

세포고사의 핵의학영상

원자력의학원 싸이클로트론응용연구실¹, 핵의학과²
이태섭¹ · 천기정²

In Vivo Nuclear Imaging of Apoptosis

Tae Sup Lee, Ph.D.¹ and Gi Jeong Cheon, MD.²

¹Laboratory of Cyclotron Application and ²Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea

Apoptosis plays a role in the pathophysiology of many kinds of diseases and in the response of treatment. Compared to the necrosis, the apoptosis is a genetically controlled and energy-dependent process which removes the unwanted cells from the body; programmed cell death or cell suicide. During the apoptosis, phosphatidylserine is expressed in the cytoplasmic outer membrane in the early phase. Annexin V, an endogenous human protein (MW=35 kD), has an affinity of about 10⁻⁹ M for the phosphatidylserine exposed on the outer membrane of apoptotic cells. Annexin V can be radiolabeled with ^{99m}Tc by HYNIC or EC chelators, which can be used as an radiotracer for the in vivo imaging of apoptosis. In this article, we reviewed the apoptosis, radiolabeling of annexin V, and the experimental and clinical data using annexin V imaging. (Korean J Nucl Med 38(2):190-197, 2004)

Key Words: Apoptosis, ^{99m}Tc-annexin V

세포고사

세포죽음은 조직화되고 정렬화되어 있는 세포죽음인 세포고사(apoptosis)와 조직화되지 않은 비생리화적인 형태의 세포죽음인 세포괴사(necrosis)로 크게 대별된다. 세포고사는 조직내에서 단일세포가 제거되는 세포죽음의 한 형태로서, "dropping off of leaves from tree"라는 그리스 어원에서 유래하는 용어이다. 이는 척추동물의 발생과정에서 조직 형성을 담당하는 예정된 세포 죽음(programmed cell death)으로서 다세포 생물체에서 불필요하거나 손상된 또는 위험한 요소를 가진 세포를 주변의 정상적인 세포들로부터 제거하여 구조적, 기능적으로 조직의 항상성을 유지하게 함으로서 적절한 발생과 기능의 형성에 있어 중요하다. 세포괴사는 다세포 생물의 정상적인 항상성 유지를 위한 반응이 아니라 비생리화적인 자극에 의한 조직 또는 장기 등에서 나타나는 과정으로서 대부분의 질병과의 관련성이 적다.¹⁾

세포고사(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)는 진행과정에서 형

태화적인 차이를 보인다. 세포고사는 초기 단계에서 세포 자체에는 변화가 없이 세포막의 뒤뜰림 현상(membrane blebbing)이 나타나고 세포고사가 진행하면서 특징적으로 세포고사소체(apoptotic body), 염색체 응축과 핵의 분절을 동반하며, 세포크기가 축소되면서 세포죽음에 이르기 때문에 염증반응을 동반하지 않는다. 세포고사와 달리 세포괴사는 미토콘드리아, 내형질막 등이 확장되며 전해질 이동에 장애가 생기고, 이로 인해 원형질막이 파괴되기 때문에 염증반응을 동반하는 세포용해 현상을 나타낸다(Table 1).

세포고사 과정은 진화학상으로 매우 유사하며 세포가 가진 고유한 과정으로서 유전적으로 형성되는 활성 과정과 외부적으로

Table 1. Comparison between Apoptosis and Necrosis

	세포고사(Apoptosis)	세포괴사(Necrosis)
자극원	생리학적	병리학적
발생	단일세포	세포군
가역성	없음(형태학적변화 이후)	있음(회귀불가지점전까지)
기저막부착능	초기상실	후기상실
세포내소기관	후반기팽창	초기에 팽창
리소좀효소의방출	없음	있음
핵	핵막파열(karyorrhexis)	핵막소실(karyolysis)
염색체	일정한크기로축소, 응축	불규칙한 형태로 엉김
DNA 분절현상	정형분절(~200bp)	비정형분절
세포변성	세포고사소체형성	팽창 및 파괴
탐식유무	있음	없음
염증반응	없음	있음
흔적현상	없음	있음

• Received: 2004. 4. 6. • Accepted: 2004. 4. 10.
• Address for reprints: Gi Jeong Cheon, M.D., Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, 215-4 Gongneung-Dong, Nowon-Gu, Seoul 139-706, Korea
Tel: 02) 970-1273, Fax: 02) 970-1341
E-mail: tarry@kccch.re.kr

유래하는 여러 가지 단백질, 시토카인, 호르몬, 방사선, 산화 스트레스(oxidative stress), 저산소(hypoxia) 등에 의하여 활성화되는 기전으로 구별된다. 이러한 세포고사의 기능 이상은 많은 종류의 질병의 유발 및 진행 과정에 관여한다. 신경계에서의 세포고사 기능항진은 알츠하이머 병(Alzheimer's disease), 척수신경 이상증(Spinal muscular dystrophy), 파킨슨씨 병(Parkinson's disease), 운동신경 질환(motor neuron disease), 뇌졸중(Stroke) 등을 유발하거나 병의 진행과정에 관여하며, 면역반응에서는 T 림프구의 세포고사 현상으로 중증 면역결핍증(severe immunodeficiency syndrome)과 후천적 면역결핍증(AIDS) 등을 유발한다. 세포고사가 불충분한 경우는 세포고사를 유도하는 유전자의 변이에 의한 기능상실과 세포고사를 억제하는 유전자의 변이에 의한 기능증가 등으로써 종양의 발생을 유도하게 된다. 또한 세포고사는 면역반응에서 음성 선택과정에서 B 림프구와 T 림프구의 사멸에서 그 예를 찾아볼 수 있으며, 종양의 방사선치료, 화학치료, 적절한 호르몬치료시에 유발될 수 있다. 세포고사는 종양세포의 죽음에 있어 유일한 형태는 아니지만 대부분의 종양에 있어서 가장 잘 알려진 세포 죽음의 한 형태로 알려져 있다.²⁾

