

비침습적인 유전자 검사법으로 진단된 아벨리노 각막이상증의 임상 양상

김정완 · 김효명 · 송종석

고려대학교 의과대학 안과학교실

목적: 비침습적인 방법으로 손쉽게 시행할 수 있는 유전자 검사방법을 이용하여 아벨리노 각막이상증 환자를 진단하고 유전자 검사로 확인된 아벨리노 각막이상증 환자의 각막혼탁 정도와 환자의 나이 및 성별과의 연관성을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 세극등 검사상 각막혼탁을 보이는 환자 11명과 정상인 4명을 대상으로 환자의 아래팔에 붙였다 떼는 스티커 형식의 검사를 이용하여 얻은 피부각질세포로 유전자 검사를 시행하여 각막이상증을 진단하였다.

결과: 각막이상증 환자 11명 모두 유전자 검사 결과 이형접합자로 확인되었고 이들의 세극등검사 사진을 기준으로 중증도에 따라 Trace, Mild, Moderate, Severe, Very Severe 5단계로 분류하였다. 이형접합자 환자의 각막이상증 정도는 성별과는 차이가 없었으며($p=0.982$), 나이가 증가함에 따라 높아졌다($p=0.005$).

결론: 피부 각질세포를 이용한 비침습적인 유전자 검사방법은 각막이상증 환자를 쉽게 진단할 수 있는 방법이며 아벨리노 각막이상증은 나이와 그 발현 정도가 유의한 상관관계가 있었다.

〈대한안과학회지 2008;49(9):1431-1436〉

각막이상증은 세극등 소견과 제한된 조직학적 염색 자료를 이용하여 분류되어 왔으며¹ 분자생물학은 각막 이상증을 야기시키는 유전적 근거를 밝혀줌으로써 이러한 환자들의 진단과 치료에 많은 도움을 주고 변화를 가져왔다.² 최근에는 In vivo confocal microscopy를 이용하여 각막이상증 환자의 경과에 따른 미세구조적 연구 또한 가능해졌다.³ 유전자 검사가 이루어진 후로는 지금까지 형태에 따라 모호하게 분리되던 각막이상증의 정확한 진단이 가능하게 되었으며, 각막기질 이상증 중 하나인 과립각막이상증으로 진단되었던 한국이나 일본에서 보고된 대부분의 환자들이 아벨리노 각막이상증(granular dystrophy type II)으로 진단이 바뀌게 되었다.^{4,5}

각막이상증에서 가장 관심받고 있는 TGFBI 유전자(Human transforming growth factor b-induced gene)는 5번 염색체의 장완 31번 밴드에 자리잡고 있으며 비정상적인 단백(keratoepithelin)을 coding하는 17개의 exon을 포함하고 있다.^{6,7} 이들 TGFBI 유전자는 최근 여러 가지 변형들이 보고되고는 있지만 일반적으로 아벨리노 각막이상증, 라이스-뷔클러 각막이상증, 격자각막이상증, 과립각막이상증, Thiel-Behnke 각막이상증의 5가지 각막이상증과 연관된 것으로 알려져 있다.⁸

단순한 샘플 채취 후 유전자 검사기관에 의뢰하는 방법도 가능하지만 유전자 검사 서면 동의 및 혈액채취를 해야 하는 어려움이 있으며 특히 혈액채취는 환자들에게 유전정보 노출이라는 두려움으로 거부감을 주고, 어린 자녀에게는 시행하기 어려워 유전여부를 확인하는데에 부담을 주었다.

본 연구에서는 각막이상증을 보이는 환자들에게 비침습적인 방법으로 피부의 각질세포를 얻어 외래에서 손쉽게 시행할 수 있는 유전자 검사방법을 소개하고 유전자검사를 통해 진단된 아벨리노 각막이상증 환자 10명을 대상으로 세극등 검사소견에 따라 5단계로 분류해 나이, 성별에 따른 차이 및 상관관계를 알아보고자 하였다.

