신이식환자에서 Thiopurine Methyltransferase의 활성이 Azathioprine 치료에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 약리학교실 및 서울대학교병원 임상약리실,
서울대학교병원 일반외과¹, 서울대학교병원 내과²

조주연, 배균섭, 유경상, 이소영, 김상준¹, 하중원¹, 안규리², 장인진, 신상구

Abstract

Effect of Erythrocyte Thiopurine Methyltransferase (TPMT) Activity on Azathioprine Immunosuppression Therapy in Renal Transplant Recipients

Joo-Youn Cho, Ph.D., Kyun-Seop Bae, M.D., Kyung-Sang Yu, M.D.,
So-Young Yi, R.Ph., Sang-Joon Kim, M.D.¹, Jong-Won Ha, M.D.¹,
Curie Ahn, M.D.², In-Jin Jang, M.D., Sang-Goo Shin, M.D.

Department of Pharmacology, Seoul National University College of Medicine, Clinical Pharmacology Unit,
Department of General Surgery¹, Department of Internal Medicine², Seoul National University Hospital

Background : The polymorphism of thiopurine methyltransferase (TPMT) is reported in several ethnic groups and low TPMT activity is known to be related to increase toxicity of azathioprine in leukemia patients. We studied the influence of erythrocyte TPMT activity on the concentration of 6-thioguanine (TGN) and its therapeutic implications in Korean renal transplant recipients receiving azathioprine treatment.

Methods : Forty one renal transplant recipients on triple immunosuppressive therapy were recruited and data from 39 of them could be analyzed. At the time of three months after the renal transplantation, therapeutic results were assessed as one of toxic, adequate or insufficient by pre-determined clinical and laboratory criteria. Pre- and post-treatment TPMT activities were also compared by paired t-test to evaluate the possible enzyme induction. Regression analysis between TPMT activity and 6-TGN concentration and logistic regression analysis between TPMT activity and therapeutic results were done.

Results : Pre-treatment TPMT activity was 11.9 ± 3.1 (mean $\pm$ SD) (nmole/hr/ml packed RBC) and did not show any modality, which were compatible with previous reports in 309 healthy Korean children and 360 healthy Korean adults. TPMT activity was significantly increased to 15.5 ± 4.0 (mean $\pm$ SD) (nmole/hr/ml packed RBC) after azathioprine treatment ($p < 0.01$). 6-TGN concentration did not correlate with either pre- or post-treatment TPMT activity ($p > 0.05$). Initial TPMT activity and 6-TGN concentration were not related to therapeutic results in Korean renal transplant recipients ($p > 0.05$).

Conclusion : TPMT activity was significantly increased after azathioprine treatment. Both pre- and post-treatment TPMT activity did not show any significant relationships with 6-TGN concentrations or therapeutic results. These data suggest that baseline TPMT activity is not useful in predicting the incidence of severe toxicity and rejection episodes. To clarify the debate on the relation between TPMT activity and therapeutic results of azathioprine, large scale trial in well-controlled conditions would be necessary in the future.

KEY WORDS : Thiopurine methyltransferase · Azathioprine · Renal transplantation · 6-Thioguanine nucleotide · Therapeutic results.

*본 연구는 '96 서울대학교병원 일반연구비의 지원으로 수행되었음.

교신저자 : 장인진

소 속 : 서울대학교 의과대학 약리학교실 및 서울대학교병원 임상약리실

주 소 : 서울시 종로구 연건동 28 ☎ 110-799

전 화 : (02) 740-8286 FAX : (02) 745-7996 E-mail : ijjang@plaza.snu.ac.kr

서 론

Azathioprine은 조직이식후에 거부반응(allograft rejection)을 감소시키기 위하여 cyclosporine 및 corticosteroids와 더불어 자주 사용되는 약물이다. 체내에서 azathioprine은 빠르게 6-mercaptopurine (6-MP)으로 대사되고 6-MP는 세가지의 상호 경쟁적인 대사과정을 거쳐 치료효과를 나타내거나 해독화된다. 즉, 6-MP는 hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase에 의하여 대사되어 6-thioguanine nucleotides (6-TGN)을 생성한다. 또한 6-MP는 xanthine oxidase에 의하여 산화되어 6-thiouric acid를 형성하거나 thiopurine S-methyltransferase (TPMT)에 의하여 methylmercaptopurine을 형성하여 불활성화된다. 활성대사물인 6-TGN은 DNA에 작용하여 세포의 성장을 억제시키는 치료효과를 나타내나 과량 생성시 백혈구 감소, 골수억제 등의 독성을 일으키는 주요 원인이 된다¹⁾. 적정용량의 azathioprine으로 치료받고 있는 조직 이식 환자 및 6-MP로 치료받고 있는 acute lymphoblastic leukemia(ALL) 환자에서 6-TGN의 농도가 백혈구 감소와 비례적인 관계가 있음이 관찰되었다^{2,3,4)}. 이러한 6-TGN 농도의 변화는 정상 신장기능을 가지는 신장이식 환자의 경우 6-MP를 해독화하는 TPMT 효소의 유전적 다형성에 기인함이 보고되었다²⁾. 즉 인체 TPMT 활성의 유전적 다형성은 6-MP나 azathioprine과 같은 약물의 대사와 약리 효과의 개체차를 결정하는 주된 요인으로서 선천적으로 TPMT 활성이 부족한 사람에서 심한 골수억제와 같은 부작용이 나타나며 이는 활성 대사물인 6-TGN의 축적에 기인한 것으로 생각된다^{5,6)}.

