

PGD & Microdeletion of Y Chromosome in Male Infertility

미즈메디병원 비뇨기과

김 종 현

Introduction

난자세포질내 정자주입술과 같은 보조생식술의 발달로 남성불임의 많은 부분이 해결되었으며 이로써 과거에는 2세를 가질 수 없었던 난치성 남성불임 환자들도 생물학적인 부모가 될 수 있다. 하지만 이로 인하여 불임과 연관된 유전적인 이상이 다음 세대로 전달되는 문제가 발생하게 되었다.

남성불임과 연관된 유전학적 문제는 염색체의 이상 (결손, 중복, 전좌, 역전)과 Y 염색체의 부분결손 (SRY, AZF), 단일 유전자 이상 등이 있다 (Table 1). 이로 인한 남성불임 환자들도 정액 내에 정자가 있을 수 있으며 고환 조직 내에서 정자의 추출이 가능하므로 보조생식술을 통하여 얼마든지 임신이 가능하다. 그러므로 유전적 이상에 의한 남성불임 환자 부부에서는 보조생식술을 하기 전에 유전상담이 필요하며 착상 전 유전진단과 양수검사나 융모막 생검과 같은 산전검사 또한 고려되어야 한다.

본 강의에서는 유전학적 이상으로 인한 남성불임 부부에서 어떠한 경우에 착상전 유전진단이 필요

Table 1. Male infertility causes related with genetic abnormalities

Chromosomal disorder

Y chromosomal microdeletion (SRY, AZF)

Sex chromosomal aneuploidy (Klinefelter synd, XYY male, mixed gonadal dysgenesis)

Chromosomal translocation or inversion

Single gene disorders

Pretesticular causes

beta thalassaemia, Sick cell anemia, Kallman's syndrome

AR mutation, Kennedy disease, FSH/LH hormone or receptor defects

Ataxia and hypogonadism

Testicular causes

Myotonic dystrophy, immotile cilia syndrome

Posttesticular causes

Cystic fibrosis with congenital absence of vas agenesis (CFTR mutations)

5 alpha-reductase deficiency

Table 2. Preimplantation genetic diagnosis for male infertility

Chromosomal disorder
Y Chromosomal microdeletion (AZF)
Sex chromosomal aneuploidy (Klinefelter synd, XYY male)
Chromosomal translocation or inversion
Single gene disorders
Myotonic dystrophy
Cystic fibrosis with congenital absence of vas agenesis (CFTR mutations)

하며, 남성불임의 가장 대표적인 유전적 이상인 Y 염색체 미세결실이 가지는 의미에 대하여 알아보자 한다.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD, 착상전 유전진단) for male infertility

착상전 유전진단은 유전병에 이환될 태아가 임신이 되는 것과 자연유산으로 종료가 될 임신을 미리 방지하고 정상적인 임신만을 성립시키기 위한 방법이다. 방법은 체외수정을 시행하여 수정란의 할구를 생검하고 착상 이전단계에서 유전진단을 하여 정상적인 수정란만을 자궁에 선별적으로 이식하여 정상적인 임신을 시도하는 것이다.

유전적 이상과 연관된 여러 남성불임 환자들에서도 보조생식술로 인하여 다음 세대로 유전적 이상이 전달될 수 있을 뿐 아니라 전좌 등의 염색체의 구조적 이상이 있는 경우 자연유산과 염색체 이상을 가진 출산아의 가능성이 높기 때문에 적용할 수 있다 (Table 2).

남성불임 환자들 중 심한 감정자증을 보이거나 비폐쇄성 무정자증 환자의 경우 10~35%의 환자에서는 Y 염색체의 AZF (Azoospermic factor) 미세결실이 발견되는데 이들 환자들에서도 보조생식술로 임신이 가능하다. 이 경우 아버지의 미세결실 부위는 아들에게 그대로 전해져서 다음 대에서도 같은 문제가 발생하기 때문에 보조생식술 전에 유전상담을 해야 하며 착상전 유전진단을 통하여 여자배아만 선택적으로 이식할 수도 있다.

성염색체 이상을 보이는 클라이네펠터 증후군 (XXY)이나 XYY 남성의 경우도 드물게나마 정액에서 정자를 보이기도 하고 고환 조직 내에서도 정자의 추출이 가능하다. 이들 환자들에서 대부분의 정자는 정상적인 X bearing 또는 Y bearing 정자이긴 하지만 정상 남성에 비하여 XX나 XY aneuploidy 정자의 출현 가능성이 높기 때문에 보조생식술 후에 얻은 배아에서 착상전 유전진단을 이용하여 성염색체의 이상 여부를 미리 알아보고 정상적인 배아만 이식할 수 있다.

