

2013년 8월

박사학위논문

혈액암 환자의 항암제 내성
유전자 mRNA 발현양상과
임상상에 관한 연구

조선대학교 대학원

의 학 과

유 미 라

혈액암 환자의 항암제 내성
유전자 mRNA 발현양상과
임상상에 관한 연구

Relationship between mRNA expression of
drug resistance genes and clinical aspects in
human hematologic malignancy patients

2013년 8월 23일

조선대학교 대학원

의 학 과

유 미 라

혈액암 환자의 항암제 내성
유전자 mRNA 발현양상과
임상상에 관한 연구

지도교수 정춘해

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2013년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

유미라

유미라의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	박치영 (인)
위 원	조선대학교 교수	정춘해 (인)
위 원	조선대학교 교수	최철희 (인)
위 원	의학 박사	박유환 (인)
위 원	조선대학교 교수	박상곤 (인)

2013년 6월

조선대학교 대학원

ABSTRACT	1
I. 서론	1
II. 대상 및 방법	4
III. 결과	6
IV. 고찰	8
V. 요약	13
참고문헌	15

표 목 차

Table 1	23
Table 2	24
Table 3	25
Table 4	26
Table 5	27
Table 6	28
Table 7	29
Table 8	30

ABSTRACT

Relationship between mRNA expression of drug resistance genes and clinical aspects in human hematologic malignancy patients

By Yu Mi-ra

Advisor : Prof. Chung Chun-Hae, M.D.& Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

(Background) Although cytotoxic chemotherapy is the most effective treatment modality for patients with hematologic malignancy, one of the major problems related to chemotherapy is resistance to anticancer drugs. It is well known that multidrug resistance could be due in part to a higher incidence of drug resistance gene expression in cancer cells. Several molecular biological mechanisms have been identified as being associated with multidrug resistance genes. P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) are well-known transporters among the ATP-binding cassette (ABC) superfamily that pump out antitumor agents via an ATP-dependent process. In addition, there are many other transporters including cooper transporters, nucleoside transporters and non-ABC transporters. So far, there have been a few reports about relation between their expression profiles and clinical significance in hematologic malignancy patients.

(Methods) All specimens were obtained by bone marrow aspiration from 44 patients that are composed of 31 acute myeloid leukemia and 13 myelodysplastic syndrome and from 23 non hematologic malignant patients.

Using the multiplex RT-PCR assay kit (Drugporter[®]), all samples were analyzed for 24 drug resistance genes, including 17 ABC transporters, two non-ABC transporter (*LRP* and *ATP7B*), 5 solute carrier (SLC) transporters, and one housekeeping gene (*GAPDH*). Relationship between expression levels of 24 resistance genes and clinical data such as response of chemotherapy and prognosis was statistically analyzed.

(Results) Transcripts of eight genes (*ABCB4*, *ABCC6*, *ABCC9*, *ABCC11*, *ABCG2*, *ATP7B*, *SLC29A1* and *SLC29A2*) were not expressed in all bone marrow specimen. The mRNA expression of five genes (*ABCA2*, *ABCC1*, *ABCC4*, *ABCC10* and *MVP*) in myeloid malignant subjects were statistically different than that of non-malignant subjects. Among 31 acute myeloid leukemia patients treated with cytarabine +/- anthracycline, 17 patients (54.8%) showed remission. The mRNA expression of 3 genes (*ABCC1*, *ABCC4* and *MVP*) were statistically different between remission group and remission failure group in chemotherapy. Expression of 2 genes (*ABCB5* and *ABCC5*) in acute myeloid leukemia patients was statistically significant In terms of prognosis.

(Conclusion) These results suggest that mRNA expression of *ABCC1*, *ABCC4* and *MVP* in acute myeloid leukemia patients could be related to primary chemotherapy resistance and that of *ABCB5* and *ABCC5* to poor prognosis. Differential expression of resistance genes implicates that chemotherapy of hematologic malignancy patients should be personally customized and prognostically estimated according to the mRNA expression of resistance genes.

Key words : Drug resistance, Hematologic malignancy, ABC transporters

I. 서론

2008년에 개정된 WHO 분류에 의하면 혈액암은 골수성(myelocytic), 림프구성(lymphocytic) 및 조직구성(histocytic)으로 나뉜다. 다른 개념으로는 이형성(dysplasia)과 증식성(proliferative)로 나눌 수 있으며, 이형성을 보이는 골수성 종양은 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML)과 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome, MDS)이 있으며, 성인에서 흔하고, 나이가 들면서 빈도수는 증가한다[1,2]. MDS의 치료는 위험도에 따라서 경과 관찰부터 저메틸화약물(hypomethylating agent), 항암화학요법 및 조혈모세포이식이 있고, AML의 치료는 주로 화학요법 또는 조혈모세포이식이 있다[3,4].

임상에서 항암화학요법 치료실패의 원인중 하나는 항암제에 대한 내성이라고 할 수 있다. 항암제 내성은 처음부터 표준 항암제에 반응하지 않는 일차내성(primary resistance) 또는 자연내성(natural resistance)과 항암제에 처음에는 잘 반응을 보이던 암세포가 치료를 거치면서 획득하는 획득내성(acquired resistance)이 있다[5]. 이러한 항암제 내성의 원인으로는 세포막에 존재하는 펌프에 의한 항암제의 세포막 이동의 변화가 하나의 원인이다[6-9].

혈액암중 AML 및 MDS의 약물내성 및 예후에 관여하는 세포막 펌프 유전자로는 multidrug resistance gene1 (*MDR1*), multidrug resistance-associated protein (*MRP*) 및 lung resistance protein (*LRP*) 등이 있다[10-29]. 그러나 혈액암에서 다른 항암 내성 세포막 펌프에 대한 정보는 거의 없는 상태이다.

혈액암은 단일 세포의 유전적 변화로 발생하는 클론형성(clonality)이 높고, 림프종을 제외한 혈액암은 골수검사를 통하여 최종적으로 진단이 되며, 림프종이나 다발골수종을 제외하고는 고형암과는 달리 병기의 개념이 상대적으로 적다. 그러므로 혈액암은 수술이나 방사선 치료보다는 전신적인 치료인 항암화학요법이 주 치료가 되고, 이론적으로는 완전관해가 가능하며 최종적으로는 조혈모세포이식으로 치료를 할 수 있다는 공통된 특징을 가지고 있다[1-4]. 다행히, 혈액암은 항암제에 감수성이 매우 높은 질환군이고 특히 적은 고용량 cytarabine을 기반으로 anthracycline (idarubicin, daunorubicin)을 조합하여 치료하면 관해를 유도할 수 있지만 표준화된 치료에도 반응이 없는 경우들이 관찰되고 이의 원인은 항암제에 대한 다약제 내성이 하나의 원인으로 사료된다[3-6]. 이러한 다약제 내성은 암세포의 기원에 따라 달라질 수 있기 때문에 항암치료에 반응이 좋은 암종부터 반응

이 없는 암종까지 다양한 항암제에 대한 반응률로 설명이 가능할 수 있다. AML에서도 관해 유도 항암치료의 실패와 항암 내성 세포막 펌프가 연관되어 있다는 보고가 있다[16,20-21].

