



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0143008
(43) 공개일자 2016년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0078985

(22) 출원일자 2015년06월04일

심사청구일자 2015년06월04일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

고정민

서울특별시 강남구 삼성로 151, 2동 1201호 (대치동, 선경아파트)

김신윤

대구광역시 수성구 동대구로 95, 105동 4202호 (두산동, 수성에스케이리더스뷰아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

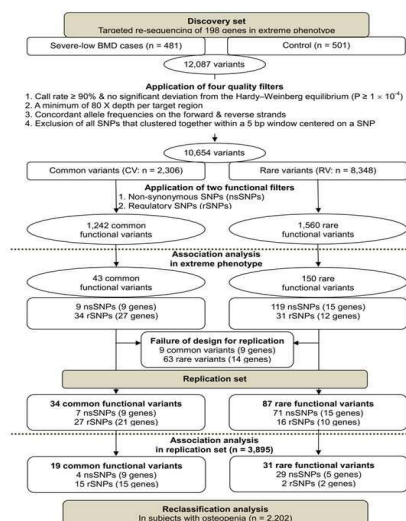
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 골다공증 골절 발생 예측용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 바이오마커로서 골다공증 골절 발생의 위험도를 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커, 상기 마커를 이용하여 골다공증 골절 발생을 예측하는 방법, 상기 마커를 이용하여 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법, 및 상기 마커를 검출할 수 있는 프로브를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 개체의 골다공증 골절의 발생 위험도를 효과적으로 예측할 수 있어, 골다공증 골절을 조기에 진단 및 예방할 수 있고, 종래 골다공증 골절 진단 방법의 예측의 부정확성에 기인한 과잉 치료 또는 치료 누락을 줄이고, 적시에 효과적인 치료 방법을 제시할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

이승훈

경기도 과천시 별양로 111, 507동 701호 (별양동,
주공아파트)

김범준

서울특별시 강동구 고덕로 131, 131동 501호 (암사
동, 강동롯데캐슬퍼스트아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리한 핵산 시료로부터, 하기의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법:

인간 1번 염색체의 113,051,074번째 염기가 A 또는 G인, 상기 113,051,074번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 11번 염색체의 40,316,673번째 염기가 G 또는 A인, 상기 40,316,673번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 13번 염색체의 29,070,533번째 염기가 C 또는 T인, 상기 29,070,533번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 13번 염색체의 42,845,500번째 염기가 T 또는 C인, 상기 42,845,500번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및

인간 6번 염색체의 127,438,642번째 염기가 C 또는 A인, 상기 127,438,642번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기가 다음과 같은 경우, 상기 염기는 골다공증 골절 발생 가능성이 있는 지표인 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법:

인간 1번 염색체의 113,051,074번째 염기가 A;

인간 11번 염색체의 40,316,673번째 염기가 G;

인간 13번 염색체의 29,070,533번째 염기가 C;

인간 13번 염색체의 42,845,500번째 염기가 T; 또는

인간 6번 염색체의 127,438,642번째 염기가 C.

청구항 3

제1항에 있어서, 하기의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 추가로 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법:

인간 11번 염색체의 68,367,943번째 염기가 G 또는 C인, 상기 68,367,943번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 17번 염색체의 2,185,956번째 염기가 T 또는 G인, 상기 2,185,956번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 1번 염색체의 65,885,357번째 염기가 A 또는 G인, 상기 65,885,357번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 4번 염색체의 88,732,874번째 염기가 A 또는 G인, 상기 88,732,874번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 5번 염색체의 52,082,846번째 염기가 T 또는 C인, 상기 52,082,846번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 3번 염색체의 29,322,363번째 염기가 T 또는 C인, 상기 29,322,363번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 7번 염색체의 38,217,555번째 염기가 A 또는 G인, 상기 38,217,555번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 8번 염색체의 119,965,024번째 염기가 T 또는 C인, 상기 119,965,024번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 3번 염색체의 85,006,615번째 염기가 C 또는 T인, 상기 85,006,615번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 7번 염색체의 120,969,769번째 염기가 G 또는 A인, 상기 120,969,769번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 3번 염색체의 29,322,297번째 염기가 C 또는 A인, 상기 29,322,297번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 12번 염색체의 28,126,245번째 염기가 C 또는 A인, 상기 28,126,245번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 7번 염색체의 120,968,674번째 염기가 A 또는 G인, 상기 120,968,674번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및

인간 7번 염색체의 27,166,854번째 염기가 A 또는 G인, 상기 27,166,854번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항에 있어서, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기가 다음과 같은 경우, 상기 염기는 골다공증 골절 발생 가능성이 있는 지표인 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법:

인간 11번 염색체의 68,367,943번째 염기가 G;

인간 17번 염색체의 2,185,956번째 염기가 T;

인간 1번 염색체의 65,885,357번째 염기가 A;

인간 4번 염색체의 88,732,874번째 염기가 A;

인간 5번 염색체의 52,082,846번째 염기가 T;

인간 3번 염색체의 29,322,363번째 염기가 T;

인간 7번 염색체의 38,217,555번째 염기가 A;

인간 8번 염색체의 119,965,024번째 염기가 T;

인간 3번 염색체의 85,006,615번째 염기가 C;

인간 7번 염색체의 120,969,769번째 염기가 G;

인간 3번 염색체의 29,322,297번째 염기가 C;

인간 12번 염색체의 28,126,245번째 염기가 C;

인간 7번 염색체의 120,968,674번째 염기가 A; 또는

인간 7번 염색체의 27,166,854번째 염기가 A.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, 하기의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 추가로 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법:

인간 10번 염색체의 43,292,131번째 염기가 C 또는 T인, 상기 43,292,131번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 10번 염색체의 43,292,146번째 염기가 A 또는 G인, 상기 43,292,146번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 10번 염색체의 43,292,337번째 염기가 A 또는 G인, 상기 43,292,337번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 10번 염색체의 43,292,394번째 염기가 G 또는 C인, 상기 43,292,394번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 10번 염색체의 43,292,584번째 염기가 T 또는 C인, 상기 43,292,584번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 10번 염색체의 43,297,622번째 염기가 G 또는 A인, 상기 43,297,622번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 7번 염색체의 27,147,763번째 염기가 G 또는 C인, 상기 27,147,763번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 7번 염색체의 27,166,747번째 염기가 C 또는 T인, 상기 27,166,747번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 7번 염색체의 27,169,034번째 염기가 C 또는 T인, 상기 27,169,034번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 7번 염색체의 27,183,762번째 염기가 T 또는 C인, 상기 27,183,762번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 7번 염색체의 27,196,304번째 염기가 G 또는 C인, 상기 27,196,304번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,273,202번째 염기가 A 또는 G인, 상기 42,273,202번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,281,233번째 염기가 A 또는 G인, 상기 42,281,233번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,281,312번째 염기가 T 또는 G인, 상기 42,281,312번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,282,136번째 염기가 G 또는 C인, 상기 42,282,136번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,282,148번째 염기가 A 또는 G인, 상기 42,282,148번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,284,361번째 염기가 G 또는 A인, 상기 42,284,361번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 2번 염색체의 42,284,769번째 염기가 A 또는 G인, 상기 42,284,769번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 11번 염색체의 46,897,404번째 염기가 A 또는 G인, 상기 46,897,404번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

인간 11번 염색체의 46,898,044번째 염기가 T 또는 C인, 상기 46,898,044번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 11번 염색체의 46,900,719번째 염기가 C 또는 T인, 상기 46,900,719번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 11번 염색체의 46,905,425번째 염기가 T 또는 C인, 상기 46,905,425번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 11번 염색체의 46,908,042번째 염기가 T 또는 C인, 상기 46,908,042번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 11번 염색체의 46,917,846번째 염기가 T 또는 A인, 상기 46,917,846번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 11번 염색체의 46,920,476번째 염기가 G 또는 A인, 상기 46,920,476번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 22번 염색체의 40,660,881번째 염기가 T 또는 C인, 상기 40,660,881번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 22번 염색체의 40,661,006번째 염기가 A 또는 G인, 상기 40,661,006번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 22번 염색체의 40,661,216번째 염기가 T 또는 G인, 상기 40,661,216번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 22번 염색체의 40,661,867번째 염기가 T 또는 C인, 상기 40,661,867번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;

인간 22번 염색체의 40,661,939번째 염기가 C 또는 G인, 상기 40,661,939번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및

인간 22번 염색체의 40,662,533번째 염기가 C 또는 A인, 상기 40,662,533번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기가 다음과 같은 경우, 상기 염기는 골다공증 골절 발생 가능성이 있는 지표인 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법:

인간 10번 염색체의 43,292,131번째 염기가 C;

인간 10번 염색체의 43,292,146번째 염기가 A;

인간 10번 염색체의 43,292,337번째 염기가 A;

인간 10번 염색체의 43,292,394번째 염기가 G;

인간 10번 염색체의 43,292,584번째 염기가 T;

인간 10번 염색체의 43,297,622번째 염기가 G;

인간 7번 염색체의 27,147,763번째 염기가 G;

인간 7번 염색체의 27,166,747번째 염기가 C;

인간 7번 염색체의 27,169,034번째 염기가 C;

인간 7번 염색체의 27,183,762번째 염기가 T;

인간 7번 염색체의 27,196,304번째 염기가 G;

인간 2번 염색체의 42,273,202번째 염기가 A;
인간 2번 염색체의 42,281,233번째 염기가 A;
인간 2번 염색체의 42,281,312번째 염기가 T;
인간 2번 염색체의 42,282,136번째 염기가 G;
인간 2번 염색체의 42,282,148번째 염기가 A;
인간 2번 염색체의 42,284,361번째 염기가 G;
인간 2번 염색체의 42,284,769번째 염기가 A;
인간 11번 염색체의 46,897,404번째 염기가 A;
인간 11번 염색체의 46,898,044번째 염기가 T;
인간 11번 염색체의 46,900,719번째 염기가 C;
인간 11번 염색체의 46,905,425번째 염기가 T;
인간 11번 염색체의 46,908,042번째 염기가 T;
인간 11번 염색체의 46,917,846번째 염기가 T;
인간 11번 염색체의 46,920,476번째 염기가 G;
인간 22번 염색체의 40,660,881번째 염기가 T;
인간 22번 염색체의 40,661,006번째 염기가 A;
인간 22번 염색체의 40,661,216번째 염기가 T;
인간 22번 염색체의 40,661,867번째 염기가 T;
인간 22번 염색체의 40,661,939번째 염기가 C; 또는
인간 22번 염색체의 40,662,533번째 염기가 C.

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서, 나이, 키, 체중, 흡연 유무, 알코올 섭취, 및 골절의 가족력으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 임상적 인자; 및/또는 골밀도를 추가로 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 나이, 키, 체중, 흡연 유무, 알코올 섭취, 및 골절의 가족력으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 임상적 인자; 및/또는 골밀도를 추가로 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제1항의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 상기 단일 염기 다형성 마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는, 골다공증 골절 발생 예측용 키트.

청구항 10

제3항의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 상기 단일 염기 다형성 마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는, 골다공증 골절 발생 예측용 키트.

청구항 11

제5항의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 상기 단일 염기 다형성 마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는, 골다공증 골절 발생 예측용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오마커로서 골다공증 골절 발생의 위험도를 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커, 상기 마커를 이용하여 골다공증 골절 발생을 예측하는 방법, 상기 마커를 이용하여 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법, 및 상기 마커를 검출할 수 있는 프로브를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골다공증은 골 강도가 손상되는 것을 특징으로 하는 질환으로, 골다공증 골절(OF; osteoporotic fracture)의 위험성이 증가한다.

[0003] 골다공증 치료는 골다공증 골절의 발생을 방지하는 것을 목표로 하며, 따라서 골다공증 관리에 있어서 골다공증 골절의 위험성이 높은 환자를 찾아 치료하는 것이 중요하다. 현재, 골다공증의 진단은 골밀도(Bone mineral density; BMD)를 측정함으로써 이루어지는 것이 대부분이나, 골다공증 골절이 있는 대부분 환자가 BMD 기준에 따르면 골다공증이 아닌 것으로 판명되는 등, 정확성이 떨어지는 문제가 있다. 따라서, 골다공증 골절의 위험도의 예측력을 높이기 위하여, 임상적 위험 인자들(clinical risk factors; CRFs) 자체 혹은 BMD 자료를 포함한 골절 위험 평가 도구(fracture risk assessment tool, FRAX® <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>)와 같은 여러 가지 골다공증 골절 예측 모델이 개발되었다. 임상적 치료 지침은 골다공증의 약물적인 치료 여부를 결정하는데 이러한 FRAX®를 기준으로 이용할 수 있음을 제안하였다. 그러나, FRAX® 또한, 예측의 정확성이 불충분하여, 과잉 치료 및 불필요한 치료를 가져올 수 있다. 따라서, 골다공증 골절의 발생을 예측할 수 있는 개선된 방법이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy (JAMA. 2001; 285(6):785-795)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 골다공증 골절의 발생 위험도를 효과적으로 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 개체로부터 분리한 핵산 시료로부터, 하기의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

- [0007] 인간 1번 염색체의 113,051,074번째 염기가 A 또는 G인, 상기 113,051,074번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0008] 인간 11번 염색체의 40,316,673번째 염기가 G 또는 A인, 상기 40,316,673번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0009] 인간 13번 염색체의 29,070,533번째 염기가 C 또는 T인, 상기 29,070,533번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0010] 인간 13번 염색체의 42,845,500번째 염기가 T 또는 C인, 상기 42,845,500번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0011] 인간 6번 염색체의 127,438,642번째 염기가 C 또는 A인, 상기 127,438,642번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 상기 단일 염기 다형성 마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는, 골다공증 골절 발생 예측용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따르면 개체의 골다공증 골절의 발생 위험도를 효과적으로 예측할 수 있어, 골다공증 골절을 조기에 진단 및 예방할 수 있고, 기존의 골다공증 골절 진단 방법의 예측의 부정확성에 기인한 과잉 치료 또는 치료 누락을 줄이고, 적시에 효과적인 치료 방법을 제시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 단일 염기 다형성 마커의 발굴 및 확인의 과정을 보여준다.
- 도 2는 흔한 변이에 의한 유전자 위험 지수 (genetic risk score-common variants, GRS-C) 및 총 변이에 따른 유전자 위험 지수 (genetic risk score-total variants, GRS-T) 분포를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 용어 정리
- [0016] 흔한 변이: 소수 대립유전자 빈도(minor allele frequency, MAF)가 = 1%인 변이
- [0017] 임상적 위험 인자(Clinical risk factors; CRFs): 나이, 키, 체중, 현재 흡연 유무, 알코올 섭취, 및 골절의 가족력
- [0018] 유전자 위험 지수-흔한 변이(Genetic risk scores-common variants; GRS-C): 흔한 변이에 의한 유전자 위험 지수
- [0019] 유전자 위험 지수-총 변이(Genetic risk scores-total variants; GRS-T): 흔한 변이와 드문 변이에 의한 유전자 위험 지수
- [0020] 기능성 변이: 서열- 및 구조-기반 예측 틀에 의하여 "양성(benign)", "손상의 가능성이 있는(possibly damaging)" 또는 "아마도 손상될(probably damaging)" 것으로 예상되는 nsSNPs(non-synonymous single nucleotide polymorphisms), 또는 알려진 전사 인자 결합 부위 이내의 rSNPs(regulatory single nucleotide polymorphisms)
- [0021] 드문 변이: 소수 대립유전자 빈도가 < 1%인 변이
- [0022] 잠재적으로 유해한 nsSNPs: 서열- 및 구조-기반 예측 틀에 의하여 "손상의 가능성이 있는(possibly damaging)" 또는 "아마도 손상될(probably damaging)" 것으로 지정되는 nsSNPs.
- [0023] 약어 정리
- [0024] BMD, 골밀도(bone mineral density); CMC법, combined multivariate and collapsing (CMC) method; CRFs, 임상적 위험 인자(clinical risk factors); FRAX, 골절 위험 평가 도구(fracture risk assessment tool); FN, 대퇴 경부(femoral neck); GRS-C, 유전자 위험 지수-흔한 변이 (genetic risk scores-common variants; GRS-T,

유전자 위험 지수-총 변이 (genetic risk scores-total variants); GWASs, 전장 유전체 연관성 분석(genome-wide association studies); KBAC, kernel-based adaptive cluster methods; LS, 요추(lumbar spine); MAF, 소수 대립유전자 빈도(minor allele frequency); NRI 인덱스, 순 재분류 향상 인덱스(net reclassification improvement index); nsSNPs, non-synonymous single nucleotide polymorphisms; NVF, 비-척추 골절(non-vertebral fractures); OF, 골다공증 골절(osteoporotic fracture); rSNPs, regulatory single nucleotide polymorphisms; SD, 표준 편차(standard deviations); SKAT-O, optimal sequence kernel association test; T1DM, 제1형 당뇨병(type 1 diabetes mellitus); T2DM, 제2형 당뇨병(type 2 diabetes mellitus); VF, 척추 골절(vertebral fracture); WHO, 세계 보건 기구(World Health Organization); WSS 법, weighted-sum statistics method

