(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월19일
(11) 등록번호 10-1919753
(24) 등록일자 2018년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/68* (2018.01) *G01N 24/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/6883* (2018.05)
*C12Y 114/16004* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0090369
(22) 출원일자 2017년07월17일
심사청구일자 2017년07월17일
(56) 선행기술조사문헌
PLoS One (2012) 7(5):e36721
*(뒷면에 계속)*

(73) 특허권자
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**함병주**
서울특별시 중구 소공로 35, 102동 1503호(회현동1가, 남산 롯데캐슬)
(74) 대리인
**특허법인 다해**

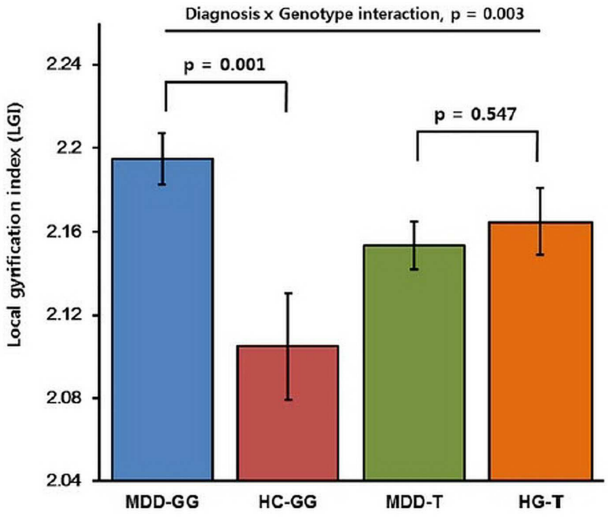
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **대뇌 주름 지수 및 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 대뇌 주름 지수 및 트립토판 수산화효소(Tryptophan Hydroxylase) 유전자인 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 전대상(anterior cingulate) 피질 및 전두엽 피질에서 나타나는 과도한 주름진 피질 양의 증가(hypergyria)와 MDD의 진단 및 전대상 피질 유전자형 사이의 상호작용 효과를 확인하여, 우울증 진단에 관한 정보를 제공할 수 있다.

*대 표 도* - 도3



(52) CPC특허분류
*G01N 24/08* (2013.01)
*C12Q 2600/156* (2013.01)
*C12Q 2600/158* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
PLoS One (2016.10.03.) 11(10):e0162585
Social Cognitive and Affective Neuroscience (2013) 8:828-837
Journal of Affective Disorders (2011) 133(1-2):128-136
함병주, "세로토닌계 유전자와 성격 특성에 대한 연구", 고려대학교 박사학위논문 (2003)
함병주(고려대학교 산학협력단), "영상 유전학적 연구를 통한 주요우울장애 환자의 항우울제 치료 반응 예측 인자 규명", 보건의료기술진흥산업 최종보고서 (2012)
원은수, 고려대학교 박사학위논문 (2015)
Behavioural Brain Research (2012) 231:105-110

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A120004
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 중점중개연구센터
연구과제명 뇌영상 유전자 융합 연구를 이용한 우울증 진단 및 항우울제 치료반응 예측 생체 지표 규명
기 여 율 50/100
주관기관 전남대학교
연구기간 2012.04.01 ~ 2017.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A1A2058864
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업
연구과제명 주요 우울 장애 및 양극성 장애 우울증 환자에서 뇌의 보상 회로와 관련 유전자 다형성의 역할 규명: 다중기법 영상 유전학적 연구
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30
공지예외적용 : 있음

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

검사대상 개체 및 정상 개체가 TPH2(Tryptophan Hydroxylase-2) rs4570625 유전자에 대하여 G 동형(homozygous) 군에서 G 동형 접합체(homozygote)를 가지고 있는지 확인하는 단계;

상기 검사대상 개체 및 정상 개체가 G 동형 접합체(homozygote)를 가지고 있을 경우, 우측 말단 ACC(anterior cingulate cortex)에서의 국부적인 대뇌 주름 지수(local gyrification index, LGI) 값을 측정하는 단계;

상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 대뇌 주름 지수의 차이를 확인하는 단계를 포함하는, 대뇌 주름 지수 및 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 검사대상 개체의 대뇌 주름 지수가 정상 개체의 대뇌 주름 지수에 비해 적어도 0.08 이상 높은지 확인하는 단계를 포함하는, 대뇌 주름 지수 및 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대뇌 주름 지수 및 트립토판 수산화효소(Tryptophan Hydroxylase) 유전자인 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[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(서울대학교병원 의학정보, 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] 한편, 대뇌피질 접힘(gyrification)은 대뇌 피질 접힘의 패턴과 정도를 반영하기 때문에, 비정상적인 대뇌피질 접힘이 피질 병리에 있어 이전의 신경해부학적 매개 변수보다 안정한 지표가 될 수 있다는 여러 연구가 제안되었다. 또한, 대뇌피질 접힘은 이제 자동으로 재구성된 피질 표면 모델을 사용하여 평가할 수 있다(비특허문헌 2). 국부적인 대뇌피질 접힘은, 고밀도로 연결된 피질 영역의 섬유 장력은 뇌회(gyri)를 형성하고 드문 드문하게 연결된 영역은 임신의 두 번째 석달 동안에 대뇌구(열구, sulci)에 의해 분리되게 되는 이른 신경 발달을 반영하는 것으로 알려졌다(비특허문헌 3). 비정상적인 대뇌피질 접힘은 두뇌 피질의 기능적 연결이 끊어지는 것을 반영한다고 여겨진다(비특허문헌 4).

