

골형성부전증의 착상전 유전진단을 위한 분자유전학적 방법의 조건 확립과 적용

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 산부인과학교실²

김민지¹ · 이형송¹ · 최혜원¹ · 임천규¹ · 조재원¹ · 김진영² · 송인옥² · 강인수^{2*}

Establishment and Application of Molecular Genetic Techniques for Preimplantation Genetic Diagnosis of Osteogenesis Imperfecta

Min Jee Kim¹, Hyoung-Song Lee¹, Hye Won Choi¹, Chun Kyu Lim¹, Jae Won Cho¹,
Jin Young Kim², In Ok Song², Inn Soo Kang^{2*}

¹Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea

Objectives: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has become an assisted reproductive technique for couples carrying genetic conditions that may affect their offspring. Osteogenesis imperfecta (OI) is an autosomal dominant disorder of connective tissue characterized by bone fragility and low bone mass. At least 95% of cases are caused by dominant mutations in the *COL1A1* or *COL1A2*. In this study, we report on our experience clinical outcomes with 5 PGD cycles for OI in two couples.

Methods: Before clinical PGD, we assessed the amplification rate and allele drop-out (ADO) rate of alkaline lysis and nested PCR protocol using heterozygous patient's single lymphocytes in the pre-clinical diagnostic tests for OI. We performed 5 cycles of PGD for OI by nested PCR for the causative mutation loci, *COL1A1* c.2452G>A and c.3226G>A, in case 1 and case 2, respectively. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with *HaeIII* restriction enzyme in the case 1 and direct DNA sequencing.

Results: We confirmed the causative mutation loci, *COL1A1* c.2452G>A in case 1 and c.3226G>A in case 2. In the pre-clinical tests, the amplification rate was 94.2% and ADO rate was 22.5% in case 1, while 98.1% and 1.9% in case 2, respectively. In case 1, a total of 34 embryos were analyzed and 31 embryos (91.2%) were successfully diagnosed in 3 PGD cycles. Eight out of 19 embryos diagnosed as unaffected embryos were transferred in all 3 cycles, and in the third cycle, pregnancy was achieved and a healthy baby was delivered without any complications in July, 2005. In case 2, all 19 embryos (100.0%) were successfully diagnosed and 4 out of 11 unaffected embryos were transferred in 2 cycles. Pregnancy was achieved in the second cycle and the healthy baby was delivered in March, 2008. The causative locus was confirmed as a normal by amniocentesis and postnatal diagnosis.

Conclusions: To our knowledge, these two cases are the first successful PGD for OI in Korea. Our experience provides a further demonstration that PGD is a reliable and effective clinical techniques and a useful option for many couples with a high risk of transmitting a genetic disease.

[Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(2): 99-110.]

Key Words: Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Osteogenesis imperfecta (OI), *COL1A1*, *COL1A2*, Allele drop-out (ADO)

최근 체외수정을 통해 얻은 배아를 대상으로 착

상 전에 분자생물학적 기술을 이용한 유전진단을 통해 정상적인 배아만을 선별적으로 이식하여, 유전적 이상이 있는 환아를 출산할 확률이 높은 부부들에게 정상아의 출산 기회를 제공해 주는 착상

주관책임자: 강인수, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19,
관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과
Tel: (02) 2000-7581, Fax: (02) 2000-7790
e-mail: ikang67@yahoo.co.kr

전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 이 널리 시행되고 있다. 착상전 유전진단을 간단히 설명하면 배아가 착상되기 전인 6-8세포기 배아에서 1~2개의 할구를 생검한 후, 단일세포 수준에서 유전자 이상을 진단하기 위한 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)법이나 염색체의 수적, 구조적 이상을 진단하기 위한 형광직접조합법 (fluorescence in situ hybridization, FISH)을 이용하여 정상 배아만을 선별하고 이식해 정상아의 임신을 성립시키기 위한 유용한 방법이다. 현재까지 보고된 바에 의하면 진단할 수 있는 착상전 유전진단의 범위는 염색체의 수적, 구조적 이상, 그리고 대부분의 단일 유전자 이상까지 범위가 확대되었으며, 또한 advanced maternal age, recurrent pregnancy loss 등을 겪는 체외수정 시술 환자들을 대상으로 chromosomal aneuploid screening을 시행하는 등 그 범위가 점차 확대되어 가고 있다.^{1~4}

국내에서도 1990년대 중반 이후부터 착상전 유전진단이 시행되고 있으며, 염색체의 수적이거나 구조적 이상을 대상으로 형광직접조합법을 이용하여 시행한 사례들과^{5~8} 듀센씨 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy, DMD), 수포성 표피박리증 (epidermolysis bullosa), 오르니틴 트랜스카바밀라아제 결핍증 (ornithine transcarbamylase deficiency), 그리고 lactic acidosis 등의 단일 유전자 이상에 의한 유전질환을 대상으로 착상전 유전진단을 시행한 결과가 보고되었다.^{9,10}

골형성부전증 (osteogenesis imperfecta, OI, MIM# 120150)은 상염색체 우성 유전질환으로서 일반적으로 뼈가 잘 부러지고, blue sclerae와 척추 측만증 등과 같은 뼈의 기형 등을 나타내는 것이 특징이다.¹¹ 골형성부전증의 원인으로는 뼈와 피부를 구성하는 type I procollagen의 경우 두 분자의 pro $\alpha 1$ chain과 한 분자의 pro $\alpha 2$ chain으로 이루어진 triple helix로 구성되어 있는데, 각각의 chain 합성에 관여하는 COL1A1와 COL1A2 유전자의 돌연변이로 triple helix 구조의 결함이 발생해 질환이 나타나는 것으로 알려져 있다.¹² 현재까지 COL1A1과 COL1A2

의 원인 유전자에서 200여 종의 돌연변이가 발견되었고,¹³ 전 세계적으로 골형성부전증의 발병율은 1:10,000~1:20,000으로 보고되고 있으며,¹⁴ 원인 돌연변이 allele을 가질 경우, 95% 이상이 골형성부전증으로 발현하는 것으로 보고되어 있다.¹⁵ 이러한 골형성부전증은 우성질환이므로 후대로 유전될 수 있는 위험이 매우 높아서 임신 중기에 인공유산을 시키지 않으려면 착상전 유전진단을 수행해야 하며, De Vos 등 (2000)은 골형성부전증 가계에서 착상전 유전진단을 수행하여 두 사례에서 임신에 성공한 결과를 보고한 바 있다.¹⁶

