

파브리병의 바이오마커 발굴을 위한 파브리 마우스와 세포모델에서의 microRNA 발현 분석

이화여자대학교 의학전문대학원 생화학교실

정남희 · 박세영 · 전여진 · 최윤영 · 정성철

MicroRNA Expression Profiling in Cell and Mouse Models of Fabry Disease to Identify Biomarkers for Fabry Disease Nephropathy

Namhee Jung, Saeyoung Park, Yeo Jin Jeon, Yoonyoung Choi, Sung-Chul Jung

Department of Biochemistry, School of Medicine,
Ewha Womans University, Seoul, Republic of Korea

Purpose: The main aim of this study was to compare and analyze expression profiles of microRNAs (miRNAs) to establish miRNA signature of Fabry nephropathy related epithelial mesenchymal transition (EMT).

Methods: Expression profiles of miRNAs in kidney tissue samples and cell lines from normal and Fabry disease mouse model were examined by miRNA expression microarray analysis followed by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis (qRT-PCR).

Results: In the miRNA expression microarray analysis of Fabry mouse kidney tissues compared to wild type mouse, 5 and 3 miRNAs among 1,247 miRNAs examined were up- and down-regulated, respectively. Among them, miR-149-5p was down-regulated about 2-fold in Fabry kidney samples. The down-regulations of miR-149-5p were observed in kidney tissues of under 35 week-old-Fabry mice. However, this down-regulation was not observed in kidney tissues of 42 week-old Fabry mice. In SV40 MES 13 cells, mouse mesangial cells, treated with globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3), miR-149-5p was also downregulated. The down-regulation of miR-149-5p induced up-regulation of its target genes related to EMT.

Conclusion: The miRNA expression array and qRT-PCR results show that miR-149-5p expression was decreased in kidney tissues of Fabry mice compared to wild type mice under 35 weeks of age. Along with the observation of miR-149-5p expression in Fabry disease cell models, these results indicate that the down-regulated miR-149-5p were related to the biological response of mesangial cells to lyso-Gb3 and also have influence to the transcriptional up-regulation of its target genes. These results suggest miR-149-5p might play important roles in the Fabry nephropathy.

Key words: Fabry disease, MicroRNAs, Biomarkers

서 론

파브리병은 리소좀에 존재하는 50여종의 가수분해 효소 중 하나인 α -galactosidase A (α -Gal A)의 결핍에 의해 발생하는 lysosomal storage disorder이다

책임저자: 정성철, 서울시 양천구 안양천로 1071
이화여자대학교 의학전문대학원 생화학교실
Tel: 02)2650-2725, Fax: 02)2652-7846
Email: jungsc@ewha.ac.kr

¹⁾ α-Gal A는 8개의 exon으로 구성된 GLA 유전자에 의해 발현되는데, GLA의 유전적 돌연변이에 의한 효소 결핍은 리소솜, 세포외 기질(extracellular matrix) 그리고 그 밖의 여러 세포 구성 물질에 α-Gal A의 주요 전구 물질인 globotriaosylceramide (Gb3)의 축적을 초래한다. Gb3는 주로 혈관내피세포, 심장, 신장, 신경 조직 내에 축적되며 이로 인해 조직 손상 및 여러 임상 증상을 나타낸다²⁻⁴⁾. Gb3가 축적됨에 따라 Gb3의 탈아실화 파생물인 글로보트리아오실스핑고신(globotriaosylsphingosine, lyso-Gb3) 또한 혈장 내에서 증가된 수치를 보이고 있어 파브리병의 새로운 바이오표지자로 제안되고 있다⁵⁾.

신장 질환은 파브리병의 대표적인 증상으로 병리적으로 진행되는, 신장의 분절성(segmental) 사구체 경화증, 혹은 전체적(global) 사구체 경화증, 신 세뇨관 위축, 간질조직의 섬유화로 특징지어 질 수 있다⁶⁾. 초기 위축세포(podocyte) 손상과 근위세뇨관 상피세포(proximal tubular epithelial cell)에 의한 섬유화에 따른 사구체의 기능 장애는 사구체의 여과율을 떨어뜨려 파브리 환자에게서 단백뇨, 혈뇨, 지방뇨 등의 임상적 특징을 갖게 한다. 사구체 경화가 진행 됨에 따라 대부분의 환자가 30-40대에 신부전, 고혈압을 갖게 되는데 이는 파브리 환자의 가장 흔한 사망 원인이 된다^{7, 8)}. 분자 생물학적인 측면에서 신장 조직의 섬유화 과정을 이해하기 위해 세뇨관 세포의 상피간엽화이행(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)의 역할이 규명되고 있는데, 이러한 EMT는 일반적으로 상피 세포의 표지자인 E-cadherin과 간엽 세포의 표지자인 Vimentin의 발현 조절에 따라서 이루어 진다⁹⁻¹¹⁾. 이러한 EMT 현상을 조절 하는 메커니즘 중 다수의 microRNA(miRNA)가 관여한다는 것이 여러 연구를 통해 증명된 바 있다^{9, 12-16)}.

miRNA는 21개에서 24개의 뉴클레오타이드(nucleotide)로 이루어져 있는 비단백질 부호화 RNA로, 세포의 증식과 생존, 발달에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. miRNA는 부분 상보적인 염기 서열을 가진 mRNA의 3 untranslated region에 결합하여 해당 mRNA의 분해 혹은 해독을 방해하고, 결과적

