



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

**Analysis of the Repeated Measurement
Data using the Hierarchical Clustering
and Nonlinear Regression Methods
in Asthma Pharmacogenetic Study**

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 현 영

천식 약물 유전체 연구에서의 계층적
군집분석과 비선형 회귀분석을
이용한 반복 측정 자료의 분석

지도교수 박 해 심

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2008년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원
의 학 과
이 현 영

이현영의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 박 해 심 인

심사 위원 이 승 호 인

심사 위원 박 상 면 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2007년 12월 21일

-국문요약-

천식 약물 유전체 연구에서의 계층적 군집분석과 비선형 회귀분석을 이용한 반복측정 자료의 분석

연구 목적: 천식 환자에게 천식 약제 투여 후 개개인의 반응을 확인하기 위해 반복측정 분산분석, 계층적 군집분석, 비선형 회귀분석을 실시하여 환자의 유전적 변이와 약물 반응간의 연관성을 확인하고, 환자의 예후를 보다 효율적으로 예측할 수 있는 모형을 구성하고자 한다.

연구 방법: 경증 및 중등증 천식 환자 86명을 대상으로 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제를 투여하여 80일간의 변화를 관찰하였다. 천식 환자의 약물 반응을 파악하기 위해 8주 간격으로 폐 기능을 측정하였고, 하루 2회 최고호기유속 (PEFR: peak expiratory flow rate) 을 측정하였다. 그리고 9개의 천식과 관련된 유전자로부터 12개의 단일염기성변이 ADCY9 132007 T>C (Ile772Met), ALOX5 -1708 G>A, CysLTR1 -634 C>T, CysLTR2 2079 C>T, 2534 A>G, IL10 -1082 A>G, IL13 -1510 A>C, LTC4S -1072 G>A, -444 A>C, NK2R 7853 G>A (Gly231Glu), TNF α -1031 T>C, -308 G>A 다형성과 천식 환자의 약물 반응 정도와의 연관성을 확인하였다.

환자의 천식 증상의 정도는 2006년 GINA 지침에 기준하여 판정하였다. 판정된 천식 정도와 단일염기성변이의 연관성을 확인하기 위해 독립성검정을

실시하였다. 다음으로는 1초당 강제 호기량 (FEV1: forced expiratory volume at 1 second), 노력성 호기량 (FVC: forced vital capacity), 최대 호기 중간유량 (MMEF: maximum mid-expiratory flow) 값을 반복측정 분산분석을 이용하여 단일염기성 변이와의 관계를 확인하였다. 폐 기능 검사 결과 중에서도 최고호기유속은 1일 2회 80일간 측정된 값을 보유함으로써 전체 맥락을 확인하기 위해 계층적 군집분석을 실시하였다. 그리고 그룹을 나누는 단일염기성변이를 확인하기 위해 독립성검정을 실시하였고, 천식 환자의 80일간 약물 반응도 개형을 확인하기 위해 비선형 회귀분석을 실시하였다.

결 과: 분석에서 사용한 단일염기성변이 12개 중에서 ADCY9 132007 T>C 다형성이 약물 반응을 나타내는 변수와 유의한 연관성이 있었다. ADCY9 132007 T>C 다형성의 CT 또는 CC 유전자형을 가진 천식 환자들이 TT 유전자형을 가지는 환자에 비해 천식의 증상조절과 폐 기능이 유의하게 호전되는 것으로 나타났다. 또한 ADCY9 132007 T>C 다형성은 IL13 -1510 A>C 다형성과 상호작용 가능성이 관찰되었다.

약물 반응성의 결과를 예측하기 위해 비선형 회귀분석을 실시하여 얻은 약물 복용 후 환자의 반응에 대한 모형은 77~80%의 결정 계수 값을 보였고, 약물 반응도 개형을 확인한 결과, 아침의 최고호기유속의 결과가 저녁 측정치 보다 차이가 있었다. 그리고 최고호기유속의 주간 변화를 확인해 본 결과 아침, 저녁의 최고호기유속의 차이가 클수록 약물이 효과적으로 환자에게 작용하지 못해 천식 증상을 개선시키지 못하는 것으로 파악되었다.

결 론: 흡입 스테로이드제제와 지속형 β -항진제를 복합 투여하게 되면 ADCY9 132007 T>C이 환자의 약물 반응에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 폐 기능 값들로부터 얻은 지수함수 형태의 회귀모형을 이용하여 환자의 반응을 개형화할 수 있었다. 이런 결과를 얻기 위해 사용한 계층적 분산분석과 비선형 회귀분석은 결과를 뒷받침할 수 있는 대안적 방법이 될 수 있을 것이다.

핵심어: 천식, 계층적 군집분석, 비선형 회귀분석, 반복측정 분산분석, 단일염기변이, 약물유전체학

차 례

| | |
|--------------------------|-----|
| 국문요약 | i |
| 차례 | iv |
| 그림 차례 | vi |
| 표 차례 | vii |
| 약어 | ix |
| I. 서론 | 1 |
| II. 재료 및 방법 | 4 |
| A. 연구 대상 및 방법 | 4 |
| 1. 연구 대상 | 4 |
| 2. 폐 기능 검사 | 7 |
| 3. 단일염기변이 | 7 |
| B. 통계적 분석 방법 | 7 |
| 1. 반복측정 분산분석 | 9 |
| 2. 계층적 군집분석 | 9 |
| 3. 비선형 회귀분석 | 9 |
| 4. 임상 변수의 분석 | 10 |
| 5. 단일염기변이의 분석 | 10 |
| 6. 천식 조절 단계와 주간 변화 | 11 |
| 7. 단일염기변이의 순위 | 11 |

| | |
|-------------------------------|----|
| III. 결과 | 12 |
| A. 후보 유전자의 종류 | 12 |
| B. 폐 기능 변화와 단일염기변이의 연관성 | 15 |
| C. 천식 조절과 관계되는 단일염기변이 | 20 |
| D. 약물 반응도에 따른 군집분석 | 22 |
| E. 약물 반응도와 단일염기변이의 연관성 | 25 |
| F. 후보 단일염기변이의 순위 | 30 |
| G. 통계적 접근 방법 | 32 |
| IV. 고찰 | 33 |
| V. 결론 | 37 |
| 참고문헌 | 38 |
| ABSTRACT | 51 |

그림 차례

| | |
|---|----|
| Fig. 1. The flow chart of statistical analysis for constructing a pharmacogenetic model..... | 8 |
| Fig. 2. The change of pulmonary function tests during study period according to the ACDY9 132007 T>C polymorphism..... | 18 |
| Fig. 3. The classification of asthmatics according to the change (%) of peak expiratory flow rate..... | 23 |
| Fig. 4. A pharmacogenetic model based on change (%) of morning/evening PEFR..... | 29 |
| Fig. 5. Importance values of the candidate genetic polymorphisms used for classification each group..... | 31 |

표 차례

| | |
|---|----|
| Table 1. The clinical features of the study subjects..... | 6 |
| Table 2. The genotype distribution of candidate genetic polymorphisms in 86 asthmatics... 14 | |
| Table 3. The association between % predicted value of pulmonary function test and two genetic polymorphisms..... | 16 |
| Table 4. The association between changes of value of pulmonary function test and two genetic polymorphisms..... | 17 |
| Table 5. The clinical characteristics of the study subjects according to the ADCY9 132007 T>C and TNF α -1031 T>C polymorphisms..... | 19 |
| Table 6. The genetic effect of the ADCY9 132007 T>C and TNF α -1031 T>C polymorphisms on asthma control..... | 21 |
| Table 7. The clinical characteristics of two groups..... | 24 |

Table 8. The genetic effect of the ADCY9 132007 T>C polymorphisms on changes (%) of PEFR during study period..... 27

Table 9. The interaction between the ADCY9 132007 T>C and IL13 -1510 A>C polymorphisms on asthma control in the favorable response group of morning PEFR..... 28

약 어

ADCY9: Adenylate cyclase 9

ALOX5: Arachidonate 5-lipoxygenase

CysLTR1: Cysteinyl leukotriene receptor 1

CysLTR2: Cysteinyl leukotriene receptor 2

IL10: Interleukin 10

IL13: Interleukin 13

LTC4S: Leukotriene C4 synthase

NK2R: Tachykinin receptor 2, neurokinin receptor 2

TNF α : Tumor necrosis factor superfamily, member 2

I. 서 론

기관지 천식은 만성적 기도 염증에 의한 비특이적 기도 과민성 및 가역적 기도 폐쇄를 특징으로 한다 (Mcfadden, 1992). 천식의 주 병인기전이 가역적 기도 폐쇄에서 기도 염증으로 바뀌어 가면서 흡입 스테로이드 제제가 주 치료제로 쓰여지고 있다. 흡입 스테로이드는 T-림프구, 호산구, 대식세포, 수지상 세포와 같은 만성 염증 세포에 영향을 주어 기도 과민성을 완화시켜 천식 증상이 호전된다 (Georas, 2004). 그러나, 흡입 스테로이드 제제만으로는 천식이 개선되지 않는 경우도 존재하며, 그 반응도 개인마다 다르다 (Sxeffler et al., 2002). 최근 흡입 스테로이드 제제를 보완하기 위해 지속성 β -항진제와의 복합제 처방이 추천되고 있다 (Barnes, 2002). 지속성 β -항진제는 기도의 평활근을 이완시킬 뿐 아니라 비만세포로부터 염증 매개 물질 분비를 억제한다 (Chong et al., 1998; Nials et al., 1994). 또한 내피세포의 분리를 막음으로써 혈장 삼출액 분비를 억제하고 (Baluk, 1994), 신경 세포의 활성화를 저지한다 (Verleden et al., 1993).

천식 치료를 위한 단일 약제 효과들이 상호 보완적 작용을 하여 효과적 천식 치료를 가능하게 한다 (Barnes, 2002). 흡입 스테로이드 제제는 지속성 β -항진제에 장시간 노출 시 발생할 수 있는 β_2 -수용체의 발현의 감소를 개선시킬 수 있으며, 또한 β_2 -항진제는 스테로이드 제제의 항 염증 작용을 강화한다 (Adcock et al., 1996; Romain et al., 1997; Barnes, 2002). 즉, 흡입 스테로이드 제제의 단독 처방보다 지속성 β -항진제 복합제 처방 시 2~4배 높은 치료 효과를 보였다 (Shrewbury et al., 2000; Pauwels et al., 1997). 이렇듯 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제

투여는 서로 상호보완적인 작용하여 하나의 약제를 투여 하였을 때 보다 호전율이 좋았다 (Greening, 1994).

최근 천식 약제 사용에 따른 약물유전체 연구가 진행되었다 (Israel et al., 2004; Hall, 2006; Kelan et al., 2005). 이들 대부분의 연구에는 하나의 유전자를 선택하여 유전자에 따른 차이를 분석하고 있지만, 천식의 경우에는 병인기전이 다양함으로 여러 유전자의 영향을 함께 고려하지 못한 제한점이 있다 (Israel et al., 2004; Lee, 2004; Hall, 2006). 또한 대부분의 임상시험이 작은 인원과 많은 변수를 분석에 사용하기에 다중 공선성을 만족하는 것이 쉽지 않다. 따라서 이런 점을 보완 해 줄 수 있는 분석법의 필요성이 제기되었다.

