



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](#)

의학박사 학위논문

소아기에 조기 발병한 한국인 크론병 환자에서
autophagy 관련 유전자의 다형성에 관한 연구

2013년 8월

서울대학교 대학원
의학과 소아과학 전공

나 소 영

의학박사 학위논문

소아기에 조기 발병한 한국인 크론병 환자에서
autophagy 관련 유전자의 다형성에 관한 연구

지도교수 서 정 기

2013년 8월

서울대학교 대학원
의학과 소아과학 전공

나 소 영

소아기에 조기 발병한 한국인 크론병 환자에서
autophagy 관련 유전자의 다형성에 관한 연구

지도교수 서 정 기

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2013년 4월

서울대학교 대학원
의학과 소아과학 전공
나 소 영

나소영의 의학박사 학위논문을 인준함

2013년 7월

위 원 장 _____ (인)
부위원장 _____ (인)
위 원 _____ (인)
위 원 _____ (인)
위 원 _____ (인)

Genetic Polymorphisms in Autophagy Associated
Genes and Early-Onset Crohn disease
Susceptibility in Korean Children

by

So Young Na, M.D.

Directed by Prof. Jeong Kee Seo

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirements for the Degree of Doctor of Philosophy
in Medicine (Major in Pediatrics)
at Seoul National University College of Medicine

July 2013

Doctoral Committee:

Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____

국문초록

목적: 소아기에 조기 발병한 한국인 크론병 환자에서 autophagy pathway와 관련된 *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2* 유전자의 다형성에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 2000년 1월부터 2012년 5월까지 서울대학교 어린이병원에서 크론병으로 진단 받은 환자 중에서 발병시 연령이 15세 이하인 환자 65명을 환자군으로, 건강한 72명을 대조군으로 하였다. 11개의 SNP[*ATG16L1* SNP rs2241880, *IRGM* SNP (rs13361189, rs4958847, rs1000113, rs10065172, rs72553867), *ULK1* SNP (rs12303764, rs10902469, rs7488085), *NOD2* SNP (Arg702Trp, Gly908Arg)]에 대해 Taqman assay로 분석하였고, *NOD2* SNP leu1007fsinsC은 직접 시퀀싱법으로 분석하였다. 환자군의 발병시 연령은 8.6 ± 4.72 세였고, 1세 이하는 12명(18.5%)이었으며 1세 이하와 8세 이상에 주로 분포하였다.

결과: 12개의 SNP중에서 2개의 SNP이 유의한 결과를 보였다. *IRGM* SNP rs1000113은 대립유전자 빈도(OR 1.71 95% CI: 1.05-2.79, $p=0.03$)와 유전형 분포(dominant model: OR 2.17 95% CI 1.07-4.39, $p=0.03$)에서 크론병과의 연관성을 보였다. *IRGM* SNP rs72553867은 대립유전자 빈도(OR 0.50 95% CI: 0.27-0.91, $p=0.02$)와 유전형 분포(dominant model: OR=0.50: 95% CI, 0.23-0.94, $p=0.03$)에서 크론병과의 연관성을 보였다. *ATG16L1*, *ULK1*은 크론병과 연관성이 없었다. *NOD2*의 SNP(Arg702Trp, Gly908Arg, leu1007fsinsC)은 환자군과 대조군 모두에서 wild-type으로만 관찰되었다. 유전형-표현형 분석에서 발병 연령, 병변의 위치, 병변의 형태와의 연관성은 없었다.

결론: 본 연구에서 *IRGM* SNP rs1000113은 위험인자로, *IRGM* SNP rs72553867은 방어인자로 조기 발병한 크론병과의 연관성을 보였다. 이는

소아기에 조기 발병한 크론병에서 autophagy pathway가 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

중심단어: autophagy, 조기 발병 소아 크론병, 유전자 다형성, *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2*

학번: 2007-30494

도표목록

Table 1. Taqman Probe Type & Assay ID

Table 2. Primer & Probe Sequence

Table 3. Demographic and Clinical Characteristics in Children with CD

Table 4. Minor Allele Frequency Between CD and Controls

Table 5. Genotype Distribution Between CD and Controls

Table 6. Comparison of Genotype Distribution Between CD and Controls

Table 7. Haplotype Frequency Between CD and Controls

Table 8. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Perianal Fistula

Table 9. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Disease Location

Table 10. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Disease Behavior

Table 11. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Age at Onset

그림 목록

Figure 1. Age Distribution

Figure 2. Linkage Disequilibrium and Haplotype Block Structures of
IRGM SNPs

목차

국문초록	i
도표목록	iii
그림목록	v
논문목차	vi
서론	1
연구대상 및 방법	6
결과	11
고찰	28
결론	35
참고문헌	36
영문초록	53

서론

크론병은 장내 항원에 대한 비정상적인 면역반응이 특징인 다인자성 질환으로, 장내 세균과 같은 환경적 요인에 대한 면역 반응을 조절하는 여러 유전자들의 상호작용에 의해 발생한다고 생각된다(Kaser et al., 2010). 크론병은 궤양성 대장염과 더불어 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)에 속하는데, 성인기에 발병한 IBD와 구별하여 16세 이하의 소아기에 발병한 IBD를 'early onset' IBD라고 한다(Levine et al., 2011). 특히 1~2세 이하의 영아기에 발병한 IBD를 'very early onset' IBD라고 분류하기도 한다.

영아기에 발병한 IBD (very early-onset IBD)는 연장아 및 성인에서보다 증상이 중하고, 면역 억제제에 잘 반응하지 않는다(Cohen et al., 2000; Ruemmele et al., 2006; Størdal et al., 2004; Ferraris et al., 2006; Seo, 2011). 그리고 치료에 불응하는 심한 대장염을 보인 1세 이하의 영아들에서 IL-10 수용체 유전자의 변이를 발견한 보고(Glocker et al., 2009)나 IL-10 유전자의 변이를 발견한 보고(Glocker et al., 2010)는 소아기 특히 영아기에 발병하는 IBD의 병인이 성인기에 발병하는 IBD의 병인과 다를 수 있으며, 성인기에 발병하는 IBD에 비해 유전적 소인이 더 강할 수 있음을 시사한다.

2001년 *NOD2* 유전자 변이가 크론병의 질병 발생 연관 유전자로 최초로 발견된 이후(Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001), 유전적 인자에 대한 수많은 연구가 있어 왔다. 최근 genome-wide association study (GWAS) 등의 연구를 통해 현재까지 질병 연관 유전자로 밝혀진 유전자 부위(loci)로는 크론병은 71개, 궤양성 대장염은 47개, 크론병과 궤양성 대장염 공통으로는 28개가 있다(Lees et al., 2011).

IBD를 일으키는 중요한 pathway로는 innate immunity와 관련된

autophagy pathway, Th1과 Th17 반응에 관여하여 adaptive immunity에 중요한 역할을 하는 IL-23/Th17 pathway (*IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, TYK2*), 장의 염증을 down-regulation하는 면역억제 유전자인 IL-10 signalling pathway, epithelial barrier 기능과 관련된 pathway (*HNF4A, LAMB1, CDH1, GNA12*)가 있다(Lees et al., 2011; Abraham et al., 2009).

크론병은 세포 내 병원균을 제거하는 선천 면역에 결핍이 있을 것으로 생각되는데, 성인에서의 연구를 통해 autophagy 관련 유전자인 autophagy-related 16-like 1 (*ATG16L1*) (Hampe et al., 2007; Rioux et al., 2007; Cummings et al., 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007)과 immunity-related GTPase M (*IRGM*) (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007; Parkes et al., 2007; Singh et al., 2006), Unc-51-like kinase 1 (*ULK1*)(Henckaerts et al., 2011)의 유전자 다형성이 크론병과 연관이 있다고 추정되면서 autophagy pathway가 주목받게 되었다(Xavier et al., 2008; Fritz et al., 2011). 소아는 성인에 비해 감염의 위험성이 더 높다는 점과 1세 이하의 영아기에 발병한(very early-onset) 크론병 환자들이 면역 결핍과 관련이 있으며(Cannioto et al., 2009; Yamamoto-Furusho et al., 2006; Korzenik et al., 2000), 이 들에서 장관 내 감염과 이른 발병 연령이 관련이 있다(Ruemmele et al., 2006)는 점에서 소아기에 조기 발병한 크론병 환자에서 autophagy pathway의 중요성이 더욱 강조된다.

