

□ 연구보고 □

## CREST 증후군에 동반된 폐고혈압 환자에서 총상병변내 내피세포 증식의 클론성에 관한 연구

울산대학교 의과대학 서울 중앙병원 내과학교실, 이산 생명과학 연구소\*,  
콜로라도 의대 병리학 교실\*\*

이상도, 전용감\*, 이지현, 심태선, 임채만, 고윤석,  
김우성, 김동순, 김원동, Rubin M. Tuder\*\*

= Abstract =

### Study on the Clonality of Endothelial Cell Proliferation in Plexiform Lesions in Patients with Pulmonary Hypertension Associated with CREST Syndrome

Sang-Do Lee, M.D., Yong-Gam Jeon\*, M.D., Ji-Hyun Lee, M.D.,  
Tae Sun Shim, M.D., ChaeMan Lim, M.D., Yun Suck Koh, M.D., Woo Sung Kim, M.D.,  
Dong Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D. Rubin M. Tuder

*Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, of Medicine, University of Ulsan,  
Asan Institute for Life Science\*, Seoul, Korea*

*Department of Pathology, University of Colorado, Health Sciences Center\*\**

**Background :** The CREST syndrome is an indolent form of progressive systemic sclerosis. Although its clinical progress is indolent, pulmonary hypertension(PH) associated with CREST syndrome have grave prognosis with over 40 percent mortality rate at 2 year follow-up. But the pathogenesis of pulmonary hypertension in this disease is not known, and classified as either primary or secondary PH. Clonality of endothelial cell proliferation in plexiform lesion is a molecular marker which allows distinction between primary and secondary PH. We performed this study to know whether the PH associated with CREST syndrome is a variant of primary

---

†본 연구는 대한 결핵 및 호흡기학회 1998년 연구비의 일부 보조로 이루어 졌음.

Address for correspondence :

Sang-Do Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center 388-1

Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea

Phone : 02-2224-3140 Fax : 02-2224-6968 E-mail : sdlee@www.amc.seoul.kr

PH or is a secondary PH.

**Methods :** We assessed the X-chromosome inactivation based on the methylation pattern of the human androgen-receptor gene by PCR(HUMARA). Endothelial cells in plexiform lesions from female patients(n=3) with PH associated with CREST syndrome were microdissected from paraffin blocks. Vascular smooth muscle cells and lung parenchyma were also microdissected for clonality studies.

**Results :** The proliferating endothelial cells in 14 plexiform lesions were all polyclonal. Similarly proliferated smooth muscle cells from 5 vessels with medial hypertrophy were also polyclonal.

**Conclusion :** These results suggest that the pulmonary hypertension associated with CREST syndrome has different pathogenesis from primary PH and to be classified as secondary PH. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 150-160)

---

**Key words :** CREST syndrome, Pulmonary hypertension, Clonality, Plexiform lesion.

## 서 론

CREST 증후군(calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasias) 환자의 약 50%에서 폐나 심장질환의 증거 없이 폐고혈압이 발생하며, 이러한 환자들의 이년 생존률은 40%로 폐고혈압이 없는 환자에 비해 예후가 매우 나쁘다<sup>1-4</sup>. 그러나 CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압의 원인과 병리기전에 대해서는 전혀 알려진 바 없으며 막연히 원발성 폐고혈압(primary pulmonary hypertension)의 이형(variant form)으로 분류되고 있다<sup>5</sup>. 총상병변(plexiform lesion)은 원발성 폐고혈압 환자의 80%에서 관찰되는 특징적인 조직병리학적 소견으로, 직경 300  $\mu\text{m}$  이하의 작은 근육형 동맥내에 내피세포(endothelial cell)의 증식에 의한 혈관폐색을 특징으로 한다<sup>6-9</sup>. 최근 연구자는 원발성 폐고혈압에서 총상병변내의 내피세포 증식이 단일클론성(monoclonal)임을 발견한 바 있다<sup>10</sup>. 단일클론성 증식은 신생물(neoplasm) 생성의 가장 초기 변화이며, 유전적 변성(genetic alteration)이 그 병리기전임을 시사한다. 한편 선천성 심장질환에 의한 이차성 폐고혈압에서 총상병변내 내피세포의 증식은 다클론성(polyclonal)으로 관찰되었다<sup>10</sup>. 그동안 원발

성과 이차성 폐고혈압의 구분은 폐고혈압을 유발할 수 있는 기저질환의 유무에 의존하는 임상적 판단이었으나, 이제는 총상병변내 내피세포 증식의 클론성으로 원발성과 이차성을 객관적으로 구분할 수 있게 되었다. CREST 증후군에 동반된 폐고혈압에서 관찰되는 총상병변내 내피세포증식의 클론성 분석은 그 병리기전을 이해하는데 중요한 단서를 제공한다. 이 질환에서 총상병변내 내피세포 증식이 단일클론성 이라면 이 질환은 원발성 폐고혈압과 같은 유전적 변성에 의한 혈관증식성 질환으로 이해 할 수 있다. 또한 그 치료도 prostacyclin 등 원발성 폐고혈압의 치료원칙을 적용해 볼 수 있다. 반면에 내피세포 증식이 다클론성일 경우 이 질환은 이차성 폐고혈압으로 분류되며 자가면역 또는 염증에 의한 혈관내피세포의 손상(endothelialitis)이 주 병리기전으로 작용하고 치료는 다른 이차성 폐고혈압에서와 마찬가지로 원인질환의 치료가 중심이 될 것으로 사료된다. 연구자는 CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압이 원발성 폐고혈압과 같은 유전적 변성을 병리기전으로 하는 혈관증식성 질환인가, 아니면 결합조직병(connective tissue disease)에 의한 이차성 폐고혈압인가를 검정함으로써 이 질환의 병리기전을 이해하고 치료방법을 개발하는데 보탬이 되고자 본 연구를 시행하였다.

