

소아 IgA 신병증 환자에서 임상병리 양상과 *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자 다형성의 연관성 연구

경희대학교 의과대학 소아과학교실, 경희대학교 동서신장병 연구소

한원호 · 서진순 · 조병수

= Abstract =

Association Study between *CCL-2* and *CCL-5* Polymorphisms and Clinicopathological Characteristics of Childhood IgA Nephropathy

Won-Ho Hahn, M.D., Jin-Soon Suh, M.D. and Byoung-Soo Cho, M.D., Ph.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine

East West Kidney Diseases Research Institute Kyung Hee University, Seoul, Korea

Purpose : Previous studies have suggested that Chemokine (C-C motif) ligand-2 (*CCL-2*; also known as MCP-1) and *CCL-5* (also known as RANTES) are possibly associated with the pathogenesis of various inflammatory and non-inflammatory renal diseases. The present study was conducted to investigate association of polymorphisms of *CCL-2* and *CCL-5* genes with childhood IgA nephropathy (IgAN).

Methods : The authors analyzed six single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CCL-2* and *CCL-5* in 196 pediatric IgAN patients and in 285 healthy controls. We compared variations in SNPs between two several sets of IgAN subgroups, allocated by presence of proteinuria (>4 mg/m²/hour), podocyte foot process effacement, and pathologically advanced disease markers, such as interstitial fibrosis, tubular atrophy, or global sclerosis.

Results : Genotypic data of IgAN patients and controls showed no significant SNP frequency difference in both of *CCL-2* and *CCL-5*. Even though two linkage disequilibrium blocks were formed, there was no significance in the haplotype analysis. In the patient subgroup analysis, no SNP of *CCL-2* and *CCL-5* was found to be associated with the presence of proteinuria, podocyte foot process effacement, and pathologically advanced disease markers.

Conclusion : Our data indicate that no association exists between *CCL-2* and *CCL-5* SNPs and childhood IgAN susceptibility, and presence of proteinuria, podocyte foot process effacement, and pathologic progression of IgAN. (*J Korean Soc Pediatr Nephrol* 2010;14: 51-61)

Key Words : *CCL-2*, MCP-1, *CCL-5*, RANTES, Chemokine, Polymorphism, IgA nephropathy, Childhood

*이 연구는 경희대학교 신진연구자 특별 지원사업의 보조로 이루어 졌습니다(KHU-20091437).

접수 : 2010년 3월 27일, 수정 : 2010년 4월 13일

승인 : 2010년 4월 21일

책임저자 : 조병수, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 소아청소년과

Tel : (02)958-8295 팩스 : (02)958-8304

E-mail : bscho@dreamwiz.com

서 론

신장에서 국소적으로 생성되는 여러 사이토카인과 성장인자들은 직접적으로 병리적 변화와 그 정도에 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며, Monocyte

chemoattractant protein-1 (MCP-1)으로도 알려진 Chemokine (C-C motif) ligand-2 (*CCL-2*)와 Regulated upon activation, normally T-expressed, and presumably secreted (RANTES)로도 알려진 *CCL-5*는 모두 monocyte와 macrophage를 손상된 조직으로 이동시키고 증식시키는 강력한 사이토카인이다.

*CCL-2*는 주로 monocyte와 같은 염증 세포 등에서 생산되며, 동명의 수용체인 Chemokine receptor-2 (CCR-2)의 리간드로서 작용을 나타낸다. 여러 연구들에 따르면 염증 세포 이외에 신장 구성 세포들에서도 발견이 되었는데, 신장의 메산지움 세포, 혈관 내피 세포, 세뇨관의 표피 세포 등에서 생산이 확인되었고[1, 2], 반월형 사구체 신염의 동물 모델에서 발현이 증가되는 것으로 보고된 바 있다 [2]. 동물 실험 외에도 IgA 신병증을 포함하여 루푸스 신염과 당뇨병성 신병증 및 반월형 사구체 신염 환자의 소변 검체에서 *CCL-2*의 배설이 증가 하였으며[3-5], 특히 신염의 활동성 병변 및 신세뇨관의 진행성 병변과의 관련성도 보고 되었다[3, 5, 6].

한편, *CCL-5*는 CCR-5의 리간드로 작용하며, 이미 다양한 신장의 염증성 질환들에서 신장 손상 기전 및 macrophage의 신장으로의 이동에 매우 중요한 사이토카인으로 잘 알려져 있다[7, 8]. CCR-5 길항제인 Met-RANTES의 투여가 신장동종이식 동물 모델에서 monocyte를 포함한 염증세포의 신장 조직 침윤을 억제하고 단백뇨의 발생을 감소시켰으며, 간질 섬유화 및 세뇨관 위축, 사구체 경화 등의 진행성 병변을 억제하였다는 보고가 있다[9]. 또한, *CCL-5* 역시 루푸스 신염의 활성화기(flare)에 소변으로의 배설이 증가되어 활성화기의 예측과 관련성이 있었다는 보고가 있으며 [7], 소변 내 *CCL-5*의 messenger RNA 발현 역시 루푸스의 질병 활동성 및 신장 침범의 중증도와 관련성이 있다고 보고되었다[10]. 사구체 신염과 같은 염증성 질환 외에도 폐쇄성 신병증과 같은 비염증성 신질환에서도 현저하게 *CCL-5*가 발현되었고[11], 안지오텐신 II가 사

구체의 혈관 내피세포에서 *CCL-5*의 발현을 촉진하였다는 사실도 보고된 바 있다[12].

