



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0034415
(43) 공개일자 2012년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0095967
(22) 출원일자 2010년10월01일
심사청구일자 2012년03월09일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김기수
서울특별시 강남구 연주로 107, 현대 2차아파트
208동 804호 (개포동)
고정민
서울특별시 강남구 남부순환로395길 10, - 1동
509호 (대치동, 선경아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

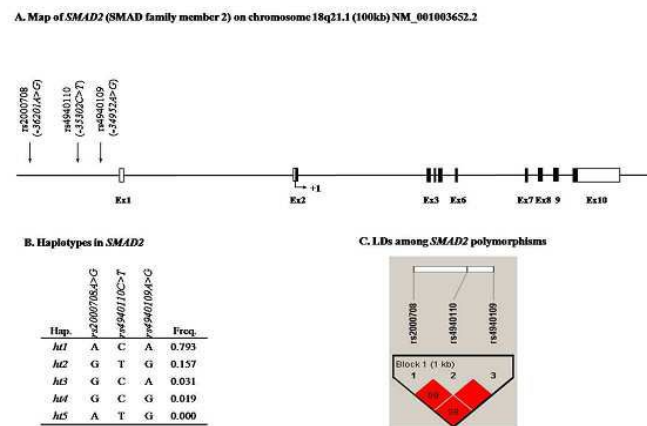
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 골밀도 마커 및 이를 이용한 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험의 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 골밀도 마커 및 이를 이용한 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험의 예측 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 또는 -34952A>G (rs4940109), 또는 일배체형 중 ht1 또는 ht2는 골다공증 지표인 골밀도와 밀접한 관련이 있으며, 이를 마커로 이용할 경우 골다공증의 유전적 소인을 사전에 예측할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김신윤

대구광역시 남구 효성중앙길 38, 효성아파트 205동
805호 (봉덕동)

박의균

대구광역시 수성구 교학로5길 67 (만촌동)

이종영

경기도 고양시 일산서구 일산로 808, 304동 803호
(대화동, 장성마을)

한복기

서울특별시 종로구 평창24길 19, 롯데아파트
101-1104호 (평창동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A010252

부처명 보건복지부

연구사업명 골격계유전체센터

연구과제명 골다공증 후보 유전자군의 한국인 특이 SNP 발견 및 골다공증 관련 유전자 규명

주관기관 한국보건산업진흥원

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 및 -34952A>G (rs4940109)로 이루어진 군에서 선택된 골밀도(bone mineral density) 마커.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G는 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되며, -35302C>T는 요추, 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되며, -34952A>G는 요추, 대퇴골 경부, 전체 대퇴골 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되는 것을 특징으로 하는 골밀도 마커.

청구항 3

SMAD2 유전자의 일배체형 중 SMAD2 유전자의 변역 개시 지점으로부터 -36201번째 염기(rs2000708)가 A이고 -35302번째 염기(rs4940110)가 C이고 -34952번째 염기가 A(rs4940109)인 일배체형 ht1, 또는 SMAD2 유전자의 변역 개시 지점으로부터 -36201번째 염기(rs2000708)가 G이고 -35302번째 염기(rs4940110)가 T이고 -34952번째 염기가 G(rs4940109)인 일배체형 ht2인 골밀도 마커.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 일배체형 ht1은 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되며, 상기 일배체형 ht2는 요추, 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되는 것을 특징으로 하는 골밀도 마커.

청구항 5

시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

시료로부터 추출한 DNA로부터 청구항 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 골밀도 마커를 검출하는 단계; 및

상기 골밀도 마커를 확인하는 단계를 포함하는 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험의 예측 방법.

청구항 6

SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 및 -34952A>G (rs4940109) 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트, 증폭효소, 뉴클레오타이드 및 완충액을 포함하는 골다공증 및 골다공성 골절의 발생 위험의 예측 및 진단용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 골밀도 마커 및 이를 이용한 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험의 예측 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 골다공증(osteoporosis)은 낮은 골밀도(bone mineral density; BMD) 및 골 손실(bone loss)의 특징을 갖는 전신성 골 질환(systemic bone disease)으로서, 골절 위험성을 높일 수 있다. 다중 위험 인자가 골다공증 발명에 영향을 미침에도 불구하고, 유전적 인자가 주로 관여되며, 쌍둥이 및 가족 연구 결과에 따르면 BMD에서의 변이의 약 50-86%가 이들 유전인자에 의해 설명된다(Arden NK, Spector TD (1997) Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bonemineral density: a twin study. J Bone Miner Res 12:2076-2081, Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC, Jr. (1991) Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. J Bone Miner Res 6:561-567). 골다공증은 파골세포(osteoclast)에

의한 골 흡수(bone resorption)가 조골세포(osteoblast)에 의한 골 형성을 초과하여 발생되는 골 리모델링의 불균형에 의해 야기된다. 따라서, 조골세포 또는 파골세포의 활성화 및 기능과 관련된 유전자는 BMD 및 골다공증에 대한 유전적 영향을 밝히는데 있어 잠재적 후보이다.