Autophagy란 lysosome을 이용하여 세포 자신의 세포질 내에 존재하는 여러 소기관, 단백질, 세균을 분해하고 제거하는 lysosomal degradation pathway를 말한다(Levine et al., 2007; Levine et al., 2008). 이는 세포 내 병원균을 제거하는 선천 면역 반응으로서 중요할 뿐 아니라, 적응 면역계에 항원을 제시함으로써 장내 미생물에 대한 방어 면역에 중요한 기전으로 작용한다(Levine et al., 2007). Autophagy의 첫 단계는 autophagosome

을 형성하는 것인데, 이는 initiation, isolation membrane의 nucleation, isolation membrane의 elongation의 과정을 통해 형성된다(Pyo et al., 2012). 이후 autophagosome은 lysosome과 fusion하여 autolysosome을 형성하는데, 이 autolysosome에서 내용물의 분해가 일어나게 된다(Levine et al., 2008; Deretic et al., 2006).

Atg16L은 Atg12-Atg5 conjugate과 결합하여 Atg12-Atg5-Atg16L complex를 형성하는데, 이 complex는 LC3(Atg8)-phospholipid phosphatidylethanolamine이 새로운 isolation membrane을 만드는데 기여함으로써 autophagosome을 형성한다(Pyo et al., 2012; Deretic et al., 2006; Mizushima et al., 2003; Grant et al., 2008). 따라서 *ATG16L1* 결핍시에는 autophagosome이 형성되지 못한다(Cadwell et al., 2008). *IRGM*은 isolation membrane의 생성을 유도하고, autophagosome을 형성하는데 필수적인 LC3(Atg8)를 유도하며, autolysosome을 형성한다(Singh et al., 2006). *ULK1*은 autophagosome의 형성과정의 시작단계에 Atg1/ULK1 complex의 활성화가 필요하다(Pyo et al., 2012; Mizushima, 2010).

*NOD2*는 autophagy에 직접 참여하지는 않지만 이를 유도한다. 즉, *NOD2*는 세포질 내로 침입한 세균의 세포벽의 주요 성분인 peptidoglycan fragment muramyl dipeptide를 인지한 후(Girardin et al., 2003), autophagy 결정기(determinant)인 *ATG16L1*을 세균이 침입한 부위의 세포막으로 동원하여 세포내로 침입한 세균을 autophagosome으로 싸도록 하여 autophagy를 유도한다(Travassos et al., 2010; Cooney et al., 2010). 요약하자면, *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2* 유전자 변이가 일어나면 세포내로 침입한 세균에 대한 autophagy가 일어나지 않아 친염증성 면역반응이 과도하게 일어나게 되어 크론병의 발생으로 이어지게 된다.

Autophagy에 직접 관여하는 유전자 중 가장 많이 연구된 유전자는 *ATG16L1*로, *ATG16L1* 유전자 다형성 중에서는 Ala281Thr 변이가 크론병 발생의 가장 강력한 위험인자로 알려져 있다(Cadwell et al., 2008;

Cummings et al., 2007; Cotterill et al., 2010). *IRGM*은 rs13361189와 rs4958847이 GWAS(Parkes et al., 2007)와 meta-analysis 연구 (Palomino-Morales et al., 2009)에서, rs1000113은 다른 GWAS(Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007)에서, rs10065172는 독일과 유럽의 보고에서(Glas et al., 2013; Prescott et al., 2010) 크론병과 연관성이 있었다. *ULK1*은 2011년에 처음으로 크론병의 질병 발생 연관 유전자로 보고되었는데(Henckaerts et al., 2011), rs12303764(Henckaerts et al., 2011), rs10902469와 rs7488085(Morgan et al., 2012)이 크론병의 발생과 관련이 있었다.

*NOD2*의 유전자 다형성은 크론병 발생과 관련된 유전적 인자 중 가장 큰 부분(15~20%)을 차지한다(Van Limbergen et al., 2009; Barrett et al., 2008). 그 중 Arg702Trp, Gly908Arg, leu1007fsinsC의 3가지 중요한 유전자 다형성이 널리 알려져 있는데, 이들은 유럽 및 미국에서 크론병 발생의 위험인자로 알려져 있다(Hampe et al., 2001; Cuthbert et al., 2002; Vermeire et al., 2002; Heliö et al., 2003; Abreu et al., 2002; Weiss et al., 2004). 그러나 우리나라(Lee et al., 2005; Croucher et al., 2003)를 포함하여 일본(Nakagome et al., 2010; Yamazaki et al., 2002; Iinoue et al., 2002), 중국(Gao et al., 2005; Leong et al., 2003), 인도(Pugazhendh et al., 2008), 말레이시아(Chua et al., 2009) 크론병 환자에서는 *NOD2*의 Arg702Trp, Gly908Arg, leu1007fsinsC 변이가 전혀 없었다. 이것이 인종의 차이인지 성인기에 발병한 경우여서인지는 불명확하다. 왜냐하면 소아에서는 *NOD2*에 대한 연구가 거의 없고, 산발적인 보고 (Motamed et al., 2011; Jang et al., 2010)가 있을 따름이나 이 또한 대상 환자수가 16명으로 적고(Motamed et al., 2011), 진단시 평균 연령이 12세 (Jang et al., 2010)로 연령이 높아 제한점이 있다.

최근 autophagy pathway에 관련된 유전자들에 대해 많은 관심을 가지고 연구가 진행 중이나 지금까지의 연구는 autophagy pathway에 관련된 유전

자 중 1~2가지의 유전자를 대상으로 한 연구이고, *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2*의 4가지 유전자를 체계적으로 검사한 외국이나 국내의 연구는 아직 없다. 그리고 기존의 연구는 유럽이나 북미 등 서양인을 대상으로 한 연구가 대다수이어서 아시아인을 대상으로 한 연구는 매우 부족하다. 게다가 대부분의 연구는 성인 환자를 대상으로 한 연구여서, 면역 결핍과 관련되어 있고 감염의 위험성이 큰 영유아를 포함한 소아기에 조기 발병한 크론병에서 autophagy pathway가 어떤 연관성이 있는지에 대한 연구가 반드시 필요한 실정이다.

이에 본 연구에서는 소아기에 조기 발병한 크론병 환자와 건강대조군을 대상으로 autophagy pathway에 직접 관련된 유전자인 *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*와 autophagy를 유도하는 *NOD2* 유전자의 다형성을 분석하여, 조기 발병한 크론병에서 유전자 다형성의 연관성, 유전형-표현형의 관련성, 기존에 알려져 있는 성인에서 발병한 크론병과의 차이점에 대해 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

2000년 1월부터 2012년 5월까지 서울대학교 어린이병원에서 크론병으로 진단 받은 환자 중에서 발병시 연령이 15세 이하인 소아 환자 65명을 대상으로 하였다. 크론병의 진단은 임상적, 내시경적, 영상의학적, 조직학적 기준에 따라 진단하였고(IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, 2005; Bousvaros et al., 2007), 크론병의 분포 및 양상은 Paris 분류법(Levine et al., 2011)에 따라 정의하였다. 대조군은 성별을 고려하여 건강한 72명을 대조군으로 선정하였다.

2. 연구 방법

환자군과 대조군에 대해 총 12개의 SNP에 대해 genotyping을 시행하였다. 그 중 11개의 SNP [*ATG16L1* SNP rs2241880, *IRGM* SNP (rs13361189, rs4958847, rs1000113, rs10065172, rs72553867), *ULK1* SNP (rs12303764, rs10902469, rs7488085), *NOD2* SNP (rs2066844, rs2066845)]은 Taqman assay로 분석하였다.

NOD2 SNP rs2066847은 SNP 근처에 4개의 SNP이 존재하여 Taqman assay로 분석이 불가능하여 direct sequencing으로 분석하였다.

1) 11개의 SNP의 분석

㉓ DNA 추출

G-DEX™ genomic DNA extraction kit (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 말초혈액으로부터 DNA를 추출하였다.

㉞ SNP genotyping (Taqman assay)

ATG16L1 SNP rs2241880, *IRGM*의 SNP (rs13361189, rs4958847, rs1000113, rs10065172, rs72553867) *ULK1* SNP (rs12303764, rs10902469, rs7488085), *NOD2* SNP (rs2066844, rs2066845) 분석은 TaqMan® fluorogenic 5' nuclease assay (ABI, Foster City, CA, USA)로 이루어졌다. PCR 반응을 위해 반응액은 template DNA 10ng, 40X assay mix 0.13ul (Assay ID는 표 1, 표 2와 같다), TaqMan® Universal PCR master mix 2.5ul로 총 5ul로 조정하였다. Real-time PCR은 ABI Prism® 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였는데 PCR 수행은 95°C 10분간 pre-denaturing한 후 95°C, 15초, 60°C, 1분간의 2단계로 PCR을 45 cycles 수행하였다. PCR 수행이 끝난 후 결과의 분석은 7900HT SDS 2.3 software (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 실시하였다.

2) *NOD2* SNP rs2066847의 분석

㉟ DNA 추출

G-DEX™ genomic DNA extraction kit (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 말초혈액으로부터 DNA를 추출하였다.

