

## 한국인 재생불량빈혈에서 T 세포 수용체 $\beta$ 쇄 가변부위 분석을 이용한 T 세포 클론의 탐색

최현정<sup>1</sup> · 신명근<sup>1</sup> · 김혜란<sup>3,4</sup> · 김형준<sup>4</sup> · 국 훈<sup>2</sup> · 기승정<sup>1</sup> · 김수현<sup>1</sup> · 신종희<sup>1</sup> · 서순팔<sup>1</sup> · 양동욱<sup>1</sup>

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup> · 소아청소년과학교실<sup>2</sup>, 두뇌한국21사업 전남대학교 의생명인력사업단<sup>3</sup>, 화순전남대학교병원 조혈계질환 유전체 연구센터<sup>4</sup>

### Detection of Putative T cell Clones Using T cell Receptor $\beta$ Chain Gene Clonality Assay in Korean Patients with Aplastic Anemia

Hyun-Jung Choi, M.D.<sup>1</sup>, Myung-Geun Shin, M.D.<sup>1</sup>, Hye-Ran Kim, Ph.D.<sup>3,4</sup>, Hyeoung-Joon Kim, M.D.<sup>4</sup>, Hoon Kook, M.D.<sup>2</sup>, Seung-Jung Kee, M.D.<sup>1</sup>, Soo-Hyun Kim, M.D.<sup>1</sup>, Jong-Hee Shin, M.D.<sup>1</sup>, Soon-Pal Suh, M.D.<sup>1</sup>, and Dong-Wook Ryang, M.D.<sup>1</sup>

Departments of Laboratory Medicine<sup>1</sup> and Pediatrics<sup>2</sup>, Chonnam National University Medical School, Chonnam National University Hwasun Hospital; Brain Korea 21 Project<sup>3</sup>, Center for Biomedical Human Resources at Chonnam National University; Genome Research Center for Hematopoietic Disease<sup>4</sup>, Chonnam National University Medical School, Chonnam National University Hwasun Hospital, Hwasun, Korea

**Background :** We analyzed T cell receptor  $\beta$  chain (TCRB) gene to investigate the presence of putative T cell clones and its clinicopathologic implications in Korean patients with aplastic anemia (AA).

**Methods :** Twenty-nine bone marrow specimens were collected from 20 AA patients, 19 specimens from initial diagnosis and 10 from follow-up. T cell clonality assay was performed using IdentiClone™ TCRB Gene Clonality Assay kit (InVivoScirbe Technology, USA) and automatic genetic analyzer. Patients' clinical information and laboratory parameters were also analyzed.

**Results :** Five patients had definitive underlying factors related with aplastic anemia, such as hepatitis B virus (4 cases) and benzene exposure (1 case). Putative T cell clones were detected in bone marrow specimens of 11 (58%) out of 19 patients at diagnosis. The location of putative T cell clones of TCRB gene (diversity region, D $\beta$ ; joining region, J $\beta$ ; variable region, V $\beta$ ) was distributed in D $\beta$ 2+J $\beta$ 2 (6 cases), D $\beta$ 1+J $\beta$ 1 (3 cases), V $\beta$ +J $\beta$ 1 (2 cases), and D $\beta$ 1+J $\beta$ 2 (2 cases). Interestingly, among seven patients who underwent stem cell transplantation, five patients with no T cell clones detected at diagnosis developed new T cell clones during the follow-up.

**Conclusions :** Putative pathogenetic T cell clones were detected in most of AA patients in the current study. T cell clonality assay would be useful for investigating the pathophysiology of acquired AA. (Korean J Lab Med 2009;29:269-76)

**Key Words :** Aplastic anemia, T cell receptor  $\beta$  chain gene, T cell clone

Received : January 16, 2009  
Revision received : July 19, 2009  
Accepted : July 20, 2009

Manuscript No : KJLM2217

#### 서 론

Corresponding author : Myung-Geun Shin, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 160 Ilsim-ri, Hwasun-eup, Hwasun 519-809, Korea  
Tel : +82-61-379-7950, Fax : +82-61-379-7984  
E-mail : mgshin@chonnam.ac.kr

\*본 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. M10531020001-08N3102-00110).

재생불량빈혈은 골수 세포충실도의 감소 및 범혈구감소증을 특징으로 하는 골수부전 질환이다. 발생 빈도는 아시아인에서 백만 명당 3.9-7.4명으로 서구인에 비해 2-3배 더 높다[1, 2]. 재생불량빈혈의 병인으로 판코니 빈혈이나 선천성 이상각화증 등 선천적 질환이 있고, 후천적 요인으로는 방사선, 약제(chlo-

ramphenicol 등), 벤젠, 바이러스, 임신 및 자가면역질환 등이 알려져 있으나, 원인이 밝혀지지 않는 경우가 대부분이다[1, 3, 4]. 따라서 후천적으로 발생하는 재생불량빈혈의 병인을 밝혀 효율적인 치료방침 수립 및 치료제 개발이 활발히 연구되고 있다.