- [0025] 골다공증 골절(osteoporotic fracture) 발생을 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커를 발굴하기 위하여 실시된 GWASs (Genome-wide association studies)를 통하여 골다공증에 대한 흔한 변이들[소수 대립유전자 빈도(minor allele frequency; MAF) $\geq 1\%$]이 다수 발굴되었다. 그러나, 대규모의 GWAS 메타-분석에 의해 확인된 56 BMD 유전자 자리들(loci)을 모두 합쳐도 BMD 변화의 단지 5.8% 만이 설명됨을 보여주었다. 이는 GWAS에 의하여 확인한 변이들로는 골다공증 및 OF의 유전성을 완전히 설명되지 못함을 의미한다. 이러한 "사라진 유전율(missing heritability)"을 설명하기 위한 여러 가설이 제안되어왔다. 첫 번째 가설은 기능성 변이로 알려진 아미노산의 서열을 변화시킬 수 있는 코딩 부위 내의 nsSNPs(non-synonymous single nucleotide polymorphisms), 또는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터 또는 비해독 부위 이내의 rSNPs(조절 SNPs)가 흔한 변이가 아닐 가능성이 높다는 것이다. 두 번째 가설은 흔한 변이에 비해 질병 발생에 대해 강한 영향력을 갖고 있다고 알려진 드문 변이는 현재의 유전자형 분석 방법에 의해서는 확인하기가 어렵다는 점이다.
- [0026] 본 발명자들은 이러한 가설에 기초하여, 골다공증 골절 발생에 영향을 미치는 흔한 기능성 변이들과 드문 기능성 변이들 모두 함께 골다공증 골절 발생에 영향을 미칠 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 그 결과, 골다공증 골절과 관련된 단일 염기 다형성 마커로, 총 19개의 흔한 기능성 변이들과 총 31개의 드문 기능성 변이들을 관찰하였다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커의 용도를 제공한다.
- [0028] 본 발명은 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커들 중에서 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 마커; 상기 마커를 이용하여 골다공증 골절 발생을 예측하는 방법; 상기 마커를 이용하여 골다공증 골절의 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법; 및 상기 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 상기 마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 키트를 제공한다.
- [0029] 구체적으로, 본 발명은 개체로부터 분리한 핵산 시료로부터, 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 단일 염기 다형성 마커들 중에서 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 확인하는 것을 포함하는 개체의 골다공증 골절 발생을 예측하기 위하여 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0030] 용어 '다형성(polymorphism)'은 엑손 및 인트론을 포함하는 핵산 또는 그 일부에 하나 이상의 형태가 공존하는 것을 일컫는다. '단일 염기 다형성(Single Nucleotide Polymorphism)' 또는 'SNP'는 유전자의 특정한 위치에서 두 가지 이상의 단일 염기가 존재는 경우를 말한다. 대부분의 SNP는 두 개의 대립유전자를 갖는다. 상기 다형성의 하나의 대립유전자에 대해, 2개의 동일한 대립유전자를 가지면 대립유전자에 대해 동형접합성(SNP 위치에서 동일한 염기를 가짐)이라고 하고, 2개의 상이한 대립유전자를 가지면 대립유전자에 대해 이형접합성(SNP 위치에서 상이한 염기를 가짐)이라고 한다. 바람직한 SNP는 선택된 집단에서 1% 이상, 더욱 바람직하게는 10% 또는 20% 이상의 발생빈도를 나타내는 두 가지 이상의 대립유전자를 가진다. 본 발명에서, SNP 명명은 rs ID로 나타낸다. Rs ID는 NCBI(the National Center for Biotechnological Information)에서 각각의 독특한 SNP에 부여한 공식적인 SNP(Reference SNP, rs) ID를 의미한다.
- [0031] 용어 '대립 유전자(allele)'는 유전자 또는 그 일부와 관련된 인트론, 엑손, 인트론/엑손 접합(junction) 및 3' 및/또는 5' 비해독 영역을 포함하는 유전자의 대안적인 형태를 일컫는다. 일반적으로 대립유전자는 상동 염색체 상의 동일한 유전자 좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 말한다. 특정 유전자의 대립유전자는 서로 단일 뉴클레오타이드 또는 몇 개의 뉴클레오타이드가 다를 수 있고 뉴클레오타이드의 치환, 결실 및 삽입을 포함할 수 있다.
- [0032] 용어 '마커(marker)', '다형성 마커' 또는 '단일 염기 다형성 마커'는 유전자의 다형성 부위(genomic

polymorphic site)를 의미한다. 각 다형성 마커는 다형성 부위에서 특정한 대립유전자에 특징적인 두 개 이상의 서열 변이를 갖는다.

- [0033] 용어 '개체'는 골다공증 골절 발생을 예측하기 위한 피험자를 의미하며, '핵산 시료(nucleic acid sample)'는 개체로부터 수득된 핵산(DNA 또는 RNA)을 포함하는 시료를 의미한다. 핵산 시료는, 개체로부터 채취한 혈액, 뇨, 머리카락, 양수액, 뇌척수액; 또는 피부, 근육, 구강 점막 또는 결막 점막; 태반, 위장관 또는 기타 기관으로부터의 조직 시료 등과 같은, 핵산을 포함하는 임의의 공급원(source)으로부터 수득될 수 있다. 개체로부터 핵산 시료를 수득하는 방법은 당업계에서 잘 알려져 있고, 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0034] 개체로부터 분리한 핵산 시료로부터, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 단일 염기 다형성 마커를 검출할 수 있는 프로브와 혼성화하여 다형성 부위의 염기를 확인할 수 있다.
- [0035] 예를 들어, PCR, 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭(transcription amplification), 자가유지 서열 복제 및 핵산에 근거한 서열 증폭 (NASBA)을 이용하여 다형성 부위를 증폭할 수 있다.
- [0036] 다형성 부위의 염기의 확인은 시퀀싱 분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 대립유전자 혼성화 기법(dynamic allele-specific hybridization, DASH), PCR 연장 분석, SSCP, PCR-RFLP 분석, TaqMan 기법, SNPlex 플랫폼(Applied Biosystems), 질량 분석법(예를 들면, Sequenom의 Mass ARRAY 시스템), 미니-시퀀싱(mini-sequencing) 방법, Bio-Plex 시스템(BioRad), CEQ 및 SNP stream 시스템(Beckman), Molecular Inversion Probe 어레이 기술(예를 들면, Affymetrix GeneChip), 및 BeadChip (Illumina의 HumanOmni2.5-8) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, SNP 칩을 이용하여 다형성 부위의 염기를 확인할 수 있다. SNP 칩은 수십만개의 SNP의 각 염기를 한번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이의 하나를 의미한다.
- [0037] TaqMan 방법은 (1) 원하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 탐침을 설계 및 제작하는 단계; (2) 서로 다른 대립유전자의 탐침을 FAM 염료 및 VIC 염료로 표지(Applied Biosystems)하는 단계; (3) 상기 DNA를 주형으로 하고, 상기의 프라이머 및 탐침을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; (4) 상기의 PCR 반응이 완성된 후, TaqMan 분석 플레이트를 핵산 분석기로 분석 및 확인하는 단계; 및 (5) 상기 분석결과로부터 단계 (1)의 폴리뉴클레오티드들의 유전체형을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0038] 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자분석기를 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 대립유전자 특이적 PCR은 SNP가 위치하는 염기를 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트로 상기 SNP가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다. 상기 방법의 원리는, 예를 들어, 특정 염기가 A에서 G로 치환된 경우, 상기 A를 3' 말단염기로 포함하는 프라이머 및 적당한 크기의 DNA 단편을 증폭할 수 있는 반대 방향 프라이머를 고안하여 PCR 반응을 수행할 경우, 상기 SNP 위치의 염기가 A인 경우에는 증폭반응이 정상적으로 수행되어 원하는 위치의 밴드가 관찰되고, 상기 염기가 G로 치환된 경우에는 프라이머는 주형 DNA에 상보결합할 수 있으나, 3' 말단 쪽이 상보결합을 하지 못함으로써 증폭반응이 제대로 수행되지 않는 점을 이용한 것이다. DASH는 통상적인 방법으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 프린스 등에 의한 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [0039] PCR 연장 분석은 먼저 단일염기 다형성이 위치하는 염기를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 쌍으로 증폭을 한 다음, 반응에 첨가된 모든 뉴클레오티드를 탈인산화시킴으로써 불활성화시키고, 여기에 SNP 특이적 연장 프라이머, dNTP 혼합물, 디디옥시뉴클레오티드, 반응 완충액 및 DNA 중합효소를 첨가하여 프라이머 연장반응을 수행함으로써 이루어진다. 이때, 연장 프라이머는 SNP가 위치하는 염기의 5' 방향에 바로 인접한 염기를 3' 말단으로 삼으며, dNTP 혼합물에는 디디옥시뉴클레오티드와 동일한 염기를 갖는 핵산이 제외되고, 상기 디디옥시뉴클레오티드는 SNP를 나타내는 염기 종류 중 하나에서 선택된다. 예를 들어, A에서 G로의 치환이 있는 경우, dGTP, dCTP 및 TTP 혼합물과 ddATP를 반응에 첨가할 경우, 상기 치환이 일어난 염기에서 프라이머는 DNA 중합효소에 의하여 연장되고, 몇 염기가 지난 후 A 염기가 최초로 나타나는 위치에서 ddATP에 의하여 프라이머 연장반응이 종결된다. 만일 상기 치환이 일어나지 않았다면, 그 위치에서 연장반응이 종결되므로, 상기 연장된 프라이머의 길이를 비교함으로써 SNP를 나타내는 염기 종류를 판별할 수 있게 된다.
- [0040] 이때, 검출방법으로는 연장 프라이머 또는 디디옥시뉴클레오티드를 형광 표지한 경우에는 일반적인 염기서열 결정에 사용되는 유전자 분석기(예를 들어, ABI사의 Model 3700 등)를 사용하여 형광을 검출함으로써 상기 SNP를 검출할 수 있으며, 무-표지된 연장 프라이머 및 디디옥시뉴클레오티드를 사용할 경우에는 MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) 기법을 이용하여 분자량을 측정함으로써 상기 SNP를

검출할 수 있다.

- [0041] 본 발명의 골다공증 골절 발생 예측용 단일 염기 다형성 마커의 예는 다음과 같다.
- [0042] 인간 1번 염색체의 113,051,074번째 염기가 A 또는 G인, 상기 113,051,074번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0043] 인간 11번 염색체의 40,316,673번째 염기가 G 또는 A인, 상기 40,316,673번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0044] 인간 13번 염색체의 29,070,533번째 염기가 C 또는 T인, 상기 29,070,533번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0045] 인간 13번 염색체의 42,845,500번째 염기가 T 또는 C인, 상기 42,845,500번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드; 및
- [0046] 인간 6번 염색체의 127,438,642번째 염기가 C 또는 A인, 상기 127,438,642번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드.
- [0047] 상기 단일 염기 다형성 마커는 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 기능성 혼한 변이들에 해당한다.
- [0048] 한 구체 예에서, 상기의 단일 염기 다형성 마커는 하나를 사용할 수도 있고, 마커들 중에서 1종 이상을 조합하여 사용할 수 있으며, 마커 모두를 조합하여 사용할 수도 있다. 조합하는 마커의 수가 증가할수록, 골다공증 골절 발생 예측의 정확도가 향상된다. 예를 들어, 상기 단일 염기 다형성 마커를 2개 이상, 3개 이상 또는 5개 모두를 조합하여 사용할 수 있다.
- [0049] 상기에서, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기가 다음과 같은 경우, 상기 염기는 골다공증 골절 발생의 가능성이 있는, 즉 다른 염기와 비교하여 골다공증 골절 발생의 가능성이 높은 지표이다.
- [0050] 인간 1번 염색체의 113,051,074번째 염기가 A;
- [0051] 인간 11번 염색체의 40,316,673번째 염기가 G;
- [0052] 인간 13번 염색체의 29,070,533번째 염기가 C;
- [0053] 인간 13번 염색체의 42,845,500번째 염기가 T; 또는
- [0054] 인간 6번 염색체의 127,438,642번째 염기가 C.
- [0055] 본 발명의 일 예에 따르면, 하기의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 추가로 확인하는 것을 포함할 수 있다.
- [0056] 인간 11번 염색체의 68,367,943번째 염기가 G 또는 C인, 상기 68,367,943번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0057] 인간 17번 염색체의 2,185,956번째 염기가 T 또는 G인, 상기 2,185,956번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0058] 인간 1번 염색체의 65,885,357번째 염기가 A 또는 G인, 상기 65,885,357번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0059] 인간 4번 염색체의 88,732,874번째 염기가 A 또는 G인, 상기 88,732,874번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0060] 인간 5번 염색체의 52,082,846번째 염기가 T 또는 C인, 상기 52,082,846번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0061] 인간 3번 염색체의 29,322,363번째 염기가 T 또는 C인, 상기 29,322,363번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0062] 인간 7번 염색체의 38,217,555번째 염기가 A 또는 G인, 상기 38,217,555번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

- [0063] 인간 8번 염색체의 119,965,024번째 염기가 T 또는 C인, 상기 119,965,024번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0064] 인간 3번 염색체의 85,006,615번째 염기가 C 또는 T인, 상기 85,006,615번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0065] 인간 7번 염색체의 120,969,769번째 염기가 G 또는 A인, 상기 120,969,769번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0066] 인간 3번 염색체의 29,322,297번째 염기가 C 또는 A인, 상기 29,322,297번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0067] 인간 12번 염색체의 28,126,245번째 염기가 C 또는 A인, 상기 28,126,245번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;
- [0068] 인간 7번 염색체의 120,968,674번째 염기가 A 또는 G인, 상기 120,968,674번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드; 및
- [0069] 인간 7번 염색체의 27,166,854번째 염기가 A 또는 G인, 상기 27,166,854번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드.
- [0070] 상기 단일 염기 다형성 마커는 하기 실시 예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 기능성 혼한 변이들에 해당한다.
- [0071] 한 구체예에서, 상기의 단일 염기 다형성 마커는 하나를 사용할 수도 있고, 마커들 중에서 1종 이상을 조합하여 사용할 수 있으며, 마커 모두를 조합하여 사용할 수도 있다. 조합하는 마커의 수가 증가할수록, 골다공증 골절 발생 예측의 정확도가 향상된다. 예를 들어, 상기 단일 염기 다형성 마커를 2개 이상, 3개 이상, 5개 이상, 7개 이상, 10개 이상, 또는 14개 모두를 조합하여 사용할 수 있다.
- [0072] 상기에서, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기가 다음과 같은 경우, 상기 염기는 골다공증 골절 발생 가능성이 있는, 즉 다른 염기와 비교하여 골다공증 골절 발생의 가능성이 높은 지표이다.
- [0073] 인간 11번 염색체의 68,367,943번째 염기가 G;
- [0074] 인간 17번 염색체의 2,185,956번째 염기가 T;
- [0075] 인간 1번 염색체의 65,885,357번째 염기가 A;
- [0076] 인간 4번 염색체의 88,732,874번째 염기가 A;
- [0077] 인간 5번 염색체의 52,082,846번째 염기가 T;
- [0078] 인간 3번 염색체의 29,322,363번째 염기가 T;
- [0079] 인간 7번 염색체의 38,217,555번째 염기가 A;
- [0080] 인간 8번 염색체의 119,965,024번째 염기가 T;
- [0081] 인간 3번 염색체의 85,006,615번째 염기가 C;
- [0082] 인간 7번 염색체의 120,969,769번째 염기가 G;
- [0083] 인간 3번 염색체의 29,322,297번째 염기가 C;
- [0084] 인간 12번 염색체의 28,126,245번째 염기가 C;
- [0085] 인간 7번 염색체의 120,968,674번째 염기가 A; 또는
- [0086] 인간 7번 염색체의 27,166,854번째 염기가 A.
- [0087] 본 발명의 다른 일 예에 따르면, 하기의 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 추가로 확인하는 것을 포함할 수 있다.
- [0088] 인간 10번 염색체의 43,292,131번째 염기가 C 또는 T인, 상기 43,292,131번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드;

- [illegible]