[0005] 한편, 최근 뇌영상 데이터를 이용하여 통계적 예측 모형을 통해 개개인 주요우울장애 환자의 진단을 예측하는

모형이 연구되고 있으나, 그간의 뇌영상 데이터를 이용한 주요우울장애 진단 예측 모형들은 구조적 뇌자기공명영상 데이터 중 대뇌 회백질 부피, 두께, 피질하 구조물의 부피 등에 초점이 맞춰져 있었으며, 이러한 제한된 뇌영상 파라미터의 사용으로 인하여 우울증 진단 예측 모형의 정확도 (accuracy)의 제한이 있었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 MDD 환자가 건강한 대조군과 비교하여 우측 말단 ACC(right rostral anterior cingulate cortex), 내측 안와전두 피질(medial orbitofrontal cortex) 및 전두극(frontal pole)에서 현저한 주름진 피질 양의 증가(hypergyria)를 확인하고 우측 말단 ACC(right rostral anterior cingulate cortex)의 국부적인 대뇌 주름 지수에서 유의한 진단-유전자형(genotype-by-diagnosis) 상호작용이 나타나는 것을 확인하여, 이와 같은 전두엽 피질(prefrontal cortex)과 전대상 피질(anterior cingulate cortex)의 피질 gyrification의 변화와 MDD 환자의 TPH2 rs4570625 다형성과의 관련성을 기반으로 한 높은 진단 정확도를 갖는 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0007] (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) Nenadic I ., et al. (2015): Prefrontal gyrification in psychotic bipolar I disorder vs. schizophrenia. J Affect Disord 185:104-107.

(비특허문헌 0003) Nanda P., et al. (2014): Local gyrification index in probands with psychotic disorders and their first-degree relatives. Biol Psychiatry 76:447-455.

(비특허문헌 0004) Janssen J., et al. (2014): Cortical morphology of adolescents with bipolar disorder and with schizophrenia. Schizophr Res 158:91-99.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 대뇌 주름 지수 및 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하기 방법에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[0010] 검사대상 개체 및 정상 개체가 TPH2(Tryptophan Hydroxylase-2) rs4570625 유전자에 대하여 G 동형(homozygous) 군에서 G 동형 접합체(homozygote)를 가지고 있는지 확인하는 단계;

[0011] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체가 G 동형 접합체(homozygote)를 가지고 있을 경우, 우측 말단 ACC(anterior cingulate cortex)에서의 국부적인 대뇌 주름 지수(local gyrification index, LGI) 값을 측정하는 단계;

[0012] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 대뇌 주름 지수의 차이를 확인하는 단계를 포함하는, 대뇌 주름 지수 및 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 상기 검사대상 개체의 대뇌 주름 지수가 정상 개체의 대뇌 주름 지수에 비해 적어도 0.08 이상 높을 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

[0014] 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 전대상(anterior cingulate) 피질 및 전두엽 피질에서 나타나는 과도한 주름진 피질 양의 증가(hypergyria)와 MDD의 진단 및 전대상 피질 유전자형 사이의 상호작용 효과를 확인하여, 우울증 진단에 관한 정보를 제공함으로써 우울증의 정확한 조기 진단을 통해서 적시에 우울증을 치료하고 질병의 경과

가 악화되는 것을 예방할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 국소 대뇌 주름 지수(LGI)의 지도 및 자동화 피질 구획(parcellation)를 나타낸 도이다; A는 분석에서 별도로 생성된 모든 실험대상의 LGI 지도, 컬러 바는 LGI 스케일. B는 Desikan-Killiany 지도의 피질 구획 기준.

도 2는 주요 우울 장애(MDD)를 가진 환자와 건강한 대조군(HC) 간의 평균 국소 대뇌 주름 지수(LGI)의 차이를 나타낸 도이다; A는 MDD와 HC 그룹 사이의 LGI 값의 통계 비교 지도, B는 그룹 간 LGI 값의 차이.

도 3은 유전자형과 진단에 의해 결정된 그룹 중 rACC의 LGI 값의을 비교한 도이다; MDD-GG: MDD 및 GG 유전자형 환자, MDD-T: MDD 및 T 대립 유전자 환자, HC-GG: GG 유전자형 건강 대조군, HC-T: T 대립 유전자가 있는 건강 대조군, 오차 막대는 LGI 값의 표준 오차.

도 4는 기계학습기법을 기반으로 한 대뇌 국소 뇌주름지수 (LGI)와 TPH2 유전자 다형성 정보를 이용한 주요우울장애 진단의 통계적 예측 모형을 나타낸 모식도이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 하기 방법에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[0017] 검사대상 개체 및 정상 개체가 TPH2(Tryptophan Hydroxylase-2) rs4570625 유전자에 대하여 G 동형(homozygous) 군에서 G 동형 접합체(homozygote)를 가지고 있는지 확인하는 단계;

[0018] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체가 G 동형 접합체(homozygote)를 가지고 있을 경우, 우측 말단 ACC(anterior cingulate cortex)에서의 국부적인 대뇌 주름 지수(local gyrification index, LGI) 값을 측정하는 단계;

[0019] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 대뇌 주름 지수의 차이를 확인하는 단계를 포함하는, 대뇌 주름 지수 및 TPH2 rs4570625 유전자를 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0020] 용어 "개체"는 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0021] TPH2 rs4570625 유전자는 G 동형 접합체(homozygote) 또는 T 대립 유전자(allele) 운반 그룹으로 명명되는, 두 종류의 다형성(유전자형)을 나타낸다.

[0022] 용어 "G 동형 접합체(homozygote)"는 G 동형(homozygous) 군에서 G/G를 나타내는, 대립 인자가 같은 유전자로 구성된 개체를 의미한다.

[0023] 용어 "T 대립 유전자(allele) 운반 그룹"은 G 동형(homozygous) 군에서 G/T를 나타내는, 대립 인자가 다른 유전자로 구성된 개체를 의미한다.

[0024] 상기 검사대상 개체의 대뇌 주름 지수가 정상 개체의 대뇌 주름 지수에 비해 적어도 0.08 이상 높을 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.

