



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월31일
(11) 등록번호 10-1933893
(24) 등록일자 2018년12월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) A61B 5/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
A61B 5/165 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0090370
(22) 출원일자 2017년07월17일
심사청구일자 2017년07월17일
(56) 선행기술조사문헌
American Journal of Medical Genetics Part B
(Neuropsychiatric Genetics) (2008)
147B:543-549
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
함병주
서울특별시 중구 소공로 35, 102동 1503호(
회현동1가, 남산 롯데캐슬)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 7 항

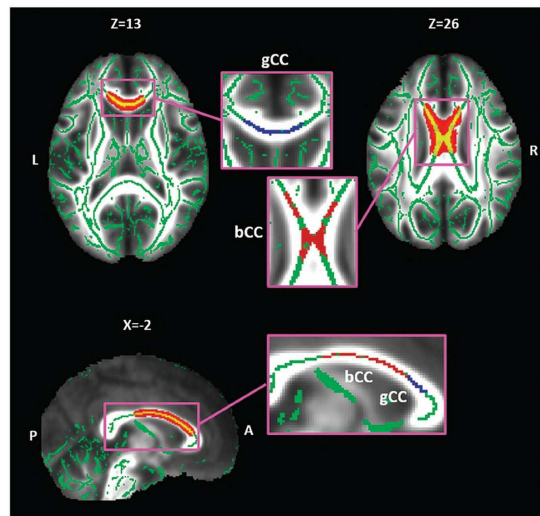
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 세로토닌 전달체 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법

(57) 요약

본 발명은 세로토닌 전달체 유전자인 SLC6A4 유전자에서 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 우울증에서 후생적 유전자 조절과 구조적 뇌 변화 사이의 연관성을 나타내는 증거에 기여하며, 우울증 진단에 관한 정보를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Psychiatry & Neuroscience (2015)
40(5):296-305

PLOS ONE (2015) 10(3):e0119061

Journal of Human Genetics (2011) 56:456-459

PLOS ONE (2016.10.10.) 11(10):e0164301

American Journal of Medical Genetics Part B
(Neuropsychiatric Genetics) (2006)
141B:912-917

Human Brain Mapping (2014) 35:5356-5367

Biological Psychiatry (2010) 68:405-407

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0023272

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 세로토닌 전달체에 대한 후생유전적 조절이 우울증 재발에 미치는 영향 규명: 영상 유전학
적 연구

기 여 율 30/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2011.09.01 ~ 2013.08.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A2058864

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 주요 우울 장애 및 양극성 장애 우울증 환자에서 뇌의 보상 회로와 관련 유전자 다형성의
역할 규명: 다중기법 영상 유전학적 연구

기 여 율 40/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120004

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 중점중개연구센터

연구과제명 뇌영상 유전자 융합 연구를 이용한 우울증 진단 및 항우울제 치료반응 예측 생체 지표 규
명

기 여 율 30/100

주관기관 전남대학교

연구기간 2012.04.01 ~ 2017.03.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

검사대상 개체 및 정상 개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 CpG(C-phosphate-G dinucleotides) 2(CpG2) 및 CpG(C-phosphate-G dinucleotides)3 (CpG3) 위치의 메틸화 비율을 각각 확인하는 단계; 및

상기 검사대상 개체의 SLC6A4 유전자 프로모터에서 CpG2 및 CpG3 위치의 메틸화 비율이 상기 정상 개체의 메틸화 비율에 비해 0.1% 이상 높은지 확인하는 단계;를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 뇌량의 genu 및 뇌량체의 축상 확산(axial diffusivity, AD) 값을 각각 측정하는 단계;

상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 AD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 뇌량의 genu에서 검사대상 개체의 AD 값이 정상 개체의 AD 값에 비해 높고 뇌량체에서 검사대상 개체의 AD 값이 정상 개체의 AD 값에 비해 낮은지 확인하는 단계를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 뇌량의 genu 및 뇌량체의 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값을 각각 측정하는 단계;

상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 RD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 뇌량의 genu 및 뇌량체에서 검사대상 개체의 RD 값이 정상 개체의 RD 값에 비해 높은지 확인하는 단계를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 CpG2 및 CpG3 위치의 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 제제를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물.

청구항 9

제 8항에 따른 조성물을 포함하는 SLC6A4 유전자 프로모터 CpG2 및 CpG3 위치의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세로토닌 전달체 유전자인 SLC6A4 유전자에서 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 주요 우울 장애(Major depressive disorder, MDD) 또는 우울증(depression)은 자살 시도와 밀접한 관련이 있는 심각한 정신의학 질환이다(비특허문헌 1). 우울증은 매우 흔한 정신질환의 하나로, 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져온다(서울대학교병원 의학정보, 서울대학교병원).

[0003] 우울증의 분명한 원인에 대해서는 아직 명확하지 않으나 다른 정신 질환과 같이 다양한 생화학적, 유전적 그리고 환경적 요인이 우울증을 야기할 수 있다. 생화학적 요인으로, 뇌 영상 기기를 이용한 연구에서 우울증 환자의 뇌에 변화가 있음을 보고하고 있다. 이 변화의 중요성에 대해서는 아직 불분명한 면이 있으나 궁극적으로 원인을 가려내는데 도움을 줄 것이다. 신경전달 물질이라 불리는 뇌 안의 물질이 감정 등의 뇌 기능과 연결이 되어 있고 우울증 발생에 역할을 하는 것으로 보인다. 호르몬 불균형도 하나의 원인이 될 수 있다. 유전적 요인으로, 일부 연구는 우울증을 가진 가족 내에서 우울증이 더 잘 발생하는 것으로 보고하고 있으며 우울증을 발생시키는 유전자를 찾고 있다. 환경적 요인으로, 환자를 둘러싸고 있는 환경도 우울증 발생에 영향을 줄 수 있으며 삶에 있어서 대처하기 어려운 상황들인데, 사랑하는 사람을 잃는 것, 경제적 문제, 그리고 강한 스트레스 등을 예로 들 수 있다.

[0004] 유전적 관련과 연관성 연구로부터 특정한 강력하고 일관성 있는 MDD 감수성 유전자를 밝히지는 못했지만(비특허문헌 2), MDD의 유전성은 31~42 %이며(비특허문헌 3) 병인은 여러 유전자에 의해 크게 영향을 받는 것으로 여겨진다. 변성된 세로토닌성 신경 전달이 우울증의 원인에 중요한 기여를 하는 것은 반복적으로 언급되어 왔다(비특허문헌 4). 따라서, 세로토닌 활성의 조절에 기여하는 유전자는 MDD와 관련하여 널리 연구되어 왔다. 세로토닌 전달체는 세로토닌성 뉴런의 말단과 세포체에서 세로토닌 재흡수를 담당하고 세로토닌 재흡수 억제제의 주요 분자 표적이기 때문에 세로토닌 운반체 유전자(SLC6A4)는 특히 많이 연구되어 왔다(비특허문헌 5).

