

Duchenne/Becker 근이영양증에서의 임상적, 면역조직학적 및 유전학적 소견

울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아청소년과

서창덕 · 이윤정 · 정민희 · 이은혜 · 염미선 · 고정민 · 유한욱 · 고태성

= Abstract =

The Clinical Features, Immunostaining and Genetic Study in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy

Chang-Deok Seo, M.D., Yoon-Jung Lee, M.D., Min-Hee Jeong, M.D.,
Eun-Hye Lee, M.D., Mi-Sun Yum, M.D., Jung-Min Ko, M.D.
Han-Wook Yoo, M.D. and Tae-Sung Ko, M.D.

*Department of Pediatrics, Asan Medical Center
University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose : This retrospective study was designed to know the relation between clinical features, genetics, and immunostaining findings among children with Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) and the validity of the diagnostic tools for muscular dystrophy.

Methods : The medical records and computerized databases of 93 patients diagnosed with DMD/BMD from June 1989 to December 2008 were reviewed retrospectively. Demographic characteristics including clinical features, serum creatinine kinase(CK) level, electromyogram(EMG) and nerve conduction velocity(NCV), muscle biopsy, immunochemical staining for dystrophin, and the deletion of dystrophin gene were analyzed. We calculate the concordance rate between type of frame (in or out of frame) and phenotype.

Results : 58(62%) children were diagnosed with DMD, 13(14%) BMD, 19(20%) unclassified dystrophy, and 3(3%) DMD/BMD carriers. The mean age of symptom onset was 5.0 ± 3.5 years(range, 1-17). 46(49%) children presented gait disturbance and 35(37%) elevation of liver enzymes. The mean value of serum CK enzyme was $14,758 \pm 11,792$ IU/L (range, 633-61,349). There was no dystrophin in the immunochemical stain among 48 DMD children and at least partial or incomplete dystrophin among 10 BMD children. 28/54(51%) children had dystrophin gene deletion in multiplex PCR and 13/14(92%) in Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification(MLPA). The loss of heterozygosity was shown in 2 children by MLPA. The overall concordance rate between type of frame(in or out of frame) and phenotype was 95% in this study.

Conclusion : Despite of small population, this finding indicates that the determination of type of frame (in or out of frame) by MLPA may be helpful in differential diagnosis of DMD/BMD. In addition, we surmise that the detection of carrier by MLPA is helpful in genetic counseling.

Key Words : Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, Dystrophin, Multiplex ligation-dependent probe amplification

접수 : 2009년 3월 16일, 승인 : 2009년 4월 21일

책임저자 : 고태성, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아청소년과

Tel : 02)3010-3381, Fax : 02)473-3725, E-mail : tsko@amc.seoul.kr

서 론

Duchenne 및 Becker 근이영양증은 진행성 근력 저하를 보이고 성염색체 열성(Xp21)으로 유전되는 근육질환이다. 발병률은 Duchenne 근이영양증(DMD)의 경우 출생한 남아 약 3,300명당 1명 정도로 매우 높아 유전성 근육질환의 약 90%를 차지한다¹⁾. 1987년 디스트로핀 단백질의 결핍이 DMD와 Becker 근이영양증(BMD)을 유발함이 처음 증명되었다²⁾. 디스트로핀 유전자의 변이는 결손이 가장 흔하여 전체 환자의 60-65%를 차지하고 중복이 5%, 나머지 30%는 점돌연변이 또는 다형성, 소변이 등의 미세변으로 추정된다³⁾.

결손 부위가 mRNA의 translational reading frame을 이동시킬 경우(out of frame deletion) 전사가 조기에 종식하게 되면 디스트로핀 단백질이 형성되지 않아 증상이 심한 DMD형이 발현된다. 그러나 결손이 있더라도 reading frame이 보존될 경우(in frame deletion)에는 분자량이 작거나, 비정상적인 단백질이 생성되어 DMD에 비해 증상이 경미한 BMD형이 발현하게 된다⁴⁾.

과거에는 임상소견과 근육생검에 의한 병리학적 소견에 의해 진단할 수밖에 없었지만 southern blot 검사법으로 디스트로핀 유전자 검사가 가능해졌으며 multiplex PCR에 의한 결손 빈도가 높은 exon들에 대한 결손 확인이 상용화되었고 그 후 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)에 의한 79개의 exon 결손, 중복의 확인이 가능해졌다. 국내의 경우 multiplex PCR을 이용한 연구들이 보고 되었고⁵⁾, 1993년 디스트로핀 면역조직검사를 이용한 DMD의 진단이 처음 소개된 후⁶⁾ 현재는 상용화되어 진단에 있어 가장 민감도와 특이도가 높은 검사로 DMD와 BMD 감별에도 도움을 주고 있다⁷⁾.

