

법의 분야에서 DNA 메틸화를 이용한 연령 추정

안자현¹ · 신경진^{1,2} · 최아진¹
양우익¹ · 이환영^{1,2}¹연세대학교 의과대학 법의학과²연세대학교 개인식별연구센터접 수 : 2013년 1월 31일
수 정 : 2013년 2월 8일
게재승인 : 2013년 2월 21일

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 일반연구 자지원사업의 지원을 받아 수행된 것임(과제번호: 2012R1A1A2007031).

책임저자 : 이환영
(120-752) 서울시 서대문구 연세로 50,
연세대학교 의과대학 법의학과
전화 : +82-2-2228-2482
FAX : +82-2-362-0860
E-mail : hylee192@yuhs.ac

DNA Methylation-Based Age Estimation in the Forensic Field

Ja Hyun An¹, Kyoung-Jin Shin^{1,2}, Ajin Choi¹, Woo Ick Yang¹, Hwan Young Lee^{1,2}¹Department of Forensic Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea²Human Identification Research Center, Yonsei University, Seoul, Korea

The estimation of age is an important issue in forensic science, and the forensic community has attempted many times to establish methods for solving this issue. Aging leads to alterations in tissues and organs at the molecular level. These alterations at the molecular level may aid forensic scientists to estimate the age of a living person or a dead body. Initially, the focus was on the genetic components of aging, but recently, epigenetic mechanisms have emerged as the key contributors to the alterations in genome structure and function that accompany aging. In particular, DNA methylation is one of the best-understood mechanisms, and it has been suggested as a promising biomarker for age estimation in many studies. In this review, we summarize the recent studies on age-associated DNA methylation changes in different tissues and discuss its possible and practical applications in forensics.

Key words : DNA methylation, Age estimation, Epigenetics, Forensics

서 론

법의 분야에서 연령 추정은 신원불상자의 신원을 파악하는데 매우 중요한 역할을 한다. 연령을 추정하기 위해 사용되는 방법으로는 유해의 치아나 뼈를 이용한 인류학적 방법이 가장 일반적이나, 이러한 방법은 치아나 뼈가 아닌 범죄현장의 증거물에는 적용할 수 없는 단점이 있다. 따라서 최근에는 인체 기원의 현장 증거물로부터 얻은 DNA 정보를 이용하여 시료를 남긴 사람의 연령을 추정하는 연구가 새롭게 관심을 받고 있는데, 이는 DNA를 기반으로 하여 눈동자, 머리카락, 피부색 등 신체의 외형적인 특징을 추정하는 연구와 마찬가지로 사건 현장에서 발견한 인체 기원의 증거물로부터 얻은 정보를 이용하여 수사대상자의 범위를 좁힘으로써 범죄를 해결하는 데 이바지할 수 있기 때문이다.^{1,2)}

유전 또는 환경 요인에 의해 유도되는 노화는 인체의 각 기관과 조직에 기능 저하를 포함한 다양한 변화를 일으키는데, 이러한 노화의 원인이 되거나 노화의 결과로 나타나는 주요한

변화는 크게 단백질 수준의 변화와 유전체 수준의 변화로 나누어 볼 수 있다. 다양한 단백질 변화 중에서도 아스파르트산(aspartic acid)의 라세미화(racemization)를 이용한 연령 추정 방법은 1970년대부터 시작된 연구를 통해 정확도와 표준화된 방법론이 입증되었고, 형태적 특징을 이용할 수 없는 법의 실무에 가장 널리 사용되어온 방법이다. Ohtani 등³⁾의 연구가 대표적이며, 이에 의하면 치아의 상아질(dentin)에서 D-아스파르트산의 축적이 나이가 들에 따라 증가하므로 이를 이용하면 비교적 정확하게 연령을 추정할 수 있다. 이 외에도 조직에 축적되는 최종당화산물(advanced glycation end products; AGEs)의 양을 측정하여 노화의 정도를 추정하는 방법 또한 법의 분야의 연령 추정에 적용 가능하다고 보고되었다.⁴⁾ 하지만 이러한 방법들은 분자적 수준의 변화를 측정하면서도 정확한 연령 추정을 위하여 치아나 뼈를 필요로 하므로 적용범위가 제한적인 단점이 있다.

유전체 수준에서는 세포의 노화 때문에 좀 더 광범위하고 복잡한 변화가 일어나며, 이러한 현상들은 유전적(genetic) 변이와 후성유전적(epigenetic) 변이로 나누어 살펴볼 수 있다. 세

