



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0102081
 (43) 공개일자 2016년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7022020(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년08월10일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2011-7005559
 원출원일자(국제) 2009년08월10일
 심사청구일자 2014년08월11일
- (85) 번역문제출일자 2016년08월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/053307
- (87) 국제공개번호 WO 2010/019519
 국제공개일자 2010년02월18일
- (30) 우선권주장
 61/087,722 2008년08월10일 미국(US)

- (71) 출원인
 쿠아키니 메디컬 센터
 미국 하와이 96817 호놀룰루 쿠아키니 스트리트 347
 엔.
- (72) 발명자
 돈론, 티모시, 애치슨
 미국 하와이 96821 호놀룰루 헤마 플레이스 350
 월콕스, 브래들리, 존
 미국 하와이 96813 호놀룰루 프로스펙트 스트리트
 8
 커브, 제이., 다비드
 미국 하와이 96817 호놀룰루 에이치피엠 쿠아키니
 스트리트 347 엔.
- (74) 대리인
 양영준, 김영

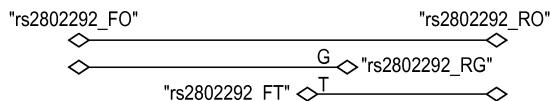
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 건강한 노화 및 장수를 예측하고 증진하기 위하여 FOXO3A 다형성 및 일배체형을 사용하는 방법

(57) 요약

본 발명은 개인의 장수 가능성을 측정하고 증가시키기 위해, 노화하는 동안 신체 및 인지 기능의 유지 및 관상동맥(심장)질환, 중풍, 암, 만성 폐질환, 당뇨병, 파킨슨씨병 및 치매를 비롯한 심혈관, 대사 또는 나이관련된 질병을 발병할 개인의 가능성을 결정하고 감소시키기 위해 사용될 수 있는 FOXO3A 유전자로부터 유전정보의 확인 및 사용에 관련된 방법 및 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/15 (2013.01)
C12Q 2535/125 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/172 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

사망, 나이 관련된 질병 또는 장래의 신체 기능의 예측을 돋기 위한 위험 계산기에서 "GCC" FOXO3A 일배체형의 존재 또는 부존재의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 건강한 노화 및 장수를 증진하기 위하여 치료 및 개입을 예측하거나 계획하기 위하여 FOXO3A 다형성 및 일배체형을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

관련 출원에 대한 교차 언급

[0003] 본 출원은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 2008년 8월 10일 출원된 미국 특허 가출원 번호 61/087,722호를 부분적으로 기초로 하며 또 그를 우선권 주장하고 있다.

연방 지원 연구 또는 개발에 관한 기술

[0005] 본 발명은 노화에 대한 국가연구소로부터 승인 1 R01 AG027060-01 (건강한 노화 표현형의 확인)하에 정부의 지원으로 이루어졌다. National Heart, Lung, and Blood Institute로부터 계약 N01-HC-05102, National Institute on Aging으로부터 계약 N01-AG4-2149 및 승인 5 U01 AG019349-05 및 K08 AG22788-02하에 미국 정부의 지원에 의해 추가의 기금지원이 제공되었다. 미국 정부는 본 발명에 대하여 어느 정도의 권리를 가지고 있다. 부가적인 지원은 Hawaii Community Foundation으로부터 승인 2004-0463 하에서 이루어졌다.

본 발명의 배경

[0007] FOXO3A 유전자는 뚜렷한 포크헤드(forkhead) 도메인을 특징으로 하는 전사 인자의 포크헤드 패밀리에 속한다. 이 유전자는 세포 치사에 필요한 유전자의 발현을 통하여 세포자살 유발제로서 작용한다. 상기 유전자의 MLL 유전자에 의한 전좌(Translocation)는 이차 급성 백혈병과 관련된다. 다르게는, 동일 단백질을 암호화하는 스플라이싱된 전사 변종이 관찰되었다.

[0008] FOXO3A 유전자는 모델 생물 씨. 엘레간스(*C. elegans*)(Murphy CT (2006) The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp Gerontol* 41 :910-921) 및 디. 멜라노가스터(*D. melanogaster*) (Giannakou ME et al. (2007) Dynamics of the action of dFOXO on adult mortality in *Drosophila*. *Aging Cell* 6:429-438)에서 수명을 연장하기 위해 기재된 유전자인 DAF-16의 인간 상동체(homologs) 중의 하나이다.

[0009] FOXO3A 유전자는 인간 크로모좀 6q21 상의 위치 108, 987, 719 내지 109112664 (NCBI ver. 36) 상에 위치하며, 다르게 발현되어 동일한 단백질을 초래할 수 있는 4개의 엑손으로 구성된다(변종 #1은 파일 NM 001455.3에 의해 기재되고; 변종 #2는 파일 NM 201559.2에 의해 기재된다). FOXO3A 단백질은 673개 아미노산으로 구성되며 또 크기는 71,277 Da이다. FOXO3A의 아미노산 서열은 NCBI에 파일 "NP_963853"으로 표시된 바와 같이 서열번호 1로 나타내며 다음과 같다;

MAEAPASPAPLSPLEVELDPEFEPQSRPRSCTWPLQRPELQASPAKPSGETAADSMIP
 EEEEDDEDGGGRAGSAMAIAGGGGGSGTLGSLLEDSARVLAPGGQDPGSGPAT
 AAGGLSGGTQALLQPQQPLPPPQPGAAAGGSQPRKCSSRRNAWGNLSYADLITRAIE
 SSPDKRLTLSQIYEWMVRCVPYFKDKGDSNSSAGWKNSIRHNLHSRFMRVQNEG
 TGKSSWWIINPDGGKSGKAPRRRAVSMDNSNKYTKSRRGAAKKKAALQTAPESAD
 DSPLSQLSKWPGSPTSRSSDELDATDFRSRTNSNASTVSGRLSPIMASTELDEVQDD
 DAPLSPMLYSSASLSPSVSKPCTVELPRLTDAGTMNLNDGLTENLMDDLLDNITL
 PPSQPSPTGGLMQRSSFPYTTKGSGLGSPTSSFNSTVFGPSSLNSLRQSPMQTIQENK
 PATFSSMSHYGNQTLQDLLTSDSLSHSDVMMTQSDPLMSQASTAVSAQNSRRNVML
 RNDPMMSFAAQPNQGSLVNQNLLHHQHTQGALGGSRALSNSVSNMGLSESSLGS
 AKHQQQSPVQSQSMQTLSDSLGSSLYSTSANLPVMGHEKFPSDLDLMFNGSLECD
 MESIIRSELMDADGLDFNFDSLSTQNVVGLNVGNFTGAKQASSQSWVPG

[0010]

FOXO3A는 YWHAB/14-3-3-베타 및 YWHAZ/14-3-3-제타와 반응한다: UniProt : the Universal Protein Resource (www.uniprot.org), 시토졸 분리에 필요. 산화적 스트레스시, STK4와의 상호작용은 YWHAB/14-3-3-베타와의 상호작용을 파괴하여 핵 전좌를 초래한다. FOXO3A의 준세포(subcellular) 위치는 세포질 및 시토졸이다. 이것은 산화적 스트레스를 받을 때 및 생존 인자 부재하에서 핵으로 전좌된다. IGF-1과 같은 생존 인자의 존재하에서, FOXO3A는 AKT1/PKB에 의해 Thr-32 및 Ser-253 상에서 인산화된다. 이러한 인산화된 형태는 14-3-3 단백질과 상호작용하여 세포질 내에 유지된다. 생존 인자 제거는 탈인산화를 유도하고 또 탈인산화된 단백질이 표적 유전자의 전사를 유도하여 세포자살을 유발하는 핵으로의 전좌를 증진시킨다. AKT1/PKB는 Ser-315를 직접적으로 인산화하지 않는 것으로 보이지만, 상기 잔기에서 인산화를 유발하는 다른 키나아제를 활성화할 수도 있다. FOXO3A는 산화적 스트레스시 Ser-209 상에서 STK4에 의해 인산화되어, YWHAB/14-3-3-베타로부터 분리 및 핵 전좌를 초래한다.

[0012]

인간의 장수는 다수의 결정인자를 갖는 복잡한 표현형이다. 식이, 신체적 활성, 건강 습관 및 심리사회적 인자를 비롯한 비-유전적 인자가 중요하지만, 인간 수명에서 50% 이하의 변화는 유전자 차이에 의해 설명될 수 있다.¹⁻⁵ 몇 개 연구는 평균 수명 집단에서 인간 수명 변화의 약 25%는 유전 인자에 의해 설명될 수 있지만, 다수의 예외적 생존자 집단에서는 수명에 대한 유전적 기여는 훨씬 더 높을 수 있음을 제시한다. 예컨대, 90세 사람들과 100세 사람들의 가족 연구는 복잡한 표현형에 대한 있을 수 있는 유전자 기여를 평가하기 위한 공통적인 방법인 형제자매 관련 위험⁶은 특히 높고 또 시발자(proband)의 연령이 증가함에 따라 증가함을 보여준다.⁷⁻¹⁰ 그러나, 인간에서 "장수 관련" 유전자 후보(이후 "장수 유전자"로 지칭) 연구는 일반적으로 실망스러웠다. ApoE 유전자를 제외하고는 집단을 통하여 몇 개의 복제가 관찰되었다.³

[0013]

대조적으로, 노화의 모델 생물에서 몇 가지 강인한 유전적 발견이 있었다.¹¹⁻¹³ 예컨대, 단일 유전자에서 변화는 특히 인슐린/IGF-1(IIS) 신호전달 경로의 일부로 간주되는 유전자를 갖는 모델 생물에서 수명의 실질적 차이를 초래할 수 있다.¹⁴⁻¹⁸

[0014]

SIR-2 활성을 증가시키거나 또는 인슐린/IGF-1 신호전달을 증가시키는 돌연변이는 DAF-16/FOXO 단백질을 활성화하는 것에 의해 씨. 엘레간스(*C. elegans*)의 수명을 증가시킨다.^{19,20} 포유동물 세포에서, Sir2 상동체(homolog) "SIRT1"은 스트레스에 대한 세포 반응을 비롯한 수명에 영향을 미치는 몇 가지 하류 전사(downstream transcription) 이벤트에 영향을 준다. SIRT1은 IIS 경로에서 센서로서 작용하고 또 몇 가지 포유동물에서 장수의 조절인자인 단백질 패밀리인 FOXO (포크헤드 박스 전사) 인자를 조절하는 것에 의해 상기를 달성한다.¹⁷

[0015]

포유동물(및 기타 종)에서 유전자 녹아웃(knock-out) 모델은 또한 IIS 가설을 지지하였다. 예를 들어, 지방 특이적 인슐린 수용체 녹아웃(FIRKO)을 갖는 마우스는 지방 중량을 감소시켰고, 나이 관련 비만에 대한 보호를 하고 또 장수를 연장시켰다.²¹ IIS 경로에서 다수의 다른 돌연변이는 마우스에서 장수에 영향을 줄 수 있다. 이들은 IGF-1 수용체,²² IRS-1,²² IRS-2,²³ PAPP-A,²⁴ 에서 돌연변이 및 아메스 난장이(Ames Dwarf) 마우스 돌연변이를 포함한다.

- [0016] 인슐린 신호전달의 기본 분자 경로는 진화를 통하여 보존되며, 그 증거는 효모, 파리, 애벌레, 설치류 및 인간에서 볼 수 있다.²⁵ 애벌레에서 상기 경로의 주요 조절자는 전사인자 DAF-16(ABnormal DAuer Formation-16)이며, 이것은 인슐린/IGF-1 신호전달을 억제하는 것에 의해 씨. 엘레간스에서 생긴 큰 수명 확대에 필요하다.¹⁶ AMP 키나아제,²⁶ 14-3-3 단백질,²⁷ lin-4 마이크로RNA,²⁸ 및 열쇼크 인자²⁹와 같은 다수의 인자가 daf-16 의존적 방식으로 씨. 엘레간스의 수명을 증대시키는 것으로 보인다. 몇 개 종에서 DAF-16의 상동체는 나이 표현형 및 장수에 연결되어 있다.³⁰ 예를 들어, 스트레스 반응성 Jun-N-K 말단 키나아제(JNK) 경로는 초파리에서 수명을 연장시키기 위하여 FOXO를 필요로 하는 것으로 보이며 또 파리가 DAF-16 올소로그(ortholog)인 dFOXO를 과발현하면, 이것은 수명을 현저하게 증가시킬 수 있다.³² DAF-16/FOXO 상에서 다양한 신호 어레이와 같은 현저한 콘버전스(convergence)는 상기 단백질이 노화 및 장수에 영향을 주는 신호전달 네트워크에서 중요하고 진화적으로 보존된 "노드(node)" 임을 제시한다.
- [0017] DAF-16의 인간 상동체는 4개의 FOXO: FOXO1, FOXO3A, FOXO4 및 FOXO6를 포함한다. 따라서, FOXO 및 관련 유전자에서 단일 뉴클레오티드 다양성(SNP) 형태의 공통되는 천연적 변화는 인간 장수에 영향을 줄 수 있다고 가정할 수 있다. "FOXO3"은 FOXO3B가 염색체 17 상의 슈도-유전자이기 때문에 "FOXO3A"과 동의어이다.
- [0018] 이것은 매력적인 가설이다. 인슐린, FOXO, 산화적 스트레스 및 인간 장수 사이의 연관이 특히 재미있는데 이는 산화적 스트레스가 노화의 최고 가상 메카니즘이었기 때문이다. 1956년 이후로, 노화의 자유 라디칼 이론은 노화 결과가 반응성 산소분자³³에 대한 축적 노출로부터 DNA, 세포 및 조직에 대한 손상으로부터 부분적으로 기인한다고 가정되어 왔지만, 아직까지 보편적으로 수용되고 지지되는 증거는 수년에 걸쳐 축적되지 않고 있다.³⁴⁻³⁵ 따라서, FOXO는 인슐린 시그널링, 자유 라디칼 및 인간 노화/장수 사이에 분자점 또는 브릿지를 제공할 수 있다.
- [0019] 기능적으로 유의한 IGF-I 수용체 돌연변이를 예외적 장수에 연결하는 서(Suh) 등³⁸에 의한 재미있는 최근의 보고를 비롯하여 IIS 경로 중의 유전자를 인간 장수^{36, 37}에 연결하는 일부 종래 작업이 있었지만, 우리는 FOXO 유전자와 인간 장수 사이의 연관의 공고된 보고를 발견하지 않았다. 종래 연구는 4-년 생존 및 중풍 우려³⁹ 뿐만 아니라 조기 폐경⁴⁰을 비롯한 FOXO 유전자와 기타 노화 표현형 사이의 연결을 발견하였다.
- [0020] 그러나, 인간 장수는 질병 특이적 위험뿐만 아니라 노화의 개별 속도를 포함하는 복잡한 표현형이다. 유전자 전례의 연구는 도전적이다. 장수 연구는 작은 유전자 효과 크기, 집단 계층화 인공산물, 집단 해테로유전자, 충분한 수의 장수 연구 지원자의 부족 및 기타 문제에 의해 영향을 받을 수 있다.^{3, 4, 41} 따라서, IIS 신호전달에 연결된 유전자로부터 인간 장수에 대한 있을 수 있는 유전자 기여를 평가하기 위하여, 우리는 노화 표현형에 대하여 아주 잘 특징화된 사람의 큰, 균일한 장수 집단을 선택하고 또 IIS 경로에 대한 연관을 갖는 5명의 후보자 장수 유전자의 코호트내 환자-대조군 연구(nested-case control study)를 실시하였다. 이들 유전자는 노화의 유전자 녹아웃, 트랜스제닉, 돌연변종 및 기타 모델 생물^{3, 4, 14-17, 36, 42}로부터 노화 표현형과의 이전 결합을 기초로 선택하였다. 인슐린 민감성 및 글루코오스 (에너지) 항상성에 관련된 유전자에 우선권이 주어졌다.
- [0021] 집단의 신속한 노화는 만성 질병 및 장애의 증가된 만연으로 인하여 사회에 대하여 유례없는 도전을 줄 것이다.⁴⁵ 우리가 어떻게 노화되는지에 대한 폭넓은 영향을 가질 수 있는 생물학적 경로를 비롯한 노화 메카니즘의 더욱 우수한 이해는 나이 관련된 질병 및 장애에 대한 우리의 우려를 저하시키기 위한 중요한 의의를 가질 수 있다. 인간 장수에 대한 생물학적으로 그럴듯한 후보자 유전자가 다수 있지만, ApoE 유전자의 다수 집단에서는 1개 발견만이 지금까지 널리 복제되어 왔다.³ 이 유전자는 노화 표현형, 특히 심혈관 질병 및 치매에 대하여 폭넓은 효과를 가지며, 또 길고 건강한 수명을 달성하는 능력에 영향을 준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

본 발명의 요약

인간 노화 표현형 및 장수에 대하여 폭넓은 영향을 갖는 유전자 발견에서의 도전은 인간 연구를 실시하기 전에

있을 수 있는 후보자를 확인하기 위하여 모델 생물을 이용하는데 유용할 수 있음을 제시한다.

