

급성백혈병 치료 후 완전관해 및 골수이식생착 후 재생중인 골수에서 CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13,33+/CD34+ 세포의 분포

강지민 · 신소영 · 한경자

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실

Proportions of Cells Expressing CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, or CD13,33+/CD34+ in the Regenerating Bone Marrows During Complete Remission of Acute Leukemia or After Bone Marrow Transplantation

Jimin Kahng, M.D., So-Young Shin, M.D., and Kyungja Han, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Catholic University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The hemopoietic stem cells increase in number during the regeneration after chemotherapy or bone marrow transplantation (BMT). Although the proportion of hemopoietic stem cells and their differentiation have been studied by immunophenotyping using the flow cytometry, no substantial research efforts have been directed toward the regenerating marrow. We attempted to discover the proportions of undifferentiated stem cells, committed stem cells, B cell precursors, and myeloid precursors in the regenerating bone marrows during complete remission (CR) and after engraftment of BMT.

Methods : Bone marrow samples from 82 patients with acute leukemia in CR and from 25 patients after BMT engraftment, along with 22 control samples, were used to find the numbers of CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, and CD13,33+/CD34+ cells in the large lymphocyte gate by flow cytometry. We cross-analyzed our results in terms of groups: CR, BMT, and initial diagnosis groups. We performed significance tests on age, relapse, chromosomal abnormalities, clinical outcomes, and initial immunophenotypes of the leukemic cells.

Results : The proportions of CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, and CD13,33+/CD34+ cells are more highly distributed in acute B-lymphoblastic leukemia than the normal group and also in the CR than the BMT group. CD19+/CD34+ cells were increased in the relapse group and CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, and CD13,33+/CD34+ cells were increased in the group with chromosomal abnormality. The results were irrelevant to the initial immunophenotype of the leukemic blasts.

Conclusions : The increases of the markers spanned too widely to apply one specific cutoff value to analyze them. They seemed to be the results of normal regeneration, irrelevant to relapse or initial immunophenotype of leukemic blasts. (*Korean J Lab Med 2007;27:406-13*)

Key Words : CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13,33+/CD34+, Regenerating bone marrow, Acute leukemia

접 수 : 2007년 8월 21일 접수번호 : KJLM2066
수정본접수 : 2007년 10월 24일
게재승인일 : 2007년 11월 9일
교 신 저 자 : 한 경 자
우150-713 서울시 영등포구 여의도동 62
가톨릭대학교 성모병원 진단검사의학과
전화 : 02-3779-1297, Fax : 02-783-6648
E-mail : hankja@catholic.ac.kr

서 론

*본 연구는 가톨릭 대학교 성모병원 2007년도 임상의학연구비의 일부 지원에 의해 이루어진 것임.

화학요법으로 완전관해에 도달한 급성백혈병과 골수이식 후 골

수에서는 정상골수에 비하여 빠른 속도로 광범위한 재생과정이 이루어진다. 이 과정에서 미분화 조혈모세포(undifferentiated stem cell) 및 계열특이항원(lineage specific antigen)을 발현하는 조혈모세포들은 정상골수에 비해 많은 수가 존재할 것으로 추정된다. 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 정상골수 내의 조혈모세포 분화에 따른 면역표현형분석(immunophenotyping)이 보고되었으나[1-5], 급성백혈병 완전관해 시기의 골수 및 골수이식생착 후 재생과정에 있는 골수 내에서의 분포도는 보고된 경우가 적다[5, 6]. 한편 미세잔존질환(minimal residual disease, MRD)의 진단을 위해 면역표현형분석이 적극 활용되면서 다양한 면역표현형의 조합이 사용되고 있으나[1, 7, 8], 재생을 위해 정상보다 높은 비율로 존재하는 것으로 인정할 수 있는 기준치는 아직 정립되어있지 않다. 이에 본 연구에서는 급성백혈병의 완전관해 골수와 급성백혈병 치료 후 골수이식의 생착이 확인된 골수내에서 CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13,33+/CD34+ 세포들의 분포도를 정상골수를 대조군으로 하여 분석하여, 미분화 조혈모세포, 구속전구세포(committed stem cell), B림프계 및 골수계 조혈모세포의 분포를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2005년 12월부터 2006년 2월까지 가톨릭대학교 성모병원 진단검사의학과에 골수천자검사가 의뢰되어 급성백혈병으로 진단된 환자 중, 완전관해가 확인된 82예(완전관해군)와 골수이식 후 생착에 성공한 25예(골수이식군)를 대상으로 하였다. 완전관해의 판정은 화학요법 후 21일째에 말초혈액검사와 골수검사서에서 완전관해에 합당한 소견을 보이고 골수내 아세포 5% 미만을 기준으로 하였다. 완전관해군 82예 중 23예는 완전관해 당시의 검체로 검사를 시행하였고, 59예는 완전관해 확인 후 추적검사의 검체였으며 완전관해 도달 후 기간은 평균 267.9일(중앙값 91일, 범위 28-1,309일)이었다. 생착의 판정은 골수이식 후 21일째에 골수검사서에서 적혈구계, 골수구계, 거핵구계 모세포들 중 2계열 이상이 확인되는 것을 기준으로 하였다. 골수이식군 25예 중 15예는 생착 확인 당시의 검체로 검사를 시행하였고, 나머지 10예는 생착 확인후 추적검사의 검체였으며 생착 확인 후 기간은 평균 485.6일(중앙값 365일, 범위 60-1,095일)이었다. 조혈성인자의 투여는 관해유도 화학요법 시행시와 골수이식시 공통적인 지침에 의해 사용되었는데, 화학요법 시작일로부터 18세 미만 소아는 5일째, 성인은 7일째부터 G-CSF 5 µg/kg의 용량으로 18일째까지 투여되었다. 이후 공고요법과 강화요법 시행시에는 역시 동일한 용량이 투여되었으나, 화학요법약제를 바꿔 관해재유도를 하는 경우에는 투여되지 않았다.

