



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0121159
(43) 공개일자 2020년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G16H 50/20 (2018.01) G16B 20/20 (2019.01)
G16B 25/10 (2019.01)
(52) CPC특허분류
G16H 50/20 (2018.01)
G16B 20/20 (2019.02)
(21) 출원번호 10-2019-0043862
(22) 출원일자 2019년04월15일
심사청구일자 2019년04월15일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
김민주
서울특별시 마포구 월드컵북로 481, 6층 2-635호 (상암동)
이종호
서울특별시 용산구 대사관로11길 8-7(한남동)
지선하
서울특별시 마포구 월드컵북로30길 9-22, 101동 903호(성산동, 성산월드타운대림아파트)
(74) 대리인
특허법인 하나

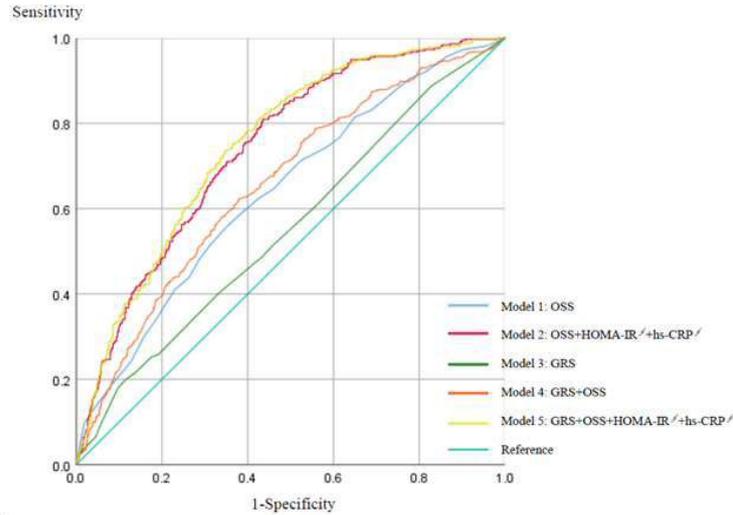
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 유전 위험 점수와 산화 스트레스 점수를 이용한 비만 예후 또는 위험도를 평가하는 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 특정 바이오 마커에 기반한 유전 위험 점수와 산화 스트레스 점수를 이용하여 비만 관련 위험도를 평가하는 방법 및 이를 이용한 비만 관련 위험도 평가용 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G16B 25/10 (2019.02)
A61G 2200/16 (2013.01)
G01N 2800/044 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1C1B2007195
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	과체중 및 비만인에서 비만 관련 유전자, 주요 지질 대사물질, 체지방 및 염증/면역
지표 조절 생리활성물질을 포함하는 맞춤형 식품 프로그램 개발 기술 확보 및 가이드라인 제시	
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C2686
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발(R&D)
연구과제명	코호트기반 대사증후군 및 당뇨병 합병증 예측모형 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.10.01 ~ 2019.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 개체로부터 수득한 DNA에서 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) rs2846412, rs58424360 및 rs591120으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성을 확인하는 단계; 및

(b) 상기 rs2846412, rs58424360 및 rs591120으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성을 가지는 개체를 비만의 위험도가 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 rs2846412의 단일염기다형성을 확인할 때, 11번 염색체(GRCh38.p12, chr11, NC_000011.10) 내 108513480 번째 위치의 대립유전자형이 C/T인 경우 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS)를 부여하고;

상기 rs58424360의 단일염기다형성을 확인할 때, 9번 염색체(GRCh38.p12, chr9, NC_000009.12) 내 76855929번째 위치의 대립유전자형이 G/T인 경우 유전 위험 점수(GRS)를 부여하며;

상기 rs591120의 단일염기다형성을 확인할 때, 1번 염색체(GRCh38.p12, chr1, NC_000001.11) 내 177933618번째 위치의 대립유전자형이 C/G인 경우 유전 위험 점수(GRS)를 부여하여;

산출된 유전 위험 점수(GRS)의 총합을 이용해 개체의 비만 위험도를 판단하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

(a) 개체로부터 수득한 시료에 포함된 산화 스트레스의 바이오 마커인 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA), 산화된 저밀도 지질단백질(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 및 8-에피-프로스타글란딘 F_{2α} (8-epi-prostaglandin F_{2α}, 8-epi-PGF_{2α})의 농도로부터 산화 스트레스 점수(Oxidative Stress Score, OSS)를 산출하는 단계; 및

(b) 상기 산화 스트레스 점수(OSS)가 높을수록 개체의 비만 위험도가 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (a)단계에서 산화 스트레스 점수(OSS)는,

말론디알데히드(MDA)의 농도가 7.70 nmol/mL 이하이면 0점, 7.70 nmol/mL 초과 9.84 nmol/mL 이하이면 1점, 9.84 nmol/mL 초과면 2점을 부여하고;

산화된 저밀도 지질단백질(ox-LDL)은 농도가 35.60 U/L 이하이면 0점, 35.60 U/L 초과 50.89 U/L 이하이면 1점, 50.89 U/L 초과면 2점을 부여하며;

8-에피-프로스타글란딘 F_{2α}(8-epi-PGF_{2α})는 농도가 1,123.89 pg/mg 크레아틴 이하이면 0점, 1,123.89 pg/mg 크레아틴 초과 1,642.56 pg/mg 크레아틴 이하이면 1점, 1,642.56 pg/mg 초과면 2점을 부여하여; 상기 3개 바이오 마커의 산화 스트레스 점수를 합하여 산출한 것인, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

인슐린 저항성(HOMA-IR) 지수 및 고감도 C-반응성 단백질(hs-CRP) 농도를 추가 매개변수로 포함하여 개체의 비

만 위험도를 판단하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 유전 위험 점수(GRS)에 더하여,

산화 스트레스의 바이오 마커인 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA), 산화된 저밀도 지질단백질(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 및 8-에피-프로스타글란딘 F_{2α} (8-epi-prostaglandin F_{2α}, 8-epi-PGF_{2α})의 농도로부터 산출된 산화 스트레스 점수(OSS)를 추가 매개변수로 포함하여 개체의 비만 위험도를 판단하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

