

급성 골수구성 백혈병
줄기세포에서 mTOR 발현의
임상적 의의

연세대학교 대학원
의 학 과
이 혜 원

급성 골수구성 백혈병
줄기세포에서 mTOR 발현의
임상적 의의

지도교수 민 유 홍

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 12월

연세대학교 대학원
의 학 과
이 혜 원

이혜원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2007년 12월

감사의 글

그 동안 대학원 과정을 통하여 새로운 학문의 길을 열게 해주시고 본 논문이 완성되기까지 깊은 애정과 자상한 지도로 이끌어 주신 존경하는 민유흥 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 연구 계획 수립과 논문 작업에 각별한 조언을 아끼지 않으신 양우익 교수님, 윤채옥 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 실험과 논문 작업에 있어서 많은 도움을 주신 송재우 교수님, 김유리 선생님, 엄주인 연구원께 감사드립니다. 또한 언제나 옆에서 힘이 되어주는 소중한 내과 동기들과, 저를 낳아주시고 현재의 제가 있기까지 키워주신 사랑하는 부모님께 진심으로 감사드립니다.

저자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	5
II. 대상 및 방법	8
1. 연구 대상	8
가. 백혈병 아세포에서의 mTOR 및 Rheb의 활성화도	8
나. 백혈병 줄기세포에서의 mTOR 활성화도	8
2. 연구 방법	9
가. 검체 준비	9
나. 항체 염색 및 투과	9
다. 유세포 분석	10
라. 정의	10
마. 통계 분석	11
III. 결과	12
1. 백혈병 아세포에서의 mTOR/Rheb 발현	12
가. 대상 환자의 임상 특성	12

나. mTOR/Rheb 유세포 분석 결과	14
다. 임상 경과에 따른 mTOR/Rheb 활성 비교	16
2. 백혈병 줄기세포에서의 mTOR 발현	18
가. 대상 환자의 임상 특성	18
나. mTOR 유세포 분석 결과	20
다. 진단 시 mTOR 활성에 따른 임상 양상 분석	22
라. 진단 및 관해 시의 mTOR 활성 변화	23
IV. 고찰.....	26
V. 결론	30
참고문헌.....	31
영문요약.....	35

그림 차례

Figure 1. Flow cytometric analysis of normal control and AML patients	15
Figure 2. Comparison of mTOR/Rheb expression between normal CD33+ cells, primary AML blasts and AML cell lines	15
Figure 3. Comparison of mTOR/Rheb expression between good and poor response groups	17
Figure 4. Flow cytometric analysis of normal control and AML patients.....	20
Figure 5. Survival analysis of low and high CD34+ CD38- mTOR+ frequency groups	23
Figure 6. Comparison of mTOR fraction and frequency before and after treatment	24
Figure 7. Change of mTOR expression after remission induction chemotherapy	25

표 차례

Table 1. Patient characteristics of mTOR/Rheb analysis in AML blasts	13
Table 2. Patient characteristics of mTOR analysis in AML stem cells	19
Table 3. mTOR+ fraction and frequency in both CD34+ CD38- and CD34+ CD38+ cells	21
Table 4. Comparison of clinical course between low and high CD34+ CD38-mTOR+ frequency groups	23

국문요약

급성 골수구성 백혈병 줄기세포에서

mTOR 발현의 임상적 의의

급성 골수구성 백혈병(AML) 세포에서는 종양 세포의 증식과 고사를 조절하는 여러 가지 신호전달 경로들이 활성화 되어 있다. 그 중에서도 중심 역할을 하는 mammalian target of rapamycin (mTOR) 및 Ras homolog enriched in brain (Rheb) 경로는 백혈병의 치료와 연관하여 많은 관심을 모으고 있으나, 실제 임상 경과와의 연관성에 대해서는 명확히 규명되어 있지 않다. 본 연구에서는 백혈병 아세포 및 줄기세포를 대상으로 mTOR 및 Rheb의 활성도를 유세포 분석법을 이용하여 측정하고 그 임상적 의의를 밝히고자 하였다.

급성 골수구성 백혈병 세포주 5가지와 AML 환자 15명의 백혈병 아세포에서 mTOR와 Rheb의 활성도를 각 물질이 인산화 되어 있는 세포의 빈도로 측정하였다. 세포주에서는 mTOR 활성세포의 빈도가 평균 92.8%였으며 Rheb에서는 79.1%였다. 환자의 백혈병 아세포

(CD33+)에서는 mTOR 5.9%와 Rheb 모두 정상 세포에서의 활성도에 비하여 유의하게 높았다 ($p<0.001$). 이 환자군을 완전 관해에 도달한 군(CR군)과 불응성 반응을 보인 군(non-CR군)으로 분류하여 mTOR와 Rheb의 활성도를 비교해 본 결과, 두 군의 CD33+mTOR+ 및 CD33+ Rheb+ 세포 빈도 모두 통계적 차이가 없었다 ($p=0.263$, $p=0.213$).

백혈병 줄기세포를 대상으로 한 실험에서는 AML 환자 17명의 진단 및 관해 시 채취한 골수에서 CD34+ CD38- 세포 내 mTOR의 인산화 빈도를 측정하였다. 측정된 CD34+ CD38- 세포의 빈도는 19.58% (0.3%-81.6%)이었으며, 그 중 mTOR+ 세포가 차지하는 분율 (mTOR+ /CD34+ CD38- fraction)은 10.31% (0.6%-54.1%)였다. 전체 세포에 대한 CD34+ CD38-mTOR+ 세포의 빈도는 2.52% (0%-30.7%)였다. 동시에 CD34+ CD38+ 세포에서도 mTOR의 활성도를 측정하였고, mTOR+ /CD34+ CD38- 분율은 65.9% (0%-99.1%), CD34+ CD38+ mTOR+ 빈도는 1.4% (0%-17.3%)였다.

백혈병 줄기세포에서 mTOR 발현 양상의 임상적 의의를 살펴보기 위하여 CD34+ CD38-mTOR+ 빈도의 중앙값 (0.48%)을 기준으로 낮은 군과 높은 군으로 분류하여 비교하였다. 1차 관해 유도 치료에 불응성 반응을 보인 환자수는 줄기세포의 mTOR 활성 빈도가 낮은

군에서 1명 (12.5%), 높은 군에서 3명 (32.3%)이었으며 ($p=0.576$), 첫 번째 완전 관해 기간은 각각 117일과 94일로 낮은 군에서 오래 유지되는 경향을 보였다 ($p=0.079$). 생존 분석에서는 무병생존율이 각각 72.9%, 41.6%, 전체 생존율이 48%, 0%로 낮은 군이 높은 군에 비해 우월하였다 ($p=0.31$, $p=0.041$). 이 환자군의 임상경과 중, 관해 유도 치료 전후의 CD34+CD38-mTOR+ 빈도는 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 ($p=0.326$).

