

분자유전학 검사로 확진된 Charcot-Marie-Tooth 1A

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 소아과학교실*

최병옥 · 선우일남 · 이진성*

한림대학교부속 춘천성심병원**

배재천**

A Family of Charcot-Marie-Tooth 1A Confirmed by Molecular Genetic Analysis

Byung Ok Choi, M.D., Il Nam Sunwoo, M.D., Jin Sung Lee, M.D.*

Department of Neurology, and Pediatrics College of Medicine Yonsei University*

Jae Chun Bae, M.D.**

*Department of Neurology, Chuncheon Sacred Heart Hospital***

—Abstract—

Recently, thanks to the development of the molecular genetics which had made us understand the nature of some genetic disorders, the concept of the classification has changed. Charcot-Marie-Tooth disease(CMT) is the most conspicuous disease. The disease is inherited as an autosomal dominant trait. CMT is classified into two major forms: demyelinating CMT type 1 and axonal CMT type 2. CMT type 1 loci are known to map to chromosome 17 (CMT 1A), chromosome 1 (CMT 1B), X chromosome (CMT 1X), and unknown autosome (CMT 1C). And CMT type 2 loci are divided into chromosome 1 (CMT 2A) and chromosome 3 (CMT 2B). The most prevalent form is CMT 1A caused by a duplication in a region of chromosome 17p11.2-12. Peripheral myelin protein-22 (PMP-22) gene in that region is known to being responsible for the disease.

In Korea, although several families of CMT were reported, there is no report on the subtype of CMT type 1 confirmed by genetic analysis. We report a

family of CMT 1A confirmed by molecular genetic analysis using D17S122 markers.

서 론

최근 분자 유전학의 발전으로 이제까지 확실하지 않던 여러 유전성 질환의 본질이 규명되면서 질병에 대한 분류의 개념이 많이 달라지게 되었는데 그중 가장 대표적인 것이 Charcot-Marie-Tooth disease(이하 CMT로 약함)이다.

CMT는 이제까지 상염색체 우성으로 유전되는 질환으로서 말초 신경의 병리학적 변화에 따라 수초의 변화를 특징으로 하는 CMT 1형과 축삭형인 CMT 2형으로만 분류되었는데, 한가지 질환으로 생각되던 CMT 1형은 유전자 검사 결과 CMT 1A(염색체 17번), CMT 1B(염색체 1번), CMT 1X(X 염색체) 및 아직 유전자 손상의 위치가 규명되지 않은 CMT 1C등으로 세분되고 있으며, CMT 2형도 CMT 2A(염색체 1번), CMT 2B(염색체 3번)로 나누어진 다(Ben Othmane 등, 1993; Chance와 Pleasure, 1993; Hayasaka 등, 1993; Ionasescu 등, 1993; Bost 등, 1994; Nelis 등, 1994; Guzzetta 등, 1995; Kwon 등, 1995; Uncini 등, 1995). CMT 1형중의 대부분을 차지하는 것은 CMT 1A로 말초성 수초 단백질(peripheral myelin protein: 이하 PMP로 약함)-22 유전자를 포함하는 염색체 17p11.2-12에 중복이 있는 것으로 알려져 있다(Lupski 등, 1991; Harding, 1995; Ionasescu, 1995).

우리 나라에서도 CMT가 그리 드물지 않다고 생각되지만(오정희 등, 1979; 최문성 등, 1987), 아직 분자 유전학적으로 그 아형이 확인 발표된 경우는 없는 것으로 생각되는데, 저자 등은 최근 한가족 모녀에서 CMT 1A형을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

대상 및 결과

증례 1

본 14세 여자 환자(II-1)는 내원 2개월 전부터 시

작된 발등과 발꿈치 저리는 증상을 주소로 내원하였다. 처음 증상이 나타난 시기는 분명하지 않으나, 초등학교 때부터 달리기를 할 때는 늘 뒤에 처지는 편이었다고 하며 그후 차츰 발이 끌리는 보행 장애가 서서히 진행되는 양상을 보였는데, 1995년 12월

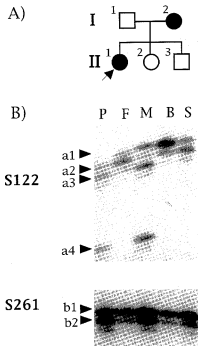


Fig. 1.

