

의학 석사 학위 논문

한국인 골다공증 환자에서 GGPS1
및 FDPS의 유전자 다형성에 따른
비스포스포네이트 약물 치료에
대한 골밀도 변화의 차이

아주대학교 대학원

의학과

김연경

한국인 골다공증 환자에서 GGPS1
및 FDPS의 유전자 다형성에 따른
비스포스포네이트 약물 치료에
대한 골밀도 변화의 차이

지도교수 정 윤 석

이 논문을 의학 석사 학위 논문으로 제출함.

2006년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 연 경

한국인 골다공증 환자에서 GGPS1 및 FDPS의 유전자 다형성에 따른 비스포스포네이트 약물 치료에 대한 골밀도 변화의 차이

Geranylgeranyl diphosphate synthase1(GGPS1)과 farnesyl diphosphate synthase(FDPS)는 골다공증 치료제인 질소 함유 비스포스포네이트가 억제하는 표적효소로, 환자마다 비스포스포네이트에 대한 반응이 달리 나타나는 이유는 이 표적효소들의 유전자 다형성에서 기인하는 부분이 있을 것으로 생각된다. 본 연구의 목적은 GGPS1, FDPS 유전자에서 한국인 고유의 유전자 다형성을 찾고, 이에 따라 비스포스포네이트 투여에 대한 반응에 차이가 있는지를 평가하는 것이다. 골다공증 외에 골밀도에 영향을 줄 수 있는 질환이나 약물의 복용력이 없는 한국인 폐경 여성을 대상으로 하여 1년간 질소 함유 비스포스포네이트를 투여하였다. 비스포스포네이트에 대한 반응을 평가하기 위하여 투여 전과 투여 후에 이중에너지 방사선흡수법을 이용하여 요추와 대퇴골의 골밀도를 측정하였다. 48명의 건강한 한국인에서 GGPS1, FDPS 유전자를 염기서열분석 (sequencing)하여 한국인 고유의 단일 염기 다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)을 찾았으며, 219명에서 single base extension assay로 유전형분석(genotyping)을 시행하였다. 그 결과 한국인 고유의 SNP로 GGPS1 유전자에서는 -8188A/[del], IVS3-12~13T[ins]이, FDPS 유전자에서는 IVS1-98G/T, IVS9+66G/T가 확인되었다. 1년간 질소 함유 비스포스포네이트를 투여한 후 GGPS1 -8188A/[del]에서 요추 골밀도는 A/[del] 또는 [del]/[del]인 경우가 AA인 경우보다 유의하게 증가하였으나

($p < 0.05$), 대퇴골에서는 유의한 차이가 없었다. GGPS1 IVS3-12~13에서는 T/[ins] 또는 [ins]/[ins]인 경우에 TT인 경우보다 요추 골밀도가 유의하게 증가하였으나($p < 0.05$), 대퇴골 골밀도에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. FDPS의 IVS1-98G/T와 IVS9+66G/T에서는 유전자형에 따라 요추와 대퇴골 모두에서 비스포스포네이트 투여 전후의 골밀도 변화에 유의한 차이가 없었다. 골밀도 변화에 유의한 차이를 보인 GGPS1-8188A/[del] 및 IVS3-12~13T[ins]로 반수체형(haplotype)을 구성한 결과 A-T의 빈도가 가장 높았으며, 반수체형 2개가 모두 A-T로 구성된 경우 (A-T:A-T)가 나머지 모든 경우보다 비스포스포네이트 투여 후의 요추 골밀도 증가가 유의하게 작았다 ($p < 0.05$). 따라서 GGPS1 유전자 다형성은 질소 함유 비스포스포네이트에 대한 요추 골밀도 증가에 관련이 있는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 토대로 하여 향후 골다공증 약물 치료에 대한 개개인의 반응을 예측할 수 있는 여러 유전자를 찾아내고 이를 활용하는 모델을 수립할 수 있을 것이다.

핵심어: 단일 염기 다형성, 골다공증, 비스포스포네이트

차 례

국문 요약	i
차례	iii
그림 차례	iv
표 차례	v
I. 서론	1
II. 연구 대상 및 방법	5
A. 대상	5
B. 방법	5
1. 골밀도측정	5
2. 유전자형 분석	5
C. 통계 처리 및 분석	6
III. 결과	8
A. 한국인에서 GGPS1, FDPS 유전자형의 분포	8
B. GGPS1, FDPS 유전자 다형성에 따른 질소 함유 비스포스포네이트 투여에 대한 골밀도 변화	9
C. GGPS1, FDPS의 반수체형(haplotype) 구성	10
IV. 고찰	12
V. 결론	15
참고문헌	16
영문 요약	21

그림 차례

Fig 1. The mevalonate pathway and the effect of nitrogen-containing bisphosphonates	2
Fig 2. Newly identified SNPs of GGPS1 and FDPS in Korean.....	8

