

급성림프구성백혈병에서 면역조직화학염색에 의한 p16 단백질 소실의 의의

충남대학교 의과대학 소아과학교실, 내과학교실*, 진단검사의학과교실†, 원자력병원 소아과‡

진혜영 · 강경인 · 김선영 · 윤유숙 · 강준원 · 조덕연* · 권계철† · 박경덕‡

Clinical significance of loss of p16 protein by immunohistochemical staining in acute lymphoblastic leukemia

Hye Young Jin, M.D., Kyoung In Kang, M.D., Sun Young Kim, M.D., You Sook Youn, M.D., Joon Won Kang, M.D., Deog Yeon Jo, M.D.*, Kye Chul Kwon, M.D.† and Kyung Duk Park, M.D.‡

Department of Pediatrics, Internal Medicine*, Clinical Laboratory Medicine†, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea
Department of Pediatrics‡, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Purpose : p16 gene, mapped to the 9p21 chromosomal region, has emerged as a candidate tumor suppressor gene in human neoplasm. It is an inhibitor of cyclin-dependent kinase and inhibits Rb phosphorylation. In a variety of tumors including childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), deletion and/or mutation of the p16 gene has been found. Despite their high frequency, the prognostic importance of p16 alterations is still controversial in ALL and has been reported to be either unfavorable or similar to that of other patients. We studied the correlation between loss of p16 protein confirmed by immunohistochemical staining and clinical outcomes of patients diagnosed as ALL.

Methods : We performed an immunohistochemical staining for p16 protein in 74 cases of bone marrow biopsy slide initially diagnosed as ALL between January 1998 and December 2006. We reviewed the clinical manifestations, laboratory findings, treatment outcomes retrospectively.

Results : Of 74 slides, 12 were negative for p16 protein. Seven were males and 5 were females with a median age at diagnosis was 5.8 (1.3-18.8) years. Initial WBC were 17,225 (500-403,300)/ μ L. By immunologic surface marker analysis, 7 patients were early pre-B CALLA (+) and 5 patients were T-cell ALL. Two patients of intermediate risk group had relapsed and died. Three patients had family history of breast cancer. Four patients died and overall survival rates were 53.5 \pm 18.7%.

Conclusion : Loss of p16 protein is supposed to be an independent risk factor of childhood ALL associated with poor outcomes. In clinical setting, the clinician must take into account p16 status, not only at the genomic but also at the protein level. Further clinical experience on thoroughly investigated cases will help a better understanding between p16 status and clinical outcomes. (Korean J Pediatr 2008;51:73-77)

Key Words : Leukemia, Lymphocytic, Acute, p16

서론

급성림프구성백혈병의 진단 시 예후 인자들에 따른 위험군 분류는 치료 방침을 결정하는데 있어 가장 중요하며 예후와 연관되

접수 : 2007년 11월 8일, 승인 : 2007년 12월 23일

본 연구는 2005년도 충남대학교 자체 연구과제 연구비 지원으로 수행되었음
책임저자 : 김선영, 충남대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Sun Young Kim, M.D.

Tel : 042)280-7252 Fax : 042)255-3158

E-mail : sunyoung@cnuh.co.kr

있을 것으로 추정되는 인자들에 대한 여러 연구들이 진행 중에 있다^{1, 2)}.

Retinoblastoma(RB)와 cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1(CDKN2/MTS1) 종양억제 유전자는 세포 주기를 조절하는 주요한 유전자들이다. 이 유전자들에 의한 단백질이 pRB와 p16인데 이들은 세포주기의 G₁에서 S로의 진행을 억제한다²⁾. 더욱이 p16은 cyclin-dependent kinase의 억제제로 pRB 인산화를 억제하는 기능도 갖고 있다²⁾. CDKN2/MTS1의 과메틸화, 결실, 점 돌연변이에 의한 p16 단백질

질 발현의 소실은 급성림프구성백혈병의 30%이상에서 발견되는 소견으로 예후와의 연관성에 대한 관심이 높아지고 있는데³⁾, 최근 p16 단백질 소실이 불량한 예후와 연관되어 있다는 의견들이 제시되고 있는 반면⁴⁾ p16 단백질 소실이 급성림프구성백혈병의 발병에는 중요한 역할을 하지만 예후와는 연관이 없다는 보고도 있어 p16과 급성림프구성백혈병의 예후와의 연관성에 대해서는 논란의 여지가 있다⁵⁾.