[0026] 국소적인 대뇌피질 접힘(gyrification)은 대뇌 피질 연결성의 초기 신경 발달을 반영하고, 정신 장애에서 잠재적인 신경 endophenotype(행동학적 증상으로부터 유래한 유전적 연결성을 가진 표현형)으로 간주된다. 본 발명에서는 전두엽 피질(prefrontal cortex, PFC)과 전대상 피질(anterior cingulate cortex, ACC)의 대뇌피질 접힘의 변화와 MDD 환자의 TPH2 rs4570625 다형성과의 관련성을 조사하여, MDD 환자의 우측 말단 ACC(right rostral anterior cingulate cortex, right rostral ACC)(P=0.001), 내측 안와전두 피질(medial orbitofrontal cortex)(P=0.003) 및 전두극(frontal pole) (P=0.001)에서 현저한 주름진 피질 양의 증가(hypergyria)를 확인하였으며 ACC(P=0.003)의 국소 대뇌 주름 지수에서 유의한 진단-유전자형(genotype-by-diagnosis) 상호작용이 나타나는 것을 확인하였다. MDD 환자는 G 대립 유전자 동형 접합체 그룹에서만 말단 ACC에 대한 국소 대뇌 주름 지수가 증가했다. 이러한 결과는 TPH2 rs4570625에 의해 부여된 유전적 위험과 함께 대뇌 피질 접힘 패턴의 이상이 우울감을 유발할 수 있는 감정 조절과 관련된 신경 회로의 조절 장애와 관련이 있을 수 있음을 시사한다. 한편, 우울증의 중증도와 질병의 지속 기간을 포함한 MDD 환자의 임상 상태를 반영할 수 있는 인자는 PFC와 ACC의 국소 대뇌 주름 지수에 영향을 미치지 않았으며, 향정신성 약물 또한 대뇌피질 접힘에 아무런 영향을 미치지 않았다.

[0028] 따라서, 본 발명에 따른 결과는 전대상 피질 및 전두엽 피질의 과도한 주름진 피질 양의 증가와 MDD의 진단 및

전대상 피질 유전자형 사이의 긴밀한 상호작용 효과를 나타내며, 감정 처리를 중재하는 신경 회로의 기능 장애와의 관련성을 시사한다.

[0030] 본 발명에서는 주요우울장애 환자에서 정서 처리 뇌신경회로에 해당하는 전대상 피질, 내측 안와전두 피질, 전두극 부위의 대뇌 주름 지수(LGI) 증가 및 세로토닌 대사에 영향을 미치는 TPH2 rs4570625 유전자 다형성을 이용하여 높은 진단 정확도를 갖는 우울증 진단 예측 모형을 개발하였다. 이전의 우울증의 진단 예측 모형은 대뇌 회백질 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 대뇌 주름 지수(LGI)와 TPH2 rs4570625 유전자 다형성 정보를 통합한 예측으로 정확도를 향상시킬 수 있다.

[0032] 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 뇌자기공명영상 및 TPH2 유전자형 분석을 진행하고, 그 정보를 토대로 우울증 진단의 예측에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0034] 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.

[0036] **<실시예 1> 실험방법**

[0037] **<1-1> 참가자**

[0038] 고려대학교 안암병원 외래 정신과에서 MDD 환자 113 명을 모집하였다. MDD 그룹의 포함 기준은 다음과 같았다: (1) 20-65 세의 성인; (2) DSM-IV에서 MDD의 진단 기준 충족. DSM-IV 기준에 근거한 MDD의 진단은 공인된 정신과 의사에 의해 이루어졌으며 각 정신과 의사는 DSM-IV Axis I 장애(SCID-1)에 대한 구조화임상면접(Structured Clinical Interview)을 통해 진단의 유효성을 확인하였다. 두 명의 공인 정신과 의사에 의한 MDD 진단 일치율은 0.95 이상이었다. 두 명의 정신과 의사는 생애 차트 방법론(life-chart methodology)을 사용한 인터뷰를 실시하여 MDD 환자의 병력 기간을 평가하였다. MDD 환자에 대한 제외 기준은 다음과 같았다: (1) 지난 6 개월 이내에 축(Axis) 1 또는 축 2에 대한 다른 주요 정신 질환(DSM-IV 기준에 근거)의 추정 1 차 합병증 진단; (2) 정신병적 특징이 있는 MDD; (3) 입원 치료가 필요한 급성 자살 또는 살인 환자; (4) 심각하거나 불안정한 의학적 질병의 병력; (5) 신체 검사 및 일상적인 검사실 검사에서의 이상 소견; (6) 일차 신경학 병고; (7) 맥박 조정기, 금속 임플란트 및 폐쇄 공포증을 포함한 MRI의 금기 사항. 정신과적 병력이 없는 20-65 세의 건강한 참가자 86 명을 건강한 대조군으로 광고를 통해 지역 사회에서 모집하였다. 이사회에서 인증한 정신과 의사는 SCID-1을 사용하여 건강한 대조군 참가자를 평가하고 현재 또는 이전의 정신과적 장애가 없음을 확인하였다. 또한 MDD 환자에게 적용된 것과 동일한 제외 기준을 사용하였다. 실험 참가자는 에든버러 테스트(Edinburgh Handedness Test)를 사용하여 오른손잡이임이 확인되었다. 모든 참가자는 확인된 한국인이었으며, 그들의 민족성은 참가자 가족의 3대에 따른 민족 동일시를 통해 확인되었다.

[0039] MDD 환자와 건강한 대조군 참가자는 17 항목 HDRS(Hamilton Depression Rating Scale)을 사용하여 MRI 스캔한 당일 우울 증상의 심각성을 평가하였다. MDD 군의 항우울제 치료에 대한 자세한 내용을 표 1에 정리하였다. 실험 프로토콜은 고려대학교 안암병원 기관감사위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받았다. 헬싱키 선언에 따라, 모든 참가자는 실험 참여에 대한 서면 동의서를 제출하였다.