으로는 단백질 합성을 저해하게 된다^{17, 18)}. 이미 언급한 바와 같이 miRNA는 EMT 기전에서도 중요한 역할을 하는데 E-cadherin의 전사를 억제하는 ZEB1과 ZEB2는 miR-200 family의 표적 유전자로서 miR-200의 과발현은 EMT 과정을 억제하고 epithelial cell에서 발현이 증가되어 있음이 보고된바 있다. 이외에도 E-cadherin의 발현을 억제하는 Twist와 Snail의 발현에 miR-10b가 영향을 준다는 보고가 있다¹⁹⁻²³⁾. 파브리 신장 질환의 진행 과정과 섬유화, Gb3와 lyso-Gb3의 축적과 EMT 기전의 연관성은 매우 특징적이긴 하지만, 이와 함께 연구된 miRNA의 전반적인 발현 변화에 대한 연구는 매우 미미하다.

따라서 본 연구는 파브리병의 마우스 모델을 대상으로 miRNA expression microarray를 적용시켜 질환 모델과 정상 대조군 간의 전체 miRNA의 발현 차이를 조사하였고, 발현량에서 차이를 보인 특정 miRNA를 선별 후, 해당 miRNA의 표적 유전자의 발현량 변화를 살펴보았다. 마우스 모델 외에도, 사구체 혈관 상피세포 및 혈관간세포를 파브리 질환의 주 원인 물질인 Gb3와 lyso-Gb3가 첨가된 배양액에서 키움으로 파브리 질환 세포 모델을 유도하여 앞서 언급한 실험을 실행하였다. 또한, 신장의 섬유화를 일으키는 주요 기전으로 알려진 EMT와 관련된 특정 miRNA 선별 및 표적 유전자의 발현 양상을 조사함으로써 파브리 신장 질환에 대한 miRNA 생체지표를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에서 사용한 Fabry 마우스는 National Institutes of Health (NIH, USA)의 Dr. Roscoe O. Brady로부터 공급 받았다. 이화여자대학교 의과대학 동물실의 사육 환경은 온도 24±2°C, 습도 40-60%, 150-300 Lux의 환경에서, 멸균 증류수와 고형 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 실험은 이화여자대학교 의과대학의 동물 실험 윤리 위원회의 규정을 준수하여 설계, 수행되었다.

2. 세포 배양

사람 유래 근위세뇨관 상피세포인 HK2 cell과 마우스 유래 혈관간세포인 SV40 MES 13은 모두 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. HK2 세포는 0.05 mg/mL BPE (bovine pituitary extract)와 5 ng/mL EGF (human recombinant epidermal growth factor), 그리고 50 ng/mL gentamicin이 들어간 Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM) 배지에서 배양하였고, SV40 MES 13 세포는 5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin이 들어간 3:1 mixture of ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 배양하였다.

3. Gb3와 lyso-Gb3 처리

세포를 배양 접시 위에 키운 후 Gb3 혹은, lyso-Gb3 (Matreya, Pleasant Gap, PA, USA)를 처리하였다. 30 μ M Gb3 혹은, 400 nM lyso-Gb3을 포함한 혈청이 들어 있지 않은 배양액에서 24시간 배양시킨 후 혈청이 들어 있는 배양액을 첨가해 총 72시간 배양시켰다.

4. miRNA 추출과 miRNA expression microarray

miRNA는 Ambion mirVana microRNA isolation kit (Ambion, Austin TX)를 이용해 제조자의 프로토콜에 따라 추출하였다. 전체 RNA의 quality 검사는 Agilent bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara CA)로 수행되었다. 2 μ g의 RNA로 SurePrint G3 Mouse miRNA Microarray, Release 19.0, 8 x 60K (Agilent, Inc. Santa Clara, CA)를 수행하였다. Microarray 결과를 바탕으로 log₂ fold change 값이 1.5 이상, -1.5 이하인 miRNA를 선별하였다.

5. cDNA 합성

1 μ g mRNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free

water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C에 10분간 denaturation 시키고 얼음에 2-3분간 둔 다음 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 80°C에서 10분 중합효소연쇄반응을 시행하여 cDNA를 합성하였다.

6. Real-time RT-PCR

Quantitative real-time RT-PCR은 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] kits (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 수행되었다. 유전자의 상대적 발현량 comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 방법으로 계산되었다. 모든 측정치는 삼중(triplicate)으로 측정되었다.

7. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군 별로 군간의 상호 유의성을 검정하기 위해 student's t-test를 수행하였다.

결 과

1. 정상 mouse와 Fabry mouse model의 liver와 kidney 샘플에서의 miRNA 프로파일링

우선 log₂ fold change 값이 1.5 이상을 나타내는 miRNA를 선별하였다. Wild type과 Hemizygous type의 파브리 마우스 간 조직과 신장 조직으로부터 전체 RNA를 추출하여 miRNA array를 실행한 결과, 신장 조직에서 상향 조절된 miRNA는 5개, 하향 조절된 miRNA는 3개로 총 8개의 miRNA가 선별되었다. 간 조직에서는 6개의 상향 조절된 miRNA, 5개의 하향 조절된 miRNA가 선별되었고, 간과 신장, 두 조직간 공통으로 조절된 miRNA는 보이지 않았다(Fig. 1) (Table 1). 파브리 병의 신장 섬유화를 고려하였을 때, EMT를 야기시키는 원인 miRNA로 흔히 알려진 miR-9, miR-

10b, miR-29a, miR-141 혹은 miR-200a 등이 선별될 것으로 예측되었으나 miRNA array 결과 이들의 발현 양에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 본 실험을 통해 선별된 miRNA의 이전 연구된 바를 조사한 결과, miR-149-5p가 최근 EMT 혹은 중앙 세포의 이동과 침습 등과 관련하여 많은 보고가 있어서 이를 대상으로 앞으로의 실험을 전개하였다^{20, 24, 25}.

