

후성유전학 시계를 통해 감지될 수 있는 양극성 장애의 메틸화 변화

정연오 · 조광원[†]

조선대학교 생명과학과

Methylation Changes in Bipolar Disorder that can be detected through The Epigenetic Clock

Yeon-Oh Jeong¹ and Gwang-Won Cho^{1,2†}

¹Department of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

²BK21 FOUR Education Research Group for Age-Associated Disorder Control Technology, Department of Integrative Biological Science, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

Abstract

Bipolar disorder is a mental illness characterized by extreme mood and behavioral swings, such as highs of euphoria and lows of depression. It is a socially significant disorder in which people with the disorder experience intense mood swings and, for those with severe bipolar disorder, it is even difficult leading a normal life. High stress levels in people with mental illness can lead to neuroendocrine disruption, and it is strongly linked to aging. When the neuroendocrine system becomes vulnerable to these mental illnesses and stress, it is likely to accelerate aging. And it's the epigenetic clock that can measure the extent of this accelerated aging. The Epi clock, a pan tissue clock, measures aging through DNA methylation, and the degree of methylation is modified and changed by environmental conditions in the body. Therefore we wanted to check the changes in the epigenetic age of the patients with bipolar disorder. While we found no significant differences in epigenetic age, we did confirm the possibility that people with bipolar disorder have different methylation than normal people. We also found that the EPIC array data fit better on the Epi clock than on the Horvath clock with age-accelerated data from normal people.

Keywords: Aging clock, Bipolar disorder, Age acceleration, DNA methylation

(Received May 31, 2023; Revised July 13, 2023; Accepted July 13, 2023)

[†] Corresponding author: gwcho@chosun.ac.kr

1. 서론

정신적 질환은 심각한 스트레스를 동반하는 질병으로써^[1], 비단 정신적 피해뿐만 아니라 건강까지 영향을 끼친다. 특히 스트레스가 극심한 정신병 환자들의 경우 자살, 사고사 등의 이유를 제하더라도 일반 비환자들 보다 수명이 비교적 짧다는 결과가 보고되고 있다^[2-4]. 따라서 우울증이나 조현병, Bipolar disorder와 같이 극심한 스트레스를 유발할 가능성이 있는 심각한 정신적 질환은 인간의 수명 단축에 기여한다는 가설이 유력하다^[3].

정신적 질환이 노화와 관계가 있다면, 노화의 속도에 영향을 끼친다는 의미이며, 이것이 DNA methylation 정도를 통해 노화를 측정하는 Aging clock에서 이 가설이 어떻게 발현하는지가 주 질문이다. 만약에 정신 질환들의 노화 가속화 가설^[5]을 지지할 수 있다면, 노화 정도를 계산하는데 쓰이는 요소들에도 영향을 끼칠 가능성이 다분하며, 이가 결과로써 나타날 가능성이 있기 때문이다. 실제로, 지나친 스트레스는 DNA Methylation에 영향을 끼치므로 정신적 질환을 지닌 사람들의 Aging clock 속도는 정상인과 차이가 날 수 있다^[6,7].

Aging clock이란, 생명체의 노화로 인한 DNA의 후성유전학적 변화를 감지해 예측 나이와 수명을 도출하는 시계이다. 그 중에서도 Horvath clock은 가장 유명한 Aging clock이며 353개의 CpG 프로브에서의 Methylation 변화를 측정해 예측 나이를 계산한다^[8]. Epi clock은 6761개의 CpG 프로브로부터 Methylation을 계산하여 예측 나이를 계산하며, 두 시계 모두 다양한 조직에서 예측 나이 측정의 높은 정확도를 지닌다^[9]. 이들은 질병이 없는 정상인 군에 대한 시계이므로, 질병을 지닌 사람들의 예측 나이에는 정상인과 다른 차이가 있을 수 있으며, 특히 정신병 같은 노화와 직결되지 않는 질병도 Aging clock의 CpG 프로브에 영향을 줄 수 있어 변화가 있을 수 있다.