여러 특정 단일 유전자의 이상에 의해서도 남성불임이 초래되는데 이들 유전자의 존재 유무 및 이상을 알기 위하여 PCR이 시행되어야 한다. 대표적인 것으로 동양인에서는 발견되지 않지만 서양인에서 자주 발견되는 낭성 섬유화증 (cystic fibrosis) 환자에서는 선천성 정관 무형성증 (congenital absence of vas deferense)이 동반되어 나타나며 cystic fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR; 7q31.2)이라 불리는 유전자의 변이에 의해 상염색체 열성으로 나타난다. 그러므로 이 질환을 가지고 있는 대부분의

남성은 정로가 없기 때문에 무정자증으로 나타나며 이 경우 부고환이나 고환에서 정자를 채취하여 보조생식술을 하게 되면 다음 대에서 같은 환자나 보인자로 나타나게 된다. 보인자의 경우도 부인이 이 유전자의 이상을 가진 경우 다음 대에서 불임환자로 나타날 수 있다. 그러므로 부인에 대한 유전자 검사가 꼭 필요하며 착상전 유전진단을 시행하여 정상적이거나 보인자 배아만을 선택적으로 이식할 수 있다. 근긴장성 이영양증 (myotonic dystrophy)은 가장 일반적인 성인 때 발병하는 근 이영양증으로 19q13.2에 위치한 serine-threonine protein kinase gene의 CTG region의 불안정한 반복에 의하여 상염색체 우성으로 나타난다. 고환의 위축을 초래하여 불임을 유발시키지만 많은 환자들에서 정액이나 고환에서 정자를 얻을 수 있다. 이들 환자에서도 착상전 유전진단을 통하여 정상적인 배아만 선택적으로 이식하게 된다.

염색체의 전좌나 역전에 의해서도 남성불임이 초래되는데 특히 reciprocal 전좌, Robertsonian 전좌와 9번 염색체 역전은 정상인에 비해 불임환자에서 8배 많다고 하며 감정자증을 보이는 남성불임 환자의 5.3%에서 전좌가 발견된다고 한다. 전좌는 직접 정자형성 관련 유전자를 변형시키거나 정자형성 중에 염색체의 감수분열 및 pairing을 방해하여 불임을 유발할 뿐 아니라 Robertsonian 전좌의 경우는 습관성 유산을 일으키며 다운증후군과 같은 유전질환을 가진 아기를 출산하게 된다. 염색체 전좌를 가진 남성불임 환자에서 착상전 유전진단의 목적은 unbalanced 배아로부터 정상 혹은 balanced 배아를 구분하여 이식하여 자연유산의 가능성을 감소시키고 건강한 아기를 출산하는데 있다. 하지만 이 방법의 문제점으로는 정상 혹은 balanced된 배아를 얻기 위해서는 적어도 6~9개의 배아가 진단에 필요하기 때문에 적은 수의 배아를 얻은 경우 배아이식을 못하는 경우가 발생할 수 있다.

Microdeletion of Y chromosome in male infertility

Y chromosome & Azoospermic factor(AZF) region

Y 염색체는 가장 작은 크기의 염색체로 6000만개의 염기쌍으로 구성되며 남성불임 영역에서는 초기 성분화와 정자형성에 관여한다. 중심질을 중심으로 단완 (Yp)과 장완 (Yq)으로 나뉘며 단완의 근위부에 배아 발달단계에서 미분화 성선을 고환으로 분화시켜 남성 성분화를 유도하는 SRY gene이 있으며, 장완의 euchromatin 부위의 interval 5와 6에는 정자형성에 관여하는 여러 후보 유전자들을 포함한 AZF (Azoospermia factor) 부위가 존재한다.

1976년 Tiepolo와 Zuffardi는 1170명의 무정자증이나 감정자증을 가진 남성불임 환자에서 현미경적 검사를 시행한 결과 6명 (0.5%)에서 Y 염색체 장완 부위의 결실을 최초로 발견하여 이 부위에 정자형성을 조절하는 유전적 요소가 존재한다고 제안하였고 그 유전적 요소를 Azoospermic Factor (AZF)라 명명하였다.

그 이후 PCR의 발달로 많은 연구자들에 의해 핵형분석으로 관찰되지 않았던 미세결실 (microdeletion)의 존재가 밝혀지게 되었다. Y 염색체 장완 (Yq11)에서 유일한 sequence를 가지는 sequence tagged sites (STS) primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 이러한 미세결실은 불임환자의 약 3%~35%로 다양하게 나타났다. 이러한 빈도의 차이는 연구대상 선정기준이 다르고 찾고자 하는 부위의 primer 수의 차이와 PCR 자체의 위양성에 기인한다고 한다.

