신 이형성증에서 PAX2 발현

연세대학교 대학원

의 과 학 과

이 윤 희

신 이형성증에서 PAX2 발현

지도 정 현 주 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 6월 9일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

이 윤 희

이윤희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 9일

감사의 글

이 작은 논문이 세상에 나오기까지 늘 한결같은 열정과 세심한 배려로 이끌어 주시고 병리의사의 좋은 본을 보여주신 정현주 교수님께 마음 깊이 감사드립니다. 깊은 통찰력과 따뜻한 관심으로 좋은 자문을 주시고 더 나은 방향으로 지도해주신 정우희 교수님과 박순정 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이 연구의 실험을 탁월한 수준으로 도와주시고 감동적인 슬라이드를 제작해주신 정형재 선생님께 진심으로 감사드립니다. 수많은 밤을 함께 보내며 의국생활의 큰 기쁨과 위로가 되어준 소중한 동기 권지은, 석재연 선생님과 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 부족한 의국장을 많이 이해해주고 힘든 업무 가운데서도 서로를 아껴주고 격려해준 김현기, 박종필, 표주연, 김상겸 선생님께 감사의 마음을 전합니다.

큰 헌신과 사랑으로 저를 길러주시고 항상 믿고 후원해 주신 사랑하는 아버지와 어머니, 늘 앞서 걸어가며 좋은 길을 내준 자상한 오빠, 평생을 함께 할 종인오빠에게 감사와 사랑을 드립니다. 늘 제게 좋은 것만 주시는 하늘에 계신 아버지께 감사드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약 ·····1

I. 서 론 ·····3

II. 대상 및 방법 ·····7

1. 환자군 ·····7
2. 임상 소견 ·····7
3. 병리조직 염색 ·····7
4. 면역조직화학 염색 ·····8
5. TUNNEL 염색 ·····9
6. Trichrome 염색 ·····10
7. 통계학적 분석 ·····11

III. 결 과 ·····12

1. 임상 소견 ·····12
2. 육안 및 조직 소견 ·····14
3. PAX2의 발현 및 세포자멸사지수 ·····17
   가. PAX2의 발현 ·····17
      (1) 정상 신장에서의 PAX2 발현 ·····17
      (2) 이형성 신장에서의 PAX2 발현 ·····21
   나. 세포자멸사지수 ·····26

4. 원시관 주변의 중간엽 세포에서 smooth muscle actin과 trichrome의 염색 양상 ·····27

IV. 고 찰 ·····30

V. 결 론 ·····35

참고문헌 ·····37

영문요약 ·····44

그림 차례

그림 1. 신 이형성증의 육안 소견 ·····15

그림 2. 신 이형성증의 조직 소견 ·····16

그림 3. 정상 태아 신장의 PAX2 면역조직화학 염색소견 ·····18

그림 4. 정상 성인 신장의 PAX2 면역조직화학 염색소견 ·····20

그림 5. 신 이형성증에서 원시관의 PAX2 면역조직화학 염색소견 ·····22

그림 6. 신 이형성증의 주변 정상 신장조직에서의 PAX2 면역조직화학 염색소견 ·····23

그림 7. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 원시관과 집합관 상피세포의 PAX2 면역조직화학 염색의 비교 ·····25

그림 8. 신 이형성증의 원시관 상피와 미분화 중간엽 실질의 세포자멸사 ·····27

그림 9. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 미분화 중간엽 실질의 smooth muscle actin 면역조직화학 염색의 비교 ·····28

그림 10. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 미분화 중간엽 실질의 trichrome 염색의 비교 ·····29

표 차례

표 1. 신 이형성증 환자들의 임상 소견 ·····13

표 2. 신장의 부위에 따른 PAX2의 면역조직화학 염색소견 ··24

표 3. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 원시관과 집합관 상피세포의 PAX2 면역조직화학 염색의 비교 ·····25

표 4. 신 이형성증의 원시관 상피세포와 미분화 중간엽 실질의 세포자멸사지수 ·····26

국문요약

신 이형성증에서 PAX2 발현

신 이형성증(renal dysplasia)은 신장의 발생과정에서 요관싹(ureteric bud)과 신발생 모체(metanephric blastema) 사이의 상호작용이 정상적으로 일어나지 않아 일어나는 후신(metanephros) 조직의 이상 분화이다. 그 결과 신 실질의 비정상적인 발달로 인해 원시관(primitive duct), 미분화 중간엽 조직, 연골 형성과 무질서한 엽구성등의 특징적인 조직학적 소견을 보인다. 신 이형성증은 대부분 소아나 산전 진찰에서 발견되며 그 병인은 아직 완전히 정립되어있지 않다. 최근 많은 분자 생물학적 연구들을 통해 PAX2 유전자의 변이가 쥐와 사람의 신 이형성증과 저형성증 등의 신장발생의 결함에 중요한 원인임이 밝혀졌다. PAX2는 신장의 발생과정에 중요한 전사인자중 하나로 신 이형성증의 원시관 상피에서 과발현되며 과도한 세포자멸사를 유발함이 밝혀졌고, 이러한 세포 자멸사와 증식 양식의 변화가 신 이형성증 발생에서 나타나는 비정상적인 분화의 주요 원인으로 받아들여지고 있다. 지금까지 이루어진 대부분의 신 이형성증에 대한 연구는 제태기와 소아기의 신장발달단계에 중점을 두고 이루어졌고, 상대적으로 출생 후 성인이 되면서 이러한 신장의 비정상적 분화들이 보이는 형태 변화와 PAX2 발현양상에 대한 연구는 체계적으로 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 정상 신장과 신 이형성증에서 PAX2의 발현 양상을 분석하고 소아군 20예와 성인군 10예의 신 이형성증을 보이는 신장의 파라핀 포매 조직을 이용하여 병리학적 특징, PAX2의 발현과 세포자멸사지수, 그리고 원시관 주변의 중간엽 조직의 분화 정도의 차이를 비교 분석해 보았다.

정상 태아의 신장에서 PAX2는 피막밑 신장발생 구역에 국한되어 강한

발현을 보였고 중심부로 성숙되면서 발현이 뚜렷이 감소하였다. S자형 신장발생 소포의 상피에서 PAX2의 강한 발현을 보였고 성숙한 발세포에서는 발현되지 않았으며 원위관과 집합관의 상피에서 강한 발현을 보였다. 정상 성인의 신장에서는 보우만 주머니의 벽쪽 상피세포와 원위관과 집합관의 핵에서 다양한 강도로 발현되었고 사구체, 발세포, 근위관, 혈관, 사이질 세포등에서는 발현되지 않았다. 신 이형성증에서 PAX2는 원시관 상피에서 강하게 발현되었고 주변의 미분화 중간엽 조직에서는 발현되지 않았다. 원시관의 상피의 PAX2 발현은 성인군에서 유의한 감소를 보였고(p=0.007), 주변의 신장 조직에서는 집합관 상피에서의 PAX2 발현강도가 성인군에서 소아군에 비해 유의한 차이를 보이며 감소하였다(p=0.004). 원시관 상피세포의 세포자멸사지수를 주위의 정상적인 집합관 상피세포와 비교하였을때 유의한 증가를 보였으나(p=0.000), 세포자멸사지수는 소아군과 성인군간에 유의한 차이가 없었다(p=0.882). 그러나 원시관에서 보다 미분화 실질에서 세포자멸사가 더 활발한 경향을 보였다. 원시관을 둘러싸는 중간엽 세포들은 대부분 섬유근육분화를 나타내었고 성인군에서 소아군에 비해 smooth muscle actin (SMA)과 trichrome 염색의 강도가 감소하는 경향을 보였다.

이러한 결과들을 종합해 볼 때 신 이형성증에서 원시관에서 PAX2의 이상 과발현은 성인이 된 후에도 지속되나 소아에서 보다 발현이 감소하고 미분화 중배엽 실질의 섬유근육 분화도 감소하여 신 이형성증은 시간이 지남에 따라 점차 쇠퇴하는 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 신 이형성증, PAX2, 세포자멸사, 성인

신 이형성증에서 PAX2 발현

<지도교수 정현주>

연세대학교 대학원 의과학과

이 윤 희

Ⅰ. 서 론

신 이형성증(renal dysplasia)은 후신(metanephros)조직의 이상 분화로 인한 신장 실질의 비정상적인 발달로[1], 4000명 출생당 1명의 빈도로 발생하며 소아 부검의 2%에서 발견되고 대부분 소아나 산전 진찰에서 발견된다[2]. 영구 신장(permanent kidney)의 기원이 되는 후신은 발생 5주경 나타나며, 요관싹(ureteric bud)과 후신발생모체(metanephric blastema)로 이루어진다. 이 두 신장발생 원기(primordium)사이의 상호작용을 통해 요관싹은 요관(ureter), 신우(renal pelvis), 신배(calyx), 집합관(collecting duct)등으로 분화하고, 후신발생모체는 신장단위(nephron)를 형성하게 된다[3]. 신 이형성증은 요관싹과 후신발생모체 사이의 상호작용의 결함으로 비정상적인 신장 실질의 발달을 나타낸다. 요관싹에서 기원한 원시관(primitive duct)과 이를 둘러싸는 미분화 중간엽 세포, 후신발생모체에서 형성된 연골, 원시 사구체와 미성숙 세뇨관등이 무질서한 엽구성을 보인다[1]. 원시관의 표면상피는 입방형, 원주형 또는 섬모세포로 이루어져 있고 그 주변을 섬유모세포나 평활근세포 등의 방추세포로 구성된 중간엽 세포들이 소

용돌이치는 모양으로 둘러싸고 있다[4, 5].

대부분의 신 이형성증은 산발적으로 발생하고 드물게 가족성 발생이 보고되어 있으며,[6-9] 약 90%에서 요로계 폐쇄와 관련된 다양한 요로기형을 동반한다[4]. 신 이형성증은 일측성이나 양측성으로 발생하고 신장 전체를 침범하거나 부분적으로 침범 할 수 있으며 다양한 정도의 낭성 변화를 보인다[5]. 심한 이형성을 보이는 경우에는 신장의 기능이 거의 없고 방광과 연결되지 않으며 일측성인 경우 증상이 나타나지 않는다[5]. 이형성의 정도가 심하지 않은 경우에는 거의 정상적인 신기능을 보이며 그 크기로 인한 증상이나 요로계 감염 등으로 나타난다[5]. 양측성 이형성증이거나 다른 비뇨생식기계의 기형을 동반한 경우는 일측성이거나 동반된 기형이 없는 경우보다 요로감염과 신기능부족 또는 신부전증으로 진행하는 나쁜 임상경과를 보인다[10].

