

신 이형성증에서 PAX2 발현

이윤희 · 정우희 · 홍순원 · 정현주

연세대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2006년 12월 11일
게재승인 : 2007년 2월 2일

책임저자 : 정 현 주
우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의료원 진단병리과
전화: 02-2228-1766
Fax: 02-2227-7939
E-mail: jeong10@yumc.yonsei.ac.kr

PAX2 Expression in Renal Dysplasia

Yoon Hee Lee, Woo Hee Jung, Soon Won Hong and Hyeon Joo Jeong

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Renal dysplasia is the abnormal development of the kidney. The condition is usually detected in childhood along with other urinary tract anomalies, but can remain unnoticed until adulthood. It was recently reported that a PAX2 gene mutation plays a major role in the development of renal dysplasia. The aim of this study was to examine the expression of PAX2 in dysplastic kidneys of children and adults. **Methods :** A total of 30 cases diagnosed with renal dysplasia after a nephrectomy were examined. PAX2 expression was evaluated using immunohistochemistry. Apoptosis was detected using an Apop Tag detection kit. **Results :** In the dysplastic kidneys, there was strong PAX2 expression in the epithelia of the primitive ducts in both children and adults, but the degree was significantly lower in adults ($p=0.007$). However, the mesenchyme surrounding the primitive ducts of children showed stronger staining for the smooth muscle actin antibody and trichrome than the adults. The apoptosis index was significantly higher in the primitive duct epithelia than in the surrounding normal collecting duct epithelia ($p=0.000$). **Conclusions :** PAX2 is overexpressed in the primitive ducts of renal dysplasia, which is sustained until adulthood and is associated with increased apoptosis. However, a decrease in PAX2 expression in the dysplastic epithelia and mesenchymal cuff of adults suggest a gradual regression of the dysplastic elements with time.

Key Words : PAX2; Renal dysplasia; Apoptosis; Adult

신 이형성증(renal dysplasia)은 후신(metanephros)조직의 이상 분화로 신장 실질이 비정상적으로 발달하는 것으로, 요관 밖에서 기원한 원시관(primitive duct)과 이를 둘러싸는 미분화 중간엽세포, 후신발생모체에서 형성된 연골, 원시 사구체와 미성숙 세뇨관 등이 무질서한 엮이성을 보인다.¹

신 이형성증은 신생아 4,000명당 1명의 빈도로 발생하며, 소아 부검의 2%에서 발견되고 대부분 소아나 산전 진찰에서 발견된다.² 신 이형성증은 대부분 산발적으로 발생하지만 가족성 발생이 드물게 보고되고 있으며,³⁻⁵ 약 90%에서 요로계 폐쇄와 관련된 다양한 요로기형을 동반한다.⁶

신 이형성증의 병인은 아직 명확히 밝혀지지 않았으며 대표적인 두 가지 이론으로 설명해 왔다. Osathanondh와 Potter (1972)⁷는 미세절제(microdissection) 연구를 통해 다낭성신의 병인을 설명하고 형태 소견에 따라 네 종류로 분류하였다. 이 중 제2형과 4형이 신 이형성증에 해당하며, 제2형은 다낭성 신 이형성증(multicystic renal dysplasia)으로, 제4형은 요도폐쇄와 관련 있는 폐쇄성 신 이형성증(obstructive renal dysplasia)으로 정의하

였다. Stephens 등^{8,9}은 대다수 신 이형성증이 임상적으로 이소성 요도 입구와 연관이 있다는 점에 착안하였다. 그리하여 요관 밖이 이소성 위치에서 기원하여 신모체와 잘 접촉되지 않은 결과로 후신이 비정상적으로 발생하게 된다고 이론화하여, 요관 밖과 후신발생모체 사이의 상호작용의 중요성을 강조하였다.

최근 들어 많은 분자 생물학 연구들을 통해 세포의 생존 유전자인 PAX2 유전자가 쥐와 사람의 신 이형성증 및 신 형성저증(renal hypoplasia) 등의 신장 발생 결함에 중요한 원인임이 밝혀졌다. PAX2는 WT1, N-myc, p53 등의 유전자를 조절하고^{5,10} 신장 발생 과정에서 DNA에 결합하여 신장 발생을 조절하는 중요한 유전자들의 발현을 변화시키며, PAX5, PAX8과 함께 p53의 전사를 억제하고 세포자멸사(apoptosis)를 유발한다.¹¹ 다낭성 신 이형성증에서도 PAX2가 원시관과 미성숙관의 상피세포의 핵에서 강하게 발현하는 것으로 알려져 있다.¹¹ PAX2 이외에도 WT-1, BCL-2, PCNA, TGF-1, EGFR, galectin 3 등 여러 인자들이 신 이형성증에서 이상 발현된다고 보고되었지만,¹²⁻¹⁴ 이러한 분자들이 신 이형성증을 일으키는 직접적인 원인

인지, 요로계 폐쇄의 결과로 발견되는 것인지는 아직 확실하지 않다. 그러나 세포자멸사와 증식 양식의 변화가 신 이형성증 발생에서 나타나는 비정상적 분화의 주요 원인으로 받아들여지고 있다.

지금까지 이루어진 신 이형성증에 대한 연구는 대부분 병인을 밝혀내기 위해 동물실험과 제태기와 소아의 신장 발달 단계에 중점을 두었으며, 성인이 되면서 이러한 신장의 비정상적 분화들이 보이는 형태 변화와 PAX2 발현 양상에 대한 체계적인 연구는 상대적으로 적었다. 본 연구에서는 정상 신장과 신 이형성증에서 PAX2의 발현 양상을 분석하고, 신 이형성증의 소아군과 성인군의 임상적 병리학적 특징과 PAX2의 발현, 세포자멸사 지수, 주변 미분화 중간엽조직의 분화 정도를 비교 분석해 보았다.

재료와 방법

재료

1993년 1월부터 2003년 12월까지 연세의료원에서 신 적출술을 통해 신 이형성증으로 진단된 30예를 대상으로 하였다. 대상예를 신 적출술을 시행한 당시의 나이를 기준(만 18세)으로 소아군과 성인군으로 나누어 20예의 소아군과 10예의 성인군으로 구분하였다. 각각 제태기 24주와 30주에 특별한 원인 없이 자궁 내에서 사망한 태아의 신장 2예와 요관의 요로상피암으로 신 적출술을 받은 34세와 64세의 신장 2예를 대조군으로 이용하였다.

임상 소견

환자의 의무 기록을 통해 수술 당시 나이, 성별, 증상의 발현, 과거력, 가족력, 방사선 소견, 신장의 일측성 또는 양측성 침범 여부와 남성 변화, 다른 요로계 기형이 동반되었는지 여부, 방광 요관 역류와 요로 감염 여부 등을 조사하였다. 그런 다음 Potter¹⁹의 남성 신장 분류에 따라 다낭성 신 이형성인 II형과 요도폐쇄와 연관된 폐쇄성 신 이형성인 IV형으로 분류하였다.

