AC133 항원 양성 급성 백혈병의 생물학적 특성

연세대학교 대학원

의 학 과

김 진 석

AC133 항원 양성 급성 백혈병의 생물학적 특성

지도 민 유 홍 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 진 석

김진석의 석사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되도록 아낌없는 배려와 용기를 북돋아주신 민유홍 교수님께 진심으로 감사드리며, 각별한 조언을 아끼지 않으신 양우익 교수님, 유철주 교수님께 고개숙여 감사를 드립니다. 항상 세심한 지도를 해 주신 고윤웅 교수님, 한지숙 교수님, 이승태 교수님과 장준호, 서형찬 선생님께도 감사를 드립니다. 그리고, 실험실에서 어려움이 있을 때마다 도움을 주신 Jiangez, 이광훈, 김지연, 유종호 선생님께도 감사드립니다. 아울러 보이지 않게 끊임없이 격려해주신 아버님과 두 동생 내외들과 여러 친구들, 특히 늘 우리 내외를 위해 기도해 주시는 장인, 장모님과 형님 내외분께 진심으로 감사드립니다. 그리고, 논문을 쓸 수 있도록 건강을 허락하신 하나님께 마지막으로 감사드립니다. 이 논문을 먼 곳에 계신 어머니와 항상 곁에서 따뜻한 후원을 보내준 사랑하는 아내 지원이에게 바칩니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

국문요약

AC133 항원 양성 급성 백혈병의 생물학적 특성

AC133 항원은 미성숙한 단계의 조혈모세포에서 특이적으로 표현되는 세포표면 항원이며, 정상 조혈모세포 뿐만 아니라 CD34 양성 급성 백혈병 세포 및 일부 CD34 음성 백혈병세포에서도 표현되는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 AC133 항원 양성 급성 백혈병세포의 임상적, 면역학적 및 생물학적 특성에 대한 연구는 거의 없는 상태이므로 저자는 급성 백혈병에서 AC133 항원표현의 임상적 의미 및 세포생물학적 특성을 알아보고자 하였다. 대상환자는 세브란스병원에서 급성 백혈병으로 진단 받은 환자 36예 (급성 골수성 백혈병 21예, 급성 림프구성 백혈병 15예)이었으며, 급성 백혈병 진단시의 골수 백혈병세포를 대상으로 유세포분석과 Western blot 분석을 시행하였다. AC133 항원 양성 백혈병은 이들 환자의 진단시 골수의 단핵세포 중 CD45와 side scatter를 이용하여 유세포분석으로 측정한 백혈병 세포 중에서 AC133 항원의 발현이 20%이상 표현되는 경우로 정의하였다. AC133 항원은 33.3% (12예/36예)에서 양성이었고, 급성 골수성 백혈병에서는 52.4% (11예/21예)에서, 급성 림프구성 백혈병에서는 6.7% (1예/15예)에서 AC133 항원 양성이었다. 급성 골수성 백혈병 환자에서 AC133 항원 유무에 따른 관해유도율 등 임상적인 차이는 없었으며, 총 생존기간이나 생존율도 차이가 없었다. 면역표현형 검사 (CD34, HLA-DR, CD38 항원)에서는 CD34 항원만 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 더 높게 표현이 되었다 (P =0.045). 세포고사와 관련된 단

백인 Fas, Fas ligand, Bcl-2, caspase-3의 표현을 측정하였으며, 급성 골수성 백혈병 세포들 중에서 AC133 항원 표현 정도가 높을수록 Fas의 표현정도가 통계적으로 높았다 (P=0.048). 세포고사를 유발하는 화학물질 (cytosine arabinoside[Ara-C], doxorubicin, tumor necrosis factor[TNF]-α)을 사용하여 세포고사의 정도를 분석하였다. AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 세포고사의 정도가 낮은 경향을 보였으나 Ara-C를 사용한 경우에만 통계적으로 유의하게 나왔으며 (P=0.049), 이러한 결과는 분리되지 않은 형태의 caspase-3 단백의 표현이 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병세포에서 높은 경향을 보이면서 Ara-C에 의한 caspase-3의 활성화에 저항을 보였기 때문으로 생각할 수 있을 것이다. 그리고, CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서는 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병과는 다르게 doxorubicin이나 TNF-α에 의한 세포고사 정도가 낮았다. 결론적으로 본 연구에서 AC133 항원의 세포고사를 포함하는 생물학적 특성이 다른 미성숙 세포 표면 항원과 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, AC133 항원 양성 백혈병의 이러한 생물학적 특성의 기전을 규명하고, CD34 항원과는 구별되는 임상적인 예후인자로 AC133 항원을 사용하기 위해서는 더 많은 환자를 대상으로 하는 임상연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

핵심되는 말 : AC133 항원, 급성 백혈병, 세포고사

AC133 항원 양성 급성 백혈병의 생물학적 특성

<지도교수 민유홍>

연세대학교 대학원 의학과

김 진 석

I. 서 론

AC133 항원은 처음에는 $CD34^{bright}$ 조혈모세포에서만 제한되어 표현되는 구조적으로 매우 새로운 5-transmembrane molecule로서, 세포표면에서 이 항원의 표현은 매우 미성숙한 과립구-단구 수임 조혈모세포군임을 시사한다고 알려졌다[1,2,3]. 즉, AC133 항원은 지금까지 조혈모세포 특이 항원으로 널리 알려진 CD34 항원 양성 조혈모세포 중 특히 미성숙한 단계의 조혈모세포에서 특이적으로 표현되는 세포표면 항원임을 의미한다고 할 수 있었다. 그러나, 이후에 AC133 항원은 정상 조혈모세포 뿐만 아니라 CD34 양성 급성 백혈병 세포 및 일부 CD34 음성 백혈병세포에서도 표현되는 것으로 알려져 왔으며[4], 아직까지 AC133 항원 양성 급성 백혈병의 임상 양상과 면역학적 및 생물학적 특성에 대한 연구는 거의 없는 실정이며, 이에 대해서 알려진 바가 없다.

급성 백혈병은 조혈모세포의 발생 및 분화단계의 한 시점에서 발생하는 혈액종양임은 주지하는 사실이며, 따라서 백혈병 생성기전에 있어서 각각의 백혈병이 조혈모세포 개체발생단계 (ontogeny) 중 어느 시점에서 유래되었는가 하는 사실을 인지함으로써 각각의 생물학적 특성을 예측할 수 있을 것이다. 미성숙한 단계에서 발생한 백혈병의 경우 생물학적으로도 역시 더욱 미성숙한 양상을 보여 치료에 대한 반응 및 생존율 등이 다소 저조한 것으로 알려져 있으며[5,6], 항암제에 대한 다약제 내성

유전자 (multi-drug resistance gene)의 발현과도 연관이 있는 것으로 보고되고 있다[7]. 그러나, 기존의 조혈모세포 특이 항원인 CD34 항원 양성 백혈병의 면역학적 및 생물학적 특성에 대한 다양한 연구결과를 보면 연구마다 상이한 결과를 보이며, 이는 CD34 항원 양성 백혈병이 이질적인 세포군임을 시사하는 소견이라고 생각된다. 따라서 CD34 항원 양성 세포군의 일부로 생각되는 AC133 항원 양성 세포를 이용함으로써 이러한 문제를 극복할 수 있을 것으로 기대할 수 있겠다.

급성 백혈병의 가장 중요한 치료방침은 항암화학요법이며 이러한 항암약제의 항백혈병효과는 세포고사 (apoptosis)에 의한 것으로 밝혀진 바 있다. 급성 백혈병의 치료실패의 가장 중요한 원인은 약제내성이며, 따라서 세포고사 조절기전의 이상이 이러한 약제내성의 중요한 기전으로 생각되고 있다[8]. 지금까지 백혈병세포의 면역표현형 분석 및 세포고사 연구가 활발히 이루어지고 있는 바, CD34, HLA-DR, CD38 항원 표현형에 따라 백혈병세포의 클론 유래 단계 및 증식, 분화에 있어서의 백혈병세포의 특성을 연관시킨 연구 결과들이 보고된 바 있다. 따라서 AC133 항원 양성 백혈병세포의 면역표현형 분석 및 세포고사 조절기전을 연구함으로써 AC133 항원 양성 백혈병세포의 생물학적 특성을 규명할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 본 연구자는 AC133 항원 표현 여부에 따른 백혈병세포의 면역표현형과 임상양상의 차이를 비교 분석하고, 또한 세포고사 조절기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Fas, Bcl-2, caspase-3 단백의 구조적 표현정도를 측정하며, in vitro에서 AC133 항원 양성 백혈병세포의 세포고사 유발 화학물질에 대한 세포고사 유발 반응 정도를 AC133 항원 음성 백혈병세포 및 다른 미성숙 세포 표면 항원과 비교 분석함으로써 급성 백혈병에서 AC133 항원의 임상적인 의미와 AC133 항원 양성 백혈병의 생물학적 특징을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

1997년 11월부터 2000년 5월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원 혈액종양내과에서 처음 급성 백혈병으로 진단 받은 15세 이상의 환자 36예 (급성 골수성 백혈병 21예, 급성 림프구성 백혈병 15예)를 대상으로 하였다. 급성 백혈병의 혈액학적 진단은 형태와 세포화학염색에 기초를 둔 French-American-British (FAB) 분류에 따라 시행하였다. 급성 백혈병으로 진단 받을 당시의 골수 단핵세포 (bone marrow mononuclear cells)를 Ficoll-Hypaque (Nyegaard, Oslo, Norway) 농도 차이 (density gradient)를 이용한 분리법으로 분리하였다. 2차례 세척을 한 뒤에 세포들을 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Gaithersburg, MD)과 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 포함한 RPMI 1640 배양액 (GIBCO)에 재부유시킨 후에 액화 질소에 냉동하여 -70℃에서 보관하였다. 급성 백혈병으로 진단 받을 당시의 골수 단핵세포를 녹이고 FBS와 RPMI 1640으로 2번 세척하고 0.3% trypan blue 용액으로 염색한 뒤에 hemocytometer를 이용하여 활성도 (viability)를 측정하여서 활성도가 90%이상인 것만 사용하였다.

