

비골수억제 동종조혈모세포 이식 후 Mutiplex STR PCR을 이용한 T세포 키메라즘 분석

동아대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 내과학교실²

고리영¹ · 한진영¹ · 한 훈² · 김재석² · 권혁찬² · 김성현² · 김효진²

T-Cell Chimerism Analysis by Mutiplex STR PCR after Non-Myeloablative Allogeneic Stem Cell Transplantation

Ri-Yeong Goh, M.S.¹, Jin-Yeong Han, M.D.¹, Hoon Han, Ph.D.², Jae-Seok Kim, M.D.²,
Hyuk-Chan Kwon, M.D.², Sung-Hyun Kim, M.D.² and Hyo-Jin Kim, M.D.²

Departments of ¹Laboratory Medicine and ²Internal Medicine, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

Background: The ability of non-myeloablative allogeneic stem cell transplants to eradicate host neoplastic cells is based on the accumulating evidence of a graft-versus-malignancy (GVM) effect. Stable mixed chimerism (MC) is associated to the lower risk for the development of graft-versus-host diseases (GVHD), but this possibly occurs at the expense of the GVM effect. Therefore, assessment of the chimerism status is critical to allow immune intervention to maintain a state of donor-host tolerance and to prevent loss of the graft.

Methods: Serial post-transplant peripheral blood samples were collected from 17 patients with various malignant diseases following non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation. DNA was amplified from the T-cells, and the polymerase chain reaction (PCR) products were quantified by an automated fluorescent DNA analyzer.

Results: All 17 patients showed T-cell MC at post-transplant, but this varied in degree and duration, and then 3 patterns emerged. Group 1: 5 patients experienced a short interval of T-cell MC prior to conversion to complete donor chimerism (CC) (median: 25 days). Group 2: 5 patients showed a rapid increase of host cells after a brief MC at a median of 21 days. They never achieved CC, and they relapsed or showed progressive diseases. Group 3: 7 patients showed persistent T-cell MC for 40-50 days, and they subsequently gradually converted to CC after a median of 112 days.

Conclusion: All the patients achieved T-cell MC in post-transplant, but the CC development differed in frequency and speed. GVHD preceded the onset of T-cell CC in the majority of the patients. Serial engraftment monitoring of the T-cell chimerism status during the first 100 days after non-myeloablative stem cell transplantation is important in aiding the clinical management of such patients. (*Korean J Hematol* 2006;41:28-35.)

Key Words: Non-myeloablative Allogeneic Stem Cell Transplantation, Chimerism, GVHD, STR Analysis, T-cell

접수 : 2005년 12월 23일, 수정 : 2006년 2월 4일

승인 : 2006년 2월 7일

교신저자 : 한진영, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지

☎ 602-715, 동아대학교병원 진단검사의학과

Tel: 051-240-5323, Fax: 051-255-2366

E-mail: jyhan@dau.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A050099).

Correspondence to : Jin-Yeong Han, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Dong-A University College of Medicine

1, Dongdaesin-dong 3-ga, Seo-gu, Busan 602-715, Korea

Tel: +82-51-240-5323, Fax: +82-51-255-2366

E-mail: jyhan@dau.ac.kr

서론

암세포를 충분히 사멸시키지는 않으나 공여자의 조혈모세포를 생착시킬 수 있을 정도의 비골수억제 조혈모세포 이식 전처치 요법이 1990년대 초반에 동물 실험에 사용된 이후 전세계 연구자들에 의해 성공적인 환자의 치료 결과들이 발표되었다.¹⁾ 비골수억제 조혈모세포 이식은 이식 전에 사용하는 항암제나 면역억제제의 투여량을 최소화하여 보다 안전한 치료를 선택함으로써 이식 후에 이러한 약제에 의해 발생할 수 있는 합병증을 최소화할 수 있다. 즉, 이식 후 초기에 혈액 세포의 감소가 서서히 일어나며 대부분의 환자에서 백혈구 수가 안정된 상태를 유지하여 이식과 관련된 초기 합병증인 폐렴 등의 감염, 출혈 및 장기 손상 등의 심각한 합병증을 줄일 수 있다. 또한 이식 후 안정적으로 생착된 공여자의 면역 세포를 이용하여 항암제의 투여에 저항하는 암 세포나 환자의 손상된 면역 세포를 사멸시킬 수도 있다.¹⁻⁴⁾