표 차례

Table 1. The frequency of identified SNPs of GGPS1 and FDPS in Korean	9
Table 2. BMD difference (%) before and after bisphosphonate therapy according to GGPS1 and FDPS genotype	10
Table 3. BMD difference (%) before and after bisphosphonate therapy according to duplotype of GGPS1 -8188A/[del] and IVS3-12~13T [ins]	11

I. 서 론

골다공증은 골량의 감소와 골의 미세구조 변화로 인해 골이 약화되고 골절이 발생하기 쉬워지는 전신적 질환으로서, 인구가 고령화됨에 따라 골다공증성 골절로 인한 사회경제적 손실이 급격히 증가하고 있을 뿐만 아니라 골다공증성 골절의 합병증으로 인한 사망 또한 증가하고 있다(Reginster와 Burlet, 2006).

골다공증 치료약제는 골흡수를 억제하는 비스포스포네이트, 여성호르몬 제제, 선택적 여성호르몬 길항제 등이 있으며, 골형성을 촉진하는 약제로는 부갑상선 호르몬 등이 알려져 있다(Heaney, 2003). 이 중 비스포스포네이트는 가장 많이 사용하는 골흡수 억제제로, 골 표면에 쉽게 흡착되어 골흡수가 진행되는 동안 선택적으로 파골세포로 들어가 세포골격과 파골세포의 특징인 세포막 주름을 붕괴시키며 파골세포의 세포 사멸을 유도한다(Thompson 등, 2002). 비스포스포네이트 계열 약물 중 질소를 함유하는 비스포스포네이트 (nitrogen-containing bisphosphonate, N-BP)는 pamidronate, alendronate, risedronate, zoledronate 등이 있다. 질소 함유 비스포스포네이트의 파골세포에서의 작용기전의 핵심은 콜레스테롤 합성 과정의 일부인 메바론산(mevalonate) 경로를 억제하는 것이다(Bergstrom 등, 2000, Fig 1).

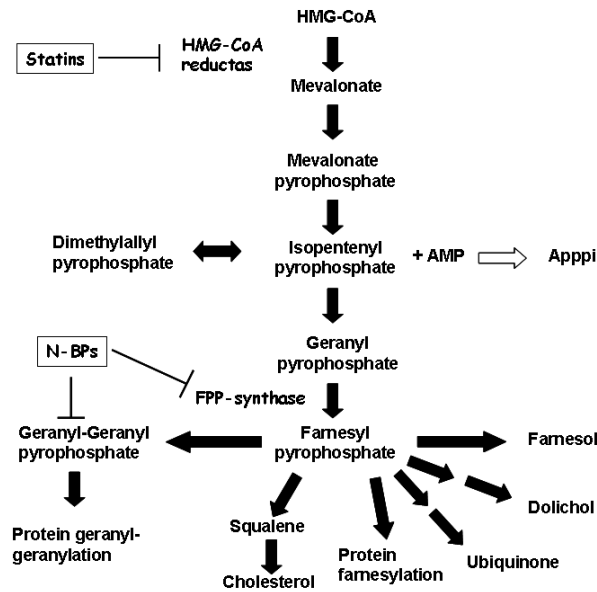


Fig 1. The mevalonate pathway and the effect of nitrogen-containing bisphosphonates

질소 함유 비스포스포네이트가 억제하는 표적 효소는 geranylgeranyl diphosphate synthase1(GGPS1)과 farnesyl diphosphate synthase(FDPS)로, 이 효소들이 차단되면 단백질의 지질화(prenylation)가 억제되어 결국 스테롤(sterol) 합성이 억제된다(Van Beek 등, 1999; Szabo 등, 2002; Sanders 등, 2005). 단백질의 지질화(prenylation)란, geranylgeranyl 또는 farnesyl 지질군을 카르복시 말단의 특정 부위에 결합시키는 과정인, 단백질의 geranylation과 farnesylation을 말한다. 지질화(prenylation)된 단백질의 대부분은 Rho, Rac, cdc42, Rab 등의 GTPase이다. 단백질 지질화(prenylation)를 억제하면 파골세포의 형태 유지, 세포막의 주름 형성, 소포소통 등과 같은 파골세포의 기능에 중요한 신호전달체계에 영향을 미쳐, 결국 파골 세포의 기능 억제와 세포사멸을 초래하게 된다.

결과적으로 질소 함유 비스포스포네이트는 골다공증 환자에서 골밀도 증가와 골절 예방 효과를 가져온다(Emkey와 Ettinger, 2006; Rizzoli, 2006).

