

Sirolimus 사용 후 사구체 기저막 세극막 관련 분자의 변화

영남대학교 의과대학 소아과학교실, 식품공학과*, 의과대학 병리학교실†

최정연 · 한기동* · 김용진† · 박용훈

= Abstract =

The Changes of Slit Diaphragm Molecules After Using Sirolimus

Jung Youn Choi, M.D., Gi Dong Han, Ph.D.*
Yong Jin Kim, M.D.† and Yong Hoon Park, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Department of Food Science and Technology*
Department of Pathology†, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

Purpose: Recently, massive proteinuria has been observed in some transplant patients after switching cyclosporine A (CsA) to sirolimus. To evaluate the pathogenesis of sirolimus-associated proteinuria, we investigated the early changes in slit diaphragm molecules by various administrative conditions of sirolimus and CsA.

Methods: *In vitro*-Mouse podocytes were incubated with buffer (C), sirolimus (10 µg/mL) after CsA (10 µg/mL) (C-S), sirolimus only (S) and CsA and sirolimus simultaneously (C+S) for 12, 24, and 48 hours. *In vivo*- twenty four SPF female Wistar rats were divided into 4 groups buffer (C), sirolimus after 2 weeks of CsA (C-S), sirolimus only (S) and CsA and sirolimus simultaneously (C+S). All groups were treated by intraperitoneal injection every other day for 4 weeks (CsA: 25 mg/kg, sirolimus: 0.5 mg/kg). The changes in mRNA of slit diaphragm molecules were examined by RT-PCR.

Results: The mRNA of nephrin was significantly decreased in group C-S and C+S *in vitro*. *In vivo*, the mRNA of nephrin in all groups using sirolimus and the mRNA of podocin in group C-S and C+S were decreased. Microscopically, group C-S and C+S showed small vacuolization and calcification in proximal tubular epithelial cells. Immunohistochemistry using nephrin and podocin antibodies did not show remarkable decrease of staining along the glomerular capillaries. Electron-microscopically, focal fusion of foot processes was seen in group C-S and C+S.

Conclusion: This study suggests the decrease of slit diaphragm molecules (nephrin and podocin) in podocyte may be one of the causes of sirolimus associated proteinuria, and podocyte injury by sirolimus may need a primary hit by CsA to develop the proteinuria. (J Korean Soc Pediatr Nephrol 2010;14:143-153)

Key Words : Sirolimus, Proteinuria, Cyclosporine, Nephrin

*본 논문은 대한소아신장학회 2008년도 연구비와 2008년도 (주)녹십자 연구비 지원을 받았습니다.

접수 : 2010년 8월 26일, 수정 : 2010년 9월 21일, 승인 : 2010년 10월 5일

책임저자 : 박용훈, 대구시 남구 대명동 317-1 영남대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 053)620-3532 Fax : 053)629-2252 E-mail : yhpark@med.yu.ac.kr

서 론

신이식을 받은 환자에서 보다 강력한 면역억제제인 cyclosporine A (CsA)의 사용은 급성 거부반응으로 인한 신기능 소실의 빈도를 현저히 감소시켰다. 그러나 고혈압, 고지혈증, 이차적 암 발생 및 만성 이식병증을 포함한 신독성 등의 CsA 부작용으로 장기 신생존율은 이전과 비교하여 큰 향상을 보이지 못하였다[1, 2]. 따라서 신이식 후 장기적 신기능 유지를 위해서는 CsA 외에 다른 면역억제제가 필요하였는데, 직접적인 신독성은 가지지 않으며 항암 및 면역억제 활동을 동시에 가졌다는 mammalian target of rapamycin (mTOR) 억제제인 sirolimus가 새로운 면역억제제로 소개되었다[3-6].

Sirolimus는 tacrolimus (FK506)와 유사한 구조를 가진 제제로서 세포내 수용체인 FK506 binding protein (FKB12)과 결합하여 표적 단백질인 mTOR을 억제하여 G1-S 시기의 세포주기를 정지시키며, interleukin (IL)-2에 의한 신호 전달을 방해한다. 이로 인해 사이토카인에 의한 T 림프구와 B 림프구의 활성화를 억제하며, 세포 주기의 진행을 방해하고 림프구 증식을 억제하여 면역억제작용을 나타낸다. 또한 평활근과 섬유모세포의 증식을 감소시켜 이식신 소실의 주요 원인인 만성 이식병증을 일으키는 주요 병리 기전인 간질 섬유화를 억제하기도 한다[5-8]. He 등[9]은 이식한 쥐에서 8주 동안 CsA를 사용 후 sirolimus로 대체한 군에서 CsA를 계속 사용한 군과 비교하였을 때 24주 후에는 단백뇨 및 transforming growth factor (TGF) mRNA 감소가 관찰되었으며 Banff sum score가 낮아 만성 이식병증의 진행 속도를 늦춘다고 보고하였다. 다른 연구들에서도 신이식 후 CsA를 조기에 sirolimus로 대체하여 사용했을 때 만성 이식병증의 진행이 완화되고 고혈압 발생의 빈도가 낮으며 이식신의 신기능이 개선되는 등의 장기적 이점을 보고하였으며 최근에는 신이식 후 CsA의 대체 면역 억제제로 siroli-

mus가 널리 사용되고 있다[10-13].

