유전성 근육 질환의 실제적 유전자 검사 접근 방법

¹경북대학교 의과대학 신경과학교실, ²경북대학교병원 신경과

이종목^{1,2}

Practical Diagnostic Approach to Myopathy

Jong-Mok Lee, MD, PhD^{1,2}

¹Department of Neurology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Department of Neurology, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

KEYWORDS

Whole exome sequencing,
Multiplex polymerase
chain reaction, Blotting,
southern, Sequence
analysis

Hereditary myopathy is characterized by the weakness of skeletal muscles and is associated with various genetic defects. The efficiency of a genetic diagnosis has been archived with wide application of next-generation sequencing (NGS) recently. However, the establishment of the correct diagnosis of hereditary myopathy is still challenging and sometimes requires other methods of genetic analysis besides NGS. Therefore, clinicians still have crucial roles in analyzing the causative genes. In this article, we introduced the genetic analysis approach in the clinical field.

서론

유전성 근육 질환은 다양한 유전적 원인에 의해 골격근의 약화를 보이는 질환군이다. 유전성 근육 질환을 임상 특징과 병리학적 소견에 따라 근디스트로피(muscular dystrophy), 선천성 근디스트로피(congenital muscular dystrophy), 선천성 근육병(congenital myopathy), 원위부 근육병(distal myopathy), 대사성 근육병(metabolic myopathy), 근긴장증후군(myotonic syndrome), 이온통로 근육병(ion channel muscle disease)으로 구분할 수 있다.¹ 이에 따른 현재까지 알려진 원인 유전자의 갯수는 180개가 넘는다.¹ 그러나 대부분의 유전성 근육 질환은 사지근력저하라는 임상 양상을 공유하고 있으며, 추가적인 임상 표현이 감별하는 데 도움을 줄 수 있지만 임상 표현 범위에 따라 그 임상 표현이 모두

나타나지 않아 진단이 쉽지 않다.

전통적으로 임상 양상 분석, 근전도 검사 소견, 병리 소견 분석, 단백 발현 확인, 유전자 검사를 통해 유전성 근육 질환을 진단한다. 2010년 이후 차세대 염기서열 분석(next-generation sequencing, NGS)의 발전으로 효율적으로 유전자 검사를 하게 되어 진단율이 높아졌다. 그러나 방법론적인 단점으로 인해 분석이 되지 않는 부분이 있어 해석에 주의가 요구되며, 필요 시 다른 방법의 유전자 검사가 필요하다. 본고에서는 유전성 근육 질환의 진단 과정 중 필요한 유전자 검사 접근에 대해서 경험을 공유하고자 한다.

Received: May 28, 2021 / Accepted: June 12, 2021

Address for correspondence: Jong-Mok Lee, MD, PhD

Department of Neurology, School of Medicine, Kyungpook National University, 680 Gukchaebosang-ro, Jung-gu, Daegu 41944, Korea
Tel: +82-53-200-5765, Fax: +82-53-422-4265, E-mail: azulmar@gmail.com

본 론

1. 복합결찰의존탐색자증폭(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

MLPA의 탐색자(probe)는 2개의 단일가닥 DNA로 왼쪽 탐색자와 오른쪽 탐색자로 나뉜다. 두 탐색자의 길이는 보통 60에서 80개의 핵산을 가진다. 샘플 DNA에 탐색자와 상보되는 염기서열이 있는 경우, 각각의 탐색자가 샘플 DNA에 결합하면서 이웃하여 위치한다. 이후 두 탐색자는 결찰(ligation)이 되고 증폭(amplification)을 통해 확인할 수 있으며, 식별을 위해 오른쪽 탐색자는 각자의 길이를 갖고 있다. 최종적으로 증폭된 탐색자를 식별함으로써 유전자 이상을 확인할 수 있다.² 이 방법은 주로 엑손 결손 혹은 반복의 확인에 쓰인다. 뒤센느근디스트로피(Duchenne muscular dystrophy)의 약 70%가 엑손 결손 혹은 반복으로 발생한다고 알려져 있어, 임상적으로 뒤센느근디스트로피 혹은 베커 근디스트로피(Becker muscular dystrophy)가 의심되는 경우 근생검 이전에 시도해 볼 수 있다.³ MLPA의 결과 해석에서 주의가 필요한데, 한 개의 엑손 결손으로 확인되는 경우에 반드시 해당 탐색자가 결합하는 위치에 염기서열 분석을 통해 점돌연변이(point mutation)가 없는지 확인해야 한다.^{4,5}

2. 표적 생거 염기서열(targeted Sanger sequencing)

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 통해 500-600 base pair 이하의 분석하고자 하는 DNA를 증폭하여 염기서열을 확인하는 방법이다. 확인하고자 하는 부위가 넓지 않으면서 임상 증상, 병리적 소견에 따라 이상 유전자가 강력히 의심이 되는 경우에는 권장할 수 있다. 예를 들면, 중심코어병(central core disease)이나 뒤센느 혹은 베커 근디스트로피에서 엑손 결손이 확인되지 않은 경우에 시도해 볼 수 있다.⁶ 그러나 분석하고자 하는 유전자의 길이가 길거나, 하나의 임상표현형에 따른 원인 유전자가 다양한 경우에는 NGS를 우선 고려하는 것이 좋겠다.

