동종 조혈모세포이식 후 생착 평가를 위한 variable number of tandem repeats-polymerase chain reaction (VNTR-PCR)의 유용성

연세대학교 대학원

의과학사업단

정 준 원

동종 조혈모세포이식 후 생착 평가를 위한 variable number of tandem repeats-polymerase chain reaction (VNTR-PCR)의 유용성

지도 고 윤 웅 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

정 준 원

정준원의 석사학위논문을 인준함

심사의원 _____ 인

심사의원 _____ 인

심사의원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

본 논문이 완성되도록 허락하여주신 하나님께 감사 드립니다. 시작부터 끝까지 따뜻한 지도와 변함없는 사랑으로 격려하여주신 고윤웅 교수님께 진심으로 감사 드리며, 애정어린 조언을 아끼지 않으신 민유홍 교수님, 김주항 교수님과 한지숙 교수님께 깊이 감사 드립니다. 자신의 일처럼 마지막까지 큰 힘이 되어주신 이승태 교수님께 늘 감사 드리며, 장준호, 서형찬, 김진석 선생님께도 감사 드립니다. 그리고 실험이 어렵기만 했던 저에게 동료애를 느끼게 해주었던 Enzi Jiang, 이광훈, 김지연, 유종호 선생님께도 감사 드립니다. 떨어져있는 저를 위해 멀리 속초에서 지금도 쉬지 않고 기도하고 계실 아버님, 어머님과 소중한 누나에게 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차례

그림 차례

표 차례

국문요약

동종 조혈모세포이식 후 생착 평가를 위한 variable number of tandem repeats-polymerase chain reaction (VNTR-PCR)의 유용성

동종조혈모세포이식 후 환자의 조혈기능이 일부 잔류하는 상태를 혼합 키메리즘(mixed chimerism)이라 하며, 혼합 키메리즘의 지속 또는 재현이 이식거부반응 또는 재발과 연관되어있다고 알려져 있다. 따라서 키메리즘의 확인은 동종조혈모세포이식 후 이식편의 생착 확인 이외에도 거부반응 및 재발의 가능성 등을 평가할 수 있는 유용한 지표로 생각된다. 동종조혈모세포이식 후 키메리즘 상태를 확인하는 생착검사 중 사람 유전자의 인트론 부위 내에 무작위로 산재해있는 단순반복배열인 microsatellite의 다형성을 이용하여 혼합 키메리즘을 검색하는 variable number of tandem repeats-polymerase chain reaction (VNTR-PCR) 방법은 민감도(0.01-0.1%)가 높으며, DNA 필요량이 적고, DNA 분리과정이 간단하여 기존의 다른 생착검사법에 비해 많은 장점을 가진 방법이다.

본 연구에서는 혈액질환으로 동종조혈모세포이식술을 시행 받은 환자 10례를 대상으로 VNTR-PCR 방법을 이용하여 이식 후 1-4주 간격으로 환자의 키메리즘 상태를 확인하였다. 10례 중 8례에서 이식 후 28일째 완전 키메리즘 상태가 확인되었고 2례에서는 이식 후 14일째 완전 키메리즘이 확인되었다. 1례에서는 이식 후 554일째, 혈액학적 완전관해상태에서 혼합 키메리즘(환자 DNA 53.1%)의 재현이 관찰되어 밀착추적관찰 중이다.

본 연구를 통해 VNTR-PCR 방법이 키메리즘 상태를 확인하고 생착 여부 및 재발 여부를 예측할 수 있는 유용한 방법임을 알 수 있었다.

핵심되는 말: 동종조혈모세포이식술, VNTR-PCR, 혼합 키메리즘

동종 조혈모세포이식 후 생착 평가를 위한 variable number of tandem repeats-polymerase chain reaction (VNTR-PCR)의 유용성

<지도교수 고윤웅>

연세대학교 대학원 의과학사업단

정 준 원

I. 서론

동종조혈모세포이식 후 환자의 조혈기능이 일부 잔류할 수 있다는 증거는 많이 보고되어 왔다[1-6]. 이러한 혼합 키메리즘(mixed chimerism)의 임상적 의미에 대해서는 논란의 여지가 있지만, 백혈병 등의 악성혈액질환에서 동종조혈모세포이식 후 재발하는 경우 혼합 키메리즘의 발현이 선행될 수 있으며, 특히 이식 후 연속적인 생착검사 상 잔류세포가 점진적으로 증가하는 소견을 보이는 경우 재발의 가능성이 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다[7]. 악성 혈액질환 이외에 재생불량성빈혈 및 선천성 면역결핍증 등의 질환에서도 이식 후 환자의 잔류세포가 관찰될 수 있으며 이는 이식거부반응과 연관되어 있다고 제기되어 왔다[8,9]. 따라서 혼합 키메리즘은 동종조혈모세포이식 후 이식편의 생착 확인 이외에도 재발의 가능성 및 거부반응 등을 평가할 수 있는 유용한 지표로 생각된다.

동종조혈모세포이식 후 생착 여부를 확인하기 위하여 사용되었던 기존의 방법으로는 Y-염색체 검출법, 단백질 다형성 검사, 적혈구응집반응 또는 전기영동방법을 이용한 적혈구 동종항원 또는 다형 동위효소의 확인, 염색체 표지자의 핵형 분석법 등이 사용되었으나 민감도가 낮거나 수혈로 인한 세포 및 염색체 오염으로 결과 분석이 어려웠다[10,11].

