

소아 급성림프구성백혈병에서 활성도의 지표로써 혈청 Neopterin치의 의의

연세대학교 의과대학 소아과학교실

유병원 · 송태원 · 유철주 · 양창현

Neopterin as a Marker of Disease Activity in Childhood Acute Lymphocytic Leukemia

Byung Won Yoo, M.D., Tae Won Song, M.D., Chul Ju Yoo, M.D.
and Chyang Hyun Yang, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Neopterin is a degradation product derived from guanosin triphosphate (GTP) during biosynthesis of tetrahydrobiopterin. It is produced by human monocytes/macrophages upon stimulation with interferon- γ from activated T lymphocytes. Therefore, increased neopterin concentration suggests the activation of cell-mediated immune response during viral infections, autoimmune diseases, allograft rejection, immunodeficiencies and certain types of malignancy. In these diseases, increased neopterin concentrations in serum and urine correlate to the stage of disease and predict worse prognosis. It has been proved that in various malignant disorders, higher neopterin concentrations are associated with more rapid disease progression and are a valuable predictor of stage and extension of the tumor. **Methods:** Serum neopterin concentrations were measured by ELISA test in 20 patients with acute lymphocytic leukemia (ALL) at diagnosis and at complete remission after induction chemotherapy, and in 20 normal children that served as the control group. **Results:** Serum neopterin levels were significantly ($P=0.021$) increased in the ALL group at diagnosis (9.48 nmol/L) compared to the control group (4.49 nmol/L). In the ALL group, serum neopterin levels were significantly ($P=0.015$) decreased at complete remission state (6.84 nmol/L) compared to the time of diagnosis (11.96 nmol/L). **Conclusion:** Neopterin was shown to be a valuable indicator of disease activity in childhood ALL and will contribute to predicting the treatment response. (*Korean J Pediatr Hematol Oncol* 2003;10:58~63)

Key Words: Neopterin, Acute lymphocytic leukemia

책임저자 : 양창현, 서울특별시 강남구 도곡동 146-92, 연세대학교 의과대학 소아과학교실, 우편번호: 135-720

Tel: 02-3497-3350, Fax: 02-3461-9473, E-mail: chyang@navekids.co.kr

본 논문은 2001년도 연세대학교 의과대학 소아과학교실 교수연구비의 지원으로 이루어졌음.

서 론

Neopterin (6-D-erythro-trihydroprophylpterin)은 1963년 벌의 유충에서 처음으로 분리된 pteridine계 물질¹⁾로 1979년 중앙성 질환을 가진 환자에서 neopterin의 소변 내 배설이 증가되어 있다²⁾는 것이 밝혀진 이후 각종 질환에서 그 임상적 의의가 연구되고 있다.

Neopterin은 세포매개면역반응의 예민한 지표^{3,4)}로써 각종 중앙이나 바이러스감염, 세균감염, 자가면역질환, 후천성 면역결핍증, 동종이식 거부반응 등 세포매개면역반응이 활성화되는 질환들에서 혈청이나 소변 내 농도가 증가함이 확인되었으며 이는 질병의 정도 및 예후와 밀접한 관련성을 보임이 밝혀지고 있다^{4,5)}. 특히 여러 중앙성 질환에서 neopterin농도의 지속적 상승이 관찰되며 증가된 neopterin농도와 암종의 범위, 중증도 및 예후와의 관련성이 확인되고 있는데 폐암⁶⁾, 자궁경부암⁷⁾, 유방암⁸⁾, 난소암⁹⁾, 대장암¹⁰⁾, 췌장암¹¹⁾, 비뇨생식계암¹²⁾, 림프절암¹³⁾, 다발성골수종¹⁴⁾, 백혈병¹⁵⁾, 소아암¹⁶⁾ 등에서 그 임상연구가 보고된 바 있다.

