

한국인 선천성 무홍채증의 임상양상과 분자유전학적 특성

Clinical Features and Molecular Characteristics of Korean Patients with Congenital Aniridia

한인균¹ · 김대희² · 임현택¹

In Kyun Hahn, MD¹, Dae Hee Kim, MD², Hyun Taek Lim, MD, PhD¹

울산대학교 의과대학 서울아산병원 안과학교실¹, 서남대학교 의과대학 명지병원 안과학교실²

Department of Ophthalmology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Myongji Hospital, Seonam University College of Medicine², Goyang, Korea

Purpose: To introduce clinical features and molecular characteristics of Korean patients with congenital aniridia.

Methods: Patients with iris hypoplasia were diagnosed clinically as congenital aniridia and were included in the study. Best corrected visual acuity (BCVA) and associated ocular abnormalities (including severity of iris hypoplasia, nystagmus, keratopathy, and foveal hypoplasia), and findings in optical coherence tomography were analyzed. *PAX6* analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), genomic molecular karyotyping, and candidate gene sequencing were performed to detect genetic abnormalities.

Results: 28 patients from 18 families were included in the study. BCVA varied from hand motion to 20/25. No manifest nystagmus was found in 3 patients, but the rest of the patients had pendular horizontal nystagmus. Keratopathy was found in 23 patients, cataracts in 12 patients, and glaucoma in 4 patients. All patients had foveal hypoplasia, including one case with a subtle phenotype. The *PAX6* mutation was detected in 13 families out of 18; 2 (p.Trp162Leufs*38, p.Gly409Arg) were novel, 3 families had the missense mutation, and 3 families had a large deletion in the *PAX6* gene.

Conclusions: This study adds 2 novel *PAX6* mutations related to congenital aniridia to those previously reported. Congenital aniridia is a serious, sight-threatening ocular malformation, but central vision and the degree of iris hypoplasia were highly variable. The *PAX6* mutation was detected in 72% of the patients in this study, and there were no specific clinical features differentiating aniridia with and without *PAX6* mutations.

J Korean Ophthalmol Soc 2016;57(9):1441-1450

Keywords: Aniridia, Foveal hypoplasia, Iris hypoplasia, Mutation, *PAX6*

■ Received: 2016. 6. 16. ■ Revised: 2016. 7. 6.

■ Accepted: 2016. 8. 18.

■ Address reprint requests to Hyun Taek Lim, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Asan Medical Center, #88
Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea
Tel: 82-2-3010-3680, Fax: 82-2-470-6440
E-mail: htlim@amc.seoul.kr

* This study was presented as a narration at the 114th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2015.

선천성 무홍채증(congenital aniridia)은 다양한 정도의 홍채형성저하증을 기본으로, 각막혼탁, 백내장, 녹내장, 황반형성저하증 및 눈떨림 등의 안구 전반에 걸친 다양한 합병증을 동반할 수 있으며, 이로 인하여 실명을 초래할 수 있는 심각한 질환이다.^{1,2} 전 세계적으로 64,000명에서 96,000명만이 이환되어 있는 매우 드문 유전질환으로, 약 2/3의 환자에서는 상염색체우성으로 나타나지만 나머지 1/3에서는 산발적으로 나타난다고 알려져 있다.¹ 드물게 WAGR 증후군(Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, and

mental retardation) 혹은 Gillespie 증후군(aniridia, cerebellar ataxia, and mental retardation)과 같이 눈 이외의 다른 기관의 장애를 동반한 증후군의 일부로 나타나기도 하는데, 대부분의 경우에서 안과질환 단독으로만 나타난다. 이렇게 비증후군성으로 발생하는 무홍채증의 약 40-80%는 *PAX6* 유전자의 이형접합 돌연변이에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.³⁻⁵

Ton이 1991년에 처음으로 *PAX6* 유전자가 무홍채증과 연관이 있는 것으로 보고하였는데, 현재까지도 무홍채증과 연관이 있을 것이라 밝혀진 유일한 유전자로 생각된다.^{6,7} *PAX6* 유전자는 인간 눈의 정상적인 성장 및 발달에 중요한 역할을 하고, 그 외 뇌, 중추신경계, 체장의 발달에도 관련이 있는 것으로 알려진 유전자로, 염색체 11p13에 존재하는 22 kb의 유전체 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA)로, 14개의 엑손(exon)을 포함하며, 422개의 아미노산을 부호화(encode)하고 있다.^{5,8-10} 유전자내 점돌연변이(point mutation)나 *PAX6* 유전자 부근의 큰 염색체의 결손(large chromosomal deletions) 혹은 재배열(rearrangement)이 발생할 경우 무홍채증의 표현형이 발현될 수 있다는 보고들이 있으며,¹¹⁻¹³ 이러한 세포유전자들은 복합결찰의존프로브증폭법(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)으로 발견할 수 있다.¹⁴

하지만 모든 무홍채증 환자들에서 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지는 않는다. 전체 *PAX6* 유전자를 포괄적으로 분석하여도 약 10% 이상의 무홍채증 환자들에서 아무런 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않았으며,^{2,4,6} 이런 환자들의 임상양상이 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견된 무홍채증 환자들의 임상양상보다 경미하다는 보고들이 있었다.^{15,16} 하지만 이를 뒷받침할 충분한 연구가 진행되지 않았으며, *PAX6* 유전자의 돌연변이 유무와 관련된 특이적인 임상양상의 차이가 아직 밝혀지지 않았다.

본 연구의 공동저자(Lim HT)는 한국인 무홍채증 환자 14명을 대상으로 *PAX6* 유전자 돌연변이 유무에 따른 임상양상의 차이를 알아보고자 시행한 연구 결과 두 군 간 유의한 차이가 없음을 보고한 바 있다.¹⁷ 본 연구는 2012년 발표된 기존 연구에 이은 후속 추적 연구로, 2012년 이후 추가 발견된 무홍채증 환자의 임상정보 및 유전검사정보를 취합하여 데이터베이스 업데이트 보고하는 바이다.