재생불량빈혈 치료의 중요한 방침 중 하나는 면역억제제의 사용이다[5]. 이를 통해 유추할 수 있듯이 재생불량빈혈의 병인은 골수의 전구세포 및 조혈모세포를 타깃으로 한 특정 T 세포의 면역반응에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 면역학적 기전은 자가면역반응 또는 이형성된 골수 세포에 의해 감작된 면역 감시 체계의 반응으로 인해 특정 T 세포 클론이 과다 증식하는 T 세포 매개 자가면역 질환으로 인식되고 있다[1, 6-13]. 그러나 이러한 비정상 면역반응을 유발하는 원인은 정확히 밝혀져 있지 않았으나, 환경유전학적 요인 등 다양한 잠재 요소가 관여하는 것으로 알려져 있다[1-3, 8].

T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)는  $\alpha$ 쇄와  $\beta$ 쇄로 구성된 이종이합체이고, 소수의 T 세포와 미성숙 T 세포에서는  $\gamma$ 쇄와  $\delta$ 쇄로 이루어진다. TCR 유전자는 7번 염색체( $\beta$ 쇄 및  $\gamma$ 쇄)와 14번 염색체( $\alpha$ 쇄 및  $\delta$ 쇄)에 위치해 있다[14]. TCR은 불변부위와 가변부위로 이루어져 있고, 가변부위는 높은 유전적 다형성을 보이는데, 이는 TCR 쇄를 구성하는 variable (V), diversity (D) 및 joining (J) 유전자 단편의 무작위적인 체세포 재조합과 V-D-J 연결부위에 뉴클레오티드가 제거 또는 첨가됨으로써 형성된다[14, 15]. 특히  $\beta$ 쇄 유전자 재조합이 일어나는 V-D-J 연결부위는 가장 다형성이 높은 부위로서 특정 T 세포 클론의 특이 표지자로 사용된다[14-16].  $\beta$ 쇄 유전자 재조합은 다음 두 단계 과정으로 이루어진다. 첫 번째는 D 유전자(D $\beta$ 1, D $\beta$ 2) 중 한 개의 단편과 J 유전자(J $\beta$ 1.1-J $\beta$ 1.6, J $\beta$ 2.1-J $\beta$ 2.7) 중 한 개의 단편간의 재조합이고, 두 번째는 V 유전자(V $\beta$ 1-V $\beta$ 24) 중 한 개의 단편과 D-J 유전자 단편간의 재조합이다.

최근 진단분자유전학적 검사 기법의 발달로 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위의 분석이 용이하게 되면서 특정 면역 세포의 클론을 확인할 수 있게 되었다. 구미에서는 이러한 분자유전학적 검사 기법을 이용하여 재생불량빈혈, 이식편대숙주질환, 대형과립립프구성 백혈병 및 발작야간혈색소증(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 등의 질환에서 특정 T 세포 클론을 검사하고, 이의 진단검사 및 임상적 유용성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[8-13]. 그러나 실제 임상 검사실 수준에서 이의 적용은 미미한 실정이고, 더욱이 한국인 재생불량빈혈 환자에서 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 유전자를 표적으로 한 분자유전학적 검사 기법을 이용한 특정 T 세포 클론의 검출 및 이의 진단검사적 의의에 대한 연구는 찾아보기 힘든 실정이다. 따라서 본 연구자

는 한국인 재생불량빈혈 환자의 진단 및 조혈모세포 이식 후 골수 검체를 대상으로 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 유전자를 증폭 후 이를 자동염기서열분석기로 분석하여 특정 T 세포 클론을 탐색하고, 이의 검사의학적 의의를 검토하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2004년 7월부터 2008년 4월까지 화순전남대학교병원에서 재생불량빈혈로 진단된 환자 20명의 골수 검체 29예(초진 검체 19예, 추적 검체 10예)를 대상으로 하였다. 20명의 환자 중 7명에서 골수 및 말초혈액 조혈모세포 이식(골수이식 5명, 말초혈액 조혈모세포이식 2명)을 시행하였고, 5명에서 면역억제요법을 받았다. 이식 후 생착 여부는 추적 골수검사와 생착능 정량평가 검사 및 말초혈액에서 전혈구계산(Sysmex XE-2100, TOA Medical Electronics, Kobe, Japan)을 시행하여 평가하였다. 추적 골수검사 시기는 이식 후 평균 22일째 시행하였고, 두 명의 환자에서는 이식 후 90일과 117일째 추가로 시행하였다. 재생불량빈혈의 진단 기준은 재생불량빈혈의 중증도는 중증과 초중증으로 구분하였고, 중증 재생불량빈혈의 정의는 말초혈액 전혈구계산 검사에서 호중구  $500 \times 10^3/\mu\text{L}$  이하, 혈소판  $20 \times 10^3/\mu\text{L}$  이하, 교정망상적혈구수 1% 이하의 세 항목 중 2개 이상이면서 골수검사에서 세포충실도가 25% 이하인 경우로 하였고, 위의 조건에 호중구가  $200 \times 10^3/\mu\text{L}$  이하인 경우를 초중증 재생불량빈혈로 분류하였다[17]. 환자의 임상적 특성은 의무기록을 통해 후향적으로 조사하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검체 준비

질소 탱크에 냉동 보존된 골수 검체를 37°C 수욕조에 녹인 후 1 mL를 채취하고, 인산염완충식염수 5 mL와 혼합하여 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 후 침전된 세포군에 인산염완충식염수 5 mL를 다시 첨가하여 1,200 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 침전된 세포군에서 200  $\mu\text{L}$ 를 준비하였다.