이에 본 연구에서는 DMD/BMD로 진단된 환자에서 임상양상과 multiplex PCR 또는 MLPA를 이용한 디스트로핀 유전자 결손, 면역조직화학 염색에 의한 디스트로핀 발현을 조사하여 각 임상형의 특징

과 각 검사의 진단적 유용성에 대해 고찰해 보았고 아울러 본 연구의 대상 환자군에서 reading frame 이론을 적용하여 그 일치율을 구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1989년 6월부터 2008년 12월까지 서울아산병원에서 혈청 Creatinine Kinase(CK) 증가가 있고 근육질환의 임상소견을 보이는 환자에서 조직학적 소견 또는 디스트로핀 유전자 검사소견이 DMD/BMD에 부합되는 93명을 대상으로 하였다.

2. 방법

의무기록을 후향적으로 조사하였고 성별, 나이, 첫 임상증상의 종류와 발병연령, 진단시 Gower sign 유무, 가족력, 진단 당시 혈청 CK수치, 근전도검사와 신경전달속도검사, 대퇴근의 근육생검, 말초혈액을 이용한 디스트로핀 유전자 검사(multiplex PCR 또는 MLPA)를 조사하였다. 대상 중 72명이 근전도와 신경전달속도검사를 시행하였고 75명이 근육생검을 시행했으며 이중 58명이 면역조직화학검사를 시행하였다. 또한 대상 중 68명에서 디스트로핀 유전자검사를 시행하였고 이중 54명이 multiplex PCR로, 14명이 MLPA로 검사하였다.

DMD와 BMD의 임상적 분류의 기준은 13세 이전에 독립보행이 불가능하면 DMD, 16세까지도 독립보행 가능하면 BMD, 그 사이를 intermediate로 구분하고 있으나⁸⁾ 본 연구에서는 기준연령보다 연구대상이 어린 경우가 있었고 진단을 받은 후 추적 관찰을 할 수 없었던 경우도 포함되어 있어서 임상소견상 독립보행이 불가능하게 된 나이가 13세 이전이거나 면역조직학적 검사상 디스트로핀이 완전히 염색되지 않으면 DMD로, 16세까지도 독립보행이 가능하거나 면역조직학적 검사상 디스트로핀이 부분적이거나 흐린 염색을 보이면 BMD로 분류하였고, 감별하기 어려운 대상들은 비분류군(unclassified)으로 분류하였다.

1) 면역조직학적 검사

항디스트로핀 항체는 clone 13H6(1 mL lyophilized Dystrophin N-terminus)를 사용하였고 VENTANA기계를 사용하였으며 제조회사에서 권고한 대로 1:20으로 희석한 항체를 실온에서 1시간 반응시켰다.

2) 디스트로핀 유전자검사

Multiplex PCR: 검사를 시작할 당시는 primer 포함해서 15개의 exon에 대한 시발체(probe)로 시작하였고 시발체수가 점점 늘어 19개까지 증가하였다. 15개의 시발체로 검사한 환자가 2명, 16개는 2명, 17개는 21명, 18개는 25명, 19개는 4명이었다. Multiplex PCR은 Chamberlain 등⁹⁾과 Begg Ed 등¹⁰⁾의 방법에 근거하였다.

MLPA: 제조회사의 권고대로 시행하였다(MRC Holland, Amsterdam, Netherlands). 20-500 ng DNA를 SALSA probe mix 034(DMD exons 1-10, 21-30, 41-50, 61-70)와 035(DMD exons 11-20, 31-40, 51-60, 71-79)를 섞어 60°C에서 변성(denature)과 부합(hybridization)시켰다. 그 후 54°C에서 15분간 ligase 65를 가지고 처리한 다음 5분간 98°C 항온처리(incubation)시켜 반응을 멈추게 했다. PCR 증폭은 SALSAFAM PCR primer를 가지고 시행했고 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer에서 전기

영동 시킨 후 GeneScan 3.7 Software를 가지고 얻어진 자료를 분석하였다.

또한 frame 유지여부에 따른 임상 표현형의 일치율을 구해보았다. 우선 GenBank에서 디스트로핀 mRNA의 각각 exon의 염기서열을 참조하여 각각의 exon의 마지막 코돈이 triplet 중 몇 번째 코돈인지를 조사하였다¹¹⁾. 시작 코돈은 Kozak consensus를 고려해 결정하였다¹²⁾(Fig. 1).

그 후 multiplex PCR로 결손이 발견된 환자 중 결손의 시작과 끝을 명확하게 알 수 있으며 임상표현형이 분명한 10명의 환자와 MLPA로 결손을 발견한 임상표현형이 분명한 11명의 환자를 대상으로 in frame인지 out of frame인지 결정한 후 임상표현형과의 일치율을 구해보았다.

결 과

대상 증례들의 연령분포는 1-32세였고, 평균 연령은 11세였다. 대상군의 분류별 분포는 DMD 58명, BMD 13명, 비분류군 19명, DMD/BMD carrier 3명이었다.