㊱ PCR

genomic DNA 100ng과 각각의 시발체 2.5 pmoles를 혼합하여 총 20 µl로 조정하였고, 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응은 AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix (Bioneer, Seoul, Korea)을 이용하여 한 cycle당 94°C에서 5분간 전변성 반응 후 변성반응 94°C 1분, 결합반응 58°C 1분, 연장반응 72°C 1분을 총 30회 반복한 후 72°C에서 10분간 추가 연장반응을 시행하였다.

증폭된 산물은 1% agarose gel electrophoresis로 분리시킨 뒤 Qiaquick

PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다.

© Direct sequencing

PCR 산물은 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

3. 통계 분석

검사 대상의 적합성 여부를 위한 Hardy-Weinberg equilibrium의 검증은 chi-square test를 사용하였다. SNP들과 크론병의 연관성을 알아보기 위하여, 환자군과 정상대조군에서의 각 SNP의 minor allele 빈도와 SNP 유전형 분포를 비교하였다. 이를 위해 chi-square test를 이용하였고, 로지스틱 회귀분석을 시행하여 p값과 odds ratio(OR)와 95% 신뢰구간을 계산하였다. Haploview software v.4.2 (Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA)를 이용하여 분석한 SNP에 대해 haplotype을 확인하였고, haplotype의 질병 연관성을 분석하기 위해 로지스틱 회귀 분석을 시행하였다. 유전형과 표현형의 연관성을 알아보기 위하여 환자군을 연령, 성별, 침범 부위, 침범 형태 등으로 나누어 로지스틱 회귀분석을 시행하였다. 모든 통계분석은 SPSS ver 17.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였고, 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

Table 1. Taqman Probe Type & Assay ID

Gene	SNP IDs	Assay ID	Type
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	C___9095577_20	pre-designed
	rs13361189	C__31986315_10	pre-designed
	rs4958847	C___1398968_10	pre-designed
<i>IRGM</i>	rs1000113	C__27107152_10	pre-designed
	rs10065172	rs10065172	
	rs72553867	rs72553867	
<i>ULK1</i>	rs12303764	C____146323_10	pre-designed
	rs10902469	C__30670034_10	pre-designed
	rs7488085	C__26012615_10	pre-designed
<i>NOD2</i>	rs2066844	C__11717468_20	pre-designed
	rs2066845	C__11717466_20	pre-designed

Table 2. Primer & Probe Sequence

Gene	SNP IDs		Primer sequence
<i>IRGM</i>	rs10065172	Forward primer	AGGGTCTGCCACCACAAC
		Reverse primer	TGATGAAGTCATACCGGTTGAACTG
		VIC Probe	CATTTCCATCAGGTAGTTC
		FAM Probe	CATTTCCATCAAGTAGTTC
<i>IRGM</i>	rs72553867	Forward primer	CCTCCTATTTCTCTTCCCACTTTTCAAA
		Reverse primer	CGGTTGAACTGCATTTCCATCA
		VIC Probe	CCTGGCAAAGGGTCT
		FAM Probe	CTGGCACAGGGTCT

결과

Clinical Characteristics of Study Population

연구 대상의 임상적 특징들은 표 3에 요약되어 있다. 65명의 소아 크론병 환자를 분석하였다. 환자군의 발병시 연령은 8.6 ± 4.72 세이고 1세 이하는 12명(18.5%)였으며, 1세 이하와 8세 이상에 집중적으로 분포하였다(Fig 1.) 건강대조군은 72명으로 남자 37명, 여자 35명이었다.

Distribution of Minor Allele Frequency and Genotype

환자군과 정상대조군에서 각 SNP의 minor allele frequency와 유전형 분포는 Hardy-Weinberg equilibrium내에 있었다. 환자군과 대조군에서의 12개 SNP의 minor allele frequency은 표 4에 제시하였다.

12개의 SNP 중 2개의 SNP이 크론병과 연관성이 있었는데, *IRGM* rs1000113는 환자군에서 유의하게 높았으며(OR 1.71 95% CI: 1.05-2.79, $p=0.03$), *IRGM* rs72553867는 환자군에서 유의하게 낮았다(OR 0.50 95% CI: 0.27-0.91, $p=0.02$). *NOD2*의 3가지 SNP의 minor allele은 환자군과 대조군 모두에서 관찰되지 않았다.

환자군과 대조군에서의 유전형은 표 5와 표 6에 표시하였다. *IRGM* rs1000113의 TT 동형접합체와 CT이형접합체의 합은 환자군에서 그 빈도가 유의하게 높아($p=0.03$), 적어도 하나의 T 대립유전자를 가진 사람은 CC 유전형을 가진 사람보다 크론병의 위험도가 2.17배 증가하였다 (TT+CT vs. CC: OR=2.17; 95% CI, 1.07-4.39).

한편 *IRGM* rs72553867의 AA 동형접합체와 CA이형접합체의 합은 환자군에서 그 빈도가 유의하게 낮아 ($p=0.03$), 적어도 하나의 A 대립유전자를 가진 사람은 CC유전형을 가진 사람보다 크론병의 위험도가 1/2로 감소하였다. (AA+CA vs. CC: OR= 0.50; 95% CI, 0.23-0.94). 이는 *IRGM* rs72553867

의 A 대립유전자가 방어인자로 작용함을 시사한다. *NOD2*의 3종류의 SNP은 환자군과 대조군 모두에서 wild-type으로만 존재하였다.

Haplotype Analysis of *IRGM* Polymorphisms

분석한 SNP에 대한 pairwise linkage disequilibrium (LD)의 pattern은 그림 2에 제시하였다. *IRGM* SNP rs rs13361189, rs72553867, rs10065172, rs4958847, rs1000113가 한 개의 LD 블록내에 있었다.($D' = 1.0$) 32개의 가능한 haplotype중에서 haplotype의 빈도가 0.01이상인 haplotype 4가지를 표 7에 제시하였다.

Hapotype 1(C-C-T-A-T)은 크론병에서 가장 흔하게 관찰(46.2%)되는 haplotype이었고 대조군에서는 두 번째로 흔하게 발견(34.3%)되었는데, 두 군에서의 빈도 차이는 11.9%로 가장 큰 차이에 해당하였다. Hapotype 1(C-C-T-A-T)은 3개의 minor 대립유전자(C allele at SNP rs13361189, T allele at SNP rs10065172, T allele at SNP rs 1000113)와 2개의 major 대립유전자(C allele at SNP rs 72553867, A allele at SNP rs rs4958847)로 구성되어 있는데, 로지스틱 회귀분석에서 haplotype 1의 빈도가 대조군에 비해 환자군에서 더 높았다(46.2% vs. 34.3%; OR=1.64; 95% CI, 1.01-2.68; $p=0.047$).

Hapotype 2(T-A-C-A-C)는 1개의 minor 대립유전자(C allele at SNP rs 72553867)와 4개의 major 대립유전자로 구성되어 있는데, 로지스틱 회귀분석에서 haplotype 2의 빈도가 대조군에 비해 환자군에서 유의하게 낮아(14.6% vs. 25.0%; OR=0.51; 95% CI,0.28-0.95; $p=0.03$) 크론병을 방어하는 haplotype임을 나타냈다. Hapotype 3과 haplotype 4는 크론병과는 연관성이 없었다.

Geotype-Phenotype Analysis

앞의 결과에서 크론병과의 연관성이 입증된 2개의 *IRGM* SNP과 크론병 환자의 임상적인 특징과의 연관성을 분석하였는데, 임상적 특징의 항목으로 disease location, disease behavior, 항문 질환의 유무를 택하여 로지스틱 회귀 분석을 하였지만, minor allele frequency의 유의한 차이는 없었다(표 8-10). 발병 연령을 기준으로 1세 이하와 1세 이상의 두 군으로 나누어 minor 대립유전자 빈도를 비교하였지만 통계적 유의성은 없었으며($p=0.57$ and $p=0.75$), 발병 연령 기준을 4세, 6세, 9세로 하였을 때에도 역시 유의한 차이는 없었다(표 11). 유전형에 따라 적어도 1개의 minor 대립유전자를 가지고 있는 유전형 군과 야생형 군 사이의 상기에 언급한 임상적 특징들을 비교하였으나, 역시 유의한 차이는 없었다(표 8-11).

Table 3. Demographic and Clinical Characteristics in Children with CD

	CD (n=65)
Age at onset (years) ^a	8.6±4.72
Age group at onset	
0 ≤ <1 years	12 (18.5%)
2 ≤ <6 years	5 (7.7%)
6 ≤ <10 years	18 (27.7%)
10 ≤ <15 years	30 (46.2%)
Duration of follow-up (years) ^a	4.73±4.42
Gender (male/female)	38/27 (1.4:1)
Disease location ^b	
Ileum	3 (4.7%)
Colon	8 (12.5%)
Ileocolon	52 (81.3%)
Upper GI tract	7 (10.9%)*
Disease behavior ^b	
Inflammatory	49 (76.6%)
Stricturing	12 (18.8%)
Penetrating	2 (3.1%)
Fistula	
Perianal	24 (36.9%)
Internal	4 (6.2%)
Surgery	24 (36.9%)

CD, Crohn disease

^aMean±standard deviation.