2. 방법

가. 임상적 특징과의 연관성

대상 급성 백혈병 환자의 진단당시의 나이, 성별, 말초혈액수치, lactate dehydrogenase (LDH), 염색체 변이 및 관해유도 항암치료 이후 골수검사 상 완전 관해 판정 유무, 완전 관해 유지기간, 1년내 재발 유무, 무병생존기간, 총 생존기간 등 임상적인 특징을 의무기록을 통하여 후향적으로 조사하였다. 급성 골수성 백혈병과 급성 림프구성 백혈병으로 나눠서 AC133 항원 표현 유무와 임상적인 특징과의 연관성을 조사하였다. 완전관해는 골수 외 백혈병 (extramedullary leukemia)의 증거가 없으며, 말초혈액에서 호중구가 1,500/L이상, 미숙세포 (blast)가 없고, 혈소판이 100,000/uL이상이며 골수검사 상 세포 충실도 20%이상, 미숙세포가 5%미만에서 관찰되는 상태가 적어도 4주 이상 지속될 때로 정의하였다.

나. AC133 항원 표현에 따른 면역표현형 (immunophenotype) 검사

백혈병세포에서 AC133, CD34, CD38, HLA-DR 항원의 표현과 세포고사와 관련된 단백질인 Fas, FasL (ligand)을 측정하기 위하여 각각의 항원에 대한 단클론 항체 (monoclonal antibodies)를 이용한 유세포분석 (flow cytometry)을 하였다. 각 단클론 항체는 FITC (fluorescent isothiocyanate, FL1)나 PE (phycoerythrin, FL2)나 PerCP (peridinine cholorophyll protein, FL3)와 결합된 것을 사용하거나 purified 형태를 사용하였다. AC133-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD34-FITC (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), CD38 (Becton Dickinson), HLA-DR-PerCP (Becton

Dickinson), Fas (Becton Dickinson), FasL (Becton Dickinson), CD45-FITC (Becton Dickinson)을 사용하였다. 음성 대조로는 mouse IgG_1-FITC, mouse IgG_1-PE, mouse IgG_1-PerCP (Becton Dickinson)을 사용하였다.

유세포분석을 위해서 $2.5\text{-}5.0\times10^5$ cells/50 uL의 단핵세포를 100 uL FACS wash buffer에 재부유시킨 뒤에 다음과 같은 단클론 항체 조합 (Table 1)에 따라 각각 10 uL 단클론 항체를 넣고 4℃에서 20분간 배양시킨 후 FACS wash buffer 2 ml을 넣고 4℃에서 300 g로 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 사용하였다.

Table 1. Monoclonal antibody panel for flow cytometry used in the study

No	FITC	PE	PerCP
1	Control IgG_1	Control IgG_1	Control IgG_1
2	CD34	AC133	CD38
3	CD34	AC133	HLA-DR
4	CD34	AC133	Fas
5	CD34	AC133	FasL
6	CD45	AC133	

형광물질이 결합되지 않은 항체인 CD38, Fas, FasL은 RAM (rat anti-mouse) IgG_1-PerCP (Becton Dickinson)와 다시 한번 더 4℃에서 20분간 배양하여 분석하였다. 염색된 세포들은 유세포분석기 (FACSCalibur, Becton Dickinson)를 이용하여 forward scatter (FSC)와 side scatter (SSC)지표는 linear scale로, 형광 강도의 검출에는 FITC는 FL1, PE는 FL2, PerCP는 FL3 지표를 log scale로 맞추고 CellQuest software (Becton Dickinson)를 사용하여 각 항원마다 적어

도 10,000개의 골수 유핵 세포 분석 결과를 얻어서 분석을 하였다. 실험에 사용된 환자의 전체 세포 중에서 CD45와 SSC를 이용하여 백혈병 세포를 검출한 뒤 여기서 AC133 항원의 표현정도를 측정하였다. 염색된 세포가 대조군과 비교하여 적어도 20%이상일 때를 양성으로 간주하였다. AC133 양성 백혈병은 CD45와 SSC를 이용하여 측정한 백혈병 세포 중에서 AC133 항원이 대조군과 비교하여 20%이상 표현될 때로 정의하였다.

다. Western blot 분석

급성 백혈병 환자 36예의 백혈병세포에서 Western blot 분석을 이용하여 Bcl-2, caspase-3 단백의 표현 정도를 측정하였다. AC133 항원에 따른 급성 골수성 백혈병에서 이들 단백의 표현에 대한 결과분석은 세포에서 추출한 단백의 농도가 낮아 분석을 시행하지 못한 2예와 급성 전골수성 백혈병 (acute promyelocytic leukemia, M3) 2예를 제외한 17예를 대상으로 하였다. 급성 백혈병으로 진단 받을 당시의 환자의 골수 단핵세포에서 단백을 추출한 후에 측정할 단백을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)위로 단백을 이동시켰다. Anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), anti-caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology)와 ECL chemiluminiscent detection reagent (Amersham)를 사용하였고, 각각의 단백의 표현정도는 CSC Camera controller 1.4 program (Vilber lourmat, France)으로 읽은 뒤에 TINA 2.10e program (Raytest, Germany)을 이용하여 측정하였으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 각각 단백의 표현정도의 차이를 관찰하였다. 대조군으로 anti-human α-tubulin (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada)을 사용하여 α-tubulin을 측정하였다.

라. 화학물질에 의한 세포고사 유도 검사

급성 백혈병 환자 36예의 진단 받을 당시의 환자의 골수 단핵세포에 세포고사를 유발하는 화학물질 (cytosine arabinoside[Ara-C], doxorubicin, TNF-α)을 첨가하여 세포고사를 유도하였으며, Ara-C 1 uM (24시간), doxorubicin 1 uM (4시간), TNF-α 10 ng/ml (4시간)을 사용하였다. 세포고사의 유도정도는 Annexin-V-FITC (Becton Dickinson)/Propidium iodide (PI; Sigma, Deisenhofen, Germany) 염색 후 유세포분석기를 이용하여 분석하였다. 100 uL (1×10^6 cells)에 Annexin-V-FITC 5 uL와 PI 10 uL를 첨가하여 염색하였다. 세포고사가 된 세포는 Annexin-V^+/$PI^\pm$ 세포로 규정하였다. 세포고사의 정도는 화학물질을 첨가하지 않은 대조군과의 차이를 측정하여 사용하였으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도의 변화를 측정하였다.

마. 화학물질에 의한 세포고사의 형태학적 분석

세포고사를 유발하는 화학물질인 Ara-C 1 uM (24시간), doxorubicin 1 uM (4시간), TNF-α 10 ng/ml (4시간)을 첨가하여 세포고사를 유도하였으며, 화학물질을 첨가하지 않은 대조군과 각각의 화학물질은 첨가한 세포와의 형태학적 차이를 관찰하였다. 24시간 동안 배양을 한 다음 세포염색을 위해서 cytospin centrifuge (Cytospin 3; Shandon, USA)를 시행하였으며, Wright 염색을 하여 현미경 (Olympus BX50F; Olympus optical co, Japan)으로 AC133 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 형태학 변화를 관찰하였다.

바. 통계 분석

AC133 항원 양성 유무에 따른 임상적 특징을 비교하기 위해서는 Student's T-test를 사용하였고, 생존율 비교를 위해서는 Kaplan-Meier survival test를 사용하였고 통계적인 의의를 검사하기 위해서는 log rank test를 사용하였다. AC133 항원에 따른 면역표현형 검사와 생물학적 특성을 비교하기 위해서는 chi-square test, Student's T-test, Pearson correlation test를 사용하였다. 모든 통계 결과는 P값이 0.05미만인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 이상의 모든 통계적 분석은 Windows-SPSS release 9.0을 사용하여 수행하였다.

