

만성 B형 간염에서 라미부딘 치료반응과
약물 수송단백 MRP4 유전자 다형성과의
상관성

연세대학교 대학원

의학과

한 기 준

<제출서>

만성 B형 간염에서 라미부딘 치료반응과
약물 수송단백 MRP4 유전자 다형성과의
상관성

지도교수 한 광 협

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

년 월 일

연세대학교 대학원

의학과

한 기 준

한기준의 박사학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

의학과

년 월 일

감사의 글

인간은 자신의 체험을 제대로 돌아볼 때 올바른 방향으로 변화한다. 논문의 주제를 잡고 처음 떠오른 생각이 바로 이것이었다. 마찬가지로 만성 B형간염에 대한 라미부딘의 치료경험을 제대로 분석하고 그 과정에서 올바른 지식을 찾아낼 때 우리는 새로운 항바이러스제를 더 잘 사용할 수 있다. 이점이 라미부딘의 시대가 끝나가는데 그 약의 치료효과에 대해 왜 연구하느냐라는 물음에 대한 답이라고 생각한다. 우리는 지금까지 라미부딘의 치료반응이 다양하게 나타났던 현상의 이면에 약물수송단백이 관여할 수 있다는 사실을 알지 못했다.

외래진료를 마치고 진료실에 앉아 연구에 몰두했던 시간들을 회상해 본다. 지난 10년간 세브란스 병원에 축적된 라미부딘의 치료 경험과 환자들의 유전인자 일부가 담긴 엑셀파일 가운데 다양한 통계방법과 프로그램을 이용하여 숫자의 형태로 표현된 임상현상과 유전인자들의 연관성을 찾아내고자 했다. 나의 지적 호기심과 지식에 대한 욕망이 어우러져 6개월간의 시간이 흘러갔다. 몸은 많이 지치고 힘들었지만 내게 가장 행복한 시간이었음을 고백하지 않을 수 없다. 이 과정을 함께 해준 모든 분께 감사드린다.

먼저 한광협 선생님께 감사드린다. 임상 의사인 내가 나의 지식과 경험을 최대한 활용할 수 있는 논문 주제를 주셨고, 연구가 가능하도록 환경을 만들어 주셨다. 학교를 떠난 지 오래되었는데도 예전과 같이 편하게 해주신 점도 감사드린다. 구체적인 연구방법을 알려주시고, 과정을 이끌어 주신 약리학 교실의 이민구 선생님께도 감사드린다. 또한 약리학 교실의 고등학교 후배이자, 대학후배인 이성희 선생이 없었다면 나는 이 연구를 할 수 없었을 것이다. 과정 내내 나와 함께 하면서 생물정보학의 다양한 도구들을 활용할 수 있도록 가르쳐주고 결과를 해석해 주었다. 이성희 선생의 연구에 대한 열정과 남을 배려하는 마음을 보면서 선배인 내가 배운 점이 많았다. 그리고 방대한 임상데이터를 엑셀파일에 담아준 이현웅 선생님에게도 감사를 드린다. 210명 환자의 의무기록을 리뷰하고 일일이 엑셀파일에 데이터화하는 작업이 얼마나 많은 시간과 인내를 필요로 하는지를 잘 알기에, 엑셀파일에 기입된 숫자들이 양을 표시하는 단순한 기호가 아님을 알 수 있었다. 또한 세 번이나 교정된 논문을 모두 꼼꼼하게 읽고 교정해 주신 미생물학 교실의 박전환 선생님과 내가 생물정보학에 처음으로 관심을 갖게 해준 원세연 박사님께도 감사 드린다.

에스더와 지원이에게 고맙다고 말하고 싶다. 자신의 박사학위를 준비하느라 바쁜 와중에도 언제나 나를 격려해주고 도와주었던 에스더와 그 옆에 붙어서 ‘심심해’를 연발하면서도 꼭 참고 아빠를 도와준 지원이가 없었다면 나는 금방 지치고 말았을 것이다. 함께 마치게 된 에스더의 박사학위를 축하하고, 이제 아빠 엄마와 함께 놀 수 있게 된 지원이에게도 축하한다.

아버지와 어머니께 감사 드린다. 늦은 나이에 박사학위를 다시 하고 있다는 말을 들으시고, 내가 생각했던 것 이상으로 무척 기뻐하셨던 두 분의 모습이 떠오른다. 나에게 대한 그분들의 기대와 사랑은 삶이 끝나는 날까지 나를 뒷받침해주는 가장 큰 힘이 될 것이다.

지금은 내가 어리석어 느끼지 못하지만, 언젠가 나의 연구과정을 깊이 묵상해보면, 그 여정 속에 주님께서 함께 하셨음을 발견하리라. 하느님, 감사합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 대상 및 방법	6
1. 대상	6
2. 방법	6
가. 약제 투여 및 임상적 관찰	6
나. Genotyping & haplotype분석	6
다. 통계 분석	7
III. 결 과	8
1. 대상환자의 임상적 특징	8
2. MRP4 유전자 단일염기 다형성(SNP)의 구조 및 빈도	8
3. 라미부딘 투약 24주 HBV-DNA 음전 여부와 MRP4 유전자 다형성과의 연관성	9
가. promotor 부위 -2055C>A와의 연관성	9
나. 3'UTR 4672A>G와의 연관성	11
다. MRP4 유전자의 일배체형 분석	12
4. 바이러스 돌파현상과 MRP4 4672A>G 의 연관성	13
5. HBeAg 소실과 MRP4 -2055 C>A 의 연관성	13
IV. 고 찰	14
V. 결 론	22
참고문헌	22
영문요약	26

<그림 및 표 차례>

그림 차례

그림 1. The variability of treatment response to lamivudine in chronic hepatitis B 4
그림 2. The LD measure of the MRP4 polymorphisms in this study population 9
그림 3. MRP4 gene haplotypes distribution in the patient with or without virologic response at 24 weeks 12

표 차례

표 1. Baseline characteristics of the patients 8
표 2. Hardy-Weinberg equilibrium & minor allele frequency of the candidate SNPs of MRP4 8
표 3. The Association of MRP4 -2055C>A and 4672A>G with the virological response at 24 weeks 10
표 4. Multiple analysis for loss of HBV-DNA at 24 weeks with the clinical factors including -2055C>A in MRP4 10
표 5. Multiple analysis for loss of HBV-DNA at 24 weeks with the clinical factors including 4672A>G in MRP4 11
표 6. The genotype and allele frequency of MRP4 4672A>G in the patients with or without virological response at 24 weeks and viral breakthrough 13
표 7. The Association of MRP4 -2055 C>A with the Loss of HBeAg 14

<국문요약>

만성 B형 간염에서 라미부딘 치료반응과 약물 수송단백 MRP4 유전자 다형성과의 상관성

연구배경 및 목적 : 지난 10 여년간 만성 B형 간염에서 항바이러스 치료의 중심에 있었던 라미부딘은 현재 몇 가지 문제에 부딪혀 있다. 약제 내성 바이러스의 발생빈도가 높고 지속적인 치료반응을 얻기 위한 적절한 투약기간을 정할 수 없으며, 소수이기는 하지만 치료에 불응하여 HBV-DNA가 음전되지 않거나 억제 정도가 미약한 환자가 있다는 것 등이다. 이렇게 환자에 따른 치료반응의 다양성을 조기에 예측하기 위해 여러 가지 임상 지표를 사용하지만 그 예측도가 낮아 실제 임상에서 유용성이 적다. 따라서 보다 예측도가 높은 지표를 찾기 위해 바이러스, 환경 및 숙주요인을 대상으로 한 연구들이 보고되고 있다. 그러나 아직까지 숙주요인의 하나인 약물수송 및 대사의 개인차와 이러한 치료반응의 다양성이 연관되어 있는지에 대한 연구는 없다. 본 연구는 약물수송단백인 MRP4 유전자에 존재하는 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)과 만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 치료반응의 다양성이 연관되어 있는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법 : 라미부딘 투여 후 48주 이상 추적 관찰한 210명을 대상으로, 임상자료를 후향적으로 조사하였고, 보관된 혈액으로 선정된 SNP에 대한 genotyping을 시행하였다. 이 전의 연구에서 한국인에서 발견된 MRP4 49개 SNP 중 haplotype-tagging SNP을 선정하는 방법에 따라 12 개를 선정하였다. 일배체형 분석은 haploview program을 이용하였다.

