

한국인 당원병 제 Ia형에서 유전형의 임상 양상

서울대학교 의과대학 소아과학교실, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단의학과*

고재성 · 양혜란 · 김종원* · 서정기

Clinical Findings of Genotypes in Korean Patients with Glycogen Storage Disease Type Ia

Jae Sung Ko, M.D., Hye Ran Yang, M.D., Jong Won Kim, M.D.* and Jeong Kee Seo, M.D.

*Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine,
Department of Laboratory Medicine*, Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose : Glycogen storage disease type Ia(GSD Ia) is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of glucose-6-phosphatase(G6Pase). The aim of the study was to investigate the spectrum of G6Pase gene mutations and relationship between genotype and clinical findings in Korean patients with GSD Ia.

Methods : Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes of 20 patients with GSD Ia. The five exons of G6Pase gene were amplified and PCR products were directly sequenced. The frequency of short stature, hypoglycemia, hypercholesterolemia, hyperuricemia, hypercalciuria, nephrocalcinosis and hepatic adenoma was compared between 727G>T homozygotes and 727G>T compound heterozygotes.

Results : A total of 5 different mutations were identified. The most common mutation was the 727G>T with an allele frequency of 80%. All patients were either homozygous(12/20) or heterozygous(8/20) for the 727G>T mutation. G122D was found in 3 patients, P178A in 1, G222R in 2, and S339R in 2. There was no difference in the frequency of short stature, hypoglycemia, hypercholesterolemia, hyperuricemia, nephrocalcinosis, and hepatic adenoma between 727G>T homozygotes and heterozygotes.

Conclusion : Diagnosis of GSD Ia can be based on clinical and biochemical abnormalities combined with mutation analysis instead of enzymatic diagnosis that requires liver biopsy. Homozygosity for the 727G>T does not seem to alter the disease phenotype as compared with the heterozygous state. (Korean J Pediatr 2005;48:877-880)

Key Words : Glycogen storage disease type Ia, Glucose-6-phosphatase, Mutation, Clinical finding, Korean

서 론

당원병 Ia형은 glucose-6-phosphatase(G6Pase)가 결핍되어 간, 신장에 당원(glycogen)이 축적되는 상염색체 열성 유전 질환이다. 임상적으로 신생아기에 저혈당과 젖산혈증을 보일 수 있

으며 간종대로 인한 복부 팽만, 저혈당성 경련발작으로 병원을 찾게 된다. 저혈당, 젖산혈증, 고요산혈증, 고지방혈증의 검사 소견을 보이고, 간비대, 저신장, 볼에 축적되는 지방 때문에 인형 같은 얼굴을 보인다. 합병증으로 간의 선종(adenoma)이 잘 발생하고 일부에서 악성화되기도 하며, 동맥경화증, 고칼슘뇨증(hypercalciuria), 신석회화증(nephrocalcinosis)이 발생할 수 있다¹⁾.

이 질병은 glucose-6-phosphate(G6P)를 포도당과 인산염(phosphate)으로 분해하는 G6Pase의 결핍 때문에 발생한다. G6Pase는 소포체(endoplasmic reticulum)에 존재하며, 이 효소가 부족하여 Ia형 당원병이 발생하며¹⁾ G6P가 세포질내에서 소포체로 이동하기 위해서 G6P transporter가 필요한데 이것의 결핍이 Ib형 당원병을 일으킨다²⁾. 간 생검을 통해 효소 활성도를

이 논문은 서울대학교병원 일반연구비 04-2001-046-0에 의해 이루어진 것임.

접수 : 2005년 3월 4일, 승인 : 2005년 4월 19일

책임저자 : 서정기, 서울대학교병원 소아과

Correspondence : Jeong Kee Seo, M.D.

Tel : 02)2072-3627 Fax : 02)743-3455

E-mail : jkseoo@snu.ac.kr

분석하여 G6Pase 효소의 결핍으로 당원병 제 Ia형을 확진할 수 있다.