#### 2) DNA 추출

전술한 준비된 검체 200  $\mu\text{L}$ 로부터 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 다음과 같이 제

조사의 지침에 따라 DNA를 추출하였다. Proteinase K 20  $\mu$ L를 1.5 mL 미세원심분리 튜브에 피펫팅 후 준비된 검체 200  $\mu$ L를 첨가한 다음 완충액 AL을 200  $\mu$ L 첨가하여 15초간 보텍스 혼합 후 56°C에서 10분간 배양하였다. 배양 후 96-100% 에탄올 200  $\mu$ L를 첨가 후 15초간 보텍스 혼합하였다. 위의 혼합액을 QIAamp Mini spin column에 옮겨서 8,000 rpm으로 1분간 원심분리 한 다음, 완충액 1을 500  $\mu$ L 첨가하고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 하고 다시 완충액 2를 500  $\mu$ L 첨가하여 14,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 한 번 더 14,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후 용출 완충액 200  $\mu$ L를 첨가하고, 3분 후 8,000 rpm으로 1분간 원심분리 하여 총 DNA를 획득하였다.

### 3) 조혈모세포 생착능 정량 평가 검사

추출한 DNA를 40 ng/ $\mu$ L로 농도를 맞춘 후 7개의 유전자위(D12S391, D18S51, Amelogenin, F13A1, HumFABP, RENA, D18S80)를 표적으로 하는 시발체를 사용해 각각의 조건에 맞게 PCR을 시행하였고, 그 산물을 자동염기서열분석기(ABI 3130XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 유전자 스캔 기능을 이용하여 공여자와 수여자의 유전자 지문을 비교하였다.

### 4) TCR $\beta$ 쇄 가변부위 분석

TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 분석은 IdentiClone™ TCRB Gene Clonality Assay 키트(InVivoScribe Technology, San Diego, CA, USA)와 자동염기서열분석기를 이용하였다.

IdentiClone™ TCRB Gene Clonality Assay kit는 T 세포 증식이 의심되는 질환에서 클론성 증식을 평가할 수 있는 새로운 방법으로 반응액(튜브 A, B 및 C), specimen control size ladder, 양성과 음성 대조물질로 구성되어 있다. 반응액내에는

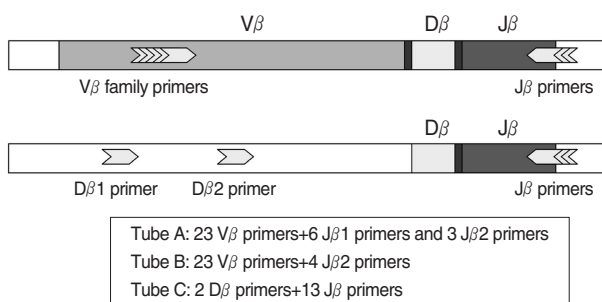


Fig. 1. Schematic diagram of strategy for T cell clonality assay. A representative rearranged T cell receptor beta gene on chromosome 7 (7q35) shows the approximate placement of the upstream and downstream DNA primers. The numbers of primers and their specificity are listed for master mix tubes A, B and C.

기능적 V $\beta$  유전자를 타겟으로 하는 시발체가 반응액별로 나누어 포함되어 있는데, 튜브 A (23개의 V $\beta$  시발체, 6개의 J $\beta$ 1 시발체, 3개의 J $\beta$ 2 시발체)와 B (23개의 V $\beta$  시발체, 4개의 J $\beta$ 2 시발체)는 V 유전자와 J 유전자를 타겟으로 하는 시발체가 들어 있고, 튜브 C (2개의 D $\beta$  시발체, 13개의 J $\beta$  시발체)는 D 유전자와 J 유전자를 타겟으로 하는 시발체가 들어 있다(Fig. 1). 그 외 DNA 검체의 질과 양을 평가할 수 있는 specimen control size ladder가 있다. 한편 J $\beta$ 1과 J $\beta$ 2는 형광 표지를 다르게 하여 자동염기서열 분석시 구분이 되도록 하였다. 추출한 DNA 검체를 반응액과 함께 PCR을 이용해 증폭시킨 후 자동염기서열분석기를 통해 분석하였다. 정상 또는 다클론성 T 세포군에서는 종모양의 곡선을 보이는 반면, 단클론성 또는 올리고클론성 최고점을 보이는 것이 특징이다. 결과는 제조사의 지침에 따라 각 튜브별로 정해진 범위 내에 한 개 또는 두 개의 양성 최고점(첫 번째 높은 최고점  $\geq$  세 번째 높은 최고점의 3배)이 있는 경우 양성으로, 그렇지 않은 경우 음성으로 판정하였다. 방법에 대해 간단히 설명하면 다음과 같다.