^bDisease location and behavior according to the Paris classification

*One patient had upper G-I involvement only.

Table 4. Minor Allele Frequency Between CD and Controls

Gene	SNP IDs	Allele		Minor Allele Frequency		OR	95% CI	<i>p</i>
		1*	2	CD (n=65)	Control (n=72)			
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	G	A	41.5%	35.4%	1.30	0.79-2.09	0.30
<i>IRGM</i>	rs13361189	C	T	48.5%	38.2%	1.52	0.94-2.46	0.30
	rs4958847	G	A	36.9%	35.9%	1.04	0.64-1.71	0.30
	rs1000113	T	C	46.9%	34.0%	1.71	1.05-2.79	0.03
	rs10065172	T	C	48.5%	38.0%	1.53	0.95-2.48	0.08
	rs72553867	A	C	14.6%	25.7%	0.50	0.27-0.91	0.02
<i>ULK1</i>	rs12303764	G	T	23.8%	18.3%	1.40	0.78-2.51	0.26
	rs10902469	C	G	8.5%	10.4%	0.80	0.35-1.80	0.58
	rs7488085	C	T	8.5%	10.4%	0.80	0.35-1.80	0.58
<i>NOD2</i>	rs2066844	T	C	0.0%	0.0%	-	-	-
	rs2066845	C	G	0.0%	0.0%	-	-	-
	rs2066847	C (insetion)	-	0.0%	0.0%	-	-	-

*Allele 1 is as minor allele.

Table 5. Genotype Distribution Between CD and Controls

Gene	SNP IDs	CD (n=65)			Control (n=72)		
		+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	13 (20.0%)	28 (43.1%)	24 (36.9%)	11 (15.3%)	29 (40.3%)	32 (44.4%)
<i>IRGM</i>	rs13361189	17 (26.2%)	29 (44.6%)	19 (29.2%)	13 (18.1%)	29 (40.3%)	30 (41.7%)
	rs4958847	8 (12.3%)	32 (49.2%)	25 (38.5%)	9 (12.7%)	33 (46.5%)	29 (40.8%)
	rs1000113	15 (23.4%)	31 (47.7%)	19 (29.2%)	11 (15.3%)	27 (37.5%)	34 (47.2%)
	rs10065172	17 (26.2%)	29 (44.6%)	19 (29.2%)	13 (18.3%)	28 (39.4%)	30 (42.3%)
	rs72553867	0 (0.0%)	19 (29.2%)	46 (70.8%)	3 (4.2%)	31 (43.1%)	38 (52.8%)
<i>ULK1</i>	rs12303764	3 (4.6%)	25 (38.5%)	37 (56.9%)	4 (5.6%)	18 (25.4%)	49 (69.0%)
	rs10902469	0 (0.0%)	11 (16.9%)	54 (83.1%)	0 (0.0%)	15 (20.8%)	57 (79.2%)
	rs7488085	0 (0.0%)	11 (16.9%)	54 (83.1%)	0 (0.0%)	15 (20.8%)	57 (79.2%)
<i>NOD2</i>	rs2066844	0 (0.0%)	0 (0.0%)	65 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	72 (100.0%)
	rs2066845	0 (0.0%)	0 (0.0%)	65 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	71 (100.0%)
	rs2066847	0 (0.0%)	0 (0.0%)	65 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	72 (100.0%)

+/+: homozygous mutant +/-: heterozygous mutant -/-: wild-type

Table 6. Comparison of Genotype Distribution Between CD and Controls

Gene	SNP IDs	Genotype of homozygous mutant and heterozygous mutant		OR	95% CI	<i>p</i>
		CD (n=65)	Control (n=72)			
<i>ATG16L1</i>	rs2241880	41 (63.1%)	40 (55.6%)	1.37	0.69-2.71	0.37
<i>IRGM</i>	rs13361189	46 (70.8%)	42 (58.3%)	1.73	0.85-3.52	0.13
	rs4958847	40 (61.5%)	42 (59.2%)	1.11	0.56-2.20	0.78
	rs1000113	46 (70.8%)	38 (52.8%)	2.17	1.07-4.40	0.03
	rs10065172	46 (70.8%)	41 (57.7%)	1.77	0.87-3.61	0.11
	rs72553867	19 (29.2%)	34 (47.2%)	0.50	0.23-0.94	0.03
<i>ULK1</i>	rs12303764	28 (43.1%)	22 (31.0%)	1.69	0.83-3.40	0.14
	rs10902469	11 (16.9%)	15 (20.8%)	0.77	0.33-1.84	0.56
	rs7488085	11 (16.9%)	15 (20.8%)	0.77	0.33-1.84	0.56
<i>NOD2</i>	rs2066844	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NA*	NA	NA
	rs2066845	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NA	NA	NA
	rs2066847	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NA	NA	NA

*NA, Not applicable.

Table 7. Haplotype Frequency Between CD and Controls

Haplotype ID	SNP*	CD (n=65)	Control (n=72)	OR	95% CI	<i>p</i>
1	C-C-T-A-T	46.2%	34.3%	1.64	1.01-2.68	0.047
2	T-A-C-A-C	14.6%	25.0%	0.51	0.28-0.95	0.03
3	T-C-C-G-C	36.2%	36.4%	0.99	0.60-1.62	0.96
4	C-C-T-A-C	2.31%	4.29%	0.53	0.13-2.16	0.37

*The haplotype combination consists of *IRGM* SNPs rs13361189, rs72553867, rs10065172, rs4958847 and rs1000113 (list in order).

Table 8. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Perianal Fistula

SNP IDs	Perianal fistula (+)	Perianal fistula (-)	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	24 (48.0%)	37 (46.3%)	1.07	0.53-2.18	0.85
C	26 (52.0%)	43 (53.8%)			
TT/CT	17 (70.8%)	29 (70.7%)	1.05	0.33-3.04	1.00
CC	7 (29.2%)	12 (29.3%)			
rs72553867					
A	9 (18.0%)	10 (12.5%)	1.54	0.58-4.10	0.39
C	41 (82.0%)	70 (87.5%)			
AA/CA	8 (33.3%)	11 (26.8%)	1.36	0.46-4.07	0.58
CC	16 (66.7%)	30 (73.2%)			

Table 9. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Disease Location

SNP IDs	Ileal ^a	Colonic ^a	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	52 (47.3%)	7 (43.8%)	1.15	0.40-3.31	0.79
C	58 (52.7%)	9 (56.3%)			
TT/CT	39 (70.9%)	5 (62.5%)	1.46	0.31-6.86	0.67
CC	16 (29.1%)	3 (37.5%)			
rs72553867					
A	16 (14.5%)	3 (18.8%)	0.74	0.19-2.88	0.71
C	97 (85.5%)	13 (81.3%)			
AA/CA	16 (29.1%)	3 (37.5%)	0.68	0.15-3.21	0.69
CC	39 (70.9%)	5 (62.5%)			

^aIncludes ileal disease with or without colonic or upper tract involvement.

Colonic disease include patients with or without upper tract involvement(i.e. L2±L4)

Table 10. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Disease Behavior

SNP IDs	Inflammatory	Noninflammatory ^a	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	50 (51.1%)	9 (32.1%)	2.20	0.91-5.34	0.08
C	48 (49.0%)	19 (67.9%)			
TT/CT	37 (75.5%)	7 (50.0%)	3.08	0.90-10.59	0.07
CC	12 (24.5%)	7 (50.0%)			
rs72553867					
A	13 (13.3%)	5 (17.9%)	0.70	0.23-2.18	0.55
C	85 (86.7%)	23 (82.1%)			
AA/CA	13 (26.5%)	5 (35.7%)	0.65	0.18-2.30	0.52
CC	36 (73.5%)	9 (64.3%)			

^aIncludes subjects with stricturing and/or penetrating disease.