2. Fabry mouse model과 정상 대조군간의 miR-149의 발현량 확인

miRNA array 결과를 재확인하기 위해 miRNA Real-time PCR를 이용하여 miR-149의 발현량을 재확인 하였다(Fig. 2). 샘플 별 miR-149-5p의 발현량은 내부 대조 지표인 sno-202로 normalization하고 comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)법을 이용하여 상대 정량 하였다. miRNA array에 적용되었던 35주령 파브리 mouse와 정상 대조군 mouse의 신장 조직에서의 miR-149-5p 양은 Real time PCR에서도 miRNA array 결과와 비슷한 결과로 나오는 것을 확인하였다.

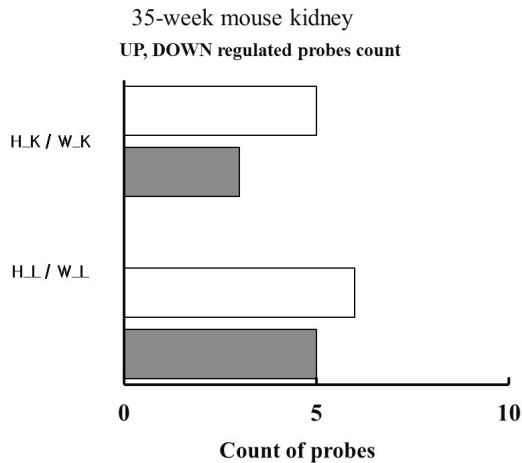


Fig. 1. MicroRNAs expression profiling of kidney and liver tissues from Fabry mice. Compared with normal mouse tissue samples, altered expression of 8 miRNAs in kidney and 11 miRNA in liver with 1.5 fold change (log 2 fold change) were found in Fabry mouse tissues by miRNA microarray analysis (white, upregulation; gray, downregulation; H_K, hemizygous kidney; W_K, wild kidney; H_L, hemizygous liver; W_L, Wild liver).

파브리 마우스의 주령과 비례하여 miR-149-5p 하향 조절 양상이 심화되는지 확인하기 위해 21주와 42주령의 마우스 신장 조직에서의 miR-149-5p의 발현량을 측정하였다. 하지만, 42주 마우스의 신장 조직에서는 파브리 마우스의 miR-149-5p의 평균 발현량이 정상 대조군에 비해 더 높게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

3. 파브리 신장 세포 모델과 정상 세포군간의 miR-149-5p의 발현량 확인

miR-149-5p의 발현량을 전체 조직 단위가 아닌 신장 조직을 이루는 세포 유형별 수준에서 확인하기 위해 근위세뇨관 상피세포인 HK2 세포와 사구체 혈관간 세포인 SV40 MES 13 세포를 실험에 적용하였다. 각각의 세포에 Gb3 혹은, lyso-Gb3를 처리하여 72시간 배양한 후 miR-149-5p의 발현량을 측정한 결과 SV40 MES 13에 lyso-Gb3를 처리한 경우에만 특이적으로 miR-149-5p의 양이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). HK2 세포에서는 반대로 miR-

Table 1. Example of the Differentially Expressed miRNA List

Expression change in hemizygous Fabry mice	Systematic name	log2 fold change
Up regulation in kidney	miR-3960	1.68
	miR-3102-5p	1.67
	miR-574-5p	1.56
	miR-3473b	1.53
	miR-211-3p	1.50
Down regulation in kidney	miR-122-5p	-1.58
	miR-149-5p	-1.57
	miR-709	-1.51
Up regulation in liver	miR-451a	1.69
	miR-142-5p	1.61
	miR-31-5p	1.59
	miR-362-3p	1.59
	miR-34a-5p	1.56
Down regulation in liver	miR-144-3p	1.53
	miR-21a-3p	-1.88
	miR-671-5p	-1.86
	miR-3096b-3p	-1.78
	miR-1839-3p	-1.66
	miR-125a-5p	-1.62