[0005] SLC6A4에 있는 다형성 사이트 중 하나는 MDD에 대한 취약성(비특허문헌 6)과 항우울제 치료에 대한 반응(비특허문헌 7)을 포함하여 MDD 관련 표현형과 관련된 5' 측면 프로모터 영역(5'-flanking promoter region)(세로토닌 수송체 결합 다형성 영역, 5-HTTLPR)의 삽입/결실이다. MDD의 병리생리학에서 유전적 요인과 환경적 요인 사이의 중요한 상호 작용을 암시하는 연구가 축적되어(비특허문헌 8), 대다수가 5-HTTLPR과 우울증 발달에서의 스트레스 간 상호 작용을 보고한다(비특허문헌 9). 그러나, 5-HTTLPR에 의해 설명되는 전사에서의 가변성은 낮을 가능성이 높으며, 후성 기전이 강조되었다(비특허문헌 4). MDD에 기여하는 유전자-환경 상호 작용의 기전으로 DNA 메틸화 또는 히스톤 아세틸화에 의한 SLC6A4 발현의 후성적 조절이 제안되어 왔다(비특허문헌 10).

[0006] 한편, 최근 LDC(linear discriminant classifier), LRC(logistic regression classifier), SVM(support vector machine), GPC(Gaussian process classifier), 및 NNC(neural network classifier) 등의 다양한 다변량 패턴 분석 방법을 기반으로 하여 뇌영상 데이터를 이용한 통계적 예측 모델을 통해 개개인 주요 우울 장애 환자의 진단을 예측하는 모형이 연구되고 있다.

[0007] 그간의 뇌영상 데이터를 이용한 주요 우울 장애 진단 예측 모형들은 구조적 뇌자기공명영상 데이터 중 대뇌 회백색질 부피 또는 두께, 백색질 신경로의 연결성 등 뇌영상 데이터에만 초점을 맞춰 왔다. 그러나, 우울증 진단 예측의 정확도(accuracy)를 높이기 위해서는 후생유전학적 정보를 통합한 데이터에 기반한 예측 모형이 필요한 실정이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 MDD 환자의 뇌량체에 대하여 SLC6A4 유전자 프로모터 부위의 DNA 메틸화와, 분획 이방성(fractional anisotropy, FA) 값과 AD(axial diffusivity) 값 간에 나타나는 유의한 역상관관계를 통해 MDD 환자에서 SLC6A4 유전자 프로모터 부위의 DNA 메틸화와 백색질 완전성 간에 상관관계가 있음을 확인하여 SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Ferrari AJ., et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. PLoS Med. 2013;10(11):e1001547.
- (비특허문헌 0002) Lopez-Leon S, Janssens AC, Gonzalez-Zuloeta Ladd AM, Del-Favero J, Claes SJ, Oostra BA et al. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. Mol Psychiatry 2008; 13: 772-785.
- (비특허문헌 0003) Kendler KS, Gatz M, Gardner CO, Pedersen NL. A Swedish national twin study of lifetime major depression. Am J Psychiatry 2006; 163: 109-114.
- (비특허문헌 0004) Dannlowski U, Kugel H, Redlich R, Halik A, Schneider I, Opel N et al. Serotonin transporter gene methylation is associated with hippocampal gray matter volume. Hum Brain Mapp 2014; 35: 5356-5367.
- (비특허문헌 0005) Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A et al. Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. Biol Psychiatry 1998; 44: 169-178.
- (비특허문헌 0006) Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter:II. Suicidal behavior. Mol Psychiatry 2003; 8: 646-653.
- (비특허문헌 0007) Smeraldi E, Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Perez J, Catalano M. Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. Mol Psychiatry 1998; 3: 508-511.
- (비특허문헌 0008) McGowan PO, Kato T. Epigenetics in mood disorders. Environ Health Prev Med 2008; 13: 16-24.
- (비특허문헌 0009) Karg K, Burmeister M, Shedden K, Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. Arch Gen Psychiatry 2011; 68: 444-454.
- (비특허문헌 0010) Devlin AM, Brain U, Austin J, Oberlander TF. Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. PLoS One 2010; 5: e12201.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 목적은 개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 제제를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 하기 방법에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

- [0014] 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 메틸화 비율을 각각 확인하는 단계; 및
- [0015] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체 간 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화 비율의 차이를 확인하는 단계;를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0016] 상기 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화는 SLC6A4 유전자 프로모터 내 CpG3 및 CpG4 위치에서의 메틸화인 것일 수 있다.
- [0017] 상기 검사대상 개체의 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화 비율이 정상 개체의 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화 비율에 비해 0.1% 이상 높은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법은,
- [0019] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 뇌량의 genu 및 뇌량체의 축상 확산(axial diffusivity, AD) 값을 각각 측정하는 단계;
- [0020] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 AD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 뇌량의 genu에서 검사대상 개체의 AD 값이 정상 개체의 AD 값에 비해 높고 뇌량체에서 검사대상 개체의 AD 값이 정상 개체의 AD 값에 비해 낮은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법은,
- [0023] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 뇌량의 genu 및 뇌량체의 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값을 각각 측정하는 단계;
- [0024] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 RD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 뇌량의 genu 및 뇌량체에서 검사대상 개체의 RD 값이 정상 개체의 RD 값에 비해 높은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명은 상기 개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 체제를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명은 상기 SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 기존의 우울증 진단이 임상가에 의한 정신과적 면담, 병력 청취 및 정신상태검사(mental status examination)에 의존하였으며, 이로 인해 임상가 간의 우울증 진단이 상이하거나, 진단의 신뢰도 및 타당도에 의구심이 있는 사례가 많았다. 이에, 본 발명은 우울증에서 후생적 유전자 조절과 구조적 뇌 변화 사이의 연관성을 나타내는 증거에 기여하며, 우울증 진단에 관한 정보를 제공함으로써 뇌영상 데이터 및 유전자 정보를 통한 우울증 진단 예측 모델을 통해서 우울증의 정확한 조기 진단을 통해서 적시에 우울증을 치료하고 질병의 경과가 악화되는 것을 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 약물 치료를 하지 않은 MDD 환자에서 뇌량의 genu(gCC) 및 뇌량체(bCC)에 대한 FA 값을 나타내는 TBSS(tract-based spatial statistics)를 나타낸 도이다; 이미지는 모든 참가자의 평균 FA 맵(map), 녹색 voxels은 평균 FA 뼈대 이미지. 빨간색과 노란색 voxels은 MDD 환자에서 FA 수치가 건강한 대조군보다 유의하게 낮은 백색질 영역. 확대된 이미지는 손으로 그린 관심 영역 마스크(mask). 빨간색 영역은 뇌량체, 파란색 영역은 뇌량의 genu.
- 도 2는 약물 치료를 하지 않은 MDD 환자 및 건강한 대조군의 뇌량체 및 뇌량의 genu에서 측정된 평균 AD 및 RD 값을 나타낸 도이다; 막대는 s.e. '*'는 Bonferroni의 보정을 사용하여 다중 비교를 위해 보정된 주요 P 값; $P < 0.05/2$ (뇌량체, 뇌량의 genu) = 0.025.
- 도 3은 약물 치료를 하지 않은 MDD 환자의 뇌량체에서 CpG3에서의 SLC6A4 메틸화에 대한 FA 값과 AD 값의 역상

관관계를 나타낸 도(a); 건강한 대조군의 뇌량의 genu에서 CpG4에서의 SLC6A4 메틸화에 대한 FA 값의 유의한 역상관관계를 나타낸 도(b)이다.

