(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0123463
(43) 공개일자 2024년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G16B 25/20* (2019.01)
G16B 40/20 (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G16B 25/20 (2019.02)
(21) 출원번호 10-2023-0015691
(22) 출원일자 2023년02월06일
심사청구일자 2023년02월06일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
(72) 발명자
조광원
광주광역시 남구 서문대로 780, 111동 1302호(주월동, 제석산 호반 힐하임)
카르띠케얀 비자야쿠말
인도 첸나이 자퍼칸펫 알.브이.나가르 69번가 57
(74) 대리인
특허법인리채

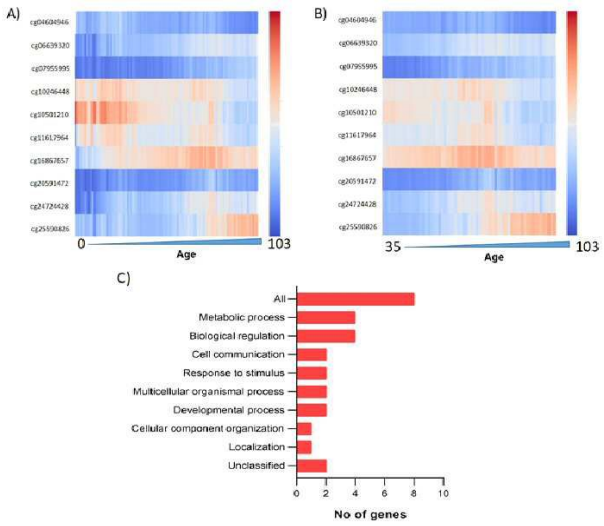
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **생물학적 연령 예측 시스템 및 생물학적 연령 예측에 필요한 정보 제공 방법**

(57) 요 약

본 발명은생물학적 연령 예측 시스템 및 생물학적 연령 예측에 필요한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 이용하여 높은 예측도로 대상 개체의 생물학적 연령을 예측할 수 있으며, 다양한 종류의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA를 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
G16B 40/20 (2019.02)
C12Q 2537/165 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준이 입력되는 입력부;

상기 입력부로부터 수신되는 상기 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여 상기 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하는 연산부; 및

상기 연산부에서 계산된 결과를 출력하는 출력부;를 포함하는, 생물학적 연령 예측 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측 시스템.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터를 수신하고, 상기 수신된 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 모델 생성부를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 입력부에 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준이 더 입력되는, 생물학적 연령 예측 시스템.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측 시스템.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터를 수신하고, 상기 수신된 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 모델 생성부를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측 시스템.

청구항 7

연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여, 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하여 제공하는 단계를 포함하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 생물학적 연령 예측 모델에 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준을 더 대입하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생

물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

모델 생성 대상 집단의 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 CpG 부위의 메틸화 수준을 이용하는 생물학적 연령 예측 시스템 및 생물학적 연령 예측에 필요한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 노화(aging)는 모든 생명체에서 일어나는 피할 수 없는 과정이다. 이는 시간 의존적 방식으로 생리적 과정의 쇠퇴를 의미한다. 일반적으로 출생 시부터의 연수가 연령 측정에 이용된다. 노화의 속도는 유기체마다 다르며 인간의 경우에도 같은 나이의 사람들은 다양한 신체 및 건강 변화를 보인다.

[0004] DNA 메틸화가 잠재적으로 노화 속도에 영향을 미치는 요인 중 하나일 수 있다. 따라서 후생 유전학적 변화를 기반으로 노화 마커를 확립하려는 다양한 시도가 있었으며, 그러한 연구 중 하나는 메틸화 패턴에 기초한 노화 시계의 확립이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 다양한 종류의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA를 이용할 수 있으면서도 실제 연령에 대한 예측력이 높은 생물학적 연령 예측 시스템을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 미국등록특허 제10435743호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 생물학적 연령 예측 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 생물학적 연령 예측에 필요한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및

cg25590826의 메틸화 수준이 입력되는 입력부;

[0012] 상기 입력부로부터 수신되는 상기 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여 상기 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하는 연산부; 및

[0013] 상기 연산부에서 계산된 결과를 출력하는 출력부;를 포함하는, 생물학적 연령 예측 시스템.

[0014] 2. 위 1에 있어서,

[0015] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측 시스템.

[0016] 3. 위 1에 있어서,

[0017] 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터를 수신하고, 상기 수신된 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 모델 생성부를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측 시스템.

[0018] 4. 위 1에 있어서,

[0019] 상기 입력부에 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준이 더 입력되는, 생물학적 연령 예측 시스템.

[0020] 5. 위 4에 있어서,

[0021] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측 시스템.

[0022] 6. 위 4에 있어서,

[0023] 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터를 수신하고, 상기 수신된 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 모델 생성부를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측 시스템.

[0024] 7. 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여, 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하여 제공하는 단계를 포함하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

[0025] 8. 위 7에 있어서,

[0026] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

[0027] 9. 위 7에 있어서,

[0028] 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계를

더 포함하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

[0029] 10. 위 9에 있어서,

[0030] 상기 생물학적 연령 예측 모델에 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준을 더 대입하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

[0031] 11. 위 10에 있어서,

[0032] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것인, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

[0033] 12. 위 10에 있어서,

[0034] 모델 생성 대상 집단의 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계를 더 포함하는, 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템 및 생물학적 연령 예측에 필요한 정보 제공 방법은 다양한 종류의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA를 이용할 수 있고 실제 연령에 대한 높은 예측력을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 실시예의 실험 과정을 도시한 것이다. 다양한 조직의 다양한 데이터 세트가 수집되었고, 데이터는 전처리 되었으며 필터링된 공통 프로브에 해당한다. 기계가 읽을 수 있도록 데이터가 구성된 후 학습 세션이 시작된다.

도 2는 본 실시예에서 정규화된 데이터의 주성분 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 학습 및 테스트 데이터 모두에서 모델의 성능을 나타낸 것으로, 도 3A 및 도 3C는 학습 세트(MAE=1.6세) 및 테스트 세트(MAE=2.8세)의 실제 연령과 예측 연령 사이의 상관관계를 나타낸 것이고, 도 3B 및 도 3D는 학습 및 테스트 데이터 세트의 잔차 플롯을 나타낸 것이다.

도 4는 다양한 조직에서 본 실시예의 메틸화 시계의 성능을 나타낸 것이다. 빨간색 점선은 학습 데이터 세트의 회귀선을 나타낸다.

도 5는 본 실시예의 학습 데이터에 사용되지 않은 다양한 조직에서 메틸화 시계의 성능을 나타낸 것이다. 빨간색 점선은 학습 데이터 세트의 회귀선을 나타낸다.

도 6는 본 실시예에서 선택된 총 6761개의 프로브의 메틸화 패턴의 변화를 나타낸 것으로, 도 6A는 선택된 모든 프로브의 메틸화 수준을 보여주는 히트맵이고, 도 6B는 0에서 103세까지의 가중 평균 DNA 메틸화 변화를 나타낸 것이다.

도 7은 본 실시예에서 선택된 총 6761개의 프로브를 p 값을 이용하여 두 그룹으로 분리 후 각 그룹의 메틸화 수준을 보여주는 히트맵이다.

도 8은 경로 강화 분석에 대한 것으로, 도 8A는 고강화 경로를 보여주는 생물학적 과정에 대한 유전자 온톨로지 용어의 경로 강화를 나타낸 것이고, 도 8B는 유전자 온톨로지에 따른 각 강화 경로의 유전자 수를 표시한 것이다.

도 9는 본 실시예에서 선택된 총 6761개의 프로브와 기존에 알려진 모델의 프로브와 비교한 것이다.

도 10은 다른 데이터베이스에서 선별된 알려진 유전자와의 비교 결과로, 도 10A 및 도 10B는 본 실시예의 연령 프로브와 GenAge 데이터베이스 및 CellAge 데이터베이스의 공통 유전자를 나타낸 것이고, 도 10C 및 도 10D는 p 값이 0.0001 이하인 본 실시예의 연령 프로브와 GenAge 데이터베이스 및 CellAge 데이터베이스의 공통 유전자를 나타낸 것이다. 도 10E는 일반적으로 알려진 유전자에 해당하는 매우 중요한 프로브의 메틸화 패턴의 변화를 보여주는 히트맵이고, 도 10F는 매우 중요한 프로브와 알려진 노화 관련 유전자 사이에 공통적인 유전자의 경로 강화 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 실시예에서 선택된 상위 10개의 프로브의 성능을 나타낸 것으로, 도 11A 및 도 11B는 학습 및 테스트 데이터 세트의 실제 연령과 예측 연령 사이의 상관 관계를 나타낸 것이고, 도 11C 및 도 11D는 학습 및 테스트 데이터 세트의 잔차 플롯을 나타낸 것이다.

도 12는 본 실시예에서 선택된 상위 10개의 프로브를 분석한 것으로, 도 12A는 0세부터 103세까지 연령에 따른 각 10개 프로브의 메틸화 패턴을 나타내는 히트맵이고, 도 12B는 35세부터 103세까지 연령에 따른 각 10개 프로브의 메틸화 패턴을 나타내는 히트맵이고, 도 12C는 고통축 경로의 경로 강화 플롯을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0041] 본 발명은 생물학적 연령 예측 시스템을 제공한다.

[0042] 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템은 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준이 입력되는 입력부; 상기 입력부로부터 수신되는 상기 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여 상기 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하는 연산부; 및 상기 연산부에서 계산된 결과를 출력하는 출력부;를 포함한다.

[0043] 상기 대상 개체는 연령 예측 대상으로서 인간일 수 있다.