병리조직 염색

신장 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매하고 4 μm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin과 Masson's trichrome 염색을 시행하였다. 그런 다음 광학 현미경으로 hematoxylin-eosin에서 원시관, 중배엽 세포, 연골 화생, 그리고 주변 신장 조직의 변화 등을 관찰하였다. Masson's trichrome 염색 결과 원시관을 둘러싼 중간엽세포의 세포질에서 푸른색으로 염색되는 것을 양성으로 판정하였고, 염색 강도와 분포를 반정량적으로 나누어 염색이 안 된 경우 0, 염색 강도가 약한 경우 1+,

중간 정도인 경우 2+, 강한 경우 3+로 판독하였다.

면역조직화학염색

원시관과 미분화 중간엽 실질을 보이는 가장 대표적인 파라핀 블록을 선택하여 조직을 4 μm 두께로 절편하고 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 그런 다음 고농도 알코올에서 저농도 알코올에 처리하여 함수한 후 증류수로 세척하였다. 조직절편을 예열한 10 mM citrate 완충액에 담가 800 W microwave에서 10분간 처리하였다. 그리고 나서 실온에서 식힌 후, Tris 완충액으로 10분간 세척하고 3% 과산화수소로 15분간 처리하여 endogenous peroxidase의 작용을 차단하였다. 그런 다음 다시 Tris 완충액으로 10분간 세척하고 normal blocking serum으로 15분간 처리하였다. 일차항체로 1:100으로 희석한 rabbit anti-PAX2 (Zymed, South San Francisco, CA, USA)와 mouse anti-smooth muscle actin (SMA)(Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)에 2시간 동안 반응시킨 후 Tris 완충액으로 10분간 세척하였다. 그런 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 알코올로 탈수하는 과정과 xylene에서 투명하는 과정을 거쳐 permount로 봉입하여 관찰하였다.

PAX2 면역염색 결과는 원시관의 이형성 상피세포의 핵에 갈색으로 염색되는 것을 양성반응으로 판정하였고, 원시관을 이루는 상피세포의 절반 이상에서 양성반응을 보이는 경우를 의미 있는 결과로 판단하였다. 전체 원시관 개수에서 양성반응을 보이는 원시관의 비율을 계산하여 30% 이하인 경우 1+, 30-60%인 경우 2+, 60% 이상인 경우 3+로 판독하였다.

SMA 면역조직화학염색 결과는 원시관을 둘러싼 중간엽세포의 세포질에서 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 판정하였고, 염색 강도와 분포에 따라 세 가지 군으로 나누어 염색이 안 된 경우 0, 염색 강도가 약한 경우 1+, 중간 정도인 경우 2+, 강한 경우 3+로 판독하였다. PAX2 면역염색의 대조군으로는 태아와 성인의 정상 신장조직을 이용하였고, SMA 면역조직화학염색의 대조군으로는 정상적인 혈관의 평활근에서 보이는 양성반응의 강도를 이용하였다.

TUNEL 염색

자멸사 세포를 보기 위해 Apop Tag detection kit (Chemicon, CA, USA)를 사용하였다. 파라핀에 포매된 조직을 4 μm 두께로 절편하여 xylene에서 탈파라핀한 후 고농도 알코올에서 저농도 알코올로 염수하는 과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. 그

런 다음 Tris buffer saline (TBS) 완충액으로 10분간 세척하였다. 그리고 나서 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°C에서 90분 동안 반응시키고, stop/wash 완충액에서 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 그런 다음 1:100으로 희석한 anti-digoxigenin alkaline phosphatase (Roche Diagnostic GmbH, Penzberg, Germany)에 37°C에서 30분 동안 반응시키고 TBS 완충액으로 10분간 세척하였다. NBT/BCIP (Pierce, IL, USA)로 발색하고 nuclear fast red로 대조염색한 후 봉입하여 관찰하였다.

세포자멸사는 농축된 핵이 감색으로 염색되거나 염색된 핵 주위에 투명대가 있는지 여부로 판정하였다. 자멸사세포 지수는 원시관을 구성하는 이형성 상피세포들 중에서 세포자멸사가 관찰되는 비율로 정하였으며 평균±표준편차로 표시하였다. 대조군으로 주위의 정상 집합관의 상피세포의 핵에서도 같은 방법으로 자멸사세포 지수를 계산하여 비교하였다. 이때 검색하는 원시관과 집합관의 최대 개수는 10개로 하였고, 원시관의 총수가 10개 미만인 경우에는 모든 원시관을 구성하는 세포 수에서 염색된 세포의 비율을 구하였다. 원시관 주변의 미분화 실질의 세포자멸사는 400배율 시야 10군데에서 보이는 자멸사세포의 합으로 표시하였다.

통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS for Window (Version 11.0)를 사용하여 검증하였다. 성인군과 소아군에서 PAX2와 SMA의 발현 양상 차이를 비교하기 위해 χ^2 test를 이용하였고, 세포자멸사 지수를 비교하기 위해 Mann-Whitney test를 사용하였다. p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

임상 소견

신 적출술 당시 30명의 연령은 5개월부터 55세까지 분포하였으며 평균연령은 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%)이었다. 이형성을 보인 신장의 위치는 오른쪽이 15예(50%), 왼쪽이 13예(43.3%), 양쪽이 2예(6.7%)였다. Potter의 분류에 따라 나눠 보면, 제II형인 다낭성 신 이형성증이 10예(33.3%), 제IV형인 폐쇄성 신 이형성증이 20예(66.7%)였다. 다낭성 신 이형성증에

서는 7예(77.7%)가, 폐쇄성 신 이형성증에서는 13예(61.9%)가 소아군에 해당하였다. 소아군은 대부분(14예, 70%) 산전 초음파에서 수신증 등 신장 이상이 발견되었고, 나머지는 1세 이전에 배뇨 곤란, 요로계 감염 등의 증상으로 처음 발견되었다. 성인군은 1세 때 진단된 1예를 제외하고, 대부분 특별한 증상 없이 지나다가 성인이 된 이후 요로계 감염이나 신기능 이상 증상이 점차 나타났다. 하부 요로계 이상이 동반된 경우는 18예(60%)로 두 군에 고르게 분포하였다. 요방광 역류는 7예(23.3%), 물요관 증이나 거대요관이 7예(23.3%), 요관신우 협착이나 폐쇄가 6예(20%)에서 동반되었고, 중복신우와 중복요관이 6예(20%), 이소성 신장이 3예(15%)였다. 소아 환자군에서는 이소성 요관이 질벽 등 이상 부위에서 개구하는 예가 4예(20%), 다른 장기의 기형으로 인한 심방중격 결손이 1예(5%), 항문막힘증과 Meckel 게실이 1예(5%)에서 발견되었다. Potter 분류에 따른 임상 양상을 비교해 보면 제II형 중에서는 5예(56%)에서 요관 및 방광의 기형이 동반되었고 1예(11%)에서 심장 기형을 보였으며 요로의 폐쇄로 인한 요관방광역류는 1예에서만 관찰되었다. 제IV형 중에서는 12예(62%)에서 요도의 협착, 폐쇄, 역류 등과 동반된 요로의 폐쇄가 발견되었고 4예(20%)에서 요로계의 기형이 동반되었다.

