

제주 지역의 만성육아종질환에서 발견되는 *CYBA* 유전자 내 특정 유전자 돌연변이의 현황 연구

박성혜¹, 김영미², 조문제², 신경수³

¹제주대학교 의학전문대학원 의학과, ²생화학교실, ³소아청소년과학교실

(Received November 4, 2013; Revised November 11, 2013; Accepted November 18, 2013)

Abstract

A Survey on the Present Condition of Subjects Carrying the Unique Mutated Allele in *CYBA* Gene on Jeju Island, Korea

Seong Hye Park¹, Young Mee Kim², Moonjae Cho², Kyung-Sue Shin³

¹Department of Medicine, ²Biochemistry, and ³Pediatrics, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

The estimated prevalence of chronic granulomatous disease (CGD) is between 1 in 200,000 and 1 in 250,000 individuals, with variable occurrence in different countries. According to a collation by the Korean College of Pediatric Clinical Immunology, the prevalence of CGD in Korea was 0.9 in 1,000,000 individuals. Although most regions of Korea had similar prevalence of CGD, the prevalence of CGD on Jeju Island was a surprising 20.7 in 1,000,000 individuals. Previously, we demonstrated that all CGD patients on Jeju Island had an identical mutation in the *CYBA* gene. We hypothesized that the high prevalence of CGD on Jeju Island is associated with an identical mutation inherited from a common ancestor or proband. In this study, we developed highly sensitive assay using mutation-specific primers to detect the unique mutation in the *CYBA* gene on Jeju Island. We investigated the frequency of subjects carrying the unique mutated allele in *CYBA* gene. Circa 700 subjects from Seogwipo City (~0.5% of the population of Seogwipo City) were enrolled, 1.1% of whom had the *CYBA* mutated allele. A significant difference was observed between the expected and calculated numbers in the population of Seogwipo City (~2% of the population) by Hardy-Weinberg equilibrium. Further studies are necessary to elucidate the frequency at which this mutant allele occurs in the population of Jeju Island. (J Med Life Sci 2013;10(2):111-115)

Key Words : Chronic granulomatous disease, p22^{def}, *CYBA*

서론

만성육아종질환 (Chronic granulomatous disease, CGD)은 유독성 산소 대사물을 생성하는 백혈구 내의 효소인 NADPH oxidase의 유전적인 결함으로 발생하는 면역결핍 질환으로 세균과 진균에 의한 반복적인 감염과 여러 내부 장기에 육아종 (granuloma) 형성을 특징으로 한다¹⁾. NADPH oxidase는 여러 개의 구성단위(subunit)로 이루어지는 효소 복합체이며, 각각의 구성단위로는 세포막에 있는 flavocytochrome b558 (gp91^{def}와 p22^{def})과 세포질에 있는 p47^{def}, p67^{def}, p40^{def} 등이 있다²⁾. 만성육아종질환은 NADPH oxidase의 각 구성단위의 유전적인 결함

으로 인하여 발생되며, 현재까지 보고된 구성단위의 유전적 결함 중에서 가장 많은 것은 상염색체에 유전자가 있는 gp91^{def} 결함으로 약 70%를 차지한다. 상염색체 유전성 만성육아종질환 중에서는 p47^{def} (7번 염색체)의 결함이 전체 만성육아종질환의 약 20%로 가장 많고, p22^{def} (16번 염색체) 결함과 p67^{def} (1번 염색체) 결함이 약 10% 정도이다³⁾. p40^{def} 결함을 가진 만성육아종환자는 최근에 1례가 보고되었을 뿐이다⁴⁾. 그리고 p47^{def} 결함을 제외한 다른 구성단위의 유전적 결함은 매우 다양한 종류의 돌연변이가 보고되고 있다⁵⁾.

제주 지역의 만성육아종질환 환자의 실태와 유전 분석은 1999년 만성육아종질환에 관한 보고⁶⁾에 의하면 전체 상염색체 유전성 만성육아종질환이 18명 중 7명이 제주 지역의 환자들이었고, 2006년 대한소아임상면역학회 주관의 조사에서도 전체 44명의 만성육아종질환 환자 중 11명이 제주 지역의 환자들이어서 인구 백만 명당 0.94명의 전국 유병율에 비해 제주 지역은 인구 백만 명당 20.73명의 매우 높은 유병율을 나타내었다⁶⁾.