[0041] **<1-2> 유전형 분석**

[0042] 각 참가자의 말초 정맥혈에서 추출한 게놈 DNA 샘플을 TPH2 rs4570625(Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4570625, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4570625)의 유전형 분석에 사용하였다. 구체적으로, 정맥혈 8cc를 말초 혈관에서 채취하여 EDTA 튜브에 넣어 처리하였고, 24시간 이내 DNA 분리가 불가능한 경우에는 20℃에서 냉동 보관하였다. 게놈 DNA는 현재 상업적으로 개발된 DNA 추출 키트(Wizard® genomic DNA purification kit, Promega, USA) 제품을 이용하여 분리하였으며, 유전자증폭기(thermocycler)를 통해 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 일으켜 증폭시킨 이후에, 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동기법(electrophoresis method)을 통해서 TPH2 rs4570625 유전자 다형성을 분석하였다. PCR 수행 시 사용한 프라이머는 다음과 같았다 : forward, 5'-TGCA TAGAGGCATCACAGGA-3'(서열번호 1); reverse, 5'-CATTCCAATTC CACTCTTCCA-3'(서열번호 2); extension, 5'-CTCACACATTTGCATGC ACAAAATTA-3'(서열번호 3). 유전형 분석 성공률은 95 % 이상이었다. 대립 유전자 빈도와 Hardy-Weinberg 평형의 세부 사항은 표

1에 설명되어 있다.

[0044] **<1-3> MRI 데이터 획득**

[0045] 다음 매개 변수를 포함하는 3D T1-weighted MP-RAGE(magnetization prepared rapid gradient-echo)을 사용한 3.0 T Siemens Trio 전신 영상 시스템(Siemens Medical Systems, Iselin, NJ)을 이용하여 MRI 스캔을 전방 - 교차 - 후부 - 교차 선과 평행하게 획득하였다: 1,900 ms 반복 시간, 2.6 ms 에코 시간, 220 mm 시야, 256 X 256 매트릭스 크기, 1 mm 슬라이스 두께, 176 틈 없는 코로날(coronal) 슬라이스, 0.86 × 0.86 × 1 $mm^3$ 복셀(voxel), 16° 플립 각도, 자극 횟수 = 1. 개인의 MRI 스캐닝 후, MRI 시스템과 환자의 머리 움직임 등으로 인한 동작의 인공물(artifact)을 육안으로 점검하고, 인공물이 관찰되면 피검자의 MRI를 재검사하였다.

[0047] **<1-4> 이미지 가공**

[0048] 양측 PFC(prefrontal cortex)와 ACC(anterior cingulate cortex)에서 각 피질 부분의 평균 LGI(local gyrification index) 값은 FreeSurfer 5.3 Development Version(Massachusetts General Hospital, Boston, http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu)에서 구현된 전체 뇌 구조에 대한 자동 재구성 과정을 사용하여 3D T1 이미지에서 계산되었다. surfer.nmr.mgh.harvard.edu). 평균 LGI는 각 대뇌 피질 영역에서 외측 볼록(겉) 표면 영역에 대한 매설 피질 표면 영역의 비율로 정의된다. LGI 값을 계산하기 위해 T1 이미지에서 계산한 피질 표면 재구성의 3 차원 모델을 FreeSurfer에서 사전처리하였다. 대뇌 피질 재건술의 순차적 과정 후에 LGI는 자동 FreeSurfer 절차를 사용하여 구형 3 차원 관심 영역에서 피질 접힘의 정도를 나타내는 외부 선체 표면에 대한 전구(sulcal) 및 묻힌 표면의 비율을 측정하여 계산하였다. 각 반구는 Desikan-Killiany 지도에 따라 33 개의 뚜렷한 피질 영역으로 자동으로 분리되었다. 이들 영역의 평균 LGI 값이 자동으로 계산되었다. 33 개 피질 소포의 LGI 값 중 PFC 또는 ACC를 구성하는 11 개의 피질 영역(반구당)을 최종 분석에 사용하였다. PFC 또는 ACC에 포함된 11 개의 피질 영역 목록은 표 2에 설명되어 있다. 도 1은 Desikan-Killiany 지도에 따라 분석에서 별도로 생성된 모든 피험자와 자동화된 피질 부분의 LGI 지도를 나타낸다.

[0050] **<1-5> 서포트 벡터 머신 (support vector machine, SVM) 기법**

[0051] MDD 100명 및 대조군 참가자 100명의 LGI 및 TPH2 rs4570625 유전자 다형성 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 분급기(classifier)는 트레이닝 세트에서 MDD와 정상인으로 표시되어 있는 사람들을 대상으로 LGI 및 TPH2 rs4570625 유전자 다형성을 기반으로 MDD와 정상인에 대한 판별을 훈련하며, 테스트 세트에서는 실제로 MDD 예상 환자에 대해서 MDD 진단을 예측하였다(도 4).

[0053] **<1-6> 통계적 분석**

[0054] 주요 분석에서 두 반구 모두에서 PFC 또는 ACC를 포함하는 22 개의 피질 영역에서 추출한 LGI 값을 MDD와 건강한 대조군과 TPH2 rs4570625 유전자형(GG vs. TT+TG) 사이에서 비교하였으며, 유전자형-진단(genotype-by-diagnosis) 상호작용을 확인되었다. 유전자형 그룹은 TPH2 유전자에 대한 이미징 연구에 따라 우성 모델(위험-대립 유전자 동질 접합체를 비위험 대립 유전자의 운반체와 비교)에 따라 나누었다. FreeSurfer에 의해 계산된 LGI 값은 개별 LGI 값을 종속 변수; 진단 및 유전자형을 독립 변수; 연령, 성별, 교육 수준(한국 교육 시스템의 수준에 따라 1-3 점), 각 참가자의 전체 뇌의 전체 피질 표면적의 감소된 값(자동 FreeSurfer 절차로 계산)을 공변량으로 포함하는 공분산(ANCOVA)의 양방향 분석법으로 분석되었다. 다중 비교를 교정하기 위해 진단의 주요 효과와 진단-유전자형(diagnosis-by-genotype) 상호작용 모두에 대해 q <0.05, 총 44 개의 비교(진단 집단에 따른 LGI 값 22 개 비교와 진단-유전자형 상호작용의 22 개 분석)를 사용하는 FDR(False Discovery Rate) 보정을 적용하였다. 연령 및 HDRS 점수는 독립적 t-검정을 사용하여 분석하였고, 유전자형에 따른 성별, 교육 수준, 유전자형 및 약물 미투여 환자의 분포를 카이 제곱 검정으로 분석하였다. 통계 분석은 SPSS 버전 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 수행하였다.

