



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월25일
(11) 등록번호 10-1911339
(24) 등록일자 2018년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) A61B 5/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
A61B 5/165 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0090368
(22) 출원일자 2017년07월17일
심사청구일자 2017년07월17일
(56) 선행기술조사문헌
BMC Medicine (2013) 11:132
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
함병주
서울특별시 중구 소공로 35, 102동 1503호(
회현동1가, 남산 롯데캐슬)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 7 항

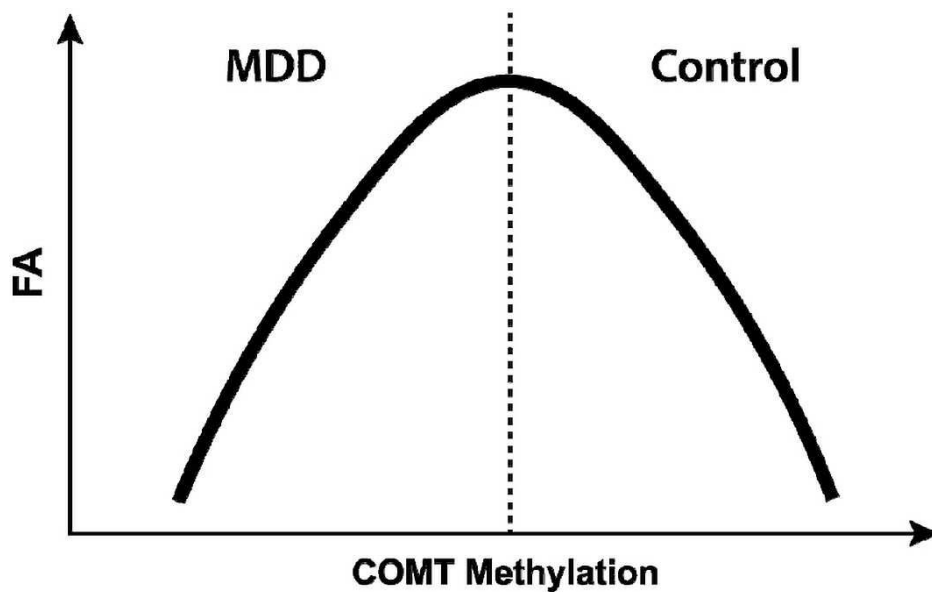
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 카테콜아민-O-메틸 전이 효소 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법

(57) 요약

본 발명은 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 도파민성 신경 전달 물질의 스트레스 관련 변화에 관련된 신경생리학적 증거에 기여하며, 우울증 진단에 관한 정보를 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Y 201/01006 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Biological Psychiatry (1999) 45:1178-1189
 Neuropharmacology (2018) 137:59-70
 Neuroscience & Biobehavioral Reviews (2013) 37(8):1597-1610
 Scientific Reports (2015) 5:8813
 Human Molecular Genetics (2006) 15(21):3132-3145
 The Journal of Neuroscience (2011) 31(18):6692-6698
 US20130132114 A1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016M3A9A7916996
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	우울증 진단/치료 의사결정 보조시스템 개발을 위한 뇌영상-오믹스 기반 빅데이터 구축 및
임상 검증 연구	
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2016.07.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

검사대상 개체 및 정상 개체로부터 유래하는 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자에서 메틸화 비율을 각각 확인하는 단계; 및

상기 검사대상 개체 및 정상 개체 간 COMT 유전자에서의 메틸화 비율의 차이를 확인하는 단계;를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 검사대상 개체의 COMT 유전자에서의 메틸화 비율이 정상 개체의 COMT 유전자에서의 메틸화 비율에 비해 0.5% 이상 낮은지 확인하는 단계를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 전두엽 백색질의 분획 이방성(fractional anisotropy, FA) 값 및 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값을 각각 측정하는 단계;

상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 FA 값 및 RD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 검사대상 개체의 FA 값이 정상 개체의 FA 값에 비해 낮은지 확인하는 단계를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 검사대상 개체의 RD 값이 정상 개체의 RD 값에 비해 높은지 확인하는 단계를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

개체로부터 유래하는 COMT 유전자에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 체제를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물.

청구항 7

제 6항에 따른 조성물을 포함하는 COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 주요 우울 장애(Major depressive disorder, MDD) 또는 우울증(depression)은 자살 시도와 밀접한 관련이 있는

심각한 정신의학적 질환이다(비특허문헌 1). 우울증은 매우 흔한 정신질환의 하나로, 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져온다(서울대학교병원의 학정보, 서울대학교병원).

[0003] 우울증의 분명한 원인에 대해서는 아직 명확하지 않으나 다른 정신 질환과 같이 다양한 생화학적, 유전적 그리고 환경적 요인이 우울증을 야기할 수 있다. 생화학적 요인으로, 뇌 영상 기기를 이용한 연구에서 우울증 환자의 뇌에 변화가 있음을 보고하고 있다. 이 변화의 중요성에 대해서는 아직 불분명한 면이 있으나 궁극적으로 원인을 가려내는데 도움을 줄 것이다. 신경전달 물질이라 불리는 뇌 안의 물질이 감정 등의 뇌 기능과 연결이 되어 있고 우울증 발생에 역할을 하는 것으로 보인다. 호르몬 불균형도 하나의 원인이 될 수 있다. 유전적 요인으로, 일부 연구는 우울증을 가진 가족 내에서 우울증이 더 잘 발생하는 것으로 보고하고 있으며 우울증을 발생시키는 유전자를 찾고 있다. 환경적 요인으로, 환자를 둘러싸고 있는 환경도 우울증 발생에 영향을 줄 수 있으며 삶에 있어서 대처하기 어려운 상황들인데, 사랑하는 사람을 잃는 것, 경제적 문제, 그리고 강한 스트레스 등을 예로 들 수 있다.

