



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0121636
(43) 공개일자 2022년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6827 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)
C12Q 2600/156 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0025971

(22) 출원일자 2021년02월25일

심사청구일자 2021년02월25일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

차정열

서울특별시 강남구 도곡로 320, 105동 502호(도곡동, 래미안도곡카운티)

유지연

경기도 수원시 영통구 센트럴파크로 60, 6303동 1503호(이의동, 래미안 광고)

이지현

서울특별시 종로구 송월길 99, 206동 1303호(홍파동, 경희궁자이 2단지)

(74) 대리인

리엔목특허법인

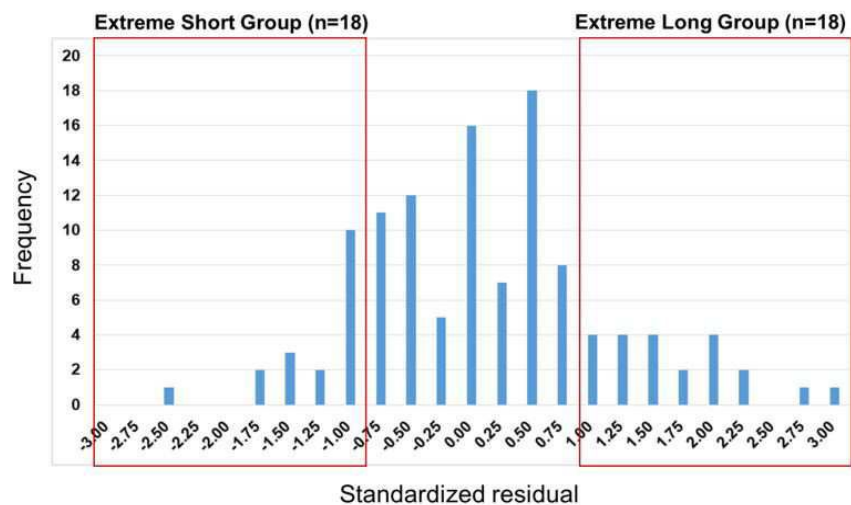
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 단일염기다형성을 이용한 교정 치료 기간 예측용 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

단일염기다형성(SNP) 마커를 검출하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 교정치료 기간 예측용 조성물, 키트, 및 상기 마커를 이용한 교정 치료기간 예측에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따른 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커 검출하는 폴리뉴클레오티드를 교정치료 기간 예측용 조성물을 활용하면 개체의 수평견인량(Horizontal anterior retraction)을 효과적으로 예측할 수 있으며, 또한 개체의 교정 치료기간이 길지 또는 짧을지를 정확히 예측할 수 있으므로, 이후 교정 치료의 계획 수립이나 환자의 관리에 도움을 줄 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 유전자의 단일염기다형성(SNP) 마커를 검출하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 교정치료 기간 예측용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 단일염기다형성(SNP) 마커는 rs752107, rs4754, rs1126616, rs9138, rs3810765, rs1800139, rs1800189, rs1140648, rs3751143, rs12585229, rs931273, 및 rs4524034 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 단일염기다형성 마커는

인간 1번 염색체의 228,059,650 번째 염기는 T가 C로 치환되는 것인 WNT3A 유전자 내 rs752107 단일염기다형성 부위;

인간 4번 염색체의 87,981,540 번째 염기는 T가 C로 치환되는 것인 SPP1 유전자 내 rs4754 단일염기다형성 부위;

인간 4번 염색체의 87,982,701 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 SPP1 유전자 내 rs1126616 단일염기다형성 부위;

인간 4번 염색체의 87,983,190 번째 염기는 A가 C로 치환되는 것인 SPP1 유전자 내 rs9138 단일염기다형성 부위;

인간 4번 염색체의 153,788,328 번째 염기는 G가 A로 치환되는 것인 SFRP2 유전자 내 rs3810765 단일염기다형성 부위;

인간 12번 염색체의 57,191,361 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1800139 단일염기다형성 부위;

인간 12번 염색체의 57,196,082 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1800189 단일염기다형성 부위;

인간 12번 염색체의 57,199,318 번째 염기는 G가 A로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1140648 단일염기다형성 부위;

인간 12번 염색체의 57,199,318 번째 염기는 G가 A로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1140648 단일염기다형성 부위;

인간 12번 염색체의 121,184,501 번째 염기는 A가 C로 치환되는 것인 P2RX7 유전자 내 rs3751143 단일염기다형성 부위;

인간 13번 염색체의 42,597,530 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 TNFSF11 유전자 내 rs931273 단일염기다형성 부위;

인간 13번 염색체의 42,604,447 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 TNFSF11 유전자 내 rs931273 단일염기다형성 부위; 또는

인간 13번 염색체의 62,360,775 번째 염기는 A가 G로 치환되는 것인 TNFRSF11A 유전자 내 rs4524034 단일염기 다형성 부위;를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 교정치료 기간은 배열기간(leveling)과 견인기간(retraction for space closing)을 합한 기간인 것인 조성물.

청구항 6

WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 유전자 단일염기 다형성(SNP) 마커 좌위에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 교정 치료 기간을 예측하기 위한 키트.

청구항 7

- 1)개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 수득하는 단계;
- 2)수득된 핵산 시료로부터 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드와 혼성화 하는 단계; 및
- 3)증폭된 또는 혼성화된 다형성 부위의 유전자형을 확인하여 분석하여 개체의 교정 치료 기간이 짧다(short) 또는 길다(long)로 판단하는 단계를 포함하는 교정 치료기간 예측에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변 및 타액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 단계 2)의 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커는 rs752107, rs4754, rs1126616, rs9138, rs3810765, rs1800139, rs1800189, rs1140648, rs3751143, rs12585229, rs931273, 및 rs4524034 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 단계 3)의 판단하는 단계는

상기 rs752107 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우,

상기 rs9138 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우,

상기 rs4754 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우,

상기 rs3810765 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "G"인 경우,

상기 rs12585229 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우, 또는

상기 rs931273 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우에 개체를 교정 치료 기간이 길다라고 판단하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 단계 3)의 판단하는 단계는