대상과 방법

본 연구는 6년간 서울아산병원 안과 외래를 방문한 18개의 다른 가계에서 온 총 28명의 무홍채증 환자를 대상으로 진행되었다. 28명 중 여자는 18명, 남자는 10명이었다. 모

든 환자들은 한국인이었으며, 초진 당시 연령은 만 3개월부터 54세까지 분포되어 있었다. 18명은 가족력이 있었으며, 10명은 산발적으로 발생하였다. 무홍채증은 홍채의 전체적 혹은 부분적인 결손이 있고, 동반되는 윤부 각막병증(limbal keratopathy), 백내장, 황반형성저하증, 또는 눈떨림이 있는 경우 임상적으로 진단하였다. 모든 환자들에게서 최대교정시력(best corrected visual acuity, BCVA)을 측정하였고, 홍채의 이상, 각막병증, 수정체이상 등을 확인하기 위한 세극등검사, 그리고 안저검사를 시행하였다. 일부 환자들에서는 시신경 및 황반부에 대하여 빛간섭단층촬영(optical coherence tomography, OCT)을 촬영하여 황반형성저하증과 녹내장을 보다 정밀하게 분석하고자 하였다. 시행한 모든 검사 결과에 대한 임상적 판단은 한 명의 안과 전문의(Lim HT)에 의해 이루어졌다. 홍채형성저하증은 홍채결손의 정도에 따라 분류하였는데, 잔존 홍채가 50% 미만인 경우를 경증으로, 50%에서 80%인 경우를 중등도로, 80%를 초과할 경우를 중증의 홍채형성저하증으로 분류하였다. 황반형성저하증은 황반의 망막세포층 형태 및 임상적 판단에 따라 분류하였는데, Thomas et al¹⁸이 이전 발표한 OCT를 이용한 황반형성저하증의 중증도 분류 방법을 참고하였다. 망막중심오목(foveal pit) 및 망막중심오목반사(foveal reflex)의 감소가 있지만 유지되고, 망막얼기층의 돌출(extrusion of plexiform layer)이 소실된 경우를 경증, 망막중심오목이 소실되거나 빛수용체바깥분절의 늘임(outer segment lengthening)이 소실된 경우를 중등도로, 바깥핵층의 확장(outer nuclear layer widening)이 소실된 경우를 중증으로 분류하였다. 최대교정시력, 눈의 해부학적 이상의 정도 및 동반된 안과적 이상소견 혹은 합병증을 종합적으로 분석하여 각 환자들의 중증도를 매우 경증부터 중증까지 분류하였다. 모든 환자들의 표현형 분석 결과를 *PAX6* 유전자의 돌연변이 분석결과와 종합하여 비교하였다. 본 연구는 서울아산병원 연구윤리심의위원회의 승인을 받아 연구를 진행하였다(2016-0777).

분자유전학적 분석

PAX6 유전자 돌연변이 선별검사

PureGene DNA purification kit (Gentra systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용해서 말초 혈액의 백혈구에서 유전체 DNA 채취하였다. 채취한 DNA는 분광광도계를 이용하여 양을 측정하고, 시료를 나누어 -20°C에 보관하였다. *PAX6* 유전자의 모든 암호화된 엑손과 주변의 엑손-인트론 경계들을 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭하였다. PCR 시발체(primer)는 Primer 3 (available

at <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)와 Love et al¹⁹이 제안한 방법으로 설계하였다. PCR 결과물은 ABI 3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 양방향으로 염기서열을 결정하였고, GenBank sequence (accession no. NM_000280.3)에 따라 조정하였다. 유전자 돌연변이 명명법은 Human Genome Variation Society (available at: <http://www.hgvs.org/mutnomen/>)의 권고를 따랐다. 참조한 염기서열에서는 상보성 DNA (complementary DNA) 뉴클레오티드(nucleotide) 번호를 Adenine-Thymidine-Guanine (ATG) 번역 개시 코돈의 A를 +1로 매겼고, 이것은 관습적으로 쓰이는 *PAX6* complementary DNA 번호 체계에서 363번째 염기에 해당한다.²⁰ 새로운 과오(missense) 돌연변이와 인트론의 변화에 대한 가상 실험은 SIFT program (available at: <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>)과 NetGene2 server (available at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)를 사용해서 진행하였다.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 분석

염기서열 분석에서 돌연변이가 발견되지 않는 경우, *PAX6* 유전자의 큰 결손 부위를 확인하기 위하여 MLPA 분석을 추가적으로 시행하였다. 분석에는 Commercial kit P219 *PAX6* (MCR Holland, Amsterdam, The Netherlands)가 이용되었고, 제조사의 지시를 엄밀하게 따랐다. 최종적으로 정량화된 MLPA 자료는 GeneMaker v7.0 software (SoftGenetics, State College, PA, USA)를 이용하여 분석하였다.

유전체의 분자 핵형 분석(Genomic molecular karyotyping)

PAX6 유전자 분석에서 돌연변이가 발견되지 않은 모든 환자들에서 원인이 되는 유전적 변형을 발견하기 위해 유전체의 분자 핵형 분석과 후보 유전자 염기서열 결정(candidate gene sequencing)을 시행하였다. 유전체 분자 핵형 분석을 위해, Human Genome 244K CGH microarray platform (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 배열 기반(array-based) 비교 유전체 혼합(comparative genomic hybridization, CGH)으로 전유전체 DNA의 변이를 확인하였다. 모든 과정은 Agilent의 표준 프로토콜(Version 4)을 따라 수행하였고, 데이터는 DNA analytics 4.0.76 (Agilent Technologies, Inc.)으로 분석하였다.

후보 유전자 염기서열 분석(Candidate gene sequencing)

PAX6 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 환자들에서는 *FOXC1*, *PITX2*, *PITX3*, *FOXE3*, *CYP11B1* 유전자의 염기서열을 후보 유전자 분석으로 시행하였다. 후보 유전자의 특이 유전자 PCR 증폭 결과물은 이전에 제안된 시발체와 환경에서 만들어졌다.^{21,22} 후보 유전자의 모든 코딩된 부분들은 서술된 직접 염기배열 결정 방법으로 검사하였다.