소아 급성림프구성백혈병은 소아에서 가장 흔한 혈액종양임에도 아직까지 소아 급성 림프구성 백혈병과 neopterin의 관련성에 대해 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 ELISA법을 이용한 혈청 neopterin농도의 측정을 통해 neopterin이 소아 급성림프구성 백혈병에서 질병활성도의 지표로써 의미 있는지 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 대상

1997년 6월에서 12월까지 세브란스병원에서 급성림프구성백혈병으로 처음 진단된 환자 13례와 재발된 환자 7례를 환자군으로 하여 정상 대조군 20명과 비교하였다. 환자군 선정 시 타질환으로 인한 neopterin농도의 영향을 고려해 감염 등 다른 질환이 합병된 환자는 제외하였다. 환자군의 연령

은 평균 6.4세(0.8~14.4), 남녀비는 11 : 9명으로 대조군의 5.8세(0.4~11.2), 남녀비 13 : 7명과 비교해 유의한 차이가 없었으며 FAB 분류상 L1, L2, L3형이 각각 17명, 3명, 1명이었고 고위험군이 12명, 중간위험군 7명, 양호위험군 1명이었다(Table 1). 환자 중 발열을 제외하고 임상적으로 급성 감염이 의심되는 경우는 없었으며 발열증상이 있는 경우에도 방사선 검사 및 혈액검사(혈침속도, C-반응단백, 세균배양검사 등)상 이상이 있는 경우는 없었다.

2) 방법

혈청 neopterin농도의 측정은 대상자로부터 채취한 전혈에서 혈청을 분리한 후 neopterin이 안정하게 유지되는 온도인 -20도에서 냉동 보관하여 ELISA법(Neopterin ELI test, Alpco diagnostics, Winham, NH, USA)을 이용하여 측정하였다. 환자군에서는 진단당시 및 관해도입치료 완료 후 14일째 완전관해 상태에서 측정하였으며 치료 중 사망하거나 추적관찰 되지 않은 환자 10명은 완전관해 후 농도측정이 불가하여 관해전후 농도비교에서 제외되었다. 이상의 측정치를 통해 환자군과 정상 대조군의 혈청 내 농도 및 환자군에서 진단당시와 완전관해 후 농도를 비교하였다.

3) 통계

SPSS 10.0 프로그램을 사용하여 환자군과 정상 대조군의 농도 비교 시 independent samples T test

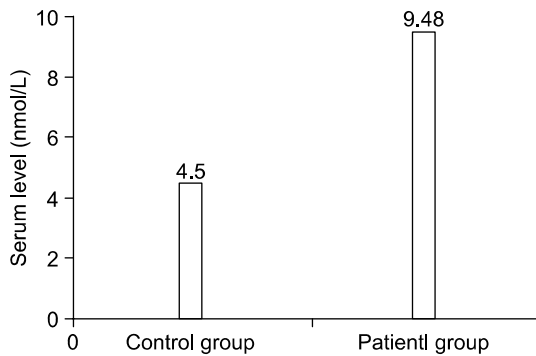
Table 1. Clinical Characteristics of Patient Group

Characteristics	No.
Newly diagnosed : relapsed	13 : 7
Age (years)	Mean 6.4 (0.8~14.4)
Sex (Male : Female)	11 : 9
FAB classification (L1 : L2 : L3)	17 : 3 : 0
CCG* risk group: High risk	12
Intermediate risk	7
Low risk	1

*CCG; Children Cancer Group

Table 2. Serum Neopterin Level in Patient Group and Control Group

	No.	Mean \pm SD (nmol/L)	P-value
Control group	20	4.50 \pm 2.86	0.002
Patient group	20	9.48 \pm 6.18	

**Fig. 1.** Serum neopterin level in patient group and in control group.

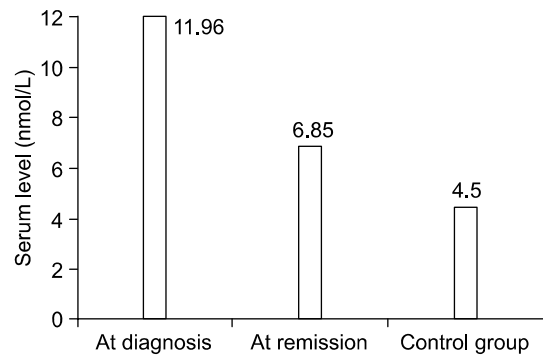
를, 환자군에서 진단당시와 완전관해 후의 농도 비교시에 paired samples T test를 이용하였으며 통계학적 유의수준은 P 값 0.05 미만을 기준으로 하였다.

