

## 다발성 골수종의 병인에서 불확실한 Human herpesvirus-8의 역할

조민선 · 이시내

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2004년 11월 23일  
게재승인 : 2005년 4월 4일

책임저자 : 조 민 선  
우 158-056 서울시 양천구 목6동 911-1  
이화여대 부속 목동병원 의과대학 병리학교실  
전화: 02-2650-5730  
Fax: 02-2650-2635  
E-mail: mcho1124@ewha.ac.kr

\*본 연구는 2002년도 이화여자대학교  
신입교수연구비(2002-139-1) 지원으로  
수행되었음.

### Questionable Role of Human Herpesvirus-8 in the Pathogenesis of Multiple Myeloma

Min-Sun Cho and Shi Nae Lee

Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womens University, Seoul, Korea

**Background :** Human herpesvirus 8 (HHV-8) has been strongly implicated in the etiopathogenesis of multiple myeloma. Cytokines, especially interleukin-6, that are produced by HHV-8 infected bone marrow stromal cells may play a role in the proliferation of neoplastic plasma cells. Viral DNA sequences have been detected in the bone marrow and peripheral blood cells of myeloma patients. Yet some investigators have not found the same results. **Methods :** We examined the presence of HHV-8 DNA in the paraffin-embedded cell block specimens of bone marrow aspirations from 26 patients with multiple myeloma by polymerase chain reaction (PCR) with KS330(233) primers. Thirteen cases of bone marrow aspirations from patients with other diseases were used as a negative control. The DNA extracted from the BC-1 cell line was used as a positive control. Immunohistochemistry using commercially available HHV-8 antibody was done in the cases that were proven HHV-8 DNA-positive by PCR. **Results :** One case (3.9%) among the 26 patients with myeloma was positive for HHV-8 DNA by PCR, but no positive cells were detected in this case by immunohistochemistry. **Conclusions :** We could not find a clear relation between myeloma and HHV-8 in Korean patients examined in the present study.

**Key Words :** Human herpesvirus 8; Multiple myeloma; Polymerase chain reaction

HHV-8은 감마 헤르페스 바이러스의 하나로서, 후천성 면역 결핍증 환자에게서 발생한 카포시 육종에서 분자생물학적 방법을 통해 처음 발견하였다.<sup>1</sup> HHV-8은 카포시 육종 외에도 pleural effusion lymphoma,<sup>2</sup> 다발성 Castlemann disease 등의 발생에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. HHV-8은 사람의 여러 생체 활성 물질과 동일한 유전자를 갖고 있는데, 여기에는 시토카인이나 시토카인 수용체인 IL-6 (vIL-6), macrophage inflammatory protein I & II (vMIP I/II), IL-6/G-protein-coupled receptor (vGPCR)가 있고, 세포 증식 유도 및 세포 자멸사 억제 물질인 cyclin D (vCyc), interferon response factor (vIRF), vbc1-2, FLICE-inhibitory protein (vFLIP) 등이 있다.<sup>4,5</sup>

다발성 골수종의 병인은 아직 확실히 밝혀지지 않았다. IL-6은 형질세포의 증식을 유도하고 세포 자멸사를 억제하는 작용을 하며,<sup>6</sup> 다발성 골수종의 경우 골수 간질세포가 분비하는 IL-6이 종양성 형질세포의 증식을 유도한다고 알려져 있다.<sup>7,8</sup> Rettig 등은 다발성 골수종 환자의 골수간질세포에서 HHV-8 DNA를 처음 발견하였고 바이러스성 IL-6이 실제로 생산됨을 증명하여, 다발성 골수종과 HHV-8이 밀접하게 연관되어 있다고 보고하였

다.<sup>9</sup> 그러나 그 후 많은 연구자들이 다발성 골수종과 HHV-8의 연관성에 대해 연구했으나, 연구자 및 나라에 따라 HHV-8의 양성 빈도가 달라 아직 의견의 일치를 보지 못한 상황이다.<sup>10</sup>

이에 우리나라에서 다발성 골수종에서 HHV-8의 연관성을 알아보고자 KS330<sub>233</sub> 시발체를 이용하여 HHV-8 DNA에 대한 PCR과 면역염색을 시행하였다.

