□원저 : 임상□

Alagille 증후군에서 *Jagged1* 돌연변이

서울대학교 의과대학 소아과학교실, 울산대학교 의과대학 소아과학교실*

고재성 · 양혜란 · 김경모* · 서정기

Jagged1 mutation analysis in Alagille syndrome patients

Jae Sung Ko, M.D., Hye Ran Yang, M.D., Kyung Mo Kim, M.D.* and Jeong Kee Seo, M.D.

Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine,
Department of Pediatrics, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose : Alagille syndrome is an autosomal dominant disorder with developmental abnormalities affecting the liver, heart, eyes, vertebrae, and craniofacial region. The *Jagged1*(JAG1) gene, which encodes a ligand of Notch, has been found mutated in Alagille syndrome. The aim of the study was to investigate the mutation analysis of JAG1 gene in Korean patients with Alagille syndrome.
Methods : Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes of 6 patients. The 26 exons of JAG1 gene were amplified and PCR products were directly sequenced.
Results : Two novel frameshift mutations were found. 118delC in exon 2 was found in a patient who developed hepatocellular carcinoma at 4 years of age. 999-1000delTG was identified in exon 7.
Conclusion : Mutations identified in this study are expected to give rise to truncated proteins.
(Korean J Pediatr 2006;49:519-522)

Key Words : Alagille syndrome, *Jagged1*, JAG1, Mutation, Hepatocellular carcinoma

서 론

Alagille 증후군은 간, 심장, 눈, 골격, 얼굴 모양, 신장 등 여러 장기에 이상을 일으키며 상염색체 우성으로 유전되는 질환으로 7,000명에 1명 꼴로 발생한다. 유전적인 원인에 의한 소아 만성 간질환 중에서 흔한 질환으로 임상양상은 경한 경우에서부터 간이식이 필요한 경우까지 다양하다. 1987년 Alagille 등[1]에 의해 제시된 진단기준은 간생검에서 담도 부족증(bile duct paucity)을 보이면서 5개의 주요 임상소견 중 3개 이상을 동반하는 것이다. 주요 임상 소견은 담즙정체, 심장기형(폐동맥의 협착이 가장 흔함), 후태상환(posterior embryotoxon), 척추 기형(나비모양의 척추), 특징적인 삼각형의 얼굴모양(높고 넓은 이마, 간격이 넓고 깊게 자리한 눈, 특출나고 뾰족한 턱)이다. 이러한 진단기준을 완전히 만족시키지 못 하지만 Alagille 증후군이 의심되는 애매한 경우도 있는데, 가족력이 있으면 2개의 주요임상소견으로 진단할 수 있게 기준을 넓혀나가고 있다[2].

Alagille 증후군 환자 일부에서 세포유전학 검사를 통해 20번 염색체의 12p 부위의 결실이 있는 것이 발견되어 이 부위에 유전자가 존재함이 알려졌다[3-5]. 결실을 보이는 환자가 전체 환자의 7%에 불과하여 단일 유전자의 돌연변이가 이 질환에 관여할 것으로 추정되었다[6]. 20번 염색체 12p에 존재하는 *Jagged1* (JAG1) 유전자가 Alagille 증후군의 유전자임이 밝혀졌고[7, 8], JAG1 유전자는 36 kb의 크기이며, 26개의 엑손(exon)으로 이루어져 있고 5.5 kb의 유전정보를 가지고 있다. 지금까지 밝혀진 돌연변이는 결손, 삽입, 무의미돌연변이(nonsense mutation), 과오 돌연변이(missense mutation), splice site 돌연변이 등이며 지역, 인종별로 새로운 돌연변이들이 계속 발견되고 있는데, Alagille 증후군 환자의 60-70%에서 JAG1 돌연변이가 발견되고 있다[9-12].

국내에서는 Alagille 증후군 환자의 JAG1 유전자 돌연변이에 대한 연구가 전혀 없는 실정이다. 본 연구의 목적은 Alagille 증후군 환자에서 JAG1 유전자 염기서열 분석을 하여 우리나라에서 JAG1 돌연변이의 종류를 알아보는 것이다.

