

## 중증근무력증 환자의 CTLA-4 유전자 다형성

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 임상유전학과\*

박지형 이철호\* 이진성\* 김현숙 김원주 이경열 최영철

## CTLA-4 Polymorphism in Myasthenia Gravis

Ji-Hyung Park, M.D., Chul-Ho Lee,\* Jin-Sung Lee, M.D., Ph.D.\*, Hyun Sook Kim, M.D., Won-Ju Kim, M.D., Kyung-Yul Lee, M.D., Ph.D., Young-Chul Choi, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Clinical Genetics\*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) plays a role in down-regulating both the cellular and the humoral responses by suppressing the ongoing responses of activated T-cells. There are evidences to suggest the genetic contribution of the CTLA-4 locus to a number of autoimmune diseases, such as insulin dependent diabetes mellitus, multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. The aim of the present study is to analyze CTLA-4 gene polymorphism in patients with myasthenia gravis (MG) compared to healthy controls. **Methods:** Thirty healthy controls and 31 patients with MG were genotyped into G/G, A/G and A/A of CTLA-4 gene polymorphism at position 49 and the relationship with the clinical feature was analysed. **Results:** In the patients with MG, the genotype frequencies of G/G, A/G and A/A were 61.3%, 35.5% and 3.2%, respectively. In healthy controls, the frequencies of each genotype were 50%, 43% and 7%, respectively. There was no significant difference in the genotype frequencies of CTLA-4 gene between patients with MG and the control group. There were also no significant differences in the genotype frequencies of CTLA-4 gene between ocular and generalized MG. **Conclusions:** These data suggest that the CTLA-4 polymorphism at position 49 do not affect the development of MG. However, further study is needed to clarify the possible role of the CTLA-4 polymorphism in the susceptibility to MG.

J Korean Neurol Assoc 22(5):504-507, 2004

**Key Words:** Cytotoxic T lymphocyte antigen-4, Polymorphism, Myasthenia gravis

## 서 론

중증근무력증은 아세틸콜린 수용체에 대한 자가항체에 의해 신경근 접합부의 기능장애가 나타나는 자가면역질환이다. 최근의 연구에서 T세포, 대식세포 그리고 그들의 생산물인 인터루킨-1(interleukin-1)과 종양괴사인자(tumor necrosis factor) 등이 질환의 발생과 증상에 있어 중요한 역할을 담당하고 있음이 밝혀지고 있다.<sup>1-3</sup> 인터루킨-1 베타(interleukin-1 $\beta$ ) Taq I RFLP allele 2나

종양괴사인자- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 -308 allele가 정상인보다 중증근무력증에서 빈도가 높다는 것이 보고된 바 있다.<sup>2,3</sup>

세포독성 T 림프구 항원 제4형(cytotoxic T lymphocyte antigen-4, 이하 CTLA-4)은 T 세포 표면 분자로 활성화된 T세포에서 발현하여 항원 제공 세포의 B7과 결합하여 T세포를 억제하는 신호를 전달한다.<sup>4-7</sup> 이러한 CTLA-4와 B7 경로의 차단은 T세포 반응을 변화시켜 자가면역 질환을 야기할 수 있으며 CTLA-4가 결핍된 동물에서 과도한 T세포의 활성화로 인해 자가면역 질환과 같은 조직 파괴가 일어난다.<sup>4,8</sup> 이러한 사실들에서 미루어 볼 때 염색체 2번 장완(2q33)에 위치하는 CTLA-4의 돌연변이나 유전자의 다양성이 T 세포 기능에 영향을 줄 것이라고 생각할 수 있다. CTLA-4 유전자 다형성으로 세 가지가 알려져 있는데 -318 위치의

Received February 4, 2004 Accepted March 30, 2004

\* Address for correspondence Young-Chul Choi, M.D.  
Department of Neurology, Yongdong Severance Hospital  
146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul, 135-720, Korea  
Tel: +82-2-3497-3323 Fax: +82-2-3462-5904  
E-mail: ychoi@yumc.ac.kr

promoter 부위에 위치하는 cytosine-thymine 단일 유전자 치환, +49 위치의 exon 1에 존재하는 A/G dimorphism, 그리고 exon 4에 위치한 dinucleotide repeat이다.<sup>9</sup> 지금까지 연구에서는 그레이브스병이나 인슐린 의존성 당뇨병이 CTLA-4 유전자의 다형성과 연관이 있음이 밝혀진 바 있다.<sup>10-15</sup>

