

급성 골수성 백혈병에서 Fas 및 *Bcl-2* 항원의 발현과 그 임상적 의의

연세대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학교실*

이 석 · 민유홍 · 정소영 · 김성철 · 유내춘
이정운* · 권오현* · 한지숙 · 고윤웅

= Abstract =

Expression of Fas and *Bcl-2* Antigen in Acute Myelogenous Leukemia : Clinical Significance as a Prognostic Determinant

Seok Lee, M.D., Yoo Hong Min, M.D., So Young Chong, M.D.
Seong Cheol Kim, M.D., Nae Choon Yoo, M.D., Jung Woon Lee, M.D.*
Oh Hun Kwon, M.D.* , Jee Sook Hahn, M.D. and Yun Woong Ko, M.D.

Departments of Internal Medicine and Clinical Pathology,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Fas antigen is a cell surface protein belonging to the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Activation of Fas by its ligand results in transduction of a signal for apoptosis. Leukemic cells often die by apoptosis in response to chemotherapy. Here, we studied both Fas antigen expression on leukemic cells and its clinical significance in newly diagnosed acute myelogenous leukemia(AML). To evaluate the relative clinical significance of Fas and *bcl-2* expression, we also investigated the expression of Fas and *bcl-2* antigen on CD34-positive AML cells.

Methods : We have analyzed the correlation of Fas and *bcl-2* expression with the clinicopathological parameters and therapeutic outcomes to the various chemotherapy in 37 patients with AML retrospectively. Expression of Fas and *bcl-2* antigen on the leukemic blasts was analyzed by flow cytometry direct immunofluorescence method.

Results : The number of Fas-positive cells in each sample was heterogeneous(range, 1.1% to 74.4%). Greater than 50% of the cells showed *bcl-2* staining in every samples, and the percentage of cells coexpression *bcl-2* and CD34 antigen was heterogeneous(range, 4.6% to 96.9%). There was no correlation between Fas and *bcl-2* expression in individual AML cells nor CD34-positive AML cells. Fas expression had substantial effect on the remission rate: 84.2% in Fas-positive versus 44.4% in Fas-negative AML. Fas expression remained an independently significant predictor for response to remission induction chemotherapy.

본 논문은 1996년도 연세대학교 의과대학 일반과제연구비에 의해 이루어졌다.

이석 : 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세의료원 의과대학 내과학교실

Tel : (02)361-5438 Fax : (02)393-6884

Conclusion : Although the mechanism by which induction chemotherapy can result in better therapeutic outcome in Fas-positive AML is to be addressed, we may suggest that the quantification of Fas expression can be predictive of treatment outcome in AML. Further studies for evaluation of the biologic and clinical characteristics of Fas antigen and the mechanism of apoptosis in AML are warrented.

Key Words : Fas antigen, *Bcl-2* antigen, Acute myelogenous leukemia

oncogene이다^{18~21)}.

서 론

Programmed cell death 또는 apoptosis는 embryogenesis, metamorphosis, endocrine-dependent tissue atrophy, normal tissue turnover, thymic selection 등 면역조절반응, 바이러스 감염증 및 종양퇴행(tumor regression) 등에 관여하는 중요한 세포조절 기전이며^{1~3)}, 골수 등 조혈계에서 조혈작용의 homeostasis를 유지하는데 있어서도 중요한 세포생리학적 기전으로 알려지고 있다^{3~7)}. 현재까지 apoptosis의 유도 및 조절에 관여하는 기전에 대해서는 아직 알려진 바 없으나, 최근 분자생물학적 관점에서 apoptosis에 대한 연구 및 그 이용도가 광범위하게 연구되고 있다^{8~13)}.

Apoptosis와 관련된 다양한 유전자 산물 중 최근에 cloning된 Fas 혹은 APO-1(Fas/APO-1) 항원은 tumor necrosis factor 수용체(TNFR)/nerve growth factor 수용체(NGFR) superfamily에 속하는 세포표면항원으로, Fas 항원에 대한 ligand 자극시 세포내에 apoptotic signal을 전달함으로써 세포의 apoptosis를 유도할 수 있음이 밝혀지면서 세포생물학적인 측면에서 그 의미가 매우 크다 하겠다^{14, 15)}. 그러나 Fas 항원이 표현되더라도 anti-Fas 단일클론항체(monoclonal antibody) 등 ligand에 의한 apoptosis 유도 여부 및 그 정도(감수성)는 세포에 따라 다양하게 나타난다^{16, 17)}. Fas-positive 세포간의 이러한 apoptosis 차이가 나타나는 원인으로는 Fas 수용체의 downstream signalling의 변화, Fas 유전자 돌연변이 등 유전자 결손이 언급되고 있으나, 최근 가장 관심을 끄는 조절인자는 *bcl-2* proto-

백혈병세포에서의 apoptosis는 실험조건하에서 백혈병세포의 분화에 따른 조혈인자 의존성 획득에 의해 유도되기도 하지만^{22, 23)}, 또한 여러 종류의 항암제, transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), 열충격, 항체, wild-type p53 transfection 등에 의해서도 분화와 상관없이 유도될 수 있는 것으로 볼 때^{10, 11, 22~28)}, 백혈병세포의 무한증식은 백혈병 클론세포의 불멸성보다는 비정상적인 apoptosis 기전에 기인한다고 생각되고 있으나, 백혈병세포에 있어서 apoptosis 조절기전에 대해서는 아직 확실히 알려진 바 없으며, 특히 백혈병 환자에서의 Fas 및 *bcl-2* 유전자의 발현이 갖는 임상적 의의 및 두 유전자의 상호작용에 의한 백혈병세포의 apoptosis에 미치는 영향에 대해서는 검토된 바 없다.