이 논문은 서울대학교병원 일반연구비 04-2001-048-0에 의해 이루어진 것임.
접수 : 2006년 1월 12일, 승인 : 2006년 2월 20일
책임저자 : 서정기, 서울대학교 어린이병원 소아과
Correspondence : Jeong Kee Seo, M.D.
Tel : 02)2072-3627 Fax : 02)743-3455
E-mail : jkseo@snu.ac.kr

대상 및 방법

1. 대 상

서울대학교병원과 서울아산병원에서 Alagille 증후군으로 진단받은 환자 6명을 대상으로 하였다. Alagille 증후군의 진단을 위하여 얼굴모양을 관찰하고 간조직 검사, 심장초음파, 안과 검진, 척추 방사선 검사를 실시하였다. 간조직 검사에서 담도 부족증을 확인하고 3개 이상의 주요 임상 소견을 동반한 경우를 연구 대상으로 하였다. 병의 경과를 조사하고 심장병, 황달 병력, 얼굴모양 등에 대한 가족력을 조사하였다.

2. 방 법

대상 환자로부터 말초 혈액을 채취하여 말초 혈액 내 백혈구에서 genomic DNA를 phenol chloroform 방법으로 추출하였다. JAG1 유전자의 26개 모든 엑손을 Oda 등[8]이 사용했던 시동체(primer)를 이용해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭하였다. 중합효소연쇄반응 산물을 DNA purification kit(Promega, Madison, WI, USA) 이용하여 정제하였다. PCR 때 사용했던 같은 시동체를 사용하여 automatic DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 통해 직접 염기서열 분석한 후 sense 및 antisense strand의 DNA 염기서열을 National Center for Biotechnology Information database의 JAG1 cDNA와 비교하였다.

결 과

2개의 새로운 frameshift 돌연변이가 2명의 환자에서 발견되었다(Fig. 1). 한 환자에서 엑손 2의 118delC이 이형접합체로 발견되었는데, 뉴클레오티드(nucleotide) 136에서 정지코돈(stop codon)이 되어 Delta/Serrate/Lag-2(DSL) domain에서 premature termination을 초래하였다. 이 환자는 폐동맥협착이 동반되었고, 4세에 간경변, 간세포암이 발생하였다. 다른 환자에서는 엑손 7에서 999-1000delTG로 인하여 뉴클레오티드 999에서 정지코돈이 되었고, epidermal growth factor(EGF) 3 domain에서 premature termination이 발생하였다. 이 환자는 심실 중격결손, 심방 중격 결손, 폐동맥 협착이 동반되었고 간경변으로 진행하여 간이식을 기다리고 있다.

엑손 2에서 267G>A(G89), 엑손 4에서 588C>T(C196), 엑손 26에서 3528T>C(Y1176)의 유전자 다형성(polymorphism)이 발견되었는데, 아미노산의 변화를 일으키지 않으며, 과거에 보고된[10] 바 있는 것들이다.

고 찰

Alagille 증후군은 상염색체 우성으로 유전되며 94%의 투과도(penetrance)를 보인다고 보고된다[13]. Alagille 증후군 환자 일부에서 세포유전학 검사를 통해 20번 염색체의 12p 부위의 결실이 있는 것을 발견하여 이 부위에 유전자가 존재함을 시사하였다[3, 4]. 미세결실이 있는 환자들에서 fluorescent in situ hybridization(FISH)를 이용하여 유전자 예상부위를 250 kb로 좁혔다 5). 20번 염색체 12p에서 쥐의 *Jagged1* 유전자와 유사한 JAG1이 클론되었고, 중복되는 가장 작은 부위로 유전자 지도를 만들어 두 그룹에 의해 JAG1이 Alagille 증후군의 유전자임이 밝혀졌다[7, 8].

