creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

2014년 2월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체의학 전공

강 주 형

의학박사 학위논문

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

2014년 2월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체의학 전공

강 주 형

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

지도교수 하 일 수

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2013년 10월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체의학 전공

강 주 형

강주형의 의학박사 학위논문을 인준함

2013년 12월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위　　원 _____ (인)

위　　원 _____ (인)

위　　원 _____ (인)

초록

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

강 주 형

의학과 분자 유전체 의학 전공

서울대학교 대학원

서론: RAS와 Ang II의 활성화는 사구체 콩팥 손상을 유도하는 주된 요인이다. ACEI 또는 ARB의 부작용을 피하고 Ang II 비의존성 경로를 차단하기 위해 레닌 활성화 억제제인 알리스키렌이 등장하게 되었다. 면역성 콩팥 사구체 질환은 IgG에 의한 면역 반응으로 일어나는 사구체 질환이다. 족세포와 근위세뇨관에서 FcRn에 의한 IgG의 이동은 V-ATPase에 의한 낮은 pH 환경을 필요로 하며 레닌 수용체는 V-ATPase의 기능을 도와 pH 환경을 조절한다. 본 연구는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정과 질병의 진행에 미치는 효과에 대하여 알아보았다.

방법: 제태 연령 10주 male BALB/c mice를 정상군, 정상치료군, 질병군, 질병치료군으로 나누고 질병군에 rat의 사구체로 면역한

토끼의 혈청으로부터 추출된 항사구체 기저막 항체 0.2 mg/g을 꼬리정맥을 통해 투여하고 치료군에는 20 mg/kg의 알리스키렌을 피하로 투여하였다. 질병 유발 7일째 사구체에서 세포 외 기질 단백질 합성 정도, 소변의 단백크레아티닌 비, 혈액과 소변의 mouse IgG와 특이 MAR IgG 농도, 콩팥 피질에서 TGF-β1, FcRn, 레닌 수용체의 발현 차이를 평가하였다.

결과: 알리스키렌으로 치료받은 질병군에서 세포 외 기질 단백질 합성, 소변 단백크레아티닌 비, 콩팥 피질의 TGF-β1 발현 양상 모두 감소하였다. 총 mouse IgG의 사구체 침착은 치료받은 질병군에서 의미 있게 감소하였다. 총 mouse 항체와 특이 MAR IgG의 혈액 농도는 치료받은 질병군에서 치료받지 않은 질병군에 비해 증가하였고 특이 MAR IgG의 소변 농도는 치료받은 질병군에서 감소하였다. 콩팥 피질의 FcRn과 레닌수용체 발현은 치료받은 질병군에서 치료받지 않은 질병군에 비해 억제되었다.

결론: 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌은 FcRn을 통한 IgG의 대사 과정의 조절과 레닌수용체의 과다발현을 억제함으로써 질병의 진행을 차단한다.

주요어: 면역성 콩팥 사구체 질환, Ang II, 알리스키렌, FcRn, 레닌 수용체

학번: 2006-30525

목차

한글 초록 · i
목차 · iii
그림 · v
약어 목록 · vii
서론 · 1
연구재료와 방법 · 9
1. 콩팥 사구체 기저막 항원 추출 (Production of glomerular antigen)
2. 항사구체 기저막 항체 추출 (Production of anti-GBM antibody)
3. 항사구체 기저막 콩팥염 유발 (Induction of anti-GBM nephritis)
4. 알리스키렌 투여 (Administration of aliskiren)
5. 콩팥사구체의 손상 평가 (The assessment of glomerular injury)
6. 소변 단백크레아티닌 비 평가 (The assessment of urine protein/creatinine)
7. 혈액과 소변의 Mouse IgG 측정 (The measurement of total mouse IgG and specific anti-rabbit IgG in serum and urine)
8. 콩팥 조직의 TGF-β1, FcRn and ATP6AP2 발현도 평가 (The assessment of the expression of TGF-β1, FcRn and ATP6AP2 in renal tissue by Western blot)
9. 통계 분석 (Statistical analyses)

결과 · 15
고찰 · 34
참고문헌 · 44
영문초록 · 54

그림

그림 1. 광학현미경 PAS 염색상 알리스키렌이 사구체의 세포외 기질 단백질 합성에 미치는 항섬유화 효과 · · · · · · · · · · 17

그림 2. 면역조직화학 형광염색상 알리스키렌이 사구체의 FN 합성에 미치는 항섬유화 효과 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 18

그림 3. 알리스키렌이 단백뇨 (Up/Ucr) 발생에 미치는 효과 · 20

그림 4. 알리스키렌이 콩팥 피질의 TGF-β1 발현에 미치는 항섬유화 효과 · 21

그림 5. 면역조직화학 형광염색상 질병 유발 1 일째 이종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과 · 24

그림 6. 면역조직화학 형광염색상 질병 유발 7 일째 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과 · 25

그림 7. 면역조직화학 형광염색상 질병 유발 7 일째 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 각 집단 개체 별 효과 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 26

그림 8. 알리스키렌이 혈액의 동종 항체와 특이 MAR IgG 농도에 미치는 효과 · 28

그림 9. 알리스키렌이 소변의 특이 MAR IgG 농도에 미치는 효과 · 29

그림 10. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 FcRn 발현에 미치는 효과 · 31

그림 11. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 레닌수용체 (ATP6AP2) 발현에 미치는 효과 · 33

약어 목록(List of Abbreviations)

RAS renin angiotensin system

Ang II angiotensin II

ACE angiotensin converting enzyme

ACEI angiotensin converting enzyme inhibitor

ARB angiotensin II receptor blocker

FN fibronectin

MAPK Erk 1/2 mitogen activated protein kinase extracellular signal regulated kinase 1/2

MAR IgG mouse anti-rabbit IgG

C3a complement 3a

C5a complement 5a

FcRn neonatal Fc receptor

PRR prorenin receptor

β_2m beta-$_2$ microglobulin

V-ATPase vacuolar-type H^+-ATPase

서론

사구체 콩팥염은 만성 콩팥부전을 일으키는 주된 원인질환이다. 사구체 콩팥염에서 활성화된다고 알려진 레닌안지오텐신 체계 (renin angiotensin system, RAS)가 질병의 만성경과를 유도하며 이 과정에서 생성되는 안지오텐신 II (Ang II)가 콩팥 손상의 주된 인자로 되어 있다[1]. 전형적인 RAS 활성화는 콩팥에서 분비된 레닌이 간에서 생성된 안지오텐시노겐의 분할 (cleavage)을 유도함으로써 시작된다. 이 과정에서 생성된 Ang I은 폐에 존재하는 안지오텐신 변환 효소 (angiotensin converting enzyme, ACE)에 의해 Ang II로 변환되는데 Ang II는 전신 혈관의 수축을 야기하여 고혈압을 일으키는 한편 콩팥에서는 단백뇨와 세포외기질 (extracellular matrix) 단백질 생성 및 사구체 여과장벽 구조들의 변성을 일으켜서 만성 콩팥 손상을 유도한다[1].

안지오텐신 변환 효소 억제제 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) 와 Ang II 수용체 차단제 (angiotensin II receptor blocker, ARB)가 Ang II의 생성과 작용을 차단함으로써 단백뇨를 호전시키고 염증세포들의 침윤을 감소시켜 콩팥 손상을 최소화할 수 있다는 사실은 이미 많은 임상연구와 기초연구들에서 증명되었다[2,3]. 그러나 기침, 혈관 부종, 고칼륨혈증, 신기능 감소 등의 부작용들과 ACE에 의존하지 않는 Ang II 생성 경로와 Ang II의 기능을 가지는 다른 안지오텐신 유도체들이 존재한다는 사실이 알려지면서 Ang II의 생성과 작용을 차단하는 효과만으로는 콩팥의 손상을 근본적으로 막을 수 없다는 결론에 이르게 되었다[4-7].

최근에는 레닌 수용체의 직접 활성화로 생성되는 세포 내 섬유화 단백질이 조직의 손상을 유발한다는 사실이 알려졌다[8,9]. 이 과정은 Ang II의 활성화와는 무관하기 때문에 Ang II 비의존성 과정이라고 일컬어진다. 레닌 또는 프로레닌에 의한 레닌 수용체의 활성화는 세포 내 MAPK Erk 1/2의 신호 전달 체계를 활성화시켜 TGF-β1의 생성을 증가시킨다. TGF-β1은 섬유화 단백질 생성을 증가시키는 대표적인 섬유화 매개체로서 fibronectin (FN), plasminogen activator-1 등 섬유화 단백질들을 합성해 낸다. 이러한 Ang II 비의존성 과정 때문에 ACEI 또는 ARB만으로는 질병의 진행을 차단하기에 한계가 따를 수 있다는 인식이 더욱 분명해졌다. 그래서 안지오텐신 유도체들의 활성화로 이어지기 전 RAS 활성화의 첫 단계인 레닌의 활성화를 차단할 필요가 있다는 인식에 따라 레닌 억제제의 개발이 이루어졌다[10].

레닌 억제제는 처음 개발 당시 약한 효능과 짧은 반감기, 비경구용, 그리고 높은 비용이라는 단점들 때문에 상용화되지 못하였다. 최근 개발된 알리스키렌은 이러한 점들을 보완하여 제조된 직접 레닌 억제제로서 수분과 체액에 높은 용해성을 가지고 있어서 경구용으로 사용 가능하며 반감기가 길어서 하루 1회 복용이 가능하다는 장점을 가지고 있다[11]. 분자량은 609.8 g/mol이며 사람의 레닌에 대한 반응 특이도 IC_{50}은 0.6 nM로서 marmoset 2 nM, mouse 6 nM, rabbit 11 nM, rat 80 nM 등 다른 동물들과 비교해 볼 때 매우 높은 것으로 되어 있다[11]. 알리스키렌은 안지오텐시노겐이 레닌과 결합하는 자리에 결합하기

때문에 안지오텐시노겐의 접근을 막아 Ang I으로의 변환을 차단한다. 그래서 이후에 일어나는 Ang I을 비롯한 그 밖의 유도체들이 만들어지는 것을 막는다. RAS 활성화 과정의 산물로 생성되는 안지오텐신 유도체와 다른 대사물의 생성 정도를 조사한 결과에서, 레닌 억제제는 ACEI 또는 ARB와 비교할 때 효능은 유사하였지만 음성 되먹이기 기전에 의한 안지오텐신 유도체들의 증가 현상은 관찰되지 않았다[12]. 현재까지 알리스키렌에 대한 임상적, 조직학적, 분자유전학적인 차원의 연구는 이미 많이 진행되어 왔으며 그 효능이 입증되고 있다[13-16].

실험적 항사구체 기저막 콩팥염은 면역성 기전에 의해 야기되는 자가 면역성 콩팥 사구체 질환 (immune mediated glomerular disease)으로서 주입된 이종 항체에 대한 동종 항체의 면역 반응 유도 과정을 통해 발생한다[17]. 대상 동물에게 주입된 이종 항체는 수분 내에 사구체 혈관 내피세포의 fenestrae를 통과하여 사구체 기저막에 가서 달라붙는다. 그러면 사구체 기저막 구성 성분인 laminin의 재배열, 족세포의 족돌기 융합, 사구체 기저막의 음전하 소실 등 기저막 투과성이 증가되어 단백뇨가 발생하고 점차적으로 콩팥기능이 나빠진다. 이 과정은 항사구체 기저막 콩팥염의 초기 반응 단계로 실험적 항사구체 기저막 콩팥염의 이종 항체 면역 반응 단계 (heterologous phase in experimental anti-GBM nephritis)로 분류된다.

이종 항체가 주입 된 후 5-7일째가 되면, 주입된 이종 항체에 의해 생성된 동종 항체가 사구체 기저막에서 이종 항체와 결합하는

동종 항체 면역 반응 단계 (autologous phase)로 접어든다. 이 시기에는 이종 항체에 결합하는 동종 항체와 보체의 면역 복합체에 의한 손상이 진행되며, 생성되는 C3a와 C5a가 다양한 염증 세포들의 주화성 인자 (chemotactic factors)로 작용하여 이차적인 염증 반응을 유도한다. T-cell 은 동종 항체의 항원성 자극이 더 이상 없더라도 사구체 여과 장벽의 손상을 지속시키는 요인으로 작용하고[18], 메산지움 세포, 족세포와 각종 염증 세포들은 세포막에 존재하는 Fcγ 수용체를 통해 IgG와 결합 후 염증반응을 일으켜 사구체 여과 장벽의 손상을 더욱 가중시킨다[19]. 그래서 동종 항체 면역 반응 단계에서 발생하는 손상은 이종 항체 면역 반응 단계에 비해 사구체 여과 장벽의 손상 정도가 더욱 심하고 광범위한 것으로 여겨진다.

사구체 여과 장벽은 혈관 내피세포의 fenestrae, 사구체 기저막, 족세포의 족돌기와 slit diaphragm 세가지 요소로 구성되어 있다[20]. 각 요소들은 크기 또는 전하 선택성 여과 기전을 가지고 있어서 혈액 내의 각종 세포 또는 크기가 큰 단백질들이 소변으로 빠져나가지 않도록 상호 보완하는 역할을 한다. 혈관 내피세포의 fenestrae는 성긴 여과 간격 (coarse filter)을 가지는데, 크기가 70-100 ㎚ 정도로 크기가 비교적 큰 혈액 성분들의 통과를 차단한다. 사구체 기저막은 크기 선택성에 따른 투과성 효과와 동시에 기저막을 구성하는 성분들의 음전하 성질에 따라 전하 선택성에 의존하여 투과성을 결정하기 때문에 여과 기능을 보다 더 미세하게 조절할 수 있다고 되어 있다[21]. 족세포의 족돌기와 slit

diaphragm은 사구체 여과 장벽의 마지막 단계로서 미세 여과 간격(fine filter)을 가지며, 약 70 kDa 이하의 작은 분자량의 단백질만 통과시킨다[22]. 분자량이 약 150 kDa인 IgG는 사구체 기저막을 통과하지만 slit diaphragm의 크기에 따른 선택적 투과성 제한 때문에 여과되지 못하고 사구체 여과 장벽에 남게 된다. 그러나 생리적 환경에서 IgG는 사구체 여과 장벽에 축적되지 않는다. 그 이유는 IgG 또는 IgG-complex가 생리적 환경에서 사구체 여과 장벽의 slit diaphragm으로부터 제거되는 여과 기전이 존재하기 때문이다. Haymann 등[23]은 족세포와 근위세뇨관의 brush border에 IgG의 여과와 이동에 관여하는 neonatal Fc receptor (FcRn)이 존재한다는 사실을 규명하였다. Kobayashi 등[24]은 사구체에서 여과된 IgG가 근위세뇨관 세포의 brush border에 존재하는 FcRn에 의해 IgG trafficking이 일어나며 세포를 통과하여 basolateral membrane으로 이동하는 현상을 보고하였다. Akilesh 등[25]은 IgG가 족세포의 slit diaphragm으로부터 소변 강 (urinary space) 내로 이동하는 과정에 FcRn이 관여한다는 사실을 규명하였고, FcRn이 결핍된 mouse의 사구체 여과 장벽에 IgG가 지속적으로 침착되는 현상을 가지고 면역성 콩팥 사구체 질환이 발생하는 이유는 FcRn이 IgG를 여과할 수 있는 한계를 넘어서기 때문이라고 주장하였다.

FcRn의 분자유전학적 구조가 규명되기 이전 모체의 IgG가 대사되지 않고 신생아 또는 영아의 혈액으로 이동되는 현상은 이를 전달하는 매개체가 장 (intestine) 상피에 존재하기 때문이라는 가능성이 Brambell 등[26]에 의해 제시되었다. 이후 Simister

등[28]에 의해 FcRn은 생후 11일 된 rat의 장 상피세포에 존재하는 Fc receptor로서 MHC class I과 유사한 구조를 가지며 약 50 kDa의 heavy chain으로 구성된 heterodimer임이 밝혀졌고 12 kDa의 beta-2 microglobulin (β_2m)과 결합된 형태로 존재한다는 사실이 알려졌다. FcRn은 콩팥을 비롯하여 폐, 간, 눈, 피부, 태반, 뇌, 장과 혈액 세포들 등에 분포하고 있으며, 각각의 부위에서 IgG의 이동에 관여한다[29-31].

FcRn과 IgG의 결합과 이동은 낮은 pH 환경에서 일어난다[27,32]. FcRn은 주로 세포의 endosome 내부에 위치하고 있으며 endosome 내부는 항상 낮은 pH로 유지된다. 낮은 pH 환경의 endosome에서 형성되는 FcRn-IgG 복합체는 라이소좀에 의해 분해가 되지 않은 채 세포막으로 이동 하며, 세포외 높은 pH 환경을 만나면 IgG는 FcRn과 분리되어 혈액으로 유입된다. 이 과정은 다른 항체들에 비해 IgG가 혈중에서 긴 반감기를 유지할 수 있는 이유가 된다[33]. 그리고 세포 내 낮은 pH 환경은 세포내 다양한 소기관들의 정상적인 단백질 대사 기능 유지를 위한 필수적인 요소로 되어 있다. 세포막 수용체를 매개로 이루어지는 함입 (receptor mediated endocytosis)과 함입된 단백질들의 이동, 수용체 복구 (receptor recycling), 세포내 소기관들 사이의 막융합, 그리고 lysosomal/autophagosomal 단백 분해 등의 대사 과정은 낮은 pH 환경 하에서 가능하다. 낮은 pH가 유지되지 않으면 세포내 대사는 불완전하게 일어나서 대사 산물들이 축적되며 세포의 항상성 (cellular homeostasis)이 깨져서 세포 사멸 (apoptosis)로 이어진다.

세포 내 낮은 pH 환경은 vacuolar-type H^+-ATPase(V-ATPase)의 proton (H^+) pump 작용에 의해 유지되는 것으로 되어 있다[34]. V-ATPase는 분자량이 큰 다단위 복합체로서 세포내 peripheral domain V1과 세포막에 있는 integral domain V0로 구성되어 있으며, V1은 ATP hydrolysis, V0는 H^+의 이동을 담당한다. V-ATPase는 endosome, lysosome, Golgi-derived vesicles, secretory veiscles 등과 같은 세포내 소기관들의 막 (membrane)에서 뿐만 아니라 콩팥세뇨관, 족세포, 골파괴 세포, 대식세포 등 다양한 세포의 세포막에도 존재한다고 알려져 있다[35].

V-ATPase는 Ang II 농도 변화에 따라 그 활성도에 차이를 보인다. 즉, Ang II 농도가 상승하면 V-ATPase 활성도는 차단되며, Ang II 농도가 정상으로 유지되면 V-ATPase 활성도는 증가한다[36].

레닌 수용체 (prorenin receptor, PRR)는 V-ATPase를 구성하는 한 요소이며, 유전자 구조가 V-ATPase의 한 부속 단백질로 규명된 ATP6ap2와 동일하다는 사실이 알려지면서 레닌 수용체에 의한 세포의 생존과 기능 유지는 V-ATPase 활성화와 매우 깊은 연관성이 있는 것으로 여겨진다[37].

실험적 항사구체 기저막 콩팥염에서 RAS 활성화로 생기는 Ang II의 변화 양상과 임상 지표들의 변화에 대해서는 많은 연구가 있어 왔다. Yayama 등[38]은 실험적 항사구체 기저막 콩팥염 유발 후 12시간째에 혈중 레닌과 안지오텐신의 농도가 최고치에 이르렀고 소변 단백량이 증가되었으며, 저알부민혈증, 고콜레스테롤혈증과 고질소혈증이 관찰되었다고 하였다. ARB를 질병 유발 2시간 전부터

투여했을 때 임상 지표들은 호전되는 반면, 질병 발생 이후에 투여한 경우에는 효과가 없었다고 보고하였다. Timmermans 등[39]은 항사구체 기저막 콩팥염의 질병 경과에 Ang II 수용체의 활성화가 관련되어 있음을 보여주었다. 다른 연구에서 Ang II 수용체를 경유하는 TGF-β1의 발현증가가 질병의 손상 과정에 관여한다는 사실을 제시하였다[40]. 이와 같은 사실들은 레닌 활성화 억제제인 알리스키렌이 면역성 콩팥 사구체 질환에서 이상적인 질병차단제 역할을 할 수 있음을 시사한다.

면역성 콩팥 사구체 질환의 사구체 여과 장벽에서 일어나는 변화는 매우 복잡하고 다양하며 임상적으로 질병이 급속도로 진행되거나 만성 경과로 이어질 수 있기 때문에 환자들에게 미치는 영향은 매우 크다고 할 수 있다. 그러므로 최대한 질병의 경과를 차단하고자 하는 노력은 끊임없이 이루어져야 한다. 면역성 콩팥 사구체 질환에 미치는 다양한 약제들과 그 효과에 대한 연구 결과들은 많지만, 발병 기전과 관련된 IgG 대사와 질병의 진행과정에 미치는 알리스키렌의 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 그래서 본 연구에서는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과와 질병의 진행에 대한 차단 효과가 어떠한 지를 알아보고자 하였다.