신 이형성증의 병인은 아직 완전히 정립되어있지 않으며 대표적인 두 가지 이론으로 설명되어 왔다. Osathanondh 와 Potter는 미세절제(microdissection) 연구를 통해 다낭성신의 병인을 설명하고 형태 소견에 따라 네가지 종류로 분류하였다. 이 중 제 2형과 4형이 신 이형성증에 해당하며, 제 2형은 다낭성 신 이형성증(multicystic renal dysplasia)으로, 제 4형은 요도폐쇄와 관계있는 폐쇄성 신 이형성증(obstructive renal dysplasia)으로 정의하였다[11]. 미세절제 연구를 통해 제2형은 요관싹의 팽대부 활성의 억제로 인해 신장단위 유도가 일어나지 않고 요관싹의 분지가 미성숙한 낭성 변화를 보인다고 추측하였다. 제4형에서는 요관 폐쇄로 인한 이차적인 압력의 증가로 인한 요관싹 팽대부의 손상으로 생긴 변화로 생각하였다. 이를 토대로 신 이형성증은 비정상적인 팽대부의 활성으로 인한 신장단위의 유도의 결여로 초래된 것이라 주장하였다. Stephens등은 많은 신 이형성증이 임상적으로 이소성 요도 입구와 연관이 있다는 점에 착안하여 요관싹이 이소성 위치에서 기원하여 신모체와 접촉이 잘 이루어지지 않은 결과로 비정상적인 후신의 발생을 초래한다고 이론화하여 요관싹과 후신발생모체 사이의 상호

작용의 중요성을 강조하였다[12, 13].

최근 많은 분자 생물학적 연구들을 통해 세포의 생존 유전자인 PAX2 유전자가 쥐와 사람의 정상적인 신장의 발생과 신 이형성증과 신 형성저하증(renal hypoplasia)등의 신장발생의 결함에 중요한 원인임이 밝혀졌다. PAX2는 중간뇌(midbrain), 마름뇌(hindbrain), 척수, 눈, 귀, 비뇨생식기관등의 여러 가지 신경기관과 배설기관의 발달과정에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. PAX2는 WT1, N-myc, p53 등의 유전자를 조절하는 것이 밝혀졌으나[14, 15] 아직 PAX2의 표적 유전자와 기능은 정확히 밝혀지지 않았다. 신장의 발생과정에서 PAX2는 DNA에 결합하여 신장발생을 조절하는 중요한 유전자들의 발현을 변화시키고 PAX5, PAX8과 함께 p53의 전사를 억제하고 세포 자멸사(apoptosis)를 유발한다[16]. 특히 PAX2의 결함이 태아의 신장과 요로계의 이상을 유발하고 PAX2의 과발현이 신장의 낭성질환이나 종양성 질환에서 상피세포의 과성장과 관련 있음이 밝혀졌다[16]. Porteous등은 신 결손증후군(renal coloboma syndrome)에 관한 연구에서 PAX2 변이 쥐에서 신 형성저하증이 나타남을 발견하였고 이는 발생 과정에서 일어나는 과도한 세포자멸사가 주요한 요인이라고 보고하였다[17]. 다낭성 신 이형성증에서도 원시관과 미성숙관의 상피세포의 핵에서 PAX2가 강하게 발현됨이 알려져 있다[16]. 그러나 아직 PAX2가 신장의 발생과정에서 세포자멸사의 경로에서 어떻게 유전자를 조절하는지는 아직 밝혀지지 않았다. PAX2이외에도 WT-1, BCL-2, PCNA, TGF-1, EGFR, galectin 3 등의 여러 인자들이 신 이형성증에서 이상 발현되는 것이 보고되었고[18-20], 아직 이러한 분자들이 신 이형성증을 일으키는 직접적인 원인인지, 요로계 폐쇄로 인한 산물로 발현되는 것인지는 아직 확실하지 않으나 세포 자멸사와 증식 양식의 변화가 신 이형성증 발생에서 나타나는 비정상적인 분화의 주요 원인으로 받아들여지고 있다.

지금까지의 신 이형성증에 대한 연구는 병인과 관련하여 동물실험과 제태기와 소아기의 신장발달단계에 중점을 두고 이루어졌다. 그러나 신

이형성증이 성인이 된 이후 발견되는 예도 적지 않으며 상대적으로 성인이 되면서 이러한 신장의 비정상적 분화들이 보이는 형태 변화와 PAX2 발현양상에 대한 체계적인 연구는 잘 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 정상 신장과 신 이형성증에서 PAX2의 발현 양상을 분석하고 신 이형성증의 소아군과 성인군 사이의 임상적 및 병리학적 특징과 PAX2의 발현, 세포자멸사지수, 주변 미분화 실질의 분화 정도의 차이를 비교 분석해 보았다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 환자군

1993년 1월부터 2003년 12월까지 연세의료원에서 신 적출술을 통해 신 이형성증으로 진단된 30예를 대상으로 하였고, 신 적출술을 시행했을 당시의 나이를 만 18세를 기준으로 소아군과 성인군으로 나누어 20예의 소아군과 10예의 성인군으로 구분하였다. 대조군으로 각각 제태기 24주와 30주에 특별한 원인 없이 자궁내에서 사망한 태아의 신장과 요관의 요로상피암으로 신 적출술을 받은 34세와 64세의 신장을 대상으로 하였다.

2. 임상 소견

환자의 의무 기록을 통하여 수술 당시의 나이, 성별, 증상의 발현, 과거력, 가족력, 방사선 소견, 신장의 일측성 또는 양측성 침범 여부와 낭성 변화, 동반된 다른 요로계 기형,방광 요관 역류와 요로 감염 등을 조사하고, Potter의 낭성 신장의 분류[21]에 따라 다낭성 신 이형성인 II형과 요도폐쇄와 연관된 폐쇄성 신 이형성인 IV형으로 분류하였다.

3. 병리조직 염색

신장 조직을 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀 포매하고 4㎛의 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 광학 현미경을 통해 원시관, 중배엽 세포, 연골 화생, 그리고 주변의 신장 조직의 변화 등을 관찰하였다.

4. 면역조직화학 염색

원시관과 미분화 중간엽 실질을 보이는 가장 대표적인 파라핀 블록을 선택하여 조직을 4㎛ 두께로 절편하고 xylene으로 파라핀을 제거한 후 고농도 알코올에서 저농도 알코올에 처리하여 함수시킨 후 증류수로 세척하였다. 조직절편을 예열시킨 10 mM citrate 완충액에 담가 800W microwave에서 10분간 처리하고 실온에서 식힌 후, Tris 완충액으로 10분간 세척하고 3% 과산화수소로 15분간 처리하여 endogenous peroxidase의 작용을 차단한 후, 다시 Tris 완충액으로 10분간 세척하고 normal blocking serum으로 15분간 처리하였다. 일차항체로 1:100으로 희석한 rabbit anti-PAX-2 (Zymed, South San Francisco, CA, USA)와 mouse anti-smooth muscle actin (SMA)(Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)에 2시간 동안 반응시키고 Tris 완충액으로 10분간 세척한 다음 이차항체에 15분간 반응시킨 후, Tris 완충액으로 10분간 세척하였다. HRP-conjugated streptavidin에 15분간 반응시킨 후, Tris 완충액으로 10분간 세척하고 Nova Red substrate (SK4800; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 발색시킨 다음 Harris hematoxylin으로 10초간 대조염색을 시행하였다. 처리된 슬라이드를 저농도 알코올에서 고농도 알코올로의 탈수과정과 xylene에서의 투명과정을 거쳐 permount로 봉입하여 관찰하였다.

PAX2 면역염색의 판정은 원시관의 이형성 상피세포의 핵에 갈색으로 염색되는 것을 양성반응으로 판단하였고, 원시관을 이루고 있는 상피세포의 절반 이상에서 양성반응을 보이는 경우를 의미있게 판단하였다. 전체 원시관의 개수에서 양성반응을 보이는 원시관의 비율을 계산하여 30% 이하인 경우 1+, 30%-60%인 경우 2+, 60% 이상인 경우 3+로 판독하였다.

SMA면역조직화학 염색의 판정은 원시관을 둘러싸는 중간엽 세포의 세포질에서 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 판정하였고, 염색의 강도와 분포를 준정량적인 기준을 적용하여 세가지 군으로 나누어 염색의 강도가 약한 경우 1+, 중간 정도이거나 음성인 부분과 혼합되어 있는 경우 2+, 강한 경우 3+로 판독하였다. PAX2 면역염색의 대조군으로 태아와 성인의 정상 신장조직을 이용하였고, SMA 면역조직화학 염색은 정상적인 혈관의 평활근에서 보이는 양성반응의 강도를 대조군으로 이용하였다.

5. TUNEL 염색

자멸사 세포를 보기 위해 Apop Tag detection kit (Chemicon, CA, USA)를 사용하였다. 파라핀에 포매된 조직을 4㎛ 두께로 절편하여 xylene에서 탈파라핀을 시킨 후 고농도 알코올에서 저농도 알코올로의 염수 과정을 거쳐 증류수로 세척한 후 Tris buffer saline (TBS) 완충액으로 10분간 세척하였다. Proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 10분간 반응시킨 후, TBS 완충액으로 10분간 세척하였다. Humidified chamber에서 equilibration buffer로 처리한 후, 실온에서 10분간 두었다가 working strength TdT enzyme을 떨어뜨리고 37℃에서 90분동안 반응시키고, stop/wash 완충액에서 37℃에서 20분 동안 반응시킨 다음 1:100으로 희석한 anti-digoxigenin alkaline phosphatase (Roche Diagnostic GmbH, Penzberg, Germany)에 37℃에서 30분동안 반응시키고 TBS 완충액으로 10분간 세척하였다. NBT/BCIP (Pierce, IL, USA)로 발색하고 nuclear fast red로 대조염색 후 봉입하여 관찰하였다.

세포자멸사는 농축된 핵이 감색으로 염색되거나 염색된 핵 주위에 투명대를 갖는 것으로 판정하였다. 자멸사세포지수는 원시관을 구성하는 이형성 상피세포들 중에서 세포자멸사가 관찰되는 세포의 백분율로 정하

였으며 평균± 표준편차로 표시하였다. 대조군으로 주위의 정상적인 집합관의 상피세포의 핵에서도 같은 방법으로 자멸사세포지수를 계산하여 비교하였다. 이 때 검색하는 원시관과 집합관의 최대 개수는 10개로 하였고, 원시관의 총수가 10개가 되지 않을 경우는 모든 원시관을 구성하는 세포수에 대한 염색된 세포의 백분율을 구하였다. 원시관 주변의 미분화 실질의 세포자멸사는 400배율 시야 10군데에서 보이는 자멸사 세포의 합으로 표시하였다.

6. Trichrome 염색

조직 슬라이드에 Masson's trichrome 염색을 시행하였다. 파라핀에 포매된 조직을 4m 두께로 절편하고 xylene에서 파라핀을 제거한 후 고농도 알코올에서 저농도 알코올로 점차적으로 처리하여 함수시킨 후 증류수로 세척하였다. 부앙용액(Bouin’s solution)에 넣어 56℃에서 1시간 동안 반응시키고 흐르는 물에 수세하고 증류수에 10분간 담가둔 후, Weigert iron hematoxylin과 acid fuchsin solution에 각 각 10분간 염색하고 같은 방법으로 세척하였다. Phosphomolybdic acid 용액에 5분간 담가둔 후, 증류수에 수세하고 light green 용액에 10분간 담가두었다 수세한 후, 저농도 알코올에서 고농도 알코올의 탈수과정과 xylene에서의 투명과정을 거쳐 permount로 봉입하여 관찰하였다.

Trichrome 염색은 원시관을 둘러싸는 중간엽 세포의 세포질에서 푸른색으로 염색되는 것을 양성으로 판정하였고, 염색의 강도와 분포를 준정량적으로 나누어 염색의 강도가 약한 경우 1+, 중간 정도이거나 음성인 부분과 혼합되어 있는 경우 2+, 강한 경우 3+로 판독하였다.