육안 및 조직 소견

육안으로 살펴본 결과 이형성 신장은 13예(61.9%)에서 뚜렷한 낭성 변화를 동반하고 있었다. 신 이형성증을 Potter 분류에 따라 분류하면 10예(33.3%)는 제2형인 다낭성 신 이형성증이고 20예(66.7%)는 제4형인 폐쇄성 신 이형성증이었다(Fig. 1). 6예(20%)에서는 정상적인 겉질(cortex)이 관찰되지 않았다. 모든 예에서 신 이형성증 진단에 필수적인 원시관과 그 주변을 둘러싼

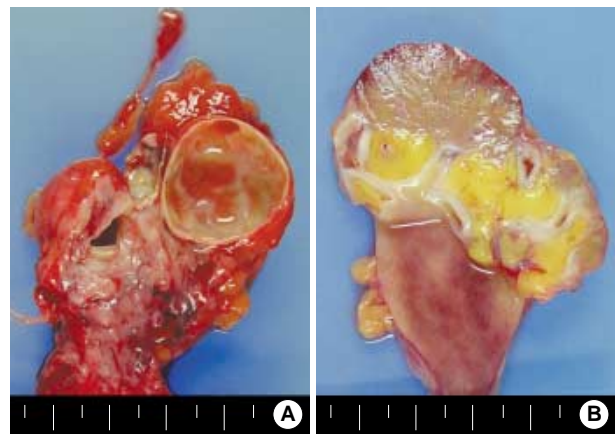


Fig. 1. Gross appearance of renal dysplasia. (A) The kidney of a 11-year-old girl with multicystic dysplasia (Potter type II) shows variably sized cysts in both cortex and medulla. (B) The kidney of a 32-year-old man with obstructive dysplasia (Potter type IV) shows dilated renal pelvis and ureter due to ureteral obstruction.

미분화 중간엽조직이 다양한 크기와 분포를 보이며 관찰되었다. 원시관은 단층의 입방상피세포나 중층의 원주상피세포로 피복되

어 있으며 원시관 주위로 미분화 방추세포가 소용돌이 치는 모양으로 둘러싸고 있다(Fig. 2A). 화생 연골을 형성한 예는 12예

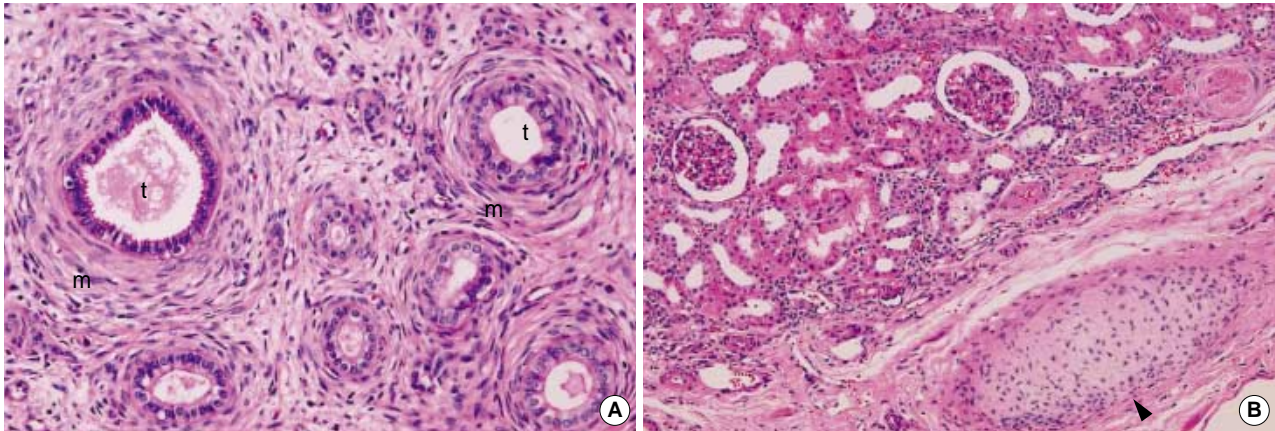


Fig. 2. Histologic findings of renal dysplasia. (A) Primitve ducts (t) consist of a single layer of cuboidal epithelium or pseudostratified columnar epithelium, and are surrounded by spindle mesenchymal cells (m). (B) Metaplastic cartilage (arrowhead) is seen in lower right area.