결과 : 만성 B형 간염에서 라미부딘의 향후 치료반응을 조기에 예측할 수 있는 투약 24주 HBV-DNA 음전여부는 MRP4 promoter 부위의 -2055 C>A ($p = 0.025$), 3'UTR 부위 4672 A>G ($p = 0.016$)와 관련이 있었으며, 이와 연관된 LD block이 MRP4 유전자에 존재하였다($p = 0.0287$). HBV-DNA 비음전군에서 -2055 C>A의 AA 유전형(odds ratio, OR, 4.535; 95% confidence interval, CI, 1.51-13.61; $p = 0.007$)과 4672 A>G의 AA 유전형(OR, 4.98; CI, 1.78-13.89; $p = 0.002$)이 연관되었다. MRP4 4672 A>G의 G allele

은 치료 후기의 바이러스 돌파현상과 연관이 있었으며($p = 0.0091$), MRP4 -2055 C>A는 장기 치료효과를 예측할 수 있는 HBeAg 혈청소실과도 연관이 있었다(OR, 4.29; CI, 1.27-14.56; $p = 0.019$). **결론** : MRP4 promoter 부위의 -2055C>A와 3'UTR 부위 4672A>G는 라미부딘투약 24주 후 HBV-DNA 음전여부와 연관되어 있어, 투약 전에 향후 치료반응을 예측할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 만성 B형 간염, 라미부딘, 치료반응, 약물수송단백, SNP, MRP4

<본 문>

만성 B형 간염에서 라미부딘 치료반응과
약물 수송단백 MRP4 유전자 다형성과의 상관성

<지도교수 **한 광 협**>

연세대학교 대학원 의학과

한 기 준

I. 서 론

만성 B형 간염의 치료에 있어 경구용 항바이러스제의 투약이 증가하고 있다. 이는 활동성 염증을 완화시켜 간경변증으로 진행 또는 악화되는 것을 예방하고 결국 생존율을 증가시킨다는 근거¹⁻³가 확인되었기 때문이다. 만성 B형 간염의 치료에 있어 경구용 항바이러스제가 표준치료의 가이드라인으로 제시되는⁴⁻⁷ 시대를 맞이하면서, 가장 먼저 임상적으로 치료에 사용하였던 항바이러스제인 라미부딘의 치료경험을 제대로 분석하는 것은 중요하다. 이는 앞으로 새로운 약제를 투약하면서 부딪히게 될 난관을 극복하는데 필요한 지식을 얻기 위함이다.

뉴클레오사이드 유사체인 라미부딘(Lamivudine, (-)- β -2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine, 3TC)은 B형 간염 바이러스의 역전사 효소에 경쟁적으로 작용하여 바이러스 증식을 억제한다.⁸ 지난 10 여년간 항바이러스 치료의 중심에 있었던 라미부딘은 현재 몇 가지 문제에 부딪혀 있다. 약제 내성 바이러스의 발생빈도가 높고 지속적인 치료 반응을 얻기 위한 적절한 투약기간을 정할 수 없으며, 소수이기는 하지만 치료에 불응하여 HBV-DNA가 음전 되지 않거나 억제 정도가 미약한 환자가 있다는 것이다.⁹ 또한 라미부딘의 치료결과는 이렇게 환자에 따라 다양하지만(그림 1), 투약 전 또는 투약 초기에 앞으로의 임상경과가 어떻게 진행될 지 예측하기 어렵다. 따라서 환자에 따른 치료반응의 다양성을 조기에 예측할 수 있는 인자를 찾는 것과 치료를

시도하기 전에 적절한 치료 대상자를 선정하는 것은 중요한 과제이다.

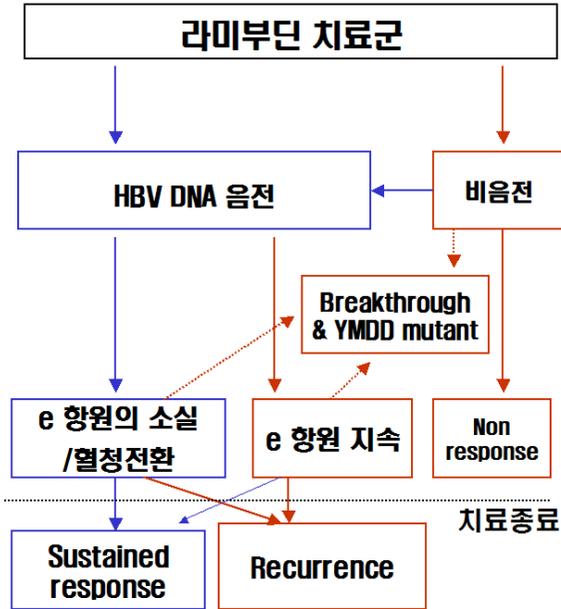


Fig 1. The variability of treatment response to lamivudine in chronic hepatitis B.

현재 라미부딘의 치료반응을 예측하는 것은 투약기간, 혈중 HBV-DNA 수치, 치료시점의 ALT 등 임상적인 자료를 통해서 이지만,¹⁰⁻¹² 이러한 임상 지표만으로는 라미부딘의 치료반응을 적절하게 예측하기 어렵다. 라미부딘 치료반응이 이렇게 다양한 것은 바이러스 요인, 숙주 요인, 환경 요인 등이 복합적으로 관여하기 때문으로 생각된다. 따라서 보다 예측도가 높은 지표를 찾기 위해 바이러스, 환경 및 숙주요인을 대상으로 한 연구들이 보고되고 있다.¹³⁻¹⁸ 그러나 아직까지 숙주요인의 하나인 약물수송 및 대사의 개인차와 치료반응의 다양성이 연관되어 있는지에 대한 연구는 없다.

약물수송단백은 작용기전에 따라 크게 ATP binding cassette (ABC) transporter와 solute carrier (SCL) superfamily의 2 가지 유형으로 분류한다. ABC transporter에는 multidrug resistant gene /P-glycoprotein (MDR), multidrug resistance associated protein (MRP), breast cancer resistance protein (BCRP) 등이 속하고, SCL transporter에는 organic anion transporter (OAT), organic cation transporter (OCT), concentrative nucleoside transporter (CNT), equilibrative nucleoside transporter (ENT) 등이 있다. 이러한 다양한 약물수송단백은 종류에

따라 substrate에 대한 친화도가 다르며, 또한 조직에 따라 발현되는 정도가 상이하다. 따라서 특정 약물의 조직내 분포나 방출을 결정하는 과정에서 중요한 역할을 하고 있다.¹⁹ ABC transporter 중 MRP는 cyclic nucleotide와 nucleotide analogue의 운반에 관여하는 것으로 알려져 있으며, MRP4의 발현과 항바이러스제인 adeforvir, zidovudine의 세포외 방출이 연관되어있음이 보고되었다.²⁰

라미부딘의 간세포내 수송 및 방출과 연관이 있는 약물수송단백의 발현 또는 기능에 변화가 생긴다면, 라미부딘의 혈중 농도가 일정하게 유지된다고 해도 간세포내에서는 적정 농도를 유지하지 못 할 것이고, 따라서 바이러스 억제능에 장애가 초래될 것으로 생각된다. 다른 약제와 마찬가지로 라미부딘의 약물효과, 즉 HBV 바이러스 억제 정도는 혈액 보다는 표적 장기인 간세포내의 농도와 더 연관성 높을 것이기 때문이다. 그러나 환자를 대상으로 간세포에서 이를 직접 측정한다는 것은 불가능하다. 하지만 이러한 약물수송단백의 발현 및 기능을 결정하는 유전자 변이가 인간에게 실제로 존재한다면, 이는 환자에 따른 다양한 약물반응의 한가지 요인이 될 것으로 추정된다. 인간 유전체학 분야가 급격히 발전하면서 개인에 따른 약물반응의 다양성과 유전적 요인의 연관성에 대한 연구가 가능해졌고, 약력학과 약동학에 관여하는 약물수용체, 이온통로, 약물대사효소 및 약물수송단백의 발현을 결정하는 유전자의 변이가 약물반응의 개인차를 크게 유발하는 것으로 보고되고 있다²¹.

본 연구는 궁극적으로 약물수송단백의 유전자 변이가 라미부딘의 약동학에 변화를 주어 치료반응에 영향을 미치는 지를 밝히기 위해서다. 라미부딘의 치료반응을 예측할 수 있는 인체의 약물 반응 후보 유전자 발굴은 치료반응 예측 및 맞춤형 치료 대상군 선정에 매우 중요하나 아직까지 이에 대한 연구 결과가 미흡한 실정이다.

우선 약물 유전체학에서 지금까지 여러 약물을 대상으로 연구된 결과를 고찰하여 현재 조명 받고 있는 약물수송단백 중, 라미부딘과 연관성이 있을 것으로 예측되는 MRP4를 선정하여, MRP4 유전자에 존재하는 SNP과 만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 치료반응의 다양성이 관련이 있는지를 알아보고자 하였다. 약물수송단백의 기능에 따라 라미부딘의 바이러스 억제능이 달라질 것이라는 점과 내성돌연변이의 발생이나 HBeAg의 소실 등의 장기 치료결과를 비교적 조기에 예측할 수 있는 임상지표로서 투약 24주 HBV-DNA 수치가 제시되고^{22,23} 있는 점을 고려하여, 이 시기의 HBV-DNA 음전여부에 초점을 맞추었다. 본 연구의 목적은 라미부딘 투약 24주 HBV-DNA 음전여부와 환자의 MRP4 유전자 변이가 연관되어 있는지를 밝히고, 또한 그 연관성이 내성돌연변이의 발생이나 HBeAg의 소실을 예측할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

2001년 1월부터 2005년 8월까지 연세대학교 세브란스 병원과 일산 병원에 내원하여 만성 B형 간염과 간경변증으로 진단받은 환자들 중 HBV-DNA 수치가 10^5 copies/mL 이상으로 라미부딘 투여 후 48주 이상 추적 관찰한 환자를 대상으로 하였다. -20°C 에서 보관하였던 혈액 중 DNA 추출이 가능하였던 210예를 대상으로 후향적인 임상자료 조사와 선정된 SNP에 대한 genotyping을 시행하였다.