도 4는 기계학습기법을 기반으로 한 뇌량의 백색질 연결성과 세로토닌 전달체 유전자 메틸화과 정보를 이용한 주요우울장애 진단의통계적 예측 모델을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 하기 방법에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [0033] 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 메틸화 비율을 각각 확인하는 단계; 및
- [0034] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체 간 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화 비율의 차이를 확인하는 단계;를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0035] 용어 "개체"는 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0036] 상기 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화는 SLC6A4 유전자 프로모터 내 CpG3 및 CpG4 위치에서의 메틸화인 것일 수 있다.
- [0037] 상기 검사대상 개체의 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화 비율이 정상 개체의 SLC6A4 유전자 프로모터에서의 메틸화 비율에 비해 0.1% 이상 높은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법은,
- [0039] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 뇌량의 genu 및 뇌량체의 축상 확산(axial diffusivity, AD) 값을 각각 측정하는 단계;
- [0040] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 AD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 용어 "축상 확산(axial diffusivity)" 또는 "AD"는 축상돌기 섬유(axon fiber)에서 세로방향으로 움직이는 물분자의 고유값(eigenvalue)을 나타내는 것으로 ' λ_1 ' 또는 'L1' 로 표시하기도 한다. 이러한 AD 값은 축상돌기의 방향과 길이, 또는 축상돌기 길이의 온전성을 반영한다. 따라서, 낮은 AD 값은 축상돌기의 온전성이 손상되었음을 의미한다고 해석한다.
- [0042] 상기 뇌량의 genu에서 검사대상 개체의 AD 값이 정상 개체의 AD 값에 비해 높고 뇌량체에서 검사대상 개체의 AD 값이 정상 개체의 AD 값에 비해 낮은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 우울증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법은,
- [0044] 상기 검사대상 개체 및 정상 개체로부터 뇌량의 genu 및 뇌량체의 방사상 확산(radial diffusivity, RD) 값을 각각 측정하는 단계;
- [0045] 상기 측정된 검사대상 개체 및 정상 개체의 RD 값의 차이를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 용어 "방사상 확산(radial diffusivity)" 또는 "RD"는 축상돌기 섬유(axon fiber)에서 가로방향으로 움직이는 물분자의 고유값(eigenvalue) 나타내는 것으로써 축상돌기 내에서 좌우 방향으로 움직이는 두 개의 고유값인 λ_2 와 λ_3 의 평균값을 계산하여 표현한다. 이러한 RD 값은 축상돌기의 두께를 의미하며, 이는 축상돌기의 수초화(myelinated) 정도를 반영한다. 따라서, 높은 RD 값은 축상돌기의 두께가 두꺼워졌다는 것을 의미하며, 이는 축상돌기의 탈수초화(demyelinated)가 이뤄졌다고 해석한다.
- [0047] 상기 뇌량의 genu 및 뇌량체에서 검사대상 개체의 RD 값이 정상 개체의 RD 값에 비해 높은 경우, 검사대상 개체를 우울증인 것으로 진단하는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명은 상기 개체로부터 유래하는 SLC6A4 유전자 프로모터에서 메틸화 비율을 확인하고 측정하는 제제를 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명은 상기 SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 조성물을 포함하는, SLC6A4 유전자 프로모터의 메틸화 비율을 이용한 우울증 진단용 키트를 제공한다.
- [0053] 뇌량은 인간 두뇌의 반구를 연결하는 가장 큰 접합면의 백색질 경로이며, 뇌의 좌우 기능 분화 및 반구 간 통신

에 필수적인 요소이다. genu는 뇌량 중 부리가 있는 영역이며 전두엽 뇌 영역을 연결한다. 뇌량의 꼬리 부분은 뇌량팽대(splenium)이고, 몸체는 genu와 뇌량팽대 사이의 중간 부분이다. 일반적으로, 뇌량의 전체 면적은 소아기와 청소년기에 증가하며, 뇌량의 성숙은 인지 과정의 성숙에 해당한다. 이 성숙 과정에서 핵심 생리적 메커니즘은 축삭 수초 형성(myelination)이며, 수초 형성의 중단은 결정 및 일상 기능에 손해를 유발할 수 있다. 작업 기억, 인지 및 정서적 처리와 같은 중요한 기능은 신체가 더 심한 우울한 증상을 앓게 하는 뇌량의 결손에 의해 부정적인 영향을 받을 수 있다. 뇌량의 구조적 변화는 변화된 반구 연결성을 유도하고 MDD 환자에서 보고된 정서적 및 인지적 통제를 손상시키는 것으로 나타났다.

[0055] 한편, 세로토닌은 신경 세포 증식, 이동 및 분화, 축삭 유도 및 시냅스 생성의 조절과 같은 뇌 발달 동안 기본적인 형태 형성 활동에 관여할뿐만 아니라 성인의 신경 발생에도 관여한다. 세로토닌 전달체는 시냅스 기능 및 가소성에 연루된 세로토닌 1A 수용체를 비롯한 시냅스 전 및 후 수용체와의 세로토닌 전달의 지속 기간 및 강도를 결정하는 데 필수적이다. 따라서 증가된 DNA 메틸화로 인한 SLC6A4의 발현 감소는 세로토닌 섭취를 감소시키고 세로토닌 활성의 결핍을 일으킬 수 있다. 따라서, SLC6A4 프로모터 메틸화는 특정 뇌 영역에서의 세로토닌 합성의 생체 내 측정치와 관련이 있다. 세로토닌성 조절의 변화가 뉴런의 성장에 예기치 않은 영향을 미칠 수 있다고 가정하면, SLC6A4 프로모터 영역의 메틸화가 증가된 뇌 영역은 기능 불명의 뇌 형태 및 생리를 나타낼 수 있다. MDD에는 스트레스가 반복적으로 연관되어 있으므로 MDD 환자는 스트레스에 노출되었을 가능성이 더 크다. 따라서 본 발명의 결과는 스트레스 노출로 인한 SLC6A4 프로모터 메틸화 수준의 증가와 MDD에서의 백색질 무결성의 변화에 영향을 받는 세로토닌 활성의 변화 사이의 연관성을 나타낼 수 있다.

[0057] 본 발명은 일실시예에서, SLC6A4 프로모터 영역의 CpG2에서 DNA 메틸화가 유의미한 차이를 보이며, MDD 환자에서 메틸화가 증가함을 확인하였다. 또한, MDD 환자에서 뇌량체의 FA 값 및 AD 값과 CpG3에서의 SLC6A4 메틸화 사이의 유의한 역상관관계를 확인했다. 이는 SLC6A4 프로모터 부위 메틸화의 증가와 관련된 뇌량체 완전성의 감소를 나타낸다.