연구재료와 방법

1. 콩팥 사구체 기저막 항원 추출 (Production of glomerular antigen)

12마리의 male Sprague-Dawley rats에서 추출된 콩팥을 잘게 부순 후 (chopping) 체공이 200, 150, 125, 그리고 75 ㎛인 여과체 (sieve)를 차례로 통과시킨 다음, 75 ㎛ 체공에 걸린 사구체를 5분간 1500 rpm으로 원심분리 후 상청액을 버리고 가라앉은 사구체를 멸균된 생리 식염수에 넣은 뒤 −70℃에서 냉동 보관하였다. 얻어진 사구체를 초음파로 분쇄 (ultrasonic disruption)시키고 멸균된 생리 식염수와 ddH_2O가 섞여 있는 용액으로 수세 (washing) 후 4℃ 환경에서 8200 rpm으로 10분간 원심분리를 5회 시행하고 이후 다시 멸균된 ddH_2O로 수세 후 동일한 조건으로 원심분리를 5회 시행한 후 15 ㎖ cornical tube에 옮겨서 보관하였다. 냉동 건조기에서 밤새 건조시킨 후 분말의 콩팥 사구체 기저막 단백질 항원을 얻었다.

2. 항사구체 기저막 항체 추출 (Production of anti-GBM antibody)

콩팥 사구체 기저막 단백질 항원을 토끼 (New Zealand White rabbits)의 피하로 투여하여 면역하고 충분한 항사구체 기저막 항체가 생성되었다고 판단될 때까지 항체 역가를 평가해 가며 2주 간격으로 항원을 투여하였다. 충분한 항체가 생성되었다고 판단되는 시점에서 토끼로부터 혈액을 추출 한 뒤 DEAE anion-exchange chromatography (Elution 75 mM NaCl) 방법으로 항사구체 기저막 항체를 얻었다.

3. 항사구체 기저막 콩팥염 질병유발 (Induction of anti-GBM nephritis)

제태 주령 10주 male BALB/c mice을 마취시킨 후 질병군은 항사구체 기저막 항체를 체중 g당 0.2 mg을 꼬리 정맥을 통해 주사하였고 정상군에는 동일한 양의 멸균된 생리 식염수를 주사하였다.

4. 알리스키렌 투여 (Administration of aliskiren)

알리스키렌 약물은 하루 체중 kg당 20 mg을 osmotic minipumps (Model 2002 Alzet mini-osmotic pumps, Durect Corp.)에 주입한 후 생리 식염수에 담가 37℃ 환경에 보관하였다가 priming에 필요한 6시간이 지나서 mice 피하로 투여하였다. 이후에 바로 항사구체 기저막 항체를 꼬리 정맥으로 주입하였다.

5. 콩팥사구체의 손상 평가 (The assessment of glomerular injury)

1) 광학 현미경 검사 (Light microscopy); 콩팥 조직을 적출 후 포르말린에 바로 고정한 뒤 4 μm로 박절하고 PAS로 염색한 후 광학 현미경을 통해 사구체의 병변을 평가하였다. 평가 방법은 BALB/c mouse 개체당 30개의 사구체를 가지고 이전 문헌을 참고하여 그 기준에 따라 점수화하여 평가하였다[41]. 광학 현미경 소견의 주관적 편견을 배제하고자 두 명의 소아신장 전문의가 이중 맹검법 (double blind method)으로 사구체 병변을 관찰하여 점수화한 후 평균한 값으로 차이를 분석하였다.

2) 면역 형광 검사 (Immunohistology); 동결 절편기 (frozen microtome)로 조직을 4 μm로 박절하여 슬라이드에 부착시키고

실온에서 30분간 건조한 후 −20℃ 아세톤으로 20분간 고정하고 실온에서 약 20초간 건조시킨다. pH 7.0의 phosphate buffer (Dako, code S3024)에 각 10분씩 4차례 슬라이드를 수세 후 FITC-conjugated rabbit anti-fibronectin IgG (Bioss, bs-0666R-FITC), FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Abfrontier, LF-SA5015) 또는 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2012)를 4℃ wet chamber에서 약 1시간 30분 동안 반응시킨다. 이후 슬라이드를 pH 7.0의 phosphate buffer (Dako, code S3024)에 각 10분씩 4차례 수세한 후 aqueous mounter (scyteck, AMT060)로 봉입(mount)한 후 암실에서 면역 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

6. 소변 단백크레아티닌 비 평가 (The assessment of urine protein/creatinine, Up/Ucr)

소변으로 배출되는 단백질 정량 방법으로 질병 유발 7일째 단백크레아티닌 비를 측정하였다. 소변은 mice의 방광에 1 cc syringe를 찔러 채취한 후 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용해 측정하였고 소변의 크레아티닌은 5배 희석하여 Advia 2404 (Siemens)를 이용한 측정값으로 단백크레아티닌 비를 산출하였다.

7. Mouse IgG 측정 (The measurement of total mouse IgG and specific anti-rabbit IgG)

1) 혈액의 총 mouse IgG 측정 (The measurement of the circulating

mouse IgG in serum by ELISA kit, E99-131, Bethly Laboratories)

100 ㎕의 표본과 추출 시료를 중복하여 각 well에 분주한 후 plate를 덮고 20-25℃ 환경에서 1시간 동안 incubation한 후 4회에 걸쳐 plate를 수세하였다. 각 well에 2차 항체를 100 ㎕ 첨가 후 plate를 덮고 실온에서 1시간 동안 incubation한 후 다시 4회 수세하였다. 이후 각 well에 HRP solution 100 ㎕를 첨가 후 plate를 덮고 30분간 incubation하였고 4회 수세 후 TMB solution 100 ㎕를 각 well에 분주 후 암실에서 30분 동안 plate에서 일어나는 발색 반응을 관찰하였다. 각 well에 100 ㎕의 반응 차단 용액을 첨가 후 xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 평가하였다.

2) 혈액과 소변에서 특이 anti-rabbit IgG 측정 (The measurement of mouse anti-rabbit IgG in serum and urine by ELISA)

96 well plate에 rabbit IgG (BGM)를 50 mM Bicarbonate/Carbonate buffer로 10 ㎍/㎖ 농도가 되도록 희석 후 각 well당 100 ㎕씩 분주하여 4℃에서 밤새 incubation하였다. Plate를 4회 PBST로 수세하여 2% skim milk를 각 well에 200 ㎕씩 분주하여 37℃에서 2시간 차단 (blocking)한 후 다시 수세하였다. 표본 (mouse anti-rabbit IgG, BD, 550326)과 추출 시료를 각 well에 200 ㎕씩 중복 (duplication)하여 분주하고 plate에 뚜껑을 덮어 37℃에서 2시간 동안 incubation하였다. 이때 표본 시료는 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 0 ng/ml로 순차적으로

희석하였고, 추출 시료로서 혈액은 1000배, 소변은 200배로 희석하였다. Plate 수세 후 2차 항체인 goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005)를 blocking buffer (2% skin milk)로 1:2000 희석하여 각 well당 100 ㎕씩 첨가한 후 plate를 덮고 37℃에서 2시간 동안 incubation하고 plate를 수세하였다. 각 well에 TMB 용액을 100 ㎕씩 분주한 후 암실에서 15-30분 동안 발색 시킨 후 반응 차단 용액 (2 N H_2SO_4)을 100 ㎕씩 넣고 xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 평가하였다

8. 콩팥 조직에서 western blot을 이용한 TGF-β1, FcRn과 ATP6AP2 발현도 평가 (The assessment of the expression of TGF-β1, FcRn and ATP6AP2 in renal tissue by western blot)

600 ㎕의 lysis buffer에 적출한 콩팥 조직을 넣고 얼음에서 분쇄 (homogenization)시켜 -20℃에서 20-30분간 냉동 보관한 후 5분 동안 4℃에서 13000 rpm으로 원심분리를 시행하였다. 새 1.5 ㎖ tube에 상층 액을 옮기고, 얻어진 단백질은 -20℃에서 냉동 보관하였다. Bradford assay로 단백질 농도를 측정한 후 단백질 40 ㎍ 과 5X sample buffer, DW를 섞어 5분 동안 끓는 물에 끓인 후 얼음에서 단백질 시료를 식혔다. 12% polyacrylamide gel의 각 well당 단백질 40 ㎍이 부하(loading)되도록 분주하고 100 V 에서 약 두 시간에 걸쳐 전기영동을 시행하였다. 이후 단백질들을 PVDF membrane에 두

시간에 걸쳐 100 V에서 옮기고, ponceau S solution으로 막에 단백질이 옮겨졌는지 확인하였다. 실온에서 PBST로 5분 동안 2회에 걸쳐 막을 수세한 후 PBST로 희석한 5% skim milk에 막을 담가 4℃에서 밤새 blocking incubation하였다. 이후 PBST로 10분씩 3회 실온에서 막을 수세하고 5% BSA, 0.1% sodium azide로 희석된 1차 항체인 TGF-β1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-31690), FcRn (Santa Cruz Biotechnology, sc-66893), ATP6AP2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-67390)와 대조를 위한 α-tubulin antibody로 4℃에서 2시간 동안 incubation하였다. 이후 막을 수세한 후 2차 항체인 HRP-conjuated antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020, sc-2004)와 함께 상온에서 1시간 동안 incubation 하였다. 막을 수세한 후 ECL solution으로 반응 시켜 ChemiDoc MP Imaging System (Bio rad)를 이용하여 이미지를 얻었다.

9. 통계 분석 (Statistical analyses)

각 집단들의 평균값을 구하여 가장 큰 값을 100분율로 환산하고, 이 값을 기준하여 다른 집단들의 평균 값을 100분율로 환산한 값(relative value)을 표시하였다. 집단들 간의 차이 분석은 SPSS 통계 패키지를 이용하였고, Mann-Whitney 검정을 이용하여 집단들 간의 차이를 평가하였으며, P값이 0.05 미만($P<0.05$)일 때 통계적으로 의미 있는 차이를 보인다고 정의하였다.

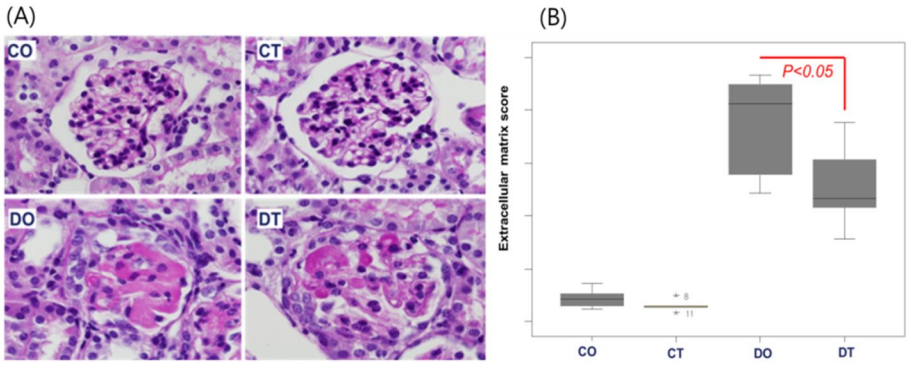
결과

알리스키렌은 면역성 콩팥 사구체 질환에서 레닌안지오텐신 활성화를 억제함으로써 질병의 진행을 차단한다.

항사구체 기저막 콩팥염에서 추출된 사구체를 가지고 PAS 염색후 알리스키렌이 콩팥 사구체에서 세포외기질 단백질의 합성에 미치는 영향에 대해 광학현미경 상에서 관찰을 한 결과 (그림 1A), 대조군과 질병군 사이에 세포외기질 단백질 침착 소견은 분명한 차이를 나타내었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 그런데 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에서 사구체 전반에 걸쳐 세포외기질 단백질의 침착 소견과 함께 반월양 세포 증식이 관찰된 반면, 치료를 받은 질병군 (DT)에서 사구체 일부에서만 세포외기질 단백질의 합성이 관찰되었다. 세포외기질 단백질 합성의 정도를 점수화하여 비교한 결과 (그림 1B), 알리스키렌 치료를 하지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 점수가 의미 있게 낮았다 (DO, 1.54 ± 0.45 vs DT, 1.38 ± 0.28, Mann-Whitney test, $P=0.037$). 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 사구체의 세포외기질 단백질 합성을 억제하는 작용이 있음을 시사하며 콩팥 기능을 보호하는 효과를 통해 질병의 진행을 억제할 수 있는 가능성을 제시한다.

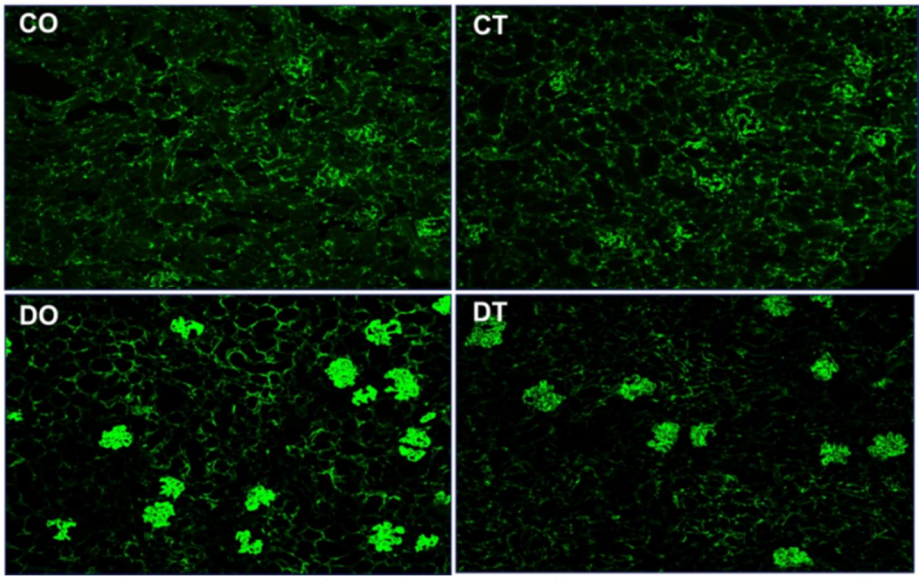
세포외기질 단백질 중 섬유화 정도의 지표로 자주 사용되는 FN 합성에 미치는 알리스키렌의 영향에 대해 면역조직화학 형광염색 상에서의 차이를 확인한 결과 (그림 2), 대조군과 질병군

사이에 FN 발현 정도에 분명한 차이를 나타내었다. 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 사구체의 FN 발현이 감소되어 있었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 대표적인 세포외기질 단백질인 FN 합성을 억제함으로써 콩팥 기능을 보호하는 효과를 나타낸다는 가능성을 제시한다.



CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 1. (A) 광학현미경 PAS 염색상 (original magnification: 400-fold) 알리스키렌이 사구체의 세포외기질 단백질 합성에 미치는 효과; 사구체의 세포외기질 단백질 합성이 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)보다 더 증가되어 있으며 게다가 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에서는 반월양 세포의 증식 소견도 함께 관찰되고 있다. 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. (B) 세포외기질 단백질 합성의 정도를 점수화한 결과 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 점수가 의미 있게 낮았다($P<0.05$).

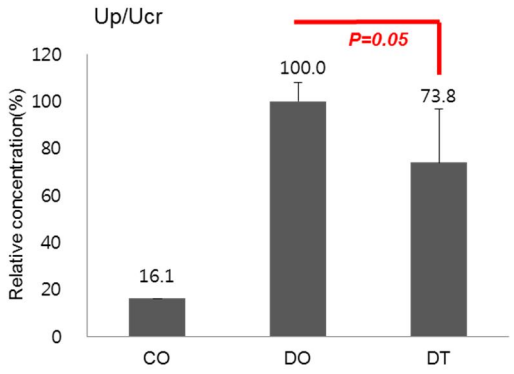


CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 2. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 (original magnification: 100-fold) 알리스키렌이 사구체의 세포외기질 단백질 중 FN 합성에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 콩팥 사구체의 FN 합성이 감소된 사실이 확인되었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

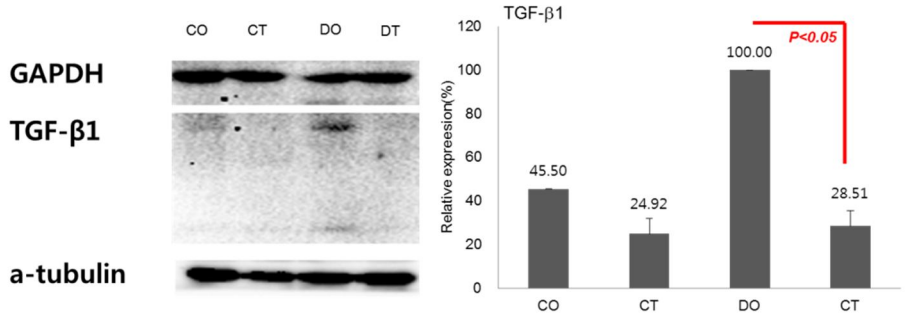
항사구체 기저막 콩팥염의 임상적 경과에 따른 알리스키렌의 치료 효과에 대해 단백뇨 (Up/Ucr) 발생에 미치는 효과에 대해 알아 본 결과 (그림 3), 단백뇨는 질병군에서 대조군에 비해 증가되었다. 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 단백뇨는 의미 있게 감소되었다 (*P=0.05*). 치료를 받은 대조군 (CT)은 방광천자를 통한 소변 채집 과정에서 방광에 소변이 차지 않거나 채집하는 과정에서 일어난 소변의 소실로 단백뇨를 측정할 수 없었다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 단백뇨를 감소시키는 기능이 있음을 보여주는 결과로서 단백뇨 감소 효과를 통해 질병을 차단할 수 있다는 가능성을 제시한다.

콩팥 피질에서 TGF-β1의 발현에 미치는 알리스키렌의 치료 효과에 대해 알아 본 결과 (그림 4), 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 콩팥 사구체의 TGF-β1의 발현은 현저하게 감소되어 있었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 이 결과는 알리스키렌이 면역성 콩팥 사구체 질환에서 TGF-β1의 발현을 억제함으로써 질병의 섬유화 진행을 차단하고 있음을 시사한다.



CO ; control group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 3. 알리스키렌이 단백뇨 (Up/Ucr)에 미치는 효과; 질병군 (DO, DT)에서 대조군 (CO)에 비해 의미 있는 상승이 관찰되었고 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 단백뇨가 의미 있게 감소되었다(*P=0.05*).



CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

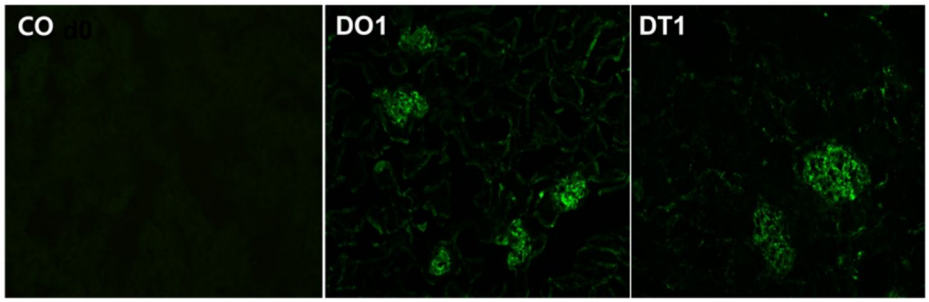
그림 4. 알리스키렌이 콩팥 피질의 TGF-β1의 발현에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 콩팥 사구체의 TGF-β1의 발현이 현저하게 감소되었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌은 사구체 여과 장벽의 IgG 대사 과정에 관여함으로써 질병의 진행을 차단한다.

항사구체 기저막 콩팥염의 질병 기전에 근거하여 질병 유발 1 일째인 이종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 여과 장벽의 항체 침착 과정에 미치는 효과를 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)으로 알아 본 결과 (그림 5), 치료를 받지 않은 질병군 (DO1)과 치료를 받은 질병군 (DT1) 모두에서 사구체 기저막을 따라 이종 항체가 균일하게 염색되었고 두 군간에 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염의 이종 항체 면역 반응 단계에서는 알리스키렌이 질병 경과에 영향을 미치지 못한다는 사실을 시사한다.