- [0110] 인간 11번 염색체의 46,908,042번째 염기가 T 또는 C인, 상기 46,908,042번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0111] 인간 11번 염색체의 46,917,846번째 염기가 T 또는 A인, 상기 46,917,846번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0112] 인간 11번 염색체의 46,920,476번째 염기가 G 또는 A인, 상기 46,920,476번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0113] 인간 22번 염색체의 40,660,881번째 염기가 T 또는 C인, 상기 40,660,881번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0114] 인간 22번 염색체의 40,661,006번째 염기가 A 또는 G인, 상기 40,661,006번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0115] 인간 22번 염색체의 40,661,216번째 염기가 T 또는 G인, 상기 40,661,216번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0116] 인간 22번 염색체의 40,661,867번째 염기가 T 또는 C인, 상기 40,661,867번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드;
- [0117] 인간 22번 염색체의 40,661,939번째 염기가 C 또는 G인, 상기 40,661,939번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0118] 인간 22번 염색체의 40,662,533번째 염기가 C 또는 A인, 상기 40,662,533번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 핵산 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드.
- [0119] 상기 단일 염기 다형성 마커는 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 기능성 드문 변이들에 해당한다.
- [0120] 한 구체 예에서, 상기의 단일 염기 다형성 마커는 하나를 사용할 수도 있고, 마커들 중에서 1종 이상을 조합하여 사용할 수 있으며, 마커 모두를 조합하여 사용할 수도 있다. 조합하는 마커의 수가 증가할수록, 골다공증 골절 발생 예측의 정확도가 향상된다. 예를 들어, 상기 단일 염기 다형성 마커를 2개 이상, 3개 이상, 5개 이상, 7개 이상, 10개 이상, 13개 이상, 15개 이상, 17개 이상, 20개 이상, 23개 이상, 25개 이상, 27개 이상 또는 31개 모두를 조합하여 사용할 수 있다.
- [0121] 상기에서, 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기가 다음과 같은 경우, 상기 염기는 골다공증 골절 발생 가능성이 있는, 즉 다른 염기와 비교하여 골다공증 골절 발생의 가능성이 높은 지표이다.
- [0122] 인간 10번 염색체의 43,292,131번째 염기가 C;
- [0123] 인간 10번 염색체의 43,292,146번째 염기가 A;
- [0124] 인간 10번 염색체의 43,292,337번째 염기가 A;
- [0125] 인간 10번 염색체의 43,292,394번째 염기가 G;
- [0126] 인간 10번 염색체의 43,292,584번째 염기가 T;
- [0127] 인간 10번 염색체의 43,297,622번째 염기가 G;
- [0128] 인간 7번 염색체의 27,147,763번째 염기가 G;
- [0129] 인간 7번 염색체의 27,166,747번째 염기가 C;
- [0130] 인간 7번 염색체의 27,169,034번째 염기가 C;
- [0131] 인간 7번 염색체의 27,183,762번째 염기가 T;
- [0132] 인간 7번 염색체의 27,196,304번째 염기가 G;
- [0133] 인간 2번 염색체의 42,273,202번째 염기가 A;
- [0134] 인간 2번 염색체의 42,281,233번째 염기가 A;

- [0135] 인간 2번 염색체의 42,281,312번째 염기가 T;
- [0136] 인간 2번 염색체의 42,282,136번째 염기가 G;
- [0137] 인간 2번 염색체의 42,282,148번째 염기가 A;
- [0138] 인간 2번 염색체의 42,284,361번째 염기가 G;
- [0139] 인간 2번 염색체의 42,284,769번째 염기가 A;
- [0140] 인간 11번 염색체의 46,897,404번째 염기가 A;
- [0141] 인간 11번 염색체의 46,898,044번째 염기가 T;
- [0142] 인간 11번 염색체의 46,900,719번째 염기가 C;
- [0143] 인간 11번 염색체의 46,905,425번째 염기가 T;
- [0144] 인간 11번 염색체의 46,908,042번째 염기가 T;
- [0145] 인간 11번 염색체의 46,917,846번째 염기가 T;
- [0146] 인간 11번 염색체의 46,920,476번째 염기가 G;
- [0147] 인간 22번 염색체의 40,660,881번째 염기가 T;
- [0148] 인간 22번 염색체의 40,661,006번째 염기가 A;
- [0149] 인간 22번 염색체의 40,661,216번째 염기가 T;
- [0150] 인간 22번 염색체의 40,661,867번째 염기가 T;
- [0151] 인간 22번 염색체의 40,661,939번째 염기가 C; 또는
- [0152] 인간 22번 염색체의 40,662,533번째 염기가 C.
- [0153] 본 발명의 일 예에 따르면, 골다공증 골절 발생의 예측을 위한 정보를 제공하기 위하여, 상기 단일 염기 다형성 마커의 다형성 부위의 염기를 확인하는 것과 함께, 임상적 위험 인자 및/또는 골밀도를 추가로 확인할 수 있다. 골다공증 골절과 관련되는 임상적 위험 인자는, 이에 제한되는 것은 아니나, 나이, 키, 체중, 흡연 유무, 알코올 섭취, 및 골절의 가족력으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 하기 실시 예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 임상적 위험 인자 및/또는 골밀도를 함께 확인함으로써, 골다공증 골절 발생 예측의 정확도를 높일 수 있다.
- [0154] 본 발명은 또한, 상기 단일 염기 다형성 마커로부터 선택되는 하나 이상의 단일 염기 다형성 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 상기 단일 염기 다형성 마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 골절 발생 예측용 조성물을 포함하는, 골다공증 골절 발생 예측용 키트를 제공한다. 위에서 기술한 모든 단일 염기 다형성 마커가 키트에 이용될 수 있다.
- [0155] 용어 '프로브'는 유전자의 다형성 부위와 특이적으로 혼성화 반응을 하여 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있는 물질을 의미하며, 이와 같은 유전자 분석의 구체적 방법은 특별한 제한이 없으며, 이 발명이 속하는 기술분야에 알려진 모든 유전자 검출 방법에 의하는 것일 수 있다.
- [0156] 용어 '프라이머'는 단일 염기 다형성 마커의 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 물질로, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4 가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 골다공증 골절 발생을 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있고, 예를 들어 15 내지 30 뉴클레오타이드일 수 있다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.
- [0157] 프로브 또는 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적

으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0158] 본 발명에서, 키트는 단일 염기 다형성 마커를 검출하거나, 확인할 수 있는 키트이면 제한 없이 사용 가능하다. 예를 들어, 키트는 DNA 칩 키트 또는 RT-PCR(real time- polymerase chain reaction) 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 다형성 마커의 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 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), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. RT-PCR 키트를 이용하여, 단일 염기 다형성 마커의 mRNA 발현 수준을 측정함으로써, 다형성 마커를 확인할 수 있다. DNA 칩 키트는, 일반적으로 편평한 고체 지지판, 전형적으로는 현미경용 슬라이드보다 크지 않은 유리 표면에 핵산 중을 격자형 배열(grided array)로 부착한 것으로, 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화(hybridization) 반응이 일어나 대량 병렬 분석이 가능하도록 하는 도구이다.

[0159] 본 발명의 키트는 또한 마이크로어레이를 포함한다. 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 프로브 폴리뉴클레오타이드에 본 발명의 다형성 마커의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어질 수 있다.

[0160] 프로브 폴리뉴클레오타이드를 기판상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 프로브 폴리뉴클레오타이드는 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립유전자 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 이 경우 혼성화 조건은 대립유전자간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립유전자 중 하나에만 혼성화 하도록 충분히 엄격해야 한다. 이렇게 함으로써 다른 대립유전자 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다.

[0161] 마이크로어레이는 공지된 마이크로어레이를 제한 없이 사용할 수 있으며, 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화 결과의 검출 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 핵산 시료를 형광 물질과 같은 검출 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지 물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.

[0162] 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상적인 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0163] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0164] 연구 집단

[0165] 연구 대상은 대한민국의 서울 아산 병원(Asan Medical Center; AMC), 서울성모병원(Catholic Medical Center; CMC), 강원대학교 병원(Kangwon Medical Center; KMC) 세 개의 코호트(Asan, Catholic, and Kangwon-Medical Centers; ACK-MC)로 구성되었다. 모든 연구는 각 기관의 윤리 위원회에 의하여 승인되었고, 모든 참여자로부터 서면 동의를 받았다. AMC 코호트는 서울 아산 병원에 방문한 2,922명의 대한민국 폐경 여성을 포함하였다. CMC 코호트는 충주 지역의 1,206명의 대한민국 폐경 여성을 포함하였다. KMC 코호트는 강원대학교 병원에 방문한 749명의 대한민국 폐경 여성으로 이루어졌다. 폐경은 적어도 1년 동안 생리가 없는 것으로 정의하였고, 혈청 난포-자극 호르몬 수치로 확인하였다. 설문지를 통하여 흡연력(현재 흡연 유무), 알콜 섭취량(≥ 3 units/day), 복용 중인 약물, 이전의 의학적 또는 외과적 질병, 출산, 골절의 가족력, 및 골절의 과거력과 같은 정보를 얻었다. 조기 폐경 여성(<40세), 및 골 대사에 영향을 줄 수 있는 약물(예를 들어, 글루코코르티코이드, 성 호

르몬, 비스포스포네이트, 또는 다른 골다공증 치료제)을 6 개월 이상 복용하거나 이들 약물을 12개월 이내에 복용한 적 있는 사람은 제외하였다. 또한, 글루코코르티코이드의 경우에는 1개월 이상 복용한 사람 역시 제외하였다. 또한, T1DM, 암, 부갑상선 기능 항진증, 갑상선 질환, 또는 류마티스성 관절염과 같은 골 대사에 영향을 줄지도 모르는 질병을 경험한 적이 있었던 사람은 제외하였다. 뇌졸중(stroke) 또는 치매가 있는 여성 또한 신체 활동의 제한에 대한 우려가 있기 때문에 제외하였다. 또한, 나단 분류 시스템(Nathan classification system)의 4단계 이상의 골극 형성이 있거나, 통상적인 척추 방사선 사진에 의하여 확인된 요추(lumbar spine; LS)에 심각한 퇴행성 변화가 있는 여성은 제외하였다.

[0166] 발골 단계에서, AMC 코호트로부터 양극단 표현형을 가진 대상자에서 타겟 리시퀀싱을 수행하였다. 타겟 리시퀀싱을 위한 대상자를 선정하기 위해 나이를 2년 이내로 매칭시켜 대퇴 경부(femoral neck; FN) BMD 수치 및 체질량 지수(body mass index; BMI)를 이용하여 두 그룹으로 나누었다. BMI가 높으면 높은 골밀도를 가진다고 알려져 있기 때문에, BMI 를 보정하여 유전적 영향을 증폭하고자 하였다, 이에 따라, 대조군(n=505)으로서는 상대적으로 낮은 BMI(사분 범위 [Interquartile range; IQR]: 20.9-24.4 kg/m²)를 가졌음에도 불구하고, 나이를 매칭한 대상자의 FN BMD 수치가 상위 10%(IQR: 0.710-0.840 g/cm²)인 대상자를 포함하였다. 매우 낮은 BMD군(n=505)은 상대적으로 높은 BMI(IQR: 21.5-25.1 kg/m²)를 가졌음에도 불구하고, 나이를 매칭한 대상자의 FN BMD 수치가 하위 10%(IQR: 0.594-0.723 g/cm²)인 대상자 들을 포함하였다. 이 들 중 DNA 추출, 질 감시, 및 농도 측정 후에, 타겟 리시퀀싱을 위한 501명의 대조군 및 481명의 매우-낮은 BMD군을 최종 선발되었다. ACK-MC 코호트의 남아 있는 3,895명에서 검증 시퀀싱을 수행하였다.

[0167] DNA 추출, 질 감시(Quality check) 및 농도 측정

[0168] DNA의 질 감시를 위하여 A260/A280 비율을 측정하여 1.8-2.0이 유지되는지 확인하고, 아가로스 겔 전기영동을 실시하여 안정성을 확인하였다. Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 gDNA의 농도를 측정하였다.

[0169] LS 및 FN부위에서 BMD 측정 및 골절 평가

[0170] BMD(g/cm²)는 이중에너지 방사선 흡수법으로 측정하였는데 AMC 코호트의 1,138명 여성에서는 Lunar 기계(Lunar, Expert XL, Madison, WI)를 이용하여, 남은ACK-MC 코호트의 3,717명 여성에서는Hologic 기계(Hologic, QDR 4500-A, Waltham, MA)를 이용하여 LS (L1-L4) 및 FN 부위에서 측정하였다. WHO(World Health Organization)의 정의에 따라 골다공증은 T-score ≤ -2.5 SD(standard deviation)일 때, 골감소증은 -1.0 및 -2.5 SD 일 때로 정의하였다.

[0171] 두 개의 측정 기계 사이의 교차-보정 식은 두 개의 기계를 이용하여 109 명의 건강한 한국 여성(평균 나이 55±11세; 범위, 31-75세)의 BMD를 측정한 결과를 이용하였고 그 식은 다음과 같다.

[0172] LS BMD (g/cm²): Lunar=1.1287 X Hologic - 0.0027

[0173] FN BMD (g/cm²): Lunar=1.1556 X Hologic - 0.0182

[0174] 정밀도를 나타내는 변동 계수(variation coefficients)는 AMC의 Lunar 기계의 LS 부위에서는 0.82% 및 FN 부위에서는 1.10%이었다. Hologic 기계의 변동 계수는 LS 및 FN 각각에 대하여 AMC에서는 0.85% 및 1.08%, CMC에서는 1.36% 및 1.42%, KMC에서 1.36% 및 1.50% 이었다. 이들 수치는 본 연구에 참여하지 않은 17-25명의 지원자를 같은 날에 다섯 번 측정하여 얻었다.

[0175] 모든 대상자는 측면 흉요추부(Lateral thoracolumbar spine) 방사선 사진을 찍어 형태학상 척추 골절(vertebral fracture; VF)의 유무를 결정하였다. VF 평가는 Working Group on Vertebral Fractures의 권고안에 따랐다. VF의 정량적 정의는 척추 높이의(즉, 전면, 중앙, 또는 후면) > 20%의 감소로 정의되었다. 설문지를 통하여 비-척추 골절(Non-vertebral fractures; NVFs), 즉 손목, 대퇴골, 아래팔, 상완골, 늑골, 골반의 골절 여부를 평가하였다. 자동차 사고와 같은 중증 외상에 의하거나, 서 있는 높이보다 높은 곳에서 떨어져서 유발된 골절은 제외하였다. 따라서, 골절은 설문지 혹은 상담을 통하여 폐경 또는 50세 이후에 작은 외상으로 발생한 것으로 확인된 골다공증 골절만을 포함하였다.

[0176] 타겟 리시퀀싱(Targeted resequencing)

[0177] 타겟 리시퀀싱을 위한 198개 유전자(표 1)는 문헌을 통하여 선택하였다. 타겟 부위는 단백질을 코딩하는 엑손, 엑손-인트론 경계 부위, 포유동물-보존된 조절 부위(전사 시작 부위의 10kb 상위부위)를 포함하였다. 타겟 리시퀀싱을 위한 198개 유전자의 총 타겟 부위 사이즈는 1,751,078 bp이었다. Agilent eArray website (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>)를 이용하여 배이트 라이브러리(Bait libraries)를 디자인하고 타겟 부위의 커버리지에 대하여 평가하였다. 온라인 디자인 과정은 오프-타겟의 포획을 최소화하기 위하여 타겟 서열을 반복 마스크하도록 추천하였다. 인간 게놈 레퍼런스(human genome reference; hg19)에서 결과물인 배이트를 조사하였다. 하나 이상의 위치에서 맵핑된 배이트가 BLAST (~12 mismatches across the bait)를 이용하여 90% 초과 서열 상동성이 있는 경우 해당 배이트는 디자인에서 제외시켰다. 최종적으로, Agilent SureSelect Sequence Enrichment Kit 에 의하여 1,248,160 bp (타겟 부위의 71.3%)를 포획하고 Illumina HiSeq2000 analyzer (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 시퀀싱하였다. Covaris System을 이용하여 게놈 DNA (3 μ g)에 무작위로 전단력을 인가하여, 약 150 bp의 인서트를 생성하였다. T4 DNA 중합효소 및 Klenow 중합효소를 이용하여 조각난 DNA의 말단을 수선(end-repaired)하고, Illumina paired-end 어댑터 올리고뉴클레오타이드를 접착성 말단(sticky ends)에 연결(ligation)시켰다. 아가로스 겔 전기영동에 의하여 연결 혼합물(ligation mixture)을 분석하고 200-250 bp의 단편을 분리하였다. 제조사의 설명서에 따라 정제된 DNA 라이브러리 결과물을 SureSelect target Enrichment probes set (Agilent, Santa Clara, CA, USA)와 혼성화하여, 타겟 부위를 포획하였다. 제조사의 프로토콜에 따라, 포획된 라이브러리를 이용하여 HiSeq2000 paired-end flowcell을 제조하였다. 그 후 HiSeq2000 platform을 이용하여 PCR 콜로니의 클러스터를 시퀀싱하였다.

[0178] 질적으로 우수한 변이들만을 선별하기 위해, 다음과 같은 4개의 퀄리티 필터(quality filters)들을 적용하였다. 첫째, 모집 비율(call rate)이 $\geq 90\%$ 인 변이들만을 포함시키고, 하디-와인버그 평형 검사(Hardy-Weinberg equilibrium test)에서 유의한 편차($P < 1 \times 10^{-4}$)를 갖는 변이들은 제외시켰다. 둘째, 타겟 부위당 최소 80 depth를 갖는 부위만을 포함시켰다. 셋째, 정방향 및 역방향 가닥에서 대립 유전자 빈도가 일치한 것을 선택하였다. 마지막으로, SNP를 중심으로 5 bp 이내에 모여있는 SNPs를 제외하였다. 두 개의 기능적 필터를 적용시켜 엑손에서 아미노산을 변화시킬 가능성이 있거나(nsSNPs), 유전자 발현의 조절에 영향을 미칠 가능성이 있는(rSNPs) “기능성 드문 변이들 (functional rare variants)”를 선별하였다. 첫째, Polymorphism Phenotyping (PolyPhen-2) version 2 software (v2.2.2)를 이용한 서열- 및 구조-기반 예측프로그램으로부터 “양성(benign)”, “손상의 가능성이 있는(possibly damaging)”, 또는 “아마도 손상될 (probably damaging)”에 예측되는 드문 nsSNP 변이를 선별하였다. 둘째, UCSC(University of California Santa Cruz) Genome Browser database (<http://genome.ucsc.edu/>)를 이용하여 알려진 전사 인자 결합 부위 내에서 존재하는 드문 rSNP 변이를 선별하였다.