이중에서 종양세포의 세포막을 통한 항암제의 이동의 변화에 의한 내성을 전통적다약제 내성 (multidrug resistance, MDR)이라고 한다[5-7]. 대부분 전통적 다약제 내성은 세포막에 존재하고 폭넓은 약물 특이성을 갖는 adenosine triphosphate (ATP) 의존적인 배출펌프(efflux pump)들에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 이러한 펌프들은 ATP-binding cassette (ABC) transporter라고 하며, 지금까지 48개의 인간 ABC transporter가 동정되었고, 이는 다시 7개의 subfamily (A-G)로 분류된다[5-9]. 이러한 약물펌프들은 소화기 점막세포와 신장, 폐 등의 정상 세포들에도 다양하게 분포하는데 그 생리적 기능이 완전히 밝혀지지는 않았으나, 우리 몸이 다른 약제 및 독물들에 과다하게 노출되는 것을 막는 방어기제의 일종으로 생각 된다[5-7,30]. 그러나 ABC transporter가 비정상적으로 발현되거나 과다 발현되면 그 펌프에 해당하는 특이 약물 배출이 증가되고 이로 인하여 세포 내 약물 농도를 낮추기 때문에 결과적으로 약제에 대한 내성이 유도된다. Human ABC transporter 중 17개 ABC transporters가 항암제를 배출함으로써 항암제 내성과 관련이 있다고 알려져 있다 [1-4, 31-33]. 그 외 ABC transporter는 아니지만 *ATP7B*같은 경우는 세포막에 존재하면서 cisplatin을 배출하여 항암제 내성과 관련되고, *LRP (MVP)*는 특이하게 핵막에 존재하면서 여러 항암제들을 핵에서 세포질로 배출함으로써 내성을 유도한다고 알려져 있다[34-34]. 위와 같은 상황과는 반대로 항암제의 유입을 감소시킴으로써 항암제의 내성을 유도하는 세포막유입펌프 (uptake pump)로는 *SLC28A1*, *SLC28A2*, *SLC29A1*, *SLC 29A2* 및 *SLC31A1* 등이 있다. *SLC28A1*, *SLC28A2*, *SLC29A1* 및 *SLC 29A2* 등은 nucleoside analogues 계열의 항암제의 유입과 연관되고, *SLC31A1*은 백금계 항암제(Platinum analogues)의 항암제 유입과 연관되어 있으며 이러한 유입펌프 유전자들의 발현의 감소가 항암제 내성과 연관이 있음이 보고되었다[1-6, 36].

혈액암 특히 AML 및 MDS의 항암내성 세포막 펌프의 발현양상은 많은 연구가 있지만 예후와 연관이 있을 수 있다는 보고부터 발현은 되지만 항암제내성과 연관이 없다는 보고까지 다양하다. 더구나, 다양한 항암 세포막 펌프에 대한 종합적인 정보는 거의 없는 상태이며 특히 항암 내성중 일차내성의 원인에 대한 연구는 많지 않다 [9-28,37-38].

이에 본 저자는 AML과 MDS 같은 골수성 혈액암 환자에서 항암제 내성 세포막 펌프의 mRNA발현양상을 조사하고 대상 환자의 임상상(예후인자 및 항암제 반응과의 연관성)을 알아보고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

2011년 3월부터 2013년 1월까지 조선대학교병원에서 골수검사시에 골수 흡인액을 환자의 동의를 구하고 보관이 가능했던 환자들을 대상으로 진단명이 골수성 혈액암으로 진단 받은 44명(AML:13명 및 MDS:13명)의 환자와 골수검사에서 어떠한 악성세포도 나타나지 않고 유전학적으로 정상 유전자를 가지고 있던 환자(비혈액암군) 23명을 대상으로 하였다.

2. 연구방법

(1) 항암 내성유전자의 발현 측정

1) RNA 추출 및 cDNA 합성

환자의 골수흡인액 시료로부터 자동핵산 추출장치(MFX-2100, Toyobo, Osaka, Japan)의 21번 프로토콜을 이용해 총 RNA를 분리 추출하였다. RNA 농도 ($1OD = A_{260}$ unit of single-stranded RNA = $40 \mu\text{g/mL}$)는 260 nm에서 spectrophotometer (DU^R650, Beckman, Fullerton, CA, USA)로 측정하였고, RNA 순도는 A_{260}/A_{280} 비율로 측정하고, RNA 보존도는 LabChip GX system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)을 이용하여 28S/18S 비율이 1.6.이상인 조직만 사용하였다. 총 RNA $1 \mu\text{g}$ 으로부터 Sprint RT Complete (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

2) 다중 역전사-중합효소 연쇄반응(Multiplex RT-PCR)을 이용한 항암제 내성유전자의 발현 측정

합성된 cDNA와 항암제 내성진단유전자 검출키트 (상표명: Drugspotter[®]; Bioneer, Daejeon, Korea; 특허 10-0839585)을 이용하여 PCR기계 (Mygenie 96; Bioneer, Daejeon, Korea)로 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 키트의 PCR 반응에 사용한 모델 세포주, 프라이머, 버퍼, dNTP 및 중합효소 농도, PCR 조건은 Table 1과 2과 같다[39]. PCR 산물을 20배 희석하여 자동전기영동 장치(Lapchip GX system, Hopkinton, MA, USA)를 이용하여 밴드의 강도를 분석하였다.

3) 항암제 내성진단키트(Drugspporter[®])의 구성 유전자

본 연구의 항암 내성 유전자구성을 살펴보면, ABC transporter 유전자 17개 (*ABCA1*, *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB5*, *ABCC1*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC6*, *ABCC9*, *ABCG1*, *ABCG2* 및 *CFTR*), ABC transporter가 아닌 7개의 transporters[항암제 배출 펌프 유전자 2개(*MVP* 및 *ATP7B*)와 항암제 유입펌프 유전자 5개(*SLC28A1*, *SLC28A1*, *SLC29A1*, *SLC28A2* 및 *SLC31A1*)] 및 대조유전자(*GAPDH*)로 구성되어 있다[39].

4) 항암제 내성 유전자의 발현양상

내성유전자와 대조 유전자와의 밴드 강도를 수치화 하였고, 대조 유전자들이 적절히 발현된 시료에 한하여 내성유전자가 발현되면 양성으로 판별하였다.

(2) 임상정보

환자의 임상정보는 병록지를 검토하여 후향적으로 확인하였다. AML 예후는 염색체 결과에 따라 각각 양호 예후군, 중간 예후군 및 불량 예후군으로 분류하였다. 염색체에 따른 예후군의 분류는 다양하지만 양호예후군은 *inv(16)*, *t(16:16)*, *t(15:17)*, *t(8:21)*이 검출된 환자로, 정상 염색체군과 그 외 *+8,+21,+22,del(7q)*, *del(9q)*, *-Y* 등이 검출되면 중간 예후군으로, 그리고 *t(9:22)*, *t(6:9)*, *del(5q)*, complex type 및 이차성 골수성 백혈병, 재발된 급성 골수성 백혈병은 불량 예후군(poor prognosis)으로 분류하였다. 관해유도 항암치료의 관해유도의 정의는골수 검사를 시행하여 중성백혈구 1000/u이상, 혈소판 100,000/u 이상, 골수검사상 cellularity 20% 이상, 골수내 모세포가 5% 이하인 경우로 하였다[4].

