

Mitofusin 2 (MFN2) 유전자 돌연변이가 있는 Charcot-Marie-Tooth 2A 환자들의 임상 및 유전학적 특성

이화여자대학교 의과대학 신경과학교실, 건국대학교 의과대학 신경과학교실^a, 연세대학교 의과대학 신경과학교실^b, 병리학교실^c, 부산대학교 의과대학 신경과학교실^d, 계명대학교 의과대학 신경과학교실^e, 아주대학교 의과대학 신경과학교실^f, 공주대학교 생명과학과^g, 가천의과대학 생명과학부^h, 경남대학교 화학과, 전남대학교 의과대학 병리학교실ⁱ

최병옥 김상범 박기덕 최경규 오지영^a 서범천^b 김세훈^c 김대성^d 임정근^e 주인수^f
김승민^b 선우일남^b 윤은경^g 정찬구^g 이정주^h 김용성ⁱ 이민철ⁱ 정기희^g

Clinical and Genetic Characteristics in Patients of Charcot-Marie-Tooth type 2A with Mitofusin 2 (MFN2) Mutations

Byung-Ok Choi, M.D., Sang-Beom Kim, M.D., Kee-Duk Park, M.D., Kyoung-Gyu Choi, M.D., Jeeyoung Oh, M.D.^a, Bum Chun Suh, M.D.^b, Se Hoon Kim, M.D.^c, Dae-Seong Kim, M.D.^d, Jeong-Geun Lim, M.D.^e, In Soo Joo, M.D.^f, Seung-Min Kim, M.D.^b, Il-Nam Sunwoo, M.D.^b, Eun Kyoung Yun^g, Chan Goo Chung^g, Chung Choo Lee, Ph.D.^h, Yongseong Kim, Ph.D.ⁱ, Min-Chul Lee, M.D.ⁱ, Ki Wha Chung, Ph.D.^g

Department of Neurology, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul; Department of Neurology, Konkuk University College of Medicine^a, Seoul; Departments of Neurology^b and Pathology^c, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Neurology, Pusan National University College of Medicine^d, Busan; Department of Neurology, Keimyung University College of Medicine^e, Daegu; Department of Neurology, Ajou University College of Medicine^f, Suwon; Department of Biological Science, Kongju National University^g, Gongju; Department of Biological Science, Gachon Medical School^h, Incheon; Department of Chemistry, Kyungnam Universityⁱ, Masan; Department of Pathology^j, Chonnam National University College of Medicine^j, Gwangju, Korea

Background: Mitofusin 2 (MFN2) is a membrane protein and is an essential component of mitochondrial fusion machinery. Mitochondrial fusion is essential for various biological functions in mammalian cells. Thus mutations in MFN2 are the underlying cause of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A (CMT2A). However, there has been no reports investigating the MFN2 genes in Korean CMT patients. Therefore, we investigated to find the clinical and genetic characteristics in Korean patients with the MFN2 gene mutation.

Methods: We examined the mutations of the MFN2 gene in 137 Korean CMT families. According to criteria from the European CMT consortium, CMT2 was 45 families. Mutations were confirmed by both strands sequencing. Nerve conduction studies were carried out in CMT patients having each mutation.

Results: Eight pathogenic mutations were found in 10 families. Six mutations (Leu92Pro, Gly127Asp, His165Arg, Ser263Pro, Arg364Trp, Met376Thr) were determined to be novel, and those were not detected in the 100 healthy controls. A *de novo* missense mutation was found in three CMT families (30%). The frequency of the MFN2

mutation was 22.2%, which was higher than those found in the Cx32 mutation. In CMT2A, the frequencies with early age at onset (<10 years) and flat feet were 46.2%.

Conclusions: We found MFN2 mutations in patients with sporadic or dominantly inherited CMT. In the majority of cases with CMT type 2, the axonal neuropathy, may be due to MFN2 mutations.

J Korean Neurol Assoc 24(2):131-140, 2006

Key Words: Charcot-Marie-Tooth disease, Characteristics, Mitofusin 2, Gene, Mutation

Received October 17, 2005 Accepted November 25, 2005

* Byung-Ok Choi, M.D.

Department of Neurology, Ewha Womans University College of Medicine, Dongdaemun Hospital

70 Jongno 6-ga, Jongno-gu, Seoul, 110-783, Korea

Tel: +82-2-760-5257 Fax: +82-2-760-5008

E-mail: bochoi@ewha.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A05-0503-A20718-05N1-00010A).

서 론

샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT)은 유전성 신경계 질환 중 가장 흔하며, 임상 양상은 비교적 유사하지만 다양한 유전학적 원인을 보이는 말초신경계 질환이다.¹

CMT 질환은 탈수초성 신경병증인 CMT1형과 축삭형 신경병증인 CMT2형, 그리고 이들의 중간 그룹에 속하고 다른 유전적 원인을 가진 중간형 CMT (CMT-Int)로 나눌 수 있다.² CMT1형은 원인이 되는 유전학적 변이 및 병인이 잘 알려져 있지만 CMT2형은 최근에 들어서야 비로소 분자유전학적 발병 기전이 규명되고 있다.³ 현재까지 CMT2형은 유전자 연구 결과에 따라 8개의 유전좌위와 7개의 원인 유전자들이 보고되어 있다.⁴ CMT2A의 유전좌위는 여러 인종에서 시행한 연관분석(linkage analysis)을 통해 염색체 1p36.2에 위치한다는 것은 잘 알려져 있다.⁵ Zhao 등에 의해 이 부분에 위치하는 Kinesin 1B-β (*KIF1B*) 유전자 돌연변이를 가진 한 가계가 보고되었으나 이후로 더 이상의 보고는 없었다.⁶ 그런데 2004년에 Zuchner 등은 *KIF1B*에서 동원체(centromere) 쪽으로 1.65 Mb 떨어진 곳에 있는 Mitofusin 2 (*MFN2*) 유전자에 돌연변이를 가진 7가계를 발견하였고 이후 몇몇 보고에 의해 8-23%의 매우 높은 빈도를 가진다는 사실이 발표되어 축삭형 신경병증인 CMT2형의 주요 유전자(major gene)가 될 가능성이 있음을 시사하였다.⁷⁻⁹

