

청소년 고혈압과 후보 유전자들의

연관성 연구: Kangwha study

Association Study between Adolescent Essential

Hypertension and Candidate Genes

: Kangwha study

연세대학교 대학원

보건학과

이 윤 경

청소년 고혈압과 후보 유전자들의
연관성 연구: Kangwha study

지도 남 정 모 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

보건학과

이 윤 경

이윤경의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

충분한 시간을 두고 논문을 보정하지 못 하여 아쉽지만, 이 논문은 2000년부터 2005년까지 제 삶의 시간이 고스란히 녹아 있는 논문입니다. 신규 이론과 빠르게 진화하는 연구 패러다임을 모두 체득하고 싶은 욕심에 여러 연구소, 학교, 회사에서 학문을 익혔습니다. 많은 만남이 있었고 중요한 경험을 했습니다. 그 기간 동안 있었던 일을 기록하고 진정한 승자의 길을 보여준 분들께 감사의 글을 남기고자 합니다.

의대 신경과학과 박사과정 중 몸이 아파 중도에 포기했을 때 아빠가 바라시던 학자의 길을 가지 못한 것과 엄마의 고된 노고에 보답을 드리지도 못한 채 끝난 것 같아 마음이 무척이나 무거웠습니다. 또한 제가 다시 이 분야의 공부를 할 수 있을지 알 수 없어 두려웠습니다. 그저 하나님을 바라보는 마음으로 막연한 희망을 가졌을 뿐입니다. 그러나 오래지 않아 건강을 회복하여 2005년도에 이르기까지 분자생물학, 생물정보학, 세포유전학, 인류유전학, 유전역학 등을 연구했으며, 휴먼게놈 프로젝트가 완료되어 한국에서 한 참 벤처 붐이 일던 시기에 국립 연구소와 회사를 다녔습니다. 아직 너무나도 부족한 사람이지만 신생 분과와 다 분야를 공부한 사람으로서 의학 생물학이 한 창 꽃피우던 시기에 다양한 프로젝트에 참여한 사람으로서 꼭 기록하고 싶은 내용이 있습니다. 의학 생물 분야의 연구와 결과에 대해 막연한 환상보다는 비판어린 눈으로 인프라가 구축되길 희망하며, 또한 정직하게 일하는 많은 사람들을 위로하는 글이라 생각되어 감히 적습니다.

연구 기간 동안 시대적 강자들의 횡포와 비리를 보았습니다. 시대적 강자라 함은 지식기반이 두루 형성되지 못해 충분한 비판세력이 존재하지 않은 상태를 이용하여 권력, 돈, 알파한 지식으로 비뚤어진 선점을 차지한 사람들을 말합니다. 1] 외국 유학을 통한 과장된 우월의식, 외국 연구진들과의 사업적 공약을 통한 유명 해외저널에 논문출판 그리고 언론 로비, 그리고 그들의 만연한 사대주의적 가치관에 의한 독창적이고 자생하는 국내 연구들의 평가 절하 등을 보았습니다. 2]석사급 이상 전문 인력들의 하급화 및 저인급화, 여러 회사들이 공동으로 일하는 가운

데 비밀비재하게 발생하는 적절하지 못한 자료의 보안, 관리 및 결과의 허위보도, 준비되지 않은 상태에서 벤처들이 살아남기 위한 사기성 사업, 국립대학 교수님들이 벤처 사업을 할 때 발생하는 부조리와 국가 세금의 낭비, 연구 보다 돈을 벌기 위해 썩은 동아줄을 명예의 줄로 착각하고 현실과 부끄럽게 타협하는 교수님들을 보았습니다. 3]국가 연구비로 수행된 연구가 투명하고 때론 공개되어야 하는데도 불구하고 연구를 수행한 집단이 이익집단으로 둔갑하여 서로 경쟁을 일삼거나 그 결과의 형평을 살피기 어렵게 자원을 관리하는 현실, 국가기관의 역사적 가치관의 부재에 의한 근시안적 대책과 국가자원의 낭비도 보았습니다. 이 모든 일들이 얼마나 심각하고 참신한 연구자들의 희망을 짓밟았는지도 보았습니다. 결국 이와 같은 행위들은 역사의 오점을 남기며 오래가지 않고 결국 폐망의 길로 가게 되는 것도 보고 있습니다. 특히 서 박사님, 강 사장님은 위 내용의 한가운데에 있었음을 부끄럽게 여기시길 바랍니다.

감사할 일은 시대적 강자가 선점을 차지하는 척박한 시기에도 겸손하고 열린 마음으로 때론 독창적인 아이디어로 연구하시는 멋진 분들이 존재하고 그들의 끊임없는 노력으로 좋은 연구 성과를 내고 국가에 도움을 주고 있다는 것입니다. 그들은 언론을 이용하지 않으며 조용히 성실히 일을 수행합니다. 좋은 것만을 경험하고 누릴 수도 있는 나이에 이 모든 부조리함이 일어나는 현실을 보고 체험하고 기록하게 해주신 하나님께 감사드립니다. 때론 이런 일들에 당황스럽고 함구하면 공조자가 된다는 현실이 힘들었지만 가족들의 사랑과 희생 그리고 하나님의 놀라운 계획에 용기를 잃지 않고 부조리함을 알리고 때론 투쟁하며 걸어 나갈 수 있었습니다. 제가 보낸 모든 메일과 기록과 일들이 역사적으로 위 내용들을 증명할 것입니다. 제가 더 큰 사람이었다면 하나님께 소망하여 사랑으로 그들을 감화하는 자가 되었을 텐데 아직은 작은 사람이어서 그 기간 동안 전 투쟁하는 자가 되었습니다.

삶의 승자임을 보이신 서일 교수님, 신동천 교수님, 남정모 교수님, 김진우 교수님, 박상철 교수님, 이용욱 사장님, 이종은 사장님, 박한오 사장님, 송광현 사장님, 김익기 선생님, 전상원 선생님, 회사 다닐 때 많은 도움을 주신 이호영 이사님, 김재홍 이사님, 정일경 사장님, 프로정신으로 연구를 도와주신 신동직 교수님, 허

정욱 연구원, 남궁현 선생님, 김숙 팀장님, 항상 좋은 조언을 해주신 강대룡 선생님, 생물정보학 커뮤니티에 참여하게 배려해주신 오흥범 교수님, 임신 중에도 연구원으로 뽑아주신 이동순 교수님, 의대 박사과정을 중도에 포기했을 때 위로를 주신 백자현 지도 교수님, 역학을 가르쳐주신 오희철 교수님, 지선하 교수님, 연구자의 말을 귀담아 들어주신 조성일 교수님, 논문을 지도해주신 교수님들, 위 분들께 각별히 깊은 감사들 드립니다. 지도자와 선각자의 모습으로 제게 많은 아이디어를 주신 이재승 교수님, 김진우 교수님, 서일 교수님, 신동천 교수님, 남정모 교수님은 제게 참으로 귀한 스승입니다.

한 가정의 엄마가 되어 힘들고 바빠서 논문을 충분히 다듬지 못 한 상태로 출판하게 되었습니다. 지도 교수님께 누가되는 것 같아 무엇보다도 죄송하고 부족한 제자를 길러주시고 힘든 시기에도 화평과 온화의 힘을 보여주셔서 감사합니다. 좀 더 정진해서 유능한 제자로 교수님의 연구를 도울 수 있도록 노력하겠습니다.

나의 끊임없는 사랑과 삶의 교훈이며 원동력인 부모님, 언니들과 동생, 시부모님, 남편과 딸, 무엇보다도 논문을 쓰는 동안에 아빠, 엄마, 윤희 언니, 윤정 언니, 동생 동환, 남편, 나의 예쁜 딸에게 무척이나 감사하고 미안했습니다. 모두 합심하여 절 도와주었기에 부족한 제가 하나님과의 약속을 지킬 수 있었습니다. 아빠가 평생 연구하시고 헌신하신 모교를 위해 제가 노력할 수 있어서 즐거웠으며 5년 동안 제게 큰 힘이 되어주셔서 감사합니다. 엄마의 희생에는 그저 눈물만 납니다. 항상 옆에서 든든히 날 지켜주고 위로해준 남편, 뱃속에서부터 지금까지 건강하게 자라주고 내 삶의 의미가 되어 준 내 아가, 항상 하나님의 말씀을 전해준 윤희언니 모두 마음에 깊이 새기며 은혜에 보답하겠습니다.

차 례

표차례.....	ii
그림차례.....	iii
부록차례.....	iv
국문요약.....	v
제1장 서론.....	1
1.1 연구배경.....	1
1.2 연구목적.....	5
제2장 연구방법.....	7
2.1 연구의 틀.....	7
2.2 연구대상 및 자료수집.....	8
2.3 변수의 측정방법.....	8
2.4 유전자 및 표지자 선정.....	9
2.5 혈액 채취 및 DNA분리.....	9
2.6 유전자 타이핑.....	9
2.7 통계분석.....	10
제3장 연구결과.....	11
3.1 연구대상의 특성.....	11
3.2 분석에 사용된 유전자의 특성.....	12
3.3 단일 유전자좌에 기초한 분석.....	14
3.4 Haplotype에 기초한 분석.....	22
3.5 여러 유전자좌에 기초한 분석.....	29
제4장 고찰.....	33
제5장 결론.....	38
참고문헌.....	40
부록.....	47
영문요약.....	48

표 차 례

Table 1. Characteristics of study subject	11
Table 2. Specific genes and variants used in the study	13
Table 3. The results (P-value) of Hardy-Weinberg equilibrium in hypertensive and hypotensive	15
Table 4. Associations between specific markers and systolic blood pressure	18
Table 5. Associations between specific markers and diastolic blood pressure	19
Table 6. The effects of specific markers on systolic blood pressure by inheritance of model	20
Table 7. The effects of specific markers on diastolic blood pressure by inheritance of model	21
Table 8. The results of likelihood ratio test between specific gene and blood pressure based on haplotypes	28
Table 9. The results of haplotype trend regression test	28
Table 10. Multifactor dimensionality reduction analysis in systolic blood pressure	30
Table 11. Multifactor dimensionality reduction analysis in diastolic blood pressure	32

그림 차례

Figure 1. The frame of the study	7
Figure 2. ADRB2 linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive	26
Figure 3. GRK4 linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive	26
Figure 4. AGT linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive	27
Figure 5. ACE linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive	27

부 록 차 례

Table 1. Characteristics of study subjects.....	47
---	----

국 문 요 약

청소년 고혈압과 후보 유전자들의 연관성 연구: Kangwha study

소아 및 청소년 본태성 고혈압은 성인 본태성 고혈압에 비해 환경적 소인 보다 유전적 소인이 더 클 것으로 기대되므로 고혈압 관련 유전자를 탐색하는데 유용한 형질로 평가되고 있다. 따라서 본 연구에서는 수축기와 이완기 혈압을 별도의 형질로 규정하고 각 혈압의 극단값 분포를 활용하여 청소년 본태성 고혈압에 대한 후보유전자들의 연관성 및 상호작용을 평가하고자 하였다. Kangwha study의 청소년 470명을 대상으로 수축기와 이완기 각 형질에 대해 15세부터 17세에 해당하는 3년 혈압자료의 평균을 이용하여 평균의 양극단값 분포(약 10%)에 해당하는 100명을 고혈압군과 저혈압군으로 각각 정의한 후 분석 대상으로 하였다. 사용된 표지자들은 6개 기전 11개 유전자내의 총 25개이며 이들 중 다형성을 보인 5개 기전 10개 유전자내의 총 22개를 최종 연관성 분석에 사용하였다. 단일 유전자에 기초한 분석으로는 대립 유전자(allele) 및 유전자형(genotype)의 빈도 차이에 대한 카이스퀘어검정과 대립유전자의 상가적 영향(addictive affect)에 대한 경향성 검정을 수행하였고, 오즈비를 이용하여 유전모형을 평가하였다. Haplotype에 기초한 분석으로는 먼저 expectation maximization (EM) 방법을 이용하여 haplotype을 재구성한 후 linkage disequilibrium(LD)를 평가하였고 이에 근거해 우도비 검정(likelihood ratio test)을 수행하였다. 또한 연관성이 있는 특정 haplotype을 발굴하기 위해 haplotype 경향회귀분석을 수행하였다. 여러 유전자좌에 기초한 분석으로는 최근에 비모수적 방법으로 유용성과 타당성이 증명된 multifactorial dimensionality reduction(MDR) 분석을 수행하였고 연관성을 보이는 단일 유전적 표지자를 하나씩 제거하는 모델을 통해 전체 상호작용에 어떤 영향을 주는지 평가하였다. 단일 유전자좌에 기초한 분석 결과 표지자 1, 19, 21(유전자 ADRB2, CYP11B2, REN)은 수축기 고혈압에서 표지자 1, 9, 19, 20(유전자