3. 통계

통계분석은 SPSS 21.0 버전을 이용하였고, 통계적 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다. 통계분석은 χ^2 test, Fisher's exact test, Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

III. 결과

총 67명의 대상자의 골수검체 시료를 분석하였다. 전체 환자들의 중앙연령은 69세이었고, AML환자는 31명, MDS환자는 13명이었으며 골수 검사상 어떠한 악성 세포도 나타나지 않고 유전학적으로 정상 유전자를 가지고 있던 환자(비혈액암군)는 총 23명이었다. 골수 검사상 악성소견이 보이지 않았던 23명중 일차성 혈소판 감소증으로 진단 받은 환자가 12명, 철결핍성 빈혈로 진단 받은 환자가 3명이었으며 그 외에는 비혈액학적인 질환으로 혈액학적 지표의 감소 3명(간경화 2명, 만성 신부전1명, 루프스1명) 및 일시적 이상 후 바로 회복된 환자 3명이었다 (Table 3).

AML 환자들의 중앙연령은 70세였고, 골수모세포는 평균 54.5% (0-98.4%)였으며, 형태학적인 분류(FAB Classification)로는 M2가 16건(51.6%)으로 가장 많았다. 예후는 양호 예후군 7명(22.6%), 중간 예후군 13명(41.9%) 그리고 불량 예후군 11명(35.5%)으로 분류가 가능하였다(Table 4).

환자중 총 16명(51.6%)이 관해유도 항암치료를 받았으며, 관해유도 항암치료를 시행 받은 환자의 중앙연령은 57세, 골수모세포수는 평균 53.1%, 예후는 양호 예후군 4명(25%), 중간 예후군 7명(43.8%) 및 불량 예후군 5명(31.2%)이었다. 대부분 환자(81.3%)에서 표준 관해요법인 cytarabine + anthracyclin을 사용하였다. 치료 효과는 관해유도 7명(41.1%), 관해실패 5명(31.3%), 그리고 관해유도 치료 중 사망이 4명(25%)으로 사망은 관해 실패로 분류하였다(Table 5).

모든 골수검체에서 항암제 내성과 관련된 24개의 세포막 펌프와 house-keeping gene인 GAPDH과 β -actin를 분석하였다. 모든 골수검사검체에서 한 번도 검출되지 않은 유전자는 *ABCB4*, *ABCC6*, *ABCC9*, *ABCC11*, *ABCG2*, *ATP7B*, *SLC29A1* 및 *SLC29A2*로 총 8개였다.

한번이라도 검출된 유전자중 혈액암의 소견이 보이지 않았던(비혈액암) 골수검체와 통계학적으로 유의하게 골수성 혈액암 환자에서 발현되는 유전자는 *ABCA2* ($p = 0.038$), *ABCC1* ($p = 0.044$), *ABCC4* ($p = 0.036$), *ABCC10* ($p = 0.044$), *MVP* ($p = .044$)로 총 5개였다. 빈도수가 적어 통계학적 유의성은 없었으나, 비혈액암 검체에서는 한번도 검출되지 않고 골수성 혈액암 특히 AML 검체에서만 나타난 유전자로 *ABCB5* (16.1% 발현; $p = 0.156$)과 *SLC31A1* (9.7% 발현; $p = 0.546$)가 있었다(TABLE 6).

AML에서 예후군에 따라서 유전자들의 빈도를 분석하였다. 예후군에 따라서 통

계학적으로 의의가 있는 내성유전자는 *ABCB5* ($p = 0.032$), *ABCC5* ($p = 0.028$)였다. 통계학적으로 유의성은 없었으나 *MVP* ($p = 0.072$)가 불량한 예후일수록 더 발현되는 경향을 보였으며, *ABCC4* ($p = 0.33$)는 양호한 예후인자에서는 전혀 발현되지 않은 채 중간 및 불량한 예후로 갈수록 늘어나는 경향을 보였다(TABLE 7).

AML환자에서 치료받은 환자(16명)의 반응에 따라서 관해유도 환자(43.8%)와 관해유도 치료실패 혹은 치료 중 사망한 환자(56.2%)로 분류하였고, 관해유도그룹에서의 나이가 48.8세로 다소 낮았으나, 통계학적으로 유의성은 없었다($p = 0.145$). 그 외 골수모세포수, 백혈구, 혈색소, 혈소판 수 통계학적으로 의의 있는 지표는 없었으나, 예후인자가 더 나쁠수록 관해유도 치료실패의 확률이 더 높았다($p = 0.002$). 치료받고 반응을 관찰할 수 있었던 환자 수는 많지는 않았지만($n = 16$), 각 군에 발현되는 특이한 내성유전자를 관찰할 수 있었다. 관해유도 항암치료 실패군에서 *ABCC1* ($p = 0.034$), *ABCC4* ($p = 0.034$), *MVP* ($p = 0.001$)가 통계학적으로 유의하게 많이 나타났으므로, 이들 유전자가 급성백혈병치료 관해유도 항암치료 실패와 연관이 있을 것으로 사료된다. 그 외 통계학적으로 유의성은 없었지만, 관해유도가 성공한 군과 실패한 군을 비교하면 *ABCB5* (0%: 30%; $p = 0.228$) *ABCC5* (57.1%: 8.9%, $p = 0.262$), *ABCC10* (14.3%: 55.6%, $p = 0.145$), *ABCG1* (57%: 100%, $p = 0.063$)등이 연관이 있을 수도 있을 것으로 보인다. 그러므로 향후 더 많은 검체 및 임상자료가 모아 진다면 AML의 일차내성과 연관된 내성유전자를 보다 더 확실히 알 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 고찰

암의 내성기전은 너무도 다양하고 아직 완벽하게 이해되지 않고 있으며 여러 기전이 복합적으로 작용하는 것으로 생각된다[5,30]. 본 논문의 혈액암의 연구결과는 종전의 보고와 비슷하지만 새로운 결과를 얻을 수 있었는데, 혈액암에서 나쁜 예후, 관해유도 항암치료의 실패와 연관된 몇몇 세포막 내성 유전자들을 알 수 있었다. 이 같은 결과는 개인 맞춤형 항암제 내성진단의 필요성을 지지해주며, 향후 혈액암에서 내성유전자의 선별과 치료를 예측하는데 도움이 될 수 있다는 것으로 생각된다.

혈액암에서 *ABCC* (MRP) family의 발현과 임상 자료와의 관계

ABCC1 (MRP1) 유전자는 소세포폐암의 세포주에서 처음 발견되었고 소수성 (Hydrophobic) 물질 및 중금속등을 배출하는 중요한 세포의 항산화 방어시스템 (antioxidative defense system)의 기능을 가지고 있다. 약물 흡수가 중요한 폐조직 및 소화기세포, 대사 및 배출이 중요한 간과 신장, 그리고 혈액-뇌 장벽 (Blood-brain barrier) 같은 여러 생체장벽 세포 등에서 흔히 발현 된다[40,41]. 이 세포막펌프는 매우 강력하여 특히 anthracycline, etoposide, vincristine 등의 약물을 배출함으로 내성을 유발한다[3,38]. 특히 AML에서 주로 사용되는 항암제가 idarubicin이나 daunorubicin 같은 anthracyclin 계열이기 때문에 특히 항암제 내성과 밀접한 연관성이 있을 것으로 보인다. MRP1 발현 환자에서의 관해유도 항암치료의 높은 불응빈도, 재발한 AML 환자에서의 MRP1 과발현 빈도, MRP1발현 양성 AML 환자의 짧은 무질병 생존기간 등은 잘 알려져 있다[10-18].