2. 방법

가. 약제 투여 및 임상적 관찰

라미부딘을 매일 100 mg씩 48주 이상 투여하였으며, 라미부딘 투여 전 혈청 HBV-DNA, HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe, ALT를 포함한 간기능검사, 프로트롬빈 시간 및 혈소판 등을 측정하였다. 총 투약기간은 환자에 따라 상이하였다. 라미부딘 투여 후 2-3개월 간격으로 HBeAg, anti-HBe, 간기능검사(AST, ALT, ALP, 총 빌리루빈 등)를 반복 측정하였고, HBV-DNA는 3개월, 6개월(이후 6개월 간격) 간격으로 측정하면서 12개월 이상 추적 관찰하였다. 혈청 HBeAg, anti-HBe 검사는 방사면역법(RIA) (Dade Behring, Malburg, Germany)으로, 혈청 HBV-DNA의 정량은 hybrid capture II 법(Digene, Diagnostic Inc, Beltsville, MD, USA. 검출 한계는 0.5 pg/mL, 1.4×10^5 copies/mL)으로 검사하였다. 치료 효과의 평가는 투약 24주 혈청 HBV-DNA가 hybrid capture II 법의 검출 한계인 0.5 pg/mL (1.4×10^5 copies/mL)미만인 경우를 HBV-DNA 음전으로 하였다. Viral breakthrough는 라미부딘 치료 후 HBV-DNA 수치가 0.5 pg/mL 미만으로 음전되었다가 다시 0.5 pg/mL 이상으로 증가하는 경우로 정의하였고, 그 발생 시기는 투약 및 추적관찰기간에 따라 다양하였다. 기존의 연구결과를 통해 라미부딘 치료반응에 영향을 주는 임상적인 요인으로 보고되었던 치료 시점의 나이, ALT, HBV-DNA 수치, 성별 및 투약기간 등을 조사하여 다변량 분석에 이용하였다.

나. MRP4 Genotyping과 haplotype 분석

이 전의 연구²⁴에서 DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis), TDGS (two-dimensional gene scanning) 및 DNA sequencing 방법으로 한국인에서 발견된 MRP4 49개 SNP 중 12개를 선정하였다. 선정 방법은 발

생빈도가 한국인에서 5% 이상, nonsynonymous SNP, intron에 위치한 SNP 중 mRNA의 splicing에 변화를 초래할 가능성이 높을 것으로 예상되는 SNP, 강한 연관불균형 관계에 있는 LD block 내에서는 최소한의 SNP를 선택한다는 원칙을 고려하여 선정하였다.

선정된 SNP에 대해서 primer extension 방법의 일종인 SNaPShot Kit를 이용하여 대상환자의 혈액으로부터 추출한 DNA를 분석하여 유전형(genotype)을 검사하였다. 일배체형 분석에서는 EM (Expectation Maximization) algorithm을 이용한 haploview program 을 이용하여 유전자 별로 가능한 haplotype 을 얻었다.

다. 통계 분석

라미부딘의 치료반응에 영향을 미치는 SNP를 알아내기 위해 Fisher's exact test와 chi-square test를 시행하였다. 그리고 비모수 단변량 분석에서 통계학적으로 의미있게 나온 SNP에 대해서 치료 시점의 HBV-DNA, ALT, 나이, 성별 및 투약기간을 포함하여 이변량 로지스틱 회귀분석(binary logistic regression test)을 시행하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였고 통계 처리는 윈도우용 통계 프로그램(SPSS, Version 11, Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

III. 결 과

1. 대상환자의 임상적 특징

대상환자 총 210명 중 남자가 160명, HBeAg 양성인 경우가 176명으로 많았다. 평균 투약기간은 31개월이었고 투약 당시 HBV-DNA 수치의 평균은 3.75×10^8 copies/mL, ALT의 평균은 218 IU/L 이었다(표 1).

Table 1. Baseline characteristics of the patients

Characteristics	N = 210 (range)
Age (years)	43.8 (21 - 68)
Gender (M:F)	160 : 50
ALT (IU/L)	218 (14 - 889)
HBV-DNA (copies/mL)*	3.75×10^8
HBeAg (+ : -)	176 : 24
Duration of treatment (month) *	31.9 (8 - 85)

* Mean

2. MRP4 유전자 단일염기 다형성(SNP)의 구조 및 빈도

210명의 대상환자에서 MRP4 SNP 12개에 대하여 genotyping을 실시한 후 Haploview 3.32 프로그램을 이용하여 12개의 MRP4 SNP에 대하여 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium) 검사와 minor allele frequency를 계산하였다. 12개 모두 Hardy-Weinberg equilibrium 을 만족하였고, 빈도 0.05 이하의 SNP는 없었다(표 2). Promoter 부위 -2055C>A와 -1985InsA 사이에 강한 LD block이 관찰되었고, IVS-35G/A, K304N 및 S323S에도 LD block이 있었다(그림 2).

Table 2. Hardy-Weinberg equilibrium & minor allele frequency of the candidate SNPs of MRP4

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWPval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	M.A.	Rating
1	-2055	1	0,424	0,436	0,8285	86,8	0	0	0,321	A	✓
2	-1985insA	70	0,352	0,471	0,0020	85,3	0	0	0,38	T	✓
3	-1508A/G	547	0,191	0,173	0,409	85,3	0	0	0,096	G	✓
4	-642G/C	1413	0,427	0,467	0,3114	93,7	0	0	0,371	G	✓
5	I223I	93819	0,311	0,372	0,0577	86,3	0	0	0,247	T	✓
6	IVS6-35G/A	95409	0,331	0,33	1,0	85,8	0	0	0,209	A	✓
7	K304N	96588	0,269	0,313	0,1147	87,9	0	0	0,195	T	✓
8	S323S	96645	0,439	0,494	0,1728	90,0	0	0	0,447	A	✓
9	IVS9+70T/C	108603	0,473	0,494	0,6629	87,9	0	0	0,446	C	✓
10	IVS10-57G/A	116420	0,184	0,177	1,0	85,8	0	0	0,098	A	✓
11	K1116K	240647	0,271	0,313	0,126	89,5	0	0	0,194	G	✓
12	4672A/G	300000	0,508	0,496	0,8934	93,2	0	0	0,458	A	✓

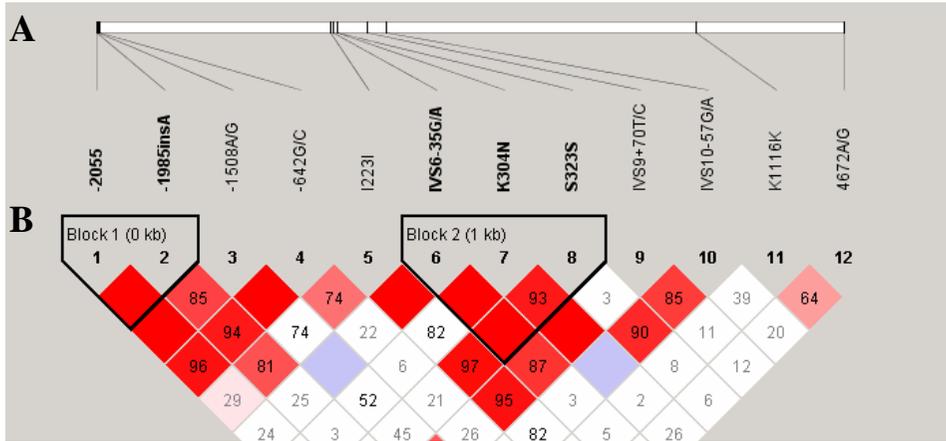


Fig.2 The LD measure of the *MRP4* polymorphisms in this study population. (A) Gene structure and positions of the 12 *MRP4* polymorphisms investigated in this study. (B) LD block & statistics for *MRP4* gene. The absolute values of the D' was provided in the plot.

3. 라미부딘 투약 24주 HBV-DNA 음전 여부와 MRP4 유전자 다형성과의 연관성

가. 라미부딘 투약 24 주 HBV-DNA 음전 여부와 promoter 부위 -2055C>A의 연관성

만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 투약 24주에서 HBV-DNA 음전여부와 MRP4 -2055C>A의 연관성을 조사하기 위해, MRP4 -2055C>A의 genotype frequency를 조사한 결과, MRP4 유전자 promoter 부위 -2055C>A가 AA 유전형인 경우 HBV-DNA 음전군에서 8명(44.4%), HBV-DNA 비음전군에서는 10명(55.6%)으로, CC 유전형의 63명(75.9%), 20명(24.19%), CA 유전형의 52명(73.2%), 19명(26.8%)에 비하여 음전되지 않을 가능성이 더 높았다($p = 0.025$, 표 3).

HBV-DNA 음전군을 control로 비음전군을 case로 정하여 haploview 3.32 프로그램을 이용하여 유전자형 빈도(allele frequency)분석을 하였을 때, 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였고($p = 0.0214$), HBV-DNA 비음전과 연관된 대립유전자(associate allele)는 A allele이었다(표 3).