반응액 45  $\mu$ L와 AmpliTag Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 첨가(튜브 A 및 B: 0.45  $\mu$ L, 튜브 C 및 specimen control size ladder: 0.25  $\mu$ L) 후 보텍스 혼합하였다. 위의 혼합액에 검체, 양성 대조물질과 음성 대조물질 5  $\mu$ L씩 각각 혼합하여 조건에 맞게 PCR을 시행하여 증폭하였다. 96-well PCR plate에 10  $\mu$ L의 ROX로 표지된 Hi-Di Formamide를 각각 분주하고, 위의 PCR 산물 1  $\mu$ L를 각 well에 분주한 다음 95°C에서 2분간 가온 후 5분간 얼음에 놓아두었다. 결과물을 자동염기서열분석기로 분석하였다.

## 결 과

### 1. 임상 검사적 특성

환자 분포는 남자 8명, 여자 12명, 평균 나이는 37.4세(18-73세)였으며 B형 간염바이러스 보균자는 4명, 벤젠 노출력은 1명이었다. 유세포 분석을 이용한 PNH 검사상 모두 음성 소견을 보였다. 진단시 전혈구계산 결과 평균 백혈구는  $2,150 \times 10^3/\mu$ L (400-4,700), 혈색소는 7.7 g/dL (4.4-15.1), 혈소판은  $26.5 \times 10^3/\mu$ L (2-73)이었고, 중증 재생불량빈혈 환자는 8명, 중증증 재생불량빈혈 환자는 6명이었다(Table 1).

재생불량빈혈로 진단된 환자 20명 중 7명에서 골수 및 말초혈액 조혈모세포 이식을 받았고, 5명에서는 면역억제요법을 받았

Table 1. Patient characteristics and laboratory data

Patient No.	Age	Sex	Underlying factor	BM cellularity (%)	WBC (ANC) ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Hemoglobin (g/dL)	Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Corrected reticulocyte count (%)	Severity	Treatment
1*	35	M	HBV, benzene	5	1,900 (600)	7.4	10	1.5		IST
2	38	M	-	10	940 (400)	4.4	28	0.1	Severe	IST
3	36	M	-	10	2,440 (100)	10.0	2	0.4	Very severe	BMT
4	21	M	HBV	10	400 (70)	7.8	36	0.1	Very severe	PBSCT
5	25	F	-	10	600 (80)	7.0	52	0.1	Very severe	IST
6	33	M	HBV	10	1,700 (360)	7.3	24	0.4	Severe	
7	50	F	-	10	2,000 (70)	8.7	7	0.4	Very severe	BMT
8	69	M	-	10	1,700 (160)	6.0	33	0.1	Very severe	
9	28	F	-	10	2,400 (620)	6.3	10	0.4	Severe	BMT
10	27	F	-	10	2,000 (390)	5.7	9	0.1	Severe	BMT
11	73	F	-	10	3,100 (500)	5.5	5	0.2	Severe	IST
12	26	F	-	10	4,700 (1780)	8.4	14	0.9	Severe	
13	36	F	-	10	800 (550)	6.9	9	0.2	Severe	BMT
14	57	F	-	15	3,700 (1510)	11.3	67	0.8		
15	23	F	-	15	1400 (20)	5.7	4	0.1	Very severe	PBSCT
16	25	M	-	20	900 (290)	5.0	11	0.3	Severe	IST
17	69	F	HBV	10	3,800 (1700)	10.0	73	0.9		
18	33	F	-	10	3,200 (1120)	9.9	27	0.8		
19	26	M	-	5	2,600 (1200)	15.1	86	0.8		
20	18	F	-	10	2,740 (750)	5.7	23	0.8		

\*follow up state of known aplastic anemia with IST 12 yrs ago.

Abbreviations: -, not detected; HBV, hepatitis B virus; a, degree of severity of aplastic anemia ('severe' was defined as two of following criteria: neutrophils  $\leq 500 \times 10^3/\mu\text{L}$ , platelet  $\leq 20 \times 10^3/\mu\text{L}$ , corrected reticulocyte count  $\leq 1\%$  and 'very severe' defined as the criteria of 'severe' plus neutrophils  $\leq 200 \times 10^3/\mu\text{L}$ ); IST, immunosuppressive therapy; BMT, bone marrow transplantation; PBSCT, peripheral blood stem cell transplantation.

다. 골수 및 말초혈액 조혈모세포 이식을 받은 7명의 환자들은 이식 후 첫 번째 추적 골수검사에서 세포충실도가 초진시보다 증가하였는데 진단 당시 골수의 세포충실도는 약 11.5%이었고, 이식 후에는 약 44%이었다.

