

생화학 및 분자유전학 검사로 진단한 한국인 조기유년기형 이염성백질이영양증 1례와 문헌 고찰

A Korean Patient with Early Juvenile Form of Metachromatic Leukodystrophy: Biochemical and Molecular Genetic Investigation

김영빈¹ · 박형두¹ · 최리화¹ · 이수연¹ · 기창석¹ · 송정환² · 김종원¹ · 이지훈³

Yeong-Bin Kim, M.D.¹, Hyung-Doo Park, M.D.¹, Rihwa Choi, M.D.¹, Soo-Youn Lee, M.D.¹, Chang-Seok Ki, M.D.¹, Junghan Song, M.D.², Jong-Won Kim, M.D.¹, Jeehun Lee, M.D.³

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과¹ · 소아청소년과³, 서울대학교 의과대학 분당서울대학교병원 진단검사의학과²

Department of Laboratory Medicine and Genetics¹, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam; Department of Pediatrics³, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Metachromatic leukodystrophy is an inherited lysosomal storage disorder caused by the deficiency of arylsulfatase A activity. The patient in this study, a 5-yr-old girl, presented with progressive psychomotor regression. An MRI image of her brain showed bilateral symmetrical demyelination. The arylsulfatase A activity in her leukocytes was decreased to 8.0 nmol/hr/mg protein (reference range, 25-80 nmol/hr/mg protein). Mutation analysis of *ARSA*, using PCR and direct sequencing, showed two heterozygote pathogenic variations of c.449C>T (p.Pro150Leu) and c.640G>A (p.Ala214Thr). In summary, we report a Korean patient with an early juvenile form of metachromatic leukodystrophy, who was diagnosed based on her clinical symptoms as well as by using biochemical, radiological, and molecular genetic investigations.

Key Words: Metachromatic leukodystrophy, Arylsulfatase A, *ARSA*

서론

이염성백질이영양증(metachromatic leukodystrophy)은 arylsulfatase A 효소가 돌연변이에 의해 기능을 상실하여 발생하는 리소좀축적병(lysosomal storage disorder)으로, 상염색체 열성으로 유전된다. Arylsulfatase A 효소 활성도가 저하되면 뇌의 백색질을 비롯한 중추 신경계, 말초 신경계 및 기타 장기에서 설��파타이드(sulphatide)가 축적되면서 미엘린 수초(myeline sheath)가 손실(de-

myelination)되며, 이에 따라 백색질에서 광범위한 탈수초화가 일어나고 중추 신경계 등에 여러 가지 증상이 나타난다[1].

이염성백질이영양증은 발병 연령과 임상 양상에 의해 영아 후기형, 유년기형, 성인형으로 나뉘며 이 중 영아 후기형이 가장 흔하다. 유년기형은 4세 이후부터 16세 이전에 증상이 발현되며, 6세를 기준으로 하여 그 이전에 발병하는 경우를 조기 유년기형(early juvenile form), 이후에 발병하는 경우를 후기 유년기형(late juvenile form)으로 나누기도 한다[2]. 조기 유년기형의 경우 지속적으로 진행되는 운동능력과 인지기능의 퇴행을 특징으로 하며, 후기 유년기형보다 급격히 진행하여 수년 내 사망에 이른다[2]. 후기 유년기형은 주로 학업 능력 저하와 이상 행동 등으로 시작되는데, 실조증이 진행하면서 보행 장애가 발생하며, 말초신경이 침범되어 심부반사가 감소하거나 소실된다. 신경학적 증상이 나타난 후에는 경과가 빠르게 진행하고, 경직성 마비로 인해 앉거나 일어서지 못하며, 발병 후 다양한 지속 기간을 거쳐 사망한다[1-3].