[0044] 상기 생물학적 시료는 생물학적 연령을 예측하고자 하는 상기 대상 개체에서 분리된 시료로써, 예를 들면, 조직, 세포, 혈액, 혈장, 복막액, 활막액, 타액, 소변, 대변 등일 수 있고, 구체적으로 말초 혈액, 전혈, 전두엽 피질, 유방 조직, 중측두이랑, 소뇌, 타액, 기관지 폐포 세척액, 기관지 솔, 제대혈, 자궁내막, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, 배외측 전두엽 피질, 해마, 소뇌, 내후각 피질, 구강, 신장 또는 뼈 등일 수 있다.

[0045] 상기 cg20591472, cg10246448, cg24724428, cg11617964, cg04604946 및 cg25590826은 CpG 부위에 해당한다.

[0046] 상기 메틸화는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 의미하고, 구체적으로 메틸화 여부는 특정 CpG 부위의 시토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다.

[0047] 상기 메틸화 수준은 예를 들면 표적 CpG 부위의 DNA 염기서열에 존재하는 메틸화의 양을 의미한다.

[0048] 상기 메틸화 수준의 측정은 당 분야의 공지된 방법에 의해 수행될 수 있고, 예를 들면, PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), MethyLight PCR, MethyLight digital PCR, EpiTYPER, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택되는 1종의 방법으로 수행될 수 있다.

[0049] 보다 구체적인 예를 들자면, 하기 사용된 프로브를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

표 1

[0050]

프로브	CpG site 위치	Probe Sequences	Target Sequences
cg20591472	1번째 염색체의 109,466,368-109,466,369번째 염기서열	AAAAATAAACCTAAAACCTATACRTCCAAATACRCCTAACTAAAATTTCC(서열번호 1)	GGGTTTCCGACGGCC(서열번호 8)

cg10246448	1번째 염색체의 154,329,034-154,329,035번째 염기서열	ATCATAACRATCCCCAAAAAAATACCCRAAAAATAAACCCRAACCCAAAC(서열번호 2)	GCCCAGGCGCCTCCC(서열번호 9)
cg24724428	6번째 염색체의 11,044,655-11,044,656번째 염기서열	ACAACTACCAATCTAAACAACAAATAAATATTCCTAAAACTCCATAAACA(서열번호 3) ACGACTACCGATCTAAACAACGAATAAATATTCCTAAAACTCCGTAAACG(서열번호 4)	GGCTCAACGTCCACG(서열번호 10)
cg11617964	6번째 염색체의 32,150,622-32,150,623번째 염기서열32118399번째 염기서열	AAACRAATCTCCTACAAATAAAAATCRAATAACATACRAAACAAAATAAC(서열번호 5)	CAAGGTGCGCAGCCG(서열번호 11)
cg04604946	12번째 염색체의 6,914,188-6,914,189번째 염기서열	ACACAAAAACATCACTCTATTTCTTTATTAAAAATCCRAACACCCCAACC(서열번호 6)	GCGAAGGCGGCTGGG(서열번호 12)
cg25590826	15번째 염색체의 74,265,196-74,265,197번째 염기서열	TTTCAACACCAAAAACAACAACTAACCCTTAAAAACTCAACAAATTCAAC(서열번호 7)	CTGAGCCCGCTGAAC(서열번호 13)

[0051] 상기 메틸화 수준은 마이크로 어레이에 의해 정량화된 수치일 수 있다. 상기 마이크로 어레이는 예를 들면 Infinium DNA 메틸화 마이크로 어레이일 수 있다. 상기 메틸화 수준은 통상의 기술자에게 beta-value(베타 값) statistics로 알려진 방법에 의해 정량화된 수치일 수 있다. 상기 메틸화 수준이 베타 값으로 표시되는 경우, 메틸화 수준은 0에서 1까지의 값을 가지며 1에 가까울수록 CpG 부위의 메틸화 정도가 높다고 판단할 수 있다.

[0052] 상기 입력부는 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준이 입력되는 것으로, 상기 CpG 부위들의 메틸화 수준은 연령 예측 대상 개체 또는 다른 개체에 의해 직접 입력되거나 별도의 메틸화 수준 획득 수단으로부터 CpG 부위의 메틸화 수준 데이터를 수신 받아 입력될 수 있다. 상기 메틸화 수준 획득 수단은 기 측정된 상기 CpG 부위들의 메틸화 수준 데이터가 저장되거나, 별도로 구비된 CpG 부위 메틸화 수준 측정부에 의해 측정된 메틸화 수준 데이터가 저장될 수 있다.

[0053] 상기 연산부는 상기 입력부로부터 수신된 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 CpG 부위들의 메틸화 수준을 기반으로 상기 연산부에 기 저장된 생물학적 연령 예측 모델 또는 별도로 구비된 모델 생성부에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델을 적용하여 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산한다.

[0054] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것일 수 있다.

[0055] 상기 생물학적 연령 예측 시스템은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터를 수신하고, 상기 수신된 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 모델 생성부를 더 포함할 수 있다.

[0056] 상기 모델 생성 대상 집단은 상기 생물학적 연령 예측 시스템에 이용되는 생물학적 연령 예측 모델 생성에 활용되는 데이터를 제공하는 집단이다.

[0057] 상기 생물학적 연령 예측 모델 생성에는 공지된 통계 툴, 모델, 알고리즘 등이 활용될 수 있다. 예를 들면, Python, 탄성 순 회귀 알고리즘(Elastic net regression algorithm), sklearn 패키지 등이 활용될 수 있다.

[0058] 상기 출력부는 상기 연산부에서 계산된 결과인 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령이 출력된다. 상기 계산된 결과는 예를 들면, 0 내지 150세 등의 값으로 출력된다.

[0059] 상기 출력부는 사용자(예컨대, 의사, 연령 예측 대상 개체 등)에게 상기 생물학적 연령을 제공할 수 있는 형태

라면 제한되지 않고 이용 가능하다. 예를 들면, 예를 들면, 상기 계산된 결과를 화면이 구비된 형태의 출력부에 의해 시각적으로 출력되거나, 스피커가 구비된 형태의 출력부에 의해 청각적으로 출력될 수 있다.

[0060] 생물학적 연령을 예측하고자 하는 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템의 입력부에 입력하면, 연산부에서 기 저장된 또는 모델 생성부에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델에 의해 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령이 계산되고, 연산부에서 계산된 결과가 출력부에 출력된다.

[0062] 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템의 입력부에 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준이 더 입력될 수 있다.

[0063] 즉, 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템은 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준이 입력되는 입력부; 상기 입력부로부터 수신되는 상기 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여 상기 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하는 연산부; 및 상기 연산부에서 계산된 결과를 출력하는 출력부;를 포함할 수 있다.

[0064] 상기 cg10501210, cg06639320, cg16867657 및 cg07955995은 CpG 부위에 해당한다.

[0065] 상기 CpG 부위, 대상 개체, 생물학적 시료, 메틸화, 메틸화 수준, 메틸화 수준의 측정 방법의 예시 및 메틸화 수준의 정량화 방법의 예시는 전술한 바와 같다.

[0066] 보다 구체적인 예를 들자면, 하기 사용된 프로브를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

표 2

[0067]

프로브	CpG site 위치	Probe Sequences	Target Sequences
cg10501210	1번째 염색체의 207997020번째 염기서열	CAAAACTACAACACCTTACAACAAAACCAAAATTTAAATCTACACAAACA(서열번호 14) CGAAACTACGACACCTTACGACGAAACCAAAATTTAAATCTACGCAAACG(서열번호 15)	CCATCGCCGCCTGCG(서열번호 20)
cg06639320	2번째 염색체의 106015739번째 염기서열	CAAAACTCCTTTCTTCRTACCCTCCRAATCTTAAAAACACAATAATTATC(서열번호 16)	TAGTTATCGGGAGCG(서열번호 21)
cg16867657	6번째 염색체의 11044877번째 염기서열	TCTAAACAACAAATAAATATTCCTAAAACTCCATAAACATTAAACCACCA(서열번호 17) TCTAAACAACGAATAAATATTCCTAAAACTCCGTAAACGTTAAACCGCCG(서열번호 18)	TTTCGCGCGGCGGCT(서열번호 22)
cg07955995	7번째 염색체의 130419159번째 염기서열	CCAATACTTACTCCAACTTTCAATCRAACCTAAATTTCTATTCAAATTAC(서열번호 19)	AACAGAGCGAAACYC(서열번호 23)

[0068] 상기 연산부는 전술한 바와 같이 상기 입력부로부터 수신된 메틸화 수준을 기반으로 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산한다.

[0069] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준,

cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것일 수 있다.

[0070] 상기 생물학적 연령 예측 시스템은 상기 입력부로부터 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터를 수신하고, 상기 수신된 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 모델 생성부를 더 포함할 수 있다.

[0071] 상기 생물학적 연령 예측 모델 생성에는 공지된 통계 툴, 모델, 알고리즘 등이 활용될 수 있다. 예를 들면, Python, 탄성 순 회귀 알고리즘(Elastic net regression algorithm), sklearn 패키지 등이 활용될 수 있다.

[0072] 상기 출력부는 전술한 바와 같다.

[0073] 생물학적 연령을 예측하고자 하는 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준을 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템의 입력부에 입력하면, 연산부에서 기 저장된 또는 모델 생성부에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델에 의해 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령이 계산되고, 연산부에서 계산된 결과가 출력부에 출력된다.

[0075] 또한, 본 발명은 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0076] 본 발명의 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법은 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여, 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하여 제공하는 단계를 포함한다.

[0077] 상기 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법은 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0078] 상기 CpG 부위, 대상 개체, 생물학적 시료, 메틸화, 메틸화 수준, 메틸화 수준의 측정 방법의 예시 및 메틸화 수준의 정량화 방법의 예시는 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템에 대하여 전술한 바와 같다.