〈접수일 : 2007년 7월 16일, 심사통과일 : 2008년 6월 3일〉

통신저자 : 송 종 석

서울시 구로구 구로동길 97번지
고려대학교 구로병원 안과
Tel: 02-2626-1260, Fax: 02-857-8580
E-mail: crisim@korea.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제96회 추계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

대상과 방법

대상 선정

2005년 6월부터 2006년 12월까지 1년 6개월간 고려대학교 구로병원을 찾은 환자 중 세극등 검사상 각막 이상증이 관찰되는 환자에서 유전자 검사에 동의한 11명을 대상으로 연구를 진행하였다. 이들의 의무기록으로 나이, 성별, 발현 시기를 조사하였으며 유전자 검사 시행 시 세극등 카메라로 전안부 사진을 찍었다. 그리고 각막에 혼탁을 보일 수 있는 다른 전신적 질환과 안과적 질환 여부를 확인하였다. 본 연구에서 시행한 비침습적인 유전자 검사를 시작하기 전 검사를 시행한 연구소에 피검자에 대한 아무런 정보를 제공하지 않고 정상인 4명과 각막이상증을 보이는 한 환자의 검체를 보내어 각막이상증을 보이는 환자의 검체를 정확하게 진단할 수 있는지 확인하였으며 그 후 본 연구를 진행하였다.

유전자 검사 방법

각막이상증을 보이는 환자 11명과 정상인 환자 4명을 대상으로 환자의 동의하에 각막이상증의 확진을 위하여 환자 아래팔에 접촉력 있는 스티커를 붙였다 떼어냄으로써 피부표면의 핵을 갖고 있는 각질세포를 채취하여 유전자 검사를 실시하는 “U-gene test”를 시행하였다(Fig. 1). 검사자에 의한 오염방지를 위해 환자 본인이 직접 스티커를 자신의 아래팔에 붙인 후 반대 손으로 스티커를 10초간 수 차례 누른 다음 떼어낸다. 그 다음 떼어낸 스티커를 봉투에 담아 밀봉한 후 유전자 검사(DNA sequencing)를 위해 연구소에 보낸다. 보내진 스티커에서 피부의 각질뿐 아니라 핵을 가진 충분



Figure 1. Showing how to use “U-gene test.” Put the sticker on the forearm about 20 seconds and peel it off.

한 양의 각질세포를 얻을 수 있으며 각질만 붙어있어 핵을 분리할 수 없는 경우는 재검사를 시행하게 된다. 본 연구에서 시행한 유전자 검사에서는 모든 경우에 핵을 갖는 충분한 양의 각질세포를 얻을 수 있었다. 채취된 상피세포의 TGFBI 유전자의 4번, 12번 엑손(exon)의 DNA 염기서열은 적절한 순행, 역행 프라이머(exon 4, 5'-CCTCGTCCTCTCCACCTGTA-3'/5'-CAGACGGAGGTCATCTCACA-3'; exon 12, 5'-CAACCGGGAAGGAGTCTACA-3'/5'-TGGCCTCATCCTTTGCTAGT-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭하였다. 증폭된 염기 서열은 정제된 후 MegaBACE 500 Automatic sequencer (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 이용하여 바로 분석하였다.

환자 분류 및 통계방법

환자의 세극등 사진을 기초로 병변의 개수에 따라 표준사진을 지정하여 아벨리노 각막이상증을 크게 5단계로 분류하였다(Fig. 2). 각막 병변이 점차 진행함에 따라 각 혼탁의 크기와 개수가 함께 증가하는 양상을 나타냈으나 본 연구에서는 주로 병변의 개수에 따라 분류하였다. 병변의 개수가 5개 미만인 경우를 1단계(Trace), 5개에서 20개를 2단계(Mild), 20개에서 40개를 3단계(Moderate), 40개에서 60개를 4단계(Severe), 60개 이상을 5단계(Very Severe)로 각각 분류한 후 환자의 성별 및 나이와의 상관관계를 분석하였다.

