

# 이식신장에서 생체 표지자로서 C4d의 의의와 한계

인하대학교 의과대학 인하대병원 병리과

한 지 영

## The Significance and Limitation of C4d as a Biomarker in the Transplanted Kidney

Jee-Young Han, M.D.

Department of Pathology, Inha University Hospital, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

C4d is produced from the direct interaction between antibodies and tissue injury at an antibody binding site in a graft. C4d deposition along peritubular capillaries (PTCs) in a renal allograft is a characteristic finding of antibody-mediated rejection (AMR), and is a useful diagnostic tool of AMR. The C4d along PTCs is associated with poor graft survival. Therefore C4d is regarded as a biomarker of AMR and was included in the diagnosis criteria of AMR at 2007 Banff conference. However, although C4d assay is widely used, it has several limitations. ABO-incompatible transplantations develop C4d along the PTCs in the majority of grafts but this seems to be graft accommodation rather than AMR. Recent studies reported that more than half of renal allograft biopsies with chronic AMR were C4d-negative. Without treatment, the C4d-negative AMR can cause scarring within the graft, transplant glomerulopathy (TG) or even graft loss. C4d is not a certain indicator of antibody-mediated rejection and C4d staining is not always highly sensitive for detecting AMR. Measuring endothelial gene expression in kidney graft biopsies with alloantibody can be another sensitive and specific method to diagnose AMR and predict graft outcomes. Because of these complexities, at the 2011 Banff meeting, criteria for diagnosis of chronic AMR in the kidney were refined, and the need for inclusion of C4d-negative AMR in the Banff classification was investigated.

**Key Words:** C4d, Antibody, Rejection, Limitation

**중심 단어:** C4d, 항체, 거부, 한계

### 서 론

항체 매개 이식 거부반응(antibody-mediated rejection, AMR)은 세포 매개 이식 거부반응(cell-mediated rejection, CMR)에 비하여 예후가 나쁘며 더 자주 이식신장의 기능이상과 기능 소실을 초래하고 신장이식 조직의 신세관 주변 모세혈관(peritubular capillary, PTC)에서 C4d가 양성 반응을 보이고 이러한 소견이 이식신장의 기능 이상 또는 소실 등의 나쁜 예후 및 AMR과 상관이 있음이 밝혀졌다(1-3). C4d는 이식신장에서 항체가 혈관 내피세포에 결합한 후에 보체 활성화 과정에서 나온 생물학적 기능이 없는 C4의 부산물로서, 항체가 결합한 혈관

내피세포와 단단한 공유 결합을 형성한다(4,5). 면역 형광 염색 또는 면역 조직화학 염색을 통해서 C4d가 PTC에 발현되는 것을 관찰할 수 있으며 이러한 이유로 C4d는 AMR의 생체 표지자로서 간주되며 C4d 염색은 AMR 진단에 있어 매우 유용한 방법으로 사용되고 있다. 2007 Banff 모임에서 C4d의 중요성을 인지하고 신장이식의 진단 기준을 다음 3가지로 정의하였다(6): 1) 급성 또는 만성 조직 손상의 형태학적 증거, 2) PTC에서 C4d에 대한 면역 염색 양성, 3) 혈청 내 제공자 특이 항체(donor specific antibody, DSA)의 존재이다.

그러나 C4d가 널리 쓰임에 따라 AMR의 진단에 있어 C4d의 민감도가 기대보다 낮다는 보고가 발표되고 있으며 특히 만성 AMR에서 50% 이하의 C4d의 민감도를 보고하고 있다(7). Haas와 Mirocha(8)의 보고에 따르면 C4d 음성이며 AMR의 병리학적 소견을 보이는 경우, 치료하지 않은 환자의 많은 수에서 이식사구체병증(transplant glomerulopathy, TG)으로 진행하였고, Loupy 등(9)은 3개월 간격의 계획된 이식 후 신생검에서, 모세혈관염이

책임저자 : 한지영, 인천시 중구 인항로 27  
인하대학교 의과대학 인하대병원 병리과, 400-700  
Tel: 032-890-3976, Fax: 032-890-3464  
E-mail: jeeyhan@inha.ac.kr

