

## PGD in Human ART Program

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

오 선 경

### 1. Introduction

최근 현대의학기술의 급속한 발전으로 다양한 유전성 질환들이 보고되었고 이를 예방하고 치료하기 위한 수많은 연구들이 이루어지고 있다. 또한 유전적 결함이 있는 아기의 출산을 방지하기 위해 임신중절 태아의 산전진단 (prenatal diagnosis)이 널리 활용되어져왔다. 산전진단은 양수천자 (amnio centesis), 음모채취 (chorionic villi sampling), 태아혈액채취 (fetal cord blood sampling) 등에 의해 태아세포를 얻은 후 그들의 염색체나 DNA를 분석하여 보인자 (carrier)인지 이환자 (affected)인지를 판별하는 방법이다. 확실한 유전적 결함이 발견된 경우는 유전상담 (genetic counseling)을 거쳐 임신중절을 할지 혹은 임신을 계속 유지할지를 결정해야만 한다. 따라서 생식의학자와 유전학자들은 만일 착상 전에 건강하다고 판단되는 생식세포 (gametes)만을 선별하여 임신할 수 있다면 임신중절에 따르는 고통을 없앨 수 있으리라는 생각을 하게 되었다. 착상 전 유전진단 (Preimplantation Genetic Diagnosis: PGD)에 관한 가능성은 1967년 Edwards와 Gardner가 토끼 배아를 성감별 (sexing) 한 후 예견된 성을 가진 산자를 얻음으로써 시작되었고, 그 이후 가축 분야에서 많은 발전이 이루어져왔다.

McLaren은 1985년도에 PGD의 이론적인 가능성을 제시하였으나 그 당시에는 제법 많은 양의 세포를 이용하여 염색체 혹은 DNA를 분석하였으므로 생식세포나 배아와 같은 단일세포 (single-cell) 수준에서의 분석은 가능하지 않았다. 단일세포의 PGD를 임상에 이용했던 경우는 Handyside 등에 의해 최초로 보고되었다 (1990). 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction: PCR)을 이용하여 Y 염색체 특정 부위의 DNA를 증폭함으로써 초기 배아를 성감별하여 배아 이식 후 건강한 여자 아기의 출산을 가능하게 했다.

뒤이어 간기세포 (interphase)에서도 염색체 분석이 가능한 fluorescent in situ hybridization (FISH) 방법이 개발, 적용되어 단일세포의 성 구분이나 이수배수체 (aneuploidy) 검사가 가능해짐으로써 PGD는 많은 발전을 이룩할 수 있게 되었다.

또한, 1990년대에는 세포질내 정자 미세주입술 (ICSI), 공배양 (Coculture), 보조부화술 (AHA), 포배 배양 (Blastocyst culture) 및 냉동보존 (Cryopreservation) 등 보조 생식술 (Assisted Reproductive Technology: ART) 영역에서 많은 기술적인 발전이 있어왔고 더불어 PGD는 ART 및 산전진단 영역에서 중요한 자리를 차지하게 되었다. PGD 시행을 위해서 얻을 수 있는 분석 재료로는 난자 (oocyte)의 이환 (affected) 여부를 파악할 수 있는 생검된 제 1극체 (first polarbody: 1st PB), 제 2극체 (second polar body: 2nd PB)와 초기 배아의 이환 여부를 분석할 수 있는 6~8 세포기에서 생검된 한 두 개의 할구 (blastomeres) 등이 있다.

이와 같이 분석해야 할 재료가 한, 두 개의 세포이고 또한 생검 후 가장 빠른 시간 내에 정

상, 보인자, 이환 여부를 판정하여 선택된 배아만을 배아 이식 (Embryo Transfer) 해야만 하므로 PGD를 적용할 수 있는 유전 질환은 아직은 그 한계가 있다. 생검법 (biopsy method)으로 얻어진 극체나 할구는 단일세포이므로 multiplex rested PCR이나 FISH 등의 방법이 일반적으로 분석에 이용되고 있다.

현재까지는 다음과 같은 경우에 PGD를 시행해 오고 있다.

1. X 염색체에 연관된 열성 유전 질환 (X-linked recessive disorder) 환자의 경우 PCR 또는 FISH를 이용한 성감별
2. 여성의 나이가 많아 (35세 이상) 염색체 이상이 있는 아기를 임신할 가능성이 높은 경우 FISH를 이용한 이수배수체의 진단
3. 염색체 전좌 (translocation) 보인자로서 건강한 아기를 갖고자 하는 경우
4. 가계에 단일 유전자 질환 (single-gene disorder)이 있는 경우

또한, PGD를 시행한 후 임신이 되면 반드시 산전진단 (Amniocentesis 또는 CVS)을 통해 건강한 아기의 임신인지를 한번 더 확인해 주어야만 한다.