이러한 점에 대해 계층적 군집분석과 비선형 회귀분석이 보완해 줄 수 있는데, 계층적 군집분석은 작은 인원 분석에서 용이하며, *unsupervised learning*으로 출력 결과 값이 없을 경우 사용된다 (Michael, 1975). 계층적 군집분석은 혼돈되어 있는 약물 반응 정도를 환자 별 유사성에 의해 그룹화하여, 데이터를 명료하게 해석할 수 있는 장점 때문에 *microarray*에도 사용된다.

또한 비선형 회귀분석은 약물 복용 후 환자의 반응을 시각적으로 확인 할 수 있는 방법이다. 이는 앞선 군집분석이 가지는 명목화한 결과를 보완해 줄 수 있다. 비선형 회귀 모형은 실제 데이터에 좀더 적합한 결론을 얻을 수 있기 때문에 *pharmacokinetics*과 같은 인체내의 변화를 확인하는 것에 주로 사용된다 (Buchel et al., 1996; Mohammad et al., 2006).

따라서 본 연구에서는 반복측정 분산분석과 계층적 군집분석, 비선형 회귀분석을 통해 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제 처방 시 환자가 보이는 약물 반응성을 확인하고, 이와 연관된 유전자를 확인하고자 한다.

또한, 계층적 군집분석, 비선형 회귀분석과 같은 대안적 분석을 실시하여 환자의 약물 반응성을 구체화하기 위해 상기 방법의 효용성을 확인한다.

II. 재료 및 방법

A. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

연구에 사용한 86명의 천식 환자는 모두 한국인이며 아주대학교 알레르기 내과를 방문한 환자를 대상으로 하였다. 이들 모두 임상시험을 위한 동의서를 제출하였으며, GINA 치료 지침에 의해 경증 혹은 중등증 천식이라 진단받은 환자들이 연구에 참여하였다. 경증 및 중등증 천식환자들은 80일간 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제 투여를 받았다 (budesonide 160 μ g and formoterol 4.5 μ g).

이 연구는 19세에서 64세까지의 천식 진단을 받을 후 6개월이 지난 환자를 대상으로 하였다. 남성 49명과 여성 37명으로 평균 나이는 39 \pm 11.6세이다. 총 86명의 환자들 중에서 62.35% (n=53) 가 아토피로 판정되었다. 그리고 혈청 내 총 IgE치와 methacholine PC₂₀치는 324.0 \pm 339.9, 6.6 \pm 9.1 값이었다 (Table 1).

80일간 약물을 투여하면서 환자의 약물 복용 후 반응 정도를 측정하기 위해 폐 기능 조사를 실시하였다. 최대호기유속 (PEF: peak expiratory flow) 은 80일간 아침, 저녁 하루 두 번 측정하였다. 그리고 1초당 강제 호기량 (FEV₁: forced expiratory volume at 1 second), 노력성 호기량 (FVC: forced vital capacity), 최대 호기 중간유량 (MMEF: maximum mid-expiratory flow) 은 8주 간격으로 측정하였다. 또한 80일 간의 연구기간 동안 약물 복용 후 환자의 반응 변화를 약물 복용 초기, 후기로 나누어 조사하기 위해 측정 값들을 8주를 기준으로 구분하였다. 기간에

따른 천식 개선 정도를 수치화 하기 위해 주간 증상, 야간 증상, 증상 완화제의 사용 횟수, 폐 기능 수치에 따라 환자의 천식 조절 등급을 나누었다 (GINA, 2006).

Table 1. The clinical features of the study subjects.

| | Mean±S.D | S.E | (Min,Max) | 25 th | 50 th | 75 th |
|-------------------------------|-------------|------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| Age | 39.0±11.6 | 1.2 | (19.0,64.0) | 28.2 | 41.0 | 46.3 |
| Serum total IgE | 324.0±339.9 | 37.8 | (5.0,1407.0) | 79.5 | 212.0 | 438.3 |
| Methacholine PC ₂₀ | 6.6±9.1 | 1.0 | (0,26.0) | 0.8 | 2.3 | 6.3 |
| FEV ₁ % | 88.9±16.3 | 1.8 | (49.0,124.3) | 76.8 | 90.1 | 100.0 |
| FEV ₁ /FVC | 0.8±0.1 | 0.0 | (0.5,1.0) | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| MMEF% | 72.3±29.5 | 3.2 | (23.3,144.8) | 49.8 | 69.5 | 96.1 |
| AQLQ | 5.1±1.0 | 0.1 | (2.4,6.6) | 4.4 | 5.2 | 6.0 |
| ACQ | 1.3±1.0 | 0.1 | (0.0,4.4) | 0.6 | 1.1 | 1.9 |

S.D: standard deviation, S.E: standard error of mean, (Min, Max): (minimum, maximum),

AQLQ (Asthma Quality of Life Questionnaire), ACQ (Asthma Control Questionnaire),

25th, 50th and 75th were percentiles.

2. 폐 기능 검사

환자의 천식 조절 정도를 확인하기 위한 폐 기능 검사를 실시하였다. 최대호기유속은 연구 기간 동안 매일 아침, 저녁으로 환자 스스로 최대 호기유량계 (the adult type peak flow-meter) 를 사용하여 측정하였고, 1초당 강제 호기량, 노력성 호기량, 최대 호기 중간유량은 8주 간격으로 폐량계 (dry wedge spirometer, Vitalograph, Buckingham, UK) 를 이용하여 측정하였다. 그리고 폐 기능에 환자의 성별, 나이, 신장 등이 영향을 미칠 수 있기 때문에 각각의 폐 기능 검사 결과에 대한 예측치 (% predicted value) 를 분석에 사용하였다.

3. 단일염기변이

단일염기변이 (SNP: single nucleotide polymorphism) 를 조사하기 위해 천식 환자 86명으로부터 혈액을 채취한 뒤 DNA purification kit (Gentra, Minneapolis, USA) 를 이용하여 DNA를 추출하였다. 그리고 단일염기변이 유전자형은 SNaPshot ddNTP Primer Extension kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 를 이용하여 확인하였다.

B. 통계적 분석 방법

반복측정 데이터를 분석하기 위해 주로 쓰이는 반복측정 분산분석과 대안적인 분석 방법으로 계층적 군집분석과 비선형 회귀분석을 사용하였다 (Fig. 1).

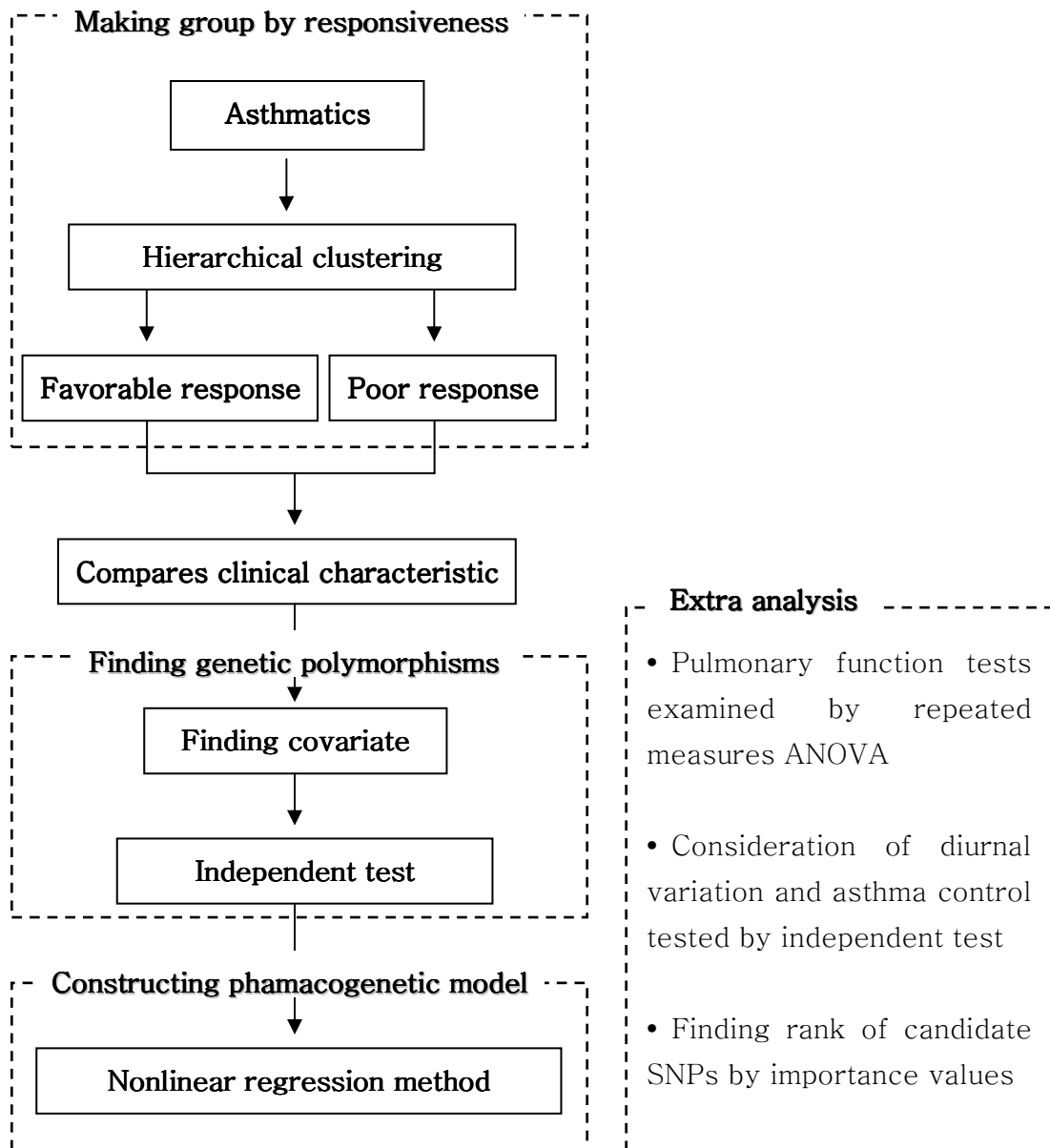


Fig. 1. The flow chart of statistical analysis for constructing a pharmacogenetic model.

The analytic methods as hierarchical clustering and nonlinear regression methods were constructed by several steps. We could construct bronchial responsiveness according to the asthma drug's affection. Followed by extra analysis for summarized variable result.

1. 반복측정 분산분석

한 환자에서 80일간 얻어진 관측치와 시간간의 상관관계를 고려하기 위해, 반복측정 분산분석 (repeated measures analysis of variance) 을 사용하였다. 반복측정 분산분석은 폐 기능 검사 측정치 중에서도 8주 간격으로 측정하였던 1초당 강제 호기량, 노력성 호기량, 최대 호기 중간 유량에 사용하였다 (SAS, 9.1, U.S.A). 그리고 결과 해석 시 다중 공선성의 적합성 유무를 고려하였다.

2. 계층적 군집분석

약물 복용 후 86명의 천식 환자의 반응 정도에 따라 그룹을 나누기 위해 계층적 군집분석 (hierarchical cluster analysis) 을 실시하였다. 80일 동안 약물 반응성을 파악하기 위해서 연구기간 동안 매일 측정한 최대호기유속을 군집분석에 사용하였다. 분석을 진행할 때에 환자의 약물 반응 유사도에 따라 Ward's method를 이용하여 군집을 구성하였다. Ward's method는 임상시험과 같이 작은 인원을 대상으로 많은 수의 측정치를 얻었을 때 적합한 방법으로 알려져 있다 (Jane et al., 2007). 또한 Ward's method는 오차제곱합 (error sum-of-squares) 을 최소화 시키는 방법으로 데이터가 가지고 있는 정보의 손실을 최소화 할 수 있는 방법이다 (Hu and Pizzi, 2004).

