(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0132899
(43) 공개일자 2024년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2531/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0026180
(22) 출원일자 2023년02월27일
심사청구일자 2023년02월27일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김재민
경상남도 진주시 소호로19번길 11, 111동 1602호
고진신
경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 103동 1701호
(74) 대리인
위병갑

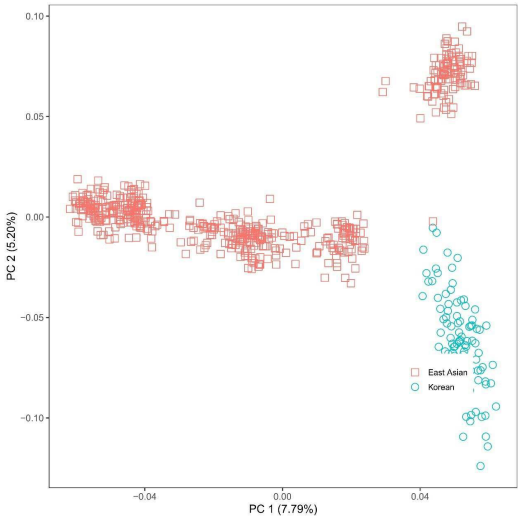
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **혈관 노화 예측용 SNP마커 및 이를 이용한 혈관 노화 예측방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈관 노화 예측용 SNP마커 및 이를 이용한 혈관 노화 예측방법에 관한 것으로, Genome-wide association study를 이용하여, 혈관 노화와 관련된 60개의 유전자 중 64개의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism)을 확인하였다. 또한, 확인된 64개의 단일염기 다형성 중 *PTPN14*, *PFKFB3*, *TLE1*, *TAB2*, *RUNX1*, *HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP가, 혈관 정맥 내피세포의 노화와 관련성이 높은 것을 확인하여, 혈관 노화의 진단 및 예후 예측을 위한 마커로 이용될 수 있는 것을 확인하였다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4 및 *ELK3 유전자*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SNP는

1) *PTPN14* 유전자의 1:214659101(서열번호 15);

2) *PFKFB3* 유전자의 kgp22051919(서열번호 16);

3) *TLE1* 유전자의 9:84302707(서열번호 17);

4) *TAB2* 유전자의 rs7746208(서열번호 18);

5) *RUNX1* 유전자의 rs140330787(서열번호 19);

6) HDAC4 유전자의 rs59539170(서열번호 20); 및

7) *ELK3*로 유전자의 rs12424513(서열번호 21); 인 것인 SNP.

청구항 3

PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4 및 *ELK3*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 노화 예측용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 측정하는 제제는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍 및 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 세트인 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍은 *PTPN14* 유전자의 1:214659101(서열번호 15)를 증폭하고;

상기 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍은 *PFKFB3* 유전자의 kgp22051919(서열번호 16)를 증폭하고;

상기 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍은 *TLE1* 유전자의 9:84302707(서열번호 17)를 증폭하고;

상기 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍은 *TAB2* 유전자의 rs7746208(서열번호 18)를 증폭하고;

상기 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍은 *RUNX1* 유전자의 rs140330787(서열번호 19)를 증폭하고;

상기 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍은 *HDAC4* 유전자의 rs59539170(서열번호 20)를 증폭하고;

상기 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍은 *ELK3*로 유전자의 rs12424513(서열번호 21)를 증폭하는 것인, 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 혈관 노화 예측용 키트.

청구항 7

1) 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

2) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

3) 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화 예측을 위한 정보제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 3) 단계에서 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, RUNX1, HDAC4* 또는 *ELK3* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 저발현되면, 혈관 노화로 예측하는 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 3) 단계에서 측정된 *TAB2* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치와 비교하여 고발현되면 혈관 노화로 예측하는 것인, 방법.

청구항 10

1) 개체로부터 단리된 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

2) 후보물질 처리 후 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

3) 상기 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화로 인한 질병 예방 또는 치료용 조성물 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, RUNX1, HDAC4* 또는 *ELK3* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치보다 고발현되면, 후보물질이 혈관 노화 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로 판단하는 것인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 *TAB2* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치보다 저발현되면, 후보물질이 혈관 노화 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로 판단하는 것인, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 혈관 노화로 인한 질병은 혈관내 염증, 당뇨병, 고혈압, 뇌출혈 및 심실내 출혈로 이루어진 군에서 선택된 질환인 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈관 노화 예측용 SNP마커 및 이를 이용한 혈관 노화 예측방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 염기서열 다형성(Polymorphism)은 1% 초과하는 빈도로 나타나는 염기서열의 변이를 일컫는 것으로, 이 중 90%는 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이다. 인간 유전적 서열은 99.9% 동일하고, SNP는 약 250~1000bp 마다 하나씩 나타나며, 인간 유전체의 경우 약 2백만개의 SNP가 존재하고 이중 유전자에는 약 21,000개가 존재한다. 또한 1% 이하의 빈도로 나타나는 다른 단일염기의 변이는 통상 돌연변이(mutation)로 칭한다.

[0004] 염기서열 돌연변이 분석 또는 SNP는 DNA 서열분석은 DNA의 분석 뿐만 아니라, 다양한 질환, 예를 들어 암, 천식, 당뇨와 같은 질환을 유도하는 유전자 식별 또는 특정 질환과의 연관성을 판단할 수 있는 마커로서 중요한 역할을 한다. 따라서 단일염기다형성을 분석함으로써 사람의 경우 특정 질환에 대한 개인의 감수성을 파악하여, 염기서열의 차이로 인해 발생하는 선천성 질병에 대한 예방 또는 발병한 질환의 치료에 도움이 될 수 있다.

[0005] 한편, 혈관 노화는 반응성 산소 종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 축적 및 만성 저등급 염증과 관련이 있으며, 이는 내피 기능 장애와 죽상동맥경화증 및 뇌졸중의 발병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 산화 스트레스는 연령과 관련된 내피세포의 팽창 또는 혈관수축, 조직 관류의 손상과 같은 문제를 유도하는 내피세포에서 유래한 산화질소(Nitric Oxide, NO)의 불활성화를 촉진한다. 따라서 동맥 노화 과정에 대한 더 나은 기계론적 이해를 확립하고 이 증가하는 건강 문제를 치료하기 위한 생활 습관 및 약리학적 대책을 모두 평가하는 것이 중요하다.

[0006] 장수하는 가족 구성원은 궁극적으로 인구 사망률에 기여하는 관상 동맥 질환(Coronary Artery Disease, CAD), 암 및 제2형 당뇨병과 같은 질병으로부터 보호하는 대립 유전자의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이러한 가설은 사망의 주요 원인인 일반적인 질병과 강력한 연관성을 보여주는 게놈 차원 연관 연구(Genome-Wide Association Study, GWAS)에서 인과적 SNP의 식별에 의해 테스트되고 뒷받침되었다. 현재까지 혈관 노화의 원인이 되는 유전적 변이체의 추적은 크게 제한되어져 있는 실정이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 혈관 노화의 원인이 되는 유전적 변이체를 추적하고자 연령 관련 혈관 기능 및 표현형 변화의 스펙트럼을 탐색하기 위해 한국인의 반응성 충혈 지수(Reactive Hyperemia Index, RHI), 혈관 내피 기능 및 당뇨병의 심혈관 위험 인자, 고혈압 빈도 및 폐쇄성 CAD를 측정하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2013-0027093호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 노화 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 혈관 노화 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 1) 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[0014] 2) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

[0015] 3) 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 1) 개체로부터 단리된 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0017] 2) 후보물질 처리 후 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

[0018] 3) 상기 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화로 인한 질병 예방 또는 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3 유전자*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 노화 예측용 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 혈관 노화 예측용 키트를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 1) 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[0024] 2) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

[0025] 3) 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 1) 개체로부터 단리된 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0027] 2) 후보물질 처리 후 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

[0028] 3) 상기 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화로 인한 질병 예방 또는 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 Genome-wide association study를 이용하여, 혈관 노화와 관련된 60개의 유전자 중, 64개의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism)을 확인하였다. 또한, 확인된 64개의 단일염기 다형성 중 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP가, 혈관 정맥 내피세포의 노화와 관련성이 높은 것을 확인하여, 혈관 노화의 진단 및 예후 예측을 위한 마커로 사용될 수 있어, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 동아시아인과 한국인 코호트의 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)결과를 나타낸 도이다.

도 2는 혈관 내피 기능에 대한 전체 게놈에서의 GWAS의 mahattan plot을 나타낸 도이다.

도 3은 전체 게놈에서 확인된 p-value들의 Q-Q 플롯을 나타낸 도이다.

도 4는 독립된 대상집단에서 후보 유전자들의 누적효과를 나타낸 도이다.

도 5는 노화에 따른 혈관내피세포내 7개 후보 유전자의 SNP의 발현량을 비교한 도이다.

도 6은 *TLE1* 유전자 보호대립유전자의 대륙별 빈도 차이 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0034] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0035] 본 발명은 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3 유전자*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 제공한다.

[0036] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 SNP는

[0037] 1) *PTPN14* 유전자의 1:214659101(서열번호 15);

[0038] 2) *PFKFB3* 유전자의 kgp22051919(서열번호 16);

[0039] 3) *TLE1* 유전자의 9:84302707(서열번호 17);

[0040] 4) *TAB2* 유전자의 rs7746208(서열번호 18);

[0041] 5) *RUNX1* 유전자의 rs140330787(서열번호 19);

[0042] 6) *HDAC4* 유전자의 rs59539170(서열번호 20); 및

[0043] 7) *ELK3*로 유전자의 rs12424513(서열번호 21); 인 것일 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서, '다형성(polymorphism)'은 단일 유전자 좌위에 두 가지 이상의 대립 유전자기 존재하는 경우를 의미하며, '다형성 부위(polymorphic site)'란 상기 대립 유전자가 존재하는 유전자 좌위를 의미한다. 다형성 부위 중에서, 사람에 따라 단일 염기만이 상이한 것을 '단일염기다형성', 즉 SNP(single nucleotide polymorphism)라고 한다.

[0045] 본 발명에 있어서, '대립유전자(allele)'는 상동염색체의 동일한 유전자좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 말한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP은 두 종류의 대립인자(biallele)를 갖는다.

[0046] 또한, 본 발명은 *PTPN14*, *PFKFB3*, *TLE1*, *TAB2*, *RUNX1*, *HDAC4* 및 *ELK3*로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 단일 염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 측정하는 제제를 포함하는 혈관 노화 예측용 조성물을 제공한다.

[0047] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 측정하는 제제는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍 및 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 세트인 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍은 *PTPN14* 유전자의 1:214659101(서열번호 15)를 증폭하고;

[0049] 상기 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍은 *PFKFB3* 유전자의 kgp22051919(서열번호 16)를 증폭하고;

[0050] 상기 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍은 *TLE1* 유전자의 9:84302707(서열번호 17)를 증폭하고;

[0051] 상기 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍은 *TAB2* 유전자의 rs7746208(서열번호 18)를 증폭하고;

[0052] 상기 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍은 *RUNX1* 유전자의 rs140330787(서열번호 19)를 증폭하고;

[0053] 상기 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍은 *HDAC4* 유전자의 rs59539170(서열번호 20)를 증폭하고;

[0054] 상기 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍은 *ELK3*로 유전자의 rs12424513(서열번호 21)를 증폭하는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 수 있다. 상기 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 혈관 노화 예측용 키트를 제공한다.

[0057] 상기 키트에는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍 및 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 세트 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0058] 예를 들어, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, 상기 프라이머 세트 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0059] 또한, 상기 키트는 안내서를 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 1) 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[0061] 2) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *PTPN14*, *PFKFB3*, *TLE1*, *TAB2*, *RUNX1*, *HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

[0062] 3) 측정된 *PTPN14*, *PFKFB3*, *TLE1*, *TAB2*, *RUNX1*, *HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화 예측을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 3) 단계에서 측정된 *PTPN14*, *PFKFB3*, *TLE1*, *RUNX1*, *HDAC4* 또는 *ELK3* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치와 비교하여, 저발현되면 혈관 노화로 예측하는 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 3) 단계에서 측정된 *TAB2* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치와 비교하여, 고발현되면 혈관 노화로 예측하는 것일 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 1) 개체로부터 단리된 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0066] 2) 후보물질 처리 후 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 측정하는 단계; 및

[0067] 3) 상기 측정된 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP 발현을 대조군의 기준치와 비교하는 단계;를 포함하는 혈관 노화로 인한 질병 예방 또는 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

[0068] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, RUNX1, HDAC4* 또는 *ELK3* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치보다 고발현되면, 후보물질이 혈관 노화 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[0069] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 *TAB2* 유전자의 SNP 발현이 대조군의 기준치보다 저발현되면, 후보물질이 혈관 노화 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[0070] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혈관 노화로 인한 질병은 혈관내 염증, 당뇨병, 고혈압, 뇌출혈 및 심실내 출혈로 이루어진 군에서 선택된 질환인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 상기 "예방"은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 혈관 노화로 인한 증상이 상기 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.