세포고사의 기전

세포고사는 외부 자극 또는 내부 자극에 의하여 그 과정이 시작된다. 세포고사는 세 가지 다른 단계로 구별되는데 세포가 자극을 받아 비가역적으로 사멸에 이르게 되는 개시기(commitment or lag phase), 주요한 구조적 변화가 일어나는 실행기(execution phase), 식세포작용에 의하여 세포 잔유물이 제거되는 제거기(clearance phase)로 구분된다.³⁾ 세포의 국소적인 외부환경에는 생존을 증가시키는 자극(성장인자, 세포간 접촉, 호르몬 등)과 세포 죽음을 유도하는 자극(바이러스 감염, 방사선, 화학 물질 등)이 있으며 이러한 자극들의 균형이 죽음을 유도하는 자극으로 변화하게 되면 세포고사 과정을 시작하게 된다. 개시된 세포고사 과정은 일정한 지연시간(lag phase)을 가지는데 이는 세포의 종류, 자극의 인자와 정도 그리고 자극 시간, 주변 환경, 다양한 사멸 조절인자들의 발현 정도에 따라 결정되며 그 양상은 일정하지 않다.

개시기에서 다양한 종류의 자극들이 세포에 영향을 미치면 세포내의 다양한 기전에 의하여 공통의 세포내 기전인 caspase를 활성화하게 된다. Caspase는 인터루킨전환효소 과에 속하는 단백질 분해효소로서 세포내의 구조적 변화가 나타나기 이전에 활성화된다.⁴⁾ 외부자극과 함께 미토콘드리아는 세포고사에 있어서 중추적인 역할을 수행한다.⁵⁾ 미토콘드리아 막에는 시토크롬 c

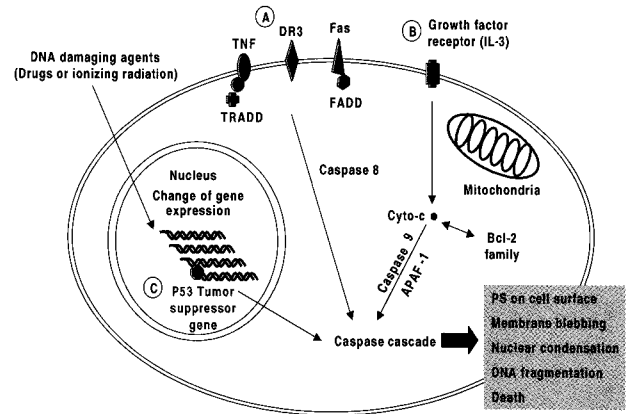


Fig. 1. Simplified representation of apoptosis-inducing mechanism. Three distinct pathways can result in apoptosis: activation of death receptor (A), withdrawal of growth factor (B), DNA damage by drugs or ionizing radiations leading to p53-induced apoptosis. The first pathway leads to activation of caspase cascade. The second pathway leads to release of cytochrome c from mitochondria and is regulated by Bcl-2 protein family. Once the caspase cascade involving the key caspase, caspase 3, is activated, cell death was automatically result. During apoptosis, inner leaflet phosphatidylserine (PS) is expressed on outer leaflet.

(cytochrome c)가 존재하며 자극시에 세포질로 방출되고 이는 세포고사를 유도하는 caspase 3을 활성화시키는 기능을 한다. 즉 미토콘드리아 막의 전위가 상실됨으로서 전자전달계 시스템이 붕괴되고 이는 결과적으로 자유라디칼(free radicals)의 생성이 증가되고 궁극적으로 세포고사를 유발하게 된다.⁶⁾ 이러한 미토콘드리아에서의 시토크롬-c의 방출은 모든 세포고사 과정에서 나타나는 현상은 아니지만 미토콘드리아는 생체내에서 중요한 스트레스 반응을 매개하는 세포내 소기관이다. 이러한 세포고사의 조절을 담당하는 복잡한 조절 작용과 분자수준의 기전에 관해서는 많은 보고가 있어왔다.⁷⁻⁹⁾ 세포고사의 기전을 크게 3가지의 작용 경로로 구별하여 Fig. 1에 나타내었다. 첫번째 경로는 death receptor에 의한 신호전달 체계로서 Fas나 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)의 작용으로 인하여 caspase가 활성화 되는 경로이며, 두 번째 경로는 성장인자의 제거에 의한 세포고사 경로로서 인터루킨-3(IL-3)의 작용에 의하여 미토콘드리아에서 시토크롬 c가 방출하게 되고 이로서 caspase가 활성화 되는 경로이며 이러한 경우에는 Bcl-2 과에 속하는 단백질의 조절을 받게 된다. 세 번째 경로는 DNA 상해에 의한 세포고사 경로로서 전리방사선이나 항암제등의 약물에 의하여 p53 경로가 활성화되고 이로서 caspase가 활성화 되는 방식이다. 이러한 세가지 경로에 의하여 caspase 경로가 활성화 되면 세포외막에 phosphatidylserine이 나타나게 되고 세포막 뒤틀림 현상과 핵 농축, DNA 분절현상 등이 비가역적으로 일어나게 된다.

