



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0121795

(43) 공개일자

2013년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2013-0123253(분할)

(22) 출원일자

2013년10월16일

심사청구일자

2013년10월16일

(62) 원출원

특허 10-2010-0137820

원출원일자

2010년12월29일

심사청구일자

2012년03월09일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

송규영

서울특별시 강남구 압구정동 434 현대아파트 114동 204호

양석균

서울특별시 강남구 도곡2동 삼성타워팰리스 G동 1301호

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭

한국인의 췌양성 대장암 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커, 이를 이용한 대장암 또는 크론병 위험 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 한국인의 췌양성 대장암 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커를 제공한다. 한국인의 췌양성 대장암 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커는 한국인의 염증성 장질환의 하위군인 췌양성 대장암 또는 크론병의 유전적인 위험 인자로서, 췌양성 대장암 또는 크론병의 유전적인 진단 표지로서, 췌양성 대장암 또는 크론병의 유전적인 진단 표지로서 췌양성 대장암 또는 크론병 위험 예측 방법 등에 유용하게 사용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0700

부처명 교육과학기술부

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 전유전체연관검색을 활용한 한국인 염증성 장질환 유전자발굴과 발병기전 분석[1]

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

CARD8 유전자의 rs1972619의 단일염기다형성 위치인 1852번째 염기가 G인 다형성 마커를 포함하는 한국인의 크론병 위험 예측용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 한국인의 크론병의 병변의 위치가 회결장, 발현 형태가 염증형 또는 항문 주위 치루 부존재인 것을 특징으로 하는 한국인의 크론병 위험 예측용 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 한국인의 궤양성 대장염 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커, 이를 이용한 대장염 또는 크론병 위험 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 장질환은 임상적으로 궤양성 대장염 및 크론병으로 이루어진 만성 재발성 질환이다. 주로, 염증성 장질환은 인종별로 유태인과 코카시안에서 발생이 많고 동양인에는 상대적으로 발병 빈도는 드물다. 그런데, 최근에는 남유럽과 우리나라를 포함하는 아시아 국가, 그리고 다른 개발도상국에서도 발병률이 증가하고 있다. 그런데, 염증성 장질환의 두 하위군인 궤양성 대장염 및 크론병으로 많은 환자들이 고통 받고 있지만 이 질병의 명확한 원인이나 치료 방법은 제시되지 않았으며, 많은 임상 연구에도 불구하고 전문가의 판단이나 의견으로밖에 답변이 어려운 문제들이 많다. 따라서 환자 진료나 치료 방법에 차이가 있을 수 있으며, 이러한 차이를 줄이기 위해서는 궤양성 대장염 및 크론병 위험을 정확하게 진단하는 것이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명의 목적은 한국인 궤양성 대장염 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커를 제공하는 데에 있다.

[0004] 본 발명의 다른 목적은 한국인의 궤양성 대장염 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커를 이용하여 한국인에서의 대장염 또는 크론병 위험을 예측하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CARD8 유전자의 rs2043211의 단일염기다형성 위치인 15075번째 염기가 T인 한국인의 궤양성 대장염 위험 예측용 다형성 마커를 제공한다.

[0006] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한국인의 궤양성 대장염 위험 예측용 다형성 마커에서 상기 한국인은 남성일 수 있다.

[0007] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한국인의 궤양성 대장염 위험 예측용 다형성 마커에서 상기 한국인의 궤양성 대장염의 분포 범위가 좌측 결장염 또는 전결장염일 수 있다.

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CARD8 유전자의 rs1972619의 단일염기다형성 위치인 1852번째 염기가 G인 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커를 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커에서 한국인의 크론병의 병변의 위치가 회결장, 발현 형태가 염증형 또는 항문 주위 치루 부존재일 수 있다.

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CARD8 유전자의 rs4389238의 단일염기다형성 위치인 32342번째 염기가 T인 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커를 제공한다.

- [0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커에서 상기 한국인은 남성일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커에서 한국인의 크론병의 병변의 위치가 회결장일 수 있다.
- [0013] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 한국인 피험자로부터 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 게놈 DNA 상에 존재하는 *CARD8* 유전자의 rs2043211의 단일염기다형성 위치인 15075번째 염기가 T인 한국인의 궤양성 대장염 위험 예측용 다형성 마커, *CARD8* 유전자의 rs1972619의 단일염기다형성 위치인 1852번째 염기가 G인 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커 또는 *CARD8* 유전자의 rs4389238의 단일염기다형성 위치인 32342번째 염기가 T인 한국인의 크론병 위험 예측용 다형성 마커를 검출하는 단계를 포함하는 궤양성 대장염 또는 크론병 위험 예측 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 한국인의 궤양성 대장염 및 크론병 위험 예측용 다형성 마커는, 한국인의 염증성 장질환의 하위 군인 궤양성 대장염 또는 크론병의 유전적인 위험 인자로서, 궤양성 대장염 또는 크론병의 유전적인 진단 표지로서 궤양성 대장염 또는 크론병 위험 예측 방법 등에 유용하게 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 실시예