이에 저자 등은 급성 골수성 백혈병으로 진단받은 환자의 골수세포를 대상으로 Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현양상을 유세포분석을 이용하여 알아보고, CD34 항원과 Fas 및 *bcl-2* 항원간의 dual expression을 분석하며, 이들의 발현정도에 따른 완전관해율, 생존기간 등 임상상을 비교·검토하여 급성 골수성 백혈병에 있어서 하나의 중요한 예후인자로 고려될 수 있는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1994년 3월부터 1995년 12월까지 연세대학교 세브란스병원 혈액종양내과에 입원하여 급성 골수성 백혈병으로 진단받고 관해유도요법을 시행받은

37례의 환자를 대상으로 하였다. 급성 골수성 백혈병의 진단은 French-American-British(FAB) 기준에 의해 분류하였고, 골수이형성 증후군 및 만성 골수증식성 질환 등의 클론성 혈액질환이 선행되었던 예는 제외하였다.

2. 치료방법 및 치료반응 평가

관해유도요법으로는 표준화된 TAD 병용요법(6-thioguanine 100mg/m²/일, 1~7일; cytosine arabinoside 100mg/m²/일, 1~7일; daunorubicin 45mg/m²/일, 1~3일)이 시행되었다. 관해후 화학요법이 시행된 경우에는 TAD 병용요법(6-thioguanine 100mg/m²/일, 1~5일; cytosine arabinoside 100mg/m²/일, 1~5일; daunorubicin 45mg/m²/일, 1~2일) 혹은 MEC 병용요법(mitoxantrone 10mg/m²/일, 1~2일; etoposide 100mg/m²/일, 1~3일; cytosine arabinoside 2g/m²/일, 1~4일)이 시행되었다. 완전관해는 화학요법 시작일로부터 21~28일째 골수검사를 시행하여 골수아세포가 골수내 유핵세포의 5% 미만이면서 정상적인 조혈기능을 나타내는 경우로 정의하였다. 관해유도실패는 조기사망과 불응성 백혈병(resistant leukemia)으로 구분하였는데, 조기사망은 관해유도요법 시행기간 혹은 화학요법 직후 조기합병증으로 인해 사망한 경우로 정의하였으며, 그 외의 경우에는 불응성 백혈병으로 판단하였다. 치료에 따른 생존기간은 진단시로부터 사망일 혹은 최종 추적일까지의 기간으로 하였으며, 무병생존기간은 완전관해 확인일로부터 재발확인일까지로 하였다.

3. 골수세포처리 및 유세포분석(flow cytometry)

1) 골수세포처리

본 연구에서는 초진시의 급성 골수성 백혈병환자의 골수내 백혈병세포를 대상으로, 방부제가 없는 heparin(preservative-free heparin; Gibco, New York, USA)을 400U/mL 되게 희석한 용액으로 주사기 내부를 적신 다음 골수세포를 흡인채취한 후, 즉시 1:2의 비율로 α-배양액(Gibco, New York, USA)을 첨가하여 희석한 다음, Ficoll-Hypaque

(Nycomed, Norway; S.G. 1.077)이 들어있는 시험관내에 조심스럽게 중층하였다. 이를 400g로 30분간 원심분리한 후 단핵구층을 pasteur pipette을 이용하여 채취하고, 이를 다시 3회 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, New York, USA)이 첨가된 RPMI 배양액으로 세척한 후 얻은 세포층을 10% 우태아혈청이 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM; Gibco, New York, USA)에 재부유하여 다시 세척한 후, CD2-conjugated immunomagnetic bead(Dynabead M-450; Dynal A.S. Oslo, Norway) 방법에 의해 T-세포를 제거하였다. 이런 방법으로 T-세포를 제거한 골수세포는 항 CD3 단일클론항체 면역표지자 검사상 T-세포가 1% 이하이었고, 세포원침 및 Wright 염색을 통한 형태학적 관찰상 백혈병아세포가 90% 이상이었다. 위의 방법으로 T-세포와 단구가 제거된 골수세포는 hemocytometer로 세포수를 계산하였다.

2) 유세포 분석

환자로부터 채취한 골수천자액을 위의 방법으로 단핵구를 분리한 후, direct immunofluorescence 방법을 사용하여 Fas 항원, *bcl-2* 항원 및 CD34 항원을 측정하였다. 검사방법을 약술하면, 분리된 세포를 각각 FITC-conjugated anti-Fas 단일클론항체(IgM; UBI, New York, USA) 1μg, FITC-conjugated anti-*bcl-2* 단일클론항체(IgG1; DAKO, Denmark) 10μL, PE-conjugated anti-CD34 단일클론항체(HPCA-2; Becton Dickinson, CA, USA) 20μL와 4°C에서 30분간 배양한 다음, 0.1% sodium azide/PBS(phosphate-buffered saline) 및 1% paraformaldehyde로 2회 세척한 후, 488nm, 0.3W로 조정된 argon-ion laser가 장착된 FACStar^{PLUS} LYSIS II soft ware(Becton Dickinson, CA, USA)를 이용한 유세포분석을 시행하였다. Consort 30 Data Management Program list mode에서 최소한 30,000개의 events를 분석하였으며, 분석한 전체 단핵구 가운데 Fas⁺, *bcl-2*⁺, CD34⁺ 세포의 빈도를 계산하였다. 또한 이들을 동시에 배양시킴으로써 CD34 항원과 Fas 및 *bcl-2* 항원간의 dual

expression을 분석하였다. 음성대조군은 FITC- 혹은 PE-conjugated isotype 단일클론항체(Becton Dickinson, CA, USA)를 사용하였고, gated blasts의 20%이상이 발현되는 경우를 "양성(positive)"으로 정의하였다.