중증근무력증에서는 흉선종을 가진 환자와 CTLA-4 유전자와의 연관성에 관해 Huang 등이 보고한 바가 있다.<sup>1</sup> 우리 나라에서는 CTLA-4 유전자 다형성과 류마티스 관절염, 건선, 당뇨병증, 갑상선질환 등과의 연관성에 대한 연구들이 있으나 아직 중증근무력증과의 연관 관계에 관한 연구는 없었다.<sup>16-18</sup>

본 연구에서는 CTLA-4 exon 1 유전자 다형성의 분포를 정상 한국인에서 조사하고, 중증근무력증 환자와 정상 대조군에서 유전자 다형성의 분포를 비교하며, 환자의 임상적 특징에 따라 유전자 다형성 분포의 차이가 있는지를 알아보려고 하였다. 이를 통하여 CTLA-4 유전자 다형성이 중증근무력증에 미치는 영향을 규명해 보고자 한다.

**대상과 방법**

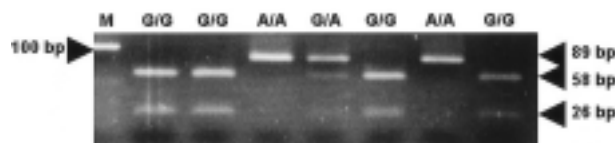
**1. 대상**

2002년 3월부터 12월까지 영동세브란스병원 신경과에 내원한 중증근무력증 환자 31명을 환자군으로 하였고 대조군은 중증근무력증이나 자가면역질환의 과거력이 없는 정상인 30명을 대상으로 하였다. 중증근무력증은 특징적인 임상 소견, 아세틸콜린 수용체 양성 여부, 반복 신경자극검사, 그리고 네오스티그민(neostigmine)검사를 통하여 진단하였다. 환자군은 발병 연령, 아세틸콜린 수용체 항체 양성 여부, 흉선의 조직병리학적 소견, 전신형인지 안구형인지에 따라 나누었고 각 환자군에서 유전자 다형성을 비교 분석하였다.

**2. 방법**

**1) CTLA-4 유전자 다형성의 검사**

CTLA-4 유전자 다형성의 검사를 위해 말초 혈액을 채취하여 DNA 추출 kit (DNA extraction kit, QIAGEN,



**Figure 1.** RFLP patterns of A/G dimorphisms of CTLA4 gene after digestion with *Fnu*4I in patients' samples. Sizes of each band marked on the right side. M denotes for size marker, G/G; homozygous G.

Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. CTLA-4 유전자 exon 1의 유전자 다형성은 PCR primer, 5'-TTCAGCGGCACAAGGCT C-3'와 5'-GCAGAAG ACAGGGATGAAGAGAAG-3'를<sup>19</sup> 이용하여 89 bp (염기서열 +17에서 +105)를 증폭시킨 후 해당 PCR 산물을 제한 효소 *Fnu* 4 HI로 37°C에서 1시간 처리하고 1% agarose gel에서 전기영동 후 다형성의 결과를 확인하였다. CTLA-4 exon 1 polymorphism은 G/G형은 58 b와 26 bp로 2개의 밴드, G/A형의 경우 89 bp와 56 bp로 2개의 밴드, A/A형은 89 bp 하나의 밴드로 나타나게 된다 (Fig. 1).

**2) 통계 처리**

각 군 간의 CTLA-4 유전자 다형성의 빈도는 유의성을 알아보기 위하여 chi-square test를 이용하였고  $P < 0.05$  이하를 통계학적으로 유의한 경우로 하였다.

**결 과**

**1. 환자군의 임상적 특징**

총 31명의 평균 연령은 48세였고 성별은 여성이 19명 (61.3%), 남성이 11명(%)으로 성별의 빈도는 유의한 차이를 보이지 않았다. 발병 연령은 40세 이후 발병이 18명(58.1%)으로 40세 이전 발병보다 많았다. 아세틸콜린 수용체 결합(binding) 항체 양성이 20명으로 64.5%

**Table 1.** Clinical characteristics of the patients with myasthenia gravis

	No. of patients n=31	(%)
<b>Gender</b>		
Female	19	(61.3)
Male	12	(38.7)
<b>Age of onset</b>		
<40	13	(41.9)
≥40	18	(58.1)
<b>Serum AchR binding Ab</b>		
Positive	20	(64.5)
Negative	11	(35.5)
<b>Serum AchR blocking Ab</b>		
Positive	11	(35.5)
Negative	20	(64.5)
<b>Thymic histology</b>		
Thymoma	6	(19.4)
Hyperplasia	6	(3.2)
Normal	1	(3.2)
Unthymectomized	18	(58.1)

였고, 차단(blocking)항체는 양성인 11명으로 35.5%였다. 흉선 제거를 받은 환자 13명 중 흉선종이 6명, 흉선증식증이 6명, 정상인 한 명이었다(Table 1).