개체의 비만 위험 예측 또는 진단용 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커로서,

11번 염색체(GRCh38.p12, chr11, NC_000011.10) 내 108513480번째 위치의 대립유전자형이 C/T인 것을 검출할 수 있는 프로브;

9번 염색체(GRCh38.p12, chr9, NC_000009.12) 내 76855929번째 위치의 대립유전자형이 G/T인 것을 검출할 수 있는 프로브; 및

1번 염색체(GRCh38.p12, chr1, NC_000001.11) 내 177933618번째 위치의 대립유전자형이 C/G인 것을 검출할 수 있는 프로브;로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 프로브를 포함하는, 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

산화 스트레스의 바이오 마커인 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA), 산화된 저밀도 지질단백질(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 및 8-에피-프로스타글란딘 F_{2α} (8-epi-prostaglandin F_{2α}, 8-epi-PGF_{2α})의 농도를 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

인슐린 저항성(HOMA-IR) 지수 및 고감도 C-반응성 단백질(hs-CRP) 농도를 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 비만 위험 예측 또는 진단용 키트.

청구항 11

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 비만 위험 예측 또는 진단용 마이크로 어레이.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 특정 바이오 마커에 기반한 유전 위험 점수와 산화 스트레스 점수를 이용하여 비만 관련 위험도를 평가하는 방법 및 이를 이용한 비만 관련 위험도 평가용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 그 발생률이 세계적으로 해마다 빠르게 증가하고 있다. 비만은 당뇨병, 심혈관 질환, 간 질환 및 신장 질환에 대한 위험 인자로 인식되고 있다.

[0003] 관련 위험을 줄이기 위해서 체중 증가의 원인(예를 들어 생활방식 및 습관)을 조사하는 것이 필요하다.

- [0004] 체지방이 건강에 유해한 영향을 미칠 정도로 과도하게 축적된 상태를 비만이라고 한다.
- [0005] 체지방 분포 위치는 비만으로 인한 사망률과 이환율의 주요 결정 요인이다. 복부비만은 복부에 과도하게 지방이 축적된 상태를 말하며, 특히, 체내 장기를 둘러싸고 있는 체강 내에 지방이 축적되는 내장비만을 복부비만과 같은 용어로 사용한다.
- [0006] 복부비만은 심혈관 질환 및 대사 증후군의 발병 기전에 필수적인 역할을 하는 인슐린 저항성, 이상지질혈증 및 조직적 염증과 관련이 있으며, 비만도가 높아질수록 당뇨병, 담석증, 복부비만, 심장 질환 및 뇌졸중을 포함하는 심혈관 질환 및 대사 증후군의 유병률이 증가할 수 있다.
- [0007] 복부비만의 원인은 음주, 흡연 및 운동 부족과 같은 문화적 요인과, 과도한 열량 섭취 또는 고지방 식이로 인한 식이 환경적 요인, 및 유전적 요인이 있다.
- [0008] 복부비만을 진단하는 방법은 체질량 지수(BMI), 체지방률, 허리 둘레 및 허리 엉덩이 비율 등 다양한 척도가 있다. 그러나 이러한 진단 방법은 한정된 신체적 특성에만 의존하는 진단 방법이기 때문에 이들 척도만으로는 복부비만을 정확히 진단하는데 어려움이 있다.
- [0009] 따라서 복부비만을 일으키는 생물학적 메커니즘을 기반으로 하여 복부비만의 위험도를 평가하는데 사용될 수 있는 바이오 마커를 발굴하고, 이를 이용하여 복부비만의 위험도를 평가하는 방법을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1561656호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 이용해 산출한 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS)와 산화 스트레스의 바이오마커로부터 산출한 산화 스트레스 점수(Oxidative Stress Score, OSS)를 이용하여 비만의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 비만 발병 예측 방법을 이용해 비만의 예후 또는 발병 위험도를 진단하는 키트 또는 마이크로 어레이를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 측면은, (a) 개체로부터 수득한 DNA에서 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) rs2846412, rs58424360 및 rs591120으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성을 확인하는 단계; 및
- [0014] (b) 상기 rs2846412, rs58424360 및 rs591120으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성을 가지는 개체를 비만의 위험도가 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 rs2846412의 단일염기다형성을 확인할 때, 11번 염색체(GRCh38.p12, chr11, NC_000011.10) 내 108513480번째 위치의 대립유전자형이 C/T인 경우 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS)를 부여하고; 상기 rs58424360의 단일염기다형성을 확인할 때, 9번 염색체(GRCh38.p12, chr9, NC_000009.12) 내 76855929번째 위치의 대립유전자형이 G/T인 경우 유전 위험 점수(GRS)를 부여하며; 상기 rs591120의 단일염기다형성을 확인할 때, 1번 염색체(GRCh38.p12, chr1, NC_000001.11) 내 177933618번째 위치의 대립유전자형이 C/G인 경우 유전 위험 점수(GRS)를 부여하여; 산출된 유전 위험 점수(GRS)의 총합을 이용해 개체의 비만 위험도를 판단하였다.
- [0016] 구체적으로, 상기 유전 위험 점수(GRS)는 각각의 SNP에 대하여 위험 대립유전형이 부재한 경우인 동형 비-위험성 대립유전자(homozygous of non-risk alleles)는 0점, 위험 대립유전형이 한 개의 반수체에만 존재하는 경우

인 이형 대립유전자(heterozygous of alleles)는 1점, 동형 위험성 대립유전자(homozygous of the risk alleles)는 2점을 부여하고, 이들 세부점수의 총합인 것일 수 있다.