최근 분자생물학적 기술이 발달하고 사람 유전자의 인트론 부위 내에 무작위로 산재해있는 단순반복배열인 microsatellite의 다형성이 알려지면

서 이 microsatellite이 혼합 키메리즘을 검색하는 유용한 표지자로 사용되고 있다. Microsatellite을 분석하는 방법으로는 Southern blotting 을 이용한 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 과 variable number of tandem repeats-polymerase chain reaction (VNTR-PCR)이 있으며 모두 1% 이하의 민감도를 보이나, 두 방법을 비교한 문헌을 보면 비용과 소요시간 면에서 VNTR-PCR이 Southen blotting과 DNA hybridization을 이용하는 RFLP보다 우수하다고 보고되고 있다[12-15]. 이외에도 VNTR-PCR은 민감도(0.01-0.1%)가 상대적으로 높으며, DNA 필요량이 적고, DNA 분리과정이 간단하며, 파라핀 고정 검체에서도 검사가 가능하고, 제한효소와 방사선 동위원소를 사용하지 않는 장점이 있다.

연구자는 동종 조혈모세포이식 후 1-4주 간격으로 환자의 말초혈액 내 유핵구를 이용한 VNTR-PCR 방법을 사용하여 환자의 키메리즘 상태를 확인함으로써 조혈모세포의 생착, 이식거부 및 재발의 가능성을 조기에 진단하고, 경과를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

1999년 5월부터 2000년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 악성 및 비악성 혈액질환을 진단 받고 동종조혈모세포이식을 시행받은 환자 10례(급성 골수성 백혈병 2례, 급성 림프구성 백혈병 3례, 만성 골수성 백혈병 2례, 중증 재생불량성 빈혈 2례, 골수 이형성 증후군 1례)를 대상으로 하였다. 중증재생불량성 빈혈환자 2례를 제외한 8명의 환자는 전처치로서 전신방사선조사(total body irradiation, 1,320 cGy, 8회 분할조사, 6 cGy/min)와 cyclophosphamide(60mg/kg/day, 2일)가 사용되었으며, 급성이식편대숙수질환 예방법으로 cyclosporin A와 단기 methotrexate(이식 후 1일째 15mg/M^2 IV, 이식 후 3,6,11일째 10mg/M^2 IV) 병용요법이 시행되었다. 모든 환자는 HEPA 여과기가 작동되는 class 100청정도의 laminar air flow room내에서 이식술을 시행 받았으며 장관 decontamination을 위하여 ciprofloxacin 및 fluconazole을 경구섭취 하였고, 단순포진감염 예방을 위하여 acyclovir(15mg/kg/day)를 전처치일로부터 정주하였다. 이식 후 5일째부터 인형 재조합 과립구 집락촉진인자(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, 300μg/M^2/day)를 투여하기 시작하여 생착 후 말초혈액 내 과립구 수치가 1,000/μL 이상으로 3일간 지속될 때까지 투여하였다. 백혈구 생착은 말초혈액 내 과립구 수치가 500/μL이상으로 3일 이상 지속된 시기의 첫째 일로 평가 하였다. 중증재생불량성 빈혈환자 2례는 anti-thymocyte globulin와 cyclophosphamide으로 전처지를 시행 받았으며 다른 처치는 백혈병 환자와 동일하였다.

2. 방법

가. 조혈모세포이식 전 검사

(1) DNA 추출

Qiaamp blood maxi kit(QIAGEN)를 이용하여 동종 조혈모세포이식 이전에 채취한 조혈모세포 공여자 및 환자의 말초혈액 또는 골수검체 내 유핵구의 genomic DNA를 추출하였다.

(2) PCR

1번 과정에서 얻은 조혈모세포 공여자와 환자의 genomic DNA를 이용하여 7개의 primer로 PCR을 시행하였다(Table 1). PCR 방법은 dNTP 각각 200 μM, primer(forward 및 reverse) 20 pmol, Tris-HCl(ph 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Taq DNA polymerase(AmpliTaq Gold; Perkin Elmer, Norwalk, CT,USA) 3 units와 DNA 100 ng 을 PCR 튜브에 넣고 95°C 10분, 94°C 30초/65°C 1분/72°C 30초 – 2회, 94°C 30초/61°C 1분/72°C 30초 – 2회, 94°C 30초/58°C 1분/72°C 30초 – 40회, 72°C 7분, 4°C 유지의 순서로 시행하였으며 7개 primer 모두 동일한 PCR 조건 하에서 시행되었다.

(3) 전기영동

증폭된 PCR 산물로 12% non-denaturating polyacrylamide gel 전기영동을 시행하였다. Gel은 Distilled water:30% polyacrylamide(29:1 acrylamide/bisacryamide):5 X TBE electrophoresis buffer:10% ammonium persulfate:TEMED 를 800:800:400:10:1의 부피비로 혼합하여 제작하였다. 전기영동은 1xTBE 용액을 running buffer로 사용하여 35mA 하에서 2시간동안 시행하였다.

(4) 조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합농도 대 VNTR band 간 관계곡선 유도

전기영동 결과 조혈모세포 공여자에서는 관찰되지않고 환자에서만 VNTR band가 나타나는 primer를 선택하고, 환자의 DNA 가 각각 0%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, 3.2%, 6.4%, 12.5%, 25%, 50%, 75% 및 100%인 혼합물

을 합성하여 조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합물 11종 모두를 대상으로 선택된 primer를 이용하여 동일한 방법으로 PCR를 시행하고 12% denaturating polyacrylamide gel 전기영동을 시행하였다. 구별되는 환자만의 VNTR band의 optical dense를 densitometry로 측정하고 이를 바탕으로 조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합농도 대 VNTR band 간 관계곡선을 유도하였다.

