

한국인 성인 급성골수성백혈병 환자에서의 살해세포 면역글로불린양 수용체의 분석

가톨릭대학교의과대학부속 성모병원 ¹혈액내과, ²미생물학교실, ³가톨릭조혈모세포이식센터

김희제^{1,3} · 최 영³ · 정혜영³ · 민우성^{1,3} · 김춘추^{1,3} · 김태규²

Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) Analysis in Adult Korean Patients with Acute Myeloid Leukemia

Hee-Je Kim, M.D.^{1,3}, Young Choi, M.S.³, Hye-Young Jeong, B.S.³, Woo-Sung Min, M.D.^{1,3},
Chun-Choo Kim, M.D.^{1,3} and Tai-Gyu Kim, M.D.²

Departments of ¹Hematology-oncology and ²Microbiology, ³Catholic Hemopoietic Stem Cell Transplantation Center,
St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The prevalent natural killer (NK) cells induce alloreaction against leukemic cells during post-transplant. NK cell alloreactivity depends on the compatibility of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) epitopes for graft-versus-host disease. Genotypic expressions of inhibitory or activating KIR in patients with acute myelogenous leukemia (AML) and their HLA-matched sibling donors, as a model for Korean KIR haplotype diversity and NK alloreactivity, were investigated.

Methods: Ninety-two patients in complete remission and their 76 HLA-matched sibling donors were enrolled in this study. All the patients were scheduled to receive allogeneic hematopoietic stem cell transplantations (HSCT). KIR PCR-SSP typing was performed for 19 different kinds of KIR genes and pseudogenes. The PCR data representing the KIR genotypes from both the patients and donors were compared.

Results: We found 43 Korean KIR haplotypes. Thirty-three variable haplotypes for the AML patients, in addition to 25 haplotypes for the normal HSCT donors, were demonstrated. Of note, the expressions of specific genes such as 2DL2 ($P=0.026$), 2DS2 ($P=0.042$), and 2DS4 ($P=0.037$) revealed remarkable differences between the patients and the normal donors. Korean HLA-identical sibling pairs showed 38% KIR matches in terms of the gene content and allelic polymorphism. Although the KIR gene content was the same between the patients and the donors, 40% of those matched pairs of patients and donors showed allelic polymorphism, specifically in the context of 2DL5 and 2DS4 genes.

Conclusion: These results indicate that the expressions of donor inhibitory and activating repertoire of KIR genotypes, even in the HLA-matched sibling setting, are unique parameters to be considered when we perform allogeneic sibling HSCT. (*Korean J Hematol* 2006;41:139-148.)

Key Words: NK cells alloreactivity, KIR, HSCT, Korean AML, Haplotype

접수 : 2006년 5월 9일, 수정 : 2006년 5월 23일

승인 : 2006년 7월 20일

교신저자 : 김희제, 서울시 영등포구 여의도동 62

☎ 150-713, 가톨릭대학교 의과대학부속 성모병원

가톨릭조혈모세포이식센터, 혈액내과

Tel: 02-3779-1096, Fax: 02-780-3132

E-mail: cumckim@catholic.ac.kr

본 연구는 2003년도 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원으로 이루어진 것임(과제고유번호: 0320100-3).

Correspondence to : Hee-Je Kim, M.D., Ph.D.

Division of Hematology, Department of Internal Medicine,
Catholic Hemopoietic Stem Cell Transplantation Center, St.
Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of
Medicine

62, Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-713, Korea

Tel: +82-2-3779-1096, Fax: +82-2-780-3132

E-mail: cumckim@catholic.ac.kr

서론

자연살해세포는 인체 면역계의 중요한 세포이며 내재면역의 최첨병 역할을 담당한다. 각종 바이러스 감염에 대응하고 종양의 발생을 억제하는 일차 기능에 더하여 최근 항종양 세포요법의 한 축으로서의 임상이용 가능성도 부각되고 있다. 특히 혈액종양 질환자의 동종 조혈모세포이식 과정에서 '자연살해세포 동종면역반응'이 소개된 이후^{1,2)} 고식적인 자연살해세포의 내재면역계의 역할뿐만 아니라 적응면역능을 포함하는 다양한 세포 연계작용에 대한 연구들도 제시되고 있다.^{3,4)} 이들 '자연살해세포 동종면역반응'은 HLA-Cw좌의 특정 유전자에 의해 매개되어 표현되는 자연살해세포의 각각의 수용체와 결합하는 여러 다양한 표적세포의 리간드와 매우 특이적으로 결합하며 특히 '억제 수용체'와 '활성화 수용체'의 상호작용에 따라 내재면역능이 조절됨이 밝혀졌다.⁵⁾