[0059] 본 발명에서는 주요 우울 장애 환자에서 뇌량의 백색질 신경로 연결성 정보, 세로토닌 전달체 유전자 (SLC6A4) 메틸화 정보를 이용하여 높은 진단 정확도를 갖는 우울증 진단 예측 모델을 개발하였다. 이전의 우울증의 진단 예측 모형은 대뇌 회백색질 부피, 두께, 피질하 구조물의 부피 등 구조적 뇌영상 데이터에만 초점이 맞춰져 있었으며, 이러한 제한된 데이터의 사용으로 인하여 우울증 진단 예측 모형의 정확도의 제한이 있었다. 이에, 본 발명은 뇌량의 백색질 신경로 연결성 정보, 세로토닌 전달체 유전자 (SLC6A4) 메틸화 정보를 통합한 예측으로 정확도를 향상시킬 수 있다.

[0061] 본 발명은 정신건강의학과 클리닉에서 정신건강의학과 전문의가 우울 증상으로 내원한 환자에게 제공하는 서비스의 형태로 적용될 수 있으며, 정신건강의학과 전문의는 우울증으로 예상되는 환자에게 본 서비스(기술)를 권유한 뒤에 확산 텐서 영상 촬영 및 세로토닌 전달체 유전자 (SLC6A4) 메틸화 분석을 진행하고, 그 정보를 토대로 우울증 진단의 예측에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0065] <실시예 1> 실험방법

[0066] <1-1> 참가자

[0067] 항우울제의 신경 영양성 효과가 보고되었으므로, 정신병 약물 치료를 받지 않은 MDD 환자만이 본 연구에 포함되었다. 이전에 항우울제를 복용하지 않은 MDD 환자 35 명과 건강한 대조군 49 명을 대상으로 실험을 수행하였다. 고려대학교 안암병원 외래 정신과에서 환자를 모집하였다. 진단은 공인된 정신과 의사에 의해 이루어졌으며 정신 분열증 진단 및 통계 매뉴얼 제 4 판, 텍스트 개정판(Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision, DSM-IV-TR)에 따른 DSM-IV(SCID-1)에 대한 구조화임상면접(Structured Clinical Interview)의 한국어 버전으로 수행되었다. 우울증의 중증도는 자기 공명 영상(MRI) 획득 당시 17 항목 HDRS(Hamilton Depression Rating Scale)로 측정되었다. MDD 이외의 일차성 또는 합병증의 정신병 진단을 받은 환자는 임상적 중요성을 지닌 성격 장애를 포함하여 연구에서 제외되었다. 니코틴, 카페인 및 사회적 음주를 제외한 DSM-IV 의존성 또는 남용 관련 약물에 평생 노출된 환자도 제외되었다. 뇌 혈관 질환, 파킨슨 병 및 간질 같은 심각한 또는 불안정한 의학적 질환 또는 1 차 신경 질환 환자도 제외되었다. 2 명의 환자는 현재의 우울 증상에서 자살 시도의 병력이 있었는데, 하나는 약물 중독이고 다른 하나는 자기 교살이었다.

그러나 두 시도 모두 유해한 정도로 수행되지 않았다. 나머지 33 명의 환자는 현재의 우울 증상에서 자살 시도의 병력이 없었다. 또한 18 명의 환자가 정신과적 가족 병력이 있는 것으로 확인되었고, 다른 17 명의 환자는 그러한 병력을 부인하였다. 그러나 가족 구성원이 직접 평가되지 않았으므로 이 환자들에서 정신과적 가족 병력이 없다는 것을 확인할 수 없었다. 연령, 성별, 교육 수준이 일치하는 49 명의 건강한 대조군이 지역 사회의 광고에 의해 모집되었다. 건강한 대조군은 주요 정신과 병력에 대해 검사를 받았으며 정신병적 장애가 없었다. 사회적 수준 이상으로 음주를 한 건강한 참가자도 제외되었다. 두 그룹의 참가자 연령은 21 세에서 64 세 사이였다. 모든 참가자는 에든버러 테스트(Edinburgh Handedness Test)에서 밝혀진 바와 같이 오른손잡이였으며 3 세대의 환자 가족의 민족성을 확인함으로써 민족적 기원을 확증한 한국인이었다. 실험 계획안은 고려대학교 의과대학 윤리심의위원회의 승인을 얻었으며 헬싱키 선언에 따라 모든 참가자들의 동의를 얻었다.

[0069] <1-2> SLC6A4 DNA 메틸화 분석

[0070] SLC6A4 DNA(Homo sapiens (human) solute carrier family 6 member 4, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6532>) 메틸화 분석을 위해 모든 참가자로부터 말초 혈액 샘플을 얻었고 사용된 세포 유형은 전혈 DNA였다. 전사 시작과 관련되어 있는 -34 및 -5 사이 프로모터의 CpG-풍부 영역은 5개의 CpG 부위 (CpG1 = -34, CpG2 = -30, CpG3 = -16, CpG4 = -7, 및 CpG5 = -5)를 포함하였다. 선정된 지역은 ~ -66 bp에서부터 유전자의 -230 bp ~ + 960 bp에 위치하는 CpG 섬(CpG island)의 일부인 SLC6A4의 전사 시작 위치까지의 범위이며, CpG 섬 전체에 걸쳐 CpG 메틸화 수준이 가장 높다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics>). 이는 본 연구에서 스크리닝된 영역이 CpG 섬의 메틸화 수준을 나타낼 수 있음을 의미한다. 또한, CpG 섬은 뇌의 전체 SLC6A4 부위에서 유일하게 메틸화된 부위이다. 따라서, 이 영역은 CpG 메틸화 수준과 SLC6A4 발현 사이의 관계를 시험하는데 적합하다고 판단하였다.

[0071] SLC6A4 프로모터 영역의 메틸화 분석은 바이설파이트 피로시퀀싱(bisulfite pyrosequencing) 방법을 사용하여 수행되었다. 구체적으로, 참가자의 정맥혈 8cc를 말초 혈관에서 채취하여 EDTA 튜브에 넣어 처리하였고, 24시간 이내 DNA 분리가 불가능한 경우에는 -20℃에서 냉동 보관하였다. PCR 및 시퀀싱 프라이머는 Pyrosequencing Assay Design Software v2.0(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 설계되었다. 유전자증폭기(thermocycler)를 통해 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 일으켜 증폭시켰다. PCR 반응은 DNA 20 µg, 10 × Taq 완충액 5 µl, hot-start Taq 중합 효소(Enzymomics, Daejeon, Korea) 2.5 µl, 각 2.5mM dNTP 혼합물 2 µl, 1 µl Primer-S 10 pmol/µl 및 10 pmol/µl biotinylated-Primer-As에서 수행되었다. 증폭은 피로시퀀싱의 일반적인 가이드 라인에 따라 수행되었다: 95 °C에서 10 분 동안 변성, 95 °C, 55 °C 및 72 °C에서 45 사이클을 30 초간, 72 °C에서 5 분간 최종 확장. 2 % 아가로스 겔에서 전기 영동으로 PCR 반응 (2 µl)을 확인하고 에티듐 브로마이드 염색으로 가시화하였다. 다중 채널 피펫(multichannel pipettes)을 위한 PSQ 96 샘플 준비 안내서에 따라 streptavidin Sepharose HP beads(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하여 16 ~ 18 µl의 바이오틴이 부착된 PCR 제품으로 단일 가닥 DNA 템플릿을 준비하였다. 각각의 시퀀싱 프라이머의 15 picomoles을 분석을 위해 첨가하였다. 시퀀싱은 PyroMag 시약 키트(Qiagen)를 사용하여 PyroMark ID 시스템에서 제조업체의 지시에 따라 추가 최적화 없이 수행되었다. 피로시퀀싱 방법을 사용하여 5 개의 CpG 부위에서의 개별 메틸화 백분율을 계산하고 분석하였다.

