

한국인 자폐스펙트럼장애에서 Glutamate Receptor, Iontropic,
N-methyl-D-Aspartate 2B(*GRIN2B*)
유전자 다형성-가족기반연구*

유희정¹⁾ · 조인희²⁾ · 박미리³⁾ · 유한익⁴⁾ · 김진희⁵⁾ · 김순애⁵⁾†

Polymorphisms in Glutamate Receptor, Iontropic, N-methyl-D-aspartate
2B(*GRIN2B*) Genes of Autism Spectrum Disorders in Korean
Population : Family-based Association Study*

Hee Jeong Yoo, M.D., Ph.D.,¹⁾ In Hee Cho, M.D., Ph.D.,²⁾ Mira Park, Ph.D.,³⁾
Hanik K. Yoo, M.D., Ph.D.,⁴⁾ Jin Hee Kim, B.A.,⁵⁾ Soon Ae Kim, M.D., Ph.D.⁵⁾†

ABSTRACT

Objectives : Autism is a complex neurodevelopmental spectrum disorder with a strong genetic component. Previous neurochemical and genetic studies suggested the possible involvement of glutamate N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor in autism. The aim of study was to investigate the association between the NMDA2B receptor gene (*GRIN2B*) and autism spectrum disorders(ASD) in the Korean population.

Methods : The patients with ASD were diagnosed with Autism Diagnostic Interview-Revised and Autism Diagnostic Observation Schedule based on DSM-IV diagnostic classification. The present study was conducted with the detection of four single nucleotide polymorphisms(SNPs) in *GRIN2B* and family-based association analysis of the single nucleotide polymorphisms in Korean ASD trios using transmission disequilibrium test

*본 연구는 2006년도 범석학술장학재단 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

*본 연구의 요지는 2006년 7월 12일 세계정신의학회 국제학술대회(International Congress of World Psychiatric Association, Istanbul, Turkey)에서 구연발표되었음.

¹⁾ 서울대학교 의과대학 분당서울대학교병원 신경정신과학교실

Department of Psychiatry, College of Medicine Seoul National University, Bundang Hospital, Seongnam, Korea

²⁾ 가천의과대학 정신과학교실

Department of Psychiatry, Gachon Medical College, Incheon, Korea

³⁾ 을지의과대학 생명통계학교실

Department of Biostatistics, School of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea

⁴⁾ 울산대학교 의과대학 서울아산병원 정신과학교실

Department of Psychiatry, College of Medicine Ulsan University, Asan Medical Center, Seoul, Korea

⁵⁾ 을지의과대학 약리학교실

Department of Pharmacology, School of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea

†교신저자 : 김순애, 301-832 대전광역시 중구 용두동 143-5

전화) (042) 259-1672, 전송) (042) 259-1669 E-mail) sakim@eulji.ac.kr

(TDT).

Results : One hundred twenty six patients with ASD and their biological parents were analyzed. 86.5% were male and 85.1% were diagnosed as autistic disorder. The mean age was 71.9 ± 31.6 months (range : 26–185 months). We found that rs1805247 showed significantly preferential transmission (TDT $\chi^2=12.8$, $p<0.001$) in ASD.

Conclusion : One SNP in GRIN2B gene was significantly associated with ASD in the Korean population. This result suggests the possible involvement of glutamate NMDA receptor gene in the development of ASD.

KEY WORDS : Autism spectrum disorders · Transmission disequilibrium test(TDT) · Glutamate NMDA receptor.

서론

자폐장애는 의사소통의 장애, 사회적 상호작용의 질적 장애, 그리고 관심범위의 제한과 상동적 행동이 주된 증상이면서 생후 첫 3년 이전에 시작하여 평생 지속되는 뇌신경학적 발달장애이다.¹⁾ 이는 전반적 발달장애(Pervasive developmental disorders, 이하 PDD)에 속하는 질환들 가운데 가장 심하고 전형적인 형태이다. 자폐장애와 함께 아스퍼거씨 장애, 랫트씨 병, 소아기 붕괴성 장애, 그리고 달리 분류되지 않는 전반적 발달장애(Pervasive developmental disorder, not otherwise specified, 이하 PDD, NOS)는 자폐스펙트럼 장애(autism spectrum disorders, 이하 ASD)로 분류하기도 하는데, 이들은 임상적, 행동학적으로 유사한 특성들을 공유하고 있다.

그 동안 많은 연구를 통해 자폐장애가 기질적, 생물학적 원인을 갖는 신경발달의 장애일 가능성이 대두되어 왔으며, 그 가운데 쌍생아 연구와 가족 연구들의 결과를 근거로, 자폐장애와 ASD에서 유전적인 요인의 중요성이 강조되어 왔다. 일란성 쌍생아의 경우 자폐장애에서 40~60%, ASD에서 70~90%의 일치율을 보인 반면, 이란성 쌍생아에서는 0~25%의 일치율이 보고되었다.²⁾³⁾ 형제간 일치율은 2~6%로, 이는 일반 인구에서의 위험률인 .03~1%에 비해 50~100배나 높다.⁴⁻⁷⁾ 또한 자폐장애의 5%에서 이미 알려진 염색체 이상 질환이 동반되며, 10%에서는 fragile X 증후군이나 결절성 경화증(tuberous sclerosis)과 같이 멘델리안 유전 법칙을 따르는 질환을 가지는 점 등은 자폐장애의 유전적 요인을 뒷받침하는 강력한 증거가 되어 왔다.⁸⁾ 그러나 자폐장애의 유전 패턴은 아직 정확히 밝혀진 바 없으며, 그 수가 아

직 밝혀지지 않은 다수의 취약 allele들의 oligogenic inheritance에 의해 비롯된, 복합적인 유전적 기전을 가진 질환이라고 생각되고 있다.³⁾⁸⁻¹⁰⁾ 따라서 현재 ASD의 유전 연구의 많은 부분은 이 병의 발병과 관련될 수 있는 취약 유전자(susceptibility genes)를 규명하는 것에 집중되고 있다.