본 연구에서는 골형성부전증 가계에서 단일세포를 대상으로 nested PCR 후 restriction fragment length polymorphism (RFLP)과 direct sequencing 방법을 이용한 진단방법의 확립과 이러한 진단방법을 골형성부전증을 가진 2 가계에 적용한 5 주기의 착상전 유전진단에 대해 보고하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 환 자

첫 번째 가계의 경우 내원 당시 32세의 여성으로 남편은 정상이었지만, 부인의 COL1A1 유전자 exon 37의 염기서열 중 G가 A (c.2452G>A)로 치환되면서, 643번째 아미노산 glycine (GGC)의 codon이 serine (AGC)으로 치환 (G643S)된 것으로 확인되었으며, 내원한 환자의 가족은 표현형이 모두 정상으로 판단되었으며, 환자 본인만이 돌연변이를 가진 것으로 확인되었다.

두 번째 가계의 경우 내원 당시 27세의 여성이었으며 COL1A1 유전자 exon 44의 염기서열 중 G가 A (c.3226G>A)로 치환되어 1076번째 아미노산인 glycine (GGT)이 serine (AGT)으로 치환 (G1076S)된 돌연변이를 가지고 있었다. 첫 번째 환자의 경우와 마찬가지로 가족은 모두 표현형이 정상이었으며, 환자 본인만이 돌연변이를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

2. Genomic DNA의 분리와 단일 림프구 (single lymphocytes) 준비

각 부부의 혈액으로부터 AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 사용 전까지 -20°C 에 보관하였으며, 이를 이용하여 *COLIA1* 유전자 해당 돌연변이 부위에 대한 primer 쌍의 효율적인 PCR 조건 확립과 PCR 산물을 이용한 염기서열 분석 과정을 통해 돌연변이를 확인하였다. 또한 genomic DNA에서 확립된 조건의 효용성을 단일세포 수준에서 확인하기 위해 각 환자의 혈액으로부터 Ficoll-Paque density gradient separation (Ficoll-Paque™ PLUS, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 방법으로 단일 림프구를 분리하였다. 그 후 배양접시에 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free phosphate buffered saline (PBS)로 소적을 만들고 그 소적에 분리된 림프구의 일부를 넣어 희석한 후 현미경 하에서 미세유리관을 이용하여 각각의 단일 림프구를 3 μl 의 lysis buffer (200 mM KOH, 50 mM DTT)가 들어있는 각각의 PCR tube에 넣었다. 준비된 단일 림프구 시료는 사용 전까지 -70°C 에 보관하였으며, 이를 이용하여 단일세포 수준에서의 각 primers의 PCR 조건을 재확인하고, 증폭성공률 그리고 allele drop-out (ADO) rate를 조사하는 착상전 유전진단에 대한 임상진검사를 실시하였다.

3. 난자의 채취 및 배아의 배양

Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist, human menopausal gonadotrophins (hMG)와 human follicular stimulating hormone (hFSH)을 이용하여 과배란을 유도하였다. 초음파로 난자의 크기를 관찰하여 최소한 2개 이상의 난포가 18 mm 이상 되었을 때 human chorionic gonadotrophins (hCG) 10,000 IU를 주사하였고, hCG 주사 후 34시간에 질식초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 G-Fert 배양액 (Vitrolife Sweden AB, Kungsbacka, Sweden)에 넣어, 37°C , 5% CO_2 , 95% 공기 중 배양

기에서 3~4시간 배양하였다. 배양 후 성숙된 난자를 대상으로 세포질내 정자주입술을 시행하였으며, 16~18시간 후에 수정을 확인하였다. 수정이 확인된 수정란은 48시간 동안 배양한 후 할구 생검을 실시하였다.

4. 할구 생검 (blastomere biopsy)

배양 3일째 6-10세포기의 배아를 대상으로 할구 생검을 시행하였다. 생검 과정을 용이하게 하기 위하여 먼저 배아를 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 이 들어있지 않은 배양액 (Biopsy medium, Medicult, Jyllinge, Denmark)에 넣은 후 생검을 시행하였다. Biopsy pipette 내에 적당량의 acid Tyrode 용액 (pH 2.4)을 채우고 holding pipette으로 배아를 고정된 후, acid Tyrode 용액으로 투명대의 일부를 제거하였다. 투명대 제거 후 뚜렷한 1개의 핵을 갖는 할구 1~2개를 생검하였고, 할구 생검 시에 상태가 양호한 6-세포기 이상의 배아에서는 2개의 할구를 생검하였다. 할구를 생검한 후 배아는 3~4회 수세한 후 배양액으로 옮겨, 배아이식 전까지 배양하였다. 또한 배양액 또는 배양 과정 중의 오염 여부를 확인하기 위하여 생검 당시 배아를 배양하였던 배양액만을 수확하여 동일한 조건에서 실험함으로써 오염 여부를 확인하였다.

5. Single cell PCR analysis

준비된 단일 림프구는 alkaline lysis buffer를 이용하여 용해시키고, neutralization buffer (900 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM KCl, 200 mM HCl)를 넣어 중화시켰다. PCR 특이성을 높이기 위해 semi-nested PCR 방법을 사용하였으며, primers의 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 일차 PCR의 경우, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 10 pmol outer primers, 1 unit Taq. DNA polymerase (GeneCraft Co, Munster, Germany)를 혼합한 후 전체 반응액이 30 μl 가 되게 하였다. 일차 PCR은 DNA thermal cycler (ABI 2700, Applied Biosystems, Foster