Mitofusin 2는 미토콘드리아의 외막에 위치하고 미토콘드리아의 융합을 조절하는 기능을 한다.¹⁰ 미토콘드리아는 역동적 기관으로 융합 및 분열을 반복하는 고도의 운동성을 가진 세포 내 소기관인데 말초신경계의 기능을 유지하기 위해서는 미토콘드리아가 축삭을 따라 먼 거리를 이동할 수 있어야 한다.¹¹ 따라서 미토콘드리아의 융합을 통한 네트워크의 형성은 말초신경계 축삭 기능의 유지를 위해서도 반드시 필요하다.¹² 그러므로 이와 같은 말초신경계의 특징적인 구조에 의해 *MFN2*의 돌연변이는 축삭형 신경병증인 CMT2A를 유발하게 되는 것이다.¹³

그런데 CMT2A 질환을 유발하는 *MFN2* 유전자에 대해 한국인 CMT 환자들을 대상으로 한 유전자 돌연변이 분석 및 임상적 특성 분석에 관한 보고는 없었으므로, 저자들은 CMT 질환으로 진단된 137가계를 대상으로 하여 유전자검사를 하고, 그 결과 *MFN2* 유전자 돌연변이로 확인된 10가계를 대상으로 임상 및 유전학적 특성을 분석하였다.

본 연구는 신경학적 진찰 소견, 전기생리학적검사 및 비복신경 조직검사 등을 하여 CMT 질환으로 진단된 137가계, 412명의 환자들을 대상으로 하였다. 이들 중 상염색체 우성 유전이고 전기생리학적검사 소견상 정중신경의 전도속도가 38 m/s 이하인 CMT1형은 77가계, 상염색체 우성 유전이고 정중신경의 전도속도가 38 m/s 이상인 CMT2형은 45가계, 심한 임상 양상을 보이고 태생 시부터 증상이 시작된 Dejerine-Sottas 증후군으로 생각되는 CMT3형은 4가계, 상염색체 열성 유전인 CMT4형 및 명확하게 분류하기 어려운 경우가 11가계가 있었다. 정상 대조군으로는 임상 진찰 소견 및 전기생리학적검사상 CMT에 합당한 신경병증의 소견이 없으면서 동시에 CMT의 가족력이 없는 100명을 선택하여 대조군으로 하였다. 대상 환자들과 면접하여 본 질환에 대하여 충분히 설명하고 유전자검사의 동의를 구하였으며, 동의한 환자와 그 가족 구성원들 및 CMT 유전자검사를 위해 본원으로 의뢰된 환자들을 대상으로 하였다.

임상 양상을 비교하기 위해서 발병 연령, 질병 기간, 근육 위축, 발 모양 변형, 건반사 등을 조사하였다. 발병 연령은 운동이나 감각의 저하, 혹은 발 모양 변형 등과 같은 CMT 질환의 증상이 처음으로 나타났던 시기로 하였으며, 질병 기간은 환자가 병원을 방문한 시점과 발병 연령 사이의 기간으로 하였다.

CMT 질환의 심한 정도를 측정하기 위하여 9단계로 된 기능장애척도(functional disability scale; FDS)를 사용하였는데 기준은 다음과 같다.¹⁴ 0; 정상, 1; 정상이지만 피로감이나 통증이 있는 경우(normal but with cramps and fatigability), 2; 달리기를 할 수 없는 경우(inability to run), 3; 걸기가 어렵지만 도움 없이 걷는 것이 가능한 경우(walking difficulty but still possible unaided), 4; 지팡이를 가지고 걸을 수 있는 경우(walk with cane), 5; 목발을 가지고 걸을 수 있는 경우(walk with crutches), 6; 보행기에 의지해서 걸을 수 있는 경우(walk with a walker), 7; 휠체어를 타고 다녀야 하는 경우(wheelchair bound), 8; 누워서 생활하는 경우(bedridden).

2. Genomic DNA의 추출

CMT 가계의 환자 및 가족 구성원들과 정상 대조군들의 말초혈액을 EDTA가 처리된 튜브에 모은 후, DNA 정제 장치(Promega, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 모근이나 타액으로부터의 DNA 추출은 55℃에서 3시간 동안 proteinase K를 처리한 후 phenol:chloroform 방법으로 실시하였다.

3. MFN2 유전자검사

대상과 방법

1. 대상

MFN2 유전자에서 GTPase domain과 그 주변 부위를 암호화하는 엑손(exon) 3-11 및 인접 인트론(intron) 부위를 PCR 방법으로 증폭한 후, 서열분석(sequencing)을 하여 구체적인 돌연변이를 검색하였다. 엑손 7-8 및 10-11은 동시에 하나의 단편으로 증폭하였으며, 그 외는 각 엑손별로 증폭하였다. MFN2 유전자의 해당 부위를 증폭하기 위한 PCR은 주형 DNA 30-50 ng, 각 primer 10 pmol, dNTPs 200 μM, MgCl₂ 1.5 mM, Taq polymerase 0.5 unit 및 1X reaction buffer (Promega, USA)가 포함된 50 μL의 반응 용액을 이용하였으며, PCR 증폭 장치 (ABI GeneAmp 9700[□], USA)에서 94°C에서 2분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C 40초, 60°C 30초 72°C 1분 30초의 32회 사이클링을 실시하고 72°C에서 7분간 추가적으로 extension시켰다. 각 엑손의 증폭을 위해 사용된 primer와 PCR 산물의 길이는 Table 1과 같다. PCR 실시 후 증폭된 DNA는 정제한 후 자동염기서열분석기(ABI 3700, USA)에서 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit를 이용하여 양 방향의 염기서열을 결정하고, 서열의 판독은 CHROMAS (Ver. 2.23) 프로그램을 이용하였다. 한편, 염기서열 분석을 통해 발견된 돌연변이가 해당 가계의 환자에서만 관찰되고 비환자 구성원에서는 발견되지 않으며, 또한 임의적으로 선택된 100명의 정상인 중에서는 전혀 발견되지 않을 때, 그 돌연변이를 원인 돌연변이로 판정하였다.

결 과

1. MFN2 유전자 검사

MFN2 유전자 변이가 있는 환자들의 유전자 검사결과를

Table 2에 정리하였다.