[0003] SMAD 단백질은 TGF- β (transforming growth factor- β)의 슈퍼패밀리(superfamily)의 중요한 세포내 신호 변환기(intracellular signal transducer)로서, 세포 증식, 세포자살(apoptosis) 및 분화와 같은 중요하고 다양한 프로세스를 조절한다. R-SMAD(receptor-regulated SMAD)는 막 결합 세린/트레오닌 수용체(membrane bound serine/threonine receptor)와 결합하고, 상기 수용체의 키나아제(kinase) 활성화에 의해 활성화된다. 세포질(cytoplasm)에서 상기 활성화된 R-SMAD는 SMAD4와 결합하고, 이러한 이형질 SMAD 복합체(heteromeric SMAD complex)는 유전자 발현을 조절하는 핵으로 이동한다. SMAD2는 R-SMAD 중 하나이며, 특히 TGF- β 및 액티빈(activin) 신호 경로를 매개한다(Song B, Estrada KD, Lyons KM (2009) Smad signaling in skeletal development and regeneration. Cytokine Growth Factor Rev 20:379-388).

[0004] TGF- β 는 골 기질(bone matrix)에 많이 존재한다. 이 단백질은 조골세포에 의해 생산되고, 조골세포의 증식 및 기질 침착(matrix deposition)을 자극하고 조골세포의 세포자살을 억제함으로써, 골 형성에 역할을 한다(Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005) Transforming growth factor-beta to the bone. Endocr Rev 26:743-774).

[0005] 이와는 대조적으로, TGF- β 는 파골세포 세포자살의 잠재적 유도인자(inducer)이며, 파골세포의 형성 및 활성화를 늦춘다(Houde N, Chamoux E, Bisson M, Roux S (2009) Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1) Induces Human Osteoclast Apoptosis by Up-regulating Bim. J Biol Chem 284:23397-23404, Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y (1998) Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. J Biol Chem 273:27091-27096). 따라서, TGF- β 1, 즉, 뼈에서 가장 풍부한 아형(isoform), 부족한 마우스는 골 중량(bone mass)이 감소되었다(Geiser AG, Zeng QQ, Sato M, Helvering LM, Hirano T, Turner CH (1998) Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene. Bone 23:87-93). 액티빈은 역시 골 대사(bone metabolism)에 중요한 역할을 한다. 실험관 내 연구는 쥐 세포(murine cell)에서 조골세포 및 파골세포 둘 모두의 분화를 자극하며, 이는 골 리모델링에 긍정적인 효과를 가한다(Nicks KM, Perrien DS, Akel NS, Suva LJ, Gaddy D (2009) Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin. Mol Cell Endocrinol 310:11-20).

[0006] 액티빈의 국부 주입은 골절 치료(Sakai R, Miwa K, Eto Y (1999) Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. Bone 25:191-196), 전신 주입은 난소제거 래트에서 골 중량 및 골 강도를 유지시켜준다(Sakai R, Fujita S, Horie T, Ohyama T, Miwa K, Maki T, Okimoto N, Nakamura T, Eto Y (2000) Activin increases bone mass and mechanical strength of lumbar vertebrae in aged ovariectomized rats. Bone 27:91-96).

[0007] TGF- β 및 액티빈의 세포내 유도인자로서의 SMAD2가 골 대사에 중요한 역할을 할 수 있다. 그런데, 골 중량에 있어서의 SMAD2의 유전적 영향에 대해서는 어떠한 연구도 이루어지지 않았다. 그런데, 골밀도는 골다공증을 진단하는 것은 골다공증을 진단하는데 필요한 중요한 요소 중의 하나로 이를 정확히 측정하는 것은 골다공증을 진단하는 것뿐만 아니라 골절의 위험도를 판단하고 치료 효과를 파악하는데 중요하다. 따라서, 골밀도와 관련된 유전적 소인에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 발명자들은 최초로 골밀도에 있어서의 SMAD2의 유전적 영향을 알아보기 위하여, 폐경기 여성에서 SMAD2의 유전적 변이와 골밀도와의 연관성을 조사하여, 3개의 단일염기다형성과 2개의 일배체형이 골밀도와 연관됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 목적은 골밀도와 연관되는 SMAD2 유전자의 단일염기다형성 마커 및 일배체형 마커를 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 골밀도 마커를 이용하는 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험의 예측 방법을 제공하는

데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 피험자의 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험을 예측하는데 유용한 키트를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 및 -34952A>G (rs4940109)로 이루어진 군에서 선택된 골밀도(bone mineral density) 마커를 제공한다.

[0013] 상기 골밀도는 골다공증 및 골다공성 골절의 지표가 된다.

[0014] 상기 SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G는 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되며, -35302C>T는 요추, 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되며, -34952A>G는 요추, 대퇴골 경부, 전체 대퇴골 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관된다.

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SMAD2 유전자의 일배체형 중 SMAD2 유전자의 변역 개시 지점으로부터 -36201번째 염기(rs2000708)가 A이고 -35302번째 염기(rs4940110)가 C이고 -34952번째 염기가 A(rs4940109)인 일배체형 ht1, 또는 SMAD2 유전자의 변역 개시 지점으로부터 -36201번째 염기(rs2000708)가 G이고 -35302번째 염기(rs4940110)가 T이고 -34952번째 염기가 G(rs4940109)인 일배체형 ht2인 골밀도 마커를 제공한다.

[0016] 상기 일배체형 ht1은 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관되며, 상기 일배체형 ht2는 요추, 대퇴골 경부, 전체 대퇴골, 전자부 및 대퇴골 간부의 골밀도와 연관된다.

[0017] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 시료로부터 추출한 DNA로부터 골밀도 마커를 검출하는 단계; 및 상기 골밀도 마커를 확인하는 단계를 포함하는 골다공증 및 골다공성 골절 발생 위험의 예측 방법을 제공한다.

