. 2. One example of G-banding karyotype from a marrow cell of BP case, including  $+8(\uparrow)$ ,  $\text{Ph}^1$  i(17q)(▲).

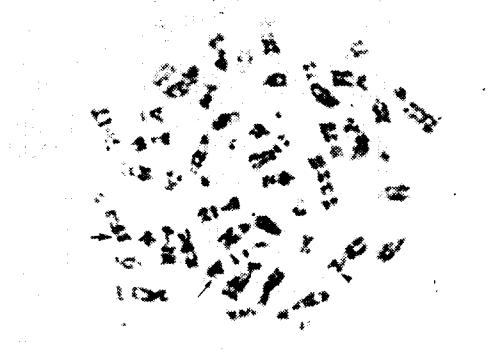


Fig. 3. One example of G-banding karyotype from a marrow cell of BP case, including  $\text{Ph}^1(\uparrow)$  t(3q21 : 9q34)(▲) mar(19 + ?)(↑)

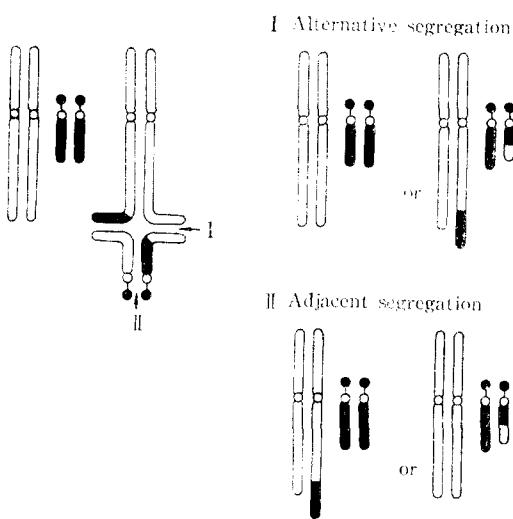


Fig. 4. Genesis of the  $\text{ph}^1$ -chromosome through different process of segregation.

으로 CP의 46%에 비해 낮은 출현 빈도였다. 염색체의 수가 일정치 않은 2명의 경우 modal number (mn)가 hyperdiploid 이거나 hypotetraploid였으며 예후가 나쁜 고령암 조직에서 보이는 hypodiploid는 나타나지 않았다. stem line(sl)이 46인 경우도 염색체의 결실과 중복이 C-group 염색체와 22번에서 일어났다.

남자 26명의 핵형이 분류되었으나 Y염색체의 결실은 없었으며 double  $\text{Ph}^1$  염색체의 출현도 발견할 수 없었다.

## 고 찰

CML에서  $\text{Ph}^1$  염색체 발견 이후로 많은 다른 종양에서도 종양에 따른 특이 염색체 소견이 보고되어 있으며 최근에는 염색체 분석 방법의 발달도 대부분의 악성 종양이 염색체 변이를 동반하고 있는 것으로 알려져 있다. 즉 미세한 부분의 결실 혹은 전좌에 기인하여, trisomy 이거나 중복(duplication)인 경우는 gene dosage 기전으로 풀이되어 불분리(nondisjunction) 등에 의해 활성화된 oncogene를 두 배나 가질 것으로써 종양으로 발전한다고 한다(Pimentel, 1985).

이런 염색체 변이는 종양 형성에 어떤 직접적 역할을 하는가에 대해서 많은 유추가 있다. 예를 들어 화학물질이 악성 종양을 유발시키는데 직접적인 변화가 있을 수도 염색체 변화가 두드러지며 시험관에

서 유한 생명을 가진 diploid 세포가 heteroploid로 전형을 일으키면 종양화되어 영구 세포계(cell line)로 된다(McClain, 1984), 이런 것들은 virus나 다른 인자를 투여하여 시험에서 증명할 수 있는 것들이며 이밖에도 종양세포의 stem line (sl), 혹은 side line 세포의 핵형이 그 종양 특유의 핵형 변화를 동반한다든지, 선천적으로 핵형이 불안정하여 breakage를 잘 일으키는 Bloom의 증후군, Fanconi의 변형, ataxia telangiectasia 등으로 잘 이행되는 질병으로 알려져 있다. 21 trisomy나 13q-증후군 같은 염색체 이상 환자에서는 멀암물질(mutagen)에 과민성이 증명되어 종양의 유발원으로 염색체 변화가 선형 요인으로 알려져 있다(Freireich, 1984). 그러나 Sasaki(1982)는 이런 핵형의 변화는 특이한 표적 세포에 한하거나 의학적 인자 혹은 속주의 유전적 배경에 달려 있다고 주장하였다.