나. 조혈모세포이식 후 생착검사

(1) DNA 추출

이식 후 1-4주 간격으로 환자의 말초혈액을 채취하고 혈액세포 내 유핵구의 DNA를 Qiaamp Blood mini kit(QIAGEN)를 이용하여 추출하였다.

(2) PCR 과 전기영동

조혈모세포이식 전 검사에서 선택되었던 primer를 이용하여 동일한 방법으로 PCR 및 12% non-denaturating polyacrylamide gel 전기영동을 시행하였다.

(3) 조혈모세포 이식 후 환자 DNA의 잔류정도 추정 및 키메리즘 판단

환자의 특징적인 VNTR band가 나타나는지 확인하고 나타나는 경우에는 VNTR band의 optical dense를 측정한 후 이식 전 같은 위치의 band와의 백분율을 구한 후, 이 수치를 이미 유도해 놓은 조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합농도 대 VNTR band 간 관계곡선에 대입하여 채취 당시 환자 DNA의 잔류정도를 추정하고 키메리즘 상태를 판단하였다.

Table 1. Characteristics of primers

Primer	Locus	Product size(bp)	Chromosome No.	No. alleles	Primer sequences 5'>3'
1	D3S3045	176-208	3	7	Forward:ACCAAATGAGACAGTGGCAT Reverse:ATGAGGACGGTTGACATCTG
2	D4S2366	120-144	4	7	Forward:TCCTGACATTCCTAGGGTGA Reverse:AAAACAAATATGGCTCTATCTATCG
3	D12S1064	173-201	12	8	Forward:ACTACTCCAAGGTTCCAGCC Reverse:AATATTGACTTTCTCTTGCTACCC
4	D16S539	148-172	16	12	Forward:GATCCCAAGCTCTTCCTCTT Reverse:ACGTTTGTGTGTGCATCTGT
5	D17S1290	170-210	17	9	Forward:GCCAACAGAGCAAGACTGTC Reverse:CGAAACAGTTAAATGGCCAA
6	D20S481	217-253	20	8	Forward:TGGGTTATGAGTGCACACAG Reverse:AACAGCAAAAAGACACACAGC
7	D22S689	202-230	22	7	Forward:TATGTACAGACCTGCAACTTGC Reverse:CCTGCCTGCCTATCTATCTG

III. 결과

대상환자들은 총 10례이었으며, 남녀비는 1:1(남자 5례, 여자 5례)이었다. 대상환자의 평균연령은 32.6세(19-41세)이었다. 혈액질환으로는 급성골수성백혈병 2례(M2 1례, M3 1례), 급성림프구성백혈병 3례(모두 L2), 골수이형성증후군 1례(RA-EBT), 만성골수성백혈병(만성기) 2례, 그리고 중증재생불량성빈혈이 2례이었다. 이 들 모두는 1999년 5월부터 2000년 12월 사이에 조직형이 일치하는 형제자매로부터 동종조혈모세포이식을 시행 받았으며 급성 백혈병환자 5례는 일차 완전관해상태에서 이식을 시행 받았다. 진단부터 동종조혈모세포이식까지의 평균기간은 7.2개월(1개월-18개월)이었으며, 혈액학적 생착은 이식 후 평균 12.8일(11-20일)에 이루어졌다(Table 2). 6례에서 이식 후 평균 19.8일째(12일-28일)에 Grade Ⅱ 이하의 급성이식편대숙주질환이 피부에 나타났으나 부신피질호르몬 투여 후 호전되었으며, 2000년 12월에 이식술을 시행 받은 1례를 제외한 9례 중 2례에서 만성이식편대숙주질환이 피부에 나타났으며 모두 이식 후 28일째 완전 키메리즘을 획득한 이후 계속적으로 완전 키메리즘 상태를 유지하던 상태에서 발생한 것이었다. 현재까지 10례 모두 혈액학적 완전관해상태를 유지하고 있다.

Primer은 D4S2366이 4례에서, D16S539이 3례에서, D17S1290이 1례에서, 그리고 D22S689이 2례에서 선택되었다. 선택된 primer을 이용하여 각각의 환자에게서 조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합농도 대 VNTR band 간 관계곡선을 유도하였다(Figure 1).

조혈모세포이식 후 생착검사를 위한 혈액채취는 8례에서 4주간격으로 시행하였으며, 최근에 이식을 시행 받아 이식 4주후까지 추적 관찰이 이루어졌던 2례에서는 각각 1주간격, 2주간격으로 조혈모세포이식 후 생착검사가 시행되었다(patient 9, patient 10). 이식 후 4주 이상 추적 관찰하였던 8례 중 3례는 이식 후 196일째까지, 나머지 5례는 각각 이식 후 112일, 554일, 140일, 84일, 56일째까지 시행하였다. 완전 키메리즘은 10례 모두에서 관찰되었고 완전 키메리즘 이전의 혼합 키메리즘 상태도 이식 후 생착검사를 1-2주 간격으로 시행하였던 2례(patient 9,10)에서 관