과제의 해결 수단

[0024] 따라서, 우리는 노화 또는 이전의 인간 연구의 모델 생물의 서열 및/또는 기능적 상동성을 기초로 인간 인슐린 /IGF-1 신호전달 경로 및/또는 산화적 스트레스 반응 시스템 내에서 몇 개의 후보 유전자를 연구하도록 선택하였다. 우리는 신호전달 경로로부터 인간 후보 유전자 목록을 작성하고 또 일본 인구에서 약 10% 또는 그 이상의 빈도로 생기는 이들 후보 유전자에서 변이를 평가하였다. 제한된 공급으로 인하여, 분석을 위한 각 유전자로부터 오직 3개의 SNP를 선택하였다. SNP는 가능하다면, 각 유전자의 최대 커버리지를 제공하기 위하여 연관 불균형(LD)을 갖는 영역으로부터 선택하였다.

[0025] 일반적으로 본 발명은 FOXO3A "GCC" 일배체형(haplotype)을 검출하는 조성물 및 방법을 제공한다(예를 들어 인간 검체가 부가적으로 15년 또는 그 이상 더 살아갈 가능성으로 정의되는 증가된 장수와 관련된 FOXO3A 일배체형). 바람직한 구체예에서, 검출된 FOXO3A 일배체형은 더 오래살 가능성 증가 또는 감소와 관련되지만, 본 발명은 반드시 더 오래살 가능성의 증가 또는 감소 및/또는 나이-관련 질병의 우려를 최소화하는 (예를 들어 "정상" 또는 "wt" 유전자형) 것과 관련된 FOXO3A 일배체형을 검출하는 물질과 방법을 필수적으로 포함한다. 나이-관련 질병은 관상동맥 질병, 중풍, 암, 만성 폐색성 폐질환 (COPD) 또는 기타 만성 폐질환, 파킨슨씨 병, 당뇨병, 비만, 치매(및 일반적 인지 기능), 허약함(보행능력) 또는 기타 나이-관련 질병 또는 신체적 및/또는 인지 손상으로 공지된 관상동맥 심장병(CHD)을 지칭한다. 이는 인간에서 비만과 결합될 수 있다.

[0026] "GCC" 일배체형은 수십 킬로베이스의 DNA를 포함한다. 상기 영역에서 다른 SNP는 본 명세서에 기재된 3개의 SNP 와 연관 불균형을 나타낸다. 부가적 SNP는 장수와 건강한 노화와 연관성을 갖는 상기 GCC 일배체형 내에서 확인될 것으로 예상되며, 또 나이 관련 질병을 예측하는데에도 유용할 수 있다. "GCC 일배체형"은 예외적 장수 및/ 또는 건강한 노화를 예측하게 이끄는 궁극적으로 "기능적 변종"인 것으로 밝혀진 FOXO3A 유전자 내에 또는 그와 인접한 기타 유형의 DNA 변형에 대한 내용으로서 작용할 수 있다. 이를 기타 변형은 역위, 중복, 결실 형태일 수 있고, 또 이전에 알려지지 않은 다른 유전자 또는 전사물, 예를 들어 유전자 "LOC100130966"를 포함할 수 있다. LOC100130966은 mif two 3 상동체의 SMT3 서프레서(suppressor)와 유사하며 2개는 "GCC" 일배체형 내에 있는 FOXO3A 유전자의 엑손 2 내에 위치하는 것으로 확인되었다. LOC100130966에 대한 DNA 서열은 GenBank accession ID# "XM_00 1725519"에 의해 기재되며 또 LOC100130966의 예측된 아미노산 서열은 GenBank 파일 "XP_00 1725571"에 의해 기재된다.

발명의 효과

[0027] 일배체형 분석은 공격적 건강함 또는 질병 예방/치료 중재술에 의해 환자들이 이득을 볼 것이라는 예측을 하기 위해 이용될 수 있다. 일배체형 분석은 키트 형태로 제공될 수 있다. 위험 계산기(risk calculators)는 질병, 장애 또는 치사의 가능성을 평가하거나 또는 한 개인의 생존 연수 또는 무질병 생존 연수를 결정하기 위해 그러한 정보를 이용할 수 있었다. 이러한 정보는 환자의 장기간 필요성에 대하여 안내를 제공하기 위하여 환자, 건강 보험 회사, 장기간 요양 보험 회사 및 의사 또는 기타 건강 관리 제공자에게 중요할 것이다. 건강 또는 노화에 관련된 질병에 영향을 주기 위하여 FOX3A 유전자의 작용을 변형하고, FOXO3A 단백질 및/또는 기타 단백질과의 상호작용을 변형하거나, 또는 유전자에 의해 생성된 단백질의 양 또는 유형을 변형하는 약물이 개발될 수 있다.

[0028] 마우스에서 상동 서열은 조기 난소 손상과 관련될 수 있다. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the 전사인자 Foxo3a. Science. 2003 Jul 11;301(5630):215-8. 따라서, 유사한 일배체형 분석은 수의과 용도에서 유용할 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 특징은 예시적 목적으로 첨부한 도면 및 표를 참조하여 이하의 상세한 설명으로부터 분명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 표 10에 기재된 프라이머 및 조건을 이용하여 FOXO3A G/T 변종을 검출하기 위한 ARMS-PCR 에세이의 결과를 도시한다.

도 2는 표 10에 기재된 프라이머를 사용하여 FOXO3A G/T 변종을 검출하기 위한 ARMS-PCR 에세이의 대략적 개요를 도시한다.

하기 표는 기재의 일부이다:

- 표 1. 1991-93 (n=3,741)에서 HHP/HAAS 코호트의 기본 특징
- 표 2. 환자군-대조군 상태(Case-Control Status)에 의한 기본 특징
- 표 3. 환자군 및 대조군에서 인간 장수 및 MAF에 대한 후보 유전자
- 표 4. 환자군-대조군 상태에 의한 FOXO 3A3 유전자형
- 표 5. 기본에서 유전자형 그룹 사이의 건강 상태에서의 차이
- 표 6. FOXO3A 유전자형에 따른 인슐린 민감성 표현형
- 표 7. FOXO3A 유전자형에 대한 노화-관련된 표현형의 유병률
- 표 8. 최대 도달 나이에 의한 유전자형 분포
- 표 9. rs2802292 G-T 다형성을 확인하기 위한 프라이머
- 표 10. rs2802292 G-T 다형성을 확인하기 위한 PCR 조건

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031]

발명의 상세한 설명

[0032]

A. 하와이 수명 연구

[0033]

연구 집단

[0034]

이 호트내 환자군-대조군 연구는 하와이 수명 연구의 일부로서 호놀루루 심장 프로그램(HHP)과 호놀룰루 아시아 노화 연구(HAAS)의 원 집단으로부터 얻은 건강한 노화의 코호트 연구로서 실시되었다. HHP는 1965년 시작된 8006명의 일본계 미국인 남성 중에서 심혈관 질병의 집단-기준 예상 연구이다. HHP 지원자는 1900년 내지 1919년 사이에 태어나서 1965년 오아후 섬에 사는 정확한 접촉 정보를 지닌 9,877명으로부터 모집하였다.⁶¹

[0035]

연구 지원자는 양쪽 부모가 흔히 서부 및 남부 일본 출신이었다(중앙 지역 또는 서부 및 남부로부터 94%); 이들의 49%는 히로시마 및 야마구치의 인접한 지역에 부모 기원이 있었다.^{61,62} 대부분의 지원자들은 하와이에서 태어났지만(88%), 지리적 기원으로 인한 대립유전자 빈도를 가진 환자군-대조군 상태의 이론적 혼동의 가능성이 존재한다. 따라서, 특정 분석의 경우, 환자군 및 대조군은 조건부 로지스틱 회귀 모델을 이용하여 부모의 도(prefecture) 출신에 따라 계층화하였다. 분석에 의하면 데이터세트(데이터는 나타내지 않음)에서 집단 계층화에 대한 증거는 나타내지 않았다.

[0036]

HHP 코호트 모집, 디자인, 및 과정 다른 경우에 자세히 나타낸 바와 같다.⁶² 간단히 밀해, 연구 등록 시기에 (1965-1968), 지원자들은 45 내지 68세(평균 연령, 54세)이었다. HHP 개시때부터, 부수하는 관상동맥 심장병과 중풍의 발병뿐만 아니라 모든 원인에 기인한 사망률에 대한 정보는 지역신문(영자판 및 일어판)의 부고란을 모니터링하는 것에 의해 또 병원의 퇴원 기록을 감독하는 것을 통하여 얻었다.⁶¹ 1991-1993 조사에서 추후 검사로 5명 만이 사망률 정보를 추적할 수 없음이 밝혀졌다.⁶³

[0037]

현재 연구에 대한 모든 지원자는 2007년 8월에 업데이트된 연구 지원자 기록에서 뽑았다. 호놀룰루 아시아 노화 연구(HAAS)와 동시에 HHP(1991-1993)의 조사 4로부터 보존된 표현형 데이터 및 혈액 샘플을 이 코호트내 환자군-대조군 연구에 대한 기본 조사로 이용하였다. HAAS는 노인에서 신경퇴화성 질병, 인지 기능 및 기타 노화 표현형의 연구를 위한 HHP의 확대로서 시작되었다.⁶⁴ 지원자들은 조사 4에서 71 내지 93세의 3,741명 남성(평균 연령 77.9±4.7세)을 포함하였고, 원래 HHP의 인원의 대략 절반이다.⁶⁴

[0038]

현재의 코호트내 환자군-대조군 연구를 위하여, "환자증례"(장수 표현형)는 모집 시기로부터 1910년 미국 태생 코호트 특이적 생존 (최소 95세)의 적어도 상위 1%로 생존한 모든 HHP 지원자로 정의하였다.^{65,66} 2007년 8월부로 적어도 95세 생존한 총 213명의 개인을 연구하였다. 이를 개인 중 176명은 죽었고(평균 사망연령 97.5; SD 2.1; 95-106세 범위) 또 37명은 여전히 살아있었다(평균 연령 98.7, SD 2.1; 97-106세 범위).

[0039] 대조군은 중년 남성에 대한 특이적 생존(약 77세 연령) 1910년 미국 태생 코호트에 대한 평균 사망 연령 근처에서 사망한 HHP/HAAS 코호트로부터 402명 개인으로 구성된다. 약 1:2의 환자군: 대조군 비율을 달성하기 위하여, 우리는 81세까지 사망한 대조군에 대하여 HHP/HAAS 연구 집단을 샘플링하였다. 우리의 대조군 집단에서 평균 연령은 78.5세(SD 1.8, 73-81세 범위)였다. 이것은 미국 남성 집단의 값보다는 약간 더 높지만, 하와이에 사는 일본계 미국인의 높은 평균 수명 예상치와 일치하며, 마지막 보고에서 백인 남성에 비하여 3.5세 더 길었다.⁶⁷ 모든 환자군 및 대조군은 그 가족들이 주로 중앙-서부 일본 출신인 일본 인종이었다.^{61,62}

[0040] 과정은 연구소 가이드라인에 따라 실시하였고 또 Institutional Review Board of Kuakini Medical Center에 의해 인가되었다. 모든 연구 지원자로부터 사전동의서를 얻거나 또는 지원자가 동의서를 제공할 수 없었던 경우 가족 대표자로부터 얻었다.

유전자형 판별(genotyping)

[0042] 우리는 5개의 후보 유전자 각각으로부터 3개 SNP를 선택하였다. 우리는 모델 생물에서 노화 경로에 대한 잘 기재된 영향을 갖는 유전자를 선택하였다. 모든 유전자는 IIS 경로에 대한 가상적 연관 및 에너지 항상성, 글루코오스 및/또는 지질 대사에 대한 가능성 있는 연관을 기본으로 하여 선택하였다, 도 1 참조. SNP는 HapMap 또는 JSNP 데이터베이스에 보고된 최소의 대립유전자 빈도를 기초로 선택하였다(snp.ims.u-tokyo.ac.jp).

[0043] 전체 세포 DNA는 피코그린 염색(PicoGreen staining)을 이용하여 정량화된 순수한 유전자 시스템 (Gentra Systems, Inc.)을 이용하여 단리하였고(Molecular Probes, Eugene, OR) 또 후보 유전자로부터 SNP는 대립유전자 분별 에세이를 이용하여 유전자 확인되었다. Taq Man[®] (Applied Biosystems, Inc.) 시약은 ABI로부터 구입하였고 또 SNP는 일본인 집단에서 \geq ~0.1 빈도로 선택하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). PCR은 Taq Gold(Perkin-Elmer, Corp)를 이용한 표준 조건하에서 증폭하였고 또 1개 대립유전자에 대한 6-FAM-라벨링된 FRET 프로브 및 다른 대립유전자에 대한 VIC-라벨링된 프로브를 사용한 Taq Man[®] 에세이에 의한 PCR 산물의 검출은 에세이 검출을 향상시키기 위하여 최소 그루브 결합 (MGB) 켄처(quencher)를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 ABI Prism 7000 Sequence Detection System에 의해 측정하였다.

[0044] 유전자형 데이터는 집적된 데이터베이스 시스템(MS Excel, Microsoft, Inc)을 통하여 처리되었다. 각 유전자형 플레이트 상의 모든 양성 대조군은 일관성에 대해 평가되었다. 양성 마커는 하디-바인버그(Hardy-Weinberg) 평형으로부터 편차에 대해 시험하였다. 콜 레이트는 98%를 초과하였다.

통계적 분석

[0046] SNP는 하디-와인버그 평형으로부터 편차에 대해 평가하였다. 소프트웨어 프로그램 StatXact⁶⁸를 이용하여 동일 유전자형 빈도에 대한 환자군-대조군을 비교하기 위하여 피어슨 카이-스퀘어 시험을 이용하였다. 결합의 세기를 평가하기 위하여, SAS로부터의 로지스틱 회귀 모델을 이용하여 오즈비(odds ratio)를 평가하였다. 일반적 선형 모델 (GLM) 및 공분산의 분석(ANCOVA)을 이용하여 FOXO3A 유전자형에 의한 건강한 연구 지원자의 비율을 비교하였다. 환자군 및 대조군에서 노화 표현형의 분석을 위하여, 비례하는 변수에 대한 연속적 변수 및 카이 스퀘어의 분포를 비교하기 위하여 스투덴트 t 시험(Student's t test)을 실시하였다.

결과

[0048] 1991-1993 조사에서 HHP/HAAS 연구 집단의 기본적 특징은 표 1에 제시되어 있다. 평균 연령은 77.9세이고 또 집단의 100%는 남성이고 일본계였다. 생물학적 특징, 일반적 유전자 상태, 유병률 및 기능적 상태를 제시한다.

표 1**1991-93**에서 **HHP/HAS** 코호트 (**n=3,741**)의 기본 특징

기본 조사에서 변수 (1991-93)	평균 ± SD	최소 - 최대
생물학적 특징		
연령 (y)	77.88 ± 4.69	71 - 93
체질량 지수 (BMI) kg/m ²	23.43 ± 3.16	12.25 - 39.34
허리/엉덩이 비율	0.94 ± 0.06	0.73 - 1.27
전체 콜레스테롤 (mg/dl)*	189.73 ± 33.16	81 - 382
트리글리세리드 레벨 (mg/dl)*	148.96 ± 93.85	32 - 1369
HDL (mg/dl)*	50.94 ± 13.36	20 - 129
글루코오스 (mg/dl)*	113.03 ± 29.4	44 - 399
인슐린 (mIU/L)*	16.82 ± 32.48	1.5 - 1164
일반적 건강 상태		
자가-보고된 "불량한" 건강 (%)	32.88	--
질병 상황		
CHD (%)	19.38	--
증풍 (%)	4.73	--
암 (%)	13.84	--
당뇨병 (%)	58.11	--
신체적 및 인지 기능		
하체 (보행 어려움) (%)	20.47	--
상체 (그립 강도, kg)	30.09 ± 6.88	0 - 55
인지 점수 (CASI)	82.24 ± 16.37	0-100

* 공복 값

[0049]

상기 1991-93 기본 집단으로부터, 우리는 2007년 경에, 95세 이상까지 생존한 모든 지원자를 "장수" 환자군으로 선택하였다(n=213). 우리는 81세 이전에 죽은 모든 지원자를 "평균" 생존 대조군으로 선택하였다(n=402). 환자군 및 대조군의 기본적 특징은 표 2에 나타낸다. 생물학적 특징 면에서, 장수 환자군은 더 늙었고, 더 흐리호리했고(허리:엉덩이 비율이 더 낮음), 더 낮은 트리글리세리드(경계선), 더 낮은 글루코오스, 더 낮은 인슐린 레벨을 가졌고 또 기본 조사에서 FOXO3A3 대립유전자의 높은 유병률을 가졌다. 상기 환자군은 또한 자신이 평가한 건강이 더 우수했고 심혈관 질병(CHD 및 증풍) 및 암의 유병률도 더 낮았다. 기능적으로 이들은 더 잘 걸을 수 있었지만 악력은 더 낮았다. 인지 점수에서는 현저한 차이가 없었다.

