

월슨병의 진단과 분자유전학적 검사

서울대학교 의과대학 소아과학교실 소아소화기 영양 분과

서 정 기

Molecular Genetic Testing and Diagnosis of Wilson Disease

Jeong Kee Seo, M.D.

Division of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Department of Pediatrics,
College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea.

Wilson disease (WD) is an autosomal recessive disorder of copper metabolism that results in accumulation of copper primarily in the liver, the brain and the cornea. Mutations in the WD gene, ATP7B cause failure of copper excretion from hepatocyte into bile and a defective synthesis of ceruloplasmin. More than 370 mutations are now recognized, scattering throughout the ATP7B gene. Since WD has protean clinical presentations, awareness of WD in clinical practice is important for the early diagnosis and prevention of accumulated copper toxicity. None of the laboratory parameters alone allows a definite diagnosis of WD. There are numerous pitfalls in the diagnosis of WD. Low serum ceruloplasmin concentrations, increased 24 hour urinary copper excretion, increased hepatic copper concentrations and the presence of Kayser-Fleischer rings in the cornea are major diagnostic points. A combination of any two of these 4 laboratory findings is strong support for a diagnosis of WD. Molecular methods are now being used to aid diagnosis. Molecular genetic testing has confirmed the diagnosis in individuals in whom the diagnosis is not clearly established biochemically and clinically. Siblings should be screened for WD once an index case has been diagnosed. Discrimination of heterozygotes from asymptomatic patients is essential to avoid inappropriate lifelong therapy for heterozygotes. Genetic testing, either by haplotype analysis or by mutation analysis, is the only reliable tool for differentiating heterozygote carriers from affected asymptomatic patients. Currently, genetic testing is of limited value in the primary diagnosis. However, genetic testing will soon play an essential role in diagnosing WD as rapid advancement of biomedical technology will allow more rapid, easier and less expensive mutation detection. [Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr 2008; 11(Suppl 1): 72~82]

Key Words: Wilson disease, Diagnosis, Molecular genetic testing

서 론

구리는 우리 몸에 꼭 필요한 필수 미량 원소이지만 과잉의 구리는 독이 된다. 우리가 음식물로 섭취한 구

리는 주로 십이지장에서 흡수되며 대부분 알부민과 결합하여 간문맥을 거쳐 간으로 운반된다. 과잉의 구리는 담관을 거쳐 소장으로 배출되며 정상인에서 소변으로의 배출은 매우 적다.

월슨병(Wilson disease, WD)은 상염색체 열성으로 유

전하는 구리대사 이상 질환^{1,2)}으로 1993년 율슨병 유전자 ATP7B가 처음 밝혀졌다. 정상인의 간 세포에서는 ATP7B 단백질의 작용으로 구리가 아포세룰로플라스민(apoceruloplasmin)과 결합하여 체내에 필요한 구리를 세포 밖 혈류로 방출하거나 또는 과잉의 구리를 담판으로 배출한다. 율슨병에서는 유전자 돌연변이로 이러한 ATP7B 단백질의 기능에 장애가 생겨 구리축적에 의한 장기 손상이 온다. 율슨병의 경우 구리의 담도 배출은 정상치의 20%에 불과하며 그 결과 구리가 점차 간에 축적된다.

율슨병 유전자 발견 이후 최근까지 10여 년간 구리대사장애 기전에 대한 분자생물학적 연구, 돌연변이 유형 검색 및 유전 진단의 가치, 돌연변이 유전형과 증상 표현형과의 관계 연구 등이 활발히 진행됨에 따라 이 병의 생화학적 유전적 임상적 양상이 새롭게 재조명되고 있다.

율슨병은 구리가 간, 뇌, 각막, 신장 및 적혈구에 침착되어 매우 다양한 임상증상을 나타내는 데다 또한 발병 연령도 3세에서 60세 이상까지 보고되는 등 임상양상이 비전형적인 증례가 많아 진단이 쉽지 않은 질환으로 알려져 있다. 치료가 늦어지면 간과 신경에 치명적인 손상이 누적되어 사망하게 되므로 조기 진단과 치료의 중요성이 특히 강조되고 있는 희귀 질환이다.

그러나 아직까지 확진이 가능한 결정적인 단일 진단 방법이 없다.

여기에서는 율슨 병의 진단에서 중요한 역할을 하는 임상적 생화학적 방법과 함께 최근 점차 임상에서 많이 이용되고 있는 분자유전학적 방법에 대하여 요점적으로 검토하여 보고자 한다.

임상적 생화학적 진단

1. 율슨병의 증상과 임상 진단

간염을 가진 3세 이상의 소아나 젊은 성인에서 바이러스성 간염, 자가면역성 간염, 지방간염, 약물에 의한 간 손상 등의 원인이 발견되지 않는 경우 반드시 율슨병을 우선적으로 고려해야 한다. 사춘기와 성인에서 특징적 신경증상이 있는 경우 또는 급성 용혈성 빈혈, Fanconi 증후군이 있는 환자에서도 반드시 감별진단에 포함시켜야 한다.

율슨병은 단일 질환인 데도 불구하고 임상양상이 다양하므로 이에 대하여 잘 알아 볼 필요가 있다. 율슨병에서 가장 중요한 임상 발현양상은 간질환과 신경증상이다. 정신과적 문제, 용혈성 빈혈이나 Fanconi 증후군 등 신장증상, 기타 구루병등 골격계이상, 부갑상선 기능 저하 등 내분비계이상으로 병원을 찾는 경우도 있지만 매우 드물다.

소아 연령에서는 주로 간질환으로 발현한다³⁾. 장기에 어느 정도 구리가 축적되어야 증상이 나타나게 되므로 출생 시나 영아기에는 발현하지 않는다. 율슨병에 의한 간염은 과거의 교과서에는 5세 이상에서 감별진단에 포함되었으나 유전자 진단에 의한 조기 간염 증례가 속속 발견되면서 3세 또는 그 이전이라도 원인 불명의 간염 감별진단에 율슨병을 포함시키고 있는 추세이다.