이러한 특징 때문에 초기에는 나이가 많은 고령의 환자와 표준 이식을 시행하기 어려운 간, 심장, 폐, 뇌 또는 신장 기능 이상의 합병증이 동반되어 있는 환자를 주 대상으로 하였으나 최근에는 일차 치료 요법으로서의 응용이 증가하고 있다.^{5,6)} 이식 전에 저용량의 항암제와 면역억제제를 투여하기 때문에 이식 직후에는 혼합 키메라즘(mixed chimerism, MC) 상태가 되며 이때부터 공여자의 면역 세포가 환자 체내에 남아 있는 암세포를 면역 반응으로 제거하기 시작한다. 이후 추가로 공여자의 말초 혈액 내의 면역 세포를 환자에게 투여하거나 면역억제제의 투여 기간을 줄이면 완전 키메라즘(complete chimerism, CC) 상태가 되어 항암 및 면역 요법의 효과가 극대화된다.^{7,8)} CC란 골수나 혹은 말초에서 환자 유래의 세포를 검출할 수 없고, 전부 공여자의 세포로만 구성된 상태이며, MC는 환자의 조혈 세포가 남아 공여자와 환자의 세포가 공존하는 상태를 의미하여, 이를 검출하기 위해서는 충분히 예민한 검사법을 사용해야 하는 것이 필수적이다.^{9,10)}

조혈모세포 이식 후 키메라즘 분석에는 전통적으로 말초와 골수의 세포 형태 관찰, 적혈구 표현형 검사, 세포유전 검사 등이 시행되어 왔다. 골수 검사나 적혈구 표현형 검사는 예민도가 낮고, 초기에 임상 양상의 변화를 예측하기 어려운 단점이 있다. 세포유전 검사는 진단 당시 질병에 특이한 클론성의 염색체 변이가 발견되지 않은 경우나 혹은 동일한 성별의 공여자로부터

터 조혈모세포 이식을 받은 경우에는 유용한 정보를 얻을 수가 없다. 최근에는 염색체상에 위치하는 동일 염기서열의 반복 횟수 차이에 기인한 DNA 다형성(polymorphisms)을 이용한 분자유전학적 검사인 short tandem repeats (STR), variable numbers of tandem repeats (VNTR) 및 single nucleotide polymorphisms (SNP) 등의 사용이 증가하고 있다.⁹⁻¹²⁾

국내에서도 최근 여러 종류의 STR 및 VNTR 표지자를 사용한 키메라즘 분석이 보고되기 시작하고 있으나,^{13,14)} 대부분의 경우 실험실에서 자가 제조한 시약들에 의한 10개 미만의 표지자를 사용한 보고들로서 그 결과를 표준화하기가 어렵다. 본 연구에서는 상품화된 PowerPlex 16 System을 사용하여 조혈모세포 이식 후 T세포 키메라즘을 분석하였다. 이 시약에는 15종류의 STR 표지자 및 amelogenin 유전자가 포함되어 있고, 세 종류의 서로 다른 형광물질이 부착된 primer를 사용하므로 단일 시험관에서 16개 표지자의 동시 증폭

Table 1. The PowerPlex16 System locus-specific informations

STR locus	Label	Chromosomal location	Repeat sequence 5'→3'
Penta E	FL	15q	AAAGA
D18S51	FL	18q21.3	AGAA
D21S11	FL	21q11~21	TCTA complex
TH1	FL	11p15.5	AATG
D3S1358	FL	3p	TCTA complex
FGA	TMR	4q28	TTTC complex
TPOX	TMR	2p23~2pter	AATG
D8S1179	TMR	8q	TCTA complex
vWA	TMR	12p12~pter	TCTA complex
Amelogenin	TMR	Xp22.1~22.3 and Y	NA
Penta D	JOE	21q	AAAGA
CSF1PO	JOE	5q33.3~34	AGAT
D16S539	JOE	16q24-qter	GATA
D7S820	JOE	7q11.21~22	GATA
D13S317	JOE	13q22~q31	TATC
D5S818	JOE	5q23.3~32	AGAT

Abbreviations: STR, short tandem repeats; TH1, throsine hydroxylase theta I; FGA, alpha chain fibrinogen; TPOX, thyroid peroxidase; vWA, von willebrand factor; CSF1PO, c-fms-proto-oncogene for CSF-1 receptor; TMR, carboxy-tetramethylrhodamine; FL, fluorescein; JOE, 6-carboxy-4', 5'- dichloro-2', 7'-dimethoxyfluorescein; NA, not applicable.