본 연구에서는 MRP1은 비혈액암군(13%)보다 골수성 혈액암군에서 유의하게 많은 빈도(36.4%)를 보였다. AML에서의 MRP1발현빈도는 45.2%로 혈액암으로 진행될수록 발현이 증가하는 것으로 보이며, 실제 AML의 관해유도 항암치료의 실패율과도 밀접한 관계가 있었다($p=0.036$). 비록 통계학적으로는 의의는 없었으나($p = 0.3$), MRP1이 양호 예후군(42.9%)보다 불량 예후군에서 많은 빈도 (63.6%)를 보이는 것은 이 유전자 발현이 관해유도 항암치료의 실패율 및 그 자체로도 독립적 예후인자가 될 수 있음을 시사하고 있다. 그러므로 이 유전자가 발현된 환자에서는 anthracyclin에 대해 내성을 보일 가능성이 높으므로, 이 수송체 단백질의 기질이 되지 않은 다른 약제(cytarabine 등)의 용량을 증가 시키는 등의 추가적 치료가

필요할 수도 있을 것으로 보인다.

ABCC (MRP) family중 *ABCC4* (MRP4), *ABCC5* (MRP5)는 cyclic nucleotides를 배출하는 것으로 알려져 있다. 즉, MRP4는 6-mercaptopurine, 6-thioguanine 및 methotrexate, MRP5는 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, methotrexate, cladribine, 5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin를 세포막 밖으로 배출한다 [6,7,42-44]. 그러나 MRP4와 MRP5는 임상에서 AML의 예후 및 항암치료의 치료반응과 연관이 있다는 보고는 거의 없었다[22-23,45-46]. 그러나 본 연구에서는 MRP4는 골수성 혈액암군에서 발현빈도도 25%로 비혈액암군의 4.3%보다 통계학적으로 유의하게 높았고($p = 0.036$), AML의 관해유도 항암치료 반응과의 연관성도 통계학적으로 유의하였다($p=0.036$). 이 결과는 최근 MRP4 자체가 세포의 cAMP 농도에 영향을 미쳐서 백혈병세포의 증식과 분화를 야기할 수 있다는 보고도 있어서 항암치료의 표적이 될 수도 있음을 시사한다고 할 수 있다[47-49]. 그 외 환자수가 적어 통계적 의의는 없었지만 ($P = 0.33$), MRP4가 양호 예후군(0%)보다는 불량 예후군에서 훨씬 많이 발현된 것으로 봐서(45.5%) 예후인자 역시 될 수도 있을 것으로 생각된다.

*ABCC5*의 경우에는 비혈액암군(69.6%)과 골수성 혈액암군에서의 발현율(65.9%)에서는 큰 차이는 없었으나, 불량 예후군으로 갈수록 통계학적으로 유의하게 발현율이 높았다($p = 0.028$). 통계학적으로 유의성은 없었으나($p = 0.262$), 관해유도 항암치료 성공군(57.1%)보다 실패군(88.9%) 더 많이 발현되는 경향을 보이고 있어서 MRP5가 독립적 예후인자 및 치료효과를 예측할 수 있는 인자가 될 수 있으리라고 생각되고 더 많은 환자를 대상으로 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

ABCC10 (MRP7)는 많이 알려지지 않은 MRP family로서, 주로 taxane 계열의 내성인자로 많이 알려져 있다[6]. 하지만, 최근 *ABCC10*이 급성 골수성 백혈병의 주 치료로 사용되는 cytarabine에 대한 약물내성을 유발할 수 있는 것으로 보고되었다[50]. 본 연구에서는 *ABCC10*이 비혈액암군(13%)과 비교시 골수성 혈액암군(36.4%)에서 통계학적으로 유의하게 발현되어 있었다($p=0.044$). 통계학적으로 의미는 없었으나($p = 0.131$), 양호 예후군(42.9%)보다 불량 예후군(72.7%)에서 더 많이 발현되었으며, 관해유도 항암치료 성공군(14.3%)보다 실패군(55.6%)에서 더 많이 발현된 점으로 *ABCC10*도 독립적 예후인자 및 치료효과를 예측할 수 있는 인자가 될 수 있으리라고 생각되고 더 많은 환자를 대상으로 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

혈액암에서 ABCB family의 발현과 임상 자료와의 관계

ABCB family의 대표적인 유전자인 ABCB1 (MDR1)이 AML 환자에서 불량한 예후, 관해유도 예측인자 될 수 있다는 많은 보고가 있었다[10-14,17-21,29]. 그러나 본 연구에서는 전체 혈액암의 11.4%(5례), AML에서 6.5%(2례)에 불과 하였으며, 정상 환자에서도 4.3%(1례)의 환자에서 발현이 관찰되었고 이 환자들도 모두 항암치료를 받지 않아서 예후와의 상관관계를 예측할 수 없었다.

ABCB5는 많은 암에서 taxanes 계열과 anthracyclines 계열의 약제의 내성과 관계가 있다는 것으로 보고되었다[5,51]. ABCB5의 발현과 혈액암과의 관련성을 보고하는 논문은 많지 않으나 최근 B-precursor ALL 과 French-American-British (FAB)분류상 AML의 M1 및 M2 형 및 림프종에서 잘 발현되며, 재발 혹은 항암불응군에서 더 많이 발현되었다[52,53]. 본 연구에서는 통계적으로는 유의성은 없었으나($p = 0.156$), 비혈액암군(0%)와 비교시 골수성 혈액암군에서는 5례(11.4%)에서 발현되었고, 불량 예후군으로 갈수록 통계학적으로 유의하게 발현되었으며($p = 0.028$), 이들 중 항암치료를 받은 2명 모두 관해유도가 되지 않아, ABCB5가 AML의 특징적인 진단인자 혹은 예후인자가 될 수도 있을 것으로 보인다.

혈액암에서 ABCG family의 발현과 임상 자료와의 관계

ABCG2 (BCRP)는 여러암에서 mitoxantron, topotecan 등의 내성과 밀접한 관계가 있고[6,7,44], AML의 예후와 밀접한 관계가 있다고 많이 보고 되었다[24-26]. 그러나 본 연구결과에서는 비혈액암군 및 골수성 혈액암 조직에서 전혀 검출되지 않았다.

혈액암에서 MVP (LRP)의 발현과 임상 자료와의 관계

MVP (LRP) 유전자는 16번 염색체에 위치하며, 핵막에 존재하며 여러 항암제를 핵내에서 세포질로 배출함으로써 내성을 유도한다고 알려져 있지만 아직까지 정확한 생리적 기능은 알려져 있지 않다[54]. 그러나 많은 암에서 백금계 항암제(platinum)에 강력한 배출을 보이는 것으로 알려져 있고, 골수성 백혈병에 사용되는 anthracyclin에 강한 내성을 보일 수 있는 것으로 보고되었다[6,8,10-12,21,44]. 본 연구에서는 비혈액암군(21.7%)보다 골수성 혈액암군에서 유의하게 많은 빈도(54.5%)를 보였고, AML에서는 54.8%에서 발현되었다. AML에서 관해유도 항암치료의 실패율과도 역시 밀접한 관계가 있었다 ($p = 0.001$). 그

외에 통계학적으로 유의 하지는 않았으나($p = 0.072$), 양호 예후군(28.6%) 보다 불량 예후군(72.7%)에서 더 높은 빈도로 발현되는 것을 보면 MVP 역시 관해유도 항암치료의 실패율 과 독립적 예후인자가 될 수 있을 것으로 보인다.