3. 비선형 회귀분석

약물 복용 후 시간에 따른 환자들의 반응이 어떤 개형으로 나타나는지 알아보기 위해서 비선형 회귀분석 (nonlinear regression method) 을 실시하였다

(Sigma plot 10.0, Germany). 계층적 군집분석으로 얻은 두 군집의 특성이 어떻게 차이가 나는지 파악하기 위해 지수함수 형태의 회귀 모형 $y_0 = a(1-e^{-bx})$ (the Exponential Rise to Maximum, Single, 2 Parameter) 을 이용하였다. 그리고 결정 계수 (coefficient of determination) 로 모형의 설명력을 계산하였다.

4. 임상 변수의 분석

임상 시험을 진행하면서 조절 되지 못한 임상 변수를 확인하기 위해 독립성검정과 평균을 비교하는 분석을 실시하였다. 비 연속 변수인 성별, 가족력, 아토피 유무는 Fisher's exact test를 사용하였으며, 연속 변수인 나이, 혈청 내 총 IgE치, methacholine PC₂₀치, 기저 1초당 강제 호기량, 노력성 호기량, 최대 호기 중간 유량은 Mann-Whitney U test를 이용하였다 (SPSS 12.0, USA). 그리고 임상 변수 중 기저에서 차이를 보이는 변수는 공변량으로 사용하였다.

5. 단일염기변이의 분석

반복측정 분산분석을 이용하여 단일염기변이가 폐 기능에 영향을 미치는 정도를 확인하였다. 그리고 군집분석을 이용하여 얻는 약물 반응도와 연관성이 있는 단일염기변이를 찾아 내기 위해 Fisher's exact test을 이용하여 독립성검정을 실시하였다. 분석을 통해 환자의 약물 반응도에 영향을 미치는 특정 단일염기변이의 유전자형을 찾아 낼 수 있다. 그리고 P-value를 보정하기 위해 일반선형모델 (GLM: Generalized linear model) 을 이용하여 공변량 분석을 실시하였다 (SPSS 12.0, USA).

6. 천식 조절 단계와 주간 변화

천식 조절 단계를 조절이 잘 된 그룹 (well controlled group), 부분적으로 조절이 된 그룹 (partially controlled group), 조절이 되지 않은 그룹 (uncontrolled group)으로 나누었다 (GINA, 2006, Appendix 1). 또한 약물 투여 직후 초기 반응을 보기 위해 0~8주, 이후 약물 유지기간으로 연구 종료 시점까지인 8~16주로 기간을 나누어 천식 조절 정도와 연관이 되는 단일염기변이를 조사하였다.

또한 주간변화 (diurnal variation) 도 천식 조절을 판단할 수 있는 인자이기에 최대호기유속 측정치를 이용하여 주간변화가 15%이상인 사람을 양성이라 판단하였다. 이때 주당 2회 혹은 1회를 기준으로 분석을 진행하였다.

7. 단일염기변이의 순위

여러 후보유전자에서 단일염기변이를 확인하게 되면 그 중 어떤 단일염기변이에 우선순위를 두어 분석을 진행할 것인지도 중요한 문제가 된다. 따라서 decision tree forest을 이용하여 각 시행마다 도출되는 빈도수를 수치화하여 importance value를 구성하고 단일염기변이의 중요도 순위를 결정하였다.

Ⅲ. 결 과

A. 후보 유전자의 종류

유전적 변이와 천식과의 연관성을 확인하기 위해 기도 염증과 류코트리엔, β_2 항진제 신호 전달 과정에 관계되는 유전자 ALOX5 (arachidonate 5-lipoxygenase), ADCY9 (adenylate cyclase 9), CysLTR1 (cysteinyl leukotriene receptor 1), CysLTR2 (cysteinyl leukotriene receptor 2), IL10 (interleukin 10), IL13 (interleukin 13), LTC4S (leukotriene C4 synthase), NK2R (tachykinin receptor 2), TNF α (tumor necrosis factor superfamily, member 2) 를 선정하였다 (Barnes, 2002; Zhang et al., 2002; Israel et al., 2004; Kim et al., 2005; Klotsman et al., 2007; Aoki et al., 2006; Zimmermann et al., 2003; Kelan et al., 2005; Katsunuma et al., 1999). 그리고 각 유전자에서 단일염기변이 ALOX5 -1708 G>A, ADCY9 132007 T>C, CysLTR1 -634 C>T, CysLTR2 2079 C>T, 2534 A>G, IL10 -1082 A>G, IL13 -1510 A>C, LTC4S -1072 G>A, -444 A>C, NK2R 7853 G>A (Gly231Glu), TNF α -1031 T>C, -308 G>A 다형성을 선택하여 연구를 진행하였다 (Table 2). 그리고 천식과 관련된 유전자 중 ADR β_2 는 이미 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제와 연관성이 보고가 있어, 그 외 유전자를 관찰하였다 (Baluk and McDonald, 1994; Chong et al., 1998; Lee et al., 2004).

12개의 단일염기변이 유전자형의 분포와 Hardy Wein-berg Equilibrium (H.W.E) 을 확인한 결과 CysLTR1 -634 C>T, IL10 -1082 A>G, LTC4S -1072 G>A, NK2R 7853 G>A 다형성은 H.W.E를 만족하지 못하였다. 이 중 CysLTR1 -634 C>T 다형성은 X 염색체 위에 존재하기 때문에 H.W.E를 만족하지 못하지만, IL10 -1082 A>G, LTC4S

-1072 G>A, NK2R 7853 G>A 다형성의 경우 대상자 선정에서 발생한 문제로 분석에서 제외하였다.

Table 2. The genotype distribution of candidate genetic polymorphisms in 86 asthmatics.

| Genetic polymorphisms | n. | MM* | Mm* | mm* | M.A.F | H.W.E |
|------------------------|----|-----|-----|-----|-------|------------------|
| ADCY9 132007 T>C | 83 | 31 | 44 | 8 | 0.361 | 0.176 |
| ALOX5 -1708 G>A | 86 | 50 | 31 | 5 | 0.238 | 0.946 |
| CysLTR1 -634 C>T | 85 | 44 | 14 | 27 | 0.400 | <0.001 |
| CysLTR2 2079 C>T | 83 | 40 | 36 | 7 | 0.301 | 0.782 |
| CysLTR2 2534 A>G | 84 | 37 | 38 | 9 | 0.333 | 0.870 |
| IL10 -1082 A>G | 85 | 78 | 0 | 7 | 0.082 | <0.001 |
| IL13 -1510 A>C | 84 | 45 | 31 | 8 | 0.280 | 0.440 |
| LTC4S -1072 G>A | 64 | 30 | 8 | 26 | 0.469 | <0.001 |
| LTC4S -444 A>C | 84 | 50 | 28 | 6 | 0.238 | 0.456 |
| NK2R 7853 G>A | 82 | 30 | 31 | 21 | 0.445 | 0.034 |
| TNF α -1031 T>C | 84 | 44 | 33 | 7 | 0.280 | 0.818 |
| TNF α -308 G>A | 83 | 75 | 8 | 0 | 0.048 | 0.645 |

*M: major allele, m: minor allele, M.A.F was minor allele frequency. H.W.E was Hardy Weinberg Equilibrium. Genetic polymorphisms was notated by gene name, location and Major allele>minor allele.

B. 폐 기능 변화와 단일염기변이의 연관성

1초당 강제 호기량, 노력성 호기량, 최대 호기 중간유량을 8주 간격 측정 값을 이용하여 반복측정 분산분석을 실시하였다. 이때 폐 기능 수치 예측치를 이용하였다 (Table 3). 그리고 연구 시작 시점을 기준으로 약물 복용 후 폐 기능의 증가량을 확인하기 위해 변화량도 분석에 사용하였다 (Table 4). 총 12개의 단일염기변이가 미치는 영향을 조사한 결과, ALOX5 -1708 G>A, CysLTR1 -634 C>T, CysLTR2 2079 C>T, 2534 A>G, IL10 -1082 A>G, IL13 -1510 A>C, LTC4S -444 A>C, NK2R 7853 G>A (Gly231Glu), TNF α -1031 T>C, -308 G>A 다형성은 의미가 없었다.

ADCY9 132007 T>C 다형성은 1초당 강제 호기량에서 두 군간의 유의한 차이를 보였다 (P -value <0.05). 즉, ADCY9 132007 T>C 다형성의 CT 또는 CC 유전자형을 가질수록 약물 복용 후 폐 기능 변화량이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있다 (Fig. 2). 하지만 폐 기능이 약물 복용 8주 후 증가량이 연구 초기 시점 (0~8주) 보다 감소되는 것을 확인 하였다. 또한, ADCY9 132007 T>C 다형성의 유전자형에 따라 다른 임상 변수의 차이를 확인한 결과 성별, 나이, 가족력, 아토피, 기저 폐 기능에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (P -value >0.05, Table 5).

Table 3. The association between % predicted value of pulmonary function test and two genetic polymorphisms.

| P-value | FEV1 % pred. | MMEF % pred. | FEV1/FVC | ACQ | AQLQ |
|--|--------------|--------------|----------|-------|-------|
| ADCY9 132007 T>C [AA vs. AG or GG] | | | | | |
| 0~8 week | 0.201 | 0.805 | 0.519 | - | - |
| 8~16 week | 0.194 | 0.835 | 0.300 | - | - |
| 0~16 week | 0.136 | 0.772 | 0.362 | 0.388 | 0.275 |
| TNFα -1031 T>C [TT vs. CT or CC] | | | | | |
| 0~8 week | 0.581 | 0.822 | 1.000 | - | - |
| 8~16 week | 0.689 | 0.684 | 0.441 | - | - |
| 0~16 week | 0.592 | 0.656 | 0.596 | 0.874 | 0.883 |

AQLQ (Asthma Quality of Life Questionnaire), ACQ (Asthma Control Questionnaire), P-value was tested by repeated measures analysis of variance.

Table 4. The association between changes of value of pulmonary function test and two genetic polymorphisms.

| P-value | Change of FEV1% | Change of MMEF% | Change of FEV1/FVC | Change of ACQ | Change of AQLQ |
|--|-----------------|-----------------|--------------------|---------------|----------------|
| ADCY9 132007 T>C [AA vs. AG or GG] | | | | | |
| 0~8 week | 0.132 | 0.489 | 0.740 | - | - |
| 8~16 week | 0.024 | 0.405 | 0.415 | - | - |
| 0~16 week | 0.356 | 0.623 | 0.396 | 0.071 | 0.166 |
| TNFα -1031 T>C [TT vs. CT or CC] | | | | | |
| 0~8 week | 0.298 | 0.286 | 0.967 | - | - |
| 8~16 week | 0.611 | 0.119 | 0.098 | - | - |
| 0~16 week | 0.506 | 0.813 | 0.163 | 0.213 | 0.746 |

AQLQ (Asthma Quality of Life Questionnaire), ACQ (Asthma Control Questionnaire), P-value was tested by repeated measures analysis of variance.