Correspondence to : Kyung-Sue Shin
Jeju National University School of Medicine
E-mail kyungsue@jejunu.ac.kr

2008년 본 연구자들은 제주 지역의 만성육아종질환 환자의 실태 조사와 비혈연관계 10가족의 유전 분석을 시행하였다. 유전 분석의 결과 제주 지역의 만성육아종질환 환자들 모두가 NADPH oxidase의 구성단위들 중에서 p22^{phox} 결함에 의한 상염색체 열성 유전형의 만성육아종질환으로 진단되었고, 환자들의 부모 모두에서도 환자들에서 발견되는 유전 변이를 가지는 보인자로 확인되었다. 그리고 조사한 비혈연관계 10가족 모두에서 동일한 유전 변이가 발견되었다⁹⁾. 환자 실태 조사 결과에서 2008년 현재 제주 지역의 만성육아종질환 유병율은 인구 백만명 당 23.1명이었고, 지역별로 구분하였을 때 제주시 지역의 유병율은 7.4명인데 비하여 서귀포시 지역은 64.6명으로 제주시 지역보다 약 9배 이상의 유병율을 나타내었다⁹⁾. 그러나 이 조사도 전수 조사나 표본 조사를 통하여 이루어지지 않은 조사여서 실제 제주 지역의 만성육아종질환 환자의 실태 자료라 하기가 힘들다. 그러므로 본 연구는 제주 지역의 만성육아종질환에서 발견되는 CYBA 유전자 내 특정 유전자 돌연변이를 가진 인구의 현황을 파악하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

서귀포시 지역을 모집단으로 하였고, 제주대학교병원을 내원한 환자들 중에서 주소지가 서귀포시 지역 내 환자들을 대상으로 환자들의 통상적인 치료 과정에서 채혈한 검체들 중에서 폐기할 혈액 704개를 이용하였다. 이 연구는 제주대학교병원 기관윤리위원회 심의를 거쳤다(2008-39).

2. 방법

본 연구자들은 제주 지역의 만성육아종질환 환자들 모두에서 발견되는 특정 유전자 부위를 찾아내는 방법을 고안하였고¹⁰⁾, 동일한 방법으로 특정 유전자 돌연변이의 유무를 조사하였다. CYBA 유전자 내의 특정 유전자 부위를 포함하는 부분을 1차로 중합효소반응을 이용하여 증폭하였고, 증폭된 산물을 이용하여 2차적으로 nested 중합효소반응을 하였다(Fig. 1A). 전기영동법으로 264bp의 산물이 발현되었을 경우에 특정 유전자 돌연변이가 있다고 하였고, 이를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 하였다(Fig. 1B).

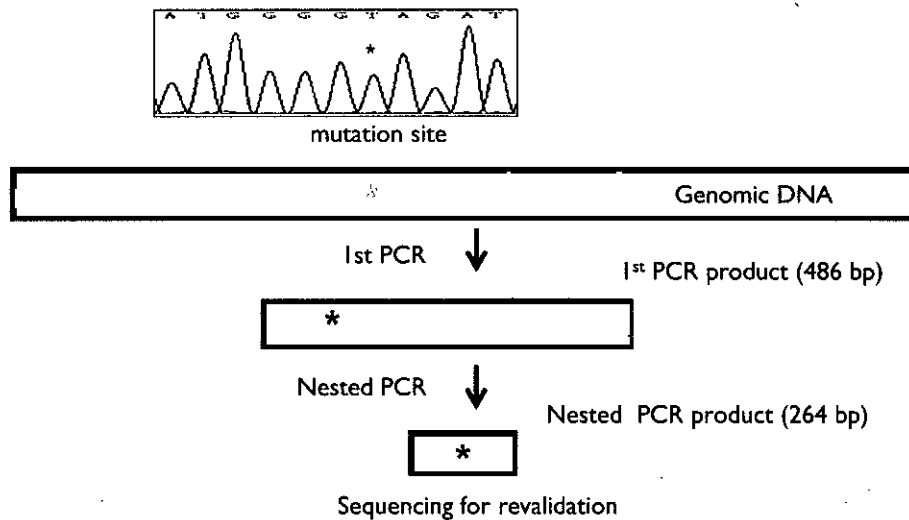


Figure 1. Detection of subjects carrying the mutated allele in the CYBA gene.

Fig. 1A

Genomic DNA was subjected to nested PCR. The first PCR was performed using the primers specific to the p22^{phox} gene. Nested PCR was performed using the heterozygote-specific primer, whose positions are illustrated.