Glutamate는 뇌에 분포하는 중요한 excitatory amino acid 가운데 하나이다. 특히 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체는 long term potentiation (이하 LTP)와 같은 시냅스의 기능을 매개하는 ligand-gated ion channel이다. NMDA 수용체 유전자는 3가지 소단위에 대한 유전자가 알려졌는데(*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*), 이 가운데 NR2B subunit는 이 수용체에서 기능적, 구조적으로 중요한 부분이다. NR2B를 암호화하는 유전자(이하 *GRIN2B*)는 12번 염색체의 단완(12p12)에 위치해 있다. 동물과 사람 모두에서 NR2B subunit는 피질, 뇌해마, 선조체, 시상, 후신경구(olfactory bulb) 등 전뇌부에 주로 분포해 있는 것으로 알려졌다.¹¹⁻¹⁵⁾

자폐장애와 glutamate의 관계에 대해서는 서로 상반되는 가설들이 존재하고 있다. 일부 신경해부학적 연구들과 뇌영상 연구들은 자폐장애 환자의 뇌에서 glutamate가 풍부하게 분포하는 부위에 이상을 보고하였고, 또 다른 연구에서는 건강한 사람 또는 생쥐에게 NMDA 길항제를 투여했을 때 자폐장애에서와 유사한 행동들을 나타냈다고 보고함으로써 자폐장애가 hypoglutaminergic disorder라는 사실을 주장하고 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 반면 또 다른 연구들에서는 자폐장애를 가진 아동들에서 혈장 내 glutamate가 정상치보다 높아져 있다고 보고함으로써 이 장애를 hyperglutaminergic disorder로 설명할 수 있는 가능성을 제시하였다.¹⁹⁾²⁰⁾ 이러한 연구 결과들은 glutamate의 기능 변화와 조절기능의 이상이 자폐장애의

병인론 가운데 하나가 될 수 있으리라는 점을 시사하는 것이다.

자폐장애와 glutamate 관련 유전자와의 관계를 규명하려는 시도는 주로 Glutamate receptor 6(이하 *GluR6*) 유전자 다형성에 관해 진행되어 왔고, 그 가운데 한 연구에서 *GluR6* 유전자와 자폐장애가 유의한 관련이 있음이 보고되었다.²¹⁻²⁴⁾ MNDA 수용체와 관련해서는 한 연구에서 *GRIN2A* 유전자가 자폐장애와 관련이 있음이 보고되었다.²⁵⁾ *GRIN2B* 유전자의 경우, 주로 정신분열병, 양극성 장애, 광박장애, 알코올 의존 등 다른 정신과적 질환들과의 관련성이 탐색되어 왔는데, 특히 정신분열병 환자를 대상으로 한 몇몇 가족기반연구들에서 이 유전자의 다형성과 정신분열병이 관련되어 있음이 비교적 일관되게 보고되고 있다.²⁶⁻²⁹⁾ 이와 같은 기존의 연구 결과들은 NMDA 수용체 관련 유전자의 변이가 인지, 언어, 정동 등의 광범위한 이상을 동반하는 중추신경계의 만성적 질환과 관련된 가능성이 있다는 가설을 가능하게 한다.

본 연구는 Transmission Disequilibrium Test(이하 TDT)를 이용한 가족 기반 연구로써, ASD를 가진 아동들과 그 부모로 이루어진 trio를 대상으로 ASD와 NMDA 수용체 유전자, 그 가운데 *GRIN2B* 유전자와의 관련성을 규명하고자 하였다.

연구 방법

1. 대상군 선정 및 진단

연구 대상군은 자폐 스펙트럼 장애로 일차 진단된 아동과 그들의 생물학적 부, 모를 대상으로 하였으며 이들은 모두 국내에 거주하는 한민족으로 구성되었다. 연구 대상군은 발달지연을 주소로 가천의대 길병원과 경상대학교병원 소아정신과 외래를 내원한 아동이나 해당 지역사회 내 복지관, 특수교육기관 및 부모협회 등으로부터 연구에 참여할 것을 동의하여 의뢰된 아동을 선별 대상으로 하였다. 이 가운데 DSM-IV 진단체계를 이용하여 2명의 소아정신과 의사가 자폐 스펙트럼 장애로 진단한 아동이 일차적인 연구 대상으로 선별되었다. 선별을 돕기 위해 대상군 모두에게 한국판 자폐평정척도(Korean version of Childhood Autism Rating Scale, 이하 K-CARS)가 사용되었다.

선별된 아동과 부모들에게는 미국의 원저자로부터 도

구 사용에 대한 훈련과정을 통하여 신뢰도 평가 과정을 마친 검사자가 한국판 자폐증 진단 관찰 스케줄(Autism Diagnostic Observation Schedule, 이하 ADOS)³⁰⁾ 및 자폐증 진단 면담-개정판(Autism Diagnostic Interview-Revised, 이하 ADI-R)³¹⁾을 실시하였다.

