



A Korean Case of Neonatal Nemaline Myopathy Carrying *KLHL40* Mutations Diagnosed Using Next Generation Sequencing

Yoong-a Suh, MD¹, Young Bae Sohn, MD, PhD², Moon Sung Park, MD, PhD¹, Jang Hoon Lee, MD, PhD¹

Departments of ¹Pediatrics and ²Medical Genetics, Ajou University Hospital, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Nemaline myopathy is a genetically heterogeneous neuromuscular disorder and one of the most common congenital myopathies. The clinical manifestations usually vary depending on the age of onset. Neonatal nemaline myopathy has the worst prognosis, primarily due to respiratory failure. Several genes associated with nemaline myopathy have been identified, including *NEB*, *ACTA1*, *TPM3*, *TPM2*, *TNNT1*, *CFL2*, *KBTBD13*, *KLHL40*, *KLHL41*, *LMOD3*, and *KBTBD13*. Here, we report a neonatal Korean female patient with nemaline myopathy carrying compound heterozygous mutations in the gene *KLHL40* as revealed using next generation sequencing (NGS). The patient presented with postnatal cyanosis, respiratory failure, dysphagia, and hypotonia just after birth. To identify the genetic cause underlying the neonatal myopathy, NGS-based gene panel sequencing was performed. Compound heterozygous pathogenic variants were detected in *KLHL40*: c.[1405G>T];[1582G>A] (p.[Gly469cys];[Glu528Lys]). NGS allows quick and accurate diagnosis at a lower cost compared to traditional serial single gene sequencing, which is greatly advantageous in genetically heterogeneous disorders such as myopathies. Rapid diagnosis will facilitate efficient and timely genetic counseling, prediction of disease prognosis, and establishment of treatments.

Key Words: Congenital; Myopathies, nemaline; Next generation sequencing; *KLHL40*

서론

네말린 근병증은 선천성 근병증 중 가장 흔한 질환 중 하나로, 병리학적으로 골격근 섬유에 네말린 로드(nemaline rod)라는 특징적인 소견이 관찰 된다¹⁾. 이는 유전적 이질성을 가지며 선천성 근병증의 17%를 차지하고, 대략 1/50,000의 확률로 태어난다²⁾. 전형적으로 나타나는 임상증상은 근육 약화, 근육 긴장성 손상, 심부전 반사의 소실 등이다. 근육 약화는 일반적으로 얼굴, 목 굴곡근, 사지 근위부 근육에서 주로 발생한다. 얼굴 근육이 심하게 약해지며, 마르고 턱이 두드러져 보이는 특징적인 얼굴 모양이 나타나게 된다. 또한 호흡근이나 저작근이 약해져서 호

Received: 2 February 2021

Revised: 7 May 2021

Accepted: 10 May 2021

Correspondence to: Jang Hoon Lee, MD, PhD

Department of Pediatrics, Ajou University Hospital, Ajou University School of Medicine, 164 World cup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea

Tel: +82-31-219-5167

Fax: +82-31-219-5169

E-mail: neopedlee@gmail.com

Copyright(c)

By Korean Society of Neonatology.

All right reserved.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

흡 장애와 연하 장애가 발생하며, 호흡 장애가 사망의 가장 큰 원인이 된다³⁾. 1999년도 European Neuromuscular Centre International Consortium (ENMC)에서는 네말린 근병증을 발생 연령 및 임상증상의 중증도에 따라서 6가지 타입으로 다음과 같이 분류하였고, 이는 (1) 극심한 선천성형, (2) 아미쉬형, (3) 중간 선천성형, (4) 전형적 선천성형, (5) 소아기 발병형, (6) 성인기 발병형이다. 네말린 근병증은 골격근의 얇은 필라멘트를 구성하는 단백질을 생성하는 유전자에 돌연변이가 발생하는 것으로, 단백질에는 네불린, 트로포마이신 베타와 감마, 액틴, 트로포닌 티가 있으며, 이들의 연결은 Kelch-like family member 40으로 안정화 되어 있다. 네말린 근병증의 원인 돌연변이가 되는 유전자는 대표적으로 *NEB*, *ACTA1*, *TPM3*, *TPM2*, *TNNT1*, *CFL2*, *KBTBD13*, *KLHL40*, *KLHL41*, *KBTBD13*가 있다^{1,4)}.