간에 구리가 침착되면 처음에는 간효소치만 약간 증가된 무증상의 간장비대를 보이나 시간이 경과하면 만성 활동성간염, 간경변증으로 진행한다. 간세포암종의 발생은 매우 드물다^{4~6)}. 율슨병 간염에서는 간기능 이상이 심한 데도 불구하고 특이하게도 알칼라인 포스파타제 효소가 낮거나 정상인 경우가 적지 않다. 급성 간염으로 발현하여 전격성 간염으로 사망하는 경우도 있다. 간뇌증, 혈액응고장애, 콤즈 음성(Coombs negative) 용혈성 빈혈과 함께 간신증후군이 급격히 진행하면 환자는 대부분 사망한다. 또한 전신피로, 관절병변, 피부 발진과 함께 자가 면역간염의 형태로 나타나기도 한다. 간효소치의 이상을 동반한 경증 또는 중등도의 지방간 환자로 보이기도 한다. NASH환자로 오인되어 치료시기를 놓치는 수가 있으므로 비만이 있는 환자에서 특히 주의가 필요하다. 신경증상은 사춘기 이전에 증상이 나타나는 경우는 드물며 대개 10~15세 이후 청소년기에 발현한다. 학교성적 저하가 첫 증상으로 나타나기도 하며 손 떨림으로 글쓰기가 어렵고 구음장애(dysarthria)가 오기도하며 정서 행동장애 문제를 일으키기도 하는데 정상 사춘기 발달 과정으로 잘못 인식되어 진단이 지연되는 경우도 종종 있다. 구리 침착으로 인한 대뇌 기저핵 손상으로 운동장애(movement disorders- tremors, poor coordination, loss of fine motor control, chorea, choreoathetosis 등)와 강직성 근긴장이상(rigid dystonia-mask like faces, rigidity, dystonic posturing, gait

disturbance, pseudobulbar paralysis)의 신경증상이 발생한다. 신경증상이 있는 경우에 기질적 치매가 흔하며 경련은 드물다.

신경형 환자에서 정신과적 문제를 많이 본다^{7,8)}. 조울증, 신경증등이 오기도 하지만 가장 흔한 증상은 공포증(phobia), 강박증(compulsive behavior), 공격성(aggression), 반사회적 행동 등 비전형적인 행동장애이다. 대개 월슨병 치료 후 좋아진다. 일부 환자는 정신과적 치료를 받아야 한다.

일부(25% 정도) 월슨병 환자에서 병의 초기에 간질 환과 신경증상이 함께 발견되기도 한다⁷⁾.

급성 용혈성 빈혈은 괴사성 간세포에서 다량의 구리가 혈류로 배출될 때 적혈구 손상으로 발생하는 데 잦은 용혈로 담석증이 발생하기도 한다.

월슨 병에 의한 신장 병변으로는 Fanconi 증후군, RTA, nephrocalcinosis, 아미노산뇨, 단백뇨, 현미경적 혈뇨 등이 올 수 있다.

드물지만 구리가 관절골격에 침착되어 골연화증, 골다공증, 골돌기체(osteophyte), 건 이완(lax ligaments) 및 관절염, 구루병 등을 초래할 수 있다. 췌장, 심장, 부갑상선에도 축적되어 손상을 주기도 하며 일부의 환자에선 해바라기양 백내장(sunflower cataracts)을 일으키기도 한다.

2. 생화학적 진단 검사

월슨병 환자의 대부분은 혈청 세룰로플라스민, 24시간 소변 구리 배출량, 간생검 조직내 구리 함량 등 생화학적 검사로 진단된다. 혈청 세룰로플라스민 감소, 24시간 소변 구리 배출 증가, 간조직 내 구리 함량 증가 등 생화학적 진단 검사 셋과 그리고 Kayser-Fleischer (K-F) ring 등 네 가지 소견 중 두 가지 이상 양성이면 월슨병의 확진 가능성이 매우 높다.

1) **혈청 세룰로플라스민:** 세룰로플라스민은 2-globulin 당단백질로서 혈장 내 구리의 80% 이상을 운반하며 amine oxidase 활성을 갖기 때문에 간세포로부터 다른 조직으로 구리를 운반할 수 있다. 혈청 세룰로플라스민은 원인불명의 간질환을 가진 어린이에서 월슨병 진단 시 가장 좋은 선별 검사의 하나로 간주되고 있다. 그러나 소아 월슨병 환자의 85~95%에서만 세룰로플라스민 감소를 보인다. 일부 성인 문헌에서는 신경증상

이 있는 환자에서는 5%에서, 간증상이 있는 환자에서는 40%에서 혈청 세룰로플라스민치가 정상 소견을 보여 성인 월슨병의 선별 검사로서의 진단 가치가 떨어진다고 보고한 바도 있다⁹⁾. 이러한 차이는 세룰로플라스민 측정법의 문제로 일부 설명되기도 한다. 효소분석법은 구리로 인하여 효소가 활성화된 세룰로플라스민만을 측정하므로 훨씬 정확하고 세룰로플라스민 비결합 혈청 구리(nonceruloplasmin bound copper, free copper) 농도를 알아보는 데에도 유용하다. 그러나 대부분의 실험실이나 병원에서는 면역학적 측정방법을 이용하고 있는 데 이 방법은 구리가 결합 안된 Apoceruloplasmin과 구리가 결합된 Holoceruloplasmin 모두를 함께 측정하게 되어 정확치 못하며 월슨병 환자에서 세룰로플라스민이 높게 측정될 수 있다.

우리나라 소아와 성인 월슨병 환자 492명의 조사를 보면 혈청 세룰로플라스민이 68%에서 7 mg/dL 미만으로 매우 낮았고 28%에서 7~20 mg/dL으로 정상치보다 상당히 낮았으며 4%의 환자는 정상 혈청 세룰로플라스민 농도를 보였다¹⁰⁾.

신생아나 어린 영아에서는 세룰로플라스민이 진단 가치가 없다. 이 연령에서는 생리적으로 혈청 세룰로플라스민이 낮고(5~26 mg/dL) 간조직 내 구리 농도가 높아 월슨병 환자와 감별이 되지 않기 때문이다. 혈청 세룰로플라스민 농도는 생후 6개월에 증가하기 시작하여 2~3세경에는 최고가 되었다가 그 후 점차 낮아져 성인의 수준으로 바뀌며 이와 함께 간의 구리 농도도 감소하게 된다. 그러나 월슨병 환자에서는 이러한 생리적인 변화가 없다.