ADOS는 자폐장애 및 기타 전반적 발달장애의 반구조화된 진단 도구로, 아동과의 상호작용을 유발할 수 있는 상황을 제공함으로써 놀이를 통해 전반적 발달장애와 관련된 사회성 및 의사소통 행동의 질을 관찰할 수 있게 고안된 도구이다. 이는 module 1부터 module 4까지 모두 4개의 module로 구성되어 있고, 언어의 유창한 정도에 따라 하나의 module을 선택하도록 되어 있다. 즉 이 도구는 아동의 인지기능이나 언어의 발달 정도와 관련 없이 자폐장애와 관련된 증상들을 평가할 수 있는 도구이다. 여기에는 자폐장애를 비롯하여 다른 전반적 발달장애, 비전형 자폐증, 기타 자폐범주 장애 등보다 광범위한 진단에 대한 경계 점수가 설정되어 있어 정해진 알고리즘에 따라 진단을 내리도록 되어 있다.³⁰⁾

ADI-R은 1994년 Lord 등에 의해 개발된 반구조화된 면담 도구로, ICD-10 및 DSM-III-R에 근거하여 아동의 부모 혹은 일차적으로 돌보는 보호자를 면담하는 과정을 통해 유아기 자폐증을 비롯한 전반적 발달장애를 진단하는 도구이다. 이는 위에 기술한 ADOS와 상호보조적으로 사용되며, 자폐장애 진단 기준에 포함된 의사소통, 사회적 상호작용, 행동과 관심의 제한 등 세 영역에 걸쳐, 영유아기부터 현재까지에 걸친 아동의 발달 과정과 행동 양상을 포괄적으로 기술하고 평가하도록 되어 있다. ADOS와 마찬가지로, 면담 내용에 근거하여 각각의 항목마다 점수를 매기고, 진단 알고리즘에 따라서 진단 범주를 구분하도록 구성되어 있다.³¹⁾

ADOS와 ADI-R은 자폐스펙트럼장애에서 나타나는 다양하고 복잡한 행동 및 발달의 전 영역들을 정확히 평가하기 위해 고안된 것이다.³⁰⁾ 이 도구들은 매우 포괄적인 평가 지표들을 가지고 있고, 동시에 놀이를 통해 아동의 행동을 직접 관찰하고 분석할 수 있는 장점을 갖고 있으므로, 기존의 자폐장애 관련 연구들에서 가장 큰 문제점으로 대두되었던, 진단에 있어서의 위음성 및 위양성을 최대한 배제할 수 있는 장점을 가지고 있다.

모든 대상군 부모들에게는 연구자가 직접 제작한 발달력과 가족력에 대한 기초적인 인적사항 설문지를 실시하였으며, 대상군 아동에게는 발달수준과 검사 적용 가

능성여부에 따라 한국판 웨슬러 지능검사(Korean Educational Developmental Institute-Wechsler Intelligence Scale for Children; KEDI-WISC)³²⁾와 한국판 사회성숙도 검사(Korean version of Vineland Social Maturity Scale ; K-VSMS)³³⁾를 시행하였다.

자폐장애의 발병에 영향을 줄 수 있는 신체 질환이나 신경학적 질환을 배제하기 위하여 과거력 조사, 이학적 신체검사 및 신경학적 검사, 뇌파검사를 시행하였고, 임상적/신경학적으로 필요하다고 판단된 경우에는 뇌자기 공명 촬영술과 염색체 검사 등이 시행되었다. 이러한 과정을 통해 신경섬유종증(neurofibromatosis), 결절성 경화증(tuberous sclerosis), 원인 불명의 뇌병증(encephalopathy) 및 기타 뇌기질적 질환, 취약 X 염색체 증후군, 다운 증후군, 기타 염색체 이상과 같이 자폐스펙트럼 장애의 발병에 원인을 제공할 수 있는 타 의학적 상태가 동반되었거나 갖고 있는 것으로 강하게 의심되는 환자들은 연구 대상에서 배제하기로 하였다. 형제/자매나 쌍생아가 함께 이환된 경우에는 TDT 분석에서 동시에 분석할 수 없으므로, 한 형제 또는 자매만 무작위로 분석에 포함하였다.

1, 2차 선별검사를 통하여 연구 대상군으로 확진된 아동의 부모에게 연구에 참여하는 소아정신과 의사가 연구 과정을 직접 설명하고, 연구 참여에 대하여 생명윤리에 관한 법률 양식에 준한 서면 동의서를 받았다. 이 연구는 연구가 수행된 모든 기관에서 Institutional Review Board의 인증을 받았다.

2. 유전자 분석(Genotyping)

1) 혈액채취

연구대상 아동과 부모 모두에게서 혈액을 채취한 후 EDTA tubes에 담아 -70℃에서 보관하였다. DNA는 G-spin Genomic DNA Extraction Kit를 사용하여 추

출되었으며 추출된 DNA는 -20℃에서 보관하였다.

2) 유전자 분석과정

PCR은 50mM Tris, pH 8.3, 16mM(NH₄)₂SO₄, 1.75mM MgCl₂, 2.5mM each dNTP, 2U HiPi thermostable DNA polymerase, 0.6 μg genomic DNA, 10pmole of primers를 함유하고 있는 40 μl reaction volume에서 수행되었다. GRIN2B 유전자에서 모두 4개의 단일유전자다형성(single nucleotide polymorphism, 이하 SNP)을 분석하였는데(rs7301328, rs1806201, rs1805247, rs1805502), 각각은 적절한 annealing temperature에서 30-60초-30초에 걸쳐 40 cycle의 PCR을 반복하였다. PCR 과정에 사용된 oligonucleotide primer들의 염기 서열 및 제한효소, 그리고 온도(annealing and incubation temperature)는 표 1과 같다. 모든 과정은 thermo-cycler, PCR MBS 0.2G block(Thermo Electron Corporation, USA)를 사용하여 시행하였다. 증폭된 DNA들은 0.5xTBE running buffer 내 3% agarose gel에서 전기영동을 실시하였으며, 크기 측정을 위하여 ethidium bromide를 사용하여 표시하였다(rs7301328 : 112bp, rs1806201 : 248bp, rs1805247 : 320bp, rs1805502 : 353bp). 각각의 PCR product들은 특정 제한 효소들을 처리한 후(표 1) 적정 온도의 수조에 20시간 동안 반응시켰다. 제한효소에 의해 절단된 절편들은 0.5xTBE running buffer 내 3.5% agarose gel에서 전기영동이 실시되었으며 ethidium bromide를 이용하여 염색하고 UV trans-illuminator를 사용하여 관찰하였다.