[표 1] 골다공증-연관 표현형과 유의한 관련성을 보여주는 선별된 타겟 유전자 리스트(n=198)

Group (N)	Subgroup	Gene name
	P	
I (14)		<i>CALCR, CAT, FLT3, HSD11B1, IL15, ITGA1, LEPR, MECOM, OSCAR, PLXNA2, SEMA7A, SMAD2, TNFSF11 (RANK), TWIST1</i>
II (71)		<i>ABCF2, AKAP11, ANAPC1, ARHGAP1, AXIN1, C12orf23, C16orf38 (PTX4), C17orf53, C18orf19 (FAM210A), C6orf97, C7orf58, CDKAL1, CLCN7, CPN1, CTNBN1, CYLD, DDCDC5, DHH, DKK1, DNM3, ERC1, ESR1, FAM9B, FLJ42280, FOXL1, FUBP3, GALNT3, GPATCH1, GPR177 (WLS), HOXC6, IDUA, INSIG2, JAG1, KAL1, KCNMA1, KIAA2018, KLHDC5, LEKRI, LIN7C, LOC91461 (PKDCC), LRP5, MAPT, MARK3, MBL2, MEF2C, MEPE, MPP7, NTAN1, PTHLH, RPS6KA5, RSPO3, RUNX2, SALL1, SLC25A13, SMG6, SOS1, SOX4, SOX6, SOX9, SP7, SPITBN1, STARD3NL, SUPT3H, TNFRSF11A (RANKL), TNFRSF11B (OPG), TXNDC3, WNT16, WNT4, WNT5B, XKR9, ZBTB40</i>
III (9)	IIIA (5)	<i>ADAMTS18, ALDH7A1, FONG, PLCL1, TGFBR3</i>
	IIIB (4)	<i>FAM20C, MDH2, LRP4, RGS9</i>
IV (71)	IVA (24)	<i>AAAS, ADRA1D, C11orf49, C12orf10, CDK5RAP2, CKAP5, EIF6, ESPL1, F2, FOXE1, HMG3, KPRP, LCE2A, LCE2B, LCE2C, LCE4A, MFSD5, PFDN5, RARG, RIP3, SFRP4, SPI, TBC1D8, ZNF408</i>
	IVB (47)	<i>A2BP1 (RFXO1), ADAM19, ADAMTS13, C11orf48, CABYRP1, CADM2, CATSPER4, CATSPERB, CD44, CNTNAP2, CRHR1, CTNBN1, DIP2C, DOK6, HDAC5, FAM3C, FGF14, GAL, GPR98, GRB10, HDAC5, IBSP, IL21R, KCNJ16, LMO3, LRRC4C, LTBP3, MIR3134, MIR548A1, MTHFS, NR5A2, PDHX, PHF14, PRR16, PTH, RAPIA, RBMS3, RHPN2, RPS12, RUNX1, SAPL (PPP6R3, NUSAP1), SCG2, SPP2, SRGAP2, ST7L, TNRC6B, WNT2B</i>
V (33)	VA (11)	<i>ADAMTS17, ADCY2, ARHGEF18, BMS1 (BMSIL), CSMD3, DRD1, FBXL17, LCE1B, PPP2R2A, SALL3, SAMSNI</i>
	VB (22)	<i>ATF2, BMP3, BMP7, FGF18, FLT1, HOXA (HOXA1, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXA2, HOXA3, HOXA4, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9), IFNAR2, KLF10, NFATC1, SMAD1, TGFB3, THRB</i>

[0179]

[0180]

상기 표에서, N은 유전자의 수를 나타낸다. 그룹 I은 본 연구자가 한국인에서 골다공증과 연관성을 관찰한 유전자; 그룹 II는 유럽인들에서 골다공증과 연관성이 관찰되었고 아시아인에서도 확인된 유전자; 그룹 III은 전장 유전체 연관성 연구(genome wide association studies; GWAS)를 통하여 아시아인(IIIA) 혹은 유럽인(IIIB)에서 BMD 및 골절과 연관성이 관찰된 유전자; 그룹 IV는 GWAS를 통하여 아시아인(IVA) 및 유럽인(IVB)에서 BMD와 연관성이 관찰된 유전자; 그룹 V는 대규모 후보 유전자 연관성 연구(candidate gene association studies; CGAS)를 통하여 아시아인(VA) 및 유럽인(VB)에서 BMD와 연관성이 관찰된 유전자를 의미한다.

[0181]

검증 유전자형 분석(Replication genotyping)

[0182]

제조사에 추천에 따라 SNptype™ assay (Fluidigm, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 유전자형 분석을 수행하였다. 요약하면, 5 µL 반응 부피에서 STA 프라이머 세트 및 Qiagen 2× Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 관심 있는 SNP를 함유하는 부위의 PCR 증폭을 위하여 75 ng 게놈 DNA를 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같았다: 95° C에서 15분 동안 1 사이클 후, 95° C에서 15초 및 60° C에서 4분 동안 14 사이클. 증폭 후, 생성물을 DNA 현탁액 버퍼에서 1:100으로 희석하였다. 희석된 STA 생성물 (2.5 µL)을 3 µL 2× Fast Probe Master Mix, 0.3 µL SNptype™ 20× 샘플 로딩 시약(Sample Loading Reagent), 0.1 µL SNptype™ 시약, 및 0.036 µL 50× ROX™ 레퍼런스 염료(reference dye; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유하는 샘플 프리-믹스에 가하였다. 96.96 Dynamic Array에 분석 프리-믹스(Assay Pre-Mix) 및 샘플 프리-믹스9Sample Pre-Mix)를 로딩한 후, 다음에 따라 SNptype™ assay 반응을 수행하였다: 95° C에서 5분, 95° C에서 15초, 64° C에서 45초, 72° C에서 15초, 95° C에서 15초, 63° C에서 45초, 72° C에서 15초, 95° C에서 15초, 62° C에서 45초, 72° C에서 15초, 95° C에서 15초, 61° C에서 45초, 및 72° C에서 15초 동안 1 사이클, 뒤이어 95° C에서 15초, 60° C에서 45초, 및 72° C에서 15초 동안 34 사이클, 및 25° C에서 10초 동안 마지막 1

사이클. Fluidigm SNP Genotyping Analysis software (version 3.1.1; Fluidigm, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 분석을 수행하였다.

[0183] 유전자형 데이터를 이용한 SNP 분석

[0184] 유전자형과 연속적 데이터(골밀도)의 연관성 평가는 선형 회귀 분석을 통하여 이분형 데이터(골다공증, VF, NVF, 골다공증 골절)의 연관성 평가는 로지스틱 회귀 분석을 통하여 나이, 체중, 키를 보정하여 실시하였다.

[0185] MAF<1%의 드문 변이에 의한 유전적 부하(genetic burden) 분석

[0186] 드문 변이에 의한 총 유전적 부하를 평가하기 위하여 다음의 네 가지 분석법을 이용하였다. 1) CMC(combined multivariate and collapsing) 법; 2) WSS(weighted-sum statistics); 3) KBAC(kernel-based adaptive cluster) 법; 4) SKAT-O(optimal sequence kernel association test). 이 분석법은 적어도 두개 이상의 드문 변이가 있을 때 적용하였다.

[0187] 유전자 위험 지수 (genetic risk score; GRS)의 생성을 위한 마커의 선별

[0188] 하나 이상의 골다공증과 연관된 형질과 연관성이 확인된 위험 대립 유전자 (MAF $\geq$ 1%) 및 드문 변이 (MAF<1%)가 있는 위험 유전자를 선별하여, GRS를 계산하였다. 위험 대립 유전자 및 위험 유전자는 BMD의 감소, 골다공증, VF, NVF, 골다공증 골절 위험성의 증가와 연관성이 있는 것으로 정의하였다. 통계학적으로 연관성이 있는 것으로 판단한 P 값은 $\alpha < P < 0.05$ 이었다. α 는 다중 시험에 대한 본페로니 보정(Bonferroni correction)을 적용한 경우로 α 값은 0.00008 ($0.05/198$ 유전자/ 3 유전적 모델)이었다. 위험 대립유전자 및 위험 유전자의 가중치를 두었다. 흔한 변이는 위험 대립유전자(MAF $\geq$ 1%)와 관련하여, 각 유전자에 대하여 두 개의 위험 대립유전자가 존재하는 경우 가중치를 2, 하나의 위험 대립유전자가 존재하는 경우 가중치를 1, 위험 대립유전자가 없는 경우 가중치를 0으로 부여하였다. 드문 변이는 위험 유전자와 관련하여, 각 개인의 드문 변이 개수와 가중치를 곱하여 계산하였다.

[0189] 누적되는 영향을 추산하기 위하여 유전자 위험 지수를 계산하였다. 흔한 변이는 위험 대립유전자 점수를 합산하여 GRS-C(GRS-C)을 산출하였다. 모든 유전자 위험 점수는 드문 변이에 의한 점수를 GRS-C에 더하여 GRS-T를 산출하였다.

[0190] 통계

[0191] 데이터는 평균 $\pm$ SD 또는 개수, 및 퍼센트로 나타내었다. 다중 분석을 이용하여 골다공증-관련 형질(BMD, 골다공증, VF, NVF, 골다공증 골절)과 유전자 위험 지수와의 연관성을 확인하였다. GRS-C또는 GRS-T와 LS및 FN에서의 BMD의 연관성은 임상적 위험 인자(clinical risk factors; CRFs)들을 보정하여 다중 회귀 분석을 실시하였다. CRFs에는 나이, 키, 체중, 현재 흡연 유무, 알콜 섭취 및 골절의 가족력이 포함되었다. GRS-C또는 GRS-T의 나이 및 체중을 보정한 BMD에 대한 설명력은 선형 회귀 분석 모델로부터 분산값(보정된 R^2)을 계산하였다. GRS-C또는 GRS-T와 골다공증과의 연관성은 CRFs를 보정하여 로지스틱 회귀 분석을 실시하였다. GRS-C또는 GRS-T와 골절 (VF, NVF, 골다공증 골절) 위험성과의 연관성은 에서의 BMD의 연관성은 CRFs 및/또는 FN BMD 수치를 보정하여 로지스틱 회귀 분석을 실시하였다.

[0192] 유전적 프로파일링이 골감소증 환자($-1.0 < T\text{-score} < -2.5$)에서 골절 위험도의 예측능을 향상시킬 수 있는지 알아보기 위하여, 수신기 작동 특성 곡선 (receiver operating characteristic curve; ROC curve)의 곡선 하 면적(area under the curve; AUC)을 이용하여 GRS-C 또는 GRS-T에 의한 예측능을 정량화 하였다. 골절 (VF, NVF, 혹은 골다공증 골절)을 예측하는 모델은 다음과 같은 세 가지 모델을 확인하였다. 모델 I (CRFs + BMD), 모델 II (CRFs + BMD + GRS-C), 및 모델 III (CRFs + BMD + GRS-T)이었다. CRFs는 나이, 키, 체중, 현재 흡연 유무, 알콜 섭취량, 및 골절의 가족력을 포함하였다. BMD는 대부분의 골절 위험 예측 모델에서 포함되는 FN T-값을 포함하였다. 측정 상의 기술적인 제한 점 때문에 LS BMD 데이터는 포함되지 않았다. 그러나, 최근 연구에서 AUC 분석이 민감도가 떨어져 마커의 추가에 의한 예측능의 향상을 확인하기는 어렵다고 보고되고 있다. 따라서, 재분류 분석을 사용하여 유전적 프로파일링이 골감소증 환자($-1.0 < T\text{-score} < -2.5$)에서 골절 위험도의 예측능을 향상시킬 수 있는지 알아보았다. 최근의 일본의 골다공증 치료 권고안에서 골감소증 환자에 대한 치료 기준으로 10년 동안 주요 골다공증 골절 발생 확률이 15% 이상이 제시되었다. 따라서, 재분류 분석에 대한 기준 수치로 15%의 발생 확률을 선택하였다. 환자를 다음과 같이 두 개의 위험군으로 분류하였다: <15% 위험도 및 $\geq$ 15% 위험도. 각 모델에서, 재분류된 환자의 비율을 계산하고 비교하였다.

[0193] 재분류 분석 상 골다공증 골절 발생 확률 예측에 있어서 GRS가 유용하다면, GRS-C 또는 GRS-T (모델 I)가 없는

모델과 비교하여, GRS-C (모델 II) 또는 GRS-T (모델 III)가 추가되어 계산된 확률이 골절 발생군에서는 증가 또는 골절이 발생하지 않은 군에서는 감소될 것이라 가정하였다. 재분류 분석상 예측 확률의 향상은 순 재분류 향상 인덱스(net reclassification improvement index; NRI index) 로써 계산하였다:

[0194]
$$\text{NRI index} = (\text{발생군에서 확률 증가}) - (\text{발생군에서 확률 감소}) - (\text{비-발생군에서 확률 증가}) + (\text{비-발생군에서 확률 감소}).$$

[0195] NRI index 통계적 유의성은 Z-테스트로 추산하였다. 이것은 NRI 인덱스=0인 영가설(null hypothesis)에 대한 간단한 접근선 테스트이다. 재분류 분석 결과 상 얻어지는 순 이득이 0보다 매우 크면, 통계적으로 유의하다. 모든 통계적 분석은 R (version 2.81) 및 SPSS 통계적 소프트웨어(version 18; SPSS Inc. Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였고, $P \leq 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[0196] 결과

[0197] 총괄

[0198] 다음의 세 개의 단계로 연구를 수행하였다 (그림 1): 1) 발굴 단계(discovery set; n=982); 2) 검증 단계(replication set; n=3,895); 및 3) 재분류 분석(reclassification analysis).

[0199] 발굴 단계에서는 양극단 표현형을 가진 982명에서 198개 유전자의 타겟 리시퀀싱을 수행하였다. 12,087 개의 변이가 확인되었고, 네 개의 퀄리티 필터 및 두 개의 기능적 필터를 통하여 그 중에서 1,242개의 흔한 기능성 변이들 (134개 유전자에서 457개의 nsSNPs 및 188개 유전자에서 785개의 rSNPs) 및 1,560개의 드문 기능성 변이들 (189개 유전자에서 1,329개의 nsSNPs 및 116개 유전자에서 231개의 rSNPs)를 선별하여 추가로 분석하였다. 이들 중에서, 43개의 흔한 기능성 변이들 (9개 유전자에서 9개의 nsSNPs 및 27개 유전자에서 34개의 rSNPs) 및 150개의 드문 기능성 변이들 (15개 유전자에서 119개의 nsSNPs 및 12개 유전자에서 31개의 rSNPs)이 골다공증과 연관된 표현형과 연관성이 관찰되었다. 이 중 72개의 변이들 (9개 유전자의 9개의 흔한 변이들 및 14개 유전자의 63개의 드문 변이들)은 SNPtypeTM assay (Fluidigm, San Francisco, CA, USA)를 이용하여서는 디자인할 수 없었기 때문에 검증 단계에서는 사용할 수 없었다. 검증 단계에서는 세 개의 코호트 나머지 3,895 명에서 34개의 흔한 기능성 변이들 (9개 유전자에서 7개의 nsSNPs 및 21개 유전자에서 27개의 rSNPs) 및 87개의 드문 기능성 변이들 (15개 유전자에서 71개의 nsSNPs 및 10개 유전자에서 16개의 rSNPs)에서 골다공증과 연관된 표현형과 연관성이 관찰되었다. 마지막으로, 골감소증이 있는 2,202명의 개체에서 재분류 분석을 수행하여 유전자 프로파일의 골절 예측에 있어서의 영향력을 평가하였다.

[0200] 발굴 단계(discovery set)

[0201] 표2는 발굴 단계의 환자 특성을 보여준다, 양극단 표현형을 선별 하기 위한 기준에 맞게(연구 집단 참조), 두 개의 군은 나이가 유사하였고, BMI는 매우-낮은 BMD군에서 유의하게 높았다($P=0.001$). LS 및 FN BMD 수치는 대조군에서 유의하게 높았다($P < 0.001$).