찰되었다. 이식 후 생착검사를 1주 간격으로 시행하였던 1례(patient 9)에서는 이식 후 7일째에 혼합 키메리즘(환자 DNA 13.7%)이 관찰되었으나 14일째에는 완전 키메리즘을 획득하였고(Figure 4), 2주 간격으로 시행하였던 1례(patient 10)에서는 이식 후 14일째에 혼합 키메리즘(환자 DNA 28.6%)이 관찰되었으나 28일째에는 완전 키메리즘을 획득하였다(Figure 5). 이식 후 14일째에 완전 키메리즘을 획득한 환자(patient 9)는 혈액학적 생착이 이식 후 11일째이었으므로 완전 키메리즘의 획득과 혈액학적 생착의 전후관계를 정확히 알 수 없었고 이식 후 14일째 혼합 키메리즘을 보였던 환자는 혈액학적 생착이 이식 후 12일째에 이루어졌으므로 혈액학적 생착이 완전 키메리즘에 선행하였음을 알 수 있었다. 10례 중 이식 후 첫번째 생착검사가 이식 후 28일째에 시행되었던 8례 모두에서 첫번째 생착검사에서 완전 키메리즘을 보여 완전 키메리즘 획득 전의 혼합 키메리즘 상태를 확인할 수 없었기 때문에 완전 키메리즘으로의 전환이 이식 후 몇 일에 나타나는 지 알 수 없었다. 10례 중 9례에서 최종 추적관찰 시까지 완전 키메리즘 상태가 유지되고 있음을 알 수 있었으나(Figure 2), 이식 후 140일째 생착검사를 시행 받고 이 후 414일간 생착검사를 위한 혈액채취가 이루어지지 못했던 1례(patient 5)에서는 이식 후 140일째까지 유지되었던 완전 키메리즘이 이식 후 554일째에는 혼합 키메리즘(환자 DNA 53.1%)으로 전환되었음이 관찰되었다(Figure 3). 이 환자는 혈액학적으로 정상소견을 유지하고 있음이 확인되었으나 만성 골수성 백혈병환자로 재발의 가능성이 있어 골수검사, 1주 간격의 생착검사 및 *bcr-abl* 확인 검사 등 밀접추적관찰 중이다.

Table 2.Patients characteristics

Patient	Sex/Age	Diagnosis	Type of HSCT	Duration from Diagnosis to HSCT (month)	Donor	Conditioning regimen	Date of Hematologic Engraftment	cGVHD여부
1	F/27	AML(M3)	Allo	5	syster	TBI+Cy	D+12	Yes
2	F/34	MDS	Allo	18	syster	TBI+Cy	D+12	No
3	F/19	ALL(L2)	Allo	4	syster	TBI+Cy	D+11	No
4	F/35	ALL(L2)	Allo	3	syster	TBI+Cy	D+13	No
5	M/41	CML(CP)	Allo	11	brother	TBI+Cy	D+20	No
6	M/35	SAA	Allo	3	brother	ATG+Cy	D+13	No
7	M/41	AML(M2)	Allo	10	syster	TBI+Cy	D+12	No
8	F/37	CML(CP)	Allo	14	brother	TBI+Cy	D+12	Yes
9	M/22	SAA	Allo	1	syster	ATG+Cy	D+11	No
10	M/35	ALL(L2)	Allo	3	brother	TBI+Cy	D+12	N.E

HSCT; hematopoietic stem cell transplantation, cGVHD; chronic graft versus host disease, AML; acute myelogenous leukemia, MDS; myelodysplastic syndrome, ALL; acute lymphocytic leukemia, CML(CL); chronic myelogenous leukemia(chronic phase), SAA; severe aplastic anemia, Allo; allogeneic, TBI; total body irradiation, Cy; cyclophosphamide, ATG; antithymocyte globulin, N.E; not evaluable

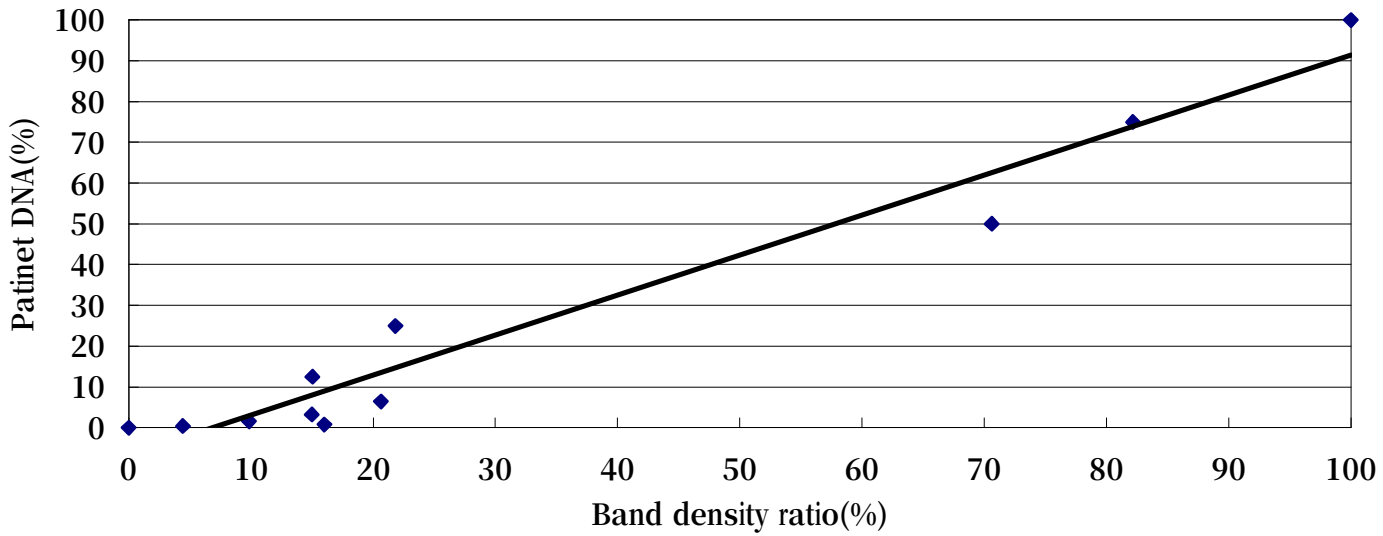

Figure 1. 조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합농도 대 VNTR band 간 관계곡선 및 추세선 (*y=0.9818x - 6.743*)