## 연구방법

### 1. 가설에 접근하는 방법에 대한 개요

폐고혈압을 동반한 CREST 증후군 여자환자에서 얻은 폐조직의 파라핀 block을 사용하여 microdissection 방법으로 총상병변내에 증식된 내피세포를 분리한다. 클론성 검정은 X-염색체의 methylation pattern을 이용한다. 여성에서는 태아발생 초기에 differential methylation에 의해 각 세포내 두 개의 X-염색체중 하나만이 활성화가 유지되며(Lyon hypothesis) 이러한 methylation pattern은 이후 세포분열 과정에서 일정하게 유지된다. Human androgen receptor 유전자는 X-염색체상에 존재하며 methylation에 의해 비활성화된다. Methylation은 무작위로 진행되어 세포의 반은 아버지로부터 받은 유전자가 methylation되고 나머지 반은 어머니로부터 받은 유전자가 methylation 된다. 따라서 다클론성 조직에서는 세포의 반은 어머니 유전자가 methylation되고 나머지 세포의 반은 아버지 유전자가 methylation된 혼합 양상을 보인다. 반면 단일세포에서 유래한 단일클론성 조직은 어머니 또는 아버지 어느 한쪽 유전자의 methylation pattern 만을 보이게 된다. 본 연구에서는 human androgen-receptor gene methylation assay(HUMARA) 방법으로 클론성 검정을 하였다. Human androgen-receptor 유전자는 (CAG)<sub>n</sub> sequence (n=11-31)의 short tandem repeat를 가지고 있고 90%에서 다형성(polymorphism)을 보인다. Trinucleotide의 100 bp upstream에 두 개의 *HhaI* site가 존재하며 이곳의 methylation 상태는 X염색체의 불활성화 (inactivation)와 관련되어 있다. Methylation-sensitive endonuclease *HhaI*으로 genomic DNA를 처리하면 불활성화된 X염색체상의 human androgen-receptor 유전자는 분해되지 않으나 활성 X염색체상의 human androgen-receptor 유전자는 *HhaI*에 의해 분해되어 이후의 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에

의해 증폭되지 않는다. 이러한 원리로 단일클론성 조직에서 추출한 DNA를 *HhaI*으로 처리하면 어머니 또는 아버지중 한쪽의 methylated human androgen-receptor 유전자만이 PCR로 증폭되어 겔전기영동상 단일 밴드를 형성한다. 반면에 다클론성 조직에서는 *HhaI* 처리후에 아버지와 어머니로부터 유래한 두 androgen-receptor 유전자가 존재하며 이 경우 PCR과 겔전기영동후 두 개의 밴드를 형성하게 된다.

### 2. 연구방법

#### 1) 조직과 microdissection

CREST 증후군에 동반된 폐고혈압 여자 환자 4명에서 개흉폐생검(2예) 또는 부검(2예)시에 얻어진 폐의 포르말린고정 파라핀 block을 이용하였다. 연구에 사용된 모든 파라핀 block은 Dr. Rubin Tuder (Department of pathology, University of Colorado)로부터 기증 받았다. 이 환자들의 임상 정보는 (Table 1)과 같다. 각 환자에서 2-8개(평균 4개)의 block을 사용하였다. 하나의 파라핀 block으로부터 10  $\mu$ m 두께로 50개의 연속적인 조직 절편을 얻은 후 이들중 매 여섯번째 슬라이드를 *hematoxyline and eosin* 염색을 하여 총상병변이 있는 혈관을 찾고 이를 삼차원으로 재구성하였다. 길이 120  $\mu$ m 이상의 총상병변만을 분석 대상으로 하였다. 총상병변이 있는 슬라이드중 하나는 factor VIII r.Ag으로 면역염색하여 총상병변내의 내피세포증식을 확인하였다. 선택된 총상병변이 보이는 나머지 슬라이드는 모두 eosin염색을 하고 각각의 슬라이드로부터 microdissection기법으로 증식된 혈관내피세포를 선택적으로 분리해 모두 하나의 튜브에 모았다. Microdissection은 40x dissecting microscope을 사용해 30 게이지 바늘로 내피세포를 분리하고 글리세롤내에 부유시켜 진공조질 피펫으로 부유세포들을 모았다. 같은 방법으로 총상병변이 있는 혈관과 비슷한 크기의 혈관중 중막비후를 보이는 혈관을 선택해 100  $\mu$ m에 걸쳐 혈관평활근을 microdissection 하였다. 또한 각 환자에서

**Table 1.** Selected clinical and clonality data of four women with pulmonary hypertension associated with CREST syndrome