[0004] 전두엽 피질(prefrontal cortex, PFC)에서의 도파민성 신경 전달은 인간 뇌의 동기 부여 및 보상 회로에서 중요한 역할을 한다(비특허문헌 2). 피질 하부 영역과 비교하여 PFC에서는 도파민 수송체가 드물기 때문에(비특허문헌 3), 도파민의 분해는 PFC에서의 가용성에 특히 중요하다(비특허문헌 4).

[0005] 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT)는 카테콜아민, 특히 도파민을 대사시켜 세포 외 도파민 생체 이용률을 감소시키는 효소이다(비특허문헌 5, 비특허문헌 6). COMT 매개 프로세스는 도파민의 대사 저하의 약 60 %를 차지한다(비특허문헌 7). 그러므로 전두엽 COMT와 도파민은 인지, 동기 부여, 정서적 과정의 필수 조절자이다(비특허문헌 8, 비특허문헌 9). PFC에서의 도파민 대사의 조절 장애는 인지 기능 장애, 동기 부족, 즐거움의 상실을 초래하며, 이들은 모두 주요 우울 장애(MDD)의 주요 증상이다(비특허문헌 10).

[0006] PFC에서 COMT의 기능을 조절하는 COMT 유전자와 *rs4680*의 기능적 다형성(Val158Met)은 널리 연구되어 왔다(비특허문헌 11, 비특허문헌 12). 그러나 이러한 연관성은 반드시 COMT 유전자 기능 변이형이 MDD와 관련되어 있음을 나타내지 않으며, 최근의 메타 분석에 따르면 Val158Met 변이형의 유전자형이나 대립 형질 모두 MDD와 관련이 없다는 것이 밝혀졌다.(비특허문헌 13). 일반적으로 유전자 다형성은 정신 분열병과 양극성 장애에 비해 특히 유전적 비율이 낮은 MDD에서 정신 및 행동 증상이 나타나기 훨씬 전에 발생한다(비특허문헌 14). 그러므로, DNA 서열의 변화없이 유전자 발현을 조절하기 위해 환경 인자와 상호 작용하는 후성적 마커를 확인하는 것이 필요하다(비특허문헌 15).

[0007] 한편, 최근 LDC(linear discriminant classifier), LRC(logistic regression classifier), SVM(support vector machine), GPC(Gaussian process classifier), 및 NNC(neural network classifier) 등의 다양한 다변량 패턴 분석 방법을 기반으로 하여 뇌영상 데이터를 이용한 통계적 예측 모델을 통해 개개인 주요 우울 장애 환자의 진단을 예측하는 모형이 연구되고 있다.

[0008] 그간의 뇌영상 데이터를 이용한 주요 우울 장애 진단 예측 모형들은 구조적 뇌자기공명영상 데이터 중 대뇌 회백색질 부피 또는 두께, 백색질 신경로의 연결성 등 뇌영상 데이터에만 초점을 맞춰 왔다. 그러나, 우울증 진단 예측의 정확도(accuracy)를 높이기 위해서는 후생유전학적 정보를 통합한 데이터에 기반한 예측 모형이 필요한 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 전두엽의 도파민 활동이 결핍되면 주요 우울 장애(MDD)의 핵심 증상인 관심, 에너지 및 동기 부여가 상실되는 점을 기반으로 우울증이 있는 피험자 대 건강한 피험자에서 전두엽 연결성에 대한 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자 메틸화 상태의 차이 효과를 조사한 결과, COMT 유전자 메틸화 비율, 전두엽 백색질 부위의 분획 이방성(fractional anisotropy, FA) 값이 우울증이 있는 피험자가 건강한 피험자에 비해 유의하게 낮으며 전두엽 백색질 부위의 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값이 우울증이 있는 피험자가 건강한 피험자에 비해 유의하게 높은 것을 확인함으로써, 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명에 따라 수득한 COMT 유전자의 메틸화 정보 및 뇌자기공명영상 데이터 중 전두엽 백색질 신경로의 연결성 정보를 이용하여 개개인의 주요 우울 장애 진단을 예측하는 통계적 모형 및 진단 기술을 개발할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011]