본 실험에서는 진단 시의 AML 줄기세포 내 mTOR 활성도는 관해 유지 및 생존과 관련이 있었으며 치료 과정에 있어 예후를 예측하는 중요한 인자로 고려해 볼 수 있었다. 이를 토대로, 백혈병 줄기세포에서 비롯되는 종양의 증식에 mTOR가 중요한 역할을 함을 예상할 수 있으며, mTOR 활성을 조절함으로써 백혈병의 진행을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 급성골수구성 백혈병, mTOR, 백혈병 줄기세포

급성 골수구성 백혈병 줄기세포에서

mTOR 발현의 임상적 의의

< 지도교수 민유홍 >

연세대학교 대학원 의학과

이 혜 원

I. 서론

급성 골수구성 백혈병 (AML)에서는 항암요법 후 많은 수의 환자에서 완전 관해가 유도되나, 재발 또한 빈번하다. 혈액학적 관해 상태에서 미세잔존질환의 유무는 질병의 재발 여부와 밀접한 관련이 있으며, 이의 조기 검출을 위해 여러 가지 세포 표면 물질이나 유전자에 대한 연구가 활발히 시도되고 있다.^{1,2} 이러한 노력의 일환으로 세포 내부의 여러 신호전달 경로 (signal transduction pathway)에 관여하는 단백질 및 전사 인자 (transcription factor)가

세포의 증식 또는 고사 (apoptosis)를 조절하는 데 있어 중요한 역할을 하며, 종양의 증식에도 관여한다는 것이 밝혀졌다.³ 그 중에서도 mammalian target of rapamycin (mTOR)는 serine/threonine kinase로 ribosomal kinase (p70S6K)를 활성화시키고, eukaryotic initiation factor (eIF-4E)를 binding protein인 4E-BP1에서 유리시킴으로써 단백질 합성을 촉진한다. 이러한 과정은 보다 상위 물질인 phosphoinositide3 kinase (PI3K), ras homolog enriched in brain (Rheb) 단백 등에 의해 조절되며, 타 경로와의 교차 활성화 가능성도 밝혀져 있다. 이러한 신호전달 과정은 세포의 성장과 비후를 조절하며 결과적으로 종양 발생과 성장에 있어 중요한 역할을 하여 불량한 예후인자로 작용한다.⁴ 또한, Recher 등이 보고한 바에 의하면 mTOR 억제제인 rapamycin을 급성 골수구성 백혈병 세포에 투약하였을 때 백혈병 세포의 증식이 현저히 감소하였다.⁵

mTOR는 대부분의 급성 골수구성 백혈병세포에서 기본 활성이 증가되어 있다. 그러나, Xu 등의 연구에 따르면 대상 환자의 100%에서 기본 활성이 증가되어 있었으나 각 환자간의 mTOR 활성도의 차이가 뚜렷하지 않아 임상적 의의를 밝히지는 못했다.⁶ mTOR 억제제가 항암효과가 있다는 것은 분명하나, 백혈병 세포의

mTOR의 활성화 획득 단계, mTOR 활성화 정도와 진단 분류나 기존에 알려진 예후 인자들과의 연관성 등에 대한 보다 구체적인 연구가 필요한 실정이다.

최근에는 백혈병 세포 중에서도 종양 증식에 중심 역할을 하는 줄기세포에 대한 개념이 관심을 모으면서 이를 표적으로 보다 효과적으로 암세포를 공격하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 종양 줄기세포는 관해 상태에서도 소수 생존하였다가 다시 증식하면서 질병의 재발에 핵심 역할을 할 것으로 예상된다.⁷ AML에서는 CD34+ CD38- 세포가 줄기세포이며,⁸ 진단 시의 CD34+ CD38- 세포의 빈도는 항암제 저항성 및 질병의 예후와 연관이 있다는 보고가 있다.⁹⁻¹¹ 재생력 및 활발한 증식 능력을 가진 백혈병 줄기세포에서 생존에 관련된 신호전달 경로들은 비정상적으로 활성화되어 있을 것으로 추정할 수 있으나 이에 대한 구체적 연구 결과는 부족하다.¹²

아직 백혈병 줄기세포에서의 mTOR의 발현에 대해서는 확인된 바가 없어, 본 연구에서는 백혈병 세포 중 아세포 및 줄기세포 단계에서의 mTOR 활성도를 확인하고 그 임상적 의의를 분석해보았다.

II. 대상 및 방법

1. 연구대상

가. 백혈병 아세포에서의 mTOR 및 Rheb의 활성화도

2005년 2월부터 2006년 7월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 새로 진단된 급성 골수구성 백혈병 환자 15명을 대상으로 하였다. 정상 세포에서의 mTOR 활성도를 측정하기 위해 2명의 골수 기증자에게서 검체를 얻었으며, 이를 5가지의 AML 세포주 -HL60, THP-1, NB4, KG1, U937 -와 함께 비교하였다.

나. 백혈병 줄기세포에서의 mTOR 활성화도

2001년 1월부터 2007년 5월까지 본원에서 급성 골수구성 백혈병으로 진단된 신환 중, 진단 및 첫 번째 관해 시의 골수 단핵구가 냉동 보존된 17명을 대상으로 하였다. 대조군 설정을 위해 골수 기증자 1명에게서 검체를 채취하였다.

2. 연구방법

가. 검체 준비

세포주를 제외한 모든 검체는 골수에서 얻었으며, 골수 채집 직후 적혈구를 제거하고 단핵구만 분리하여 10% dimethylsulfoxide와 20% fetal bovine serum (FBS) 배지에 넣어 냉동 보관하였다가 실험 직전에 해동하여 PBS로 두 번 세척한 후 사용하였다.