2) **간 생검 조직 구리 함량:** 월슨병에 의한 간질환 환자에서 생검을 하여 간조직 내의 구리 농도를 측정하면 현저히 증가(간생검 건조 중량 그램당 250 μ g/g 이상)되어 있어 진단 가치가 높다¹¹⁾. 정상치는 보통 간생검 건조 중량 그램당 55 μ g/g 이하이다. 월슨병 환자라도 나이가 어려 아직 증상 발현 전이나 또는 전격성 감염의 경우 간생검 조직 구리 함량이 진단기준 이하일 수 있다. 또한 간조직 내의 구리 분포가 균등하지 않게 되는 말기 월슨병에서는 간조직 내 구리농도검사의 진단 가치가 떨어진다. 이런 환자 중 일부에서는 간조직 내의 구리 농도가 100~250 μ g로 진단 기준 미달이 될 수 있다. 일부 이형접합체 월슨 유전자 보인자도 이와

비슷한 구리 농도를 보이므로 환자와 보인자의 감별이 어렵게 된다.

구리농도 측정은 흑연로원자흡수분광법(graphite furnace atomic absorption spectrometry)이나 중성자활성화 측정법(neutron activation)이 추천된다. 간조직 내의 구리를 측정하는 방법으로서 생검 조직의 구리 염색은 신뢰할 만한 방법이 못되며 진단가치가 없다.

3) 24시간 소변 구리 배출량: 율슨 환자의 24시간 소변 구리 배출량은 100 μg 이상(대개 1,000 μg 이상)으로 정상(40 μg)보다 증가 되어 있어 중요한 진단 검사가 된다. 검사의 확실성을 위하여 보통 3회 시행이 추천된다. 율슨병 연구자에 따라서는 단일 검사로서는 가장 좋은 손쉬운 선별 검사로 사용되기도 한다. 우리나라 율슨병 환자 469명에서 실시한 24시간 요중 구리 배설량은 대부분(87%)이 100 μg 이상이었으며, 10%환자에서 40~100 μg 이다¹⁰⁾. 율슨병 환자의 거의 대부분에서 24시간 소변 구리 배출량이 100 μg 이상이므로 이보다 낮은 경우는 율슨병을 감별진단에서 제외하는 데 도움이 된다. 혈청 세룰로플라스민이 정상인 경우 등 율슨병 진단이 어려울 때 1 g의 페니실라민을 투여하면 (penicillamine provocative test) 소아 율슨병 환자에서 24시간 소변 구리 배출량이 1,200~2,000 μg (정상인 600~800 μg)으로 증가되어 진단에 도움이 된다는 보고가 있다¹²⁾. 그러나 성인에서 이러한 페니실라민 부하 시험의 진단 가치에 대하여는 논란이 있다. 또 문제점으로 환자와 보인자(heterozygote) 구리배출량이 겹치는 영역이 있다는 것이다.

소변 내 구리와는 달리 총 혈청 구리 농도는 율슨병의 진단에 신빙성이 낮다. 대부분의 율슨병 환자에서 총 혈청 구리의 감소를 보이나 급성 용혈성 빈혈이 있는 상태에서는 총혈청 구리가 정상이거나 증가되어 있는 소견을 보인다. 그러나 체내 구리 과잉 축적을 나타내는 세룰로플라스민 비결합 혈청 구리(nonceruloplasmin bound copper, free copper)는 율슨 병에서 높게 나오므로 진단에 도움을 줄 수 있다. 정상은 5~15 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 이며 치료되지 않은 율슨병에서는 보통 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 이상 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 정도 또는 그 이상의 높은 수치를 보인다. 총 혈청 구리 농도($\mu\text{g}/\text{dL}$)에서 세룰로플라스민 결합 혈청 구리(ceruloplasmin in $\text{mg}/\text{dL} \times 3.15$ 수치가 Cu level in $\mu\text{g}/\text{dL}$ 에 해당함)를 빼어 계산할 수 있다. 다시 말하면

세룰로플라스민 10 mg/L 는 대략 혈청 구리 3.15 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 과 결합한 것으로 계산한다. 그러나 세룰로플라스민 측정 방법이 검사실에 따라 정확하지 않아 율슨병 진단 검사로 세룰로플라스민 비 결합 혈청구리가 잘 사용되지 못하고 있다. 정확한 세룰로플라스민 비결합 혈청 구리 측정을 하기 위하여는 구리가 결합된 세룰로플라스민(holoceruloplasmin) 농도를 측정할 수 있는 세룰로플라스민 효소 측정 방법을 사용하여야 한다^{13,14)}. 세룰로플라스민 비결합 혈청 구리는 율슨병 에서 확진보다는 약물요법의 효과를 모니터링하는 데 주로 사용되고 있다.

3. K-F ring의 Slit lamp 검사

구리가 각막에 침착되어 생기는 K-F고리는 율슨 병의 첫 보고보다 훨씬 앞선 1902년 Kayser와 1903년 Fleischer에 의하여 신경 환자에서 일찍이 관찰되었다. 각막 Descemet membrane에 구리가 침착되면 황갈색의 K-F고리가 나타난다. 주로 운부의 상.하극에 뚜렷하다. 확인을 위하여는 세극등(slit lamp)검사가 필요하다.

과거에는 K-F ring이 있으면 율슨병이라고 확진할 수 있는 소견(pathognomonic finding) 이라고 교과서에 기술된 일도 있었으나 그 후 primary biliary cirrhosis 환자, sclerosing cholangitis 환자, extrahepatic biliary atresia 환자 등 담즙 정체성 간질환환자 또는 자가면역성간염환자에서도 발견되어 이제는 율슨병에 매우 특징적인 소견이라고 표현이 완화되었다.