초기질환은 급성B림프모구성백혈병(acute B-lymphoblastic leukemia, B-ALL) 76예, 급성T림프모구성백혈병(acute T-lymphoblastic leukemia, T-ALL) 10예, 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML) 10예, 급성양표현백혈병(acute biphenotypic leukemia, ABL) 11예이었다. 완전관해도달 및 골수이식생착 후, 본 검사에 사용된 검체 채취 시점 이후 재발한 경우가 총 22예(중추신경계 재발 16예 포함)였으며, 초기질환은 B-ALL 19예, AML 2예, ABL 1예이었다.

정상 대조군은 22예이었으며, 골수이식 공여자 골수 10예와 특발성혈소판감소성자반병 및 림프종의 골수전이 판정을 위해 골수검사를 시행하여 정상으로 판정받은 골수 12예로 구성되었다. 129예 모두 자필 서명된 '검사 후 잔여 검체 사용 승낙서'를 제출하였으며, 골수검사 후 1 mL 이상의 골수흡입액이 남은 경우였다.

2. 방법

EDTA가 함유된 골수흡입액 100 µL에 fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) 또는 peridinin chlorophyll protein (PerCP)로 표지된 단클론항체(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 각각 10 µL씩 섞은 후 상온 암소에 15분 방치하고, 적혈구 용해액(Becton Dickinson) 2 mL을 첨가하여 다시 상온 암소에 10분 방치하여 적혈구를 용해하였다. 모든 골수검체는 FITC로 표지된 CD13, CD33, CD38 항체, PE로 표지된 CD19 항체, 그리고 PerCP로 표지된 CD34 항체로 염색하였다. CD34 항체와 CD38 항체를 한 시험관 내에서 반응시키고, CD34 항체와 CD13, CD33 및 CD19 항체를 한 시험관 내에서 반응시켰다. 음성대조로는 mouse IgG₁-FITC/IgG_{2a}-PE/CD45-PerCP를 사용하였다. 적혈구 용해가 완료된 후 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하고 다시 PBS에 부유시켜 유세포분석기(FACSCalibur, Becton Dickinson)의 Cell Quest program으로 20,000개의 세포를 분석하였다. Forward scatter channel (FSC)/side scatter channel (SSC)은 linear mode로 고정하고 형광 channel들은 log mode로 고정하였다. FSC와 SSC 분포에서 일반적으로 백혈병 세포가 속하는 아세포를 구획할 때 이용하는 분획(gate)인 FSC는 다양하지만 SSC가 낮은 부분의 large lymphocyte gate를 선택하였다(Fig. 1). 선택한 구획 내에서 CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13,33+/CD34+ 세포의 백분율을 계산하였다(Fig. 1).

3. 통계

SAS통계프로그램을 이용하여 Wilcoxon two-sample test를 시행하여 정상골수와 백혈병 완전관해 골수 사이의 표지자별 유의성을 검정하였다. Kruskal-Wallis test와 Wilcoxon rank sum test로 세 군 이상의 다중비교를 시행하여, 초기진단별군 간의 표지자별 유의성을 검정하고, 완전관해군 및 골수이식군과 정상군