나. 항체 염색 및 투과 (permeabilization)

대상 세포를 0.5% BSA에 섞고 $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/tube가 되도록 분주한 후 세포 표면 물질 (CD33, CD34, CD38)에 대한 항체를 2.5 μ L씩 넣어 염색한 후 30분간 실온에서 반응시키고 세척하였다. mTOR와 Rheb의 활성도를 확인하기 위해서는 세포 내 인산-특이 염색을 시행하였으며, 2% paraformaldehyde (methanol free)로 37°C에서 10분간 고정한 다음 1분간 냉각 후 분리하였다. 이후 세포막 투과를 위해 90% methanol를 첨가한 후 4°C에서 30분간 섞어준 다음 0.5% DPBS 0.1mL를 넣고 10분간 실온 보관하였다. 그 후 1차 항체로 염색하여 30분간 실온에서 배양하였고, 세척하고 나서 2차 항체를 넣고 다시 30분간 실온에서 배양하였다.

다. 유세포 분석

준비된 세포들은 FACS Caliber cytometer (Becton Dickinson)로 분석하였다. 백혈병 아세포의 표지자로 CD33, 줄기세포의 표지자로 CD34와 CD38을 사용하였다. 사용된 항체는 phycoerythrin (PE)가 결합된 anti-CD33, CD34 항체, peridynyl chlorophyllin (PerCP)가 결합된 anti-CD38항체였으며, 세포 내 물질인 mTOR와 Rheb에 대해서는 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 1차 인산-특이 항체를 부착한 후 2차적으로 Alexa-Rabbit 항체를 사용하였다. 백혈병 아세포에서는 CD33+mTOR+, CD33+Rheb+ 세포의 빈도를 two-color fluorescence-activated cell sorting (FACS)으로 측정 하였으며, 백혈병 줄기세포에서는 CD34+CD38-mTOR+ 세포의 빈도를 three-color FACS로 측정 하였다.

라. 정의

AML 아세포는 CD33+, 줄기세포는 CD34+CD38- 표현형을 가지는 세포로 정의하였고, mTOR와 Rheb의 활성화는 대상 세포군 중 각 단백질 인산화 되어 있는 세포의 비율을 백분율로 표시하였다. 줄기세포의 경우, 분석한 단핵세포 전체에 대한 활성 세포의 비율을 CD34+CD38-mTOR+ 빈도 (frequency)로, 줄기세포 중 활성 세포의

비율을 mTOR+ /CD34+ CD38- 분을 (fraction)로 정의하였다.

마. 통계 분석

생존률 비교를 위해서는 Kaplan-Meier survival test를 사용하였고 통계적인 의의를 검사하기 위해서는 log rank test를 사용하였다. 각 항목들을 비교하기 위해서는 chi-square test, student's t-test, person correlation을 사용하였다. 모든 통계 결과는 p-value가 0.05미만인 경우를 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 이상의 모든 통계 분석은 SPSS (Window release Ver. 12.0) package를 사용하여 수행하였다.

III. 결과

1. 백혈병 아세포에서의 mTOR/Rheb 발현

가. 대상 환자의 임상 특성

총 15명의 급성골수구성 백혈병 환자의 검체를 분석하였다 (table 1). 연령은 21세부터 72세까지 분포하였으며, 성별은 남자와 여자가 각각 12명, 3명이었다. FAB 분류는 M1과 M4 각각 3명 (20%), M2와 M3 각각 2명 (13.3%), M5와 M6 각각 1명 (6.7%)이었으며, 골수이형성증이 동반된 2차 백혈병이 3명 (20%)이었다. 진단 시의 염색체 양상은 예후에 따라 양호 (favorable), 중등도 (intermediate), 불량 (poor risk)로 나누었으며, 각각 4명 (26.7%), 9명 (60%), 2명 (13.3%)이었다. 1차 치료 후 8명 (53.3%)에서 완전 관해에 도달하였으며, 6명 (40%)에서 부분 반응 또는 불응성 반응을 보였다. 나머지 1명 (7.7%)의 경우 첫 치료 도중 사망하였다. 전체 관찰 기간은 420일 (11-769일)이었고, 이 기간 동안의 무병 생존율은 50%, 전체 생존율은 54.5%였다.

Table 1. Patient characteristics of mTOR/Rheb analysis in AML blasts

No.	Diagnosis	Age /sex	WBC count at diagnosis (10 ³ /μL)	Chromosome	Response to CTx	HSCT	Last status
1	M1	67 /F	31.27	Intermediate	NR	No	Ref
2	2 nd AML	40 /M	5.00	Poor	NR	uBMT	Death
3	M4	50 /F	23.70	Intermediate	NR	No	Death
4	M1	21 /M	19.26	Poor	NR	Allo/PB	Death
5	M5	43 /M	46.57	Intermediate	NR	No	Death
6	2 nd AML	42 /M	54.96	Intermediate	NR	Allo/PB	Death
7	M2	45 /M	43.66	Intermediate	CR	Auto/PB	CR
8	M6	38 /M	15.91	Intermediate	CR	Allo/BM	Death
9	M4E	33 /M	101.70	Favorable	CR	Allo/BM	CR
10	M3	26 /M	35.78	Favorable	CR	No	CR
11	M1	49 /F	6.38	Intermediate	CR	Allo/PB	CR
12	M4	64 /M	5.29	Favorable	CR	No	CR
13	M2	72 /M	56.40	Favorable	CR	No	NE
14	M3	42 /M	17.02	Favorable	CR	No	CR
15	2 nd AML	39 /M	1.17	Intermediate	CR	No	CR

CTx=chemotherapy, HSCT=hematopoietic stem cell transplantation, NR=no response, CR=complete remission, Ref=refractory, uBMT=unrelated bone marrow transplantation, Allo=allogeneic, PB=peripheral blood, BM=bone marrow, NE=not evaluable.

나. mTOR/Rheb 유세포 분석 결과

각 검체에서 CD33+ mTOR+ 세포와 CD33+ Rheb+ 세포의 빈도를 측정하였다 (figure 1). AML 세포주에서 mTOR와 Rheb의 활성화도 평균값은 각각 92.8% (83.9%-97.0%)과 79.1% (61.3%-89.3%)였다. 정상 골수 내 CD33+ 세포에서는 mTOR와 Rheb 활성화도가 각각 5.9% (3.9%-7.8%), 35.1% (34.6%-35.5%)였으며, AML CD33+ 세포에서는 mTOR 85.46% (31.4%-97.8%), Rheb 95.6% (76.9%-99.8%)이었다 (figure 2). 정상 세포와 AML 세포주 및 AML 환자의 아세포에서의 mTOR와 Rheb 활성도를 비교한 결과, 세포주 및 환자의 아세포에서 통계적으로 유의하게 높았다 ($p < 0.001$).