Bipolar disorder는 감정 변화가 심히 변칙적으로 나타나는 정신적 질환이다. 극도의 감정 장애, 충동적 행동과 무기력감, 조증과 우울증 증상이 번갈아서 나타날 수 있으며^[10], 이는 일상생활에까지

지장을 초래하는 심각한 정신적 질환으로 분류되므로 치료의 필요성이 요구된다. 이 질환은 환자에게 강한 스트레스를 동반하며 심한 경우 자살까지 유도되는 경우도 존재한다. 그러나 사고사 등을 제외한 사인을 고려했을 때에도 Bipolar disorder 환자는 비교적 적은 수명의 경향이 관측되고 있다. Bipolar disorder 또한 가속 노화 가설을 지지하는 질병으로 알려져 있으며, 심혈관 질환 및 이른 나이의 노화성 질병의 발병 확률이 증가하는 것으로 밝혀져 있다^[11]. 이번 연구에서는 Bipolar disorder의 예측 나이 변화 유무를 확인하여 Bipolar disorder에서 Aging clock으로 측정된 수명의 차이가 나타나는지 밝혀내었다.

2. 재료 및 방법

2.1. GEO data 수집

연구에 사용된 모든 데이터 파일은 공개적으로 접근 가능한 Gene Expression Omnibus (ncbi.nlm.nih.gov/geo/)에서 수집되었다. 인간 뇌 샘플을 사용한 데이터를 수집하였다. 또한, 비교를 위해 실제 나이를 지닌 RAW 데이터만을 선별했다(Table. 1.).

2.2. GEO data 세부사항

정상인과 Bipolar disorder 환자군의 데이터는 GEO의 데이터 세트 중 GSE129428가 선택되었다. 해당 데이터는 사후 Hippocampus에서 추출된 DNA이며, EPIC array에서 분석되었다. 각각 정상인 군 32명과 Bipolar disorder 군 32명으로 구성되어 있으며 정상인은 34-78세, Bipolar disorder 환자는 34-75세의 나잇대를 지니고 있다. Aging clock의 정확한 비교를 위해 두 집단의 나이의 등분산도가 유사한 것을 확인하였으며, 나이의 사분위수를 비교하였을 때 각각의 실험 집단이 유사한 나이 분포를 띠고 있어(Table. 2.) 나이 가속도 비교에 적합함을 확인할 수 있다.

2.3. Horvath clock과 Epi clock의 이용

Idat 파일 형식으로부터 R 프로그램(4.0.4. 버전)

Table 1. GEO set data used in the study.

GEO set ID	Disease	Tissue	Bead array	No. of sample	Data type
GSE129428	Bipolar disorder	Hippocampus	EPIC	64	RAW

Table 2. Details of GSE129428 data set.

State	N	Mean age	1st Quartile	Median age	3rd Quartile	Age range
Control	32	48	40	46	51	34~78
Bipolar disorder	32	47	38	44	51	34~75.9

을 사용하여 각 CpG 사이트들의 베타 값을 추출하였다. 후성유전학적 시계로 가장 보편적이고 유명한 Horvath clock과 최근에 개발된 Epi clock (2022)을 사용하였다. Horvath clock은 353개의 CpG를 가지고 있는 Aging clock으로 각 해당하는 프로브의 베타 값을 추출하였다. EPIC array 데이터에서 19개의 CpG 사이트가 누락되어 해당하는 프로브의 베타 값은 0으로 대체되어 계산되었다^[12]. 뽑은 베타 값은 Horvath clock의 계산 방식에 따라 예측 나이가 계산되었다. Epi clock은 총 6761개의 프로브를 지닌 Aging clock으로 해당하는 베타 값은 위와 동일하게 R로 추출되었다. 배치 이펙트 삭제 및 정규화는 R 프로그램 내의 minfi 패키지로 이루어졌다. Anaconda를 사용해 Epi clock 프로브들의 베타 값만을 뽑아 Coefficient value에 각각의 베타 값을 곱한 후 Intercept 값과 모두 합산하여 예측 나이를 계산하였다. 나이의 가속도 측정은 두 시계 모두 예측 나이에서 실제 나이를 뺀 값이 사용되었다.

