

면역억제제에 의한 당뇨 관련 유전자의 DNA microarray 분석

김경신¹ · 김병수¹ *

DNA Microarrays Analysis of Gene Expression Profiles in Diabetes-related genes using Immunosuppressant

Kim Kyoung-Shin¹ · Kim Byoung-Soo¹ *

¹Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

New onset diabetes is a major complication after kidney transplantation. However, the natural course of posttransplantation diabetes mellitus (PTDM) remains unclear. The aim of this study was to demonstrate the detailed natural courses of PTDM according to the onset and persistency of hyperglycemia, and to investigate risk factors for development of different courses of PTDM in renal allograft recipients. The purpose of this study is to develop novel immune suppressants for PTDM using of action mechanism of them.

The use of immunosuppressive drugs in transplanted patients is associated with the development of diabetes, possibly due to β -cell toxicity. To better understand the mechanisms leading to post-transplant diabetes, we investigated the actions of prolonged exposure of β -cells to therapeutical levels of tacrolimus (FK506) or cyclosporin A(CsA).

The immunosuppressive drug cyclosporine(CsA) is a potent agent widely used after organ transplantations and various autoimmune disorders. After using CsA, some patients suffer severe complications including renal and vascular toxicity. The renal or vascular toxicity is influenced by the degree of the endothelial damage. FK506(tacrolimus) is a widely used immunosuppressive agent in the treatment of various medical conditions, including autoimmune disease, bone marrow and organ transplantations.

We found some interesting clusters and confirmed the feasibility of cDNA microarray in the study of Immunosuppressant. In this study, we investigated gene expression patterns induced by Immunosuppressant in RIN-m5F of rat insulinoma cell line. Gene expressions evaluated using cDNA microarray in two clusters were increased or decreased. this study provides comprehensive comparison of the patterns of gene expression changes induced by CsA and FK506 in β -cells. This study could establish that the mode of action mechanism by which currently used insulin inhibitors inducing PTDM could be elucidated at least in part, which raises the possibility that novel immune suppressive PTDM can be developed. The molecular biological study on PTDM will also contribute the progress in diabetes research field as well as in that of PTDM.

Key words : Immunosuppressants, Tacrolimus(FK506), Cyclosporine(CsA),
PTDM(Post-Transplant Diabetes Mellitus), DNA microarray

I. 서론

신장 이식 후 발생하는 당뇨병을 이식후 당뇨

* 교신저자 : 김병수 대전대학교 생리학교실

E-mail : kbsoo25@dju.kr

투고일 : 2012년 6월11일 게재일 : 2012년 6월27일

병(PTDM; Post-transplantation Diabetes Mellitus)이라 한다. 장기이식 수술 전에 당뇨병이 없던 환자가 수술을 받은 후 약물 치료를 받는 과정에서 발생하는 당뇨병으로 장기 이식 환자는 수술 후 필수적으로 면역억제제 치료를 받는다. 하지만, 면역 억제제의 영향으로 인슐린을 분비하는 췌장의 기능 및 수용체의 기능을 억제하는 부작용이 발생한다. PTDM을 유발하는 분자적 기전은 아직 정확히 알 수 없지만 다만, corticosteroid는 당뇨 유발의 주요한 인자로서 알려져 있다. 최근 면역 억제제와 corticosteroid의 병합으로 인해 corticosteroid를 저용량으로 사용하게 되어 PTDM의 발병률은 낮아졌으나 면역억제제인 cyclosporin과 tacrolimus 자체도 PTDM을 유발하는 특성을 나타낸다. Cyclosporin과 tacrolimus 같은 면역억제제는 immunophilin과 결합하여 calcineurin 억제를 이루는데 이것은 면역 억제제의 대표적 기전이다.

대표적인 면역억제제인 사이크로스포린(Cyclosporine)과 FK506(Tacrolimus)는 calcineurin의 활성화를 억제하는 면역 억제 기전을 삼는 것으로 지금까지의 면역억제제 중 가장 널리 사용되어지고 있다. 하지만, NFAT family는 복잡한 작용기전으로 면역반응에 관여하며, 특히 칼슘 시그널링과 다른 시그널링의 상호작용에 의해 면역반응을 조절한다. 이처럼 Cyclosporine은 탁월한 면역 억제 작용으로 인해 이식 환자에게 널리 사용되는 약제이나 약물 농도의 치료 범위(therapeutic window)가 좁다. 따라서 체내 cyclosporine의 약물 농도가 낮은 경우에는 급성 거부반응과 이식 장기의 소실 빈도를 증가시키고 cyclosporine의 약물 농도가 높은 경우에는 각종 부작용을 야기한다. 또한 cyclosporine은 약물 흡수의 변동이 심하여 만성 거부반응을 일으키는 요인이 되기도 한다¹⁾. 하지만, 이들 약물 간에 PTDM 유발에 차이를 보인

다는 연구 결과는 calcineurin에 의한 인슐린 억제 기전에 있어서 다른 대체 기전이 관여하고 있음을 보여준다¹¹⁾. 따라서 본 연구에서는 DNA chip을 이용하여 면역억제제에 의해 췌장베타세포주인 RIN-m5F 세포에서 유전자들의 발현과 대사과정의 연관관계를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