생착능 정량 평가 검사상 7명 모두 이식 후 첫 번째 골수 검체 (이식 후 21일째 골수 검체: 6예, 이식 후 28일째 골수 검체: 1예) 에서 100% 공여자 세포로 대체되었다. 이 중 1예에서는 두 번째 추적 골수 검체(이식 후 90일째 골수 검체)에서 93%로 감소되었는데, 세포충실도 역시 첫 번째 추적 검사보다 두 번째 검사에서 약간 감소되었다.

면역억제요법을 받았던 환자 5명 중 1명은 현재 추적관찰 중 이나 전혈구계산 검사상 범혈구감소 소견은 여전히 관찰되지만 백혈구 백분율에서는 림프구 분획이 감소하는 경향을 보였다. 한편 4명 중 1명은 추적 관찰중 사망하였고, 3명은 추적관찰에 실패하였다.

## 2. T 세포 클론 검출

TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 분석 결과 진단 당시 T 세포 클론을 검출할 수 있었던 경우는 11명(58%)이었고, 추적 검사에서 5예가 검

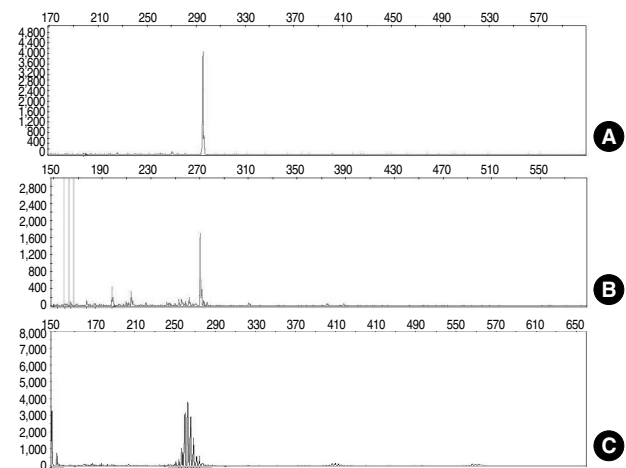


Fig. 2. Capillary electrophoretogram of amplified T-cell receptor beta chain (TCRB) gene. Positive peaks (presence of clonal cell population) are observed in IVS-0004 positive control DNA at 295 base pairs (bp) (A), and patient No. 13 at 21 days after bone marrow transplantation in TCRB variable and joining region (B). Typical polyclonal peaks are observed in Patient No. 20 at 240-285 bp (C). The definition of positive peaks was at least three times the amplitude of the third largest peak in the polyclonal background within the valid size range.

출되었다(Table 2, Fig. 2). 또한 중증과 초중증 재생불량빈혈 환자 14명 중 7명(50%)에서 T 세포 클론이 확인되었다.

**Table 2.** T cell clonality detected in bone marrow specimens of aplastic anemia patients

Patient No.	Tube A		Tube B	Tube C				Interpretation
	VB+JB1	VB+JB2a	VB+JB2b	DB1+JB1	DB2+JB1	DB1+JB2	DB2+JB2	
1	-	-	-	-	-	-	-	N
2	-	-	-	-	-	-	-	N
3	-	-	-	-	-	-	-	N
4	+	-	-	+	-	-	-	P
5	-	-	-	-	-	-	+	P
6	-	-	-	-	-	-	+	P
7	-	-	-	-	-	-	-	N
8	-	-	-	-	-	+	+	P
9	-	-	-	-	-	-	-	N
10	-	-	-	-	-	-	-	N
11	-	-	-	-	-	-	+	P
12	-	-	+	-	-	-	-	P
13	-	-	-	-	-	-	-	N
14	-	-	-	+	-	-	+	P
15	-	-	-	-	-	-	-	N
16	-	-	-	+	-	-	+	P
17	-	-	-	-	-	-	-	N
18	+	-	-	-	-	-	-	P
19	-	-	-	-	-	+	-	P
20	-	+	-	-	-	-	-	P
Total	2	1	1	3	0	2	6	11

Abbreviations: VB, T cell receptor beta chain (TCRB) variable region; JB, TCRB joining region; DB, TCRB diversity region; -, not detected; +, detected in T cell clonality; N, negative for T cell clonality; P, positive for T cell clonality.

**Table 3.** Changes of T cell clonality in bone marrow specimens after stem cell transplantation

Patient No.	Days after SCT	Tube A		Tube B	Tube C				Interpretation
		VB+JB1	VB+JB2a	VB+JB2b	DB1+JB1	DB2+JB1	DB1+JB2	DB2+JB2	
3	Initial Dx	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+28	-	-	-	-	-	+	-	P
4	Initial Dx	+	-	-	+	-	-	-	P
	D+28	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+117	-	-	-	-	-	-	-	N
7	Initial Dx	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+21	-	-	-	-	-	-	-	N
9	Initial Dx	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+21	-	-	-	-	-	+	+	P
	D+90	-	-	-	-	-	+	+	P
10	Initial Dx	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+21	+	-	-	-	-	-	-	P
13	Initial Dx	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+21	+	-	-	-	-	-	-	P
15	Initial Dx	-	-	-	-	-	-	-	N
	D+22	-	+	-	-	-	-	-	P

Abbreviations: SCT, stem cell transplantation; Dx, diagnosis; D, day after SCT.