1993년에 G6Pase catalytic unit의 유전자가 발견되었는데, 염색체 17번 q21에 위치하고 5개의 exon으로 구성되고 12.5 kb의 크기이다³⁾. 현재까지 80개 이상의 유전자 돌연변이가 밝혀졌는데, 과오(missense) 돌연변이, 난센스(nonsense) 돌연변이, splice site 돌연변이, 결실(deletion) 등⁴⁾이 보고되고 있다. 유럽⁵⁾, 이스라엘⁶⁾에서는 R83C, Q347X, 158delC가 흔하며, 일본^{7, 8)}과 대만⁹⁾, 홍콩¹⁰⁾에서 727G>T가 흔한 돌연변이로 보고되어 지역과 종족간의 차이를 보이고 있다. 우리나라에서도 저자들이 727G>T가 가장 흔한 돌연변이임을 보고한 바 있다^{11, 12)}. 유전형과 표현형간의 연관성은 잘 알려져 있지 않으며, R170X 유전형이 P257L에 비해서 저혈당이 자주 발생한다는 보고가 있다¹³⁾. 동양인에서 가장 흔한 727G>T 유전형과 임상 양상간의 관계에 대해서 연구가 이루어져 있지 않다.

이 연구의 목적은 한국인 당원병 제 Ia형 환자에서 유전자 돌연변이를 조사하고, 유전형이 임상양상에 미치는 영향을 밝히는 것이다.

대상 및 방법

서울대학교병원 소아과에서 간 조직 내 당원 함량이 정상보다 증가해 있고, 간 생검 효소 분석을 통해 G6Pase가 정상보다 감소하여 Ia형 당원병으로 진단받은 환자 20명을 대상으로 하였다. 환자의 말초 혈액을 채취하여 백혈구에서 genomic DNA를 phenol chloroform 방법으로 추출하였다. G6Pase 유전자 5개 exon에 대하여 Lei 등³⁾이 기술한 primer를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 산물을 Quiaquick spin DNA purification kit(Qiagen, Germantown, USA)를 이용하여 정제한 후 ABI automatic DNA sequencer를 이용하여 직접 염기서열 분석하였다.

유전형이 임상양상에 미치는 영향을 알아보기 위해서 진단시 연령, 저신장, 저혈당, 고콜레스테롤혈증, 고요산혈증, 고칼슘뇨증, 신석회화증, 간선종 발생 여부를 조사하였다. 저신장은 당원병 진단시 키가 같은 성과 연령의 3 백분위수(percentile) 미만인 경우로 하였다. 저혈당은 공복시 혈청 포도당이 60 mg/dL 미만인 경우, 고콜레스테롤혈증은 혈청 콜레스테롤이 240 mg/dL 이상일 때, 고요산혈증은 혈청 요산이 7 mg/dL 이상일 때, 고칼슘뇨증은 소변 Ca/Cr이 0.2 이상일 때로 정의하였고, 이 검사조건들은 치료에 의한 효과를 배제하기 위해 처음 진단시의 결과를 기준으로 하였다. 간선종과 신석회화증은 정기적인 복부 초음파 검사를 통해 진단하였다.

통계분석은 SPSS 12.0을 이용하여 student t-test와 Fisher's exact test를 시행하였고 평균값은 평균±표준오차로 표시하였고, P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 돌연변이의 종류

전체 GSD Ia 환자 20명, 즉 40개의 대립 유전자(allele)에서 총 5종류의 돌연변이가 발견되었고, splice site 돌연변이인 727G>T가 32개의 대립 유전자에서 발견되어 80%의 대립 유전자 빈도를 보였다. 전체 20명 중에서 12명이 727G>T 동형접합자(homozygote)이고, 8명이 727G>T 이형접합자(heterozygote)이었다. 8명의 이형접합자는 전부 다른 부위의 이형접합자 돌연변이를 찾을 수 있는 복합 이형접합자(compound heterozygote)이었다. Exon 3의 444G>A(G122D)가 3명에서 발견되었고, exon 4의 611C>G(P178A)가 1명에서 발견되었다. Exon 5의 743G>A(G222R)이 2명에서 발견되었고 새로운 돌연변이인 1096T>G(S339R)를 2명에서 찾을 수 있었다(Table 1).