증상이 처음 발견된 연령은 평균 4.7±3.2세(1-17세)였고 첫 증상은 보행장애가 46명(49%), 간효소 상승이 우연히 발견된 경우가 35명(37%), 사지위약

(A) The RNA sequencing of Dystrophine gene

```

1 tctggcatcagttactgtgtgactcactcagtgatggatcactcacttctccocctac
61 aggactcagatctggaggcaattacctcggagaaaacgaaataggaaaactgaagt g
121 ttacttttttaagctgctgaagttgtgtgttctcattgttttaagcctactgaag
181 caataaagtttgaagaactttaccaggttttttatcgcctgacatatacactttt
241 caaa/atg/ctt/tgg/tgg/gaa/gaa/gta/gag/gac/tgt/tat/gaa/aga/gaa/gat/gtt/caa/aag/aa
301 a/aca/ttc/aca/aaa/tgg/gta/aat/gca/caa/ttt/tct/aag/ttt/ggg/aag/cag/cat/att/gaa/aa
361 c/ctc/ttc/agt/gac/cta/cag/gat/ggg/agg/cgc/ctc/cta/gac/ctc/ctc/gaa/ggc/ctg/aca/gg
421 g/caa/aaa/ctg/cca/aaa/gaa/aaa/gga/tcc/aca/aga/gtt/cat/gcc/ctg/aac/aat/gtc/aac/aa
481 g/gca/ctg/cgg/gtt/ttg/cag/aac/aat/aat/gtt/gat/ta/gtg/aat/att/gga/agt/act/gac/at
    ⋮
    
```

(B) The position of RNA Sequencing of the each exon

exon1=1-275, exon2=276-337, exon3=338-430, exon4=431-508, exon5=509-601
⋮

(C) Kozak consensus and Start codon

Kozak consensus : GCC GCC ACC ATG G
G
Exon 1 : CTT TCC AAA ATG C

(D) The position of the last codon of each exon

exon	position	exon	position	exon	position	exon	position
1	1	21	1	41	3	61	1
2	3	22	3	42	3	62	2
3	3	23	3	43	2	63	1
4	3	24	3	44	3	64	1
5	3	25	3	45	2	65	2
6	2	26	3	46	3	66	1
7	1	27	3	47	3	67	3
8	3	28	3	48	3	68	2
9	3	29	3	49	3	69	3
10	3	30	3	50	1	70	2
11	2	31	3	51	3	71	2
12	3	32	3	52	1	72	2
13	3	33	3	53	3	73	2
14	3	34	3	54	2	74	2
15	3	35	3	55	3	75	3
16	3	36	3	56	2	76	1
17	2	37	3	57	3	77	1
18	3	38	3	58	1	78	3
19	1	39	3	59	3	79	3
20	3	40	3	60	3		

(E) in frame vs out of frame

ex) deletion exon 13-15 :/123 ⇔ 3/..... : out of frame
deletion exon 12-43 :/123 ⇔ 123/..... : in frame

Fig. 1. The method of Differentiation : in frame vs out of frame.

이 3명(3%), 나머지 9명은 알 수 없었다. 각 분류에 따른 첫 증상과 증상 발현된 나이는 Table 1과 같았다. 또한 각 분류에 따른 임상양상은 Table 2와 같다.

의무기록상 가족력을 알 수 있었던 74명 중 12명(16%)이 가족력을 가지고 있었다.

진단시 혈청 CK는 평균 $14,758 \pm 11,792(633-61,349)$ IU/L 이었고 DMD에서는 $18,402 \pm 12,117(633-61,349)$ IU/L, BMD에서는 $6,675 \pm 6,414(814-17,898)$ IU/L, 비분류군에서는 $11,103 \pm 9,032(2,623-39,549)$ IU/L, DMD/BMD carrier는 $1,281 \pm 637(718-1,974)$ IU/L이었다.

근전도와 신경전도속도검사를 시행한 DMD 45명 중 37명(82%)에서 근육질환을 시사하는 소견을 보였고 8명(17%)은 정상소견을 보였으며 근전도와 신경전도속도검사를 시행한 BMD 10명 중 9명(90%)이 근육질환을 시사하는 소견을, 나머지 1명(10%)은 정상소견을 보였다. 비분류군 13명 중 12명(92%)이 근육질환을 시사하는 소견을, 1명(8%)이 정상소

견을 보였고 carrier 2명은 모두 근육질환을 시사하는 소견을 보였다. 근전도와 신경전도속도검사서 근육질환을 시사하는 소견을 보인 환자의 연령분포는 1-12세(4.7 ± 2.6)이었고 정상소견을 보인 환자의 연령분포는 1-3세(2.0 ± 0.94)였다.

근육 생검을 한 75명에서 근섬유의 괴사 및 재생, 근섬유 크기의 다양화, 근세포 내부의 핵, 간질의 섬유화, 염증세포 침윤 등이 관찰되었으며 clone 13H6 (N-terminus)를 사용하여 DMD 48명과 BMD 10명에서 면역조직화학염색을 시행하였는데 DMD에서는 48명 모두 디스트로핀이 발현되지 않았으며 BMD에서는 10명 모두 불완전/부분적으로 발현되었다.

디스트로핀 유전자 검사는 54명에서 multiplex PCR로 시행했으며 결과는 Table 3 과 같고, 14명에서 MLPA로 시행하였으며 결과는 Table 4와 같다.