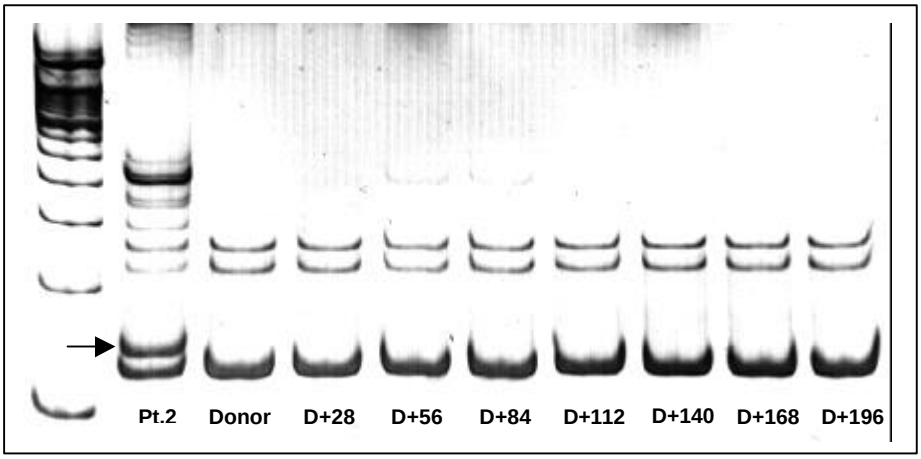

Figure 2. 환자 2의 VNTR-PCR 결과. 이식 후 28일 간격으로 196일까지 생착검사를 시행하였다. 이식 후 28일째 시행한 생착검사 상 환자에서만 관찰되었던 VNTR band(arrow)가 완전히 소실되어 완전 키메리즘이 획득되었음이 확인되었고 이 완전 키메리즘은 이식 후 196일까지 계속 유지되고 있다.

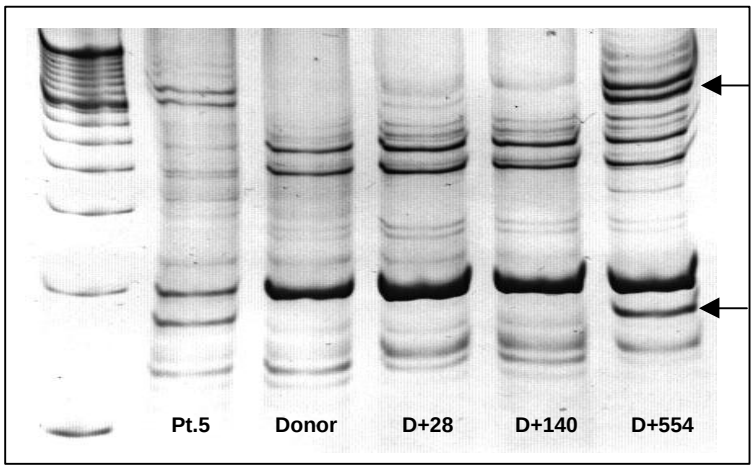

Figure 3. 환자 5의 VNTR-PCR 결과. 이식 후 28일과 140일째에는 완전 키메리즘이 관찰되었으나, 554일째에는 소실되었던 환자의 VNTR band(arrow)가 다시 나타나 혼합 키메리즘(Arrow, 환자 DNA; 53.1%)으로 전환되었다.

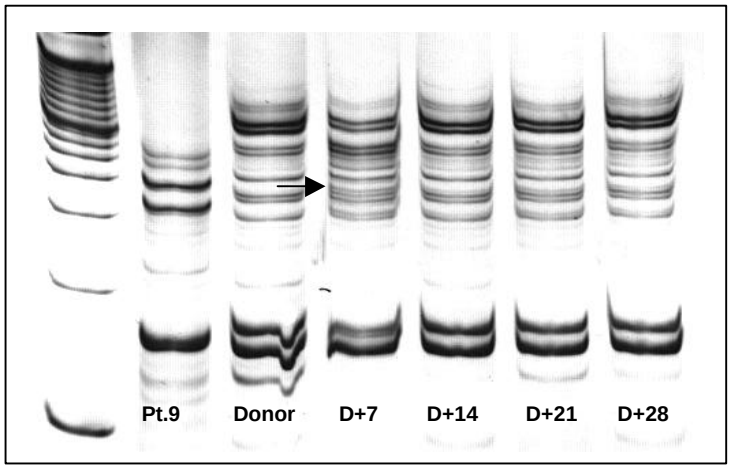

Figure 4. 환자 9의 VNTR-PCR 결과. 이식 후 7일째는 환자의 VNTR band(arrow)가 잔존하는 혼합 키메리즘 상태였으나, 14일째에는 완전 키메리즘을 획득하였다.