2. 727G>T 유전형과 임상양상간의 관계

727G>T 동형접합자와 이형접합자의 현재 평균 연령은 14.1±1.9세, 14.6±2.2세로 두 군간에 차이가 없었다. 진단시 연령은 727G>T 동형접합자는 2.0±0.4세이었고, 이형접합자는 4.0±1.1세이어서 동형접합자가 어린 나이에 발견되는 경향을 보이지만 통계적 유의성은 없었다(P=0.07). 저신장은 727G>T 동형접합자 12명 중 7명(58%)에서, 이형접합자 8명 중 3명(38%)에서 관찰되어 두 군간에 차이는 없었다. 저혈당은 동형접합자 8명(67%)에서, 이형접합자 3명(38%)에서 발견되어 두 군간에 차이가 없었고, 각 군에서 1명씩이 경련을 동반하였다. 고콜레스테롤혈증은 동형접합자 9명(75%)에서, 이형접합자 4명(50%)에서 관찰되어 유전형에 따른 차이가 없었다. 고요산혈증은 동형접합자 11명(92%)에서, 이형접합자 6명(86%)에서 발견되었다. 고칼슘뇨증은 727G>T 동형접합자 중 7명(58%), 이형접합자 중에는 한 명(13%)에서 발생하여 동형접합자에서 높게 발생하는 경향이 있지만, 통계적 유의성은 없었다(P=0.07). 신석회화증이 동형접합자 중 3명(25%)에서, 이형접합자에서는 관찰되지 않아 두 군간에 차이가 없었다. 간선종이 727G>T 동형접합자 4명(33%)에서, 이형접합자 2명(25%)에서 발견되어 유전형에 따른 차이가 없었다(Table 2).

Table 1. Mutations in Glucose-6-phosphatase Gene Identified in 20 Glycogen Storage Disease Type Ia Patients

Nucleotide change	Location	Amino acid change	No. of alleles (%)
444G>A	exon 3	G122D	3(7.5)
611C>G	exon 4	P178A	1(2.5)
727G>T	exon 5	aberrant splicing	32(80.0)
743G>A	exon 5	G222R	2(5.0)
1096T>G	exon 5	S339R	2(5.0)

Table 2. Comparison of Clinical Findings in Homozygotes and Heterozygotes of 727G>T

	727G>T homozygote	727G>T heterozygote	P value
Age* at diagnosis	2.0±0.4 yr	4.0±1.1 yr	0.07
Short stature	7/12(58%)	3/8(38%)	0.65
Hypoglycemia	8/12(67%)	3/8(38%)	0.36
Hypercholesterolemia	9/12(75%)	4/8(50%)	0.35
Hyperuricemia	11/12(92%)	7/8(88%)	0.78
Hypercalciuria	7/12(58%)	1/8(13%)	0.07
Nephrocalcinosis	3/12(25%)	0/8(0%)	0.43
Hepatic adenoma	4/12(33%)	2/7(29%)	0.62

*Age is expressed as mean±standard error

고 찰

본 연구에서 80%의 빈도로 발견된 727G>T 돌연변이는 동양에서 가장 흔한 돌연변이이며 일본에서 86%의 빈도로 발견되어⁸⁾ 우리나라와 일본이 비슷한 빈도를 보인다. 대만에서는 727G>T가 44%, R83H가 36%의 빈도로 발견되어⁹⁾ 한국, 일본에 비해 727G>T가 낮게 보고되고 있다. G122D는 우리나라¹²⁾와 일본⁸⁾에서, G222R은 이탈리아¹⁴⁾에서, P178A는 우리나라¹¹⁾에서 보고된 바 있으며 S339R는 새롭게 발견된 돌연변이이다.