4. 통계 분석

Fas 및 *bcl-2*/CD34 항원의 표현과 각종 인자와

의 연관성을 검토하기 위해서 chi-square test와 Student t-test를 이용하였고, 생존기간에 대한 분석은 Kaplan-Meier method와 log-rank statistics를 사용하여 평가하였다. 또한 완전관해율에 영향을 줄 수 있는 예후인자에 관한 분석은 다변량분석(multivariate analysis)를 시행하였다. 통계적 유의수준의 *P*값은 0.05 이하로 하였다.

Table 1. Fas Expressions according to FAB Distribution

FAB subtype	Mean % of Fas ⁺ cells*	Number of cases with	
		<20% Fas ⁺ cells	≥20% Fas ⁺ cells
M1(n=5)	21.0(5.6~42.8)	2	3
M2(n=5)	38.9(18.8~50.3)	1	4
M3(n=6)	13.6(5.5~19.4)	6	0
M4(n=17)	24.2(3.0~43.9)	8	9
M5(n=4)	34.7(1.1~74.4)	1	3
Total(n=37)	25.7(1.1~74.4)	18(48.6)	19(51.4)

Values represent mean and numbers in parenthesis are range of values.

Assessed by flow cytometry.

* among gated total cells

Table 2. Patients Characteristics according to Fas Expression

	Fas expression		Significance
	<20%(n=18)	≥20%(n=19)	
Age(yr)	36(19-56)	42(16-60)	NS
Sex(M:F)	10:8	9:10	NS
Hemogram			
Hb(g/dL)	7.4(3.4-12.7)	8.3(4.5-14.3)	NS
WBC($\times 10^9/L$)	61.5(0.8-259.1)	40.1(2.0-185.8)	NS
Blast(%)	57.7(0-95.0)	50.4(0-98.0)	NS
Platelet($\times 10^9/L$)	60.3(7.0-161.0)	57.4(8.0-220.0)	NS
BM cellularity(%)	93.3(60-100)	87.8(30-100)	NS
BM blast(%)	84.1(50-100)	71.6(35-100)	NS
CD34 expression(%)	36.0(0.7-91.6)	30.1(0.6-95.8)	NS
<i>Bcl-2</i> expression(%)	81.9(59.3-99.8)	86.3(73.3-99.5)	NS

Values represent mean and numbers in parenthesis are range of values.

NS: no significance(*P*>0.05)

Table 3. Therapeutic Outcomes according to Fas Expression

	Fas expression		Significance
	<20%(n=18)	≥20%(n=19)	
Complete remission(%)	8(44.4)	16(84.2)	P=0.01
Remission failure			
Early death(%)	4(22.2)	1(5.3)	
Resistance(%)	6(33.3)	2(10.5)	
Relapse rate(%)	2(25.0)	3(18.7)	NS
1-yr DFS(%)	72.9	74.3	NS

NS: no significance($P>0.05$), DFS: disease-free survival

결과

1. Fas 항원의 발현양상 및 치료반응과의 연관성

Fas 항원의 발현은 1.1%에서 74.4%(평균 25.7%)로 대상환자의 백혈병세포마다 이질적인 양상을 보였다. 전체 대상환자를 20% 기준하에 Fas-positive ($\geq 20\%$)와 Fas-negative(<20%)로 구분한 결과, Fas-positive 환자군은 19례(51.4%)이었으며, FAB 분류에 따른 아형간의 Fas 항원의 발현정도의 차이는 관찰되지 않았으나, 단 M3 아형에서는 6례 모두에서 20% 미만의 낮은 발현율을 보였다(Table 1).

전체 대상환자 37례의 평균연령은 38(16~60)세, 남녀비는 19:18이었고, Fas 항원의 발현정도에 따른 진단당시의 연령, 성별, 진단당시 말초혈액소견 및 골수소견간의 차이는 관찰되지 않았으며, CD34 항원의 발현율에 있어서도 양군간의 차이는 없었다 (Table 2).

전체 환자중 완전관해에 도달한 경우는 37례중 24례로 64.9%이었으며, 특히 Fas-positive 급성 골수성 백혈병에서 보다 높은 완전관해율을 보였다 (84.2% versus 44.4%, $P=0.01$). 관해유도 치료 도중 조기사망한 경우는 Fas-positive 환자군에서 1례 (5.3%), Fas-negative 환자군에서 4례(22.2%)로 양군간의 차이가 있었으며, 불응성 백혈병으로 판단된 경우는 각각 2례(10.5%), 6례(33.3%)이었다. 재

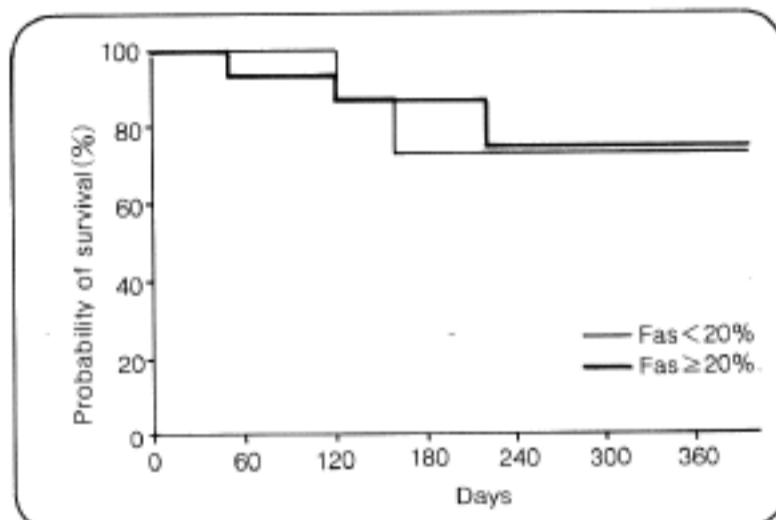


Fig. 1. Kaplan-Meier plot of the survival duration according to Fas expression.