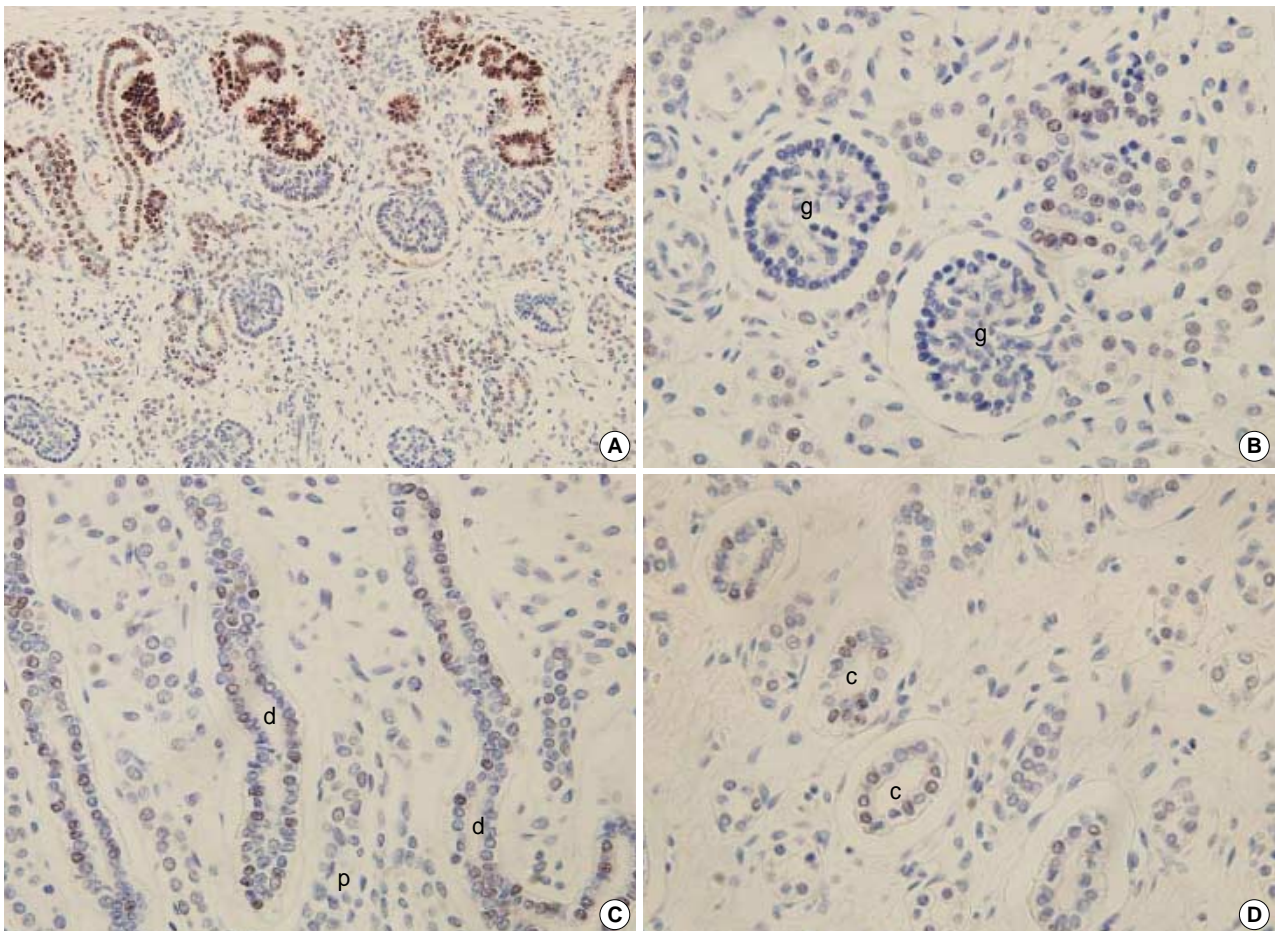


Fig. 3. Immunohistochemistry of PAX2 in normal fetal kidney in 24 gestational week. (A) There is a strong expression of PAX2 in the epithelium of S-shaped nephrogenic vesicle in the subcapsular nephrogenic area, with downward decrease to the center along with maturation. (B) There is a weak expression of PAX2 in parietal epithelial cells of glomerular tufts (g), but not in podocytes. (C, D) In medulla, there is a weak PAX2 expression in epithelia of distal tubules (d) and collecting ducts (c), but not in proximal tubules.

(40%)로 특이하게도 모두 소아군이었다(Fig. 2B). 원시관과 미분화 중간엽조직이 분포해 있는 위치에 따라 분류하면 속질에 위치한 것이 19예(63.3%), 겉질에 위치한 것이 3예(10%), 양쪽에 모두 위치한 것이 8예(27.7%)였고, 7예(23.3%)에서는 신우신염이 동반되어 있었다. Potter 분류에 따라 비교해 보면 제2형 중에서는 7예(70%)에서 이형성을 보이는 부위가 속질에만 국한되어 있었고, 제4형 중에서는 11예(55%)에서 이형성이 속질에만 국한되어 있었다. 제2형의 모든 예에서는 정상적인 겉질 조직이 관찰된 반면, 제4형의 5예(24%)에서는 정상적인 겉질 조직이 발견되지 않았다.

PAX2 발현 및 세포자멸사 지수

정상 신장에서 PAX2 발현

태아의 신장에서 PAX2는 피막 및 신장 발생 구역에 국한되어 강하게 발현되었고 중심부로 성숙되면서 발현이 뚜렷이 감소하였다. S자형 신장 발생 소포 상피에서 PAX2는 강하게 발현

되었고 미성숙 사구체의 벽세포에서 약하게 발현되었으며 성숙한 발세포에서는 발현되지 않았다. 속질로 가면서 원위관과 집합관의 상피에서는 다소 강하게 발현되었다(Fig. 3). 성인의 신장에서는 보우만 주머니의 벽 쪽 상피세포와 원위관과 집합관의 핵에서 다양한 강도로 발현되었고 사구체, 발세포, 근위관, 혈관, 사이질 세포 등에서는 발현되지 않았다(Fig. 4).

이형성 신장에서 PAX2 발현

이형성을 보이는 부분에서 PAX2는 원시관을 이루는 상피세포의 핵에서 강하게 발현되었고 주변의 중간엽세포에서는 관찰되지 않았다. 이러한 PAX2의 발현을 정량적인 기준으로 세 등급으로 나누어 보았을 때, 소아군에서는 원시관 상피세포의 핵 대부분에서 3+ 강도의 강한 발현을 보였고, 성인군에서는 2+ 강도의 발현이 자주 관찰되었으며 통계학적으로도 유의하였다 ($p=0.007$) (Fig. 5). 그 밖에 원시관이 남성 변화를 보이면서 납작해지는 부위에서는 PAX2의 발현이 감소하는 경향을 보였다.