JAG1 단백은 1,220개의 아미노산으로 이루어져 있고 Notch 수용체에 대한 리간드(ligand)인데, JAG1과 Notch 상호작용이 초기 발달과정에서 세포운명을 결정하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Notch는 초파리에서 처음 발견되었고 전구세포에서 더 분화된 세포로 진행할 때 세포의 운명을 결정하는 역할을 한다. 이 유전자 중 하나만 가지고 있는 암파리는 금이 간 날개(notched wing)를 갖고 있어 Notch라는 이름을 붙이게 되었다[14]. Notch 수용체의 리간드인 Jagged는 처음 쥐에서 발견되었는데, 사람의 것과는 92%가 동일하고, 초파리인 Drosophilla Serrate의 유전자와도 유사하다[15]. Jagged는 여러 종 사이에 공통되는 single peptide, DSL domain, EGF domain, cystein-

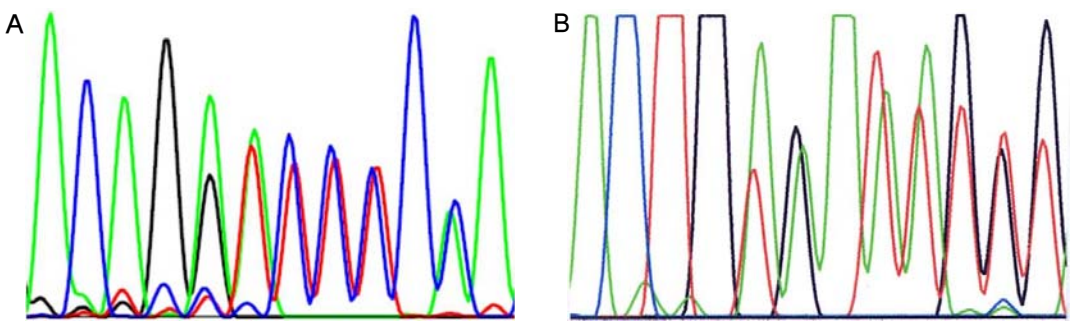

Fig. 1. Identification of two novel JAG1 mutations. **(A)** Direct sequencing analysis revealed a heterozygous 118delC in exon 2. Because the sequencing was performed with anti-sense primer, G was deleted in this figure. **(B)** A heterozygous 999-1000delTG was found in exon 7. Two mutations resulted in premature termination codon.

rich region, transmembrane domain 등으로 구성되어 있어 있는데, 이 부분들이 리간드-수용체 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[16]. Jagged의 한 copy에서 돌연변이가 발생하고 태생기 발달의 각기 다른 단계에서 Notch 활성화가 이루어지지 않으면, 다양한 강도로 각기 다른 기관에 장애를 일으키리라고 추정된다.

JAG1 단백은 성인의 심장, 폐, 신장에서 정상적으로 발현되고, 간에서는 장차 성숙한 담도로 분화하게 되는 태아의 ductal plate, 성인의 담도 상피세포, zone 3 간세포에서 발현된다[17]. Notch 2는 ductal plate 개조시에 높게 발현되어 담도 상피세포의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다[18].

간을 비롯한 다른 이상이 동반되지 않고 Fallot 4징이나 폐동맥 협착 같은 심장 기형만 존재하는 환자에서도 JAG1의 돌연변이가 발견되었고[19], JAG1 돌연변이가 발견된 환자의 가족, 친척을 대상으로 한 연구에서 돌연변이를 가지고 있는 사람의 21%만이 Alagille 증후군의 진단기준에 맞은 것[20]을 고려해 볼 때 JAG1 돌연변이가 심각한 간질환, 심장질환을 예상보다 적게 발생시키는 것으로 보인다.

대부분의 돌연변이는 무의미돌연변이, frameshift 돌연변이에 의한 미숙한 정지코돈을 만들어내어 extracellular domain에서 단백이 잘라져서 transmembrane domain이 없게 된다. 본 연구에서 발견된 새로운 돌연변이들도 결실에 의해서 정지코돈이 발생하여 단백이 잘라져 기능을 못 하게 된 것들이다. 유전자 분석을 실시한 환자의 33%에서만 돌연변이가 발견되었는데, 전체 엑손이 26개에 이르러 분석에 어려움이 있었다. 돌연변이 중 70%는 부모로부터 유전되지 않고 산발적으로 발생하는 de novo 돌연변이로 보고된다[10]. 환자 가족에 대한 유전상담과 산전진단을 위해서는 유전자 분석이 유용할 것이다. 가족력이 있는 선천성 폐동맥 협착증 환자, Alagille 증후군의 진단이 의심되지만 진단기준에 안 맞는 환자에서도 유전자의 돌연변이 분석이 도움이 되겠지만 유전자의 크기가 크고 hot spot가 없어서 아직까지는 상용화되기가 어려울 것 같다.