ADRB2, GRK4, CYP11B2, ADD1)은 이완기 고혈압에서 각각 연관성이 있는 것으로 평가되었다. 또한 오즈비를 이용한 유전모형 평가 결과 수축기 고혈압에서는 표지자 21, 이완기 고혈압에서는 표지자 9가 낮은 빈도의 대립유전자 우성모형을 표지자 20의 경우는 이완기 고혈압에서만 높은 빈도의 대립유전자 우성모형을 따르는 것으로 평가되었다. 표지자 1과 19는 이완기 고혈압에서는 빈도가 낮은 대립유전자가 동형접합자가 아닌 이형접합자일 때 위험도를 감소 혹은 증가시키는 공우성모형으로 평가되었고 수축기 고혈압에서는 낮은 대립유전자의 동형접합자가 고혈압군 혹은 저혈압군에서 존재하지 않아 공우성모형을 따르는지 확인할 수 없었다. 단, 이형접합자 일 때 우성모형을 따르는 것으로 평가되었다. Haplotype에 기초한 분석 결과 수축기 및 이완기 고혈압에 대해 ADRB2의 표지자 1, 2, 3으로 구성된 C-A-C는 고혈압 위험을 감소시키는 것으로 평가되었으며, 이완기 고혈압에 대해 GRK4의 표지자 1, 2, 3으로 구성된 C-T-C와 C-C-C는 고혈압 위험을 감소시키고 표지자 2, 3으로만 구성된 C-T는 고혈압 위험을 증가시키는 것으로 평가되었다. 여러 유전자좌에 기초한 분석 결과 22개 표지자로 구성된 2차 상호작용 모형에서는 표지자 1과 3의 상호작용이 가장 높았고, 주효과가 가장 높았던 표지자 1을 제외하고 2차 상호작용을 평가한 모형에서는 표지자 3과 19의 상호작용이 가장 높았다. 표지자 1과 3은 유전자 ADRB2에 해당하며, 표지자 19는 CYP11B2에 해당하므로 유전자 ADRB2와 CYP11B2가 수축기 및 이완기 고혈압에서 상호작용을 함을 알 수 있었다. 결론적으로 본 연구의 연구디자인과 결과는 국내외 소아 및 청소년 본태성 고혈압과 후보유전자의 연관성 연구에서 볼 수 없었던 새로운 것으로 첫째, 고혈압에 관련된 다양한 기전내 여러 후보유전자들에 대하여 체계적으로 평가를 수행함 둘째, 여러 분석 방법에서 일치된 결과를 통해 고혈압에 연관된 유전적 표지자들을 신뢰성 있게 발굴함 셋째, 실험실적으로 규명하기 어려운 유전적 표지자들 혹은 유전자들 간의 상호작용을 규명함 넷째, 혈압의 양극단값 분포를 활용하여 기존연구에서의 표본추출에 대한 편의를 없앴 다섯째 수축기와 이완기에 관여하는 후보유전자들을 발굴함 여섯째 3년 동안의 혈압 자료의 평균을 사용하여 혈압 측정에 신뢰성을 부여함에 큰 의의를 둘 수 있으며 성인 고혈압의 유전적 기전을 이해하는데도 도움을 줄 것으로 기대된다. 단, 본

연구 목적과 연구디자인으로는 BMI에 대해 심도있게 평가할 수 없었으나 고혈압
군은 일반적으로 BMI가 높아 BMI에 관련된 유전자가 혼란변수로 작용할 가능성
이 있으므로 후속 평가가 필요하다.

핵심되는 말 : 청소년 고혈압, 연관성 분석, Haplotype, ADRB2, GRK4, CYP11B2,
ADD1, REN, 유전자좌의 상호작용, MDR

제 1장. 서 론

1-1. 연구배경

고혈압은 일반적으로 수축기 혈압이 140mmHg 이상, 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 혈압을 말하며, 50세 이상 성인들에서 매우 흔하게 발생하는 일종의 퇴행성질환이다. 만성적인 고혈압은 혈관 조직과 혈관조직의 표적장기(심장, 뇌, 신장)에 점진적으로 손상을 주어, 치명적인 급성 및 만성 합병증을 유발하므로 발생 기전에 대한 이해와 조기 예방이 절실히 필요한 질환이다(Johnson, 2005).

고혈압은 다양한 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 영향을 받는 다인자성 질환(multifactorial disease)이며, 고혈압의 유전적 기여도는 30-45%로 보고되고 있다(Ward, 1990). 단일 유전성 고혈압과 그 유전자의 변이에 따른 혈압의 변화에 대한 연구도 보고되고 있기는 하나, 동물 연구와 인간을 대상으로 한 많은 연구들은 혈압의 조절에 특정 소수의 유전자가 관여하는 것이 아니라 여러 기전에 속하는 다수의 유전자가 상호작용을 하여 개체 간 혈압의 분포 차이를 형성한다는 가설을 지지하고 있다(Hunt, 1993).

고혈압은 원인이 분명하지 않은 본태성 고혈압(primary essential hypertension)과 원인 질환이 뚜렷한 이차성 고혈압(secondary hypertension)으로 분류되며, 고혈압 환자의 85-90% 이상에 해당되는 본태성 고혈압에서의 혈압상승은 환경적 인자들에 민감한 유전적 소인에 기인할 것으로 평가되고 있으며, 환경적 인자로는 비만, 운동부족, 식염의 과잉섭취, 영양불균형, 과도한 육체노동, 정신적인 흥분이나 긴장, 불안, 음주 등이 있다.

본태성 고혈압의 경우는 특정질환의 원인으로 혈압이 상승된 상태가 아니므로 혈압이라는 양적형질(quantitative trait)에 대한 이해와 혈압조절에 관여하는 유전적 소인을 평가하는데 유용한 질환으로 알려져 있다. 성인의 경우뿐 아니라 소아 및 청소년(0~18세)의 경우에도 발생하며 미국의 경우 소아 및 청소년의 1~3%가 본태성 고혈압을 가지고 있는 것으로 보고되었다(Sulochana, 1981; Falkner, 1995; Kaplan, 1994; Sadowski, 1996; Bartosh, 1999; David, 2001; Salgado, 2003; Varda, 2005).

소아 및 청소년 본태성 고혈압은 성인 본태성 고혈압에 비해 환경적 위험요인보다 유전적 영향이 더 클 것으로 기대되므로 고혈압 관련 유전자를 탐색하는데 더욱 유용한 질환으로 평가되고 있다(Kaplan, 1994).

고혈압의 발생 기전 및 혈압조절에 관여하는 유전자 혹은 유전적 표지자를 발굴하기 위한 많은 연구들은 주로 성인 고혈압군을 대상으로 기존에 잘 알려진 복합형질(complex disease)에 대한 유전적 평가 방법인 후보 유전자 접근방법(candidate gene approach), 유전체 탐색방법(genome-wide search), 중간형질 이용방법(intermediate phenotype approach), 비교유전체 방법(comparative genomics) 등을 사용하고 있으며 혹은 적절히 방법들을 조합하여 사용하고 있다(David, 2001; Peter, 2003).

후보 유전자 접근 방법은 복합형질과 양적형질에 관여하는 유전자들 내에 기능에 영향을 주는 염기 다형성(polymorphism)의 존재하며 이들의 조합에 의해 특정 질환에 민감한 집단이 형성된다는 것을 기본 전제로 하며 특히 분석의 용이성, 효율성 및 경제성으로 현재 가장 많이 사용되고 있다(Patrick, 1999; Peter, 2002). 최근 후보 유전자 접근방법은 유전자 내외의 방대한 SNP(single nucleotide-polymorphism) 표지자의 발굴, haplotype을 재구성하는 통계적 알고리즘의 개발, LD(linkage-disequilibrium)에 근거한 haplotype 블록의 존재 규명, 고혈압에 관련한 다양한 분자생물학적 연구 및 동물모델 연구를 통한 지속적인 후보유전자의 발굴, 다양한 유전자좌에서의 상호작용 평가에 대한 알고리즘 개발로 더욱 각광 받고 있다(Gillian, 2000; Kenneth, 2000; Lon, 2001; Kenneth, 2002; David, 2003; Lon, 2003; Scott, 2004) 그러나 후보 유전자 접근 방법은 종종 민족의 유전적 이질성, 샘플수의 차이, 표지자의 특성, 유전자-유전자, 유전자-환경 상호작용 등에 의해 결과가 상이하여 해석에 어려움이 발생하기도 한다. 이러한 한계점이 있음에도 불구하고 복합질환이나 양적형질의 유전적 요인을 평가하는데 있어 현재의 분자생물학적, 실험실적 접근에 비해 인간집단을 대상으로 한 해석 및 적용의 용이성, 집단의 다양한 감수성 요인을 평가, 다양한 유전자간의 상호작용 평가, 연구디자인의 다양성 및 재평가 용이성 등 여러 장점으로 인하여 중요한 방법으로 인식되고 있다(Joseph, 1998; Marc, 1999; Monika, 2000; Michael, 2003; Peter, 2003;

Nobuyuki, 2004).

고혈압의 후보 유전자는 인간을 대상으로 한 연구에서 혈압 혹은 고혈압에 연쇄 혹은 연관이 평가된 유전자이며 이들 유전자는 혈압변화의 세포적 기능 및 생리적 기능에 관계하며 특히 심장 및 신장 기능에 영향을 주는 유전자들이다. 혹은 비교유전체 방법으로 다른 동물에서 혈압과 관련된 유전자로 사람과 상동성이 발견된 유전자를 대상으로 한다. 현재까지는 주로 renin-angiotensin-aldosterone system(RASS), sodium epithelial channel, catecholaminergic/adrenergic function, renal kallikrein system, lipoprotein metabolism, hormone receptors, growth factors, nitric oxide(NO) dependent and NO independent vasodilation, sodium balance 기전에 속하는 유전자들이 주로 후보 유전자로 사용되고 있다(David, 2001).

성인의 본태성 고혈압보다 유전적 영향이 비교적 더 크게 작용할 것으로 기대되는 소아 및 청소년 본태성 고혈압은 그 형질의 유용성에도 불구하고 후보유전자 접근을 이용한 환자-대조군 연구가 아직 활발하지 않다. BMPR2, CYP3A1 유전자 등은 최근에 보고 되었지만(Givens, 2003; Grunig, 2004) 분석 방법으로는 연쇄 분석(linkage analysis)을 채택하고 있다. 환자 대조군을 이용한 연관분석(association study)에서는 최근 ScaI에 대한 연구가 있으나 소아의 고혈압과의 연관성을 증명하지 못 했으며, 단지 BMI에 유의하다고 평가하고 있다(ZorcPI-eskovic, 2004). 그 외 연구에서는 주로 성인 고혈압의 위험요인으로 평가된 RASS에 해당하는 AGT, REN, ACE, CYP11B2, ATR1 등의 유전자들에 대해서 연구되고 있으며 각 해당 유전자들의 한 두 개의 기능성 SNP(functional SNP)만 평가하고 있다. 많지 않은 소아 및 청소년 본태성 고혈압의 후보유전자 평가 논문들 안에서도 해당 유전자들의 연관성에 이견이 존재하며, 다양한 유전자에 대한 평가 및 유전자-유전자, 유전자-환경에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다(Boitsov, 2003; Petrovic, 2003; Porto, 2003; Gardier, 2004; Franken, 2004; Safar, 2004).

소아 및 청소년 본태성 고혈압이 성인 본태성 고혈압에 비해 혈압에 대한 유전적 요인을 규명하는데 유용할 것이라는 기대에도 불구하고 아직까지 후보유전

자들의 연관성이 극명하게 나타나지 않는 것은 성인과 소아 및 청소년 본태성 고혈압에 관여하는 유전적 기전의 차이 때문일 수도 있으나(Grunig, 2004; Wilk, 2004) 혈압은 지속성과 항상성이란 특성이 존재하므로 소아 및 청소년 본태성 고혈압에 관련한 유전자는 성인의 고혈압에도 영향을 줄 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 유전적 연관성이 극명하게 나타나지 않는 주 원인에 대해 두 가지를 가정해 보았다. 첫째, 소아 및 청소년 본태성 고혈압에 대한 정의가 성인에서와 다르게 수축기 혹은 이완기 혈압을 성, 연령, 키를 고려한 상위 5%에 해당하는 자를 고혈압군으로 채택하고 정상혈압군은 수축기 및 이완기 혈압이 정상 혈압분포에 있는 자를 채택하는 다소 임의적 정의를 따르기 때문이다. 일반적으로 소아 및 청소년기에 혈압이 높은 사람이 성인이 되어서도 높은 상태를 유지한다는 혈압의 지속성을 전제로 소아 및 청년기 본태성 고혈압과 정상혈압군을 평가하나, 소아 및 청년기 본태성 고혈압으로 평가된 일부 집단이 성인의 본태성 고혈압으로 완전히 진행되는 것도 아니며, 정상혈압군에 있는 소아 및 청년 중 고혈압에 대한 민감성을 가지고 있음에도 불구하고 아직 성인과 같이 오랜 기간 누적되는 환경적인 위험요인에 노출되지 않아 대조군으로 배정된 소아 및 청년도 다수 존재하므로 혈압의 조절에 관여하는 유전적 효과를 평가하는데 한계가 있을 것으로 보인다(Blood pressure education program; 1996; Varda, 2005). 둘째로 소아 및 청소년을 대상으로 한 연구에서 수축기 및 이완기 혈압을 별도의 형질로 나누어 평가하지 않기 때문이다. 즉 성인의 본태성 고혈압의 경우 수축기 및 이완기 모두 상승된 상태이며 상승된 혈압은 혈관조직의 표적장기에 점진적 손상을 야기하므로 수축기와 이완기의 혈압상태를 묶어서 고혈압을 정의하는 것은 타당한 반면 소아 및 청소년 본태성 고혈압에 해당하는 수축기 및 이완기 혈압은 조직 손상을 야기할 만큼 높은 혈압이 아니므로 두 형질을 묶어 고혈압군으로 정의하고 정상혈압군과 비교하는 것 보다는 수축기 혹은 이완기 혈압을 별도의 형질로 보고 각 형질의 양극단값 분포를 활용하는 것이 정상혈압군 정의에 대한 편의를 제거할 수 있으므로 고혈압과 유전적 표지자의 연관성을 평가하는데 유용할 것으로 사료된다. 또한 최근 많은 성인 본태성 고혈압 연구에서 수축기 및 이완기 혈압에 관련한 유전자의 영향이 다르게 평가되고 있으므로 소아 및 청소년 본태성 고혈압

의 정의에 있어 형질을 나누어 유전적 효과를 평가하는 것은 타당할 것으로 보인다(Kopciuk, 2003).

