

제4기 신경모세포종에서 Tyrosine Hydroxylase
mRNA RT-PCR을 이용한
미세잔존암 검출의 임상적 의의

연세대학교 대학원

의 학 과

박 송 희

제4기 신경모세포종에서 Tyrosine Hydroxylase
mRNA RT-PCR을 이용한
미세잔존암 검출의 임상적 의의

지도 임 백 근 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

1999년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 송 희

박송희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

1999년 12월 일

감사의 말씀

본 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 노고를 아끼지 않으신 임백근 교수님께 진심으로 감사드립니다. 본 논문을 준비하는 동안 많은 지도편달을 베푸신 김길영 교수님, 유철주 조교수님께 감사드리며 본 연구과정중에 지속적인 협조와 이해를 해주신 임상의학연구센터 연구원 및 암연구소의 김태수선생님께 감사를 드립니다. 끝으로 오늘에 이르기까지 끊임없는 사랑으로 돌봐주신 부모님께 감사드리며 어려울 때 큰 힘이 되어준 남편에게도 고마운 마음을 전합니다.

저자 씀.

차 례

국문요약	1
서 론	4
II. 연구대상 및 방법	8
1. 연구대상 및 검체수집	8
2. 단핵구 분리	9
3. 총RNA의 분리	9
4. cDNA의 합성 및 역전사효소 중합효소 연쇄반응	9
5. 전기영동 및 표적밴드의 검출	10
III. 결과	11
1. 대상환아의 임상적 특성	11
2. 골수 및 조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA RT-PCR 결과	12
3. 수득된 조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA RT-PCR 양성도와 고용량의 항암화학요법 및 말초 조혈모세포이식 결과의 상관관계	15
IV. 고 찰	16
V. 결 론	23
참고문헌	24
영문요약	30

표 차례

표1. 대상 환아의 임상적 특성	11
표2. 신경모세포종 환자의 골수 및 조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA RT-PCR	13
표3. 수득된 조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA nested RT-PCR 양성도와 고용량의 항암제투여 및 조혈모세포 이식 결과의 상관관계	16

그림 차례

그림1. Catecholamine 형성과정	7
그림2. Tyrosine hydroxylase mRNA 유발자의 구조	10
그림3-5. 환아들의 Tyrosine hydroxylase mRNA nested RT-PCR 전기영동 및 표적밴드	13

제4기 신경모세포종에서 Tyrosine Hydroxylase mRNA의 RT-PCR을 이용한 미세잔존암세포 검출의 임상적 의의

신경모세포종은 소아에서 비교적 흔하게 발생하는 고형종양으로서 수술, 항암제 투여 및 방사선치료의 병합으로 치료율이 많이 향상되었으나 이러한 치료방법의 발달에도 불구하고 제4기 신경모세포종은 3년 생존율이 10-15%에 불과하다. 최근에는 이러한 낮은 생존율을 개선하기 위하여 고용량의 항암제 투여 후 말초조혈모세포를 이식하는 방법이 도입되어 그 생존율이 30-40%까지 향상되었으나 아직 만족할 만한 성과를 얻지 못하였으며, 이식 후의 높은 재발율을 낮추는 것이 해결되어야 할 가장 큰 과제로 남아있다. 재발은 주로 수집된 조혈모세포군에 포함된 암세포가 다시 주입됨으로서 일어난다는 것이 과거 여러 연구에서 실험적으로 입증되었고, 이런 암세포의 오염을 줄이는 방법 중의 하나로 CD34 표지자를 이용한 조혈모세포의 선택적 분리가 개발되어 시도되고있다. 저자는 신경모세포종의 세포에서 민감한 양성반응을 보이는 것으로 알려진 tyrosine hydroxylase mRNA의 역전사효소 증합효소연쇄반응(이하 THMR-RT-PCR)으로 신경모세포종 세포의 오염여부를 확인하고자 하였고, CD34 양성세포의 선택적 분리가 암세포 오염 방지에 기여하는 정도를 환자의 경과와 함께 알아보하고자 하였다.

제4기 신경모세포종으로 진단 받은 8명의 환자(남아: 5예, 여아: 3예, 정

중 연령 5년 5개월)를 대상으로 하였는데 이 들에서 채취한 검체는 1) 진단 당시의 골수혈, 2) 3차례의 항암제 투여 후 시행한 골수혈, 3) 항암제와 G-CSF 투여 후 수집한 말초혈액조혈모세포군, 4) CD34 양성세포를 선택적으로 분리 수집한 말초혈액조혈모세포군 이었다.

8예 중 세포도말 검사상 골수의 침범이 없었던 1예는 치료 전 골수의 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었고, 세포도말 검사상 암세포를 볼 수 있었던 7예 중 치료 전 골수에서 THMR-RT-PCR검사가 가능한 3예 모두에서 이 검사가 양성으로 반응하여 THMR-RT-PCR 검사가 신경모세포종 세포를 비교적 예민하게 검출할 수 있는 방법으로 사료되며, 3차례의 항암제 투여 후 시행한 골수 세포도말검사상 8예 모두에서 암세포를 볼 수 없었는데 THMR-RT-PCR 검사가 가능하였던 6예 중 5예는 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었으나 나머지 1예는 이 검사상 양성으로 반응하여 골수 세포도말검사상 암세포가 보이지 않더라도 신경모세포종 세포의 오염 여부를 확인하기 위해 THMR-RT-PCR을 이용한 검사가 필요할 것으로 사료되는바, 이를 바탕으로 보다 정확한 병기 결정, 치료 반응 평가, 조혈모세포이식 시기 결정 및 재발의 조기발견에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

항암제 투여 후 임상소견 및 골수의 세포도말 검사상 완전 관해였으며, 골수혈에 대한 THMR-RT-PCR의 검사 결과도 음성이었던 5예 중 1예는 항암제와 G-CSF를 투여(가동화:mobilization)한 후 말초 조혈모세포에서 THMR-RT-PCR 검사가 양성으로 반응하여 가동화 중 암세포가 출현할 수 있는 것으로 사료된다.

가동화한 후 수집한 말초 조혈모세포의 THMR-RT-PCR 검사상 3예가 양성이었다, 이 중 1예는 CD34 양성세포 선택과정을 거친 후 THMR-RT-PCR 검사상 음성으로 역전되었으나, 1예는 CD34 양성세포의 선택적 분리 후에도 지속적으

로 양성하였고, CD34 양성세포분리 전 말초 조혈모세포의 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었던 5예 중 2예는 CD34 양성세포 분리 후 양성으로 반응하여 CD34 양성세포의 선택적 분리의 효용성을 평가하기 위해서는 좀 더 많은 예를 대상으로 한 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다.