[0017] 1. 대상 집단

- [0018] 본 실시예에 따른 집단은 한국인으로서, 크론병(Crohn's disease, CD) 환자 650명(남성 441명, 여성 209명), 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC) 환자 660명(남성 344명, 여성 316명), 정상인 대조군 688명(남성 351명, 여성 337명)으로 이루어졌다. 크론병 또는 궤양성 대장염에 걸린 환자는 종래의 임상적, 방사선학적, 내시경적 및 조직병리학적 기준에 따라 서울아산병원의 염증성 장질환(IBD) 클리닉에서 진단되었다. 크론병 또는 궤양성 대장염으로 분류할 수 없는 불확정 대장염(Indeterminate colitis, IC)은 본 실시예에서 제외되었다. 서울아산병원의 건강증진센터(Health Promotion Center)에서 특이 질환이 없는 대조군을 모집하였다. 약간 개량한 몬트리얼 분류법(Montreal classification)을 이용하여 크론병 및 궤양성 대장염의 표현형 하위군(Phenotypic subgroup)을 결정하였다. 두 명의 독립적인 조사자(크론병에 대해서는 S.K.Y. 및 S.K.P. 궤양성 대장염에 대해서는 S.K.Y. 및 B.D.Y.)가 유전자형(genotype) 분석 결과를 모른 상태에서 분류시키는 방법을 이용하였다. 즉, 크론병 환자는 진단 당시 시 나이(A1: 16살 이하, A2: 17 내지 40살, A3: 40살 초과), 병변의 위치(L1: 회장(ileum), L2: 결장(colon); L3: 회결장(ileocolon)), 병변의 발현 형태(B1: 염증형(inflammatory), B2: 협착형(stricturing), B3: 관통형(penetrating))에 따라서 하위분류 되었다. 몬트리얼 분류 중 상부 위장관(upper GI) 침범 및 항문 주변 병변(perianal disease modifier)은 적용하지 않았다. 염증성 대장염 환자들은 대장내시경 소견 즉, 최대 내시경 분포 범위(maximal endoscopic extent, E1: 궤양성 직장염(ulcerative proctitis), E2: 좌측 결장염(left-sided UC), E3: 전결장염(extensive UC))를 기초로 분류되었다. 본 실시예의 집단의 인구 통계학적 및 임상학적인 특징은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0019]

	크론병(n=650)		궤양성 대장염(n=660)		대조군(n=688)	
	명(N)	비율(%)	명(N)	비율(%)	명(N)	비율(%)
성별	-	-	-	-	-	-
남성	441	67.8	344	52.1	351	51.0
여성	209	32.2	316	47.9	337	49.0
진단 시 평균 연령(yr)	24.3±7.7		36.6±12.9		-	
진단 시 나이	-	-	-	-	-	-
16세 이상	63	9.7	21	3.2	-	-
17 내지 40세	560	86.2	374	56.7	530	77.0
40 세 초과	27	4.1	265	40.2	158	23.0

위치(location)	-	-	-	-	-	-
회장(ileum)	123	18.9	-	-	-	-
결장(colon)	31	4.8	-	-	-	-
회결장(ileocolon)	496	76.3	-	-	-	-
분포범위(extent)	-	-	-	-	-	-
직장염(proctitis)	-	-	200	28.2	-	-
좌측 결장염(left-sided UC)	-	-	208	31.7	-	-
전결장염(extensive UC)	-	-	252	37.4	-	-
발현 형태(behavior)	-	-	-	-	-	-
염증형(inflammatory)	296	45.5	-	-	-	-
협착형(stricture)	135	20.8	-	-	-	-
관통형(penetrating)	219	33.7	-	-	-	-
perianal fistula(항문 주위 치루)	-	-	-	-	-	-
없음(No)	278	42.8	-	-	-	-
있음(Yes)	372	57.2	-	-	-	-

[0020] 본 실시예는 서울아산병원 임상연구심의위원회의 승인을 받았고, 모든 피험자로부터 서명 동의를 취득하였다.

[0021] 2. 단일염기다형성 유전자형 분석(SNP genotyping)

[0022] 프로테아제(proteinase) K 및 페놀/클로로포름 추출법을 이용하는 표준적인 방법으로, EDTA-항응고(EDTA-anticoagulated) 처리된 정맥혈 5ml로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. CARD8(caspase recruitment domain-containing protein 8)에서 7개 SNP (rs1965759, rs1062808, rs4389238, rs2288877, rs2043211, rs2288876, rs1972619)의 유전자형을 분석하였다. 상기 rs 번호는 NCBI dbSNP에 공식적으로 등록된 SNP의 번호를 의미한다. 유전자형 분석은 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based system (Sequenom, San Diego, CA)을 이용하였고 Analytical Genetics Technology Centre, Princess Margaret Hospital/University Health Network (Toronto, Canada)에서 수행하였다.

