

2006년 8월

석사학위 논문

Cherubism 환자에서 SH3BP2 유전자
돌연변이

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 하 형

Cherubism 환자에서 SH3BP2 유전자
돌연변이

SH3BP2 Gene Mutation in a Korean Patient with
Cherubism

2006년 8월 일

조선대학교 대학원
치 의 학 과
이 하 형

Cherubism 환자에서 SH3BP2 유전자 돌연변이

지도교수 안 상 건

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 하 형

이하형의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 류 훈 인

위원 조선대학교 교수 윤 정 훈 인

위원 조선대학교 교수 안 상 건 인

2006년 5월 일(석사)

조선대학교 대학원

Contents

도목차

ABSTRACT

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	2
A. 환자	2
B. 조직학적 및 면역조직화학 염색	3
C. SH3BP2의 유전자의 돌연변이 검색	3
III. 결과	4
A. 조직학적 면역조직화학 소견	4
B. SH2BP2의 돌연변이 검색	5
IV. 고찰	6
V. 참고문헌	9

도 목 차

- Fig.1 3D computerized tomogram showed multilocular cystic lesions of bilateral posterior regions of the mandible and maxilla 2
- Fig. 2 A. Photomicrograph showing scattered multinucleated giant cells within the fibroblastic background (H-E). B. CD 68 immunoreactivity in multinucleated giant cells..... 4
- Fig. 3 DNA sequencing chromatograms of the patient and mother. Arrows indicate the positions of the mutated nucleotide. In exon 9, a C to G transition was identified in codon 418..... 5

ABSTRACT

SH3BP2 Gene Mutation in a Korean Patient with Cherubism

Ha-Hyung Lee

Advisor : Prof. Sang-Gun Ahn

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Cherubism is a rare autosomal dominant inherited condition caused by mutations in the c-Abl-binding protein SH3BP2. It is characterized by multiple cystic giant cell lesions of the jaw appearing in early childhood with stabilization and remission after puberty. In the present study, genomic DNA was purified from a blood sample obtained from the patient and parents and used for direct sequence analysis of the SH3BP2 gene. In addition, a sample of the lesion was used for histologic and immunohistochemical purposes. Histology revealed a proliferation of spindle shaped fibroblastic cells and irregularly dispersed multinucleated giant cells. The multinucleated giant cells proved positive for CD68 and TRAP. Genomic DNA sequencing found a missense mutation Pro418Arg in exon 9 of the SH3BP2 gene of the patient and the mother. Therefore, the multinucleated giant cells are basically osteoclastic in nature. Additionally, as the Pro418Arg mutation had been reported as causing cherubism, it represents a mutational hotspot.

I. 서론

Cherubism은 보통 대칭적으로 악골에 발생하는 다발성 발육성 유전성 질환으로 1933년 Jones이 처음 기술하였다¹⁾. 매우 어린 나이에 상악과 하악이 팽대되기 시작하여 사춘기까지 점차 진행된다^{1,2)}. 보고된 대다수의 cherubism은 상염색체 우성유전을 하지만 가족력이 동반되지 않는 경우도 있다³⁻⁷⁾. 유전자 침투도는 남자에서는 100%, 여자에서는 50-70%로 보고되어 여성에서 발생하는 경우가 남성에 비해 드물다^{7,8)}. 최근 문헌에 따르면 cherubism은 전세계적으로 약 150여 예의 보고가 있고 우리나라에서 경험한 증례도 있다⁷⁻⁹⁾.

Cherubism은 조직학적으로 반응성으로 보이는 섬유혈관성 간질과 치밀한 섬유조직과 파골세포형 다핵 거대세포가 산재되어 나타난다^{3,7,8)}. 그러나 이러한 조직학적 소견은 거대세포 육아종, 맥관성 골낭, 부갑상선 기능항진증에서 보는 갈색종과 구별이 어렵다^{2,7,8)}.

최근 cherubism에 관한 연구에서 관련 유전자가 염색체 4p16.3에 위치함을 밝혀내었고^{3,5)}, Ueki등⁶⁾은 SH3-binding protein (SH3BP2) 유전자의 점 돌연변이가 열다섯 가족 중 12명에서 확인하여 SH3BP2 유전자 돌연변이가 이 질환을 초래할 것으로 생각한다. 특히, SH3BP2 유전자의 exon 9부위에만 국한되어 발생하고, 아울러 가족력이 없는 cherubism 환자에서도 SH3BP2 유전자 돌연변이가 관찰된다는 논문이 있어 cherubism 진단에 이 유전자 돌연변이의 역할이 중요시 되고 있다⁷⁾.

