

## 유전성 대사질환의 착상전 유전진단

강인수

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과

≡ Abstract ≡

### Preimplantation Genetic Diagnosis in Inborn Error Metabolic Disorders

Inn Soo Kang, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Cheil Hospital,  
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Prenatal diagnosis (PND) such as amniocentesis or chorionic villi sampling has been widely used in order to prevent the birth of babies with defects especially in families with single gene disorder or chromosomal abnormalities. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has already become an alternative to traditional PND. Indications for PGD have expanded beyond those practices in PND (chromosomal abnormalities, single gene defects), such as late-onset diseases with genetic predisposition, and HLA typing for stem cell transplantation to affected sibling. After in vitro fertilization, the biopsied blastomere from the embryo is analyzed for single gene defect or chromosomal abnormality. The unaffected embryos are selected for transfer to the uterine cavity. Therefore, PGD has an advantage over PND as it can avoid the risk of pregnancy termination. In this review, PGD will be introduced and application of PGD in inborn error metabolic disorder will be discussed.

---

**Key Words:** Preimplantation genetic diagnosis, Inborn error metabolic disorder, Embryo, Mutation

## 서론

유전 질환이나 염색체 이상을 가진 태아의 출생을 예방하기 위해서 산전 진단 (prenatal diagnosis, PND)과 유전 상담이 널리 시행되어 왔다. 산전 진단은 임신이 성립된 후 양수 검사나 융모막 융모 검사(chorionic villi sampling: CVS), 양수 검사, cordocentesis 등을 통해 얻어진 태아 세포에서 유전자나 염색체의 이상 유무를 진단하여, 이상이 있는 경우는 임신중절을 함으로써 유전병이 발현될 아기의 출생을 예방할 수 있다. 그러나 산전 진단의 단점은 임신중절에 의해 산모가 신체적, 정신적 고통을 겪게 되며 이미자란 태아를 유산시키는데 대한 윤리적 문제들이 따를 수 있다. 한편, 염색체의 구조적인 이상이 있는 부부가 임신한 경우에는 산전 진단이 가능한 10주 이전에 반복적으로 유산이 일어나므로 산전 진단이 효과적인 진단법이 되지 못하며 이보다 더 조기에 진단, 예방할 수 있는 방법이 필요성이 증가하게 되었다.

### 1. 착상전 유전 진단 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 이란

이러한 필요성에 의해 착상전 유전 진단 (PGD; Preimplantation Genetic Diagnosis)이 산전 진단의 대안으로서 소개되었다. PGD는 착상이 되기 전에 유전질환이나 염색체 이상을 진단하여 정상적인 임신을 성립시키기 위한 방법이다. 그 과정은 체외 수정 시술 (in vitro fertilization and embryo transfer: IVF-ET)을 시행하여 얻어진 난자의 극체 (polar body)를 사용하거나 배아(embryo)에서 1-2개의 세포를 떼낸 후, 단일 세포 수준에서 PCR이나 FISH기

법을 이용한 유전진단을 시행하며, 유전병이 없거나 정상 또는 균형 염색체를 갖는 배아만 선별하여 자궁에 이식한다. 그러므로 유전병이나 염색체 이상이 있어서 환아 출생이나 습관성 유산의 가능성이 높은 가계에서는 착상전 유전 진단이 매우 효과적인 예방법으로서 제시되고 있다. 현재까지 세계적으로 약 40 center 에서 매년 7,000주기 이상의 PGD가 시행되었고 1,000명 이상의 건강한 아기가 태어났다.

착상전 유전 진단과 산전 진단의 특징 및 장, 단점을 비교하면 다음과 같이 요약된다.

	PGD (착상전 유전진단)	PND (산전 진단)
적응증	염색체 이상 및 유전 질환	염색체 이상 및 유전 질환
임신 방법	체외수정 (IVF-ET)	자연 임신
진단 시기	배아 이식 이전 (임신 전)	임신 10주 (CVS), 16주 (양수천자)
진단할 세포	극체 또는 수정란의 할구	Chorionic villi나 양수내 태아 세포
진단 세포수	Single cell	Numerous cells
진단 방법	PCR, FISH	염색체검사, PCR, FISH
진단후 결과	이환되지 않을배아를 자궁에 이식한다.	이환된 아기로 판정되면 임신을 종료시키는 것을 고려한다.
심리적 불안감	적다	크다
비용	많다	적다