3. 서든 블롯(southern blot)

Kilo base pair 이상의 유전자 크기를 확인할 때 주로 쓰인다. 즉, kb 단위의 유전자반복수를 확인하여 정상보다 늘어나 있거나 줄어든 경우에 이용이 된다. 유전성 근육 질환군에서는 안면견갑상완근이영양증(facioscapulohumoral mus-

cular dystrophy) 1형의 진단을 확인할 때 쓰인다. 4q35의 위치한 D4Z4 하나가 3.3 kb로, 정상인의 경우 12회 이상 보존되어 있어, 서든 블롯을 이용하지 않고는 진단이 쉽지 않다. 다만, 유전자 분석 시 간헐영역겔전기영동(pulsed-field gel electrophoresis)이 필요하며, 처음 준비부터 최종 결과물을 얻을 때까지 약 10일이라는 오랜 시간과 노력이 필요하기 때문에, 다른 검사 방법의 도입이 필요하다.⁷

4. 전엑솜 염기서열(whole exome sequencing)

차세대 염기서열의 꽃이라고 할 수 있는 유전자 분석이다. 수많은 100-300 bp의 앰프리콘(amplicon)을 대량으로 염기서열 분석을 하여 표준게놈에 정렬하여 이어진 염기서열을 얻는다. 이 결과물을 생물정보학(bioinformatic) 파이프라인을 통해 변이의 정보가 더해진다. 흔히 유전자패널(gene panel)로 불리는 유전자 분석과 전엑솜 염기서열은 기본적으로 같다. 다만, 염기서열 분석기(sequencer)의 성능에 따라 효율적으로 검사를 위해 방법이 달라진다. 보통 유전자패널은 MiSeq® (Illumina, San Diego, CA, USA)을 통해서, 임상적 표현 및 질환에 맞추어 가능성이 높은 유전자 수십개를 염기서열 분석을 하게 된다. HiSeq® (Illumina)을 통한 염기서열 분석은 MiSeq® (Illumina)에 비해 10배 이상 빠르게 할 수 있으므로 주로 전엑솜 염기서열 분석에 이용된다. 전엑솜 염기서열의 결과물로 변이 목록에서 의미 있는 병리적 변이를 찾기 위해서는 임상적 표현, 병리 소견을 바탕으로 분석해야 한다. 현재 다양한 근디스트로피, 선천성 근육병, 원위성 근육병 등의 원인 유전자 확인에 이용되고 있다. 근육디스트로피멘텔유전법칙을 따르는 경우에는 발단자(proband)에 부모를 포함하여 3명의 전엑솜 염기서열을 분석하는 셋엑솜 염기서열(trio exome sequencing)을 하기도 한다. 발단자만 전엑솜 염기서열 분석을 시행한 경우에는 mutationDistiller (www.mutationdistiller.org)라는 도구를 통해서 병리적 변이를 찾는 데 도움을 받을 수 있다.⁸ 추가적으로 전엑솜 염기서열 단계에서 생성되는 앰프리콘의 수의 분석에 따라 유전자복제수변이(copy number variation)나 엑손 결손 혹은 반복을 찾기도 한다.⁹

그러나 상대적으로 짧은 앰프리콘 크기로 인해 표준게놈에 정렬할 때 지도화 에러(mapping error)가 발생하여 데이터를 얻지 못하는 엑손도 있으니 해석에 주의가 필요하겠다.

5. 긴읽음 염기서열 분석(long-read sequencing)

기존 200-300 bp의 앰프리콘 크기에 의한 단점을 보완한

NGS이다. 분석 방식에 따라 다르지만, 앰프리콘 크기가 평균 5 kb에서 35 kb까지 가능하다.¹⁰ 최근 이를 이용하여 진단에 이르는 질환이 보고되고 있다.^{11,12} 그러나 분석비용이 높기 때문에 임상에 적용하기에는 시일이 걸릴 것으로 보인다.¹⁰

결론

최근 10년간 NGS의 발전으로 유전성 근육병의 원인 유전자를 효율적으로 확인할 수 있게 되었으며 지속적으로 단점을 보완해 나가고 있다. 동시에 더욱 빠르게 원인 유전자를 파악하기 위해 다양한 in-silico 방법이 개발되고 있다. 그러나 최종적인 원인 유전자와 그에 따른 임상적 진단을 위해서는 임상가의 판단이 여전히 필요하며 임상적 표현, 병리 소견을 바탕으로 적절한 유전자 검사를 선택할 수 있도록 해야 하겠다.

REFERENCES

1. Benarroch L, Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2021 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 2020;30:1008-1048.
2. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
3. Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics* 2005;6:29-35.
4. Cho MS, Lee JM. A novel single-base mutation mimicking exon deletion of MLPA in symptomatic Duchenne muscular dystrophy carrier. *Acta Neurol Belg* 2021;121:287-289.
5. Nakamura A. Mutation-based therapeutic strategies for duchenne muscular dystrophy: from genetic diagnosis to therapy. *J Pers Med* 2019;9:16.
6. Lynch PJ, Tong J, Lehane M, Mallet A, Giblin L, Heffron JJ, et al. A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca²⁺ release channel function and severe central core disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4164-4169.
7. Goto K, Nishino I, Hayashi YK. Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2006;16:256-261.
8. Hombach D, Schuelke M, Knierim E, Ehmke N, Schwarz JM, Fischer-Zirnsak B, et al. MutationDistiller: user-driven identification of pathogenic DNA variants. *Nucleic Acids Res* 2019;47:W114-W120.
9. Okubo M, Minami N, Goto K, Goto Y, Noguchi S, Mitsuhashi S, et al. Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet* 2016;61:483-489.
10. Lang D, Zhang S, Ren P, Liang F, Sun Z, Meng G, et al. Comparison of the two up-to-date sequencing technologies for genome assembly: HiFi reads of Pacific Biosciences Sequel II system and ultralong reads of Oxford Nanopore. *Gigascience* 2020;9:giaa123.
11. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet* 2019;51:1222-1232.
12. Ogasawara M, Iida A, Kumutpongpanich T, Ozaki A, Oya Y, Konishi H, et al. CGG expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations. *Acta Neuropathol Commun* 2020;8:204.