III. 결 과

1. AC133 항원 표현에 따른 급성 백혈병 환자들의 임상적 특성

대상 급성 백혈병 환자들은 총 36예이었으며, 환자들의 임상적인 특성을 요약하였다 (Table 2, 3).

Table 2. Clinical characteristics and expression rates of AC133 and CD34 antigen in acute lymphoblastic leukemias

UPN	Sex/Age	FAB type	AC133 (%)	CD34 (%)	Karyotype	CR1 duration (months)	OS (months)
1	M/39	L2	3.3	91.2	46XY, t(9;22)	7	11
2	F/15	L2	5.7	4.7	normal	4	12
3	F/18	L2	0.8	68.1	not reportable	5	8
4	F/26	L2	3.9	80.4	normal	9	20
5	M/45	L2	2.0	2.0	normal	4	12
6	M/43	L2	35.3	94.3	not reportable	1	9
7	F/17	L2	1.0	1.8	normal	17	18
8	M/59	L2	1.4	0.3	normal	13	14
9	M/24	L2	10.1	9.8	47XY, +16	11	13
10	F/36	L2	0.9	78.6	normal	12	13
11	M/27	L2	2.6	21.8	47XY, +10	4	10
12	F/37	L2	0.3	79.5	not reportable	6	7
13	F/42	L2	0.2	48.4	normal	0	4
14	M/45	L2	1.1	89.3	normal	4	5
15	M/45	L2	9.4	91.9	normal	0	11

FAB; French-American-British, CR1; first complete remission, OS; overall survival duration.

Table 3. Clinical characteristics and expression rates of AC133 and CD34 antigen in acute myelogenous leukemias

UPN	Sex/Age	FAB type	AC133 (%)	CD34 (%)	Karyotype	CR1 duration (months)	OS (months)
1	F/25	M4	23.0	80.3	normal	8	11
2	M/46	M4	36.0	64.3	48XY, +21×2	10	11
3	F/18	M2	67.8	0.7	45XO, -7,+15	13	14
4	M/42	M2	6.4	2.1	47XY, +8	11	15
5	F/15	M2	7.1	58.0	not reportable	0	10
6	F/58	M4	1.5	48.4	46XX, t(8;21)	0	3
7	M/51	M3	0.3	31.2	46XY, t(15;17)	17	18
8	M/17	M5	64.8	74.0	normal	16	17
9	M/50	M5	20.1	26.8	normal	18	20
10	F/68	M2	51.5	58.7	not reportable	3	6
11	M/35	M1	87.7	92.3	normal	0	2
12	M/42	M2	11.4	84.0	not reportable	4	10
13	M/52	M5	9.5	90.9	45XY, -8	0	2
14	M/67	M0	65.3	46.8	normal	0	1
15	M/34	M5	1.4	0.6	49XY, +8,10,14	3	4
16	M/59	M0	0.9	49.4	normal	0	1
17	M/73	M1	73.6	91.6	47XY, +8	0	1
18	M/72	M5	91.0	93.6	47XY, +8	0	7
19	F/71	M3	1.7	5.0	normal	22	23
20	F/18	M5	2.3	1.6	not reportable	27	29
21	M/56	M4	90.9	89.3	normal	2	10

전체 36명 급성 백혈병 환자의 남녀 비는 1.6:1 (남자 22명, 여자 14명)이었다. 평균 연령은 41.3세 (15-73세)였다. AC133 항원은 12예 (33.3%)에서 양성이었으며, 이들 AC133 항원 양성 급성 백혈병 환자에서 백혈병세포 중 AC133 항원의 표현은 중앙값이 65.0% (20.1-91.0%)이었다. 대상환자들의 임상적인 특징을 AC133 항원 표현 유무에 따라 요약하였으며, 중앙값을 사용하였다 (Table 4).

Table 4. Patients characteristics according to AC133 expression

	AC133 expression		
	Positive (N=12)	Negative (N=24)	P
Age	48 (17-73)	40.5 (15-71)	NS
Sex (M:F)	9:3	13:11	NS
AML			
M0/M1/M2/M3	1/2/2/0	1/0/3/2	
M4/M5	3/3	1/3	
ALL (L2)	1	14	
Hemogram			
Hemoglobin (g/dL)	7.6 (4.2-12.0)	7.8 (2.8-13.0)	NS
WBC ($\times 10^9$/L)	42.9 (2.7-341.5)	16.3 (1.3-109.2)	NS
Platelets ($\times 10^9$/L)	53.0 (9.0-139.0)	54.0 (8.0-512.0)	NS
LDH*(IU/L)	713.5 (250.0-4672.0)	1423.0 (344.0-13570.0)	NS

*Normal range; 225-445 IU/L, LDH; lactate dehydrogenase, NS; non-significant.

AC133 항원 양성 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병 중에서 52.4% (11예/21예)이었으며, 급성 림프구성 백혈병 중에서는 6.7% (1예/15예)이었다. 급성 림프구성 백혈병보다는 급성 골수성 백혈병에서 AC133

항원의 표현이 높았다 (P=0.005). AC133 항원 양성 급성 림프구성 백혈병 1예는 형태학적으로는 L2, 면역학적으로는 common B-세포 림프구성 백혈병 (CD10 양성)이었으며, 백혈병세포 중 AC133 항원의 표현은 35.3%이었다. 급성 골수성 백혈병환자의 임상적 특징을 AC133 항원 표현 유무에 따라 요약하였다 (Table 5). 급성 골수성 백혈병에서 French-American-British (FAB) 분류에 따른 AC133 항원은 M1에서 100% (2예/2예), M4에서 75% (3예/4예), M0에서 50% (1예/2예), M5에서는 50%(3예/6예)에서 표현되었으며, 급성 전골수성 백혈병 (M3) 2예에서는 AC133 항원의 표현은 없었다 (Table 3).

Table 5. Clinical characteristics of AML patients according to AC133 expression

	AC133-positive (N=11)	AC133-negative (N=10)	P
Age	50.0 (17-73)	46.5 (15-71)	NS
Sex (M:F)	8:3	6:4	NS
Hemogram			
Hemoglobin (g/dL)	7.6 (4.9-13.7)	6.9 (5.0-12.3)	NS
WBC ($\times 10^9$/L)	28.6 (2.7-341.5)	18.6 (1.4-45.7)	NS
Platelets ($\times 10^9$/L)	41.0 (9.0-139.0)	24.5 (8.0-116.0)	NS
LDH (IU/L)	663.0 (250.0-4672.0)	1537.5 (480.0-4232.0)	NS
Percentage of AC133-positive cells	65.3 (20.1-91.0)	2.0 (0.3-11.4)	<0.01
Karyotype			
Normal	6	2	
t(8:21) or t(15:17)	0	2	
+8 or +21	3	2	
-5 or -7	1	0	
others	0	1	
not reportable	1	3	

2. AC133 항원 표현에 따른 치료결과와 생존율

AC133 항원 표현 유무에 따른 치료결과와 생존율을 비교하기 위해서는 급성 골수성 백혈병과 급성 림프구성 백혈병의 임상 경과가 다르므로 각각의 치료결과와 생존율을 분석하였다. AC133 항원 양성 급성 림프구성 백혈병 1예는 VPD (vincristine, prednisolone, daunorubicin) 항암화학요법 시행 후 완전관해에 도달하였으나 1달 뒤에 재발하였으며, 총 생존기간은 10개월이고 무병 생존기간은 6개월이었다. 급성 골수성 백혈병 21예의 치료결과와 생존율은 AC133 항원 표현 유무에 따라 분리하여 분석하였다 (Table 6).

Table 6. Therapeutic outcomes in acute leukemia patients

	AML			ALL
	AC133-positive	AC133-negative	P	
CR rate (%)	63.6 (7/11)	60.0 (6/10)	NS	86.7 (13/15)
CR1 duration (months)	10.0	14.0	NS	6.0
Remission failure rate (%)	36.4 (4/11)	40.0 (4/10)	NS	13.3 (2/15)
Early death	25.0 (1/4)	50.0 (2/4)		0.0 (0/2)
Resistance	75.0 (3/4)	50.0 (2/4)		100.0 (2/2)
Relapse rate (%)	42.9 (3/7)	50.0 (3/6)	NS	53.8 (7/13)
One-year relapse rate (%)	42.9 (3/7)	33.3 (2/6)	NS	53.8 (7/13)
Median OS (months)	10.0	10.0	NS	11.0
One-year survival rate (%)	45.5	46.7	NS	41.7
Median DFS (months)	10.0	14.0	NS	6.0

AML; acute myelogenous leukemia, ALL; acute lymphoblastic leukemia.

급성 골수성 백혈병 환자 중 15예에서는 관해유도 항암제로 Ara-C 100 mg/m^2을 관해도입 치료 1일부터 7일까지, idarubicin 12 mg/m^2을 1일에서 3일까지 사용하였으며 이중 11예에서 완전관해에 도달하였다. 급성 전골수성 백혈병 2예는 ATRA (all-tans retinoic acid)로 완전관해에 도달하였다. 관해유도 항암제로 Ara-C, idarubicin, topotecan의 병합요법을 시행한 1예에서는 완전관해에 도달하지 못하였으며, 3예에서는 치료를 시행하지 못하고 조기에 사망하였다.