임상적으로 율슨 병이 의심되는 환자에서 특히 신경 증상이 있는 경우에는 K-F ring이 발견되면 거의 확진이 가능하다. 신경증상이 있는 소아 율슨병 환자에서는 거의 전 예에서 발견된다¹⁵⁾. 국내 율슨병 환자조사에서 K-F ring은 성인 및 소아 검사자 462명 중 336명(73%)에서 양성이었다. 간증상만 있는 환자군에서는 272명 중 176명(63%)에서 양성이었고 간증상 유무에 상관없이 신경증상이 있는 환자군에서는 168명 중 153명(91%)에서 양성이었다¹⁰⁾.

4. 병리조직학적 검사

과잉의 구리는 구리 이온에 의한 자유라디칼(free radical)의 발생으로 장기에 산화손상 (oxidative damage)을 주는 독이 된다¹⁶⁾. 구리가 축적되면 우선 메탈로

치오닌 단백질의 생산을 촉진시켜 초기에는 과잉의 구리가 메탈로치오닌에 결합됨으로써 한동안 독성이 없는 상태를 유지하며 간세포의 세포질에 미만성으로 분포한다. 조직화학적 구리염색은 음성으로 나타난다. 간세포내 구리 축적이 진행하여 메탈로치오닌 결합 능력이 한계점에 도달하면 구리의 독성이 나타나면서 처음에는 미토콘드리아에 그리고 나중에는 간세포에 손상이 오게 된다. Rubanic acid나 Orcein 염색 등 구리결합 단백질 또는 구리를 염색하는 염색 기법을 이용하면 구리 축적이 상당히 진행되어 나타나는 lysosome 축적구리를 관찰 할 수 있다.

광학현미경상 율슨병에 특징적인 소견은 없다. 율슨병의 간조직 소견으로는 초기에 지방 침윤과 핵의 당원 침착이 나타나며 진행되면 lobular necrosis, periportal fibrosis를 거쳐 나중에 간경변증 소견을 보이게 된다. 대개 대결절성이지만 소결절성 간경변 소견을 보이기도 한다.

전자현미경 소견상 율슨병에 매우 특징적인 미토콘드리아 병변을 볼 수 있다^{17,18}. 전형적인 전자현미경 소견은 미토콘드리아의 크기와 모양의 다양성, matrix material의 밀도 증가, 구리로 생각되는 미세한 dense granular material과 lipid를 포함하는 inclusion등이다. mitochondria crista의 안쪽과 바깥쪽 막이 벌어지면서 팽창되고 불규칙한 낭성변화를 보이는 경우 매우 진단적 가치가 있다. 담즙 정체 간 질환이 없는 상태에서 이러한 병변들이 보이면 율슨병의 확진이 가능한 소견(Pathognomonic finding)으로 간주된다.

5. MRI 영상 검사

뇌에서의 구리 독성은 자기공명촬영상에서 보면 렌즈핵(lenticular nucleus)에서 가장 심하고, 다음으로는 교뇌(pons), 수질(medulla), 시상(thalamus), 소뇌, 대뇌피질에도 손상이 온다. 최근 신경증상이 있는 환자에서는 자기공명 영상검사가 매우 유용한 진단방법으로 점차 많이 사용되고 있다. 자기공명영상검사서 가장 흔히 발견되는 이상은 T2-강조(weighted) 이미지에서 조가비핵(putamen) 부위 양측에 대칭적으로 나타나는 고신호감도(high signal intensity)이다. 이는 치료 후 소실되는 가역적 병변이다¹⁹. 최근 문헌에 보고된 흥미로운 T2-강조 자기공명영상 소견으로는 midbrain panda sign 이

있다²⁰.

분자유전학적 진단

율슨병 유전자는 구리를 운반하는 P형 ATPase 단백을 합성하는 ATP7B이다^{21~26}.

ATP7B는 염색체 13q14.3-q21.1 부위에 위치하며 게놈 DNA가 80 kb 이상 되는 커다란 유전자로 7.8 kb mRNA를 가지며 이 유전자의 코드화 부위도 4.1 kb에 달한다. 21개의 엑손으로 되어 있으며 1,465개의 아미노산(copper transporting P type ATPase)을 전사한다²⁷. 율슨병 유전자가 알려진 1993년 이후 질병관련 돌연변이들이 발표되면서^{21,24} 율슨병 진단의 획기적인 전환점이 될 수 있으리라는 기대가 컸었다.

그러나 율슨 병에서 분자유전학적 진단은 질환과 연관된 돌연변이 수가 너무 많은 데다 각 돌연변이의 출현 빈도가 매우 낮아 율슨병을 대표할 만한 돌연변이가 없어서 기존의 생화학적 진단방법에 비하여 우월한 장점이 많지 않은 것으로 밝혀졌다. 또한 유전자가 커서 검사비용이 많이 들고 검사 시간도 오래 걸렸다. 그러나 지난 수년간 실험실 기술의 급격한 발달로 분석 시간 및 검사 경비의 감소, 질병 관련 돌연변이 보고 수의 급격한 증가가 이루어지면서 최근 분자유전학적 진단의 정확성과 중요성이 매우 커지고 있으므로 향후 결국은 생화학적 진단을 대체할 수 있을 것으로 전망된다^{28~31}.

현재 율슨병에서 유전 진단은 임상 진단이 불명확한 사례들에서 가장 특이도가 높고 가장 예민한 진단방법이 되었다. DNA 돌연변이 분석에 의한 환자의 진단은 생화학, 임상양상이 비전형적이거나 생화학 소견이 아직 충분히 나타나지 않는 율슨병 초기의 어린 연령 또는 간이식을 받은 전격성간염에서 매우 유용하다.

