

급성백혈병에서의 Akt 발현과 그 임상적 의의

연세대학교 의과대학 내과학교실¹, 두뇌한국21 사업단²

맹호영¹ · 정준원¹ · 이승태¹ · 민유홍^{1, 2} · 한지숙¹ · 고윤웅¹

Akt Expression in Acute Leukemia Cells and Its Clinical Significance

Ho Young Maeng, M.D.¹, June Won Cheong, M.D.¹, Seung Tae Lee, M.D.¹,
Yoo Hong Min, M.D.^{1, 2}, Jee Sook Hahn, M.D.¹, Yun Woong Ko, M.D.¹

¹Department of Internal Medicine, ²Brain Korea 21 Project for Medical Science,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Disturbances in apoptosis through phosphoinositide 3-kinase(PI3K)/Akt pathway is thought to be crucial in cancer cell immortality. Enhanced expression and activation of Akt was investigated in several malignancies but not in acute leukemia. We investigated the expression of Akt and phospho-Akt in acute leukemia cells and clinical characteristics of expression and non-expression group.

Methods : Bone marrow cells from patients who were newly diagnosed as acute leukemia and healthy volunteer were obtained and analyzed by Western blot analysis using monoclonal antibody against Akt, phospho-Akt (Ser473), and phospho-Akt (Thr308). Clinical data were obtained retrospectively.

Results : The expression of Akt was demonstrated in 27 of 43 cases (63%) and phospho-Akt(Ser473) was noted in 24 of 27 (54%) Akt-positive cases, respectively. Phospho-Akt (Ser473)-expression group showed significantly higher initial WBC counts compared to negative group ($P=0.003$). By chromosomal analysis, patients with Akt expression did not show any good prognostic karyotype ($P=0.001$).

Conclusion : This result suggests that Akt overexpression and activation is detected in acute leukemia cells and might have a role in molecular pathogenesis of acute leukemia. (*Korean J Hematol* 2003;38:253~260)

Key Words : Akt, Acute leukemia, WBC count, Karyotype, Cell signaling

서 론

악성 신생물을 포함한 다양한 질병의 발생 기전에 있어서 세포 생존 조절 기전의 장애가 핵심적 역할을 한다. 다양한 세포내외의 단백질 및 세포 신호 전달 체계가 세포 고사에 있어 상호작용을 하는데 이러한 과정의 결함은 유전물질의 불안정성 및 돌연변이의 발생률을 증대시켜 발

암의 가능성과 종양세포의 생존 효율성을 높인다.^{1,2)}

세포고사는 크게 두 가지 경로 즉, caspase protease의 활성화가 중심이 되는 사멸 수용체 (death receptor)에 관련된 경로와 미토콘드리아 경로 (mitochondrial pathway)가 알려져 있으며 이 둘 두 경로간의 bcl-2 동족체를 통한 세포고사 기전의 연관성이 여러 실험 모형에서 밝혀졌는데 이 중 항세포고사를 나타내는 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway의 과표현 (overexpression) 및 과활성화 (overactivation)가 한 예이다.³⁾

Akt는 AKR mouse의 자발성흉선종에서 처음 발견된

접수 : 2003년 9월 23일, 수정 : 2003년 11월 14일

승인 : 2003년 11월 19일

책임저자 : 맹호영, 연세대학교 의과대학 내과학교실

Tel : 02)361-5410, Fax : 02)362-1253

E-mail : maggie@yumc.yonsei.ac.kr

retroviral transforming oncogene인 λ -Akt의 homologue인 c-Akt로 57,500 MW의 Ser/Thr kinase이며 PKB (protein kinase B) 혹은 Rac protein kinase로도 불린다.⁴⁾ 정상적으로는 DNA 손상, 자외선 투과 및 세포 주기의 이상이 초래된 경우 등에서 세포사멸에 중요한 역할을 하며⁵⁾ 전사 활성화 물질의 하나로 항세포고사 및 세포성장을 촉진시키는 것으로 알려진 NF- κ B의 활성을 조절한다.^{6,7)} 시험관 내에서는 인슐린이나 인슐린양 성장 인자(insulin-like growth factor; IGF),⁸⁾ anaplastic large cell lymphoma에서 t(2;5)(p23;q35) 유전자 전위에 의해 나타나는 nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) 중합 단백질 등이 Akt를 활성화 시키는 것으로 밝혀졌다.⁹⁾ 또한, 최대의 Akt 활성화를 위해서는 Thr308 말단 혹은 Ser473 말단의 인산화가 필요하다.^{10,11)}