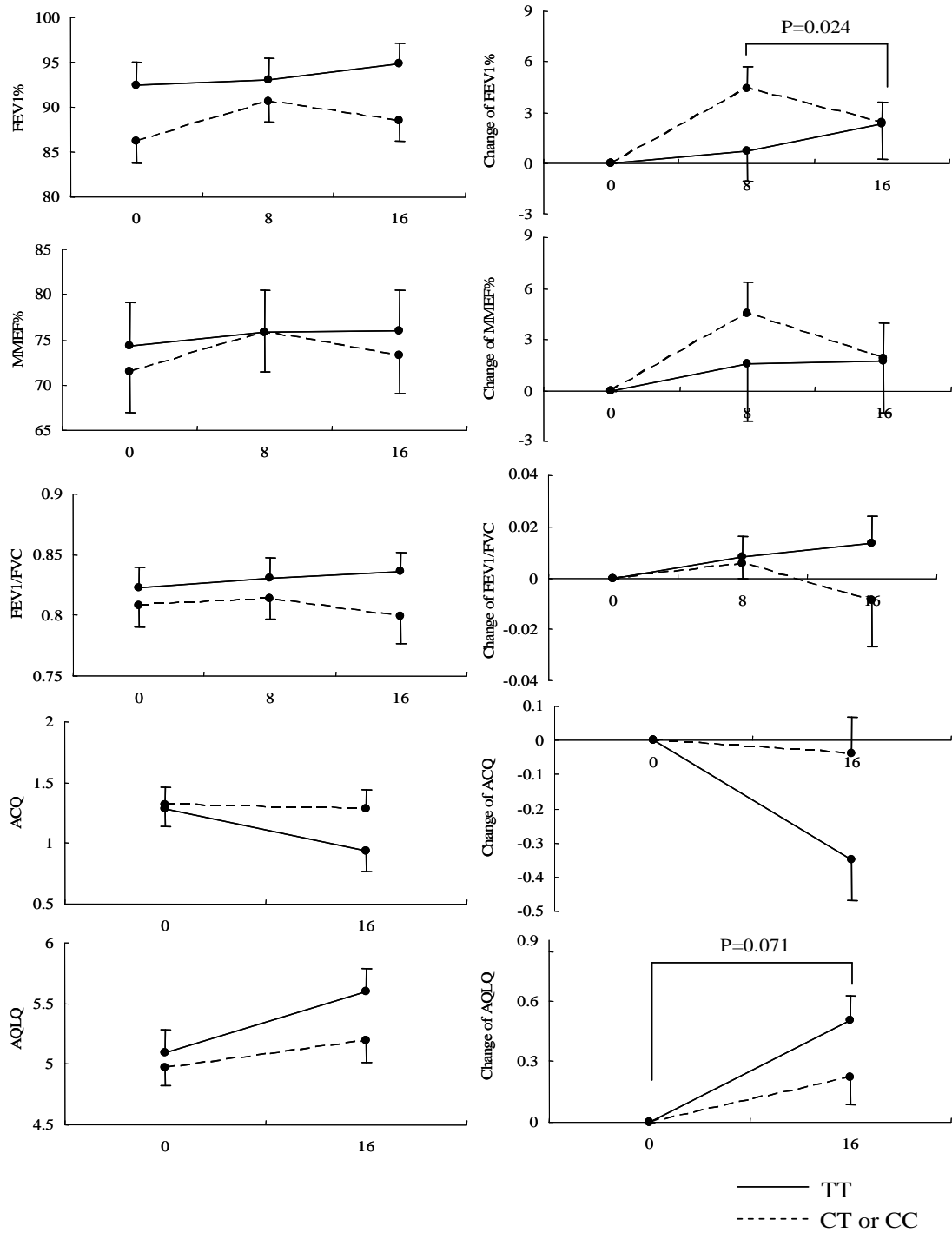


Fig. 2. The change of pulmonary function tests during study period according to the ACDY9 132007 T>C polymorphism.

Table 5. The clinical characteristics of the study subjects according to the ADCY9 132007 T>C and TNF α -1031 T>C polymorphisms.

| | ADCY9 132007 T>C | | <i>P</i> value | TNF α -1031 T>C | | <i>P</i> value |
|---|------------------|--------------------|----------------|------------------------|--------------------|----------------|
| | TT (n=31) | CT or CC (n=52) | | TT (n=44) | CT or CC (n=40) | |
| Sex (male/female)* | 14/17 | 33/19 | 0.116 | 25/19 | 23/17 | 1.000 |
| Age(years) [†] | 41(29,45) | 41.5(27,49) | 0.595 | 41(30,48.75) | 38.5(27.3,45) | 0.415 |
| Family history* | 6(19.4) | 19(36.5) | 0.138 | 16(36.4) | 9(22.5) | 0.233 |
| Atopy (positive)* | 20(64.5) | 30(58.8) | 0.648 | 26(59.1) | 25(64.1) | 0.659 |
| Serum total IgE [†] | 205(64,480) | 216(79,398) | 0.775 | 235(118,502) | 195.5(66,381) | 0.258 |
| Methacholine PC ₂₀ [†] | 1.59(0.8,5.7) | 2.5(0.7,9.1) | 0.625 | 2.05(0.6,9) | 2.5(0.84,5) | 0.884 |
| Baseline FEV ₁ % [†] | 94.4(81,101) | 87.7(74,99) | 0.094 | 94.85(77,102) | 87.4(76.0,97) | 0.265 |
| Baseline FEV ₁ /FVC [†] | 0.84(0.8,0.9) | 0.85(0.7,0.9) | 0.996 | 0.85(0.8,0.9) | 0.835(0.7,0.9) | 0.767 |
| Baseline MMEF% [†] | 74.7(52,97) | 65.5(48,96) | 0.618 | 76.4(49.6,98) | 62.0(49.3,94) | 0.507 |
| Baseline AQLQ [†] | 5.22(4,6.0) | 5.1(4.3,5.8) | 0.585 | 5.22(4.5,5.9) | 5.1(4.3,5.9) | 0.680 |
| Baseline ACQ [†] | 1(0.6,2.2) | 1.2(0.5,1.8) | 0.940 | 1.0(0.6,1.8) | 1.3(0.6,1.9) | 0.526 |

**P*-value for independent test: Fisher's exact test; n(%); [†]*P*-value for rank sum test: Mann-whitney U test; Median(25th quantile, 75th quantile), AQLQ (Asthma Quality of Life Questionnaire), ACQ (Asthma Control Questionnaire)

C. 천식 조절과 관계되는 단일염기변이

GINA 진료 지침에 따른 천식 조절단계와 단일염기변이와의 연관성 분석을 실시하였다. 12개의 단일염기변이 중에서 ADCY9 132007 T>C와 TNF α -1031 T>C 다형성에서 통계적으로 유의한 연관성이 관찰되었다. 즉, ADCY9 132007 T>C 다형성은 CT 또는 CC 유전자형을 가진 환자에서 TT 유전자형을 지닌 환자보다 유의하게 천식 조절이 잘 되는 것으로 확인되었다 (P -value <0.05). 하지만 8~16주 사이의 천식 조절의 결과를 보면 천식조절이 잘 되는 그룹과 부분적으로 천식이 조절되는 통합하여 분석한 결과는 CT 또는 CC 유전자형의 비율이 높았지만 천식조절이 잘 되는 그룹만을 보았을 때에는 CT 또는 CC 유전자형의 비율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 부분적으로 천식이 조절된 경우에 따라 의미가 변하였다 (Table 6). TNF α -1031 T>C 다형성의 경우 TT 유전자형을 가진 환자일수록 천식이 조절률이 높았다. 그 외에는 천식 조절과 유의한 연관성을 보이는 단일염기변이는 없었다.

Table 6. The genetic effect of the ADCY9 132007 T>C and TNFa -1031 T>C polymorphisms on asthma control.

| | ADCY9 132007 T>C | | <i>P</i> value | TNFa -1031 T>C | | <i>P</i> value |
|-----------------------------|------------------|-------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
| | TT | CT or CC | | TT | CT or CC | |
| In initial stage | | | | | | |
| Controlled+partly | 31/74(41.9) | 43/74(58.1) | 0.018 | 38/75(50.7) | 37/75(49.3) | 0.458 |
| Controlled | 7/15(46.7) | 8/15(53.3) | 0.402 | 13/16(81.3) | 3/16(18.8) | 0.005 |
| In maintenance stage | | | | | | |
| Controlled+partly | 30/73(41.1) | 43/73(58.9) | 0.080 | 37/74(50.0) | 37/74(50.0) | 0.299 |
| Controlled | 14/25(56.0) | 11/25(44.0) | 0.044 | 19/26(73.1) | 7/26(26.9) | 0.005 |

The LTC4S -1072 G>A polymorphism was significant, but we ruled out because of its clinical characteristic. ALOX5 -1708, CysLTR1 -634, CysLTR2 2079, CysLTR2 2534, IL10 -1082, IL13 -1510, LTC4S -444, NK2R 231and TNFa -308 were not significant.; *P*-value: adjusted with age, sex using GLM

D. 약물 반응도에 따른 군집분석

약물 복용 후 폐 기능 변화를 구체적으로 확인하기 위해서 부가적인 분석을 실시하였다. 우선, 약물의 반응 정도를 그룹화 하기 위해 계층적 군집분석을 이용하여 최대호기유속의 수치에 따라 2개의 군집으로 나누었다 (Fig. 3). 최대호기유속은 천식의 정도와 기도 폐색 정도를 수치화 한 것이기 때문에 약물 반응 장도를 나타내는 지표로 이용하였다 (Hatzel and Clark, 1980; Cross and Nelson, 1991). 그리고 최대호기유속의 예측치 값은 기저를 기준으로 약물 복용 후의 최대호기유속의 증가량을 조사하여 분석에 이용하였다.

그 결과 약 15~25% 상위에 위치하는 그룹과 최대호기유속의 증가량이 거의 보이지 않는 두 그룹이 존재하였다 (Fig. 3). 상위에 위치하는 그룹은 66/53명이며 증가 정도가 미미한 그룹은 17/29명으로 나타났다 (아침/저녁). 두 그룹의 성별, 나이 외에도 가족력, 아토피, 혈청 내 총 IgE치, methacholine PC₂₀치, 기저 1초당 강제 호기량, 노력성 호기량, 최대호기유량, AQLQ (Asthma Quality of Life Questionnaire), ACQ (Asthma Control Questionnaire)도 통계적으로 차이가 없었다 (Table 7). 두 그룹간의 기간별 주간 변화를 확인한 결과 약물 복용 후 초기 (0~8주) 주간 변화에 대한 양성 반응이 16주 간의 연구 기간 동안 약물 반응성에 영향을 미치고 있다. 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제 처방 후 약물 반응도를 살펴보면 두 그룹간의 차이가 아침에 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 3).