Patient No.	Age	Pulmonary arterial pressure*	Allele inactivation ratio <sup>‡</sup>	Number of plexiform lesions studied	Unbalanced methylation <sup>§</sup>
	yr	mmHg			
1	48	79/25/48	0.91	5(4) <sup>  </sup>	0
2	37	87/37/56	1.18	4	0
3	53	40/15/28	0.97	6	0
4	59	65/20/35	Homozygous HUMARA alleles		0

\*Systolic/diastolic/mean. <sup>‡</sup>Of lung parenchyma (refer to Methods) ; the average allele inactivation ratio was 1.02, excluding the possibility of unequal lyonization. <sup>§</sup>Number of plexiform lesions with clonality ratio < 0.25 (refer to Methods), suggestive of monoclonality. <sup>||</sup>Of the five plexiform lesions analyzed, PCR amplification was successful in four. HUMARA, Human androgen receptor.

human androgen-receptor 유전자 이형유무를 알아보기 위해 폐실질을 microdissection 하였다.

## 2) 클론성 분석(Analysis of clonality)

클론성분석은 human androgen-receptor gene methylation assay(HUMARA) 방법을 이용하였다.

### (1) Microdissection으로 얻은 조직의 처리

Microdissection으로 얻은 조직을 proteinase K buffer(0.2 mg/ml proteinase K, 1mM EDTA, 50mM Tris HCl, pH 8.4, 0.5% Tween) 20  $\mu$ l 로 부유해 37 $^{\circ}$ C로 overnight 항온 반응한 후 98 $^{\circ}$ C에서 8분간 불활성화 하였다.

### (2) Restriction endonuclease *HhaI* digestion of active X-chromosome

(1)에서 얻은 DNA preparation mixture를 두 개의 튜브에 10  $\mu$ l 씩 나누어 담는다. 한쪽 튜브에는 20U *HhaI*과 1.0x PCR buffer(20mM Tris HCl, pH 8.4, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, GIBCO BRL)로 최종용량을 25  $\mu$ l 로 하고 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 항온 반응시켰다. 이후 *HhaI* 20U을 추가하여 2시간동안 두 번째 digestion을 마친후 70 $^{\circ}$ C에서 20분간 항온 반

응하여 불활성화 하였다. 다른 하나의 튜브는 *HhaI* 없이 같은 반응을 진행시켰다.

### (3) 중합효소연쇄반응 (PCR)

PCR 증폭의 민감도와 특이도를 높이기 위해 hot start protocol을 이용한 two step 'nested' primer approach<sup>11</sup>를 시행하였다. 일차 PCR은 primer 1 (5'-GCTGT GAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3')과 primer 3 (5'-CGTCCAAGACCTACCG AGGAGCTT-3')을 이용하였고 이차 PCR에는 primer 2 (5'-TCCAGAATCTGTT CCAGAGCGTGC-3')와 primer 4 (5'-ATGGGCTTGGGGAGAACCATCCTC-3')를 이용하였다<sup>11</sup>. 일차 PCR은 dNTPs (50  $\mu$ M), primers 1,3(각각 10nM), MgCl<sub>2</sub>(1.5mM), Tris-HCl, pH 8.4(20mM), KCl(50mM), *Taq* polymerase(0.25U), 0.01% gelatin과 *HhaI* digest 10  $\mu$ l 로 최종용량 50  $\mu$ l 로 하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 initial denaturation후 32회 증폭하고 (thermal profile : 1 min at 94 $^{\circ}$ C, 1 min at 60 $^{\circ}$ C, 2 min at 72 $^{\circ}$ C) 72 $^{\circ}$ C로 10분간 final extension 하였다. 이차 PCR은 일차 PCR과 같은 thermal profile을 사용하였으며, 일차 PCR product 1.0  $\mu$ l, primer 2,4(각각 500nM), dNTPs(200  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ l

of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]deoxycytidine triphosphate(3000 Ci per millimole), MgCl<sub>2</sub>(1.5mM), Tris-HCl, pH 8.4 (20mM), KCl(50mM), *Taq* polymerase(0.25U), 0.01% gelatin으로 최종용량 50  $\mu$ l 로 하였다. 각각의 PCR은 PCR gem(Perkin Elmer, Norwalk, CT)을 사용한 hot start protocol을 이용하였다.

#### (4) Electrophoretic analysis of human androgen receptor gene STR amplification products :

PCR product는 6% denaturing polyacrylamide sequencing gel로 전기영동후 autoradiography로 분석하였다<sup>12</sup>. PCR product의 정량분석은 겔분석용 프로그램 SigmaGel™(Jandel Corporation, San Rafael, CA)를 이용하여 densitometric analysis 하였다. Polyacrylamide 겔전기영동상 *Hha*I digestion 하지 않은 PCR product는 두 개의 band를 보이며 각각 아버지와 어머니로부터 받은 allele을 나타낸다. *Hha*I digestion 후 다클론성 조직의 PCR product는 두 개의 band로 나타나고 단일클론성 조직의 PCR product는 하나의 band를 형성한다. 각 sample에 대해 *Hha*I digested sample 의 allele amplification ratio(allele 1/allele 2)를 *Hha*I non-digested sample의 allele amplification ratio(allele 1/allele 2)으로 나누어 'allele inactivation ratio'를 구하였다. Allele inactivation ratio는 두 allele의 길이에 많은 차이가 있을 때 생길 수 있는 preferential amplification을 교정하기 위해 이용되었다<sup>13</sup>. 한편 정상조직의 allele inactivation ratio를 이용해 unequal lyonization에 의한 aberrant X-chromosome inactivation을 교정하였다. Clonality ratio는 sample의 allele inactivation ratio를 폐실질의 allele inactivation ratio로 나누어 구하였다. 이론적으로 다클론성 조직에서는 두 allele 이 balanced methylation되어 있고 따라서 clonality ratio는 1이 된다. 반면에 단일클론성 조직은 하나의 allele이 selective methylation되어 있어 clonality ratio는 0이 된다.