이형성을 보이지 않는 주변의 정상 신장 조직에서는 PAX2의

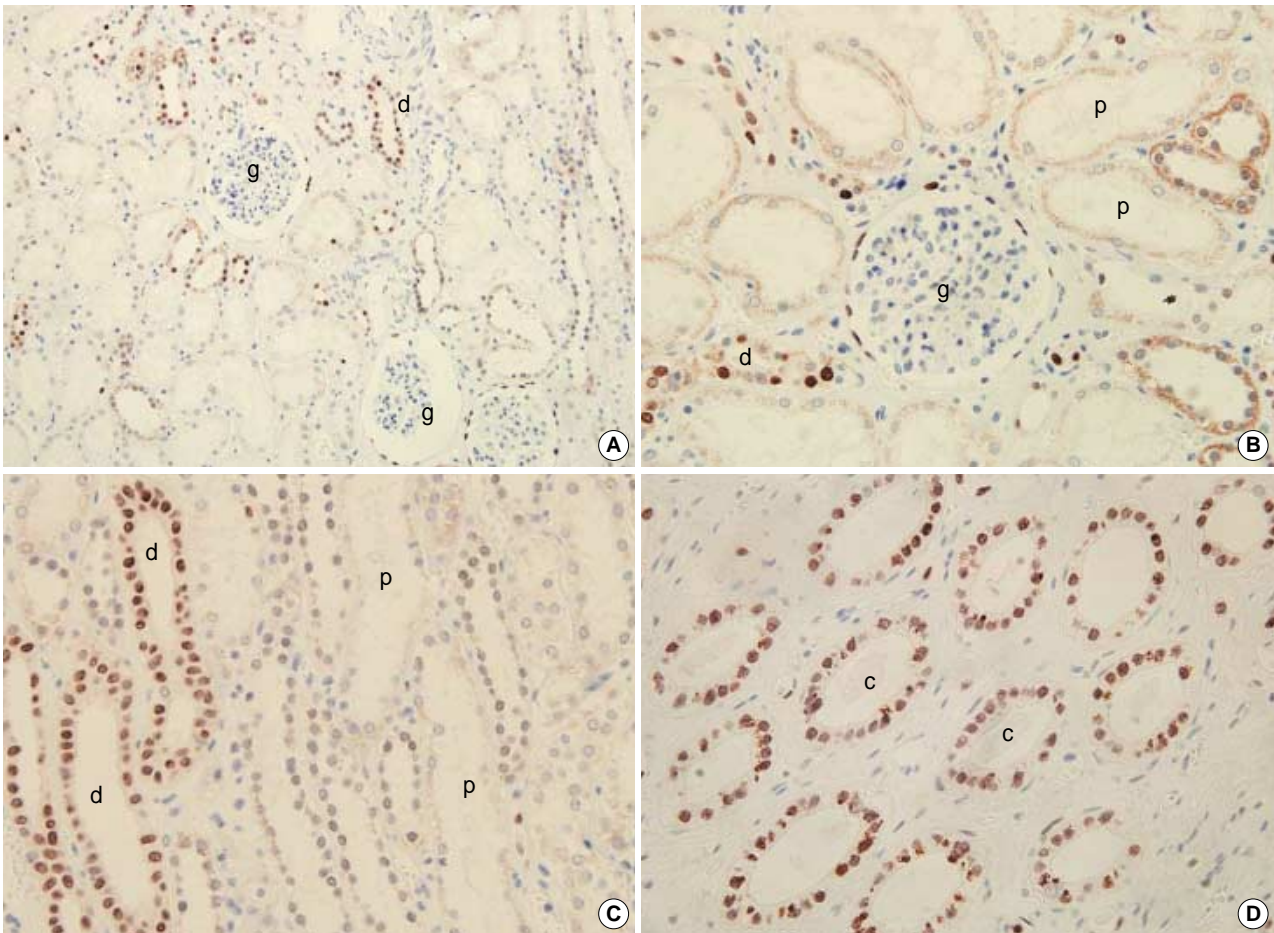


Fig. 4. Immunohistochemistry of PAX2 in normal adult kidney. (A, B) In cortex, there is PAX2 expression in parietal epithelial cells distal tubules (d), but not in glomerular tufts (g) and proximal tubules (p). (C, D) In medulla, strong expression is noted in epithelial nuclei of the distal tubules (d) and collecting ducts (c).

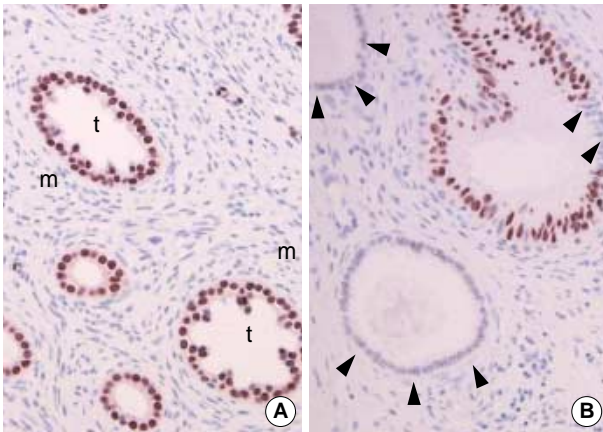


Fig. 5. Immunohistochemistry of PAX2 in primitive ducts of renal dysplasia. (A) In children, there is a strong PAX2 expression in most of epithelial nuclei of primitive ducts (t). PAX2 is not expressed in mesenchymal cells (m) surrounding primitive ducts. (B) In adults, epithelial cells of primitive ducts frequently shows negative (arrowheads) PAX2 expression.

Table 1. Comparison of PAX2 immunohistochemical stain in epithelium of primitive ducts and collecting ducts in children and adults with renal dysplasia

PAX2 expression	Children (n=20)				Adults (n=10)				p-value
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+	
Primitive ducts	0*	0	7	13	0	0	9	1	0.007
Collecting ducts	7	0	0	13	4	0	4	2	0.004

*, number of patients.

발현 양상이 정상 대조군에서와 비슷하게 나타났다. PAX2는 보우만 주머니의 벽 쪽 상피세포와 원위관과 집합관의 핵에서 발현되었고 사구체 발세포, 근위관, 혈관, 사이질 세포에서는 거의 발현되지 않거나 부분적으로 약한 양성반응을 보였다. 이 중 7예(23%)에서는 사구체의 발세포에서 국소적으로 PAX2가 발현되었다. 신장 구조의 부위에 따라 PAX2 면역조직화학염색 결과에도 차이가 나타났는데, 신장의 다른 부위보다 근위관과 집합관에서 강하게 발현되는 경향이 공통적으로 나타났다. 특히 집합관에서 PAX2의 발현 강도는 소아군에 비해 성인군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($p=0.004$) (Table 1). 그 외에 사구체의 발세포, 보우만 주머니의 벽세포, 근위관, 원위관 등 다른 부위에서는 소아군과 성인군 사이에 유의한 차이는 없었다.

세포자멸사 지수

원시관 상피세포의 세포자멸사 지수는 0.13 ± 0.41 로 주위의 정상적인 집합관 상피세포와 비교하였을 때 유의하게 증가하는 경향을 보였다($p=0.000$). 원시관 상피세포의 세포자멸사 지수는 소아군에서는 0.07 ± 0.15 , 성인군에서는 0.24 ± 0.68 로 성인군에서 세포자멸사 지수가 더 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.882$). 중간엽세포의 세포자멸사 지수는 소아

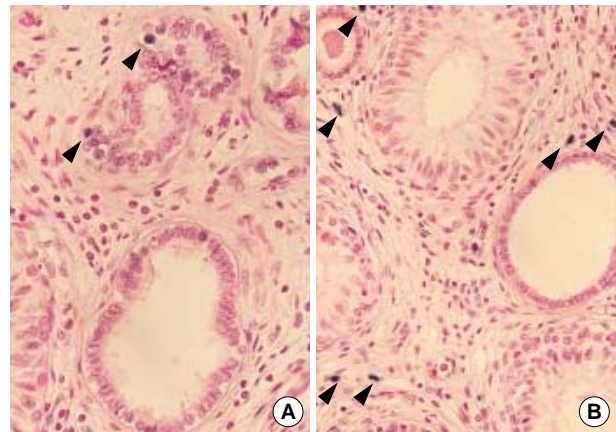


Fig. 6. Apoptosis in renal dysplasia. There are apoptotic cells (arrowheads) in primitive ducts (A) and surrounding mesenchymal tissue (B).

Table 2. Apoptosis index in primitive duct epithelium and undifferentiated mesenchyme in renal dysplasia

	Children (n=20)	Adults (n=10)	p-value
Primitive ducts	$0.07 \pm 0.15 /$ 100 cells	$0.24 \pm 0.68 /$ 100 cells	0.882
Undifferentiated mesenchyme	$11.70 \pm 15.73 /$ 10 HPF	$5.90 \pm 11.21 /$ 10 HPF	0.207

군에서 $11.70 \pm 15.73 / 10\text{HPF}$, 성인군에서 $5.90 \pm 11.21 / 10\text{HPF}$ 로, 원시관 상피세포에서와는 달리 소아군에서 세포자멸사 지수가 더 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.207$). PAX2의 면역조직화학염색 강도에 따른 세포자멸사 지수를 비교하면, 원시관 상피세포($p=0.879$)와 중간엽세포($p=0.7639$)에서 모두 PAX2의 발현 강도와 세포자멸사 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 2). 특히하게 원시관의 상피세포보다 주변의 중간엽세포에서 세포자멸사가 더 활발하게 나타나는 예가 많았다(Fig. 6).