이들 자연살해세포가 표적세포를 공격하는 기전으로 최근 널리 소개된 자연살해세포 면역글로불린양 수용체(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)의 급성골수성백혈병 환자에서의 발현 양상을 '억제수용체'와 '활성화 수용체'를 중점으로 이들 수용체 유전형 분석을 통하여 고찰하고자 하였다. 동종 표적세포에 대한 이러한 자연살해세포 수용체의 작동 여부는 Klas Karre의 'missing self' 개념으로 이루어지는 것으로 생각되지만⁶⁾ 아직까지 이에대한 보다 정확한 연구가 확대될 필요성도 제기되고 있다. 현재까지 위유전자(pseudogene)인 2DP1과 3DP1을 포함하여 대략 16종의 KIR 유전자가 밝혀져 있으며 이들 수용체 유전자의 획득된 숫자와 기능 표현여부 혹은 정도에 따라 세포의 활성도가 결정되는 것으로 생각된다.⁷⁾ 따라서, 이 분야에서 가장 처음 임상연구를 보고한 이태리 연구진의 주장처럼⁸⁾ 내재면역의 첨병 역할을 담당하는 이들 세포가 백혈병 표적세포를 공격할 수 있는지 여부와 함께 이들 유전자들의 개체 활성화 과정에서의 변이여부 등이 주요한 면역반응의 결정인자가 될 것으로 생각된다.

본 연구는 이와 같이 중요한 자연살해세포의 면역기능을 탐구하기 위하여 특히 이들 자연살해세포의 동종면역반응이 가장 특이적으로 작동되는 것으로 과거 국외 임상연구에서 소개된 급성골수성백혈병 환자들을 대상으로 진행하여 이 분야에서 한국인 고유의 집단 유전학적 연구자료를 얻고자 하였다. 이를 위해 자연

살해세포의 면역글로불린양 수용체 중 대표적인 '억제수용체'와 '활성화 수용체'의 유전형 분석을 시행하여 정상인과의 유전자의 내용과 대립유전자의 다형성 등 발현의 차이를 비교연구하고 이를 임상에서의 향후 자연살해세포를 이용한 면역세포요법의 기초 자료로 삼고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상군

처음 진단된 성인 급성골수성백혈병 환자 92명과 정상 동종조혈모세포이식 공여자 76명을 포함하여 총 168명의 한국인 말초혈액 시료 분석이 이루어졌다. 이들 중 환자와 HLA가 일치하는 형제자매 사이 공여자 쌍의 분석이 동시에 이루어진 경우는 48쌍이었다. 각각의 시료는 본 병원 임상시험위원회에서 인정한 센터 표준의 인체 시료처리에 대한 고지된 양식에 서면동의한 경우에 이용되었다.

2. 시료의 처리

각각의 말초혈액 시료는 정상 공여자의 경우는 입원 후 이식 당일, 환자는 이식 전처치가 시작되기 전 완전관해 상태에서 채혈하였다. 전체 시료는 채혈 당일 Ficoll-Hypaque 비중차법에 의해 단핵구를 분리하여 인완충 생리식염수에 1회 세척하고 다시 196°C의 냉동 질소탱크에 보관한 후 일괄 해동하여 DNA를 추출하여 유전형 분석에 이용하였다.

3. 염기서열 특이적인 탐식자를 이용한 중합효소연쇄반응법에 의한 분석

1.8 μ g의 유전자 분석용 DNA가 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전형 분석에 이용되었다. 본 연구에서는 Pel-Freez kit (Invitrogen Co., CA, USA)를 이용한 19종 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전자 분석법을 이용하였다. 간략히 기술하면, 1.8 μ g의 유전자 분석용 DNA와 150 μ L의 완충액, 2.4 μ L의 Taq DNA 중합효소, 그리고 60 μ L의 물이 혼합된 용액을 전체 11 μ L가 되게 만들었다. 중합효소연쇄반응은 95°C에서 1회를 1분 20초 동안, 94°C에서 40초, 63°C에서 40초, 그리고 72°C에서 100초 동안 진행되는 방식으로 총 30주기를 수행하였다. 이후 2%의 전기영동 겔에 걸어 각각의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전형을 분석하고 환자 및 공여자 사이의 결과를 비교 분석 연구하였다.

4. 자연살해세포 면역글로불린양 수용체의 구분과 일배체의 형별 구분

본 연구에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체는 다른 보고에서와 마찬가지로²⁾ HLA-Cw좌의 대립유전자에 의해 결정되는 리간드와 특이적으로 결합하는 양상에 따라 ‘억제 수용체’와 ‘활성화 수용체’로 구분하였다. ‘억제 수용체’는 대표적으로 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3을 포함하였고 ‘활성화 수용체’는 이에 상응하는 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1을 그리고 2DP1, 3DP1의 가유전자를 포함하였다. 이들 중에서 2DL5와 2DS4 유전자의 경우 현재까지 알려진 몇 가지 변이형을 포함하여 분석하였다. 또한 환자와 정상인 공여자의 형별을 각각 별도로 구분한 후 최종 168명의 한국인 개체에 대한 결과를 통합하여 분석하였다. 즉, 연구에 포함된 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전형의 판독을 위해 환자, 정상 공여자, 전체 대상집단 등 3가지로 구분하여 각각의 일배체형 분석 결과를 Table로 작성하였다.