[표 2] 발굴 단계 및 검증 단계에서의 연구 대상자들의 특징

Variables	Discovery Set			Replication Set
	Control	Severe-Low BMD	P	
n	501	481		3895
Age, y	58.4 ± 6.3	58.8 ± 7.0	.346	60.2 ± 10.2
Height, cm	154.9 ± 4.8	154.6 ± 5.2	.255	154.1 ± 5.9
Weight, kg	54.5 ± 5.9	55.6 ± 6.7	.006	56.5 ± 8.3
BMI, kg/m ²	22.7 ± 2.6	23.3 ± 2.9	.001	23.8 ± 3.2
BMD, g/cm ²				
LS	0.956 ± 0.005	0.727 ± 0.005	<.001	0.873 ± 0.003
FN	0.749 ± 0.004	0.635 ± 0.004	<.001	0.715 ± 0.002
T-score				
LS	-1.2 ± 0.9	-3.2 ± 0.7	<.001	-1.7 ± 1.4
FN	-1.1 ± 0.7	-2.3 ± 0.8	<.001	-1.3 ± 1.1
Osteoporosis, n (%)	0	482 (100)	<.001	1313 (33.7)
Fracture history, n (%)	0	164 (34.0)	<.001	810 (20.8)
NVF	0	48 (10.0)	<.001	540 (13.9)
VF	0	120 (24.9)	<.001	451 (11.6)

[0202]

[0203] 시퀀싱을 위하여, 총 1,248 kb에 달하는 198개의 유전자가 포함되는 타겟 부위를 포획하였다. 포획된 부위를 시

퀵싱하여, 각 ~101 bp의 평균 108,317 리드를 생성하였다. 평균 폴드 커버리지 $251\times$ (range, $89-730\times$)인 약 99.8%의 리드가 타겟 부위에 대하여 맵핑되었다. $10\times$ 시퀀스 커버리지 및 30 초과 Phred-like quality score를 퀄리티 기준을 갖는 GATK unified genotyper 모듈을 이용하여 SNP 콜링을 수행하였다. GATK Genomic Annotator module은 dbSNP rs ID, SNP 위치, 및 SNP 기능과 같은 데이터를 제공하는 UCSC hg19 및 dbSNP 135를 사용하였다. 총 12,087개의 변이들(개체당 평균 13.5 변이)이 call되었고, 이 중 10,654개가 성공적으로 네 개의 퀄리티 필터를 통과하였는데, 2,306 개는 흔한 변이 ($MAF \geq 1\%$), 8,348개는 드문 변이 ($MAF < 1\%$)였다. 65%의 SNPs는 dbSNP 데이터베이스에서 보고된 바 없는 새로운 SNPs였다. 10,654개 변이들 중 3,481개(32.7%)가 엑손 부위에서 나타났고, 이 중 982 개 SNPs (9.2%)는 nsSNPs이었다. 10,654개 변이들 중 3,225개 SNPs(30.3%)는 업스트림 부위에서 나타났다.

[0204] 2,306개 흔한 변이들 중에서, 엑손 및 조절 부위의 1,242 개 변이들을 선별하여 추가 분석을 수행하였다. 1,242 개 변이들 중 134 개 유전자의 457개는 nsSNPs 이었고 188 개 유전자의 785 개는 rSNPs이었다. 8,348 개 드문 변이들 중에서는, 두 개의 기능적 필터를 통하여 189 개 유전자의 1,329 개 nsSNPs 및 116 개 유전자의 231 rSNPs를 선별하였다. 결론적으로 1,242 개 흔한 기능성 변이들과 1,560개 드문 기능성 변이들로 골다공증과 연관성을 확인하였다. 이 중, 32개 유전자 43개 흔한 기능성 변이들(표 3)과 15개 유전자 150개의 드문 기능성 변이들(표 4)이 골다공증과 연관성이 있는 것으로 관찰되었다.

[0205] 검증 단계(replication set)

[0206] 표2는 검증 단계의 환자 특성을 보여준다. 검증 단계에서 Fluidigm BioMark 시스템을 이용하여, 9개 유전자의 9 개의 흔한 변이들 및 14개 유전자의 63개의 드문 변이들을 디자인하지 못하였다. 따라서, 검증 단계에서는 26개 유전자의 34개의 흔한 변이들 (표 3) 및 15개 유전자의 87개의 드문 변이들(표 4 및 표 5)만 분석이 가능하였다.

[표 3] 발굴 단계에서 골다공증과 연관성을 보인 흔한 변이들

Gene	Chr_position	rs_number	G ²	A1	AF1 (%)	Case (%)	Control (%)	Impact	Dominant OR (95% CI)	P ^b	Recessive OR (95% CI)	P ^b	Additive OR (95% CI)	P ^b
Common variants which were successful in the design for replication set														
AKAP11	chr13_42845500	rs76450469	II	T	3.3	39 (4.1)	25 (2.5)	upstream	1.80 (1.05-3.08)	0.032		0.978	1.69 (1.00-2.85)	0.051
BMS1	chr10_43292346	rs3814621	V	C	2.9	17 (1.8)	39 (3.9)	ns_cSNP	0.43 (0.24-0.77)	0.005			0.43 (0.24-0.77)	0.005
C17orf53	chr17_42219267	rs74635090	II	A	8.1	87 (9.7)	61 (6.6)	upstream	1.52 (1.05-2.21)	0.026	3.42 (0.33-35.49)	0.303	1.53 (1.07-2.18)	0.021
CAB1R1	chr3_54083067	rs4927996	IV	A	16.1	170 (17.7)	146 (14.6)	upstream	1.40 (1.06-1.85)	0.019	0.76 (0.29-1.97)	0.572	1.29 (1.00-1.67)	0.047
CADM2	chr3_85006615	rs79526794	IV	C	8.6	70 (7.4)	98 (9.8)	upstream	0.70 (0.49-0.99)	0.044	0.56 (0.11-2.99)	0.498	0.71 (0.51-0.99)	0.042
FLT1	chr13_29070533	rs2296282	V	T	6.4	51 (5.3)	75 (7.5)	upstream	0.66 (0.45-0.97)	0.034	0.46 (0.04-5.09)	0.525	0.66 (0.46-0.97)	0.032
GPR98	chr5_90074097	rs3107223	V	T	28.9	282 (29.3)	285 (28.5)	upstream	0.85 (0.66-1.10)	0.216	1.95 (1.20-3.16)	0.007	1.02 (0.84-1.25)	0.827
HOM43	chr7_27166854	rs17471457	V	A	8.8	72 (7.5)	101 (10.1)	upstream	0.71 (0.50-1.00)	0.048	0.44 (0.08-2.46)	0.350	0.71 (0.51-0.98)	0.040
JBSP	chr4_88732874	rs17013182	IV	G	13.0	141 (14.7)	114 (11.4)	ns_cSNP	1.31 (0.97-1.77)	0.079	2.02 (0.74-5.50)	0.171	1.31 (1.00-1.72)	0.050
ITGA1	chr5_52082846	rs4865745	I	C	26.9	242 (25.2)	286 (28.5)	upstream	0.69 (0.53-0.89)	0.004	1.25 (0.72-2.17)	0.434	0.80 (0.65-0.99)	0.040
ITGA1	chr5_52193518	rs17829997	I	C	36.6	326 (33.9)	393 (39.229)	upstream	0.65 (0.50-0.84)	0.001	0.99 (0.68-1.44)	0.942	0.79 (0.66-0.96)	0.018

[0207]

표 3 계속- 발굴 단계에서 골다공증과 연관성을 보인 흔한 변이들

Gene	Chr_position	rs_number	G ²	A1	AF1 (%)	Case (%)	Control (%)	Impact	Dominant OR (95% CI)	P ^b	Recessive OR (95% CI)	P ^b	Additive OR (95% CI)	P ^b
Common variants which were successful in the design for replication set														
<i>KCNJ16</i>	chr17_68096908	rs7226242	IV	A	4.8	55 (5.7)	39 (3.9)	Splice site donor	1.56 (1.01-2.42)	0.045	0.87 (0.05-13.92)	0.919	1.52 (0.99-2.32)	0.055
<i>LEPR</i>	chr1_65885357	rs3806318	I	G	13.8	155 (16.2)	115 (11.5)	upstream	1.61 (1.20-2.17)	0.002	1.20 (0.49-2.93)	0.689	1.48 (1.14-1.93)	0.004
<i>LEPR</i>	chr1_65989393	rs1619754	I	A	10.2	114 (11.9)	87 (8.7)	upstream	1.40 (1.01-1.94)	0.042	1.70 (0.42-6.96)	0.461	1.38 (1.02-1.87)	0.039
<i>LEPR</i>	chr1_65990422	rs6656451	I	T	7.2	83 (8.6)	58 (5.8)	upstream	1.63 (1.12-2.37)	0.010		0.979	1.54 (1.07-2.22)	0.020
<i>LEPR</i>	chr1_66036441	rs1137100	I	A	17.9	190 (19.8)	162 (16.2)	cSNP	1.28 (0.98-1.69)	0.076	1.98 (0.93-4.22)	0.076	1.29 (1.02-1.64)	0.034
<i>LRRC4C</i>	chr11_40316673	rs992797	IV	G	35.2	366 (38.1)	325 (32.4)	upstream	1.28 (0.99-1.66)	0.065	1.68 (1.13-2.51)	0.011	1.29 (1.06-1.56)	0.010
<i>OSCAR</i>	chr19_54604194	rs3760698	I	C	44.8	451 (46.9)	429 (42.8)	upstream	1.52 (1.15-2.01)	0.003	1.00 (0.73-1.36)	0.978	1.19 (1.00-1.43)	0.056
<i>PPP6R3</i>	chr11_68367943	rs2298702	IV	C	1.6	7 (0.7)	24 (2.4)	cSNP	0.29 (0.12-0.68)	0.005			0.29 (0.12-0.68)	0.005
<i>PTHLH</i>	chr12_28126245	rs39635	II	A	34.8	316 (32.9)	367 (36.6)	upstream	0.77 (0.60-0.99)	0.042	0.91 (0.61-1.34)	0.618	0.85 (0.70-1.02)	0.083
<i>RBMS3</i>	chr3_29322297	rs2888099	IV	C	19.2	51 (15.6)	327 (20.0)	upstream	0.75 (0.58-0.98)	0.035	0.95 (0.48-1.88)	0.886	0.81 (0.64-1.01)	0.063
<i>RBMS3</i>	chr3_29322363	rs9874998	IV	T	8.5	68 (7.1)	98 (9.8)	upstream	0.71 (0.50-1.00)	0.050		0.977	0.70 (0.50-0.98)	0.040
<i>RG59</i>	chr17_63131609	rs1530351	III	G	7.2	56 (5.8)	85 (8.5)	upstream	0.63 (0.43-0.91)	0.015	1.19 (0.16-8.71)	0.863	0.65 (0.46-0.94)	0.021
<i>RSPO3</i>	chr6_127438642	rs10872311	II	A	47.6	432 (45.2)	496 (49.9)	upstream	0.81 (0.60-1.08)	0.142	0.75 (0.55-1.02)	0.068	0.83 (0.69-1.00)	0.044
<i>SMAD1</i>	chr4_146402592	rs6537355	V	G	8.6	95 (9.9)	74 (7.4)	upstream	1.43 (1.01-2.02)	0.044	2.33 (0.41-13.37)	0.340	1.42 (1.02-1.98)	0.036

[0208]

표 3 계속- 발굴 단계에서 골다공증과 연관성을 보인 흔한 변이들

Gene	Chr_position	rs_number	G ^a	A1	AF1 (%)	Case (%)	Control (%)	Impact	Dominant OR (95% CI)	p ^b	Recessive OR (95% CI)	p ^b	Additive OR (95% CI)	p ^b
Common variants which were successful in the design for replication set														
<i>SMG6</i>	chr17_2185956		II	T	0.1	0 (0.0)	2 (0.1)	ns_cSNP	0 (0-∞)	0.987			0 (0-∞)	0.987
<i>STARD3NL</i>	chr7_38217555	rs10230858	II	G	25.8	229 (23.8)	278 (27.7)	upstream	0.82 (0.64-1.07)	0.139	0.53 (0.32-0.88)	0.013	0.80 (0.65-0.97)	0.027
<i>TBC1D8</i>	chr2_101769127	rs60021611	IV	A	9.0	72 (7.5)	104 (10.4)	upstream	0.67 (0.47-0.94)	0.020	0.65 (0.11-4.00)	0.642	0.68 (0.49-0.94)	0.021
<i>TBC1D8</i>	chr2_101769742	rs74983176	IV	C	4.9	35 (3.6)	61 (6.1)	upstream	0.54 (0.34-0.85)	0.008	2.31 (0.20-26.42)	0.501	0.59 (0.38-0.91)	0.017
<i>TNFRSF11B</i>	chr8_119965024	rs3134070	II	T	12.5	140 (14.0)	105 (10.9)	upstream	1.39 (1.02-1.85)	0.037	2.44 (0.72-8.33)	0.151	1.39 (1.04-1.82)	0.023
<i>TNFRSF11B</i>	chr8_119965070	rs3102735	II	C	12.9	144 (14.4)	109 (11.3)	upstream	1.35 (1.00-1.82)	0.050	2.78 (0.85-9.09)	0.092	1.37 (1.04-1.82)	0.026
<i>WNT16</i>	chr7_120968674	rs117483380	II	A	7.0	56 (5.8)	82 (8.2)	upstream	0.70 (0.48-1.02)	0.060		0.975	0.68 (0.47-0.98)	0.037
<i>WNT16</i>	chr7_120969769	rs2908004	II	A	15.2	133 (14.6)	151 (15.7)	ns_cSNP	0.93 (0.70-1.25)	0.638	0.33 (0.12-0.93)	0.036	0.87 (0.67-1.13)	0.294
<i>WNT2B</i>	chr1_113051074	rs12136566	IV	G	46.3	422 (44.2)	480 (48.2)	upstream	0.75 (0.56-0.99)	0.043	0.92 (0.67-1.25)	0.585	0.86 (0.72-1.03)	0.105
Common variants which were not successful in the design for replication set														
<i>CPN1</i>	chr10_101829514	rs61751507	II	T	1.7	9 (1.0)	24 (2.4)	cSNP	0.37 (0.17-0.81)	0.013			0.37 (0.17-0.81)	0.013
<i>C16orf38</i>	chr16_1538692	rs2667675	II	A	42.3	393 (40.9)	438 (43.7)	upstream	1.04 (0.80-1.37)	0.755	0.62 (0.44-0.88)	0.007	0.89 (0.74-1.07)	0.199
<i>SALL1</i>	chr16_51187040	rs9938285	II	C	46.0	410 (44.7)	454 (47.2)	upstream	1.03 (0.77-1.37)	0.846	0.70 (0.51-0.97)	0.032	0.90 (0.74-1.08)	0.263
<i>MAPT</i>	chr17_43971191	rs117746985	II	T	2.4	14 (1.5)	32 (3.2)	upstream	0.45 (0.24-0.86)	0.016	0 (0-∞)	0.978	0.45 (0.24-0.85)	0.014
<i>PLCL1</i>	chr2_198669110	rs78835808	III	A	27.7	267 (27.9)	275 (27.6)	upstream	0.87 (0.68-1.12)	0.293	1.74 (1.07-2.82)	0.026	1.01 (0.83-1.24)	0.907
<i>RBM3</i>	chr3_29322492	rs9875163	IV	T	8.8	66 (7.1)	98 (10.3)	upstream	0.64 (0.46-0.91)	0.012	0 (0-∞)	0.978	0.64 (0.45-0.90)	0.010
<i>DRD1</i>	chr5_174871534		V	A	2.7	36 (3.7)	16 (1.6)	upstream	2.43 (1.32-4.46)	0.004	∞ (0-∞)	0.979	2.43 (1.33-4.43)	0.004
<i>WNT16</i>	chr7_120979089	rs2707466	II	T	14.2	133 (13.8)	145 (14.5)	ns_cSNP	1.02 (0.77-1.36)	0.897	0.34 (0.12-0.94)	0.037	0.94 (0.73-1.21)	0.609
<i>HOXA3</i>	chr7_27183530	rs62454415	V	G	24.5	248 (25.8)	232 (23.2)	upstream	1.11 (0.86-1.43)	0.428	1.91 (1.04-3.51)	0.036	1.17 (0.95-1.45)	0.149

[0209]

[0210]

상기 표에서, A1은 소수 대립유전자; AF1은 발굴 단계에서의 소수 대립유전자 빈도; G^a는 유전자 그룹(표 1 참조); OR은 오즈비; 95% CI는 95% 신뢰 구간을 나타낸다.^b 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha = 0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[0211] ^c이 변이는 발굴 단계에서는 드문 변이에 속해 있었다.