모든 골수검사검체에서 한 번도 검출되지 않은 유전자

모든 검체에서 전혀 검출되지 않은 유전자는 *ABCB4*, *ABCC6*, *ABCC9*, *ABCC11*, *ABCG2*, *ATP7B*, *SLC29A1* 및 *SLC29A2*로 총 8개였다.

이들 중 *ABCC11* (*MRP8*)은 nucleoside analogue 와의 약제 내성과 연관이 있고 cytarabine 의 세포내 농도에 관여함으로써 AML의 치료결과에 영향이 있을 수 있다고 하는 보고는 있었지만[21,104], 본 연구에서는 1례도 나타나지 않았다. 그 외의 유전자는 역시 혈액암과의 정확한 연관성을 가진 유전자로 보이지는 않았다.

** 위 104 문헌 확인 요망

본 논문에서는 골수성 혈액암의 항암제 내성에 대하여 알아보기 위하여 세포막 펌프 유전자들 중 항암제 내성과 관련성이 알려진 24개의 유전자의 발현에 대하여 연구 하였다. 몇몇 유전자에서 골수성 혈액암에서의 유의한 발현 및 AML 환자들의 불량한 예후 및 항암제 내성등과 연관성이 있음을 알게 되었다. 그러나 본 연구의 한계점으로는 첫째, 수행된 역전사-중합효소 연쇄반응 방법이 정량성이 떨어져 발현의 양성과 음성으로만 판단하여 비교분석하였다. 그러므로 향후 정확한 정량적 PCR을 시행하여 발현 농도를 측정하고 가능하면 임상자료와 상관성이 있는 cut-off 값을 산출할 필요가 있겠다. 두 번째 한계점으로는 본 연구에서 조사한 AML환자는 31명이었지만, 지역 병원의 특성상 많은 환자가 진단만 받고 타 병원으로 전원되었고 또 고령 및 경제적 문제로 약물치료를 포기한 환자가 많아 16명이라는 적은 수에서만 관해유도 항암치료를 시행하였다. 셋째는 연구기간이 짧아 관해유도 성공유무만 알아볼 수 있었고 완치율, 생존율은 파악할 수 없었다. 넷째, MDS은 상대적으로 적은 수 및 짧은 연구기간으로 예후인자 및 치료반응과의 연관성을 파악할 수 없었다. 그러므로 정확한 관해유도치료 반응을 그 외 완치율 및 생존율과의 관계를 조사하기 위해서는 추후 더 많은 시간과 더 많은 환자를 대상으로 연구가 필요할 듯하다.

그러나 본 연구는 골수성 혈액암 환자에서 다양한 항암제 내성 세포막 펌프의 발현 양상을 파악할 수 있었고 이를 바탕으로 골수성 혈액암의 일차내성 양상을 이해하는데 도움을 줄 수 있었으며, AML환자에서 예후의 예측 및 관해유도 항암

치료의 실패 가능성을 미리 알아볼 수 있는 표지자로 사용할 수 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 추후 연구를 통하여 이러한 연구가 진전되면 진단시 검사할 때 항암 화학 요법의 내성 양상을 미리 파악할 수 있을 것으로 보이고 이를 바탕으로 항암치료의 반응을 미리 예측하여 교차내성이 없는 적절한 항암제의 사용이 가능할 수도 있을 것으로 보인다.

V. 요약

목적

현재 세포독성 항암 화학 요법이 혈액암환자에서 가장 효과적인 치료방법이지만, 치료와 관련된 가장 큰 문제는 항암제에 대한 내성이다. 특히 다약제 내성은 암세포에서 약제내성 유전자의 높은 발현율과 관련이 있다는 것은 잘 알려져 있다. 이중에서 P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance-associated protein (MRP), 그리고 breast cancer resistance protein (BCRP) 등이 잘 알려진 세포막 펌프이다. 이러한 유전자들은 ATP 에 의존하여 항암제를 배출시키는 기능을 하며 이러한 유전자들은 ATP-binding cassette(ABC) superfamily 또는 transporter 라고 불린다. 그러나 이러한 ABC transporter이외에도 cooper transporters, nucleoside transporters, 그리고 lung resistance protein (LRP) 등과 같은 많은 세포막 펌프들이 존재 한다. 이러한 세포막 펌프에 대한 각각의 여러 연구는 있었지만 골수성 혈액암에 대한 종합적인 발현율 및 임상적 의의를 나타내는 보고는 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 저자는 골수성 혈액암 환자에서 항암제 내성 세포막 펌프의 mRNA 발현과 임상상 (예후인자 및 항암제 반응과의 연관성)과의 관계를 알아보고자 하였다.

방법

2011년 3월부터 2013년 1월까지 조선대학교병원에서 진단된 급성 골수성 백혈병환자(31명) 및 골수 이형성 증후군 환자(13명)와 23명의 혈액암으로 진단되지 않은 환자를 대상으로 연구를 진행하였다. 모든 환자는 진단시에 골수 흡인액을 환자의 동의를 구하고 보관하였고 항암내성유전자 양상을 각각 분석하였다. Multiplex RT-PCR 방법을 사용하였고 17개의 ABC transporter 유전자, 7개의 ABC transporter가 아닌 transporter 유전자 [항암제 배출 펌프 유전자 2개(*MVP* 및 *ATP7B*)와 항암제 유입펌프 유전자 5개(*SLC28A1*, *SLC28A1*, *SLC29A1*, *SLC28A2* 및 *SLC31A1*)]의 총 24개 항암 내성 유전자 및 대조유전자(*GAPDH*)를 분석하였다. 골수성 혈액암 환자와 비혈액암 환자의 시료에서 발현된 항암제 내성 세포막 펌프의 발현 양상과 실제 환자의 임상정보(예후인자 및 항암제반응)와의 비교를 시행하였다.

결과

모든 골수검사검체에서 한 번도 검출되지 않은 유전자는 *ABCB4*, *ABCC6*, *ABCC9*, *ABCC11*, *ABCG2*, *ATP7B*, *SLC29A1* 및 *SLC29A2*로 총 8개였다. 한 개 이상 검출된 유전자중 혈액암의 소견이 보이지 않았던 골수검체와 통계학적으로 유의하게 혈액암 환자에서 발현되는 유전자는 *ABCA2* ($p = 0.038$), *ABCC1* ($p = 0.044$), *ABCC4* ($p = 0.036$), *ABCC10* ($p = 0.044$), *MVP* ($p = 0.044$)로 총 5개였다.

급성 백혈병 환자에서 양호 예후군, 중간 예후군, 그리고 불량 예후군으로 3가지로 나누었으며, 이 분류에 따라서 급성 백혈병에서 나타난 유전자들의 빈도를 분석하였다. 예후군에 통계학적으로 의의가 있는 내성유전자는 *ABCB5* ($p = 0.032$), *ABCC5* ($p = 0.028$)였다.