Table 11. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Age at Onset

SNP IDs	<1yr	≥ 1yr	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	10 (41.7%)	51 (48.1%)	0.77	0.31-1.89	0.57
C	14 (58.3%)	55 (51.9%)			
TT/CT	7 (58.3)	39 (73.6%)	0.50	0.14-1.84	0.31
CC	5 (41.7)	14 (26.4%)			
rs72553867					
A	4 (16.7%)	15 (14.2%)	1.21	0.36-4.05	0.75
C	20 (83.3%)	91 (85.8%)			
AA/CA	4 (33.3%)	15 (28.3%)	1.27	0.33-4.84	0.74
CC	8 (66.7%)	38 (71.7%)			

Table 11. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Age at Onset (continued)

SNP IDs	<4yr	≥4yr	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	12 (42.9%)	49 (48.0%)	0.81	0.35-1.89	0.63
C	16 (57.1%)	53 (52.0%)			
TT/CT	9 (64.3%)	37 (72.5%)	0.68	0.19-2.38	0.53
CC	5 (35.7%)	14 (27.5%)			
rs72553867					
A	4 (14.3%)	15 (14.7%)	0.97	0.30-3.18	1.00
C	24 (85.7%)	87 (85.3%)			
AA/CA	4 (28.6%)	15 (29.4%)	0.96	0.26-3.55	1.00
CC	10 (71.4%)	36 (70.6%)			

Table 11. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Age at Onset (continued)

SNP IDs	<6yr	≥6yr	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	14 (41.2%)	47 (49.0%)	0.73	0.33-1.61	0.44
C	20 (58.8%)	49 (51.0%)			
TT/CT	11 (64.7%)	35 (72.9%)	0.68	0.21-2.22	0.52
CC	6 (35.3%)	13 (27.1%)			
rs72553867					
A	4 (11.8%)	15 (15.6%)	0.72	0.22-2.34	0.58
C	30 (88.2%)	81 (84.4%)			
AA/CA	4 (23.5%)	15 (31.3%)	0.68	0.19-2.43	0.76
CC	13 (76.5%)	33 (68.8%)			

Table 11. Allele Frequency and Genotype of *IRGM* SNPs in CD by Age at Onset (continued)

SNP IDs	<9yr	≥9yr	OR	95% CI	<i>p</i>
rs1000113					
T	31 (47.0%)	30 (46.9%)	1.00	0.50-2.00	0.99
C	35 (53.0%)	34 (53.1%)			
TT/CT	23 (69.7%)	23 (71.9%)	0.90	0.31-2.62	0.85
CC	10 (30.3%)	9 (28.1%)			
rs72553867					
A	9 (13.6%)	10 (15.6%)	0.85	0.32-2.26	0.75
C	57 (86.4%)	54 (84.4%)			
AA/CA	9 (27.3%)	10 (31.3%)	0.83	0.28-2.41	0.72
CC	24 (72.7%)	22 (68.8%)			

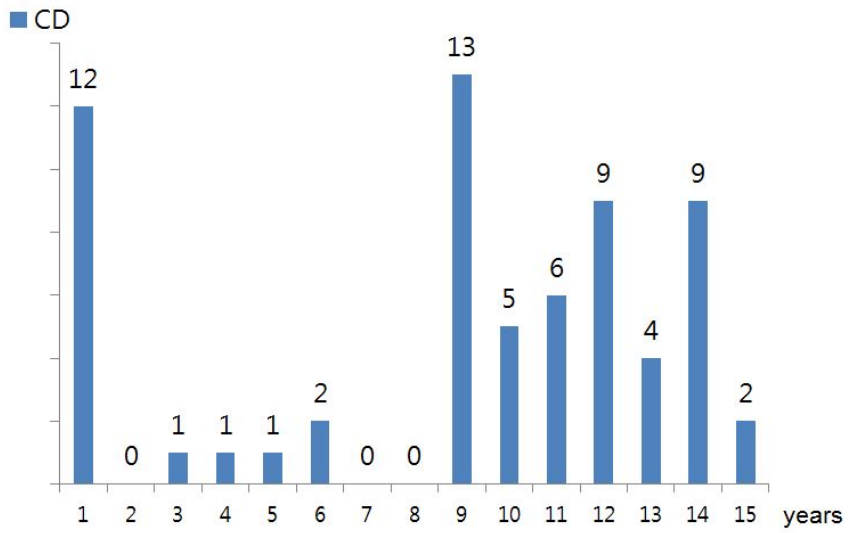


Figure 1. Age distribution

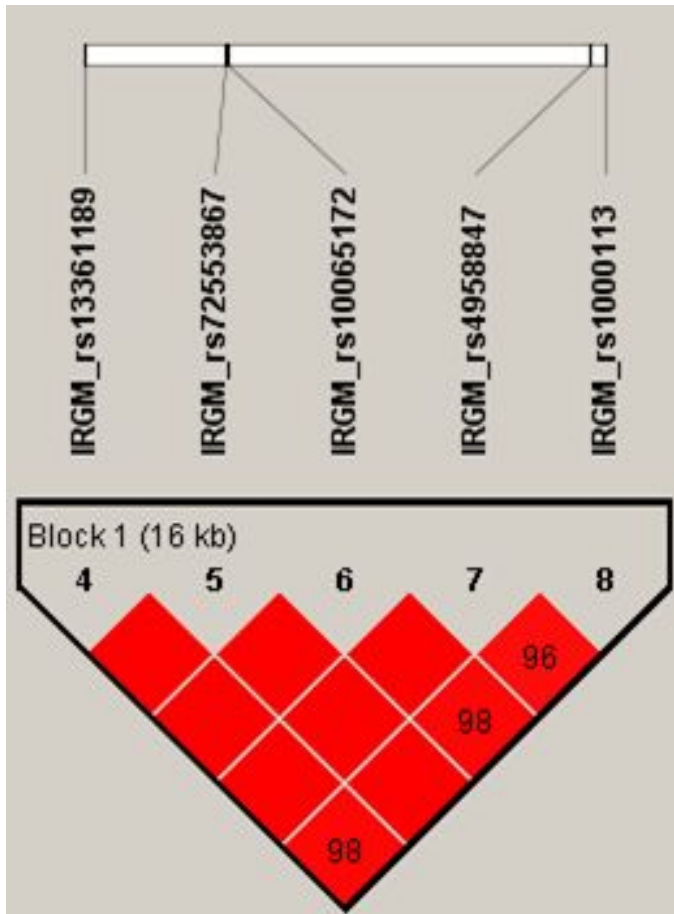


Figure 2. Linkage disequilibrium and haplotype block structures of *IRGM* SNPs. SNP rs13361189, rs72553867, rs10065172, rs4958847, and rs1000113 in tight LD were organized in a single haplotype block ($D'=1.0$).

고찰

본 연구에서는 한국인 소아 크론병 환자에서 autophagy pathway와 관련된 *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2* 유전자의 다형성과 크론병의 연관성에 대해 연구하였다. 그 결과 대립유전자 빈도와 유전형 분포에서 *IRGM* SNP rs1000113은 위험인자로, rs72553867은 방어인자로서의 크론병과의 연관성을 보였다.

본 연구에서 *IRGM* rs1000113의 minor T 대립유전자는 위험인자 (OR=1.71, 95% CI=1.05-2.79, $p=0.03$)로 크론병과 연관성을 보였으며, 적어도 하나의 T 대립유전자를 가진 사람은 CC 유전형을 가진 사람보다 크론병의 위험도가 2.17배 증가하였다 (TT+CT vs. CC: OR=2.17; 95% CI, 1.07-4.39, $p=0.03$). 영국인을 대상으로 한 GWAS에서 rs1000113이 ($p=5.1 \times 10^{-8}$, 환자군의 minor 대립유전자 빈도 9.8%, 대조군의 minor 대립유전자 빈도 6.7%) 크론병과 관련이 있다고 보고하였다(Wellcome Trust Case Control Consortium., 2007). 또한 독일인을 대상으로 한 보고(Glas et al., 2013)에서도 rs1000113의 minor 대립유전자와($p=0.047$, OR=1.27, 95% CI 1.01-1.61) rs10065172의 minor 대립유전자가($p=0.016$, OR=1.33, 95% CI 1.06-1.66)이 크론병과 연관이 있었다. 반면 일본의 보고(Yamazaki et al., 2009)에서는 크론병 환자군에서 minor 대립유전자 빈도는 0.34, 대조군에서 minor 대립유전자 빈도는 0.32로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편 소아에서의 연구는 거의 없는데, 이탈리아 소아 크론병 환자를 대상으로 한 보고(Latiano et al., 2009)에서 rs1000113과(minor 대립유전자 OR=1.69 95% CI=1.26-2.26, $p=4 \times 10^{-4}$, dominant model OR=1.85, 95% CI=1.33-2.57, $p=2.3 \times 10^{-4}$) rs4958847(minor 대립유전자 OR=1.41 95% CI=1.09-1.83, $p=8 \times 10^{-3}$ dominant model OR=1.49, 95% CI=1.10-2.03, $p=9.6 \times 10^{-3}$)이 유의한 인자라고 하였다.