결 과

1. 정상 공여자의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 형별(Table 1)

Fig. 1에서와 같은 중합효소 연쇄반응법에 의한 최종 밴드가 형성되어 각각의 특이적 탐식자와 일치하는 밴드를 개체별로 구분하여 정상 공여자 집단에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 형별에 대한 결과를 정리하여 표로 작성하였다. 결과적으로 총 25 유형이 관찰되었으며 유형 22번의 경우 단 4개의 자연

살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자와 위유전자만을 포함하는 흥미로운 결과를 보였다. 이를 제외하면 대개 7~12개의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 갖고 있는 것으로 관찰되었으며 Hsu 등에 의한⁹⁾ 일배체 A형은 4가지 유형으로 관찰되었고 (Table 1의 유형 6, 7, 10, 22) 그 빈도는 10/76 (13.2%)였다. 한국인의 유전학적 특성의 하나로써 흥미롭게 관찰한 2DL2의 유전자가 존재하는 정상인의 빈도는 전체 대상 76명 중 5명(6.6%)으로 낮았으며 이 경우 대체로 11~12개에 이르는 다수의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 포함하였다. 또한 ‘활성화 수용체’ 유전자 중의 하나인 2DS2 유전자의 경우 표현 빈도는 7/76 (9.2%)이었고 이 경우 대체로 8~12개에 이르는 다수의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 포함하였다. 복합 유전자 구성의 다양성을 고찰하기 위해 정상 공여자군에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 전체 유형 중 2DL2 유전자를 포함하는 유형의 빈도를 살펴보면 3/25 (12.0%)였으며 2DS2의 경우는 5/25 (20.0%)였다.

2. 급성골수성백혈병 환자의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 형별(Table 2)

상기 결과 1에서 살펴본 것과 마찬가지로 방법으로 본 연구에 포함된 92명의 급성골수성백혈병 환자들에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 형별에 대한 정리표를 작성하였다. 정상인의 경우에서보다 많은 총 33 유형이 관찰되었으며 환자들은 개체별로 대개 7~13개 범위에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 갖고 있는 것으로 관찰되었으며 Hsu 등에 의한⁹⁾ 일배체 A형은 3가지 유형으로만

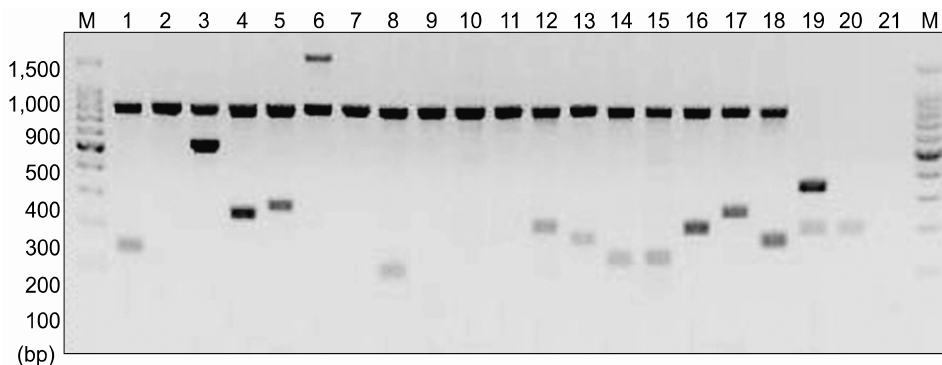


Fig. 1. KIR genotyping by PCR-SSP in a specific AML patient. Details are described in 'Materials and Methods'. 1, 2DL1; 2, 2DL2; 3, 2DL3; 4, 2DL4; 5, 2DL5A; 6, 2DL5B*002/004; 7, 2DL5B*003; 8, 2DS1; 9, 2DS2; 10, 2DS3; 11, 2DS4*00101/00102/002; 12, 2 DS4*003; 13, 2DS5; 14, 3DL1; 15, 3DL2; 16, 3DL3; 17, 3DS1; 18, 2DP1; 19, 3DP1*001/001; 20, 3DP1*00301/00302; 21, negative control; M, marker.

