

Clinical Significance of Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) in Genetic Disorders

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과

강 인 수

1. 착상전 유전진단이란?

유전 질환이나 염색체 이상을 가진 태아가 출생하는 것을 예방하기 위하여 산전진단 (prenatal diagnosis)이 널리 시행되어 왔다. 산전진단은 임신된 후 융모막 융모검사 또는 양수검사로 태아 세포를 얻어내어 유전 질환 유무를 진단하는 방법으로, 이상이 있는 경우는 임신 중절을 하여 유전병이 있는 태아가 출생하는 것을 방지하는 방법이다. 그러나 이러한 경우 임신 중절에 따르는 신체적, 정신적 고통이 따르며, 이미 자란 태아를 유산시켜야 하는데 대한 윤리적 문제 등 어려움이 있다.

이와 반면에 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis: PGD)은 임신하기 전에 수정란을 이용하여 유전 질환이나 염색체 이상 질환의 유무를 진단한 후 건강한 수정란만을 선택하여 임신이 되도록 하기 위한 방법이다. 이를 위해서는 시험관 아기 기술을 시행하여야 하는데, 난자와 정자를 얻어내고 시험관에서 수정시켜 발생한 수정란으로부터 1~2개의 세포를 떼어내어 분자 생물학적 유전진단 기법을 이용하여 유전진단을 시행한다. 그 결과 유전병이 없거나 정상적인 염색체를 갖는 것으로 진단된 수정란만을 선별적으로 자궁내 이식하는 방법이다. 착상전 유전진단의 가장 큰 장점은 유전병이 있는 태아가 자궁에 임신되는 것을 차단하기 때문에 임신 중절을 피할 수 있다는 점이다. 따라서 인공 유산에 따르는 산모의 정신적, 신체적 부담이나 합병증을 피할 수 있으므로 효율적인 예방책이라고 할 수 있다. 또한 윤리적 측면에서도 산전 진단 후 자란 태아를 유산시키는 것 보다는, 환아가 될 수정란을 이식하지 않는 방법이 수용하기가 더 쉬울 것으로 생각된다. 단점으로는 불임이 아니라도 체외 수정 기술을 해야 하는 점도 있다.

착상전 유전진단은 수정란을 다루는 체외수정법과 산전 유전진단법이 접목한 것이기 때문에 단일 세포수준에서 유전 검사를 한다는 점과, 유전 검사의 시기가 임신 전이라는 점, 그리고 8 세포기의 수정란 할구를 생검할 때에는 1~2일 이내의 제한된 시간 내에 유전 검사를 완료해야 하는 특징을 갖고 있다. 따라서 많은 세포를 이용하여 시행하는 유전 검사법과는 달리 단일 세포 검사가 갖고 있는 진단적 오류의 가능성을 얼마나 줄일 수 있는가가 이 기술의 성패를 좌우한다. 특히 착상전 유전진단법으로 유전 질환을 진단할 때 오진을 피하기 위해서는 첨단 유전진단 장비와 기술 숙련에 의한 높은 정확성이 요구된다. 또한 난자 및 정자의 미세조작술, 수정란을 최적의 조건으로 키우기 위한 세포배양 기술, 수정란에서 세포채취를 위한 미세조작술, 단일 세포를 사용한 정확한 유전진단 기술, 배아 이식술 등, 분업화된 전문인원들 간의 팀웍이 필요하다.

2. 유전 질환의 적응증

유전자 돌연변이로 인해 발생하는 각종 단일 유전자 질환에서 PGD를 시행할 수 있다. 모든 유전병이나 기형아에 대해서 착상전 유전진단을 할 수는 없으며, 유전자 돌연변이 상태가 밝혀지면 가능하다. 그러기 위해서는 우선 유전질환 전문의사의 진단을 받고, 그 질환의 원인이 되는 유전자 검사를 받아서 돌연변이 부위가 명확히 규명되어야 착상전 유전진단이 가능하다 (이 점은 산전진단도 마찬가지이다).

예로서는 크루존 증후군 (Crouzon syndrome), 알포트 증후군 (Alport syndrome), spinocerebellar ataxia, 신경섬유종 (neurofibromatosis type), 골형성 부전증 (osteogenesis imperfecta) 등이 있다 (Table 1 참조).

아래 표는 2004년도 European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium에 참여한 Center에서 PGD가 시행되었던 대표적인 유전병들을 열거한 것이다. 그러나 여기에 기술하지 않은 유전 질환도 앞으로 원인 유전자가 밝혀짐으로써 PGD가 가능해질 수도 있고, 어떤 유전질환이라도 그 해당 환자에서 원인 유전자의 돌연변이를 정확히 알고 있으면 PGD를 시행할 수 있으므로 PGD의 적응증이 되는 유전질환의 종류는 점차 확대될 것으로 기대된다.