Insulinoma cell line인 Rat RIN-5mF cells (ATCC® Number: CRL-11605Tm)을 계대 번호가 10에서 17번 사이의 것을 사용하여, 10% FBS (Gibco-BRL, GrandIsland, NY), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodiumpyruvate, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 혼합한 RPMI-1640 (Gibco-BRL, GrandIsland, NY) Media에서 37°C에서 5% CO₂ incubator에서 배양한다. well plate에 well당 5×10⁴개의 세포를 배양한 후 12시간이 지난 후 세포가 플레이트에 완전히 부착된 것을 확인 후에 사용하였다. 면역억제제의 농도는 50 nM FK-506(Sigma-Aldrich. St, Louis, MO, USA. F4679), 10 µM Cyclosporine(Sigma-Aldrich. St, Louis, MO, USA. C1832)으로 사용하였다.

2. 인슐린 분비능 측정 (Insulin ELISA kit)

RIN-5mF 세포를 well 당 3.0 × 10⁵개로 12-well plate에 분주하여 완전배지에서 3일간 배양한 후 면역억제제 함유한 배지에서 배양하였다. modified Kreb's ringer bicarbonate 완충액(KRBB-HEPES, 134 mmol/L NaCl, 4.8 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L MgSO₄, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L HEPES, 1 mg/mL BSA, pH7.4)로 2회 세척하고 5 mM 또는 20 mM의 포도당을 함유한 KRBB-HEPES 완충액으로 바꾸어 1시간 배양한 후, 상층액을 취하여 4°C에서

1) 김정미·김동한·김태우·조규향·최준혁·박종원·도준영·윤경우. 이식 후 12개월이 지난 신 이식 환자에서 Cyclosporine Trough Level과 2-hour Postdose Blood Level 사이의 상관 관계 및 적정 C₂ Level. 대한신장학회지, 21(3):435-442, 2002.

10분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20°C 에 보관하였다. 분비된 인슐린의 양을 rat insulin RIA kit로 측정하고 각 well의 세포 단백질의 농도를 측정하여 각 단위 그램 단백질 당 인슐린 분비량을 계산하였다.

2. RNA Extraction

DNA microarray 분석을 위한 RNA의 준비는 TRIZOL reagent (Invitrogen Life Technologies, USA)를 이용하였다. 간단히 요약하면 충분히 세포를 씻어낸 후 1 mL TRIZOL reagent를 처리하고 상온에 5분간 방치하였다. 그 후 4°C 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층용액을 새 tube에 옮겼다. 여기에 0.2 mL의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 vortex 하였다. 그 후 15분 동안 상온에 방치 하였다가 후 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층용액을 새 tube에 옮겼다. 동일 부피의 isopropanol을 첨가하고 상온에서 5분간 방치 하였다가 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. RNA sample은 Agilent's 2100 Bioanalyzer System을 이용하여 total RNA의 quality를 측정하였고 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS를 이용하여 증폭 및 라벨링 과정을 수행하였다.

3. DNA Microarray 및 데이터 분석

Agilent Rat whole genome 44K Oligo chip(G4131A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)을 사용하여 Microarray hybridization은 Agilent's Gene Expression Hybridization Kit를 그리고 Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit를 이용하였다. 그리고 Scan and image analysis는 Agilent's DNA microarray scanner 및 Feature Extraction Software를 사용하였다. Data Analysis는 Agilent's GeneSpring Software를 이용하여 normalization 및 clustering 등을 수행하였다.

II. 결 과

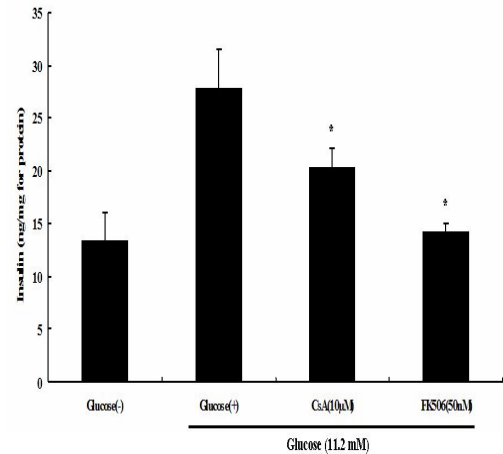


Fig. 1. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in RIN-5mF cells. Glucose responsiveness is suppressed by immunosuppressant pretreatment. RIN-5mF cells were treated with 50 nM tacrolimus, 10 μM CsA or nothing for 60 min in complete RPMI-1640 media. Data shown \pm S.D. * $P < 0.05$.

1. 면역억제제의 인슐린 분비능 차이

면역억제제인 CsA와 FK506을 첨가 배양한 RIN-5mF 세포를 배양한 후 인슐린 분비능에 미치는 효과를 알아보았다. 대조군과의 차이는 면역억제제에 따른 인슐린의 분비량이 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

2. RIN-m5F세포에서 면역억제제에 의한 유전자 발현

Hierarchical clustering을 이용하여 분석한 전체적인 유전자 발현 양상을 TreeView 프로그램을 이용하여 Fig. 2에 도시하였다. average-linkage hierarchical clustering 방법²⁾을 각 유전자와 샘플에 적용하여 그 결과를

2) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide

면역억제제에 의한 유전자 발현의 특성을 관찰하고, 연관성을 알아보았다. 가로축에는 각 샘플들이, 세로축에는 유전자들이 배열되며, 유전자 발현 양상의 유사성에 근거하여 배열순서가 결정된다. 즉, 가로축에서는 dendrogram에서의 가지의 거리가 짧을수록 유전자 발현에 유사성이 있는 것이다.

