

한국인 Down 증후군 환자에서의 Apolipoprotein E의 다형현상에 관한 연구

충북대학교 의과대학 신경학교실·임상병리학교실¹·정신과학교실²·가톨릭의대 소아과학교실³
삼성의료원 신경과⁴·서울대학교 의과대학 임상병리학교실⁵

한설희·한문구·이도훈¹·김재진²·정승연³·이일근⁴·김진규⁵

—Abstract—

Apolipoprotein E Polymorphism in Korean Patients with Down's Syndrome

Seol-Heui Han, M.D., Moon-Ku Han, M.D.,
Do-Hoon Lee, M.D.¹, Jae-Jin Kim, M.D.²,
Seung-Yun Chung, M.D.³, Il-Keun Lee, M.D.⁴, Jin-Q Kim, M.D.⁵

Department of Neurology, ¹Clinical Pathology, ²Psychiatry, Chungbuk National University College of Medicine

³Department of Pediatrics, Catholic University Medical College;

⁴Department of Neurology, Samsung Medical Center;

⁵Department of Clinical Laboratory, Seoul National University College of Medicine

An association between the apolipoprotein E 4 (APOE 4) allele and pathological changes in Alzheimer's disease (AD) is now well established. We analyzed the APOE genotype in patients with another amyloid forming disease, Down's syndrome (DS). It is well-known that patients with DS develop the neuropathological features of AD if they reach middle adult life. The amyloid precursor protein gene is located on chromosome 21 and increased expression of this gene over a patient's lifetime is thought to underlie the development of this pathology.

We examined the APOE genotypes of 19 cytogenetically confirmed DS patients. The allele frequencies in this group did not differ from the general population. Our data suggest that the APOE 4 is not essential pathomechanism of AD pathology in patients with DS. Prospective analysis of the occurrence of AD in DS population and APOE genotype is warranted.

Key Words : Apolipoprotein E, genotype, Alzheimer's disease, susceptibility gene, Down's syndrome, amyloid forming disease

* 본 연구는 부분적으로 1995년도 충북대학교병원 공동 임상연구비 보조로 이루어졌음.

서 론

정신지둔(mental retardation)을 동반하는 가장 흔한 유전성 질환인 다운중후군(Down syndrome, DS)은 치매와 매우 밀접한 관계를 가지고 있어서 40대 DS 환자의 8%, 50대 환자의 55%, 60대 환자의 75%에서 치매의 유병율을 나타낸다(Lai and Williams, 1989). 또한 DS 환자는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)의 발병 위험이 매우 높으며(Wianiewski 등, 1985a; Wisniewski 등, 1985b) 실제로 40세 이상까지 생존한 DS 환자의 거의 모든 예에서 노인반(senile plaque, SP), 신경섬유다발(Neurofibrillary tangle, NFT) 등 AD의 병리학적 특징이 뇌조직에서 관찰된다(Mann, 1993). 이러한 병리적 변화는 amyloid precursor protein (APP)이 과잉표현(overexpression)되어 나타나는데 APP 유전자는 21번 상염색체에 존재하며 이 염색체가 삼체성(trisomy 21)인 DS 환자는 일생동안 과도한 amyloid burden을 받는 것으로 생각된다(Mann, 1993). 분자 유전학적 기법이 도입되면서 AD연구에 있어 여러 가지 광복합한 성과가 최근에 이루어졌는데 그 중의 하나가 apolipoprotein E 4(APOE, gene: ApoE, protein)와 AD의 관계가 확립된 것이다. APOE 4 allele은 후기 가족성 및 후기 산발성(late-onset familial and sporadic) AD의 발생과 관련이 높은 주요 위험인자로 밝혀졌다(Saunders 등, 1993; Corder 등, 1993; Strittmatter 등, 1993a). 더구나 Schmechel 등(1993)의 연구에 의하면 APOE의 isoform에 따라 amyloid β protein(A β)이 뇌조직에 축적되는 정도가 다르며 체의 실험에서도 isoform에 따라 apoE와 A β 가 결합하는 정도가 다르다는 것이 밝혀졌다(Strittmatter 등, 1993b). 본 연구에서는 A β 가 체내에서 과도하게 생성되어 뇌조직에 축적되는 DS 환자를 대상으로 APOE genotyping을 시행하였다. 이와 같은 연구로 AD 이외에 또 다른 amyloid forming disease인 DS에서도 APOE 4의 발현 빈도가 대조군에 비해 높게 관찰되어 발병 위험인자로 나타나는가를 규명해 보고자 한다.