- (비특허문헌 0001) Ferrari AJ., et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. PLoS Med. 2013;10(11):e1001547.
- (비특허문헌 0002) Haber SN & Knutson B (2010) The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. Neuropsychopharmacology 35(1):4-26.
- (비특허문헌 0003) Ciliax BJ, et al. (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. J Neurosci 15(3 Pt 1):1714-1723.
- (비특허문헌 0004) Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, & Levey AI (1998) Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. J Neurosci 18(7):2697-2708.
- (비특허문헌 0005) Axelrod J & Tomchick R (1958) Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. J Biol Chem 233(3):702-705.
- (비특허문헌 0006) Mier D, Kirsch P, & Meyer-Lindenberg A (2010) Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: a meta-analysis. Mol Psychiatry 15(9):918-927.
- (비특허문헌 0007) Karoum F, Chrapusta SJ, & Egan MF (1994) 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. J Neurochem 63(3):972-979.
- (비특허문헌 0008) Dumontheil I, et al. (2011) Influence of the COMT genotype on working memory and brain activity changes during development. Biological psychiatry 70(3):222-229.
- (비특허문헌 0009) Puglisi-Allegra S & Ventura R (2012) Prefrontal/accumbal catecholamine system processes emotionally driven attribution of motivational salience. Rev Neurosci 23(5-6):509-526.
- (비특허문헌 0010) Whitton AE, Treadway MT, & Pizzagalli DA (2015) Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. Curr Opin Psychiatry 28(1):7-12.
- (비특허문헌 0011) Thomason ME, et al. (2010) COMT genotype affects prefrontal white matter pathways in children and adolescents. Neuroimage 53(3):926-934.
- (비특허문헌 0012) Antypa N, Drago A, & Serretti A (2013) The role of COMT gene variants in depression: Bridging neuropsychological, behavioral and clinical phenotypes. Neurosci Biobehav Rev 37(8):1597-1610.
- (비특허문헌 0013) Klein M, Schmoeger M, Kasper S, & Schosser A (2016) Meta-analysis of the COMT Val158Met polymorphism in major depressive disorder: the role of gender. World J Biol Psychiatry 17(2):147-158.
- (비특허문헌 0014) Wray NR & Gottesman, II (2012) Using summary data from the danish national registers to estimate heritabilities for schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. Frontiers in genetics 3:118.
- (비특허문헌 0015) Nestler EJ (2014) Epigenetic mechanisms of depression. JAMA Psychiatry 71(4):454-456.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 목적은 개체로부터 유래하는 COMT 유전자에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 제제를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 하기 방법에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [0016] 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 유래하는 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자에서 메틸화 비율을 각각 확인하는 단계; 및
- [0017] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체 간 COMT 유전자에서의 메틸화 비율의 차이를 확인하는 단계;를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0018] 상기 검사대상 개체의 COMT 유전자에서의 메틸화 비율이 정상 개체의 COMT 유전자에서의 메틸화 비율에 비해 0.5% 이상 낮은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법은,
- [0020] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 전두엽 백색질의 분획 이방성(fractional anisotropy, FA) 값 및 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값을 각각 측정하는 단계;
- [0021] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 FA 값 및 RD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 상기 검사대상 개체의 FA 값이 정상 개체의 FA 값에 비해 낮은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0023] 상기 검사대상 개체의 RD 값이 정상 개체의 RD 값에 비해 높은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명은 개체로부터 유래하는 COMT 유전자에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 제제를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 기존의 우울증 진단이 임상가에 의한 정신과적 면담, 병력 청취 및 정신상태검사(mental status examination)에 의존하였으며, 이로 인해 임상가 간의 우울증 진단이 상이하거나, 진단의 신뢰도 및 타당도에 의구심이 있는 사례가 많았다. 이에, 본 발명은 도파민성 신경 전달 물질의 스트레스 관련 변화에 관련된 신경생리학적 증거에 기여하며, 우울증 진단에 관한 정보를 제공함으로써 뇌영상 데이터 및 유전자 정보를 통한 우울증 진단 예측 모형을 통해서 우울증의 정확한 조기 진단을 통해서 적시에 우울증을 치료하고 질병의 경과가 악화되는 것을 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 MDD와 건강한 대조군 사이의 COMT 유전자 메틸화, FA 및 RD의 비교 결과를 나타낸 도이다; FA: fractional anisotropy; RD: radial diffusivity; SLFP: Superior longitudinal fasciculus, parietal bundle; SLFT: superior longitudinal fasciculus, temporal bundle; ILF: inferior longitudinal fasciculus; ATR: anterior thalamic radiation; UF: uncinate fasciculus.
- 도 2는 MDD의 백색질 영역에서 FA 값에 대한 회귀 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 진단에 따른 COMT 유전자 메틸화와 전두엽 연결성 사이의 U 자형 관계의 도식을 나타낸 도이다.

도 4는 기계학습기법을 기반으로 한 전전두엽의 백색질 연결성과 COMT 유전자 메틸화과 정보를 이용한 주요 우울 장애 진단의 통계적 예측 모형을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 하기 방법에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [0031] 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 유래하는 카테콜아민-O-메틸 전이 효소(catecholamine-O-methyl transferase, COMT) 유전자에서 메틸화 비율을 각각 확인하는 단계; 및
- [0032] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체 간 COMT 유전자에서의 메틸화 비율의 차이를 확인하는 단계;를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 검사대상 개체의 COMT 유전자에서의 메틸화 비율이 정상 개체의 COMT 유전자에서의 메틸화 비율에 비해 0.5% 이상 낮은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법은,
- [0035] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 전두엽 백색질의 분획 이방성(fractional anisotropy, FA) 값 및 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값을 각각 측정하는 단계;
- [0036] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 FA 값 및 RD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 용어 "개체"는 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0038] 상기 FA 또는 RD는 확산 텐서 영상의 파라미터 중 하나를 의미한다.
- [0039] 용어 "분획 이방성(fractional anisotropy) 또는 "FA"는 백색질 신경로 내의 물분자 확산의 방향성을 측정하는 값으로, 0과 1 사이의 스칼라 값(scalar value)으로 나타내며, 백색질 신경로의 미세 구조적(microstructural) 변화 및 구조적 연결성을 반영한다. 낮은 FA 값은 탈수초 및 축삭 손상과 같은 문제로 인해 백색질의 완전성이 감소되었음을 나타낸다.
- [0040] 용어 "방사상 확산(radial diffusivity)" 또는 "RD"는 축삭돌기 섬유(axon fiber)에서 가로방향으로 움직이는 물분자의 고유값(eigenvalue) 나타내는 것으로써 축삭돌기 내에서 좌우 방향으로 움직이는 두 개의 고유값인 λ_2 와 λ_3 의 평균값을 계산하여 표현한다. 이러한 RD 값은 축삭돌기의 두께를 의미하며, 이는 축삭돌기의 수초화(myelinated) 정도를 반영한다. 따라서, 높은 RD 값은 축삭돌기의 두께가 두꺼워졌다는 것을 의미하며, 이는 축삭돌기의 탈수초화(demyelinated)가 이뤄졌다고 해석한다.
- [0041] 상기 검사대상 개체의 FA 값이 정상 개체의 FA 값에 비해 낮은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0042] 상기 검사대상 개체의 RD 값이 정상 개체의 RD 값에 비해 높은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명은 상기 개체로부터 유래하는 COMT 유전자에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 체제를 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명은 상기 COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 포함하는, COMT 유전자의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트를 제공한다.
- [0048] 백색질 연결성(connectivity)은 MDD에서 가장 광범위하게 연구된 신경 해부학적 기질 중 하나이다. 확산 텐서 영상(DTI)은 뇌 백색질 영역의 미세 구조를 비-침습적으로 측정하기 위해 물 확산을 이용하는 MRI-기반 이미징 기술이다. MDD에서 가장 흔하게 보고된 DTI의 2 가지 측정 방법은 부분 이방성(fractional anisotropy, FA)과 방사상 확산(radial diffusivity, RD)이다. FA 값은 일반적으로 백색질 영역에서의 수분 확산의 방향성 및 일관성을 반영하므로 낮은 FA 값은 탈수초 및 축삭 손상과 같은 문제로 인해 백색질의 완전성이 감소되었음을 나타낸다. MDD에서의 DTI 연구에 관한 최근의 메타 분석에 따르면, MDD 환자는 뇌량(corpus callosum)의 genu, 상중속(superior longitudinal fasciculus) 및 하중속(inferior longitudinal fasciculus)에서 낮은 FA 값을 나타내었으며, 이들은 모두 PFC와 관련된 중요한 백색질이다. 두 번째 DTI 결과 측정치인 RD 값은 축삭 섬유의 길이 수직인 방향으로의 물 분자의 확산성을 반영한다. 따라서, 높은 RD 값과 나타나는 낮은 FA 값은 비정상적