3. 착상전 유전진단의 방법

착상전 유전진단에서는 수정란을 검사해야 하기 때문에 시험관 아기 기술 (체외수정)을 해야 한다. 대개 long protocol을 이용하여 과배란 유도를 한다. 유전질환의 경우에는 DNA의 혼입을 막기 위해서 다른 주변 세포는 제거하고 ICSI를 이용하여 수정 시킨다. 수정란을 3일간 배양하면 대개 8 세포기로 발달하게 되고 미세조작술로 1~2개의 할구 세포를 분리해 낸다. 유전자 검사 결과 유전병이 발현되지 않을 건강한 수정란을 선택하여 수정 제 4~5일에 자궁에 이식한다. 임신에 성공하면 산전 진단을 시행하여 유전자의 이상유무를 확인해야 한다.

일반적으로 single gene defect인 경우에는 채취된 단일 할구 세포에서 PCR기법으로 유전자 진단을 한다. PCR primer가 있는 경우에는 PCR을 시행하고, PCR primer가 없는 경우에는 유전 형식에 따라 X-linked disease에서는 유전병이 발현되지 않을 성 (gender)을 선택하기 위하여 FISH를 시행하기도 한다.

1) 단일 세포에서 유전진단을 위한 Polymerase chain reaction (PCR) 및 관련 기법

돌연변이가 있는 특정 유전자 부위 전후에 충분한 길이의 염기서열을 알고 있으면 2개의 oligonucleotide sequence를 선택하여 PCR로 유전자를 증폭할 수 있다.

단일 세포에서의 PCR을 이용한 진단의 문제점은 contamination과 allele drop out (ADO)이다. 적은 양의 contamination이라도 매우 많은 copy로 증폭될 수 있으므로 주의를 요한다. 또한 Heterozygotic cell의 allele 중 한 allele에서는 약하게 증폭이 일어나고 다른 allele에서 많이 증폭되는 경우를 preferential amplification (PA)라고 하며 PA가 극단적으로 되는 경우 즉, 한쪽 allele에서만 증폭이 일어나고 다른 쪽에서는 증폭이 거의 안되면 ADO라고 한다. 만약 정상 allele은 증폭이 잘 되고 돌연변이 allele에서 ADO가 발생하게 되면 heterozygote로 우성질환에서는 환자가 발생하는데 PGD 진단에서는 정상이라

Table 1. 착상전 유전진단이 시행되었던 질환들 (2004년 유럽생식의학회 PGD 컨소시움 자료)

Achondroplasia (연골무형성증)
Adrenogenital syndrome
Agammaglobulinemia, X-linked
Alport syndrome, X-linked (알포트 증후군)
Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1A
Charcot-Marie-Tooth disease type 1A
Crouzon syndrome (크루존 증후군)
Cystic fibrosis (낭성섬유증)
Deafness (connexin26, 35delG, E47X mutation).
DMD/BMD (듀센씨 근이양증)
Epidermolysis bullosa with pyloric atresia (수포성 표피박리증)
familial adenomatous polyposis coli
Fanconi anemia (판코니 빈혈)
Fragile X (취약X증후군)
haemophilia A (혈우병)
Huntington's disease
incontinentia pigmenti
Kennedy disease
Krabbe disease
Leigh syndrome
Lesch-Nyhan syndrome (레쉬-니한 증후군)
Marfan syndrome
MCAD deficiency
Muscular dystonia DYT1
Myotonic dystrophy (근긴장성 근이양증)
Neurofibromatosis type1 and 2 (신경 섬유증)
Ornithine transcarbamylase deficiency (오르니틴 트랜스카바밀라제 결핍증)
Osteogenesis imperfecta (골형성 부전증)
Polycystic kidney disease (다낭성 신장 증후군)/ AD
Pyruvate dehydrogenase deficiency
Retinitis pigmentosa (망막성 색소증)
Retinoblastoma (망막아세포종)
Rh factor incompatibility
San Filippo disease
sickle cell anemia (겸상적혈구증)
Spinal muscular atrophy (척수성근위축증)
spinocerebellar ataxia type 1, 3 and 7 (척수 소뇌성 운동실조증)
Tay-Sachs disease
Thalassemia-A
Thalassemia-B
Tuberous sclerosis
Tuberous sclerosis type 1
Tyrosine hydroxylase deficiency
Von Hippel-Lindau syndrome
Wiscott-Aldrich syndrome

고 오진하게 된다.