Table 1. Primers used for nested PCR of *COL1A1* and the PCR conditions

	Sequences of primers (5' → 3')	Annealing temperature	Size
<i>Col1A1</i> Exon 37			
COL1A1-Ex37-F (outer)	TCCCCCAGGTAGTGGAAACTCCTGC	62°C	558 bp
COL1A1-Ex37-R (outer)	TCCTTCTGGCAGCCCCCAGCCAGCC		
COL1A1-Ex37-F (inner)	TAGTGGAAACTCCTGCCTC	64°C	261 bp
COL1A1-Ex37-R (inner)	CCAACATTACCCTGTAGGAG		
<i>Col1A1</i> Exon 44			
COL1A1 Ex44-F (outer)	TGGGAGTTGGGAGAGATGG	62°C	245 bp
COL1A1 Ex44-F (inner)	GGAAGCAGCTGAGGAGAGAG	65°C	218 bp
COL1A1 Ex44-R (outer/inner)	GGGCACTGTCTGCATCTGTA		

City, CA, USA)를 사용하여 96°C에서 10분, 94°C에서 30초 (처음 10 cycles에서는 96°C에서 40초), 각 primer의 annealing temperature에서 30초, 72°C에서 40초의 cycle을 25회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 일차 PCR의 증폭산물 0.5 µl를 사용하여 nested PCR을 진행하였으며, 전체 반응액은 20 µl가 되게 하였다. 이차 PCR 반응조건은 일차 PCR 조건과 동일하게 수행하였으며, 반응산물은 2% agarose gel 전기영동법을 이용하여 증폭 여부를 확인하였고, 착상전 유전진단의 오진 원인 중 하나인 오염 여부를 확인하기 위하여 PCR 반응시 2개 이상의 negative control 시료를 포함하여 모든 과정을 진행하였다.

6. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis

첫 번째 사례의 경우 *COL1A1* 유전자 c.2452G>A의 돌연변이 여부를 진단하기 위하여 RFLP 분석법을 동시에 시행하였다. *COL1A1* 유전자 exon 37에 특이적인 primer를 이용하여 nested PCR을 수행한 결과 261-bp에 해당하는 산물을 확인할 수 있었다. 이 환자가 가지고 있는 c.2452G>A 돌연변이의 경우 *HaeIII* 제한효소의 절단 부위인 5'-GG[^]CC-3'의 염기서열이 치환되어 *HaeIII* 제한효소로 절단되

지 않기 때문에 환자의 PCR 산물을 절단할 경우 정상인과는 다른 band 양상을 보인다. 따라서 정상 allele과 돌연변이 allele을 간단하게 구별하기 위해, 8 µl의 PCR 산물, 1 µl의 10X NEBuffer 2, 0.9 µl의 3차 증류수, 그리고 0.1 µl의 *HaeIII* 제한효소 (New England Biolabs Inc., MA, USA)를 섞은 후 37°C에서 2시간 처리한 후 3% agarose gel에 전기영동하여 그 산물을 UV 하에서 관찰하였다. 정상 allele의 경우 86-, 65-, 63-, 27-, 20-bp의 절단 산물이 관찰되며, 돌연변이 allele의 경우, 128-, 86-, 27-, 20-bp의 절편들이 관찰된다. 따라서 두 allele을 가지고 있는 환자의 경우 128-, 86-, 65-, 63-, 27-, 20-bp의 절단 산물이 관찰된다. 그러나 27-bp와 20-bp의 경우 크기가 작아 3% agarose gel에서는 관찰이 불가능하며 또한 절단 절편 중 하나인 65-bp의 경우 또 다른 절편인 63-bp의 절편과 겹쳐서 보여 gel 상에서는 구분이 되지 않는다.

7. 염기서열 분석 (Direct sequencing)

Nested PCR 수행 후 얻어진 반응산물 중 일부는 RFLP 분석을 위해 사용하고 더 정확한 진단을 위해 direct sequencing을 동시에 진행하였다. Sequencing reaction 진행 전에 AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer corp., Daejeon, KOREA)을 이용

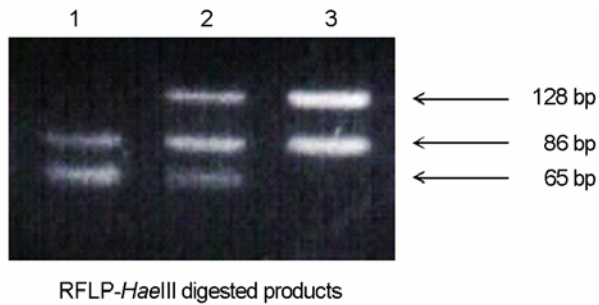


Figure 1. The diagnosis of preclinical test with single lymphocytes isolated from heterozygote patient in case 1. Results were obtained from the test using the nested PCR followed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *HaeIII*. Lane 1; normal allele only-band pattern (mutant allele: ADO), lane 2; heterozygote-band pattern, and lane 3; mutated allele only-band pattern (normal allele; ADO). After *HaeIII* restriction enzyme digestion, the PCR products of the heterozygote lymphocyte (lane 2) were digested into 128-, 86- and 65 (and 63)-bp fragments, while the products of the normal allele (lane 1) and mutated allele (lane 3) were digested into 86- and 65 (and 63)-bp fragments and 128- and 86-bp fragments (not 65-bp), respectively (the digested 27- and 20-bp fragments were not seen in the agarose gel).

하여 PCR 산물을 정제하였으며, sequencing reaction 은 4 µl의 5X sequencing buffer, 8 µl의 Terminator Ready Reaction Mix (BigDye Terminator Reaction Kit; Applied Biosystems, Foster city, USA), 1.6 pmol의 해당 sequencing primer, 50 ng의 PCR 산물과 증류수를 혼합하여 최종 20 µl로 만들었으며, 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분으로 25 cycle을 수행하였다. Sequencing 반응물은 50 µl의 100% ethanol과 2 µl의 3M sodium acetate (pH 5.2)를 넣어 혼합 후 얼음에 15분간 방치시킨 다음 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하고, 상층액 제거 후 다시 70% ethanol로 세척해 건조시켰다. 침전물은 15 µl의 Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Foster city, USA)를 넣어 용해시킨 다음 95°C에서 3분간 변성시킨 후 automatic genetic analyzer (ABI Prism 3100-Avant, Applied Biosystems, Foster city, USA)를 이용한 capillary electrophoresis와 Seqscape software (Applied Biosystems, Foster city, USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