TPMT (E.C. 2.1.1.67)는 thiopurine을 메틸화시키는 효소로서 그 활성에 개인차 및 인종차가 있음이 알려져 있다⁷⁾. 그러나 이 대사과정의 개인차를 보이는 원인을 체계적으로 연구한 것은 10년이 넘지 않는다. 특히 적혈구 내에서 TPMT의 활성을 측정할 수 있음으로써 많은 피험자를 대상으로 약물유전학적 연구가

가능하게 되었다^{8,9)}. 실제 적혈구 자체의 효소활성은 양적으로 약물의 대사에 크게 기여하지는 못하나 주 대사장기인 간장 및 신장의 활성을 반영함이 밝혀졌고 유전적인 요인이 인체의 TPMT 활성의 개체간 변이를 결정하는 주된 요인임이 밝혀졌다^{10,11)}. 구미인 인구를 대상으로 시행한 연구에서 TPMT 활성은 trimodal 분포를 가지며 활성이 높은 개체는 집단의 89%, 중등도의 활성을 가진 집단은 11% 그리고 활성이 없는 개체는 0.3% (300명중 1명)으로 다형성(polymorphism)을 보였다^{12,13,14)}.

정상 한국인 성인 360명을 대상으로 TPMT의 활성의 분포에 대한 연구를 실시한 결과 한국인의 TPMT 활성은 중앙값이 12.0 nmole/hr/ml packed RBC으로 unimodal하고 개체간에 7배 이상의 변화폭을 나타내 그 범위가 3.2-22.9이었고 유전적 다형성을 관찰할 수 없었다¹⁵⁾. 비록 한국인에서 TPMT 활성이 없는 표현형이 발견되지 않았으나 약 12%의 대상자가 백인종의 TPMT 중등도 활성군에 속하는 값을 보여주어, 이들 환자군에서 약물 반응 양상이 구미인과 유사할 것인지, 또는 용량의 조절이 필요한 것인지 등에 관한 연구가 요구된다. 또한 개체간 7배 이상의 TPMT 활성의 차이를 고려할 때 한국인에서도 TPMT 활성의 변이에 따른 azathioprine 효과의 개체차가 임상적으로 문제가 될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이러한 연구결과들에도 불구하고 TPMT 활성도 측정을 이용한 azathioprine이나 6-MP 요법의 적정화에 대한 체계적인 보고가 없으며 다만 그 필요성이 강조되고 있다^{16,17)}.

따라서 본 연구에서는 azathioprine을 이용하는 면역억제 요법을 시행받는 신장이식환자에서 적혈구내 TPMT 활성도와 활성 대사물인 6-TGN의 축적정도를 분석함으로써 골수억제와 같은 독성의 발생이나 치료효과 부족으로 인한 면역억제의 실패를 예측하며 개개 환자의 용량을 결정하는 지표로 이용하고자 하였다. 또한 신장이식환자에서의 TPMT 활성도 분포와 정상인 인구집단에서의 분포와 비교하고 azathioprine 반복 투여에 따른 TPMT 활성의 유도여부를

Table 1. Demographic and clinical data of the 39 renal transplant patients

	Period	Mean $\pm$ SD
Age(years)	Day 0	31.5 $\pm$ 15.24
Weight(kg)	Day 0	49.4 $\pm$ 12.93
Azathioprine dose (mg/kg)	Day 0	1.988 $\pm$ 0.265
	Day 7	1.962 $\pm$ 0.550
	Day 14	1.935 $\pm$ 0.526
	Day 28	1.751 $\pm$ 0.727
	Month 2	1.806 $\pm$ 0.609
Prednisolone (mg/kg)	Day 0	0.340 $\pm$ 0.208
	Day 7	0.861 $\pm$ 0.228
	Day 14	0.548 $\pm$ 0.302
	Day 28	0.445 $\pm$ 0.231
	Month 2	0.301 $\pm$ 0.051
Whole blood cyclosporin A concentration (ng/ml)	Day 7	251.4 $\pm$ 95.84
	Day 14	260.3 $\pm$ 101.29
	Day 28	197.9 $\pm$ 83.83
	Month 2	210.2 $\pm$ 44.70
Gender	M : F = 27 : 12	
Donor type	Living related : cadaveric : living unrelated = 22 : 10 : 7	
Therapeutic results	Toxic : adequate : insufficient = 7 : 25 : 7	

측정하여 유도 여부나 그 양상에 따른 개개 환자의 면역억제 효과를 비교 분석하여 치료결과에 어떠한 영향을 미치는지를 예측하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교 병원 일반외과에서 신장이식 수술을 받은 환자 41명을 대상으로 하여 연구를 수행하였으며 이들은 모두 azathioprine, prednisolone, cyclosporin A를 포함하는 triple therapy의 면역억제 요법을 받은 환자들이었다. 그러나 본 연구에서 신장이식환자 41명중에서 면역억제 요법 시행전에 채혈되지 않은 환자 2명이 제외되고 39명만이 분석되었다