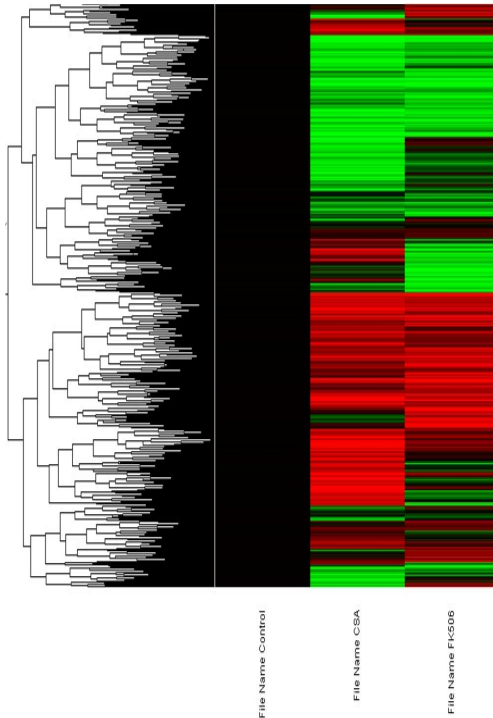


Fig. 2 Cluster image showing the different classes of total gene expression profiles.

3. 면역억제제에 의한 유전자 발현 차이 분석

Fig. 3는 면역억제제에 의한 영향 중 면역억제제를 처리한 실험군에서 2배 이상 증가한 유전자 중 당대사 및 인슐린 관련 유전자를 클러스터 한 것으로 Fig. 3(A)의 경우 CsA 의해서 NFAT 관련 유전자를 나타낸다. Tnfaip8의 경우 2배 이상의 증가를 보였으며 Fkbp9, Ppid, Fos는 유전자 발현의 저하를 나타내고 있다. Fig. 3(B)의 경우

CsA 의해서 당대사 관련 유전자를 나타낸다. Pdk1, Irs2의 경우 2배 이상의 증가를 보였으며 Shc4, Shc1는 유전자 발현의 저하를 나타내고 있다. Fig. 3(C)의 경우 CsA 의해서 cytochrome P450(CYP) 관련 유전자를 나타낸다. Cyp2c79, Cyp26b1의 경우 2배 이상의 증가를 보였으며 Cyp11b3, Cyp2s1는 유전자 발현의 저하를 나타내고 있다.

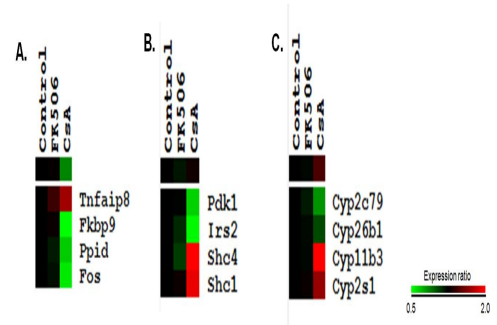


Fig. 3. Hierarchical cluster of genes changing in Immunosuppressants treated RIN-m5F cell compared with 2X regulated genes in only CsA. A. Cluster of NFAT-related genes B. Cluster of glycometabolism genes C. Cluster of CYP genes

Fig. 4는 면역억제제에 의한 영향 중 면역억제제를 처리한 실험군에서 2배 이상 증가한 유전자 중 당대사 및 인슐린 관련 유전자를 클러스터 한 것으로 Fig. 4(A)의 경우 FK506 의해서 NFAT 관련 유전자를 나타낸다. Calm2, Ppil2, Tnfaip1의 경우 2배 이상의 증가를 보였으며 Fkbp15, Fkbp1b는 유전자 발현의 저하를 나타내고 있다. Fig. 4(B)의 경우 FK506에 의해서 cytochrome P450(CYP) 관련 유전자를 나타낸다. Cyp2d1의 경우 2배 이상의 증가를 보였으며 Cyp2ab1, LOC293989는 유전자 발현의 저하를 나타내고 있다. 관련 유전자들을 정리하여 Table 1에서 나타내었다.

expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA, 95(25):14863-8, 1998.

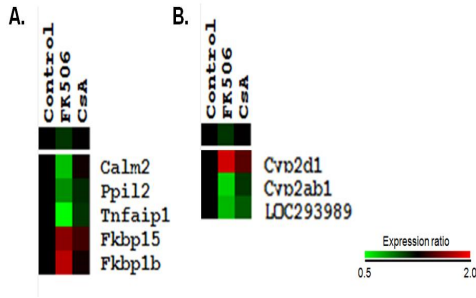


Fig. 4. Hierarchical cluster of genes changing in Immunosuppressants treated RIN-m5F cell compared with 2X regulated genes in only FK506. A. Cluster of NFAT-related genes. B. Cluster of CYP genes

Table 1은 MODY 관련 유전자군(A)과 인슐린 관련 유전자군(B), NFAT 관련 유전자군(C), 그리고 CYP 관련 유전자군(D)을 정리한 것이다. 인슐린 관련 유전자군에서 Akt2 발현은 FK506이 낮아지는 것에 비해 CsA는 2배에 가까운 증가를 보였고, CYP 관련 유전자군에서는 Cyp2s1는 CsA가 1에 가까운 것에 비해 FK506은 4.77을 보였고, Cyp11b3는 CsA가 1에 가까운 것에 비해 FK506은 50을 보이고 있다.