7. 통계학적 분석

통계학적 검증은 SPSS for Window (Version 10.0)을 사용하였다. 성인군과 소아군 사이의 PAX2와 SMA의 발현 양상의 차이를 비교하기 위해서는 Chi-square test를 이용하였고 세포자멸사지수를 비교하기 위해서는 Mann-Whitney test를 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 임상 소견

총 30명의 신적출술 당시 연령은 5개월부터 55세였으며 평균은 14.32세였다. 연령별로는 1세 미만이 3예, 10세 미만이 14예, 10대가 3예, 20대가 4예, 30대가 2예, 40대가 3예, 50대가 1예로 소아군이 20예(66.7%)이고 성인군이 10예(33.3%)였다. 성별은 남성이 16명(53.3%), 여성이 14명(46.7%)였다. 이형성을 보인 신장의 위치는 오른쪽이 15예(50%), 왼쪽이 13예(43.3%), 양쪽이 2예(6.7%)였다. Potter의 분류에 따른 유형별로는 제 II형인 다낭성 신 이형성증이 10예(33.3%), 제 IV형인 폐쇄성 신 이형성증이 20예(66.7%)였다. 다낭성 신 이형성증에서는 7예(77.7%)가, 폐쇄성 신 이형성증에서는 13예(61.9%)가 소아군에 해당하였다. 소아군의 대부분은 산전 초음파에서 수신증등의 신장의 이상이 발견된 경우로 14예(70%)였고, 나머지는 1세 이전에 배뇨곤란, 요로계 감염등의 증상으로 처음 발견되었다. 성인군에서는 1세 때 진단된 1예를 제외하고 대부분 특별한 증상 없이 지내다가 성인이 된 이후 요로계 감염이나 점차적인 신기능 이상으로 나타났다. 하부 요로계 이상을 동반하고 있는 경우는 18예 (60%)로 두 군에 고르게 분포하였다. 요방광 역류는 7예(23.3%), 물요관증이나 거대요관이 7예(23.3%), 요관 신우 협착이나 폐쇄가 6예(20%)에서 동반되어 있었고, 중복신우와 중복요관이 6예(20%), 이소성 신장이 3예(15%)였다. 소아 환자군에서는 이소성 요관이 질벽등의 이상 부위에서 개구하는 예가 4예(20%), 다른 장기의 기형으로 심방중격 결손이 1(5%), 항문막힘증과 Meckel 게실이 1예(5%)에서 발견되었다. Potter 분류에 따른 임상 양상을 비교해 보면 제 II형에서는 5(56%)에서 요관 및 방광의 기형을 동반하였고 1예(11%)에서 심장 기형을 보였으며 요로의 폐쇄로 인한 요관방광역류는 1예에서만 동반되었다.

제 IV형에서는 12예(62%)에서 요도의 협착, 폐쇄, 역류등과 동반된 요로의 폐쇄가 발견되었고 4예(20%)에서 요로계의 기형을 동반하였다(표 1).

표 1. 신 이형성증 환자들의 임상 소견

증례	나이 (세)	성별	Potter분류	이형성신장의 위치	진단 시기	동반된 요로계 이상과 기형
1	0.4	남	IV	왼쪽	생후 2개월	요방광 역류, 물요관증
2	0.5	여	IV	왼쪽	출생전	신우요관 폐쇄
3	0.5	남	II	오른쪽	출생전	신우요관 폐쇄, 심방중격결손
4	0.9	여	II	오른쪽(이소성)	출생전	이소성 신장, 요도개구 이상
5	1	여	II	오른쪽	출생전	신우요관 폐쇄
6	1	남	IV	왼쪽	출생전	무
7	1	남	II	오른쪽	출생전	요맹관
8	1	남	IV	오른쪽	출생전	물요관증
9	2	여	II	오른쪽	출생전	무
10	4	여	IV	오른쪽	미상	중복신우요관, 신우요관폐쇄
11	4	여	IV	오른쪽(이소성)	1세	중복신우요관, 신우요관폐쇄
12	4	여	IV	왼쪽	출생전	무
13	4	남	IV	왼쪽	출생전	요방광 역류, 항문막힘증
14	4	여	IV	오른쪽	미상	무
15	4	남	II	오른쪽	출생전	신우요관 폐쇄
16	5	여	IV	왼쪽(이소성)	생후 3개월	이소성 신장, 중복 요관
17	8	남	IV	왼쪽	출생전	요방광 역류
18	11	여	II	양쪽	7세	요방광 역류, 수신증
19	12	여	IV	오른쪽	12세	무
20	12	남	IV	오른쪽	출생전	요관방광 협착
21	20	남	IV	오른쪽	19세	물요관증
22	24	남	IV	왼쪽	23세	물요관증
23	24	남	IV	양쪽	22세	요방광 역류, 수신증
24	26	남	II	오른쪽	20세	거대요관
25	32	남	IV	왼쪽	31세	요방광 역류
26	34	남	II	왼쪽	미상	무
27	41	여	IV	왼쪽	1세	요방광 역류, 이소성 요관
28	43	여	IV	왼쪽	43세	중복신우, 중복요관
29	49	여	II	왼쪽	48세	무
30	55	남	IV	오른쪽	미상	무

2. 육안 및 조직 소견

이형성 신장은 육안으로 13예(61.9%)에서 뚜렷한 낭성 변화를 동반하고 있었다. 신 이형성증을 Potter 분류에 따라 분류하면 10예(33.3%)는 Potter 분류의 제 2형인 다낭성 신 이형성증이었으며 20예(66.7%)는 제 4형 폐쇄성 신 이형성증이었다(그림 1). 6예(20%)에서는 정상적인 겉질(cortex)이 관찰되지 않았다. 모든 예에서 신 이형성증의 진단에 필수적인 원시관과 그 주변을 둘러싸는 미분화 실질이 다양한 크기와 분포를 보이며 관찰되었다. 원시관은 단층의 입방상피세포나 중층의 원주상피세포로 피복되어 있으며 원시관 주위로 미분화 방추세포가 소용돌이 치는 모양으로 둘러싸고 있다. 화생 연골을 형성한 예는 12예(40%)로 특이하게 모두 소아군이었다. 원시관과 미분화 실질이 분포하고 있는 위치는 속질이 19예(63.3%), 겉질이 3예(10%), 양쪽에 모두 위치한 경우가 8예(27.7%)였고, 7예(23.3%)에서는 신우신염이 동반되어 있었다(그림 2). Potter 분류에 따라 비교해 보면 제 2형에서는 7예(70%)에서 이형성을 보이는 부위가 속질에만 국한되어 있었고, 제 4형에서는 11예(55%)에서 이형성이 속질에반 국한되어 있었다. 제 2형의 모든 예에서는 정상적인 겉질의 조직이 남아 있는 반면, 제 4형에서는 5예(24%)에서 정상적인 겉질 조직이 발견되지 않았다.

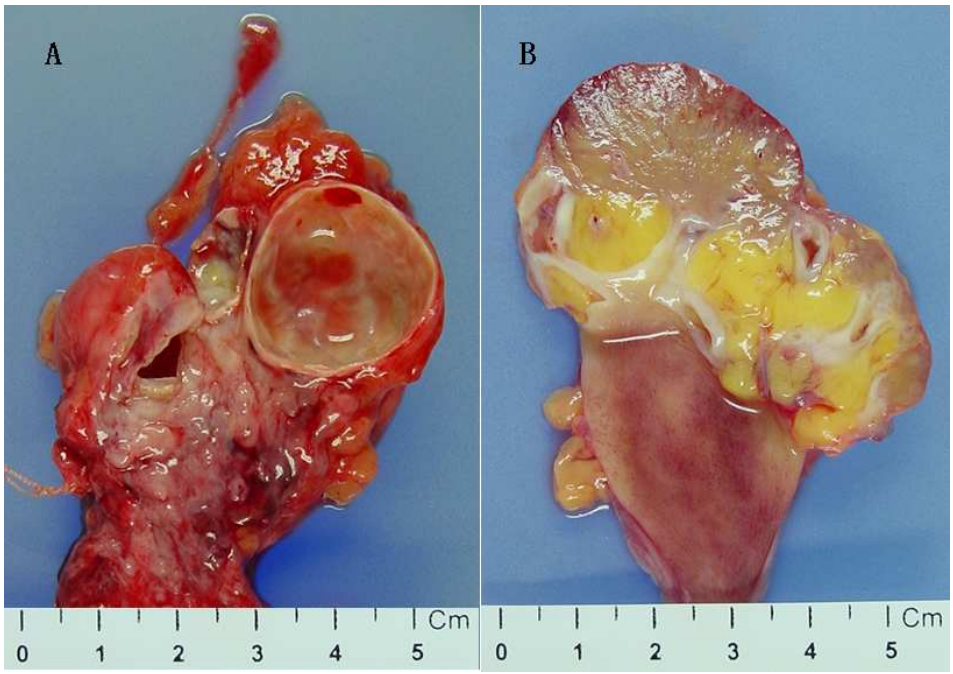

그림 1. 신 이형성증의 육안 소견. (A) Potter 제 II형 다낭성 신 이형성증을 보이는 11개월 여아의 신장단면사진으로 다양한 크기의 불규칙한 낭성변화를 보이며 정상적인 신장의 실질과 요관은 관찰되지 않는다. (B) Potter 제 IV형 폐쇄성 신 이형성증을 보이는 32세 남자의 신장 단면사진으로 요관폐쇄로 인한 신우와 요관의 확장이 보이고 신장의 실질은 겉질과 속질의 구분이 없고 위축이 동반되어 있다.