미엘린화에 의해 야기되는 혼탁한 백색질을 나타낸다.

[0050] 본 발명은 MDD 및 건강한 그룹에서 COMT 유전자 메틸화와 백색질 연결성 사이의 반대 관계가 전두엽 도파민의 유효성이 역전된 U 자형 패턴을 따른다는 통념을 정교화한다. 도파민이 너무 적거나 너무 많으면 전두엽 기능이 불충분해진다. 따라서, 유효한 도파민 수치를 결정하는 COMT 활성은 구조적 백색질 연결성에 긍정적 또는 부정적으로 연관될 수 있다. 이는 전두엽 도파민 활동에 대한 COMT 유전자 메틸화 활성의 다면 발현성을 나타낸다. 도파민 레벨이 U의 왼쪽에 위치할 때, COMT 유전자 메틸화가 감소하면 도파민 레벨을 감소시킴으로써 전두엽 연결성을 억제 할 수 있다. 한편, 도파민 수준이 U의 오른쪽에 있을 때 COMT 유전자 메틸화가 감소하면 전두엽 연결성을 향상시킬 수 있다.

[0052] MDD 환자의 뇌 내 미세 환경은 도파민성 신경 전달 물질의 정상적인 발달에 해로울 수 있다. MDD 환자의 뇌의 전두엽 및 해마 부위는 뇌 파생 신경 영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 수준이 낮고 만성적으로 염증성 사이토카인의 수준이 높은 것이 특징이다. BDNF가 도파민성 신경 세포에 대한 보호 효과를 가지지만, 전염증성 사이토카인은 그들에게 해로운 영향을 미친다. 그러므로 MDD 환자의 도파민 수치는 역 U 자형의 좌단에서 이미 낮을 수 있다. 이 상황에서 COMT 유전자 메틸화를 억제하면 도파민의 유효성이 더욱 감소할 수 있다. MDD에서 COMT 유전자 메틸화와 FA 사이의 긍정적 상관관계는 감소된 도파민성 신경 전달에서 COMT 유전자 메틸화의 감소 원인을 뒷받침한다. 불충분한 도파민성 신경 전달은 결과적으로 낮은 BDNF 및 높은 전염증성 매개체 수준의 해로운 영향을 악화시킬 수 있다.

[0054] 본 발명은 일실시예에서, COMT 유전자 메틸화가 우울증 환자에 대하여 독특한 특징을 가지고 있음을 확인하였다. 특히, COMT 유전자 메틸화는 환자 및 대조군에서 주요 전두엽 백색질 연결성과 차등적으로 연관되어 있었다. DNA 메틸화는 유전자에 대한 초기 생애 스트레스의 마커이며 동시에 현재 스트레스에 대한 후성적 취약성을 나타내므로, 우울증의 여러 예방 및 치료 양식으로 활용할 수 있는 후보가 될 수 있다.

[0056] 본 발명에서는 주요 우울 장애와 관련한 핵심 뇌영상 결과인 전전두엽 백색질 신경로의 연결성 변화와 관련한 데이터, 뇌내 전두엽 도파민 생체 이용도에 핵심적인 역할을 하는 COMT 유전자 메틸레이션의 후생유전학적 유전 정보를 이용하여 높은 진단 정확도를 갖는 우울증 진단 예측 모델을 개발하였다. 이전의 우울증의 진단 예측 모형은 대뇌 회백색질 부피, 두께, 피질하 구조물의 부피 등 구조적 뇌영상 데이터에만 초점이 맞춰져 있었으며, 이러한 제한된 데이터의 사용으로 인하여 우울증 진단 예측 모형의 정확도의 제한이 있었다. 이에, 본 발명은 뇌영상 데이터와 후생유전학적 정보를 통합한 예측으로 정확도를 향상시킬 수 있다.