[표 4] 발굴 단계에서 골다공증과 연관성을 보인 드문 변이들

Gene	Number of discovery set	Number of replication set	G ^a	CMC	WSS	KBAC	SKAT-O	
				OR (95% CI)		P ^b	P ^b	P ^b
<i>A2BP1</i> (<i>RBFox1</i>)	5	3	IV	0.11 (0.01-0.84)	3.3E-02	7.3E-02	6.0E-03	2.1E-02
<i>BMS1</i>	26	6	V	1.86 (1.08-3.20)	2.5E-02	1.1E-01	6.1E-02	6.1E-02
<i>C16orf38</i> (<i>PTX</i>)	9	4	II	9.83 (1.24-78.08)	3.1E-02	1.6E-02	3.3E-02	2.9E-02
<i>CDK5RAP2</i>	4	4	IV	14.62 (1.88-113.55)	1.0E-02	1.7E-02	1.0E-03	1.1E-03
<i>FLT1</i>	7	5	V	0.10 (0.01-0.80)	3.0E-02	3.1E-02	4.0E-03	8.3E-03
<i>GRB1</i>	4	2	IV	0.30 (0.10-0.90)	3.3E-02	8.6E-02	1.0E-01	3.6E-02
<i>HOXA3</i>	9	5	V	5.06 (1.44-17.79)	1.1E-02	1.5E-02	4.0E-03	1.5E-02
<i>LOC91461</i> (<i>PKDCC</i>)	10	7	II	0.35 (0.13-0.99)	4.8E-02	6.6E-02	1.3E-01	1.2E-01
<i>LRP4</i>	8	7	II	0.11 (0.01-0.89)	3.8E-02	4.4E-02	5.4E-02	1.8E-02
<i>MECOM</i>	8	4	I	0.09 (0.01-0.72)	2.3E-02	5.5E-02	1.0E-03	6.5E-02
<i>NFATC1</i>	10	3	V	11.13 (1.42-87.49)	2.2E-02	3.8E-02	1.0E-03	1.5E-02
<i>RGS9</i>	10	6	III	11.42 (1.45-89.87)	2.1E-02	2.1E-02	1.0E-03	7.1E-03
<i>SMG6</i>	19	15	II	0.11 (0.03-0.37)	3.5E-04	2.1E-03	1.0E-03	4.1E-05
<i>SP1</i>	11	10	IV	2.08 (1.05-4.12)	3.6E-02	1.5E-01	1.4E-01	5.7E-02
<i>TNRC6B</i>	10	6	IV	0.11 (0.01-0.88)	3.7E-02	1.6E-01	2.9E-01	2.7E-01

[0212]

[0213] 상기 표에서, G^a는 유전자 그룹(표 1 참조); OR은 오즈비; 95% CI는 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

[0214] ^a연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha = 0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[표 5] 검증 단계에서 사용된 드문 변이들의 빈도 및 위치

Gene (N)	Chr_position	A	MAF (%)	Impact	Gene (N)	Chr_position	A	MAF (%)	Impact
<i>A2BP1</i>	chr16_6067626	C	0.05	upstream	<i>MECOM</i>	chr3_168810807	A	0.10	ns_cSNP
(3)	chr16_7381112	T	0.31	upstream	(4)	chr3_168833593	G	0.15	ns_cSNP
	chr16_7721585	A	0.05	ns_cSNP		chr3_168833724	T	0.05	ns_cSNP
<i>BMS1</i>	chr10_43292131	C	0.05	ns_cSNP		chr3_168865364	T	0.05	upstream
(6)	chr10_43292146	A	0.05	ns_cSNP	<i>NFATC1</i>	chr18_77159182	T	0.05	upstream
	chr10_43292337	A	0.05	ns_cSNP	(3)	chr18_77246317	A	0.15	ns_cSNP
	chr10_43292394	G	0.10	ns_cSNP		chr18_77246890	T	0.05	ns_cSNP
	chr10_43292584	T	0.05	ns_cSNP	<i>RGS9</i>	chr17_63156377	C	0.05	ns_cSNP
	chr10_43297622	G	0.05	ns_cSNP	(6)	chr17_63156697	A	0.05	ns_cSNP
<i>C16orf38</i>	chr16_1536245	T	0.05	ns_cSNP		chr17_63193269	A	0.05	ns_cSNP
(4)	chr16_1538466	T	0.05	start_lost		chr17_63221258	T	0.05	stop_gained
	chr16_1539118	T	0.05	upstream		chr17_63223436	C	0.05	ns_cSNP
	chr16_1539127	A	0.21	upstream		chr17_63223519	A	0.05	ns_cSNP
<i>CDK5RAP2</i>	chr9_123171602	T	0.05	intron	<i>SMG6</i>	chr17_1968859	T	0.05	ns_cSNP
(4)	chr9_123177496	C	0.41	intron	(15)	chr17_1968967	C	0.05	ns_cSNP
	chr9_123199759	A	0.15	cSNP		chr17_1985121	A	0.05	ns_cSNP
	chr9_123201998	C	0.05	cSNP		chr17_1989027	G	0.62	ns_cSNP
<i>FLT1</i>	chr13_28891686	T	0.05	ns_cSNP		chr17_2076111	C	0.05	ns_cSNP
(5)	chr13_28891707	G	0.05	ns_cSNP		chr17_2139826	T	0.05	ns_cSNP
	chr13_28971100	C	0.05	ns_cSNP		chr17_2185918	C	0.05	intron
	chr13_29005429	T	0.05	ns_cSNP		chr17_2186002	G	0.05	ns_cSNP
	chr13_29069955	C	0.05	upstream		chr17_2186929	A	0.05	ns_cSNP
<i>GRB10</i>	chr7_50673103	A	0.05	cSNP		chr17_2196187	T	0.05	ns_cSNP
(2)	chr7_50682496	T	0.31	ns_cSNP		chr17_2200677	G	0.05	INTRON
<i>HOXA3</i>	chr7_27147763	G	0.05	ns_cSNP		chr17_2202357	C	0.05	ns_cSNP
(5)	chr7_27166747	C	0.05	upstream		chr17_2202635	A	0.05	ns_cSNP
	chr7_27169034	C	0.10	cSNP		chr17_2202686	T	0.05	ns_cSNP
	chr7_27183762	T	0.15	upstream		chr17_2202882	G	0.05	ns_cSNP
	chr7_27196304	G	0.41	upstream	<i>SP1</i>	chr12_53773449	G	0.05	upstream
<i>LOC91461</i>	chr2_42273202	A	0.10	upstream	(10)	chr12_53776381	G	0.26	ns_cSNP
(7)	chr2_42281233	A	0.05	cSNP		chr12_53776708	C	0.05	ns_cSNP
	chr2_42281312	T	0.05	cSNP		chr12_53776820	C	0.15	ns_cSNP
	chr2_42282136	G	0.05	cSNP		chr12_53777403	T	0.10	ns_cSNP
	chr2_42282148	A	0.05	cSNP		chr12_53803147	A	0.05	ns_cSNP
	chr2_42284361	G	0.26	cSNP		chr12_53803151	T	0.82	ns_cSNP
	chr2_42284769	A	0.21	cSNP		chr12_53803331	G	0.05	ns_cSNP
<i>LRP4</i>	chr11_46897404	A	0.05	ns_cSNP		chr12_53804813	A	0.21	ns_cSNP
(7)	chr11_46898044	T	0.05	ns_cSNP		chr12_53804875	G	0.15	ns_cSNP
	chr11_46900719	C	0.05	ns_cSNP	<i>TNRC6B</i>	chr22_40660881	T	0.05	ns_cSNP
	chr11_46905425	T	0.05	ns_cSNP	(6)	chr22_40661006	A	0.05	ns_cSNP
	chr11_46908042	T	0.05	cSNP		chr22_40661216	T	0.05	ns_cSNP
	chr11_46917846	T	0.15	ns_cSNP		chr22_40661867	T	0.05	ns_cSNP
	chr11_46920476	G	0.05	ns_cSNP		chr22_40661939	C	0.05	ns_cSNP
						chr22_40662533	C	0.15	ns_cSNP

[0215]

[0216]

상기 표에서, A1은 소수 대립유전자; AF1은 발굴 단계 및 검증 단계에 기초한 소수 대립 유전자 빈도; N은 변이들의 개수를 나타낸다.

[0217]

검증 단계에서의 연관성 분석 결과, 8개 유전자(HOXA3, IBSP, ITGA1, PPP6R3, PTHLH, RSPO3, WNT16, 및 TNFRSF11B)의 10개의 흔한 변이들이 BMD와 연관성이 관찰되었다($\beta=0.01-0.03$)(표 6).

[표 6] BMD와 연관성을 보인 흔한 변이들

Gene	Chr_Position	A1	AF1, %	Discovery					
				Dominant		Recessive		Additive	
				β	P^a	β	P^a	β	P^a
BMD at LS									
PTHLH	chr12_28126245	A	35.6	0.02	.001	0.02	.026	0.01	4.3E-04
RSPO3	chr6_127438642	A	47.9	0.00	.543	0.02	.013	0.01	.065
WNT16	chr7_120969769	A	15.8	0.01	.184	0.04	.033	0.01	.068
BMD at FN									
HOXA3	chr7_27166854	A	7.5	-0.01	.045	-0.01	.590	-0.01	.045
IBSP	chr4_88732874	G	12.9	0.00	.839	0.04	.094	0.00	.515
ITGA1	chr5_52082846	C	26.6	0.01	.048	0.00	.600	0.00	.094
PPP6R3	chr11_68367943	C	1.3	0.03	.008			0.03	.008
PTHLH	chr12_28126245	A	35.5	0.01	.077	0.01	.068	0.01	.029
RSPO3	chr6_127438642	A	47.9	0.01	.004	0.01	.006	0.01	.001
WNT16	chr7_120968674	A	6.7	-0.02	.037	-0.08	.252	-0.02	.029
WNT16	chr7_120969769	A	15.8	0.01	.084	0.03	.008	0.01	.020
TNFRSF11B	chr8_119965024	T	13.0	-0.01	.372	-0.04	.093	0.01	.218
TNFRSF11B	chr8_119965070	C	13.3	-0.01	.466	-0.05	.034	0.01	.228

표 6-계속

Replication						Total (Discovery + Replication)					
Dominant		Recessive		Additive		Dominant		Recessive		Additive	
β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a
0.01	.008	0.02	.012	0.01	.001	0.02	2.6E-04	0.01	.029	0.01	1.9E-04
0.01	.117	0.01	.013	0.01	.014	0.01	.101	0.01	.010	0.01	.010
0.01	.014	0.03	.020	0.01	.004	0.01	.051	0.03	.011	0.01	.013
-0.01	.022	-0.01	.739	-0.01	.027	-0.01	.047	-0.01	.634	-0.01	.049
0.01	.014	0.03	.027	0.01	.005	0.01	.013	0.03	.010	0.01	.003
0.00	.471	0.01	.045	0.00	.824	0.00	.915	0.01	.027	0.00	.411
0.02	.074			0.02	.074	0.02	.018			0.02	.018
0.01	.039	0.01	.249	0.00	.039	0.01	.010	0.01	.122	0.01	.008
0.01	.006	0.01	.006	0.01	.001	0.01	.002	0.01	.004	0.01	2.6E-04
0.00	.821	-0.06	.059	0.00	.587	-0.01	.064	-0.05	.176	-0.01	.045
0.01	.102	0.01	.110	0.01	.054	0.00	.108	0.02	.010	0.01	.027
-0.01	.002	-0.03	.037	-0.01	.001	-0.01	.016	-0.01	.268	-0.01	.013
-0.01	.002	-0.02	.038	-0.01	.001	-0.01	.016	-0.01	.350	-0.01	.015

상기 표에서, A1은 소수 대립유전자; AF1은 발굴 단계 및 검증 단계에 기초한 소수 대립유전자 빈도를 나타낸다.

^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준 ($\alpha = 0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

검증 단계에서의 연관성 분석 결과, 8개 유전자(AKAP11, FLT1, LEPR, LRRC4C, RSPO3, SMG6, STARD3NL, 및 WNT2B) 8개의 흔한 변이들이 골다공증 골절과 관련이 있었다(표 7). 8개 유전자(FLT1, LEPR, RBMS3, RSPO3, SMG6, STARD3NL, 및 WNT2B) 8개의 흔한 변이들과 VF와 연관성이 관찰되었고, 두 개 유전자(CADM2 및 IBSP) 두 개의 흔한 변이들이NVF와 연관성이 관찰되었다(표 7).

[표 7] 골절과 연관성을 보인 흔한 변이들

Gene	Chr_Position	A1	AF1, %	Discovery					
				Dominant		Recessive		Additive	
				OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a
Any fracture									
AKAP11	chr13_42845500	T	3.10	1.30 (0.68–2.47)	.433	0 (0–∞)	.986	1.25 (0.67–2.36)	.484
FLT1	chr13_29070533	T	6.71	1.05 (0.63–1.73)	.863	0 (0–∞)	.983	1.00 (0.61–1.63)	.995
LEPR	chr1_65885357	G	14.52	1.05 (0.71–1.54)	.824	0.53 (0.12–2.32)	.396	0.99 (0.70–1.40)	.957
LRRC4C	chr11_40316673	G	35.34	1.27 (0.89–1.81)	.188	1.07 (0.64–1.80)	.799	1.15 (0.89–1.49)	.273
RSP03	chr6_127438642	A	47.87	0.85 (0.58–1.24)	.407	0.92 (0.61–1.39)	.682	0.91 (0.71–1.16)	.443
SMG6 ^b	chr17_2185956	T	2.11	0 (0–∞)	.987			0 (0–∞)	.987
STARD3NL	chr7_38217555	G	25.27	0.70 (0.49–1.00)	.048	0.23 (0.08–0.66)	.006	0.66 (0.49–0.89)	.005
WNT2B	chr1_113051074	G	45.37	0.90 (0.62–1.31)	.578	1.22 (0.82–1.84)	.329	1.03 (0.81–1.31)	.834
VF									
FLT1	chr13_29070533	T	6.71	0.63 (0.32–1.21)	.164	0 (0–∞)	.985	0.62 (0.32–1.17)	.141
LEPR	chr1_65885357	G	14.52	1.13 (0.73–1.75)	.592	0.77 (0.17–3.44)	.736	1.08 (0.73–1.59)	.706
RBMS3	chr3_29322297	C	19.14	0.74 (0.48–1.13)	.167	1.35 (0.53–3.43)	.529	0.84 (0.58–1.20)	.337
RBMS3	chr3_29322363	T	8.71	1.01 (0.60–1.69)	.969	0 (0–∞)	.987	1.00 (0.60–1.66)	.991
RSP03	chr6_127438642	A	47.87	0.79 (0.52–1.21)	.271	1.22 (0.78–1.92)	.378	0.98 (0.74–1.29)	.865
SMG6 ^b	chr17_2185956	T	2.11	0 (0–∞)	.989			0 (0–∞)	.989
STARD3NL	chr7_38217555	G	25.27	0.70 (0.47–1.05)	.081	0.08 (0.01–0.57)	.012	0.63 (0.45–0.88)	.007
WNT2B	chr1_113051074	G	45.37	0.89 (0.58–1.35)	.576	1.19 (0.75–1.89)	.467	1.01 (0.76–1.33)	.950
NVF									
CADM2	chr3_85006615	C	9.15	0.72 (0.30–1.72)	.457	3.17 (0.37–26.93)	.291	0.83 (0.38–1.84)	.649
IBSP	chr4_88732874	G	12.88	0.59 (0.27–1.29)	.185	1.09 (0.14–8.45)	.932	0.66 (0.33–1.33)	.244

[표 7]- 계속

Replication						Total (Discovery + Replication)					
Dominant		Recessive		Additive		Dominant		Recessive		Additive	
OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a
1.38 (1.00–1.89)	.051	0 (0–∞)	.980	1.37 (1.00–1.89)	.049	1.35 (1.02–1.80)	.038		.966	1.34 (1.01–1.78)	.044
0.72 (0.56–0.93)	.012	1.46 (0.48–4.45)	.507	0.76 (0.59–0.96)	.024	0.78 (0.62–0.98)	.032	1.15 (0.40–3.34)	.799	0.80 (0.65–1.00)	.047
0.93 (0.77–1.12)	.441	0.49 (0.28–0.88)	.017	0.89 (0.76–1.04)	.145	0.95 (0.81–1.13)	.568	0.50 (0.29–0.86)	.012	0.91 (0.78–1.05)	.189
1.20 (1.02–1.42)	.029	1.14 (0.90–1.45)	.291	1.14 (1.01–1.28)	.035	1.20 (1.05–1.42)	.009	1.14 (0.92–1.42)	.241	1.15 (1.03–1.28)	.013
0.95 (0.80–1.14)	.597	0.79 (0.65–0.96)	.020	0.91 (0.81–1.02)	.087	0.93 (0.79–1.10)	.393	0.81 (0.68–0.97)	.022	0.90 (0.82–1.00)	.057
1.47 (1.03–2.08)	.034			1.47 (1.03–2.08)	.034	1.47 (1.04–2.09)	.029			1.47 (1.04–2.09)	.029
1.05 (0.89–1.24)	.540	0.77 (0.53–1.12)	.166	1.00 (0.87–1.14)	.976	0.98 (0.85–1.14)	.786	0.63 (0.44–0.89)	.008	0.93 (0.82–1.04)	.206
0.80 (0.68–0.95)	.012	0.99 (0.81–1.21)	.923	0.91 (0.81–1.02)	.092	0.82 (0.70–0.95)	.011	1.03 (0.86–1.23)	.738	0.93 (0.84–1.03)	.143
0.72 (0.52–1.00)	.051	0.86 (0.19–3.96)	.845	0.74 (0.55–1.01)	.059	0.71 (0.53–0.95)	.021	0.69 (0.15–3.07)	.621	0.72 (0.55–0.96)	.023
0.94 (0.75–1.19)	.603	0.40 (0.17–0.91)	.030	0.89 (0.72–1.08)	.236	0.98 (0.80–1.20)	.835	0.45 (0.22–0.93)	.031	0.92 (0.77–1.10)	.370
1.18 (0.96–1.46)	.118	1.67 (1.04–2.66)	.033	1.20 (1.01–1.44)	.039	1.07 (0.89–1.29)	.491	1.59 (1.05–2.42)	.028	1.11 (0.95–1.30)	.182
1.18 (0.91–1.54)	.212	3.32 (1.59–6.92)	.001	1.26 (1.00–1.59)	.047	1.14 (0.90–1.44)	.272	3.00 (1.45–6.20)	.003	1.21 (0.98–1.49)	.082
1.04 (0.83–1.31)	.730	0.70 (0.54–0.90)	.006	0.90 (0.78–1.04)	.158	0.98 (0.80–1.20)	.841	0.79 (0.63–0.99)	.043	0.92 (0.81–1.04)	.182
1.79 (1.19–2.70)	.006			1.79 (1.19–2.70)	.006	1.67 (1.11–2.50)	.014			1.67 (1.11–2.50)	.014
1.01 (0.82–1.24)	.944	0.60 (0.35–1.01)	.053	0.94 (0.79–1.12)	.490	0.94 (0.78–1.12)	.482	0.45 (0.27–0.74)	.002	0.87 (0.75–1.01)	.066
0.78 (0.63–0.97)	.023	0.99 (0.77–1.27)	.936	0.90 (0.78–1.03)	.127	0.80 (0.67–0.97)	.024	1.03 (0.83–1.28)	.792	0.92 (0.81–1.04)	.189
1.03 (0.80–1.32)	.804	2.22 (1.00–4.91)	.050	1.08 (0.87–1.36)	.483	1.01 (0.79–1.28)	.954	2.32 (1.10–4.89)	.026	1.07 (0.86–1.32)	.559
0.95 (0.76–1.19)	.629	0.20 (0.05–0.84)	.028	0.89 (0.72–1.10)	.278	0.90 (0.73–1.12)	.338	0.28 (0.09–0.89)	.032	0.86 (0.71–1.05)	.138

상기 표에서, A1은 소수 대립유전자; AF1은 발굴 단계 및 검증 단계에 기초한 소수 대립유전자 빈도; OR은 오즈 비; 95% CI는 95% 신뢰 구간을 나타낸다. ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha = 0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델 = 0.00008)을 나타낸다.