발률에 있어서는 양군에서 각각 18.7%, 25.0%로 Fas-positive 환자군에서 낮은 경향을 보였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았으며, 1년-무병생존율간의 차이도 없었다(Table 3, Fig. 1).

2. *Bcl-2*/CD34 항원의 coexpression 양상 및 치료반응과의 연관성

Bcl-2 항원의 발현은 59.3%에서 99.8%(평균 90.8%)로 모든 환자의 백혈병세포에서 50%이상 높게 발현되는 양상을 보였다. *Bcl-2* 항원이 급성 골수성 백혈병에 미치는 생물학적 및 임상적 의의를 규명하기 위해 CD34 항원과 coexpression (*bcl-2*⁺/CD34⁺)되는 정도에 따라 20% 기준하에 구분한 결과, *bcl-2*⁺/CD34⁺ 양성($\geq 20\%$)인 경우는 19

Table 4. *Bcl-2/CD34 Coexpression according to FAB Distribution*

FAB subtype	Percent of mononuclear cells*			Number of cases with	
	Bcl-2 ⁺	CD34 ⁺	Bcl-2 ⁺ /CD34 ⁺	<20%	≥20%
				Bcl-2 ⁺ /CD34 ⁺	Bcl-2 ⁺ /CD34 ⁺
M1(n=5)	99.6(99.4~99.8)	87.1(78.3~95.8)	69.1(61.3~77.0)	0	5
M2(n=5)	90.7(84.6~96.8)	17.9(0.7~35.0)	34.6(14.4~54.8)	2	3
M3(n=6)	91.9(80.4~99.5)	3.6(1.6~5.0)	8.7(6.0~15.5)	6	0
M4(n=17)	83.9(59.3~98.6)	35.6(0.7~84.3)	48.3(8.5~89.5)	8	9
M5(n=4)	90.8(59.3~99.8)	34.7(0.6~95.8)	40.4(4.6~96.9)	2	2
Total(n=37)	90.8(59.3~99.8)	34.7(0.6~95.8)	40.4(4.6~96.9)	18(48.6)	19(51.4)

Values represent mean and numbers in parenthesis are range of values.

Table 5. Patients Characteristics and Therapeutic Outcomes according to *Bcl-2* and CD34 Coexpression

	<i>Bcl-2/CD34 coexpression</i>		Significance
	<20%(n=18)	≥20%(n=19)	
Age(yr)	41(17~60)	36(16~57)	NS
Sex(M:F)	9:9	10:9	NS
Hemogram			
Hb(g/dL)	7.3(3.4~14.3)	7.8(3.8~9.9)	NS
WBC($\times 10^9/L$)	27.2(2.0~185.8)	78.7(0.8~259.1)	P=0.01
Blast(%)	39.7(0~87.0)	66.7(0~98.0)	P=0.01
Platelet($\times 10^9/L$)	56.2(8.0~161.0)	61.8(7.0~220.0)	NS
BM cellularity(%)	91.3(30~100)	92.3(60~100)	NS
BM blast(%)	78.6(35~96)	75.8(36~100)	NS
Fas expression(%)	29.4(5.3~74.4)	19.1(1.1~45.6)	NS
Complete remission(%)	14(77.8)	10(52.6)	NS
1-yr DFS(%)	72.0	68.6	NS

Values represent mean and numbers in parenthesis are range of values.

NS: no significance(P>0.05), DFS: disease-free survival

례(51.4%)이었으며, M3 아형을 제외한 FAB 아형 간의 발현정도의 차이는 관찰되지 않았다(Table 4). *Bcl-2⁺/CD34⁺* 항원의 coexpression에 따른 진단 당시의 임상양상을 비교한 결과, 백혈구 및 백혈병아세포 수치가 *bcl-2⁺/CD34⁺* coexpression 양성군에서 보다 높게 관찰되었다(P=0.01). 하지만 *bcl-2⁺/CD34⁺* coexpression 정도와 완전관해율 및 생존율 등 치료

반응과의 연관성은 관찰되지 않았다(Table 5).

3. CD34 항원과 Fas 및 *bcl-2* 항원간의 발현율에 있어서의 상관관계

CD34 항원의 발현정도를 20% 기준하에 구분한 후, 이에 의한 Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현율에 미치는 영향을 조사한 결과, CD34 항원의 발현율과

Table 6. Percentage of *Fas*⁺, *Bcl-2*⁺ AML Cells and Its Intensity according to CD34 Antigen Expression Assayed by Flow Cytometry

	Percent of gated cells*			
	<i>Fas</i> ⁺ cells	<i>Bcl-2</i> ⁺ cells	<i>Bcl-2</i> intensity	Fas intensity
CD34<20%(n=15)	29.1(5.3~74.4)	80.2(59.3~99.5)	15.8(2.7~34.4)	12.6(3.7~31.8)
CD34≥20%(n=22)	21.5(1.1~52.7)	87.9(67.3~99.8)	15.3(2.8~34.8)	20.4(4.9~53.5)
P value*	NS	NS	NS	NS

Values represent mean and numbers in parenthesis are range of values.