급성 골수성 백혈병의 총 생존기간의 중앙값은 10개월이었으며, AC133항원 표현 유무에 따른 통계적인 차이는 없었다. AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자의 생존율이 AC133 항원 음성 환자보다 낮은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다 (Figure 1). 그리고, AC133 항원 양성 골수성 백혈병 환자의 첫번째 관해유지기간 (CR1 duration)이 AC133 항원 음성 환자보다 짧은 경향을 보였고, 1년내 재발율 (one-year relapse rate)은 높은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 6). CD34 항원 표현 유무에 따른 생존율은 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 통계적으로 유의하게 낮았다 (log rank test; P <0.01). 그러나, $AC133^+/CD34^+$ 급성 골수성 백혈병 환자와 $AC133^-/CD34^+$ 급성 골수성 백혈병 환자의 생존율은 차이가 없었다. 그리고, CD38 항원과 HLA-DR 항원의 표현에 따른 생존율의 차이도 없었다.

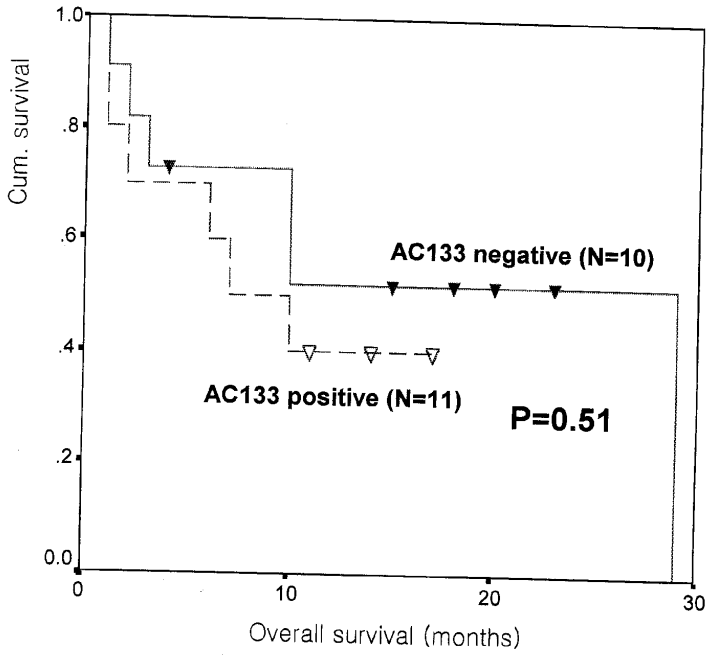

Fig. 1. Kaplan-Meier survival estimates of acute myeloid leukemia patients according to AC133 expression.

3. AC133 항원과 CD34, CD38, HLA-DR 항원 표현과의 연관성

급성 백혈병 환자의 골수 단핵세포에서 AC133 항원 표현에 따른 CD34, CD38, HLA-DR 항원의 표현정도를 유세포분석을 통하여 분석하였다 (Figure 2).

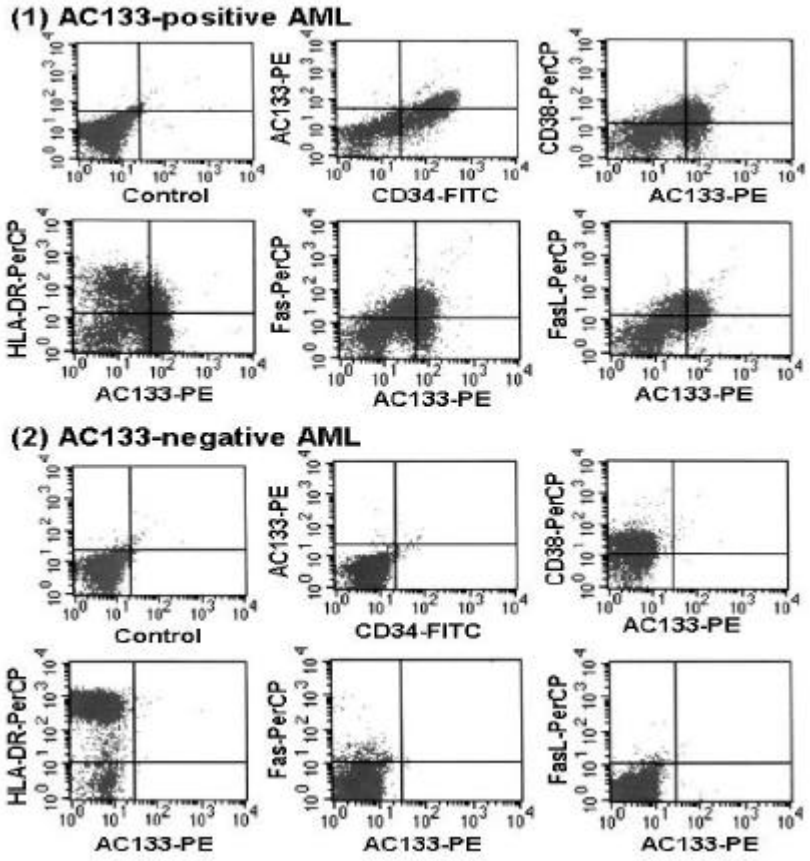

Fig. 2. Coexpression of AC133, CD34, CD38, HLA-DR, Fas, FasL (ligand) in AML cells. Flow cytometric analyses of immunophenotypes of AML cells obtained from two representative cases are shown.

급성 림프구성 백혈병 15예 중에서는 CD34 항원 양성은 10예 (66.7%), CD38 항원 양성은 15예 (100%), HLA-DR 항원 양성은 12예 (80.0%)이었다. AC133 항원 양성 급성 림프구성 백혈병 1예에서는 CD34, CD38, HLA-DR 모두 양성으로 나타났다.

급성 골수성 백혈병 21예 중에서 CD34 항원 양성은 15예 (71.4%), CD38 항원 양성은 18예 (85.7%), HLA-DR 항원 양성은 19예 (90.5%)이었다. 급성 골수성 백혈병 환자에서 AC133 항원 양성 유무에 따른 이들 항원의 표현은 CD34 항원의 표현만 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 더 높게 표현이 되었다 (P=0.045)(Table 7). CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병 15예 중 AC133 양성 ($AC133^+/CD34^+$)은 10예 (66.7%)이었으며, $AC133^-/CD34^+$인 경우가 5예 (33.3%) 있었다. AC133 항원 양성인 나머지 1예는 $AC133^+/CD34^-$인 경우이었다.

Table 7. Immunophenotype in AC133-positive and AC133-negative AML cells

	AC133-positive (N=11)	AC133-negative (N=10)	P
CD34 (%)	65.3±30.2	34.1±36.3	0.045
CD38 (%)	58.9±25.8	56.4±33.9	NS
HLA-DR (%)	72.2±20.0	59.1±32.6	NS

AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 AC133 항원 양성 세포 중 AC133 항원과 CD34 항원을 동시에 표현하는 세포가 차지하는 비율은 99.0% (중앙값)이었으며, AC133 항원과 CD38 항원을 동시에 표현하는 세포는 76.5%, AC133 항원과 HLA-DR 항원을 동시에 표현하는 세포는 94.1%이었다.

4. AC133 항원 표현에 따른 세포고사와 관련된 단백의 표현 특성

급성 백혈병 환자의 골수 단핵세포에서 AC133 항원 표현에 따른 세포고사와 관련된 단백인 Fas, FasL 단백의 표현정도는 유세포분석을 시행하였고 (Figure 2), Bcl-2, caspase-3 단백의 표현정도는 Western blot 분석을 시행하였다 (Figure 3).

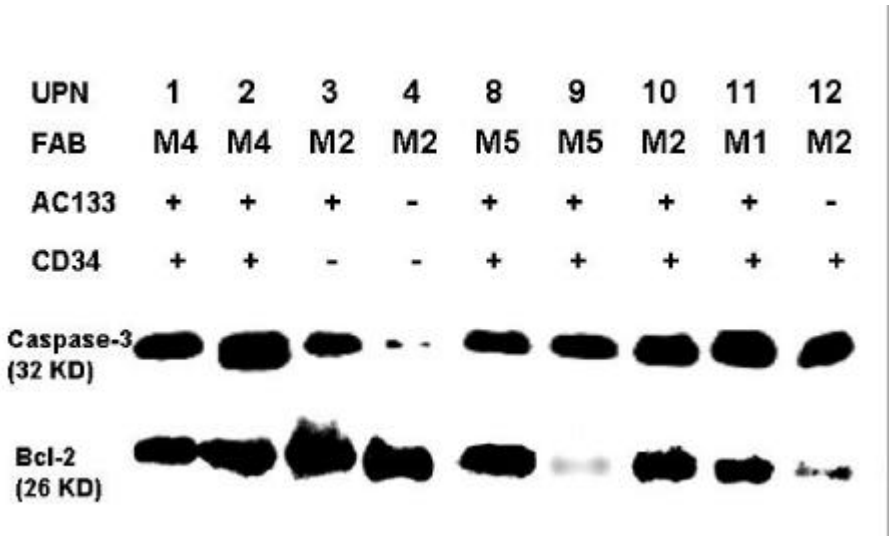

Fig. 3. Detection of Bcl-2, caspase-3 proteins in AML cells using Western blot analysis.