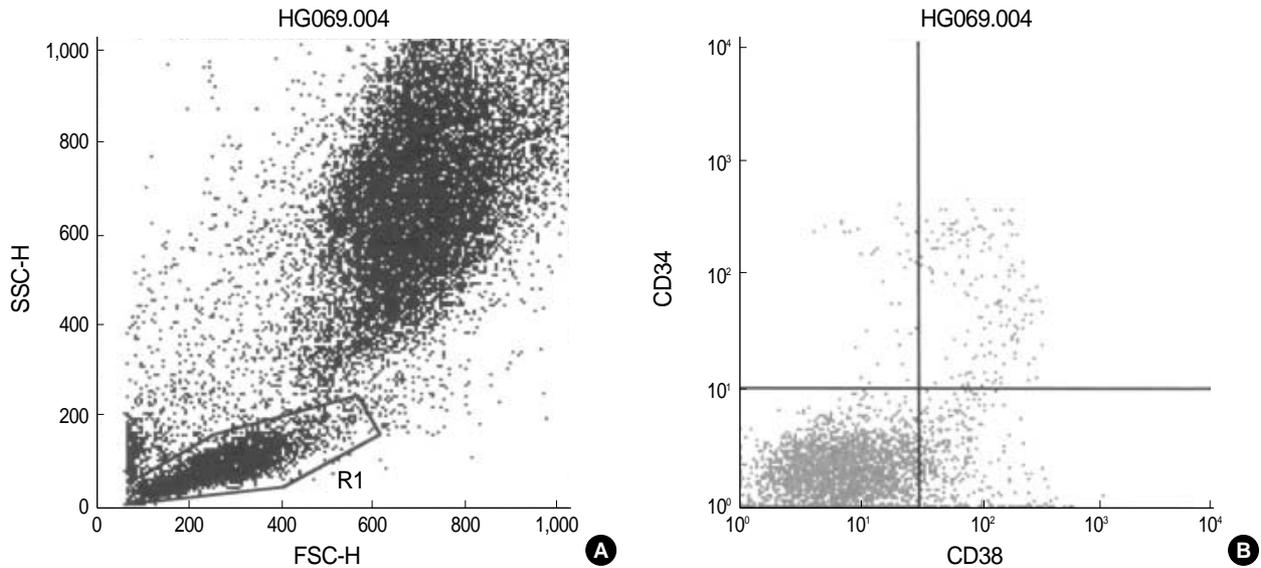


Fig. 1. Dot plot scattergrams of bone marrow cells of a B-ALL patient in complete remission stained with anti-CD38-FITC/anti-CD34-PerCP (A, B). The large lymphocyte gate was set using forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics (A). The CD38+/CD34+ cells in the gate (upper right quadrant) was 4.30% (B).

Table 1. Frequencies of cells expressing CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, or CD13,33+/CD34+ in the bone marrow during complete remission of acute leukemia or after bone marrow transplantation

	Normal control (N=22)	B-ALL (N=76)	T-ALL (N=10)	AML (N=10)	ABL (N=11)
CD38-/CD34+	0.30±0.24 (0.00-0.85)	0.77±0.79 (0.02-4.95) <i>P=0.013</i>	0.46±0.25 (0.04-0.79) <i>P=1</i>	0.41±0.37 (0.00-1.19) <i>P=1</i>	1.14±1.80 (0.18-6.38) <i>P=0.117</i>
CD38+/CD34+	0.89±0.59 (0.14-2.71)	2.66±2.57 (0.09-11.28) <i>P=0.004</i>	4.06±3.95 (0.12-10.84) <i>P=1</i>	0.74±0.51 (0.18-1.93) <i>P=1</i>	2.45±2.40 (0.19-7.62) <i>P=0.138</i>
CD19+/CD34+	0.32±0.28 (0.00-1.06)	1.35±1.64 (0.05-9.75) <i>P=0.002</i>	1.76±2.35 (0.07-7.19) <i>P=1</i>	0.54±0.50 (0.01-1.71) <i>P=1</i>	1.40±1.28 (0.32-4.46) <i>P=0.005</i>
CD13,33+/CD34+	0.32±0.26 (0.04-1.35)	1.32±1.64 (0.02-8.85) <i>P<0.001</i>	1.45±1.80 (0.08-6.15) <i>P=0.124</i>	0.27±0.13 (0.13-0.52) <i>P=1</i>	0.94±0.63 (0.11-2.01) <i>P=0.022</i>

*mean±SD % in the large lymphocyte gate (range in the parentheses).

Abbreviations: B-ALL, acute B-lymphoblastic leukemia; T-ALL, acute T-lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; ABL, acute biphenotypic leukemia.

간의 유의성을 검정하였다. 각각의 유의수준은 $P<0.05$ 로 하였다.

결 과

급성백혈병 치료 후 완전관해 및 골수이식 후 골수에서 CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13, CD33+/CD34+ 세포의 분포는 Table 1, 2와 같다. 18세를 기준으로 나이, 성별, 중추신경계 재발의 여부, 말초혈액내 백혈구 수, 혈소판 수, 혈색소 등에 따른 통계학적인 차이는 유의성이 없었다.

1. CD38-/CD34+ 세포의 분포

급성백혈병 치료 후 완전관해 및 골수이식 후 골수에서 CD38-/CD34+ 세포의 분포는 정상군의 $0.30\pm0.24\%$ (범위 0.00-0.85%)

에 비해 B-ALL, T-ALL, AML, ABL군은 각각 $0.77\pm0.79\%$ (범위 0.02-4.95%), $0.46\pm0.25\%$ (범위 0.04-0.79%), $0.41\pm0.37\%$ (범위 0.00-1.19%), $1.14\pm1.80\%$ (범위 0.18-6.38%)로 모두 높았으나, 이 중 B-ALL군($P=0.013$)의 값이 통계적으로 유의하게 높았다. 그러나 B-ALL, T-ALL, AML, ABL군 간에는 유의한 차이가 없었다.

완전관해군은 $0.87\pm0.98\%$ (범위 0.02-6.38%)로, 골수이식군의 $0.36\pm0.30\%$ (범위 0.00-1.19%)보다 높았으며($P=0.003$), 골수이식군은 정상군과 유의한 차이가 없었다.

재발이 있었던 군은 $0.92\pm1.31\%$ (범위 0.06-6.38%)로 재발하지 않은 군의 $0.62\pm0.70\%$ (범위 0.00-4.95%)와 유의한 차이가 없었다($P=0.176$).

염색체이상이 하나 이상 있었던 군($N=57$)은 $0.66\pm0.60\%$ (범위 0.02-3.16%)으로 염색체이상이 없었던 군($N=50$)의 $0.78\pm1.14\%$ (범위 0.00-6.38%)와 유의한 차이가 없었다($P=0.523$).