그러나 최근 여러 연구에서 CsA의 대체로 sirolimus를 투여 받은 일부 신이식 환자들에서 심한 단백뇨가 발생하였다는 임상보고가 발표되었다. 이러한 sirolimus로 발생한 단백뇨는 주로 이식 전에 단백뇨나 사구체병증에 의해 이식신이 이미 손상된 경우나, 이식 후 국소분절사구체경화증과 같은 일차적 질환이 재발한 환자에서 주로 유발되었다[10, 14-17]. 지속적인 단백뇨 자체로 만성 신질환이 악화될 수 있기 때문에 sirolimus로 발생한 단백뇨 또한 만성 이식 신기능부전을 조장하여 신기능을 악화시킬 수 있다. 현재까지 sirolimus에 의한 급성 신기능장애는 세포중식 억제제가 주요한 원인으로 여겨지고 있으나, sirolimus로 발생한 단백뇨는 한 가지 원인에 의한 것이라기보다는 다인자성인 것으로 생각되고 있다[18]. CsA의 제거에 따른 사구체 모세혈관 내압의 증가, 세뇨관의 단백 재흡수 감소, 그리고 sirolimus의 족세포(podocyte)에 대한 직접적인 영향 등이 단백뇨의 원인으로 보고되고 있으나, 이런 기전에 대한 결정적 단서는 아직까지 없는 상황이다[19]. 이에 본 연구에서는 사구체 상피세포 세포주인 mouse 족세포를 이용한 생체 외 실험 및 동물모델을 이용한 생체 내 실험을 통하여 CsA와 sirolimus의 비교 투여 실험을 통해 세극막 관련 분자의 변화를 살펴봄으로써 지금까지 명확하게 밝혀지지 않은 sirolimus에 의한 단백뇨 발생기전 중 족세포에 대한 직접적인 영향에 대해 알아보려 하였다.

대상 및 방법

1. 생체 외 실험

Mundel의 mouse immortalized 족세포를 배양하여 실험에 이용하였다. 족세포는 10% FBS (Gibco, USA), 100 unit/mL penicillin (Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan)과 100 mg/mL streptomycin (Gibco, USA)을 추가한 RPMI 1640 배지

(Gibco, USA)에서 유지되었다. 족세포 증식을 위해 33°C (permissive conditions)에서 세포를 배양하였으며, 온도에 민감한 항원의 표현을 촉진하기 위해 배양된 배지에 20 U/mL mouse IFN- γ (PeproTech EC, England)를 추가하였다. 최소 실험에 사용하기 1주전에 37°C의 γ -interferon이 없는 배양액(non-permissive condition)을 사용하여 족세포를 분화시켰다[20]. 배양된 족세포는 대조군인 완충액(C), CsA (10 μ g/mL) 처리 후 sirolimus (10 μ g/mL) 처리군(C-S), sirolimus (10 μ g/mL) 단독군(S), CsA (10 μ g/mL)과 sirolimus (10 μ g/mL) 병합군(C+S)으로 분류하여 12시간, 24시간, 48시간 동안 배양되었다. Novartis (Switzerland)에서 구입한 CsA는 PBS에, Wyeth Korea에서 구입한 sirolimus는 DMSO 및 ethanol에 각각 용해하여 사용하였다. 족세포와 관련된 분자의 mRNA 발현 변화를 알기 위해 RT-PCR을 사용하였다.

2. 생체 내 실험

Samtako (Korea)에서 구입한 140-180 g의 6주 된 specific pathogen-free Wistar 암컷 쥐를 사용하였다. 총 24마리의 쥐를 각 군당 6마리씩 완충액을 사용한 대조군(C), CsA (25 mg/kg) 2주간 사용 후 sirolimus (0.5 mg/kg)를 2주간 사용한 군(C-S), sirolimus를 4주간 단독으로 사용한 군(S), CsA와 sirolimus를 병합하여 4주간 사용한 군(C+S)으로 분류하여 모든 시약을 하루 걸러서 복강 내에 주사하였다. 시약 주입 4주 후에 모든 쥐를 희생하였고 양측 신장은 즉시 DEPC-PBS를 이용하여 세정한 뒤, 막을 벗겨내고 적당하게 절개한 후 오른쪽 신장 중 일부는 광학현미경, 면역형광현미경과 전자현미경 등의 조직검사에 사용하였으며, 나머지 신장은 신피질만 잘라내어 가위 및 메스를 이용하여 잘게 조각낸 뒤 체질법(sieving method)에 따라 차례대로 mesh #60 (pore size 250 μ m)으로 분쇄하고 #150 (pore size 150 μ m)에 통과시켜 세뇨관

을 걸러내고 mesh #200 (pore size 75 μ m)로 사구체를 걸러내어 걸러진 사구체들을 원심분리를 통해 정제하였다. 족세포와 관련된 분자의 변화를 알기 위해 RT-PCR을 이용하여 총 사구체 mRNA를 측정하였다. 모든 쥐들을 대상으로 희생하기 전 24시간 뇨 수집을 시행하였다.