상기 rs3751143 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "A"인 경우에 개체를 교정 치료 기간이 짧다라고 판단하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 단일염기다형성(SNP) 마커를 검출하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 교정치료 기간 예측용 조성물, 키트, 및 상기 마커를 이용한 교정 치료기간 예측에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 치료기간은 교정치료를 받는 환자들의 가장 큰 관심사 중 하나이다. 환자들은 치료 전에 어느정도 기간이 소요되는지 궁금해하며, 종종 치료 중간에도 치료기간이 얼마나 남았는지, 언제 장치를 뗄 수 있는지 물어보기도 한다. 치료기간에 따라 교정치료 계획이 바뀌는 일도 있는데 유학이나 군입대, 장거리 이사 등 내원이 어려운 상태가 예측되면 기간이 짧게 걸리는 치료방법으로 계획이 변경될 수 있다. 치료기간이 너무 길어지면 환자들뿐만 아니라 교정의사도 지치게 되며 오히려 협조도가 낮아져 치료결과가 좋지 않을 수도 있다. 또한 정확한 치료기간을 예측하면 치료비 산정에 용이하며, 예상한 치료기간 내에 치료를 종료한 경우 환자 만족도가 높다. 이렇듯 치료기간에 대한 예측은 교정 치료의 계획 수립이나 환자의 관리에 상당히 중요한 요소이다.
- [0004] 교정치료 기간에 영향을 미치는 요인들은 성별, 나이, 교합관계, 교정력의 종류, 부정교합의 심도, 환자의 협조도 등 여러 가지가 언급되고 있다. 또한 치조골의 밀도나 골대사율의 차이, 치아이동에 관련한 여러 인자들의 활성도(activity) 차이 등 환자의 생물학적인 개인차도 치아이동과정에 관여하여 치료기간에 영향을 미칠 수 있다.
- [0005] 특히 환자 개인의 유전자 변이인 SNPs(single nucleotide polymorphisms)은 환자의 생물학적인 개인차를 야기할 수가 있으며 이는 치료기간의 차이를 나타낼 수 있다. 하지만 교정 치료 영역에서 단일염기다형성과 치료기간과의 관련성에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 일 양상은 단일염기다형성(SNP) 마커를 검출하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 교정치료 기간 예측용 조성물을 제공한다.
- [0008] 다른 양상은 단일염기다형성(SNP) 마커 좌위에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 교정치료 기간을 예측하기 위한 키트를 제공한다.
- [0009] 또 다른 양상은 교정 치료기간 예측에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 양상은 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 유전자의 단일염기다형성(SNP) 마커를 검출하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 교정치료 기간 예측용 조성물을 제공한다.
- [0012] 용어 "단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)"은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 예를 들어, 서로 다른 개체의 세 개의 DNA 단편들(예: AAGT[A/A]AG, AAGT[A/G]AG, AAGT[G/G]AG)처럼 단일염기에서 차이를 포함하는 경우, 두 개의 대립 유전자(C 또는 T)라고 부르며, 일반적으로 거의 모든 SNPs는 두 개의 대립 유전자를 가진다. 한 집단(population)내에서, SNP는 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF; 특정 집단에서 발견되는 유전자위치(locus)에서 가장 낮은 대립인자 빈도)로 할당될 수 있다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 치환(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변이를 유발할 수 있다. SNP는 인간 유전체 상에 가장 많이 존재하는 유전적 다형성으로, 유전학적으로 SNP 위치에 따라 각

개체에 큰 차이를 야기할 수 있다. 예를 들면, SNP가 단백질을 암호화하고 있는 위치에 존재할 경우, 단백질의 구조에 영향을 미쳐 단백질 기능이 달라질 수 있고, 질병을 유발할 수 있다. SNP가 단백질을 암호화하지 않는 비암호화 영역에 존재할 경우, 즉 프로모터 (promoter) 또는 인트론 (intron)에 존재할 경우, 각각에 대하여 단백질의 발현 수준에 차이를 가져와 그 단백질의 전체적인 활성이 증가 또는 감소할 수 있고, 선택적 이어맞추기 (alternative splicing)를 통하여 비정상적 단백질이 발현될 수도 있다.

[0013] 용어 "다형성"은 군집 내에서 변하는 유전자의 서열에서의 배치를 지칭한다. 다형성은 상이한 "대립유전자"로 구성된다. 이러한 다형성의 배치는 유전자에서의 그의 위치 및 그에서 발견되는 상이한 아미노산 또는 염기에 의해 확인될 수 있다. 이러한 아미노산 변이는 2개의 상이한 대립유전자인, 2개의 가능한 변이체 염기, C 및 T의 결과이다. 유전자형은 2개의 다른 별개의 대립유전자로 구성되기 때문에, 여러 가능한 변이체 중 임의의 변이체가 어느 한 개체에서 관찰될 수 있다 (예를 들어, 이 예에서, CC, CT 또는 TT). 개체의 다형성은 또한 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면, NCBI 웹사이트 상에서 이용가능한 뉴클레오티드 염기 변이의 단일 뉴클레오티드 다형성 데이터베이스(Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation)에서 사용되는 것인, 지정된 독특한 식별자 ("기준 SNP", "refSNP" 또는 "rs#")이다. 또한 "유전자형(genotype)"이라는 용어는 세포 또는 조직 샘플에서 특정 유전자의 특이적 대립유전자 또는 대립형질을 지칭한다.

[0014] 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 변이를 수반하는 것은 아니다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고, 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다.

[0015] 상기 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 상기 미스센스 변이는 다른 아미노산을 발생시킬 수 있고 상기 넌센스 변이는 비정숙 종결코돈을 형성할 수 있다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.

[0016] 상기 "교정치료 기간"은 배열기간(leveling)과 견인기간(retraction for space closing)을 합한 기간을 의미하는 것이며, 특히 교정치료 기간에 있어 임상에서 발치 교정 치료기간의 가장 핵심적인 단계는 치아이동과 관련이 많은 배열 및 견인기간이고, 마무리단계(finishing)는 교합의 완성을 위한 미세조정 과정이기 때문에 치아이동이 많지 않으므로 치조골 내 치아이동과 연관성이 높은 배열 및 견인기간을 합한 기간으로 결정하였다.

[0017] 일 양상의 조성물의 단일염기다형성(SNP) 마커는 rs752107, rs4754, rs1126616, rs9138, rs3810765, rs1800139, rs1800189, rs1140648, rs3751143, rs12585229, rs931273, 및 rs4524034 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 검출하는 것일 수 있다. 특히 상기 SNP 마커는 개체가 교정 치료 기간이 길지 혹은 짧을지 여부에 대한 지표 또는 개체의 상악 전치의 수평견인량(horizontal anterior retraction) 즉, 측모 두부 방사선 사진에서 HRP에 평행한 선을 따라 상악전치의 치관부 첨단(crown tip)이 교정 치료 전후로 얼마나 이동을 하는지를 예측할 수 있는 지표 기능을 하므로 개체의 교정치료 기간을 예측하거나 개체의 수평견인량의 수준을 예측하는 인자로 이용할 수 있다. 즉, 이러한 유전자들의 다형성 측정은 앞으로 교정 치료를 수행할 때, 그 기간이 긴 혹은 짧은 개체인지 예측할 수 있는 유용한 지표(예측 마커)로 사용될 수 있다.

[0018] 상기 WNT3A 유전자는 1번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID 는 NM_033131.3이다. 상기 SPP1 유전자는 4번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID는 NM_001251830.1이다. 상기 SFRP2 유전자는 4번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID는 NM_003013.2이다. 상기 LRP1 유전자는 12번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID 는 NM_002332.2이다. 상기 P2RX7 유전자는 12번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID 는 NM_002562.5이다. 상기 TNFSF11 유전자는 13번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID 는 NM_003701.3이다. 상기 TNSFRSF11A 유전자는 13번 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있고, 이의 GenBank Transcript ID 는 NM_003839.3이다.