Akt는 활성화 된 PI3K의 자극에 의해 인산화 된 세포막에 부착하게 되고^{4,12)} procaspase-9를 인산화시켜 procaspase-9의 활성화를 억제하는 것 이외에 Fas ligand 합성에 관계하는 전사 인자를 불활성화하고 FLIP 표현을 용이하게 하며 미토콘드리아로부터의 cytochrome-C 유리를 억제하여 세포고사를 억제한다.¹³⁾ 이는 좀 더 근본적으로는 oncogenic receptor tyrosine kinase나 Ras 돌연변이, bcr-abl 중합 단백질 등의 작용에 의해 체질적 활성화를 나타내는 것으로 생각되며¹⁴⁾ 특히 Akt가 암세포의 무한생존에 기여하는 기전에 tumor suppressor gene인 PTEN 불활성화에 의한 영향이 작용하리라는 증거가 제시되고 있다.^{3,15,16)} 즉, Akt의 활성 증가는 세포고사에 관계하는 다양한 세포 내 단백질의 활성을 조절하여 종양세포의 무한생존 (immortality)을 유지시키는데 기여한다.¹⁷⁾

유전적 다발성 종양을 그 임상 증상으로 하는 Cowden's disease, 비소세포폐암, 췌장암, 갑상선암, 유방암, 피부암 및 설암¹²⁾ 등 일부 고형 종양 세포에서는 Akt가 과표현 및 활성화 되어 있다. 또한 B세포성 만성림프구성백혈병 세포에서 자가 혈청에 의한 Akt가 활성화 및 방사선 조사나 항암 약물 처리에 의한 DNA 손상에 대한 생존율이 증가 된다.¹⁸⁾

따라서 어떠한 악성 종양세포에서 Akt의 발현 여부에 따른 임상 양상의 차이가 존재한다면 치료 반응을 예측할 수 있는 예후인자로 사용할 수 있을 뿐 아니라 PI3K/Akt 경로에 관계된 단백을 선택적으로 억제하여 세포신호전달 체계 수준에서의 효과적인 표적 치료의 개념으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.^{3,19)}

지금까지 Akt 발현 및 활성화에 대한 연구는 주로 일부 고형종양을 대상으로 시행된 바 있으나 급성 백혈병에서는 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 급성백혈병에서 Akt의 발현 및 활성화 양상을 정상 골수세포와 비교

하여 세포 신호 전달 체계 수준에서의 치료 표적으로서의 적용 가능성과 Akt의 발현 및 활성화가 임상적으로 갖는 의미와 그 유용성에 대해 조사해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

1997년 1월부터 2001년 9월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원 혈액종양내과에서 급성림프구성백혈병 혹은 급성골수성백혈병으로 처음 진단 받은 성인 환자 중 무작위 선정된 43례를 대상으로 하였으며 정상 대조군으로 8례의 정상 골수세포를 이용하였다. 모든 골수 급성백혈병 세포는 진단 당시 골수아세포의 분율이 골수내 유헤세포 중 90%이상인 환자의 골수 흡인 검사 표본을 사용하였고, 대조군으로 사용한 정상 골수 세포는 동종 골수이식 공여자로부터 채취한 것을 사용하였다. 모든 골수 세포의 채취는 자발적 골수 세포 기증에 대한 동의서 작성 후 시행되었다. 급성백혈병의 혈액학적 진단의 분류는 French-American-British (FAB) 분류를 따랐다.

급성백혈병 진단시의 골수 단핵세포를 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 농도차분리법을 사용하여 분리하였다. 2회의 세척 후에 세포를 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)과 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 함유된 RPMI 1640 배양액 (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)에 재부유 시킨 후에 액화 질소에 냉동하여 -70°C에 보관하였다. 정상 골수세포의 경우에는 세포 성상의 단일화를 위하여 MiniMACS[®] CD34 cell isolation kit (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)를 이용하여 골수 단핵구 중의 CD34양성 세포만을 분리하여 같은 방법으로 저장하였다.