### 2. 대조군과 환자군에서 CTLA-4 유전자 다형성의 분포

한국인 정상 대조군 30명에서 G/G형을 가진 환자가 15명으로 50%였으며 가장 많은 비율을 차지하였고 그 다음은 A/G형 13명(43%), A/A형은 2명(7%) 순이었다. 대립 유전자의 빈도는 G가 71.7%, A가 28.3%였다.

환자군에서는 대조군과 마찬가지로 G/G형이 19명으로 61.3%의 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며 환자군과 대조군에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p=0.621$ ). 대립 유전자의 빈도는 환자군에 G가 79%, A가 21%, 대조군에서 G가 71.7%, A가 21.3%로 역시 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $p=0.345$ , Table 2).

### 3. 중증근무력증 환자의 임상 특징에 따른 CTLA-4 유전자 다형성

환자를 전신형과 안구형으로 나누었을 때 안구형 19명 가운데 G/G, A/G, A/A형이 각각 12명(63.1%), 6명(31.6%), 1명(5.2%)이었고 전신형 12명은 G/G형이 7명(58.3%), A/G형이 5명(41.6%)이었으며 A/A형은 없었다.

**Table 2.** CTLA-4 polymorphism in patients with myasthenia gravis and controls

	Control n=30 (%)	MG patient n=31 (%)
Genotype frequencies*		
G/G	15 (50)	19 (61.3)
A/G	13 (43)	11 (35.5)
A/A	2 (7)	1 (3.2)
Allelic frequencies*		
G	43 (71.7)	49 (79)
A	17 (28.3)	13 (21)

MG; myasthenia gravis, \* $p>0.05$

두 군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $p=0.647$ ).

발병 연령에 따른 유전자 분포를 살펴보면, 40세 이전에 발병한 13명의 환자는 G/G, A/G형이 각각 6명(46.2%), 7명(53.8%)이었고 40세 이후 발병한 환자군 18명에서는 G/G, A/G, A/A형이 13명(72.2%), 4명(22.2%), 1명(5.6%)이었다. 40세 이전 발병에서는 G/G형과 A/G형의 빈도가 비슷한 반면에 40세 이전 발병군에서는 G/G형의 빈도가 72.2%, A/G형이 22.2%로 두 형의 빈도에 차이가 있었으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

아세틸콜린 수용체 결합 항체 양성인 20명, 음성은 11명으로 양성군에서 G/G, A/G형은 12명(60%)과 8명(40%)이고, 음성군 11명에서는 G/G, A/G, A/A형이 각각 7명(63.6%), 3명(27.3%), 1명(9.1%)이었다. 대립유전자 빈도는 항체 양성군에서 G형이 80%, A형이 20%이고 음성군에서는 G형이 77.3%, A형이 22.7%로 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

아세틸콜린 수용체 차단 항체 양성인 11명, 음성은 20명으로 양성군에서 G/G, A/G는 9명(81.8%)과 2명(18.2%)이고, 음성군 20명에서는 G/G, A/G, A/A형이 각각 10명(50%), 9명(45%), 1명(5%)이었다. 양성 군에서 G/G가 81.8%로 음성 군에서 G/G가 차지하는 비율인 50%보다 높았으나 통계적인 의의는 없었다.

흉선의 조직병리학적 소견에 따른 분류를 보면 수술을 한 13명 중 흉선종 6명에서는 G/G, A/G형은 4명(66.7%)과 2명(33.3%)이고, 흉선증식증 6명에서는 G/G, A/G형이 각각 3명(50%), 3명(50%)이었다(Table 3).

## 고 찰

중증근무력증 환자를 anti-CD4 항체를 사용하여 치료한 결과 증상의 호전을 확인하였고 T세포 활성화도 감소와 증상의 호전 정도가 잘 부합하는 결과를 보여, 중증근무력증에서 T세포와 그 생산물은 신경근 접합부에도 직접적인 영향을 미칠 것이라는 연구가 있었다.<sup>19</sup> CTLA-4는 T세포의 활성화에 중요한 역할을 담당하므로 CTLA-4의 유전적 변이가 중증근무력증의 감수성 조절에 관여할 것이라고 생각되어 지금까지 많은 연구가 진행되고 있다.