A) Pedigree of patient's family. An arrow indicates proband.

● : CMT female patient, ○ : normal female, □ : normal male

B) Results of PCR haplotyping for D17S122 and D17S261. Three copies of patient's alleles were indicated as a1, a3, a4(1/2) and a2, a3, a4(II-1). Alleles of D17S261 locus were shown as b1 and b2.

P: patient, F: father, M: mother, B: younger brother, S: younger sister

경부터 양쪽 발등과 발바닥이 저리는 증상이 점차
상행하여 병원을 방문하게 되었다.

환자는 1남 2녀중의 장녀로써 환자의 어머니(I-2)
가 걸을 때, 약간 좌우로 뒤통거리라는 모습을 보이는
것 이외에 뚜렷한 가족력이 없었다(Fig. 1).

환자의 키는 160cm, 몸무게는 80kg으로 비만한
편이었으며, 지능이나 판단력은 정상 범위였다. 이
학적 검사상 양쪽 발에 요곡(pes cavus)과 족하수
(foot drop), 하지 원위부에서의 경도의 근육 위축
이 있었고, 측만증(scoliosis), 보행실조, 수지진전
등은 없었다.

신경학적 검사상 뇌신경과 소뇌 기능은 정상이었
고, 근력은 하지의 원위부에서 감퇴된 소견을 보였
지만, 하지 근위부나 상지에서는 정상이었다. 흉각
과 촉각, 진동각은 양쪽 부를 이하에서 경도로, 발
등과 발바닥에서는 중등도로 저하되었으며, 위치각
역시 양쪽 하지에서 감소되어 있었다. 심부건반사는
하지에서는 소실되었고 상지에서는 저하되었는데,
병적 반사는 없었다. 혈액 검사, 소변 검사, 간기능
검사와 전해질 검사 등에서는 이상 소견이 없었다.

신경전도 검사상 비골신경, 후경골신경의 운동신경
활동 전위와 정중신경, 척골신경, 비복신경의 감각
신경 활동 전위가 검출되지 않았고, 정중신경, 척골
신경에서 잠복기 및 운동신경 전달속도가 현저하게
지연되었고, 진폭도 작아서 CMT 1형에 해당하는 다발
성 말초 신경병증의 소견이 관찰되었다(Table 1).
이 환자의 확진과 CMT 1형의 아형을 알아보기 위
하여 유전자 검사를 시행하였다.

증례 2

본 38세된 증례 1 환자의 어머니(I-2)는 보행시
몸이 약간 좌우로 뒤통거리기는 하였지만 불편하게
생각하지는 않았다고 하는데, 약 20세경부터 점차
달리는 것이나 빨리 걷는 것이 힘들어 졌다고 한다.
키는 155cm, 몸무게는 51kg이었으며 지능이나 판단
력은 정상 범위였고, 이학적 검사상 요곡, 족하수,
하지의 근위축 및 측만증은 없었다.

신경학적 검사상 근력은 정상이었고, 위치각도 비
교적 정상이었으나 흉각, 촉각 및 진동각이 양쪽 무
릎 이하에서 경도로 저하되었다. 심부건반사에서 족

Table 1. Electrophysiologic data of I-2 and II-1.