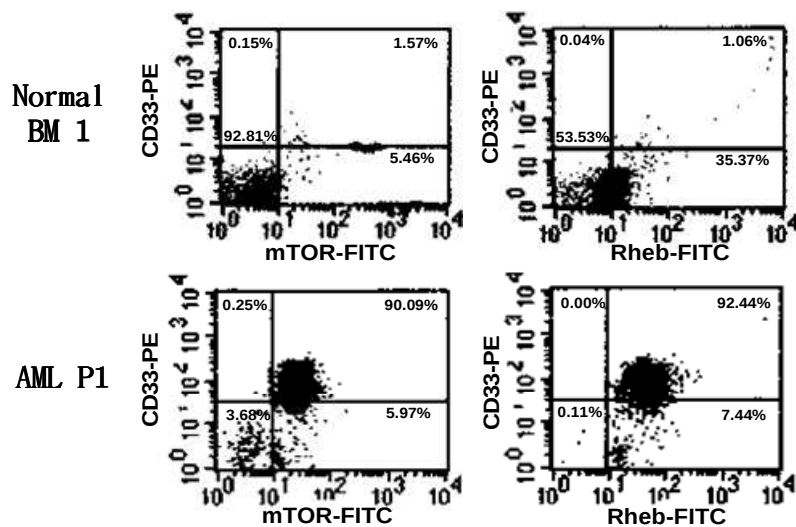


Figure 1. Flow cytometric analysis of normal control and AML patients., BM=bone marrow, P1=patient 1, PE=phycoerythrin, FITC= fluorescein isothiocyanate.

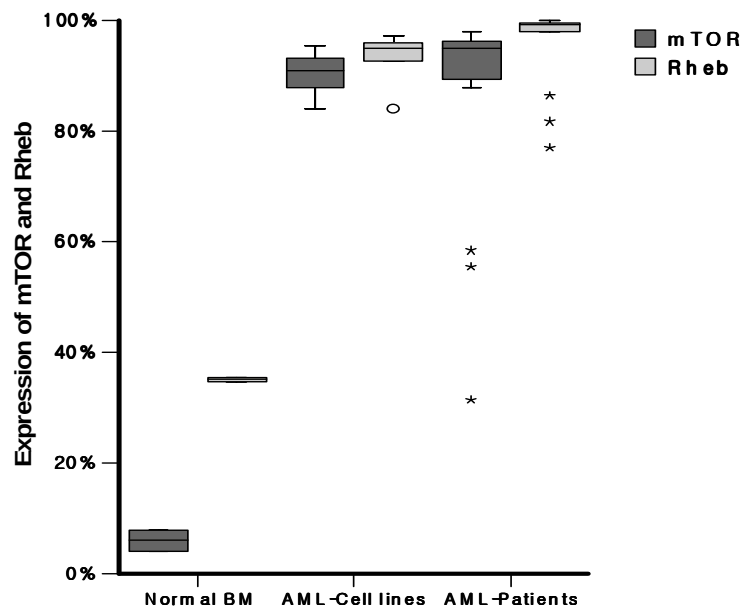


Figure 2. Comparison of mTOR/Rheb expression between normal CD33+ cells, primary AML blasts and AML cell lines.

다. 임상 경과에 따른 mTOR/Rheb 활성 비교

15명의 환자 중 조기 사망으로 인해 치료반응 평가가 불가능하였던 1명을 제외한 14명을 첫 항암치료 후 완전 관해에 도달한 환자군(CR군)과 부분 관해 또는 불응성 반응을 보였던 환자군(non-CR군)으로 나누어 두 군간의 CD33+ mTOR+ 세포의 빈도를 비교하였다. CR군은 8명, non-CR군은 6명이었으며 두 군간 나이, 성별, FAB 분류, 조혈모세포 이식 여부 등 환자 특성의 통계적 차이는 없었다. CR군에서의 무병생존율과 전체 생존율은 모두 87.5%였으며, non-CR군에서는 모두 0%였다 ($p < 0.001$). CR군과 non-CR군에서 CD33+ mTOR+ 세포의 빈도를 비교한 결과, 평균 90.4% (58.3%-97.8%)와 77.4% (31.3%-97.4%)로 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p = 0.263$). Rheb의 경우에도 평균값 97.5% (86.3%-99.8%), 92.2% (76.9%-99.8%)로 두 군의 차이가 없었다 ($p = 0.213$) (figure 3).

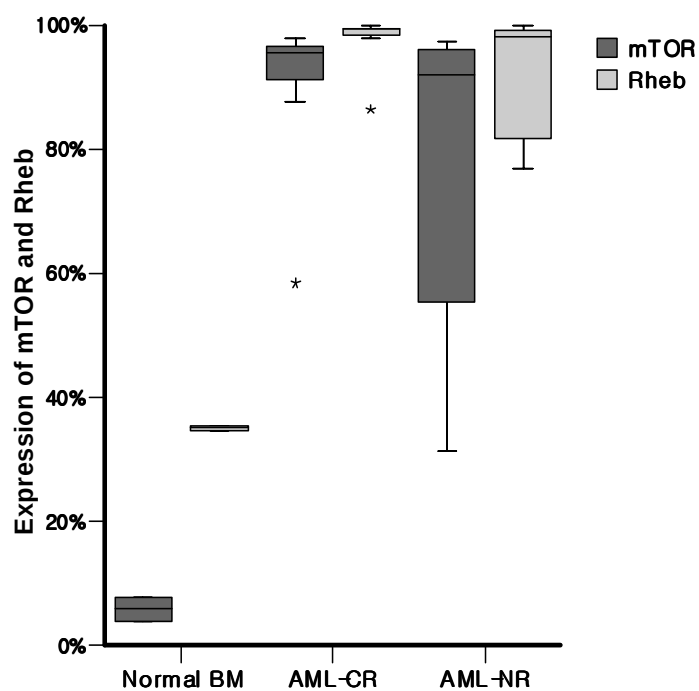


Figure 3. Comparison of mTOR/Rheb expression between good and poor response groups. CR=complete remission, NR=no response.