IRGM rs72553867는 minor A 대립유전자는 방어인자 (OR=0.50 95% CI: 0.27-0.91, $p=0.02$)로 크론병과 연관성을 보였으며, 적어도 하나의 A 대립 유전자를 가진 사람은 CC유전형을 가진 사람보다 크론병의 위험도가 1/2로 감소하였다. (AA+CA vs. CC: OR= 0.50; 95% CI, 0.23-0.94). 또 haplotype 분석에서도 크론병의 방어인자임을 보여주었다. 이는 한국인 성인을 대상으로 한 최근의 보고(Moon et al., 2013)와는 일치하며, 서양 뿐 아니라 일본을 비롯한 아시아에서 현재까지 보고된 적이 없다.

*IRGM*은 5q33에 위치하며(Bekpen et al., 2010), 181개의 아미노산을 코딩하는 긴 첫 번째 exon과 50kb이상의 짧은 4개의 putative exons으로 구성되어있다(Bekpen et al., 2005). 유전자 다형성은 protein coding, splicing regulation, transcriptional regulation, post-translation등의 단계에서 변화를 일으켜 그 영향을 나타내게 된다. 단백질을 coding하지 않아 regulatory cluster로 추정되는 *IRGM* 유전자 다형성이 *IRGM*의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 설명하는 몇 개의 다른 기전이 증명되었다. McCarroll 등(2008)은 rs13361189 및 rs10065172와 완벽한 연관 불균형을 이루는 20-kb의 deletion polymorphism의 deletion allele이 transformed cell에서 *IRGM*의 발현을 감소시킨다는 사실을 밝혔다. 그리고 이 *IRGM* mRNA의 발현의 감소가 autophagy의 유도를 방해하여 세포내 *Salmonella typhimurium*의 제거하는데 장애를 일으킴을 보고하였다. Bekpen 등(2009)이 deletion polymorphism에 의해 *IRGM*의 spliced isoform의 발현에도 변화가 생긴다고 하였다. Prescott 등(2010)은 5' UTR에 존재하는 insertion-deletion ('indel') polymorphism이 transcription factor이 결합하는 부위를 방해한다고 보고하였다. Brest 등은(2011) exon 2에 존재하는 synonymous SNP인 rs10065172가 microRNA의 binding domain을 변화시켜 mRNA stability와 gene translation에 영향을 줘 크론병 환자에서 세균에 대한 autophagy를 약화시킨다고 보고하였다.

IRGM 유전자의 발현을 감소시키는 것 이외에, 직접적으로 세포내 세균을

제거하는 autophagy와 관련된 실험 결과들이 발표되었다. murine *IRGM*이 autophagy를 유도하여 세포내의 *Mycobacterium tuberculosis*를 파괴하고, 사람 *IRGM*이 세포내 세균의 수를 감소시키거나(Singh et al., 2006), *Salmonella typhimurium* 감염시 IFN- γ 에 의해 *IRGM*이 유도되어 방어작용을 한다는 보고가 있다(Rioux et al., 2007) 또 Lapaquette 등(Lapaquette et al., 2010)은 *IRGM*과 *ATG16L1*이 없는 사람 대식세포에서 대식세포 내 adherent-invasive *E. coli* LF82 혈청형의 증식이 증가하였을 뿐 아니라, non-pathogenic, commensal, pathogenic strains을 포함한 모든 *E. coli* strains의 증식도 증가함을 입증하였는데, 이는 autophagy가 장의 염증을 감소시키고 장의 항상성을 유지하여 크론병 발병의 중요한 방어역할을 함을 시사한다.

IRGM rs1000113은 유전자와 유전자 사이의 intergenic region에 존재하는 genomic SNP이고 *IRGM* rs72553867은 exon 1에 존재하는데, 두 SNP의 기능에 대한 연구는 현재까지는 없다. 따라서 *IRGM* rs1000113이 어떤 기전으로 크론병의 발병을 일으키고, *IRGM* rs72553867은 어떤 기전으로 크론병의 발병을 감소시키는 지에 대해 알기 위해서, 향후 이 2가지 SNP의 기능에 대한 연구가 필요하다.

IRGM rs10065172은 유럽인을 대상으로 한 여러 보고(Glas et al., 2013; Prescott et al., 2010)에서 유의하다고 제시된 것과는 대조적으로, 본 연구에서는 연관성이 없었다(환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.49, 대조군의 minor 대립유전자 빈도=0.38, $p=0.08$). 130명의 성인 크론병 환자를 대상으로 한 일본(Nakagome et al., 2010)의 보고(환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.60, 대조군의 minor 대립유전자 빈도= 0.61)에서도 *IRGM* rs10065172이 크론병과 관련성이 없었다고 하였다. 그러나 한국인 성인을 대상으로 한 연구에서는 rs10065172가 크론병의 질병 발생 연관 유전자(환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.47, 대조군의 minor 대립유전자 빈도=0.39 $p=0.004$)로 본 결과와 반대되는 결과를 보였다(Moon et al., 2013).

이 차이가 환자군의 대상 수의 차이에 의한 것인지, 성인기에 발병한 크론병과 소아기에 발병한 크론병의 차이에 의한 것인지는 추후 지속적인 연구가 필요하다.

IRGM rs13361189와 *IRGM* rs4958847은 유럽인을 대상으로 한 GWAS(Parkes et al., 2007)와 메타 분석(Palomino-Morales et al., 2009)에서 공통적으로 크론병과의 연관성이 있다고 발표된 바 있다. 개별 연구로 보면 *IRGM* rs13361189은 유럽(Prescott et al., 2010)과 유태인(Peter et al., 2011)에서, *IRGM* rs4958847은 대규모의 독일-벨기에 코호트 연구(Weersma et al., 2009)에서 크론병과의 연관성을 보였다. 그리고 평균 발병 연령이 11.7세인 북미 소아 크론병 환자를 대상으로 한 연구(Prescott et al., 2008)에서 *IRGM* rs13361189은 크론병과 관련이 있었으며, 이탈리아 소아 크론병 환자를 대상으로 한 보고(Latiano et al., 2009)에서 rs4958847(minor 대립유전자 OR=1.41 95% CI=1.09-1.83, $p=8 \times 10^{-3}$ dominant model genotype OR=1.49, 95% CI=1.10-2.03, $p=9.6 \times 10^{-3}$)은 크론병과 관련이 있다고 하였다. 그러나 서양의 결과와는 대조적으로, 일본인을 대상으로 한 두 연구(Yamazaki et al., 2009; Prescott et al., 2010)에서 *IRGM* rs13361189, *IRGM* rs4958847이 크론병과 관련이 없었다 [(rs13361189 환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.36, 대조군의 minor 대립유전자 빈도=0.33) (rs4958847 환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.51 대조군의 minor 대립유전자 빈도=0.50)]. 또한 본 연구에서도 *IRGM* rs13361189와 *IRGM* rs4958847은 크론병과 관련이 없는 것으로 나와 크론병의 유전적인 배경에 서양인과 동양인의 인종적인 차이의 가능성에 대해 생각할 수 있으나, 향후 더 많은 지역에서의 연구가 필요하다.

GWAS를 비롯한 많은 연구들이 각기 다른 성인 집단에서 *ATG16L1* SNP rs2241880(Ala281Thr)이 크론병과 연관성이 높았다고 하였다(Hampe et al., 2007; Rioux et al., 2007; Cummings et al., 2007; Cotterill et al., 2010) 소아 크론병 환자를 대상으로는 6개의 연구가 시행되었는데, 영국의

연구(Prescott et al., 2007)에서는 성인에서보다 16세 이전에 크론병을 진단받은 소아(63.8%)에서 40세 이후 진단을 받은 군(53.6%)에 비하여 minor 대립 유전자의 빈도가 높다고 하였으며, 북미 소아 크론병 환자를 대상으로 한 연구(Prescott et al., 2008; Baldassano et al., 2007)와 캐나다 소아 크론병 환자를 대상으로 한 연구(Amre et al., 2009)에서도 minor 대립 유전자의 빈도가 환자군에서 더 높았다. 그러나 진단시 평균 연령이 11.2세인 스코틀랜드 소아 크론병 환자를 대상으로 한 연구(Van Limbergen et al., 2008)와 이탈리아 소아 크론병 환자들에 대한 연구(Latiano et al., 2008)에서는 *ATG16L1* SNP rs2241880과 크론병 발생과 관련이 없었다. 또한 일본(Yamazaki et al., 2007)에서도 *ATG16L1* SNP rs2241880과 크론병과의 연관성이 없었으며(환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.28, 대조군의 minor 대립유전자 빈도=0.26), 국내 성인 크론병 환자를 대상으로 한 연구에서도 *ATG16L1* SNP rs2241880을 포함한 12개의 유전자 변이(rs2083575, rs12471449, rs6431660, rs1441090, rs3792110, rs2289472, rs2241880, rs2241879, rs3792106, rs4663396, rs7587051, rs6748547) 중 크론병과 연관성을 보인 유전자 변이는 없었다(Yang et al., 2009). 본 연구에서 *ATG16L1* SNP rs2241880의 환자군에서의 minor 대립유전자 빈도는 41.5%, 대조군에서의 minor 대립유전자 빈도는 35.4%로 한국인 성인(Yang et al., 2009)에서의 결과(환자군의 minor 대립유전자 빈도=0.32, 대조군의 minor 대립유전자 빈도=0.30)보다는 두 군 모두에서 다소 높았지만, 두 군 간의 차이는 유의하지 않아 크론병과는 연관성이 없었다.