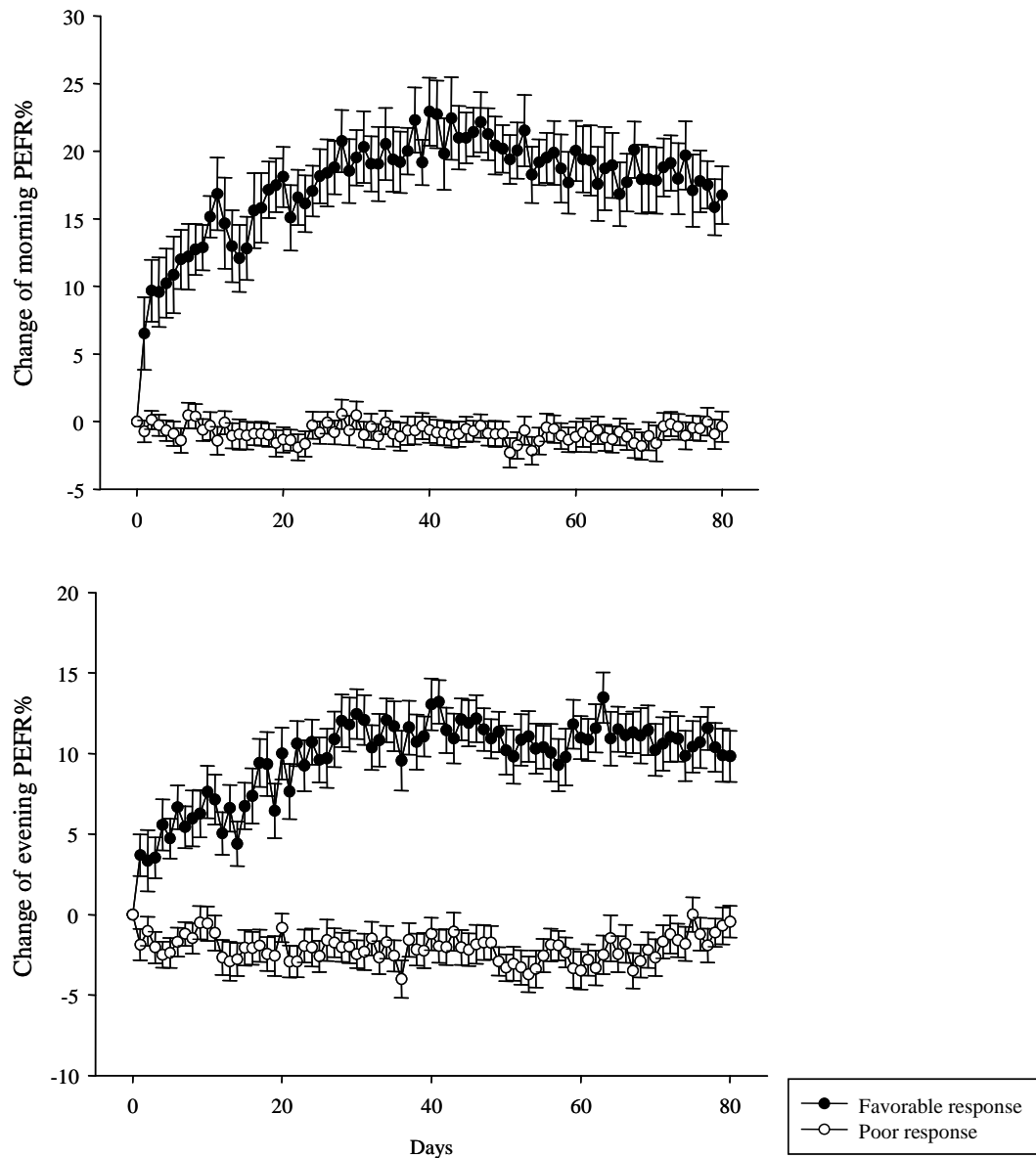


Fig. 3. The classification of asthmatics according to the change (%) of peak expiratory flow rate. After 80 days of treatment with combination inhaler, 66/53 showed favorable responses, while 17/29 showed poor responses.

Table 7. The clinical characteristics of two groups.

| | Change of morning | | <i>P</i> -value | Change of evening | | <i>P</i> -value |
|--|----------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| | FR (n=66) | PR (n=17) | | FR (n=53) | PR (n=29) | |
| Sex (male/female)* | 39/27 | 8/9 | 0.419 | 28/25 | 18/11 | 0.489 |
| Age (years)† | 38.0±11.4 | 42.9±11.8 | 0.121 | 39.0 ±11.9 | 39.2 ±11.3 | 0.944 |
| Family history (positive)* | 18(27.3%) | 6(35.3%) | 0.555 | 13(24.5%) | 10(34.5%) | 0.441 |
| Atopy (positive)* | 42(63.6%) | 8(50.0%) | 0.395 | 34(64.2%) | 15(53.6%) | 0.474 |
| Serum total IgE† | 310.9±345.7 | 376.7±345.4 | 0.499 | 309.5 ±348.7 | 366 ±341.5 | 0.501 |
| Methacholine PC ₂₀ † | 6.2±8.6 | 7.4±10.7 | 0.662 | 6.8 ±9.5 | 6.9 ±8.8 | 0.949 |
| Baseline FEV ₁ %† | 89.5 (77.5,99.2) | 94.4 (75,100.8) | 0.557 | 89.0 (78.0,99.6) | 90.0 (73.7,99.0) | 0.587 |
| Baseline FEV ₁ /FVC† | 0.845 (0.74,0.89) | 0.830 (0.735,0.90) | 0.901 | 0.84 (0.77,0.89) | 0.82 (0.705,0.9) | 0.638 |
| Baseline MMEF%† | 69.5 (49.8,96.1) | 67.8 (47.6,105.4) | 0.910 | 70.0 (53.4,95.05) | 56.1 (44,105.2) | 0.519 |
| Baseline AQLQ† | 5.115 (4.37,5.98) | 5.31 (3.89,5.95) | 0.982 | 5.16 (4.37,6.02) | 5.22 (3.89,5.8) | 0.666 |
| Baseline ACQ† | 1.2 (0.55,1.85) | 1.2 (0.8,2.2) | 0.579 | 1.0 (0.6,2.0) | 1.4 (0.5,2.0) | 0.669 |
| DV of initial Stage (2/week) | 25(37.9%) | 11(64.7%) | 0.058 (OR=3.0) | 18(34%) | 17(58.6%) | 0.038 (OR=2.8) |
| DV of initial Stage (1/week) | 32(48.5%) | 13(76.5%) | 0.056 (OR=3.5) | 25(47.2%) | 18(62.1%) | 0.250 (OR=1.8) |
| DV of maintenance Stage (2/week) | 17(25.8%) | 9(52.9%) | 0.042 (OR=3.2) | 12(22.6%) | 14(48.3%) | 0.025 (OR=3.2) |
| DV of maintenance Stage (1/week) | 23(34.8%) | 13(76.5%) | 0.003 (OR=6.1) | 17(32.1%) | 19(65.5%) | 0.005 (OR=4.0) |

**P*-value for independent test: Fisher's exact test; †*P*-value for rank sum test: Mann-whitney U test; Median(25th quantile, 75th quantile); Initial stage: during 0~8 week, maintenance stage: during 8~16 week; FR: favorable response, PR: poor response, DV: diurnal variation.

E. 약물 반응도와 단일염기변이의 연관성

계층적 군집분석을 통하여 86명의 천식 환자를 80일간 약물 반응도에 따라 두 그룹으로 나누었다. 서로 다른 약물 반응을 나타내는 단일염기변이를 확인하기 위해 독립성 분석을 진행하였다. ALOX5 -1708 G>A, ADCY9 132007 T>C, CysLTR1 -634 C>T, CysLTR2 2079 C>T, 2534 A>G, IL10 -1082 A>G, IL13 -1510 A>C, LTC4S -1072 G>A, -444 A>C, NK2R 7853 G>A (Gly231Glu), TNF α -1031 T>C, -308 G>A 다형성을 분석한 결과 ADCY9 132007 T>C 다형성 만이 유의한 차이가 있다 (Table 8). ADCY9 132007 T>C 다형성의 CT 또는 CC 유전자형을 가질 경우 약물에 대해 경과가 좋은 반응을 보이는 군과 반응을 보이지 않는 군의 비율이 63.8%와 41.2%로 그 차이가 27.1%로 유의하게 높았다 (P -value <0.05). 그리고 교차비 (Odds ratio) 는 공변량에 의한 보정 전후에 따라 3.071배, 1.826배를 보였다.

그리고 최대호기유속을 증가량을 20%이상 감소시키는 요인을 찾은 결과 IL13 -1510 A>C이 유의하게 CC 유전자형을 가진 환자들이 AA 또는 AC 유전자형을 가진 환자보다 최대호기유속의 증가량을 20%이상 감소시키는 것으로 확인되었다 (P -value <0.05). 약제 복용 후 최대호기유속에 영향을 미치는 ADCY9 132007 T>C와 IL13 -1510 A>C 다형성의 상호 연관성 (gene-gene interaction) 을 확인해본 결과 통계적으로 유의한 관계가 존재하였다 (P -value <0.05). 좀더 효율적인 분석을 위해 연구 시점부터 16주간 영향을 미칠 수 있는 임상 변수인 기저 1초당 강제 호기량, 혈청 내 총 IgE치, methacholine PC₂₀치, 성별과 나이를 포함하여 상호 연관성 분석을 진행하였다. 그 결과 약물 복용 초기 (0~8주) 에는 두 개의 단일염기변이간의 상호연관성이 유의하지 않았지만 8주 이후에

상호작용을 하면서 천식 조절 정도에 영향을 미치는 것으로 확인되었다 (P -value=0.003, Power=93.4%, Table 9). 8주 이후 천식 조절 정도에 연구 시작 시점의 1초당 강제 호기량도 유의한 결과를 얻었지만 검정력과 계수가 ADCY9 132007 T>C와 IL13 -1510 A>C 다형성의 상호 연관 변수보다 작은 수치였다 (Table 9). 마지막으로 80일간 환자의 약물 반응도를 비선형 회귀모형을 통해 관찰결과 도입한 모형, $y_0 = a(1 - e^{-bx})$ 에 대한 설명력은 77~80%를 보였다 (Fig. 4).

Table 8. The genetic effect of the ADCY9 132007 T>C polymorphisms on changes (%) of PEFr during study period.

| | | Change of morning PEFr% | | <i>P</i> -value* (Odds ratio) |
|---------------------|----------|-------------------------|---------------|----------------------------------|
| | | Favorable response | Poor response | |
| ADCY9 132007 T>C | TT | 20/63(31.7%) | 10/17(58.8%) | 0.051(OR=3.071) * |
| | CT or CC | 43/63(68.3%) | 7/17(41.2%) | 0.043 (OR=1.826) [†] |

**P*-value: Fisher's exact test; [†] *P*-value was adjusted with sex, age using logistic regression.

Table 9. The interaction between the ADCY9 132007 T>C and IL13 -1510 A>C polymorphisms on asthma control in the favorable response group of morning PEFr.