- [0017] 본 발명의 용어 “개체(subject)”는 진단 대상으로서 인간일 수 있고, 상기 생물학적 시료는 비만의 위험성을 평가하고자 하는 상기 대상체에서 분리된 시료로서, 조직, 세포, 혈액, 혈장, 복막액, 활막액, 타액, 소변, 대변 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 소변일 수 있다.
- [0018] 상기 “단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)”은 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 가지 이상의 대립유전자(allele)가 존재하는 다형성 부위(polymorphic site) 중에서, 단일 염기만이 다른 것을 의미한다.
- [0019] 예컨대, 서로 다른 개체의 세 개의 DNA 단편들(예: AAGT[A/A]AG, AAGT[A/G]AG, AAGT[G/G]AG)과 같이 단일염기에서 차이가 있을 때, 이를 두 개의 대립유전자(C 또는 T)라고 부르며 대다수의 SNP는 두 개의 대립유전자를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 용어 "대립유전자(allele)"란, 상동염색체의 동일한 유전자좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 의미한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP는 두 종류의 대립인자(biallele)를 갖는다.
- [0021] 상기 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있으므로, 번역 프레임의 변화를 유발할 수 있다. 또한, 상기 단일염기다형성은 유전자 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열의 변화를 수반하는 것은 아니다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고, 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 상기 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넨센스일 수 있으며, 상기 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시킬 수 있고 상기 넨센스 변화는 비성숙 종결코돈을 형성할 수 있다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.
- [0022] 인간의 DNA 서열 상의 변이는 질병의 발병 또는 병원체, 화학물질, 약물, 백신 및 다른 시약에 대한 인체의 반응에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 상기 SNP는 맞춤형 의학의 중요한 도구(key enabler)로 활용될 수 있다.
- [0023] 특히, 상기 SNP는 질병군 또는 비질병군 간의 게놈 부위를 비교하는 방식으로 질병을 진단하는 생의학적 연구에서 고려될 수 있다. 상기 SNP는 인간 게놈의 가장 많은 변이이며, 1.9 kb 당 하나의 SNP 비율로 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 SNP는 매우 안정된 유전적 마커이고, 표현형에 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 자동화된 유전자형 규명 시스템에 매우 적합하다.
- [0024] 상기한 바와 같이, 단일염기다형성의 유무로 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS)를 계산할 수 있다. 상기 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS)는 각 SNP 좌위에 존재하는 위험 대립유전자의 수를 세부점수로 부여하고 그 세부 점수의 총합으로 계산될 수 있다.
- [0025] 상기 위험 대립유전형이 SNP에서 발견되면, 비만 발병 위험도가 높은 것으로 판단된다.
- [0026] 본 발명에서, rs2846412의 위험 대립 유전자형은 “C/T” 이고, rs58424360의 위험 대립 유전자형은 “G/T” 이며, rs591120의 위험 대립 유전자형은 “C/G” 에 해당한다. 즉, 상기 rs2846412의 유전자형이 “C” 인 경우, 상기 rs58424360의 유전자형이 “G” 인 경우, 상기 rs591120의 유전자형이 “C” 인 경우 비만 위험도가 높은 것으로 판단할 수 있다.
- [0027] 상기 rs2846412는 exophilin 5 gene (*EXPH5*) 근처에 존재하는 SNP로, 공복 혈당 항상성에 관여하고, *EXPH5*는 제 2형 당뇨병 치료제의 1차 약물인 메트포르민에 대한 혈당 반응과 밀접하게 관련되어 제 2형 당뇨병의 후보 유전자로 확인되었다. 또한, *EXPH5*가 식이조절에 의한 체중 감소 동안 지방 조직에서 상향 조절되었다는 내용도 보고된 바 있다 (Johansson LE et al. Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. Am J Clin Nutr 2012; 96: 196-207).
- [0028] 상기 rs58424360는 prune homolog 2 gene (*PRUNE2*) 근처에 존재하는 SNP로서, *PRUNE2* 유전자가 종양 억제 인자로서 작용하고 그 발현이 전립선 암 세포에서 전립선 암 항원 3에 의해 조절된다는 연구결과가 보고된 바 있으며(Salameh A et al. PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112: 8403-8408), 스트레스 섬유 형성을 감소시키고, Ras 상동 구성체 A(Ras homolog family member A) 활성을 억제함으로써 발암성 세포질로의 형질 전환을 억제한다는 내용의 연구결과가 보고되었다(Soh UJ, Low BC. BNIP2 extra long inhibits RhoA and cellular

transformation by Lbc RhoGEF via its BCH domain. J Cell Sci 2008; 121: 1739-1749). 또한, *Prune2*는 중추 신경계에서 고도로 발현되기 때문에 알츠하이머 병의 감수성 유전자로 확인되었다.