Table 2. The differences of the frequencies of cells expressing CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, or CD13,33+/CD34+ according to the variables

	Status		Relapse		Chromosomal abnormality		Clinical outcome	
	CR (N=82)	BMT (N=25)	Negative (N=85)	Positive (N=22)	Negative (N=50)	Positive (N=57)	CR & Survive (N=103)	Expire (N=4)
CD38-/CD34+	0.87±0.98 (0.02-6.38)	0.36±0.30 (0.00-1.19)	0.92±1.31 (0.06-6.38)	0.62±0.70 (0.00-4.95)	0.78±1.14 (0.00-6.38)	0.66±0.60 (0.02-3.16)	0.68±0.88 (0.00-6.38)	0.54±0.26 (0.29-0.90)
	<i>P</i> =0.003		<i>P</i> =0.176		<i>P</i> =0.523		<i>P</i> =0.934	
CD38+/CD34+	2.98±2.78 (0.09-11.28)	1.42±1.87 (0.12-7.94)	2.30±2.61 (0.09-11.28)	2.30±2.07 (0.18-7.22)	1.83±2.15 (0.12-8.58)	2.93±2.94 (0.09-11.28)	2.21±2.50 (0.09-11.28)	2.60±3.09 (0.90-7.22)
	<i>P</i> =0.001		<i>P</i> =0.509		<i>P</i> =0.012		<i>P</i> =0.591	
CD19+/CD34+	1.54±1.77 (0.05-9.75)	0.65±0.66 (0.01-2.88)	1.09±1.54 (0.00-9.75)	1.45±1.44 (0.10-6.13)	0.97±1.41 (0.01-7.19)	1.45±1.74 (0.07-9.15)	1.07±1.45 (0.00-9.75)	2.04±2.75 (0.34-6.13)
	<i>P</i> =0.012		<i>P</i> =0.033		<i>P</i> =0.017		<i>P</i> =0.406	
CD13,33+/CD34+	1.33±1.61 (0.02-8.85)	0.78±1.18 (0.08-5.96)	1.03±1.38 (0.02-8.85)	1.13±1.66 (0.11-8.11)	0.98±1.66 (0.04-8.85)	1.21±1.35 (0.02-8.11)	0.96±1.14 (0.02-8.85)	0.92±0.26 (0.73-1.28)
	<i>P</i> =0.012		<i>P</i> =0.519		<i>P</i> =0.006		<i>P</i> =0.550	

*mean±SD % in the large lymphocyte gate (range in the parentheses).
Abbreviations: CR, complete remission; BMT, bone marrow transplantation.

환자의 임상경과 중 생존여부와의 관련성은 사망한 군에서 0.54±0.26% (범위 0.29-0.90%)로 완전관해를 유지하고 생존한 군의 0.68±0.88% (범위 0.00-6.38%)와 유사하였다(*P*=0.934).

2. CD38+/CD34+ 세포의 분포

급성백혈병 치료 후 완전관해 및 골수이식 후 골수에서 CD38+/CD34+ 세포의 분포는 정상군의 0.89±0.59% (범위 0.14-2.71%)에 비해 B-ALL, T-ALL, ABL군의 경우는 각각 2.66±2.57% (범위 0.09-11.28%), 4.06±3.95% (범위 0.12-10.84%), 2.45±2.40% (범위 0.19-7.62%)로 모두 높았으나, 이 중 B-ALL군 (*P*=0.004)의 값이 통계적으로 유의하게 높았다. 또한 B-ALL군은 AML군의 0.74±0.51% (범위 0.18-1.93%)보다 유의하게 높은 값을 나타내었으며(*P*=0.031) ABL, T-ALL군과는 유의한 차이가 없었다.

완전관해군은 2.98±2.78% (범위 0.09-11.28%)로, 골수이식군의 1.42±1.87% (범위 0.12-7.94%)보다 높았으며(*P*=0.001), 골수이식군은 정상군보다 평균치는 높았으나 유의한 차이가 없었다(*P*=0.907).

재발이 있었던 군은 2.30±2.07% (범위 0.18-7.22%)로 재발하지 않은 군의 2.30±2.61% (범위 0.09-11.28%)와 유의한 차이가 없었다(*P*=0.509).

염색체 이상이 하나 이상 있었던 군(N=57)은 2.93±2.94% (범위 0.09-11.28%)로 염색체 이상이 없었던 군(N=50)의 1.83±2.15% (범위 0.12-8.58%)에 비해 높았다(*P*=0.012).

환자의 임상경과 중 생존여부와의 관련성은 사망한 군에서 2.60±3.09% (범위 0.90-7.22%)로 완전관해를 유지하고 생존한 군의 2.21±2.50% (범위 0.09-11.28%)와 유사하였다(*P*=0.591).

3. CD19+/CD34+ 세포의 분포

급성백혈병 치료 후 완전관해 및 골수이식 후 골수에서 CD19+/CD34+ 세포의 분포는 정상군의 0.32±0.28% (범위 0.00-1.06%)에 비해 B-ALL, T-ALL, AML, ABL군이 각각 1.35±1.64% (범위 0.05-9.75%), 1.76±2.35% (범위 0.07-7.19%), 0.54±0.50% (범위 0.01-1.71%), 1.40±1.28% (범위 0.32-4.46%)로 모두 높았으나, 이 중 B-ALL군(*P*=0.002) 및 ABL군(*P*=0.005)의 값이 통계적으로 유의하게 높았다. B-ALL군이 다른 백혈병군에 비해 높은 분포도를 나타내는가를 검증하기 위해 나머지 T-ALL, AML, ABL군 전체와 B-ALL군의 값을 비교하였을 때 유의한 차이가 없었다.

