

조직적합형항원 일치성 동중조혈모세포이식의 성적예측인자로서 Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 불일치성의 임상적 의미

경북대학교병원 ¹혈액종양내과, ²조혈모세포이식센터

곽동훈¹ · 김동환^{1,2} · 김시내¹ · 안병민¹ · 문준호¹ · 채의수¹
백진호¹ · 김종광^{1,2} · 손상균^{1,2} · 이난영² · 서장수² · 이규보¹

Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Disparity between Donor and Recipient has a Potential to Predict the Outcomes of HLA-identical Allogeneic Stem Cell Transplantation

Dong Hoon Kwack, M.D.¹, Dong Hwan Kim, M.D.^{1,2}, Shi Nae Kim, M.D.¹, Byung Min Ahn, M.D.¹, Joon Ho Moon, M.D.¹, Yee Soo Chae, M.D.¹, Jin Ho Baek, M.D.¹, Jong Gwang Kim, M.D.^{1,2}, Sang Kyun Sohn, M.D.^{1,2}, Nan Young Lee, M.D.², Jang Soo Suh, M.D.² and Kyu Bo Lee, M.D.¹

¹Department of Hematology/Oncology, ²Stem Cell Transplantation Center,
Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

Background: Detection of variable number of tandem repeats (VNTR) between recipient and donor has been adopted to monitor the degree of chimerism after allogeneic stem cell transplantation (SCT). In allogeneic SCT, besides MHC-disparity, the disparity of various polymorphous proteins encoded by several genes may play a critical role in the pathogenesis of graft-versus-host disease (GVHD). However, the biologic effect of VNTR disparity has been scarcely studied.

Methods: We analyzed 84 patients receiving SCT from HLA-identical sibling (n=68) or unrelated donors (n=16). Enrolled diseases included AML 48, ALL 8, CML 15, NHL 10, and high-risk MDS 3. The PCR was performed to amplify 3 VNTR regions (D1S80, D1S111, and D17S5).

Results: We observed strong correlation between the D1S80 disparity and transplant outcomes in terms of OS ($P=0.0179$) or non-relapse mortality (NRM) ($P=0.0305$), but not for D1S111 or D17S5 disparity. The D1S80-fully matched pair showed a better OS (72% vs 38%) and lower NRM (17% vs 50%) compared to partially matched or mismatched pairs. In multivariate analyses, D1S80-fully matched pair was found to be independent favorable prognostic factor for OS ($P=0.03$) or NRM ($P=0.05$). In addition, the D1S80 disparity was significantly associated with the myeloid engraftment speed ($P=0.01$) or the occurrence of gut chronic GVHD ($P=0.05$).

접수 : 2005년 10월 19일, 수정 : 2005년 11월 15일

승인 : 2005년 11월 30일

교신저자 : 손상균, 대구시 중구 삼덕 2가 50

☎ 700-721, 경북대학교병원 혈액종양내과

Tel: 053-420-5587, Fax: 053-426-2046

E-mail: sksohn@knu.ac.kr

Correspondence to : Sang Kyun Sohn, M.D., Ph.D.

Department of Oncology/Hematology, Kyungpook National University Hospital

50 Samdeock 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea

Tel: 82-53-420-5587, Fax: 82-53-426-2046

E-mail: sksohn@knu.ac.kr

Conclusion: Our data suggest that disparities in D1S80-located on chromosome1-seemed to be associated with increased incidence of gut chronic GVHD and NRMs, thus suggesting the existence of unknown genes of minor histocompatibility antigens targeting gut or cytokine/cytokine receptor on chromosome 1. (*Korean J Hematol* 2005;40:231-241.)

Key Words: Variable number of tandem repeats, Allogeneic stem cell transplantation, Graft-versus-host disease

서 론

Variable number of tandem repeats (VNTR) 또는 short tandem repeats (STR)은 동종조혈모세포이식 후의 조혈모세포 생착여부를 판단하거나,¹⁾ 키메라즘의 정도를 측정하는 목적으로 이용되어 왔으며,²⁾ 이러한 목적으로 이용되는 여러 검사법 중에서도 민감도와 특이도가 높은 것으로 알려져 있다.³⁻⁷⁾ 하지만 공여자와 수여자 간의 VNTR이 완전하게 일치하는 경우에는, 이러한 생착여부 판단이나, 키메라즘의 모니터링 목적으로서의 VNTR 측정의 의의는 잃어 버리게 된다.

조직적합형항원 일치성 동종조혈모세포이식술 후 발생하는 이식편대숙주질환의 발병기전에 공여자의 동종반응성 T-세포 활성화가 중요한 기전 중의 하나인데, 이의 활성화를 위해서는 수여자 및 공여자의 염색체 내 다양한 부위에 위치한 유전자 중 일부의 불일치를 동종반응성 T-세포가 인지함으로써 시작된다고 할 수 있다.^{8,9)} 이러한 기전과 유사하게, 공여자와 수여자 간의 VNTR 또는 STR의 불일치는 해당 염색체 또는 유전자 집단의 불일치를 반영한다고 할 수 있다. 하지만, 이러한 VNTR 또는 STR의 불일치가 지니는 생물학적 기능에 대한 연구는 전무하다 할 수 있다.

최근의 두 연구는 이러한 공여자/수여자 간의 STR의 불일치가 이식편대숙주질환의 발생과 관계함을 시사한다. Alcoceba 등¹⁰⁾은 D13S317, D18S51 그리고 TPOX 부위의 불일치가 급성이식편대숙주질환의 중증도와 연관되며, 또한 D16S539 부위의 불일치는 만성이식편대숙주질환과 연관된다고 보고하였다. 이와 유사하게 Stern 등¹¹⁾은 Alcoceba 등의 보고에 언급된 바 있는 D13S317 부위의 불일치가 급성이식편대숙주질환의 발생빈도 및 중증도와 연관된다고 보고하였고, 현재까지 우리가 발견하지 못한 소수 조직적합형항원(minor histocompatibility antigen)이 D13S317 부위 내지는 제13번 염색체에 위치하지 않을까 제

시하고 있다.

