

착상 전 유전진단

김진영¹ · 이형송² · 강인수¹ | 차의과학대학교 강남차병원¹ 여성의학연구소 산부인과, ²유전학연구소

Preimplantation genetic diagnosis

Jin Young Kim, MD¹ · Hyoung-Song Lee, MS² · Inn Soo Kang, MD¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology of Fertility Center, ²Genetics Laboratory of Fertility Center, CHA Gangnam Medical Center, CHA University, Seoul, Korea

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a technique to examine genetic disease or chromosome abnormalities in single cell biopsied from embryos before implantation to uterus. It allows achieving normal pregnancy by transfer of unaffected embryos. The main indications are single gene disorders and recurrent miscarriage related to chromosome aberration and it has advantages to avoid termination of pregnancy or miscarriages in couples with high risk. PGD is also widely applied for aneuploidy screening in assisted reproduction to improve the outcome in infertile patients such as advanced maternal age, although its efficacy still needs to be established. Furthermore, the application of PGD has expanded to other indications, such as late onset-diseases with genetic predisposition and human leukocyte antigen typing for stem cell transplantation. With the advances of molecular diagnostic technologies using single cells, such as fluorescent in situ hybridization, multiplex polymerase chain reaction, fluorescent polymerase chain reaction, linkage analysis, whole genome amplification, array comparative genomic hybridization (array comparative genomic hybridization), and next generation sequencing, PGD can provide more comprehensive and reliable diagnosis.

Key Words: Preimplantation diagnosis; Genetic disorder; Polymerase chain reaction; Comparative genomic hybridization; Next generation sequencing

서론

착상 전 유전진단(preimplantation genetic diagnosis)은 유전질환의 위험이 있는 부부에서 유전병에 이환되지 않은 정상적인 태아를 임신하기 위해 시행되는 방법이다. 기존에는 유전질환이 있는 가계에서 유전병을 피하기 위해서 피임을 하거나, 임신 후 산전진단을 통해 태아의 유전병 여부를 진단하여 이환된 경우 임신중절을 고려할 수밖에 없었다.

산전진단은 임신이 된 후 임신 초기 융모막 융모검사나 임신중기 양수검사를 통해 얻어진 태아세포에서 유전질환이나 염색체 이상을 진단하는 방법이므로, 유전질환 또는 염색체 이상을 가진 태아가 진단될 경우 임신중절을 고려하는 윤리적 문제 및 고통을 겪게 된다. 부부의 염색체 이상이 있는 경우에는 습관성 유산의 원인이 되며, 자연유산이 임신 초기에 발생되므로 산전진단이 불가능하다. 이에 기존 산전진단보다 더 조기에 진단할 수 있는 방법이 필요하다. 착상 전 유전진단은 착상 전 배아에서 유전질환이나 염색체 이상을 진단하여 정상적인 태아의 임신을 성립시키는 방법으로서, 매우 초기 단계의 산전진단으로 볼 수 있다. 그 과정은 체외수정 기술을 시행하여 얻어진 수정란으로부터 할구세포 또는 영양배엽세포를 생검하여 유전진단을 시행하고, 유전적으로 정상인 배아만을 선별적으로 자궁 내에 이식함으로써 정상임신을 시도한다. 착상 전 유전진단은 배아

Received: October 5, 2015 Accepted: October 19, 2015

Corresponding author: Inn Soo Kang
E-mail: ikang67pgd@gmail.com

© Korean Medical Association

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

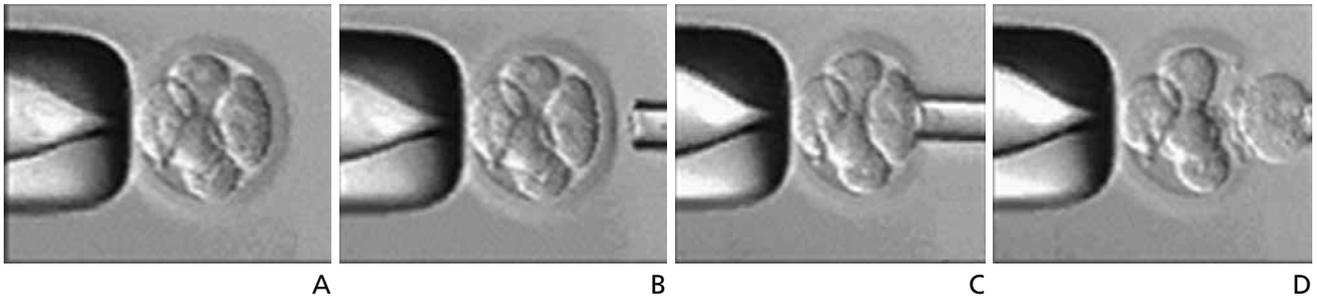


Figure 1. Blastomere biopsy with acid Tyrode's solution or laser in cleavage stage embryo. (A) Position cleavage stage embryo on holding pipette. (B) Zona opening for cleavage stage embryo has been performed by acid Tyrodes or laser. (C,D) Removal of blastomeres by aspiration.

의 초기 발달 단계에 있어 부정형 난할이라는 현상에 기초하며, 즉, 8세포기 정도의 초기 배아로부터는 한 개 내지 두 개의 할구를 떼어내도, 남은 할구세포로부터 정상적으로 온전한 개체가 발생한다는 것이다[1]. 최초의 착상 전 유전진단은 X-연관 열성 유전질환을 가진 가계의 부부에서 정상인이나 보인자가 되는 여아를 진단하여 선택적으로 이식하여 임신에 성공한 예였다[2]. 이후 체외수정 시술(*in vitro* fertilization and embryo transfer)의 발전과, 형광직접조합법(fluorescent in situ hybridization, FISH), 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 등 단일세포에서 진단을 할 수 있는 기법의 발달에 따라 다양한 유전질환에서 착상 전 유전진단의 시행이 확대되어 왔다[3,4]. 본 종설에서는 착상 전 유전진단에 이용되는 진단기법 및 임상적 적용에 대하여 알아본다.