### 재료와 방법

#### 연구 대상

이화여대 부속 동대문 및 목동 병원에서 골수 천자 및 생검을 통해 다발성 골수종으로 진단한 26예를 대상으로 하였다. 남자가 11명, 여자가 15명이었고, 나이는 31세에서 80세였다(평균 58세). 골수 천자 및 생검 후 골수 천자액을 알코올에 고정한 다음 파라핀 포매한 블록을 DNA 추출에 이용하였다. 음성 대조군은 13예를 시행하였는데, 특발성 혈소판 감소증 2예, 철분 결핍

성 빈혈 7예, 만성질환에 따른 빈혈 1예, 급성 골수성 백혈병 1예, 골수 이형성증 1예, 가벼운 형질세포침윤을 보이는 정상 골수 1예였다. 양성 대조군은 PCR의 경우 BC-1 세포주의 DNA를 이용하였고, 면역염색의 경우 파라핀 포매된 카포시 육종 예를 이용하였다.

**DNA 추출 및 HHV-8 PCR**

골수 천자액의 파라핀 포매 세포 블록을 8  $\mu\text{m}$ 의 두께로 5-6장 박절하여 1.5 mL 튜브에 담았다. Xylene으로 파라핀을 제거한 후 proteinase K 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 섞인 용해 용액을 가하고 55°C에 모든 조직이 거의 녹을 때까지(대부분 24-48시간) 두었다. 그런 다음 SV PCR clean up system (Promega, Medison, WI, USA)을 이용하여 DNA 정제 후 PCR에 사용하였다. 시발체는 KS330<sub>233</sub> 시발체(KS1과 KS2)를 사용하였다.<sup>1</sup> Non-nested 및 nested PCR을 시행하였다.

먼저 추출한 DNA 7-10  $\mu\text{L}$ 와 PCR buffer, 시발체 각 0.4  $\mu\text{M}$ , Hot start Taq 중합효소(Takara, Shiga, Japan) 1 unit을 섞어 총 양이 25  $\mu\text{L}$ 가 되도록 하여 시행하였다. 94°C에서 5분 동안 반응시킨 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서

45초로 45차례 증폭 반응을 시킨 다음 72°C에서 10분간 반응시켰다. 2.5% agarose gel에서 전기영동하여 233 염기쌍에 해당하는 띠를 확인하였다. Nested PCR의 경우 위 반응물을 3  $\mu\text{L}$  취하여 동일한 조건으로 35회 반응시킨 후 띠를 확인하였다. DNA의 상태를 증명하기 위해 모든 예에서 beta-globin에 대한 PCR을 먼저 시행하였다.

**HHV-8에 대한 면역염색**

PCR에서 양성으로 나온 예에 대해 HHV-8에 대한 단클론 항체(Novocastra, Newcastle, UK)를 이용하여 면역 염색을 시행하였다. 파라핀 블록을 4  $\mu\text{m}$  두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후 항온기에서 60°C로 1시간 동안 건조시킨 다음, xylene으로 파라핀을 제거한 뒤 다단계 농도의 알코올로 탈수시켰다. 항원성 회복을 위해 citrate (pH 9.0) buffer 속에서 극초단파로 20분간 가열한 후 실온에서 식혔다. 이 후 Bond polymer detection system 시약(Vision biosystems, Mount Waverley VIC, Australia)과 함께 Bond-X automated immunostainer (Vision biosystems)를 이용하여 면역염색을 시행하였는데, 이 과정에는 내인성 과산화 효소 활성을 억제하기 위해 30분 동안 0.3% 과산화수소수용액에 처리하는 과정과 1차 항체로 실온에서 30분 동안 처리하는 과정, 그리고 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하는 과정이 포함된다.

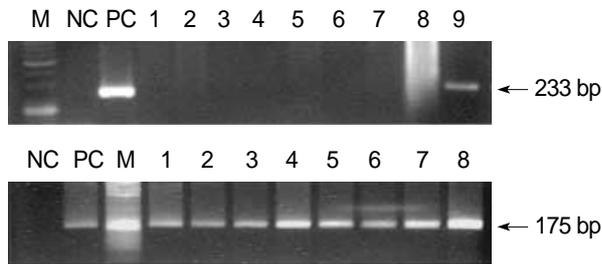


Fig. 1. (A) PCR analysis for HHV-8 in cases of multiple myeloma. One case (case 9) shows positive band at 233 base pair in size. (B) PCR analysis for beta-globin. All cases show positive bands at 175 base pair in size. M, size marker; NC, negative control; PC, positive control.

**결 과**

**HHV-8 PCR**

모두 26에서 추출한 DNA 검체에서 beta-globin에 대한 증폭 산물을 얻을 수 있었으며(Fig. 1B). HHV-8에 대해서는 전체 26예 중 1예에서만 233 염기쌍 크기의 양성 띠가 보였다(Fig. 1A).