고용량의 항암제투여 및 조혈모세포이식을 시행한 7예에서 모두 백혈구 및 혈소판이 성공적으로 생착되었으나 3예에서 재발하였고, 이중 2예는 CD34 양성세포의 선택적 분리 후 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었음에도 불구하고 재발로 인해 사망하였던 바, 이식되는 말초 조혈모세포군내 신경모세포종 세포의 오염이 없어도 다른 경로를 통하여 재발 될 가능성을 고려할 수 있을 것으로 사료되며, 또한 관찰 기간 동안 재발의 증거 없이 생존하고 있는 4예 중 2예는 CD34 양성세포의 선택적 분리 후 THMR-RT-PCR 검사상 양성이어서 이식된 말초 조혈모세포군내 신경모세포종 세포의 오염으로 인한 재발의 가능성이 있으므로 지속적으로 주의 깊은 추적관찰이 필요할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 신경모세포종, 미세간존암, 조혈모세포이식,
역전사효소 증합효소연쇄반응

제4기 신경모세포종에서 Tyrosine Hydroxylase mRNA RT-PCR을 이용한 미세잔존암세포검출의 임상적의의

< 지도 임 백 근 교수 >

연세대학교 대학원 의학과

박 송 희

I . 서 론

신경모세포종(neuroblastoma)은 중추신경계 종양을 제외하고 소아에서 일어나는 가장 흔한 악성 고형종양으로서 매년 소아인구 백만명당 7-10명씩 발생하며, 환자의 40%이상에서 진단 당시 이미 제 4기로 발견되어 예후가 매우 불량하고, 3년 무병생존율이 10-20%이하이며, 치료 중이거나 치료 후에 골수 재발이 흔한 것으로 보고되어 있다^{1,2}. 그러므로 치료 중 혹은 치료 후에 골수 및 말초혈액에서 신경모세포종 세포를 조기에 발견하는 것은 재발을 예견하며 조기에 적극적인 치료가 가능하여 생존율 향상에 많은 도움을 줄 수 있다³. 또한 치료 전 말초혈액 및 골수에서 미세전이(micrometastasis)의 발견이 가능해 정확한 병기의 결정 및 치료의 방향을 결정하는 데 많은 정보를 줄 수 있고, 제 4기의 신경모세포종에서 시행되고 있는 말초조혈모세포이식의 경우 조혈모세포 수득시에 암세포의 오염을 확인하여 과연 수득된 조혈모세포가 이식에 사용 가능한지 여부를 결정하는데 객관적인 자료를 제공해줄 수 있어 그 의의가 매우 크다고 하겠다³.

현재 신경모세포종의 골수전이를 진단하기 위해 사용하고 있는 방법에는 조직 및 세포학적 방법(histological and cytological methods), 생화학적 방

법(biochemical method), 면역화학적 방법(immunohistochemical method)이 있다⁴⁻¹⁰. 조직학적 방법에 의존해서 진단하는 경우, 암세포와 골수의 조혈세포를 모양으로 구분하는 것이 매우 어려우며, 특히 적은 수의 암세포가 있을 경우에는 보지 못하는 경우가 있어 이러한 세포모양에 의존하는 검사만으로는 진단에 이용하기 어려운 단점이 있다. 단일클론 항체를 사용한 면역화학 염색(immunostaining)방법을 이용하여 신경모세포종 암세포를 검출하는 경우에는 10^5 - 10^6 개중의 하나의 암세포 오염을 검출할 수 있는 민감한 방법의 하나이지만 염색의 기술 및 정도에 따라 그 민감도가 변할 수 있으며, 양성으로 판독하는 객관성의 결여로 믿을만한 진단적 가치를 제공받지 못하는 단점이 있다⁶. 반면에 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR)은 특정한 유전자를 증폭시켜서 10^5 - 10^6 개중 하나의 암세포 오염도 검출할 정도로 민감도와 특이도가 높아 특정유전자를 포함하고 있는 암에서는 간단하고 정확하게 이용할 수 있는 장점을 지니고 있다⁸. 또한 신경모세포종은 교감신경계에서 발생하는 종양으로서 모든 환자에서 catecholamine의 형성이 증가되며, tyrosine hydroxylase는 catecholamine형성시 첫 단계에 관여하는 효소로서, 정상 조혈모세포와 신경모세포종을 감별할 수 있는 방법으로 사용이 가능하다(그림 1)^{1,8}. 민감도가 높은 중합효소연쇄반응과 신경모세포종 세포에 특이도가 높은 tyrosine hydroxylase mRNA를 이용하여 tyrosine hydroxylase mRNA의 역전사 효소중합효소연쇄반응(이하 THMR-RT-PCR)이 개발되었고, 이 방법은 골수 및 말초혈액에서 신경모세포종 세포를 검출하며, 신경모세포종의 미세전이를 진단하기 위한 객관적인 방법의 하나로 그 가치가 인정되고 있다^{8,9}.

최근에는 제 4기의 신경모세포종의 생존율을 향상시키기 위하여 고용량의 항암제 투여 후 조혈모세포이식을 시행하고 있으나^{11,12} 주입된 조혈모세포 내에 포함된 암세포의 오염으로 인해 재발이 발생할 수 있음이 밝혀져 오염되지

많은 조혈모세포만을 선택적으로 분리하여 이식하는 방법이 시행되었다^{13,14,15}. 최근의 한 연구에서 CD34양성세포의 선택적 분리 전후의 암세포 오염정도를 비교하여 그 효용성을 비교하고 선택적 분리 후에도 암세포의 오염이 발견될 수 있음을 보고한 바 있다¹⁶. 한국에서도 tyrosine hydroxylase mRNA의 RT PCR을 이용하여 신경모세포종의 미세잔존암세포를 검출하고자하는 노력은 있었으나 고용량의 항암제 투여를 위해서 수집한 조혈모세포 및 CD34양성세포의 선택적 분리 후의 조혈모세포에서 미세잔존암세포 검출에 대해서는 아직 보고된 바 없다¹⁷.