착상 전 유전진단의 방법

1. 체외수정 시술

착상 전 유전진단에서는 수정란을 검사해야 하기 때문에 체외수정 시술을 시행해야 한다. 성선 자극호르몬 효현제 또는 길항제와 성선자극호르몬을 사용하여 과배란 유도하고, 난포가 충분히 성장하면 난자 채취를 한다. 난자와 정자를 수정시킬 때 다른 세포의 유전물질이 혼입되는 것을 막기 위해서 미세조작술로 세포내정자주입술을 시행하여 한 개의 정자만 난자에 넣어 수정을 시도한다. 정상적인 배아 발달과정에서 수정 1일 후 전핵 단계, 제2일에 4세포

기, 제3일에 8세포기, 제4일에 상실기, 제5일에 배반포로 발달하게 된다.

2. 배아 생검방법

먼저 난자나 수정란을 둘러싸고 있는 투명대를 절개하는데 최근에는 레이저 부화술이 가장 널리 사용된다. 이외에 산성 Tyrode 용액을 이용하여 배아의 투명대를 녹이는 방법도 많이 사용된다. 다음단계로 난자나 배아로부터 세포 생검을 한다.

1) 난할 단계 배아의 할구 생검

현재까지 가장 많이 이용되는 방법이다[4]. 수정란의 할구의 밀착이 완전히 일어나면 세포를 분리하기가 어려우므로 수정 3일째(6-10 세포기) 시행한다. 방법은 산성 Tyrode 용액 또는 레이저 부화로 투명대에 구멍을 만든 후에 생검 피펫(pipette)으로 1-2개의 할구를 흡인하여 할구를 분리해 낸다(Figure 1). 이 방법의 단점은 단 1-2개의 세포를 이용하여 진단을 해야 하는 제한이 있고, 배아의 모자이시즘이 있을 수 있다는 점이다.

2) 영양세포외배엽 생검

포배기에 도달하면 내부세포괴와 영양외배엽으로 나뉜다. 영양외배엽은 주로 태반을 형성하며 태아형성에는 직접 관여하지 않으므로 세포를 여러 개 생검해도 태아에게 해를 주지 않는다는 장점이 있으며, 생검되는 세포의 수가 많으므로(10-30 cells) 좀더 정확한 착상 전 유전진단이 가능하다[5]. 발생 5-6일째에 포배기 배아의 부화 전에 내부세포괴의 반대편에 피펫이나 레이저로 투명대에 구멍을 만들어 6-24시간 후 일부 영양세포외배엽이 이탈되면 그 일부

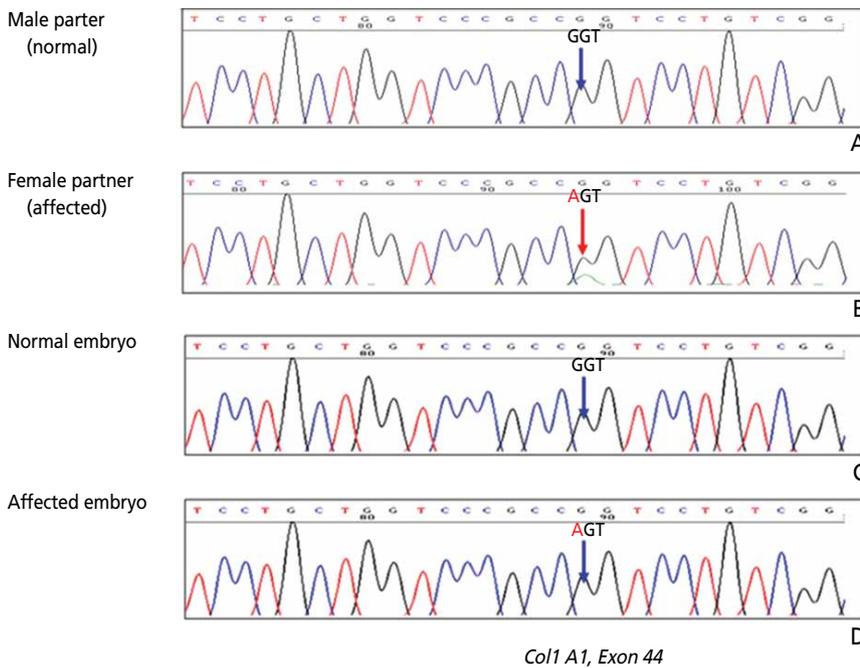


Figure 2. Direct sequencing of the polymerase chain reaction product spanning exon 37 in the preimplantation genetic diagnosis for osteogenesis imperfecta. (A) Normal male partner showing G/G sequence, (B) affected female partner demonstrating heterozygous G>A transition, (C) normal embryo showing G/G sequence, and (D) abnormal embryo showing G/A transition (From Kim MJ, et al. Korean J Reprod Med 2008;35:99-110, according to the Creative Commons license) [13].

를 생검한다. 세포수가 많으므로 더욱 포괄적인 유전진단이 가능하다. 그러나 단점으로는 수정란의 약 36-66%만이 포배기에 도달하므로 진단을 할 수정란이 수적으로 제한된다는 점과[6], 태아와 태반세포 사이에 염색체 상태가 다른 태반 모자이시즘인 경우에는 태반세포와 태아의 유전자 상태가 다를 수 있고, 포배기 배아시식까지 진단시간이 짧다는 점이다. 따라서 생검된 배아를 동결하였다가 이식을 하는 방법도 이용되고 있으며, 초자화 동결방법을 이용하여 생검된 포배기 배아를 동결-융해하여 이식 후 성공적인 임신이 보고되고 있다[7,8].

3) 극체 생검

극체의 염색체나 유전자 상태는 난자의 것과 상호 관련되므로 극체를 생검하여 유전자검사를 시행하면 난자의 상태를 진단할 수 있다[9]. 극체 생검은 유전자 검사 후 이식까지 걸리는 시간에 여유가 있으며, 수정란에 조작을 가하지 않는다는 장점이 있다. 그러나 난자, 즉 모계에서 유래되는 질환에만 적용이 가능하고, 2개의 극체를 모두 얻는데 작업량이 많다는 단점이 있다. 난자를 피펫으로 잡고, 투명대에 레이저

로 예리한 구멍을 만든 후, 얇은 피펫으로 극체를 생검한다.