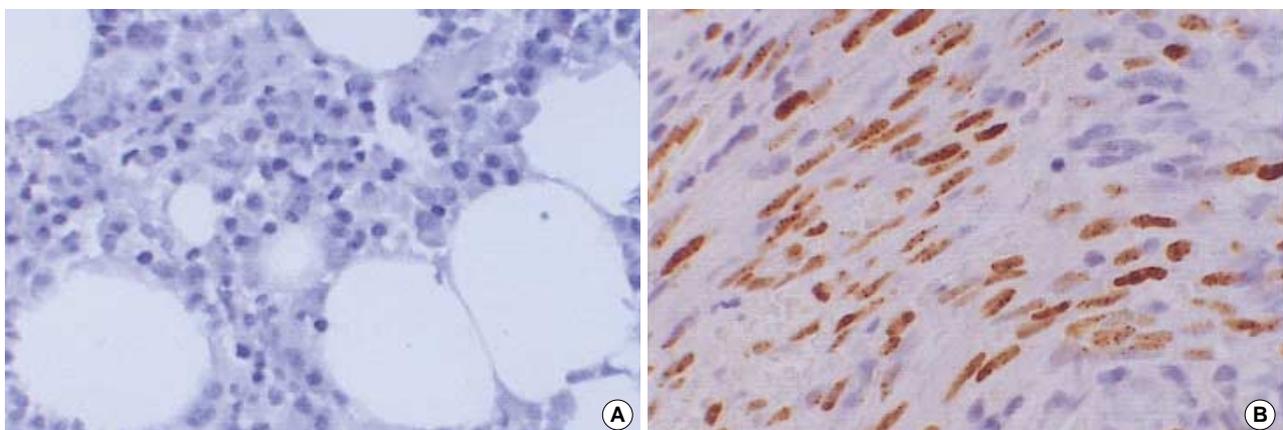


Fig. 2. (A) Immunohistochemical staining with HHV-8 antibody shows no positive cells in the case 9. (B) A positive control case of Kaposi's sarcoma shows HHV-8 positive spindle tumor cells ( $\times 400$ ).

## 면역염색

PCR에서 HHV-8 DNA 양성인 1예에 대해 HHV-8에 대한 항체를 이용하여 골수 생검 조직에 면역염색을 시행하였으나 양성으로 염색되는 세포는 없었다(Fig. 2).

## 고 찰

다발성 골수종과 HHV-8의 연관성에 대해서는 아직 연구자들의 의견이 일치하지 않고 있다. Barense 그룹은 다발성 골수종의 골수 내 간질 세포, 즉 수지상 세포가 HHV-8에 감염되어 있고 바이러스가 생산한 IL-6가 중앙성 형질세포의 증식을 유발하여, HHV-8이 다발성 골수종의 병인에서 중요한 역할을 한다고 주장하였다.<sup>11</sup> 이들은 골수종 환자의 골수에서 분리한 수지상 세포를 장기간 배양한 후, 이 세포에 HHV-8의 DNA가 존재하며 이 세포에서 바이러스성 IL-6이 생산된다는 사실을 증명하였고,<sup>9</sup> 파라핀 포매된 골수 조직에서 제자리 부합법을 통해 수지상 세포의 3-10%가 HHV-8에 감염되어 있음을 밝혔다.<sup>12</sup> 또한 골수종 환자의 말초 혈액에서 분리한 수지상 세포에서도 HHV-8 DNA를 발견하였다.<sup>13</sup>

이를 뒷받침하는 연구로서 Raje 등은 동일한 방법으로 골수의 수상 세포를 장기간 배양한 후 HHV-8에 대한 nested PCR을 시행하였다. 그리하여 정상인에게서는 38%의 양성률을 얻은 데 반해, 골수종 환자에게서는 89%의 양성률을 얻어 의미 있는 차이를 발견할 수 있었다.<sup>14</sup> 그리고 터키의 Bekscac 등은 21예의 골수종 환자의 신선 골수조직으로 PCR을 시행하여 80% 이상의 예에서 HHV-8 양성 결과를 얻어, 골수종과 HHV-8의 연관성을 뒷받침하였다.<sup>15</sup>