[0072] 상기 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.

[0073] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0075] **<실시예 1> 혈관 노화 예측용 SNP 발굴을 위한 준비**

[0076] **1-1. 연구 설계**

[0077] 모든 참가자는 서면 동의서를 제공하였다. 본 발명은 경상대학교 임상시험심사위원회의 승인을 받았으며(승인번호: GIRB-A16-Y-0012), 남가람 코호트의 데이터를 사용하였다. 남가람 코호트는 2015년부터 2017년까지 이 코호트에 참여하기로 동의한 만 50세 이상 농촌 지역에 거주하는 사람들로 구성되었다. 1,010명의 남가람 코호트에 등록된 참가자들은 신체검사, 혈액검사, 방사선 검사를 수행하였다. 그 후, 혈관 내피 기능을 구체적으로 알아보기 위하여, 비침습적 EndoPAT 장치를 사용하여 손가락 끝에서 맥박 신호 진폭을 측정하고 RHI 값으로 정량화하였다. 모델 y = b0 + b1×나이 + e를 이용하여 연령 효과에 대한 RHI의 표현형을 조정한 다음, R 소프트웨어의 "lm" 함수를 사용하여 각 성별 그룹의 z-점수에 대한 잔차를 개별적으로 표준화하였다.

[0079] **1-2. 게놈 데이터 및 품질관리**

[0080] Genomic DNA 및 순환 무세포 DNA들은 각각 26개의 전혈 및 97개의 혈청 샘플에서 추출되었다. cfDNA의 경우 제조업체 설명서의 프로토콜에 따라 REPLI-g Qiagen 키트를 사용하여 Whole Genome Amplification(WGA)을 수행하였다. 그 후, DNA를 고밀도 Illumina Infinium Asian Screening Array(ASA-24v1)로 유전자형을 분석하였다. PLINK 1.9을 이용하여, missingness > 20%("-geno 0.20") 이거나, 대립유전자형빈도(minor allele frequency, MAF) < 0.05("-maf 0.05")인 SNP들은 배제하였고, 총 177,236개의 autosomal SNP들을 얻었다. 위 유전자형 데

이터를 IMPUTE2 소프트웨어를 사용하여 1000 Genomes 패널에 입력하였다. 그 후, 동일한 품질 관리 기준을 적용하였을때, 3,084,757개의 autosomal genotyped/imputed SNP들을 확인하였다.

[0082] **1-3. Genome-wide association study (GWAS)**

[0083] GCTA 도구에서 구현된 선형 모델은 혈관 노화 표현형과의 연관성을 테스트하는 데 사용되었다. 먼저, 모든 genotyped SNP("-make-grm")들과 모든 개인들 사이의 유전 관계 매트릭스(GRM)를 추정한 다음 각 SNP가 표현형에 미치는 영향을 테스트했다("-mlma" 옵션). 초기 GWAS 결과의 견고성을 테스트하기 위해 악력과 근육량을 공변량("-qcovar")으로 포함하여 동일한 분석을 수행하였다. 또한, 가까운 친척 사이의 표현형 유사성이 비유전적 영향(예: 공유 환경) 때문일 수 있는 가능성을 피하기 위해 추정 관계 > 0.05인 각 개인을 제외하였다. $P = 5 \times 10^{-5}$을 달성한 SNP들은 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였고, 가장 가까운 유전자를 표시하였다. SnpEff는 후보 SNP들의 해로운 효과를 예측하는 데 사용되었다.

[0085] **1-4. Gene set enrichment analysis (GSEA)**

[0086] DAVID 6.8을 사용하여 GWAS 후보 유전자 중에서 특정 기능적 범주(GO)를 가진 유전자의 상당한 집중도(enrichment)가 있는지 확인하였다. 0.05의 *p*-value가 통계적 유의성에 대한 기준으로 사용되었다. GWAS 카탈로그는 또한 특정 GWAS 특성의 과대대표(over-representation)을 확인에 이용되었다. 이전에 보고된 최소 300개의 관련 히트가 있는 특성은 분석을 위해 유지되었다. GWAS 변이체와 겹치는 60개의 후보 유전자의 수를 계산하였다. 각 GWAS 특성에 대한 중첩 수가 예상보다 더 극단적인지 확인하기 위하여, 동일한 크기의 동일한 수의 영역을 게놈에서 1000번 리샘플링하였다. 그 후, R 소프트웨어의 "pnorm" 및 "adjust" 기능을 사용하여 z-점수, 관련 P-값 및 FDR(False Discovery Rate)을 추정하였다. 결과의 강인성을 테스트하기 위해 5개의 독립적인 순열을 반복하였다.

[0087]

[0088] **1-5. 조직 특이적 발현 분석**

[0089] 유전자형-조직 발현(Genotype-Tissue Expression, GTEx) V8 데이터베이스는 이용가능한 인간의 모든 조직에 걸친 각 후보 유전자의 발현을 특징짓기 위하여 사용하였다. FUMA GWAS("SNP2FUNC" 함수)를 사용하여 후보 유전자의 조직 특이성을 확인하였다. 결과를 중요한 변이 유전자 쌍으로 제한하기 위해, eQTL 맵핑을 기반으로 0.05의 FDR을 적용하여 "SNP2GENE" 함수를 이용하여 중요한 SNP에 유전자 주석을 첨부하였다.

[0091] **1-6. 대립유전자와 연관된 혈통**

[0092] 보다 다양한 인종(아프리카, 아메리카, 유럽, 동아시아 및 남아시아)에서 대립 유전자 빈도를 평가하기 위해, 1000 게놈 프로젝트를 활용하였다. 전체 게놈 데이터를 활용하면서, GCTA 도구("PCA 20")를 사용하여 PCA를 추가로 수행하였다.

[0094] **1-7. 통계 분석 및 시각화**

[0095] 대륙 그룹과 RHI 값 사이, discovery training과 실험에 참여한 인구들 사이의 대립유전자 빈도 분포의 차이를 확인하기 위하여, *t*-test를 통한 통계분석을 진행하였다. "ggplot2", "ggpubr", "smplot" 및 동일한 소프트웨어의 기본 내장 패키지를 이용하여 Manhattan Plot과 boxplot을 생성하였다.

[0097] **1-8. 정량적 real-time PCR에 의한 mRNA 수준 측정**

[0098] 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 정량화된 후보 유전자의 발현 수준 변화를 조사하였다. 인간 내피 세포(HUVEC)는 Gibco에서 구입하여 20% FBS(GenDEPOT, F0900-050), 30mg/ml의 내피 세포 성장 보충제(ECGS)(corning, 306006) 및 100mg/ml 헤파린(시그마, H3149)가 보충된 Medium 199(sigma, M4530)에서 배양하였다. 전체 RNA는 NucleoSpin RNA 키트(macherey-nagel, 740955)를 사용

하여 제조업체의 방법에 따라 추출하였다. 추출된 RNA는 iScript cDNA Synthesis 키트(bio-rad, BR1708891)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 정량적 real-time PCR(q-PCR)은 Rotor-Gene Q-Pure Detection 시스템(QIAGEN)과 함께 IQ SYBR Green Supermix(bio-rad, BR1708882)를 사용하여 수행하였다. 프라이머 목록은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0099]

서열번호	Name	Sequence 5' →3'
1	*PTPN14 (F)*	AGTGTGGTGAGCACTACTCGGA
2	*PTPN14 (R)*	CTACACACGCTGCCATTGGTGA
3	*PFKFB3 (F)*	GGCAGGAGAATGTGCTGGTCAT
4	*PFKFB3 (R)*	CATAAGCGACAGGCGTCAGTTTC
5	*TLE1 (F)*	AGGATGCTTCTAGCAGTCCAGC
6	*TLE1 (R)*	GTGTGCTGGATTTCAGAACAGGC
7	*TAB2 (F)*	TATTCAGCACCTCACGGACCCT
8	*TAB2 (R)*	CTTTGAAGTCGTTCCATTCTGGC
9	*RUNX1 (F)*	CCACCTACCACAGAGCCATCAA
10	*RUNX1 (R)*	TTCACTGAGCCGCTCGGAAAAG
11	*HDAC4 (F)*	AGGTGAAGCAGGAGCCCATTGA
12	*HDAC4 (R)*	GGTAGTTCCTCAGCTGGTGGAT
13	*ELK3 (F)*	TTCTGACTCCGAGTCCACTGCT
14	*ELK3 (R)*	AGCTCTGTCCAGACTGGGGATT
-	*GAPDH (F)*	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
-	*GAPDH (R)*	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

[0101] 대조 유전자(*GAPDH*)을 통해 유전자 발현을 정량화하였다. 각 그룹에 대해 최소 3회 반복 측정하였다. 데이터의 유의성을 테스트하기 위해 GraphPad Prism 소프트웨어 v7.00(GraphPad)을 사용하여 일원 분산 분석(one-way analysis of variance ,ANOVA)에 의해 통계적 유의성을 평가하였다. 0.05 미만의 P-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0103] **<실시예 2> 피험자들의 특성 및 주성분 분석(PCA)**

[0104] 한국의 남부지역(진주시)에서 모집한 50세 이상의 총 1,010명의 피험자로 구성된 남가람 프로젝트의 데이터를 사용하였으며, 모든 피험자의 연령을 포함하여 악력, 근력 점수 및 혈관 내피 기능연령 관련 질적 및 양적 특성을 측정하였다. 이 중 97명의 개체를 선택하고 Illumina Infinium SNP Genotyping Array ASA의 177,236 SNP에서 혈청 샘플을 사용하여 유전자형을 분석하였다. 19명의 중복되는 개체에 걸쳐 혈청에서 gDNA(전혈)와 cfDNA(혈청)에서 추출한 DNA 간에 95.8%의 전체 유전자형 일치성을 확인하였다. 상기의 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0105]

샘플ID	Common SNP	Matching SNP	일치율
GS0007	468603	426107	90.93%
GS0346	587711	578859	98.49%
GS0405	517092	492246	95.20%
GS0265	542617	520932	96.00%
GS0050	534664	513102	95.97%
GS0647	538627	518957	96.35%
GS0073	531055	507442	95.55%
GS0415	549791	529444	96.30%
GS0449	614533	611282	99.47%
GS0576	576291	565899	98.20%

GS0670	536299	516372	96.28%
GS0239	511308	485429	94.94%
GS0548	420337	373569	88.87%
GS0260	525425	500141	95.19%
GS0295	571766	558250	97.64%
GS0352	512766	487180	95.01%
GS0650	469359	433922	92.45%
GS0334	563311	547295	97.16%
GS0254	541080	521190	96.32%

[0106] 상기 표 2에서 common SNP는 중복되는 SNP를 나타내고, Matching SNP는 중복되는 SNP 사이에서 동일한 빈도를 같은 SNP를 나타내며, 일치율은 중복되는 SNP 중에 동일한 빈도를 같은 SNP의 비율을 나타내고, Matching SNP/Common SNP × 100으로 계산하였다.

[0107] 코호트의 동질성을 평가하고 모든 대상이 동아시아 혈통임을 확인하기 위하여 주성분 분석(PCA)을 수행하였다(도 1).

[0108] 다중 로지스틱 회귀 분석 결과 성별(P = 0.0348)과 연령(P = 0.0269)이 내피 혈관 기능에 유의적인 상관관계가 있는 것을 확인하였다. 하기 표 3에 다중 로지스틱 회귀 분석 결과를 나타내었다.