[0079] 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하여 제공하는 단계에서는 기 생성된 생물학적 연령 예측 모델 또는 별도의 모델 생성 단계에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델을 이용하여 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령이 계산된다.

[0080] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것일 수 있다.

[0081] 상기 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0082] 상기 모델 생성 대상 집단은 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템에 대하여 전술한 바와 같다.

[0083] 상기 생물학적 연령 예측 모델 생성에는 공지된 통계 툴, 모델, 알고리즘 등이 활용될 수 있다. 예를 들면, Python, 탄성 순 회귀 알고리즘(Elastic net regression algorithm), sklearn 패키지 등이 활용될 수 있다.

[0084] 상기 계산된 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 예를 들면, 0 내지 150세 등의 값일 수 있다.

[0085] 생물학적 연령을 예측하고자 하는 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준 및 cg25590826의 메틸화 수준을 기 생성된 또는 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델에 대입하면 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 예측할 수 있다.

[0087] 본 발명의 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법은 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준을 생물학적 연령 예측 모델에 대입하여, 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하여 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

[0088] 상기 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법은 상기 연령 예측 대상 개체의 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0089] 상기 CpG 부위, 대상 개체, 생물학적 시료, 메틸화, 메틸화 수준, 메틸화 수준의 측정 방법의 예시 및 메틸화 수준의 정량화 방법의 예시는 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템에 대하여 전술한 바와 같다.

[0090] 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 계산하여 제공하는 단계에서는 기 생성된 생물학적 연령 예측 모델 또는 별도의 모델 생성 단계에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델을 이용하여 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령이 계산된다.

[0091] 상기 생물학적 연령 예측 모델은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생성된 것일 수 있다.

[0092] 상기 생물학적 연령 예측을 위한 정보 제공 방법은 모델 생성 대상 집단의 각 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준, cg07955995의 메틸화 수준 및 각 개체의 실제 연령 데이터로부터 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0093] 상기 모델 생성 대상 집단은 본 발명의 생물학적 연령 예측 시스템에 대하여 전술한 바와 같다.

[0094] 상기 생물학적 연령 예측 모델 생성에는 공지된 통계 툴, 모델, 알고리즘 등이 활용될 수 있다. 예를 들면, Python, 탄성 순 회귀 알고리즘(Elastic net regression algorithm), sklearn 패키지 등이 활용될 수 있다.

[0095] 상기 계산된 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 예를 들면, 0 내지 150세 등의 값일 수 있다.

[0096] 생물학적 연령을 예측하고자 하는 연령 예측 대상 개체의 생물학적 시료로부터 분리된 DNA에서 측정된 cg20591472의 메틸화 수준, cg10246448의 메틸화 수준, cg24724428의 메틸화 수준, cg11617964의 메틸화 수준, cg04604946의 메틸화 수준, cg25590826의 메틸화 수준, cg10501210의 메틸화 수준, cg06639320의 메틸화 수준, cg16867657의 메틸화 수준 및 cg07955995의 메틸화 수준을 기 생성된 또는 생물학적 연령 예측 모델을 생성하는 단계에 의해 생성된 생물학적 연령 예측 모델에 대입하면 상기 연령 예측 대상 개체의 생물학적 연령을 예측할 수 있다.

[0098] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명한다.

[0100] **실시예**

[0101] **실험 방법**

[0103] 1. 데이터 세트 수집

[0104] 본 실시예에 사용된 모든 데이터 세트는 공개 데이터베이스인 "Gene Expression Omnibus"에서 수집되었다. 도 1은 본 실시예의 실험 과정을 도시한 것이다. 데이터 세트의 기존 연구에 질병 샘플이 포함되어 있으면 무시하고 데이터 세트의 대조군 샘플만을 사용하였다. 따라서, 본 실시예에 사용된 모든 데이터는 정상인을 대상으로 하였다. 학습(훈련) 및 테스트를 위해 4671개의 샘플로 구성된 21개의 다른 조직 데이터 세트를 사용하였다. 학습 및 테스트에 사용된 데이터 세트 목록은 표 3에 나와 있다. 수집된 모든 데이터 세트는 Infinium Human Methylation 450k 또는 EPIC 850k methylation array platform의 다른 조직에서 얻었다. 개인의 나이와 IDAT 형식의 원시 파일이 있는 연구만 수집하여 모든 데이터 세트를 동일한 전처리 기술로 전처리하였다. 데이터는 학습 세트에서 0~103세, 테스트 데이터 세트에서 0~102세 범위의 샘플로 구성되었다. 표 4는 사용된 데이터 세트의 세부 정보와 데이터 세트 전체의 연령대 분포를 나타낸다. 학습 데이터와 테스트 데이터의 연령대 분포가 비슷하도록 하였다. 데이터 세트의 모든 사분위수에서 동일한 연령 분포가 보정되었다(표 4). 학습 및 테스트 데이터에서 연령 범위와 유사한 연령 분포를 늘리면 예측의 정확도가 향상된다는 것은 이미 알려져 있다.

표 3

[0105]

S.NO	GEO ID	조직	샘플 수
1	GSE147740	말초 혈액 (Peripheral blood(mononuclear cells))	1032
2	GSE87571	전혈(Whole blood)	729
3	GSE74193	전두엽 피질(Prefrontal cortex)	418
4	GSE88883	유방 조직(Breast tissue)	100
5	GSE134379	중측두이랑(Middle temporal gyrus)	173
6	GSE134379	소뇌(Cerebellum)	177
7	GSE119078	타액(Saliva)	59
8	GSE132547	기관지 폐포 세척액(BAL fluid, Broncho alveolar lavage fluid)	24
9	GSE137716	기관지 솔(Bronchial brush)	16
10	GSE151042	제대혈(Umbilical cord blood)	454
11	GSE90060	자궁내막(Uterine Endometrium)	32
12	GSE59065	CD8 + T cells	96
13	GSE59065	CD4 + T cells	95
14	GSE129428	해마(Hippocampus)	32
15	GSE157341	간(Liver)	35
16	GSE107038	간(Liver)	40
17	GSE125895	배외측 전두엽 피질(Dorsolateral prefrontal cortex)	196
18		해마(Hippo), 소뇌(Cerebellum), 내후각 피질(entorhinal cortex)	
19	GSE154566	구강 도말(Buccal swab)	900
20	GSE79100	인간 신장(Human Kidney)	31
21	GSE138307	뼈(Bone)	32
		총 샘플	4671

표 4

[0106]

데이터 세트	N	평균 연령 (mean age)	1사분위 (1^{st} Quartile)	중간 연령 (median age)	3사분위 (3^{rd} Quartile)	연령 범위
학습	3114	36.5	18	36	53	0-103
데이터	1557	36.9	18	36	54	0-102

[0107] 2. 데이터 전처리

[0108] 'minfi' R 패키지는 배치 효과의 정규화와 원시 파일의 베타 값 계산에 사용하였다. 전처리 분위수(preprocess quantile)를 사용하여 데이터를 정규화하고 베타 값을 얻었다. 분위수 정규화는 정규화를 수행할 뿐만 아니라 infinium I 및 infinium II 프로브의 이동도 수정한다. 주성분 분석(PCA)은 정규화된 데이터를 보여준다(도 2). 데이터 가용성으로 인해 450K 메틸화 어레이와 850K 어레이 사이의 공통 프로브를 사용하기로 결정하였다. 450K와 EPIC 어레이 사이에 성염색체 부위를 포함하지 않는 399,365개의 공통 CpG 프로브만 사용하였다. 제대혈 샘플을 Zero age로 사용하였다.

[0110] 3. 기계 학습

[0111] 본 실시예의 메틸화 연령 예측 모델을 생성하기 위해 특성 선택에 사용할 수 있는 Elastic net regression algorithm을 사용하였다. Python 3.6은 프로그래밍 플랫폼으로 사용되었다. sklearn 패키지는 elastic net regression를 컴파일(compile)하는 데 사용되었다. 하이퍼 매개변수 조정(hyper parameter tuning)은 10 fold 교차 검증과 함께 sklearn.gridsearch 패키지를 사용하여 수행되었다. 10 fold 교차 검증은 학습 세션을 여러 번 반복하여 모델의 견고성을 보장하였다. l1 ratio의 best-fit 값과 alpha 값은 각각 0.5와 0.1이었다. 이들은 모델 구축에 사용되었다. 전체 데이터는 sklearn train_test_split을 사용하여 학습 및 테스트를 위해 분할되었다. 전체 데이터의 1/3을 테스트 데이터로 사용하였다. 따라서 학습 및 테스트 세트는 각각 3114개 및 1557개 샘플로 구성되었다. 학습 세션이 종료됐을 때, 모델은 6761개의 프로브를 선택했다. 선형 커널을 사용하여 기능 선택을 위해 sklearn 패키지에서 재귀적 기능 제거(RFE, Recursive feature elimination)를 수행했다.

[0113] 4. 경로 강화(Pathway enrichment)

[0114] 경로 강화 분석은 G:Profiler 온라인 소프트웨어 분석에 의해 수행되었다. 분자 기능, 세포 구성 요소 및 생물학적 과정에 대한 유전자 온톨로지 용어가 사용되었다. 유의 임계값은 p 값이 ≤ 0.01인 Bonferroni 보정을 사용하여 제어되었다. 단일 경로의 강화와 관련된 유전자의 수를 보여주는 GO bar diagram을 만들기 위해 웹 기반 유전자 세트 분석 도구 키트를 사용하였다.

[0116] 5. 통계 분석 및 데이터 시각화

[0117] 정확도 메트릭스 MAE(Mean Absolute Error), RMSE(Root Mean Square Error) 및 R^2 값은 Python 3.8의 sklearn.metrics(v.0.24.2)(https://scikit-learn.org)를 사용하여 결정되었다. 히트 맵은 Python용 Seaborn(v.0.11.2)으로 생성되었다. 벤 다이어그램은 파이썬용 matlplotlib Venn을 사용하여 작성되었다. 모든 데이터 시각화는 GraphPad Prism 버전 8.0.1로 수행되었다.