			Case 1	Case 2	Normal range
Median	TL	(ms)	13.1	7.0	2.3-3.9
	MAP	(μ V)	3640	1000	5000-28000
	MCV	(m/s)	19.0	24.1	50.6-67.4
Ulnar	TL	(ms)	8.6	4.9	1.9-3.1
	MAP	(μ V)	32	5000	6000-23000
	MCV	(m/s)	9.3	23.0	49.4-70.6
Peroneal	TL	(ms)	*	*	3.1-5.5
	MAP	(m/s)	*	*	1000-18000
	MCV	(m/s)	*	*	39.1-59.9
Post. Tibial	TL	(ms)	*	11.2	2.8-5.6
	MAP	(m/s)	*	2400	5000-35000
	MCV	(m/s)	*	23.7	41.0-59.0
Median	SNAP	(μ V)	*	10	10-125
	SCV	(m/s)	*	30.9	48.1-62.1
Ulnar	SNAP	(μ V)	*	12	10-100
	SCV	(m/s)	*	26.2	47.3-63.3
Sural	SNAP	(μ V)	*	*	10-40

* : no potential

TL : terminal latency

MAP : motor nerve action potential

MCV : motor nerve conduction velocity

SNAP : sensory nerve action potential

SCV : sensory nerve conduction velocity

Motor nerve conduction velocity was tested by stimulation on elbow and sensory nerve conduction velocity was tested over wrist-elbow segment.

반사는 나타나지 않았고, 슬반사는 저하되었으며 상지의 건반사는 정상이었다.

신경전도 검사를 시행한 결과, 비골 신경에서 운동 신경 활동 전위가 나타나지 않았으며, 정중신경, 척골신경, 후경골신경에서 운동 신경 전달 속도가 현저하게 지연되었고 비골신경의 감각 신경 활동 전위는 검출되지 않았고, 정중신경과 척골신경에서 감각 신경 전달 속도가 저하되는 등, 말보다 경하기는 하지만 역시 CMT 1형에 합당한 소견을 보여 (Table 1), 유전자 검사를 시행하였다.

유전자 분석

(1) Genomic DNA의 추출

환자의 말초혈액 10ml를 EDTA 튜브에 채취하고, 10배의 핵 추출 완충액 (0.3M Sucrose, 10mM TrisHCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton-X100, pH 7.5)을 첨가하여 실온에서 15분간 놓아둔 후 2500 r.p.m.에서 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 침전물에 용해 완충액 2ml (0.075M NaCl, 0.024M EDTA, pH8.0)와 10% SDS 125 μ l, Proteinase K (10 mg/ml) 50 μ l를 첨가한 다음 55°C에서 2시간 동안 담가두었다. 위의 샘플에 같은 부피의 페놀액으로 2회 처리한 후 Chloroform/Isoamylalcohol (24:1)로 3회 처리하고 0.1 volume의 3M sodium acetate, 2 volume의 무수 에탄올을 첨가하여 DNA를 추출하였다.

(2) DNA analysis

추출된 환자 및 가족의 genomic DNA에서 염색체 17p11.2-12 부위에 위치하며 short tandem repeats polymorphism을 보이는 D17S122와 D17S261을 이용하여 유전자형의 결합 여부를 검사하였다. 사용된 PCR primer의 염기 서열은 table 2와 같다. 각 primer set의 sense strand primer는 T₄ polynucleotide kinase를 이용하여 (5'-

³²P)ATP로 5'-end labeling을 하였다. 반응 조건은 primer 10 pmole, 10 X kinase buffer 0.5 μ l, (5'-³²P)ATP 2 μ l, H₂O 0.5 μ l, T₄ kinase 0.5 μ l (10 units)를 첨가하여 최종 반응 부피는 5 μ l로 하고 37°C에 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Sephadex-50 (Pharmacia) column으로 unlabeled isotope을 제거하였다.

PCR은 labeled primer 0.5 μ l, antisense primer 20 pmole, 10 x PCR buffer, dNTP 2.5mM, template 500ng, Taq polymerase (Takara) 1 unit를 첨가하였으며 최종 부피는 25 μ l로 하였다. PCR program은 7 분간의 initial denaturation 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 30초로 하여 35회 반복하였다. 반응이 끝난 후, PCR 산물의 2 μ l를 위해 gel loading buffer 1 μ l를 첨가하여 6% acrylamide/8M urea denaturation gel에 35watt로 약 2시간 30분간 전기영동하였다. 전기 영동이 끝난 후 gel을 15% acetic acid 용액에서 고정한 후 헤이드라이어로 건조시키고 X-ray 필름을 붙여 -70°C에서 약 12-15 시간 노출시킨 다음 이를 현상하여 결과를 판독하였다.