Table 2. Preclinical single-cell PCR analysis with single lymphocytes in osteogenesis imperfecta

	Case 1	Case 2
Amplification rate	94.2% (49/52)	98.1% (52/53)
Contamination rate	0.0%	0.0%
Allele drop-out rate	22.5% (9/40)	1.9% (1/52)

결 과

1. 임상전 검사 (preclinical tests)

첫 번째 사례의 경우 genomic DNA를 이용한 염기서열 분석 결과 부인의 *COL1A1* 유전자 exon 37에 c.2452G>A 돌연변이가 있음을 재확인하였으며 남편의 경우에는 정상으로 확인되었다. 착상전 유전진단에 들어가기 위한 예비 실험으로서 단일세포 수준에서의 진단방법의 효용성, 증폭성공률 그리고 ADO rate을 조사하기 위하여 부인의 단일 림프구를 대상으로 nested PCR, RFLP 그리고 염기서열 분석 방법을 이용한 임상전 검사를 수행하였다. 총 52개의 림프구를 대상으로 실시하였으며 그 중 49개에서 증폭에 성공하여 94.2%의 증폭성공률을 보였으며 22.5% (9/40)의 다소 높은 ADO rate를 나타내었다 (Figure 1 and Table 2).

두 번째 사례 역시 염기서열 분석 결과 부인의 *COL1A1* 유전자 exon 44에 c.3226G>A 돌연변이가 있음을 재확인하였으며, 남편은 정상으로 확인되었다. 부인의 단일 림프구를 대상으로 임상전 검사를 수행한 결과 98.1% (52/53)의 증폭성공률과 1.9% (1/52)의 ADO rate을 나타내었다 (Table 2).

2. 골형성부전증에 대한 착상전 유전진단

1) 사례 1

본 사례의 경우 첫 과배란 유도 후 개인 사정으로 인해 해당 주기에 착상전 유전진단을 시행하지 못하고 모든 배아를 동결보존하였다. 첫 번째와 두 번째 착상전 유전진단에서는 동결보존된 배아 중 각각 12개와 15개의 배아를 용해하여 착상전

Table 3. Clinical outcomes of the PGD for two cases of osteogenesis imperfecta

	Case 1			Case 2	
	1 st cycle	2 nd cycle	3 rd cycle	1 st cycle	2 nd cycle
No. of biopsied embryos	12	15	7	9	10
No. of analyzed embryos	12 (100.0%)	15 (100.0%)	7 (100.0%)	9 (100.0%)	10 (100.0%)
No. of non-amplified embryos	2	1	0	0	0
No. of diagnosed embryos	10 (83.3%)	14 (93.3%)	7 (100.0%)	9 (100.0%)	10 (100.0%)
No. of unaffected embryos	4	9	6	4	6
No. of affected embryos	6	5	1	5	4
No. of transferred embryos	3	3	2	2	2
Clinical pregnancy	No	No	Yes	No	Yes
Results of amniocentesis	-	-	Normal	-	Normal
Delivery	-	-	37.0 wks	-	36.4 wks

유전진단을 시행하였고 각각 10개 (83.3%)와 14개 (93.3%)의 배아에서 진단에 성공하였으며, 이들 배아 중 4개와 9개의 배아가 정상으로 진단되었다. 또한 각각 1개씩의 할구에서 ADO가 관찰되어 6.3% (1/16)과 4.8% (1/21)의 ADO rate를 나타내었다. 각각 3개씩의 정상 배아만을 이식하였으나 임신에 성공하지 못 하였다 (Table 3). 세 번째 착상전 유전진단에서는 총 7개의 배아를 대상으로 생검을 시행하였고, 그 중 5개의 배아에서는 2개씩의 할구를 생검하였으며, 나머지 2개로부터는 1개씩의 할구를 생검하여 착상전 유전진단을 시행하였다 (Table 3). Nested PCR, RFLP와 direct sequencing을 이용한 진단 결과 7개 모두에서 진단에 성공하여 100.0%의 진단성공률을 보였으며 ADO는 나타나지 않았다. 총 6개의 정상 배아가 확인되었으며 그 중 2개의 정상 배아만을 이식하여 임신에 성공하였다. 임신 17주에 실시된 양수검사서 태아가 정상임을 확인하여 착상전 유전진단의 수행 결과가 정확함을 재확인하였다 (Figure 2). 그 후 임신 37주에 제왕절개를 통해 분만에 성공하였다.

2) 사례 2

첫 번째 착상전 유전진단 시 동결보존되어 있던

9개의 배아를 융해하여 생검을 실시하였으며, 9개 모두에서 진단에 성공하여 100.0%의 진단성공률을 나타내었고, 2개의 할구에서 ADO가 관찰되어 11.8% (2/17)의 ADO rate를 나타내었다. 총 5개의 배아가 정상으로 진단되어 이 중 2개의 배아를 이식하였으나 임신에 성공하지 못 하였다 (Table 3). 두 번째 착상전 유전진단 시 총 10개의 배아를 획득하여 생검을 진행하였는데 이 중 6-세포기 이상인 8개의 배아에서는 2개씩의 할구를 생검하였고 나머지 2개의 배아로부터는 1개의 할구만을 생검하여 nested PCR과 direct sequencing을 이용한 진단을 실시하였다. 생검을 실시한 10개 배아 모두에서 진단에 성공하여 100.0%의 진단성공률과 11.1% (2/18)의 ADO rate를 보였으며, 이 중 6개의 정상 배아를 확인할 수 있었으며, 그 중 2개의 정상 배아만을 이식하여 임신에 성공하였다. 임신 17주차에 수행한 양수검사서 태아가 정상 염기서열을 가지고 있는 것을 확인하여 착상전 유전진단의 결과를 재확인할 수 있었고 이후 임신 36.4주에 제왕절개를 통하여 분만에 성공하였으며, 제대혈을 이용하여 수행한 신생아 검사 결과에서도 정상임을 최종적으로 확인할 수 있었다 (Table 3 and Figure 3).