CMT 환자 137가계를 대상으로 하여 MFN2 유전자검사를 하였는데 이 중 CMT2형은 45가계였다. 모두 10가계(22.2%)에서 8개의 MFN2 유전자 돌연변이를 발견하였는데 이들은 네 번째 (Leu92Pro, Arg94Trp), 다섯 번째(Thr105Met, Gly127Asp), 여섯 번째(His165Arg), 여덟 번째(Ser263Pro), 열한 번째(Arg 364Trp, Met376Thr) 엑손에 위치하였으며 GTPase 도메인의 내부 혹은 위쪽에 위치하였다. 본 연구에서 관찰된 8개의 돌연변이 중 6개는 신규 돌연변이(novel mutation)로 밝혀졌다 (Leu92Pro, Gly127Asp, His165Arg, Ser263Pro, Arg364Trp, Met376Thr). 그리고 임상 증상이 없는 가족 구성원들과 정상인 100명에서는 같은 유전자 변이가 발견되지 않아 CMT 질환을 유발하는 원인 유전자 돌연변이로 생각하였다. 부모의 유전자는 정상이었으나 본인부터 유전자 변이가 발생한 새로운 돌연변이 (de novo mutation)가 세 가족(30.0%)에서 발견되었는데, 이는 높은 수치였다. 또한 이들 11가계에서 염색체 17p11.2-p12의 중복(duplication)과 peripheral myelin protein 22 (PMP22), myelin protein zero (MPZ), connexin32 (Cx32), early growth response 2 (EGR2), periaxin (PRX), neurofilament light chain (NEFL) 유전자에 대한 점상 돌연변이를 검사하였는데 모두 정상이었다.

FC87 (number of CMT family 87) 가계에서는 MFN2 유전자의 열한 번째 엑손에 위치하는 364번 아미노산을 암호화하는 코돈이 CGG에서 TGG로 변형되어 아르기닌(arginine; Arg)에서 트립토판(tryptophan; Trp)으로 변형(Arg364Trp)된 것을 확인하였다. FC25 가계와 FC113 가계에서는 네 번째 엑손에 위치하는 94번 아미노산을 암호화하는 코돈이 CGG에서 TGG로 변형되어 아르기닌에서 트립토판으로 변형(Arg94Trp)되었고

Table 1. Sequence of the oligonucleotide primers and PCR product sizes for mutation screening of the MFN2 gene

Region	Primer name	Sequence (5'-3')	PCR product size
Exon4	MFN2 4F	TCCAGACTTGGGACTGTGGAAC	284
	MFN2 4R	TGGAACGTTCTGTGACCTTGAC	
Exon5	MFN2 5F	CCAGGCTGGTATCTGCGTTGTGA	306
	MFN2 5R	GTGTCACAACGGAGGACTTGCTC	
Exon6	MFN2 6F	TGTGATGCAGCGGCACAGGAAATC	248
	MFN2 6R	TGGTGCCCTCCAGTTTGACCTC	
Exon7 & 8	MFN2 7F	TAGGGCTCCTGCTCTGCCTGATGA	425
	MFN2 8R	AGTGCTCCCTCGGGTTGCATTC	
Exon9	MFN2 9F	GCCCAGCCTCTTATGACCTATTC	323
	MFN2 9R	TGACAGACTCCTCAGCACGAGAC	
Exon10 & 11	MFN2 10F	CTGCTGCCAAGTTGTTTCTGGAC	409
	MFN2 11R	TCCACCTATCTGCAGTCTTGAC	

Table 2. Mutations found in *MFN2* gene in Korean CMT2A pedigrees

Exon	Domain	Nt. change	AA change	Family ID	Inheritance	Phenotype	Reference
Exon 4	GTPase	c.275T>C	Leu92Pro	FC34	<i>De novo</i>	CMT2, severe	Novel
Exon 4	GTPase	c.280C>T	Arg94Trp	FC25 FC113	AD AD	CMT2, severe CMT2, severe	Züchner et al., 2004
Exon 5	GTPase	c.314C>T	Thr105Met	FC135	<i>De novo</i>	CMT2, mild	Züchner et al., 2004; Lawson et al., 2005
Exon 5	GTPase	c.380G>A	Gly127Asp	FC48	<i>De novo</i>	CMT2, mild	Novel
Exon 6	GTPase	c.494A>G	His165Arg	FC81 FC111	AD AD	CMT2, mild CMT2, mild	Novel
Exon 8	GTPase	c.787T>C	Ser263Pro	FC52	AD	CMT2, mild	Novel
Exon 11	Middle	c.1090C>T	Arg364Trp	FC87	AD	CMT2, severe	Novel
Exon 11	Middle	c.1127T>C	Met376Thr	FC70	AD	CMT2, mild	Novel

Nucleotide numbering; The A of ATG translation initiation site as +1, Reference sequence accession number is NM 014874.

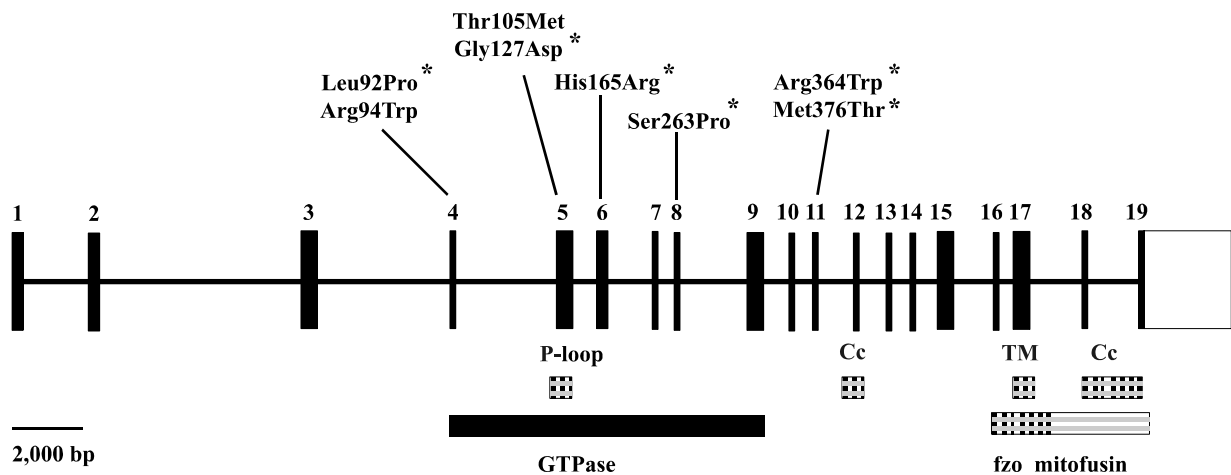


Figure 1. Genomic structure and mutations of *MFN2*. We found Leu92Pro, Gly127Asp, His165Arg, Ser263Pro, Arg364Trp and Met376Thr in *MFN2* gene. The Arg94Trp and Thr105Met mutations in the *MFN2* tail domain was reported previously (Züchner et al, 2004). Solid black boxes and solid white boxes indicate protein coding sequences and untranslated sequences, respectively. Novel mutations are indicated by an asterisk(*). P-loop; GTP-binding site motif, Cc; coiled-coil domain, TM; transmembrane domain, GTPase; GTPase functional domain, fzo mitofusin; fzo mitofusin functional domain.

