

청소년 고혈압 관련 유전자의 연관성 분석: Kangwha Study

서 일, 남정모, 김성주¹⁾, 신동직¹⁾, 허남욱, 강대룡
연세대학교 의과대학 예방의학교실, 가톨릭대학교 의과대학 연구원²⁾

Association Analysis of the Essential Hypertension Susceptibility Genes in Adolescents : Kangwha Study

Il Suh, Chung Mo Nam, Sung-Joo Kim¹⁾, Dong-Jik Shin¹⁾, Nam Wook Hur, Dae Ryong Kang

Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Yonsei University;
Catholic Research Institutes of Medical Science, College of Medicine, Catholic University of Korea²⁾

Objectives : In this study we examined the association between the genetic markers ACE (A-240T, C-93T, I/D, A2350G), AGT (M235T), AT1R (A1166C), CYP11B2 (T-344C, V386A), REN (G2646A), ADRB2 (G46A, C79G, T-47C, T164I), GNB3 (C825T) and ADD1 (G460W) and the presence of essential hypertension in adolescents.

Methods : The Kangwha Study is an 18-year prospective study that is aimed at elucidating the determinants of the blood pressure level from childhood to early adulthood. For this study, we constructed a case-control dataset of size of 277 and 40 family trios data from the Kangwha Study. For this purpose, we perform a single locus-based case-control association study and a single locus-based TDT (transmission/disequilibrium test) study.

Results : In the case-control study, the single locus-based association study indicated that the ADD1 (G460W)

($p=0.0403$), AGT (M235T) ($p=0.0002$), and REN (G2646A) ($p=0.0101$) markers were significantly associated with the risk of hypertension. These results were not confirmed on the TDT study. This study showed that genetic polymorphisms of the ADD1, AGT and REN genes might be related to the hypertension in Korean adolescents.

Conclusions : This study provided useful information on genetics markers related to blood pressure. Further study will be needed to confirm the effect of the alpha adducin gene, the angiotensinogen gene and the renin gene on essential hypertension.

J Prev Med Public Health 2006;39(2):177-183

Key words : Association analysis, Hypertension, Case-control study, TDT, Kangwha study

서론

우리나라 30세 이상 성인의 고혈압 유병률은 30.0% (남자 39.8%, 여자 30.6%) 이상으로 만성퇴행성 질환 중 가장 높다 [1]. 고혈압의 유전율(heritability) 혹은 혈압변화의 유전적 기여도는 30~50%로 평가되고 있어 환경적 요인 외에 유전적 요인이 차지하는 비중이 높음을 알 수 있다 [2].

질병 관련 유전자를 발굴하기 위한 방법으로서 후보유전자 접근방법(candidate gene approach), 유전체 탐색방법(genome-wide search), 중간 표현형 접근방법(intermediate phenotype approach), 비교유전체 방

법(comparative genomics) 등이 사용되고 있다 [3]. 이들 방법 중 후보유전자 접근방법이 가장 많이 사용되고 있으며, 이는 후보유전자내에 존재하는 유전적 다형성(genetic polymorphism)을 분석함으로써 유전적 변이(genetic variation)가 질병발생에 미치는 영향을 파악할 수 있다.

현재까지 고혈압에 관여하는 유전자 혹은 표지유전자를 발굴하기 위한 환자-대조군 연구에서는 고혈압의 병태생리기전 중 주로 레닌-안지오텐신계(renin-angiotensin system, RAS), 교감신경계(catecholaminergic/adrenergic function), 신장상피의 나트륨 채널(sodium epithelial channel), 산화수소 의존

성 혹은 독립성 혈관수축과 혈관비대(nitric oxide dependent/independent vasodilation) 등의 기전 [4]에 속하는 유전자들을 후보유전자로 사용하여 왔다.

성인 고혈압 형질과 유전자와의 관련성 연구는 RAS에 해당하는 ACE(angiotensin-I converting enzyme), AGT(angiotensinogen), AT1R(angiotensin II type1 receptor), CYP11B2(cytochrome p450 subfamily 11), REN(renin) 등의 유전자들의 SNP(single nucleotide polymorphism)에 대해서 많은 연구들이 보고되고 있다. 일본인과 중국인에서 ACE I/D(insertion/deletion)의 D 대립유전자는 고혈압과 관련성이 있는 반면 스페인을 대상으로 한 연구 등 많은 연구에서는 또한 관련성이 없었다 [5,6]. 그러나

최근 Porto 등 [7]은 청소년을 대상으로 실시한 환자-대조군 연구에 의하면 ACE I/D와 AGT의 유전적 변이와 상호작용은 고혈압 발생에 매우 중요한 원인으로 작용한다고 보고하였다. 일본인을 대상으로 한 환자-대조군 연구에서 환자군에서는 AGT 내 174M과 235T의 대립유전자를 동시에 갖는 일배체형(haplotype)이 많았고, 특히 174M 대립유전자의 빈도가 통계학적으로 유의하게 높았다 [8]. AT1R 유전자는 세포내 칼슘 농도를 조절하여 심혈관계에 매우 중요한 매개 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 즉 혈관수축, 알도스테론 분비촉진, 신장의 염분 흡수, 혈관비대, 교감신경의 항진 등에 관여하며 지금까지 약 69종의 SNPs가 식별되었다. 이들 가운데 A1166C 유전자변이 연구에서 1166C 대립유전자의 빈도가 백인 집단의 환자군에서 비교적 높은 빈도로 존재하는 것으로 조사되어 A1166C와 고혈압의 연관성이 밝혀졌다 [9].