이에 저자는 첫째, 신경모세포종 세포를 검출하는데 tyrosine hydroxylase mRNA에 대한 역전사효소 중합효소 연쇄반응(THMR-RT-PCR : tyrosine hydroxylase mRNA reverse transcriptase polymerase chain reaction)의 임상적 유용성을 분석하고자 하였으며, 둘째, 암세포의 오염을 줄이기 위해 사용되고 있는 조혈모세포(CD34 양성세포)에 대한 양성 선택적 분리의 효용성을 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

CATECHOLAMINE METABOLISM

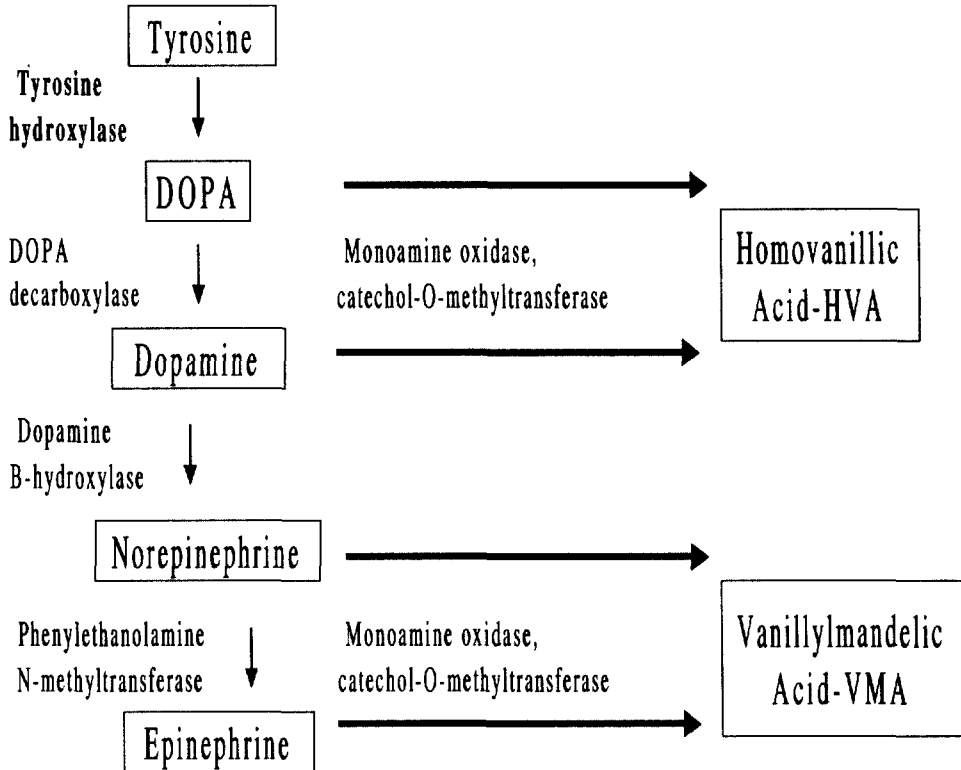


그림 1. Catecholamine의 형성과정. Tyrosine hydroxylase는 catecholamine 형성과정의 첫 단계에 작용한다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상 및 검체 수집

1996년 8월부터 1999년 5월까지 연세대학교 의료원 신촌세브란스병원 소아과에 내원하여 제4기의 신경모세포종으로 진단받은 8명의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 병기의 결정은 INSS(international neuroblastoma staging system)의 기준에 준하였다. 모든 환자들에서 CCG(children's cancer group)321P4 protocol에 따라 항암제를 투여하였으며, 치료 후 종양의 존재유무를 평가하기 위하여 추적 방사선 검사 및 24시간 소변내 VMA(vanillmandelic acid)/HVA(homovanillic acid)양을 측정하였으며, 혈청내에서 NSE(neuron specific enolase)를 측정하여 수치가 정상으로 회복되고, 복부 전산화단층 촬영 또는 자기공명영상검사상 종괴가 관찰되지 않는 경우를 임상적 관해(clinical remission)로 정의하였다.

환자들의 진단 당시와 항암제 투여 후 시행한 골수를 EDTA tube에 3ml 채혈하여 실험에 이용하였고, 임상적 관해시에 항암제와 G-CSF(Granulocyte-colony stimulating factor, $10\mu\text{g}/\text{kg}$)로 가동화 한 후 말초혈액 내 총 백혈구수가 $3,000/\mu\text{l}$ 이상 되는 시기에 말초 조혈모세포를 수집하였으며, 두 차례 이상의 조혈모세포를 수집하였다. 조혈모세포는 CD34양성세포수가 $1 \times 10^6/\text{kg}$ 이상이 수득될 때까지 시행하였으며, 백혈구 분반술은 Fenwall CS 3000(Baxter, Round Lake, IL)이나 Cobe Spectra separator (Cobe, Lakewood, CO) 를 사용하였다. 2차 수득한 조혈모세포는 암세포를 제거하기 위하여 Avidin-biotin 흡착을 이용한 장비(Ceprate system, CellPro, Bothell, WA)를 사용하여 CD34 양성 세포만 선택적으로 분리하였다. 수득된 조혈모세포는 이식할 때까지 -230°C 의 액체질소에 보관하였다.

2. 단핵구 분리

채취된 골수혈 및 말초혈액 조혈모세포는 EDTA tube에 각각 3 ml씩 수집하여 15ml Falcon tube에 넣은 후 Ficoll Hypaque(Pharmacia Biotech, Sweden)를 넣고 2000rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 Buffy coat를 분리한 후 PBS(phosphate buffered saline, Gibco BRL, USA)와 혼합한 뒤 다시 2000rpm에서 20분간 원심분리한 후 단핵세포를 수득하였다. 신경모세포종 세포주인 IMR32를 양성대조군으로 하였으며 정상 골수의 단핵구를 음성대조군으로 하였다.

3. 총 RNA 분리

분리된 세포는 RBC lysis buffer(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 적혈구를 제거한 후 RNA isolation kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA의 정량(concentration) 및 순수도(purity)는 흡광기(spectrophotometry)로 측정하였다.

4. cDNA합성 및 증합효소연쇄반응 (PCR: polymerase chain reaction)

RNA는 cDNA 총량이 100 μ l가 되게 역전사효소(reverse transcriptase, Gibco BRL, USA)를 사용하여 전환시켰다. 분리된 RNA 50 μ l에 1.25M DNTP, 1.5M DTT, DEPC water, 증합효소연쇄반응 완충액, random 6 mer, RNase inhibitor 및 역전사효소를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 1차 PCR 은 5U의 Taq-DNA-polymerase(Boehringer Mannheim, Germany)와 10XPCR 완충액을 사용하여 50 pmole의 primer A (sense: 5'-TGTCAGAGCTGGACAAGT-3', exon 5에 상보적)와 primer B(antisense: 5'-GATATGTGTCTTCCCGGTAGC-3'; axon 8에 상보적)를 이용하였다(그림 2). 증합

효소연쇄반응은 denaturation은 96℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, 그리고 extension은 72℃에서 2분을 하는 3단계로 구성되었으며 30회 반복하여 시행하였다. 1차 중합효소연쇄반응 산물중 10 μ l를 취하여 2차 중합효소연쇄반응(n-PCR , nested PCR)을 시행하였다. 2차 중합효소연쇄반응은 2.5U의 Taq polymerase , 10X 중합효소반응 완충액, 1.25mM DNTP를 사용하여 50 pmole의 Primer C(sense: 5'-GTTCGACCCTGACCTGGACT-3')와 primer D (antisense: 5'-TGTA CTGGAAGCGATCTCA-3')을 이용하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 1차 반응과 같았다.