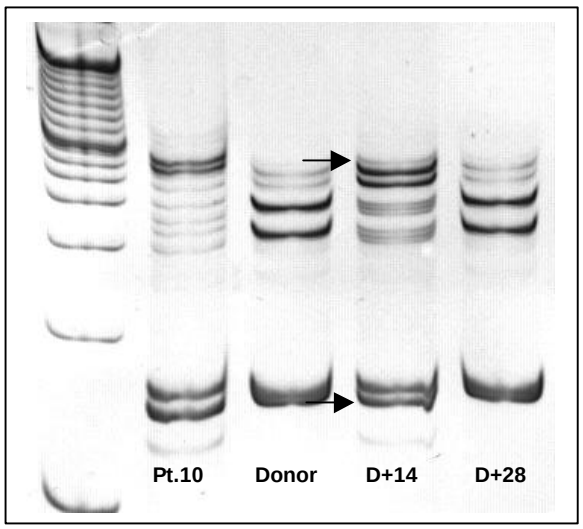

Figure 5. 환자 10의 VNTR-PCR 결과. 이식 후 14일째에는 환자의 VNTR band(arrow)가 잔존하는 혼합 키메리즘 상태였으나, 28일째에는 완전 키메리즘을 획득하였다.

IV. 고찰

동종 조혈모세포이식 후 관찰되는 혼합 키메리즘은 대부분 전처치 후에도 잔존하는 환자의 림프구때문이라고 알려져 있다[15,16]. 이 외에 환자의 CD34+세포도 이식 후 말초혈액에 빈번히 나타나며 이식 후 70일째까지 관찰되어진다고 보고된 바 있다[17]. 그러나 이식 후 공여자의 세포수가 점진적으로 증가하면서 상대적으로 환자의 잔존세포는 일반적인 방법으로는 측정할 수 없는 수준으로 감소하게 되어 세포의 존재여부를 확인할 수 없게 된다. 이 혼합 키메리즘의 임상적 의의에 대해서는 논란의 여지가 있지만, 대부분의 경우, 혼합 키메리즘의 발현이 혈액질환의 재발에 선행되며, 연속적인 생착검사 상 환자의 잔류세포가 점진적으로 증가하는 소견을 보이는 경우 재발의 가능성이 높은 것으로 알려져 있다[7-9].

따라서 동종 조혈모세포이식 시행 후 키메리즘 상태의 확인은 혈액소견의 추적관찰과 함께 환자의 질환 상태를 판단하는 중요한 정보를 제공할 수있다고 생각되므로 본 연구에서는 이 혼합 키메리즘을 확인하는 방법 중, DNA 필요량이 적고, DNA 분리과정이 간단하며, 민감도가 기존의 방법에 비해 높은 VNTR-PCR 방법을 이용하여 동종 조혈모세포이식 후 1-4주 간격으로 환자의 VNTR band를 분석함으로써 키메리즘 상태를 확인하였다.

공여자에서는 관찰되어지지 않고 환자에서만 관찰되는 VNTR band를 보이는 primer를 선택하는 과정은 생착검사의 가장 중요한 단계로 본 연구에서는 PCR 조건이 동일한 7가지 primer를 사용하였다. 환자에서는 관찰되어지지 않고 공여자에서만 관찰되는 VNTR band를 보이는 primer는 환자와 공여자의 DNA 구별은 가능하지만 이식 후 생착검사에서 혼합 키메리즘 정도를 정량화하지 못하기 때문에 적합하지 않다. 본 연구에서는 10례 모두, 7가지 primer 중에 적어도 하나 이상의 primer가 환자와 공여자의 유전자를 구별할 수 있으며 혼합 키메리즘 정도를 정량화 할 수 있는 primer였다. 본 연구에서 사용된 7가지 primer는 모두 동일한 PCR 조건하에서 PCR이 이루어졌기 때문에 PCR 조건이 다른 여러 primer를 이용하는 경우에 비해 실험에 소요되는 시간을 감소시킬 수 있었다. 하지만 7가지 primer 모두가 환자와 공여자의 DNA를 구별할 수 없는 경우를 위해,

동일한 PCR 조건에서 PCR이 가능한 다른 primer의 개발이 반드시 필요하겠다.

조혈모세포 공여자-환자 DNA 혼합농도 대 VNTR band 간 관계곡선은 10예 모두 유사한 곡선을 보여주었다. 이는 환자마다 band 위치는 다를 수 있지만, 공여자에게는 관찰되지 않고 환자에게만 관찰되는 band를 이용하기 때문에, 정해진 혼합비율을 이용한 관계곡선는 환자에 관계없이 동일한 관계곡선이 유도될 것으로 기대되며, 더 많은 수의 환자를 대상으로 하여 공통으로 적용할 수 있는 일반관계곡선의 유도가 필요하겠다. 본 실험에서 사용한 PCR은 반정량적 PCR로 정량화를 위해 log scale의 혼합비율을 사용하였는데, 혼합비율 중 환자의 DNA가 3.2% 이하인 혼합물에서는 측정하려는 VNTR band가 densitometry로 측정할 수 없는 경우가 많아 혼합 키메리즘의 정도가 적은 경우에는 관계곡선의 정확도가 떨어진다. 따라서 관계곡선의 유도에 있어 log scale 혼합물의 유용성에 대한 더 많은 실험이 일반 관계곡선 유도 전에 선행되어야 할 것이다.