2008년 최근까지 ATP7B 내에서 370개 정도의 돌연변이가 알려져 있는데 단일 염기쌍의 과오 돌연변이가 가장 흔하다(Table 1). ATP7B 내의 돌연변이형이 삽입(insertion), 결손(deletion), 해독틀(frameshift) 돌연변이, 무의미(nonsense) 돌연변이 그리고 짜깁기(splice site) 돌연변이 등 단백질 합성에 심한 장애를 일으키는 돌연변이의 경우 과오(missense) 돌연변이에 비해 임상증상이 심할 것으로 예측된다^{26,32~35}. 실제로 짜깁기 돌연변이

Table 1. ATP7B Mutation Types in Wilson Disease

Mutation types	Number
Nucleotide substitutions (missense/nonsense)	218 (59%)
Nucleotide substitutions (splicing)	28 (8%)
Nucleotide substitutions (regulatory)	3
Small deletions	79 (21%)
Small insertions	32 (9%)
Small indels	4
Gross deletions	5
Gross insertions	0
Complex rearrangements	1
Repeat variations	0
	370 (100%)

The Human Gene Mutation Database (2008)

로 인하여 엑손 5번이 없어서 54개의 아미노산이 못 만들어진 3세의 어린이에서 심한 윌슨간염이 조기에 발견되었다^{36,37}. 이러한 증례의 발견은 그 동안 알려져 왔던 윌슨병 발병 최소 연령인 5세보다 더 낮은 연령에서도 감별진단에 윌슨 간염을 고려하여야 한다는 것을 시사한다.

상염색체 열성으로 유전하는 윌슨병에서 돌연변이 유전자에 의한 발병은 두 개가 같은 돌연변이로 구성된 동형접합체이거나 두 개가 서로 다른 돌연변이로 구성된 복합 이형접합체(compound heterozygote)에 의하는데, 대부분의 윌슨병 환자는 복합 이형접합체이다. DNA 유전 진단에서는 임상증상과 특징적인 생화학검사 소견을 보인 환자에서는 기존에 보고된 윌슨병 유발 돌연변이가 최소 하나만 발견되어도 확진에 충분하다고 생각되고 있다. 이 경우 발견된 돌연변이는 정상인에서 드물게 발견되는 과오 돌연변이가 아니고 이미 문헌상으로 확인된 윌슨병 연관 돌연변이어야 한다.

윌슨병에서 발견되는 가장 흔한 돌연변이로는 R778L (Arg778Leu, arginine778leucine)과 H1069Q (His1069Gln, histidine1069glutamine)이 있다^{24,38}. R778L 돌연변이는 18세 이하 아시아 지역 윌슨병 환자 염색체의 57%에서 발견되는 흔한 돌연변이로 우리나라 윌슨병 환자에서의 대립 유전자 빈도(allele frequency)는 37~41%이다^{1,39}. H1069Q는 서구 지역에서는 평균적으로 환자 염색체의 약 35~45%가 이 돌연변이를 가지고 있는데 우리나라를 포함하여 동아시아 종족에서는 거의 발견

되지 않고 있다.

돌연변이 수가 너무 많고 개개 돌연변이의 빈도가 낮아 과거에는 윌슨병의 유전 진단은 R778L과 H1069Q 등 그 지역에 흔한 돌연변이를 포함한 엑손을 선택하여 염기서열 분석, DHPLC122 또는 SSCP41,123 등으로 몇 개의 흔한 돌연변이를 모아 검사를 시행하여 왔으나 이러한 표적유전 진단은 한계가 있다.

최근에는 우수하고 효과적인 장비를 이용하여 전체 암호화 부위(coding region)에 대한 자동 염기서열 분석을 시행하는 경우가 많으며 이 방법으로 한 개 또는 두 개의 돌연변이 검색율을 보면 윌슨병 환자의 80%에서 많게는 98%까지 돌연변이를 검색할 수 있다⁴⁰. 서울대학교 어린이병원에서 윌슨병 79가족의 발단자(proband) 환자를 대상으로 직접 염기서열 분석을 시행한 돌연변이 유형 조사에 의하면 한 명을 제외한 모든 윌슨병 환자(98.7%)에서 유전 진단이 가능하였으며 대립 유전자 빈도로는 85%의 돌연변이 진단 검색율을 보였다. 검색 환자 70%에서는 두 개의 돌연변이가 발견되어 확진되었고 검색 환자 29%에서는 한 개의 돌연변이만 발견되었으나 이들은 윌슨병에 특징적인 임상적 생화학적 소견을 보여서 확진이 가능하였다. 우리나라에서 가장 흔한 돌연변이는 R778L (c.2333G>T, 36.7% 대립유전자 빈도), A874V (c.2621C>T, 12.7%), L1083F (c.3247C>T, 8.2%), N1070S (c.3809A>G, 6.3%), T1029I (c.3086C>T 4.4%), V872X-fs (c.2513delA, 4.4%) 등이다¹.

윌슨 병 진단 검사의 한계와 문제점

윌슨병 진단의 문제점은 확진할 만한 단일 검사방법이 없다는 점이며 또 모든 검사가 위양성과 위음성의 가능성이 있다는 것이다.

세룰로플라스민 검사의 경우 윌슨병이 아니라도 신생아나 어린 영아, 심한 영양실조, 장단백소실증, 신증후군, 선천성 저세룰로플라스민혈증, 환자가 아닌 윌슨병 보인자(heterozygote)의 20%에서 낮게 나올 수 있으므로 해석에 주의해야 한다. 세룰로플라스민 합성이 현저히 저하되는 급성간부전환자나 비대상성 간경변환자에서도 혈청 세룰로플라스민 농도가 정상보다 낮다. 유전성 저세룰로플라스민혈증 환자에서는 혈중 세룰

로플라스민이 거의 없어 월슨병과의 감별을 요하나 이 병에서는 철분이 축적되는 것이 특징적이다⁴¹⁾. 또한 세룰로플라스민은 급성기 반응산물(acute phase reactant)로서 월슨 환자에서 감염이나 임신 중에 증가할 수 있으므로 이점을 고려해야 한다. 세룰로플라스민 측정방법도 문제가 될 수 있다. 효소분석법이 바람직하나 면역학적 측정방법을 사용하는 경우 Apoceruloplasmin과 Holoceruloplasmin을 함께 측정하게 되어 월슨 환자에서 세룰로플라스민이 높게 측정될 수 있으며 월슨병 진단에 도움을 줄 수 있는 세룰로플라스민 비결합 혈청구리 농도를 알아보는 데도 문제가 생긴다.

원발담즙간경변증(primary biliary cirrhosis), 간의 담도 폐쇄증(biliary atresia) 등 심한 담즙정체 간질환에서는 월슨병이 없더라도 K-F고리가 발견되거나 간조직내 구리 함량과 24시간 구리 배출이 월슨병만큼 높을 수 있으므로 감별 진단에 주의하여야 한다.