표 3

[0109]

변수	모든 참가자 (N = 1010)				
	B	SE	Lower	Upper	p-value
여성	-0.67	0.317	-1.3	-0.055	0.0348
나이	0.03	0.014	0.004	0.057	0.0269
근육 감소	-0.583	0.241	-1.063	-0.123	0.0153
비타민	0.013	0.008	-0.003	0.03	0.1086
인슐린	0.008	0.02	-0.029	0.049	0.669
악력	-0.039	0.016	-0.07	-0.008	0.0141

[0110] 내피 혈관 기능은 노인에서 감소하는 경향을 확인하였으며, 그리고 경향은 여성에서 훨씬 두드러졌다. 위와 같은 분석은 또한 연령 관련 특성, 근육 손실(P = 0.0153) 및 악력(P = 0.0141)과 상당한 표현형 상관관계가 있는 것을 확인하였다.

[0112] **<실시예 3> 혈관 노화-GWAS 신호 확인**

[0113] 97명의 한국인을 포함하는 GWAS는 autosomal SNP들과 RHI를 사용하여 연령에 맞게 조정하고 각 성별 그룹의 z-점수로 표준화하여 진행되었다. 60개의 유전자에 걸쳐 있는 총 64개의 SNP들이 고안된 genom-wide significance level ($P = 5 \times 10^{-5}$)을 초과하였다.(도 2 및 표 4). 64개의 SNP 서열은 표 5에 나타내었다.

표 4

[0114]

염색체	bp	A1	A2	Freq	b	se	p	가장 가까운 유전자
5	52398005	C	T	0.059	2.255	0.382	3.68E-09	*MOCS2*
10	62010155	T	C	0.494	-7.722	1.314	4.20E-09	*ANK3*
1	214659101	T	C	0.494	-7.575	1.315	8.46E-09	*PTPN14*
1	187209108	A	C	0.060	2.030	0.392	2.20E-07	*LINC01036*
4	6246543	C	T	0.489	-4.833	0.943	3.01E-07	*WFS1*
14	50724996	T	C	0.488	-4.777	0.946	4.45E-07	*L2HGDH*
17	63444990	C	T	0.051	2.015	0.410	9.07E-07	*AXIN2*
9	84302707	A	G	0.058	1.978	0.409	1.32E-06	*TLE1*
5	174611803	C	T	0.057	1.672	0.352	1.98E-06	*ARL2BPP6*
17	72314399	A	G	0.084	1.531	0.326	2.75E-06	*DNAI2*

11	35842967	A	G	0.108	1.282	0.274	2.93E-06	*TRIM44*
7	50152510	A	G	0.090	1.454	0.312	3.20E-06	*ZPBP*
2	125346013	A	G	0.076	1.714	0.370	3.53E-06	*CNTNAP5*
2	240156312	T	C	0.056	2.007	0.434	3.68E-06	*HDAC4*
8	58133642	C	T	0.091	1.409	0.305	3.76E-06	*LINC00588*
12	133473221	T	C	0.057	1.893	0.412	4.44E-06	*CHFR*
6	94922348	G	A	0.067	1.689	0.369	4.62E-06	*SNORA18*
2	234910442	C	T	0.065	1.671	0.366	5.07E-06	*TRPM8*
18	22800826	T	C	0.071	1.738	0.383	5.85E-06	*ZNF521*
7	50182079	T	C	0.092	1.473	0.325	5.98E-06	*C7orf72*
9	24618331	C	T	0.064	1.479	0.329	7.17E-06	*IZUMO3*
18	9158643	A	G	0.065	1.627	0.363	7.17E-06	*ANKRD12*
1	22472732	G	A	0.104	1.335	0.297	7.18E-06	*WNT4*
10	129381096	A	G	0.186	1.085	0.243	8.26E-06	*NPS*
16	60997653	T	C	0.081	1.441	0.323	8.37E-06	*GNPATP*
6	143797752	C	T	0.074	1.652	0.372	9.01E-06	*PEX3*
13	33757815	A	G	0.067	1.481	0.338	1.16E-05	*STARD13*
13	110633410	C	T	0.255	0.879	0.201	1.20E-05	*RN7SKP10*
10	6222774	A	G	0.062	1.599	0.367	1.29E-05	*PFKFB3*
17	63437097	T	C	0.085	1.444	0.332	1.37E-05	*AXIN2*
16	83979552	A	C	0.103	1.334	0.307	1.41E-05	*OSGIN1*
3	24632124	C	A	0.065	1.825	0.420	1.41E-05	*EIF3KP2*
6	149493632	A	G	0.198	1.021	0.235	1.42E-05	*TAB2*
10	127900223	A	C	0.082	1.522	0.351	1.49E-05	*ADAM12*
10	68371063	C	A	0.071	1.825	0.424	1.67E-05	*CTNNA3*
21	36797083	C	T	0.137	1.077	0.250	1.67E-05	*RUNX1*
3	111651285	A	G	0.223	0.882	0.205	1.71E-05	*PHLDB2*
10	130247163	G	A	0.124	1.283	0.300	1.89E-05	*MKI67*
19	53344701	G	A	0.066	1.544	0.361	1.91E-05	*ZNF28*
6	107764862	A	G	0.099	1.283	0.301	2.04E-05	*PDSS2*
1	231488541	A	G	0.070	1.786	0.420	2.14E-05	*SPRTN*
11	11317991	T	C	0.072	1.467	0.346	2.21E-05	*GALNT18*
7	50145007	A	G	0.090	1.393	0.328	2.23E-05	*ZPBP*
6	143793155	A	G	0.071	1.631	0.385	2.24E-05	*PEX3*
10	2916766	A	G	0.064	1.589	0.377	2.52E-05	*PFKP*
11	104461298	G	A	0.053	1.810	0.430	2.53E-05	*CASP12*
3	175798213	A	G	0.058	1.641	0.392	2.78E-05	*EI24P1*
10	89596013	A	G	0.070	1.755	0.420	2.89E-05	*CFL1P1*
1	60822886	G	A	0.134	1.109	0.266	2.98E-05	*PGBD4P8*
4	181536971	G	A	0.057	1.588	0.381	3.04E-05	*LINC00290*
13	49944406	C	T	0.058	1.782	0.427	3.06E-05	*CAB39L*
4	79906385	G	A	0.064	1.653	0.397	3.12E-05	*LINC01088*
1	34684463	G	A	0.158	0.970	0.233	3.21E-05	*C1orf94*
20	22772814	T	C	0.053	1.764	0.427	3.60E-05	*KRT18P3*
18	5439417	A	G	0.113	1.307	0.316	3.61E-05	*EPB41L3*
5	112179909	A	C	0.131	1.172	0.285	3.82E-05	*APC*
20	22746255	C	T	0.050	1.856	0.451	3.85E-05	*KRT18P3*
6	121559651	C	T	0.086	1.449	0.352	3.88E-05	*TBC1D32*
1	182038718	A	G	0.154	1.013	0.248	4.45E-05	*ZNF648*
3	25105548	T	C	0.054	1.580	0.389	4.85E-05	*RNA5SP125*
12	96563954	C	T	0.088	1.373	0.338	4.89E-05	*ELK3*

13	71789085	T	C	0.059	1.677	0.413	4.93E-05	*LINC00348*
4	95601206	T	C	0.123	1.273	0.314	4.96E-05	*PDLIM5*
9	111406348	T	C	0.063	1.485	0.366	4.98E-05	*RPL36AP35*

표 5

[0116]

	gene	SNP	SNP sequence (5'-3')
1	*MOCS2*	kgp4619083	TTCTCGGCAG [T/C] AAAGTTTATA
2	*ANK3*	10:62010155	TGGAGTCTCG [C/T] TCTGTCGCCC
3	*PTPN14*	1:214659101	CGGAGTCTCG [C/T] TCTGTCGCCC
4	*LINC01036*	kgp9614090	TGAAAAGGAG [C/A] AGAGAAATGA
5	*WFS1*	4:6246543	AGTGTTGGAC [T/C] GCACAGTCTA
6	*L2HGDH*	14:50724996	TGCAGTGGCA [C/T] AATCACAACT
7	*AXIN2*	rs58768287	CCCACATTTC [T/C] GGCCGTCTCA
8	*TLE1*	9:84302707	CCGGGGACCA [G/A] AGGAGAAAAA
9	*ARL2BPP6*	rs4868495	GACTTACTAT [T/C] ACAGAGAAGC
10	*DNAI2*	rs55867106	TCCGGGTAAC [G/A] TTGCCTACAC
11	*TRIM44*	rs2958198	TCTGTGCTTC [G/A] TTTTCTCTGG
12	*ZPBP*	rs1585140	GAGATATGCA [G/A] AAGAGATCGC
13	*CNTNAP5*	kgp5247832	AATTGTCGTC [G/A] GTCTGAGGAA
14	*HDAC4*	rs59539170	TGTAGAGAGG [C/T] ATTATCATCC
15	*LINC00588*	GSA-rs11786845	AGAGGAAGGT [T/C] ATGGAGCTGC
16	*CHFR*	12:133473221	AGACACTCAG [C/T] GTTTCCTCAT
17	*SNORA18*	kgp17337641	CTGAACTGTG [A/G] CCCAAAGAAT
18	*TRPM8*	kgp3620172	CATCACTTGG [T/C] GGGAGCTGGA
19	*ZNF521*	kgp1703341	GATGGGGCAG [C/T] CCCTGAGTAG
20	*C7orf72*	rs10234768	GAATTGAAGA [C/T] ATTAACTGTA
21	*IZUMO3*	GSA-rs78757286	AGCATTATTT [T/C] CTCCCTAGCA
22	*ANKRD12*	rs75180660	TGATCACCTG [G/A] CTGATAATAG
23	*WNT4*	rs12042083	TAATGAGAAA [A/G] TCTCTTGGAG
24	*NPS*	rs12252756	CGATTGTTTT [G/A] CTTCCACATT
25	*GNPATP*	rs80310105	GTCATAGATG [C/T] TAAATAACTT
26	*PEX3*	kgp17044243	GTTGAACCAG [T/C] AGTACTTGTG
27	*STARD13*	rs11147512	AGTCAGATTT [G/A] GTGAGGGGAG
28	*RN7SKP10*	rs9555657	ACAGAAGAAC [T/C] AAGAGTTACT
29	*PFKFB3*	kgp22051919	TGTGTTCTGA [G/A] TGCTTTACTT
30	*AXIN2*	rs7219534	CTATGGAAAA [C/T] GAGTCAGACA
31	*OSGIN1*	kgp11781079	ATCCTGCTGG [C/A] CTGGCTCCTC
32	*EIF3KP2*	3:24632124	TTTCTAAGTC [A/C] CAAGATCTGG
33	*TAB2*	rs7746208	AGCAGATTCA [G/A] TTCTTCATGA
34	*ADAM12*	kgp4346098	CCACTAATAG [C/A] CTTCTCTGCT
35	*CTNNA3*	rs7070370	AACACAAAAA [A/C] GGATAAATAT
36	*RUNX1*	rs140330787	TGTGGTAAAA [T/C] GTTTTCTGGG
37	*PHLDB2*	rs754914	TTTGCTTTTC [G/A] TTTTTGTTTT
38	*MKI67*	10:130247163	TGGTTTTGGA [A/G] TAGGGAAAGG
39	*ZNF28*	rs10420793	GGGATGAATT [A/G] TGACCAAAGG
40	*PDSS2*	rs12202734	CCATCCCACC [G/A] TGTGGTGCAG
41	*SPRTN*	rs78209580	TAAAATCAAG [G/A] TGAAATTTGA
42	*GALNT18*	rs60842800	GACACTGTAG [C/T] TCTTAATCTC

43	*ZPBP*	7:50145007	ACTCCTATAT [G/A] TATTTCTTCT
44	*PEX3*	GSA-rs4896661	GGCTGATTTC [G/A] TAATCCATTC
45	*PFKP*	kgp1453415	CCATGCTGGC [G/A] ACATGGCACA
46	*CASP12*	rs80278125	GCTATGAGGA [A/G] TAACCTGGTG
47	*EI24P1*	JHU_3.175798212	GCCTTATGTC [G/A] TTTGTTCACT
48	*CFL1P1*	kgp9921725	CTTCCGAGTC [G/A] CTAAGACTAC
49	*PGBD4P8*	rs7513568	ACACAAAAAT [A/G] CTTAAATTAA
50	*LINC00290*	kgp2167036	ACCATTACAG [A/G] AAACAAGGAC
51	*CAB39L*	rs74072538	AATTTAAATA [T/C] ATTAAATTTA
52	*LINC01088*	rs78974865	TTTCTCCTTC [A/G] TGTTCCTTCT
53	*C1orf94*	rs705207	GGAAAAGCAA [A/G] GTTCTGACCA
54	*KRT18P3*	rs6113810	GCACACCTCA [T/C] GATAACTTCC
55	*EPB41L3*	GSA-rs75591954	TCCTTTCTCT [G/A] AACTGTTCTC
56	*APC*	rs1804197	CTTTAAAAGA [C/A] TGAAAAATTT
57	*KRT18P3*	rs6075948	ACAAGTGAAA [T/C] AAAAGAACTG
58	*TBC1D32*	6:121559651	TAAGCTACCA [T/C] ACAATCAAAG
59	*ZNF648*	kgp9545664	CAGTAAGCAT [G/A] TCTATTCTTT
60	*RNA5SP125*	kgp3023113	AGATGGGCAG [C/T] GGTGGGTGGA
61	*ELK3*	rs12424513	TTGAGGAGGA [T/C] GGGCAGGGAA
62	*LINC00348*	rs73511157	ACGAGAGAAA [C/T] GCTCTGGATC
63	*PDLIM5*	kgp5581913	CGTGAATGCG [C/T] TCACGTTGAG
64	*RPL36AP35*	rs10979426	AATACTTTTC [C/T] AAATAATTCT

[0118] 상기 표 4에서 bp는 physical position, A1는 minor 대립유전자, A2는 major 대립유전자, Freq은 minor 대립유전자의 빈도, b는 SNP effect, Se는 표준오차, P는 P value를 나타낸다.