그러나 여러 다른 연구자들은 다발성 골수종과 HHV-8의 연관성을 증명하지 못했다. Tisdale 등은 다발성 골수종 환자에게서 배양한 골수 수지상 세포를 이용하여 본 연구에서 사용한 시발체로 nested PCR을 했을 때 66% 예에서 양성 밴드를 얻었다. 그러나 대조군도 44%의 양성률을 보였고 혈청 HHV-8 항체가 모두 음성이어서, 골수 내에 있는 HHV-8이 아닌 다른 바이러스가 증폭된 것이 아닌가 하고 추측하였다.<sup>16</sup> 또한 Patel 등은 다발성 골수종환자에서 23.5%의 HHV-8 양성률을 얻었으나, 이는 정상인의 양성률과 비교했을 때 의미 있게 높은 수치는 아니라고 보고하였다.<sup>17</sup> 다른 연구자들도 골수종 환자의 골수 간질세포 배양이나<sup>16-21</sup> 신선 골수 천자액,<sup>17,22</sup> 골수 조직 또는 파라핀 포매 조직을 이용해 연구했으나,<sup>18-21,23-25</sup> HHV-8 DNA 양성률이 약 0-10%로 나타나 의미 있는 연관성을 찾을 수 없었다. 혈청 내 HHV-8 항체에 대한 연구 결과도 약 0-5%로, 대조군에 비해 그다지 높지 않아 다발성 골수종과의 연관성을 뒷받침 해주지 못했다.<sup>18-21,25,26</sup>

역학적으로 볼 때 후천성 면역 결핍증에 걸린 환자에서 다

발성 골수종이 발생할 빈도가 높다는 보고가 있다.<sup>27</sup> 그러나 핀란드에서 HHV-8 항체에 양성인 사람들의 다발성 골수종 발생률을 연구한 결과 정상인과 특별한 차이가 없었으며,<sup>28</sup> HIV 감염 환자에서 다발성 골수종이 발생할 확률이 높지 않다는 보고도 있어,<sup>29</sup> HHV-8과 다발성 골수종 발생률의 상관관계는 확실치 않다.

Chang 등이 ORF26의 minor capsid protein에 대해 KS330<sup>233</sup> 시발체를 이용한 PCR을 시행하여 카포시 육종에서 HHV-8 DNA의 존재를 처음으로 증명한 이래,<sup>1</sup> ORFK9, ORF72, ORF73 등 HHV8 유전자 내의 다른 부분에 대한 PCR을 시행하여 민감도 및 정확도를 높이기 위한 시도가 이루어지고 있다. 일반적으로 골수 조직 내에서 HHV-8은 매우 적은 농도로만 존재하여 검출 역가가 매우 낮기 때문에, 30회 정도의 통상적인 증폭으로는 검출이 어렵다고 여겨지고 있다. 따라서 많은 연구자들이 nested PCR 방법을 이용하여 HHV-8 DNA를 검사하고 있다. 그러나 이러한 방법을 이용하면 위양성률이 증가하여 정상 조직과 다발성 골수종 조직에서 모두 양성 띠가 검출되는 경향이 있다고 보고되었다.<sup>14,16,30</sup> 위양성률을 감소시키기 위해 여러 ORF에 PCR을 동시에 시행하여 정확도를 높이려 하고 있으나, ORF72, 75 등에 대한 PCR은 ORF26에 비해 민감도가 떨어진다는 보고가 있다.<sup>16</sup>

본 연구에서는 파라핀 포매 골수 생검 조직은 탈회과정에서 이용하는 5% 질산용액으로 인해 DNA의 구조가 파괴되어 PCR에 이용할 수 없었다. 따라서 탈회과정을 거치지 않고 알코올에 고정된 후 파라핀 포매하는 골수 천자액에 대한 세포 블록에서 DNA를 추출하여 PCR을 시행하였다. 그러나 통상적인 조직을 이용한 경우보다 DNA의 양이 적었다. 따라서 우선 1차 PCR의 증폭 횟수를 45회로 늘려 PCR 산물의 양성률을 확인하고, 그 후 nested PCR을 시행하였다. Nested PCR에서 다발성 골수종 26예 중 4예에서 양성 띠를 볼 수 있었으나, 재검사했을 때는 1예에서만 동일한 띠를 볼 수 있었다. 이 예의 경우 1차 PCR 산물에 대한 전기영동에서도 매우 흐린 양성 띠가 보여, 이 1예만을 양성반응으로 생각하였다. HHV-8 DNA 양성인 1예에서는 면역조직화학염색에서 양성 세포를 발견할 수 없었는데, 이는 HHV-8 DNA가 있더라도 매우 적은 것이라는 사실을 반영하는 것이라고 생각한다.