[0018] 상기 시료는 혈액, 피부 세포, 점막 세포 또는 모발 등을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 골밀도 마커를 검출하는 단계는 DNA 시퀀싱 분석, 마이크로어레이에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 대립유전자 혼성화, PCR-SSCP 분석, RFLP 분석, TaqMan 분석 또는 DNA칩 분석에서 선택된 어느 하나의 분석법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0020] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 및 -34952A>G (rs4940109) 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트, 증폭효소, 뉴클레오타이드 및 완충액을 포함하는 골다공증 및 골다공성 골절의 발생 위험의 예측 및 진단용 키트를 제공한다.

[0021] 상기 키트는 SMAD2 유전자의 단일염기다형성 중 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 및 -34952A>G (rs4940109) 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 포함하고, 이를 이용한 PCR 산물을 수득하여 염기서열을 분석함으로써 -36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110) 및 -34952A>G (rs4940109)의 단일염기다형성 및 이들의 일배체형 ht1(SMAD2 유전자의 변역 개시 지점으로부터 -36201번째 염기(rs2000708)가 A이고 -35302번째 염기(rs4940110)가 C이고 -34952번째 염기가 A(rs4940109)), 또는 ht2(SMAD2 유전자의 변역 개시 지점으로부터 -36201번째 염기(rs2000708)가 G이고 -35302번째 염기(rs4940110)가 T이고 -34952번째 염기가 G(rs4940109))을 확인하여 골다공증 및 골다공성 골절을 예측할 수 있다.

[0022] 상기 프라이머쌍은 상기 다형성 부위를 증폭할 수만 있다면 크기 및 주형에 결합하는 위치가 제한되지 않으며, 당업자라면 통상의 프라이머 선정용 소프트웨어를 이용하여 용이하게 프라이머 디자인이 가능하다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 SMAD2 유전자의 골밀도 마커는 골다공증 및 골다공성 골절의 발생 위험에 대한 유전적 소인에 대한 유용한 마커를 이용할 수 있다. 또한, 상기 골밀도 마커를 이용하여 피검자의 골다공증 또는 골다공성 골절에 대한 위험성에 대한 감수성을 예측하거나 진단할 수 있을 뿐 아니라, 골다공증 및 골다공성 골절의 발생 위험의 예측 및 진단용 키트를 개발할 수 있어 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 SMAD2의 유전자 지도(gene map), 일배체형(haplotype) 및 연관불균형(LD) 계수를 나타내는 도면이다. 코딩 엑손은 검정 블록으로 나타내며, 5' - 및 3' -번역되지 않은 영역(UTRs)은 흰색 블록으로 나타내며, 번역 개시 지점의 첫 번째 염기를 뉴클레오티드 '+1'로 나타내었다. 다형성(polymorphism)은 1,329명의 피험자를 유전자형 분석한 결과이다.

도 1의 A는 염색체 13q21.1(참조 게놈 시퀀스 번호(reference genome sequence)는 NM_001003652.2) 상의 SMAD2에서 확인된 다형성을 나타낸다.

도 1의 B는 SMAD2 다형성의 일배체형 빈도를 나타낸다.

도 1의 C는 SMAD2 다형성 사이의 LD 블록 및 상관계수를 나타낸다. 붉은색 칸(red square)은 D' 통계치(statistic)로 측정된 단일염기다형성(SNP)의 한 쌍 사이에 통계학적으로 유의한 대립 유전자 연관성(allelic association)을 나타내며, 붉은색의 음영들이 짙을수록 최대 1까지의 높은 D' 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 참고예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] <실시예>

[0027] 1. 피험자(subjects)

[0028] 본 실시예에 따른 피험자는 서울 아산병원을 방문한 폐경기 여성 1,329명을 대상으로 하였다. 폐경은 적어도 1년 동안 월경이 부재된 것으로 정의되며, 혈청 난포 자극 호르몬(serum follicle-stimulating hormone) 수치를 측정함으로써 확인하였다. 조기폐경(40세 미만)을 경험한 여성, 및 골 대사(예를 들어, 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 성 호르몬, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 또는 골다공증을 위한 다른 치료들)에 영향을 미치는 약물을 6개월 이상 복용한 환자 또는 상기 약물을 12개월 전에 복용한 환자는 본 실시예에서 제외시켰다. 또한, 당뇨병, 암, 부갑상선기능항진증(hyperparathyroidism) 또는 류마티스관절염(rheumatoid arthritis)과 같이 골 대사에 영향을 미칠 수 있는 질환을 겪을 환자도 본 실시예에서 제외시켰다. 물리적 행동 장애의 우려가 있는 뇌졸중 발작(stroke)으로 고통 받거나, 치매(dementia)를 앓고 있는 환자도 그들의 제한된 물리적 활동성으로 인한 영향 등을 고려하여 본 실시예에서 배제하였다. Nathan 분류법(Nathan M, Pope MH, Grobler LJ (1994) Osteophyte formation in the vertebral column: a review of the etiologic factors--Part II. Contemp Orthop 29:113-119)의 4등급을 넘는 골증식체(Osteophyte) 형성이 있는 경우 및/또는 통상의 척추 방사선 사진에서 확인되는 요추(lumbar spine)에 심각한 후관절 관절염(facet joint osteoarthritis)이 있는 경우에는 피험자에서 배제하였다. 실험은 서울아산병원(AMC)의 윤리위원회의 승인을 받았으며, 각 대상자에게 서명동의서를 받았다.

