



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0085588
(43) 공개일자 2023년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0173905

(22) 출원일자 2021년12월07일

심사청구일자 2021년12월07일

(71) 출원인

주식회사 엔젠바이오

서울특별시 구로구 디지털로 288, 303호, 304호,
305호, 306호, 307호, 904호 (구로동, 대륭포스트
타워1차)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

김광중

세종특별자치시 새롬북로 13, 407동 201호(
새롬동, 새뜸마을4단지)

김지연

경기도 부천시 중동로 204, 1301동 601호(중동,
그린타운삼성, 우성1차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

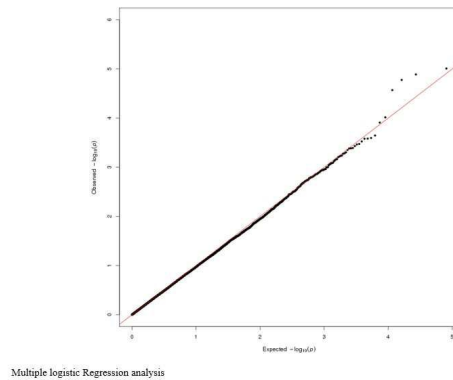
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 파킨슨병 치매 진단을 위한 단일염기다형성 마커

(57) 요약

본 발명은 파킨슨병 치매 진단용 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커에 관한 것으로, 본 발명의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커와 파킨슨병 치매와의 연관성이 있으므로, 본 발명의 SNP 마커를 파킨슨병 치매 환자의 진단을 위해 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장미미

인천광역시 서구 원적로124번길 33, 103동 1203호
(가좌동, 범양아파트)

정선주

서울특별시 송파구 올림픽로 99, 104동 2402호(잠
실동, 잠실엘스)

박계원

서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 11(잠실동, 우
성아파트)

조성양

서울특별시 서초구 남부순환로 2311-12(방배래미안
아트힐)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030384
과제번호	HI19C0256040020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	국가치매극복기술개발사업
연구과제명	혈액 기반 치매 조기진단을 위한 체외진단 의료기기 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)엔젠바이오
연구기간	2019.04.18 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 마커 조성물로서,

상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마커 조성물은 rs1949829, rs4767293, rs3758650, rs1064807, rs636291, rs3803689 및 rs60334317로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 더 포함하는 것인, 마커 조성물.

청구항 3

단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 조성물로서,

상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 진단용 조성물은 rs1949829, rs4767293, rs3758650, rs1064807, rs636291, rs3803689 및 rs60334317로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 더 포함하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 제제는 상기 SNP를 포함하는 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 염기쌍 또는 프로브인 것인, 진단용 조성물.

청구항 6

제3항의 조성물을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 키트.

청구항 7

파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계;

상기 시료 DNA를 청구항 제6항의 키트를 이용하여 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 결과로부터 파킨슨병 치매 특이적 단일염기다형성 유전형의 유무를 확인하는 단계;를 포함하는 파킨슨병 치매 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파킨슨병 치매를 진단하기 위한 단일염기다형성 마커 조성물, 단일염기다형성 마커를 검출할 수 있는 재제를 포함하는 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 파킨슨병 치매 진단용 키트 및 파킨슨병 치매 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 3대 노인성 신경퇴행질환 중 하나로서, 인구 고령화에 따라 전 세계적으로 발병률이 증가하고 있는 질환이다. 파킨슨병 환자의 수는 1990년 3백만 명에서 2015년 620만 명으로 증가했으며 2040년까지 1,240만명으로 증가할 것으로 예측된다. 아직까지 파킨슨병의 근본적인 치료는 정립되지 못한 실정이다.

[0003] 파킨슨병 치매(Parkinson's disease with dementia, PDD)는 연수(medullar)부터 대뇌피질로 파킨슨병 병리소견이 진행되어 나타나는 증상이다. 파킨슨병 치매는 파킨슨병에서 높은 발생 비율을 보여준다. 구체적으로 초기 파킨슨병 환자의 30% 정도 경도 인지장애 발생하고, 15년 후 50% 20년 후 80% 이상의 파킨슨병 환자가 치매가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 정상인보다 최대 6배 이상의 치매 발생 위험도를 가지고 있다. 파킨슨병 치매는 파킨슨병 환자의 삶의 질 악화의 대표적인 요인으로서, 치매에 걸리게 되면 요양병원 입소, 보호자 부담 증가, 사회적 비용 증가 등의 추가적인 비용이 발생하게 된다.