Multiplex PCR을 시행한 54명 중 28명(51%)에서 결손이 발견되었고 MLPA를 시행한 14명 중 13명(92%)에서 결손이 발견되었다. MLPA 검사를 통해

Table 1. The First Symptom and Manifestation Age

	Gait disturbance		Extremity weakness		Liver enzyme elevation		Unknown	
	N	Age	N	Age	N	Age	N	Age
DMD	30	1-8(5.1 ± 3.5)	3	4	20	1-7(2.6 ± 1.7)	5	
BMD	4	4-17(10.5 ± 9.1)	0		8	1-9(6.1 ± 2.6)	1	
unclassified	12	2-15(5.8 ± 4)	0		4	1-8(4.5 ± 3.1)	3	
Carrier	0		0		3	8-10(9 ± 1)	0	

Abbreviations : DMD, duchenne muscular dystrophy; BMD, becker muscular dystrophy

Table 2. The Clinical Feature of each Type

	Gower sign(+)	Family history(+)	CK at diagnosis	Myopathy at EMG & NCV	Dystrophin deletion(+)
DMD(N=58)	31/45*	7/53*	$18,402 \pm 12,117$ IU/L	37/45 [†] (82%)	24/45 [†] (53%)
BMD(N=13)	2/10*	1/5*	$6,675 \pm 6,414$ IU/L	9/10 [†] (90%)	9/11 [†] (81%)
Unclassified(N=19)	11/14*	2/13*	$11,103 \pm 9,032$ IU/L	13/14 [†] (92%)	9/9 [†] (100%)
Carrier(N=3)	0/3*	2/3*	$1,281 \pm 637$ IU/L	2/2 [†] (100%)	2/3 [†] (66%)
Total(N=93)	44/72*	12/74*	$14,758 \pm 11,792$ IU/L	61/71 [†] (85%)	44/68 [†] (64%)

Abbreviations : DMD, duchenne muscular dystrophy; BMD, becker muscular dystrophy

*The number of positive patients/the number of all recorded patients

[†]The number of positive patients/the number of all tested patients

exon 3-7, exon 10-13의 이형접합 결손(heterozygote deletion)을 발견할 수 있었다.

Frame 유지여부에 따른 임상 표현형의 일치율은 95%였는데, exon 48-51 결손을 가진 한명의 환자에서만 불일치를 보였고 나머지에서는 frame 유지 여부와 임상표현형이 일치하였다(Table 5).

고 찰

디스트로핀 유전자는 약 240만 bp이고 79개의

exon으로 이루어져 있으며 X 염색체의 약 1%를 차지한다^{13, 14)}. 이 유전자는 디스트로핀 단백을 코드하는데 이 단백질은 근세포막을 유지하는 중요한 역할을 하고 있다. 디스트로핀 단백질은 근육세포내 횡문근형 질막하부위에 존재하는 427 kDa 크기의 단백질로서 3,685개의 아미노산으로 이루어져 있고 아미노 말단부위(amino terminal domain), 중간막대부위(mid rod domain), 시스틴이 풍부한 부위(cystein-rich domain) 및 카르복시 말단부위(carboxy terminal domain)로 구성된다. 아미노 말단부위와 중간막대

Table 3. The Distribution of Exon Deletion by Multiplex PCR for Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy, Becker Muscular Dystrophy, Unclassified

DMD	N(37)	BMD	N(7)	unclassified	N(9)	Carrier	N(1)
45, 47, 48, 50	3	45, 47	1	43	2	-	1
46, 47, 48	2	45, 46, 47	1	46	1		
48, 50	1	45, 46, 47, 48	1	45, 47	1		
44	1	45, 46, 47, 48, 50, 51	1	50, 51, 52	1		
45, 46, 47, 48	1	45, 47, 48, 50, 51, 52	1	51	1		
48, 50, 51	1	-	2	52	1		
51	1			60	1		
8, 13	1			12, 13, 17, 19	1		
8, 13, 17, 19	1			-	0		
13	1						
19	1						
-	23						

Abbreviations : DMD, duchenne muscular dystrophy; BMD, becker muscular dystrophy
[†]Bold is Hot spot(exon 44-55)

Table 4. The Distribution of Exon Deletion by MLPA for Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy, Becker Muscular Dystrophy, Unclassified

DMD	N(8)	BMD	N(4)	unclassified	N(0)	carrier	N(2)
44	1	45-47	1	-	0	3-7*	1
52	1	45-48	1			10-13*	1
52-54	1	45-53	1			-	0
38-43	1	45-55	1				
62	1	-	0				
66	1						
3-11	1						
-	1						

Abbreviations : DMD, duchenne muscular dystrophy; BMD, becker muscular dystrophy
^{*}Heterozygote Deletion
[†]Bold is Hot spot(exon44-55)

Table. 5 The Correlation of Frame and Phenotype

DMD			BMD		
Deletion	N(14)	Type of frame	Deletion	N(7)	Type of frame
45-50	3	out of frame	45-47	3	in frame
44	2	out of frame	45-48	1	in frame
48-50	1	out of frame	45-51	1	in frame
48-51	1	in frame	45-53	1	in frame
38-43	1	out of frame	45-55	1	in frame
51	1	out of frame			
52	1	out of frame			
52-54	1	out of frame			
62	1	out of frame			
66	1	out of frame			
3-11	1	out of frame			

Abbreviations : DMD, duchenne muscular dystrophy; BMD, becker muscular dystrophy

부위는 actin과 상호작용하며 시스틴이 풍부한 부위 및 카르복시 말단부위는 β -dystroglycan과 상호작용하여 결합하게 된다^{15, 16)}.