[0119] **결과**

[0120] 1. 학습 및 테스트 데이터에서 모델의 성능

[0121] 모델의 성능을 검증하기 위해 RMSE(Root Mean Squared Error), MAE(Mean Absolute Error), 실제 연령과 예측 연령 사이에 측정된 상관 계수 R^2 값과 같은 다양한 메트릭스를 사용했다(도 3A 및 도 3C). R^2 값은 분산의 비율을 설명한다. RMSE와 MAE는 예측의 평균 오류를 측정하는 데 사용되었다. 표 5는 테스트 및 학습 세트 데이터 모두에서 시계 모델의 성능 값을 보여준다. 학습 데이터의 R^2 값은 0.99이고 테스트는 0.97이다. 학습 데이터에서 1.62년의 MAE를, 테스트 데이터에서 2.8의 MAE를 관찰했다. 학습 세트 데이터의 RMSE는 2.3년이고 테스트 세트 데이터의 RMSE는 4.4년이다. 이러한 통계 수치는 학습 데이터에서 메틸화 시계가 거의 정확하고 미지의 데이터에 적용될 때도 동일하게 우수함을 보여준다. 잔차 플롯은 모델이 학습 및 테스트 데이터 세트 모두에 적합함을 시사하는 무작위 패턴을 보여준다(도 3B 및 도 3D).

표 5

[0122]

데이터 세트	상관관계(R^2)	RMSE	MAE
학습	0.99	2.3년	1.62년

테스트	0.97	4.4년	2.8년

[0123] 2. 다른 조직에서 모델의 성능

[0124] 이 범조직 모델이 다른 조직에서 어떻게 작동하는지 확인하기 위해 학습 및 테스트에 사용한 각 개별 조직 데이터 세트에 대해 모델을 테스트했다. 학습 데이터에 사용된 대부분의 조직의 정확도는 양호하였다(도 4A 내지 30 및 표 5). 학습 데이터에 사용된 조직 중 뼈 조직만이 평균 이하의 예측 정확도를 나타냈다. 모델 학습에 사용된 거의 모든 조직에서 R^2 값과 기타 지표도 더 우수했다. 또한 모델의 성능을 확인하기 위해 학습 세션에서 사용되지 않은 조직 및 세포 유형에 대한 모델을 테스트했다(도 5A 내지 4E). 검증에 사용된 accession id는 GSE151732(Devall et al., 2020), GSE164195(Pepin et al., 2021), GSE173356(Konigsberg et al., 2021), GSE66351(Gasparoni et al., 2018)이다. 각 개별 조직의 R^2 값, RMSE 및 MAE는 표 6에 나와 있다. 심장 조직을 제외하고, 이러한 검증 조직 데이터에서 연령 예측의 정확도는 4년에서 9년 사이의 더 나은 RMSE와 3.9년에서 7.8년 사이의 MAE를 보이며 적당히 양호했다(표 7).

표 6

[0125]

조직	상관관계(R^2)	RMSE(년)	MAE(년)
전혈(Whole blood)	0.98	2.66	1.98
CD4+	0.97	5.1	4.01
CD8+	0.96	4.96	3.37
말초 혈액(Peripheral blood)	0.97	4.74	3.83
타액(Saliva)	0.78	6.63	3.72
중측두이랑(Middle temporal gyrus)	0.88	2.75	2.22
소뇌(Cerebellum)	0.85	4.06	3.15
해마(Hippocampus)	0.95	2.95	2.37
유방 조직(Breast Tissue)	0.95	3.75	2.87
간(Liver)	0.93	5.79	4.40
신장(Kidney)	0.87	6.40	4.32
자궁내막(Uterine endometrium)	0.78	1.53	1.19
뼈(Bone)	0.57	12.23	6.87
기관지 폐포 세척액(BAL fluid)	0.93	1.52	1.15
기관지 솔(Bronchial brush)	0.91	3.81	2.79

표 7

[0126]

조직	상관관계(R^2)	RMSE(년)	MAE(년)
대장(Colon)	0.56	9.22	7.87
심장(Heart)	0.50	14.01	14.68
폐(Lung)	0.70	4.86	3.91
교세포(Glia)	0.93	7.98	6.46
뉴런(Neurons)	0.70	6.36	5.27

[0127] 3. 메틸화 패턴의 경향 변화

[0128] 선택된 6761개의 프로브는 노화 프로브로 간주되었다. 선택한 프로브의 노화 시 메틸화 패턴을 확인하기 위해 각 프로브의 베타 값으로 히트 맵을 생성했다(도 6A). 0세부터 103세까지 모든 연령대에서 각 프로브의 베타 값의 평균을 계산했다. 25세를 중간점으로 간주하여 데이터를 하이퍼 메틸화(과 메틸화)에서 하이포 메틸화(저 메틸화)로 정렬했다. 25세를 노화가 시작되는 단계로 간주했다. 히트 맵(도 6A)을 관찰한 결과 각 개별 프로브 레벨의 변화는 미세하였다. 기계 학습 모델은 선택한 모든 프로브의 집합적 추가 가중치로 종속 변수를 예측한다. 따라서 우리는 각 연령의 모든 6761 프로브의 베타 값의 평균을 취하고 이러한 연령 프로브의 메틸화 패턴의 집합적 변화를 확인했다. 청소년기의 가중평균 변화는 일정하지 않았고, 불균일한 변화를 보였다(도 6B). 이것은 방해를 받아 온 발달 변화 때문일 수 있다. 대략 35세 전후의 초기 성인기 이후, 메틸화의 집단 평균이 증가하고 이러한 지속적인 증가는 80세 전후로 점차 느려진다(도 6B). 이것은 실제로 노화 과정이 노화 메틸화 부위에

영향을 미친다는 것을 보여준다. 선택된 6761개의 연령 프로브를 모두 사용하여 다중 선형 회귀를 수행하여 프로브를 두 그룹으로 분리했다. p 값을 사용하여 프로브를 면밀히 조사했다. p 값이 0.0001 이하인 한 그룹의 프로브는 3659개의 프로브로 구성되었고, 다른 그룹은 3102개의 프로브를 포함하는 더 높은 p 값을 가졌다. 더 낮은 p 값을 갖는 이러한 프로브의 메틸화 경향을 분석했을 때, 이러한 CpG의 대부분은 고도로 과메틸화되고 일부는 저메틸화된다(도 7A 및 도 7B). 이는 노화 과정에 따라 DNA 메틸화 패턴이 변경됨을 나타낸다.

[0130] 4. 경로 강화 분석(Pathway enrichment analysis)

[0131] 6761개의 선택된 연령 프로브는 Illumina 450k 주석을 사용하여 각각의 유전자 ID로 주석을 달았다. 그 결과 4120개의 유전자가 생성되었다. 이 유전자를 사용하여 풍부한 경로를 확인했다. 고도로 강화된 유전자 온톨로지 용어는 해부학적 구조 발달, 다세포 유기체 발달, 신경계 발달, 발달 과정, 시스템 발달, 다세포 유기체 과정, 행동, 중추신경계 발달, 세포 형태형성, 세포 발달, 신경발생, 해부학적 구조 형태형성, 동물 기관 발달, 뇌 발달, 머리 발달, 뉴런 생성 및 분화에 관여하는 세포 형태 형성이었다(도 8A). 1588개의 유전자에 유전자 온톨로지 설명 경로에 대해 주석을 달았다. 강화된 경로의 대부분은 생물학적 조절에 관련된 886개, 발달 과정에 관련된 537개, 번식에 관련된 101개, 대사 과정에 관련된 805개 및 기타 다수와 같은 초기 발달 관련 경로였다(도 8B). 이러한 경로는 에너지 대사 관련 경로(생물학적 조절, 대사 과정), 스트레스 유지(자극 및 세포 통신에 대한 반응) 및 성장 및 발달(다세포 유기체 과정, 발달 과정, 세포 구성 요소 조직화, 세포 증식, 번식 및 성장)으로 분류할 수 있다. 발달 관련 경로가 강화된 이유에 대한 답을 찾기 위해 길항 다발성 이론(antagonistic pleiotropy theory)을 고려하였다. 길항 다발성 노화 이론에 따르면, 일부 유전자는 여러 가지 다른 특성을 제어하고 초기 단계에서 긍정적인 방식으로 조절하고 삶의 후기 단계에서 반대로 조절하여 노화 과정의 다양한 후유증을 초래한다. 이러한 유전자를 더 자세히 탐색하면 이러한 유전자가 어떻게 상호 작용하고 노화 과정에 총체적으로 참여하는지 알 수 있다.