그런데 모든 골다공증 환자에서 질소 함유 비스포스포네이트에 대한 치료 반응이 동일하게 나타나지는 않는다. 어떤 환자는 유의한 골밀도 증가를 보이는 반면, 골밀도 증가가 뚜렷하지 않은 환자도 있다. 이는 각 개인의 골다공증의 원인이나 치료에 대한 환자의 순응도, 운동, 식사 요법 등 약물 치료 외의 다른 여러 가지 요인이 작용한 결과일 것이나, 이러한 모든 요인을 동일하게 한다고 가정해도 약물에 대한 개개인의 반응차는 분명히 존재한다. 즉, 생리적, 환경적 요인과 더불어 개인이 가지고 있는 유전적 소양의 차이가 있는 것으로 생각된다(Livshits 등, 2004).

인간의 유전적 다양성을 설명하는 수많은 변이 중 가장 많은 빈도를 보이는 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)은 개인의 유전적 다양성을 유발하는 원인으로 주목받고 있다(Venter 등, 2001). 인간 유전자가 99% 이상 해독되면서 과거 환경적인 요인에 질병 발생의 원인을 두었던 것과는 달리, 선천적으로 개인마다 질병에 대한 감수성에 차이가 있다는 것이 입증되었다. 즉, 개인 간 유전자 염기서열의 차이에 의해 각 유전자의 기능이 달라질 수 있고, 나아가 질병에 대한 감수성의 차이를 만들어 내며, 동일한 조건 하에서도 각각 다른 반응을 이끌어 낼 수 있다는 것이다. 이러한 염기서열의 차이, 즉 유전자 변이 중 대부분을 차지하는 SNP는 유전체 상에서 1kb 간격으로 최소 하나 이상 존재하여 매우 고르고 높은 출현 빈도를 보인다(Venter 등, 2001). 이 SNP를 사용하여 질병과 유전자의 연관성을 입증하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 류마티스 관절염, 알츠하이머 병, 골다공증 등 여러 질병에서 SNP에 대한 연구 성과가 나타나고 있다(Tanaka 등, 2004; Martin 등, 2000; Lorentzon 등, 2006). 향후에는 축적된 SNP 정보와 개인의 SNP를 비교 분석하여 그 개인이 특정 질환에 대해 어느 정도의 감수성을 가지고 있는지, 치료 약물에 대해 얼마나 반응을 보일 것인지를 파악할 수 있기를 기대하고 있다. 또한 특정한 기능을 가지는 SNP에 대한 정보를 이용하여 신약을 개발할 수 있으며, 각 개인의 유전적 특징에 따라 보다 효율적인 약품을 적용하는 맞춤형약을 개발할 수

도 있을 것이다. 그런데 SNP는 민족에 따라서 출현 빈도가 달라 한국인 고유의 SNP에 대한 정보를 축적할 필요가 있으며, 이를 실제로 임상에 활용하기 위해서는 앞으로도 수많은 과제를 해결해야 한다.

비스포스포네이트는 체내에서 거의 대사되지 않고 골 표면에 흡착하여 표적 효소에 작용하므로, 비스포스포네이트에 대한 개개인의 반응차이를 연구하기 위해서는 대사와 관련된 유전자보다는 표적효소에 관련된 유전자를 연구하는 것이 타당할 것이다. 그러나 현재까지 질소 함유 비스포스포네이트의 표적효소인 GGPS1, FDPS의 유전자 다형성에 대하여 연구한 결과는 없다.

본 연구의 목적은 질소 함유 비스포스포네이트의 표적효소인 GGPS1, FDPS에서 한국인 SNP의 특징을 찾고, 발견된 SNP에 따른 질소 함유 비스포스포네이트 투여에 대한 골밀도 증가의 차이를 알아보는 것으로, 향후 골다공증 약물 치료에 대한 개개인의 반응을 예측하는 모델의 기반 지식으로 활용할 수 있을 것이다.

II. 연구 대상 및 방법

A. 대 상

41세에서 70세 사이의 한국인 폐경 여성 중, 요추 골밀도(L2-4)의 T-score가 -1.5 이하이거나 대퇴골 경부 골밀도(Femur neck)의 T-score가 -1.5 이하인 환자를 대상으로 하였다. 과거력상 갑상선질환, 부갑상선질환, 종양 등 골밀도에 영향을 줄 수 있는 질환이 있거나, 과거 1년 이내에 골밀도에 영향을 줄 수 있는 약물(골다공증 치료제, 칼슘제제, 스테로이드제제, 갑상선 호르몬제제, 진경제 등)을 복용한 경력이 있는 경우, 약물 흡수에 영향을 미칠 수 있는 상부 위장관 질환(연하곤란, 식도질환, 위염, 십이지장염, 궤양 등)이 있는 경우, 혈액 검사상 신장 기능과 간 기능에 이상이 있는 경우는 대상자에서 제외하였다. 기준에 맞는 대상자 219명에 대해서 1년간 질소 함유 비스포스포네이트로 약물치료를 시행하였다.