이 가능하다(Table 1).¹⁵⁾ 저자들은 비골수억제 조혈모세포 이식 후 표준화된 키트를 이용한 T세포 키메리즘 분석과 공여자-환자 면역조절 상태 및 MC의 빈도와 크기, 지속 기간 등과의 사이의 관련성을 분석하고자 본 연구를 수행하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2001년 1월부터 2003년 6월 사이에 조직적합성 항원(human leukocyte antigen, HLA)이 일치하는 혈연간 공여자로부터 비골수억제 말초혈액 조혈모세포 이식을 시행한 총 17명의 환자를 대상으로 하였다. 본 연구는 동아대학교 생명윤리심의위원회의 승인을 득하였다. 대상군의 남녀 분포는 남자 5명, 여자 12명이었으며, 나이의 중앙값은 50.8세(범위: 28~62세)였다. 질환별 분포는 급성골수성백혈병 2예, 만성골수성백혈병 3예, 골수이형성증후군 3예, 다발성골수종 4예, 신세포암 2예 그리고 만성림프구성백혈병, Waldenstrom 마크로글로불린혈증 및 특발성 골수섬유증 각기 1예

씩이었다. 이식에 포함된 조혈모세포(CD34+) 평균은 $6.07 \times 10^6/\text{kg}$ (범위: 3.13~7.04)이었고, T세포(CD3+) 평균은 $4.15 \times 10^8/\text{kg}$ (범위: 1.08~6.74)이었다. 조혈모세포 이식 후 90일 이상 생존하였던 환자들을 97~543일간 추적 관찰하였다(Table 2).

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 를 투여하여 말초혈액 가동 후 5일부터 조혈모세포 채집을 시작하였으며, 조혈모세포(CD34+)가 최대 $7 \times 10^6/\text{kg}$ 주입되도록 하였다. 전처치 요법으로는 fludarabine $30\text{mg}/\text{m}^2$ 이식 전 4일부터 사흘간 투여 및 200cGy 방사선 조사를 사용하였고, graft-versus-host diseases (GVHD) 예방을 위해 cyclosporine 200mg과 mycophenolate 1,500mg을 투여하였다. 호중구 수 $500/\mu\text{L}$ 이상 연속적으로 3일 지속되고, 혈소판 수혈이 필요 없이 연속적으로 3일 이상 $20,000/\mu\text{L}$ 이상 유지될 때 생착이라고 판정하였다. 키메리즘 분석은 이식 후 4주 동안은 매주, 이후 3개월은 2주 간격으로, 다음 8개월 동안은 매월, 그리고 그 다음 1년간은 3개월 간격으로 실시하였다.

Table 2. Clinical and hematologic findings in 17 patients

Case No.	Sex/Age	Diagnosis	Disease status	CD34+ ($\times 10^6/\text{kg}$)	CD3+ ($\times 10^8/\text{kg}$)
1	F/62	AML	Complete remission 2	7.00	2.06
2	F/38	MM	Partial remission 2	7.03	3.23
3	F/62	CML	Chronic phase	6.92	8.10
4	M/62	MDS	Refractory anemia	7.00	1.08
5	F/44	MM	Partial remission 2	7.00	2.59
6	F/61	Waldenstrom	Refractory	3.46	3.08
7	F/52	MDS	Unclassified	4.06	6.56
8	F/52	Myelofibrosis	Stable	6.11	4.34
9	M/57	CML	Chronic phase	3.13	3.98
10	F/45	AML	Complete remission 2	6.99	5.24
11	M/48	Renal Ca	Progressive	3.58	3.97
12	F/60	MDS	RAEB	6.58	3.92
13	F/52	CML	Chronic phase	7.04	2.78
14	M/44	MM	Partial remission 3	7.00	5.23
15	M/49	MM	Partial remission 1	6.58	4.43
16	F/48	CLL	Relapse 2	7.03	3.30
17	F/28	Renal Ca	Stable	6.74	6.74

Abbreviations: AML, acute myelogenous leukemia; MM, multiple myeloma; CML, chronic myelogenous leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; Ca, cancer; RAEB, refractory anemia with excess blasts; CLL, chronic lymphocytic leukemia.

2. T세포 분리 및 DNA 추출

EDTA 말초혈액 검체로 RosetteSep™ kit (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)를 사용하여 T세포를 분리하였다. 혈액에 키트 내의 cocktail 용액을 50 μ L/mL 되게 넣어 실온에서 20분간 반응시켰다. 검체와 동량의 phosphate-buffered saline (PBS)와 2% fetal bovine serum (FBS)를 넣어 혼합한 후 이를 Ficoll-Paque (d=1.077g/mL, Pharmacia, Sweden) 위에 조심스럽게 중층하여 2,500rpm, 20분간 원심 분리하였다. 혈장을 제거하고 T세포가 풍부한 buffy coat 층을 따서 PBS와 2% FBS로 2회 세척하였다. 수확한 세포층으로부터 Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega Corp., Madison, WA, USA) 지침에 따라 DNA를 추출하였다.

3. 키메라즘 분석

PowerPlex 16 kit (Promega Corp.)을 사용하여 그 지침서에 따라 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. 각 반응은 1ng DNA, 2.5 μ L Gold 10X buffer, 2.5 μ L PowerPlex 16 10X primer pair mix, 0.8 μ L (4 units) AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 증류수를 더하여 총량이 25 μ L가 되게 하였다. 16종류 STR 표지자의 종류, 염색체상 위치 및 반복 염기서열의 특성은 Table 1에 표시하였다. PCR은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA)를 사용하여 먼저 95°C 11분, 96°C 1분간 반응시킨 후, 94°C 30초, 60°C 68초, 70°C 50초간의 반응을 10주기, 그리고 90°C 30초, 60°C 60초, 70°C 50초의 반응을 각각 22주기 실시하고 60°C 30분간 반응한 다음 4°C로 보존하였다.