3) 통계분석

각각의 SNPs에 대한 allelic association 을 평가하기 위하여 TDT 방법이 시행되었다.³⁴⁾ TDT는 가족내 연관성 검사(within-family test of linkage disequilibrium)

Table 1. Oligonucleotide primer sequence, restriction enzymes, and temperature used for PCR process of GRIN2B gene

SNPs	Primer		Process		
	Sense	Antisense	Annealing temperature	Restriction enzyme	Incubation temperature
rs7301328	tcagcacagactctcacctc	cctcagcacaacacctcagg	60℃	Taq I	65℃
rs1806201	taacctgtccctccattctt	ctgcggcgggtgctctgagat	56℃	Aci I	37℃
rs1805247	cggacatcaccaccacaaca	tgaagccctggggthttg	56℃	Nco I	37℃
rs1805502	cccccaaaactgattacaac	tgftaagtgaaggggagcatc	60℃	Aci I	37℃

SNP : single nucleotide polymorphism

um)의 한 방법으로, 자폐장애 아동이 부모로부터 후보 유전자의 특정 alleles들을 유의하게 더 많이 전달받았는지의 여부를 관찰한 뒤 McNemar chi-square test (df=1)에 의거하여 분석하였다. Conventional TDT의 경우 사용되는 공식은 다음과 같다.

$$TDT = (b-c)^2 / (b+c)$$

b=high-risk alleles가 부모로부터 전달된 숫자

c=low-risk alleles가 부모로부터 전달된 숫자

SNP들의 각 allele들에 대한 transmission ratio (transmitted/not transmitted)와 그에 대한 95% CI (confidence interval)를 구하였다. 통계 프로그램은 SAS (Ver. 8.01)가 사용되었으며 통계적 유의성은 p<0.05로 정의하였다.

결 과

1. 연구 대상군의 특성(Subject characteristics)

모두 154명의 자폐스펙트럼장애아동들이 선별 및 진단 단 과정을 통해 잠재적 대상으로 평가되었다. 이 가운데 20명은 부모 중 한 명이 채혈을 거부하였고, 1명은 어머니가 한국인이 아니었으며, 1명은 부모와 아동이 이론적으로 불가능한 유전자형의 분포를 보였으므로 모두 분석에서 탈락하였다. 3쌍은 일란성 쌍생아였으며 1쌍은 친형제였는데, 이와 같이 유전적으로 서로 관계가 있는 대상자들의 경우 아동 한 쌍 중 한 명만을 무작위로 선택하여 분석 대상에 포함하였으므로 총 4명의 아동이

추가적으로 배제되었다.

이학적, 신경학적, 뇌기능 및 뇌영상학적 검사 결과 1명은 신경섬유종증, 1명은 정확한 진단을 내리기 어려운 광범위한 뇌병증을 가지고 있어서 분석 대상에서 제외하였다. 16명(12.7%)의 환자들이 뇌파검사 결과 부분발작(partial seizure) 또는 광범위한 대뇌 기능부전(diffuse cerebral dysfunction)을 시사하는 이상소견을 보였으나 임상적으로 의미 있는 경련성 질환을 갖고 있는 환자는 없었으며, 다른 신경학적 이상 없이 뇌파이상만을 보인 아동들은 분석에 모두 포함시켰다.

그 결과, 총 126명의 자폐 스펙트럼장애 아동과 그들의 생물학적 부모가 최종 분석 대상에 포함되었다. 전체 대상자 중 109명(86.5%)이 남아였으며 여아는 17명(13.5%)으로, 남아 대 여아의 비율은 6.41 : 1이었다. 대상군의 진단 분포는 자폐장애 107명(85.1%), 달리 분류되지 않는 전반적 발달장애(Pervasive developmental disorders, not otherwise specified ; 이하 PDD, NOS) 17명(13.5%), 아스퍼거 씨 장애(Asperger's disorder) 2명(1.6%)이었다. 대상군 아동의 평균 연령은 71.9±31.6개월(range : 26~185개월)이었으며 한국 관 사회성숙도 검사로 측정된 평균 사회지수(Social Quotient)는 61.2±20.6(range : 23.1~126), 측정 가능한 아동들의 평균 지능은 65.0±27.7(range : 25~126)이었다. K-CARS 점수는 31.5±5.4(range 18.5~46)로 나타났다.