초기 진단시의 백혈병 세포의 면역표현형이 CD19+/34+이었던 51예는 치료 후 1.39±1.72% (범위 0.08-9.75%)이었고 CD19+/34-이었던 7예는 1.12±1.57% (범위 0.09-4.60%)로 유의한 차이가 없었다(*P*=0.685).

완전관해군은 1.54±1.77% (범위 0.05-9.75%)로, 골수이식군 0.65±0.66% (범위 0.01-2.88%)보다 높았으며(*P*=0.012), 골수이식군은 정상군보다 평균치는 높았으나 유의한 차이가 없었다.

재발이 있었던 군은 1.45±1.44% (범위 0.10-6.13%)로 재발하지 않은 군의 1.09±1.54% (범위 0.00-9.75%)보다 유의하게 높았다(*P*=0.033).

염색체 이상이 하나 이상 있었던 군은 1.45±1.74% (범위 0.07-9.75%)로 염색체 이상이 없었던 군의 0.97±1.41% (범위 0.01-7.19%)보다 높았다(*P*=0.017).

환자의 임상경과 중 생존여부와의 관련성은 사망한 군에서 2.04±2.75% (범위 0.34-6.13%)로 완전관해를 유지하고 생존한 군의 1.07±1.45% (범위 0.00-9.75%)보다 높게 나타났지만 유의한 차이는 없었으며 사망한 환자의 수가 4명에 불과하여 통계적

의의를 적용하기 힘들었다($P=0.406$).

4. CD13,33+/CD34+ 세포의 분포

급성백혈병 치료 후 완전관해 및 골수이식 후 골수에서 CD13,33+/CD34+ 세포의 분포는 정상군의 $0.32 \pm 0.26\%$ (범위 0.04-1.35%)에 비해 B-ALL, T-ALL, AML, ABL군의 평균치는 각각 $1.32 \pm 1.64\%$ (범위 0.02-8.85%), $1.45 \pm 1.80\%$ (범위 0.08-6.15%), $0.27 \pm 0.13\%$ (범위 0.13-0.52%), $0.94 \pm 0.63\%$ (범위 0.11-2.01%)로 모두 높았으나, 이 중 B-ALL군($P<0.001$) 및 ABL군($P=0.022$)의 값이 통계적으로 유의하게 높았다. 또한 B-ALL군과 ABL군은 각각 AML군보다 유의하게 높았다($P=0.008, 0.043$).

초기 진단시의 백혈병 세포의 면역표현형이 CD13,33+/34+이었던 28예는 치료 후 $1.07 \pm 0.96\%$ (범위 0.08-3.27%)이었고 CD13,33-/34-이었던 26예는 $1.53 \pm 2.20\%$ (범위 0.08-9.75%)로 유의한 차이가 없었다($P=0.971$).

완전관해군은 $1.33 \pm 1.61\%$ (범위 0.02-8.85%)로, 골수이식군의 $0.78 \pm 1.18\%$ (범위 0.08-5.96%)보다 높았으며($P=0.012$), 골수이식군은 정상군보다 평균치는 높았으나 유의한 차이가 없었다.

재발이 있었던 군은 $1.13 \pm 1.66\%$ (범위 0.11-8.11%)로 재발하지 않은 군의 $1.03 \pm 1.38\%$ (범위 0.02-8.85%)와 유의한 차이가 없었다($P=0.519$).

염색체 이상이 하나 이상 있었던 군은 $1.21 \pm 1.35\%$ (범위 0.02-8.11%)로 염색체 이상이 없었던 군의 $0.98 \pm 1.66\%$ (범위 0.04-8.85%)보다 유의하게 높았다($P=0.006$).

환자의 임상경과 중 생존여부와와의 관련성은 사망한 군에서 $0.92 \pm 0.26\%$ (범위 0.73-1.28%)로 완전관해를 유지하고 생존한 군의 $0.96 \pm 1.14\%$ (범위 0.02-8.85%)와 유의한 차이가 없었다($P=0.550$).

고 찰

CD34 항원을 표현하지 않는 조혈모세포가 존재한다는 보고가 있으나[9] 현재까지 CD34 항원은 그 조혈잠재력(hemopoietic potential)과의 직접적인 연관성에 기인하여[10] 조혈모세포 표지자로 인식되며 활용되고 있다. CD34 양성세포의 수는 정상군에서 $1.19 \pm 0.83\%$, B-ALL $3.43 \pm 3.36\%$, T-ALL $4.52 \pm 4.30\%$, AML $1.15 \pm 0.88\%$, ABL $3.59 \pm 4.20\%$ 이었으며, B-ALL군 중에서 관해유도 21일째 완전관해진 19예의 결과는 $2.60 \pm 1.95\%$ 였다. 이는 van Wering 등[6]이 소아 ALL 환자들의 완전관해 후 2주(진단 후 5주)에 단핵구 중 $1.7 \pm 2.1\%$ 로 보고한 것과 크게 다르지 않았으며, 완전관해 도달 시점에도 이미 CD34 양성인 조혈모세포 수가 정상골수보다 높음을 알 수 있었다.