[0004] 이와 같은 파킨슨병 치매를 조기에 진단하여 대응하기 위한 연구가 진행되고 있으나(한국 출원번호: 10-2019-0053978), 루이소체 치매나 시누클레인병증 등과 차별화되는 파킨슨병 치매만을 특이적으로 구별할 수 있는 진단 기술에 대한 연구 개발은 부족한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 파킨슨병 치매를 진단할 수 있는 마커를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, 본 발명의 단일염기다형성 마커를 활용하는 경우, 파킨슨병 치매를 유의적으로 진단할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 이에, 본 발명은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 마커 조성물로서, 상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 검출할 수 있는 재제를 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 조성물로서, 상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 진단용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계; 상기 시료 DNA를 청구항 제6항의 키트를 이용하여 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 결과로부터 파킨슨병 치매 특이적 단일염기다형성 유전형의 유무를 확인하는 단계;를 포함하는 파킨슨병 치매 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다

른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 마커 조성물로서, 상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 마커 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마커 조성물은 rs1949829, rs4767293, rs3758650, rs1064807, rs636291, rs3803689 및 rs60334317로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 조성물로서, 상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 진단용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 진단용 조성물은 rs1949829, rs4767293, rs3758650, rs1064807, rs636291, rs3803689 및 rs60334317로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 실시예에 있어서 상기 체제는 상기 SNP를 포함하는 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 염기쌍 또는 프로브일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 키트를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계; 상기 시료 DNA를 상기 키트를 이용하여 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 결과로부터 파킨슨병 치매 특이적 단일염기다형성 유전형의 유무를 확인하는 단계;를 포함하는 파킨슨병 치매 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 파킨슨병 치매 진단용 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커에 관한 것으로, 본 발명의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커와 파킨슨병 치매와의 연관성이 있고, 파킨슨병 치매 진단의 재현성 및 정확도에서 우수한 수준의 효과를 보여주었는바, 본 발명의 SNP 마커를 파킨슨병 치매 환자의 진단을 위해 사용할 수 있다.
- [0021] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 파킨슨병 치매 환자와 건강한 대조군의 유전자형 분석을 위해 Q-Q 플롯 분석을 수행한 결과이다.
- 도 2는 파킨슨병 치매 환자와 건강한 대조군의 맨해튼 유전자형 분석을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명자들은 본 발명의 단일염기다형성 마커를 활용하는 경우, 파킨슨병 치매를 유의적으로 진단할 수 있음을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0024] 이에, 본 발명은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 마커 조성물로서, 상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 마커 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 마커 조성물은 rs1949829, rs4767293, rs3758650, rs1064807, rs636291, rs3803689 및 rs60334317로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서 "진단(diagnosis)"이란 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에

있어서 진단은 상기 SNP 마커들의 발현 수준에 기인하여 파킨슨병 환자에서 파킨슨병 치매가 발병할지 여부를 판단하는 것 또는 이미 파킨슨병 치매가 발병한 환자에서 파킨슨병 치매를 판단하는 것을 의미한다.