유전자 검사 결과

염색체 17p11.2-12 부위의 이상을 많이 발견할 수 있는 것으로 알려진 dinucleotide repeats polymorphism을 나타내는 D17S122와 D17S261을 이용한 유전자 검사 결과는 fig. 1과 같다. 즉, D17S261을 이용한 검사 결과는 환자와 가족 모두에서 두 개씩의 대립 유전자만을 보여 유용하지 않았으나 (noninformative), D17S122에서는 환자 (I-2와 II-1)에서 해당 부위의 중복이 일어난 것을 잘 보여주고 있다. 아버지와 동생들은 모두 두 개씩의 정상적인 대립 유전자를 보이고 있으나 환자인 I-2와 II-1은 모두 삼체성 (trisomy)의 형태 (a2, a3, a4

Table 2. Primers used in PCR and sequencing reactions

	Sense Primer	Antisense Primer
S122	5'CAGAACCAAAAATGTCTTGCATTG3'	5'GGCCAGACAGACAGGCTCTGCG3'
S261	5' CAGGTTCTGTCTATAGGACTA3'	5'TTCTGGAAACCTACTCTGTGA3'

또는 a1, a3, a4)를 보임으로써 이들에게서 D17S122 부위에 중복이 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 이상이 있는 대립유전자는 이 집안의 조상대에서부터 유전되어 왔을 가능성을 시사해 주고 있으나 외가 쪽으로 조부모들에 대한 혈액 채취가 불가능하여 이를 확인할 수는 없었다.

고 찰

1866년 프랑스의 Charcot와 Marie, 그리고 영국의 Tooth가 거의 같은 시기에 서서히 진행되는 요족, 보행실조, 하지 원위부의 근위축 및 감각저하를 보이는 유전 질환을 보고한 이래 CMT는 가장 흔한 선천성 신경 질환의 하나로 알려져 있다(Chance와 Pleasure, 1993; Harding, 1995; Ionasescu, 1995). 미국에서 CMT의 발생 빈도는 2500명중의 1명으로 보고되고 있는데(Ionasescu, 1995), 국내에서는 정확한 발생 빈도가 알려져 있지 않지만, 외국의 예로 미루어 볼 때 국내에도 상당수의 환자가 있을 것으로 추정된다.

CMT는 병리적 소견에 따라 CMT 1형과 CMT 2형으로 나눈다(Ionasescu 등, 1993; Kwon 등, 1995). 본 증례 1은 서서히 보행장애와 감각장애가 진행되고, 요족, 족하수와 함께 신경학적 검사상 원위부 하지의 근력약화, 감각저하 및 심부건반사의 소실이 있으며, 신경전도 검사에서 특징적인 이상 소견이 관찰되어 전형적인 CMT 1형으로 생각되었다. 이에 비하여 환자의 모친인 증례 2는 특이한 이학적 소견은 관찰되지 않았지만, 신경학적 검사상 하지 원위부의 감각저하와 심부건반사 감소와 함께 신경전도 검사상 운동신경 및 감각신경의 전도속도가 저하되어 있어서 같은 CMT 1형으로 의심할 수 있었다.