저자는 골수 생검을 통해 다발성 골수종 진단을 받은 환자의 골수 천자액에서 DNA를 추출하여 HHV-8에 대한 검출률을 검사하였다. 그 결과 3.9%에서만 양성반응을 보여 뚜렷한 상관관계를 증명할 수 없었다.

## 참고문헌

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science

- 1994; 266: 1865-9.
2. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995; 332: 1186-91.
  3. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood* 1995; 86: 1276-80.
  4. Aoki Y, Tosato G. Pathogenesis and manifestations of human herpesvirus-8-associated disorders. *Semin Hematol* 2003; 40: 143-53.
  5. Cathomas G. Human herpes virus 8: a new virus discloses its face. *Virchows Arch* 2000; 436: 195-206.
  6. Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, *et al.* Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 1998; 91: 1858-63.
  7. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993; 82: 3712-20.
  8. Bloem AC, Lamme T, de Smet M, *et al.* Long-term bone marrow cultured stromal cells regulate myeloma tumour growth in vitro: studies with primary tumour cells and LTBMC-dependent cell lines. *Br J Haematol* 1998; 100: 166-75.
  9. Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 1997; 276: 1851-4.
  10. Tarte K, Chang Y, Klein B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and multiple myeloma: lack of criteria for causality. *Blood* 1999; 93: 3159-63.
  11. Berenson JR, Vescio RA. HHV-8 is present in multiple myeloma patients. *Blood* 1999; 93: 3157-9.
  12. Said JW, Rettig MR, Heppner K, *et al.* Localization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in bone marrow biopsy samples from patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90: 4278-82.
  13. Vescio RA, Wu CH, Zheng L, *et al.* Human herpesvirus 8 (KSHV) contamination of peripheral blood and autograft products from multiple myeloma patients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 153-60.
  14. Raje N, Gong J, Chauhan D, *et al.* Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* 1999; 93: 1487-95.
  15. Beksac M, Ma M, Akyerli C, *et al.* Frequent demonstration of human herpesvirus 8 (HHV-8) in bone marrow biopsy samples from Turkish patients with multiple myeloma (MM). *Leukemia* 2001; 15: 1268-73.
  16. Tisdale JF, Stewart AK, Dickstein B, *et al.* Molecular and serological examination of the relationship of human herpesvirus 8 to multiple myeloma: orf 26 sequences in bone marrow stroma are not restricted to myeloma patients and other regions of the genome are not detected. *Blood* 1998; 92: 2681-7.
  17. Patel M, Mahlangu J, Patel J, *et al.* Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and multiple myeloma in South Africa. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 95-9.
  18. Masood R, Zheng T, Tupule A, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 1997; 278: 1970-1.
  19. Parravicini C, Lauri E, Baldini L, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 1997; 278: 1969-70.
  20. Olsen SJ, Tarte K, Sherman W, *et al.* Evidence against KSHV infection in the pathogenesis of multiple myeloma. *Virus Res* 1998; 57: 197-202.
  21. Schonrich G, Raftery M, Schnitzler P, Rohr U, Goldschmidt H. Absence of a correlation between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) and multiple myeloma. *Blood* 1998; 92: 3474-5.
  22. Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 185-95.
  23. Yi Q, Ekman M, Anton D, *et al.* Blood dendritic cells from myeloma patients are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8). *Blood* 1998; 92: 402-4.
  24. Brousset P, Meggetto F, Attal M, Delsol G. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and multiple myeloma. *Science* 1997; 278: 1972.
  25. Cathomas G, Stalder A, Kurrer MO, Regamey N, Erb P, Joller-Jemelka HI. Multiple myeloma and HHV8 infection. *Blood* 1998; 91: 4391-3.
  26. Jaccard A, Touati M, Sol C, *et al.* Human herpesvirus-8 and relatives of patients with plasmocytic diseases. *Blood* 1998; 92: 3488.
  27. Goedert JJ, Cote TR, Virgo P, *et al.* Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 1998; 351: 1833-9.
  28. Tedeschi R, Kvarnung M, Knekt P, *et al.* A prospective seroepidemiological study of human herpesvirus-8 infection and the risk of multiple myeloma. *Br J Cancer* 2001; 84: 122-5.
  29. Sitas F, Pacella-Norman R, Carrara H, *et al.* The spectrum of HIV-1 related cancers in South Africa. *Int J Cancer* 2000; 88: 489-92.
  30. Chauhan D, Bharti A, Raje N, *et al.* Detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus DNA sequences in multiple myeloma bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; 93: 1482-6.