Generalized linear model: $g(\mu) = \beta_0\chi_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \beta_3\chi_3 + \beta_4\chi_4 + \beta_5\chi_5 + \beta_6\chi_6$

| Variables (n=6) | Initial stage | | | Maintenance stage | | |
|--|---------------|--------------|-------|-------------------|--------------|--------------|
| | B | P-value | Power | B | P-value | Power |
| Interaction of ADCY9 132007 T>C and IL13 -1510 A>C | | 0.061 | 0.652 | | 0.003 | 0.934 |
| TT + AA or AC | 2.116 | | | 3.760 | | |
| TT + CC | 2.875 | | | 2.671 | | |
| CT or CC + AA or AC | 2.177 | | | 3.870 | | |
| CT or TT + CC | 1.953 | | | 3.798 | | |
| Sex | 0.077 | 0.750 | 0.061 | -0.445 | 0.121 | 0.340 |
| Age | 0.024 | 0.015 | 0.695 | 0.022 | 0.061 | 0.469 |
| Baseline FEV1% | -0.004 | 0.575 | 0.086 | -0.017 | 0.042 | 0.534 |
| Baseline PC20 | -0.014 | 0.316 | 0.168 | 0.002 | 0.884 | 0.052 |
| Baseline serum total IgE | 0.000 | 0.671 | 0.07 | 0.000 | 0.410 | 0.129 |

Design: interaction of Two SNPs + sex+ age+ Baseline FEV₁%+ methacholine PC₂₀+ Serum total IgE

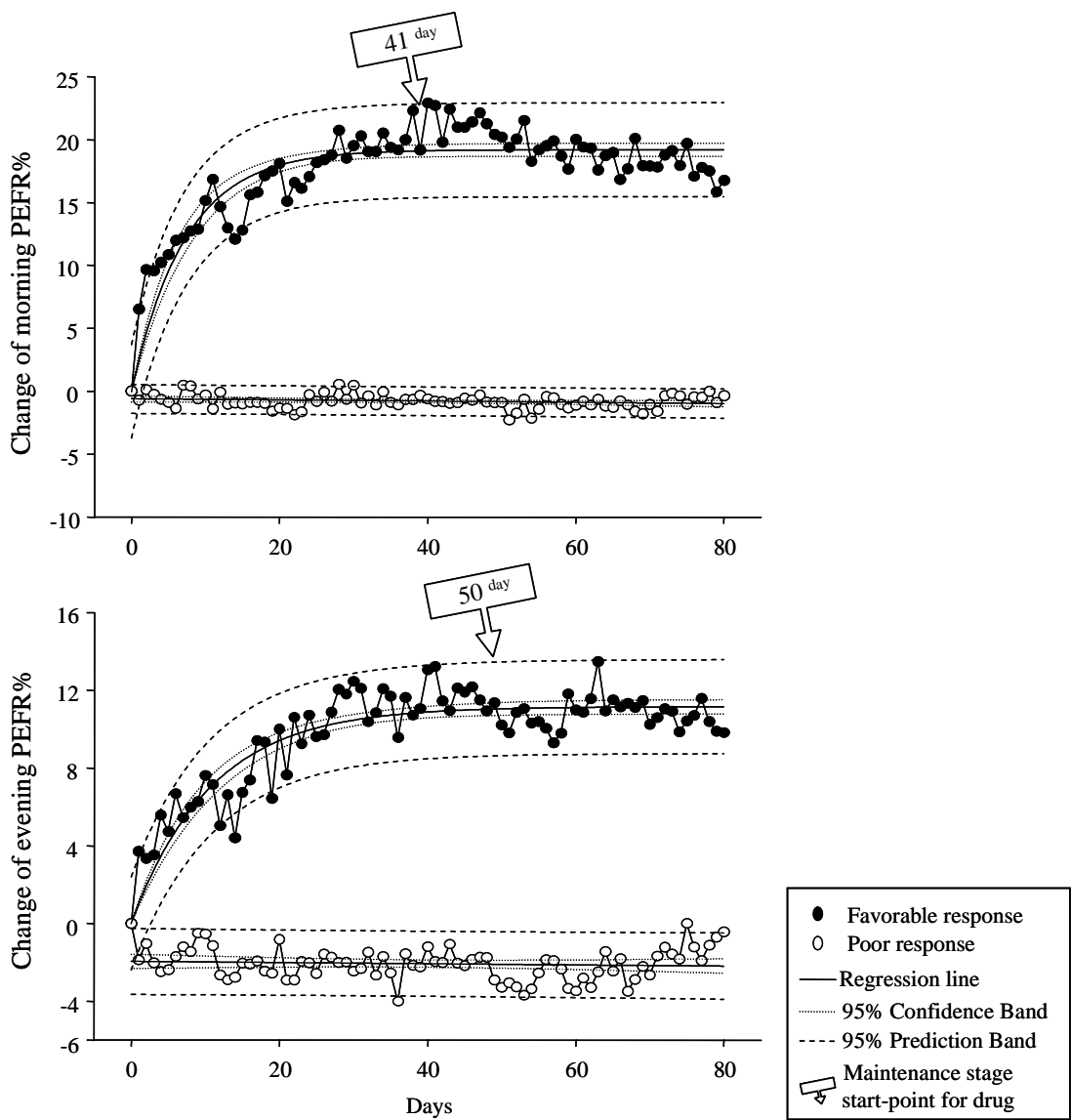


Fig. 4. A pharmacogenetic model based on change (%) of morning/evening PEFR. The regression line $y = a(1 - e^{-bx})$ for responder was fitted to the data point by finding the line that is closest to the data points.

F. 후보 단일염기변이의 순위

임상 시험 후 약물 반응도와 유전적 변이간의 관계를 확인할 때에 여러 단일염기변이를 사용하기 때문에 분석을 진행할 시 우선순위를 생각하는 것은 시간과 경제적 효율성을 높여줄 수 있다. 따라서 단일염기변이의 중요도에 따라 순위를 세울 수 있는 방법을 조사하였다. Decision tree forest를 이용하여 각 시행마다 도출되는 빈도수를 수치화한 importance value로 순위를 계산할 수 있었다.

그 결과 0~8주에 천식 조절 정도에 영향을 미치는 단일염기변이의 순서는 TNF α -1031 T>C (95.3235), LTC4S -444 A>C (90.5265), ADCY9 132007 T>C (85.838) 나타났고, 8~16주간의 천식 조절 정도에 따른 순위는 TNF α -1031 T>C (97.92), ADCY9 132007 T>C (93.867), LTC4S -444 A>C (89.556) 였다. 또한 전체 연구기간 동안의 최대호기유속을 이용한 약물 반응도에 따른 단일염기 변이의 순위는 LTC4S -444 A>C (100.0), TNF α -1031 T>C (95.421), ADCY9 132007 T>C (92.032) 으로 나타났다. 앞서 의미가 있었던 ADCY9 132007 T>C, TNF α -1031 T>C 다형성 모두 상위 순위에 속하였다 (Fig. 6). LTC4S -444 A>C 다형성 역시 상위에 위치하였지만 천식 조절 정도와 약물 반응도의 차이가 커 순위를 그대로 받아들이기 전 검증이 필요하다.

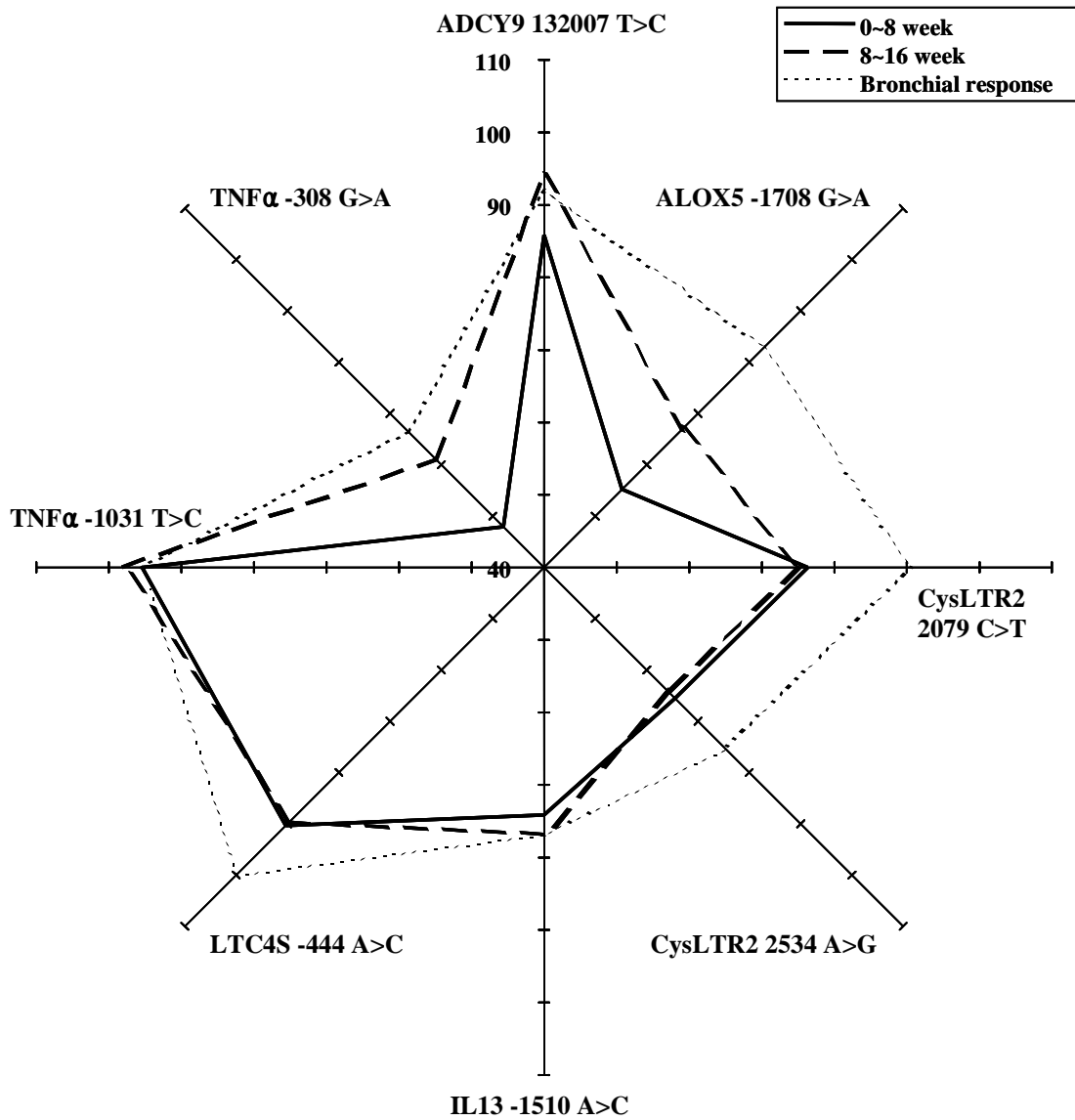


Fig. 5. Importance values of the candidate genetic polymorphisms used for classification each group. We tested candidate SNPs excepting rejected SNP about H.W.E.

G. 통계적 접근 방법

반복측정 데이터에 주로 쓰이는 반복측정 분산분석 외에 몇 가지 대안적인 분석을 실시하였다. 우선, 연구기간 동안 약물 반응도를 확인하기 위해 계층적 군집분석을 실시하였다. 나누어진 군집을 통해 약물 반응도에 영향을 미치는 단일염기변이를 확인할 수 있었다. 그리고 비선형 회귀모형을 사용하여 약물 반응도 형태를 파악하였다. 계층적 군집분석과 비선형 회귀분석을 통해서 수 일간의 데이터를 간소하고, 효율적 분석을 진행하였으며, 또한 회귀분석으로 전체 데이터의 패턴을 확인 할 수 있어 환자의 반응도가 어떻게 변화하고 있는지 확인하였다. 마지막으로 decision tree forest을 이용해 단일염기변이의 우선 순위를 세울 수 있었다.