CML의 표적 핵형이 되는 Ph<sup>1</sup> 염색체의 특징으로는 22번 염색체의 장환으로부터 결실된 염색질이 late labeling이 아니며 Gimsa-positive이며 형광물질에 강하게 염색되는 특징을 가진다(Canellos, 1972). 또한 유전적으로 active chromation이며, Rowley 등(1973)은 CML 환자의 90%에서 발견된다고 주장하였다. 그 출현율이 60~100%까지 다양하고 보고되는 Ph<sup>1</sup> 염색체의 형성은 Fig. 4에서와 같이 9번과 22번 염색체 사이에 quadriradial 염색체가 형성되어 그 분열이 어떻게 이루어 지느냐에 따라 Ph<sup>1</sup> 염색체 혹은 정상 염색체의 특징을 가질 수 있다. 즉 75%에서 Ph<sup>1</sup> 염색체가 출현 할것이라 예상할 수 있다(Sandberg, 1983).

Gödde-Salz 등(1985)은 CP의 경우 전형적인 Ph<sup>1</sup> 염색체 외에 가장 흔한 염색체 이상으로 8 trisomy를 보고하였고(10% 혹은 그 이하), 1%에서 Y 염색체의 결실을 보고하였다. 그러나 연령에 따라 Y 염색체의 결실은 차이가 많아 Whittaker 등(1975)은 8~10%에서 나타난다고 보고하였으며 Sakurai 등(1976)은 40세 이상에서 나타나기 시작하여 70세 이상에서 급격히 증가하고 80세 이상의 CML 환자 일 경우 75%에서 Y 염색체 결실이 있다고 하였다.

BP의 경우에는 +8외에도 17번 염색체의 구조적 이상이 혼히 동반되며 hypodiploidy는 발견치 못하였다. 이러한 변화에 대해서 Mitelman 등(1976)은 정상 핵형에서 46, Ph<sup>1</sup> 핵형으로 전개되며 다음 순차적으로 2Ph<sup>1</sup>, +8, i(17q)로 전행한다고 하였다. 즉 i(17q)가 있으면 더 이상 염색체의 변화를 일으키지 않는다(Sadamori, 1985).

Ph<sup>1</sup> 염색체는 B-임피구에서 기원되며 (Sasaki,

1982), Ph<sup>1</sup> 염색체가 있으면 없는 CML보다 더 좋은 예후를 가진다 하였다(Puchkova, 1983). 본 연구에서 총환자의 49%에서 Ph<sup>1</sup> 염색체 음성으로 많은 환자에서 나쁜 예후가 예견된다. 어린이의 CML 일 경우 Ph<sup>1</sup> 염색체 음성(juvenile type)의 비도가 더욱 증가하여 전형적으로 더 나쁜 예후를 가진다.

이 밖에도 질병의 전형과 염색체 변화와의 관계로서는 i(17q)는 병이 많이 진행되었을 때 나타나며 복잡한 염색체 변화를 가질수록 대수가 나쁘며 Y 염색체 결실이 있으면 더 이상의 염색체 변화를 초래하지 않는다는 보고가 있다(Casalone, 1981), BP의 경우는 CP보다 blastic transformation이 많이 일어나 pleuripotential stem cell의 모든 분화과정 세포들이 다 출현하여 더욱 다양한 핵형을 보인다(Table 2).

표지 염색체인 Ph<sup>1</sup> 염색체의 break point에 대한 gene locus는 21q11에 있다고 하나(Sasaki, 1982), Berger 등(1983)은 oncogene으로 9q34에 c-abl, 22q13에 c-sis가 있어 Ph<sup>1</sup> 염색체를 형성한다고 주장하였고 Hagemeyer 등(1985)에 의해 in situ hybridization 기술로 쟁쟁 전파(reciprocal translocation)가 증명되었다.