현재까지 유전자들의 연관성 연구에 있어 소아 및 청소년 본태성 고혈압에 대하여 혈압의 형질을 나누어 고혈압군을 정의하거나 극단값 분포를 활용한 연구가 없으므로 이에 근거하여 한국인 소아 및 청소년 본태성 혈압에 관여하는 유전자들의 연관성을 평가하는 것은 의미 있는 시도일 것으로 생각된다.

1-2. 연구목적

본 연구는 Kangwha study 청소년 470명을 대상으로 수축기 및 이완기 각각의 혈압을 별도의 형질로 규정하고 각 혈압의 양극단값 분포를 활용하여 고혈압군과 저혈압군을 정의한 후 6개 기전 11개 유전자내의 총 25개의 표지자들과의 연관성을 평가하고자 하였다.

연구의 구체적인 세부목적은 다음과 같다.

첫째, 고혈압과 연관성을 평가할 표지자를 선정하고 한국에서의 다형성 여부 및 빈도를 조사하여 표지자로서의 가능성을 평가한다.

둘째, 단일 유전자좌에 기초한 분석으로 고혈압과 연관성이 있는 단일 표지자를 발굴한다.

셋째, haplotype에 기초한 분석으로 LD(linkage disequilibrium) 영역의 특징을 평가한 후 고혈압과 연관성이 있는 haplotype을 발굴한다.

넷째, 여러 유전자좌에 기초한 분석으로 표지자들 및 후보유전자들 간의 상호작용을 평가한다.

제 2 장. 연구방법

2-1. 연구의 틀

본 연구의 틀은 Fig 1과 같다. 청소년 본태성 고혈압과 저혈압군을 정의하고, 혈압 관련 후보유전자 및 유전적 표지자를 선정한 후 단일 유전자좌에 기초한 분석, haplotype에 기초한 분석, 여러 유전자좌에 기초한 분석을 수행하였다.

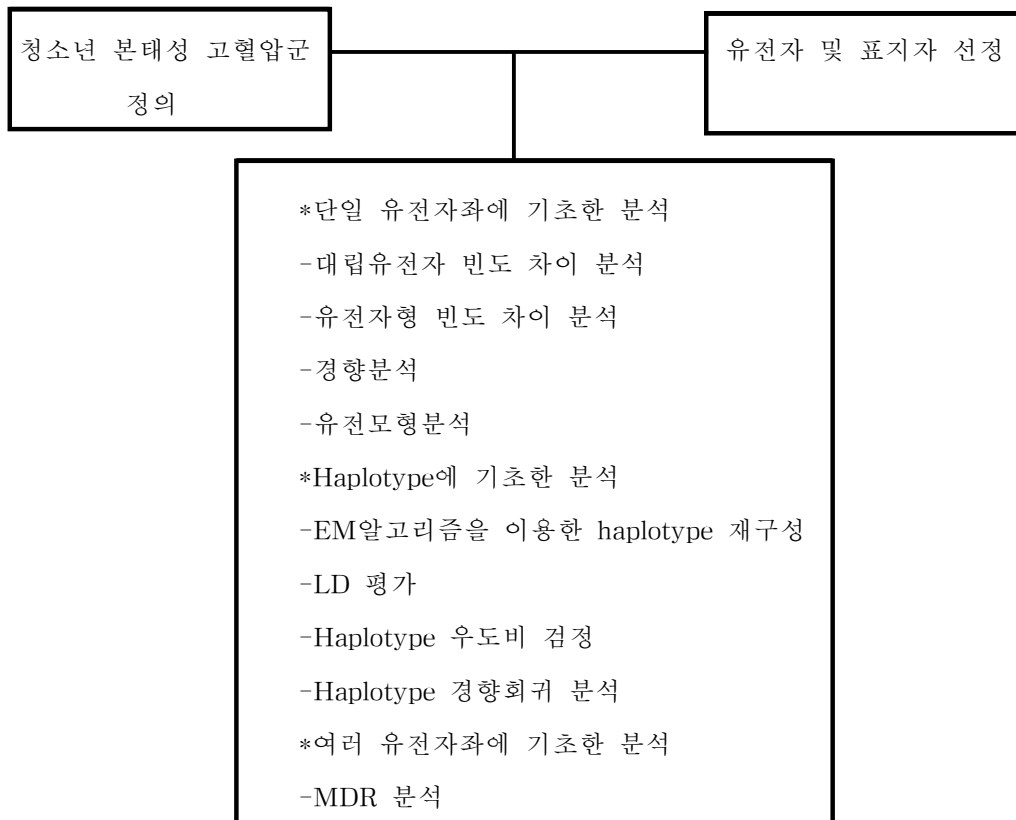


Figure 1. Frame of the study

2-2. 연구대상 및 자료수집

본 연구의 연구대상은 서일 등(1997)이 연구한 Kangwha study에서 선정하였다. Kangwha study는 1986년 당시 경기도 강화군 강화읍에 소재한 4개 초등학교 1학년생을 전체로 코호트를 구성하여 12년간의 혈압 및 관련 요인을 조사한 연구이다.

본 연구에서는 12년간(86년도에서 97년도까지)자료 중 혈압자료와 혈액자료가 보관되어 있는 470명을 대상으로 수축기 및 이완기 각 혈압에 기초하여 15세에서 17세까지의 3년 동안 측정된 혈압의 평균을 이용하였다. 각 혈압의 평균값을 높은 순서로 정렬 후 상위 50명과 하위 50명을 각 혈압에서 선택하였으며 고혈압군과 저혈압군으로 정의하였다.

2-3. 변수의 측정방법

Kangwha study는 1986년부터 1997년까지 매년 동일한 시기에 조사대상자들이 재학하고 있는 학교를 방문하여 수축기 및 이완기 혈압, 신장, 체중을 측정하였고, 수축기 혈압은 Korotkoff phase I, 이완기 혈압은 Korotkoff phase IV와 V를 측정하고 이완기 혈압에 대한 분석에서는 Korotkoff phase V를 사용하였다. 혈압 및 모든 신체 계측치는 2회 측정한 값의 평균을 사용하였다.

2-4. 유전자 및 표지자 선정

각 유전자의 선정은 Medline에서 MESH 용어에 근거해서 hypertension, gene, polymorphism, haplotype, case-control study 등을 조합하여 검색하고 데이터베이스를 구축 후 해당 유전자의 중요도 및 관련성에 근거하여 선정하는 방법과 혈압과 유전자 상호작용에 관련된 대표 저널들을 참조하는 방법을 사용하였다. 각 유전자의 유전적 표지자는 세포내 기능에 영향을 주는 표지자를 우선적으로 선택하였고, ADRB2에 대해서는 기능에 영향을 주지 않는 맵핑 표지자도 포함하였다.

6개 기전에 속하는 11개의 총 25개의 표지자를 최종 선택하였다. 선택된 후보 유전자는 다음과 같다. Renin-angiotensin-aldosterone system(RASS)에 속하는 AGT, ACE, REN, AGTR1, CYP11B2 유전자와(AGT, ACE, AGTR1은 혈압조절에서 vasoconstriction에 속함), catecholaminergic/ adrenergic function에 속하는 ADRB2, GNB3, nitric oxide(NO) dependent vasodilation에 속하는 CPS1, and NO independent vasodilation에 속하는 CYP2C8, sodium balance에 속하는 GRK4, 혈압에서의 기전이 잘 알려져 있지 않은 후보유전자 Alpha-adducin (ADD1).

2-5. 혈액 채취 및 DNA 분리

EDTA 전혈시험관을 이용하여 혈액을 채취하였고, DNA는 혈액 50ml 정도에서 puregene kit(Gentra system, Plymouth, MN, USA)를 이용하여 분리 하였고 증류수 20ul에 1ul당 100ng 정도의 농도가 되도록 보관하였다.

2-6. 유전자 타이핑

정상혈압인 청소년 48명을 대상으로 아직 국내에서 빈도가 확인되지 않은 표지자에 대한 빈도를 먼저 조사하였고, 이는 48명을 대상으로 할 경우 다형성이 있는 표지자 중 빈도가 낮은 대립유전자의 빈도가 5% 이상인 것들은 99% 검출된다는 선행연구에 근거하였다. 유전자 타이핑 분석방법은 ABI SNaPshot Multiplex kit(Applied Bio systems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 genotyping 하였다. 타이핑에러가 있거나 분석 결과가 나오지 않은 표지자에 대해서는 여러번 재분석을 통해 결과를 확인하였다.

유전자 타이핑에 대한 구체적 내용은 다음과 같다. 각 SNP를 포함하는 부위를 약 500kb 이상 크기를 갖는 증폭산물을 얻도록 PCR을 수행하고 정제한 후 SNP 부위 바로 앞까지 결합되도록 시발체를 제조하였다. 제조된 시발체를 변성된 주형과 결합 후 각 염기를 동정할 수 있는 4개의 형광물질로 표지된 dideoxy nucleotide와 taq polymerase를 첨가하여 증폭한 후 Shimp Alkaline Phosphatase

를 혼합하여 37도에서 1시간 반응하였다. 반응 산물의 효소를 불활성화 하기 위해 72도에서 15분간 반응한 후 정제하였다. 얻어진 산물은 ABI Prism 3700 Genetic Analyzer를 이용하여 분석하였다.

2-7. 통계 분석

HWE 평가, 단일 유전자좌에 기초한 분석, haplotype에 기초한 통계분석은 SAS genetics 프로그램을 사용하였고 모델에 근거한 위험도 평가는 SNPalyze 프로그램 version 4.0을 사용하였다. 여러 유전자좌에 기초한 분석은 MDR 프로그램을 사용하였다. 단일 유전자에 기초한 분석은 유전자형에 기초한 카이스퀘어검정, 대립유전자형에 기초한 카이스퀘어검정, 그리고 대립유전자의 빈도에 대한 경향성 검정을 수행하였다. 또한 유전모형 평가는 오즈비를 이용하였다. Haplotype에 기초한 분석은 먼저 EM(Expectation Maximization) 방법 이용하여 haplotype을 재구성한 후 각 유전자내의 표지자들간의 연쇄불평형을 분석하고 이에 근거해 우도비 검정(likelihood ratio test)를 수행하였고 특정한 haplotype의 효과를 알아보기 위해 haplotype 경향회귀분석을 수행하였다. 여러 유전자좌에 기초한 분석은 MDR(mutifactor dimensionality reduction)분석을 수행하였다.

3. 연구결과

3-1. 연구대상의 특성

Table 1은 분석 대상자의 일반적인 특성이다. 수축기에 기초한 고혈압군과 저혈압군에서 수축기 혈압 평균은 t검정에서 유의한 차이가 있음을 확인하였다. 고혈압군은 남성의 비율이 높고 저혈압군은 여성의 비율이 높았다. 이완기에 기초한 고혈압군과 저혈압군에서 이완기 혈압 평균은 t검정에서 유의한 차이가 있음을 확인하였다. 고혈압군과 저혈압군의 남성과 여성의 비율은 비슷했다.

Table 1. Characteristics of study subjects

Blood pressure	Male					Female				
	N	Mean	SD	Min	Max	N	Mean	SD	Min	Max
SBP										
Hypertensive	35	136.5	8.8	130	161	15	135.2	5.1	130	141
Hypotensive	8	100.8	2.4	98	104	42	100.6	3.1	96	105
DBP										
Hypertensive	26	77.9	4.9	73	89	24	79.7	5.2	73	94
Hypotensive	25	55.7	2.9	47	59	23	53.9	2.9	49	58

SBP indicates systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

3-2. 분석에 사용된 유전자의 특성

Table 2 는 분석에 사용된 유전자 및 유전적 표지자의 특성을 보여주고 있다. 총 6개 기전에 속하는 11개 유전자내의 총 25개의 표지자에 대한 유전자내 위치 (단백질 코드 이전의 위치는 염기위치로 단백질 코드 이후의 위치는 단백질 위치로 명시), 기전 분류, 유전자의 염색체 위치를 명시하였다.

No independent vasodilation 속하는 CYP2C8의 3 개 표지자는 정상혈압군 48명을 대상으로 한 유전자타이핑에서 다형현상이 보이지 않아 연관성 분석에서 제외하였다. 유전적 표지자의 유전자형의 빈도는 table 4에 명시하였다.

분석을 용이하게 하고 결과를 통일성 있게 보여주고자 ADRB2의 표지자 T-47C, G16R, Q27E, L84L, G351G, L413L, GRK4의 표지자 R65L, A142V, A486V, CPS1의 표지자 T1405N, GNB3의 표지자 C825T, AGT의 표지자 -6G/A, T174M, M235T, ACE의 표지자A-270T, T-93C, ID, G2350A, CYP11B2의 표지자 T-344C, ADD1의 표지자 G460W, REN의 표지자 G2646A, AGTR1의 표지자 A1166C에 순차자적으로 1번부터 22번까지 표지자 번호를 부여하였다. 단 Haplotype 분석에 사용된 표지자들은 표지자들의 유전자 내의 위치 순서에 따라 순차적으로 번호를 부여하였다.

Table 2. Specific genes and variants analyzed

Pathway	Gene	Candidate variant(s)	Chromosome
Rass	ACE	A-270T, T-93C, ID, G2350A	17
	AGT	G-6A, T174M, M235T	1
	AGTR1	A1166C	3
	REN	G2646A	1
	CYP11B2	T-344C	8
Sodium balance	GRK4	R65L, A142V, A486V	4
No dependent vasodilation	CPS1	T1405T	2
No independent vasodilation	CYP2C8	R139K, K269F, K399R	10
Catecholaminergic/adrenergic function	ADRB2	T-47C, G16R, Q27E L84L, G351G, L413L	5
	GNB3	C825T	12
?	ADD1	G460W	4

3-3. 단일 유전자좌에 기초한 분석

가. 수축기에서 유전적 표지자의 HWE 분석

수축기 고혈압군과 저혈압군에 사용된 모든 유전적 표지자는 HWE를 만족하였다(table 3).