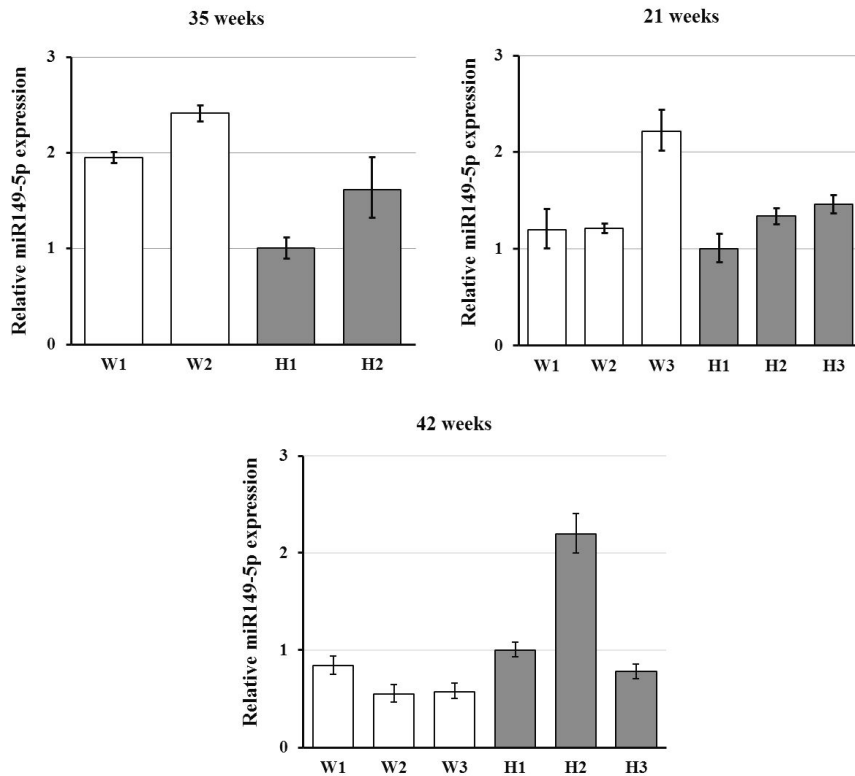


Fig. 2. Quantitative real-time RT-PCR analyses of miR-149-5p in wild type and Fabry disease mouse (21, 35, and 42 week-old) kidney tissues. The relative expression values were normalized against the inner control, sno-202. The calculation of relative gene expression level was analyzed using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Data are presented as the mean \pm SE of at least three experiments (W: wild, H: hemizygous).

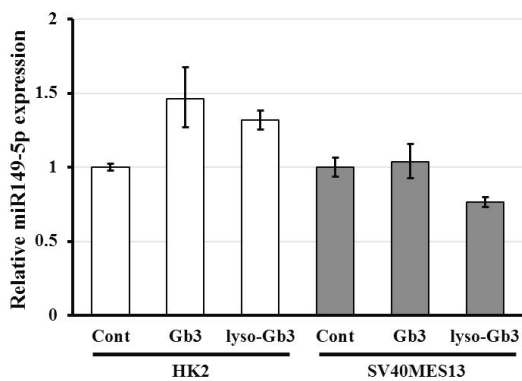


Fig. 3. Quantitative real-time RT-PCR analyses of miR-149-5p in SV40 MES 13 cells treated with Gb3 or lyso-Gb3. The relative expression values were normalized against the inner control, sno-202. The calculation of relative gene expression level was analyzed using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Data are presented as the mean \pm SE of at least three experiments.

149-5p의 양이 증가하는 것으로 측정되었다.

4. 세포 모델에서의 miR-149-5p의 표적 유전자 발현량 확인

miR-149-5p에 의해 발현이 조절되는 유전자들을 확인하기 위해 miRNA의 표적 유전자를 예측하는 프로그램인 miRDB를 이용하여 miR-149-5p의 target을 확인하였다. 표적 유전자로 예측된 여러 유전자 중 상위에 있던 Kif2a와 Pag1을 무작위 선정하였고 이외에도 EMT와 관련하여 miR-149-5p의 target으로 알려진 유전자인 Foxm1과 Mmp9, 그리고 miR149가 속한 miR-200 family에 의해 조절되는 것으로 알려진 EMT의 주요 조절 단백질인 Zeb1의 발현량을 세포 모델에서 확인해 보았다(Table 2, Fig. 4). 이들의 발현

Table 2. List of miR-149-5p Target Genes

Gene symbol	Gene description	Accession number	Primer (5-3)	Reference
Mmp9	matrix metalloproteinase 9	NC_000068.7	F: CTGGACAGCCAGACACTAAAG R: CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG	(24)
Foxm1	forkhead box M1	NC_000072.6	F: CTGATTCTCAAAAGACGGAGGC R: TTGATAATCTTGATTCCGGCTGG	(35)
Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1	NC_000084.6	F: GCTGCAAGACAACGTGAAAG R: GCCTCAGGATAAATGACGGC	(22)
Kif2a	kinesin heavy chain member 2A	NC_000079.6	F: ATTTTCTCTCATTGACCTGGCTG R: ACTCCTTGAGTGCTAAAAGGC	miRDB
Pag1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	NC_000069.6	F: CAGGAAGCGTACTGAGCAGTG R: TCTCTGTCGCAAGTGGAAACAC	miRDB