Table 1. Genes changed in RIN-m5F Insulinoma cells affected by Immunosuppressants

(A) MODY-related genes

Name	Control	CSA	FK506	UNIQUID
Gck	1	0.4646359	0.6449316	NM_012565
Hnf4a	1	0.7929026	0.6183444	NM_022180
Neurod1	1	0.2181226	0.4547653	NM_019218

(B) Insulin-related genes

Name	Control	CSA	FK506	UNIQUID
Foxa3	1	2.3881323	0.5891085	NM_017077

Hnf4g	1	0.8647901	1.7895476	NM_001108939
Akt2	1	1.818966	0.3982587	NM_017093
Ins2	1	0.5968204	0.9651177	NM_019130
Mafa	1	1.101778	9.167893	XM_345846
Pdx1	1	0.3767616	0.7865572	NM_022852
Irs2	1	0.2594712	0.8028583	NM_001168633
Irs3	1	0.6665288	0.9397765	NM_032074
Shc1	1	3.581737	1.0724908	NM_001164060
Pclo	1	0.1765321	0.42661	NM_001110797
Rfx6	1	0.1581443	0.6538928	NM_001106388
Lnpep	1	2.0866654	0.7025099	NM_133574

(C) NFAT-related genes

NAME	Control	CSA	FK506	UNIQUID
Calm2	1	1.101	0.3492	NM_017326
Gsk3b	1	0.6742	0.9584	NM_032080
Fkbp4	1	1.887	0.9481	NM_001191863
Fkbp9	1	0.2562	1.06	NM_001007646
Fos	1	0.2917	0.9208	NM_022197
Ifng	1	0.9253	0.1961	NM_138880
Il10	1	0.8401	0.1804	NM_012854
Il4	1	1.482	0.3248	NM_201270

(D) CYP-related genes

NAME	Control	CSA	FK506	UNIQUID
Cyp2s1	1	1.1093131	4.7724085	NM_001107495
Cyp26b1	1	0.9020542	0.4621565	NM_181087
Cyp11b3	1	0.9373846	50.930046	NM_181824
Cyp2c79	1	0.7706707	0.2123613	XM_219933

III. 고찰 및 결론

장기이식 후 면역억제제는 평생 복용해야 한다. 이에 따른 장기간 복용은 환자에게 경제적인 부담뿐 아니라, 감염위험률, 악성종양의 발병률 및 고혈압, 당뇨병, 고지질혈증과 같은 합병증 발

병을 증가시킨다. 장기이식 후 당뇨병은 20~30%에서 발병하는데 이는 정상인보다 3~4 배 높은 수치이다³⁾. 면역억제제 사용은 병합요법으로 이루어지는데 단기간 신장이식의 성공률을 증가시키고 타 장기이식 성공률 또한 비약적으로 끌어올렸으나 면역억제제로 인한 부작용 역시 증가하였다. 장기이식 이후 거부반응을 막아 치료 성공률을 높이는 면역억제제가 다른 한편으로는 여러 부작용을 발생시키는 것이다. 면역억제제로 인한 부작용들은 아직까지 면역억제제의 감량만이 유일한 치료방법으로 알려져 있다⁴⁾. 최근의 다양한 약물 개발은 질병 치료에 있어서 다제병용요법을 가능하게 하였다. 이로써 약물상호간 작용을 예측하여 부작용을 최소화하고 약리작용을 극대화하는 것이 무엇보다 중요한 과제로 떠올랐다.

Cyclosporin A와 FK506은 현재 임상에서 흔히 쓰이고 있는 강력한 면역억제제이다. CsA는 1976년 발견된 이래 장기이식의 새 장을 열었다고 평가되며, FK506은 1987년에 발견되었다.

이 두 가지 약제는 모두 진균에서 분리되었으며, 비록 그 구조는 상이하지만 작용기전에는 상당한 공통점이 있다. 이 두 가지 약제는 세포내에서 immunophilin이라 불리는 수용체와 결합하는데, CsA의 경우 cyclophilin, FK506의 경우에는 FK506-binding proteins(FKBPs)이 알려져 있다⁵⁾. 이 세포내 수용체들은 peptidyl-prolyl isomerase 활성을 가지고 있어서 세포내에서 단백질 샤페론으로 작용한다. 즉, 약제와 immunophilin의 복합체는 calcineurin과 결합하여 calcineurin의 기질인 nuclear factor of activated T cells(NFAT)의 탈인산화를 억제함으로써, NF-AT에 의한 각종 염증 유발성 사이

토카인의 전사를 억제한다⁶⁾⁷⁾. 대표적인 전사인자(transcription factor)인 NFAT는 유전자 발현 조절에 있어서 transcription coactivator(jun, fos)의 관여가 필수적이며 다양한 유전자 발현에 영향을 미치게 된다. 따라서 기존의 면역억제제들은 NFAT를 매개로한 억제기전을 공통적으로 가지나 각 약물에 따른 인슐린 합성에 차별적 영향을 미친다.