따라서 이 같은 문제들을 극복하기 위해 대부분의 PCR-PGD에서는 nested 또는 hemi-nested PCR을 시행한다. nested primer를 사용하여 two-step PCR을 시행하는데, first PCR에서 일단 증폭한 fragment의 내부에 second PCR의 primer들이 결합할 수 있도록 하여 원하는 부위를 증폭하는 방법이다.

ADO를 줄이기 위한 방법으로는 2개의 할구 세포를 채취하여 진단을 하고, 민감도가 높은 fluorescent PCR을 이용하며, multiplex PCR, specific linked marker를 이용한 linkage analysis 등을 함께 시행한다.

(1) Heteroduplex analysis

Heterozygous DNA 검체를 변성시킨 후 reanneal 시키면 homoduplex를 만들면서 mutant와 normal allele strand가 결합한 hybrid form을 만든다. Heterduplex는 DNA 염기배열 중 1~2 allele에 mismatch가 있는 경우, 이 부위에서는 결합하지 않으므로 전기영동에서 서서히 이동하기 때문에 검체에는 heterozygosity가 있다고 판정할 수 있다. 이 방법은 특히 작은 deletion이나 insertion에도 판정이 잘 되며 cystic fibrosis, Tay-Sachs disease, familial adenomatous polyposis 등의 진단에 사용되었다.

(2) Single strand conformational polymorphism (SSCP)

Scanning assay이며 100~500 bp의 DNA fragment에서 작은 deletion, insertion이나 단일 염기의 변화를 발견할 수 있는 방법이다. PCR에 의해 증폭된 DNA sample을 denaturation시켜 single strand로 만들면 염기의 차이에 의해서 intrastrand ineteraction에 의해서 구조가 다른 형태가 되고 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 다른 allele이 발견될 수 있다.

SSCP는 장비와 procedure가 간단하며 저 비용이고 방사성 동위원소를 사용하지 않는다는 점에서 많이 사용된다. SSCP는 familial adenomatous polyposis coli (FAPC)에서 사용되었다.

(3) Restriction endonuclease digestion

돌연변이와 정상 유전자는 염기서열이 다르므로 특정한 염기배열을 인지하여 절단하는 restriction endonuclease으로 분해시키면 PCR 산물이 각기 다른 양상으로 나뉘게 되어 electrophoresis에서 나타나게 된다. 만약 돌연변이 유전자를 절단하는 효소의 작용이 불충분하거나 실패할 경우에는 오진이 발생할 수 있다. 이 방법은 다양한 유전질환들인 Marfan's syndrome, Lesch-Nyhan syndrome, cystic fibrosis, spinal muscular atrophy 등에서 사용되었다.

(4) Multiplex PCR

PGD에서는 단일세포를 이용하여 PCR 증폭을 실행하게 된다. 그러나 multiplex PCR을 사용하면 2개 이상의 여러 유전자를 동시에 조사할 수 있다. 여러 개의 서로 관계없는 primer set를 혼합하여 한번에 PCR을 시행하는 방법이다. 이때에는 primer들과 또는 PCR product들 사이에 상호작용이 없어야 한다. 첫번째 PCR을 할 때 다른 종류의 primer 쌍을 여러 개 넣어 증폭하고, 2번째 PCR에서는 sample을 나눈 후에 각기 다른 nested primer 쌍을 이용하여 증폭한다. 이 복합반응이 잘 일어나도록 primer들의 상대적인 농도, annealing temperature, reaction buffer를 최적화 시켜야 한다. 검사 시간이 6~8시간으로 짧으므로 PGD를 시행하는데 적합하다. 또한 Multiplex PCR은 ADO 문제를 해결하는데 도움이 된다. 병을 유발하는 돌연변이 그리고 이와 인접한 부위의 polymorphism을 같이 조사하면 이 두 부위에서 동시에 ADO가 일어날 확률은 매우 적으므로 거의 대부분에서 mutant allele을 발견할 수 있다. 이것은 특히 autosomal dominant 질환의 진단에 중요하다.

(5) Fluorescent PCR

일반적인 PCR은 정성적인 방법이므로 비슷한 크기의 product를 구별하기 힘들다. Fluorescent PCR에서는 한 primer 대신에 fluorescent oligonucleotide를 사용하여 증폭시켜 laser analysis system으로 product를 감지한다. Fluorescent PCR의 민감도는 기존 PCR의 약 1000배 이상으로 매우 높기 때문에 예를 들어 cystic fibrosis에서 normal allele과 3 bp가 결손된 $\Delta 508$ allele을 정확히 구별해 낼 수 있다. fluorescent PCR을 사용하면 PA 경우에도 peak를 발견하기 쉽고 ADO로 인한 오진도 많이 줄일 수 있다. 실제로 Dr. Sermon 등은 Fluorescent PCR을 이용하여 myotonic dystrophy에서 ADO율을 1/4로 줄일 수 있었다.