[0023] 3. 혈청 내의 IL-1 β 농도의 측정

[0024] 혈청 샘플은 -20℃에서 보관되었다. 혈청 내의 인터류킨-1 β 의 정량적 측정은 human IL-1 β ELISA kit II (BD Biosciences, San Diego, USA)를 이용하여 수행하였다. 제조자의 매뉴얼에서 설명한 바와 같이, microtiter plate(BD Biosciences, San Diego, USA)는 IL-1 β 에 대한 마우스 단일클론 항체 100 μ l/웰이 코팅되어 있다. 표준 및 순차적으로 희석된 인간 혈청 샘플을 상기 웰에 넣고 상온에서 2시간동안 배양하였다. 세척 완충제로 5번 세척한 후, 2차 항체인 biotinylated 항-인간 IL-1 β 항체를 첨가하고, 상온에서 1시간동안 배양시켰다. 2번 세척한 후, 스트렙타비딘-퍼옥시다제(streptavidin-horseradish peroxidase) 100 μ l를 첨가하고 상온에서 30분 동안 배양시켰다. 테트라메틸-벤지딘(TMB) 기질 용액 100 μ l을 첨가함으로써 색반응을 시키고, 정지(stop) 용액 50 μ l을 첨가함으로써 상기 색반응을 정지시켰다. ELISA 플레이트 리더를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 7개의 IL-1 β 표준 희석용액으로부터 표준곡선을 구하고, IL-1 β 샘플 농도를 측정한다. 상기 분석(assay)의 검출범위는 1.95 내지 125pg/ml 이었다.

[0025] 4. 통계학적 분석(statistical analysis)

[0026] 상업적 프로그램인 SNP Alyze version 5.0 (Dynacom Co., Yokohama, Japan)을 이용하여 하디-와인버그 평형으로 예상되는 값에 대한 각각의 집단 및 대조군 유전자형 빈도(genotype frequency) 사이의 일치성을 조사하였다. 상기 관련성은 PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) 및 version 3.2 of the Haploview program (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>)을 이용하는 permutation correction과 함께 χ^2 테스트를 이용하여 서로 다른 군의 피험자들의 대립 유전자(allele) 빈도 및 유전자형 빈도를 비교함으로써 구하였다.

[0027] 대립 유전자 빈도는 각각의 군과 대조군 사이를 로지스틱 회귀분석(logistic regression)을 이용하여 비교하여 나이 및 성별 보정된 오즈비(odds ratio, OR) 및 95% 신뢰구간(confidence interval, CI)을 구하였다. 환자-대조군 분석(case control analysis)에서 p -값(p -value)이 0.2 이하인 단일염기다형성(SNP)에 대해 유전자형-표현형 분석을 수행하였다. 로지스틱 회귀 분석을 또한 수행하여 표현형 및 병변 표현형 사이의 유의적 관련성이 있는 지를 조사하였다.

[0028] χ^2 테스트에 대응하는 pair-wise 연관불균형(linkage disequilibrium, LD) 값, D' 및 로스퀘어(r^2), 및 p -값을 SNP Alyze 소프트웨어 패키지 및 Haploview 프로그램 version 3.2를 이용하여 계산하였다. 염색체 19q13.3 상에 43,349 염기쌍 (bp)에 이르는 *CARD8*의 7개의 다형성(polymorphism) 사이의 pair-wise 연관불균형(LD)은 약간 낮다($0.08 < R^2 < 0.51$, 데이터는 나타내지 않음). 일체배형(haplotype) 분석 결과는 단일 마커 분석과 다르지 않았다. 다양한 유전자형군 사이의 IL-1 β 수준의 차이를 ANOVA(analysis of variance) 및 t -테스트를 이용하여 평가하였다. p -값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였고, 상기 데이터를 SPSS version 12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 분석하였다.