면역억제제 (CsA와 FK506)는 calcineurin/NFAT signaling 억제를 갖기 때문에 다양한 유전자 발현에 영향을 미치게 된다. 특히, 인슐린 유전자에서 NFAT는 필수적인 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. NFAT 단백질은 베타세포의 인슐린 프로모터에 작용하여 인슐린 발현을 조절하며 증진시킨다. 이러한 증거로는 베타세포에서 calcineurin Knockout(KO) 마우스를 이용하여 NFAT 활성화를 유도하면 인슐린 분비, 베타세포의 증식과 크기를 회복시키며 KO 마우스의 당뇨 발병을 방지한다는 보고와 calcineurin 불활성화에 의해 베타세포의 결손이 NFATc1의 발현으로 복구시킨다는 연구⁹⁾를 통해 NFATc 단백질이 베타세포의 calcineurin에 매우 결정적인 역할을 가지며, 베타세포의 4가지 NFATc 단백질(NFATc1-c4) 발현은 calcineurin에 의해 활성

3) First MR. Tacrolimus based immunosuppression. J Nephrol. 17:S25-31, 2004.
 4) 강종명. 새로운 면역억제제의 임상적 응용. 대한신장학회지, 제18권 부록1호, pp100-111, 1999.
 5) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell 66:807-15, 1991.

6) Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. Nature 357:695-7, 1992.
 7) O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506 and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. Nature 357:692-4, 1992.
 8) Michael C. Lawrence, Harshika S. Bhatt, Jeannette M. Watterson, And Richard A. Easom: Regulation of Insulin Gene Transcription by a Ca²⁺ Responsive Pathway Involving Calcineurin and Nuclear Factor of Activated T Cells. Molecular Endocrinology 15(10):1758-1767, 2001.
 9) Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB: Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. EMBO J 17: 6701--6713, 1998.

화됨을 설명하였다¹⁰⁾.

특히 면역억제제는 임상에서 사용되고 있는 대부분의 약물과 마찬가지로 간에서 cytochrome P450(CYP) 효소군에 의해 제 1 상 산화반응을 거쳐 대사된다. 이들 효소의 유전자에는 여러 종류의 다형성(polymorphism) 혹은 변이(mutation)가 존재하고 있는데, 개인 별로 어떤 형의 유전자를 가지고 있느냐에 따라서 약물 대사에 차이가 나타난다¹¹⁾¹²⁾. 면역억제제인 FK506(Tacrolimus)의 경우도 간에서 대사되며 cytochrome P450 isozyme CYP3A4 효소계를 이용한다. 이 효소계는 칼슘 길항제, 스테로이드, cyclosporine, macrolide 항생제 등의 산화에도 관여하므로 여러 약물과의 상호작용이 가능하다¹³⁾. CsA의 경우도 혈중 및 조직 중 약물농도에는 위장관 및 간 내 시토크롬 P450 (CYP450) 효소군 중 CYP3A4 및 CYP3A5 와 P-glycoprotein이 관여한다. 이 대사체들과 수송단백질은 유전적 또는 비유전적 영향을 받으며 이로 인하여 개인 간 또는 개인 내의 약동력학적 차이와 이로 인해 임상적으로 영향을 미칠 수가 있다. 또한 약물 유전학적으로 CYP3A5*1 allele을 가지면 CsA의 혈중 농도가 낮아지며 CYP3A5*5 allele을 가지면 혈중 CsA의 농도가 높아진다고 알려져 있다¹⁴⁾.

이식 환자에서 면역 억제제로 사용되는

cyclosporine은 약물농도의 치료 범위가 좁아서 체내 cyclosporine의 약물 농도가 낮은 경우에는 급성 거부반응과 이식 장기의 소실(graft loss) 빈도를 증가시키고 체내 cyclosporine의 약물 농도가 높은 경우에는 각종 부작용을 야기한다. 또한 cyclosporine은 개인 간혹은 동일인 내에서도 약물 흡수의 변동이 심하여 만성 거부반응을 일으키는 요인이 되기도 한다. 따라서 각종 부작용 및 독성은 피하면서 내성은 향상시켜 cyclosporine의 임상적 효능을 증대시키고자 cyclosporine의 체내 적정 약물 농도를 유지시키기 위한 노력은 계속되어 왔다¹⁵⁾.

이와 같은 약물간의 작용기전의 차이는 한약재를 기반으로 하는 한의학에서도 필요한 연구라 보인다. 동일한 질환의 한의처방에 대한 세부 기전에 대한 연구는 향후 한의학의 과학화에 필수적이며, 장기이식 등에 필요한 한약재를 발굴하여 향후 기존 면역억제제와 비교 연구할 필요가 있다.