본 연구에서는 p16 단백질 소실과 급성림프구성백혈병 환아들의 예후 및 생존과의 연관성에 대하여 조사하여 급성림프구성백혈병 환아들의 진단 당시 예후 판정 및 치료에 도움이 되고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환아

1998년 1월부터 2006년 12월까지 충남대학교병원 소아과와 내과에 입원해서 치료받은 만 20세 미만의 급성림프구성백혈병 환아들을 대상으로 임상적 특징과 검사실 소견, 치료에 대한 결과를 의무기록을 중심으로 후향적으로 분석하였다.

진단 시 예후 인자에 따른 위험군 분류는 CCG(Childrens Cancer Group)를 기준으로 하였으며 양호군, 중간군, 불량군 3개군으로 분류하였다⁶⁾.

관해 유도 7일째 골수검사서 모세포가 5% 미만인 경우는 M1, 5% 이상 25% 미만인 경우는 M2, 25% 이상인 경우는 M3로 하였다. BFM(Berlin-Frankfurt-Munster)을 기초로 한 CMCP 2001, 2005를 사용하였던 환아들에서는 스테로이드 복용 후 8일째 말초혈액에서 모세포가 1,000/ μ L 미만인 경우 반응이 양호한 것으로 하였고, 1,000/ μ L 이상인 경우 스테로이드에 대한 반응이 불량한 것으로 정의하였다⁷⁾.

2. p16 단백질 면역조직화학염색

포르말린에 고정된 파라핀 함몰 골수 조직절편에 p16 단백질에 대한 면역조직화학염색을 하였다. 일차 항체로는 1:25로 희석한 사람 p16에 대한 생쥐 항체(Dakocytomation, Glostrup, Denmark)를 사용하였고 이차 항체로는 홍당무과산화효소를 붙인 항생쥐 염소 면역글로불린을 사용하였으며, 색소원으로는 디아미노벤지딘(3,3-diaminobenzidine)을 사용하였다. 대조염색은 헤마톡실린으로 하였다. 염색 결과는 Geradts 등⁸⁾이 제시한 기준에 따라서 판별하였다.

3. 치료 방법

CCG에 의한 항암화학요법을 하였으며 2005년 5월 이후에는 BFM을 기초로 한 CMCP 2001, 2005에 의한 항암화학요법을 시행하였다.

결 과

1. 진단 시 대상 환아들의 특성

급성림프구성백혈병으로 진단 후 치료 받았던 환아들 74명 중 면역조직화학염색 결과 p16 단백질이 소실된 환아들은 12명(16.2%)이었으며 이들 중 남아가 7명 여아가 5명이었다. 연령의 중앙값은 5.8(1.3-18.8)세였으며, 진단 시 백혈구의 중앙값은 17,225(500-403,300)/ μ L 이었다. 면역표현형은 전체 대상 환아 74명 중 early pre-B CALLA (+)형이었던 환아들은 55명, T 세포형이었던 환아들은 15명이었는데 이들 중 p16 단백질이 소실되었던 환아들은 각각 7명(12.7%), 5명(33.3%)으로 T 세포형에서 많았지만 통계적 의의는 없었다($P=0.062$). 염색체 검사에서 t(9;22)이 동반된 경우는 한 명(8.3%), t(6;9)이 동반된 경우는 2명(17.6%) 있었으며, 염색체 수가 36-38로 저배수체였던 경우가 한 명(8.3%) 있었다. 이들 중 p16 FISH(Fluorescence in situ hybridization)에서 p16 유전자의 결실이 있었던 환아들은 모두 4명이었는데 2006년 5월 이전에는 p16 FISH를 시행하지 않아서 그 이전에 진단되었던 환아들에 대한 FISH 결과는 알 수 없었다. CCG에 따른 진단 시 예후 인자에 따른 분류에서 양호군은 한 명(8.3%), 중간군은 5명(41.7%)이었고 불량군이 6명(50.0%) 있었다. 두 명의 환아 어머니가 유방암으로 사망하였으며 한 명은 이모가 유방암으로 진단되어 치료 중이어서 유방암의 가족력이 있었던 환아들이 3명(25%) 있었으며 어머니가 유방암이었던 환아 중 한 명에서는 환아의 오빠도 급성림프구성백혈병으로 진단되었다. 후두암과 자궁암의 가족력이 있었던 환아도 한 명(8.3%) 있었다(Table 1).