B. 방 법

1. 골밀도측정

이중에너지 방사선측정법(dual energy X-ray absorptiometry; Lunar Co, Madison, WI, USA)으로 L2부터 L4 부위의 요추 및 대퇴골 부위에서 골밀도를 측정하였다. 질소 함유 비스포스포네이트로 약물 치료를 시작하기 전에 골밀도를 측정하고, 약물 복용 1년 후에 다시 동일한 부위의 골밀도를 측정하였다.

2. 유전자형 분석

골밀도에 영향을 줄 수 있는 질환이나 약물 복용력이 없는 건강한 한국인 48명에서 GGPS1, FDPS의 유전자를 염기서열분석(sequencing)하여 한국인의 SNP를 조사하였다. NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 SNP 부위 중 대립유전자 빈도가 10% 이상인

부위를 참고하였다. 요약하면, 대상 환자의 말초 혈액을 헤파린 튜브에 채취하고, 전혈의 백혈구에서 DNA 정제 키트(DNA purification kit; Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하여 유전체(genomic) DNA를 추출한 후, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭에 의해 GGPS1과 FDPS 유전자에서 SNP를 확인하였다. PCR 단계는 먼저 95°C에서 10분간 활성화 단계를 거친 후 95°C에서 30초간 변성(denaturataion), 65°C에서 1분간 단련(annealing), 72°C에서 10분간 확장(extension)하는 과정을 35회 반복하였다.

발견된 SNP 중 대립유전자 빈도가 10% 이상인 SNP에 대해서는 이전의 방법에 따라 single base extension assay (DNA Link Inc., Korea)를 통해 유전형분석(genotyping)을 시행하였으며(Syvanen 등, 1999), 유전형분석을 시행한 대상자는 1년간 질소 함유 비스포스포네이트를 투여한 골다공증 환자 219명이었다. SNP 부위를 포함한 유전체(genomic) DNA 부위를 시동체(primer)를 이용하여 PCR 증폭한 후, 시동체를 제거하고 증폭 산물을 핵산말단분해효소(exonuclease)로 분해하여 단일 가닥의 PCR 주형(template)을 생성하였다. 분석하고자 하는 SNP의 바로 앞부분까지를 포함하도록 설계된 시동체(extension primer)와 형광 물질이 붙은 dideoxynucleoside triphosphate(ddNPTs)를 넣어 single base extension 반응을 일으킨 후, 삽입된 뉴클레오티드(nucleotide) 반응 산물을 분석하여 유전자형을 확인하였다.

C. 통계 처리 및 분석

각 대립 유전자에 대해 Hardy-Weinberg 평형을 만족하는지를 Fisher's exact test로 확인하였다. 반수체(haplotype)구성은 E-M 알고리즘(expectation maximization algorithm)을 이용한 SNP analyzer software를 사용하여 분석하였다. 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유전자형에 따른 비스포스포네이트 투여 전후의 골밀도 변화량에 유의한 차이가

있는지는 Kruskal-Wallis test로 분석하였다. STATA v.8.0(Stata Corporation, College Station, TX)를 사용하였고, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 정의하였다.

III. 결 과

A. 한국인에서 GGPS1, FDPS 유전자형의 분포

건강한 한국인 48명의 GGPS1, FDPS 유전자를 염기서열분석 (sequencing)한 결과, 대립유전자의 빈도가 10% 이상으로 나타난 한국인의 SNP는 GGPS1 유전자에서는 -8188A/[del]와 IVS3-12~13T[ins]였고, FDPS 유전자에서는 IVS1-98G/T와 IVS9+66G/T로 나타났다 (Fig 2, Table 1). 1년간 비스포스포네이트를 투여한 219명의 환자를 대상으로 10% 이상의 대립유전자 빈도를 보인 4군데의 SNP 유무와 골밀도 변화 결과를 비교 분석하였다.