- [0029] 상기 rs591120는 *SEC16B*의 근처에 존재하는 SNP로서, *SEC16B*는 백인 및 일본인 집단의 비만과 유의미한 관련이 있고, 현재 한국인의 비만에 대한 감수성을 가진다는 내용이 보고되었다(Hotta K et al. Association between obesity and polymorphisms in *SEC16B*, *TMEM18*, *GNPDA2*, *BDNF*, *FAIM2* and *MC4R* in a Japanese population. J Hum Genet 2009; 54: 727-731). *SEC16B* 단백질은 다양한 조직에 편재하여 발현되고, 오렉신, 신경 펩타이드 Y 및 프로오피오멜라노코르틴(proopiomelanocortin)과 같은 식욕 관련 펩타이드의 분비를 조절하는 역할을 하는 것으로 판단되며, 탄수화물 및 지질 등의 음식 섭취 조절과 관련이 있을 것으로 기대되어 비만의 발달과 높은 관련이 있을 것으로 기대되고 있다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 제공하는 비만 관련 SNP 위치로 구성된 유전 위험 점수(GRS)를 비만 발병률 예측 모델에 매개변수로 포함되는 경우 비만 발병률 예측을 크게 향상시킬 수 있는 것을 확인하였다.
- [0031] 본 발명의 다른 측면은 (a) 개체로부터 수득한 시료에 포함된 산화 스트레스의 바이오 마커인 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA), 산화된 저밀도 지질단백질(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 및 8-에피-프로스타글란딘 $F_{2\alpha}$ (8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$, 8-epi-PGF $_{2\alpha}$)의 농도로부터 산화 스트레스 점수(Oxidative Stress Score, OSS)를 산출하는 단계; 및 (b) 상기 산화 스트레스 점수(OSS)가 높을수록 개체의 비만 위험도가 높은 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 비만 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 (a)단계에서 산화 스트레스 점수(OSS)는, 말론디알데히드(MDA)의 농도가 7.70 nmol/mL 이하이면 0점, 7.70 nmol/mL 초과 9.84 nmol/mL 이하이면 1점, 9.84 nmol/mL 초과면 2점을 부여하고; 산화된 저밀도 지질단백질(ox-LDL)은 농도가 35.60 U/L 이하이면 0점, 35.60 U/L 초과 50.89 U/L 이하이면 1점, 50.89 U/L 초과면 2점을 부여하며; 8-에피-프로스타글란딘 $F_{2\alpha}$ (8-epi-PGF $_{2\alpha}$)는 농도가 1,123.89 pg/mg 크레아틴 이하이면 0점, 1,123.89 pg/mg 크레아틴 초과 1,642.56 pg/mg 크레아틴 이하이면 1점, 1,642.56 pg/mg 초과면 2점을 부여하여; 상기 3개 바이오 마커의 산화 스트레스 점수를 합하여 산출한 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 산화 스트레스 점수(OSS)는 산화 스트레스 점수를 구성하는 각각의 개별 구성요소를 매개변수로 하는 경우보다 비만 발병률에 있어서 더 확실한 예측이 가능케 하는 인자에 해당한다는 사실을 확인하였다.
- [0034] 산화 스트레스는 활성산소 생산계 및 소거계의 균형이 깨져 활성산소를 제거하는 기능이 저하될 경우 유해산소에 의한 각종 질병이 유발되며, 이러한 활성산소의 부작용을 일컫는다. 또한, 산화 스트레스는 산화촉진제와 항산화제 사이의 불균형으로 정의될 수 있으며, 이것은 산화환원 신호 및 조절에서 세포 손상과 장애를 초래한다. 산화 스트레스는 내인성 및 외인성 요인 모두에 의해 영향을 받으며, 식이 및 약물과 같은 다양한 외인성 요인이 산화 방지제 및 항산화제의 역할을 할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 산화 스트레스 점수는 산화 스트레스 바이오 마커로 널리 알려진 MDA, ox-LDL, 및 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ 를 포함한 세 개의 내재적 요소로 구성된 것을 특징으로 한다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 산화 스트레스 점수는 외인성 요인을 배제하고, 산화 스트레스의 요소를 정확하게 반영할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 본 발명의 다른 측면은, 상기 산화 스트레스 점수(OSS)와 인슐린 저항성(HOMA-IR) 및 고감도 C-반응성 단백질(hs-CRP)을 매개변수로 포함하고, 추가로 상기 유전 위험 점수(GRS)를 포함하는 비만의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법을 제공한다.
- [0037] 상기 HOMA-IR은 인슐린 저항성(Insulin resistance, IR)을 산출하기 위해 HOMA(Homostatic Model Assessment)를 사용하여 계산한 값이다. 상기 인슐린 저항성은 일반적으로 체내 세포가 포도당 섭취, 대사 또는 저장에 대한 내성을 포함하여 인슐린에 대한 감수성을 상실함을 의미한다.
- [0038] 또한, 비만에서의 인슐린 저항성은 지방세포 및 골격근에서 인슐린-자극 포도당 수송과 대사가 감소하고, 간의 포도당 생산 억제 활성이 제 기능을 못하는 것으로 나타난다
- [0039] 본 발명의 또 다른 측면은, 개체의 비만 위험 예측 또는 진단용 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 마커로서, 11번 염색체(GRCh38.p12, chr11, NC_000011.10) 내 108513480번째 위치의 대립유전자형이 C/T인 것을 검출할 수 있는 프로브; 9번 염색체(GRCh38.p12, chr9, NC_000009.12) 내 76855929번째 위치의 대립유전자형이 G/T인 것을 검출할 수 있는 프로브; 및 1번 염색체(GRCh38.p12, chr1, NC_000001.11)

내 177933618번째 위치의 대립유전자형이 C/G인 것을 검출할 수 있는 프로브;로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 프로브를 포함하는, 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다.

- [0040] 본 발명의 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미할 수 있다. 상기 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥일 수 있고, 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 상기 프로브로서 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다.
- [0041] 상기 프로브는 상기 SNP를 포함하는 10 내지 30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 상기 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열 일치에 의해 결정될 수 있으므로, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 상기 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0042] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., MolecularCloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic AcidHybridization, A PracticalApproach, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 상기 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 상기 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 상이하게 결정될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것(예컨대, 대사 이상 또는 비만의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 측면은, 상기 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물에 산화 스트레스의 바이오 마커인 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA), 산화된 저밀도 지질단백질(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 및 8-에피-프로스타글란딘 F_{2a} (8-epi-prostaglandin F_{2a}, 8-epi-PGF_{2a})의 농도를 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다. 나아가 인슐린 저항성(HOMA-IR) 지수 및 고감도 C-반응성 단백질(hs-CRP) 농도를 검출할 수 있는 제제를 추가로 더 포함할 수도 있다.
- [0045] 본 발명의 다른 일 측면은, 상기 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물을 포함하는 비만 위험 예측 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0046] 상기 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 용액 형태의 검출용 키트는 나트륨-인산, 칼륨-인산, 트리스-염산 및 이외의 여러 종류의 완충액 등의 완충액에 단백질 또는 프라이머 등을 별도로 또는 혼합하여 제제화할 수 있으며, 필요에 따라 냉동시키거나 동결 건조할 수도 있다.
- [0047] 상기 비만 위험 예측 또는 진단용 키트는 면역측방유동 스트립 방식을 이용한 것일 수 있다. 측방유동분석법(lateral flow assay)은 크로마토그래피 방법을 기본으로 하는 단백질 또는 핵산의 검출 방법이다. 이러한 측방유동분석법은 임신진단, 암진단, 기타 특정 단백질 또는 유전자의 존재 여부 또는 미생물탐지 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 측방유동분석법은 항원-항체 반응과 같은 두 물질 간의 특이적인 반응을 기본으로 하는 것으로, 민감도와 특이성이 높고, 짧은시간 내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있어 질병의 진단 및 빠른 예방 조치를 가능하게 한다.
- [0048] 또한, 상기 검출용 키트는 RT-PCR 키트일 수 있다. 구체적으로, RT-PCR 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있으며, 상기 키트는 RT-PCR 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있다. 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 상기 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한