[0056] **<실시예 2> 실험결과**

[0057] **<2-1> 인구통계학적 및 유전적 특성**

[0058] 연령, 성별, 교육 수준, HDRS 점수 및 HDRS 점수(t (197)=16.649, P <0.001)를 제외한 유전자형 분포에서 MDD와 건강한 대조군 간에 유의한 차이는 없었다(표 1). 약물 치료를 하지 않은(Drug-naive) MDD 환자의 비율은 유전자형 하위 그룹( $\chi 2$=0.486, P=0.514)에 따라 크게 다르지 않았다.

표 1

[0060]

| | MDD (n=113) | HC (n=86) | P value |
|---|---|---|---|
| Age | 42.78±1.07 | 39.23±1.46 | 0.051 |
| Gender(female/male) | 90/23 | 59/27 | 0.099 |
| Education level | | | |
| Elementary and middle school | 25 | 11 | 0.128 |
| High school or college/university | 80 | 64 | - |
| Above graduate school | 8 | 11 | - |
| HDRS-17 score | 15.05±0.74 | 2.23±0.23 | <0.001 |
| Duration of illness (months) | 45.81±4.60 | - | - |
| TPH2 gene rs4570625 | | | |
| TT | 26 | 30 | 0.174 |
| TG | 60 | 40 | - |
| GG | 27 | 16 | - |
| HWE | 0.510 | 0.680 | - |
| TT+TG | 86 | 70 | 0.391 |
| GG | 27 | 16 | - |
| T(allele frequency) | 112 | 100 | 0.105 |
| G(allele frequency) | 114 | 72 | - |
| Drug-naive /Antidepressant | 52/61 | - | - |
| TT+TG | 38/48 | - | 0.514 |
| GG | 14/13 | - | - |
| Antidepressant type | | | |
| SSRI | 31 | - | - |
| SNRI | 9 | - | - |
| NDRI | 6 | - | - |
| NaSSA | 4 | - | - |
| Combination | 11 | - | - |

[0061] MDD, major depressive disorder; HC, healthy controls; HDRS-17, Hamilton Depression Rating Scale; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; SNRI, serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor; NDRI, norepinephrinedopamine reuptake inhibitor; NaSSA, noradrenergic and specific serotonergic antidepressant; Combination, combinations of two or more types of antidepressants.

[0062] 데이터는 연령, HDRS-17 점수 및 질병 지속 기간에 대한 평균값±표준 오류.

[0063] 유전자형에 따른 성별, 교육 수준, TPH2 유전자형, 대립 유전자 빈도 및 약물 치료를 하지 않은 MDD 환자의 분포에 대한 P 값은 카이 제곱 검정으로 산출.

[0064] 연령과 HDRS-17 점수의 비교를 위한 P 값은 독립적인 t- 검정을 사용 산출.

[0065] 대립 빈도 (T/G): MDD 환자 0.50 / 0.50, HC 0.58 / 0.42.

[0067] **<2-2> 진단 및 TPH2 rs4570625 유전자형에 따른 LGI 값의 차이**

[0068] MDC 환자는 건강한 대조군과 비교하여 우반구 내 내측 OFC(mOFC, F (1,198)=8.897, P=0.003, Cohen 's f=0.216; MDD=2.215±0.010, HC=2.203±0.013), 말단(rostral) ACC(F (1,198)=11.576, P=0.001, Cohen 's f=0.246; MDD=2.163±0.009, HC=2.154±0.014), 및 전두극(F (1,198)=12.248, P=0.001, Cohen 's f=0.253; MDD=2.233±0.012, HC=2.205±0.013)에서 LGI에 차이를 나타내었다(표 2 및 도 2). 또한, 우측 말단 ACC(F (1, 198)=9.265, P=0.003, Cohen 's f=0.220)의 LGI 값에서 유의한 진단-유전자형 상호작용 효과를 확인하였다(표 2). FDR 교정 후 위의 결과는 중요하였다. 유전자형 단독은 주 분석에서 LGI 값에 영향을 미치지 않았다(표 2).

[0069] 우측 말단 ACC에서 현저한 진단-유전자형 상호작용을 보이는 LGI 값의 사후 분석을 수행하였다. 주 분석에서 사

용된 것과 같은 공변량을 조절하면서 one-way ANCOVA를 사용하여 MDD 환자와 건강한 대조군 사이에서 오른쪽 주머니에서 얻은 LGI를 각 유전자형 그룹 내에서 비교했다. G 동형(homozygous) 군에서 G 동형 접합체(homozygote)를 가진 MDD 환자는 G 동형 접합체(homozygote)를 가진 건강한 대조군에 비하여 우측 말단 ACC(rACC)(F (1,42)=13.551, P=0.001, Cohen 's f=0.605; MDD=2.195±0.012, HC=2.105±0.026)에서 LGI 값을 유의하게 증가시켰다(표 3 및 도 3). T 대립 유전자(allele) 운반 그룹에서 우측 말단 ACC 값은 MDD 환자와 건강한 대조군간에 차이가 없었다(P> 0.1)(표 3 및 도 3).

[0070] 이차 분석으로 Desikan-Killiany 지도 내 PFC 또는 ACC에 포함되지 않은 대뇌 피질 영역(두 반구 내 44 개의 대뇌 피질 영역)으로부터 추출한 LGI 값에 대해 동일한 통계 검정을 수행하였으나, 유의미한 결과는 나타나지 않았다.