나. 이완기에서 유전적 표지자의 HWE 분석

이완기 고혈압군과 저혈압군에 사용된 표지자 중 저혈압군에서 5, 14가 HWE를 만족하지 않았고, 고혈압군에서는 표지자 3, 9가 HWE를 만족하지 않았다(table 3). 본 연구에서 정의한 저혈압군은 수축기와 이완기 혈압 평균이 71/59 mmHg으로, 이 수치는 선행 연구인 서일 등(2000)이 연구한 혈압의 장기변화와 고혈압 발생에 대한 유전역학적 연구에서 본 연구에 사용된 470명 혈압자료를 바탕으로 혈압이 낮은 순서로 176명을 구성하여 매년 혈압 평균을 측정한 결과와 비교했을 때 수축기의 경우는 9세 소아의 평균혈압과 유사하며, 이완기 혈압의 경우는 7세 소아의 평균혈압과 유사하다. 따라서 저혈압의 형질에 대해서도 충분히 HWE가 깨질 수 있고 또한 이완기 고혈압군과 저혈압군에서 HWE가 깨진 표지자가 상이하므로 모든 유전적 표지를 연관성 분석에 포함시켰다.

Table 3. The results(p-value) of Hardy-Weinberg Equilibrium test in hypertensive and hypotensive

Marker	SBP		DBP	
	Hypertensive	Hypotensive	Hypertensive	Hypotensive
1	0.43	0.40	0.14	0.26
2	0.25	0.33	0.74	0.55
3	0.53	0.70	0.04	0.84
4	0.63	0.81	0.48	0.58
5	0.09	0.25	0.57	0.02
6	0.56	0.44	0.53	0.88
7	0.48	0.72	0.43	0.48
8	0.07	0.63	0.23	0.77
9	0.07	0.57	0.01	0.35
10	0.37	0.38	0.21	0.77
11	0.77	0.11	0.10	0.28
12	0.71	0.17	0.14	0.88
13	0.44	0.43	0.98	0.43
14	0.84	0.21	0.83	0.03
15	0.49	0.29	0.47	0.81
16	0.72	0.19	0.41	0.44
17	0.40	0.34	0.89	0.72
18	0.23	0.34	0.81	0.55
19	0.14	0.65	0.95	0.84
20	0.94	0.11	0.36	0.16
21	0.29	0.88	0.18	0.27
22	0.82	0.76	0.88	0.65

다. 수축기에서 유전적 표지자의 연관성 및 유전모형 평가

수축기 고혈압군과 저혈압군에서 유전적 표지자의 대립유전자 및 유전자형 빈도 차이 분석과 경향분석 결과 표지자 1, 19, 21이 유의한 연관성이 있는 것으로 평가되었다(table 4). Table 6은 대립유전자에 근거한 모델, 빈도가 낮은 대립유전자의 우성모델, 빈도가 높은 대립유전자의 우성모델을 평가한 결과이다. 대립유전자에 근거한 모델에서는 빈도가 높은 대립유전자를 1로 했을 때 빈도가 낮은 대립유전자의 오즈비를 구하여 빈도가 낮은 대립유전자가 고혈압 위험을 증가 혹은 감소시키는지 평가하였다. 수축기 고혈압에 대해 표지자 1과 21은 고혈압 위험을 감소시켰으며 표지자 19는 고혈압 위험을 증가시켰다. 우성모델의 평가 결과 표지자 1, 19, 21은 낮은 빈도의 대립유전자 우성모델을 따랐다. 그러나 표지자 1, 21의 경우 고혈압군 혹은 저혈압군에서 빈도가 낮은 대립유전자의 동형접합자가 없는 경우가 있어서 공우성모델에 대해서는 평가할 수 없었다.

라. 이완기에서 유전적 표지자의 연관성 및 유전모형 평가

이완기 고혈압군과 저혈압에서 유전적 표지자의 대립유전자 및 유전자형 빈도 차이 분석과 경향분석 결과 표지자 1, 9, 19, 20이 유의한 연관성이 있는 것으로 평가되었다(table 5). Table 7은 대립유전자에 근거한 모델, 빈도가 낮은 대립유전자의 우성모델, 빈도가 높은 대립유전자의 우성모델, 그리고 공우성 모델을 각각 평가한 결과이다. 대립유전자에 근거한 모델에서는 빈도가 높은 대립유전자를 1로 했을 때 빈도가 낮은 대립유전자의 오즈비를 구하여 빈도가 낮은 대립유전자가 위험도를 증가 혹은 감소시키는지 평가하였다. 이완기 고혈압에 대해 표지자 1과 20은 고혈압 위험을 감소시켰으며 표지자 9와 19는 고혈압 위험을 증가시켰다. 우성모델과 공우성 모델의 평가 결과 표지자 9는 낮은 빈도의 대립유전자 우성모델을 따랐다. 표지자 20은 높은 빈도의 대립유전자가 우성모델을 따랐다. 표지자 1, 9의 경우는 공우성 모델을 따랐다.

Table 4. Associations between specific markers and systolic blood pressure

Marker	Frequency(genotype)										P-value
	Hypertensive					Hypotensive					
	Major hom o, †	Hetero, †	Minor hom o, †	Major hom o, †	Minor hom o, †	Hetero, †	Hetero, †	Minor hom o, †	Major hom o, †	Minor hom o, †	
1	0.20 (TT)	0.80 (CT)	0 (CC)	0.48 (TT)	0.46 (CT)	0.06 (CC)	0.002	<0.001	0.321	0.284	
2	0.22 (GG)	0.58 (AG)	0.20 (AA)	0.28 (AA)	0.56 (AG)	0.16 (GG)	0.560	0.321	0.389	0.372	
3	0.84 (CC)	0.16 (CG)	0 (GG)	0.90 (CC)	0.10 (CG)	0 (GG)	0.671	0.389	0.884	0.887	
4	0.16 (GG)	0.44 (AG)	0.40 (AA)	0.38 (GG)	0.46 (AG)	0.16 (AA)	0.976	0.884	1.000	1.000	
5	0.32 (CC)	0.38 (CG)	0.30 (GG)	0.30 (CC)	0.42 (CG)	0.28 (GG)	0.920	1.000	0.763	0.773	
6	0.48 (AA)	0.40 (AG)	0.12 (GG)	0.46 (AA)	0.40 (AG)	0.14 (GG)	0.952	0.763	0.458	0.455	
7	0.82 (GG)	0.18 (GT)	0 (TT)	0.77 (GG)	0.20 (GT)	0.02 (TT)	0.560	0.458	0.279	0.314	
8	0.74 (CC)	0.20 (CT)	0.06 (TT)	0.62 (CC)	0.32 (CT)	0.06 (TT)	0.384	0.279	0.570	0.553	
9	0.24 (TT)	0.62 (CT)	0.14 (CC)	0.28 (TT)	0.46 (CT)	0.26 (CC)	0.208	0.570	0.494	0.496	
10	0.62 (CC)	0.36 (AC)	0.02 (AA)	0.60 (CC)	0.32 (AC)	0.08 (AA)	0.380	0.494	0.321	0.351	
11	0.26 (TT)	0.48 (CT)	0.26 (CC)	0.38 (TT)	0.38 (CT)	0.24 (TT)	0.417	0.321	0.706	0.697	
12	0.68 (AA)	0.28 (AG)	0.04 (GG)	0.68 (AA)	0.32 (AG)	0 (GG)	0.344	0.706	0.962	0.961	
13	0.81 (CC)	0.16 (CT)	0.02 (TT)	0.80 (CC)	0.20 (CT)	0 (TT)	0.545	0.962	0.683	0.670	
14	0.76 (CC)	0.22 (CT)	0.02 (TT)	0.70 (CC)	0.30 (CT)	0 (TT)	0.419	0.683	1.000	1.000	
15	0.36 (AA)	0.44 (AT)	0.20 (TT)	0.30 (AA)	0.56 (AT)	0.14 (TT)	0.467	1.000	0.774	0.766	
16	0.36 (CC)	0.46 (CT)	0.18 (TT)	0.28 (CC)	0.58 (CT)	0.14 (TT)	0.486	0.774	1.000	1.000	
17	0.40 (II)	0.42 (DI)	0.18 (DD)	0.34 (II)	0.54 (DI)	0.12 (DD)	0.450	1.000	0.884	0.885	
18	0.40 (AA)	0.40 (AG)	0.20 (GG)	0.34 (AA)	0.54 (AG)	0.12 (GG)	0.318	0.884	<0.001	<0.001	
19	0.56 (TT)	0.32 (CT)	0.12 (CC)	0.12 (TT)	0.88 (CT)	0 (CC)	<0.001	<0.001	0.77572	0.786	
20	0.30 (TT)	0.50 (GT)	0.20 (GG)	0.38 (TT)	0.38 (GT)	0.24 (GG)	0.479	0.77572	0.005	0.004	
21	0.74 (GG)	0.26 (AG)	0 (AA)	0.50 (GG)	0.42 (AG)	0.08 (AA)	0.016	0.005	0.700	0.695	
22	0.94 (AA)	0.06 (AC)	0 (CC)	0.92 (AA)	0.08 (AC)	0 (CC)	0.926	0.700			

†Major hom o indicates major homozygous; Hetero, heterozygous; Minor hom o, Minor homozygous.

Table 5. Associations between specific markers and diastolic blood pressure

Marker	Frequency(genotype)										P-value		
	Hypertensive					Hypotensive					Genotype	Allele	Trend
	Major hom.o.†	Hetero.†	Minor hom.o.†	Major hom.o.†	Hetero.†	Minor hom.o.†	Major hom.o.†	Hetero.†	Minor hom.o.†	Genotype			
1	0.78 (TT)	0.18 (CT)	0.04 (CC)	0.40 (TT)	0.52 (CT)	0.08 (CC)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	0.28 (AA)	0.52 (AG)	0.20 (GG)	0.38 (AA)	0.44 (AG)	0.18 (GG)	0.564	0.391	0.396	0.391	0.396	0.391	0.396
3	0.82 (CC)	0.14 (CG)	0.04 (GG)	0.76 (CC)	0.22 (CG)	0.02 (GG)	0.512	0.663	0.684	0.663	0.684	0.663	0.684
4	0.40 (GG)	0.50 (AG)	0.10 (AA)	0.52 (GG)	0.38 (AG)	0.10 (AA)	0.449	0.363	0.360	0.363	0.360	0.363	0.360
5	0.28 (CC)	0.46 (CG)	0.26 (GG)	0.38 (GG)	0.34 (CG)	0.28 (CC)	0.363	0.395	0.437	0.395	0.437	0.395	0.437
6	0.44 (AA)	0.42 (AG)	0.14 (GG)	0.44 (AA)	0.44 (AG)	0.12 (GG)	0.925	0.835	0.839	0.835	0.839	0.835	0.839
7	0.82 (GG)	0.16 (GT)	0.02 (TT)	0.82 (GG)	0.18 (GT)	0	0.588	0.809	0.810	0.809	0.810	0.809	0.810
8	0.76 (CC)	0.20 (CT)	0.04 (TT)	0.60 (CC)	0.34 (CT)	0.06 (TT)	0.228	0.101	0.118	0.101	0.118	0.101	0.118
9	0.26 (TT)	0.66 (CT)	0.08 (CC)	0.38 (CC)	0.42 (CT)	0.20 (TT)	<0.001	0.010	0.007	<0.001	0.010	0.007	0.010
10	0.30 (CC)	0.70 (AC)	0	0.60 (CC)	0.34 (AC)	0.06 (AA)	0.172	0.149	0.141	0.172	0.149	0.149	0.141
11	0.28 (TT)	0.6 (CT)	0.12 (CC)	0.34 (TT)	0.42 (CT)	0.24 (TT)	0.143	0.668	0.662	0.143	0.668	0.668	0.662
12	0.66 (AA)	0.34 (AG)	0	0.72 (AA)	0.26 (AG)	0.02 (GG)	0.435	0.699	0.681	0.435	0.699	0.699	0.681
13	0.74 (CC)	0.24 (CT)	0.02 (TT)	0.82 (CC)	0.16 (CT)	0.02 (TT)	0.604	0.384	0.396	0.604	0.384	0.384	0.396
14	0.61 (CC)	0.35 (CT)	0.04 (TT)	0.53 (CC)	0.46 (CT)	0	0.203	0.732	0.706	0.203	0.732	0.732	0.706
15	0.30 (AA)	0.54 (AT)	0.16 (TT)	0.30 (AA)	0.48 (AT)	0.22 (TT)	0.722	0.669	0.664	0.722	0.669	0.669	0.664
16	0.32 (CC)	0.54 (CT)	0.14 (TT)	0.34 (CC)	0.44 (CT)	0.22 (TT)	0.489	0.667	0.667	0.489	0.667	0.667	0.667
17	0.38 (II)	0.48 (DI)	0.14 (DD)	0.36 (II)	0.46 (DI)	0.18 (DD)	0.861	0.664	0.666	0.861	0.664	0.664	0.666
18	0.34 (AA)	0.50 (AG)	0.16 (GG)	0.38 (AA)	0.44 (AG)	0.18 (GG)	0.834	0.885	0.886	0.834	0.885	0.885	0.886
19	0.52 (TT)	0.40 (CT)	0.08 (CC)	0.76 (TT)	0.22 (CT)	0.02 (CC)	0.035	0.008	0.010	0.035	0.008	0.008	0.010
20	0.38 (TT)	0.52 (GT)	0.10 (GG)	0.34 (GG)	0.40 (GT)	0.26 (TT)	0.014	0.010	0.013	0.014	0.010	0.010	0.013
21	0.70 (GG)	0.24 (AG)	0.06 (AA)	0.62 (GG)	0.30 (AG)	0.08 (AA)	0.698	0.381	0.418	0.698	0.381	0.381	0.418
22	0.96 (AA)	0.04 (AC)	0 (CC)	0.88 (AA)	0.12 (AC)	0 (CC)	0.337	0.148	0.140	0.337	0.148	0.148	0.140

†Major homo indicates major homozygous; Hetero, heterozygous; Minor homo, Minor homozygous.