### 2. 착상전 유전 진단의 역사

1989년 영국의 A.H. Handyside가 X-linked

recessive 질환을 가진 가계의 부부에서 체외 수정으로 얻은배아를 이용하여 유전 진단으로 정상이나 보인자가 되는 여아 배아를 선택적으로 자궁에 이식하여 첫 PGD에 의한 임신이 되었다. 착상전 유전 진단법의 가능성은 배아의 초기 발달에 있어 indeterminate cleavage라는 현상에 근거를 두고 있다. 즉, 8 세포기의 초기 배아로부터는 한두 개의 활구를 때내도 배아는 계속잘 발달할 수 있다는 것이다. 이렇게 얻어진 단일 세포에서 유전 진단을 할 수 있을 정도로 예민한 분자생물학적인 진단 기법이 뒷받침되어야 하므로, PGD의 발달은 적은 양의검체에서도 유전 진단을 할 수 있는 FISH나 PCR 유전 진단 기법의 발달과 함께 이루어졌다. Verlinsky 등은 (1996) 배아뿐 아니라, 난자의 극체를 생검하여 착상전 진단을 시행하여 진단에 성공하였다. 1997년에 유럽에서는 착상전 유전 진단 기술이 증가되면서 그 효용성과 임상적 결과를 통합 연구할 목적으로 European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) 학회 산하에 PGD consortium이 전세계 국가를 대상으로 조직되었고, 매년 통합data를 발표하고 있다. 최근 ESHRE PGD consortium의 보고에 의하면 1997년부터 2003년까지 약 970명의 건강한 아기가 착상전 유전진단으로 태어났다. PGD가 역사적으로는 15년이나 경과 되었음에도 불구하고 빠르게 발전하지 못했던 이유는 체외 수정시 단일 세포를 다루는 미세 조작술의 어려움과 단일 세포 수준에서 분자생물학적인 방법으로 진단하는 데어려움이 있었고 많은 인력과 시간이 요구되는 점등을 들 수 있다.

### 3. 착상전 유전 진단의 적응증

착상전 유전 진단의 적응증이 되는질환들을 대별하면 단일 유전 질환 (single gene disorder)과 염색체 이상(숫적 이상 및 구조적 이상)으로 나눌 수 있다. 적응증 별 빈도는 부부의 염색체 이상이 가장 많고, 다음으로 X-연관 열성 유전질환, 상염색체 열성질환, 상염색체 우성 질환등의 순이다. 염색체의 구조적 이상으로 인한 기형아 출산이나 습관성 유산을 예방하기 위해서, 또는 염색체의 이수성 (aneuploidy)을 예방하기 위해 시도되는 경우가 매우 증가되는 추세이고, PGD가 적용되는 유전병의 적응증은 PND를 넘어서 다양화되고 확대되고 있다. 유전병에 이환된 아기를 치료하기 위하여 HLA가 적합한 배아를 선별하여 태어난 아기의 stem cell로 이식, 치료에 성공한 예들이 소개되고 있고, 유전적 소인이 높은 adult-onset disorder를 예방하기 위하여 PGD를 시행하기도 한다. 또human genome project의 결과로 유전성이 있는것으로 규명된 소수의 선천성 기형질환에서 PGD가 적용되고 있다. 이러한 적응증들은 기존의 PND 후에는 치료적 유산을 결정하기 힘들었던 질환들로 적응증이 확대되고 있는 것을 보여준다.

#### 1) 염색체의 구조적 이상

##### a) Translocation (염색체 전좌):

염색체 전좌의 빈도는 약 1/500 명의 출산아에서 발견되나 습관성 유산부부에서는 5-9%의 높은 비율로 발견된다. 2개 이상의 염색체 일부가 서로 절단되어 새로운 염색체를 구조를 형성한다. 상호 균형 전좌를 가진 부부는 표현형으로는 정상이지만 감수분열 후 생긴 생식세포의

대다수는 unbalanced chromosome을 가진 gametes 이므로 이들 부부는 임신 초기에 습관성 유산을 경험하게 된다. 이런 경우에도 telomeric, subtelomeric probe를 이용하여 정상 염색체나 balanced carrier를 선별하여 PGD를 시행할 수 있게 되었다.

b) Chromosomal inversion (역위): 염색체의 일부의 양끝이 잘려서 거꾸로 재조합되면, 그 부위 유전 물질의 순서가 거꾸로 된다. 중심체 주변 역위 (pericentric inversion)과 중심체로부터 떨어진 부위의 부중심절 역위가 있다. 역시 임상증상은 대개 정상이나, 감수 분열시 불균형 염색체를 가진난자나 정자를 생성할 수 있다.

2) 염색체의 수적 이상

a) Age-related aneuploidy :

체의 수정을 통하여 인간 배아는 높은비율로 염색체의 이상을 갖고있음을 알게 되었다. 불

임 환자의 IVF시 FISH 연구결과에 의하면 약 35-70%의 인간 배아에서 aneuploidy가 있고, 17-43%가 mosaicism을 갖고 있다. 배아가 빨리 또는 너무 느리게 분열하는 경우나 fragmentation의 여부도 염색체 이상과 상관 관계가 있다. 그러나 배아의 형태는 염색체의 이상을 예견하는데 사용될 수 없다. 왜냐하면 양질의 배아도 aneuploidy가 많다는 것이여러 연구자를 통해 관찰되고되었기 때문이다. 고령의 여성에서는 이러한 염색체의 수적인 이상을 가진 배아가 생길 확률이 높아서 임신 실패나 자연 유산, 기형아의 위험이 높으므로 이를 착상전에 진단(preimplantation genetic screening: PGS 또는 PGD-aneuploidy screening: PGD-AS)하여 착상율을 높일 수 있다.

Repeated implantation failure에서도 염색체 이상이 있으면 착상율이 낮고 임신 실패가 따를 수 있으므로 aneuploidy screening이 시도되고 있다.