FC34 가계에서 네 번째 엑손에 위치하는 92번 아미노산을 암호화하는 코돈이 CTG에서 CCG로 변형되어 류신(leucine; Leu)에서 프롤린(proline; Pro)으로 변형(Leu92Pro)되었다. FC48 가계는 다섯 번째 엑손에 위치하는 127번 아미노산을 암호화하는 코돈이 GGC에서 GAC로 변형되어 글리신(glycine; Gly)에서 아스파라긴(asparagine; Asp)으로 변형(Gly127Asp)되었고, FC52 가계는 여덟 번째 엑손에 위치하는 263번 아미노산을 암호화하는 코돈이 TCT에서 CCT로 변형되어 세린(serine;

Ser)이 프롤린으로 변형되었다. FC70 가계는 열한 번째 엑손에 위치하는 376번 아미노산을 암호화하는 코돈이 ATG에서 ACG로 변형되어 메티오닌(methionine; Met)에서 트레오닌(threonine; Thr)으로 변형(Met376Thr)된 것을 확인하였다. FC81 가계와 FC111 가계에서는 여섯 번째 엑손에 위치하는 165번 아미노산을 암호화하는 코돈이 CAT에서 CGT로 변형되어 히스티딘(histidine; His)에서 아르기닌으로 변형(His165Arg)되었고, FC135 가계는 다섯 번째 엑손에 위치하는 105번 아미노산을 암



Figure 2. Phenotype of CMT2A patient with *MFN2* mutation. Bilateral leg muscle atrophy was prominent in FC34 patient with Leu92Pro mutation. His feet deformities displayed the flat feet rather than high-arched feet.

호화하는 코돈이 ACG에서 ATG로 변형되어 트레오닌에서 메티오닌으로 변형(Thr105Met)된 것을 확인하였다. 저자들은 또한 c.212T>C (5'-UTR, exon 1), c.150C>A (Ile150Ile), c.165C>T

(Thr55Thr), c.408A>T (Val136Val), c.474+4A>G (5'-splicing site, intron 5), c.1161-4T>C (3'-splicing site, intron 11), c.1569C>T (Ser523Ser), c.2332A>G (3'-UTR at exon 19) 등 8개의 유전자 다형성을 발견하였는데 이는 정상군에서도 관찰되었거나 이전에 유전자 다형성으로 이미 보고된 것들이었다.

2. *MFN2* 돌연변이가 있는 CMT2A 환자들의 임상적 특성

MFN2 유전자 변이가 있는 10가족, 13명의 환자(남자 8명, 여자 5명)들의 임상 양상을 Table 3에 정리하였다. 유전되는 양상으로는 상염색체 우성 유전이 7가족이었고, 부모에서는 유전자 변형이 없었고 본인부터 돌연변이가 발생한 산발성 유전도 3가족(30.0%)에게서 발견되었다.

MFN2 유전자 변이 환자들에서 신경학적 진찰 및 전기생리학적검사를 할 당시의 나이는 24.8 ± 17.1 세였고, 질병의 발생에서 진찰까지의 기간(disease duration)은 11.1 ± 8.9 년이었다. 평균 발병 연령은 13.8 ± 14.6 세였으며 10세 이전에 CMT 증상이 나타나는 경우가 46.2%로 관찰되어 *MFN2* 유전자 변이는 어린 나이에 발병함을 알 수 있었다. CMT 질환에 의한 기능장

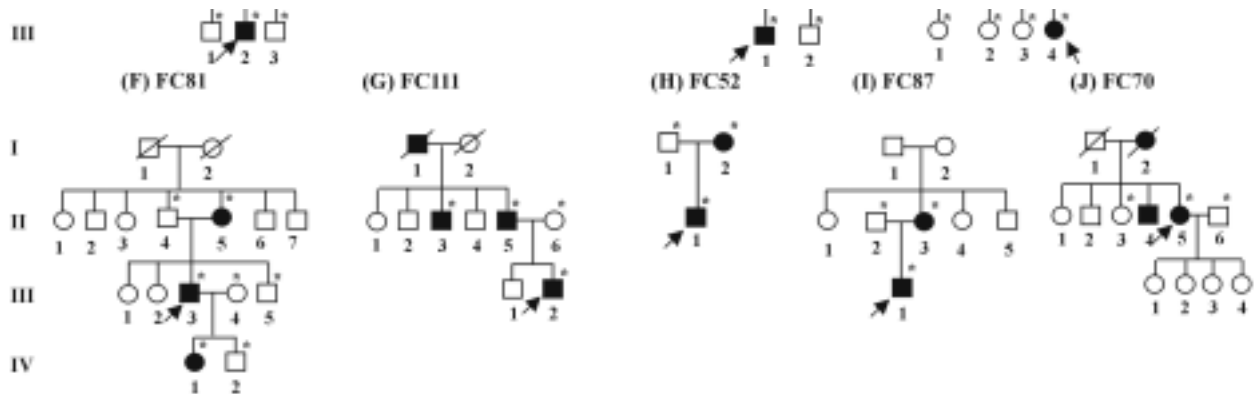


Figure 3. Pedigrees of CMT2A families with *MFN2* mutations. The available DNA samples are indicated by asterisks (*). The open symbols stand for unaffected males (\square) and unaffected females (\circ). The filled symbols represent affected males (\blacksquare) and affected females (\bullet). The arrows indicate the proband. (A) FC34 with Leu92Pro, (B) FC25 with Arg94Trp, (C) FC113 with Arg94Trp, (D) FC135 with Thr105Met, (E) FC48 with Gly127Asp, (F) FC81 with His165Arg, (G) FC111 with His165Arg, (H) FC52 with Ser263Pro, (I) FC87 with Arg364Trp, and (J) FC70 with Met376Thr.