[0029] 2. 골밀도(Bone mineral density; BMD) 측정 및 골다공증에 의한 골절(osteoporotic fracture) 평가

[0030] 834명의 여성은 Lunar 장치(Lunar, Expert XL, Madison, WI)를 이용하여 이중 에너지 엑스레이 흡수 계측법(dual-energy X-ray absorptiometry)으로, 요추(L2-L4) 및 대퇴골 경부(femur neck)에서의 면적 골밀도(Areal BMD) (g/cm³)를 측정하였다. 나머지 495명의 여성은 Hologic 장치(Hologic, QDR 4500-A, Waltham, MA)를 이용하여 골밀도를 측정하였다. 변동계수(variation coefficient)로 나타내는 Lunar 및 Hologic 장치의 정밀도(precision)는 각각 요추에서 0.82% 및 0.85%, 대퇴골 경부에서 1.12% 및 1.20%이었다. 상기 값(value)은 본 실시예에 참여하지 않은 17명의 지원자를 스캔함으로써 얻은 결과이다. 각각의 지원자는 동일 자에 5번 스캔을 되었으며, 매 측정사이마다 테이블 위에 오르고 내려왔다. 두 시스템 사이의 교차보정식(cross-calibration equation)을 유도하기 위하여, Lunar 장치와 Hologic 장치를 이용하여 109명의 건강한 한국 여성(평균 연령 55±11세(평균±표준편차), 범위 31-75세)을 BMD 값을 측정하였고, 교차보정식(cross-calibration equation)은 하기 수학적 1 및 수학적 2와 같다(Jo JM KJ, Kim GS, Kim SW, Shin JW, Moon DH, Lee HK (1999) Cross-calibration of bone mineral density between two different dual X-ray absorptiometry systems: Hologic QDR 4500-A and Lunar EXPERTXL Korean J Nucl Med 33:282-288).

[0031] [수학적 1]

[0032] L2-L4 BMD(g/cm³): Lunar = 1.1287 × Hologic - 0.0027

- [0033] [수학식 2]
- [0034] 대퇴부 경부 BMD(g/cm³): Lunar = 1.1556 × Hologic - 0.0182
- [0035] 추가적으로, 다른 대퇴골 근위부(proximal femur)에서 BMD 값을 측정하였다. Hologic 장치로 대퇴골 간부(femur shaft)는 측정하지 않았다. 따라서, 대퇴골 간부 및 다른 대퇴골 근위부(예를 들어, 전체 대퇴골(femur), 전자부(trochanter) 및 Ward 삼각(Ward's triangle))에서의 BMD 값은 각각 571명 및 839명의 지원자로부터 입수하였다. 본 실시예의 피험자로부터 측부 흉추요추부(lateral thoracolumbar) T4-L4 방사선사진(radiograph)을 수득하였다. 척추 골절에 대한 실무그룹(Working Group on Vertebral Fractures)의 권고에 따라 척추 골절을 분석하였다(Kiel D (1995) Assessing vertebral fractures. National Osteoporosis Foundation Working Group on Vertebral Fractures. J Bone Miner Res 10:518-523). 척추 골절은 측정된 추체 높이(vertebral height) (예를 들어, 전방(anterior), 중부(middle) 또는 후방(posterior))의 20% 이상이 정량적으로 감소된 것으로 정의 하였다(Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC (1993) Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. J Bone Miner Res 8:1137-1148). 비-척추 골절(예를 들어, 손목, 엉덩이, 전완, 상완, 늑골 및 골반)은 자가-리포트에 의해 평가되었다. 골절 중 교통사고 또는 신장 이상의 높이에서의 낙상과 같은 중증 외상에 의해 발생한 명백한 골절 환자는 제외되었다.
- [0036] 3. 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 선택 및 유전자형 분석(genotyping)
- [0037] 프로모터 영역의 변이가 단백질의 전사 및/또는 발현 수준을 조절함으로써, 중요한 역할을 수행할 수 있기 때문에, SMAD2의 프로모터 영역을 분석하였다. SMAD2의 프로모터 영역의 단일염기다형성(SNP)은 dbSNP 데이터베이스(www.hapmap.org)를 이용하여 조사하였으며, 하기 기준으로 평가되었다.
- [0038] 기준 (1): 이형 접합률(예를 들어, 소수 대립 유전자(minor allele) 빈도가 0.1 이상)
- [0039] 기준 (2): 유효 상태(validation status)
- [0040] 본 실시예에서는, 상기 기준을 이용하여 3개의 프로모터 단일염기다형성(-36201A>G (rs2000708), -35302C>T (rs4940110), 및 -34952A>G (rs4940109))이 선택되었고, 분석되었다. 상기 rs 번호는 NCBI dbSNP에 공식적으로 등록된 SNP의 번호를 의미한다. 상기 다형성 자리의 유전자형 분석을 위하여, TaqMan 기법을 위해 DNA 증폭을 위한 프라이머, 및 프로브를 Primer Express (Applied Biosystems)를 이용하여 디자인하였다(Livak KJ (1999) Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. Genet Anal 14:143-149). 하나의 대립 유전자 프로브(allelic probe)는 FAM 염색약으로 표지하였으며, 다른 대립 유전자 프로브는 VIC 형광 염색약으로 표지하였다. 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction)은 우라실 DNA 글리코실라제(uracil DNA glycosylase; UNG, Applide Biosystems)가 없는 TaqMan Universal Master mix, 900nM의 PCR 프라이머 및 200nM의 TaqMan MGB-프로브를 이용하여 수행하였다. 반응은 20ng의 게놈 DNA를 사용하여 전체 5mL의 부피로 384-웰 플레이트를 사용하는 형식으로 수행하였다. 플레이트는 서멀 사이클러(thermal cycler)(PE 9700, Applied Biosystems)에서 50℃에서 2분간, 그리고 나서 95℃에서 10분으로 가열한 다음, 95℃ 15초 및 60℃ 1분의 40사이클로 수행되었다. 형광 세기(fluorescence intensity)를 Prism 7900HT 기기(Applied Biosystems)를 이용하여 측정하였고, 자동화 소프트웨어(SDS 2.1, Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다.
- [0041] 4. 통계(statistics)
- [0042] χ^2 검정을 본 개체군의 각 (locus)에서 각 개개의 변이체가 평형상태인지(하디-와인버그 평형; Hardy-Weinberg equilibrium)를 결정하기 위하여 사용하였다. 이대립유전자 좌위(biallelic loci)의 모든 쌍 사이에서 요소간 쌍대비교(Pair wise Comparison)에 의해 Lewontin의 D' ($|D'|$) 및 LD 계수(linkage disequilibrium coefficient, r^2)를 검사하였다(Hedrick PW (1987) Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. Genetics 117:331-341). Haploview version 3.2(Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) 소프트웨어를 LD 블록(LD block) 구조를 조사하는데 이용하였다(Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 21:263-265). 상기 프로그램은 D' 및 LOD 값(odd의 log 값)으로부터 유도한 네 개의 생식자 빈도(gamete frequency)의 최대우도(maximum-likelihood) 값을 측정하기 위하여 2개 마커의 기댓값 최대화(expectation maximization; EM)를 사