2. 치료 결과

면역조직화학염색 결과 p16 단백질이 소실된 12명의 환아들 중 8명의 환아는 재발이나 특별한 합병증이 없는 상태로 현재 이들 중 항암화학요법을 종결한 환아들은 3명이며 5명은 항암화학요법을 진행 중에 있다. 항암화학요법을 받고 있는 환아들 중 2명(17.6%)은 스테로이드 투여 후 8일째 모세포가 1,000/ μ L 이상이었는데 이들 중 한 명은 진단 시 백혈구가 32,310/ μ L로 중간군으로 분류되었으며 그 외 예후 불량 인자는 없었던 환아였으며 다른 한 명은 T 세포형이면서 진단 시 백혈구가 403,300/ μ L로 불량군으로 분류되었던 환아였다. 두 명이 골수 재발 후 사망하였는데 한 명은 진단 후 11개월 후 재발하여 13개월째 제대혈조혈모세포 이식을 받았으며 이식 후 폐렴과 동반된 폐출혈로 사망하였으며 한 명은 진단 후 27개월에 재발하여 치료불응 상태로 32개월째 사망하였다. 두 명 모두 진단 당시 예후군은 중간군으로 한 명은 진단 시 혈소판 수가 100,000/ μ L 미만이었으며 다른 한 명은 진단 시 백혈구가 22,010/ μ L로 중간군으로 분류되었던 환아였으며 그 외 예후 불량 인자는 없었으나 항암화학요법 도중 골수 재발하였으며 사망하였다. 염색체 저배수성으로 불량한 예후 인자를 갖고

Table 1. Initial Characteristics of Study Group

Case	Age (yr)	Sex	WBC (μ L)	Immunophenotype	Cytogenetics	p16 FISH	CCG (prognostic group)	Family History
1	18.8	M	500	T-cell	46,XY	ND	Poor	
2	1.3	F	40,880	Early pre-B CALLA(+)	46,XX	ND	Intermediate	
3	9.1	F	2,410	T-cell	46,XX	ND	Good	
4	2.6	M	3,120	Early pre-B CALLA(+)	46,XY	ND	Intermediate	
5	12.9	M	2,960	Early pre-B CALLA(+)	46,XY,t(1:11)(p32;q13)t(9:22)(q34;q11.2)	ND	Poor	Mother: Breast Ca
6	6.0	F	22,010	Early pre-B CALLA(+)	46,XX	ND	Intermediate	Mother: Breast Ca Brother: ALL
7	3.2	F	32,310	Early pre-B CALLA(+)	46,XX	ND	Intermediate	
8	8.3	M	6,090	Early pre-B CALLA(+)	36-38,XY,-2,-3,-4,-7,-9,-12,-16,-17	ND	Poor	
9	5.6	M	57,100	T-cell	46,XY,t(6:9)(p21.2;p21)[15]/46,XY[5]	+	Poor	
10	4.8	M	403,300	T-cell	45,XY,-6,der(9)t(6:9)(p21.2;p21)[20]	+	Poor	
11	2.8	F	12,440	Early pre-B CALLA(+)	46,XX	+	Intermediate	Aunt: Breast Ca
12	11.8	M	22,600	T-cell	46,XY	+	Poor	Grand father: Laryngeal Ca Grand Mother: Uterine Ca