[0029] 5. 결과

[0030] (1) 한국인의 염증성 장질환과 *CARD8*의 다형성과의 관련성 분석

[0031] 1,310명의 염증성 장질환 환자(650명의 크론병 환자 및 660명의 궤양성 대장염환자) 및 688명의 건강한 대조군에 대해 *CARD8*의 7개의 단일염기다형성을 분석하였다. 상기 7개의 단일염기다형성(SNP)은 하디-와인버그 평형으로부터 유의편차(significant deviation)를 보여주지 못했다. 한국인에 있어서는 상기 7개의 단일염기다형성(SNP)이 염증성 장질환 환자군에서 유의적인 관련성을 보여주지 못했다. 대조군과 염증성 장질환 환자군 사이의 7개의 단일염기다형성의 대립 유전자 빈도 차이 범위는 0.1 내지 1.7%이었고, 통계적으로 유의한 범위에 도달하지 못했다(데이터는 표시하지 않음). 그런데, 크론병 환자군 및 궤양성 대장염 환자군 각각에 대하여 연관성 분석을 수행한 결과, 6개의 단일염기다형성은 정반대의 위험 대립 유전자(opposite risk allele)를 보여 주었고, 각 질환에 대해 통계학적으로 관련성을 보여주는 상기 단일염기다형성은 서로 달랐다(표 2 및 표 3 참조, aOR은 나이 및 성별 보정된 오즈비, ^a염색체 위치(a chromosome position), ^b대립 유전자 1은 위험 대립 유전자이며, ^a대립 유전자 1은 위험 대립 유전자임). 하기 표 2는 궤양성 대장염 환자군과 대조군 사이의 *CARD8*의 연관성 분석 결과이며, 하기 표 3은 크론병 환자군과 대조군 사이의 *CARD8*의 연관성 분석 결과를 나타낸다.

표 2

[0032]

ID	위치(position ^a)	대립유전자(all ^b ele)		UC 환자군의 유전자형(genotype of case)			합계	대조군 유전자형(genotype of control)			합계
				11	12	22		11	12	22	
rs1965759	53399393	C	T	341(53.7%)	252(39.7%)	42(6.6%)	635	302(51.0%)	249(42.1%)	41(6.9%)	592
rs1062808	53403288	G	A	173(27.4%)	314(49.7%)	145(22.9%)	632	143(24.2%)	305(51.5%)	144(24.3%)	592
rs4389238	53412251	C	T	388(61.2%)	221(34.9%)	25(3.9%)	634	353(59.7%)	214(36.2%)	24(4.1%)	591
rs2288877	53429518	A	G	377(57.8%)	242(37.1%)	33(5.1%)	652	388(57.1%)	244(35.9%)	48(7.1%)	680
rs2043211	53429363	T	A	150(22.9%)	318(48.6%)	186(28.4%)	654	112(16.4%)	354(51.9%)	216(31.7%)	682

rs2288876	53429576	T	C	371(57.4%)	241(37.3%)	34(5.3%)	646	387(57.1%)	243(35.8%)	48(7.1%)	678
rs1972619	53442741	A	G	59(9.5%)	273(44.0%)	288(46.5%)	620	52(8.8%)	237(40.3%)	299(50.9%)	588
ID	위치	대립유전자		대립 유전자 1 대 2 χ^2 (p -값)	유전자형 11 대 22			유전자형 11+12 대 22		유전자형 11 대 12+22	
		1	2		aOR(95% CI)	p -값		aOR(95% CI)	p -값	aOR(95% CI)	p -값
rs1965759	53399393	C	T	0.696(0.404)	1.191(0.742-1.911)	0.470		1.119(0.706-1.775)	0.633	1.157(0.918-1.458)	0.216
rs1062808	53403288	G	A	1.294(0.255)	1.225(0.881-1.703)	0.227		1.092(0.832-1.433)	0.526	1.201(0.922-1.565)	0.175
rs4389238	53412251	C	T	0.226(0.634)	1.023(0.564-1.859)	0.936		1.012(0.561-1.825)	0.969	1.030(0.814-1.305)	0.804
rs2288877	53429518	A	G	0.689(0.407)	1.492(0.926-2.403)	0.100		1.502(0.940-2.398)	0.089	1.043(0.835-1.302)	0.711
rs2043211	53429363	T	A	6.411(0.011)	1.551(1.126-2.136)	0.007		1.170(0.921-1.486)	0.198	1.505(1.140-1.988)	0.004
rs2288876	53429576	T	C	0.420(0.517)	1.424(0.888-2.285)	0.143		1.439(0.905-2.289)	0.124	1.028(0.823-1.284)	0.807
rs1972619	53442741	A	G	1.838(0.175)	1.178(0.775-1.791)	0.442		1.172(0.929-1.479)	0.182	1.095(0.732-1.639)	0.658

표 3

[0033]