CYP11B2의 T-344C 표지유전자는 알도스테론 종합효소계에 관계하며 이태리 북동지역의 86명의 고혈압 군과 172명의 대조군 간의 유전자형 빈도비교 결과 두 군간에 매우 유의한 차이를 보였다 [9]. 이러한 결과는 영국 원주민(Anglo-Celtic)들 중 특히 여성에서도 관찰되었다 [10]. 일반인구 집단을 대상으로 한 일본의 'The Ohasama Study'는 CYP11B2 유전자내의 4개 SNP를 이용한 일배체형이 고혈압과 연관성이 있음을 보고하였다 [11].

REN 유전자는 신장의 사구체 세포에서 분비되어 간에서 합성되어 혈중에 순환되는 안지오텐시노젠을 분해하여 AngI으로 전환시킨다. 또한 알도스테론 방출과 혈관수축 등에 관여하여 결국에는 혈압조절의 기능을 담당한다. 이 유전자의 크기는 12kb로 크지 않으며 지금까지 6종류의 SNPs가 보고 되었다. 이들 중 2개 SNPs는 아프리카계 미국인에서만 고혈압과 연관성이 있음이 보고되었다 [12].

GNB3(G-proteinsubunit)은 호르몬이나 신경전달물질 등과 결합하여 이들의 신호를 전달하는 기능을 수행하는 G-protein 결합 수용체의 하나로 이들 내에 생긴 변이는

심혈관질환의 원인을 제공하는 것으로 알려져 있다. 이 유전자내 C825T 다형성에 대한 분석을 북부 중국인을 대상으로 환자(501명)-대조군(503명) 연구를 수행한 결과 고혈압 발생과는 연관성이 없는 것으로 관찰되었다 [13]. 그리고 남자 867명과 여자 1,013명으로 구성된 일본인 일반인구 코호트 연구 'The Suita Study' 결과 역시 남녀 모두에서 C825T는 고혈압과 관련성이 없는 것으로 보고되었다 [14]. ADRB2(adrenergic receptor)는 카테콜라민 활성화에 관여하며 혈관확장에 관여하는 다른 유전자와 마찬가지로 고혈압과의 관련성 연구결과들이 일치하지 않고 있다. 최근 Lee 등 [15]의 싱가포르 중국인을 대상으로 실시한 환자-대조군 연구에 의하면 이 유전자내 3개의 SNP로 이루어진 일배체형은 고혈압과 연관성이 있고 또한 이들 SNP의 주효과보다 교호작용이 중요하게 고혈압과 관계있음을 밝혔다. 그리고 미국 남성 2,092명을 대상으로 한 연구에서는 ADRB2 유전자내의 몇 개 SNPs에 대한 일배체형이 심근경색과 관련 있게 나왔다 [16].

Alpha adducin(ADD1) 유전자는 거의 모든 종류의 세포에 관여하며 고혈압과 salt sensitivity에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 선행연구에 의하면 우리나라와 식습관이 비슷한 일본과 중국인을 대상으로 한 연구에서 ADD1 유전자내 exon 10번의 G460W가 고혈압과 관련이 있게 분석되었다 [14,17]. 그러나 우리나라 일반인구 집단을 대상으로 실시한 환자-대조군 연구결과에 따르면 G460W는 고혈압과 관련성이 없는 것으로 보고되었다 [18].

한편 유전적 다형성과 질병과의 연관성을 분석하는 방법으로서 환자-대조군 연구와 TDT(transmission/disequilibrium test) 연구방법이 가장 많이 사용되고 있다. 환자-대조군 연구설계에 기초한 연관성분석은 크게 유전자형에 기초한 방법과 대립유전자에 기초한 방법으로 구별할 수 있다. 통계적인 관련성은 환자군과 대조군의 유전자형 또는 대립유전자의 빈도에 차이가 있는가를 검정하는 카이제곱 검정, 우도로부터 제안된 로그 우도비 검정(log-

likelihood ratio, LLR)과 스코아 통계량, 그리고 로지스틱 또는 로그-선형 모형을 이용한 방법 등이 있을 수 있다. 환자-대조군 연구설계에 기초한 연관성분석은 좁은 영역의 유전자 위치탐색이 가능하고, 분석방법이 쉬우며 또한 자료를 수집하기에 용이하다는 장점으로 현재 가장 널리 사용되는 방법이다. 대립유전자의 이질성(allelic heterogeneity)이 있거나, 인구집단내 혼합(admixture) 또는 층화(stratification)가 있는 경우에 치명적인 약점이 있다.

TDT 방법은 부/모/자의 유전자형 자료로만 분석하기 때문에 대규모 가계자료에 비해 자료를 수집하기가 용이하며, 다인자성 질환과 같이 유전자의 효과가 그리 크지 않은 경우 통계적인 검정력이 우수하며, 특정한 유전모형을 가정하지 않는 비모수적 방법이므로 매우 실용적이다. 또한 LD(linkage disequilibrium)와 연쇄(linkage) 모두를 검정할 수 있는 방법이므로 재조합율(recombinant fraction)을 추정하고 이를 이용하는 고전적인 연쇄 방법들이 할 수 없는 위치탐색이 가능하다는 장점을 가지고 있고, 인구집단의 혼합 또는 층화로 야기되는 문제가 없으므로 현재까지 가장 많이 사용되고 있다.