초진 환자에서 병적 T 세포 클론의 위치는  $DB2+JB2$ 가 6예로 가장 많았고, 그 다음으로  $DB1+JB1$  3예,  $DB1+JB2$ 와  $V\beta+JB1$ 이 각각 2예 순이었다. 추적 검사에서 발견된 5명의 환자는  $DB1+JB2$ 와  $V\beta+JB1$ 이 각각 2예,  $DB2+JB2$ 와  $V\beta+JB2b$ 가 각각 1예로 확인되었다(Table 2, 3).

### 3. T 세포 클론의 임상검사적 의의

골수 및 말초혈액 조혈모세포 이식 후 추적관찰 및 검사가 가능했던 환자 7명(환자 3, 4, 7, 9, 10, 13, 15) 중 초진 시 T 세포 클론이 관찰되었던 환자 4는 임상경과 호전에 따라 소실되었고,

환자 3, 9, 10, 13, 15에서는 초진 시 T 세포 클론이 검출되지 않았으나 추적 검사에서는 검출되었다. 추적 검사에서 T 세포 클론이 검출되었던 5명 중 환자 9, 10, 13에서는 최근 말초혈액 전혈구계산 검사에서 혈구감소증이 관찰되었다(경한 빈혈 1명, 경한 백혈구감소증 1명, 경한 두 종류 혈구감소증 1명) (Table 3).

한편 면역억제요법을 받았던 환자 5명 중에서 환자 2, 5, 11, 16은 초진 검체에 대해, 환자 1은 치료 후 검체에 대해 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 분석을 시행하였다. 초진 검체로 시행하였던 환자 중 환자 5, 11, 16에서 T 세포 클론이 확인되었으나 면역억제요법 후 현재까지 추적 관찰에는 실패하였다. 마지막으로 시행한 전혈구계산 결과를 초진 시와 비교했을 때 림프구수가 약간 감소되었으나 여전히 범혈구감소증을 보였다. 또한 치료 후 검체로 시행한 환자 1에서는 T 세포 클론이 관찰되지 않았다.

## 고 찰

대부분 재생불량빈혈에서 비정상 면역학적 반응을 유발하는 원인은 정확히 알려져 있지 않으나, 환자의 환경유전적 소인이 연관되는 것으로 알려져 있다[1-3, 8]. 대표적인 것으로 HLA-DR2는 재생불량빈혈 환자에서 과발현되며, 이는 항원을 인식하는데 관여하고 면역억제제인 cyclosporine에 대해 좋은 반응을 예측할 수 있는 인자이다[18, 19]. 이 외에도 중앙괴사인자, 감마인터페론, 인터루킨-6 등의 사이토카인 유전자의 다형성도 면역학적 기전을 유발하는데 관여하는 것으로 알려져 있다[20-22]. 또한 후천성 재생불량빈혈 환자의 소수와 선천성 이상각화증에서 짧은 종말체를 갖는 경우가 보고되었다[4, 23]. 이것은 텔로메라아제 복합체의 돌연변이로 인해 텔로메라아제 활성이 감소되어 점차 종말체가 짧아지게 되고 결국 조혈모세포 증식능의 결핍을 초래하게 되는데, 이러한 환자에서는 선천성 골수부전 질환과 병태생리의 일부를 공유하는 것으로 생각 되어진다[23]. 한편 비정상적 면역반응의 핵심은 클론성으로 증식된 특정 T 세포에 의해 조혈모세포가 파괴되는 것으로 알려져 있다. 세포독성 T 세포로 분화에 있어 중요한 역할을 하는 전사인자인 T-bet은 감마인터페론의 촉진자 부위에 결합하여 T 세포의 증식을 유발한다[10, 24]. 이들의 말초혈액에서는 자가반응성 T 세포를 조절하고 억제하는 역할을 하는 조절 T 세포가 감소되어 있음이 보고되었다[25].

본 연구에서는 재생불량빈혈로 진단받은 환자 20명을 대상으로 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 분석을 시행하였고, 임상검사적 특성과 비교하였다. 구미에서 선행된 보고에 의하면 초진 재생불량빈혈 환자(N=15)에서 특정 T 세포 클론이 검출된 경우는 73%로[7],