[0058] 본 발명은 정신건강의학과 클리닉에서 정신건강의학과 전문의가 우울 증상으로 내원한 환자에게 제공하는 서비스의 형태로 적용될 수 있으며, 정신건강의학과 전문의는 우울증으로 예상되는 환자에게 본 서비스(기술)을 권유한 뒤에 확산 텐서 영상 촬영 및 COMT 유전자 메틸화 측정을 진행하고, 그 정보를 토대로 우울증 진단의 예측에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0062] <실시예 1> 실험방법

[0063] <1-1> 참가자 및 절차

[0064] 2012년 1월에서 2015년 12월 사이에 횡단면 조사를 실시하였다. 피험자는 고려대학교 안암병원에서 모집되었다. 환자와 대조군 모두에 대한 포함 기준은 18세에서 65세 사이로, 에든버러 테스트(Edinburgh Handedness Test)를 통해 오른손잡이임을 확인하였다. 제외 기준은 다음과 같았다: 합병증 정신 장애에 대한 과거 병력 또는 현재 진단, 80 미만의 지능 지수(IQ), 다른 일차 신경병(예: 파킨슨 병) 또는 간질에 대한 과거 병력 또는 현재 진단, 금속 임플란트와 같은 자기 공명 영상(magnetic resonance imaging, MRI)에 대한 금기 사항을 포함하는 종양과 같은 두개강 내 병변 또는 신경 혈관 질환. 한국정신신경학회 회원이었던 공인된 정신과 전문의는 정신 분열증 진단 및 통계 매뉴얼(Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, DSM-IV) 축 1 장애(Axis-I Disorders, SCID-I)의 한국어판을 사용하여 모든 피험자를 인터뷰하고 진단하였다. 진단 평가의 정확성을 보장하기 위해 환자의 가까운 친지 및/또는 친구들에게 연락하여 환자의 허락 하에 환자의 생활 방식 및 성격에 관한 필요한 정보를 수집하였다.

[0065] MDD(우울증)의 가족력은 모든 피험자에서 상세히 조사되었다. 또한 항우울제 사용 이력, 입원 및 자살 시도도 MDD 환자에서 신중하게 조사되었다. 우울증의 중증도는 17 항목 HRSD(Hamilton Rating Scale of Depression)을

사용하여 결정되었다. 민족적 기원은 3 세대의 환자 가족을 확인함으로써 확정되었다. 이 연구에서 일부 피험자의 데이터는 이전에 다른 연구에서 보고되었다.

[0066] 모든 연구 참가자들은 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 서면 동의서를 제공하였다. 연구 프로토콜은 고려대학교 안암병원의 기관감사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인을 받았다.

[0068] <1-2> COMT 유전자 분석

[0069] 유전형 분석(genotyping)은 MDD 환자 79 명과 건강한 대조군 67 명으로 구성된 총 146 개의 샘플을 사용하여 수행되었다. 유전형 분석을 위해 시판 중인 TaqMan 프로브와 프라이머(Biosystems, USA)를 사용하였다. 유전형 분석 데이터 품질을 평가하기 위해 중복 DNA 검사가 수행되었다(n = 10, 중복에서 99 % 이상의 일치율). TaqMan 프로브 C_25746809_50이 Val158Met 변이에 사용되었다. COMT 유전자(Homo sapiens (human) catechol-O-methyltransferase, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>)의 메틸화 분석을 위해 바이설파이트 피로시퀀싱(bisulfite pyrosequencing) 방법을 사용하였다. 구체적으로, 정맥혈 8cc를 말초 혈관에서 채취하여 EDTA 튜브에 넣어 처리하였고, 24시간 이내 DNA 분리가 불가능한 경우에는 -20℃에서 냉동 보관하였다. 시퀀싱 프라이머는 상업적으로 이용 가능한 피로시퀀싱 어레이(prosequencing Assay Design Software v2.0, Qiagen)를 이용하며, 유전자증폭기(thermocycler)를 통해 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction)을 일으켜 증폭시킨 후에, 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동기법(electrophoresis method)을 시키고, 마지막으로 피로골드 시약 키트(Pyro Gold reagents kit, Qiagen)의 PyroMarkID 시스템을 통해서 COMT 유전자의 각 CpG 위치마다 평균 메틸화 퍼센티지를 분석하였다.

[0070] DNA 메틸화는 신경정신병학 분야에서 가장 널리 조사되는 후생적(epigenetic) 변이 형태이다. DNA 메틸화는 DNA 메틸전이효소를 이용하여 시토신(cytosine) 고리의 5' 탄소 상에 메틸기를 첨가하는 것을 의미한다. 유전자의 프로모터 영역이 메틸화되면 프로모터 영역에 전사 인자의 결합이 방해되어 유전자 발현이 억제된다. 따라서 메틸화 정도가 높을수록 유전자 발현이 감소하고, 그 반대의 경우도 같다.

[0072] <1-3> MRI 획득

[0073] 3 차원 구조적 MRI 스캔은 3.0 T Siemens Trio 전체 이미징 시스템 (Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany)을 사용하여 획득되었다. 확산 텐서 영상(Diffusion tensor images, DTI)은 다음 매개 변수와 함께 에코 평면 이미징 시퀀스를 사용하여 획득되었다: 반복 시간(repetition time, TR) : 6300 ms; 에코 시간(echo time, TE) : 84 ms; 시야(field of view, FOV) : 230 mm; 128 × 128 매트릭스; 간격이 없는 3mm 슬라이스 두께; 복셀(voxel) 크기 1.8 mm × 1.8 mm × 3.0 mm; 확산 방향 = 20; 슬라이스 수 = 50; b- 값 : 0 및 600 s/mm²; 위상 인코딩 방향 및 6 / 8 위상 부분 푸리에에 대해 38 개의 참조 라인을 갖는 가속 계수(iPAT-GRAPPA) = 2.