2. 방 법

1) 단백질 추출

동결 저장 세포를 37°C 항온 수조에서 해동하였고 PBS 1mL로 2회 세척하였다. 4°C 원심분리기에서 450g로 1분간 원심 분리한 뒤 0.3% trypan blue 용액으로 염색하여 hemocytometer로 세포생존분율 (viability)을 측정하여 생존도가 90% 이상인 세포를 사용하였는데, 시험관 한 개당 5×10^6 개의 세포가 되도록 나누어 SDS sample buffer 100 μ L로 용해시킨 뒤 2초 간 sonication하고 95°C에서 10분간 heat block 하였다. 추출된 단백질은 4°C에서 400g로 1분간 원심 분리하였고 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

각각의 단백질은 전기 영동 전에 Bradford assay를 시행하여 정량 하였다. Western blot을 시행할 때는 기준으로 α -tubulin을 측정하여 비교하였다.

2) Western blotting

(1) SDS-PAGE

Hoeffer[®] Mighty[®] gel cast (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)에 Hoeffer[®] gel glass plate (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 12% acrylamide running gel과 5% acrylamide stacking gel을 만들고 pH 8.3 SDS-PAGE running buffer (iNtRON Biotech, Korea)를 전기영동 chamber에 채운 뒤 SDS-PAGE prestained standard low range marker (BioRad, Hercules, CA, USA) 10 μ L 및 1 \times sample buffer가 첨가된 준비되어 있는 protein을 각각 15 μ L 씩 loading하고 120V, 100mA에서 bromophenol blue가 gel의 말단부에 도달할 때까지 전기영동하였다.

(2) Transfer

전기영동이 끝나면 pH 8.3 transfer buffer (iNtRON Biotech, Korea)를 사용하여 350mA에서 4시간 동안 nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 단백을 이동시켰다.

(3) Immunoblotting

5% non-fat milk에 4시간 이상 비특이적 단백을 차단하고 1차 항체를 각 항체의 권장되는 농도로 5% non-fat milk에 희석한 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 동안 반응시켰다.

각 추출된 세포 단백질의 양은 α -tubulin antibody (Cedarlane, Canada)를 사용하여 normalization하였다. 사용한 1차 항체는 모두 rabbit antibody로 Akt (Cell signaling technology, Beverly, MA USA), phospho-Akt (Ser473) (Cell signaling technology, Beverly, MA USA) 및 phospho-Akt (Thr308) (Cell signaling technology, Beverly, MA USA)였다.

1차 항체를 반응시킨 뒤에는 Tris-buffered saline-Tween (TBST; 1X TBS, 0.1% Tween 20)로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체 (anti-rabbit antibody, Cell signaling technology, USA)를 2시간 동안 반응시키고 TBST를 사용한 세척을 3회 반복하였다.

(4) Detection

ECL chemiluminiscent detection reagent (Amersham Co, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 각각 15 초와 1분, 3분간 노출시켜 현상하였다.

3) 임상 자료 수집

급성백혈병 환자의 입원 및 외래 진료 기록을 토대로 진단 당시의 나이, 성별, 말초 혈액 백혈구 수치와 미숙세포 (blast)의 분율, lactate dehydrogenase (LDH), 골수 외

백혈병의 침습의 유무, 골수 조직 검사의 세포 충실도 및 염색체 변이 여부, 항암 치료 여부 및 치료 효과, 항암 치료 후 재발 유무, 전체생존기간, 무병생존기간 등의 임상적 특징을 후향적으로 조사하였다.

4) 통계 분석

Akt 발현 및 활성화 유무에 따른 임상적 특징의 비교는 Chi-square test, independent-samples t test를 사용하였고, 생존을 비교는 Kaplan-Meier survival test와 log rank test를 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였고 Windows-SPSS release 10.0을 사용하여 수행하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특성

급성림프구성백혈병 및 급성골수구성백혈병 환자 43례 중 27례인 63%에서 Akt 발현을 보였고 56%인 24례에서 phospho-Akt (Ser473) 발현이 관찰되었다 (Table 1, Fig. 1). Akt 발현을 보이는 환자군의 진단 당시 말초 혈액 백혈구 수치는 Akt 발현을 보이지 않는 군의 수치에 비해 의미 있게 높았다 (P=0.008). 성별이나 나이, 급성 백혈병의 조직아형, 말초 혈액 중의 미숙세포 분율, 진단 당시의 LDH, 진단 당시의 골수 충실도, 중추신경계 침범 여부는 Akt 발현군과 비발현군 간에 유의한 차이가 없었다 (Table 2). 급성백혈병의 골수의침범 여부와 Akt 발현 여부를 비교하면 중추신경계, 간비종대, 림프절종대 등의 골수의침