동종조혈모세포이식 후 혼합 키메리즘의 출현은 이식 직후부터 시작되어 이식 후 2일에서 8일 사이에 완전 키메리즘이 된다고 보고된 바 있다[18-20]. 본 연구에서 1주간격으로 이식 4주 후까지 생착검사를 시행하였던 1례(patient 9)에서는 D+7에 혼합 키메리즘이 관찰되었고 D+14에는 완전 키메리즘이 관찰되어 D+7과 D+14사이에 완전 키메리즘이 되었음을 알 수 있었고 2주 간격으로 생착검사를 시행하였던 1례(patient 10)에서는 D+14에 혼합 키메리즘이 관찰되었고 D+28에는 완전 키메리즘이 관찰되어 D+14과 D+28사이에 완전 키메리즘이 되었다. 이는 위의 보고와 비교하여 늦게 완전 키메리즘에 도달한 것이지만 1례에 지나지 않아 일반적인 사실로 이야기하기는 어렵다. 본 연구에서 이식 4주째까지 완전 키메리즘에 도달하지 못한 예는 없었지만, 이식 후 완전 키메리즘 및 혈액학적 생착에 도달하였다가 다시 혼합 키메리즘 상태를 거쳐, 환자의 이식 전 VNTR형태로 전환되면서, 혈액학적으로도 재발이 입증되었던 경우에 대한 보고에 의하면 완전 키메리즘에서 환자의 이식 전 상태로 돌아가는데 소요되는 시간이 48시간 정도임을 알 수 있다[18,21]. 이는 완전 키메리즘으로 도달하는데 2-8일이 소요되는 것에 비해서 짧은 시간이 소요됨을 의미한다.

따라서 키메리즘의 변화를 정확히 관찰하고 임상적인 의의를 판단하기위해서는 이식 2주후까지는 생착검사를 2일 이하의 간격으로 시행하고 2주에서 4주까지는 4일-7일 간격으로 시행하여야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서 시행했던 생착검사는 모두 일반적인 동종조혈모세포이식을 시행 받은 환자들을 대상으로한 생착검사이었지만, 혼합 키메리즘의 임상적 의의는 단순한 생차검사로서의 유용성 이 외에도 non-myeloablative stem cell transplantation을 시행 받은 환자들에게서는 키메리즘의 확인이 이식편의 생착 여부나 이식거부 혹은 재발을 조기에 진단하기 위한 목적 이 외에 면역억제치료의 조절 혹은 공여자 림프구투여와 같은 면역치료의 시행여부를 결정하는 중요한 판단기준이 되며, 혈액질환으로 인한 이식술 후 면역관용의 획득과 이식편대종양반응 유발에 중요한 과정으로 알려졌고, 면역관용 현상을 이용하여 골수 외의 장기이식에서 거부반응의 억제에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[22-27].

현재 임상적으로 시행되고있는 VNTR-PCR은 혈액 내 전체 유핵세포를 대상으로한 것이 대부분이었다. 하지만 개별 세포군에 따라 VNTR-PCR의 결과를 비교 분석한 일부 보고에 의하면 세포군에 따른 혼합 키메리즘 출현 시점, 완전 키메리즘 도달 시점 및 재발 시 키메리즘의 변화가 나타나는 시점 등의 차이가 있다고 한다.[28] 따라서 향후 더욱 소량의 세포에서 DNA를 추출할 수 있는 방법 및 다양한 단클론성 항체를 이용한 세포분주법을 이용하여 다양한 세포군의 세포별 키메리즘 변화 및 기저혈액질환에 따른 키메리즘의 차이를 비교하기 위한 많은 연구가 진행되어야 하겠다. 그리고 비혈액질환에서 면역치료의 의미에서 시행되고있는 non-myeloablative stem cell transplantation이 점차 증가하고 있는 바, 기존의 생착검사로서의 VNTR-PCR과 구별된 면역관용의 확인검사로서의 VNTR-PCR의 정립이 필요하겠다. 또한 다양한 장기이식환자들의 이식 후 거부반응을 감소시키기 위한 면역관용유도의 확인검사로서의 VNTR-PCR의 정착이 필요하겠다.

V. 결론

동종조혈모세포이식술을 시행 받은 10례의 환자(급성 골수성 백혈병 2례, 급성 림프구성 백혈병 3례, 만성 골수성 백혈병 2례, 중증 재생불량성 빈혈 2례, 골수 이형성 증후군 1례)에서 이식 후 말초혈액 유핵구를 이용하여 VNTR-PCR방법으로 키메리즘 상태를 확인하여 생착 실패와 거부반응, 재발 등을 예측하고자 하였다.

10례의 대상환자 중 9례에서 이식 후 28일째 시행한 VNTR-PCR검사상 완전 키메리즘이 관찰되었고 1례에서는 이식 후 14일째 완전 키메리즘이 관찰되었다. 6례에서 급성이식편대숙주질환이 발생하였으며 2례에서 만성이식편대숙주질환이 발생하였다. 만성 골수성 백혈병 환자 1례에서 이식 후 554일째 혈액소견은 정상이나 53.1%의 혼합 키메리즘으로 변환된 소견을 보여 재발을 조기에 예측할 수 있는 유용한 추적검사법으로 생각된다.