결 과

환자군 20명의 진단 시 혈청 neopterin농도는 평균 9.48 ± 6.18 nmol/L로 정상 대조군의 4.50 ± 2.86 nmol/L 보다 유의하게($P=0.002$) 높아 소아의 급성림프구성백혈병에서 neopterin 생성이 증가됨을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 1). 또 환자군 중 진단 시와 완전관해 후 혈청 neopterin농도를 모두 측정환자 10명에 대한 결과에서 진단 시 농도는 평균 11.97 ± 5.72 nmol/L, 완전관해 후 농도는 평균 6.85 ± 4.12 nmol/L로 나타나 완전관해 후 농도가 유의하게($P=0.015$) 낮아졌으며 이는 정상 대조군의 평균농도보다는 높은 수치를 보였다(Table 3, Fig. 2).

Table 3. Serum Neopterin Level in Patient Group at Diagnosis and at Remission

	No.	Mean \pm SD (nmol/L)	P-value
at Diagnosis	10	11.97 \pm 5.72	0.015
at Remission	10	6.85 \pm 4.12	

**Fig. 2.** serum neopterin level in patient group at diagnosis and at remission.

고 찰

생체 내에서 neopterin은 guanosine triphosphate (GTP)에서 tetrahydrobiopterin (BH4)이 생합성되는 과정에서 생성되는 중간산물로 사람에서는 주로 활성화된 T 림프구(T helper-1 cell, Th-1)에서 분비되는 Interferon gamma ($INF-\gamma$)에 의해 자극된 단구/대식세포계에서 생성되어 대사되지 않고 신장을 통해 배설된다¹⁷⁻²⁰. GTP는 GTP cyclohydrolase I에 의해 dihydroneopterin triphosphate로 분해되어로부터 BH4 또는 neopterin이 생성되게 되는데 이때 GTP cyclohydrolase I의 활성도를 증가시키는 자극물질로 $INF-\gamma$, $INF-\alpha$, 내독소(endotoxin)등이 작용함이 밝혀졌다. 특히 $INF-\gamma$ 가 가장 강력한 유도물질이며 이는 활성화된 Th-1세포에서 유리된다^{19,21,22}. 사람의 경우 이런 과정들은 섬유모세포(fibroblast), 내피세포(endothelial cell) 등을 비롯한 여러 종류의 세포에서 일어나지만 단구/대식세

포계에는 상대적으로 BH4를 생성시키는 효소가 결핍되어 있어 반응은 neopterin을 생성시키는 방향으로 주로 진행되며 따라서 대식세포는 neopterin의 주요 세포원이 된다^{5,18,19,23}).

이상의 생성과정을 통해 neopterin은 Th-1세포와 대식세포 사이의 밀접한 상호작용에 의한 세포매개면역반응의 예민한 생화학적 지표임을 알 수 있다²⁴. 특히 아직까지 발견된 neopterin 수용체가 없어 neopterin은 혈관 외로 유출되지 않는 것으로 생각되며 비교적 안정성이 유지되 생체 외에서도 2~8°C에서 24시간, -20°C에서 6개월까지 유지되므로 반감기가 짧아 측정하기 어려운 INF- γ 에 대한 좋은 간접 지표임을 알 수 있다²³. 이후 진행된 최근 연구결과들에서 주목할 점은 neopterin 생성은 세포매개면역반응에서 T세포 증식이 최대가 되기 수 일전부터, 또 특히 항체가 생성되기 약 1주전부터 증가되기 시작하므로 neopterin이 임상증상이나 다른 생체지표들보다 더 조기에 질병상태를 반영하는 지표로 유용하다는 것이다^{20,25}.

종양성 질환에서 neopterin의 농도가 증가된다는 것은 이미 여러 임상연구들을 통해 밝혀져 왔는데 종양의 종류에 따라 상이하게 나타나 유방암, 악성흑색종의 경우 환자의 20%에서 neopterin 농도가 정상인보다 증가되는데 비해 혈액종양성 질환에선 90%의 환자에서, 특히 비호지킨림프종에선 환자의 100%에서 증가됨이 보고되었다^{13,15}.