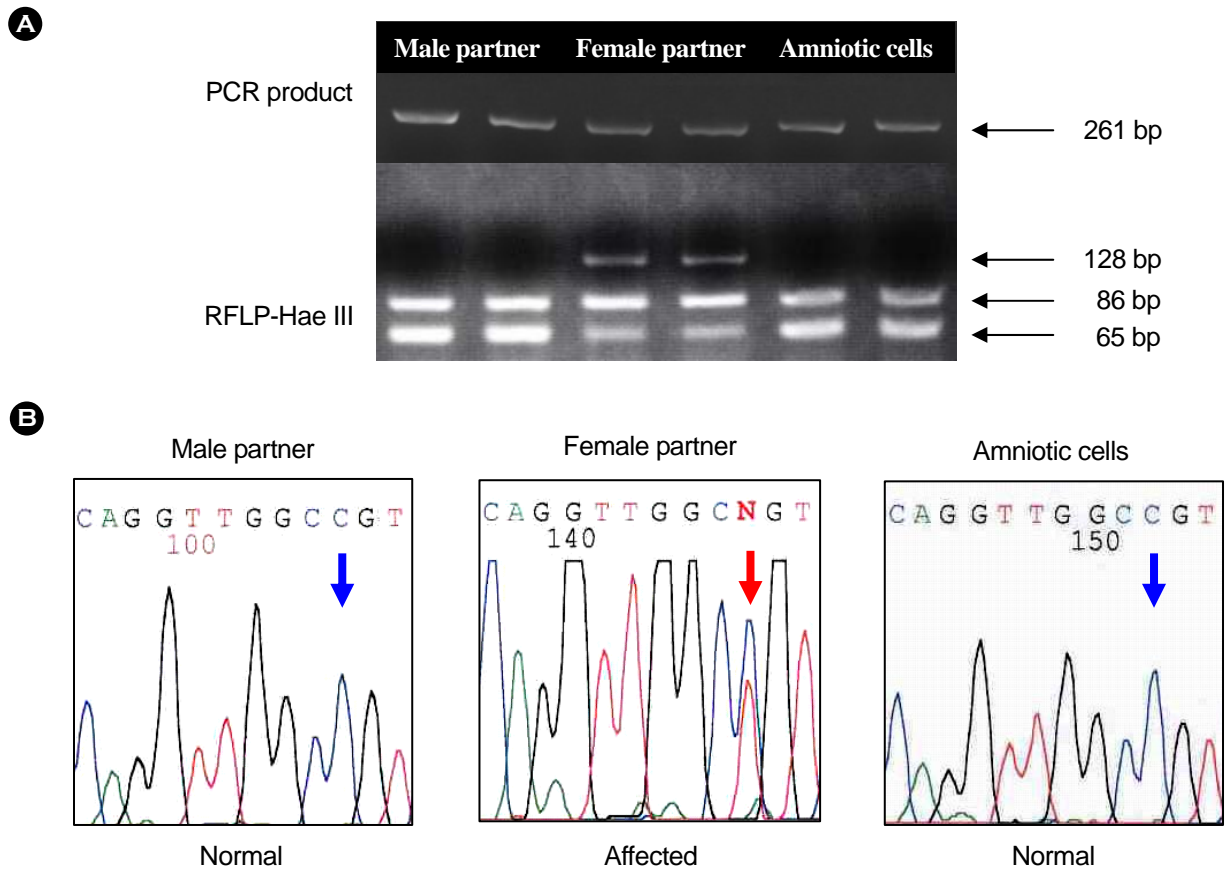


Figure 2. The results of amniocentesis for osteogenesis imperfecta in case 1. Results of amniocentesis using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Hae*III or direct sequencing analysis. **(A)** Detection of the mutation in exon 37 of the *COL1A1* gene in the female partner. After *Hae*III restriction enzyme digestion, the PCR products of the female partner (lane 3 and 4) were digested into 128-, 86- and 65 (and 63)-bp fragments, while the products of the amniotic cells (lane 5 and 6) and normal male partner (lane 1 and 2) were completely digested into 86- and 65 (and 63)-bp fragments (the digested 27- and 20-bp fragments were not seen in the agarose gel). **(B)** Direct sequencing of the PCR product spanning exon 37 demonstrates the presence of a normal homozygous C/C sequence in the male partner and the amniotic cells (The blue arrows indicate normal C/C sequences).

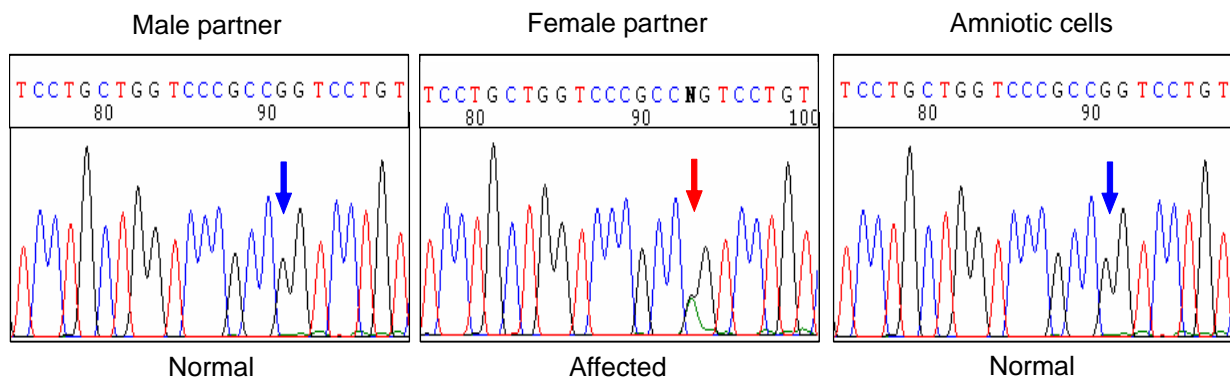


Figure 3. The results of amniocentesis for osteogenesis imperfecta in case 2. Direct sequencing of the PCR product spanning exon 44 of the *COL1A1* shows the presence of a heterozygous G-to-A transition in affected female partner (red arrow). The normal male partner and amniotic cells were homozygous G/G (blue arrows).