(Table 1). 이들 신장이식환자(남자 : 27명, 여자 : 12명)의 평균 연령은 31.5 $\pm$ 15.2세였으며, 평균 체중은 49.4 $\pm$ 12.9 kg이었다. Azathioprine의 투약 용량은 약 2.0 mg/kg을 투약하였으며(Table 1), 병용투약된 prednisolone의 용량은 표 1과 같다. 약물 투약전, 투약후 7일, 14일, 28일 및 2개월에 혈액을 채취하여 적혈구내 TPMT 활성도와 6-TGN 농도를 측정하였다. 이때 피험자 혈장의 prednisolone과 cyclosporin A의 농도를 약물 투약 직전에 채혈하여 각각 고성능 액체크로마토그래피와 monoclonal antibody를 이용한 FPIA 방법 (TDx®)으로 측정하였다. Azathioprine 면역억제 효과 판정시 prednisolone과 cyclosporin A의 농도가 치료영역에 있는 피험자만을 대상으로 분석하여 독성 또는 치료이하 농도(용량)에 의한 분석 오류를 배제하였다.

2. 연구 방법

Azathioprine 면역억제 요법의 평가 :

Azathioprine에 의한 면역억제 효과는 혈액검사, 요검사, 혈액 화학검사 등 임상검사와 이학적 검사 등을 통하여 3개월까지 월 1회 이상 평가하였다. 구체적으로 이식거부의 여부는 주로 혈청 크레아티닌을 관찰하여 평가하였다. 즉, 초기 측정치가 3 mg/dL 이하인 경우는 0.5 mg/dL 이상의 상승을, 그리고 3 mg/dL 이하인 경우는 1 mg/dL 이상의 상승을 유의한 것으로 보고 임상가가 기타의 검사결과를 종합하여 치료부족군으로 판정하였다. Azathioprine에 의한 골수 억제가 있을 때 말초혈액의 백혈구 수를 기준으로 4,000 mm³ 이하인 경우 유의한 골수독성 (독성발현군)으로 판정하였다. 이들 독성이나 부적절한 면역억제 효과의 두 경우에 속하지 않는 경우 적절한 면역억제효과 (치료적정군)로 판정하고 3개월 이상 6개월까지 추적조사하였다.

적혈구내 TPMT 활성도의 측정 :

채혈액내 적혈구의 전처리는 Weinshilbourn 등의 방법을 일부 수정하여 시행하였다¹⁸⁾. 헤파린으로 처리한 전혈로부터 얻은 세포 분획을 0.9% 식염수로 3회 세척한 후 헤마토크릿을 측정하여 -80℃에 TPMT 활성도 측정시까지 냉동 보관하였다. 적혈구 TPMT의 활성도 측정은 Weinshilbourn 등의 방법에 준하여 시행하였다¹⁹⁾. TPMT 활성도의 측정원리는 동위원소가 함유된 S-adenosyl-L-methionine를 이용하여 6-MP가 radioactive 6-methylmercaptapurine으로 전환되는 정도를 측정하는 것이다. 약술하면, 냉동 보관된 적혈구는 효소활성도 측정시 8 mL의 증류수에 희석하여 용혈시킨 후, 13,000 g에서 10분 원심분리하였다. 원심 상층액 100 μ L를 150 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.5) 25 μ L, 3.2 mM 6-MP 5 μ L와 섞은 후, S-adenosyl-L-[¹⁴C-methyl] methionine (25 μ M, 0.32 μ Ci/mL), 1 mM dithiothreitol과 50 μ M allopurinol을 함유하는

반응개시 용액 25 μ L를 첨가하여 TPMT 반응을 개시시키며, 37℃ 수욕조에서 1시간 진탕하고 0.5 M borate 완충액 (pH 10) 0.5 mL를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응액내에 형성된 6-methylmercaptapurine은, 20% isoamylalcohol (in toluene) 3 mL로 추출한 후 추출액 1.5 mL에 0.5 mL의 ethanol을 첨가하고 10 mL의 aqueous liquid scintillant를 섞은 후 β -counter로 측정하였다. 이때 반응액에 6-MP를 첨가하지 않고 반응시킨 것을 대조로 사용하였다. 적혈구 TPMT의 활성도는 1 mL의 packed RBC당 1시간 반응으로 형성되는 6-methylmercaptapurine의 양을 nmole로 표시하였다.