[0133] 5. 선택된 연령 브로브와 알려진 노화 관련 유전자의 비교

[0134] 먼저 시계 모델의 선택된 프로브를 Horvath의 모델과 비교하여 두 모델 간에 공유되는 프로브 수를 확인했다. 334개의 프로브가 두 모델 간에 공유되었다(도 9). 프로브의 주석이 달린 유전자 중 몇 개가 이미 보고되었는지 알기 위해 GenAge 및 CellAge라는 두 데이터베이스에서 유전자를 선별했다(Avelar et al., 2020; de Magalh~aes and Toussaint, 2004). 이 두 데이터베이스는 Human Aging Genomic Resources 데이터베이스에 속한다. GenAge는 노화 과정에 관여하는 인간 유전자 모음이며 CellAge는 다양한 유전자 조작 실험 및 유전자 발현 프로파일링을 통해 선별된 인간 노화 관련 유전자로 구성된 데이터베이스이다. DNA 메틸화 시계는 인간 기반이므로 인간 노화와 관련된 유전자만 큐레이팅했으므로 이 두 데이터베이스를 선택하였다. 이 데이터베이스에서 큐레이팅된 총 유전자 수는 554개의 유전자를 생성했다. 그 중 97개의 유전자가 본 실시예 모델에서 선택된 것과 공통된다. 그들 중, 48개의 유전자가 본 실시예의 연령 프로브와GenAge 데이터베이스의 유전자 사이에서 공통됐고, 56개는 CellAge 데이터베이스와 공통된 유전자였다(도 10A 및 도 10B). 그런 다음 p 값이 0.0001 이하인 다중 선형 회귀 현명한 분리 유전자(multiple linear regression wise separated genes)간에 공유되는 유전자 수를 확인했다(도 7A). 97개의 알려진 유전자 중 62개의 유전자가 프로브 사이에서 공통적이라는 것을 발견했으며, p 값은 0.0001 이하였다(도 10C 및 도 10D). 이 62개의 유전자는 80개의 CpG 프로브에 해당하며, 이러한 프로브의 메틸화 패턴은 고도로 과메틸화되었고 일부는 저메틸화되었다(도 10E). 62개의 유전자 중에서 TP73, FOXO1, mTOR와 같은 일반적으로 사용되는 노화 관련 마커와 TNF, STAT3, STAT5A 및 CDK와 같은 염증 마커를 많이 찾을 수 있었다. 다음으로, 강화 경로를 찾기 위해 이러한 공통 알려진 유전자로 경로 강화 분석을 수행했다. 생물학적 과정에 대한 상위 10개 고강화 유전자 온톨로지 용어는 세포 사멸 조절, 세포 사멸 음성 조절, 프로그램된 세포 사멸 조절, 세포사멸 과정 음성 조절, 세포 사멸, 세포사멸 과정 조절, 프로그램 세포사 음성 조절, 호르몬에 대한 반응 및 세포 집단 증식의 조절이다(도 10F). 놀랍게도 대부분의 강화된 경로는 세포 사멸, 세포 증식, 세포 사멸 조절 및 호르몬 반응의 음성 조절이다. 세포 사멸의 음성 조절과 세포 증식의 조절은 노화 세포가 세포 사멸에 대해 저항성을 보이는 것으로 잘 알려진 바와 같이 세포가 노화 상태로 들어가는 과정을 의미한다. 강화되는 모든 경로는 노화 과정의 모든 결과인 메커니즘으로 간주될 수 있다.

[0136] 6. 재귀적 기능 제거(RFE, Recursive feature elimination)로 프로브 순위 지정

[0137] 이전 데이터에서와 같이 모든 6761 프로브가 나이 결정에 집합적으로 관여한다는 것을 분명히 볼 수 있다(도 6A). 또한 프로브의 거의 절반이 상당한 선형 변화를 나타낸다(도 7A). 따라서 RFE 방법을 사용하여 선택된 연령 프로브의 순위를 매기고자 하였다. 분석 결과, 알려진 유전자의 CpG 사이트 중 어느 것도 상위 50개 유전자에 순위가 매겨지지 않았다. 결과적으로 RFE에서 순위가 매겨진 상위 10개 프로브에 대해 선형 회귀 분석을 수행했다. 그들은 예측 R^2 점수로 학습 데이터에서 0.91, 테스트 데이터 세트에서 0.90, 두 데이터 세트에서 5.3년의 MAE를 보여주었다(도 11A 및 도 11B 및 표 8). 잔차 플롯은 학습 데이터와 테스트 데이터 모두에서 잘 맞는 것을 보여준다(도 11C 및 도 11D). 이러한 상위 10개 프로브 및 해당 유전자에 주석을 달고 표 9에 제공했다. 이러한 상위 10개 프로브는 다중 회귀 시 유의한 임계값보다 큰 p 값을 나타내는 프로브 그룹에 속했다. 베타 값을 사용하여 상위 10개 프로브에 대한 히트 맵을 생성하였다(도 12A 및 도 12B). 이는 이들 메틸화 부위가 노화 동안 급격하게 변화하지 않고 중간 정도의 변화만을 보인다는 것을 보여준다. 그런 다음 우리는 이들 유전자의 풍부한 경로를 분석했으며(도 12C), 그들은 다시 6761개의 메틸화 연령 프로브와 유사하게 발달 및 성장 관련 경로가 매우 풍부하다는 것을 보여주었다. 이것은 이러한 상위 유전자가 전체 노화 프로브와 유사하게 작동한다는 증거한다. 본 발명자들은 노화 과정 전반에 걸쳐 이러한 일정한 메틸화 부위가 노화 및 호르몬 반응 및 세포 증식과 같은 다른 노화 특성을 조절한다는 길항 다발성 이론으로 이러한 관찰을 이론화하였다. 상위 10개 프로브 중 4개는 Hannum 연구의 클록 CpG와도 공통적이다. 4개의 프로브는 cg10501210, cg06639320, cg16867657 및 cg07955995이다.

표 8

[0138]

데이터 세트	상관관계(R^2)	RMSE	MAE
학습	0.91	7.7년	5.3년
테스트	0.90	7.8년	5.3년

표 9

[0139]

프로브	**유전자**	**유전자 기능**
cg20591472	SYPL2	심장 발달 및 근육 조직
cg10246448	ATP8B2	인지질 트랜스로카제(translocase)
cg10501210	C1orf132	miRNA
cg06639320	FHL2	분자 전달자 - FOXO1과 SIRT1 사이의 상호작용 강화
cg16867657	ELOVL2	
cg24724428	ELOVL2	다중불포화지방산 생합성
cg11617964	PRRT1	AMPA 수용체 활동의 조절
cg07955995	KLF14	RNA 중합효소 II의 전사 조절
cg04604946	ENO2, LRRC23	당분해, 기능 미상
cg25590826	CCDC33	

[0140] 상위 10개 프로브 중 기존에 알려지지 않은 6개의 프로브(CpG site)인 cg20591472, cg10246448, cg24724428, cg11617964, cg04604946 및 cg25590826에 대해 선형 회귀 분석을 수행했다. 그들은 예측 R^2 점수로 학습 데이터에서 0.82, 테스트 데이터 세트에서 0.80을 나타냈다(표 10).

표 10

[0141]

데이터 세트	상관관계(R^2)
학습	0.82
테스트	0.80

[0142] 위 6개의 프로브를 이용하여 생물학적 예상 연령을 계산할 수 있는 수학식을 도출하였다. 수학식은 6개의 probe를 회기분석법으로 모델을 학습하였고 테스트(확인)하여 얻어진 공식이며, R2값으로 각각 82, 80을 얻었다.

[0144] [수학식 1]

[0145] J(predict age)

[0146] =50.10211147602977+

[0147] {(74.50140001)*[cg20591472의 메틸화 수준]}+

[0148] {(-19.78928576)*[cg10246448의 메틸화 수준]}+

[0149] {(78.72632088)*[cg24724428의 메틸화 수준]}+

[0150] {(-44.16733269)*[cg11617964의 메틸화 수준]}+

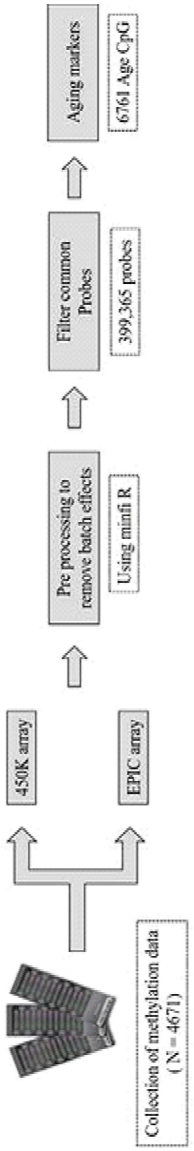
[0151] {(-93.91130895)*[cg04604946의 메틸화 수준]}+

[0152] {(27.48180958)*[cg25590826의 메틸화 수준]}

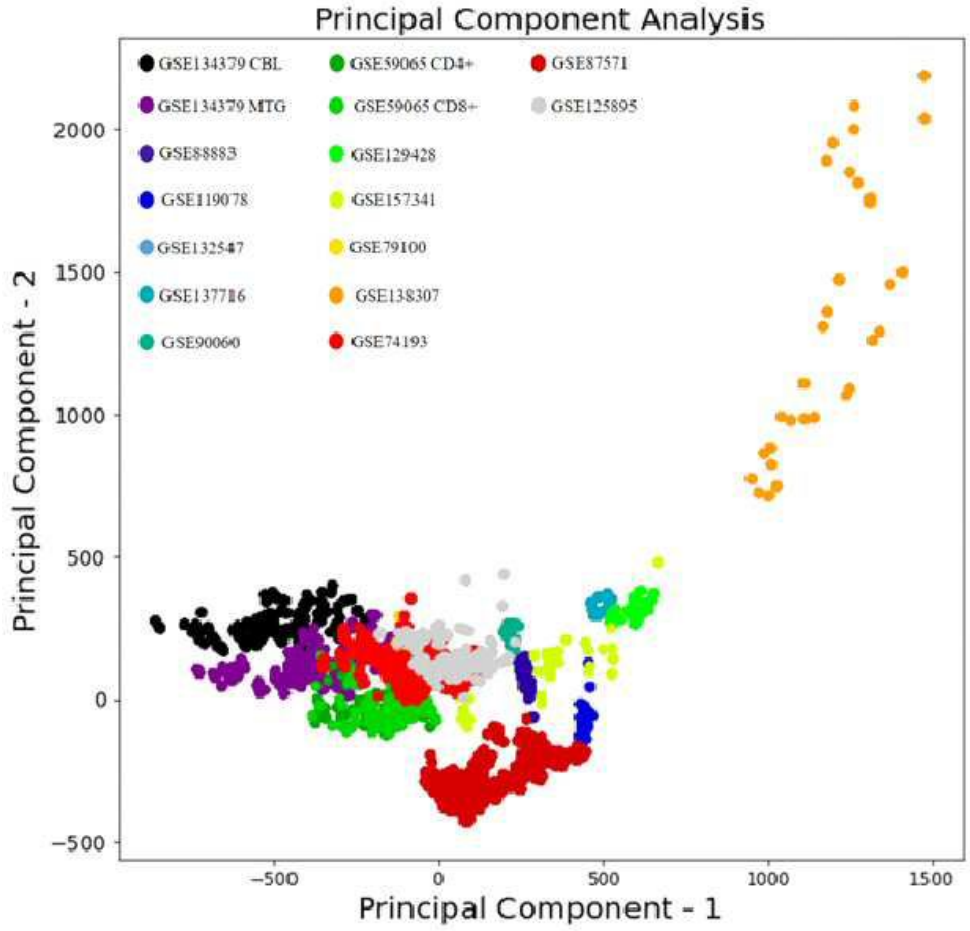
[0153] (식 중, 메틸화 수준은 0 내지 1의 값이고, 메틸화 수준이 0인 경우 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화된 것을 의미하며, 메틸화 수준이 1인 경우 해당 CpG 부위가 완전히 메틸화된 것을 의미함)