세포고사의 실행기에서 가장 특징적인 현상 중에 하나는 세포 내막에 존재하는 음성 전하를 띤 인지질인 phosphatidylserine의 세포외막으로의 선택적인 이동하는 현상이다.⁷⁾ 정상적인 세포막의 인지질은 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, phosphatidylserine의 4가지 성분으로 구성된다. 이러한 인지질은 세포막내에 불균일하게 분포하여 세포막으로서의 여러 가지 기능을 수행한다. Phosphatidylserine은 translocase와 floppase의 작용에 의하여 세포내막에 주로 존재한다. 이 효소들은 phosphatidylserine을 능동적으로 세포막 안쪽으로 이동시키고 다른 인지질은 세포막 바깥쪽으로 이동시킨다. 세포가 세포고사를 개시하여 caspase 활성화되면 이러한 효소들의 작용이 정지하게 되고 인지질의 분포를 일정하게 하는 scramblase라고 하는 효소의 작용이 활성화되어 결과적으로 phosphatidylserine이 세포외막으로 이동하게 된다. phosphatidylserine의 세포외막으로 이동을 측정하는 것이 세포고사의 개시기에 속하는 세포를 확인하여 세포고사를 영상화하는 방법으로서 유용하게 사용될 수 있는 것이다.

방사표지 Annexin V

체내의 세포고사 현상을 영상화하려는 많은 시도들 중에서 세포고사의 개시기에 세포외막으로 이동한 phosphatidylserine을 annexin V를 이용한 핵의학적인 방법으로 영상화하는 것이 가장 성공적인 방법 중의 하나이다. phosphatidylserine의 특징적인 머리 구조는 모든 포유동물에서 나타나는 구조로서 동물실험 결과를 사람에게 직접 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

Annexin V는 염색체 4번(4q26~4q28)에 존재하는 ANXA5 유전자가 암호화하고 있는 322개의 아미노산으로 구성되는 35 Kd의 분자량을 가지며 태반, 내피세포, 평활근세포 등의 세포질 내에 정상적으로 존재하는 내재 단백질이다. 이는 세포막에 존재하는 phosphatidylserine에 대하여 칼슘-의존적인 고친화도(1~10 nM)를 가지며 가역적으로 결합하는 특성을 가진다. annexin V는 정상적으로 중성 인지질이나 양성 인지질과는 결합하지 않는다. 세포고사 유발시에 annexin V 결합 부위는 현저하게 증가되며, 정상적으로 176 개의 결합 부위를 가지는 적혈구의 경우 calcium ionophore인 A23187의 자극시에 300,000 개 이상으로 결합부위가 증가되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 이러한 특성으로 인하여 세포고사를 유발하는 세포를 계측하기 위하여 fluorescein이 표지된 annexin V를 이용한 방법이 일반적인 세포고사 평가 방법으로 사용되어 왔다.⁴⁾ 세포고사가 유발되는 세포를 핵의학적인 방법으로 평가하는 방법은 annexin V에 방사성동위원소를 표

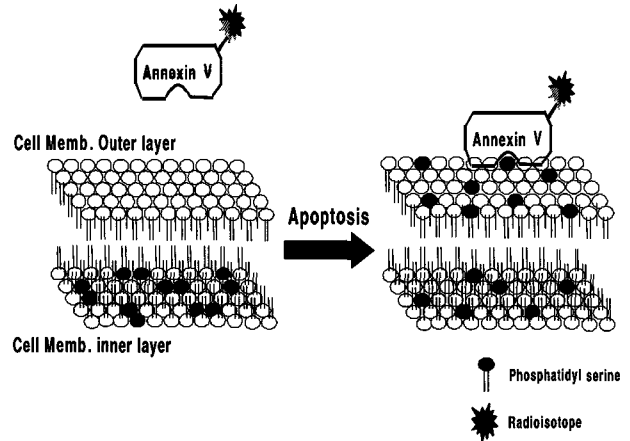


Fig. 2. Schematic representation of in vivo imaging of apoptosis using radiolabeled annexin V. Normal cells maintain strictly asymmetric lipid bilayer composition, with phosphatidylserine (PS, green circles) facing the cytosol. During apoptosis, these PS molecules become exposed at the outer membrane leaflet. radiolabeled annexin V can bind with high affinity to the exposed PS in the presence of millimolar Ca^{2+} concentration, and then PS bound radiolabeled annexin V can be imaged.

지하여 세포외막에 나타나는 phosphatidylserine에 결합시킴으로서 가능하게 되었으며(Fig. 2), 체내의 세포고사의 평가를 위하여 핵의학적인 영상기법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

Annexin V을 암호화하는 유전자가 클로닝되고 재조합 단백질의 생산이 가능함으로써 순수한 형태의 annexin V를 상업적으로 이용 가능하게 되었으며 방사성 동위원소 표지를 위한 키레이트화 부위를 유전자 재조합 과정을 통하여 단백질의 말단에 발현하는 방법들도 보고되고 있다.¹¹⁾ 세포고사를 핵의학적인 방법으로 영상화하기 위한 방법으로 방사성요오드나 ^{99m}Tc 등이 주로 표지되어 이용하고 있다. 표지법은 직접 표지법과 간접 표지법이 연구되었으며 방사성요오드의 간접 표지법으로는 Bolton-Hunter reagent 또는 benzoic acid 유도체들이 사용되었고,¹²⁾ ^{99m}Tc의 간접 표지법으로는 N_2S_2 ,^{13,14)} HYNIC,^{15,16)} BTAP¹⁷⁾ 등이 키레이트로서 사용되었다. 표지법에 따라서 다른 생체분포 양상을 나타내었다. 방사성 요오드로 표지한 경우에는 쉽게 탈요오드화 되어 생체 분포 평가에 어려움이 있고, ^{99m}Tc를 직접 표지한 경우에는 간으로의 섭취가 증가되는 현상이 나타났다. 이는 환원제 사용과정에서 단백질의 구조변화에 따른 것으로 생각된다. ^{99m}Tc의 간접표지법 중에서 N_2S_2 와 BTAP를 이용하는 방법은 bowel에 상당량의 방사능이 배출되는 양상과 빠른 혈중 제거율을 나타내었다. HYNIC과 결합된 경우 bowel 배출현상이 없었으며 적은 양이 간으로 섭취되는 양상을 보였으며 N_2S_2 보다는 느린 혈중 제거율을 나타내었다.