본 연구는, 이러한 연구배경을 바탕으로 본원에서 시행한 D1S80, D1S111, D17S5 세 가지 부위의 VNTR의 공여자/수여자 간의 불일치를 분석함으로써 이식이식성적이나 이식편대숙주질환의 발생과 어떠한 연관성을 보이는지 알기 위해 고안되었다. 특히, D1S80 부위의 불일치에 주안점을 두어, 조직적합형항원 일치성 혈연 및 비혈연 동종 조혈모세포이식술 후의 비재발성치사율 및 위장관 특이 만성 이식편대숙주질환의 누적발생률의 차이를 살펴보았다.

대상 및 방법

1. 환자군 특성 및 동종이식

본 연구는 1996년 12월부터 2004년 12월까지 경북대학교병원에서 조직적합형항원 일치형 동종 조혈모세포이식술을 시행 받은 84명의 환자를 대상으로 하였는데, 이 중 68명은 혈연성 공여자로부터 이식 받은 경우이고, 16명은 비혈연 공여자로부터 이식 받은 경우였다. 중간 연령은 35.0세(범위; 17~58세)였고, 남녀 비는 64% 대 36%였다(54명 : 30명). 환자군의 원질환으로는 급성골수성백혈병(n=48, 56%), 급성림프구성백혈병(n=8, 10%), 만성골수성백혈병(n=15, 18%), 악성림프종(n=10, 12%) 및 고위험도의 골수이형성증후군(n=3, 4%)이었고, 이 중 47명(56%)의 환자는 표준 위험군이었으며, 37명(44%)은 고위험군이였다.

동종 조혈모세포이식술 과정은 전술한 바와 같이 시행되었다.^{12,13)} 간략히 요약하자면, 전처치로는 busulfan/cyclophosphamide (BuCy; n=60) 또는 fludarabine-기저 비골수과괴성 전처치(n=24)가 이용되었고, 이 중 fludarabine-기저 비골수과괴성 전처치는 다음과 같은 용법이 이용되었다. 1) Fludarabine, Busulfan, Cyclophosphamide (n=12), 2) Fludarabine, Idarubicin, Cytarabine (n=4), 3) Fludarabine, Cyclophosphamide (n=2), 4) Fludarabine, Busulfan, Anti-thy-

mocyte globulin (ATG, ATGAM; Pharmacia-Upjohn, Kalamazoo, MI, USA)(n=6). 전술한 바와 같이 백혈구분별을 통해 61명(73%)의 혈연 공여자로부터 말초조혈모세포가 채집되었고,^{14,15)} 7명의 혈연 공여자 및 16명의 비혈연 공여자(총 23명, 27%)로부터는 골수채집을 통해 조혈모세포이식이 진행되었다. 조직적합형항원 일치성 비혈연 골수이식을 시행하기 전에 고해상도 조직적합형항원 검사(Biosewoom, 서울)를 수여자 및 공여자의 HLA-A, B, C, DR 항원에 대해 시행하여 분자단위에서의 각 조직적합형항원의 일치여부를 확인하였다.

급성 이식편대숙주질환 예방을 위해 77명의 환자에 대해서는 methotrexate (MTX)와 cyclosporin A (CSA; Cipol-N[®], 종근당, 서울)을 이용한 복합요법이 이용되었고, 5명의 환자에 대해서는 CSA 단독요법, 2명의 환자에 대해서는 tacrolimus와 MTX를 이용한 복합요법이 각각 이용되었다. 감염예방요법은 ciprofloxacin (250mg bid p.o.)/metronidazole (500mg tid p.o.)/fluconazole (100mg qd p.o.)을 전처치 시작일부터 투여하였고, acyclovir (600mg bid p.o.)는 조혈모세포이식 전일부터 이식 후 180일까지 투여하였다. Co-trimoxazole은 생착 후 투여하기 시작하였고, 간장맥폐쇄질환의 예방을 위해 ursodeoxycholic acid 경구투여를 전환자에서 전처치 시작과 동시에 시행하였다. 정맥면역글로불린(500mg/kg)은 이식 후 3개월까지 격주마다 투여하였고, 이후부터 이식 후 6개월까지는 동량을 매달 투여하였다. 혈액제제 수혈 시에는 백혈구제거 및 방사선 조사 후에 사용하였다.

2. Variable number of tandem repeats/polymerase-chain reaction (VNTR/PCR)

1) DNA 추출: 말초혈액 또는 골수를 검체로 His-

topaque-1017 (Sigma Diagnostics, USA)를 이용하여 단백질을 분리하고 Phenol-Chloroform-Isopropanol 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 순도는 1.8~2.0으로 유지하여 사용하였다.

2) 중합효소연쇄반응: D1S80, D1S111, D17S5 3종류의 부위에 대한 표지자를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 각 표지자의 염색체상 위치, 예상되는 중합효소연쇄반응 증폭산물인 대립인자의 크기, 예상되는 대립인자의 수 및 각 시발체의 염기서열은 Table 1과 같다. 각각의 시발체는 국내(Bioneer사)에서 제조한 것을 사용하였다.

중합효소연쇄반응은 Accupower PCR premix (Bioneer, 청원, 한국) 17uL, 1uL씩의 시발체, 250ng의 DNA를 혼합하여 총 20uL이 되도록 하여 시행하였다. D1S80과 D1S111 부위에 대한 중합효소연쇄반응은, 94°C에서 30초간 변성 후, 65°C에서 30초간 결합반응주기를 30회 반복하고 65°C에서 20분간 연장반응을 시켰다. D17S5 부위에 대한 중합효소연쇄반응은, 94°C에서 45초간 변성 후, 60°C에서 30초간 결합반응 및 72°C에서 120초간 연장반응을 35회 반복한 후 72°C에서 2분간 추가 연장반응을 진행하였다. 중합효소연쇄반응은 GeneAmp PCR 2400/9600 (Perkin Elmer, Roche Diagnostics Industry, Basel, Switzerland)을 이용하였다.