그 정확한 위치는 Yq11.21~23이며, 1996년 Vogt 등은 결손부위에 따라 정자형성장애가 다양하게 나타나는 것을 관찰하고 이에 따라 크게 3부분으로 나누어 근위부로부터 AZFa, b, c로 명명하였다.

현재까지 여러 남성불임 후보 유전자들이 밝혀졌으나 그 기능이나 교환 내에서의 표현형은 일부에서만 밝혀져 있다. Table 3에서는 남성불임과 연관된 불임 후보 유전자들을 Y염색체 AZF 부위에 따라 정리하였다.

Clinical aspect (prevalence, clinical correlation & significance)

Foresta 등은 1992년 이후의 Y 염색체 미세결실에 대하여 발표한 연구를 분석한 결과 전체 불임환자의 8%에서 미세결실이 나타났다고 하였으며 보고자에 따라 1%에서 35%까지 다양하게 보고하였

Table 3. Y chromosome AZF regions and candidate genes involved in male infertility

Y chromosome region	Gene	Function	Testicular phenotype
TDF	SRY, Sex determining region, Y	DNA binding protein	XY male/Sertoli cell only
AZFa	AZFaT1	Unknown	Unknown
	USP9Y (DFFRY) ubiquitine-specific protease 9, Y	Protein degradation	Hypospermatogenesis
	DBY, dead box on the Y	Unknown	Hypospermatogenesis/Sertoli cell only
	UTY, ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on the Y	Mediates protein-protein interaction	Unkown
AZFb	TBY4 thymosine, Beta-4, Y	Actin sequestration	Unknown
	RBMY1-6, RNA-binding motif protein Y	RNA processing	Hypospermatogenesis/Sertoli cell only
	EIF1AY, eukaryotic translation initiation factor 1A, Y isoform	essential translation initiation factor	Unknown
	CDY2, chromodomain protein, Y chr, 2	Unknown	Unknown
AZFc	XKRY, XK-related protein Y	membrane transport protein	Unknown
	SMCY, selected cDNA Y	H-Y antigen	nonpapillary renal tumor
	DAZ, deleted in azoospermia	RNA-binding protein	Hypospermatogenesis/Sertoli cell only
	CDY1, chromodomain protein, Y chr, 1	Unknown	Unknown
	BPY2, basic protein on Y chr, 2	Unknown	Unknown
	PRY, PTPBL-related protein on Y chr	Unknown	Unknown
	TTY2, testis transcript on Y chr, 2	Unknwon	Unknwon

Table 4. Male phenotypes and the expected prevalence of Y chromosome microdeletions

Semen parameters/pathologic condition	% of patients with Y chr microdeletion
Fertile male	0.4%
Unselected infertile patients	7.5%
Unselected oligospermia	2.9%
Idiopathic severe oligospermia ($<5 \times 10^6/\text{mL}$)	14.3%
Unselected azoospermia	7.3%
Idiopathic azoospermia	18.0%
Sertoli cell only	34.5%

다고 한다. 이러한 차이의 가장 큰 이유는 연구 대상군이 다르기 때문에 나타난다고 한다 (Table 4).

국내의 보고는 1998년 백 등이 무정자증 환자의 22%, 심한 감정자증 환자의 14.3%에서 미세결실이 발견되었다고 보고하였고, 1997년 본원의 결과는 무정자증의 환자의 15%, 심한 감정자증 환자의 11.5%에서 미세결실이 관찰되었다.

미세결실 부위에 따른 환자의 고환 조직 및 정액검사 표현형에 대한 연구는 정확하게 일치하지는 않지만 대체로 AZFa나 AZFb의 전체 결실이 있는 경우는 Sertoli cell only나 spermatogenic arrest와 같은 심한 형태로 나타나는 데 반하여 위 부위의 부분 결실이나 AZFc부위 결실의 경우는 hypospermatogenesis (oligozoospermia)에서 Sertoli cell only까지 다양하게 나타난다. 이러한 표현형의 차이는 각 개인의 유전적 배경 (X와 상염색체 homologue의 보상에 의한 가능성 등)과 환경적인 요인에 의한 영향이 다르기 때문으로 생각되며, AZFc 미세결실 환자의 경우는 시간이 지남에 따라 세정관내의 germinal epithelium이 점진적으로 퇴행함으로써 그 상태가 나빠져서 다양하게 나타난다고 생각되어지고 있다.

그러므로 AZFa나 AZFb의 전체 결실이 발견되는 경우 고환 조직 정자채취술에서 나쁜 예후를 의미하며, 정액검사서 심한 감정자증을 보이는 환자는 시간이 지나면서 나빠질 가능성이 있으므로 미리 정자를 냉동보관하는 것도 고려되어야 한다.