AML환자에서 관해유도 항암치료를 받은 환자들(16명)의 반응에 따라서 관해유도된 환자(43.8%)와 관해유도 실패 혹은 치료 중 사망한 환자(56.2%)로 분류하였다. 관해유도 실패한 군에서 *ABCC1* ($p = 0.034$), *ABCC4* ($p = 0.034$), *MVP* ($p = 0.001$)가 통계학적으로 유의하게 많이 나타났으므로, 이들 유전자가 AML 환자의 관해유도의 실패에 연관이 있을 것으로 사료된다.

결론

골수성 혈액암 환자에서 *ABCA2*, *ABCC1*, *ABCC4*, *ABCC10* 및 *MVP*의 발현이 비혈액암 환자와 비교하여 통계학적 유의한 차이를 보였으며, *ABCB5*와 *ABCC5*의 발현은 불량한 예후와 *ABCC1*, *ABCC4* 및 *MVP*의 발현은 관해유도 항암치료의 실패와 통계학적으로 관련이 있었다. 이와 같이 골수성 혈액암에서 다양한 항암제 내성 세포막 펌프의 발현은 항암제에 대한 일차 내성, 예후의 예측, 관해유도 및 항암치료의 실패 가능성을 예측할 수 있는 표지자로서 사용 가능성을 시사한다. 뿐만 아니라, 이 같은 결과는 임상에서 항암제 내성 유전자 mRNA 발현에 기초한 개인 맞춤형 항암요법이 필요하다는 것을 의미한다.

참고 문헌

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.* World Health Organization classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer;2008.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114:937–51.
3. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361:1872–85.
4. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2013;88:318–27.
5. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:48–58.
6. Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:183–201.
7. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*. 2005;5:30.
8. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001;11:1156–66.

9. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*. 2003;8:411–24
10. Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, Lee KH, Seo JJ, Moon HN, Ghim T. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci*. 2006;21:253–8.
11. Han K, Kahng J, Kim M, Lim J, Kim Y, Cho B, Kim HK, Min WS, Kim CC, Lee KY, Kim BK, Kang CS. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia. *Acta Haematol* 2000;104:174–180.
12. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdemis L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1999;94:1086–99.
13. Zhou DC, Zittoun R, Marie JP. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) and multidrug resistance (MDR1) genes in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995;9:1661–66.
14. Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, Lee KH, Seo JJ, Moon HN, Ghim T. Prognostic Significance of Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1), Multidrug Resistance-related Protein (MRP) and Lung Resistance Protein (LRP) mRNA Expression in Acute Leukemia. *J Korean Med Sci*. 2006;21:253–8.
15. Laupeze B, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Branger B, Grosset JM, Lamy

T, Fauchet R, Fardel O. High multidrug resistance protein activity in acute myeloid leukaemias is associated with poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol.* 2002;116:834–8.

16. Hunault M, Zhou D, Delmer A, Ramond S, Viguié F, Cadiou M, Perrot JY, Levy V, Rio B, Cymbalista F, Zittoun R, Marie JP. Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia: major prognostic significance for in vivo drug resistance to induction treatment. *Ann Hematol* 1997;74:65–71.

17. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T; SHG AML96 Study Group. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;128:324–32.

18. Zhou DC, Zittoun R, Marie JP. Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) and multidrug resistance (MDR1) genes in acute myeloid leukemia. *Leukemia.*1995;9:1661–6.

19. Broxterman HJ, Sonneveld P, Pieters R, Lankelma J, Eekman CA, Loonen AH, Schoester M, Ossenkoppele GJ, Löwenberg B, Pinedo HM, Schuurhuis GJ. Do P-glycoprotein and major vault protein (MVP/LRP) expression correlate with in vitro daunorubicin resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1999;13:258–65.

20. Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, Schrappe M, Büchner T, Schoch C, Haferlach T, Harbott J, Ratei R, Dörken B, Ludwig WD. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica.* 2000;85:711–21.

21. Tsuji K, Wang YH, Takanashi M, Odajima T, Lee GA, Sugimori H, Motoji

T. Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *Hematol Rep.* 2012;11:4:e18.

22. Guo Y, Köck K. Expression of ABC-type nucleotide exporters in blasts of adult acute myeloid leukemia: relation to long-term survival. *Clin Cancer Res.* 2009;15:1762-9.

23. Steinbach D, Lengemann J, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. Response to chemotherapy and expression of the genes encoding the multidrug resistance-associated proteins MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, and SMRP in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1083-6.

24. van der Kolk DM, Vellenga E, Scheffer GL, Müller M, Bates SE, Scheper RJ, de Vries EG. Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:3763-70.

25. Sargent JM, Williamson CJ, Maliepaard M, Elgie AW, Scheper RJ, Taylor CG. Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;115:257-62.

26. van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, Prins A, Meijerink JP, Vossebeld PJ, van der Holt B, Pieters R, Sonneveld P. Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia.* 2002;16:833-9.

27. Poulain S, Lepelley P, Preudhomme C, Cambier N, Cornillon J, Wattel E, Cosson A, Fenaux P. Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2000;110:591-8.

28. Ross DD. Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2004;17:641–51.
29. Kurata M, Hasegawa M, Nakagawa Y, Abe S, Yamamoto K, Suzuki K, Kitagawa M. Expression dynamics of drug resistance genes, multidrug resistance 1 (MDR1) and lung resistance protein (LRP) during the evolution of overt leukemia in myelodysplastic syndromes. *Exp Mol Pathol*. 2006;81:249–54.
30. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:275–84.
31. Wei LY, Stutts MJ, Hoffman MM, Roepe PD. Overexpression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in NIH 3T3 cells lowers membrane potential and intracellular pH and confers a multidrug resistance phenotype. *Biophys J*. 1995;69:883–95.
32. Moustafa MA, Ogino D, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Furukawa M, Uchida T, Ikai I, Sawada H, Fukumoto M. Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2004;95:530–6.
33. Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito–Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, Tsuruo T, Inazawa J. Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res*. 2004;64:1403–10.

34. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer*. 2002;101:488–95.
35. Berger W, Elbling L, Micksche M. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int J Cancer*. 2000;88:293–300.
36. Lang TT, Selner M, Young JD, Cass CE. Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol*. 2001;60:1143–52.
37. van der Kolk DM, de Vries EG, Müller M, Vellenga E. The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:685–701.
38. de Jonge-Peeters SD, Kuipers F, de Vries EG, Vellenga E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62:214–26
39. Lee TB, Choi CH. Detection of drug transporter expression using a 25-multiplex RT-PCR assay. *Biotechnol Lett*. 2009;31:1485–92.
40. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*. 2001;167:3–23.
41. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol*

Appl Pharmacol. 2005;204:216–37.

42. Chen ZS, Lee K, Kruh GD. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-h-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 2001;276:33747–54.

43. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrugresistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2000;275:30069–74.

44. Ross DD, Doyle LA. Mining our ABCs: pharmacogenomic approach for evaluating transporter function in cancer drug resistance. *Cancer Cell* 2004;6:105–7.

45. Steinbach D, Lengemann J, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. Response to chemotherapy and expression of the genes encoding the multidrug resistance-associated proteins MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, and SMRP in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1083–6.

46. van der Kolk DM, de Vries EG, Noordhoek L, van den Berg E, van der Pol MA, Müller M, Vellenga E. Activity and expression of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2001;15:1544–53

47. Belinsky MG, Guo P, Lee K, Zhou F, Kotova E, Grinberg A, Westphal H, Shchavaleva I, Klein-Szanto A, Gallo JM, Kruh GD. Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage. *Cancer Res.* 2007;67:262–8.