증상 발현 전의 월슨병 환자에서는 소변 구리 배출량이 낮아 위음성의 소견을 보일 수 있다. 구리의 양을 측정하기 위한 소변 채취 용기가 오염되어 있으면 실제보다 높게 측정될 수 있으므로 주의하여야 한다.

분자유전학적 진단의 문제점도 점차 보완 발전되고 있다. 지금까지 알려진 돌연변이는 대부분 기능성 도메인(functional domain)과 membrane-spanning segments에 많아 이러한 부위의 엑손을 중심으로 돌연변이가 검색이 집중되어 있으며 이를 위하여 주로 전체 암호화 부위(coding region)에 대한 자동 염기서열 분석을 시행하는 경우가 많다. 그러나 이러한 방법만으로는 두 개의 돌연변이가 발견되지 않는 환자가 30%정도나 된다. 일부 환자에서 다른 비암호화 부위(non-coding region)에서의 돌연변이도 보고된바 있으므로, 비암호화 Promoter 부위 등의 분석을 확장하고 매우 빈도가 드물지만 자동 염기서열 분석으로 검색 안 되는 큰 deletion 또는 duplication에 대하여 MLPA, CGH 등 새로운 분석 기술을 적용하여 분자유전검사의 진단율을 높이고 또한 검사를 보편화하기 위해 향후 지속적인 기술 개발이 필요하다.

현행 ATP7B 유전자검사의 난점이라면, 기존에 알려지지 않은 새로운 과오 돌연변이와 짜깁기 돌연변이가 발견되었을 때 이 돌연변이가 단백질의 기능에 직접적으로 어떠한 영향을 주는 질병 연관 돌연변이인지 정상인에서 발견되는 다형성 변이인지 감별이 어려울 수도

있다는 점이다⁴²⁾. 문헌상에 발표된 과오돌연변이의 약 12%정도는 기능이상 여부가 알려지지 않고 있으며 또 짜깁기돌연변이도 17% 만 검증되었을 뿐 모든 짜깁기 돌연변이가 다 짜깁기에서 이상이 오는지 검증되지 않았다.

일반적으로 한 쌍의 염기치환(substitution)이 있을 때 동일한 인구조사에서 50개 이상의 정상 유전자에서 발견되지 않거나, 아미노산치환이 기능 변화를 초래하는 단백을 생성한다면 질병을 유발할 것으로 간주된다.

특정 돌연변이가 단백질 기능 결손을 유발하여 질병을 유발하는 과오 돌연변이인지 또는 드문 빈도의 정상 변이 인지를 구별하기 위한 실험실 방법으로 이스트를 이용한 기능 평가 시스템과 현미경을 이용한 조직학적 검사가 있다.

포유동물의 구리 운반 시스템은 *Saccharomyces cerevisiae* 이스트와 비슷하다. 이스트는 ATP7B와 비슷한 P-형 ATPase (Ccc2p)를 가지고 있으며, 이것은 세포 내에서 구리를 운반하는 역할을 하며 철의 운반에도 중요한 역할을 한다. 이스트 유전자를 인간의 ATP7B로 대체시켜 유사한 운반 기능을 하게 할 수 있으며 이로써 정상 변이와 질병을 유발하는 변이 감별이 가능하다⁴³⁾. 기능 결손을 보는 이러한 이스트 모델 평가 시스템 외에 다른 방법으로는 구리 유발에 의한 세포 내 ATP7B 이동경로(trafficking)를 현미경으로 관찰하는 방법이 있다. 돌연변이에 의해 ATP7B 단백질에 결함이 생기면 세포 내 소포로의 위치 이동에 이상이 생겨 구리 운송 장애가 생기게 되는 데 이를 조직학적으로 관찰하는 것이다. Chinese hamster ovary세포나 hepatoma cell line에서 면역형광항체기법을 이용하여 면역형광 현미경으로 관찰하면 ATP7B가 정상적으로 위치하고 있는지, 구리 농도가 증가할 때 trans-Golgi network에서 세포질 내 소포로 정상적인 이동을 하는지 또는 새롭게 발견된 ATP7B 변이 단백질이 세포 내에서 정상적으로 일어나는 구리 이동 경로에 장애를 주는지 알 수 있다⁴⁴⁾.

환아 가족 검색과 분자유전학적 검사

환아의 형제에 대해서는 반드시 월슨병 검색을 하여야 한다. 유전 진단이 가능하지 않은 경우에는 세룰로플라스민과 24시간소변 구리배출량검사, K-F고리 안과

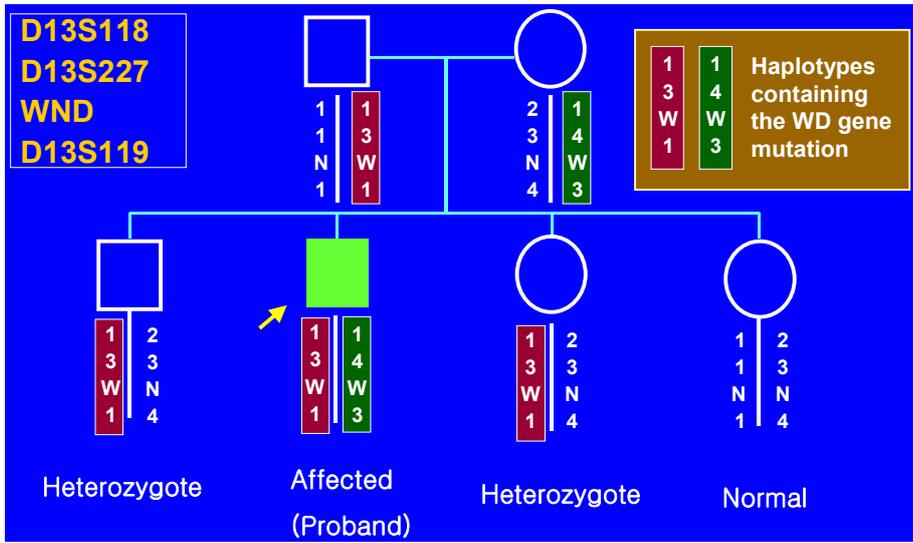


Fig. 1. Haplotype analysis with closely linked microsatellite markers for precise carrier detection.