Ia 당원병 환자들은 동형접합자이거나 복합 이형접합자이며, 전체 80개 이상의 돌연변이 중에 48개의 돌연변이는 과오 돌연변이로 한 개의 아미노산에 변환이 일어나지만, 효소 활성에 중요한 역할을 하는 부분이 제 기능을 하지 못하여 발병하게 된다⁴⁾. 727G>T 돌연변이는 splicing site에 이상을 일으켜 exon 5에서 91개 염기의 결실을 초래하여 357개의 정상 아미노산을 가지지 못하고 201개의 아미노산을 갖는 끝이 잘려진 단백질이 생성되어 효소 활성이 없다¹⁵⁾. 저자들이 새로이 발견한 S339R 돌연변이는 G6Pase 활성에 중요한 영향을 미치는 단백질 나선(helical) 구조에 존재하는데 앞으로 발현(expression) 연구가 필요할 것이다.

G6Pase 단백질-기능 연구¹⁶⁾에 의하면, G6Pase는 9개의 transmembrane helix에 의해 소포체에 고정되어 있다. 나선 구조는 소포체 막에 걸쳐 존재하고 이 부위의 돌연변이 대부분에서 효소 활성이 사라지며, 비나선 구조는 소포체 내강(lumen)에 존재하며 효소활성에 덜 중요하여 이 부위의 돌연변이는 효소 활성이 일부 남아 있다. 본 연구에서 발견된 G122D, G222R은 단백질 중 나선 구조에 위치하지만 G6Pase 활성도가 완전히 없어지지 않고 남아있는 돌연변이이다¹⁷⁾. P178S의 경우도 G6Pase의 활성도가 남아있는데, 저자들이 발견한 같은 위치의 P178A도 비슷하리라고 추정된다. 따라서 이들 돌연변이 하나를 가지고 있는 737G>T 이형접합자의 경우 727G>T 동형접합자보다 효소 활성도가 더 남아 있을 가능성이 많다. 본 연구에서 727G>T 동형접합자에서 복합 이형접합자보다 어린 나이에 진단이 되고, 고칼슘뇨증이 많이 발생하는 경향을 보이는데, 남아 있는 효소

활성도와 연관이 있을 수 있다고 생각된다. 이러한 경향은 더 많은 환자를 대상으로 하여 확인할 필요가 있으리라 생각되며, 727G>T가 아닌 동형접합자와 비교하면 더 좋을 것이지만, 우리나라에서는 이런 환자를 찾기가 어려운 것이 문제이다. 고칼슘뇨 증은 당원병 I형의 33%에서 관찰되는데¹⁸⁾, 신석회화증을 유발하고, 단백뇨와 함께 나이가 들면서 만성 신부전으로 진행되는 중요한 원인이 되고 있다. 본 연구에서 환자들의 평균 연령이 14세이므로 앞으로 유전형에 따른 신부전의 발생을 장기 추적관찰해야 할 것으로 생각된다. 일본의 유전형, 표현형 연구⁸⁾에서 R170X, R83H 동형접합자가 반복되는 저혈당을 보이는 심한 표현형을 보였으나, 각 돌연변이가 한 명뿐이어서 더 많은 환자로 검증되어야 할 것이다. 본 연구에서 진단시의 저혈당, 저신장, 고콜레스테롤혈증, 고요산혈증은 727G>T 동형접합자와 이형접합자 사이에 차이를 발견할 수 없었다. 간선종은 대개 10대 이후에 발견되며 암으로 진행할 가능성이 있어 장기적인 예후를 결정하는 중요한 요인이다¹⁾. 본 연구에서 간선종 발생에서 유전형에 따른 차이가 없었지만, 생육수수 전분의 섭취, 식이 조절 등을 통한 대사 이상의 조절 여부도 간선종 발생에 영향을 미칠 수 있다는 것을 고려할 필요가 있다.