#### (5) 양성 및 음성 대조(positive and negative control)

자궁내막선암종 세포주 HEC-1-A(American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 추출한 DNA를 양성 대조로 사용하였다. 이 세포주는 human androgen-receptor STR에 다형성을 갖고 제한효소 처리후 하나의 allele이 완전 소실된다. PCR product에 의한 오염을 감시하기 위해 target DNA가 없는 reagent control을 음성 대조로 사용하였다.

## 결 과

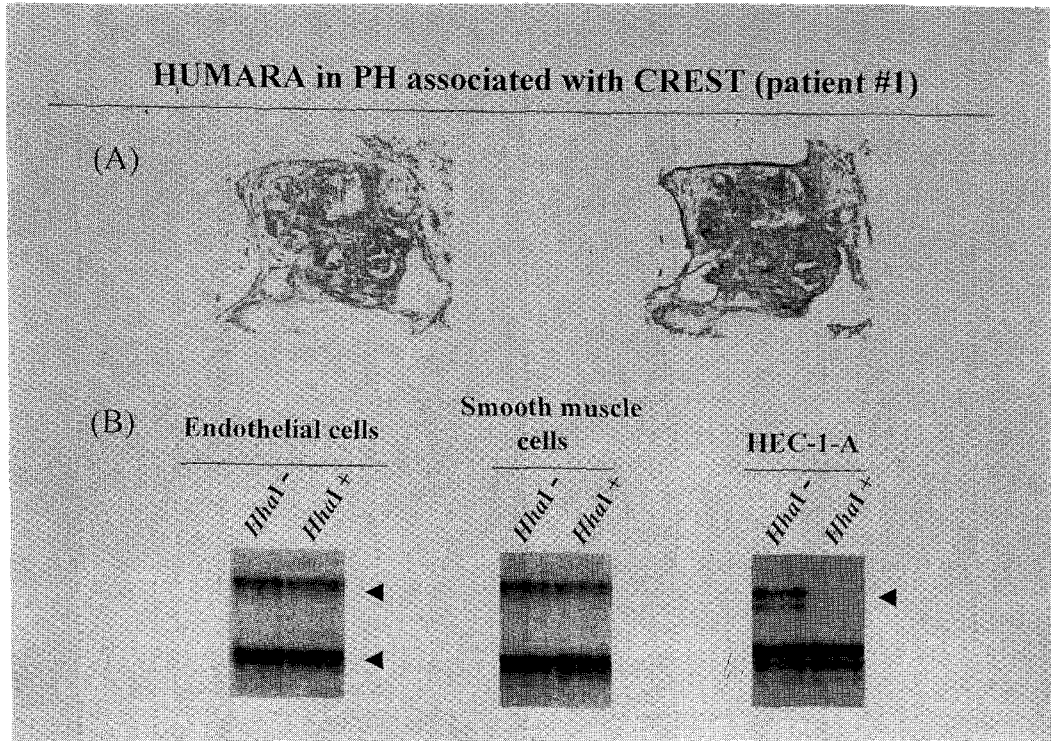
CREST 증후군에 동반된 폐고혈압 여자환자 4명의 폐조직을 연구에 사용 하였다. 이중 1예는 human androgen receptor 유전자의 homozygosity 때문에 분석에서 제외되었다. 나머지 3예에서 폐조직의 allele inactivation ratio는 0.91, 0.97, 1.18로 balanced methylation을 보였고(Table 1) 따라서 unbalanced lyonization의 가능성은 배제할 수 있었다.

### 1. 총상병변내 내피세포 증식의 클론성 분석

3예로부터 모두 15개의 총상병변에 대해 '증식된 내피세포'의 클론성 분석을 시행하였고 HUMARA는 이중 14개의 총상병변에서 가능하였다. 14개 총상병변의 clonality ratio는  $0.69 \pm 0.20$ (mean+S.D.) (range : 0.38-0.95)로 unbalanced methylation (clonality ratio<0.25)을 보인 예는 없이 모두 다클론성 이었다(Fig. 1-3).

### 2. 중막비후가 있는 작은 폐동맥에서 평활근세포 증식의 클론성 분석

중막비후가 현저한 5개의 근육형 폐동맥에서 평활근세포 증식의 클론성을 분석하였다. 5개 병변의 clonality ratio는  $0.81 \pm 0.13$ (mean  $\pm$  S.D.)(range:



**Fig. 1.** (A) Morphology of one plexiform lesion from patient #1 with pulmonary hypertension associated with CREST syndrome, showing prominent intravascular proliferation of endothelial cells, (a) H&E staining ( $\times 400$ ) and (b) immunostaining for factor V  $\text{III r.Ag}$  ( $\times 400$ )  
 (B) HUMARA data of the plexiform lesion of panel (A), proliferated smooth muscle cells and lung parenchymal cells from patient #1. Presence of one band after restriction endonuclease Hha I digestion (Hha I+ column) represents monoclonality and presence of two bands after Hha I digestion represents polyclonality. The plexiform lesion showed two bands after Hha I digestion, which indicates the proliferating endothelial cells in this plexiform lesion is polyclonal. Similarly proliferated smooth muscle cells were also polyclonal. On the other hand in the analysis of HEC-1-A cells we can see only one band after Hha I digestion, which indicates these cells are monoclonal.