대표적인 면역억제제인 (CsA와 FK506)는 calcineurin/NFAT signaling 억제제를 갖기 때문에 NFAT에 의해 베타세포의 인슐린 프로모터에 작용하여 인슐린 발현을 조절작용을 갖는다. 이를 통해 두 면역 억제제는 NFAT를 매개로한 억제기전을 공통적으로 가지나 각 약물에 따른 인슐린 합성에 차별적 영향을 미치므로 각 유전자군의 분석을 통하여 각 면역억제제의 차별적인 유전자 변화를 알아보았다.

Cyclosporin과 tacrolimus 같은 면역억제제는 immunophilin과 결합하여 calcineurin 억제제를 이루는데 이것은 면역 억제제의 대표적 기전 갖는다. 그에 따라 당대사 및 인슐린 관련 유전자 및 NFAT 관련 유전자의 공통적인 작용을 확인할 수 있었다. 그 결과 Maturity Onset Diabetes of Youth (MODY) 관련 유전자들은 공통적인 억제양상을 확인할 수 있었다. 이와 같이 당뇨에 있어서 주요한 유전자는 유전적 결손이 확인된 당뇨

10) Heit JJ: Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics. Bioessays. Oct;29(10):1011-21, 2007.

11) Thomas R, Gerlinde W, Henrike W, Norbert T, Jens L, Thomas E, et al. CYP2D6 genotype: Impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressant-A pilot study. Clin Pharmacol Ther 75:386-393, 2004.

12) Dahl ML. Cytochrome P450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics. Clin Pharmacokinet 41:453-470, 2002.

13) Budde K, Fritsche L, Mai I, Neumayer HH et al : Clinical pharmacokinetics of tacrolimus the rapyafter renal transplantation. Int J Clin Pharmacol Ther 34:493- 497, 1996.

14) Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. Transplantation 88(3S):62-7, 2009.

15) Dumont RJ, Ensom MH : Methods for clinical monitoring of cyclosporine in transplant patients. Clin Pharmacokinet 38:427-447, 2000.

병인 Maturity Onset Diabetes of Youth (MODY) 증후군으로 이들 유전자들은 transcription factor hepatocyte nuclear factor 4a (HNF-4a/MODY1), glucokinase (GCK/MODY2) transcription factor hepatocyte nuclear factor 1a (HNF-1a/MODY3), insulin promotor factor 1 (IPF-1/MODY4), transcription factor hepatocyte nuclear factor 1β (HNF-1β/MODY5), Neuro D1로서 인슐린 분비 세포 발달의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 실험 결과 대부분의 MODY 유전자는 CsA, FK506 모두 공통적으로 억제하는 양상을 확인할 수 있었다.

CsA와 tacrolimus 모두 PTDM의 발생 위험을 높이는데 영향을 미치는 것으로 알려져 있지만 이전의 임상 연구들에서는 tacrolimus가 CsA에 비해 약 5배 가량 더 당뇨병의 위험이 높다고 보고되고 있다¹⁷⁾¹⁸⁾. 또한 췌장 베타세포주를 이용한 실험에서는 tacrolimus가 인슐린 분비 과정의 여러 단계에서 인슐린 분비능을 떨어뜨리지만 tacrolimus를 처리하지 않으면 다시 인슐린 분비능을 회복함을 보여준 바 있다¹⁹⁾. 특히 인슐린 생성 및 분비에 대한 FK506 고유의 영향은 규명되어야 할 과제로 남아있다. 기존의 세포 실험과 임상 연구 결과들을 종합하면 CsA나 tacrolimus와 같은 calcineurin 억제제들은 췌장 세포에 직접적인 독성을 주어서 PTDM의 발생위험을 높이

지만, 특히 tacrolimus는 현재 통상적으로 사용하는 용량에서 PTDM의 발생위험도를 더 높인다고 할 수 있다²⁰⁾.

FK506을 복용중인 환자들이 CsA 복용 환자들보다 이식 후 2년 PTDM발병률이 약 70% 높았다는 보고가 있으며(29.7% vs. 17.9%)²¹⁾, 고농도 FK506의 사용은 CsA에 비하여 PTDM의 발생의 독립적 위험인자로 나타나고 FK506 복용 환자에서 PTDM은 인슐린 내성의 증가와 인슐린 분비의 감소에 의해 발생하는 것으로 보인다²²⁾. 최근 보고한 연구에서도 PTDM의 유병률이 22.7%였고, CsA에 비하여 FK506의 사용이 약 2.8배의 상대적 위험도를 가진다²³⁾고 하였다. 또한 다른 연구에 의하면 FK506은 인슐린 분비에 영향을 주며, 인슐린 내성에는 영향이 없다는 결과를 보여준다²⁴⁾.

FK506 농도를 30% 감량하면 인슐린 분비가 24%증가하는 것으로 보고²⁵⁾는 인슐린 분비에

16) 황진순. MODY 증후군. 대한소아내분비학회지, 15(1):1-6, 2010.
 17) Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ: Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. Am J Transplant 3:178-185, 2003.
 18) Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J: A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. Transplantation 73:775-782, 2002.
 19) Uchizono Y, Iwase M, Nakamura U, Sasaki N, Goto D, Iida M: Tacrolimus impairment of insulin secretion in isolated rat islets occurs at multiple distal sites in stimulus-secretion coupling. Endocrinology 145:2264-2272, 2004.