일차성 IgA 신병증은 성인 및 소아 환자에서 가장 흔한 만성 사구체 신염이며, 매우 다양한 임상 경과를 보인다. 사구체 간질의 IgA 침착이 특징이며, 이로 인해 간질 세포의 증식, 사구체 경화, 신세뇨관 위축, 간질 섬유화 등의 병리적 변화가 일어나게 된다. 한때는 저절로 회복되는 양성 질환인 것으로 알려졌으나, 일부에서는 말기 신부전으로 진행되는 알려졌으며, 이 과정에서 개인차가 존재하여 아마도 유전적 인자가 IgA 신병증의 발병과 진행에 관련되어 작용할 것으로 생각되고 있다.

여러 염증성 질환에서도 *CCL-2* 및 *CCL-5*의 유전자 다형성이 연구되어 왔는데, 대표적인 것이 *CCL-2*의 A-2518G이며 보고에 따라 어느 정도의 차이를 보이나, 이미 여러 몇몇 인종에서 당뇨병성 신병증, 전신성 홍반성 루푸스, 등의 신 질환에서 질환에 대한 감수성 및 진행성 병변의 발생, 말기 신질환으로의 진행 등과 연관성이 보고되었다[13-19]. IgA 신병증에서도 동일한 유전자 다형성이 연구되었는데, *CCL-2*의 유전자 다형성이 IgA 신병증의 진행의 독립적 위험인자이며, 신기능의 보존과 밀접히 연관되어 있었다[20]. *CCL-2* 및 CCR-5의 유전자 다형성도 여러 연구에서 보고된 바 있으며, 결과에 있어 약간씩의 차이는 있으나 주로 전신성 홍반성 루푸스에서 질환 감수성 및 신장 침범과 연관성이 있으며, 당뇨병성 신병증에서 말기 신질환으로의 이행과 연관성이 있다는 보고들이었다[16, 17, 21-23].

이와 같이 *CCL-2* 및 *CCL-5*는 IgA 신병증을 포함한 다양한 염증성, 비염증성 신장질환에서 신장 조직의 손상 기전과 관련성이 높은 것으로 생각되고 있으며, 일부에서는 발병과 활동성 및 예후의 지표로 주장 되고 있지만[3, 24-27], *CCL-2*에서는 A-2518G 이외의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)이 연구된 바 없으며, *CCL-5*에서도 제한적인 SNP만이 연구되었다. 더구나

IgA 신병증에서는 *CCL-2* A-2518G 만을 다루었던, 단 2개의 보고만이 있을 뿐이다[20, 28]. 특히 소아 연령 환자에서는 연구된 바가 없어, 소아 IgA 신병증 환자의 임상, 병리양상과 *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자의 다양한 SNP과의 연관성을 알아보기 위하여 본 연구를 계획하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

환자군은 학교 검뇨 상 이상 소견을 보여 경희의료원으로 전원된 환자 중 2000년 1월부터 2007년 12월까지 신장 조직검사를 시행하여 IgA 신병증으로 확진된 196명의 환자를 대상으로 하였다. 총 196명의 IgA 신병증 환자(mean age±SD: 12.62±5.17세) 중 남자는 117명(13.31±4.95세), 여자는 79명(11.60±5.34세)이었으며, 칼슘뇨 및 비뇨기계 질환을 제외시킨 환자 중 1년 이상의 지속적인 혈뇨, 혹은 단백뇨가 동반된 혈뇨가 있는 경우, 신기능 악화가 있는 경우 등의 신생검 적응증에 따라 사구체 질환을 감별하기 위하여 신장 조직검사를 시행하였다. 대조군은 본원에서 건강검진 센터를 방문한 성인 중 과거 병력 및 증상 등에 대한 설문 조사, 혈압, 심전도, 복부초음파, 혈액 및 소변 검체에 대한 기본적인 검사실 검사에서 모두 정상소견을 보인 자로 하였으며, 하나의 항목이라도 이상소견이 있다면 대상에서 제외하였다. 총 285명이 대조군으로 선별되었으며(37.64±13.45세), 남자는 155명(39.74±14.76세), 여자는 130명(35.14±11.24세)이었다.

CCL-2 및 *CCL-5* 유전자가 IgA 신병증의 병리에 미치는 영향을 보다 자세히 알아보기 위하여 IgA 신병증 환자를 다음의 세가지 기준에 따라 각각 두 하위 그룹으로 나누어 비교하였다. 1) 단백뇨 유무에 따라(>4 mg/m²/hr) 단백뇨 군(149명, 12.99±5.46세)과 비단백뇨 군(47명, 11.45±3.93세)으로 분류하였고, 2) 신생검 상 족세포의 족돌기 융합(po-

docyte foot process effacement)의 유무에 따라 있는 군(73명, 12.81±5.20세)과 없는 군(123명, 12.51±5.17세)으로 분류하였으며, 3) 신생검 상 간질 섬유화, 신세뇨관 위축, 사구체 경화의 진행성 병변 유무에 따라 진행성(21명, 15.33±6.69세) 및 비진행성(175명, 12.29±4.88세) 병변 그룹으로 나누어 *CCL-2*와 *CCL-5* 다형성의 대립 유전자의 빈도 차이를 비교 분석하였다(Table 1). 여기에서 단백뇨는 늦은 시기에 발생할 수 있는 단백뇨를 모두 포함하기 위하여 질병의 경과 중 가장 심했던 단백뇨를 기준으로 삼았다.