연구대상 및 연구방법

1. 연구대상

DS 환자 : 모 사회단체 수용시설에 수용되어 있는

정신지체 환자중 정신지둔, 특이한 얼굴모양과 손발 등 임상적으로 다운중후군이 의심되는 환자중 세포유전학검사(염색체 분석)상 21 trisomy 또는 mosaicism 등을 나타내 DS로 확진된 환자를 연구 대상으로 하였다.

대조군 : 관상동맥질환자의 APOE genotyping 연구에서 사용되었던 100명의 건강한 대조군을 이용하였다(Kim 등, 1994).

2. 연구방법

1) 세포유전학 검사

염색체 검사법은 Moorhead(1960)의 방법을 변형하여 시행한다. 약술하면 정맥혈을 채취하여 원심분리시켜 백혈구층을 적혈구층으로 분리한다. 백혈구가 풍부한 혈장을 배양액이 함유되어 있는 15ml 시험관에 이주시켜 37.5°C, 5% 탄산가스 배양기내에서 72시간 배양한다. 배양액은 RPMI 1640(Sigma), fetal bovine serum(Gibco), phytohemagglutinin M-form(1.5ml/100ml of media, Gibco), Penicillin G 100 U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml을 첨가하여 사용한다. 배양종료 후 수 시간전에 Colcemid(Gibco)를 0.2 μ g/ml 농도로 첨가하여 세포분열을 metaphase에서 정지시킨다. 배양 종료후 이를 1,200rpm에서 5분 원심분리시켜 세포성분을 침착시키고 이를 0.075M KCl로 10분간 처리한 다음 Carnoy 고정액으로 10분간씩 3회 고정한후 air-drying method로 슬라이드 표본을 제작하였다. 이를 1X PBS로 1분 세척후 T-rypsin(Gibco) 용액으로 1-2분 처리한 다음 4% Gimesa 용액으로 10분간 염색한다. 염색체 검정은 100개의 저배율에서 metaphase 세포를 찾고 이를 1,000배 고배율로 관찰한다. 현미경 촬영후 세밀한 현미경 분석을 시행하였다.

2) Apolipoprotein E 유전자형 검사(amplification and restriction isotyping of APOE)

genomic DNA는 전혈로부터 Triton X-100 lysis 방법을 변형하여 추출하였으며(Kunkel 등, 1979) 이를 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 증폭하였다. primer로 사용된 oligonucleotide는 Applied Biosystems 380B DNA synthesizer로 제조하였다(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). 사용된 두 종류의 primer sequence는 다음과 같다.

F4:5'-ACAGAATTCCGCCCCGGCCTCGTACAA-3',
F6:5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTOCAAGGA-3'.

PCR protocol은 Saiki 등(1988)의 방법을 변형하여 사용하였다. 약술하면 200-400ng의 genomic DNA, 200ng primer, 200 μ M dNTP, reaction buffer를 총용적 100 l로 준비한 후 evaporation을 방지하기 위하여 mineral oil로 덮은 다음 반응을 시작하였다. 최초 denaturation은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 시킨 다음, 95 $^{\circ}$ C 1분 denaturation, primer annealing 60 $^{\circ}$ C 1분, chain extension 70 $^{\circ}$ C 2분의 주기(cycle)로 30회 반복 증폭하였다. 증폭후 각 반응물의 aliquot(10 μ l)를 제한효소인 HhaI 10 unit를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 overnight 배양시켰다. digestion 된 DNA sample은 nondenaturing 10% polyacrylamide slabgel에서 70V, 16시간동안 전기영동시켰다.

통계분석 : DS 환자군과 비교군의 APOE allele의 출현빈도 비교에는 χ^2 test를 이용하였으며 출현 확률의 표준편차는 이항분포의 정규분포 근사법을 이용하였다.