Table 6. The effects of specific markers on systolic blood pressure by inheritance of model

Marker	Allele based model		Minor allele dominant model	
	OR	P-value	OR	P-value
1	0.20	<0.001	0.23	<0.001
2	1.62	0.17	1.56	0.34
3	1.71	0.35	1.71	0.37
4	0.92	0.80	0.91	0.83
5	0.93	0.84	0.91	0.82
6	0.95	0.89	0.95	0.91
7	0.71	0.47	0.77	0.61
8	0.60	0.18	0.57	0.19
9	1.07	0.84	1.23	0.64
10	0.80	0.54	0.91	0.83
11	1.70	0.10	1.74	0.19
12	1.12	0.76	1.00	1.00
13	1.00	0.10	0.90	0.83
14	0.79	0.58	0.73	0.49
15	0.83	0.58	0.76	0.52
16	0.74	0.36	0.69	0.39
17	0.85	0.61	0.77	0.53
18	0.87	0.67	0.77	0.53
19	7.33	<0.001	5.76	<0.001
20	1.32	0.03	1.43	0.39
21	0.30	<0.001	0.35	<0.001
22	0.73	0.06	0.73	0.69

Table 7. The effects of specific markers on diastolic blood pressure by inheritance of model

Marker	Allele based model		Minor allele dominant model		Major allele dominant model		Dominance model	
	OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value
1	0.20	<0.001	0.19	<0.001	2.09	0.39	0.25	0.11
2	1.56	0.17	1.57	0.28	0.87	0.39	1.5	0.47
3	0.78	0.57	0.69	0.46	0.48	0.55	1.85	0.61
4	1.56	0.16	1.62	0.22	1	1	1.30	0.70
5	1.65	0.12	1.74	0.19	1	1	1.46	0.32
6	1.04	0.88	1.01	0.98	0.79	0.7	1.22	0.49
7	1.11	0.82	1.00	1	1	0.31	1	0.32
8	0.48	0.51	0.47	0.86	1.53	0.64	0.52	0.49
9	6.83	<0.001	7.04	<0.001	0.71	0.47	6.17	0.005
10	0.55	0.19	0.64	0.29	1	0.07	1	0.68
11	1.13	0.70	1.32	0.51	2.31	0.11	0.60	0.41
12	1.23	0.58	1.32	0.51	1	0.31	1	0.34
13	1.55	0.32	1.60	0.33	1	1	1.10	0.94
14	0.79	0.51	0.71	0.41	1	0.15	1	0.19
15	0.93	0.84	1.00	1	1.48	0.44	0.72	0.58
16	0.99	0.97	1.09	0.83	1.73	0.29	0.67	0.51
17	0.87	0.68	0.91	0.83	1.34	0.58	0.73	0.61
18	1.14	0.67	1.18	0.67	1.15	0.79	0.99	0.99
19	3.14	0.002	2.92	0.012	0.23	0.16	5.84	0.87
20	0.45	0.01	0.57	0.19	4.63	0.004	0.20	0.007
21	0.69	0.30	0.69	0.39	1.36	0.69	0.66	0.60
22	0.30	0.13	0.30	0.14	1	1	1	1

3-4. Haplotype 에 기초한 분석

가. 수축기에서 haplotype 분석

ADRB2 유전자는 fig 2 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 여섯 개에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 상이하다. 즉 표지자 1, 2, 3은 저혈압군에서 다른 표지자들과 LD가 없지만, 고혈압군에서는 다른 표지자들과 높은 LD를 보였다. 표지자 1, 2, 3은 functional SNP이므로 이들 표지자의 높은 LD는 고혈압의 형질을 발현하는데 상가적인 영향(addictive affect)을 줄 수도 있다는 것을 간접적 시사하므로 이를 평가하고자 표지자 여섯 개로 구성된 haplotype, 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 4, 5, 6으로 구성된 haplotype에 대해 haplotype 빈도의 우도비 검정과, haplotype 경향회귀분석을 수행하였다. 그 결과 table 8과 같이 표지자 여섯 개로 구성된 haplotype은 고혈압군과 저혈압군에서 빈도에 차이가 없는 반면(표지자 4, 5, 6으로 구성된 haplotype 역시 동일결과 결과를 따로 명시하지 않았다.), 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype은 고혈압군과 저혈압군 비교에서 haplotype 빈도 차이가 유의하였다. Table 9는 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype 중 어떤 haplotype이 고혈압과 연관성이 있는지 평가한 결과이다. Haplotype 경향 회귀분석 결과 C-A-C로 구성된 haplotype이 고혈압 위험을 감소시키는 것으로 평가되었다. C-A-C는 고혈압군에서 minor-minor-major 대립유전자에 속하며 표지자 1의 C의 경우는 단일 유전자좌에 기초한 분석에서 빈도가 낮은 대립유전자를 가질 경우 위험도에 관여하는 것으로 분석된 표지자이다. 따라서 표지자 1의 C를 가지면서 표지자 2, 3의 A-C를 가진 집단의 고혈압과 연관성이 높다 것을 알 수 있었다.

GRK4 유전자는 fig 3과 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 1, 2, 3에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 유사하다. 즉 표지자 1 과 2의 LD와 표지자 1과 3의 LD는 높은 반면 표지자 2와 3의 LD는 낮다. 고혈압군과 저혈압군의 LD가 유사하고, 모두 functional SNP이며, 단일 유전자좌에서 연관성이 없었으므로 고혈압과 연관성이 있는 haplotype 역시 없을 것으로 예상된다. 이를 평가하고자 표지자

1, 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 1, 2로 구성된 haplotype, 표지자 1, 3으로 구성된 haplotype에 대해 각각 haplotype 빈도 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석을 수행하였고 어떤 haplotype도 연관성이 없는 것을 확인하였다(table 8, 9).

AGT 유전자는 fig 4와 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 1, 2, 3에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 유사하다. 즉 표지자 1과 2의 LD와 표지자 2과 3의 LD는 높은 반면 표지자 1과 3의 LD는 낮다. 고혈압군과 저혈압군의 LD가 유사하고, 모두 functional SNP이며, 단일 유전자좌에서 연관성이 없었으므로 고혈압과 연관성이 있는 haplotype 역시 없을 것으로 예상된다. 이를 평가하고자 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 1, 2으로 구성된 haplotype, 표지자 2, 3로 구성된 haplotype, 표지자 1, 3으로 구성된 haplotype에 대해 각각 haplotype 빈도 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석을 수행하였고 어떤 haplotype도 연관성이 없는 것을 확인하였다(table 8, 9).

ACE 유전자는 fig 5와 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 1, 2, 3, 4에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 유사하다. 즉 표지자 1, 2, 3, 4의 LD가 모두 높다. 고혈압군과 저혈압군의 LD가 유사하고, 모두 functional SNP이며, 단일 유전자좌에서 연관성이 없었으므로 고혈압과 연관성이 있는 haplotype 역시 없을 것으로 예상된다. 이를 평가하고자 표지자 1, 2, 3, 4로 구성된 haplotype에 대해 haplotype 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석을 수행하였고 어떠한 haplotype도 연관성이 없는 것을 확인하였다(table 8, 9).

나. 이완기에서 haplotype 분석

ADRB2 유전자는 fig 2 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 여섯 개에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 상이하다. 표지자 1, 2, 3은 저혈압군에서 다른 표지자들과 LD가 없지만, 고혈압군에서는 높은 LD를 보였다. 표지자 1, 2, 3은 functional SNP이므로 이들 표지자의 높은 LD는 고혈압의 형질을 발현하는데 상가적인 영향(addictive affect)을 줄 수도 있다는 것을 간접적으로 시사한다. 따

라서 이를 평가하고자 표지자 여섯 개로 구성된 haplotype, 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 4, 5, 6으로 구성된 haplotype에 대해 haplotype 빈도의 우도비 검정과, haplotype 경향회귀분석을 수행하였다. 그 결과 table 8과 같이 표지자 여섯 개로 구성된 haplotype은 고혈압군과 저혈압군에서 빈도에 차이가 없는 반면(표지자 4, 5, 6으로 구성된 haplotype 역시 동일결과), 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype은 고혈압군과 저혈압군 비교에서 빈도 차이가 유의하였다. Table 9는 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype 중 어떤 haplotype이 고혈압과 연관성이 있는지 평가한 결과이다. Haplotype 경향 회귀분석 결과 C-A-C로 구성된 haplotype이 고혈압 위험을 감소시키는 것으로 평가되었다. C-A-C는 고혈압군에서 minor-major-major 대립유전자에 속하며 표지자 1의 C의 경우는 단일 유전자좌에 기초한 분석에서 빈도가 낮은 대립유전자를 가질 경우 위험도에 관여하는 것으로 분석된 표지자이다. 따라서 표지자 1의 C를 가지면서 표지자 2, 3의 A-C를 가진 집단의 고혈압과의 연관성이 높다 것을 알 수 있었다.

GRK4 유전자는 fig 3과 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 1, 2, 3에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 다르다. 즉 표지자 2와 3의 LD가 저혈압군에서는 낮은 반면 고혈압군에서는 높다. 모두 functional SNP이며, 단일 유전자좌에서 연관성이 있었던 표지자 9는 haplotype 분석에서 표지자 3과 동일하므로 고혈압과 연관성이 있는 haplotype이 있을 것으로 예상된다. 이를 평가하고자 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 1, 2로 구성된 haplotype, 표지자 1, 3으로 구성된 haplotype에 대해 각각 haplotype 빈도 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석 결과 표지자 1, 2, 3으로 구성된 C-T-C와 C-C-C는 고혈압의 위험도를 감소시킨 반면 표지자 2 3으로 구성된 C-T는 고혈압의 위험도를 증가시키는 것으로 평가되었다. 그러나 단일 유전자좌에 기초한 연관성을 보인 표지자 9가 C 대립유전자를 가질 경우 위험도가 증가한다는 결과와는 상반되는 것으로 표지자들 간의 상호작용을 하거나 혹은 LD 영역 내에 새로운 가능성 표지자가 존재할 가능성을 보였다..

AGT 유전자는 fig 4와 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 1, 2, 3에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 유사하다. 즉 표지자 1과 2의 LD와 표지자 2과

3의 LD는 높은 반면 표지자 1과 3의 LD는 낮다. 고혈압군과 저혈압군의 LD가 유사하고, 모두 functional SNP이며, 단일 유전자좌에서 연관성이 없었으므로 고혈압과 연관성이 있는 haplotype 역시 없을 것으로 예상된다. 이를 평가하고자 표지자 1, 2, 3으로 구성된 haplotype, 표지자 1, 2으로 구성된 haplotype, 표지자 2, 3로 구성된 haplotype, 표지자 1, 3으로 구성된 haplotype에 대해 각각 haplotype 빈도 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석을 수행하였고 어떤 haplotype도 연관성이 없는 것을 확인하였다(table 8, 9).

ACE 유전자는 fig 5와 같이 고혈압군과 저혈압군에서 표지자 1, 2, 3, 4에 대한 LD 측정 수치인 D' 값의 결과가 유사하다. 즉 표지자 1, 2, 3, 4의 LD가 모두 높다. 고혈압군과 저혈압군의 LD가 유사하고, 모두 functional SNP이며, 단일 유전자좌에서 연관성이 없었으므로 고혈압과 연관성이 있는 haplotype 역시 없을 것으로 예상된다. 이를 평가하고자 표지자 1, 2, 3, 4로 구성된 haplotype에 대해 haplotype 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석을 수행하였고 어떠한 haplotype도 연관성이 없는 것을 확인하였다(table 8, 9).

BP	marker	1	2	3	4	5	6
SBP	1		0.05	0.27	0.30	0.41	0.10
	2	0.99		0.27	0.90	0.79	0.69
	3	1.00	0.99		1.00	1.00	1.00
	4	1.00	1.00	1.00		1.00	0.89
	5	1.00	0.55	1.00	1.00		0.92
	6	0.81	0.68	0.78	1.00	1.00	
DBP	1		0.12	0.12	0.15	0.22	0.03
	2	0.79		0.67	0.86	0.47	0.18
	3	0.78	0.52		1.00	1.00	1.00
	4	0.33	1.00	1.00		1.00	0.85
	5	0.37	0.58	1.00	1.00		0.92
	6	0.25	0.59	0.83	1.00	1.00	

Figure 2. ADRB2 linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive. Upper right triangle means hypotensive and red colour indicates ID¹ value >0.5 ; pink color, <0.5.

BP	marker	1	2	3
SBP	1		1.00	1.00
	2	1.00		0.25
	3	0.99	0.07	
DBP	1		0.83	1.00
	2	1.00		0.06
	3	1.00	0.57	

Figure 3. GRK4 linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive. Upper right triangle means hypotensive and red colour indicates ID¹ value >0.5 ; pink color, <0.5.

BP	marker	1	2	3
SBP	1		0.99	0.58
	2	0.99		0.00
	3	0.04	0.70	
DBP	1		1.00	0.99
	2	0.99		0.34
	3	0.17	0.71	

Figure 4. AGT linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive. Upper right triangle means hypotensive and red colour indicates ID¹ value >0.5 ; pink color, <0.5.