본 연구의 모든 환자 및 대조군은 유전자 연구에 대하여 서면으로 동의를 받았으며, 경희대학교 임상연구윤리위원회의 심의 하에 수행되었다.

2. 환자군의 임상 및 병리 소견

환자의 단백뇨와 신생검으로 얻어진 병리 소견을 분석하였다. 병리 소견은 modified H. S. Lee's classification [29]에 의거하여 분류하였으며, I-V로 구분하였으며, 각 환자군의 하위 그룹에 따른 병리학적 소견의 분포를 조사하였다.

3. SNP 선정 및 Genotyping

Genomic DNA를 환자 및 대조군의 전혈에서 Qiagen DNA Extraction kit (Qiagen, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자의 SNP는 데이터 베이스(<http://www.ensemble.org>, <http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)의 검색을 통하여 선정하였으며, 너무 낮은 heterozygosity (<0.1)와 minor allele frequency (<0.05)를 보이는 경우 선정에서 제외하였다. HapMap database로 위 SNP들을 검정하였고, 결과적으로 총 6개의 SNP가 선정되었으며, *CCL-2* (rs4586, rs2857656, rs3760396)와 *CCL-5* (rs2107538, rs2280789, rs3817655)에서 각각 3개씩이었다.

Table 1. Demographics of the IgA Nephropathy Patients (n=196)

Subgroup	n (%)	M:F	Age (years)		Pathologic Grading (n) [*]					
			mean±SD	Mean	I	II	III	IV	V	P-value
Proteinuria (mg/m ² /hr) [†]										
>4	149 (46.0)	100:49	12.99±5.46	33.47±52.28	92	56	0	1	0	<0.001
≤4	47 (54.0)	17:30	11.45±3.93	2.06±1.03	38	9	0	0	0	
Podocyte foot process effacement										
(+)	73 (37.2)	44:29	12.81±5.20	NA	33	39	0	1	0	<0.001
(-)	123 (62.8)	73:50	12.51±5.17	NA	52	21	0	0	0	
Advanced disease markers										
(+)	21 (10.7)	15:6	15.33±6.69	NA	6	14	0	1	0	<0.001
(-)	175 (89.3)	102:73	12.29±4.88	NA	124	51	0	0	0	

^{*}Modified H. S. Lee's glomerular grading system [23]; Mann-Whitney U test performed comparing pathologic grading between patient subgroups.

[†]Proteinuria indicates the largest level of proteinuria observed during the course of disease. Abbreviations : NA, not applicable

Table 2. Primers of Candidate SNPs of *CCL-2* and *CCL-5* genes

Gene	SNP		Sequence (5-3)	Product size (bp)
<i>CCL-2</i>	rs4586	Forward	GAAGCACTGGGATTTAATGAGC	421
		Reverse	AGAGTGATGTTGGGGTTCACTT	
	rs2857656	Forward	TATGCCTTTGTCCAAGTCTGAA	440
		Reverse	CTGTGGATTTCCAGGAAGTAGG	
	rs3760396	Forward	ATGCTAGCAACAGCCTCCTAAC	362
		Reverse	GAGTGCTTACTCTGCCAGGAAT	
<i>CCL-5</i>	rs2107538	Forward	CAAGAAATTCCCACAAGAGGAC	407
		Reverse	AGTTTCCTCTTTGACCAAGCAC	
	rs2280789	Forward	GACTCTGCCTAGAATGCCTACC	366
		Reverse	CTGTCTCAGGGTCTCAGGAAGT	
	rs3817655	Forward	GACTCAGTTCTTGAGGGACACC	379
		Reverse	AGAAGAGGGAGGATGAGACCTT	

Abbreviations : CCL, Chemokine (C-C motif) ligand; SNP, single nucleotide polymorphism

Genomic DNA들은 각각에 대한 primer를 이용하여 증폭하였고, 각 primer 및 각 SNP의 정보는 Table 2에 나타내었다. Polymerase chain reaction (PCR)은 30초간 94°C, 다음 30초간 58°C, 다음 1분간 72°C에서 35 cycle을 반복하였으며, PCR을 종료하기 위해 7분간 72°C에서 마지막 1 cycle

을 시행하였다. PCR 결과물은 ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing system (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 sequencing 하였으며, sequencing 자료는 SeqManII software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)를 이용하여 분석하였다.

4. 통계 방법

환자 하위그룹의 병리소견 비교는 Mann-Whitney U test를 시행하였으며, 통계 프로그램은 SPSS version 15.0을 이용하였다.