- [0027] 본 발명에 있어서 "단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)"이란, 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 가지 이상의 대립유전자(allele)가 존재하는 경우를 의미하며 다형성 부위(polymorphic site) 중에서, 단일 염기만이 다른 것을 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 사용된 SNP는 파킨슨병 치매의 발병에 연관되는 한 특별히 제한되지 않으나, rs11931074(인간의 4번 염색체에 위치한 SNCA 또는 GPRIN3 유전자에 존재하고, 4번 염색체의 89718364번 좌위에 위치하고, G/C의 다형성을 갖는다), rs1456522(인간의 2번 염색체에 위치한 SATB2, LOC101927619 유전자에 존재하고, 2번 염색체의 198904459번 좌위에 위치하고, A/G의 다형성을 갖는다), rs12642514(인간의 4번 염색체에 위치한 SNCA, GPRIN3 유전자에 존재하고, 4번 염색체의 89708246번 좌위에 위치하고, A/C의 다형성을 갖는다), rs1949829(인간의 7번 염색체에 위치한 COBL, POM121L12 유전자에 존재하고, 7번 염색체의 51470190번 좌위에 위치하고, T/C의 다형성을 갖는다), rs4767293(인간의 12번 염색체에 위치한 ERP29, NAA25 유전자에 존재하고, 12번 염색체의 112025492번 좌위에 위치하고, A/G의 다형성을 갖는다), rs3758650(인간의 11번 염색체에 위치한 CDHR5 유전자에 존재하고, 11번 염색체의 616865번 좌위에 위치하고, A/G 다형성을 갖는다), rs1064807(인간의 8번 염색체에 위치한 BNIP3L, PPP2R2A 유전자에 존재하고, 8번 염색체의 26379462번 좌위에 위치하고, C/T 다형성을 갖는다), rs636291(인간의 1번 염색체에 위치한 PEX14 유전자에 존재하고, 1번 염색체의 10496040번 좌위에 위치하고, G/A 다형성을 갖는다), rs3803689(인간의 16번 염색체에 위치한 ZNF276 유전자에 존재하고, 16번 염색체의 89733650번 좌위에 위치하고, C/T 다형성을 갖는다) 및 rs60334317(인간의 4번 염색체에 위치한 KIT 유전자에 존재하고, 4번 염색체의 54715585번 좌위에 위치하고, T/C 다형성을 갖는다)로 이루어진 군에서 선택되는 것 일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 유전형을 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 조성물로서, 상기 SNP는 rs11931074, rs1456522 및 rs12642514로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 진단용 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 진단용 조성물은 rs1949829, rs4767293, rs3758650, rs1064807, rs636291, rs3803689 및 rs60334317로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 상기 체제는 상기 SNP를 포함하는 염기서열에 특이적으로 결합하여, 상기 SNP를 검출할 수 있는 체제를 의미하는데, 이들 체제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 SNP를 포함하는 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 염기쌍 또는 프로브가 될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서 "파킨슨병(Parkinson's disease)"은 도파민이란 신경전달 물질을 분비하는 특정 뇌신경들이 점차 죽어가면서 생기는 신경 퇴행성 질환으로서, 느린 동작, 정지시 떨림, 근육 경직, 질질 끌며 걷거나 굽은 자세와 같은 자세불안정 증상 등을 특징으로 한다. "파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia)"는 파킨슨병과 관련된 치매로서, 루이소체 치매(Lewy body demntia)와 함께 뇌에 비정상적인 루이소체(Lewy bodies) 침착에 의해 발생할 수 있으며, 파킨슨병의 환자의 78% 가량이 파킨슨병 치매를 앓고 있는 것으로 보고된다. 주된 증상은 운동, 인지 및 실행 기능 장애이다.
- [0033] 이러한 파킨슨병 치매는 사망 후 뇌 부검을 통해서만 확실하게 진단할 수 있으나, 본 발명의 마커를 활용하는 경우 부검없이도 파킨슨병 치매를 진단할 수 있을 것으로 판단된다.
- [0034] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 진단용 키트를 제공한다.
- [0035] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명의 단일염기다형성 마커가 파킨슨병 치매의 진단에 유용하게 활용될 수 있음을 구체적으로 확인하였다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 파킨슨병 치매 환자 317명, 루이소체 치매 환자 11명, 건강한 대조군 648으로 구성된 대상에게 유전자형 분석 및 이에 대한 통계 분석을 수행한 결과, 파킨슨병 치매와 관련이 있다고 예상되는 상위 10개의 SNP를 발굴할 수 있었다(실시예 2 참조).
- [0037] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 실시예 2에서 발굴해낸 10개의 SNP를 포함하는 차세대염기서열분석용 타겟 패널을 제조한 다음, 분석정 성능을 검증한 결과, 고농도의 간섭물질(cholesterol)의 첨가에도 실험이 정상

적으로 수행되었으며, 재현성 및 정확도도 우수한 결과를 보여주었다(실시예 3 참조).

[0038] 본 발명자들은 상기와 같은 결과를 토대로 실제로 환자의 유전자 분석을 수행하고 이를 통해 얻어진 데이터에 통계분석을 수행하여 얻어진 본 발명의 SNP는 파킨슨병 치매와 관련성이 있고, 종래 기술의 한계로 인해 진단이 어려웠던 파킨슨병 치매의 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 파킨슨병 치매(Parkinson's disease dementia) 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계; 상기 시료 DNA를 청구항 제6항의 키트를 이용하여 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 결과로부터 파킨슨병 치매 특이적 단일염기다형성 유전형의 유무를 확인하는 단계;를 포함하는 파킨슨병 치매 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0043] [실시예]

[0044] 실시예 1. 실험 준비 및 방법

[0045] 1-1. 실험 대상 환자군

[0046] 본 발명자들은 아산의료원에서 파킨슨병(Parkinson's disease, PD) 치매(Parkinson's disease with dementia, PDD), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies, DLB), 건강한 사람을 대조군으로 하여 실험을 진행하였다. PD의 진단은 UK Brain bank 기준에 기초하였고, PDD에 대한 진단은 Movement Disorder Society Task Force에서 제안한 진단 기준에 기초하였다. 우리는 DLB에 대한 진단 기준을 사용하였다. 본 연구는 서울아산병원 심사위원회(Institutional Review Board, IRB)는 관련 명명된 지침 및 규정에 따라 수행하였으며, 실험에 참여한 모든 환자는 IRB 규정에 따라 사전 동의서를 제공받았다.