본 연구에서 첫 임상 증상을 분석해 보면 이중 35명(37%)이 우연히 발견된 AST/ALT의 상승이었다. 따라서 간효소 수치의 지속적인 증가가 있을 때는 근이영양증의 가능성을 고려하고 선별검사로 혈청 CK 검사를 시행하는 것이 필요하리라 사료된다.

DMD/BMD에서 혈청 CK치는 약 3세 정도에서 최고치를 보이고 이후 점차 감소되는 것으로 알려져 있으며¹⁷⁾ DMD의 경우 정상 상한치의 10배 가까이, 그리고 BMD는 50배 이상 증가되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 본 환자군에서도 이와 유사한 결과를 보였으나 임상 양상의 중증도와 혈청 CK치가 비례하지는 않았다.

본 연구의 대상 중, 유전자 이상 및 근조직 검사에서 진단되었으나 근전도와 신경전달속도검사에서 정상 소견을 보인 환자가 10명이었으며 연령분포는 1-3세(2±0.94)였다. 이는 어린 나이에서는 근이영양증이 있더라도 근전도와 신경전달속도검사에서 정상소견을 보일 수 있으므로 이들 검사 결과가 정상이라도 근이영양증을 배제할 수 없음을 시사한다.

디스트로핀 유전자 결손은 두 곳의 hot spot이 있

는데 5' 끝부분에서 500 kb 이내에 위치한 최초 20개의 exon부위와 첫번째 exon으로부터 1,200 kb위치인 exon 44번과 exon 55번 사이에 있다. 이중에서도 1,200 kb 위치인 유전자 중간부위에서 결손 빈도가 가장 높다고 보고되고 있다¹⁹⁾. Park 등²⁰⁾의 연구에 의하면 multiplex PCR로 발견된 결손 중 80%가 exon 44번과 exon 54번 사이에서 발견되었고 본원의 환자에서도 결손이 발견된 43명 중 27명(62%)이 exon 44번에서 exon 55번 사이에서 결손이 있었다. multiplex PCR로 시행한 검사에서는 hot spot을 중심으로 시발체를 만들었기 때문에 빈도가 더 높게 나타난 것일 수도 있지만 본원에서 MLPA를 시행하여 결손이 발견된 13명중 7명(53%)도 exon 44번에서 exon 55번 사이에 결손이 있었다.

디스트로핀 유전자 결손 후에도 reading frame이 유지되는지 여부에 따라 DMD와 BMD가 결정된다는 이론은 여러 연구에서 연관성을 보여주나 in frame인 경우에도 DMD의 임상형을 보일 수 있으며 out of frame인 경우에도 BMD가 되는 예외적인 상황들이 많이 보고되어 결손을 가지고 DMD인지, BMD인지를 예상하기에는 한계가 있다. 하지만 frame에 따른 임상 표현형의 일치율이 높다면 진단 시, 임상 증상이 나타나기 전의 조기 진단시에도 디스트로핀 유전자 검사를 통해 환자의 예후를 어느

정도는 예상할 수 있으며 현재 연구중인 exon skipping을 이용한 치료²¹⁾(out of frame인 경우 anti-sense oligonucleotide를 이용하여 in frame으로 바꾸어 임상 표현형을 가볍게 하려는 시도)가 임상에 적용될 때도 유용하게 이용될 수 있겠다. 현재 디스트로핀 유전자에 대한 염기서열분석이 끝난 상태이므로 exon 결손위치를 알면 in frame 또는 out of frame 여부를 알 수 있다(Fig. 1). 또한 본원에서도 높은 빈도의 결손을 보이는 exon에 대해서만 결손 유무를 알 수 있었던 multiplex PCR검사를 대체하여 79개의 exon의 결손유무를 알 수 있는 MLPA가 상용화되어 검사를 시행한 모든 환자에서 결손의 시작과 끝을 명확하게 알 수 있게 되었다. 이를 이용하여 구한 frame 유지여부와 임상표현형의 일치율은 95%로 이전에 Koenig 등⁹⁾이 발표한 92%보다 높았다. 하지만 소수의 환자를 대상으로 하였으므로, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하겠다. 또한 아미노 말단부위의 in frame 결손 환자에서 심한 임상 표현형을 보이는 것은 Glen 등²²⁾에 의한 연구에서 보인 바와 같이 actin과 결합하는 아미노 말단부위의 영역이 골격근의 수축성의 유지와 근섬유의 피사로부터의 보호에 있어 중요한 기능을 담당하기 때문이라고 생각되는데, 본 연구에서 아미노 말단부위 결실을 보인 환자는 out of frame mutation을 보여 일치율에 영향을 주지 않았다.