PCR 산물은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)로 분석하였다. 1 μ L PCR 산물을 24 μ L deionized formamide 및 1 μ L Internal Lane Standard 600 (Applied Biosystems)과 혼합하여 95°C 3분 변성시킨 후, ABI 310 기기로 전기영동하였다. 각기 STR 표지자별로 관찰되는 대립 유전자의 위치와 크기(peak areas)는 PowerTyper 16 Macro (Promega Corp.) 프로그램으로 분석하였다(Fig. 1). 공여자와 환자의 대립 유전자의 위치가 서로 다른 위치에 있어(heterozygous) 감별될 때 'informative'라고 판독하고, 한 개의 대립 유전자만 관찰되거나(homozygous) 혹은 환자에서 공여자와 서로 다른 최소 한 개의 대립 유전자가 관찰되지

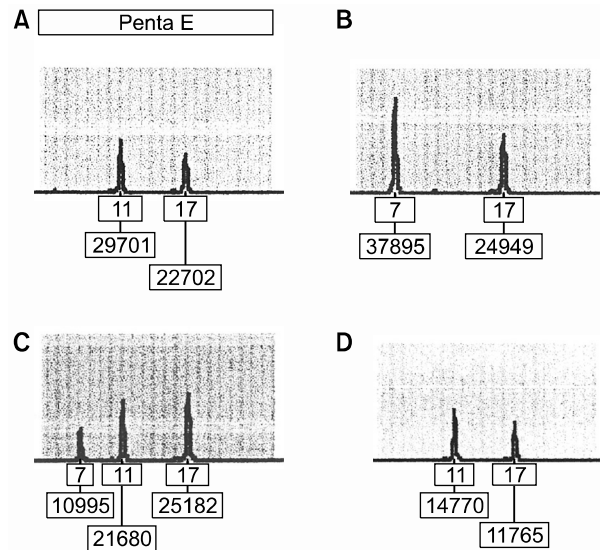


Fig. 1. Representative engraftment analysis results from the case No. 2 patient. The loci shown is penta E. Allele numbers and peak areas are designated in the boxes below each allele peak. (A) Donor. (B) Pre-transplantation patient. (C) Mixed chimerism at post-transplantation day 7. (D) Complete donor chimerism at post-transplantation day 28.

않을 때는 'noninformative'라고 판독하였다.

결 과

T세포 MC는 이식 후 모든 환자에서 관찰되었으며, 그 정도와 지속 기간 등에 따라 세 군으로 구분할 수 있었다.

1군은 5명의 환자였으며 중앙값 25일(범위: 13~41일)에 신속히 CC로 이행하였다. CC는 이후 중앙값 352일(범위: 97~384일) 동안 관찰하였을 때, 5명 중 4명에서 91일 이상 지속되었다. 한 명은 MC가 다시 나타나서 가장 최근까지도(이식 후 97일) 약 11~15%로 관찰되었다. 5명 모두 중앙값 21일(범위: 8~41일)에 급성 GVHD가 발생하였으며 5명 중 4명에서 GVHD는 CC에 선행하였다. 2명은 이식 후 각각 220일과 420일에 재발하였다(Fig. 2A).

2군은 5명이었고 짧은 동안 T세포 MC를 보여 중앙값 21일(범위: 7~70일)에 가장 높은 MC를 나타낸 후 급속하게 공여자 세포가 소실되었다. 5명 중 3명에서 공여자 림프구 주입(donor lymphocyte infusion, DLI)을 시행하였으며 한 명에서는 DLI 실시 전에 CC에 도달하였다. 5명 중 한 명에서만 급성 GVHD가 발생하였다. 5명 모두 이식 후 150일 이내에 질병이 재발하거나