3. 배아로부터 생검된 단일 세포에서의 유전학적 분석방법

1) 형광직접조합법

염색체의 구조적 이상이나 염색체의 이수성을 진단하기 위해서는 FISH 기법을 이용한다[10]. 각 염색체의 특이 반복서열에 대한 형광 반복서열탐침자를 사용하면 여러 개의 DNA 대한 신호를 동시에 관찰할 수 있다. 휴지기 세포에서 X, Y, 13, 16, 18, 21, 22 등의 염색체를 동시에 진단할 수 있다. 제한점으로는 신호의 판독상의 문제, 사용할 수 있는 색의 제한으로 몇몇 염색체만을 진단할 수 있고, 모자이시즘이 있을 수 있다는 점이다[11].

2) 중합효소연쇄반응 및 관련 기법

단일 유전자 질환에서는 특정 유전자 돌연변이 부위에 대한 PCR로 유전자를 증폭하여 진단한다. Fluorescent primer를 이용한 fluorescent PCR의 도입과 PCR 산물의 fluorescent DNA sequencing 기법을 이용함으로써 진단의 민감도가 증가되었다(Figures 2,3) [12,13].

주의할 점은 1-2개의 세포를 증폭하여 진단을 하게 되므로 다른 세포의 혼입의 문제, 반응의 특이성 문제, 대립유전자탈락의 문제 등이다. 비특이적으로 증폭이 되는 것을 방지하고 정확성을 높이기 위하여 heminested 또는 nested primer를 사용하여 2단계의 PCR을 시행한다. 즉, 첫 단계의 PCR로 일단 증폭한 fragment의 내부에 2단계 시발체들이 결합할 수 있도록 하여 원하는 부위만을 증폭하는 방법으로, 착상 전 유전진단에서 대부분 적용하고 있다[14,15].

한편 이형접합세포의 대립유전자 중 한 대립유전자에서는 많이 증폭이 되고, 다른 대립유전자에서는 약하게 증폭이 일어나는 경우를 선택적 증폭이라고 하며, 선택적 증폭이 극단

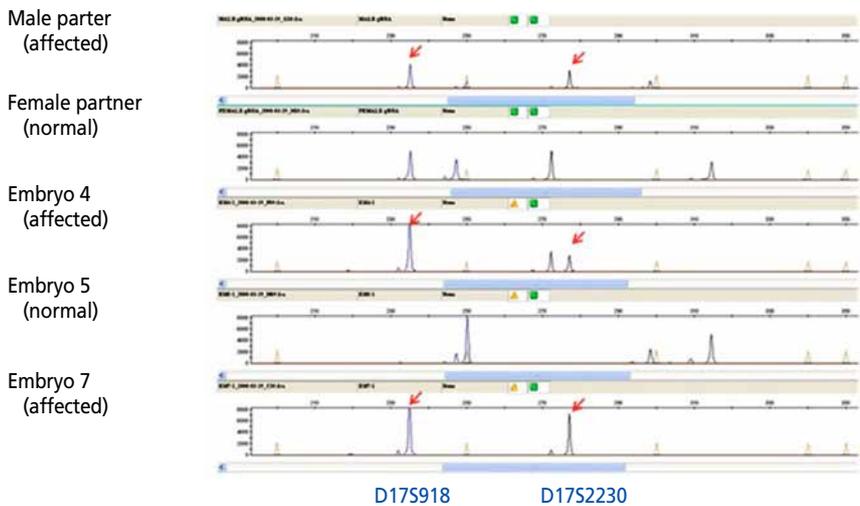


Figure 3. Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease by using duplex nested polymerase chain reaction and multiplex-fluorescent-polymerase chain reaction with linked marker. Arrows indicate polymorphic markers linked with affected allele (From Lee HS, et al. Clin Exp Reprod Med 2013;40:163-168, according to the Creative Commons license) [17].

적으로 되어 한쪽 대립유전자에서만 증폭이 일어나고 다른 쪽에서는 증폭이 거의 안되면 대립유전자 탈락이라고 한다. 대립유전자 탈락률을 줄이기 위하여 할구 2개를 생검하거나, 민감도가 높은 fluorescence PCR과 multiplex PCR 기법이 이용되고 있다[16,17].

(1) 다중 증합효소연쇄반응

PCR 증폭 시 여러 개의 서로 관계없는 시발체 세트를 혼합하여 한번에 PCR을 시행하는 방법으로, 2개 이상의 여러 유전자를 동시에 진단할 수 있다. 이로써 대립유전자 탈락 문제를 해결하는데 도움이 되는데, 병을 유발하는 돌연변이 유전자 및 이와 인접한 linked polymorphic marker를 이용한 연관분석을 시행한다(Figure 3) [16,17].

(2) 형광 증합효소연쇄반응

일반적인 PCR 기법은 정성적인 방법이므로 비슷한 크기의 PCR 산물을 구별할 수 없다. Fluorescent PCR에서는 형광물질이 부착된 형광 올리고 핵산염을 사용하여 증폭시켜 레이저 분석기로 PCR 산물을 감지해 내므로, 민감도가 기존 PCR의 약 1,000배 이상으로 높아서 대립유전자 탈락이나 선택적 증폭 문제를 해결할 수 있다[12,16].

3) 포괄적인 유전진단 방법

(1) 전 유전체 증폭

착상 전 유전진단에서는 1-2개의 할구로부터 얻은 극

소량의 DNA를 이용하므로, 포괄적인 진단을 하기에는 DNA 양이 제한적이다. 이에 DNA 양을 증폭시키기 위해 primer extension preamplification (PEP)-PCR, degenerate oligo-nucleotide primed (DOP)-PCR 등의 whole genome amplification (WGA) 방법들이 개발되었다[18,19]. 이는 PCR 방법을 기반으로 하여 DNA 전체 서열에 무작위적으로 결합하는 random oligonucleotide primer 또는 degenerate oligonucleotide primer를 사용하여 증폭함으로써 극소량의 DNA(약 6 pg/cell)로부터 다량의 DNA

(5-10μg)를 얻을 수 있다[20].