동일한 exon 결손을 보이는 환자들에게서도 임상적으로 그 표현형의 중증도가 다양하게 나타나기 때문에 임상 표현형을 결정하는 요인으로 exon 결손 부위뿐만 아니라 다른 요인이 있을 것으로 추론되지만²³⁾ 본 연구에서 보인 비교적 높은 임상형과의 일치율을 고려한다면, 침습적인 근육생검을 대신하여 MLPA를 통한 임상형의 예측도 어느 정도 가능하리라 예상된다.

본 연구에서 3명의 carrier가 포함되어 있는데 그 중 1명은 남동생이 DMD로 진단되었고 환아가 간 수치와 혈청 CK가 상승되어 있어 carrier가 의심되었지만 multiplex PCR로 검사하였을 때는 결손을 발견할 수 없었다. 그러나 최근에 MLPA를 이용한 검사가 가능해지면서, 간 수치가 증가한 다른 두 여

자 환자에서 exon 3-7, exon 10-13의 이형접합 결손(heterozygote deletion)을 발견할 수 있었다. 이처럼 MLPA는 여성에서의 이형접합 결손을 발견하여 보인자를 진단할 수 있는 장점이 있으며, DMD 유전자 변이의 약 30%가 “de novo” 변이로 알려져 있으므로, 남자 환자를 진단하였을 때 어머니의 carrier 여부를 확인하는 것이 유전상담에 있어 중요하겠²⁴⁾.

현재 결손이나 중복 이외의 미세병변 검출목적으로 single-strand conformation polymorphism (SSCP), heteroduplex analysis, protein truncation test(PTT), chemical mismatch cleavage(CMC), denaturing electrophoresis(DGGE) 등이 개발되어 상용화되지는 못하지만 사용 중이다^{25, 26)}.

본 연구의 대상 환자군에서 카르복시 말단부위에 대한 항체를 이용한 면역조직검사상 DMD 환자에서는 모두 염색되지 않았으며 BMD 환자에서는 카르복시 말단부위의 결손이 없음에도 불구하고 모두에서는 부분적이거나 흐린 염색을 보였다. 면역조직학적 검사는 민감도와 특이도가 높은 검사로서 사용할 수 있는 항 디스트로핀 항체는 여러가지가 있으며 각각의 항체는 아미노 말단부위, 중간막대부위, 시스틴이 풍부한 부위, 카르복시 말단부위 등 단백질의 각각의 부위를 인지할 수 있도록 만들어졌다²⁷⁾. 정상 근육은 모든 항 디스트로핀 항체에 대해 모든 근육섬유의 주위로 연속성을 가지고 염색된다²⁸⁾. 하지만 DMD에서는 디스트로핀이 대부분 생성되지 않으므로 대다수의 경우에 모든 항 디스트로핀 항체에 대해 염색되지 않고 일부에서 아미노 말단부위에 대한 항 디스트로핀 항체를 사용했을 경우에만 드문 드문 염색될 수 있다²⁸⁻³⁰⁾. 이것은 DMD의 경우 reading frame이 벗어나게 되어 디스트로핀이 결손 부위에서 잘리게 되면 그 근위부가 불안정하여 빠르게 퇴화되지만 드물게 근위부가 남아있을 경우 그것들이 염색되어 보이는 것으로 설명할 수 있다^{27, 29-31)}. BMD의 경우는 불안정한 디스트로핀 단백을 가지고 있으므로, 대다수에서 고르지 못하게 염색되거나 희미하게 염색되거나 끊어진 염색양상을 보이기도 하나^{31, 33)} 결손된 단백질을 인지하는 항디스트로핀

항체를 사용했을 경우는 완전히 염색되지 않을 수도 있다. 또한 거의 정상적인 디스트로핀 염색 양상을 보이는 경우도 있어 면역조직검사만으로 BMD를 진단하는 것이 곤란한 경우도 있다³⁴⁾.

Francesco 등²⁷⁾은 BMD 환아에서 생김한 근육조직을 영하 30도에서 보관할 경우 2-12개월 후부터는 면역염색강도가 서서히 흐려지는 것을 보고하였다. 이것은 reading frame이 보존될 경우 만들어진 분자량이 작거나, 비정상적인 디스트로핀이 기능적인 문제뿐만 아니라 불안정성을 가진다는 것을 의미하며 특히 결손부위부터 그 원위부까지가 불안정함을 의미한다. 또한 이들의 연구에서 결손양상으로 보면 frame을 벗어나지만 임상양상이 BMD인 환아 1명과 intermediate인 환아 1명에서 카르복시 말단부위 인지 항체에 의해 디스트로핀이 염색되는 것을 확인하였다. 이것 역시 frame을 벗어난 결손도 어떤 이유로 결손 원위부가 합성되게 되면 BMD가 될 수 있고 frame을 유지하더라도 결손부위에 의해 디스트로핀 단백질의 불안정성이 심해지면 DMD가 될 수 있다는 가설을 뒷받침한다.