^{99m}Tc-HYNIC-annexin V를 이용한 세포고사의 핵영상은 방

사성의약품 주사후 1 시간에서 핵영상기기를 이용한 영상 평가가 가능한 것으로 알려져 있다. ^{99m}Tc 이 표지된 annexin V의 경우 짧은 혈중 반감기(<7 분)와 ^{99m}Tc 의 짧은 반감기(6 시간)로 인하여 6 시간이후에 나타나는 세포고사를 영상화하는 데는 단점으로 작용하게 된다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 annexin V에 polyethylene glycol (PEG)을 접합하여 혈중 반감기를 증가시키는 방법도 보고되었다.¹⁸⁾

최근에는 PET 영상을 위한 ^{18}F 를 이용한 표지방법이 개발되었으며¹⁹⁾ 생체분포 양상은 ^{99m}Tc 를 표지한 annexin V와 비교한 결과 혈중 제거율은 거의 동일한 양상을 나타내었으나 간과 비장, 신장에서의 섭취율은 상당히 적은 것으로 나타났다.²⁰⁾

방사성동위원소가 표지된 annexin V는 심장과 신장의 장기이식, 심장 허혈 및 심근 경색의 평가, 뇌 허혈과 경색 등의 다양한 질환의 평가와 여러 가지 종류의 종양에서 화학치료, 방사선 치료 등의 치료효과 판정에 유용하게 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다.

세포고사의 다른 영상기법

자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI)은 주로 생체내 물분자 중 수소원자의 자기장 내에서 공명현상을 이용하여 영상화하는 기법이다. 생체를 구성하는 성분은 많은 양의 물을 포함하고 있으며(65-75%) 일반적으로 자기공명영상은 다른 영상 기법에 비하여 해상도가 우수하다는 장점이 있다. 자기공명영상을 이용하여 종양의 부피감소를 측정하는 것은 세포고사 정도를 측정하는 가장 간단하고 쉬운 방법 중의 하나라고 할 수 있으나 이 경우는 세포고사의 최종 결과를 확인하는 것이라 할 수 있다.

자기공명영상은 조직내 물의 변화에 매우 민감하여 거대분자에 결합되어 있는 물성분(very short T_2)과 유리물성분(long T_2)의 변화를 T_2 -weighted MRI를 이용하여 구분할 수 있다.²¹⁾ 세포고사가 일어나면 세포의 부피가 감소하고 세포내 점도(intracellular microviscosity)가 증가하게 되어 물분자의 운동이 제한되게 된다.²²⁾ Diffusion-weighted MRI (DW-MRI)은 조직내 물분자가 매우 빨리 확산될 경우 양극성 펄스장 내에서 수소원자의 전자기 신호가 재초점되지 않을 것이라는 가정 하에 물확산(diffusion) 또는 평균확산계수(average diffusion coefficient, ADC)를 측정하여 세포고사를 영상화할 수 있다.²³⁾ Zhao 등²⁴⁾은 cyclophosphamide를 처리하여 세포고사를 유발시킨 RIF-1 종양 생쥐모델에서 종양의 부피감소가 일어나기 전에 ADC가 두배 정도 증가하는 것을 보고하기도 하였다. 이는 물분자의 세포내 확산이 제한되어 있는 세포독성부종(cytotoxic edema)에서

DW-MRI의 신호증가 현상과 같은 원리이다. 하지만 세포고사의 세포부피 감소와 동반되어 일어나는 세포괴사의 세포부종이 함께 있을 경우 MRI의 신호가 상쇄될 수 있는 문제점을 가지고 있으며,²⁵⁾ 실제 임상에 이용할 경우에 중추신경계를 제외한 다른 장기의 영상에 적용할 경우 해석에 어려운 점을 가지고 있다.²⁶⁾

MR을 이용한 여러 종양 모델 실험에서 지질양성자 스펙트럼 중 1.3-ppm 영역의 특이한 자기공명 신호가 보고된 바가 있었는데,^{27,28)} 이 스펙트럼은 종양을 치료한 후 세포고사가 유발될 경우 신호가 증가하는 것이 알려졌다. 이 신호는 세포막 또는 세포질 소체 내의 중성지질 지방산의 메틸렌기(-CH₂-)에 있는 양성자(proton)에 의한 것으로 알려져 있다.^{29,30)} 하지만, 이 신호는 비특이적인 경우가 많아 악성종양, 림프구와 같은 세포의 자극이나 증식, 성장억제 등의 경우에서도 관찰될 수 있다. 그 외에도 세포고사 과정에서 phosphatidylcholine 등의 불포화지방산이 포스포리파제 A₂(phospholipase A₂)에 대한 활성도의 차이를 보인다는 점에 착안하여 다른 파장대의 신호를 측정하거나, (-CH=CH-CH₂-CH=CH- at 2.8 ppm, -CH=CH- at 5.3 ppm) ³¹P MRS를 이용한 phosphatidylcholine의 농도에 의한 신호를 측정하려는 시도들이 있다.³¹⁾

조영 물질을 주사한 후 자기공명영상을 획득하여 세포고사를 영상화하려는 시도들도 있다. Phosphatidylserine (PS)과 특이적으로 결합하는 단백질들이 이미 알려져 있으며, 이들 단백질에 supermagnetic iron oxide (SPIO) 입자를 접합하여 자기공명영상을 통하여 세포외막에 발현된 PS를 지도화(mapping)하려는 시도가 있다. SPIO 입자들은 체내에서 그물내피시스템(reticulo-endothelial system)에 의하여 간이나 비장 등으로 빠르게 제거되는데 입자의 크기는 충분히 작아(34-42 nm) 세포고사 세포들이 있는 곳까지 투과하는 데에는 지장이 없어 T2W-MRI 영상으로 측정이 가능한 것으로 Zhao 등³²⁾은 보고하고 있으며 임상에 적용가능 할지에 대해서는 좀더 많은 연구가 필요한 실정이다.