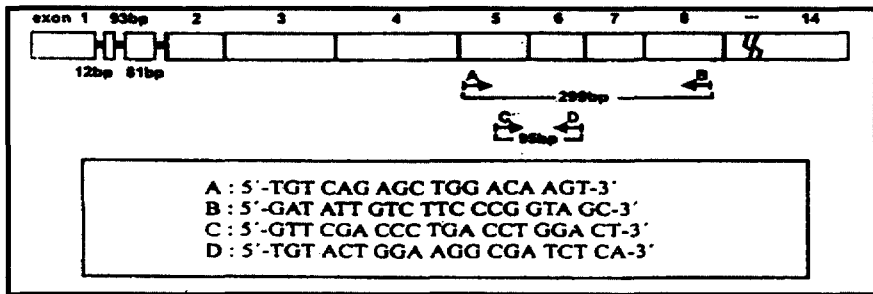


그림 2. tyrosine hydroxylase mRNA RT PCR을 위해서 사용된 유발자. AB는 각각 첫 번째 중합효소 연쇄반응에 이용하였으며 CD는 각각 두 번째 중합효소연쇄반응에 이용하였다.

5. 전기영동 및 표적밴드 확인

2차 중합효소반응 산물의 20 μ l와 6X loading dye를 mix하여 1.2% Argarose gel에서 전기영동(electrophoresis)하여 95 base pair(bp)크기의 표적밴드를 확인하였다. 종양세포가 양성으로 검출되는 것은 양성대조군과 같은 위치에서 band가 관찰되는 것으로 정의하였다.

III. 결 과

1. 대상환아의 임상적 특성

8명의 신경모세포종 환아 중 여아가 3명, 남아가 5명이었다. 모든 환아의 병기는 제 4기였고 골 전이는 있으나 골수의 침범이 없었던 1명을 제외한 나머지 7명에서는 골수 침범이 있었다. 수술 전 CCG321P4에 의한 항암화학요법을 시행받고, 항암제 투여 후 종양의 크기가 줄어 수술의 적응증이 되었던 환자들 7예 중 6예는 종괴를 완전 적출하였으며, 종양이 임파절을 침범한 6예는 방사선 치료도 병행하였다(표 1).

표 1. 대상 환자의 임상적 특성

번호	연령(개월)	성별	원발종양부위	치료	전이장기
1	5년9개월	여	부신 (좌)	화학요법, 완전적출, 방사선치료	골, 골수
2	5년4개월	남	부신 (우)	화학요법, 완전적출, 방사선치료	골, 골수
3	5년4개월	남	요추	화학요법, 방사선치료	골, 골수
4	4년3개월	여	부신 (우)	화학요법, 완전적출, 방사선치료	골
5	5년6개월	남	후종격동	화학요법, 부분적출, 방사선치료	골, 골수
6	6년2개월	남	부신 (좌)	화학요법, 완전적출, 방사선치료	골, 골수, 간
7	16년3개월	남	부신 (좌)	화학요법, 완전적출	골, 골수
8	2년3개월	여	부신 (우)	화학요법, 완전적출	골, 골수

2. 골수 및 조혈모세포의 Tyrosine hydroxylase mRNA RT-PCR 결과(표2)

골수의 세포도말 검사상 골수의 침범이 없었던 4번 예는 진단 당시의 골수, 항암제 투여 후의 골수, 치료 및 가동화 후 수집한 말초 조혈모세포 및 CD34 양성세포 수득 후의 말초 조혈모세포 모두에서 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었고, 진단 당시 골수에서 THMR-RT-PCR의 시행이 가능하였던 3예(2, 6, 7번 예)는 tyrosine hydroxylase(TH) mRNA가 검출(양성)되었다(그림 3) 이 들 3예 모두 항암제 투여 후 골수에서 THMR-RT-PCR 검사가 가능하였고, 항암 치료 전 양성결과가 음성으로 역전되었다(그림4). 치료 전 골수에서 THMR-RT-PCR 검사가 불가능하였으나 항암제 투여 후의 골수에서는 이 검사가 가능하였던 8번 예는 임상적 검사결과가 관해에 합당하였고, 골수의 세포도말 검사상 암세포가 검출되지 않아 임상적 관해에 도달한 것으로 생각하였으나 항암제 투여 후의 THMR-RT-PCR 검사상 양성으로 검출되었다.

항암제와 G-CSF 처치를 한 후 채취한 말초조혈모세포 8예 중 3예(37.5% 2, 3, 8번 예)에서 tyrosin hydroxylase mRNA가 검출되었는데, 2번 예는 항암제 투여 후 골수에 대한 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었으나 항암제와 G-CSF 가동화 후 말초 조혈모세포에서 양성으로 나타났고(그림4), 8번 예는 항암제와 G-CSF 가동화 후에도 지속적으로 THMR-RT-PCR 검사상 양성이었다.

CD34양성세포를 선택적으로 분리한 후의 조혈모세포에서는 7예 중 3예에서 양성(42.8%)이었고, 2번 예는 CD34양성세포의 선택적 분리 후 THMR-RT-PCR 검사상 음성으로 역전되었다. 3번 예는 분리전후 모두 THMR-RT-PCR 검사상 양성이었으며, 6번과 7번 예에서는 CD34 양성 세포 분리 전에는 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었는데 분리 후에는 양성이었다(그림5).

표 2. 신경모세포종 환자의 골수 및 조혈모세포에서 tyrosine hydroxylase mRNA RT-PCR 결과

환자번호	PTBM	PCTBM	PBSC	CD34+PBSC
1	NA	NA	-	-
2	+	-	+	-
3	NA	NA	+	+
4	-	-	-	-
5	NA	-	-	-
6	+	-	-	+
7	+	-	-	+
8	NA	+	+	NA

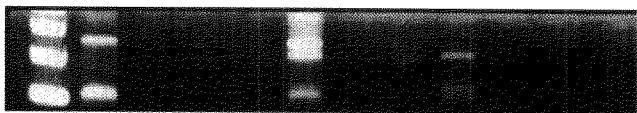
주) NA : non-assessible (시행하지 못한 경우)

PTBM : pretreatment bone marrow

PCTBM : posttreatment bone marrow

PBSC : peripheral blood stem cells after chemotherapy and G-CSF treatment

CD34+PBSC : CD 34 positive peripheral blood stem cells

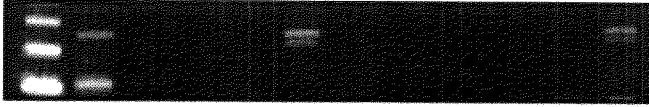


a b c d

그림 3. 환자들의 tyrosine hydroxylase mRNA 의 nested RT-PCR 전기영동.