[0019] 상기 단일염기다형성 마커는 인간 1번 염색체의 228,059,650 번째 염기는 T가 C로 치환되는 것인 WNT3A 유전자 내 rs752107 단일염기다형성 부위; 인간 4번 염색체의 87,981,540 번째 염기는 T가 C로 치환되는 것인 SPP1 유전자 내 rs4754 단일염기다형성 부위; 인간 4번 염색체의 87,982,701 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 SPP1 유전자 내 rs1126616 단일염기다형성 부위; 인간 4번 염색체의 87,983,190 번째 염기는 A가 C로 치환되는 것인 SPP1 유전자 내 rs9138 단일염기다형성 부위; 인간 4번 염색체의 153,788,328 번째 염기는 G가 A로 치환되는 것인 SFRP2 유전자 내 rs3810765 단일염기다형성 부위; 인간 12번 염색체의 57,191,361 번째 염기는 C가 T

로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1800139 단일염기다형성 부위; 인간 12번 염색체의 57,196,082 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1800189 단일염기다형성 부위; 인간 12번 염색체의 57,199,318 번째 염기는 G가 A로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1140648 단일염기다형성 부위; 인간 12번 염색체의 57,199,318 번째 염기는 G가 A로 치환되는 것인 LRP1 유전자 내 rs1140648 단일염기다형성 부위; 인간 12번 염색체의 121,184,501 번째 염기는 A가 C로 치환되는 것인 P2RX7 유전자 내 rs3751143 단일염기다형성 부위; 인간 13번 염색체의 42,597,530 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 TNFSF11 유전자 내 rs931273 단일염기다형성 부위; 인간 13번 염색체의 42,604,447 번째 염기는 C가 T로 치환되는 것인 TNFSF11 유전자 내 rs931273 단일염기다형성 부위; 또는 인간 13번 염색체의 62,360,775 번째 염기는 A가 G로 치환되는 것인 TNFRSF11A 유전자 내 rs4524034 단일염기다형성 부위를 포함하는 것일 수 있다. 이러한 상기 단일염기다형성의 염기 위치의 기준은 GRCh38/hg38 Assembly reference sequence 기준 (GRCh38.p12)에 따랐다.

- [0020] 통상의 기술자라면 상기 정보를 이용하여 변이의 위치 및 서열을 용이하게 확인할 수 있을 것이다. UCSC genome browser 또는 GenBank에 등록되어 있는 번호에 해당하는 구체적인 서열은 시간이 지남에 따라 다소 변경될 수 있다. 본 발명의 범위가 상기 변경된 서열에도 미치는 것은 통상의 기술자에게 자명할 것이다.
- [0021] 교정치료 기간 예측은 개체의 교정치료 기간이 길지 혹은 짧을지를 판단하는 것일 수 있다.
- [0022] 일 양상의 조성물은 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A의 유전자의 단일염기다형성 마커를 검출할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 프라이머 또는 이의 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 상기 각각의 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드는 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A의 유전자의 단일염기다형성 마커에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0023] 상기 프라이머는 증폭된 PCR 산물이 차세대 시퀀싱(NGS)을 이용하여 신경교종을 효과적으로 진단 및 예후를 예측하기 위해 최적 크기의 비교 서열을 얻을 수 있도록 서열을 증폭하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드는 검출 가능한 표지로 표지된 것인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 검출 가능한 표지는 검출 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로서, 형광물질, 예를 들면, Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질일 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 핵산의 혼성화 결과를 확인할 수 있다.
- [0025] 용어 "프라이머 (primer)"는 중합효소에 의한 뉴클레오티드의 중합반응에서, 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥의 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 예를 들면, 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건, 즉, 4종의 다른 뉴클레오티드 트리포스페이트 및 중합효소의 존재 하에서 주형-지시 (template-directed) DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥의 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예를 들면, 온도와 프라이머의 용도에 따라 달라질 수 있다. 상기 프라이머는 길이가 5 내지 100nt, 5 내지 70nt, 10 내지 50nt, 또는 15 내지 30nt인 것일 수 있다. 예를 들면, 프라이머의 길이가 짧을수록, 낮은 어닐링 (annealing) 온도에서 주형과 충분히 안정된 혼성화 복합체를 형성할 수 있다.
- [0026] 상기 프라이머는 포스포로티오에이트 (phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트와 같은 뉴클레오티드 유사체 (analogue), 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid) 또는 삽입 물질 (intercalating agent)을 더 포함할 수 있다. 또한, 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 표지 물질을 더 포함할 수 있다. 상기 형광 표지 물질은 VIC, NED, FAM, PET, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 표지 물질은 상기 폴리뉴클레오티드의 5' 말단에 표지될 수 있다. 또한, 방사성 표지 물질은, 32P 또는 35S 와 같은 방사성 동위원소가 첨가된 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction: PCR, 이하 'PCR'이라고 함) 반응액을 이용한 PCR 반응을 통해 증폭 산물에 혼입될 수 있다.
- [0027] 용어 "프로브 (probe)"는 상보적인 폴리뉴클레오티드 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 프로브는 길이가 5 내지 100nt, 10 내지 90nt, 15 내지 80nt, 20 내지 70nt, 또는 30 내지 50nt인 것일 수 있다. 상기 프로브는 혼성화 방법, 예를 들면 마이크로어레이 (microarray), 서던 블로팅, 다이 나믹 대립유전자-특이적 혼성화 (dynamic allele-specific hybridization) 및 DNA 칩 등을 이용한 방법에 이용될 수 있다. 마이크로어레이는 당업계에 알려진 의미로 사용되며, 예를 들면, 기관 상의 복수 개의 구분된 영역에 프로브 또는 프로브의 집단이 고정화되어 있는 것일 수 있다. 상기 기관은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예를 들면, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 프로브 또는 그에 상보적인 프로브는 개체로부터

터 수득된 핵산과 혼성화되고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정할 수 있는 방법에 이용될 수 있다.

[0028] 상기 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 SNP 또는 SNP에 상보적인 뉴클레오타이드를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 뉴클레오타이드인 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 또한 상기 프로브는 SNP에 상보적인 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0030] 다른 양상은 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커 좌위에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 포함하는 교정치료 기간을 예측하기 위한 키트를 제공한다.

[0031] 상기 키트에는 안지오텐신 전환효소 억제제 이상반응의 진단을 위하여 선택적으로 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커 좌위에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 증폭할 수 있는 프라이머 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0032] 일 양상의 키트에는 유리 또는 나이트로셀룰로스와 같은 지지체의 표면에 항원이 부착될 수 있으며, 상기 마이크로어레이 제조 기술은 예를 들면 Schena et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA. 93(20):10614-9; Schena et al., 1995, Science 270(5235):467-70; 및 U.S. Pat. Nos. 5,599,695, 5,556,752 또는 5,631,734를 참조할 수 있다. 형광 광도는 스캐닝 콘포칼 현미경이 사용될 수 있으며, 예를 들면 Affymetrix, Inc. 또는 Agilent Technologies, Inc 등에서 입수할 수 있다.

[0033] 상기 키트 (kit)는 타겟 유전자의 유전자 변이를 예측하기 위한 키트일 수 있다. 키트는 당업계에 알려진 의미로 사용된다. 상기 키트는 예를 들면, 상기한 바와 같은 폴리뉴클레오타이드와 그의 특정 용도에 필요한 항목들을 포함하는 것일 수 있다. 상기한 바와 같은 폴리뉴클레오타이드와 함께 그의 사용 방법에 필요한 시약을 포함하는 것일 수 있다.

[0034] 일 양상의 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으며, 내열성 DNA 중합효소, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 일 양상의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0036] 또 다른 양상은 1)개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 수득하는 단계; 2)수득된 핵산 시료로부터 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드와 혼성화하는 단계; 및 3)증폭된 또는 혼성화된 다형성 부위의 유전자형을 확인하여 분석하여 개체의 교정 치료 기간이 짧다(short) 또는 길다(long)로 판단하는 단계를 포함하는 교정 치료기간 예측에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0037] 용어 "시료"는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함되며, 예를 들면 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 소변 및 타액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 보다 구체적으로 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직생검으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출,

농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 핵산 및 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.