IV. 고찰

유전적 요인은 환자의 약물 반응 정도를 예측하는 것에 중요한 인자로 사용되고 있다. 특정 유전적 요인이 개인간 차이를 만들어내는 정도를 확인 할 수 있다면 유전자에 근거한 처방이 가능해 질 것이다 (Nakamura, 1999; Phillips et al., 2001; Güzey and Spigset, 2002; Severino and Zompo, 2004). 하지만 복합 형질 질환인 천식의 경우 하나의 유전자가 아닌 여러 유전자간 상호작용이 있어 연구 진행 시 우선 순위 선정의 어려움이 생긴다. 이때 decision tree forest을 이용하여 유전적 변이의 우선순위를 얻을 수 있다면 시간적, 경제적 효율적인 연구를 진행하는 데에 있어 도움이 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제를 투여하여 80일간의 약물 반응을 확인하였다. ADCY9 132007 T>C 다형성이 폐 기능, 천식 조절 정도, 약물 반응도에서 모두 유의한 연관성이 존재하였다. 하지만 8~16주 사이의 천식 조절의 결과를 보면 천식조절이 잘 되는 그룹과 부분적으로 천식이 조절되는 통합하여 분석한 결과는 CT 또는 CC 유전자형의 비율이 높았지만 천식조절이 잘 되는 그룹만을 보았을 때에는 CT 또는 CC 유전자형의 비율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 8주 이후 연구 초기에 천식이 개선이 잘된 그룹의 사람들이 부분적으로 천식이 조절되는 그룹으로 옮겨간 것을 의미한다. 그런데 앞서 폐 기능 분석에서도 8주 이후에 CT 또는 CC 유전자형에서 폐기능의 증가량 감소가 있는 것을 확인하였고, 천식 조절 결과에서도 8주 이후의 천식 조절 정도가 떨어지는 것을 확인하면서 8주 이후에

ADCY9 132007 T>C 다형성 외에도 영향을 미치는 다른 요인이 있을 가능성이 관찰 되었다.

IL13 -1510 A>C 다형성이 약물 복용 8주 이후 ADCY9 132007 T>C 다형성과 상호 연관성의 가능성을 관찰하였다. 그리고 ADCY9 132007 T>C, IL13 -1510 A>C 다형성의 상호연관성 조사를 위해 임상 변수인 1초당 강제 호기량, 혈청 내 총 IgE치와 methacholine PC₂₀치, 성별과 나이를 포함하여 일반선형모델을 이용한 분석을 실시한 결과에서도 유전적 요인이 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

Adenylyl cyclase 9 (ADCY 9) 는 기도의 평활근에서 protein kinase A (PKA) 를 활성화를 시켜 평활근의 이완을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Billington et al., 1999). 또한 ADCY9 132007 T>C 다형성은 CT 또는 CC 유전자형 일수록 흡입 스테로이드 제제의 기도 확장 효과가 좋다는 보고가 있다 (Kelan et al., 2005). 지금까지의 결과와 종합하면 ADCY9 132007 T>C 다형성의 CT 또는 CC 유전자형은 흡입 스테로이드제제와 지속성 β -항진제 복합제 처방 시 환자의 기관지 확장 효과를 높인다는 것을 알 수 있었다. 또한 ADCY9 132007 T>C 다형성과 IL13 -1510 A>C 다형성의 상호 연관성이 있는 것으로 확인되었는데, ADCY 9에 의한 PKA의 활성화는 IL-13의 생성과 수치를 높여 천식의 중증도를 높여 이런 결과를 얻을 것으로 생각된다 (Janet et al., 2007; Lisa et al., 2006; Matthew et al., 2006).

이 연구에서 기존의 분석방법 외에 대안적인 방법의 도입을 제시하였다. 동일 질병의 비슷한 병기를 가진 환자라 할지라도 약물에 대한 반응은 개인 간의 차이를 보인다. 따라서 유전적 요인에 따라 개개인의 반응 양상을 어느 정도 예측할 수 있어 적절한 시기에 알맞은 약물을 투여할 수 있게 된다면 치료 효율을 높일 수 있다. 이전 약물유전체 연구에서는 하나의 유전자의 성격을

규정하는 것을 목표로 하여 모형이 설계되고 분석이 진행되었다 (Israel et al., 2004). 그러나 생물학적 기술이 발전하면서 대량의 유전자 분석이 가능해 지고 있다. 하지만 수많은 유전자의 양에 수반하는 많은 샘플을 대상으로 분석을 진행하는 것은 많은 난관을 가지고 있다. 또한 천식과 같은 복합 질환에서 하나의 요인이 약물의 반응을 결정짓는 다는 것은 쉽지 않다. 따라서 본 연구에서는 작은 샘플에서 여러 개의 유전자를 비교 분석 할 수 있는 대안적 통계적 접근방법을 찾고자 하는 것을 목표로 하였다.

임상시험을 통해 얻어진 데이터를 실험설계 시 미리 정해진 요인으로 나누어 약물 반응의 개인차를 살펴보는 방법과는 역으로 개인의 반응 양상에 따라 군집을 나누고 각 개인이 어떤 약물 반응을 보이는 지 확인 한 뒤 차이를 만드는 요인을 찾는 방법을 강구하였다. 전자와 같은 방법으로 분석 시 유전자 안에서 다른 반응 양상을 보이더라도 의미가 퇴색될 수 있기 때문이다. 이럴 경우 초반 설계한 유전적 요인 외의 다른 요인들에 대해서는 둔감해져 다른 유의미한 요인을 찾을 수 없게 된다. 이 연구에서 후자의 방법을 사용한 분석으로 얻은 유전적 요인을 이용하여 환자의 약물투여 후 반응을 100% 예측해 낼 수는 없겠지만 예후 인자로서 가능성을 보이는 후보 요인을 분류 할 수 있게 하는 분석방법을 제시했다.

우리는 질환 군에게 복합 투여한 뒤 개개인의 약물 반응을 살펴보아 서로 다른 반응을 보이게 하는 유전적 요인을 찾기 위한 분석을 실시하였다. 적은 환자 수에 비해 긴 기간 많은 변수들로 인해 생기는 분석 문제점을 해결하기 위해 계층적 군집분석을 도입하였다. 그리고 군집화로 인하여 긴 기간 측정된 연속 변수의 명목 변수로의 변화가 가지는 문제점의 보완이 필요하였다. 따라서

비선형 모형을 사용하여 연속적 약물 반응을 확인하였다. 비선형 모형을 이용하면 우리가 확인하고자 하는 집단의 시간에 따른 약물 반응의 변화를 한눈에 살펴볼 수 있다는 장점을 가지고 있다. 위와 같은 분석 방법의 보조분석으로서 부족한 점을 채워 줄 수 있을 것이다.

전체 유전자를 확인하지 못하였기에 개인의 약물반응에 영향을 미치는 유전자를 단정 짓기는 어렵다. 하지만 위에서 언급한 일련의 분석을 통하여 설정한 유전자 목록 중에서 개개인이 같은 약제에 다른 약물 반응양상을 만들어 내는 최선의 유전자 변이를 찾아 내는 것은 가능할 것이며 천식의 예후인자로서의 가능성을 확인 할 수 있을 것이다. 이와 같은 수치적 분석 하의 분석을 통한 예후인자의 발견에 생물학적인 의미를 부여하기 위해서는 많은 실험이 뒷받침 되어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 흡입 스테로이드제제와 지속형 β -항진제를 복합 투여하게 되면 ADCY9 132007 T>C이 환자의 약물 반응에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 폐 기능 값들로부터 얻은 지수함수 형태의 회귀모형을 이용하여 환자의 반응을 개형화 할 수 있었다. 이런 결과를 얻기 위해 사용한 계층적 분산분석과 비선형 회귀분석은 결과를 뒷받침할 수 있는 대안적 방법이 될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Adcock IM, Stevens DA, Barnes PJ.: Interactions of glucocorticoids and beta 2-agonists. *Eur Respir J* 9: 160-168, 1996
2. Albert Maydeu-Olivares: Classification of prison inmates based on hierarchical cluster analysis. *Psicothema* 8: 709-715, 1996
3. Annika W, Thomas S, Margaretha S, Peter H, Bo L, Giovanni D, Susan W, Mary J, Ratko D, Stephen H, Anne L, Lars L: The effects of regular inhaled formoterol, budesonide and placebo on mucosal inflammation and clinical indices in mild asthma. *Am J Respir Crit Med* 159: 79-86, 1999
4. Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, Shibasaki M, Noguchi E.: An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet* 51: 677-685, 2006
5. Baluk P, McDonald DM.: The beta 2-adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvascular leakage by inhibiting endothelial gap formation. *Am J physiology* 266: 461-468, 1994

6. Barnes KC, Grant AV, Hansel NN, Gao P, Dunston GM.: African Americans with asthma: genetic insights. *Proc Am Thorac Soc* 4: 58-68, 2007
7. Barnes PJ.: Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-acting beta2-agonists and corticosteroids. *Eur Respir J* 19: 182-191, 2002
8. Billington CK: Inflammation and contractile agents sensitize specific adenylyl cyclase isoforms in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 597-606, 1999
9. Billington CK, Pascual RA, Hawkins M, Penn RB, and Hall IP.: Interleukin-1b and rhinovirus 1 sensitize adenylyl cyclase in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 633–639, 2000
10. C. Buchel, R. J. S. Wise, C. J. Mummary, J.-B. Poline, K.J. Friston: Nonlinear regression in parametric activation studies. *Neuroimage* 4: 60-66, 1996
11. Chong LK, Cooper E, Vardey CJ, Peachell PT.: Salmeterol inhibition of mediator release from human lung mast cells by beta-adrenoceptor-dependent and independent mechanisms. *British journal of pharmacology* 123: 1009-1015, 1998
12. Cockcroft DW, Berscheid BA.: Volume adjustment of maximal midexpiratory flow:

importance of changes in total lung capacity. *Chest* 78: 595-600, 1980

13. Cross D, Nelson HS. The role of the peak flow meter in the diagnosis and management of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 87:120-128, 1991
14. Elliot Israel, Vernon M Chinchilli, Jean G Ford, Homer A Boushey, Reuben Cherniack, Timothy J Craig, Aaron Deykin, Joanne K Fagan, John V Fahy, James Fish, Monica Kraft, Susan J Kunselman, Stephen C Lazarus, Robert F Lemanske Jr, Stephen B Liggett, Richard J Martin, Nandita Mitra, Stephen P Peters, Eric Silverman, Christine A Sorkness, Stanley J Szeffler, Michael E Wechsler, Scott T Weiss, Jeffrey M Drazen: use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomized, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 364: 1505-1512, 2004
15. Ensom MH, Chang TK, Patel P.: Pharmacogenetics: the therapeutic drug monitoring of the future? *Clin Pharmacokinet* 40: 783-802, 2001
16. Fushimi, T., S. Shimura, S. Suzuki, H. Saitoh, H. Okayama, and K. Shirato.: Suppression of gene expression and production of interleukin 13 by dexamethasone in human peripheral blood mononuclear cells. *Tohoku J Exp Med.* 185:157–160, 1998

17. Georas SN.: Inhaled glucocorticoids, lymphocytes, and dendritic cells in asthma and obstructive lung diseases. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1: 215-221, 2004
18. Greening AP, Ind PW, Northfield M, Shaw G: Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. *Lancet* 344:219–224, 1994
19. Güzey C, Spigset O.: Genotyping of drug targets: a method to predict adverse drug reactions? *Drug Saf* 25: 553-560, 2002
20. Güzey C, Spigset O.: Genotyping as a tool to predict adverse drug reactions. *Curr Top Med Chem* 4: 1411-1421, 2004
21. Hall IP.: Pharmacogenetics of asthma. Division of Therapeutics. *Chest* 130: 1873-1878, 2006
22. Hatzel MR, Clark TJH.: Comparison of normal and asthmatic circadian rhythms in peak expiratory flow rate. *Thorax* 35: 732-738, 1980
23. Hu Yang and Pizzi, N.J.: Biomedical data classification using hierarchical clustering. *Electrical and Computer Engineering* 4: 1861-1864, 2004