Table 3. Regional distribution of subject with the mutated allele

Region	Subject	Subject with the mutated allele
Seogwipo-Si	249	4
Seongsan	109	0
Pyoseon	57	2
Namwon	184	1
Andeok	39	0
Daejeong	66	1
	704	8

고찰

2008년 본 연구자들의 제주 지역의 만성육아종질환 환자의 실태 조사 결과 Hardy-Weinberg equilibrium에 근거하여 모집단의 만성육아종질환 보인자의 빈도는 전체 인구의 약 2%로 추정되었으나, 그러나 본 연구 결과에서는 제주 지역의 만성육아종질환에서 발견되는 CYBA 유전자 내 특정 유전자 돌연변이를 가진 인구는 모집단 전체 인구의 약 1.1%로 추정되었다. Hardy-Weinberg equilibrium은 제한된 조건하에서 유전자의 빈도와 유전자형의 빈도가 모두 변하지 않고 항상 평형을 이룬다는 법칙이다¹⁴. 그러므로 환자의 수로 예측한 대립유전자의 빈도로 보인자의 수를 예측할 수 있고, 세대가 지나더라도 대립유전자의 빈도는 변하지 않으므로 세대를 거치는 과정에서 발생할 수 있는 대립유전자의 빈도도 예측할 수 있다. 그러나 Hardy-Weinberg equilibrium이 성립되기 위해서는 몇 가지 전제 조건들이 필요하다. 집단 내의 교배는 완전 무작위적이며, 개체군에서는 자연 선택이 작용하지 않으며, 집단의 크기가 상당히 크고, 집단 내외로 이동이 없고, 대립유전자는 멘델의 제1법칙에 따라 분리되며, 대립유전자의 돌연변이가 없다는 전제 조건들이다. 본 연구자들은 본 연구의 모집단이 이러한 조건들을 만족한다고 가정하였으나 본 연구에서는 열성 동형 대립유전자의 관찰 값(모집단 내의 만성육아종질환 환자 수)만 확인할 수 있어 Hardy-Weinberg equilibrium의 오차를 확인할 수 없었다. 그러나 고령 인구에서는 인구 이동이 적기 때문에 지역별 인구간의 유전자 이동이나 유전자간의 재조합 (gene recombinant)이 적어 고령자에서 유전 분석을 시행하는 것이 유전적인 계보를 확인하는 효과적인 방법이라고 생각하여 모집단에서 표본 집단을 추출할 때 조사 대상자의 약 50%를 60세 이상의 고령자를 선정하였다. 그 결과 본 연구에서 8명의 제주 지역의 만성육아종질환에서 발견되는 CYBA 유전자 내 특정 유전자 돌연변이를 가진 대상자가 확인되었고, 그 중에서 4명이 60세 이상의 고령자에서 확인이 되어 본 연구 조사의 접근 방법이 동일한 유전적인 계보를 확인하는 효과적인 방법이라 생각된다. 그러나 60세 이상의 고령자에서 확인된 보인자의 지역적 분포가 분산되어 있고, 비혈연관계로 파악되어 동일한 유전적인 계보를 확인하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 4. Age distribution of subject with the mutated allele

Age	Subject	Subject with the mutated allele
> 60 years	329	4
40 - 59 years	152	2
20 - 39 years	79	1
< 20 years	144	1
	704	8