3. 면역조직검체 준비

신장조직은 3 μ m 두께로 박절한 후 acetone으로 1분간 고정시키고 일차항체와 FITC-conjugated IgG 이차항체로 염색한 뒤 면역형광현미경으로 관찰하였다.

4. RT-PCR

세포를 분리하고 TRIZOL (RNA isolation solution)과 chloroform으로 추출한 후 isopropanol과 3% sodium acetate, 100% ethanol을 이용하여 precipitation시킨 다음 전체 mRNA를 분리하였다. 전체 mRNA를 5 μ g의 농도로 M-MLV reverse transcriptase (Intron, Korea), oligo-dT (KDR, Korea), 2.5 mM dNTP (Intron, Korea), 그리고 증류수로 최종 20 μ L의 부피를 맞춘 후 37°C에서 20분간 반응 후 90°C에서 효소의 반응을 불활성화시켜 합성된 cDNA를 주형으로, 족세포 기능유지에 필수적인 slit diaphragm 관련 분자인 nephrin, podocin, CD2AP에 대한 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 생성된 PCR products 20 μ L를 1% agarose gel에 running시킨 후 ethidium bromide로 염색하고, quantitative densitometer scan으로 측정하여 정량화하였으며 검체 내 역전사 효율 차이를 보정하기 위하여 GAPDH를 internal control로 하여 상대적인 density로 보정하였다.

각각의 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, unpaired t-test를 이용하여 $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 생체 외 실험

대조군(C)과 비교하였을 때 nephrin은 CsA 처리 후 sirolimus 처리군(C-S)과 CsA와 sirolimus 병합군(C+S)에서 24시간, 48시간의 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. Sirolimus 단독군에서는 24시간, 48시간에 nephrin의 mRNA 발현이 증가하였다(Fig. 1). CD2AP는 대조군과 비교하였을 때 C-S군, sirolimus 단독군과 C+S군 모두에서 24시간, 48시간의 mRNA 발현이 증가하였다(Fig. 2).

2. 생체 내 실험

대조군과 비교하였을 때 nephrin은 C-S군, sirolimus 단독군과 C+S군 모두에서 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. Podocin은 대조군과 비교하였을 때 C-S군과 C+S군에서 mRNA 발현이 유의하게 감소하였다. CD2AP의 경우 C-S군에서만 그 mRNA 발현이 유의하게 감소하였으며, C+S군에서는 큰 변화가 없었으며, 오히려 sirolimus 단독군에

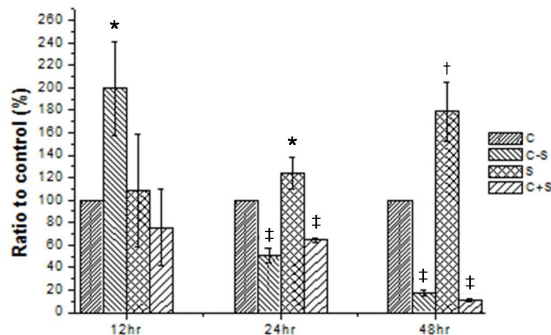


Fig. 1. The mRNA expressions of nephrin at 24 and 48 hours were significantly decreased in group C-S and C+S in vitro. The mRNA expressions of nephrin in group S were increased at 24 and 48 hours ($p < 0.05$, $†p < 0.01$, $‡p < 0.001$ compared with control).

서 증가하였다(Fig. 3).

광학현미경소견에서 C-S군과 C+S군에서는 간질 섬유화, 세뇨관 상피세포의 석회화 및 globule들이 관찰되었으며, 대조군 및 sirolimus 단독군에서는 특이 소견이 없었다(Fig. 4). 면역조직화학검사 소견에서는 모든 군에서 모세 혈관 주변의 podocin과 nephrin 항체 침착은 감소하지 않았다(Fig. 5). 전자현미경소견에서는 대조군 및 sirolimus 단독군은 특이 소견이 없었으나, C-S군과 C+S군에서 부분적인 족돌기 소실이 관찰되었다. 24시간 뇨 단백질은 모든 군에서 100 mg 미만이었다.

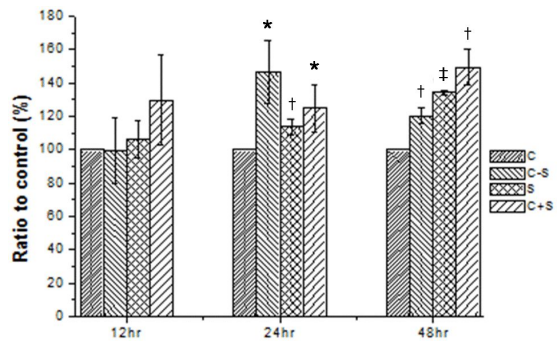


Fig. 2. The mRNA expressions of CD2AP at 24 and 48 hours were significantly increased in group C-S, S and C+S in vitro ($p < 0.05$, $†p < 0.01$, $‡p < 0.001$ compared with control).