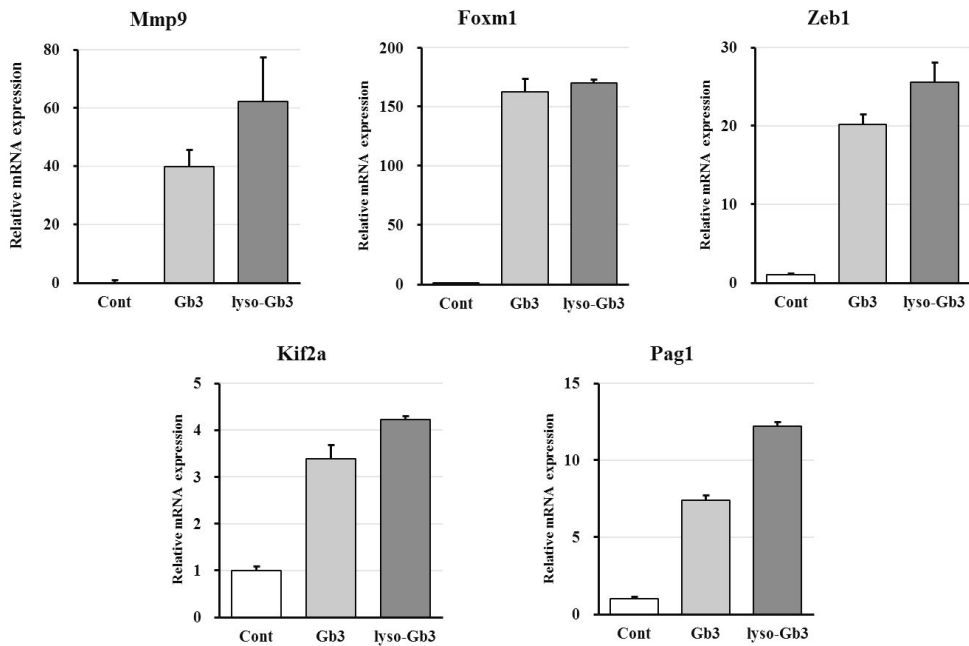


Fig. 4. Quantitative real-time RT-PCR analyses of Mmp9, Foxm1, Zeb1, Kif2a and Pag1 genes in SV40MES13 cells treated with Gb3 or lyso-Gb3. Expression levels were normalized against expression of the housekeeping gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the results are reported as ratios of the marker gene expression versus GAPDH. The calculation of relative gene expression level was analyzed using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Data are presented as the mean \pm SE of at least three experiments.

량은 miR-149-5p의 감소를 보였던 사구체 혈관간세포를 통해 확인하였고, Fig. 4와 같이 SV40 MES 13 세포에 Gb3와 lyso-Gb3를 각각 처리한 경우 모든 표적 유전자들의 발현량이 증가한 것을 볼 수 있었다.

5. 동물 모델에서의 miR-149-5p의 표적 유전자 발현량 확인

세포 모델을 통해 확인 된 miR-149-5p의 표적 유전자들을 35주령 마우스의 신장 조직을 대상으로 확인하였다(Fig. 5). 파브리 마우스의 신장 조직에서는

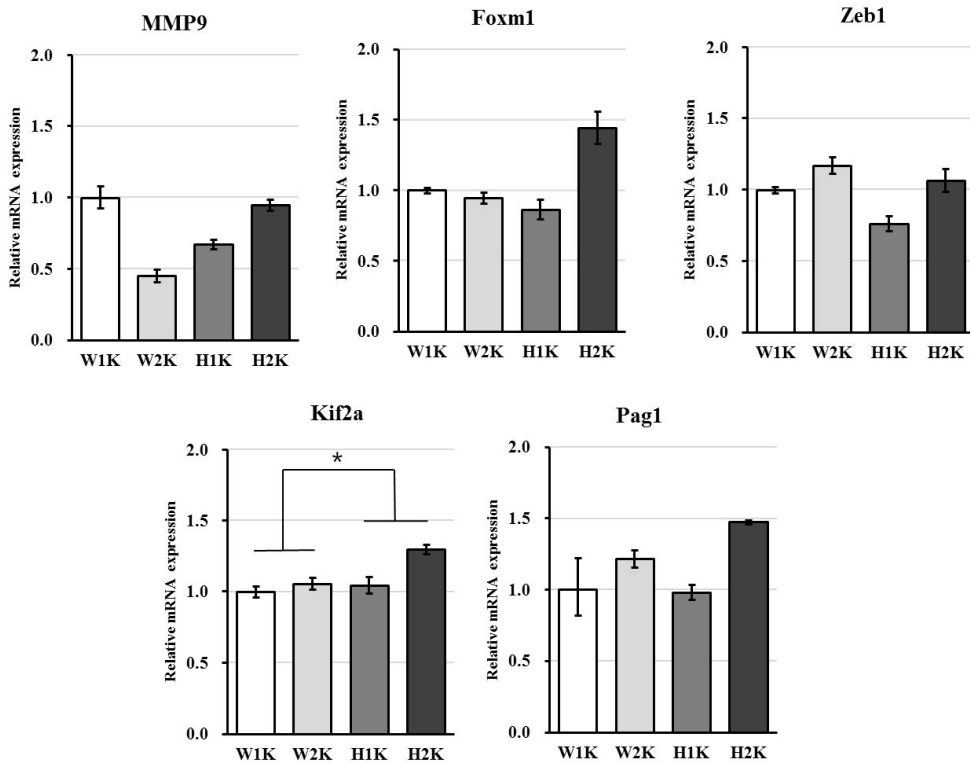


Fig. 5. Quantitative real-time RT-PCR analyses of *Mmp9*, *Foxm1*, *Zeb1*, *Kif2a* and *Pag1* genes in wild type and Fabry disease mouse (35 week-old) kidney tissues. Expression levels were normalized against expression of the housekeeping gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the results are reported as ratios of the marker gene expression versus GAPDH. The calculation of relative gene expression level was analyzed using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Data are presented as the mean \pm SE of at least three experiments (W: wild, H: hemizygous).

Zeb1을 제외한 나머지 유전자들에서 평균적으로 발현량이 증가한 양상을 보였지만 개체간의 차이로 인해 유의한 결과를 보인 것은 Kif2a 유전자로 제한되었다.