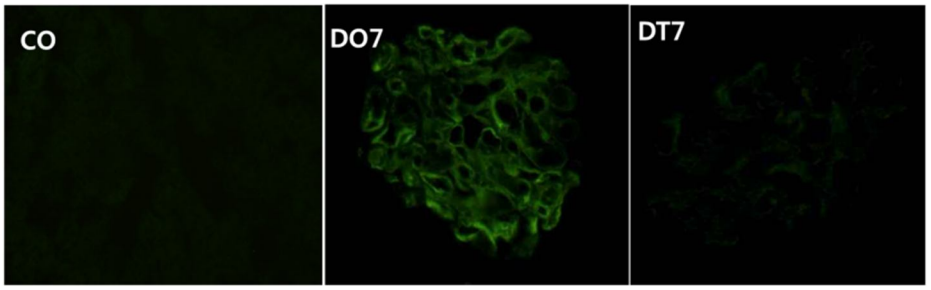
항사구체 기저막 콩팥염 유발 7 일째 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 여과장벽의 항체 침착 과정에 미치는 효과를 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)으로 알아 본 결과 (그림 6), 치료를 받지 않은 질병군(DO7)에서 동종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 뚜렷이 관찰되었지만 치료를 받은 질병군 (DT7)에서는 그 현상이 현저히 감소되어 있었다. 그리고 각 질병군의 개체에 따른 차이를 알아본 결과에서 (그림 7), 치료를 받은 질병군의 각 개체 (DT-1~DT4)에서 치료를 받지 않은 질병군 (D-1~D-4)보다 사구체 여과 장벽에 동종 항체의 염색 정도가 현저하게 낮아져 있었다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염의 사구체 여과장벽에서

알리스키렌이 동종 항체의 침착 또는 소멸 등의 대사 변화에 주된 요인으로 작용하고 있다는 것을 보여준다.



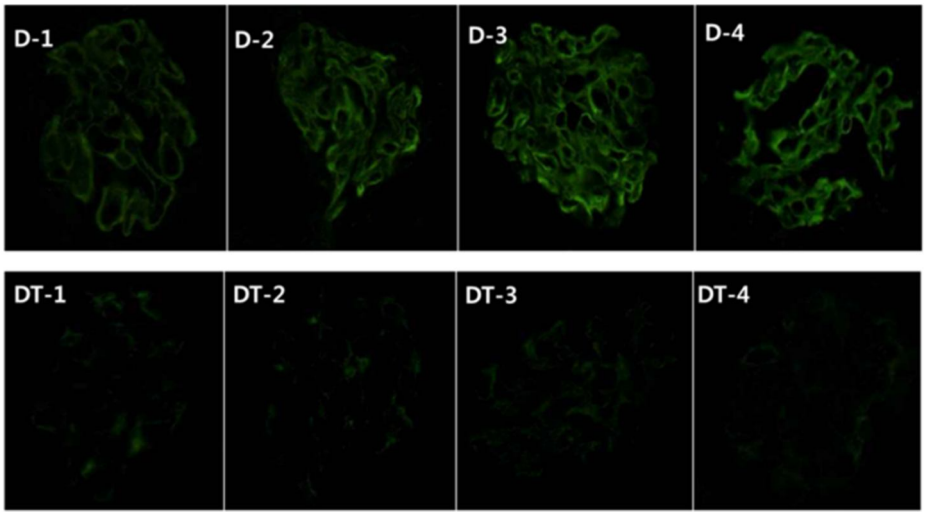
CO ; control group, DO1 ; disease untreated group at 1 day after disease induction, DT1 ; disease treated at 1 day after disease induction

그림 5. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 질병 유발 1일째인 이종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과; 알리스키렌을 치료 받지 않은 질병군 (DO1)과 치료 받은 집단군 (DT1) 모두에서 사구체 기저막을 따라 이종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 관찰되었고 두 집단간에 차이는 없었다.



CO ; control group, DO7 ; disease untreated group at 7 day after disease induction, DT ; disease treated group at 7 day after disease induction

그림 6. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 질병 유발 7일째인 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않은 질병군 (DO7)에서 사구체 기저막에 동종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 뚜렷이 관찰되었지만 치료를 받은 질병군 (DT7)에서는 그 현상이 현저히 감소되었다.

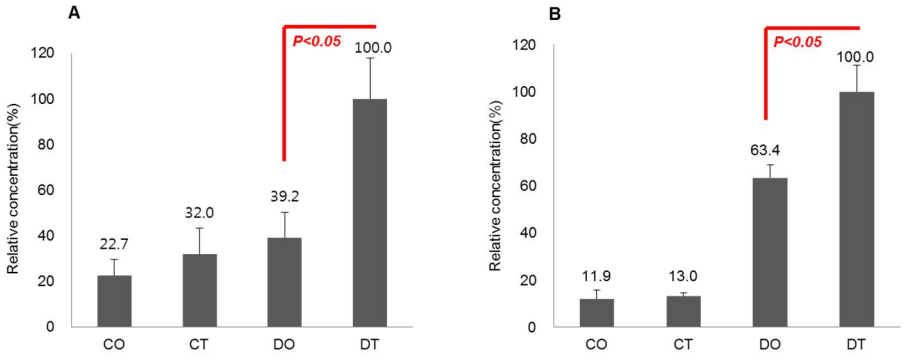


D-1~D-4 ; 4 mice of disease untreated group(one panel per mouse),

DT-1~DT-4; 4 mice of disease treated group(one panel per mouse)

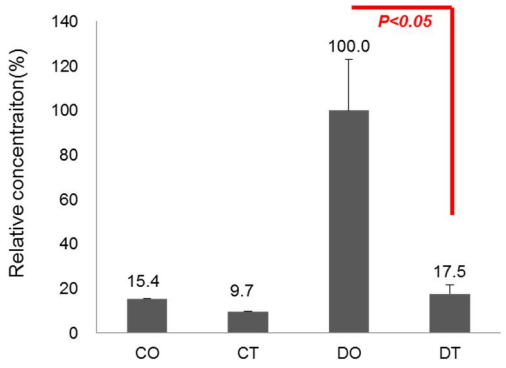
그림 7. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 질병 유발 7일째인 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 질병군 개체별 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군의 각 개체 (D-1~D-4)에서는 사구체 기저막에 동종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 뚜렷이 관찰되었지만 치료를 받은 질병군의 각 개체 (DT-1~DT4)에서는 그 현상이 현저히 감소되었다.

치료를 받은 질병군 (DT)과 치료를 받지 않은 질병군 (DO) 사이에 확인된 병리 조직 검사상 차이에 근거하여 혈액 내 생성된 동종 항체로서 총 mouse IgG를 확인하였다. 그 결과 (그림 8A), 치료를 받은 질병군 (DT)에서 총 mouse IgG의 역가가 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에 비해 의미 있게 상승되어 있었다 ($P<0.05$). 총 mouse IgG 중, 주입된 이종 항체에 특이적으로 반응하여 결합하는 특이 MAR IgG의 농도를 확인한 결과 (그림 8B), 치료를 받은 질병군 (DT)에서 의미 있게 높게 측정되었다 ($P<0.05$). 소변에서 특이 MAR IgG의 농도에 미치는 효과에 대해 알아 본 결과 (그림 9), 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 소변 내 농도가 의미 있게 감소되어 있었다 ($P<0.05$). 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 이 결과는 사구체 여과 장벽에서 여과된 특이 MAR IgG가 소변으로 배설되지 않고 콩팥 세뇨관을 통해 재흡수가 일어나는 기전이 존재하고 있다는 사실과 함께 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 혈액과 소변을 통해 일어나는 IgG의 대사 조절에 관여한다는 증거를 제시한다.



CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 8. 알리스키렌이 혈액의 mouse IgG(A)와 특이 MAR IgG(B)의 농도에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 두 항체의 혈청 내 농도가 의미 있게 증가되어 있었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

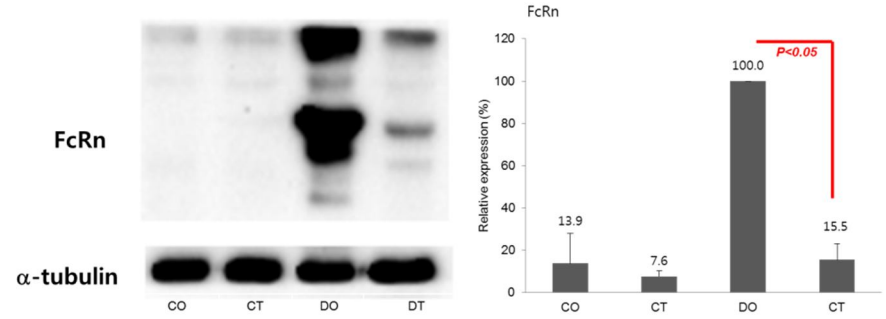


CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 9. 알리스키렌이 소변의 특이 MAR IgG의 농도에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 항체의 소변 내 농도가 현저히 감소되었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

항사구체 기저막 콩팥염의 사구체 여과 장벽에서 IgG의 대사과정은 FcRn에 의해 일어나며, 알리스키렌은 FcRn의 과다 발현 현상을 차단한다.

콩팥 사구체 여과 장벽에서 관찰되는 IgG의 대사는 족세포의 slit diaphragm의 여과 현상과 근위세뇨관 세포의 재흡수 과정이며 IgG의 이동은 FcRn에 의해 이루어지므로, 추출한 콩팥 피질을 이용하여 FcRn의 발현 현상과 그 차이를 western blot으로 확인하였다. 그 결과 (그림 10), 전반적으로 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 FcRn의 발현은 증가되어 있었고 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이가 없었다. 이는 사구체 여과 장벽에서 IgG의 대사가 FcRn에 의해 일어나고 있음을 보여주는 소견이다. 그리고 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 FcRn의 발현은 증가되어 있었다 ($P<0.05$). 즉, 알리스키렌에 의해 FcRn의 과다발현이 차단되고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 FcRn의 발현 과정에 알리스키렌이 관련되어 있음을 시사하며, 동시에 알리스키렌이 FcRn을 통한 IgG의 대사과정에 영향을 끼치고 있음을 보여준다.

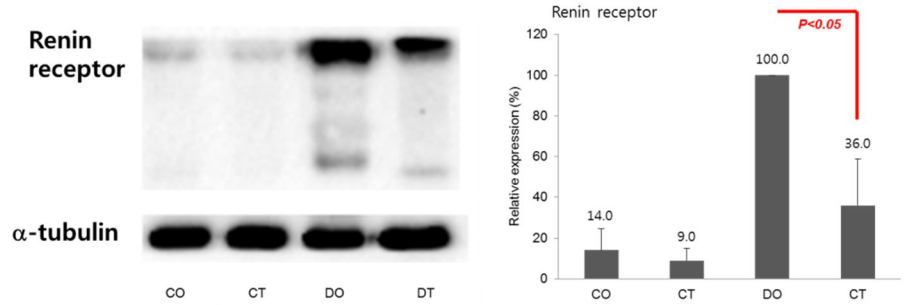


CO ; control group, CT ; control treated, DO ; disease untreated, DT ; disease treated

그림 10. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 FcRn의 발현에 미치는 효과; 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 FcRn의 발현은 증가되어 있었고 알리스키렌을 치료받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 FcRn의 발현은 의미 있게 증가되어 있었다. 농도계 분석 (densitometric analysis) 결과는 두 군 간에 의미 있는 차이를 보여주었다. 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌은 사구체 여과 장벽의 레닌 수용체의 과다 발현 현상을 억제함으로써 질병의 경과를 차단한다.

알리스키렌에 의한 레닌 활성화 억제 기전과 관련하여 추출한 콩팥 피질을 이용하여 알리스키렌이 레닌 수용체의 발현에 미치는 영향을 알아보았다 (그림 11). 그 결과 전반적으로 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 레닌 수용체의 발현은 증가되어 있었고 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이가 없었다. 그리고 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 레닌 수용체가 과다하게 발현되고 있는 반면, 치료를 받은 질병군에서는 레닌 수용체의 과다 발현 현상이 억제되었다 ($P<0.05$). 이 결과는 레닌 수용체의 과다 발현이 질병의 진행을 유도하는 요인임을 보여주는 한편, 레닌 수용체의 과다 발현을 억제함으로써 질병의 진행을 차단한다는 알리스키렌 작용 기전을 설명해 준다.



CO ; control group, CT ; control treated, DO ; disease untreated, DT ; disease treated

그림 11. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 레닌수용체 (ATP6AP2)의 발현에 미치는 효과; 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 레닌수용체의 발현은 증가되어 있었고 알리스키렌을 치료받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 레닌 수용체의 발현은 의미 있게 증가되어 있었다. 농도계 분석 (densitometric analysis) 결과는 두 군 사이에 의미 있는 차이를 보여주었다. 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

고찰

본 연구 결과는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 레닌 억제제인 알리스키렌이 사구체 섬유화 과정을 차단하고 단백뇨를 호전시키는 효과는 물론, 사구체 여과 장벽에서 IgG의 대사 과정에 관여함으로써 질병의 진행을 억제하는 효과가 있다는 증거들을 제시한다.

항체 또는 항원-항체의 면역복합체가 유발 인자가 되어 발생하는 면역성 콩팥 사구체 질환에는 Goodpasture 증후군, 루프스 콩팥염, 막성사구체 콩팥염, 급성 감염후성 사구체 콩팥염 등이 있으며 이 질병들은 급속한 병의 진행 또는 비가역적인 만성 경과를 보일 수 있기 때문에 조기에 대처하지 못할 경우 환자의 생명에 치명적이거나 말기 콩팥 기능 장애로 진행될 수 있다. 면역성 사구체 콩팥 질환이 진행 경과를 보일 때 나타나는 사구체의 조직학적 변화 소견은 다양한 세포들의 증식과 세포외기질 단백질 합성의 증가, 그리고 콩팥의 위축을 일으키는 섬유화이다[42]. 사구체 기저막을 구성하는 세포외기질 단백질에는 type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan, FN, laminin, cyclooxygenase, lipoxygenase products (urokinase-type plasminogen activator, PAI-1, antioxidant enzymes, IL-1 and angiopoietin-1) 등이 있으며 이들 중 FN은 족세포와 메산지움 세포에서 분비되는 대표적인 세포외기질 단백질로서 콩팥의 섬유화 정도를 평가하는 주된 도구이다[43]. Ang II는 이러한 세포외기질 단백질의 합성을 증가시키는 기능뿐만 아니라[44] 다양한 염증 세포들을 직접 동원하거나 MCP-1 등의 염증 유발

매개체 (pro-inflammatory mediators)의 생성을 유도함으로써 콩팥 손상을 일으킨다[45-48].

단백뇨가 콩팥질환의 진행을 가속화시키는 위험 인자임은 잘 알려져 있다[44]. 단백뇨는 Ang II 상승에 의한 사구체 efferent arteriole의 수축 또는 TGF-β1의 상승에 의한 afferent arteriole의 자동조절 (auto-regulation) 혼란으로 사구체 혈관내압이 증가하기 때문에 발생한다고 되어 있다[49]. 이러한 혈액 역동학적 변화에 의한 기전과는 달리, Ang II가 음이온 전하를 띠는 proteoglycan의 합성을 차단하고 족세포의 slit diaphragm에 있는 nephrin transcription을 억제함으로써 유발되는 사구체 여과장벽의 구조적 손상 기전에 의해 단백뇨가 발생하기도 한다[50-51]. 그러므로 Ang II의 생성 또는 작용을 차단하는 것은 질병의 악화를 막는데 있어 매우 중요한 요인이다. 본 연구에서 관찰된 콩팥 사구체 세포외기질 단백질의 생성 감소, 단백뇨의 호전과 TGF-β1의 발현 감소는 알리스키렌 치료에 의한 RAS 활성화 차단 효과로 나타난 결과라고 할 수 있다.

알리스키렌이 세포외기질 단백질 합성 차단과 단백뇨의 감소에 미치는 효과에 대해서 알아 본 많은 연구들이 있었다. Kelly 등[15]은 당뇨병 쥐에서 전신성 혈압 변화와는 상관 없이 단백뇨와 사구체 경화증 및 사이 간질의 섬유화를 감소시켰다고 보고하였다. 루프스 콩팥염 질병 모델에서 혈압 조절과 상관없는 단백뇨 감소 효과가 나타났고[16], COL4A3-/- 질병 모델에서는 세포외기질 단백질의 합성, 단백뇨, 콩팥 조직의 TGF-β1 발현 모두

감소하였다고 하였다[52]. 사람의 족세포를 가지고 세포내 국소성 Ang II의 상승을 유도한 후 ACEI, ARB와 알리스키렌 세 가지 약물을 처치하여 RAS 활성화 억제 효과를 알아본 비교 연구는, 다른 두 가지 약물에 비해 알리스키렌이 그 효과가 더 우월하다고 하였다[53,54]. 이 연구 결과들은 알리스키렌의 RAS 활성화 억제 작용으로 질병의 진행이 차단될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 알리스키렌과 ACEI 또는 ARB의 비교 연구를 병행하지 못한 점이 아쉬움으로 남지만, 알리스키렌 치료 효과는 최소한 ACEI 또는 ARB의 치료 효과에 필적할 만하다고 할 수 있으며 앞으로 비교 연구 또는 병행 치료의 효과를 연구하고자 함에 있어 유용한 정보가 될 것이다.

레닌 수용체에 의한 세포내 섬유화 단백질 합성 과정은 Ang II의 생성이나 작용을 차단하는 것만으로는 질병의 진행을 막을 수 없다는 한계점을 드러내었다. 게다가 음성 되먹이기 기전에 의해 재활성화되는 레닌과 프로레닌은 레닌 수용체 활성화를 더욱 부추겨 조직의 손상은 더 심해질 것이라는 우려를 지적하였다. 알리스키렌에 의한 레닌 수용체의 직접 차단 효과에 대해 알아본 많은 연구들도 동일한 결과들을 보여주었다[55,56].

그런데 레닌 수용체가 활성화 될 때 세포내에서만 아니라 세포 외에서의 RAS가 활성화된다는 연구 결과들은 기존의 RAS 활성화 차단 약물들이 여전히 질병의 진행을 차단하는데 유용할 수 있음을 시사한다. 레닌 활성화 과정은, 프로레닌의 prosegment가 단백 분해(proteolytic cleavage)에 의해 떨어져 나가면서 생성되는 레닌이

안지오텐시노겐을 기질로 하여 Ang I, II를 생성해 내는 과정이다. 이 과정은 전형적인 RAS 활성화 과정으로서 수분 부족, 저나트륨 혈증, 저혈압 등이 유발 인자가 되어 콩팥 사구체의 사구체옆세포에서 레닌이 활성화되면서 일어나는 반응 과정이다. 한편 레닌 수용체에 의한 세포외 RAS 활성화는 레닌 수용체에 결합하는 프로레닌 prosegment의 구조적 변형으로 말미암아 프로레닌이 레닌과 동일한 효소 기능을 획득함으로써 일어나는 Ang II의 생성 과정이다[57]. 이런 점에서 RAS 활성화 차단제들이 레닌 수용체에 의한 세포내 섬유화 단백질 합성 과정을 차단하기에는 한계가 있다 하더라도 세포외의 RAS 활성화를 차단한다는 점에서는 여전히 유용하다고 할 수 있다. 아직도 다양한 연구 결과들을 통해 ACEI 또는 ARB의 효과가 입증되고 있고 임상에서 가장 흔하게 투여되는 치료제 중 하나인 이유가 이러한 작용 기전 때문이라고 판단되며, 알리스키렌 또한 세포외 RAS 활성화 차단 효과로 조직 손상을 최소화할 수 있을 것으로 추정된다.

실험적 항사구체 기저막 콩팥염은 nephrotoxic serum nephritis라고도 명명되며 주로 mouse를 이용한 면역성 콩팥 사구체 질환의 대표적인 질병모델이다[58]. Rantala 등[59]은 항사구체 기저막 콩팥염의 SD rat 모델에서 사구체 기저막뿐만 아니라 족세포의 세포질에서 면역 복합체가 함입된 탐식체 (phagosomes)와 소포체 (endocytotic multivesicles)들을 확인함으로써 사구체 여과 장벽에서 일어나는 면역복합체의 함입과 이동의 대사 과정을 보고하였는데, 이러한 면역 복합체의 이동은 족세포에 존재하는 FcRn에 의해

일어난다는 사실이 Akilesh 등[25]에 의해 확인되었다. 항체가 발병 기전에 관련되어 있다는 사실을 근거로 본 실험에서 IgG의 대사양상을 알아본 결과 알리스키렌 치료가 이루어진 질병군에서 사구체에 침착되는 IgG의 양은 감소, 혈액의 IgG 농도는 증가, 소변의 IgG 배설은 감소하였음을 알 수 있었다. 이 결과들이 보여주는 임상적 의미는 첫 번째, IgG의 대사 과정에 알리스키렌의 작용이 관련되어 있다는 점이다. 즉, 사구체 기저막에 침착되는 IgG가 사구체 여과장벽으로부터 여과된 후 세뇨관에서 재흡수되는 과정에 알리스키렌이 영향을 미치고 있음을 보여준다. 두 번째는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 IgG의 정상적인 대사를 유도하기 때문에 사구체 여과 장벽에서 일어날 수 있는 각종 면역 반응과 염증 반응들을 차단할 수 있다는 점이다. 이는 만성 콩팥 손상으로의 진행을 지연시킬 수 있는 중요한 사안이 된다. 즉, 루프스 콩팥염과 막성신염증후군 등의 면역성 콩팥 사구체 질환에 알리스키렌 치료가 효과적일 수 있음을 반영하는 것으로, 이에 대해서는 대규모 임상 연구를 통해 입증되어야 할 것이다. 세 번째는 기존의 다른 연구들은 병리 소견과 분자 유전학적 측면에서 FcRn에 의한 IgG의 이동 현상만을 제시한 반면[23-25], 채취한 혈액과 소변의 실제 IgG 농도 변화 양상을 보여주고 있다는 점이며 이것은 본 연구가 가지는 독특한 점이라고 할 수 있다.