적혈구내 6-TGN의 측정 :

헤파린 처리된 전혈을 20℃에서 400g로 10분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 제거한 후 Hank's balanced salt solution으로 세척한 다음 Hayem's fluid로 200배 희석하여 적혈구 수를 센 후 그 수를 약 $8 \times 10^8 / 100 \mu$ L로 하여 -20℃에 보관하였다. 적혈구내 6-TGN 농도의 측정은 Lennar와 Maddocks의 방법에 준하여 시행하였다¹⁹⁾. 적혈구 100 μ L를 취하여 산으로 세척한 눈금있는 시험관에 0.1M HCl 1.0 mL를 가하였다. 물로 2mL을 만든 다음 0.1M Tris/HCl buffer(pH 8.0)와 0.1M phosphate buffer(pH 8.0)를 7:1로 섞은 혼합액 7mL를 가하고 나서 thionucleotide를 침전시키기 위해 0.5M lanthanum chloride 1mL를 가하였다. 완전히 섞어 시험관을 10분간 얼음에 방치한 후 혼합액을 10℃에서 2,000g로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전된 6-TGN을 0.5mL의 1.5M H₂SO₄에 다시 분산시켰다. 물로 용적을 1.5mL로 맞춘 후 시험관을 Dri-Block (Technique Ltd) 100℃에서 1시간동안 가열하여 nucleotide를 parent purine으로 완전히 가수분해하였다. 6-TG 표준용액을 대조 시험관에 가하여 비슷하게 처리하고 냉각하였다. 각 시험관에 10mM dithiothreitol 0.1mL, 5M NaOH 0.5mL와 물을 가하여 2mL가 되게 하고 89mM phenyl-

Table 2. Erythrocyte TPMT activity and 6-TGN concentrations of the renal transplant patients

Period	TPMT activity (nmole/hr/ml)			
	Mean $\pm$ SD	Median	Range	n
Day 0	11.92 $\pm$ 3.05	11.38	7.43-20.76	39
Day 7	12.43 $\pm$ 3.13	12.18	5.67-21.70	37
Day 14	12.74 $\pm$ 3.28	12.47	6.10-24.37	36
Day 28	13.46 $\pm$ 3.02	13.45	6.64-21.22	32
Month 2	15.52 $\pm$ 3.96*	14.57	11.67-29.9	18

Period	6-TGN (pmol/ 8×10^8 cells)			
	Mean $\pm$ SD	Median	Range	n
Day 7	59.63 $\pm$ 65.88	42.06	4.55-344.5	31
Day 14	124.43 $\pm$ 101.95	99.80	6.24-523.9	32
Day 28	126.78 $\pm$ 88.17	111.02	16.39-287.6	23
Month 2	113.82 $\pm$ 116.58	60.89	4.77-440.3	18

*p=0.012, analysed by paired t-test in comparison with Day 0 TPMT activity.

mercuric acetate 2mL, toluene 8mL를 가하여 10분동안 shaking한 후 10분동안 ultrasonication하고, 900g에서 5분동안 원심분리하였다. Toluene 7mL을 눈금이 있는 시험관에 옮기고, 0.025M HCl로 역추출하여 10분동안 shaking한 후 900g에서 5분동안 원심분리하였다. 수용액층에 있는 소량의 toluene을 제외하고 대부분의 toluene을 제거한 후 6-TGN을 함유하고 있는 수용액을 2분동안 상온에서 2mM potassium chromate 20 μ L로 산화시킨 다음, 과다한 chromate 이온을 21mM sodium metabisulphate 50 μ L로 제거하여 용액을 pH 10.45 sodium borate 완충액 1mL를 가하여 pH를 10.1로 하여 상대적인 형광강도를 측정하였다(excitation wavelength : 330nm, emission wavelength:410nm). 적혈구내의 6-TGN 농도는 nucleotide의 산성 가수분해 후에 8×10^8 개의 적혈구내에 6-TGN의 pmol로 나타났다.

적혈구내 TPMT 활성도, 6-TGN 농도 및 치료효

과간 관련성 분석 :

측정된 개개인의 TPMT 활성도 분포를 기존의 정상 성인의 TPMT 활성도 분포와 비교하였다. Azathioprine 투약 전과 투약 후의 TPMT 활성도를 paired t-test로 분석하여 TPMT 효소의 활성 유도양상을 관찰하였다. 또한 TPMT 활성도와 6-TGN의 농도와의 상관성 여부를 관찰하기 위하여 선형회귀분석을 시행하였다. Azathioprine의 면역억제 치료 효과에 따라 환자들을 독성발현군, 치료효과군 및 치료부족군으로 구분한 후 이러한 azathioprine의 면역 효과에 따른 TPMT 활성이나 6-TGN의 적혈구내 농도와의 상관성을 분석하고자 하였다. 이 경우 한쪽 변수가 범주형 자료이므로 로지스틱 회귀분석을 시행하였다. 그 외 성별, 나이, 체중, 혈청 크레아티닌, 병용약물 농도 등의 영향인자와의 관련성을 관찰하고자 general linear model (GLM)으로 분석하였다. 이상의 모든 통계자료는 SAS 6.12 package를 이용하여 분석하였다.

Fig. 1. Frequency distribution of red blood cell (RBC) thiopurine methyltransferase (TPMT) activities in Korean renal transplant recipients before azathioprine treatment (baseline values).