이 연구는 고혈압과 관련된 서로 다른 기전의 8개 유전자 총 15개의 단일유전자좌위를 선정하여 환자-대조군 연구와 TDT 연구를 동시에 실시하여 우리나라에서 이들 유전자들이 고혈압과 관련성이 있는지를 밝히고자 하였다. 고혈압 같은 다인성 복합형질(multifactorial complex traits) 질환은 연령이 높을수록 환경적인 요인에 기인하여 발생할 가능성이 높으므로 환경적 영향을 아직 덜 받았을 청소년을 대상으로 혈압 양상이 다른 남녀를 구분하여 연구를 진행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

Kangwha Study는 1986년 만 6세에 해당하는 430명의 초등학생들을 대상으로 1997년 17세까지 매년 추적되었으며, 현재에도 추적 관리되고 있는 코호트 연구로서, 한국인의 혈압의 자연사(natural history)

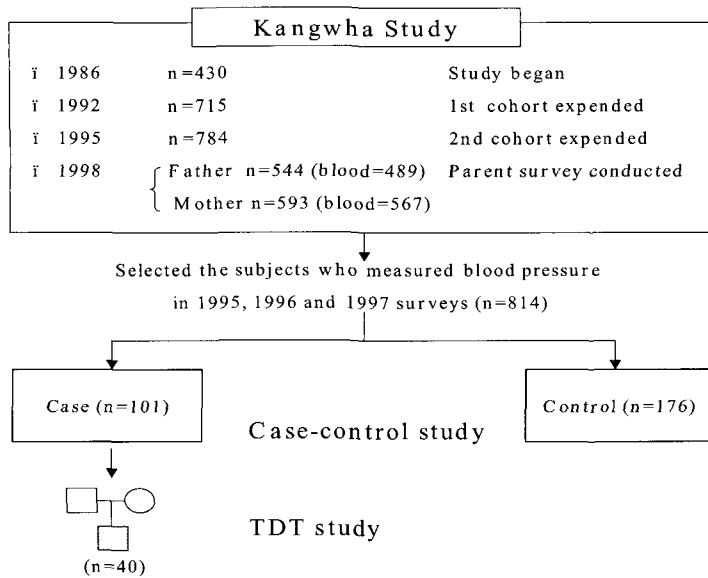


Figure 1. Study design and number of subjects.

와 혈압변화의 관련요인을 찾고자 시도되었다. Kangwha Study는 코호트 구성원이 중학교에 진학한 1992년 시점에서 715명, 그리고 고등학교로 진학한 1995년 시점에서 784명으로 각각 확대되었으며, 1998년에는 코호트 구성원의 부모에 대한 혈압 및 관련요인에 대한 조사를 하였고 혈액을 채취하였다 (Figure 1).

본 연구에 사용된 환자-대조군과 가계 자료는 다음과 같다. 환자군은 15세부터 17세까지 측정된 혈압 중 적어도 한번 이상 수축기혈압(systolic blood pressure, SBP)이 130 mmHg 이상이거나 또는 이완기혈압(diastolic blood pressure, DBP)이 85 mmHg 인 경우로 정의하였다. 이 기준에 해당하는 환자군은 총 139명이었으며, 이 중 혈액이 보관되어 있는 101명으로 남자 61명과 여자 40명으로 구성되었다. 대조군은 15세부터 17세까지 측정된 수축기혈압과 이완기혈압이 모두 120 mmHg/80 mmHg 미만으로 총 396명이었다. 이 중 혈액이 보관되어 있는 구성원 289명 중에서 검정력과 연구대상자의 손실을 감안하여 남자의 경우 환자군과 대조군을 1:1로 짝짓기 하였고 여자의 경우는 1:2로 짝짓기 하여, 낮은 혈압 순서대로 176명 (남자 74명, 여자 102명)을 추출하였다.

환자군의 혈압은 JNC 7th 기준으로 볼 때 전기고혈압(prehypertension) 이상으로 정의할 수 있고, 대조군은 정상(normal) 혈압

군으로 볼 수 있다. 한편 환자군 중에서 부모의 혈액이 모두 있는 40명을 발단자 (proband)로 하여 부/모/자의 가계 자료를 구축하였다.

2. 분석유전자

장기 코호트 연구인 Kangwha Study를 통해 확보된 유전자원을 바탕으로 고혈압 관련 유전역학 선행연구의 문헌고찰과 실질적인 혈압조절에 관여하는 것으로 알려진 RAS(Renin-Angiotensin System), Catecholaminergic/Adrenergic function, Renal sodium(salt sensitivity) 대사기전에 관여하는 유전자 중 8개 유전자 총 15개 표지유전자를 선정하였다 (Table 1). 선정된 유전

자는 ACE(A-240T, C-93T, I/D, A2350G), AGT(M235T), AT1R(A1166C), CYP11B2(T-344C, V386A), REN(G2646A), ADRB2(G46A, C79G, T-47C, T164I), GNB3(C825T), ADD1(G460W) 등이다. 이들 내에서 PCR-RFLP, PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), Allele-specific multiplex PCR, DHPLC 및 SNP-IT 등의 방법을 이용하여 유전자형을 분석하였다. 대립유전자의 minor allele의 빈도가 5%이상인 경우만을 분석하였다.

3. 연구방법

본 연구는 다음 두 가지 단계로 진행되었다. 첫 번째 단계는 277명의 환자-대조군 자료에서 연구대상자의 일반적 특성을 파악하고 선정된 고혈압 관련 단일유전자좌위를 이용하여 연관성분석을 남겨 독립적으로 실시하였다. 이때 환자군과 대조군 전체자료에서 각 표지유전자의 HWE (Hardy-Weinberg Equilibrium)를 확인하였다. 두 번째 단계는 부/모/자로 구성된 Trio 자료에서 TDT 통계량을 구하여 앞 단계의 결과를 확인하였다. 모든 분석은 SAS/Genetics 9.1.3을 사용하였다 [19].