[0038] 상기 생물학적 시료로부터 핵산 시료를 획득하는 단계는 통상의 DNA 분리방법에 의하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 표적 핵산을 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction: PCR), 리가제 연쇄 반응 (ligase chain reaction: LCR), 전사 증폭 (transcription amplification), 또는 실시간-핵산 서열 기초 증폭 (realtime-nucleic acid sequence based amplification: NASBA)을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다.

[0039] 상기 단계 2)의 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커는 rs752107, rs4754, rs1126616, rs9138, rs3810765, rs1800139, rs1800189, rs1140648, rs3751143, rs12585229, rs931273, 및 rs4524034 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[0040] 상기 단계 3)의 판단하는 단계는 상기 rs752107 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우, 상기 rs9138 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우, 상기 rs4754 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우, 상기 rs3810765 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "G"인 경우, 상기 rs12585229 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우, 또는 상기 rs931273 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "C"인 경우에 개체를 교정 치료 기간이 길다라고 판단하는 것일 수 있다.

[0041] 또한 상기 단계 3)의 판단하는 단계는 상기 rs3751143 단일염기다형성 부위의 대립형질이 "A"인 경우에 개체를 교정 치료 기간이 짧다라고 판단하는 것일 수 있다.

[0042] 상기 방법에 있어서, 상기 유전자형을 분석하는 단계는 뉴클레오티드 또는 염기 서열을 결정하는 방법으로서, 시퀀싱, 마이크로어레이에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR (allele specific PCR), 다이내믹 대립유전자 혼성화 (dynamic allele-specific hybridization), PCR 연장 분석, PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) 및 TaqMan 방법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기법에 의해 수행되는 것일 수 있다. 상기 유전자형을 분석하는 단계는 상기 조성물 또는 키트를 이용할 수 있다. 상기 유전자형을 분석하는 단계는 어떠한 대립형질을 가졌는지를 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자 분석기를 이용하여 수행될 수 있다. 대립유전자 특이적 PCR은 단일염기 변이가 위치하는 염기를 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트로 상기 단일염기 변이가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다. PCR 연장 분석은 먼저 단일염기 변이가 위치하는 염기를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 쌍으로 증폭한 다음, 반응에 첨가된 모든 뉴클레오티드를 탈인산화시킴으로써 불활성화시키고, 여기에 단일염기 변이에 특이적인 연장 프라이머, dNTP 혼합물, 디디옥시뉴클레오티드, 반응 완충액 및 DNA 중합효소를 첨가하여 프라이머 연장반응을 수행함으로써 이루어진다. TaqMan 방법은 원하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 탐침을 설계 및 제작하고, 서로 다른 대립유전자의 탐침을 FAM 및 VIC로 표지 (Applied Biosystems)하여, 증폭 및 분석하는 단계로 수행된다.

[0044] 상기 방법의 개체는 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 구체적으로 한국인, 더욱 구체적으로는 한국인 중에서 소구치 발치 교정환자일 수 있다.

발명의 효과

[0046] 일 양상에 따른 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11 및 TNFRSF11A 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유전자 단일염기다형성(SNP) 마커 검출하는 폴리뉴클레오티드를 교정치료 기간 예측용 조성물을 활용하면 개체의 수평견인량(Horizontal anterior retraction)을 효과적으로 예측할 수 있으며, 또한 개체의 교정 치료기간이 길지 또는 짧을지를 정확히 예측할 수 있으므로, 이후 교정 치료의 계획 수립이나 환자의 관리에 도움을 줄 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 수평견인량(Horizontal anterior retraction)을 결정하기 위한 기준이 되는 수형기준 면(horizontal reference plane: HRP)와 관련 계측점들을 나타낸 도이다. 안형요와 (sella, S), 코뿌리점(nasion, N), A 포인

트(A), B 포인트 (B), 하악점(pogonion, Pog), 턱끝점(menton, Me), 상악전치의 치근첨(U1r), 상악전치의 절단연(U1t), 하악전치의 절단연(L1t), 하악전치의 치근첨(L1r), 코시작점(pronasale, Pn), 비하점(subnasale, Sn), 소프트 티슈 A 포인트 (A'), 상순 점막부 상연의 중앙점(labrale superioris, Ls), stomion superioris (Stms), stomion inferioris (Stmi), 하순 점막부 하연의 중앙점(labrale inferioris, Li), 소프트 티슈 B 포인트 (B'), 소프트 티슈 하악점 (Pog'), 소프트 티슈 턱끝점 (Me')

도 2는 교정 치료 기간에 따른 과도한(extreme) 군의 분류를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실험예 및 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **실시예 1. 실험 대상자의 선정과 통계 분석**
- [0052] 2008년 2월부터 2020년 5월까지 연세대학교 치과병원 치과교정과에서 상악 소구치 발치 교정치료를 받은 122명의 환자들을 일차적으로 선정하여 타액 DNA를 채취하였다. 이 중 채취한 샘플의 불량으로 분석이 불가능하거나 환자의 개인사정으로 통상적인 치료과정을 진행하지 못한 케이스를 제외하고 117명(남성 24명, 여성 93명, 평균 연령 19.8세)을 최종 실험 대상으로 선택하였다. 평균 치료기간은 배열기간(leveling)이 9.8개월, 공간폐쇄를 위한 견인기간(retraction)이 16.8개월이었고, 총 치료기간은 33.5개월이었다.
- [0053] 실험대상자로 포섭한 기준 (Inclusion criteria)는 다음과 같다: 1) 영구치열기에 전체 고정성 교정장치를 부착하여 치료, 2) 상악 소구치 발치 증례, 3)치료 전후의 파노라마 방사선사진 및 측모 두부방사선 사진 촬영, 4) 악교정 수술 증례는 제외, 5) 전신질환이 없는 건강한 대상자.
- [0054] 이 연구에서는 교정적 치아이동에 영향을 미칠 수 있는 요소들을 제어하기 위해 표준화된 조건에서 교정치료를 진행하였다. 117명의 환자들은 022 슬롯 브래킷(slot bracket)을 전체 치열에 부착하고 SWA(straight wire appliance) 테크닉으로 교정하였고, 와이어(wire)는 014 인치 또는 016 인치 NiTi 원형호선을 사용하여 배열단계 시작하였고, 배열완료 후에는 019x025 인치 스테인리스 스틸(stainless steel) 각형호선을 삽입하고 탄성 체인을 이용하여 200gm(150-250gm 범위) 포스(force)로 공간폐쇄를 진행하였다.
- [0055] 이 후 연세대학교 치과 병원 기관 심의위원회 (번호 : 2-2016-0023)의 승인을 받았습니다. 모든 임상 검사는 헬싱키 선언에 따라 수행되었으며 모든 피험자를 등록하기 전에 연구에 대한 설명과 함께 서면 동의를 얻고 진행하였다.
- [0056] 아울러, 하기 실시예에서 확인한 임상변수들과 교정 치료 기간 간의 연관성 분석을 위해 단순 및 다변량 선형 회귀 분석(univariate & multivariate linear regression)을 수행하였다. 단순선형회귀분석은 연령과 성별을 covariant로 설정하였으며, 다변량선형회귀분석은 연령, 성별, 수평견인량, 총생(crowding) 및 변위(displacement)를 covariant로 설정하였다. 치료기간에 따른 그룹(long/short group)을 분류한 후, 그룹 간 임상변수들의 빈도 및 수치 차이를 알아보기 위해 임상변수의 종류에 따라 카이 스퀘어 테스트(chi square test) 또는 t-test를 수행하여 유의성 검증을 하였다. 타겟 시퀀싱(Targeted sequencing)을 진행한 유전자들의 발현 빈도는 우성/열성/공우성 모델(dominant/recessive/co-dominant model)을 사용, 오즈비(odds ratio :OR)(95% 신뢰구간 (confidence interval : CI))로 나타냈다.
- [0058] **실시예 2. 교정 치료기간과 연관성 있는 임상변수들의 측정(Measurement of clinical parameters)**
- [0059] **2.1 교정 치료기간과 연관성이 나타나는 임상변수의 확인**
- [0060] 교정 치료기간과 연관성을 보이는 변수를 확인하기 위하여, 실험 대상자 간 공통적으로 나타나는 임상적 특징을 확인하고 여러 가지 임상변수들(clinical parameters)을 선정하고 측정하였다. 치료 전 치아 모델 및 측모 두부 방사선 사진으로부터 측정한 대상환자들의 임상변수들(clinical parameters) 중 교정 치료 기간(배열 및 견인기간)과의 연관성을 보이는 변수를 알아보기 위해 성별 및 연령을 기본적인 공변량(covariant)로 설정하고 단순선형회귀분석(univariate linear regression analysis)을 시행하였다. 기본적인 정보로는 연령 및 성별을 수집하였고, 치성 및 골격성 변수들(dental and skeletal parameters)로는 앵글분류(Angle classification), 상악 전치의 수평견인량(horizontal anterior retraction), 총생(crowding), 변위(displacement), 수평피개(overjet),