연구결과

연구에 참여한 32명의 정신지체자중 염색체 분석에 의해 DS로 확인된 사람은 25명이었으며 그중 APOE genotype이 확인된 환자는 19명이였다. 대상 환자중 1명을 제외한 모든 환자들은 정신지체가 심하여서 간이지능검사의 시행이 불가능할 정도이었으며 가장 간단한 신경심리검사중 하나인 clock drawing test에서도 심한 이상을 보였다(Fig. 1). APOE type 2, 3, 4 allele의 빈도는 정상대조군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1, 2).

토 론

노년기 치매질환의 가장 흔한 원인중의 하나인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 전형적인 age-related 퇴행성 신경질환으로서 이환된 환자의 뇌조직 특정 부위 즉, 대뇌피질, 해마, 중격부(septal area)에 노인반(senile plaque, SP), 신경섬유 엉킴어리(neurofibrillary tangle, NFT), 아밀로이드 혈관병성(amyloid angiopathy) 등이 특징적으로 발현된다. 최근의 분자 유전학적 연구에 의하여 AD의 발병 기전

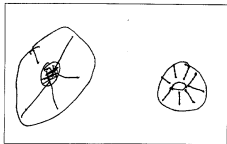


Fig. 1. Some examples of clock drawing by DS patients.

Table 1. APOE Genotypes

Genotype	controls		DS	
	No. of observed	(%)	No. of observed	(%)
E4/4	2	(2.0)	0	(0)
E3/3	66	(66.0)	13	(68.0)
E2/2	2	(2.0)	0	(0)
E4/3	20	(20.0)	4	(21.0)
E4/2	4	(4.0)	1	(5.0)
E3/2	6	(6.0)	1	(5.0)
Total	100	(100.0)	19	(100.0)

Table 2. Allele Frequencies

Allele frequencies control	DS	
	n(mean \pm s.d.)	n(mean \pm s.d.)
ϵ 2	14(0.070 \pm 0.035)	2(0.050 \pm 0.069)
ϵ 3	158(0.790 \pm 0.029)	31(0.820 \pm 0.122)
ϵ 4	28(0.140 \pm 0.048)	5(0.130 \pm 0.107)
Total	200	38

$\chi^2=0.19$, df=2, p<0.05

에 리포단백인 apoE가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 확인되었다(Strittmatter 등, 1993a, b; Corder 등, 1993; Poirier 등, 1993; Mayeux 등, 1993; Saunders 등, 1993; Nalbantoglu 등, 1994; Maestre 등, 1995). apoE의 대립 유전자 가운데 하나인 apolipoprotein E ϵ 4 allele(APOE 4)는 AD의 취약유전자(susceptibility gene) 또는 위험인자(risk factor)로 작용하여 AD의 발병위험을 높이며 AD에 이환되는 초발연령(age of onset)을 낮추는 것으로 밝혀졌다(Strittmatter 등, 1993a, b; Corder 등, 1993;