자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

- [0049] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 비만 위험 예측 또는 진단용 조성물을 포함하는 비만 위험 예측 또는 진단용 마이크로어레이를 제공하는 것이다.
- [0050] 상기 마이크로어레이는 고상표면에 고정화된 프로브를 이용할 수 있다. 상기 프로브는 상기 SNP를 포함하는 각 유전자상의 10 내지 100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용될 수 있고 기체(substrate) 상에 고정화될 수 있다. 상기 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화될 수 있다.
- [0052] 상기 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시될 수 있다. 예컨대, 상기 혼성화 어레이 요소는 예폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수도 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [0053] 상기 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화될 수 있다. 혼성화 조건은 다양하게 변경할 수 있고, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수도 있다.
- [0054] 상기 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다.
- [0055] 상기 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 상기 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labeling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))에 의해 라벨링될 수 있다. 상기 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공할 수 있다.
- [0057] 상기 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.
- [0058] 상기 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킬 수 있다. 상기 적절한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 상기 절차는 연구실에서의 사용을 위한 프로토콜을 수립하고자 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시될 수 있다.
- [0059] 예컨대, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 상기 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)을 참조할 수 있다.
- [0060] 예컨대, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미할 수 있다. 또는 상기 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미할 수 있고, 저 엄격조건은 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미할 수 있다.
- [0061] 상기 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출할 수 있다. 예컨대, 상기 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 상기 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다.

[0062] 상기 효소 및 기질은 퍼옥시다아제(예컨대, 호스라디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl 및 pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코오스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)가 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0063] 본 발명은 기존에 밝혀지지 않은 새로운 비만 관련 SNP를 제공하고, 내재적 산화스트레스 바이오 마커인 MDA, ox-LDL, 및 8-epi-PGF_{2a}-만으로 산화 스트레스 점수(OSS)를 구축하였다. 본 발명은 나아가 비만의 위험 요소로 알려진 HOMA-IR, hs-CRP와 더불어 상기 새로운 SNP를 포함하는 유전 위험 점수(GRS) 및 본 발명의 산화 스트레스 점수(OSS)를 이용한 비만 예측 모델이 매우 높은 설명력을 갖는 것을 확인하고, 이를 통해 새로운 비만 예측 모델을 제공한다.

[0064] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 비만 예측 모델의 4가지 매개변수인 GRS, OSS, HOMA-IR 및 hs-CRP의 최적 임계 기준치를 확인한 모습을 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 실험 대상자 선정

[0068] 본 발명의 실험대상을 선정하기 위하여, 한국 암 예방 연구 II(Korean Cancer Prevention Study-II, KCPS-II) 바이오뱅크에서 2004년 내지 2013년의 기간 동안 수집된 데이터 및 국민건강보험 일산병원에서 2010년 내지 2015년의 기간 동안 수집된 데이터로부터 총 9,537명의 대상자를 선별하였다.

[0069] 구체적으로, BMI가 25 kg/m² 이상이고, 허리둘레가 남자는 90cm 이상, 여자는 85cm 이상인 대상을 비만으로 정의하여 2,115명을 선별하였고, 7,422명은 건강한 집단으로 구성하여 총 9,537명을 본 발명의 실험 대상으로 선정하였으며, 이때 i) 현재 심혈관 질환, 간 질환, 신장 질환, 제1형 또는 제2형 당뇨병, 췌장염 또는 암 진단을 받았거나 기록이 있는 대상자, ii) 약물 복용자는 실험 대상에서 제외하였다.

[0070] 실험에 착수하기 전에 모든 참가자들에게 실험의 목적을 상세히 설명한 후 동의서를 받았다. 수행된 실험의 프로토콜은 국민건강보험 일산병원 및 연세대학교의 승인을 받았으며 헬싱키 선언(Helsinki Declaration)에 따라 수행되었다.

실시예 2. 유전자형 및 단일염기다형성(SNP) 선별

[0072] Affymetrix AxiomTM KORV1.0-96 어레이(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 실시예 1에서 선정한 총 9,537개의 샘플을 유전자형으로 분류하였고 유전자형 데이터를 K-CHIP을 사용하여 산출하였다.

[0073] 총 797,528개의 단일염기다형성(SNP)과 실시예 1에서 선정한 9,537개의 샘플로부터 품질 관리(quality control)를 통해 5% 이상의 높은 결손비율을 갖거나 대립 유전자 빈도가 지나치게 낮은(0.05 미만) 마커를 제외한 후, 선별된 356,974개의 단일염기다형성(SNP)과 9,460개의 샘플을 연관 분석에 사용하였다.

실시예 3. 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS) 모델의 설계

[0075] 비만과 가장 연관성이 높은 상위 3개의 SNP인 rs2846412, rs58424360 및 rs591120를 사용하여 유전 위험 점수(GRS) 모델을 구축하였다.