[0050]

표 2

생물학적 특징 [†]	기본 조사(1991-93)에서 변수		평균 생존 표현형 (평균 도달 연령 78.5세)		장수 표현형 (평균 도달 연령 97.9 세)*	
	평균 \pm SD	최소-최대	평균 \pm SD	최소 - 최대	P†	
기본 조사 시 연령 (y)						
	74.63 \pm 2.05	71 - 79	85.62 \pm 3.12	80 - 93	<.0001	
체질량 지수 (BMI) kg/m ²	23.4 \pm 3.17	15.89 - 32.33	23.0 \pm 2.91	15.4 - 31.1	0.1272	
	0.95 \pm 0.06	0.78 - 1.15	0.93 \pm 0.06	0.73 - 1.07	0.0008	
혈액/영양이 비율 (mg/dl)	187.96 \pm 34.6	98 - 303	185.36 \pm 32.16	95 - 304	0.3680	
HDL (mg/dl)	50.82 \pm 14.17	21 - 129	51.29 \pm 13.54	27 - 100	0.6911	
전체 콜레스테롤 (mg/dl)	154.72 \pm 118.72	46 - 1369	140.32 \pm 82.23	38 - 649	0.1178	
트리글리세리드 §	4.88 \pm 0.51	3.83 - 7.22	4.81 \pm 0.50	3.64 - 6.48	0.0965	
글루코오스 (mg/dl)	117.83 \pm 35.9	69 - 323	108.98 \pm 22.55	77 - 298	0.0012	
인슐린 (mIU/L)	25.54 \pm 82.89	3.3 - 1164	13.8 \pm 11.39	1.5 - 104	0.0421	
로그 인슐린 §	2.69 \pm 0.74	1.19 - 7.06	2.44 \pm 0.58	0.41 - 4.64	<0.0001	
FOXO3A3 MAF (rs2802292)	0.255	--	0.371	--	<0.0001	
일반적 건강 상태						
지가 평가된 "불충분" 건강 (%)	41.92	--	31.07	--	0.0163	

[0051]

[0052]

표 2(계속)

유병률		기본 특징 (계속)			
CHD (%)	26.37	--	7.55	--	<0.0001
증명 (%)	7.46	--	3.3	--	0.0394
합 (%)	20.15	--	13.68	--	0.0468
당뇨병 (%)	60.55	--	59.81	--	0.8587
신체적/인지 기능					
체중 (보행 어려움)	30.59	--	16.83	--	0.0002
성별 (여성)	29.85 ± 7.54	0~47	26.37 ± 5.53	8~45	<0.0001
인지 첨수 (CASI) [¶]	80.96 ± 19.48	0~100	78.54 ± 13.85	12~98	0.1088

[0053]

[0054]

*환자군(장수 표현형)은 2007년 8월경 95세에 도달했던 DNA 샘플(생존 및 치사)을 가진 모든 HHP/HAAAS 지원자로 이루어졌다; Gp 1: 생존, n=37, 평균 연령 98.7세, 97-106세 범위; Gp 2: 사망, n=166, 평균 사망 연령 97.5세, 95-106세 범위); [†]p 연속적 변수 및 카테고리 변수에 대한 카이 스퀘어에 대한 스튜던트 t 시험으로부터 얻은 값; [‡] 공복값; [§] 정상적으로 분포되지 않은 변수에 대해 실시된 로그 변환; [¶] CASI (인지능력 스 크리닝 인스트루먼트)⁴³

[0055]

5개 유전자를 조사하였다(ADIPOQ, FOXO1A, FOXO3A, SIRT1, 및 COQ7). 환자군 및 대조군에 대한 마이너 대립유전자 빈도 및 기타 관련된 유전자 정보는 표 3에 나타낸다. 그러나, FOXO3A 유전자형 만은 p <0.05의 초기 컷오프값을 이용한 장수와 관련이 있었다.

표 3

인간의 첨수에 대한 후보 유전자 및 환자군 및 대조군에서 MAF 바이너리 대립유전자 빈도(MAF)						
유전자 명칭	기호	SNP ID#	변수 명칭	환자군	대조군	P*
† Adipo, CIQ, CDC	ADIPOQ	rs1063359	ADIPOQ_1	0.297	0.263	0.20
		rs182052	ADIPOQ_2	0.455	0.493	0.22
		rs266729	ADIPOQ_3	0.195	0.239	0.08
<hr/>						
포크헤드 박스 O1A	FOXO1A	rs2755209	FOXO1A1	0.272	0.291	0.48
		rs2721069	FOXO1A2	0.293	0.307	0.62
		rs2755213	FOXO1A3	0.350	0.358	0.77
<hr/>						
포크헤드 박스 O3A	FOXO3A	rs2764264	FOXO3A1	0.347	0.248	0.0002
		rs13217795	FOXO3A2	0.340	0.248	0.0006
		rs2802292	FOXO3A3	0.371	0.255	<0.0001
<hr/>						
Sirtuin 1	SIRT1	rs7069102	SIRT1_1	0.185	0.181	0.84
		rs10823112	SIRT1_2	0.337	0.360	0.44
		rs1885472	SIRT1_3	0.188	0.179	0.71
<hr/>						
Coenzyme Q7	COQ7	rs8051232	COQ7_1	0.147	0.150	0.90
		rs11074359	COQ7_2	0.153	0.171	0.43
		rs7192898	COQ7_3	0.162	0.170	0.73

* 카이-스퀘어 시험에 의한 환자군 및 대조군 사이의 MAF 비교; † Adipocyte, CIQ, 및 콜라겐 도메인 함유.

[0056]

[0057]

변종 "rs2764264"는 이전에는 "rs12524491"로 지칭되었다. 서열번호 2로 확인된 SNP rs2764264("FOXO3A1")의 DNA 서열은 다음과 같다:

TATTCACTGGCCAGGACCTCCAATACATTGTTGAATAGCAGTGGTCAAAGCAGA
 GATCCTTACCATTTCTCATCTAAGGGAAAGCATTCACTCTTCACTGTTAAG
 TATCATGTTAGGTGTAAGTTGTCACATATTCCTTATCAGGCTGAGGTAGTTT
 CTCTATTCCTATGTTGAGTAGTTTGTAAATTATGAGTGGATATTGAA
 TTTGTCAGATGCTTCTCACCTGTTGAGAAGATCAGATGGTTTCTTTTC
 AGTCTTTAATATGATGAAATACATTGACTGATTGCAATGTTAACCAACCTTA
 CATTCTGGATAAATCCCACCTGGTCTGATATGTTACCATGAGATTCAAGTAG
 CTAAAAATTTGTTAAGGATTTGTCATGAGGAATATTGATCTATAC
 ATTCTTATAATATCTTGCTTTGGTACCGGTAATGGTGGTCTTATAA
 (C/T)

ATGAGTTGGA AAGTGTCCC TGTTCTGCTC TGGTAGCACT GTAGTATCTC
 TTCCTAAATGTTGGTAGAATTCAACGGCAGTTAACCCATCAGAGCCTGGAGTT
 TTTTGTGTGAGGAAATGTTAACTGCTAATTCAATTATTCATAGATACAAT
 GCTGTTGGCTGTCTGTTCTTGAATGAGTTGGTAGTCTGTCTTTAAG
 GAATTGCCATTATTAAAGTGTCTAATTATGGGCATAAAGTCATTATAAT
 GTTCTCTTATTATCCTTTAATAGATATATCATCTGTAGTGATTCATTTCATTCC
 TGATGTTGATAATTGTCCTAACCTCCCTCCCCCTCATTCTTATCTGTTAGTGC
 CTTGCAATTTCATTGATCTTAAACGAATTAACATTGCTTCACTGACTTTCC
 CCCGTTACTTTATGTTTACTCCATTGATTTTTCTCTTTAATCTTTA
 [0058]

서열번호 3으로 확인된 SNP rs13217795("FOX03A2")의 DNA 서열은 다음과 같다:

CACCACCACCCACTAGACAAATTGCTAACCTTCTGCACCTCAGTTCCCTGA
 CAGGCTTGTAGAAAATAAAATGAGATCAAATTGTCAAGCACAGAGCATTGG
 CCCTGGTAGGCACCACATACATGAATTCTTCAGATTGTAGGTGAAGTAGACTT
 GATTTGGGATTCTCTGTTACCTAGGTGCTGTAGAGGAGACTTGAACCA
 GAATGTGTTATTGTGGTTTGAGTGTGCCTGGACTCTGAGCCAATGAAATTAC
 CAAGTAATGGGGCCCCATGGCATC

(C/T)

CATGACAGGTGGAGAGCCGGCTTCACCTGGATGGACCTGAAATGCCTGCTA
 AGGCCTTGCTCCACCGAGTAGCACACACCCCTATCAGTTGCCCTTCCATCTC
 TTATTCTAGAGACCTAAAGCTACTTGTGGTATATATTTCAGGTTGGAAA
 [0060]

TTGGGCTTTAATTGAAGTTAACCACTGATGAGACTTTAACCTGAGAAC
 ACCTAGATGCTACTTCACATTGCACTGGAAAGCTTACTCCATCTCACTCATGT
 AGGACATTCTTGGTCTCAATGT
 [0061]

[0062]

서열번호 4로 확인된 SNP rs2802292("FOXO3A3")의 DNA 서열은 다음과 같다:

TGAAGCAGGGCATCAGGGAATGGGAGTTGGTGAGGAAATTACATTAACATTAT
 TGAGCACCATTCTCACTATAAACCTGAACGTAAATATTATTATTATTATTATTATT
 ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT
 TGCCTAGACTGGTCTTGAACTCCTGGGCTCAAGCAATCCTCACCTGGCCTCTC
 AAAGTGCCTCTCAAAGGTGTGAGCCACCATGCCAGCCTATCGTTTAATTTC
 TGAAGAAACTGAGGCTAACAGCTGGTCTGGCCATGACTGTTAGTTGAGTGAATATA
 TGGTGGACCAAGTTGACCAAGCTCACCCAGCTTGAGTGACAGAGTGAATATA
 AACCCAGCCTGCTCACTCCATTCTAGTTCTCACCTTACCCAGGGTCTGTGTT
 GCTCACACAAGAGCTCAGGGCTGGGA

(G/T)

AAGCCTCTGTGTGACAGATGAAGGGTCTGCTGCTCTAGGGAAAGAATCGGT
 CCCAAATTGCTCAAGGGAGTAAGGTGGTTCTGTTGAGGAGCATCAGCTAGGGGG
 ATTGATGGGAATAGGTGTCAGGCAGCCAGTGGAAATTTGTGTGCCACCTGTGG
 CACATGTATTATGCAAATTGCAAAATATATATA

[0063]

[0064]

"GCC 일배체형"은 SNP rs2764264, rs 13217795, 및 rs2802292를 사용하여 기재될 수 있고 또 다음 유전자형의 조합을 함유하는 대립유전자이다:

rs2764264	rs13217795	rs2802292
"C"	"C"	"G"

[0065]

[0066]

염색체의 상부(유전자 지도 상의 낮은 뉴클레오티드 위치)에서부터 하부(유전자 지도 상의 높은 뉴클레오티드 위치)까지의 이들 변종을 보면 "GCC 일배체형"은 NCBI 명명법에 따라 SNP rs2802292, rs2764264, 및 rs13217795을 이용하여 기재되며, 또 하기 유전자형의 조합을 함유하는 대립유전자이다:

SNP ID #	rs2802292	rs2764264	rs13217795
표 3으로부터 SNP 번수 명칭	FOXO3A3	FOXO3A1	FOXO3A2
염색체 6 뉴클레오티드 위치	109015211	109041154	109080791
SNP 대립유전자	"G"	"C"	"C"

[0067]

[0068]

상기 데이터는 다음으로부터 얻었다:

[0069]

단일 뉴클레오티드 다형성의 데이터베이스(dbSNP). Bethesda(MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: 129, NCBI genome build 36.3). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>로부터 입수가능⁷⁰

[0070]

환자군 및 대조군 사이에서 FOXO3 A3의 유전자형 빈도를 비교하는 조사는 피어슨의 카이-스퀘어 통계의 순열분포(permuation distribution)를 이용하여 0.00009의 정확한 p값에 의한 매우 유의한 차이를 밝혀내었다. 이들 결과를 표 4에 나타낸다. 상기 연구(표 3)에서 각 대립유전자 내에 3개 SNP를 갖는 5개 부위가 존재하였고 다중 대조를 위한 본페로니(Bonferroni) 조절은 $15 \times 0.00009 = 0.00135$ 의 수정된 p값을 초래하였다. FOXO3A의 3개 SNP 사이의 높은 연관 LD로 인하여, 우리는 FOXO3A3 SNP(rs2802292)만을 더 조사하였다. 환자군 및 대조군 사이의 FOXO3A3에 대한 동형접합 마이너 대 동형접합 메이저 대립유전자에 대한 오즈비(OR)는 2.75(95% CI: 1.51-5.02, p=0.0007)이었고, 또 환자군 및 대조군 사이의 이형접합 대 동형접합 메이저 대립유전자에 대한 OR은 1.91이었다(95% CI: 1.34-2.72, p=0.0003). 이들 결과는 장수에 대한 부가적 효과를 제시한다.

표 4

환자군-대조군 상태에 의한 FOXO 3A3 유전형

	FOXO 3A3 유전형 (rs 2802292)		
환자군-대조군 상태	TT	TG	GG
평균 생존 표현형*	223 (55%)	153 (38%)	26 (6%)
장수 표현형†	81 (38%)	106 (50 %)	26 (12 %)
피어슨 정화 시험에 대한 p값‡			0.000091
본페로니 조절 후의 p값			0.00135

[0071]

[0072] * n=402의 "평균 생존"한 검체의 인원수 및 % 감소된 대조군 (평균 도달연령 78.5세)

[0073] † n=213의 "장수" 환자군의 인원수 및 % (평균 도달연령 97.9세)

[0074] ‡ 환자군 및 대조군에서 유전형 빈도를 비교하는 정확한 피어슨 카이-스퀘어 시험으로부터 얻음

[0075] 젊은 연령에서 장수 표현형에 대해 더욱 잘 이해하기 위하여, 우리는 월콕스 등(2006)으로부터 건강한 생존의 정의를 이용하여 3개의 FOXO3A 유전자형 그룹 각각에 대하여 기본 조사(1991-93)에서 건강한 사람들의 비율을 비교하였다. 차이점은 매우 현저하였다(표 5). 1 이상의 G 대립유전자를 보유한 사람들은 메이저 (TT) 대립유전자에 대한 동형접합인 사람들에 비하여 기본에서 더욱 건강할 것이었다. 마이너 대립유전자에 대한 동형접합의 약 75%는 기본 조사에서 건강하였던 반면에 메이저 대립유전자에 대한 동형접합의 약 57%가 건강하였다. 환자군-대조군 상태에 대해 조절한 후, 차이점은 미미하나 유의하였다. 이것은 장기간 생존(환자군) 및 대조군의 카테고리 내에서 건강 상태와 관련된 대립유전자의 연관성이 존재함을 제시한다.

표 5

기본에서 유전자형 그룹 사이의 건강 상태의 차

	기본에서 % 건강 *				트렌드에 대한 p
	동종접합 메이저	이종접합	동종접합 마이너	조절되지 않음	
FOXO3A1	57.41	69.48	75.51	0.01	0.065
FOXO3A2	57.37	69.35	77.08	0.01	0.035
FOXO3A3	57.89	68.34	75.00	0.02	0.097

[0076]

[0077] * 6개 메이저 만성 질병의 부재로 정의된 "건강함"(CHD; 중풍, 암, PD, COPD 및 치료된 유형 2 DM, 높은 신체 기능(보행가능 1/2 마일) 및 높은 인지 기능(CASI 점수 >74).

[0078] 인슐린 민감성, 장수의 가능한 중간 표현형, 및 유전자형 사이에 관계가 있었는지 여부를 평가하기 위하여, 우리는 공복 인슐린, 글루코오스, HOMA 및 유전자형 사이의 관계를 시험하였다(표 6). 비정상적으로 분포된 변수의 경우, 우리는 정상 분포에 대한 로그 전환을 이용하였다. 인슐린, 로그 인슐린, HOMA 및 유전자형 사이에 상당한 관계가 있었다. G 대립유전자에 대한 동종접합은 대조군에서만 현저하게 낮은 인슐린, 로그 인슐린 및 HOMA 점수와 관련이 있었다.