통계적 분석은 SPSS 12.0 프로그램의 Student *t*-test와 Spearman Correlation을 사용하였고 *p* value 0.05 미만을 통계적으로 유의한 것으로 정의하였다.

결 과

각막이상증을 보여 유전자 검사를 시행한 환자 11명 중 남자는 5명, 여자는 6명이었으며 이 중 2명은 모자관계, 2명은 부녀관계였다. 이들의 평균 나이는 44.3세(범위 21~66세)였으며, 이들은 유전자검사 결과 모두 이형접합체 아벨리노 각막이상증(CGC→CAC)으로 확진되었다.

환자들의 각막 병변 상태에 따라 새롭게 정의한 5단계로 분류한 결과 1단계(Trace)에는 21세 환자 1명, 2단계(Mild)에는 31, 34, 44세 환자 3명, 3단계(Moderate)에는 34, 42, 53, 54세 환자 4명, 4단계

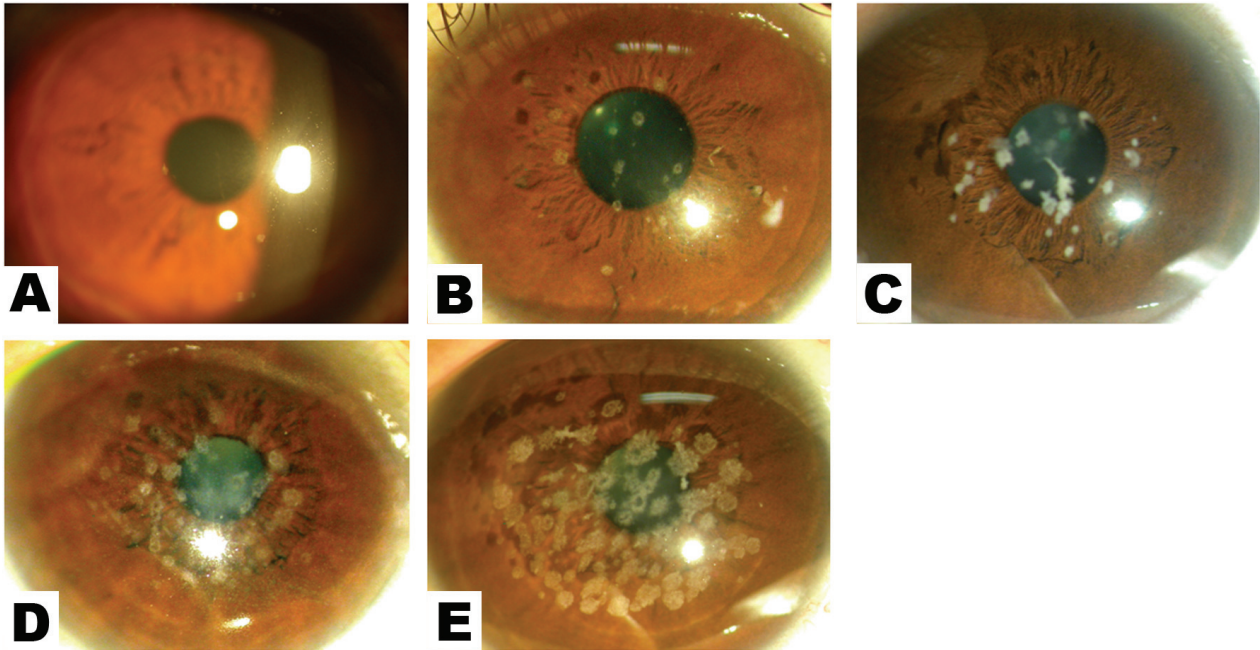


Figure 2. Index photographs of Avellino corneal dystrophy. Five stages based on a slit-lamp photography. (A) Trace, (B) Mild, (C) Moderate, (D) Severe, (E) Very Severe.