Table 1. Akt and phospho-Akt(Ser473) expression in acute leukemia cells and normal bone marrow stem cells

	Acute leukemia (N=43)		Normal control (N=8)
	N	%	
Akt expression	27	63	0
Phospho-Akt(Ser473) expression	24	56	0

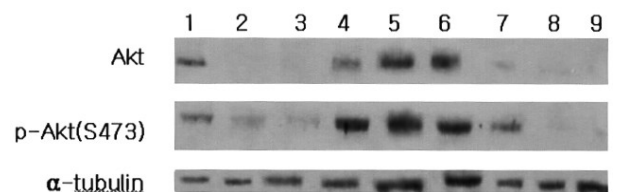


Fig. 1. Expression of Akt and phospho-Akt (Ser473) in leukemic cells. Samples loaded from No.1 to No.7 are acute leukemic cells. From No. 8 to No. 9 samples are normal bone marrow stem cells.

범을 보인 6례 중 5례에서 Akt의 발현을 보였으나 통계적인 의미는 없었다($P=0.262$).

Phospho-Akt (Ser473)의 발현군과 비발현군을 비교하였을 때는 Akt 발현군에서 진단 당시 말초 백혈구 수치만 의미 있게 높았고($P=0.003$), 그 외에 LDH, 말초혈액 미숙세포의 분율, 골수침실도 등에서는 의미 있는 차이를 보이지 않았다.

2. Akt 발현 여부와 염색체 이상

급성 백혈병 세포의 염색체의 이상에 따라 좋은 예후, 평균 정도의 예후, 나쁜 예후의 세가지 군으로 분류하여 평

Table 2. Clinical characteristics of acute leukemia patients

	Akt expression		P
	Positive (N=27)	Negative (N=16)	
Age	49* (17~68)	51* (17~66)	0.202
Sex (M:F)	16:11	8:8	0.55
ALL	8	3	0.429
L2	8	3	
AML	19	13	
M0/M1/M2	3/1/7	0/2/3	
M3/M4/M5	1/4/3	2/4/2	
WBC ($10^9/L$)	16.3* (2.3~444)	17.0* (0.3~156)	0.008
Blast (%)	75* (16~90)	46.5* (12~92)	0.677
LDH†	6.5* (0.6~11.2)	2.76* (0.82~12.6)	0.778
BM cellularity (%)	90* (35~100)	90* (60~100)	0.367

*Values denote median; † ratio to upper normal limit
Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; LDH, lactate dehydrogenase, BM, bone marrow

Table 3. Akt expression and karyotypes of bone marrow cells

	Akt expression		P
	Positive (N=21)	Negative (N=14)	
Good	0	7 (50%)	<0.001
t(15;17)	0	2	
t(8;21)(q22;q22)	0	4	
inv16	0	1	
Intermediate	15 (70%)	5 (35.7%)	0.091
Normal	14	5	
47,XY,+8	1	+	
Poor	6 (30%)	2 (14.3%)	0.121
t(9;22)(q34;q11)	3	0	
del(7)t(9;22)	1	0	
t(3;5)(q21;31)	1	0	
45,XX,-7,+15,+16,21,-X	1	0	
t(5;9)(p24;q22)	0	1	

가하였을 때 Akt 발현을 보인 27례 중 염색체 검사 결과를 확인할 수 있었던 경우가 21례였는데 그 중 좋은 예후를 보이는 염색체 이상을 가진 군에 속하는 경우는 없었고 평균 정도의 예후와 나쁜 예후를 보이는 염색체 이상의 경우는 각각 15례와 6례가 있었다. Akt를 발현하지 않은 군의 14례 중 염색체 검사 결과를 확인할 수 있었던 7례에서 좋은 예후, 평균 정도의 예후 및 나쁜 예후를 보이는 경우가 각각 5례, 그리고 2례 있었다(Table 3). Akt 발현군에 속하면서 phospho-Akt (Thr473) 음성이었던 3례 중 2례가 나쁜 예후를 보이는 군에 속하였고 나머지 1례는 정상 핵형을 가졌다. 급성백혈병에서 예후와의 연관성이 뚜렷이 밝혀지지 않은 핵형 중 하나인 47,XY,+Y 핵형을 가진 1례의 경우 Akt 발현은 보이지 않았으며 통계 처리에서는 제외하였다.