4. Controversies in PGD

1) Non-disclosure PGD

예로서 Huntington's disease (무도병)는 late-onset disease로 부부가 자신은 보인자인지 아닌지는 알기를 원하지 않으면서 자식에게는 병이 전달되지 않기를 바라는 경우가 있다. 이런 non-disclosure PGD의 경우에는 의사에게 윤리적으로 어려운 상황에 놓이게 한다. 즉, 이전 PGD cycle에서 보인자가 아닌 것으로 판명되더라도 다음에 PGD를 해야 하며, 또 수정란이 건강하지 않아 모두 폐기되어 취소되는 상황이라도 mock-transfer를 시행해야 해야 하는 것이다. ESHRE에서는 non-disclosure PGD는 권장하지 않으며 그대신 exclusion testing을 권하고 있다. 돌연변이 자체는 검사하지 않고 수정란에서 linked marker를 조사하여 환자 조부모의 유전자가 존재하는가를 보는 것이다.

2) HLA matching

Verlinsky 등 (2001)은 Fanconi anemia 환이를 가진 부부에서 PGD를 시행하여 Fanconi anemia가 없이 건강하면서 환아와 동일한 HLA를 가진 수정란을 선택하여 이식하는 방법으로 두번째 아기를 분만하였다. 이런 경우 건강한 아기는 stem-cell donor로서 환아를 치료할 수 있다. 이러한 PGD를 반대하는 주된 윤리적 논쟁점은 사람은 어떤 목적을 위해서 사용되어서는 안된다는 Kant의 원칙에 위배되기 때문이다. 그러나 이에 대한 반론의 근거는, 이렇게 태어난 아이도 다른 자녀와 마찬가지로 가정에서 사랑과 돌봄을 받게 되기 때문에 이 원칙에 위배되지 않으며, 또한 치료를 위한 donor가 될 자녀가 이미 있었다면 부모는 망설이지 않고 치료를 할 것이기 때문에 HLA matching은 윤리적으로 인정된다는 견해가 많다.

5. 결 과

최근 유럽생식의학회 (ESHRE)의 data collection (I-IV) 자료에 의하면 세계적으로 Cystic fibrosis 219 주기, Myotonic dystrophy 144 주기, Fragile X 36 주기 등을 포함하여 모두 821 주기의 유전질환을 위한 PGD가 시행되었다. 이중 681 주기에서 배아 이식이 가능하였고, 임신율은 이식 주기당 23% 정도로 보고되었다.

삼성제일병원에서는 지금까지 염색체이상 및 유전질환을 위한 착상전 유전진단을 시행하여 51명의 건강한 아기를 출산하였다. 특히 유전질환 중에서는 듀센씨 근이양증 (DMD), 척수성 근위축증 (SMA),

오르니틴 트랜스카바미라제 (OTC) 효소 결핍증 등에서 특정 유전자의 돌연변이를 진단하는 방법으로 착상전 유전진단을 시행하여 임신에 성공, 돌연변이가 없는 정상아를 출산한 바 있다. 평균 3.1개의 정상 배아를 이식하여 임상적 임신율은 38.0%였으며 자연유산된 경우는 없었으며 모두 만삭 분만을 하였다. 그 외에도 수포성 표피 박리증 (epidermolysis bullosa), 골형성 부전증 (osteogenesis imperfecta), 젖산혈증 (pyruvate dehydrogenase deficiency) 등에서 현재 PGD를 진행하고 있다.

6. Future Directions

1) Real-time PCR

Real-time PCR에서는 PCR이 진행되는 과정 중에 product가 축적되는 양을 측정할 수 있다. 반응 시료에 molecular beacon들을 첨가시켜서 정상과 돌연변이 유전자를 구별한다. Beacon의 한쪽 끝에는 fluorochrome이, 다른 한쪽에 quencher가 있어 oligonucleotide가 PCR fragment에 부착하지 않고 수용액에 있을 때는 folding되어 발광하지 않으며, 부착된 경우에만 형광을 띄게 된다. Real-time PCR에서는 PCR 산물의 길이가 짧아서 ADO의 가능성이 적고, exponential phase에서 PCR 산물을 계속적으로 측정하게 되므로 single cell의 homozygous, heterozygous 여부를 구별하기 용이한 장점이 있다.