[0075] <1-4> 이미지 가공

[0076] 자동화된 구조 라벨링 소프트웨어인 FreeSurfer v5.2를 사용하여 T1-weighted 이미지를 분할하였다. 관심 영역(regions of interest) 접근법의 특징인 연구자 간 편향을 피하기 위해 TRACULA(tracts constrained by underlying anatomy) 프로그램을 사용하여 백색질 영역을 재구성하였다. TRACULA 프로그램은 베이지안 구조(Bayesian framework)를 기반으로 한 글로벌 신경다발 추적방법(tractography)으로, FreeSurfer 5.3 development version software package (Massachusetts General Hospital, Boston, U.S., <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>)에서 구동되며, 총 18개의 대뇌 주요 백색질 신경로에 대한 확률적 분포(probabilistic distribution)를 확산 텐서 영상을 통해 자동화된 기법으로 구현하며, 각각의 백색질 신경로에서 FA, MD, RD, AD 등의 DTI 파라미터를 추출할 수 있게 한다. 이 중 FA는 0과 1 사이의 스칼라 값(scalar value)으로서 백색질 신경로 내의 물분자 확산의 방향성을 측정하는 값이며, 백색질 신경로의 미세 구조적(microstructural) 변화 및 구조적 연결성을 반영하는 것으로 알려져 있다. 백색질 재구성을 위한 프로토콜은 다음과 같았다: 전처리, FMRIB 소프트웨어 라이브러리(FMRIB Software Library, FSL) v5 (<http://www.fmrib.ox>)에서 구현된 볼 스틱(ball-and-stick) 모델 적합을 사용하여 각 복셀에서의 확률 분포 추정, 그리고 이 확률 분포를 사용한 경로의 재구성. 최근의 연구와 메타 분석, 그리고 MDD의 병리학에서 전두엽 영역의 중요성을 토대로, 다음과 같은 6 개의 백색질 영역을 선택하였다: 소견자(forceps minor), 상중속(superior longitudinal fasciculus) 두정엽 다발(parietal bundle)(SLFP), 상중속 측두엽 다발(temporal bundle)(SLFT), 하중속(inferior longitudinal fasciculus, ILF), 전측사상방사(anterior thalamic radiation, ATR) 및 구상속(uncinate fasciculus, UF). SLFP는 배측면 전두엽 피질(dorsolateral prefrontal

cortex, DLPFC)로부터의 백색질 투영으로 감정적 조절뿐만 아니라 관리 기능의 기록 제어에 관여한다.

[0078] <1-5> 서포트 벡터 머신 (support vector machine, SVM) 기법

[0079] MDD 100명 및 대조군 참가자 100명의 전전두엽 백색질 신경로의 연결성 정보, COMT 유전자 메틸화 정보를 이용하여 서포트 벡터 머신(SVM) 상에서 트레이닝 세트(training set)를 실행하고, 이후 테스트 세트(test set)에서는 실제 MDD 예상 환자의 MDD 진단을 예측하였다. SVM 분류기(classifier)는 트레이닝 세트에서 MDD와 정상인으로 표시되어 있는 사람들을 대상으로 전전두엽 백색질 신경로의 연결성 정보, COMT 유전자 메틸화를 기반으로 MDD와 정상인에 대한 판별을 훈련하며, 테스트 세트에서는 실제로 MDD 예상 환자에 대해서 MDD 진단을 예측하였다(도 4).

[0081] <1-6> 통계적 분석

[0082] 연속 변수의 비교를 위한 독립적 t-검정과 MDD와 대조군 간의 이분법 변수의 비교를 위한 χ^2 검정을 사용하였다. Val158Met (rs4680) 변종의 대립 유전자 빈도의 Hardy-Weinberg 평형 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)을 χ^2 검정을 사용하여 분석하였다.

[0083] 먼저, 독립적 t-검정을 이용하여 MDD와 대조군 간의 COMT 유전자 메틸화와 백색질 연결성(FA와 RD)을 비교하였다. COMT 유전자 메틸화는 각개(CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 및 CpG5) 및 평균 매개 변수 값 모두를 사용하여 분석하였다. 팽창된 양성 소견을 줄이기 위해, 후속 분석에서 5 개의 매개 평균 값만을 사용하였다. 마지막으로, MDD와 대조군 간의 COMT 유전자 메틸화, FA 및 RD의 차이를 분석하기 위해 공분산(ANCOVA) 모델 분석을 사용했다. 백색질 연결성 분포에서의 진단 x 대립 유전자형 상호작용이 조사되었다.

[0084] 연속 및 터미(이분법) 변수 모두에 대하여 M-S 견적을 계산하기 위해 견고한 회귀 분석, 특히 MS 로버스트 회귀(robust regression)를 수행하였다. 이 회귀 분석은 이상치(outliers)로 인한 타입 I의 오류를 최소화하는 데 특히 적합하다. 각 반복마다 20 개의 p-부분집합(subset)을 확인하였다. 각 군의 백색질 결과 측정치인 FA와 RD는 평균 COMT 유전자 메틸화로 회귀되었고, 연령과 성별에 따라 조정되었다. 다중 비교로 인한 타입 I의 오류를 예방하기 위해, FA와 RD에 대한 각 그룹에서 11 개의 결과 척도(소견자, 우측 SLFP, 우측 SLFT, 우측 ILF, 우측 ATR, 우측 UNC, 좌측 SLFP, 좌측 SLFT, 좌측 ILF, 좌측 ATR 및 좌측 UNC)를 이용하여 로버스트 회귀 분석을 통해 계산된 p 값에 대해 FDR (false discovery rate) 보정을 사용하였다.

[0085] 모든 통계 분석은 Stata Statistical Software: Release 12(StataCorp 2011, College Station, StataCorp LP)에서 수행되었다.

[0087] <실시예 2> 실험결과

[0088] <2-1> 사회인구통계학적 및 임상적 변수

[0089] 연구 표본의 사회인구통계학적 및 임상적 변수는 표 1에 제시되었다. MDD 환자는 건강 대조군과 비교하여 MDD와 가족 실업률이 유의하게 높았다. 환자군에서 MDD의 평균(SD) 기간은 47.28 (44.43) 개월이었다.