Table 3. The Association of MRP4 -2055C>A and 4672A>G with the virological response at 24 weeks

	Week 24		Total	<i>p value</i>
	HBV-DNA $\leq 10^5$ (n = 155)	HBV-DNA $> 10^5$ (n = 55)		
-2055C>A				
CC	63 (75.9)	20 (24.1)	83	0.025
CA	52 (73.2)	19 (26.8)	71	
AA	8 (44.4)	10 (55.6)	18	
A allele	0.28	0.41		0.0214
4672A>G				
AA	22 (56.4)	17 (43.6)	39	0.016
AG	73 (76.0)	23 (24.0)	96	
GG	42 (82.4)	9 (17.6)	51	
A allele	0.42	0.58		0.008

NOTE. The frequencies of genotypes are indicated in absolute values and percentages in parentheses. The number of samples genotyped varies because of genotyping failure for some individuals.

MRP4 -2055C>A 다형성을 치료시점의 HBV-DNA와 ALT 수치, 성별 및 연령 등의 임상요인과 함께 독립변수로 정하고, 투약 24주 HBV-DNA 음전여부를 종속변수로 하여 이변량 로지스틱 회귀분석을 시행하면, 치료시점의 HBV-DNA 수치와 -2055C>A 다형성이 통계적으로 유의한 예측 인자였다. 라미부딘 투약 6개월 후에 MRP4 -2055C>A의 AA 유전형은 C 보유군에 비해 HBV-DNA가 음전되지 않을 가능성이 4.5 배 정도 높았다(OR, 4.535; 95% CI, 1.512-13.605; p=0.007)(표 4).

Table 4. Multiple analysis for loss of HBV-DNA at 24 weeks with the clinical factors including -2055C>A in MRP4

Factor	<i>p value</i>	Odds ratio	95.0% CI for EXP(B)	
			Lower	Upper
Gender	.697	1.185	.505	2.784
Age	.367	1.017	.981	1.054
HBV-DNA*	.019	1.672	1.087	2.574
ALT	.059	.998	.996	1.000

AA of -2055C>A	.007	4.535	1.512	13.605
Constant	.013	.004		

* Log scale

나. 라미부딘 투약 24 주 HBV-DNA 음전여부와 3'UTR 4672A>G 의 연관성

만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 투약 24주에서 HBV-DNA 음전여부와 MRP4 4672A>G의 연관성을 조사하기 위해, MRP4 4672A>G의 genotype frequency를 조사한 결과, MRP4 유전자 3'UTR 부위 4672A>G의 AA 유전형을 갖는 경우가 HBV-DNA 음전군에서 22명(56.4%), HBV-DNA 비음전군에서는 17명(43.6%)으로 나타났으며, AG 유전형 갖는 경우는 각각 73명(76.0%), 23명(24.0%), GG 유전형에서는 각각 42명(82.4%), 9명(17.62%)으로 유의한 차이를 보였다($p = 0.016$, 표 3). 유전자형 빈도로 분석을 하였을 때, 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였고 ($p = 0.008$), HBV-DNA 비음전과 연관된 대립유전자는 A allele이었다 (표 3).

MRP4 4672A>G 다형성을 치료시점의 HBV-DNA와 ALT 수치, 성별 및 연령 등의 임상요인과 함께 독립변수로 정하고, 투약 24주 HBV-DNA 음전여부를 종속변수로 하여 이변량 로지스틱 회귀분석을 시행하면, 4672A>G 다형성만이 통계적으로 유의한 예측 인자였다. 라미부딘 투약 6개월 후에 MRP4 4672A>G의 AA 유전형에 비해 AG 유전형의 환자에서 HBV-DNA가 음전될 가능성은 3배(OR, 1/0.332; 95% CI, 0.14-0.79; $p=0.013$), GG 유전형이 음전될 가능성은 4.98 배 높았다(OR, 1/0.201; 95% CI, 0.072-0.562, $p=0.002$)(표 5). 다시 말하면, AA 유전형은 투약 24주 후에도 비음전군으로 남아있을 가능성이 GG 유전형에 비하여 4.98 배 높은 것을 알 수 있었다.

Table 5. Multiple analysis for loss of HBV-DNA at 24 weeks with the clinical factors including 4672A>G in MRP4

Factor	<i>p value</i>	Odds ratio	95.0% CI for EXP(B)	
			Lower	Upper
Gender	.416	.703	.300	1.644
Age	.401	1.015	.980	1.051
HBV-DNA*	.180	1.312	.882	1.950
ALT	.056	.998	.995	1.000
4672A>G	.006			
AG of 4672A>G	.013	.332	.140	.790
GG of 4672A>G	.002	.201	.072	.562

Constant .274 .115

* Log scale

다. 라미부딘 투약 24주 HBV-DNA 음전여부와 MRP4 유전자의 일배체형 분석

만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 투약 24주에서 HBV-DNA 음전여부와 연관된 haplotype이 MRP4에 존재하는지를 조사하기 위해, MRP4 12개 SNP의 genotype frequency를 가지고 Haploview 3.32 프로그램을 이용하여 일배체형 분석을 실시한 결과, MRP4 유전자의 promoter 부위 -2055C>A와 -1985ins 사이에 강한 LD block이 있었고, 이중 AA haplotype이 다른군에 비해 비음전이 될 가능성이 높았다 ($p=0.0287$)(그림 3). 3' UTR 부위인 4672A>G와 연구대상 SNP 중에서 비교적 인접한 K1116K 간에 임의로 LD block을 잡고 haplotype 분석을 시행하였다. D (linkage disequilibrium coefficient)값은 낮았지만, AG와 AA haplotype에서 HBV-DNA 음전현상과 통계적으로 유의한 관련이 있었다($p=0.0147, 0.0018$)(그림 3).

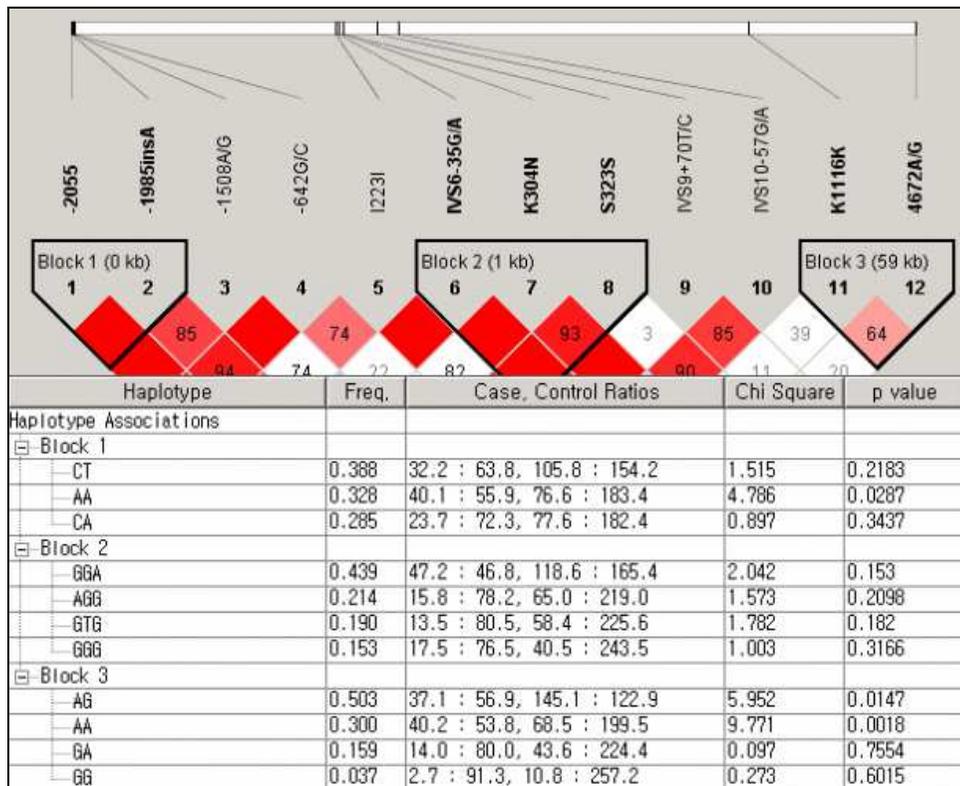


Fig 3. MRP4 gene haplotypes distribution in the patients with or without virologic

response at 24 weeks.

4. 바이러스 돌파현상과 MRP4 4672A>G 의 연관성

만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 투약 후 바이러스 돌파현상이 발생한 경우와 MRP4 4672A>G의 연관성을 조사하기 위해, MRP4 4672A>G의 genotype frequency를 조사한 결과, MRP4 유전자의 3' UTR 부위에 존재하는 4672A>G의 AA 유전형 환자 중 바이러스 돌파현상이 발생한 경우는 10명(25.6%, 10/39명)이었으나, G 보유군에서는 65명(44.2%, 65/147명)이었다. 따라서 억제내성 돌연변이는 G 보유군에서 높게 발생하였다($p = 0.043$; 표 6). 반면에 G 보유군은 AA 유전형에 비해 투약 24주에는 HBV-DNA가 음전될 가능성도 높았다($p = 0.008$; 표 6).

유전자형 빈도로 분석하면 투약 24주 HBV-DNA 비음전과 연관된 대립유전자는 A allele이었고($p = 0.008$), 바이러스 돌파현상과 연관된 대립유전자는 G allele이었다($p = 0.0091$)(표 6).