ID	대립유전자 (allele ^b)		CD 환자군의 유전자형(genotype of CD case)			합계	대조군 유전자형(genotype of control)			합계
	1	2	11	12	22		11	12	22	
rs1965759	C	T	330(53.14%)	244(39.29%)	47(7.57%)	621	302(51.01%)	249(42.06%)	41(6.93%)	592
rs1062808	A	G	169(27.21%)	316(50.89%)	136(21.90%)	621	144(24.32%)	305(51.52%)	143(24.16%)	592
rs4389238	T	C	45(7.25%)	226(36.39%)	350(56.36%)	621	24(4.06%)	214(36.21%)	353(59.63%)	591
rs2288877	G	A	44(6.79%)	249(38.43%)	355(54.78%)	648	48(7.06%)	244(35.88%)	388(57.06%)	680
rs2043211	A	T	230(35.44%)	306(47.15%)	113(17.41%)	649	216(31.67%)	354(51.91%)	112(16.42%)	682
rs2288876	C	T	44(6.82%)	246(38.14%)	355(55.04%)	645	48(7.08%)	243(35.84%)	387(57.08%)	678
rs1972619	G	A	335(54.65%)	248(40.46%)	30(4.89%)	613	299(50.84%)	237(40.31%)	52(8.84%)	588
ID	대립유전자 (allele ^b)		대립 유전자 1 대 2 χ^2 (p -값)	유전자형 11 대 22			유전자형 11+12 대 22		유전자형 11 대 12+22	
	1	2		aOR(95% CI)	p -값		aOR(95% CI)	p -값	aOR(95% CI)	p -값
rs1965759	C	T	0.167(0.683)	0.922(0.568-1.498)	0.743		0.918(0.573-1.473)	0.724	0.996(0.781-1.269)	0.972
rs1062808	A	G	1.606(0.205)	1.345(0.949-1.906)	0.096		1.221(0.915-1.628)	0.174	1.211(0.917-1.600)	0.177
rs4389238	T	C	3.582(0.058)	1.923(1.098-3.367)	0.022		1.139(0.891-1.457)	0.298	1.883(1.085-3.269)	0.024

rs2288877	G	A	0.352(0.553)	1.076(0.668-1.733)	0.764	1.164(0.919-1.474)	0.208	1.007(0.632-1.604)	0.978
rs2043211	A	T	0.528(0.467)	1.019(0.719-1.446)	0.914	0.904(0.662-1.235)	0.525	1.167(0.911-1.496)	0.222
rs2288876	C	T	0.277(0.599)	1.074(0.667-1.729)	0.769	1.155(0.912-1.464)	0.232	1.009(0.633-1.607)	0.971
rs1972619	G	A	4.569(0.033)	2.010(1.212-3.332)	0.007	1.994(1.217-3.266)	0.006	1.123(0.880-1.433)	0.350

[0034] (2) 한국인의 궤양성 대장염(UC)과 *CARD8*의 다형성과의 관련성 분석

[0035] 궤양성 대장염 환자군에 있어서의 7개의 단일염기다형성의 유전자형 분포는 상기 표 2를 통해 나타냈다. 상기 결과는 로지스틱 회귀분석을 이용하여 성별 및 연령 보정된 오즈비(OR)로서 나타냈다. 7개의 단일염기다형성을 유전자형을 분석한 결과, rs2043211 즉, *CARD8*의 단백질 발현의 변이를 초래하는 단일염기다형성(C10X)이 궤양성 대장염 환자군과 대조군 사이에서 대립 유전자 빈도(4.9%)에 있어서 가장 유의적인 차이를 보여주었다($P=0.011$). 그런데, 상기 대조군과 크론병 환자군 사이의 차이는 반대 방향으로 1.4%였다(표 3 참조). 상기 크론병 환자군 및 궤양성 대장염 환자군 사이의 정지 대립 유전자 빈도(stop allele frequency)의 차이는 6.3%이며, 통계적으로 유의하였다($P=0.0013$). AA 유전자형과 비교할 때 TT 유전자형의 상기 rs2043211의 보정된 오즈비(OR)는 1.55이었다(95% 신뢰구간(CI)=1.13-2.14, $P=0.007$).

[0036] 성별에 따른 관련성 분석을 수행하였다. 남성 및 여성 사이의 대립유전자 빈도에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 보여주는 유일한 마커는 rs2043211이었다. 상기 차이는 남성에서는 6.8%, 여성에서는 2.7%이었으며, 남성에서만 통계적으로 유의하였다($P=0.0011$). AA 유전자형과 비교할 때 TT 유전자형의 상기 rs2043211의 보정된 오즈비(OR)는 남성에서는 1.80(95% 신뢰구간(CI)=1.16-2.78, $P=0.008$)이었고 여성에서는 1.32(95% 신뢰구간(CI)=0.82-2.14, $P=0.256$)로 나타나, 궤양성 대장염의 증가된 위험은 남성에서만 나타남을 알 수 있었다.

[0037] (3) 한국인의 크론병(CD)과 *CARD8*의 다형성과의 관련성 분석

[0038] 크론병 환자군에 있어서의 7개의 단일염기다형성의 유전자형 분포는 상기 표 3을 통해 나타냈다. 상기 결과는 로지스틱 회귀분석을 이용하여 성별 및 연령 보정된 질병에 대한 오즈비(상대적 위험도(relative risk))로서 나타냈다.