이런 현상들은 neopterin의 면역계에서의 역할이 밝혀짐에 따라 세포매개 숙주 항암 면역반응 (cell mediated host antitumoral immune reactivity)의 결과라는 의견이 제시되었다¹⁸. 유일하게 골수세포종 세포주에서 neopterin이 직접 생성될 뿐이므로 일반적으로 neopterin은 직접적인 종양 표지자는 아니나 종양성 질환에서 neopterin의 농도가 증가됨은 지속적으로 세포면역반응이 자극되나 자극원이 제거되지 못하는 상태임을 의미한다. 즉 면역계가 종양세포를 인식해 초기 면역 활성화 반응을 일으키는 과정은 온전하나 효과기 세포 (effector cell)의 종양세포 제거과정이 효과적으로

일어나지 못해 세포면역의 기능적 결핍이 초래되었음을 반영한다²⁶. 이런 관점에서 볼 때 높은 neopterin 농도증가는 이미 존재하는 암종보다 현재 진행중인 종양에서 단구/대식세포체계의 활성화도와 비례해 증가하므로 기존의 TNM stage나 암종의 범위를 나타내는 표지자들보다 더 예민하게 암종의 현재 진행속도, 향후 전이 가능성 및 예후와 관련된 결과를 보인다는 의견도 제시되었다⁸.

최근 neopterin이 대식세포의 반응성 산소종(reactive oxygen species) 생성에 의한 세포독성 작용에 관련되어 있음이 밝혀지면서 neopterin과 종양 발생과의 좀더 직접적인 연관성이 제시되고 있다. Neopterin은 반응성 산소종의 생성과정에 영향을 주고 그 독성을 증강시키므로 산화력(oxidative stress) 증가의 간접적 지표가 되는데 반응성 산소종은 산화기/항산화기의 신호전달체계와 성장인자(growth factor)에 직접 영향을 주어 발암(carcinogenesis)을 유발하고 촉진시키며 이 과정들은 neopterin 유도체들에 의해 조정된다는 것이다. 또 neopterin과 그 환원 유도체인 7,8-dihydroneopterin이 c-fos oncogene의 발현을 유발시키며 최근 밝혀져 세포 내 신호 전달체계에서의 작용을 통한 암 유전자 발현과 세포고사(apoptosis)에 직접 관련되어 있음이 밝혀지고 있다²⁷⁻²⁹.

본 연구에서 급성림프구성백혈병 환자군에서 혈청 neopterin 농도가 대조군에 비해 유의하게 증가된 결과를 보여 neopterin이 소아 급성림프구성 백혈병에서 질병활성도의 지표로서 의미있음을 알 수 있었다. 그러나 환자군중 정상 대조군의 평균±표준편차(3.3~15.6 nmol/L) 범위 이상으로 증가한 경우는 3명으로 15%였으며 Werner 등이³⁰ 방사선면역측정법(radioimmunoassay)에 의해 0~18세 정상 대조군 263명을 대상으로 측정한 혈청 neopterin 농도(3.5~13.5 nmol/L) 이상으로 증가한 경우 역시 3명이었다. 이는 이전 연구들에서 보였던 혈액종양성 질환에서의 높은 neopterin 증가율에¹⁵ 비해 낮은 수치였다. 그러나 정상인의 혈청 neopterin 농도에 연령에 따른 변동이 있어 18세 미만과 75세 이상에서 유의하게 높아짐을 고려할

때 성인 환자군에서의 연구 결과를 비교하는 것은 부적절하므로 소아 혈액종양질환에 대한 연구가 계속되어 이에 대한 객관적 자료가 있어야 하겠다.