검사와 함께 간 진찰, 간기능검사, 혈청 구리검사 등을 시행하여야 한다. 혈청 세룰로플라스민이 낮은 환자의 자녀 검색은 일찍 시행하려면 생후 1세 경에 해보는 것이 좋다.

6세 이하 어린이에선 생화학적 검사의 진단정확도가 떨어지므로 증상이 없는 경우, 환자인지 약을 쓸 필요가 없는 보인자인지 확인이 어려우므로 분자유전학적 검사가 안 되면 5~10년 간에 걸쳐 매년 생화학적 추적 검사를 시행하여야 한다.

분자유전학적 검사 방법을 이용하면 환자 가족의 율슨병 검색을 거의 완벽하게 할 수 있다. 환자의 형제를 검색하고자 할 때, 즉 아직 증상이 없는 환자인지 또는 치료가 필요 없는 이형접합 보인자 인지를 확인하는 데에는 분자유전학 방법이 유일한 표준 해결 방법이다. 특히 일부 이형접합 보인자는 세룰로플라스민이 낮거나 소변 구리 배출의 증가가 경계선상(40~100 μg/일)에 있으며 또한 간조직 내 구리 농도도 경계선상(100~250 μg/g, 건조 무게)에 있어서 임상적으로는 무증상인 환자와의 감별이 어렵게 될 수 있는데 이런 경우 분자유전학적 진단 검사가 감별진단에 결정적이다.

분자유전학적 방법에는 돌연변이 검색을 이용하는 방법과 haplotype을 이용하는 방법이 있다. 환자에서 두 개의 특정 돌연변이가 밝혀진 경우에는 환자의 가족과 친척에 대하여 같은 돌연변이의 유무를 검색하면 된다. 환자의 돌연변이형을 직접 모르는 경우 또는 하나만 발

견되는 경우에는 haplotype 유형 분석을 이용한다. 환자와 형제 부모의 DNA marker haplotype 유형을 정하여 형제에서 율슨병인지 보인자인지 진단할 수 있다^{45,46}. 이는 cytosine-adenosine 반복서열의 길이의 다양성에 기초한 율슨병 유전자 전후 부위의 highly polymorphic microsatellite marker를 이용하여 haplotype 유형을 작성 분석하는 방법이다(Fig. 1). SNP를 이용하여 marker 분석을 시행할 수도 있다. 율슨병에서 사용되는 microsatellite marker들(예; D13S316, D13S301, D13S314)은 약 90%의 환자 가족에서 이용 가능한 정보 가치가 있어 성공적인 DNA marker 분석이 가능하다. 이와 같은 haplotype 유형 분석은 환자와 이형접합 보인자를 1~2%의 오차 내에서 진단할 수 있다^{23,47,48}.

Haplotype 유형분석 또는 확인된 돌연변이 검색을 이용하여 정확한 산전진단도 가능하다. 재태기간 10~12주에 용모막 용모(chorionic villus)를 채취하거나 또는 재태기간 15~18주에 양수천자로 얻은 태아세포로부터 DNA를 추출 분석하여 산전진단을 하게 된다.

결 론

율슨병은 ATP7B유전자 돌연변이로 간세포에서 담관으로의 구리 배출에 장애가 생겨 발생하는 상염색체 열성 유전질환이다. 구리가 간, 뇌, 각막, 신장, 적혈구 등 여러 장기에 침착되어 간염, 신경증상, 정신과적 문

제, K-F ring, Fanconi 신세뇨관 장애, 용혈성 빈혈, 담석증, 골관절병변 등 다양한 임상증상을 나타내며 또 발병연령도 2~3세에서 60세경까지 광범위하여 임상에서 진단을 놓치기 쉽다. 그러나 치료가 늦어지면 말기 간경변, 비가역적인 신경증상의 악화 등 치명적인 장기 손상으로 사망하게 되므로 조기 진단의 중요성이 강조되고 있는 희귀질환이다.

그러나 아직까지 진단에 결정적인 검사 방법이 없는 것이 문제점이다.

임상의는 윌슨병의 다양한 임상증세를 항상 숙지하여 원인 불명의 간염이나 특징적인 신경증 등 의심되는 환자에서 반드시 이병을 감별진단에 포함시키도록 해야 한다. 임상적으로 의심되는 환자에서 혈청 세룰로플라스민 감소, 24시간 소변 구리 배출 증가, 간생검조직내 구리 함량 증가, K-F ring 소견 등 네 가지 소견 중에서 두 가지 이상이 양성이면 윌슨병의 확진 가능성이 매우 높다. 간염환자에서 간 생검조직의 전자 현미경검사와 신경환자에서 MRI영상 검사가 진단에 도움을 줄 수 있다.

분자유전학적 진단은 최근 유전자 분석 기술의 획기적인 발전에 힘입어 기존의 생화학적 임상적 검사로 진단이 불명한 사례들에서 가장 특이도가 높고 예민한 방법으로 자리잡고 있다. 특히 윌슨병 환자 가족에서의 환자나 보인자 검색, 산전 검색에서 mutation analysis와 haplotype analysis을 이용한 분자유전학적 진단 검사가 결정적인 진단 방법이다. 생화학적 진단 검사가 아직까지 윌슨병 진단의 근간이라고 할 수 있으나 최근 분자유전학적 진단의 정확성과 중요성이 매우 커지고 있으므로 향후 결국은 생화학적 진단을 대체할 수 있을 것으로 전망된다.