[0073] <1-3> MRI 획득

[0074] 확산 데이터는 3.0 T Siemens Trio 전체 이미징 시스템 (Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany)을 사용하여 획득되었다. 확산 텐서 영상(Diffusion tensor images, DTI)은 다음 매개 변수와 함께 에코 평면 이미징 시퀀스를 사용하여 획득되었다: 반복 시간(repetition time, TR) : 6300 ms; 에코 시간(echo time, TE) : 84 ms; 시야(field of view, FOV) : 230 mm; 128 × 128 매트릭스; 간격이 없는 3mm 슬라이스 두께; 복셀(voxel) 크기 1.8 mm × 1.8 mm × 3.0 mm; 확산 방향 = 20; 슬라이스 수 = 50; b- 값 : 0 및 600 s/mm²; 위상 인코딩 방향 및 6 / 8 위상 부분 푸리에에 대해 38 개의 참조 라인을 갖는 가속 계수(iPAT-GRAPPA) = 2.

[0076] <1-4> MRI 가공

[0077] DTI 원데이터의 사전 처리를 위해 뇌의 기능적 MRI(Functional MRI of the Brain, FMRIB) Software Library(FSL 버전 4.1.9, 영국 Oxford, <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/>)를 사용하였다. TBSS version 4.1.9를 이용하여 각 환자의 확산 텐서 영상에서 FA 뼈대(skeleton) 영상을 만들었으며, JHU 지도(Johns Hopkins University (JHU) white matter tractography atlas)에서 뇌량의 체부 및 슬부에 해당하는 관심영역과 FA 뼈대 영상이 겹치는 영역에서 FA 값을 추출하였다. FA는 0과 1 사이의 스칼라 값 (scalar value)으로서 백색질 신경로 내의 물분자 확산의 방향성을 측정하는 값이며, 백색질 신경로의 미세 구조적 (microstructural) 변화 및 구

조직 연결성을 반영하는 것으로 알려져 있다. FA 이외에도 각각의 백색질 신경로에서 MD, RD, AD 등의 DTI 파라미터를 추출하였다. 각 참가자의 원데이터는 에디 전류 왜곡 및 머리 움직임에 대해 소프트웨어 수정되었다. Brain Extraction Tool (BET)을 사용하여, 뇌 내부를 표현하는 '1'과 뇌 외부($b = 0$)를 표현하는 '0'을 사용한 단일 이진화된 뇌 마스크(mask)가 확산 공간에서 생성되었다. 마지막으로 확산 텐서 모델을 FA 영상의 보정 데이터에 적용하였다.

[0078] TBSS 분석을 수행하기 전에 왜곡된 데이터를 필터링하기 위해 FA 이미지의 품질을 검사하였다. FMRIB 비선형 이미지 등록 도구(FMRIB Non-linear Image Registration Tool, FNIRT)를 사용하여 각 참가자의 FA 이미지를 FMRIB58_FA 템플릿 이미지에 정렬하고 $1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$ 표준 공간(Montreal Neurological Institute 152 표준)으로 변형하였다. 비선형 변환된 FA 이미지는 각 참가자의 원본 FA 이미지에 적용되었다. 변환된 FA 영상을 이용하여 평균화된 FA 영상을 생성하고 추출하여 모든 백색질 영역의 중심을 나타내는 평균 FA 골격 영상을 생성하였다. FA 골격 이미지는 주요 백색질 경로를 포함하기 위해 $FA > 0.2$ 의 역치값으로 설정되었다.

[0079] FSL 랜덤화 프로그램(FSL randomize program, University of Oxford, Oxford, United Kingdom)을 사용하여 각 참가자의 골격화된 데이터에 Voxel-wise cross-subject statistics를 적용하였다. MDD 환자와 건강한 대조군 간 FA 비교를 위해 2-표본 t-검정을 실시하였다. 역치값이 없는 클러스터 강화를 사용하여 5000 개의 순열을 테스트했다. 클러스터 크기는 항상 100 개의 voxels 이상이었으며, 유의 수준은 다중 비교를 위해 family-wise error(FWE) 보정된 $P < 0.01$ 로 설정되었다. MDD 환자와 건강한 대조군 간에 FA 값이 유의적으로 다른 백색질 기관의 해부학적 위치는 FSL의 John Hopkins University (JHU) ICBM-DTI-81 백색질 표지에서 확인되었다. 이진화된 마스크 이미지는 FSL을 사용하여 식별된 영역으로부터 가져와 관심 영역(regions-of-interests, ROI)으로 정의되었다. 개별 FA 평균, 축 방향 확산 계수(AD) 및 방사형 확산 계수(RD) 값을 ROI에서 추출하였다(도 1).

[0080] DTI는 FA를 비롯하여 AD 및 RD와 같은 다른 확산 계수를 사용하여 축삭 섬유의 특성을 표현한다. FA 지수는 WM 섬유의 존재와 완전성에 민감하며, 높은 FA 값은 축삭 섬유의 수와 크기의 증가 또는 교차 섬유의 밀도 감소를 나타낸다. 이전의 연구에서는 AD가 축삭 병리(axonal pathologies)에 민감하고 RD가 수초화(myelination)에 민감하다는 사실이 밝혀졌으며 이는 신경 회로 내 기능적 연결에 영향을 미치는 백색질 조직 미세 구조를 반영할 수 있다. 따라서 AD 및 RD 값은 FA 값을 보완하고 잠재적 조직 내부 미세 구조 변화를 해석하는 데 도움이 된다.