고 찰

골형성부전증은 뼈와 피부를 구성하는 type I procollagen chain의 구조적 결함으로 발병하며, 이러한 procollagen chain은 두 분자의 pro $\alpha 1$ chain과 한 분자의 pro $\alpha 2$ chain으로 이루어진 triple helix로 구성되어 있으며, COL1A1과 COL1A2 단백질의 아미노산 서열 중 G-X-Y unit의 반복에 의해 procollagen chain이 서로 꼬여지는 독특한 helix 구조를 가지게 된다. 이 G-X-Y unit의 helix 구조를 이루는데 가장 중요한 아미노산은 glycine이며, glycine이 아닌 다른 아미노산으로 치환이 될 경우, helix의 구조에 결함이 발생하여 정상적인 기능을 하는 procollagen chain이 형성되지 않는다. 또한 다른 하나의 chain이 정상이라 할지라도 비정상 chain이 끼어 있는 triple helix는 전체적으로 비정상적인 helix 구조를 가지게 되며, 결국, $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ chain 중 한 chain의 두 alleles 중 한 allele의 변이에 의해서도 최종적으로 생성되는 type I collagen triple helix의 형성에 문제가 생겨 질환이 나타나는 것으로 알려져 있다.¹² 지금까지 보고된 많은 돌연변이들이 이러한 glycine에 해당하는 위치에 있는 돌연변이들이며 본 연구에서 보고한 두 사례 역시 모두 glycine이 serine으로 치환되는 돌연변이를 가지고 있었다.

현재까지도 골형성부전증 환자의 경우 정상아의 출산을 위하여 다양한 산전진단법들이 수행되어 왔다. 보고된 골형성부전증의 대부분이 경미한 증상을 가지고 있었으며, 이렇게 경미한 증상을 가진 환자의 진단에 있어서 초음파로 진단하는 것은 중증 환자의 경우와는 다르게 오진의 위험이 크기 때문에, Raghunath 등은 융모막세포를 생검하여 collagen 합성 정도를 autoradiography을 통하여 비교 분석하는 진단방법을 산전진단에 적용하기도 하였다.¹⁷ 그러나 autoradiography을 이용한 진단법 역시 일부 골형성부전증 환자에 있어서는 진단 결과가 명확하지 않아 부적합하기 때문에, 보다 정확한 진단을 위하여 근래에 여러 가지 다양한 분자

생물학적인 진단방법들이 도입되었다. Lynch 등과 Benuslene 등은 COL1A1, COL1A2 유전자의 polymorphic markers를 이용한 linkage analysis를 진행하여 haplotype을 분석하였고, 이를 이용하여 원인 돌연변이 allele를 구분하는 방법을 산전진단에 적용하였던 사례를 보고하였으며,^{18,19} Gomez 등은 COL1A2 유전자의 640번째 아미노산인 glycine이 cysteine으로 치환된 새로운 점 돌연변이를 발견한 후 이 부위에 대한 DNA hybridization 방법을 c.2327G>T을 가진 골형성부전증 환자의 산전진단에 성공적으로 적용하였다.²⁰ Nuytinck 등은 type 1 collagen 합성을 저하시키는 non-functional COL1A1 allele을 진단하기 위하여 두 개의 polymorphic marker를 이용하여 mutant allele과 normal allele을 구분하였고, 이를 산전진단에 적용하였다.²¹ 이와 같이 많은 연구자들에 의한 다양한 유전적 분석과 linkage analysis를 통한 진단법의 발전으로 산전진단의 적용이 확대되었다.

하지만 최근에는 산전진단에서만 가능하였던 여러 가지 진단방법들이 단일세포 수준에서도 시행되어 유전적인 분석과 정확한 진단이 가능하게 되었으며, 여러 연구자들의 노력으로 과거와는 달리 여러 부위를 동시에 볼 수 있는 multiplex PCR, 일반 PCR보다 민감도가 높은 fluorescent PCR²² 그리고 단일세포로부터의 whole genome amplification method의 발전으로 인한 comparative genomic hybridization (CGH)나 array CGH의 적용²³ 등 많은 분자 생물학적 분석방법 등이 착상전 유전진단에 적용되어짐에 따라 높은 증폭성공률과 낮은 ADO rate의 조건 확립으로 적용 가능한 질환의 범위가 확대되었고, 비정상적인 임신으로 인한 유산의 정신적, 육체적 부담감으로부터 벗어날 수 있게 되었다.

De Vos 등은 유전의 위험성이 높은 골형성부전증을 가지고 있는 두 가계를 대상으로 착상전 유전진단의 적용과 임신 성공사례를 최초로 보고한 바가 있다.¹⁶ 이들은 진단방법으로써 fluorescent PCR과 RFLP 그리고 fragment analysis 방법을 사용하였으며, 약 11.0%의 ADO rate와 약 85%의 증폭성공

를 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서도 골형성부전증을 가지고 있는 두 가계를 대상으로 총 5 주기의 착상전 유전진단을 시행함에 있어 nested PCR과 RFLP 그리고 direct sequencing 방법을 이용하여 진단하였으며, 착상전 유전진단을 수행하기 이전에 원인 돌연변이의 확인, 특이적 primers의 고안 및 선정 그리고 단일 림프구에서의 증폭성공률과 ADO rate의 조사와 같은 PCR 조건 확립과 진단방법의 최적화를 위해 임상전 검사를 수행하였다. 임상전 검사에서 증폭성공률은 94~98%로 높게 나타났으나, ADO rate의 경우 첫 번째 사례에서 22.5%로 높아 생검 시 6-세포기 이상의 배아에서 두 개의 할구를 생검하여 진단하기로 결정하였으며, PCR 반응 시 denaturation step에서의 온도를 높이고, 반응시간을 조절하여 조건을 최적화하였다. 또한 처음에는 RFLP 분석방법으로 임상전 검사를 수행하였으나, 부분적 절단 (partial digestion)이나 preferential amplification가 나타날 경우 ADO로 오진할 가능성이 있는 등 정확한 진단을 할 수 없고, ADO rate 역시 높아 이후에는 direct sequencing 방법으로 진단방법을 개선하였다. 이러한 direct sequencing 방법을 진단에 적용한 결과 4.0%의 낮은 ADO rate를 나타내었다. 두 번째 사례에서는 임상전 검사 결과 ADO rate가 1.9%로 매우 낮게 관찰되었으나, 착상전 유전진단 결과에서는 ADO rate가 임상전 검사와는 다르게 4.8~11.8%로 다소 높게 관찰되었다. 그러나 할구 두 개로부터 얻은 결과를 종합하여 진단하기 때문에 오진의 위험을 줄일 수 있었다. 이후 임신 17주차에 양수검사를 통하여 착상전 유전진단의 결과가 정확하였음을 재확인하였고, 첫 번째 사례의 경우 2005년에 분만하여 현재까지 건강하게 생활하고 있으며, 두 번째 사례 또한 2008년에 분만에 성공하였고 신생아 검사 결과 정상으로 나타났으며 현재 아무런 증상 없이 건강하게 생활하고 있다.