본 연구 결과보다 약간 높은 검출률을 보였다. 또한 다회 수혈을 받은 경우 및 극소수의 정상인에서 T 세포의 클론을 보임이 보고되고 있으나 그 빈도는 낮은 것으로 알려져 있어, 특정 T세포 클론의 유무판정은 면역학적 관점에서 재생불량빈혈의 새로운 병태생리를 규명하는데 의미 있음이 보고되었다[7]. 골수 및 말초혈액 조혈모세포 이식 후 추적관찰 및 검사가 가능했던 환자 7명 중 환자 4에서는 진단 시 T 세포 클론이 검출되었으나 임상경과 호전에 따라 소실되었고, 환자 3, 9, 10, 13, 15에서는 진단 시 T 세포 클론이 검출되지 않았으나 추적 검사에서 검출되었다(Table 3). 추적 검사에서 T 세포 클론이 검출된 5명 중 환자 9, 10, 13에서는 추적 전혈구계산 검사 결과 혈구감소증이 관찰되었다. 특히 환자 9는 말초혈액 조혈모세포 이식 후 21일째 추적 검사에서 T 세포 클론이 검출되었고, 당시 골수 세포충실도의 증가와 생착능 정량 평가 검사상 100% 대치된 결과를 보였으나 90일째 추적 검사에서는 골수 세포충실도와 생착능 정량 평가 검사 결과가 감소되었고, 최근 전혈구검사 검사결과에서는 두 종류의 혈구감소증을 보이고 있어, 이 환자에서 T 세포 클론의 증식과 질병의 재발 및 지속과의 연관성을 추정해 볼 수 있었다. 또한 이식 후 면역체계가 완전히 복원되기 위해서는 6-12개월 정도의 시간이 걸리므로 이러한 환자에서는 다음의 경우도 고려해야 할 것으로 생각되었다. 첫째로 이식 후 조혈모 세포계의 복원 과정에서 완전한 T 세포 체계가 형성되기 이전의 단계로 모든 T 세포 레퍼토리가 형성되지 않아 비대칭 분포를 보일 수 있겠고[26], 두 번째로는 이식 후 T 세포에 의해 발생하는 GVHD가 있는 경우에도 증식한 특정 T 세포 클론에 의해 이러한 분포를 보일 수 있을 것으로 사료되었다[27]. 초진 시 관찰되지 않았던 T 세포 클론이 이식 후 추적 검사에서 발견되었으나 현재까지는 혈구감소증이 없는 환자 3과 15에 대해서는 추적 관찰이 더 필요할 것으로 생각되었다.

한편 면역억제요법을 받았던 환자 중 환자 5, 11, 16에서 초진 시에 T 세포 클론이 확인되었고, 치료 후 검체로 시행했던 환자 1은 간염바이러스 보균자이면서 벤젠 노출력이 있었던 사람으로 T 세포 클론은 관찰되지 않았으나 치료 효과로 인한 것인지 존재하지 않았던 것인지 확인할 수 없었다.

본 연구에서 이용한 IdentiClone™ TCRB Gene Clonality Assay는 European BIOMED-2 공동연구자들에 의해 제안된 표준화 방법을 근간으로 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위 전체 유전자를 타깃으로 하여 특정 T 세포 클론을 탐색할 수 있는 검사법이다[15, 16].

그러나 각각의 TCR  $\beta$ 쇄 가변부위를 spectratyping 할 수 없으므로 각각의 가변부위를 파악하기에는 한계가 있었다. 또한 자동염기서열분석기를 통한 분석에 있어 반응성 클론성 증식의

경우나 클론성 증식이 약한 경우 다클론성 배경으로 인해 해석에 어려움을 줄 수 있어 다른 진단 검사의 결과와 환자의 임상적 정보를 종합해서 해석해야 할 것이다[15]. 지금까지 서구에서 발표된 연구 결과를 보면 TCRB가 재생불량빈혈에서 T 세포 클론을 확인하는데 가장 유용성이 있어, 본 연구에서도 TCRB를 타깃으로 하였으나 재생불량빈혈에서 비정상 T 세포 클론을 포괄적으로 분석하기 위해서는 TCRG와 TCRD도 함께 시행할 필요가 있다고 생각되었다[6, 7, 10, 13].

본 연구는 국내에서 처음으로 한국인 재생불량빈혈 환자를 대상으로 검사실 수준에서 T 세포 클론의 존재를 확인하였고, 이의 임상검사적 의의를 제시하였다. 따라서 본 연구와 같이 실제 검사실 수준에서 재생불량빈혈 환자를 대상으로 시행한 T 세포 클론 탐색 검사는 재생불량빈혈의 병인 규명에 유용할 것으로 판단되었다.

## 요 약

**배경 :** 본 연구에서는 한국인 재생불량빈혈 환자의 골수 검체에서 T 세포 수용체  $\beta$ 쇄(T cell receptor  $\beta$  chain, TCRB) 가변부위 분석을 시행하여 T 세포 클론을 검출하고, 이의 검사학적 의의를 검토하였다.

**대상 및 방법 :** 재생불량빈혈로 확진된 환자 20명의 골수 검체 29예(초진 검체 19예, 추적 검체 10예)를 대상으로 하였다. TCRB 가변부위 분석은 IdentiClone™ TCRB Gene Clonality Assay kit (InVivoScirbe Technology, USA)와 자동염기서열분석기를 이용하였다. 이와 함께 대상 환자의 임상검사적 특성을 조사하였다.