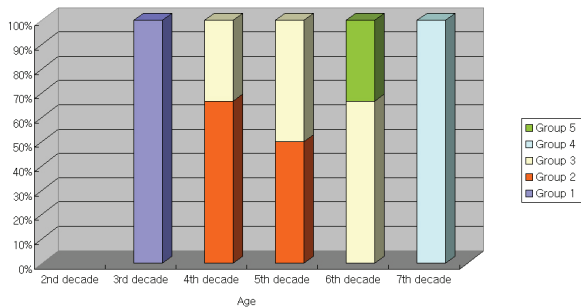


Figure 3. Distribution of heterozygous Avellino corneal dystrophy according to the age. ACD aggravates as the patients become older.

(Severe)에는 60, 66세 환자 2명, 5단계(Very Severe)에는 48세 환자가 분포하게 되어 대체적으로 고령 분포와 함께 나이가 증가함에 따라 각막이상증 정도가 심해지는 양상을 보였다(Fig. 3). 나이에 따른 세극등 검사소견은 Spearman Correlation 검사상 r 값 0.772, P value 0.005로 나이가 증가함에 따라 각막 이상증 정도가 심해지는 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다(Fig. 4). 반면에 성별에 따른 세극등 검사소견은 Student t -test 검사상 남자의 경우 2.60단계, 여자의 경우 3.17단계, P value 0.982로 성별에 따른 세극등 소견 사이에는 통계적 유의성은 존재하지 않았다(Table 1).

가족 관계에서 나이에 따른 각막이상증 정도를 비교

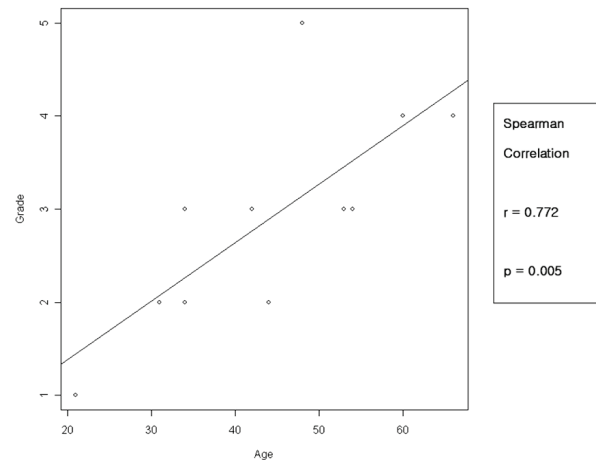


Figure 4. Linear correlation between ACD grade and age.

Table 1. Relationship between ACD grade and sex

	Grade*	P value
Male	2.60±1.14	0.982
Female	3.17±1.17	

* 1=Trace; 2=Mild; 3=Moderate; 4=Severe; 5=Very Severe.

해 보기 위해 모자관계인 환자 2명과 부녀관계인 환자 2명의 세극등 사진을 비교해 본 결과 역시 한 가족 내에서 각막이상증 정도를 살펴보면 아들보다 어머니가 그리고 딸보다는 아버지가 더 심한 양상을 보였다. 하지만,