2. 유전자 분석(Genetic analysis)

분석한 GRIN2B 유전자의 4개 SNPs 가운데 하나의

Table 2. GRIN2B genotype and allele frequencies in 126 autistic probands and their biological parents

SNPs	Genotype frequencies			Allele frequencies	
	CC	CG	GG	C	G
rs7301328					
Patients	31 (.25)	71 (.56)	24 (.19)	133 (.53)	119 (.47)
Parents	35 (.14)	204 (.81)	13 (.05)	274 (.54)	230 (.46)
rs1806201					
Patients	24 (.19)	78 (.62)	24 (.19)	126 (.50)	126 (.50)
Parents	59 (.23)	143 (.57)	50 (.20)	261 (.52)	243 (.48)
rs1805247					
Patients	4 (.03)	45 (.36)	77 (.61)	53 (.21)	199 (.79)
Parents	16 (.06)	112 (.44)	124 (.49)	144 (.29)	360 (.71)
rs1805502					
Patients	2 (.02)	40 (.32)	84 (.67)	44 (.17)	208 (.83)
Parents	2 (.01)	99 (.39)	151 (.60)	103 (.20)	401 (.80)

SNP : single nucleotide polymorphism

Table 3. Transmission Disequilibrium Test (TDT) of the GRIN2B in autism spectrum disorders

SNPs	Allele	T	NT	χ^2	p-value*	Ratio(T/NT)	95% CI for ratio
rs7301328	C	98	106	.31	.58	.92	.70–1.23
	G	106	98			1.08	.81–1.44
rs1806201	A	76	66	.70	.40	1.15	.82–1.62
	G	66	76			.87	.62–1.22
rs1805247	A	75	37	12.89	.00	2.03	1.35–3.06
	G	37	75			.49	.33–.74
rs1805502	A	58	41	2.92	.08	1.41	.93–2.15
	G	41	58			.71	.47–1.07

T : Transmitted, NT : Non-transmitted. * : p<.05

SNP(rs1805247)에서 의미 있는 allelic transmission의 차이를 보였다. 이 SNP에서 transmission ratio(transmitted alleles/non-transmitted alleles)는 A allele과 G allele에서 각각 2.03과 .49로, A allele이 G allele에 비해 부모로부터 환자군에게 더 빈번하게 전달(preferential transmission) 되었음이 확인되었다(TDT $\chi^2=12.89$, p=.0003). 이는 Bonferroni correction 후에도 여전히 유의미한 수준을 유지하였다(p=.0009).

기타 3개의 SNP(rs7301328, rs1806201, rs1805502)들에서는 의미 있는 transmission의 차이가 나타나지 않았다(p>.05). 각각의 SNP에 대한 GRIN2B 유전자의 allelic frequencies와 genotypic frequencies, TDT 분석 결과를 각각 표 2와 표 3에 각각 제시하였다.

고 찰

아직까지 한국 내에서 한국인 자폐장애 아동을 대상으로 한 가족기반 유전연구는 발표된 바 없다. 본 연구는 자폐스펙트럼장애 아동 및 생물학적 부모 trio를 대상으로 한 가족기반 유전연구로 *GRIN2B* 유전자의 SNP와 자폐스펙트럼장애 사이에 유의한 연관성을 보였다. 이는 glutamate NMDA 수용체 유전자가 이 질환의 발생에 관여할 가능성을 시사하는 것이라 생각된다.

Amino acid 계열의 신경전달물질은 뇌신경계의 광범위한 부위에 걸쳐 존재하며, dopamine, acetylcholine, norepinephrine, 그리고 gamma-aminobutyric acid(이하 GABA)의 조절을 담당하는 신경전달물질임에도 불구하고,¹¹⁾ 발달의 넓은 영역에 있어 장애를 보이는 자폐스펙트럼장애의 원인론에서 상대적으로 주목을 덜 받아왔다. 하지만 최근의 연구들이 자폐장애에서 glutamate

의 역할, 특히 NMDA 수용체와의 관련성이 일부 제기된 바 있다. 이러한 추론들은 주로 신경해부학 및 신경영상학 연구, 자폐장애 환자의 혈청에서 glutamate의 증가 및 감소 소견, 그리고 NMDA 관련 약물에 대한 반응을 토대로 한 동물연구들에 근거한 것이다.

그 가운데 하나는 자폐장애에서 뇌의 이상을 보인 부위로 제시되었던 뇌해마, 편도 등의 내측 측두엽, 전두엽 및 전전두엽이 공통적으로 glutamatergic neuron의 기시부이므로, 자폐장애가 hypoglutamatergic한 질병일 가능성을 주장하는 것이다.¹⁸⁾ 신경생물학적 연구에서는 Aldred 등(2003)이 자폐관련장애 아동 및 부모, 형제에서 혈청 glutamic acid의 증가를 보고하였고,²⁰⁾ Shinohe 등(2006)은 자폐장애를 가진 성인에서 정상 대조군에 비해 혈청 glutamate치가 상승해 있음을 보고하였다.³⁵⁾ 특히 한 연구에서 NMDA 수용체 길항제인 MK-801을 투여한 생쥐 또는 MNDA 수용체 유전자(*GRIN1* 및 *GRIN2*)에 결함이 있는 생쥐에서 학습 기능이 떨어졌을 뿐 아니라, 과잉행동과 grooming의 감소, 사회적 행동의 감소, 상동행동의 증가 등 행동의 primitivization이 나타났는데, 이것이 정신분열병과 자폐장애의 동물 모델이 될 가능성이 제시되었다.¹⁶⁾³⁶⁾ 이들은 모두 glutamate, 특히 NMDA 수용체가 자폐장애의 원인론에 기여할 가능성을 시사하는 뇌생물학적, 생화학적 근거들로, 본 연구는 이들 연구를 유전자 수준에서 뒷받침하는 결과 가운데 하나라고 할 수 있다.