Abbreviations : WBC, white blood cell; FISH, fluorescence in situ hybridization; CCG, Childrens Cancer Group; ND, not done; CALLA, common acute lymphoblastic leukemia antigen; Ca, cancer; ALL, acute lymphoblastic leukemia

Table 2. Clinical Outcomes of Study Group

Case	Day 7 BM study or response to prophase	Outcomes (EFS)
1	M1	No event (112 mo)
2	M1	No event (61 mo)
3	M1	No event (47 mo)
4	M1	BM relapse (11mo), Death (13 mo)
5	M1	Death in CR (1 mo)
6	Good	BM relapse (27 mo), Death (32 mo)
7	Poor	No event (34 mo)
8	Good	BM relapse (6 mo), Death (11 mo)
9	Good	No event (26 mo)
10	Poor	No event (24 mo)
11	Good	No event (9 mo)
12	Good	No event (9 mo)

Abbreviations : BM, bone marrow; CR, complete remission; EFS, event free survival; mo, months

있었던 환자 한 명은 진단 6개월 후 골수 재발하여 11개월 후에 사망하였으며 관해 유도 항암화학요법 중 진균 감염으로 사망한 환자도 한 명 있어 12명의 환아들 중 4명이 사망하였으며 환아들의 8년 생존율은 $53.5 \pm 18.7\%$ 였다(Table 2, Fig. 1).

고 찰

급성림프구성백혈병은 70-80%의 환아들에서 완치가 되는 질환으로 진단 시 예후 인자에 따른 위험군 분류에 의해 항암화학요법을 하고 있지만 항암화학요법 도중 또는 후에 재발하는 환아들

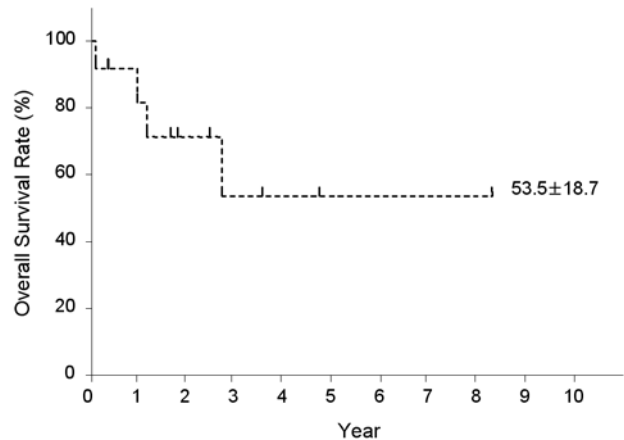


Fig. 1. Twelve patients were positive for p16 protein mutation in immunohistochemical staining. Two patients relapsed and four patients died. Overall survival rates were $53.5 \pm 18.7\%$.

이 있어 아직도 밝혀지지 않은 인자들이 있음을 생각해 볼 수 있다¹⁻³⁾.

염색체 9p21의 변이는 급성림프구성백혈병에서 흔히 보이는 소견으로 9p21은 CDKN2A(p16^{INK4A}/p14^{ARF})를 포함하는데 이는 p16과 p14를 암호화하는 유전자이다²⁾. p16^{INK4A}는 세포 주기를 조절하는 유전자로 결실, 과메틸화, 점 돌연변이에 의해서 p16^{INK4A}가 암호화하는 p16 단백질이 소실 또는 부족되면 다양한 암 유전자의 증강 및 세포사멸 억제작용을 초래하기 때문에 종양억제 유전자로 명명되었다^{2,3)}. p16 단백질이 소실되면 위암, 방광암, 유방암, 두경부 종양, 자궁암 등이 발생하는 것으로 알려져 있으며 급성림프구성백혈병의 발병 및 치료에 대한 반응과도 연관이 있는

것으로 생각되고 있다⁹⁻¹²⁾.