도면

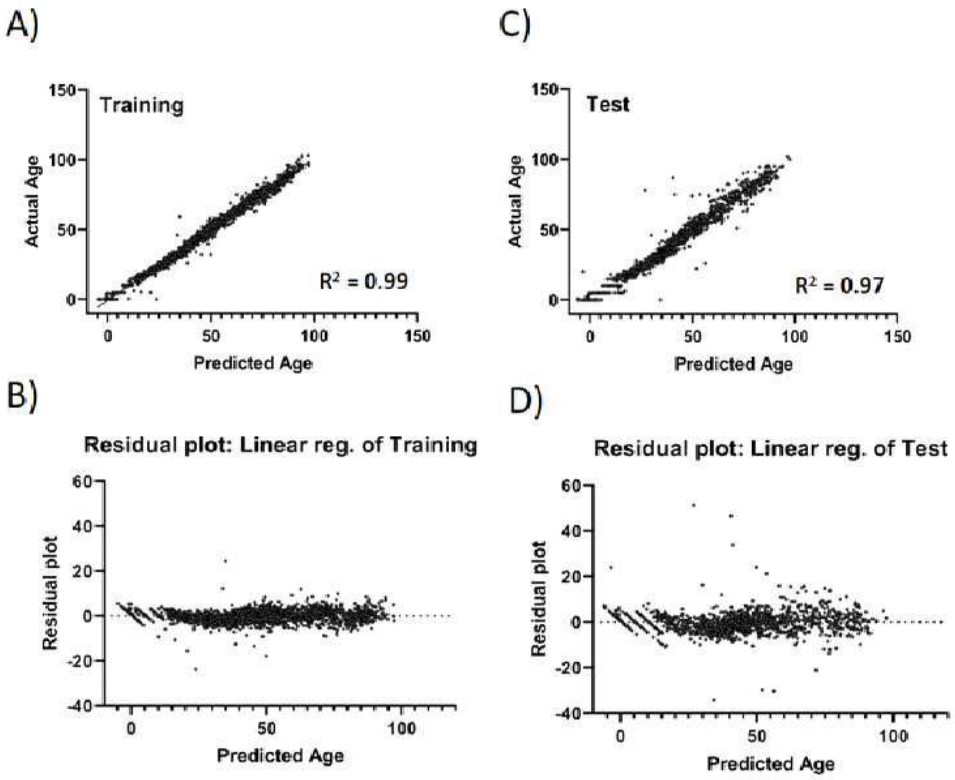
도면1


Collection of methylation data
(N = 4671)
450K array
EPIC array
Pre processing to remove batch effects
Using minfi R
Filter common Probes
399,365 probes
Aging markers
6761 Age CpG

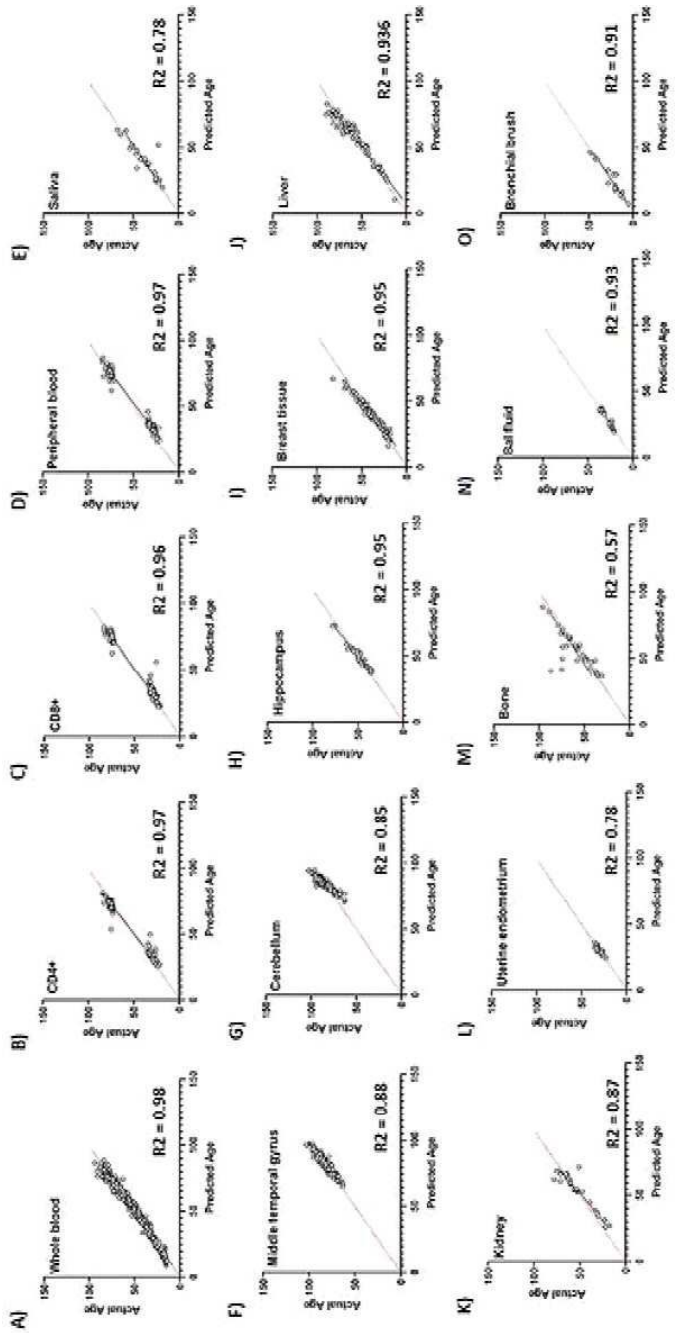
도면2


Principal Component Analysis
GSE134379 CBL
GSE134379 MTG
GSE88883
GSE119078
GSE132547
GSE137716
GSE90060
GSE59065 CD4+
GSE59065 CD8+
GSE129428
GSE157341
GSE79100
GSE138307
GSE74193
GSE87571
GSE125895
Principal Component - 2
Principal Component - 1
2000
1500
1000
500
0
−500
−500
0
500
1000
1500

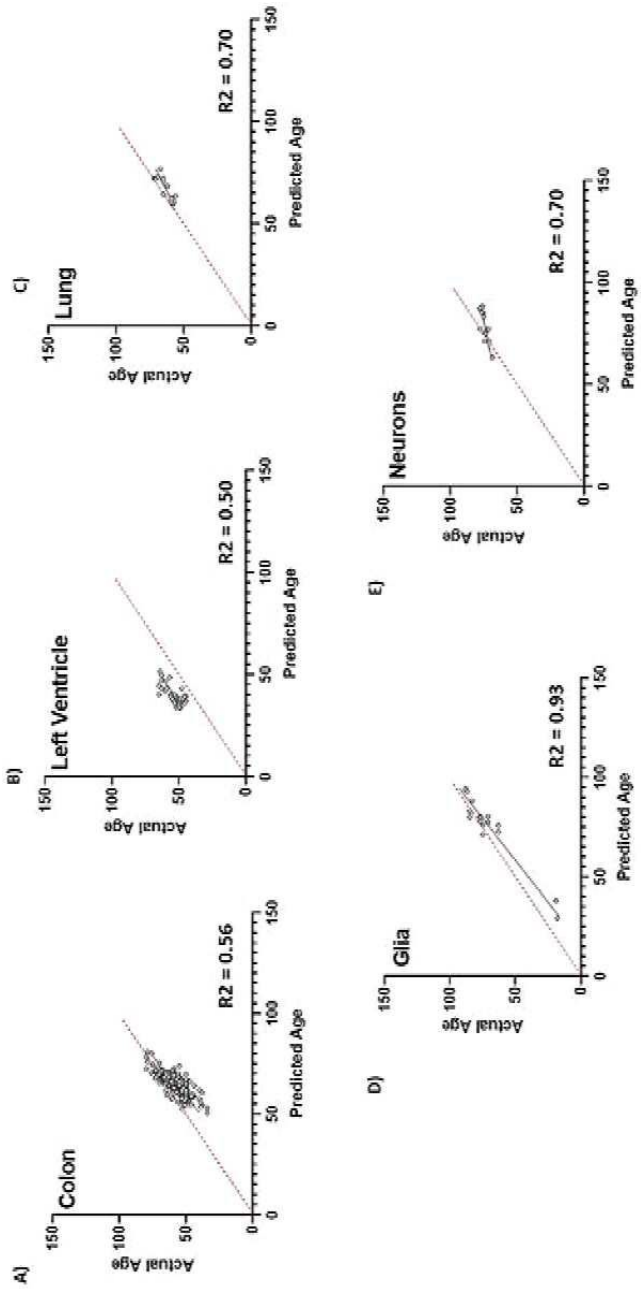
도면3


A)
Training
Actual Age
Predicted Age
R^2 = 0.99
C)
Test
Actual Age
Predicted Age
R^2 = 0.97
B)
Residual plot: Linear reg. of Training
Residual plot
Predicted Age
D)
Residual plot: Linear reg. of Test
Residual plot
Predicted Age

