,ㅏ : 31 2 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 2, 2004, 6

미세정자주입술로 임신이 된 남자태아의 Y 염색체 미세결실의 Vertical Transmission, *de novo*, 그리고 Expansion의 연구

포천중문의대 차병원 유전학연구실[1], 여성의학연구소 산부인과[2],
보건복지부 지정 생식의학 및 불임 유전체 연구센터[3]

김현아[1,3] · 이숙환[1,2,3] · 조성원[1,3] · 정혜진[1,3] · 손수민[1]
강수진[1] · 배성근[2] · 김수희[2] · 윤태기[2]

A Vertical Transmission, *de novo*, and Expansion of Y chromosome Microdeletion in Male Fetuses Pregnant after Intracytoplasmic Sperm Injection

Huyn Ah Kim[1,3], Sook-Hwan Lee[1,2,3], Sung Won Cho[1,3], Hye Jin Jeong[1,3], Soo Min Son[1], Soo Jin Kang[1], Seong-Keun Bae[2], Soo-Hee Kim[2], Tae Ki Yoon[2]

[1]Human Genetics Laboratory of CHA Infertility Medical Center, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, CHA General Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University, [3]Genome Research Center for Reproductive Medicine and Infertility of Korea Ministry of Health and Welfare, Seoul, Korea

Objectives: Despite severe oligospermia, males with Y chromosome microdeletion can achieve conception through ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection). However, ICSI may not only result in the transmission of microdeletions but also the expansion of deletion to the offspring. The purpose of this study was to screen vertical transmission, expansion of microdeletions and *de novo* deletion in male fetuses conceived by ICSI.

Materials and Methods: A total of 32 ICSI treated patients with their 33 (a case of twin) male fetuses conceived by ICSI were used to make this study group. Sequence-tagged sites (STSs)-based PCR analyses were performed on genomic DNA isolated from peripheral blood of fathers and from the amniocytes of male fetuses. Ten primer pairs namely, sY134, sY138, MK5, sY152, sY147, sY254, sY255, SPGY1, sY269 and sY158 were used. The samples with deletions were verified at least three times.

Results: We detected a frequency of 12.5% (4 of the 32 patients) of microdeletions in ICSI patients. In 4 patients with detected deletions, two patients have proven deletions on single STS marker and their male fetuses have the identical deletion in this region. Another two patients have two and three deletions, but their male fetuses have more than 3 deletions which include deletions to their father's. Meanwhile, seven male fetuses, whose fathers were analyzed to have all 10 STS markers present, have deletions present in at least one or more of the markers.

Conclusions: Although the majority of deletions on the Y chromosome are believed to arise *de novo*,

주관책임자: 이숙환, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터
Tel: +82-2-3468-3403, Fax: +82-2-3468-3464, e-mail: dnalee@nuri.net
*본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호: 01-PJ10-PG6-01GN13-0002)
**이 논문은 2003년도 제45차 추계학술대회 구연부문 우수발표상을 수상한 바 있음

in some cases a deletion has been transmitted from the fertile father to the infertile patient. In other cases the deletion was transmitted through ICSI treatment, it is likely that one sperm cell is injected through the oocyte's cytoplasm and fertilization can be obtained from spermatozoa. Our tests for deletion were determined by PCR and our results show that the ICSI treatment may lead to vertical transmission, expansion and de novo Y chromosome microdeletions in male fetuses. Because the sample group was relatively small, one should be cautious in analyzing these data. However, it is important to counsel infertile couples contemplating ICSI if the male carries Y chromosomal microdeletions.

Key Words: Y microdeletion, ICSI, Vertical transmission, *de novo*, Expansion

1976년에 Y 염색체 장완에 있는 미세결실이 정자형성에 영향을 미친다는 보고가 있었다.[1] 이러한 미세결실에 관한 연구는 주로 azoospermia factor (AZF) 부분에 있는 sequence taqqed sites (STS)를 사용하여 연구되어 왔는데 남성요인으로 인한 불임부분 중 1~55% 정도가 Y 염색체 결실에 의한 것으로 알려져 있다.[2] 최근에 보조생식술의 발달로 미세정자주입술 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)은 불임부부의 상당수가 자녀를 가질 수 있게 하였고 특히 남성불임에서 수정률을 높이는데 이용되고 있다. 그리고 AZF 부분에 결실을 갖고 있는 남성은 정상적인 아버지의 germ line에 random *de novo* 현상이 일어나는 경우가 대부분이고 이러한 사람들은 단지 ICSI를 통해서만 자녀를 가질 수 있다.[2] 그러나 유전적으로 결함을 가진 아버지로부터 그 결함이 전달될 수 있는 위험성을 가진다. 또한 이러한 전달은 ICSI로 태어난 남자아이에서 나중에 생식능력결함의 원인으로 나타날 수 있다.