3) 중합효소연쇄반응의 결과분석: 중합효소연쇄반응 산물의 분석은 전기영동기 Power pac 1000 (BioRad, USA)으로 시행하였고, 2% agarose gel에 1×TBE (Trizma base 108g, Boric acid 55g, 0.5M EDTA 40mL를 1,000 mL가 되게 증류수를 첨가한 후, 사용할 때 10배로 희석하여 사용) 완충액으로 115volt에서 50분간 전기영동하였다. DNA band 판독을 위한 염색액으로 1% ethidium bromide를 사용하였다. 전기영동된 결과는 1D-main software (Bioneer, 청원, 한국)를 이용하여 스-

Table 1. Characteristics of the human long tandem repeat markers

Loci	Allele size (bp)	Allele number	PCR primer sequence
D1S80	224~6400	>29	5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC-3' 5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G-3'
D1S111	500~1000	>13	5'-TGT GAG TAG AGG AGA CCT CAC-3' 5'-AAA GAC CAC AGA GTG AGG AGC-3'
D17S5	200~2000	>11	5'-GGT CGA AGA GTG AAG TGC ACA G-3' 5'-CAC AGT CTT TAT TCT TCA GCG-3'

캔하여 최종 결과를 얻었다. 본 연구는 경북대학교병원 임상연구심의위원회의 승인 하에 시행되었다. 전체 환자 중에 D1S80부위 VNTR 결과를 이용가능하였던 환자는 84명, D1S111부위는 83명, D17S5부위는 78명이었다.

3. 정의

VNTR 간의 일치도는 1) 완전 일치, 2) 부분 일치, 3) 완전 불일치의 3가지로 판정하였다. 완전 일치의 경우 공여자와 수여자간에 DNA band가 완전하게 일치한 경우로 정의하였고, 부분 일치의 경우는 일부의 일치 band와 함께 일부의 불일치 band가 같이 공존하는 경우로 정의하였다(Fig. 1). 완전 불일치는 공여자와 수여자간의 DNA band상에 일치하는 band가 하나도 없이 불일치 band만 보이는 경우로 정의하였다.

조혈모세포를 처음으로 주입하는 날을 day 0로 정의하였고, 급성 및 만성 이식편대숙주질환의 진단

및 정도 판정은 기존의 판정기준을 따랐다.^{16,17)} 위장관 이식편대숙주질환은 위장관 질환의 증상이 있거나 정기 검사에서 이학적 또는 조직학적 검사에 의해서 진단하였다. 장기 특이 급성 및 만성 이식편대숙주질환의 시작일은 장기 특이적 증상 또는 이학적 소견이 처음으로 관찰된 날을 기준으로 하였다.

전체 생존은 이식 후 사망일까지로 정의하였고, 비재발성 치사는 원질환의 재발 및 진행과는 무관하게 이식편대숙주질환의 악화, 기회감염, 급성호흡기증후군, 출혈, 생착거부, 간부전, 간정맥폐쇄성질환, 혈전성 혈소판 감소성 자반증 등의 원인으로 사망하는 경우로 정의하였다. 재발은 이식 후 원질환이 재발 또는 진행한 경우로 정의하였다. 고위험군의 정의는 이전의 동종 또는 자가이식 후 재발한 경우, 1차 완전관해 상태가 아닌 급성백혈병, 필라델피아 양성 급성림프구성백혈병, 진행병기의 만성 골수성백혈병 및 치료 불응성 또는 다재발성 림프

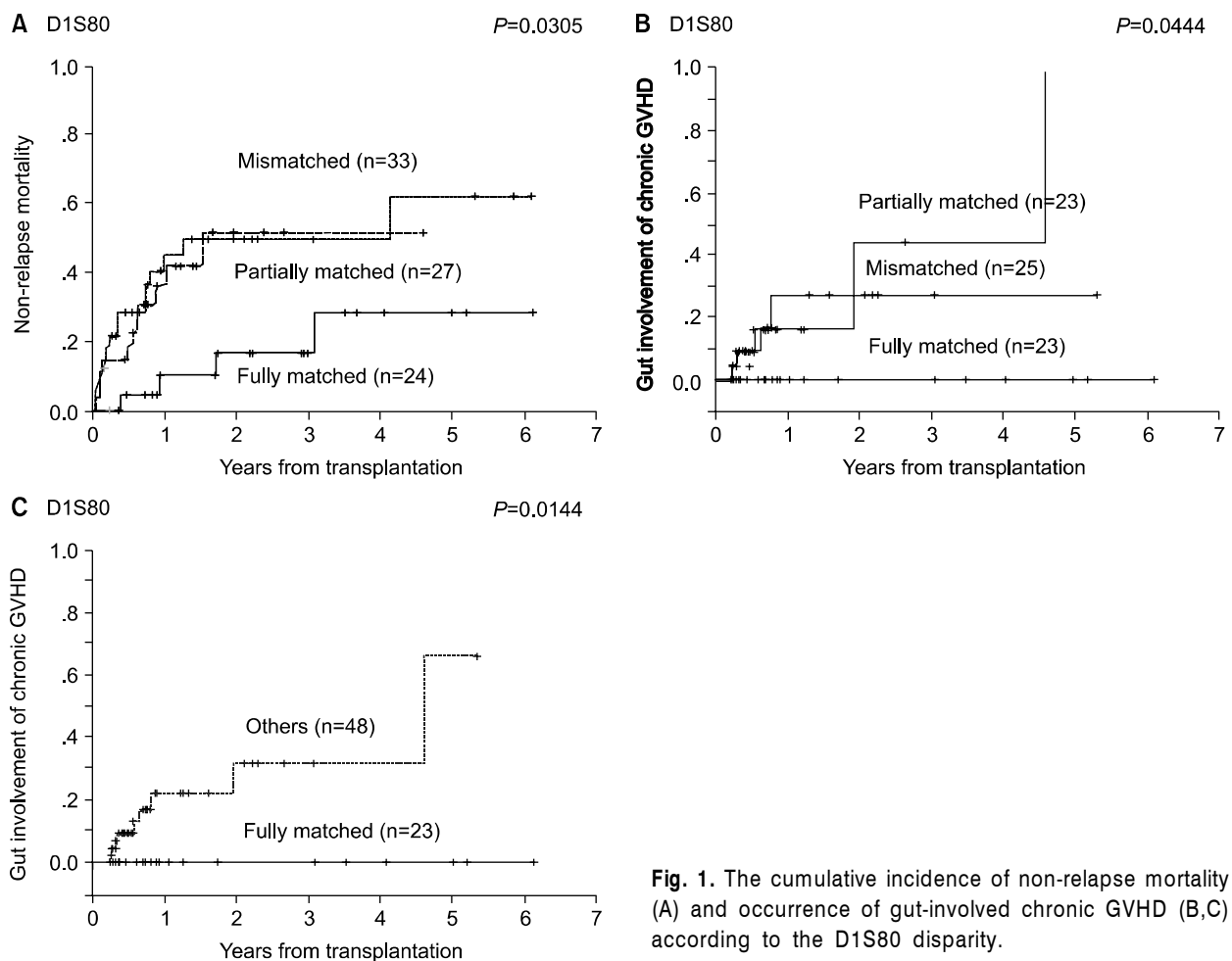


Fig. 1. The cumulative incidence of non-relapse mortality (A) and occurrence of gut-involved chronic GVHD (B,C) according to the D1S80 disparity.