최근에는 기존의 PCR 방법에 기초한 WGA 방법과는 다르게 isothermal 방식을 사용하며, DNA를 변성시킨 후 일정 온도에서 random hexamer primer를 결합시키고 bacteriophage에서 추출한 phi29 DNA polymerase를 이용하여 strand displacement 방법으로 DNA를 합성하는 방법인 multiple displacement amplification (MDA) 방법도 많이 사용되고 있다[21]. 이 외에 genomic DNA를 무작위적으로 자른 후 그 절편들의 양 말단에 universal adaptor를 붙여 library를 만든 후, 이 library를 대상으로 universal primer를 이용하여 증폭하는 OmniPlex 방법도 개발되어 사용되고 있다[22,23]. 현재에는 모든 DNA가 고르게 증폭되지 않는 현상을 보였던 초기 PEP-PCR 또는 DOP-PCR 방법의 WGA 방법보다는 MDA이나 OmniPlex 방법의 WGA 방법들을 많이 사용하고 있다.

(2) Array comparative genomic hybridization and single nucleotide polymorphism array

염색체 이상의 진단 시 FISH 기법은 몇몇 염색체만을 진단할 수 있을 뿐 모든 염색체를 관찰할 수 없는 단점이 있다. 최근 single nucleotide polymorphism (SNP)에 대한 oligonucleotide probe 또는 BAC clone 등을 고정시켜 놓은 수백에서 수만 개의 spot으로 이루어진 microarray chip을

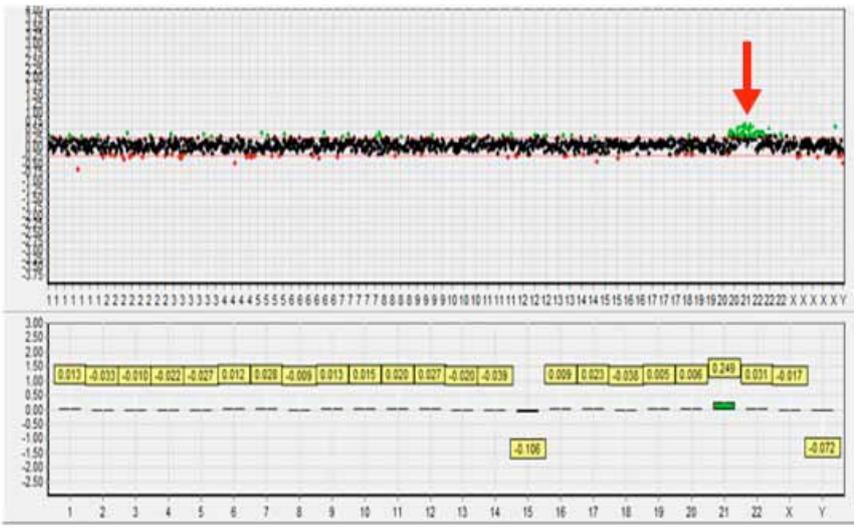


Figure 4. Example of array comparative genomic hybridization based preimplantation genetic diagnosis result from aneuploidy embryos with trisomy 21. Arrow indicates chromosomal imbalance of a shift of the clones towards the green line (gain).

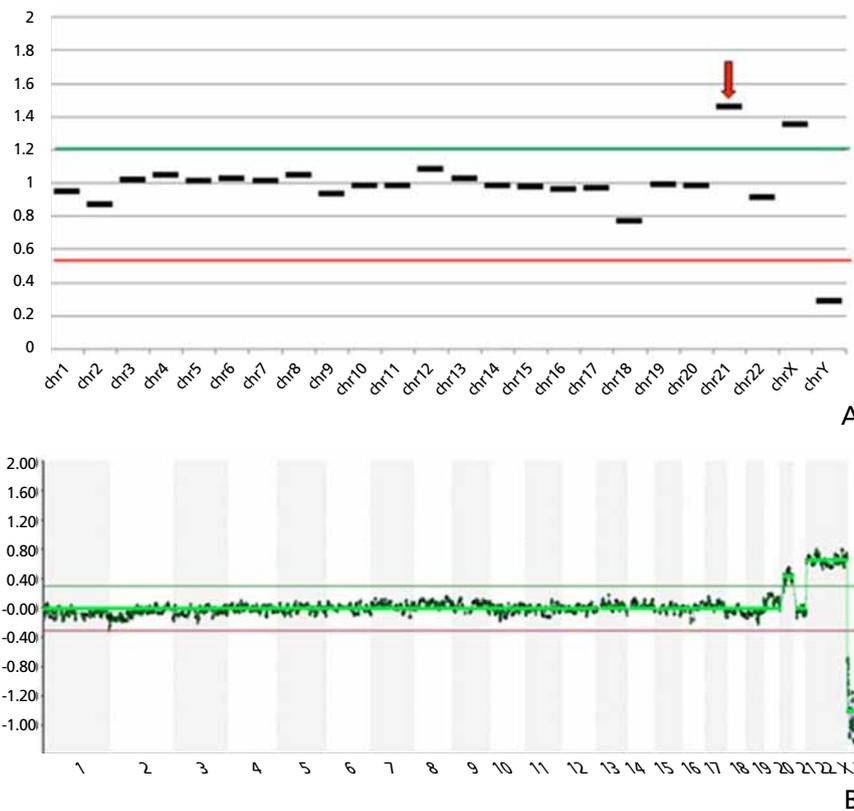


Figure 5. Aneuploidy analysis of cells biopsied from a human blastocyst. (A) Analysis of embryo using next generation sequencing predicting a female trisomic for chromosome 21. (B) Microarray comparative genomic hybridization analysis confirming the next generation sequencing result (From Wells D, et al. J Med Genet 2014;51:553-562, according to the Creative Commons license) [28].

linked polymorphism 을 진단할 수 있고, 동시에 염색체 이수성도 함께 진단할 수 있다[24,25].