Table 6. The genotype and allele frequency of MRP4 4672A>G in the patients with or without virological response at 24 weeks and viral breakthrough

4672A>G	Week 24 ^a		Viral Breakthrough ^b	
	HBV-DNA $\leq 10^5$ (n = 137)	HBV-DNA $> 10^5$ (n = 49)	No (n = 111)	Yes (n = 75)
AA	22 (56.4)	17 (43.6)	29 (74.4)	10 (25.6)
G carrier	115 (78.2)	32 (21.8)	82 (55.8)	65 (44.2)
A allele	0.42	0.58	0.51	0.37
G allele	0.58	0.42	0.49	0.63

^a $p = 0.008$, ^b $p = 0.043$ (p value of chi-square test in genotype frequency)

NOTE. The frequencies of genotypes are indicated in absolute values and percentages in parentheses.

5. HBeAg 소실과 MRP4 -2055 C>A 의 연관성

만성 B형 간염 환자에서 라미부딘 투약 후 HBeAg 소실 여부와 MRP4 -2055C>A의 연관성을 조사하기 위해, MRP4 -2055C>A의 genotype frequency를 조사한 결과, MRP4 -2055 C>A의 CC 유전형을 갖는 경우가 HBeAg 소실군에서 41명(59.4%), 비전환군에서 28명(40.6%)으로

나타났으며, CA 유전형을 갖는 경우는 각각 25명(42.4%), 34명(57.6%), AA 유전형에서는 각각 5명(29.4%), 12명(70.6%)으로 유의한 차이를 보였다($p = 0.036$). 유전자형 빈도로 분석하였을 때 HBeAg 지속과 연관된 대립유전자는 A allele이었다($p = 0.0107$). 투약 종료시까지도 HBeAg이 지속될 가능성은 CC 유전형에 비해 CA 유전형 환자에서 2.37배(OR, 2.37; 95% CI, 1.10-5.08; $p=0.026$), AA 유전형에서는 4배 이상 높았다(OR, 4.29; 95% CI, 1.27-14.56, $p=0.019$)(표 7).

Table 7. The Association of MRP4 -2055 C>A with the Loss of HBeAg

-2055 C>A	HBeAg ^a		OR (95% CI)	<i>p</i> value
	Loss (n = 71)	Persistence (n = 74)		
CC	41 (59.4)	28 (40.6)	Reference	
CA	25 (42.4)	34 (57.6)	2.37(1.10-5.08)	0.026
AA	5 (29.4)	12 (70.6)	4.29(1.27-14.56)	0.019
A allele	0.26	0.40		0.0107

^a $p = 0.036$ (*p* value of chi-square test in genotype frequency)

NOTE. The frequencies of genotypes are indicated in absolute values and percentages in parentheses. All ORs and *P* values are adjusted for age, gender, initial HBV-DNA and ALT, and duration of treatment.

IV. 고찰

유전적 변이에 따라 개인의 질병에 대한 감수성이나 약물에 대한 반응이 다르다는 개념은 오래 전부터 제시되고 확인되어 왔다. 최근에 이 분야에서 새로운 것이 있다면 질병 또는 약물반응과 관련된 유전자변이를 탐색하고, 접근하고, 그 결과를 해석하는데 새로운 방법과 도구들이 도입되었다는 것이다. 즉, 대부분의 질병이나 약물반응은 다수의 유전적인 요인과 환경요인에 의해 유발되거나 영향을 받는 복합형질 현상인데, 이런 다양한 요인을 분석하는 것이 유전체학의 혁명적인 발달로 가능해졌다. 인간유전체 염기서열이 해독되었고, 각 개인이 지니고 있는 대량의 유전변이형이 새롭게 발굴되었으며, HapMap project의 결과인 haplotype map이 공개되면서 인간 유전체 구조에 대한 이해가 깊어지고 자료에 대한 접근이 용이해졌다²⁵. 또한 과거에 비해 대량의 유전형 분석을 정확하고 신속하게 수행할 수 있는 검사법이 개발되었고, 특정

후보유전자와 질병의 연관성을 밝히는데 도움을 주는 통계학적 방법이 개발되고 이를 프로그램화한 software를 사용할 수 있게 되었다. 본 연구에서 genotyping 을 대량으로 할 수 있었던 SNaPShot assay, 후보유전자를 선정하거나 유전자형 및 일배체형 분석에 사용한 통계학적 방법 및 haploview 프로그램 등은 이렇게 유전체학에서 개발되고 발전한 방법으로 흔히 생물정보학 (bioinformatics) 분야로 분류하기도 한다.

최근 개인에 따른 약물반응의 다양성과 유전적 요인의 연관성에 대한 관심이 높아지고 있다. 대부분의 약물은 인체 내에 들어오면 흡수 (absorption), 분포(distribution), 대사(metabolism) 및 배설 (excretion)의 4 단계(ADME)를 거치면서 생체에 이용된다. 이 과정에 관여하는 것이 약물수용체, 이온통로, 약물대사효소 및 약물수송단백 등이다. 이 중 본 연구분야에 해당하는 약물수송단백만 해도 작용기전이 다른 여러 가지 종류의 수송단백이 존재한다. 이 다양한 약물수송단백이 인체내 흡수/배설을 담당하는 기관이나 약물표적/비표적 기관의 조직에 발현되는 양상이나 기능정도에 따라 특정 약물의 약동학, 약물효과 및 부작용이 환자에 따라 크게 다르게 나타날 것이다. 실제로 단백질의 발현을 결정하는 유전자의 변이가 약물반응의 개인차를 크게 유발하는 것으로 보고있다²¹.

유전자 서열중 하나의 염기가 변이된 다형성(SNP)도 유전적 요인이 약물반응의 차이를 나타내는 방식 중 하나이다. 인간의 염기서열을 분석한 결과 SNP이 약 290 bp 당 하나 정도로 존재하는 것으로 추정되는데, 현재까지 1200 만개 이상 발견되었다²⁵. 이러한 SNP는 당연히 약물 수용체, 대사효소 및 수송단백을 coding하는 유전자에도 존재하는데, 약물동력(pharmacokinetics)과 약물역동(pharmacodynamics)에 영향을 미칠 가능성이 높아 약물유전체학 분야에서 중요시 되고 있다. 실제로 일부 SNP은 약물 효과에 큰 변화를 나타내는 것으로 인정되어 현재 임상반응을 예측하는데 사용되고 있다²⁶.

약물수송단백은 작용기전에 따라 크게 ABC transporter와 SCL superfamily의 2 가지 유형으로 분류한다.¹⁹ ABC transporter는 약물수송에 필요한 에너지를 ATP hydrolysis 과정을 통해 자체적으로 생산하는 반면, SCL transporter는 세포내부와 외부에 존재하는 이온의 교환 또는 cotransport 과정으로 약물을 수송한다. ABC transporter로 분류되는 약물수송단백(MDR, MRP, BCRP 등)은 상대적으로 크고 (150-200 kDa), 대부분 2 개의 ATP binding domain을 가지고 있다. SCL transporter로 분류되는 약물수송단백(OAT, OCT, CNT, ENT 등)은 12 개의 putative membrane-spanning domain을 포함하는 유사한 구조를 가지고 있다. 이러한 다양한 약물수송단백은 종류에 따라 substrate

에 대한 친화도가 다르며, 또한 조직에 따라 발현되는 정도가 상이하다. 따라서 특정 약물의 조직내 분포나 방출을 결정하는 과정에서 중요한 역할을 하고 있다.¹⁹

라미부딘의 약력학과 약동학에 이러한 약물수송단백이 관여할 가능성은 높다. 라미부딘의 생체이용률은 87%, 반감기는 성인에서 5-7시간이며 혈중에서 단백질결합률은 36% 이하이고, 거의 대부분 미변화체로 신장을 통해 소변으로 배출된다. 다른 약물과 마찬가지로, 라미부딘의 약력학(pharmacodynamics)은 혈중 농도에 영향을 받으므로 이를 결정하는 약동학(pharmacokinetics) 요인에 영향을 받는다. 약물의 혈중 농도를 결정하는 약동학적 요인으로는 해당 약물을 대사시키는 효소뿐만 아니라 약물을 흡수하고 배설하는데 관여하는 장과 신장세뇨관의 상피세포에 발현된 약물수송단백이다. 여기에 추가로 고려해야 할 사항은 약물수송단백은 장과 신장 외에도 간, lymphocyte, gonad-, placenta-, brain-blood barrier에도 존재하기에 이런 장기가 약물 작용 부위인 경우에는, 약물의 혈중 농도가 같다고 하더라도 작용부위 세포의 약물수송단백의 발현 정도에 따라 약물반응은 달라질 수 있다는 점이다.²⁷ 라미부딘과 같은 nucleoside analog-reverse trnascripases inhibitor (NRTI)제제의 약물 반응은 혈액내의 약물농도 보다는 표적 세포 내에 triphosphate anabolite 형태로 존재하는 약물의 농도와 더 연관성이 크다. 인산화된 약물을 추출해내고 측정할 수 있는 방법이 개발되면서, 실제로 AIDS 환자의 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell)을 가지고 측정을 해보면, 세포내 활성화된 NRTI 농도를 결정하는 coefficients of variation 은 50% 이상으로 보고되었지만,^{28,29} 환자에 따라 개인차가 대단히 크다는 점을 강조한 보고들도 있다.³⁰ 아직까지 이러한 개인차가 임상적으로 얼마나 중요한지는 알 수 없지만, 이러한 현상의 기전에는 약물수송 단백질이 관여하리라 생각된다. 하지만 임상적으로 말초혈액 단핵구가 아닌 환자의 간세포를 대상으로 세포내 약물농도를 측정하는 것은 어렵다.