[0048] 1-2. 마이크로어레이 유전자분석 방법

[0049] 마이크로어레이의 분석대상이 된 유전자 변이체(variants)중, GWAS(genome-wide association study) 연구에서 PD와 관련된 변이체, 멘델 유전이 있는 파킨슨병의 드문 단일 유전자 패밀리 형태 (rare monogenic familial form), GWAS 연구에서 루이소체 치매 및 이와 관련된 변이 후보 유전자, 알츠하이머병과 관련된 변이, 제2형 당뇨병과 파킨슨병의 일반적인 발병기전을 고려한 제2형 당뇨병과 관련된 변이체, 신경염(neuroinflammation)과 관련된 변이를 비롯한 109,804개의 변이는 유전자형 분석의 성능이나 효능이 낮출 수 있기 때문에 제외하였다. 제외된 변이의 구체적인 목록은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Source	Not Design	Design	submit	Design Rate
AD(PMID:30820047)	689	244	933	26.2%
AD_IGAP	9754	6474	16228	39.9%
ADPD_cRE	5412	533	5945	9.0%
DLB(PMID:31065058)	2	1	3	33.3%
ENDOSOME	451	714	1165	61.3%
GWAS_cat_AD	2827	2319	5146	45.1%
GWAS_cat_DM	484	332	816	40.7%
GWAS_cat_PD	1356	1183	2539	46.6%
GWAS_cat_T2D	6248	5261	11509	45.7%
KEGG_LYSOSOME	946	1289	2235	57.7%
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	817	1166	1983	58.8%
MITOCHONDRION	2389	3458	5847	59.1%
NEURON_DEVELOPMENT	423	715	1138	62.8%

PD(Nall_2019_Biorxiv)	663	615	1278	48.1%
PD(PMID:28892059)	6	6	12	50.0%
PD_Foo	3681	3604	7285	49.5%
PD_Nall	13158	10132	23290	43.5%
REACTOME_ACTIVATION_OF_NF_KAPPAB_IN_B_CELLS	378	545	923	59.0%
SLEEP	142	282	424	66.5%
SLEEP(PMID:18820697)	3	6	9	66.7%
SLEEP(PMID:19412176)	5	5	10	50.0%
SLEEP(PMID:21170044)	4	3	7	42.9%
SLEEP(PMID:22257907)	7	4	11	36.4%
SLEEP(PMID:26507264)	34	50	84	59.5%
SLEEP(PMID:29535854)	139	107	246	43.5%
T2D(PMID:30718926)	9	2	11	18.2%
T2D_Xue	9223	8059	17282	46.6%
UBIQUITIN_CYCLE	262	426	688	61.9%
Other_GWAS_cat	50292	61726	112018	55.1%
총합계	109804	109261	219065	49.9%

[0052] 다음으로, 중복 마커, 1000 게놈 프로젝트 단계 3에 포함되지 않은 마커, 동아시아 GWAS 연구에서 소수 대립 유전자 빈도가 0인 마커 및 프록시 SNP(태그 $r^2 > 0.8$)를 제외했다(표 2).

표 2

[0053]

Tagging을 위한 단계 별 마커 확인			
	Description	Marker #	QC Marker #
Step0	Raw	219065	.
Step1	Remove duple Marker	179344	39721
Step2	1000genome	165822	13522
Step3	MAF = 0	151641	14181
Step4	Tagging $r^2 \geq 0.8$	59920	91721
Tagging SNP Coverage			
Step4	Tagging $r^2 \geq 0.8$	59920	14811
Step5-1	independent Marker	45109	
Step6-1	DesignPossible	32379	12730
Step5-2	Non Independent Group	14807	
Step6-2	DesignPossible Group	13880	927
Step7	Final Tagging SNP	46259	

[0055] 또한 칩 슬롯을 고려하여 우선 순위의 특이적 마커를 선택했다(표 3).