연구결과

연구대상자의 일반적 특성은 Table 2와 같다. 환자군의 비율이 남자의 경우 45%이고 여자인 경우 28%로 다소 차이를 보

Table 1. List of hypertension related polymorphisms which scheduled to genetic analysis

Pathway	Gene	Chromosomal location	Polymorphism	
RAS [§]	ACE (angiotensin-I converting enzyme)	17q23	A-240T C-930T I/D A2350G	
	AGT (angiotensinogen)	1q42-q43	M235T	
	AT1R (angiotensin II type1 receptor)	3p21-25	A1166C	
	CYP11B2 (cytochrome p450 subfamily 11)	8q21-q22	T-344C V386A	
		REN (renin)	1q32	G2646A
C/A function [†]	ADRB2 (adrenergic receptor)	5q31-q32	G46A C79G T-47C T164I	
	Renal sodium [‡]	GNB3 (G-protein subunit)	7q22	C825T
		ADD1 (adducin)	4p16.3	G460W

[§] Renin-Angiotensin System

[†] Catecholaminergic/Adrenergic function

[‡] Salt sensitivity

Table 2. Characteristics of subjects studied

Variable(unit) [§]	Male (n=135)			Female (n=142)		
	Case (n=61)	Control (n=74)	p-value	Case (n=40)	Control (n=102)	p-value
Height (cm)	173.5 ± 5.7	168.6 ± 5.7	<0.0001	157.4 ± 4.8	159.2 ± 5.2	0.0590
Weight (kg)	65.3 ± 11.5	56.3 ± 6.4	<0.0001	56.1 ± 8.9	52.1 ± 5.5	0.0111
Body Mass Index (kg/m ²)	21.7 ± 3.4	19.8 ± 1.8	0.0001	22.6 ± 3.4	20.1 ± 2.0	0.0007
Systolic blood pressure (mmHg)	131.7 ± 9.0	110.9 ± 5.2	<0.0001	127.6 ± 7.5	104.8 ± 4.9	<0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.0 ± 8.1	62.4 ± 6.1	<0.0001	73.9 ± 8.9	62.4 ± 5.9	<0.0001

Values shown are mean ± sd

[§] averages of three measurements in 1995, 1996, and 1997

Table 3. Genotype frequencies of 8 genes (15 SNPs) in case-control study

Gene	SNP	Genotype	Male (n=135)				Female (n=142)			
			Case (n=61)	Control (n=74)	P-value [§]	HWE [†]	Case (n=40)	Control (n=102)	P-value [§]	HWE [†]
ACE	A-240T	AA	21 (34.4)	28 (37.8)	0.9191	0.9907	15 (37.5)	41 (40.2)	0.6577	0.6475
		AT	30 (49.2)	35 (47.3)			22 (55.0)	49 (48.0)		
		TT	10 (16.4)	11 (14.9)			3 (7.5)	12 (11.8)		
	C-93T	CC	22 (36.1)	31 (41.9)	0.7548	0.5645	17 (42.5)	41 (40.2)	0.7666	0.6475
		CT	30 (49.2)	32 (43.2)			20 (50.0)	49 (48.0)		
		TT	9 (14.7)	11 (14.9)			3 (7.5)	12 (11.8)		
	I/D	II	23 (37.7)	27 (36.5)	1.0000	0.8587	17 (42.5)	46 (45.1)	0.8199	0.7596
		ID	29 (47.5)	36 (48.7)			20 (50.0)	46 (45.1)		
		DD	9 (14.8)	11 (14.9)			3 (7.5)	10 (9.8)		
	A2350G	AA	24 (39.3)	33 (44.6)	0.7920	0.5325	19 (47.5)	45 (44.1)	0.7755	0.8836
AG		27 (44.3)	31 (41.9)	18 (45.0)			45 (44.1)			
GG		10 (16.4)	10 (13.5)	3 (7.5)			12 (11.8)			
AGT	M235T	MM	41 (67.2)	23 (32.0)	0.0002	0.0003	29 (73.0)	81 (79.4)	0.5897	0.4863
		MT	19 (31.2)	47 (65.3)			9 (22.0)	19 (18.6)		
		TT	1 (1.6)	2 (2.7)			2 (5.0)	2 (2.0)		
AT1R	A1166C	AA	59 (96.7)	66 (89.2)	0.1174	0.6230	36 (90.0)	93 (91.2)	1.0000	0.6411
		AC	2 (3.3)	8 (10.8)			4 (10.0)	9 (8.8)		
		CC	-	-			-	-		
CYP11B2	T-344C	TT	34 (55.7)	34 (46.0)	0.3804	0.8039	20 (50.0)	52 (51.0)	0.96161	0.6357
		TC	20 (32.8)	33 (44.6)			18 (45.0)	43 (42.1)		
		CC	7 (11.5)	7 (9.4)			2 (5.0)	7 (6.9)		
	V386A	TT	61(100.0)	74(100.0)	-	-	40(100.0)	102(100.0)	-	-
		-	-	-			-			
		-	-	-			-			
REN	G2646A	GG	41 (67.2)	46 (62.2)	0.5346	0.7108	31 (77.5)	53 (52.0)	0.0101	0.7330
		GA	19 (31.2)	24 (32.4)			9 (22.5)	42 (41.2)		
		AA	1 (1.6)	4 (5.4)			0 (0.0)	7 (6.8)		
ADRB2	G46A	GG	12 (22.9)	19 (25.7)	0.5828	0.8162	10 (25.0)	20 (19.6)	0.4488	0.2012
		GA	35 (57.4)	36 (48.6)			19 (47.5)	43 (42.2)		
		AA	14 (19.7)	19 (25.7)			11 (27.5)	39 (38.2)		
	C79G	CC	47 (77.1)	54 (73.0)	0.7235	0.2827	33 (82.5)	85 (83.3)	0.3607	0.3585
		CG	13 (21.3)	17 (23.0)			6 (15.0)	17 (16.7)		
		GG	1 (1.6)	3 (4.0)			1 (2.5)	0 (0.0)		
T-47C	TT	45 (73.8)	54 (73.0)	0.6124	0.7375	33 (82.5)	84 (82.3)	0.3294	0.3284	
	TC	16 (26.2)	18 (24.3)			6 (15.0)	18 (16.7)			
	CC	0 (0.0)	2 (2.7)			1 (2.5)	0 (0.0)			
T164I	CC	61(100.0)	74(100.0)	-	-	40(100.0)	102(100.0)	-	-	
	-	-	-			-				
	-	-	-			-				
GNB3	C825T	CC	8 (22.2)	19 (25.7)	0.8968	0.9987	3 (12.0)	29 (28.4)	0.2560	0.0303
		CT	18 (50.0)	37 (50.0)			12 (48.0)	40 (39.2)		
		TT	10 (27.8)	18 (24.3)			10 (40.0)	33 (32.4)		
ADD1	G460W	GG	7 (11.5)	22 (29.7)	0.0403	0.1634	8 (20.0)	19 (18.6)	0.8843	0.3855
		GW	32 (52.5)	31 (41.9)			19 (47.5)	45 (44.1)		
		WW	22 (36.0)	21 (28.4)			13 (32.5)	38 (37.3)		