[0119] 상기 유전자들 중 3개의 유전자가 genome-wide significance level을 충족하였다($P < 5 \times 10^{-8}$). 1.067개의 genomic 인자들은 코호트에서 인구 구조가 없음을 나타낸다(도 3). 위 후보들의 강건성을 확인하기 위하여, 악력과 근육량의 연령 관련 요인을 공변량으로 적용하여 연관 분석을 추가로 수행했으며, 이는 초기 분석에서 식별된 60개의 유전자 중 54개의 중요한 유전자를 선별하였다. 하기 표 6에 해당 유전자를 나타낸다.

표 6

[0120]

Chr	SNP	BP	A1	A2	Freq	b	SE	P	Closest Gene
5	kgp4619083	52398005	C	T	0.05882	2.24513	0.38464	5.31E-09	*MOCS2*
10	10:62010155	62010155	T	C	0.49412	-7.65424	1.32177	7.00E-09	*ANK3*
1	1:214659101	214659101	T	C	0.49359	-7.50423	1.32294	1.41E-08	*PTPN14*
1	kgp9614090	187209108	A	C	0.05952	2.02467	0.39408	2.78E-07	*LINC01036*
4	4:6246543	6246543	C	T	0.48901	-4.83941	0.94890	3.40E-07	*WFS1*
14	14:50724996	50724996	T	C	0.48781	-4.72310	0.95178	6.96E-07	*L2HGDH*
17	rs58768287	63444990	C	T	0.05056	2.02195	0.41273	9.63E-07	*AXIN2*
9	9:84302707	84302707	A	G	0.05769	1.94392	0.41130	2.29E-06	*TLE1*
11	rs2958198	35842967	A	G	0.10753	1.29646	0.27572	2.57E-06	*TRIM44*
5	rs4868495	174611803	C	T	0.05670	1.66052	0.35355	2.64E-06	*ARL2BPP6*
7	rs1585140	50152510	A	G	0.08989	1.45951	0.31405	3.36E-06	*ZPBP*
17	rs55867106	72314399	A	G	0.08421	1.52181	0.32834	3.57E-06	*DNA12*
8	GSA-rs11786845	58133642	C	T	0.09140	1.40440	0.30635	4.56E-06	*LINC00588*
2	kgp5247832	125346013	A	G	0.07595	1.70326	0.37175	4.61E-06	*CNTNAP5*
6	kgp17337641	94922348	G	A	0.06667	1.68400	0.37071	5.56E-06	*SNORA18*
12	12:133473221	133473221	T	C	0.05729	1.87493	0.41477	6.17E-06	*CHFR*

18	kgp1703341	22800826	T	C	0.07051	1.74101	0.38567	6.35E-06	*ZNF521*
2	rs59539170	240156312	T	C	0.05618	1.96159	0.43621	6.89E-06	*HDAC4*
18	rs75180660	9158643	A	G	0.06522	1.63293	0.36468	7.55E-06	*ANKRD12*
7	rs10234768	50182079	T	C	0.09239	1.46393	0.32722	7.68E-06	*C7orf72*
16	rs80310105	60997653	T	C	0.08140	1.45381	0.32536	7.89E-06	*GNPATP*
9	GSA-rs78757286	24618331	C	T	0.06395	1.47452	0.33134	8.58E-06	*IZUMO3*
2	kgp3620172	234910442	C	T	0.06522	1.63325	0.36843	9.29E-06	*TRPM8*
10	rs12252756	129381096	A	G	0.18617	1.07901	0.24474	1.04E-05	*NPS*
6	kgp17044243	143797752	C	T	0.07447	1.63883	0.37417	1.19E-05	*PEX3*
3	3:24632124	24632124	C	A	0.06471	1.84283	0.42272	1.30E-05	*EIF3KP2*
1	rs12042083	22472732	G	A	0.10440	1.30159	0.29912	1.35E-05	*WNT4*
10	kgp22051919	6222774	A	G	0.06186	1.59879	0.36876	1.45E-05	*PFKFB3*
13	rs11147512	33757815	A	G	0.06742	1.47119	0.33988	1.50E-05	*STARD13*
16	kgp11781079	83979552	A	C	0.10309	1.33178	0.30895	1.63E-05	*OSGIN1*
13	rs9555657	110633410	C	T	0.25544	0.86911	0.20211	1.71E-05	*RN7SKP10*
3	rs754914	111651285	A	G	0.22340	0.88590	0.20641	1.77E-05	*PHLDB2*
6	rs7746208	149493632	A	G	0.19780	1.01385	0.23649	1.81E-05	*TAB2*
17	rs7219534	63437097	T	C	0.08511	1.42964	0.33398	1.86E-05	*AXIN2*
10	rs7070370	68371063	C	A	0.07051	1.81737	0.42633	2.02E-05	*CTNNA3*
21	rs140330787	36797083	C	T	0.13684	1.07169	0.25163	2.05E-05	*RUNX1*
10	10:127900223	127900223	A	C	0.08247	1.50452	0.35347	2.08E-05	*ADAM12*
10	kgp4346098	127900223	A	C	0.08247	1.50452	0.35347	2.08E-05	*ADAM12*
11	rs60842800	11317991	T	C	0.07216	1.47718	0.34772	2.16E-05	*GALNT18*
10	10:130247163	130247163	G	A	0.12360	1.27536	0.30156	2.34E-05	*MKI67*
7	7:50145007	50145007	A	G	0.08974	1.39063	0.33026	2.55E-05	*ZPBP*
10	kgp1453415	2916766	A	G	0.06395	1.59572	0.37925	2.58E-05	*PFKP*
19	rs10420793	53344701	G	A	0.06593	1.52354	0.36332	2.75E-05	*ZNF28*
6	rs12202734	107764862	A	G	0.09890	1.26680	0.30300	2.90E-05	*PDSS2*
6	GSA-rs4896661	143793155	A	G	0.07065	1.61608	0.38690	2.95E-05	*PEX3*
11	rs80278125	104461298	G	A	0.05319	1.80072	0.43213	3.09E-05	*CASP12*
3	JHU_3.175798212	175798213	A	G	0.05814	1.63005	0.39396	3.51E-05	*EI24P1*
1	rs78209580	231488541	A	G	0.06962	1.74809	0.42267	3.54E-05	*SPRTN*
1	rs705207	34684463	G	A	0.15790	0.96899	0.23462	3.63E-05	*C1orf94*
4	kgp2167036	181536971	G	A	0.05670	1.58060	0.38291	3.66E-05	*LINC00290*
13	rs74072538	49944406	C	T	0.05814	1.76948	0.42995	3.86E-05	*CAB39L*
20	rs6113810	22772814	T	C	0.05263	1.76358	0.42938	4.00E-05	*KRT18P3*
1	rs7513568	60822886	G	A	0.13441	1.09622	0.26719	4.08E-05	*PGBD4P8*
10	kgp9921725	89596013	A	G	0.06962	1.72559	0.42203	4.34E-05	*CFL1P1*
18	GSA-rs75591954	5439417	A	G	0.11310	1.29872	0.31825	4.49E-05	*EPB41L3*
20	rs6075948	22746255	C	T	0.05000	1.85051	0.45362	4.51E-05	*KRT18P3*
4	rs78974865	79906385	G	A	0.06383	1.62033	0.39912	4.91E-05	*LINC01088*
9	rs10979426	111406348	T	C	0.06316	1.49391	0.36817	4.96E-05	*RPL36AP35*
4	kgp5581913	95601206	T	C	0.12346	1.28032	0.31562	4.98E-05	*PDLIM5*
10	rs10508223	2200068	C	T	0.16489	0.98293	0.24375	5.52E-05	*RNU6-576P*
3	kgp3023113	25105548	T	C	0.05376	1.57688	0.39122	5.56E-05	*RNA5SP125*
5	rs1804197	112179909	A	C	0.13095	1.15175	0.28628	5.74E-05	*APC*
14	kgp19687400	21501514	T	C	0.08750	1.30370	0.32436	5.84E-05	*NDRG2*
12	rs12424513	96563954	C	T	0.08824	1.36533	0.34008	5.95E-05	*ELK3*
18	kgp10191517	14146691	G	A	0.13636	1.06779	0.26650	6.16E-05	*NF1P5*
13	rs73511157	71789085	T	C	0.05851	1.66173	0.41564	6.39E-05	*LINC00348*
10	GSA-rs12780291	2189155	C	T	0.18421	0.92002	0.23028	6.46E-05	*RNU6-889P*

6	6:121559651	121559651	C	T	0.08642	1.41432	0.35430	6.56E-05	*TBC1D32*
9	9:138182452	138182452	T	C	0.07692	1.15760	0.29009	6.60E-05	*C9orf62*
4	rs12512152	173797669	C	T	0.07558	1.42438	0.35709	6.64E-05	*GALNTL6*
12	rs7315280	117320938	G	A	0.05263	1.72529	0.43312	6.79E-05	*HRK*
6	rs220944	94958322	C	T	0.07216	1.36891	0.34435	7.03E-05	*SNORA18*
16	rs7204028	86555680	A	G	0.07609	1.49301	0.37727	7.58E-05	*FOXF1*
8	rs2685359	27765925	A	G	0.13736	1.09397	0.27657	7.64E-05	*SCARA5*
22	rs5756596	37685896	G	A	0.32759	0.75679	0.19134	7.65E-05	*CYTH4*
13	13:40062144	40062144	T	C	0.10106	1.31672	0.33297	7.67E-05	*LHFP*
6	rs1515333	112338958	A	G	0.06452	1.58072	0.40006	7.77E-05	*WISP3*
16	JHU_16.83926409	83926410	G	A	0.09341	1.21368	0.30729	7.83E-05	*MLYCD*
2	JHU_2.46660751	46660752	C	A	0.06250	1.43231	0.36295	7.94E-05	*TMEM247*
6	rs1360909	94470429	A	G	0.06818	1.45657	0.36963	8.13E-05	*SNORA18*
1	kgp9545664	182038718	A	G	0.15385	0.98273	0.24947	8.17E-05	*ZNF648*
20	rs8117354	55484048	T	C	0.05618	1.72468	0.43785	8.18E-05	*RNU6-929P*
6	rs11155629	149494909	T	C	0.20000	0.97465	0.24807	8.53E-05	*TAB2*
5	kgp9649883	125312899	C	T	0.08824	1.33692	0.34098	8.83E-05	*RPSAP37*

[0122] 비유전적 영향으로 인해 관련된 개인 간의 표현형 유사성 편향을 테스트하기 위해 개인 쌍 중 하나를 제외하고 분석하였으며(추정된 관계 > 0.05, n = 96), 49개의 중요한 유전자들을 수득하였다. 하기 표 7에 해당 유전자들을 나타내었다.