표 3

[0056]

	Description	Marker #	누적 합계 #	Priority
Step0	Tagging SNP	46,259	46,259	Top
Step1	Priority1 Uniq Marker	12,088	58,347	Middle
Step2	Priority2 Uniq Marker	15210	73,557	Bottom
Step3	관심있는 마커 및 Multi allelic 포함	667	74,224	Top

- [0058] 최종 마이크로어레이에는 74,224개의 마커가 포함되었다.
- [0060] 1-3. 샘플 품질관리
- [0061] 보다 명확한 실험결과 도출을 위하여 실험대상 샘플의 분석을 수행하였다. 1차 시료 품질관리는 낮은 DNA 품질 또는 실험 오류 가능성 때문에 낮은 호출률(call rate)($<0.95\%$)을 가진 시료는 분석에서 제외하였다. 높은 이형 접합성(heterozygosity)을 보여주는 샘플은 낮은 DNA 품질 또는 샘플의 오염 가능성 때문에 분석에서 제외하였다. 전체 표본 분포를 확인하였으며, 전체 표본 분포에서 크게 벗어나는 것으로 확인되는 케이스는 저질 샘플(low quality sample)로 규정하여 실험 대상에서 제외하였다. SNP 프루닝(pruning) 또한 수행되었다. 전체 데이터를 사용하는 경우 애매한 1차 상대 및 다차원 척도법(multidimensional scaling, MDS) 분석은 시간이 많이 걸리므로 연결 불균형(linkage disequilibrium)에 기반한 대표적인 SNP 정보만 데이터에서 선택하였다. 모집단 계층화 가능성(possibility of population stratification)으로 인해 전체 표본에서 벗어난 표본은 MDS를 평가하여 분석에서 제외하였다. 단 하나의 샘플로 일정 수 이상의 SNP가 있는 경우 DNA 품질 및 기술적 인공물로 인한 오류 가능성을 배제하였다.
- [0062] 2차 시료 품질 관리는 1차 시료 품질 관리 기준에 따라 품질이 낮은 것으로 간주되는 시료 및 성별이 일치하지 않는 시료(sex-inconsistent samples)를 제외한 유전자형 콜링(genotype calling)으로 구성하였다. 반복 검체 품질 관리를 수행한 다음, 품질 관리 기준을 충족하지 못한 검체는 제외하였다. 통계 분석은 대부분의 경우 각 표본에 대한 독립성을 가정하기 때문에 SNP 데이터는 암호 1차 상대 분석(cryptic first-degree relative analysis)에서 제외되었다.
- [0064] 1-4. 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism) 마커 품질 관리
- [0065] 저품질 SNP를 제외하기 위해 SNPfilter 분석을 수행하였다. 호출률이 95% 미만일 때 호출률이 낮은 SNP는 프로브 설계 및 클러스터링 분석 문제로 인해 호출 프로세스에 오류가 발생할 수 있으므로 제외시켰다. 특정 SNP의 Hardy-Weinberg 평형(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 테스트의 P-값이 낮으면 유전자형 클러스터링 과정에 오류가 있을 수 있기에, HWE는 $P < 10^{-4}$ 로 하였다. MAF가 $<1\%$ 인 경우는 실험군 및 대조군에서 모두 제외하였다.
- [0067] 1-5. 통계 분석 방법
- [0068] 유전적 변이와 파킨슨병 치매간의 연관성은 연령과 성별을 보정한 다음 다중 로지스틱 회귀 모델(multiple logistic regression model)을 사용하여 분석하였다. 각 유전적 변이에 대하여 교차비(odds ratios, OR), 95%의 신뢰구간(confidence interval, CI) 및 양측 P-값(two-tailed P-value)을 계산하였다. 다중 비교를 위하여 Bonferroni 보정을 사용하여 1차 분석의 P-값의 유의성을 평가하였다. 클러스터링 품질 관리는 $P < 0.0001$ 로 SNP의 분석 데이터를 육안으로 검사하여 수행하였으며, 품질 관리를 통과한 모든 유전자형 변이체에 대한 P-값에 대해 맨해튼 플롯(Manhattan plots) 및 분위수-분위수 플롯(quantile-quantile plots, Q-Q Plot)을 구성했습니다.
- [0069] 통계 분석은 PLINK 프로그램(버전 1.90, NIH-NIDDK Laboratory of Biological Modeling, Bethesda, MD, USA), Haploview(버전 4.2, Daly Lab at the Broad Institute, Cambridge, MA, USA), LocusZoom(버전 1.4, University of Michigan, Department of Biostatistics, Center for Statistical Genetics, Ann Arbor, MI, USA) 및 R(버전 3.1.2, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA)를 활용하여 진행하였다.
- [0072] **실시예 2. 파킨슨병 치매 마커의 발굴**
- [0073] 파킨슨병 치매 환자 317명, 루이소체 치매 환자 11명, 건강한 대조군 648명을 등록하여 실험을 수행하였다. 품질 관리 과정에서 파킨슨병 치매 환자 4명과 건강한 대조군 13명을 제외하였다. 최종 연구 모집단은 파킨슨병 치매 환자 313명, 루이소체 치매 환자 11명, 건강한 대조군 635명으로 구성하였다. 연구 모집단의 파킨슨병 치매 환자의 경우 건강한 대조군보다 연령이 유의하게 더 높게 나타났다(평균 69.9 대 68.5, $P=0.008$)(표 4).