* CD34<20% vs ≥20%, NS: no significance($P>0.05$)

Table 7. Results of Univariate and Multivariate Analysis

Variables	Univariate P value	Multivariate P value
WBC	0.001	0.001
Fas expression	0.01	0.01
Blast	0.04	0.97
CD34 expression	0.05	0.42

Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현율에 있어서의 상관관계는 관찰되지 않았다(Table 6).

4. 예후인자

완전관해율에 영향을 주는 예후인자를 조사하고자 단일변량분석을 시행한 결과, 진단당시의 백혈구 및 백혈병아세포의 수치, CD34 항원 및 *Fas* 항원의 발현율이 의의가 있었으나, 이를 대상으로 단변량분석을 시행한 결과 진단당시의 백혈구 수치($P=0.001$)와 함께 *Fas* 항원의 발현율($P=0.01$)이 독립적인 예후인자로 확인되었다(Table 7).

고 찰

조직내에서의 homeostasis의 유지는 세포의 증식 및 분화과정 뿐만 아니라 apoptosis와 세포괴사(necrosis)와 같은 cell death 과정에 의해 조절된다⁴⁾. Apoptosis의 유도 및 조절에 관여하는 기전에 대해서는 아직 알려진 바 없으나, 조혈촉진인자의 결핍, calcium ionophore, glucocorticoid 등이 언급되고 있으며^{29, 30)}, 또한 방사선 혹은 자외선 및 항

암제에 의해서 종양세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 알려져 있다^{2, 31)}. 최근에는 *c-myc* protooncogene, wild-type p53, *bcl-2* 등 다양한 유전자 산물이 apoptosis 조절에 밀접한 연관성이 있음이 알려지게 되어 분자생물학적 관점에서 apoptosis 연구 및 그 이용도가 광범위하게 연구되고 있다^{8~13)}.

Apoptosis와 관련된 다양한 유전자 산물 중 최근에 cloning된 *Fas* 항원은 주로 활성화된 림프구 혹은 바이러스에 감염된 림프구에서 높게 발현되며, 정상 골수내 CD34⁺ 조혈모세포 혹은 골수구계 세포에서는 그 발현정도가 매우 미미한 것으로 알려져 있다³²⁾. *Fas* 항원의 주된 기능은 이에 대한 ligand 자극시 세포내로 apoptotic signal을 전달함으로서 세포의 apoptosis를 유도할 수 있는 것이며^{14, 15, 32, 33)}, 이러한 기전은 흥선내에서의 T-лим프구의 분화 및 성장조절, 정상 말초혈액 림프구와 달리 interleukin(IL)-2, IL-4 등의 자극으로 생성된 미성숙 림프아세포(lymphoblast)에서 *Fas* 항원의 발현이 증가하는 현상, anti-*Fas* 단일클론항체를 첨가하여 3시간 배양시 세포의 apoptosis가 dose-dependent하게 증가한 점 및 *Fas* 유전자 trans-

fection에 의해 apoptosis가 유도되었던 실험결과로 볼 때^{12, 34~38)}, Fas 항원의 발현이 면역세포 혹은 미성숙세포의 apoptosis 기전과 기능적으로 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있다. 또한 일부 보고에 의하면 anti-Fas 단일클론항체가 실험조건하에서 일부 급성 골수성 백혈병 세포주 및 T-세포의 apoptosis를 유도하는 것이 관찰되고³⁹⁾, Kotani 등³⁸⁾에 의해 성인 T-세포 백혈병(ATL) 세포에서 Fas 항원의 발현이 현저히 증가되어 있으며, anti-Fas 항체를 첨가시 ATL 세포의 apoptosis가 현저히 증가하는 것이 관찰됨으로써, 백혈병 환자의 세포에서 발현되는 Fas 항원의 발현양상을 측정하고, 항암제 투여에 따른 반응을 관찰하는 것은 이 질환의 병태기전 및 치료에 대한 반응을 예측하는데 있어서 중요한 지표가 될 수 있으리라 판단된다.

본 연구에서 급성 골수성 백혈병으로 진단받은 환자의 골수세포를 대상으로 Fas 항원의 발현정도를 측정하고자 유세포분석을 통해 Fas 항원의 정량화 및 CD34 항원, 백혈구 수치, 치료반응 등과의 연관성을 조사한 결과, Fas 항원의 발현은 환자마다 매우 이질적인 양상을 보였고, 또한 CD34 항원의 발현정도에 따른 발현율의 차이도 관찰되지 않았다. 이는 Fas 항원이 stage-specific하지 않음을 추측할 수 있으며, 정상 CD34⁺ 조혈모세포에서 매우 낮은 발현율을 보이는 첨으로 볼 때³⁴⁾, 백혈병 세포에서의 Fas 항원의 발현은 aberrant 혹은 dysregulated expression 결과일 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 관해유도요법 후 완전관해율에 있어서는 Fas 항원이 높게(Fas-positive) 발현된 경우가 낮게 발현된 경우보다 높은 완전관해율을 보였으며, 관해유도에 실패한 원인의 대부분이 불응성 백혈병이었고, 재발률에 있어서는 유의한 차이는 관찰되지 않았으나 Fas 항원이 보다 높게 발현된 경우 낮은 경향이 관찰되었다. Fas 항원의 발현 정도에 따라 완전관해율에 있어서 차이가 관찰되는 기전으로는 현재까지 Fas-Fas ligand pathway에 대해 정립된 규명이 없어 단언하기는 힘들지만, 투여된 항암제가 백혈병세포에서 aberrant expression 되어 있는 Fas 항원에 직접 혹은 간접적으로 작용

함으로써 apoptosis를 유도했을 가능성, 백혈병세포의 증식에 관여하는 물질의 합성 억제, 세포내 apoptosis 신호전달체계의 변화 등을 고려해 볼 수 있겠다. 최근에는 apoptosis에 있어서 세포막에 존재하는 신호전달체계(sphingomyelin pathway)에 관여하는 ceramide의 역할 및 세포내의 interleukin-1 β -converting enzyme(ICE) 혹은 ICE-related protease의 역할의 규명 등 Fas 수용체의 downstream signalling에 관한 분자생물학적 접근이 시도되고 있어 그 결과가 주목되는 바이다^{40~43)}.