3. Akt 발현 여부에 따른 치료 결과와 생존율

1) Akt 발현 여부와 치료 결과

Akt 경로의 활성화가 치료 반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Akt 및 phospho-Akt (Ser473) 발현군과 비발현군의 치료 성적을 비교하였고, 급성림프구성백혈병과 급성골수성백혈병의 임상 경과와 예후가 다르므로 각각의 군으로 나누어 치료 결과와 생존율을 분석하였다.

항암 치료에 대한 반응은 첫 2회의 항암 치료 후 완전 관해를 얻은 경우와 그렇지 않은 경우로 나누어 표시하였다(Table 4). 항암 약물 치료를 받은 38례 중 급성림프구성백혈병은 10례였으며 Akt 발현을 보인 환자는 총 7례였으며 이 중 완전관해 4례, 무반응 3례였으나, Akt 비발현군에 속하는 환자 3례는 모두 완전관해를 보였고 무반응을 보이는 경우는 없었다($P=0.175$). 급성골수성백혈병은 28례로 Akt 발현군 18례 중에서는 완전관해 12례, 무반응 6례

Table 4. Akt expression and treatment response

Treatment response	Akt expression		Phospho-Akt (Ser473) expression	
	Positive	Negative	Positive	Negative
ALL				
NR	3	0	2	1
CR	4	3	4	3
P	NS	NS		
AML				
NR	6	2	6	2
CR	12	8	10	10
P	NS	NS		
Total	25	13	22	16

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; NR, no response; CR, complete remission

였으며, Akt 비발현군 10례 중 완전관해는 8례, 무반응은 2례였다 ($P=0.454$).

2) Akt 발현과 생존율

Akt 발현군과 비발현군의 생존율을 비교하였으며 조혈 모세포이식을 시행 받은 9례의 환자에서는 이식일을 기준으로 전체생존기간과 무병생존기간을 계산하였다 (Table 5). 전체생존기간과 무병생존기간에 있어서 Akt 발현군과 비발현군 간의 Kaplan-Meier 생존 곡선에서 Akt 발현군이 비발현군에 비하여 급성림프구성백혈병과 급성골수성백혈병 모두에서 생존율이 낮았으나 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다 (Fig. 2).

Table 5. Akt expression and survival duration

	Akt expression		P
	Positive (N=24)	Negative (N=13)	
Overall survival (weeks)			
ALL	19 (3-105)	38 (17-48)	NS
AML	21 (0-154)	4 (0-36)	NS
Disease-free survival (weeks)			
ALL	2 (0-44)	33 (14-33)	NS
AML	15 (0-67)	6 (0-78)	NS

Values denote median.
Abbreviations : See Table 4.

고 찰

PI3K-Akt 경로가 세포고사에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려지면서 여러 고형 악성종양 및 악성 혈액질환에서의 Akt 발현 및 활성화와 이의 작용이나 세포생물학적 혹은 임상적 의미에 대해 다각적으로 연구되고 있으나 급성 백혈병 세포에서 Akt가 갖는 의미에 대해서는 알려진 바 없다. Akt는 PKB 혹은 Rac으로도 불리며 IGF-1, EGF 및 basic fibroblast growth factor 등의 다양한 growth factor 와 insulin, interleukin-3, interleukin-6, macrophage-colony stimulating factor 등 생체 내 존재하는 여러 가지 물질에 의해 활성화되며²⁰⁾ 최근 당뇨병이나 혈관질환, 퇴행성 뇌질환 등 다양한 영역에서 세포고사와 관계하여 병인 이전에 중요한 역할을 할 것으로 예측된다.

Akt 발현군 및 phospho-Akt (Ser473) 발현군은 비발현군과 비교했을 때 말초 혈액 백혈구 수치가 의미 있게 증가되어 있었으나 나이, LDH 등의 다른 예후인자에 있어서는 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다.