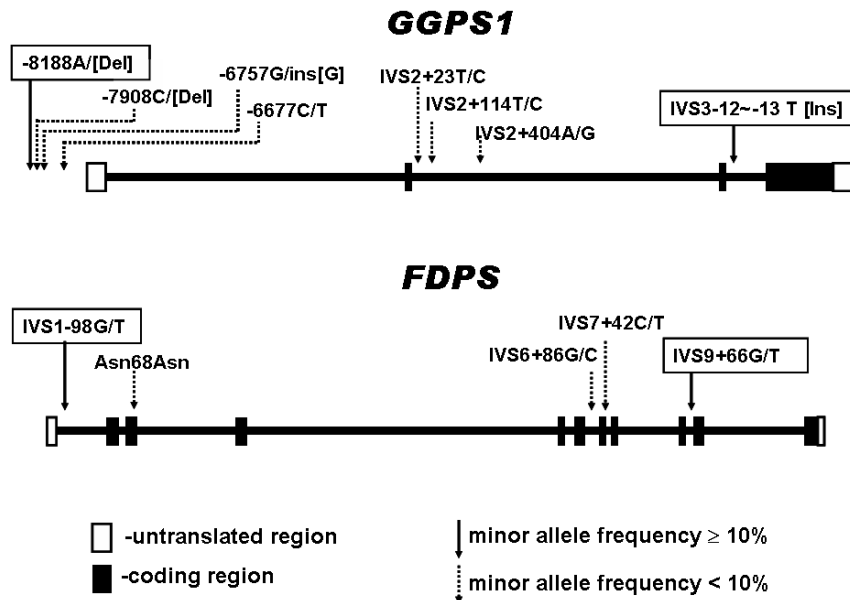


Fig. 2. Newly identified SNPs of GGPS1 and FDPS in Korean

Table 1. The frequency of identified SNPs of GGPS1 and FDPS in Korean

Gene	SNP ID	SNP(Position)	SNP(Location)	rs#	Change	Frequency
FDPS	DL1000998	intron1	IVS1-98G/T	2297480	G to T	G:T=0.766:0.234
FDPS	DL1000999	exon3	Asn68Asn	16836819	C to T	C:T=0.989:0.011
FDPS	DL1000995	intron6	IVS6+86G/C		G to C	G:C=0.99:0.01
FDPS	DL1000990	intron7	IVS7+42C/T		C to T	C:T=0.99:0.01
FDPS	DL1000971	intron9	IVS9+66G/T	11264361	G to T	G:T=0.792:0.207
GGPS1	DL1001048	promoter	-8188A/[del]	3840452	A to [del]	A:del=0.67:0.33
GGPS1	DL1001049	promoter	-7908C/[del]		C to [del]	C:del=0.99:0.01
GGPS1	DL1001050	promoter	-6757G/Ins[G]		G to ins[G]	G:Ins=0.969:0.031
GGPS1	DL1001051	exon1	-6677C/T		C to T	C:T=0.969:0.031
GGPS1	DL1000992	intron2	IVS2+23T/C		T to C	T:C=0.979:0.021
GGPS1	DL1000993	intron2	IVS2+114T/C		T to C	T:C=0.989:0.011
GGPS1	DL1000994	intron2	IVS2+404A/G		A to G	A:G=0.969:0.031
GGPS1	DL1000991	intron3	IVS3-12~13T/[Ins]	3841735	T[Ins]	T:Ins=0.75:0.25

B. GGPS1, FDPS 유전자 다형성에 따른 질소 함유 비스포스포네이트 투여에 대한 골밀도 변화

GGPS1 -8188A/[del]에 대하여 SNP의 유전자형에 따라 질소 함유 비스포스포네이트 투여 전과 투여 후의 골밀도 변화에 차이가 있는지를 분석하였다. 요추 골밀도 변화는 AA와 A/[del] 또는 [del]/[del] 사이에 유의한 차이를 보였으나($p < 0.05$), 대퇴골 골밀도 변화에서는 유의한 차이가 없었다. GGPS1 IVS3-12~13에서는 TT와 T/[ins] 또는 [ins]/[ins]의 요추 골밀도 변화 사이에 유의한 차이를 보였으며($p < 0.05$), 대퇴골 골밀도 변화에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2). FDPS의 IVS1-98G/T와 IVS9+66G/T에서는 요추와 대퇴골 모두에서 질소 함유 비스포스포네이트 투여 전후의 골밀도 변화에 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. BMD difference(%) before and after bisphosphonate therapy according to GGPS1 and FDPS genotype

Genotype	N	Lumbar spine	Femoral neck
GGPS1			
-8188A/[del]			
AA	133	5.9 ± 6.7	3.3 ± 6.1
A/[del] or [del]/[del]	98	9.0 ± 9.4	4.3 ± 8.1
p for trend		0.009	0.586
IVS3-12~13 T/[ins]			
TT	118	5.9 ± 6.4	3.4 ± 6.1
T/[ins] or [ins]/[ins]	88	9.2 ± 9.7	4.6 ± 8.5
p for trend		0.011	0.637
FDPS			
IVS1-98 G/T			
GG	130	7.8 ± 9.0	3.5 ± 6.2
GT or TT	77	6.7 ± 6.9	4.3 ± 8.6
p for trend		0.466	0.449
IVS9+66 G/T			
GG	137	7.6 ± 8.9	3.3 ± 6.1
GT or TT	73	6.8 ± 6.8	4.6 ± 8.5
p for trend		0.780	0.262

Values are mean ± SD

C. GGPS1, FDPS의 반수체형(haplotype) 구성

GGPS1에서 확인된 -8188A/[del]와 IVS3-12~13T[ins]로 반수체형(haplotype)을 구성한 결과, 이론상 구성 가능한 4가지 반수체형 중 A-T의 빈도가 가장 높았다. 반수체형 2개가 모두 A-T로 구성된 경우(A-T:A-T)가 나머지 모든 경우보다 비스포스포네이트 투여 전후의 요추 골밀도 증가가 유의하게 작았다($p < 0.05$) (Table 3).