환자-대조군 연구에서 모든 SNP는 SNPstats를 이용하여 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)를 산출하였으며[30], SNP 중 HWE에 해당하지 않은 SNP는 분석에서 제외하였다($P < 0.05$). Gabriel 방법[31]을 이용하여 linkage disequilibrium (LD) block을 확인하고 하플로 타입분석을 통해 질병과의 연관성을 조사하였고, 이를 위해서 Hapview (version 4.1)과 HapAnalyzer (version 1.0)가 사용되었다. 환자-대조군 연구 및 각 하위 그룹 간의 SNP 대립 유전자 빈도를 비교하기 위하여 로지스틱 회귀 분석을 시행하였으며, 분석에는 SNPstats와 SNPAnalyzer (ISTECH Inc., Goyang, Korea)의 통계 프로그램을 사용하였다.

결 과

1. IgA 신병증 환자군의 임상 및 병리 소견

IgA 신병증 환자군을 하위 그룹으로 나누었을 때, 병의 경과 중 최대량의 단백뇨가 있는 그룹($>4 \text{ mg/m}^2/\text{hr}$; $\text{mean} \pm \text{SD}$: $33.47 \pm 52.28 \text{ mg/m}^2/\text{hr}$)은 그렇지 않은 그룹($\leq 4 \text{ mg/m}^2/\text{hr}$; $2.06 \pm 1.03 \text{ mg/m}^2/\text{hr}$)에 비해 평균 modified H. S. Lee's classification이 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.001$) (Table 1). 또한, 신장 생검 상 족세포의 족돌기 융합이 있는 군 및 병리적으로 진행성 신병변을 가지는 군 모두에서 통계적으로 유의하게 높은 modified H. S. Lee's classification을 보였다($P < 0.001$). 그러나, 환자의 대부분이 grade I-II에 한정되어 있어, 매우 초기 질환자들이 연구의 대상이 되었음을 알 수 있었다.

2. IgA 신병증 환자군과 정상 대조군 간의 유전자 다형성 연관성 분석

*CCL-2*와 *CCL-5* 유전자의 대상 SNP는 6개 모두 HWE에 해당하였다($P > 0.05$). IgA 신병증 환자군과 건강한 대조군에서 *CCL-2* 및 *CCL-5* SNP의 대립 유전자 빈도를 비교한 결과, 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 발견하지 못하였다 (Table 3). 또한 HapMap database (<http://www.hapmap.org>) 검색을 통해 타 인종(유럽, 중국, 일본)과 *CCL-2* 및 *CCL-5* SNP의 빈도를 비교해 본 결과 유럽 및 일본과는 대립 유전자 빈도가 전반적으로 차이가 있었으며, 상대적으로 중국 인종과는 모든 SNP에서 그 빈도가 상당히 유사하였다 (Table 4).

3. IgA 신병증 환자군 내에서 형질에 따른 유전자 다형성 연관성 분석

IgA 신병증 환자군을 다시 단백뇨의 유무에 따라 아군으로 나누어 총 6개의 유전자 다형성을 비교한 결과, *CCL-2* 및 *CCL-5* 모두에서 대립 유전자의 빈도에 유의한 차이점이 없었다 (data not shown). 신장 생검 상 족세포의 족돌기 융합 소견을 보인 그룹과 보이지 않은 그룹 사이에서도 SNP의 빈도 차이에는 차이가 없었으며 (data not shown), 병리 소견 상 진행성 병변으로 신세뇨관 위축이나 간질 섬유화, 사구체 경화 등을 가지는 진행성 그룹과 가지지 않는 비 진행성 그룹 사이에서도 SNP의 빈도는 유의한 차이점을 보이지 않았다 (data not shown).

4. LD block의 계산과 하플로타입 분석

Gabriel 방법[31]을 이용하여 환자-대조군 사이에서 모두 2개의 LD block이 확인되었으며, block 1은 rs3760396, rs2857656, rs4586으로 이루어져 있으며, block 2는 rs3817655, rs2280789,

Table 3. Logistic Regression Analysis of *CCL-2* and *CCL-5* Gene Polymorphisms in IgA Nephropathy Patients and Healthy Controls after Adjustment for Age*