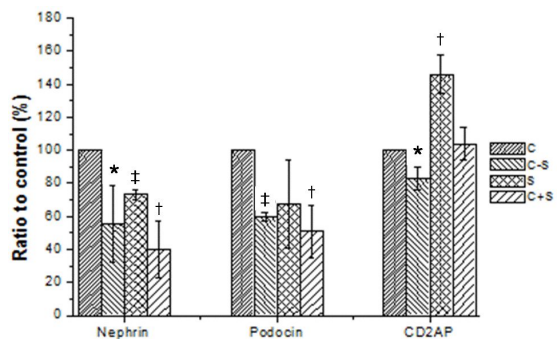


Fig. 3. In vivo, the mRNA expressions of nephrin were decreased in all groups of using sirolimus, and the mRNA expressions of podocin were decreased in group C-S and C+S. The mRNA expression of CD2AP was only significantly decreased in group C-S and increased in group S ($p < 0.05$, $†p < 0.01$, $‡p < 0.001$ compared with control).

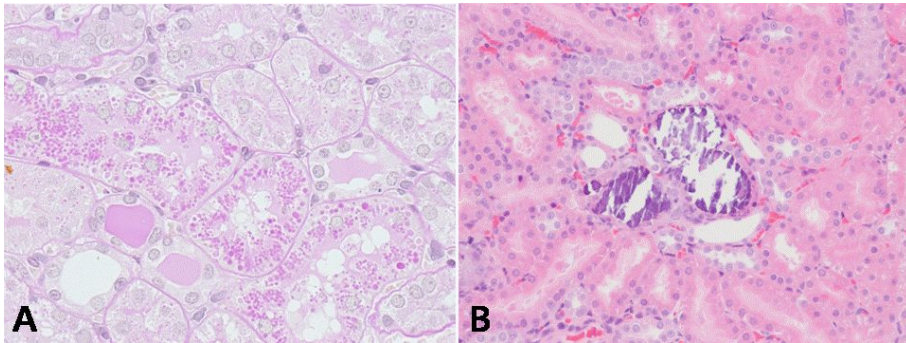


Fig. 4. LM findings: group C-S and C+S showed small vacuolization, globules and calcification in proximal tubular epithelial cells (A: PAS, $\times 400$, B: HE, $\times 200$).

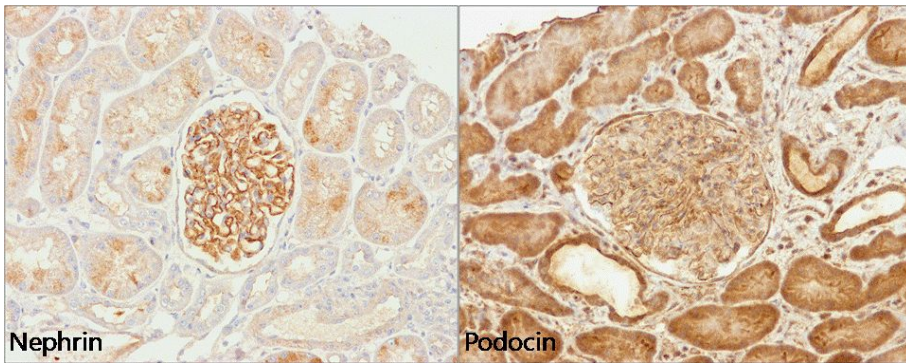


Fig. 5. Immunohistochemistry by using nephryn and podocin antibodies did not show a remarkable decrease of staining along the glomerular capillaries in all groups.

고 찰

단백뇨성 신질환이 있는 환자에서 심한 사구체 단백뇨는 신손상의 진행과 신부전 발생의 독립적인 주요 예측인자이다. 다량의 사구체 단백뇨가 지속되면 단백이 세뇨관 상피세포와 접촉하여 사구체 기저막의 손실이 있음을 세포내 신호전달을 통해 알리게 된다. 이후 알부민, 보체 및 기타 단백질의 독성에 의해 급성 염증 반응이 일어나고 세포간질의 염증을 유발하여 결국 사구체 손상 종류에 관계없이 신손상을 초래하게 된다[21].

Sirolimus로 발생한 단백뇨는 아직까지 그 기전

이 뚜렷이 밝혀지지 않았으며 단백뇨의 발생부위가 사구체인지 세뇨관인지, CsA 제거 효과로 인한 것인지 아니면 sirolimus 자체의 독성으로 인해 발생하는지 등에 대한 논란이 계속되고 있다[18, 19]. Straathof-Galema 등[22]은 한 증례에서 FITC가 부착된 항 알부민 항체를 이용하여 sirolimus 사용 후 단백뇨가 발생한 환자에서 근위 세뇨관의 알부민 흡수가 감소된 것을 관찰하였으며 이는 sirolimus로 발생한 단백뇨가 세뇨관 기원임을 시사하는 소견이라고 제시하였다. 하지만, 이는 한 증례로 단백뇨 발생의 인과 관계를 뚜렷이 밝히지는 못하였다. Mreich 등[23]은 이 증례에 반박하여 근위 세뇨관 세포 및 쥐 실험을 통해 근위 세뇨관에서 알부민의