2. 백혈병 줄기세포에서의 mTOR 발현

가. 대상 환자의 임상 특성

대상 환자는 총 17명으로 연령은 16세에서 67세까지 분포하였고 중앙값 49세였으며 성별은 각각 남자 6명 (35%), 여자 11명 (65%)이었다. 모든 환자는 cytarabine과 idarubicin으로 복합 항암화학요법을 시행 받았고, 치료 후 혈액학적으로 완전 관해를 보인 환자가 13명 (76%)이었다. 나머지 4명은 부분 관해 또는 불응성 반응으로 항암제 저항성을 보였으며, 2~3회의 구제항암치료 후 완전 관해에 도달하였다. 이식을 제외한 총 항암치료 평균 횟수는 2회 (1-4회)였으며, 17명 중 10명 (59%)이 완전 관해 상태에서 조혈모세포 이식을 시행 받았다. 관찰 기간 동안 재발은 4명 (24%), 사망한 환자는 7명 (41%)이었다. 관찰 기간은 252일(46-2480일) 이었고 이 기간 동안의 무병생존율은 64.8%, 전체 생존율은 35.6%였다.

Table 2. Patient characteristics of mTOR analysis in AML stem cells

	Total (n=17)	CD34+ CD38-mTOR+		<i>P</i> *
		Low group ¹ (n=8)	High group ² (n=9)	
Age, median (range)	49 (16-67)	40 (16-63)	52 (27-67)	NS
Gender, n (%)				
Male	6 (35)	2 (25)	4 (44)	NS
Female	11 (65)	6 (75)	5 (56)	
WBC count at diagnosis, 10 ³ /μL, median (range)	10.3 (1.1-13.9.7)	13.8 (1.1-36.8)	10.3 (1.5-139.7)	NS
Extramedullary involvement, n (%)	1 (6)	1 (12.5)	0 (0)	NS
FAB classification, n (%)				
M1	1 (6)	1 (13)	0 (0)	NS
M2	5 (30)	2 (25)	3 (33)	
M4	3 (18)	2 (25)	1 (11)	
M5	3 (18)	1 (13)	2 (23)	
Unclassified	5 (29)	2 (24)	3 (33)	
Chromosome, n (%)				
Favorable	2 (12)	1 (13)	1 (11)	NS
Intermediate	9 (53)	4 (50)	5 (56)	
Poor risk	5 (29)	3 (38)	2 (22)	
No metaphases	1 (6)	0 (0)	1 (11)	
Transplantation, n (%)	10 (60)	6 (75)	4 (44)	NS

RI=remission induction, CR=complete remission, NS=not significant.

^{1,2}Patients were divided into two groups that showed lower or higher CD34+ CD38-mTOR+ cell frequency than median value.

*Comparison of low and high groups.

나. mTOR 유세포 분석 결과

CD34, CD38, mTOR에 대한 유세포 분석을 시행하여 mTOR가 활성화 된 세포의 빈도를 측정하였다 (figure 4). 진단 시의 골수 단핵세포 중 CD34+ CD38- 빈도는 평균 19.58% (0.3%-81.6%)이었으며, mTOR+ /CD34+ CD38- 분율은 평균 10.31% (0.6%-54.1%)이었다. 전체 단핵세포 중 CD34+ CD38-mTOR+ 빈도는 최소 0.03%, 최대 30.71%, 평균값 2.52%, 중앙값 0.48%였다 (table 3).

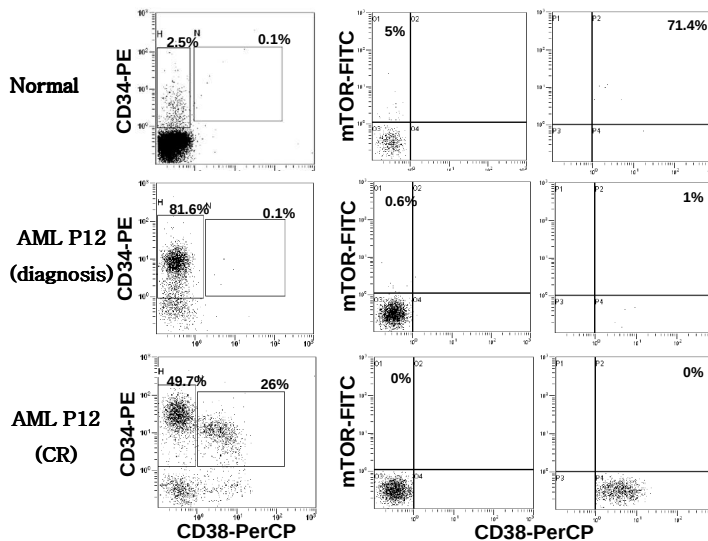


Figure 4. Flow cytometric analysis of normal control and AML patients. CR=complete remission, PE=phycoerythrin, PerCP=peridiny chlorophyllin, FITC= fluorescein isothiocyanate, H=gated CD34+ CD38- cell group, N=gated CD34+ CD38+ cell group

CD34+ CD38+ 세포에 대해서도 동일하게 분석하였다.
 CD34+ CD38+ 세포는 전체 단핵세포의 2.7% (0%-23.4%)이었고
 mTOR+ /CD34+ CD38+ 분율은 평균 65.9% (0%-99.1%),
 CD34+ CD38+ mTOR+ 빈도는 평균 1.4% (0%-17.3%)였다 (table
 3).

Table 3. mTOR fraction and frequency in both CD34+ CD38- and CD34+ CD38+ cells

	% FACS-positive cells' mean (range)			<i>p</i> [*]
	Total (n=17)	Low group¹ (n=8)	High group² (n=9)	
CD34+ CD38- frequency	19.6 (0.3-81.6)	2.5 (0.3-7.2)	34.7 (7.3-81.6)	0.005
mTOR on CD34+ CD38- fraction	10.3 (0.6-54.1)	5.86 (1.2-11.4)	14.26 (0.6-54.1)	NS
CD34+ CD38-mTOR+ frequency	2.5 (0-30.7)	5.86 (0-0.2)	14.27 (0.5-30.7)	NS
CD34+ CD38+ frequency	2.7 (0-23.4)	3.0 (0-23.4)	2.53 (0.1-17.5)	NS
mTOR on CD34+ CD38+ fraction	65.9 (0-99.1)	64.4 (0-93.8)	67.2 (14.3-99.1)	NS
CD34+ CD38+ mTOR+ frequency	1.4 (0-17.3)	0.4 (0-2.5)	2.3 (0-17.3)	NS

FACS=fluorescence-activated cell sorting.