NMDA 수용체 관련 유전자와 자폐장애의 관련성에 대한 이전의 연구로는 Barnby 등(2005)의 연구가 유일하다.²⁵⁾ 저자들은 자폐장애를 가진 아동의 가족에서 NMDA 2A 수용체 유전자(*GRIN2A*)의 intron 10에 위치한 하나의 SNP가 transmission disequilibrium 상태

에 있으며, 자폐장애와 유의한 연관이 있음을 보고하였다. 한편 *GRIN2B* 유전자는 그 동안 자폐장애보다는 다른 정신과적 질환, 즉 정신분열병, 양극성 장애, 알코올 의존, 강박장애, 주의력결핍과잉행동장애 등과의 관련성이 보고되어 온 바 있다.¹¹⁾²⁷⁾³⁷⁻³⁹⁾ 저자들이 이는 한 본 연구는 유전자 수준에서 *GRIN2B* 유전자와 자폐스펙트럼장애의 연관성을 규명한 첫 번째 연구로, Bonferroni correction을 적용한 뒤에도 통계적으로 유의한 연관성을 유지한 것으로 보아, NMDA 2B 수용체와 자폐장애 사이에 적어도 한 SNP에 있어서는 뚜렷한 관련성이 있는 것으로 보인다.

NMDA 수용체는 뇌신경계의 발달과 시냅스 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 *GRIN2B* 유전자의 작은 변화는 NMDA 2B 수용체가 매개하는 신경 전달 경로에 영향을 미치고, 따라서 glutamate의 신호 전달 기능을 감소시킬 수 있을 것으로 보인다. 이런 신호 전달 기능의 변화는 뇌신경계가 발달하는 과정에서 뇌의 광범위한 부위, 특히 NMDA 2B 수용체가 집중적으로 존재하는 뇌해마, 시상, 피질, 그리고 기저핵과 소뇌 등에 영향을 미치고,⁴⁰⁾ 그 결과로 언어, 학습, 기억, 사회적 행동 양식, 상동증적 관심 및 행동 등을 포함한 자폐장애 관련 표현형으로 나타나게 할 가능성이 있다고 추론할 수 있다.

하지만 기존의 연구들에서 자폐장애 아동 및 성인의 혈중 glutamate 수준의 증가가 연구들마다 다르고, kainate 계열의 수용체들을 포함한 glutamate와 관련된 유전자 다형성 연구들에서도 일관된 보고가 없다는 점, 그리고 자폐장애 뿐 아니라 공통적으로 비교적 만성 경과를 밟으면서 인지, 지각, 사고 등 다양한 스펙트럼에 걸친 정신병리를 동반하는 신경정신과 질환에서 공통적으로 관련성을 보이고 있다는 점 등은 NMDA 수용체가 단독적으로 자폐장애의 발생을 유발한다기 보다는 이와 유기적인 연결을 가지고 있는 GABA, 5-HT_{2A} 등 다른 신경전달물질과의 복잡한 상호조절 과정을 통해 발현된다고 생각하는 것이 더 타당할 듯 하다.⁴¹⁾ 이는 자폐장애가 뇌신경계의 국소적인 이상에 의한 질병이라기 보다는 중추신경계의 광범위한 범위에 걸친, 정보 처리 및 통합 능력의 장애라는 관점과도 상통하는 바 있다고 생각된다.⁴²⁾

본 연구에서 자폐스펙트럼장애와 의미 있는 연관성을 나타낸 rs1805247 유전자는 12번 염색체 장완에 위치

한 genomic DNA로 단백질을 암호화하는 유전자로, 대립유전자 빈도에 있어 민족간에 많은 차이를 보이고 있다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). 이는 X-linked disorder이면서 선천성 백내장, 신소관의 Fanconi 증후군, 그리고 정신지체를 특징으로 하는 Oculocerebrorenal syndrome of Lowe의 원인으로서 nonsense mutation을 보이는 부위이다.⁴³⁾ 또한 이 부위를 한국인을 대상으로 한 알코올 의존의 유전연구에서 탐색된 바 있었으나 알코올 의존군과 대조군 사이에 유의미한 전달의 차이를 보이지 않았다.⁴⁴⁾ 따라서 이 SNP 부위는 자폐관련 장애에 있어서는 새롭게 탐색된 것이며, 향후 이 부위가 자폐스펙트럼장애 전반뿐 아니라 자폐장애의 특정 행동 표현형과 관련성이 있는지를 규명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

자폐장애와 다른 전반적 발달장애 또는 자폐스펙트럼장애는 그 경계가 분명하지 않는 부분이 존재한다.⁴⁵⁾ 특히 PDD, NOS는 전반적 발달장애의 진단 기준을 만족시키면서 자폐장애의 진단기준을 모두 만족시키지 않는 residual diagnosis로서 그 진단적 타당성이 명백하게 제시되지 못하는 경향이 있고, 고기능 자폐증과 아스퍼거 증후군의 경계 또한 명확하지 않다.⁴⁶⁾⁴⁷⁾ 뿐만 아니라 그 동안의 유전연구들은 자폐장애와 PDD 내의 다른 소수 질환들(lesser variants)이 동일한 유전적 메커니즘을 공유하고 있다는 것을 지지하고 있다.⁷⁾ 많은 연구자들이 PDD의 분류에 있어 범주적 구분(categorical classification)보다는 차원적 구분(dimensional classification)인 자폐스펙트럼장애의 개념이 임상적, 학문적으로 유용함을 인정하고 있다.⁴⁵⁾⁴⁸⁾ 따라서 본 연구에서는 다양하고 서로 이질적인 발달장애들 가운데 언어 및 상호작용, 제한된 관심범위 및 상동적 행동이라는 세 가지 공통된 증상의 요인을 가지는 질병군을 하나의 스펙트럼으로 묶을 수 있다는 관점 하에, 자폐장애보다는 자폐스펙트럼장애를 분석의 대상으로 삼았다.