FcRn의 발현과 정상적인 기능에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구는 많이 진행되어 왔다. FcRn이 endosome에서 IgG와 결합하고 이동해 가는 과정에 이르기까지는 여러 가지 단백질들의 복합적인

기능이 관련되어 있다[60-66]. FcRn이 endoplasmic reticulum (ER)을 빠져 나오기 위한 FcRn의 folding 과정에는 β_2m의 결합이 꼭 필요하다. 만약 이 과정이 차단되면 disulfide bond oligomers 형태로 ER에 축적된다. 그리고 FcRn folding은 endosome을 경유하는 IgG의 이동 과정에 필수적인 요인으로 작용한다[60]. β_2m과 FcRn의 복합체 형성 전 단계에서 FcRn heavy chain 들의 연결 과정에는 calnexin과 ERp57이, FcRn-β_2m 복합체의 성숙 과정에는 calreticulin이 관여한다[61]. Rab 11은 IgG 이동뿐만 아니라 endosome과 세포막 융합 과정을 유도하는 것으로 알려져 있고 basolateral membrane recycling을 통한 exocytosis 과정에도 관여한다[62]. Clathrin은 rat intestine의 FcRn trafficking 과정에 기여한다[63]. FcRn의 cytoplasmic tail은 endocytosis와 exocytosis 뿐만 아니라 basolateral membrane targeting을 유도하며, FcRn의 N-glycan은 apical membrane targeting의 regulation에 관여하는 것으로 되어 있다[64]. FcRn의 발현을 증가시키는 인자로서는 TNF-α와 IL-1β를 들 수 있고 반면 IFN-γ는 FcRn 발현을 감소시키는 인자로 알려져 있다[65,66].

FcRn의 정상적인 기능 유지에 가장 중요한 생물학적 요소는 낮은 pH 환경이라고 할 수 있다[66]. FcRn-IgG 복합체의 형성과 이동은 낮은 pH 환경에서 일어나고 분리 현상은 세포외 높은 pH 환경을 만날 때 일어난다. 서론에서 밝혔듯이 FcRn과 IgG 의 복합체가 형성되는 곳은 endosome인데 endosome 막에 존재하는 V-ATPase에 의해 endosome 내는 항상 낮은 pH 환경 (pH 6.0 이하)이 유지된다. 만약 어떤 요인에 의해 V-ATPase 활성도가 떨어지면 낮은 pH 환경

조성이 깨어져 FcRn에 의한 IgG 결합과 이동 현상은 일어나지 않을 뿐만 아니라 세포 내 모든 단백질들의 정상적 대사 기능 유지도 어려워진다[67]. 이와 같이 FcRn의 생성으로부터 IgG 대사 과정에 이르기까지 다양한 단백질들의 대사과정과 생물학적 환경이 복합적으로 얽혀있다는 사실을 고려해 볼 때 낮은 pH 환경 조성을 위한 V-ATPase의 역할은 매우 중요한 요소임을 알 수 있다.

V-ATPase의 활성도는 Ang II의 농도에 따라 차이를 보인다. Harris 등[68]은 콩팥의 근위 세뇨관에서 낮은 농도의 Ang II (10^{-11} M, 10^{-10} M)에서는 HCO_3^-의 재흡수가 증가하지만 높은 농도 (10^{-7} M, 10^{-6} M)에서는 HCO_3^-의 재흡수가 감소된다고 하였다. Wagner 등[69]도 Ang II 농도가 낮은 환경에서 근위 세뇨관 세포의 H^+ 분비가 이루어진다고 하였다. Tojo 등[70]은, renal cortical collecting duct에 존재하는 Ang II의 농도가 증가함에 따라 V-ATPase 활성도가 감소한다는 결과와 함께, AT1 차단제를 사용한 후 V-ATPase 활성도가 정상으로 회복되는 결과를 가지고 Ang II에 의한 V-ATPase 활성도 조절은 AT1을 경유하여 일어난다고 주장하였다[70]. 상기 결과들은 Ang II가 V-ATPase 활성도의 조절 인자로 작용하고 있음을 보여 주는 증거들이다.

본 실험에서 FcRn 발현 양상의 결과는 질병군에서 나타난 FcRn의 과다 발현 현상이 알리스키렌의 작용으로 억제되고 있음을 보여주고 있다. 그 이유를 설명하기 위해 저자는 V-ATPase 활성도와 Ang II의 역할을 관련인자로 고려하였다. 즉, 치료가 이루어지지 않은 질병군에서 Ang II의 상승이 V-ATPase 활성도를 감소시켜 세포

내 FcRn에 의한 IgG의 이동뿐만 아니라 다양한 단백질들의 대사 장애가 일어나기 때문에 이를 보상하기 위한 이차적인 반응에 의해 FcRn 발현이 과다하게 증가되었다고 추정하였다. 반대로 치료를 받은 질병군에서는 알리스키렌에 의해 Ang II의 농도 상승이 억제되기 때문에 V-ATPase의 활성도는 그대로 유지되어 FcRn의 이차적인 과다 발현 현상이 나타나지 않았다고 판단하였다.

레닌 수용체가 가지는 세포의 생존 유지 기능이 세포 내 낮은 pH 환경을 유도하기 때문이며 이는 V-ATPase 활성도와 연관이 깊다는 연구 결과들이 발표되었다. Advani 등[71]은 rat 콩팥 집합관의 intercalated A 세포에 레닌 수용체가 분포하고 있으며 V-ATPase가 같은 위치에 공존 (colocalization)하고 있다는 사실과 함께 V-ATPase가 레닌 수용체의 세포내 신호 전달 과정에 관여한다는 증거들을 제시한 바 있다. 족세포에 존재하는 레닌 수용체를 없앤 mice는 생후 2, 3주경 신증후군과 급성 신기능 장애로 사망하였고 족세포의 족돌기 융합 (effacement) 소견과 함께 주변의 골격구조의 파괴가 관찰되었는데 bafilomycin A1으로 V-ATPase 활성도를 차단한 결과가 이와 유사하다고 하였다[72-73]. Kinouchi 등[74]은 레닌 수용체를 없앤 mice가 생후 3주째 심실기능의 저하로 인한 심부전으로 사망하였고 RAB-7과 Lysosomal associated membrane protein 2 (LAMP2)을 포함하는 소포 (vacuoles)들과 자가 탐식포 (autophagic vacuoles)들이 불완전 대사의 결과로 인해 cardiomyocytes 내 많이 축적되어 있음을 확인하였고 bafilomycin A1으로 처치한 결과가 이와 유사하였음을 보여주었다. 그리고 bafilomycin A1으로

V-ATPase 활성화를 차단한 이후 레닌 수용체 mRNA의 발현이 증가한 결과를 제시하면서, V-ATPase 활성도 감소에 따른 세포내 pH 변화를 회복시키는 과정에서 레닌 수용체가 과다하게 발현되었다고 설명하였다. 본 실험 결과에서 나타난 레닌 수용체의 과다발현 현상 또한 질병으로 인해 V-ATPase 활성도가 억제됨으로써 나타난 보상적인 결과일 수 있으며, bafilomycin A1이 아닌 활성화된 Ang II에 의해 V-ATPase 활성도가 차단되었을 가능성이 있다.

저자는 치료가 이루어지지 않은 질병군에서 나타난 레닌 수용체의 과다 발현 현상이 일차적인 레닌 또는 프로레닌의 증가로 인한 결과라고 보기는 어렵다고 판단하였다. 만약 질병에 의한 일차적인 결과라면 치료가 이루어진 질병군에서도 레닌 수용체의 과다 발현 현상은 나타나야 한다. 왜냐하면 알리스키렌은 레닌 또는 프로레닌이 레닌 수용체에 결합하는 현상을 차단할 수 없다고 되어 있기 때문이다[55,56].

알리스키렌에 의한 레닌 수용체의 과다 발현 차단 현상은 또 하나의 중요한 임상적 의미를 가진다. 그 이유는 레닌 수용체의 과다 활성화는 질병의 섬유화 진행을 촉진하기 때문에 알리스키렌 치료에 따른 레닌 수용체의 과다 활성화 차단은 질병이 악화되는 길을 막는 한 가지 방법이 될 수 있기 때문이다. 이 점에 대해서는 보다 많은 연구들을 통해 입증되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구를 통해 Ang II는 여전히 콩팥 손상을 일으키는 주된 요인이며 사구체 여과 장벽에서 일어나는 여러 가지 변화들의 중심에 서 있다는 사실을 알 수 있었다. 그리고 면역성

콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 FcRn을 통한 IgG의 정상적인 대사 과정을 유도함으로써 면역 기전의 활성화에 의한 콩팥 손상의 진행을 차단할 수 있음을 알게 되었다. 또한 알리스키렌 치료는 레닌 수용체의 과다 활성화를 억제함으로써 질병이 악화되는 것을 막을 수 있는 한 가지 방법이 될 수 있음을 알게 되었다. 마지막으로 본 연구 결과는 알리스키렌의 치료적 적용을 위한 기초의학적인 정보와 함께, 임상에서 접하게 되는 다양한 면역성 콩팥 사구체 질환의 치료적 접근을 시도함에 있어 유익한 발판을 마련해 줄 수 있으리라 판단된다.

참고문헌

1. Mezzano SA. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension 2001;38:635-8.

2. Todd PA, Heel RC. Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. Drugs 1986;31:198-248.

3. Hernandez R, Sosa-Canache B, Velasco M, Armas-Hernandez MJ. Armas-Padilla MC, Cammarata R. Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. J Hum Hypertens 2002;16(Suppl 1):S93-9.

4. Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY: Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: Implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. J Am Soc Nephrol 2003;14:1738-47.

5. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. Kidney Int 2004;65:30-9.

6. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature 2002;417:822-8.

7. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin–angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocr Rev 2003;24:261-71.

8. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest 2002;109:1417-27.

9. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-β1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. Kidney Int 2006;69:105-13.

10. Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rueger H, Goschke R, Cohen NC et al. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. Chem Biol 2000;7:493-504.

11. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen NC, Rasetti V, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:698-705.

12. Azizi M. Direct renin inhibition: clinical pharmacology. J Mol Med 2008;86:647-54.

13. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. Circulation 2005;111:1012-8.

14. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK, et al. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med 2008;358:2433-46.

15. Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, Naik G, Gilbert RE. Aliskiren, a novel renin

inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. Diabetologia 2007;50:2398-404.

16. Yen TH, Yang HY, Chu PH, Wen CJ, Fu JF, Wang IK et al. Aliskiren attenuates proteinuria in mice with lupus nephritis by a blood pressure-independent mechanism. Lupus 2013;22:180-9.

17. Chugh S, Yuan H, Topham PS, Haydar SA, Mittal V, Taylor GA, et al. Aminopeptidase A: a nephritogenic target antigen of nephrotoxic serum. Kidney Int 2001;59:601-13.

18. Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF 2nd, Lou YH. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. J Clin Invest 2002;109:517-24.

19. Park SY, Ueda S, Ohno H, Hamano Y, Tanaka M, Shiratori T, et al. Resistance of Fc receptor- deficient mice to fatal glomerulonephritis. J Clin Invest 1998;102:1229-38.

20. Tryggvason K, Wartiovaara J. How does the kidney filter plasma? Physiology(Bethesda) 2005;20:96-101.

21. Miner JH. Renal basement membrane components. Kidney Int 1999;56:2016-24.

22. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. Physiol Rev 2003;83:253-307.

23. Haymann JP, Levraud JP, Bouet S, Kappes V, Hagège J, Nguyen G, et al. Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult

human kidney. J Am Soc Nephrol 2000;11:632-9.

24. Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 2002;282:F358-F365.

25. Akilesh S, Huber TB, Wu H, Wang G, Hartleben B, Kopp JB, et al. Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:967-72.

26. Brambell FW. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. Proc Nutr Soc 1969;28:35-41.

27. Rodewald R. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. J Cell Biol. 1976;71:666-9.

28. Simister NE, Rees AR. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. Eur J Immunol 1985;15:733-8.

29. Radulescu L, Antohe F, Jinga V, Ghetie V, Simionescu M. Neonatal Fc receptors discriminates and monitors the pathway of native and modified immunoglobulin G in placental endothelial cells. Hum Immunol 2004;65:578-85.

30. Kim KJ, Fandy TE, Lee VH, Ann DK, Borok Z, Crandall ED. Net absorption of IgG via FcRn-mediated transcytosis across rat alveolar epithelial cell monolayers. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:616-22.

31. Claypool SM, Dickinson BL, Wagner JS, Johansen FE, Venu N, Borawski

JA, et al. Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fc gamma-receptor. Mol Biol Cell 2004;15:1746-59.

32. Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. Int Immunol 2003;15:187-95.

33. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. J Exp Med 2003;197:315-22.

34. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:917-29.

35. Beyenbach KW, Wieczorek H. The V-type H^+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J Exp Biol 2006;209:577-89.

36. Rothenberger F, Velic A, Stehberger PA, Kovacikova J, Wagner CA. Angiotensin II stimulates vacuolar H+ -ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells from the outer medullary collecting duct. J Am Soc Nephrol 2007;18:2085-93.

37. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, et al. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H+-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. Circ Res 2010;107:30-4.

38. Yayama K, Matsui T, Takano M, Hayashi K, Nagamatsu T, Suzuki Y, et al.

Activation of the renin-angiotensin system in anti-glomerular Basement antibody-induced GN. Biol Pharm Bull 1995;18:411-5.

39. Timmermans V, Peake PW, Charlesworth JA, Macdonald GJ, Pawlak MA. Angiotensin II receptor regulation in anti-glomerular basement membrane nephritis. Kidney Int 1990;38:518-24.

40. Yayama K, Makino J, Takano M, Okamoto H. Role of Angiotensin II in the transforming growth factor-b1 expression of rat kidney in anti-glomerular basement membrane antiserum-induced GN. Biol Pharm Bull 1995;18:687-90.

41. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-β induced matrix proteins in glomerulonephritis. Lab Invest 1993;69:68-76.

42. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. N Engl J Med 1988;318:1657-66.

43. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. J Clin Invest 2001;108:1583-7.

44. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-b and angiotensin II in renal fibrosis. Hypertension 1998;31:181-8.

45. Cattell V. Macrophages in acute glomerular inflammation. Kidney Int 1994;45:945-52.

46. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensin II. Curr Opin Nephrol Hypertens

2001;10:321-9.

47. Schlöndorf D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. Kidney Int 1995;47:S44-S47.

48. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in the kidney through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 gene expression. J Immunol 1998;161:430-9.

49. Sharma K, Cook A, Smith M, Valancius C, Inscho EW. TGF-beta impairs renal autoregulation via generation of ROS. Am J Physiol Renal Physiol 2005;288:F1069-77.

50. Brinkkoetter PT, Holtgrefe S, van der Woude FJ, Yard BA. Angiotensin II type 1-receptor mediated changes in heparan sulfate proteoglycans in human SV40 transformed podocytes. J Am Soc Nephrol 2004;15:33-40.

51. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease. Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. Diabetes 2005;54:1626-34.

52. Gross O, Girgert R, Rubel D, Temme J, Theissen S, Müller GA. Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. Am J Hypertens 2011;24:355-61.

53. Sakoda M, Ichihara A, Kurauchi-Mito A, Narita T, Kinouchi K, Murohashi-Bokuda K, et al. Aliskiren Inhibits Intracellular Angiotensin II Levels Without Affecting (Pro)renin Receptor Signals in Human Podocytes. Am J Hypertens 2010;23:575-80.

54. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. Diabetes 2008;57:3297-306.

55. Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, Kvakan H, et al. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. Hypertension 2008;51:682-8.

56. Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. Hypertension 2008;52:130-6.

57. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. Hypertension 2005;46:1069-76.

58. Nishihara T, Kusuyama Y, Gen E, Tamaki N, Saito K. Masugi nephritis produced by the antiserum to heterologous glomerular basement membrane. I. Results in mice. Acta Pathol Jpn 1981;31:85-92.

59. Rantala I. Glomerular Epithelial cell endocytosis of immune deposit s in the nephrotic rat. an ulatrastructural immunoperoxidase study. Nephron 1981;29:239-44.

60. Claypool SM, Dickinson BL, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS. Functional reconstitution of human FcRn in Madin–Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin. J Biol Chem 2002;277:28038-50.

61. Zhu X, Peng J, Chen D, Liu X, Ye L, Iijima H, et al. Calnexin and ERp57 facilitate the assembly of the neonatal Fc receptor for IgG with beta 2-microglobulin in the endoplasmic reticulum. J Immunol 2005;175:967-76.

62. Ward ES, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Tang Q, Ober RJ. From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. Mol Biol Cell 2005;16:2028-38.

63. He W, Ladinsky MS, Huey-Tubman KE, Jensen GJ, McIntosh JR, Bjorkman PJ. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. Nature 2008;455:542-6.

64. Kuo TT, de Muinck EJ, Claypool SM, Yoshida M, Nagaishi T, Aveson VG, et al. N-glycan moieties in neonatal Fc receptor determine steady-state membrane distribution and directional transport of IgG. J Biol Chem 2009;284:8292-300.

65. Liu X, Ye L, Christianson GJ, Yang JQ, Roopenian DC, Zhu X. NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. J Immunol 2007;179:2999-3011.

66. Liu X, Ye L, Bai Y, Mojidi H, Simister NE, Zhu X. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can downregulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. J Immunol 2008;181:449-63.

67. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nature Rev Mol Cell Biol 2007;8:917-29.

68. Harris PJ, Young JA. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. pflugers Arch 1977;367:295-7.

69. Wagner CA, Giebisch G, Lang F, Geibel JP. Angiotensin II stimulates vesicular H+-ATPase in rat proximal tubular cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9665-8.

70. Tojo A, Tisher CC, Madsen KM. Angiotensin II regulates H+-ATPase activity in rat cortical collecting duct. Am J Physiol 1994;267:F1045-51.

71. Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K et al. The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H+-ATPase in the kidney. Hypertension 2009;54:261-9.

72. Riediger F, Quack I, Qadri F, Hartleben B, Park JK, Potthoff SA, et al. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. J Am Soc Nephrol 2011;22:2193-202.

73. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, et al. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. J Am Soc Nephrol 2011;22:2203-12.

74. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H: The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H+-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. Circ Res 2010;107:30-4.

Abstract

The Effect of Aliskiren on IgG Metabolism In a Mouse Model of Immune Mediated Glomerular Disease

Kang, Ju Hyung

Molecular Genomic medicine

The graduate School

Seoul National University

Introduction: Ang II is the factor associated with chronic renal injury. The use of ACEI and ARB may be limited because of the Ang II independent pathway as well as the adverse effects. Aliskiren shows RAS inhibition and the effects compatible to ACEI or ARB. The anti-GBM nephritis is mediated by IgG followed by inflammation. IgG is normally filtered from slit diaphragm and reabsorbed in proximal tubular cells by FcRn under the low pH environment which is made by V-ATPase. PRR has the regulatory function for low pH environment associated with V-ATPase. This study shows the effect of aliskiren on IgG metabolism in immune mediated glomerular disease

Methods: 10-week-old male BALB/c mice were divided into 4 groups; control(CO), control-treated(CT), disease(DO), disease treated(DT). Anti-GBM nephritis was induced by anti-GBM IgG. Aliskiren were infused

subcutaneously. Each group was sacrificed on day 7. The indicators of fibrosis and Up/Ucr were assessed. Total mouse IgG and specific MAR IgG levels in serum and urine were measured. TGF- 1, FcRn, and PRR expressions in renal cortex were assessed by western blot.

Results: The ECM protein and FN increased significantly in DO compared to DT. TGF- 1 expression on renal cortex decreased significantly in DT compared to DO. Mouse IgG depositions in glomerular basement membrane decreased but circulating mouse IgG levels increased in DT compared to DO. Specific MAR IgG level increased in serum but decreased in urine in DT compared to DO. FcRn and PRR were expressed much higher in DO than in DT.

Conclusions: Aliskiren is able to inhibit the progression of glomerular injury through the maintenance of IgG metabolism by FcRn in immune mediated glomerular disease.

Key words: Immune mediated glomerular disease, Aliskiren, Ang II, FcRn, PRR.