Table 1. Summarized data of KIR genotyping from normal transplantation donors in this study (n=76)

Geno- type	2DL							2DS							3DL			3D- S1	2D- P1	3DP		No. of KIR genes	Genotypes	
	1	2	3	4	5AB	5A	5B	1	2	3	4	4v	5	1	2	3	1			1v	No.		%	
1	*		*	*				*			*	*		*	*	*		*	*		8	14	18.4	
2	*		*	*				*			*			*	*	*		*	*		8	14	18.4	
3	*		*	*	*	*		*		*	*			*	*	*	*	*	*		11	5	6.6	
4	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	5	6.6	
5	*		*	*				*				*		*	*	*		*	*		8	5	6.6	
6	*		*	*							*			*	*	*		*	*		7	4	5.3	
7	*		*	*								*		*	*	*		*	*		7	3	3.9	
8	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	3	3.9	
9	*		*	*	*	*		*				*	*	*	*	*	*	*	*		11	3	3.9	
10	*		*	*							*	*		*	*	*		*	*		7	2	2.7	
11	*	*	*	*	*		*	*	*			*	*	*	*	*		*	*		12	2	2.7	
12	*		*	*				*			*	*		*	*	*		*	*	*	8	2	2.7	
13	*	*	*	*	*	*		*	*				*		*	*	*	*	*	*	11	2	2.7	
14	*	*	*	*	*		*	*	*		*		*	*	*	*		*	*		12	1	1.3	
15	*		*	*	*	*		*					*		*	*	*	*	*		9	1	1.3	
16	*		*	*	*	*		*		*		*		*	*	*	*	*	*		11	1	1.3	
17	*		*	*				*			*			*	*	*		*	*	*	8	1	1.3	
18	*		*	*	*	*		*					*		*	*	*	*	*		9	1	1.3	
19	*		*	*	*	*		*		*					*	*	*	*	*		9	1	1.3	
20	*		*	*	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*	*	*		12	1	1.3	
21	*		*	*	*	*				*	*	*		*	*	*	*	*	*		10	1	1.3	
22	*		*	*												*		*	*		4	1	1.3	
23	*		*	*					*		*			*	*	*		*	*		8	1	1.3	
24	*		*	*	*	*		*	*		*	*		*	*	*	*	*	*		11	1	1.3	
25	*		*	*	*	*		*		*	*	*		*	*	*	*	*	*		11	1	1.3	

Table 2. Summarized data of KIR genotyping from acute myelogenous leukemia patients in this study (n=92)

Geno- type	2DL							2DS							3DL			3D- S1	2D- P1	3DP		No. of KIR genes	Genotypes	
	1	2	3	4	5AB	5A	5B	1	2	3	4	4v	5	1	2	3	1			1 v	No.		%	
1	*		*	*				*			*	*		*	*	*		*	*		8	15	16.3	
2	*		*	*				*			*			*	*	*		*	*		8	13	14.1	
3	*		*	*							*			*	*	*		*	*		7	7	7.6	
4	*		*	*							*	*		*	*	*		*	*		7	6	6.5	
5	*		*	*	*	*		*		*	*			*	*	*	*	*	*		11	5	5.3	
6	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	5	5.3	
7	*		*	*				*				*		*	*	*		*	*		8	4	4.3	
8	*		*	*								*		*	*	*		*	*		7	3	3.2	
9	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	2	2.2	
10	*	*	*	*	*		*	*	*		*		*	*	*	*		*	*		12	2	2.2	
11	*		*	*	*	*		*					*		*	*	*	*	*		9	2	2.2	
12	*	*	*	*	*	*		*	*				*		*	*	*	*	*	*	11	2	2.2	
13	*		*	*	*	*		*		*	*	*		*	*	*	*	*	*		11	2	2.2	
14	*	*	*	*					*		*			*	*	*		*	*	*	9	2	2.2	
15	*	*	*	*					*		*	*		*	*	*		*	*	*	9	2	2.2	
16	*		*	*	*	*		*		*		*		*	*	*	*	*	*		11	2	2.2	
17	*		*	*	*	*		*		*			*		*	*	*	*	*		10	2	2.2	
18	*		*	*	*	*		*				*	*	*	*	*	*	*	*		11	1	1.1	
19	*	*	*	*	*		*		*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	12	1	1.1	
20	*		*	*				*			*			*	*	*		*	*	*	8	1	1.1	
21	*		*	*	*	*		*					*		*	*	*	*	*		9	1	1.1	
22	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*		*	*	*		*	*		11	1	1.1	
23	*	*	*	*	*	*		*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	13	1	1.1	
24	*		*	*	*	*		*			*	*	*	*	*	*	*	*	*		11	1	1.1	
25			*	*					*		*			*	*	*		*	*		7	1	1.1	
26		*		*					*		*			*	*	*			*	*	7	1	1.1	
27	*		*	*	*	*	*	*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	1	1.1	
28	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	12	1	1.1	
29	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*	*	11	1	1.1	
30	*	*	*	*	*		*	*	*	*		*		*		*		*	*		11	1	1.1	
31	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	1	1.1	
32	*	*	*	*				*	*		*			*	*	*		*	*	*	10	1	1.1	
33	*		*	*	*	*		*				*	*	*	*	*	*	*	*		11	1	1.1	