재흡수가 감소되지 않음을 증명하였으며, Letavernier 등[14]의 연구에서도 단백뇨의 전기영동을 통해 sirolimus로 발생한 단백뇨는 사구체 기원임을 제시하였다. 단백뇨의 발생 기원이 사구체라면 CsA의 혈관 수축 효과 소실로 인해 단백뇨가 발생하는지, sirolimus 자체가 사구체 구조 및 투과에 직접적인 영향을 미쳐 단백뇨가 발생하는 것인지에 대해서도 명확히 밝혀진 것은 없다[19]. CsA는 endothelin, thromboxane A2와 nitric oxide synthase를 억제하고 교감 신경을 항진시켜 구심 세동맥의 수축을 일으킨다[24]. Sirolimus로 발생한 단백뇨를 최초로 기술한 Letavernier 등[14] 및 Franco 등[16]의 여러 다른 임상 연구에서 이식 후 CsA를 sirolimus로 전환 후 단백뇨가 발생하였고 sirolimus를 중단하고 다시 CsA로 전환하였을 때에는 단백뇨가 다시 소실됨을 보고하였다. Saurina 등[25]은 만성 이식병증 환자에서 CsA를 sirolimus로 전환 후 혈액역학적으로 구심 세동맥의 저항이 감소하여 신혈류 및 사구체 내 압력이 증가함을 입증하여, CsA의 제거에 따른 사구체 내압의 증가로 사구체 투과성이 증가하여 단백뇨가 발생한다는 이론을 뒷받침하였다. 하지만 CsA 사용 없이 azathioprine에서 sirolimus로 전환하여 비교한 연구와 mycophenolate mofetil (MMF) 단독 및 sirolimus와 MMF 병합한 군을 비교한 연구들에서는 모두 sirolimus 투여 후에 단백뇨가 발생하였다. 즉, 이는 CsA 제거효과 만으로는 sirolimus 관련 단백뇨가 설명될 수 없음을 보여 준다[26, 27]. Letavernier 등[28]은 일차적인 국소분절사구체경화증 혹은 만성 이식병증이 없는 환자 3명에서 이식 후에 고농도의 sirolimus를 사용한 후 새로 신증후군의 단백뇨 및 국소분절사구체경화증이 발생하였으며, 족세포의 조절 장애를 의미하는 족세포내의 synaptopodin, P57, cytokeratin과 PAX2 등이 감소되어 sirolimus가 족세포에 직접적인 영향을 줄 수 있음을 처음으로 제시하였다. 이후 Letaverneir 등[29]은 human immortalized 족세포를 sirolimus로 처리한 생체 외 실험에서 족세포

생존에 관여하는 Akt 경로 및 VEGF 합성 및 족세포 분화에 필수적인 전사 요소인 WT1의 감소를 관찰하였으며 이러한 기전으로 고농도의 sirolimus가 생체 내에서 국소분절사구체경화증을 발생시킬 수 있다고 하였다.

족세포는 사구체의 선택적 투과 장벽을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 족세포의 족돌기는 서로 손가락 깎지 끼듯 맞물려 사구체내 모세혈관 loop의 표면을 덮고 있으며 독특한 세포 대 세포 접촉인 세극막을 형성하게 된다. 과거에는 300 nm 간격의 전기적으로 음성을 띠고 있는 사구체 기저막만이 사구체내 모세혈관 내의 전기적 양성을 띤 단백질의 소실을 막는 장벽 역할을 한다고 설명되었으나, 최근의 연구 결과에 따르면 35-45 nm 간격의 세극막 또한 최종 여과 장벽 역할을 가지며, actin cytoskeleton 혹은 세극막의 손상 또한 족세포와 사구체 기저막이 손상되었을 때와 마찬가지로 족돌기 소실 및 단백뇨를 유발하게 된다고 하였다. 세극막 관련 분자들은 nephrin, podocin, CD2AP, ZO-1, Nck 등이 밝혀져 있으며 이들 분자는 족세포의 cytoskeleton 조절 역할도 가진다[30-33].

Vollenbröker 등[34]의 연구에서는 sirolimus를 24시간, 120시간 처리한 human immortalized 족세포에서 CD2AP 발현의 차이는 없었지만, nephrin과 Nck 발현의 유의한 감소가 있어 sirolimus가 족세포의 세극막 관련분자에 직접적인 영향을 줄 수 있음을 보여주었다. 본 연구에서 nephrin은 생체 외 실험의 경우 CsA와 sirolimus 동시처리한 군과 CsA 처리 후 sirolimus를 처리한 군에서, 생체 내 실험에서는 sirolimus를 처리한 모든 군에서 대조군과 비교하여 mRNA 발현이 감소하였으며, 생체 내 실험에서 podocin은 CsA와 sirolimus 동시처리한 군과 CsA 처리 후 sirolimus를 처리한 군에서 mRNA 발현이 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 CsA과 sirolimus 동시처리한 군에서도 nephrin과 podocin의 감소가 있었으므로 CsA의 제거에 따른 혈관 수축 효과로 설명될 수는 없으며, Vollenbröker

등[34]의 연구에서처럼 sirolimus가 직접 족세포 관련분자에 영향을 줄 수 있으나 sirolimus 단독보다는 CsA와 함께 작용했을 때 그 효과가 더 커질 수 있음을 보여주었다. 특히 이러한 CsA와 sirolimus의 세극막 관련 분자들에 대한 직접적인 영향은 족세포의 cytoplasmic site에 존재하는 CD2AP보다는 사구체상피세포의 족돌기 사이의 세극막을 구성하는 nephrin과 하나의 세포막 관통부를 가지며 nephrin과 직접 결합하고 세극막의 구조를 담당하는 podocin에서 두드러지는 것으로 생각된다. 본 연구의 CD2AP의 발현이 nephrin과 podocin의 발현변화와 다르게 나타난 것은 이러한 CD2AP가 위치하는 구조적 차이에서 온 것으로 생각된다[30-32].