Student number: 2006-30525

creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

2014년 2월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체의학 전공

강 주 형

의학박사 학위논문

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

2014년 2월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체의학 전공

강 주 형

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

지도교수 하 일 수

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2013년 10월

서울대학교 대학원

의학과 분자유전체의학 전공

강 주 형

강주형의 의학박사 학위논문을 인준함

2013년 12월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위　　원 _____ (인)

위　　원 _____ (인)

위　　원 _____ (인)

초록

면역성 콩팥 사구체 질환 동물 모델에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과

강 주 형

의학과 분자 유전체 의학 전공

서울대학교 대학원

서론: RAS와 Ang II의 활성화는 사구체 콩팥 손상을 유도하는 주된 요인이다. ACEI 또는 ARB의 부작용을 피하고 Ang II 비의존성 경로를 차단하기 위해 레닌 활성화 억제제인 알리스키렌이 등장하게 되었다. 면역성 콩팥 사구체 질환은 IgG에 의한 면역 반응으로 일어나는 사구체 질환이다. 족세포와 근위세뇨관에서 FcRn에 의한 IgG의 이동은 V-ATPase에 의한 낮은 pH 환경을 필요로 하며 레닌 수용체는 V-ATPase의 기능을 도와 pH 환경을 조절한다. 본 연구는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정과 질병의 진행에 미치는 효과에 대하여 알아보았다.

방법: 제태 연령 10주 male BALB/c mice를 정상군, 정상치료군, 질병군, 질병치료군으로 나누고 질병군에 rat의 사구체로 면역한

토끼의 혈청으로부터 추출된 항사구체 기저막 항체 0.2 mg/g을 꼬리정맥을 통해 투여하고 치료군에는 20 mg/kg의 알리스키렌을 피하로 투여하였다. 질병 유발 7일째 사구체에서 세포 외 기질 단백질 합성 정도, 소변의 단백크레아티닌 비, 혈액과 소변의 mouse IgG와 특이 MAR IgG 농도, 콩팥 피질에서 TGF-β1, FcRn, 레닌 수용체의 발현 차이를 평가하였다.

결과: 알리스키렌으로 치료받은 질병군에서 세포 외 기질 단백질 합성, 소변 단백크레아티닌 비, 콩팥 피질의 TGF-β1 발현 양상 모두 감소하였다. 총 mouse IgG의 사구체 침착은 치료받은 질병군에서 의미 있게 감소하였다. 총 mouse 항체와 특이 MAR IgG의 혈액 농도는 치료받은 질병군에서 치료받지 않은 질병군에 비해 증가하였고 특이 MAR IgG의 소변 농도는 치료받은 질병군에서 감소하였다. 콩팥 피질의 FcRn과 레닌수용체 발현은 치료받은 질병군에서 치료받지 않은 질병군에 비해 억제되었다.

결론: 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌은 FcRn을 통한 IgG의 대사 과정의 조절과 레닌수용체의 과다발현을 억제함으로써 질병의 진행을 차단한다.

주요어: 면역성 콩팥 사구체 질환, Ang II, 알리스키렌, FcRn, 레닌 수용체

학번: 2006-30525

목차

한글 초록 · i
목차 · iii
그림 · v
약어 목록 · vii
서론 · 1
연구재료와 방법 · 9
1. 콩팥 사구체 기저막 항원 추출 (Production of glomerular antigen)
2. 항사구체 기저막 항체 추출 (Production of anti-GBM antibody)
3. 항사구체 기저막 콩팥염 유발 (Induction of anti-GBM nephritis)
4. 알리스키렌 투여 (Administration of aliskiren)
5. 콩팥사구체의 손상 평가 (The assessment of glomerular injury)
6. 소변 단백크레아티닌 비 평가 (The assessment of urine protein/creatinine)
7. 혈액과 소변의 Mouse IgG 측정 (The measurement of total mouse IgG and specific anti-rabbit IgG in serum and urine)
8. 콩팥 조직의 TGF-β1, FcRn and ATP6AP2 발현도 평가 (The assessment of the expression of TGF-β1, FcRn and ATP6AP2 in renal tissue by Western blot)
9. 통계 분석 (Statistical analyses)

결과 · 15
고찰 · 34
참고문헌 · 44
영문초록 · 54

그림

그림 1. 광학현미경 PAS 염색상 알리스키렌이 사구체의 세포외 기질 단백질 합성에 미치는 항섬유화 효과 · · · · · · · · · · 17

그림 2. 면역조직화학 형광염색상 알리스키렌이 사구체의 FN 합성에 미치는 항섬유화 효과 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 18

그림 3. 알리스키렌이 단백뇨 (Up/Ucr) 발생에 미치는 효과 · 20

그림 4. 알리스키렌이 콩팥 피질의 TGF-β1 발현에 미치는 항섬유화 효과 · 21

그림 5. 면역조직화학 형광염색상 질병 유발 1 일째 이종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과 · 24

그림 6. 면역조직화학 형광염색상 질병 유발 7 일째 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과 · 25

그림 7. 면역조직화학 형광염색상 질병 유발 7 일째 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 각 집단 개체 별 효과 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 26

그림 8. 알리스키렌이 혈액의 동종 항체와 특이 MAR IgG 농도에 미치는 효과 · 28

그림 9. 알리스키렌이 소변의 특이 MAR IgG 농도에 미치는 효과 · 29

그림 10. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 FcRn 발현에 미치는 효과 · 31

그림 11. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 레닌수용체 (ATP6AP2) 발현에 미치는 효과 · 33

약어 목록(List of Abbreviations)

RAS renin angiotensin system

Ang II angiotensin II

ACE angiotensin converting enzyme

ACEI angiotensin converting enzyme inhibitor

ARB angiotensin II receptor blocker

FN fibronectin

MAPK Erk 1/2 mitogen activated protein kinase extracellular signal regulated kinase 1/2

MAR IgG mouse anti-rabbit IgG

C3a complement 3a

C5a complement 5a

FcRn neonatal Fc receptor

PRR prorenin receptor

β_2m beta-$_2$ microglobulin

V-ATPase vacuolar-type H^+-ATPase

서론

사구체 콩팥염은 만성 콩팥부전을 일으키는 주된 원인질환이다. 사구체 콩팥염에서 활성화된다고 알려진 레닌안지오텐신 체계 (renin angiotensin system, RAS)가 질병의 만성경과를 유도하며 이 과정에서 생성되는 안지오텐신 II (Ang II)가 콩팥 손상의 주된 인자로 되어 있다[1]. 전형적인 RAS 활성화는 콩팥에서 분비된 레닌이 간에서 생성된 안지오텐시노겐의 분할 (cleavage)을 유도함으로써 시작된다. 이 과정에서 생성된 Ang I은 폐에 존재하는 안지오텐신 변환 효소 (angiotensin converting enzyme, ACE)에 의해 Ang II로 변환되는데 Ang II는 전신 혈관의 수축을 야기하여 고혈압을 일으키는 한편 콩팥에서는 단백뇨와 세포외기질 (extracellular matrix) 단백질 생성 및 사구체 여과장벽 구조들의 변성을 일으켜서 만성 콩팥 손상을 유도한다[1].

안지오텐신 변환 효소 억제제 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) 와 Ang II 수용체 차단제 (angiotensin II receptor blocker, ARB)가 Ang II의 생성과 작용을 차단함으로써 단백뇨를 호전시키고 염증세포들의 침윤을 감소시켜 콩팥 손상을 최소화할 수 있다는 사실은 이미 많은 임상연구와 기초연구들에서 증명되었다[2,3]. 그러나 기침, 혈관 부종, 고칼륨혈증, 신기능 감소 등의 부작용들과 ACE에 의존하지 않는 Ang II 생성 경로와 Ang II의 기능을 가지는 다른 안지오텐신 유도체들이 존재한다는 사실이 알려지면서 Ang II의 생성과 작용을 차단하는 효과만으로는 콩팥의 손상을 근본적으로 막을 수 없다는 결론에 이르게 되었다[4-7].

최근에는 레닌 수용체의 직접 활성화로 생성되는 세포 내 섬유화 단백질이 조직의 손상을 유발한다는 사실이 알려졌다[8,9]. 이 과정은 Ang II의 활성화와는 무관하기 때문에 Ang II 비의존성 과정이라고 일컬어진다. 레닌 또는 프로레닌에 의한 레닌 수용체의 활성화는 세포 내 MAPK Erk 1/2의 신호 전달 체계를 활성화시켜 TGF-β1의 생성을 증가시킨다. TGF-β1은 섬유화 단백질 생성을 증가시키는 대표적인 섬유화 매개체로서 fibronectin (FN), plasminogen activator-1 등 섬유화 단백질들을 합성해 낸다. 이러한 Ang II 비의존성 과정 때문에 ACEI 또는 ARB만으로는 질병의 진행을 차단하기에 한계가 따를 수 있다는 인식이 더욱 분명해졌다. 그래서 안지오텐신 유도체들의 활성화로 이어지기 전 RAS 활성화의 첫 단계인 레닌의 활성화를 차단할 필요가 있다는 인식에 따라 레닌 억제제의 개발이 이루어졌다[10].

레닌 억제제는 처음 개발 당시 약한 효능과 짧은 반감기, 비경구용, 그리고 높은 비용이라는 단점들 때문에 상용화되지 못하였다. 최근 개발된 알리스키렌은 이러한 점들을 보완하여 제조된 직접 레닌 억제제로서 수분과 체액에 높은 용해성을 가지고 있어서 경구용으로 사용 가능하며 반감기가 길어서 하루 1회 복용이 가능하다는 장점을 가지고 있다[11]. 분자량은 609.8 g/mol이며 사람의 레닌에 대한 반응 특이도 IC_{50}은 0.6 nM로서 marmoset 2 nM, mouse 6 nM, rabbit 11 nM, rat 80 nM 등 다른 동물들과 비교해 볼 때 매우 높은 것으로 되어 있다[11]. 알리스키렌은 안지오텐시노겐이 레닌과 결합하는 자리에 결합하기

때문에 안지오텐시노겐의 접근을 막아 Ang I으로의 변환을 차단한다. 그래서 이후에 일어나는 Ang I을 비롯한 그 밖의 유도체들이 만들어지는 것을 막는다. RAS 활성화 과정의 산물로 생성되는 안지오텐신 유도체와 다른 대사물의 생성 정도를 조사한 결과에서, 레닌 억제제는 ACEI 또는 ARB와 비교할 때 효능은 유사하였지만 음성 되먹이기 기전에 의한 안지오텐신 유도체들의 증가 현상은 관찰되지 않았다[12]. 현재까지 알리스키렌에 대한 임상적, 조직학적, 분자유전학적인 차원의 연구는 이미 많이 진행되어 왔으며 그 효능이 입증되고 있다[13-16].

실험적 항사구체 기저막 콩팥염은 면역성 기전에 의해 야기되는 자가 면역성 콩팥 사구체 질환 (immune mediated glomerular disease)으로서 주입된 이종 항체에 대한 동종 항체의 면역 반응 유도 과정을 통해 발생한다[17]. 대상 동물에게 주입된 이종 항체는 수분 내에 사구체 혈관 내피세포의 fenestrae를 통과하여 사구체 기저막에 가서 달라붙는다. 그러면 사구체 기저막 구성 성분인 laminin의 재배열, 족세포의 족돌기 융합, 사구체 기저막의 음전하 소실 등 기저막 투과성이 증가되어 단백뇨가 발생하고 점차적으로 콩팥기능이 나빠진다. 이 과정은 항사구체 기저막 콩팥염의 초기 반응 단계로 실험적 항사구체 기저막 콩팥염의 이종 항체 면역 반응 단계 (heterologous phase in experimental anti-GBM nephritis)로 분류된다.

이종 항체가 주입 된 후 5-7일째가 되면, 주입된 이종 항체에 의해 생성된 동종 항체가 사구체 기저막에서 이종 항체와 결합하는

동종 항체 면역 반응 단계 (autologous phase)로 접어든다. 이 시기에는 이종 항체에 결합하는 동종 항체와 보체의 면역 복합체에 의한 손상이 진행되며, 생성되는 C3a와 C5a가 다양한 염증 세포들의 주화성 인자 (chemotactic factors)로 작용하여 이차적인 염증 반응을 유도한다. T-cell 은 동종 항체의 항원성 자극이 더 이상 없더라도 사구체 여과 장벽의 손상을 지속시키는 요인으로 작용하고[18], 메산지움 세포, 족세포와 각종 염증 세포들은 세포막에 존재하는 Fcγ 수용체를 통해 IgG와 결합 후 염증반응을 일으켜 사구체 여과 장벽의 손상을 더욱 가중시킨다[19]. 그래서 동종 항체 면역 반응 단계에서 발생하는 손상은 이종 항체 면역 반응 단계에 비해 사구체 여과 장벽의 손상 정도가 더욱 심하고 광범위한 것으로 여겨진다.

사구체 여과 장벽은 혈관 내피세포의 fenestrae, 사구체 기저막, 족세포의 족돌기와 slit diaphragm 세가지 요소로 구성되어 있다[20]. 각 요소들은 크기 또는 전하 선택성 여과 기전을 가지고 있어서 혈액 내의 각종 세포 또는 크기가 큰 단백질들이 소변으로 빠져나가지 않도록 상호 보완하는 역할을 한다. 혈관 내피세포의 fenestrae는 성긴 여과 간격 (coarse filter)을 가지는데, 크기가 70-100 ㎚ 정도로 크기가 비교적 큰 혈액 성분들의 통과를 차단한다. 사구체 기저막은 크기 선택성에 따른 투과성 효과와 동시에 기저막을 구성하는 성분들의 음전하 성질에 따라 전하 선택성에 의존하여 투과성을 결정하기 때문에 여과 기능을 보다 더 미세하게 조절할 수 있다고 되어 있다[21]. 족세포의 족돌기와 slit

diaphragm은 사구체 여과 장벽의 마지막 단계로서 미세 여과 간격(fine filter)을 가지며, 약 70 kDa 이하의 작은 분자량의 단백질만 통과시킨다[22]. 분자량이 약 150 kDa인 IgG는 사구체 기저막을 통과하지만 slit diaphragm의 크기에 따른 선택적 투과성 제한 때문에 여과되지 못하고 사구체 여과 장벽에 남게 된다. 그러나 생리적 환경에서 IgG는 사구체 여과 장벽에 축적되지 않는다. 그 이유는 IgG 또는 IgG-complex가 생리적 환경에서 사구체 여과 장벽의 slit diaphragm으로부터 제거되는 여과 기전이 존재하기 때문이다. Haymann 등[23]은 족세포와 근위세뇨관의 brush border에 IgG의 여과와 이동에 관여하는 neonatal Fc receptor (FcRn)이 존재한다는 사실을 규명하였다. Kobayashi 등[24]은 사구체에서 여과된 IgG가 근위세뇨관 세포의 brush border에 존재하는 FcRn에 의해 IgG trafficking이 일어나며 세포를 통과하여 basolateral membrane으로 이동하는 현상을 보고하였다. Akilesh 등[25]은 IgG가 족세포의 slit diaphragm으로부터 소변 강 (urinary space) 내로 이동하는 과정에 FcRn이 관여한다는 사실을 규명하였고, FcRn이 결핍된 mouse의 사구체 여과 장벽에 IgG가 지속적으로 침착되는 현상을 가지고 면역성 콩팥 사구체 질환이 발생하는 이유는 FcRn이 IgG를 여과할 수 있는 한계를 넘어서기 때문이라고 주장하였다.

FcRn의 분자유전학적 구조가 규명되기 이전 모체의 IgG가 대사되지 않고 신생아 또는 영아의 혈액으로 이동되는 현상은 이를 전달하는 매개체가 장 (intestine) 상피에 존재하기 때문이라는 가능성이 Brambell 등[26]에 의해 제시되었다. 이후 Simister

등[28]에 의해 FcRn은 생후 11일 된 rat의 장 상피세포에 존재하는 Fc receptor로서 MHC class I과 유사한 구조를 가지며 약 50 kDa의 heavy chain으로 구성된 heterodimer임이 밝혀졌고 12 kDa의 beta-2 microglobulin (β_2m)과 결합된 형태로 존재한다는 사실이 알려졌다. FcRn은 콩팥을 비롯하여 폐, 간, 눈, 피부, 태반, 뇌, 장과 혈액 세포들 등에 분포하고 있으며, 각각의 부위에서 IgG의 이동에 관여한다[29-31].

FcRn과 IgG의 결합과 이동은 낮은 pH 환경에서 일어난다[27,32]. FcRn은 주로 세포의 endosome 내부에 위치하고 있으며 endosome 내부는 항상 낮은 pH로 유지된다. 낮은 pH 환경의 endosome에서 형성되는 FcRn-IgG 복합체는 라이소좀에 의해 분해가 되지 않은 채 세포막으로 이동 하며, 세포외 높은 pH 환경을 만나면 IgG는 FcRn과 분리되어 혈액으로 유입된다. 이 과정은 다른 항체들에 비해 IgG가 혈중에서 긴 반감기를 유지할 수 있는 이유가 된다[33]. 그리고 세포 내 낮은 pH 환경은 세포내 다양한 소기관들의 정상적인 단백질 대사 기능 유지를 위한 필수적인 요소로 되어 있다. 세포막 수용체를 매개로 이루어지는 함입 (receptor mediated endocytosis)과 함입된 단백질들의 이동, 수용체 복구 (receptor recycling), 세포내 소기관들 사이의 막융합, 그리고 lysosomal/autophagosomal 단백 분해 등의 대사 과정은 낮은 pH 환경 하에서 가능하다. 낮은 pH가 유지되지 않으면 세포내 대사는 불완전하게 일어나서 대사 산물들이 축적되며 세포의 항상성 (cellular homeostasis)이 깨져서 세포 사멸 (apoptosis)로 이어진다.

세포 내 낮은 pH 환경은 vacuolar-type H^+-ATPase(V-ATPase)의 proton (H^+) pump 작용에 의해 유지되는 것으로 되어 있다[34]. V-ATPase는 분자량이 큰 다단위 복합체로서 세포내 peripheral domain V1과 세포막에 있는 integral domain V0로 구성되어 있으며, V1은 ATP hydrolysis, V0는 H^+의 이동을 담당한다. V-ATPase는 endosome, lysosome, Golgi-derived vesicles, secretory veiscles 등과 같은 세포내 소기관들의 막 (membrane)에서 뿐만 아니라 콩팥세뇨관, 족세포, 골파괴 세포, 대식세포 등 다양한 세포의 세포막에도 존재한다고 알려져 있다[35].

V-ATPase는 Ang II 농도 변화에 따라 그 활성도에 차이를 보인다. 즉, Ang II 농도가 상승하면 V-ATPase 활성도는 차단되며, Ang II 농도가 정상으로 유지되면 V-ATPase 활성도는 증가한다[36].

레닌 수용체 (prorenin receptor, PRR)는 V-ATPase를 구성하는 한 요소이며, 유전자 구조가 V-ATPase의 한 부속 단백질로 규명된 ATP6ap2와 동일하다는 사실이 알려지면서 레닌 수용체에 의한 세포의 생존과 기능 유지는 V-ATPase 활성화와 매우 깊은 연관성이 있는 것으로 여겨진다[37].

실험적 항사구체 기저막 콩팥염에서 RAS 활성화로 생기는 Ang II의 변화 양상과 임상 지표들의 변화에 대해서는 많은 연구가 있어 왔다. Yayama 등[38]은 실험적 항사구체 기저막 콩팥염 유발 후 12시간째에 혈중 레닌과 안지오텐신의 농도가 최고치에 이르렀고 소변 단백량이 증가되었으며, 저알부민혈증, 고콜레스테롤혈증과 고질소혈증이 관찰되었다고 하였다. ARB를 질병 유발 2시간 전부터

투여했을 때 임상 지표들은 호전되는 반면, 질병 발생 이후에 투여한 경우에는 효과가 없었다고 보고하였다. Timmermans 등[39]은 항사구체 기저막 콩팥염의 질병 경과에 Ang II 수용체의 활성화가 관련되어 있음을 보여주었다. 다른 연구에서 Ang II 수용체를 경유하는 TGF-β1의 발현증가가 질병의 손상 과정에 관여한다는 사실을 제시하였다[40]. 이와 같은 사실들은 레닌 활성화 억제제인 알리스키렌이 면역성 콩팥 사구체 질환에서 이상적인 질병차단제 역할을 할 수 있음을 시사한다.

면역성 콩팥 사구체 질환의 사구체 여과 장벽에서 일어나는 변화는 매우 복잡하고 다양하며 임상적으로 질병이 급속도로 진행되거나 만성 경과로 이어질 수 있기 때문에 환자들에게 미치는 영향은 매우 크다고 할 수 있다. 그러므로 최대한 질병의 경과를 차단하고자 하는 노력은 끊임없이 이루어져야 한다. 면역성 콩팥 사구체 질환에 미치는 다양한 약제들과 그 효과에 대한 연구 결과들은 많지만, 발병 기전과 관련된 IgG 대사와 질병의 진행과정에 미치는 알리스키렌의 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 그래서 본 연구에서는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 IgG 대사 과정에 미치는 효과와 질병의 진행에 대한 차단 효과가 어떠한 지를 알아보고자 하였다.