Arylsulfatase A 효소를 인코딩하는 *ARSA* 유전자는 22번 상염색체의 장완(22q13.33)에 위치하며, 8개의 엑손으로 이루어진 3 kb의 유전자로, 돌연변이가 발생하면 arylsulfatase A 효소의 결핍을 유발한다[4, 5]. Arylsulfatase A 결핍에 의한 이염성백질이영양증

Corresponding author: Hyung-Doo Park

Department of Laboratory Medicine & Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea
Tel: +82-10-2064-0290, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: nayadoo@hanmail.net

Received: March 25, 2016

Revision received: May 10, 2016

Accepted: May 17, 2016

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2017, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

환자들 중 19.7%에서 *ARSA* 유전자의 두 번째 엑손과 두 번째 인트론 경계부위에 공여자 이음 자리 돌연변이(splice donor-site mutation)인 c.465+1G>A가 발견되며[4], c.1283C>T (p.Pro428Leu) 과오돌연변이(missense mutation)가 12.2%의 환자들에서 나타나고[4], 약 5%의 환자들에서는 c.542T>G (p.Ile181Ser) 돌연변이가 나타난다고 알려져 있다[4]. 이 세 가지 유형 이외에 이염성백질이 영양증을 유발한다고 알려진 나머지 돌연변이들은 소수의 환자에서만 보고되어 있다[4].

저자들은 유년기형 이염성백질이영양증의 임상 증상과 특징적 영상검사 소견을 보이고 arylsulfatase A 효소 활성도 저하가 확인된 5세 환아에서 *ARSA* 유전자의 과오돌연변이(c.449C>T, c.640G>A)를 확인하였기에 문헌 고찰과 함께 증례를 보고하는 바이다.

증례

특정 병력이나 가족력이 없던 5세 여아가 발달 지연, 인지능력 저하 및 진행하는 신경학적 퇴행을 주소로 내원하였다. 내원 2개월 전부터 대소변을 가리지 못하고, 말수가 줄어들었으며 계단 오르내림을 못하게 되었다. 내원 1개월 전부터는 불분명한 소리를 냈으며 누운 상태에서 스스로 앉거나 서지 못하여 입원하였다.

내원 당시 신장 104.5 cm (10-25 백분위수), 체중 18.7 kg (50-75 백분위수)였다. 신체 검진에서 의식은 명료하였으며, 손가락 전체를 이용하여 과자를 움켜질 수 있었으나 다른 물체나 도구는 사용하지 못하였다. 단어를 이야기하거나 명령에 따르지 못하였으며, 대소변을 가리지 못하였다. 신경학적 검사에서 뇌신경 검사 및 사지 근력은 정상이었으나, 상하지에 모두 경직이 있었으며 상지보다 하지가 더 심하였다. 좌우 하지에서 모두 바빈스키 징후 양성이었다.

일반혈액 검사, 일반화학 검사, 뇌척수액 검사에서는 유의한 이상 소견이 없었으며, 액체크로마토그래피-이중질량분석법(LC-MS/MS)을 이용한 신생아 선별검사 및 혈장 아미노산 검사에서도 특이 소견은 관찰되지 않았다. 인지능력 저하 및 신경학적 퇴행에 대해 뇌자기공명영상(MRI) 검사를 시행하였고, 영상 사진에서 뇌실 주위 백색질 및 대뇌 심부 백색질(periventricular and deep cerebral white matter)에 T2 신호 강도 증가, T1 신호 강도 감소된 병변들이 대칭적으로 존재하였다. 뇌량(corpus callosum)과 뇌실삼각부 주위(peritrigone area)의 병변에는 확산강조영상에서 제한확산(diffusion restriction)이 확인되었다. 뇌의 위축성 변화는 뚜렷하지 않았고 피질하 U-섬유(subcortical U fiber)와 회백질(gray matter)에는 특이 소견을 보이지 않았다.

영상 소견과 임상 상황을 고려하여 이염성백질이영양증의 가능성을 생각하고 진단을 위해 정맥혈 백혈구의 arylsulfatase A 효소 활성도 검사를 시행하였다. Arylsulfatase A 활성도는 말초혈액을

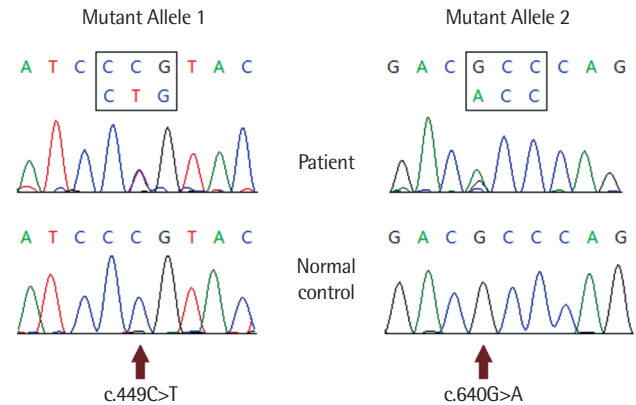


Fig. 1. Mutation analysis of *ARSA* from the patient: c.449C>T (p.Pro150Leu) and c.640G>A (p.Ala214Thr).