이식 후 CsA과 스테로이드를 기초로 azathioprine 및 sirolimus를 병합하는 비교 연구에서 sirolimus와 CsA를 병합한 군에서만 약물역동학적 상호작용으로 CsA의 농도가 높아져 급성 거부반응은 낮아졌으나 혈중 크레아티닌은 증가한다고 하였다[35]. 그러나 본 연구의 sirolimus 및 CsA 상호작용은 위의 연구에서처럼 단순히 CsA의 증대로만 해석될 수는 없다. Kokui 등[36]은 쥐를 이용한 실험에서 고농도의 CsA (30 mg/kg/day)를 2-3주 사용하였을 때 사구체 여과가 감소한다고 하였으며 Faul 등[37]은 CsA가 actin 형성 단백질인 synaptopodin의 분해를 방지하는 기전으로 항 단백질뇨 효과를 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 CsA는 면역억제 효과 뿐 아니라 사구체 기저막의 투과성 감소 기전과 족세포 내 cytoskeleton을 안정화시켜 단백뇨를 감소시키는 효과가 있으며 이미 임상적으로 미세변화형 신증후군, 특발성 막증식사구체신염 뿐만 아니라 세극막 이상 유전성 신증후군 등의 단백뇨 치료에 사용되고 있다[38]. 그러므로 본 연구에서 CsA의 항 단백질뇨 효과와는 반대로 sirolimus와 CsA 모두 사용한 두 군에서 podocin과 nephrin이 감소한 것은 sirolimus와 관련된 단백질뇨는 CsA 증대효과가 아님을 보여주며 sirolimus와 CsA 사이에 다른 상호작용이 있을 수 있음을 제시한다.

CsA 신독성의 특징적인 병리 소견은 세뇨관 간질 섬유화, 세뇨관 위축, 구심 동맥병증 등이 있으며, 본 연구에서도 CsA와 sirolimus 동시처리 한 군과 CsA 처리 후 sirolimus를 사용한 군에서는 간질 섬유화, 세뇨관 세포의 석회화와 공포형성 등의 특징적인 CsA 신독성의 병리 소견이 관찰 되었다[24]. Nacar 등[39]은 CsA 신독성을 나타낸 신이식 환자에서 전자현미경상 내피 세포의 변화, 미토콘드리아 팽창, 두꺼워 지거나 이중화 된 사구체기저막의 변화, 족돌기의 소실, 공포형성 등의 족세포 변화를 기술하였으며 본 연구에서도 역시 전자현미경소견에서 CsA와 sirolimus를 동시처리한 군과 CsA처리 후 sirolimus를 처리한 군에서 족돌기의 소실이 관찰되었다. 면역조직화학현미경소견에서는 모든 군에서 세극막 관련 단백질 변화는 관찰되지 않았다. 결론적으로 병리학적으로는 CsA 사용군에서 CsA 사용에 따른 특징적인 변화만 관찰되었을 뿐, DiJoseph 등[40]이 발표한 것과 같이 sirolimus와 관련된 특징적인 변화는 관찰되지 않았다.

Sirolimus로 발생한 단백질뇨는 sirolimus를 사용한 환자 모두에게서 일어나는 것은 아니며, 그 기전 또한 하나로만 설명되기 어렵다. Franco 등[16]은 그들의 연구에서 CsA에서 sirolimus로 전환하였을 때 25.4%, 처음부터 sirolimus 사용하였을 때 13.3%로 sirolimus 관련 단백질뇨가 전체의 23.1%에서 발생한다고 보고하였으며, Liew 등[41]은 sirolimus 관련 단백질뇨 발생은 여성보다는 남성에서, 남성이 여성의 신장을 이식 받은 경우, 급성 거부증이 있을 때 증가하며, CsA와 병합시 구심 세동맥의 수축 효과로, 그리고 statin을 함께 사용하였을 때는 항염증, 항섬유화 기전으로 sirolimus관련 단백질뇨가 감소한다고 보고하였다. Ruiz 등[42]은 장기간의 CsA 사용으로 CsA의 병리적 소견이 관찰되어야, CsA의 혈관 수축 효과 소실 기전으로 CsA에서 sirolimus로 전환 후 단백질뇨가 발생하며, CsA 제거 및 sirolimus의 사용이 조기에 이루어진다면 단백질뇨는 발생하지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서도 CsA 사

용군에서는 특징적 병리 소견이 관찰되었으며, 역시 CsA 노출이 있었던 sirolimus군에서 podocin 및 nephrin의 감소가 있어 Ruiz 등[42]의 결과와 일치하나 그 기전은 CsA의 혈관 수축 효과 소실이 아닌 CsA 및 sirolimus의 다른 상호 작용에 의해 단백뇨가 발생한다는 것으로 다르다.