표 7

[0123]

Chr	SNP	bp	A1	A2	Freq	b	se	p	Gene	matching	distance
10	10:62010155	62010155	T	C	0.494048	-7.6955	1.34508	1.06E-08	*ANK3*	.,match	
5	kgp4619083	52398005	C	T	0.059524	2.25909	0.395874	1.15E-08	*MOCS2*	.,match	
1	1:214659101	2.15E+08	T	C	0.493506	-7.54304	1.34617	2.10E-08	*PTPN14*	.,match	
1	kgp9614090	1.87E+08	A	C	0.060241	2.0314	0.402782	4.57E-07	*LINC01036*	.,match	
4	4:6246543	6246543	C	T	0.488889	-4.81144	0.96307	5.86E-07	*WFS1*	-	25033
14	14:50724996	50724996	T	C	0.487654	-4.75152	0.965394	8.57E-07	*L2HGDH*	.,match	
17	rs58768287	63444990	C	T	0.051136	2.02427	0.420312	1.46E-06	*AXIN2*	-	79691
9	9:84302707	84302707	A	G	0.058442	1.98678	0.420142	2.26E-06	*TLE1*	.,match	
5	rs4868495	1.75E+08	C	T	0.057292	1.67685	0.360033	3.20E-06	*ARL2BPP6*	-	105931
17	rs55867106	72314399	A	G	0.085106	1.53651	0.336393	4.93E-06	*DNAI2*	+	3376
11	rs2958198	35842967	A	G	0.108696	1.28328	0.28265	5.62E-06	*TRIM44*	+	13192
2	kgp5247832	1.25E+08	A	G	0.075949	1.72308	0.379816	5.72E-06	*CNTNAP5*	.,match	
7	rs1585140	50152510	A	G	0.090909	1.45438	0.320705	5.76E-06	*ZPBP*	.,match	
8	GSA-rs11786845	58133642	C	T	0.092391	1.40826	0.313168	6.90E-06	*LINC00588*	-	58460
2	rs59539170	2.4E+08	T	C	0.056818	2.00084	0.445505	7.08E-06	*HDAC4*	.,match	
6	kgp17337641	94922348	G	A	0.067416	1.6921	0.378169	7.66E-06	*SNORA18*	+	333401
12	12:133473221	1.33E+08	T	C	0.057895	1.8882	0.424013	8.46E-06	*CHFR*	.,match	
2	kgp3620172	2.35E+08	C	T	0.065934	1.66417	0.376362	9.79E-06	*TRPM8*	.,match	
19	rs10420793	53344701	G	A	0.061111	1.71343	0.388028	1.01E-05	*ZNF28*	.,match	
18	kgp1703341	22800826	T	C	0.070513	1.73185	0.3933	1.07E-05	*ZNF521*	.,match	
7	rs10234768	50182079	T	C	0.093407	1.47024	0.334011	1.07E-05	*C7orf72*	.,match	

9	GSA-rs78757286	24618331	C	T	0.064706	1.48321	0.33785	1.13E-05	*IZUMO3*	+	72387
1	rs12042083	22472732	G	A	0.105556	1.33276	0.305124	1.25E-05	*WNT4*	+	2270
18	rs75180660	9158643	A	G	0.065217	1.63121	0.373502	1.26E-05	*ANKRD12*	.,match	
10	rs12252756	1.29E+08	A	G	0.18617	1.08877	0.250483	1.38E-05	*NPS*	+	30161
16	rs80310105	60997653	T	C	0.082353	1.44473	0.332969	1.43E-05	*GNPATP*	+	307100
6	kgp17044243	1.44E+08	C	T	0.075269	1.64523	0.382783	1.72E-05	*PEX3*	.,match	
13	rs11147512	33757815	A	G	0.068182	1.48912	0.348029	1.88E-05	*STARD13*	.,match	
16	kgp11781079	83979552	A	C	0.098958	1.35542	0.318087	2.03E-05	*OSGIN1*	-	2335
17	rs7219534	63437097	T	C	0.086022	1.45079	0.340601	2.05E-05	*AXIN2*	-	87584
10	kgp22051919	6222774	A	G	0.0625	1.59966	0.376137	2.11E-05	*PFKFB3*	.,match	
6	rs7746208	1.49E+08	A	G	0.2	1.02733	0.242639	2.30E-05	*TAB2*	-	46145
13	rs9555657	1.11E+08	C	T	0.258242	0.875339	0.206872	2.32E-05	*RN7SKP10*	+	65643
3	3:24632124	24632124	C	A	0.065476	1.82164	0.430849	2.36E-05	*EIF3KP2*	+	34174
10	10:127900223	1.28E+08	A	C	0.083333	1.52036	0.36156	2.61E-05	*ADAM12*	.,match	
10	rs7070370	68371063	C	A	0.071429	1.81894	0.434517	2.84E-05	*CTNNA3*	.,match	
3	rs754914	1.12E+08	A	G	0.225806	0.881443	0.211284	3.02E-05	*PHLDB2*	.,match	
10	10:130247163	1.3E+08	G	A	0.125	1.28535	0.308119	3.02E-05	*MKI67*	+	322514
21	rs140330787	36797083	C	T	0.138298	1.0696	0.256744	3.10E-05	*RUNX1*	.,match	
5	rs1804197	1.12E+08	A	C	0.126506	1.24365	0.29928	3.25E-05	*APC*	.,match	
7	7:50145007	50145007	A	G	0.090909	1.39798	0.337281	3.40E-05	*ZPBP*	.,match	
11	rs60842800	11317991	T	C	0.072917	1.4716	0.355092	3.41E-05	*GALNT18*	.,match	
1	rs78209580	2.31E+08	A	G	0.06962	1.78648	0.431454	3.46E-05	*SPRTN*	.,match	
6	rs12202734	1.08E+08	A	G	0.1	1.27339	0.309411	3.86E-05	*PDSS2*	.,match	
6	GSA-rs4896661	1.44E+08	A	G	0.071429	1.62113	0.395716	4.19E-05	*PEX3*	.,match	
10	kgp1453415	2916766	A	G	0.063954	1.58531	0.387905	4.37E-05	*PFKP*	-	191759
1	rs7513568	60822886	G	A	0.13587	1.11088	0.271965	4.41E-05	*PGBD4P8*	+	259238
4	kgp2167036	1.82E+08	G	A	0.057292	1.58928	0.389757	4.55E-05	*LINC00290*	-	448271
11	rs80278125	1.04E+08	G	A	0.053763	1.80053	0.442053	4.64E-05	*CASP12*	-	295147
1	rs705207	34684463	G	A	0.159574	0.976779	0.239852	4.65E-05	*C1orf94*	.,match	
3	JHU_3.175798212	1.76E+08	A	G	0.05814	1.63646	0.402522	4.79E-05	*EI24P1*	+	11517
10	kgp9921725	89596013	A	G	0.070513	1.74911	0.431174	4.98E-05	*CFL1P1*	.,match	

[0125] 또한, 통계의 신뢰도를 높이기위해 Genomes Project reference panel에 삽입된 모든 SNP들로부터 GWAS를 수행하였으나, 추가적으로 유의미한 유전자를 도출해내지 못 하였다.

[0126] 초기 GWAS 결과를 이용하여, 각 후보 SNP의 보호 대립유전자를 RHI 값의 증가와 혈관 노화 속도를 감소시키는 대립유전자로 정의하였다. 하기 표 8에 해당 유전자들을 나타내었다.

표 8

[0127]

	염색체	SNP	BP	P	가장 가까운 유전자	b	Protective Allele	Risk Allele
1	5	kgp4619083	52398005	3.68E-09	*MOCS2*	2.25549	C	T
2	10	10:62010155	62010155	4.20E-09	*ANK3*	-7.72243	C	T
3	1	1:214659101	214659101	8.46E-09	*PTPN14*	-7.57509	C	T
4	1	kgp9614090	187209108	2.20E-07	*LINC01036*	2.03019	A	C
5	4	4:6246543	6246543	3.01E-07	*WFS1*	-4.83317	T	C

6	14	14:50724996	50724996	4.45E-07	*L2HGDH*	-4.77743	C	T
7	17	rs58768287	63444990	9.07E-07	*AXIN2*	2.01513	C	T
8	9	9:84302707	84302707	1.32E-06	*TLE1*	1.978	A	G
9	5	rs4868495	174611803	1.98E-06	*ARL2BPP6*	1.6717	C	T
10	17	rs55867106	72314399	2.75E-06	*DNAI2*	1.53065	A	G
11	11	rs2958198	35842967	2.93E-06	*TRIM44*	1.28166	A	G
12	7	rs1585140	50152510	3.20E-06	*ZPBP*	1.45434	A	G
13	2	kgp5247832	125346013	3.53E-06	*CNTNAP5*	1.71393	A	G
14	2	rs59539170	240156312	3.68E-06	*HDAC4*	2.0074	T	C
15	8	GSA-rs11786845	58133642	3.76E-06	*LINC00588*	1.40855	C	T
16	12	12:133473221	133473221	4.44E-06	*CHFR*	1.8927	T	C
17	6	kgp17337641	94922348	4.62E-06	*SNORA18*	1.68857	G	A
18	2	kgp3620172	234910442	5.07E-06	*TRPM8*	1.67112	C	T
19	18	kgp1703341	22800826	5.85E-06	*ZNF521*	1.73763	T	C
20	7	rs10234768	50182079	5.98E-06	*C7orf72*	1.47282	T	C
21	9	GSA-rs78757286	24618331	7.17E-06	*IZUMO3*	1.47865	C	T
22	18	rs75180660	9158643	7.17E-06	*ANKRD12*	1.62746	A	G
23	1	rs12042083	22472732	7.18E-06	*WNT4*	1.33479	G	A
24	10	rs12252756	129381096	8.26E-06	*NPS*	1.08489	A	G
25	16	rs80310105	60997653	8.37E-06	*GNPATP*	1.44131	T	C
26	6	kgp17044243	143797752	9.01E-06	*PEX3*	1.65165	C	T
27	13	rs11147512	33757815	1.16E-05	*STARD13*	1.48149	A	G
28	13	rs9555657	110633410	1.20E-05	*RN7SKP10*	0.879496	C	T
29	10	kgp22051919	6222774	1.29E-05	*PFKFB3*	1.59912	A	G
30	17	rs7219534	63437097	1.37E-05	*AXIN2*	1.44397	T	C
31	16	kgp11781079	83979552	1.41E-05	*OSGIN1*	1.33398	A	C
32	3	3:24632124	24632124	1.41E-05	*EIF3KP2*	1.82474	C	A
33	6	rs7746208	149493632	1.42E-05	*TAB2*	1.02083	A	G
34	10	kgp4346098	127900223	1.49E-05	*ADAM12*	1.52178	A	C
35	10	rs7070370	68371063	1.67E-05	*CTNNA3*	1.82502	C	A
36	21	rs140330787	36797083	1.67E-05	*RUNX1*	1.07715	C	T
37	3	rs754914	111651285	1.71E-05	*PHLDB2*	0.88229	A	G
38	10	10:130247163	130247163	1.89E-05	*MKI67*	1.28251	G	A
39	19	rs10420793	53344701	1.91E-05	*ZNF28*	1.5442	G	A
40	6	rs12202734	107764862	2.04E-05	*PDSS2*	1.28332	A	G
41	1	rs78209580	231488541	2.14E-05	*SPRTN*	1.78587	A	G
42	11	rs60842800	11317991	2.21E-05	*GALNT18*	1.46688	T	C
43	7	7:50145007	50145007	2.23E-05	*ZPBP*	1.39253	A	G
44	6	GSA-rs4896661	143793155	2.24E-05	*PEX3*	1.6309	A	G
45	10	kgp1453415	2916766	2.52E-05	*PFKP*	1.58857	A	G
46	11	rs80278125	104461298	2.53E-05	*CASP12*	1.80952	G	A
47	3	JHU_3.175798212	175798213	2.78E-05	*EI24P1*	1.64136	A	G
48	10	kgp9921725	89596013	2.89E-05	*CFL1P1*	1.75478	A	G
49	1	rs7513568	60822886	2.98E-05	*PGBD4P8*	1.10915	G	A
50	4	kgp2167036	181536971	3.04E-05	*LINC00290*	1.58761	G	A
51	13	rs74072538	49944406	3.06E-05	*CAB39L*	1.78226	C	T
52	4	rs78974865	79906385	3.12E-05	*LINC01088*	1.65264	G	A
53	1	rs705207	34684463	3.21E-05	*C1orf94*	0.970013	G	A