전 세계적으로 시행되는 착상전 유전진단의 데이터를 관리하는 ESHRE PGD consortium에서 발표한 2008년 1월 ESHRE PGD consortium data collection

VII에 의하면 2004년까지 총 11,791 주기의 착상전 유전진단이 시행되었으며 임상적 임신율은 난자채취당 18% (per oocyte retrieval)와 배아이식당 25% (per embryo transfer)를 나타내고 있고, 총 1,988명의 아이들이 태어났다고 보고하였다. ESHRE PGD consortium data collection I~VII까지 정리한 결과 단일 유전자 이상에 의한 착상전 유전진단 적용 질환 중 골형성부전증의 경우 전 세계적으로 총 17 주기만이 시행된 것으로 확인되었다.^{24~31} 이와 같이 골형성부전증의 착상전 유전진단의 적용과 성공이 전 세계적으로도 흔하지 않은 경우임을 알 수 있다. 특히, 본원에서 시행한 골형성부전증에 대한 착상전 유전진단의 경우 총 2 가계, 5 주기의 착상전 유전진단을 모두 성공적으로 수행하였으며, 두 가계 모두에서 건강한 아이를 출산하였다. 이와 같은 임상 결과는 전 세계적으로 흔하지 않은 사례이며, 아직까지 국내에서 보고된 바가 없는 성공적인 골형성부전증에 대한 착상전 유전진단 적용 사례이다.

본원에서는 2003년부터 2007년까지 단일 유전자 이상에 대한 착상전 유전진단을 총 36 주기 시행하였고, 이 중 12 주기에서 임신에 성공하여 배아 이식당 34.3%의 임상적 임신율 (per embryo transfer)을 보이고 있고, 12명의 건강한 아기가 태어났으며, 1 주기의 경우는 아직 임신 중으로 현재 30주 이상 유지되고 있으며 양수검사 결과 모두 정상으로 확인되었다. 현재까지 시행한 착상전 유전진단의 질환들에는 듀센씨 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy), 수포성 표피박리증 (epidermolysis bullosa), 골형성부전증 (osteogenesis imperfecta), 취약 X 염색체 증후군 (fragile X syndrome), 오르니틴 트랜스카바밀라아제 결핍증 (ornithine transcarbamylase deficiency), pyruvate dehydrogenase (PDH) deficiency, 척수성 근위축증 (spinal muscular atrophy), Huntington's disease (HD), 척수소뇌성 운동실조증 (spinocerebellar ataxia 3), long-chain 3-hydroacyl CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency, 페닐케톤뇨증 (phenylketonuria) 그리고 Chacot-Marie-Tooth (CMT)

disease 등이 있으며, 최근 multiple displacement amplification (MDA) 방법을 이용한 whole genome amplification을 수행하여 array 또는 array CGH 등의 다양한 진단법을 착상전 유전진단에 적용한 사례들이 보고되고 있으며,²³ 앞으로도 착상전 유전진단의 적용 범위는 점차 확대되어질 것으로 사료된다.

결론적으로 앞으로도 더욱 높은 증폭성공률과 낮은 ADO rate 위하여 더 정확한 진단방법의 개발 및 확립을 통해 더 많은 단일 유전자 이상의 유전 질환을 가진 환자들에게 착상전 유전진단을 적용할 수 있게 될 것이며 이는 이러한 부부들에게 정상아의 임신과 출산의 기회를 더욱 많이 제공하게 될 것이다.

참 고 문 헌

1. Munne S. Preimplantation Genetic Diagnosis and Human Implantation-A Review. *Placenta* 2003; 24: S70-6.
2. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective. *Human Reprod* 2004; 19: 2849-58.
3. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Human Reprod* 2005; 20: 2140-52.
4. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril* 2005; 84: 319-24.
5. 임천규, 한미현, 전진현, 송견지, 김정옥, 박소연 등. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아이식술에서 형광직접조합법을 이용한 착상전 유전자진단의 임상적 적용. *대한산부인과학회지* 2000; 43: 1147-53.
6. 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선 등. 유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. *대한불임학회지* 2002; 29: 269-78.
7. 임천규, 민동미, 이형송, 변혜경, 박소연, 류현미 등. 형광직접조합법을 이용한 착상전 유전진단 기법의 최적화와 경험 축적에 의한 임신율의 향상. *대한불임학회지* 2004; 31: 29-38.
8. Lim CK, Jun JH, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong MK, et al. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* 2004; 24: 556-61.
9. 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수, 백은찬 등. 근이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상전 유전자진단. *대한불임학회지* 1996; 23: 109-14.
10. 이형송, 최혜원, 임천규, 민동미, 변혜경, 김진영 등. OTC 효소결핍증, 수포성 표피박리증 및 lactic acidosis 가계에서 duplex nested PCR 방법을 이용한 착상전 유전진단: OTC 효소결핍증 가계에서의 정상아 임신 및 출산. *대한산부인과학회지* 2004; 47: 708-18.
11. Byers PH. Brittle bones-fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet* 1990; 6(9): 293-300.
12. Sykes B. Linkage analysis in dominantly inherited osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 1993; 45(2): 212-6.
13. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 1997; 9(4): 300-15.
14. Ries-Levavi L, Ish-Shalom T, Frydman M, Lev D, Cohen S, Barkai G, et al. Genetic and biochemical analyses of Israeli osteogenesis imperfecta patients. *Hum Mutat* 2004; 23(4): 399-400.
15. Byers PH. Osteogenesis imperfecta. In Royce PM, Steinmann B (eds): *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects*. New York: Wiley Liss; 1993; 317-50.
16. De Vos A, Sermon K, Van de Velde H, Joris H, Vandervorst M, Lissens W, et al. Two pregnancies after preimplantation genetic diagnosis for osteogenesis imperfecta type I and type IV. *Hum Genet* 2000; 106(6): 605-13.17.
17. Raghunath M, Steinmann B, Delozier-Blanchet C, Extermann P, Superti-Furga A. Prenatal diagnosis of collagen disorders by direct biochemical analysis of chorionic villus biopsies. *Pediatr Res* 1994; 36: 441-8.
18. Lynch JR, Ogilvie D, Priestley L, Baigrie C, Smith R, Fardon