Table 3. Summarized data of KIR genotyping from all enrolled individuals in this study (n=168)

Geno- type	2DL							2DS							3DL			3D- S1	2D- P1	3DP		No. of KIR genes	Genotypes	
	1	2	3	4	5AB	5A	5B	1	2	3	4	4v	5	1	2	3	1			1 v	No.		%	
1	*		*	*				*			*	*		*	*	*		*	*			8	29	17.3
2	*		*	*				*			*			*	*	*		*	*			8	27	16.1
3	*		*	*							*			*	*	*		*	*			7	11	6.5
4	*		*	*	*	*		*		*	*			*	*	*	*	*	*			11	10	5.9
5	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*			11	10	5.9
6	*		*	*				*				*		*	*	*		*	*			8	9	5.4
7	*		*	*							*	*		*	*	*		*	*			7	8	4.8
8	*		*	*								*		*	*	*		*	*			7	6	3.6
9	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*			11	5	3.0
10	*		*	*	*	*		*				*	*	*	*	*	*	*	*			11	4	2.4
11	*	*	*	*	*		*	*	*		*		*	*	*	*		*	*			12	3	1.7
12	*		*	*	*	*		*					*		*	*	*	*	*			9	3	1.7
13	*	*	*	*	*	*		*	*				*		*	*	*	*	*	*	*	11	3	1.7
14	*	*	*	*	*		*	*	*			*	*	*	*	*		*	*			12	2	1.2
15	*	*	*	*	*		*		*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	12	2	1.2
16	*		*	*	*	*		*		*	*	*		*	*	*	*	*	*			11	2	1.2
17	*		*	*	*	*		*		*			*		*	*	*	*	*			10	2	1.2
18	*	*	*	*					*		*			*	*	*		*	*	*		9	2	1.2
19	*	*	*	*					*		*	*		*	*	*		*	*	*		9	2	1.2
20	*		*	*	*	*		*		*		*		*	*	*	*	*	*			11	2	1.2
21	*		*	*				*			*			*	*	*		*	*	*		8	2	1.2
22	*		*	*	*	*		*					*		*	*	*	*	*			9	2	1.2
23	*		*	*				*			*	*		*	*	*		*	*	*		10	2	1.2
24	*		*	*	*	*		*		*					*	*	*	*	*			9	1	0.6
25	*		*	*	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*	*	*			12	1	0.6
26	*		*	*	*	*				*	*	*		*	*	*	*	*	*			10	1	0.6
27	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*			11	1	0.6
28	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*		*	*	*		*	*			11	1	0.6
29	*	*	*	*				*	*		*			*	*	*		*	*	*		10	1	0.6

Table 3. Continued

Geno- type	2DL							2DS							3DL			3D- S1	2D- P1	3DP		No. of KIR genes	Genotypes	
	1	2	3	4	5AB	5A	5B	1	2	3	4	4v	5	1	2	3	1			1v	No.		%	
30	*	*	*	*	*	*		*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	13	1	0.6	
31	*		*	*	*	*		*				*	*	*	*	*	*	*	*		11	1	0.6	
32	*		*	*												*		*	*		4	1	0.6	
33	*		*	*	*	*		*			*	*	*	*	*	*	*	*	*		11	1	0.6	
34			*	*					*		*			*	*	*		*	*		7	1	0.6	
35	*		*	*					*		*			*	*	*		*	*		8	1	0.6	
36	*		*	*	*	*		*	*		*	*		*	*	*	*	*	*		11	1	0.6	
37		*		*					*		*			*	*	*			*	*	7	1	0.6	
38	*		*	*	*	*	*	*			*		*	*	*	*	*	*	*		11	1	0.6	
39	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	12	1	0.6	
40	*		*	*	*	*		*		*		*		*	*	*	*	*	*		11	1	0.6	
41	*		*	*	*	*		*			*		*	*	*	*	*	*	*	*	11	1	0.6	
42	*	*	*	*	*		*	*	*	*		*		*		*		*	*		11	1	0.6	
43	*		*	*	*	*		*		*	*	*		*	*	*	*	*	*		11	1	0.6	

관찰되었으며(Table 2의 유형 3, 4, 8) 그 빈도는 16/92 (17.4%)였다. 또한 정상 공여자에서와 달리 상대적으로 급성골수성백혈병 환자들에서의 2DL2의 유전형이 존재하는 빈도는 전체 대상 92명 중 15명(16.3%)으로 높았으며($P=0.026$) 이 경우 대체로 7~13개에 이르는 범위의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 포함하고 있었다. 2DS2 유전자의 경우 표현 빈도는 16/92 (17.4%)이었고 이 경우 대체로 7~12개에 이르는 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 포함하였다. 이 경우 환자군에서의 보다 높은 일배체 A형의 분포를 감안할 때 단일 ‘활성화 수용체’ 연관 유전자인 2DS2가 정상 공여자군에 비해 환자군에서 상대적으로 높은 빈도로 발현된 점은($P=0.044$) 주목할 만한 결과였다. 이를 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 전체 유형 중 2DL2 유전자를 포함하는 급성골수성백혈병 환자군에서의 유형 빈도로 살펴보면 11/33 (33.3%)이었으며 2DS2의 경우는 12/33 (36.4%)로써 전반적으로 정상 공여자군의 경우보다 모두 높은 유전자 빈도를 나타내었다. 특히 ‘활성화 수용체’ 유전자인 2DS1~2DS5의 경우를 정상 공여자군과 환자군