p-nitrocatechol sulfate 용액에 반응시켜 유리된 p-nitrocatechol의 양을 spectrofluorometry로 정량하여 측정하였다. 그 결과 환아의 말초혈액 백혈구 arylsulfatase A 효소 활성도는 8.0 nmol/hr/mg protein (참고범위, 25-80 nmol/hr/mg protein)으로 이염성백질이 영양증에 합당한 소견이었다.

유전자 돌연변이를 확인하기 위해 중합효소연쇄반응법을 통해 *ARSA* 유전자의 모든 엑손과 근접 인트론 부위를 증폭하고, 증폭 산물에 대해 18종의 시발체와 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 ABI 3130xl (Applied Biosystems)에서 직접염기서열분석을 시행하였다. *ARSA* 유전자 검사결과는 NM_0004875의 염기서열을 기준으로 하여 비교하였는데, 환아에서 *ARSA* 유전자의 엑손 2에서 c.449C>T (p.Pro150Leu) 과오돌연변이가 이형접합체(heterozygote)로 발견되었으며, 이는 기준에 질환을 유발한다고 알려져 있는 돌연변이(disease causing mutation)였다[2, 4]. 또한 엑손 3에서 c.640G>A (p.Ala214Thr) 돌연변이가 이형접합체로 발견되었다(Fig. 1). 이는 아직까지 질환과의 연관성이 알려지지 않은 변이나, 동일 아미노산 위치에서 c.640G>C (p.Ala214Pro) 및 c.641C>T (p.Ala214Val) 변이가 질환 유발 돌연변이로 잘 알려져 있다[2, 4]. 환아에서 확인된 c.640G>A 변이는 생물정보학 분석 결과 포유류의 arylsulfatase A 효소에서 잘 보존되어 온 부위의 아미노산 서열에 변화를 일으킨 것으로(Fig. 2), 단백질 구조에 변성을 일으킬 가능성이 높아 질환의 원인 돌연변이일 가능성이 높을 것으로 판단되었다. 아쉽게도 부모를 비롯한 가족구성원의 유전자 검사는 시행하지 못하였기에 환아에서 관찰된 c.449C>T 및 c.640G>A 변이의 복합이형접합체(compound heterozygote) 여부는 확인하지 못하였지만, 관련 검사결과와 임상 증상 등을 고려하였을 때 복합이형접합체 양상의 *ARSA* 돌연변이를 가진 이염성백질이영양증일 것으로 판단된다.

Species	Codon Number	Amino Acid Sequences
<i>Homo sapiens</i>	214	DLMADAQRQDR
<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	190	DLMADAQRQDR
<i>Sus scrofa</i>	212	DLMADAQRQGR
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	214	DLMADAQRQGR
<i>Equus caballus</i>	213	DLMADAQRQGR
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	212	DLMADAQRQGR
<i>Canis lupus familiaris</i>	212	DLMADAQRQGL
<i>Rattus norvegicus</i>	212	DLMADAQRQGR
<i>Gallus gallus (Aves)</i>	217	DFIADCARRGV
<i>Xenopus laevis (Amphibia)</i>	212	SFIRAAVKENK
<i>Danio rerio (Actinopterygii)</i>	211	QFISDSVKDNR

Fig. 2. Conservation of the amino acid changed by c.640G>A (p.Ala-214Pro) across different species.

한편, 환자에서 *ARSA*, c.1178C>G (p.Thr393Ser) 변이가 동형접합체(homozygote)로 발견되었다. 2002년 Regis 등[6]은 *ARSA* cDNA를 expression vector (pSVL4BAT plasmid)에 주입하여 발현시키고 arylsulfatase A 활성도를 측정한 결과, p.Thr393Ser 변이가 단독으로 존재할 때에는 wild type 대비 89.1%의 활성도를 나타내어 질환을 일으키기에 충분하지 않으나, 질환 유발 돌연변이인 E255K와 함께 같은 allele에 존재할 경우 E225K가 단독으로 존재할 때에 비해 68.1%의 효소 활성도로 감소함을 확인하였다. 이는 동일한 대립유전자(allele)에 질환 유발 돌연변이가 존재할 때, arylsulfatase A 효소의 활성도를 추가로 감소시켜 더욱 심한 임상경과를 보이도록 하는 질환 연관 변이(phenotype modifier, disease associated variation)이다.