본 연구의 한계점은 2009년 현재 Hardy-Weinberg equilibrium으로 추정한 모집단 내의 만성육아종질환 보인자 수와 본 연구에서 확인된 CYBA 유전자 내 특정 유전자 돌연변이를 가진 대상자로 추정한 보인자의 수는 통계학적으로 차이가 있고, 조사 대상자가 2008년 현재 모집단 내의 인구의 약 0.5%에 해당되어 모수에 비해 표본수가 너무 적어서 통계적으로 의미 있는 결과는 아니라고 할 수 있다. 그러나 아직까지 다른 지역이나 인종에서 이러한 조사가 이루어지지 않았다는 점에서 본 연구의 의의가 있다고 생각한다. 그리고 본 연구는 조사 대상자 선정에 있어서 방법론적인 한계로 인하여 모집단의 인구 분포와 연령별 분포를 표본 선정 과정에서 충실하게 반영하지 못하였다. 모집단의 65세 이상 인구비가 11 - 17%인 점에 비하여 본 연구 조사에서는 65세 이상 대상자들이 전체 대상자의 47%였고, 표본 조사 대상자의 연령별 분포와 지역별 분포도 모집단의 분포와 차이가 있었다. 그러므로 본 연구 조사 결과를 실제 모집단 내의 만성육아종질환자와 보인자의 실태 자료로 추산하기에는 힘든 점이 있다. 그러나 제주 지역의 만성육아종질환 환자들 모두가 NADPH oxidase의 구성단위들 중에서 p22^{phox} 결함에 의한 상염색체 열성 유전형의 만성육아종질환으로 진단되었고, 환자들의 부모 모두에서도 환자들에서 발견되는 동일한 유전 변이를 가지는 보인자로 확인되었다. 제주 지역 내의 만성육아종질환자와 보인자의 실태 파악을 위하여 제주도 차원의 추가적이고 체계적인 조사가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구 결과에서 CYBA 유전자 내 특정 유전자 돌연변이를 가진 인구는 60세 이상의 고령자에서만 보유하고 있는 것이 아니라 전 연령층에서 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 만성육아종질환은 발생 빈도는 낮지만 치명적인 유전성 면역 결핍증으로 조기 진단과 이에 따른 적절한 치료가 중요하지만 유전 분석을 통한 보인자 검출과 이에 따른 유전 상담과 효과적인 산전 진단으로 병의 발생을 예방하는 방법도 병의 조기 진단과 효과적인 치료에 못지않게 중요하다. 그러므로 본 연구 결과는 제주 지역에서 나타나는 특이한 만성육아종질환 유전자 변이에 대한 유전 분석이 산전 진단과 신생아 기본 검사의 항목에 포함되어야 하는 필요성과 타당성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

최근 치명적이고 치유가 힘든 감염이 동반된 만성육아종질환의 치료에 조혈모세포를 이용한 유전자치료가 시도되고 있으나

만성육아종질환은 유전 변이가 다양하여 일부 유전형에만 적용되고 있다. 그러나 제주 지역에서는 만성육아종질환자의 유전 변이가 모두 동일하여 동일한 바이러스 매개체를 이용할 수 있고, 제주 지역의 환자들의 연령이 높아서 조혈모세포를 얻기가 용이하며, 유전자치료 과정에서 발생할 수 있는 부작용들에 대한 해결이 용이하여 타 지역에 비하여 유전자치료를 시행할 수 있는 좋은 조건들을 갖추고 있다. 그러므로 유전자치료가 제주 지역 특화 의료로 발전할 수 있도록 정책적인 연구 지원도 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2013학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었다.

참고 문헌

- 1) Segal BH, Veys P, Malech H, Cowan MJ. Chronic granulomatous disease. Lessons from a rare disorder. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(Suppl 1):123-31.
- 2) Kuijpers T, Lutter R. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:7-15.
- 3) Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, Roos D, van Koppen E, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease - second update. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:16-26.
- 4) Cross AR, Noack D, Rae J, Curnutte JT, Heyworth PG. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (first update). *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26:561-5.
- 5) Matute JD, Arias AA, Wright NAM, Wrobel I, Waterhouse CCM, Li XJ, et al. A new genetic subgroup of chronic Granulomatous disease with autosomal recessive mutation in p40^{phox} and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 2009;114:3309-15.
- 6) Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, Heyworth PG. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes. *Blood* 2001; 97:305-11.
- 7) Shin KS, Park JS, Kim JG. Clinical study on chronic granulomatous disease in Korea. *Korean J Immunol* 1999;21:271-83.
- 8) Rhim JW, Kim KH, Kim DS, Kim BS, Kim JS, Kim CH, et al. Prevalence of primary immunodeficiency in Korea. *J Korean Med Sci* 2012;27:788-93.
- 9) Kim YM, Park JE, Kim JY, Lim HK, Nam JK, Cho M, et al. Genetic analysis of 10 unrelated Korean families with p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: an unusually identical mutation of the CYBA gene on Jeju Island, Korea. *J Korean Med Sci* 2009;24:1045-50.
- 10) Kim YM, Shin KS, Cho M. New method for detection of p22-phox-deficient chronic granulomatous disease heterozygote carriers in Jeju. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2012;55:595-8.
- 11) Mao WG, He HQ, Xu Y, Chen PY, Zhou JY. Powerful haplotype-based hardy-weinberg equilibrium tests for tightly linked loci. *PLoS* 2013;22:e77399.