54	20	rs6113810	22772814	3.60E-05	*KRT18P3*	1.76383	T	C
55	18	GSA-rs75591954	5439417	3.61E-05	*EPB41L3*	1.30717	A	G
56	5	rs1804197	112179909	3.82E-05	*APC*	1.17207	A	C
57	20	rs6075948	22746255	3.85E-05	*KRT18P3*	1.85641	C	T
58	6	6:121559651	121559651	3.88E-05	*TBC1D32*	1.44943	C	T
59	1	kgp9545664	182038718	4.45E-05	*ZNF648*	1.01271	A	G
60	3	kgp3023113	25105548	4.85E-05	*RNA5SP125*	1.58026	T	C
61	12	rs12424513	96563954	4.89E-05	*ELK3*	1.37308	C	T
62	13	rs73511157	71789085	4.93E-05	*LINC00348*	1.67734	T	C
63	4	kgp5581913	95601206	4.96E-05	*PDLIM5*	1.27334	T	C
64	9	rs10979426	111406348	4.98E-05	*RPL36AP35*	1.48495	T	C

[0129] 또한, 고기능 변이에 대해 이러한 후보 유전자를 추가로 스크리닝하고 *MOCS2* 및 *SPRTN* 유전자에서 미스센스 변이를 확인하였다. 하기 표 9은 GWAS 결과 요약에서의 유전적 변이를 나타내었다.

표 9

[0130]

CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO
1	22472732	rs12042083	A	G	.	.	ANN=G,upstream_gene_variant,MODIFIER,WNT4,transcript
1	34684463	rs705207	A	G	.	.	ANN=G,3_prime_UTR_variant,MODIFIER,C1orf94,transcript
1	60822886	rs7513568	A	G	.	.	ANN=G,intergenic_region,MODIFIER,C1orf87-LOC101926964,intergenic_region
1	182038718	kgp9545664	G	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,ZNF648-LINC01344,intergenic_region
1	187209108	kgp9614090	C	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,LINC01036,transcript
1	214659101	1:214659101	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,PTPN14,transcript
1	231488541	rs78209580	G	A	.	.	ANN=A,missense_variant,MODERATE,SPRTN,transcript
2	125346013	kgp5247832	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,CNTNAP5,transcript
2	234910442	kgp3620172	T	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,TRPM8,transcript
2	240156312	rs59539170	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,HDAC4,transcript
3	24632124	3:24632124	A	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,MIR4792-RARB,intergenic_region
3	25105548	kgp3023113	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,RARB,transcript
3	111651285	rs754914	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,PHLDB2,transcript
3	175798213	JHU_3.175798212	G	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,NAALADL2-MIR7977,intergenic_region
4	6246543	4:6246543	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,LOC285484-WFS1,intergenic_region
4	79906385	4:79906385	A	G	.	.	ANN=G,intron_variant,MODIFIER,LINC01088,transcript
4	79906385	rs78974865	A	G	.	.	ANN=G,intron_variant,MODIFIER,LINC01088,transcript
4	95601206	kgp5581913	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,PDLIM5-BMPR1B-AS1,intergenic_region
4	181536971	kgp2167036	A	G	.	.	ANN=G,intergenic_region,MODIFIER,LINC01098-LINC00290,intergenic_region

5	52398005	kgp4619083	T	C	.	.	ANN=C,structural_interaction_variant,HIGH,MOCS2,interaction
5	112179909	rs1804197	C	A	.	.	ANN=A,3_prime_UTR_variant,MODIFIER,APC,transcript
5	174611803	rs4868495	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,FLJ16171-DRD1,intergenic_region
6	94922348	kgp17337641	A	G	.	.	ANN=G,intergenic_region,MODIFIER,TSG1-MANEA-AS1,intergenic_region
6	107764862	rs12202734	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,PDSS2,transcript
6	121559651	6:121559651	T	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,TBC1D32,transcript
6	143793155	GSA-rs4896661	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,PEX3,transcript
6	143797752	kgp17044243	T	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,PEX3,transcript
6	149493632	rs7746208	G	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,UST-TAB2,intergenic_region
7	50145007	7:50145007	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,C7orf72,transcript
7	50152510	rs1585140	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,C7orf72,transcript
7	50182079	rs10234768	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,C7orf72,transcript
8	58133642	GSA-rs11786845	T	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,LINC01606,transcript
9	24618331	GSA-rs78757286	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,IZUMO3-TUSC1,intergenic_region
9	84302707	9:84302707	G	A	.	.	ANN=A,upstream_gene_variant,MODIFIER,LOC101927502,transcript
9	111406348	rs10979426	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,KLF4-ACTL7B,intergenic_region
10	2916766	kgp1453415	G	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,LOC105376351-PFKP,intergenic_region
10	6222774	kgp22051919	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,PFKFB3,transcript
10	62010155	10:62010155	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,ANK3,transcript
10	68371063	rs7070370	A	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,CTNNA3,transcript
10	89596013	kgp9921725	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,CFL1P1,transcript
10	127900223	10:127900223	C	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,ADAM12,transcript
10	127900223	kgp4346098	C	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,ADAM12,transcript
10	129381096	rs12252756	G	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,NPS-FOXI2,intergenic_region
10	130247163	10:130247163	A	G	.	.	ANN=G,intergenic_region,MODIFIER,LINC01163-MGMT,intergenic_region
11	11317991	rs60842800	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,GALNT18,transcript
11	35842967	rs2958198	G	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,TRIM44-LDLRAD3,intergenic_region
11	104461298	rs80278125	A	G	.	.	ANN=G,intron_variant,MODIFIER,LOC102723895,transcript
12	96563954	rs12424513	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,LTA4H-ELK3,intergenic_region
12	133473221	12:133473221	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,LOC101928530-ZNF605,intergenic_region
13	33757815	rs11147512	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,STARD13,transcript
13	49944406	rs74072538	T	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,CAB39L,transcript

13	71789085	rs73511157	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,LINC00348-DACH1,intergenic_region
13	110633410	rs9555657	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,IRS2-LINC00396,intergenic_region
14	50724996	14:50724996	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,L2HGDH,transcript
16	60997653	rs80310105	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,LOC729159-MIR4426,intergenic_region
16	83979552	kgp11781079	C	A	.	.	ANN=A,intergenic_region,MODIFIER,MLYCD-OSGIN1,intergenic_region
17	63437097	rs7219534	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,RGS9-CRAT40,intergenic_region
17	63444990	rs58768287	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,RGS9-CRAT40,intergenic_region
17	72314399	rs55867106	G	A	.	.	ANN=A,downstream_gene_variant,MODIFIER,DNAI2,transcript
18	5439417	GSA-rs75591954	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,EPB41L3,transcript
18	9158643	rs75180660	G	A	.	.	ANN=A,intron_variant,MODIFIER,ANKRD12,transcript
18	22800826	kgp1703341	C	T	.	.	ANN=T,intron_variant,MODIFIER,ZNF521,transcript
19	53344701	rs10420793	A	G	.	.	ANN=G,synonymous_variant,LOW,ZNF468,transcript
20	22746255	rs6075948	T	C	.	.	ANN=C,intergenic_region,MODIFIER,LINC01384-SSTR4,intergenic_region
20	22772814	rs6113810	C	T	.	.	ANN=T,intergenic_region,MODIFIER,LINC01384-SSTR4,intergenic_region
21	36797083	rs140330787	T	C	.	.	ANN=C,intron_variant,MODIFIER,LOC100506403,transcript

[0132] 또한, CADD(Combined Annotation-Dependent Depletion) 데이터베이스를 이용하여 수행된 위 변이들의 병원성 평가는 상위 0.9% (chr5:52398005, *MOCS2*) 그리고 사람 게놈에서 생겨날 수 있는 가장 유해한 단일 뉴클레오티드 치환 중 0.67%(rs78209580, *SPRTN*)에 해당하는 것으로 예측되었다.

[0133] 제시된 64개의 모든 SNP들은 공개적으로 이용 가능한 데이터 저장소에서 파생된 변형 수준(*cis*-eQTLs)에서 대립형질 변이와 관련된 발현이 있는 유전자에 주석을 달았으며, 추가로 15개의 후보 유전자를 식별하였다. 하기 표 10은 FUMA GWAS SNP2GENE에 의한 GWAS 결과 요약에서 eQTL eQTL gene annotation을 나타낸 표이다.

표 10

[0134]

GWAS using FUMA GWAS SNP2GENE eQTL					
Tissue	Chr	Pos	Gene symbol	P	FDR
BIOS_eQTL_geneLevel	1	22472732	CDC42	8.33E-11	0
BIOS_eQTL_geneLevel	3	111651285	ABHD10	8.77E-11	0
BIOS_eQTL_geneLevel	4	6246543	WFS1	7.63E-08	6.17E-05
BIOS_eQTL_geneLevel	8	58133642	RP11-513017.2	9.41E-36	0
BIOS_eQTL_geneLevel	12	133473221	CHFR	1.24E-51	0
BIOS_eQTL_geneLevel	12	133473221	ZNF605	4.91E-33	0
BIOS_eQTL_geneLevel	12	133473221	ZNF605	5.41E-22	0
BIOS_eQTL_geneLevel	12	133473221	ZNF84	1.78E-05	0.011526627
BIOS_eQTL_geneLevel	19	53344701	ZNF320	1.99E-05	0.01283717
BIOS_eQTL_geneLevel	19	53344701	ZNF600	6.43E-08	5.63E-05
Whole_Blood	1	22472732	LINC00339	4.83E-05	6.48E-23
Whole_Blood	3	111651285	ABHD10	2.10E-06	1.97E-13
Whole_Blood	12	133473221	CHFR	7.80E-09	7.62E-06
Whole_Blood	12	133473221	GOLGA3	4.98E-10	7.36E-08
Whole_Blood	12	133473221	ZNF605	6.34E-05	6.27E-46

Artery_Aorta	5	52398005	ITGA2	8.25E-08	1.45E-16
Artery_Aorta	5	52398005	CTD-2366F13.2	1.78E-08	7.70E-05
Artery_Aorta	12	133473221	CHFR	7.57E-05	0.00651991
Artery_Aorta	12	133473221	RP11-46H11.3	9.63E-05	1.52E-10
Artery_Aorta	19	53344701	ZNF468	1.18E-10	1.02E-09
Artery_Tibial	5	52398005	ITGA2	7.12E-07	2.73E-24
Artery_Tibial	5	52398005	CTD-2366F13.2	6.43E-05	0.0187996
Artery_Tibial	12	133473221	ANKLE2	3.60E-05	1.84E-30
Artery_Tibial	17	63444990	PRKCA	1.80E-05	1.06E-08
Artery_Tibial	19	53344701	ZNF468	3.72E-11	1.13E-27

[0136] **<실시예 4> 유전자 온톨로지(GO) 용어의 과잉 표현 분석**

[0137] 유전자 온톨로지(GO) 용어의 과잉 표현 분석(over-representation analysis)은 혈관신생, 맥관구조 및 죽상동맥경화증을 포함한 혈관 질환의 조절에서 Wnt 신호의 역할을 고려할 때 혈관 노화 관련 유전자가 Wnt 신호 경로(GO:0016055) 및 표준 Wnt 신호 경로의 음성 조절(GO:0090090)을 포함한 기능적 범주에 대해 상당히 많다는 것을 확인하였다. 하기 표 11에 과잉표현 분석 결과를 나타내었다.