참 고 문 헌

- 1) Seo JK. Wilson disease: an update. *Korean J Hepatol* 2006;12:333-63.
- 2) Gitlin N. Wilson's disease: the scourge of copper. *J Hepatol* 1998;28:734-9.
- 3) Seo JK, Moon HR. Hepatitis in Childhood as a Manifestation of Treatable Wilson's disease. *Korean J Gastroenterol* 1983;15:55-64.
- 4) Kumagi T, Horriike N, Abe M, Kurose K, Iuchi H, Masunoto T, et al. Small hepatocellular carcinoma associated with Wilson's disease. *Intern Med* 2005;44:439-43.
- 5) Walshe JM, Waldenstrom E, Sams V, Nordlinger H, Westermarck K. Abdominal malignancies in patients with Wilson's Disease. *Q J Med* 2003;96:657-62.
- 6) Wilkinson ML, Portmann B, Williams R. Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper. *Gut* 1983;24:767-71.
- 7) Gollan JL, Gollan TJ. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects. *J Hepatol* 1998;28 (Suppl 1):28S-36S.
- 8) Dening TR and Berrios GE. Wilson's disease. Psychiatric symptoms in 195 cases. *Arch Gen Psychiatry* 1989;46:1126-34.
- 9) Pfeil SA, Lynn DJ. Wilson's disease: copper unfettered. *J Clin Gastroenterol* 1999;29:22-31.
- 10) Seo JK, Kim YS, Hahn CJ, Baik SK. A nationwide survey for prevalence and clinical characteristics of Wilson disease in Korea. *Korean J Hepatol* 2004;10 Suppl:5-15.
- 11) Nuttall KL, Palaty J, Lockitch G. Reference limits for copper and iron in liver biopsies. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:443-50.
- 12) Martins da Costa C, Baldwin D, Portmann B, Lolin Y, Mowat AP, Mieli-Vergani G. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology* 1992;15:609-15.
- 13) Walshe JM. Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. *Ann Clin Biochem* 2003;40:115-21.
- 14) Macintyre G, Gutfreund KS, Martin WR, Camicioli R, Cox DW. Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. *J Lab Clin Med* 2004;144:294-301.
- 15) Moon JS, Ko JS, Seo JK. Long-term clinical follow-up of Korean children with Wilson disease; twenty years' experience. *J Korean Pediatr Soc* 2001;44:127-38.
- 16) Brouwer M, Brouwer TH. Biochemical defense mechanisms against copper -induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch Biochem Biophys* 1998;351:257-64.
- 17) Sternlieb I. Mitochondrial and fatty changes in hepatocytes of patients with Wilson's disease. *Gastroenterology* 1968;55:354-67.
- 18) Roberts EA, Robinson BH, Yang S. Mitochondrial structure and function in the untreated Jackson toxic milk (tx-j) mouse, a model for Wilson disease. *Mol Genet Metab* 2008;93:54-65.
- 19) Kim TJ, Kim IO, Kim WS, Cheon JE, Moon SG, Kwon JW, et al. MR imaging of the brain in Wilson disease of

- childhood: findings before and after treatment with clinical correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:1373-8.
- 20) Jacobs DA, Markowitz CE, Liebeskind DS, Galetta SL. The "double panda sign" in Wilson's disease. *Neurology* 2003;61:969.
 - 21) Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993;5:327-37.
 - 22) Chelly J, Monaco AP. Cloning the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993;5:317-8.
 - 23) Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993;5:338-43.
 - 24) Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;5:344-50.
 - 25) Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:271-7.
 - 26) Cox DW, Moore SD. Copper transporting P-type ATPase and human disease. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34:333-8.
 - 27) Riordan SM, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol* 2001;34:165-71.
 - 28) Huster D, Weizenegger M, Kress S, Mossner J, Caca K. Rapid detection of mutations in Wilson disease gene ATP7B by DNA strip technology. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:507-10.
 - 29) Lovicu M, Dessi V, Zappu A, De Virgiliis S, Cao A, Loudianos G. Efficient strategy for molecular diagnosis of Wilson disease in the sardinian population. *Clin Chem* 2003;49:496-8.
 - 30) Maier-Dobersberger T, Ferenci P, Polli C, Balac P, Dienes HP, Kaserer K, et al. Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1997;127:21-6.
 - 31) Weirich G, Cabras AD, Serra S, Coni P, Nurchi AM, Faa G, Hofler H. Rapid identification of Wilson's disease carriers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Prev Med* 2002;35:278-84.
 - 32) Cox DW. Molecular advances in Wilson disease. *Prog Liver Dis* 1996;14:245-64.
 - 33) Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, Hsiao KJ, Zhang JM, Gu XF, et al. Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:590-3.
 - 34) Deguti MM, Genschel J, Cancado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, et al. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat* 2004;23:398.
 - 35) Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, et al. Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet* 2005;68:524-32.
 - 36) Thomas GR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotypes and mutations in Wilson disease. *Am J Hum Genet* 1995;56:315-9.
 - 37) Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW, Roberts EA. Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J Pediatr* 2000;137:719-22.
 - 38) Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet* 1995;9:210-7.
 - 39) Seo JK, Kim CW. Mutation analysis of Wilson disease gene: Arg778Leu Mutation in Korean Children. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;2:164-8.
 - 40) Waldenstrom E, Lagerkvist A, Dahlman T, Westermark K, Landegren U. Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics* 1996;37:303-9.
 - 41) Yoshida K, Furihata K, Takeda S, Nakamura A, Yamamoto K, Morita H, et al. A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet* 1995;9:267-72.
 - 42) Cox DW, Prat L, Walshe JM, Heathcote J, Gaffney D. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Hum Mutat* 2005;26:280.
 - 43) Forbes JR, Cox DW. Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? *Am J Hum Genet* 1998;63:1663-74.
 - 44) Forbes JR, Cox DW. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet* 2000;9:1927-35.
 - 45) Stewart EA, White A, Tomfohrde J, Osborne-Lawrence S, Prestridge L, Bonne-Tamir B, et al. Polymorphic Microsatellites and Wilson Disease (WD). *Am J Hum Genet* 1993;53:864-73.
 - 46) Kim CW, Kim SI, Seo JK. A Genetic Linkage Study of Wilson Disease in Korean Families. *J Korean Pediatr Soc* 1993;36:1596-612.
 - 47) Houwen RH, Roberts EA, Thomas GR, Cox DW. DNA

markers for the diagnosis of Wilson disease. *J Hepatol* 1993;17:269-76.

48) Maier-Dobersberger T, Mannhalter C, Rack S, Granditsch

G, Kassere K, Korninger L, et al. Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by DNA linkage analysis. *Gastroenterology* 1995;109:2015-8.