원시관 주변의 중간엽세포에서 smooth muscle actin (SMA) 과 Masson's trichrome의 염색 양상

원시관을 둘러 싸고 있는 중간엽세포는 대부분 SMA 면역조직화학염색에 양성반응을 보여 평활근의 분화를 보였다. 염색 강도와 분포를 반정량적 기준으로 보았을 때 성인군보다 소아군에서 더 강하게 발현되는 경향을 보였으나 통계적 의미는 없었다($p=0.135$) (Fig. 7).

Masson's trichrome 염색 결과, 모든 예에서 원시관을 둘러싼 중간엽세포에 다양한 강도와 분포로 염색되었다. 또 SMA와 마찬가지로 성인군보다 소아군에서 더 강하게 염색되는 경향을 보였으나 의미 있는 차이를 보이지는 않았다($p=0.110$) (Fig. 7).

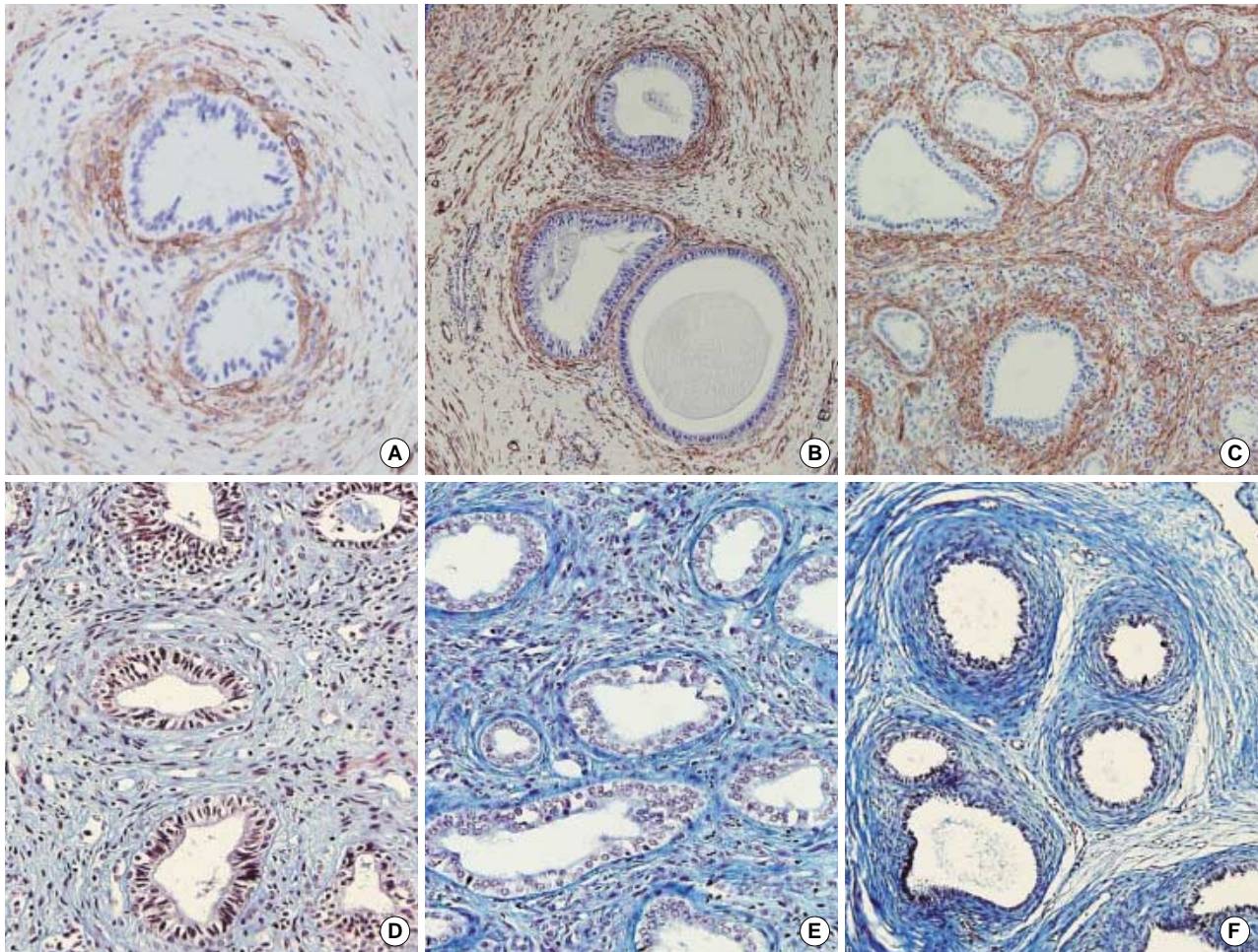


Fig. 7. Smooth muscle actin immunohistochemical and Masson's trichrome staining in renal dysplasia. (A-C) The mesenchymal cells surrounding primitive ducts show weekly positive (1+), moderately positive (2+), or strongly positive (3+) reaction for smooth muscle actin. (D-F) On Masson's trichrome staining the mesenchymal cells show weekly positive (1+), moderately positive (2+), or strongly positive (3+) staining.

고찰

PAX2는 정상적인 신장의 발생에서 볼프관(Wolffian duct)에서 나타나기 시작하여 후신의 요관짜과 그 유도체에서 발현하고 요관짜의 팽대부에서 가장 강하게 나타난다. PAX2는 후신 발생모체에서는 발현하지 않으며 신장 소포(renal vesicle), 콤마형 신장 발생 소포(comma-shape bodies), S자형 신장 발생 소포(S-shape bodies)와 발달하는 신장단위에서 나타난다. S자형 신장 발생 소포 단계에서는 발세포의 전구체에서 점차 사라지고 이후 단계에서는 더는 발현되지 않으며 출생 후에는 집합관에서 계속 발현된다.^{12,15,16} PAX2는 성인이 된 후에는 거의 발현되지 않지만, 일부 신 종양과 낭종성 질환의 증식하는 세포와 신독성 손상 후 재생하는 세포에서 강하게 발현된다는 보고가 있다.¹⁷ 본 연구에서 대조군으로 사용한 정상 태아의 신장에서는 앞서 이루어진 연구 결과와 비슷하게 주로 발생하는 신장단위와 집합관에서 PAX2가 발현되었고, 정상 성인의 신장에서는 주로 집합

관에서 강하게 발현되었다. 그러나 이전의 문헌들에 기술된 바와는 다르게, 태아의 신장과 성인의 신장 모두 보우만 주머니의 벽 세포와 원위세관에서 PAX2가 약하게 발현되는 소견을 보였다. 특히 원위세관에서는 집합관에서의 마찬가지로 강한 PAX2 면역조직화학염색 소견을 보였다.