a : Molecular marker b : 양성대조세포

c : 2번 환자의 진단 당시의 골수 d : 6번 환자의 진단 당시의 골수



a b c d e f g

그림 4. Tyrosine hydroxylase mRNA의 nested RT-PCR 전기영동.

a : Molecular marker b : 양성대조세포

c, d : 2번, 6번 환자의 항암제 치료 후 골수 (음성으로 역전)

e : 2번 환자의 가동화된 말초조혈모세포

f : 2번 환자의 CD34선택적 분리 후 말초 조혈모세포(음성으로 역전됨)

g : 3번 환자의 가동화된 말초 조혈모세포 (CD34 양성세포의 분리 후에도 계속 양성으로 검출됨)



a b c d

그림 5. Tyrosine hydroxylase mRNA의 nested RT-PCR 전기영동.

a : Molecular marker b : 양성대조세포

c : 7번환아의 가동화된 말초 조혈모세포

d : 7번 환아의 CD34 선택적 분리 후의 말초 조혈모세포

3. 말초 조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA 양성도와 고용량의 항암제 투여 및 자가 말초조혈모세포이식 결과와의 비교

고용량의 항암제 및 전신 방사선 치료를 한 후 말초혈액조혈모세포 이식을 시행한 7예 모두에서 이식 후 10일에서 16일 사이(정중기간 11일)에 백혈구 생착이 이루어졌고, 혈소판 생착은 15일에서 100일 사이(정중기간 60일)에 이루어져 모든 환자에서 백혈구 및 혈소판이 생착되었다.

이식 후 3예(2, 3, 5번 예)에서 재발하였으며 재발까지의 기간은 각각 7, 10, 3개월이었다. 재발한 3예 중 2예(2, 5번 예)는 CD34양성세포의 선택적 분리 후 조혈모세포의 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었으나 재발로 인하여 사망하였고, CD34양성세포의 선택적 분리 후에도 지속적으로 양성되었던 1예(3번 예)는 재발 후 항암제를 투여하여 2차 관해 상태로 현재까지 생존해 있다.

상기한 3예를 제외한 나머지 4예는 말초 조혈모세포 이식 후 추적기간(10개월에서 27개월 사이 : 정중기간 12개월) 동안 재발의 증거 없이 생존하고 있으며, 이식한 말초조혈모세포의 THMR-RT-PCR 검사가 양성되었던 2예(6, 7번 예)가 포함되었다(표 3).

표 3. 이식된 조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA의 양성도와 이식 결과의 상관관계

번호	조혈모세포양 ($\times 10^6$ /kg)	조혈모세포의 tyrosine hydroxylase mRNA 양성도	이식 결과 (추적기간 : 개월)
1	4.2	-	생존 (27)
2	6.4	-	재발(7), 사망(14)
3	0.76	+	재발(10), 생존(16)
4	1.98	-	생존(15)
5	2.1	-	재발(3), 사망(5)
6	2.4	+	생존(12)
7	1.4	+	생존(10)

주) 정중 조혈모세포양 : 2.4×10^6 /kg

IV. 고 찰

신경모세포종은 소아에서 흔하게 발생하는 악성종양으로 교감신경계에서 기인하는 것으로 알려져 있다. 이 종양이 국소적으로 침범했을 경우에는 수술적 완전절제 및 항암화학요법만으로 우수한 치료성적을 낼 수 있으나, 환자의 40%에서는 3년 무병생존율이 10-15%로 예후가 매우 불량하다^{1,18}. 신경모세포종의 치료성적을 향상시키기 위하여 1980년대 중반부터 고용량의 항암제투여 및 자가조혈모세포이식이 표준적인 치료방법으로써 시행되어 왔으며, 그 결과 뚜렷한 치료성적의 향상을 보여 3년 무병생존율이 30-40%에 이르게 되었다^{18,19,20}. 그러나 이러한 치료성적의 향상에도 불구하고 50%의 환자에서 이식 후

1년 이내에 재발이 발생하여 현재 치료의 한계점으로 존재한다¹⁹.

고용량의 항암요법 및 자가조혈모세포 이식 후 종양의 재발에 관해서 두가지 가설이 제시되고 있다. 첫째, 항암제에 저항성이 있는 미세 잔존 종양세포가 남아있어 고용량의 항암제 투여에도 불구하고 근치되지 않아 재발을 유발하게 되고, 둘째, 골수 혹은 말초혈액 내에 존재하는 미세잔존 종양세포가 조혈모세포 가동화 중에 오염되어 이식할 때 조혈모세포와 함께 주입됨으로서 재발이 발생한다¹³. 그러므로 신경모세포종의 미세잔존암세포를 발견하는 것은 진단 당시 종양의 침범유무를 평가하고 임상적 관해시와 재발시에 종양을 추적 관찰하는데 중요할 뿐만 아니라 고용량의 항암제 투여 후에 조혈모세포 이식이 예정된 환자에서 말초조혈모세포 가동화(mobilization)시 암세포의 오염이나 이식된 조혈모세포 내에 포함된 암세포를 발견할 수 있어 재발여부를 조기에 예측함으로써 최선의 치료가 병행될 수 있고 궁극적으로는 생존율의 향상에 기여할 것으로 보인다. 이러한 목적에 의해 과거 여러 연구에서 적은 수의 암세포를 검출하기 위한 여러 방법에 대한 연구가 활발히 진행되어 가장 민감한 방법의 하나로 역전사효소 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하게 되었다⁹. 또한 모든 신경모세포종 환자에서는 catecholamine 형성이 증가되어있으며, tyrosine hydroxylase는 catecholamine 형성시 첫 단계에 작용하는 중요한 효소로 다른 정상적인 세포에서는 활성을 나타내지 않는다. 따라서 tyrosine hydroxylase mRNA를 표적으로한 역전사효소 증합효소연쇄반응(THMR-RT-PCR)은 진단에 많이 이용되어 Burchill 등은 진단 당시 골수침범이 있는 환자의 92%에서 THMR-RT-PCR 검사상 양성임을 보고하였으며, 재발시 88%에서 THMR-RT-PCR이 양성으로 검출되었고, 골수에서 이 검사가 양성으로 반응할 때, 말초에 순환하는 암세포와 밀접한 연관이 있어 임상적 관해시에도 신경모세포종 재발을 조기에 예측할 수 있음을 보고하였다⁸. 저자의 연구에서도