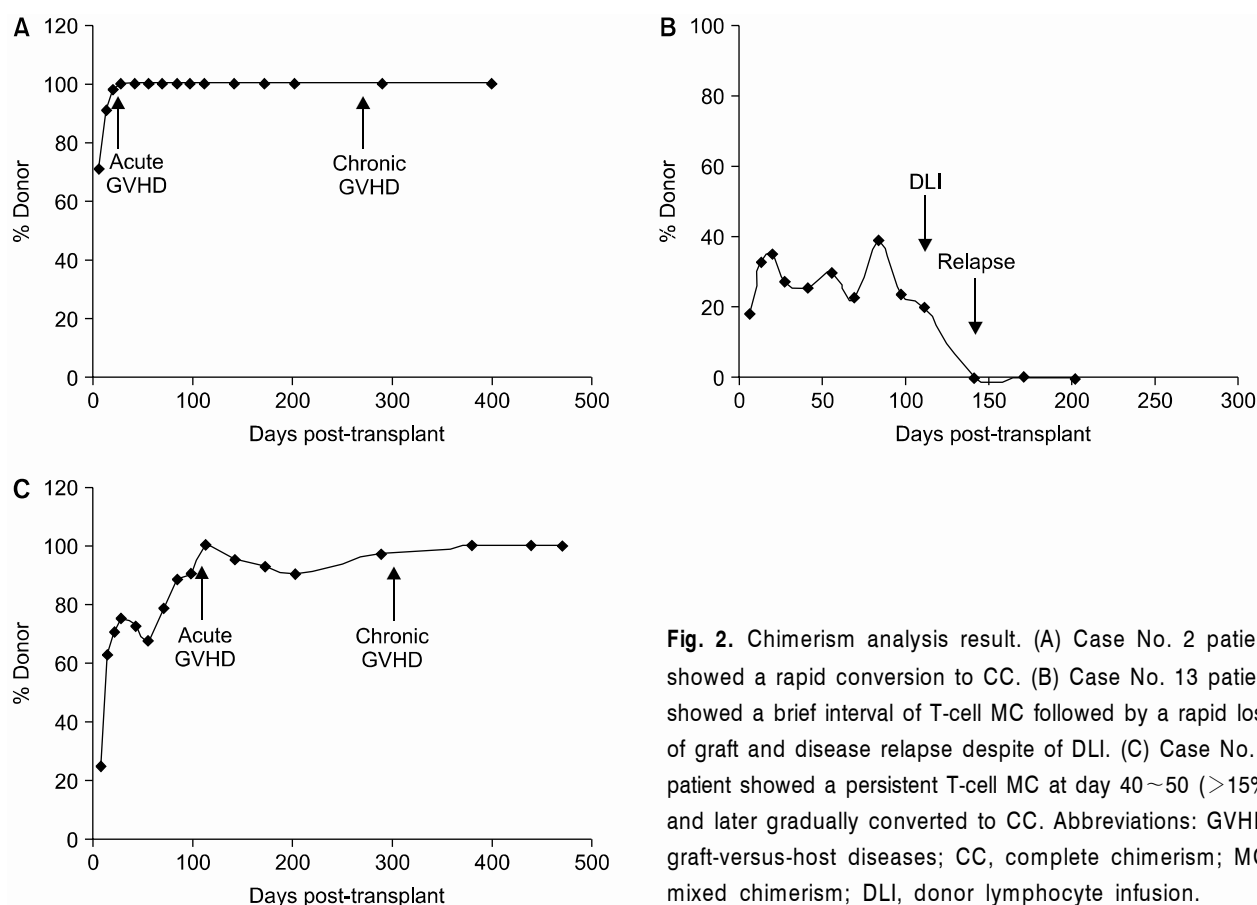


Fig. 2. Chimerism analysis result. (A) Case No. 2 patient showed a rapid conversion to CC. (B) Case No. 13 patient showed a brief interval of T-cell MC followed by a rapid loss of graft and disease relapse despite of DLI. (C) Case No. 4 patient showed a persistent T-cell MC at day 40~50 (>15%) and later gradually converted to CC. Abbreviations: GVHD, graft-versus-host diseases; CC, complete chimerism; MC, mixed chimerism; DLI, donor lymphocyte infusion.

진행하였다(Fig. 2B).

3군은 7명의 환자로 분류하였는데 이식 후 40~50일 경에 지속적인 MC (>15%)를 보이다가 그 후 DLI를 실시하지 않고도 점차 중앙값 112일(범위: 69~224일)에 CC로 바뀌었다. 3명의 환자에서는 CC 도달 후 일시적으로 환자 세포가 다시 3~10% 정도 관찰되었으나 이후 중앙값 252일(범위: 160~511일)에 CC로 이행하였다. 7명 모두 CC에 선행하여 급성 GVHD가 발생하였다. 3명에서 질병이 재발하였는데 이 중 2명은 CC에 도달하기 전 재발하여 원 질환이 급속히 진행함을 보여주었다. 2명이 사망하였는데 한 명은 이식 후 322일에 병의 재발로 사망하였으며 다른 한 명은 485일에 완전 관해 상태였으나 밝혀지지 않은 원인으로 사망하였다(Fig. 2C).

2군에서 급성 GVHD가 가장 적게 발생하였고 재발은 가장 높게 관찰되었다. 총 17명의 환자 중에서 4명의 환자가 사망하였다. 4명의 환자 중에서 3명은 재발된 상태였고 한 명의 환자는 완전 관해 상태였다. 나머지 13명 중 7명이 재발을 하였고, 4명의 환자는 완전

관해였으며, 2명은 부분 관해였다(Table 3).