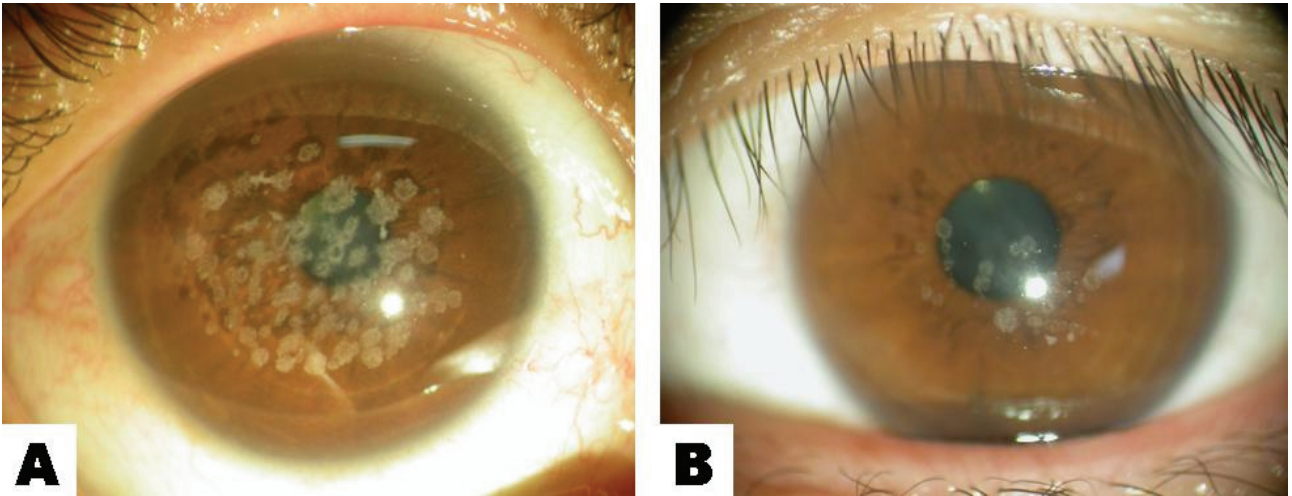


Figure 5. A slit lamp photograph showing the different stages of Avellino corneal dystrophy in the patients of similar age. (A) A 48-year-old female (B) A 42-year-old female.

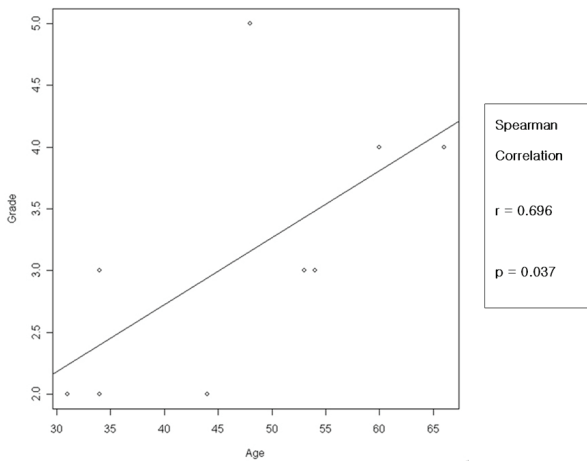


Figure 6. Linear correlation between ACD grade and age after excluding one of the family members.

본 환자 증례 중에서 다른 가족끼리는 비슷한 연령임에도 불구하고 환자의 각막이상증 정도에 차이를 보이는 경우도 있었다(Fig. 5). 따라서 유전자 이상이 동반된 경우에도 각각의 가족에 따라 발현되는 정도와 양상이 다를 수 있다고 생각하여 대상군에서 가족 구성원 중 한 명을 남기고 다른 나머지 사람은 제외한 후 나이와 각막이상증 정도에 관한 상관분석을 시행하였다. 그 결과 역시 Spearman Correlation 검사상 r 값 0.696, P value 0.037로 통계적으로 유의하게 나이가 증가할수록 각막이상증 정도가 심해지는 상관관계를 확인하였다(Fig. 6).

고 찰

아벨리노 각막이상증은 임상적으로 염증이 없이 과

립형과 격자 모양의 각막기질 혼탁을 나타내는 상염색체 우성 유전의 양안성 병변을 보이는 질환이다.⁹ 아벨리노 각막이상증은 나이가 증가할수록 각막 앞에서부터 기질로 진행되는 양상을 띠며 TGFBI Gene의 돌연변이에 의해 124번 아미노산이 알기닌에서 히스티딘으로 전환되어 발생한다.^{4,7,10} 임상적으로 과립각막이상증으로 진단받은 환자의 91%에서 BIGH3의 codon 555에서 돌연변이가 아닌 codon 124에서 돌연변이가 있다고 밝혀져 그동안 과립각막이상증으로 알려졌던 많은 질환이 아벨리노 각막이상증이었던 것으로 보고된 바 있다.¹¹ 따라서 각막이상증의 감별진단을 위해서는 유전자 검사가 필수적이며¹² 외래에서 손쉽게 시행할 수 있는 유전자 검사 방법에 대한 바램이 제기되어 왔다.