0.62-0.92)로 모두 다클론성 이었다(Fig. 1-3).

### 고 찰

CREST 증후군은 진행성 전신성 경화증(progressive systemic sclerosis : 이후 PSS로 칭함)의 이형(variant form)으로 calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly

와 telangiectasias를 특징으로 하고, PSS와는 달리 병의 진행이 늦은 것으로 알려져 있다. CREST 증후군 환자에서 관찰되는 폐의 조직병리학적 변화는 1) 폐혈관병변 2) 폐섬유화 3) 소기도질환 및 4) 전술한 세가지 병변의 혼합형 등 네가지 유형으로 구분되며 이중 폐혈관병변은 환자의 60% 이상에서 관찰되는 가장 흔한 소견이다<sup>1</sup>. 한편 임상적으로는 PSS 전체 환자의 9%에서 폐고혈압이 발생하는 것에 반해,

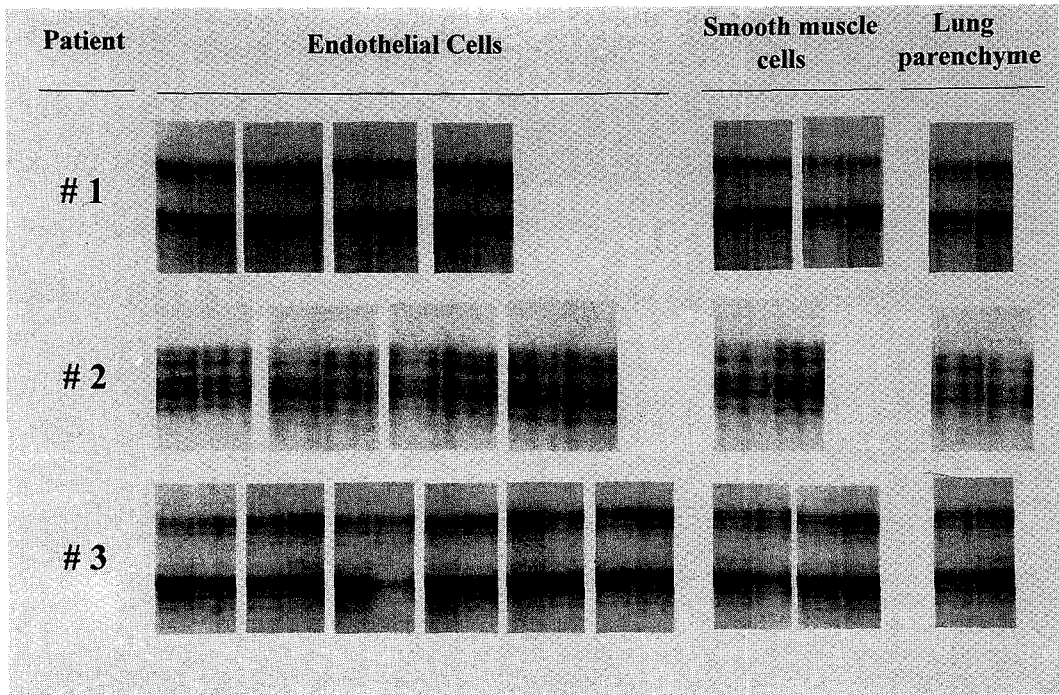
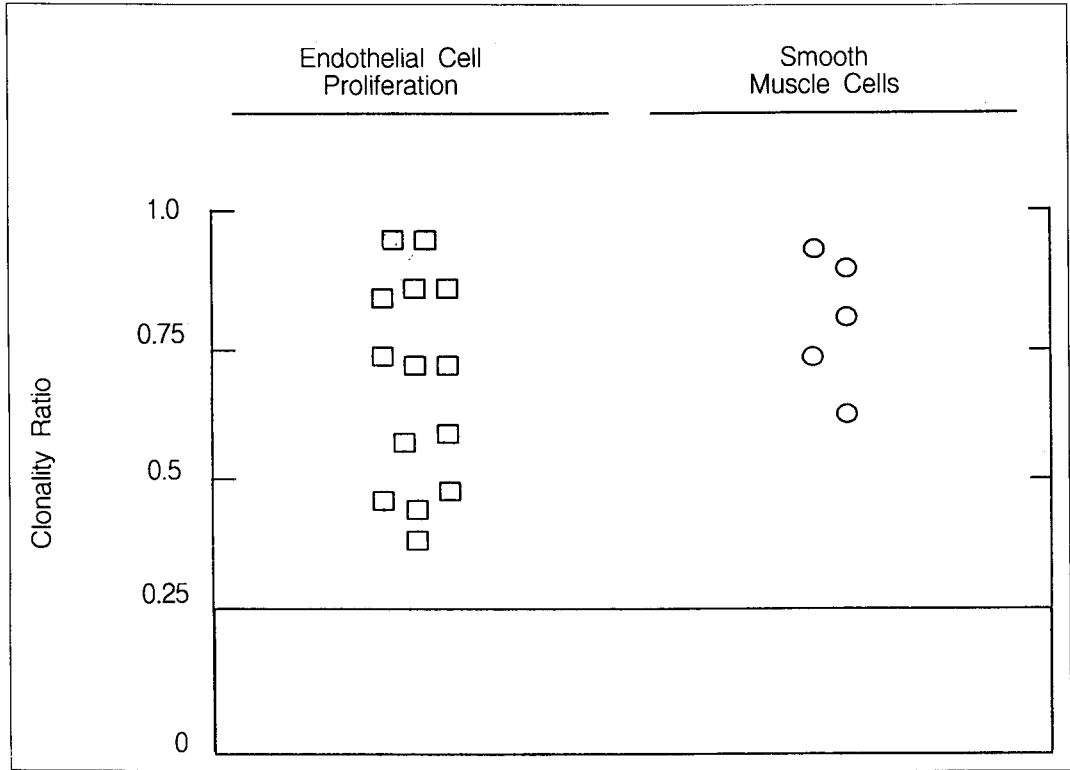