고 찰

이식 후 공여자의 건강한 혈액 세포를 만들기 위해서 공여자의 조혈모세포가 환자의 골수 내에 안정적으로 정착되어야 하는데 안정적 정착이 일어나기 위해서는 여러 가지 요인이 작용하지만 가장 중요한 요소는 이식 전 면역억제 치료 약제의 강도와 이식 시 주입되는 조혈모세포의 수에 의해 결정된다. 비골수억제 조혈모세포 이식의 특징은 이식 후 초기에 혈액 세포의 감소가 서서히 일어나며 대부분의 환자에서 백혈구 수가 안정된 상태를 유지하여 이식과 관련된 초기 합병증인 폐렴 등의 감염, 출혈 및 장기 손상 등의 심각한 합병증을 줄일 수 있다.¹⁻⁶⁾

혈액 종양에서 조혈모세포 이식의 궁극적인 목표는 종양세포의 제거인데 비골수억제 조혈모세포 이식을 위해 전처치 시행한 환자의 잔존 종양 세포를 사멸시키는 이식편대 종양(graft-versus-malignancy, GVM) 효

Table 3. Follow-up informations

Case No.	Current status	Response (day)	Last day follow-up
Group 1			
2	Dead	Relapse (220)	380
3	Alive	Complete remission	483
5	Alive	Relapse (420)	427
6	Alive	Partial remission	440
17	Alive	Complete remission	97
Group 2			
9	Alive	Relapse (104)	260
10	Dead	Relapse (55)	207
12	Alive	Relapse (126)	176
13	Alive	Relapse (97)	174
16	Alive	Relapse (140)	156
Group 3			
1	Alive	Complete remission	543
4	Dead	Complete remission	485
7	Dead	Relapse (114)	304
8	Alive	Complete remission	381
11	Alive	Partial remission	253
14	Alive	Relapse (104)	174
15	Alive	Relapse (148)	174

과가 매우 중요하다. GVM 효과는 공여자의 T세포에 의해 매개되며 이식 후 키메라즘 현상 및 GVHD의 발병과도 연관되어 있다. MC가 지속되면 GVHD의 위험성은 감소되지만 종양에 대한 내성이 초래되어 결과적으로는 GVM 효과가 감소될 우려가 있다. 더욱이 이식 전 전처치 항암 요법으로 충분한 항종양 효과를 획득하지 못한 경우에는 이식 후 원질환이 진행할 가능성이 높아지게 된다. 따라서 이식 후 키메라즘 분석은 면역 억제 중단 시기와 DLI 시기 등을 결정하는 데에 필수적이다.

동종 조혈모세포 이식 후 생착의 판정 혹은 키메라즘 분석을 위한 분자유전학적 검사에는 공여자와 환자를 식별할 수 있는 여러 종류의 DNA 반복 염기서열이 사용되고 있다. 이러한 반복 DNA는 인간 유전체상에서 고루 흩어져 분포하고 멘델 법칙에 따라 유전한다. 그 중 대표적인 VNTR 및 STR 표지자는 수백 개가 전 염색체상에 위치하며 각 VNTR/STR 표지자의 대립 유전

자는 특정한 반복 횟수를 나타낸다. VNTR은 8~80bp의 염기서열의 반복에 의한 0.5~30kb 정도의 다형성 부위로 구성되고 주로 염색체의 말단부(telomeres)와 같은 곳에 위치한다. STR은 2~7bp 정도의 다형성 부위로 구성되고 염색체 전체에 걸쳐 흩어져 분포한다.^{9-10,16)}

키메라즘 분석에 응용할 때 STR은 VNTR에 비해 몇 가지 장점이 있는데,^{9,11)} 무엇보다 그 염기서열 내에 guanine과 cytosine (GC) 포함률이 낮고 그 크기가 작으므로 PCR에 의한 증폭이 용이하다. 또한 PCR 산물의 크기가 500bp보다 작으므로 검체 시료에 포함된 DNA가 변화하거나 변성된 경우에도 증폭이 가능하다. 최근 여러 개의 STR 표지자를 동시에 증폭할 수 있는 상용화된 키트들이 시판되고 있어서 VNTR에 비해 더 예민한 방법으로 키메라즘을 분석할 수 있게 되었다. STR을 이용한 키메라즘 분석에서는 각 표지자별로 공여자와 환자를 비교하여 공여자에서는 발견되지 않고 환자만 특이하게 갖는, 유전적으로 유용한 대립 유전자를 발견하는 것이 가장 중요하다. 이식 후에는 환자의 말초혈액이나 골수로부터 DNA를 추출하여 이전에 결정해 둔 환자-특이 표지자에 대해 분석한다.