*표 2*

[0072]

| Cortical regions | MDD vs. HC | | | | GG vs. TT+TG | | | Diagnosis×Genotype interaction | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | P | Cohen's f | MDD vs. HC | F | P | Cohen's f | F | P | Cohen's f |
| L superior frontal cortex | 0.273 | 0.602 | 0.038 | - | 1.214 | 0.272 | 0.080 | 0.147 | 0.702 | 0.028 |
| L rostral anterior cingulate cortex | 2.817 | 0.095 | 0.121 | - | 0.196 | 0.659 | 0.032 | 0.684 | 0.409 | 0.060 |
| L caudal anterior cingulate cortex | 0.184 | 0.668 | 0.031 | - | 0.185 | 0.668 | 0.031 | 0.475 | 0.492 | 0.050 |
| L rostral middle frontal cortex | 0.245 | 0.621 | 0.036 | - | 0.893 | 0.346 | 0.068 | 2.349 | 0.127 | 0.111 |
| L caudal middle frontal cortex | 0.005 | 0.945 | 0.005 | - | 2.063 | 0.153 | 0.104 | 0.517 | 0.473 | 0.052 |
| L medial orbitofrontal cortex | 4.234 | 0.041 | 0.149 | MDD>HC | 0.657 | 0.419 | 0.059 | 1.451 | 0.230 | 0.087 |
| L lateral orbitofrontal cortex | 2.272 | 0.133 | 0.109 | - | 2.451 | 0.119 | 0.113 | 2.414 | 0.122 | 0.112 |
| L pars opercularis | 1.534 | 0.217 | 0.090 | - | 1.788 | 0.183 | 0.097 | 1.275 | 0.260 | 0.082 |
| L pars orbitalis | 0.009 | 0.923 | 0.007 | - | 3.797 | 0.053 | 0.141 | 0.028 | 0.866 | 0.012 |
| L pars triangularis | 0.005 | 0.946 | 0.005 | - | 0.876 | 0.350 | 0.068 | 0.243 | 0.622 | 0.036 |
| L frontal pole | 2.097 | 0.149 | 0.105 | - | 0.526 | 0.469 | 0.053 | 0.306 | 0.581 | 0.040 |
| R superior frontal cortex | 2.617 | 0.107 | 0.117 | - | 0.110 | 0.740 | 0.024 | 2.059 | 0.153 | 0.104 |
| R rostral anterior cingulate cortex | 11.576 | 0.001[a] | 0.246 | MDD>HC | <0.001 | 0.994 | 0.001 | 9.265 | 0.003[a] | 0.220 |
| R caudal anterior cingulate cortex | 1.969 | 0.162 | 0.102 | - | <0.001 | 0.982 | 0.002 | 0.328 | 0.567 | 0.041 |
| R rostral middle frontal cortex | 2.470 | 0.118 | 0.114 | - | 0.129 | 0.720 | 0.026 | 0.057 | 0.811 | 0.017 |
| R caudal middle frontal cortex | 0.778 | 0.379 | 0.064 | - | 0.632 | 0.428 | 0.058 | 3.325 | 0.070 | 0.132 |
| R medial orbitofrontal cortex | 8.897 | 0.003[a] | 0.216 | MDD>HC | 0.137 | 0.712 | 0.027 | 5.609 | 0.019 | 0.171 |
| R lateral orbitofrontal cortex | 2.738 | 0.100 | 0.120 | - | 0.714 | 0.399 | 0.061 | 3.822 | 0.052 | 0.141 |
| R pars opercularis | 0.457 | 0.500 | 0.049 | - | 0.026 | 0.873 | 0.012 | 1.345 | 0.248 | 0.084 |
| R pars orbitalis | 2.489 | 0.116 | 0.114 | - | 1.435 | 0.232 | 0.087 | 2.347 | 0.127 | 0.111 |
| R pars triangularis | 1.877 | 0.172 | 0.099 | - | 0.004 | 0.950 | 0.005 | 0.993 | 0.320 | 0.072 |
| R frontal pole | 12.248 | 0.001[a] | 0.253 | MDD>HC | 0.615 | 0.434 | 0.057 | 3.677 | 0.057 | 0.139 |

[0074] MDD, major depressive disorder; HC, healthy controls; GG, GG genotype of rs4570625; TT+TG, TT or TG genotype of rs4570625; L, left hemisphere; R, right hemisphere.

[0075] F와 P 값은 연령, 성별, 교육 수준 및 총 표면적을 공변량으로 한 공분산 보정의 양방향 분석을 사용하여 산출.

[0076] 진단 효과(MDD vs. HC) 및 진단-유전자형(diagnosis-by-genotype) 상호작용 분석 시 FDR(False Discovery Rate) 적용.

[0077] [a] : FDR 교정 후 남아있는 유의미한 피질 영역.

표 3

[0079]

| | GG | | | | | TG+TT | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cortical regions | MDD | HC | F | P | Cohen's f | MDD | HC | F | P | Cohen's f |
| R rostral anterior cingulate cortex | 2.195 ±0.063 | 2.105 ±0.102 | 13.551 | 0.001 | 0.605 | 2.154 ±0.106 | 2.165 ±0.132 | 0.365 | 0.547 | 0.049 |

[0080] MDD, major depressive disorder; HC, healthy controls; GG, GG genotype of rs4570625; TT1TG, TT or TG genotype of rs4570625; L, left hemisphere.

[0081] 데이터는 LGI 수치에 대한 평균값±표준 오류.