또한 Knudson(1983)은 premalignancy model로서 종양으로 이행되기까지 적어도 2단계의 과정을 주장하였다. 즉 염색체의 미세한 구조적 이상이 선형하고 이로서 c-abl이나 c-sis, 혹은 두 oncogene 이 같이 활성화되어 CML을 유발한다고 한다.

premalignancy model에 따르면 염색체 미세구조의 변화가 oncogene의 활성화에 실행하므로 이를 선별하는 것이 질병을 더 빠르게 진단할 수 있을 것이며 환자의 경우에서도 해형의 확인으로 질병의 진행을 예전할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

43명의 만성 끌수성 백혈병 환자의 끌수세포 배양 후 핵형을 조사하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 전형적 Ph<sup>1</sup> 염색체 출현은 20명으로 47%에서 양성이었으며 연령에 따른 차이는 없었다.
2. 정상적 핵형의 출현은 14명으로 33%였다.(단 BP에서는 정상 핵형은 없었다.)
3. 염색체 결실은 12번, 16번, 22번 염색체에서 일어났으며 비율이 전자 7번과 10번 사이에서 있었다.
4. BP에서 Ph<sup>1</sup> 염색체, 8 trisomy, i(17q)외에

도 다양한 heteroploid 알록제가 출현했으나 hypodiploid 표형은 없었다.

### 참 고 문 헌

- Berger R, Bernheim A, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G: Cytological types of mitoses and chromosome abnormalities in acute leukemia. *Leukemia Res* 1983; 7: 221-235.
- Canellos GP, Whang-Perg J: Philadelphia chromosome positive preleukemic state. *Lancet* 1972; 1: 1227-1229.
- Casalone R, Francesconi D, Pasquali F, Comothy R, Vaccari F: Isochromosome (17q) in Philadelphia chromosome (Ph<sup>+</sup>)-negative juvenile chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1981; 3: 145-148.
- Freireich EJ, Keating M, Cabanillas F, Barlogie B: The hematologic malignancies. *Cancer* 1984; 54: 2741-2750.
- Gödde E, Von Zelewski E: A clone with loss of the Y chromosome in Ph<sup>+</sup>-positive chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 2: 7-11.
- Gödde-Salz E, Schnitzler N, Bruhn HD: Philadelphia chromosome (Ph) positive chronic myelocytic leukemia (CML): frequency of additional findings. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 14: 313-323.
- Hagemeijer A, de Klein A, Godde-Salz E, Turc-Carel C, Smit EME, Van Agthoven AJ, Grosveld GC: Translocation of C-abl to masked Ph in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 18: 95-104.
- Knudson AG: Hereditary cancers of man. *Cancer Invest* 1983; 1: 187-193.
- McClain KL: Expression of oncogenes in human leukemias. *Cancer Res* 1984; 44: 5382-5389.
- Mitelman F, Levan G, Nilson P: Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976; 18: 24-30.
- Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosomal in human granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497-1451.
- Pimentel E: Oncogenes and human cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 14: 347-368.
- Puchkova GP, Prigogina EL, Fleischman EW, Drosdova TS, Mayakova SA, Peterson IS: Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukemia in children. *Hum Genet* 1983; 64: 257-262.
- Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 1973; 243: 290-293.
- Rowley JD: Chromosomal abnormalities in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 2: 175-198.
- Sadamori N, Matsunaga M, Yao E, Ichimaru M, Sandberg AA: Chromosomal characteristics of chronic and blastic phases of Ph-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15: 17-24.
- Sakurai M, Sandberg AA: The chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XVIII. (AML) and Ph-positive chronic leukemia (CML). *Cancer* 1976; 38: 762-769.
- Sandberg AA: The cytogenetics of chronic myelocytic leukemia (CML): chronic phase and blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 1: 217-228.
- Sandberg AA: *The chromosomes in human cancer and leukemia*. New York, Elsevier Science Publishing Co, 1983, pp 190-208.
- Sandberg AA, Morgan R, Kipps JJ, Hecht F: The Philadelphia (Ph) chromosome in leukemia. II. Variant "Ph" translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 14: 11-21.
- Sasaki M: Role of chromosomal mutation in the development of cancer. *Cytogenet Cell Genet* 1982; 33: 160-168.
- Whittaker JA, Davies P, Khurshed M: Absence of the Y chromosome in patients with chronic granulocytic leukemia. *Acta Haematol* 1975; 54: 350-357.
- Yunis JJ: The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983; 221: 227-236.
- Yunis JJ: Fragile sites and predisposition to leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 12: 85-88.