DMD/BMD 근이영양증 환아에서 여러 진단 방법이 발전하고 상용화되어 현재는 근생검을 통한 면역조직학적검사와 말초혈액을 이용한 디스트로핀 유전자검사가 유용하게 사용되고 있다. 면역조직학적 검사는 민감도와 특이도가 높고 특히 DMD/BMD의 감별에도 유용한 장점이 있지만 침습적인 검사라는 단점을 가지고 있다. 현재 상용화된 MLPA를 통한 디스트로핀 유전자 검사는 점돌연변이, 다형성, 소변이 등은 발견하지 못하므로 이런 환자에서는 진단을 위해 침습적인 방법이라도 근육생검이 필요하다. 하지만 DMD/BMD 환아의 60-65%에서는 MLPA에서 발견할 수 있는 결손을 가지고 있고, 검사자체가 비침습적 진단방법이어서 진단적 유용성이 크다. 또한 frame 유지여부에 따른 DMD/BMD의 예상이 비록 소수에서 이루어진 연구지만 95%의 일치율을 보였으므로 결손을 가진 환자에서는 MLPA만으로도 진단과 DMD/BMD의 감별에 있어 임상적으로 유용할 것으로 보인다. 또한 앞에서 언급했던 것처럼 MLPA를 통한 DMD/BMD carrier의 발견은 유전

상담에 있어 도움을 줄 수 있겠다.

요 약

목적 : 본원에서 Duchenne 및 Becker 근이영양증(DMD/BMD)으로 진단된 환자에서 임상양상과 multiplex PCR 또는 MLPA를 이용한 디스트로핀 유전자 결손, 면역조직화학 염색에 의한 디스트로핀 발현을 조사하여 각 임상형의 특징과 각 검사의 진단적 유용성에 대해 고찰해 보았다.

방법 : 1989년 6월부터 2008년 12월까지 서울아산병원에서 진단시 혈청 Creatinine Kinase(CK) 증가가 있고 근육질환의 임상소견을 보이는 환자에서 조직학적 소견 또는 디스트로핀 유전자 검사소견이 DMD/BMD에 부합되는 93명을 대상으로 의무기록을 후향적으로 분석하였다. 성별, 나이, 첫 임상증상의 종류와 발병 연령, 진단시 Gower sign 유무, 가축력, 진단시 혈청 CK 수치, 근전도 및 신경전달속도검사, 대퇴근의 근육생검 및 면역조직학적 검사, 말초혈액을 이용한 디스트로핀 유전자 검사(multiplex PCR 또는 MLPA)를 조사하였다. 또한 frame 유지여부와 임상표현형의 일치율을 구해 보았다.

결과 : DMD 58명, BMD 13명, 비분류군(unclassified) 19명, DMD/BMD carrier 3명이었다. 증상이 처음 발견된 연령은 평균 4.7±3.2세(1-17세)였고 첫 증상은 보행장애가 46명(49%)으로 가장 많았고 간효소 상승이 우연히 발견된 경우가 35명(37%)으로 두번째로 많았다. 진단시 혈청 CK는 평균 14,758±11,792(633-61,349) IU/L이었고 DMD에서는 18,402±12,117(633-61,349) IU/L, BMD에서는 6,675±6,414(814-17,898) IU/L, unclassified에서는 11,103±9,032(2,623-39,549)IU/L, PMD carrier는 1,281±637(718-1,974),IU/L이었다. 근육 생검을 한 75명중 clone 13H6(N-terminus)를 사용하여 DMD 48명과 BMD 10명에서 면역조직화학염색을 시행하였는데 DMD에서는 48명 모두 디스트로핀이 발현되지 않았으며 BMD에서는 10명 모두 불완전/부분적으로 발현되었다. Multiplex PCR을 시행한 54명중 28명(51%)에서 결손이 발견되었고 MLPA를 시

행한 14명 중 13명(92%)에서 결손이 발견되었고 이 중 2명은 이형접합결손이었다. Frame 유지여부와 임상표현형의 일치율은 95%를 보였다.

결론 : multiplex PCR를 시행한 10명의 환자와 MLPA를 시행한 11명의 환자를 대상으로 frame 유지여부와 임상표현형과의 일치율을 구해보았는데 일치율은 95%로 높았다. 대상군이 적어 추가적인 연구가 필요할 것으로 보이지만 MLPA를 통해 in frame과 out of frame을 결정한 후 DMD/BMD를 예상하는 것은 근육생검을 시행하지 않는 환자에 있어서는 임상적으로 유용하겠다. 또한 MLPA를 통한 carrier의 진단이 유전상담에 있어 큰 도움이 되겠다.