용하였다. 각 개체의 일배체형을 스테판 등(Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet 68:978-989)에 의해 개발된 PHASE 알고리즘을 사용하여 유추하였다. PHASE 알고리즘은 개체군 유전적 특징(population genetics) 및 융합 이론(coalescence theory)에 기초하는 일배체형 구조(haplotype structure)의 우선기대치(priori expectation)를 통합한 베이저안 접근법 (Bayesian approach)을 사용한다. PHASE 소프트웨어 (ver 2.0)를 사용하여 각 개체에 대해 모든 일배체형 다형성 부위의 페이즈 확률을 계측했다. 97% 미만의 페이즈 확률(phase probability)을 갖는 개체는 분석에서 제외하였다. 유추된 해플로타입(hts)의 유전적 효과를 다형성의 분석과 같은 방법으로 분석하였다. 연령, 폐경이후 연차(years since menopause; YSM), 체중, 및 공변수(covariate)로서 신장(height)을 이용하여, 요추 및 대퇴골 경부에서 SMAD2 다형성에 대해 BMD의 다중회귀분석(Multiple regression analyses)을 수행하였다. 다른 대퇴골 근위부(예를 들어, 전체 대퇴골, 전자부 및 Ward 삼각)에서 BMD 값과 SMAD2 유전자 변이체(genetic variation) 사이의 연관성(association)을 본 모델에서 공변수로서 골 밀도(bone densitometry)로 추가적인 통계학적 조정(statistical adjustment)을 이용하여 결정하였고, 이는 한국인 여성에서 이 부위에서 상기 교차 보정식을 이용할 수 없었기 때문이다. 골절 및 비골절 피험자 사이의 유전자형 및 ht 분포는 연령, 폐경이후 연차(YSM), 체중 및, 신장을 제어한 로지스틱 회귀분석(logistic regression)을 이용하여 분석되었다. 우성 동형접합체(major homozygote), 이형 접합체(heterozygote), 및 열성 동형 접합체(minor homozygote)의 유전자형에 대해, 공동우성(codominant), 우성(dominant) 및 열성(recessive) 모델에서 각각 0, 1 및 2; 0, 1 및 1; 및 0, 0 및 1의 코드를 부여했다. 소프트웨어 SNPSpD를 이용하여 SMAD2의 독립적인 마커 좌위의 유효 수(effective number)를 계산하여 다중 검정(multiple testing)을 보정하였는데, 상기 소프트웨어는 단일염기다형성(SNP) 사이의 쌍별 LD(pairwise LD)의 행렬의 스펙스럼 분해(spectral decomposition; SpD)에 기초한 것이다(Nyholt DR (2004) A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. Am J Hum Genet 74:765-769). 결과적으로 수득된 독립적인 마커 좌위의 수를 다중 검정을 위한 보정에 적용하였다. 모든 통계학적 분석은 SAS (SAS Institute, Cary, NC)를 이용하여 수행하였다.

5. 결과

폐경기 여성(n=1,329)에 있어서, 연관성 분석 전에 세 개의 선택된 단일염기다형성을 유전자형 분석을 하였다. 피험자의 임상정보(clinical profile) 및 요추 및 대퇴골 경부의 BMD와 연령, 체중, 신장 및 YSM과의 독립적인 연관성(상관관계)은 표 1에 나타났다. 표 1은 폐경기 여성(n=1,329)에서 임상정보와 골밀도(BMD)의 다중회귀분석 결과이다. 상기 표에서 값(value)은 모든 다른 변수(variable)에 따라 조정되었으며, YSM은 폐경이후 연차, β 는 회귀 계수, SE는 표준오차를 각각 나타낸다. 피험자의 평균 연령은 59.1 ± 7.3 세(범위 45~87세)였고, 평균 YSM은 9.7 ± 7.8 년(범위 1~42년)이었다. 예상했던 바와 같이, 연령 및 YSM은 요추 및 대퇴골 경부 영역에서의 BMD는 음의 상관관계에 있었고, 반면에 체중은 상기 두 영역의 BMD와 양의 상관관계에 있었다. 신장은 요추의 BMD와 양의 상관관계에 있었다.