*NEB*는 네불린 단백질을 형성하는 유전자로, *NEB*에 발생하는 돌연변이는 상염색체 열성 유전이며 네말린 근병증에서 약 50% 정도의 증례를 보이는 돌연변이고²⁾, 우리나라에서도 가장 흔한 병적 변이로 알려져 있다¹⁾. *NEB* 돌연변이에서 발생하는 가장 흔한 임상증상에는 원위부 근육 약화가 있다⁵⁾.

*KLHL40*은 Kelch-like family member 40 단백질을 형성하는 유전자로, *KLHL40* 돌연변이 또한 상염색체 열성 유전이며 임상적으로 극심한 네말린 근병증을 일으키는 대표적인 돌연변이이며, Ravenscroft 등⁶⁾은 약 19.6%로 발생한다고 보고하였다. 특히 이 표현형을 가지는 유형의 28%는 일본에서 대부분 발견되고 있으며⁴⁾, 대부분 태동의 감소, 관절 구축, 호흡 부전, 연하 장애를 태어날 때부터 가지게 된다. 선천적인 골절도 흔하게 나타나며 환자의 절반 이상이 중력에 반하는 힘을 주지 못한다. 평균 수명은 약 5개월이라고 알려져 있다. Ravenscroft 등⁶⁾은 c.1582G>A 변이가 일본에서 주로 발생하는 돌연변이이며 이는 한국, 터키에서도 정의된다 밝혔다.

본 증례에서는 출생 직후 심한 전신 근육 약화를 보인 신생아에서 차세대 염기서열분석법(next generation sequencing, NGS)을 이용한 유전자 패널검사를 통해 네말린 근병증을 진단한 경험을 보고하고자 한다.

증례

재태 연령 37주 5일에 출생 체중 3,500 g, 제왕절개로 아프가 점수 1분 5점, 5분 7점으로 출생한 여아가 출생 후 잘 울지 않고 청색증이 동반되어 출생 당일 본원으로 전원 되었다. 환자의 어머니는 임신으로 인한 고혈압 이외 특이 병력 없었고, 산전 진찰상에서도 이상 소견 없었으며 출생 전 태동 감소 소견을 보이지 않았다. 환아는 첫째이며, 유전 질환의 가족력은 없었고 내원 당시 키 46 cm (10 백분위수), 체중 3,290 g (50 백분위수), 두위 38 cm (90 백분위수), 태변 착색이 있었으며 전반적 근긴장도 저하가 있었다. 이마가 돌출되어 있

으며, 이마에 포도주색 반점이 있고, 평평한 얼굴, 양안 격리증, 하악 발육 부전, 인중 모양이 짧고, 흉부 함몰을 동반한 숏통 가슴, 목이 짧고 익상경이 있는 모습을 보였다. 또 모든 관절이 느슨하게 늘어져 있고, 각 관절의 구축이 있었으며, 손가락이 비정상적으로 길고 얇은 형태이며 등과 다리에는 다모증이 있었다. 선천적 골절은 존재하지 않았다.