전체 염색체 이수성을 진단하는 데에는 array comparative genomic hybridization (CGH) 기법이 많이 이용되는데, microarray chip에 염색체 핵형을 알고 있는 정상 대조군과 시험군의 시료에 서로 다른 형광물질을 부착하여 혼합한 후 경쟁적으로 hybridization 시키면, 발현되는 형광의 차이로 염색체의 gain 또는 loss를 확인한다(Figure 4). Array CGH 방법은 미세결실이나 중복 등의 copy number variation을 진단할 수 있고 모든 염색체의 진단이 가능하므로 매우 효과적이다[26,27].

(3) Next generation sequencing

기존의 염기서열 분석방법인 Sanger sequencing 방법은 높은 정확도를 보이나 비용과 시간이 많이 들고 처리 속도가 늦어 소량의 정보만을 처리한다는 단점이 있다. 이에 비해 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS) 방법은 한번의 플랫폼을 통하여 수십만 내지 수십억 개의 서로 다른 염기서열 분석반응이 동시에 진행되고 단독 가능한 방법으로, 이를 통하여 분석 가능한 유전적 범위가 확대되고 대량의 유전 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다. 이에 최근에는 array CGH 방법보다 더 많은 유전정보를 얻을 수 있고 상대적으로 비용이 저렴한 NGS 방법이 시도되고 있으며, Wells 등[28]은 NGS와 array CGH 방법을 비교하여 정상과 비

정상배아의 진단이 일치함을 보고하였고, 검사한 모든 염색체(1,296개)의 진단 일치율은 99.7%로 조사되었다(Figure

제작하여 포괄적인 유전진단을 적용할 수 있다. SNP array 를 이용하여 단일유전자 질환에서의 돌연변이 진단과 함께

Table 1. Indications of preimplantation genetic diagnosis

Classification	Indication according to the causes of genetic disorders
Chromosome abnormality	Structural abnormality (reciprocal/Robertsonian translocation, inversion, deletion, insertion) Aneuploidy (advanced maternal age, recurrent miscarriage, repeated implantation failure)
Single gene disorder	Autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked
Extended indications	Late onset disease, human leukocyte antigen matching

5). 또한 염색체의 이수성 검사와 동시에 cystic fibrosis의 CFTR ΔF508 돌연변이도 동시에 정확하게 진단하였다. 이처럼 NGS 방법의 사용은 저비용과 빠른 처리속도, 다양한 유전정보의 획득, 그리고 정확성에 있어서 효용성이 있으며, 추후 많은 전향적인 연구가 필요할 것이라 생각된다 [29,30].

착상 전 유전진단의 적응증 및 임상 결과

착상 전 유전진단의 적응증은 크게 단일 유전자 질환과 염색체 이상이다. 염색체 이상에 있어서는 염색체의 구조적 이상(전좌, 역위 등)과 염색체의 이수성 스크리닝을 위해 시행한다(Table 1). 최근에는 Huntington’s disease 등 late onset disease 유전성 종양이나, 줄기세포 이식을 위한 human leukocyte antigen (HLA) matching을 하는 designer baby에 이르기까지 그 적용범위가 확대되고 있다. 유럽생식의학회(European Society for Human Reproduction and Embryology) 산하의 착상 전 유전진단 컨소시엄의 보고에 의하면, 1997년부터 2009년까지 전세계적으로 32,000건이 시행되어 약 6,000여 명의 정상아의 출생이 이루어졌으며, 시행이 증가되고 있다. 착상 전 유전진단을 통해 출생한 아기들에서 건강상 또는 선천기형 발생에 차이는 없는 것으로 보고되었다[4]. 단일 세포를 이용한 기술이므로 진단과정이나 배아의 모자이시즘 등으로 진단오류가 있을 수 있으며, 전반적인 진단오류는 약 2% 정도로 보고되고 있다[4]. 따라서 착상 전 유전진단을 시행하여 임신이 된 경우에는 반드시 산전진단을 시행해야 한다.

1. 단일 유전질환에서의 착상 전 유전진단

단일 유전질환은 유전되는 방식에 따라 크게 상염색체 우성, 상염색체 열성, X-연관 유전으로 분류된다. 최초의 착상 전 유전진단은 상염색체 열성 유전인 cystic fibrosis에서 ΔF508 돌연변이를 진단하여 시행되었다[31]. 한편 우리나라에서는 “생명윤리 및 안전에 관한 법률”에 의거, 배아나 태아를 대상으로 시행할 수 있는 유전자검사를 63종으로 허용하였다가, 2009년 citrullinemia 등 76종을 추가하였고(생명윤리법 제25조 2항, 시행령 제14조), 2011년 15종을 추가하여(보건복지부 고시) 총 154종의 유전질환으로 제한하고 있다(Appendix 1-3). 착상 전 유전진단을 시행하는 경우에는 단일 유전자 이상에 의한 유전 질환인지 정확한 진단이 확립되어야 하며, 정확한 가계도와 가능한 많은 가족 구성원에 대한 유전정보가 필요하다. 다인자성 유전에서는 적용이 불가능하다.

1) 상염색체 우성 유전질환

보통 증상이 심하지 않은 경우가 많고 성장한 후에 서서히 발현되는 경우도 있기 때문에 자녀를 가질 수도 있으며 자녀의 50%가 질환에 이환 된다. 우성 유전에서는 착상 전 유전진단 시에 변이유전자와 정상유전자를 모두 정확히 진단해내야 하므로 오진에 더욱 주의를 요한다. 그 예로 근이영양증, 헌팅톤병, 샤르코-마리-투스, 크루존중후군, 연골무형성증, 마르판중후군, 가족성 선종성폴립증, 신경섬유종증, 골형성부전증, 결절성경화증 등에서 착상 전 유전진단이 시행되고 있다.