세포고사의 임상적 역할

많은 종류의 질병들은 세포고사가 너무 많이 일어나거나 너무 적게 일어나는 경우들이라 할 수 있다. 각종 퇴행성 뇌질환이나 허혈성 질환, 악성종양 등의 경우가 이에 해당하는 질환들이다. 악성종양의 경우 세포고사는 종양세포의 죽음의 주된 형태로 항암치료에 의해 세포고사가 유발되었다면 치료에 대한 좋은 반응을 기대할 수 있을 것이다. 따라서 세포고사의 조기 징후를 영상화하는 것은 종양의 부피 변화 전 단계에서 치료효과를 판정하여 적절한 항암제를 선정하고 치료의 최적화를 미리 예측하도록 도

움을 줄 수 있다. 자가면역 질환이나 허혈성 질환과 같은 세포고사가 항진된 경우에 세포고사 영상을 통하여 세포고사의 치료전 진행정도를 파악하고 치료에 따라 세포고사 억제정도를 미리 예측할 수 있을 것이다. 세포고사 영상은 질병의 기전 및 단계를 설명하고 치료에 대한 반응을 예측하는데 유용할 것으로 기대할 수 있다. 현재까지 가장 유용하게 이용할 수 있는 세포고사 영상은 방사성 표지 annexin V를 이용한 세포고사 영상으로, 이 장에서

는 대표적인 질환 또는 질환모델에서 세포고사 영상의 역할 및 임상적 의미들에 대해서 알아보려고 한다(Table 2).

Table 2. Potential Roles for Apoptosis Imaging in Clinical Care*

A. Transplant rejection: Animal studies and early results of human investigations suggest that radiolabeled annexin imaging can identify transplant rejection in the heart with a reliability similar to that of endomyocardial biopsy. Rejection appears as multi-focal zones of increased tracer localization. Experimental studies suggest that the technique will also be useful in liver and lung transplants. If clinical studies support the high sensitivity of this technique, it could eliminate the need for a large fraction of the endomyocardial biopsies now performed as part of the routine care of patients with heart transplants. At this time, physiologic concentration of the radiopharmaceutical in the kidney makes annexin imaging of renal transplants more difficult than other transplanted organs.

B. Early identification of cerebral hypoxic ischemic brain injury: Since apoptosis can be reversed in the early phases of the process, annexin imaging can play a major role in the selection of therapy in the first several hours following stroke in adults, or following difficult delivery in the newborn. If a patient has significant localization in the brain, it is likely that therapy directed to minimizing apoptosis will be useful.

C. Cancer therapy: Animal studies and early results in patients with tumors imaged before and after chemotherapy with annexin V suggest that successful chemotherapy is associated with a marked increase in radiolabeled annexin localization in the tumor. Although clear criteria are not available yet, successful therapy could be identified following a single treatment. Success will be identified by a marked increase in tracer concentration in the tumor (probably exceeding 100% of the baseline tumor concentration).

D. Heart failure: Although the role of apoptosis in heart failure is controversial, it is clear that severe heart failure is associated with cells that stain with the TUNEL technique. As a result, patients with severe heart failure are losing myocytes. Current approaches to therapy are largely subjective, relying on improvements in exercise tolerance, or objective measures of cardiac performance, such as ejection fraction. Since these patients have a nearly inexorable downhill course, identifying therapy that reduces apoptotic cell death may help prolong life, even in the absence of improving symptoms or exercise tolerance.

E. Bone: Osteoporosis is a major public health problem. The effectiveness of the bone sparing diphosphonates is related to the induction of apoptosis in osteoclasts, resulting in a reduction of bone mineral loss. The current methods of evaluating the therapeutic efficacy of these agents utilizes a direct determination of bone mineral content, based on transmission of sound or attenuation of x-rays. These determinations change slowly, requiring intervals of 1-2 years between measurements to define whether a course of therapy is successful. A technique that could measure apoptosis of osteoclasts may predict the alterations in mineral mass much earlier.

* Adopted from Blankenberg et al,³⁶⁾ Apoptosis 2001.

1. 장기이식거부(Organ Transplant Tejection)

Blankenberg 등^{33,34)}은 annexin V 영상이 심장, 폐, 간이식 등의 급성 거부반응을 영상화할 수 있다고 보고하였다.(Fig. 3) 또한, 급성거부반응이 일어난 동물모델에서 면역억제치료 후 annexin V의 섭취가 감소하는 양상으로 적절한 면역억제치료 여부를 평가할 수 있음을 제시하기도 하였다.³⁴⁾(Fig. 4) 하지만, 실제 임상에서 접하는 장기이식 거부반응들은 급성 거부반응도 있지만, 이보다는 낮은 정도의 세포고사와 염증반응이 점진적으로 진행하거나 이식장기의 혈관장애들이 동반되어 장기간의 경과를



Fig. 3. Imaging of cardiac allograft transplant rejection with radiolabeled annexin V. Prone anterior 10-min acquisitions (256X256 matrix, parallel hole collimator) of abdominal heterotopiccardiac isograft and allograft 5 days after transplantation using an injection of 900 mCi of ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V. Arrowhead= location of cardiac graft. From Blankenberg et al. Copyright (1998) National Academy of Sciences, USA.

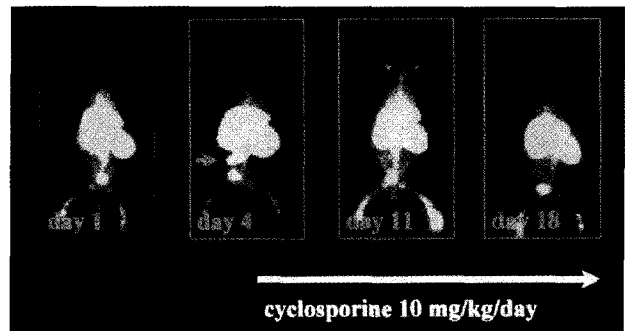


Fig. 4. Imaging of immunosuppressive therapy of abdominal heterotopic cardiac allografts with cyclosporine using the same imaging parameters as in Fig. 3. Arrowhead = location of graft. Blankenberg et al. Copyright (1999) Society of Pediatric Radiology, USA.