향 후 이식 초기(4주 이전)에 보다 짧은 간격으로 생착검사를 시행함으로써 혼합 키메리즘이 완전 키메리즘으로 전환되는 역동학을 관찰하고, 보다 다양한 세포군에 대한 개별적인 키메리즘 변화를 알아보기 위한 검사가 필요하다. 또한 non-myeloablative stem cell transplantation을 시행 받는 환자에게 적용할 생착검사에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

IV. 참고문헌

1. Briones J, Urbano-Ispizua A, Rozman C, Marin P, Carreras E, Rovira M, et al. Study of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplatation using PCR amplification of short tandem repeats. Ann Hematol 1996;72:265-8
2. Gaiger A, Mannhalter C, Hinterberger W, Haas O, Marosi C, Kier P, et al. Detection of engraftment and mixed chimerism following bone marrow transplantation using PCR amplification of highly variable region number of tandem repeats(VNTR) in the von Willebrand factor gene. Ann Hematol 1991;63:227-8
3. Mangioni S, Balduzzi A, Rivolta A, Rovelli A, Nese F, Rosso V, et al. Long-term persistence of hemopoietic chimerism following sex-mismatched bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1997;20:969-73
4. Molloy K, Goulden N, Lawler M, Cornish J, Oakhill A, Pamphilon D, et al. Patterns of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia from volunteer unrelated donors. Bone Marrow Transplant 1996;87:3027-31
5. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. Bone Marrow Transplant 1996;18:1161-5
6. van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJ, Khan PM, et al. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. Blood 1994;83:3059-67

7. Sparkes MC, Crist ML, Sparkes RS, Gale RP, Feig SA, UCLA transplantation group. Gene markers in human bone marrow transplantation. Vox Sang 1980:33;414
8. Gomez JR, Garcia MJ, Serrano J, Sanchez J, Falcon M, Castillejo JA, et al. Chimerism analysis in long-term survivor patients after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. Haematologica 1997;82:588-91
9. Andreani M, Manna M, Lucarelli G, Tonucci P, Agostinelli F, Ripalti M, et al. Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia. Blood 1996;87:3494-9
10. Pets LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, De Lange G, Knowlton RG, et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. Blood 1987;70:1331-7
11. de Man AJ, Foolen WJ, van Dijk BA, Kunst VA, de Witte TM. A fluorescent microsphere method for the investigation of erythrocyte chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using antigenic differences. Vox Sang 1988;55:37-41
12. Nuckols JD, Rasheed BK, McGlennen RC, Bigner SH, Stenzel TT. Evaluation of an automated technique for assessment of marrow engraftment after allogeneic bone marrow transplantation using a commercially available kit. Am J Clin Pathol 2000;113:135-40
13. Sreenan JJ, Pettay JD, Tbakhi A, Totos G, Sandhaus LM, Miller ML, et al. The use of amplified variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation. A comparison with restriction fragment length polymorphism (RFLP) by Southern blotting. Am J Clin Pathol 1997;107:292-8
14. Leclair B, Fregeau CJ, Aye MT, Fourney RM. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogeneic transplant: a

comparative study of current technologies. Bone Marrow Transplant 1995;16:43-55

15. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Loffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. Leukemia 1993;7:679-87
16. Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on Hematopoietic chimerism following allogeneic Bone Marrow transplantation in the molecular biology era. Leuk Res 1995;19:497-504
17. Fritsch G, Dubovsky J, Matthes S, Peters C, Buchinger P, Printz D, et al. Flow cytometric monitoring of hematopoietic reconstitution in myeloablated patients following allogeneic transplantation. Cytometry 1999;1:291-305
18. Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. Leukemia 1999;13:2059, 2060-9
19. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Bone Marrow Transplant 1999;23:1055-60
20. Palka G, Di Bartolomeo P, Iacone A, Di Girolamo G, Betti S, Calabress G, Natale D, Stuppia L, Rieve AK, Rimm AA: Cytogenetics and bone marrow transplantation. Cancer Genet Cytogenet 1986;21:147-157
21. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemia allows the

prediction of relapse after allogeneic BMT. Bone Marrow Transpant 1998;21:487-95

22. Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R, Colby C, Toh HC, Multani P, et al. Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies. Biol Blood Marrow Transplant 2000;6:309-20
23. Sachs DH. Mixed chimerism as an approach to transplantation tolerance. Clin Immunol 2000;95:S63-8
24. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. Blood 1999;94:3234-41
25. Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrump D, Leitman S, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. N Engl J Med 2000;343:750-8
26. Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, McAfee S, Sackstein R, Saidman S, et al. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. Transplantation 1999;68:480-4
27. Exner BG, Acholonu IN, Bergheim M, Mueller YM, Ildstad ST. Mixed allogeneic chimerism to induce tolerance to solid organ and cellular grafts. Acta Haematol 1999;101:78-81
28. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasman-Bjork I, Svenberg P, Tammik L, et al. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow

transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. Bone Marrow Transplant 2000;25:843-51

Abstract

Variable number of tandem repeat – polymerase chain reaction(VNTR-PCR) for engraftment evaluation in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

June-Won Cheong

Brain Korea 21 Project for Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yun Woong Ko)

Mixed chimerism are defined as a state of mixture of both donor and recipient cells after allogeneic transplantation. Chimerism analysis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation allows detection of early marrow engraftment, disease relapse, and graft rejection. Among various analytical methods, VNTR-PCR has many theological advantages including increased sensitivity, the use of smaller quantities of DNA, easier preparation of the DNA, faster turnaround time, the elimination of restriction enzymes and radioisotopes, and overall cost reduction.

In this study, ten allogeneic hematopoietic stem cell transplantations in 10 adult patients suffering from different types of leukemia(n=7) or non-malignant hematologic disorders(n=3) were investigated. Patient- and donor-derived hematopoiesis were assessed at 1- to 4-week intervals in peripheral blood samples by VNTR-PCR. In 9 of 10 patients, the complete chimerism

was documented day+28, and 1 patients showed the complete chimerism at day+14. In one CML patient who showed normal hematologic parameters, the reappearance of mixed chimerism(recipient DNA:53.`1%) was documented at day+554.

VNTR-PCR method is a useful analytical method in the detection of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Key Words: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, VNTR-PCR, mixed chimerism