Fig. 2. HUMARA of representative examples of polyclonal plexiform lesions, polyclonal pulmonary artery smooth muscle cell and lung samples in patients (#1, #2, #3) with pulmonary hypertension associated with CREST syndrome.

CREST 증후군 환자의 50%에서 심폐질환의 증거 없이 독립적으로 폐고혈압이 발생하며, 이 환자들의 이년 생존률은 40%로, 폐고혈압이 없는 환자에 비해 예후가 매우 나쁘다<sup>2</sup>. CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압은 여자에 호발하고 Raynaud's phenomenon을 주증상으로 하는 환자에서 잘 발생하며 폐섬유화 등 다른 전신증상과 상관관계가 없다<sup>3</sup>. 또한 폐고혈압은 anticentromere와 anti-Scl 70 항체와도 연관성이 없어<sup>4</sup> CREST 증후군에 동반되어 발생하는 하지만 PSS와는 다른 독자적인 병리기전을 가지는 것으로 추측된다. 더욱이 CREST 증후군 환자에서 면역억제 치료 후에 대부분의 증상은 호전을 보이나 폐고혈압만은 전혀 호전되지 않는 경우를 자주 관찰하게 된다. 이상의 소견으로 CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압은 PSS에 의한 이차성 폐고혈압으로 분류되지 않고 원발성 폐고혈압의 이형으로 분류되기도 하였

다<sup>5</sup>. 그러나 본 연구 결과 CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압에서 총상병변내 내피세포 증식은 원발성 폐고혈압과는 달리 다클론성 이었으며 이는 이 질환이 원발성 폐고혈압과는 다른 병리기전을 가지는 이차성 폐고혈압임을 시사한다.

CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압 환자의 폐동맥에서 관찰되는 조직병리학적 소견은 혈관내막(intima)의 섬유탄성증(fibroelastosis), 중막비후(medial hypertrophy) 및 총상병변에 의한 혈관폐색이며 주로 작은크기의 근육형동맥(muscular artery)에서 관찰된다<sup>1</sup>. 소동맥 fibroelastotic plaque내에 현저한 단핵구의 침윤이 관찰되며 이는 자가면역 또는 염증에 의한 혈관내피세포의 손상(endothelialitis)이 병리기전으로 작용할 가능성을 추측케 한다<sup>1</sup>. 총상병변은 원발성 폐고혈압과 일부 이차성 폐고혈압(선천성심질환, HIV 감염, schistosomiasis 등)에서 관찰되며,



**Fig. 3.** Summary of clonality analysis by HUMARA of endothelial cell proliferation in the plexiform lesions and of hyperplastic smooth muscle cells in small pulmonary arteries with medial hypertrophy in three patients with pulmonary hypertension associated with CREST syndrome. All 14 plexiform lesions showed balanced methylation by HUMARA (clonality ratio > 0.25), diagnostic of polyclonal composition of the proliferated endothelial cells. Clonality of hyperplastic smooth muscle cells was analyzed in 5 small pulmonary arteries with medial hypertrophy. Balanced methylation was found in all of these lesions.

비가역성 혈관변화의 지표이다<sup>7</sup>. 형태학적으로 총상병변은 지름 50-300 $\mu$ m의 작은 근육형동맥에 동맥류(aneurysm)를 형성하고 그 내부는 혈관내피세포의 증식으로 폐색되어 있으며 증식된 혈관내피세포는 작은 혈관 열기(plexus)를 이루기도 한다<sup>7</sup>. 또한 이 병변은 malignant glioma에서 관찰되는 neovascularization과 유사하여 angiogenic process의 일종일 가능성도 추측케 한다<sup>8</sup>. 총상병변은 원발성 폐고혈압 환자의 80%에서 관찰되며 총상병변이 있는 환자는 임상적으로 보다 중한 증상을 보이고 예후도 더욱 나쁜 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>. 그러나 총상병변이 원발성 폐고