수직피개(overbite), ANB(T1: 치료 전, T2: 치료 후 수치), FMA(T1, T2), U1 to SN(T1, T2)를 측정하였다. PAR score는 종합적인 치료의 난이도를 수치화한 것으로 PAR 스코어는 1992년 Richmond S. 등이 개발한 PAR 인덱스로부터 측정하였다.

[0061] 임상변수들은 치료 전 치아 모델 및 측모두부방사선 사진을 측정하여 분석하였다. 앵글분류, 총생, 변위, 수평 피개, 수직피개, 변위는 환자의 치료 전 치아모델을 계측하였다. 변위 (displacement)는 치아의 비정상적인 위치 변화량을 수치화하기 위해 crowding과 spacing의 절대값 수치들을 합한 변수로 이번 연구에서 정의하였으며 mm단위로 계측하였다. 수평견인량, ANB, FMA(Frankfort mandibular plane angle), U1 to SN (Sella-Nasion line에 대한 상악중절치의 각도)는 측모두부방사선 사진을 이용하여 측정하였다.

[0062] 상악 전치의 수평견인량을 측정하기 위한 기준선으로는 1978년 Burstone이 제시한 HRP(horizontal reference plane)을 선택하였고, HRP는 도 1의 Sella-Nasion 라인에서 7도 아래로 설정한 수평선이다. 상악 전치의 수평견인량은 측모 두부 방사선 사진에서 HRP에 평행한 선을 따라 상악전치의 치관부 첨단(crown tip)이 치료 전후로 얼마나 이동을 하였는지 mm단위로 측정한 수치이다.

[0063] 이후, 측모 두부 방사선 사진을 연세대학교 치과병원 치과방사선과의 숙련된 방사선사에 의해 교정치료 전 및 치료 후에 Cranex3 + (Soredex, Helsinki, Finland) 장비를 이용하여 촬영되었으며, 환자를 NHP(natural head position)으로 두부를 위치하게 하고 입술을 자연스럽게 힘을 뺀 자세로 촬영하였다. 측모 두부 방사선 사진의 계측(tracing)은 V-CephTM 5.5 트레이싱 프로그램 (Osstem, Seoul, South Korea)을 사용하였다.

[0064] 연구자 간의 측정오류를 배제하기 위해 임상변수들의 측정은 한 사람이 담당하였다. 방사선 사진 계측 상의 오류 검증을 위해 10명의 대상자들을 무작위로 선정하여 수평견인량을 두 번 측정하였으며, 두 계측치의 일치도는 급내상관계수(intraclass correlation coefficient(ICC))가 0.9이상으로 나타나 상당한 일치성을 보였다.

[0065] 종합적으로 치료 전 치아 모델 및 측모 두부 방사선 사진으로부터 측정한 대상환자들의 상기 임상변수들 (clinical parameters) 중 교정 치료 기간(배열 및 견인기간)과의 연관성을 보이는 변수를 알아보기 위해 성별 및 연령을 기본적인 공변량(covariant)으로 설정하고 단순선형회귀분석(univariate linear regression analysis)를 수행하고, 임상변수들의 관련성을 확인한 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0067] 치료기간과 관련된 임상변수 (배열 및 견인기간)

변수	일변량 분석		다변량 분석	
	OR (95%신뢰구간)	P value	OR (95%신뢰구간)	P value
나이	0.1090 (-0.0358 - 0.2537)	0.1387	0.1349 (-0.0916-0.3614)	0.2455
성별	0.0004 (-0.0090 - 0.0099)	0.928	-1.7935 (-5.4371-1.8501)	0.3367
앵글 분류	0.0008 (-0.0150 - 0.0165)	0.9247	0.6038 (-1.4962-2.7038)	0.5742
수평견인량 (Horizontal anterior retraction)	0.1026 (0.0406 - 0.1646)	0.0014	0.5889 (0.0102-1.1676)	0.0485
총생 (Crowding, mm)	-0.1241 (-0.2049 - -0.0433)	0.0029	-0.3441 (-1.4399-0.7517)	0.5394
변위(Displacement, mm)	-0.1104 (-0.1852 - -0.0357)	0.0041	-0.0299 (-1.2154-1.1556)	0.9607
수평피개(Overjet, mm)	-0.0217 (-0.0749 - 0.0316)	0.4215	-0.6036 (-1.2411-0.034)	0.0662
수직피개(Overbite, mm)	0.0244 (-0.0236 - 0.0724)	0.3158	0.2557 (-0.4163-0.9277)	0.4573
ANB(T1)	0.0120 (-0.0445 - 0.0685)	0.6751	-0.188 (-0.8001-0.4242)	0.5485
ANB(T2)	0.0078 (-0.0500 - 0.0657)	0.7887	-0.1933 (-0.7852-0.3986)	0.5235

PAR (unweighted)	-0.0565 (-0.1181 - 0.0052)	0.0725	0.2679 (-0.5177-1.0534)	0.5053
PAR (weighted)	-0.1054 (-0.3368 - 0.1259)	0.3687	0.0796 (-0.0865-0.2457)	0.3497
FMA(Frankfort mandibular plane angle, T1)	-0.0708 (-0.1985 - 0.057)	0.2748	-0.0959 (-0.3539-0.1621)	0.4679
FMA(Frankfort mandibular plane angle, T2)	-0.1105 (-0.3126 - 0.0915)	0.2809	-0.0649 (-0.226-0.0963)	0.4316
U1 to SN(T1)	0.0497 (-0.1146 - 0.2139)	0.5504	-0.0329 (-0.2404-0.1746)	0.7565
U1 to SN(T2)	-0.0072 (-0.15 - 0.1356)	0.9207	0.0899 (-0.1448-0.3247)	0.4543

[0068] 단순(일변량) 및 다변량 선형 회귀 분석을 수행하였다. 굵은 글씨체는 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 나타낸다.