결 과

분자유전학적 특성

본 연구에는 18가계의 총 28명의 환자가 포함되었다. *PAX6* 유전자의 염기서열분석결과 10가계의 17명의 환자

Table 1. *PAX6* gene analysis in 18 probands

Case	<i>PAX6</i> mutation	Consequence	Exon/Intron	Domain	Status/Reference
1A	c.128C>T	p.Ser43Phe	Exon 5	PD	Previously reported ¹⁷
2A	c.399 + 1G>A (IVS3 [+1] G>A)	Splice defect	Intron 7	Linker	Previously reported ²³
3	c.484_485insT	p.Trp162Leufs*38	Exon 7	Linker	Novel
4A	c.622C>T	p.Arg208Trp	Exon 8	HD	Previously reported ²⁴
5	c.683-9C>G (IVS8-9C>G)	Splice defect	Intron 8	HD	Previously reported ¹⁷
6	c.718C>T	p.Arg240X	Exon 9	HD	Previously reported ⁵
7	c.949C>T	p.Arg317X	Exon 11	PST	Previously reported ⁴
8A	c.1225G>C	p.Gly409Arg	Exon 13	PST	Novel
9A	c.1268A>T	p.X423Leu	Exon 13	3' Untranslated Region	Previously reported ²⁵
10A	c.1268A>T	p.X423Leu*15	Exon 13	3' Untranslated Region	Previously reported ²⁵
11	Exon 1-4 deletion				MLPA kit P219
12	Whole exon deletion	WAGR			MLPA kit P219
13	Whole exon deletion	WAGR			MLPA kit P219
14A	No mutation found				
15	No mutation found				
16	No mutation found				
17A	No mutation found				
18	No mutation found				

PD = paired domain; HD = homeodomain; PST = proline-serine-threonine-rich domain; MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification; WAGR = Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation.

에서 9종류의 돌연변이가 발견되었다. 이 중 2개는 처음 발견된 돌연변이였으며, 7개는 이전 보고된 적 있는 돌연변이였다.^{4,5,17,23-25} 발견된 총 10개의 돌연변이 중 3개는 과오돌연변이(missense mutation), 2개는 무의미돌연변이(nonsense mutation), 2개는 런온 C-말단 확장돌연변이(run-on C-terminal extension mutation), 2개는 splice-site 돌연변이, 그리고 1개는 틀이동돌연변이(frameshift mutation)였다. 염기서열

분석에서 돌연변이가 발견되지 않은 11명의 환자들에서 MLPA 분석을 시행하여 3명의 환자에서 큰 결손이 산발적으로 발견되었다. 그중 2명의 환자는 *PAX6* 유전자와 인접한 *WT1* 유전자의 모든 엑손(1-14)에 큰 결손(large chromosomal deletions)이 있었고, 그 결과 WAGR 증후군(윌름즈종양, 무홍채증, 비뇨생식기계 기형, 정신지체)으로 진단되었다. 유전체의 분자 핵형 분석과 후보 유전자 염기서열

Table 2. Phenotypic data of the 20 patients having *PAX6* mutation

Case	Age/ Sex	Inheritance	Mutation type	BCVA	Iris anomaly	Nystagmus	Foveal hypoplasia	Keratopathy	Others	Severity
1A	0.4/F	AD	Missense	FF	Iris remnant, ~70%	++	+	+/-	Ectropion uvea, corectopia	Severe
1B	30/F	Mother of 1A	Missense	20/80	Iris remnant, ~50%	+++	+	+++	Ectropion uvea, corectopia, cataract	Moderate
2A	0.4/F	AD	Splice defect	FF	Thin rim of iris, ~10%	+	+	+	-	Moderate
2B	30/F	Mother of 2A	Splice defect	20/80	Thin rim of iris, ~10%	+	+	++	Cataract, glaucoma	Moderate
3	3.5/F	Sporadic	Frameshift	20/200	Near-total absence of iris	++	++	+/-	Null zone nystagmus with face turn	Severe
4A	25/F	AD	Missense	20/300	Iris remnant, ~80%	++	+	+++	Cataract, microcornea	Severe
4B	54/F	Mother of 4A	Missense	20/100	Iris remnant, ~80%	+	+	++	Microcornea	Moderate
5	4/F	Sporadic	Splice defect	20/160	Iris remnant, ~80% OD; thin rim, ~20% OS	+/-	+	+	Ectropion uvea, corectopia	Mild
6	3/F	Sporadic	Nonsense	20/400	Near-total absence of iris	+	++	+		Severe
7	18/F	Sporadic	Nonsense	20/200	Thin rim of iris, ~10%	+	+	+	Cataract	Severe
8A	1/M	AD	Missense	FF	Iris remnant, ~50%	++	++	+++	Ectropion uvea, corneal opacity, cataract	Severe
8B	42/F	Mother of 8A	Missense	20/160	Iris remnant, ~80%	++	++	+	Cataract, glaucoma	Severe
9A	3/M	AD	Run-on	20/400	Near-total absence of iris	++	++	+	Cataract	Severe
9B	26/M	Father of 9A	Run-on	20/125	Near-full iris	++	++	++	Cataract	Moderate
10A	2.5/M	AD	Run-on	FF	Iris remnant, ~80%	+	++	+/-	Iridocorneal adhesion, hearing loss	Severe
10B	9/F	Sister of 10A	Run-on	20/80	Iris remnant, ~80%	+	++	+/-	High myopia, hearing loss	Moderate
10C	43/M	Father of 10A	Run-on	20/100	Iris remnant, ~80%	+	++	+	Cataract	Moderate
11	0.5/M	Sporadic	Large deletion	FF	No iris	++	++	-	Glaucoma	Severe
12	0.5/F	Sporadic	Large deletion	FF	No iris	++	++	-	WAGR	Severe
13	0.3/M	Sporadic	Large deletion	FF	Near-total absence of iris	++	++	+++	WAGR, cataract, glaucoma	Severe

BCVA = best corrected visual acuity; AD = autosomal dominant; FF = fix and follow; +++ = severe; ++ = moderate; + = mild; +/- = very subtle or minimal; - = none; WAGR = Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation.

분석에서는 유전체적 이상이 발견되지 않았다. 분자유전학적 분석 결과는 Table 1에 정리되어 있다. *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견율은 72%로, 총 18가계 중 13가계에서 변이가 발견되었다. 5가계의 8명 환자들에서는 무홍채증과 관련된 돌연변이가 발견되지 않았다.