종으로 정의하였다.

4. 통계 분석

환자의 임상정보는 2005년 2월을 기준으로 분석하였다. 환자군 특성, 이식시기 및 이식성적의 VNTR 불일치성에 따른 차이를 비교하기 위해 Fisher's exact test 또는 Mann-Whitney's U-test를 이용한 단변량 분석을 시행하였다. 전체생존율 및 비재발치사율, 누적재발률 등은 Kaplan-Meier 방법을 이용해 구하였다. D1S80, D1S111 및 D17S5 부위의 VNTR 불일치성에 따른 전체생존율 및 비재발치사율, 누적재발률의 차이는 log-rank test를 이용해 비교하였다. 다변량 생존분석을 위해 Cox 비례위험도모형을 채택하였는데, 전체생존율 및 비재발치사율, 누적재발률의 후보예후인자의 대입은 backward conditional procedure를 이용하였고, P -값 0.05 이하인 경우 독립적 예후인자로 판정하였다. 다변량 생존분석에 이용된 후보예후인자는 아래와 같다. D1S80부위의 VNTR 불일치도(완전일치 대부분일치/완전불일치), 원질환상태(표준위험군 대 고위험군), 이식된 CD34+ 세포량($6 \times 10^6/\text{kg}$ 기준), 공여자의 혈연여부(혈연성 대 비혈연성), 급성 이식편대숙주질환(제0~2도 대 제3, 4도), 만성 이식편대숙주질환 발생여부, 위험도와 95% 신뢰구간의 추정치를 같이 기록하였고, 모든 통계과정에서 P -값 0.05를 유의수준으로 정하였다. 모든 통계는 SPSS software package (SPSS 11.5 Inc. Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

결 과

1. 이식성적

중앙추적기간 712일 동안(생존자 대상, 범위, 83 ~ 2,229일), 2년 전체생존율 $48 \pm 6\%$, 2년 비재발치사율 $40 \pm 6\%$ 및 2년 누적재발률 $38 \pm 6\%$ 가 관찰되었고, 전체 환자 84예 중 43예(51%)가 사망하였는데, 재발과 무관한 치사가 30예(36%), 재발로 인한 사망이 13예(15%)였다. 공여자가 혈연성인가 비혈연성인가에 따른 이식성적의 차이는 관찰되지 않았다(전체생존율, $P=0.6942$; 비재발치사율 $P=0.3223$; 누적재발률, $P=0.1759$).

2. 각 부위별 VNTR 불일치의 빈도

전체 84명의 공여자/수여자간의 VNTR 불일치도의 빈도는 다음과 같다. D1S80 부위에 대해 24예(29%)가 완전일치쌍이었고, 27예(32%)는 부분일치쌍, 33예(39%)는 완전 불일치쌍이었다. D1S111 부위에 대해서는 24예(29%)의 완전일치, 38예(46%)의 부분일치, 21예(25%)의 완전불일치쌍이 확인되었다. D17S5 부위에 대해서는 37예(47%)의 완전일치, 17예(22%)의 부분일치 및 24예(31%)의 완전불일치쌍이 각각 확인되었다.

D1S80 및 D1S111, D17S5 부위의 불일치도에 따른 이식성적의 차이는 Table 2에 요약되어 있다. D1S80-완전일치군이 부분일치 또는 완전불일치군에

Table 2. The transplant outcomes in terms of overall survival, non-relapse mortality or relapse according to the VNTR disparities

Loci	2Y-OS (%)	2Y-NRM (%)	2Y-Relapse (%)
D1S80	0.0179	0.0305	0.2317
Fully matched (n=24, 29%)	72±10	17±9	25±10
Partially matched (n=27, 32%)	37±11	52±12	41±11
Mismatched (n=33, 39%)	38±9	50±10	43±11
D1S111	0.6327	0.6334	0.8000
Fully matched (n=24, 29%)	50±11	35±11	36±11
Partially matched (n=38, 46%)	50±8	40±9	31±8
Mismatched (n=21, 25%)	45±12	46±13	57±16
D17S5	0.8470	0.9814	0.9953
Fully matched (n=37, 47%)	48±9	43±9	37±9
Partially matched (n=17, 22%)	52±12	33±12	40±14
Mismatched (n=24, 31%)	36±12	50±14	39±13

Abbreviations: OS, overall survival; NRM, non-relapse mortality.

비해 향상된 전체생존율($P=0.0179$) 및 감소된 비재발치사율($P=0.0305$)을 보여주는 반면, 재발률의 차이는 관찰되지 않았다. D1S111 또는 D17S5 부위의 불일치도에 따른 이식성적의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

3. D1S80부위 VNTR불일치와 이식성적의 연관성

D1S80부위의 완전일치군, 부분일치군 및 완전불일치군 간에 환자의 연령, 성별, 진단명과 이식 수기, 즉 전처치요법, 이식편대숙주병 예방법, 조혈모세포의 종류와 양 등은 차이가 없었다. 그러나, Table 3에 보여지는 바와 같이 D1S80 완전일치군의 전체