Table 3. Clinical features of patients with *MFM2* mutation

Patient	FC25 (II-2)	FC34 (III-2)	FC48 (II-3)	FC52 (II-1)	FC70 (II-3)	FC81 (II-5)	FC81 (III-5)	FC37 (II-2)	FC37 (III-1)	FC111 (III-2)	FC113 (II-5)	FC113 (III-1)	FC135 (III-4)
Sex	Male	Male	Male	Male	Female	Female	Male	Female	Male	Male	Female	Male	Female
Age at exam (yr)	28	13	23	14	53	60	32	22	2	20	37	6	12
Age of onset (yr)	9	1	16	12	39	50	10	4	1	14	8	4	11
Disease duration (yr)	19	12	7	2	14	10	22	18	1	6	29	2	1
FDS ^a	6	6	2	1	2	1	3	7	6	1	7	3	2
Muscle weakness ^b													
Upper limbs	++	++	-	-	+	-	+	++	++	-	++	+	+
Lower limbs	+++	+++	+	+	++	-	++	+++	+++	+	+++	+++	++
Muscle atrophy	Severe (U<L)	Severe (U<L)	No	Mild (L)	Mild (U<L)	No	Mild (U<L)	Severe (U<L)	Severe (U<L)	No	Severe (U<L)	Severe (U<L)	Mild (L)
Sensory disturbance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DTE ^c													
Upper limbs	A	A	N	D	D	N	N	A	A	N	A	A	D
Lower limbs	A	A	I	D	A	D	A	A	A	D	A	A	A
Feet deformities													
High-arched feet	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
Flat feet	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Additional symptoms	-	Scoliosis	Exostosis plantar responses	-	Pain	Tremor, SNHL	Tremor, SNHL	Scoliosis, contracture	-	-	-	Scoliosis, contracture	Tremor
Pathologic findings	ND	Sural nerve, axonal	ND	ND	ND	Sural nerve, axonal	ND	Sural nerve, axonal	ND	ND	Sural nerve, axonal	ND	Gastrocnemius muscle, neurogenic atrophy

^aFunctional disability scale, 0=normal, 1=grunts and fatigability, 2=inability to run, 3=possible unaided, 4=with cane, 5=with crutch, 6=with walker, 7=wheelchair, 8=bedridden.

^bMuscle weakness in lower limbs: += ankle dorsiflexion <45 on MRC (medical research council) scale; ++= ankle dorsiflexion <45 on MRC scale; +++= proximal weakness and wheelchair dependent.

^cMuscle weakness in upper limbs: += intrinsic hand weakness <45 on MRC scale; ++= intrinsic hand weakness <45 on MRC scale; -= no symptoms.

^dU<L, lower limb predominant; ^eDeep tendon reflexes: N=normal; D=diminished; A=absent; I=increased; ND; not done; SNHL, sensorineural hearing loss; Contracture, both knee joint contracture

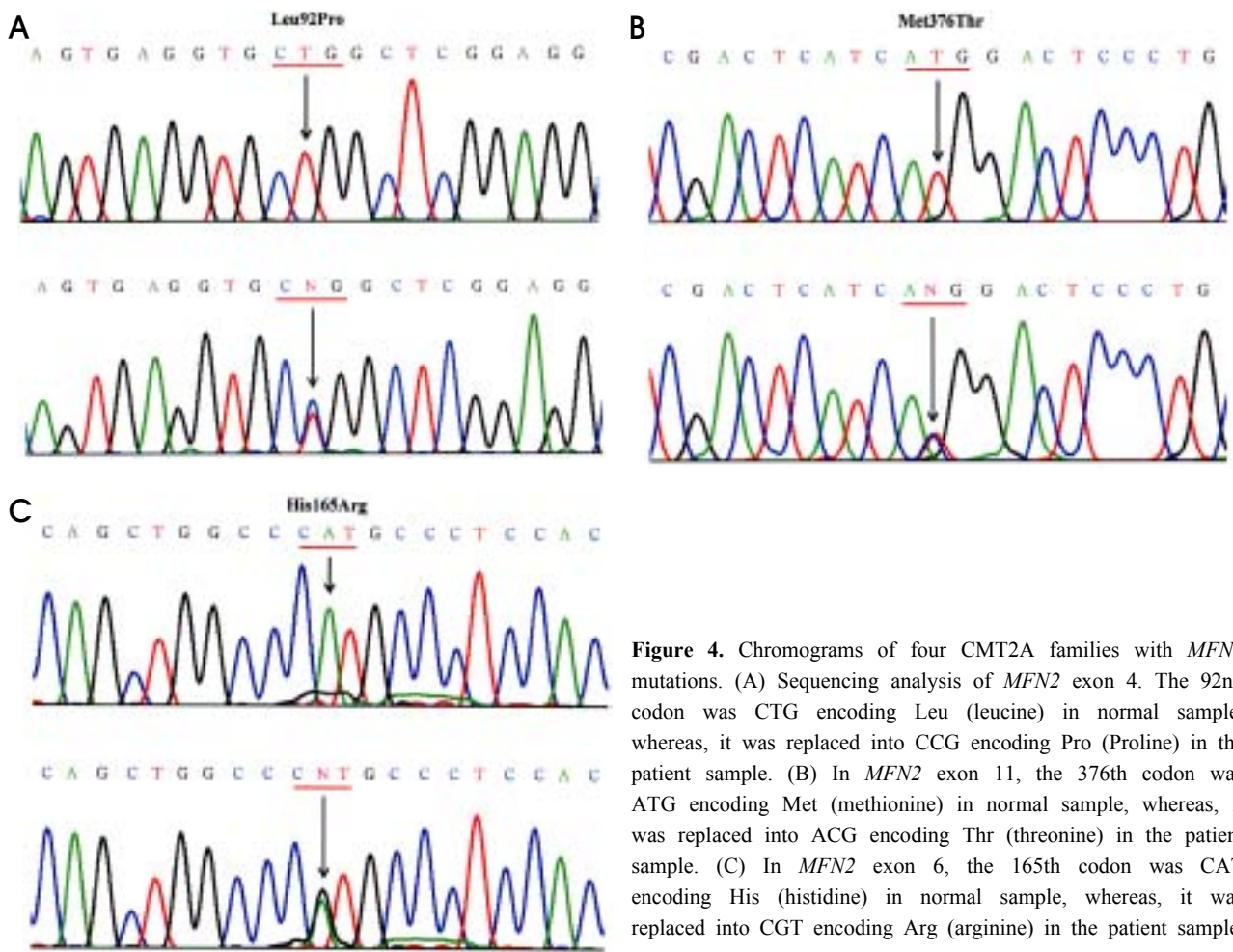


Figure 4. Chromograms of four CMT2A families with *MFN2* mutations. (A) Sequencing analysis of *MFN2* exon 4. The 92nd codon was CTG encoding Leu (leucine) in normal sample, whereas, it was replaced into CCG encoding Pro (Proline) in the patient sample. (B) In *MFN2* exon 11, the 376th codon was ATG encoding Met (methionine) in normal sample, whereas, it was replaced into ACG encoding Thr (threonine) in the patient sample. (C) In *MFN2* exon 6, the 165th codon was CAT encoding His (histidine) in normal sample, whereas, it was replaced into CGT encoding Arg (arginine) in the patient sample.