우리나라에서도 cherubism 환자가 적지 않게 발생함에도 불구하고 SH3BP2 유전자 돌연변이를 확인한 논문은 전혀 없다. 따라서 이 연구에서는 임상 및 조직학적으로 cherubism으로 진단된 환자에서 SH3BP2 유전자 돌연변이 여부를 규명하고, 아울러 조직학적으로 다핵거대세포에 대한 면역조직화학적 특성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

A. 환자

환자는 6세 남아로 양측 협부 종창을 보였고, 파노라마 사진에 하악 및 상악 후구치 부위에 양측성 다방성 방사선 투과성 병소가 관찰되었다. 전산화 단층 사진 촬영에서 양측성으로 하악골이 협설, 상하 팽윤되어 있었으며, 하악 좌측 소구치부에 피질골 천공이 관찰되었다 (Fig. 1). 혈액검사 결과에서 alkaline phosphatase level 이 149 U/L (정상 42~128)로 약간 높게 나타난 것을 제외하고는 정상범주에 속하였다. 환자의 과거력이나 가족력에서는 특별한 이상이 없었다.



Fig. 1. 3D computerized tomogram showed multilocular cystic lesions of bilateral posterior regions of the mandible and maxilla.

B. 조직학적 및 면역조직화학 염색

생검조직은 통법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정하여 탈회하고 파라핀에 포매한 후 Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색은 파라핀 포매 조직에서 박절 표본을 만든 후 xylene 용액에서 30분간 파라핀을 제거하고 95%, 90%, 70% 알콜과 증류수에 순차적으로 함수하였다. 3% H₂O₂로 20분간 endogenous peroxidase를 제거한 후, 0.1% trypsin으로 효소 처리하여 항원 부위를 노출시키고, goat serum에 30분간 반응시켰다. 일차항체로는 anti-CD68 (clone PG-M1, 1:200, Transduction Laboratories, Lexington, KY)과 anti-tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP, clone 26E5, 1:200, Biogenex, San Ramon)를 4°C overnight으로 반응시키고, avidin-biotin method로 면역조직화학 염색을 시행한 후, diaminobenzidine (DAB)로 발색하고 Mayer씨 hematoxylin으로 대조염색하여 관찰하였다.

C. SH3BP2 유전자의 돌연변이 검색

SH3BP2 유전자의 돌연변이를 검색하기 위하여 환자와 환자의 부모에서 혈액을 채취한 후 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Korea)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. SH3BP2 유전자의 exon 9을 증폭하기 위하여 sense 5'-AGGGGAGCAGAGGGTGG-3'와 antisense 5'-GGGACACAGAAGCAGGAAG-3' (543 bp) primer를 제작하였다. PCR 반응은 Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan)를 이용하여 다음의 조건으로 수행하였다. 94°C에서 5분, 변성반응을 94°C에서 30초, 결합반응을 60°C에서 30초, 중합반응을 72°C에서 1분간 35주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. PCR 반응 산물은 AccuPrep[®]PCR Purification Kit (BIONEER, Korea)으로 정제하고 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. Sequencing 분석을 위해서는 PCR 반응에 이용한 primer를 사용하였다.

Ⅲ. 연구결과

A. 조직학적 및 면역조직화학 소견

조직학적으로 섬유혈관성 간질과 치밀한 섬유조직의 증식이 관찰되었다. 섬유성 간질 조직내에 다수의 다핵 거대세포가 산재되어 관찰되었다. 면역조직화학 염색에 거대세포는 TRAP 항체와 CD68에 강한 양성반응을 보였고, 일부의 간질세포에서도 CD68에는 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 2).