[0070] 상기 임상변수를 확인한 117명의 대상자 중 남성은 24명, 여성은 93명이었고 평균연령은 19.8세였다. 상기 변수 중 수평견인량은 치료기간과 양의 상관관계를 보였고, 총생(crowding) 및 변위(displacement)는 음의 상관관계를 보였다. 나머지 연령, 성별, 앵글분류, 수평피개, 수직피개, ANB, PAR score는 유의미한 연관성을 보이지 않았다. 상기 표 2에서 확인한 바와 같이, 단순선형회귀분석에서 연관성을 보인 수평견인량, 총생, 및 변위를 공변수에 추가하여 다변량선형회귀분석(multivariate linear regression)을 진행한결과, 치료기간과 유의하게 연관이 있는 변수는 수평견인량 뿐임을 확인하였다.

[0072] 2.2 수평견인량의 교정 치료기간과의 연관성 재확인

[0073] 이에, 수평견인량이 치료기간과 가장 연관성 있는 변수라는 위 결과를 바탕으로 치료기간에 따른 환자군(group)을 분류하였다. 수평견인량과 치료기간 간의 상관도(correlation plot)를 만든 후, 표준잔차 ± 1 을 벗어나는 수치들을 과도한(extreme) 군으로 설정하였다. 표준잔차 (+1) 이상의 수치들은 치료기간이 평균보다 긴 과도하게 긴(extreme long) 군으로, (-1)이하의 수치들은 치료기간이 평균보다 짧은 과도하게 짧은 군(extreme short) 군으로 구분하고, 이를 구분한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 확인한 바와 같이, 각 군의 대상자 n수는 동일하게 18명인 것을 확인할 수 있었다.

[0074] 또한, 전체 피험자 및 각 과도한 군들의 임상적 특징을 하기 표 2에 재정리하고, 수평견인량이 치료기간과 연관성 있는지를 재확인하였다.

표 2

[0076]

임상적 변수	모든 피험자 (n=117)	과도하게 짧은 군 (n=18)	과도하게 긴 군 (n=18)	P value* (짧은 vs 긴)
나이 (years), 중간 값(range)	19.8(12-46.9)	18.4(12-34.3)	19.5(12-26.7)	0.558
성별, n (%)				
여성	93(79.5)	15(83.3)	13(72.2)	0.423
남성	24(20.5)	3(16.7)	5(27.8)	
앵글분류 (Angle Classification), n (%)				
Class I	44(37.6)	7(38.9)	7(38.9)	0.073
Class II	57(48.7)	10(55.6)	5(27.8)	
Class III	16(13.7)	1(5.5)	6(33.3)	
수평견인량, 평균 ± SD	4.45(2.79)	4.07(2.82)	3.99(2.77)	0.934
EARR, 평균 ± SD	2.86(2.38)	2.50(2.29)	3.2(2.78)	0.413

평균 (mm), mean \pm SD	3.72(3.61)	5.14(3.45)	4.16(3.88)	0.424
변위(mm),	3.97(3.33)	5.14(3.45)	4.84(2.91)	0.780
수평피개 (mm)	3.26(2.29)	3.36(2.01)	2.35(2.11)	0.150
수직피개 (mm)	1.57(2.07)	0.53(2.72)	1.36(1.79)	0.285
ANB(T1, 치료 전)	4.01(2.43)	4.57(2.05)	3.43(3.29)	0.220
ANB(T2, 치료 후)	3.66(2.49)	4.25(1.72)	3.08(3.49)	0.212
FMA(T1, 치료 전)	29.90(5.52)	31.17(6.06)	28.66(6.70)	0.246
FMA(T2, 치료 후)	30.24(8.73)	30.21(5.60)	28.61(6.58)	0.436
U1 to SN(T1, 치료 전)	107.16(7.07)	106.08(8.05)	106.94(9.52)	0.771
U1 to SN(T2, 치료 후)	101.00(6.13)	100.41(6.13)	102.13(6.98)	0.437
PAR (unweighted)	5.22(2.69)	6.00(2.47)	6.17(3.31)	0.865
PAR (weighted)	15.75(9.97)	17.50(9.95)	18.67(12.42)	0.758
치료 기간 (배열+전인)	26.59(7.94)	15.67(4.78)	39.06(5.06)	<0.001

* x2 테스트 혹은 t-테스트를 사용하였다. 굵은 글씨체는 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 나타낸다.

상기 표 2에서 확인한 바와 같이, 전체 환자 수는 총 117명(남성 24명, 여성 93명)이며 과도하게 짧은 군과 긴 군은 각각 18명인 것을 확인하였다. 아울러 피험자의 전체 평균 연령은 19.8세이나, 과도하게 짧은 군은 18.4세, 과도하게 긴 군은 19.5세로 각 군당 유의한 연령 차이는 없는 것을 확인하였다. 아울러, 연령뿐만 아니라 성별, 앵글분류, 총생, 변위, OJ, OB, ANB, PAR 스코어도 그룹 간에 유의한 차이는 없었으며 오직 치료기간만이 유의미한 각 군간 차이를 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 통하여 이러한 각 군을 분류할 때 치료기간을 기준으로 하였기 때문에 치료기간이 각 군의 차이를 나타낸 것임을 확인하였다.

실시예 3. NGS 분석을 통한 교정 치료 기간 관련 후보 유전자 및 이의 변이 규명

Oragene DNA self-collection kit(Genotek, Ottawa, Canada)를 이용하여 피험자의 타액을 채취하였으며, PrepIT-L2P DNA extraction kit(Genotek, Ottawa, Canada)를 이용하여 타액샘플로부터 DNA를 추출하였다. DNA 정량화(quantification)는 Qubit을 이용하여 수행하였다. 이렇게 추출한 DNA를 차세대염기서열분석(targeted next-generation sequencing : NGS)을 위해 기존 연구들로부터 치아 이동 및 골대사(bone metabolism)과 관련한 유전자들을 스크리닝하여 후보 유전자들(candidate genes)을 선정하고, 이를 표 3에 나타내었다.

표 3

유전자	관련 유전자 단일염기 다형성 영역
ALPL	
CASP1	rs530537 (Intron)
CASP5	rs554344 (2KB Upstream)
IL-17A	rs2275913 (2KB Upstream)
IL1A	rs1800587 (5'-UTR)
IL1B	
IL1RN	
IL-6	rs1800796 (Intron)
IL-8	
IRAK1	
LRP1	
LRP5	
LRP6	
DKK1	
DKK2	