급성 림프구성 백혈병 중에서는 Fas 항원 양성은 9예 (60.0%), FasL 항원 양성은 9예 (60.0%)이었다. AC133 항원 양성 급성 림프구성 백혈병 1예에서는 Fas (91.9%), FasL (89.9%) 모두 양성이었다. Bcl-2, caspase-3의 표현정도는 흡광도 (OD, optical density)로 정량화 하였으며, AC133 항원 양성 급성 림프구성 백혈병 1예에서는 Bcl-2와 caspase-3 단백의 표현정도는 모두 평균값 이상이었다.

급성 골수성 백혈병 21**예 중에서** Fas **항원 양성은** 12**예** (57.1%), FasL **항원 양성은** 11**예** (52.4%)**이었다**. **급성 골수성 백혈병 환자에서** AC133 **항원 양성 유무에 따른** Fas, FasL **단백의 표현정도는** AC133 **항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 더 높은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다** (Table 8).

Table 8. Coexpression of Fas and Fas ligand proteins according to AC133 expression in AML cells

	AC133-positive (N=11)	AC133-negative (N=10)	P
Fas (%)	39.3±26.1	19.1±21.3	NS
Fas ligand (%)	41.2±30.9	22.7±26.5	NS

급성 골수성 백혈병 17**예에서** Western blot **분석을 통한** Bcl-2, caspase-3 **단백의 표현정도는** AC133 **항원 양성 급성 골수성 백혈병에서** Bcl-2**의 표현은 더 낮고**, caspase-3**의 표현은 더 높은 경향을 보였으나**, AC133 **항원 양성 유무에 따른 이들** Bcl-2, caspase-3 **단백의 표현정도는 통계적으로는 차이가 없었다** (Figure 4).

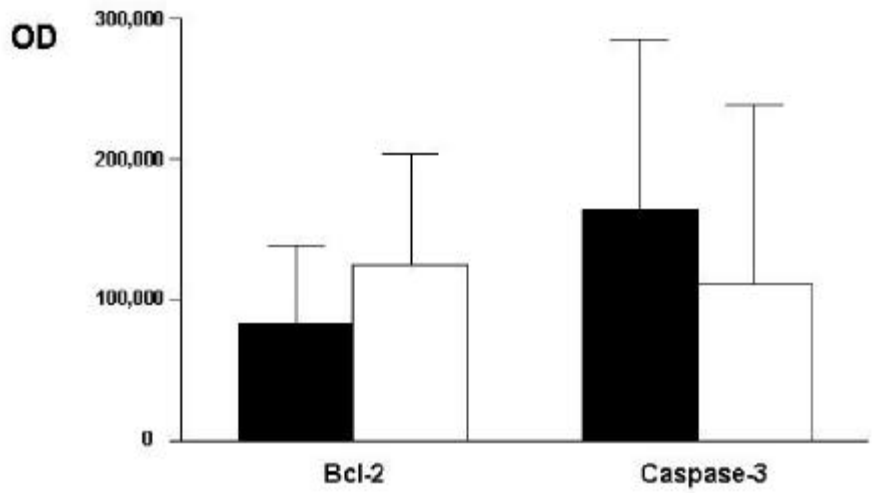

Fig. 4. Expression of Bcl-2, caspase-3 in AC133-positive (filled bars) and AC133-negative AML cells (empty bars). OD; optical density.

급성 골수성 백혈병 환자에서 CD45**와** SSC**를 이용하여 측정한 백혈병 세포들** (leukemic blasts) **중에서** AC133 **항원 표현정도와** Fas**의 표현정도와의 연관성은 통계적으로 의미있게** AC133 **항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 높게 나타났다** (Pearson correlation, P=0.048). **그러나, 다른 세포고사 관련 단백인** FasL, Bcl-2, caspase-3**의 표현정도는** AC133 **항원의 표현정도와 관련성이 없었다**.

급성 골수성 백혈병에서의 CD34 **항원과 세포고사 관련 단백의 표현과의 연관성은** Fas, FasL**의 표현정도는 통계적으로 의미있게** CD34 **항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 높게 나타났다** (P <0.001). **그러나**, CD34 **항원 양성 급성 골수성 백혈병에서** Bcl-2**의 표현정도는 낮은 경향을 보였고**, caspase-3**의 표현정도는 높은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다**. CD34 **항원 양성 급성 골수성 백혈병 중에서** $AC133^{+}/CD34^{+}$ **급성 골수성 백혈병과** $AC133^{-}/CD34^{+}$ **급성 골수성 백혈병간에 세포고사와 관련된 단백인** Fas, FasL, Bcl-2, caspase-3**의 표현은** Fas, FasL**은** $AC133^{+}/CD34^{+}$ **급성 골수성 백혈병에서 높은 경향을 보였고**, Bcl-2, caspase-3**는** $AC133^{+}/CD34^{+}$ **급성 골수성 백혈병에서 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 보이지 않았다**.

5. AC133 항원 표현에 따른 세포고사 유도 결과

급성 골수성 백혈병에서 AC133 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도를 Annexin-V-FITC/Propidium iodide (PI) 염색 후 유세포분석을 통하여 분석하였다 (Figure 5). 급성 골수성 백혈병에서 AC133 항원에 따른 세포고사의 정도는 세포고사를 유발하는 화학물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 분석한 결과 Ara-C를 사용한 경우에는 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성 세포에서 세포고사의 정도가 더 낮게 나왔다 (P=0.049). 그러나, doxorubicin, TNF-α를 사용한 경우에서는 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 세포고사의 정도가 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다 (Table 9).

Table 9. Percentage of apoptosis according to AC133 expression in AML cells

	AC133-positive (N=11)	AC133-negative (N=10)	P
Ara-C (%)	34.8±6.3	39.7±4.2	0.049
Doxorubicin (%)	40.7±7.1	45.4±3.2	NS
TNF-α (%)	34.7±1.6	36.6±4.0	NS

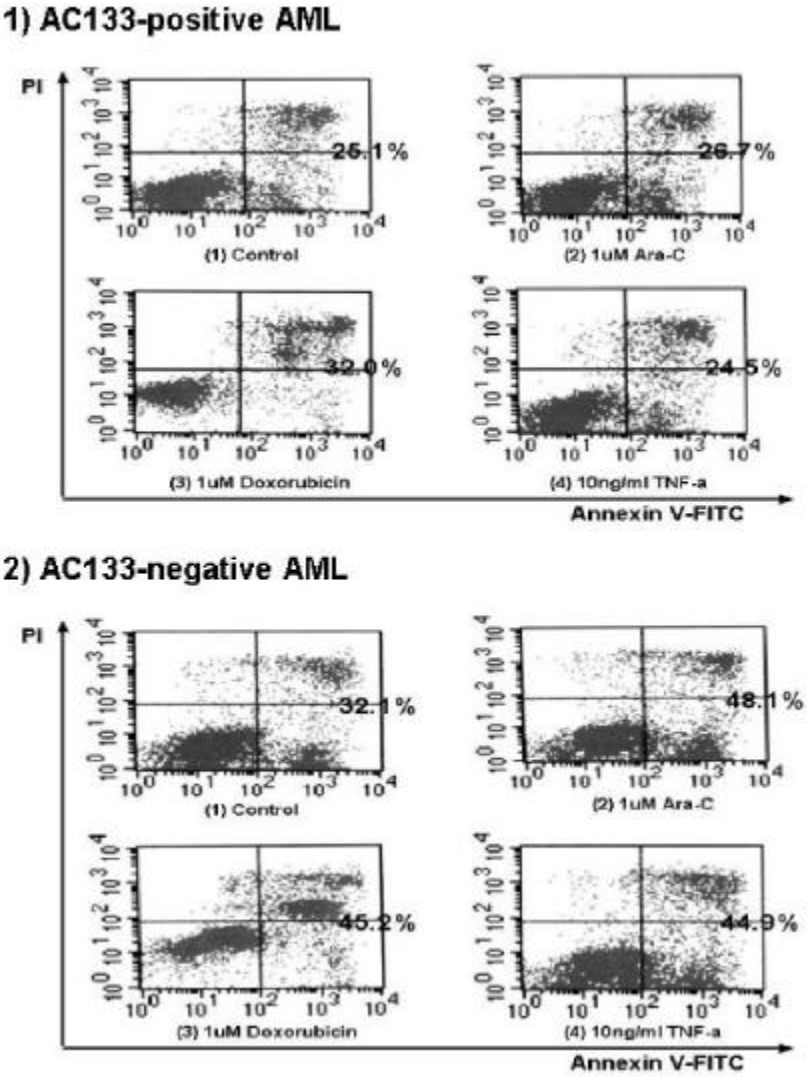

Fig. 5. Dual color flow cytometry analysis of apoptosis in AML cells (representative cases). (1) Untreated control cells. (2) Cells treated with 1 uM Ara-C for 24hrs. (3) Cells treated with 1 uM doxorubicin for 4hrs. (4) Cells treated with 10 ng/ml TNF-α for 4hrs.