신 이형성증에서 PAX2는 원시관의 상피세포에서 강하게 발현되며 원시관을 둘러싸고 있는 미분화 중간엽세포에서는 발현되지 않는다는 것이 여러 연구들을 통해 분명하게 밝혀진 바 있다.^{12,18,19} 본 연구에서 PAX2 면역조직화학염색을 시행한 결과, 이와 동일하게 모든 증례의 원시관 상피세포에서 PAX2가 강하게 발현되었고 주변의 중간엽세포들이나 화생 연골에서는 PAX2 면역반응을 관찰할 수 없었다. Winyard 등¹²은 신 이형성증을 제태기와 출생 후로 나누어 제태기의 신 이형성증 10예와 성인 2예를 포함한 출생 후 신 이형성증 12예에서 PAX2 발현 양상을 비교한 바 있다. 그들은 이 연구에서 정상적인 신장 발생에서는 성숙과정을 통해 세포의 증식과 PAX2의 발현이 감소하는

데 반해, 이형성을 보이는 원시관에서는 출생 전과 출생 후에 모두 높은 증식률과 강한 PAX2 발현을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서도 성인 신 이형성증 환자군의 원시관 상피에서 PAX2는 계속 발현되었으나 발현 강도는 소아 환자군보다 유의하게 감소하였다($p=0.007$). 또 이형성이 없는 집합관 상피세포에서 PAX2의 발현 정도도 성인군이 소아군보다 감소하여, 성장과 함께 PAX2의 발현 정도가 전반적으로 감소하는 것으로 추정하였다($p=0.004$).

신 이형성증에 대한 연구는 대부분 동물실험과 제태기의 신장 발생 단계에 중점을 두고 이루어졌기 때문에, 성인 신 이형성증에 대한 보고는 상대적으로 드문 편이다. 국내에서 보고된 증례들도 대부분 소아에 치중해 있는데, 강 등²⁰의 여러 저자가 현재까지 보고한 총 35예 가운데, 30예가 태어나 소아였고 5예만이 성인이었다. 본 연구에서는 신 이형성증 30예 중 10예가 성인인 것으로, 국내 단일 연구로는 가장 많은 성인군을 포함하고 있다. 신 이형성증 성인군을 소아군과 비교하였을 때 성별의 분포나 Potter 분류에 따른 차이는 보이지 않았다. 임상적으로 소아 환자들은 대부분 산전 초음파에서 수신증으로 발견되었고, 성인 환자들은 특별한 증상이 없이 지나다가 요로계 감염이 반복해서 나타나거나 신기능이 점차 떨어져 발견되는 차이를 보였다. 또 소아군이 성인군보다 다양한 비뇨 생식기계의 기형을 동반하는 경향을 보였다. 이는 산전 초음파로 출생 전에 신 이형성증이 진단되는 예가 점점 늘어났고, 성인 환자군은 이형성 정도나 동반 요로계 기형이 심하지 않아 소아기에 잘 발견되지 않은 결과일 것으로 추정된다. 조직 소견에서는 두 환자군에서 모두 원시관과 미분화 중간엽세포들이 다양한 분포를 보이며 관찰되었고, 연골 화생을 보이는 12예(40%)는 특이하게 모두 소아 환자들이었다. Potter 분류에 따른 임상 양상을 비교해 보면, 제2형보다 제4형에서 요로의 폐쇄로 인한 요관방광역류가 흔히 동반되었고, 결절에서도 이형성을 보이는 부분이 관찰되는 예가 더 많았으며, 정상적인 결절 조직이 보이지 않는 예도 더 많았다. 그러나 Potter 분류에 따른 PAX2의 발현 양상과 세포자멸사 지수는 유의한 차이를 보이지 않았다.

PAX2 변이 쥐에 대한 연구들을 통해 세포자멸사의 양과 위치는 요로상피에서 PAX2의 발현 양상과 잘 연관되어 알려져 있다. Porteous 등²¹은 PAX2 변이 쥐의 신 저형성증 발달과정에서 신장단위 유도 비율이 감소하며 요관쪽 끝부분에 있는 초기 상피구조와 사구체의 수가 감소하는 것이 과도한 세포자멸사와 연관이 있음을 알아냈다. 반면 세포의 증식 속도에서는 PAX2 변이 쥐와 정상 쥐가 차이를 보이지 않아, 증가한 세포자멸사가 PAX2 변이 쥐에서 신 저형성증이 나타나는 주요 원인이라고 주장하였다. Torban 등²²은 신장의 정상 발생 과정에서도 세포자멸사가 일어나지만 PAX2 변이 쥐의 집합관에서 정상 쥐보다 9배나 많은 세포자멸사가 나타나며, 이는 퇴화를 진행시켜 볼프관이 꼬리 쪽으로 연장되는 것을 방해한다는 사실을 발견하였다. 반면 중간엽에서 유래한 구조에서는 PAX2가 발현되더라도 세

포자멸사가 일어나지 않는데, Eccles 등은 이러한 현상이 나타나는 이유가 중간엽 구조에서는 PAX8이 함께 발현하여 PAX2의 변이가 있더라도 보완할 수 있기 때문이라고 설명하였다.¹⁵ 그러나 사람에게서 발생하는 신 이형성증을 연구한 Winyard 등¹²은 이전의 연구 결과와는 달리, 이형성 상피에서는 세포자멸사가 드물게 나타나고 오히려 원시관 주변의 미분화 세포에서 세포자멸사가 뚜렷하게 나타난다고 보고하였다. 이들은 세포자멸사가 일어나지 못하게 막는 기능을 하는 BCL2가 정상 신장 발생 과정에서는 요관쪽과 그 유도체인 팽대부나 집합관에서 나타나지 않지만, 신 이형성증에서는 BCL2가 PAX2의 발현 양상과 비슷하게 원시관 상피의 세포질에서 발현되며 원시관 주변의 미분화 중간엽 조직에서는 BCL2가 발현되지 않는다는 사실을 밝혀냈다. 그리하여 이들은 원시관보다 주변의 미분화 실질에서 PAX2에 의한 분화가 일어나지 않고 BCL2에 의해 유지되는 생존의 실패로 초래된 퇴행 과정으로 설명하였다. 본 연구에서는 원시관의 이형성 상피와 주변의 미분화 중간엽세포에서 모두 세포자멸사가 관찰되었으며, Winyard의 연구 결과와 같이 원시관보다 주변의 중간엽세포에서 세포자멸사가 더 활발하게 나타남을 볼 수 있었다.