Genetic counseling

ICSI라는 보조생식술을 시행함으로써 수정과 임신을 하는데 있어 자연선택의 장벽이 없어지게 되었고 이로 인하여 과거에는 2세에게 전달이 되지 않고 도태되어야 할 유전적 이상이 전달되게 되었다. Y 염색체 미세결실의 경우도 아버지로부터 아들에게 그대로 전달이 되는데 아들의 표현형은 개인의 유전적 배경과 환경의 차이로 인하여 아버지와 다르게 나타날 수도 있다. 이러한 문제에 대하여 보조생식술 전에 충분한 유전상담이 필요하며 남자에게 미세결실이 발견된 경우 보조생식술을 진행할지의 여부와 수정 후에 착상전 유전진단을 통하여 여자배아만을 이식하는 것도 상의되어야 한다.

knock-out model에 의한 동물실험에서는 Y 염색체 뿐 아니라 X 염색체나 상염색체의 여러 유전자들도 정자형성, 이동, 성숙, 수정, 배아발달에 관여한다고 알려져 있다. 인간에서도 확실하지는 않지만 이들 여러 유전자들이 관여할 수 있으며 이는 정상적인 Y 염색체만으로 불임에 대한 유전적인 문제가 없다는 것이 의미하는 것은 아니다. 그러므로 불임환자 부부에서 유전상담시 미세결실이 발견되지 않는다 해서 유전적 문제가 없다고 말해서는 안된다.

이와 아울러 심한 정자형성 장애를 가진 남성불임 환자들은 Y염색체 미세결실의 문제 뿐 아니라 다른 유전적 이상을 가질 가능성이 높다고 일반적으로 알려져 있다. 그러므로 남성불임에 의한 보조 생식술 후에 출산한 아이들의 장기 추적에 따른 평가와 연구가 필요하겠다.

참 고 문 헌

- Bergere M, Wainer R, Natag V, et al. Biopsied testis cells of four 47, XXY patients: fluorescence in-situ hybridization and ICSI results. *Hum Reprod* 2002; 17: 32-7.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Meiotic behaviour of sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XXY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2001; 16: 887-92.
- Brandell RA, Mielnik A, Liotta DY, et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 1998; 13: 2812-5.
- Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, et al. Spontaneous regression over time of the germinal epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient. *Hum Reprod* 2001; 16: 1845-8.
- Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod* 1999; 14: 2689-94.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22: 226-39.
- Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 1997; 2: 1635-41.
- Harley HG, Walsh KV, Rundle S, et al. Localization of the myotonic dystrophy locus to 19q13.2-3 and its relationship to twelve polymorphic loci on 19q. *Hum Genet* 1991; 87: 73-80.
- Kamp C, Huellen K, Fernandes S, et al. High deletion frequency of complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 987-94.
- Kent-First M, Muallem A, Shultz J, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Devel* 1999; 53: 27-41.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117-21.
- Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* 2003; 26: 70-5.
- Lamb DJ. Debate: is ICSI a genetic time bomb? Yes. *J Androl* 1999; 20: 23-33.
- Ma K, Inglis JD, Sharkey A, et al. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; 75: 1287-95.
- Pagani R, Brugh VM III, Lamb DJ. Y chromosome genes and male infertility. *Urol Clin N Am* 2002; 29: 745-53.
- Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, et al. Microdeletion in the Y chromosome of infertile men. *New Eng J Med* 1997; 336: 534-9.

- Reijo R, Lee TY, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10: 383-93.
- Saut N, Terriou P, Navarro A, et al. The human Y chromosome genes BPY2, CDY1 and DAZ are not essential for sustained fertility. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 789-93.
- Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Ashagen K et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligospermia. *Fertil Steril* 1997; 67: 542-7.
- Simpson JL, Bischoff F. Genetic counseling in translocations. *Urol Clin N Am* 2002; 29: 793-807.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescence portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119-24.
- Turek PJ, Reijo RA. Current and future genetic screening for male infertility. *Urol Clin N Am* 2002; 29: 767-92
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996; 4 (Suppl): 1-24, discussion 25-6.
- Van Krausz C, Quintan-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000; 15: 1431-4.
- Vazquez JA, Pinies JA, Martul P, et al. Hypothalamic-pituitary-testicular function in 70 patients with myotonic dystrophy. *J Endocrinol Invest* 1990; 13: 375-9.
- Verlinsky et al. Tenth anniversary of preimplantation genetic diagnosis. *J Assisted Reprod and Genet* 2001; 18: 64-70.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-43.