임상양상

PAX6 유전자의 돌연변이를 보인 20명의 환자와 돌연변이가 발견되지 않은 8명의 표현형의 임상양상은 Table 2와 Table 3에 각각 정리되어 있다. 최대교정시력은 다양하여, 20/400에서 20/25의 범위였다. 주시와 추종운동만 가능하였던 환아를 제외한, 시표로 시력측정이 가능하였던 환자들 19명 중 18명에서 20/60 이하의 저시력을 보였고(95%), 9명에서 20/200 이하의 시력을 보였다(47%). 경도의 홍채형성저하를 보인 환자는 5명(18%), 중등도는 8명(29%), 그 외 중증은 15명(54%)이었다. 눈떨림의 측면에서, 3명에서는 육안적으로 확인할 수 있는 눈떨림이 없었고, 그 외 25명에서 수평방향의 시계추눈떨림이 있었다(89%). 각막병증은 23명에서 동반되어 있었고(82%), 백내장은 12명에서(43%), 녹내장은 4명에서 동반되었다(14%). 황반형성저하증은 모든 예에서 관찰되었고 1명에서는 매우 경증이었다. 임상양상을 종합하여 보았을 때, 매우 경증의 표현형을 보인 환자는 1명(4%), 경증은 2명(7%), 중등도는 7명(25%), 그리고 중증의 표현형을 보인 환자는 18명(64%)이었다. 표현형은 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 있는 군과 없는 군에서 모두 중증에서부터 경도까지 다양하게 나타났다. 두 군 간의 표현형의 중증도와 다양성에 있어 유의한 차이를 보이지 않았다.

임상양상 관찰 결과, 황반형성저하증이 시력예후에 가장

중요한 인자로 사료된다. 증례 5는 *PAX6* 유전자의 splice-site 돌연변이를 보인 4세 여아로, 우안은 홍채의 약 70%, 좌안은 약 20%만 존재하는 비대칭적 홍채형성저하증을 보이고, 포도막결막염이 동반되어 있었다. 양안 모두 황반형성저하증이 있었으나, 좌안이 우안에 비해 황반형성저하증이 더 저명하였다. OCT에서도 우안의 망막외층이 좌안에 비해 더 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다. 우안 최대교정시력은 0.63, 좌안은 0.3으로, 같은 환자에서 황반형성저하증이 경미한 눈의 시력이 더 양호하였다. 증례 10B는 *PAX6* 유전자의 런온돌연변이(run-on mutation)를 보인 9세 여아로, 양안 모두 약 20%의 경미한 홍채형성저하증을 보이고, 각막병증 및 백내장은 동반되지 않았다. 하지만 양안의 황반형성저하증이 심하여 최대교정시력은 양안 모두 0.1까지 밖에 발달하지 못하였다. OCT에서도 양안 황반오목이 보이지 않는 심한 황반형성저하증을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 증례 9B는 *PAX6* 유전자의 런온돌연변이(run-on mutation)를 보인 26세 남자로, 양안 모두 거의 정상에 가까운 홍채의 형성을 보였으나, 황반형성저하증이 심하여 최대교정시력은 양안 모두 0.1이었다(Fig. 1).

PAX6 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 환자들 중 일부에서는 비교적 경미한 표현형을 보였으나, 일부 환자들에서는 중증의 표현형을 보여, 전체적으로 매우 다양한 표현형으로 발현하는 것으로 여겨진다. 증례 18은 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 3세 남아로, 양안의 경미한 홍채형성저하증이 있었으며, 우안이 좌안에 비해 홍채형성저하증이 더 심하였다. 하지만 안저검사상 양안 모두 비교적 정상에 가까운 황반의 발달을 보였으며, OCT에서도 중심와 오목이 관찰되어 황반형성저하증이 매우 경미하게 확인되어 전반적으로 경한 임상양상을 보였다(Fig. 2). 증례

Table 3. Phenotypic data of the 8 patients without *PAX6* mutation

Case	Age/ Sex	Inheritance	BCVA	Iris anomaly	Nystagmus	Foveal hypoplasia	Keratopathy	Others	Severity
14A	2/F	AD	FF	No iris	+++	++	-	Developmental delay	Severe
14B	27/F	Mother of 14A	20/200	Thin rim of iris, ~5%	+++	++	++	Cataract, optic atrophy	Severe
15	5/F	Sporadic	20/25	No iris	+/-	+	-		Very mild
16	4/M	Sporadic	20/400	No iris	++	++	-		Severe
17A	1/F	AD	FF	Iris remnant, ~80%	++	++	-		Severe
17B	3/M	Brother of 17A	20/200	No iris	++	++	+/-		Severe
17C	31/F	Mother of 17A	20/160	Near-total absence of iris	++	++	++	Cataract	Severe
18	3/M	Sporadic	20/200	Iris remnant, ~80%	+/-	+/-	-		Mild

BCVA = best corrected visual acuity; AD = autosomal dominant; FF = fix and follow; +++ = severe; ++ = moderate; + = mild; +/- = very subtle or minimal; - = none.