에서 각각의 유전자를 포함하는 일배체형별 빈도수를 통계분석하여 상대 비교하였을 때, 2DS1 (19/25 vs. 23/33; $P=0.205$), 2DS2 (5/25 vs. 12/33; $P=0.042$), 2DS3 (6/25 vs. 8/33; $P=0.344$), 2DS4 (14/25 vs. 22/33; $P=0.037$), 2DS4v (12/25 vs. 14/33; $P=0.344$), 2DS5 (9/25 vs. 14/33; $P=0.144$)의 결과를 보여 ‘활성화 수용체’ 유전자들 중 2DS2, 2DS4에서 양 군 사이에 유의있는 내용의 차이가 존재하는 것으로 분석되었다.

3. 본 연구에서 수행된 전체 164명의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 형별(Table 3)

결과적으로 본 연구에 포함된 급성골수성백혈병 환자와 HLA가 일치하는 정상 형제자매 조혈모세포이식 공여자를 포함하는 전체 168명의 한국인 인구집단에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체는 43가지의 유형으로 분류되었다. 개체별로 각각 대개 7~13개 범위에서의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 갖고 있고 Hsu 등에 의한⁹⁾ 일배체 A형은 4가지 유형으로 관찰되었으며(Table 3의 유형 3, 7, 8, 32) 전체 대상 집단에서의 이들 유전형의 발현 빈도

는 26/168 (15.5%)였다. 전체 연구집단에서의 2DL2의 ‘억제 수용체’ 유전자가 존재하는 개체의 표현 빈도는 대상 168명 중 20명(11.9%)이었으며 이 경우 개체당 대체로 7~13개에 이르는 범위의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 포함하고 있었다. 2DS2 ‘활성화 수용체’ 유전자의 경우 표현 빈도는 23/168 (13.7%)이었고 이 경우 개체당 대체로 7~13개에 이르는 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 포함하였다. 또한 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 전체 유형 중 2DL2 유전자를 포함하는 유형 빈도로 살펴보면 12/43 (27.9%)이었으며 2DS2의 경우는 15/43 (34.9%)로 표현되었다.

한국인에서 가장 흔한 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 형별은 Table 3에서 정리한 것처럼 8개씩의 유전자를 가지고 있는 유형 1과 2로써 Hsu 등의 분류법에 의한⁹⁾ 일배체 B형이었으며 이들이 전체 168명 중 56명으로써 33.3%를 차지하였고 이들은 특징적으로 2DL2와 2DS2 유전자를 갖고 있지 않았다. 또한 본 연구에 포함된 전체 168명 중 급성골수성백혈병 환자와 각각의 HLA가 일치하는 동종 조혈모세포 이식 예정 형제자매 공여자 사이에 분석이 가능하였던 48쌍(96명)의 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 유전자의 내용을 비교 대비한 결과 18쌍(38%)에서만 서로간의 유전자 내용(개수)이 같고 동시에 2DL5, 2DS4에 대한 대립 유전자 변이형도 존재하지 않는 수준에서 완전하게 일치하였다. 따라서 상대적으로 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 일배체 유전자의 내용이 같은 30쌍 중에서 2DL5 혹은 2DS4에 대한 대립 유전자 변이형이 하나라도 존재하는 경우는 12쌍(40%)이었다. 예를 들어 Table 3의 유형 1과 2는 본 연구결과 한국인에서 가장 흔하게 관찰되는 일배체 형들이며 환자(유형 1)와 형제 공여자(유형 2) 사이에 단지 2DS4 유전자의 일배체형에서 단 하나의 대립 유전자 차이만 관찰되는 경우이었다. 결과적으로 2DS4 유전자의 경우 19쌍에서, 2DL5 유전자는 11쌍에서 공여자-환자 사이에서의 변이형이 존재하여 대립 유전자 수준에서의 다형성이 관찰되었다.