표 11

[0138]

Pathway	Term	P-value	Genes
GO:0016055	Wnt signaling pathway	7.35E-03	*TLE1, APC, AXIN2, WNT4*
GO:0031398	positive regulation of protein ubiquitination	1.16E-02	*WFS1, SPRTN, CHFR*
GO:0001822	kidney development	2.68E-02	*TBC1D32, WFS1, WNT4*
GO:0090090	negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	3.63E-02	*TLE1, APC, AXIN2*

[0139] 인간 GWAS 카탈로그 데이터베이스와 이전에 보고된 특성 관련 유전자 좌위을 이용하여, "빌리루빈 측정" 및 "양극성 장애" 특성이 일관되게 가장 중요하고 강력한 집중도(enrichment)임을 확인하였다(순열 $P < 0.05$). 하기 표 12은 GWAS 결과에서, 혈관내피세포 기능과 연관되고, 표현형과 연결된 유전자 자리와 중복되는 유전자의 집중도를 나타낸 표이다. 또한, 하기 표 13은 GWAS 결과에서 60개의 유전자 자리의 순열을 나타낸 표이다.

표 12

[0140]

Mapped Trait	N	No. Overlap	No. Overlap from permutation	S.D. of No. Overlap from permutation	z-score	P-value
빌리루빈 측정	974	30	2.11	7.8304	3.5616	3.69E-04
조울증	608	10	2.01	2.3805	3.3560	7.91E-04
백혈구 대비 호산구의 비율	789	11	2.92	2.8357	2.8501	4.37E-03
사이토카인 측정	449	5	1.40	1.3468	2.6738	7.50E-03
편두통	354	5	1.12	1.9234	2.0172	4.37E-02

표 13

[0141]

No.1						
MAPPED_TRAIT	N	Overlap_N	Perm_mean (1000)	Perm_sd (1000)	Z_score	P_value
bipolar disorder	608	10	1.986	2.29604	3.49036	4.82E-04
bilirubin measurement	974	30	2.197	8.95534	3.10463	1.91E-03
eosinophil percentage of leukocytes	789	11	2.916	2.86896	2.81774	4.84E-03
cytokine measurement	449	5	1.456	1.44432	2.45375	1.41E-02

wellbeing measurement	842	9	2.679	3.08090	2.05167	4.02E-02
No.2						
MAPPED_TRAIT	N	Overlap_N	Perm_mean (1000)	*Perm_sd (1000)*	*Z_score*	P_value
bipolar disorder	608	10	1.908	2.32369	3.48239	4.97E-04
eosinophil percentage of leukocytes	789	11	2.855	2.81425	2.89420	3.80E-03
cytokine measurement	449	5	1.427	1.38588	2.57814	9.93E-03
migraine disorder	354	5	1.086	1.70605	2.29419	2.18E-02
bilirubin measurement	974	30	2.659	14.78705	1.84898	6.45E-02
No.3						
MAPPED_TRAIT	N	Overlap_N	Perm_mean (1000)	*Perm_sd (1000)*	*Z_score*	P_value
bilirubin measurement	974	30	1.8	4.11607	6.85120	7.32E-12
bipolar disorder	608	10	2.182	2.57583	3.03514	2.40E-03
eosinophil percentage of leukocytes	789	11	2.923	2.80269	2.88187	3.95E-03
cytokine measurement	449	5	1.408	1.29520	2.77332	5.55E-03
migraine disorder	354	5	1.127	1.84577	2.09831	3.59E-02
No.4						
MAPPED_TRAIT	N	Overlap_N	Perm_mean (1000)	*Perm_sd (1000)*	*Z_score*	P_value
bilirubin measurement	974	30	2.111	7.83037	3.56165	3.69E-04
bipolar disorder	608	10	2.011	2.38052	3.35599	7.91E-04
eosinophil percentage of leukocytes	789	11	2.918	2.83571	2.85008	4.37E-03
cytokine measurement	449	5	1.399	1.34677	2.67380	7.50E-03
migraine disorder	354	5	1.12	1.92343	2.01722	4.37E-02
No.5						
MAPPED_TRAIT	N	Overlap_N	Perm_mean (1000)	*Perm_sd (1000)*	*Z_score*	P_value
bipolar disorder	608	10	1.957	2.22602	3.61318	3.02E-04
bilirubin measurement	974	30	2.151	8.16739	3.40978	6.50E-04
eosinophil percentage of leukocytes	789	11	2.762	2.65770	3.09968	1.94E-03
cytokine measurement	449	5	1.412	1.41076	2.54330	1.10E-02
migraine disorder	354	5	1.069	1.63164	2.40924	1.60E-02

[0143] 빌리루빈은 효과적인 항산화제 역할을 하며 혈관 노화에 의해 매개될 수 있는 혈관 질환의 발병을 예방하는 수단이다. 조직 특이성 분석은 진성 당뇨병의 주요 기관인 췌장에서 관련 유전자의 풍부화를 확인하였다. 췌장 B 세포는 인슐린 생합성과 분비를 담당한다.

[0144] 이전 문헌 및 OMIM 데이터베이스의 수동 검토를 기반으로, 후보 유전자는 혈관 신생의 증식 및 분화(*PTPN14, ELK3, ADAM12, WNT4, AXIN2, RNUX1, PFKFB3, PDLIM5* 및 *EPB41L*), 혈관계의 염증 반응(*CASP12, PFKP, TLE1, HDAC4* 및 *TAB2*)과 관련이 있었다. 심혈관 질환은 당뇨병(*PDLIM5, HDAC4* 및 *TLE1*)심장 발달(*PDLIM5*) 및 심근 노화(*CASP12*), 고혈압(*PFKP* 및 *TAB2*), 뇌내 및 심실내 출혈(*RUNX1*) 및 뇌졸중(*AXIN2*)와 관련이 있는 것을 확인하였다.

[0146] **<실시예 5> GWAS 결과 분석**

[0147] GWAS 결과를 검증하고 64개의 후보 SNP에서 대립 유전자의 누적 효과를 평가하기 위해 모든 코호트의 상위 30%에서 표준화된 RHI 값을 가진 독립적인 피험자 샘플(테스트 모집단, n = 7)을 활용하였다. 테스트 모집단은 GWAS 훈련 대상자보다 약화된 혈관 노화를 나타내는 훨씬 더 높은 표준화된 RHI 값을 나타내었다($P = 5.9\times10^{-4}$, t-테스트) (도 4). 훈련된 인원에서 선택된 모든 남가람 코호트(n = 29)의 하위 30% 피험자보다 보호 대립 유전

자의 분포가 상당히 높다는 것을 확인하였다($P = 6.96\times10^{-4}$). 이러한 결과는 후보군의 유전자 좌위가 혈관 노화 속도의 현저한 차이에 상당 부분 기여한 것임을 나타낸다.

[0149] **<실시예 6> 노화 혈관 내피에서의 유전자 차등발현 분석**

[0150] 분자 수준에서 노화 과정의 유전자 비균질성에 기초한 변화를 이해하기 위해, 상대적으로 젊음(p4), 중간(p6) 및 나이든(p11)으로 분류하고 혈관의 인간 제대 정맥 내피세포(HUVEC)에서 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 정량화된 후보 유전자의 발현 수준 변화를 확인하였다.

[0151] GTEx 데이터베이스에서 혈관 기능과의 직접적인 연관성 및 의 혈관 조직에서 보편적으로 높은 발현 수준(Transcript per million, TPM > 100)를 갖는 것으로 판별된, *PTPN14*(서열번호 15), *PFKFB3*(서열번호 16), *TLE1*(서열번호 17), *TAB2*(서열번호 18), *RUNX1*(서열번호 19), *HDAC4*(서열번호 20) 및 *ELK3*(서열번호 21) 총 7개의 유전자를 선별하였다. 상기 7개 유전자의 SNP 서열을 하기 표 14에 나타내었다. 이때, 상기 표 1의 서열번호 1 내지 14의 염기서열을 갖는 프라이머들을 이용하여 PCR을 진행하였다.

표 14

[0152]

서열번호	Name	SNP	Sequence 5’ →3’
15	*PTPN14*	1:214659101	CGGAGTCTCG [C/T] TCTGTCGCCC
16	*PFKFB3*	kgp22051919	TGTGTTCTGA [G/A] TGCTTTACTT
17	*TLE1*	9:84302707	CCGGGGACCA [G/A] AGGAGAAAAA
18	*TAB2*	rs7746208	AGCAGATTCA [G/A] TTCTTCATGA
19	*RUNX1*	rs140330787	TGTGGTAAAA [T/C] GTTTTCTGGG
20	*HDAC4*	rs59539170	TGTAGAGAGG [C/T] ATTATCATCC
21	*ELK3*	rs12424513	TTGAGGAGGA [T/C] GGGCAGGGAA

[0153] 노화된 human primary endothelial cells에서 *TLE1* mRNA 발현 수준의 급격한 감소(75%)를 나타내었다($P < 0.001$)(도 5). 다른 테스트된 유전자도 유전자 발현 변이에서 상당한 연령 관련 감소(*PTPN14, PFKB3* 및 *RUNX1*), 증가(*TAB2*) 및 감소와 증가(*HDAC4*)를 나타내었다.

[0155] **<실시예 7> *TLE1* 보호대립유전자 빈도의 조상과 연관된 차이 분석**

[0156] 질병 통제 예방 센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)는 의학적으로 진단된 당뇨병의 유병률과 발생률의 불균형 측정을 지속적으로 보고하였으며, 다른 인종에 비해 아프리카 흑인 조상의 당뇨병 위험이 상당히 높은 것을 확인하였다. 다양한 인종에서 후보 대립 유전자에 의한 위험요소를 평가하기 위하여, 당뇨병과의 연관성에 대해 7개의 후보 유전자에 대한 대륙 그룹(아프리카, 남아시아, 동아시아, 아메리카 및 유럽)에서 공개적으로 이용 가능한 개인들의 유전자형을 활용하였다. 인종 그룹 간의 대립유전자 빈도의 차이를 테스트했고 아프리카계 개인들이 *TLE1* 유전자에서 상당히 낮은 보호 대립유전자 빈도를 나타내었다($P = 1.24\times10^{-6}$, t-테스트) (도 6 및 표 15). 하기 표 15에 다양한 인종그룹에서 7개의 보호대립유전자 빈도의 분포를 나타내었다.

표 15

[0157]

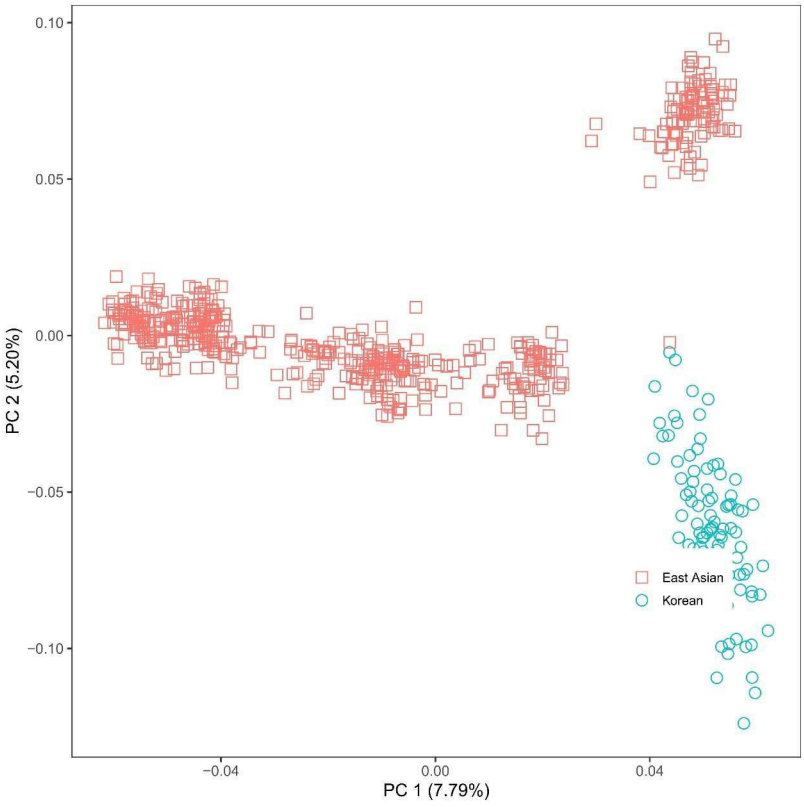
	염색체	SNP	BP	Gene	t	df	P
1	1	1:214659101	214659101	*PTPN14*	*-2.669E+00*	*1.509E+01*	*1.746E-02*
2	2	rs59539170	240156312	*HDAC4*	*3.733E+00*	*1.516E+01*	*1.967E-03*
3	6	rs7746208	149493632	*TAB2*	*1.419E+01*	*2.430E+01*	*2.959E-13*
4	9	9:84302707	84302707	*TLE1*	*-6.276E+00*	*2.585E+01*	*1.243E-06*
5	10	kgp22051919	6222774	*PFKFB3*	*-3.609E+00*	*2.389E+01*	*1.412E-03*
6	12	rs12424513	96563954	*ELK3*	*7.294E+00*	*7.204E+00*	*1.422E-04*
7	21	rs140330787	36797083	*RUNX1*	-5.728E+00	2.000E+01	1.320E-05

[0159] *RUNX1*($P = 1.32 \times 10^{-5}$), *PFKB3*($P = 1.41 \times 10^{-3}$) 및 *PTPN14*($P = 1.75 \times 10^{-2}$)유전자들도 또한, 아프리카계 흑인 가계에서 다른 인종 대비 더 낮은 보호대립유전자빈도를 보였다.