[0082] <1-5> 서포트 벡터 머신 (support vector machine, SVM) 기법

[0083] MDD 100명 및 대조군 참가자 100명의 뇌량의 백색질 신경로 연결성 정보, 세로토닌 전달체 유전자 (SLC6A4) 메틸화 정보를 이용하여 서포트 벡터 머신(SVM) 상에서 트레이닝 세트(training set)를 실행하고, 이후 테스트 세트(test set)에서는 실제 MDD 예상 환자의 MDD 진단을 예측하였다. SVM 분류기(classifier)는 트레이닝 세트에서 MDD와 정상인으로 표시되어 있는 사람들을 대상으로 뇌량의 백색질 신경로 연결성 정보, 세로토닌 전달체 유전자 (SLC6A4) 메틸화 정보를 기반으로 MDD와 정상인에 대한 판별을 훈련하며, 테스트 세트에서는 실제로 MDD 예상 환자에 대해서 MDD 진단을 예측하였다(도 4).

[0085] <1-6> 통계적 분석

[0086] 약물 치료 하지 않은 MDD 환자와 건강한 대조군 간의 인구통계학적 차이는 연속 변수(연령, 교육 년수 및 HDRS 점수)와 성별에 대한 χ^2 검정에 대한 2-표본 t-검정을 사용하여 분석되었다. 노화와 DNA 메틸화 사이의 연관성이 이전에 보고되었으므로, 연령을 공변량으로 한 공변수(ANCOVA) 분석이 MDD 환자와 건강한 대조군 사이의 SLC6A4 프로모터 부위 메틸화의 차이를 계산하기 위해 수행되었다. 알파 수준은 Bonferroni's 보정이 CpG 위치 수(CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 및 CpG5)를 수정한 후 $P < 0.05/5 = 0.01$ 로 설정되었다. 백색질 미세 구조의 연령 관련 변화가 이전에 보고되었으므로, MDD 환자와 건강한 대조군 간 ROI의 AD 값과 RD 값의 차이는 연령을 공변량으로 한 ANCOVA를 사용하여 분석되었다. Bonferroni's 보정이 ROI 수를 수정한 후 ROI는 $P < 0.05 / 2 = 0.025$ 로 테스트되었다.

[0087] 추출된 FA, AD 및 RD 값과 SLC6A4 메틸화 사이의 상관 관계를 분석하기 위해, 노화와 DNA methylation 사이의 연관 요인인 연령을 제어한 양측 Pearson's의 상관 관계가 수행되었으며, 백색질 미세 구조의 변화가 이전에 보고되었다. Bonferroni's 보정이 5 개의 CpG 위치를 수정한 후 각 ROI는 $P < 0.05/5 = 0.01$ 로 별도로 테스트되었다. 모든 통계 분석은 SPSS 버전 12.0(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. 또한 Fisher의 r-to-z 변환(양측)을 사용하여 각 진단 그룹의 상관 계수 간의 차이를 분석하였다.

[0088] ANCOVA에 대한 사후 통계 전력 계산과 상관 계수의 비교는 G*Power 분석 프로그램을 사용하여 수행하였다. 전력

계산은 ANCOVA에 대한 Cohen's f 와 상관 차이에 대한 Cohen's q 에서 나온 효과 크기를 기반으로 하였다.

<실시예 2> 실험결과

<2-1> 인구통계학적 및 임상적 특성과 SLC6A4 DNA 메틸화 상태

HDRS 점수를 제외하고는 MDD 환자와 정상 대조군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(표 1). SLC6A4 DNA 메틸화 수준은 Cohen으로 확인된 중등도 효과 크기를 가진 건강한 대조군($F(1,81) = 8.365$, $P = 0.005$; 표 1)보다 MDD 환자의 CpG2에서 유의하게 높았다(Cohen's $f = 0.322$, $\eta^2 = 0.094$).

표 1

	MDD patients (n = 35)	Healthy controls (n = 49)	t/ χ^2 /F	df	P-value
Age (years)	40.34 (11.08)	41.12 (14.11)	$t = -0.283$	81.2	0.786
Gender (male/female)	10/25	15/34	$\chi^2 = 0.041$	1	0.84
Education (years)	13 (3.02)	14.14 (3.06)	$t = -1.696$	82	0.094
HDRS-17 ^a	20.2 (4.95)	2.18 (2.14)	$t = 20.222$	43.11	$<0.001^a$
Illness duration (months)	12.03 (24.55)	-	-	-	-
SLC6A4 methylation (%)					
CpG1	4.25 (1.76)	5.38 (2.14)	$F = 6.397$	81	0.013
CpG2	2.45 (1.43)	1.61 (1.21)	$F = 8.365$	81	0.005^b
CpG3	6.90 (2.00)	6.10 (1.53)	$F = 4.702$	81	0.033
CpG4	5.69 (1.96)	5.83 (2.24)	$F = 0.085$	81	0.772
CpG5	1.75 (1.50)	1.59 (1.16)	$F = 0.31$	81	0.579

df, degree of freedom; HDRS-17, 17-item Hamilton Depression Rating Scale; MDD, major depressive disorder; SLC6A4, serotonin transporter gene.

달리 표시되지 않는 한 데이터는 평균(s.d.)으로 표시되었다.

^a : 인구통계학적 및 임상적 특성에 대한 유의 수준. $P < 0.05$

^b : Bonferroni 보정을 이용하여 다중 비교를 위해 SLC6A4 메틸화의 유의 수준을 보정; $P < 0.05/5$ (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 및 CpG5)=0.01

<2-2> TBSS 분석, AD 및 RD 값

약물 치료를 하지 않은 MDD 환자는 건강한 대조군과 비교하여 뇌량의 genu와 뇌량체에 대한 FA 값이 유의하게 낮았다(FWE corrected, $P = 0.004$, 표 2 및 도 1). 따라서, 뇌량의 genu와 뇌량체를 ROI로 정의하였다.

뇌량체의 AD 값은 두 군 간에 유의한 차이가 있었다. MDD 군은 중등도 효과 크기(Cohen's $f = 0.322$, $\eta^2 = 0.125$)를 나타낸 정상 대조군($F(1,81) = 11.577$, $P = 0.001$)보다 낮은 AD 값을 나타내었다. 뇌량체의 RD 값 또한 두 군 간에 유의한 차이가 있었다. MDD 그룹은 큰 효과 크기(Cohen's $f = 0.53$, $\eta^2 = 0.222$)를 나타낸 건강한 대조군($F(1,81) = 23.084$, $P < 0.001$)보다 높은 RD 값을 나타내었다. 또한, 뇌량 genu의 RD 값은 두 군 간에 유의한 차이가 있었다. MDD 그룹은 큰 효과 크기(Cohen's $f = 0.59$, $\eta^2 = 0.255$)를 나타낸 건강한 대조군($F(1,81) = 27.793$, $P < 0.001$)과 비교하여 더 높은 RD 값을 나타냈다(표 3 및 도 2).

표 2

Cluster size	P-value ^a	MNI peak coordinates (mm)			Anatomical region
		X	Y	Z	

1872	0.004	- 2	23	13	뇌량의 genu(Genu of corpus callosum) 뇌량체(Body of corpus callosum)
------	-------	-----	----	----	---

[0105] FA, fractional anisotropy; MDD, major depressive disorder; MNI, Montreal Neurological Institute coordinates.

[0106] ^a : 임계값 없는 클러스터 향상 보정된 P-value(family-wise comparisons, error corrected, P<0.01).