고 찰

본 연구는 Karre에 의해 제창되어 널리 인정되어온 ‘missing self’ 개념에 기초한 자연살해세포 면역반응을 바탕으로 현재까지 알려진 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자를 ‘억제 수용체’와 ‘활성화 수용체’

로 구분하고 이들 각각의 유전자의 획득 유전형의 표현을 조사하였다. 이를 위해 우선 개체 유전자의 유전학적 구성에 따른 발현 유전자 개수 등을 분석하여 급성 백혈병과 같은 악성 혈액질환의 치료 과정에서의 강력한 예후인자로써의 기능 표현여부나 정도를 예측하고자 하였으며 향후 실제 면역세포요법을 위한 임상 이행연구의 기초가 될 한국인 급성골수성백혈병 환자의 집단 인구 유전학적 특이성에 근간을 둔 자연살해세포 수용체의 다형성에 대한 국내 첫 선도 연구이다.

불확실한 중앙의 개체 면역회피기전과 마찬가지로 현재까지 어떠한 임상상태에서 이들 자연살해세포가 원활하게 활성화되는지 혹은 차단되거나 방해받는지 아직 정확하게 밝혀진 바 없다. 국내외에서 임상적으로 경험되고 소개된 것처럼^{5,8,10)} HLA가 절반 혹은 고도 불일치하는 동종조혈모세포이식에서 제기된 이들 자연살해세포 동종면역반응이 효과적으로 활성화되는지의 여부를 결정짓는 복합 수용체의 신호체계에 대한 면역 역동학적 파악이 반드시 필요하다. 또한 향후 내재면역의 침범 역할을 담당하는 이들 세포가 환자의 면역학적 환경 변화에 따라 백혈병 표적세포를 공격할 수 있는지 여부와 더불어 이들 특정 수용체 유전자들의 변이 여부 등이 임상성적과 연관되어 주요한 연구과제가 될 것이다.

저자들은 급성골수성백혈병 환자의 개체 면역성을 이해하는 한 가지 단서로써 이들 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전형의 특징을 면밀히 분석 연구하고자 하였으며 특히 HLA가 일치하는 가족 내의 환자-공여자 쌍을 대상으로 선택하여 유전학적으로 가장 가까운 친혈족 사이에서의 미세한 유전면역학적 차이를 이들 자연살해세포 수용체 분석을 통하여 질환특이적 유전형에 대한 자료를 습득하고자 시도하였다. 또한 동종조혈모세포이식 공여자인 HLA가 일치하는 형제자매 공여자들을 정상 대조군으로 이용하여 환자군과의 유전학적 비교 대조 연구를 바탕으로 이를 임상에서의 자연살해세포 면역세포요법의 시발점으로 삼고자 하였다. 결과적으로 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 일배체의 한국인 인구집단의 분석 결과 43 유형의 유전자 일배체 형별이 관찰되었으며 서양 보고와 마찬가지로 이들 중 Hsu 등의 분류에 의한⁹⁾ 일배체 B형이 우세하였으나 양 군 간에 몇 가지 독특한 표현양상의 차이가 관찰되었다. 한국인 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체를 분석한 결과 가장 큰 두 가지의 특징은 첫째, 한국인에서의 전체 유전자의 분포양상이 종족유전학적으로 현재까지 보고된 동서양

의 자료들과 많은 차이를 보인다는 점이며 둘째, 본 연구에서 시도된 HLA가 일치하는 형제자매 간 정상 공여자군과 급성골수성백혈병 환자군 사이에서의 비교 분석 결과 특징적으로 ‘억제 수용체’인 2DL2와 ‘활성화 수용체’인 2DS2, 2DS4 유전자들의 내용이 양 군에서 서로 의의 있게 다르다는 점이었다. 흥미로운 점은 본 연구 결과 대표적 ‘억제 수용체’ 중의 하나인 2DL2의 한국인 유전자 표현이 상대적으로 서양인에 비해 현저히 낮은 반면에 HLA가 일치하는 형제자매 사이의 자연살해세포 수용체 유전자 분석임에도 불구하고 급성골수성백혈병 환자에게서는 2배 정도 높은 결과를 보였으며 ‘활성화 수용체’ 2DS2, 2DS4 등의 유전자 표현도 정상 공여자의 그것에 비해 마찬가지로 의의 있는 발현 빈도의 차이를 보였다는 사실이다. 이는 한국인에서의 매우 특징적인 질환 특이적 주요 소견으로 생각되었으며 향후 이에 대한 백혈병 면역생물학적 의의를 찾는 전향적 연구가 절실하다. 더불어 집단유전학의 관점에서 생각할 때 본 연구는 급성골수성백혈병에 국한된 혈액질환자를 대상으로 하였으므로 보다 광범위한 유사 질환군을 대상으로 한 비교 대조 연구도 필요할 것이다.