Reciprocal translocation: 관련된 두 염색체의 일부가 잘린 후 서로 위치만 바뀌는 경우.

Robertsonian translocation: 선단부 부착 염색체 (acrocentric chromosome, 13,14,15,21,22)에서 일어나는데, 단완의 위성부위가 손실되고 중심에서 두 염색체가 융합된다.

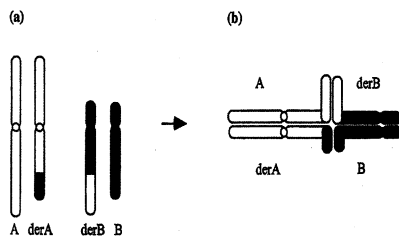


Figure 2.4 (a) Reciprocal translocation—reciprocal exchange of material between two non-homologous chromosomes. (b) Cross-shaped arrangement (quadrivalent) adopted by reciprocal translocations during early meiosis allows pairing of homologous chromosomes. A, B: normal homologues; derA, derB: rearranged or derivative chromosomes

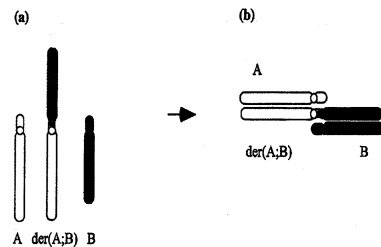


Figure 2.5 (a) Robertsonian translocation—fusion of two acrocentric chromosomes with varying loss of centromeric and short-arm material. (b) Pairing arrangement (trivalent) adopted by Robertsonian translocations during early meiosis allowing pairing of most homologous regions. A, B: normal homologues; der(A;B): rearranged or derivative chromosome

b) Sex chromosome mosaicism :

모자이크 터너증후군 (45,XO/46,XX 등)이나 클라인펠터 증후군 (47,XXY)등에서는 임신 가능성이 낮고, 임신이 되더라도 염색체 이상 및 이와관련된 유산 위험이 높아, 착상전 유전 진단을 적용한다.

3) Single gene disorders

기존의 산전 진단에서 적용되던 모든 단일유전자 질환 (single gene disorder) 이 PGD의 적용증이 될 수 있고현재까지 약 100 여종 이상의 유전 질환에서 PGD가 시행되었다. 그들 중 일부분으로서 2004년까지 European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium에 참여한 Center 에서 PGD가 시행되었던 대표적인 유전병들을 열거하였다 (Table 1).

우리나라에서는 2005년 발효된 생명 윤리법에 배아및 태아를 대상으로 시행할 수 있는 유전 질환을 아래와 같이 DMD를 포함하여 63종으로 제한하였다.

1. 수적 이상 염색체 이상 질환 (Numerical Chromosome abnormalities)
2. 구조적 이상 염색체 이상 질환 (Structural Chromosome rearrangements)
3. 연골무형성증(Achondroplasia)
4. 낭성 섬유증 (Cystic Fibrosis)
5. 혈우병 (Haemophilia)
6. 척수성 근육위축 (Spinal Muscular Atrophy)
7. 디 조지 증후군 (Di George's Syndrome)
8. 표피 수포증 (Epidermolysis Bullosa)
9. 고세병 (Gaucher's disease)
10. 레쉬 니한 증후군 (Lesch-Nyhan Syndrome)
11. 마르팡 증후군 (Marfan's Syndrome)
12. 근육긴장성 장애 (Myotonic Dystrophy)
13. 오르니틴 트랜스카바밀레이즈 결핍 (Ornithine transcarbamylase deficiency)
14. 다낭성 신장병 (Polycystic Kidney disease)
15. 겸상 적혈구빈혈 (Sickle Cell Anemia)
16. 테이삭스병 (Tay-Sachs disease)
17. 윌슨병 (Wilson Disease)
18. 판코니 빈혈 (Fanconi's Anemia)
19. 블룸 증후군 (Bloom Syndrome)
20. 부신백질 영양장애 (Adrenoleukodystrophy)
21. 무감마글로불린혈증 (Agammaglobulinemia)
22. 알포트 증후군 (Alport Syndrome)
23. 파브리 (-안더슨)병 (Fabry's-Anderson disease)
24. 바스 증후군 (Barth syndrome)
25. 샤르코-마리-투스 병 (Charcot-Marie-Tooth disease)
26. 코핀-로리 증후군 (Coffin-Lowry Syndrome)
27. 선천 부신 증식 (Congenital Adrenal Hyperplasia)
28. 크루존 증후군 (Crouzon Syndrome)
29. 가족성 선종성 용종증 (Familial Adenomatous Polyposis Coli)
30. 골츠 증후군 (Goltz's syndrome)