접수일 : 2013년 8월 31일, 심사일 : 2013년 9월 3일  
게재승인일 : 2013년 9월 3일

있으면 C4d 음성인 경우에도 후에 TG가 발생하였음을 보고하였다. 위와 같은 여러 정황으로 2011년 Banff 모임에서 만성 AMR의 진단 기준의 재정립과 C4d 음성 AMR에 대한 연구의 필요성에 대한 논의가 있었다(10). 본 논문에서는 그 동안 AMR의 생체 표지자로 알려져 있던 이식신장에서의 C4d의 의미와 그 한계에 대해서 알아보려고 한다.

## 본 론

### 1) AMR의 임상적 지표로서의 C4d의 발견

1990년대 초반에 Feucht 등(1)은 이식신장 생검에서 급성 또는 만성 이식거부 반응을 보이는 환자 중 면역학적 고위험군(이식거부반응이 있었거나 HLA 항원에 대해 혈액 내 DSA가 있는 경우)에서 다량의 C4d 또는 C3d의 침착이 PTC에서 관찰되었으며 정상 또는 사구체 질환에서는 관찰되지 않음을 보고하였다. 이들은 그 후 후속 연구로 AMR에서 C4d가 침착되는 경우 그렇지 않은 경우보다 이식신장의 기능장애와 이식신장 소실이 더 많이 일어남을 보고하였다(2). AMR과 ACR은 그 치료가 다르고 예후가 달라 서로 명확히 구분해야 하지만 AMR과 ACR의 형태학적 특징적인 소견이 서로 겹치는 경우가 있어 병리학적 진단이 힘든 경우가 있었다. Collins 등(3)은 PTC의 C4d침착은 AMR의 유용하고 타당한 병리학적 표지자로서 AMR과 CMR을 구분할 수 있으며 기존의 진단 기준보다 더 민감하고 특이도가 높음을 보고하였다. 이들 연구에서 CMR, cyclosporine 독성 신증 및 기타 사구체 질환에서 C4d의 침착은 발견되지 않았다. 이러한 C4d 연구 결과는 AMR에서 C4d의 의의를 부각시켰고 AMR 진단에 있어 C4d의 유용성을 높였으며 결과적으로 2003 Banff 분류에 C4d가 도입되었다(11).

### 2) C4d의 생성 및 이식신장에 침착되는 과정

C4d는 고전적인 경로를 통해서 형성된다(5). 면역 복합체의 침착 또는 항원-항체 반응이 있는 곳에 C1q가 결합한 후 C1q가 활성화되면 순차적으로 C4와 C3가 활성화된다. C4는 고전적인 경로 외에 lectin 경로를 통해서도 형성되는데 항원 표면의 탄수화물 ligand에 Mannose binding lectin 또는 ficolin이 결합되면 C4가 형성된다. C4d는 생물학적 기능이 없는 C4의 부산물로서 항체가 결합한 혈관 내피세포와 단단하고 안정적이며 긴 반감기를 가지는 공유 결합을 형성한다. C4d의 이러한 결합은 혈액 내에서 쉽게 깨지지 않고 견고하므로 항체가 매개된 조직 손상에서 족적(footprint) 효과를 나타내며 이식

신장의 혈관내피세포에 있는 DSA에 대한 조직 내 증거로 간주할 수 있다.

면역 형광 염색 또는 면역 조직화학 염색을 통해서 C4d가 PTC에 발현되는 것을 관찰 할 수 있으며 이러한 이유로 C4d는 AMR의 생체 표지자로서 간주되며 C4d 염색은 AMR 진단에 있어 매우 유용한 방법으로 사용되고 있다.