고 찰

miRNA는 전사, processing, 표적 mRNA와의 상보적 결합과 같은 여러 단계를 통해 표적 유전자의 mRNA의 안정성을 저해시키거나 단백질 번역을 방해함으로써 유전자의 발현 억제를 유도한다. 정상 조직에서의 miRNA는 세포의 발달 과정 중 성장, 증식, 분화, 그리고 세포 사멸에 이르기 까지 다양한 조절 기능을 하며 조직이 정상적인 속도와 항상성을 유지하며 발달하는데 중요한 역할을 한다. 반대로, miRNA의 비정상

적 발현은 신진대사 질환, 당뇨, 암과 같은 여러 질환의 주요 원인으로 보고되고 있는데, 특히 암과 관련해서는 암 세포의 이동, 침윤 혹은 종양 줄기 세포의 성장 조절 인자로서 여러 메커니즘에 관여한다고 알려져 있다^{20, 26}. 이러한 miRNA는 혈액이나 체액 내에서 엑소좀(exosome) 내에 갇힌 채로 순환되어 RNase 저항력을 가짐과 동시에 주변 세포나 혹은 멀리 떨어져 있는 조직 세포로 이동하여 여러 영향을 줄 수 있다²⁷⁻²⁹. 따라서 많은 질병 연구에 있어서 생물학적 표지자로서의 이용 가능성이 부각되고 있다.

파브리병의 신장 질환은 사구체 경화가 진행됨에 따라 신부전과 같은 심각한 신장 손상을 초래하게 된다. 이미 연구된 바에 따르면, 파브리병 환자의 초기 사구체 경화증에서 위축세포 손상과 근위세뇨관 상피세포

섬유화가 관찰되고 있는데, 이러한 사구체 손상의 주원인 메커니즘으로 근위세뇨관 상피세포의 EMT 현상이 연구되고 있다. EMT 현상을 조절 하는 데에는 다수의 miRNA가 관여한다. 특히, 최근에는 본 실험을 통해 선정된 여러 miRNA 중, miR-149의 기능에 대해 여러 연구가 활발히 진행되고 있다. 요약하자면, miR-149는 p53에 의해 조절되는 miRNA로 AKT-mTOR pathway를 통한 tumor suppressor로 작용하거나, apoptosis를 야기시키는 기능을 가진다^{30, 31)}. 또한, GIT1이나 FOXM1과 같은 표적 유전자의 발현을 억제 시킴으로 유방암, 비소세포 폐암, 그리고 대장암 세포의 전이와 침윤을 저해한다^{25, 32)}. 위와 같이 여러 논문에서 miR-149 발현이 암세포의 EMT 현상을 억제하는 기능을 확인한 바 있다면, 2015년 Cell Research에 발표된 논문은 역으로 miR-149 하향 조절 발현이 위암에서 EMT를 야기시킨다는 결과를 보여 줌으로써 이전의 miR-149의 EMT 조절 능력에 힘을 더한다³³⁾. 여러 연구 자료를 비추어 보아, 본 실험실에서 진행한 miRNA expression microarray를 통해 선별된 miRNA들 중, miR-149-5p의 하향 발현이 파브리병의 사구체 섬유화에 결정적인 역할을 할 것으로 추정되었다.

miR-149-5p의 발현이 파브리병 세포의 생물학적 특성, 특히 신장을 구성하는 세포의 섬유화에 영향을 줄 것이라는 가정을 입증하기 위해 신장 세포에 Gb3와 lyso-Gb3를 처리하여 배양한 후, miR-149-5p의 발현 변화와 miR-149-5p 표적 유전자 후보군의 발현 변화를 측정하였다. Gb3와 lyso-Gb3를 처리한 HK2와 SV40MES13 cell에서의 miR-149-5p 발현을 보면 SV40 MES 13에서 lyso-Gb3를 처리한 경우에만 특이적으로 miR-149-5p 발현이 줄어든 것을 볼 수 있었다. 반면, HK2의 경우는 둘 다 동일하게 miR-149-5p의 발현이 증가하였다. 이와 같이 똑같은 조건의 Gb3와 lyso-Gb3를 처리하였을 때 세포 별 반응 양상이 다른 것은, 본 실험실에서 이미 발표한 유전자 microarray 결과와 비교해 보았을 때에도 비슷한 결과를 보여 주고 있다³⁴⁾. HK2와 SV40 MES 13에 Gb3와 lyso-Gb3를 처리하였을 때, mRNA 뿐만 아니라 miRNA도 세포 별로 각각 다른 양상의 반응을 보이는

것으로 해석된다. 다음으로, miR-149-5p의 발현이 줄어든 SV40 MES 13을 중심으로 miR-149-5p의 표적 유전자 발현을 살펴보았다. 후보군은 miR-149-5p와 관련하여 이미 연구된 논문을 바탕으로 Mmp9, Foxm1, Zeb1을 선정하였고 또한, miRDB (<http://mirdb.org>)를 통해 표적으로 예측된 유전자들 중 상위 권으로 선정된 Kif2a와 Pag1을 무작위 선정하였다. 특히 Mmp9와 Foxm1 그리고 Zeb1은 EMT 현상을 직접적으로 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Mmp9, metalloproteinase은 E-cadherin을 분해시키는 역할을 하고 Foxm1의 경우는 Snail이라는 EMT의 주요 단백질 발현을 유도하는 transcription factor의 발현을 증가시킨다. Zeb1역시 EMT의 주요 표지자로 cancer에서는 metastasis와 관련하여 많은 연구가 되어 있다^{22, 24, 25, 35, 36)}. 예상한 대로, miR-149-5p의 하향 발현에 뒤따른 표적 유전자들의 상향 조절 발현 현상이 관찰되었고 특히 표적 유전자들 중 여러 유전자들이 EMT와 관련되어 있는 점으로 미루어 보아 miR-149-5p가 파브리병에서의 사구체 섬유화 및 EMT에서도 주요한 역할을 할 것으로 기대된다.