CD34 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도는 doxorubicin, TNF-α를 사용한 경우에서는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 세포고사의 정도가 통계적으로 유의하게 더 낮았으나 (doxorubicin; P=0.015, TNF-α; P=0.011), Ara-C를 사용한 경우에는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 세포고사의 정도가 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다.

AC133 항원 유무에 따른 세포고사의 형태학적 변화를 관찰하였다 (Figure 6). 염색질이 모이고 농축되며, 핵이 조각나고, 농축된 호염기성의 세포질을 가진 세포고사의 전형적인 형태소견이 관찰되었고, AC133 항원 표현 유무나 세포고사를 유발하는 화학물질에 따른 세포고사의 형태학적 변화는 차이가 없었다.

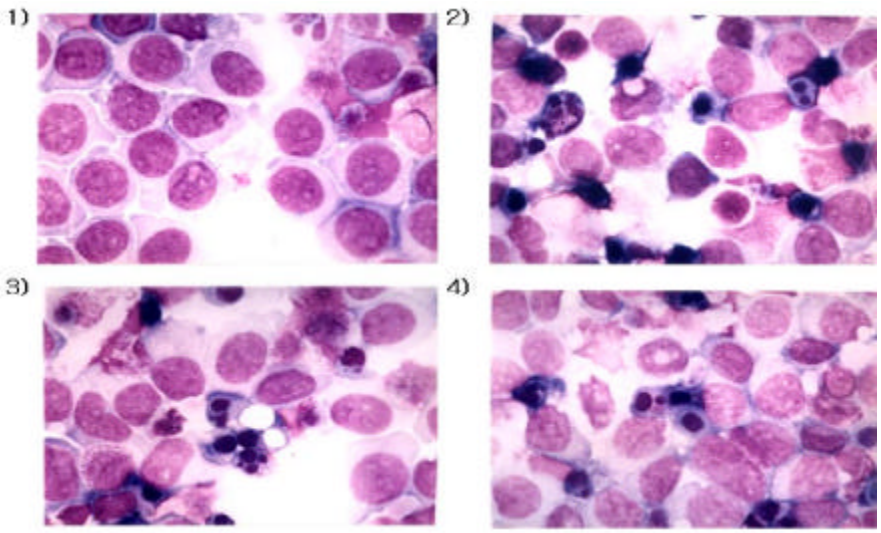

Fig. 6. Light microscopic findings of apoptotic AC133-positive AML cells (Wright's stain, ×1,000). (1) Untreated control cells. (2) Cells treated with 1 uM ara-C for 24hrs. (3) Cells treated with 1 uM doxorubicin for 4hrs. (4) Cells treated with 10 ng/ml TNF-α for 4hrs.

IV. 고 찰

최근 급성 백혈병에서의 AC133 항원의 표현에 대한 소수의 연구논문이 발표되었지만[1,2,3,4], 아직까지 AC133 항원의 임상적인 의의에 관련된 보고는 적으며, 세포고사와의 연관성에 대해서는 보고된 바가 없다. 이에 저자는 급성 백혈병에서 AC133 항원의 임상적인 의의와 세포고사와 연관된 단백과의 연관성, 세포고사 정도 등 AC133 항원 양성 급성 백혈병의 생물학적 특성을 연구하였다.

본 연구에서는 본원에서 급성 백혈병으로 진단 받은 36명의 환자를 대상으로 하였으며, AC133 항원 양성 백혈병은 CD45와 SSC를 이용한 유세포분석상 AC133 항원의 발현이 백혈병 세포 중 20%이상 표현될 때로 정의하였다[9]. 전체 급성 백혈병 환자에서는 33.3%에서 AC133 항원 양성을 보였으며, 급성 골수성 백혈병에서는 52.4%에서, 급성 림프구성 백혈병에서는 6.7%에서 AC133 항원 양성이었다. Buhring 등[4]의 급성 백혈병 32예에서의 AC133 항원의 표현에 대한 보고에서 전체 급성 백혈병에서는 78%, 급성 골수성 백혈병에서는 87%, 급성 림프구성 백혈병에서는 56%에서 AC133 항원이 양성으로 보고하였다. 본 연구에서는 Buhring 등[4]의 결과보다는 AC133 항원 양성율이 떨어지나, AC133 항원이 급성 골수성과 급성 림프구성 백혈병에서 모두 표현이 됨을 확인할 수 있었고, 급성 림프구성 백혈병보다는 급성 골수성 백혈병에서 더 많이 표현됨을 확인할 수 있었다. CD34 항원이 FAB 분류 중 미성숙한 세포형태 (M0, M1, M4)에서 높게 표현된다고 보고되고 있고[6], 본 연구 결과에서도 AC133 항원 역시 이들 미성숙 세포형태에서 더 많이 표현되는 경향을 보이므로 AC133 항원의 표현이 FAB 분류에 따른 차이가 있는지를 확인하기 위해서 더 많은 급성 골수성 백혈

병 환자를 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서는 CD34 항원의 표현이 높으며, AC133 항원이 CD34 양성 급성 백혈병 세포 및 일부 CD34 음성 백혈병세포에서도 표현된다는 Buhring 등[4]의 결과 ($AC133^+/CD34^+$; 70%, $AC133^-/CD34^+$; 9%, $AC133^+/CD34^-$; 17%)를 확인하였다. CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병은 불량한 치료결과와 예후를 가진다고 알려져 있으나[5,6], 본 연구에서는 AC133 항원 표현 유무에 따른 생존율은 차이가 없었으며, $AC133^+/CD34^+$ 급성 골수성 백혈병 환자와 $AC133^-/CD34^+$ 급성 골수성 백혈병 환자의 생존율도 차이가 없었다. Horn 등[3]이 30예의 급성 골수성 백혈병 환자에서 보고한 결과에서도 AC133 항원 양성 환자의 완전 관해율이 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었으며, 본 연구에서도 완전 관해율의 차이는 없었고 AC133 항원 양성 골수성 백혈병 환자의 첫번째 관해유지기간이 AC133 항원 음성 환자보다 짧은 경향을 보였고, 1년내 재발율은 높은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 본 연구에서 급성 백혈병에서 예후인자로 사용되던 진단 시 백혈구의 수, LDH 값, 나이 등은[10] AC133 항원 표현 유무에 따른 차이를 보이지 않았다. 염색체에 따른 급성 백혈병의 예후가 차이가 나는 것으로 보고되고 있으며, 특히 Grimwade 등[11]은 급성 골수성 백혈병에서 복잡한 핵형 (complex karyotype), -5, -7, 3q의 이상소견을 보이는 경우는 불량한 예후를, +8, +21, +22, 정상 염색체를 보이는 경우는 중간정도의 예후를, t(8;21), t(15;17), inv(16)인 경우에는 좋은 예후를 보인다고 보고하였다. 본 연구에서 염색체에 따른 세 집단간에 생존율의 차이는 보이지 않았으며, AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 불량한 예후를 보이는 염색체가 많은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다.

HLA-DR 항원 양성 급성 골수성 백혈병은 불량한 예후를 보이는 것

으로 알려져 있으며[12], CD38 항원 양성 급성 골수성 백혈병은 CD38 항원 음성에 비하여 생존율이 높은 것으로 보고되고 있다[13]. 특히 $CD34^+/CD38^-$ 급성 골수성 백혈병은 항암화학요법에 대한 민감도(sensitivity)가 떨어지는 것으로 보고하고 있다[14,15]. 본 연구에서는 CD38 항원과 HLA-DR 항원의 표현은 각각 85.7%, 90.5%이었고 각 항원에 따른 생존율의 차이는 없었으며, AC133 항원 표현 유무에 따른 이들 항원의 표현에도 차이가 없었다. 그리고, AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 대부분 하나의 AC133 항원 양성 백혈병 세포에서 CD34, CD38, HLA-DR 항원을 같이 표현하였다.