CMT 1형은 다시 유전학적 검사의 결과에 따라 CMT 1A, CMT 1B, CMT 1C와 CMT 1X의 4가지로 나눈다(Lupski 등, 1991; Hayasaka 등, 1993; Bost 등, 1994; Guzzetta 등, 1995; Nelis 등; Harding, 1995). 이중 CMT 1A는 말초 신경 수초의 단백질을 만드는 데 관여하는 PMP-22 유전자를 포함하는 염색체 17p11.2-12에 중복이 있는 것으로서 CMT 1형중의 가장 많은 비율(68-

82.5%)을 차지한다고 알려져 있다(Neil 등, 1994). CMT 1B는 염색체 1q21-23 유전자에 돌연변이가 있는 것으로서 PMP P₀ 유전자의 장애 때문에 증세가 나타난다고 하며(Hayasaka 등, 1993; Guzzetta 등, 1995), 그 외에도 X 염색체의 connexin 32 유전자에 장애가 있는 CMT 1X와 아직까지 유전자상의 이상 부위를 모르는 CMT 1C 등이 있다(Bergoffen 등, 1993; Harding, 1995). 병리학적 및 유전학적으로 다른 질병으로 알려진 CMT 2형도 최근 유전자 검사 결과에 따라 CMT 2A와 CMT 2B의 2가지로 나누는데, 이들의 정확한 유전적인 결함은 아직 규명되지 않았지만 CMT 2A는 염색체 1p35-36에, CMT 2B는 염색체 3q13-22에 장애가 있는 것으로 알려져 있다(Ben Othmane 등, 1993; Kwon 등, 1995).

CMT 1A에서 관찰되는 유전자의 중복은 pulsed gel electrophoresis, fluorescent in situ hybridization (FISH), Southern blot, PCR 등 여러 가지 방법을 이용하여 발견할 수 있으나 본 연구에서는 비교적 손쉬운 방법인 short tandem repeats의 PCR을 통한 유전자형의 판별법을 사용하였다(Lupski 등, 1991; Ionasescu 등, 1993; Roa 등, 1993; Blair 등, 1995; Guzzetta 등, 1995). 본 연구 결과 D17S261 위치에 대한 검사 결과는 유용하지 않은 것으로 나타났는데, 이것은 다른 연구자들도 대부분 유전자의 중복을 D17S122 부위에서 발견한 것으로 볼 때, 특기할 소견은 아닌 것으로 생각된다(Lupski 등, 1991; Roa 등, 1993; Wise 등, 1993; Blair 등, 1995; Guzzetta 등, 1995). 일반적으로 PMP-22 유전자의 중복은 de novo duplication의 경우도 흔하지만, 감수분열이나 체세포분열의 과정 중에도 소실되지 않고 안정적으로 차손대에 전달되는 것으로 알려져 있는데(Harding, 1995; Ionasescu, 1995), 본 환자 가족의 경우도 중복된 어머니의 유전자가 딸로 유전된 것을 알 수 있었다.

저자들의 증례에서 관찰된 흥미있는 사실은 이들이 한 가족으로서 동일한 유전자 이상이 있음에도 불구하고 임상 양상에는 큰 차이가 있어서 환자에서는 나이가 어릴수록 불규칙하고 전형적인 CMT의 양상을 보인 반면 환자의 모친은 별로 증상이 심하지 않았다는 것이다. 이는 CMT 1A의 임상 발현 및

진행에는 PMP-22 유전자 외에도 다른 유전자가 관여하든지, 또는 복합적인 환경 요인이 관여하는 것을 의미하는 것으로 추정되며, 따라서 추후 많은 환자들을 대상으로 유전자형과 표현형을 비교하여 이런 환경 요인을 찾아낸다면 CMT질환 자체의 이해와 치료에 도움을 줄 수 있게 될 것이다. 또한, 앞으로 이 가족에서는 D17S122 위치를 분석함으로써 보인자 및 산전 진단이 가능한 것으로 생각되며, 그 밖에 다른 환자들에서도 임상 진단 목적으로 이와 같은 방법이 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

저자 등은 서서히 보행 장애가 진행되고 요족, 족하수, 원위부 하지에서의 근력약화 및 감각저하가 있으며, 신경전도 검사에서 CMT 1형으로 진단된 환자 및 그 가족에서 유전자 검사를 시행하여 PMP-22 유전자를 포함하는 염색체 17p11.2의 중복이 환자 및 환자의 모친에서 발견되어 CMT 1A로 진단할 수 있었던 증례를 경험하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다.