Gene	SNP	Genotype	IgAN		Control		Models	OR (95% CI)	P-value
			n=196 (%)	n=285 (%)	n=196 (%)	n=285 (%)			
<i>CCL-2</i>	rs4586 exon	C/C	107 (37.5)	85 (43.4)	Codominant	0.94 (0.72-1.23)	0.660		
		T/C	141 (49.5)	81 (41.3)	Dominant	0.80 (0.55-1.16)	0.240		
		T/T	37 (13)	30 (15.3)	Recessive	1.24 (0.73-2.08)	0.430		
	Cys35Cys	T/T	Overdominant			Overdominant	0.73 (0.50-1.05)	0.087	
			Codominant	107 (37.5)	85 (43.4)	Codominant	0.94 (0.72-1.23)	0.650	
			Dominant	141 (49.5)	81 (41.3)	Dominant	0.80 (0.55-1.16)	0.240	
			Recessive	37 (13)	30 (15.3)	Recessive	1.23 (0.73-2.07)	0.440	
	rs2857656 promoter	G/G	Overdominant			Overdominant	0.73 (0.50-1.05)	0.088	
			Codominant	107 (37.5)	85 (43.4)	Codominant	0.94 (0.72-1.23)	0.650	
			Dominant	141 (49.5)	81 (41.3)	Dominant	0.80 (0.55-1.16)	0.240	
			Recessive	37 (13)	30 (15.3)	Recessive	1.23 (0.73-2.07)	0.440	
	rs3760396 promoter	G/G	Overdominant			Overdominant	0.73 (0.50-1.05)	0.088	
Codominant			244 (85.6)	163 (83.2)	Codominant	1.26 (0.79-2.02)	0.340		
Dominant			40 (14)	31 (15.8)	Dominant	1.23 (0.75-2.03)	0.420		
Recessive			1 (0.4)	2 (1)	Recessive	3.09 (0.28-34.53)	0.340		
<i>CCL-5</i>	rs2107538 promoter	G/G	Overdominant			Overdominant	1.17 (0.70-1.96)	0.540	
			Codominant	108 (37.9)	81 (41.3)	Codominant	0.86 (0.66-1.11)	0.230	
			Dominant	125 (43.9)	88 (44.9)	Dominant	0.86 (0.60-1.25)	0.440	
			Recessive	52 (18.2)	27 (13.8)	Recessive	0.72 (0.43-1.20)	0.200	
	rs2280789 intron	T/T	Overdominant			Overdominant	1.04 (0.72-1.50)	0.850	
			Codominant	111 (39)	81 (41.3)	Codominant	0.87 (0.67-1.13)	0.310	
			Dominant	124 (43.5)	89 (45.4)	Dominant	0.90 (0.62-1.31)	0.590	
			Recessive	50 (17.5)	26 (13.3)	Recessive	0.72 (0.43-1.20)	0.210	
	rs3817655 intron	C/C	Overdominant			Overdominant	1.08 (0.75-1.55)	0.700	
			Codominant	108 (38)	81 (41.3)	Codominant	0.86 (0.66-1.11)	0.240	
			Dominant	124 (43.7)	88 (44.9)	Dominant	0.87 (0.60-1.26)	0.460	
			Recessive	52 (18.3)	27 (13.8)	Recessive	0.72 (0.43-1.19)	0.200	
					Overdominant	1.04 (0.72-1.51)	0.820		

*Total numbers of SNPs differ because the genotypes of some SNPs were not determined. Abbreviations : CCL, Chemokine (C-C motif) ligand; SNP, single nucleotide polymorphism; IgAN, IgA nephropathy

rs210758로 이루어져 있고, 모두 강한 LD를 보이고 있었다(Fig. 1). 그러나, 2개의 block을 이루는 하플로타입 분석을 시행한 결과 환자-대조군 간의 통계적으로 유의한 차이를 발견하지 못하였다(data not shown).

고 찰

*CCL-2*와 *CCL-5*의 유전자 다형성은 다양한 질환군에서 질병과의 연관성이 보고되고 있다. *CCL-2*의 SNP는 당뇨병성 신병증의 위험성을 증가시켰

으며[13], 말기 신질환으로의 진행과 연관성이 있다는 우리나라 환자군의 연구 결과도 있다[15]. 유럽 인종에서는 전신성 홍반성 루푸스의 감수성이나 루푸스 신염의 발생에는 영향을 주지 못했으나 피부 혈관염의 발생과 연관성이 있다고 보고되었다[14]. 또 다른 연구에서는 전신성 홍반성 루푸스 환자에서 신염의 발생이 *CCL-2*의 SNP와 강한 연관성을 보였으나 신기능의 변화와는 연관성을 찾지 못하였다고 보고하였다[19, 32, 33].

CCL-5 유전자 및 그 수용체(CCR-5)의 다형성 역시 당뇨병성 신병증의 발생, 혹은 말기 신부전으로

Table 4. Allele Frequencies of Total 6 Candidate SNPs in Korean and Reference Racial Frequencies (European, Chinese, and Japanese)

Gene	SNP		IgAN frequency	Control frequency	Hapmap*		
	Locus	Genotype			European	Chinese	Japanese
<i>CCL-2</i>	rs4586 exon	C/C	0.375	0.434	0.086	0.448	0.409
		T/C	0.495	0.413	0.466	0.448	0.477
		T/T	0.130	0.153	0.448	0.133	0.114
	rs2857656 promoter	C/C	0.375	0.434	0.000	0.311	0.409
		G/C	0.495	0.413	0.456	0.533	0.477
		G/G	0.130	0.153	0.544	0.156	0.114
	rs3760396 promoter	C/C	0.856	0.832	0.550	0.800	0.886
		G/C	0.140	0.158	0.383	0.178	0.114
		G/G	0.004	0.010	0.067	0.022	0.000
<i>CCL-5</i>	rs2107538 promoter	C/C	0.379	0.413	0.810	0.444	0.364
		T/C	0.439	0.449	0.190	0.422	0.477
		T/T	0.182	0.138	0.000	0.133	0.159
	rs2280789 intron	T/T	0.390	0.413	0.850	0.477	0.364
		T/C	0.435	0.454	0.133	0.409	0.477
		C/C	0.175	0.133	0.017	0.114	0.159
	rs3817655 intron	T/T	0.380	0.413	0.800	0.444	0.349
		A/T	0.437	0.449	0.183	0.422	0.488
		A/A	0.183	0.138	0.017	0.133	0.163