표 4

[0074]

	PD with dementia (n=313)	DLB (n=11)	HC (n=635)	p-value
Age, mean (SD)	69.9 (6.8)	72.1 (6.8)	68.5 (6.7)	0.008
Sex, female (%)	167 (58.0)	2 (20.0)	257 (44.3)	<0.001
MMSE, mean (SD)	16.7 (5.8)	20.3 (5.2)	27.5 (1.5)	<0.001
Age at disease onset of PD, mean (SD)	69.9 (6.8)	72.1 (6.8)	-	0.03
Disease duration, mean (SD)	7.9 (5.3)	3.1 (2.5)	-	0.004
MOCA, mean (SD)	16.1 (6.3)	-	-	<0.001
UPDRS total	43.5 (19.7)	54.2 (28.8)	-	<0.001
H&Y	2.7 (0.8)	1.8 (1.7)	-	<0.001

[0076]

건강한 대조군에 비해 파킨슨병 치매에서 여성의 비율이 더 높았고(58.0% 대 44.3%, $P < 0.001$), DLB에서 여성의 비율이 건강한 대조군과 비교하여 더 낮게 나타났다(20.0% 대 44.3%, $P < 0.001$).

[0077]

품질 관리를 통과한 41,534개의 SNP의 유전자형에 대하여 상기 실시예 1-5의 통계분석 방법을 통한 분석을 수행하였다. 파킨슨병 환자와 건강한 대조군을 비교한 Q-Q 플롯은 도 1에 나타내었으며, 이에 대한 맨해튼 플롯은 도 2에 나타내었다.

[0078]

SNCA SNP rs11931074는 파킨슨병 치매와 관련이 있음을 확인하였으며[교차비(OR) 0.614, 신뢰 구간(CI) 0.494-0.762, $P < 10^{-5}$], 이와 같이 파킨슨병 치매와 관련되었다고 확인된 상위 10개 SNP는 표 5에 나열하였다.

표 5

[0079]

rs number	chr	Gene	Region relative to gene	Allele (minor/major)	Minor allele frequency (case/control)	OR (95% CI)	P-value
rs11931074	4	SNCA, GPRIN3	intron, downstream, upstream	G/C	0.3622/0.4646	0.6138 (0.494, 0.762)	0.00000980
rs1456522	2	SATB2, LOC101927619	intron, downstream, upstream	A/G	0.1534/0.09685	2.031 (1.471, 2.804)	0.00001672
rs12642514	4	SNCA, GPRIN3	intron, downstream, upstream	A/C	0.3562/0.4558	0.6322 (0.5104, 0.7831)	0.00002691
rs1949829	7	COBL, POM121L12	upstream	T/C	0.2067/0.1451	1.734 (1.315, 2.287)	0.00009644
rs4767293	12	ERP29, NAA25	downstream	A/G	0.08466/0.04646	2.285 (1.499, 3.483)	0.00012320
rs3758650	11	CDHR5	UTR-3	A/G	0.1198/0.07965	1.923 (1.359, 2.722)	0.00022600
rs1064807	8	BNIP3L, PPP2R2A	upstream, downstream, exon	C/T	0.09295/0.1524	0.5234 (0.37, 0.7403)	0.00025340
rs636291	1	PEX14	intron	G/A	0.238/0.3252	0.6354 (0.4981, 0.8105)	0.00026110

rs3803689	16	ZNF276	intron	C/T	0.2644/0.1924	1.586 (1.238, 2.032)	0.0002629 0
rs6033431 7	4	KIT	intron	T/C	0.2188/0.1635	1.642 (1.255, 2.149)	0.0002982 0

[0081] 상기 SNP들은 SATB2, LOC101927619, SNCA, GPRIN3, COBL, POM121L12, ERP29, NAA25, CDHR5, BNIP3L, PPP2R2A, PEX14, ZNF276 및 KIT 유전자 근처의 SNP를 포함하는 것으로 확인되었다.