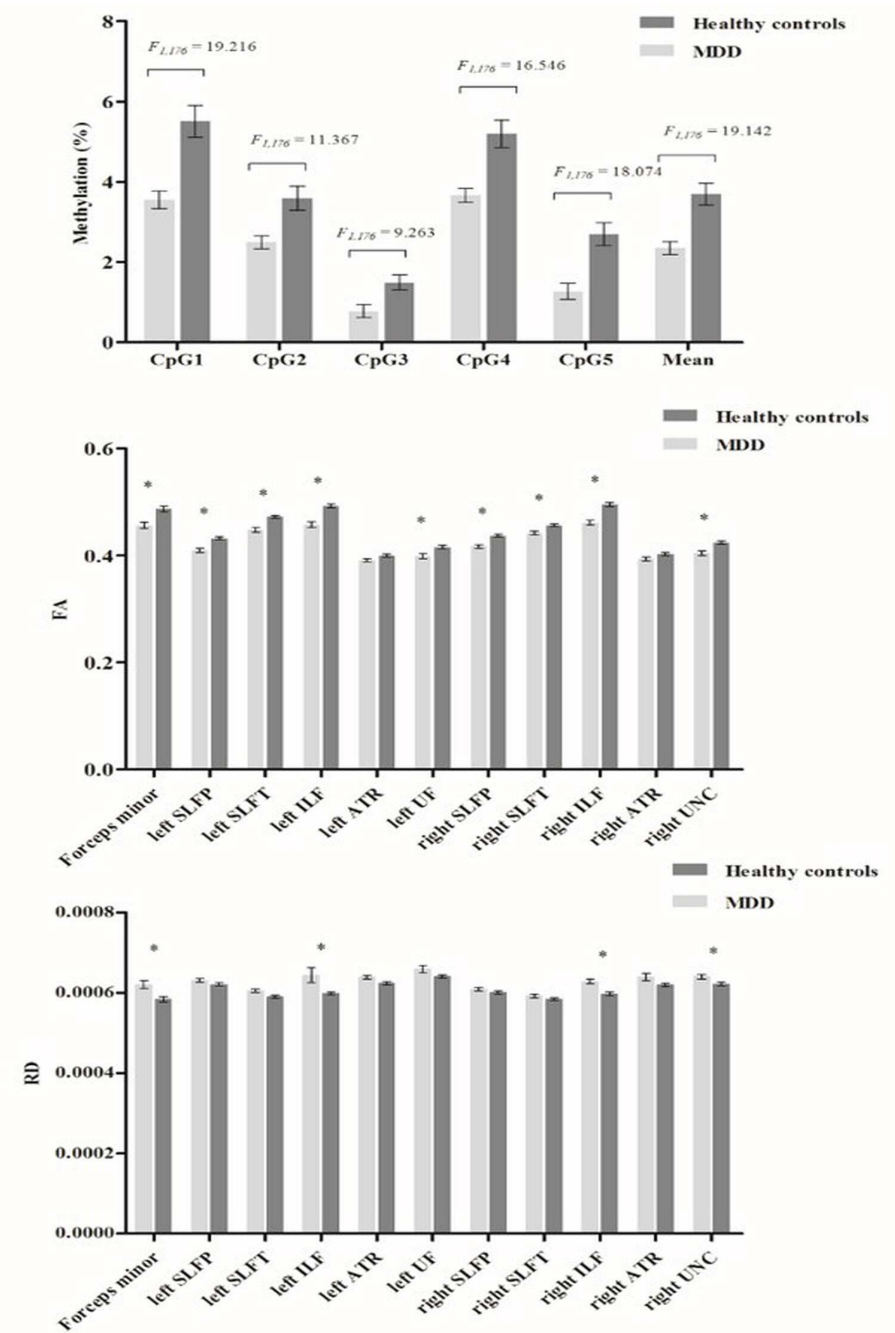
표 1

	MDD	N	Controls	N	Statistics	p
Age	41.67 (10.8)	90	39.68 (13.8)	90	1.077	0.283
Gender, female	68 (75.6)	90	63 (70.8)	90	0.519	0.471
Education, < 12, years	15 (17.2)	87	11 (12.9)	85	0.570	0.450
Occupation, yes	26 (29.9)	87	6 (7.1)	84	14.531	0.0001
Family history of MDD, yes*	27 (34.2)	79	2 (3.1)	65	21.445	<0.0001
HRSD scores	14.48 (8.15)	89	2.14 (2.06)	87	92.742	<0.0001
Past history of MDD, yes*	61 (77.2)	79	-	-	-	-
Duration of illness (months)	47.3 (44.4)	88	-	-	-	-