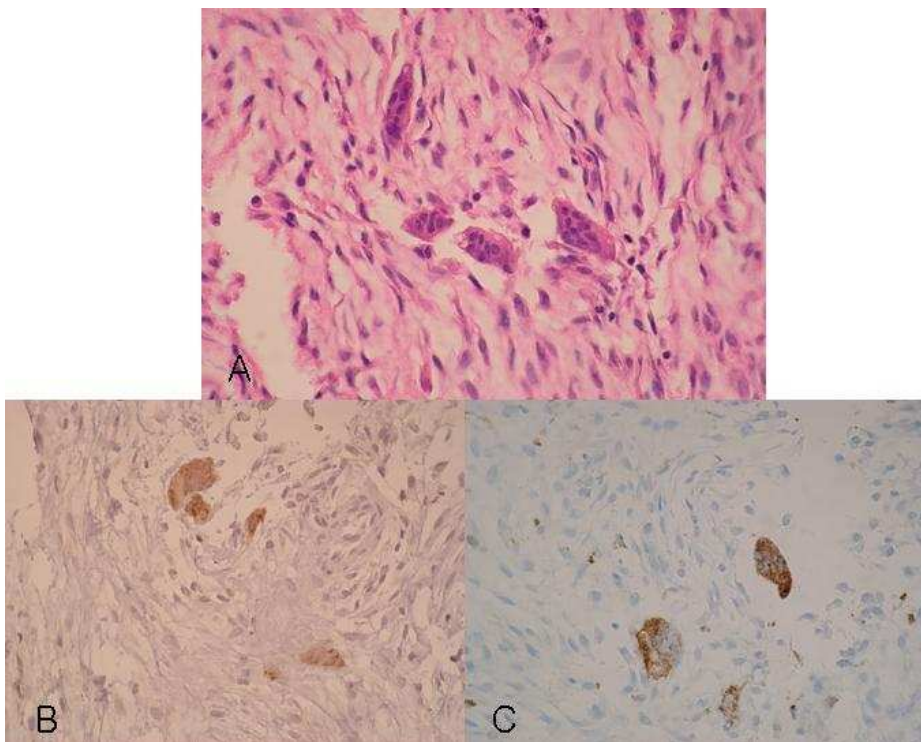


Fig. 2. A. Photomicrograph showing scattered multinucleated giant cells within the fibroblastic background (H-E). B, C. Immunohistochemistry showing multinucleated giant cells proved positive for TRAP (B) and CD68 (C).

B. SH3BP2의 돌연변이 검색

환자와 환자 부모의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 SH3BP2 유전자의 exon 9의 염기서열을 분석한 결과 환자와 환자 어머니의 codon 418번에서 CCC가 CGC로 돌연변이가 되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 Proline을 Arginine으로 바꾸어 주는 point mutation이었다 (Fig. 3). 반면, 환자의 아버지에서는 어떠한 돌연변이도 발견되지 않았다.

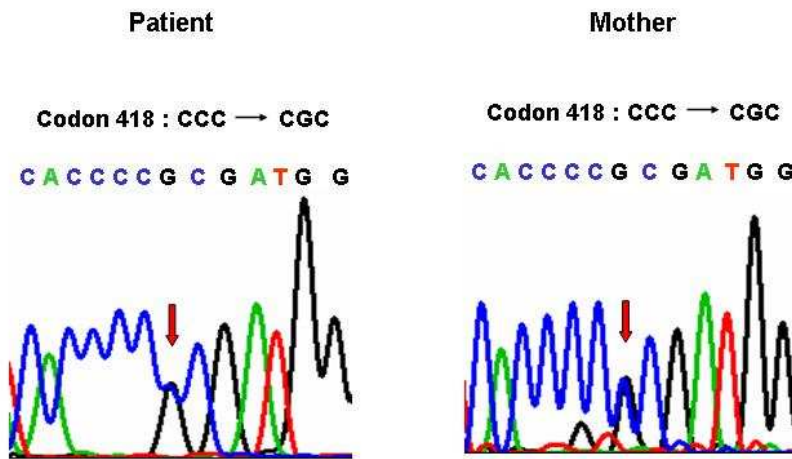


Fig. 3. DNA sequencing chromatograms of the patient and mother. Arrows indicate the positions of the mutated nucleotide. In exon 9, a C to G transition was identified in codon 418.