Table 3. Transplantation outcomes according to VNTR disparity for D1S80 loci

Disparity of D1S80	Fully matched pair (n=24, 29%)	Partially matched pair (n=27, 32%)	Mismatched pair (n=33, 39%)	P-value
Follow-up duration (days)	347 (15~2181)	232 (17~1290)	479 (15~2181)	
Engraftment				
Myeloid	13.0 (10~24)	13.5 (10~25)	16 (10~30)	0.01
Platelet	14 (9~161)	14 (10~56)	17 (0~42)	0.26
Acute GVHD (n=81)	(24)	(26)	(31)	
Overall	21 (88)	23 (89)	22 (71)	0.19
≥grade 2	17 (71)	20 (77)	20 (65)	0.59
≥grade 3	4 (17)	7 (27)	8 (26)	0.64
Skin, ≥stage 2	12 (50)	14 (54)	15 (48)	0.92
Liver, ≥stage 1	4 (17)	9 (31)	13 (42)	0.14
Gut, ≥stage 1	14 (58)	16 (62)	17 (55)	0.88
Chronic GVHD (n=71)	(23)	(23)	(25)	
Limited+extensive	16 (70)	19 (83)	20 (80)	0.60
Extensive	9 (39)	11 (48)	11 (44)	0.87
Skin involvement	11 (48)	13 (57)	11 (44)	0.68
Hepatic involvement	11 (48)	12 (52)	14 (56)	0.85
Gut involvement	0 (0)	5 (22)	4 (16)	0.05
Infectious events				
CMV reactivation	15 (63)	15 (56)	17 (52)	0.71
Infectious events	11 (46)	10 (37)	18 (55)	0.40
Bacterial infections	6 (25)	7 (26)	10 (30)	0.91
Viral infections	6 (25)	3 (11)	10 (30)	0.21
Fungal infections	3 (13)	3 (11)	4 (12)	1.00
Survival				
Relapse	8 (33)	10 (26)	6 (29)	0.84
Deaths	7 (29)	15 (56)	21 (64)	0.03
Causes of death				
Non-relapse mortalities	4 (17)	11 (41)	15 (45)	0.06[†]
GVHD+/-infection	4 (17)	10 (37)	13 (39)	0.15 [§]
Others	0 (0)	1 (4)*	2 (6) [†]	0.78
Progression	3 (12)	4 (15)	6 (18)	0.93

*Others denote veno-occlusive disease (n=1), [†]Others denote veno-occlusive disease (n=1) and hemorrhagic uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura (n=1), respectively. [†] $P=0.02$ when analyzed between D1S80 fully matched pairs versus others including partially matched and mismatched pairs by chi-square test, [§] $P=0.05$ when analyzed between D1S80 fully matched pairs versus others including partially matched and mismatched pairs by chi-square test.

Abbreviation: GVHD, graft-versus-host disease.

생존율 및 골수계생착이 호전되는 결과를 보여주고 있다. 반면 급성 이식편대숙주질환의 발생 및 거대 세포바이러스감염증, 기회감염, 재발 등에는 차이가 없었다.

Table 2와 Fig. 1A에 보여주는 것처럼 D1S80 완전일치군의 비재발 치사율($17 \pm 9\%$)이 부분일치군($52 \pm 12\%$) 또는 완전불일치군($50 \pm 10\%$)에 비해 현저히 낮았으나($P=0.0305$), 누적재발률에는 세 군 간에 차이가 없었다($P=0.2317$). 일반적으로 동종 조혈모세포이식 후의 2가지 중요한 비재발 치사원인으로 이식편대숙주질환과 기회감염을 들 수 있는데, 본 연구에서 VNTR불일치도는 기회감염의 발생률이나 급성 및 만성 이식편대숙주질환의 발생률 또는 중증도와 연관성을 보이지 않았다(Table 3). 그러나, 장기 특이적 이식편대숙주질환의 발생률을 분석해보면, 위장관 특이적 만성 이식편대숙주질환의 발생은 D1S80부위의 VNTR 불일치도에 비례하여 발생함이 관찰되었다. D1S80부위 완전일치군에서는 위장관 특이적 만성 이식편대숙주질환이 1예도 발생하지 않은 반면, 부분일치군에서는 22%, 완전불일치군에서는 16%의 위장관 특이적 만성 이식편대숙주질환의 발생이 관찰되었다($P=0.05$; Table 3, Fig. 1B). 이러한 통계적인 유의성은 D1S80부위 완전일치군과 비-완전일치군을 비교하면 Fig. 1C와 같이 더욱 확연하게 드러나게 된다(0% in fully matched pair vs 32% in other pairs; $P=0.0144$).

D1S80부위의 VNTR 불일치도에 따른 환자들의 사인을 분석해보면(Table 3), D1S80부위 완전일치군에서는 단 4예(17%)만이 비재발성 치사를 기록한 반면, 부분일치 또는 완전불일치군 중 26예(43%)의 환자가 비재발성 치사가 사인이었다($P=0.02$). 또한 이러한 비재발성 치사가 이식편대숙주질환 또는 기회감염으로 인한 경우가 D1S80부위 완전일치군에서는 17%인 반면, 부분일치 또는 완전불일치군에서는 38%를 차지하였다($P=0.05$). 그러나, 원질환의 진행 또는 재발로 인한 치사율에는 D1S80부위 완전일치군(12%)과 부분일치 및 완전불일치군(17%) 간의 차이는 관찰되지 않았다($P=0.93$).

추가적으로 각 군의 골수구계 및 혈소판 생착속도를 비교해보면, D1S80부위 완전일치 또는 부분일치군의 골수구계 생착속도가 완전불일치군에 비해 통계적으로 유의하게 빨리 생착되었으나($P=0.01$), 혈소판계의 생착에는 차이가 관찰되지 않았다($P=0.26$, Table 3).

4. 다변량 분석

Cox 비례위험도 모형을 이용한 다변량 생존분석의 결과를 요약하면, D1S80부위 완전일치군은 동종 조혈모세포이식 후 전체생존율 및 비재발성치사율 측면에서 양호한 이식성적을 독립적으로 예측할 수 있는 인자로 분석되었으나, 재발과는 무관하게 분석되었다(Table 4).