### 3) AMR에서의 C4d의 의의 및 제한점

Feucht 등(1,2)과 Collins 등(3)의 연구 이후 PTC의 C4d 침착이 초기 이식신장 소실과 연관이 있다는 연구 보고가 뒤따랐다(12,13). 이에 따라 2007 Banff 이식신장 분류에서(6) AMR의 진단 기준에 C4d를 포함시켜 급성 또는 만성 손상의 형태학적 소견, PTC의 C4d 침착, 제공자의 혈관 내피세포에 존재하는 HLA 또는 다른 항원에 대한 혈액 내 항체 등 3가지를 AMR의 진단 기준으로 삼았다. 또한 C4d 침착 유무가 AMR의 진단 기준이 됨에 따라 모든 신장생검에서 C4d 염색을 하는 것이 필수 사항이 되었다. C4d는 모두 4단계로 점수를 측정하며 PTC에 전혀 염색이 안 되면 0, 0~10% (미약한 양성)이면 1, 10~50% (국소적 양성)이면 2, 50% 이상(미만성 양성)이면 3으로 한다. 이 중 3점에 대해서 C4d 양성으로 하는 것은 의의가 없으나 1~2점에 대한 임상적 의의는 아직 이견이 많다. 일반적으로 1점은 0과 마찬가지로 C4d 음성으로 간주하며 2점인 경우에는 면역조직화학염색에 의한 경우에는 양성, 면역형광염색에 의한 결과일 때는 병리학적 소견과 DSA가 있는 경우 AMR 가능성이 있는 것으로 진단한다. 그러나 DSA가 없고 병리학적 소견이 뒷받침되지 않을 때 AMR로 진단하고 치료해야 되는 지는 아직 원칙이 성립되지 않아 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것이다. 병리학적 소견이 없고 C4d가 양성인 경우는 다음 두 가지로 해석할 수 있다. 첫째는 ABO 부적합 이식신장에서 일어나는 경우이다. 이 경우 병리학적 소견도 정상이며 이식신장의 기능도 정상인데, 이 경우 이식신장의 적응(accommodation)으로 간주하며 치료는 필요하지 않다. 그러나 의도치 않은 병변의 발생 가능성을 방지하기 위해 추적관찰을 권고하고 있다. 두 번째로 ABO 적합 환자에서 이러한 소견을 보이는 경우에는 이식신장 적응으로 간주하면 안 되고 AMR이 가능성 있는 것으로 보고 치료를 고려해야 한다(5).

C4d가 AMR의 진단 기준의 하나가 됨에도 불구하고 위에서 언급한 여러 문제점 외에 다음과 같은 몇 가지 제한점이 더 있는데 그 중의 하나가 C4d 염색에 대한 실험실간 또는 병리의사간 다양성 및 불일치이며 2011

Banff meeting에서도 이러한 점이 논의가 되었다(10). 두 번째는 AMR 중 C4d 음성 AMR에 대한 존재 유무이다. 이에 대해서는 아래 단원에서 언급하였다. 세 번째는 AMR이 있는 환자의 순차적 생검에서 C4d의 발현이 일정치 않고 불규칙하게 발현하는 것이다.

#### 4) 만성 거부 반응에서의 C4d

이식신장에서 C4d의 염색이 보편화됨에 따라 만성소견을 보이는 이식신장에서도 C4d 양성 소견이 관찰되었다(14). 만성 이식 거부 조직소견을 보이는 이식신장에 대한 연구에서, 항체가 관련되고 뒤이어 이식신장의 기능 이상과 이식신장 소실이 뒤따른다는 점, C4d 침착이 다수에서 있다는 점을 고려하여 2007 Banff 분류에서(6) 급성 AMR과 마찬가지로 C4d를 진단 기준에 포함시켜 만성 AMR의 진단 기준을 다음과 같이 정하였다; 1) 만성 손상의 병리학적 소견, 2) C4d 침착, 3) DSA.

그러나 실제로 만성 AMR의 한 형태인 TG를 보이는 환자에서 C4d 양성을 보이는 경우는 50% 미만이어서 만성 AMR 진단에 있어 C4d의 유용성에 대한 논란이 있다(7).