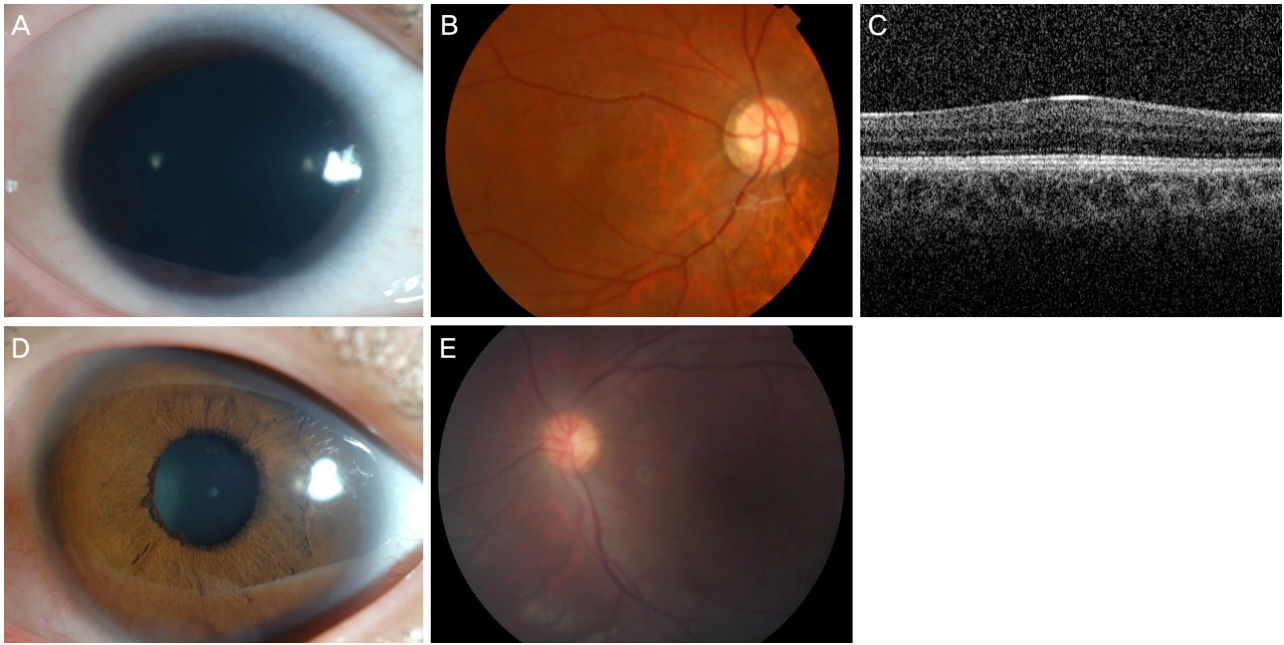


Figure 1. Patients with *PAX6* mutation. (A-C) Case 10B carries a run-on mutation of *PAX6*. (A) Anterior segment image showing iris hypoplasia, about 20% of iris remnants, but no significant keratopathy and cataract. (B) Fundus image showing marked foveal hypoplasia. (C) Loss of foveal depression is seen in optical coherence tomography. (D, E) Case 9B carries a run-on mutation of *PAX6*. (D) Anterior segment image showing subtle iris hypoplasia. (E) But fundus image demonstrates moderate degree of foveal hypoplasia.

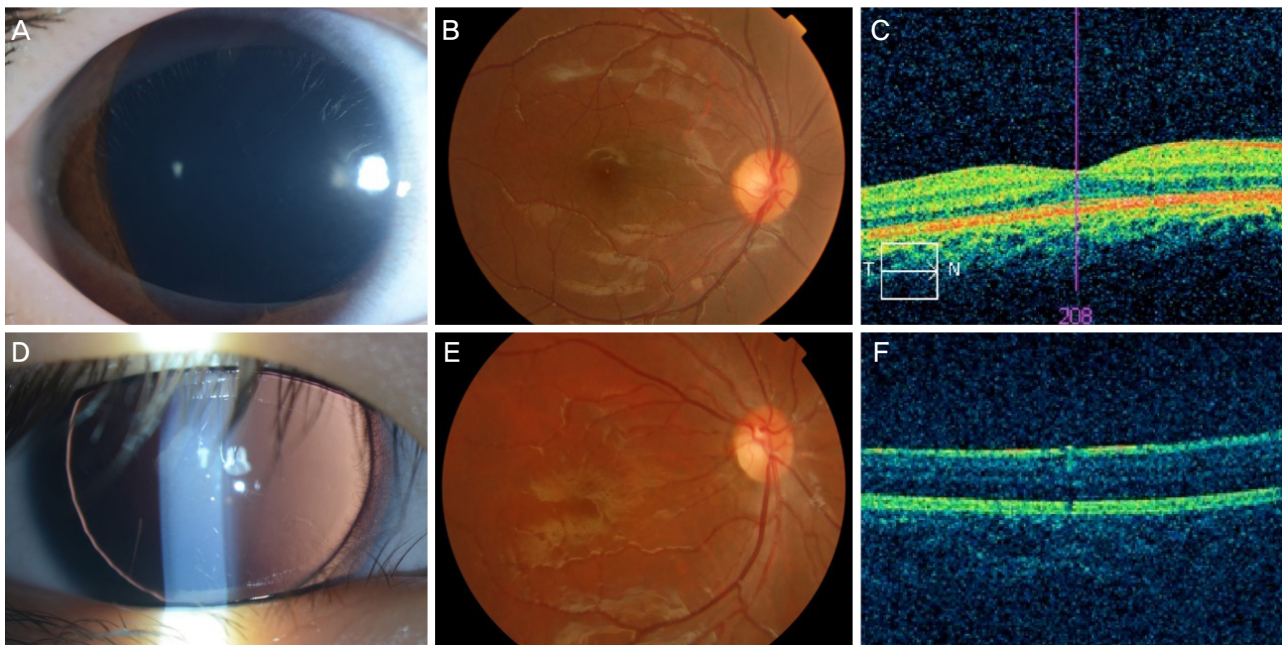


Figure 2. Patients without *PAX6* mutation. (A-C) Case 18. (A) Anterior segment image showing mild degree of iris hypoplasia. (B) Subtle foveal hypoplasia was seen in fundus image. (C) Near normal foveal depression was also demonstrated in optical coherence tomography. (D-F) Case 17B. (D) Anterior segment image showing complete absence of iris. (E) Fundus image showing moderate degree of foveal hypoplasia. (F) Loss of foveal depression was seen in optical coherence tomography.

15는 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 5세 여아로, 홍채의 완전한 형성저하(무홍채)가 있었으나, 안저사진과 OCT에서 모두 황반 형성저하는 보이지 않아, 최대교정

시력은 양안 모두 0.8로, 매우 경증의 표현형을 보였다. 증례 17B는 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 3세 남아로, 홍채의 완전한 형성저하가 있으며, 안저사진과 OCT에