* All the reference data was from the HapMap database (<http://www.hapmap.org>) of European, Chinese, and Japanese population

의 진행과 유의한 상관 관계가 보고 되었으며[17, 21, 23], 이유는 알 수 없으나 남성에서만 연관성이 있었다는 보고도 있었다[34]. 전신성 홍반성 루푸스와 관련하여서는 *CCL-5*의 다형성이 루푸스의 감수성과는 연관성이 없었으나, 신염의 발생과는 유의한 상관 관계를 보였다는 보고가 있었으며[22], 한편, 우리나라를 포함한 몇몇 인종의 당뇨 환자에서 *CCL-2*와 *CCL-5* 모두 말기 신질환으로의 진행과 연관성이 없었다는 상반된 결과도 보고된 바 있으며[16, 17], 루푸스 신염[35] 및 신이식[36]과 관련해서도 *CCL-2*와 *CCL-5* 모두 SNP가 병리 소견 및 예후에 영향을 미치지 못했다는 보고도 있다.

Brown 등의 *CCL-2* 유전자 다형성과 전신성 홍반성 루푸스와의 연관성 연구[18]에서는 *CCL-2* (-2518)G 대립 유전자를 보유하는 경우 미국의 백인에서는 전신성 홍반성 루푸스의 높은 위험성(OR=

4.2, 95% CI=1.8-9.6, $P<0.0001$)을 보였으나, 흑인종에서는 유의한 차이를 보이지 못하였다는 보고가 있어, 연구 결과들에 차이를 보이는 것이 일부 인종간에 유전자 다형성이 다르게 작용할 수 있기 때문일 것으로 생각된다.

몇몇 연구들의 결과에 다소 상반되는 결과는 있으나 전반적으로 *CCL-2* 혹은 *CCL-5* 유전자가 다양한 질환의 발생에 작용할 것이라고 보고되고 있어 새로운 진단적 지표나 진행성 신질환의 치료 대상 유전자로 여겨지고 있다[25].

본 연구에서 *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자의 다형성이 소아 IgA 신병증의 발생에 대한 감수성과 관련성이 없음을 알 수 있었다. 또한, 환자를 다시 세분화하여 SNP의 대립 유전자 빈도를 비교한 결과 IgA 신병증 경과 중 단백뇨의 발생, 족세포의 죽들기 융합, 병리학적 진행성 병변의 발생과도 연관성을 찾을

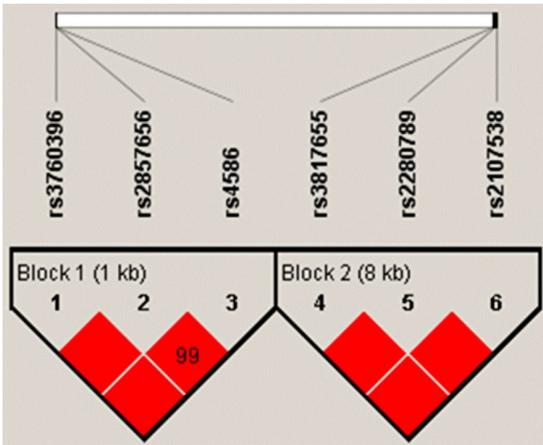


Fig. 1. Linkage disequilibrium (LD) block organization of the *CCL-2* and *CCL-5* gene. Each box represents linkage disequilibrium (LD) (range 0–1) between pairs of single-nucleotide polymorphism (SNP) markers as generated with the Haploview program. Red shading indicates strong LD (no number means a score 1). Purple shading indicates uninformative and white shading indicates strong evidence for recombination.

수 없었다. 이 결과는 Steinmetz 등[28]이 유럽 인종에서 시행하였던 IgA 신병증 환자와 *CCL-2* 유전자 다형성의 연관성 연구와 일부 일치하는 것이다. 그러나, 일본 환자를 대상으로 한 연구에는 IgA 신병증의 진행과 독립적으로 연관성을 보였으며, 신장 기능의 보존과 관련되어 있다는 보고도 있었다[20].

유전자의 기능을 살펴볼 때, *CCL-2*와 *CCL-5*의 SNP가 IgA 신병증의 병리에 밀접히 관련되어 있을 것으로 생각되나 유의성을 보이는 데에 실패한 것도 인종간에 유전자 발현의 차이가 있다는 데에 일부 원인이 있다고 생각된다. 우리 연구 결과(Table 4)를 보면, 대조군의 SNP 대립 유전자 빈도가 중국인종과 비슷하며, 유럽이나 일본과는 상당히 다른 양상을 보이는 것을 알 수 있다. 따라서, 향후 보다 많은 환자 및 대조군을 대상으로 연구를 시행하고, 중국 인종을 대상으로 한 연구들과 비교 연구해야 할 필요성이 있다.

또한, 대부분의 *CCL-2*에 대한 연구가 A-2518G SNP에 국한되는 등, 우리가 대상으로 삼았던 SNP

는 과거 연구에 거의 포함되어 있지 않았기 때문에 직접적인 비교가 어려울 수 있다. 따라서 다른 연구들에서 많이 다루어져 이번 연구에서는 제외하였던, *CCL-2* A-2518G에 대해서도 연관성 연구를 해 보고 타 결과들과 다시 비교해 보는 것도 필요할 것이다.