표 6

FOXO3A 유전자에 따른 인슐린 민감성 표현형

	FOXO3A 유전형 (rs 2802292)			P*
	TT	TG	GG	
공복 글루코오스 (mg/dl)				
평균 생존	118.4+34.0	117.4+38.0	115.9+40.1	0.80
장수	108.3+20.7	109.1+23.7	110.5+24.1	0.73
공복 인슐린 (mIU/L)				
평균 생존	23.7+81.2	30.4+91.9	13.2+5.9	0.004
장수	13.5+9.0	14.1+13.4	13.3+9.3	0.77
로그 공복 인슐린 (mIU/L)				
평균 생존	2.68+0.67	2.73+0.85	2.47+0.48	0.03
장수	2.45+0.55	2.43+0.61	2.44+0.52	0.99
HOMA IR 점수				
평균 생존	9.1+53.0	10.0+32.2	3.8+2.4	0.03
장수	3.7+2.8	4.0+4.3	3.6+2.2	0.55

[0079]

[0080] * 환자군 및 대조군 내에서 GG 유전자형 및 기타 군 사이의 평균 값을 비교하는 스투덴트 t-시험에 대한 p값

[0081] 우리는 연구 지원자의 몇 개의 만성 질병의 생애 유병률과 FOXO3A 유전자형 사이의 관계에 대해 시험하였다(표 7).

표 7

CHD	유병률 (%)	FOXO3A3 유전자형						FOXO3A3 유전자형							
		FOXO3A3 유전자형			FOXO3A3 유전자형			TT			TG			GG	
		TT	TG	GG	p										p
평균 생존															
장수	32.3	18.3	23.1	0.010		평균 생존	22.4	18.3	11.5	0.326					
	7.4	7.6	7.7	0.998		장수	17.3	12.4	7.7	0.400					
전체	25.7	14.0	15.4	0.002		전체	21.1	15.9	9.6	0.075					
증풍 유병률 (%)															
평균 생존	6.7	8.5	7.7	0.813		평균 생존	60.6	62.3	50.0	0.498					
장수	4.9	1.9	3.8	0.510		장수	57.5	64.1	50.0	0.368					
전체	6.3	5.8	5.8	0.974		전체	59.8	63.0	50.0	0.212					

[0082]

[0083] 평균 생존 대조군($n= 402$), 장수 환자군($n = 213$) 및 모든 검체 ($n = 615$)에 대하여 다른 유전형에 대한 GG 유전형의 빈도를 비교하는 카이-스퀘어 시험을 기본한 p값

[0084]

CHD에 대한 G 대립유전자에 대한 동형접합 및 암 및 인지 기능에 대한 경계 관계에 대해 유의한 보호 관계가 밝혀졌다. 마지막으로, 우리는 조합된 모든 지원자(환자군 및 대조군)에서 최대 도달연령에 의해 FOXO3A3 마이너 대립유전자 빈도 (MAF) 분포를 평가하였다. MAF는 초기의 환자군-대조군 분석에 의해 예상되는 바와 같이 연령에 따라 현저하게 증가하였다(표 8).

표 8

최대 도달연령에 의한 유전형 분포

사망시 연령(세) *	N	FOXO3A3 의 MAF
72-74	17	0.21
75-79	277	0.25
80-81	108	0.26
95-99	185	0.37
100-106	28	0.39

* 37 "장수" 환자군은 여전히 생존하였다;

98.7세의 평균 연령 (97-106세 범위)

[0085]

[0086] 5개의 후보 유전자의 분석은 1개 유전자가 가능한 인간 장수 유전자 - 분명히 FOXO3A 면에서 다른 결과는 분명히 구별됨을 나타내었다. 인간 장수에 중요할 수 있는 상기 유전자는 몇 개의 증거에 의해 지지된다. 첫째, 코호트내 환자군-대조군 분석에서, 상기 유전자 내에서 변이는 장수와 강하게 연관이 있었다. 환자군 및 대조군 사이의 FOXO3A3 대립유전자(rs 2802292)에 대한 동형접합 마이너 대 동형접합 메이저에 대한 오즈비(OR)는 2.75 이었고(95% CI: 1.51 - 5.02, p=0.0007), 또 환자군 및 대조군 사이의 이형접합 대 동형접합 메이저에 대한 OR은 1.91이었다 (95% CI: 1.34 - 2.72, p=0.0003). 이들 결과는 장수에 대한 FOXO3A3 G 대립유전자의 부가적 효과를 제시한다(즉, 2 카페의 G 대립유전자는 약 2배의 보호 효과를 전달하였다). 이와 일치하게, 마이너 대립유전자 빈도는 연구 지원자의 연령에 따라 70대로부터 100세대로 현저하게 상승하였다(표 8).

[0087]

둘째, 긴밀한 연관 불균형(LD)에 있는 FOXO3A 유전자에서 평가된 모든 3개 SNP는 장수 표현형과 강한 상관관계가 있다. 이것은 상기 발견이 우연에 의한 것은 아닐 것이라는 것을 나타낸다. 셋째, 1 이상의 마이너 (G) 대립유전자를 보유한 사람들은 메이저 (TT) 대립유전자에 대한 동형접합을 보유한 사람들에 비하여 약 15년 이전의 기본 조사에서 훨씬 더 건강할 가능성이 있었다. 마이너 대립유전자에 대한 동형접합을 갖는 사람의 약 75%는 메이저 (TT) 대립유전자에 대한 동형접합을 갖는 사람의 약 57%만이 건강한 것과 대조적으로 기본 조사에서 건강하였다(표 5).

[0088]

실제로, 기본 조사는 환자군이 평균 11세 더 노령임에도 불구하고 대조군에 비하여 현저하게 더 건강하였음을 제시하였다. 환자군은 현저하게 낮은 나이-관련 질병을 적게 가지며, 즉 CHD, 중풍, 및 암의 유병률이 낮았다. 이들은 또한 자가평가한 건강 레벨이 더 높았고 또 일반적으로 높은 신체 기능을 가졌고, 예컨대 보행의 어려움이 적었다. 흥미롭게도, 대조군에 비하여 십여 년 더 고령임에도 불구하고, 장수 환자군은 유사한 인지 기능 수준이었다. 이는 개인들이 인생의 후반기까지 주요한 임상 질환과 장애를 자연시키거나 피하는 "건강한 노화" 표현형의 존재를 지지해준다. 환자군에서 우리가 관찰한 건강한 노화 표현형은 나이 매칭된 출생 코호트⁴⁶⁻⁴⁸ 와 비교할 때 더 젊은 나이에서 100세 사람 및 100세 사람의 자손에서 보고된 건강한 노화 표현형과 유사하다.⁴⁹ 장수 환자군은 또한 젊은 나이에서 더 높은 인슐린 민감성, 더 낮은 허리 대 엉덩이 비율, 더 낮은 글루코오스 레벨, 더 낮은 인슐린 레벨 및 더 낮은 HOMA 값을 나타낸 대사 특징을 가졌다(표 2 및 6). 몇 개의 표현형은 FOXO3A 유전자형에서 변이와 연관이 있었다.

[0089]

놀랍게도, 환자군 및 대조군 사이에는 당뇨병 유병률에서 현저한 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 환자군은 대조군에 비하여 10여년 더 노령이었기 때문에 또 당뇨병은 나이에 따라 현저하게 증가하는 경향이 있기 때문에, 당뇨병의 유병률은 그다지 현저히 상이하지 않음은 언급할 가치가 있다. 실제로, 환자군 및 대조군 모두는 비교적 낮은 BMI에도 불구하고 높은 당뇨병 유병률(60% 근처)을 나타내었다. 2형 당뇨병이 비교적 낮은 BMI인 일본인에서 더욱 빈번한 경향이 있는지는 완전히 밝혀져 있지 않다.⁵⁰ 그러나, 백인이나 흑인에 비하여 낮은 BMI인 아시아인에서 더 높은 내장지방을 갖는 일본인(및 일부 다른 아시아인)에서 대사성 차이가 있을 수 있

다.^{51, 52} 실제로, 일본의 국가 가이드라인은 이러한 집단 차이를 반영하고 있고 또 BMI 25인 일본인을 비만으로 간주하고 있다.⁵³ HHP/HAS 코호트에서 높은 당뇨병 유병률에 기여하는 다른 인자는 모든 지원자들이 몇 가지 다른 임상 시험에 의해 당뇨병 시험을 받았고 또 몇 가지 사전 조사가 검출을 더욱 가능성있게 만든다는 사실을 포함한다.

[0090] FOXO3A 유전자형은 혈장 인슐린 농도뿐만 아니라 CHD, 암 및 2형 당뇨병 유병률과 현저하게 연관되어 있었다. 이것은 세포 증식, 세포자살 및 대사를 비롯한 다양한 신체 기능에 대한 인슐린 및 인슐린-유사 성장인자의 효과의 매개체로서 FOXO에 대한 공지 역할과 일치한다.^{17, 54} 씨. 엘레간스 및 초파리에서 유전자 연구는 FOXO 단백질이 대사와 장수를 조절하는 인슐린-유사 신호전달의 옛날 표적이라는 것을 나타낸다. 포유동물 세포에서 추가의 작업은 FOXO 단백질이 단백질 키나아제의 표적이고, 세포 주기 진행에 영향을 주며 또 시험관내에서 산화적 스트레스에 대한 내성을 조절함을 나타내었다.⁵⁴ 생체내 연구는 FOXO가 인슐린에 반응하여 간 글루코오스 출력을 조절하고 또 기타 대사 작용을 매개함을 나타내었다.⁵⁴ 이것은 FOXO 단백질이 대사시 인슐린 효과를 매개하고 또 인간의 장수에 영향을 줄 수 있는 증거를 강화시킨다.

[0091] 전체적으로, 증거 전체는 인간 건강, 노화 및 장수에서 FOXO3A의 역할을 지지한다. 인슐린 민감성, CHD, 암, 2형 당뇨병 및 장수를 비롯한 다양한 노화 표현형에 대한 FOXO의 연관성은 IIS 경로에서 "문지기" 역할을 예시한다. FOXO3A가 인간 노화에 영향을 줄 수 있는 중요한 하류 메카니즘은 우리가 어떻게 노화되는가에 대한 오래된 이론인 산화적 스트레스의 변형을 통하고 있지만, 우리는 현재 연구에서 이것에 대한 직접적인 증거를 갖지 않는다. 그러나, FOXO 유전자는 세포를 산화적 스트레스로부터 보호하는 씨. 엘레간스 DAF-16의 가장 가까운 인간 상동체이며, 이것은 인간 노화의 변형에 대한 가능한 작용 메카니즘이다. 씨. 엘레간스에서, DAF-16은 초산화물을 손상이 덜한 과산화수소로 전환시키고 또 다른 "항노화" 효과 중에서 자유 라디칼⁵⁵에 대한 강력한 내생 보호 인자인 SOD2(manganese superoxide dismutase)의 발현을 증가시킨다. 생체내 연구는 DNA, 단백질 및 기타 조직에서 산화적 병반은 나이에 따라 축적되며 또 설치류⁵⁶ 및 인간⁵⁷에 대한 칼로리 제한된 식사공급(강력한 인슐린 증감제)은 이러한 손상을 감소시킴을 보여준다.

[0092] FOXO는 분명히 장수와 연관이 있었지만 우리는 환자군-대조군에서 인슐린 민감성에 대한 유전자형의 강한 효과를 관찰하지 못했다. 그러나, GG 유전자형은 환자군 및 대조군 모두에서 유사하게 낮은 혈장 인슐린 농도를 나타내었고, 양쪽 그룹에서 인슐린 레벨에 대한 유전자형의 조절 효과와 일치하였다. 환자군은 이들의 유전자형에 관계없이 더 큰 인슐린 민감성을 나타내었기 때문에 이들은 FOXO 이외에 인슐린 민감성에 대한 다수의 메카니즘을 갖는 것으로 추정할 수 있다. 이것은 대부분의 장수 유전자는 중간 정도 또는 작은 효과 크기를 갖는다는 가설과 일치할 것이다. 작은 샘플 크기는 환자군에서 차이를 검출하는 우리의 능력을 제한할 수 있다. 한편, IRS-1⁵⁸ 또는 IRS-2²³에서 돌연변이를 갖는 장수 마우스는 실질적으로 인슐린 내성이어서, 인슐린 민감성은 더 큰 장수를 부여할 수 있는 IIS 경로에서 돌연변이에 대한 필요 조건이 아니다.

[0093] 그러나, 씨. 엘레간스에서, 그 자체가 수명에 대하여 작은 효과를 가질 수 있는 몇 개의 유전자는 "마스터 유전자" DAF-16를 조절하는 전사에 의해 영향을 받을 수 있다는 것은 흥미로운 것이다.⁵⁹ 검출하기 곤란할 수 있는 FOXO3A에서 미차는 DNA 결합, 단백질- 단백질 상호작용, 세포 주기 진행, 세포자살 및 대사에 관련된 몇 개의 하류 유전자를 이론적으로 변형시킬 수 있다. 이렇게 하여, FOXO3A에 의한 작은 변형 효과는 노화 표현형 및 장수에 대하여 더 크고, 부가적인 하류 효과를 가질 수 있다.

[0094] 인간 노화 및 장수에서 인슐린-신호전달의 역할을 지지하는 증거가 축적되기 시작하고 있지만, 이들 효과를 매개할 수 있는 유전자들은 알려져 있지 않다. 이전의 연구는 몇 개의 노화 표현형과 관련된 이탈리아인³⁶, 일본인,^{37, 42} 네덜란드인⁶⁰ 및 중동부유럽 유대인³⁸의 장수자에서 인슐린-IGF-1 신호전달 경로로부터 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)의 과대 또는 과소 표현이 발견되었다. 이들 발견의 일부는 작은 효과 크기 및 미미한 통계적 유의성에 의해 제한되었지만, 서(Suh) 등³⁸에 의한 연구는 또한 100세 사람과 같은 일부 장수인에서는 IGF-I 수용체에 기능적으로 중요한 돌연변이가 존재함을 나타내었다.

[0095] 지금까지, 인간에서 노화의 FOXO 유전자 및 표현형의 연구는 거의 없었다. 최근의 2개 연구는 FOXO 유전자가 더 조사할 가치가 있다는 것을 보여준다. 첫째, 노령 네덜란드 남성 및 여성의 종적 연구는 FOXO1A 일배체형이 4년 생존을 예측하고 또 FOXO3A 일배체형은 중풍의 우려를 예측함을 발견하였다.³⁹ 둘째, 광범위 게놈 관련 분석

에서 프라밍햄(Framingham) 연구에 의해 FOXO3A SNP가 여성($p=0.00003$)의 자연적 폐경에서 나이와 강하게 관련됨이 밝혀졌다. 그러나, 네덜란드인에서 발견된 것은 다수의 대조로 해석하고 양쪽 연구가 복제를 필요로 할 때 통계적으로 유의하지 않았다. 현재의 연구는 지지되며 또 인간 장수 및 인슐린 민감성에 대한 FOXO3A의 연관성을 연장한다.

[0096] 현재 연구의 주요 이점 중의 하나는 코호트내 환자군-대조군 디자인을 이용하는 것이다. 이 연구 디자인은 종적으로 수집된 데이터를 이용하여 현재 진행중인 코호트 연구로부터 환자군 및 대조군을 선택한다. 따라서, 관심을 두고 있는 몇 개의 표현형(예를 들어 유병률, 건강 상태, 기능)은 지원자가 더 젊을 때 직접적 임상 조사에 의해 얻으므로, 데이터는 리콜 바이어스(recall bias)에 대한 영향을 덜 받는다. 과거 일을 기억하는데 어려움으로 인하여 연구 결과의 정확도가 덜한 리콜 바이어스는 더 나이가 많은 어른에 대하여는 현저한 도전일 수 있다.

[0097] 실제로, 더 느린 노화를 나타내는 표현형에 대한 증거를 발견하였던 100세 사람과 같은 예외적 생존자의 연구는 상당한 리콜 바이어스로 인하여 고통을 받을 수 있다. 즉, 더 나이 많은 지원자는 그들의 과거의 의학 이력과 그들의 과거 기능 상태를 정확하게 기억하지 못할 수 있다. 그러나, 현재 연구에서, 주요 질병은 이환률과 사망률에 의해 판별되며 또 신체적 기능 및 인지 기능의 성능을 기본한 측정은 자가 보고를 보충하기 위해 이용되었고 또 이러한 건강한 노화 표현형에 대한 증거가 밝혀졌다. 이것은 이전의 과거 작업에 대한 유망한 지원을 준다.