References

- 1) Smith SA, Swaiman KF. Muscular dystrophy. In : Swaiman KF, Ashwal S. Pediatric neurology. 3rd ed. St. Louis : Mosby Inc, 1999: 1235-56.
- 2) Hoffman E, Brown RJ, Kunkel L. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987;51:919-28.
- 3) Asano J, Tomatsu S, Sukegawa K, Ikedo Y, Minami R, Iida M, et al. Gene deletions in Japanese patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies: deletion study and carrier detection. Clin Genet 1991;39:419-24.
- 4) Monaco A, Bertelson C, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel L. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 1988;2:90-5.
- 5) Han SK, Kim JW, Son BK. Mutation Analysis of the Dystrophin Gene by Application of PCR in Duchenne Muscular Dystrophy. J Korean Neurol Assoc 2000;8:221-30.
- 6) Kim SY, Lee KW, Cha JI. Immunohistochemical Staining with Anti-Torpedo Dystrophin Antibody in Duchenne Type Muscular Dystrophy. J Korean Neurol Assoc 1993;11:68-77.
- 7) Kim DS, Park KH, Nam SO. Significance of Immunohistochemical Study in Patients with Muscular Dystrophy. J Korean Neurol Assoc 2004;22:613-22.
- 8) Emery AEH. Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders. 2nd ed. London: RSM press. 1997:1-26.
- 9) Chamberlain JC, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey PN. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In : Innes MA, Geifand DH, Sninski JJ, White TJ. Edotors. PCR protocols, San Diego : Academic press, 1990:272-81.
- 10) Beggs A, Koenig M, Boyce F, Kunkel L. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet 1990;86:45-8.
- 11) Koenig M, Beggs A, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet 1989;45: 498-506.
- 12) Malhotra S, Hart K, Klamut H, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, et al. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. Science 1988;242: 755-9.
- 13) Den DJ, Grootsholten P, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. Am J Hum Genet 1989;45:835-47.
- 14) Roberts R, Coffey A, Bobrow M, Bentley D. Exon structure of the human dystrophin gene. Genomics 1993;16:536-8.
- 15) Ervasti J, Campbell K. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. Cell 1991;66:1121-31.
- 16) Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. J Biochem 1990;108:748-52.
- 17) Brooke M, Fenichel G, Griggs R, Mendell JR, Moxley R, Miller JP, et al. Clinical investigation in Duchenne dystrophy: 2. Determination of the "power" of therapeutic trials based on the natural history. Muscle Nerve 1983;6:91-103.
- 18) Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Serum creatine kinase in progressive muscular dystrophy. In: Bushby KMD, Anderson LVB. Muscular dystrophy. Methods and protocols

- 1st ed. Totowa: Humana Press. 2001:31-49
- 19) Imoto N, Arinami T, Hamano K, Matsumura K, Yamada H, Hamaguchi H, et al. Topographic pattern of the rearrangement of the dystrophin gene in Japanese Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1993;92:533-6.
- 20) Park SY, Koh KN, Lim BC, Kang HS, Lee KY, Hwang H, et al. Molecular Genetic Analysis of Dystrophin Gene in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *J Korean Child Neurol Soc* 2004;12:50-8.
- 21) Viliet LV, Winter CL, Deutekom JC, Ommen GB, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2008;9:105.
- 22) Banks G, Gregorevic P, Allen J, Finn E, Chamberlain J. Functional capacity of dystrophins carrying deletions in the N-terminal actin-binding domain. *Hum Mol Genet* 2007;16:2105-13.
- 23) Gangopadhyay S, Sherratt T, Heckmatt J, Dubowitz V, Miller G, Shokeir M, et al. Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1992;51:562-70.
- 24) Gatta V, Scarciolla O, Gaspari A, Palka C, De angelis MV, Di Muzio A, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification(MLPA). *Hum Genet* 2005;117:92-8.
- 25) Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 1993;5:111-7.
- 26) Essen A, Kneppers A, Hout A, Scheffner H, Ginjaar IB, Ten Kate LP, et al. The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol. *J Med Genet* 1997;34:805-12.
- 27) Muntoni F, Mateddu A, Cianchetti C, Marrosu MG, Clerk A, Cau M, et al. Dystrophin analysis using a panel of anti-dystrophin antibodies in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:26-31.
- 28) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, et al. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 1988;333:861-3.
- 29) Nicholson L, Davison K, Johnson M, Slater CR, Young C, Bhattacharya S, et al. Dystrophin in skeletal muscle. II. Immunoreactivity in patients with Xp21 muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1989;94:137-46.
- 30) Nicholson L, Johnson M, Gardner-Medwin D, Bhattacharya S, Harris J. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1990;80:239-50.
- 31) Arahata K, Hoffman E, Kunkel L, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, et al. Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7154-8.
- 32) Bulman D, Murphy E, Zubrzycka-Gaarn E, Worton R, Ray P. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino- and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. *Am J Hum Genet* 1991;48:295-304.
- 33) Bonilla E, Samitt C, Miranda A, Hays AP, Salviati G, Dimauro S, et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988;54:447-52.
- 34) Sewry C. Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* 2000;48:142-54.

— 서창덕 외 7인 : Duchenne/Becker 근이영양증에서의 임상적, 면역조직학적 및 유전학적 소견 —

접수: 2009년 3월 16일, 승인: 2009년 4월 21일

책임저자: 고태성, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아청소년과

Tel : 02)3010-3381, Fax : 02)473-3725, E-mail : tsko@amc.seoul.kr