Table 4. Multivariate survival analysis of the prognostic factor for overall survival and the cumulative incidence of non-relapse mortality or relapse in overall patients

	Risk factor	2-yr rate (%)	HR [95% CI]	P-value
Overall Survival				
D1S80 disparity	Fully matched	72±10	1.0	0.03
	Others	38±7	2.217 [1.128~4.826]	
Non-Relapse Mortality				
D1S80 disparity	Fully matched	17±9	1.0	0.05
	Others	50±8	2.551 [1.000~7.021]	
Acute GVHD, ≥gr 3	Grade 0~2	40±7	1.0	0.004
	Grade 3, 4	61±13	3.802 [1.538~9.346]	
Relapse				
Disease risk	Standard risk	28±8	1.0	0.01
	Advanced risk	57±10	3.155 [1.319~7.576]	

For the analysis, the D1S80 disparity (fully matched pair vs partially matched or mismatched pairs), the disease status (standard vs advanced risk), transplanted dose of CD34+ cells ($6 \times 10^6/\text{kg}$), the donor type (sibling vs unrelated donors) and GVHD (acute GVHD grade 0~2 vs 3,4, and the development of chronic GVHD) were included.

전체생존율을 보면, D1S80부위 완전일치군에 비해 부분일치 및 완전불일치군의 경우 낮은 전체생존율을 보였고, 그 위험도는 약 2.22배 정도였으며 ($P=0.03$, HR 2.217 [1.128~4.826]), 비재발치사율의 측면에서 D1S80부위 완전일치군에 비해 부분일치 및 완전불일치군의 경우 높은 비재발치사율을 보였고, 그 위험도는 약 2.55배 정도였다($P=0.05$, HR 2.551 [1.000~7.021]). 이외에 비재발치사율과 연관된 예후인자로써는 제3도 이상의 중증 급성이식편대숙주질환의 발생이 확인되었다($P=0.004$, HR 3.802 [1.538~9.346]). D1S80부위의 VNTR불일치도는 재발에는 아무 영향을 주지 못하였고, 이에는 원질환 위험도가 영향을 주었다($P=0.01$, HR 3.155 [1.319~7.576]).

고 찰

본 연구는 조직적합형항원 일치성 동종 조혈모세포이식술 후의 임상결과와 공여자/수여자간의 VNTR 불일치(특히 D1S80 부위 VNTR불일치) 간의 연관성에 대한 연구이다. 그 내용을 요약하자면, 1) D1S80부위의 불일치 여부가 동종 조혈모세포이식술 후의 생존 및 비재발성 치사율과 유의한 연관성을 보이고 있으며, 2) D1S80부위의 불일치 여부는 비재발성 치사율을 증가시킬 수 있는 위장관 특이 만성 이식편대숙주질환의 발생과 연관성을 보인다.

골수이식분야에서 VNTR 또는 STR의 이용은, 동종 조혈모세포이식 후의 조혈모세포 생착 여부를 판단하거나, 키메라즘의 정도를 측정하는 목적으로 이용되어 왔으며, 이러한 목적으로 이용되는 여러 검사법 중에서도 특히 VNTR이나 STR을 이용한 검사법이 민감도 및 특이도가 높은 것으로 알려져 있다. 하지만 공여자와 수여자의 VNTR이 완전하게 일치하는 경우에는, 이러한 생착 여부 판단이나, 키메라즘의 모니터링 목적으로서의 VNTR 측정은 의미를 잃게 된다. 실제 임상에서 조직적합형항원이 일치하는 공여자로부터 이식을 받는다 하더라도 상당수의 환자에서 이식편대숙주질환은 발생하며, 일부에서는 치명적인 결과를 초래하기도 한다. 이러한 경우에 조직적합형항원 일치성 이식과는 다르게, 이식편대숙주질환의 발생에 관여하는 공여자의 T-세포를 활성화 시키는 기전에 조직적합형항원이 관여하지 않는다. 반면, 인체 유전자 내에 여러 유전자들의 다양한 변이들간의 불일치가 이러한 공여자 T-세포의 활성화에 관여한다. 동종활성화(alloreactivity)

는 이식편대숙주질환 발생의 중요한 기전이다.⁹⁾ 이는 환자(수여자)의 항원제시세포(antigen-presenting cell)의 조직적합형항원과 결합된 이중 단백을 공여자의 T-세포 수용체가 인지하는 과정을 통해 활성화 된다.⁹⁾

이와 유사하게, 공여자/수여자간의 VNTR/STR 대립유전자(allele)의 불일치는 이러한 VNTR/STR 불일치 부위에 해당되는 공여자/수여자의 염색체 또는 유전자의 불일치를 시사한다. 그러나 이식결과에 대한 VNTR의 불일치의 생물학적 영향에 대해서는 거의 연구되지 않았다. 인체유전자를 통틀어 엄청난 수의 유전자 다형성이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 유전자 다형성은 아미노산 치환을 통해 해당 단백질의 생물학적 기능을 변화시키거나, 생산을 변화시키는 과정을 야기하여 유전자의 생물학적 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 아미노산 치환의 과정을 거치지 않는다 하더라도 염기서열의 변화로 조직적합형항원과 결합하여 이러한 단백질의 면역학적 성질을 변화시켜 T-세포의 인지에 영향을 줄 수 있다.⁸⁾

최근, STR의 불일치가 동종이식에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 두 연구가 보고된 바 있다. Alcoceba 등은 PowerPlex 16[®] (Promega, Madison, WI, USA) 시스템을 이용한 STR 결과에서 D13S317와 D18S51, TPOX부위의 공여자/수여자 간의 불일치가 급성이식편대숙주질환의 중증도와 연관성을 보였으며, D16S539 부위의 불일치는 만성이식편대숙주질환의 발생과 연관된다고 보고하고 있다. 이 연구에서는 16가지의 미세위성적 표지자(microsatellite) STR을 이용하고 있는데, 그 종류는 Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Amelogenin, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S 820, D13S317, D5S818 등이다. 여기에서 보이는 바와 같이 현재 STR의 모니터링을 위해 가장 많이 사용되고 있는 Powerplex 16[®]시스템(Promega, Madison, WI, USA)에서는 본 연구에서 이용된 D1S 80, D1S 111, D13S5 부위를 포함하고 있지 않다. 즉 본 연구에서는 이전 연구에서 보고된 바 있는 이식과 연관된 STR 불일치 부위 이외에 다른 부위를 제시하고 있다. 이 외에 Alcoceba 등¹⁰⁾은 16가지 부위의 STR의 불일치 중에 11개 이상의 불일치를 보일 경우, 이가 이식편대숙주질환의 발생과는 통계적인 차이를 보이지는 않았지만, 환자의 불량한 전체 생존율과 연관됨을 제시하고 있다. Stern 등¹¹⁾에 의해 보고된 또 다른 연구에서는, 10종

류의 STR을 조사하여 Alcoceba 등에 의해 보고된 결과를 다시 한번 확인하여 주었다. 즉, D13S317 부위의 불일치가 급성이식편대숙주질환의 발생 및 중증도와 연관성이 있음을 보고하였다.