지금까지 Y 염색체 미세결실이 아버지로부터 아들로 전달되는 경우에 대한 연구는 계속되어 왔다. 단순히 *de novo*에 의한 경우뿐만 아니라 아버지의 결실이 그대로 전달[3~8]되고 또는 더 확장되어 전달되는 경우[9,10]도 있었다. 따라서, 모든 보조생식술의 안전성과 이러한 기술로 태어난 아이들의 건강에 대해서도 관심이 증대되기 시작했다.

이에 본 연구에서는 미세결실을 갖고 있는 아버지로부터 ICSI로 임신이 된 남자태아에서 Y 염색체의 미세결실을 관찰하고 그 미세결실이 아버지로부터 전달된 것인지, 확장된 것인지, 그리고 *de novo*로 생긴 것인지를 알아보려고 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

연구 대상은 차병원을 내원한 남성 중 서른 두 명의 ICSI를 시술한 환자와 서른 셋의 남자태아(쌍태아 1례 포함)를 대상으로 Y 염색체 미세결실 분석을 수행하였다. 환자의 염색체는 모두 46, XY로 정상이었다. 연구대상인 모든 환자는 azoospermia 또는 OAT (oligoasthenoteratozoospermia)로 진단받았다. 또한, 정자형성 결함 이외의 다른 외적인 증상은 발견되지 않았다.

2. STS markers

Y 염색체의 미세결실분석에 사용된 sequence tagged sites (STS) marker는 모두 10개로 sY134. sY138. MK5 (AZFa region), sY152, sY147, sY254, sY255, SPGY1, sY269, sY158 (AZFc region)이었다 (Figure 1).

3. Genomic DNA의 분리

ICSI를 수행한 남자환자는 전혈을 채취하여 genomic DNA를 분리하였고 남자태아에서는 15~23주에 채취된 양수세포에서 genomic DNA를 분리하여 실험에 사용하였다. DNA는 표준방법에 의해 추출하였다. 두 종류의 DNA는 사용 전까지 -20℃에 보관하였다.

4. 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

반응은 Perkin Elmer Cycler를 이용하여 이전에 알려진 PCR 프로토콜과 같게 수행하였다. 반응이 끝난 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium

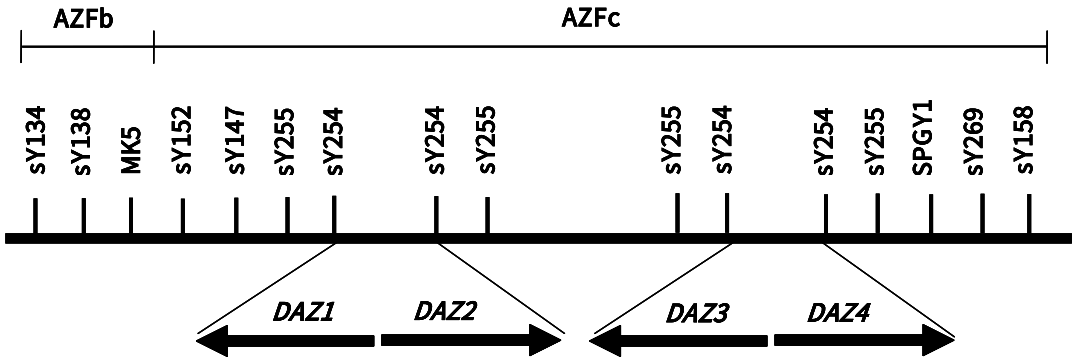

Figure 1. Y chromosome map and STS markers in AZFb and AZFc of Y chromosome long arm (Yq). 4 copies of DAZ gene are also shown.

bromide로 염색한 후, UV (Ultra Violet)하에 관찰하였다. 결과가 결실로 나온 경우에는 single PCR로 3번 반복 실험하여 최종적으로 결과를 확인하였다.