Brousseau 등, 1994). apoE의 구조 유전자는 19번 염색체의 장축(chromosome 19q)에 존재하며 다형성(polymorphism)을 나타내는데 사람에서 흔히 관찰되는 isoform은 APOE 2, APOE 3, APOE 4 세 종류이다. 이들은 유전자의 112번째와 158번째의 아미노산 염기 서열이 틀리면되어 다르게 나타나는 데 기인함으로써 생각되는 APOE 3는 112번째에 cysteine residue를 158 번째에 arginine residue를 가지고 있으며 APOE 2는 두 곳 모두가 cysteine residue로 APOE 4는 두 곳 모두가 arginine residue로 치환된다. 이들은 전하가 달라져 isoelectrical focusing으로 세 가지 형태가 쉽게 구분된다(Mahley, 1988). 따라서 유전적으로 각 개인은 homogygous($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$) 또는 heterogygous($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$) 6종류의 자기 다른 유전자 형태를 취한다. 지금까지 이루어진 대부분의 연구에서 일치되는 결과는 정상인에서의 APOE 4 발현 빈도는 약 15% 정도인데 산발성 후기 발병 알츠하이머병(late-onset sporadic AD) 및 가족성 후기 발병 알츠하이머병(late-onset familial AD) 환자에서는 약 45%의 APOE 4 발현빈도를 보여 APOE 4가 late-onset AD에 위험요소 또는 취약 유전자로 작용하는 양상을 나타낸다(Strittmatter 등, 1993a, b; Corder 등, 1993; Brousseau 등, 1994). apoE는 생체내의 여러 가지 기관에서 생성되지만 주로 간장에서 생산되며 지질의 transport와 대사에 관여하는 단백질이다(Mahley, 1988). 이 단백질은 뇌에서도 생산되며 신경세포 손상 및 재생에 중요한 역할을 한다(Ignatius, 1986; Elshourbary, 1985). 즉 신경세포 손상후 말초신경계(Boyles 등, 1989) 및 중추신경계(Snipes 등, 1986)에서 모두 apoE의 합성이 현저히 증가한다. 더구나 apoE는 체외 실험에서 dorsal root ganglia neuron의 outgrowth나 sprouting의 정도를 조절하는 것으로 알려졌다(Handelman 등, 1992). 최근의 연구에 의하면 apoE는 AD의 extracellular A β 축적인 SP와 congophilic amyloid angiopathy(CAA)에 매우 밀접하게 관계되어 나타난다(Strittmatter, 1993a; Namba 등, 1991; Diedrich 등, 1991). 따라서 아밀로이드가 파인 생산되거나 축적되는 질환들에서의 apoE의 역할이 주목을 받고 있다.

APP 유전자가 내재되어 있는 21번 염색체 삼배성이 발병 원인인 DS는 생존 출산아 약 800 내지

1,000명에 1명의 발생 빈도를 보인다. DS 환자의 주요 사망 원인이었던 선천성 심장질환, 호흡기감염, 백혈병 등이 치료 가능해짐에 따라 평균 기대 수명이 연장되었으며 40-50세 이후까지 생존하는 DS 환자의 수가 증가되었다. 신경병리연구에 의하면 40세 이상 생존한 대부분의 DS 환자의 뇌조직은 SP, NFT, CAA 등 AD의 병리학적 특징을 나타내며 50 세 이상 생존한 DS 환자의 경우 SP, NFT 변화를 보이는 뇌구조물의 분포도 AD 환자와 동일하다(Mann, 1985). 예를 들면 편도체, 해마 그리고 전두엽, 측두엽, 두정엽의 연합영역 등은 SP가 호발하는 반면 시각피질, 운동 및 감각피질 등은 비교적 덜 침범되어 유지된다(Motte and Williams, 1989).

연령이 증가되면서 DS 환자의 뇌조직은 점차 AD 환자의 신경병리학적 특징으로 변화하게 되는데 이는 두 질환이 병태생리학적으로 매우 밀접하게 연관되어 있으며 이는 APP 유전자가 존재하는 21번 염색체의 삼배성에 의해 APP가 과도하게 생산되어 A β 가 비정상적으로 축적되기 때문으로 생각된다.

그러나 amyloid overexpression disease라 할 수 있는 DS 환자를 대상으로한 본 연구에서는 APOE genotype의 분포가 정상대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이점이 관찰되지 않았다(Table 1, 2). 물론 DS 환자의 case 숫자가 적어 본 연구가 전체 DS 환자의 APOE genotype을 대변한다고 할 수는 없으나 최근에 서구에서 이루어진 연구들의 결과와 일치하고 있다(Hardy 등, 1994; Wisniewski 등, 1995). 임상적으로 AD가 진단된 DS 환자(AD-DS)와 치매가 없는 DS 환자 사이에서도 APOE 4 allele frequency의 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 사실로 미루어볼때 DS 환자에서 관찰되는 임상 양상과 신경 병리학적 변화는 A β 의 과도한 생성에서 기인 되기는 하지만 APOE 4가 이미 AD 발생의 고위험도를 지닌 DS 환자에서 AD의 위험도를 더 이상 높이는 것 같지는 않다. 물론 AD-DS 환자의 SP에서 apoE immunoreactivity가 관찰되고 있고(Wisniewski 등, 1994) 50세 이상의 DS 환자에서 APOE genotype에 따라 amyloid burden이 달라지는 것이 확인되었으나(Hyman 등, 1995) 이는 이미 AD로 변화된후에 나타나는 현상이라고 생각된다(Picker-Brown 등, 1994). 이와 같은 소견들은 결과적으로 AD 발생 이전에 있어서 apoE-A β 상호관계가 trisomy 21 집단

과 정상인 사이에 차이점이 있다는 것을 암시해준다. 이는 다시 한번 AD의 병인론이 heterogenous하다는 가설을 지지해 주는 소견이라 생각된다.