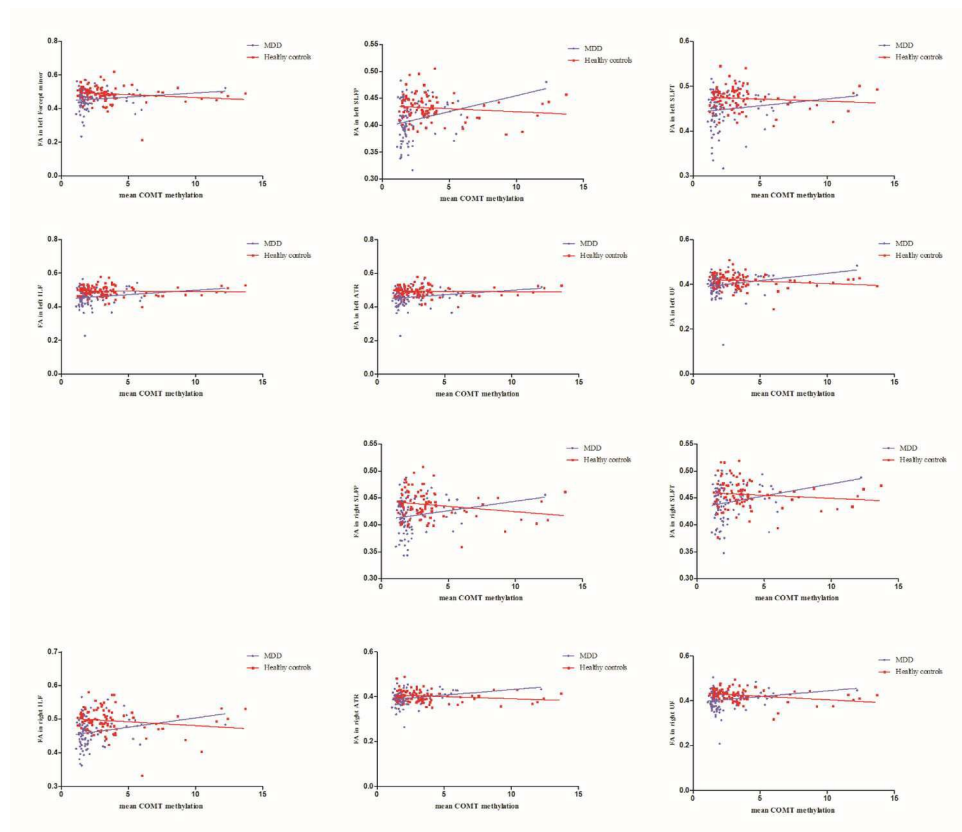
- [0092] MDD: major depressive disorder; HRSD: Hamilton Rating Scale for Depression, 17-items
- [0094] <2-2> 유전 분석
- [0095] Val157Met 대립 유전자의 분포는 MDD($\chi^2 = 1.507$, $p = 0.219$)와 대조군($\chi^2 = 0.615$, $p = 0.433$) 모두에서 Hardy-Weinberg 평형에 적합했다. MDD 환자는 대조군보다 5 개의 모든 CpG 부위에서 메틸화가 유의하게 낮았다(도 1). 약물 치료를 하지 않은 환자(10.30 ± 6.37)와 약물 치료를 한 환자(11.24 ± 5.16 , $p = 0.450$) 사이의 메틸화에는 유의한 차이가 없었다.
- [0096] 마지막으로, 메틸화율에 대한 대립 유전자 타입 x 진단 상호작용은 없었다.
- [0098] <2-3> 백색질 연결성
- [0099] MDD와 대조군 사이의 FA와 RD의 비교는 도 2에 나타내었다. 건강한 대조군과 비교하여, MDD 환자는 9 개의 백색질 영역(forceps minor, 좌측 SLFP, 좌측 SLFT, 좌측 ILF, 좌측 UF, 우측 SLFP, 우측 SLFT, 우측 ILF 및 우측 UF)에서 낮은 FA 값을 나타내었고, 두 개의 백색질 영역(forceps minor 및 우측 ILF)에서 높은 RD 값을 나타내었다. 약물 치료를 하지 않은 환자와 약물 치료를 한 환자 사이의 모든 백색질의 FA와 RD 값에는 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 마지막으로, FA와 RD 값에 대해 유의한 대립 유전자 타입 x 진단 상호작용은 없었다.
- [0101] <2-4> COMT 유전자 메틸화 및 백색질 연결성
- [0102] MDD 환자에서 COMT 유전자 메틸화 회귀 계수는 좌측 SLFT와 우측 ATR을 제외한 모든 백색질 소견에서 FA 값에 대해 유의미하였다(도 3). 회귀 계수는 좌측 ILF를 제외한 모든 백색질 문제에서 RD 값에 대해 유의미하였다.
- [0103] 반면에, 건강한 개체에서는 COMT 유전자의 메틸화 회귀 계수가 2 개의(좌측 ATR 및 우측 SLFP) 백색질 영역에서만 FA 값에 대해 유의미했다. 회귀 계수는 단지 3 개의(좌측 SLFP, 좌측 ILF, 우측 ATR) 백색질 영역에서 RD 값에 대해 유의미하였다.
- [0104] FA와 RD에 대한 COMT 유전자 메틸화의 회귀 계수는 환자와 대조군에서 반대 방향성을 보였다. MDD 환자에서 FA에 대한 모든 계수의 방향은 양이었지만 건강한 대조군에서는 음이었다. 반면에 MDD 환자에서 RD에 대한 모든 계수의 방향은 음이었지만 건강한 대조군에서는 양이었다.
- [0105] MDD에서, 유효한 도파민 수치는 신경 영양 인자 감소 및 전염증(pro-inflammatory) 매개체 증가로 이미 낮을 수 있다. 따라서, COMT 유전자 메틸화의 감소는 가용 도파민 수치를 더 낮추고 FA를 감소시킨다. COMT 유전자 메틸화의 감소는 MDD의 원인이 될 수 있다. 반면에, 정상적인 생리 조건 하에서는 뇌에 신경 해부학적 장애가 거의 없을 수 있다. 따라서, 증가된 COMT 메틸화 및 도파민 가용성의 감소는 비정상적인 백색질 연결성을 방지하기 위한 보상적 변화일 수 있다.

도면

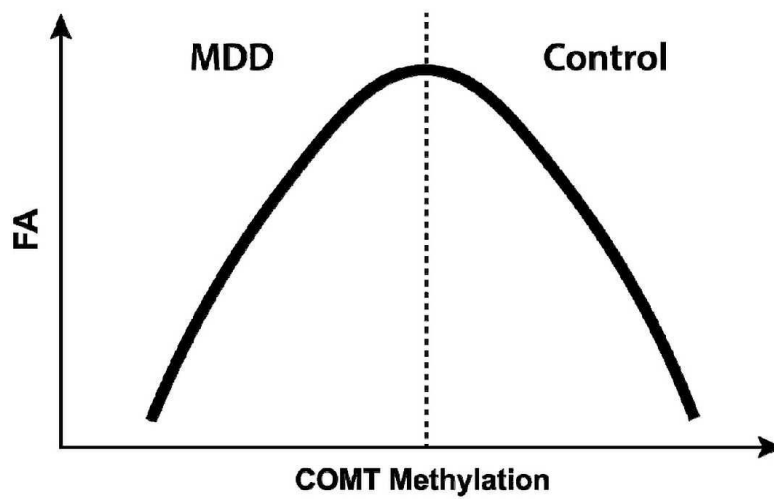
도면1



도면2



도면3



도면4