환아는 처음 내원 당시 혈액가스검사에서 pH 7.357, pCO₂ 41.1 mm Hg, BE -2.5 mmol/L, HCO₃ 22.4 mmol/L 소견으로 호흡성 산증은 없었고, 젖산 2.57 mmol/L (0.7-2), CK 294 U/L (26-192), CK-MB 18.3 μg/L (0.0-5.0), pro-BNP 36,377 pg/mL (0-320)로 근육 효소 및 심장 효소 수치가 상승하였다. 내원 당시에는, 고유량 비강 캐놀라 산소 주입으로 산소포화도 90%-100%로 유지되었으나, 단순 흉부방사선사진에서 심비대 및 폐렴 악화 소견 보이고 자발 호흡이 힘들어지면서 기관 삽관하여 기계 환기 치료를 시행하였고 또

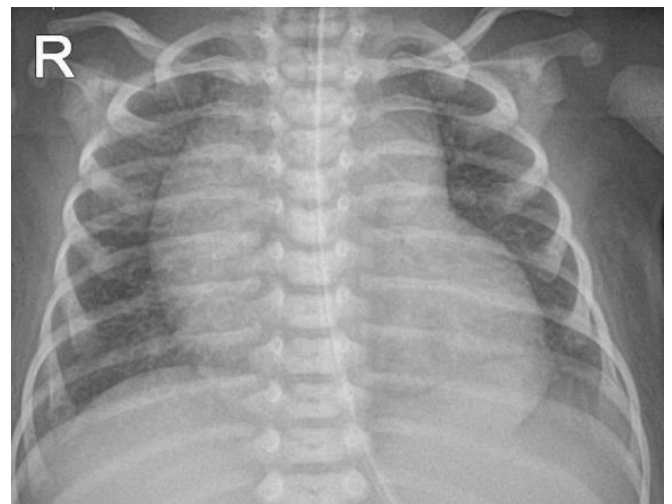


Figure 1. Chest X-ray taken at the time of admission of the patient to our hospital revealed no abnormal findings except cardiomegaly.

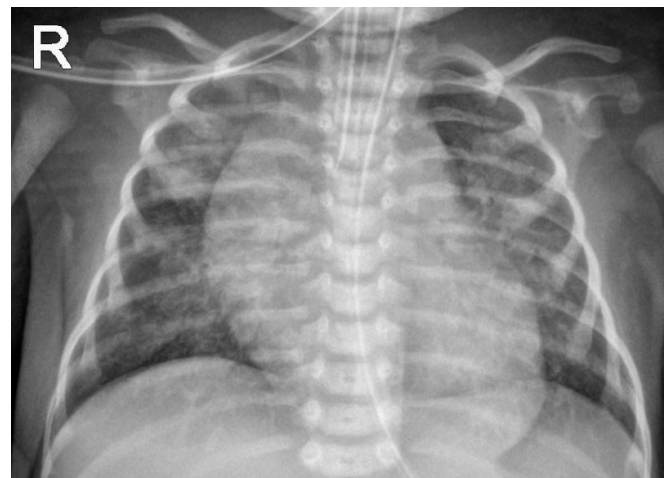


Figure 2. Chest X-ray taken at hospital day 2, revealed aggravated haziness in both lungs; therefore, the patient was intubated.

한 연하 장애도 동반되어 있어, 위관 삽입하여 식이를 진행하였다 (Figures 1, 2). 호흡 곤란 및 연하 장애, 근긴장도 저하, 특징적 외형으로 다발성 기형 감별을 위하여 뇌 초음파, 복부 초음파를 시행하였으며 정상이었다. 다양한 선천적 기형에 대한 유전학적 원인을 규명하기 위해 고식적 핵형 분석 및 염색체 마이크로어레이 검사를 시행하였으며, 선천성 신경근 질환을 감별하기 위해 선천성 대사이상 검사, *SMN1* (척수근위축증), *GAA* (포페병) 유전자검사를 시행하였다.

핵형은 46,XX로 정상이었으며 염색체 마이크로어레이 검사에서도 임상적으로 중요한 염색체의 미세 결실, 중복은 발견되지 않았다. 선천성 대사이상 선별검사는 정상이었으며, 긴 사슬 지방산 검사에서도 C22:0 28.414 $\mu\text{mol/L}$ (0.0-96.3), C24:0 21.136 $\mu\text{mol/L}$ (0.0-91.4), C26:0 0.266 $\mu\text{mol/L}$ (0.0-1.31)로 정상이었다. *SMN1*, *GAA* 유전자 검사에서도 병적 변이는 발견되지 않았다.