20) Cho YM, Park KS, Jung HS, Jeon HJ, Ahn C, Ha J, Kim SJ, Rhee BD, Kim SY, Lee HK: High incidence of tacrolimus-associated posttransplantation diabetes in the Korean renal allograft recipients according to American Diabetes Association criteria. Diabetes Care 26:1123-1128, 2003.
 21) Woodward RS, Schnitzler MA, Baty J, Lowell JA, Lopez Rocafort L, Haider S, Woodworth TG, Brennan DC. Incidence and cost of new onset diabetes mellitus among U.S. wait-listed and transplanted renal allograft recipients. Am J Transplant 3:590-8, 2003.
 22) 이식 후 당뇨병의 발생과 그 임상적 의의. 강진모, 하종원, 박양진, 박경수, 김상준. J Korean Soc Transplant 21:262-268, 2007.
 23) Kang WH, Kim SM, Ju MK, Chang HK, Ahn HJ, Kim SI, Kim YS. Risk factors of post-transplantation diabetes mellitus in renal transplant recipients. J Korean Soc Transplant, 21:1111-8 2007.
 24) Sato T, Inagaki A, Uchida K, Ueki T, Goto N, Matsuoka S, Katayama A, Haba T, Tominaga Y, Okajima Y, Ohta K, Suga H, Taguchi S, Kakiya S, Itatsu T, Kobayashi T, Nakao A. Diabetes mellitus after transplant: relationship to pretransplant glucose metabolism and tacrolimus or cyclosporine A-based therapy. Transplantation 76:1320-6, 2003.
 25) Boots JM, van Duijnhoven EM, Christiaans MH,

대한 FK506의 영향이 가역적임을 의미하며 실제로 일부 환자들에서 FK506의 당뇨유발 효과의 가역성이 보고된바 있다²⁶⁾. 또한 동물실험에서, 고농도 FK506은 인슐린 mRNA의 전사를 감소시켜 인슐린 생산을 저하시켰고, 2주후 FK506을 중단했을 때 인슐린의 생산이 정상화되었다²⁷⁾.

CsA와 FK506의 DNA chip을 이용한 당대사 및 인슐린 관련 유전자들 중에서 상반된 양상을 갖는 유전자 중에서 Akt2 유전자를 발굴하였다. Akt2는 기존의 연구를 보면 Akt2 효소를 발현시키는 유전자를 제거할 경우 인슐린 저항성 (insulin resistance)과 2형 당뇨병(type 2 diabetes)과 유사한 증상이 유도된다는 사실을 확인된다²⁸⁾. 즉 Akt2 효소가 인슐린-자극성 포도당 운송 신호 전달 기능(insulin-stimulated signaling of glucose transport)을 갖으며 Akt2 유전자의 발현 차이는 결과적으로 인슐린 합성의 차별적 영향을 갖는다.

또한, 이처럼 면역억제제의 약물상호작용을 일으키는 정도는 개인마다 다양하게 나타나는데 특히 CYP에 존재하는 약물의 양과 CYP에 대한 약물의 친화도 뿐만 아니라 나이, 영양상태, 질환상

태, 다양한 CYP에 의한 대사경로 등에 따라 차이를 나타낸다. CytochromeP450(CYP450)는 steroidhormones, fatty acids, prostaglandins 과 같은 내인성 물질 및

외인성 물질(약물)의 산화적 대사(oxidative metabolism)에 관여함으로써 이들 물질이 소변이나 담즙으로 쉽게 배설될 수 있도록 친수성 물질로 전환시키는 헴(heme)을 함유한 효소군을 일컫는다²⁹⁾. 따라서 동일 효능의 약제라 하더라도 활성도가 유전적 다형성(genetic polymorphismie, rapid vs poor metabolizers)도 CYP의 활성을 좌우하는 중요한 요소이다. 본 실험을 통해 밝혀진 Cytochrome P450 2S1(CYP2S1)은 건선의 약물치료반응에 따른 개인차를 보이고, 대장암 환자의 치료예후에도 연관이 있는 약물대사효소로³⁰⁾ 알려져 있으며 이를 통해 CsA와 FK506의 치료 반응의 차이를 확인할 수 있다.

감사의 글

“이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업지원을 받아 수행된 것임(No. 2010-0022019)”

참고문헌

1. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs-Current opinion in Immunology vol. 12, pp. 557 ~ 562, 2000.
 2. 김정미·김동한·김태우·조규향·최준혁·박종원·도준영·윤경우. 이식 후 12개월이 지난 신이식 환자에서 Cyclosporine Trough Level과 2-hour Postdose Blood Level 사이의 상관 관계 및 적정 C2 Level. 대한신
-
- 29) Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs and diseases. MolInterv. 3(4):194-204, 2003.
 - 30) Smith G, Wolf CR, Deeni YY, Dawe RS, Evans AT, Comrie MM, Ferguson J, and Ibbotson SH. Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. Lancet 361: 1336-1343, 2003.
-
- Wolffenbittel BH, van Hooff JP. Glucose metabolism in renal transplant recipients on tacrolimus: the effect of steroid withdrawal and tacrolimus trough level reduction. J Am Soc Nephrol 13:221-7, 2002.
 - 26) Neylan JF. Racial differences in renal transplantation after immunosuppression with tacrolimus versus cyclosporine. FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation 65: 515-23, 1998.
 - 27) Tamura K, Fujimura T, Tsutsumi T, Nakamura K, Ogawa T, Atumaru C, Kobayashi M. Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic beta-cell. Transplantation 59:1606-13, 1995.
 - 28) Han Cho, James Mu, Jason K. Kim, Joanne L. Thorvaldsen, Gerald I. Shulman and Morris J. Birnbaum. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β). Science., 292(5522):1728-1731. 2001.