약물 유전체학 연구는 1) 약리학적 지식에 근거하여 표적유전자를 선택하여 접근하는 방법과 2) 유전학적 표지자를 이용하여 약물 반응과 관계있는 유전자를 찾아나가는 두 가지 방법으로 접근할 수 있다. 이 중 약리학적 지식에 근거하여 접근하는 방법 중 중요 약동학 관련 유전자인 약물대사 효소계와 약물수송단백에 관한 유전자 연구가 활발히 진행되고 있다.³¹ 본 연구도 전자의 방법, 즉 다른 문헌과 연구 보고를 통해 라미부딘의 약동학과 관련이 있을 것으로 추정되는 약물수송단백을 정하고, 그 단백질의 발현에 영향을 미칠 것으로 예측되는 SNP를 찾아서, 그 SNP와 임상자료를 통해 파악한 약물반응의 연관성

을 보는 순서로 접근하였다.

간장에서 대사된 약물은 친수성으로 변하기 때문에 수송단백의 도움이 있어야만 세포막을 통과하여 세포 밖으로 나갈 수 있으며, 이 과정은 주로 에너지를 소모하며 약물을 수송하는 ABC transporter가 담당한다. 인체에서 약물을 배출하는 대표적인 ABC transporter에는 MRP와 MDR이 있으며 이들은 약물흡수단백보다 약물역동에 기여하는 부분이 크고 또 단백질의 기능적 변화를 초래하는 유전자 변이 빈도가 높을 것으로 예견되어 약물유전체 연구의 초점이 되고 있다.³¹

경구 투여 후 많은 약물들이 glutathione, glucuronate, sulfate와 포합(conjugate) 되어 최종적으로는 세포막을 통해 확산될 수 없는 산성 conjugate 화합물 형태로 전환되어 인체 독성이 없어진다. 이런 conjugate 화합물들을 세포 밖으로 운반하는 역할을 MRP family가 담당하고 있으며 MRP4 (ABCC4)와 MRP5 (ABCC5)는 cyclic nucleotide 와 nucleotide analog들의 운반에 관여한다.³² 따라서 이런 수송단백이 과도하게 발현되면 암 및 바이러스 질환치료에 사용되는 염기 또는 nucleoside analog 약물을 세포 밖으로 운반하여 결국 혈장 및 세포내 약물농도를 낮추어 약물에 저항성을 나타낼 가능성이 있다. 그러나 아직 항바이러스제를 대상으로 이러한 약물수송단백과 연관성이 있는지 연구된 보고는 소수이다.

MRP4가 세포내 monophosphate 형태의 NRTI 를 세포 외로 방출하는데 관여하므로 최종 활성형인 triphosphate 형태의 NRTI 농도가 함께 낮아지는 기전으로 약물효과에 관여할 것으로 추정된다. 실제로 MRP4 수송단백의 발현정도와 항바이러스제인 adeforvir, zidovudine이 세포 외로 방출되는 정도는 연관관계에 있고,²⁰ Zidovudine의 경우 MRP4의 발현 정도에 따라 세포내 인산화된 zidovudine의 농도가 모두 (mono-, di-, tri-) 감소하는 것으로 보고되었다.³³

현재 만성 B형 간염 환자를 대상으로 국내에서 사용되고 있는 경구용 항바이러스제는 지난 10 여년간 투약 되었던 라미부딘, 아데포비어가 있고 최근 사용하기 시작한 엔테카비어와 클레부딘 등이 있다. 비교적 최근에 개발된 엔테카비어와 클레부딘이 전자에 비해 바이러스 억제능이 탁월하여 활동성 염증이 있는 환자에서 항바이러스 요법의 표준약제로 자리바꿈을 할 것으로 전망된다. 이 약제들 역시 뉴클레오사이드 유사체로 HBV의 중합/역전사 효소에 경쟁적으로 작용하여 바이러스 증식을 억제하는 약물이기 때문에, 라미부딘의 치료경험을 바탕으로 제시된 본 연구의 결과가 향후 부딪히게 될 난관을 극복하는데 도움이 되리라 생각된다.

지난 10 여년간 임상에서 라미부딘을 투약하면서 의료진과 환자를

곤혹스럽게 했던 것은 개인에 따라 치료반응이 너무 다양하게 나타난다는 것이다(Fig 1). 1990년대 말부터 보고된 한국인 만성 B형 간염 환자를 대상으로 한 라미부딘 치료성적을 종합하여 요약하면 다음과 같다. HBeAg 양성 B형 간염 환자에서 치료반응은 virological response (HBV-DNA 음전)을 지표로 했을 때 88.3%, HBeAg의 혈청전환을 지표로 한 경우는 1년에 26.7%, 2년에 36.9%, 3년에 46.5%였다. 그러나 구미와는 달리 국내에서는 HBeAg의 소실/혈청전환 후 투약을 중단하면 다시 재발하는 경우가 많다. HBeAg의 혈청전환 후 약제를 중단하면 1년, 2년 후 재발율은 38%, 49%였으며, 재발율은 약제의 투약 기간에 따라 다르다. 라미부딘 투약 중 약제 내성 바이러스에 의한 viral breakthrough 율은 1년에 11.3%, 2년에 35.7%, 3년에 53.9%로 높게 나타난다.⁹ 국내보고를 고찰해 볼 때 외국의 경험과 마찬가지로 라미부딘의 치료효과는 환자에 따라 매우 다양하다는 것을 알 수 있다.

따라서 임상에서 라미부딘 투약의 난제는 약제 내성 바이러스의 발생빈도가 높고, 재발하지 않고 지속적인 치료반응을 얻기 위한 적절한 투약기간을 정할 수 없으며, 일부에서는 HBV-DNA가 음전 되지 않거나 억제 정도가 미약한 환자가 있다는 것이다. 그러나 위에서 제시했듯이 라미부딘의 치료결과는 환자에 따라 극히 다양하고, 투약 전 또는 투약 초기에 앞으로의 임상경과가 어떻게 진행될 지 예측할 수 없어 이러한 문제점에 대한 해결책을 찾기가 어렵다. 즉, 투약 기간이 길어짐에 따라 내성 바이러스의 출현빈도가 증가하지만 이는 환자에 따라 다양하여 투약기간만으로는 내성바이러스의 출현여부를 예측할 수 없으며, 내성바이러스가 출현하지 않고 지속적으로 바이러스가 억제되어 있는 환자에서 약제를 중단했을 때 재발여부도 환자마다 상이하다.⁹ 따라서 환자마다 다른 다양한 치료반응을 예측할 수 있는 인자를 찾는 것과 치료를 시도하기 전에 적절한 치료 대상자를 선정하는 것은 중요한 과제이다.

현재 라미부딘의 치료반응을 예측하는 것은 임상자료를 통해서이다. 지금까지 HBeAg의 소실/혈청전환과 연관된 예측인자로 제시되었던 것은 투약 전 높은 ALT 수치, 낮은 HBV DNA, 여자, 총 라미부딘 치료기간, 투약 후 ALT 정상화까지 걸린 기간, 투약 후 초기 HBV-DNA 음전 여부, 높은 조직학적 활성도 등이다. HBeAg 혈청전환 후 재발과 연관된 인자로서는 고령환자, 치료 전 높은 혈청 빌리루빈 수치, 혈청전환 후 추가 투약기간 등이 제시되었고, HBeAg 혈청전환 시점에서 HBV-DNA 수치도 재발률을 예측하는데 도움이 된다. 반면에 라미부딘 치료 중 내성돌연변이의 발생과 관련된 임상 인자로는 총 라미부딘 투약기간이 길수록, 낮은 ALT, 높은 HBV DNA 등이다.⁹⁻¹² 하지만 이러

한 임상지표는 치료결과의 예측도가 낮아 임상적 유용성이 떨어진다.

현재까지 보고된 라미부딘의 치료반응을 예측하는 임상지표중 투약 24주 후 HBV-DNA 수치는 내성돌연변이의 발생이나 HBeAg의 소실/혈청 전환 등의 장기 치료결과를 비교적 조기에 예측할 수 있는 임상지표로서 제시되고 있다²². 한국인을 대상으로 투약 24주 후에도 혈청 HBV-DNA가 음전되지 않는 환자의 임상경과와 내성 발생의 빈도에 초점을 맞춘 연구²³가 최근에 발표되었다. 음전의 기준을 본 연구와 같이 2.8×10^5 copies/mL (Digene Hybrid Capture II 방법의 검출한계)로 하였을 때 HBV-DNA 비음전군은 총 투약환자의 8%(16/198명) 정도로 소수였지만, 임상경과는 음전군에 비하여 극히 불량하다고 하였다. Viral breakthrough의 발생 빈도가 HBV-DNA 비음전군에서 1년에 63%로 음전군의 25%에 비하여 유의하게 높았고, HBeAg의 소실률도 음전군에서는 1년에 34%, 2년에 57%였던 반면 비음전군에서는 1년에 0%로 한 예도 관찰되지 않았다. 따라서 라미부딘 투여 후 6개월이 되어도 HBV-DNA가 음전되지 않는 환자는 장기간 투약하여도 HBeAg의 소실을 기대할 수 없고 내성바이러스의 발생빈도가 높으므로 조기에 투약을 중지하는 것을 권하였다.²³ 본 연구에서 투약 24주 후에도 HBV-DNA가 음전되지 않을 가능성이 -2055C>A의 AA 유전형은 C 보유군에 비해 4.5 배, 4672A>G의 AA 유전형은 GG 유전형에 비하여 4.98 배 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 유전형의 환자는 다른 약제를 사용하는 것이 도움이 되리라 사료된다.