결 과

ICSI를 시행한 전체 환자 32명 중에서 결실은 4명에서 존재하며 그 비율은 12.5%였다 (Table 1). Table 1과 Figure 2에서 보는 바와 같이, 이들 4명의 결실환자에서 2명의 남자태아는 각각 SPGY1과 sY152의 부분에 결실이 되어 아버지의 결실을 그대로 받은 것 (vertical transmission)으로 분석이 되었다 (Figure 2, A). 그리고 나머지 2명은 아버지의 결실을 포함하여 적어도 3개 이상의 결실을 갖는 것 (expansion)으로 분석이 되었다 (Figure 2, B). 또한, 7명의 남자태아에서 결실이 보였는데 이 결실은 아버지에서 관찰되지 않은 결실 (*de novo*) 이었다 (Figure 2, C).

Table 1. Vertical transmission, *de novo*, and expansion of Y chromosome microdeletions are presented

	Father	Fetus
Total microdeletion	4/32 (12.5%)	11/33 (33.33%)
Vertical transmission	2	2
Expansion	2	2
De novo	-	7

고 찰

현재까지 남성불임 환자를 대상으로 Y 염색체 미세결실에 대해서 많은 연구가 이루어져 왔다. 다행히도 1994년 이후부터는 ICSI와 같은 보조생식기술을 이용함으로써 이들이 자녀를 가질 수 있게 되었다. 그러나 ICSI를 통해 태어난 남아에게서 Y 염색체 미세결실이 유전될 수 있다는 연구가 계속 보고되었다.[11] 구체적으로 미세결실이 *de novo*로 생기는 경우 뿐 아니라 그대로 전달[3~8]되거나 더 환장되는 경우[9,10]가 보고되었다.

본 연구에서는 32명의 ICSI를 수행한 환자와 1쌍의 쌍태아를 포함한 33의 남자태아를 대상으로 Y 염색체 미세결실을 조사 분석한 결과, 아버지에서 12.5%, 남자태아에서는 33.33%로 관찰되었다 (Table 1). 그 중, 두 경우에서 보여준 vertical transmission은 단순하게 멘델리안 유전양식을 적용하면 아버지의 Y 미세결실은 모든 아들에게 다 유전이 된다. 만일, 남성불임의 기원이 Y 염색체 때문이었다면 모든 아들은 아버지와 동일한 부위에 결실을 가지게 될 것이라 생각되어진다. 그러나 같은 부위에 결실을 가지면 아들이 정자형성능력에 문제가 생길 수 있다는 예측은 가능하나, 그 증상의 심한 정도는 알 수 없다.[8]

Vertical transmission의 경우에서처럼 비정상적인 Y 염색체를 아들이 아버지로부터 물려받게 되는 것이 일반적인데 아버지에게 없던 결실 (*de novo*)이