결 론

APOE 4는 산발성 후기발병 알츠하이머병 및 가족성 후기발병 알츠하이머병에서는 높은 발현빈도를 나타내나 또다른 아밀로이드 형성 질환이라 할 수 있는 DS 환자에서는 APOE 4의 overrepresentation 현상이 관찰되지 않았다. apoE-A β 상호관계가 DS의 발병기전에는 영향을 미치지 못하며 이 경우 A β 파잉 형성 자체가 좀 더 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

REFERENCES

Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, et al. (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 76:1501-1513.

Brousseau T, Legrain S, Berr C, et al. (1994) Confirmation of the 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 44:342-344.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.

Diedrich JF, Minnigan H, Carp RL, et al. (1991) Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 65:4759-4768.

Elshourbagy NA, Liano WS, Mahley RW et al. (1985) Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rat and marmosets. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 203-207.

Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, et

al. (1992) Effects of apolipoprotein E, -very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* 33:1677-1688.

Hardy J, Crook R, Perry R, et al. (1994) ApoE genotype and Down's syndrome. *Lancet* 343:979-980.

Hyman BT, West HL, Rebeck GW, et al. (1995) Neuropathological changes in Down's syndrome hippocampal formation: effect of age and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 52:373-378.

Ignatius MJ, Gebicke HP, Skene JH, et al. (1986) Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1125-1129.

Kim JQ, Hong SH, Park YB (1994) Genotyping via amplification and HhaI cleavage of apolipoprotein E (ApoE) gene in patients with coronary artery disease. *Seoul J Med* 35:265-273.

Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, et al. (1979) Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1245-1249.

Lai F, Williams RS (1989) A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch Neurol* 46:849-853.

Maestre G, Ottman R, Stern Y, et al. (1995) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: ethnic variation in genotypic risks. *Ann Neurol* 37: 254-259.

Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: Cholesterol transprotein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-629.

Mann DMA (1993) Association between Alzheimer disease and Down syndrome: neuropathological observations. In: Berg JM, Karlinsky H, Holland AJ, eds. Alzheimer disease, Down syndrome, and their relationship. Oxford: Oxford University Press, pp 71-92.

Maysux R, Stern Y, Ottman R et al. (1993) The apolipoprotein 4 allele in patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 28:561-557.

- Moorhead PS, Nowell RC, Mellan WJ, et al. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:623-626.
- Motte J, Williams RS (1989) Age-related changes in the density and morphology of plaques and neurofibrillary tangles in Down's syndrome brains. *Acta Neuropathol* 77:535-546.
- Naibantoglu J, Gilfix BM, Bertrand P, et al. (1994) Predictive value of apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease: Results of an autopsy series and an analysis of several combined studies. *Ann Neurol* 36:889-895.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, et al. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 541:163-166.
- Pickering-Brown SM, Mann DMA, Bourke JP, et al. (1994) Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease pathology in Lewy body disease and in other amyloid-forming disease. *Lancet* 343:1155.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, et al. (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342:697-699.
- Saiki RK, Felfand DH, Stoffel S, et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9649-9653.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel DE, et al. (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1977-1981.
- Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ (1986) Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1130-1134.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, et al. (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8098-8102.
- Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, et al. (1985a) Alzheimer's disease in Down's syndrome: Clinicopathologic studies. *Neurology* 35:957-961.
- Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B (1994) Alzheimer's disease and soluble A. *Neurobiol Aging* 15:143-152.
- Wisniewski T, Morelli L, Wegiel J, et al. (1995) The influence of apolipoprotein E isotypes on Alzheimer's disease pathology in 40 cases of Down's syndrome. *Ann Neurol* 37:136-138.
- Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY, et al. (1985b) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17:278-282.