Fas (CD95)와 FasL 단백은 세포고사에 관여하는 단백으로 급성 백혈병에서 이들 단백의 표현이 많은 경우에는 Fas/FasL 경로를 통한 세포고사가 증가하는 것으로 알려져 있으며 항암약제 (doxorubicin, etoposide, cisplatin)의 항백혈병효과도 Fas/FasL 경로의 활성화에 의한 세포고사에 의한 것으로 알려지고 있다[16,17]. 그리고, 급성 골수성 백혈병에서 Fas 항원의 표현이 높을수록 완전관해율이 높다고 보고되고 있다[18]. 본 연구에서는 급성 골수성 백혈병 환자에서 백혈병 세포들 중에서 AC133 항원 표현정도가 높을수록 Fas의 표현정도가 높았으며 (P=0.048), FasL은 높은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었다. 급성 골수성 백혈병에서 CD34 항원과 Fas, FasL의 표현정도는 관련이 없다는 보고[19]도 있으나, 본 연구에서는 CD34 항원의 표현이 높을수록 Fas, FasL의 표현이 높았다 (P<0.01). 그러나, $AC133^+/CD34^+$ 급성 골수성 백혈병 환자와 $AC133^-/CD34^+$ 급성 골수성 백혈병 환자간에는 Fas, FasL의 표현정도는 차이가 없었다. 그러므로, AC133 항원과 관련되어서 Fas의 표현정도가 높았던 것이 아니고 AC133 항원 양성일수록 CD34 항원의 표현이 많았기 때문에 Fas 단백의 표현이 높았던 것으로 생각된다. 그리고, $CD34^+/CD38^-$ 급성 골수성 백혈병에는 Fas 단백의

표현이 적고 Fas 단백에 의한 세포고사가 적으며 항암화학요법에 저항을 보인다고 알려져 있으며[14,15], 본 연구의 대상환자는 급성 전골수성 백혈병 2예를 제외하면 급성 골수성 백혈병 환자의 94.7% (18예/19예)에서 CD38 항원 양성을 보여서 대부분 $CD34^{+}/CD38^{-}$이 아닌 환자를 대상으로 한 연구 결과이므로 Fas, FasL의 표현이 높았던 것으로 생각된다. 그리고, 본 연구의 결과에서는 자료를 보여주지 않았지만 CD38 항원 표현 유무에 따른 Fas의 표현정도도 의미 있게 CD38 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 높았으며 ($P<0.01$), FasL의 표현정도는 CD38 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 높은 경향을 보였으나 통계적 차이는 없었다 ($P=0.56$).

급성 백혈병에서 Fas, FasL 이외에 세포고사와 관련이 있는 단백은 여러 가지가 있으며, 그 중에서 Bcl-2계 단백 (Bcl-2 family proteins; Bcl-2, Bcl-X, $Bcl\text{-}X_L$, $Bcl\text{-}X_S$, BAX, BAD, MCL-1)과 IL-1 전환 효소 관련 단백 (interleukin-1 converting enzyme[ICE]-related proteins; ICE, CPP32[caspase-3], ICH-1[caspase-2])이 대표적이며[20] 본 연구에서는 AC133 항원 표현과 Bcl-2, caspase-3 단백의 표현정도를 관찰하였다. 급성 백혈병에서 Bcl-2 단백의 표현이 증가된 경우는 완전관해에의 도달과 생존율에 있어서 독립적인 불량한 예후인자로 보고하고 있으며, CD34 양성율과 연관성이 있는 것으로 보고하고 있다[21]. 이 것은 Bcl-2 단백의 표현이 높은 백혈병이 더 미분화된 백혈병임을 보여주는 한 증거가 된다고 볼 수 있으며, AC133항원 역시 미분화된 백혈병에서 표현되는 항원이므로, AC133 항원의 양성율과 Bcl-2 단백의 표현과의 연관성은 높을 것으로 생각하였다. 그러나, 본 연구에서는 급성 골수성 백혈병에서 Bcl-2 단백의 표현이 AC133 항원 표현에 따른 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서는 Bcl-2 단백은 CD34 항원과도 그 표현정도가 연관성이 없었으며, $AC133^{-}/CD34^{+}$ 급성 골수성 백혈병보다는

$AC133^{+}/CD34^{+}$ 급성 골수성 백혈병에서 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 보이지 않았다.

Caspase-3 단백은 전효소 (proenzyme)의 형태로 합성되는 물질로 분리되어 생물학적으로 활성화된 형태가 되면 DNA-repair enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)와 같은 세포를 보호하는 물질을 파괴하여서 세포고사를 유도하게 된다[22]. 그리고, cytosine arabinoside (Ara-C), etoposide, mitoxantrone과 같은 항암약제는 caspase-3의 활성화를 유도하여 백혈병세포의 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다[22,23]. 급성 골수성 백혈병에서 caspase-3의 표현이 높을수록 불량한 예후를 보이며, 특히 중간정도나 좋은 예후를 보이는 염색체를 가진 경우에는 분리되지 않은 형태의 (uncleaved) caspase-3의 표현이 높을수록 생존율이 감소하는 것으로 보고되고 있다[22]. 본 연구에서는 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 분리되지 않은 형태의 caspase-3의 표현은 더 높은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 또한, caspase-3의 표현정도는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서도 높은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었고, $AC133^{+}/CD34^{+}$과 $AC133^{-}/CD34^{+}$ 급성 골수성 백혈병간에서도 차이는 없었다.

AC133 항원 표현에 따른 세포고사의 정도는 세포고사를 유발하는 화학물질인 Ara-C, doxorubicin, TNF-α를 사용하여 관찰하였다. Ara-C는 nucleoside 유사물질 (analogue)로 caspase-3의 활성화에 의한 DNA 합성억제를 유발하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다[23,24,25]. 본 연구에서 Ara-C를 사용한 경우에는 AC133 항원 음성 급성 골수성 백혈병에서보다 AC133 항원 양성에서 더 낮은 세포고사를 보였으며, 이러한 현상은 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 caspase-3의 표현이 높은 경향을 보였던 결과와 연관이 있을 것으로 생각된다. 즉 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서는 분리되지 않은 형태의

caspase-3 단백의 표현이 높으며 Ara-C에 의한 caspase-3의 활성화에 저항을 보였기 때문에 Ara-C에 의한 세포고사가 낮았던 것으로 생각할 수 있을 것이다. 또한, 분리되지 않은 형태의 caspase-3의 표현이 많을수록 불량한 예후를 보이므로[22] 더 많은 환자를 대상으로 하는 연구를 하여 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 분리되지 않은 caspase-3의 표현이 AC133 항원 음성보다 통계적으로 높음을 확인하면 AC133 항원이 불량한 예후를 보이는 원인을 확실히 증명할 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서는 Ara-C에 의한 세포고사가 CD34 항원 음성 보다 낮은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없어서 AC133 항원이 CD34 항원과 생물학적 특성에서 차이를 보이는 세포표면 항원임을 확인 할 수 있었다.

Doxorubicin은 anthracycline계 항암물질로 topoisomerase II inhibitor로 작용하여 DNA에 손상을 주며, reactive oxygen species (ROS)를 생성하여 강력한 세포독성을 유발한다[26]. 급성 백혈병에서 doxorubicin은 Fas/FasL 경로를 통한 세포고사를 유발하는 것으로 알려져 있다[16,17,27]. 본 연구에서 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 doxorubicin에 의한 세포고사의 정도가 AC133 항원 음성보다 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었고, CD34 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 더 낮았다 (P=0.015).

TNF-α는 Fas 단백의 표현의 증가를 유도하여 세포의 세포고사를 유도하는 화학물질이다[28]. 본 연구에서 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 TNF-α에 의한 세포고사의 정도가 AC133 음성보다 낮은 경향을 보였으나 통계적으로는 차이가 없었고, CD34 항원 표현 유무에 따른 세포고사의 정도는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 더 낮았다 (P=0.011). 최근에는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서

TNF-α에 의한 세포고사에 저항을 보이는 것을 NF-kappaB의 활성화로 설명하고 있다[29]. AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서는 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병과는 다르게 doxorubicin이나 TNF-α에 의한 세포고사 정도가 차이가 없어서 AC133 항원은 Fas/FasL 경로와 연관된 세포고사와는 관련이 없을 것으로 생각된다.

결론적으로 AC133 항원의 표현 유무에 따른 임상적인 차이는 없었지만, AC133 항원의 세포고사를 포함하는 생물학적 특성이 다른 미성숙 세포 표면 항원과 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, AC133 항원 양성 백혈병의 이러한 생물학적 특성의 원인을 확실히 증명하고 CD34 항원과는 구별되는 임상적인 예후인자로 AC133 항원을 사용하기 위해서는 AC133 항원에 특이한 신호전달경로 (signal transduction pathway)에 대한 연구와 더 많은 환자를 대상으로 하는 임상연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

V. 결 론

저자들은 1997년 11월부터 2000년 5월까지 연세의료원 세브란스병원에서 처음 급성 백혈병으로 진단 받은 15세 이상의 환자 36예 (급성 골수성 백혈병 21예, 급성 림프구성 백혈병 15예)를 대상으로 각 환자의 임상적인 특징과 급성 백혈병으로 진단 받을 당시의 골수 백혈병세포를 가지고 AC133 항원 표현 여부에 따른 백혈병세포에서의 면역표현형 및 임상양상의 차이를 비교 분석하고, AC133 항원 표현 여부에 따른 세포고사를 포함한 생물학적 특성과의 상관관계를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상 환자들은 총 36예이었으며, 남녀 비는 1.6:1 (남자 22명, 여자 14명)이었다. 평균 연령은 41.3세 (15-73세)였다. AC133 항원은 12예 (33.3%)에서 양성이었으며, AC133 항원 양성 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병 중에서 52.4% (11예/21예)이었으며, 급성 림프구성 백혈병 중에서는 6.7% (1예/15예)가 AC133 항원 양성이었다. 급성 골수성 백혈병 중에서 AC133 항원 유무에 따른 임상적인 차이는 없었다.
2. AC133항원 표현 유무에 따른 급성 골수성 백혈병 환자의 총 생존기간이나 생존율은 차이가 없었다. 그리고, AC133 항원 양성 골수성 백혈병 환자의 첫번째 관해유지기간이 AC133 항원 음성 환자보다 짧은 경향을 보였고, 1년내 재발율은 높은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다.
3. 급성 골수성 백혈병 중에서 CD34 항원 양성은 15예 (71.4%), CD38 항원 양성은 18예 (85.7%), HLA-DR 항원 양성은 19예 (90.5%)이었으며, AC133 항원 표현에 따른 이들 항원의 표현은 CD34 항원의

표현만 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병 환자에서 더 높게 표현이 되었다 (P =0.045).