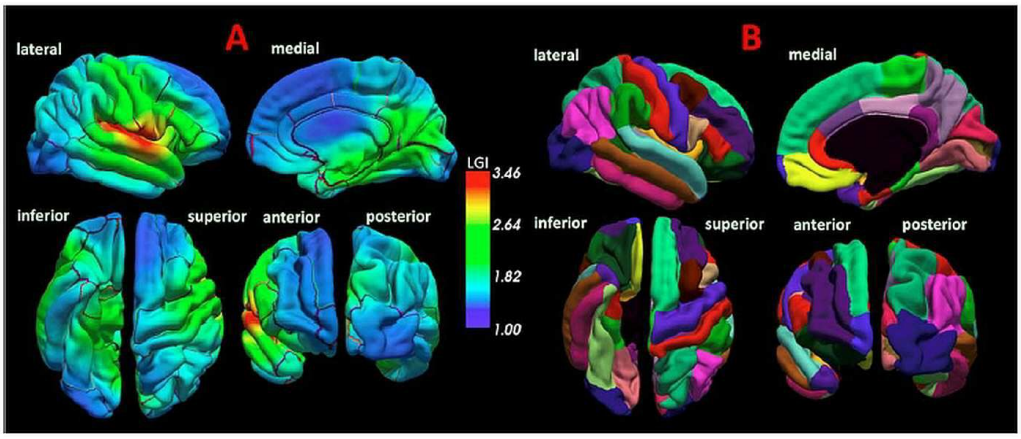
[0082] F와 P 값은 연령, 성별, 교육 수준 및 총 표면적을 공변량으로 한 공분산 보정의 단방향 분석을 사용하여 산출.

[0084] **<2-3> LGI와 약물, 우울증 중증도 및 질병 지속 기간의 연관**

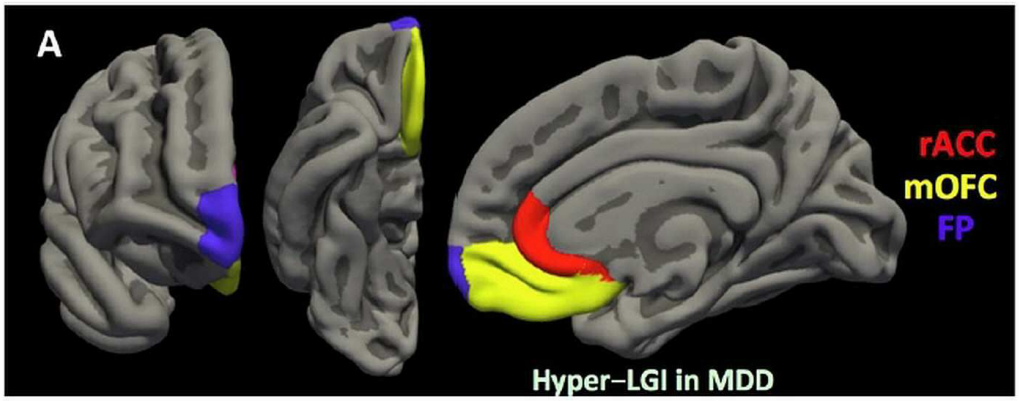
[0085] gyrification에 대한 향정신성 약물의 효과를 평가하기 위해, 주 분석에서 사용된 것과 같은 공변량을 가진 one-way ANCOVA를 사용하여 약물 치료를 한 환자 및 약물 치료를 하지 않은 환자 사이의 ROI의 LGI 값을 비교했다. 약물 치료를 하지 않은 환자와 약물 치료를 한 환자(우측 상측 전두엽(right superior frontal cortex), P> 0.05, 모든 다른 ROI, P> 0.1) 사이의 LGI 값에 유의한 차이가 없었다. 부분 상관 분석을 사용하고 연령, 성별, 교육 수준, 전체 피질 표면적을 보정한 MDD 환자에서 HDRS 점수와 22 개의 피질 영역의 LGI 값 사이의 상관관계를 조사하였으나 유의한 상관관계를 확인할 수 없었다(모든 P> 0.1, 우측 판개부(pars opercularis) 제외: P> 0.05). HDRS 점수에서 사용했던 것과 동일한 통계 방법을 사용한, 질병 지속 기간과 ROI의 LGI 값 간의 상관관계 분석을 통해 우측 상측 전두엽에서 상관관계를 확인하였다(r=-0.235, P=0.033). 그러나, 이 결과는 양 반구체에서 22 건의 비교를 위한 FDR 교정 이후에 유의하지 않았다. 다른 피질 부위는 유의한 결과를 나타내지 않았다(모든 P> 0.1, 좌측 전두극(frontal pole) 제외, P> 0.05).