Geradts 등⁸⁾은 75개의 서로 다른 곳에 위치한 암세포에서 p16 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하였는데 이들 중 37%에서 p16 단백질이 발현 되지 않는 것을 발견하였으며 특히 유방암에서는 20개의 표본 중 13개에서 발현되지 않아 p16 단백질 소실과 유방암의 발병 기전이 연관되었을 가능성이 높음을 제시하였다. 이 연구에서 면역조직화학염색은 pRB와 p16에 대한 연구 시 유용한 결과를 얻을 수 있음을 밝혔고 p16 단백질이 발현되지 않는 암세포의 종류가 많음을 고려해야 할 사항으로 제시하였으며 p16^{INK4A} 유전자는 종양억제 유전자이므로 다양한 종류의 암의 발병에 관여할 것으로 추정하였다.

본 연구에서는 p16 단백질의 소실을 보였던 12명 중 4명에서 암으로 진단 받은 가족이 있었는데 그 중 3명이 유방암의 가족력이 있었으며 한 명이 후두암과 자궁암의 가족력이 있었다. 어머니가 유방암이었던 환자 중 한 명은 진단 시 예후군은 중간군이었으나 항암화학요법 도중 골수 재발하였고 그 이후 치료불응 상태로 사망하였으며 이 환자의 오빠도 그 후 급성림프구성백혈병으로 진단되어 현재 항암화학요법 중이다. 진단 시 시행한 염색체 검사는 세 명 모두 46,XX, 46,XY, 46,XX로 정상이었으나 2명에서는 p16 FISH는 하지 못했었고 한 명에서만 시행하였는데 양성으로 나왔다. p16 FISH를 시행하였던 환자들 4명 중 2명은 염색체 검사에서 9p21의 결실과 연관된 소견을 보였지만 2명은 염색체 검사상 정상으로 나왔다. 따라서 급성림프구성백혈병 진단 시 p16 FISH는 꼭 필요한 검사로 생각된다. 또한 최근에는 실시간 정량 PCR 분석을 통하여 p16 유전자의 표현 상태를 mRNA 와 단백질 수준까지 평가할 수 있는데 환자의 치료에 따른 반응과 추적 관찰 시 필요할 것으로 생각된다¹³⁻¹⁵⁾.

최근 p16 변이가 동반된 급성림프구성백혈병 환자들의 임상 양상을 분석한 보고에서 연령, 성별, 스테로이드에 대한 초기 반응 등은 대조군 환아들과 차이를 보이지 않았지만 진단 시 백혈구는 50,000/ μ L 이상인 경우가 많아서 예후 불량군으로 분류되는 환아들이 많음을 보고한 바 있다²⁾. 본 연구에서는 12명의 환아들 중 진단 시 예후 양호군이었던 환아는 한 명(8.3%) 뿐이었으며 5명(41.7%)은 중간군, 6명(50.0%)은 불량군이었다. 진단 시 백혈구 수나 남녀 비율, 연령 면에서 p16 단백질이 발현되었던 환아들과 비교 시 별다른 차이를 보이지 않았지만 특이할 만한 사항으로는 예후 중간군에서 한 명, 불량군에서 한 명이 초기 스테로이드에 대한 반응이 불량하였다. 이는 p16 유전자가 B 세포형 급성림프구성백혈병에서 스테로이드에 의한 세포사멸과 연관되어 있어 p16 유전자의 변이가 생기면 스테로이드에 대한 반응이 좋지 않으며 내성이 생겨 예후에 영향을 줄 수 있다는 보고가 있어 고려해 보아야 할 사항으로 생각되지만 이는 더 많은 환자들을 분석하고 결론 지어야 할 사항으로 생각된다¹⁶⁾.

p16 유전자의 변이는 B 세포형의 23%, T 세포형의 64%에서 발견되는데 치료 도중 재발된 환자에서 더 많이 발견되며 재발 후 치료불응 상태를 보이는 예가 많은 것으로 보고된 바가 있다^{11, 15)}.