기존의 유전자 검사 방법으로는 혈액을 채취하거나 구강 상피세포를 이용하여 DNA를 채취하고 Polymerase chain reaction (PCR)을 수행하여 염기서열의 변이 여부를 관찰하였다.¹² 이러한 유전자 검사 방법은 환자에게 침습적이어서 시행 자체에 부담스러울 뿐만 아니라 일반 개인병원 외래에서 손쉽게 시행하기에는 어려움이 있어서 현재까지 각막이상증에 관한 유전적 연구는 몇몇 특수화된 병원 및 연구기관에서만 이루어져 왔다. 하지만 정상 각막환자에서 라식(LASIK) 후 각막이상증이 악화되는 사례가 보고되면서 라식이나 굴절교정수술 이전에 환자들에게 유전자 검사의 필요성이 한편에서 제기되고 있다.^{13,14} 본 연구에 사용된 피부 각질세포를 이용한 유전자 검사 방법은 비침습적인 뿐만 아니라 사용이 간편하고 쉽기 때문에 나이가 어린 환자들에게도 실행할 수 있다는 장점이 있고 정상인과 환자를 정확하게 진단해내는 신뢰할 만한 검사 방법이라 생각된다.

Chung et al¹²은 2005년도에 98명의 아벨리노 각막이상증 환자를 대상으로 세극등 사진에 기초하여 각막 병변을 3그룹으로 분류하고 연령이 증가할수록 각막 혼탁의 정도가 심해지는 양상을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 각막의 병변 정도에 따라 이를 더 세분화하여 5단계로 나누고 각각의 표준사진을 기초로 환자들을 각 단계로 분류하였다. 처음에는 Chung et al¹²이 각막의 혼탁 정도에 따라 제시한 3단계로 분류하려 했으나 3단계로 나누기에는 혼탁의 정도가 다양해 이를 더 세분화하여 5단계로 나누게 되었다. 그 결과 이전 연구와 마찬가지로 대체적으로 연령이 증가할수록 아벨리노 각막이상증 정도가 악화되는 양상을 확인할 수 있었다. 그러나 성별과는 유의한 상관관계가 발견되지 않았다.

본 연구에서 가지고 있는 한계는 유전자 검사로 확진된 아벨리노 각막이상증 환자가 11명으로 비교적 적은 숫자라는 점이다. 이렇게 적은 숫자의 환자를 5단계로 분류하여 나이와 성별에 따른 상관관계를 분석하기에는 다소 무리가 있다고 생각되나, 다양한 분포의 각막 혼탁을 보이는 환자들을 무리하게 3단계의 틀에 맞춰 분류하므로 발생할 수 있는 오류 또한 문제가 될 수 있다고 생각되었다. 특히 3단계로 분류를 할 경우 각막 혼탁에 뚜렷한 차이가 있음에도 불구하고 중등도 이상의 각막 혼탁이 있는 경우 모두 같은 단계로 분류는 문제가 있어 본 연구에서는 비교적 적은 숫자이지만 좀 더 세분화하여 평가하는 쪽으로 결정을 하였다.