- P, et al. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta by identification of the concordant collagen 1 allele. *J Med Genet* 1991; 28: 145-50.
19. Benuslene E, Kucinkas V. Strategy for prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta by linkage analysis to the type I collagen loci COL1A1 and COL1A2. *Med Sci Monit* 2000; 6: 217-26.
 20. Gomez-Lira M, Sangalli A, Pignatti PF, Digilio MC, Giannotti A, Carnevale E, et al. Determination of a new collagen type I alpha 2 gene point mutation which causes a Gly640 Cys substitution in osteogenesis imperfecta and prenatal diagnosis by DNA hybridisation. *J Med Genet* 1994; 31: 965-8.
 21. Nuytinck L, Sayli BS, Wettinck K, De Paepe A. Prenatal diagnosis of osteogenesis Imperfecta type I by COL1A1 null-allele-testing. *Prenat Diagn* 1999; 19: 873-75.
 22. Findlay I, Quirke P, Hall J, Rutherford A. Fluorescent PCR: a new technique for PGD of sex and single-gene defects. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13(2): 96-103.
 23. Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, et al. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 847-52.
 24. Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, et al. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 1999; 14: 3138-48.
 25. Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, et al. European Society of Human Reproduction and Embryology Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium Steering Committee ESHRE preimplantation genetic diagnosis (PGD) consortium: data collection II (May 2000). *Hum Reprod* 2000; 15: 2673-83.
 26. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002; 17: 233-46.
 27. Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, et al. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* 2005; 20: 19-34.
 28. Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C, et al. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* 2006; 21: 3-21.
 30. Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, et al. ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 2007; 22: 323-36.
 31. Harper JC, de Die-Smulders C, Goossens V, Harton G, Moutou C, Repping S, et al. ESHRE PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. *Hum Reprod* 2008; 23: 741-55.

= 국문초록 =

목 적: 착상전 유전진단은 환아를 출산할 가능성이 높은 부부들에게 정상아의 출산 기회를 제공해주는 보조생식술의 하나로써 널리 시행되고 있다. 골형성부전증은 상염색체 우성 유전질환으로서 뼈와 피부를 구성하는 결합조직의 이상으로 뼈가 잘 부러지는 특징을 가지고 있으며, 질환의 95% 이상은 *COL1A1* 또는 *COL1A2* 유전자의 이상으로 발병한다고 알려져 있다. 본 논문에서는 골형성부전증 환자 2 가계를 대상으로 5 주기의 착상전 유전진단을 시행하여 임신에 성공한 사례에 대해 보고하고자 한다.

연구방법: 착상전 유전진단 수행 전에 환자의 단일 림프구에서 증폭성공률과 allele drop-out (ADO) rate을 확인하기 위하여 임상전 검사를 수행하였다. 각각 원인 돌연변이로 확인된 *COL1A1* 유전자 c.2452G>A와 c.3226G>A를 가지고 있는 골형성부전증 2 가계를 대상으로 5 주기의 착상전 유전진단을 시행하였다. 생검한 할구로부터 원인 돌연변이를 진단하기 위하여 nested PCR 후 *HaeIII* 제한효소를 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석방법과 direct sequencing 방법을 이용하여 진단을 실시하였다.

결 과: Genomic DNA를 이용하여 *COL1A1* 유전자 검사를 해 본 결과 각 가계의 원인 돌연변이는 c.2452G>A와 c.3226G>A임을 재확인하였으며, 단일세포를 이용한 임상전 검사 결과 첫 번째 사례의 경우 94.2%의 증폭성공률과 22.5%의 ADO rate을 나타내었고, 두 번째 사례의 경우 98.1%의 증폭성공률과 1.9%의 ADO rate를 나타내었다. 착상전 유전진단 결과 첫 번째 사례의 경우, 3 주기의 착상전 유전진단에서 총 34개의 배아 중 31개의 배아에서 진단에 성공하여 91.2% (31/34)의 진단성공률을 나타내었고, 총 19개의 정상 배아 중 8개의 배아 (2.7개/배아이식)를 이식하였다. 세 번째 주기에서 임신에 성공하였고 제왕절개로 건강한 아이를 분만하였다. 두 번째 사례의 경우 2 주기의 착상전 유전진단을 시행하였으며, 총 19개의 배아 모두 진단에 성공하여 100.0% (19/19)의 진단성공률을 나타내었고, 총 11개의 정상 배아 중 4개 (2개/배아이식)의 배아를 이식하였다. 두 번째 착상전 유전진단에서 임신에 성공하였고, 건강한 아이를 분만하였다.

결 론: 착상전 유전진단을 통한 골형성부전증 환자 2 가계에서의 성공적인 임신과 출산은 국내에서 처음으로 보고되는 임상 결과로, 본원의 착상전 유전진단방법은 효과적이고 확실한 방법으로써 앞으로도 더 많은 단일 유전자 이상의 유전질환을 가진 환자들에게 적용하게 될 것이며, 이는 이와 유사한 유전질환을 가지고 있거나 유전질환의 이환 가능성이 있는 부부들에게 정상아의 임신과 출산의 기회를 더욱 많이 제공할 수 있을 것이다.

중심단어: 착상전 유전진단, 골형성부전증, *COL1A1*, *COL1A2*, Allele drop-out (ADO)