본 연구에서는, 일반적으로 상용화되어 사용되는 PowerPlex 16[®] system에서는 이용되지 않는 D1S80과 D1S111, D17S5 세 군데 부위에 대한 VNTR의 불일치여부가 동종 조혈모세포이식결과에 미치는 영향을 조사하였고, D1S80 부위의 불일치가 동종 조혈모세포이식성적과, 특히 비재발성 치사율과 밀접한 관계를 보였다. 동종 조혈모세포이식결과에 VNTR 불일치가 영향을 주게 되는 그 기전으로는 여러 가지가 제시된다. 서론에서 언급한 대로 동종반응성(alloreactivity)이 이에 중요하게 관여될 수 있는데, 이러한 동종반응성은 비자아(non-self) 펩티드(peptide)를 공여자의 T-세포가 인지하게 되는데, 여러 종류의 비자아 펩티드에 대한 T-세포의 종합된 효과가 바로 동종반응성이다. 일반적으로, 소수 조직적합형항원은 유전자 다형성으로 나타나는 다양한 유전자적 변이가 축적되어 하나의 형질로 발현되는 집합체라고 할 수 있다. 즉, 본 연구에서처럼, 특정한 어떤 유전자 때문에 이러한 결과를 보여주는지에 대해서는 추가 연구가 필요하지만, 특정 유전자나 특정 유전자 다형성에 초점을 두지 않고, 각 개체의 전체적인 유전자 다형성의 유전적 서명 또는 개인 특성을 반영하는 VNTR이나 STR을 통해서도,¹⁸⁾ 적어도 폭 넓은 부위의 유전자집단의 불일치 때문에 이러한 결과를 보여주는지에 대한 표지자가 될 수 있어, 향후 현재까지 밝혀지지 않은 소수 조직적합형항원을 밝히는 연구의 기초가 될 수 있다.

본 연구의 결과를 요약해보면, 공여자와 수여자간에 D1S80부위가 일치하는 군에서는 비재발성치사율이 낮은 결과를 보여주며, 또한 위장관 특이 만성 이식편대숙주질환의 발생률도 낮게 나타났다. D1S80 불일치군에서는 위장관 특이 만성 이식편대숙주질환이 높게 발생함을 알 수 있었는데, 이는 위장관이 감염의 유입구(Porta of entry)가 되어 기회감염률을 증가시키거나 이식편대숙주질환 자체를 통해 비재발성치사율의 증가로 연결될 수 있다는 점에서 흥미롭다. 즉, D1S80 불일치군에서 D1S80 일치군보다 조직적합형항원 일치성 동종조혈모세포이식 후 불량한 예후를 보이는 것이 이러한 위장관 특이 이식편대숙주질환의 증가 및 이와 동반된 비재발성 치사율과 연관지어 설명될 수 있다.

이식편대숙주질환이 피부, 위장관, 간 등의 조직에 호발하는지에 대해서는 이들 장기가 동종반응성 T-세포반응에 민감하게 반응하기 때문인 것으로 이전의 연구에서 제시된 바 있다.⁸⁾ 이외에도 이와 별도의 요인 또는 기전이 이러한 이식편대숙주질환의 조직특이성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이가 D1S80 불일치군에서 위장관 침범 만성이식편대숙주질환의 높은 발생을 설명하는 근거가 될 수 있다. 그 하나로 제시되는 기전이 조직특이 귀환 분자(homing molecule)를 통해 표적장기에 특이적인 귀환 T-세포가 있다는 것이다.⁸⁾ 이 중 하나로 최근에 많은 연구의 진전을 보인 키모카인(chemokine) 리간드 및 수용체가 그 예가 될 수 있다. 예를 들어 CCR5의 경우, 동종조혈모세포이식 후 피부 및 간으로의 림프구의 이동을 매개하는 것으로 알려져 있지만, 위장관으로의 이동에는 관여하지 않는다. 또한 피부 림프구 연관 항원을 발현하는 일부 T-세포의 존재가 밝혀지면서, 이러한 T-세포가 피부에 특이적으로 귀환하게 된다.¹⁹⁾ 이외의 가능한 기전으로 제시되는 것은, 위장관 및 피부 등의 특이 조직에 특이적으로 발현되는 유전자가 D1S80 부위와 연관되어 있을 가능성이다.^{8,9,18)} 이러한 조직특이성 유전자가 소수 조직적합형항원으로 인지되어 동종반응성 T-세포의 위장관 내 유입을 매개하여 위장관 특이 이식편대숙주질환이 발생한다는 가설이다.

위의 가설들을 요약해보면, 1) D1S80부위의 불일치성이 미지의 소수 조직적합형항원에 대한 동종반응성 공여자의 T-세포의 활성화와 연관되어 있거나, 2) D1S80부위의 미지의 유전자가 공여자 T-세포의 위장관 특이성 귀환 분자의 발현과 연관되거나, 3) D1S80부위의 미지의 유전자가 위장관 특이 항원의 발현과 연관되어 이 유전자가 동종반응성 T-세포에 의해 인지되었을 가능성이 본 연구를 통해 제시된다. 즉, 본 연구결과를 토대로 제1번 염색체에 위치하고 있는 D1S80부위의 유전자 불일치가 위장관 만성 이식편대숙주질환과 비재발성 치사율의 증가와 밀접한 관련이 있으며, 이러한 결과는 제1번 염색체에 위장관 특이 항원이나 사이토카인, 키모카인 또는 이의 수용체의 발현과 연관된 미지의 소수 조직적합형항원 유전자가 존재할 가능성을 시사하며, 앞으로 이에 대한 연구에 방향성을 제시한다.