- [0076] 이때, 서로 연관 불균형(linkage disequilibrium, LD)이 있는 SNP의 경우는 제외하였으며, 위험 대립유전자의 수와 비만 상태 사이의 연관성은 로지스틱 회귀 분석을 통해 분석하였다.
- [0077] 유전 위험 점수(Genetic Risk Score, GRS)는 각 SNP 좌위에 존재하는 위험 대립유전자의 수에 따라 세부점수로 부여하고 그 세부 점수의 총합으로 계산될 수 있다.
- [0078] 위험 대립유전형이 부재한 경우인 동형 비-위험성 대립유전자(homozygous of non-risk alleles)는 0점, 위험 대립유전형이 한 개의 반수체에만 존재하는 경우인 이형 대립유전자(heterozygous of alleles)는 1점, 동형 위험성 대립유전자(homozygous of the risk alleles)는 2점을 부여하였다.
- [0079] 상기 SNP의 위험 대립유전형 빈도와 정상 대조군의 위험 대립유전자 빈도를 비교하여 각 SNP에서 β 계수를 산출하고, β 계수를 SNP의 대립유전형 세부점수와 곱한 값들의 총합으로 가중 유전 위험 점수(weighted Genetic Risk Score, wGRS)를 산출하였다.
- [0080] **실시예 4. 산화 스트레스 점수(Oxidative Stress Score, OSS) 모델의 설계**
- [0081] 산화 스트레스 점수(OSS)는 산화 스트레스의 바이오 마커인 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA), 산화된 저밀도 지질단백질(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 및 8-에피-프로스타글란딘 F_{2a} (8-epi-prostaglandin F_{2a} , 8-epi-PGF $_{2a}$)의 농도를 기준으로 설계하였다.
- [0082] 구체적으로, 말론디알데히드(MDA)의 농도가 7.70 nmol/mL 이하이면 0점; 7.70 nmol/mL 초과, 9.84 nmol/mL 이하이면 1점; 9.84 nmol/mL 초과면 2점을 부여하였다.
- [0083] 산화된 저밀도 지질단백질(ox-LDL)은 농도가 35.60 U/L 이하이면 0점; 35.60 U/L 초과, 50.89 U/L 이하이면 1점; 50.89 U/L 초과면 2점을 부여하였다.
- [0084] 8-에피-프로스타글란딘 F_{2a} (8-epi-PGF $_{2a}$)는 농도가 1,123.89 pg/mg 크레아틴 이하이면 0점; 1,123.89 pg/mg 크레아틴 초과, 1,642.56 pg/mg 크레아틴 이하이면 1점; 1,642.56 pg/mg 초과면 2점을 부여하였다.
- [0085] 산화 스트레스 점수(OSS)는 상기 3개 바이오 마커의 점수를 합한 값으로 설정하였고, 실시예 3의 가중 유전 위험 점수(GRS)와 동일하게 로지스틱 회귀 분석을 통해 산출한 β 계수를 점수에 곱하여 가중 산화 스트레스 점수 모델을 설계하였다.
- [0086] **실시예 5. 생화학적 분석 및 산화 스트레스 표지자의 측정**
- [0087] 의류와 신발을 착용하지 않은 채로 아침에 실험 대상자들의 체중(kg)과 신장(m²)을 측정하고 체질량 지수(BMI)를 계산하고, 허리 둘레, 수축기 혈압(Systolic Blood Pressure) 및 이완기 혈압(diastolic blood pressure)을 포함한 인체 계측 데이터를 수집하였다.
- [0088] 또한, 공복혈당, 인슐린, HbA1c, 중성지방, 총 콜레스테롤(TC), 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL), 저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL), 감마 글루타밀 전이효소 (γ transferase, GGT), 아스파테이트 아미노전달효소(aspartate aminotransferase, AST), 알라닌 아미노전달효소 (alanine aminotransferase, ALT), 및 고감도 C-반응성 단백질 (high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)를 포함하는 생화학 데이터는 자동분석기를 이용하여 측정하였다.
- [0089] 인슐린 저항성(Insulin resistance, IR)을 산출하기 위해 HOMA(Homostatic Model Assessment)를 사용하였으며, 혈장 에디포넥틴(Plasma adiponectin) 농도는 Human Adiponectin ELISA 키트(B-Bridge International Inc., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 흡광도 값을 기록하였다(Wallac Victor2 multilabel counter, Perkin Elmer Life Sciences, Turku, Finland).
- [0090] **실시예 6. 통계 분석 방법**
- [0091] 통계적 분석은 SPSS v. 24.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다.
- [0092] 비만 그룹과 건강한 그룹을 비교하기 위해서 독립 t-검정을 이용하고, 로지스틱 회귀분석을 통해 교차비(Odds Ratio, OR) 및 95% 신뢰 구간(CI)을 계산하였다. 교란 요인을 보정하기 위해서는 일반 선형모델 UNIANOVA를 사용하였다.
- [0093] 결과값은 PLINK 1.9. Skewed의 로그 전환된 변수를 통한 로지스틱 회귀 분석을 사용하여 평가되었고, 양측 P-검

정값(two-tailed P-value)이 0.05미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0094] **실험예 1. 유전 위험 점수(GRS) 모델과 비만의 연관성 확인**

[0095] 실시예 2에 기재한 바와 같이, 356,974개의 단일염기다형성(SNP)과 9,460개의 샘플을 대상으로 비만과의 연관성 분석을 실시하였다. 그 결과 비만과 높은 연관성을 가지는 상위 10개의 SNP를 선별하였다 (표 1).

표 1

염색체	SNP	인근 유전자	위험 대립 유전자	대립유전자 빈도 (대상/대조군)	교차비(odds ratio) (95% 신뢰구간)	FDR (false discovery rate)
11	rs2846412	<i>EXPH5</i>	C/T	0.067/0.090	1.400 (1.235-1.588)	0.0534
9	rs58424360	<i>PRUNE2</i>	G/T	0.202/0.238	1.236 (1.138-1.344)	0.0757
1	rs591120	<i>SEC16B</i>	C/G	0.424/0.466	1.195 (1.114-1.282)	0.0757
9	rs4745588	<i>PRUNE2</i>	C/T	0.206/0.241	1.221 (1.124-1.327)	0.1918
3	rs4855852	<i>BSN</i>	C/T	0.070/0.050	0.698 (0.599-0.814)	0.2929
13	rs9513181	<i>HS6ST3</i>	C/A	0.229/0.196	0.818 (0.751-0.892)	0.2929
3	rs9858542	<i>BSN</i>	A/G	0.060/0.044	0.692 (0.587-0.815)	0.3950
13	rs17767562	<i>HS6ST3</i>	C/T	0.203/0.172	0.816 (0.746-0.894)	0.3950
3	rs9822268	<i>APEH</i>	A/G	0.067/0.049	0.706 (0.604-0.826)	0.3950
3	rs34762726	<i>BSN</i>	A/G	0.067/0.049	0.706 (0.604-0.826)	0.3950
유전 위험 점수(GRS)					2.879 (2.283-3.630)	

[0096]

[0097] 표 1에 나타난 바와 같이, 상위 3개의 SNP인 rs2846412, rs58424360 및 rs591120의 FDR(false discovery rate) 값이 0.1미만으로 매우 작아 비만과 매우 높은 연관성을 갖는 것임을 확인하였다. *SEC16B*의 rs591120은 이전에 비만 관련 유전자 위치로 알려진 바 있으나, *EXPH5*의 rs2846412와 *PRUNE2*의 rs58424360은 새로운 비만 관련 유전자 위치인 것으로 확인되었다.