ATG16L1 SNP rs2241880(Ala281Thr, T300A)는 non-synonymous SNP 으로 threonine을 alanine으로 치환시키는 coding variant이다. Cadwell 등(2008)은 *ATG16L1*이 결핍되고 중요한 autophagy protein인 ATG5가 결핍된 쥐의 장 상피세포인 Paneth cell에서 antimicrobial peptides를 포함하고 있는 granule의 구조를 변화시켜 granule exocytosis pathway에 현저한 이상을 초래함을 보고하였고, *ATG16L1* 변이의 동형접합체를 가진 크

론병 환자에서도 Paneth cell granule의 이상을 보고하였다. Kuballa 등 (2008)은 *ATG16L1* SNP rs2241880의 경우 autophagosomes내에 있는 internalised *Salmonella typhimurium*을 포획하는 데에 이상을 보였다고 하였다. SNP rs2241880의 기능적 역할은 현재 완전히 알려져 있지 않다. 그러나 SNP rs2241880은 단백질-단백 상호작용에 연관된 것으로 알려진 WD repeat domain에 있으며, 따라서 autophagy에 관련된 다른 단백질과의 상호작용을 촉진하는데 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다(Xavier et al., 2008).

유럽인 대상의 연구들에서 공통적으로 크론병과의 연관성이 높았던 *NOD2*의 Arg702Trp, Gly908Arg, leu1007fsinsC 변이(Hampe et al., 2001; Cuthbert et al., 2002; Vermeire et al., 2002; Heliö et al., 2003; Abreu et al., 2002; Weiss et al., 2004)의 경우, 아시아인 대상의 연구들에서는 *NOD2*의 3종류의 SNP의 minor allele이 발견되지 않아 인종별 차이를 보여주었다. 우리나라 크론병 소아를 대상으로 한 연구에서 상기 *NOD2*의 3종류의 SNP은 역시 발견되지 않았지만(Jang et al., 2010), 대상 환자의 진단시 연령이 평균 11.9 ± 3.6 세로 나이가 많았다. 본 연구에서는 1세 이하의 영아가 18.5%(12명)를 차지할 정도로 타 연구에 비해 영아의 비중이 높았다. 그러나 본 연구에서 영유아뿐 아니라 연장아에서도 *NOD2* 3종류의 SNP은 wild type genotype으로만 존재함을 확인하였다. 따라서 서양인과 아시아인에서 *NOD2*의 Arg702Trp, Gly908Arg, leu1007fsinsC 변이의 차이는 발병 연령이 아닌 인종적인 차이 때문일 수 있다고 생각된다.

*ULK1*은 2011년에 처음 발표된 크론병 연관 유전자로, 12q24에 위치하는 28개의 exon으로 구성된 유전자이다. 크론병과의 연관성에 대한 연구는 외국에서도 많지 않으며, 아시아에서는 본 연구가 처음이다. 본 연구에서는 3가지 SNP 모두 크론병과 연관이 없었다.

어린 연령에 발병한 크론병에서 늦은 나이에 발병한 크론병에서보다 유전적 영향을 더 많이 받을 것으로 기대되고 있다. 본 연구에서는 발병

연령을 기준으로 1세 이하와 1세 이상의 두 군으로 나누어 2개의 *IRGM* SNP (rs1000113, rs 72553867)에 대해 비교하였으나 결과는 유의하지 않았다. 발병 연령 기준을 4세, 6세, 9세로 하였을 때에도 역시 유의한 차이는 없었다. 이탈리아의 보고(Latiano et al., 2009)에서도 성인기에 발병한 환자군과 소아기에 발병한 환자군 간의 *IRGM* rs1000113과 *IRGM* rs4958847의 유전형 분포의 차이는 없었다.

결론

본 연구에서는 한국인 소아 크론병 환자에서 autophagy pathway에 직접 관련된 유전자인 *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*와 autophagy를 유도하는 *NOD2* 유전자의 다형성과 크론병과의 연관성에 대해 연구하였다. 그 결과 *IRGM* SNP rs1000113은 위험인자로, *IRGM* SNP rs72553867은 방어인자로 크론병과의 연관성을 보였다. 이는 소아기에 조기 발병한 크론병에서도 autophagy pathway가 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

참고문헌

Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2009 ;361(21):2066-78.

Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2002;123:679-88.

Amre DK, Mack DR, Morgan K, Krupoves A, Costea I, Lambrette P, Grimard G, Dong J, Feguery H, Bucionis V, Deslandres C, Levy E, Seidman EG. Autophagy Gene ATG16L1 But Not IRGM Is Associated with Crohn's Disease in Canadian Children. Inflamm Bowel Dis 2009;15:501-7.

Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. Gut 2007;56: 1171-3.

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A,

Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JL, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:955-62.

Bekpen C, Hunn JP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, Glowalla E, Leptin M, Howard JC. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol* 2005;6:R92.

Bekpen C, Marques-Bonet T, Alkan C, Antonacci F, Leogrande MB, Ventura M, Kidd JM, Siswara P, Howard JC, Eichler EE. Death and resurrection of the human IRGM gene. *PLoS Genet* 2009;5(3):e1000403

Bekpen C, Xavier RJ, Eichler EE. Human IRGM gene "to be or not to be" *Semin Immunopathol* 2010;32:437-44.

Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier JF, Hébuterne X, Harel-Bellan A, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A, Hofman P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011;43:242-5.

Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW 4th. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008;456:259-63.

Cannioto Z, Berti I, Martelossi S, Bruno I, Giurici N, Crovella S, Ventura A.

IBD and IBD mimicking enterocolitis in children younger than 2 years of age. *Eur J Pediatr* 2009;168:149-55.

Chua KH, Hilmi I, Ng CC, Eng TL, Palaniappan S, Lee WS, Goh KL. Identification of NOD2/CARD15 mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *J Dig Dis* 2009;10:124-30.

Cohen Z, Weizman N, Kurtzbar E, Newman N, Kapuller V, Maor E, Mares AJ. Infantile colonic Crohn's disease: a report of four cases in one family. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:461-3.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces

autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010;16:90-7.

Cotterill L, Payne D, Levinson S, McLaughlin J, Wesley E, Feeney M, Durbin H, Lal S, Makin A, Campbell S, Roberts SA, O'Neill C, Edwards C, Newman WG.

Replication and meta-analysis of 13,000 cases defines the risk for interleukin-23 receptor and autophagy-related 16-like 1 variants in Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 2010;24:297-302.

Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, Lu T, Nikolaus S, Yang SK, Krawczak M, Kim WH, Schreiber S. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* 2003;11(1):6-16.

Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Ahmad T, Cardon LR, Jewell DP. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:941-6.

Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of *NOD2* gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-74.

Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol* 2006;18:375-82.

Ferraris A, Torres B, Knafelz D, Barabino A, Lionetti P, de Angelis GL, Iacono G, Papadatou B, D'Amato G, Di Ciommo V, Dallapiccola B, Castro M. Relationship between CARD15, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and early-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:355-361.

Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 2011;60:1580-8.

Gao M, Cao Q, Luo L, Wu ML, Hu WL, Si JM. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population.

Chin J Intern Med. 2005;210-2.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.

Glas J, Seiderer J, Bues S, Stallhofer J, Fries C, Olszak T, Tsekeri E, Wetzke M, Beigel F, Steib C, Friedrich M, Göke B, Diegelmann J, Czamara D, Brand S.

IRGM Variants and Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in

the German Population. PLoS One 2013;8(1):e54338.

Glocker EO, Frede N, Perro M, Sebire N, Elawad M, Shah N, Grimbacher B. Infant colitis-it's in the genes. Lancet 2010;376:1272.

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. N Engl J Med 2009;361:2033-45.

Grant SF, Baldassano RN, Hakonarson H. Classification of genetic profiles of Crohn's disease: a focus on the ATG16L1 gene. Expert Rev Mol Diagn 2008;8:199-207.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in *NOD2* gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 2001;357:1925-28.

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association

scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-11.

Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T, Kontula K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003;52:558-62.

Henckaerts L, Cleynen I, Brinar M, John JM, Van Steen K, Rutgeerts P, Vermeire S. Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1392-7.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.

IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:1-7.

Iinoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Núñez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama

T, Hibi T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:86-91.

Jang JY, Song SM, Kim KM, Oh SH, Lee YJ, Rhee KW. Lack of common NOD2 mutations in Korean pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Pediatr Int* 2010;52:888-9.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573-621.