본 연구의 한계점으로는 mRNA 발현 변화만 실험하여 단백 발현의 차이는 비교하지 못하였다는 것과 CsA를 단독으로 사용한 군이 없어 CsA 단독 사용이 세극막 및 족세포 구성에 어떤 영향을 비교하지 못하였다는 것으로 향후 단백 발현 및 CsA 단독군에 대한 추가 실험이 필요하다. 또한, 본 연구에서는 생체 내 sirolimus의 농도를 따로 측정하지 않았으며, 단백뇨는 모두 발생하지 않아 다양한 sirolimus의 농도 차이에 따른 세극막 및 족세포 구성 차이 및 단백뇨 발생 등에 대한 비교연구가 더 추가되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 sirolimus로 발생한 단백뇨의 기전은 여러 가지 원인이 관련된 다인자성이며, 여러 기전 중 하나로 sirolimus가 세극막 관련 분자 중 nephrin 및 podocin의 mRNA 발현을 감소시킬 수 있으며 sirolimus 단독보다는 CsA와 함께 작용했을 때 효과가 더 커질 수 있음을 제시하는 바이다.

요 약

목적: 최근 신이식 환자들에서 cyclosporine A (CsA)의 대체로 sirolimus를 투여 받은 후 단백뇨가 발생한다는 임상보고가 있으나 단백뇨 발생기전의 정확한 메커니즘에 대한 연구가 없다. 이에 sirolimus에 의한 여러 단백뇨 발생기전 중 sirolimus와 CsA 투여 후 족세포의 세극막 관련 분자 변화를 조사하여 족세포와의 직접적인 영향에 대해 알아보고자 하였다.

방법: 생체 외 실험- 마우스 족세포를 완충액, CsA (10 µg/mL) 처리 후 sirolimus (10 µg/mL)

처리군, sirolimus 단독군, CsA와 sirolimus 동시 처리한 군으로 나누어 RT-PCR을 이용하여 12, 24, 48시간에 족세포의 세극막 관련 분자 변화를 측정하였다. 생체 내 실험- SPF Wistar 쥐 24마리를 각각 4군(완충액, CsA 2주 투여 후 sirolimus 2주간 투여, sirolimus 4주간 투여, CsA와 sirolimus를 4주간 동시투여)으로 분류하여 하루 걸러서 한번 복강 내 약물을 주입하였다(CsA: 25 mg/kg, sirolimus: 0.5 mg/kg). 모든 쥐는 약물주입 후 4주에 희생되어 병리조직은 오른쪽 신장의 일부분을 이용하고, 나머지 신장은 RT-PCR을 이용하여 세극막 관련 분자의 mRNA 발현 변화를 측정하였다.

결과: 생체 외 실험에서 CsA와 sirolimus 동시 투여 또는 CsA 처리 후 sirolimus 처리군에서 nephrin 발현이 의미 있게 감소하였다. 생체 내 실험에서 nephrin 발현은 sirolimus를 사용한 모든 군에서, podocin 발현은 CsA와 sirolimus 동시투여 또는 CsA 처리 후 sirolimus 처리군에서 의미 있게 감소하였다. 광학현미경에서 CsA 투여군은 세뇨관 상피세포에서 공포형성 및 석회화가 관찰되었으며, 면역 조직화학검사에서 사구체 모세혈관의 nephrin, podocin항체 침착은 감소되지 않았다. CsA 투여군의 전자 현미경소견에서 사구체 족돌기의 국소적 융합이 있었으며, sirolimus 단독군에서는 특이소견이 없었다.

결론: 본 연구를 통해 sirolimus로 발생한 단백뇨의 많은 기전 중 하나로 sirolimus가 세극막 관련 분자 중 nephrin 및 podocin의 mRNA 발현을 감소시킬 수 있으며 sirolimus 단독보다는 CsA와 함께 작용했을 때 효과가 더 커질 수 있음을 제시하는 바이다.

감사의 글

본 논문은 대한소아신장학회 2008년도 연구비와 2008년도 (주)녹십자 연구비 지원을 받았습니다.