## 2. PGD for age-related aneuploidies

배아의 염색체 이상은 생식생리 분야에서 수정장애, 배아의 전핵시기 및 초기난할 정지, 착상 후 배아 사멸 등과 관련이 있으며 자연유산, 사산, 분만 후 신생아 사망 등과도 관련이 있다. 배아의 염색체 이상은 신생아가 비록 생존하여 출생하더라도 정신박약, 기형, 불임을 일으킬 수 있다. 인간의 신생아에서 관찰되는 염색체 이상 중 가장 대표적인 염색체 인상은 이수배수체 (aneuploidy)로 보고되고 있으며 이러한 이수배수체는 산모의 연령에 비례하여 증가하는데, 산모의 연령이 증가할 경우 난자에서 염색체의 비분리 현상 (non-disjunction)이 빈발하기 때문에 생각할 수 있다.

### 1) First and second polar body biopsy

극체 (polar body)를 생검하여 분석하면 각 난자의 상보적인 유전인자형 (complementary genotype)을 알 수 있다. 만일 1st PB가 이환된 유전자를 갖고 있다면 난자는 정상적인 유전자를 갖고 있고 따라서 수정 후 배아 이식을 하여도 좋다고 볼 수 있다. 그러나 감수분열 동안 염색체의 말단부위 (telomere) 가까이에 위치한 어떤 부위에서 교차가 일어난 경우에는 heterozygous 1st PB와 난자가 생긴다. 이러한 문제는 수정 후 2nd PB를 순차적으로 생검하여 분석함으로써 극복되었다.

PB는 감수분열 과정 중 얻어지는 부산물로 생각되며 배아 생존에 반드시 필요한 물질이 아니라는 점은 PB 생검 분석의 장점이다. 만일 1st PB 분석이 성공하면 종교적으로나 도덕적으로 배아를 인위적으로 조작하는 일이 금지된 경우에 1st & 2nd PB는 수정된 배아가 아니므로 그 적용이 용이하며, 분석을 위한 기간을 길게 가질 수 있다. 또한 대부분의 이수배수체가 주로 난자에서 일어나는 점을 감안한다면 PB 분석의 타당성이 있다고 볼 수 있다.

그러나 PB는 아주 작은 세포로써 다루기가 매우 까다롭고 난자 채취 후 빠른 시간 안에 절편화 현상 (fragmentation)이 일어나기 쉬우므로 분석하고자 하는 모든 유전물질을 놓치지 않고 다 분석할 수 있는지가 염려스럽다.

또한 부모 중 모계만이 분석되므로, 만일 남편이 환자이거나 어떤 유전병의 보인자일 경우에는 적용할 수 없고, 성염색체 연관 질환일 경우에 성감별을 위해서도 사용할 수 없다.

Verlinsky 등은 여성의 나이가 35세 이상으로 의뢰된 환자 659례 (cycles)를 분석하여 그 결과를 보고하였다 (1999). 3943 난자의 1st and 2nd PB를 생검하여 분석한 후 3217 (81.6%)에서 13, 18, 21번 염색체에 대한 FISH 결과를 얻을 수 있었고 이들 중 1388 (43.1%) 난자가 비정상 (aneuploidies)으로 판명되었고 이들 중 35.7%가 제 1감수분열시, 26.1%가 제 2감수분열시 생겨난 것임을 알 수 있었다. 정상으로 판명된 1829 난자를 수정하여 얻은 1588개의 배아를 614명에게 배아 이식하여 131명이 임신되었고 (clinical pregnancy) 88명의 건강한 아기가 태어났다고 보고하였다.

## 2) Polar body vs. blastomere analysis

Verlinsky 등은 일찍이 단일 유전자 이상을 진단하기 위해 분석한 결과를 발표한 바 있다 (1992). 상염색체의 비분리 현상은 난자의 제 1감수분열시에 대부분 발생하므로 1st PB의 염색체 분석만으로도 이수배수체로 인한 이상을 80~100%를 알아낼 수 있었다.