REFERENCES

오정희, 김경희, 박명옥, 송순경 (1979) : 전갑비골형 근이영양증과 비골근위축의 근전도소견. 대한재활의학회지. 3; 15-20.

최문성, 최경, 박규현 (1987) : Charcot-Marie-Tooth 병으로 사료되는 가족 2례. 대한신경과학회지. 5(2); 262-271.

Ben Othmane K, Middleton LT, Loprest LJ, Wilkinson KM, Lennon F, Rozear MP, Stajich JM (1993) : Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 17 : 370-375.

Bergoffen J, Trofatter J, Pericak-Vance MA, Haines JL, Chance PF, Fishbeck KH (1993) : Linkage localization of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Genet.* 52 : 312-318.

Blair I, Kennerson ML, Nicholson GA (1995) : Deletion of Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication by polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 41(8) : 1105-1108.

Bost M, Bonnebouche C, Gonnaud PM, Cochat P, Gillibert B, Dupont C, Chazot G, Vandenberghe A (1994) : New allele of probe D17S61 present in the Charcot-Marie-Tooth 1A duplication. *Clin Genet* 46 : 380-381.

Chance PF, Pleasure D (1993) : Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Arch Neurol* 50 : 1180-1184.

Guzzetta V, Santoro L, Gasparo-Rippa P, Ragno M, Vita G, Caruso G, Andria G (1995) : Charcot-Marie-Tooth disease: molecular characterization of patients from central and southern Italy. *Clin Genet* 47 : 27-32.

Harding AE (1995) : From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain* 118 : 809-818.

Hayasaka K, Ohnishi A, Takada G, Fukushima Y, Murai Y (1993) : Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16 : 1317-1322.

Ionasescu VV, Ionasescu R, Searby C (1993) : Screening of dominantly inherited Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Muscle Nerve* 16 : 1232-1238.

Ionasescu VV (1995) : Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 18 : 267-275.

Kwon JM, Elliot JL, Yee WC, Ivanovich J, Scavarda NJ, Moolisintong PJ, Goodfellow PJ (1995) : Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.* 57 : 853-858.

Lapresle, Saloisachs (1973) : Onion bulbs in nerve biopsy specimen from an original case

- of Roussy-Levy disease. *Arch Neurol* 29 : 432-438.
- Lupski JR, Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardensa O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravart A, Patel P (1991) : DNA Duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66 : 219-232.
- Mancardi GL, Uccelli A, Bellone E, Sghirlanzoni A, Mandich P, Pareyson D, Schenone A, Abbruzzese, Ajmar F (1994) : 17p11.2 Duplication is a common finding in sporadic cases of Charcot-Marie-Tooth type 1. *Eur Neurol* 34 : 135-139.
- Nelis E, Timmerman V, Jonghe PD, Vandenberghe A, Pham-Dinh D, Dautigny A, Martin JJ, Broeckhoven V (1994) : Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 94 : 653-657.
- Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, Lupski JR (1993) : Charcot-Marie-Tooth disease type 1A association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *New Engl J Med* 329(2) : 96-101.
- Uncini A, Guglielmo GD, Muzio AD, Gambi D, Sabatelli M, Mignogna T, Tonari P, Marzella R, Finelli P, Archidiacono N, Rocchi M (1995) : Differential electrophysiological features of neuropathies associated with 17p11.2 deletion and duplication. *Muscle Nerve* 18 : 628-635.
- Wise CA, Garcia CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PI, Lupski JR (1993) : Molecular analysis of unrelated Charcot-Marie-Tooth(CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am. J. Hum. Genet.* 53 : 853-863.
- Yudell A, Dyck PJ, Lambert ED (1965) : A kinship with the Roussy-Levy syndrome. *Arch Neurol* 13 : 432-440.