2) Minisequencing

Minisequencing은 single nucleotide polymorphism (SNP)를 정확하고 빨리 알 수 있다. SNP는 genome 전체에 두루 분포하며 PGD에서 정확도를 높이기 위해 linked polymorphism으로 사용될 수 있다. 장점은 SNP는 microsatellite 보다 더 많기 때문에 linked informative SNP를 찾을 가능성이 크고, PCR 절편이 작아도 잘 검출된다. 단일 세포의 유전검사에서는 작은 PCR 절편의 증폭이 더 효율적이며 PGD에서는 불과 몇 개의 loci에 대해서만 동시 분석을 하기 때문에 SNP를 이용한 minisequencing이 PGD에 적합하다고 할 수 있다.

3) Microarrays

돌연변이에 특이한 primer를 microarray에 부착시킬 수 있다. 2가지 용도로 PGD에 사용될 수 있다. 첫째는 수많은 유전자의 돌연변이에 의한 비교적 흔히 발생하는 유전질환의 진단에 사용할 수 있다. 둘째는 염색체를 분석하기 위한 comparative genomic hybridization (CGH)의 metaphase spread를 대체할 수 있겠다. 장점은 CGH의 해상도 (2~10 Mb) 보다 높은 해상도 (100~200 kb)를 가지며 전체 procedure를 컴퓨터화 한다면 aneuploidy screening에 널리 이용될 수 있을 것이다.

7. 결론

유전병이 발생하면 치료에 소요되는 비용이 많이 들고 완치하기 어렵다. 따라서 이러한 질환이 다음 세대에 다시 발생하는 것을 예방하는 것은 중요하며 실제로 가능하다. 이를 위해서는 유전병이 있는 가계의 부부는 계획 임신을 해야 하며, 사전에 해당 전문의의 유전상담을 통해 정확한 진단을 받고 유전자 돌연변이 검사를 시행하는 것이 필수적 요건이다. 착상전 유전진단을 받고 임신되면 정상태아가 수태되므로 산전진단 및 그 후의 인공유산의 스트레스를 피할 수 있다. 이러한 측면에서 착상

전 유전진단은 유전질환을 예방하는 매우 효과적인 방법으로 생각된다.

그러나, 단일 세포를 이용한 유전진단이므로 진단의 오류가 있을 수도 있으며 이는 환아가 출생하는 결과를 초래하기 때문에 주의를 요한다. 원인 유전자에 대한 PCR기법과 함께 이를 보완하여 진단 오류를 줄이는 방법들을 함께 시행하며 진단과정에 많은 훈련과 숙달이 필요하다.

참 고 문 헌

- 이형송, 최혜원, 임천규, 민동미, 변혜경, 김진영, 궁미경, 유한옥, 김수찬, 전진현, 강인수. Ornithine transcarbamylase (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(4): 708-18.
- Sermon K, van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. Lancet 2004; 363: 1633-41.
- ESHRE. Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). Human Reproduction 2002; 17(1): 233-46.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty DA, Munne S. First clinical comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Fertil Steril 2002; 78(3): 543-9.
- 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선, 허걸, 송지홍, 전진현, 민동미, 박소연, 전종영, 궁미경, 강인수. 유전질환이나 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. 대한불임학회잡지 2002; 29(4): 269-78.
- Harper J, Delhanty JDA, Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis. John Wiley & Sons, LTD (NY) 2001.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation genetic diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. JAMA 2001; 285: 3130-33.
- 임천규, 한미현, 전진현, 송건지, 김정옥, 김계현, 최범채, 궁미경, 강인수. 균형전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아 이식술에서 형광직접조합법을 이용한 착상전 유전자 진단의 임상적 적용. 대한산부인과학회잡지 2000; 43(7): 1147-53.
- Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verliksky Y. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: The first 109 infants. Pediatrics. 2000; 106: 650-3.
- Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. Prenat Diagn 1998; 18: 1389-401.
- 최수경, 김진우, 조은희, 류현미, 강인수. 단일 태아세포에서의 PEP-PCR을 이용한 성의 결정과 Dystrophin 유전자 분석. 대한불임학회잡지 1997; 24(1): 51-6.
- Ray PF, Handyside AH. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. Mol Hum Reprod 1996; 2(3): 213-328.
- 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수. 큰 이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상 전 유전자 진단. 대한불임학회잡지 1996; 23(1): 109-14.
- Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single

cell analysis of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nature Genetics* 1994; 6: 19-23.

Harper JC, Handyside AH. The current status of Preimplantation diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1994; 4: 143-9.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.