**Table 1.** 착상전 유전 진단이 시행되었던 질환들 (2004년 유럽생식의학회 PGD 컨소시움 자료)

---

Achondroplasia
Adrenogenital syndrome
Agammaglobulinemia, X-linked
Alport syndrome, X-linked
Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1A
Charcot-Marie-Tooth disease type 1A
Crouzon syndrome
Cystic fibrosis
Deafness (connexin26, 35delG, E47X mutation).
DMD/BMD
Epidermolysis bullosa with pyloric atresia (수포성 표피박리증)
familial adenomatous polyposis coli
Fanconi anemia
Fragile X syndrome
haemophilia A
Huntington's disease
incontinentia pigmenti
Kennedy disease
Krabbe disease
Leigh syndrome
Lesch-Nyhan syndrome
Marfan syndrome
MCAD deficiency
Muscular dystonia DYT1
Myotonic dystrophy
Neurofibromatosis type 1 and 2 (신경섬유증)
Ornithine transcarbamylase deficiency
Osteogenesis imperfecta (골형성 부전증)
Polycystic kidney disease (다낭성 신장 증후군)/ AD
Pyruvate dehydrogenase deficiency
Retinitis pigmentosa (망막성 색소증)
Retinoblastoma (망막 아세포종)
Rh factor incompatibility
San Filippo disease
sickle cell anemia (겸상 적혈구증)
Spinal muscular atrophy (척수성근위축증)
spinocerebellar ataxia type 1, 3 and 7 (척수 소녀성 운동실조증)
Tay-Sachs disease
Thalassemia-A
Thalassemia-B
Tuberous sclerosis
Tuberous sclerosis type 1
Tyrosine hydroxylase deficiency
Von Hippel-Lindau syndrome
Wiscott-Aldrich syndrome

---

31. 육아종병 (Granulomatous disease)
32. 헌터 증후군 (Hunter's syndrome)
33. 헌팅톤병 (Huntington's Disease)
34. 발한저하성 외배엽이형성증  
(Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia)
35. 색소 실조증 (Incontinentia Pigmenti)
36. 케네디병 (Kennedy's disease)
37. 크라베병 (Krabbe Disease)
38. 로웨 증후군 (Lowe Syndrome)
39. 신경섬유종증(Neurofibromatosis)
40. 구안지 증후군  
(Oral-Facial-Digital Syndrome)
41. 불완전 골형성증  
(Osteogenesis Imperfecta)
42. 펠리제우스-메르츠바하병  
(Pelizaeus-Merzbacher disease)
43. 피르브산 탈수소효소 결핍  
(Pyruvate Dehydrogenase deficiency)
44. 망막세포변성(Retinitis Pigmentosum)
45. 망막아세포종(Retinoblastoma)
46. 망막층간분리(Retinoschisis)
47. 산필립포 증후군 (Sanfilippo disease)
48. 척수소뇌성 운동실조  
(Spinocerebellar Ataxia)
49. 스틱클러 증후군 (Stickler Syndrome)
50. 결절성 경화증 (Tuberous Sclerosis)
51. 비타민D 저항성 구루병  
(Vitamin D resistant rickets)
52. 폰 히펠-린다우 증후군  
(Von Hippel-Lindau Syndrome)
53. 비스코트-올드리치 증후군  
(Wiskott-Aldrich Syndrome)
54. 니만-피크병 (Niemann-Pick Disease)
55. 이염성 백직 이영양증

- (Metachromatic Leukodystrophy)
56. 후를러 증후군 (Hurler Syndrome)
57. 프로피온산혈증 (Propionic Acidemia)
58. 메틸말로닌산혈증  
(Methylmalonic Acidemia)
59. 페닐케톤뇨증(Phenylketonuria)
60. 티로신혈증 (Tyrosinemia)
61. 월프-허쉬호른 증후군  
(Wolf-Hirschhorn Syndrome)
62. 베타-지중해빈혈 (-Thalassemia)

4) Late-onset disorders with genetic predisposition

p53 tumor suppressor gene mutation을 가진 경우 암의 발생 가능성이 높다. Li-Fraumeni syndrome with rhabdomyosarcoma, familial adenomatous polyposis coli (APC), Von Hippel Lindau syndrome, retinoblastoma, neurofibromatosis type I and II, Alzheimer disease 에서 PGD가 성공적으로 시행되었고, 이 같이 유전성 소인이 높고 일단 발병하면 치명적인 병의 위험성이 높은 부부에게는 PGD가 유일한 안심을 주는 예방법이 되고 있다.

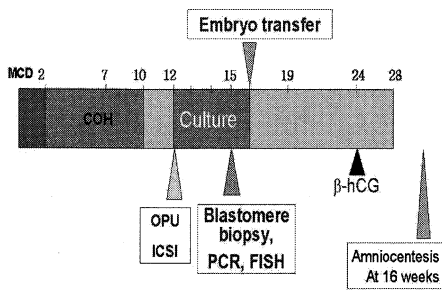
5) HLA typing

Verlinsky 등 (2001)은 Fanconi anemia 환아를 낳았던 부부에서 PGD를 시행하여 Fanconi anemia가 없이건강하며 환아와 동일한 HLA를 가진 수정란을 선택하여 자궁에 이식하는 방법으로 두 번째 아기를 분만하였다. 이런 경우 건강한 아기는 stem-cell donor로서 환아를 치료할 수 있는 잇점이 있으나 한편이 방법은 윤리적 논란을 불러일으켰다. 이러한 기술을 반대하는 윤리적 논쟁의 핵심은 사람은 어떤 목적을

위해서 사용되어서는 안된다는 원칙에 위배된다는 것이다. 이에 대해 HLA-matching PGD를 찬성하는 측의 주장은 이렇게 태어난 아이도 다른 자녀와 똑같이 가정에서 사랑과 돌봄을 받기 때문에 이 원칙에 위배되지 않으며, 만약 환아를 치료하는데 도움이 될 donor 아이가 가족 내에 있다면 부모는 치료를 망설이지 않을 것이기 때문에 HLA matching을 이용한 PGD는 윤리적으로 인정된다는 주장을 하고 있다.