전체 JAG1 유전자를 포괄하는 20p12 염색체의 결실이 있는 환자와 JAG1 유전자의 돌연변이가 있는 환자 사이에서 표현형의 차이점은 발견할 수 없었다[9]. JAG1 유전형과 표현형 사이에도 연관성이 발견되지 않고 가족 내에서 같은 돌연변이를 가져도 임상 발현이 현저히 다르게 나타나는 것을 고려하면, 다른 유전적 변이요소가 존재하는 것으로 추정된다. JAG1 유전자 중 하나만 변화해도 불완전한 단백이 만들어지는 haploinsufficiency를 보이는 것과 30-40%의 환자에서 돌연변이가 발견되지 않는데, 아직까지 확인되지 않은 JAG1 외의 다른 유전자가 관계되는지 앞으로 규명되어야 할 부분이다.

Alagille 증후군 환자의 간조직 검사에서 생후 초기에는 담도의 수가 정상이다가 생후 6개월 이후에 담도의 수가 줄어들어 담도 부족증을 보인다. 이러한 담도 수의 부족에도 불구하고 담증정체는 대개 학동기에 사라지는 경우가 대부분이다. 그러나, 본 연구의 돌연변이 환자들처럼 간경변으로 진행하는 경우는 간이식이 필요하여 다양한 임상경과를 밟는다. 주요 임상소견에 들지는 않지만, 신기형이 50%에서 동반되고 만성 중이염도 높은 빈도로 동반된다. 뇌출혈, 소장협착, 기도 및 기관지 협착, 신동맥 협착이 발견되고 있어 Alagille 증후군이 혈관형성의 이상 때문에 발생하는 것을 시사하였다[21]. 인간 태아 발생에서 JAG1이 혈관계에서 강하게 발현된다는 연구[22]는 이를 뒷바침한다.

현재까지 Alagille 증후군 소아에서 간세포암의 발생은 11례가 보고되었는데[23, 24], JAG1 돌연변이를 함께 보고한 것은 본 연구가 처음이다. JAG1이 Notch 수용체를 통하여 세포의 분화, 증식, 세포자멸사(apoptosis) 같은 세포 운명 조절에 관여하고, Notch 신호가 신생물 변환에 기여하는 연구[25]가 있었다. 따라서 Alagille 증후군의 소수에서만 발생하는 간세포암이 JAG1의 특정 돌연변이에 의해 유발되는지에 대한 연구가 필요하다.

우리나라 Alagille 증후군 환자에서 JAG 1 유전자 분석을 실시하여 단백이 잘라져 기능을 못하는 frameshift 돌연변이를 찾아내었다. 앞으로 더 많은 환자를 대상으로 유전자 분석과 함께 유전형과 표현형사이의 관계를 조사하는 연구가 필요할 것이다.

요 약

목 적 : Alagille 증후군은 간, 심장, 눈, 척추, 얼굴 모양 등 여러 장기에 이상을 일으키며 상염색체 우성으로 유전되는 질환이다. Alagille 증후군의 유전자인 JAG1은 Notch 수용체에 대한 리간드를 만든다. 이 연구의 목적은 우리나라 Alagille 증후군 환자에서 JAG1 유전자의 돌연변이를 찾아내는 것이다.

방 법 : Alagille 증후군으로 확진 받은 6명의 말초혈액 백혈구에서 DNA를 추출하여 JAG1 유전자에 대하여 중합효소연쇄반응 및 정제 후 직접 염기서열 분석하였다.

결 과 : 2개의 새로운 frameshift 돌연변이가 발견되었다. 4세에 간세포암이 발생한 환자에서 엑손 2에서 118delC이 발견되었다. 한 환자에서는 엑손 7에서 999-1000delTG이 발견되었는데, 2개 돌연변이들은 정지코돈을 만들었다.

결 론 : 우리나라 Alagille 증후군 환자에서 단백이 잘라져 기능을 못하는 frameshift 돌연변이를 찾아내었다.