#### 5) C4d 음성 AMR

C4d가 AMR의 생체 표지자로서 간주되고 있는 상황에서 Sis 등은 C4d 음성 AMR이 있음을 처음으로 보고하였다(15,16). Sis 등은 DSA 양성, AMR의 병리학적 변화를 보이는 환자군에서 C4d 양성 유무와 상관없이 이식신장 내에서 혈관내피세포 관련 유전자 발현(endothelial-associated transcripts, ENDAT)이 AMR 환자군에서 CMR 환자군에 비해 증가함을 관찰하여 C4d 음성 AMR이 있음을 보고하며 또한 ENDAT 중에서도 특히 von Willebrand factor (vWF), endothelin 1 (EDN1), caveolin 1 (CAV1), cadherin 5 (CDH5) 등이 증가한다고 하였다. 이들은 ENDAT 발현이 C4d보다 AMR을 진단함에 있어 월등한 민감도를 가지므로 미래에 C4d를 대체할 수 있는 새로운 방법으로 제시하였다. 이들은 ENDAT 발현이 높고 DSA가 있는 경우 만성 AMR의 소견과 함께 나쁜 예후를 보였음을 보고하였고 이 경우 C4d는 단지 40%에서만 양성 반응을 보였다. Loupy 등(9)은 계획된 이식신장 생검에서 C4d나 모세혈관염이 TG 발생의 위험인자이며 특히 모세혈관염은 C4d 음성인 경우에도 TG를 예측할 수 있는 인자로 보았다. Haas와 Mirocha(8)은 C4d 음성 이식신장에서 AMR을 치료하지 않은 경우 치료한 경우보다 TG로 이행하는율이 높음을 보고하며 C4d 음성 AMR의 존재를 재확인하였다. 위와 같은 여러 정황으로 2011년

Banff 모임에서(10) 만성 AMR의 진단 기준의 재정립과 C4d 음성 AMR에 대한 연구의 필요성에 대한 논의가 있었다.

C4d 음성 AMR 이식신장의 병리 소견은 근본적으로 C4d 양성 AMR과 비슷한 소견을 보이지만 그 정도가 덜 심하나 치료하지 않은 경우 이식신장 소실까지 초래할 수 있다(17). 따라서 C4d 음성 AMR이 있음을 인지하고 이에 대한 진단 기준을 정립하는 것이 중요하다.

C4d 음성 AMR을 일으키는 기전은 보체와 상관없는 손상에 의한 것으로 생각된다. *In vitro* 실험에서(18) 보체가 없는 상태에서, 항체는 혈관 내피 세포를 활성화 시켜서 vWF의 분비를 증가시키고 염증성 물질(E-selectin, P-selectin, intercellular adhesion molecule 1 [ICAM-1], vascularcell adhesion molecule-1 [VCAM-1], CX3CL1 등)을 분비하여 염증세포가 모여들게 한다. 모여든 염증세포는 여러 시토카인을 분비하거나 대식 세포 또는 NK 세포 등에 의해 항체의존 세포독성으로 혈관 내피세포의 손상을 일으킨다. Hirohashi 등(19)은 Fc 의존 방법을 통해서 NK 세포에 의해 항체가 만성 이식 혈관병증을 일으킴을 보고하였다. AMR을 보이는 사람의 이식신장 생검에서 사구체 모세혈관 내 또는 PTC에서 NK 세포가 관찰되었다(20). 이러한 실험 결과를 볼 때 AMR은 보체가 없이도 일어날 수 있으며 항체, 여러 염증성 물질, 그리고 NK 세포가 이에 관여함을 알 수 있다.

#### 6) C4d와 이식 적응

ABO 부적합 이식에서 저농도의 항혈액 항체로 인해 AMR이 발생할 수 있으며 이러한 경우 C4d가 PTC에 미 만성으로 양성 반응을 보이는데(5), 실제로 ABO 부적합 이식의 70~80%에서 C4d가 미만성으로 양성 반응을 보인다. Haas 등(21)은 병리학적 이상 소견을 보이지 않는 ABO 부적합 이식신장에서 C4d가 양성이라도 신장기능은 감소하지 않았으며 이식 1년 후에도 만성 손상의 병리학적 소견은 관찰되지 않았다고 보고하였다. 또한 Setoguchi 등(22)도 ABO 부적합 이식신장에서 계획된 이식신장 생검을 분석한 결과, 94%에서 C4d 양성 반응을 보였지만 AMR과의 연관성은 없었다고 하였다. ABO 부적합 이식신장에서 이와 같이 신장기능 감소가 없거나 AMR과의 연관성 없이 C4d가 양성 반응을 보이는 것은 적응의 현상으로 이해할 수 있다(23). 이식에서 적응은 혈관내피세포에 있는 ABO 항원에 대해 저농도의 항체가 있는 경우 이에 대해 AMR이 발생하는 것을 막으며 신장기능을 지속적으로 잘 유지하게 하는 것이다. 이러한 적응의 기전은 혈관내피세포에 있는 보체 조절 단백질(com-