48. Copsel S, Garcia C, Diez F, Vermeulem M, Baldi A, Bianciotti LG, Russel FG, Shayo C, Davio C. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and

differentiation. *J Biol Chem.* 2011;286:6979–88.

49. Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, Schuetz JD. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci.* 2002;4:E14.

50. Hopper–Borge E, Xu X, Shen T, Shi Z, Chen ZS, Kruh GD. Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res.* 2009;69:178–84.

51. Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, Sato M, Katayama K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;24; 418:736–41.

52. Frank NY, Frank MH. ABCB5 gene amplification in human leukemia cells. *Leuk Res.* 2009;33:1303–5.

53. Yang M, Li W, Fan D, Yan Y, Zhang X, Zhang Y, Xiong D. Expression of ABCB5 gene in hematological malignances and its significance. *Leuk Lymphoma.* 2012;53:1211–5.

54. Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ. The drug resistance–related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med.* 1995;1:578–82

55. Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper–Borge E, Belinsky MG, Kruh GD. MRP8, ATP–binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'–dideoxycytidine and 9'–(2'–phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem.* 2003;278:29509–14

Table 1. Cell lines, primers, buffer, enzyme and dNTP concentration for multiplex-PCR

Set	Cell lines	Primer			Buffer	Enzyme	dNTP
		No.	Forward	Reverse			
Set 1	Caco-2	1-1	200 nM	200 nM	1.0 X	2.5 U	200uM
		1-2	200 nM	200 nM			
		1-3	200 nM	200 nM			
		1-4	400 nM	400 nM			
		1-5	200 nM	200 nM			
Set 2	T47D and Caco-2	2-1	100 nM	100 nM	1.0 X	0.625 U	200uM
		2-2	200 nM	200 nM			
		2-3	4uM	4uM			
		2-4	200 nM	200 nM			
		2-5	100 nM	100 nM			
Set 3	HepG2	3-1	200 nM	200 nM	1.6 X	0.625 U	200uM
		3-2	200 nM	200 nM			
		3-3	200 nM	200 nM			
		3-4	200 nM	200 nM			
		3-5	200 nM	200 nM			
Set 4	HT-29 and Caco-2	4-1	200 nM	200 nM	1.0 X	0.625 U	200uM
		4-2	100 nM	100 nM			
		4-3	100 nM	100 nM			
		4-4	200 nM	200 nM			
		4-5	1 uM	1 uM			
Set 5	Caco-2	5-1	200 nM	200 nM	1.0 X	0.625 U	200uM
		5-2	200 nM	200 nM			
		5-3	200 nM	200 nM			
		5-4	400 nM	400 nM			
		5-5	200 nM	200 nM			

Table 2. PCR primers of five sets for multiplex-PCR

No.	Symbol	Accession No.	Forward	Reverse	Size (bp)
Set 1					
1-1	CFTR	NM_000492.2	5' AGCCAGCACAGCCTCTTAG 3'	5' AGTCAGTTTGGAGTTGAGAAGG 3'	200
1-2	ATP7B	NM_000053.2	5' TCTGACCTTCACCTTGGATGG 3'	5' GGACACAATTACTGACGGACAG 3'	161
1-3	MVP	NM_017458.2	5' CCATTGAAACGGAGGCTGAG 3'	5' TCGGTGATGAGGTTGATTTC 3'	247
1-4	ABCC1	NM_004996.2	5' CTAACCTGGACCTGGAACCTG 3'	5' TCAATCAACACTGTAAGCAACC 3'	326
1-5	ABCG2	NM_004827.2	5' CAGGTCTGTTGGTCAATCTCAC 3'	5' CAGTGTGATGGCAAGGGAAC 3'	422
Set 2					
2-1	GAPDH	CR_608433.1	5' GCAAGAGCACAAAGGAAGAG 3'	5' CTACATGGCAACTGTGAGGAG 3'	103
2-2	ABCC9	NM_005691	5' CTAGATGCGGTTGCTCACTGAAG 3'	5' GAGACACGGTGAGCCATTGTC 3'	210
2-3	SLC28A1	NM_004213.3	5' GCCTTCCAGAGCGTCAATCC 3'	5' CCTTCCTTATGCTCACTCAC 3'	272
2-4	SLC29A1	NM_004955.1	5' GACAAAGGATGGACAGAAGGAC 3'	5' ACAGACACGGACGCAGAC 3'	359
2-5	ABCC11	NM_032583.2	5' GCTCTCAGGAACCATCAGATTC 3'	5' TGCCAGCCTCCATGAAGTC 3'	499
Set 3					
3-1	ABCC6	NM_001171.2	5' CACTCGGACGAGGCTATCTG 3'	5' GGTCCACGGCAGCAGTAG 3'	205
3-2	ABCG1	NM_207630	5' GACCGACGACAGAGACTC 3'	5' CTAAGGAGCGACTGGACTGAG 3'	258
3-3	ABCB4	NM_018849	5' CAACTCGGAATCGTGCTCAG 3'	5' GCTTTGTCAGGCTTCTTG 3'	329
3-4	ABCC4	NM_005845	5' AACCTCTAACCGACATTCTG 3'	5' TCAACATATTACGCCACCATC 3'	394
3-5	SLC31A1	NM_001859	5' TTAAGTCTCCATAGCCCTCTG 3'	5' TGCCAGCCCAGAGTTTC 3'	469
Set 4					
4-1	ABCC2	NM_000392.1	5' AACCTCATTGACAGCCATCC 3'	5' GACCATTACCTTGTCACTGTCC 3'	102
4-2	ABCC5	NM_005688.2	5' GGACAGGTGGTGGAGTTTGAC 3'	5' AAAGGCAAGTTTCGGTAGGAG 3'	205
4-3	ABCC10	NM_033450.2	5' CCCATAGGCTCAACACGATCC 3'	5' TGGGGAAGTGTGGAGAGGTAG 3'	288
4-4	ABCB5	NM_178559.3	5' GTGCTGTTGATGGTGTGGATG 3'	5' CCTTCCCGTCTGGCTTTATC 3'	396
4-5	ABCC3	NM_003786.2	5' CTCCAAGACAGAGACAGAGGC 3'	5' TGGCCCACGCTGAGATTCTC 3'	501
Set 5					
5-1	SLC28A2	NM_004212	5' CAATACCGTCTGTGCTAAGG 3'	5' CATCTTGGTGTGAGTTGTGG 3'	119
5-2	ABCA2	NM_212533.1	5' CTGGAGTGGAGTTCAGGAC 3'	5' GCATCAGCCTTCATCGTAAGAG 3'	289
5-3	SLC29A2	NM_001532.2	5' TTCATCATCATCAGGAGCAGAG 3'	5' TCCTTCCAAGAGCCTCAATTAG 3'	357
5-4	ABCB1	NM_000927	5' TTCAGAATGGCAGAGTCAAGG 3'	5' TTAGCAAGGCAGTCAGTTACAG 3'	413
5-5	ABCA3	NM_001089	5' GCCCATCTTACATCCTCTCTC 3'	5' CCAGCACCTAATCACAGTCAG 3'	463