^{1,2}Patients were divided into two groups that showed lower or higher CD34+ CD38-mTOR+ cell frequency than median value.

^{*}Comparison of low and high groups.

다. 진단 시의 mTOR 활성도에 따른 임상 양상 분석

대상 환자 17명을 CD34+ CD38-mTOR+ 빈도의 중앙값 0.48%를 기준으로 두 군으로 분류하였다. 줄기세포 mTOR 활성이 낮은 군 (low group)과 높은 군 (high group)으로 나누어 두 군간의 임상 경과를 분석해 보았다 (table 3). CD34+ CD38- 빈도의 평균은 각각 2.5% (0.3-7.2%), 34.77% (7.3-81.6%)으로 낮은 군에서 더 낮았으며 ($p=0.005$), mTOR+ /CD34+ CD38- 분율은 각각 평균 5.86% (1.2-11.4%), 14.27% (0.6-54.1%)로 낮은 군에서 더 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 ($p=0.234$).

두 군의 진단 시 특성은 통계적 차이가 없었다 (table 3). 임상 경과 중 1차 관해 유도 치료에 대해 부분 관해 및 불응성 반응을 보인 환자는 낮은 군에서 1명 (12%), 높은 군에서 3명(36%)이었으며, 치료 후 첫 번째 완전 관해의 유지기간은 각각 117일과 94일로 낮은 군에서 보다 오래 유지되는 경향을 보였다 ($p=0.079$). 두 군의 무병생존율은 각각 72.9%와 41.6%였으나 통계적 차이를 보이지 않았고, ($p=0.317$), 전체 생존률은 낮은 군에서 48%로 높은 군과 비교하여 유의한 차이를 보였다. ($p=0.041$).

Table 4. Comparison of clinical course between low and high CD34+ CD38-mTOR+ frequency groups

	Total (n=17)	CD34+ CD38-mTOR+		<i>p</i> *
		Low ¹ (n=8)	High ² (n=9)	
Response after RI chemotherapy, n (%)				
CR	13 (76)	7 (88)	6 (67)	NS
Non-CR	4 (24)	1 (12)	3 (33)	
Median CR1 duration, day	110	117	94	0.079
Relapse, n (%)	4 (24.5)	2 (25)	2 (22)	NS
Death, n (%)	7 (41.1)	3 (37)	4 (44)	NS
Disease free survival, %	64.8	72.9	41.6	NS
Overall survival, %	35.6	48.6	0	0.041

RI=remission induction, CR=complete remission, CR1=1st complete remission, NS=not significant

^{1,2}Patients were divided into two groups that showed lower or higher CD34+ CD38-mTOR+ cell frequency than median value.

*Comparison of low and high groups.

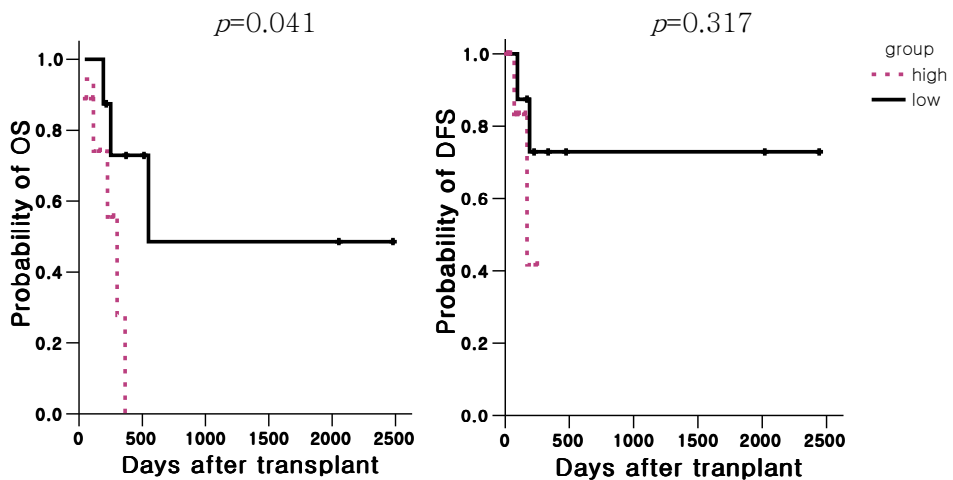


Figure 5. Survival analysis of low and high CD34+ CD38-mTOR+ group. OS=overall survival, DFS=disease free survival.

라. 진단 및 관해 시의 mTOR 활성 변화

관해 유도 치료 후 혈액학적 완전 관해에 도달하였을 때에 잔존하는 CD34+ CD38- 세포에서의 mTOR 활성을 측정하여 진단 시의 값과 비교하였다. 두 시점에서 측정한 CD34+ CD38-mTOR+ 빈도와 mTOR+ /CD34+ CD38- 분율은 치료 전후에 통계적 차이를 보이지 않았다 ($p=0.326$, $p=0.646$) (figure 6). 그러나, CD34+ CD38-mTOR+ 빈도는 총 17명 중 12명 (70.5%)에서 치료 전보다 감소하였으며 (figure 6), 두 시점의 평균은 각각 2.52% (0%-30.71%)과 0.7% (0-0.4%)이었다.

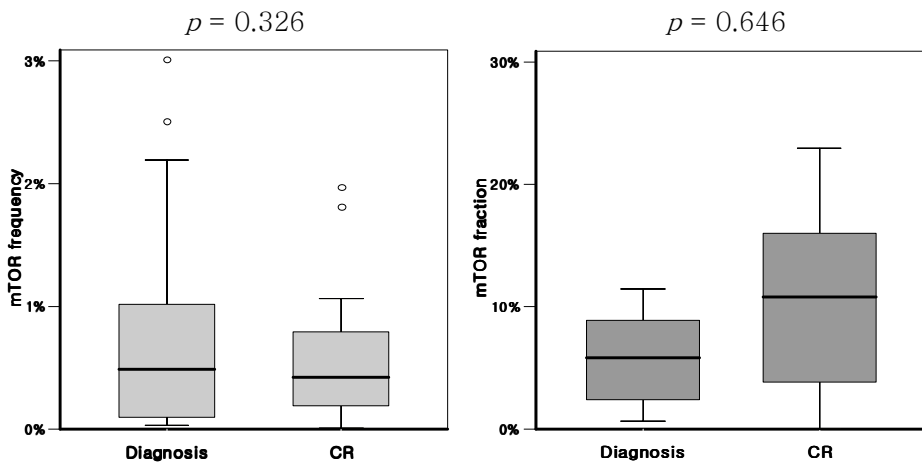


Figure 6. Comparison of CD34+ CD38-mTOR+ cell frequency before and after treatment. CR=complete remission.