[0083] **실시예 3. 차세대염기서열분석법(NGS, next generation sequencing)을 활용한 검사법 개발**

[0084] 통계분석 결과를 바탕으로 각 그룹별로 질병과의 연관성이 가장 높은 SNP 마커를 4 내지 28개씩 선별하여, 중복되는 3개를 제외하고 총 47개의 SNP 마커를 포함하는 차세대염기서열분석(NGS)용 타겟 패널(targeted panel)을 제작하였다. 패널에 포함되어 있는 SNP 중, 파킨슨병 치매와 관련된 SNP를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

PDD-H C	rs11931074	rs1456522	rs12642514	rs1949829	rs4767293	rs3758650	rs1064807	rs636291	rs3803689
------------	------------	-----------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------	-----------

[0087] 또한, 치매, 파킨슨병 치매, 루이소체 치매와 관련되어 있다고 알려진 64개의 유전자를 포함하였으며, 그 유전자는 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

APOE	APP	ARSA	ATP13A2	ATP1A3	ATP6AP2	C19orf12	CHCHD10
CHCHD2	CHMP2B	CSF1R	CTSD	DCTN1	DNAJC6	EIF4G1	FBXO7
FTL	FUS	GBA	GCH1	GIGYF2	GRN	HTRA1	HTRA2
ITM2B	LRRK2	MAPT	NOTCH3	PARK2	PARK7	PINK1	PLA2G6
POLG	PRKRA	PRNP	PSEN1	PSEN2	RAB27A	RAB35	RAB39B
SLC6A3	SNCA	SNCB	SORL1	SPG11	SPR	SQSTM1	SYNJ1
SIGMAR1	SLC20A2	TBK1	TFEB	TH	TLR2	TREM2	TYROBP
TAF1	TARDBP	UBQLN2	UCHL1	VCP	VPS13A	VPS35	XPR1

[0090] NGS 패널의 분석적 성능을 검증하기 위하여 47개 SNP와 64개 유전자에서 유전변이를 1개 이상 보유한 24종의 세포주(Coriell Institute, USA)와 3개의 환자 샘플을 사용하여 분석을 진행하였다(표 8).

표 8

#	Coriell ID	유전자	대표변이	#	Coriell ID	유전자	대표변이
1	NA25291	SLC6A3	c.1408T>A c.1409A>G	13	ND00139	SNCA	3 copies
2	ND16281	GBA	ASN370SER	14	ND00196	SNCA	3 copies
3	ND04841	PARK2	GLN34ARG	15	ND01038	PARK2	EX4DEL
4	ND06284	PARK2	ARG42PRO, EX3DEL	16	ND01039	PARK2	EX4DEL
5	ND06646	PARK2	ARG275TRP	17	ND01040	PARK2	EX4DEL
6	ND11267	MAPT	VAL337MET	18	ND02380	MAPT	ASN279LYS
7	ND11268	MAPT	VAL337MET	19	NG06849	PSEN1	ALA246GLU
8	ND12648	LRRK2	THR2356ILE	20	NG09907	PSEN2	ASN141ILE
9	ND31627	MAPT	PRO301LEU	21	NG09908	PSEN2	ASN141ILE
10	ND32658	DCTN1	THR72PRO	22	NG10009	APOE	CYS112, ARG158

11	ND34981	GBA LRRK2	ASN2370SERGLY2019SE R	23	NG10956	APOE	CYS112ARG
12	NG04402	APOE	CYS112ARG	24	NG12729	APOE	ARG158CYS

[0093]

구체적으로 상기 표 8의 세포주와 환자검체를 대상으로 제작된 NGS 패널의 최저검출한계(limit of detection, DNA input), 간섭물질(interfering substances), 재현성(reproducibility) 및 정확도(accuracy)를 측정하여 분석적 성능(analytical performances)을 검증하였으며, 그 검증결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0094]

항목	시험방법	검체(시험물질)	결과
최저검출한계 Limit of detection	200, 100, 50, 25 ng 농도의 DNA 준비 각 농도에서 2회씩 반복시험(총 24회) 시험물질의 대표변이 및 47개 SNP genotyping 이 정상적으로 검출/수행되는지 검증	ND01037 NG06849 NG09907	각 농도 별로 총 24회 반복시험한 결과, 시험물질의 대표변이가 모두 검출되었음 47개 SNP 마커에 대하여, 모든 시험에서 genotyping이 정상적으로 수행되었음(100%)
간섭물질Interfering substances	혈액 구성성분에 의한 간섭효과 측정 고농도 Bilirubin(40mg/dL), hemoglobin(0.2g/dL), cholesterol(503mg/dL)을 검체에 첨가 각 간섭물질 별로 3회 반복 시험 시험물질의 47개 SNP genotyping 이 정상적으로 수행되는지 검증	정상혈액1 정상혈액2	고농도의 간섭물질 bilirubin, hemoglobin, cholesterol을 첨가한 후에도 시험물질에서 47개 SNP에 대한 genotyping 이 모두 정상적으로 수행되었음(100%)
재현성Reproducibility	시험자, 로트, 검사장비 간의 재현성 평가 시험내 2회, 3일간 반복 시험(총 96회) 시험물질의 대표변이 및 47개 SNP genotyping 이 정상적으로 검출/수행되는지 검증	ND01037 NA25291 NG06849 NG09907	서로 다른 시험자, 제품 로트 및 검사장비를 반복적으로 사용하여 재현성을 확인한 결과, 시험물질의 대표변이 검출 및 47개 SNP에 대한 genotyping이 정상적으로 수행됨(100%)
정확도Accuracy	세포주 24종과 임상검체 3종으로 시험 각 시험물질에 대하여 1회 시험 시험물질의 대표변이 및 47개 SNP genotyping 이 정상적으로 검출/수행되는지 검증	ND06646 외 23종 CSJ-C1097 외 2종	총 27종의 시험물질을 대상으로 대표변이 검출 및 47개 SNP genotyping 결과를 이미 알려진 결과와 비교한 결과 100% 일치도를 보였음