치료 전 증가되었던 혈청 neopterin 농도가 항암 치료 후 관해 상태에서 유의하게 감소됨은 성인 급성 및 만성 백혈병 환자를 대상으로 한 연구¹⁵⁾에서와 일치하는 결과로 대조군 보다는 높으나 통계적 의의는 없는 수치를 보였다. 이는 neopterin이 소아 급성림프구성백혈병에서 추적 관찰 시 치료반응 및 재발에 대한 추적 표지자로서 활용 가능한 지표임을 보여주었다. 특히 혈액종양성 질환에서 질병 진행도에 대한 예민한 표지자가 없어 그 유용성을 주목해 볼 수 있겠다.

이상의 결과에서 소아 급성림프구성백혈병에서 neopterin은 특이적 진단 지표로서는 부적합함에도 불구하고 질병 활성도의 지표로서 의미있으며 질병의 진행도 및 관해 상태에 대한 추적 표지자로서의 활용 가능성이 확인되었다. 향후 neopterin 농도와 질병의 경과 및 예후에 대한 연구가 진행된다면 소아 백혈병에서 그 의의와 유용성은 매우 크다 하겠다.

요 약

목적: Neopterin (6-D-erythro-trihydroprophylpterin)은 GTP (guanosin triphosphate)로부터 tetrahydrobiopterin의 생합성 시 생기는 중간산물로서 활성화된 T형 임파구에서 분비되는 감마인터페론에 의해 자극된 사람의 대식세포로부터 생성되므로 T형 임파구와 대식세포 사이의 상호작용에 의한 세포매개면역 상태의 예민한 표식자이다. 각종 종양이나 바이러스 감염, 세균감염, 자가면역질환, 후천성 면역결핍증, 동종이식 거부반응 등에서 혈청이나 소변의 neopterin이 질병의 정도나 예후와 밀접히 연관되 증가되며 여러 종양성 질환에서 neopterin이 암종의 범위 및 심화도와 관련되 증가됨이 보고되고 있다. 이에 소아 급성림프구성백혈병 환자에서 neopterin이 질병 활성도의 지표로서

의의 있는지 보고자 하였다.

방법: 급성 림프구성 백혈병으로 처음 진단된 환자 13명과 재발된 환자 7명을 환자군으로 하여 정상 대조군 20명과 비교하였다. 혈청 neopterin농도의 측정은 ELISA법을 이용하여 환자군에서는 진단당시 및 관해도입치료 14일 후 완전관해 상태에서 측정하였으며 환자군과 정상 대조군의 혈청내 농도 및 환자군에서 진단당시와 완전관해 후 농도를 비교하였다.

결과: 환자군의 진단 시 혈청 neopterin농도는 평균 9.48 ± 6.18 nmol/L로 정상 대조군의 4.50 ± 2.86 nmol/L 보다 유의하게($P=0.002$) 높았으며 환자군에서 진단 시 농도는 평균 11.97 ± 5.72 nmol/L, 완전관해 후 농도는 평균 6.85 ± 4.12 nmol/L로 나타나 완전관해 후 농도가 유의하게($P=0.015$) 낮아지는 결과를 보였다.

결론: Neopterin이 소아 급성 림프구성 백혈병에서 질병활성도의 지표로서 의미 있으며 추적 관찰 시 치료반응 및 재발에 대한 추적 표지자로서 활용 가능한 지표임을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Rembold G, Buschmann L. Struktur und Synthese des Neopterin. Chem Ber 1963;96:1406-10
2. Wachter H, Hausen A, Grassmayr K. Erhohte Ausscheidung von Neopterin im Harn von Patienten mit malignen Tumoren und mit Viruserkrankungen. Hoppe-Seyler's X Physiol Chem 1979;360:1957-60
3. Hurber CH, Fuchs D, Hausen A, Margreiter R, Reibnegger R, Spielberger M, Wachter H. Pteridines as a new marker to detect human T-cells activated by allogeneic or modified self major MHC determinants. J Immunol 1983;130:1047-50
4. Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious and malignant diseases. Crit Rev Clin Lab Sci 1992;29:307-41
5. Berdowska A, Zwirski-Korczała K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. J Clin Pharm Ther 2001; 26(5):319-32
6. Kronberger P, Weiss G, Tschmelitsch J, et al. Pre-