4. 착상전 유전진단: 체외수정 및 미세조작술

1) IVF - PGD procedure의 진행 일정



PGD에서는 배아를 대상으로 검사를 해야 하므로 체외 수정을 시행해야 한다. 우선 통상적인 체외 수정 방법으로 gonadotropin 과 gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue를 사용하여 난소를 자극하여 다수의 우성 난포를 자라게 한다. 난자 채취 후에 정자와 수정을 시킬 때 다른 세포의 유전 물질이 혼입되는 것을 막기 위해서 미세조작술로 세포내 정자 주입술 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI)을 시행하여 한 개의 정자만 넣어준다.

정상적으로 배아가 발생하는 경우에는 수정 1일 후 pronuclear (PN) stage, 제2일에 4-cell stage, 제3일에 8-cell stage embryo로 발달한다.

할구 생검(blastomere biopsy)은 대개 6-10 cell stage embryo에서 시행하며 미세조작술로 할구를 1-2개 분리해 낸다. Genetic diagnosis는 PCR에 의한 돌연변이 유전자 검사, 또는 fluorescence in situ hybridization (FISH)를 시행하여 염색체 검사를 시행한다. 검사 결과, 비정상적인 수정란 즉, 돌연변이 유전자가 있어 유전병이 발현될 수정란 또는 불균형 염색체를 가지고 있어서 습관성 유산이나 기형아를 초래할 수정란은 이식에서 제외된다. 나머지 유전병이 발현되지 않을 수정란 또는 균형 염색체를 가진 수정란 만을 선택하여 수정제 4-5일에 자궁에 이식하여 임신을 시도한다. PGD 후 임신이 성공하면 산전 진단 (CVS 또는 amniocentesis)을 시행하여 염색체나 유전자 상태를 확인한다.

2) 미세조작에 의한 세포 준비 과정

과배란 유도 및 난자채취를 하여 얻은 난자나 체외수정 후 얻은 수정란의 일부를 생검하여 세포를 얻어내는 과정은 다음과 같다.

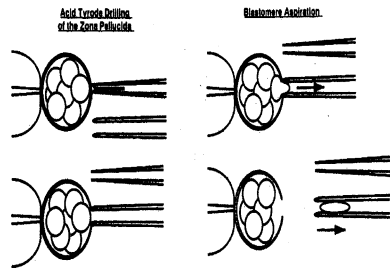


Figure 9.2 Diagrammatic representation of zona drilling using acid Tyrode's solution. The acid is applied locally using a fine micropipette. When a hole is drilled, blastomeres can be aspirated through the hole

(1) Making a hole in zona pellucida

난자나 수정란을 둘러싸고 있는 투명대를 열어준다.

① Acidified Tyrode's solution: pH 2.2-2.4의



산성을 이용하여 배아의 투명대를 녹이는 방법으로 현재 가장 널리사용되고 있으며 난자의 극체를 생검하는 데는 적합하지 않다.

② Mechanical dissection (partial zona dissection: PZD)

물리적인 방법으로 "V" 또는 "X" 자 형태의 투명대 절개를 하는 방법으로 극체를 생검하는 데 많이 사용된다.

③ Laser hatching

최근에 보고되기 시작하였는데 사용이 간단하며 구멍의 크기를 정확히 조절할 수 있고 수정란에 해를 줄 가능성이 적어 이상적인 방법으로 간주된다.

(2) Cell Biopsy

① Polar body biopsy

감수분열의 결과로 형성된 극체는 배아 발달에 필수적 요소가 아니므로 생검하여 진단에 활용될 수 있다. 난자와 수정란으로부터 제1극체 또는 제1, 제2 극체 모두 조사할 수 있다. 극체의 염색체나 유전자 상태는 난자의 것과 상호 관련되므로 극체를 생검하여 유전 검사를 시행하면 난자의 상태를 진단할 수 있다. 그러나 난자, 즉 모계에서 유래되는 질환에만 적용 가능하고, 2개의 극체를 모두 얻어야 진단이 정확하데 작업량이 많아서 아직 널리 이용되지 않는다.