CTLA-4 유전자 다형성과 자가면역질환과의 관계

**Table 3.** Genotype and allele frequencies according to the thymic histopathology

Thymic histopathology	n	Genotype			Allele	
		G/G (%)	A/G (%)	A/A (%)	G (%)	A (%)
Normal	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
Thymoma	6	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0)	10 (83.3)	2 (16.7)
Hyperplasia	6	3 (50)	3 (50)	0 (0)	9 (75)	3 (25)
Unthymectomized	18	12 (66.7)	5 (27.8)	1 (5.6)	29 (80.6)	7 (19.4)

에 관한 많은 연구가 진행되고 있는데 exon 1의 A/G dimorphism 중 G/G 대립유전자 형과 인슐린 의존성 당뇨병증(IDDM), 그레이브스병, 다발성경화증과의 연관성이 보고된 바 있다.<sup>11,12,15,19</sup>

스웨덴인 중증근무력증 환자들을 대상으로 한 연구에서 CTLA-4 exon 3의 (AT)n repeat를 정상인과 비교했을 때 흉선종이 있는 중증근무력증 환자에서 대립 유전자 86의 빈도가 낮은 반면에 대립 유전자 104의 빈도는 증가하는 경향을 보였다.<sup>1,21</sup>

본 연구에서 정상인의 CTLA-4 exon 1 유전자 다형성 분포 중 가장 흔한 형은 G/G로 이전에 한국인 정상인에 관한 연구 결과와 같았으며 A/G, A/A형의 분포도 큰 차이는 없었다.<sup>15</sup> 그러나 서양인에서는 A/G형과 A/A형이 과반수를 차지하는데 비해 한국인에서는 G/G형과 A/G형이 과반수를 차지하고 있어 인종 간의 차이가 있음을 시사하고 있다.<sup>19</sup> 또한 본 연구에서는 중증근무력증 환자군과 CTLA-4 유전자 다형성과는 연관성은 없었고, 환자군을 임상적 특징에 따라 나눈 분류에서도 통계적으로 유의한 차이는 찾을 수 없었다.

환자와 대조군의 수가 충분치 않아 제한이 있으나 본 연구 결과에서 서양인과는 CTLA-4 유전자 다형성의 빈도가 다른 점을 보아 향후 서양인과 한국인간의 임상적 차이와 CTLA-4 유전자 다형성의 관계에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 CTLA-4 유전자 다형성과 중증근무력증 환자의 면역억제 치료 반응 및 예후에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Huang D, Liu L, Noren K, Xia SQ, Trifunovic J, Pirsknen R, et al. Genetic association of Ctl-4 to myasthenia gravis with thymoma. *J Neuroimmunol* 1998;88:192-198.
- Huang D, Pirskanen R, Hjelmstrom P, Lefvert AK. Polymorphism in IL-1beta and IL-1 receptor antagonist genes are associated with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1998;81:76-81.
- Huang D, Pirskanen R, Matell G, Lefvert AK. Tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphism and secretion in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1999;94:165-171.
- Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune disease-a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 2000;1:170-184.
- Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* 2000;101:169-177.
- Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD 28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001;1:220-228.
- Revetz JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000;290:84-89.
- Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, Qiu Q, Huang D, Pirskanen R, et al. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J Neuroimmunol* 2002;130:224-232.
- Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2001;2:145-152.
- Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Larrad MT, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphism in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997;6:1275-1282.
- Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, Hattersley A, Dodson PM, Macleod K, et al. The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2398-2401.
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera BV, Giovannini C, Bosi E, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type I diabetes. *Human Mol Genet* 1996;5:1075-1080.
- Larsen ZM, Kristiansen OP, Mato E, Johannesen J, Puig-Domingo M, de Leiva A, et al. IDDM12 (CTLA4) on 2q33 and IDDM13 on 2q34 in genetic susceptibility to Type 1 diabetes (insulin-dependent). *Autoimmunity* 1999;31:35-42.
- Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:41-45.
- Bednarczuk T, Hiromastu Y, Fukutani T, Jazdzewski K, Miskiewicz P, Osikowska M, et al. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. *Eur J Endocrinol* 2003;148:13-18.
- Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. No association of polymorphisms of the CTLA-4 exon 1(+49) and promoter (-318) genes with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Scand J Rheumatol* 2002;31:266-270.
- Lee DK, Kim YS, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA-4) polymorphism in Korean autoimmune thyroid disease. *J Kor Soc Endocrinol* 1999;14:40-52.
- Kim YK, Pyo CW, Hur SS, Kim TY, Kim TG. No association of CTLA-4 and ICAM-1 polymorphisms with psoriasis in the Korean population. *J Dermatol Sci* 2003;33:75-77.
- Mathias M, Anke P, Niels K, Peter R. CTLA4 exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;131:213-215.
- Ahlberg R, Yi Q, Pirskanen R, Matell G, Swerup C, Rieber EP, et al. Treatment of myasthenia gravis with anti-CD4 antibody: improvement correlates to decreased T-cell autoreactivity. *Neurology* 1994;44:1732-1737.
- Huang D, Giscombe R, Zhou Y, Pirskanen R, Lefvert AK. Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2000;105:69-77.