결 과

TPMT 활성도 분포 및 유도효과 :

적혈구내의 TPMT 활성도를 azathioprine 투약 전부터 투약 후 2개월까지 연속적으로 측정하였다. 투약 전 TPMT 활성도는 11.92 ± 3.05 nmole/hr/mL packed RBC (mean $\pm$ SD)의 분포를 보였고, 중앙값 (범위)은 11.8 (7.43-20.76) nmole/hr/mL 이었다 (Table 2). 투약 전 TPMT 활성도의 분포를 히스토그램으로 그림 1에 나타내었다. 이러한 분포는 이전에 보고된 건강한 한국 성인에서의 TPMT 활성도 분포 (12.0 ± 2.9 nmole/hr/mL)와 유사하였다. Azathioprine 투약 후 2개월에는 TPMT 활성도가 15.52 ± 3.96 nmole/hr/mL packed RBC (mean $\pm$ SD)의 분포를 보였고 중앙값은 14.57 (범위 : 11.67-29.9) nmole/hr/mL 이었다. Azathioprine 면역억제요법을 반복적으로 시행한 후 TPMT 활성도의 변화를 관찰하기 위하여 azathioprine 투약 전과 투약 2개월 후의 TPMT 활성도 차이를 비교한 결과, azathioprine 투약 후 2개월에 TPMT 활성이 투약 전에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($p=0.012$) (Fig. 2).

Fig. 2. Change of thiopurine methyltransferase (TPMT) activity in red blood cell (RBC) of renal transplant recipients 2 months after azathioprine therapy (Post-treatment) compared with baseline value before azathioprine therapy (Pre-treatment).

6-TGN 농도 :

적혈구내에서의 6-TGN 농도를 azathioprine 투약 후 7일, 14일, 28일, 2개월에 측정하였다. 6-TGN의 농도는 개인차가 매우 크게 나타나 투약 후 7일에 중앙값은 42.06 (범위 : 4.55-344.5) pmol/ 8×10^8 cells이었고, 투약 후 14일에는 99.80 (6.24-523.9) pmol/ 8×10^8 cells, 투약 후 28일에는 111.02 (16.39-287.6) pmol/ 8×10^8 cells, 투약 후 2개월 후에는 60.89 (4.77-440.3) pmol/ 8×10^8 cells 이었다 (표 2). 채혈한 모든 시점에서 적혈구내 6-TGN 농도와 TPMT 활성도와의 상관성을 분석하였으나, 통계적으로 유의한 상관성을 관찰할 수 없었다 ($r=0.091$, $p=0.315$) (Fig. 3).

TPMT 활성도, 6-TGN 농도 및 치료효과와의 관계 :

Azathioprine에 의한 면역억제 효과는 방법에서 언급했듯이 혈액검사, 요검사, 혈액 화학검사 등 이화학적 검사 및 임상치의 판단에 따라 독성발현군, 치료효과군 및 치료부족군으로 분류하였다. 본 연구에 참

Fig. 3. Relationship between thiopurine methyltransferase (TPMT) activity in red blood cell (RBC) and RBC 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) concentrations in renal transplant recipients after azathioprine therapy.

Fig. 4. Distribution of thiopurine methyltransferase (TPMT) activity before azathioprine treatment (initial TPMT activity) in renal transplant patients subgrouped by therapeutic results (mean $\pm$ SD).

여한 신장이식 환자는 독성발현군, 치료효과군, 치료 부족군이 각각 7, 25, 7명으로 분류되었다(Table 1). 각 치료효과군의 분류에 TPMT 활성도가 어떤 영향을 미치는지를 로지스틱 회귀분석으로 치료효과와 TPMT 활성도의 관계를 분석한 결과, 통계적 유의성이 관찰되지 않았다($p=0.449$) (Fig. 4). 또한 세

Fig. 5. Distribution of 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) at 2 months after azathioprine treatment in renal transplant patients subgrouped by therapeutic results.

치료효과군에서 6-TGN 농도가 다르게 나타나는지를 로지스틱 회귀분석으로 분석한 결과, 치료효과와 6-TGN의 농도의 관련성은 없었다($p=0.989$) (Fig. 5). 그 외 다른 covariates(나이, 체중, 성별, 병용 투약 약물 용량, cyclosporin A 농도, prednisolone 농도, 백혈구수, 헤마토크릿, 혈청 크레아티닌, BUN)와 TPMT 활성도, 6-TGN, 치료효과의 관련성을 관찰하고자 GLM을 이용하여 분석하였으나, 통계적으로 유의한 영향인자는 없었다.

고 찰

최근 유전적 다형성과 관련한 약물의 독작용 출현 및 적정용량 문제가 제기되고 있는 약물대사 효소계인 TPMT에 대해서 현재까지 주로 서양인에서 그 임상적 의의가 검토되어 왔다. 이 효소의 조직 활성도와 비례하는 적혈구내 효소 활성도는 현재까지 서양에서 시행된 연구결과 백인에서 명백한 trimodal 분포를 보임이 알려져 있다. 서양인의 경우 인구집단의 약 10%가 중등도 활성군에 해당하며 낮은 TPMT 활성도 대립형질을 갖는 homozygote poor metabolizers는 1% 미만으로 밝혀져 있다. 이러한 유전적 다형성의 임상적 의의에 대해서는 Lennard 등 및 Chan 등

7, 20)에 의해 연구된 바 있으며, TPMT 활성도가 낮은 intermediate group이나 poor metabolizers는 azathioprine이 6-methylmercaptopurine으로 불활성화되지 못하고 독성이 강한 6-TGN으로의 대사과정이 항진되어 있어 상용량에서 심한 골수억제가 나타나는 것으로 알려져 있다.