② Blastomere biopsy

현재 가장 많이 이용되는 방법으로서 수정란의 할구를 진단에 이용하므로 모계나 부계 어느 쪽에서 유전되든지 사용할 수 있다. 수정란의 compaction이 완전히 일어나면 세포를 분리하기가 어려우므로 수정 3일째 (6-10 세포기) 오전에 시행한다. 이 시기에는 생검 후에

세포의 회복이 빠르며, 할구 사이에 junction이 잘 발달하여 경구를 통해자궁에 이식할 때 수정란의 구조를 그대로 잘 유지하기 때문에 가장 널리 사용된다. 8세포기 수정란에서 할구 1-2개를 생검해 내어도 inner cell mass와 trophoctoderm 세포의 비율이 정상으로 유지되며, 남은 할구 세포로부터 정상적으로 온전한 개체가 발생한다는 사실은 이미 생쥐와 사람에서 증명되었다. 방법은 acid Tyrode's solution 또는 laser hatching으로 투명대 (zona pellucida)에 구멍을 뚫은 후에 pipet으로 할구를 흡입하거나 액체를 이용하여 밀어내는 방법으로 할구를 분리해 낸다. 이 방법의 단점으로는 1-2개의 세포만 진단에 이용된다는 제한이 있고, 배아의 모자이시즘을 진단하기 힘들며, 체외 수정 시술 기간내에 metaphase의 염색체 배열을 얻기가 어렵다는 점이다. 현재, acid Tyrode's solution에 의한 zona drilling 및 blastomere aspiration방법이 가장 널리 사용되고 있으며, 약 97%의 배아에서 성공적으로 할구 생검이 된다.

③ Trophectoderm biopsy

수정란이 발생하여 blastocyst stage에 도달하면 inner cell mass와 trophoctoderm으로 나뉜다. Trophectoderm은 주로 태반을 형성하며 태아형성에는 직접 관여하지 않으므로 trophoctoderm 세포를 여러 개 떼어내어도 태아에게 해를 주지 않는다는 장점이 있다. 발생 5-6일째에 10-30개의 많은 세포를 분리할 수 있다. 10개 이상 제거하면 hCG 생성이 다소 감소하는데 외부에서 주사를 하여보충할 수 있겠다. 5-20개의 세포를 얻으면 metaphase chromosome spread를 얻기가 훨씬 수월하여 더욱 정확한 유전 진단이 가능하다. 그러나 단

짐으로는 수정란의 약 25-60%만이 blastocyst에 도달하므로 사용 가능한 수정란이 수적으로 제한된다는 점이며, 특히 유전 질환에 대한 진단을 할 수 있는 시간이 짧다는 점이다.

### 5. 착상전 유전진단: 분자생물학적 진단방법

세포가 얻어지면 아래와 같은 방법으로 유전자 돌연변이 또는 염색체 이상 유무를 진단한다.

#### 1) PCR

일반적으로 single gene defect인 경우에는 PCR로 진단한다. PCR primer가 있는 경우에는 PCR을 시행하고, PCR primer가 없는 경우에는 X- 연관 열성질환에서 female을선택하기 위하여 FISH를 시행하기도 한다. PCR에서의 문제점은 한쪽 allele에서 증폭이 불충분한 경우 발생하는 allele drop out (ADO)으로, 이로 인해 오진이 될 수 있다.

#### 2) Fluorescent in situ hybridization (FISH)

염색체의 구조적 이상이나, 여성의 나이가 35세 이상인 경우에 염색체의 이수성 (異數性, aneuploidy)을 진단하기 위해서는 FISH를 사용한다.

PGD에서는 cleavage stage embryo에서 metaphase의 염색체를 얻기가 힘들다. 그러므로 FISH를 이용하면 interphase nucleus의 염색체에서 발광체의 signal을 세어서 염색체의 수를 알 수 있어 염색체의 수적 이상, 구조적인 이상, X-linked 유전 질환에서 sexing을 판정할 수 있다. 일반적으로 FISH는 각 염색체에 특이한 반복 서열의 DNA probe를 사용한다. 각각 다른

색깔의 형광 물질과 밝은signal을 내는 repetitive satellite probe을 사용하면 여러개의 DNA target을 동시에 관찰할 수 있다. Red (tetra-rhodamine isothiocyanate: TRITC), green (fluorescein isothiocyanate: FITC), blue (AMCA) 형광 물질만 FISH에 적합하기 때문에 두개의 형광 물질 혼합 비율에 따라 다른 색상이 나타날 수 있다. 이렇게 하면 휴지기 세포에서 X, Y, 13, 18, 21 등을 동시에 관찰할 수 있다. 많은 수의 염색체의 상태를 진단하기 위해서는 동일한 시료를 사용하되 다른 probe를 사용하여 FISH를 2 - 3회 반복하면 aneuploidy screening에 이용할 수 있다.

#### 3) Whole genome amplification & Comparative genomic hybridization (CGH)

PGD에서 때로는 2개 이상의 돌연변이를 진단해야 하는데 단일 세포를 사용하므로 적은 DNA양이 문제가 된다. 이것을 해결하기 위하여 primer extension preamplification (PEP) 이 개발되었다. 기존 PCR에서 사용하는 specific primer 대신에 15-base random oligonucleotide primer를 이용하면 low stringency 조건에서 DNA 전체에 걸쳐 결합하여 증폭한다. 실제로 sperm을 이용하며 조사하면 전체 genome의 70-80%가 증폭되므로 multilocus analysis를 원활히 시행할 수 있다. 또 whole genome amplification은 single cell을 이용한 comparative genomic hybridization (CGH)를 하기 전에 반드시 필요한 방법이다.