결론적으로 본 연구의 피부 각질세포를 이용한 비침습적인 유전자 검사방법은 종합병원 뿐 아니라 개인 안과에서도 손쉽게 각막이상증 환자를 확진할 수 있는 방법이며, 따라서 라식(LASIK)과 같은 굴절교정수술을 원하는 환자에서 아벨리노 각막이상증과의 감별이 필요한 작은 각막혼탁의 경우 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

- 1) Lisch W. Classification of corneal dystrophies. *Ophthalmic Res* 2006;38:176.
- 2) Pieramici SF, Afshari NA. Genetics of corneal dystrophies: the evolving landscape. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17:361-6.
- 3) Ye YF, Yao YF, Zhou P, Pan F. In vivo confocal microscopy of pre-Descemet's membrane corneal dystrophy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2006;34:614-6.
- 4) Konishi M, Mashima Y, Nakamura Y, et al. Granular-lattice (Avellino) corneal dystrophy in Japanese patients. *Cornea* 1997;16:635-8.
- 5) Kim HS, Yoon SK, Cho BJ, et al. BIGH3 gene mutations and rapid detection in Korean patients with corneal dystrophy. *Cornea* 2001;20:844-9.
- 6) Kocak-Atlantas AG, Kocak-Midillioglu I, Akarsu AN, Duman S. BIGH3 gene analysis in the different diagnosis of corneal dystrophies. *Cornea* 2001;20:64-8.
- 7) Klintworth GK. Advances in the molecular genetics of corneal dystrophies. *Am J Ophthalmol* 1999;128:747-54.
- 8) Waring GO, Rodringues MM, Labison PR. Corneal dystrophies. *Surv Ophthalmol* 1978;23:71-122.
- 9) Cogan DG, Donaldson DD, Kuwabara T, Marshall D. Microcystic dystrophy of the corneal epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1964;63:213-25.
- 10) Ferry AP, Benson WH, Weinberg RS. Combined granular-lattice (Avellino) corneal dystrophy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997;95:61-77.
- 11) Jee DH, Lee YD, Kim MS. Epidemiology of corneal dystrophy in Korea. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:581-7.
- 12) Chung SH, Kim CY, Kim EK. The classification and clinical characteristics in Korean Patients with Avellino Corneal Dystrophy. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:938-44.
- 13) Roh MI, Grossniklaus HE, Chung SH, et al. Avellino corneal dystrophy exacerbated after LASIK: scanning electron microscopic findings. *Cornea* 2006;25:306-11.
- 14) Jun RM, Tchah H, Kim TI, et al. Avellino corneal dystrophy after LASIK. *Ophthalmology* 2004;111:463-8.

=ABSTRACT=

Clinical Manifestations of Avellino Corneal Dystrophy Diagnosed by Non-invasive Genetic Test

Jung Wan Kim, M.D., Hyo Myoung Kim, M.D., Ph.D., Jong Suk Song, M.D., Ph.D.

Department of Ophthalmology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To introduce a new genetic method for the diagnosis of Avellino corneal dystrophy (ACD), which is non-invasive and can be easily performed on an outpatient basis, and to evaluate the relationship between the degree of corneal opacity and age or sex.

Methods: A genetic study was performed on 11 patients who had a specific corneal opacity by slit-lamp examination and on four normal patients by using a specific adhesive tape to obtain epidermal keratinocytes. Corneal dystrophy was diagnosed according to the genetic study.

Results: All 11 patients were confirmed as having heterozygous ACD. Heterozygous ACD patients were classified into five stages: trace, mild, moderate, severe, or very severe, based on slit-lamp photography status. Corneal stages had no relationship with sex ($p=0.982$), but the severity of ACD increased with age ($p=0.005$).

Conclusions: A non-invasive sticker-type genetic study kit, the “U-gene test” is a good method to diagnose corneal dystrophy genetically. Avellino corneal dystrophy becomes more severe over time but has no relationship with sex.

J Korean Ophthalmol Soc 2008;49(9):1431-1436

Key Words: Avellino corneal dystrophy (ACD), Granular dystrophy type II, TGFBI gene

Address reprint requests to **Jong-Suk Song, M.D., Ph.D.**

Department of Ophthalmology, Guro Hospital, Korea University College of Medicine

#97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea

Tel: 82-2-2626-1260, Fax: 82-2-857-8580, E-mail: crisim@korea.ac.kr