검증 단계에서의 연관성 분석 결과, 4개 유전자(BMS1, LOC91461, LRP4, 및 TNRC6B) 26개의 드문 변이들이 BMD와 연관성이 관찰되었다(표 8). 드문 변이들에 의한 골밀도에 대한 영향($\beta = 0.03-0.06$)은 흔한 변이에 의한 영향($\beta = 0.01-0.03$)보다 컸다.

[표 8] BMD와 연관성을 보이는 드문 변이들

Gene (n)	Statistic Methods	Discovery				Replication				Total (Discovery + Replication)			
		LS BMD		FN BMD		LS BMD		FN BMD		LS BMD		FN BMD	
		β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a
BMS1 (6)	CMC	-0.04	.039	-0.01	.440	-0.04	.118	-0.04	.041	-0.05	.027	-0.03	.046
	WSS	-0.07	.024	-0.01	.631	-0.14	.033	-0.07	.135	-0.15	.020	-0.06	.141
	KBAC		.210		.644		.381		.494		.024		.527
	SKAT-O		.237		.830		.177		.058		.042		.080
LOC91461 (7)	CMC	0.05	.049	0.01	.605	0.04	.050	0.01	.530	0.03	.042	0.00	.661
	WSS	0.07	.129	0.01	.689	0.12	.046	0.02	.656	0.09	.054	0.00	.920
	KBAC		.212		.970		.327		.851		.191		.708
	SKAT-O		.382		.884		.066		.697		.064		.680
LRP4 (7)	CMC	0.13	.008	0.05	.081	0.02	.628	0.05	.036	0.05	.066	0.06	.003
	WSS	0.19	.002	0.09	.018	0.04	.640	0.12	.045	0.16	.005	0.11	.002
	KBAC		.028		.158		.813		.311		.091		.041
	SKAT-O		.007		.058		.535		.055		.101		.006
TNRC6B (6)	CMC	0.04	.368	0.02	.342	0.06	.036	0.05	.014	0.06	.027	0.05	.002
	WSS	0.06	.340	0.10	.015	0.15	.031	0.12	.015	0.11	.048	0.13	6E-04
	KBAC		.691		.006		.183		.033		.124		.049
	SKAT-O		.614		.052		.046		.019		.038		.002

[0227]

[0228]

상기 표에서, n은 드문 변이들의 개수를 나타낸다. ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha = 0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[0229]

검증 단계에서의 연관성 분석 결과, 3개 유전자(BMS1, HOXA3, 및 LOC91461) 18개의 드문 변이들의 골다공증과의 연관성을 관찰하였다 (표 9).

[표 9] 골다공증과 연관성을 보인 드문 변이들

Gene (n)	Discovery					Replication					Total (Discovery + Replication)				
	CMC					CMC					CMC				
	OR (95% CI)	P ^a	WSS P ^a	KBAC P ^a	SKAT-O P ^a	OR (95% CI)	P ^a	WSS P ^a	KBAC P ^a	SKAT-O P ^a	OR (95% CI)	P ^a	WSS P ^a	KBAC P ^a	SKAT-O P ^a
BMS1 (6)	1.76 (1.03-3.00)	.038	.064	.058	.398	2.49 (1.12-5.56)	.026	.041	.041	.037	1.88 (1.11-3.19)	.019	.047	.053	.140
HOXA3 (5)	2.46 (1.11-5.46)	.027	.015	.003	.036	1.63 (1.02-2.61)	.041	.119	.119	.051	1.68 (1.11-2.54)	.014	.012	.064	.016
LOC91461 (7)	0.35 (0.13-0.99)	.048	.066	.109	.372	0.39 (0.19-0.83)	.014	.041	.041	.017	0.46 (0.25-0.85)	.012	.045	.020	.014

[0230]

[0231]

상기 표에서, n은 드문 변이들의 개수를 나타낸다. ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha = 0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[0232]

드문 변이들 중에는 검증 단계에는 발견이 안 되었지만, 발굴 단계에서 드문 변이 단독으로 골밀도에 대해 혼한 변이($\beta = 0.01-0.03$)보다 더 큰 효과를 갖는 2개 유전자(LRP4, NFATC1) 2 개의 드문 변이($\beta = 0.27-0.53$)가 관찰되었다 (표 10).

[표 10] 발굴 단계에서만 확인된 단독으로 골밀도와 연관성을 보이는 드문 변이들

Gene	Chr_position	A	MAF (%)	Impact	Discovery				Total (discovery + replication)			
					LS BMD		FN BMD		LS BMD		FN BMD	
					β	P^a	β	P^a	β	P^a	β	P^a
LRP4	chr11_46898044	T	0.01	ns_cSNP	0.58	1.E-04	0.28	0.004	0.53	1.E-04	0.27	0.006
NFATC1	chr18_77159182	T	0.01	upstream	-0.25	0.100	-0.02	0.809	-0.30	0.032	-0.06	0.529

[0233]

[0234] 상기 표에서, A는 소수 대립유전자; MAF는 발굴 단계 및 검증 단계에 기초한 소수 대립유전자 빈도를 나타낸다. ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha=0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[0235] 드문 변이 하나 단독으로 발굴 및 검증 단계에서 3개 유전자(CDK5RAP2, HOXA3, 및 LOC91461) 3 개의 드문 변이들이 골다공증과 연관성을 보였고, BMS1 유전자의 하나의 드문 변이가 골다공증 골절 및 NVF 위험도와 연관성을 보였다 (표 11).

[표 11] 발굴단계 및 검증단계 모두에서 확인된 단독으로 골다공증 표현형과 연관된 드문 변이

Gene	Chr_position	A	MAF	MAF2		Impact	Discovery		Replication		Total (discovery + replication)	
				(%)	Case (%)		Control (%)	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)	P ^a	OR (95% CI)
Osteoporosis												
CDK5RAP2	chr9_123199759	A	0.10	7 (0.39%)	3 (0.10%)	cSNP	∞ (0.00- ∞)	0.973	2.47 (0.51-11.95)	0.261	5.99 (1.36-26.44)	0.018
HOXA3	chr7_27183762	T	0.13	10 (0.56%)	3 (0.10%)	upstream	∞ (0.00- ∞)	0.975	6.78 (1.52-30.18)	0.012	7.22 (1.88-27.84)	0.004
LOC91461	chr2_42284361	G	0.49	9 (0.51%)	38 (1.24%)	cSNP	0.25 (0.03-2.38)	0.230	0.38 (0.16-0.92)	0.033	0.36 (0.16-0.81)	0.013
Non-vertebral fracture												
BMS1	chr10_43292337	A	0.07	6 (1.03%)	1 (0.02%)	ns_cSNP	∞ (0.00- ∞)	0.999	31.63 (3.55-281.95)	0.002	44.72 (5.21-383.91)	0.001
Any fracture												
BMS1	chr10_43292337	A	0.07	6 (0.62%)	1 (0.03%)	ns_cSNP	∞ (0.00- ∞)	0.978	18.39 (2.07-163.16)	0.009	22.90 (2.69-194.83)	0.004

[0236]

[0237] 상기 표에서, A는 소수 대립유전자; MAF는 발굴 단계 및 검증 단계에 기초한 소수 대립유전자 빈도; MAF2는 대조군에 있는 소수 대립유전자 빈도; OR은 오즈비를 나타낸다. ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha=0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[0238] 잠재적으로 유해한 드문 변이의 역할들을 평가하기 위하여, PolyPhen-2 소프트웨어에 의하여 “손상될 가능성이 있는” 또는 “아마도 손상될” 것으로 예측되는 드문 변이들을 “잠재적으로 유해한 nsSNPs”로 정의하였다. 5개 유전자(BMS1, HOXA3, LOC91461, LRP4, TNRC6B) 27개 드문 nsSNPs가 하나 이상의 골다공증과 연관된 표현형과 연관성을 보였다. 2개 유전자(LOC91461 및 HOXA3)에서는 모든 드문 nsSNPs가 및 BMS1에서는 1개의 nsSNP만이 잠재적으로 유해한 것으로 나타나 잠재적으로 유해한 드문 변이의 역할들을 확인하는데 제외되었다. 반면에 LRP4에서는 7개 중 5개의 nsSNPs, TNRC6B에서는 6개 중 4개의 nsSNPs가 잠재적으로 유해한 것으로 나타나 (표 12A 및 12B), 추 후 잠재적으로 유해한 드문 변이의 역할들을 확인하는데 사용되었다.

[표 12A] PolyPhen-2 소프트웨어를 이용하여 동정된 유전자의 nsSNPs 인실리코 기능성 예측

Gene	Chr_position	PolyPhen-2 HumDiv	Gene	Chr_position	PolyPhen-2 HumDiv
<i>A2BP1</i>	chr16_7721585	probably damaging	<i>RGS9</i>	chr17_63156377	probably damaging
<i>BMS1</i>	chr10_43292131	benign	<i>RGS9</i>	chr17_63156697	probably damaging
<i>BMS1</i>	chr10_43292146	benign	<i>RGS9</i>	chr17_63193269	probably damaging
<i>BMS1</i>	chr10_43292337	benign	<i>RGS9</i>	chr17_63221258	Stop_gained
<i>BMS1</i>	chr10_43292394	benign	<i>RGS9</i>	chr17_63223436	probably damaging
<i>BMS1</i>	chr10_43292584	benign	<i>RGS9</i>	chr17_63223519	probably damaging
<i>BMS1</i>	chr10_43297622	possibly damaging	<i>SMG6</i>	chr17_1968859	probably damaging
<i>C16orf38</i>	chr16_1536245	benign	<i>SMG6</i>	chr17_1968967	possibly damaging
<i>C16orf38</i>	chr16_1538466	benign	<i>SMG6</i>	chr17_1985121	probably damaging
<i>CDK5RAP2</i>	chr9_123199759	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_1989027	probably damaging
<i>CDK5RAP2</i>	chr9_123201998	possibly damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2076111	probably damaging
<i>FLT1</i>	chr13_28891686	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2139826	benign
<i>FLT1</i>	chr13_28891707	possibly damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2186002	probably damaging
<i>FLT1</i>	chr13_28971100	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2186929	possibly damaging
<i>FLT1</i>	chr13_29005429	benign	<i>SMG6</i>	chr17_2196187	benign
<i>GRB10</i>	chr7_50673103	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2202357	benign
<i>GRB10</i>	chr7_50682496	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2202635	benign
<i>HOXA3</i>	chr7_27147763	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2202686	possibly damaging
<i>HOXA3</i>	chr7_27169034	probably damaging	<i>SMG6</i>	chr17_2202882	benign
<i>LOC91461</i>	chr2_42281233	possibly damaging	<i>SP1</i>	chr12_53776381	possibly damaging
<i>LOC91461</i>	chr2_42281312	possibly damaging	<i>SP1</i>	chr12_53776708	benign
<i>LOC91461</i>	chr2_42282136	possibly damaging	<i>SP1</i>	chr12_53776820	possibly damaging
<i>LOC91461</i>	chr2_42282148	possibly damaging	<i>SP1</i>	chr12_53777403	benign
<i>LOC91461</i>	chr2_42284361	possibly damaging	<i>SP1</i>	chr12_53803147	possibly damaging
<i>LOC91461</i>	chr2_42284769	probably damaging	<i>SP1</i>	chr12_53803151	possibly damaging
<i>LRP4</i>	chr11_46897404	possibly damaging	<i>SP1</i>	chr12_53803331	benign
<i>LRP4</i>	chr11_46898044	probably damaging	<i>SP1</i>	chr12_53804813	benign
<i>LRP4</i>	chr11_46900719	benign	<i>SP1</i>	chr12_53804875	benign
<i>LRP4</i>	chr11_46905425	benign	<i>TNRC6B</i>	chr22_40660881	benign
<i>LRP4</i>	chr11_46908042	probably damaging	<i>TNRC6B</i>	chr22_40661006	benign
<i>LRP4</i>	chr11_46917846	possibly damaging	<i>TNRC6B</i>	chr22_40661216	possibly damaging
<i>LRP4</i>	chr11_46920476	possibly damaging	<i>TNRC6B</i>	chr22_40661867	probably damaging
<i>MECOM</i>	chr3_168810807	probably damaging	<i>TNRC6B</i>	chr22_40661939	possibly damaging
<i>MECOM</i>	chr3_168833593	probably damaging	<i>TNRC6B</i>	chr22_40662533	probably damaging
<i>MECOM</i>	chr3_168833724	possibly damaging			
<i>NFATC1</i>	chr18_77246317	probably damaging			
<i>NFATC1</i>	chr18_77246890	probably damaging			

[0239]

[표 12B] 전사 인자 결합의 인실리코 분석

Gene	Chr_position	Name of transcription factor
A2BP1	chr16_6067626	V\$GATA_C
A2BP1	chr16_7381112	V\$PAX2_02
C16orf38	chr16_1539118	V\$RFX1_02
C16orf38	chr16_1539127	V\$RFX1_02
CDK5RAP2	chr9_123171602	V\$FOXJ2_01, V\$HFH3_01
CDK5RAP2	chr9_123177496	V\$POU6F1_01, V\$TBP_01, V\$CDP_02
FLT1	chr13_29069955	V\$HOX13_01
HOXA3	chr7_27166747	V\$MEF2_03, V\$MEF2_03, V\$SRFC4_01
HOXA3	chr7_27183762	V\$TST1_01
HOXA3	chr7_27196304	V\$AHRARNT_02, V\$PAX2_01, V\$MYCMAX_03, V\$XBP1_01, V\$TAXCREB_01, V\$ZIC1_01, V\$ZIC2_01
LOC91461	chr2_42273202	V\$REBP1_02
MECOM	chr3_168865364	V\$SRF_C
NFATC1	chr18_77159182	V\$FOXO4_01, V\$SRY_01
SMG6	chr17_2185918	V\$CEBP_C
SMG6	chr17_2200677	V\$PBX1_02
SPI	chr12_53773449	V\$XBP1_01

[0240]

[0241]

따라서, LRP4의 5개의 잠재적으로 유해한 nsSNPs 및 TNRC6B의 4개의 잠재적으로 유해한 nsSNPs만을 대상으로 추가 분석하였다(표 13). 추가적인 연관성 분석 결과, LRP4의 5개의 잠재적으로 유해한 드문 변이들 및 TNRC6B의 3개의 잠재적으로 유해한 드문 변이들 모두 골밀도와 연관성이 있는 것이 관찰되었다(표 13). LRP4의 잠재적으로 유해한 드문 변이의 영향력($\beta=0.07-0.10$)이 LRP4의 드문 기능성 변이($\beta=0.05-0.06$) 및 다른 유전자의 흔한 변이에 의한 영향력($\beta=0.01-0.03$)보다 컸다.

[표 13] 잠재적으로 유해한 드문 변이들의 BMD에 대한 연관성

Gene	Statistic	Discovery				Replication				Total (discovery + replication)			
		LS BMD		FN BMD		LS BMD		FN BMD		LS BMD		FN BMD	
		β	P ^a	β	P ^a	β	P ^a	β	P ^a	β	P ^a	β	P ^a
LRP4	CMC	0.16	0.004	0.07	0.059	0.07	0.192	0.07	0.038	0.10	0.008	0.07	0.012
(5)	WSS	0.22	0.001	0.10	0.024	0.15	0.192	0.16	0.041	0.21	0.001	0.12	0.005
	KBAC		0.027		0.113		0.367		0.154		0.043		0.032
TNRC6B	CMC	0.04	0.357	0.04	0.385	0.06	0.036	0.05	0.012	0.06	0.021	0.05	0.036
(4)	WSS	0.06	0.714	0.16	0.006	0.15	0.032	0.12	0.016	0.17	0.015	0.14	0.005
	KBAC		0.185		0.041		0.161		0.034		0.058		0.048

[0242]

[0243]

상기 표에서, N은 드문 변이의 개수를 나타낸다. ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다. $\alpha < P < 0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다. α 는 다중 분석을 위한 본페로니 보정의 유의성 수준($\alpha=0.05/198$ 유전자/3 유전적 모델=0.00008)을 나타낸다.