결론적으로, 본 연구 결과는 조직적합형항원 일치성 동종조혈모세포이식성적과 D1S80 부위 불일치의 연관성을 제시하고 있으며, 향후 이에 대한 명확한

결론을 위해서는 다른 코호트에서 보다 많은 수의 환자를 대상으로 한 연구를 통한 검증이 필요하다. 위장관 이식편대숙주질환의 발생이 재발과 무관한 이식 후 사망과 직접적인 연관이 있는지에 대해서는 추후 연구가 필요하겠지만, D1S80 부위 불일치성과 위장관 만성이식편대숙주질환의 발생 및 비재발성 치사율과의 관련성은, 향후 소수 조직적합형항원과 연관된 유전자를 밝히는 연구가 제1번 염색체를 대상으로 진행되어야 함을 시사한다.

요 약

배경: 동종 조혈모세포이식 후 키메리즘 정도를 모니터링하고 생착여부를 판정하기 위한 목적으로 공여자와 수여자의 variable number of tandem repeats (VNTR)이 이용되어 왔다. 동종 조혈모세포이식 후 발생하는 이식편대숙주질환의 발병기전에 주요 조직적합형항원 (major histocompatibility antigen)이 주요하게 작용하지만, 이외에도 여러 유전자에서 유래된 다양한 다형질 단백질의 공여자/수여자간 불일치도 기여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 현재까지 공여자/수여자 간의 VNTR 불일치도가 동종 조혈모세포이식 성적에 미치는 영향에 대한 연구는 미미한 실정이다.

방법: 본 연구는 68명의 혈연 및 16명의 비혈연 공여자로부터 조직적합형항원 일치성 동종 조혈모세포이식을 받은 환자를 대상으로 시행되었다. 본 연구에 포함된 질환군은 급성골수성백혈병 48예, 급성림프구성백혈병 8예, 만성골수성백혈병 15예, 악성림프종 10예 및 고위험도 골수이형성증후군 3예이며, 중합효소연쇄반응은 세 군데의 VNTR 부위(D1S80, D1S11, D17S5)를 대상으로 시행되었다. VNTR 불일치도는 완전일치쌍, 부분일치쌍 및 완전불일치쌍으로 구분하여 분석하였다.

결과: 세 부위의 VNTR 불일치도 중, D1S80부위의 불일치도가 전체생존율($P=0.0179$) 및 비재발성 치사율($P=0.0305$) 측면에서 이식성적과 강한 연관성을 보였고, 반면 D1S11이나 D17S5 부위의 불일치도는 이와 무관하였다. D1S80 부위의 완전일치군의 경우 부분일치군 및 완전불일치군에 비해 높은 전체생존율(72% 대 38%) 및 낮은 비재발성 치사율(17% 대 50%)을 보였다. 또한 다변량 분석상에서도 D1S80 완전일치군은 전체생존율($P=0.03$) 및 비재발성 치사율($P=0.05$) 면에서 독립적인 예후인자로 확인되었다. 이외에 D1S80 부위 불일치도는 골수구계 생착속도($P=0.01$) 및 위장

관 특이 만성 이식편대숙주질환의 발생($P=0.05$)과 유의한 연관성을 보였다.

결론: 제1번 염색체에 위치한 D1S80부위의 VNTR 불일치는 위장관 특이 만성 이식편대숙주질환의 발생 및 비재발성 치사에 기여하는 것으로 생각되며, 이러한 결과는 소수 조직적합형항원 또는 위장관 특이 항원, 사이토카인 또는 키모카인 또는 이의 수용체 등의 발현과 연관된 미지의 유전자가 제1번 염색체에 위치하고 있을 가능성을 시사하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Kim TY, Park SH, Kwon EH, Kim KY, Suh JS, Sohn SK. The discrimination power and effectiveness of 3 kinds of LTR primers in the VNTR-PCR for evaluation of the engraftment of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Korean J Clin Pathol 2001;21:527-33.
- 2) Kim TY, Park SH, Suh JS, Sohn SK. A case of DNA chimerism analysis as a marker of donor lymphocyte infusion. Korean J Hematol 2001;36:342-5.
- 3) Martinelli G, Trabetti E, Zaccaria A, et al. In vitro amplification of hypervariable DNA regions for the evaluation of chimerism after allogeneic BMT. Bone Marrow Transplant 1993;12:115-20.
- 4) van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, et al. Relationship between patterns of engraftment in peripheral blood and immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation for (severe) combined immunodeficiency. Blood 1994;84:3936-47.
- 5) Sreenan JJ, Pettay JD, Tbakhi A, 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.
- 6) Rothberg PG, Gamis AS, Baker D. Use of DNA polymorphisms to monitor engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. Clin Lab Med 1997;17:109-18.
- 7) Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. Am J Pharmacogenomics 2004;4:177-87.
- 8) Falkenburg JH, van de Corput L, Marijt EW, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in hu-

- man stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003; 31:743-51.
- 9) Chao NJ. Minors come of age: minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:215-23.
- 10) Alcoceba M, Diez-Campelo M, Martin-Jimenez P, et al. Allogeneic transplantation with identical MHC: clinic-pronostic value of discrepancies of microsatellite DNA regions between recipient and donor. *Blood* 2004;104:912a.
- 11) Stern M, Meyer-Monard S, Bucher C, et al. Prognostic value of discrepancies in micro-satellite DNA regions between donor and recipient in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(Suppl 2):S44.
- 12) Sohn SK, Kim DH, Kim JG, et al. Transplantation outcome in allogeneic PBSCT patients according to a new chronic GVHD grading system, including extensive skin involvement, thrombocytopenia, and progressive-type onset. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:63-8.
- 13) Kim DH, Kim JG, Sohn SK, et al. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2004;125:217-24.
- 14) Sohn SK, Kim JG, Chae YS, et al. Large-volume leukapheresis using femoral venous access for harvesting peripheral blood stem cells with the Fenwal CS 3000 Plus from normal healthy donors: predictors of CD34+ cell yield and collection efficiency. *J Clin Apher* 2003;18:10-5.
- 15) Sohn SK, Kim JG, Sung WJ, et al. Harvesting peripheral blood stem cells from healthy donors on 4th day of cytokine mobilization. *J Clin Apher* 2003;18:186-9.
- 16) Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-8.
- 17) Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980;69:204-17.
- 18) Roopenian D, Choi EY, Brown A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 2002;190:86-94.
- 19) Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997;389:978-81.