PGD-FISH에서는 이상 빈발하는 염색체 몇 개만을 검사하므로 다른 염색체의 이상 여부를 알 수 없다는 제한점이 있다. CGH는

digoxigenin-labeled genomic reference DNA와 biotin-labeled test DNA를 정상 증기 염색체에 동시에 경쟁적으로 hybridization시키는 방법으로, test DNA의 염색체 결실또는 중복, 이수성 등이 green-to-red fluorescence의 차이로 나타나 이를 진단할 수 있다. 전체 염색체에 대해서 aneuploidy screening을 할 수 있으므로 염색체의 포괄적 진단을 목적으로 한 PGD에서 CGH를 적용하는 방법이 시도되었다.

일반적으로 체외 수정에서는 난자 채취 후 5일 후에 수정란을 이식해야 하는 시간적 제한이 있는데, CGH 검사는 DNA amplification, labeling하고 CGH를 완료하는데 5-6일이 소요되는 문제점이 있다. 만약 제 3일의 8-cell stage 수정란에서 blastomere를 생검하여 CGH를 시행하면 수정란을 이식할 수 있는 적절한 시기를 놓치지 때문에 cryopreservation을 해야만 하는 단점이 생긴다. 그러나 난자채취일에 (day 0) 극체를 생검하면 CGH를 수행해도 4-5일 만에 이식하는 것이 가능하다. 2002년 Wells 등은, 극체를 생검하여 얻은 소량의 DNA를 whole genome amplification으로 증폭한 후 CGH를 시행하고, 여분의 DNA를 사용하여 single gene mutation 여부까지 확인할 수 있었다. 그러므로 CGH 방법이 정확하고 안정적인 방법으로 확립되면 지금까지 염색체의 일부만을 검사하던 FISH의 한계점을 극복하여 전체 염색체에 대한 포괄적인 진단이 가능할 것이다. 그러나 정확성을 기하기 위한 기술적인 문제가 극복되어야 할 과제로 남아있다.

#### 4) CGH-Microarray

CGH 반응 과정이 microarray의 well 안에서 일어나도록 하여 여러 개의 염색체 부위를 한 번

에 판정할 수 있도록 한 방법으로 단일 세포 수준에서 이용할 수 있도록 개발 중에 있다.

#### 6. 유전성 대사질환에서 착상전 유전 진단

여러 유전성 대사 질환, 즉 Niemann-Pick disease type B, Lesch-Nyhan syndrome, familial amyloidotic polyneuropathy, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, 21-hydroxylase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, X-linked adrenoleukodystrophy 에서 PGD가 시행되었다.

#### Niemann-Pick disease (NPD) type B

ASM deficient NPD type B는 ASM 유전자 (SMPD1)의 돌연변이로 발생하는 열성 유전 질환이다. 70개 이상의 돌연변이가 보고되었고 type B가 가장 많다. Hellani 등은 nest PCR과 sequencing 을 사용하여 2 가계에서 수정란을 대상으로 착상전 유전 진단을 시행하였다. Heterozygous embryo와 정상 homozygous genotype을 갖는 배아를 선택적으로 자궁에 이식하여 임신에 성공하였다. 출생 후 신생아는 정상 homozygous genotype으로 확인되었다.

#### Mouse model of Niemann-Pick disease

최근에 mouse model로 lysosomal storage disease의 일종인 acid sphingomyelinase (ASM)가 결핍된 Niemann-Pick disease에서 착상전 효소 진단법을 보고되었다. 이것은 BODIPY로 형광물질을 붙인 sphingomyelin 을 사용하여 in situ acid sphingomyelinase (ASM)의 활성을 측정하였다. 정상적인 착상전 배아는

짧은 'pulse-chase' 시간 동안에 substrate를 잘 파괴하여 형광을 보존하고 있던 ASMKO 배아보다 현저하게 형광이 감소되는 것을 형광현미경으로 관찰할 수 있었다. 이 preimplantation enzymatic diagnosis (PED) 방법의 장점은 48시간 내에 완료될 수 있고, 형광 sphingomyelin이 배아에 대해 독성작용이 없고, 할구 생검 조작이 필요없으며, 유전자의 돌연변이 부위를 몰라도 된다는 장점이 있다. 이 방법은 유사한 효소 결핍 질환에 적용될 수 있을 것으로 전망된다.

#### Lesch-Nyhan (LN) syndrome

LN syndrome은 남아에 나타나는 심한 X-linked disease로서 염색체 Xq에 위치한 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) 유전자의 돌연변이로 발생한다. Purine 대사의 이상을 초래해서 purine 합성이 과다해지고 hyperuricemia, choreoathetosis, spasticity, mental retardation, self mutilation 등의 증세를 특징적으로 보인다. Cram 등은<sup>3)</sup> mini-sequencing을 이용해서 IVS8+6 TG mutation 과 HPRT 유전자의 intron 3에 있는 informative tetranucleotide marker를 동시에 분석하는 방법으로 착상전 유전진단을 시행하였다. 조사했던 수정란 4개가 모두 unaffected로 판정되어 수정란 2개를 자궁에 이식하여 건강한 아기 1명이 분만되었다.

#### Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency

MCDA는 fatty acid oxidation 이상을 일으키는 질환 중 가장 흔하다. 보인자 빈도는 1/70이고 신생아 10,000 명당 1명의 빈도로 발생한

다. Affected 된 아기는 첫 2년 내에 hypoketotic hypoglycemia 와 lethargy 증세가 반복적으로 나타나며 약 25%에서 사망에 이른다. 이환된 아기 2명이 사망했던 부부에서 PCR-PGD를 시행하여 2개의 배아를 이식하여 dizygotic twin으로 건강한 아기들을 분만하였다.

## 결론

유전병을 가진환아가 출생하면 치료하기 힘들고 비용이 많이 소요되며 가정적, 사회적으로 많은 문제가 발생하므로 유전 질환이 다음 세대로 전파되지 않도록 예방하는 일은 매우 중요하다. 산전 진단의 경우는 일단 자연임신된 후에 환아로 진단되면 유산시키게 되어 이에 따른 윤리적 문제 등이 따른다. 반면, 착상전 유전 진단은 질환에 이환되지 않을 배아를 선별하여 자궁에 이식하고 임신되므로 불필요한 인공 유산에 따른 합병증을 차단하고 임신부에게 심리적으로 안정감을 준다. 이러한 측면에서 착상전 유전 진단은 유전 질환의 예방에 이상적인 방법이며 삶의 질을 향상시키는 중요한 역할을 한다. 현재까지 많은 단일 유전자 질환에서 PGD가 시행되었고 유전성 대사 질환에서도 적용되고 있다. 그러나, 일반적인 유전 진단법과는 달리 PGD는 단일 세포 수준의 유전 진단이므로 allele drop out 등으로 인한 오진이 발생할 수 있으므로 이를 줄이기 위한여러가지 보완적인 진단 기술이 필수적이라 하겠다.

## References

- 1) Lim CK, Jun JH, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong MK, Kang IS. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* 2004;24:556-61.
- 2) 임천규, 민동미, 이형송, 변혜경, 박소연, 류현미, 김진영, 궁미경, 강인수, 전진현. 형광 직접조합법을 이용한 착상전 유전진단 기법의 최적화와 경험 축적에 의한 임신율의 향상. *대한불임학회지* 2004;31:29-39.
- 3) 이형송, 최혜원, 임천규, 민동미, 변혜경, 김진영, 궁미경, 유한옥, 김수찬, 전진현, 강인수. Ornithine transcarbamylase (OTC) 효소결핍증, 수포성 포피박리증 및 lactic acidosis 가계에서 duplex nested PCR 방법을 이용한 착상전 유전진단: OTC 효소결핍증 가계에서 정상아 임신 및 출산. *대한산부인과학회지* 2004;47: 708-18.
- 4) Sermon K, van Steirteghem, A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004;363:1633-41.
- 5) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Human Reproduction* 2002;17:233-46.
- 6) Wells D., Escudero T., Levy B., Hirschhorn K, Delhanty D.A., Munne S. First clinical comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78:543-9.
- 7) Verlinsky Y, Rechitsky, S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation genetic diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* 2001; 285:3130-3.
- 8) 임천규, 한미현, 전진현, 송건지, 김정옥, 김계현, 최범채, 궁미경, 강인수. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아이식술에서 형광직접조합법을 이용한 착상전 유전자 진단의 임상적 적용. *대한산부인과학회잡지* 2000;43:1147-53.
- 9) Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verliksky Y. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: The first 109 infants. *Pediatrics* 2000;106:650-3.
- 10) Van de Velde H, Sermon K, De Vos A, Lissens W, Joris H, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Fluorescent PCR and automated fragment analysis in preimplantation genetic diagnosis for 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Mol Hum Reprod* 1999;5:691-6. 11) Wells D and Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn* 1998;18:1389-1401.
- 12) 최수경, 김진우, 조은희, 류현미, 강인수. 단일 태아세포에서의 PEP-PCR을 이용한 성의 결정과 Dystrophin 유전자 분석. *대한불임학회잡지* 1997;24:51-6.
- 13) Ray PF, Handyside AH. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1996;2:213-328.
- 13) 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수. 근이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착

- 상 전 유전자 진단. 대한불임학회잡지 1996;23:109-14.
- 14) Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single cell analysis of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nature Genetics* 1994;6:19-23.
- 15) Handyside, AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.
- 16) Butler A, Henderson SC, Gordon RE, Dagan A, Gatt S, Schuchman EH. Preimplantation diagnosis of a lysosomal storage disorder by in situ enzymatic activity: 'proof of principle' in acid sphingomyelinase-deficient mice. *J Inher Metab Dis* 2005;28:1-12.
- 17) Hellani A, Schuchman EH, Al-Odaib A, Aqueel AA, Jaroudi K, Ozand P, Coskun S. Preimplantation genetic diagnosis for Niemann-Pick disease type B. *Prenat Diag* 2004;24:943-8.
- 18) Cram DS, Song B, Trounson AO. Preimplantation diagnosis of Lesch-Nyhan using mini-sequencing primer extension. *Reprod Biomed Online* 2003;7:342-5.
- 19) Sermon K, Henderix P, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, Vanderfaillie A, Vamos E, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. *Mol Hum Reprod* 20006:1165-8.