동양인에서는 TPMT 활성도에 대한 약물유전학적인 연구가 싱가포르의 중국인에 관해 발표된 바 있으나 그 효소활성의 측정 방법상의 문제로 타 연구결과와 비교가 어려워 다만 중국인이 TPMT 활성이 구미인보다 낮을 것이며 분포는 bimodal하다는 것만 알 수 있었다²¹⁾. 또 다른 동양인에 관한 연구인 브라질의 일본인에 대한 연구는 그 대상자 수가 32명으로 적으며 효소활성의 측정방법과 단위가 달라 직접 비교가 불가능하며 단지 백인보다 활성이 높고 unimodal 분포를 보인다는 점만 알 수 있다²²⁾. 이상의 두 예에서도 보듯이 비교적 가까운 일본, 중국계 인종에서도 상당히 다른 결과를 보고하고 있다. Jang 등¹⁵⁾이 수행한 한국인의 연구결과에서 TPMT 활성의 평균값이 12.0 이고 median 값이 12.0 nmole/hr/mL packed RBC로 중국과 일본인의 중간으로 서양인과 오히려 유사하나 그 분포는 unimodal 하였다. 본 연구에서 azathioprine 투약 전에 측정된 TPMT 활성도는 11.92 ± 3.05 nmole/hr/mL packed RBC (mean $\pm$ SD)로 중앙값은 11.8(범위: 7.43-20.76) nmole/hr/mL 이었다. 이러한 분포는 이전에 보고된 건강한 한국 성인에서의 TPMT 활성도 분포 및 한국 소아에서의 분포(12.4 ± 2.4 nmole/hr/mL)와 유사하였으나^{15, 23)}, 표본수가 적어(39명) 최소 활성과 최대 활성의 차이가 한국인을 대상으로 하는 다른 연구들에 비하여 작은 것으로 나타났다.

본 연구에서 적혈구내의 TPMT 활성도는 azathioprine 치료 전에 비하여 치료 후에 유의성 있는 증가를 나타냈다. Mircheva 등²⁴⁾은 azathioprine을 투약 받고 있는 신장이식 환자에서 유사한 TPMT 활성 증가를 보고하였다. 또 다른 연구에서는 6-MP를 투약받는 백혈병 환자에서 TPMT 활성이 증가되었다가

6-MP 투약을 중단하였을 때 다시 활성이 감소되었다²⁵⁾. Azathioprine 치료에 의한 TPMT 활성도 증가의 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으나, TPMT의 기질인 6-MP가 유도하는 것으로 사료된다²⁶⁾. 또 다른 기전으로 병용투약된 약물들에 의한 유도효과를 생각할 수 있으나, 여러 연구에서 steroids 및 cyclosporine이 TPMT 활성을 변화시키지 않음을 증명하였다²⁷⁾. 한편 sulphasalazine과 furosemide는 TPMT 활성도를 in vitro에서 억제하는 것으로 알려져 있으나^{28, 29)}, 그 외 병용투약된 약물이 TPMT 활성에 어떠한 영향을 미치는지에 관하여 연구된 바가 없다. 다른 연구에서 azathioprine 반복 투여시 TPMT 활성도의 변화는 치료 전 TPMT 활성도와 역 상관성을 보여 TPMT 활성도 초기값으로부터 유도 양상을 예측할 수 있다고 보고하였으나³⁰⁾, 본 연구 결과에서는 그러한 상관성을 관찰할 수 없었다.

6-TGN은 azathioprine, 6-MP와 같은 약물의 활성 대사체로서 약리효과 및 독성효과를 나타내는 주요 원인 물질이다. 적혈구내의 6-TGN의 농도와 TPMT 활성과는 반비례적 관계가 있음을 보고한 많은 서양의 연구에서와 달리 본 연구에서는 채혈된 모든 시점에서 6-TGN의 농도와 TPMT 활성과의 상관성이 없는 것으로 나타났다. 그 가장 중요한 원인은 본 연구에서 환자의 독성 징후 발생시 azathioprine의 투약 용량을 수시로 변경함에 따라 용량에 따른 농도, 효과의 변화를 추적하기 어려웠다. 또한 azathioprine의 잦은 용량 변화로 인하여 6-TGN이 체내에서 항정상상태에 도달하지 못함으로써 채혈 시점에서 일정한 6-TGN의 농도를 반영하지 못했기 때문에 개인차도 심하였을 뿐만 아니라 한 환자내에서 순차적으로 측정된 6-TGN 농도의 차이도 심하게 나타났다. Dervieux 등³⁰⁾의 연구에서 6-TGN 농도의 변화가 거의 없는 항정상상태를 6개월 이후로 잡은 것을 보면 6-TGN 농도 측정을 위한 채혈은 일정용량 투약시 6개월 이후에 실시하여야 할 것이다.