진단당시 세포도말검사로 골수 침범을 확인하고 이 골수에서 THMR-RT-PCR검사가 가능하였던 환자 3예 모두에서 tyrosine hydroxylase mRNA가 양성으로 검출되었으며, 세포도말검사상 암세포를 발견할 수 없었던 1예는 THMR-RT-PCR 검사상 음성으로 나타나 THMR-RT-PCR를 이용하면 진단당시의 골수 침범유무를 매우 민감하게 진단할 수 있는 것으로 사료된다. 또한 항암제 투여 후에 시행한 골수혈의 세포도말검사상 암세포를 발견할 수 없었으며, THMR-RT-PCR이 시행 가능하였던 6예 중 1예는 THMR-RT-PCR검사상 양성으로 나타나 세포도말검사시 암세포를 보지 못했을 가능성이 있으며, 골수의 관해를 보다 정확하게 진단하기 위해서는 세포도말 검사가 음성이어도 THMR-RT-PCR 검사를 병행하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

진행된 제 4기의 신경모세포종은 현재 고용량의 항암제투여 및 자가말초조혈모세포이식을 시행하는 것이 치료의 근간이 되고 있으나, 몇몇 과거의 연구에서는 말초 조혈모세포 내에 신경모세포종 암세포가 포함되어있음을 보고한 바 있고^{9,10}, Ri11등은 주입된 조혈모세포 내의 암세포로 인해서 재발이 유도됨을 실험으로 입증하였다²¹. Moss등은 치료 중과 치료 후의 채집된 조혈모세포 내에서 세포면역학적 방법을 이용하여 골수 관해가 이루어진 환자로부터 수집한 말초 조혈모세포의 검사상 25%의 환자에서 암세포가 검출됨을 보고하였다²². Miyajima등은 THMR-RT-PCR을 이용하여 제4기 신경모세포종 환자의 골수에서 66.7%, 말초 조혈모세포에서 20%의 암세포가 검출됨을 보고하였다²³. 본 연구에서도 항암제 치료 후 골수 세포도말검사상 음성이어서 항암제와 G-CSF를 투여한(가동화) 환아로부터 수집한 말초 조혈모세포 8예 중 3예가 THMR-RT-PCR검사상 양성으로 반응하여 37.5%의 암세포 검출율을 나타내어 과거의 연구와 유사한 연구결과를 얻었으나 대상 환아가 적어 정확한 비교는 어려울 것으로 생각된다. 이 중 1예에서는 골수혈에서도 THMR-RT-PCR검사상 양

성으로 검출되어 당연히 가동화 된 말초 조혈모세포의 THMR-RT-PCR검사가 양성으로 반응하여, 골수혈의 세포도말검사상 암세포가 발견되지 않더라도 THMR-RT-PCR검사를 시행하여 암세포 존재유무를 판별한 후 조혈모세포 수득시기를 결정하는 것이 바람직하리라 사료되고, 또 다른 1예는 항암제 치료 후 골수혈에서 THMR-RT-PCR검사상 음성이었으나 말초 조혈모세포에서는 양성으로 반응하여 THMR-RT-PCR로 확인한 골수 관해시에도 조혈모세포의 가동화 중 암세포가 출현할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다. 이와 관련하여 Miyajima 등은 말초혈액이나 혹은 수집된 조혈모세포내에서 THMR-RT-PCR 검사상 양성인 경우는 부분 관해된 것으로 간주해야하며, 조혈모세포에서 THMR-RT-PCR에 대해서 검사한 결과 음성이었던 환자는 지속적으로 완전 관해가 유지됨을 보고하였다²³. 본 저자의 연구결과에서도 말초조혈모세포의 가동화 후 말초혈액에 암세포가 출현할 가능성이 있음을 관찰하였으며, 이러한 경우 부분적 관해에 의한 재발의 가능성이 있기 때문에 조혈모세포의 이식 시기를 결정하고 완전 관해 상태를 지속적으로 유지하기 위해서는 주기적인 미세잔존암세포의 검출이 반드시 필요할 것으로 사료된다.

앞서 언급한 바와 같이 조혈모세포 내에 포함된 암세포의 재주입으로 인해 재발이 유발될 수 있는 경로가 실험적으로 입증됨에 따라 암세포오염을 줄이기 위해서 조혈모세포만을 선택적으로 분리하는 방법이 활발하게 연구되었다^{21,24}. 신경모세포종에서 조혈모세포의 수득시 암세포의 오염을 줄이기 위하여 여러 가지 방법이 사용되었으며, 이 중 많이 연구가 되었던 것은 항암제를 사용하여 암세포를 살상시키는 것과 조혈모세포 세포표면의 CD34 항원성을 이용하여 선택적으로 조혈모세포만 수득하는 방법이다^{15,24,25}. 제4기 신경모세포종 환자에서도 면역학적선택방법의 유용성 및 CD34양성세포의 이식에 대한 연구가 있었다^{9,26}. CD34양성세포만을 선택적으로 분리하는 것은 암세포감소의 효

과를 가져올 수 있으나 이러한 방법에 의한 암세포오염의 정확효과는 아직 논란의 여지가 있다. Tchirkov등은 CD34양성세포 선택적 분리전후 수득된 조혈모세포 내에서 THMR-RT-PCR검사를 통해 암세포의 존재를 확인하여 CD34양성세포의 선택적 분리의 유용성을 평가하고자 하였다¹⁶. 이 연구결과 7명의 환자 중 5명의 환자에서 수득된 조혈모세포 내에서 암세포가 검출되었으며, 이들 중 4명에서는 CD34양성세포의 선택적 분리 후에 암세포가 검출되지 않아서 CD34양성세포의 선택적 분리가 매우 유용한 방법임을 보고하였다¹⁶. 저자의 연구에서도 CD34양성세포의 선택적 분리 후에 암세포정화여부를 THMR-RT-PCR을 사용하여 확인하였고, 그 결과 THMR-RT-PCR검사상 양성으로 검출되었던 3예 중 1예는 CD34양성세포 선택적 분리 전후 모두 양성으로 검출되었고, 나머지 2예는 CD34양성세포 선택분리 전에는 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었으나 오히려 CD34양성세포의 선택적 분리 후에 양성으로 검출되었다. CD34양성세포 선택적 분리 전후 모두 양성으로 검출되었던 1예는 환자의 말초혈액 내에 포함된 암세포의 양이 많아 CD34양성세포 선택적 분리에 의해서도 오염세포를 줄이기에는 한계가 있었던 것으로 생각되며, 향후THMR-RT-PCR의 정량적 검사가 뒷받침된다면 암세포 오염을 어느 정도 줄였는지를 평가할 수 있을 것으로 사료된다. CD34양성세포 선택분리 전에는 THMR-RT-PCR 검사상 음성이었으나 오히려 CD34양성세포의 선택적 분리 후에 양성으로 검출되었던 2예는 CD34 양성세포 선택 전 수득된 조혈모세포의 RNA가 분해되어 위음성으로 검출되었을 가능성과 CD34양성세포 선택적 분리를 시행한 시기가 CD34 양성세포 선택 전 수득시기와 3개월 이상의 간격이 있어 그 기간 동안 순환말초혈액내에 미세 잔존 암세포 양이 증가하였을 가능성을 배제하지 못할 것으로 사료된다. CD34 양성세포 선택 후 음성으로 반응한 4예 중 1예에서는 CD34양성세포 선택 전에는 THMR-RT-PCR 검사상 양성으로 반응하였으나 CD34 양성세포 선택적 분리 후