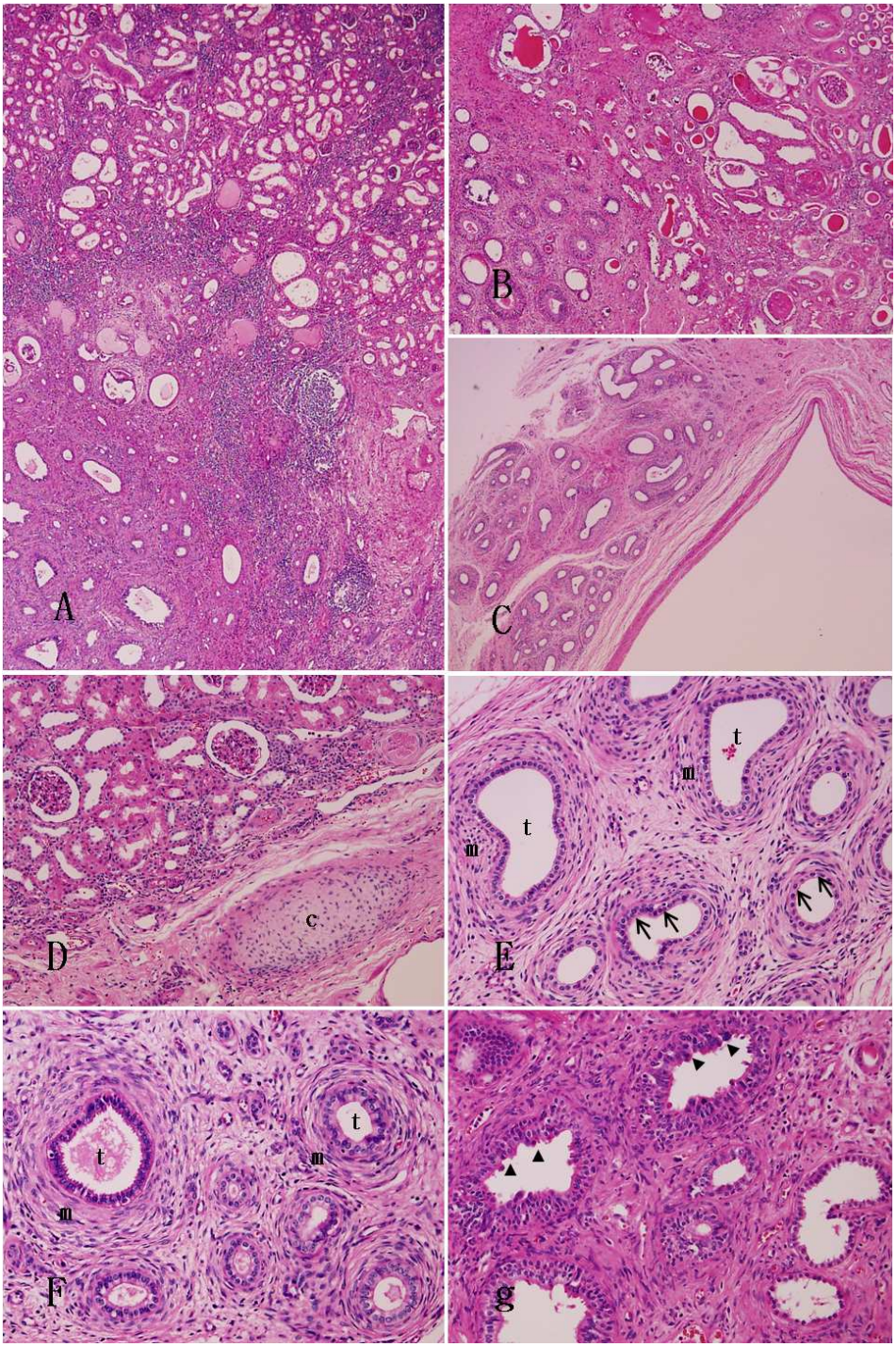
A
B
C
D
c
E
t
m
t
m
F
t
t
m
m
g

그림 2. 신 이형성증의 조직소견. (A) 겉질 부분의 정상적인 신장 조직이 보이고 속질에 원시관들이 형성된 부위(왼쪽 아래쪽)가 관찰된다(H-E, 40배). (B) 미성숙한 사구체와 세뇨관등으로 이루어진 무질서한 신장의 엽구성과 함께 원시관들이 형성된 부위(왼쪽 아래쪽)가 관찰된다(H-E, 40배). (C) Potter 제 II형 신 이형성증에서 낭성 변화를 보이고 주변 실질에 원시관들이 형성된 부분이 관찰된다 (H-E, 40배). (D) 성숙한 사구체와 세뇨관들 주변으로 화생 연골(c)이 형성되어 있다(H-E, 100배).(E,F & G) 원시관들(t)은 한층의 입방형 상피세포(화살표)나 중층의 원주상피(화살표 머리)로 이루어져 있으며 원시관 주위로 중간엽 방추세포들(m)이 소용돌이치는 모양으로 둘러싸고 있다(HE, 200배).

3. PAX2의 발현 및 세포자멸사지수

가. PAX2의 발현

(1) 정상 신장에서의 PAX2 발현

태아의 신장에서 PAX2는 피막밑 신장발생 구역에 국한되어 강한 발현을 보였고 중심부로 성숙되면서 발현이 뚜렷이 감소하였다. S자형 신장발생 소포의 상피에서 PAX2의 강한 발현을 보였고 미성숙 사구체의 벽세포에서 낮은 강도로 발현이 유지되었으며 성숙한 발세포에서는 발현되지 않았다. 속질로 가면서 원위관과 집합관의 상피에서는 다소 증가된 강도로 발현되었다(그림 3). 성인의 신장에서는 보우만 주머니의 벽쪽 상피세포와 원위관과 집합관의 핵에서 다양한 강도로 발현되었고 사구체, 발세포, 근위관, 혈관, 사이질 세포등에서는 발현되지 않았다(그림 4).

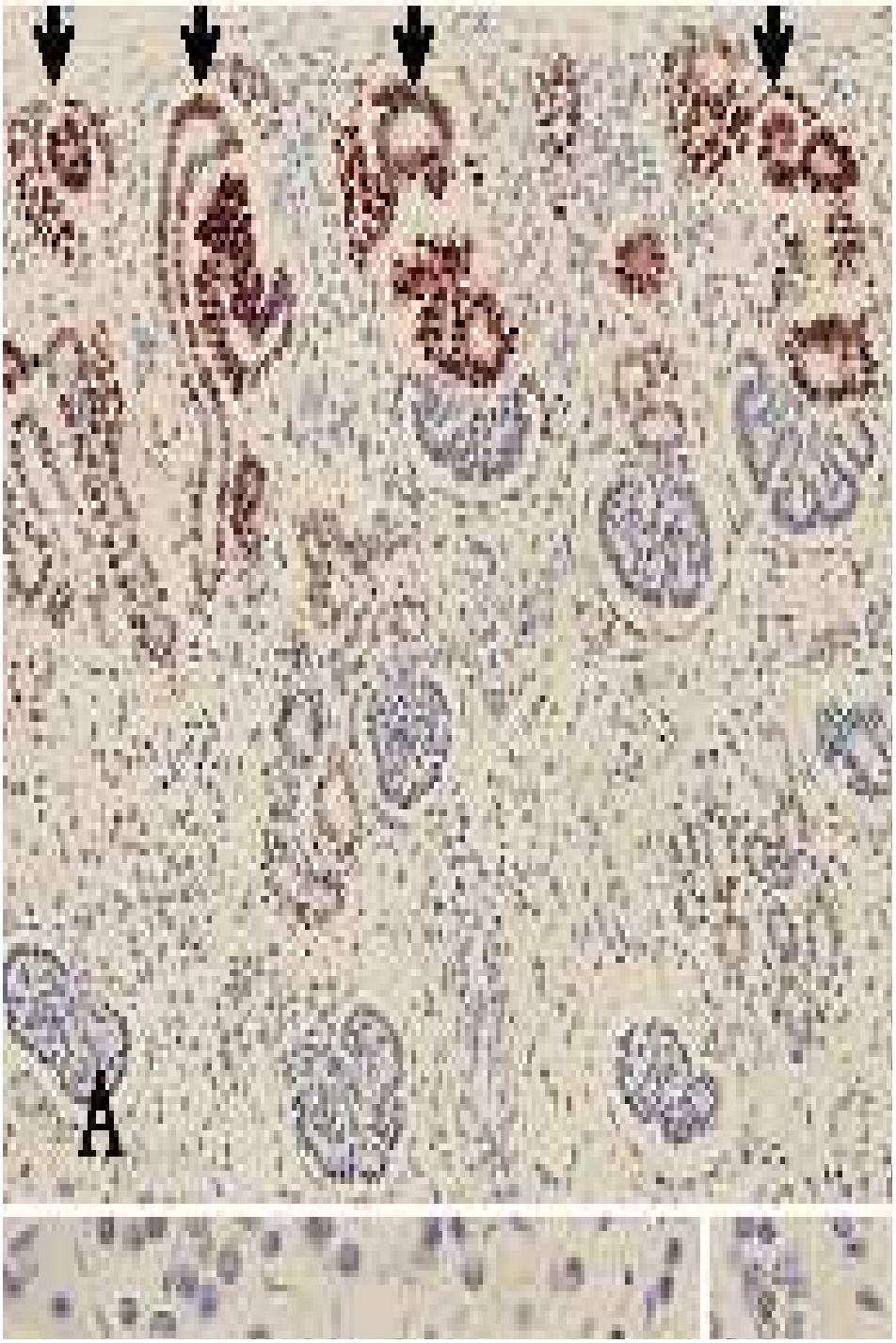
A

그림 3. 정상 태아 신장의 PAX2 면역조직화학 염색소견. (A, B, C, D & E: 제태기 24주 태아의 신장, F, G, H, I & J: 제태기 30주 태아 신장) 피막밑 신장발생 구역의 S자형 신장발생 소포의 상피의 핵에서 PAX2의 강한 발현을 보이고(화살표 머리) 중심부로 성숙되면서 PAX2의 발현이 감소한다 (A, B, F & G). 사구체(g)의 벽세포에서 낮은 강도로 PAX2의 발현이 유지되고 성숙한 발세포에서는 발현되지 않는다(C & H). 속질에서는 원위관(d)과 집합관(c)의 상피(화살표)에서 PAX2의 발현이 낮은 강도로 나타나고 근위관에서는 발현되지 않는다(D, E, I & J).(A, F: 100배, B, G: 200배, C, D, E, H, I, G: 400배)

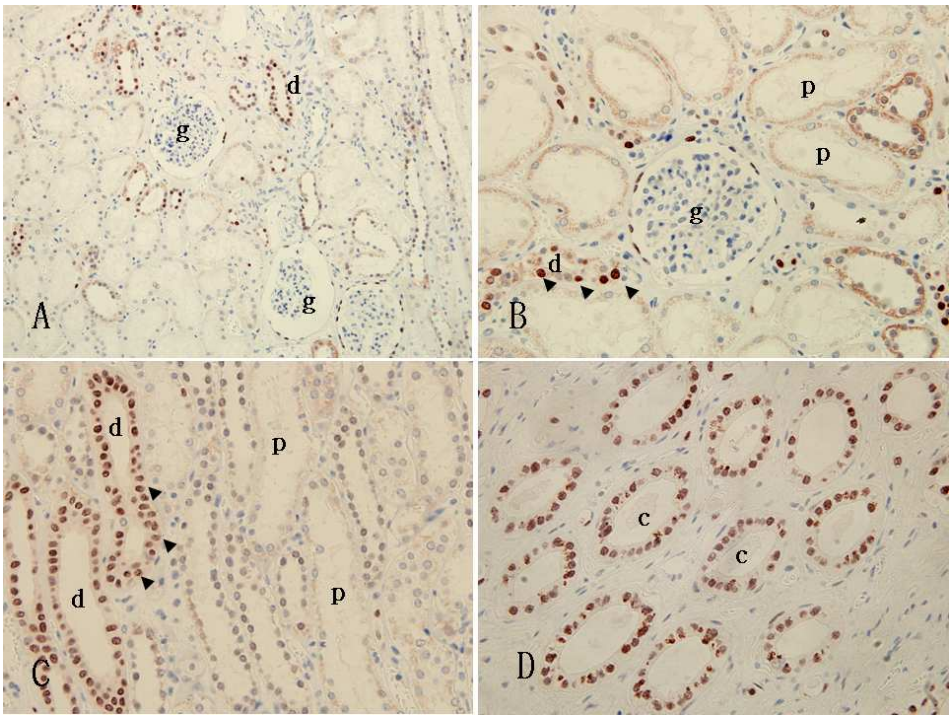

그림 4. 정상 성인 신장의 PAX2 면역조직화학 염색소견.(A, B) 겉질에서는 보우만 주머니의 벽세포와 원위관(d) 상피세포의 핵에서 PAX2의 발현이 나타나고(화살표 머리) 사구체(g)와 근위관(p)에서는 발현되지 않는다. (C, D) 속질에서는 원위관(d)과 집합관(c)의 상피세포의 핵에서 강한 발현을 보인다.(A: 100배, B, C, & D: 400배)

(2) 이형성 신장에서의 PAX2 발현

이형성을 보이는 부분에서 PAX2는 원시관을 이루는 상피세포의 핵에서 강하게 발현되었고 주변의 중간엽 세포에서는 관찰되지 않았다. 이러한 PAX2의 발현을 정량적인 기준으로 세 등급으로 나누어 보았을 때, 소아군에서는 원시관 상피세포의 핵 대부분에서 3+ 강도의 강한 PAX2의 발현을 보였고, 성인군에서는 원시관을 구성하는 상피세포의 절반 이상에서 PAX2에 음성이거나 약한 염색을 보이는 2+ 강도의 PAX2 발현이 자주 관찰되었다. 통계학적으로도 성인군이 소아군에 비해 PAX2 발현의 유의한 감소를 보였다(p=0.007)(그림5, 표2). 그 외에 원시관이 낭성 변화를 보이면서 납작해지는 부위에서 PAX2의 발현이 감소되는 경향을 보였다.