Figure 5. ACE linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive

BP	marker	1	2	3	4
SBP	1		1.00	0.90	0.85
	2	1.00		0.90	0.90
	3	1.00	1.00		0.95
	4	0.91	0.91	0.95	
DBP	1		1.00	1.00	0.95
	2	0.95		0.90	0.85
	3	0.95	1.00		0.95
	4	0.86	0.87	0.95	

Figure 5. ACE linkage disequilibrium between hypertensive and hypotensive. Upper right triangle means hypotensive and red colour indicates ID¹ value >0.5 ; pink color, <0.5.

Table 8. The results of likelihood ratio test between specific gene and blood pressure based on haplotypes

Gene	Marker composition	P-value	
		SBP	DBP
ADRB2	1,2,3,4,5,6	0.18	0.65
	1,2,3	<0.001	<0.001
GRK4	1,2,3	0.69	0.005
	2,3	0.73	0.001
AGT	1,2,3	0.97	0.73
ACE	1,2,3,4	0.83	0.63

Table 9. The results of haplotype trend regression test

Phenotype	Gene	Marker composition	Selected haplotype	Estimate	P-value
SBP	ADRB2	1,2,3	C-A-C	-7.5139	<0.001
DBP	ADRB2	1,2,3	C-A-C	-7.1856	0.001
		GRK4	1,2,3	C-T-C	-1.3198
	1,2,3		C-C-C	-3.9437	0.003
	2,3		C-T	1.8363	0.005

3-5. 여러 유전자좌에 기초한 분석

가. 수축기에서 상호작용

Table 10에서 총 4개의 모델을 평가하였다. 모델1은 총 22개의 표지자를 최대 4개씩 상호조합 했을 때 각 조합된 표지자의 수에 따른 위험도 여부를 평가한 것이다. 모델2는 총 22개의 표지자 중 표지자 1을 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때, 모델3은 총 22개의 표지자 중 표지자 19를 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때, 모델4는 총 22개의 표지자 중 표지자 19를 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때에 대한 결과이다. 총 4개의 모델에서 모델 2를 제외하고는 결과가 유사하며, 즉 표지자 1이 전체 모델을 형성하는데 깊이 관여하며 그 효과가 큰 것으로 평가되었다. 또한 표지자 1과 3의 경우 여러 모델평가에서 중요하게 평가되었으며, 모델3에서는 CV(cross validation)값이 10으로 상호작용을 하는 것으로 평가되었다. 표지자 3과 19의 경우는 모델 2에서 CV값이 10으로 상호작용을 하는 것으로 평가되었다. 그 외 1, 2, 4의 경우는 CV값이 높지는 않지만 여러 모델에서 주요하게 평가되어 상호작용 할 가능성이 있는 것으로 평가되었다.

Table 10. Multifactor dimensionality reduction analysis in systolic blood pressure

Model	Dimension	Marker	Testing accuracy	CV confidence
Model 1	1	1	0.571	5/10
	2	1,3	0.653	6/10
	3	1,2,4	0.614	4/10
	4	1,3,10,19	0.733	7/10
Model 2	1	19	0.663	10/10
	2	3,19	0.755	10/10
	3	3,12,19	0.666	6/10
	4	3,8,10,19	0.407	2/10
Model 3	1	1	0.663	10/10
	2	1,3	0.742	10/10
	3	1,2,4	0.718	8/10
	4	1,3,10,19	0.470	3/10
Model 4	1	1	0.571	5/10
	2	1,3	0.653	6/10
	3	1,2,4	0.677	7/10
	4	1,3,10,19	0.739	8/10

Model 1; Including 22 markers

Model 2; Only excluding marker 1

Model 3; Only excluding marker 19

Model 4; Only excluding marker 21

나. 이완기에서 MDR 분석

Table 11에서 총 4개의 모델을 평가하였다. 모델1은 총 22개의 표지자를 최대 4개씩 상호조합 했을 때 각 조합된 표지자의 수에 따른 위험도 여부를 평가한 것이다. 모델2는 총 22개의 표지자 중 표지자 1을 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때, 모델3은 총 22개의 표지자 중 표지자 9를 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때, 모델4는 총 22개의 표지자 중 표지자 19를 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때, 모델 5는 총 22개의 표지자 중 표지자 19를 제거하고 나머지 21개의 표지자를 4개씩 상호조합 했을 때에 대한 결과이다. 총 5개의 모델에서 모델 2를 제외하고는 결과가 유사하며, 즉 표지자 1이 전체 모델을 형성하는데 깊이 관여하며 그 효과가 큰 것으로 평가되었다. 또한 표지자 1과 3의 경우 여러 모델평가에서 중요하게 평가되었으며, 모델4에서는 CV값이 10으로 상호작용을 하는 것으로 평가되었다. 표지자 3과 19의 경우는 모델 2에서 CV값이 10으로 상호작용을 하는 것으로 평가되었다. 그외 1, 2, 4와 1, 2, 5, 21의 경우는 CV값이 높지는 않지만 여러 모델에서 주요하게 평가되어 상호작용을 할 가능성이 있는 것으로 평가되었다.

Table 11. Multifactor dimensionality reduction analysis in diastolic blood pressure

Model	Dimension	Marker	Testing accuracy	CV confidence
Model 1	1	1	0.571	5/10
	2	1,3	0.653	6/10
	3	1,2,4	0.614	4/10
	4	1,2,5,21	0.733	7/10
Model 2	1	19	0.663	10/10
	2	3,19	0.755	10/10
	3	2,3,19	0.666	6/10
	4	2,9,11,16	0.407	2/10
Model 3	1	1	0.663	10/10
	2	1,3	0.742	10/10
	3	1,2,4	0.718	8/10
	4	1,2,5,21	0.470	3/10
Model 4	1	1	0.571	5/10
	2	1,3	0.653	6/10
	3	1,2,4	0.677	7/10
	4	1,2,5,21	0.739	8/10
Model 5	1	1	0.571	5/10
	2	1,3	0.653	6/10
	3	1,2,4	0.677	7/10
	4	1,2,5,21	0.739	8/10

Model 1; Including 22 markers

Model 2; Only excluding marker 1

Model 3; Only excluding marker 9

Model 4; Only excluding marker 19

Model 5; Only excluding marker 20

제 4 장. 고 찰

본 연구에서는 청소년(15~17세)의 수축기 및 이완기 혈압을 별도의 형질로 규정하였고 혈압의 극단값 분포를 사용하여 양 극단값(약 상위 10%, 하위 10%)에 해당되는 100명을 고혈압군과 저혈압군으로 정의한 후보 유전자들의 위험성 및 상호작용을 평가하였다. 후보 유전자들은 고혈압 기전에 관련된 6개 기전에 속하는 11개를 선택하였고 총 25개의 표지자를 평가하였다. 수축기와 이완기 형질을 각각 나누어 분석했음에도 불구하고 각 형질에서 후보유전자들의 위험도가 동일하게 검출된 것도 있었으며(표지자 1, 19). 유전자 상호작용에 대해서도 유사한 양상을 보였다(표지자 1의 영향이 가장 높게 평가되었으며, 표지자 3, 19의 경우 상호작용을 하는 것으로 보임). 이는 수축기와 이완기에 동일하게 작용하는 유전자에 대한 검출을 의미하며, 표지자 21는 수축기에서만 표지자 20은 이완기에서만 유의한 것으로 평가되어 각 형질에 별도로 중요하게 작용하는 유전자가 있음을 알 수 있었다. 단일 유전자좌에서 유의하게 평가된 ADRB2, CYP11B2, GRK4, ADD1, REN의 유전자 중 haplotype을 구성할 수 있었던 ADRB2, GRK4에서도 연관성이 있는 haplotype을 발굴했으며, 여러 유전자좌의 상호작용을 MDR 분석을 수행한 결과에서 ADRB2와 CYP11B2 유전자의 상호작용을 규명하였다.

결론적으로 본 연구의 연구디자인과 결과는 국내외 소아 및 청소년 본태성 고혈압과 후보유전자의 연관성 연구에서 볼 수 없었던 새로운 것으로 첫째, 고혈압에 관련된 다양한 기전내 여러 후보유전자들에 대하여 체계적으로 평가를 수행함 둘째, 여러 분석 방법에서 일치된 결과를 통해 고혈압에 연관된 유전적 표지자들을 신뢰성 있게 발굴함 셋째, 실험실적으로 규명하기 어려운 유전적 표지자들 혹은 유전자들 간의 상호작용을 규명함 넷째, 혈압의 양극단값 분포를 활용하여 기존연구에서의 표본추출에 대한 편의를 없앴 다섯째 수축기와 이완기에 관여하는 후보유전자들을 발굴함 여섯째 3년 동안의 혈압 자료의 평균을 사용하여 혈압 측정에 신뢰성을 부여함에 큰 의의를 둘 수 있으며 성인 고혈압의 유전적 기전을 이해하는데도 도움을 줄 것으로 기대된다. 단, 본 연구 목적과 연구디자인으로는

BMI에 대해 심도있게 평가할 수 없었으나 고혈압군은 일반적으로 BMI가 높아 BMI에 관련된 유전자가 혼란변수로 작용할 가능성이 있으므로 후속 평가가 필요하다.

가. 형질 정의에 대한 고찰

소아 및 청소년 본태성 고혈압이 성인 본태성 고혈압에 비해 혈압에 대한 유전적 요인을 규명하는데 유용할 것이라는 기대에도 불구하고(David et al, 2001; Kaplan et al) 유전적 효과가 극명하게 나타나지 않거나 연구가 많지 않은 것은 성인과 소아 및 청소년 본태성 고혈압에 관여하는 유전적 기전이 다를 가능성 때문일 수도 있지만(Grunig E et al, 2004; Wilk JB et al, 2004), 혈압은 지속성과 향상성이란 특성이 존재하므로 소아 및 청소년에서의 고혈압에 관련한 유전자는 성인의 고혈압에도 영향을 줄 것으로 가정하고 아직까지 유전적 효과가 극명하게 나타나지 않는 원인에 대해 크게 두 가지를 가정하였다. 첫째, 소아 및 청소년의 본태성 고혈압에 대한 정의가 성인에서와 다르게 수축기 혹은 이완기 혈압을 성, 연령, 키를 고려한 상위 5%에 해당하는 자를 채택하고 정상혈압군은 수축기 및 이완기 혈압이 정상 혈압분포에 있는 자를 채택하는 다소 임의적 정의를 따르기 때문이다. 둘째로 소아 및 청소년의 경우 수축기 및 이완기 혈압을 별도의 형질로 나누어 평가하지 않기 때문이다.

본 연구의 디자인 및 결과들은 위의 두 가정에 신뢰성을 주는 것으로 사료되며 즉 현재까지 수축기 및 이완기 혈압을 별도의 형질로 나누어 후보유전자를 평가한 연구가 전무한 상태에서 각 혈압에 관여하는 유전자들을 규명할 수 있음을 보였고, 혈압의 양극단값 분포를 활용하여 표본 추출 편의를 줄인 상태에서 유전적 표지자들의 연관성을 규명할 수 있음을 보였다.

본 연구에서 청소년 본태성 고혈압군 및 저혈압군 정의는 다음과 같다. 강화코호트 자료에서 청소년(15~17세) 시기에 혈압과 혈액시료가 있는 470명을 대상으로 3년 자료가 다 있는 것은 3년 자료의 평균을 2년 자료가 있는 것은 2년 자료의 평균을 구하고 순위를 정하였다. 상위 50명 하위 50명을 수축기와 이완기 혈압에 각각 근거해서 선별하였고 수축기 상위 50명과 이완기 상위 50명을 고혈압군,

수축기 하위 50명과 이완기 하위 50명을 저혈압군으로 정의하였다. 간혹 순차적 순위에서 DNA 샘플이 손상되었거나 분석이 어려운 샘플은 제외하였으며, 다음 순위에 해당하는 샘플을 채택하였다. 수축기 고혈압에 해당된 50명 중 7명은 2년치 자료만 있어 2년치 자료의 평균을 사용하였으며, 이완기 고혈압군에 해당된 50명 중 8명도 2년치 자료만 있어 2년치 자료의 평균을 사용하였다. 또한 수축기와 이완기에 고혈압군 100명 중 공통인 대상은 21명이었고, 수축기와 이완기 저혈압군 100명 중 공통인 대상은 22명으로 각 고혈압군으로 정의된 50명들 내에서 절반에 해당하는 대상만 수축기와 이완기 모두 높게 평가된 것을 그리고 나머지 절반은 수축기나 이완기 쪽에서만 높게 평가된 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 수축기와 이완기를 별도의 형질로 규정할 경우 각 형질에 연관성이 있는 후보 유전자를 선별할 가능성이 있음을 보여준다.