[0098] 상기 연구에는 몇 개의 다른 힘이 존재한다. 첫째, 분석에 선택된 후보 유전자는 가설 주도 기준을 기본으로 한 과거 경험을 기초로 선택하였다. 즉, 다양한 방법, 특히 녹아웃을 적용하는 노화의 모델 생물의 연구는 IIS 경로가 노화 및 장수에 대해 중요함을 나타내었다. 많은 기능이 진화적으로 보존되는 것으로 보인다. 둘째, 상기 발견은 강하고, 매우 현저하며 또 FOXO3A 유전자에서 몇 개의 인접 SNP를 포함한다. 셋째, 상기 발견은 생물학적으로 가능하며 또 노화의 동물 모델에서 이전의 발견을 지지하며 또한 제한된 이전의 인간 연구를 지지한다. 넷째, 장수에 대한 환자군-대조군 연관은 오랜 기간의 추적 동안 높은 이벤트 레이트(사망)를 갖는 코호트내 환자군-대조군 분석을 이용하여 검출하였다. 다섯째, HHP 코호트는 매우 균일한 코호트이며 또 우리의 연구 지원자에서는 어떠한 집단 계층도 검출되지 않았다.

[0099] 가능한 결점은 환자군 및 대조군이 11년의 평균 나이 차이를 가지기 때문에, 출생 코호트를 혼동인자로서 배제할 수 없다. 그러나 지원자 사이에 출생 연도에서 최대 19년 차이가 존재하였기 때문에 있음직하지 않다. 또한 서브분석에 의하면 환자군과 대조군 사이의 교육 및 직업(데이터는 도시되지 않음)에서 차이는 어떠한 차이도 나타내지 않았다. 또한, 95세 이상까지 살 것처럼 보였던 지원자는 기본조사에서 더 늙은 지원자였으므로 장수 표현형을 얻는다. 대부분의 코호트 효과는 더 젊은 코호트에 대한 건강 이점을 나타낸다. 다른 가능한 결점은 상기 연구가 1개의 집단에서만 실시되어 그의 일반화를 평가하기 위해서는 다른 집단에서 반복되어야 하는 점이다.

[0100] 요컨대, 우리는 FOXO3A 유전자내에서 공통되는 천연 유전자 변이는 인간 장수와 강하게 관련있다는 것을 발견하였다. 보호성 대립유전자의 유병률은 나이에 따라서 현저하게 증가하였다. 장수 환자군은 암 및 심혈관 질환의 더 낮은 유병률, 더 우수한 자가보고된 건강, 높은 기능 상태를 비롯한 건강한 노화와 관련된 몇 개의 부가적인 표현형을 보유할 것으로 보이며 또 이들은 기본 조사에서 더 큰 인슐린 민감성을 제시하는 몇 개의 생물학적 마커를 나타내었다. 마지막으로, FOXO3A 유전자 내의 특정 변종은 인슐린 민감성, 장수의 가상의 즉각적인 표현형을 비롯한 몇 개의 이들 노화 표현형과도 관련되었다.

B. 환자(인간 및 비-인간)에서 대립유전자의 검출

[0102] 다형성 위치에서 특정 대립유전자를 검출하는 다수의 방법이 존재한다. 특정 다형성 대립유전자를 검출하기 위하여 바람직한 방법은 부분적으로 다형성의 분자 성질에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 다형성 위치의 다양한 대립유전자 형태는 DNA의 단일 염기쌍이 상이할 수 있다. 이러한 단일 뉴클레오티드 다형성(또는 SNP)은 모든 공지된 다형성의 80%를 포함한 유전자 변이에 대한 주요 원인이며, 또 인간 게놈에서 이들의 밀도는 1,000 염기쌍 당 평균 1로 추산된다. SNP는 2개의 상이한 형태에서만 생기는 가장 흔한 양대립유전자(biallele)이다(DNA에서 생기는 상이한 4개의 뉴클레오티드 염기에 상응하는 SNP의 4개 까지의 상이한 형태가 이론적으로 가능하지만). 그럼에도 불구하고, SNP는 다른 다형성에 비하여 돌연변이에 더 적합하여서, 마커 및 미공지 변종 사이의 연관 불균형을 이용하여 질병 유발 돌연변이를 맵핑하는 관련 연구에 적합하게 만든다. 또한, SNP는 전형적으로 2개의 대립유전자만을 갖기 때문에, 이들은 길이 측정보다는 간단한 플러스/마이너스 에세이에 의해 유전자형 구별될 수 있으므로, 자동화에 더 적합하다.

- [0103] 개인에서 특정 단일 뉴클레오티드 다형성 대립유전자의 존재를 검출할 수 있는 다양한 방법이 가능하다. 이 분야에서 진보는 정확하고, 용이하며 저렴한 대규모 SNP 유전자형을 제공하였다. 가장 최근에, 예를 들어, 동적 대립유전자-특이적 하이브리다이제이션(DASH), 마이크로플레이트 어레이 대각선 겔 전기영동(MADGE), 파이로서 열결정, 올리고뉴클레오티드-특이적 결찰, TaqMan 시스템뿐만 아니라 Affymetrix SNP 칩과 같은 다양한 DNA "칩" 기술을 비롯한 몇 개의 신규 수법이 기재되어 있다. 이들 방법은 전형적으로 PCR에 의해 표적 유전자 영역의 증폭을 필요로 한다. 침습적 절단에 이은 질량 분광계 또는 고정화된 패드록(paddock) 프로브 및 룰링-씨클 증폭에 의한 소형 시그널 분자의 생성을 기본으로 한 기타 새로운 개발된 방법은 궁극적으로 PCR의 필요성을 제거할 것이다. 특정 단일 뉴클레오티드 다형성을 검출하기 위한 당해 분야에 공지된 몇 개 방법을 이하에 요약한다. 본 발명의 방법은 모든 이용가능한 방법을 포괄하는 것으로 이해된다.
- [0104] 단일 뉴클레오티드 다형성의 분석을 실시하기 위하여 몇 개의 방법이 개발되었다. 일 구체예에서, 단일 염기 다형성은 예를 들어, Mundy, C. R.(미국 특허번호 4,656,127)에서 기재된 바와 같이 특수 엑소뉴클레아제-내성 뉴클레오티드를 사용하는 것에 의해 검출될 수 있다. 상기 방법에 따르면, 다형성 부위에 대하여 바로 3'인 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머는 특정 동물 또는 인간으로부터 얻은 표적 분자에 하이브리다이즈(hybridized)되도록 허용된다. 표적 분자 상의 다형성 부위가 특정 엑소뉴클레아제-내성 뉴클레오티드 유도체에 상보적인 뉴클레오티드를 함유하면, 그 유도체는 하이브리다이즈된 프라이머의 말단에 혼입될 것이다. 이러한 혼입으로 프라이머는 엑소뉴클레아제 내성으로 되므로, 그의 검출이 허용된다. 샘플의 엑소뉴클레아제-내성 유도체의 정체가 알려져 있기 때문에, 프라이머가 엑소뉴클레아제에 대하여 내성으로 되었다는 발견은 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드가 반응에 사용된 뉴클레오티드 유도체의 그것에 상보적이라는 것을 나타낸다. 이 방법은 다량의 이물질 서열 데이터의 결정을 필요로 하지 않는 이점을 갖는다.
- [0105] 본 발명의 다른 구체예에서, 다형성 부위에서 뉴클레오티드 정체를 결정하기 위하여 용액을 기본한 방법이 이용된다. Cohen, D. 등(프랑스 특허 2,650,840호; PCT 출원번호 WO91/02087호). 미국 특허번호 4,656,127호의 문디 방법에서와 같이, 다형성 부위에 대한 바로 3'인 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머가 사용된다. 이 방법은 다형성 부위의 뉴클레오티드에 대한 상보성이면 프라이머의 말단에 혼입될 라벨링된 디데옥시뉴클레오티드를 사용하여 상기 부위의 뉴클레오티드의 정체를 결정한다.
- [0106] Genetic Bit Analysis 또는 GBATM로 공지된 다른 방법은 Goelet, P. 등에 의해 기재되었다(PCT 출원번호 92/15712호). Goelet, P. 등에 의한 방법은 다형성 부위에 대한 3' 서열에 대하여 상보적인 라벨링된 터미네이터 및 프라이머로 혼합물을 사용한다. 혼입된 라벨링된 터미네이터는 평가될 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드에 의해 및 그에 상보적 뉴크레오티드에 의해 결정된다. 코헨 등의 방법(프랑스 특허 2,650,840호; PCT 출원번호 WO91/02087호)과 대조적으로 Goelet, P. 등의 방법은 바람직하게는 이질상(heterogenous phase) 에세이이며, 여기서 프라이머 또는 표적 분자는 고상에 고정된다.
- [0107] 최근, DNA에서 다형성을 예세이하기 위한 몇 개의 프라이머-가이드된 뉴클레오티드 혼입 과정이 기재되었다(Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A.-C. et al., Genomics 8:684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1 :159-164 (1992); Ugazzoli, L. et al., GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208:171-175 (1993). 이들 방법은 이들이 모두 다형성 부위에 있는 염기를 구별하기 위하여 라벨링된 데옥시뉴클레오티드의 혼입에 의존하는 점에서 GBA와 구별된다. 이러한 포맷에서, 신호는 혼입된 데옥시뉴클레오티드의 수에 비례하기 때문에, 동일 뉴클레오티드에서 생기는 다형성은 그의 길이에 비례하는 신호를 초래할 수 있다(Syvanen, A.-C. et al., Amer. J. Hum. genet. 52:46-59 (1993)).
- [0108] 단백질 번역의 조기 종료를 생성하는 돌연변이의 경우, 단백질 절단 시험 (PTT)은 효과적인 진단 방법을 제공한다(Roest, et. al., (1993) Hum. Mol. genet. 2:1719-21; van der Luijt, et. al., (1994) Genomics 20:1-4). PTT의 경우, RNA는 유용한 조직으로부터 단리된 다음 역전사되고 또 목적하는 절편은 PCR에 의해 증폭된다. 역전사 PCR의 산물은 RNA 중합효소 프로모터 및 진핵생물 번역을 개시하기 위한 서열을 함유하는 프라이머를 사용한 코호트내 PCR 증폭용 주형으로서 사용한다. 목적하는 영역의 증폭 후, 프라이머에 혼입된 독특한 모티프(motif)는 PCR 산물의 시험관내에서 순차적 전사 및 번역을 허용한다. 번역산물의 소듐 도데실 세레이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동시, 번역의 조기 종료를 초래하는 돌연변이의 존재하에서 절단된 폴리펩티드 시그널의 출현을 초래한다. 상기 수법의 변형으로, DNA(RNA와 대향되는)는 목적하는 표적 영역이 단일 엑손으로부터 유도될 때 PCR 주형으로서 사용된다.

- [0109] 본 명세서에 기재된 진단에 사용하기 위한 핵산 샘플을 얻기 위하여 임의 세포 유형 또는 조직이 이용될 수 있다. 바람직한 구체예로서, DNA 샘플은 체액으로부터 공지 수법에 의해 (예를 들어 정맥채혈) 얻은 혈액 또는 타액으로부터 얻는다. 다르게는, 핵산 시험은 건조 샘플(예를 들어 모발 또는 피부) 상에서 실시될 수 있다. RNA 또는 단백질을 사용할 때, 이용될 수 있는 세포 또는 조직은 FOXO3A 유전자를 발현해야 한다.
- [0110] 생체조직 검사 또는 절제술로부터 얻은 환자의 조직의 조직 부분(고정 및/또는 냉동)에 대해 직접적으로 진단 과정을 실시하여 핵산 정제는 필요하지 않다. 핵산 시약은 그 자리에 과정에 대한 프로브 및/또는 프라이머로서 사용될 수 있다 (예를 들어, Nuovo, G. J., 1992, PCR *in situ* hybridization: protocols and applications, Raven Press, N. Y. 참조).
- [0111] 1개의 핵산 서열의 검출에 주로 집중한 방법 이외에, 이러한 검출방법으로 프로필을 평가할 수 있다. 펑거프린트 프로필은 차등 표시 과정, 노던 분석 및/또는 RT-PCR을 이용하는 것에 의해 생성될 수 있다.
- [0112] 바람직한 검출 방법은 FOXO3A 일배체형의 적어도 1개 대립유전자 영역과 중첩되고 또 돌연변이 주변 또는 다형성 영역에서 약 5, 10, 20, 25 또는 30개 뉴클레오티드를 갖는 프로브를 사용한 대립유전자 특이적 하이브리다이제이션법이다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 다른 대립유전자 변종에 특이적으로 하이브리다이즈할 수 있는 몇 개의 프로브는 고상 지지체, 예를 들어, "칩" (약 250,000 이하의 올리고뉴클레오티드로 유지될 수 있음) 상에 부착된다. 올리고뉴클레오티드는 리소그래피를 비롯한 다양한 방법에 의해 고체 지지체에 결합될 수 있다. "DNA 프로브 어레이"로도 불리는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이를 칩을 사용한 돌연변이 검출 분석은 예를 들어, Cronin et al. (1996) Human mutation Human Mutation 7:244에 기재되어 있다. 일 구체예에서, 칩은 유전자의 적어도 1개의 다형성 영역의 모든 대립유전자 변종을 포함한다. 고상 지지체는 시험 핵산과 접촉하여 특정 프로브의 하이브리다이제이션이 검출된다. 따라서, 1 이상의 유전자의 수많은 대립유전자 변종의 확인은 간단한 하이브리다이제이션 실험으로 확인될 수 있다.
- [0113] 이를 수법은 분석하기 전에 핵산을 증폭하는 단계를 또한 포함할 수 있다. 증폭 수법은 당업자에게 공지되어 있지만, 특정 대립유전자(ASA)의 클로닝, 중합효소 연쇄반응(PCR), 중합효소 연쇄반응, 리가아제 연쇄반응(LCR), 코호트내 중합효소 연쇄반응, 자가 유지된 서열 복제(Guatelli, J. C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), 전사 증폭 시스템 (Kwoh, D. Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), 및 Q-베타 레플리카아제(Lizardi, P. M. et al., 1988, Bio/Techno로그y 6:1197)에 제한되지 않는다.
- [0114] 증폭 산물은 크기 분석, 크기 분석에 이은 제한 분해, 반응 산물에서 특정의 태깅된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 검출하는 것, 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드(ASO) 하이브리다이제이션, 대립유전자 특이적 5' 엑소뉴클레아제 검출, 서열결정, 하이브리다이제이션, 등을 비롯한 다양한 방식으로 에세이될 수 있다.
- [0115] PCR을 기본한 검출 수단은 복수의 마커의 복수 증폭을 동시에 포함할 수 있다. 예를 들어, 크기에서 증복되지 않고 동시에 분석될 수 있는 PCR 산물을 생성하기 위한 PCR 프라이머를 선택하는 것은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 다르게는, 상이하게 라벨링되어 있으므로 차등적으로 검출될 수 있는 프라이머를 사용하여 상이한 마커를 증폭할 수 있다. 물론, 하이브리다이제이션을 기본한 검출 수단은 1개 샘플에서 다수의 PCR 산물의 차등적 검출을 허용한다. 복수의 마커의 다수 분석을 허용하는 다른 수법도 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0116] 단순한 예시적 구체예로서, 상기 방법은 (i) 환자로부터(타액, 볼에서 면봉으로 채취한 샘플(cheek swab), 혈액 또는 기타 체액 또는 성분으로부터) 얻은 세포 샘플을 수집하는 단계, (ii) 상기 샘플 세포로부터 핵산(예를 들어, 게놈, mRNA 또는 양쪽 모두)을 단리하는 단계, (iii) 상기 핵산 샘플을 대립유전자의 하이브리다이제이션과 증폭이 생기는 조건하에서 FOXO3A 일배체형의 적어도 1개의 대립유전자에 특이적으로 5' 및 3' 하이브리다이즈하는 1 이상의 프라이머와 접촉시키는 단계, 및 (iv) 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 이를 검출 방법은 문자가 매우 작은 숫자로 존재하면 핵산 문자의 검출에 특히 유용하다.
- [0117] 본 에세이의 바람직한 구체예에서, FOXO3A 일배체형의 대립유전자는 제한효소 절단 패턴에서 변화를 주는 것에 의해 확인된다. 예를 들어, 샘플 및 대조 DNA를 단리하고, 증폭(경우에 따라)하며, 1 이상의 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 분해하며, 또 단편 길이는 겔 전기영동에 의해 결정한다.
- [0118] 다른 구체예에서, 당해 분야에 공지된 다수의 서열결정 반응을 이용하여 대립유전자를 직접적으로 서열결정화할 수 있다. 예시적 서열결정화 반응은 맥심 및 길버트((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560) 또는 생거(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463)에 의해 개발된 수법을 기본으로 한 방법을 포함한다. 본 에세이를 실시할 때 다수의 자동화된 서열결정화 과정도 이용될 수 있음을 고려할 수 있다(예를 들어 질량 분광분석에 의한 서열결정화(예를 들어 PCT 공보 WO 94/16101; Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr

36:127-162; and Griffm et al. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159)를 비롯한 Biotechniques (1995) 19:448). 특정 구체예의 경우, 서열결정화 반응에서 핵산 염기의 오직 1개, 2개 또는 3개가 결정될 필요가 있는 것도 당업자에게 분명할 것이다. 예를 들어, 예를 들어, 오직 1개의 핵산이 검출되면 A-트랙 등이 실시될 수 있다.