음성으로 역전되어 CD34양성세포의 선택적 분리에 의해서 암세포가 감소될 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

과거 조혈모세포이식을 받은 환자의 무병생존율에 대한 연구에서 암세포의 오염이 없는 조혈모세포를 이식 받은 환자들이 예후가 더 좋으며, CD34양성세포의 선택적 분리에 의한 암세포 오염 감소로 인해서 재발율을 낮출 수 있음을 보고하였다²⁷. 본 연구에서는 7예가 조혈모세포이식을 받았으며 이중 3예에서 재발하였는데 재발된 3예 중 1예는 암세포의 존재가 있음을 THMR-RT-PCR 검사로 확인한 조혈모세포를 재주입하였으므로 재주입된 암세포에 의한 재발의 가능성을 배제하기는 어려웠고, 나머지 2예에서는 THMR-RT-PCR 검사로 암세포가 검출되지 않음을 확인한 조혈모세포를 주입하였으나 재발이 되어 항암제에 내성을 가진 미세 잔존암 세포에 의한 재발의 가능성도 있음을 추정할 수 있었다. 과거 조혈모세포 이식 후에 재발이 되는 경우 50%의 환자에서 원발 부위에서 재발되는 경우가 가장 흔하게 나타나는 것으로 보고하였다²⁸. 그러나 본 연구의 환자에서는 3예 모두가 원발 부위가 아닌 원위 부위에서 일어나 과거의 보고와는 다르게 나타났는데 이는 주입된 조혈모세포 내에 포함된 암세포의 오염에 의한 재발 가능성을 시사하나 항암제에 대한 저항성이 원발 부분뿐만 아니라 혈행성으로 전이되는 암세포에도 나타나므로 정확한 재발의 원인을 밝히기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 THMR-RT-PCR검사에서 양성으로 반응한 조혈모세포를 재주입 받은 환자 2예는 아직 재발의 증거 없이 생존하고 있으며, 이들의 지속적인 추적관찰 및 말초 혈액 내에서의 암세포 검출여부가 중요한 임상적 자료를 제공할 수 있으리라 사료된다. 이들에서 추적기간 동안 종양의 육안적 재발이 확인되지는 않았으나 앞으로 주기적인 THMR-RT-PCR검사를 시행하면 재발을 조기에 발견할 수 있고 이에 대한 임상적인 대책을 조속히 강구할 수 있어 치료율을 높일 수 있을

것으로 기대되고, 아울러 재발과 THMR-RT-PCR로 확인한 암세포 검출과의 상호 연관성을 설명하는데 추가적인 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

신경모세포종 환자의 골수혈에 대한 세포도말검사상 암세포가 발견되지 않더라도 THMR-RT-PCR검사를 시행한다면 암세포 존재유무를 보다 정확히 판별할 수 있을 것으로 기대된다. CD34 양성세포의 선택적 분리 과정만으로 암세포 오염을 줄이는 데에는 한계가 있는 것으로 사료되나, 향후THMR-RT-PCR의 정량적 검사가 뒷받침된다면 암세포 오염을 어느 정도 줄였는지를 평가할 수 있을 것으로 사료된다. CD34 양성세포 선택 전 수득된 조혈모세포의 THMR-RT-PCR 검사상 음성이다가 CD34 양성세포 선택 후 양성반응을 보인 예가 있어 이러한 경우, 수득된 조혈모세포내의 RNA가 분해되어 위음성으로 검출되었을 가능성과 CD34양성세포 선택적 분리를 시행한 시기가 CD34 양성세포 선택 전 수득시기와 3개월 이상의 간격이 있어 그 기간 동안 순환말초혈액내에 미세 잔존 암세포 양이 증가하였을 가능성을 배제하지 못하므로 이러한 문제점을 보완하는 방법이 연구되어야 할 것으로 사료되고, CD34 양성세포 선택적 분리 후 음성으로 역전된 예가 있어 CD34양성세포의 선택적 분리에 의해 암세포가 감소될 가능성이 있는 것으로 사료된다. 신경모세포종이 재발한 예의 분석상 오염된 암세포가 재주입됨으로써 재발되는 가능성을 배제하기 어려웠고, 또한 오염된 암세포의 재주입 경로를 통해서 뿐만이 아니라 항암제에 내성을 가진 미세 잔존암 세포에 의한 재발의 가능성도 있음을 확인할 수 있었다. THMR-RT-PCR검사에서 양성으로 반응한 조혈모세포를 재주입 받은 환아는 아직 재발의 증거 없이 생존하고 있으나 이들의 지속적인 추적관찰이 필요할 것으로 사료되고, 이 들에 대한 말초 혈액 내에서의 암세포 검출여부가 추가적인 중요한 임상적 자료를 제공할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Brodeur GM, Seeger RC, Barret A, Berthold F, Castleberry RP, Giulio D'Angio, et el. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol 1988;6:1874-1881.
2. Whang Min Kim, Shin Heh Kang, Im Joo Kang, Chin Moo Kang, Hong Hoe Koo, Kir Young Kim 한국에서의 신경아세포종의 임상적 경험. 대한소아혈액종양학회지 1997;4:38-47.
3. Moss TJ, Sanders DG, Lasky LC, Bostrom B. Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cells. Blood 1990;76:1879-1883.
4. Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, Kobayashi R, Shikano T, Ishikawa Y, et al. Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. Eur J Cancer 1991;27: 762-765.
5. Rogers DW, Treleaven JG, Kemshead JT, Pritchard J. Monoclonal antibodies for detecting of bone marrow invasion by neuroblastoma. J Clin Pathol 1989;42:422-426.

6. Nagai J, Kigasawa H, Tomioka K, Koga N, Nishihira H, Nagao T. Immunocytochemical detection of bone marrow-invasive neuroblastoma cells. *Eur J Haematol* 1994;53:74-77.
7. Berthold F, Schneider A, Schumacher R, Bosslet K. Detection of minimal disease in bone marrow of neuroblastoma patients by immunofluorescence. *Pediatr Hematol Oncol* 1989;6:73-83.
8. Burchill SA, Bradbury FM, Smith B, Lewis IJ, Selby P. Neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase polymerase reaction(RT-PCR) for tyrosine hydroxylase mRNA. *Int J Cancer* 1994;57: 671-675.
9. Mattano LA Jr., Moss TJ, Emerson SG. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *cancer Res* 1992;52:4701-4705.
10. Lode HN, Handgretinger R, Schuermann U, Seitz G, Klingebiel T, Niethammer D, et al. Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside G_{D2} immunocytochemistry. *Eur J Cancer* 1997;33:2024-2030.