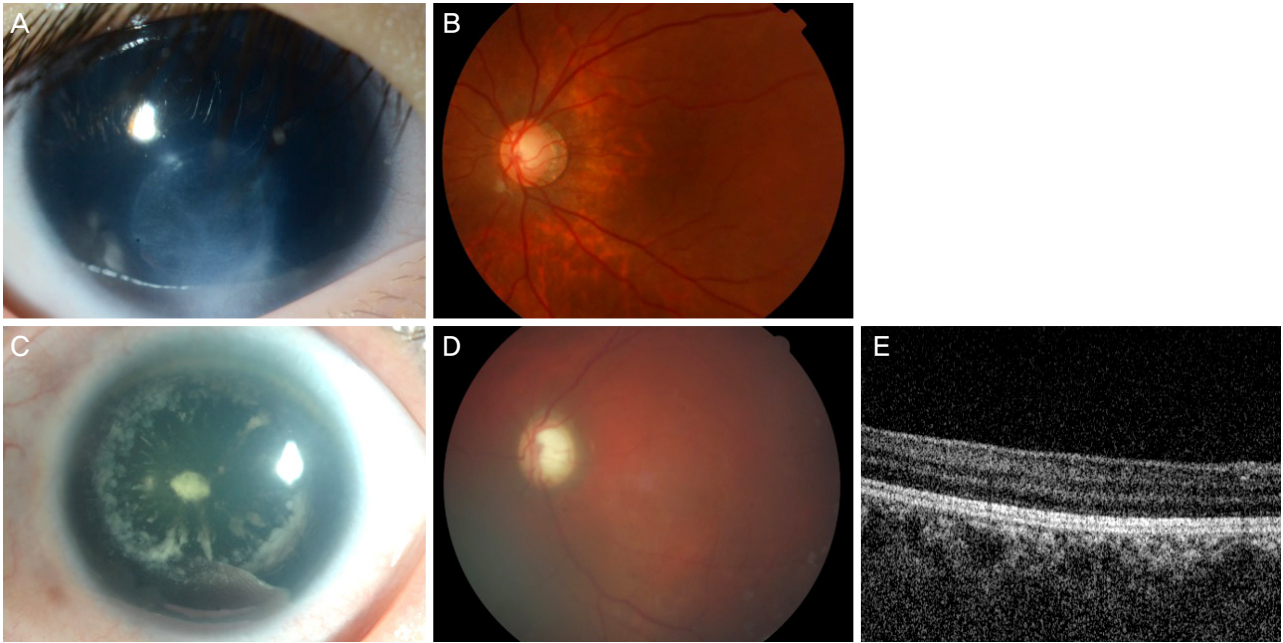


Figure 3. Familial patients with missense mutation of *PAX6*. (A, B) Case 8A. (A) Anterior segment image showing moderate degree of iris hypoplasia, peripheral corneal opacity and cataract. (B) Fundus image showing moderate degree of foveal hypoplasia. (C-E) Case 8B (mother of 8A). (C) Anterior segment image showing mild degree of iris hypoplasia and cataract, but no definite corneal opacity. (D) Fundus image showing moderate degree of foveal hypoplasia. (E) Optical coherence tomography also showing flat foveal contour.

서 중등도의 황반형성저하증이 확인되어, 전체적으로 중증의 표현형을 보였다(Fig. 2).

또한 *PAX6* 유전자의 같은 돌연변이를 보이더라도, 서로 다른 표현형으로 발현할 수 있다. 증례 8A는 *PAX6* 유전자의 과오돌연변이(missense mutation)가 확인된 1세 남아로, 양안 모두 약 50%의 홍채형성저하증과 백내장, 주변부 각막 혼탁, 그리고 중등도의 황반형성저하증을 보이고 있었다(Fig. 3). 증례 8B(증례 8A의 모)는 증례 8A와 같은 *PAX6* 유전자의 과오돌연변이(missense mutation)를 보인 42세 여자, 백내장이 있지만, 증례 8A보다 경미하며, 각막 혼탁은 보이지 않았다. 중등도의 양안 황반형성저하증이 OCT에서도 확인되었으며, 녹내장이 동반되어 있었다(Fig. 3).

고 찰

본 연구는 총 28명의 한국인 선천성 무홍채증 환자들에 대한 임상양상 및 분자유전학적 특성을 분석하였다. 환자들의 임상양상은 매우 다양한 표현형으로 발현되었으며, 13가계에서 9종의 서로 다른 돌연변이를 발견하였고, 그중 2개의 새로운 변이(p.Trp162Leufs*38, p.Gly409Arg)를 발견하였다. *PAX6* 유전자의 돌연변이 발견율은 72%였다. 최근 Bobilev et al²⁶은 66가계(81명)의 무홍채증 환자들을 대상으로 시행한 연구 결과, *PAX6* 유전자의 돌연변이 발견율

은 92%였음을 보고하였다. Villarroel et al²⁷은 30명의 멕시코인 무홍채증 환자들을 대상으로 한 연구에서 *PAX6* 유전자의 돌연변이 발견율이 30%였음을 보고한 바 있다. 이러한 돌연변이 발견율의 차이는 인종 차이에서 기인하였을 것으로 사료된다. Bobilev et al²⁶의 보고에 따르면, 무의미돌연변이(nonsense mutation)가 가장 많이 발견된(66가계 중 18가계) 돌연변이였으며, 그 다음 틀이동돌연변이(frameshift mutation)가 많이 발견되었으며(66가계 중 16가계), 유전자의 큰 결손(large chromosomal deletions)은 10가계의 산발적(sporadic) 환자들에서 발견되었다. 본 연구에서 발견된 *PAX6* 유전자의 큰 결손을 가진 환자는 3명으로, 모두 산발성이었다. Kim et al²⁸은 한국인 선천성 무홍채증 환자 12명을 대상으로 시행한 연구에서 총 7종류의 돌연변이가 발견되었음을 보고하였고, 돌연변이는 paired domain (PD)와 linker domain에 국한되어 있었음을 보고하였다. 하지만 본 연구 결과, PD와 linker domain 이외에도, homeodomain (HD), proline-serine-threonine-rich domain (PST) 그리고 3' untranslated region에서도 발견되었다.

본 연구의 분석 결과, 무홍채증 환자들은 매우 다양한 임상양상을 나타내었으며, *PAX6* 유전자의 돌연변이 유무를 감별할 수 있는 특이적인 임상양상은 없었다. 본 연구에 포함된 무홍채증 환자들은 *PAX6* 유전자의 돌연변이 발견 유무와 상관없이 경증부터 중증까지 다양한 임상양상을 보였

다. Traboulsi et al¹⁶은 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 4명의 무홍채증 환자들에서 좋은 시기능을 유지함을 보고한 바 있다. 하지만 본 연구의 분석 결과, *PAX6* 유전자의 돌연변이가 없음이 반드시 표현형의 경함을 의미하지는 않는 것으로 보이며, 이 차이는 인종의 차이에 기인하거나, 혹은 4명이라는 비교적 적은 환자수로 인한 선택바이어스가 작용하였을 가능성이 있다. Villarroel et al²⁷은 30명의 멕시코인 무홍채증 환자들 중 21명에서 *PAX6* 유전자 돌연변이가 발견되지 않았으며, 임상적으로 비교적 중증의 표현형을 나타내었음을 보고하였다. 이는 본 연구의 분석 결과와 비슷한 결과를 보였지만, MLPA 등의 추가적인 분석을 시행하지 않은 제한점이 있다. Bobilev et al²⁶은 최근 81명의 무홍채증 환자들 중 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 5명의 임상양상이 돌연변이가 발견된 환자들과 구별할 만한 점이 없었음을 보고하였다. 본 연구에서 *PAX6* 유전자의 돌연변이를 발견하지 못한 5가계에서도 다양한 임상양상이 나타났으며, 증상 및 징후, 질환의 중증도에서 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견된 가계의 환자들과 유의한 차이가 없었다.