[0119] 다른 구체예에서, RNA/RNA 또는 RNA/DNA 또는 DNA/DNA 헤테로듀플렉스(heteroduplex)에서 미스매치된 (mismatched) 염기를 검출하기 위하여 절단제(뉴클레아제, 히드록실아민 또는 사산화 오스뮴 및 피페리딘과 같은)로부터 보호를 이용할 수 있다(Myers, et al. (1985) Science 230:1242). 일반적으로, "미스매치 절단" 관련 기술은 야생형 대립유전자를 함유하는 (라벨링된) RNA 또는 DNA를 샘플과 함께 하이브리다이즈하는 것에 의해 형성된 헤테로듀플렉스를 제공하는 것에 의해 개시된다. 대조용 가닥과 샘플 가닥 사이에 염기쌍 미스매치에 기인한 이중가닥 듀플렉스는 듀플렉스의 단가닥 영역을 절단하는 물질에 의해 처리된다. 예를 들어, RNA/DNA 듀플렉스는 RNase로 처리되고 또 DNA/DNA 하이브리드는 S1 뉴클레아제에 의해 처리되어 미스매치된 영역을 효소적으로 분해한다. 다른 구체예에서, DNA/DNA 또는 RNA/DNA 듀플렉스는 미스매치된 영역을 분해하기 위하여 히드록실아민 또는 사산화 오스뮴에 의해 처리되고 또 피페리딘에 의해 처리된다. 미스매치된 영역을 분해한 후, 생성한 물질은 돌연변이 부위를 결정하기 위하여 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 크기에 의해 분리한다. 참고, 예를 들어, Cotton et al (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; and Saleeba et al (1992) Methods Enzymol. 217:286-295. 바람직한 구체예로서, 대조용 DNA 또는 RNA는 검출을 위해 라벨링될 수 있다.

[0120] 또 다른 구체예에서, 미스매치 절단 반응은 이중가닥 DNA에서 미스매치된 염기쌍을 인식하는 1 이상의 단백질을 이용한다(소위 "DNA 미스매치 수선" 효소). 예를 들어, 대장균의 mutY 효소는 G/A 미스매치에서 A를 절단하고 또 HeLa 세포로부터의 티미딘 DNA 글리코실라아제는 G/T 미스매치에서 T를 절단한다(Hsu et al. (1994) Carcinogeneis 15:1657-1662). 예시적 구체예에 따르면, FOXO3A 좌위(locus) 일배체형의 대립유전자를 기본한 프로브는 시험 세포로부터 얻은 cDNA 또는 기타 DNA 산물에 하이브리다이즈한다. 이러한 듀플렉스는 DNA 미스매치 수선 효소에 의해 처리되며, 또 그 절단 산물은 전기영동 등의 수법에 의해 검출될 수 있다. 참조, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 미국 특허번호 5,459,039호.

[0121] 다른 구체예에서, 전기영동 이동도에서 변화는 FOXO3A 좌위 대립유전자를 확인하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 단가닥 형태 다형성(SSCP)을 이용하여 돌연변종과 야생형 핵산 사이의 전기영동 이동도에서 차이를 검출할 수 있다 (Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766, 참조: Cotton (1993) Mutat Res 285:125-144; and Hayashi (1992) genet Anal Tech Appl 9:73-79). 샘플의 단가닥 DNA 단편 및 대조용 FOXO3A 좌위 대립유전자는 변성된 다음 재생될 수 있다. 단가닥 핵산의 이차 구조는 서열에 따라 다양하며, 그에 따른 전기영동 이동도에서 변화는 단일 염기 변화라도 검출할 수 있도록 한다. DNA 단편은 라벨링되거나 또는 라벨링된 프로브에 의해 검출될 수 있다. 에세이의 민감성은 RNA(DNA 보다는)를 사용하는 것에 의해 향상될 수 있고, 이때 이차 구조는 서열에서 변화에 더욱 민감하다. 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 전기영동 이동에서 변화를 기초로 이중가닥 헤테로듀플렉스 분자를 분리하기 위하여 헤테로듀플렉스 분석을 이용한다(Keen et al. (1991) Trends genet 7:5).

[0122] 다른 구체예에서, 변성제(denaturant)의 구배를 함유하는 폴리아크릴아미드 겔에서 대립유전자의 이동은 변성 구배 겔 전기영동(DGGE)을 이용하여 에세이된다 (Myers et al. (1985) Nature 313:495). DGGE가 상기 분석 방법으로서 이용되면, DNA는, 예를 들어 PCR에 의해 고용점의 GC-가 풍부한 DNA의 약 40 bp의 GC 클램프(clamp)를 부가하는 것에 의해, 그것이 완전히 변성되지 않음을 확실히 보여주기 위해 변성될 것이다. 다른 구체예에서, 대조용 및 샘플 DNA의 이동성에서 차이를 확인하기 위하여 변성제 구배 대신에 온도 구배를 이용한다(Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265:12753).

[0123] 대립유전자를 검출하는 다른 수법의 예는 비제한적으로 선택적 올리고뉴클레오티드 하이브리다이제이션, 선택적 증폭, 또는 선택적 프라이머 연장을 포함한다. 예를 들어, 공지된 돌연변이 또는 뉴클레오티드 차이(예를 들어, 대립유전자 변종에서)가 중앙에 존재하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 제조한 다음 완전한 매치가 발견되면 하이브리다이제이션을 허용하는 조건하에서 표적 DNA에 하이브리다이즈된다(Saiki et al. (1986) Nature 324:163); Saiki et al (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230). 이러한 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드 하이브리다이제이션 수법은 올리고뉴클레오티드가 PCR 증폭된 표적 DNA 또는 다수의 상이한 돌연변이에 하이브리다이즈될 때 반응당 1개의 돌연변이 또는 다형성 영역 또는 올리고뉴클레오티드가 하이브리다이징 막에 부착되어 라벨링된 표적 DNA와 하이브리다이즈할 때 다형성 영역을 시험하기 위해 이용될 수 있다.

[0124] 다르게는, 선택적 PCR 증폭에 따라 다른 대립유전자 특이적 증폭 기술은 본 발명과 조합되어 이용될 수 있다.

특이적 증폭을 위한 프라이머로서 사용된 올리고뉴클레오티드는 분자의 중심에서 목적하는 돌연변이 또는 다형성 영역을 갖거나 (증폭이 상이한 하이브리다이제이션에 따라 달라지도록) (Gibbs et al (1989) Nucleic Acids(?) Res. 17:2437-2448) 또는 적절한 조건하에서 1개의 프라이머의 3' 말단에서, 미스매치가 방지되거나 또는 중합효소 연장을 감소시킨다(Prossner (1993) Tibtech 11 :238. 또한 돌연변이 영역에 신규 제한 부위를 도입하여 절단을 기본한 검출을 생성하는 것이 바람직할 수 있다(Gasparini et al (1992) MoI. Cell Probes 6:1). 특정 구체예에서 증폭은 증폭을 위한 Taq 리가아제를 사용하여 실시될 수 있음을 예상할 수 있다(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189). 이러한 경우, 결찰은 5' 서열의 3' 말단에서 완전한 매칭이 있을 때에만 생길 것이므로 증폭의 존재 또는 부재를 보는 것에 의해 특정 부위에서 공지된 돌연변이의 존재를 검출 할 수 있다.

[0125] 다른 구체예에서, 대립유전자 변종의 확인은 예를 들어 미국 특허번호 4,998,617호 및 Landegren, U. et al. ((1988) Science 241 :1077-1080에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 결찰 에세이(OLA)를 이용하여 실시한다. OLA 수법은 표적의 단일 가닥의 인접서열에 하이브리다이즈(hybridize)할 수 있도록 디자인된 2개의 올리고뉴클레오티드를 사용한다. 올리고뉴클레오티드의 하나는 분리 마커에 연결되고, 예를 들어 비오티닐화되고, 나머지 하나는 검출가능하게 라벨링된다. 정확하게 상보적인 서열이 표적 분자에서 발견되면, 상기 올리고뉴클레오티드들은 이들의 말단이 인접하도록 하이브리다이즈되어 결찰 물질을 생성할 것이다. 상기 결찰은 상기 라벨링된 올리고뉴클레오티드가 애비딘 또는 다른 비오틴 리간드를 이용하여 회수되도록 한다. Nickerson, D. A. 등은 PCR 및 OLA의 조합한 핵산 검출 에세이를 기재하였다(Nickerson, D. A. et al.(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-27). 이 방법에서, PCR은 표적 DNA의 지수적 증폭을 달성하기 위하여 사용된 다음 OLA를 사용하여 검출되었다.

[0126] 상기 OLA 방법을 기본으로 한 몇 가지 수법이 개발되었고 또 FOXO3a 좌위 일배체형의 대립유전자를 검출하기 위하여 사용될 수 있었다. 예를 들어, 미국 특허번호 5,593,826호는 3'-아미노기 및 5'-인산화된 올리고뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 포스포르아미데이트 결합을 갖는 콘쥬게이트를 형성하는 OLA를 기재한다. 토베 등(1996)에 의한 Nucleic Acids Res 24: 3728에 기재된 OLA의 다른 변형에서, PCR과 조합된 OLA는 단일 마이크로티터 웰에서 2개의 대립유전자의 분류를 허용한다. 독특한 합텐(hapten), 즉 디곡시게닌 및 플루오레세인을 사용하여 대립유전자 특이적 프라이머 각각을 표식하는 것에 의해, 각 OLA 반응은 상이한 리포터(reporters), 알칼리성 포스파타아제 또는 서양고추냉이 페옥시다아제에 의해 라벨링된 합텐 특이적 항체에 의해 검출될 수 있다. 상기 시스템은 2개의 상이한 색의 생성을 초래하는 고 처리량 포맷을 이용하여 2개의 대립유전자의 검출을 허용한다.

[0127] 본 발명의 다른 구체예는 가까운 장래에 장수 가능성 또는 건강의 필요성 또는 진단 중재술을 검출하기 위한 키트에 관한 것이다. 이 키트는 FOXO3A 좌위 일배체형의 적어도 1개 대립유전자에 대하여 5' 및 3' 하이브리다이즈하는 5' 및 3' 올리고뉴클레오티드를 비롯한 1 이상의 올리고뉴클레오티드를 함유한다. PCR 증폭 올리고뉴클레오티드는 후속 분석에 편리한 크기의 PCR 산물을 생성하기 위하여 25 내지 2500 염기쌍, 바람직하게는 약 100 내지 약 500 염기쌍을 하이브리다이즈해야 한다.

[0128] 특히 바람직한 프라이머는 서열번호 2 내지 9에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이를 유전자에서 인간 다형성의 검출을 위해 적합한 프라이머는 프라이머 서열의 디자인 및 최적화를 위한 당해 기술에 공지된 서열 정보 및 표준 수법을 이용하여 용이하게 디자인될 수 있다. 이러한 프라이머 서열의 최적 디자인은 예를 들어 Primer 2.1, Primer 3 또는 Gene Fisher와 같은 시중에서 입수 가능한 프라이머 셀렉션 프로그램을 이용하는 것에 의해 달성될 수 있다.

[0129] "GCC 일배체형"을 검출하기 위한 간단한 방법의 일례는 상기 단락 [0067]에 기재된 것과 유사하게 목적하는 특정 뉴클레오티드를 증폭하는 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하는 것을 포함한다. 이 방법은 올리고뉴클레오티드 프라이머는 PCR하는 동안 이를 프라이머를 연장하는 DNA 중합효소에 대한 이들의 3' 말단에서 완전하게 어널링(annealed)되어야 한다는 사실을 이용한다. 특정 DNA 포인트 차이만을 매칭하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 디자인하는 것에 의해, T-형 대립유전자와 결합하지 않는 rs2802292 다형성-프라이머에서 그러한 프라이머는 다형성 대립유전자를 구별할 수 있다. 주어진 샘플로부터 생성물 생성의 부족이 단순히 PCR 반응의 부진에 기인한 것이 아니라 에세이를 프로빙하는 "G" 변종의 부족에 기인한 것이라는 것을 확실히 하기 위하여 동일 튜브에서 제어 반응 및 증폭 내성 돌연변이 시스템 반응(ARMS)를 설계할 필요가 있다. 상기 목적에 사용된 올리고뉴클레오티드는 바깥쪽 순방향 ("rs2802292_F0"), 서열번호 5로 확인된 5'-GAAACTGAGGCTAACAGCTGGTCTGGCCC-3'; 바깥쪽 역방향("rs2802292_R0"), 서열번호 6으로 확인된 5'-AGCTGATGCTCCTCAACGAAACCACCTTAC-3'; 역방향 G-특이적 ("rs2802292_RG"), 서열번호 7로 확인된 5'-GGACCCCTTCATCTGTACACAGAGGCTcC-3'; 및 순방향 T-특이적

("rs2802292_FT"), 서열번호 8로 확인된 5'-CTGTTGCTACAAGAGCTCAGGGCTGGGcT-3'를 포함하며, 후자의 2개 프라이머 중의 밑줄 친 마지막 염기는 G-T 차이 부위에서 어닐링되는 반면에, 3' 말단(하부 케이스)으로부터 두번째 염기쌍은 대립유전자 특이성을 최대화하기 위하여 의도적으로 미스매치시킨 것이다. 상기 예시적 예에서 4개 프라이머는 하기 표 9에 나타낸다.

표 9

rs2802292 G-T 다형성의 확인을 위한 프라이머

프라이머	서열
바깥쪽 순방향 “rs2802292_FO”	5'-GAAACTGAGGCTAACAGCTGGTCTGGCCC-3'
바깥쪽 역방향 “rs2802292_RO”	5'-AGCTGATGCTCCTAACGAAACCACCTTAC-3'
역방향 G-특이적 “rs2802292_RG”	5'-GGACCCCTTCATCTGTACACAGAGGCTeC-3'
순방향 T-특이적 “rs2802292_FT”	5'-CTGTTGCTACAAGAGCTCAGGGCTGGGcT-3'

[0130]

(표 9는 서열번호 5-8을 각각 출현 순으로 기재한다)

[0131]

PCR 산물 표시 프라이머 및 G/T 변종(소스 Genbank AL391646.12)의 DNA 서열은 다음과 같다:

```
GAAACTGAGGCTAACAGCTGGTCTGGCCCATGACTGGTTCAGTTGGTATTGGT
GGACCAAGTTGACCAAGCTCACCCAGCTTGAGTGACAGAGTGAATATAAAC
CAGCCTGCTCACTCCATTCCCTAGTTTCTCACCTCTACCAGGGTCT CTGTTGCTCA
CAAGAGCTCAGGGCTGGGA(T/G)AAGCCTCTGTGACAGATGAAGGGGTCTGCTG
CTCTCTAGGGAAGAACCGTCCCCAATTGCTCAAGGGAGTAAGGTGGTTCGTTG
AGGAGCATCAGCT, 서열번호 9로 확인됨
```

[0132]

이러한 방식으로 생성된 암플리콘은 아가로오스 겔에 용해되면, G-형 프라이머는 생성된 186-bp 산물을 갖는 것으로 밝혀질 수 있는 반면에, T-형 프라이머는 132-bp 산물을 생성할 수 있다. 바깥쪽 프라이머는 반응이 정확하게 진행됨을 보장하기 위하여 모든 반응에 존재해야 하는 288-bp 산물을 생성한다.

[0133]

증폭에 대한 대표적인 시약 및 조건은 하기 표 10에 나타낸다.

표 10

rs2802292 G-T 다형성의 확인을 위한 PCR 조건

시약	최종 농도	제조사
AmpliTaq Gold PCR Buffer	1 X	페킨-엘머
dNTPs	200 μ M	페킨-엘머
MgCl ₂	1.5 mM	페킨-엘머
"rs2802292_FO"	1.0 μ M	상기 참조
"rs2802292_FI"	1.0 μ M	상기 참조
"rs2802292_RG"	0.5 μ M	상기 참조
"rs2802292_FT"	0.5 μ M	상기 참조
"AmpliTaq Gold"	0.6 U	페킨-엘머
인간의 DNA	5-10 ng/ μ L	
H ₂ O	부피에 맞춤	

[0136]

[0137] PCR 조건은 94°C에서 15분간 이어, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초간의 30주기, 이어 72°C에서 7분간 최종 배양하는 것을 포함한다. 실시예에 나타낸 결과는 MJ 연구 모델 "PTC200" 씨모사이클러(thermocycler) 상에서 실시하였다.