이형성을 보이지 않는 주변의 정상 신장 조직에서 PAX2의 발현 양상은 정상 대조군에서와 비슷하게 보우만 주머니의 벽쪽 상피세포와 원위관과 집합관의 핵에서 발현되었고 사구체 발세포, 근위관, 혈관, 사이질 세포에서는 거의 발현되지 않거나 부분적으로 약한 강도의 양성반응을 보였다. 이 중 7예(23%)에서는 국소적으로 사구체의 발세포에서 PAX2의 발현을 보이는 부위가 관찰되었다. 신장 구조의 부위에 따라 PAX2 면역조직화학염색의 강도 차이를 나타냈는데, 신장의 다른 부위에서 보다 근위관과 집합관에서 강한 발현을 보이는 경향이 공통적으로 나타났다(그림 6, 표 2). 특히 집합관에서의 발현 강도는 성인군이 소아군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다(p=0.004)(그림 6, 7, 표 3). 그 외에 사구체의 발세포, 보우만 주머니의 벽세포, 근위관, 원위관등 다른 부위에서는 소아군과 성인군 사이의 유의한 차이는 없었다.

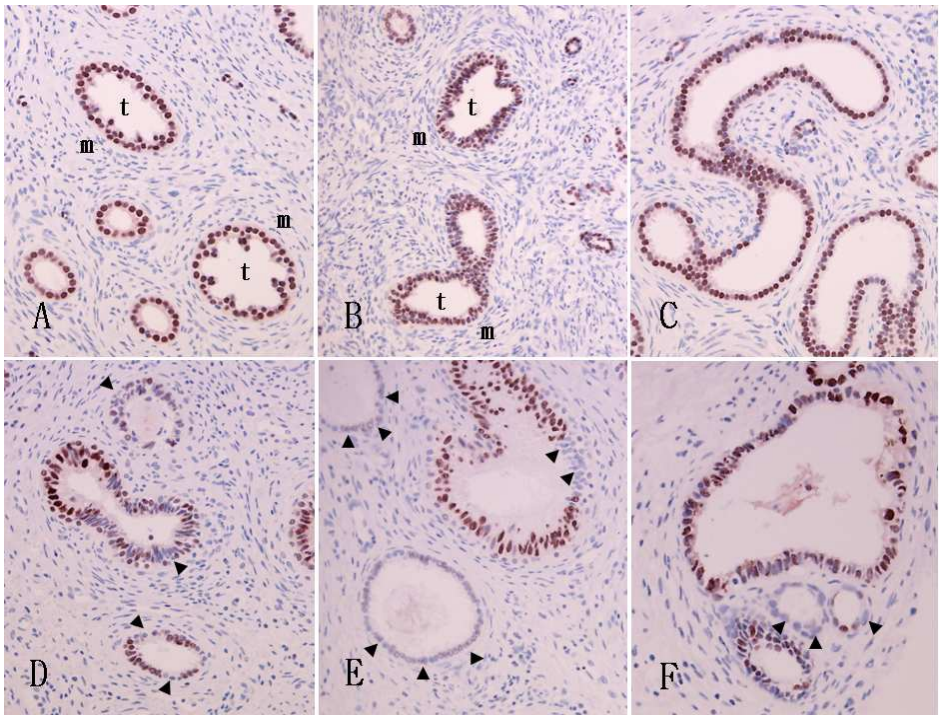

그림 5. 신 이형성증에서 원시관의 PAX2 면역조직화학 염색소견(200배). (A, B, & C) 소아군에서는 원시관(t) 상피세포의 핵 대부분에서 3+ 강도의 강한 PAX2의 발현을 보인다. (D, E, & F) 성인군에서는 원시관을 구성하는 상피세포의 절반 이상에서 PAX2에 음성이거나(화살표 머리) 약한 염색을 보이는 2+ 강도의 PAX2 발현이 자주 관찰된다. 원시관을 둘러싸는 미분화 중배엽 세포(m)에서는 PAX2가 발현되지 않는다.

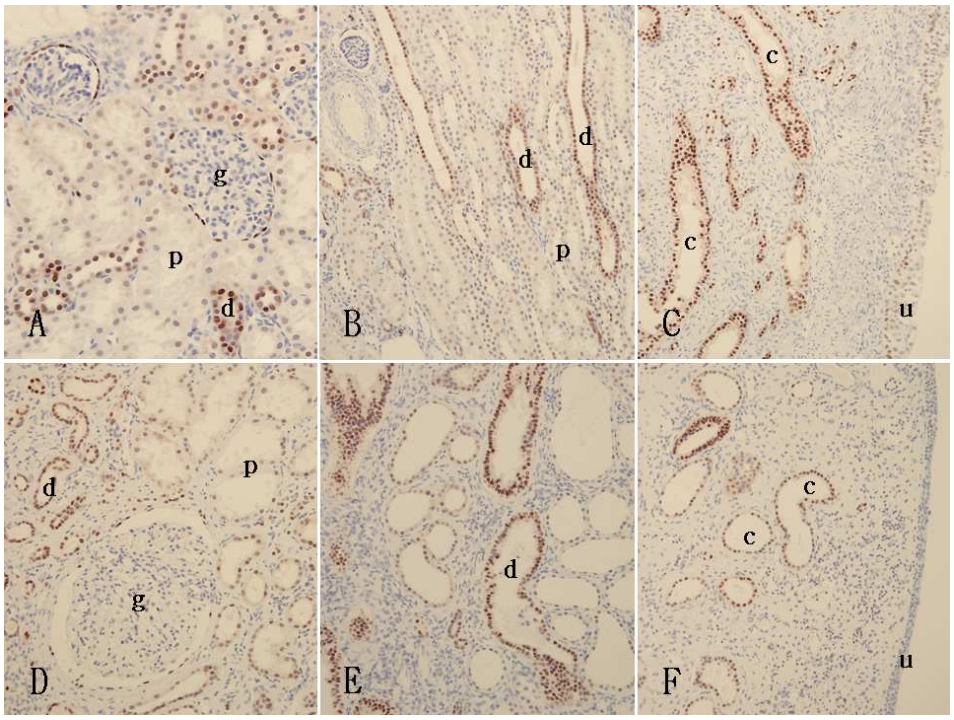

그림 6. 신 이형성증의 주변 정상 신장조직에서의 PAX2 면역조직화학 염색소견 (A, B, & C : 소아, D, E, & F : 성인). (A & D) 소아와 성인에서 모두 겉질에서는 보우만 주머니의 벽세포와 원위관(d) 상피세포의 핵에서 PAX2의 발현이 나타나고 사구체(g)와 근위관(p)에서는 발현되지 않는다. (B, C, E, & F) 속질에서는 원위관(d)과 집합관(c)의 상피세포의 핵에서 강한 발현을 보이고 신배와 신우의 요로상피(u)에서는 발현되지 않는다. (A, D: 200배, B, C, E & F: 100배)

표 2. 신장의 부위에 따른 PAX2의 면역조직화학 염색 소견

증례	나이 (세)	신 이형성증		사구체		세뇨관		
		원시관 상피	중간엽 세포	사구체 발세포	보우만 주머니 벽세포	근위관	원위관	집합관
1	0.4	3+	0	0	2+	−	−	−
2	0.5	2+	0	0	1+	1+	2+	3+
3	0.5	3+	0	0	2+	1+	2+	3+
4	0.9	3+	0	0	2+	0	2+	
5	1	2+	0	0	1+	0	2+	−
6	1	3+	0	−	−	−	−	−
7	1	3+	0	1+	2+	1+	2+	3+
8	1	2+	0	0	2+	0	2+	3+
9	2	3+	0	1+	1+	1+	2+	3+
10	4	3+	0	0	2+	1+	2+	3+
11	4	3+	0	0	2+	1+	2+	2+
12	4	3+	0	0	2+	1+	3+	3+
13	4	2+	0	0	1+	0	2+	2+
14	4	3+	0	0	2+	1+	3+	3+
15	4	2+	0	−	−	−	−	−
16	5	3+	0	0	2+	1+	3+	3+
17	8	2+	0	−	−	1+	3+	−
18	11	3+	0	1+	2+	1+	2+	3+
19	12	2+	0	−	−	−	−	−
20	12	3+	0	0	1+	1+	2+	3+
21	20	2+	0	1+	1+	0	2+	2+
22	24	2+	0	−	−	−	−	−
23	24	1+	0	1+	1+	0	2+	2+
24	26	2+	0	−	−	−	−	−
25	32	2+	0	1+	2+	1+	2+	3+
26	34	2+	0	0	1+	0	2+	−
27	41	2+	0	−	−	−	−	−
28	43	2+	0	0	2+	1+	2+	2+
29	49	3+	0	0	2+	1+	2+	3+
30	55	2+	0	1+	2+	1+	2+	2+

0: 관찰할 신장구조가 없는 경우, **−**: PAX2 면역염색에 음성인 경우, **1+**: 양성반응을 보이는 세포가 30% 미만이거나 염색의 강도가 약한 경우, **2+**: 30%−60%의 세포에서 양성반응을 보이는 경우, **3+**: 60%이상에서 강한 양성반응을 보이는 경우

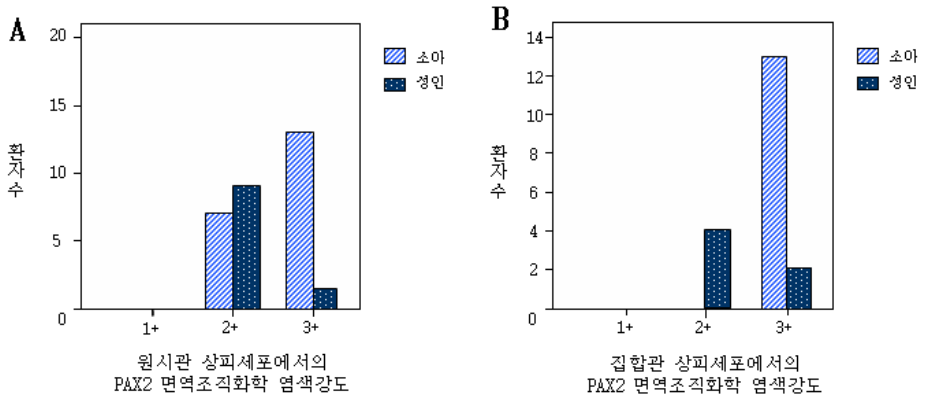

그림 7. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 원시관(A)과 집합관(B) 상피세포의 PAX2 면역조직화학 염색의 비교. 소아군의 원시관과 집합관 상피세포에서 강한 PAX2 면역조직화학 염색소견을 보이는 예가 성인군에서 보다 더 많이 관찰된다.