[§] p-values were obtained from the basis of 10,000 permutation samples

[†] Hardy-Weinberg Equilibrium for control subjects in male and female separately. p-values were obtained from the basis of 10,000 permutation samples

였다. 이러한 이유와 혈압 양상이 남녀에 차이가 있으므로 성별을 구분하여 분석하였다. 남녀 각각에서 신장을 제외한

체중, BMI, SBP, DBP 모두 환자군의 평균이 대조군에 비해 유의하게 높았다 (p<0.001).

모든 표지유전자에 대한 환자군과 대조군의 유전자형 빈도는 Table 3과 같다. 단일유전자좌위의 유전자형에 따른 환자군과 대조군의 분포를 살펴보면, T164I와 V386A 표지유전자는 남녀 모두에서 100% 동형접합체(homozygous)로 관찰되어 분석에서 고려하지 않았다. 남자에서는 M235T (p=0.0003)와 여자에서는 GNB3 (p=0.0303)를 제외한 모든 표지유전자가 HWE를 잘 만족하였다. 대부분의 표지유전자 유전자형에 따른 환자군과 대조군의 분포 차이는 모두 통계학적으로 유의하지 않아 고혈압과의 관련성을 확인할 수 없었다. 그러나 남자의 경우 G460W(p=0.0403), M235T (p=0.0002)와 여자의 경우 G2646A (p=0.0101)는 유의한 관련성을 보였다. 남자의 경우 G460W 유전자의 WW 유전자형이 환자군에서는 36%, 대조군에서는 28.4%로 환자군에서 많았으며, M235T 유전자에서는 MM 유전자형이 환자군에서 많았다. 여자의 경우 G2646A의 GG 유전자형이 환자군에서는 77.5%로 대조군의 52.0%에 비해 많았다.

Table 4는 40 Trio 자료에 대한 부/모/자 각각의 유전자형 빈도를 보여주고 있다. 단일유전자좌위에 기초한 TDT 통계량 계산은 부모의 특정 대립유전자를 자녀에게 물려줄 때, 어떤 대립유전자를 전달/비전달 하는지의 문제이므로 발단자의 성별과 무관하므로 구분하지 않았다. 모든 표지유전자의 유전자형 빈도가 부/모/자에서 모두 큰 차이 없이 비슷하였다.

Table 5는 2개 표지유전자(T164I, V386A)를 제외한 13개의 표지유전자에 대해 TDT 통계량을 구하여 검정한 결과를 보여주고 있다. 모든 표지유전자의 대립유전자에 대한 전달/비전달 2×2분할표의 TDT 통계량을 보면 조사한 13개 표지유전자는 고혈압과 연쇄 또는 연관되어 있다고 보기 어렵다. 한편 환자-대조군의 연관성 분석에서 연관성이 있었던 G460W의 경우 W 대립유전자를 전달하고 G 대립유전자를 전달하지 않는 경우가 19건, G 대립유전자를 전달하고 W 대립유전자를 전달하지 않는 경우가 25건으로 오히려 G 대립유전자가 통계적인 유의성은 없었지만 더 많이 전

달되는 경향을 보여 환자-대조군의 결과와는 상이하였다. 이러한 경향은 G2646A 유전자에서도 동일하였다. 한편 M235T의 경우는 M 대립유전자가 T 대립유전자보다 더 많이 전달되어 환자-대조군의 연구 결과 방향과는 일치하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이러한 결과는 Trio 연구대상자수가 40으로 적어서 통계적인 검정력이 낮아 연관성 강도가 약화되었을 가능성도 배제할 수 없다.

고찰

본 연구는 한국인의 고혈압 발생에 영향을 주는 유전적 요인을 알아보기 위하여 8개 유전자 총 15개 표지유전자를 선정하였고 환자-대조군 연구와 Trio 자료의 TDT 분석을 동시에 시행하였다. 국내외에서 청소년 고혈압에 대한 연구는 아주 드문 실정이며 환경적 영향을 아직 덜 받았을 청소년을 대상으로 실시한 본 연구의 결과는 표지유전자들의 유전적 다형성의 정보와 아울러 국내 관련 유전역학분야에서 매우 유용한 자료가 될 수 있을 것이다.