CD38은 조혈모세포들의 기능적 부분집합을 형성하는 구속전구

세포의 표지자로 사용된다[11]. 최근 CD34 양성 세포에서 CD38의 가역적 표현이 보고되었으나[12] 아직까지 정설은 CD38-/CD34+ 세포가 분화에 따라 CD38을 표현하게 되는 것으로 알려져 있다. 한편 CD34 양성 AML에서는 진단시 CD34+/CD38- 세포 수가 MRD 빈도와 상관성이 있으며 화학요법내성 세포의 수를 실질적으로 반영한다고 보고되기도 하였다[13, 14]. 정상골수에서 CD38-/CD34+ 세포의 분포는 Macedo 등[4]이 1×10^{-3} 미만으로 보고하였고 본 연구의 결과도 그와 큰 차이가 없었던 것에 비해, B-ALL군에서는 유의하게 높은 수치를 보였으며 AML 및 다른 군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

저자들이 완전관해 또는 골수이식에 따라 여러 군으로 나누어 분석을 시행한 결과, 분석된 모든 표지자가 정상군의 평균값보다 모든 다른 군들의 평균값이 높았다. 정상군에서는 4가지 지표값이 2예를 제외하고는 모두 2% 미만이었으며, 최대치도 CD19+/CD34+ 1.06%, CD13,33+/CD34+ 1.35%, CD38+/CD34+ 2.71%이었다. 백혈병군들 중에서 AML군은 모든 지표의 값이 정상군의 값과 큰 차이를 보이지 않았던 반면 B-ALL, T-ALL, ABL군들에서는 각 군의 평균치와 표준편차의 합을 넘어서는 높은 값을 보이는 예들이 각각 17예, 3예, 3예로 상대적으로 흔하였다. B-ALL, T-ALL, ABL군들 중에서 대체로 B-ALL군의 값이 정상군과 유의한 차이를 보였던 것은, T-ALL, ABL군의 모집단의 수가 각각 10예 정도로 너무 적었던 이유를 배제하기 어려운 것으로 생각된다.

본 연구에서 CD38+/CD34+ 세포는 통계적으로 유의하게 높게 측정되었던 B-ALL군 외에도, T-ALL과 ABL군에서도 각기 4예와 2예에서 5%를 넘는 결과를 나타내었으나 모집단의 수가 너무 적어 유의성은 입증되지 못하였다. 측정시 다른 계열특이항체들을 함께 검사하여 음성임을 확인하였다면 구속전구세포의 실제 수치를 더욱 직접적으로 반영할 수 있었을 것으로 생각된다.

B전구세포림프모구성백혈병(precursor B-cell ALL) 세포는 정상골수의 미성숙 B 전구세포의 악성대응물(counterpart)로 알려져 있다. 치료효과 판정의 표준화된 방법으로서 말초혈액과 골수의 형태학적 분석에서 5% 미만의 모세포가 관찰되면 완전관해로 간주하지만 형태학적 분석만으로는 정상적인 조혈모세포 및 전구세포와 남아있는 백혈병세포의 감별은 불가능하다. 특히 B계열 수렴전구세포(TdT+ 또는 TdT-)가 골수 단핵구의 50%까지도 증가한 예들이 보고되어 있기 때문에[15, 16] 특히 B-ALL의 치료 후 재생중인 골수 내에서 정상과 악성의 감별은 매우 중요하다. CD19+/CD34+을 지표로 사용한 본 연구에서도 3예에서 5% 이상의 결과를 보였으나 모두 재발하지 않았다.

Ciudad 등[3]은 정상골수 내에서 CD19 양성세포는 $3.23 \pm 1.89\%$, CD34 양성세포는 $0.79 \pm 0.39\%$, B 계열 전구세포의 초기단계에 해당하는 CD19+/CD34+ 세포는 전체 B 세포의 $3.92 \pm 3.10\%$ 에 해당한다고 하였으며, CD19+/CD34+ B 세포가 일반적인 CD45의 양성강도보다 훨씬 약한 강도로 음성내지 약양성(negative to dim positive)에 이르는 범위에 표현된다고 하였던 점은

본 연구와 동일하였다.

CD33은 CD34양성 세포의 골수계 구축성을 나타내는 것으로 알려졌으나[17] 골수계 분화에서의 구체적인 기능은 아직 밝혀지지 않았다. CD33+/CD34+ 세포는 적혈구 돌발형성단위(burst-forming unit erythroid, BFU-E) 및 과립구 및 대식세포 집락형성단위(colony-forming unit granulocyte-monocyte, CFU-GM)를 형성하며 CD13양성을 보이고 뒤이어 CD15, CD11b 등으로 표현된다[18]. 본 연구의 B-ALL군에서 역시 정상군보다 유의하게 높았으며 AML군에서는 오히려 정상과 차이를 보이지 않았고, 초기진단시의 CD13,33+/CD34+과 무관하였던 것은 정상적인 재생과정 중의 증가분임을 반영한다.