한편, 본 연구의 제한점으로 인해 결과에 영향을 주었을 수도 있다. 환자와 대조군의 수가 적었고, 환자군은 소아였으나 대조군은 성인(12.62±5.17세 vs. 37.64±13.45세)이었다는 점이 그것이다. 이는 환자-대조군의 개별 SNP 연관성 분석 결과 및 하플로타입 분석 결과에 영향을 끼쳤을 수 있다. 그러나, 대조군을 소아로 삼을 수는 없었다. 그 이유는 IgA 신병증은 20대에 발병하는 것으로 알려져 있기 때문에, 무증상의 IgA 신병증을 가지고 있는 대조군을 제외시키기 위해서는 성인 대조군이 필요하였기 때문이었다. 또한 이미 다른 저자들은 소아의 IgA 신병증에서 시행된 SNP 연관성 연구들이 성인 대조군을 사용하여 보고하였다[37, 38].

환자 하위그룹 간에 비교하였던 연관성 분석 역시 제한점이 있었는데, Table 1에서도 확인할 수 있듯이 너무 초기 병변의 환자 위주였다는 것이 한계점이 될 것으로 생각된다. 이는 환자군이 학교 검뇨상 이상소견을 주소로 병원을 방문하였기 때문에 병리 소견이 거의 진행하지 않은 상태였기 때문으로 판단되며, 다음 연구에서는 이를 해소하기 위해 추적 신생검을 시행한 환자들을 대상으로 다시 분석해 볼 필요가 있다고 생각된다.

또한 다른 연구들에서 많이 다루어져 이번 연구에서는 제외하였던 *CCL-2* A-2518G에 대해서도 조사해 보고 타 결과들과 비교해 보는 것도 필요할 것이다.

요약하자면, 한국 소아 IgA 신병증 환자에서 연구하였던 *CCL-2*와 *CCL-5* 유전자 다형성의 연관성 분석 결과, *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자 모두 IgA 신병증의 발병과 연관성을 보이지 않았으며, 환자군에서 단백뇨의 발생 및 병리소견 상 족세포의 죽돌기

융합과 병리학적 진행성 병변과의 연관성도 찾을 수 없었다.

요 약

목적: 최근 Chemokine (C-C motif) ligand-2 (*CCL-2*; also known as MCP-1)와 *CCL-5* (also known as RANTES)가 다양한 염증성 및 비염증성 신질환과 연관성을 보인다는 연구결과들이 보고되고 있다. 이에 본 저자들은 *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)가 소아 IgA 신병증의 발생 및 임상양상과 어떠한 연관성을 보이는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

방법: 경희의료원 소아청소년과에서 학교 검소 상 이상소견을 보여 전원된 환자 중 신생검을 통해 IgA 신병증으로 확진된 196명의 소아환아와 285명의 건강한 대조군을 대상으로 genotyping을 통해 6 개의 SNP 대립 유전자 빈도를 조사하여 분석하였다. 또한, 단백뇨(>4 mg/m²/hour), 병리 소견 상 족세포의 족돌기 융합과 병리학적 진행성 병변의 유무에 따라 환자군을 다시 세 개의 하위그룹으로 세분화하여 비교하였다.

결과: IgA 신병증 환자 및 대조군의 SNP 대립 유전자 빈도를 분석하였을 때, *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자 모두에서 질환의 발생과 연관성을 보이는 SNP는 발견되지 않았다. 두 개의 linkage disequilibrium block이 형성되었으나 하플로타입 분석에서는 유의한 하플로타입을 찾을 수 없었다. 또한, 환자의 하위그룹을 비교하였을 때에도 단백뇨, 병리 소견 상 족세포의 족돌기 융합과 병리학적 진행성 병변과 연관성을 보이는 SNP는 발견되지 않았다.

결론: 한국 소아 환자를 대상으로 시행한 본 연구에서 *CCL-2* 및 *CCL-5* 유전자 다형성과 IgA 신병증의 임상병리 양상 간에 유의한 연관성은 없었다.

References

- 1) Cheng J, Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Gray CE, Nath KA, Grande JP. TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C959-70.
- 2) Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997;185:1371-80.
- 3) Stangou M, Alexopoulos E, Papagianni A, Pantzaki A, Bantis C, Dovas S, et al. Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2009;14:613-20.
- 4) Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Stasikowska O. CC chemokines and chemokine receptors in IgA nephropathy (IgAN) and in non-IgA mesangial proliferative glomerulonephritis (MesProGN). the immunohistochemical comparative study. *Pol J Pathol* 2005;56:121-6.
- 5) Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, et al. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J* 1996;10:1418-25.
- 6) Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:1492-9.