2) 상염색체 열성 유전질환

대부분 치명적인 질환이 많으며, 부모로부터 물려받은 유전자가 모두 변이유전자일 때 질환을 나타내는 경우이다. 착상 전 유전진단이 시행된 대표적인 질환들은 낭포성섬유증, 테이-삭스병, 베타-탈라세미아, 레쉬-니한중후군, 척수성 근육위축, 겸상적혈구빈혈, 수포성표피박리증, 부신피질이 영양증, 고셔병, 선천성부신증식증 등이 있다.

3) X-연관 열성 유전질환

변이 유전자가 X 염색체에 존재하는 경우이며 심한 경우는 모두 열성이다. 모친은 증상이 없는 보인자이고 그 아들의 반이 질환에 이환된다. 돌연변이 유전자가 발견되는 경우

도 있지만 정확한 유전정보를 모르는 경우도 있어, 착상 전 유전진단 시 sexing으로 정상 또는 보인자인 여아를 선별하여 이식하기도 한다. 대표적으로 듀센근이양증, 혈우병A, 알포트증후군, 헌터병, 망막색소상피변성증 등에서 착상 전 유전진단이 시행된다.

4) X-연관 우성 유전질환

변이유전자가 X 염색체에 존재하며 보인자인 여아에서도 증상이 나타날 수 있다. 오르니틴 트랜스카바밀라제 결핍증, 알포트증후군 등에서 착상 전 유전진단이 시행된다.

5) 삼핵산 반복서열 질환

특정 유전자와 관련된 3염기의 수가 불안정하게 반복되어 증가되면서 나타나는 질환이다. 각 세대를 내려오면서 반복되는 염기의 수가 증폭되어 대를 이어서 점점 심해진다. Neurological disease와 관련되어 있다. 근긴장성 근이양증, 헌팅톤병, 취약X증후군 등에서 착상 전 유전진단이 시행된다[32].

2. 염색체 이상에서의 착상 전 유전진단

1) 구조적 이상

염색체의 상호전좌, 로벗슨 전좌, 역위 등 구조적 이상은 습관성유산의 약 5-9%에서 나타나는데, 생식세포의 감수분열 과정에서 염색체의 중복이나 결손이 발생하여 불균형 염색체를 갖는 배아가 생성됨으로써 약 80-95%에서 자연유산이 된다. 따라서 착상 전 유전진단으로 정상 염색체를 갖는 배아를 이식함으로써 유산율을 감소시킬 수 있으며, 착상 전 유전진단이 시행되는 대표적인 경우이다[10,33]. 염색체 전좌를 가진 부부에서 FISH를 이용한 착상 전 유전진단 시 정상 배아의 비율은 약 20-25% 정도이며 따라서 자연임신이 시도될 경우 불균형적인 염색체로 인한 높은 유산율을 예상할 수 있다. 착상 전 유전진단 시행 후 자연유산율은 16.7% 정도로 현저히 감소되었다[33,34].

2) 염색체 이수성: preimplantation genetic screening

모체의 나이가 증가할수록 난자 및 배아의 염색체 이수성이 증가되어 임신실패나 자연유산, 태아기형의 위험이 증가된다. 따라서 고령인 경우 자연유산에서 흔히 관련되는 염색체(13,14,15,16,18,21,22, X 및 Y염색체 등)에 대한 착

상 전 유전진단으로 유산율을 감소시키고 착상률을 높일 수 있다[35]. 이처럼 특정 유전질환을 진단하는 경우가 아니라 전반적인 염색체이상을 검사하는 경우는 preimplantation genetic screening으로 표현하기도 한다. 그러나, 고령 환자에서 FISH를 이용한 preimplantation genetic screening 시행 결과 임신율이 더 낮다는 연구도 있어서[36], 불임환자에서 염색체 이수성의 선별을 위한 착상 전 유전진단의 효과에 있어서는 논란이 있다. 그 원인으로 염색체 모자이시즘 및 FISH로 진단되지 않은 다른 염색체 이수성이 관련될 수 있기 때문에, 최근 이를 극복하기 위해 array CGH나 qPCR 기법 등을 이용하여 전체 염색체를 포괄적으로 진단할 수 있는 comprehensive chromosome screening이 시도되고 있다. Scott 등[37]은 trophectoderm 생검과 quantitative real-time PCR기법으로 전체 염색체를 진단하여 임신착상율 66.4%로 일반적 체외수정의 47.9%에 비해 향상되는 결과를 보고하였다.

3. 유전적 소인의 후발성 질환

유전적 소인과 관련된 악성종양에서도 착상 전 유전진단을 시행할 수 있다. 가족성 선종성폴립증, 망막모세포종, BRCA1 및 BRCA2 관련 유전성유방암, 신경섬유종증 같은 암 소인 유전자에 대한 착상 전 유전진단이 시행된 바 있으며, 유전성 암의 발생을 방지할 수 있다[38].

4. 조직적합항원 검사

착상 전 유전진단을 통해 조직적합항원 검사(HLA typing)를 시행하여 줄기세포 공여가 가능하다. Kahraman 등[39]은 Fanconi anemia, sickle cell disease, beta thalassemia 등 단일유전자성 혈액질환이 있는 경우 돌연변이에 대한 착상 전 유전진단을 시행하면서 HLA typing을 시행하고, leukemia 또는 lymphoma에 이환된 환자가 있는 경우에는 HLA typing을 시행하여, 유전자 돌연변이가 없으면서 환자와 조직적합항원이 적합한 수정란을 선택하여 이식하였다. 총 327건의 착상 전 유전진단을 시행하여 62명의 정상적인 둘째 아기가 출생하여 제대혈 줄기세포를 이식함으로써 21명의 환자가 완치되는 결과를 보고하였다.

결론

착상 전 유전진단은 유전병이나 염색체 이상으로 인한 습관성 유산의 위험이 있는 부부에서 유전병을 갖는 태아 및 염색체 이상으로 인한 유산을 예방할 수 있다. Fluorescent PCR을 기반으로 linked polymorphic marker를 함께 분석하는 multiplex PCR로 진단의 정확성이 향상되었으며, 나아가 microarray, array CGH 및 NGS 등, 배아로부터의 채취된 소량의 DNA로 전체 염색체와 유전병을 동시에 신속하고 포괄적으로 진단할 수 있는 기법의 발달로 착상 전 유전진단의 적용이 확대되고 있다.