표 1

임상정보		요추 BMD(g/cm ³)			대퇴골 경부 BMD(g/cm ³)		
변수	평균±표준 편차	β (회귀 계수)	표준 오차(standard error; SE)	P 값(P value)	β	표준 오차	P 값
연령(세)	59.1 ± 7.3	-0.005	0.001	<0.001	-0.005	0.001	<0.001
체중(kg)	56.2 ± 7.1	0.005	0.001	<0.001	0.003	0.001	<0.001
신장(cm)	155.0 ± 5.3	0.002	0.001	0.003	0.001	0.001	0.100
YSM(년)	9.7 ± 7.7	-0.003	0.001	0.004	-0.003	0.001	<0.001
-	-	조정된 R ² (adjusted R ²)=0.246			조정된 R ² =0.277		

3개의 단일염기다형성의 유전자형 빈도는 표 2에 나타났다. 표 2는 폐경기 여성에서 SMAD2 다형성의 빈도를 나타낸다. 하기 표 2에서 HWP*는 모든 피험자 사이의 하디-와인버그 평형(HWP)로부터 편차 *P값, MAF는 소수 대립 유전자 빈도(minor allele frequency)를 나타낸다.

표 2

[0047]

좌위(Loci)	위치(Location)	위치(position)	rs ID	유전자형				MAF	이형접합율(heterozygosity)	HWE*
-36201A>G	프로모터	43713416	rs2000708	AA	AG	GG	N	0.207	0.328	0.880
				835	438	56	1,329			
-35302C>T	프로모터	43712517	rs4940110	CC	CT	TT	N	0.158	0.266	0.096
				934	369	25	1,328			
-34952A>G	프로모터	43712076	rs4940109	AA	AG	GG	N	0.176	0.291	0.164
				894	401	34	1,329			

[0048]

모든 유전자형 분포는 하디-와인버그 평형($P>0.05$)에 있었다. 모든 관찰된 일배체형(ht)의 95.0%를 차지하는 세 개의 단일염기다형성의 2개의 공통 일배체형(빈도 0.05 초과)이 확인되었고 조사되었다(도 1B 참조). 요추 및 대퇴골 경부에서 SMAD2 다형성과 BMD와의 연관성을 연령, YSM, 체중, 및 신장을 공동변수로 이용하는 다중 회귀 분석을 이용하여 분석하였다(표 3 참조). P값은 SMAD2(P^{car})에서 독립적인 마커 좌위(1.398)의 유효 수에 의한 다중 검정으로 보정되었다. SMAD2 유전자의 3개의 단일염기다형성(SNP) 및 2개의 일배체형(ht)이 요추 및/또는 대퇴골 경부의 BMD와 유의하게 연관됨을 확인할 수 있었다. SMAD2의 -36201A>G 다형성이 단지 대퇴골 경부의 BMD와 연관됨에 비하여(공동우성 모델 및 우성 모델에서 각각 $P^{car}=0.018$ 및 $P^{car}=0.022$), -35302C>T 및 -34952A>G의 다형성은 요추 및 대퇴골 경부 모두에서 BMD와 통계학적으로 유의하게 연관되었다(공동우성 모델 및 우성 모델에서 $P^{car}=0.027-0.046$). 다중 비교(multiple comparison)를 위해 본페로니 보정(Bonferroni correction)을 엄격하게 적용하고 나서도(공동우성 모델 및 우성 모델에서 각각 $P^{bonf}=0.039$ 및 $P^{bonf}=0.048$), SMAD2의 -36201A>G 다형성이 대퇴골 경부의 BMD와 연관됨은 유지되었다. 요추 및 대퇴골 경부에서의 BMD에 대한 상기 3개의 단일염기다형성(SNP)의 유전적 영향(genetic effect)은 유전자 용량(gene dose) 의존적이다. 즉, 가장 높은 BMD는 희귀 대립 유전자(rare allele)의 동형 접합체, 중간 BMD는 이형 접합체, 가장 낮은 BMD는 공통 대립 유전자(common allele)의 동형 접합체에서 관찰되었다. 상기 공통 대립 유전자의 동형 접합체를 갖는 피험자와 희귀 대립 유전자의 동형 접합체를 갖는 피험자를 비교하면, 각각 요추 및 대퇴골 경부에서 2.6%-4.3% 및 3.2%-4.3% 더 높은 BMD 값을 가짐을 확인할 수 있었다. 또한, 일배체형(ht) 분석은 SMAD2-ht1이 단지 대퇴골 경부의 BMD와 연관됨에 비하여(공동우성 모델 및 우성 모델에서 각각 $P^{car}=0.024$ 및 $P^{car}=0.031$), SMAD2-ht2는 요추 및 대퇴골 경부 모두에서 BMD와 통계학적으로 유의하게 연관되었다(공동우성 모델 및 우성 모델에서 $P^{car}=0.020-0.035$). 본페로니 보정 후에도(우성 모델에서 $P^{bonf}=0.042$), SMAD2-ht2가 대퇴골 경부의 BMD와 유의적으로 연관됨은 유지되었다. 하기 표 3에서 피험자의 수와 BMD의 평균 및 표준편차를 나타냈다. *C/C, C/R 및 R/R은 각각 공통 대립 유전자의 동형 접합체, 이형 접합체, 희귀 대립 유전자의 동형 접합체를 나타낸다. [†]Pa, Pb, 및 Pc는 연령, 폐경이후 연차, 체중 및 신장을 제어하는 다중회귀분석에 대한 공동우성, 우성 및 열성 모델에서의 P-값을 각각 나타낸다. [‡]LD에 있는 SNP의 다중 검정을 위한 최적의 보정을 달성하기 위하여, 단일염기다형성(SNP) 사이의 쌍별 LD의 행렬의 스펙트럼 분해(SpD)에 기초한 소프트웨어 SNPSpD를 이용하여 SMAD2에서 독립적인 마커 좌위(1.398)의 유효 수가 계산되었다. 본페로니 보정 후의 [#]P값을 나타낸다.