고 찰

본 증례는 전형적 임상 양상, 뇌 자기공명영상 소견, arylsulfatase A 효소 활성도 저하, 다른 질환 배제 등으로 이염성백질이영양증(metachromatic leukodystrophy)으로 진단되었으며, 최종적으로 *ARSA* 유전자에서 두 가지 돌연변이(c.449C>T 및 c.640G>A)가 각각 이형접합체 형태로 확인된 경우이다. 본 연구에서 확인된 두 가지 돌연변이는 지금까지 한국인 이염성백질이영양증 환자들에 대한 연구에서는 발견되지 않았던 변이이다[7, 8].

1991년 Polten 등[9]은 *ARSA* 유전자의 돌연변이 유형(mutation

type)이 이염성백질이영양증의 임상 유형이나 발병 연령과 연관성이 있음을 보고하였다. *ARSA* 유전자 엑손 2번의 splice donor site가 소실되어 mRNA 발현량을 검출 한계 미만으로 감소시켜 arylsulfatase A 효소 활성도가 거의 나타나지 못하게 되는 I 대립유전자(c.465+1G>A, allele I)를 동형접합체(I/I)로 가지면 평균 발병 연령은 2세로 모두 후기 영아형의 임상양상을 보였다. 반면, 단백질 효소에 대한 감수성을 증가시켜 arylsulfatase A 단백질의 반감기가 감소하는 돌연변이(p.Leu426Pro, allele A)에 대해 동형접합체(A/A)인 경우, 평균 증상 발생 시점은 17.3세였으며, 과반 이상이 성인형 경과를 보였다. 상기 두 가지 형태의 돌연변이에 대해 복합이형접합체(I/A)인 경우에는 평균 5.8세에 증상이 나타났으며, 대부분 유년기형의 임상양상을 나타내었다. 이렇게 A 대립유전자에 비해 I 대립유전자를 많이 가지고 있을수록 질병의 발생 연령이 어리고 증상이 심한 경향이 나타났다.

한편 1997년 Berger 등[10]은 서로 동일한 돌연변이를 가진 두 환자가 서로 다른 표현형을 보이는 경우도 있음을 보고하였다. 이러한 현상의 원인으로서는 그들은 하나의 대립유전자 내에 두 개 이상의 질환관련 돌연변이를 보유함으로써, 확인되지 않은 다른 돌연변이가 표현형에 영향을 미칠 가능성이 있다고 보았다.

이에 대해 2008년 Biffi 등[2]은 *ARSA* 유전자에 발생한 돌연변이를 범주화하여, 이염성백질이영양증의 발병 연령과 진행 양상 등이 돌연변이의 유형과 상관 관계가 있음을 제시하였으며, 이러한 상관 관계가 흔한 빈도의 돌연변이는 물론 드문 돌연변이에서도 나타남을 보였다. 이들은 arylsulfatase A 단백질의 활성도를 극도로 저하시키는 돌연변이를 “0” 대립유전자로, arylsulfatase A 단백질의 활성도가 남아 있을 경우를 “R” 대립유전자로 분류하여 환자를 *ARSA* 대립유전자 유형에 따라 0/0 유형군, 0/R 유형군, R/R 유형군으로 구분한 후 임상 양상을 조사하였다. 0/0 유형군의 경우 평균 발병 연령은 18.5 ± 4.5 개월이었으며, 발병 후 2-3년 내 수의적 움직임이 불가능해지면서 bed-ridden 상태가 되었다. 0/R 유형군은 평균 발병 연령이 48 ± 4 개월이었던 반면, R/R 유형군의 경우 발병 연령이 5세부터 30세까지로 비교적 늦게 발병하였으며, 운동 능력 소실 및 인지 기능 저하도 다른 두 군에 비해 경한 모습을 보였다. 이에 따라 이들은 환자에서 *ARSA* 유전자의 돌연변이 유형이 적절한 예후 인자 및 비슷한 임상양상을 갖는 환자 군의 분류 기준을 제시한다고 결론지었다.