참 고 문 헌

- 1) Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004;4:378-83.
- 2) Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000;342:605-12.
- 3) Weir MR, Blahut S, Drachenburg C, Young C, Papademitriou J, Klassen DK, et al. Late calcineurin inhibitor withdrawal as a strategy to prevent graft loss in patients with suboptimal kidney transplant function. *Am J Nephrol* 2004;24:379-86.
- 4) Andrassy J, Graeb C, Rentsch M, Jauch KW, Guba M. mTOR inhibition and its effect on cancer in transplantation. *Transplantation* 2005;80:S171-4.
- 5) Morath C, Arns W, Schwenger V, Mehrabi A, Fonouni H, Schmidt J, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:viii61-viii65.
- 6) Lee VW, Chapman JR. Sirolimus: its role in nephrology. *Nephrology (Carlton)* 2005;10:606-14.
- 7) Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35:7S-14S.
- 8) Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Tabubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996;98:2277-83.
- 9) He Z, Chen L, Qiu J, Li J, Zhao D, Chen G, et al. Conversion from cyclosporin A to sirolimus retards the progression of chronic allograft nephropathy in the long term in a rat kidney transplantation model. *J Int Med Res* 2009;37:1396-410.
- 10) Sennesael JJ, Bosmans JL, Bogers JP, Verbeelen D, Verpooten GA. Conversion from cyclosporine to sirolimus in stable renal transplant recipients. *Transplantation* 2005;80:1578-85.
- 11) Stallone G, Infante B, Schena A, Battaglia M, Ditunno P, Loverre A, et al. Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3755-62.
- 12) Bumbea V, Kamar N, Ribes D, Esposito L, Modesto A, Guitard J, et al. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2517-23.
- 13) Gonwa TA, Hricik DE, Brinker K, Grinyo JM, Schena FP; Sirolimus Renal Function Study Group. Improved renal function in sirolimus-treated renal transplant patients after early cyclosporine elimination. *Transplantation* 2002;74:1560-7.
- 14) Letavernier E, Peraldi MN, Pariente A, Morelon E, Legendre C. Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation* 2005;80:1198-203.
- 15) Boratyńska M, Banasik M, Watorek E, Falkiewicz K, Patrzalek D, Szyber P, et al. Conversion to sirolimus from cyclosporine may induce nephrotic proteinuria and progressive deterioration of renal function in chronic allograft nephropathy patients. *Transplant Proc* 2006;38:101-4.
- 16) Franco AF, Martini D, Abensur H, Noronha IL. Proteinuria in transplant patients associated with sirolimus. *Transplant Proc* 2007;39:449-52.
- 17) Izzedine H, Brocheriou I, Frances C. Post-transplantation proteinuria and sirolimus. *N Engl J Med* 2005;353:2088-9.
- 18) Rangan GK. Sirolimus-associated proteinuria and renal dysfunction. *Drug Saf* 2006;29:1153-61.
- 19) Letavernier E, Legendre C. mTOR inhibitors-induced proteinuria: mechanisms, significance, and management. *Transplant Rev*

- (Orlando). 2008;22:125-30.
- 20) Han GD, Suzuki K, Koike H, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, et al. IFN-inducible protein-10 plays a pivotal role in maintaining slit-diaphragm function by regulating podocyte cell-cycle balance. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:442-53.
 - 21) Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitanio M, Bertani T, Remuzzi G. In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1213-24.
 - 22) Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006;6:429-33.
 - 23) Mreich E, Coombes JD, Rangan GK. Sirolimus does not reduce receptor-mediated endocytosis of albumin in proximal tubule cells. *Transplantation* 2007;83:105-7.
 - 24) Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996;50:1089-100.
 - 25) Saurina A, Campistol JM, Piera C, Diekmann F, Campos B, Campos N, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in chronic allograft dysfunction: changes in glomerular haemodynamics and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:488-93.
 - 26) van den Akker JM, Wetzels JF, Hoitsma AJ. Proteinuria following conversion from azathioprine to sirolimus in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2006;70:1355-7.
 - 27) Diekmann F, Gutiérrez-Dalmau A, López S, Cofán F, Esforzado N, Ricart MJ, et al. Influence of sirolimus on proteinuria in de novo kidney transplantation with expanded criteria donors: comparison of two CNI-free protocols. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:2316-21.
 - 28) Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, Van Huyen JP, Péraldi MN, Helal I, et al. High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:326-33.
 - 29) Letavernier E, Bruneval P, Vandermeersch S, Perez J, Mandet C, Belair MF, et al. Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:630-8.
 - 30) Pätäri-Sampo A, Ihalmo P, Holthöfer H. Molecular basis of the glomerular filtration: nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med* 2006;38:483-92.
 - 31) Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)* 2006;11:274-81.
 - 32) Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001;108:1583-7.
 - 33) Kwok C, Shannon MB, Miner JH, Shaw A. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol* 2006;1:349-74.
 - 34) Vollenbröker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstädt H, Weide T. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F418-26.
 - 35) Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000;356:194-202.
 - 36) Kokui K, Yoshikawa N, Nakamura H, Itoh H. Cyclosporin reduces proteinuria in rats with aminonucleoside nephrosis. *J Pathol* 1992;166:297-301.
 - 37) Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a

- direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med.* 2008;14:931-8.
- 38) Meyrier A. Antiproteinuric and immunological effects of cyclosporin A in the treatment of glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:S80-4.
- 39) Nacar A, Kiyici H, Oğuş E, Zağyapan R, Demirhan B, Ozdemir H, et al. Ultrastructural examination of glomerular and tubular changes in renal allografts with cyclosporine toxicity. *Ren Fail* 2006;28:543-7.
- 40) DiJoseph JF, Sharma RN, Chang JY. The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* 1992; 53:507-13.
- 41) Liew A, Chiang GS, Vathsala A. Factors associated with proteinuria in renal transplant recipients treated with sirolimus. *Transpl Int* 2009;22:313-22.
- 42) Ruiz JC, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, Mota A, Grinyo JM, Paul J, et al. Early sirolimus use with cyclosporine elimination does not induce progressive proteinuria. *Transplant Proc* 2007;39:2151-2.