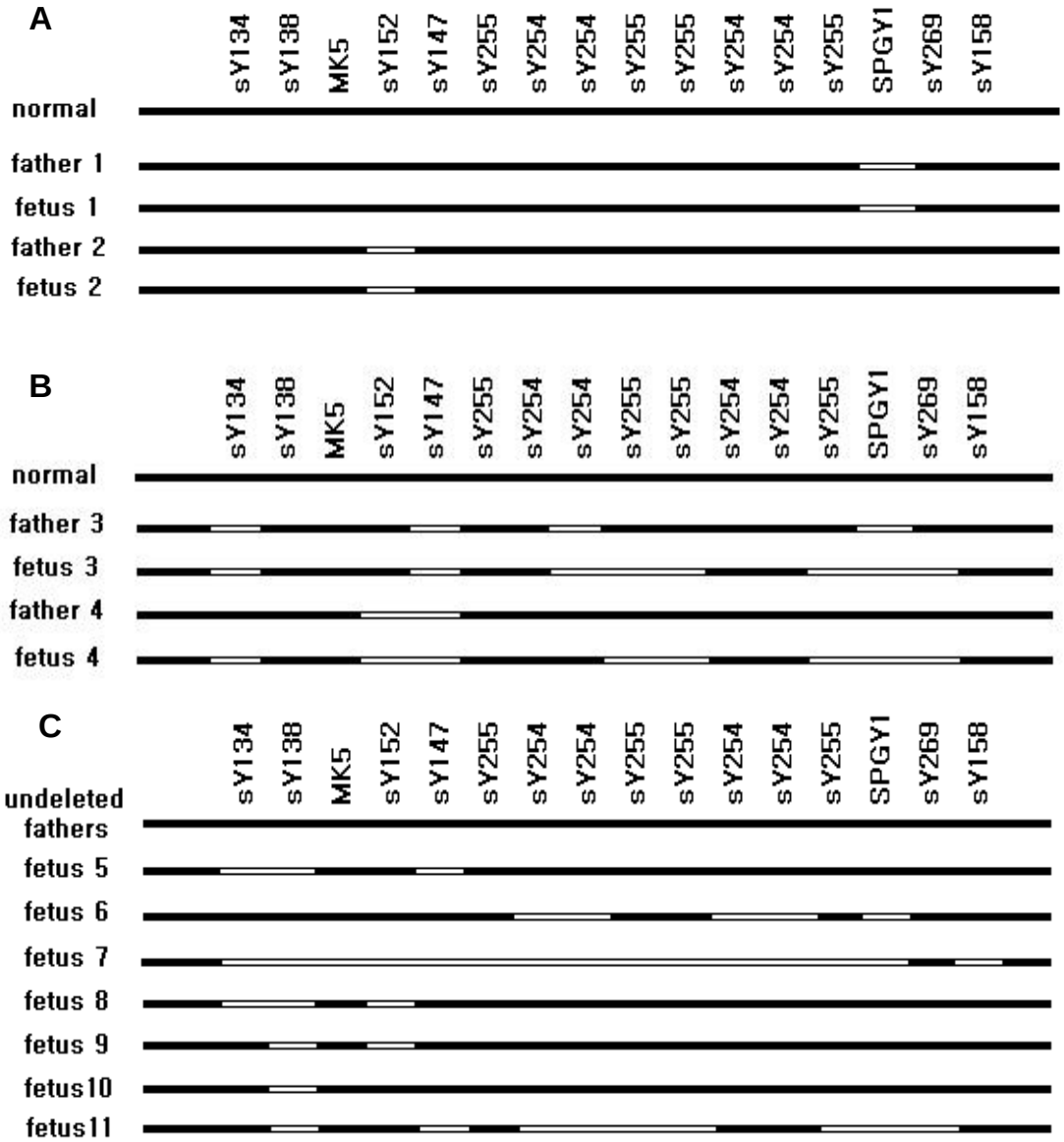

Figure 2. Schematic diagram of deletion patterns on Y chromosome long (Yq) and microdeletions in fathers and fetuses. **(A)** Vertical transmission, **(B)** expansion, and **(C)** *de novo*.

생기기도 한다. 본 연구에서는 *de novo*가 일곱 경우가 있었는데 아마도 불임아버지의 정자가 수정 후에 초기 접합자 시기에 오류로 인해 정소에서 mosaic deletion을 가져서 아버지의 전혈에서는 어떠한 결실도 관찰되지 않은 것으로 생각되어진다.[2,3,5] 이러한 경우, primodial germ cell mosaicism의 크기에 따라 ICSI를 통해 아들들로 미세결실이 전달될 수도 있고 전달되지 않을 수도 있다. 이는 본 연구에서 분석된 그룹의 수가 상대적으로 매우 작아 더 많은 경우를 연구해 보아야 할 것이다.

두 경우에서 expansion이 있었는데 아직 그 기전은 잘 밝혀지지 않았지만 Y 염색체 자체가 polymorphic하고 많은 반복적인 염기서열을 가지고 있어서 재조합이 더 잘 일어나서 expansion이 된 것

으로 생각할 수 있다.[12] 또 다른 보고에 의하면 Y 염색체에 미세결실이 있는 경우에는 Y 염색체가 또 다른 유형의 돌연변이를 쉽게 일으켜서 정자형성에 결함을 초래하기 때문이라고도 한다.[9]