<i>DKK3</i>	
<i>FRZB</i>	
<i>FZD7</i>	
<i>SFRP1</i>	rs16890444 (Intron)
<i>SFRP2</i>	rs3242 (3' UTR)
<i>SFRP4</i>	
<i>SFRP5</i>	
<i>WIF1</i>	
<i>WISP3</i>	
<i>WNT10B</i>	
<i>WNT3A</i>	rs4653533 (Intron), rs752107 (Intron)
<i>WNT7B</i>	
<i>SOST</i>	rs1230399 (Upstream), rs851054 (2KB Upstream), rs851056 (2KB Upstream)
<i>SPP1</i>	rs11730582 (2KB Upstream), rs9138 (3'UTR region)
<i>TNF</i>	rs1800629 (2KB Upstream)
<i>TNFRSF11A</i>	rs12455775 (Intron), rs12956925 (Intron), rs12959396 (Intron), rs12970081 (Intron), rs17069845 (Intron), rs17069898 (Intron), rs17069902 (Intron), rs17069904 (Intron), rs17720953 (Intron), rs3826620 (Intron), rs4426449 (Intron), rs4485469 (Intron), rs4500848 (Intron), rs4524034 (Intron), rs4941125 (Intron), rs4941129 (Intron), rs6567272 (Intron), rs7233197 (Intron), rs7236060 (Intron), rs7237982 (Intron), rs7239667 (Intron), rs8083511 (Intron), rs8086340 (Intron), rs8089829 (Intron), rs8099222 (Intron), rs9951012 (Intron)
<i>TNFRSF11B</i>	rs3102735 (2KB Upstream), rs1032128 (Intron), rs11573856 (Intron), rs11573884 (Intron), rs11573901 (Intron), rs11573938 (Intron), rs1485289 (Intron), rs2875845 (Intron), rs3102724 (Intron), rs3102728 (Intron), rs3134057 (Intron), rs3134060 (Intron), rs7010267 (Intron)
<i>TNFSF11</i>	rs1038434 (Intron), rs12585229 (Intron), rs3742257 (Intron), rs931273 (Intron)
<i>VDR</i>	
<i>P2RX7</i>	

[0085] 상기 표 3에서 확인한 바와 같이, 치아이동과 관련이 있는 유전자들은 치주인대(PDL)의 염증반응을 유발하는 사이토카인 유전자인 것을 확인하여, 이들을 후보 유전자로 선정하였으며, RANK/RANKL 경로 및 Wnt 시그널링과 연관된 유전자들로서 골대사와 관련된 유전자들 역시 치조골의 흡수 또는 골합성 과정으로 골밀도가 달라지면 교정적 치아이동도 영향을 받기 때문에 골대사 관련 유전자들을 후보로 선택하였다.

[0087] 실시예 4. 후보 유전자에 대한 NGS 분석을 통한 교정 치료 기간과 관련 있는 최종 유전자 및 이의 변이의 확인

[0088] 치료기간과 관련이 있을 것으로 선정한 상기 실시예의 후보유전자들의 유전적다형성(genetic polymorphism)을 알아보기 위해 타겟 유전자 염기서열 분석법(targeted next-generation sequencing)을 수행하고, 대상환자들을 타겟 시퀀싱한 결과를 확인하고, 이를 표 4에 나타내었다.

표 4

유전자 (rs no.)	*염기 변이 (AA 변이)	유전형	군 (%)		**P value [OR (95% CI)]				
			짧은	긴	우성	열성	공우성	हे테로	호모
									All ele

WNT3A (rs752107)	c.*185T>C	T/T	2(11.1)	0(0)	0.858 [7692.2 (0-2.957)]	0.027 [10.076 (1.3-78.375)]	0.829 [573.38 (0-6.5082)]	0.777 [4175 (0-4.6521)]	0.016 [6.529 (1.424-29.93)]
		T/C	6(33.3)	3(16.7)					
		C/C	10(55.6)	15(83.3)					
SPP1 (rs4754)	c..321T>C (p.D107D)	T/T	1(5.6)	1(5.6)	0.959 [0.927 (0.051-16.71)]	0.018 [8.935 (1.455-54.88)]	0.45 [0.305 (0.014-6.643)]	0.45 [3.316 (0.148-74.47)]	0.069 [2.902 (0.919-9.17)]
		T/C	11(61.1)	5(27.8)					
		C/C	6(33.3)	12(66.7)					
SPP1 (rs1126616)	c..789C>T (p.A263A)	C/C	1(5.6)	1(5.6)	0.959 [0.927 (0.051-16.71)]	0.018 [8.935 (1.455-54.88)]	0.45 [0.305 (0.014-6.643)]	0.45 [3.316 (0.148-74.47)]	0.069 [2.902 (0.919-9.17)]
		C/T	11(61.1)	5(27.8)					
		T/T	6(33.3)	12(66.7)					
SPP1 (rs9138)	c.*294A>C	A/A	1(5.6)	1(5.6)	0.959 [0.927 (0.051-16.71)]	0.018 [8.935 (1.455-54.88)]	0.45 [0.305 (0.014-6.643)]	0.45 [3.316 (0.148-74.47)]	0.069 [2.902 (0.919-9.17)]
		A/C	11(61.1)	5(27.8)					
		C/C	6(33.3)	12(66.7)					
SFRP2 (rs3810765)	c..502+6C>T	G/G	6(33.3)	11(61.1)	0.085 [0.287 (0.07-1.187)]	0.699 [0 (0-2.968)]	0.654 [0.698 (0.146-3.35)]	0.606 [0 (0-11428)]	0.007 [0.212 (0.068-0.659)]
		G/A	7(38.9)	7(38.9)					
		A/A	5(27.8)	0(0)					
LRP1 (rs1800139)	c..7278C>T (p.A2426A)	C/C	5(27.8)	1(5.5)	0.064 [10.572 (0.874-127.9)]	0.788 [0.821 (0.194-3.472)]	0.044 [14.647 (1.07-200.49)]	0.155 [6.868 (0.482-97.75)]	0.381 [1.541 (0.585-4.058)]
		C/T	7(38.9)	12(66.7)					
		T/T	6(33.3)	5(27.8)					
LRP1 (rs1800189)	c..8702-5C>T	C/C	5(27.8)	1(5.5)	0.064 [10.572 (0.874-127.9)]	0.788 [0.821 (0.194-3.472)]	0.044 [14.647 (1.07-200.49)]	0.155 [6.868 (0.482-97.75)]	0.381 [1.541 (0.585-4.058)]
		C/T	7(38.9)	12(66.7)					
		T/T	6(33.3)	5(27.8)					

LRP1 (rs1140648)	c.9783G>A (p.T3261T)	G/G	5(27.8)	1(5.5)	0.064 [10.572 (0.874-127.9)]	0.788 [0.821 (0.194-3.472)]	0.044 [14.647 (1.07-200.49)]	0.155 [6.868 (0.482-97.75)]	0.381 [1.541 (0.585-4.058)]
		G/A	7(38.9)	12(66.7)					
		A/A	6(33.3)	5(27.8)					
P2RX7 (rs3751143)	c.1487A>C (p.Q496A)	A/A	14(77.8)	8(44.4)	0.038 [4.968 (1.094-22.56)]	0.038 [4.968 (1.295-78.38)]	0.038 [4.968 (1.094-22.56)]	-	0.07 [3.309 (0.906-12.09)]
		A/C	4(22.2)	10(55.6)					
		C/C	0(0)	0(0)					
TNFSF11 (rs12585229)	c.388-3222 C>T	C/C	4(22.2)	11(61.1)	0.023 [0.17 (0.037-0.781)]	0.516 [0.513 (0.069-3.837)]	0.028 [0.162 (0.032-0.819)]	0.153 [0.197 (0.021-1.829)]	0.046 [0.35 (0.125-0.983)]
		C/T	11(61.1)	5(27.8)					
		T/T	3(16.7)	2(11.1)					
TNFSF11 (rs931273)	c.533-2050 C>T	C/C	4(22.2)	11(61.1)	0.013 [0.145 (0.032-0.66)]	0.516 [0.513 (0.069-3.837)]	0.015 [0.127 (0.024-0.667)]	0.147 [0.2 (0.023-1.761)]	0.029 [0.311 (0.109-0.886)]
		C/T	11(61.1)	5(27.8)					
		T/T	3(16.7)	2(11.1)					
TNFRSF11A (rs4524034)	c.616+726A>G	A/A	2(11.1)	7(38.9)	0.053 [0.167 (0.027-1.023)]	0.552 [1.687 (0.3-9.48)]	0.032 [0.128 (0.02-0.834)]	0.405 [0.382 (0.04-3.682)]	0.357 [0.632 (0.238-1.676)]
		A/G	13(72.2)	6(33.3)					
		G/G	3(16.7)	5(27.8)					

[0091] P 값은 교정 치료 시작 시 성별과 연령에 맞게 조정되었다. 굵은 값은 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 나타낸다.