이외에 다양한 유전성 근질환을 감별하기 위해 NGS를 이용한 유전자 패널검사를 시행하였다. 이를 통해 *KLHL40* 유전자에서 2개의 병적 변이(pathogenic variant)가 발견되었다: *KLHL40* c.[1405G>T];[1582G>A] (p.[Gly469cys];[Glu528Lys]) (Figure 3). 또한 부모검사에서 복합 이형접합성이 확인되어, 환아는 네말린 근병증으로 진단 되었다.

환아는 입원 치료 중 심비대를 유발한 3.2 mm 크기의 동맥관개존은 자연적으로 폐쇄되었으며, 폐렴 치료로는 항생제 아피실린-설박탐 제제를 2주간 사용하였다. 폐렴 호전 이후 기계 환기 이탈을 시도 하였으나 지속적으로 무호흡이 발생하여, 카페인(neocaf)을 사용하면서 기계 환기 치료를 유지하였고, 이후 생후 19일째 기계 환기를 이탈하였다. 하지만 객담 배출이 원활하게 이루어지지 않았고, 식이 증량 시 분비물이 증가하면서 산소포화도가 떨어지는 경우가 발생하여, 지속적 객담 흡입 및 비강 캐놀라 산소를 유지하였고, 위관

식이를 지속하였다. 또 눈동자의 움직임이 없고, 양안을 완전히 뜨고 감지 못하는 상태였지만 대광 반사는 정상적으로 이루어졌으며, 이외 소견은 정상이었다. 생후 6일째부터 혈액가스검사항에서 pH 7.674, pCO₂ 40.5 mm Hg, BE 26.7 mmol/L, HCO₃ 49.3 mmol/L로 구도 및 이노제 사용 없이 대사성 알칼리증이 발생하였고, 저칼륨혈증이 동반되어 시행한 혈액, 소변, 아미노산 및 유기산 검사는 정상이었다. 대사성 알칼리증에 대하여 경구 칼륨 복용하면서 경과 관찰하였다. 이후 보호자 요구로 재활 및 추가적 치료를 위해 상급병원으로 전원 되었다.

고찰

네말린 근병증은 발생하는 연령에 따라 다양한 임상증상을 나타내는데, 산전과 신생아기에 발병되는 네말린 근병증의 경우 호흡 부전을 보이기에 가장 예후가 좋지 않다^{1,7)}. 본 증례는 임상증상과 발병 시기를 고려하였을 시, ENMC 기준에 따라 극심한 선천성 형에 해당된다. 혈액검사에서 CK는 정상이거나 약간 상승되어 있고, 이는 근육의 손상을 의미하며 환아의 경우도 294 U/L (26-192)로 상승 소견을 관찰할 수 있었으나 이는 네말린 병증을 진단할 수 있는 요소는 아니다. 현재까지는 진단을 위해서는 관절 구축, 호흡 장애, 연하 장애 등의 임상증상을 통해서 진단을 유추하고, 근전도검사, 조직검사를 시행한 이후 유전학적 검사를 진행 하였다⁸⁾. 하지만 환아는 기계 환기 치료 중인 상태였기에 근전도검사 및 근육 조직검사를 시행하지 못하였다. 따라서 확진을 위해 염기서열 분석 등의 유전학적 검사법의 도움을 받았고, 이 증례에서는 유전적 근육퇴행위축 질환의 유전자 변이를 알아보기 위하여 NGS를 이용하였다. 이전 연구에 따르면 Lee 등¹⁾과 Park 등⁹⁾은 임상증상과 근조직검사에