4. 급성 골수성 백혈병 환자에서 백혈병 세포들 중에서 AC133 항원 표현 정도와 Fas의 표현정도와의 연관성은 통계적으로 의미 있게 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 높게 나타났다 (P =0.048). 그러나, 다른 세포고사 관련 단백인 Fas ligand, Bcl-2, caspase-3의 표현정도는 AC133 항원의 표현과 관련이 없었다.
5. 급성 골수성 백혈병에서 AC133 항원에 따른 세포고사의 정도는 Ara-C를 사용한 경우에는 통계적으로 유의하게 AC133 항원 양성에서 세포고사의 정도가 더 낮게 나왔으며 (P =0.049), 이런 결과는 분리되지 않은 형태의 caspase-3의 표현이 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 높은 경향을 보였이면서 Ara-C에 의한 caspase-3의 활성화에 저항을 보였기 때문으로 생각할 수 있을 것이다. 그리고, doxorubicin, TNF-α를 사용한 경우에서도 AC133 항원 양성 급성 골수성 백혈병에서 세포고사의 정도가 낮은 경향을 보였으나 CD34 항원 양성 급성 골수성 백혈병과는 다르게 통계적으로는 차이가 없었다.

결론적으로 본 연구에서는 AC133 항원 표현 유무에 따른 임상적인 차이는 없었지만, AC133 항원의 세포고사를 포함하는 생물학적 특성이 다른 미성숙 세포 표면 항원과 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 1997;90:5002-12.

2. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 1997;90:5013-21.

3. Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. Blood 1999;93:1435-7.

4. Buhring HJ, Seiffert M, Marxer A, Weiss B, Faul C, Kanz L, et al. AC133 antigen expression is not restricted to acute myeloid leukemia blasts but is also found on acute lymphoid leukemia blasts and on a subset of CD34+ B-cell precursors. Blood 1999;94:832-3.

5. Myint H, Lucie NP. The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukaemia. Leuk Lymphoma 1992;7:425-9.

6. Raspadori D, Lauria F, Ventura MA, Rondelli D, Visani G, de Vivo A, et al. Incidence and prognostic relevance of CD34 expression

in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. Leuk Res 1997;21:603-7.

7. Zochbauer S, Schwarzinger I, Strobl H, Lechner K, Pirker R. Relationship between MDR1 gene and surface markers in acute myeloid leukemia. Anticancer Res 1997;17:749-52.

8. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. Leukemia 2000;14:467-73.

9. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood 1997;90:2863-92.

10. Keating MJ, Smith TL, Gehan EA, McCredie KB, Bodey GP, Spitzer G, et al. Factors related to length of complete remission in adult acute leukemia. Cancer 1980;45:2017-29.

11. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 1998;92:2322-33.

12. Callea V, Morabito F, Martino B, Stelitano C, Oliva B, Nobile F. Diagnostic and prognostic relevance of the immunophenotype in

acute myelocytic leukemia. Tumori 1991;77:28-31.

13. Keyhani A, Huh YO, Jendiroba D, Pagliaro L, Cortez J, Pierce S, et al. Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia. Leuk Res 2000;24:153-9.

14. Iijima N, Miyamura K, Itou T, Tanimoto M, Sobue R, Saito H. Functional Expression of Fas (CD95) in Acute Myeloid Leukemia Cells in the Context of CD34 and CD38 Expression: Possible Correlation With Sensitivity to Chemotherapy. Blood 1997;90: 4901-9.

15. Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. Cancer Res 2000;60:4403-11.

16. Li Q, Tsuruda K, Sugahara K, Dateki N, Ohishi E, Yamada Y, et al. Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukemia cells. Leuk Res 2000;24:437-44.

17. Findley HW, Zhou M. The clinical significance of Fas expression in leukemia: questions and controversies. Leukemia 1999;13:147-9.

18. Min YH, Lee S, Lee JW, Chong SY, Hahn JS, Ko YW.

Expression of Fas antigen in acute myeloid leukaemia is associated with therapeutic response to chemotherapy. Br J Haematol 1996;93:928-30.

19. Lewis NR, Pallis M, Russell NH. Fas receptor-Fas ligand system is independent of both CD34 status and chemosensitivity in acute myeloid leukemia. Exp Hematol 2000;28:535-42.

20. Campos L, Sabido O, Viallet A, Vasselon C, Guyotat D. Expression of apoptosis-controlling proteins in acute leukemia cells. Leuk Lymphoma 1999;33:499-509.

21. Lauria F, Raspadori D, Rondelli D, Ventura MA, Fiacchini M, Visani G, et al. High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. Leukemia 1997;11:2075-8.

22. Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, Estey EH, Kantarjian HM, Andreeff M, et al. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. Blood 1998;92:3090-7.

23. Datta R, Banach D, Kojima H, Talanian RV, Alnemri ES, Wong WW, et al. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. Blood 1996;88:1936-43.

24. Vial JP, Belloc F, Dumain P, Besnard S, Lacombe F, Boisseau MR, et al. Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukaemic cells. Leuk Res 1997;21:163-72.

25. Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. Adv Cancer Res 1998;72:197-233.

26. Muller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage. Biochem Biophys Res Commun 1997;230:254-7.

27. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. Leukemia 1999;13:1854-8.

28. Munker R, Andreeff M. Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion (CD54) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-alpha and IFN-gamma. Cytokines Mol Ther 1996;2:147-59.

29. Hu X, Tang M, Fisher AB, Olashaw N, Zuckerman KS. TNF-alpha-induced growth suppression of CD34+ myeloid leukemic cell lines signals through TNF receptor type I and is associated with NF-kappa B activation. J Immunol 1999;163:3106-15.

Abstract

Biological Characteristics of AC133 Antigen-Positive Acute Leukemias

Jin Seok Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yoo Hong Min)

AC133 antigen is a cell surface antigen which is selectively expressed on hematopoietic stem and progenitor cells. It has been reported that AC133 antigen is expressed on the subsets of $CD34^+$ acute leukemias, and occasionally on $CD34^-$ acute leukemias. We investigated the clinical and biological characteristics of AC133 antigen-positive acute leukemias. Thirty-six adult acute leukemia patients were analyzed using a cut-off criterion of 20% or more gated leukemic blasts expressing the AC133 antigen for $AC133^+$ leukemias. The biological characteristics focused on apoptosis were examined using multicolor flow cytometry and Western blot analysis.

Result :

1. AC133 antigen expression was found in 12 cases (33.3%). Eleven of 21 (52.4%) acute myelogenous leukemia (AML) patients and 1 of 15 (6.7%) acute lymphoblastic leukemia patients were positive

for AC133 antigen, and the difference was significant. None of the clinical prognostic markers were significantly different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML patients.

2. Median disease free survival time and overall survival time of $AC133^+$ and $AC133^-$ AML patients were not significantly different.
3. The expression rates of CD34 were significantly higher in $AC133^+$ AML patients compared to those of $AC133^-$ AML (P=0.045).
4. Among the apoptosis-related proteins, the Fas expression on the leukemic blasts was higher in the $AC133^+$ AML (P=0.048), but Fas ligand, Bcl-2, caspase-3 expression rates were not significantly different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML.
5. The apoptosis rates were significantly lower in the Ara-C treated $AC133^+$ AML (P=0.049), but the apoptosis rates to other apoptosis-inducing agents (doxorubicin, TNF-α) were not different between $AC133^+$ and $AC133^-$ AML cells. We thought that there were some associations between a trend toward higher caspase-3 expression rates and lower Ara-C induced apoptosis rates in the $AC133^+$ AML.

Our results demonstrate that the AC133 antigen had no clinical significance, but the AC133 antigen might provide different biological characteristics including apoptosis from other immature cell surface markers. However, to verify the prognostic usefulness of AC133 antigen and the basis of the biological characteristics of AC133 antigen-positive acute leukemias, further study with more cases is needed.

Key Words : AC133 antigen, acute leukemia, apoptosis