1st PB의 유전자와 난자의 유전자는 상보적인 관계이므로 1st PB에서 extra univalent chromosome이 발견되었다면 이후 배아의 염색체는 nullisomic이나 monosomic으로 될 것이다. 또한 1st PB에서 소실된 염색체가 발견되면 이후 배아는 trisomy가 되리라고 예측할 수 있다. 이런 가설에 반해서 Angell은 predivision이 trisomy의 중요한 원인이 될 수도 있다고 보고하였다 (1991). 제 1감수분열 때 predivision이 발생하면 aneuploid MII 난자는 23 univalents와 1 chromatid를 갖게 되거나 22 univalents와 1 chromatid를 갖는 난자가 될 것이다. 이들은 2차 감수분열 동안 23 univalents (normal)로 회복될 수도 있다. 즉 감수분열시에 extra or missing chromatid가 발생하면 난자와 2nd PB의 염색체는 혼란스러워질 것이다. 그러므로 predivision을 고려한다면 2nd PB의 분석이 반드시 이루어져야만 오진 (misdiagnosis)을 예방할 것이다. Chromatids 상태에서는 두 개의 signal은 겹쳐 보이기도 하고 분리되어 보이기도 한다. Predivision이 존재하지 않다면 이런 것은 문제되지 않을 수도 있지만 predivision이 흔히 일어난다면 오진이 문제가 된다. 그러나 아직 이들은 논쟁의 여지가 있다.

## 3) Age-related aneuploidies by blastomere biopsy

할구 생검법 (blastomere biopsy)은 PGD 분야에서 가장 널리 사용되는 방법이다. 인간 배아의 경우 compaction이 일어나기 전인 8세포기 이전의 배아는 각각의 할구들이 전발생능 (totipotency)이 있으므로 한 두 개의 할구를 생검하더라도 배발달에 특별한 영향을 주지는 않게 된다. 생검된 배아는 all-or-nothing의 상황, 즉 착상 전에 배발달이 실패하거나 건강한 아기로 태어나게 될 것이라는 점 때문에 8세포기 이전의 배아를 생검하고 있다. 이런 배아 생검법의 이론적인 장점은 배아의 할구에서 얻는 유전적 구성이 산전진단에서 얻는 것과 같으리라는 생각을 할 수 있다. 염색체의 수적 이상은 산모의 나이가 35세 이상일 경우 높은 빈도로 나타난다. 따라서 IVF 환자 중 여성이 35세 이상인 경우에 PGD를 하여 정상적인 염색체를 가진 배아만을 선별하여 이식할 수 있다면 embryonic monosomy, trisomy 등을 예방할 수 있고 따라서 배아 이식 후 임신 성공률을 높일 수 있을 것이다.

Munné 등은 수년에 걸쳐 IVF 환자 중 35세 이상인 환자들을 대상으로 1~2개의 할구를 생

검하여 FISH 분석 후 그 결과들을 여러 차례 보고하였다.

체세포 분열시 배아는 비분리 현상 (mitotic nondisjunction)이나 anaphase lag 등의 이유로 mosaic이 발생하며 2가지 세포주로 구성된 mosaic이나 chaotic mosaics도 빈번하게 발생한다. 또한 초기 배아는 흔히 2개 혹은 여러 개의 핵을 가지는 경우 (multinucleated blastomeres)가 많이 발견되고 이럴 경우에는 배아가 분열할 때 mosaicism이 빈번하게 발생할 수 있다. 따라서 1~2개의 배아만 생검하여 분석하는 PGD는 오진의 위험성을 내포하고 있으므로 주의해야만 한다. 태어나는 신생아나 자연유산된 태아 조직에서는 21, 18, 13, 16번 등과 X, Y 염색체의 trisomy가 많이 알려져 왔고, 실제로 monosomy인 배아도 발생하지만 이들은 배반포 (blastocyst) 시기 이전에 발생이 중단되는 것으로 알려져 왔다. 그러나, 분열기의 배아와 미수정 난자들을 분석해보면 비정상 핵형의 빈도가 상당히 높으므로 산전진단에서 발견되어졌던 염색체만을 분석한다면 착상실패와 embryonic loss의 원인이 되는 실질적인 염색체 이상은 발견하지 못했을 가능성이 높다. 따라서 Munné 등은 생검된 할구 한 개에 2번의 FISH (two rounds FISH)를 하여 결과를 분석하였다. 먼저 4, 7, 14, 17, 18 & 22번 염색체를 분석하여 결과를 얻은 후 cover slip을 제거하고 제 2차 hybridization을 하여 1, 6, 14, 17 & 18번 염색체를 FISH 분석하였다. 이들 결과에서 비정상 배아의 빈도는 연령이 20~34.9세의 경우 14.51%, 35~39.9세의 경우는 14.10%, 40세 이상의 경우는 31.4%로 나타났다. 이 연구에서 가장 빈번하게 나타났던 염색체 이상은 22, 15, 1 & 17번 염색체의 aneuploidy였다. 그러므로, 정확하게 PGD를 하기 위해서는 1, 4, 6, 7, 14, 15, 17, 18 & 22 등의 염색체를 분석해야만 한다는 새로운 논문을 발표하였다 (1999).