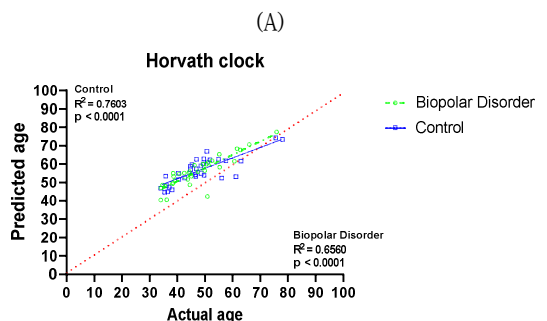
2.4. 통계 처리 및 도식화

실제 나이와 예측 나이 간의 유의적인 평균 차이와 Bipolar disorder 환자 군과 정상인 군의 나이 가속도 차이를 확인하기 위해 Student's t-test가 사용되었으며, Epi clock의 경우 Welch's t-test가 사용되었다. 모든 그래프는 Graph Prism 8를 통해 도식화되었다.

3. 결과

3.1. Horvath clock에서 Bipolar disorder 나이 가속도 변화

334 CpG 프로브로부터 계산된 예측 나이는 실제 나이와 비교했을 때(Fig. 1A.) 정상인과 Bipolar disorder 간에 통계적으로 유의한 수치는 얻지 못했으며, 정상인 군에 비해 Bipolar disorder의 예측 나이가 변화하지 않는 것으로 보였다. 나이 가속도 그래프(Fig. 1B.)에서는 정상인에서의 나이 가속도가 증가하는 것으로 보이나, 오차 범위가 크고, 정상인과 Bipolar disorder과 비교했을 때 Bipolar disorder의 예측 나이가 차이가 없는 것으로 보인다. Horvath clock에서 EPIC array 샘플의 정확도가 떨어짐을 알 수 있으며, Horvath clock에서는 Bipolar disorder의 나이 가속화 현상이 발견되지 않는다는 사실을 시사한다.



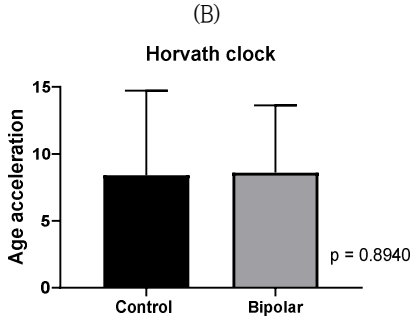


Fig. 1. Epigenetic age measurement using Horvath clock. (A) Predicted age of each sample on Horvath clock. The red dotted line in the middle represents the training regression line of the Epi clock. (B) Age acceleration graph, indicating the difference between the predicted age and the actual age.

3.2. Epi clock에서 Bipolar disorder 나이 가속도 변화

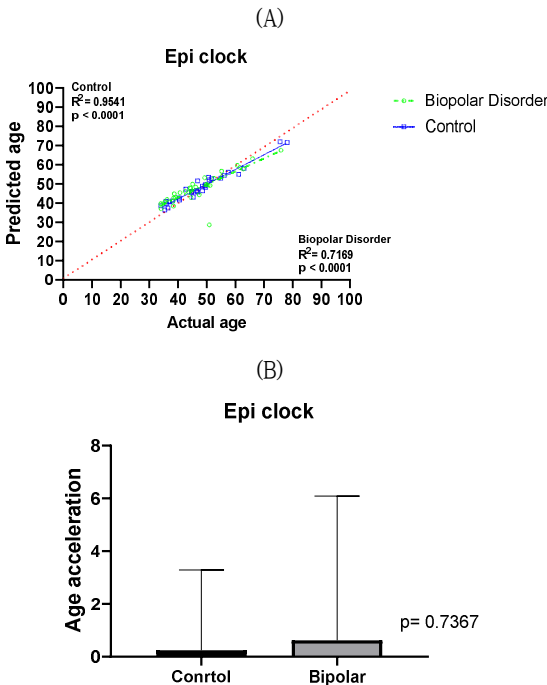


Fig. 2. Epigenetic age measurement using Epi clock. (A) Predicted age of each sample on Horvath clock. The red dotted line represents the training regression line of the Epi clock. (B) Age acceleration graph, indicating the difference between the predicted age and the actual age.

Epi clock의 6761개의 프로브를 통해 계산된 Bipolar disorder의 예측 나이는 실제 나이보다 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2A). Horvath clock과 같이 통계적으로 유의하지 않은 수치를 볼 수 있다. 정상인 군에 비해 Bipolar disorder는 나이 가속도가 더 증가하는 경향을 보인다(Fig. 2B). 이는 Horvath clock과 마찬가지로 Epi clock에서 Bipolar disorder 질병을 지닌 환자들의 나이 가속도가 증가하는 것을 보여줄 수 있다는 것을 시사한다. 정신병인 Bipolar disorder의 정상인과는 다른 Methylation 정도 변화에 대한 가능성과 시계 프로브에 대하여 Bipolar disorder가 영향을 끼칠 수 있음을 암시하고 있음을 알 수 있다.