여러 보고들에서 유사한 지표들을 보이는 세포 수를 전체 유헤 세포 내에서의 백분율로 산정하고 있어 본 연구의 결과와 단순 비교를 하기 어려운 경우가 많았다. 그러나 실제 완전관해 또는 골수이식 후 골수의 상태는 사용된 조혈성인자의 종류와 양, 그리고 환자의 화학요법과 조혈성인자에 대한 반응의 차이로 전체 세포의 구성이 판이하게 다를 수 있으므로 직접적인 적용이 가능한 수치를 얻기 위해서는 본 연구에서와 같이 large lymphocyte로 분획을 설정함이 추후 누적결과를 분석할 때 유용하다고 판단되었다.

본 연구의 대상이 되었던 완전관해군에서 완전관해에 도달한 시기는 화학요법후 21일이 가장 많았지만(23예), 완전관해도달 이후 28일부터 1,309일의 다양한 시기에 걸쳐 검사가 시행되었다. 골수이식군에서도 생착 확인은 이식 후 21일이 가장 많았으나(15예), 역시 60일부터 1,095일까지 시기적으로 다양하였다. 시기에 따라 각 지표의 수치에 차이가 있을 것으로 예상되었으나 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못하였다. 연속형 자료를 이용한 분석에서도 시기에 따른 추이는 발견되지 않았는데, 이는 해당 시기별 모집단의 수가 너무 적었기 때문으로 생각된다.

모든 지표의 결과가 완전관해군은 정상군과 골수이식군보다 높은 수치를 보였고 골수이식군은 정상군과 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 조혈모세포 개수의 차이에서 기인했을 것으로 생각되었다. 골수이식시 외부로부터 주입되는 조혈모세포의 수는 화학요법으로 완전관해에 도달한 환자의 골수 내에 존재하는 조혈모세포의 수보다 상대적으로 적을 것으로 추정된다. 한편 완전관해군과 골수이식군에 각기 여러 초기질환이 다른 비율로 존재하였고 추적검사를 시행한 시기가 다양하였으며, 더욱이 골수이식군(중앙값 365일)의 검사시기가 완전관해군(중앙값 91일)보다 더 장기간에 걸쳐 이루어졌기 때문에, 추후 통계적으로 유의한 수의 예를 축적하여 추가적인 분석이 필요할 것으로 생각되었다. 한편 그렇게 검사시기가 다양하였음에도 불구하고 완전관해도달 당일의 골수검체라 하여 모두 높은 수치를 보이는 것이 아니었고 완전관해유지기간이 32개월이나 되었던 예에서도 CD38+/CD34+ 세포가 7.26%로 높게 나타나기도 하여, 시기에 따른 일률적인 정상치를 적용하기 어려움을 알 수 있었다.

초기진단시의 백혈병 세포의 면역표현형이 CD19+/CD34+이었

거나 CD13,33+/CD34+이었던 경우들의 CD19+/CD34+ 또는 CD13,33+/CD34+ 세포의 분포는, 그렇지 않았던 예들과 비교하여 차이가 없었다. 초기진단시 백혈병 세포의 면역표현형이 CD34-이었던 예에서도 CD19+/CD34+ 세포가 4.60%를 나타내었고, 초기진단시 백혈병 세포가 CD13,33-이었던 예에서 CD13,33+/CD34+ 세포가 3.25%를 나타내었던 점은 주목할 만 하였다. 또한 CD19+/CD34+ 세포가 9.75%, CD13,33+/CD34+ 2.72%, CD38+/CD34+ 10.31%이었던 예는 1994년 6월 급성단구성백혈병(AML-M5a)으로 진단받고 화학요법 후 21일에 완전관해가 확인되었으며, 10년 7개월 후인 2005년 1월 다시 B-ALL 진단받고 화학요법 후 21일 골수검사로 완전관해가 확인된 17세 여자환자였다. 완전관해 도달 후 11개월째의 검체로 본 표지자들에 대한 검사가 시행되었으며, 검사 당시 염색체검사와 형광동소교잡법(fluorescent in-situ hybridization)에서 분자생물학적 완전관해를 확인하였고 현재까지 2년 7개월째 완전관해를 유지하며 생존하고 있어 매우 흥미로웠다. 또한 백혈병 세포의 초기 면역표현형이 CD19+/CD34+이었는데, 이는 단순히 백혈병 세포의 초기 면역표현형을 나타내는 세포수를 기준으로 하여 재발을 판정할 수 없음을 말해준다.

CD19+/CD34+ 세포가 평균과 표준편차의 합인 3%를 넘었던 13예 중에서 초기진단시 백혈병 세포가 CD19+/CD34+이었던 예는 7예이었으며 이들 중 검사시점 이후 재발한 경우가 1예 있었다. 이 경우 백혈병 세포의 초기진단시의 다른 면역표현형을 이용한 미세잔존질환 검출값을 얻어 보정하고, 정상세포에서는 발견되지 않는 CD20+/CD34+, CD13,33+/CD19+, CD15+/CD19+ 등과 같은 비정상 항원 조합(aberrant expression)[2, 19]을 이용하였다면 의미있는 결과를 얻을 수 있었으리라 생각된다.

초기진단시 하나 이상의 염색체이상성이 있었던 군에서 염색체이상성이 없었던 군에 비해 모든 지표값이 유의하게 높았던 것은, 재발과 같은 임상적 경과와 무관하였고 현재로서는 설명하기 어려우나 장기간의 추적이 필요한 부분이라 생각되었다.