[0138]

증폭된 단편은 도 1에 도시된 바와 같이 3% 아가로오스 겔에 용해될 수 있다. 도 1은 상기에 기재한 프라이머 및 조건을 이용하여 FOXO3A G/T 변종을 검출하기 위한 ARMS-PCR 에세이의 결과를 나타낸다. 트랙 1은 "T" 대립유전자(132 bp)에 대한 동형접합을 갖는 검체를 나타내고; 트랙 2 및 3은 "G" 대립유전자(186 bp)에 대한 동형접합을 갖는 검체를 나타내며; 또 트랙 4 및 5는 "T" 및 "G" 대립유전자 (132 + 186 bp)에 대한 이형접합을 갖는 검체를 나타내고 또 M은 100 bp DNA 래더(ladder)이다 (Invitrogen, Paisley, United Kingdom).

[0139]

요컨대, 도 2는 에세이의 개략도를 도시한다. 프라이머 "rs2802292_F0" 및 "rs2802292_RO"는 다형성 좌위 rs2802292와 측면(flank)에 접하고 또 모든 경우에서 대조용 288-bp 밴드를 생성해야 한다. 프라이머 "rs2802292_OF" 및 "rs2802292_RG"는 186-bp G-특이 산물을 생성하고 또 프라이머 "rs2802292_FT" 및 "rs2802292_OR"는 132-bp T-특이 산물을 생성한다.

[0140]

키트에 사용하기 위하여, 올리고뉴클레오티드는 다양한 천연 및/또는 합성 조성일 수 있고, 예컨대 합성 올리고뉴클레오티드, 제한 단편, cDNA, 합성 웨티드 혼산(PNA) 등이다. 에세이 키트 및 방법은 또한 에세이에서 확인을 용이하게 하기 위하여 라벨링된 올리고뉴클레오티드를 적용한다. 이용될 수 있는 라벨의 예는 방사능-라벨, 효소, 형광 화합물, 스트렙트애비딘, 애비딘, 비오틴, 자성 잔기, 금속 결합 잔기, 항원 또는 항체 잔기 등을 포함한다.

[0141]

상기 키트는 경우에 따라 DNA 샘플링 수단을 포함할 수 있다. 상기 DNA 샘플링 수단은 당업자에게 잘 공지되어 있지만, 여과지, AmpliCard (University of Sheffield, Sheffield, England S10 2 J F; Tarlow, J W, et al, J of Invest. Dermatol. 103:387-389 (1994)) 등과 같은 기질; DNA 정제 시약, 예컨대 뉴클레온 키트, 용균 완충액, 단백질분해효소 용액 등; PCR 시약, 예컨대 완충액, 열안정성 중합효소, dNTPs 등; 및 대립유전자 검출 수단 예컨대 HinfI 제한효소, 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드, 건조된 혈액으로부터 코호트내 PC용 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함한다.

C. 게놈약학

[0143]

단독 또는 특정 질병 또는 상태에 관여하는 다른 유전자 결합에 대한 정보와 조합된 특정 질병 또는 상태를 발생할 가능성과 관련된 특정 대립유전자의 지식은 "게놈약학"의 목적인 개인의 유전자 프로필에 따른 예방 또는 치료의 맞춤화를 허용한다. 따라서 건강한 노화에 대한 집단 프로필에 대한 개인의 FOXO3A 프로필의 대조는 특

정 환자 또는 환자 집단(즉, 동일한 유전자 변화를 갖는 환자 그룹)에 대해 안전하고 효과적일 것으로 기대되는 약물 또는 기타 치료 처방의 선택 또는 디자인을 허용한다.

[0144] 본 발명에 기재된 특정 대립유전자의 지식은 세포 배양 및 조직 시스템에서 세포 거동의 차이를 조사하고 또 세포 또는 조직 배양 시스템에 부가되는 화학물질 또는 생물학적 물질의 반응을 측정하기 위해 이용될 수 있다. 세포 거동 및 반응에서 차이는 건강을 향상시키거나 또는 수명을 연장하기 위하여 실시될 수 있는 약물 또는 기타 약리학적 물질을 확인하기 위하여 또는 유전자 또는 유전자 발현에 대한 독성 또는 효과에 대하여 새로운 화합물을 시험하기 위하여 유전자형 사이에서 비교될 수 있다.

[0145] 또한, 유전자 프로필을 기본으로하여 최고 임상적 효과를 나타낼 것으로 기대되는 표적 집단에 대한 능력을 다음을 가능하게 할 수 있다: 1) 이미 시판되는 약물의 재평가; 2) 안정성 또는 효능 제한의 결과로서 임상개발이 중단되었던 약물 후보의 구조; 및 3) 후보 치료제 및 더욱 최적인 약물 라벨링을 위해 촉진되고 비용이 덜한 개발(예를 들어 원인이 되는 돌연변이에 대한 다양한 투여량의 효능 측정이 효과적인 투여량을 최적화하는데 유용하기 때문).

[0146] 특정 치료제에 의한 개인의 치료는 장수와 관련된 유전자의 발현 수준을 측정하는 것에 의해 모니터링될 수 있다. 발현 정도는 단백질(예를 들어 FOXO3A), mRNA 및/또는 전사 수준을 결정하는 것에 의해 측정될 수 있다. 검출된 수준에 따라서, 치료제 처방은 유지되거나 조절될 수 있다(투여량이 증가되거나 또는 감소됨). 바람직한 구체예에서, 검체를 약물로 치료하는 효능은 다음 단계를 포함한다: (i) 약물을 투여하기 전에 환자로부터 투여 전 샘플을 얻는 단계; (ii) 투여전 샘플에서 단백질, mRNA 또는 게놈 DNA의 수준 또는 양을 검출하는 단계; (iii) 치료제를 투여한 후 검체로부터 1 이상의 투여 후 샘플을 얻는 단계; (iv) 투여 후 샘플에서 단백질, mRNA 또는 게놈 DNA의 발현 정도 또는 활성을 검출하는 단계; (v) 투여 전 샘플 중의 단백질, mRNA 또는 게놈 DNA의 발현 정도 또는 활성을 투여 후 샘플에서 단백질, mRNA 또는 게놈 DNA의 발현 정도 또는 활성과 비교하는 단계; 및 (vi) 검체에 대한 약물 투여를 변경시키는 단계.

[0147] 처리제가 유해할 수 있는 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시키지 않는 것을 확인하기 위하여 FOXO3A 유전자 이외의 유전자의 발현 정도를 검출하기 위하여 치료제를 투여하기 전 및 후에 검체의 세포를 얻을 수 있다. 이것은 예를 들어 전사 프로파일링 방법을 이용하는 것에 의해 실시할 수 있다. 따라서, 생체내에서 치료제에 노출된 세포로부터 얻은 mRNA와 치료제에 노출되지 않았던 동일 유형의 세포로부터 얻은 mRNA는 역전사되어 다수의 유전자로부터 DNA를 함유하는 칩에 하이브리다이즈되어 세포내에서 처리된 유전자의 발현과 치료제로 처리되지 않은 유전자의 발현을 비교하였다.

[0148] 사망 및 나이 관련된 질병(심장병, 중풍, 암, COPD 또는 기타 만성 폐질환, 파킨슨씨병, 및 당뇨병 및 치매) 및 장래의 신체 기능(보행능력, 인지 기능)의 예측에서 도움을 주는 위험 계산기에 "GCC" 일배체형이 사용될 수 있다. 이 정보는 공중, 의사, 건강관리 회사 및 보험회사에 흥미로울 수 있다. 공지된 위험 계산기의 예는 본 명세서에 참고문헌으로 포함되어 있는 2007년 5월 24일 공개된 펄스의 미국 특허출원 공개 번호 US 2007/0118398 호에 기재된 시스템 및 방법을 포함한다. 위험 계산기는 예를 들어 의사 사무실에 수기(handheld) 또는 온라인으로 제공될 수 있다. 어떤 사람이 얼마나 오래 살 수 있을지 예측하는데 관심을 가진 개인, 건강관리 전문가, 보험 회사, 건강관리 조직은 자신의 유전자형을 컴퓨터에 입력하여 노화 관련된 위험 점수, 남아있는 삶의 건강한 연수, 및 전체 잔존 수명의 연수를 얻는다.

[0149] 특정 점수를 기초로, 의사 또는 건강 전문가는 환자에게 건강한 삶 또는 상기 질병 및 사망에 대한 위험 감소, 특히 FOXO3A 유전자의 보호 벼전을 덜 갖는 사람에게 조언을 할 수 있다. 일부 예시적 선택은 다음을 포함한다: 식품 선택(예를 들어 레드 와인, 콩 제품, 및 FOXO3A 유전자의 활성에 영향을 줄 수 있는 화합물을 함유하는 기타 식품) 또는 체중 감소 또는 신체적 활성 증가와 같은 집약적 위험 인자 변형에 관한 충고.

[0150] FOXO3A 및 특히 GCC 일배체형을 건강한 노화 및 장수의 예측자로서 확인하는 것은 약학적 스크리닝 및 시험에 유용한 생물 및 표적의 공급원을 제공한다. 예를 들어, 나이 관련된 질병의 감소에 예상된 건강 이점에서 FOXO3A 유전자에 의해 생성된 유전자 산물 또는 단백질 또는 기타 활성 화합물의 합성 벼전을 취할 수 있다. 유전자 산물을 취하는 수단은 음식물섭취, 주사, 경피 투여 및 약학 분야에 공지된 기타 방법을 포함할 수 있다. FOXO3A에 의해 생성된 유전자 산물, 특히 GCC 일배체형의 유형, 활성 또는 양에 영향을 주는 화합물을 스크리닝 할 수 있다.

[0151] 본 발명은 나이관련된 질병을 예방하거나 치료하기 위하여 FOXO3A를 조절하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 FOXO3A이 관여된 질병 또는 상태, 예를 들어 나이 관련된 질병을 치료 또는 예방하는 방법 또는 검체에서 장수

를 개선하는 방법을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "검체"는 인간 및 비-인간 동물을 지칭한다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 비인간 영장류(특히 고등 영장류)와 같은 포유류, 말, 젖소, 비순, 벼팔로, 염소, 돼지 및 양과 같은 농장 포유류, 닭, 오리 및 거위; 개, 고양이와 같은 반려 동물, 토끼, 기니아피그, 설치류, 및 파충류, 그리고 실험실 동물을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 검체는 인간이다. 다른 구체예에서, 상기 검체는 실험 동물 또는 질병 모델로 적합한 트랜스제닉 동물이다. 조절 및 치료 방법은 본 명세서에 참고문헌으로 포함되어 있는, 2007년 5월 10일 공개된 기사만 등에 의해 출원된 미국 특허출원 공개번호 US 2007/0105109 A1호에 기재된 바와 같이 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0152] 본 발명에 의해 개시된 대립유전자 변이의 서열 또는 유전자 산물의 많은 기타 진단 및 치료 용도는 당업자에게 분명할 것이다. 일부 예는 작은 문자 스크린, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 이중가닥의 siRNA(small interfering RNA)에서의 용도를 포함하며, 이는 당업자에게 분명할 것이다. FOXO 활성에 관한 진단 및 치료용도를 개발하기 위한 몇 개 방법은 2006년 3월 30일 공개된 골드버그 등에 의해 출원된 미국 특허출원번호 US 2006/0069049 A1호에 기재되고 있고, 또 관련 경로에 대해서는 2006년 11월 30일 공개된 티벤바움 등에 의해 출원된 미국 특허출원 번호 US 2006/0272039호에 기재되어 있고, 상기 양쪽 문헌은 본 명세서에 참고문헌으로 포함되어 있다.

[0153] 상기 기재된 명세서는 당업자들이 본 발명을 실시하기에 충분한 것으로 간주된다. 당업자들은 본 발명의 특정 구체예에 상응하는 다수의 등가물을 알고 있거나 또는 간단한 통상적인 방법을 이용하는 것에 의해 확인할 수 있다. 이를 등가물은 이하의 특허청구범위에 포함된다. 실제로, 본 명세서에 도시되고 기재된 예 이외에 본 발명의 다양한 변형은 상술한 기재로부터 당업자들에게 명백해지며 또 이들은 첨부된 특허청구범위에 속한다.

[0154] 명세서에 수록되지 않은 참고문헌:

[0155] 1. Herskind AM et al. (1996). The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870–1900. *Hum Genet* 97:319–323.

[0156] 2. Yashin AI, Iachine IA, Harris JR (1999) Half of variation in susceptibility to mortality is genetic: findings from Swedish twin survival data. *Behav Genet* 29:11–19.

[0157] 3. Christensen K, Johnson TE, Vaupel JW (2006) The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet* 7:436–448.

[0158] 4. Willcox DC, Willcox BJ, Hsueh WC, Suzuki M (2006) Genetic determinants of exceptional human longevity: insights from the Okinawa Centenarian Study. *AGE* 28:313–332.

[0159] 5. Bishop NA, Guarente L (2007) Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet* 8:835–844.

[0160] 6. Risch N, Zhang H (1995) Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 268: 1584–1589.

[0161] 7. Gundmundsson H et al. (2000) Inheritance of human longevity in Iceland. *Eur J Hum Genet* 8:743–749.

[0162] 8. Kerber RA, O'Brien E, Smith KR, Cawthon RM (2001) Familial excess longevity in Utah genealogies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B130–B139.

[0163] 9. Perls TT et al. (2002) Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8442–8447.

[0164] 10. Willcox BJ, Willcox DC, He Q, Curb JD, Suzuki M (2006) Siblings of Okinawan centenarians exhibit lifelong mortality advantages. *J Gerontol A Biol Med Sci* 61 :345–354.

[0165] 11. Partridge L (2007) Some highlights of research on aging with invertebrates, 2006–2007. *Aging Cell* 6:595–598.

[0166] 12. Ghazi A, Henis-Korenblit S, Kenyon C (2007) Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by a proteasomal E3 ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5947–5952.

[0167] 13. Bartke A (2008) New findings in gene knockout, mutant and transgenic mice. *Exp Gerontol* 43:11–14.

[0168] 14. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C (1997) daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can

function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278:1319–1322.

[0169] 15. Brunet A et al. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303:2011–2015.

[0170] 16. Kenyon C, Murphy CT (2006) Enrichment of regulatory motifs upstream of predicted DAF-16 targets. *Nat Genet* 38:397–398.

[0171] 17. van der Horst A, Burgering BM (2007) Stressing the role of FOXO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:440–450.

[0172] 18. Russell SJ, Kahn CR (2007) Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:681–691.

[0173] 19. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD (2006) The biochemistry of Sirtuins. *Ann Rev Biochem* 75:435–465.

[0174] 20. Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227–230.

[0175] 21. Bluher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572–574.

[0176] 22. Bartke A (2008) Impact of reduced insulin-like growth factor-1 /insulin signaling on aging in mammals: novel findings. *Aging Cell* 7:285–290.

[0177] 23. White MF (2003) Insulin signaling in health and disease. *Science* 302:1710–1711.

[0178] 24. Conover CA, Bale LK (2007) Loss of pregnancy-associated plasma protein A extends lifespan in mice. *Aging Cell* 6:727–729.

[0179] 25. Curran SP, Ruvkun G (2007) Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability. *PLoS Genet* 3:e56.

[0180] 26. Greer EL et al. (2007) An AMPK-FOXO pathway mediates the extension of lifespan induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol* 17:1646–1656.

[0181] 27. Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 125:1165–1177.

[0182] 28. Boehm M, Slack F (2005) A developmental timing MicroRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science* 310:1954–1957.

[0183] 29. Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C (2003) Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300:1142–1145.

[0184] 30. Murphy CT (2006) The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp Gerontol* 41:910–921.

[0185] 31. Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005) JNK extends lifespan and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121:115–125.

[0186] 32. Giannakou ME et al. (2007) Dynamics of the action of dFOXO on adult mortality in *Drosophila*. *Aging Cell* 6:429–438.

[0187] 33. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298–300.

[0188] 34. Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547–581.

[0189] 35. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M (2007) Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging* 2:377–387.

[0190] 36. Bonafe M et al. (2003) Polymorphic variants of IGF-I receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life

span control. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3299–3304.

[0191] 37. Kojima et al. (2004) Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways. *Exp Gerontol* 39:1595–1598.

[0192] 38. Suh Y et al. (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3438–3439.

[0193] 39. Kuningas M et al. (2007) Haplotypes in the human FOXO1a and FOXO3a genes: impact on disease and mortality at old age. *Eur J Hum Genet* 15:294–301.