표 3. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 원시관과 집합관 상피세포의 PAX2 면역조직화학 염색의 비교

	소아 (n=20)				성인 (n=10)				p 값
PAX2 발현강도	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+	
원시관	0	0	7	13	0	0	9	1	0.007
집합관	7	0	0	13	4	0	4	2	0.004

나. 세포자멸사지수

원시관 상피세포의 세포자멸사지수는 0.13± 0.41로 주위의 정상적인 집합관 상피세포와 비교하였을때 유의한 증가를 보였다(p=0.000). 소아군에서 원시관 상피세포의 세포자멸사지수는 0.07± 0.15, 성인군에서는 0.24± 0.68로 성인군에서 더 높은 세포자멸사지수를 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다(p=0.882). 중간엽 세포에서는 소아군이 11.70± 15.73/10HPF, 성인군이 5.90± 11.21/10HPF로 원시관 상피세포에서와는 달리 소아군에서 더 높은 세포자멸사지수를 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다(p=0.207). PAX2의 면역조직화학 염색강도에 따른 세포고사지수를 비교하였을 때 원시관 상피세포 (p=0.879)와 중간엽 세포(p=0.7639)에서 모두 PAX2의 발현 강도와 세포자멸사 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다(표 4). 특이하게 원시관의 상피세포에서보다 주변의 중간엽 세포에서 더 활발한 세포자멸사를 보이는 예가 많았다(그림 8).

표 4. 신 이형성증에서 원시관 상피세포와 미분화 중간엽 실질의 세포자멸사지수

	소아 (n=20)	성인 (n=10)	p 값
원시관 상피	0.07± 0.15	0.24± 0.68	0.882
중간엽 세포	11.70± 15.73/10HPF	5.90± 11.21/10HPF	0.207

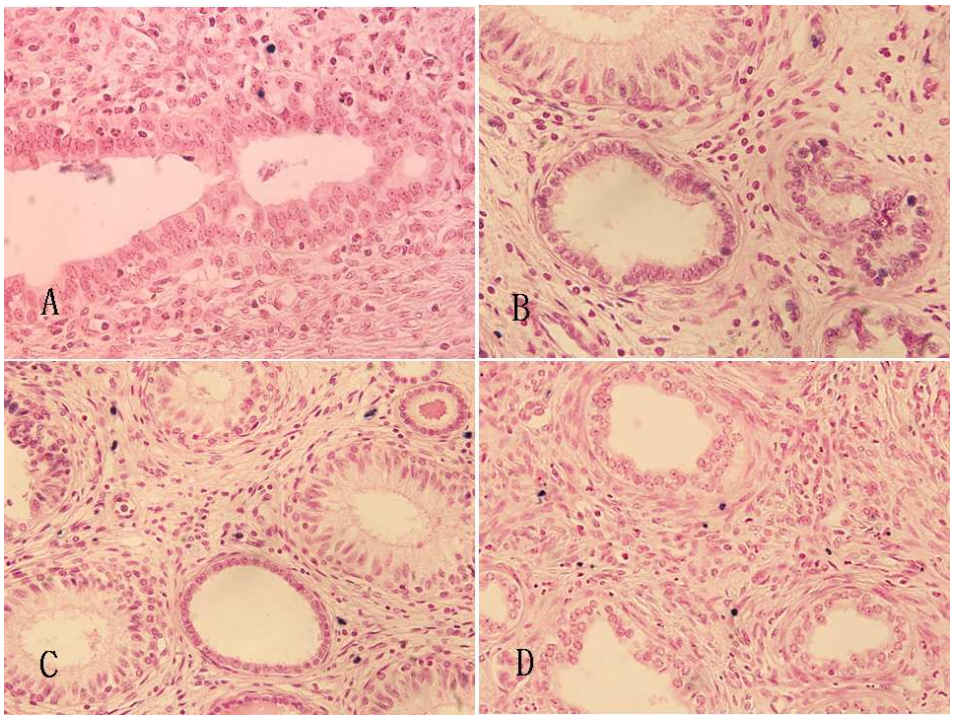

그림 8. 신 이형성증의 원시관(A, B)과 주변 미분화 중간엽 실질(C, D)의 세포자멸사 (400배)

4. 원시관 주변의 중간엽 세포에서 smooth muscle actin과 trichrome의 염색 양상

원시관을 둘러 싸고 있는 중간엽 세포는 대부분 SMA 면역조직화학 염색에 양성반응을 보여 평활근의 분화를 보였다. 염색의 강도와 분포를 반정량적 기준으로 보았을 때 성인군보다 소아군에서 더 강하게 발현되는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다(p=0.135)(그림 9).

Trichrome 염색에서는 모든 예에서 원시관을 둘러싸는 중간엽 세포에 다양한 강도와 분포를 보이며 염색되었으며 SMA와 마찬가지로 소아군에서 성인군에서보다 더 강하게 염색되는 경향을 보였으나 의의있는 차이는 없었다(p=0.110)(그림 10).

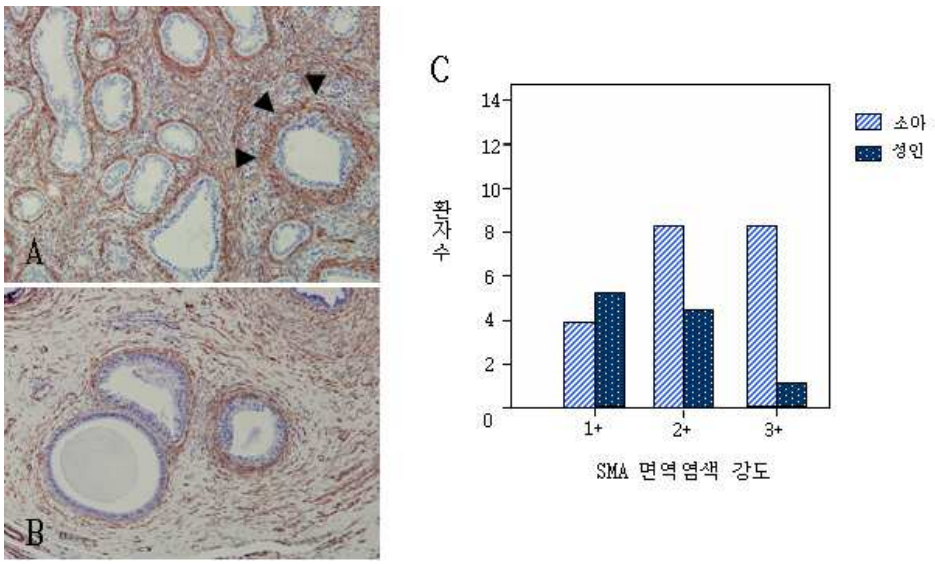

그림 9. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 미분화 중간엽 실질의 smooth muscle actin 면역조직화학 염색의 비교(200배). (A) 소아 환자의 원시관 주변의 미분화 실질에서 3+ 강도의 SMA 양성 반응을 보이고(화살표 머리), (B) 성인 환자에서는 2+ 강도의 양성반응을 보이고 있다. (C) 소아 환자군에서 성인 환자군에서 보다 강한 SMA 양성반응이 나타나는 경우가 더 많은 경향을 보인다.

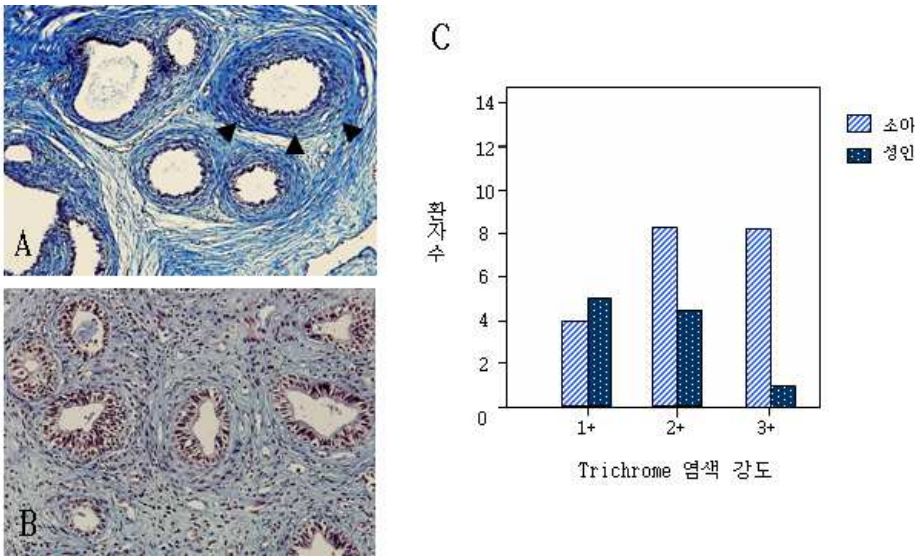

그림 10. 신 이형성증 환자의 소아군과 성인군에서 미분화 중간엽 실질의 trichrome 염색의 비교(200배). (A) 소아 환자의 원시관 주변의 미분화 실질에서 3+ 강도의 trichrome 염색을 보이고(화살표 머리), (B) 성인 환자에서는 1+ 강도의 염색을 보이고 있다. (C) 소아 환자군에서 성인 환자군에서 보다 강한 trichrome 염색소견을 보이는 증례가 더 많은 분포를 보인다.

Ⅳ. 고 찰

PAX2는 정상적인 신장의 발생에서 볼프관(Wolffian duct)에서 나타나기 시작하여 후신의 요관싹과 그 유도체에서 발현하고 요관싹의 팽대부에서 가장 강하게 나타난다. 후신발생모체에서는 발현하지 않으며 신장 소포(renal vesicle), 콤마형 신장발생 소포(comma-shape bodies), S자형 신장발생 소포(S-shape bodies)와 발달하는 신장단위에서 나타난다. S자형 신장발생 소포 단계에서 발세포의 전구체로부터 점차적으로 사라지고 이후의 단계에서는 더 이상 발현되지 않으며 출생 후에는 집합관에서 발현이 지속된다.[21-23] 성인이 된 후에 PAX2는 거의 발현되지 않으며 일부의 신 종양과 낭종성 질환의 증식하는 세포와 신독성 손상 후 재생하는 세포에서 강하게 발현됨이 보고되었다[24]. 본 연구에서 대조군으로 사용된 정상 태아의 신장에서는 앞서 이루어진 연구들에서와 비슷하게 주로 발생하는 신장단위와 집합관에서 PAX2의 발현을 보였고, 정상 성인의 신장에서는 주로 집합관에서 강한 PAX2의 발현을 보였다. 그러나 이전의 문헌들에서 기술된 바와는 다르게 태아와 성인의 신장에서 모두 보우만 주머니의 벽세포와 원위관에서도 PAX2의 약한 발현이 유지되는 소견을 보였고, 특히 원위관에서는 집합관에서와 같이 강한 강도의 PAX2 면역조직화학 염색 소견을 보였다.