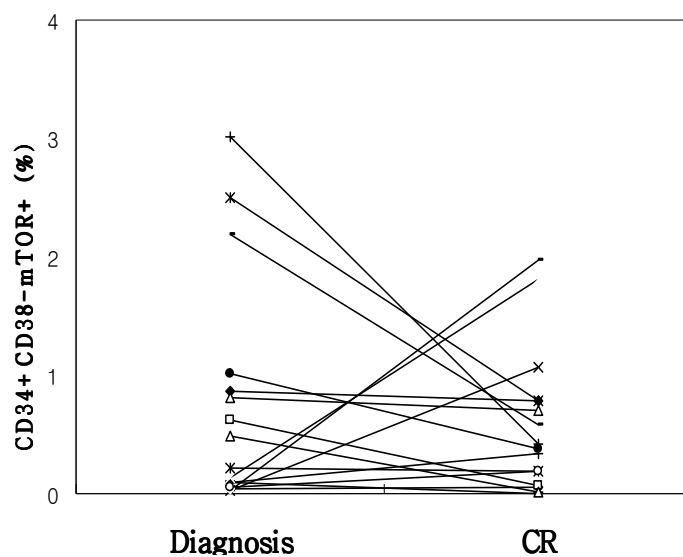


Figure 7. Change of mTOR expression after remission induction chemotherapy. CR=complete remission.

IV. 고찰

본 연구에서는 백혈병 세포에서 mTOR의 기본 활성이 증가되어 있다는 사실을 토대로 하여 mTOR의 활성도 차이가 질병의 예후와 연관성이 있는 지를 알아보고자 하였다. 백혈병 세포주 및 환자의 백혈병 아세포를 대상으로 측정한 mTOR 활성도는 정상 골수 세포와 비교하여 현저히 증가되어 있었다.

백혈병 줄기세포에 해당하는 CD34+ CD38- 세포로 대상 세포군을 달리하여 mTOR 활성을 측정한 결과에서는, 백혈병 아세포만을 대상으로 한 분석에서 mTOR의 활성도가 항암치료 반응과 통계적 연관성을 보이지 않았던 것과는 달리 줄기세포에서의 mTOR 활성도에 따라 관해 유지 기간 및 생존 확률이 차이가 있음을 확인하였다.

급성골수구성 백혈병 세포에서는 mTOR 뿐 아니라 Flt3, PTEN, JAK/STAT, Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt 등 여러 신호전달체계들의 조절 이상이 급성 백혈병의 발생을 촉진하는 것으로 밝혀져 있다.³ 이러한 신호전달 경로는 서로 교차 활성이 일어나고 있으며, 다수의 경로가 동시에 활성화되어 있을 경우 예후가 좋지 않다는 보고가 있다.⁴ mTOR의 경우에도 그 상위에 Akt, TSC1/TSC2 및 Rheb이 있어 이를 통하여 활성화 신호가 전달이 되지만, 활성화된 Akt와

mTOR가 서로를 직접 활성화시킬 수도 있다.³ 따라서, mTOR 활성화의 조절에는 타 신호전달 경로들이 관여할 것으로 예상되고, 이러한 기전에 의해 mTOR 억제제에 대한 내성이 발생할 가능성 있겠으며 이에 대해 보다 많은 연구가 필요하겠다.

본 실험에서는 백혈병 줄기세포의 표지자로 제시된 CD34+ CD38- 표현형뿐 아니라, CD34+ 38+ 세포에서의 mTOR 활성을 동시에 측정하였다. CD34+ CD38- 세포와는 달리 CD34+ CD38+ 세포에서의 mTOR 활성은 mTOR+ fraction과 frequency 모두 임상 경과와 관련성이 없었다. CD34+ CD38+ mTOR+ 세포 빈도를 말초백혈구수로 나누어 보정하여도 역시 예후와는 관련이 없었다. 이를 종합해 볼 때, 모든 백혈병 세포의 mTOR 활성이 예후와 관련이 있는 것은 아니며, CD34+ CD38- 세포에 한하여 종양 증식에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

백혈병 줄기세포의 표지자에 대한 최근 문헌들을 보면 CD123, CLL-1, CD96 등이 CD34+ CD38- 세포 중에서도 백혈병 줄기세포를 구분할 수 있는 특이 표지자로 제시되고 있다.¹³⁻¹⁵ 이를 이용하여 백혈병 줄기세포를 유세포 분석법으로 분리한 후 NOD/SCID mice에서 백혈병이 재현되는 것을 확인한 바 있다.^{14,15} 또한 약제 내성과 연관이 있는 ATP-binding cassette (ABC) drug

transporter가 백혈병 줄기세포에서 발현이 증가되어 있었으며,¹⁶ 이는 백혈병 줄기세포가 항암치료에 대한 저항성을 가지며 미세잔존질환의 진행에 중요한 역할을 할 것임을 시사한다.

본 실험의 결과에서 백혈병 아세포만을 대상으로 한 실험에서는 mTOR가 백혈병 세포의 진단 시에 유의하게 증가되어 있었음을 알 수 있었으며, 예후와의 직접적 연관성을 증명하지 못하였다. 그러나, 줄기세포를 이용한 실험에서는 CD34+ CD38-mTOR+ 세포 빈도가 예후인자로서 의미가 있음이 확인 되었다. 뿐만 아니라, 치료 전후의 활성도를 비교해 보았을 때 완전 관해에 도달 시 이전에 비하여 감소하였다는 점으로 미루어 보아, CD34+ D38-mTOR+ 세포가 종양 증식에 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 예상할 수 있다. 만약 생착 및 종양 시작 능력이 있음이 확인된다면, CD34+ CD38-mTOR+ 세포들의 종양 줄기 세포 내에서의 역할도 밝힐 수 있을 것으로 생각된다. 이로 미루어 보아 진단 시 CD34+ CD38-mTOR+ 세포의 빈도가 높게 나타나는 환자에서는 보다 강도를 높인 항암화학요법을 진행하거나 mTOR 억제제의 적극적인 사용을 고려하는 등 백혈병의 치료에 적용할 수 있을 것이다. 향후 보다 많은 수의 환자를 대상으로 한 연구가 필요하겠다.