급성백혈병 환자의 진단 시의 임상 특성 중 염색체 이상은 독립적 예후 인자인데 본 실험의 결과에서 양호한 예후를 보이는 염색체 이상에 속하는 예에서 Akt를 발현하는 경우는 한 예도 없었으며 ($P<0.001$), 불량한 예후를 보일 것

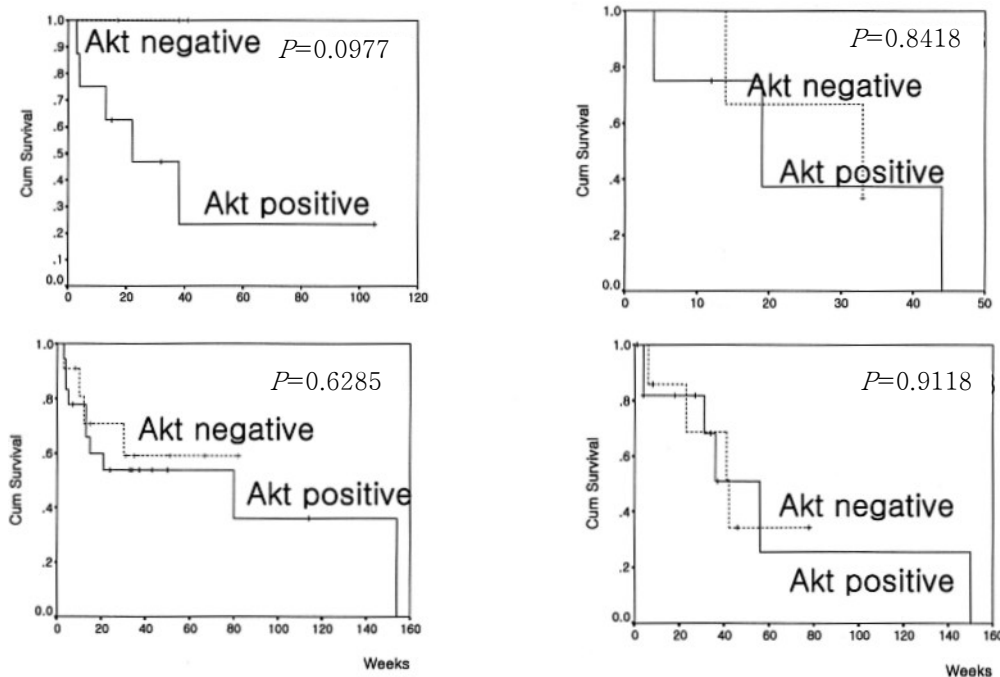


Fig. 2. Graphs showing survival duration according to Akt-expression in ALL and AML patients (Overall survival of ALL, disease free survival of ALL, overall survival of AML and disease free survival of AML, clockwise from the left top). For abbreviations, see Table 4.

으로 생각되는 염색체 이상을 나타낸 8례 중 6례가 Akt 발현군이었고 2례가 Akt 비발현군에 속하였다. 불량한 예후를 나타내는 것으로 알려진 7번 염색체 결실을 보이는 1례의 경우 Akt는 발현하였으나 phospho-Akt (Ser473)는 발현하지 않았으며, Akt 발현군이면서 Akt 비발현군에 속하는 나머지 2례의 핵형은 정상이었다.

Akt와 염색체 이상의 관련성에 대한 보고를 살펴보면 T 세포 림프종에서 14q32를 포함하는 전위가 있는 경우 TCL1A 단백질이 Akt의 pleckstrin 영역에 작용하여 Akt 활성화 보조물질의 역할을 한다고 하며²¹⁾ 10q23.3에 위치하는 PTEN gene product는 Akt를 활성화시키는 PI3K를 낮은 수준으로 유지시켜 Akt의 활성화를 억제하는 암억제유전자로서의 역할을 하므로 이를 포함하는 염색체의 이상은 Akt의 활성화를 가져올 수 있다.¹⁵⁾ 대상 예에서는 Akt 혹은 phospho-Akt 발현군에서 진단명에 특이적인 유전자 이상의 경향은 발견할 수 없었다.

급성백혈병, 특히 급성골수성백혈병에서 예후에 가장 중요한 인자는 초기 치료에 대한 반응이다.²²⁾ 또한 소아기의 백혈병이나 일부 고형 악성종양 중 항암 약물치료를 통해 완전관해가 가능한 것으로 알려진 종양일수록 그 세포의 항암제에 의한 소멸 기전이 세포고사에 의한 것이 현저하며 항암 치료에 대한 예민도는 세포고사 조절인자의 표현 정도와 비례하는 것을 살펴볼 때³⁾ 미래의 항암 약물 치료의 공격점의 하나로 세포사멸 관련 경로를 세울 수 있는 논리적 근거가 될 수 있다. 실제로 PI3K경로 및 Akt 활성을 조절할 수 있는 PTEN의 결핍을 보이는 PTEN null cell에서 PTEN gene reconstruction했을 경우 Akt경로와 관계된 세포고사가 일어남이 관찰되었고 *bcr-abl*을 발현하는 세포주에서 antisense Akt가 세포의 성장을 억제하는 현상이 발표된 바 있다.^{3, 23)}