본 연구는 아시아 국가들 가운데 최초로 ADI-R과 ADOS 등 체계적인 자폐장애 진단 도구를 사용하여 대상군을 평가한 연구이다. 이들은 자폐장애의 연구에 있어 국제적인 표준으로 받아들여지고 있는 진단 도구들이므로 향후 본 연구의 결과를 타인종에서의 연구 결과들과 비교분석 하는 데에 유용한 기반을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

목 적 :

본 연구의 목적은 자폐스펙트럼장애를 가진 아동들과 그 부모로 이루어진 trio를 대상으로 이 장애와 NMDA 수용체 유전자, 그 가운데 *GRIN2B* 유전자와의 관련성을 규명하고자 하는 것이다.

방 법 :

발달지연을 주소로 가천의대 길병원과 경상대학교병원 소아정신과 외래를 내원한 아동을 선별 대상으로 하였다. DSM-IV 진단체계를 이용하여 2명의 소아정신과 의사가 자폐 스펙트럼 장애로 진단한 아동이 일차적인 연구 대상으로 선별되었다. 선별된 아동과 부모들에게는 한국판 자폐증 진단 관찰 스케줄(Autism Diagnostic Observation Schedule, 이하 ADOS) 및 자폐증 진단 면담-개정판(Autism Diagnostic Interview-Revised, 이하 ADI-R)를 실시하였다. PCR-RFLP법을 이용, *GRIN2B* 유전자에서 모두 4개의 단일 염기 다형성을 분석하였다(rs7301328, rs1806201, rs1805247, rs1805502). 각각의 SNPs에 대한 allelic association 을 평가하기 위하여 TDT 방법이 시행되었으며, 이를 통해 자폐장애 아동이 부모로부터 후보유전자의 특정 alleles 들을 유의하게 더 많이 전달받았는지의 여부를 관찰한 뒤 McNemar chi-square test(df=1)에 의거하여 분석하였다.

결 과 :

1) 연구 대상군의 특성 : 총 126명의 자폐 스펙트럼장애 아동과 그들의 생물학적 부모가 최종 분석 대상에 포함되었다. 전체 대상자 중 109명(86.5%)이 남아였으며 여아는 17명(13.5%)으로 남아 대 여아의 비율은 6.41 : 1이었다. 대상군의 진단 분포는 자폐장애 107명(85.1%), 달리 분류되지 않는 전반적 발달장애(PDD, NOS) 17명(13.5%), 아스퍼거 씨 장애(Asperger's disorder) 2명(1.6%)이었다. 대상군 아동의 평균 연령은 71.9±31.6개월(range : 26~185개월)이었으며 한국판 사회성숙도 검사로 측정된 평균 사회지수(Social Quotient)는 61.2±20.6(range : 23.1~126), 측정 가능한 아동들의 평균 지능은 65.0±27.7(range : 25~126)이었다. K-CARS 점수는 31.5±5.4(range 18.5~46)로 나타났다. 2) 유전자 분석 : 분석한 *GRIN2B* 유전자의 4개

SNPs 가운데 하나의 SNP(rs1805247)에서 의미 있는 allelic transmission의 차이를 보였다. 이 SNP에서 transmission ratio(transmitted alleles/non-transmitted alleles)는 A allele과 G allele에서 각각 2.03과 .49로, A allele이 G allele에 비해 부모로부터 환자군에게 더 빈번하게 전달(preferential transmission) 되었음이 확인되었다(TDT $\chi^2=12.89$, p=.0003). 이는 Bonferroni correction 후에도 여전히 유의미한 수준을 유지하였다(p=.0009). 기타 3개의 SNP(rs7301328, rs1806201, rs1805502) 들에서는 의미 있는 transmission의 차이가 나타나지 않았다(p<.05).

결 론 :

본 연구에서 *GRIN2B* 유전자의 단일유전자 다형성과 자폐스펙트럼장애 사이에 유의한 연관성을 보였다. 이는 glutamate NMDA 2B수용체 유전자가 이 질환의 발생에 관여할 가능성을 시사하는 것이라 생각된다.

중심 단어 : 자폐스펙트럼장애 · Transmission Disequilibrium Test(TDT) · Glutamate NMDA 수용체.

■ 감사의 글

저자들은 이 연구에 기꺼이 참여해 주신 자폐스펙트럼장애 아동 및 그 가족들에게 깊은 감사를 전합니다.

참고문헌

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV. 4th ed. Washington DC; American Psychiatric Press;1994.
2. Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. J Child Psychol Psychiatry 1977;18: 297-321.
3. Lauritsen M, Ewald H. The genetics of autism. Acta Psychiatr Scand 2001;103:411-427.
4. Lamb JA, Moore J, Bailey A, Monaco AP. Autism: recent molecular genetic advances. Hum Mol Genet 2000; 9:861-868.
5. Smalley SL. Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Hum Genet 1997;60:1276-1282.
6. Smalley SL, Asarnow RF, Spence MA. Autism and genetics. A decade of research. Arch Gen Psychiatry 1988; 45:953-961.
7. Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L, MacLean JE. Genetics of autism: overview and new directions. J Au-

