

New Insights into Cyclosporine-Induced Nephrotoxicity : Fas-Mediated Apoptotic Cell Death by Cyclosporine

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

양 철 우

연구 배경

Cyclosporine(이하 CsA)는 장기이식에 있어 가장 널리 쓰이는 면역억제제이나 그 주된 부작용인 신독성으로 그 이용이 제한되어왔다. 따라서 그동안 CsA에 의한 신독성의 병태생리기전을 밝히고 그 예방을 위한 다양한 연구가 진행되어 왔다.

저자가 2년간 연수한 Oregon Health Sciences University의 Dr. Bennett의 연구실에서의 최근 몇 년간의 업적을 요약하면 CsA에 의한 신독성이 renin-angiotensin system(이하 RAS)의 활성화에 기인하며(Pichler *et al.*, J Am Soc Nephrol 6: 1186, 1995) 활성화된 RAS는 transforming growth factor- β 1(Shihab *et al.*, Kidney Int 49:1141, 1996)의 발현을 증가시키고 활성화된 RAS를 angiotensin converting enzyme inhibitor나 receptor를 차단하면 이를 호전시킬 수 있다는 것이다(Burdmann *et al.*, Am J Physiol 269:F491-F499, 1995). 최근에는 CsA를 장기간 투여한 쥐신장에서 TUNEL 염색 결과 apoptotic-positive 세포가 증가하며 이는 CsA에 의한 신독성에 apoptotic cell death가 관여함을 시사함을 보고하였다(Thomas *et al.*, Kidney Int 53:897m 1998).

일반적으로 CsA에 의한 apoptotic cell death는 CsA가 신장에 분포하는 혈관에 대한 수축작용을 함으로써 low-grade의 허혈성 신손상이 지속되어 유발될 것으로 가정하고 있으며 이러한 가정은 angiotensin II 또는 nitric oxide를 억제하면 apoptotic cell death가 증가하고 이와 반대로 angiotensin II를 억제하거나 nitric oxide를 보충하면 apoptotic cell death가 감소하는 것으로 증명되었다(Thomas

et al., Kidney Int 53:897, 1998).

따라서 저자가 연수 2년간 맡은 분야는 CsA에 의한 apoptotic cell death의 pathway를 분자생물학적 관점에서 규명하는 일이었다. 먼저 Fas-Fas-ligand에 대한 관계를 규명하고자 하였는데 이는 면역학적인 면에서 잘알려진 Fas-Fas-ligand의 상호작용에 의한 apoptotic cell death가 CsA에 의한 허혈성 신손상시에도 일어날 수 있는 가를 알아보기 위함이었다.

Fas system의 활성화는 면역학적 요인 특히 이식에서 거부반응시 관여하는 것으로 알려져 있으나(Ito *et al.*, Transplantation 60:794, 1995) 비면역학적 요인 예를 들면 허혈성 신손상에서도 그 발현이 증가되는 것으로 보고되고 있어(Nogae *et al.*, J Am Soc Nephrol 9:620, 1998) CsA에 의한 apoptotic cell death에 Fas system이 관여하는 가를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구 방법

Dr. Bennett이 주장하는 mouse의 chronic CsA nephrotoxicity model을 이용하였다(Andoh *et al.*, Nephrology 3:471, 1997). Low-salt diet(0.01%)를 먹인 mouse에 CsA를 25mg/kg를 1주 및 4주 피하 주사한 다음 신장을 얻어 RNA, DNA, protein 및 조직을 얻었고 심장을 천자하여 얻은 혈액을 이용하여 신장기능과 CsA의 전혈농도를 측정하였다. Fas system의 활성화를 증명하기 위하여 Fas, Fas-ligand, Interleukin-1 β converting enzyme(이하 ICE), CPP32의 mRNA에 대한 competitive RT-PCR, Western blot, immunohistochemistry를 시행하였으며 신장조직에서 caspase activity를 측정하였다. 조직내

apoptotic cell death는 TUNEL staining 및 DNA fragmentation analysis를 시행하여 증명하였다.

연구 결과

ICsA4주 투여군에서 DNA laddering이 관찰되었으며 TUNEL-positive cell은 대조군에 비하여 유의 있는 증가를 보였다(54 ± 41 vs. 3 ± 3 , $p < 0.05$). 이러한 TUNEL-positive cell의 증가는 신간질조직의 섬유화와 밀접한 상관관계를 보였다($r = 0.83$, $p < 0.01$). Fas-ligand mRNA는 CsA4주 투여군에서 대조군에 비하여 6.3배 증가하였으며 Fas protein은 대조군에 비하여 1.5배 증가하였다. 또한 ICE 및 CPP32의 mRNA는 대조군에 비하여 유의 있는 증가를 보였고 (0.21 vs. $0.03 \text{ attmol}/\mu\text{g total RNA}$, $p < 0.05$; 0.18 vs. $0.03 \text{ attomol}/\mu\text{g total RNA}$, $p < 0.05$) 그 활성

도는 유의 있게 증가함을 관찰할 수 있었다(ICE : 16.6 vs. $7.9 \text{ pmol}/\mu\text{g/hr}$, $p < 0.05$; CPP32 : 5.6 vs. $2.7 \text{ pmol}/\mu\text{g/hr}$, $p < 0.05$). 면역화학조직학적 검사법으로 Fas, Fas-ligand, ICE, CPP32 protein이 신피질과 수질의 경계부분에 위치한 신세뇨관세포에 국한하며 그 발현이 증가됨을 확인하였다.

결 과

Fas system이 CsA에 의한 apoptotic cell death에 관여하며(Yang *et al.*, Transplantation 1999, in press) CsA에 의한 Fas와 Fas-ligand의 상호작용이 이차적으로 세포질내 caspase의 활성화를 일으켜(Yang *et al.*, Kidney Int 1999, in press) 궁극적으로 세포의 apoptotic cell death를 일으키는 것으로 이해된다.