Chang et al²⁹은 한국인 무홍채증 환자 60명을 대상으로 시행한 연구에서 91%의 환자에서 황반형성저하증이 있었으며, 안구진탕과 고안압증이 불량한 시력예후와 관련된 인자라고 보고한 바 있다. 하지만 해당 연구의 통계적 분석에서 황반형성저하증은 제외되어 있었으며, 황반형성저하증의 중증도에 따른 분류는 하지 않았다. 본 연구에서도 28명의 환자 중 27명(96%)에서 경도 이상의 황반형성저하증을 보였으며, 황반형성저하증이 심할수록 시력예후가 불량한 경향을 보였다. 하지만 본 연구에서는 통계학적 검정을 시행하지 않은 한계점이 있으며, 추후 더 많은 무홍채증 환자들을 대상으로 통계학적 분석을 시행한 연구가 필요할 것으로 보인다. Park et al³⁰은 31명의 한국인 선천성 무홍채증 환자들의 임상양상에 대해 발표한 바 있으며, 산발성 유전을 보인 예는 29.0%였으며, 35.7%에서 20/200 이하의 시력을 보였고, 백내장과 녹내장, 각막병증은 각각 82.5%와 51.6%, 그리고 71.6%에서 동반되었다고 보고하였다. 본 연구에 포함된 18가계 중 10가계에서 산발성 유전을 보였으며(56%), 20/200 이하의 시력을 보인 비율은 47%였다. 본 연구에서 백내장은 43%에서, 녹내장은 14%에서, 그리고 각막병증은 82%에서 발견되었다. 백내장과 녹내장의 발생률이 차이를 보인 것은 Park et al³⁰의 연구에서는 20세 이상의 환자 비율이 약 77%였으나 본 연구에서는 32%로, 20세 미만의 소아 환자들의 비율이 상대적으로 높았던 점에서 기인한 것으로 사료된다.

본 연구 결과, 광범위한 분자유전학적 분석에서 불구하

고, 4가계로부터 온 8명의 환자들에서는 *PAX6* 유전자의 아무런 돌연변이도 발견되지 않았다. MPLA와 배열 기반 비교 유전체 혼합(array-based CGH) 분석에서도 분자유전학적 이상이 발견되지 않았다. 본 연구의 무홍채증 환자들에서 분자유전학적 이상을 발견하지 못한 이유로 변형인자 대립돌연변이(modifier allelic variant) 혹은 대립유전자(allelic gene)의 존재를 생각해 볼 수 있다. 또한 분자 경로(molecular pathway)의 하류 유전자(downstream gene)의 가능성도 있다. 무홍채증과 관련이 있다고 알려진 *PAX6* 유전자 외 다른 유전자의 돌연변이를 확인하기 위해 전안부 발생장애(anterior segment dysgenesis)와 연관 있는 것으로 알려진 *FOXC1*, *PITX2*, *PITX3*, *FOXES*, *CYP1B1* 유전자를 후보 유전자로 분석을 시행하였지만, 본 연구 결과 돌연변이가 발견되지 않았다. 무홍채증이 매우 광범위한 스펙트럼의 표현형을 보이는 질환인 만큼, *PAX6* 유전자가 이 질환을 일으키는 유일한 유전자가 아닐 것으로 추정된다. 본 연구의 임상양상 분석 결과, 같은 *PAX6* 유전자의 돌연변이를 가진 가계 안에서도 임상적으로 다양한 표현형으로 발현하는 점으로 보아, *PAX6* 유전자 외 다른 유전자의 돌연변이의 존재나 환경적인 요인이 무홍채증의 임상양상에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 추후 무홍채증과 연관된 *PAX6* 유전자 외 다른 유전자의 돌연변이를 발견하기 위한 분자유전학적 분석, 또한 더 고배율의 DNA 미세배열판(microarray), 더욱 광범위한 후보 유전자의 분석이 필요할 것으로 보인다.