신 이형성증에서 PAX2는 원시관의 상피세포에서 강하게 발현되며 원시관을 둘러싸고 있는 미분화 중간엽 세포에서는 발현되지 않는다는 것이 여러 연구들을 통해 분명하게 밝혀져있다[18, 21, 25, 26]. 본 연구에서 PAX2 면역조직화학 염색을 시행한 결과도 이와 동일하게 모든 증례의 원시관 상피세포에서 PAX2의 강한 발현이 관찰되었고 주변의 중간엽 세포들이나 화생 연골에서 PAX2 면역반응을 보이는 예는 없었다. Winyard등이 신 이형성증을 제태기와 출생 후로 나누어 비교한 연구에서는 제태기의 신 이형성증 10예와 성인 2예를 포함한 출생 후 신 이형성증 12예에서 PAX2 발현 양상을 비교한 바 있다. 그들은 이 연구에서

정상적인 신장의 발생에서는 성숙과정을 통해 세포의 증식과 PAX2의 발현이 감소하는데 반해 이형성을 보이는 원시관에서는 출생 전과 출생 후에서 모두 높은 증식율과 강한 PAX2발현을 나타낸다고 보고하였다[18]. 본 연구에서도 성인 신 이형성증 환자군의 원시관의 상피에서 PAX2의 발현은 지속되었으나 그 발현 강도는 소아 환자군에서 보다 유의하게 감소되었다(p=0.007). 또한 이형성이 없는 집합관 상피세포에서도 PAX2 발현 정도가 성인에서 소아보다 감소하여, 성장과 함께 PAX2의 발현 정도가 전반적으로 감소하는 것으로 추정하였다(p=0.004).

신 이형성증에 대한 연구들은 대부분 동물실험과 제태기의 신장발생단계에 중점을 두고 이루어졌기 때문에 상대적으로 성인 신 이형성증에 대한 보고는 드문 편이다. 국내에서 보고된 증례들도 대부분 소아에 치중되어 있는데, 현재까지 보고된 총 35예[27-35] 가운데, 30예가 태아나 소아였고 5예만이 성인이었다. 본 연구에서는 신 이형성증 30예 중 10예가 성인으로 단일 국내 연구로는 가장 많은 성인군을 포함하고 있다. 신 이형성증의 성인군을 소아군과 비교하였을 때 성별의 분포나 Potter 분류에 의한 차이는 보이지 않았다. 임상적으로 소아 환자들은 대부분 산전초음파에서 수신증으로 발견되는 경우가 대부분이었고 성인 환자들은 특별한 증상이 없이 지내다가 반복되는 요로계 감염이나 점차적인 신기능 저하로 발견되는 차이를 보였고, 소아군이 성인군보다 다양한 비뇨 생식기계의 기형을 동반하는 경향을 보였다. 이는 산전초음파로 점점 출생 전에 신 이형성증이 진단되는 예가 늘어났고, 성인 환자군은 이형성 정도나 동반 요로계 기형이 심하지 않아 소아기에 발견되지 않은 결과일 것으로 추정된다. 조직 소견에서는 두 환자군에서에서 동일하게 원시관과 미분화 중간엽 세포들이 다양한 분포를 보이며 관찰되었고, 연골 화생을 보이는 12예(40%)는 특이하게 모두 소아 환자들이었다. Potter 분류에 따른 임상 양상을 비교해 보면 제 2형보다 제 4형에서 요로의 폐쇄로 인한 요관방광역류가 흔히

동반되었고 이형성을 보이는 부분이 겉질에서도 관찰되는 예가 더 많았으며 정상적인 겉질 조직이 보이지 않는 예도 더 많았다. 그러나 Potter분류에 따라 PAX2의 발현 양상과 세포자멸사지수에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

PAX2 변이 쥐에 대한 연구들을 통해서 세포자멸사의 양과 위치는 요로상피에서의 PAX2 발현양상과 잘 연관되어 알려져 있다. Porteous등은 PAX2 변이 쥐의 신 저형성증이 발달과정에서 신장단위 유도 비율이 감소되며 요관싹의 끝부분에 있는초기 상피구조와 사구체의 수가 감소되는 것이 과도한 세포자멸사와 연관이 있음을 알아냈다. 반면 세포의 증식 속도에는 정상 쥐와 비교하였을 때 차이를 보이지 않아 증가된 세포자멸사가 PAX2 변이 쥐에서 신 저형성증의 주요 원인임을 주장하였다[17]. Torban등은 신장의 정상 발생과정에서도 세포자멸사가 일어나지만 PAX2 변이 쥐의 집합관에서 보통의 쥐에서보다 9배 많은 세포자멸사가 나타나며 이는 퇴화를 진행시켜 볼프관이 꼬리쪽으로 연장되는 것을 방해함을 발견하였다[36]. 반면 중간엽에서 유래한 구조에서는 PAX2가 발현되더라도 세포자멸사가 일어나지 않는데, 이러한 현상을 Eccles등은 중간엽 구조에서는 PAX8이 함께 발현하여 PAX2의 변이가 있더라도 보완이 가능하기 때문이라고 설명하였다[22]. 그러나 Winyard등이 시행한 사람에서의 신 이형성증에 대한 연구에서는 앞의 연구 결과와는 달리 이형성 상피에서는 세포자멸사가 드물게 나타나고 오히려 원시관 주변의 미분화 세포에서 세포자멸사가 뚜렷함을 보고하였다. 그들은 세포의 자멸사가 일어나지 못하게 막는 기능을 하는 BCL-2가 정상 신장의 발생에서는 요관싹과 그 유도체인 팽대부나 집합관에서 나타나지 않지만 신 이형성증에서는 PAX2의 발현 양상과 비슷하게 원시관 상피의 세포질에서 발현되며 원시관 주변의 미분화 중간엽 조직에서는 BCL-2가 발현되지 않은 소견을 관찰하였고, 그 결과 원시관보다 주변의 미분화 실질에서 PAX2에 의한 분화가 일어나지 않고, BCL-2에 의해 유지되는 생존의 실패로 초래된 퇴행의 과정으로 설명하였다[18]. 본 연구에서

는 원시관의 이형성 상피와 주변의 미분화 중간엽 세포에서 모두 세포자멸사가 관찰되었으며 Winyard의 연구 결과와 같이 원시관보다 주변의 중간엽 세포에서 더 활발한 세포자멸사가 나타남을 볼 수 있었다.

신 이형성증 환자가 출생 후 성인이 될 때까지 원시관을 둘러싸고 있는 미분화 중간엽 세포는 PAX2의 발현을 보이지 않으며 도중에 사멸하거나 평활근의 표현형을 보이는 화생을 일으키게 된다[37]. 본 연구에서도 모든 예에서 원시관을 둘러싸는 중간엽 기질세포에서 SMA 면역염색에서 평활근의 분화를 보였으며 trichrome에도 다양한 정도로 염색되어 섬유근육조직으로 분화된 것을 알 수 있었다. 연령이 증가함에 따라 SMA와 trichrome에서 모두 염색되는 강도가 감소되는 경향을 보였는데 이런 차이도 세포자멸사에서 보였던 소견과 같은 원인으로 유발된 퇴행의 과정으로 생각된다. 일부 성인 환자에서는 종종 원시관 주변의 미분화 중간엽 실질이 잘 관찰되지 않는다. 이런 경우 미성숙한 집합관이나 단순 낭성변화를 보이는 구조와 신 이형성증의 진단에 필수적인 원시관과 미분화실질의 구별이 어려워 지는데, 이것도 미분화 실질의 퇴행으로 인한 결과로 설명할 수 있다.

사구체에서 PAX2의 발현은 정상적인 신장의 발생과 신 이형성증에서 모두 보고된 바가 없었는데 본 연구에서는 7예(23%)에서 남아있는 사구체의 소수에서 발세포에 부분적으로 PAX2의 발현을 나타내는 부위가 관찰되었다. 그동안 발세포의 PAX2 발현은 특발성 허탈사구체 병증(idiopathic collapsing glomerulopathy), HIV와 연관된 신장병증(HIV-associated nephropathy), 원발성 초점 분절 사구체 경화증(primary focal segmental glomerulosclerosis)등에서 드물게 보고되었다[38, 39]. Patek등은 murine Denys-Drash 증후군에 대한 연구에서 사구체 경화증을 보이는 사구체의 발세포에서 PAX2의 발현이 나타남을 보고하였고, 이는 murine Denys-Drash 증후군에서 보이는 발세포의 WT1 발현 소실과 직접적인 연관없이 일어나며 지속적인 PAX2 발현에 의한 결과가 아니라 사구체 경화증에 의해

PAX2가 다시 발현된 것임을 주장하였다.[40] 그러나 Ohtaka등은 원발성 초점 분절 사구체경화증에서 보이는 발세포의 표현형의 변화에 대한 연구에서 PAX2의 발현이 사구체경화증의 중요한 원인임을 주장하였다[39]. 그들은 정상 사구체의 발세포에서는 WT1이 발현되고 PAX2와 cytokeratin에는 음성이지만 초점 분절 사구체경화증의 세포병변에서는 사구체의 발세포에서 WT1의 발현이 감소되고 PAX2와 cytokeratin이 강하게 발현되어 신장 발생 단계의 미성숙한 발세포의 상태와 유사하게 되는 것을 발견하였고, 이를 발세포의 표현형이 변하여 일어난 결과로 해석하였다. 그들은 이러한 발세포에서의 PAX2 재발현이 표현형의 변화를 유발하고 이것이 초점 분절 사구체경화증의 세포 병변 형성에 중요한 역할을 한다고 주장하였다[41]. 본 연구에서도 PAX2 발현을 나타낸 사구체들에서 PAS염색을 통해 다양한 정도의 사구체 경화증을 확인하였고 일부에서는 만성 신우신염이 동반되어 있어 사구체 손상 후 재생되는 과정에 의한 발세포의 일시적인 PAX2의 발현으로 생각되었다. 그러나 사구체의 발세포내 PAX2의 발현 빈도가 23%로 높아서 이러한 발현정도가 이형성증이 있는 신장에서 더 빈번하게 관찰되는 것인지에 대해서는 추후 연구가 필요하리라고 사료된다.

V. 결　론

본 연구는 20명의 소아와 10명의 성인 신 이형성증 환자의 신 적출술 조직을 이용하여 정상 신장과 신 이형성증에서 PAX2 발현 양상을 분석하고 신 이형성증에서 소아군과 성인군 사이의 PAX2의 발현 양상, 세포자멸사지수, 주변 미분화 중간엽 세포의 분화정도를 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 제태기의 정상적인 신장 발생과정에서 PAX2는 피막밑 신장발생구역의 발달하는 신장단위에서 강한 발현을 보이고 성숙한 사구체에서는 보이지 않으며 원위관과 집합관에서도 강하게 발현되었다. 정상 성인의 신장에서는 주로 원위관과 집합관에서만 PAX2의 발현이 강하게 유지되었다.

2. 신 이형성증의 원시관과 미분화 실질은 성인이 된 후에도 유지되며 원시관 상피에서의 PAX2 발현도 지속되었다. 원시관 상피세포에서의 PAX2 발현이 소아군에서 유의하게 감소되었다($p=0.007$). 이러한 PAX2 발현이 감소되는 경향은 집합관 상피에서도 나타났다 ($p=0.004$).