3.3. Horvath clock과 Epi clock에서의 적합도

(Table. 3.)은 예측 나이와 실제 나이의 차이를 나타낸 것으로, Horvath clock에서 정상인 그룹과 Bipolar disorder 그룹에서 각각 상당히 높은 오차 값을 보였다. R square 값은 실제 나이와 예측 나이 간의 결정계수로 Bipolar disorder에서 더 낮은 정확도를 보인다. 이는 정신 질병을 지니고 있는 그룹군이 더 낮은 R square 값과 더 큰 MAE, RMSE를 지니고 있으며, 정상인에 비해 비정상적인 Methylation이 일어나고 있음을 알 수 있다.

Epi clock에서는 정상인의 R square 값이 0.9로 높았으며, 그에 비해 Bipolar disorder는 0.7로 정상인 그룹보다 낮은 결정계수를 보였다. MAE 값과 RMSE 값은 정상인에서 2.4년, 3년으로 낮은 오차 값을 보였고 그에 반해 Bipolar disorder에서는 3.9년, 5.4년으로 각각 정상인 그룹보다 높은 오차 범위를 보였다(Table. 4.). Bipolar disorder 군의 정상인과는 다른 Methylation 변화를 Epi clock도 보이고 있음을 알 수 있다.

정상인에서 두 시계를 비교했을 때, Horvath clock보다 Epi clock에서 정확도가 더 높은 것을 알 수 있으며, 정상인의 뇌 조직 DNA의 Methylation의 변화가 Horvath clock에서 더 차이가 나고 있음을 알 수 있다. 이러한 큰 오차는 Horvath의 19개의 프로브가 누락된 영향도 있을 것으로 보이며

Table. 3. Accuracy of Horvath clock.

State	R square	MAE(year)	RMSE(year)	No. of loss CpG
Control	0.7603	9.13	9.92	19
Bipolar disorder	0.6560	9.61	10.46	19

Table. 4. Accuracy of Epi clock.

State	R square	MAE(year)	RMSE(year)	No. of loss CpG
Control	0.9541	2.4	3.0	0
Bipolar disorder	0.7169	3.9	5.4	0

(Table. 3.) 이는 즉, EPIC array 데이터가 Horvath clock 보다 Epi clock에서 더 적합함을 시사한다. 또한 정상인과 Bipolar disorder에서의 차이가 두드러지는 것은 Horvath clock에서보다 Epi clock에서 나타났다. 즉, 정상인과 비정상인 간의 차이를 비교하는데 Epi clock이 더 적합함을 알 수 있다.

4. 고찰

Horvath clock 및 Epi clock에서 나이 가속도가 차이가 없는 것처럼 보이나, 두 시계에서 Bipolar disorder의 환자가 정상인보다 증가하는 경향을 보였다. 또한, 두 Aging clock에서 정상인에 비해 질병군이 높은 오차를 보인 것을 분석했을 때, 각 시계 프로브에 해당하는 베타 값이 정상인과는 다른 베타 값을 지녔음을 알 수 있으며 심각한 정신 질환과 스트레스는 사람의 DNA의 Methylation을 변화시킨다는 사실을 발견하였다. 만약, 시계의 프로브에 해당하는 질병인들의 베타 값을 비교하면 정상인과는 어떻게 다르게 시계 프로브에 Methylation이 변화하였는지 알 수 있을 것이다.

전체적인 결과가 통계적으로 유의하지 않은 수치를 보였던 이유는 각 32개씩의 매우 적은 샘플 수가 원인으로, 통계적으로 유의하게 차이가 나려면 더 많은 샘플의 수를 필요로 할 것이다. 더불어 Horvath clock의 경우 EPIC array에서 프로브의 loss가 일어나므로 Horvath clock에서의 예측 나이를 계산할 때는 EPIC array보다 450K와 27K

array 데이터를 사용해야 환자군을 포함한 정상인 군에서의 강한 오차를 줄일 수 있을 것이다.