복합질병이나 약물에 대한 반응과 같이 유전적 소인과 환경적 요인이 함께 작용하는 현상을 연구하기 위해서는 표현형에 해당하는 임상적인 현상을 보다 상세하게 세분화할 수 있어야 한다. 본 연구에서도 치료반응을 임상적인 지표와 기전에 따라 1) 라미부딘 투약 24주에 virologic response (혈중 HBV-DNA 수치로 판단) 2) 약제내성돌연변이 바이러스의 출현을 의미하는 viral breakthrough 발생 유무, 3) 장기 치료효과를 예측할 수 있는 HBeAg 소실 유무로 세분화하였다(Fig 1). 그러나 각각 세분화된 임상현상에서 표현형을 정확하게 분류하는 것은 한계가 있었다. 왜냐하면 virologic response를 혈중 HBV-DNA의 음전여부로 판단하였고, 음전의 기준으로 1.4×10^5 copies/mL (0.5 pg/mL)를 사용하였는데, 이는 본 연구에서 HBV-DNA의 정량에 적용되었던 hybrid capture II 법(Digene, Diagnostic Inc, Beltsville, MD, USA)의 검출 한계일 뿐이지 실제로 HBV가 음전군 모두에서 같은 정도로 억제된 상태를 의미하는 것은 아니다. 또한 약제내성 바이러스의 발생을 의미하는 viral breakthrough 현상도 라미부딘 치료 후 HBV-DNA 수치가 1.4×10^5 copies/mL 미만으로 음전되었다가 다시 1.4×10^5 copies/mL 이상으로 증가하는 경우로 정의하였고, 약제내성바이

러스인 YMDD 변이종을 유전자 검사를 통하여 모든 예에서 확인했던 것은 아니다.

연관성(association)이란 특정 유전자형과 표현형이 동시에 발생함을 나타내는 단순한 통계적 용어이다. 연관성이 발생하는 것은 후보 유전자가 질병의 원인인자이거나, 실제 질병원인 유전자가 후보유전자의 주변에 위치하여 연관불균형 상태(linkage disequilibrium, LD)에 있어서 나타날 수 있지만, 그렇지 않은 경우도 연관현상은 나타날 수 있다. 즉, 다수검정을 시행할 경우 특히 빈번히 발생하는 통계상의 제 1형 오류의 결과일 수도 있고, 집단간 유전적 조성의 차이나 특정 유전자형과 질병이 자연적으로 선발되어 나타나는 현상일 수도 있다. 따라서 연구를 수행할 경우 결과에서 보여진 연관 현상을 보인 후보유전자가 실제로 질병의 원인인자이거나, 또는 적어도 원인 유전자와 같은 LD 블록안에 존재해서 나타나는 현상이라는 것을 증명하는 것이 중요하다. 이를 위해서 반복실험으로 유전형 검사의 정확성을 높이고 철저한 통계적 검정방법을 사용한다. 또한 가능하다면 해당 유전변이형의 기능연구를 시행하여 결과의 신빙성을 뒷받침해 주는 것이 중요하다²⁵. 하지만 본 연구에서는 기능연구를 시행하지는 못했다. 그러나 결과에서 제시한 연관성을 현재까지 보고된 해당 유전자의 기능연구를 최대한 검색하여 생물학적 의미를 갖을 가능성이 높은 지를 파악했다.

이번 연구를 위해 논문 고찰을 해 본 결과, MRP4 유전자에 존재하는 기능성(functional) SNP을 보고한 예는 찾기 어려웠다. 그러나 최근에 exonic splicing enhancer analyses로 mRNA의 splicing에 변화를 초래할 가능성이 아주 높을 것으로 추정되는 MRP4 유전자내 SNP을 선정하여, 세포내 라미부딘 농도와 연관성이 있는지에 관한 연구가 있었다. Anderson 등²⁷은 AIDS 환자를 대상으로 말초혈액 단핵구내 라미부딘 농도를 측정해 보면, 4131T>G의 TT 유전자형이 G carrier에 비하여 세포내 약물농도가 유의하게 낮다고 하였다. 본 연구에서 12개의 MRP4 SNP 중 투약 24주에서 HBV-DNA의 음전과 연관된 것으로 나타난 4672A>G는 4131T>G와 유사한 3' UTR 부근이어서, 두 SNP 간의 연관불균형이 존재할 가능성이 있다. 본 연구에서 4672A>G와 연구대상 SNP 중에서 비교적 인접한 K1116K 간에 임의로 LD block을 잡고 haplotype 분석을 시행하였을 때, D (linkage disequilibrium coefficient)값은 비교적 낮았지만, HBV-DNA 음전현상과 연관된 haplotype이 존재하는 것으로 보아 그 가능성은 아주 높다고 사료된다. 3' UTR 부근인 점을 감안하면 아마도 mRNA의 안정성에 관여하리라 생각된다.

MRP4 4672A>G의 G allele은 투약 초기인 24주에 HBV-DNA 음전과

연관되어 있으면서, 후기에는 viral breakthrough 현상이 많이 나타나는 결과를 보였다. 이는 투약 24주 HBV-DNA 음전군이 비음전군에 비해 억제내성바이러스가 적게 발생한다는 연구들^{22,23}과 상반된 것 처럼 보인다. 이것은 아마도 HBV의 억제정도가 적절하지 못해서 나타난 현상으로 보인다. 즉, 4672A>G의 G allele의 경우 MRP4 수송단백의 발현이 A allele보다는 낮아서, 라미부딘의 세포외방출이 적기는 하지만, 세포내 활성화된 라미부딘의 농도가 HBV를 강하게 억제할 정도로 유지되지 못하기 때문인 것 같다. 본 연구에서는 HBV-DNA 수치가 1.4×10^5 copies/mL 미만인 모든 경우가 음전군으로 분류되어 그 범위가 상당히 넓다. 최근에 10^5 copies/mL 미만인 환자군 안에서도 HBV 억제정도에 따라 viral breakthrough 발생률이 크게 차이가 있다는 보고⁸가 있었다. HBV-DNA가 200 copies/mL 미만인 군에 비해 2×10^2 - 10^3 copies/mL, 10^3 - 10^4 copies/mL 및 10^4 - 10^5 copies/mL 군에서 viral breakthrough 발생의 odds ratio가 각각 1.10, 1.93, 2.69로 차이가 난다고 하였다. HBV는 자연적으로 돌연변이가 발생하기 쉽고, 발생한 돌연변이가 지속할 수 있는 조건에 있기 때문에 항바이러스제 치료나 숙주의 면역 반응과 같은 선택적 압력(selective pressure)이 가해지면 생존에 유리한 돌연변이들이 살아남게 된다. 억제 내성은 해당 약제에 대한 감수성이 덜하여 치료 기간 중 바이러스 복제가 상대적으로 유리해진 돌연변이들이 선택적으로 생존하여 발생하는 현상이다.³⁴ 특정 돌연변이의 선택적 생존은 항바이러스제의 바이러스 증식 억제능에 의해 좌우되는데,³⁵ 해당 약제의 바이러스 증식 억제능이 미약한 경우 이는 바이러스 생존에 선택 압력으로 작용할 만한 영향을 끼치지 못하며, 반면 바이러스 증식 억제능이 완벽한 경우에는 돌연변이 발생이 복제 의존적이기 때문에 돌연변이가 발생할 틈이 없어진다. 그리하여 중등도의 바이러스 증식 억제능을 가지는 항바이러스제가 내성 발생에 가장 좋은 환경을 조성하게 된다.³⁶ 그러나 이 현상은 바이러스 억제능이 다른 여러 약제를 비교할 때만 적용되는 것은 아닐 것이다. 같은 약제라도 환자에 따라 세포내 농도가 다르다면 바이러스 증식 억제능은 달라질 수 있기 때문이다. 실제로 뉴클레오티드 혹은 뉴클레오시드 유사체의 경우 내성 바이러스가 출현할 확률은 치료 후 혈중 HBV-DNA 수치와 관련이 있어서, 라미부딘은 HBV-DNA 수치가 10^3 copies/mL 이하로 감소하면 내성 바이러스가 출현할 확률이 유의하게 낮아지는 것으로 보고된 바 있다.³⁷

MRP4 4672A>G의 A allele의 경우 세포내 라미부딘의 농도가 너무 낮아 선택압력으로 작용하지 못하고, G allele의 경우 라미부딘의 농도가 바이러스의 증식을 억제할 정도로 유지되기는 하지만(혈중 HBV-DNA 수치가 10^5 copies/mL 미만), 강하게 억제하지 못하여 시간이 경

과하면서 오히려 바이러스 생존에 대한 선택압력으로 작용하여 A allele 비하여 내성바이러스의 출현 및 증식을 조장하게 될 것으로 생각된다.