신장 이식 환자들에서 TPMT 활성도와 치료효과와의 관계에 관하여 혼동되는 연구 결과들이 있다.

Bergan 등의 연구에서 초기 TPMT 활성도와 조직 이식 거부반응의 발생이 상관성이 없었으며 따라서 초기 TPMT 활성도로 azathioprine의 치료효과를 예측할 수 없었다³¹⁾. 본 연구 결과에서도 신장이식 환자들을 치료효과에 따라 세 군으로 분류한 후 초기 TPMT 활성도 또는 6-TGN 농도와의 관련성을 관찰하였으나, 치료효과와 관련성을 발견할 수 없었다. 그러나 몇몇 다른 연구에서 azathioprine을 투약 받고 있는 신장이식 환자 중에서 TPMT 활성도가 높은 환자들은 조직이식 거부반응의 발생률이 높았다^{26, 30)}. 본 연구에서 TPMT 활성도와 치료효과의 관련성을 관찰하지 못한 가장 큰 이유는 대상환자의 TPMT 활성도 분포 범위가 크지 않았기 때문으로 사료된다. 즉, 39명의 신장이식환자를 대상으로 하였는데 그 초기 TPMT 활성도의 범위는 7.4-20.8 nmole/hr/ml로 최소 활성과 최대 활성의 차이는 약 3배 정도이며 unimodal한 분포를 보였다. Deurviex 등³⁰⁾의 연구에서는 TPMT 활성도 범위가 7.8-34.6 nmole/hr/ml로 약 5배의 차이를 나타냈으며 이들 신장이식환자 중에는 TPMT 활성이 없는 TPMT*2A와 TPMT*3A allele을 가지고 있는 heterozygous 환자들을 3명 포함하고 있어 TPMT 활성도의 분포가 커서 치료효과와의 상관성을 관찰하기 좋은 대상이었다. 또한 본 연구에서 TPMT 활성도 분포와 치료 효과와의 관련성을 검증하기 위하여 여러 가지 통계적 방법을 사용하였는데 유의성을 보이기 위한 적절한 환자수가 확보되지 않았고 검정력 (power)이 매우 낮을 것으로 사료된다. 따라서 azathioprine으로 면역억제 요법을 시행하는 신장이식 환자에서 개개인의 TPMT 활성도 검색으로 부작용 및 치료효과를 예측할 수 없었다.

이상의 결과를 종합하면, azathioprine으로 면역억제 요법을 시행하는 신장이식 환자의 적혈구내 TPMT 활성도 분포는 정상 한국인의 분포와 유사하였고 치료 후 TPMT 활성이 유의하게 유도증가되었다. 그러나 TPMT 활성도와 치료효과의 관련성을 발견할 수 없어 azathioprine을 이용한 면역억제요법에서 부작용

과 치료실패를 줄이는 적정약물요법에 이용하기 위해서는 추후 연구가 필요할 것이다. 향후 연구시 용량 조절을 고정하여야 할 뿐만 아니라, 한국인의 TPMT 활성도의 분포가 unimodal하여 개개인의 활성도 차이가 심하지 않음을 고려하여 적절한 환자수를 확보할 수 있어야 하겠다.

요 약

연구배경 :

TPMT 효소는 여러 인종에서 유전적 다형성이 있으며 백혈병 환자에서 azathioprine 치료시 TPMT 활성이 낮은 경우 활성 대사물인 6-TGN의 독성이 증가되었다. 본 연구에서는 azathioprine으로 면역억제 요법을 시행하는 신장이식환자에서 TPMT 활성의 다형성에 따라 6-TGN의 농도 및 치료 효과에 영향을 미치는지를 연구하고자 하였다.

방 법 :

신장이식 후 triple therapy를 시행하는 41명의 환자를 모집하였으나, 그 중 39명만이 분석되었다. 신장이식 후 3개월 시점에서 임상적, 이화학적 검사 결과로부터 치료 결과를 독성발현군, 치료적정군, 치료 부족군으로 분류하였다. 투약 전후의 TPMT 활성도를 paired t-test로 비교하여 TPMT 활성의 유도를 관찰하였다. TPMT 활성도와 6-TGN의 농도의 상관관계를 분석하였고 치료효과군에 따른 TPMT 활성도 또는 6-TGN 농도와의 관련성을 분석하기 위하여 로지스틱 회귀분석을 시행하였다.

결 과 :

Azathioprine으로 면역억제요법을 시행하는 신장이식환자를 대상으로 치료시작 전에 적혈구내의 TPMT 활성도를 측정된 결과, TPMT 활성도는 11.9 ± 3.1 (mean $\pm$ SD) (nmole/hr/mL packed RBC)로 나타났으며, 이러한 결과는 기존 정상 한국인의 분포(12.0 ± 2.9)와 유사하였다. Azathioprine 면역억제요법 시행 후 TPMT 활성도는 15.5 ± 4.0 (mean $\pm$ SD) (nmole/hr/mL packed RBC)으로

증가하였고 이러한 TPMT 활성도의 증가는 통계적으로 유의하였다($p < 0.01$). Azathioprine의 활성 대사물인 6-TGN의 적혈구내의 농도와 azathioprine 투여 전 또는 투여 후의 TPMT 활성도와의 역 상관성을 관찰할 수 없었다($p > 0.05$). 치료 전 TPMT 활성도 또는 6-TGN 농도와 환자 개개인의 치료 결과와는 관련성이 없었다($p > 0.05$).