[0039] 크론병 환자군과 대조군 사이의 대립 유전자 빈도 및 유전자형 빈도를 비교하기 위한 χ^2 테스트 결과는 *CARD8*의 인트론 1에 위치한 rs1972619에 대해 경계수준의 유의성(marginal significance)을 보여주었다(각각 $P=0.033$, $P=0.022$). 상기 대조군과 크론병 환자군 사이의 대립유전자 빈도의 차이는 3.9%이었다. 그런데, 상기 대조군과 궤양성 대장염 환자군 사이의 차이는 반대 방향으로 2.6%였다(표 2 참조). 따라서, 크론병 환자군과 궤양성 대장염 환자군 사이의 rs1972619 대립 유전자 빈도의 차이는 6.5%이고, 통계적으로 유의하였다($P=4.0 \times 10^{-4}$). AA 유전자형과 비교할 때 GG 유전자형의 상기 rs1972619의 보정된 오즈비(OR)는 2.01이었다(95% 신뢰구간(CI)=1.21-3.33, $P=0.007$). 인트론 8에 위치하는 다른 단일염기다형성, 즉, rs4389238은 대조군과 크론병 환자군 사이의 대립 유전자 빈도의 차이는 3.3%이었다. rs4389238의 소수 대립 유전자(minor allele)는 열성 모델(recessive model 하에서 크론병과 경계수준의 관련성(marginal association)을 보여주었다(OR=1.92, 95% 신뢰구간(CI)=1.10-3.37, $P=0.022$). 반면에 궤양성 대장염에 대해서는 유의적인 관련성을 보여주었던 단백질 발현의 변이를 초래하는 단일염기다형성 SNP(nonsynonymous SNP)은, 즉 rs2043211은 크론병에 대해서는 유의성을 보여주지 못했고, Cys 대립유전자의 빈도는 대조군에서 보다 크론병 환자군에서 높게 나타났다(0.590 대 0.576).

[0040] 성별에 따른 관련성 분석에 따르면, 남성과 여성 사이의 대립 유전자 빈도에 있어서 약한 유의적 차이를 보여주는 유일한 마커는 rs4389238이었다. 상기 차이는 남성에서는 4.6% 이었고 여성에서는 2.6%이었고, 단지 남성에서만 경계수준의 유의성을 나타냈다($P=0.041$). CC 유전자형과 비교할 때 TT 유전자형의 상기 rs4389238의 보정된 오즈비(OR)는 남성에서는 3.09(95% 신뢰구간(CI)=1.30-7.32, $P=0.011$)이었고 여성에서는 1.25(95% 신뢰구간(CI)=0.56-2.76, $P=0.59$)로 나타나, 크론병의 증가된 위험은 남성에서 나타남을 알 수 있었다.

[0041] (4) *CARD8*의 다형성과 궤양성 대장염(UC)의 임상적 표현형(clinical phenotype)

[0042] 궤양성 대장염의 임상적 표현형과 상기 7개의 단일염기다형성 사이의 관계에 대하여 평가하였다. 대조군과 비교할 때 좌측 결장염 또는 전결장염(좌측 결장염($P=0.043$)에 대해 5.6% 및 전결장염에 대해 5.6%($P=0.030$), 표 4 참조)에 대한 rs 2043211의 위험 대립 유전자 빈도(risk allele frequency)에서 통계학적으로 경계수준의 차이(marginal difference)가 관찰되었다. 좌측 결장염 및 전결장염의 결합 하위군(combined subtype) 분석에 따르면, 이것의 관련성은 통계학적으로 유의하였으며, 1,000 순열검정(permutation test)으로 확인하였다($P=0.043$). 하기 표 4는 병변의 분포범위로 계층화된 궤양성 대장염 환자군에 있어서 rs2043211의 유전자형 빈도 및 대립 유전자 빈도의 분석 결과이다.

표 4

rs2043211 (T=1, A=2)		대조군	직장염	<i>P</i>	좌측 결장염	<i>P</i>	전결장염	<i>P</i>	좌측 결장염+전결장염	<i>P</i>
유전자형 빈도	11	112/682 (16.4%)	45/199 (22.6%)	0.045	49/204 (24.0%)	0.014	56/251 (22.3%)	0.038	105/455 (23.1%)	0.005
	12	354/682 (51.9%)	91/199 (45.7%)	0.125	98/204 (48.0%)	0.332	129/251 (51.4%)	0.890	227/455 (49.9%)	0.505
	22	216/682 (31.7%)	63/199 (31.7%)	0.997	57/204 (27.9%)	0.311	66/251 (26.3%)	0.113	123/455 (27.0%)	0.094
대립 유전자	1	578/1364 (42.4%)	181/398 (45.5%)	0.272	196/408 (48.0%)	0.043	241/502 (48.0%)	0.030	437/910 (48.0%)	0.008

[0044] (5) *CARD8*의 다형성과 크론병(CD)의 임상적 표현형

[0045] 크론병의 임상적 표현형과 상기 7개의 단일염기다형성 사이의 관계에 대하여 평가하였다. 표 5에서 나타난 바와 같이, rs1972619 및 rs4389238을 제외하고는 병변의 위치 및 발현형태로 계층화된 크론병의 하위군들 사이에 대립 유전자 빈도에 유의적 차이가 있지 않았다.