Horvath clock과 Epi clock에서는 정상인 그룹과 Bipolar disorder 환자군 간의 나이 가속도 차이가 얼마 나지 않았다. Epi clock에서 정상인 그룹은 Horvath clock 보다 예측 나이와 실제 나이 간의 차이가 적었다. 이는 EPIC array 데이터는 Epi clock에 적용하기 적합함을 알 수 있으며, 각 시계별 정상군과 Bipolar disorder군의 나이 가속도 비교는 Epi clock에서 더 차이 있음을 알 수 있는데, 이는 Horvath clock의 시계 프로브 보다 Epi clock의 시계 프로브에서 Bipolar disorder의 영향력이 큼을 알 수 있다. 따라서 더 많은 CpG를 프로브로 지닌 Epi clock에서 질병에 걸린 사람들의 Methylation 변화를 잘 감지할 수 있다.

참고문헌

- [1] D. Halperin, T. Levy, S. Avissar, and G. Schreiber, "Severe Mental Illness and Acute Stress: A Study of Service Utilization in a Conflict Zone", *Psychiatric Quarterly*, Vol. 88, pp. 213-220, 2017.
- [2] H. Lavretsky, and P.A. Newhouse, "Stress, inflammation and aging", *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, Vol. 20, pp. 729-733, 2012.
- [3] A. Fiorillo, and N. Sartorius, "Mortality gap and physical comorbidity of people

- with severe mental disorders: the public health scandal”, *Annals of General Psychiatry*, Vol. 20, pp. 1-5, 2021.
- [4] E. Chesney, G.M. Goodwin, and S. Fazel, “Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review”, *World Psychiatry*, Vol. 13, pp. 153-160, 2014.
- [5] G.R. Fries, M.J. Zamzow, T. Andrews, O. Pink, G. Scaini, and J. Quevedo, “Accelerated aging in bipolar disorder: A comprehensive review of molecular findings and their clinical implications”, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 112, pp. 107-116, 2020.
- [6] B. Hing, P. Braun, Z.A. Cordner, E.R. Ewald, L. Moody, M. McKane, V.L. Willour, K.L. Tamashiro, and J.B. Potash, “Chronic social stress induces DNA methylation changes at an evolutionary conserved intergenic region in chromosome X”, *Epigenetics*, Vol. 13, pp. 627-641, 2018.
- [7] E.M. Vidrascu, A.C. Bashore, T.D. Howard, and J.B. Moore, “Effects of early- and mid-life stress on DNA methylation of genes associated with subclinical cardiovascular disease and cognitive impairment: a systematic review”, *BMC Medical Genetics*, Vol. 20, pp. 1-12, 2019.
- [8] S. Horvath, “DNA methylation age of human tissues and cell types”, *Genome Biology*, Vol. 14, pp. 1-19, 2013.
- [9] K.A. Vijayakumar, and G.W. Cho, “Pan-tissue methylation aging clock: Recalibrated and a method to analyze and interpret the selected features”, *Mechanisms of Ageing and Develop.*, Vol. 204, pp. 1-10, 2022.
- [10] R.S. McIntyre, M. Berk, E. Brietzke, B.I. Goldstein, C. López-Jaramillo, L.V. Kessing, G.S. Malhi, A.A. Nierenberg, J.D. Rosenblat, A. Majeed, E. Vieta, M. Vinberg, A.H. Young, and R.B. Mansur, “Bipolar disorders”, *Lancet*, Vol. 396, pp. 1841-1856, 2020.
- [11] F.S. Bersani, S.H. Mellon, V.I. Reus, and O.M. Wolkowitz, “Accelerated aging in serious mental disorders”, *Curr. Opin. Psychiatry*, Vol. 32, pp. 381-387, 2019.
- [12] L.M. McEwen, M.J. Jones, D.T.S. Lin, R.D. Edgar, L.T. Husquin, J.L. MacIsaac, K.E. Ramadori, A.M. Morin, C.F. Rider, C. Carlsten, L. Quintana-Murci, S. Horvath, and M.S. Kobor, “Systematic evaluation of DNA methylation age estimation with common preprocessing methods and the Infinium MethylationEPIC BeadChip array”, *Clinical Epigenetics*, Vol. 10, pp. 1-9, 2018.