결 론 :

이상의 결과로부터 환자 개개인의 TPMT 활성도 검색은 심각한 부작용 및 치료 부족에 의한 거부반응을 예측할 수 있는 지표로 이용되기 어렵다. 이러한 결과는 한국인의 TPMT 활성도의 분포가 unimodal 하여 개개인의 활성도 차이가 심하지 않기 때문인 것으로 사료되며, 이후에 관련된 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Van Scoik K, Johnson A. *The pharmacology and metabolism of the thiopurine drugs 6-mercaptopurine and azathioprine*. *Drug Metab Rev* 1985;16:157-74.
2. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon JA. *Genetic variations in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Lancet* 1990;336:225-9.
3. Bergan S, Rugstad HE, Bentdal O, Stokke O. *Monitoring of azathioprine treatment by determination of 6-thioguanine nucleotide concentrations in erythrocytes*. *Transplantation* 1994;58:803-8.
4. Schutz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M. *Azathioprine myelotoxicity related to elevated 6-thioguanine nucleotides in heart transplantation*. *Transplant Proc* 1995;27:1298-300.
5. Lennard L, Gibson BES, Nicole T, Lilleyman JS. *Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia*. *Arc Dis Child* 1993;69:577-59.
6. Schutz E, Gummert J, Mohr F, Oellerich M. *Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient transplant recipient*. *Lancet* 1993;13:436-7.
7. Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. *Pharmacogenetics of azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism*. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46:149-54.
8. Raymond FA, Weinshilboum RM. *Microassay of human erythrocyte catechol-O-methyltransferase: removal of inhibitory calcium ion with chelating resin*. *Clin Chim Acta* 1985;58:185-94.
9. Van Loon JA, Pazmino PA, Weinshilboum RM. *Human erythrocyte histamine N-methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties*. *Clin Chim Acta* 1985;149:237-51.
10. Woodson LC, Dunnette JH, Weinshilboum RM. *Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: kidney-erythrocyte correlation and immunotitration studies*. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;222:174-81.
11. Szumlanski CL, Scott MC, Weinshilboum RM. *Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human liver enzyme activity*. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43:134.
12. Weinshilboum RM, Sladek SL. *6-Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity*. *Am J Hum Genet* 1980;32:651-62.
13. Lennard L, Van Loon J, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. *Thiopurine pharmacogenetics*

- tics in leukemia correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. Clin Pharmacol Ther* 1987;41:18-25.
14. Weinshilboum RM. Methylation pharmacogenetics: thiopurine methyltransferase as model system. *Xenobiotica* 1992;22:1055-71.
15. Jang IJ, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Lee MS, Koo HH, Kim HK, Sohn DR. Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:638-41.
16. Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* 1992; 53:1051-6.
17. Soria-Royer C, Legendre C, Mircheva J, Premel S, Beaune P, Kreis H. Thiopurine methyltransferase activity to assess azathioprine myelotoxicity in renal transplant recipients. *Lancet* 1993;19:1593-4.
18. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1978;85: 323-33.
19. Lennard L, Maddocks JL. Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *J Pharm Pharmacol* 1983;35:15-8.
20. Chan GLC, Erdmann GR, Gruber SA, et al. Azathioprine metabolism: Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990;30:358-63.
21. Lee EJ, Kalow W. Thiopurine S-methyltransferase activity in a French population. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54:28-33.
22. Chocair PR, Duley JA, Sabbaga E, Arap S, Simmonds HA, Cameron JS. Fast and slow methylators: do racial differences influence risk of allograft rejection? *Q J Med* 1993;86:359-63.
23. Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J. Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:68-74.
24. Mircheva J, Legendre C, Soria Royer C, Thervet E, Beaune P, Kreis H. Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1995; 60:639-42.
25. MacLeod H, Relling M, Liu Q, Pui C, Evans W. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85:1897-902.
26. Chocair P, Duley J, Simmonds H, Cameron J. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* 1992; 53:1051-6.
27. Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, Mircheva Y, Vilmer E. Thiopurine methyltransferase activity in a french population: HPLC assay conditions and effect of drugs and inhibitions. *Br J Clin Pharmacol* 1994;38:1-8.
28. Szumlanski C, Weinshilboum R. Sulphazalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: a possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin*

- Pharmacol* 1995;39:456-9.
29. Lysaa R, Giverhaug T, Wold H, Aarbakke J. *Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide. Eur J Clin Pharmacol* 1996;49:393-6
 30. Dervieux T, Medard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, Loirat C, Jacqz-Aigrain E. *Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. Br J Clin Pharmacol* 1999;48:793-800.
 31. Bergan S, Rugstad HE, Kemestdal B, Giverhaug T, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Aarbakke J, Stokke O. *Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. Therapeutic Drug Monitoring* 1997;19:318-26.