¹⁷⁾ 본 연구에서는 면역표현형은 early pre-B CALLA (+)형이 7명, T 세포형이 5명이었는데 이는 전체 환아들을 대상으로 비교 시 T 세포형에서 p16 단백질이 소실된 환아가 많았지만 통계적 의의는 없었다. 이 또한 전체 대상 환아의 수가 많아지면 좀더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이라 생각된다. Van Zutven 등⁵⁾은 p16 유전자 변이로 인해 단백질이 소실된 환아들이 예후가 좋지 않은 T 세포형에서 많기 때문에 급성림프구성백혈병의 예후가 좋지 않은 것으로 알려졌을 뿐 실제 예후와는 연관이 없음을 보고하기도 하였지만 Mirebeau 등²⁾은 B 세포형이었던 환아들만 분석하여 독립적으로 불량한 예후 인자로 생각할 수 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 항암화학요법 중 골수 재발하여 사망한 3명의 환아들 모두 early pre-B CALLA (+)형이었고 이들 중 2명은 진단 시 예후 중간군이었고 한 명만 염색체 저배수성으로 예후 불량군이였다.

p16 유전자의 변이와 그로 인한 단백질 소실과 급성림프구성백혈병의 예후와의 관계에 대해서는 아직 논란의 여지가 있으며 소아를 대상으로 한 연구에서 재발율이나 생존율을 비교 시 독립적으로 예후에 영향을 미칠 수 있는 인자로 보고된 바도 있지만 무병생존율을 비교 시에는 별 차이가 없음이 보고되기도 하여 앞으로 대규모의 연구가 필요할 것으로 생각된다¹⁸⁻²¹⁾.

본 연구에서는 12명의 환아 들 중 3명은 골수 재발하여 사망하였으며 한 명이 관해 유도 항암화학요법 도중 진균 감염으로 사망하여 전체 생존율은 53.5 \pm 18.7%로 나타났는데 이는 소아 급성림프구성백혈병의 평균 생존율보다 낮다^{6, 20)}. 또한 early pre-B CALLA (+)형이면서 진단 시 예후 중간군이었던 환아들에서 치료 도중 재발한 환아들이 2명 있었다. 이러한 소견은 p16 단백질의 소실이 급성림프구성백혈병의 불량한 예후와 관련이 있을 수도 있다는 것을 시사하는 것이며 환자의 수가 더 많아지면 더 자세한 연구가 될 것으로 생각된다.

p16 유전자는 종양억제 유전자로 이의 불활성화는 다양한 종양의 발생과 관련이 있으며 그 중 하나가 급성림프구성백혈병이다. 급성림프구성백혈병 환아들에서 p16 유전자와 단백질의 이상 소견을 보이는 경우 불량한 예후와 관련이 있는 것으로 사료되며 예후 판정과 치료 시에 이를 고려해야 할 것이다.

요 약

목 적 : p16 유전자는 염색체 9p21에 위치하는데 종양억제 유전자 중 하나로 cyclin-dependent kinase의 억제제로 작용하며 Rb 인산화를 억제한다. 다양한 종류의 종양에서 p16 유전자의 결실 또는 과메틸화가 발견되고 있는데 이는 급성림프구성백혈병에서도 흔히 발견되는 이상 소견으로 높은 빈도로 나타나고 있지만 급성림프구성백혈병의 예후와 p16 유전자의 연관성에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다. 본 연구에서는 면역조직화학염색으로 확인한 p16 단백질의 소실과 급성림프구성백혈병 환아들의 임상 경과와의 연관성에 대하여 조사하고자 하였다.

방 법 : 1998년 1월부터 2006년 12월까지 급성림프구성백혈병으로 진단된 74명의 진단 시 골수 슬라이드에서 p16 단백질 면역조직화학염색을 하였다. 환자들의 임상 양상, 검사실 소견, 치료 후 경과에 대해서 후향적으로 조사하였다.

결 과 : 74명 중 12명에서 p16 단백질이 면역화학염색 결과 음성이었다. 이들 중 남아가 7명 여아가 5명이었으며 진단 시 연령의 중앙값은 5.8(1.3-18.8)세였다. 백혈구 수의 중앙값은 17,225(500-403,300)/ μ L 이었으며 면역표현형은 early pre-B CALLA (+)형이 7명, T 세포형은 5명이었다. 진단 시 예후 중간군이었던 두 명의 환자들에서 골수 재발 하였으며 3명의 환자들 이 유방암의 가족력이 있었다. 4명이 사망하여 8년 생존율은 53.5 \pm 18.7%였다.