References

1) Alagille D, Estrada A, Hadouchel M, Gautier M, Odievre M, Dommergues JP. Syndromic paucity of interlobular bile ducts(Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia) : review of 80 cases. J Pediatr 1987;110:195-200.
2) Elmslie FV, Vivian AJ, Gardiner H, Hall C, Mowat AP, Winter RM. Alagille syndrome : Family studies. J Med Genet 1995;32:264-8.
3) Schnittger S, Hofers C, Heidemann P, Beermann F, Hansmann I. Molecular and cytogenetic analysis of an interstitial 20p deletion associated with syndromic intrahepatic

ductular hypoplasia(Alagille syndrome). Hum Genet 1989;83:239-44.
4) Rand EB, Spinner NB, Piccoli DA, Whitington PF, Taub R. Molecular analysis of 24 Alagille syndrome families identifies a single submicroscopic deletion and further localizes the Alagille region within 20p12. Am J Hum Genet 1995;57:1068-73.
5) Oda T, Elkahloun AG, Meltzer PS, Chandrasekharappa SC. Identification and cloning of the human homolog(JAG1) of the rat Jagged1 gene from the Alagille syndrome critical region at 20p12. Genomics 1997;43:376-9.
6) Krantz ID, Rand EB, Genin A, Hunt P, Jones M, Louis AA, et al. Deletions of 20p12 in Alagille syndrome; frequency and molecular characterization. Am J Med Genet 1997;70:80-6.
7) Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. Nature Genet 1977;16:243-51.
8) Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. Nature Genet 1997;16:235-42.
9) Krantz ID, Colliton RP, Genin A, Rand EB, Li L, Piccoli DA, et al. Spectrum and frequency of Jagged1(JAG1) mutations in Alagille syndrome patients and their families. Am J Hum Genet 1998;62:1361-9.
10) Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, Dhorne-Pollet S, Pollet N, Bernard O, et al. Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome. Gastroenterology 1999;116:1141-8.
11) Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, et al. Mutation analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. Hum Mol Genet 1998;9:1363-9.
12) Pilia G, Uda M, Macis D, Frau F, Crisponi L, Balli F, et al. Jagged-1 mutation analysis in Italian Alagille syndrome patients. Hum Mut 1999;14:394-400.
13) Dhorne-Pollet S, Deleuze JF, Hadchouel M, Bonaiti-Pellie C. Segregation analysis of Alagille syndrome. J Med Genet 1994;31:453-7.
14) Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. Science 1995;268:225-32.
15) Kopan R, Weintraub H. Mouse Notch:expression in hair follicles correlates with cell fate determination. J Cell Biol 1993;121:631-41.
16) Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G. Jagged : a mammalian ligand that activates Notch1. Cell 1995;80:909-17.
17) Louis AA, Van Eyken P, Haber BA, Hicks C, Weinmaster G, Taub R, et al. Hepatic Jagged1 expression studies. Hepatology 1999;30:1269-75.
18) Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. Gastroenterology 2004;127:1775-86.
19) Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, et al. Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the Jagged1 gene. Hum Mol Genet 2001;10:163-9.
20) Kamath BM, Bason L, Piccoli DA, Krantz ID, Spinner NB. Consequences of JAG1 mutations. J Med Genet 2003;40:891-5.
21) Quiros-Tejeira RE, Ament ME, Heyman MB, Martin MG, Rosenthal P, Hall TR, et al. Variable morbidity in Alagille syndrome : a review of 43 cases. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999;29:431-7.
22) Crosnier C, Attie-Bitach T, Encha-Razavi F, Audollent S, Soudy F, Hadchouel M, et al. JAGGED1 gene expression during human embryogenesis elucidates the wide phenotypic spectrum of Alagille syndrome. Hepatology 2000;32:574-81.
23) Bhadri VA, Stormon MO, Arbuckle S, Lam AH, Gaskin KJ, Shun A. Hepatocellular carcinoma in children with Alagille syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005;41:676-8.
24) Kim B, Park SH, Yang HR, Seo JK, Kim WS, Chi JG. Hepatocellular carcinoma occurring in Alagille syndrome. Pathol Res Pract 2005;201:55-60.
25) Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. Nat Med 2002;8:979-86.