- dictive value of urinary neopterin in patients with lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:831-7
7. Reibnegger GJ, Bichler AH, Dapunt O. Neopterin as a prognostic indicator in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1986;46:950-5
 8. Murr C, Bergant A, Widschwendter M, Heim K, Schrocksnadel H, Fuchs D. Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clin Chem* 1999;45:1998-2004
 9. Zeimet AG, Widschwendter M, Knabbe C. Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1861-8
 10. Weiss G, Kronberger P, Conrad F, Bodner E, Wachter H, Reibnegger G. Neopterin and prognosis in patients with adenocarcinoma of the colon. *Cancer Res* 1993;53:260-5
 11. Manes G, Spada OA, Rabitti PG. Neopterin serum levels in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreat* 1999;25:31-7
 12. Wolfgang A, Julian F, Dietmar R, Arno H, Gilbert R, Helmut W. Significance of urinary neopterin in patients with malignant tumors of the genitourinary tract. *Cancer* 1985;55:1052-5
 13. Abate G, Comella P, Marfein SG, Nirceli F, Fiore M, Perna M. Progressive relevance of urinary neopterin in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 1993;63:484-9
 14. Reibnegger G, Krainer M, Herold M, Ludwig H, Wachter H, Huber H. Predictive value of interleukin-6 and neopterin in patients with multiple myeloma. *Cancer Res* 1991;51:6250-3
 15. Altindag ZZ, Sahin G, Isimer A, Akpek G, Kansu E. Dihydropteridine reductase activity and neopterin levels in leukemias and lymphomas: Is there any correlation between these two parameters? *Leuk Lymphoma* 1999;35(3-4):367-74
 16. Reibnegger G, Fuchs D, Hausen A, Kostron-Kainz C, Wachter H. Urinary neopterin in malignant disease of childhood. A marker for activity of the cell-mediated immunity. *Targeted Diagn Ther* 1984;5:234
 17. Hurber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, et al. Immunoresponses-associated production of neopterin. *J Exp Med* 1984;160:310-6
 18. Nicol CA, Smith GK, Duch DS. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and biopterin. *Annu Rev Biochem* 1985;54:729
 19. Bitterlich G. Selective induction of mononuclear phagocytes to produce neopterin by interferons. *Immunobiology* 1988;176:228-33
 20. Aisawa S, Hiramoto M, Araki S, Negishi S, Kimura Y, Hoshi H, et al. Stimulatory effects of neopterin on hematopoiesis in vitro are mediated by activation of stromal cell function. *Hematol Oncol* 1998;16:57-67
 21. Troppmair J, Nachbauer K, Herold M, et al. Huber in vitro studies on the induction of neopterin biosynthesis by cytokines, alloantigens and lipopolysaccharide. *Clin Exp Immunol* 1988;74:392
 22. Lang A, Niederwieser D, Huber C. Treatment with human recombinant interferon-alpha 2 induces increase of in vivo neopterin excretion. In: Pfliderer W, Wachter H, Curtius HC, editors. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. Berlin-New York: De Gruyter Co, 1984;3:251
 23. Harmerlinck FFV. Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 1999;8:167-76
 24. Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, Biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allerg Immunol* 1993;101:1-6
 25. Millner MM, Franthal W, Thalhammer GH. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum as an aid in differentiating central nervous system and peripheral infections in children. *Clin Chem* 1998;44:161-7
 26. Fuchs D, Malkovsky M, Reibnegger G, Werner ER, Forni G, Wachter H. Endogenous release of interferon-gamma and diminished response of peripheral blood mononuclear cells to antigenic stimulation. *Immunol Lett* 1989;23:103-8
 27. Murr C, Fuih LC, Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Fuchs D. Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress? *Anticancer Res* 1999;19:1721-8
 28. Oettl K, Reibnegger G. Pteridines as inhibitors of xanthine oxidase: structural requirements. *Biochem Biophys Acta* 1999;1430:387-95
 29. Oettl K, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Grammer T, Fuchs D, Reibnegger G. Formation of oxygen radical sin solutions of 7,8-dihydroneopterin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:262-7
 30. Werner ER, Bichler A, Daxenbichler G. Determination of Neopterin in Serum and Urine. *Clin Chem* 1987;33:62-6