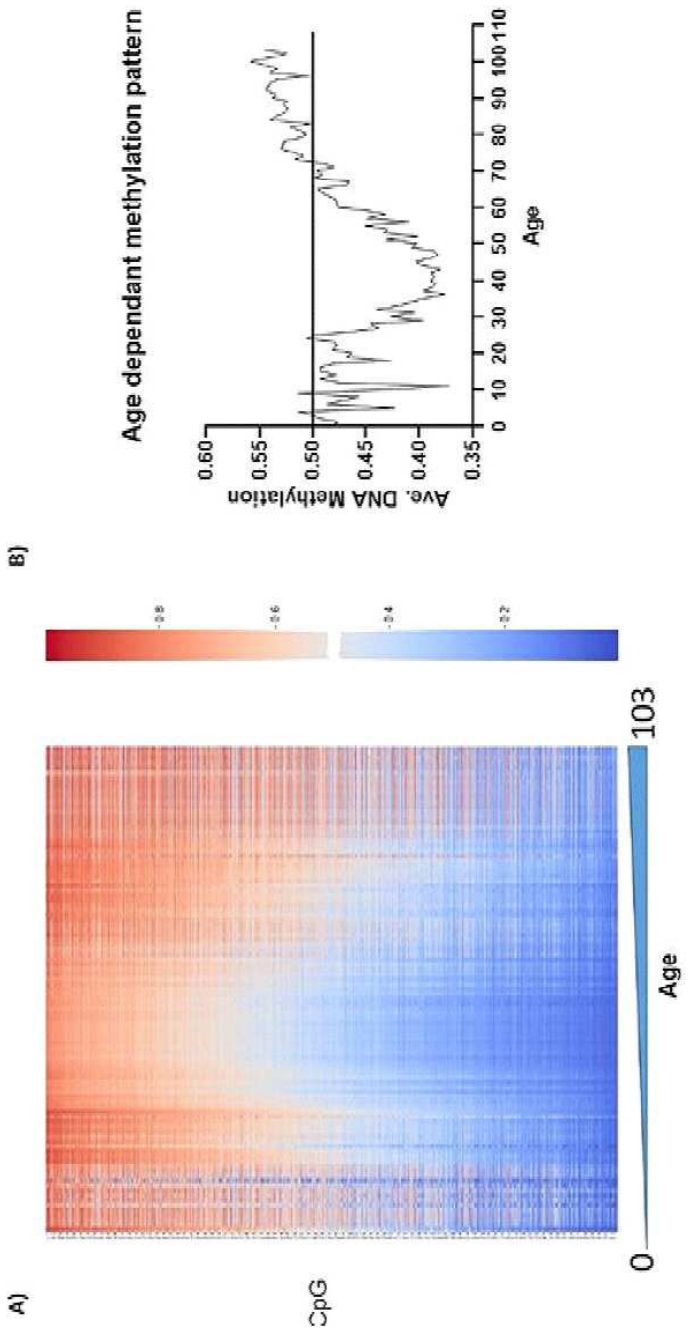
도면4


A)
Whole blood
R2 = 0.98
B)
CD4+
R2 = 0.97
C)
CD8+
R2 = 0.96
D)
Peripheral blood
R2 = 0.97
E)
Saliva
R2 = 0.78
F)
Middle temporal gyrus
R2 = 0.88
G)
Cerebellum
R2 = 0.85
H)
Hippocampus
R2 = 0.95
I)
Breast tissue
R2 = 0.95
J)
Liver
R2 = 0.936
K)
Kidney
R2 = 0.87
L)
Uterine endometrium
R2 = 0.78
M)
Bone
R2 = 0.57
N)
Saliva
R2 = 0.93
O)
Bronchial brush
R2 = 0.91
Actual Age
Predicted Age

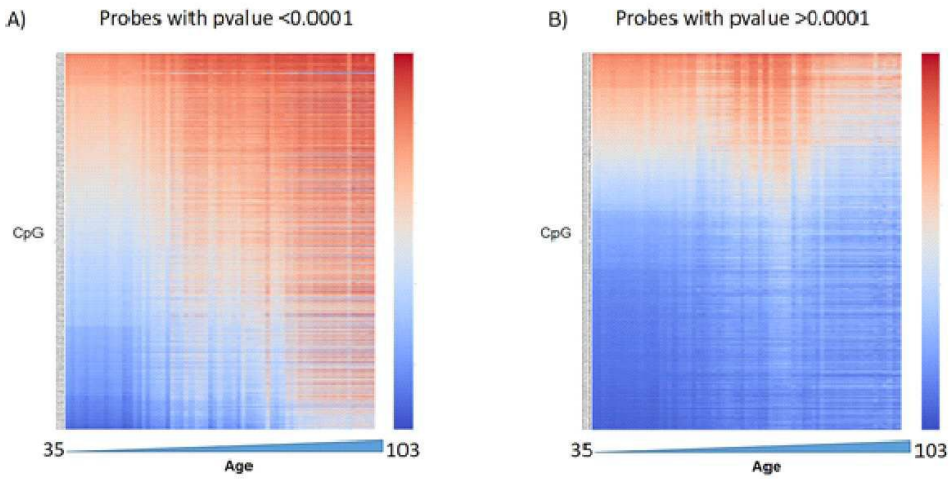
도면5


A)
Colon
R2 = 0.56
B)
Left Ventricle
R2 = 0.50
C)
Lung
R2 = 0.70
D)
Glia
R2 = 0.93
E)
Neurons
R2 = 0.70
Actual Age
Predicted Age
0
50
100
150

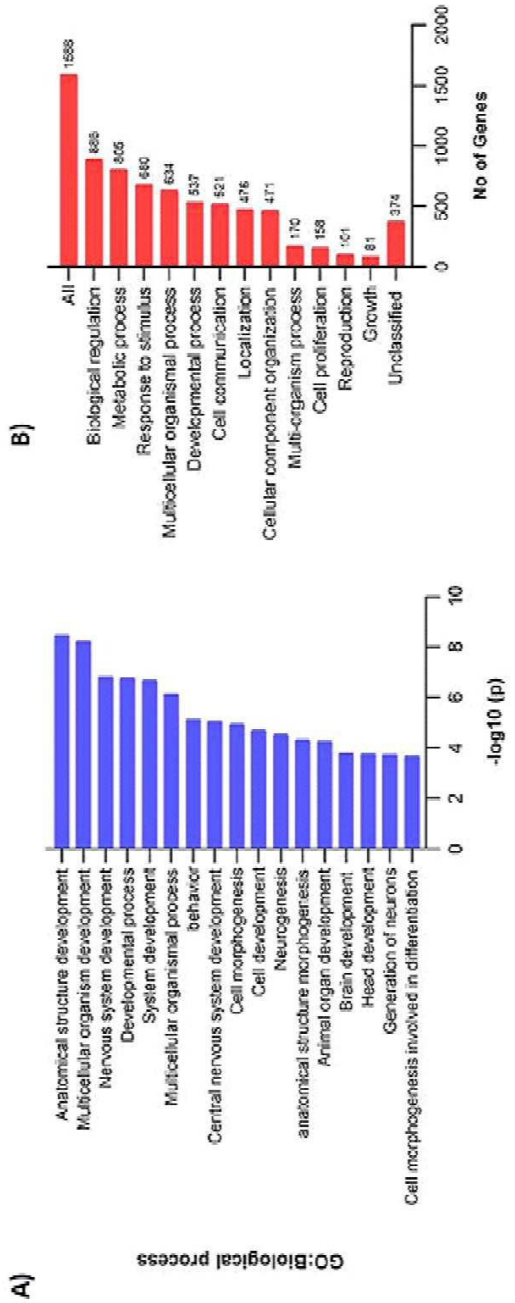
도면6


A)
CpG
0
103
Age
B)
Age dependant methylation pattern
Ave. DNA Methylation
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Age

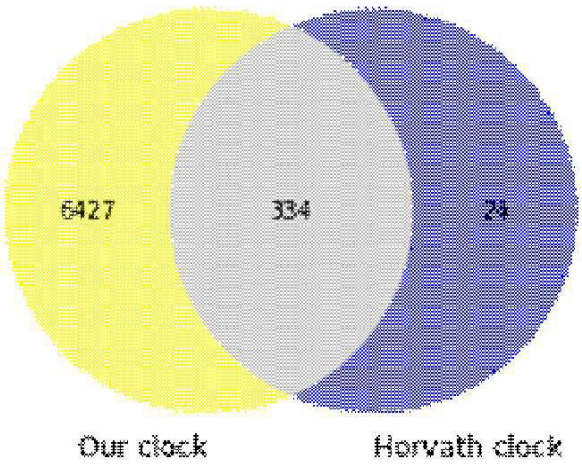
도면7


A)
Probes with pvalue <0.0001
CpG
35
Age
103
B)
Probes with pvalue >0.0001
CpG
35
Age
103