Table 3. BMD difference(%) before and after bisphosphonate therapy according to duplotype of GGPS1 -8188A/[del] and IVS3-12~13T[ins].

Duplotype	N	Lumbar spine	Femoral neck
A-T : A-T	109	6.0 ± 6.7	3.4 ± 6.2
A-T : others or others : others*	94	9.1 ± 9.6	4.5 ± 8.1
p for trend		0.016	0.716

Values are mean ± SD

* others: A-[ins], [del]-T, [del]-[ins]

IV. 고찰

본 연구는 골다공증 환자에서 질소 함유 비스포스포네이트의 표적 효소인 GGPS1의 유전자 다형성에 따라 요추 골밀도의 변화량에 차이가 있음을 최초로 입증하였다.

질소 함유 비스포스포네이트의 표적효소인 GGPS1, FDPS의 유전자는 염색체 1번에 위치하며, GGPS1, FDPS에서 한국인의 SNP를 분석한 결과, GGPS1에서는 8개, FDPS에서는 5개의 SNP가 발견되었다. 이 중 대립유전자의 빈도가 10% 이상으로 나타난 SNP는 GGPS1과 FDPS에서 각각 2군데였다. GGPS1에서는 촉진자(promotor)의 전사 시작 부위부터 상부 방향으로 8188번째 염기가 A이거나 결손(deletion)되어 있었고, 3번째 전구유전자(intron)에서 확인된 다른 하나의 SNP는 전사 시작 부위부터 상부 방향으로 13번째에 T가 삽입되어 있었다. FDPS의 첫번째 전구유전자(intron)에서는 전사 시작 부위부터 상부 방향으로 98번째 염기가 G이거나 T로 나타났고, 9번째 전구유전자(intron)에서는 전사 시작 부위부터 하부 방향으로 66번째 염기가 G 또는 T로 나타났다. 즉, 한국인의 유전자 다형성의 특징은 GGPS1 유전자에서는 -8188A/[del]와 IVS3-12~13T[ins]이 많이 나타나며, FDPS 유전자에서는 IVS1-98G/T와 IVS9+66G/T가 많이 나타난다는 것이다. 한국인 고유의 SNP의 특징에 관해서는 아직까지 충분한 정보가 축적되어 있지 않으며, 본 연구에서는 한국인에서는 최초로 GGPS1, FDPS의 SNP 빈도의 특징을 조사하였다.

연구 대상인 모든 환자에서 질소 함유 비스포스포네이트로 1년간 약물 치료한 후에 골밀도가 증가하였다. 그러나 골밀도 증가의 정도는 SNP의 유전자형에 따라서 다르게 나타났다. GGPS1 -8188A/[del]에서는 유전자형이 주요 동형접합체(major homogenotype), 즉 AA인 경우 다른 유전자형(A/[del] 또는 [del]/[del])보다 요추 골밀도 증가 정도가 유의하게 낮았다. GGPS1 IVS3-12~13T/[Ins]에서는 유전자형이 주요 동형접합체(TT)인 경우 다른 유전자형(T/[Ins] 또는

[Ins]/[Ins])에 비해 요추 골밀도 증가 정도가 유의하게 낮게 나타났다. FDPS에서는 유전자형에 따라 골밀도 증가량의 변화가 차이를 보이지 않았다. 즉, 질소 함유 비스포스포네이트의 표적효소 중 GGPS1의 유전자 다형성이 약물치료에 대한 반응에 관련이 있는 것으로 생각할 수 있다.

위의 결과와 같은 단일 locus 분석은 분명 유용한 정보를 제공할 수 있으나, 여러 개의 관련된 locus를 통합하여 분석하는 것이 질병과 유전자형의 관련성을 분석하는 데 보다 강력하다는 주장이 제기되어 왔다(Martin 등, 2000; Fallin 등, 2001). 본 연구에서도 SNP 정보를 기초로 하여 반수체형 분석을 시행하였다. GGPS1 -8188A/[del], IVS3-12~13T/[Ins]에서 반수체형을 구성한 결과 염색체 2개가 모두 반수체형 A-T를 가지고 있는 경우(A-T:A-T)에 다른 모든 반수체형보다 골밀도 증가 정도가 유의하게 낮았다. 이상의 결과는 모두 GGPS1의 유전자 다형성이 질소 함유 비스포스포네이트 투여에 대한 요추 골밀도 변화량과 관련이 있음을 시사한다.