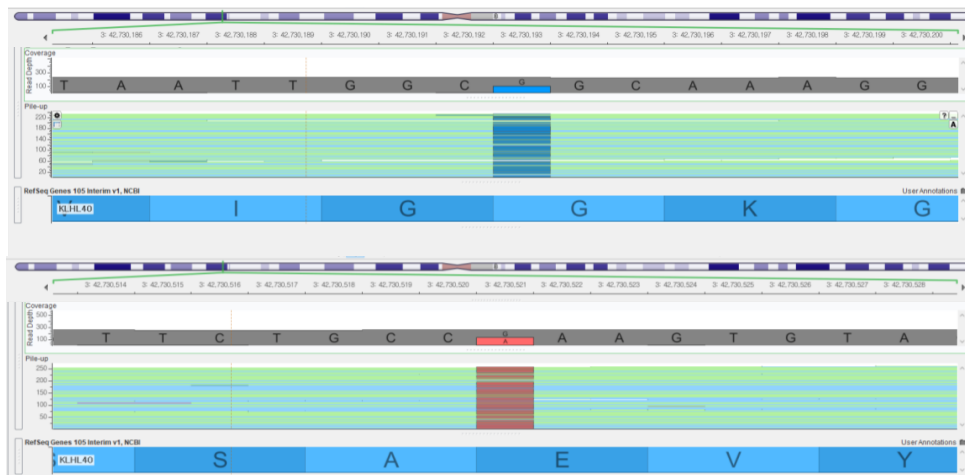


Figure 3. Next generation sequencing analysis showing compound heterozygous mutations in the gene *KLHL40*: *KLHL40* c.[1405G>T];[1582G>A] (p.[Gly469cys];[Glu528Lys]).

서 네말린 근병증으로 진단받은 환자들을 대상으로 하여 전체 엑솜 염기서열 분석법(whole exome sequencing, WES) 및 Sanger 염기서열 분석법(Sanger sequencing)을 사용하였다. 그러나 Moreau-Le Lan 등²⁾과 Piga 등¹⁰⁾은 네말린 근병증은 유전적 이질성을 가진 질환이고, *NEB* 유전자가 183개의 엑손을 가지고 있는 크고 복잡한 유전자라는 구조 특성상 기존의 염기서열 분석법을 사용할 경우 시간 소비적이며 비용적으로 비싸고, 근병증 관련 새로운 유전자들이 증가하고 있는 추세로 엑솜 염기서열 분석법 및 Sanger 염기서열 분석법보다 NGS가 더 효율적이라고 밝히고 있다. Lee 등¹⁾에서는 *NEB* 유전자의 경우 엑손 82에서 105까지 반복되는 구간이 있어 정확한 길이를 읽는 데에 WES는 제한이 되지만 NGS를 이용하였을 시, 이 제한점을 극복 할 수 있다고 기술하였다. 본 증례에서는 신생아기에 발병되는 네말린 근병증의 대표적인 증상을 보였고, NGS를 통하여 다음과 같은 유전자검사를 시행하였고 이를 통해 *KLHL40* 병적 변이를 발견하였다: *ACTA1*, *ATP2A1*, *BAG3*, *BIN1*, *CCDC78*, *CFL2*, *CLCN1*, *CNTN1*, *CRYAB*, *DAG1*, *DOK7*, *DYNC1H1*, *FHL1*, *FLNC*, *GAA*, *GNE*, *IGHMBP2*, *ITGA7*, *KBTBD13*, *KLHL40*, *KLHL41*, *LOB3*, *MTM1*, *MYH7*, *NEB*, *PABPN1*, *POLG*, *RYR1*, *SGCE*, *SYNE1*, *TNNT1*, *TPM2*, *TPM3*, *TRIM32*, *TRPV4*, *VCP*, *VPS13A*, *VRK1*. 본 증례에서 보인 *KLHL40* 유전자의 c.1405G>T (p. Gly469Cys) 변이는 일반 인구집단에서 보고된 바 없는 매우 드문 변이이며, 가상 예측에서 단백질 기능이 손실되었다고 예측되며 ClinVar에서 병적 변이로 분류되어 있다(PMID: 23746549, 25721947). c.1582G>A (p. Glu528Lys) 변이는 전체 인구집단에서 경미한 대립 유전자 빈도(minor allele frequency)로써 0.0061% 확률로 매우 드물게 보고되며, 한국인 인구집단에서는 0.36%인 변이로 가상 예측에서 단백질 기능이 손실되었다고 예측되었고, ClinVar에서 병적 변이로 등록되어 있다(PMID: 23746549). Lee 등¹⁾과 Park 등⁹⁾의 연구에서 출생 시 증상이 있어도 최종 진단되는 데 걸린 시간은 3개월이 걸렸으나, 본 증례의 경우 NGS를 확진 검사로 시행함으로써 최종 진단까지 1개월의 시간이 걸렸다. 이처럼 빠른 확진을 통하여 질병의 예후를 예측하고, 치료 계획 수립에 큰 도움이 되었으며 추후 부모의 유전 상담을 진행할 수 있었다. 또한 이전에는 근조직검사와 같은 침습적인 방법으로 확진할 수 밖에 없었으나 본 증례처럼 최근에는 침습적 방법 없이도, 유전적 검사를 통하여 선천성 근병증을 쉽게 확진 할 수 있다는 점에서도 이 증례는 의의가 있다.