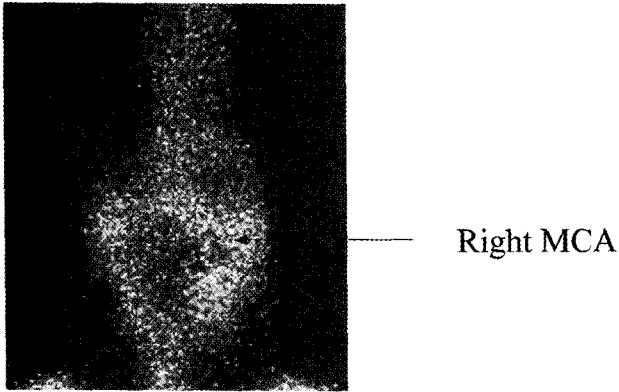


Fig. 5. Imaging of cerebral reperfusion injury in rats. Vertex pinhole view of a rat with cerebral ischaemia due to 2 h of temporary intraluminal thread occlusion of right middle cerebral artery (MCA) origin. Note the marked uptake of annexin in the right MCA territory. Blankenberg et al. Copyright (2000) British Nuclear Medicine Society, UK.

거치는 만성 거부반응들이 더 문제가 되는 경우가 많다. 이 경우 낮은 정도의 세포고사 진행정도는 annexin V를 이용한 방법으로는 영상화하기가 어려운 단점이 있을 수 있다.²⁶⁾

2. 저산소-허혈 손상(Hypoxic-ischemic Injury)

뇌졸중이나 심근경색과 같은 급성 저산소-허혈성 손상에서는 중심부의 세포괴사와 주변부(penumbra)의 세포고사 손상을 초래하게 된다. 세포고사 영상은 중심괴사 주변부의 세포고사 범위를 영상화하여 유용한 역할을 할 수 있다. 24-48 시간 후부터 중심괴사 주변부에서 세포고사가 진행되는 것으로 알려져 있는데, 조기에 케스파제(caspase) 억제제와 같은 세포고사 억제제를 사용하면 세포고사 부위의 손상을 억제하거나 최소화할 수 있다. 또한 저산소-허혈 손상 이후의 재관류 손상에 대한 예측으로 세포고사 영상을 이용하여 허혈성 손상 이후 재관류에 의한 이차 손상을 미리 예측하여 이에 대한 치료 방침을 결정하는 데 도움을 줄 수도 있을 것이다. Blankenberg 등^{35,36)} 동물모델에서 annexin V를 이용하여 재관류 손상에 대한 영상을 획득할 수 있었으며 이는 단순한 혈액뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)의 손상에 의한 것은 아님을 제시하였다(Fig. 5).

3. 종양(Oncology)

여러 종류의 종양에서 항암치료효과가 종양세포의 감소(cytoreduction)와 밀접한 관련이 있다는 것은 잘 알려져 있다. 항암치료의 반응을 평가하는 것은 대부분 CT, MRI, 초음파검사와 같은 해부학적 영상을 이용한 종괴의 부피 감소를 평가하는 것이다. 하지만 종양의 종류에 따라서 항암치료에 의한 종양의



Fig. 6. Annexin V detection of necrotic versus apoptotic tumor cell death in flank tumors of mice following chemotherapy. The animal on the left demonstrated a greater than 363% increase in left flank 38C13 murine B cell lymphoma annexin V uptake 20 h after treatment with 100 mg/kg of cyclophosphamide (i.p.) compared with untreated flank lymphoma (animal on right). Blankenberg et al. Copyright (2000) European Association of Nuclear Medicine.

부피 감소는 일정한 시간이 경과한 후에 가능하여 때에 따라 너무 늦게 평가되거나 일부 골수내 병변과 같은 경우에는 크기의 변화만으로는 치료효과를 판정하기가 불가능한 경우도 있다. 세포고사 영상은 이러한 병변의 부피 감소 이전에 항암치료에 의해 유발된 세포고사를 초기 단계에서 영상화함으로써 치료에 대한 반응을 조기에 예측할 수 있게 한다. 자기공명영상을 이용하여 세포고사 영상법들(proton lipid MRS, diffusion-weighted MRI 등)로 평가하는 방법들이 제시되고 있으나 아직까지는 세포고사 영상에 이용하기에는 제약점이 많으며 세포괴사와 세포고사를 구분하는 특이도가 높지 않다.²⁶⁾ DW-MRI의 경우 세포고사세포(apoptotic cells)의 수축(shrinkage)에 의한 세포질내 확산능의 제한을 측정하는 것이지만 adriamycin과 같이 DNA에 직접 작용하는 항암제들의 경우는 세포고사 시기에 따라 세포종창(swelling)을 나타내어 세포고사가 잘못 측정될 수 있다.³⁷⁾ Blankenberg 등²⁶⁾은 annexin V를 이용하여 항암치료에 의한 세포고사를 annexin V를 이용하여 성공적으로 영상화할 수 있음을 제시하였다(Fig. 6).²⁶⁾

Table 3. Guidelines for ^{99m}Tc-annexin V Imaging (reprinted from HCFA Recommendations in the year 2020).*