11. Philip T, Bernard JL, Zucker JM, Pinkerton R, Lutz P, Bordigoni P. High-dose chemoradiotherapy with bone marrow transplantation as consolidation treatment in neuroblastoma: an unselected group of stage IV patients over 1 year of age. J Clin Oncol 1987;5:266-271.
12. Johnson FL, Goldman S. Role of autotransplantation in neuroblastoma. Hematol Oncol Clin North Am 1993;7:647-662.
13. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertellsman R, Kanz L. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. Blood 1994;83:636-639.
14. Moss TJ, Cairo M, Santana VM, Weinthal J, Hurvitz C, Bostrom B. Clonogenicity of circulating neuroblastoma cells : Implication regarding peripheral stem cell transplantation. Blood 1994;83:3085
15. Lebkowski JS, Schain LR, Okrongly D, Levinsky R, Harvey MJ, Okarma TB. Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells-purging of human tumor cells. Transplantation 1992;53:1011-1019

16. Tchirkov A, Kanold J, Giollant M, Halle-Haus P, Berger M, Rapatel C et al. Molecular monitoring of tumor cell contamination in leukapheresis products from stage IV neuroblastoma patients before and after positive CD34 selection. *Med Pediatr Oncol* 1998;30:228-232.
17. Ki Woong Sung, Yun Hee Lee, Hye Lim Jung, Hong Hoe Koo, Hee Young Shin, Hyo Seop Ahn Tyrosine Hydroxylase mRNA의 RT-PCR을 이용한 미세잔존 신경모세포종 세포의 검출. *대한소아혈액종양학회지* 1999;6:78-87.
18. Castleberry RP. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:919-937.
19. Pole JG, Casper J, Elfenbein G, Gee A, Gross S, Janssen W, et al. High dose chemoradiotherapy supported by marrow infusions for advanced neuroblastoma: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 1991;9:152-158.
20. Seeger RC, Reynolds CP. Treatment of high-risk solid tumors of childhood with intensive therapy and autologous bone marrow transplantation. *Pediatr Clin North Am* 1991;38:393-424.
21. Rill DR, Santana VM, Roberts WM, Nilson T, Bowman LC, Krance RA, et al. Direct demonstration that autologous bone marrow

transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994;84:380-383.

22. Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN, Romansky SG, Hammond GD, Seeger RC. Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma. *N Engl J Med* 1991;324:219-226.
23. Miyajima Y, Horibe K, Fukuda M, Matsumoto K, Numata S, Mori H, et al. Sequential detection of tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with stage IV neuroblastoma by the reverse transcription-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer* 1996;77:1214-1219.
24. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Franklin WA, Archer PG, Curiel T, et al. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: Influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994;12:28-36
25. Kanold J, Berger M, Rapatel C, Lumley DE, Lutz P, Plantaz D, et al. CD34+ cell immunoselection from G-CSF alone primed peripheral blood in children with low body mass. *Br J Haematol* 1995;91:431-433

26. Combaret V, Favrot MC, Kremens B, Philip I, Bailly C, Fontaniere B, et al. Immunological detection of neuroblastoma cells in bone marrow harvested for autologous transplantation. Br J Cancer 1989;59:844-847.

27. Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to metaiodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. Eur J Cancer 1995;31A:586-590.

28. Matthay KK, Atkinson JB, Stram DO, Selch M, Reynolds CP, Seeger RC. Patterns of relapse after autologous purged bone marrow transplantation for neuroblastoma: a childrens cancer group pilot study. J Clin Oncol 1993;11:2226-2233.

- Abstract -

**Clinical Significance of Minimal residual disease
detection using tyrosine hydroxylase mRNA RT PCR in patients
with stage IV neuroblastoma**

Song-Hee Park

*Department of Medicine
The Graduate School , Yonsei University*

(Directed by Professor Baek-Keun Lim)

A sensitive assay was developed for the detection of neuroblastoma cell contamination in CD34+ selected and unseparated peripheral blood stem cells(PBSC) used for autologous transplantation in stage 4 neuroblastoma patients. Ever since detection systems have been improved, neuroblastoma cells have also been found in PBSC preparations by immunocytological method and by immunocytology and clonogenic analysis used in combination. To overcome tumor cell contamination, CD34+ selection has been proposed as a purging method. Specifically we used a non-radioactive nested cDNA-RT PCR(nPCR) for detection of tyrosine hydroxylase(TH) gene expression. We monitored the efficiency of tumor cell purging following CD34 selection in PBSCs from 8 patients with advanced neuroblastoma. Eight patients with stage IV neuroblastoma were

included in this study. Before mobilization of PBSC , patients were treated with chemotherapy, operation and radiotherapy. CD34+ progenitor cells were enriched from at least 1×10^6 /kg using the Ceparate SC system cell concentrator(CellPro, Bothell, WA). Total RNA was extracted using RNA isolation kit from bone marrow and PBSC. This RNA were reverse transcribed using SuperScrip reverse transcriptase. After then nested PCR was performed with tyrosine hydroxylase specific primers from exon 5 and 8. Pretreatment bone marrow analysis by this method were possible in 4 patients. 3 of these patients were positive for TH mRNA. Bone marrow sample from 1 patient without cytological bone marrow involvement was negative for TH mRNA. After chemotherapy, bone marrow analysis from 5 patients who had no cytological bone marrow involvement were negative for TH mRNA. But bone marrow from 1 patient who had no cytological bone marrow involvement was positive for TH mRNA. So TH mRNA RT PCR should be necessary for evaluation of clinical remission in no cytological marrow involvement cases. Since RT-PCR for TH mRNA was sensitive method to detect minimal residual neuroblastoma cells, this method can be used to evaluate initial disease status, response to treatment , time to collect stem cells for transplantation and to detect relapse early. Before the CD34 positive cell selection, various number of contaminating cells were found in leukapheresis of 3 patients. After positive selection, neuroblastoma cells were detectable in 3 patients. In one patient, PCR positive PBSCs became PCR negative after selection. In 7 of the 8 patients, high dose chemoradiotherapy was performed. In all these 7

patients, median time to reach $>0.5 \times 10^9/L$ granulocyte was 11 days (range 11-16). 3 patients were relapsed after PBSC infusion and 2 patients died due to relapse. 4 patients have been survived without relapse. We suggest that tumor cell contamination may be frequently detected in PBSC harvests of stage IV neuroblastoma patients by sensitive molecular analysis. The load of contaminating malignant cells might be reduced following CD34 positive selection. However strategies to improve the recovery of the CD34+ cells and purging efficacy of this method should be evaluated further.

Key words : neuroblastoma, tyrosine hydroxylase, peripheral blood stem cell, minimal residual disease