[0046] rs4389238의 회결장(ileocolon)을 침범하는 크론병 환자군과 대조군 사이 위험 대립 유전자 빈도에 통계학적으로 경계수준의 차이(4.0%, $P=0.028$)가 관찰되었고, rs1972619의 회결장 질환을 갖는 크론병 환자, 염증형 크론병 환자군 또는 항문 주위 치루 부존재 크론병 환자군과 대조군 사이의 위험 대립 유전자 빈도에 통계학적으로 경계수준의 차이(회결장 질환: 4.3%, $P=0.029$, 염증형: 5.4%, $P=0.018$, 항문 치루 부존재: 4.9%, $P=0.039$)가 관찰되었다. 그런데, 상기 유의성은 1,000 순열검정(permutation test)으로 확인되지는 않았다. 회결장을 침범하는 크론병 환자군, 염증형 크론병 환자군 또는 항문 주위 치루 부존재 크론병 환자군의 rs1972619의 관련성에 대한 보정된 오즈비(OR)는 각각 2.02(95% 신뢰구간(CI)=1.16-3.50, $P=0.013$), 2.94(95% 신뢰구간(CI)=1.41-6.12, $P=0.004$), 2.58(95% 신뢰구간(CI)=1.26-5.28, $P=0.010$)이었다. 하기 표 5는 대조군 및 병변의 위치 및 발현형태로 계층화된 크론병 환자군에 있어서의 *CARD8* 변이체의 유전자형 및 대립 유전자 빈도의 분석 결과이다. 하기 표 5에서, 병변의 위치에서 ML1은 회장(ileum), ML2은 결장(colon), ML3은 회결장(ileocolon)을 나타내며, 병변의 발현 형태에서 MB1은 염증형(inflammatory), MB2은 협착형(stricturing), MB3은 관통형(penetrating)을 나타내며, 대립 유전자 1이 위험 대립 유전자를 나타낸다.

표 5

rs4389238 (T=1, C=2)		대조군	ML1	<i>P</i>	ML2	<i>P</i>	ML3	<i>P</i>
유전자형 빈도	11	24/591(4.1%)	9/119(7.6%)	0.098	4/29(13.8%)	0.014	32/473(6.8%)	0.050
	12	214/591(36.2%)	35/119(29.4%)	0.156	7/29(24.1%)	0.185	184/473(38.9%)	0.367
	22	353/591(59.7%)	75/119(63.0%)	0.503	18/29(62.1%)	0.802	257/473(54.3%)	0.077
	1	262/1182(22.2%)	53/238(22.3%)	0.972	15/58(25.9%)	0.509	248/946(26.2%)	0.030

		대조군	MB1	P	MB2	P	MB3	P
유전자형 빈도	11	24/591(4.1%)	26/280(9.3%)	0.002	6/132(4.6%)	0.801	13/209(6.2%)	0.201
	12	214/591(36.2%)	95/280(33.9%)	0.511	48/132(36.4%)	0.973	83/209(39.7%)	0.368
	22	353/591(59.7%)	159/280(56.8%)	0.410	78/132(59.14%)	0.893	113/209(54.1%)	0.154
	1	262/1182(22.2%)	147/560(26.3%)	0.060	60/264(22.7%)	0.843	109/418(26.1%)	0.103
rs2043211 (A=1, T=2)		대조군	ML1	P	ML2	P	ML3	P
유전자형 빈도	11	216/682(31.7%)	36/122(29.5%)	0.635	14/31(45.2%)	0.116	180/496(36.3%)	0.098
	12	354/682(51.9%)	61/122(50.0%)	0.698	14/31(45.2%)	0.462	231/496(46.6%)	0.071
	22	112/682(16.4%)	25/122(20.5%)	0.271	3/31(9.7%)	0.318	85/496(17.1%)	0.745
	1	786/1364(57.6%)	133/244(54.5%)	0.365	42/62(67.7%)	0.114	591/992(59.6%)	0.343
		대조군	MB1	P	MB2	P	MB3	P
유전자형 빈도	11	216/682(31.7%)	119/296(40.2%)	0.010	49/135(36.3%)	0.294	62/218(28.4%)	0.369
	12	354/682(51.9%)	125/296(42.2%)	0.005	66/135(48.9%)	0.522	115/218(52.8%)	0.828
	22	112/682(16.4%)	52/296(17.6%)	0.660	20/135(14.8%)	0.643	41/218(18.8%)	0.414
	1	786/1364(57.6%)	363/592(61.3%)	0.127	164/270(60.7%)	0.343	239/436(54.8%)	0.303
rs1972619 (G=1, A=2)		대조군	ML1	P	ML2	P	ML3	P
유전자형 빈도	11	299/588(50.9%)	59/119(49.6%)	0.800	17/29(58.6%)	0.414	259/465(55.7%)	0.117
	12	237/588(40.3%)	54/119(45.4%)	0.305	12/29(41.4%)	0.908	182/465(39.1%)	0.701
	22	52/588(8.8%)	6/119(5.0%)	0.168	0/29(0.0%)	0.094	24/465(5.2%)	0.022
	1	835/1176(71.0%)	172/238(72.3%)	0.694	46/58(79.3%)	0.172	700/930(75.3%)	0.029
		대조군	MB1	P	MB2	P	MB3	P
유전자형 빈도	11	299/588(50.9%)	156/276(56.5%)	0.120	74/131(56.5%)	0.243	105/206(51.0%)	0.976
	12	237/588(40.3%)	110/276(39.9%)	0.900	51/131(38.9%)	0.772	87/206(42.2%)	0.628
	22	52/588(8.8%)	10/276(3.6%)	0.006	6/131(4.6%)	0.105	14/206(6.8%)	0.360
	1	835/1176(71.0%)	422/552(76.4%)	0.018	199/262(76.0%)	0.107	297/412(72.1%)	0.676