본 연구 대상환자수는 210예로서 SNP 연구에서 일반적으로 요구되는 sample size 를 만족하지는 못한다. 연관성 연구는 시료의 수가 검정력에 결정적인 영향을 미치게 되고, 적정 시료의 수는 유전자의 빈도와 질병의 상대적 위험도에 따라 달라진다. 이 연구에서 연관성을 보인 -2055C>A 와 4672A>G의 경우 minor allele의 빈도가 0.32, 0.46 으로 높고, 비음전에 대한 odds ratio가 4.5배, 4.98배 정도로 높으므로, 비록 적은 대상환자이지만, 어느 정도의 검정력이 있다고 생각된다.

V. 결 론

만성 B형 간염에서 라미부딘 투약 6 개월 후 바이러스 억제 정도는 약물수송단백 MRP4 유전자 변이와 연관되어 있어, 투약 전에 향후 치료반응을 예측할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, Schiff ER, Schalm SW, et al. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;36:186-94.
2. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999;341:1256-63.
3. 한광협, 김진석, 정효영, 안상훈, 백용한, 이관식, 전재윤, 문영명. 만성 B형 간질환 환자에서 라미부딘 장기투여의 치료효과. *대한간학회지* 5(2):97-104, 1999.
4. 변관수. 2004년 대한간학회 간염 치료 가이드라인 제정 : 2004년 대한간학회 B형 만성간염 치료 가이드라인. *대한간학회지* 10(5) : 89-100, 2004
5. Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GKK, Merican I. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: an update. *J Gastroenterol hepatol* 2003;18:239-45.
6. Lok ASF, McMahon BJ. AASLD Practice Guidelines: chronic hepatitis B: update of recommendation. *Hepatology* 2004;39:

- 857-61.
7. The EASL jury. EASL international consensus conference on hepatitis B. *J Hepatol* 2003;38:533-40.
 8. Chang CN, Skalski V, Zhou JH, Cheng YC. Biochemical pharmacology of (+) and (-)-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine as anti-hepatitis B virus agents. *J Biol Chem* 1992;267:22414-20.
 9. 최종영. 국내 만성 B 형간염 환자의 라미부딘 치료 성적. *대한간학회지* 11(1); 25-30, 2005
 10. 박희승, 이동현, 허정, 김광하, 강대환, 송근암, 조몽. 만성 B형 간염에서 라미부딘 치료에 의한 혈청HBV DNA치의 변화와 Viral Breakthrough의 관련성. *대한간학회지* 12(2) 173-183, 2006
 11. 권영오, 강경희. 만성 B형 간염에서 라미부딘의 치료반응 예측 인자로서 치료 전 ALT치와 조직학적 간염 활성도. *대한간학회지* 10(1) ; 31 - 41, 2004
 12. 박능화, 신정우, 박종호, 방성조, 김대현, 주광로, 김도하. 만성 B형 간질환 에서 라미부딘 내성의 임상경과 및 예측인자. *대한간학회지* 9(4) : 293-303, 2003
 13. 이천균, 한광협, 서정훈, 조용석, 원선영, 전재윤, 문영명, 박인서. 라미부딘으로 유도된 B형간염 바이러스 e항원 음전의 유지에 관여하는 인자로서 B형간염 바이러스 특이 CD8⁺ T 세포. *대한간학회지* 11(1) : 34-42, 2005
 14. Han KH, Kim KH, Chang HY. Immunogenetics of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(3s):S329-S332.
 15. Ahn SH, Kim do Y, Chang HY, Hong SP, Shin JS, Kim YS, Kim H, Kim JK, Paik YH, Lee KS, Chon CY, Moon YM, Han KH. Association of genetic variations in CCR5 and its ligand, RANTES with clearance of hepatitis B virus in Korea. *J Med Virol*. 2006;78(12):1564-71.
 16. Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology*. 2000;31(6):1371-3.
 17. 이증민, 안상훈, 장혜영, 신지은, 김도영, 심명기, 홍선표, 정현재, 김수옥, 한광협, 전재윤. 말디토프 질량 분석을 이용한 한국인의 B형간염 바이러스 유전자형 및 임상적 의의에 대한 재평가. *대한간학회지* 10(4):260-270,2004.
 18. 이천균, 조용석, 정재복, 전재윤, 문영명, 서정훈, 한광협. 만성 B 형 간염에서 HLA A2/core 18-27 tetramer 복합체를 이용한 B 형 간염바이러스 특이 CD8⁺ 림프구의 분석. *대한간학회지* 8(2):139

- 148, 2002.
19. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 55:425-461, 2003
 20. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drug. *Nat Med* 1999;5:1048-51
 21. McLeod HL, Evans WE. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:101-21
 22. Lai C et al. Maximal Early HBV Suppression is Predictive of Optimal Virologic and Clinical Efficacy in Nucleoside-Treated Hepatitis B Patients: Scientific Observations from A Large Multinational Trial (the GLOBE Study). *Hepatology* 2005;42(S1):11-15
 23. 유상균, 김지훈, 한우식, 서연석, 권정아, 연중은, 변관수, 이창호. 초록집 : 만성 B 형 간염에서 라미부딘 투여 후 혈청 HBV-DNA가 음전 되지 않는 환자의 임상적 특징. 대한간학회지. 춘계학술대회. 11:12, 2005
 24. Lee MK. Genetic variations of ABC transporters associated with altered drug responses of anti-epileptic medications. *The Annual Report of KFDA*. 2005;9:792 ~ 793.
 25. Lee JK. Genetic variation and Disease. 1st ed. Seoul: World Science, 2006.
 26. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:9-39
 27. Anderson PL, Lamda J, Aquilante CL . Pharmacogenetic Characteristics of Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine Therapy in HIV-Infected Adults: A Pilot Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:441-9
 28. Anderson PL, Kakuda TN, Kawle S. Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals. *AIDS*. 2003;17(15):2159-68.
 29. Becher F, Landman R, Mboup S. Monitoring of didanosine and stavudine intracellular triphosphorylated anabolite concentrations in HIV-infected patients. *AIDS*. 2004;18:181-87.

30. Hoggard PG, Back DJ. Intracellular pharmacology of nucleoside analogues and protease inhibitor : role of transporter molecules. *Current Opinion in infectious Disease*. 2002; 15:3-8
31. 이민구. 독성 및 약인성 간손상:간의 약물 대사 및 pharmacogenomics. *대한간학회지* 10(1s) :45 ~ 9, 2004
32. Homolya L, Varadi A, Sarkadi B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*. 2003;17(1-4):103-114. .
33. Rodman JH, Robbins B, Forbes E. Cellular efflux is a determinant of the accumulation and kinetics of intracellular zidovudine triphosphate. Paper presented at: 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 8-11, 2004; San Francisco, CA. Abstract 598.
34. Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic Hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004; 64:1-15.
35. Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2004;9:679-93.
36. 윤정환. B형간염 치료의 업데이트 : 약제 내성 바이러스의 임상적 의의와 대책. *대한간학회지* 12(2s): 18 ~ 27, 2006
37. Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Yuan HJ, Decraemer H, Lai CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001;34:785-91.

Abstract

Genetic variation of MRP4 associated with variability of lamivudine treatment response in chronic hepatitis B

Ki Jun Han

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kwang Hyub Han)

Background & Aims: Lamivudine is an effective therapy in chronic hepatitis B patient, but variability of treatment response including the emergence of resistant hepatitis B virus (HBV) mutants and recurrence after cessation of drug are the major concern. The aim of the study was to investigate relationships with genetic polymorphisms of MRP4 (drug transporter gene) and treatment response of lamivudine in patients with chronic hepatitis B. **Methods:** Twelve MRP4 polymorphisms were genotyped in 210 patients with lamivudine treatment. Treatment response was sub-grouped to loss of HBV-DNA at 24 week, loss of HBeAg and viral breakthrough. The associations with the susceptibility to treatment response were estimated by binary logistic regression. **Results:** It was found that that a statistically significant increased susceptibility to virologic nonresponse at 24 weeks was associated with the homozygous allele with MRP4 -2055 C>A AA genotype (odds ratio, OR, 4.535; 95% confidence interval, CI, 1.51-13.61; $p = 0.007$) and 4672 A>G AA genotype (OR, 4.98; CI, 1.78-13.89; $p = 0.002$) compared with the heterozygotes and homozygous allele with -2055C>A CC, 4672A>G GG genotype,

respectively. -2055C>A AA genotype was also associated with high probability of persistence of HBeAg (OR, 4.29; CI, 1.27-14.56; $p = 0.019$) compared to -2055C>A AA genotype and heterozygote. Viral breakthrough was associated with G allele of 4672A>G ($p = 0.019$). **Conclusions:** Results suggest that the genetic polymorphisms in drug transporter MRP4 may play a role in mediating susceptibility to virologic response at 24 weeks, loss of HBeAg and viral breakthrough in Korean chronic hepatitis B patients during lamivudine treatment.

Key Words : Lamivudine, chronic hepatitis B, treatment response, genetic polymorphism, drug transporter, MRP4