Table 3. The general characteristics of the sixty-seven study subjects

Characteristics (n=67)		value
Median age	years(range)	69(18-86)
Gender	Male	37(55.2%)
	Female	30(44.8%)
DISEASE		
Myeloid malignancy		44(65.7%)
	AML	31(46.3%)
	MDS	13(19.4%)
Non malignancy		23(34.3%)
	ITP	12(17.9%)
	IDA	3(4.5%)
	LC	2(3%)
	Normal finding	2(3%)
	Exc. (renal disease, viral infection, SLE)	3(4.5%)

Table 4. The general characteristics of thirty-one AML patients

Characteristics (n=31)		value
Median age	years(range)	70(18-82)
Gender	Male	15(48.4%)
	Female	16(51.6%)
Blast count	percent	54.5%(0-98.4%)
FAB clasification		
	M1	3(9.7%)
	M2	16(51.6%)
	M3	4(12.9%)
	M4	4(12.9%)
	M5	1(3.2%)
	M6	1(3.2%)
	Secondary AML	2(6.5%)
Risk group	Good	7(22.6%)
	Intermediate	13(41.9%)
	Poor	11(35.5%)
Treatment response(n=16)		52%
	Remission	7(43.8%)
	Failure	9(56.3%)

Table 5. The general characteristics of the seventeens study subjects treated with chemotherapy

Characteristics (n=16)		value
Median age	years(range)	57(18-82)
Gender	Male	7(43.8%)
	Female	9(56.2%)
Blast count	percent	53.1%(0-98.4%)
Risk group	Good	4(25%)
	Intermediate	7(43.8%)
	Poor	5(31.2%)
Remission treatment		
	Cytarabine+antracycline	13(81.3%)
	Cytarabine only	3(18.7%)

Table 6. Comparison of gene expression between non-malignant subjects and malignant subgroups (AML and MDS)

Gene	Non malignany (n=23)	MDS (n=13)	p-value	AML (n=31)	p-value	Myeloid malignancy (n=44)	p-value
ABCA2	5(21.7%)	3(23.1%)	1	18(58.1%)	0.008	21(47.7%)	0.038*
ABCA3	21(91.3%)	8(61.5%)	0.073	18(58.1%)	0.07	26(59.1%)	0.1
ABCB1	1(4.3%)	3(23.1%)	0.124	2(6.5%)	1	5(11.4%)	0.656
ABCB4	0	0		0		0	
ABCB5	0	0		5(16.1%)	0.064	5(11.4%)	0.156
ABCC1	3(13%)	2(15.4%)	1	14(45.2%)	0.012	16(36.4%)	0.044*
ABCC2	3(13%)	0	0.288	3(9.7%)	1	3(6.8%)	0.406
ABCC3	2(8.7%)	1(7.7%)	1	4(12.9%)	1	5(11.4%)	1
ABCC4	1(4.3%)	3(23.1%)	0.124	8(25.8%)	0.062	11(25%)	0.036*
ABCC5	16(69.6%)	5(38.5%)	0.09	24(77.4%)	0.546	29(65.9%)	1
ABCC6	0	0		0		0	
ABCC9	0	0		0		0	
ABCC10	3(13%)	2(15.4%)	1	14(45.2%)	0.017	16(36.4%)	0.044*
ABCC11	0	0		0		0	
ABCG1	17(73.9%)	12(92.3%)	0.382	25(80.6%)	0.742	37(84.1%)	0.344
ABCG2	0	0		0		0	
ATP7B	0	0		0		0	
CFTR	3(13%)	0	0.288	2(6.5%)	0.64	2(4.5%)	0.33
MVP	5(21.7%)	7(53.8%)	0.071	17(54.8%)	0.014	24(54.5%)	0.01*
SLC28A1	0	0		0		0	
SLC28A2	22(95.7)	0	0.539	0	0.218	36(81.8%)	0.149
SLC29A1	0	0		1(3.2%)	1	1(2.3%)	1
SLC29A2	0	0		0		0	
SLC31A1	0	0		3(9.7%)	0.253	3(6.8%)	0.546

*, p < 0.05

Table 7. Comparison of gene expression according to the prognostic factor in AML patients

N=31	Prognosis			p-value
Gene	Good risk (N=7)	Intermediated risk (N=13)	Poor risk (N=11)	
ABCA2	4(57.1%)	5(38.5%)	9(81.8%)	0.2
ABCA3	4(57.1%)	4(30.8%)	10(90.9%)	0.08
ABCB1	0	1(7.7%)	1(9.1%)	0.477
ABCB4	0	0	0	
ABCB5	0	1(7.7%)	4(36.4%)	0.032*
ABCC1	3(42.9%)	4(30.8%)	7(63.6%)	0.3
ABCC2	1(14.3%)	1(7.7%)	1(9.1%)	0.758
ABCC3	0	3(23.1%)	1(9.1%)	0.734
ABCC4	0	3(23.1%)	5(45.5%)	0.33
ABCC5	4(57.1%)	9(69.2%)	11(100%)	0.028*
ABCC6	0	0	0	0
ABCC9	0	0	0	0
ABCC10	3(42.9%)	3(23.1%)	8(72.7%)	0.131
ABCC11	0	0	0	
ABCG1	6(85.7%)	8(61.5%)	11(100%)	0.291
ABCG2	0	0	0	0
ATP7B	0	0	0	0
CFTR	0	0	2(18.2%)	0.095
MVP	2(28.6%)	7(53.8%)	8(72.7%)	0.072
SLC28A1	0	0	0	0
SLC28A2	5(71.4%)	12(92.3%)	8(72.7%)	0.89
SLC29A1	0	1(7.7%)	0	0.864
SLC29A2	0	0	0	
SLC31A1	0	2(15.4%)	1(9.1%)	0.626

*, p< 0.05

Table 8. Comparison of gene expression between remission group and remission failure group in AML patients treated with chemotherapy

Gene	Remission group (n=7)	Remission failure group (n=9)	p-value
ABCA2	4(57.1%)	5(55.6%)	1
ABCA3	4(57.1%)	6(66.7%)	1
ABCB1	0	1(11.1%)	1
ABCB4	0	0	
ABCB5	0	2(22.2%)	0.475
ABCC1	0	5(55.6%)	0.034*
ABCC2	1(14.3%)	1(11.1%)	1
ABCC3	0	2(22.2%)	0.475
ABCC4	0	5(55.6%)	0.034*
ABCC5	4(57.1%)	8(88.9%)	0.262
ABCC6	0	0	
ABCC9	0	0	
ABCC10	1(14.3%)	5(55.6%)	0.145
ABCC11	0	0	
ABCG1	4(57%)	9(100%)	0.063
ABCG2	0	0	
ATP7B	0	0	
CFTR	0	1(11.1%)	1
MVP	0	8(88.9%)	0.001*
SLC28A1	0	0	
SLC28A2	5(71.4%)	7(77.8%)	1
SLC29A1	0	0	
SLC29A2	0	0	
SLC31A1	0	2(22.2%)	0.475

*, p< 0.05

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20117228	과 정	박사
성 명	한글: 유미라	한문 :	영문 : You Mi-ra		
주 소	광주광역시 북구 매곡동 금호아파트 103동 1103호				
연락처	E-MAIL : armedsurgeonMD@gmail.com				
논문제목	한글 : 혈액암 환자에서 항암제 내성 유전자의 발현양상과 임상 DATA와의 상관성에 관한 연구 영어 : Relationship between mRNA expression of drug resistance genes and clinical data in human hematologic malignancy patients				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대()

2013 년 8 월 23 일

저작자: 유미라 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하