- *Transplant rejection*: annexin imaging is highly sensitive for the detection of rejection. Biopsies are indicated only when annexin images are positive.
- *Cancer therapy*: inability to achieve a 50% increase over baseline annexin uptake (48 h after initiation of therapy) is indicative of treatment failure. Higher doses or a new protocol is indicated.
- *Heart failure*: myocardial uptake > lung activity in patients with heart failure is an indication for therapy with slow release caspase inhibitors or free radical ion scavengers.
- *Rheumatoid arthritis*: localization in joints is indicative of disease reactivation.
- **CNS**:
 - (a) Pediatric-identify neonatal hypoxic brain injury; if positive, cryotherapy or ICE inhibitors are indicated.
 - (b) Adult-definitive diagnosis of Alzheimer's disease in preparation for therapy with NMDA GENE.
 - (c) Viability of nigral cell implants in Parkinson's disease.
- *Lung*: adult respiratory distress syndrome (ARDS). Simultaneous radionuclide and spirometry gated high-resolution tomography to determine if nitric oxide production inhibitor therapy is needed.
- *Thyroid*: objective identification of thyroiditis.
- *Bone*: definitive identification of patients destined for osteoporosis, indicating the need for therapy with parathormone to improve lifespan of osteoblasts.

*This table presents a hypothetical list of applications that may represent clinically valuable applications of apoptosis imaging. For these applications to become reality, annexin imaging has to perform at least as well in humans as it has in the laboratory.

4. 앞으로의 임상활용 가능성

실험적 결과들을 바탕으로 annexin V를 이용한 세포고사 영상은 장기이식 거부반응이나 저산소-허혈 손상, 종양의 치료반응 예측 등에서 유용한 임상적 역할이 예상된다. 그 외에도 여러 종류의 자가면역성질환, 만성퇴행성질환 등의 질병진행과정 평가와 급성 악화의 판정 등을 세포 고사 영상으로 확인하여 치료의 방향을 결정하는데 도움을 줄 것으로 예측된다. Blankenberg 등³⁵⁾은 지금까지의 실험적 결과들을 바탕으로 세포고사 영상이 2020년 정도에 임상에서 활용될 가능성을 제시하기도 하였다.(Table 3)

Belhocine 등³⁸⁾은 15명의 악성종양 환자(폐암 10 예, 유방암 2 예, 림프종 3 예)를 대상으로 항암치료 전후에 ^{99m}Tc-annexin V 영상을 획득하여 치료 반응과 비교하였더니, 치료후 annexin V 섭취가 있는 8 예에서는 완전관해(4 예)또는 부분관해(4 예)를 보였다고 보고하였다. 반면 병이 진행된 5 예에서는 모두 annexin 섭취는 없었으나 치료에 반응을 보인 2 예에서도 annexin 섭취가 없었던 경우도 있었다고 보고하였다. Belhocine 등³⁸⁾의 임상 결과와 같이 annexin V를 이용한 세포고사 영상은 종양환자의 항암치료 반응과 종양의 annexin V 섭취와 관련이

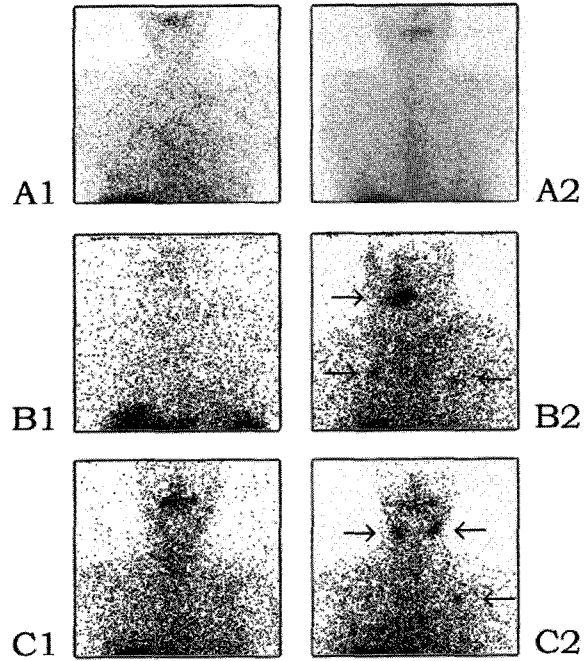


Fig. 7. (A) A case of non-small cell lung cancer. (A1) Pretreatment image with no tracer uptake. (A2) Post-treatment image with no tracer uptake detected at tumor sites. The patient had progressive disease. (B) A case of non-small cell lung cancer. (B1) Pretreatment image with no tracer uptake. (B2) Post-treatment image showed an intense tracer uptake located at the cervical tumor site and bilateral hilar nodes (arrows). The patient had complete response to chemotherapy. (C) A case of non-Hodgkin's lymphoma. (C1) Pre-treatment image with no tracer uptake. (C2) Post-treatment image showed a clear tracer uptake located at the cervical nodes and the left axillary node (arrows). The patient had complete response to chemotherapy. Belhocine et al. Copyright (2003) New York Academy of Science, USA.

있고 이는 임상적 치료방침 결정에 도움이 될 수 있을 것임을 시사하는 중요한 임상 결과이다.(Fig. 7) 하지만 annexin V 영상이 세포고사와 세포괴사를 어느 정도 구분할 수 있는지와 annexin V 영상의 임상적 유용성에 대한 결론을 내리기에는 제한된 임상 증례들로 앞으로 더 많은 임상시험과 예후에 대한 추적조사를 통하여 annexin V 영상의 유용성을 밝혀 나가야할 것이다.