[0098] 상기 상위 3개의 SNP 유전자 위치를 이용하여 9,460명의 샘플에서 FDR과 일관된 효과 방향성을 기반으로, 실시예 3에 기재된 방법에 의해 유전 위험 점수(GRS)를 구축하였다.

[0099] 교차비(odds ratio)는 위험요인과 질병 발생 간에 연관성을 나타내는 수치에 해당하므로 교차비를 중심으로 연관성을 확인하였고, 유전 위험 점수(GRS)는 각 SNP 자리에 존재하는 위험 대립유전자의 수에 따라 세부점수로 부여하여 그 세부 점수의 총합으로 계산하여 산출하였다.

[0100] 표 1에 나타난 바와 같이, 유전 위험 점수(GRS)는 2.879의 높은 교차비를 가져, 비만 발병과 연관성을 갖는 개별 SNP와 비교할 때 현저히 높은 연관성을 갖는 것을 확인하였다.

[0101] **실험예 2. 산화 스트레스 점수(OSS)와 비만 발병률 사이의 연관성 확인**

[0102] 산화 스트레스 점수(OSS)와 비만 발병률 사이의 연관성을 확인하기 위한 실험에 앞서, 비만 집단과 건강한 집단 간의 기초적인 임상특징을 확인하였다. 구체적으로, 공복 혈당, 인슐린, HOMA-IR, HbA1c, 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, hs-CRP, GGT, AST, ALT, MDA, ox-LDL, 그리고 8-epi-PGF_{2a}의 측정값은 비만 그룹이 건강한 그룹보다 높게 측정된 반면, HDL 콜레스테롤과 아디포넥틴 농도는 비만 그룹이 건강한 그룹보다 낮게 측정되었다 (표 2).

표 2

[0103]

구분	건강한 집단 (n=7,362)	비만 집단 (n=2,098)
연령(년)	45.9±0.13	48.2±0.24
성별(남성)	4,314 (58.6)	1,475 (70.3)
허리둘레(cm)	79.6±0.08	94.1±0.12
몸무게(kg)	63.0±0.11	78.3±0.22
BMI(kg/m ²)	22.9±0.03	27.8±0.05

수축기 혈압(mmHg)	118.5±0.17	127.2±0.32
이완기 혈압(mmHg)	74.5±0.12	79.8±0.23
공복혈당(mg/dL) [§]	92.6±0.24	100.0±0.53
인슐린(μIU/dL) [§]	4.91±0.04	8.06±0.15
HOMA-IR [§]	1.14±0.01	2.03±0.05
HbA1c(%)	5.82±0.02	6.09±0.04
중성지방(mg/dL) [§]	129.3±0.96	181.2±2.51
총 콜레스테롤(mg/dL) [§]	190.9±0.40	202.3±0.79
HDL 콜레스테롤(mg/dL) [§]	52.1±0.13	47.4±0.23
LDL 콜레스테롤(mg/dL) [§]	114.7±0.37	122.6±0.76
Hs-CRP(mg/L) [§]	0.68±0.04	1.01±0.07
아디포넥틴(ng/mL) [§]	7.42±0.05	5.79±0.08
GGT(U/L)	37.5±0.95	59.7±1.57
AST(IU/L) [§]	23.5±0.28	27.6±0.30
ALT(IU/L) [§]	23.5±0.24	34.3±0.54
MDA (nmol/mL) [§]	9.12±0.11	10.2±0.19
Ox-LDL (U/L) [§]	45.1±0.55	50.0±0.98
8-epi-PGF _{2α} (pg/mg 크레아틴) [§]	1,528.1±24.1	1,583.6±37.7

[0104] 각 값들은 평균±표준오차로 기재하였고, §은 로그 변환으로 검사한 값이다. 상기 측정 값을 통해 확인한 바와 같이, 본 발명의 산화 스트레스 점수(OSS)의 산출 대상인 3개의 산화 스트레스 바이오 마커 MDA, ox-LDL 그리고 8-epi-PGF_{2α}가 비만 집단에서 매우 높은 수준을 보이는 것을 확인하였다.

[0105] 산화 스트레스 점수(OSS)와 비만 발병률 사이의 연관성을 확인하기 위하여, 실시예 4에 기재한 바와 같이 상기 3개의 산화 스트레스 바이오 마커 각각의 농도에 따라 0, 1 및 2점을 부여하고, 로지스틱 회귀 분석을 수행한 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

산화 스트레스 바이오 마커	교차비 (95% 신뢰구간)	p 값
MDA (nmol/mL) [§]	1.638 (1.419-1.890)	1.58E-11
Ox-LDL (U/L) [§]	1.400 (1.222-1.605)	1.00E-6
8-epi-PGF _{2α} (pg/mg 크레아틴) [§]	1.209 (1.061-1.378)	4.29E-3
산화 스트레스 점수(OSS)	3.213 (2.469-4.180)	3.57E-18

[0107] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 산화 스트레스의 바이오 마커인 8-epi-PGF_{2α}는 1.209의 교차비; ox-LDL은 1.400의 교차비; MDA는 1.638의 교차비를 나타내었다. 반면, 실시예 4에 기재된 방법에 의해 산출된 산화 스트레스 점수(OSS)는 3.213의 교차비를 나타내는 것을 확인하여, 각각의 바이오 마커와 비교할 때 현저히 높은 연관성을 보유하는 것을 확인하였다 (p=3.57E-18).