본 연구에서 대상환자의 상당수에 대해 추적검사를 시행하기는 하였으나 관해유도시 사용된 항암치료약제의 차이, 공고요법, 강화요법, 유지치료 등의 관해 후 치료(post-remission therapy), 그리고 G-CSF, GM-CSF와 같은 조혈성인자의 투여, 환자의 반응과 같은 기질적 요인 등 다양한 변수들을 일반화할 만한 모집단을 이룰 수 없어 통계적 검증은 시행할 수 없었다. 장기생존율을 높이고 재발을 낮추기 위해 급성백혈병의 치료법은 환자맞춤형의 형태로 지속적으로 바뀌고 있으며 적용되는 변수적 요인에 따라 골수내 조혈모세포의 증식과 분화에 나타나는 변화 역시 지속적인 연구로 밝혀나가야 할 부분이다. 추후 3년 또는 5년 이상의 장기간의 추적검사에 의해, 완전관해 또는 골수이식 후의 골수에서 본 지표들을 나타내는 세포수의 많고 적음이 여러 변수들에 따라 생존율 또는 생존기간과 어떤 연관성이 있는지 연구해본다면 정상적인 증가의 범위를 설정하여 실제 예후판정의 지표로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

배경 : 화학요법이나 골수이식 후의 골수는 재생을 위해 정상골수보다 조혈모세포의 수가 증가한다. 유세포분석기를 이용한 면역표현형 분석에 의해 정상골수 내의 조혈모세포 분화에 따른 분포도가 연구되고 있으나, 재생중인 골수에 대해서는 연구가 부족한 실정이다. 저자들은 급성백혈병 완전관해 및 골수이식생착 후 골수에서 미분화 조혈모세포, 구속전구세포, B림프계 및 골수계 조혈모세포의 분포를 알아보려고 하였다.

방법 : 급성백혈병 완전관해 골수 81예와 골수이식생착이 확인된 26예에 대해 정상골수 22예를 대조군으로 하여 CD38-/CD34+, CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13,33+/CD34+ 세포 수를 large lymphocyte 분획에서 유세포분석기로 분석하였다. 결과에 대해 완전관해 및 골수이식군, 그리고 초기진단별군으로 세분하여 다중비교를 시행하고, 나이, 재발, 염색체이상, 임상경과, 초기진단시의 백혈병 세포의 면역표현형을 포함한 변수들에 따른 유의성을 검증하였다.

결과 : 모든 표지자에 대해 급성B림프모구성백혈병군에서 정상군보다 유의하게 높은 분포를 보였으며, 완전관해군에서 골수이식군보다 높은 분포를 보였다. 재발이 있었던 군에서 CD19+/CD34+세포의 분포가 높았으며, 염색체 이상이 있었던 군에서는 CD38+/CD34+, CD19+/CD34+, CD13,33+/CD34+ 세포의 분포가 높았다. 초기진단시의 백혈병 세포의 면역표현형과는 무관하였다.

결론 : 이상과 같은 지표들의 수치증가는 일률적인 기준치를 적용하기 어려운 정도로 범위가 넓었고, 재발 및 초기진단시의 면역표현형과 무관한 정상적인 재생과정 중의 증가임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. LeBien TW, Wormann B, Villablanca JG, Law CL, Steinberg LM, Shah VO, et al. Multiparameter flow cytometric analysis of human fetal bone marrow B cells. *Leukemia* 1990;4:354-8.
2. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb HJ, et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry to definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003;88:646-53.
3. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martínez A, González M, et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 1998;83:1069-75.
4. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in

normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995;9:1896-901.

5. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Fröschl G, Buchinger P, et al. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. *Leukemia* 1997;11:1266-73.
6. van Wering ER, van der Linden-Schreier BE, Szczepanski T, Villemse MJ, Baars EA, van Wijngaarde-Schmitz HM, et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2000;110:139-46.
7. Campana D and Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85:1416-34.
8. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351:550-4.
9. Osawa M, Hanada K, Hamada, H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-5.
10. Krause SD, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996;87:1-13.
11. Terstappen LW, Huang S, Safford D, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991;77:1218-27.
12. McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Exp Hematol* 2007;35:1429-36.
13. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005;11:6520-7.
14. Monreal MB, Pardo MI, Pavlovsky MA, Fernandez I, Corrado CS, Giere I, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38^{dim} in myelodysplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70:63-70.
15. Smedmyr B, Bengtsson M, Jakobsson A, Simonsson B, Oberg G, Totterman TH. Regeneration of CALLA (CD10+), TdT+ and double-positive cells in the bone marrow and blood after autologous bone marrow transplantation. *Eur J Haematol* 1991;46:146-51.
16. Fukushima T, Sumazaki R, Koike K, Tsuchida M, Matsui A, Nakauchi H. Multicolor flow-cytometric, morphologic, and clonogenic analysis of marrow CD10-positive cells in children with leukemia in remission or nonmalignant diseases. *J Pediatr Hematol Oncol*

- 1998;20:222-8.
17. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 1989;169:1721-31.
18. Frixos Paraskevas'. Clusters of Differentiation. In: Greer JP, Foerster J, et al. ed. *Wintrobe's clinical hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott 2004:27-98.
19. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 2004;45:277-85.