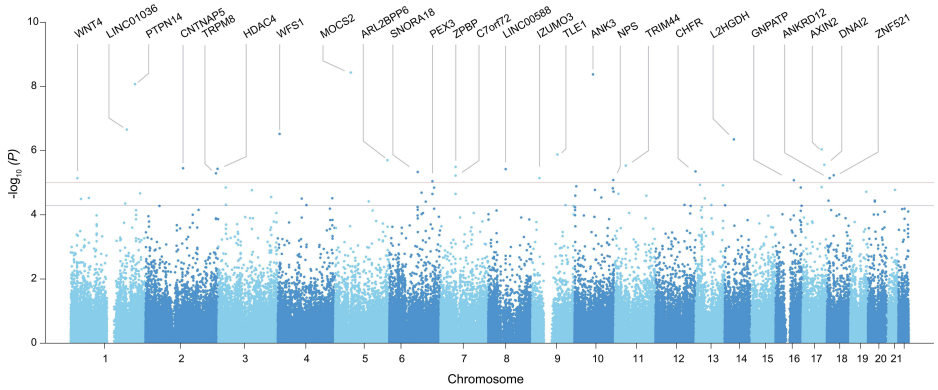
[0161] 따라서, 본 발명은 Genome-wide association study를 이용하여, 혈관 노화와 관련된 60개의 유전자 중, 64개의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism)을 확인하였다. 또한, 확인된 64개의 단일염기 다형성 중 *PTPN14, PFKFB3, TLE1, TAB2, RUNX1, HDAC4* 및 *ELK3* 유전자의 SNP가, 혈관 정맥 내피세포의 노화와 관련성이 높은 것을 확인하여, 혈관 노화의 진단 및 예후 예측을 위한 마커로 이용될 수 있는 것을 확인하였다.

도면

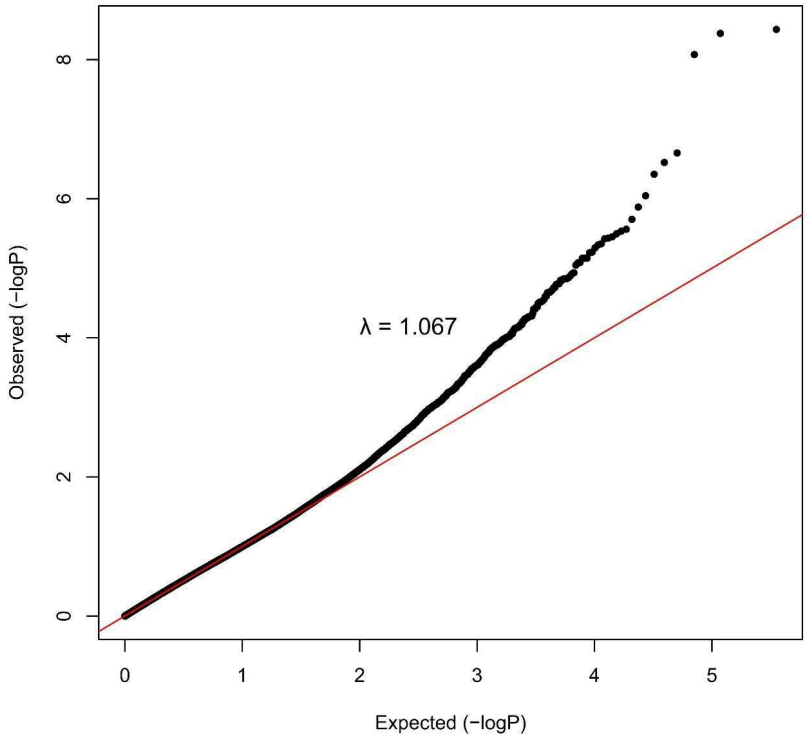
도면1



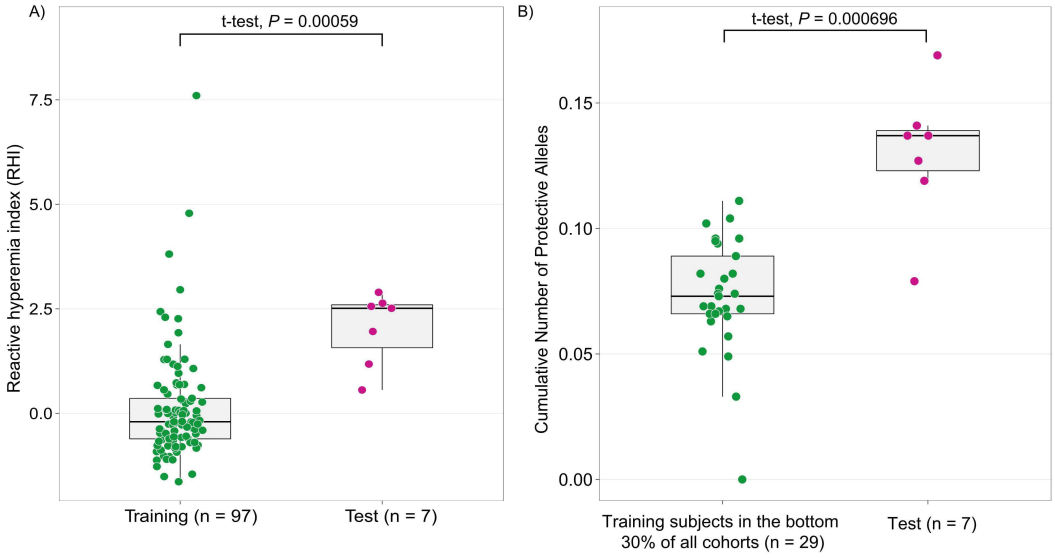
도면2


WNT4
LINC01036
PTPN14
CNTNAP5
TRPM6
HDAC4
WFS1
MOCS2
ARL2BPP6
SNORA18
PEX3
ZPBP
C7orf72
LINC00588
IZUMO3
TLE1
ANK3
NPS
TRIM44
CHFR
L2HGDH
GNPATP
ANKRD12
AXIN2
DNAI2
ZNF521
-log10 (P)
Chromosome

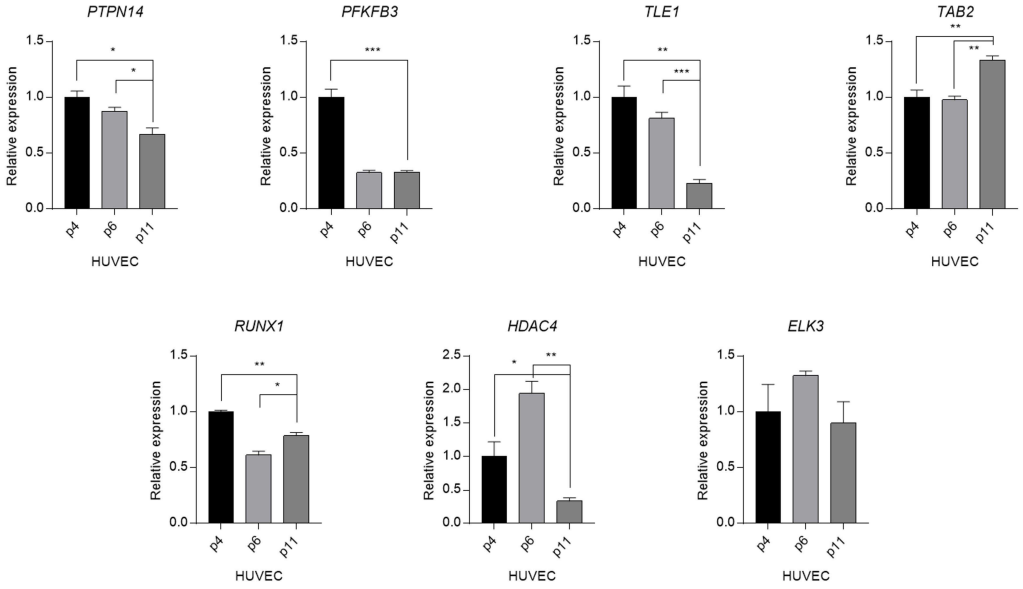
도면3


λ = 1.067
Observed (−logP)
Expected (−logP)

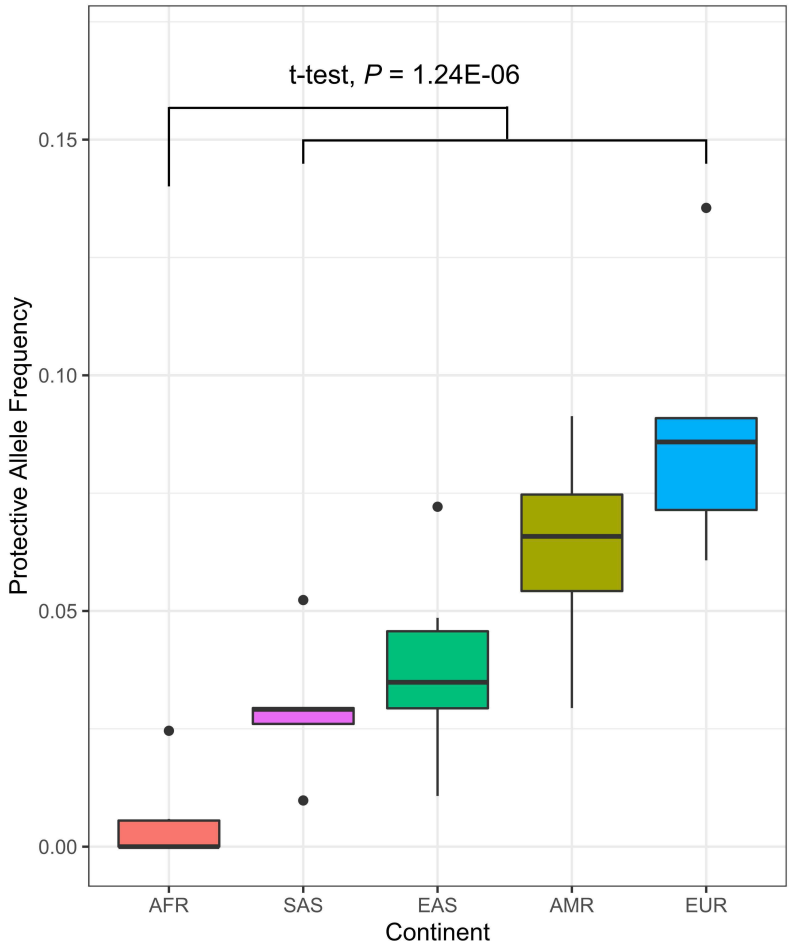
도면4


A)
t-test, P = 0.00059
Reactive hyperemia index (RHI)
7.5
5.0
2.5
0.0
Training (n = 97)
Test (n = 7)
B)
t-test, P = 0.000696
Cumulative Number of Protective Alleles
0.15
0.10
0.05
0.00
Training subjects in the bottom 30% of all cohorts (n = 29)
Test (n = 7)

도면5


PTPN14
PFKFB3
TLE1
TAB2
RUNX1
HDAC4
ELK3
Relative expression
p4
p6
p11
HUVEC

도면6


t-test, P = 1.24E-06
0.15
0.10
0.05
0.00
Protective Allele Frequency
AFR
SAS
EAS
AMR
EUR
Continent

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.