환자의 대립 유전자가 다량 검출되는 경우에는 환자의 혈액세포가 다시 회복되어 질병의 재발이나 이식 실패를 예측할 수 있다. 보고된 문헌들을 살펴보면, MC가 관찰되는 환자에서 재발률이 높았던 보고들¹⁷⁻²⁰⁾과 MC 존재와 재발 간에 연관성이 없었던 상반된 보고가 있다.^{21,22)} Barder 등¹⁹⁾의 연구에서 MC의 정도를 정량했을 때 환자의 세포량이 점점 증가할 경우 감소하는 경우보다 재발률이 유의하게 높았다. 그러나 환자의 세포가 지속적으로 극소량 존재할 경우는 재발과 무관한 것으로 보고한 연구도 있으며²³⁾ 환자 세포량이 점점 증가하는 MC 상태에서도 완전 관해를 유지했던²¹⁾ 보고들도 있다. 이와 같이 보고자마다 MC와 재발의 연관성에 대해 다른 견해를 보이는 것은 MC 상태를 유발한 잔존하는 환자의 세포가 악성 세포인지 또는 정상 세포인지에 따라 재발에 미치는 영향이 다를 수 있기 때문으로 생각된다.

이식 후 MC를 초래하는 요인으로는 이식 전에 시행한 화학요법에도 사멸되지 않는 환자의 T세포가 남아 있는 경우, 또는 T세포가 제거된 조혈모세포를 이식했거나 면역억제제 약물을 사용한 경우 이식 후 환자의 세포가 잔존할 수 있는 가능성이 높아져 MC가 관찰될 수 있다.²⁴⁾ 또한 세포 독성이 적은 비골수억제 조혈모세포 이식을 시행한 경우에도 환자의 T세포나 골수구

계 세포의 생존에 의해 MC가 관찰될 수 있다.²⁵⁾ 환자 정상 세포의 존재에 의한 MC는 재발과 연관성이 없을 것으로 생각되지만, 악성 세포에 의한 MC일 경우 재발 가능성이 있다. 따라서 환자의 백혈구 각 세포 분획에 따른 키메리즘 현상을 관찰하여 MC 세포의 기원을 밝히는 것이 재발과의 연관성을 밝히는 데 도움이 될 것이다.²⁴⁾

본 연구 결과 모든 환자에서 이식 후 T세포 MC가 관찰되었으나 CC에 도달하는 빈도와 속도는 달랐다. T세포 CC는 GVHD 발생과 연관되었으며 대부분 CC에 선행하여 GVHD가 발생하였다. 본 연구에서는 GVHD 양상 및 질병의 재발과 관련하여 세 가지 유형의 T세포 MC가 관찰되었다. 1군은 이식 후 신속하게 T세포 CC에 도달하여 5명 중 4명에서 100일 이상 지속되었다. 2군에서는 공여자 T세포가 이식 후 차츰 감소하여 질병이 재발하거나 이식편이 소실되었으며 한 명에서만 T세포 CC를 보였으나 역시 급격히 이식편이 소실되고 이후 재발하였다. 3군의 환자들은 서서히 T세포 CC로 이행하여 200일 이후에도 지속되었다.

비골수억제 조혈모세포 이식 후 T세포 키메리즘 분석에 관해서는 보고가 많지 않고 특히 CC 및 GVHD와의 관련성에 관해서도 일관된 결론이 부족한 실정이다. 이러한 차이는 전처치 요법, 질환의 차이, CD34+ 세포 용량 및 GVHD 예방법의 차이에 기인할 수 있으며 이외에 T세포 분리법 및 키메리즘 분석법의 종류와 민감도, 키메리즘 분석 시기 등의 차이가 원인일 수도 있다. 키메리즘 분석 방법을 표준화한 후 표준화된 지침에 따른 전향적 연구를 통해 이식 후 추가 치료 방침을 설정하는 데 중용한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

요 약

배경: 비골수억제 조혈모세포 이식을 시행한 환자의 종양 세포를 사멸시키는 기전은 GVM 효과에서 기인한다. MC가 지속되면 GVHD의 위험성은 감소되지만 종양에 대한 내성이 초래되어 결과적으로는 GVM 효과가 감소될 우려가 있다. 따라서 이식 후 키메리즘 분석은 면역 억제 중단 시기와 DLI 시기 등을 결정하는 데에 필수적이다.

방법: 비골수억제 조혈모세포 이식을 시행한 총 17명의 각종 종양 환자를 대상으로 이식 후 정기적으로 말초혈액의 T세포 키메리즘 상태를 분석하였다. T세포로부터 DNA를 증폭하였고, 증폭 산물은 자동 형광 분석 장비로 분석하였다.