그러나 Fas 항원이 표현되더라도 anti-Fas 단일클론항체 등 ligand에 의한 apoptosis 유도 여부 및 그 정도는 세포에 따라 다양하게 나타나므로^{16, 17)} 다른 기전에 의한 항암제 투여에 따른 백혈병세포의 apoptosis를 전혀 배제할 수 없다. 특히 *bcl-2* protooncogene의 overexpression이 백혈병세포의 apoptosis를 억제한다는 일부 연구결과로 볼 때^{16~21)}, 이에 대한 연구·검토가 필요하다고 볼 수 있다. *Bcl-2* 유전자는 t(14;18) chromosomal breakpoint에서 발견되며, B-세포 림프종에 관여하는 암유전자로 처음에는 알려졌으나^{18, 19)}, 최근에는 조혈림프구계 세포의 apoptosis를 억제하여 세포의 homeostasis를 조절하는 대표적인 유전자로 인식되고 있다^{20, 21, 29, 44)}. 따라서 *bcl-2* 항원의 발현에 이상이 있을 경우 세포의 apoptosis 조절 및 세포독성이 있는 억제에 대한 감수성이 감소되는 현상이 초래되어 치료에 대한 반응이 저하될 수 있다^{45~47)}. 일부 보고에 의하면 germinal center 세포, 활성화된 말초혈액 T-세포 및 B-세포에서 *bcl-2*와 Fas 항원 발현간의 역상관관계가 관찰되며¹²⁾, 기능적으로 볼 때에도 *bcl-2*는 부분적으로 Fas 기전에 의한 apoptosis를 억제하는 것으로 관찰되고 있다^{12, 13, 16, 48)}. *Bcl-2*와 Fas간의 유전자발현 혹은 세포표면항원 발현간의 이러한 역상관관계는 apoptosis 유도 및 조절 측면에서 중요한 기능적인 의미가 있으며, 또한 이는 조혈계 세포의 분화 정도에 따라서도 다르게 관찰되고 있다^{13, 35, 49)}. 백혈병 세포에서도 실험조건 하에서 apoptosis 현상이 관찰되나^{48, 50)}, 아직 급성 백혈병에 있어서 Fas 및 *bcl-2* 유전자의 발현, 두

유전자의 상호작용에 의한 백혈병세포의 apoptosis 조절기전에 대해서는 검토된 바 없다. *Bcl-2*-positive 급성 골수성 백혈병일수록 항암요법에 잘 반응을 하지 않고, 예후가 불량하였으며, 대부분의 항암제가 백혈병세포의 apoptosis를 유도하는 기전으로 백혈병세포를 살상시킨다는 연구결과로 볼 때^{26, 46, 47)}, 급성 골수성 백혈병에서 *bcl-2*와 연관하여 Fas 항원의 발현상을 검토하고, 이의 임상적 의의를 규명하는 것은 급성 골수성 백혈병세포의 병태 기전 분석 및 치료적인 측면에서 매우 중요할 것으로 생각된다.

본 연구결과 모든 환자에서 *bcl-2* 항원이 50% 이상에서 발현되었고, *bcl-2*의 발현과 Fas 항원의 발현간의 상관관계는 관찰되지 않았으며, 이는 일부 보고의 결과와 상이한 양상을 보였다^{12, 13, 16, 45-48)}. 따라서 *bcl-2*의 발현에 따른 임상적 의의를 보다 자세히 분석하기 위해서는 CD34 항원의 발현이 백혈병 환자의 치료반응 및 예후와 연관성이 있고⁵¹⁻⁵³⁾, *bcl-2*와 CD34 항원간의 상관관계가 있다는 보고가 있는 바⁴⁷⁾, *bcl-2/CD34* 항원의 coexpression에 대한 검토가 요구될 수 있었다. *Bcl-2/CD34* coexpression은 환자마다 매우 이질적이었고, 이는 CD34 항원의 발현과는 무관하게 진단당시의 말초 혈액내의 백혈구 및 백혈병세포의 수치와 연관성이 있었으나, 치료반응 및 예후에 미치는 영향은 관찰되지 않았다. 또한 Fas 항원과 *bcl-2* 항원의 발현에 있어서 상관관계가 관찰되지 않았다. 따라서 백혈병 환자에 있어서는 정상과는 달리 apoptosis에 관여하는 Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현이 stage-specific 하지 않으며, 백혈병세포에서 aberrant expression하고 있음을 의미할 것으로 사료된다. 또한 Fas 항원의 발현율이 높은 환자에서 관해유도요법에 대한 치료반응이 더 양호했던 점을 감안하면, 백혈병세포에서의 Fas-mediated apoptosis는 *bcl-2*의 발현과는 무관하게 작용할 가능성을 제시할 수 있다.