IV. 고찰

이 연구는 우리나라에서 처음으로 cherubism 환자에서 SH3BP2 유전자 돌연변이를 확인한 논문이다. 환자의 어머니에서도 같은 부위에 돌연변이를 관찰하였지만 어머니를 문진한 결과 어린나이에 이와 유사한 질환에 이환되었다는 병력이나 이상은 없었다. 다만 유전자 침투도가 여성에서는 50-70%로 보고되어 남성에 비해 여성에서 유전자 침투도가 낮아 표현형이 발현되지 않는 것으로 생각하였다^{7,8)}. 그러나 일부 증례에서는 가족력을 찾아볼 수 없는 경우가 보고되고 있지만⁷⁻⁹⁾, 가족력이 없는 경우에도 돌연변이 여부를 확인하지 않은 경우가 대부분이다.

조직학적으로 cherubism 병소는 거대세포 육아종과 구분이 어렵다. 악골 병소가 거대세포 육아종이라고 병리조직학적으로 확인될 때에는, 거대세포 육아종, 부갑상선 기능항진증의 갈색종, cherubism 등을 고려해야한다^{2,4,7,8)}. 갈색종은 부갑상선 호르몬의 혈청 수치가 증가되기 때문에 구분이 가능하다. 중심성 거대세포 육아종은 병소가 비대칭적이며 단독성이고, 약 3:2의 비율로 여자가 남자보다 흔하다^{7,8)}. 그러므로 cherubism은 보통은 특징적인 양상 때문에 중심성 거대세포 육아종과 쉽게 구별할 수 있다. 그러나 가족력이 없거나, 환자가 여성이거나, 하악에만 이환된 일부 증례에서는 cherubism을 악골의 거대세포 육아종과 감별하는데 어려움이 있다. 특히 악골에 다발성 거대세포 육아종이 나타났던 일부 보고가 있어 더욱 혼란이 가중된다^{4,7)}. 이 경우 SH3BP2 유전자의 돌연변이를 확인하는 것이 가족력이 있건 없건 cherubism을 진단하는데 매우 중요한 방법의 하나로 제시되었다⁷⁾. 이 증례의 환자는 병소가 악골의 4분악에 대칭적으로 동시에 이환되었고, 조직학적으로 거대세포 육아종과 일치하였다. 환자의 안모는 전형적으로 천사처럼 보였고, 실험실 검사에 부갑상선 기능항진증의 소견을 찾을 수 없었기 때문에 cherubism이라고 진단하였다. 그러나 환자는 협부 팽창의 가족력이 전혀 없는 남아였다.

Cherubism에 대한 분자적인 측면은 최근에야 기술되어 있다. Tiziani 등(1999)⁵⁾과 Mangion 등(1999)³⁾이 각각 cherubism이 4p16.3 염색체에 지도화되어 있음을 보고하였다. 이어 Ueki 등(2001)⁶⁾이 cherubism 환자 15 가족 중 12에서 SH3BP2 유전자 exon

9에서 점 돌연변이를 확인하였다. Imai 등⁷⁾은 가족력이 없는 cherubism 환자에서 동일한 돌연변이를 관찰하여 SH3BP2 유전자의 돌연변이 발견이 가족력이 있건 없건 cherubism을 진단하는데 매우 중요한 방법의 하나로 제시하였다.

SH3BP2 유전자는 c-abl oncogene의 Src homolog 3 domain을 포함하는 fusion protein으로 mouse cDNA expression library를 screening하다가 처음 확인하였다¹⁰⁾. SH3BP2 유전자는 처음에 c-Abl에 결합할 수 있는 단백질을 부호화하는 유전자라고 알려졌으며 증식성 신호변환 단백질의 하나라고 생각되었다. 따라서 SH3BP2는 일부 세포에서 c-Abl의 기능을 조절하는 신호변환 역할을 할 것이라고 생각하고 있다¹⁰⁾. SH3BP2 단백질은 pleckstrin homology (PH) domain, proline rich Src homology 3 (SH3) binding domain 그리고 Src homology 2 (SH2) domain 3 영역으로 구성되어 있다^{11,12)}. 이 연구에서 확인된 SH3BP2 유전자 돌연변이는 기존의 다른 연구 결과에서 처럼 exon 9의 Pro418Arg 돌연변이가 발견되어 Ueki 등⁶⁾과 Lo 등¹²⁾이 유전성 증례에서 발견한 것과 매우 유사하게 아미노산 415-420 서열 부위에서 관찰되어 이 부위가 돌연변이 hot spot임을 생각할 수 있다. 또한 다양한 인종의 환자에서 유전자의 exon 9의 단지 3개의 아미노산에서만 missense 돌연변이가 나타나며, 아울러 SH3BP2의 발현이 cherubism의 다핵 거대세포에서 관찰된다는 점은, 이 돌연변이가 osteoclast progenitor 같은 일부 세포에서 기능 획득(gain of function)을 초래하거나 또는 dominant-negative manner로 작용할 수 있음을 시사한다^{6,7,12)}.