나. 유전적 표지자 선정에 대한 고찰

유전자 선정과 유전적 표지자의 선정에는 가장 많이 사용하는 방법이 문헌에 근거하는 방법이며, 특정 유전자의 새로운 표지자를 발굴 하기 위해서는 dbSNP의 정보를 활용하거나 gene scanning 방법을 통해 다형성 표지자를 발굴하고 tag SNP을 규정하여 LD 평가를 통해 기능에 영향을 주는 지역을 간접적으로 평가하는 방법을 사용한다(Petertl, 2003; Peter, 2002; David, 2001; Patrickl, 1999). 본 연구에서는 문헌에 근거한 방법을 채택하였고, MEDLINE의 MESH 용어에 근거해서 hypertension, gene, polymorphism, haplotype, case-control study 등의 조합으로 선택된 논문의 정보를 데이터베이스 하여 유전자를 검토하였고, 최근 발표된 저널들을 참조하였다. 특징적으로 유전적 표지자의 선정은 LD에 기초하여 haplotype의 블록을 규명하는데 사용되는 매핑 SNP에 근거하지 않고 기능에 영향을 주며 약리유전체에서 중요하게 평가되는 기능성 SNP을 주로 선택하였다.. 단, ADRB2의 경우는 선행 연구를 확장하기 위해서 매핑 SNP을 별도로 추가 구성 하였다. 선택된 유전자는 6개 기전 11개 유전자내의 총 25개 표지자이며, 선택된 표지자의 일부는 선행 연구데이터를 사용하였다. 새롭게 13개 표지자를 정상군 48명을 이용하여 다형성 여부를 평가한 후 다형성을 보인 5개 기전 10개 유전자

의 총 22개 표지자에 대해 연관성 분석을 수행하였다. 새롭게 선정된 표지자들은 국내에서 고혈압과의 평가에서 사용된 적이 없는 표지자이며, 국외 논문에서도 청소년 고혈압 평가에서 사용된 적이 없는 표지자다. 그러나 혈압과의 관계가 명백한 기전에 속하며, 성인 고혈압에서는 평가된 표지자로서 최근 트렌드인 후보유전자 접근 방법에 타당한 표지자이다(Davidl, 2001, Williams, 2004). 다형성이 발견된 22개 표지자에 대해 수축기 고혈압군과 저혈압군에서는 모두 HWE를 만족하였고 이완기 고혈압군에서는 표지자 3,9가 저혈압군에서 표지자 5, 14가 만족하지 않았다. 저혈압군의 혈압은 정상분포의 혈압보다 낮으므로 유전적 영향을 받을 수 있고 이완기 고혈압군과 저혈압군에서 HWE가 깨지는 표지자가 상이하므로 모든 표지자를 연관성 분석 연구에 포함시켰다.

다. 결과에 대한 고찰

단일 유전자좌에 기초한 분석에서 수축기 고혈압에서 표지자 1, 19, 21가 연관성이 있는 것으로 평가되었으며, 이완기에 고혈압에서 표지자 1, 9, 19, 20가 연관성이 있는 것으로 평가되었다. 반면 수축기와 이완기가 모두 높다고 평가된 21명과 모두 낮게 평가된 22명을 대상으로 22개 표지자들과의 관련성을 평가한 결과에서는 1, 19가 연관성이 있는 것으로 평가 되었다. 형질을 나눔으로 해서 표지자 20과 21이 각각의 혈압에 연관성이 있다는 것을 확인할 수 있었으며 표지자 1과, 19는 수축기 및 이완기 고혈압에 공통적으로 연관성이 있는 것을 알 수 있었다.

표지자 1은 ADRB2 유전자의 T-47C에 해당하며, 프로모터 영역에 존재한다. 프로모터에 존재하는 다형성은 유전자의 단백질을 치환하는 것에는 관여하지 않으나 유전자의 조절 및 유전자 산물을 만드는데 영향을 주므로 기능적 의미가 크다. T-47C 표지자는 외국 소수저널에서 고혈압과의 연관성이 평가된 표지자이며, 국내에서는 고혈압과 관련해서 보고 된 바 없다. 표지자 9는 GRK4의 A486V에 해당하며, 단백질 486위치에서 단백질을 치환하는 표지자로서, 기존 해외 논문에서 1례 보고된 바 있으며, 단일 유전자 평가에서는 연관성이 없지만, 유전자-유전자 상호작용에서는 고혈압에 관여하는 것으로 보였다. 표지자 19는 CYP11B2의 T-344C에 해당하며, 역시 유전자의 프로모터 영역에 존재하며, 해외 연구에서는

민족마다 결과가 상이하며, 국내에서는 그 중요성이 보고 된 바 없다. 표지자 20은 ADD1의 G460W에 해당하며, 단백질 460 위치에서 단백질을 치환 하며, 국외 보고에서는 고혈압과의 연관성이 민족마다 상이하며 국내에서는 보고 된 바 없다. 표지자 21은 REN에 G2646A에 해당하며, 단백질을 치환하는 표지자는 아니지만, 3'UTR에 위치함으로써 유전자의 안전성에 관여할 것으로 평가되었다. 국내외에 서 이 표지자와 고혈압과의 연관성은 보고 된 바 없다.

Haplotype에 기초한 연구에서 haplotype을 reconstruction 하는 데에는 E-단계와 M-단계를 반복적으로 수행하면서 추정치를 얻는 EM 알고리즘을 사용하였으며 연관불평형 측도인 LD 평가에서는 다양한 측정치의 일치된 결과를 확인하고 최종적으로 Lewontin's의 D'절대값을 사용하였다. 본 연구에서는 ADRB2에서 6개 표지자, GRK4에서 3개의 표지자, AGT에서 3개의 표지자, ACE에서 4개의 표지자에 대해 haplotype 빈도 우도비 검정과 haplotype 경향회귀분석을 평가 하였다. 결론적으로 단일 유전자좌에 기초한 분석시 연관성이 평가된 표지자를 포함하는 haplotype이 고혈압과 연관성이 있는 것으로 평가되었다. 즉 수축기와 이완기 고혈압에 대해 ADRB2의 표지자 1, 2, 3으로 구성된 C-A-C haplotype이 고혈압 위험을 감소시켰으며 표지자 1은 단일 유전자좌에 기초한 분석에서 사용된 표지자 1과 동일한 것이다.. GRK4는 이완기 고혈압에 대해 표지자 1, 2, 3으로 C-T-C, G-C-C로 구성된 haplotype이 고혈압 위험을 증가시켰으며 표지자 2, 3으로 구성된 C-T haplotype은 고혈압 위험을 감소시켜는 것으로 평가되었다. 표지자 3의 C 대립유전자는 단일 유전자좌에 기초한 분석에서 표지자 9에 해당하며, 고혈압 위험을 감소시켜는 것을 평가된 반면 haplotype에서는 오히려 고혈압 위험을 증가시키는 것으로 평가되었다. 이는 LD가 형성된 표지자 1, 2, 3 중 2, 3 부분이 상대적으로 약한 LD를 보여 이들 사이에 별도 functional SNP이 존재하거나 표지자들간의 상호 작용일 수도 있다.

다양한 유전자좌에 기초한 상호작용 평가에서는 multifactor- dimensionality reduction(MDR) 사용하며, MDR 방법인 비모수적 방법을 사용하였다. 이 방법은 여러 유전자좌에서의 영향관계를 고위험표지자-저위험표지자 두 개의 공간으로 설정하여 평가하는 방법으로 이미 여러 편의 논문에서 그 유용성과 타당성이

평가되었으며, 고혈압에 관련한 유전자들의 상호작용을 평가하는데도 사용된 바 있다. 그러나 MDR 방법을 사용하기 위해서는 제작된 프로그램을 사용해야 하며, 제작된 프로그램에서는 최종 결과만 보여줄 뿐 다양한 검출 과정이 보여지지 않으므로 해서 특정 표지자의 주효과를 보일 경우 분석 방법의 계층적 영향에 의해 표지자들 간의 상호작용인 과소평가가 될 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 단일 유전자좌에 근거한 평가해서 중요하게 평가된 표지자를 하나씩 제거한 상태에서 평가를 해보았다. 22개 표지자들을 전부 포함했을 경우 수축기 및 이완기 고혈압에서 동일하게 표지자 1과 3이 서로 상호작용을 하는 것으로 평가되었다. 표지자 1과 3은 ADRB2의 표지자이므로 표지자들 간의 상호작용이 있음을 알 수 있었다. 표지자 1을 제외한 모델과 표지자 9, 19, 20, 21을 각각 제거 한 모델에서의 결과가 상이함을 통해 표지자 1이 고혈압에 주효과를 보이는 것으로 평가되었다. 표지자 1을 제외 했을 때는 표지자 3과 19가 상호작용을 하였다. 표지자 3은 ADRB2, 표지자 19은 CYP11B2의 표지자이며 각각 다른 기전에 속하는 유전자이다. 또한 이완기에서는 표지자 1, 2, 5, 21가 상호작용 할 가능성을 보였으며, 표지자 1, 2, 5는 ADRB2 유전자에 해당하며, 표지자 21은 ADD1에 해당한다. 실험실적 연구로는 규명하기 어려운 유전자 및 표지자들 간의 상호작용을 유전역학적 방법으로 규명했다는 점이 매우 흥미롭다. 이는 일종의 새로운 가설을 탐색하는 탐색 연구로서 가치가 있으며 후에 다양한 방법으로 고혈압의 위험과 관련하여 상호작용을 보인 유전자들이 연관성이 있는지 평가되어야 할 것으로 보인다. 또한 축기와 이완기 각각의 고혈압군에서의 BMI 평균은 25로 저혈압군의 평균 21.5에 비해 높은 편임으로 BMI에 연관된 유전자가 혼란변수로 작용할 가능성이 있으므로 동일 집단을 대상으로 BMI에 대한 양극단값 분포를 활용하여 후보유전자들의 연관성 분석이 수행되어야 할 것으로 보인다.

5. 결 론

본 연구에서는 고혈압과 후보유전자들의 연관성을 연구하고자 청소년(15~17세)의 수축기 및 이완기 혈압을 별도의 형질로 규정하고 각 혈압의 양극단값 분포를 활용하여 고혈압군과 저혈압군으로 정의하였고 다형성이 확인된 5개 기전에 속하는 10개 유전자 내의 총 22개 표지자들과의 연관성을 분석하였다. 그 결과는 다음과 같다.

첫째, 단일 유전자좌에 기초한 분석 결과 표지자 1, 19, 21(유전자 ADRB2, CYP11B2, REN)은 수축기에 기초한 고혈압과 표지자 1, 9, 19, 20(유전자 ADRB2, GRK4, CYP11B2, ADD1)은 이완기에 기초한 고혈압과 연관성이 있는 것으로 평가되었다.

둘째, haplotype에 기초한 분석 결과 ADRB2 유전자는 수축기 및 이완기에 기초한 고혈압과 연관성이 있었으며, 특히 표지자 1, 2, 3으로 구성된 C-A-C haplotype은 고혈압 위험을 감소시키는 것으로 평가되었다. GRK4 유전자는 이완기에 기초한 고혈압과 연관성이 있었으며 표지자 1, 2, 3으로 구성된 G-C-C, G-T-C haplotype은 고혈압 위험을 감소시켰고, 표지자 2, 3으로만 구성된 C-T haplotype은 고혈압 위험을 증가시키는 것으로 평가되었다.

셋째, 여러 유전자좌들의 상호작용에 기초한 분석 결과 22개 표지자로 구성된 2차 상호작용 모형에서는 표지자 1과 3의 상호작용이 가장 높았고 주효과가 가장 높았던 표지자 1을 제외하고 2차 상호작용을 평가한 결과 표지자 3과 19의 상호작용이 가장 높았다. 표지자 1과 3은 유전자 ADRB2에 해당하며, 표지자 19는 CYP11B2에 해당하므로 즉 ADRB2와 CYP11B2가 상호작용을 하는 것으로 평가되었다.

결론적으로 여러 분석 방법에서 일치된 결과로 고혈압과 연관된 표지자들을 신뢰성 있게 발굴했고 생물정보학 및 분자생물학적으로 분석하기 어려운 유전자 간의 상호작용을 유전역학적으로 발굴했다는 것에 큰 의의를 둘 수 있으며 청소년 본태성 고혈압 뿐 아니라 성인 고혈압을 이해하고 연구하는데 유용한 자료가 될 것으로 사료된다. 단, 본 연구 목적과 연구디자인으로는 BMI에 대해 심도 있게 평가할 수 없었으므로 후속연구를 통해 BMI에 관련된 유전자가 혼란변수로 작용했는지 여부를 평가할 필요가 있다. 또한 상호작용으로 평가된 유전자는 탐색적인 결과로서 동물모델이나 분자생물학적 실험을 통해 기전에 근거한 평가가 필요하다.

참고문헌

- Bartosh SM**, Aronson AJ. Childhood hypertension. An update on etiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am.* 1999, 46(2):235-52.
- Bastone L**, Reilly M, Rader DJ, Foulkes AS. MDR and PRP: a comparison of methods for high-order genotype-phenotype associations. *Hum Hered.* 2004, 58(2):82-92.
- Bianchi G**, Ferrari P, Staessen JA. Adducin polymorphism: detection and impact on hypertension and related disorders. *Hypertension.* 2005, 45(3):331-40.]
- Cashman JR**, Camp K, Fakharzadeh SS, Fennessey PV, Hines RN, Mamer OA, Mitchell SC, Nguyen GP, Schlenk D, Smith RL, Tjoa SS, Williams DE, Yannicelli S. Biochemical and clinical aspects of the human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) related to trimethylaminuria. *Curr Drug Metab.* 2003, 4(2):151-70.
- Chen W**, Srinivasan SR, Li S, Boerwinkle E, Berenson GS. Gender-specific influence of NO synthase gene on blood pressure since childhood: the Bogalusa Heart Study. *Hypertension.* 2004, 44(5):668-73.
- Cho YM**, Ritchie MD, Moore JH, Park JY, Lee KU, Shin HD, Lee HK, Park KS. Multifactor-dimensionality reduction shows a two-locus interaction associated with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2004, 47 (3):549-54.
- Coffey CS**, Hebert PR, Ritchie MD, Krumholz HM, Gaziano JM, Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Moore JH. An application of conditional logistic regression and multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions on risk of myocardial infarction: the importance of model validation. *BMC Bioinformatics.* 2004, 30;5(1):49.
- Ellis JA**, Infantino T, Harrap SB. Sex dependent association of blood pressure with oestrogen receptor genes ERalpha and ERbeta. *J Hypertens.* 2004, 22(6):1127-31.
- Falkner B**, Sadowski RH. Hypertension in children and adolescents. *Am J*

Hypertens. 1995, 8(12 Pt 2):106s-110s.