결 론 : p16 단백질의 소실은 소아 급성림프구성백혈병에서 불량한 예후와 연관된 인자로 추정되며 임상에서 진단 시 p16에 대한 유전자 검사뿐만 아니라 단백질에 대해서도 검사가 필요할 것으로 생각된다. 하지만 좀더 많은 환자들에 대한 분석이 더 정확한 연관성을 밝히는데 도움이 될 것으로 사료된다.

References

- 1) Choi J, Hwang YK, Sung KW, Lee SH, Yoo KH, Jung HL, et al. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109:471-7.
- 2) Mirebeau D, Acquaviva C, Suci S, Bertin R, Dastugue N, Robert A, et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* 2006;91:881-5.
- 3) Lee DS, Lee JH, Min HC, Kim TY, Oh BR, Kim HY, et al. Application of high throughput cell array technology to FISH: investigation of the role of deletion of p16 gene in leukemias. *J Biotechnol* 2007;127:355-60.
- 4) Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* 2005;576:22-38.
- 5) Van Zutven LJ, Van Drunen E, de Bont JM, Wattel MM, Den Boer ML, Pieters R, et al. CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2005;19:1281-4.
- 6) Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007;109:926-35.
- 7) Conter V, Aricò M, Valsecchi MG, Rizzari C, Testi A, Miniero R, et al. Intensive BFM chemotherapy for childhood ALL: interim analysis of the AIEOP-ALL 91 study. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. Haematologica* 1998;83:791-9.
- 8) Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: cor-

- relation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 1995;55:6006-11.
- 9) Gonzalgo ML, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, et al. The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 1998;58:1245-52.
- 10) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-40.
- 11) Nomdedeu JF, Badell I, Estivill C, Carnicer MJ, Sierra J, Baiget M. TEL rearrangements in acute lymphoblastic leukemia: association with p16 deletions in relapsed cases. *Haematologica* 2001;86:547-8.
- 12) Kim NR, Lin Z, Kim KR, Cho HY, Kim I. Epstein-Barr virus and p16INK4A methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. *J Korean Med Sci* 2005;20:636-42.
- 13) Bertin R, Acquaviva C, Mirebeau D, Guidal-Giroux C, Vilmer E, Cave H. CDKN2A, CDKN2B and MTAP gene dosage permits precise characterization of mono- and bi-allelic 9p21 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:44-57.
- 14) Kim DH, Moldwin RL, Vignon C, Bohlander SK, Suto Y, Giordano L, et al. TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 1996;88:785-94.
- 15) Takasaki Y, Yamada Y, Sugahara K, Hayashi T, Dateki N, Harasawa H, et al. Interruption of p16 gene expression in adult T-cell leukaemia/lymphoma: clinical correlation. *Br J Haematol* 2003;122:253-9.
- 16) Tutor O, Díaz MA, Ramírez M, Algara P, Madero L, Martínez P. Loss of heterozygosity of p16 correlates with minimal residual disease at the end of the induction therapy in non-high risk childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2002;26:817-20.
- 17) Heyman M, Rasool O, Borgonovo Brandter L, Liu Y, Grandér D, Söderhäll S, et al. Prognostic importance of p15INK4B and p16INK4 gene inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:1512-20.
- 18) Kees UR, Burton PR, Lü C, Baker DL. Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinical outcome. *Blood* 1997;89:4161-6.
- 19) Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Raimondi SC, et al. Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. *Leukemia* 1997;11:1201-6.
- 20) Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F, et al. Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85:2321-30.
- 21) Cooley LD, Chenevert S, Shuster JJ, Johnston DA, Mahoney DH, Carroll AJ, et al. Prognostic significance of cytogenetically detected chromosome 21 anomalies in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;175:117-24.