본 증례에서 확인된 *KLHL40*의 c.1405G>T (p. Gly469Cys) 변이에 대해 일본에서 증례 보고가 있으며, 미스센스 돌연변이(missense mutation)로 인해 단백질이 불안정화되어 네말린 근병증이 발생하게 되며⁶⁾, Kawase 등⁸⁾에 의하면 본 증례처럼 태어나자마자 청색증, 호흡 곤란, 전반적 근긴장도 저하가 있었으며, 본 증례와는 다르게 태아 수종(폐 흉수, 전신부종)이 있었다. 근조직검사 시행 후 유전학적 검사를 시행하였으며 c.1405G>T (p. Gly469Cys)의 동형 접합

변이를 확인하였다. 일본에서 네말린 근병증을 일으키는 가장 흔한 *KLHL40*의 변이는 c.1582G>A (p. Glu528Lys)로 알려져 있으나, c.1582G>A (p. Glu528Lys) 복합 이형 접합성이 있는 경우가 없는 경우에 비해 임상증상이 양호하다고 밝혔다⁶⁾. 본 증례는 복합 이형 접합으로 c.1582G>A (p. Glu528Lys) 변이를 가지고 있어 Kawase 등⁸⁾의 증례와 비교할 시 기관 삼관을 9개월까지 지속하여 기관 절개를 시행한 경우에 비해, 빠르게 기계 환기 이탈을 하였다. Kawase 등⁸⁾에서는 외관상의 특이 소견은 보이지 않았으나, 본 증례에서는 양안 격리증, 짧은 인중, 하악 발육 부전, 긴 손가락/발가락 등의 외관상 특징이 있었다. 또한, 우측 위팔뼈와 양측 대퇴골의 골절이 Kawase 등⁸⁾에서는 발견되었으나, 본 증례에서는 골절 소견은 보이지 않았다. 인도의 증례 발표에 의하면 *KLHL40* 돌연변이에 의한 네말린 근병증에서 구개 파열이 발견되었다고 한다¹¹⁾.

우리나라의 경우, 네말린 근병증 환자의 33.3%가 *NEB* 돌연변이였으며, 44.7%가 소아기 발병 형 임이 확인 되었다¹⁷⁾. 신생아기 발병에서는 호흡곤란, 근긴장 저하로 기계 환기를 유지하였으나, 소아기 발병 형의 경우 걸음 장애가 가장 흔한 증상으로 나타났다. Lee 등¹⁾과 Park 등⁹⁾의 국내 연구에서는 *NEB* 이외 *TPM3*, *ACTA1*의 돌연변이는 발견되었으나, *KLHL40* 돌연변이는 발견되지 않았다.

최근 *KLHL40* 돌연변이 네말린 근병증 치료에 있어 아세틸콜린 에스테라아제 억제제가 효과적인 반응을 보였다는 연구 결과에 따라 현재 가는 필라멘트 및 그들 사이의 연결 단백질을 타깃으로 하여 약물 연구가 동물 모델에서 진행 중이나 아직 구체적인 연구결과는 없다¹²⁾.