결과: T세포 MC는 이식 후 모든 환자에서 관찰되었으며, MC 정도와 지속 기간 등에 따라 세 군으로 나눌 수 있었다. 1군은 5명의 환자였고, 잠깐 동안 T세포 MC를 보인 후 중앙값 25일을 전후하여 CC에 도달하였다. 2군은 5명이었고, T세포 MC가 짧은 동안 보이다가 중앙값 21일을 전후하여 환자 세포로 다시 대체되면서 CC에 전혀 도달하지 못하고 본래 질환이 재발하거나 다시 진행하였다. 3군은 7명으로서, 이식 후 40~50일경에 지속적으로 MC를 보이다가 이후 중앙값 112일 전후하여 CC에 도달하였다.

결론: 비골수억제 조혈모세포 이식 후 모든 환자에서 T세포 MC가 관찰되었으나, CC에 도달하는 빈도와 시기는 차이가 있었다. GVHD는 대부분의 환자에서 T세포 키메리즘에 선행하였다. 비골수억제 조혈모세포 이식 후 첫 100일 동안은 T세포 키메리즘 상태를 연속적으로 관찰하는 것이 추가적 치료 방침 선정에 중요하다.

참 고 문 헌

- 1) Petersen SL, Madsen HO, Ryder LP, et al. Haematopoietic stem cell transplantation with non-myeloablative conditioning in the outpatient setting: results, complications and admission requirements in a single institution. *Br J Haematol* 2004;125:225-31.
- 2) Cao TM, Shizuru JA, Wong RM, et al. Engraftment and survival following reduced-intensity allogeneic peripheral blood hematopoietic cell transplantation is affected by CD8+ T-cell dose. *Blood* 2005;105:2300-6.
- 3) Mielcarek M, Storb R. Graft-vs-host disease after non-myeloablative hematopoietic cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1251-60.
- 4) Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, David-Gomez-Rangel J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with non-myeloablative conditioning in patients with acute myelogenous leukemia eligible for conventional allografting: a prospective study. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1191-5.
- 5) Arya M, Gommersall LM, Shergill IS, Patel HR, Chao D. Non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation: a promising new therapy in the management of metastatic renal cell cancer. *BJU Int* 2005;96:474-5.
- 6) Rzepecki P, Zolnierek J, Sarosiek T, Langiewicz P, Szczylik C. Allogeneic non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation for treatment of

- metastatic renal cell carcinoma-single center experience. *Neoplasma* 2005;52:238-42.
- 7) Bornhauser M, Thiede C. Chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005;90:1301A.
 - 8) Seidel MG, Fritsch G, Matthes-Martin S, et al. In vitro and in vivo T-cell depletion with myeloablative or reduced-intensity conditioning in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005;90:1405-14.
 - 9) Van Deerlin VM, Leonard DG. Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Med* 2000;20:197-225.
 - 10) Nuckols JD, Rasheed BK, McGlennen RC, Bigner SH, Stenzel TT. Evaluation of an automated technique for assessment of marrow engraftment after allogeneic bone marrow transplantation using a commercially available kit. *Am J Clin Pathol* 2000;113:135-40.
 - 11) Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing - comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia* 2004;18:248-54.
 - 12) Fredriksson M, Barbany G, Liljedahl U, Hermanson M, Kataja M, Syvanen AC. Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles. *Leukemia* 2004;18:255-66.
 - 13) Huh HJ, Huh JW, Eun Suk, et al. Clinical significance of mixed chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Lab Med* 2002;22:441-6.
 - 14) 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 cells transplantation. *Korean J Clin Pathol* 2001;21:527-33.
 - 15) Promega PowerPlex 16 System. Technical Manual No. D012. 2001. URL:<http://www.promega.com/tbs/tmd012/tmd012.pdf>.
 - 16) Lion T. Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Leukemia* 2003;17:252-4.
 - 17) Wasch R, Bertz H, Kunzmann R, Finke J. Incidence of mixed chimaerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2000;109:743-50.
 - 18) Roman J, Serrano J, Jimenez A, et al. Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2000;85:173-80.
 - 19) Bader P, Beck J, Frey A, et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:487-95.
 - 20) de Weger RA, Tilanus MG, Scheidel KC, van den Tweel JG, Verdonck LF. Monitoring of residual disease and guided donor leukocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimera analysis with short tandem repeats. *Br J Haematol* 2000;110:647-53.
 - 21) Choi SJ, Lee KH, Lee JH, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:327-32.
 - 22) Bertheas MF, Lafage M, Levy P, et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 1991;78:3103-6.
 - 23) Najfeld V, Burnett W, Vlachos A, Scigliano E, Isola L, Fruchtman S. Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:829-34.
 - 24) Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999;13:2059-69.
 - 25) McCarthy NJ, Bishop MR. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Oncologist* 2000;5:487-96.