이러한 결과가 파브리 마우스의 주령과도 연관되는지 확인하기 위해, 파브리 마우스의 주령을 21주령과 42주령으로 확대시켜 보았다. 21주와 35주령 마우스의 경우 정상 마우스에 비해 miR-149-5p의 발현량이 평균적으로 낮아진 것을 볼 수 있었지만 42주령의 경우는 오히려 늘어난 것을 볼 수 있었다. miR-149-5p의 표적 유전자의 경우, 35주령 마우스의 신장 조직에서 혈관간세포 모델의 패턴과는 달리 파브리 마우스 조직들이 정상 마우스 조직에 비해 높게 발현되지 않았다. 이는 아마도 세포 모델에서 본 것과 같이 miR-149-5p의 발현이 세포 별로 각각 조절되는 양상이 다르고, 또한 마우스들의 신장 조직을 채취할 때, 각 샘플을 구성하는 다양한 세포 군들의 조합 비율이 다르기 때문에 나타난 결과일 것으로 추측된다.

파브리병을 이해하기 위해 α -Gal A 녹아웃 마우스 모델은 파브리병의 질환 모델로 사용되어 왔다. GLA 유전자 제거로 인해 α -Gal A 효소의 활성이 낮아져 간이나 신장과 같은 여러 장기에 Gb3가 축적될 뿐만

아니라, 실제 사람 환자와 같이 혈청 내의 Gb3와 lyso-Gb3의 농도 또한 높아져 있어서 파브리 병을 연구하는데 아주 유용하게 쓰이고 있다. 하지만 파브리 마우스 모델이 주요 병인적 특성은 보이는데 반해, 평균적으로 정상 마우스들과 비슷한 수명과 임상적으로 정상적 표현형을 지니고 있다는 것이 마우스 모델이 지니는 한계점이다. 주령이 늘어 감에 따라 기관 내의 Gb3 축적량이 높아지긴 하지만 그 농도는 파브리 환자 대비 약 25%의 농도밖에 못 미치고 있다. 이전 논문에 따르면 파브리 마우스의 정상 표현형은 마우스의 Gb3 생산 능력이 사람에 비해 떨어지는 데에서 기인 할 수 있고, 따라서 Gb3 생산성을 향상시킴으로써 파브리 환자가 지니는 신장, 혈관, 신경 질환 양상을 유도할 수 있음을 제안한다³⁷⁾. 이외에도 각각의 기관 혹은 혈청 내의 Gb3 및 lyso-Gb3 농도와 이 물질에 대한 민감도, 그리고 각 장기의 잔여 효소 활성도는 마우스 개체간 표현형적 변이를 높이는 요소로 작용하기 때문에 마우스 모델 사용의 효율성을 제한한다.

본 실험은 파브리병에서의 신장질환에 대한 생체지표를 확보하기 위하여 miRNA의 발현을 분석하여 miR-149-5p의 생체지표로서의 가능성과 함께 miR-149-5p의 발현감소가 EMT를 통한 파브리병에서의 사구체 섬유화에 관여할 것이라는 가능성을 제시한 것에 그 의의를 지니고 있다. 하지만 더 정확하고 유의한 결과를 얻기 위해서는 마우스 모델에서의 신장 조직에서 각각의 세포를 분리하여 실험을 진행하는 것과 더불어 환자의 조직 또는 혈액에서도 확인할 필요가 있다. 또한, miR-149-5p 외에도 miRNA expression array를 통해 선정된 다른 miRNA 후보군들에 대한 심화 연구도 필요할 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 파브리병의 마우스 모델과 세포모델을 대상으로 miRNA expression microarray를 적용시켜 질환 모델과 정상 대조군 간의 전체 miRNA의 발현 차이를 조사하였고, 발현량에서 차이를 보인 특정 miRNA를 선별한 후, 해당 miRNA의 표적 유전자의

발현량 변화를 살펴본다 파브리병의 신장병변에 대한 바이오마커 발굴과 발병기전을 알아보려고 하였다. MicroRNA array 결과, 파브리 마우스 신장 조직의 경우, 1,247개의 분석 대상 miRNA 중 5개가 발현이 증가되어 있으며 3개가 발현이 감소되어 있음을 확인하였다. 그 중에서 miR-149-5p의 발현이 파브리 마우스의 신장에서 2배 이상 감소되어 있으며, 특히 35주령 이하의 파브리 마우스에서 이러한 감소현상이 나타남을 확인하였고, 또한 lyso-Gb3를 처리하여 배양한 SV40 MES 13 세포에서도 miR-149-5p의 발현이 감소됨을 알 수 있었다. miR-149-5p의 발현감소는 EMT와 관련된 유전자의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 본 연구를 통해 miR-149-5p의 생체지표로서의 가능성과 함께 miR-149-5p의 발현감소가 EMT를 통한 파브리병에서의 사구체 섬유화에 관여할 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건의료연구개발사업 중개 기반연구(HI12C0598)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) Germain DP. Fabry disease. Orphanet J Rare Dis 2010;5:30.
- 2) Thurberg BL, Fallon JT, Mitchell R, Aretz T, Gordon RE, O'Callaghan MW. Cardiac microvascular pathology in Fabry disease: evaluation of endomyocardial biopsies before and after enzyme replacement therapy. Circulation 2009;119:2561-7.
- 3) Thurberg BL, Randolph Byers H, Granter SR, Phelps RG, Gordon RE, O'Callaghan M. Monitoring the 3-year efficacy of enzyme replacement therapy in fabry disease by repeated skin biopsies. J Invest Dermatol 2004;122:900-8.
- 4) Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, Dikman S, Gordon RE, Collins AB, et al. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. Kidney Int 2002;62:1933-46.
- 5) Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman

- WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2812-7.
- 6) Wijburg FA, Benichou B, Bichet DG, Clarke LA, Dostalova G, Fainboim A, et al. Characterization of early disease status in treatment-naïve male paediatric patients with Fabry disease enrolled in a randomized clinical trial. *PLoS One* 2015;10:e0124987.
- 7) Fogo AB, Bostad L, Svarstad E, Cook WJ, Moll S, Barbey F, et al. Scoring system for renal pathology in Fabry disease: report of the International Study Group of Fabry Nephropathy (ISGFN). *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2168-77.
- 8) Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* 2003;64:801-7.
- 9) Wang JY, Gao YB, Zhang N, Zou DW, Wang P, Zhu ZY, et al. miR-21 overexpression enhances TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol* 2014;392:163-72.
- 10) Jeon YJ, Jung N, Park JW, Park HY, Jung SC. Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Tubular Epithelial Cells Induced by Globotriaosylsphingosine and Globotriaosylceramide. *PLoS One* 2015;10:e0136442.
- 11) Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadnagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 2015;21:998-1009.
- 12) Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma K, et al. miR-34c attenuates epithelial-mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. *Sci Rep* 2014;4:4578.
- 13) Liu T, Nie F, Yang X, Wang X, Yuan Y, Lv Z, et al. MicroRNA-590 is an EMT-suppressive microRNA involved in the TGFbeta signaling pathway. *Mol Med Rep* 2015;12:7403-11.
- 14) Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma K, et al. miR-363 induces trans-differentiation of human kidney tubular cells to mesenchymal phenotype. *Clin Exp Nephrol* 2015.
- 15) Xiao L, Zhou X, Liu F, Hu C, Zhu X, Luo Y, et al. MicroRNA-129-5p modulates epithelial-to-mesenchymal transition by targeting SIP1 and SOX4 during peritoneal dialysis. *Lab Invest* 2015;95:817-32.
- 16) Huang Y, Tong J, He F, Yu X, Fan L, Hu J, et al. miR-141 regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through repression of HIPK2 expression in renal tubular epithelial cells. *Int J Mol Med* 2015;35:311-8.
- 17) Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;87:3-14.
- 18) Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 2015;35:3-11.
- 19) Bendoraite A, Knouf EC, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, O'Briant KC, et al. Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecol Oncol* 2010;116:117-25.
- 20) Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, et al. An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2011;22:1686-98.
- 21) Oba S, Mizutani T, Suzuki E, Nishimatsu H, Takahashi M, Ogawa Y, et al. A useful method of identifying of miRNAs which can down-regulate Zeb-2. *BMC Res Notes* 2013;6:470.
- 22) Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* 2013;132:745-54.
- 23) Zhang L, Sun J, Wang B, Ren JC, Su W, Zhang T. MicroRNA-10b Triggers the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells by Directly Targeting the E-cadherin. *Appl Biochem Biotechnol* 2015;176:33-44.
- 24) Palmieri D, Capponi S, Geroldi A, Mura M, Mandich P, Palombo D. TNFalpha induces the expression of genes associated with endothelial dysfunction through p38MAPK-mediated down-regulation of miR-149. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:246-51.
- 25) Xu K, Liu X, Mao X, Xue L, Wang R, Chen L, et al. MicroRNA-149 suppresses colorectal cancer cell migration and invasion by directly targeting forkhead box transcription factor FOXM1. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:499-515.
- 26) Takeshita N, Hoshino I, Mori M, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, et al. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108:644-52.
- 27) Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 2013;91:431-7.
- 28) Rak J. Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer. *Front Pharmacol* 2013;4:21.
- 29) Rana S, Malinowska K, Zoller M. Exosomal tumor

- microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15:281-95.
- 30) Pan SJ, Zhan SK, Pei BG, Sun QF, Bian LG, Sun BM. MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25:871-81.
- 31) Zhang Y, Guo X, Xiong L, Yu L, Li Z, Guo Q, et al. Comprehensive analysis of microRNA-regulated protein interaction network reveals the tumor suppressive role of microRNA-149 in human hepatocellular carcinoma via targeting AKT-mTOR pathway. *Mol Cancer* 2014;13:253.
- 32) Chan SH, Huang WC, Chang JW, Chang KJ, Kuo WH, Wang MY, et al. MicroRNA-149 targets GIT1 to suppress integrin signaling and breast cancer metastasis. *Oncogene* 2014;33:4496-507.
- 33) Li P, Shan JX, Chen XH, Zhang D, Su LP, Huang XY, et al. Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Res* 2015;25:588-603.
- 34) Shin YJ, Jeon YJ, Jung N, Park JW, Park HY, Jung SC. Substrate-specific gene expression profiles in different kidney cell types are associated with Fabry disease. *Mol Med Rep* 2015;12:5049-57.
- 35) Ke Y, Zhao W, Xiong J, Cao R. miR-149 Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer Cells EMT by Targeting FOXM1. *Biochem Res Int.* 2013;2013:506731.
- 36) Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, et al. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* 2011;112:2508-17.
- 37) Shiozuka C, Taguchi A, Matsuda J, Noguchi Y, Kunieda T, Uchio-Yamada K, et al. Increased globotriaosylceramide levels in a transgenic mouse expressing human α 1,4-galactosyltransferase and a mouse model for treating Fabry disease. *J Biochem* 2011;149:161-70.