[0096]

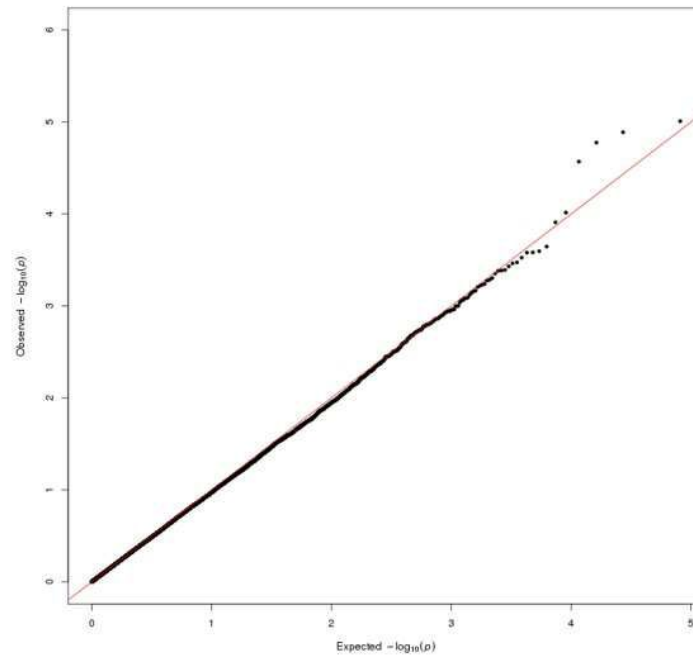
시험결과 SNP 마커와 유전자의 대표변이를 분석하기 위해 필요한 최소 DNA 양(최소검출한계)은 25 ng으로 확인되었다. 또한 SNP와 유전자 대표변이에 대한 검출결과는 시험자, 로트, 시험장비의 변동 및 반복에 의하여 영향을 받지 않았으므로 검사의 재현성을 확인할 수 있었다. 24종의 세포주와 3개의 임상검체가 보유한 대표변이는 알려진 결과값과 모두 일치하게 검출되어 100%의 정확도를 보였다. 그리고 파킨슨병 치매와 관련된 9개 SNP를 포함하는 47개 SNP에 대한 genotyping 역시 모든 검체에서 정상적으로 수행되었음을 확인하였다.

[0098]

상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

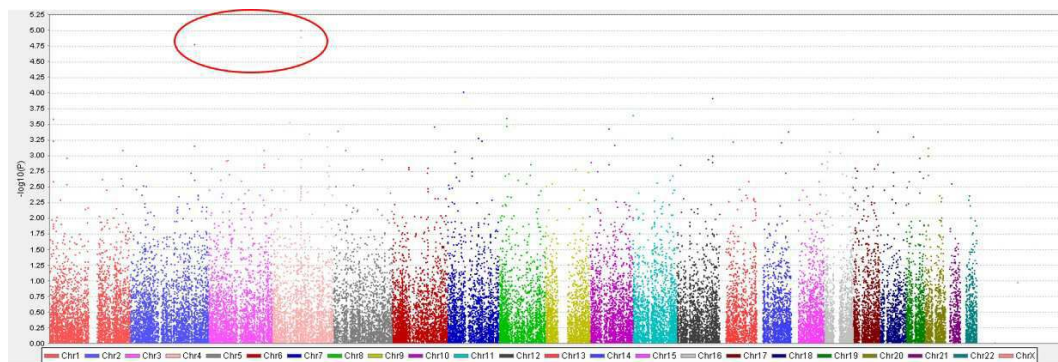
도면

도면1



Multiple logistic Regression analysis

도면2



Multiple logistic Regression analysis