본 실험에서 mTOR의 활성을 측정하기 위하여 유세포분석법을

택한 것은 이질성을 띤 세포군에서 각각의 세포의 특성을 규명하는데 유리하기 때문이다. 여러가지 변수의 분석을 동시에 신속히 수행할 수 있으며, 특히 소수의 세포를 검출하는 데 있어 Western blot에 비하여 예민하다. mTOR와 같이 세포 내 단백질의 활성화는 인산화 여부를 검출하여 측정할 수 있는데, 세포 표면 물질의 발현과 동시에 확인할 수 있다는 장점이 있는 반면에 세포 내로 항체가 투과하여 들어가는 과정에서 형광의 변화가 생길 우려가 있다.^{17,18} 본 실험에서는 mTOR가 활성화 되어 있는 세포의 빈도로 분석하였는데, 이러한 유세포 분석의 특성에 유의하여, 각 세포마다의 형광 강도를 정량적으로 분석하여 비교 해 보는 것이 도움이 될 것으로 생각된다.

V. 결론

급성 골수구성 백혈병에서 아세포 및 종양 줄기세포 내 mTOR 및 Rheb 발현의 임상적 의의를 보고자 하였으며, 각 단백질 활성도를 유세포 분석법을 이용하여 측정하였다. 급성 골수구성 백혈병 세포에서는 mTOR와 Rheb의 활성도가 정상에 비하여 현저히 증가되어 있으며, 백혈병 세포 중에서도 특히 CD34+ CD38- 세포의 mTOR 활성화 정도에 따라 관해 유지 기간과 생존율에 차이가 있음을 확인하였다. 이를 토대로 백혈병 줄기 세포에서 비롯되는 종양의 증식에 mTOR가 중요한 역할 할 것으로 예상되며, 중요한 예후 인자 및 표적 치료의 대상으로 고려해 볼 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A, Del Poeta G, Panetta P, Neri B, et al. Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica* 2007;92(5):605-11.
2. Ruiz-Argüelles GJ, Fernández-Lara D, Estrada-Gómez R, Manzano C, Ruiz-Delgado GJ, Pérez-Romano B, et al. Minimal residual disease testing in acute leukemia by flow cytometry immunophenotyping: prognostic significance. *Lab Hematol* 2007;13(1):22-6.
3. Martelli AM, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20(6):911-28.
4. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva M, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2006;108(7):2358-65.

5. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;105(6):2527-34.
6. Xu Q, Thompson JE, Carroll M. mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. *Blood* 2005;106(13):4261-8.
7. Récher C, Dos Santos C, Demur C, Payraastre B. mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell cycle* 2005;4(11):1540-9.
8. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367(6464):645-8.
9. Sutherland HJ, Blair A, Zapf RW. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 1996;87(11):4754-61.
10. Costello R, Mallet F, Chambost H, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, et al. The immunophenotype of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): reduced immunogenicity and

high frequency of CD34+ leukemic progenitors. *Leukemia* 1999;13(10):1513-8.

11. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6520-7.

12. Moore MA, Dorn DC, Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G. Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2007;35(4 Suppl 1):105-16.

13. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000;14(10):1777-84.

14. van Rhenen A, van Dongen GA, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* 2007;110(7):2659-66.

15. Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki

M, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(26):11008-13.

16. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem cells* 2006;24(1):3-12.

17. Krutzik PO, Nolan GP. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry Part A* 2003;55(2):61-70.

18. Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin Immunol* 2004;110(3):206-21.

Abstract

**Clinical Implication of mTOR Expression
in Acute Myelogenous Leukemia stem cells**

Hye Won Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yoo Hong Min)

Recent advances in the understanding of leukemogenesis in acute myelogenous leukemia (AML) showed that several intracellular signal transduction pathways play an important role in controlling the survival, progression and apoptosis of the cell. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is known as the key molecule of the PI3K/Akt pathway and its inhibitor, rapamycin, has been recognized to have a potent anti-tumor effect in AML. However, mTOR is

constitutively activated in most AML cases and the correlation of its expression status with clinical data has not been clearly established. I tried to assess mTOR activation not only in AML blasts but also in AML stem cells to analyze their clinical implication.

The activities of mTOR and Rheb were measured in the target cell by flow cytometric analysis. The mean frequencies of activated mTOR / Rheb were 92.8% / 79.1% in AML cell lines and 85.46% / 95.6% in primary AML blasts. These were higher than the values of normal CD33+ cells (5.9% / 35.1%, $p < 0.001$).

I divided the patients into a good prognosis (CR group) and a poor prognosis group (non-CR group) to assess differences in the activated mTOR/Rheb frequencies of each group. The frequencies of CD33+ mTOR+ / CD33+ Rheb+ cells were not significantly different between two groups ($p = 0.263$, $p = 0.213$).

To assess the mTOR activity in AML stem cells, paired bone marrow samples were obtained both at the time of diagnosis and complete remission from 17 patients. The frequency of total CD34+ CD38- mTOR+ cell was 2.52% (0%-30.7%) and mTOR+ fraction of CD34+ CD38- cell was 10.31% (0.6%-54.1%). In case of

CD34+ CD38+ cell, mTOR+ fraction was 65.9% (0%-99.1%). The frequency of CD34+ CD38+ mTOR+ cell was 1.4% (0%-17.3%) and it was lower than that of CD34+ CD38-mTOR+ cell (p=0.595). In the subanalysis of the patients, lower CD34+ CD38-mTOR+ cell group showed longer duration of complete remission (117 days vs. 94 days, p=0.079), better disease free survival (72.9% vs. 41.6%, p=0.317) and overall survival rate (48.61% vs. 0%, p=0.041). The CD34+ CD38-mTOR+ cell frequencies were decreased after remission induction chemotherapy in 12 cases (70.5%). The average CD34+ CD38-mTOR+ cell frequency was decreased from 2.52% to 0.7% after the treatment (p=0.333).

In conclusion, the results of this study suggest that mTOR activity in AML stem cells at diagnosis correlates with survival of the patient, thus it might be used as a possible prognostic factor. An exogenous modulation of mTOR activity might be an important modality controlling the tumor cell proliferation in AML.

Key words: acute myelogenous leukemia, mTOR, leukemia stem cell