본 연구의 환자-대조군 연구 결과에서 남자는 ADD1(G460W), AGT(M235T)와 여자는 REN(G2646A) 표지유전자가 고혈압과 유의한 연관성이 있는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 일본의 일반인구를 대상으로 한 코호트 연구 결과 G460W 유전적 다형성이 여성에서 고혈압과 연관성이 있었으며 WW 유전자형을 갖는 사람이 다른 유전자형을 갖는 사람에 비해 고혈압 위험이 1.53배 높은 결과와 일치하였으며, 또한 중국인을 대상으로 한 환자-대조군 연구에서의 결과와도 비슷하게 분석되었다. 한편 Katsuya 등 [17]의 연구결과에 따르면 레닌 활성도가 낮은 젊은층에서 ADD1의 W 대립유전자가 고혈압의 위험을 증가시키는 대립유전자임을 밝혔으며, 중국인을 대상으로 한 TDT 연구에서도 유의하게 W 대립유전자가 발단자에게 더 많이 전달되었다 [14]. 그러나 본 연구에서는 통계학적으로 유의하지는 않았으나 G 대립유전자가 발단자에게 더 많이 전달되는 경향을 보여 앞의 연구결과와 상이한 결과를 보

Table 4. Genotype frequencies of 8 genes (15 SNPs) of the 40 pedigrees in TDT study

Gene	SNP	Genotype	N (%)		
			Father	Mother	Proband
ACE	A-240T	AA	12 (30.0)	10 (25.0)	14 (35.0)
		AT	23 (57.5)	21 (52.5)	21 (52.5)
		TT	5 (12.5)	9 (22.5)	5 (12.5)
	C-93T	CC	11 (27.5)	10 (25.0)	14 (35.0)
		CT	25 (62.5)	21 (52.5)	21 (52.5)
		TT	4 (10.0)	9 (22.5)	5 (12.5)
		II	15 (37.5)	11 (27.5)	16 (40.0)
	I/D	ID	21 (52.5)	21 (52.5)	19 (47.5)
		DD	4 (10.0)	8 (20.0)	5 (12.5)
		AA	14 (35.0)	11 (27.5)	16 (40.0)
A2350G	AG	22 (55.0)	21 (52.5)	19 (47.5)	
	GG	4 (10.0)	8 (20.0)	5 (12.5)	
	MM	26 (65.0)	24 (60.0)	27 (67.5)	
	MT	13 (32.5)	13 (32.5)	11 (27.5)	
	TT	1 (2.5)	3 (7.5)	2 (5.0)	
AGT	M235T	AA	38 (95.0)	39 (97.5)	39 (97.5)
		AC	2 (5.0)	1 (2.5)	1 (2.5)
		CC	-	-	-
AT1R	A1166C	TT	13 (32.5)	16 (40.0)	21 (52.5)
		TC	23 (57.5)	22 (55.0)	15 (37.5)
		CC	4 (10.0)	2 (5.0)	4 (10.0)
		TT	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)
REN	G2646A	GG	27 (67.5)	33 (82.5)	28 (70.0)
		GA	13 (32.5)	6 (15.0)	12 (30.0)
		AA	-	1 (2.5)	-
ADRB2	G46A	GG	4 (10.0)	7 (17.5)	7 (17.5)
		GA	20 (50.0)	22 (55.0)	20 (50.0)
		AA	16 (40.0)	11 (27.5)	13 (32.5)
	C79G	CC	32 (80.0)	33 (82.5)	31 (77.5)
		CG	8 (20.0)	7 (17.5)	9 (22.5)
T-47C	T-47C	GG	-	-	-
		TT	31 (77.5)	33 (82.5)	32 (80.0)
		TC	9 (22.5)	7 (17.5)	8 (20.0)
		CC	-	-	-
T164I	T164I	CC	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)
		-	-	-	
		-	-	-	
GNB3	C825T	CC	14 (35.0)	9 (22.5)	8 (20.0)
		CT	15 (37.5)	19 (47.5)	22 (55.0)
		TT	11 (27.5)	12 (30.0)	10 (25.0)
ADD1	G460W	GG	8 (20.0)	6 (15.0)	8 (20.0)
		GW	24 (60.0)	20 (50.0)	23 (57.5)
		WW	8 (20.0)	14 (35.0)	9 (22.5)
		-	-	-	

였다. 이러한 이유는 TDT 분석 요건이 부/모/자의 자료가 모두 있어야 하고, 이 가계 모형에서는 자녀가 반드시 질병을 가지며, 부/모의 유전자형이 이형접합체이어야 하기 때문에 연구대상 가계수를 충분히 확보할 수 없었기 때문에 통계적 검정력이 떨어진 결과일 가능성이 있다[20]. 앞으로 ADD1 유전자 내에 존재하는 한국인의 특이 유전자 다형성을 더 많은 환자-대조군 자료와 Trio 자료를 이용하여 연구할 필요가 있음을 시사한다.

AGT 유전자 내의 M235T의 235T 대립유전자는 일본인을 대상으로 한 환자-대조군 연구에서 남녀 모두 연관성이 없었으나[8], 본 연구에서는 남자에서 통계학적

으로 유의한 연관성이 존재하여 앞의 연구와 상이함을 보였다. 그러나 Iso 등 [8]의 연구에서 M235T와 근접한 T174M인 경우 여자에서 그리고 고혈압 발생연령이 낮은 집단에서 유의한 연관성을 보여 AGT 내의 유전자 다형성을 더 연구할 필요성이 있고, 이들의 일배체형을 통해 고혈압에 민감한 일배체형을 찾는 연구가 필요할 것이다. 한편 본 연구에서 M235T 표지유전자의 경우 HWE를 만족하지 않아 해석의 어려움은 존재하지만 유전자형에 기초한 카이제곱 검정은 HWE에 덜 민감하기 때문에 그 관련성을 인정하였으며, 이에 대해서도 추후 확인하는 연구가 필요할 것으로 본다.