결론적으로 급성 골수성 백혈병에서 Fas 항원의 발현은 apoptosis 관점에서 볼 때 비정상적인 조혈 기전과 연관성이 있을 것으로 보이며, 항암제에 의해 유도되는 백혈병세포의 apoptosis 과정에 Fas

항원의 활성화에 의한 기전이 일부 관여할 가능성 을 제시해 주는 임상적 의의를 부여할 수 있을 것으로 판단된다. 향후 백혈병세포에서 apoptosis에 관여하는 물질들에 관한 생물학적 의미를 검토하고, 이들에 의한 조절기전에 관한 정량적인 분석과 아울러 지속적인 분자생물학적인 접근 및 연구가 요구되며, 이를 통해 백혈병세포에서의 apoptosis를 정상화 혹은 촉진시킬 수 있는 기전 및 방법이 밝혀진다면, 치료적 측면에서 현저한 개선을 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : Fas 항원은 tumor necrosis factor 수용체/nerve growth factor 수용체 superfamily에 속하는 세포표면항원으로, 세포내로 apoptotic signal을 전달함으로서 apoptosis를 유도하는 물질로 알려지고 있다. 백혈병세포의 무한증식이 비정상적인 apoptosis 기전에 기인한다고 생각되고 있으나, 이에 대해서는 아직 확실히 알려진 바 없으며, 특히 백혈병 환자에서의 Fas 및 *bcl-2* 유전자의 발현이 갖는 임상적 의의 및 두 유전자의 상호작용에 의한 백혈병세포의 apoptosis에 미치는 영향에 대해서는 검토된 바 없다. 이에 저자 등은 급성 골수성 백혈병 환자의 골수내 백혈병세포를 대상으로 Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현율을 유세포분석을 이용하여 정량적으로 측정하며, CD34, Fas 및 *bcl-2* 항원간의 dual expression를 분석하여 이들 항원간의 상관관계를 조사하고, 이들의 발현에 따른 대상환자의 임상적 특성 및 관해유도요법후 치료반응률과의 연관성을 조사함으로써 예후인자로써의 의의를 확인하고자 하였다.

방법 : 1994년 3월부터 1995년 12월까지 연세대학교 세브란스병원에 내원하여 급성 골수성 백혈병으로 진단받고 관해유도요법을 시행받은 37례 환자를 대상으로 하였고, 이들로부터 채취·분리한 골수내 백혈병세포에서의 Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현율을 유세포분석을 통하여 분석하였다.

결과 :

1) Fas 항원의 발현율은 1.1%에서 74.4%(평균 25.7%)로 대상환자의 백혈병세포마다 이질적인 양상을 보였다. Fas-positive(Fas $\geq 20\%$) 환자군은 19례(51.4%)이었으며, M3 아형을 제외한 FAB 분류에 따른 아형간의 발현정도의 차이는 관찰되지 않았다.

2) Fas-positive 급성 골수성 백혈병에서 보다 높은 완전관해율을 보였다(84.2% versus 44.4%, $P=0.01$). 관해유도요법시 조기사망한 경우는 Fas-positive 환자군에서 1례(5.3%), Fas-negative 환자군에서 4례(22.2%)이었고, 불응성 백혈병으로 판단된 경우는 각각 2례(10.5%), 6례(33.3%)이었다. Fas 항원의 발현에 따른 재발률 및 1년-무병생존율과의 연관성은 없었다.

3) *Bcl-2* 항원의 발현은 59.3%에서 99.8%(평균 90.8%)로 모든 환자의 백혈병세포에서 50%이상 높게 발현되는 양상을 보였다. *Bcl-2/CD34* coexpression-positive(*bcl-2* $^+$ /CD34 $^+ \geq 20\%$)인 경우는 19례(51.4%)이었으며, M3 아형을 제외한 FAB 아형간의 발현정도의 차이는 관찰되지 않았다. *Bcl-2* $^+$ /CD34 $^+$ 항원의 coexpression에 따른 진단당시의 임상양상을 비교한 결과, 백혈구 및 백혈병아세포 수치가 *bcl-2* $^+$ /CD34 $^+$ coexpression-positive인 경우에서 보다 높게 관찰되었다. 하지만 *bcl-2* $^+$ /CD34 $^+$ coexpression 정도와 완전관해율 및 생존율 등 치료반응과의 연관성은 없었다.

4) CD34 항원의 발현율과 Fas 및 *bcl-2* 항원의 발현율에 있어서의 상관관계는 관찰되지 않았다.

5) 진단당시의 백혈구 수치($P=0.001$) 및 Fas 항원의 발현율($P=0.01$)이 완전관해율에 영향을 주는 독립적인 예후인자로 확인되었다.

결론 : Fas 항원의 발현이 급성 골수성 백혈병 치료시 임상적 예후인자로써의 의의가 있을 것으로 보이며, 향후 이에 관한 분자생물학적 접근을 통한 생물학적 의미의 규명 및 apoptosis의 보다 정량적인 분석이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 26:239-257, 1972
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol 68:251-306, 1980
- Steller H: *Mechanisms and genes of cellular suicide*. Science 267:1445-1449, 1995
- Raff MC: *Social controls on cell survival and cell death*. Nature 356:397-400, 1992
- Cohen JJ, Duke RC: *Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death*. J Immunol 132:38-42, 1984
- Williams GT, Smith CA: *Molecular regulation of apoptosis: Genetic control on cell death*. Cell 74:777-779, 1993
- Lotem J, Cragoe EJ, Sachs L: *Rescue from programmed cell death in leukemic and normal myeloid cells*. Blood 78:953-960, 1991
- Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnert RP, Green DR: *Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas*. Science 257:212-214, 1992
- Evan GL, Wyllie AH, Gilbert CS: *Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein*. Cell 69:119-128, 1992
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: *Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6*. Nature 352:345-347, 1991
- Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J: *Induction of apoptosis by wild type p53 in a human colon tumor derived cell line*. Proc Natl Acad Sci USA 89:4495-4499, 1992