표 3

[0049]

좌위(bo ne loci)	좌위(Lo ci)	C/C*	C/R	R/R	Pa ^{car †}	Pa ^{Bonf}	Pa ^{car ‡}	Pb ^{Bonf#}	Pc ^{car}	Pc ^{Bonf}
----------------	-----------	------	-----	-----	---------------------	--------------------	---------------------	---------------------	-------------------	--------------------

요추	-36201 A>G	835(0.877 ±0.156)	438(0.886 ±0.167)	56(0.900 ±0.156)	0.168	0.360	0.176	0.372	0.642	1.377
	-35302 C>T	934(0.877 ±0.0155)	369(0.890 ±0.171)	25(0.906 ±0.141)	0.071	0.153	0.046	0.099	1.307	2.805
	-34952 A>G	894(0.876 ±0.156)	401(0.888 ±0.166)	34(0.914 ±0.170)	0.031	0.066	0.032	0.069	0.488	1.047
	ht1	56(0.900 ±0.156)	439(0.885 ±0.167)	834(0.877 ±0.156)	0.199	0.426	0.642	1.377	0.214	0.459
	ht2	936(0.876 ±0.155)	368(0.890 ±0.171)	25(0.906 ±0.141)	0.055	0.108	0.035	0.075	1.305	2.799
대퇴골 경부	-36201 A>G	835(0.725 ±0.120)	438(0.736 ±0.118)	56(0.749 ±0.152)	0.018	0.039	0.022	0.048	0.274	0.588
	-35302 C>T	934(0.726 ±0.119)	369(0.737 ±0.124)	25(0.749 ±0.152)	0.045	0.096	0.027	0.057	1.286	2.760
	-34952 A>G	894(0.726 ±0.120)	401(0.734 ±0.118)	34(0.757 ±0.171)	0.043	0.093	0.055	0.117	0.382	0.819
	ht1	56(0.749 ±0.152)	439(0.735 ±0.118)	834(0.725 ±0.120)	0.024	0.051	0.274	0.588	0.031	0.066
	ht2	936(0.726 ±0.119)	368(0.737 ±0.124)	25(0.749 ±0.152)	0.035	0.075	0.020	0.042	1.293	2.775

[0050]

다른 대퇴골 근위부(예를 들어, 전체 대퇴골, 전자부, 대퇴골 간부 및 Ward 삼각)에서 BMD에 대한 SMAD2의 유전적 영향을 확인하였다(표 4 참조). 제한된 피험자들에서, 나이 및 체중은 모든 측정 부위에서 BMD와 유의적으로 독립적인 상관관계를 보여 주었으며(각각 $\beta = -0.006 \sim -0.005$, 모든 P 값 < 0.001 ; $\beta = 0.002 \sim 0.007$, 모든 P 값 < 0.001), YSM은 BMD의 대퇴골 간부에서 BMD와 반비례하게 연관되었다($\beta = -0.004$, $P = 0.013$). 그런데, 신장은 BMD 값과 유의적인 연관성을 보여주지 못했다(데이터를 표시하지 않음). 임상적 변수(clinical variable)를 조절한 후에, SMAD2 -34952A>G가 전체 대퇴골 및 대퇴골 간부에서의 BMD와 연관됨에 비하여(공동우성 모델 및 우성 모델에서 $P^{car} = 0.004 \sim 0.017$), SMAD2 -36201A>G, -35302C>T, ht1 및 ht2는 전체 대퇴골, 전자부, 및 대퇴골 간부에서의 BMD와 유의하게 연관되었다(공동우성 모델, 우성 모델 및 열성 모델에서 $P^{car} = 0.001 \sim 0.046$). 본페로니 보정을 엄격하게 적용할 때, 대부분의 연관 P 값은 여전히 유의하였다(공동우성 모델, 우성 모델 및 열성 모델에서 $P^{bonf} = 0.003 \sim 0.042$). 하기 표 4에서 피험자의 수와 BMD의 평균 및 표준편차를 나타냈다. *C/C, C/R 및 R/R은 각각 공통 대립 유전자의 동형 접합체, 이형 접합체, 희귀 대립 유전자의 동형 접합체를 나타낸다. [†]Pa, Pb, 및 Pc는 연령, 폐경이후 연차, 체중 및 신장을 제어하는 다중회귀분석에 대한 공동우성, 우성 및 열성 모델에서의 P -값을 각각 나타낸다. [‡]LD에 있는 SNP의 다중 검정을 위한 최적의 보정을 달성하기 위하여, 단일염기다형성(SNP) 사이의 쌍별 LD의 행렬의 스펙트럼 분해(SpD)에 기초한 소프트웨어 SNPSpD를 이용하여 SMAD2에서 독립적인 마커 좌위(1.398)의 유효 수가 계산되었다. 본페로니 보정 후의 [#] P 값을 나타낸다.