(6) 혈청 내의 IL-1 β 농도의 측정

단백질 발현의 변이를 초래하는 단일염기다형성(SNP) rs2043211(C10X)의 기능적 중요성을 조사하기 위하여, 유전자형과의 연관관계를 알기 위해 70명의 대조군, 107명의 크론병 환자군, 106명의 궤양성 대장염 환자군의 IL-1 β 의 혈청 내의 수준을 측정하였다. IL-1 β 의 수준은 대조군(크론병 환자군과 궤양성 대장염 환자군 모두에 대해 $0.97 \pm 6.8 \text{ pg/ml}$, $P=0.01$)과 비교할 할 때, 크론병 환자군($7.0 \pm 17.3 \text{ pg/ml}$) 또는 궤양성 대장염 환자군($4.9 \pm 8.4 \text{ pg/ml}$)이 유의적으로 높았다. 그런데, 궤양성 대장염 환자군 및 크론병 환자군 사이의 차이는 통계적으로 유의한 수준에 도달하지 못했다($P=0.265$). 궤양성 대장염 환자군 및 크론병 환자군에 있어서의 IL-1 β 수준과 유전자형 사이의 분산분석(analysis of variance, ANOVA)에 따르면, 궤양성 대장염 환자군(TT: 6.6 ± 11.9 , TA: 5.3 ± 4.1 , AA: 2.8 ± 4.8 , $P=0.116$) 또는 크론병 환자군(TT: 4.1 ± 9.7 , TA: 12.9 ± 29.5 , AA 5.5 ± 10.1 , $P=0.114$) 혈청 내 IL-1 β 수준은 rs2043211 3개의 유전자형 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 표 8에서 나타낸 바와 같이, 이형접합체(heterozygote) 및 동형접합체(homozygote)의 결합 분석(combined analyse)은 rs2043211의 정지 대립 유전자 빈도(stop allele frequency)와 높은 혈청 내 IL-1 β 수준 사이의 양의 상관관

계(positive correlation)는 궤양성 대장염에서만 관찰되었다(TT+AT: $6.1 \pm 9.8 \text{ pg/ml}$, AA: $2.8 \pm 4.8 \text{ pg/ml}$, $P=0.048$). 궤양성 대장염 환자군에서만 성별에 따른 분석에서 더 유의적인 관련성이 관찰되었다. 궤양성 대장염 환자군의 여성 환자에서, rs2043211의 3개의 유전자형 사이의 혈청 내의 IL-1 β 수준에 유의적인 차이가 있었다($P=0.027$). 하기 표 6은 rs2043211의 유전자형에 따른 평균 혈청 내 IL-1 β 수준에 대한 결과를 나타내며, ^a대립 유전자 1은 위험 대립 유전자이다.

표 6

[0050]

ID	대립 유전자 (allele ^a)		UC										
	1	2		11 (N)	12 (N)	22 (N)	11+12 (N)	12+22 (N)	11 대 12 대 22 P	12 대 22 P	11 대 22 P	11+12 대 22 P	11 대 12+22 P
rs2043211	T	A	합계	6.639 (43)	5.254 (24)	2.793 (39)	6.143 (67)	3.731 (63)	0.116	0.041	0.055	0.048	0.133
			남성	3.997 (21)	4.990 (11)	5.176 (15)	4.338 (32)	5.097 (26)	0.824	0.936	0.592	0.658	0.535
			여성	9.161 (22)	5.479 (13)	1.303 (24)	7.793 (35)	2.770 (37)	0.027	0.003	0.025	0.004	0.064