- 12) Yoshino T, Kondo E, Cao L, Takahashi K, Hayashi K, Nomura S, Akagi T: *Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes.* Blood 83:1856-1861, 1994
- 13) Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N: *Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils.* Blood 84:1201-1208, 1994
- 14) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: *The polypeptide encoded by cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.* Cell 66:233-243, 1991
- 15) Ohem A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponsting H, Krammer PH: *Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen.* J Biol Chem 267:10709-10715, 1992
- 16) Mapara MY, Bargou R, Zugck C: *APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: Correlation with bcl-2 oncogene expression.* Eur J Immunol 23:702-708, 1993
- 17) Owen-Schaub LB, Meterissian S, Ford RJ: *Fas/APO-1 expression and function on malignant cells of hematologic and nonhematologic origin.* J Immunother 14:234-241, 1993
- 18) Tsujimoto Y, Croce CM: *Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma.* Proc Natl Acad Sci USA 83:5214-5218, 1985
- 19) Cleary ML, Sklar J: *Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a break-point cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18.* Proc Natl Acad Sci USA 82:7439-7444, 1985
- 20) Korsmeyer SJ: *A repressor of lymphocyte death.* Immunol Today 13:285-288, 1992
- 21) Korsmeyer SJ: *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.* Blood 80:879, 1992b
- 22) Sachs L: *Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia.* Nature 274:535-539, 1978
- 23) Sachs L: *The molecular control of hematopoiesis: From clonal development in culture to therapy in the clinic.* Int J Cell Cloning 10:196-204, 1992
- 24) Trauth RC, Klas C, Pters AMJ, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH: *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.* Science 245:301-305, 1989
- 25) Lotem J, Sachs L: *Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor β 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells.* Blood 80:1750-1757, 1992
- 26) Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Grant S, Bullock G, Huang Y, Ponnathpur V, Mahoney ME: *High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells.* Blood 82:3133-3140, 1993
- 27) Lotem J, Sachs L: *Regulation by bcl-2, c-myc and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation competent and defective myeloid leukemic cells.* Cell Growth Differ 4:41-48, 1993
- 28) Goldstein P, Ojcius DM, Young DE: *Cell*

- death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121:29-65, 1991
- 29) Nunez G, London L, Hockenberry D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ: *Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines.* *J Immunol* 144:3602-3610, 1990
- 30) McConkey DJ, Aguilar-Santeelies M, Hartzell P: *Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells.* *J Immunol* 146: 1072-1076, 1991
- 31) Hickman JA: *Apoptosis induced by anticancer drugs.* *Cancer Metast Rev* 11:121-139, 1992
- 32) Suda T, Nagata S: *Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis.* *J Exp Med* 179:873-879, 1994
- 33) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: *Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family.* *Cell* 75:1169-1178, 1993
- 34) Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS: *Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon γ and tumor necrosis factor α and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro.* *Blood* 85:3183-3190, 1995
- 35) Stadler T, Hahn S, Erb P: *Fas antigen is the major target molecule for CD4⁺ T-cell mediated cytotoxicity.* *J Immunol* 152:1127-1133, 1994
- 36) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.* *Nature* 356:314-319, 1992
- 37) Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N: *Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood.* *J Immunol* 149:3753-3758, 1992
- 38) Kotany T, Aratake Y, Kondo S, Tamura K, Ohtaki S: *Expression of functional Fas antigen on adult T-cell leukemia.* *Leukemic Res* 18:305-310, 1994
- 39) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: *A cell killing monoclonal antibody(anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.* *J Exp Med* 169:1747-1756, 1989
- 40) Obeid LM, Hannun YA: *Ceramide: a signal and mediator of growth suppression and apoptosis.* *J Cell Biochem* 58:191-198, 1995
- 41) Kolesnick RN, Friedman AH, Fuks Z: *The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation.* *Biochem Cell Biol* 72:471-474, 1994
- 42) Kolesnick RN, Fuks Z: *Ceramide: a signal for apoptosis or mitogenesis?* *J Exp Med* 181:1949-1952, 1995
- 43) Kumar S: *ICE-like protease in apoptosis.* *Trend Biochem Science* 20:198-202, 1995
- 44) Strasser A, Harris AW, Cory S: *Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship.* *Cell* 67:889-894, 1991
- 45) Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontanella E, Melani C, Pezzella F, Pierotti MA, Porta GD: *Bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells.* *Blood* 79:1291-1298, 1992
- 46) Maung ZT, Maclean FR, Reid MM, Pearson AD, Proctor SJ, Hamilton PJ, Hall AG: *The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukemia.* *Br J Hematol* 88:105-109, 1994
- 47) Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D: *High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemo-*

- therapy. *Blood* 81:3091-3096, 1993
- 48) Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S: Effect of *bcl-2* on *Fas* antigen-mediated cell death. *J Immunol* 151:621-627, 1993
- 49) Salmon M, Pilling D, Borthwick NJ, Viner N, Janossy G, Bacon PA, Akbar AN: The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol* 24:892-899, 1994
- 50) Miyashita T, Reed JC: *Bcl-2* oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81:151-157, 1993
- 51) 이석, 민유홍, 이승태, 이정운, 권오헌, 한지숙, 고윤웅: 급성 백혈병에서 CD34 세포면역표지
자의 임상적 의의. 대한혈액학회지 29:277-286, 1994
- 52) Campos J, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A, Maupas J, Gentilhomme O, Ehretsam A, Fiere D: Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia, correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol* 72:161-166, 1989
- 53) Borowitz MJ, Gockerman JP, Moore JO, Civin CI, Page SO, Robertson J, Bigner SH: Clinicopathologic and cytogenetic features of CD34(MY10)-positive acute nonlymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 91:265-270, 1989