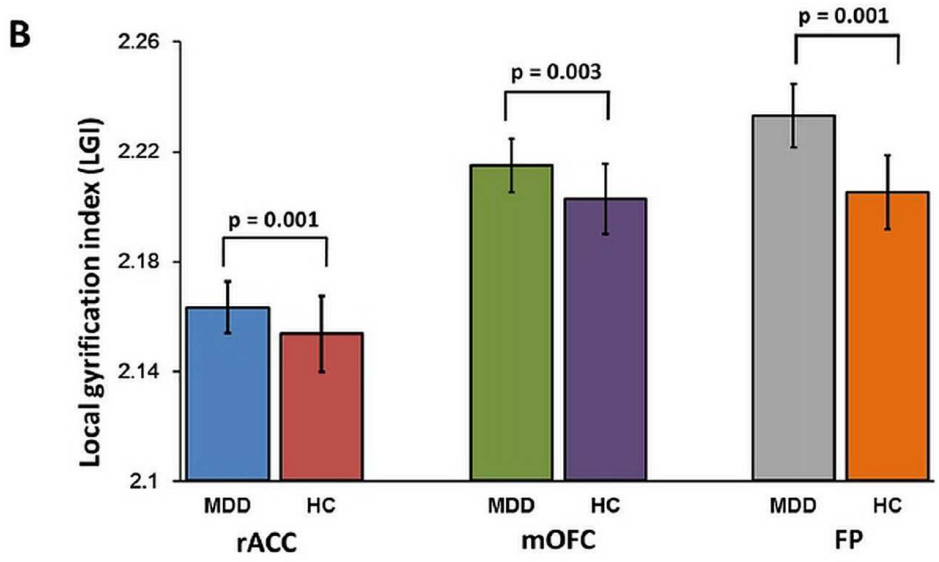
## 도면

### 도면1

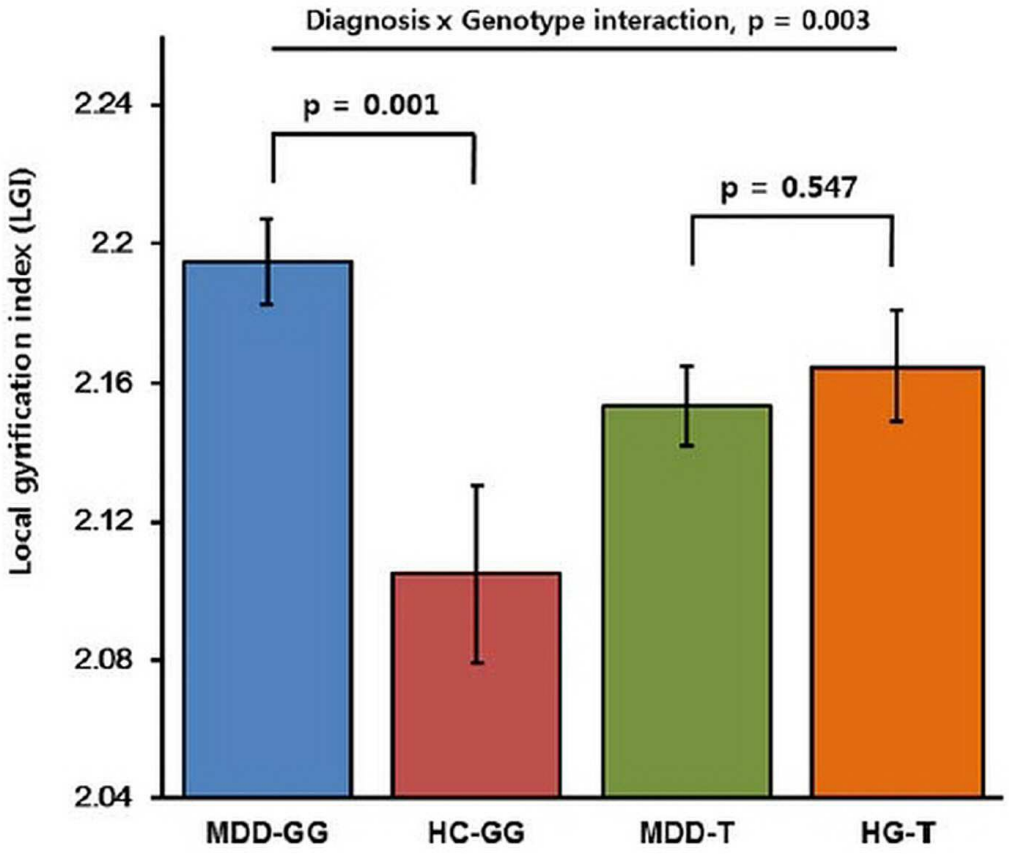


도면2

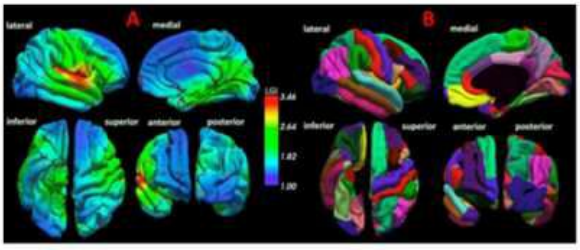

A
rACC
mOFC
FP
Hyper-LGI in MDD


B
Local gyrification index (LGI)
2.26
2.22
2.18
2.14
2.1
p = 0.001
p = 0.003
p = 0.001
MDD
HC
rACC
mOFC
FP

도면3



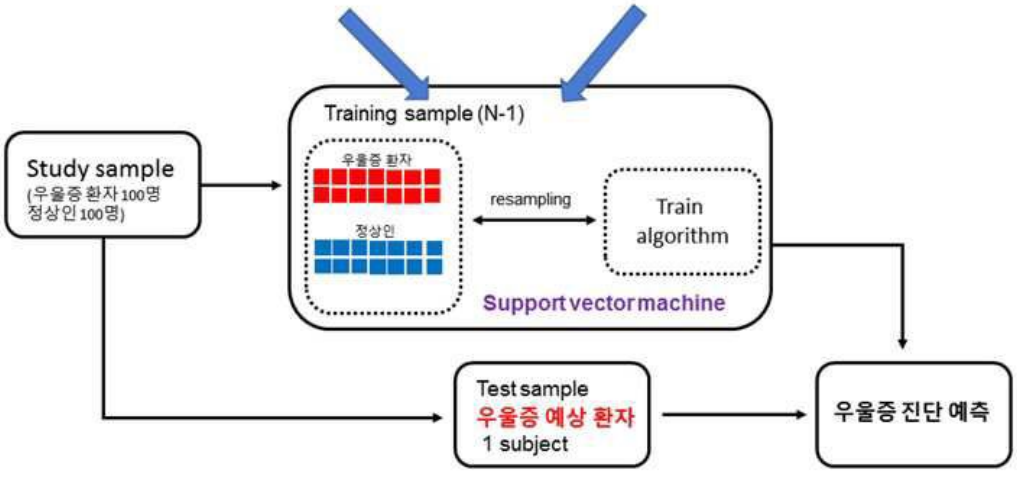

도면4



우울증 (예상) 환자의 대뇌 국소 주름 지수 (LGI) 데이터



TPH2 유전자 다형성 데이터



## 서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Gyrification index and TPH2 rs4570625 gene for providing information about diagnosis of major depressive disorder

<130> DHP17-284

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

tgcatagagg catcacagga 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 2

cattccaatt ccactcttcc a 21

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> extension primer

<400> 3

ctcacacatt tgcatgcaca aaatta 26