결국 네말린 근병증은 다양한 유전자 돌연변이가 상염색체 우성 및 열성으로 유전되는 질환으로 정확한 분자 유전학적 진단을 통해 환자 및 가족에게 질환에 대한 정보 및 예방, 조기 치료를 제공하는 유전 상담이 중요하다. 그러므로 본 증례처럼 정확하고 빠른 진단을 위해 우선적으로 NGS를 이용하는 것을 고려해 볼 수 있겠다.

ARTICLE INFORMATION

Ethical statement

This study was approved by the Institutional Review Board of Ajou University Hospital (IRB No. AJIRB-MED-EXP-20-285). Informed consent was waived by the board due to a retrospective nature of our study.

Conflicts of interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Author contributions

Conception or design: Y.S., J.H.L.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: Y.S., M.S.P., J.H.L., Y.B.S.

Drafting the work or revising: Y.S., M.S.P., J.H.L., Y.B.S.

Final approval of the manuscript: J.H.L.

ORCID

Yoong-a Suh <https://orcid.org/0000-0002-7772-4686>

Jang Hoon Lee <https://orcid.org/0000-0003-4765-9948>

Acknowledgments

None

REFERENCES

1. Lee JM, Lim JG, Shin JH, Park YE, Kim DS. Clinical and genetic diversity of nemaline myopathy from a single neuromuscular center in Korea. *J Neurol Sci* 2017;383:61-8.
2. Moreau-Le Lan S, Aller E, Calabria I, Gonzalez-Tarancon L, Cardona-Gay C, Martinez-Matilla M, et al. New mutations found by next-generation sequencing screening of Spanish patients with nemaline myopathy. *PLoS One* 2018;13:e0207296.
3. Ryan MM, Schnell C, Strickland CD, Shield LK, Morgan G, Iannaccone ST, et al. Nemaline myopathy: a clinical study of 143 cases. *Ann Neurol* 2001;50:312-20.
4. Romero NB, Sandaradura SA, Clarke NF. Recent advances in nemaline myopathy. *Curr Opin Neurol* 2013;26:519-26.
5. Wallgren-Pettersson C, Lehtokari VL, Kalimo H, Paetau A, Nuutilinen E, Hackman P, et al. Distal myopathy caused by homozygous missense mutations in the nebulin gene. *Brain* 2007;130(Pt 6):1465-76.
6. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, et al. Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 2013;93:6-18.
7. Wang Q, Hu Z, Chang X, Yu M, Xie Z, Lv H, et al. Mutational and clinical spectrum in a cohort of Chinese patients with hereditary nemaline myopathy. *Clin Genet* 2020;97:878-89.
8. Kawase K, Nishino I, Sugimoto M, Togawa T, Sugiura T, Kouwaki M, et al. Nemaline myopathy with KLHL40 mutation presenting as congenital totally locked-in state. *Brain Dev* 2015;37:887-90.
9. Park YE, Shin JH, Kim HS, Lee CH, Kim DS. Characterization of congenital myopathies at a Korean neuromuscular center. *Muscle Nerve* 2018;58:235-44.
10. Piga D, Magri F, Ronchi D, Corti S, Cassandrini D, Mercuri E, et al. New mutations in NEB gene discovered by targeted next-generation sequencing in nemaline myopathy Italian patients. *J Mol Neurosci* 2016;59:351-9.
11. Avasthi KK, Agarwal S, Panigrahi I. KLHL40 mutation associated with severe nemaline myopathy, fetal akinesia, and cleft palate. *J Pediatr Neurosci* 2019;14:222-4.
12. Haliloglu G. Nemaline rod myopathy. In: Robert MK, Joseph WST, Nathan JB, Samir SS, Robert CT, Karen MW, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 21st ed. Philadelphia: Elsevier, 2020:3264-6.