비스포스포네이트 투여 1년 후의 골밀도 변화가 GGPS1의 유전자형에 따라 요추에서는 유의한 차이를 보이는 반면 대퇴골에서는 유의한 차이가 없었다. 요추와 마찬가지로 대퇴골에서도 GGPS1 -8188A/[del]에서는 주요 동형접합체인 AA인 경우에 골밀도 변화량이 낮게 나타났으며, IVS3-12~13T/[Ins]에서도 주요 동형접합체 TT인 경우 골밀도 변화량이 다른 유전자형에 비해 낮게 나타났다. 그러나 표준편차가 매우 커서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않은 것으로 생각된다.

본 연구에서 분석한 GGPS1의 SNP은 모두 전구유전자(intron)나 촉진자(promotor) 부위에 있으며, 유전자형이 달라져도 그 유전자에서 생산하는 아미노산은 변하지 않는다. 이것은 아마도 DNA에서 mRNA를 전사하는 과정에서 스플라이싱(splicing)에 변화가 발생하거나 단백질의 입체 구조를 형성할 때 어떤 변화가 있어 결국 기능 변화를 초래한 것으로 생각할 수 있다. 혹은 본 연구에서 분석한 GGPS1의 SNP이 단지 유전적 표지자에 불과하고, 실제로는 연관 불균형에 있는 알려지지 않은 다른 유전자가 비스포스포네이트의 작용에 관련되어

있을 가능성도 있다. GGPS1의 SNP가 실제로 비스포스포네이트의 작용 과정에 어떤 영향을 미치는지를 분명히 밝히기 위해서는 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구의 문제점은 분석한 대상자의 수가 비교적 많지 않아 실제로 한국인을 대표할 수 있는 결과라고 단언할 수는 없다는 것이다. 또한 비스포스포네이트 투여군에 대한 대조군을 설정하여 정상군의 유전자까지 분석하였다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있었으리라 생각된다. 그리고 비스포스포네이트에 대한 골밀도 변화 뿐만 아니라 골대사지표의 변화는 어떠한지도 연구할 필요가 있다. 본 연구에서는 이중에너지방사선흡수법 측정법으로 측정된 골밀도 변화만을 분석하였는데, 정량적 전산화단층촬영을 이용하여 해면골과 피질골의 변화를 각각 분석하거나 골생검을 통한 골조직 변화를 분석할 수 있다면 더욱 충실한 결과를 얻을 수 있을 것이다. 질소 함유 비스포스포네이트 중에서도 alendronate는 GGPS보다는 FDPS를 선택적으로 억제한다는 보고가 있는 등 (Bergstrom 등, 2000), 각각의 질소 함유 비스포스포네이트의 작용이 조금씩 다를 가능성이 있다. 따라서 질소 함유 비스포스포네이트의 종류에 따라 개별적인 연구가 필요하리라 생각된다. 향후 이러한 문제점들을 극복하여 폐경기 여성뿐만 아니라 폐경기 전 여성 및 남성을 포함한 보다 정밀한 연구를 계획하여 한국인을 대표할 수 있는 SNP에 대한 정보를 축적해야 할 것이다.

V. 결 론

한국인 골다공증 환자에서 GGPS1 유전자를 분석한 결과, 한국인 고유의 SNP로 -8188A/[del]와 IVS3-12~13T[ins]가 확인되었으며, 이 SNP의 유전자형에 따라 질소 함유 비스포스포네이트 투여에 대한 요추 골밀도 변화에 차이가 있었다. 즉, GGPS1의 유전자 다형성은 개개인의 비스포스포네이트에 대한 치료 반응에 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다. 이러한 결과를 토대로 하여 향후 골다공증 약물 치료에 대한 개개인의 반응을 예측할 수 있는 여러 유전자를 찾아내고 이를 활용하는 모델을 수립할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, Reszka AA, Rodan G:
Alendronate is a specific, Nanomolar Inhibitor of Farnesyl
Diphosphate Synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*
373:231-241, 2000
2. Emkey RD, Ettinger M: Improving Compliance and Persistence with
Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis. *The American Journal of*
Medicine 119:18S-24S, 2006
3. Fallin D, Cohen A, Essioux L, Chumakov I, Blumenfeld M, Cohen D
and Schork NJ: Genetic analysis of case/control data using estimated
haplotype frequencies: application to APOE locus variation and
Alzheimer's disease. *Genome Res* 11:143-151, 2001
4. Gotoda T, Kinoshita M and Ishibashi S: Skipping of exon 14 and
possible instability of both the mRNA and the resultant truncated
protein underlie a common cholesteryl ester transfer protein deficiency
in Japan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1376-1381, 1997
5. Heaney RP: Advances in therapy for osteoporosis. *Clin Med Res*
1:93-99, 2003
6. Livshits G, Deng HW, Nguyen TV, Yakovenko K, Recker RR, Eisman
JA: Genetics of Bone Mineral Density: Evidence for a Major