[0194] 40. Lunetta KL et al. (2007) Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC Med Genet* 8 Suppl 1: S13.

[0195] 41. Nebel A et al. (2005) No association between microsomal triglyceride transfer protein (MTP) haplotype and longevity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7906–7909.

[0196] 42. Arai Y et al. (2001) Serum insulin like growth factor 1 (IGF-I) in centenarians: implication of IGF-1 as a turnover protein. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56A:M79–M82.

[0197] 43. Teng EL et al. (1994) The Cognitive Abilities Screening Instrument (CASI): a practical test for cross-cultural epidemiological studies of dementia. *Int Psychogeriatr* 6:45–58.

[0198] 44. Willcox BJ et al. (2006) Midlife risk factors and survival in men. *JAMA* 296:2343–2350.

[0199] 45. Kramarow E, Lubitz J, Lentzner H, Gorina Y (2007) Trends in the health of older Americans, 1970–2005. *Health AfJ (Millwood)* 26:1417–1425.

[0200] 46. Evert J, Lawler E, Bogan H, Perls T (2003) Morbidity profiles of centenarians: survivors, delayers, and escapers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:232–237.

[0201] 47. Bernstein AM et al. (2004) First autopsy study of an Okinawan centenarian: absence of many age-related diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:1195–1199.

[0202] 48. Willcox DC et al. (2007) Aging gracefully: a retrospective analysis of functional status in Okinawan centenarians. *Am J Geriatr Psychiatry* 15:252–256.

[0203] 49. Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, Perls TT (2004) Cardiovascular disease delay in centenarian offspring. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:385–389.

[0204] 50. Rodriguez BL et al. (2002) The A.D.A and W.H.O. classifications for diabetes: their impact on diabetes prevalence and total and cardiovascular disease mortality in elderly Japanese-American men. *Diabetes Care* 25:951–955.

[0205] 51. McNeely MJ, Boyko EJ (2004) Type 2 diabetes prevalence in Asian Americans: results of a national health survey. *Diabetes Care* 27:66–69.

[0206] 52. Fujimoto WY et al. (1995) Susceptibility to development of central adiposity among populations. *Obes Res* 3Suppl2:179S–186S.

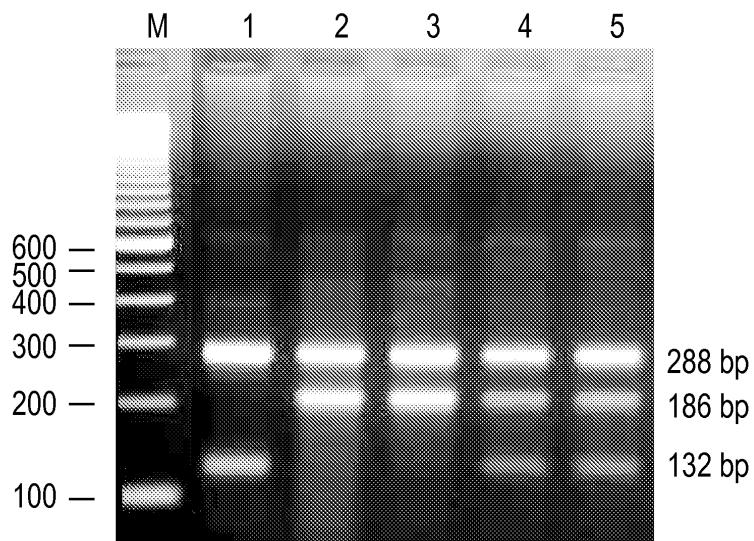
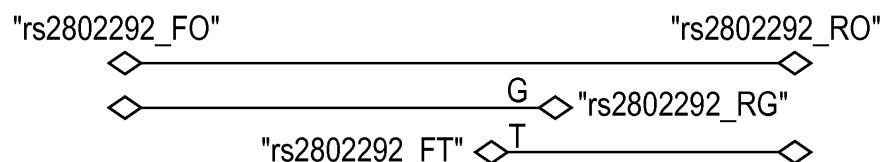
[0207] 53. Examination Committee of Criteria for Obesity Disease' in Japan, et al. (2002). New criteria for Obesity disease' in Japan. *Circ J* 66:987–992.

[0208] 54. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 16:183–189.

[0209] 55. Kops JG et al. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419:316–321.

[0210] 56. Youngman LD, Park JY, Ames BN (1992) Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9112–9116.

- [0211] 57. Heilbronn LK et al. (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* 295:1539–1548.
- [0212] 58. Selman C et al. (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* 22:807–818.
- [0213] 59. Murphy CT et al. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424:277–283.
- [0214] 60. Kuningas M et al. (2007) SIRT1 gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85-plus study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:960–965.
- [0215] 61. Kagan A. Ed (1996) The Honolulu Heart Program: An Epidemiological Study of Coronary Heart Disease and Stroke (Harwood Academic Publishers, the Netherlands).
- [0216] 62. Worth RM, Kagan A (1970) Ascertainment of men of Japanese ancestry in Hawaii through World War II Selective Service registration. *J Chronic Dis* 23:389–397.
- [0217] 63. Rodriguez BL, Curb JD (1998) Cardiovascular risk factors in the elderly: the Honolulu Heart Program. *Cardiovasc Risk Factors* 8:99–103.
- [0218] 64. White L, et al. (1996) Prevalence of dementia in Japanese-American men living in Hawaii: the Honolulu-Asia Aging Study. *JAMA* 276:955–960.
- [0219] 65. National Institutes of Health (NIH): U.S. Department of Health and Human Services, NIH, National Institute on Aging (2001) Report of the National Institute on Aging Advisory Panel on Exceptional Longevity (APEL). NIH Pub 01-4951 (NIH, Washington, DC).
- [0220] 66. Arias E (2006) United States life tables, 2003 (National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD), vol. 54, no. 14.
- [0221] 67. Nordyke EC, Lee R, Gardner RW (1984) A profile of Hawaii's elderly population. *Papers East West Popul Inst* 91:13–14.
- [0222] 68. Mehta C, Patel N (2001) StatXact 5 (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA).
- [0223] 69. SAS Institute, Inc. (1990) SAS/STAT user's guide, version 6 (SAS Institute, Cary, NC).
- [0224] 70. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotnik K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1;29(1):308–11.)

도면**도면1****도면2****서 열 목록**

SEQUENCE LISTING

<110> KUAKINI MEDICAL CENTER

<120> USE OF FOXO3A POLYMORPHISMS AND HAPLOTYPES TO PREDICT AND
PROMOTE HEALTHY AGING AND LONGEVITY

<130> KMC-P1

<140><141><150> 61/087,722

<151> 2008-08-10

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 673

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Leu Ser Pro Leu Glu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Pro Glu Phe Glu Pro Gln Ser Arg Pro Arg Ser Cys Thr

20 25 30

Trp Pro Leu Gln Arg Pro Glu Leu Gln Ala Ser Pro Ala Lys Pro Ser

35 40 45

Gly Glu Thr Ala Ala Asp Ser Met Ile Pro Glu Glu Glu Asp Asp Glu

50 55 60

Asp Asp Glu Asp Gly Gly Arg Ala Gly Ser Ala Met Ala Ile Gly

65 70 75 80

Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ser Gly Leu Leu Leu Glu Asp

85 90 95

Ser Ala Arg Val Leu Ala Pro Gly Gln Asp Pro Gly Ser Gly Pro

100 105 110

Ala Thr Ala Ala Gly Gly Leu Ser Gly Gly Thr Gln Ala Leu Leu Gln

115 120 125

Pro Gln Gln Pro Leu Pro Pro Gln Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gln Pro Arg Lys Cys Ser Ser Arg Arg Asn Ala Trp Gly Asn Leu

145 150 155 160

Ser Tyr Ala Asp Leu Ile Thr Arg Ala Ile Glu Ser Ser Pro Asp Lys

165 170 175

Arg Leu Thr Leu Ser Gln Ile Tyr Glu Trp Met Val Arg Cys Val Pro

180 185 190

Tyr Phe Lys Asp Lys Gly Asp Ser Asn Ser Ser Ala Gly Trp Lys Asn

195 200 205

Ser Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Ser Arg Phe Met Arg Val Gln

210 215 220

Asn Glu Gly Thr Gly Lys Ser Ser Trp Trp Ile Ile Asn Pro Asp Gly

225	230	235	240
Gly Lys Ser Gly Lys Ala Pro Arg Arg Arg Ala Val Ser Met Asp Asn			
245	250	255	
Ser Asn Lys Tyr Thr Lys Ser Arg Gly Arg Ala Ala Lys Lys Lys Ala			
260	265	270	
Ala Leu Gln Thr Ala Pro Glu Ser Ala Asp Asp Ser Pro Ser Gln Leu			
275	280	285	
Ser Lys Trp Pro Gly Ser Pro Thr Ser Arg Ser Ser Asp Glu Leu Asp			
290	295	300	
Ala Trp Thr Asp Phe Arg Ser Arg Thr Asn Ser Asn Ala Ser Thr Val			
305	310	315	320
Ser Gly Arg Leu Ser Pro Ile Met Ala Ser Thr Glu Leu Asp Glu Val			
325	330	335	
Gln Asp Asp Asp Ala Pro Leu Ser Pro Met Leu Tyr Ser Ser Ser Ala			
340	345	350	
Ser Leu Ser Pro Ser Val Ser Lys Pro Cys Thr Val Glu Leu Pro Arg			
355	360	365	
Leu Thr Asp Met Ala Gly Thr Met Asn Leu Asn Asp Gly Leu Thr Glu			
370	375	380	
Asn Leu Met Asp Asp Leu Leu Asp Asn Ile Thr Leu Pro Pro Ser Gln			
385	390	395	400
Pro Ser Pro Thr Gly Gly Leu Met Gln Arg Ser Ser Ser Phe Pro Tyr			
405	410	415	
Thr Thr Lys Gly Ser Gly Leu Gly Ser Pro Thr Ser Ser Phe Asn Ser			
420	425	430	
Thr Val Phe Gly Pro Ser Ser Leu Asn Ser Leu Arg Gln Ser Pro Met			
435	440	445	
Gln Thr Ile Gln Glu Asn Lys Pro Ala Thr Phe Ser Ser Met Ser His			
450	455	460	
Tyr Gly Asn Gln Thr Leu Gln Asp Leu Leu Thr Ser Asp Ser Leu Ser			
465	470	475	480

His Ser Asp Val Met Met Thr Gln Ser Asp Pro Leu Met Ser Gln Ala
 485 490 495
 Ser Thr Ala Val Ser Ala Gln Asn Ser Arg Arg Asn Val Met Leu Arg
 500 505 510
 Asn Asp Pro Met Met Ser Phe Ala Ala Gln Pro Asn Gln Gly Ser Leu
 515 520 525
 Val Asn Gln Asn Leu Leu His His Gln His Thr Gln Gly Ala Leu
 530 535 540
 Gly Gly Ser Arg Ala Leu Ser Asn Ser Val Ser Asn Met Gly Leu Ser
 545 550 555 560
 Glu Ser Ser Ser Leu Gly Ser Ala Lys His Gln Gln Gln Ser Pro Val
 565 570 575
 Ser Gln Ser Met Gln Thr Leu Ser Asp Ser Leu Ser Gly Ser Ser Leu
 580 585 590
 Tyr Ser Thr Ser Ala Asn Leu Pro Val Met Gly His Glu Lys Phe Pro
 595 600 605
 Ser Asp Leu Asp Leu Asp Met Phe Asn Gly Ser Leu Glu Cys Asp Met
 610 615 620
 Glu Ser Ile Ile Arg Ser Glu Leu Met Asp Ala Asp Gly Leu Asp Phe
 625 630 635 640
 Asn Phe Asp Ser Leu Ile Ser Thr Gln Asn Val Val Gly Leu Asn Val
 645 650 655
 Gly Asn Phe Thr Gly Ala Lys Gln Ala Ser Ser Gln Ser Trp Val Pro
 660 665 670
 Gly

<210> 2
 <211> 1001
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

tatttcactg gccaggacct ccaatacatt gttgaatagc agtggtgaaa gcagagatcc 60

ttaccattt tctcatctta agggaaagc attcagtctt tcactgttaa gtatcatgtt	120
aggtgtaagt ttgcacata ttccttat caggctgagg tagtttctc tattcctatg	180
tgttagtag ttttgaaaa taaattatg agtggatatt gaatttgtc agatgtttt	240
tcctcaccc tgagaagat cagatggttt tcctttca gtctttaat atgtgaat	300
acattgactg atttgcattt taaaccaac cttacattcc tggataaat cccacctgg	360
cttgatatgt taccatgaga ttcaagtagc taaaatttg ttaaggattt ttgtgtctgt	420
cttcatgagg aatattgatc tatacatttc ttataatatc ttgcctgtt tttgttacca	480
ggtaatggt ggtttataa yatgagttgg aaagtgtcc ctgttctgct ctggtagcac	540
tgttagtatct cticcttaaa tttttggtag aatcaacgg cagttagcc atcagagcct	600
ggagttttt tgtgtgttag gaaatgtta actgctaatt caatttattt catagataca	660
atgcgttgg ctgtctgtt tttcttgaa tgagtttgg tagtctgtt cttaagga	720
atttgccat ttatattaag ttgtctaatt tatggcata aagtcattt taatgttctc	780
ttattatcct ttaatagat atatcatcg tagtGatttc atttcattt ctgtatgttga	840
taatttgtct taactccctt tccccctcat tccttatctg ttttagtgcct tgcaatttca	900
ttgatttttt aaacgaatta acatttgcctt ccactgactt ttccccgtt actttatgt	960
ttttacttcc attgatttt ttttcttta ttaatttttt a	1001
<210> 3	
<211> 601	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
caccaccacc cactagacaa attgcttaac ctttctgcac cttagttcc tcctgacagg	60
cttggtaga aaataaaatg agatcaaattt tgtcaagcac agagcattgg ccctggtagg	120
caccacatac atgaatttcc ttcaagttgtt aggtgaagta gacttgattt gggatttctc	180
ttgttaccta ggtgttggtagaggagac tttagaaacca gaatgtgttta ttgtggttt	240
tgagtgtgcc tggactctg agccaactga attacaagt aatgggggcc ccatggcatc	300
ycatgacagg tggagagccg gctttcacc ctggatggac ctgaaatgcc tgcttaaggcc	360
ttgctccacc gagtagcaca caccatatca gtttgcctt cttccatct cttattctag	420
agacctaataa gcctacttgt tggtatataat ttccaggttt ttggaaatttggctgtttaa	480
ttgaagttaa taccagtgtt gagacttttcc aacctgagaa caaccttagat gctacttcc	540
attttgcagt ggaagcttac ttccatcttcc actcatgttag gacattttt ggtctcaatg	600

t	601
<210> 4	
<211> 667	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
tgaagcaggg catcaggaa tggagttgg tgagggaaatt acattaacat ttattgagca	60
ccattctcac tataaacctg aacgtaaata ttattattat tattattattt attattatta	120
ttattattat tattattatt ttagtagaga tgaggcctg ctgtgtgcc tagactggc	180
ttgaactcct gggctcaagc aatcctctca ccttggcctc tcaaagtgcc tctcaaagg	240
gtgagccacc atgcccagcc tattcgttt taatttctga agaaactgag gctaacagct	300
gggtctggcc catgactggt tcagttggta tttggtgac caagttgacc aagctcaccc	360
agcttctgag tgacagagtg aatataaacc cagcctgctc actccatttc ctatgtttct	420
cacctctacc agggctctg ttgctcaca gagctcaggg ctgggakaag cctctgtgtg	480
acagatgaag gggctctgct gctctctagg gaagaatcgg tcccaaattt ctcaaggag	540
taaggtggtt tcgttgagga gcatcagcta ggggattga tggaaatagg tgtcaggcag	600
ccagtggaaa ttttgtgc ccacctgtgg cacatgtatt atgcaaattc atgcaaaaat	660
atataata	667
<210> 5	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 5	
gaaactgagg ctaacagctg ggtctggccc	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer	
<400> 6	
agctgatgct cctcaacgaa accacattac	30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 7

ggaccccttc atctgtcaca cagaggctcc 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 8

ctgttgctca caagagctca gggctgggct 30

<210> 9

<211> 288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaaactgagg ctaacagctg ggtctggccc atgactggtt cagttggtat ttggggacc 60

aagttgacca agtcaccca gcttctgagt gacagagtga atataaaccc agcctgctca 120

ctccatttcc tagtttctc acctctacca gggctctgt tgctcacaag agctcaggc 180

tgggakaagc ctctgtgtga cagatgaagg ggtcctgctg ctctcttaggg aagaatcggt 240

ccccaaattgc tcaaggaggt aagggtggttt cgttgaggag catcagct 288