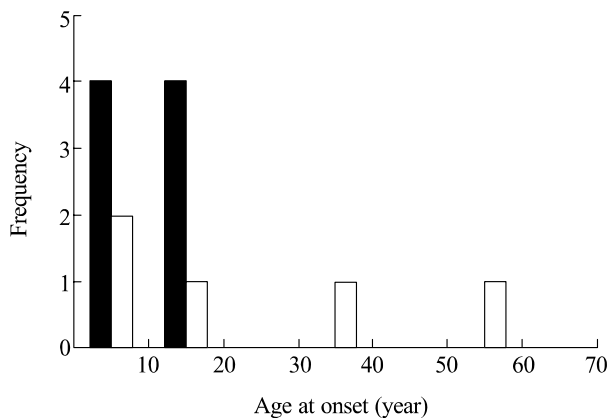


Figure 5. Frequency distribution of age at onset in CMT2A patients with *MFN2* mutation. Solid black boxes and solid white boxes indicate male and female, respectively.

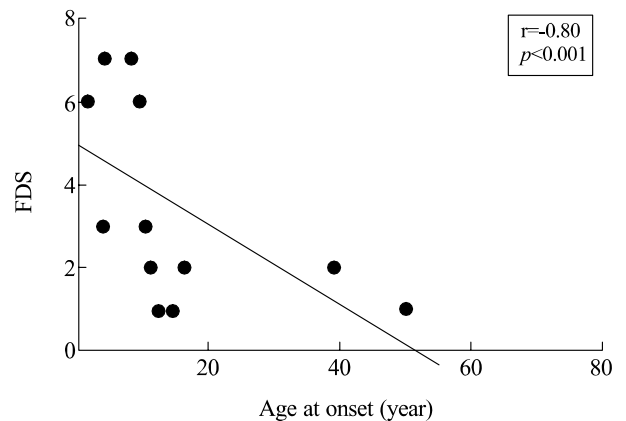


Figure 6. Scatter diagram and regression analysis between onset age and functional disability scale in CMT2A patients with *MFN2* mutations.

에의 정도를 나타내는 FDS는 평균이 3.6 ± 2.4 로 높았는데, 거동이 불편하여 휠체어가 반드시 필요한 경우가 2명(15.4%), 보행 보조기(walker)가 있어야 하는 경우도 3명(23.1%)으로, 도움이 없이 혼자서는 거동이 불편한 경우가 38.5%였다. 반면에 임상 증상이 아주 경미하여 일상생활에 장애가 거의 없는 정상에 가까운 경우도 61.5%에서 관찰되었다.

임상 양상 중 특이한 점으로 10세 이전에 발병한 경우에는 증상이 심하였고 10세 이후에 발병한 경우에는 임상 증상이 매우 경미하여 뚜렷한 차이를 보였다는 것을 들 수 있다. 그리고 1090번 코돈에서 돌연변이가 발생한 가족은 10세 이전에 발병하여 휠체어를 타거나 보조기가 있어야만 거동이 가능한 경우였으나 494번 코돈에서 돌연변이가 발견된 가족은 10세 이후에 발병하였고 임상 증상이 매우 경미하였다. 따라서 *MFN2* 유전자 변이에서는 돌연변이의 위치에 따라 서로 다른 임상 양상과 발병 연령을 보여 주었으며, 유전자 변이의 위치가 같은 경우에는 서로 다른 환자 가족들에서도 유사한 양상을 보였다.

감각의 이상은 통각, 촉각, 진동각, 위치각을 검사하였을 때 모든 경우에서 감각 이상이 있음을 알 수 있었다. 심부진반사는 380번 코돈 돌연변이가 있었던 환자의 상지는 정상, 하지는 증가된 소견을 보인 경우를 제외하고는 모두 저하되거나 관찰되지 않았다. *MFN2* 돌연변이에서 발 모양의 변형은 발등이 위로 올라간 양상(high-arched feet)이 53.8%였고, 편평발(flat feet)인 경우는 46.2%였다. 따라서 CMT1A 등의 다른 CMT 유전자형에 비해서 편평발의 빈도가 높았다. 이 외에 동반되는 증상으로 척추측만증(scoliosis)이 4명(30.8%), 진전(tremor)이 3명(23.1%)에서 관찰되었고, 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)과 무릎관절의 변형(joint contracture)은 각각 15.4%에서 관찰되었다.

FC81가족에서는 세대를 내려가면서 이른 나이에 발병하고 임상 증상이 더욱 심해지는 예기성(anticipation)을 보였다. 환자의 어머니(II-5)는 50세에 발병하였고 60세에 진찰을 하였을 때 신경전도검사 속도에서 미약한 저하가 있는 것 외에는 정상에 가까운 소견을 보였다. 이에 비해 환자(III-3)는 10세에 발병하고 32세에 검진을 하였을 때 운동 및 감각기능과 신경전도 검사에서 심한 장애와 함께 어머니보다 심한 진전을 보였다. 이와 함께 FC, 87, 113가족도 FC81가족처럼 세대를 내려가면서 발병 연령과 임상 양상이 심해졌다.

3. 발병 연령과 기능장애정도(FDS)와의 상관 관계

CMT 질환에 의한 기능장애의 정도가 발병 연령과 관련이 있는지를 알아보았다(Fig. 6). 10세 이전의 이른 나이에 발병한

경우에는 보행장애 등의 발달장애를 가진 경우도 있었으며 보조기가 없이는 보행이 불가능하였다. 환자수가 적고 50세에 발병하는 등의 제한이 있었음에도 불구하고 *MFN2* 유전자 돌연변이에 의해 CMT2A 증상이 발병하는 연령과 기능장애의 정도와는 유의한 상관 관계가 있음을 알 수 있었다($r = -0.80$, $p < 0.001$).