3. 세포자멸사는 정상 집합관의 상피세포에서보다 원시관의 상피세포에서 유의하게 증가되었으나($p=0.000$) 소아군과 성인군 사이의 유의한 차이는 없었다. 그러나 원시관 상피세포에서보다 주변의 미분화 중배엽 세포에서 세포자멸사가 더 활발한 경향을 보였다.

4. 원시관을 둘러싸고 있는 방추형의 중간엽 세포는 대부분 섬유근육분화를 나타냈고, 성인군에서 소아군에 비해 SMA와 trichrome 염색의 강도가 감소하는 경향을 보였다.

이 결과들을 종합하면 신 이형성증에서 원시관의 PAX2 이상 과발현은 성인이 된 후에도 지속되나 그 발현 강도는 소아의 신 이형성증에서 보다 감소하고 미분화 중배엽 실질의 섬유근육 분화도 감소하여 신 이형성증은 시간이 지남에 따라 점차 쇠퇴하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bonsib SM. Non-neoplastic disease of the kidney. In: Bostwick DG, Eble JN, editors. Urologic surgical pathology. 1st ed. St. Louis: Mosby; 1997. p.21-24.

2. Bernstein J, Gilbert-Barness E. Congenital malformation of the kidney. In: Tisher CC, Brenner BM, editors. Renal pathology with clinical and functional correlations. 1st ed. Philadelpia: JB Lippincott; 1989. p.1288-1301.

3. Moore KL. The urogenital system. In: Moore KL, editor. Developing human. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders company; 1988. p.246-257.

4. Risdon RA. Development, developmental defects, and cystic diseases of the kidney. In: Heptinstall RH, editor. Pathology of the kidney. 4th ed. Boston: Little, Brown and company; 1992. p. 110-121.

5. Wilson CB. Renal response to immunologic glomerular injury. In: Brenner BM, editor. The kidney. 5th ed. Philadelpia: W. B. Saunders company; 1996. p.1851-1853.

6. Srivastava T, Garola RE, Hellerstein S. Autosomal dominant inheritance of multicystic dysplastic kidney. Pediatr Nephrol 1999;13:481-483.

7. Sekine T, Namai Y, Yanagisawa A, Shirahama H, Tashiro Y, Terahara M, et al. A familial case of multicystic dysplastic kidney. Pediatr Nephrol 2005;20:1245-1248.

8. Al Saadi AA, Yoshimoto M, Bree R, Farah J, Chang CH, Sahney S, et al. A family study of renal dysplasia. Am J Med Genet 1984;19:669-677.

9. Fletcher J, Hu M, Berman Y, Collins F, Grigg J, McIver M, et al. Multicystic dysplastic kidney and variable phenotype in a family with a novel deletion mutation of PAX2. J Am Soc Nephrol 2005;16:2754-2761.

10. Feldenberg LR, Siegel NJ. Clinical course and outcome for children with multicystic dysplastic kidneys. Pediatr Nephrol 2000;14(12):1098-1101.

11. Potter EL. Normal and abnormal development of the kidney, Chicago: Year Book Medical Publishers; 1972.

12. Schwartz RD, Stephens FD, Cussen LJ. The pathogenesis of renal dysplasia. III. Complete and incomplete urinary obstruction. Invest Urol 1981;19:101-103.

13. Mackie GG, Stephens FD. Duplex kidney: a correlation of renal dysplasia with position of ureteral orifice. J Urol 1975;114:274-280.

14. McConnell MJ, Cunliffe HE, Chua LJ, Ward TA, Eccles MR. Differential regulation of the human Wilms tumor supressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. Oncogene 1997;14:2689-2700.

15. Fletcher J, Hu M, Berman Y, Collins F, Grigg J, McIver M, et al. Multicystic dysplastic kidney and variable phenotype in a family with a novel deletion mutation of PAX2. J Am Soc Nephrol 2005;16:2754-2761.

16. Eccles M, Bockett N, Stayner C. PAX2 and renal-coloboma syndrome. In: Vize PD, Woolf AS, Bard JB, editors. The kidney: from normal development to congenital disease. 1st ed. Amsterdam: Academic Press; 2003. p.411-432.

17. Porteous S, Torban E, Cho NP, Cunliffe H, Chua L, McNoe L, et al. Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. Hum Mol Genet 2000;9:1-11.

18. Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR, Dressler GR, Woolf AS. The PAX2 tanscription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. J Clin Invest 1996;98:451-459.

19. Yang SP, Woolf AS, Yuan HT, Scott RJ, Risdon RA, O'Hare MJ, et al. Potential biological role of transforming growth factor-beta1 in human congenital kidney malformations. Am J

Pathol 2000;157:1633-1647.

20. Woolf AS, Winyard PJ. Gene expression and cell turnover in human renal dysplasia. Histol Histopathol 2000;15:159-166.

21. Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR, Dressler GR, Woolf AS. The Pax2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelium in human kidney malformations. J Clin Invest 1996;98:541-549.

22. Eccles MR, Yun K, Reeve AE, Fidler AE. Comparative in situ hybridization analysis of Pax2, Pax8, and WT1 gene transcription in human fetal kidney, and Wilm's tumors. Am J Pathol 1995;146:40-45.

23. Eccles MR. The role of PAX2 in normal and abnormal development of the urinary tract. Pediatr Nephrol 1998;12:712-720.

24. Gnarra JR, Dressler GR. Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides. Cancer Res 1995;55:4092-4098.

25. Lozanoff S, Johnston J, Ma W, Jourdan-Le Saux C. Immunohistochemical localization of Pax2 and associated proteins in the developing kidney of mice with renal hypoplasia. J Histochem Cytochem 2001;49:1081-1097.

26. Shibata S, Nagata M. Pathogenesis of human renal dysplasia: an alternative scenario to the major theories. Pediatr Int 2003;45:605-609.

27. 강길현, 김종옥, 김범경, 서광선. 신 이형성증 - 6예의 임상 및 병리학적 검색. 대한병리학회지 1997;31:34-39.

28. 강신몽, 박용구, 이주희, 채수응, 양문호. 이소성 뇨관 개구부를 동반한 신의 다낭성 이형증. 대한병리학회지 1988;22:331-335.

29. 손현진, 김주헌, 강명재. 동측의 이소성 요관구와 정액낭포를 동반한 다낭성 신 이형성증. 대한병리학회지 2000;34:310-313.

30. 양동환, 채현수, 정순만, 이성호, 이양우, 이상곤, 최영희. 동측의 발육부전 이형성신 및 요관방광이행부협착과 동반된 이형성낭종고환. 대한비뇨기과학회지 2004;45:739-741.

31. 윤정현, 송기학, 이상봉, 양석우, 조미연, 김광진. 동측 신이형성과 이소성 요관이 동반된 부정낭낭종 1례. 대한비뇨기과학회지 2000;41:576-580.

32. 이경섭, 차영범. 이소성 이형성신을 동반한 이소성 단일요관 2례. 대한비뇨기과학회지 1994;35:1156-1160.

33. 정희종, 권동득, 오봉렬, 류수방, 박양일. 동측의 이소성요관구와 신이형성증을 동반한 일측성의 불완전 사중복요관 1례. 대한비뇨기과학회지 1998;39:507-509.

34. 주미, 김연미, 김종재, 서연림, 서정욱, 지제근. 신장의 선천성 낭성 질환. 대한병리학회지 1997;31:233-243.

35. Myong NH Park JW, Chi JG. Short-rib polydactyly syndrome, Beemer-Langer type, with bilateral huge polycystic renal dysplasia: an autopsy case. J Korean Med Sci 1998;13:201-206.

36. Torban E, Eccles MR, Favor J, Goodyer PR. PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells. Am J Pathol 2000;157:833-842.

37. Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJ. Evolving concepts in human renal dysplasia. J Am Soc Nephrol 2004;15:998-1007.

38. Yang Y, Gubler MC, Beaufils H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. Nephron 2002;91:416-423.

39. Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, Soma J, Sato T, Saito T, et al. Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by PAX2 in primary focal segmental glomerulosclerosis. Am J Kidney Dis 2000;39:475-485.

40. Patek CE, Fleming S, Miles CG, Bellamy CO, Ladomery M, Sparaggon L, et al. Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic medication of glomerulosclerosis. Hum Mol Genet 2003;12:2379-2394.

41. Yang Y, Jeanpierre C, Dressler GR, Lacoste M, Niaudet P, Gubler MC. WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. Am J Pathol 1999;154:181-192.

Abstract

PAX2 expression in renal dysplasia

Yoon Hee Lee

Department of Medical science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hyeon Joo Jeong)

Renal dysplasia is an abnormal development of the kidney, which results from abnormal differentiation of metanephros caused by abnormal interaction between ureteric bud and metanephric blastema. As a result of maldevelopment, disordered renal lobation and abnormal structures, such as primitive ducts, undifferentiated mesenchyme, and metaplastic cartilage appear in renal dysplasia.

The pathogenesis of renal dysplasia has not been clearly established so far. Recently, molecular biologic studies have demonstrated that PAX2 gene mutation plays a major role in the development of renal dysplasia and hypoplasia. PAX2, one of the important transcription factors in nephrogenesis, is overexpressed in the epithelium of dysplastic kidney, which results in excessive apoptosis. Although renal dysplasia has been mostly detected in perinatal period or in early childhood, it can also be diagnosed in adults. However, morphologic changes and PAX2 expressions have rarely been studied in adults with renal dysplasia.

This study was aimed to compare PAX2 expression in normal fetal kidneys to those of adults. We also compared the differences of histologic features, PAX2 expression, apoptosis,

and degree of mesenchymal differentiation in the dysplastic kidneys between adults and children. A total of 30 cases (10 adults and 20 children), diagnosed as renal dysplasia by nephrectomy, were the subject of the study. Histologic examination was performed using paraffin-embedded hematoxylin-eosin stained sections. PAX2 expression was evaluated using immunohistochemistry. Apoptosis was detected by Apop Tag detection kit. Each two cases of normal fetal kidneys and adult kidneys served as controls.

In normal fetal kidneys, PAX2 was strongly expressed in the subcapsular nephrogenic zone, and decreased down to the center along with maturation. PAX2 was also strongly expressed in the epithelia of distal tubules, and collecting ducts, but not in the mature podocytes and proximal tubules. In normal adult kidneys, PAX2 expression was similar to that of fetus. In dysplastic kidneys of children, PAX2 showed a strong expression in epithelia of primitive ducts, but not in the surrounding undifferentiated mesenchyme. PAX2 expression was sustained in the primitive ducts of adult dysplastic kidneys, but showed a signigicant decrease compared to those of children ($p=0.007$). Primitive duct epithelia showed significantly higher apoptosis index compared to the normal surrounding collecting duct epithelia ($p=0.000$). Apoptosis tended to be more prominent in the undifferentiated mesenchyma tnan the primitive duct epithelia. The mesenchymal cells surrounding the primitive ducts showed fibromuscular differentiation on smooth muscle actin and trichrome stains, and the staining intensity was decreased in adults compared to that of children.

In conclusion, PAX2 is overexpressed in the primitive ducts of renal dysplasia, which is sustained until adulthood. However, decrease of PAX2 expression in dysplastic epithelia and

fibromuscular differentiation of mesenchyme of adults compared to children may suggest a gradual regression with time.

Key Words : PAX2, renal dysplasia, apoptosis, adult