본 연구의 결과에 의하면 Akt 발현군과 활성화군에서는 비발현군이나 비활성화군과 비교하여 무반응이 차지하는 비율은 상대적으로 높았으나 그 차이는 통계적인 의미는 없었다. 실험적으로는 악성 종양 세포에서 Akt를 활성화시킬 경우 항암 약물이나 방사선 조사 등으로 염기 서열에 손상을 초래하더라도 세포고사에 저항하는 능력을 갖추게 되며 이러한 현상은 손상을 가하는 자극이 이미 일어나고 일정 기간이 경과한 후에도 Akt 활성화가 가능한 조건이 만족될 경우 cytoprotective effect를 유지하여^{18, 24)} 치료 개시 이전에 Akt가 활성화되지 않았던 군에서 치료 중 PI3K/Akt 경로가 활성을 보이면서 불응성을 나타낼 가능성이 있다.

Akt 발현과 급성림프구성백혈병에서의 환자의 생존율의 관계를 살펴보면 Akt 발현군의 총 생존 기간과 무병생존기간은 그 중앙값이 각각 22주, 4주였으며 이 두 군간의 생존

곡선에 통계적으로 의미있는 차이는 없었다($P=0.10, 0.84$). 급성골수성백혈병의 경우에도 Akt 비발현군의 생존 곡선이 우위를 차지하나 Akt 발현군과 비발현군을 비교하여 통계적으로 의미 있는 결과는 얻지 못하였다.

Akt가 임상적 예후에 중요한 진단 당시의 말초 혈액 백혈구 수나 염색체 이상과 의미있는 관계를 가지는 것으로 나타났음에도 불구하고 실제 환자의 생존율에서는 통계적으로 의미를 갖지 못한 것에 대해서 몇 가지 원인을 제시해 볼 수 있다. 이론적으로는 치료 약제에 의해 급성 백혈병 세포의 염기 서열이 손상을 입는 경우에 Akt 활성화가 일어나 세포의 무한생존을 돕는 방향으로 작용한다면 Akt 활성화를 보이는 세포는 항암 약제에도 내성을 가질 가능성이 있으나 본 실험은 환자의 골수에서 진단 당시에 채취한 백혈병 세포를 사용하였으므로 자체적인 Akt의 발현 혹은 활성화를 보이는 기전과 항암 약물 치료에 의해 Akt 활성화가 유도되는 기전은 상이할 수 있다. 이런 동질하지 못한 조건을 극복하기 위해서는 Akt의 활성화를 유도하는 조건이 없는 동일한 환경에서 기존에 Akt 활성을 유도하는 것으로 알려진 성장 촉진 인자나 인슐린 등으로 균일하게 자극한 뒤에 Akt의 활성화 여부를 측정해 볼 수 있겠다. 다른 이유는 통계상의 문제점으로 무작위 추출된 환자군의 임상 경과가 균일하지 못하다는 점이다. Akt 발현군에 비하여 비발현군의 추적관찰 기간이 짧아서 대등한 비교가 어렵고 통계적으로 의미있는 결과를 얻으려고 한다면 더 많은 수의 대상으로 실험을 진행해야 할 것으로 생각된다.

급성백혈병 환자에서 Akt 과발현과 활성화가 기존에 다른 고형 악성 종양에서 알려진 바와 같은 기전에 의한 것인가에 대한 주제에 대해서 앞으로 연구가 진행되어야 할 것이며, Akt의 활성화 기전을 더 객관적으로 확인하기 위해서는 동일한 조건에서의 세포 배양이 시행하여 Akt의 표현 수준을 세포주들 간에 동일하게 하고 혈청 제거 (serum deprivation)로 Akt 활성화를 자극하지 않는 조건에서 phospho-Akt (Ser473) 및 PI3K/Akt 세포신호전달체계에 소속된 단백질의 발현 및 활성화를 측정하고 나아가 PI3K/Akt 경로를 억제하는 물질을 투여한 후 세포고사의 증가 여부와 그에 연관된 세포신호전달체계 관련 물질의 질적, 양적 활성화 정도를 확인하여야 할 것으로 생각된다. 또한 Akt의 활성화가 종양 세포 특이적인 세포 신호 전달 체계의 중요한 물질로 생각되고 대다수의 급성백혈병세포에서 발견되는 현상으로 밝혀질 때 이를 앞으로 항백혈병 약물의 신호전달체계 수준에서의 목표 단백질로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

목적 : Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 경로를 통한 세포고사의 장애는 암세포의 불멸성에 중요한 요소로 생각되는데 이러한 Akt의 과발현과 활성화는 여러 가지 악성 종양에서 확인되어 왔으나 급성백혈병에서는 알려진 바 없다. 이에 저자 등은 급성백혈병 세포에서 Akt의 발현 및 활성화 여부를 확인하고 그 임상적 의미를 고찰하고자 하였다.