24. James F. Donohue: Combination therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2: 272-281, 2005
25. Jane clatworthy, Matthew hankins, Deanna bulck, John weinman, Robert horne: A monte carlo study to identify the most appropriate method. *Psychology and Health* 22: 123-142, 2007
26. Janet S Lee , Matthew R Rosengart , Venkateswarlu Kondragunta , Yingze Zhang , Jessica McMurray , Robert A Branch , Augustine M.K. Choi and Frank C Sciruba: Inverse association of plasma IL-13 and inflammatory chemokines with lung function impairment in stable COPD: a cross-sectional cohort study. *Respiratory Research* 8:64, 2007
27. Joe H. ward: Hierarchical grouping to optimize an objective function. *American Statistical Association Journal* 301: 236-244, 1963
28. Johan C. Kips, Romain A. Pauwels: Long-acting inhaled beta2-agonist therapy in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 923-932, 2001
29. Judith A. M. Wessels, Sjoerd M. van der Kooij, Saskia le cessie, Wietske Kievit, Pilar Barerra, Cornelia F. Allaart, Tom W.J. Huizinga, Henk-Jan Guchelaar: A

clinical Pharmacogenetics model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 56: 1765-1775, 2007

30. Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai CB, Rockel P, Sonoda M, Planchet E.: Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J Exp Bot* 53: 875-882, 2002
31. Katsunuma T, Mak JC, Barnes PJ.: Glucocorticoids reduce tachykinin NK2 receptor expression in bovine tracheal smooth muscle. *European journal of pharmacology* 344: 99-106, 1998
32. Katsunuma T, Roffel AF, Elzinga CR, Zaagsma J, Barnes PJ, Mak JC.: beta2-adrenoceptor agonist-induced upregulation of tachykinin NK2 receptor expression and function in airway smooth muscle. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21: 409-417, 1999
33. Kelan G, Tantisira, Kersten M. Small, Augusto A. Litonjua, Scott T. Weiss, Stephen B. Liggett: Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: interaction between beta-agonist and corticosteroid pathways. *Human Molecular Genetics* 14: 1671-1677, 2005

34. Kim SH, Choi JH, Holloway JW, Suh CH, Nahm DH, Ha EH, Park CS, Park HS.: Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with aspirin-intolerant urticaria and aspirin-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population. *J Korean Med Sci.* 20: 926-31, 2005
35. Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmöller J.: State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 49: 995-1003, 2006
36. Klotsman M, York TP, Pillai SG, Vargas-Irwin C, Sharma SS, van den Oord EJ, Anderson WH.: Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase biosynthetic pathway and variable clinical response to montelukast. *Pharmacogenet Genomics* 17: 189-196, 2007
37. Lee DK, Jackson CM, Bates CE, et al.: Cross tolerance to salbutamol occurs independently of β 2-adrenoceptor genotype-16 in asthmatic patients receiving regular formoterol or salmeterol. *Thorax* 59:662, 2004
38. Liggett SB.: Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 156: S156-62, 1997
39. Lisa MM, Joanna MMH, Neil Walker, Gavin PS, DPhill and Richard WJ:

Association of IL13 with total IgE: Evidence against an inverse association of atopy and diabetes. *J allergy Clin Immunol* 117: 1306-1313, 2006

40. Matthew JL, Susan F, Stephen PP and Raymond BP: Beta-agonist modulate T-cell functions via direct actions on type 1 and type 2 cells. *The American Society of Hematology* 107:2052-2060, 2006
41. Mcfadden ER, Gilbert IA. Medical progress: asthma. *N Engl J Med* 327: 1928-1937, 1992
42. Michael R. Anderberg: Cluster analysis for applications. *Society for Industrial and Applied Mathematics* 17: 580-582, 1975
43. Mohammad A. Behajady, Nasser Modirshahla: Nonlinear regression analysis of kinetics of the photocatalytic decolorization of an azo dye in aqueous TiO₂ slurry. *Photochem Photobio Sci* 5: 1078-1081, 2006
44. Nakamura Y.: Significance of SNP analysis on the future medicine. *Nippon Rinsho* 57: 2615-2622, 1999
45. Newball HH.: The unreliability of the maximal midexpiratory flow as an index of acute airway changes. *Chest* 67: 311-314, 1975

46. Nials AT, Ball DI, Butchers PR, Coleman RA, Humbles AA, Johnson M, Vardey CJ.: Formoterol on airway smooth muscle and human lung mast cells: a comparison with salbutamol and salmeterol. *European journal of pharmacology* 251: 127-135, 1994
47. Paul RJ, de Lanerolle, Liggett SB and Meyers D: Regulation of smooth muscle contractility. *Genetics of asthma*: 91-117, 1996
48. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W.: Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 286: 2270-2279, 2001
49. Romain A. Pauwels, M.D., Claes-Göran Löfdahl, M.D., Dirkje S. Postma, M.D., Anne E. Tattersfield, M.D., Paul O'Byrne, M.B., Peter J. Barnes, D.M.: Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. *N Engl J Med* 337: 1405–1411, 1997
50. Severino G, Del Zompo M.: Adverse drug reactions: role of pharmacogenomics. *Pharmacol Res* 49: 363-373, 2004
51. Shah RR.: Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360: 1617-1638, 2005

52. Shastri BS.: Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine.
Pharmacogenomics J 6: 16-21, 2006

53. Sherter CB, Connolly JJ, Schilder DP.: The significance of volume-adjusting the maximal midexpiratory flow in assessing the response to a bronchodilator drug.
Chest 73: 568-571, 1978

54. Shrewbury S, Pyke S, Britton M.: Meta-analysis of increased dose of inhaled steroid or addition of salmeterol in symptomatic asthma (MIASMA). *BMJ* 320:1368–1373, 2000

55. Spoelstra FM, Postma DS, Hovenga H, Noordhoek JA, and Kauffman HF.: Budesonide and formoterol inhibit ICAM-1 and VCAM-1 expression of human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 15: 68-74, 2000

56. Steven A. Lee, S. Matthew Fitzgerald, Shau K. Huang, Chuanfu Li, David S. Chi, Denise M. Milhorn, and Guha Krishnaswamy: Molecular Regulation of Interleukin-13 and Monocyte Chemo attractant Protein-1 Expression in Human Mast Cells by Interleukin-1 β . *American Journal of Respiratory cell and Molecular Biology* 31: 283-291, 2004

57. Stinson JM, McPherson GL, Darveaux R.: Use of the isovolume FEF25-75% to assess small airway obstruction. *Respir Care* 25: 59-62, 1980
58. Sxepler S.J, Martin R.F, King T.S, Boushey H.A, Cherniack R.M, Chichilli V.M. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109: 410-418, 2002
59. Pascual, Rodolfo M., Charlotte K. Billington, Ian P. Hall, Reynold A. Panettieri, Jr., James E. Fish, Stephen P. Peters, and Raymond B. Penn. :Mechanisms of cytokine effects on G protein-coupled receptor-mediated signaling in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1425–L1435, 2001.
60. Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O’Byrne P, Barnes PJ, Ullman A.: Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *NEngl J Med* 337: 1405–1411, 1997
61. Tantisira KG, Small KM, Litonjua AA, Weiss ST, Liggett SB.: Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: interaction between beta-agonist and corticosteroid pathways. *Human molecular genetics* 14: 1671-1677, 2005

62. Verleden GM, Belvisi MG, Rabe KF, Miura M, Barnes PJ.: Beta 2-adrenoceptor agonists inhibit NANC neural bronchoconstrictor responses in vitro. *J Appl Physiol* 74: 1195-1199, 1993
63. Vesell ES.: Advances in pharmacogenetics and pharmacogenomics. *J Clin Pharmacol* 40: 930-938, 2000
64. Ward JH: Hierarchical grouping to optimize and objective function. *Journal of the American Statistical Association* 77: 841-847, 1963
65. Zhang J, Chen H, Hu L, Fu J, Zhang H, Chen Y.: Correlation between polymorphism of IL-4 and IL-10 gene promoter and childhood asthma and their impact upon cytokine expression. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 82: 114-118, 2002
66. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME.: Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 111: 227-242, 2003

Appendix 1. Level of asthma control.

| Characteristic | Controlled (all of the following) | Partly controlled (any measure present in any week) | uncontrolled |
|--|--------------------------------------|---|--|
| Daytime symptoms | Twice or less/week | More than twice/week | Three or more features of partly controlled asthma present in any week |
| Nocturnal symptoms | None | Any | |
| Need for reliever/ Rescue treatment | Twice or less/week | More than twice/week | |
| Lung function (FEV1) | Normal | <80% predicted or personal best (If known) | |

It was based on 2006 GINA guideline

-ABSTRACT-

**Analysis of the Repeated Measurement Data using the Hierarchical
Clustering and Nonlinear Regression Methods
in Asthma Pharmacogenetic Study**

Lee Hyun Young

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Park Hae Sim)

Objective: We examined several analytic methods for predicting therapeutic response to drug in Korea asthmatics and tried to develop a clinical model to predict the drug response to asthma drug.

Background: Long acting β_2 -agonists (LABA) is the most powerful bronchodilator and inhaled corticosteroid (ICS) was the most effective anti-inflammatory drug currently available in asthma management. The combination treatment including LABA and ICS has been considered as an essential drug to achieve optimal asthma control.

Methods: The eighty-six mild to moderate asthmatic patients were enrolled. With using combination inhaler (budesonide/formoterol 320µg/d) for 80 days, we monitored morning and evening peak expiratory flow daily and pulmonary function every 8 weeks. Twelve SNPs from 9 candidate genes including ADCY9 132007 T>C (Ile772Met), ALOX5 -1708 G>A, CysLTR1 -634 C>T, CysLTR2 2079 C>T, 2534 A>G, IL10 -1082 A>G, IL13 -1510 A>C, LTC4S -1072 G>A, LTC4S -444 A>C, NK2R 7853 G>A (Gly231Glu), TNFα -1031 T>C and TNFα -308 G>A were analyzed.

First, we tested the therapeutic response to combination inhaler according to genetic polymorphisms of each SNP, level of asthma control and pulmonary function tests. The changes of pulmonary function tests such as predicted FEV₁, MMEF and FEV₁/FVC were analyzed using repeated measures ANOVA in the generalized linear model (GLM). A hierarchical clustering method was applied to get daily change (%) of PEFR to combination inhaler. The asthmatics were divided into two groups (favorable vs. poor responses) according to the changes of PEFR using the hierarchical clustering method. Each SNP was analyzed by testing for independence between two groups. For predicting drug response, the associations between each SNP and time trend of response were analyzed and the equation for the predicted PEFR was constructed by nonlinear regression method.

Result: Among the 12 SNPs, the ADCY9 132007 T>C polymorphism was significantly associated with response to combination inhaler. The patients with CT or CC genotype at the ADCY9 132007 T>C polymorphism are more in well controlled state than those with TT genotype in the initiate stage (0~8 week). A possible interaction between ADCY9 132007

T>C polymorphism and IL13 -1510 A>C polymorphism was noted by generalized linear model (GLM). The rank of candidate SNPs was determined using decision tree forest. A clinical model for predicting a drug response to combination inhaler using nonlinear regression method was constructed.

Conclusion: The ADCY9 132007 T>C polymorphism may affect on drug response to a combination inhaler in Korean asthmatics. We suggest a clinical model using an alternative statistical analysis including hierarchical clustering and nonlinear regression methods for predicting a drug response to a combination inhaler.

Key words: asthma, hierarchical clustering method, nonlinear regression method, repeated measures analysis of variance, single nucleotide polymorphism and pharmacogenetics