[0244]

GRS 와 BMD, 골다공증, VF, NVF, 또는 골다공증 골절과의 관련성

[0245]

골다공증과 관련된 표현형과 연관성을 보이는 17개 유전자, 19개의 흔한 기능성 변이들을 이용하여 GRS-C 를 계산하였다. GRS-C에 5개 유전자, 31개의 드문 기능성 변이들을 포함시켜 GRS-T 를 계산하였다(표 14).

[표 14] 흔한 기능성 변이 및 드문 기능성 변이의 가중치

(A) 흔한 기능성 변이에 의한 가중치

Gene	Chr_position	rs number	Risk Allele	RAF (%)	Impact	Associated traits	Any fracture association		Weight
							OR (95% CI)	P ^a	
PPP6R3	chr11_68367943	rs2298702	G	98.69	exon	FN BMD	1.47 (0.88-2.44)	0.137	1.6
SMG6	chr17_2185956		T	2.11	ns_cSNP	VF and any fracture	1.46 (1.04-2.06)	0.031	1.6
AKAP11	chr13_42845500	rs76450469	T	3.10	upstream	Any fracture	1.33 (1.01-1.76)	0.046	1.5
FLT1	chr13_29070533	rs2296282	C	93.29	upstream	VF and any fracture	1.25 (1.00-1.52)	0.047	1.4
LRRC4C	chr11_40316673	rs992797	G	35.34	upstream	Any fracture	1.14 (1.03-1.27)	0.014	1.3
LEPROT	chr1_65885357	rs3806318	A	85.48	upstream	VF and any fracture	1.11 (0.95-1.28)	0.176	1.2
RSPO3	chr6_127438642	rs10872311	C	52.13	upstream	LS BMD, FN BMD, VF and any fracture	1.11 (1.00-1.22)	0.058	1.2
IBSP	chr4_88732874	rs17013182	A	87.12	ns_cSNP	NVF	1.10 (0.94-1.30)	0.222	1.2
ITGA1	chr5_52082846	rs4865745	T	73.42	upstream	FN BMD	1.09 (0.96-1.22)	0.188	1.2
WNT2B	chr1_113051074	rs12136566	A	54.63	upstream	Any fracture	1.09 (0.97-1.20)	0.137	1.2
RBMS3	chr3_29322363	rs9874998	T	8.71	upstream	VF	1.09 (0.91-1.30)	0.374	1.2
STARD3NL	chr7_38217555	rs10230858	A	74.73	upstream	VF and any fracture	1.08 (0.96-1.22)	0.207	1.2
TNFRSF11B	chr8_119965024	rs3134070	T	12.95	upstream	FN BMD	1.07 (0.92-1.25)	0.395	1.2
CADM2	chr3_85006615	rs79526794	C	9.15	upstream	NVF	1.03 (0.86-1.23)	0.730	1.1
WNT16	chr7_120969769	rs2908004	G	84.17	ns_cSNP	LS BMD and FN BMD	1.02 (0.88-1.18)	0.758	1.1
RBMS3	chr3_29322297	rs2888099	C	19.14	upstream	VF	1.01 (0.88-1.15)	0.938	1.1
PTH1H	chr12_28126245	rs39635	C	64.45	upstream	LS BMD and FN BMD	1.00 (0.90-1.12)	0.948	1.1
WNT16	chr7_120968674	rs117483380	A	6.74	upstream	FN BMD	0.95 (0.78-1.17)	0.649	1.0
HOXA3	chr7_27166854	rs17471457	A	7.52	upstream	FN BMD	0.91 (0.74-1.11)	0.348	1.0

(B) 드문 기능성 변이에 의한 가중치

Gene	Number	Associated traits	Any fracture association		Weight
			OR (95% CI)	P ^a	
BMS1	6	LS BMD, FN BMD, osteoporosis	1.53 (0.74-3.19)	0.137	1.6
LRP4	7	FN BMD, osteoporosis	1.32 (0.45-3.85)	0.611	1.4
TNRC6B	6	LS BMD, FN BMD	1.20 (0.47-3.03)	0.696	1.3
LOC91461	7	LS BMD, FN BMD, osteoporosis	1.09 (0.60-1.96)	0.789	1.2
HOXA3	5	Osteoporosis	0.93 (0.57-1.50)	0.756	1.0

상기 표에서, ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키를 보정하였다.

그림 2는 연구 대상자의 GRS-C 및 GRS-T 분포를 나타낸다. GRS-C 및 GRS-T의 중간값은 각각 21.5 (range: 0-31.6) 및 47.4 (range: 25.9-57.5)이었다. 모든 연구 대상자에서 (n=4,877) GRS-C 및 GRS-T는 CRFs 보정 전이나 후에 BMD와 유의한 상관관계를 보였다 (표 15) (P=0.007-0.023). GRS-C는 LS BMD 부위의 유전성의 2.0%, FN BMD부위의 유전성의 3.0%를 설명할 수 있었다. GRS-T는 LS BMD 부위의 유전성의 2.2%, FN BMD부위의 유전성의 3.2%를 설명할 수 있었다.

[표 15] 골밀도와 골다공증에 대한 GRS-C 및 GRS-T의 연관성 (n= 4,877)

Variable	LS BMD		FN BMD		Osteoporosis	
	Univariate analysis	Multivariate analysis	Univariate analysis	Multivariate analysis	Univariate analysis	Multivariate analysis
	β (P)	β (P ^a)	β (P)	β (P ^a)	OR, 95% CI (P)	OR, 95% CI (P ^a)
GRS-C	-0.002 (0.023)	-0.002 (0.023)	-0.001 (0.020)	-0.001 (0.007)	1.02, 1.02-1.04 (0.019)	1.03, 1.01-1.05 (0.005)
GRS-T	-0.002 (0.022)	-0.002 (0.020)	-0.001 (0.019)	-0.001 (0.007)	1.02, 1.00-1.04 (0.016)	1.03, 1.01-1.06 (0.004)

상기 표에서, ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키, 현재 흡연 유무, 알코올 섭취량(≥ 3 units/d) 및 골절의 가족력을 보정하였다. 관련성 분석은 나이, 체중, 키, 현재 흡연 유무, 알코올 섭취량(≥ 3 units/d) 및 골절의 가족력

에 대하여 조정되었다. $P<0.05$ 인 경우 볼드체로 나타내었다.

[0251]

모든 참여자에서($n=4,877$), GRS-C 및 GRS-T는 CRFs 및 BMD를 보정 전과 후에 모두 VF, NVF, 골다공증 골절의 위험성과 연관성이 있었다($P=0.049-0.001$) (표 16).

[표 16] 척추 골절, 비척추 골절, 모든 골다공증 골절에 대한 GRS-C 및 GRS-T의 연관성

	GRS-C	GRS-T
	OR, 95% CI (P)	OR, 95% CI (P)
Any fracture		
Univariate analysis	1.04, 1.02–1.07 (0.001)	1.04, 1.02–1.07 (0.001)
Multivariate analysis ^a	1.05, 1.02–1.07 (< 0.001)	1.05, 1.02–1.07 (< 0.001)
Multivariate analysis ^b	1.04, 1.01–1.07 (0.014)	1.04, 1.01–1.06 (0.009)
Vertebral fracture		
Univariate analysis	1.05, 1.02–1.08 (0.002)	1.05, 1.02–1.08 (0.002)
Multivariate analysis ^a	1.05, 1.02–1.09 (0.001)	1.05, 1.02–1.09 (0.001)
Multivariate analysis ^b	1.04, 1.01–1.07 (0.024)	1.04, 1.01–1.07 (0.025)
Non-vertebral fracture		
Univariate analysis	1.03, 1.00–1.06 (0.046)	1.03, 1.00–1.06 (0.041)
Multivariate analysis ^a	1.03, 1.00–1.07 (0.028)	1.04, 1.00–1.09 (0.025)
Multivariate analysis ^b	1.03, 1.00–1.06 (0.049)	1.03, 1.00–1.06 (0.049)

[0252]

[0253]

상기 표에서, ^a 연관성 분석은 나이, 체중, 키, 현재 흡연 유무, 알코올 섭취량(≥ 3 units/d) 및 골절의 가족력을 보정하였다. ^b 연관성 분석은 나이, 체중, 키, 현재 흡연 유무, 알코올 섭취량(≥ 3 units/d), 골절의 가족력 및 대퇴 경부의 T-값을 보정하였다.

[0254]

골감소증이 있는 환자에서 재분류 분석

[0255]

골감소증 환자($n=2,202$)에 대하여 재분류 분석을 수행하여 현재의 골절 위험 평가 도구에 GRS-C 또는 GRS-T를 추가가 예측능에 미치는 영향력을 평가하였다(표 17). 모델 I (CRFs + BMD)과 비교하여, GRS-C (모델 II)를 더한 모델은 골절 발생 환자($n=342$)의 5.3% ($n=18$)를 고-위험군으로 재분류하고, 1.2% ($n=4$)를 저-위험군으로 분류하였다. 따라서, 예측률이 4.1% ($=5.3\%-1.2\%$) 향상되었다. 모델 I과 비교하여 모델 II는 골절 미발생 환자($n=1,860$)의 6.1% ($n=113$)를 저-위험군으로, 3.4% ($n=63$)를 고-위험군으로 재분류하여 예측률이 2.7% ($=6.1\%-3.4\%$) 향상되었다. 종합적으로 모델 I에 비교하여 모델 II는 총 6.8% ($=4.1\%+2.7\%$; $P<0.001$)의 예측률 향상을 보였다. 마찬가지로 모델 I에 GRS-T를 더한 모델 III는 9.6%의 예측률 상승을 보였다($P<0.001$). 예측률의 향상 정도는 혼한 변이 하나 당 0.36%이고, 드문 변이에 의한 유전적 부하에 의해서는 0.56%로 혼한 변이의 약 1.56 배 정도였다. VF 예측에 대해서는, 기존 예측 도구에 GRS-C를 추가한 모델 II는 7.3%의 예측률 향상을 가져왔고($P=0.005$), GRS-C를 추가한 모델 III 는 10.2%의 예측률 향상을 가져왔다($P<0.001$). 예측률의 향상 정도는 혼한 변이 하나 당 0.38%이고, 드문 변이에 의한 유전적 부하에 의해서는 0.58%로 혼한 변이의 약 1.52배 정도였다. NVF 예측에 대해서는, 기존 예측 도구에 GRS-C를 추가한 모델 II는 3.0%의 제한적인 예측률 향상을 가져왔고($P=0.091$), GRS-C를 추가한 모델 III 에서 4.9%의 예측률 향상을 가져왔다($P=0.008$). 예측률의 향상 정도는 혼한 변이 하나 당 0.16%이고, 드문 변이에 의한 유전적 부하에 의해서는 0.38%로 혼한 변이의 약 2.38 배 정도였다.

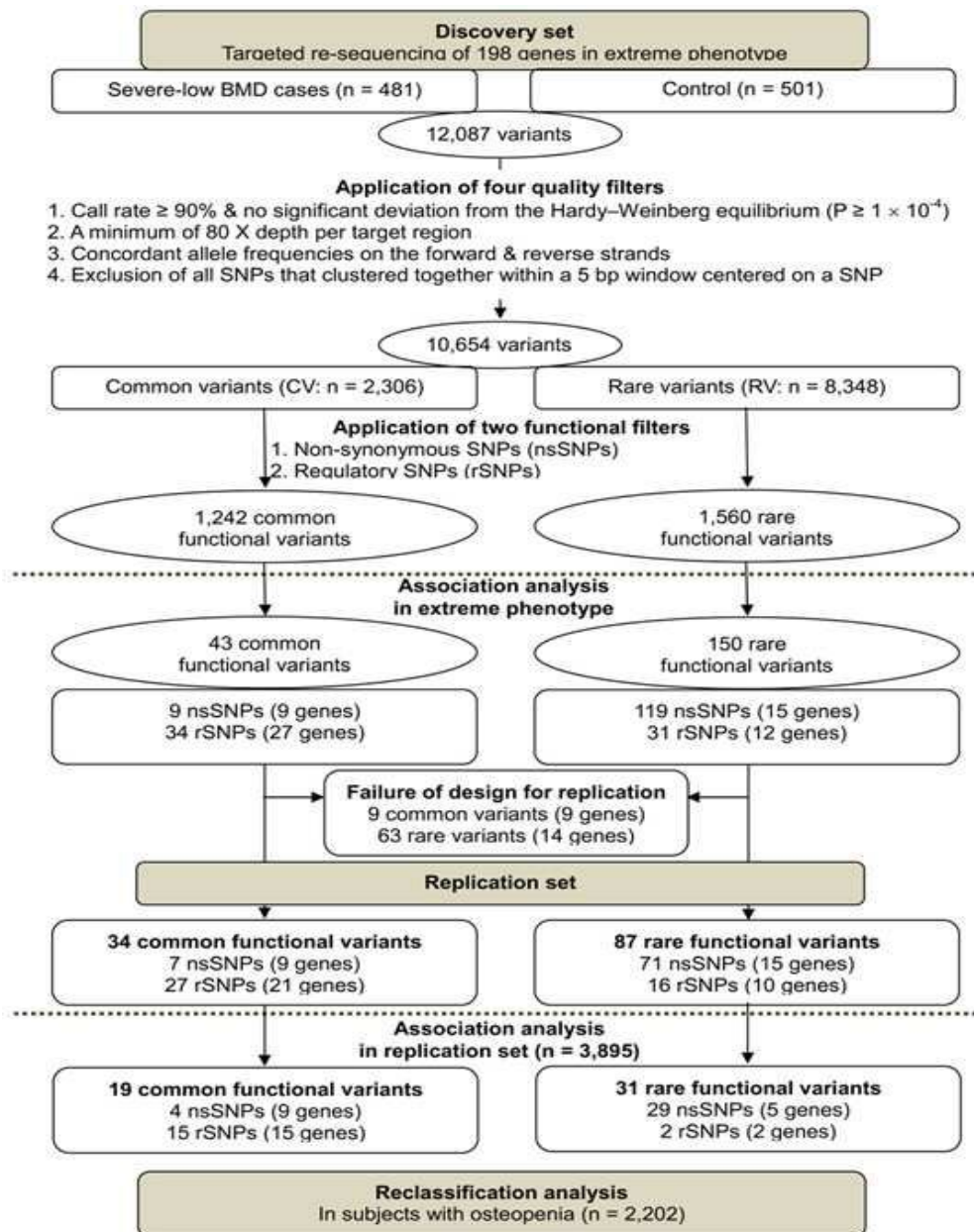
[표 17] 현재 골다공증 골절 예측 도구(CRFs+BMD: model I)에 GRS-C(model II) 혹은 GRS-T(model III)를 추가 시에 골다공증 골절 예측력 향상을 평가하기 위한 재분류 분석

	<15%	≥15%	Total	Frequency (Row %)		Reclassified	NRI Index	P Value
				Up	Down			
Model I	Model II							
Any fracture				18 (5.3%)	4 (1.2%)	4.1%	6.8%	<.001
<15% ^a	71	18	89					
≥15% ^a	4	249	253					
Total	75	267	342					
No any fracture				63 (3.4%)	113 (6.1%)	2.7%		
<15% ^a	893	63	956					
≥15% ^a	113	791	904					
Total	1006	854	1860					
Model I	Model III							
Any fracture				22 (6.4%)	3 (0.8%)	5.6%	9.6%	<.001
<15% ^a	67	22	89					
≥15% ^a	3	250	253					
Total	70	272	342					
No any fracture				55 (3.0%)	130 (7.0%)	4.0%		
<15% ^a	901	55	956					
≥15% ^a	130	774	904					
Total	1031	829	1860					
Model I	Model II							
VF				14 (8.4%)	4 (2.4%)	6.0%	7.3%	.005
<15% ^a	102	14	116					
≥15% ^a	4	46	50					
Total	106	60	166					
No VF				56 (2.8%)	83 (4.1%)	1.3%		
<15% ^a	1690	56	1746					
≥15% ^a	83	207	290					
Total	1773	263	2036					
Model I	Model III							
VF				16 (9.6%)	3 (1.8%)	7.8%	10.2%	<.001
<15% ^a	100	16	116					
≥15% ^a	3	47	50					
Total	103	63	166					
No VF				39 (1.9%)	87 (4.3%)	2.4%		
<15% ^a	1707	39	1746					
≥15% ^a	87	203	290					
Total	1794	242	2036					
Model I	Model II							
NVF				10 (4.3%)	6 (2.6%)	1.7%	3.0%	.091
<15% ^a	125	10	135					
≥15% ^a	6	91	97					
Total	131	101	232					
No NVF				25 (1.3%)	50 (2.6%)	1.3%		
<15% ^a	1588	25	1613					
≥15% ^a	50	307	357					
Total	1638	332	1970					
Model I	Model III							
NVF				12 (5.2%)	5 (2.2%)	3.0%	4.9%	.008
<15% ^a	123	12	135					
≥15% ^a	5	92	97					
Total	128	104	232					
No NVF				25 (1.3%)	62 (3.1%)	1.9%		
<15% ^a	1588	25	1613					
≥15% ^a	62	295	357					
Total	1650	320	1970					

[0256]

도면

도면1



도면2