- Pleiotropic Effect From an Intercontinental Study. *J Bone Miner Res* 19:914-923, 2004
7. Lorentzon M, Swanson C, Eriksson AL, Mellstrom D, Ohlsson C: Polymorphisms in the aromatase gene predict areal BMD as a result of affected cortical bone size: the GOOD study. *J Bone Miner Res* 21:332-339, 2006
 8. Martin ER, Lai EH, Gilbert JR, Rogala AR, Afshari AJ, Riley J, Finch KL, Stevens JF, Livak KJ and Slotterbeck BD: SNPping away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. *Am J Hum Gent* 67:383-394, 2000
 9. O'Neill JP, Rogan PK, Cariello N and Nicklas JA: Mutations that alter RNA splicing of the human HPRT gene: a review of the spectrum. *Mutat Res* 411:179-214, 1998
 10. Reginster JY, Burlet N: Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone* 38:S4-S9, 2006
 11. Rizzoli R: Long-term outcome of weekly bisphosphonates. *Clin Orthop Relat Res* 443:61-65, 2006
 12. Sanders JM, Song Y, Chan JM, Zhang Y, Jennings S, Kosztowski T, Odeh S, Flessner R, et al: Pyridinium-1-yl Bisphosphonates Are Potent Inhibitors of Farnesyl Diphosphate Synthase and Bone

- Resorption. *J Med Chem* 48:2957-2963, 2005
13. Syvanene AC: From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 13:1-10, 1999
 14. Szabo CM, Yoshihiro Matsumura, Sayaka Fukura, Martin MB, Sanders JM, Suraj Sengupta, Cieslak JA et al: Inhibition of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase by Bisphosphonates and Diphosphates: A Potential Route to New Bone Antiresorption and Antiparasitic Agents. *J Med Chem* 45:2185-2196, 2002
 15. Tanaka E, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Kamatani N: Pharmacogenetics of disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 18:233-247, 2004
 16. Thompson K, Dunford JE, Ebetino FH, Rogers MJ: Identification of a Bisphosphonate That Inhibits Isopentenyl Diphosphate Isomerase and Farnesyl Diphosphate Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290:869-873, 2002
 17. Van Beek E, Lowik C, Van der Pluijm G, Parapoulos S: The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonate in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 14:722-729, 1999

18. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M,

Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X: The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351, 2001

**Association between Genetic Polymorphisms of
Enzymes Involving Mevalonate Pathway (GGPS1 and
FDPS) and Bone Mineral Density Response to
Bisphosphonate Treatment**

Yunkyung Kim

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Yoon-Sok Chung)

Osteoporosis, the most common metabolic bone disease, is characterized by reduced bone strength and an increased risk of fragility fracture. Nitrogen containing bisphosphonates (N-BP) inhibit the enzymes of the mevalonate pathway including geranylgeranyl diphosphate synthase1 (GGPS1) and farnesyl pyrophosphate synthetase (FDPS), which result in inhibition of prenylation of small GTP-binding proteins in osteoclasts, disruption of the cytoskeleton and apoptosis of osteoclasts. To investigate the relationship between GGPS1 and FDPS genetic

polymorphisms and changes in bone mineral density (BMD) before and after N-BP treatment in Korean, 219 postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis aged 40–70 years were enrolled in this study. BMD at lumbar spine(L2–L4) and femoral neck was measured by dual-energy X-ray absorptiometry. PCR and direct sequencing were used to identify the polymorphisms of GGPS1 and FDPS in 48 healthy Korean; among five and eight SNPs screened, respectively, those of which the variant allele frequencies are more than 10% were selected (4 sites: GGPS1 -8188A/[Del], GGPS1 IVS3-12~13T[Ins], FDPS IVS1-98G/T, and FDPS IVS9+66G/T). Genetic polymorphisms were determined by single base primer extension assay. The difference changes (%) of the BMD according to the genotypes of GGPS1 and FDPS were analyzed by Kruskal–Wallis test. The response of BMD at lumbar spine to N-BP significantly increased in subjects with GGPS1 -8188A/[Del] or IVS3-12~13T[Ins] allele, respectively (p<0.05). However, these associations were not found in the femoral neck BMD. No significant association was observed between BMD changes and FDPS polymorphisms. Haplotype analysis revealed that patients with haplotype A-T(GGPS1 -8188A/[del], IVS3-12~13T[ins]) showed a significantly lower response to N-BP treatment (p<0.05). These results suggest that GGPS1 genetic polymorphisms and haplotypes are associated with responsiveness of lumbar spine BMD after 1 year of N-BP treatment in Korean.

Key words: SNP, osteoporosis, bisphosphonate