더불어 현재까지 백혈병 환자에서 정상인과의 이들 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전자형의 판별과 임상적 예후 관련 상관성에 대한 연구 결과는 없지만 유사한 국외 연구 결과를 종합하여 분석하면 본 연구에서와 마찬가지로 매우 중요한 임상적 시사점을 발견할 수 있다. 즉, Verheyden 등은¹¹⁾ 2DS1, 2DS2 유전자가 존재하는 정상 공여자로부터의 동종조혈모세포 이식 후 백혈병의 재발률이 낮은 것으로 보고하였으며 이는 동종 조혈모세포이식 후 유발되는 것으로 생각되는 항백혈병 효과의 작동 기전에 대한 면역학적 이해에 시사하는 바가 크다. 반면에 또 다른 보고에 의하면 특정한 HLA 유전형을 갖는 환자가 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 2DS2를 갖는 형제 공여자로부터 동종 이식을 받는 경우 생존율이 저하되는 결과가 있어¹²⁾ 이러한 특정 내재면역세포의 유전자 분석과 복잡한 동종 면역세포들의 상호 관계와 연관한 임상결과의 해석은 상당한 주의를 요한다. 본 연구의 결과 한국인에서는 2DL2, 2DS2를 포함하는 수용체 유전자 발현 빈도가 다른 인종-특히 서양인-의 그것에 비해 현저히 낮고 이에 비해 급성골수성백혈병 환자에서의 2DS2, 2DS4 등의 ‘활성화 수용체’ 유전자들의 발현 빈도는 정상인과 비교하여 의의 있는 차이를 보여 향후 동종 조혈모세포이식 후 임상성적과의 상관관계에

대한 영향력 평가를 비롯한 종족별 개체 유전형의 특성, 변이형 연구 등이 요구된다. 또한 이러한 유전자형의 분포와 표현 방식은 백혈병 치료에서의 임상성적과 맞물려 여러 다양한 종족 간의 영향변수로써의 차이도 반드시 있을 것으로 생각되므로 향후 국제적인 상호 정보 교환과 교류 연구가 필수적일 것이다.

요 약

배경: 조혈모세포이식 후 발현되는 자연살해세포의 항 백혈병 동종면역반응이 소개되었다. 자연살해세포 동종면역반응은 이식편대 숙주의 방향으로 일어나는 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체들에 대한 항원결정인자들의 적합성에 의해 발생한다. 한국인 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전자 일배체형의 다형성과 자연살해세포 동종면역반응의 모델로써 급성골수성백혈병 환자 및 그들의 HLA-일치 형제자매 정상 공여자 사이에서의 ‘억제’ 혹은 ‘활성화’ 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전형의 표현이 연구되었다.

방법: 완전관해 상태에 있는 92명의 급성골수성백혈병 환자와 HLA가 일치하는 그들의 형제자매 정상 공여자 76명이 포함되었다. 모든 환자들은 동종 조혈모세포이식이 예정되어 있었다. 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체의 유전자 분석은 염기서열이 확인된 19종의 유전자-위유전자를 포함하는 특이적 탐색자를 이용한 중합효소 연쇄반응법을 이용하였으며 발현되는 환자-공여자의 대표적 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전형을 비교 분석하였다.

결과: 간략히 살펴보면, 급성골수성백혈병 환자에서 33종, 정상 공여자군에서 25종이었으며 전체 대상군을 종합하면 본 연구에서는 43종의 한국인 특이적 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 유전자 일배체형이 분별되었다. 특징적으로, 2DL2 ($P=0.026$), 2DS2 ($P=0.042$), 그리고 2DS4 ($P=0.037$) 유전자들의 발현은 환자-정상 공여자 사이에서 의의 있는 차이를 보였다. 한국인 HLA-일치 환자-정상 공여자 쌍의 분석 결과 유전자의 내용과 대립 유전자의 다형성 관점에서 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체 적합은 38%였다. 비록 양 군에서 자연살해세포의 면역글로불린양 수용체의 유전자 발현 개수는 동일하더라도 이들의 40%에서는 2DL5와 2DS4 대립 유전자에서 차이가 관찰되었다.

결론: 본 결과는 비록 HLA-일치 형제자매 사이의 동종 조혈모세포이식 시에도 독특한 영향변수로써 환자-

공여자 사이의 '억제' 그리고 '활성화' 자연살해세포 면역글로불린양 수용체 유전자의 발현 레퍼토리가 고려되어야 함을 시사한다.

참 고 문 헌

- 1) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
- 2) Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol* 2003;3:108-22.
- 3) Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004;4:231-7.
- 4) Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2005;5:112-24.
- 5) Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-47.
- 6) Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237-44.
- 7) Gagne K, Brizard G, Gueglio B, et al. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* 2002;63:271-80.
- 8) Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339:1186-93.
- 9) Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.
- 10) Kim HJ, Min WS, Kim YJ, Kim DW, Lee JW, Kim CC. Haplotype mismatched transplantation using high doses of peripheral blood CD34+ cells together with stratified conditioning regimens for high-risk adult acute myeloid leukemia patients: a pilot study in a single Korean institution. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:959-64.
- 11) Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2005;19:1446-51.
- 12) Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* 2004;103:1521-6.