무홍채증은 홍채형성저하증, 황반형성저하증, 눈떨림, 각막병증, 백내장 등 다양한 안구의 이상을 초래할 수 있는 질환으로, 경증부터 중증까지 광범위한 중증도의 표현형으로 발현할 수 있다. 본 연구 결과, *PAX6* 유전자 돌연변이의 발견 유무가 질환의 중증도 및 다양성에 영향을 미치지 않으며, 돌연변이에 특이적인 임상양상은 없는 것으로 보인다. 황반형성저하증이 시력예후에 영향을 미치는 가장 중요한 인자로 보여진다. 본 저자들은 2개의 새로운 *PAX6*의 돌연변이(p.Trp162Leufs*38, p.Gly409Arg)를 발견하여 보고하는 바이다. 무홍채증의 임상양상이 매우 다양하며, 같은 종류의 *PAX6* 유전자의 돌연변이를 보이더라도 같은 가계 안에서도 다른 임상양상을 보이는 점 등은 *PAX6* 유전자 외에도 무홍채증의 발현에 관여하는 다른 잠재적인 유전자의 존재를 시사하는 것으로 보인다. 본 연구에서 철저한 유전자 분석에도 약 29%로 나타난 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않은 무홍채증 환자들을 대상으로, 발견 가능한 유전자의 이상을 찾아내어 더욱 폭넓은 유전상담을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Shaw MW, Falls HF, Neel JV. Congenital Aniridia. *Am J Hum Genet* 1960;12(4 Pt 1):389-415.
- 2) Lee H, Khan R, O'Keefe M. Aniridia: current pathology and management. *Acta Ophthalmol* 2008;86:708-15.
- 3) Wolf MT, Lorenz B, Winterpacht A, et al. Ten novel mutations found in Aniridia. *Hum Mutat* 1998;12:304-13.
- 4) Axton R, Hanson I, Danes S, et al. The incidence of PAX6 mutation in patients with simple aniridia: an evaluation of mutation detection in 12 cases. *J Med Genet* 1997;34:279-86.
- 5) Glaser T, Walton DS, Maas RL. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 1992;2:232-9.
- 6) Prosser J, van Heyningen V. PAX6 mutations reviewed. *Hum Mutat* 1998;11:93-108.
- 7) Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 1991;67:1059-74.
- 8) Gehring WJ, Ikeo K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 1999;15:371-7.
- 9) St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, et al. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 1997;387:406-9.
- 10) Stoykova A, Gruss P. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 1994;14(3 Pt 2):1395-412.
- 11) D'Elia AV, Pellizzari L, Fabbro D, et al. A deletion 3' to the PAX6 gene in familial aniridia cases. *Mol Vis* 2007;13:1245-50.
- 12) Robinson DO, Howarth RJ, Williamson KA, et al. Genetic analysis of chromosome 11p13 and the PAX6 gene in a series of 125 cases referred with aniridia. *Am J Med Genet A* 2008;146A:558-69.
- 13) Fantes J, Redeker B, Breen M, et al. Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet* 1995;4:415-22.
- 14) Crolla JA, van Heyningen V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet* 2002;71:1138-49.
- 15) Elsas FJ, Maumenee IH, Kenyon KR, Yoder F. Familial aniridia with preserved ocular function. *Am J Ophthalmol* 1977;83:718-24.
- 16) Traboulsi EI, Ellison J, Sears J, et al. Aniridia with preserved visual function: a report of four cases with no mutations in PAX6. *Am J Ophthalmol* 2008;145:760-4.
- 17) Lim HT, Seo EJ, Kim GH, et al. Comparison between aniridia with and without PAX6 mutations: clinical and molecular analysis in 14 Korean patients with aniridia. *Ophthalmology* 2012;119:1258-64.
- 18) Thomas MG, Kumar A, Mohammad S, et al. Structural grading of foveal hypoplasia using spectral-domain optical coherence tomography a predictor of visual acuity? *Ophthalmology* 2011;118:1653-60.
- 19) Love J, Axton R, Churchill A, et al. A new set of primers for mutation analysis of the human PAX6 gene. *Hum Mutat* 1998;12:128-34.
- 20) Brown A, McKie M, van Heyningen V, Prosser J. The human PAX6 mutation database. *Nucleic Acids Res* 1998;26:259-64.
- 21) Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hittner HA, et al. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet* 1998;19:167-70.
- 22) Semina EV, Brownell I, Mintz-Hittner HA, et al. Mutations in the human forkhead transcription factor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts. *Hum Mol Genet* 2001;10:231-6.
- 23) Grønskov K, Rosenberg T, Sand A, Brøndum-Nielsen K. Mutational analysis of PAX6: 16 novel mutations including 5 missense mutations with a mild aniridia phenotype. *Eur J Hum Genet* 1999;7:274-86.
- 24) Hanson IM, Seawright A, Hardman K, et al. PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet* 1993;2:915-20.
- 25) Singh S, Chao LY, Mishra R, et al. Missense mutation at the C-terminus of PAX6 negatively modulates homeodomain function. *Hum Mol Genet* 2001;10:911-8.
- 26) Bobilev AM, McDougal ME, Taylor WL, et al. Assessment of PAX6 alleles in 66 families with aniridia. *Clin Genet* 2016;89:669-77.
- 27) Villarroel CE, Villanueva-Mendoza C, Orozco L, et al. Molecular analysis of the PAX6 gene in Mexican patients with congenital aniridia: report of four novel mutations. *Mol Vis* 2008;14:1650-8.
- 28) Kim JH, Hwang BS, Lee JH, Cha SC. PAX6 mutations and clinical features of congenital aniridia. *J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49:1794-800.
- 29) Chang JW, Kim JH, Kim SJ, Yu YS. Congenital aniridia: long-term clinical course, visual outcome, and prognostic factors. *Korean J Ophthalmol* 2014;28:479-85.
- 30) Park SH, Park YG, Lee MY, Kim MS. Clinical features of Korean patients with congenital aniridia. *Korean J Ophthalmol* 2010;24:291-6.

= 국문초록 =

한국인 선천성 무홍채증의 임상양상과 분자유전학적 특성

목적: 한국인 선천성 무홍채증 환자의 임상양상과 분자유전학적 특성을 분석하여 소개한다.

대상과 방법: 홍채형성저하증을 특징으로 임상적으로 진단된 한국인 선천성 무홍채증 환자를 대상으로 하였다. 최대교정시력, 홍채형성저하증의 정도, 황반형성저하증의 정도 및 동반된 이상소견을 기록하여 분석하였다. *PAX6* 유전자의 변이분석, 복합결찰의존프로브 증폭법 분석, 유전체의 분자 핵형 분석 및 후보 유전자 염기서열 분석을 통한 분자유전학적 검사결과를 분석하였다.

결과: 18가계의 총 28명의 환자가 포함되었다. 최대교정시력은 다양하여 시표로 측정이 가능하였던 19명에서 20/400에서 20/25의 범위였고, 그중 20/200 이하의 시력을 보인 환자는 9명이었다(47%). 황반형성저하증은 전 예에서 관찰되었고, 그중 1명은 매우 경증이었다. *PAX6* 유전자 분석을 시행한 18가계 중 13가계에서 유전자 변이가 발견되었으며, 2개의 새로운 변이(p.Trp162Leufs*38, p.Gly409Arg)가 발견되었다. 발견된 변이 중 3가계에서는 과오돌연변이(missense mutation), 또 다른 3가계에서는 *PAX6* 유전자 부위의 큰 결손(large chromosomal deletions)을 보였다.

결론: 선천성 무홍채증과 연관된 2개의 새로운 변이를 발견하여 보고하는 바이다. 선천성 무홍채증은 시력을 위협하는 심각한 안구 기형이지만, 중심시력, 홍채형성저하증의 정도는 매우 다양하였다. 전체 가계의 72%에서 *PAX6* 유전자의 돌연변이가 발견되었고, 돌연변이 유무에 관계없이 경증에서 중증까지 다양한 스펙트럼의 임상양상을 보여주었다.

〈대한안과학회지 2016;57(9):1441-1450〉