Cherubism이나 거대세포 육아종은 다핵거대세포의 출현이 특징이다. 그러므로, 이 병소에서 보는 다핵 거대세포의 기원을 규명하기 위해 면역조직화학 연구가 시행되어 왔다. 최근 일부 문헌에 다핵거대세포가 CD68에 염색되는 것으로 보아 단핵/대식세포 계에서 분화되었을 것이라고 생각하고 있다^{7,11,12)}. Ueki 등⁶⁾과 Imai 등⁷⁾은 cherubism의 다핵 거대세포가 TRAP에 양성으로 염색되어 파골세포기원임을 입증한바 있다. 이 연구에서도 병소내의 다핵 거대세포가 CD68과 TRAP 항체 모두에서 양성이었다.

이 논문에서는 한국인에 발생한 cherubism 증례에서 어머니와 환자에서 SH3BP2 유전자의 exon 9의 염기서열을 분석한 결과 환자와 환자 어머니의 codon 418번에서 CCC가 CGC로 돌연변이 되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 Proline을 Arginine으로

바꾸어 주는 점 돌연변이로 다른 보고에서도 이 부위가 가장 흔히 발견되는 돌연변이 부위로 mutational hot spot이라고 생각된다. 추후에 SH3BP2 유전자 돌연변이에 의해 파골세포가 활성화되는 기전에 대한 연구가 필요하며, 아울러 SH3BP2 유전자 돌연변이에 대한 DNA 진단은 cherubism의 확인에 의미 있는 역할을 할 것으로 생각한다.

V. 참고문헌

1. Jones WA. Familial multilocular cystic disease of the jaws. *Am J Cancer* 17:946-950, 1933.
2. Jones WA. Cherubism: A thumbnail sketch of its diagnosis and a conservative method of treatment. *Oral Surg* 20:648-653, 1965.
3. Mangion J, Rahman N, Edkins S, Barfoot R, Nguyen T, Sigurdsson A, Townend JV, Fitzpatrick DR, Flanagan AM, Stratton MR. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. *Am J Hum Genet* 65:151-157, 1999.
4. Peters WJN. Cherubism: A study of twenty cases from one family. *Oral Surg* 47:307-311, 1979.
5. Tiziani V, Reichenberger E, Buzzo CL, Niazi S, Fukai N, Stiller M, Peters H, Salzano FM, Raposo do Amaral CM, Olsen BR. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16. *Am J Hum Genet* 65:158-166, 1999.
6. Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, Ninomiya C, doAmaral C, Peters H, Habal M, Rhee-Morris L, Doss JB, Kreiborg S, Olsen BR, Reichenberger E. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 28:125-126, 2001.
7. Imai Y, Kanno K, Moriya T, Kayano S, Seino H, Matsubara Y, Yamada A. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Craniofac J* 40:632-638, 2003.

8. Hyckel P, Berndt A, Schleier P, Clement JH, Beensen V, Peters H, Kosmehl H. Cherubism - new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. *J Craniomaxillofac Surg.* 33:61-68, 2005.
9. 이호빈, 여환호, 김영균, 조세인, 박인순. 체루비즘: 증례보고. *대한구강악안면외과학회지* 21:117-122, 1995.
10. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-1161, 1993.
11. Southgate J, SarmaU, Townend JV, Barron J, Flanagan AM. Study of the cell biology and biochemistry of cherubism. *J Clin Pathol* 51:831-837, 1998.
12. Lo B, Faivaz-Ul-Haque M, Kennedy S, Aviv R, Tsui LC, Teebi AS. Novel mutation in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 causes cherubism. *Am J Med Genet A* 15:121(1):37-40, 2003.