결론

Annexin V를 이용한 세포고사 영상은 세포고사 과정의 초기 단계에서 annexin V가 세포질외막에 발현된 phosphatidylserine과 결합함으로써 세포고사세포를 체내에서 측정할 수 있다. 방사성표지 Annexin V 체내 영상이 앞으로 다양한 질환에 대한 임상 시험을 통하여 임상적 유용성이 밝혀지게 된다면, 각종 질환의 병인론 규명, 치료효과 판정 등에 활용되어 임상에서 치료방침

결정에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Reference

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- Sarraf CE, Bowen ID. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumours. *Cell Tissue Kinet* 1988;21:45-9.
- Wyllie AH. Apoptosis. *Br J Cancer* 1993;67:205-8.
- Allen RT, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997;37:215-28.
- Naito M, Nagashima K, Mashima T, Tsuruo T. Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood* 1997;89:2060-6.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
- Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121-32.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281(5381):1312-6.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-22.
- Tait JF, Gibson D. Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cellerythrocytes by means of annexin V binding. *J Lab Clin Med* 1994;123:741-8.
- Tait JF, Brown DS, Gibson DF, Blankenberg FG, Strauss HW. Development and characterization of annexin V mutants with endogenous chelation sites for ^{99m}Tc . *Bioconjug Chem* 2000;11:918-25.
- Collingridge DR, Glaser M, Osman S, Barthel H, Hutchinson OC, Luthra SK, Brady F, Bouchier-Hayes L, Martin SJ, Workman P, Price P, Aboagye EO. In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope. *Br J Cancer* 2003;89:1327-33.
- Stratton JR, Dewhurst TA, Kasina S, Reno JM, Cerqueira MD, Baskin DG, Tait JF. Selective uptake of radiolabeled annexin V on acute porcine left atrial thrombi. *Circulation* 1995;92:3113-21.
- Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, Yu DF, Tansey W, Kalimi SK, Kim EE, Podoloff DA. In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using ^{99m}Tc -EC-annexin V. *Cancer Biother Radiopharm* 2001;16:73-83.
- Larsen SK, Solomon HF, Caldwell G, Abrams MJ. [^{99m}Tc]tricine: a useful precursor complex for the radiolabeling of hydrazinonicotinate protein conjugates. *Bioconjug Chem* 1995;6:635-8.
- Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF. In vivo detection and of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6349-53.
- Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, Pakbiers MT, Janssen D, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -BTAP-annexin-V in humans. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1373-8.
- Ke S, Wen X, Wu QP, Wallac S, Charnsangavej C, Stachowiak AM, Stephan CL, Abbruzzese JL, Podoloff DA, Li C. Imaging taxene-induced tumor apoptosis using pegylated, ^{111}In -labeled annexin V. *J Nucl Med* 2004;45:108-115.
- Zijlstra S, Gunawan J, Burchert W. Synthesis and evaluation of a ^{18}F -labelled recombinant annexin-V derivative, for identification and quantification of apoptotic cells with PET. *Appl Radiat Isot* 2003;58:201-7.
- Murakami Y, Takamatsu H, Taki J, Tatsumi M, Noda A, Ichise R, Tait JF, Nishimura S. ^{18}F -labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:469-74.
- Locke S, Brauer M. Response of the rat liver in situ to bromobenzene-in vivo proton MRI and ^{31}P MRS studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;110:416-428.
- Hakumaki JM, Poptani H, Puumalainen AM, Loimas S, Paljarvi LA, Yla-Herttuala S et al. Quantitative ^1H nuclear magnetic resonance diffusion spectroscopy of BT4C rat glioma during thymidine kinase-mediated gene therapy in vivo: identification of apoptotic response. *Cancer Res* 1998;58:3791-9.
- D'Arceuil HE, de Crespigny AJ, Rother J, Seri S, Moseley ME, Stevenson DK, et al. Diffusion and perfusion magnetic resonance imaging of the evolution of hypoxic ischemic encephalopathy in the neonatal rabbit. *J Magn Reson Imaging* 1998;8:820-8.
- Zhao M, Pipe J, Bonnett J, Evelhoch J. Early detection of treatment response by diffusion-weighted ^1H NMR spectroscopy in a murine tumour in vivo. *Br. J. Cancer* 1996;73:61 - 64.
- Brauer M. In vivo monitoring of apoptosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:323-31.
- Blankenberg FG, Tait JF, Strauss HW. Apoptotic cell death: its implications for imaging in the next millennium. *Eur J Nucl Med* 2000;27:359-67.
- Blankenberg FG, Storrs RW, Naumovski L, Goralski T, Spielman D. Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood* 1996;87:1951-6.
- Blankenberg FG, Katsikis PD, Storrs RW, Beaulieu C, Spielman D, Chen JY, et al. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood* 1997;89:3778-86.
- Remy C, Foulhe N, Barba I, Sam-Lai E, Lahrech H, Cucurella MG, et al. Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by ^1H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res* 1997;57:407-14.
- Veale MF, Roberts NJ, King GF, King NJ. The generation of ^1H -NMR-detectable mobile lipid in stimulated lymphocytes: relationship to cellular activation, the cell cycle, and phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:868-74.
- Brauer M, Yau M, Foley L, Baggley A. Bioenergetic and metabolic changes induced in mouse liver in vivo during anti-Fas induced apoptosis. *Proc Can Fed Biol Soc* 2002;45:F098.
- Zhao M, Beauregard D, Loizou L, Davletov B, Bindle K. Non-invasive detection of apoptosis using MRI and a targeted contrast agent. *Nat Med* 2001;7:1241-1244.
- Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6349-54.
- Blankenberg FG, Strauss HW. Non-invasive diagnosis of acute heart- or lung-transplant rejection using radiolabeled annexin V. *Pediatr Radiol* 1999;29:299-305.
- Blankenberg FG, Tait J, Ohtsuki K, Strauss HW. Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun* 2000;21:241-250.
- Blankenberg FG, Strauss HW. Will imaging of apoptosis play a role in clinical care? A tale of mice and men. *Apoptosis*. 2001;6:117-23.
- Chenevert TL, McKeever PE, Ross BD. Monitoring early response of experimental brain tumors to therapy using diffusion magnetic resonance imaging. *Clin Cancer Res* 1997;3:1457-1466.
- Belhocine T, Steinmetz N, Green A, Rigo P. In vivo imaging of chemotherapy-induced apoptosis in human cancers. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:525-529.