- 7) Tian S, Li J, Wang L, Liu T, Liu H, Cheng G, et al. Urinary levels of RANTES and MCP-1 are predictors of lupus nephritis flare. *Inflamm Res* 2007;56:304-10.
- 8) Furuichi K, Wada T, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol* 2000;20:291-9.
- 9) Song E, Zou H, Yao Y, Proudfoot A, Antus B, Liu S, et al. Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2002;61:676-85.
- 10) Chan RW, Lai FM, Li EK, Tam LS, Chow KM, Li PK, et al. Messenger RNA expression of RANTES in the urinary sediment of patients with lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* 2006;11:219-25.
- 11) Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, et al. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004;66:2264-78.
- 12) Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, et al. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 1997;100:1047-58.
- 13) Ahluwalia TS, Khullar M, Ahuja M, Kohli HS, Bhansali A, Mohan V, et al. Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. *PLoS One* 2009;4:e5168.
- 14) Aguilar F, Gonzalez-Escribano MF, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2001;58:335-8.
- 15) Moon JY, Jeong L, Lee S, Jeong K, Lee T, Ihm CG, et al. Association of polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 promoter with diabetic kidney failure in Korean patients with type 2 diabetes mellitus. *J Korean Med Sci* 2007;22:810-4.
- 16) Joo KW, Hwang YH, Kim JH, Oh KH, Kim H, Shin HD, et al. MCP-1 and RANTES polymorphisms in Korean diabetic end-stage renal disease. *J Korean Med Sci* 2007;22:611-5.
- 17) Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, et al. Association of TGFbeta1, TNFalpha, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians. *BMC Med Genet* 2007;8:20.
- 18) Brown KS, Nackos E, Morthala S, Jensen LE, Whitehead AS, Von Feldt JM. Monocyte chemoattractant protein-1: plasma concentrations and A(-2518)G promoter polymorphism of its gene in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2007;34:740-6.
- 19) Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, et al. Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1842-9.
- 20) Mori H, Kaneko Y, Narita I, Goto S, Saito N, Kondo D, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 A-2518G gene polymorphism and renal survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2005;9:297-303.
- 21) Mokubo A, Tanaka Y, Nakajima K, Watada H, Hirose T, Kawasumi M, et al. Chemotactic cytokine receptor 5 (CCR5) gene promoter polymorphism (59029A/G) is associated with diabetic nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes: a 10-year longitudinal study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:89-94.
- 22) Ye DQ, Yang SG, Li XP, Hu YS, Yin J, Zhang GQ, et al. Polymorphisms in the promoter region of RANTES in Han Chinese and their relationship with systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 2005;297:108-13.
- 23) Nakajima K, Tanaka Y, Nomiyama T, Ogiha-

- ra T, Ikeda F, Kanno R, et al. RANTES promoter genotype is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2003;26:892-8.
- 24) Dantas M, Romao EA, Costa RS, dos Reis MA, Vieira Neto OM, Ribeiro RA, et al. Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1: a biomarker of active tubulointerstitial damage in patients with glomerulopathies. *Kidney Blood Press Res* 2007;30:306-13.
- 25) Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F697-701.
- 26) Yao TC, Kuo ML, See LC, Ou LS, Lee WI, Chan CK, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein 1 as sensitive markers of disease activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis: a six-year longitudinal study. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2585-93.
- 27) Das L, Brunner HI. Biomarkers for renal disease in childhood. *Curr Rheumatol Rep* 2009;11:218-25.
- 28) Steinmetz OM, Panzer U, Harendza S, Mertens PR, Ostendorf T, Floege J, et al. No association of the -2518 MCP-1 A/G promoter polymorphism with incidence and clinical course of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:596-601.
- 29) Lee HS, Lee MS, Lee SM, Lee SY, Lee ES, Lee EY, et al. Histological grading of IgA nephropathy predicting renal outcome: revisiting H. S. Lee's glomerular grading system. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20: 342-8.
- 30) Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22: 1928-9.
- 31) Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225-9.
- 32) Kim HL, Lee DS, Yang SH, Lim CS, Chung JH, Kim S, et al. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *Am J Kidney Dis* 2002;40:1146-52.
- 33) Malafronte P, Vieira JM, Jr., Pereira AC, Krieger JE, Barros RT, Woronik V. Association of the MCP-1 -2518 A/G Polymorphism and No Association of Its Receptor CCR2 -64 V/I Polymorphism with Lupus Nephritis. *J Rheumatol* 2010;37:776-8.
- 34) Mlynarski WM, Placha GP, Wolkow PP, Bochenski JP, Warram JH, Krolewski AS. Risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with functional polymorphisms in RANTES receptor gene (CCR5): a sex-specific effect. *Diabetes* 2005;54:3331-5.
- 35) Nakashima H, Akahoshi M, Shimizu S, Inoue Y, Miyake K, Ninomiya I, et al. Absence of association between the MCP-1 gene polymorphism and histological phenotype of lupus nephritis. *Lupus* 2004;13:165-7.
- 36) Brabcova I, Petrasek J, Hribova P, Hyklova K, Bartosova K, Lacha J, et al. Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation* 2007;84: 1037-44.
- 37) Maruyama K, Yoshida M, Nishio H, Shirakawa T, Kawamura T, Tanaka R, et al. Polymorphisms of renin-angiotensin system genes in childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2001;16:350-5.
- 38) Nakanishi K, Sako M, Yata N, Aoyagi N, Nozu K, Tanaka R, et al. A-20C angiotensinogen gene polymorphism and proteinuria in childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2004;19:144-7.