Table 5. Transmission disequilibrium test(TDT) of 13 genetic polymorphisms of the 40 pedigrees in TDT study

Gene	SNP	2×2 contingency table (transmitted × non-transmitted)			TDT statistic	p-value [‡]
		T	A			
ACE	A-240T	T	14	17	2.273	0.1710
		A	27	22		
	C-93T	T	13	18	2.174	0.1788
		C	28	21		
	I/D	D	12	17	1.524	0.2787
		I	25	26		
A2350G	G	12	17	1.884	0.2255	
	A	26	25			
AGT	M235T	T	4	11	0.615	0.5538
		M	15	50		
AT1R	A1166C	C	0	1	0.333	1.0000
		A	2	77		
CYP11B2	T-344C	C	6	17	2.689	0.1279
		T	28	29		
		A	1	11		
REN	G2646A	A	1	11	0.474	0.6463
		G	8	60		
ADRB2	G46A	A	27	19	0.381	0.6424
		G	23	11		
	C79G	G	0	9	0.600	0.5979
		C	6	65		
	T-47C	C	0	8	0.000	1.0000
		T	8	64		
GNB3	C825T	T	23	19	0.471	0.6055
		C	15	23		
ADD1	G460W	W	22	19	0.818	0.4453
		G	25	14		

[‡] p-values were obtained from the basis of 10,000 permutation samples

본 연구의 표현형은 환자-대조군 즉, 고혈압 유무이다. 일반적으로 표현형을 어떻게 정의하느냐는 매우 중요한 관점이며, 분석 방법과 결과도 표현형에 따라 달라질 수 있다. 즉, 혈압의 임계치 수준에 따라 분류 범주가 바뀌게 되고 이것은 유전자의 관련성에 영향을 주기 때문에 혈압수준을 연속형으로 분석하는 양적형질(quantitative trait) 분석이 필요할 수도 있다. 본 연구에서 후보유전자의 선정은 고혈압 진단에 있어 연쇄 혹은 연관성이 평가된 유전자 즉 혈압변화에 대해 세포생리학적 기전이 잘 알려진 유전자를 대상으로 하였다. 후보유전자상에 분포하는 여러 종류의 대립인자 다형성에 관한 연구 결과에 따르면 대립인자의 빈도 및 질병관련 유전자의 관련성 연구결과가 유사한 경우도 많으나 유전자에 따라 다른 민족 집단

에서는 비교적 높은 빈도로 보고 되었음에도 불구하고 한국인에서는 매우 낮은 빈도로 발견되어 질병관련 다형성으로서의 의의가 없거나, 이와는 반대로 다른 민족에서는 보고되지 않았던 유전자 변이가 한국인에서 높은 빈도로 관찰되는 경우가 있어 유전자 다형성은 민족간 빈도 및 임상적 의의에 따라 차이가 있다.

유전자 다형성의 연관성에 대한 메타분석을 실시한 결과 ACE I/D 경우, DD 유전자형에 대한 효과크기는 Caucasian의 경우 1.11이었고 Asian의 경우 0.99로서 인종별 차이가 큰 것으로 나타났다. CYP11B2(T-344C) 경우 Caucasian, Non-caucasian에서 다소간의 차이를 보이는데 전체적으로 통합된 연구와 Caucasian 대상으로 한 연구들에서는 CC 유전자형에 비하여 TT 유전자형이 고혈압의 위험이 높았으나, 일본인

들을 대상으로 한 연구에서는 CC 유전자형이 고혈압의 위험이 높았다. 한편 GNB3(C825T)는 Caucasian과 Non-caucasian 모두에서 유의한 관련성이 없었다 [21]. 한편 Zhu 등 [22]의 연구결과에 의하면 ACE 유전자의 SNP들 가운데 A-240T와 A2350G 대립유전자 간에 교호작용이 있다고 보고하였다. 즉 A-240T의 T 대립유전자는 A2350G의 G 대립유전자와 함께 ACE 농도 수준을 증가시킴으로써 결국에는 혈압의 상승효과를 유도한다고 보고하였다. 본 연구결과에서 ACE, GNB3, ADRB2, AT1R, 그리고 CYP11B2 유전자 모두 고혈압과 연관성이 없었다. 단일유전자좌위에 의한 연관성 연구의 한계와 유전-유전 및 유전-환경 교호작용의 가능성을 고려할 때 [23], 추후 본 연구에서 여러 유전자 내의 여러 SNP들을 분석하고 이들의 일배체형의 효과와 교호작용을 평가할 필요성이 있을 것이다. ACE 유전자에 대해서는 4개의 SNP의 일배체형을 구축하고 일배체형을 이용한 연관성분석을 시행하였으나 고혈압과 관련성이 없었다 [24,25].

유전역학 연구에 있어서 표현형의 정의, 검정력이 높은 연구설계와 분석방법, 그리고 적절한 표본수는 매우 중요한 문제이다. 본 연구는 청소년을 대상으로 하였기 때문에 명확한 고혈압을 정의하기 어려웠으며, 일반적으로 청소년 고혈압을 정의할 때 많이 사용하는 백분위수를 이용한 기준을 적용하여 고혈압군을 정의하였으며, 또한 연구대상자 수가 충분치 않다는 한계가 있었다. 추후 더 많은 대상자와 다양한 표현형, 그리고 유전자내 여러 유전적 다형성을 조사하여 유전자의 관련성, 유전-유전 그리고 유전-환경의 상호작용을 연구할 필요성이 있다.