연구재료와 방법

1. 콩팥 사구체 기저막 항원 추출 (Production of glomerular antigen)

12마리의 male Sprague-Dawley rats에서 추출된 콩팥을 잘게 부순 후 (chopping) 체공이 200, 150, 125, 그리고 75 ㎛인 여과체 (sieve)를 차례로 통과시킨 다음, 75 ㎛ 체공에 걸린 사구체를 5분간 1500 rpm으로 원심분리 후 상청액을 버리고 가라앉은 사구체를 멸균된 생리 식염수에 넣은 뒤 −70℃에서 냉동 보관하였다. 얻어진 사구체를 초음파로 분쇄 (ultrasonic disruption)시키고 멸균된 생리 식염수와 ddH_2O가 섞여 있는 용액으로 수세 (washing) 후 4℃ 환경에서 8200 rpm으로 10분간 원심분리를 5회 시행하고 이후 다시 멸균된 ddH_2O로 수세 후 동일한 조건으로 원심분리를 5회 시행한 후 15 ㎖ cornical tube에 옮겨서 보관하였다. 냉동 건조기에서 밤새 건조시킨 후 분말의 콩팥 사구체 기저막 단백질 항원을 얻었다.

2. 항사구체 기저막 항체 추출 (Production of anti-GBM antibody)

콩팥 사구체 기저막 단백질 항원을 토끼 (New Zealand White rabbits)의 피하로 투여하여 면역하고 충분한 항사구체 기저막 항체가 생성되었다고 판단될 때까지 항체 역가를 평가해 가며 2주 간격으로 항원을 투여하였다. 충분한 항체가 생성되었다고 판단되는 시점에서 토끼로부터 혈액을 추출 한 뒤 DEAE anion-exchange chromatography (Elution 75 mM NaCl) 방법으로 항사구체 기저막 항체를 얻었다.

3. 항사구체 기저막 콩팥염 질병유발 (Induction of anti-GBM nephritis)

제태 주령 10주 male BALB/c mice을 마취시킨 후 질병군은 항사구체 기저막 항체를 체중 g당 0.2 mg을 꼬리 정맥을 통해 주사하였고 정상군에는 동일한 양의 멸균된 생리 식염수를 주사하였다.

4. 알리스키렌 투여 (Administration of aliskiren)

알리스키렌 약물은 하루 체중 kg당 20 mg을 osmotic minipumps (Model 2002 Alzet mini-osmotic pumps, Durect Corp.)에 주입한 후 생리 식염수에 담가 37℃ 환경에 보관하였다가 priming에 필요한 6시간이 지나서 mice 피하로 투여하였다. 이후에 바로 항사구체 기저막 항체를 꼬리 정맥으로 주입하였다.

5. 콩팥사구체의 손상 평가 (The assessment of glomerular injury)

1) 광학 현미경 검사 (Light microscopy); 콩팥 조직을 적출 후 포르말린에 바로 고정한 뒤 4 μm로 박절하고 PAS로 염색한 후 광학 현미경을 통해 사구체의 병변을 평가하였다. 평가 방법은 BALB/c mouse 개체당 30개의 사구체를 가지고 이전 문헌을 참고하여 그 기준에 따라 점수화하여 평가하였다[41]. 광학 현미경 소견의 주관적 편견을 배제하고자 두 명의 소아신장 전문의가 이중 맹검법 (double blind method)으로 사구체 병변을 관찰하여 점수화한 후 평균한 값으로 차이를 분석하였다.

2) 면역 형광 검사 (Immunohistology); 동결 절편기 (frozen microtome)로 조직을 4 μm로 박절하여 슬라이드에 부착시키고

실온에서 30분간 건조한 후 −20℃ 아세톤으로 20분간 고정하고 실온에서 약 20초간 건조시킨다. pH 7.0의 phosphate buffer (Dako, code S3024)에 각 10분씩 4차례 슬라이드를 수세 후 FITC-conjugated rabbit anti-fibronectin IgG (Bioss, bs-0666R-FITC), FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Abfrontier, LF-SA5015) 또는 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2012)를 4℃ wet chamber에서 약 1시간 30분 동안 반응시킨다. 이후 슬라이드를 pH 7.0의 phosphate buffer (Dako, code S3024)에 각 10분씩 4차례 수세한 후 aqueous mounter (scyteck, AMT060)로 봉입(mount)한 후 암실에서 면역 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

6. 소변 단백크레아티닌 비 평가 (The assessment of urine protein/creatinine, Up/Ucr)

소변으로 배출되는 단백질 정량 방법으로 질병 유발 7일째 단백크레아티닌 비를 측정하였다. 소변은 mice의 방광에 1 cc syringe를 찔러 채취한 후 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용해 측정하였고 소변의 크레아티닌은 5배 희석하여 Advia 2404 (Siemens)를 이용한 측정값으로 단백크레아티닌 비를 산출하였다.

7. Mouse IgG 측정 (The measurement of total mouse IgG and specific anti-rabbit IgG)

1) 혈액의 총 mouse IgG 측정 (The measurement of the circulating

mouse IgG in serum by ELISA kit, E99-131, Bethly Laboratories)

100 ㎕의 표본과 추출 시료를 중복하여 각 well에 분주한 후 plate를 덮고 20-25℃ 환경에서 1시간 동안 incubation한 후 4회에 걸쳐 plate를 수세하였다. 각 well에 2차 항체를 100 ㎕ 첨가 후 plate를 덮고 실온에서 1시간 동안 incubation한 후 다시 4회 수세하였다. 이후 각 well에 HRP solution 100 ㎕를 첨가 후 plate를 덮고 30분간 incubation하였고 4회 수세 후 TMB solution 100 ㎕를 각 well에 분주 후 암실에서 30분 동안 plate에서 일어나는 발색 반응을 관찰하였다. 각 well에 100 ㎕의 반응 차단 용액을 첨가 후 xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 평가하였다.

2) 혈액과 소변에서 특이 anti-rabbit IgG 측정 (The measurement of mouse anti-rabbit IgG in serum and urine by ELISA)

96 well plate에 rabbit IgG (BGM)를 50 mM Bicarbonate/Carbonate buffer로 10 ㎍/㎖ 농도가 되도록 희석 후 각 well당 100 ㎕씩 분주하여 4℃에서 밤새 incubation하였다. Plate를 4회 PBST로 수세하여 2% skim milk를 각 well에 200 ㎕씩 분주하여 37℃에서 2시간 차단 (blocking)한 후 다시 수세하였다. 표본 (mouse anti-rabbit IgG, BD, 550326)과 추출 시료를 각 well에 200 ㎕씩 중복 (duplication)하여 분주하고 plate에 뚜껑을 덮어 37℃에서 2시간 동안 incubation하였다. 이때 표본 시료는 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 0 ng/ml로 순차적으로

희석하였고, 추출 시료로서 혈액은 1000배, 소변은 200배로 희석하였다. Plate 수세 후 2차 항체인 goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005)를 blocking buffer (2% skin milk)로 1:2000 희석하여 각 well당 100 ㎕씩 첨가한 후 plate를 덮고 37℃에서 2시간 동안 incubation하고 plate를 수세하였다. 각 well에 TMB 용액을 100 ㎕씩 분주한 후 암실에서 15-30분 동안 발색 시킨 후 반응 차단 용액 (2 N H_2SO_4)을 100 ㎕씩 넣고 xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 평가하였다

8. 콩팥 조직에서 western blot을 이용한 TGF-β1, FcRn과 ATP6AP2 발현도 평가 (The assessment of the expression of TGF-β1, FcRn and ATP6AP2 in renal tissue by western blot)

600 ㎕의 lysis buffer에 적출한 콩팥 조직을 넣고 얼음에서 분쇄 (homogenization)시켜 -20℃에서 20-30분간 냉동 보관한 후 5분 동안 4℃에서 13000 rpm으로 원심분리를 시행하였다. 새 1.5 ㎖ tube에 상층 액을 옮기고, 얻어진 단백질은 -20℃에서 냉동 보관하였다. Bradford assay로 단백질 농도를 측정한 후 단백질 40 ㎍ 과 5X sample buffer, DW를 섞어 5분 동안 끓는 물에 끓인 후 얼음에서 단백질 시료를 식혔다. 12% polyacrylamide gel의 각 well당 단백질 40 ㎍이 부하(loading)되도록 분주하고 100 V 에서 약 두 시간에 걸쳐 전기영동을 시행하였다. 이후 단백질들을 PVDF membrane에 두

시간에 걸쳐 100 V에서 옮기고, ponceau S solution으로 막에 단백질이 옮겨졌는지 확인하였다. 실온에서 PBST로 5분 동안 2회에 걸쳐 막을 수세한 후 PBST로 희석한 5% skim milk에 막을 담가 4℃에서 밤새 blocking incubation하였다. 이후 PBST로 10분씩 3회 실온에서 막을 수세하고 5% BSA, 0.1% sodium azide로 희석된 1차 항체인 TGF-β1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-31690), FcRn (Santa Cruz Biotechnology, sc-66893), ATP6AP2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-67390)와 대조를 위한 α-tubulin antibody로 4℃에서 2시간 동안 incubation하였다. 이후 막을 수세한 후 2차 항체인 HRP-conjuated antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020, sc-2004)와 함께 상온에서 1시간 동안 incubation 하였다. 막을 수세한 후 ECL solution으로 반응 시켜 ChemiDoc MP Imaging System (Bio rad)를 이용하여 이미지를 얻었다.

9. 통계 분석 (Statistical analyses)

각 집단들의 평균값을 구하여 가장 큰 값을 100분율로 환산하고, 이 값을 기준하여 다른 집단들의 평균 값을 100분율로 환산한 값(relative value)을 표시하였다. 집단들 간의 차이 분석은 SPSS 통계 패키지를 이용하였고, Mann-Whitney 검정을 이용하여 집단들 간의 차이를 평가하였으며, P값이 0.05 미만($P<0.05$)일 때 통계적으로 의미 있는 차이를 보인다고 정의하였다.

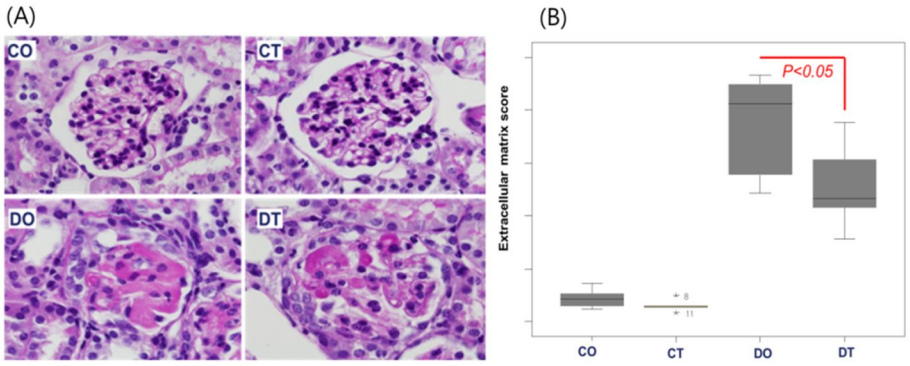
결과

알리스키렌은 면역성 콩팥 사구체 질환에서 레닌안지오텐신 활성화를 억제함으로써 질병의 진행을 차단한다.

항사구체 기저막 콩팥염에서 추출된 사구체를 가지고 PAS 염색후 알리스키렌이 콩팥 사구체에서 세포외기질 단백질의 합성에 미치는 영향에 대해 광학현미경 상에서 관찰을 한 결과 (그림 1A), 대조군과 질병군 사이에 세포외기질 단백질 침착 소견은 분명한 차이를 나타내었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 그런데 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에서 사구체 전반에 걸쳐 세포외기질 단백질의 침착 소견과 함께 반월양 세포 증식이 관찰된 반면, 치료를 받은 질병군 (DT)에서 사구체 일부에서만 세포외기질 단백질의 합성이 관찰되었다. 세포외기질 단백질 합성의 정도를 점수화하여 비교한 결과 (그림 1B), 알리스키렌 치료를 하지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 점수가 의미 있게 낮았다 (DO, 1.54 ± 0.45 vs DT, 1.38 ± 0.28, Mann-Whitney test, $P=0.037$). 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 사구체의 세포외기질 단백질 합성을 억제하는 작용이 있음을 시사하며 콩팥 기능을 보호하는 효과를 통해 질병의 진행을 억제할 수 있는 가능성을 제시한다.

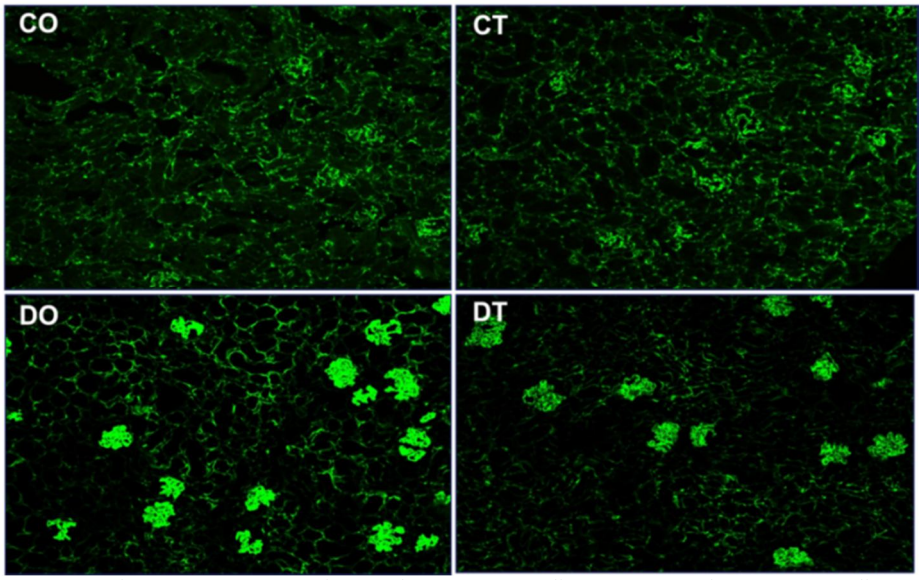
세포외기질 단백질 중 섬유화 정도의 지표로 자주 사용되는 FN 합성에 미치는 알리스키렌의 영향에 대해 면역조직화학 형광염색 상에서의 차이를 확인한 결과 (그림 2), 대조군과 질병군

사이에 FN 발현 정도에 분명한 차이를 나타내었다. 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 사구체의 FN 발현이 감소되어 있었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 대표적인 세포외기질 단백질인 FN 합성을 억제함으로써 콩팥 기능을 보호하는 효과를 나타낸다는 가능성을 제시한다.



CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 1. (A) 광학현미경 PAS 염색상 (original magnification: 400-fold) 알리스키렌이 사구체의 세포외기질 단백질 합성에 미치는 효과; 사구체의 세포외기질 단백질 합성이 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)보다 더 증가되어 있으며 게다가 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에서는 반월양 세포의 증식 소견도 함께 관찰되고 있다. 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. (B) 세포외기질 단백질 합성의 정도를 점수화한 결과 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 점수가 의미 있게 낮았다($P<0.05$).

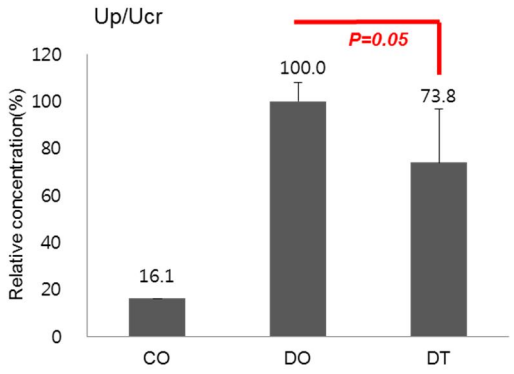


CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 2. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 (original magnification: 100-fold) 알리스키렌이 사구체의 세포외기질 단백질 중 FN 합성에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 콩팥 사구체의 FN 합성이 감소된 사실이 확인되었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

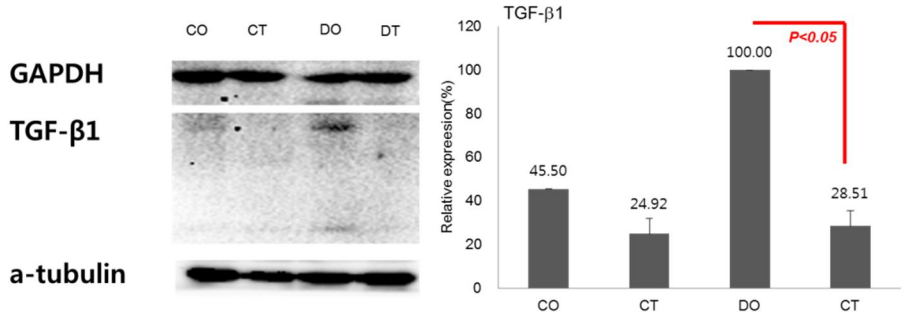
항사구체 기저막 콩팥염의 임상적 경과에 따른 알리스키렌의 치료 효과에 대해 단백뇨 (Up/Ucr) 발생에 미치는 효과에 대해 알아 본 결과 (그림 3), 단백뇨는 질병군에서 대조군에 비해 증가되었다. 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 단백뇨는 의미 있게 감소되었다 (*P=0.05*). 치료를 받은 대조군 (CT)은 방광천자를 통한 소변 채집 과정에서 방광에 소변이 차지 않거나 채집하는 과정에서 일어난 소변의 소실로 단백뇨를 측정할 수 없었다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 단백뇨를 감소시키는 기능이 있음을 보여주는 결과로서 단백뇨 감소 효과를 통해 질병을 차단할 수 있다는 가능성을 제시한다.

콩팥 피질에서 TGF-β1의 발현에 미치는 알리스키렌의 치료 효과에 대해 알아 본 결과 (그림 4), 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 콩팥 사구체의 TGF-β1의 발현은 현저하게 감소되어 있었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 이 결과는 알리스키렌이 면역성 콩팥 사구체 질환에서 TGF-β1의 발현을 억제함으로써 질병의 섬유화 진행을 차단하고 있음을 시사한다.



CO ; control group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 3. 알리스키렌이 단백뇨 (Up/Ucr)에 미치는 효과; 질병군 (DO, DT)에서 대조군 (CO)에 비해 의미 있는 상승이 관찰되었고 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 단백뇨가 의미 있게 감소되었다(*P=0.05*).



CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

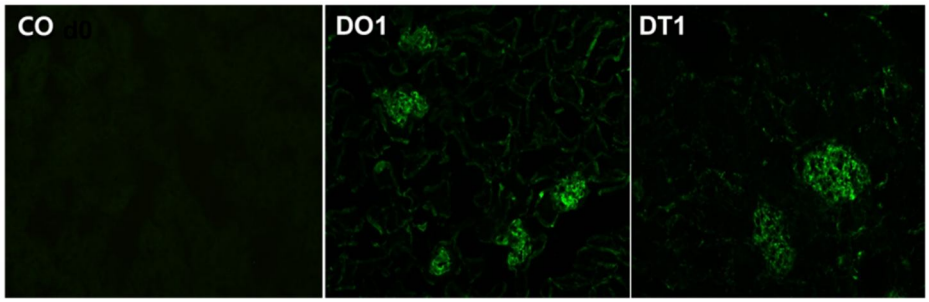
그림 4. 알리스키렌이 콩팥 피질의 TGF-β1의 발현에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 콩팥 사구체의 TGF-β1의 발현이 현저하게 감소되었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌은 사구체 여과 장벽의 IgG 대사 과정에 관여함으로써 질병의 진행을 차단한다.

항사구체 기저막 콩팥염의 질병 기전에 근거하여 질병 유발 1 일째인 이종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 여과 장벽의 항체 침착 과정에 미치는 효과를 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)으로 알아 본 결과 (그림 5), 치료를 받지 않은 질병군 (DO1)과 치료를 받은 질병군 (DT1) 모두에서 사구체 기저막을 따라 이종 항체가 균일하게 염색되었고 두 군간에 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염의 이종 항체 면역 반응 단계에서는 알리스키렌이 질병 경과에 영향을 미치지 못한다는 사실을 시사한다.

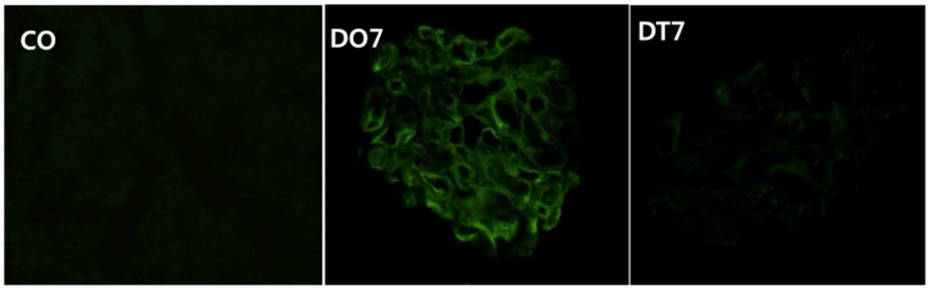
항사구체 기저막 콩팥염 유발 7 일째 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 여과장벽의 항체 침착 과정에 미치는 효과를 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)으로 알아 본 결과 (그림 6), 치료를 받지 않은 질병군(DO7)에서 동종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 뚜렷이 관찰되었지만 치료를 받은 질병군 (DT7)에서는 그 현상이 현저히 감소되어 있었다. 그리고 각 질병군의 개체에 따른 차이를 알아본 결과에서 (그림 7), 치료를 받은 질병군의 각 개체 (DT-1~DT4)에서 치료를 받지 않은 질병군 (D-1~D-4)보다 사구체 여과 장벽에 동종 항체의 염색 정도가 현저하게 낮아져 있었다. 이 결과는 항사구체 기저막 콩팥염의 사구체 여과장벽에서

알리스키렌이 동종 항체의 침착 또는 소멸 등의 대사 변화에 주된 요인으로 작용하고 있다는 것을 보여준다.