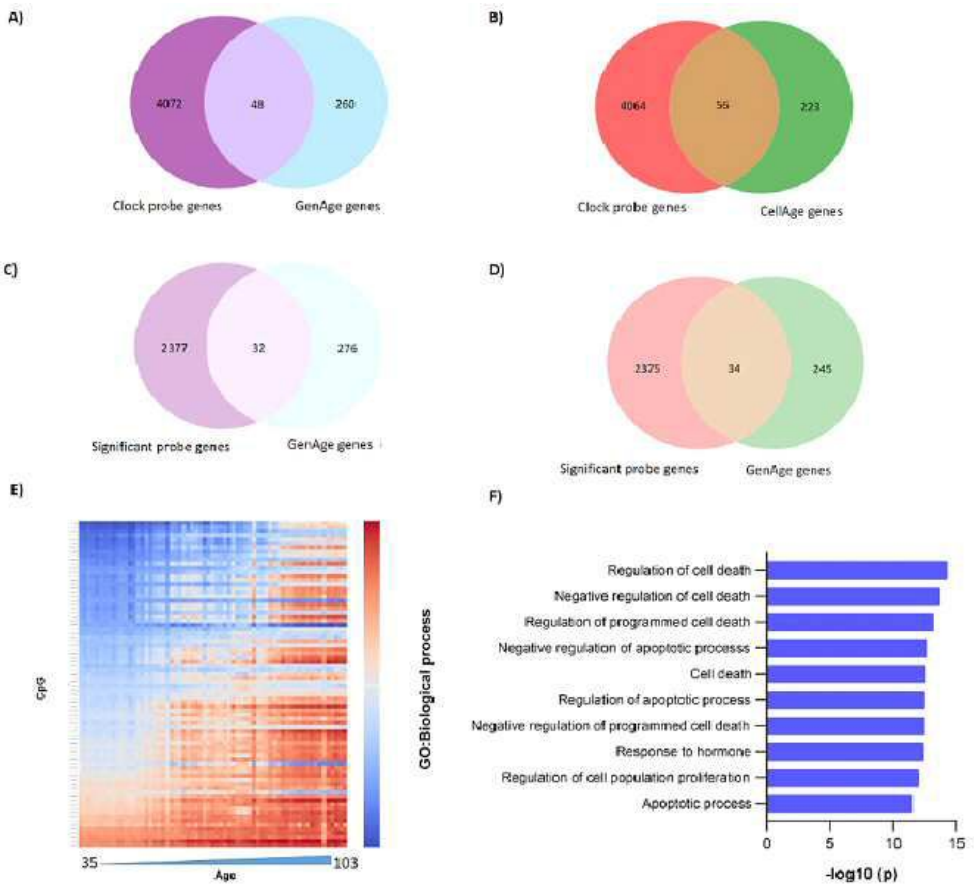
도면8


B)
All
Biological regulation
Metabolic process
Response to stimulus
Multicellular organismal process
Developmental process
Cell communication
Localization
Cellular component organization
Multi-organism process
Cell proliferation
Reproduction
Growth
Unclassified
1668
885
805
680
634
537
521
476
471
170
158
101
81
374
0
500
1000
1500
2000
No of Genes
A)
GO:Biological process
Anatomical structure development
Multicellular organism development
Nervous system development
Developmental process
System development
Multicellular organismal process
behavior
Central nervous system development
Cell morphogenesis
Cell development
Neurogenesis
anatomical structure morphogenesis
Animal organ development
Brain development
Head development
Generation of neurons
Cell morphogenesis involved in differentiation
0
2
4
6
8
10
-log10 (p)

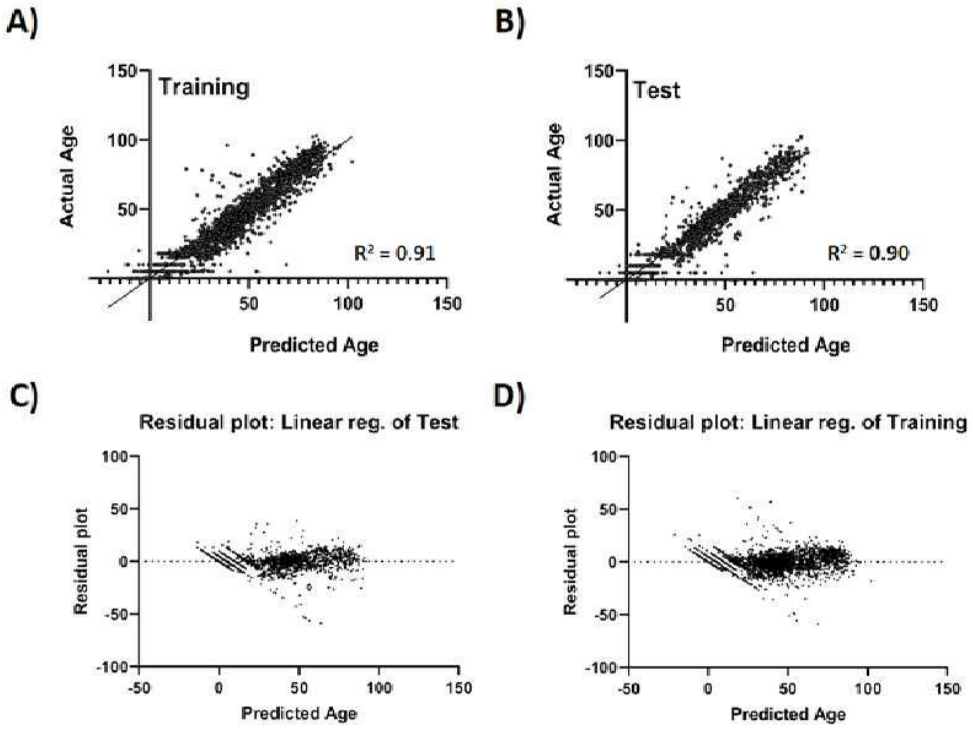
도면9


6427
334
24
Our clock
Horvath clock

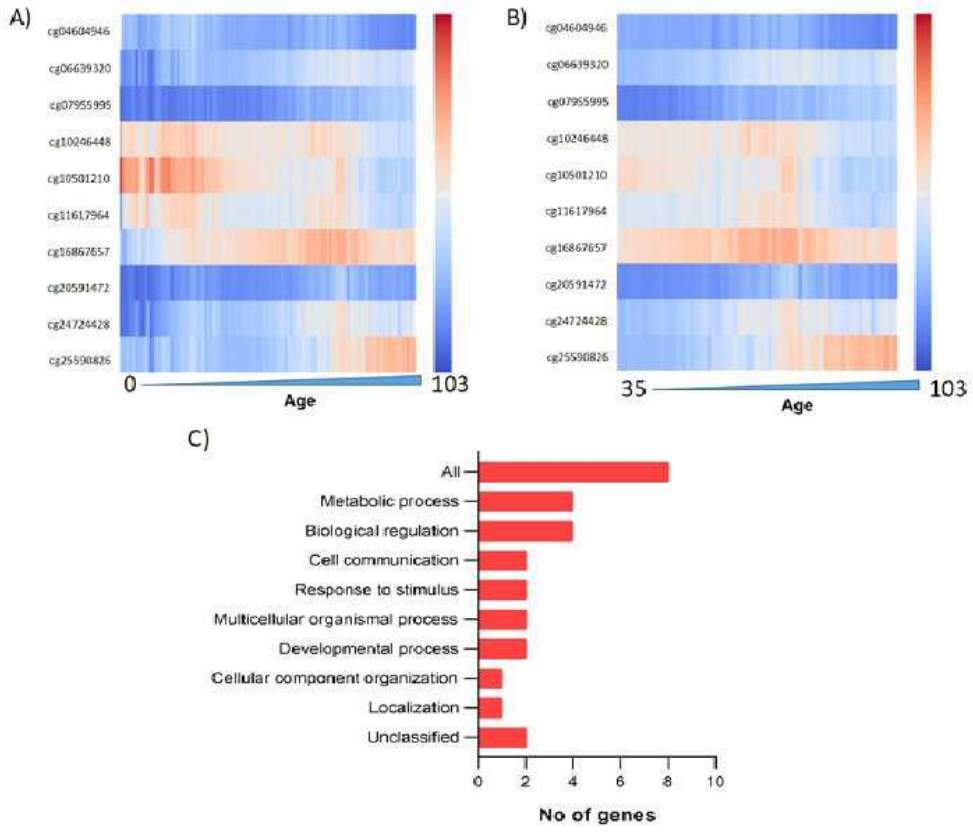
도면10


A)
4072
48
260
Clock probe genes
GenAge genes
B)
4064
56
223
Clock probe genes
CellAge genes
C)
2377
32
276
Significant probe genes
GenAge genes
D)
2375
34
245
Significant probe genes
GenAge genes
E)
exp
35
103
Age
GO:Biological process
F)
Regulation of cell death
Negative regulation of cell death
Regulation of programmed cell death
Negative regulation of apoptotic processs
Cell death
Regulation of apoptotic process
Negative regulation of programmed cell death
Response to hormone
Regulation of cell population proliferation
Apoptotic process
0
5
10
15
-log10 (p)

도면11


A)
Training
Actual Age
Predicted Age
R² = 0.91
B)
Test
Actual Age
Predicted Age
R² = 0.90
C)
Residual plot: Linear reg. of Test
Residual plot
Predicted Age
D)
Residual plot: Linear reg. of Training
Residual plot
Predicted Age

도면12


A)
cg04604946
cg06639320
cg07955995
cg10246448
cg10501210
cg11617964
cg16867657
cg20591472
cg24724428
cg25590826
0
103
Age
B)
35
103
Age
C)
All
Metabolic process
Biological regulation
Cell communication
Response to stimulus
Multicellular organismal process
Developmental process
Cellular component organization
Localization
Unclassified
No of genes

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.