**결과 :** 대상 환자에서 재생불량빈혈과 관련된 기저요인을 알 수 있었던 경우는 총 5예로 B형 간염바이러스 보균 및 벤젠 노출력이 각각 4예 및 1예이었다. TCRB 가변부위 분석 결과 진단 당시 T 세포 클론을 확인할 수 있었던 경우는 11예(58%)이었고, 추적 검사에서 5예가 추가로 발견되었다. T 세포 클론의 위치(TCRB diversity region, D $\beta$ ; joining region, J $\beta$ ; variable region, V $\beta$ )는 D $\beta$ 2+J $\beta$ 2가 6예로 가장 많았고, 그 다음으로 D $\beta$ 1+J $\beta$ 1이 3예, D $\beta$ 1+J $\beta$ 2와 V $\beta$ +J $\beta$ 1이 각각 2예 순이었다. 골수 및 조혈모세포 이식을 받은 환자 7명 중에서 초진 시 T 세포 클론이 관찰되었던 1명에서는 임상경과 호전에 따라 소실되었고, 5명에서는 초진 시 T 세포 클론이 검출되지 않았으나 추적 검사에서 검출되었다.

**결론 :** TCRB 가변부위 분석을 이용하여 재생불량빈혈 환자의 대부분에서 T 세포 클론을 검출할 수 있었다. T 세포 클론 탐색

검사는 재생불량빈혈의 병인 규명에 유용할 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

1. Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol* 2008;15:162-8.
2. Young NS and Kaufman DW. The epidemiology of acquired aplastic anemia. *Haematologica* 2008;93:489-92.
3. Dufour C and Svahn J. Fanconi anaemia: new strategies. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(S2):S90-5.
4. Walne AJ and Dokal I. Telomerase dysfunction and dyskeratosis congenita. *Cytotechnology* 2004;45:13-22.
5. Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood* 1995;85:3058-65.
6. Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, Yachie A, Takami, Kondo Y, et al. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 1999;93:3008-16.
7. Kook H, Risitano AM, Zeng W, Wlodarski M, Lottemann C, Nakamura R, et al. Changes in T-cell receptor VB repertoire in aplastic anemia: effects of different immunosuppressive regimens. *Blood* 2002;99:3668-75.
8. Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000;37:3-14.
9. Wlodarski MW, Gondek LP, Nearman ZP, Plasilova M, Kalaycio M, Hsi ED, et al. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;108:2632-41.
10. Risitano AM, Maciejewski JP, Green S, Plasilova M, Zeng W, Young NS. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing. *Lancet* 2004;364:355-64.
11. Plasilova M, Risitano A, Maciejewski JP. Application of the molecular analysis of the T-Cell receptor repertoire in the study of immune-mediated hematologic diseases. *Hematology* 2003;8:173-81.
12. Maciejewski JP, O'Keefe C, Gondek L, Tiu R. Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clones. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:5-14.



13. Risitano AM, Kook H, Zeng W, Chen G, Young NS, Maciejewski JP. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V beta CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood* 2002;100:178-83.
14. Abbaas AK, Lichtman AH, et al. eds. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2007:160-9.
15. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-317.
16. Sandberg Y, van Gastel-Mol EJ, Verhaaf B, Lam KH, van Dongen JJ, Langerak AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern blot analysis in routine clonality diagnostics. *J Mol Diagn* 2005;7:495-503.
17. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, et al. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. *Blood* 1976;48:63-70.
18. Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, et al. Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 1994;84:4257-61.
19. Maciejewski JP, Follmann D, Nakamura R, Sauntharajah Y, Rivera CE, Simonis T, et al. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood* 2001;98:3513-9.
20. Demeter J, Messer G, Schrezenmeier H. Clinical relevance of the TNF-alpha promoter/enhancer polymorphism in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2002;81:566-9.
21. Dufour C, Capasso M, Svahn J, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, et al. Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol* 2004;126:682-5.
22. Gidvani V, Ramkissoon S, Sloand EM, Young NS. Cytokine gene polymorphisms in acquired bone marrow failure. *Am J Hematol* 2007;82:721-4.
23. Calado RT and Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood* 2008;111:4446-55.
24. Solomou EE, Keyvanfar K, Young NS. T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107:3983-91.
25. Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, Malide D, Keyvanfar K, Visconte V, et al. Deficient CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells in acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;110:1603-6.
26. Witherspoon RP, Deeg HJ, Lum LG, Ochs HD, Hansen JA, Thomas ED, et al. Immunologic recovery in human marrow graft recipients given cyclosporine or methotrexate for the prevention of graft-versus-host disease. *Transplantation* 1984;37:456-61.
27. Liu X, Chesnokova V, Forman SJ, Diamond DJ. Molecular analysis of T-cell receptor repertoire in bone marrow transplant recipients: evidence for oligoclonal T-cell expansion in graft-versus-host disease lesions. *Blood* 1996;87:3032-44.