고 찰

저자들은 한국인 CMT 환자 137가계(CMT2형, 45가계)를 대상으로 *MFN2* 유전자 분석을 하였고 이 중 10가계에서 8개의 질병 유발 원인 유전자 돌연변이를 발견하였다. 모든 돌연변이들은 GTPase 도메인의 내부 혹은 바로 위쪽에 위치하였으며 다른 종류의 아미노산으로 바뀌는 missense 돌연변이였다. 이 중 6개의 CMT2A 유발 원인 유전자 돌연변이(*Leu92Pro*, *Gly127Asp*, *His165Arg*, *Ser263Pro*, *Arg364Trp*, *Met376Thr*)는 이전에 보고되지 않은 신규(novel) 돌연변이였다. 그리고 3가계(30.0%)에서는 부모는 유전자 변이가 없었고 본인부터 유전자 이상이 발생한 새로운 돌연변이(*de novo* mutation)였다. 이들은 European CMT consortium의 가이드라인을 기준으로 할 때 모두 CMT2형으로 진단되었으므로 한국인에서 발견된 *MFN2* 유전자 변이를 가진 CMT2A 가계들로 확진할 수 있었다.¹⁵

MFN2 유전자 변이가 있는 CMT2A 환자들에서 발견된 특징적인 임상 양상은 10세 이전에 발병한 조기발병(early age onset)군과 10세 이후에 발병한 후기발병(late age onset)군이 뚜렷하게 차이가 난다는 것이었다. 본 연구에서 후기발병군은 FDS 1-3으로 경미한 장애가 있거나 생활의 장애가 거의 없는 경우였고 조기발병군은 FDS 6과 7로 휠체어를 타거나 보조기가 없이는 보행이 불가능한 경우였다. 또한 조기발병을 일으키는 유전자 돌연변이와 후기발병을 일으키는 돌연변이의 위치가 서로 달랐고 중복되는 경우는 없었다. 이러한 현상은 *MPZ* (myelin protein zero) 유전자 변이군에서 조기발병과 후기발병을 일으키는 유전자 변이의 위치가 다르다는 보고와 유사하였다.¹⁶ 그러나 다른 CMT 환자군에서는 이와 같은 10세를 기준으로 조기발병과 후기발병에 대한 보고는 없었다. 이것은 매우 흥미로운 현상임에는 분명하지만 앞으로 보다 많은 증례들의 보고에 의해 이런 현상이 한국인에 국한된 것인지 혹은 보편적인 현상인지에 대해 검증이 되어야 할 것으로 생각한다.

CMT2A를 유발하는 *MFN2* 유전자 돌연변이의 빈도에 관한 자료는 매우 한정되어 있다.⁷⁻⁹ Zchner 등은 7개국의 서로 다른 인종들에서 모은 36가계의 CMT2 환자들 중 7가계(19.4%)에서 *MFN2* 유전자 변이가 있었다고 하였고, Kijima 등은

CMT2형 및 기타 명확하게 분류하기 어려운 경우를 합한 81명의 환자들 중 7명(8.6%)에서 변이가 관찰되었다고 하였다.^{7,8} 그리고 미국의 Lawson 등은 CMT2형 13가계 중 3가계(23.1%)에서 변이를 발견하였다고 보고하였다.⁹ 저자들은 한국인 CMT2형 45가계를 대상으로 하여 *MFN2* 유전자 변이의 빈도를 조사하였을 때 10가계(22.2%)에서 *MFN2* 유전자 변이를 발견하여 유사한 빈도를 보임을 알 수 있었다. 아울러 순수한 CMT2형 환자의 민족별 빈도에 대한 것으로 앞으로 CMT 2형 환자에서 *MFN2* 유전자 변이가 있는 CMT2A 환자의 빈도를 비교하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

이제까지의 보고들 중에서 유독 Kijima 등에 의한 경우만 8.6%로 낮은 빈도를 보였는데 이는 그들이 사용한 방법상의 문제점도 있다고 생각된다.⁸ Kijima 등이 *MFN2* 유전자 변이를 분석한 방법은 DHPLC (high performance liquid chromatography)를 실시하여 변이성이 예상되는 시료에 한해서 염기서열을 분석한 것이었다. 아마도 본 연구처럼 모든 시료에 대해 염기서열을 분석하는 방법을 사용하였다면 8.6%보다 더 많은 돌연변이가 발견되었을 수도 있었을 것으로 생각한다.

한국인 CMT 환자 137가계 중 *Cx32* 유전자 돌연변이는 6가계에서 발견되었고 (data not shown) *MFN2* 돌연변이는 10가계에서 발견되어 *Cx32* 유전자 변이보다 *MFN2* 유전자 변이의 빈도가 더 높았다. 아직 *MFN2* 돌연변이에 대한 통계 자료가 극히 드물기 때문에 외국의 경우와 비교를 하는 것은 시기상조이지만 적어도 한민족은 *MFN2* 돌연변이가 *Cx32* 돌연변이보다 더 높을 가능성이 있다고 생각된다.

MFN2 유전자 변이에 의한 CMT2A 환자들의 경우 부모는 유전자 이상이 전혀 없고 본인부터 유전자 돌연변이가 발생한 산발성 유전의 빈도가 30%로 매우 높았다. 이는 Kijima 등이 보고한 일본인의 빈도 14.3%보다 2배 높았다. 그러므로 CMT2A 질환으로 의심되는 경우에는 부모가 모두 정상인 경우에도 본인부터 유전자 변이가 발생할 가능성이 있으므로 전기생리학적검사 및 유전자검사를 하는 것이 필요할 것이다.

편평발의 양상을 보인 경우가 46.2%로 많은 특이한 현상도 관찰되었다. 이는 하지의 근육 위축이 심하여 발 모양의 변형이 심해져서 발생한 것으로 생각된다. 그러므로 탈수초성 병변을 가진 환자가 보이는 발 모양과 축삭형 병변을 가진 환자에서 보이는 편평발의 양상은 감별 진단에서 중요한 단서가 될 수 있을 것으로 생각된다.