혈압뿐 아니라 일부 이차성 폐고혈압에서도 관찰되는 점은 총상병변이 폐고혈압의 병리기전에서 일차적 역할을 하기보다는 단순히 심한 폐고혈압에 의한 이차적 현상일 가능성도 생각할 수 있다. 최근 연구자는 원발성 폐고혈압에서 총상병변내의 내피세포 증식이 단일 클론성임을 발견하였다<sup>10</sup>. 단일클론성 증식은 신생물 생성의 가장 초기 변화이며, 유전적 변성이 그 병리기전임을 시사한다. 즉 원발성 폐고혈압은 유전적 변성을 병리기전으로 하는 혈관증식성 신생물질환(angio-proliferative neoplastic disorder)임을 알게되었다. 한편 선천성 심장질환에 의한 이차성 폐고혈압에



서 총상병변내 내피세포의 증식은 다클론성으로 관찰되었다<sup>10</sup>. 그동안 원발성과 이차성 폐고혈압의 구분은 폐고혈압을 유발할 수 있는 기저질환의 유무에 의존하는 임상적 판단이었으나, 이제는 총상병변내 내피세포 증식의 클론성(clonality)으로 원발성과 이차성을 객관적으로 구분할 수 있게 되었다. 한편 폐고혈압은 조직병리학 소견상 혈관내피세포 증식의 유무에 따라 두 군으로 나눌 수 있다. 만성폐색성 폐질환과 특발성 미만성 간질성 폐섬유화증에서 폐고혈압은 혈관내피세포 증식 소견을 보이지 않으며, 원발성 폐고혈압, 심내단락이 있는 선천성 심장질환과 CREST 증후군에 동반된 폐고혈압은 혈관내피세포 증식 소견을 보인다<sup>14</sup>.

세포의 단일클론성 증식은 하나의 세포가 선천성 유전적 변화 또는 체세포돌연변이(somatic mutation)와 같은 아주 드문 후천성 유전적변화에 의해 주위의 다른 정상세포에 비해 잘 자랄 수 있는 성질을 갖게되어 생긴다<sup>15</sup>. Colonic gland hyperplasia에서 adenoma를 거쳐 colon cancer에 이르는 일련의 과정을 분석해보면 단일클론성 증식은 신생물 형성의 가장 초기단계임을 알 수 있다<sup>16</sup>. 반면에 창상치유(wound healing)와 같은 반응성 과형성(reactive hyperplasia) 조직에서 관찰되는 세포증식은 다클론성이다. 단일클론성 증식은 다른 종류의 암에서도 관찰되며<sup>17,18</sup>, desmoid tumor<sup>19</sup>나 평활근종(leiomyoma)<sup>20</sup>과 같은 mesenchymal tumor에서는 이 조직이 신생물인지 또는 반응성 과형성인지를 감별하기 위해 클론성을 조사하기도 한다. 본 연구 결과 CREST 증후군에 동반된 폐고혈압에서 관찰되는 총상병변내 내피세포증식이 다클론성이라는 사실은 자가면역 또는 염증에 의한 혈관내피세포의 손상이 이 질환의 주 병리기전일 것으로 추측케 하며 치료는 다른 이차성 폐고혈압에서와 마찬가지로 원인질환의 치료가 중심이 될 것으로 사료된다.

클론성분석에 상존하는 문제점은 normal monoclonal patch의 개념이다. 태아 발생초기에 하나의 X 염색체가 불활성화된 후 이 세포는 이후 발생과정중에 계속 분열성장하여 monoclonal patch를 형성하게 된

다. 만일 이렇게 형성된 normal monoclonal patch가 클론성분석에 사용된 조직보다 크다면 반응성 과형성 조직도 단일클론성의 결과를 보일 수 있다. 특히 본 연구와 같이 microdissection 기법을 이용하여 300  $\mu\text{m}$  미만의 작은 조직을 분석할 때는 normal monoclonal patch의 문제를 반드시 해결해야 한다. 몇가지 조직에서는 이미 normal monoclonal patch의 존재와 크기가 알려져 있고<sup>21,22</sup> 대동맥과 관상동맥의 중막내 평활근세포의 normal monoclonal patch에 대해서도 연구결과들이 알려져 있다<sup>23</sup>. 그러나 혈관내피세포에서 normal monoclonal patch의 존재와 크기에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 연구자는 선천성심질환에 의한 이차성 폐고혈압에서 19개의 총상병변이 모두 다클론성을 보고한 바 있다. 반면에 원발성 폐고혈압에서는 비슷한 크기의 총상병변 22개중 17개 (77%)가 단일클론성 이었다<sup>10</sup>. 이 결과는 원발성 폐고혈압에서 관찰된 단일클론성이 normal monoclonal patch에 의한 것이 아니며 혈관내피세포에서 normal monoclonal patch의 크기는 총상병변보다 작다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서 normal monoclonal patch의 문제점은 극복될 수 있다.