Feitosa MF, Borecki IB, Rich SS, Arnett DK, Sholinsky P, Myers RH, Leppert M, Province MA. Quantitative-trait loci influencing body-mass index reside on chromosomes 7 and 13: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Hum Genet.* 2002, 70(1):72-82.

Friedel S, Antwerpen B, Hoch A, Vogel C, Grassl W, Geller F, Hebebrand J, Hinney A. Glucose transporter 4 gene: association studies pertaining to alleles of two polymorphisms in extremely obese children and adolescents and in normal and underweight controls. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 967:554-7.

GarciaTsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005, 21(3): 313-22.

Grunig E, Koehler R, MiltenbergerMiltenyi G, Zimmermann R, Gorenflo M, Mereles D, Arnold K, Naust B, Wilkens H, Benz A, von Hippel A, Ulmer HE, Kubler W, Katus HA, Bartram CR, Schranz D, Janssen B. Primary pulmonary hypertension in children may have a different genetic background than in adults. *Pediatr Res.* 2004, 56(4):571-8.

GuerraA, Rego C, Silva D, Rodrigues P, Silva Z, Breitenfeld L, Pinto AT, Bicho M. Related Articles, Links Blood pressure and genetic and biological markers in a pediatric population. *Rev Port Cardiol.* 2002, 21(1):23-36.

HahnLW, Moore JH. Ideal discrimination of discrete clinical endpoints using multilocus genotypes. *In Silico Biol.* 2004, 4(2):183-94.

HahnLW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics.* 2003, 19(3):376-82.

IsajiM, Mune T, Takada N, Yamamoto Y, Suwa T, Morita H, Takeda J, White PC. Correlation between left ventricular mass and urinary sodium excretion in specific genotypes of CYP11B2. *J Hypertens.* 2005, 23(6):1149-57.

JeunemaitreX, Gimenez-Roqueplo AP, Celerier J, Corvol P. Angiotensinogen variants and human hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 1999, 1(1):31-41.

Johnson RJ, Segal MS, Titte S, Ejaz A, Mu W, Roncal C, SanchezLozada

LG, Gersch M, RodriguezIturbe B, Kang DH, Acosta JH. Essential Hypertension, Progressive Renal Disease, and Uric Acid: A Pathogenetic Link? *J Am Soc Nephrol*. 2005, 20:[Epub ahead of print]

Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Dopamine and the kidney: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003, 12(2):189-94.

Kaneko Y, Herrera VL, Didishvili T, Ruiz-Opazo N. Sex-specific effects of dual ET-1/ANG II receptor (Dear) variants in Dahl salt-sensitive/resistant hypertension rat model. *Physiol Genomics*. 2005, 20(2):157-64.

Kaplan N, Morris R. Issues concerning association studies for fine mapping a susceptibility gene for a complex disease. *Genet Epidemiol*. 2001, 20(4):432-57.

KatoN, Sugiyama T, Morita H, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y.

Angiotensinogen gene and essential hypertension in the Japanese: extensive association study and meta-analysis on six reported studies. *J Hypertens*. 1999, 17(6):757-63.

KatsuyaT, Ishikawa K, Sugimoto K, Rakugi H, Ogihara T. Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism. *Hypertens Res*. 2003, 26(7):521-5.

Kopciuk KA, Briollais L, Demenais F, Bull SB. Using an age-at-onset phenotype with interval censoring to compare methods of segregation and linkage analysis in a candidate region for elevated systolic blood pressure. *BMC Genet*. 2003, 31:4

Lane DA, Gill P. Ethnicity and tracking blood pressure in children. *J Hum Hypertens*. 2004, 18(4):223-8.

Lanzani C, Citterio L, Jankaricova M, Sciarrone MT, Barlassina C, Fattori S, Messaggio E, Serio CD, Zagato L, Cusi D, Hamlyn JM, Stella A, Bianchi G, Manunta P. Role of the adducin family genes in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2005, 23(3):54-39. Lee HH, Won GS, Chao HT,

LeeYJ, Chung BC. Novel missense mutations, GCC [Ala306]- > GTC [Val] and ACG [Thr318]- > CCG [Pro], in the CYP11B1 gene cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency in the Chinese. 2005, 62(4):418-22.

LeleRD. Hypertension: molecular approach. *J Assoc Physicians India*. 2004,

52:53-62.

ManuntaP, Bianchi G. Low-salt diet and diuretic effect on blood pressure and organ damage. *J Am Soc Nephrol*. 2004, 15:43-6.

MooreJH. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004, 4(6):795-803.

MooreJH. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered*. 2003, 56(1-3):73-82.

MorrisBJ, Benjafield AV, Lin RC. Essential hypertension: genes and dreams. *Clin Chem Lab Med*. 2003, 41(7):834-44.

OrchardTJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. *Kidney Int*. 2002, 62(3):963-70.

O'ShaughnessyKM. The genetics of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 2001, 51(1):5-11.

ParvingHH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1996, 7(12):2509-17.

PetrovicD, Bidovec M, Peterlin B. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and essential arterial hypertension in childhood. *Folia Biol (Krakow)*. 2002, 50(1-2):53-6.

PirolaCJ. Molecular genetics of essential hypertension. Susceptibility and resistance genes *Medicina (B Aires)*. 2000, 60(1):59-66.

PochE, Botey A. [Is essential arterial hypertension of renal etiology? Lessons from molecular genetics] *Med Clin (Barc)*. 1998, 111(2):58-60.

Rajput C, Makhijani K, Norboo T, Afrin F, Sharma M, Pasha ST, Pasha MA. CYP11B2 gene polymorphisms and hypertension in highlanders accustomed to high salt intake. *Hypertens*. 2005, 23(1):79-86.

Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH. Power of multifactor dimensionality

reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genet Epidemiol.* 2003, 24(2):150-7.

RitchieMD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2001, 69(1):138-47..

Romano-SpicaV, Mettimano M, Ianni A, Specchia ML, Ricciardi G, Savi L. Epidemiology of essential hypertension: the role of genetic polymorphism. *Eur J Epidemiol.* 2003, 18(3):211-9.

Sadowski RH, Falkner B. Hypertension in pediatric patients. *Am J Kidney Dis.* 1996, 27(3):305-15.

Salgado CM, Carvalhaes JT. Arterial hypertension in childhood. *J Pediatr (Rio J).* 2003, 79:S115-24.

Savva SC, Kourides Y, Epiphaniou-Savva M, Tornaritis M, Kafatos A. Short-term predictors of overweight in early adolescence. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004, 28(3):451-8.

SoaresML, Coelho T, Sousa A, Batalov S, Conceicao I, Sales-Luis ML, Ritchie MD, Williams SM, Nievergelt CM, Schork NJ, Saraiva MJ, Buxbaum JN. Susceptibility and modifier genes in Portuguese transthyretin V30M amyloid polyneuropathy: complexity in a single-gene disease. *Hum Mol Genet.* 2005, 14(4):543-53. .

SpeirsHJ, Katyk K, Kumar NN, Benjafeld AV, Wang WY, Morris BJ. Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension. *J Hypertens.* 2004, 22(5):931-6.

Sulochana L, Asirvadam C, Girinath MR, Cherian KM, Das PM. Hypertension in childhood. *Ann Acad Med Singapore.* 1981, 10(4):485-93.

TaittonenL, Uhari M, Kontula K, Kainulainen K, Miettinen H, Turtinen J, Nuutinen M. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion

polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens.* 1999, 12(9 Pt 1):858-66.

TsaiCT, Lai LP, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, Ritchie MD, Moore JH, Hsu KL, Tseng CD, Liao CS, Tseng YZ. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. *Circulation.* 2004, 6;109(13):1640-6.

Varda NM, Gregoric A. A diagnostic approach for the child with hypertension. *Pediatr Nephrol.* 2005, 20(4):499-506. .

VaysseJ, Pilardeau P, Gattegno L. Variations in serum alpha-L-fucosidase activity during childhood and pregnancy. *Chim Acta.* 1990, 187(3) :273-80.

Vos LE, Oren A, Uiterwaal C, Gorissen WH, Grobbee DE, Bots ML. Adolescent blood pressure and blood pressure tracking into young adulthood are related to subclinical atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) study. *Am J Hypertens.* 2003, 16(7):549-55.

Wilk JB, Djousse L, Arnett DK, Hunt SC, Province MA, Heiss G, Myers RH. Genome-wide linkage analyses for age at diagnosis of hypertension and early-onset hypertension in the HyperGEN study. *Am J Hypertens.* 2004, 17(9):839-44.

WilliamsSM, Ritchie MD, Phillips JA 3rd, Dawson E, Prince M, Dzhura E, Willis A, Semanya A, Summar M, White BC, Addy JH, Kpodonu J, Wong LJ, Felder RA, Jose PA, Moore JH. Multilocus analysis of hypertension: a hierarchical approach. *Hum Hered.* 2004, 57(1):28-38.

Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, O'Rahilly S, Frayling TM, Bell JI, Lathrop GM, Bennett A, Dhillon R, Fletcher C, Groves CJ, Jones E, Prestwich P, Simecek N, Rao PV, Wishart M, Bottazzo GF, Foxon R, Howell S, Smedley D, Cardon LR, Menzel S, McCarthy MI. A genomewide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a U.K. population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 2001, 69(3):553-69.

Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA.

Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics*. 2004, 19(3):233-46.

ZieskeAW, Malcom GT, Strong JP. Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY study. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2002, 21(2):213-37.

Zorc-PleskovicR, Bidovec M, Bregar D, Milutinovic A, Terzic R, Teran N. The ScaI gene polymorphism of the atrial natriuretic factor and essential arterial hypertension in childhood. *Coll Antropol*. 2004, 28(2):617-21.

Table 1. Characteristics of study subjects

BMI	Male			Female		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD
SBP						
hypertensive	35	25	7.3	15	24	3.4
hypotensive	8	21	1.7	42	22	1.7
DBP						
hypertensive	26	24	4.3	24	26	4.1
hypotensive	27	21	2.1	23	22	2.1

ABSTRACT

Association Study between Adolescent Essential Hypertension and Candidate Genes : Kangwha study

Genetic factors play a more important role than environmental factors in the development of child essential hypertension comparing to adult essential hypertension. Therefore it could be speculated as the main trait to search the candidate gene of hypertension. So, this study is to evaluate the association between adolescent essential hypertension and candidate genes using the extreme value distribution of the blood pressure. We used the means of the blood pressure value during the three years (from 15 age to 17 age) based on the classification according to systolic blood pressure and diastolic blood pressure for the 470 adolescents in the Kangwha study. We selected the extreme value distribution of means corresponding to about 10 percent at each phenotype and gave definitions as hypertensive and hypotensive. Using these two opposite phenotypes, we evaluated the effect on total 25 markers corresponding to 11 genes in 6 mechanisms to regulate blood pressure. For analysis based on single locus, we performed chi-square test based on difference of the allele and genotype frequency and trend test to evaluate the additive effect according to the number of allele causing hypertension. Also we evaluated genetic models using odds ratio. For analysis based on haplotype, using EM (Expectation-Maximization) algorithm at first we reconstructed haplotype to analyze the LD (linkage disequilibrium) among the markers. To evaluate the difference of reconstructed haplotypes at

hypertensive and hypotensive, we performed the likelihood ratio test. Also, to find the specific haplotype causing hypertension, we performed the haplotype trend regression. For analysis based on multilocus, we used MDR(multifactorial dimensionality reduction) test which is a non-parametric method and is demonstrated the usefulness and validity. Specially, we constructed the model to eliminate the single locus causing hypertension stepwise and then evaluated the effect of the interaction among the markers. For analysis based on single locus, we found associated markers(1, 19, and 21 each corresponding to ADRB2, CYP11B2 and REN genes) at systolic blood pressure, markers(1, 9, 19 and 21 each corresponding to ADRB2, GRK4, CYP11B2 and ADD1 genes) at diastolic blood pressure, Also, we found markers(1, 19 and 21) following to dominance model of lower frequency allele at systolic blood pressure, marker 9 following to dominance model of lower frequency allele at diastolic blood pressure, markers(1 and 19) following to co-dominance model of lower frequency allele at diastolic blood pressure, marker 20 following to dominance model of upper frequency allele at diastolic blood pressure. For analysis based on haplotype, C-A-C haplotype constructed markers(1, 2 and 3) of the ADRB2 was a risk factor at systolic and diastolic blood pressure, C-T-C and C-C-C haplotypes constructed markers(1, 2 and 3) of the GRK4 was risk factors at systolic blood pressure, C-T haplotypes constructed markers(1 and 2) of the GRK4 was a risk factor at systolic blood pressure. For analysis based on multilocus, marker 1 and 3 showed interaction at two combination among 22 markers, marker 3 and 19 showed interaction at two combination among 22 markers except the markers causing the main effect of hypertension. So, we found the interaction between ADRB2 and CYP11B2. Conclusionally, The study design and results of this study are novel tries comparing to previous studies for childhood and adolescent hypertension based on candidate gene case-control study. Also this study is very

meaningful six reasons 1] Evaluation based on systematic approach using many candidate genes including many hypertension physiological pathway. 2] Concordant results in different three methods(based on single locus, haplotype, multilocus). 3] Finding gene interaction to difficult using other methods. 4] To eliminate selection bias using extreme value. 5] Finding each genes causing hypertension based on systolic blood pressure and diastolic blood pressure. 6] Keeping reliability of measuring blood pressure using the mean of three years. Although these results are meaningful to understand hypertension, there are the study limitation for BMI evaluation as confounding value.

Key word: Adolescent hypertension, BMI, Haplotype, ADRB2, GRK4, CYP11B2, ADD1, multilocus interaction, MDR