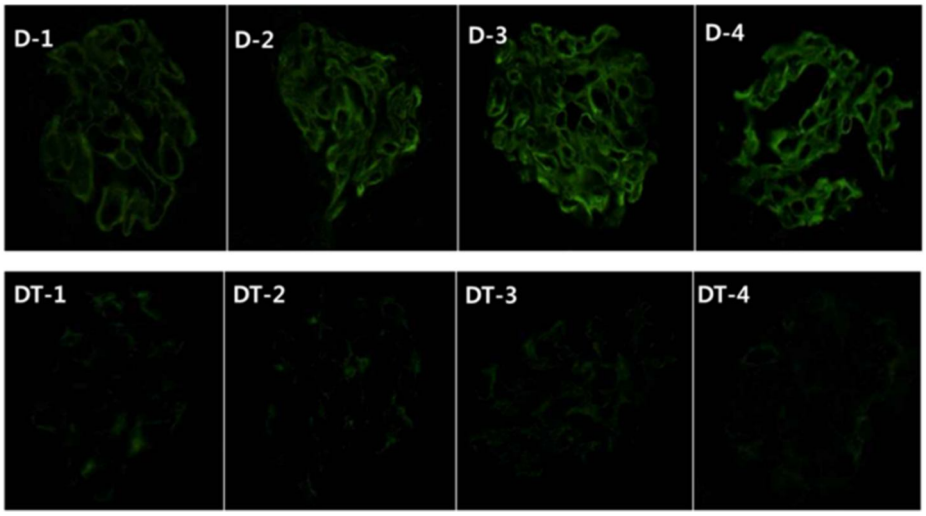
CO ; control group, DO1 ; disease untreated group at 1 day after disease induction, DT1 ; disease treated at 1 day after disease induction

그림 5. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 질병 유발 1일째인 이종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과; 알리스키렌을 치료 받지 않은 질병군 (DO1)과 치료 받은 집단군 (DT1) 모두에서 사구체 기저막을 따라 이종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 관찰되었고 두 집단간에 차이는 없었다.



CO ; control group, DO7 ; disease untreated group at 7 day after disease induction, DT ; disease treated group at 7 day after disease induction

그림 6. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 질병 유발 7일째인 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않은 질병군 (DO7)에서 사구체 기저막에 동종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 뚜렷이 관찰되었지만 치료를 받은 질병군 (DT7)에서는 그 현상이 현저히 감소되었다.

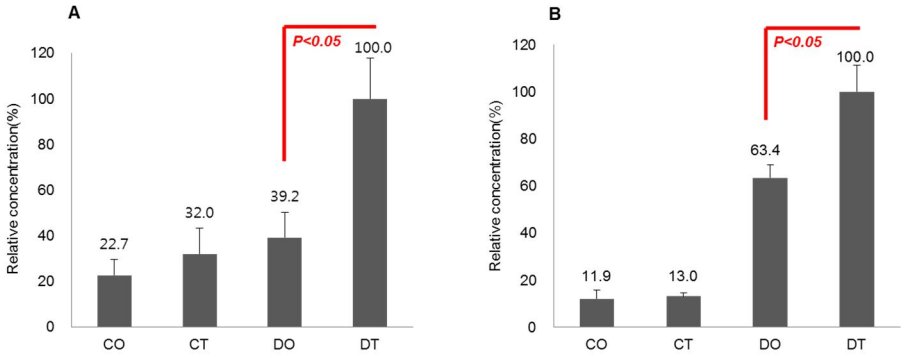


D-1~D-4 ; 4 mice of disease untreated group(one panel per mouse),

DT-1~DT-4; 4 mice of disease treated group(one panel per mouse)

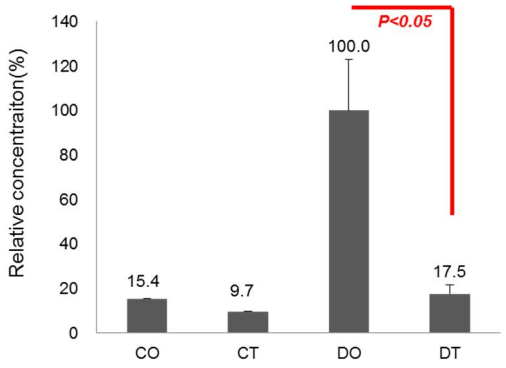
그림 7. 면역조직화학 형광염색 (immunohistochemistry stain)상 질병 유발 7일째인 동종 항체 면역 반응 단계에서 알리스키렌이 사구체 기저막의 항체 침착 과정에 미치는 질병군 개체별 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군의 각 개체 (D-1~D-4)에서는 사구체 기저막에 동종 항체가 균일하게 염색되는 현상이 뚜렷이 관찰되었지만 치료를 받은 질병군의 각 개체 (DT-1~DT4)에서는 그 현상이 현저히 감소되었다.

치료를 받은 질병군 (DT)과 치료를 받지 않은 질병군 (DO) 사이에 확인된 병리 조직 검사상 차이에 근거하여 혈액 내 생성된 동종 항체로서 총 mouse IgG를 확인하였다. 그 결과 (그림 8A), 치료를 받은 질병군 (DT)에서 총 mouse IgG의 역가가 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에 비해 의미 있게 상승되어 있었다 ($P<0.05$). 총 mouse IgG 중, 주입된 이종 항체에 특이적으로 반응하여 결합하는 특이 MAR IgG의 농도를 확인한 결과 (그림 8B), 치료를 받은 질병군 (DT)에서 의미 있게 높게 측정되었다 ($P<0.05$). 소변에서 특이 MAR IgG의 농도에 미치는 효과에 대해 알아 본 결과 (그림 9), 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 소변 내 농도가 의미 있게 감소되어 있었다 ($P<0.05$). 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다. 이 결과는 사구체 여과 장벽에서 여과된 특이 MAR IgG가 소변으로 배설되지 않고 콩팥 세뇨관을 통해 재흡수가 일어나는 기전이 존재하고 있다는 사실과 함께 항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌이 혈액과 소변을 통해 일어나는 IgG의 대사 조절에 관여한다는 증거를 제시한다.



CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 8. 알리스키렌이 혈액의 mouse IgG(A)와 특이 MAR IgG(B)의 농도에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 두 항체의 혈청 내 농도가 의미 있게 증가되어 있었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

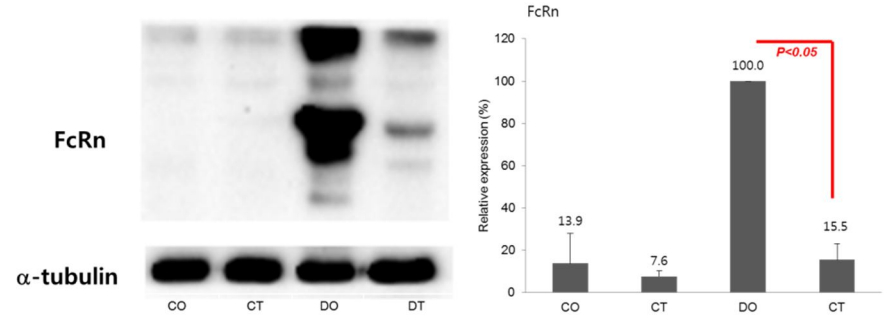


CO ; control group, CT ; control treated group, DO ; disease untreated group, DT ; disease treated group

그림 9. 알리스키렌이 소변의 특이 MAR IgG의 농도에 미치는 효과; 알리스키렌 치료를 받지 않았던 질병군 (DO)에 비해 치료를 받은 질병군 (DT)에서 항체의 소변 내 농도가 현저히 감소되었다. 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

항사구체 기저막 콩팥염의 사구체 여과 장벽에서 IgG의 대사과정은 FcRn에 의해 일어나며, 알리스키렌은 FcRn의 과다 발현 현상을 차단한다.

콩팥 사구체 여과 장벽에서 관찰되는 IgG의 대사는 족세포의 slit diaphragm의 여과 현상과 근위세뇨관 세포의 재흡수 과정이며 IgG의 이동은 FcRn에 의해 이루어지므로, 추출한 콩팥 피질을 이용하여 FcRn의 발현 현상과 그 차이를 western blot으로 확인하였다. 그 결과 (그림 10), 전반적으로 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 FcRn의 발현은 증가되어 있었고 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이가 없었다. 이는 사구체 여과 장벽에서 IgG의 대사가 FcRn에 의해 일어나고 있음을 보여주는 소견이다. 그리고 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 FcRn의 발현은 증가되어 있었다 ($P<0.05$). 즉, 알리스키렌에 의해 FcRn의 과다발현이 차단되고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 FcRn의 발현 과정에 알리스키렌이 관련되어 있음을 시사하며, 동시에 알리스키렌이 FcRn을 통한 IgG의 대사과정에 영향을 끼치고 있음을 보여준다.

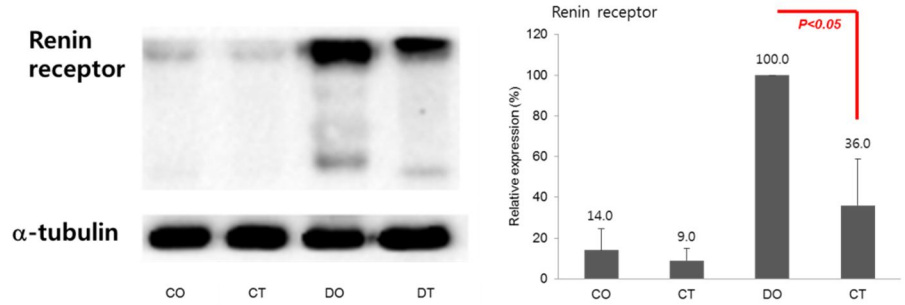


CO ; control group, CT ; control treated, DO ; disease untreated, DT ; disease treated

그림 10. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 FcRn의 발현에 미치는 효과; 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 FcRn의 발현은 증가되어 있었고 알리스키렌을 치료받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 FcRn의 발현은 의미 있게 증가되어 있었다. 농도계 분석 (densitometric analysis) 결과는 두 군 간에 의미 있는 차이를 보여주었다. 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

항사구체 기저막 콩팥염에서 알리스키렌은 사구체 여과 장벽의 레닌 수용체의 과다 발현 현상을 억제함으로써 질병의 경과를 차단한다.

알리스키렌에 의한 레닌 활성화 억제 기전과 관련하여 추출한 콩팥 피질을 이용하여 알리스키렌이 레닌 수용체의 발현에 미치는 영향을 알아보았다 (그림 11). 그 결과 전반적으로 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 레닌 수용체의 발현은 증가되어 있었고 대조군 간의 비교에서는 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이가 없었다. 그리고 치료를 받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 레닌 수용체가 과다하게 발현되고 있는 반면, 치료를 받은 질병군에서는 레닌 수용체의 과다 발현 현상이 억제되었다 ($P<0.05$). 이 결과는 레닌 수용체의 과다 발현이 질병의 진행을 유도하는 요인임을 보여주는 한편, 레닌 수용체의 과다 발현을 억제함으로써 질병의 진행을 차단한다는 알리스키렌 작용 기전을 설명해 준다.



CO ; control group, CT ; control treated, DO ; disease untreated, DT ; disease treated

그림 11. 콩팥 피질에서 알리스키렌이 레닌수용체 (ATP6AP2)의 발현에 미치는 효과; 질병군 (DO, DT)에서 정상군 (CO, CT)에 비해 레닌수용체의 발현은 증가되어 있었고 알리스키렌을 치료받지 않은 질병군 (DO)에서 치료를 받은 질병군 (DT)에 비해 레닌 수용체의 발현은 의미 있게 증가되어 있었다. 농도계 분석 (densitometric analysis) 결과는 두 군 사이에 의미 있는 차이를 보여주었다. 대조군 간의 비교에서 비치료군 (CO)과 치료군 (CT) 사이에 차이는 없었다.

고찰

본 연구 결과는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 레닌 억제제인 알리스키렌이 사구체 섬유화 과정을 차단하고 단백뇨를 호전시키는 효과는 물론, 사구체 여과 장벽에서 IgG의 대사 과정에 관여함으로써 질병의 진행을 억제하는 효과가 있다는 증거들을 제시한다.

항체 또는 항원-항체의 면역복합체가 유발 인자가 되어 발생하는 면역성 콩팥 사구체 질환에는 Goodpasture 증후군, 루프스 콩팥염, 막성사구체 콩팥염, 급성 감염후성 사구체 콩팥염 등이 있으며 이 질병들은 급속한 병의 진행 또는 비가역적인 만성 경과를 보일 수 있기 때문에 조기에 대처하지 못할 경우 환자의 생명에 치명적이거나 말기 콩팥 기능 장애로 진행될 수 있다. 면역성 사구체 콩팥 질환이 진행 경과를 보일 때 나타나는 사구체의 조직학적 변화 소견은 다양한 세포들의 증식과 세포외기질 단백질 합성의 증가, 그리고 콩팥의 위축을 일으키는 섬유화이다[42]. 사구체 기저막을 구성하는 세포외기질 단백질에는 type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan, FN, laminin, cyclooxygenase, lipoxygenase products (urokinase-type plasminogen activator, PAI-1, antioxidant enzymes, IL-1 and angiopoietin-1) 등이 있으며 이들 중 FN은 족세포와 메산지움 세포에서 분비되는 대표적인 세포외기질 단백질로서 콩팥의 섬유화 정도를 평가하는 주된 도구이다[43]. Ang II는 이러한 세포외기질 단백질의 합성을 증가시키는 기능뿐만 아니라[44] 다양한 염증 세포들을 직접 동원하거나 MCP-1 등의 염증 유발

매개체 (pro-inflammatory mediators)의 생성을 유도함으로써 콩팥 손상을 일으킨다[45-48].

단백뇨가 콩팥질환의 진행을 가속화시키는 위험 인자임은 잘 알려져 있다[44]. 단백뇨는 Ang II 상승에 의한 사구체 efferent arteriole의 수축 또는 TGF-β1의 상승에 의한 afferent arteriole의 자동조절 (auto-regulation) 혼란으로 사구체 혈관내압이 증가하기 때문에 발생한다고 되어 있다[49]. 이러한 혈액 역동학적 변화에 의한 기전과는 달리, Ang II가 음이온 전하를 띠는 proteoglycan의 합성을 차단하고 족세포의 slit diaphragm에 있는 nephrin transcription을 억제함으로써 유발되는 사구체 여과장벽의 구조적 손상 기전에 의해 단백뇨가 발생하기도 한다[50-51]. 그러므로 Ang II의 생성 또는 작용을 차단하는 것은 질병의 악화를 막는데 있어 매우 중요한 요인이다. 본 연구에서 관찰된 콩팥 사구체 세포외기질 단백질의 생성 감소, 단백뇨의 호전과 TGF-β1의 발현 감소는 알리스키렌 치료에 의한 RAS 활성화 차단 효과로 나타난 결과라고 할 수 있다.

알리스키렌이 세포외기질 단백질 합성 차단과 단백뇨의 감소에 미치는 효과에 대해서 알아 본 많은 연구들이 있었다. Kelly 등[15]은 당뇨병 쥐에서 전신성 혈압 변화와는 상관 없이 단백뇨와 사구체 경화증 및 사이 간질의 섬유화를 감소시켰다고 보고하였다. 루프스 콩팥염 질병 모델에서 혈압 조절과 상관없는 단백뇨 감소 효과가 나타났고[16], COL4A3-/- 질병 모델에서는 세포외기질 단백질의 합성, 단백뇨, 콩팥 조직의 TGF-β1 발현 모두

감소하였다고 하였다[52]. 사람의 족세포를 가지고 세포내 국소성 Ang II의 상승을 유도한 후 ACEI, ARB와 알리스키렌 세 가지 약물을 처치하여 RAS 활성화 억제 효과를 알아본 비교 연구는, 다른 두 가지 약물에 비해 알리스키렌이 그 효과가 더 우월하다고 하였다[53,54]. 이 연구 결과들은 알리스키렌의 RAS 활성화 억제 작용으로 질병의 진행이 차단될 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 알리스키렌과 ACEI 또는 ARB의 비교 연구를 병행하지 못한 점이 아쉬움으로 남지만, 알리스키렌 치료 효과는 최소한 ACEI 또는 ARB의 치료 효과에 필적할 만하다고 할 수 있으며 앞으로 비교 연구 또는 병행 치료의 효과를 연구하고자 함에 있어 유용한 정보가 될 것이다.

레닌 수용체에 의한 세포내 섬유화 단백질 합성 과정은 Ang II의 생성이나 작용을 차단하는 것만으로는 질병의 진행을 막을 수 없다는 한계점을 드러내었다. 게다가 음성 되먹이기 기전에 의해 재활성화되는 레닌과 프로레닌은 레닌 수용체 활성화를 더욱 부추겨 조직의 손상은 더 심해질 것이라는 우려를 지적하였다. 알리스키렌에 의한 레닌 수용체의 직접 차단 효과에 대해 알아본 많은 연구들도 동일한 결과들을 보여주었다[55,56].

그런데 레닌 수용체가 활성화 될 때 세포내에서만 아니라 세포 외에서의 RAS가 활성화된다는 연구 결과들은 기존의 RAS 활성화 차단 약물들이 여전히 질병의 진행을 차단하는데 유용할 수 있음을 시사한다. 레닌 활성화 과정은, 프로레닌의 prosegment가 단백 분해(proteolytic cleavage)에 의해 떨어져 나가면서 생성되는 레닌이

안지오텐시노겐을 기질로 하여 Ang I, II를 생성해 내는 과정이다. 이 과정은 전형적인 RAS 활성화 과정으로서 수분 부족, 저나트륨 혈증, 저혈압 등이 유발 인자가 되어 콩팥 사구체의 사구체옆세포에서 레닌이 활성화되면서 일어나는 반응 과정이다. 한편 레닌 수용체에 의한 세포외 RAS 활성화는 레닌 수용체에 결합하는 프로레닌 prosegment의 구조적 변형으로 말미암아 프로레닌이 레닌과 동일한 효소 기능을 획득함으로써 일어나는 Ang II의 생성 과정이다[57]. 이런 점에서 RAS 활성화 차단제들이 레닌 수용체에 의한 세포내 섬유화 단백질 합성 과정을 차단하기에는 한계가 있다 하더라도 세포외의 RAS 활성화를 차단한다는 점에서는 여전히 유용하다고 할 수 있다. 아직도 다양한 연구 결과들을 통해 ACEI 또는 ARB의 효과가 입증되고 있고 임상에서 가장 흔하게 투여되는 치료제 중 하나인 이유가 이러한 작용 기전 때문이라고 판단되며, 알리스키렌 또한 세포외 RAS 활성화 차단 효과로 조직 손상을 최소화할 수 있을 것으로 추정된다.

실험적 항사구체 기저막 콩팥염은 nephrotoxic serum nephritis라고도 명명되며 주로 mouse를 이용한 면역성 콩팥 사구체 질환의 대표적인 질병모델이다[58]. Rantala 등[59]은 항사구체 기저막 콩팥염의 SD rat 모델에서 사구체 기저막뿐만 아니라 족세포의 세포질에서 면역 복합체가 함입된 탐식체 (phagosomes)와 소포체 (endocytotic multivesicles)들을 확인함으로써 사구체 여과 장벽에서 일어나는 면역복합체의 함입과 이동의 대사 과정을 보고하였는데, 이러한 면역 복합체의 이동은 족세포에 존재하는 FcRn에 의해

일어난다는 사실이 Akilesh 등[25]에 의해 확인되었다. 항체가 발병 기전에 관련되어 있다는 사실을 근거로 본 실험에서 IgG의 대사양상을 알아본 결과 알리스키렌 치료가 이루어진 질병군에서 사구체에 침착되는 IgG의 양은 감소, 혈액의 IgG 농도는 증가, 소변의 IgG 배설은 감소하였음을 알 수 있었다. 이 결과들이 보여주는 임상적 의미는 첫 번째, IgG의 대사 과정에 알리스키렌의 작용이 관련되어 있다는 점이다. 즉, 사구체 기저막에 침착되는 IgG가 사구체 여과장벽으로부터 여과된 후 세뇨관에서 재흡수되는 과정에 알리스키렌이 영향을 미치고 있음을 보여준다. 두 번째는 면역성 콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 IgG의 정상적인 대사를 유도하기 때문에 사구체 여과 장벽에서 일어날 수 있는 각종 면역 반응과 염증 반응들을 차단할 수 있다는 점이다. 이는 만성 콩팥 손상으로의 진행을 지연시킬 수 있는 중요한 사안이 된다. 즉, 루프스 콩팥염과 막성신염증후군 등의 면역성 콩팥 사구체 질환에 알리스키렌 치료가 효과적일 수 있음을 반영하는 것으로, 이에 대해서는 대규모 임상 연구를 통해 입증되어야 할 것이다. 세 번째는 기존의 다른 연구들은 병리 소견과 분자 유전학적 측면에서 FcRn에 의한 IgG의 이동 현상만을 제시한 반면[23-25], 채취한 혈액과 소변의 실제 IgG 농도 변화 양상을 보여주고 있다는 점이며 이것은 본 연구가 가지는 독특한 점이라고 할 수 있다.