Korzenik JR, Dieckgraefe BK. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1121-9.

Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* 2008;3(10):e3391.

Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010;12:99-113.

Latiano A, Palmieri O, Cucchiara S, Castro M, D'Inca R, Guariso G, Dallapiccola B, Valvano MR, Latiano T, Andriulli A, Annese V.

Polymorphism of the IRGM gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:110-6.

Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, D'Inca R, Cucchiara S, Riegler G, Staiano AM, Ardizzone S, Accomando S, de Angelis GL, Corritore G, Bossa F, Annese V. Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult and pediatric onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J Gastroenterol* 2008;14:4643-51.

Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-70.

Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007;7:767-77.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008;132:27-42.

Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(6):1314-21.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics:

common pathways with other diseases. *Gut* 2011;60(12):1739-53.

Lee GH, Kim CG, Kim JS, Jung HC, Song IS. Frequency analysis of NOD2 gene mutations in Korean patients with Crohn's disease. *Korean J Gastroenterol* 2005;45(3):162-8.

McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, Zody MC, Hall JL, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Silverberg MS, Taylor KD, Rioux JD, Altshuler D, Daly MJ, Xavier RJ. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:1107-12.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003;116:1679-88.

Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:132-9.

Moon CM, Shin DJ, Kim SW, Son NH, Park A, Park B, Jung ES, Kim ES, Hong SP, Kim TI, Kim WH, Cheon JH. Associations between genetic variants in the IRGM gene and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19(1):106-14.

Morgan AR, Lam WJ, Han DY, Fraser AG, Ferguson LR. Association Analysis of ULK1 with Crohn's Disease in a New Zealand Population. *Gastroenterol Res Pract* 2012;2012:715309. Epub 2012 Mar 20.

Motamed F, Najafi M, Taghvaei M, Moazzami K, Farahmand F, Khodadad A, Fallahi GH, Parvaneh N, Khatami GR, Rezaei N. NOD2 sequencing in Iranian children with Crohn's disease. *Z Gastroenterol* 2011;49(12):1526-8.

Nakagome, S., Y. Takeyama, S. Mano, S. Sakisaka, T. Matsui, S. Kawamura, and H. Oota. Population-specific susceptibility to Crohn's disease and ulcerative colitis: dominant and recessive relative risks in the Japanese population. *Ann Hum Genet* 2010;74:126-36.

North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; Colitis Foundation of America, Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB, Dubinsky MC, Glickman JN, Gold BD, Griffiths AM, Jevon GP, Higuchi LM, Hyams JS, Kirschner BS, Kugathasan S, Baldassano RN, Russo PA. Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44(5):653-74.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

Palomino-Morales RJ, Oliver J, Gomez-Garcia M, Lopez-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A, Alizadeh BZ, Martin J. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Genes Immun* 2009;10:356-64.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007;39:830-2.

Peter I, Mitchell AA, Ozelius L, Erazo M, Hu J, Doheny D, Abreu MT, Present DH, Ullman T, Benkov K, Korelitz BI, Mayer L, Desnick RJ; New York Crohn's Disease Working Group. Evaluation of 22 genetic variants with Crohn's disease risk in the Ashkenazi Jewish population: a case-control study. *BMC Med Genet* 2011;6:12-63.

Prescott NJ, Dominy KM, Kubo M, Lewis CM, Fisher SA, Redon R, Huang N, Stranger BE, Blaszczyk K, Hudspith B, Parkes G, Hosono N, Yamazaki K, Onnie CM, Forbes A, Dermitzakis ET, Nakamura Y, Mansfield JC, Sanderson J, Hurles ME, Roberts RG, Mathew CG. Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 2010;19:1828-39.

Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. Genetic variants in the autophagy pathway contribute to paediatric Crohn's disease. *Gut* 2008;57:1336-7.

Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132:1665-71.

Pugazhendhi S, Amte A, Balamurugan R, Subramanian V, Ramakrishna BS. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol* 2008;27(5):201-3.

Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in

autophagy. *Exp Mol Med* 2012;44:73-80.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39(5):596-604.

Ruemmele FM, El Khoury MG, Talbotec C, Maurage C, Mougenot JF, Schmitz J, Goulet O. Characteristics of inflammatory bowel disease with onset during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:603-9.

Seo JK. Pediatric Inflammatory Bowel Disease (IBD): Phenotypic, Genetic and Therapeutic Differences between Early-Onset and Adult-Onset IBD. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;14(1):1-25.

Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006;313:1438-41.

Størdal K, Jahnsen J, Bentsen BS, Moum B. Pediatric inflammatory bowel disease in southeastern Norway: a five-year follow-up study. *Digestion* 2004;70:226-30.

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010;11:55-62.

Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Anderson NH, Davies G, Gillett PM, McGrogan P, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Arnott ID, Wilson DC, Satsangi J. Autophagy gene ATG16L1 influences susceptibility and disease location but not childhood-onset in Crohn's disease in Northern Europe. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:338-46.

Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009;10:89-116.

Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. *CARD15* genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002;71:74-83.

Weersma RK, Stokkers PC, Cleynen I, Wolfkamp SC, Henckaerts L, Schreiber S, Dijkstra G, Franke A, Nolte IM, Rutgeerts P, Wijmenga C, Vermeire S. Confirmation of multiple Crohn's disease

susceptibility loci in a large Dutch-Belgian cohort. *Am J Gastroenterol* 2009;104(3):630-8.

Weiss B, Shamir R, Bujanover Y, Waterman M, Hartman C, Fradkin A, Berkowitz D, Weintraub I, Eliakim R, Karban A. NOD2/CARD15 mutation analysis and genotype-phenotype correlation in Jewish pediatric patients compared with adults with Crohn's disease. *J Pediatr* 2004;145:208-12.

Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.

Xavier RJ, Huett A, Rioux JD. Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. *Gut* 2008;57:717-20.

Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol* 2006;12:6751-5.

Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. Association analysis of genetic variants in *IL23R*, *ATG16L1* and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* 2007;52:575-83.

Yamazaki K, Takahashi A, Takazoe M, Kubo M, Onouchi Y, Fujino

A, Kamatani N, Nakamura Y, Hata A. Positive association of genetic variants in the upstream region of NKX2-3 with Crohn's disease in Japanese patients. *Gut* 2009;58(2):228-32.

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002;47(9):469-72.

Yang SK, Park M, Lim J, Park SH, Ye BD, Lee I, Song K. Contribution of *IL23R* but not *ATG16L1* to Crohn's disease susceptibility in Koreans. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1385-90.

ABSTRACT

Aims: We investigated genetic polymorphisms in autophagy associated genes (*ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2*) in Korean children with early-onset Crohn disease (CD).

Methods: Genomic DNA from 137 individuals including 65 CD (all younger than 15 years at onset) and 72 healthy, unrelated controls was analyzed for 12 single nucleotide polymorphisms (SNPs); *ATG16L1* SNP rs2241880, *IRGM* SNP (rs13361189, rs4958847, rs1000113, rs10065172, rs72553867), *ULK1* SNP (rs12303764, rs10902469, rs7488085), *NOD2* SNP (Arg702Trp, Gly908Arg, leu1007fsinsC).

NOD2 SNP leu1007fsinsC was analyzed by direct sequencing method and others was analyzed by Taqman assay. The mean age at onset of patients was 8.6 ± 4.72 years. The number of patient younger than 1 was 12 (18.5%) and age distribution showed a bimodal distribution (<1 years vs > 8 years).

Results: Among 12 SNPs, 2 SNPs were associated with CD susceptibility. *IRGM* SNP rs1000113 was significantly associated with CD susceptibility in terms of allelic frequency (OR 1.71 95% CI: 1.05-2.79, $p=0.03$) and genotype frequency (dominant model: OR 2.17 95% CI 1.07-4.39, $p=0.03$). We also found a relationship between *IRGM* SNP rs72553867 and CD susceptibility in the analysis of allelic frequency (OR=0.50 95% CI: 0.27-0.91, $p=0.02$) and genotype frequency (dominant model; OR=0.50; 95% CI, 0.23-0.94, $p=0.03$). None of the *ATG16L1* SNP, *ULK1* SNPs showed any positive association with CD. None had *NOD2* 3 SNPs (Arg702Trp,

Gly908Arg, leu1007fsinsC). Genotype-phenotype analysis revealed no significant associations with a specific CD phenotype, especially age at onset.

Conclusions: Our results confirm *IRGM* SNP rs1000113 as risk loci and *IRGM* SNP rs 72553867 as protective loci for early-onset Crohn disease. This study suggested that autophagy pathway appears to play a central role in the pathogenesis of early-onset Crohn disease in Korean children.

Key words: autophagy, early-onset Crohn disease, single nucleotide polymorphism, *ATG16L1*, *IRGM*, *ULK1*, *NOD2*

Student Number: 2007-30494