표 3

	MDD patients (n = 35)	Healthy controls (n = 49)	F	P-value
Axial diffusivity				
gCC	0.001709 (1.08E - 05)	0.001681 (1.09E - 05)	3.204	0.077
bCC	0.001739 (1.32E - 05)	0.001793 (9.43E - 06)	11.577	0.001 ^a
Radial diffusivity				
gCC	0.000345 (7.44E - 06)	0.000283 (8.71E - 06)	27.793	<0.001 ^a
bCC	0.000454 (7.67E - 05)	0.000404 (6.86E - 06)	23.084	<0.001 ^a

[0109] AD, axial diffusivity; bCC, body of corpus callosum; gCC, genu of corpus callosum; MDD, major depressive disorder; RD, radial diffusivity.

[0110] Bonferroni 보정을 이용하여 다중 비교를 위해 유의 수준을 보정; P<0.05/2 (BCC, GCC)=0.025.

[0112] <2-3> FA, AD 및 RD 값과 SLC6A4 DNA 메틸화 상태 사이의 상관관계

[0113] 뇌량체의 FA 값과 CpG3에서의 SLC6A4 DNA 메틸화 사이의 유의한 역상관관계가 MDD 환자에서 확인되었으며 (Pearson's correlation: $r = -0.493$, $P = 0.003$, 표 4 및 도 3), CpG4에서도 유의미한 역상관관계가 있었다 (Pearson's correlation: $r = -0.438$, $P = 0.01$, 표 4). 뇌량체의 AD 값과 CpG3에서의 SLC6A4 DNA 메틸화 사이의 유의한 역상관관계가 MDD 군에서도 발견되었다 (Pearson's correlation: $r = -0.478$, $P = 0.004$, 표 4 및 도 3). 건강한 대조군에서는 뇌량체의 DTI 수치와 SLC6A4 DNA 메틸화 상태 사이에 유의한 상관관계가 없었다.

[0114] 뇌량 genu의 경우, MDD 환자에서 유의한 상관관계가 나타나지 않았다. 그러나, 건강한 대조군에서는 뇌량 genu의 FA 값과 CpG4에서의 SLC6A4 DNA 메틸화 사이의 유의한 역상관관계가 관찰되었다(Pearson's correlation: $r = -0.372$, $P = 0.009$, 표 4 및 도 3). 또한, 건강한 대조군에서는 뇌량 genu의 RD 값과 CpG4에서의 SLC6A4 DNA 메틸화 상태 사이에 유의한 양의 상관관계가 나타났다(Pearson's correlation: $r = 0.388$, $P = 0.006$, 표 4 및 도 3).

[0115] MDD 환자는 큰 효과 크기(Cohen's $q = 0.5$)를 나타낸 건강한 대조군(FA : $z = -2.16$, $P<0.05$)과 비교하여 CpG3에서의 SLC6A4 DNA 메틸화와 뇌량체의 FA 값 사이에 유의한 상관관계를 보였다. 또한, MDD 환자는 중간 효과 크기(Cohen's $q = 0.45$)를 나타낸 건강한 대조군($z = 2.56$, $P<0.05$)과 비교하여 뇌량체의 AD 값과 CpG3에서의 SLC6A4 DNA 메틸화 사이에 유의한 상관관계를 보였다. 그러나 건강한 대조군에서 뇌량 genu의 CpG4에서의 FA 값 및 RD 값과 CpG4에서의 SLC6A4 DNA 메틸화 사이의 상관 관계는 MDD 환자에 비해 유의하게 높지 않았다(FA : $z = 0.57$, $P>0.1$; RD : $z = 1.04$, $P>0.1$).

표 4

	SLC6A4 methylation				
	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5
FA					
MDD patients					
gCC	- 0.068 (0.702)	- 0.195 (0.27)	- 0.28 (0.108)	- 0.253 (0.15)	- 0.132 (0.458)

bCC	- 0.301 (0.084)	- 0.255 (0.15)	- 0.493 (0.003) ^a	- 0.438 (0.01) ^b	- 0.142 (0.422)
Healthy controls					
gCC	- 0.191 (0.192)	- 0.17 (0.249)	- 0.203 (0.167)	- 0.372 (0.009) ^a	- 0.095 (0.519)
bCC	- 0.022 (0.88)	- 0.03 (0.840)	- 0.042 (0.778)	- 0.117 (0.428)	0.013 (0.931)
AD					
MDD patients					
gCC	- 0.188 (0.288)	- 0.315 (0.07)	- 0.419 (0.14)	- 0.361 (0.036)	- 0.301 (0.084)
bCC	- 0.225 (0.2)	- 0.252 (0.151)	- 0.478 (0.004) ^a	- 0.341 (0.049)	- 0.293 (0.092)
Healthy controls					
gCC	0.215 (0.143)	- 0.139 (0.345)	- 0.101 (0.493)	0.201 (0.170)	- 0.042 (0.779)
bCC	0.024 (0.872)	0.012 (0.938)	0.068 (0.647)	0.082 (0.577)	- 0.080 (0.587)
RD					
MDD patients					
gCC	0.034 (0.847)	0.124 (0.486)	0.190 (0.282)	0.168 (0.341)	0.042 (0.815)
bCC	0.237 (0.178)	0.156 (0.378)	0.307 (0.077)	0.294 (0.092)	0.021 (0.907)
Healthy controls					
gCC	0.200 (0.173)	0.153 (0.298)	0.175 (0.234)	0.388 (0.006) ^a	0.064 (0.664)
bCC	0.028 (0.850)	0.041 (0.780)	0.022 (0.883)	0.107 (0.470)	-0.041 (0.783)

[0118] AD, axial diffusivity; bCC, body of corpus callosum; FA, fractional anisotropy; gCC, genu of corpus callosum; MDD, major depressive disorder; RD, radial diffusivity; SLC6A4, serotonin transporter gene.