찾아보기말: 착상전 진단; 유전질환; 종합효소연쇄반응; 비교유전체부합법; 차세대 염기서열분석법

ORCID

Jin Young Kim, <http://orcid.org/0000-0001-5191-5612>

Hyoung-Song Lee, <http://orcid.org/0000-0003-3112-1510>

Inn Soo Kang, <http://orcid.org/0000-0001-8551-3355>

REFERENCES

- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;5:708-714.
- Handside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-770.
- Staessen C, Van Assche E, Joris H, Bonduelle M, Vandervorst M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1999;5:382-389.
- Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, De Rycke M, Moutou C, Pehlivan T, Derks-Smeets IA, Harton G. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod* 2012;27:1887-1911.
- de Boer KA, Catt JW, Jansen RP, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril* 2004;82:295-298.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;69:84-88.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005;84:1628-1636.
- Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT Jr. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril* 2011;96:638-640.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis: Preimplantation Genetics Group. *Fertil Steril* 1996;66:126-129.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000;73:1209-1218.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 2002;4:223-232.
- Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, Trengia V, Caserta D, Bonu MA, Borini A, Baldi M. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 2006;21:670-684.
- Kim MJ, Lee HS, Choi HW, Lim CK, Cho JW, Kim JY, Song IO, Kang IS. Establishment and application of molecular genetic techniques for preimplantation genetic diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Korean J Reprod Med* 2008;35:99-110
- Holding C, Monk M. Diagnosis of beta-thalassaemia by DNA amplification in single blastomeres from mouse preimplantation embryos. *Lancet* 1989;2:532-535.
- Lee HS, Choi HW, Lim CK, Min DM, Byun HK, Kim JY, Koong MK, Yoo HW, Kim SC, Jun JH, Kang IS. Successful preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency, junctional epidermolysis bullosa and lactic acidosis using duplex nested PCR: delivery of healthy baby by specific preimplantation genetic diagnosis for ornithine tran. *Korean J Obstet Gynecol* 2004;47:708-718.
- Dreesen JC, Jacobs LJ, Bras M, Herbergs J, Dumoulin JC, Geraedts JP, Evers JL, Smeets HJ. Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene: a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod* 2000;6:391-396.
- Lee HS, Kim MJ, Ko DS, Jeon EJ, Kim JY, Kang IS. Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Exp Reprod Med* 2013;40:163-168.
- Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5847-5851.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnaclyffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992;13:718-725.
- Handside AH, Robinson MD, Simpson RJ, Omar MB, Shaw MA, Grudzinskas JG, Rutherford A. Isothermal whole genome

- amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod* 2004;10:767-772.
21. Burtlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, Bonnefont JP, Frydman R, Munnich A, Steffann J. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006;12:647-652.
 22. Langmore JP. Rubicon Genomics, Inc. *Pharmacogenomics* 2002;3:557-560.
 23. Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF, Giannola D, Irsula OR, Lasken RS, Latterich M, Makarov V, Oliphant A, Pinter JH, Shen R, Sleptsova I, Ziehler W, Lai E. Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res* 2004;14:901-907.
 24. Treff NR, Su J, Kasabwala N, Tao X, Miller KA, Scott RT Jr. Robust embryo identification using first polar body single nucleotide polymorphism microarray-based DNA fingerprinting. *Fertil Steril* 2010;93:2453-2455.
 25. Hegde MR, Chin EL, Mülle JG, Okou DT, Warren ST, Zwick ME. Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene. *Hum Mutat* 2008;29:1091-1099.
 26. Colls P, Escudero T, Fischer J, Cekleniak NA, Ben-Ozer S, Meyer B, Damien M, Grifo JA, Hershlag A, Munne S. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod Biomed Online* 2012;24:621-629.
 27. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Curr Genomics* 2012;13:463-470.
 28. Wells D, Kaur K, Grifo J, Glassner M, Taylor JC, Fragouli E, Munne S. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J Med Genet* 2014;51:553-562.
 29. Lukaszuk K, Puksza S, Wells D, Cybulska C, Liss J, Plociennik L, Kuczynski W, Zabielska J. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2015;103:1031-1036.
 30. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Michel CE, Minasi MG, Greco E. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014;29:2802-2813.
 31. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992;327:905-909.
 32. Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C, Muntjewerff N, Repping S, SenGupta S, Scriven PN, Traeger-Synodinos J, Vesela K, Wilton L, Sermon KD. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* 2006;21:3-21.
 33. Lim CK, Jun JH, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong MK, Kang IS. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* 2004;24:556-561.
 34. Kim JY, Lim CK, Song IO, Yoo KJ, Yang KM, Han KS, Hur K, Song JH, Jun JH, Min DM, Park SY, Jun JY, Koong MK, Kang IS. Outcome of preimplantation genetic diagnosis for chromosome aneuploidy and genetic disease. *Korean J Fertil Steril* 2002;29:269-278.
 35. Munne S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002;78:234-236.
 36. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.
 37. Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:697-703.
 38. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Ozen S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod Biomed Online* 2002;5:148-155.
 39. Kahraman S, Beyazyurek C, Ekmekci CG. Seven years of experience of preimplantation HLA typing: a clinical overview of 327 cycles. *Reprod Biomed Online* 2011;23:363-371.

Peer Reviewers' Commentary

2014년 우리나라 출생아 수는 약 43만명으로 매년 감소하고 있으며 그 가운데 2%인 9천 여명이 크고 작은 유전병을 가지고 태어나는 것으로 보고되고 있다. 유전성희귀질환 환자로 인한 가정의 고통과 이들을 치료하고 재활하는데 소요되는 사회적 비용은 엄청나다. 유전성 희귀질환은 치료가 거의 불가능하여 출산의 예방이 최우선 방법이다. 시험관아기기술과 유전자 검사 기술이 결합된 '착상전 유전 진단'의 발달로 대물림 유전병을 가진 부부들에게 건강한 2세를 출산할 수 있는 희망을 안겨주고 있다. 본 논문은 착상전 유전진단에 대하여 포괄적으로 기술하여 유전병 없는 건강한 아이를 출산할 수 있는 방법을 이해하는데 그 가치가 크다고 사료된다.