Y 염색체에 존재하는 AZF region은 AZFa, AZFb, AZFc의 세 부분으로 나뉘어져 있는데 본 실험에서 사용된 STS marker는 AZFb와 AZFc에 위치하고 있다. AZFa region은 SCOS (Scertoli Cell Only Syndrome)에 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 삼백명의 우리나라 환자를 대상으로 조사해본 결과 결실이 하나도 발견되지 않아 본 연구에서는 제외하였다 (unpublished data). AZFb region은 AZFa region 보다 결실빈도가 조금 더 높은 것으로 알려져 있고 이곳의 결실은 maturation arrest와 관련이 있다고 알려져 있다.[13] 가장 많은 결실이 보고 되고 연구가 많이 되고 있는 부위는 AZFc이고 이는 재조합이 잘 일어나는 부위로도 알려져 있다.[14,15] 그런데 본 실험에 이용한 STS marker가 각각의 AZF locus 스크린에 좋은 방법이기는 하지만 DAZ 유전자 결실 자체는 분석이 불가능하여 제한효소 단편 다형성 분석 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), DAZ probe를 이용한 Southern blot, 또는 DAZ cosmid를 이용한 형광 결합 보합법 (Fluorescence in situ hybridization, FISH)분석 등과 같은 방법들과 함께 병행되는 것이 좋을 것으로 사료된다.[4,16,17]

결론적으로, AZFb와 AZFc 위치에 존재하는 STS marker를 사용하여 관찰하였을 때 vertical transmission, *de novo* 그리고 expansion을 모두 11례에서 관찰되었다. 본 연구에서 분석된 그룹의 수가 상대적으로 작기 때문에, 자료를 분석하는데 매우 조심스러워야 하나, ICSI로 인해서 아들에게 아버지의 결함이 전달될 수 있으므로 시술전 그 위험성에 대해 환자와 보호자에게 설명을 해야 하고 ICSI로 태어난 남자아기에 대해서도 미세결실 스크린의 필요성에 대해서도 주지시켜야 한다. 또한, 현재로서는 ICSI로 태어난 남자아이 중 미세결실이 있는 경우에는 사춘기가 될 때까지는 생식 능력에 판정이 불가능하므로 성인이 되기 전까지는 주기적인 관찰이 필요하다.

참 고 문 헌

1. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 1976; 34: 119-24.
2. Palermo GD. Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children. Reprod Biomed Online 2004; 8: 307-18.
3. Kent-First MG, Kol S, Muallem A, Ofir R, Manor D, Blazer S, et al. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. Mol Hum Reprod 1996; 2: 943-50.
4. Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y-chromosomal microdeletion in a father and his four infertile sons. Hum Reprod 1999; 14: 2689-94.
5. Jiang MC, Lien YR, Chen SU, Ko TM, Ho HN, Yang YS Transmission of *de novo* mutations of the deleted in azoospermia genes from a severely oligospermic male to a son via intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 71: 1029-32.
6. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Paz G, et al. Three-generation evaluation of Y-chromosome microdeletion. J Androl 1999; 20: 394-8.
7. Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. Hum Reprod 1999; 14: 1722-6.
8. Oates RD, Silber S, Brown L, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. Hum Reprod 2002; 17: 2813-24.
9. Stuppia L, Calabrese G, Franchi PG, Mingarelli R, Gatta V, Palka G, et al. Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia criti-

cal region distal to the RBM1 and DAZ genes. Am J Hum Genet 1996; 6: 1393-5.
10. Komori S, Kato H, Kobayashi S, Koyama K, Isojima S. Transmission of Y chromosomal microdeletions from father to son through intracytoplasmic sperm injection. J Hum Genet 2002; 47: 465-8.
11. Katz MG, Chu B, McLachlan R, Alexopoulos NI, de Kretser DM, Cram DS. Genetic follow-up of male offspring born by ICSI, using a multiplex fluore-scent PCR-based test for Yq deletions. Mol Hum Reprod 2002; 8: 589-95.
12. Lupski JR. Genomic disoders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human dieases traits. Trends Genet 1998; 14: 417-22.
13. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromo some azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 1996; 5: 933 -43.
14. Reijo R, Lee TY, Salo P Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nature Genet 1995; 10: 383-93.
15. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterson RH, et al. The human Y chromosome's AZFc region features massive palindromes, uniform recurrent deletions and testis gene families. Nature 2001; 29: 279-86.
16. Saxena R, de Vries JWA, Repping S, Alagap-pan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region on the human Y chromosome. Genomics 2000; 67: 256-67.
17. de Vries JWA, Hoffer MJV, Repping S, Hoovers JMN, Leschot NJ, van der Veen F. Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men. Fertil Steril 2000; 74: 909-15.