이상의 연구 결과와 본 증례의 arylsulfatase A 활성도 검사 결과 및 *ARSA* 유전자 검사에서 발견된 돌연변이 결과를 종합하였을 때, 환자가 두 개의 과오돌연변이 대립유전자를 보유하고 있으며 arylsulfatase A 활성도가 8.0 nmol/hr/mg protein으로 측정 가능한 정도로 남아있는 점을 고려하면, 본 증례의 환자는 복합이형접합체이긴 하나 Polten 등[9]이 A/A 유형, 그리고 Biffi 등[2]이 R/R 유

형으로 분류했던 환자와 비슷한 임상 양상을 보일 것으로 판단된다. 발병 연령이 5세로 비슷한 유형의 환자들에 비해 비교적 조기에 발병하게 된 원인으로는 환자의 *ARSA* 유전자에 동형접합체로 존재하는 phenotype modifier (질환 연관 변이)인 c.1178C>G (p.Thr393Ser)가 질환 유발 돌연변이들과 상호작용을 일으켜, arylsulfatase A 효소의 활성도를 추가로 감소시켜 더욱 심한 임상경과를 보이도록 하였을 가능성을 생각해 볼 수도 있다.

향후, 본 연구에서 확인된 c.640G>A (p.Ala214Thr) 변이에 대해 cDNA library와 expression vector, 유전형질 도입기술 등을 이용하여 arylsulfatase A 효소의 발현량과 활성도의 변화를 확인하는 유전자 기능 검사를 시행하는 등 추가적인 검사 및 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

이염성백질이영양증은 arylsulfatase A 효소의 결핍으로 인해 발생하는 선천성 대사질환이다. 본 연구는 진행하는 신경학적 퇴행을 주소로 내원한 5세 환아를 대상으로 하였다. 환아는 뇌자기공명영상에서 양측 대뇌 백색질에 대칭적인 병변을 보였고 백혈구의 arylsulfatase A 효소 활성도는 8.0 nmol/hr/mg protein으로 감소되어 있었다(참고범위: 25-80 nmol/hr/mg protein). 중합효소연쇄반응-직접염기서열분석법으로 시행한 *ARSA* 유전자 검사에서는 기존에 질환 유발 변이로 알려진 c.449C>T (p.Pro150Leu) 변이와 새로운 돌연변이인 c.640G>A (p.Ala214Thr)가 확인되었다. 이에 임상 증상 및 생화학적, 영상의학적, 분자유전학적 검사 결과를 바탕으로 조기유년기형 이염성백질이영양증 환자 사례를 보고하는 바이다.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Korea Health Technology R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (A120030).

REFERENCES

1. Gieselmann V and Krageloh-Mann I. Metachromatic leukodystrophy - an update. *Neuropediatrics* 2010;41:1-6.
2. Biffi A, Cesani M, Fumagalli F, Del Carro U, Baldoli C, Canale S, et al. Metachromatic leukodystrophy - mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* 2008;74:349-57.
3. van Rappard DF, Boelens JJ, Wolf NI. Metachromatic leukodystrophy: disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29:261-73.
4. Cesani M, Lorioli L, Grossi S, Amico G, Fumagalli F, Spiga I, et al. Mutation update of *ARSA* and *PSAP* genes causing metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 2016;37:16-27.
5. Gieselmann V. Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr* 2008;97:15-21.
6. Regis S, Corsolini F, Stroppiano M, Cusano R, Filocamo M. Contribution of arylsulfatase A mutations located on the same allele to enzyme activity reduction and metachromatic leukodystrophy severity. *Hum Genet* 2002;110:351-5.
7. Han M, Jun SH, Lee YJ, Eun BL, Lee SJ, Seong MW, et al. Biochemical and genetic analysis of seven Korean individuals with suspected metachromatic leukodystrophy. *Ann Lab Med* 2015;35:458-62.
8. Kang DH, Lee DH, Hong YH, Lee ST, Jeon BR, Lee YK, et al. Identification of a novel splicing mutation in the *ARSA* gene in a patient with late-infantile form of metachromatic leukodystrophy. *Korean J Lab Med* 2010;30:516-20.
9. Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V. Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *N Engl J Med* 1991;324:18-22.
10. Berger J, Loschl B, Bernheimer H, Lugowska A, Tylki-Szymanska A, Gieselmann V, et al. Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *Am J Med Genet* 1997;69:335-40.