## 요 약

### 연구 배경 :

CREST 증후군은 전신성 경화증의 이형으로 전신성 경화증에 비교하여 병의 진행이 늦은 것으로 알려져 있다. 하지만 CREST 증후군 환자의 약 50%에서 폐나 심장질환의 증거 없이 폐고혈압이 발생하며, 이러한 환자들의 이년 생존률은 40%로 폐고혈압이 없는 환자에 비해 예후가 매우 나쁘다. 그러나 CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압의 원인과 병리기전에 대해서는 전혀 알려진 바 없으며 막연히 원발성 폐고혈압의 이형(variant form) 또는 이차성 폐고혈압으로 분류되고 있다. 총상병변(plexiform lesion)내 증식된 내피세포의 클론성 검증은 폐고혈압을 원발성과 이차성으로 나누는 기준이 되고 있다. 이에 저자들은

CREST 증후군이 동반된 폐고혈압 환자의 총상병변 내피세포의 클론성을 분석함으로써 CREST 증후군이 동반된 폐고혈압이 원발성인지 이차성인지를 알아보 고자 하였다.

**방 법 :**

폐고혈압을 동반한 CREST 증후군 여자환자에서 얻은 폐조직의 파라핀 block을 사용하여 microdissection 방법으로 총상병변내에 증식된 내피세포를 분리한 후 X-염색체의 methylation pattern을 이용하여 클론성 분석을 시행하였다. 같은 방법으로 중막 비후를 보이는 혈관의 혈관 평활근과 폐실질의 클론성도 분석하였다.

**결 과 :**

14개 총상병변의 '증식된 내피세포'의 클론성은 모두 다클론성 이었다. 또한 중막비후가 현저한 5개 폐동맥의 평활근세포 클론성도 모두 다클론성 이었다.

**결 론 :**

이상의 결과는 CREST 증후군에 동반되는 폐고혈압이 원발성 폐고혈압과는 다른 병리 기전을 갖는 이차성 폐고혈압임을 시사한다.

**참 고 문 헌**

1. Yousem SA. The pulmonary pathologic manifestations of the CREST syndrome. *Hum Pathol* 1990;21:467-74.
2. Stupi AM, Steen VD, Owens GR, Barnes EL, Rodnan GP, Medsger TA. Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of systemic sclerosis. *Arthritis Rheu* 1986;29(4): 515-24.
3. Owens GR, Fino GI, Herbert DL. Pulmonary function in progressive systemic sclerosis: comparison of CREST syndrome variant with diffuse scleroderma. *Chest* 1983;84:546-50.
4. Steen VD, Ziegler GL, Rodnan GP. Clinical and laboratory associations of anticentromere antibody in patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheu* 1984;27:125-31.
5. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 1987;107:216-23.
6. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994; 144:275-85.
7. Wagenvoort CA, Wagenvoort N. Primary pulmonary hypertension. A pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation* 1970;42:1163-84.
8. McComb RD, Jones TR, Pizzo SV, Bigner DD. Immunohistochemical detection of factor V<sup>III</sup>/ von Willebrand factor in hyperplastic endothelial cells in glioblastoma multiforme and mixed glioma-sarcoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1982; 41:479-89.
9. Palevsky HI, Schloo BL, Pietra GG, Weber KT, Janicki JS, Rubin E, et al. Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation* 1989;80:1207-21.
10. Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tuder RM. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary hypertension. *J Clin Invest* 1998;101(5): 927-34.
11. Fujita M, Enomoto T, Wada H, Inoue M, Okudaira Y, Shroyer KR. Application of clonal analysis: Differential diagnosis for synchronous primary ovarian and endometrial cancers and metastatic cancer. *Am J Clin Pathol* 1996;105: 350-59.

12. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *Hpa* II and *Hpa* I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X-chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229-39.
13. Willman CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE, McClain KL, Duncan MH, et al. Langerhans'-cell histiocytosis(Histiocytosis X)-A clonal proliferative disease. *N Engl J Med* 1994;331:154-60.
14. Tuder RM, Lee SD, Cool CC. Histopathology of pulmonary hypertension. *Chest* 1998;114(1):1-6.
15. Fialkow PJ. Use of genetic markers to study cellular origin and development of tumors in human females. *Adv Cancer Res* 1972;15:191-226.
16. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238:193-7.
17. Noguchi S, Aihara T, Koyama K, Motomura K, Inajū H, Imaoka S. Discrimination between multicentric and multifocal carcinoma of the breast through clonal analysis. *Cancer* 1994;74: 872-77.
18. Shroyer KR, Gudlaugsson. Analysis of clonality in archival tissue by polymerase chain reaction amplification of PGK-1. *Hum Pathol* 1994;25: 287-92.
19. Lucas DR, Shroyer KR, McCarthy PJ, Markham NE, Fujita M, Enomoto TE. Desmoid tumor is a clonal cellular proliferation : PCR amplification of HUMARA for analysis of patterns of X-chromosome inactivation. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:306-11.
20. Mashal RD, Fejoz MLS, Friedman AJ, Mitchner N, Nowak RA, Rein MS, et al. Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origin of uterine leiomyomata and the secondary nature of cytogenetic aberrations in the development of leiomyomata. *Genes Chromosom Cancer* 1994;11:1-6.
21. Linder D, Gartler SM. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase electrophoretic variants in different tissues of heterozygotes. *Am J Hum Genet* 1965;17:212-20.
22. Tsai YC, Lu Y, Nichols PW, Zlotnikov G, Jones PA, Smith HS. Mosaicism in human epithelium: Macroscopic monoclonal patches cover the urothelium. *J Urol* 1995;153:1697-700.
23. Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Benditt EP, Schwartz SM. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1997;151:697-05.