본 연구에서 20명 모든 환자에서 유전자 돌연변이를 찾을 수 있었다. 따라서 임상 양상, 생화적 검사로 당원병 Ia형이 의심되면 침습적인 간생검을 통한 효소측정 대신에 유전자 돌연변이 분석을 통하여 Ia형 당원병을 진단할 수 있다고 여겨진다. 727G>T 돌연변이가 가장 흔하므로 먼저 exon 5를 검사한 후 필요하면, 다른 exon을 검사하는 것이 좋을 것이다. 유전자 분석은 형제를 비롯한 보인자(carrier) 진단이나 산전 진단¹⁹⁾에도 이용할 수 있을 것이다.

치료는 적절한 에너지를 섭취하여 저혈당을 예방해야 하는데, 흡수가 천천히 이루어지는 조리하지 않은 옥수수 전분(uncooked cornstarch)을 먹임으로써 대사 이상을 조절하여 저혈당, 고요산혈증, 고지질혈증 등 대사 이상을 조절할 수 있다. 그러나 이러한 치료에도 불구하고 저신장이 계속되거나 간암이 발생하는 등 합병증이 발생할 수 있어 새로운 치료가 필요한 실정이다. 생쥐에서 I형 당원병 모델이 개발되었고²⁰⁾, 생쥐 모델에서 adenovirus vector를 이용한 유전자 치료를 시도하여 Ia형 당원병을 치료하는 성과가 보고된 바 있다²¹⁾.

결론적으로 우리나라 당원병 제 Ia형 환자에서 727G>T 돌연변이가 가장 흔히 발견되며, 임상 양상, 생화적 검사와 함께 유전자 돌연변이 분석을 이용하면 간생검을 통한 효소측정을 하지 않고 Ia형 당원병을 진단할 수 있다. 727G>T 동형접합, 이형접합 돌연변이사이에서 임상양상이 크게 다르지 않았으나 장기적으로 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요할 것이다.

요 약

목적 : 한국인 당원병 제 Ia형 환자에서 G6Pase 유전자 돌연

변이를 찾아내고, 유전형과 임상양상과의 연관관계를 밝히는 것이다.

방법 : 서울대학교병원 소아과에서 Ia형 당원병으로 진단 받은 환자 20명을 대상으로 G6Pase 유전자에 대하여 직접 염기서열 분석하였다. 유전형과 임상 양상의 상관성을 알아보기 위하여 진단시 연령, 저신장, 저혈당, 고콜레스테롤혈증, 고요산혈증, 고칼슘뇨증, 신석회화증, 간선종 발생을 조사하였다.

결과 : 총 5종류의 돌연변이가 발견되었고, splice site 돌연변이인 727G>T가 40개의 대립 유전자 중 32개에서 발견되어 80%의 빈도를 보였다. 전체 20명 중에서 12명이 727G>T 동형접합자이고, 8명이 727G>T 복합 이형접합자이었다. 8명의 이형접합자에서 G122D 3명, P178A 1명, G222R 2명, 새로운 돌연변이인 S339R 2명 등 다른 돌연변이를 찾을 수 있었다. 727G>T 동형접합자와 복합 이형접합자 두 군 사이에 저신장, 저혈당, 고콜레스테롤혈증, 고요산혈증, 신석회화증, 간선종의 빈도는 차이를 보이지 않았다.

결론 : 임상 양상, 생화학적 검사와 함께 유전자 돌연변이 분석을 이용하면 간성경을 통한 효소측정을 하지 않고 Ia형 당원병을 진단할 수 있으며, 727G>T 동형접합 돌연변이가 이형접합과 비교할 때 질병 양상에 큰 영향을 미치지 않는다.