plement regulatory protein)의 증가하여 항체 결합으로 인한 보체의 활성화를 막는 것이다(5). 따라서 ABO 부적합 이식에서 이식거부반응에 대한 병리학적 소견 없이 C4d가 양성인 경우 이식거부 반응으로 진단 할 수 없으며 이 경우 C4d는 진단적 방법으로서 사용할 수 없다.

## 결론

본 논문에서는 이식에서 C4d의 의의와 제한점에 대해 알아보았다. C4d는 AMR 진단에 있어 광범위하게 사용되는 매우 유용한 표지자로서 해석방법이 명확하고 위양성이 거의 없다는 장점이 있다. 그러나 C4d가 광범위하게 사용됨에 따라 AMR 진단에 있어 C4d의 여러 제한점 또는 문제점이 관찰되었다. C4d가 국소적으로 양성 반응을 보일 때 또는 DSA 상태와 차이가 있을 때 이에 대한 해석 및 치료 방침이 정해지지 않았다. C4d는 만성 AMR에서는 민감하지 못하여 그 유용성이 떨어지며 ABO 부적합 이식에서도 도움이 되지 못한다. 신장조직에서 ENDAT의 발현증가가 AMR 진단에 민감하다는 보고가 있지만 아직 실질적으로 진단 방법으로 사용되지는 않고 있으며 여러 단점에도 불구하고 AMR 진단에 있어 C4d를 대체할 만한 실용적인 새로운 방법은 아직 없다. AMR 진단 시 C4d의 한계점을 인식하고 진단에 유의해야 할 것이며 C4d 음성 AMR의 존재에 대해 인지하고 C4d 외에 AMR의 새로운 실용적인 진단 방법에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991;86:464-70.
- 2) Feucht HE, Schneeberger H, Hillerbrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993;43:1333-8.
- 3) Collins AB, Schneeberger EE, Pascula MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2208-14.
- 4) Nickleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2232-9.
- 5) Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickleit V, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012;81:628-39.
- 6) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
- 7) Mengel M, Husain S, Hidalgo L, Sis B. Phenotypes of antibody mediated rejection in organ transplants. *Transpl Int* 2012;25:611-22.
- 8) Haas M, Mirocha J. Early ultrastructural changes in renal allografts correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2011;11:2123-31.
- 9) Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2009;9:2561-70.
- 10) Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012;12:563-70.
- 11) Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004;4:1562-6.
- 12) Regele H, Böhmig GA, Habicht A, Gollwitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2371-80.
- 13) Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:234-41.
- 14) Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:574-82.
- 15) Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009;9:2312-23.
- 16) Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:42-8.
- 17) Haas M. Pathology of C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;18:319-26.
- 18) Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009;9:2459-65.
- 19) Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant* 2012;12:313-21.

- 20) Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010;10:1812-22.
- 21) Haas M, Segev DL, Racusen LC, Bagnasco SM, Locke JE, Warren DS, et al. C4d deposition without rejection correlates with reduced early scarring in ABO-incompatible renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:197-204.
- 22) Setoguchi K, Ishida H, Shimmura H, Shimizu T, Shirakawa H, Omoto K, et al. Analysis of renal transplant protocol biopsies in ABO-incompatible kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:86-94.
- 23) Park WD, Grande JP, Ninova D, Nath KA, Platt JL, Gloor JM, et al. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *Am J Transplant* 2003;3:952-60.