방법 : 급성백혈병으로 처음 진단 받은 환자 및 정상 골수 공여자의 골수 세포로 Akt, phospho-Akt (Ser473)와 phospho-Akt (Thr308)에 대한 항체를 사용하여 Western 분석을 시행하였다. 환자의 임상 자료는 의무기록을 통하여 후향적으로 조사하였다.

결과 : Akt의 발현은 총 43례 중 27례 (63%)에서 관찰할 수 있었고 phospho-Akt (Ser473)는 Akt양성인 27례 중 24례 (전체 급성백혈병의 54%)에서 관찰되었다. Phospho-Akt (Ser473)의 발현군은 비발현군에 비해 진단시의 백혈구 수치가 의미있게 높았으며 ($P=0.003$) Akt 발현군에서는 염색체 검사에서 양호한 예후를 보이는 핵형을 가지는 환자는 없었다 ($P=0.001$).

결론 : 급성백혈병 세포에서의 Akt의 과발현 및 활성화를 확인하였으며 관찰되며 Akt의 발현 여부는 진단시 백혈구 수치 및 핵형 등 임상적 예후인자들과 연관성이 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Reed JC: *Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. Curr Opin Oncol* 11:68-75, 1999
- 2) Kaufmann SH, Gores GJ: *Apoptosis in cancer: Cause and cure. Bioassays* 22:1007-1017, 2000
- 3) Sellers WR, Fisher DE: *Apoptosis and cancer drug targeting. J Clin Inves* 104:1655-1661, 1999
- 4) Coffey P, Woodgett J: *Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J* 335:113, 1998
- 5) Wan X, Yokoyama Y, Shinohara A, Takahashi Y, Tamaya T: *PTEN augments staurosporine-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells by down-regulating PI3K/Akt signaling pathway. Cell Death Differ* 9:414-420, 2002
- 6) Curnock AP, Logan MK, Ward SG: *Chemokine signalling: Pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. Immunology* 105:125-136, 2002
- 7) Baldwin AS: *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. J Clin Inves* 107:241-246, 2001
- 8) Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM: *Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. Nature* 398:630-634, 1999
- 9) Falini B: *Anaplastic large cell lymphoma: Pathological, molecular and clinical features. Br J Haematol* 114:741-760, 2001
- 10) Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA: *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J* 15:6541-6551, 1996
- 11) Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science* 282:1318-1321, 1998
- 12) Pap M, Cooper GM: *Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. J Biol Chem* 273:19929-19932, 1998
- 13) Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science* 282:1318-1321, 1998
- 14) Mow BM, Blajeski AL, Chandra J, Kaufmann SH: *Apoptosis and the response to anticancer therapy. Curr Opin Oncol* 13:453-462, 2001
- 15) Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK, Mao L: *Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127:1441-1445, 2001
- 16) Ravandi F, Talpaz M, Kantarjian H, Estrov Z: *Cellular signalling pathways: New targets in leukemia therapy. Br J Haematol* 116:57-77, 2002
- 17) Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF: *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem* 269:5241-5248, 1994
- 18) Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, Lindsay C, Spanswick V, Hartley JA, Wadhwa M, Thorpe R, Hoffbrand V, Prentice HG, Mehta AB: *Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chromic lymphocytic leukemia cells. Br J Haematol* 114:608-615, 2001
- 19) Sedlacek HH: *Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. Drugs* 59:435-476, 2000
- 20) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: *Cellular survival: A play in three Acts. Genes Dev* 13:2905-2927, 1999
- 21) Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC: *Pi3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. Cell* 88:435-437, 1997
- 22) Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI,

Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R: *Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 16:64-67, 1997*

23) Cantley LC, Neel BG: *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by*

restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci 96:4240-4245, 1999

24) Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA: *Akt/PKB is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. Cancer Res 61:3986-3997, 2001*