References

- 1) Yang HR, Seo JK. Long-term outcome of glycogen storage disease type 1a: analysis of risk factors for hepatic adenoma. *Korean J Pediatr Gastroenterol* 2003;6:129-39.
- 2) Beaudet A, Anderson DC, Michels UV, Arion WJ, Lange AJ. Neutropenia and impaired neutrophil migration in type Ib glycogen storage disease. *J Pediatr* 1980;97:906-10.
- 3) Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type Ia. *Science* 1993;262:580-3.
- 4) Rake JP, ten Berge AM, Visser G, Verlind E, Niezen-Konig KE, Buys CH, et al. Glycogen storage disease type Ia: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flowchart. *Eur J Pediatr* 2000;159:322-30.
- 5) Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot AM, Bruni N, Mithieux G, Mathieu M, et al. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type Ia. *J Med Genet* 1996;33:358-60.
- 6) Parvari R, Lei KJ, Bashan N, Carmi R, Bashan N. Glycogen storage disease type Ia in Israel: biochemical, clinical, and mutational studies. *Am J Med Genet* 1997;72:286-90.
- 7) Okubo M, Aoyama Y, Kishimoto M, Shishiba Y, Murase T. Identification of a point mutation(G727T) in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia, and carrier screening in healthy volunteers. *Clin Genet* 1997;51:179-83.
- 8) Akanuma J, Nishigaki T, Fujii K, Matsubara Y, Inui K, Takahashi K, et al. Glycogen storage disease type Ia: molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of splicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells. *Am J Med Genet* 2000;91:107-12.
- 9) Chang SC, Lee YM, Chang MH, Wang TR, Ko TM, Hwu WL. Glucose-6-phosphatase gene mutations in Taiwan Chinese patients with glycogen storage disease type Ia. *J Hum Genet* 2000;45:197-9.
- 10) Lam CW, But WM, Shek CC, Tong SF, Chan YS, Choy KW, et al. Glucose-6-phosphatase gene(727G-->T) splicing mutation is prevalent in Hong Kong Chinese patients with glycogen storage disease type Ia. *Clin Genet* 1998;53:184-90.
- 11) Kim JW, Park JY, Seo JK. Mutation analysis of Korean patients with glycogen storage disease type Ia. *Korean J Pediatr Gastroenterol* 2001;4:213-7.
- 12) Ki CS, Han SH, Kim HJ, Lee SG, Kim EJ, Kim JW, et al. Mutation spectrum of the glucose-6-phosphatase gene and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with glycogen storage disease type Ia. *Clin Genet* 2004;65:487-9.
- 13) Takahashi K, Akanuma J, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Suzuki Y, et al. Heterogeneous mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia. *Am J Med Genet* 2000;92:90-4.
- 14) Stroppiano M, Regis S, DiRocco M, Caroli F, Gandullia P, Gatti R. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene of 53 Italian patients with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 1999;22:43-9.
- 15) Kajihara S, Matsuhashi S, Yamamoto K, Kido K, Tsuji K, Tanae A, et al. Exon redefinition by a point mutation within in exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage type Ia in Japan. *Am J Hum Genet* 1995;57:549-55.
- 16) Lei KJ, Pan CJ, Liu JL, Shelly LL, Chou JY. Structure-function analysis of human glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type Ia. *J Biol Chem* 1995;270:11882-6.
- 17) Shieh JJ, Terzioglu M, Hiraiwa H, Marsh J, Pan CJ, Chen LY, et al. The molecular basis of glycogen storage disease type Ia: structure and function analysis of mutations in glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 2002;277:5047-53.
- 18) Lee PJ, Patel JS, Fewtrell M, Leonard JV, Bishop NJ. Bone mineralization in type I glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 1995;154:483-7.
- 19) Trioche P, Francoual J, Audibert F, Chalas J, Lindenbaum A, Odievre M, et al. Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia by restriction enzyme digestion. *Prenat Diagn* 1998;18:629-31.
- 20) Lei KJ, Chen H, Pan CJ, Ward JM, Mosinger B Jr, Lee EJ, et al. Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-Ia mouse. *Nat Genet* 1996;13:203-9.
- 21) Zingone A, Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Chen H, Ward JM, et al. Correction of glycogen storage disease type Ia in a mouse model by gene therapy. *J Biol Chem* 2000;275:828-32.