[정리: 편집위원회]

Appendix 1. Genetic disorders that can be diagnosed for genetic test on embryo or fetus

1. Numerical chromosome abnormalities	22. Alport syndrome	43. Pyruvate dehydrogenase deficiency
2. Structural chromosome rearrangements	23. Fabry's-Anderson disease	44. Retinitis pigmentosa
3. Achondroplasia	24. Barth syndrome	45. Retinoblastoma
4. Cystic fibrosis	25. Charcot-Marie-Tooth disease	46. Retinoschisis
5. Haemophilia	26. Coffin-Lowry syndrome	47. Sanfilippo disease
6. Spinal muscular atrophy	27. Congenital adrenal hyperplasia	48. Spinocerebellar ataxia
7. Di George's syndrome	28. Crouzon syndrome	49. Stickler syndrome
8. Epidermolysis bullosa	29. Familial adenomatous polyposis coli	50. Tuberous sclerosis
9. Gaucher's disease	30. Goltz's syndrome	51. Vitamin D resistant rickets
10. Lesch Nyhan syndrome	31. Granulomatous disease	52. Von Hippel-Lindau disease
11. Marfan's syndrome	32. Hunter's syndrome	53. Wiskott-Aldrich syndrome
12. Myotonic dystrophy	33. Huntington's disease	54. Niemann-Pick Disease
13. Ornithine transcarbamylase deficiency	34. Hypohydrotic ectodermal dysplasia	55. Metachromatic Leukodystrophy
14. Polycystic kidney disease	35. Incontinentia pigmenti	56. Hurler syndrome
15. Sickle cell anemia	36. Kennedy's disease	57. Propionic acidemia
16. Tay-Sachs disease	37. Krabbe's disease	58. Methylmalonic acidemia
17. Wilson's disease	38. Lowe syndrome	59. Phenylketonuria
18. Fanconi's anemia	39. Neurofibromatosis	60. Tyrosinemia
19. Bloom syndrome	40. Orofacial-digital syndrome	61. Wolf-Hirschhorn syndrome
20. Adrenoleukodystrophy	41. Osteogenesis imperfecta	62. β -thalassemia
21. Agammaglobulinemia	42. Pelizaeus-Merzbacher disease	63. Muscular dystrophy

Appendix 2. Genetic disorders that can be diagnosed for genetic test on embryo or fetus (extended in 2009)

1. Citrullinemia	26. Ceroid lipofuscinosis or Batten disease	53. Leber retinal congenital amaurosis
2. Crigler-Najjar syndrome	27. Congenital disorder of glycosylation	54. Best disease or Vitelliform macular dystrophy
3. Galactosemia	28. Cosman-cyclic neutropenia	55. Noonan syndrome
4. Glutaric acidemia	29. Cystinosis	56. Norrie disease
5. Glycogen storage disease	30. Denys-Drash syndrome	57. Oculodentodigital dysplasia
6. Hypophosphatasia	31. GM1 gangliosidosis	58. Optic atrophy 1
7. Long chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase deficiency	32. Hallervorden-Spatz disease	59. Periventricular heterotopia
8. Maple syrup urine disease	33. Hydrocephalus: X-linked L1CAM	60. Pfeiffer syndrome
9. Menkes syndrome	34. Hyper IgM syndrome	61. Sacral agenesis syndrome or Currarino syndrome
10. Nonketotic hyperglycinemia	35. Mucopolidosis IV	62. Smith-Lemli-Opitz syndrome
11. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy	36. NEMO immunodeficiency	63. Spindly-epiphyseal dysplasia congenita
12. Severe combined immunodeficiency disorder	37. Pulmonary hypertension	64. Treacher Collins syndrome
13. Wolman disease	38. Actin-Nemaline myopathy	65. Waardenburg syndrome
14. Zellweger peroxisome syndrome	39. Alpha-1 antitrypsin deficiency	66. Hereditary angioedema
15. Ataxia telangiectasia	40. Childhood ataxia with central nervous system hypomyelination	67. Hereditary deafness
16. Mucopolysaccharidosis	41. Congenital Finnish nephrosis	68. Blackfan-Diamond syndrome
17. Osteopetrosis	42. Apert syndrome	69. Hypokalemic periodic paralysis
18. Rett syndrome	43. Choroideremia	70. X-linked ichthyosis: steroid sulfatase deficiency
19. Osteochondroma	44. Cleidocranial dysplasia	71. Congenital harlequin ichthyosis
20. Rhizomelic chondrodysplasia punctata	45. Cockayne syndrome	72. Hereditary lymphedema
21. Albinism	46. Congenital erythropoietic porphyria	73. Pachonychia congenita
22. Alagille syndrome	47. Desmin storage myopathy	74. Pseudohypoparathyroidism
23. Hereditary fructose intolerance or Aldolase A deficiency	48. Epidermolytic hyperkeratosis	75. Baller-Gerold syndrome or Saethre-Chotzen syndrome
24. α -thalassemia	49. Friedreich's ataxia	76. West syndrome
25. Canavan disease	50. Glycine encephalopathy	
	51. Hereditary hemorrhagic telangiectasia	
	52. Hemophagocytic lymphohistiocytosis	

Appendix 3. Genetic disorders that can be diagnosed for genetic test on embryo or fetus (extended in 2011)

77. Diastrophic dysplasia	82. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1	87. Fragile X syndrome
78. Von Willebrand disease	83. Branchio-oto-renal spectrum disorders	88. Loeye-Dietz syndrome
79. Multiple epiphyseal dysplasia	84. Polycystic kidney disease	89. Meckel Gruber syndrome
80. Progressive familial intrahepatic cholestasis 1	85. Congenital central hypoventilation syndrome	90. Hypochondroplasia
81. Ornithine aminotransferase deficiency	86. Mucopolidosis II	91. Pseudoachondroplasia