신 이형성증 환자가 출생 후 성인이 될 때까지 원시관을 둘러싸고 있는 미분화 중간엽세포에서는 PAX2가 발현되지 않으며 도중에 사멸하거나 평활근의 표현형을 보이는 화생을 일으킨다.²³ 본 연구에서도 모든 예에서 원시관을 둘러싸고 있는 중간엽세포는 SMA 면역염색에서 평활근의 분화를 보였으며 trichrome에도 다양한 정도로 염색되어 섬유근육조직으로 분화되었다. 대상 예의 연령이 증가할수록 SMA와 trichrome의 염색 강도는 감소하는 경향을 보였는데, 이런 차이도 세포자멸사에서 보였던 소견과 같은 원인으로 유발된 퇴행 과정으로 생각된다. 일부 성인 환자에서는 종종 원시관 주변의 미분화 중간엽조직이 잘 관찰되지 않는다. 이런 경우 미성숙한 집합관이나 단순 낭성변화를 보이는 구조와 신 이형성증을 진단하는 데 필수적인 원시관과 미분화 중간엽조직을 구별하기 힘들데, 이것도 미분화 중간엽조직의 퇴행으로 인한 결과로 설명할 수 있다.

사구체에서 PAX2의 발현은 정상적인 신장 발생과 신 이형성증에서 모두 보고된 바 없다. 그런데 본 연구에서는 7예(23%)에서 남아 있는 사구체의 소수에서 PAX2가 발세포에 부분적으로 발현된 부위가 관찰되었다. 그동안 발세포에서 PAX2 발현은 특발성 허탈 사구체 병증(idiopathic collapsing glomerulopathy), HIV와 연관된 신장병증(HIV-associated nephropathy), 원발성 초점분절사구체경화증(primary focal segmental glomerulosclerosis) 등에서 드물게 보고된 바 있다.^{24,25} Patek 등²⁶은 murine Denys-Drash 증후군에 대한 연구에서 사구체 경화증을 보이는 사구체의 발세포에서 PAX2가 발현된다고 보고하였고, 이는 murine Denys-Drash 증후군에서 보이는 발세포의 WT1 발현 소실과 직접적인 연관 없이 일어나며 지속적인 PAX2 발현에 의한 결과가 아니라 사구체 경화증에 의해 PAX2가 다시 발현된

것이라고 주장하였다. 그러나 원발성 초점 분절 사구체경화증에서 보이는 발세포의 표현형 변화를 연구한 Ohtaka 등²⁵은 PAX2의 발현이 사구체경화증의 중요한 원인이라고 주장하였다. 이들은 정상 사구체의 발세포에서는 WT1이 발현되고 PAX2와 cytokeratin에는 음성이지만 초점분절사구체경화증에서는 사구체의 발세포에서 WT1의 발현이 감소하고 PAX2와 cytokeratin이 강하게 발현되어 신장 발생 단계의 미성숙한 발세포와 유사한 상태가 되는 것을 발견하였고, 이를 발세포의 표현형이 변하여 일어난 결과로 해석하였다. 이들은 이러한 발세포에서 PAX2 재발현이 표현형 변화를 유발하고, 이것이 초점분절사구체경화증 형성에 중요한 역할을 한다고 주장하였다. 본 연구에서도 PAX2 발현을 나타낸 사구체들에서 PAS염색을 통해 다양한 사구체 경화증을 확인하였다. 또 일부 예는 만성 신우신염이 동반되어 있어 사구체 손상 후 재생되는 과정에서 발세포에 PAX2가 일시적으로 발현된 것으로 생각하였다. 그러나 사구체의 발세포 내 PAX2의 발현 빈도가 23%로 높아서, 이러한 발현율이 이형성증이 있는 신장에서 더 빈번하게 관찰되는 것인지를 밝히기 위해서는 연구가 더 필요하리라고 생각한다.

참고문헌

- Bonsib SM. Non-neoplastic disease of the kidney. In: Bostwick DG, Eble JN, eds. Urologic surgical pathology. 1st ed. St. Louis: Mosby, 1997; 21-4.
- Bernstein J, Gilbert-Barness E. Congenital malformation of the kidney. In: Tisher CC, Brenner BM, eds. Renal pathology with clinical and functional correlations. 1st ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1989; 1288-301.
- Sekine T, Namai Y, Yanagisawa A, et al. A familial case of multicystic dysplastic kidney. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 1245-8.
- Al Saadi AA, Yoshimoto M, Bree R, et al. A family study of renal dysplasia. *Am J Med Genet* 1984; 19: 669-77.
- Fletcher J, Hu M, Berman Y, et al. Multicystic dysplastic kidney and variable phenotype in a family with a novel deletion mutation of PAX2. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2754-61.
- Risdon RA. Development, developmental defects, and cystic diseases of the kidney. In: Heptinstall RH, ed. Pathology of the kidney. 4th ed. Boston: Little, Brown and Company, 1992; 110-21.
- Potter EL. Normal and abnormal development of the kidney. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1972.
- Schwartz RD, Stephens FD, Cussen LJ. The pathogenesis of renal dysplasia: III. complete and incomplete urinary obstruction. *Invest Urol* 1981; 19: 101-3.
- Mackie GG, Stephens FD. Duplex kidney: a correlation of renal dysplasia with position of ureteral orifice. *J Urol* 1975; 114: 274-80.
- McConnell MJ, Cunliffe HE, Chua LJ, Ward TA, Eccles MR. Differential regulation of the human Wilms tumor suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene* 1997; 14: 2689-700.
- Eccles M, Bockett N, Stayner C. PAX2 and renal-coloboma syndrome. In: Vize PD, Woolf AS, Bard JB, eds. The kidney: from normal development to congenital disease. 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 2003; 411-32.
- Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR, Dressler GR, Woolf AS. The PAX2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J Clin Invest* 1996; 98: 451-9.
- Yang SP, Woolf AS, Yuan HT, et al. Potential biological role of transforming growth factor-beta1 in human congenital kidney malformations. *Am J Pathol* 2000; 157: 1633-47.
- Woolf AS, Winyard PJ. Gene expression and cell turnover in human renal dysplasia. *Histol Histopathol* 2000; 15: 159-66.
- 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 Wilms' tumors. *Am J Pathol* 1995; 146: 40-5.
- Eccles MR. The role of PAX2 in normal and abnormal development of the urinary tract. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 712-20.
- Gnarra JR, Dressler GR. Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 1995; 55: 4092-8.
- 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: 1081-97.
- Shibata S, Nagata M. Pathogenesis of human renal dysplasia: an alternative scenario to the major theories. *Pediatr Int* 2003; 45: 605-9.
- Kang GH, Kim JO, Kim BK, Suh KS. Renal dysplasia: a clinicopathologic review of six cases. *Korean J Pathol* 1997; 31: 34-9.
- Porteous S, Torban E, Cho NP, 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.
- Torban E, Eccles MR, Favor J, Goodyer PR. PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells. *Am J Pathol* 2000; 157: 833-42.
- Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJ. Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 998-1007.
- Yang Y, Gubler MC, Beaufile H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 2002; 91: 416-23.
- Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, et al. Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by PAX2 in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 475-85.

26. Patek CE, Fleming S, Miles CG, *et al*. Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic medication of glomerulosclerosis. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2379-94.
27. 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: 181-92.