MFN2 유전자 변이가 있는 CMT2A 가족은 세대를 내려가면서 보다 이른 나이에 발병하고 임상 증상이 심해지는 예기현상 (anticipation)을 관찰할 수 있었다. 10가족 중 새로 발생한 돌연변이(de novo mutation) 3가족을 제외하고 상염색체 우성

유전이 확인된 경우는 7가족이었으며 이 중 3가족에서 예기현상이 관찰되었다. 아직 CMT2A 환자들이 예기현상을 보이는 것에 대해서는 보고되어 있지 않으나 CMT1A 환자들은 예기현상에 대한 보고들이 간헐적으로 있었다.¹⁷ 그러나 발병 기전에 대해서는 알려진 바가 없었다. 그러므로 CMT2A 환자들에서 관찰된 예기현상에 대해서는 앞으로 많은 수를 대상으로 임상 양상을 토대로 검증을 해 나가야 할 것이다.

MFN2 유전자는 염색체1p36.2에 위치한다. 미토콘드리아의 융합을 조절하는 GTPase (Fzo)의 인간 상동체(human homologue)로 미토콘드리아의 외막에 함몰된 형태로 존재하며 근육, 척수, 신경 등에서 발현된다.¹⁸ 미토콘드리아의 융합이 감소하는 경우에는 세포 내에 있는 각각의 기관들의 자율성(autonomy)이 증가하고 서로간의 이질성이 커져서 미토콘드리아의 기능장애를 유발하게 된다.¹⁹ *MFN2* 유전자 결손 쥐에서는 융합의 장애가 일어나 영양막거대세포의 손상을 일으키므로 이 유전자는 배아 발생에 필수적인 역할을 담당하는 것을 알 수 있었다.²⁰ 그리고 이러한 이상들은 레트로바이러스 주사를 통해 *MFN2* 유전자를 투입할 때 호전되는 양상을 보였다.²⁰ *MFN2* 유전자에 변이가 생기면 미토콘드리아의 융합 능력이 저하되고, 세포체에서 멀리 떨어진 원위부 축삭으로의 에너지 공급에 중요한 미세관 혹은 액틴 섬유를 따라 이동하는 미토콘드리아 운반 기능이 저하된다.^{21,22} 따라서 원위부 축삭에 에너지 공급을 하지 못하여 CMT2A의 축삭형 신경병증을 유발하게 되는 것이다.²³

CMT2형에서 유전자 변이에 따른 아형들은 전기생리학적 소견으로는 감별이 어렵다. 그러나 임상적인 특징으로 CMT2B는 주로 감각신경병증 유발과 만성족부궤양과 족부 절단 등이 있으며, CMT2C는 성대의 마비에 의한 쉼 목소리와 늑간근육의 위약에 의한 호흡마비 증상이 있고, CMT2D는 운동 및 감각신경에서 일반적인 경우와 달리 하지보다 상지에서의 장애가 더 심한 특징이 있다.²⁴⁻²⁶ 그러므로 CMT2A의 임상적 특성 분석은 이와 같이 CMT2형에서 전기생리학적검사로 구분이 안될 때 진단의 가능성을 좁히는 데 유용할 것이다.

저자들은 *MFN2* 유전자 변이가 빈도 면에서 CMT2형의 가장 대표적인 유전자 변이가 될 것으로 생각한다. *MFN2* 유전자 변이가 있는 CMT2A형은 대개 10세 전에 발병하였고 발 모양의 변형으로 편평발의 양상을 보이는 경우가 많았으며, 기능장애의 정도가 심하였고 본인부터 시작되는 산발성 유전이 30% 이상으로 높았다. 그러므로 *MFN2* 유전자검사는 축삭형 신경병증을 가진 환자가 이와 같은 임상 양상을 보이는 경우에 가장 먼저 검사해야 할 중요한 유전자 변이라고 생각한다.

REFERENCES

1. Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF. *Peripheral neuropathy*. 3rd ed. Philadelphia: WB. Saunders. 1993;1094-1136.
2. Reilly MM. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 2005; 65:186-187.
3. Muglia M, Zappia M, Timmerman V, Valentino P, Gabriele AL, Conforti FL, et al. Clinical and genetic study of a large Charcot-Marie-Tooth type 2A family from southern Italy. *Neurology* 2001; 56:100-103.
4. Gemignani F, Marbini A. Charcot-Marie-Tooth disease (CMT): distinctive phenotypic and genotypic features in CMT type 2. *J Neurol Sci* 2001;184:1-9.
5. Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 2002;51:190-201.
6. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 2001;105:587-597.
7. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004;36:449-451.
8. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 2005;116:23-27.
9. Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 2005;65:197-204.
10. Honda S, Aihara T, Hontani M, Okubo K, Hirose S. Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2. *J Cell Sci* 2005;118:3153-3161.
11. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001;114:867-874.
12. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; 280:26185-26192.
13. Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 2005;280:25060-25070.
14. Birouk N, Le Guern E, Maisonnobe T, Rouger H, Gouider R, Tardieu S, et al. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations: clinical and electrophysiologic study. *Neurology* 1998;50:1074-1082.
15. De Jonghe P, Timmerman V, Broeckhoven CV, and workshop participants. 2nd Workshop of the European CMT Consortium: 53rd ENMC International Workshop on Classification and Diagnostic Guidelines for Charcot-Marie-Tooth Type 2 (CMT2-HMSN II) and Distal Hereditary Motor Neuropathy (Distal HMN-Spinal CMT) 26-28 September 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 1998;8:426-431.
16. Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 2003;126:134-151.
17. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980;103:259-280.
18. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 2004;117:6535-6546.
19. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 2004;305:858-862.
20. Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem (Tokyo)* 2003;134:333-344.
21. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 2003;116:2763-2774.
22. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 2003;278:17190-17197.
23. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and MFN2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003;160:189-200.
24. Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, Kwon JM, et al. Mutations in the small GTPase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *AM J Hum Genet* 2003;72:722-727.
25. Vance JM, Speer MC, Stajich JM, West S, Wolpert C, Gaskell P, et al. Misclassification and linkage of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 as Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B. *AM J Hum Genet* 1996;59:258-262.
26. Kok C, Kennerson ML, Spring PJ, Ing AJ, Pollard JD, Nicholson GA. A locus for hereditary sensory neuropathy with cough and gastroesophageal reflux on chromosome 3p22-p24. *AM J Hum Genet* 2003;73:632-637.