- 장학회지, 21(3):435-442, 2002.
3. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(25): 14863-8, 1998.
 4. First MR. Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol*. 17:S25-31, 2004.
 5. 강종명. 새로운 면역억제제의 임상적 응용. *대한신장학회지*, 제18권 부록1호, pp100-111, 1999.
 6. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-15, 1991.
 7. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357:695-7, 1992.
 8. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506 and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357:692-4, 1992.
 9. Michael C. Lawrence, Harshika S. Bhatt, Jeannette M. Watterson, And Richard A. Easom: Regulation of Insulin Gene Transcription by a Ca²⁺ Responsive Pathway Involving Calcineurin and Nuclear Factor of Activated T Cells. *Molecular Endocrinology* 15(10):1758-1767, 2001.
 10. Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB: Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J* 17: 6701-6713, 1998.
 11. Heit JJ: Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics. *Bioessays*. Oct;29(10):1011-21, 2007.
 12. Thomas R, Gerlinde W, Henrike W, Norbert T, Jens L, Thomas E, et al. CYP2D6 genotype: Impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressant-A pilot study. *Clin Pharmacol Ther* 75:386-393, 2004.
 13. Dahl ML. Cytochrome P450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics. *Clin Pharmacokinet* 41:453-470, 2002.
 14. Budde K, Fritsche L, Mai I, Neumayer HH et al : Clinical pharmacokinetics of tacrolimus the rapyafter renal transplantation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34:493-497, 1996
 15. Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation* 88(3S):62-7, 2009.
 16. Dumont RJ, Ensom MH : Methods for clinical monitoring of cyclosporine in transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 38:427-447, 2000.
 17. 황진순. MODY 증후군. *대한소아내분비학회지*, 15(1):1-6, 2010.
 18. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ: Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 3:178-185, 2003
 19. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J: A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 73:775-782, 2002.

20. Uchizono Y, Iwase M, Nakamura U, Sasaki N, Goto D, Iida M: Tacrolimus impairment of insulin secretion in isolated rat islets occurs at multiple distal sites in stimulus-secretion coupling. *Endocrinology* 145:2264-2272, 2004.
21. Cho YM, Park KS, Jung HS, Jeon HJ, Ahn C, Ha J, Kim SJ, Rhee BD, Kim SY, Lee HK: High incidence of tacrolimus-associated posttransplantation diabetes in the Korean renal allograft recipients according to American Diabetes Association criteria. *Diabetes Care* 26:1123-1128, 2003.
22. Woodward RS, Schnitzler MA, Baty J, Lowell JA, Lopez Rocafort L, Haider S, Woodworth TG, Brennan DC. Incidence and cost of new onset diabetes mellitus among U.S. wait-listed and transplanted renal allograft recipients. *Am J Transplant* 3:590-8, 2003.
23. 이식 후 당뇨병의 발생과 그 임상적 의의. 강진모, 하종원, 박양진, 박경수, 김상준. *J Korean Soc Transplant* 21:262-268, 2007.
24. Kang WH, Kim SM, Ju MK, Chang HK, Ahn HJ, Kim SI, Kim YS. Risk factors of post-transplantation diabetes mellitus in renal transplant recipients. *J Korean Soc Transplant*, 21:1111-8 2007.
25. Sato T, Inagaki A, Uchida K, Ueki T, Goto N, Matsuoka S, Katayama A, Haba T, Tominaga Y, Okajima Y, Ohta K, Suga H, Taguchi S, Kakiya S, Itatsu T, Kobayashi T, Nakao A. Diabetes mellitus after transplant: relationship to pretransplant glucose metabolism and tacrolimus or cyclosporine A-based therapy. *Transplantation* 76:1320-6, 2003.
26. Boots JM, van Duijnhoven EM, Christiaans MH, Wolffenbuttel BH, van Hooff JP. Glucose metabolism in renal transplant recipients on tacrolimus: the effect of steroid withdrawal and tacrolimus trough level reduction. *J Am Soc Nephrol* 13:221-7, 2002.
27. Neylan JF. Racial differences in renal transplantation after immunosuppression with tacrolimus versus cyclosporine. *FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation* 65: 515-23, 1998.
28. Tamura K, Fujimura T, Tsutsumi T, Nakamura K, Ogawa T, Atumaru C, Kobayashi M. Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic beta-cell. *Transplantation* 59:1606-13, 1995.
29. Han Cho, James Mu, Jason K. Kim, Joanne L. Thorvaldsen, Gerald I. Shulman and Morris J. Birnbaum. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β). *Science*, 292(5522):1728-1731. 2001.
30. Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol Interv.* 3(4):194-204, 2003.
31. Smith G, Wolf CR, Deeni YY, Dawe RS, Evans AT, Comrie MM, Ferguson J, and Ibbotson SH. Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *Lancet* 361: 1336-1343, 2003.