[0092] * 뉴클레오타이드 위치는 WNT3A (Transcript ID: NM_033131.3), SPP1 (Transcript ID: NM_001251830.1), SFRP2 (Transcript ID: NM_003013.2), LRP1 (Transcript ID: NM_002332.2), P2RX7 (Transcript ID: NM_002562.5), TNFSF11 (Transcript ID: NM_003701.3) and TNSFRSF11A (Transcript ID: NM_003839.3) mRNA 시퀀스에 따라 할당하였다.

[0093] 마이너 대립 유전자 서열을 각 위치에 밑줄을 그어 표시하였다.

[0094] ** 유전자 연관 연구의 우성 및 열성 모델은 대체 대립 유전자(alternative allele)를 기반으로 하였다.

[0096] 상기 표 4에서 확인한 바와 같이, 교정 치료기간과 가장 연관도가 높은 유전자는 WNT3A, SPP1, SFRP2, LRP1, P2RX7, TNFSF11, 및 TNFRSF11A의 7개였고, 이들 영역의 12개의 SNPs는 각각 치료기간이 짧은 그룹과 긴 그룹 간에 유의한 빈도 차이로 발현되는 것을 확인하였다.

[0097] 구체적으로, 과도하게 긴 군에서는 과도하게 짧은 군과 비교하여 WNT3A SNP의 CC 유전자형(genotype), SPP1의 CC 유전자형, SFRP2의 GG 유전자형, LRP1의 CT 유전자형, TNFSF11의 CC 유전자형의 빈도가 유의하게 많은 것을 확인하였다. 또한 과도하게 짧은 군에서는 긴 군에 비해 SPP1의 TC 유전자형, P2RX7의 AA 유전자형, TNFSF11의 CT 유전자형, TNFSF11A의 AG 유전자형의 빈도가 높은 경향이 나타나는 것으로 확인되었다. SPP1의 3개 SNPs(rs4754, rs1126616, rs9138)들은 서로 연관되어 있어(linked) 동일한 유전형 빈도가 나타났으며, 마찬가지로 LRP1의 SNPs(rs1800189, rs1140648)도 서로 연관(linked)되어 있어 동일한 결과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0098] WNT3A의 SNP(rs752107) 및 SPP1의 SNP(rs9138)는 3'UTR영역에서 염기 변이가 이루어지며, P2RX7의 SNP는 미스센스 변이(missense variant)이다. 그리고 TNFSF11의 SNP(rs12585229, rs931273) 및 TNFSF11A의 SNP는 인트론에서 변이가 나타나는 인트론 변이(intron variant)이다. SFRP2(rs3810765)와 LRP1(rs1800189)는 스플라이싱 영역(splicing region) 및 인트론 변이(intron variant)로서 mRNA 스플라이싱에 관여할 가능성이 있다. 이외 나머지 SNPs는 synonymous variant로서 바뀐 시퀀스가 동일한 아미노산을 코딩하여 유전자 기능이 변화되지 않는 것을 확인하였다.

[0099] 종합적으로 단일염기 다형성 중 치료기간이 짧은 군과 치료기간이 긴군에서의 빈도수를 고려한 결과, 하기 표 5와 같은 대립유전자 빈도를 확인할 수 있었다.

표 5

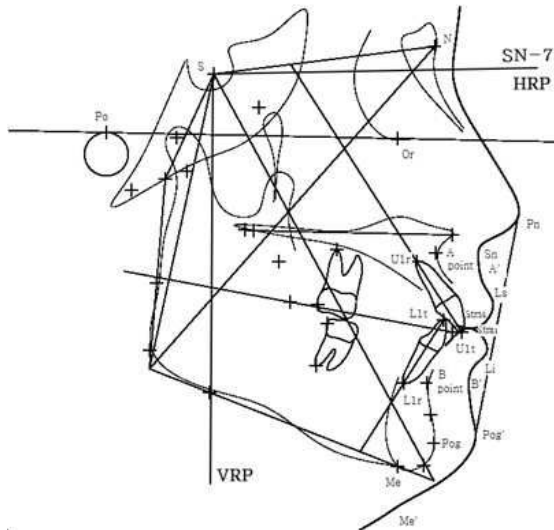
유전자	SNPs (염기 변이 영역)	교정 기간이 과도하게 짧은 군	교정 기간이 과도하게 긴 군
WNT3A	rs752107(3'UTR)		C allele
SPP1	rs9138(3'UTR) rs4754,rs1126616(synonymous)		C allele
SFRP2	rs3810765(스플라이싱 영역)		G allele
TNFSF11	rs12585229, rs931273(인트론)		C allele
P2RX7	rs3751143(미스센스)	A allele	

[0103] 종합적으로, 상기 표 5에서 확인한 바와 같이, 교정기간이 긴 군에서 WNT3A 유전자의 rs752107 단일염기 다형성이 C allele로 나타나는 것으로 확인하였으므로, rs752107 단일염기 다형성의 C allele에 해당하는 경우에는 교정기간이 과도하게 긴 것으로 판단할 수 있음을 확인하였다. 아울러, 교정기간이 긴 군에서 SPP1 유전자의 rs9138, rs4754, 및 rs1126616 단일염기 다형성이 C allele로 나타나는 것으로 확인하였으므로, rs9138, rs4754, 및 rs1126616 단일염기 다형성이 C allele에 해당하는 경우에는 교정기간이 과도하게 긴 것으로 판단할 수 있음을 확인하였다. 또한, 교정기간이 긴 군에서 SFRP2 유전자의 rs3810765 단일염기 다형성이 G allele로 나타나는 것으로 확인하였으므로, rs3810765 단일염기 다형성이 G allele에 해당하는 경우에는 교정기간이 과도하게 긴 것으로 판단할 수 있음을 확인하였다. 또한, 교정기간이 긴 군에서 TNFSF11(A) 유전자의 rs12585229 및 rs931273 단일염기 다형성이 C allele로 나타나는 것으로 확인하였으므로, rs12585229 및 rs931273 단일염기 다형성이 C allele에 해당하는 경우에는 교정기간이 과도하게 긴 것으로 판단할 수 있음을 확인하였다.

[0104] 반대로, 교정기간이 짧은 군에서 P2RX7 유전자의 rs3751143 단일염기 다형성이 A allele로 나타나는 것으로 확인하였으므로, rs3751143 단일염기 다형성의 A allele에 해당하는 경우에는 교정기간이 과도하게 긴 것으로 판단할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