[0108] **실험예 3. 비만 발병률 예측 모델의 비만 발병 위험도 및 임계 기준치의 확인**

[0109] 본 발명자는 본 발명의 유전 위험 점수(GRS) 및 산화 스트레스 점수(OSS)를 이용한 비만 발병률 예측 모델의 비만 발병 위험도 확인에 앞서, 비만 발병에 관여하는 가장 대표적인 매개 변수를 탐색하기 위해 단계별 선형 회귀 분석을 수행하였다.

[0110] 그 결과, 비만 관련 변수 중 HOMA-IR 및 hs-CRP이 비만 발병 위험 증가의 가장 중요한 요인으로 확인되었고, 이러한 단계적 회귀 분석 결과를 바탕으로 ROC 곡선 분석을 통해 HOMA-IR, hs-CRP, GRS 및 OSS가 포함된 비만 발병의 매개변수 각각에 대한 최적의 임계 기준치를 확인하였다.

[0111] 이를 확인하기 위하여 각기 다른 5가지 모델을 설계하여 이들의 비만 발병 위험도를 측정하였다. 구체적으로, 모델 1은 산화 스트레스 점수(OSS)만을 포함하고, 모델 2는 산화 스트레스 점수 외 비만과 관련된 중요한 요인인 HOMA-IR, hs-CRP를 추가로 포함하도록 설정하였다. 모델 3은 유전 위험 점수(GRS)만을 포함하고, 모델 4는 유전 위험 점수(GRS) 및 산화 스트레스 점수(OSS)를 동시에 포함하며, 모델 5는 유전 위험 점수(GRS), 산화 스트레스 점수(OSS), HOMA-IR 및 hs-CRP 모두를 포함하도록 설정하였다.

[0112] 각 모델별로 비만 발병 매개 변수의 교차비 및 ROC 곡선 아래 면적(area under ROC, AUROC)에 해당하는 값을 측정하여 표 4에 나타내었다.

표 4

구분	비만 발병의 매개 변수	비만 발병 위험도(교차비, OR) (95% 신뢰구간)	P 값
모델 1	OSS	2.956 (2.297-3.803)	3.58E-17
	AUROC	0.638 (0.606-0.671)	-
모델 2	OSS	2.573 (1.961-3.376)	9.41E-12
	HOMA-IR	3.164 (2.387-4.195)	1.15E-15
	hs-CRP	1.453 (1.300-1.623)	4.06E-11
	AUROC	0.742 (0.714-0.769)	-
모델 3	GRS	2.798 (2.224-3.519)	1.52E-18
	AUROC	0.553 (0.519-0.581)	-
모델 4	GRS	2.987 (1.734-5.144)	8.00E-5
	OSS	2.919 (2.265-3.763)	1.35E-16
	AUROC	0.656 (0.625-0.688)	-
모델 5	GRS	2.953 (1.633-5.339)	3.40E-4
	OSS	2.520 (1.916-3.314)	3.72E-11
	HOMA-IR	3.266 (2.452-4.350)	5.93E-16
	hs-CRP	1.445 (1.292-1.616)	1.17E-10
	AUROC	0.751 (0.724-0.778)	-

[0114] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, ROC 곡선 아래 면적(AUROC)은 산화 스트레스 점수(OSS)만을 포함하는 모델 1에서 0.638 ± 0.016 ($p < 0.001$)의 값을 나타내고; OSS와 두개의 비만관련 매개변수를 포함하는 모델 2에서는 0.742 ± 0.014 ($p < 0.001$)의 값을 가지며; 유전 위험 점수(GRS)만을 포함하는 모델 3에서는 0.553 ± 0.017 ($p = 0.002$)를; 유전 위험 점수(GRS)와 산화 스트레스 점수(OSS)를 모두 포함하는 모델 4에서는 0.656 ± 0.016 ($p < 0.001$)의 값을 갖는 것을 확인하였다. 이때, 비만과 관련된 두가지 위험요소인 HOMA-IR, hs-CRP를 포함하고, 유전 위험 점수 및 산화 스트레스 점수를 모두 포함하는 모델 5에서는 AUROC의 값이 74.2%에서 75.1%로 증가된 것을 확인하였다.

[0115] 즉, 비만과 관련된 위험요소에 산화 스트레스 점수(OSS)를 포함하는 비만 예측 모델에 유전 위험 점수(GRS)라는 매개변수를 추가로 포함함으로써 비만 예측률이 현저히 상승한 것을 확인하였다.

[0116] 또한, 상기 결과에서 4개의 비만 발병 매개변수는 각각의 최적 임계치를 설정하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, GRS(sensitivity=0.515, specificity=0.541)는 0.2785; OSS(sensitivity=0.587, specificity=0.618)는 1.2060; HOMA-IR(sensitivity=0.619, specificity=0.625)은 2.0435; 및 hs-CRP(sensitivity=0.622, specificity=0.637)는 0.7150의 농도가 최적의 임계 기준치에 해당하는 것을 확인하였다.

[0117] 따라서, 2.0435 이상의 HOMA-IR 지수 또는 0.7150 mg/L 이상의 hs-CRP 농도와 함께 0.2785 이상의 GRS와 1.2060 이상의 OSS를 가지는 경우 비만 발병률이 높은 경우에 해당하여 비만이 될 가능성이 높다는 것을 시사한다.

[0118] 본 발명은 기존에 밝혀지지 않은 새로운 비만 관련 SNP를 제공하고, 내재적 산화스트레스 바이오 마커인 MDA, ox-LDL, 및 8-epi-PGF_{2a}-으로 산화 스트레스 점수(OSS)를 구축하였다. 본 발명은 나아가 비만의 위험 요소로 알

려진 HOMA-IR, hs-CRP와 더불어 상기 새로운 SNP를 포함하는 유전 위험 점수(GRS) 및 본 발명의 산화 스트레스 점수(OSS)를 이용한 비만 예측 모델이 매우 높은 설명력을 갖는 것을 확인하고, 이를 통해 새로운 비만 예측 모델을 제공한다.

[0119] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0120] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