FcRn의 발현과 정상적인 기능에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구는 많이 진행되어 왔다. FcRn이 endosome에서 IgG와 결합하고 이동해 가는 과정에 이르기까지는 여러 가지 단백질들의 복합적인

기능이 관련되어 있다[60-66]. FcRn이 endoplasmic reticulum (ER)을 빠져 나오기 위한 FcRn의 folding 과정에는 β_2m의 결합이 꼭 필요하다. 만약 이 과정이 차단되면 disulfide bond oligomers 형태로 ER에 축적된다. 그리고 FcRn folding은 endosome을 경유하는 IgG의 이동 과정에 필수적인 요인으로 작용한다[60]. β_2m과 FcRn의 복합체 형성 전 단계에서 FcRn heavy chain 들의 연결 과정에는 calnexin과 ERp57이, FcRn-β_2m 복합체의 성숙 과정에는 calreticulin이 관여한다[61]. Rab 11은 IgG 이동뿐만 아니라 endosome과 세포막 융합 과정을 유도하는 것으로 알려져 있고 basolateral membrane recycling을 통한 exocytosis 과정에도 관여한다[62]. Clathrin은 rat intestine의 FcRn trafficking 과정에 기여한다[63]. FcRn의 cytoplasmic tail은 endocytosis와 exocytosis 뿐만 아니라 basolateral membrane targeting을 유도하며, FcRn의 N-glycan은 apical membrane targeting의 regulation에 관여하는 것으로 되어 있다[64]. FcRn의 발현을 증가시키는 인자로서는 TNF-α와 IL-1β를 들 수 있고 반면 IFN-γ는 FcRn 발현을 감소시키는 인자로 알려져 있다[65,66].

FcRn의 정상적인 기능 유지에 가장 중요한 생물학적 요소는 낮은 pH 환경이라고 할 수 있다[66]. FcRn-IgG 복합체의 형성과 이동은 낮은 pH 환경에서 일어나고 분리 현상은 세포외 높은 pH 환경을 만날 때 일어난다. 서론에서 밝혔듯이 FcRn과 IgG 의 복합체가 형성되는 곳은 endosome인데 endosome 막에 존재하는 V-ATPase에 의해 endosome 내는 항상 낮은 pH 환경 (pH 6.0 이하)이 유지된다. 만약 어떤 요인에 의해 V-ATPase 활성도가 떨어지면 낮은 pH 환경

조성이 깨어져 FcRn에 의한 IgG 결합과 이동 현상은 일어나지 않을 뿐만 아니라 세포 내 모든 단백질들의 정상적 대사 기능 유지도 어려워진다[67]. 이와 같이 FcRn의 생성으로부터 IgG 대사 과정에 이르기까지 다양한 단백질들의 대사과정과 생물학적 환경이 복합적으로 얽혀있다는 사실을 고려해 볼 때 낮은 pH 환경 조성을 위한 V-ATPase의 역할은 매우 중요한 요소임을 알 수 있다.

V-ATPase의 활성도는 Ang II의 농도에 따라 차이를 보인다. Harris 등[68]은 콩팥의 근위 세뇨관에서 낮은 농도의 Ang II (10^{-11} M, 10^{-10} M)에서는 HCO_3^-의 재흡수가 증가하지만 높은 농도 (10^{-7} M, 10^{-6} M)에서는 HCO_3^-의 재흡수가 감소된다고 하였다. Wagner 등[69]도 Ang II 농도가 낮은 환경에서 근위 세뇨관 세포의 H^+ 분비가 이루어진다고 하였다. Tojo 등[70]은, renal cortical collecting duct에 존재하는 Ang II의 농도가 증가함에 따라 V-ATPase 활성도가 감소한다는 결과와 함께, AT1 차단제를 사용한 후 V-ATPase 활성도가 정상으로 회복되는 결과를 가지고 Ang II에 의한 V-ATPase 활성도 조절은 AT1을 경유하여 일어난다고 주장하였다[70]. 상기 결과들은 Ang II가 V-ATPase 활성도의 조절 인자로 작용하고 있음을 보여 주는 증거들이다.

본 실험에서 FcRn 발현 양상의 결과는 질병군에서 나타난 FcRn의 과다 발현 현상이 알리스키렌의 작용으로 억제되고 있음을 보여주고 있다. 그 이유를 설명하기 위해 저자는 V-ATPase 활성도와 Ang II의 역할을 관련인자로 고려하였다. 즉, 치료가 이루어지지 않은 질병군에서 Ang II의 상승이 V-ATPase 활성도를 감소시켜 세포

내 FcRn에 의한 IgG의 이동뿐만 아니라 다양한 단백질들의 대사 장애가 일어나기 때문에 이를 보상하기 위한 이차적인 반응에 의해 FcRn 발현이 과다하게 증가되었다고 추정하였다. 반대로 치료를 받은 질병군에서는 알리스키렌에 의해 Ang II의 농도 상승이 억제되기 때문에 V-ATPase의 활성도는 그대로 유지되어 FcRn의 이차적인 과다 발현 현상이 나타나지 않았다고 판단하였다.

레닌 수용체가 가지는 세포의 생존 유지 기능이 세포 내 낮은 pH 환경을 유도하기 때문이며 이는 V-ATPase 활성도와 연관이 깊다는 연구 결과들이 발표되었다. Advani 등[71]은 rat 콩팥 집합관의 intercalated A 세포에 레닌 수용체가 분포하고 있으며 V-ATPase가 같은 위치에 공존 (colocalization)하고 있다는 사실과 함께 V-ATPase가 레닌 수용체의 세포내 신호 전달 과정에 관여한다는 증거들을 제시한 바 있다. 족세포에 존재하는 레닌 수용체를 없앤 mice는 생후 2, 3주경 신증후군과 급성 신기능 장애로 사망하였고 족세포의 족돌기 융합 (effacement) 소견과 함께 주변의 골격구조의 파괴가 관찰되었는데 bafilomycin A1으로 V-ATPase 활성도를 차단한 결과가 이와 유사하다고 하였다[72-73]. Kinouchi 등[74]은 레닌 수용체를 없앤 mice가 생후 3주째 심실기능의 저하로 인한 심부전으로 사망하였고 RAB-7과 Lysosomal associated membrane protein 2 (LAMP2)을 포함하는 소포 (vacuoles)들과 자가 탐식포 (autophagic vacuoles)들이 불완전 대사의 결과로 인해 cardiomyocytes 내 많이 축적되어 있음을 확인하였고 bafilomycin A1으로 처치한 결과가 이와 유사하였음을 보여주었다. 그리고 bafilomycin A1으로

V-ATPase 활성화를 차단한 이후 레닌 수용체 mRNA의 발현이 증가한 결과를 제시하면서, V-ATPase 활성도 감소에 따른 세포내 pH 변화를 회복시키는 과정에서 레닌 수용체가 과다하게 발현되었다고 설명하였다. 본 실험 결과에서 나타난 레닌 수용체의 과다발현 현상 또한 질병으로 인해 V-ATPase 활성도가 억제됨으로써 나타난 보상적인 결과일 수 있으며, bafilomycin A1이 아닌 활성화된 Ang II에 의해 V-ATPase 활성도가 차단되었을 가능성이 있다.

저자는 치료가 이루어지지 않은 질병군에서 나타난 레닌 수용체의 과다 발현 현상이 일차적인 레닌 또는 프로레닌의 증가로 인한 결과라고 보기는 어렵다고 판단하였다. 만약 질병에 의한 일차적인 결과라면 치료가 이루어진 질병군에서도 레닌 수용체의 과다 발현 현상은 나타나야 한다. 왜냐하면 알리스키렌은 레닌 또는 프로레닌이 레닌 수용체에 결합하는 현상을 차단할 수 없다고 되어 있기 때문이다[55,56].

알리스키렌에 의한 레닌 수용체의 과다 발현 차단 현상은 또 하나의 중요한 임상적 의미를 가진다. 그 이유는 레닌 수용체의 과다 활성화는 질병의 섬유화 진행을 촉진하기 때문에 알리스키렌 치료에 따른 레닌 수용체의 과다 활성화 차단은 질병이 악화되는 길을 막는 한 가지 방법이 될 수 있기 때문이다. 이 점에 대해서는 보다 많은 연구들을 통해 입증되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구를 통해 Ang II는 여전히 콩팥 손상을 일으키는 주된 요인이며 사구체 여과 장벽에서 일어나는 여러 가지 변화들의 중심에 서 있다는 사실을 알 수 있었다. 그리고 면역성

콩팥 사구체 질환에서 알리스키렌이 FcRn을 통한 IgG의 정상적인 대사 과정을 유도함으로써 면역 기전의 활성화에 의한 콩팥 손상의 진행을 차단할 수 있음을 알게 되었다. 또한 알리스키렌 치료는 레닌 수용체의 과다 활성화를 억제함으로써 질병이 악화되는 것을 막을 수 있는 한 가지 방법이 될 수 있음을 알게 되었다. 마지막으로 본 연구 결과는 알리스키렌의 치료적 적용을 위한 기초의학적인 정보와 함께, 임상에서 접하게 되는 다양한 면역성 콩팥 사구체 질환의 치료적 접근을 시도함에 있어 유익한 발판을 마련해 줄 수 있으리라 판단된다.

참고문헌

1. Mezzano SA. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension 2001;38:635-8.

2. Todd PA, Heel RC. Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. Drugs 1986;31:198-248.

3. Hernandez R, Sosa-Canache B, Velasco M, Armas-Hernandez MJ. Armas-Padilla MC, Cammarata R. Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. J Hum Hypertens 2002;16(Suppl 1):S93-9.

4. Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY: Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: Implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. J Am Soc Nephrol 2003;14:1738-47.

5. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. Kidney Int 2004;65:30-9.

6. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature 2002;417:822-8.

7. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin–angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocr Rev 2003;24:261-71.

8. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest 2002;109:1417-27.

9. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-β1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. Kidney Int 2006;69:105-13.

10. Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rueger H, Goschke R, Cohen NC et al. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. Chem Biol 2000;7:493-504.

11. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen NC, Rasetti V, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:698-705.

12. Azizi M. Direct renin inhibition: clinical pharmacology. J Mol Med 2008;86:647-54.

13. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. Circulation 2005;111:1012-8.

14. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK, et al. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med 2008;358:2433-46.

15. Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, Naik G, Gilbert RE. Aliskiren, a novel renin

inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. Diabetologia 2007;50:2398-404.

16. Yen TH, Yang HY, Chu PH, Wen CJ, Fu JF, Wang IK et al. Aliskiren attenuates proteinuria in mice with lupus nephritis by a blood pressure-independent mechanism. Lupus 2013;22:180-9.

17. Chugh S, Yuan H, Topham PS, Haydar SA, Mittal V, Taylor GA, et al. Aminopeptidase A: a nephritogenic target antigen of nephrotoxic serum. Kidney Int 2001;59:601-13.

18. Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF 2nd, Lou YH. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. J Clin Invest 2002;109:517-24.

19. Park SY, Ueda S, Ohno H, Hamano Y, Tanaka M, Shiratori T, et al. Resistance of Fc receptor- deficient mice to fatal glomerulonephritis. J Clin Invest 1998;102:1229-38.

20. Tryggvason K, Wartiovaara J. How does the kidney filter plasma? Physiology(Bethesda) 2005;20:96-101.

21. Miner JH. Renal basement membrane components. Kidney Int 1999;56:2016-24.

22. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. Physiol Rev 2003;83:253-307.

23. Haymann JP, Levraud JP, Bouet S, Kappes V, Hagège J, Nguyen G, et al. Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult

human kidney. J Am Soc Nephrol 2000;11:632-9.

24. Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 2002;282:F358-F365.

25. Akilesh S, Huber TB, Wu H, Wang G, Hartleben B, Kopp JB, et al. Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:967-72.

26. Brambell FW. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. Proc Nutr Soc 1969;28:35-41.

27. Rodewald R. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. J Cell Biol. 1976;71:666-9.

28. Simister NE, Rees AR. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. Eur J Immunol 1985;15:733-8.

29. Radulescu L, Antohe F, Jinga V, Ghetie V, Simionescu M. Neonatal Fc receptors discriminates and monitors the pathway of native and modified immunoglobulin G in placental endothelial cells. Hum Immunol 2004;65:578-85.

30. Kim KJ, Fandy TE, Lee VH, Ann DK, Borok Z, Crandall ED. Net absorption of IgG via FcRn-mediated transcytosis across rat alveolar epithelial cell monolayers. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:616-22.

31. Claypool SM, Dickinson BL, Wagner JS, Johansen FE, Venu N, Borawski

JA, et al. Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fc gamma-receptor. Mol Biol Cell 2004;15:1746-59.

32. Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. Int Immunol 2003;15:187-95.

33. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. J Exp Med 2003;197:315-22.

34. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:917-29.

35. Beyenbach KW, Wieczorek H. The V-type H^+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J Exp Biol 2006;209:577-89.

36. Rothenberger F, Velic A, Stehberger PA, Kovacikova J, Wagner CA. Angiotensin II stimulates vacuolar H+ -ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells from the outer medullary collecting duct. J Am Soc Nephrol 2007;18:2085-93.

37. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, et al. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H+-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. Circ Res 2010;107:30-4.

38. Yayama K, Matsui T, Takano M, Hayashi K, Nagamatsu T, Suzuki Y, et al.

Activation of the renin-angiotensin system in anti-glomerular Basement antibody-induced GN. Biol Pharm Bull 1995;18:411-5.

39. Timmermans V, Peake PW, Charlesworth JA, Macdonald GJ, Pawlak MA. Angiotensin II receptor regulation in anti-glomerular basement membrane nephritis. Kidney Int 1990;38:518-24.

40. Yayama K, Makino J, Takano M, Okamoto H. Role of Angiotensin II in the transforming growth factor-b1 expression of rat kidney in anti-glomerular basement membrane antiserum-induced GN. Biol Pharm Bull 1995;18:687-90.

41. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-β induced matrix proteins in glomerulonephritis. Lab Invest 1993;69:68-76.

42. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. N Engl J Med 1988;318:1657-66.

43. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. J Clin Invest 2001;108:1583-7.

44. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-b and angiotensin II in renal fibrosis. Hypertension 1998;31:181-8.

45. Cattell V. Macrophages in acute glomerular inflammation. Kidney Int 1994;45:945-52.

46. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensin II. Curr Opin Nephrol Hypertens

2001;10:321-9.

47. Schlöndorf D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. Kidney Int 1995;47:S44-S47.

48. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in the kidney through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 gene expression. J Immunol 1998;161:430-9.

49. Sharma K, Cook A, Smith M, Valancius C, Inscho EW. TGF-beta impairs renal autoregulation via generation of ROS. Am J Physiol Renal Physiol 2005;288:F1069-77.

50. Brinkkoetter PT, Holtgrefe S, van der Woude FJ, Yard BA. Angiotensin II type 1-receptor mediated changes in heparan sulfate proteoglycans in human SV40 transformed podocytes. J Am Soc Nephrol 2004;15:33-40.

51. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease. Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. Diabetes 2005;54:1626-34.

52. Gross O, Girgert R, Rubel D, Temme J, Theissen S, Müller GA. Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. Am J Hypertens 2011;24:355-61.

53. Sakoda M, Ichihara A, Kurauchi-Mito A, Narita T, Kinouchi K, Murohashi-Bokuda K, et al. Aliskiren Inhibits Intracellular Angiotensin II Levels Without Affecting (Pro)renin Receptor Signals in Human Podocytes. Am J Hypertens 2010;23:575-80.

54. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. Diabetes 2008;57:3297-306.

55. Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, Kvakan H, et al. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. Hypertension 2008;51:682-8.

56. Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. Hypertension 2008;52:130-6.

57. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. Hypertension 2005;46:1069-76.

58. Nishihara T, Kusuyama Y, Gen E, Tamaki N, Saito K. Masugi nephritis produced by the antiserum to heterologous glomerular basement membrane. I. Results in mice. Acta Pathol Jpn 1981;31:85-92.

59. Rantala I. Glomerular Epithelial cell endocytosis of immune deposit s in the nephrotic rat. an ulatrastructural immunoperoxidase study. Nephron 1981;29:239-44.

60. Claypool SM, Dickinson BL, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS. Functional reconstitution of human FcRn in Madin–Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin. J Biol Chem 2002;277:28038-50.

61. Zhu X, Peng J, Chen D, Liu X, Ye L, Iijima H, et al. Calnexin and ERp57 facilitate the assembly of the neonatal Fc receptor for IgG with beta 2-microglobulin in the endoplasmic reticulum. J Immunol 2005;175:967-76.

62. Ward ES, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Tang Q, Ober RJ. From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. Mol Biol Cell 2005;16:2028-38.

63. He W, Ladinsky MS, Huey-Tubman KE, Jensen GJ, McIntosh JR, Bjorkman PJ. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. Nature 2008;455:542-6.

64. Kuo TT, de Muinck EJ, Claypool SM, Yoshida M, Nagaishi T, Aveson VG, et al. N-glycan moieties in neonatal Fc receptor determine steady-state membrane distribution and directional transport of IgG. J Biol Chem 2009;284:8292-300.

65. Liu X, Ye L, Christianson GJ, Yang JQ, Roopenian DC, Zhu X. NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. J Immunol 2007;179:2999-3011.

66. Liu X, Ye L, Bai Y, Mojidi H, Simister NE, Zhu X. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can downregulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. J Immunol 2008;181:449-63.

67. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nature Rev Mol Cell Biol 2007;8:917-29.

68. Harris PJ, Young JA. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. pflugers Arch 1977;367:295-7.

69. Wagner CA, Giebisch G, Lang F, Geibel JP. Angiotensin II stimulates vesicular H+-ATPase in rat proximal tubular cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9665-8.

70. Tojo A, Tisher CC, Madsen KM. Angiotensin II regulates H+-ATPase activity in rat cortical collecting duct. Am J Physiol 1994;267:F1045-51.

71. Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K et al. The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H+-ATPase in the kidney. Hypertension 2009;54:261-9.

72. Riediger F, Quack I, Qadri F, Hartleben B, Park JK, Potthoff SA, et al. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. J Am Soc Nephrol 2011;22:2193-202.

73. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, et al. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. J Am Soc Nephrol 2011;22:2203-12.

74. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Kurauchi-Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H: The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H+-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. Circ Res 2010;107:30-4.

Abstract

The Effect of Aliskiren on IgG Metabolism In a Mouse Model of Immune Mediated Glomerular Disease

Kang, Ju Hyung

Molecular Genomic medicine

The graduate School

Seoul National University

Introduction: Ang II is the factor associated with chronic renal injury. The use of ACEI and ARB may be limited because of the Ang II independent pathway as well as the adverse effects. Aliskiren shows RAS inhibition and the effects compatible to ACEI or ARB. The anti-GBM nephritis is mediated by IgG followed by inflammation. IgG is normally filtered from slit diaphragm and reabsorbed in proximal tubular cells by FcRn under the low pH environment which is made by V-ATPase. PRR has the regulatory function for low pH environment associated with V-ATPase. This study shows the effect of aliskiren on IgG metabolism in immune mediated glomerular disease

Methods: 10-week-old male BALB/c mice were divided into 4 groups; control(CO), control-treated(CT), disease(DO), disease treated(DT). Anti-GBM nephritis was induced by anti-GBM IgG. Aliskiren were infused

subcutaneously. Each group was sacrificed on day 7. The indicators of fibrosis and Up/Ucr were assessed. Total mouse IgG and specific MAR IgG levels in serum and urine were measured. TGF- 1, FcRn, and PRR expressions in renal cortex were assessed by western blot.

Results: The ECM protein and FN increased significantly in DO compared to DT. TGF- 1 expression on renal cortex decreased significantly in DT compared to DO. Mouse IgG depositions in glomerular basement membrane decreased but circulating mouse IgG levels increased in DT compared to DO. Specific MAR IgG level increased in serum but decreased in urine in DT compared to DO. FcRn and PRR were expressed much higher in DO than in DT.

Conclusions: Aliskiren is able to inhibit the progression of glomerular injury through the maintenance of IgG metabolism by FcRn in immune mediated glomerular disease.

Key words: Immune mediated glomerular disease, Aliskiren, Ang II, FcRn, PRR.

Student number: 2006-30525