### 3. PGD for structural abnormalities

부모가 염색체의 구조적인 이상이 있는 translocation carrier일 경우 미처 산전진단을 받지 않은 상태라면 염색체 이상인 아기를 출산하거나 반복적인 자연유산을 경험하였을 것이다. 또한 이들은 임신 후 산전진단 (CVS, amniocentesis)에 의한 태아의 염색체 분석을 시행하더라도 만일 아기의 염색체 이상이 발견되면 유전상담 후 유산을 해야만 하는 신체적 고통을 겪어왔다. 지금까지 FISH를 이용한 PGD는 염색체의 수적 이상 (aneuploidy)에 국한되어 많은 연구가 있어 왔으나 Van Steirteghem 등과 Munné 등은 각 translocation carriers들의 specific한 probe를 만들고 multi-color FISH를 적용하여 PGD를 시행하였다. 그러나 patient specific한 probe는 자체적으로 만들기에는 비용과 시간이 매우 많이 소요되는 단점이 있어 손쉽게 적용하기에는 어렵다고 볼 수 있다.

### 4. PGD for monogenic disease

여러 center의 다각적인 노력이 있었음에도 불구하고 단일 유전자 이상 (single-gene disorders)을 밝히기 위한 PGD는 아직도 그 정확성이나 신뢰도가 중요한 문제로 남아있다. 이러한 단일 유전자 이상을 알아내기 위한 PGD의 경우 PCR을 이용하여 분석하고 있으나 이 방법은 allele dropout (ADO)이 발생할 수 있어 오진 할 수 있는 중요한 원인이 된다.

ADO란 single cell에 존재하는 두 대립인자 (alleles) 중 한 쪽이 증폭에 실패하였을 때 나타나는 현상으로 single cell의 PCR 시행시에 발생할 수 있는 기술적 한계로써 단일 유전자 진단시

가장 빈번히 겪을 수 있는 오진의 원인이다.

현재 Verlinsky 등은 ADO를 극복하기 위하여 mutant gene과 그들의 linked polymorphic marker를 동시에 증폭하는 방법을 사용하여 엄마가 보인자인 경우 1st & 2nd PB를 단계적으로 분석한 후 건강한 난자만을 선별하여 ICSI한 후 수정되면 배아 분석을 시행하고 있다.

최근에는 fluorescent multiplex PCR을 single cell PGD에 적용하여 더 정확한 성감별과 단일 유전자 이상, 염색체 수적 이상 등을 분석하였고 이로써 더 정확한 결과를 얻었음이 Findlay 등에 의해 보고되었다.

지금까지 Cystic fibrosis,  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency, Retinitis pigmentosa, Hemophilias A and B, Thalassemias, Alport, Gaucher's, Tay Sach's and Sickle cell disease, long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, Duchene muscular dystrophy and Epidermolysis bullosa 등의 질환에 대한 PGD가 시행되고 있다.

## 5. PGD for X-linked disease

300종 이상의 recessive X-linked diseases가 이미 알려져 있으므로 배아의 성을 구분 (gender determination)하여 배아 이식을 하여 주는 일은 매우 필요하고 중요한 일이라 하겠다. 초기에는 Y 염색체 특이 probe를 사용하여 PCR에 의한 성감별법으로 PGD를 수행하였으나 증폭이 되지 않아 오진을 1례 보고한 이래 대부분의 성감별은 FISH를 사용하고 있다. 그러나 FISH를 이용한 PGD의 경우도 앞서 언급한 바와 같이 complex mosaicism이 발생하여 XX/XY 배아가 만들어진다면 역시 오진의 위험이 있다.

## Suggested Readings

1. Bahçe M, Cohen J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: Were we looking at the wrong chromosomes? *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 154-9.
2. Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RML. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism, chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997; 99: 755-60.
3. Findlay I, Matthews P, Quirke P. Preimplantation genetic diagnosis using fluorescent polymerase chain reaction: Results and future developments. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 177-84.
4. International Working Group on Preimplantation Genetics. Preimplantation Diagnosis: An Alternative to Prenatal Diagnosis of Genetic and Chromosomal Disorders. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 161-4.
5. Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities using FISH. In Trounson A, Gardner DK, Handbook of in Vitro Fertilization. 2nd. Ed. CRC Press 1999; 307-26.
6. Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharenko V, Kuliev A, Verlinsky Y. Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 170-5.
7. Sermon K, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. In Fauser BCJM, Molecular Biology in

Reproductive Medicine. Parthenon Publishing, New York, NY 1999; 409-31.

8. Verlinsky Y, Munné S, Simpson JL, Kuliev A, Ao A, Ray P et al. Current status of preimplantation diagnosis. *J Assisi Reprod Genet* 1997; 14: 72-5.
  9. Verlinsky Y, Cieslak, Ivakhnenko V, Eviskov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. Prevention of Age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 143-7.
-