- tism Dev Disord 1998;28:351-368.
8. Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2001;2:943-955.
 9. Andres C. Molecular genetics and animal models in autistic disorder. *Brain Res Bull* 2002;57:109-119.
 10. Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, et al. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2003;73:886-897.
 11. Martucci L, Wong AH, De Luca V, Likhodi O, Wong GW, King N, et al. N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit gene GRIN2B in schizophrenia and bipolar disorder: Polymorphisms and mRNA levels. *Schizophr Res* 2006;84:214-221.
 12. Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2003; 97:55-85.
 13. Cull-Candy SG, Brickley SG, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A, Farrant M. NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology* 1998; 37:1369- 1380.
 14. Schito AM, Pizzuti A, Di Maria E, Schenone A, Ratti A, Defferrari R, et al. mRNA distribution in adult human brain of GRIN2B, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit. *Neurosci Lett* 1997;239:49-53.
 15. Laurie DJ, Bartke I, Schoepfer R, Naujoks K, Seeburg PH. Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 51:23-32.
 16. Nilsson M, Carlsson A, Markinhuhta KR, Sonesson C, Pettersson F, Gullme M, et al The dopaminergic stabiliser ACR16 counteracts the behavioural primitivization induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 in mice: implications for cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:677-685.
 17. Nilsson M, Waters S, Waters N, Carlsson A, Carlsson ML. A behavioural pattern analysis of hypoglutamatergic mice-effects of four different antipsychotic agents. *J Neural Transm* 2001;108:1181-1196.
 18. Carlsson ML. Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate-serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm* 1998; 105:525-535.
 19. Moreno-Fuenmayor H, Borjas L, Arrieta A, Valera V, Socorro-Candanoza L. Plasma excitatory amino acids in autism. *Invest Clin* 1996;37:113-128.
 20. Aldred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH. Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *J Autism Dev Disord* 2003;33:93-97.
 21. Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, et al. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* 2002; 7:302-310.
 22. Ramoz N, Reichert JG, Smith CJ, Silverman JM, Bepalova IN, Davis KL, et al. Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25 A12 gene with autism. *Am J Psychiatry* 2004;161:662-669.
 23. Serajee FJ, Zhong H, Nabi R, Huq AH. The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J Med Genet* 2003;40:e42.
 24. Shuang M, Liu J, Jia MX, Yang JZ, Wu SP, Gong XH, et al. Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;131:48-50.
 25. Barnby G, Abbott A, Sykes N, Morris A, Weeks DE, Mott R, et al. Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT. *Am J Hum Genet* 2005;76:950-966.
 26. Di Maria E, Gulli R, Begni S, De Luca A, Bignotti S, Pasini A, et al. Variations in the NMDA receptor subunit 2B gene (GRIN2B) and schizophrenia: a case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;128:27-29.
 27. Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, et al. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet* 2005; 77:918-936.
 28. Hong CJ, Yu YW, Lin CH, Cheng CY, Tsai SJ. Association analysis for NMDA receptor subunit 2B (GRIN2B) genetic variants and psychopathology and clozapine response in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2001;11:219-222.
 29. Ohtsuki T, Sakurai K, Dou H, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T. Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:211-216.
 30. Lord C, DiLavore PC, Risi S. *Autism Diagnostic Observation Schedule*. Los Angeles; Western Psychological Services;2000.
 31. Lord C, Rutter M, Le Couteur A. *Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders*. *J Autism Dev Disord* 1994;24:659-685.
 32. Park KS, Yoon JR, Park HJ, Kwon KO. *Korean Educational Developmental Institute-Wechsler Intelligence Scale for Children (KEDI-WISC)*. 2nd ed. Seoul; Korean Educational Development Institute;2002.
 33. Kim SK, Kim OK. *Korean Vineland Social Maturity Scale*. 4th ed. Seoul: Chung-Ang Jeokseong Press;2002.
 34. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-

- based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996;59:983-989.
35. Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, et al. Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006 (in press).
 36. Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999;98:427-436.
 37. Buckley ST, Foley PF, Innes DJ, Loh EW, Shen Y, Williams SM, et al. GABA(A) receptor beta isoform protein expression in human alcoholic brain: interaction with genotype. *Neurochem Int* 2006 (in press).
 38. Qin S, Zhao X, Pan Y, Liu J, Feng G, Fu J, et al. An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. *Eur J Hum Genet* 2005;13:807-814.
 39. Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Wu S, Muhleman D, Blake H, et al. Multivariate analysis of associations of 42 genes in ADHD, ODD and conduct disorder. *Clin Genet* 2000;58:31-40.
 40. Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003; 140:1-47.
 41. Polleux F, Lauder JM. Toward a developmental neurobiology of autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004;10:303-317.
 42. Belmonte MK, Cook EH, Jr., Anderson GM, Rubenstein JL, Greenough WT, Beckel-Mitchener A, et al. Autism as a disorder of neural information processing: directions for research and targets for therapy. *Mol Psychiatry* 2004;9:646-663.
 43. Kubota T, Sakurai A, Arakawa K, Shimazu M, Wakui K, Furihata K, et al. Identification of two novel mutations in the OCRL1 gene in Japanese families with Lowe syndrome. *Clin Genet* 1998;54:199-202.
 44. Kim JH, Park M, Yang SY, Jeong BS, Yoo HJ, Kim JW, et al. Association study of polymorphisms in N-methyl-d-aspartate receptor 2B subunits (GRIN2B) gene with Korean alcoholism. *Neurosci Res* 2006 (In press).
 45. Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK. The autistic spectrum: subgroups, boundaries, and treatment. *Psychiatr Clin North Am* 2002;25:811-836.
 46. Dawson G, Webb S, Schellenberg GD, Dager S, Friedman S, Aylward E, et al. Defining the broader phenotype of autism: genetic, brain, and behavioral perspectives. *Dev Psychopathol* 2002;14:581-611.
 47. Berney TP. Autism-an evolving concept. *Br J Psychiatry* 2000;176:20-25.
 48. Myhr G. Autism and other pervasive developmental disorders: exploring the dimensional view. *Can J Psychiatry* 1998;43:589-595.