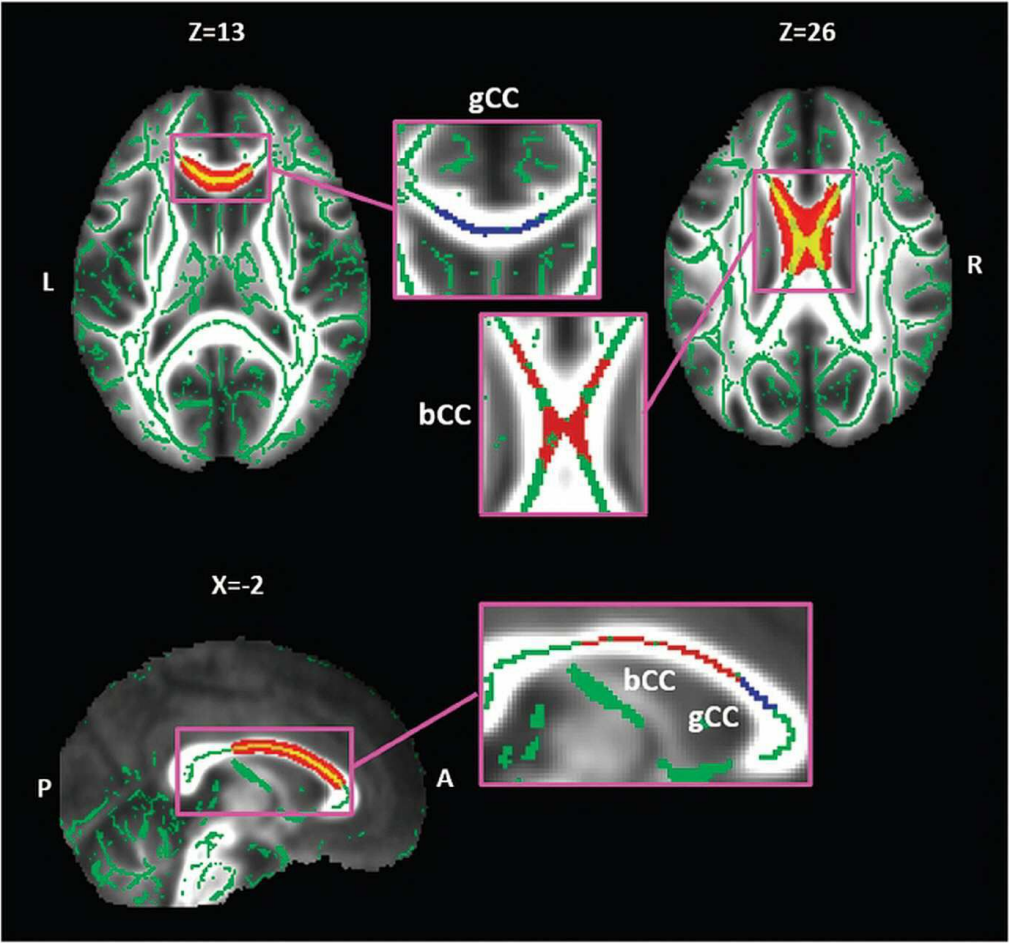
[0119] 모든 데이터는 연령(P-value)을 제어하는 Pearson's 상관 계수로 주어졌다.

[0120] ^a : Bonferroni 보정을 이용하여 다중 비교를 위해 SLC6A4 메틸화의 유의 수준을 보정; $P < 0.05/5$ (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 및 CpG5) = 0.01.

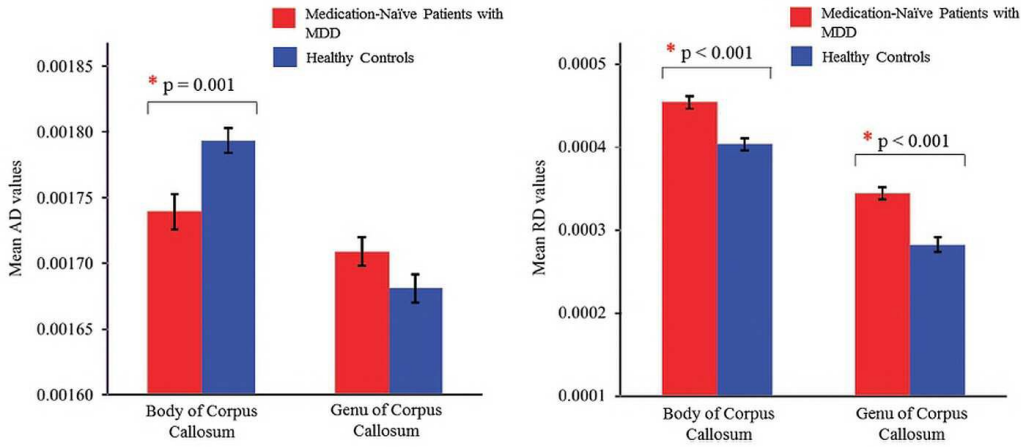
[0121] ^b : 통계적 유의성 $P = 0.01$.

도면

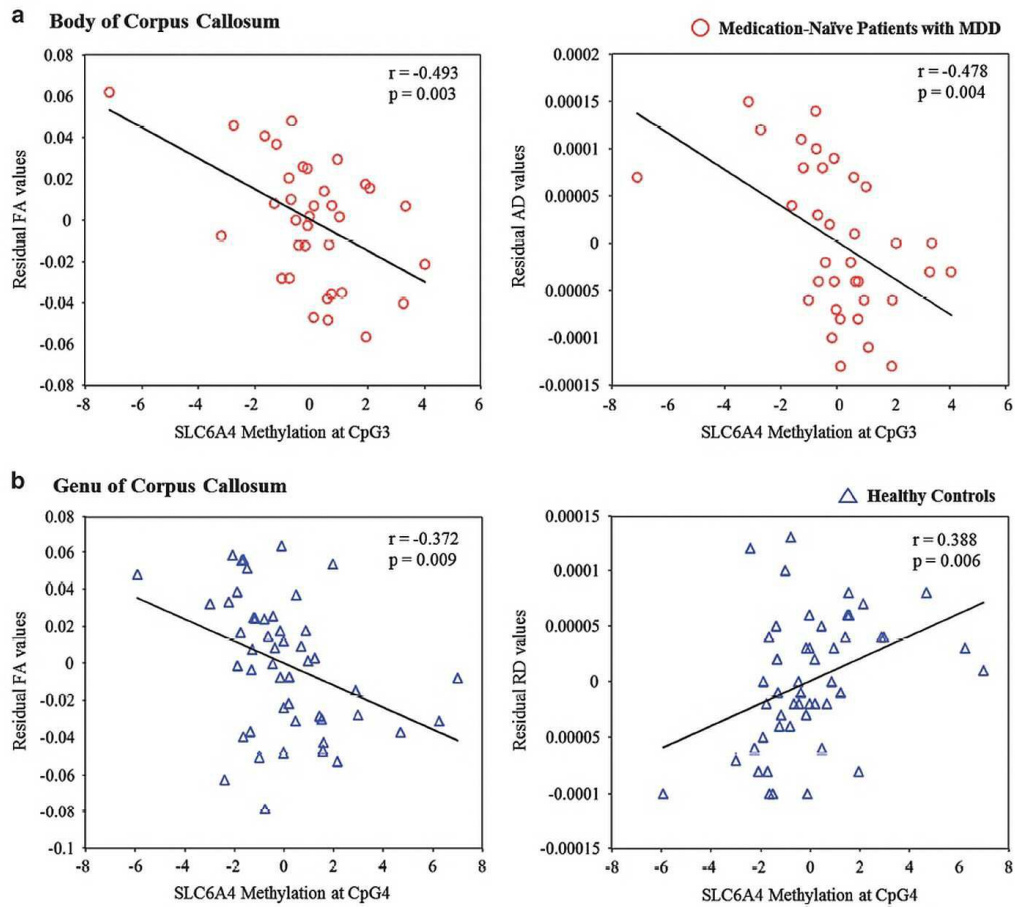
도면1



도면2



도면3



도면4