결론

본 연구는 Kangwha Study 자료를 이용하여 우리나라 고혈압과 관련된 유전자를 찾고자 현재까지 알려진 3개 기전에 해당하는 8개 유전자 총 15개의 표지유전자를 조사하였다. 각 단일유전자좌위에 대한 환

자-대조군의 유전자형에 기초한 카이제곱 검정과 부/모/자녀로 구성된 Trio 가계자료에 기초한 TDT를 수행하여 유전자좌위별로 연관성 분석을 실시하였다. 환자-대조군 연구에서는 남자의 경우 ADD1(G460W)과 AGT(M235T), 여자는 REN(G2646A)이 고혈압과 유의한 연관성이 있는 것으로 관찰되었으나 Trio 연구설계에서는 관련성이 없었다. 그러나 본 연구의 결과는 추후 더 많은 연구대상자와 다양한 표현형을 이용하고, 또한 검정력이 높은 방법을 이용하여 한국인의 특이 유전자를 발굴할 필요성이 있음을 시사한다.

참고문헌

1. Ministry of Health & Welfare. 2001 National Health and Nutrition Survey - Overview -. Seoul; Ministry of Health & Welfare; 2002 (Korean)
2. Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. JH Laragh and BM Brenner, editors. Raven Press, New York; 1990. p. 81-100
3. Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nature Genet* 1995; 9(4): 347-350
4. Braunwald E, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed. The McGraw-Hill Companies; 2001. p.1414-1417
5. Liu Y, Qiu C, Zhou W, Zheng Y, Hou S, Cao J. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in essential hypertension. *Chin Med J* 1999; 112(2): 115-120
6. Giner V, Corella D, Javier Chaves F, Maria Pascual J, Portoles O, Marin P, Vicente Lozano J, Eugenia Armengod M, Redon J. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and essential hypertension in the Spanish. *Med Clin* 2001; 117(14): 525-529
7. Porto PI, Garcia SI, Dieuzeide G, Gonzalez C, Pirola CJ. Renin-angiotensin-aldosterone system loci and multilocus interactions in young-onset essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2003; 25(2): 117-130
8. Iso H, Harada S, Shimamoto T, Sato S, Kitamura A, Sankai T, Tanigawa T, Iida M, Komachi Y. Angiotensinogen T174M and M235T variants, sodium intake and hypertension among non-drinking, lean Japanese men and women. *J Hypertens* 2000; 18(9): 1197-1206
9. Fabris B, Bortoletto M, Candido R, Barbone F, Cattin MR, Calci M, Scanferla F, Tizzoni L, Giacca M, Caretta R. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal insufficiency in essential hypertension. *J Hypertens* 2005; 23(2): 309-316
10. Kumar NN, Benjafield AV, Lin RC, Wang WY, Stowasser M, Morris BJ. Haplotype analysis of aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphisms shows association with essential hypertension. *J Hypertens* 2003; 21(7): 1331-1337
11. Matsubara M, Omori F, Fujita S, Metoki H, Kikuya M, Fujiwara T, Araki T, Imai Y. Haplotypes of aldosterone synthase (CYP11B2) gene in the general population of Japan: the Ohasama study. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23(8): 603-610
12. Zhu X, Chang YPC, Yan D, Weder A, Cooper R, Luke A, Kan D, Chakravarti A. Associations between hypertension and genes in the Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 2003; 41(5): 1027-1034
13. Li B, Ge D, Wang Y, Zhao W, Zhou X, Gu D, Chen R. G protein beta3 subunit gene variants and essential hypertension in the northern Chinese Han population. *Ann Hum Genet* 2005; 69(4): 468-473
14. Shioji K, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, Morisaki H, Mino Y, Tagoi N, Yasui N, Iwami N. Association between hypertension and the alpha-adducin, beta1-adrenoreceptor, and G-protein beta3 subunit genes in the Japanese population; the Suita study. *Hypertens Res* 2004; 27(1): 31-37
15. Lee YW, Oh VM, Garcia E, Taylor EA, Wu H, Yap EP, Kazeem GR, Caulfield MJ, Munroe MJ. Haplotypes of the beta2-adrenergic receptor gene are associated with essential hypertension in a Singaporean Chinese population. *J Hypertens* 2004; 22(1): 2111-2116
16. Zee RYL, Cook NR, Reynolds R, Cheng S, Ridker PM. Haplotype analysis of beta2-adrenergic receptor gene and risk of myocardial Infarction. *Humans Genetics* 2005; 669(3): 1583-1587
17. Katsuya T, Ishikawa K, Sugimoto K, Rakugi H, Ogihara T. Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism. *Hypertens Res* 2003; 26(7): 521-525.
18. Shin MH, Chung EK, Kim HN, Park KS, Nam HS, Kweon SS, Choi JS. Alpha-adducin Gly460Trp polymorphism and essential hypertension in Korea. *J Korean Med Sci* 2004; 19(6): 812-814
19. SAS Institute Inc. SAS/Genetics 9.1 User's Guide, SAS Institute Inc., Cary, 2004
20. Allison DB. Transmission-disequilibrium tests for quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1997; 60(3): 676-690
21. Nam CM, Kang DR, Park JY, Lee YK, Hur NW, CHO ER, Suh I. Meta-analysis on the association between gene polymorphisms(ACE I/D, GNB3, CYP11B2) and essential hypertension. 55th Annual Conference The Korean Society for Preventive Medicine, 2003. p.321 (Korean)
22. Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure, *Am J Human Genetics* 2001; 68(5): 1139-1148
23. Moore JH. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4(6): 795-803
24. Kim J, Kang DR, Lee YK, Shin SM, Suh I, Nam CM. Statistical algorithm in genetic linkage based on haplotypes. *J Prev Med Public Health* 2004; 37(4): 366-372 (Korean)
25. Kim J, Nam CM, Kang DR, Suh I. Haplotype-based association and linkage analysis of angiotensin-I converting enzyme(ACE) gene with a hypertension. *Korean J Appl Stat* 2005; 18(2): 297-310 (Korean)