표 4

[0051]

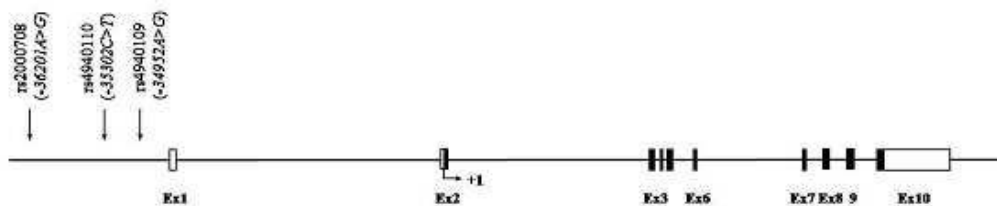
뼈 좌위	좌위	C/C*	C/R	R/R	Pa ^{car †}	Pa ^{Bonf}	Pa ^{car ‡}	Pb ^{Bonf#}	Pc ^{car}	Pc ^{Bonf}
전체 대퇴골(total femur)	-36201A>G	570(0.767 ±0.131)	289(0.791 ±0.133)	34(0.792 ±0.122)	0.007	0.015	0.008	0.018	0.243	0.522
	-35302C>T	635(0.768 ±0.130)	244(0.792 ±0.135)	14(0.800 ±0.155)	0.007	0.015	0.003	0.006	1.267	2.718
	-34952A>G	608(0.768 ±0.131)	266(0.792 ±0.132)	19(0.786 ±0.144)	0.007	0.015	0.004	0.009	0.878	1.884
	ht1	34(0.792 ±0.122)	290(0.790 ±0.134)	569(0.767 ±0.131)	0.011	0.024	0.243	0.522	0.014	0.030
	ht2	636(0.768 ±0.130)	243(0.793 ±0.134)	14(0.800 ±0.155)	0.004	0.009	0.001	0.003	1.267	2.718

전자부(t rochante r)	-36201A> G	569(0.571 ±0.119)	289(0.583 ±0.121)	34(0.603 ±0.114)	0.063	0.135	0.187	0.402	0.046	0.099
	-35302C> T	634(0.572 ±0.119)	244(0.586 ±0.122)	14(0.627 ±0.130)	0.018	0.039	0.027	0.057	0.277	0.594
	-34952A> G	607(0.572 ±0.120)	266(0.584 ±0.119)	19(0.602 ±0.131)	0.069	0.147	0.098	0.210	0.326	0.699
	ht1	34(0.603 ±0.114)	290(0.583 ±0.121)	568(0.572 ±0.119)	0.084	0.180	0.046	0.099	0.246	0.528
	ht2	635(0.571 ±0.119)	243(0.587 ±0.121)	14(0.627 ±0.130)	0.013	0.027	0.018	0.036	0.277	0.594
대퇴골 간부(fem ur shaft)	-36201A> G	355(0.966 ±0.172)	196(0.989 ±0.169)	20(1.019 ±0.137)	0.015	0.033	0.025	0.054	0.166	0.357
	-35302C> T	400(0.968 ±0.169)	162(0.990 ±0.171)	9(1.042 ±0.172)	0.034	0.072	0.034	0.072	0.643	1.380
	-34952A> G	382(0.967 ±0.172)	177(0.992 ±0.165)	12(1.014 ±0.169)	0.017	0.036	0.017	0.036	0.561	1.203
	ht1	20(1.019 ±0.137)	197(0.987 ±0.170)	354(0.967 ±0.171)	0.024	0.051	0.166	0.357	0.045	0.096
	ht2	401(0.968 ±0.170)	161(0.992 ±0.169)	9(1.042 ±0.172)	0.020	0.042	0.018	0.039	0.643	1.380
Ward 삼 각(Ward' s triangl e)	-36201A> G	570(0.498 ±0.144)	289(0.516 ±0.147)	34(0.508 ±0.139)	0.093	0.201	0.103	0.222	0.506	1.086
	-35302C> T	635(0.499 ±0.143)	244(0.513 ±0.150)	14(0.536 ±0.171)	0.101	0.216	0.080	0.171	1.167	2.505
	-34952A> G	608(0.499 ±0.143)	266(0.515 ±0.149)	19(0.515 ±0.161)	0.112	0.240	0.096	0.207	0.948	2.034
	ht1	34(0.508 ±0.139)	290(0.515 ±0.147)	569(0.498 ±0.144)	0.122	0.261	0.506	1.086	0.141	0.303
	ht2	636(0.499 ±0.143)	243(0.514 ±0.150)	14(0.536 ±0.171)	0.074	0.159	0.056	0.120	1.167	2.505

도면

도면1

A. Map of *SMAD2* (SMAD family member 2) on chromosome 18q21.1 (100kb) NM_001003652.2



B. Haplotypes in *SMAD2*

Hap.	rs2000708A>G	rs4940110C>T	rs4940109A>G	Freq.
ht1	A	C	A	0.793
ht2	G	T	G	0.157
ht3	G	C	A	0.031
ht4	G	C	G	0.019
ht5	A	T	G	0.000

C. LDs among *SMAD2* polymorphisms