포의 분열이 계속됨에 따라 일어나는 유전적 변화들에는 특히 말단소체(telomere)의 소실과 유전자 손상 복구 능력의 저하로 말미암은 돌연변이 축적 등 유전체의 불안정화를 유도하는 여러 가지 기전들이 포함된다. 말단소체 구조의 소실이 세포노화와 관련이 있다는 최초의 실험적 증거는 1990년 Harley 등⁵⁾에 의하여 발표되었으며, 이에 Tsuji 등⁶⁾은 60명의 0세에서 85세 사이의 일본인 혈액을 이용하여 연령과 말단소체 길이 감소간의 상관관계를 밝혀 이를 이용한 연령 추정 가능성이 보여주었다. 하지만 말단소체 길이의 감소는 개인에 따른 편차가 심하다는 점에서 단지 노소의 구별만이 필요한 경우에 제한적으로 적용할 수 있을 것으로 전망되었다.⁷⁾ 또한 T-림프구 수용체 유전자 재배열을 이용한 연령 추정 방법은 최근 법의 영역에서 새롭게 제시된 유전적 변이를 이용한 방법이다.⁸⁾ 혈액 내에 존재하는 T-림프구는 다양한 외부 항원을 인식하기 위하여 유전자 재배열 과정을 거쳐 여러 종류의 수용체를 형성하게 되는데, 이 과정에서 signal joint TCR excision circles (sjTCRs)이라 불리는 작은 원형의 DNA 부산물이 형성된다. Zubacov 등은 이 DNA 부산물의 양이 나이가 들에 따라 일정한 비율로 감소한다는 것을 밝히고, 195명의 건강한 독일인을 대상으로 sjTCRs의 양을 real-time quantitative PCR을 이용하여 측정함으로써 이 방법을 이용하면 약 9년의 오차범위 내에서 연령 추정이 가능하다는 결과를 보여주었다. 이 방법은 미량의 혈액으로 비교적 정확도가 높은 연령 추정이 가능한 장점이 있으나, T-림프구를 포함하고 있지 않은 정액이나 타액 등의 다른 체액을 대상으로는 사용할 수 없고 면역 체계를 구성하는 T-림프구의 유전자 재배열을 이용하기 때문에 앞으로 질병이 있는 환자군을 대상으로 연령 추정의 정확도를 테스트할 필요성이 있다.

최근에는 노화와 관련한 후성유전적 변이에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되었다. 후성유전학(epigenetics)은 분자생물학 분야에서 새롭게 등장한 분야로 DNA 염기서열 자체의 변화 없이 유전자 발현을 조절하는 인자와 그 작용 체계를 연구하는 학문이다.⁹⁾ 후성유전 기작은 염색질(chromatin)의 구조와 기능의 변화를 조절하는 데 중요한 역할을 한다고 알려졌으며 노화 연구뿐만 아니라 암 발생의 기전에 관한 연구에서도 관심이 고조되고 있다. 세 가지 주요한 후성유전 작용인 DNA 메틸화(methylation), 히스톤 변형(histone modification), 비암호화 RNA(noncoding RNA)가 유전자 발현과 유전체의 불안정성을 조절하는 데 중요한 역할을 수행하며 염색질의 구조를 변화시켜 노화를 포함한 다양한 생명 활동에서 유전자 발현의 활성 혹은 억제에 관여한다고 알려졌다.¹⁰⁾ 특히 가장 많은 연구가 이루어진 DNA 메틸화는 DNA 메틸화 효소(DNA methyltransferase; DNMT)에 의해 DNA 염기서열 중 guanine 바로 앞 cytosine (CpG dinucleotide)에서 메틸화가 일어나는 것을 말한다.¹¹⁾ 인간의 유전체에서 전체 CpG의 70-80%는 메틸화되어있으며 메틸화되지 않은 대부분의 CpG는

유전자의 5' 말단 쪽에 있는 CpG island에 무리지어 분포한다.¹²⁾ 노화의 분자 기작에 대한 연구가 활성화되면서 연구자들은 DNA 메틸화를 포함하는 후성유전 조절 기작이 노화에 따른 유전자 발현 변화에 중요한 역할을 한다는 연구 결과를 제시하였으며, 실제로 최근에 많은 연구 결과에서 연령의 증가에 따라 변이를 보이는 DNA 메틸화 표지자를 보고하였다.¹³⁻²⁴⁾ 또한 이러한 DNA 메틸화 표지자는 DNA를 주된 분석 대상으로 하는 법의 유전학 분야에서 연령을 추정하기 위한 분석에 효과적으로 적용이 가능할 것으로 전망되었다.^{19, 24)}

이에 따라 본 종설에서는 현재까지 보고된 연령에 따라 변이를 보이는 DNA 메틸화 표지자 및 DNA 메틸화 분석방법을 소개하고 DNA 메틸화를 기반으로 하는 연령 추정 방법의 법의 영역에서의 적용 가능성에 대해 논의해 보고자 한다.

본 론

1. 연령에 따른 DNA 메틸화 변이

연령과 DNA 메틸화 변이 사이의 상관관계를 밝히기 위하여 다양한 조직과 세포주를 대상으로 하는 연구가 꾸준히 이루어져 왔다. 여러 연구를 통하여 노화가 진행됨에 따라 유전체의 전체적인 메틸화 정도는 감소한다고 알려져 있으며¹³⁻¹⁵⁾ 이는 DNA methyltransferase 1a (DNMT1a)의 활성 저하로 인한 수동적인 탈메틸화(passive demethylation)의 결과라는 실험적 결과가 제시되었다.¹⁶⁾ 하지만 최근에는 이와 반대로 많은 특정한 부위에서 메틸화 정도가 증가하는 것이 밝혀졌다.^{17, 18)} 특히 분석 기술의 발달로 Infinium HumanMethylation BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)과 같은 microarray 기술을 이용하여 epigenome-wide 수준의 DNA 메틸화 분석이 가능하게 됨으로써 연령의 증가에 따라 변이를 보이는 DNA 메틸화 표지자의 발굴이 다양한 시료에서 활발히 이루어지게 되었다.

Bocklandt 등¹⁹⁾은 21세에서 55세 사이의 34쌍의 쌍둥이로부터 얻은 타액 시료에서 HumanMethylation27 BeadChip microarray를 이용하여 27,578개의 CpG site에서 메틸화 정도를 비교 측정하였고, 노화에 따라 DNA 메틸화에 변화를 보이는 88개의 CpG site를 발굴하였다. 19개의 표지자는 나이가 증가함에 따라 메틸화가 감소하는 경향을, 69개의 표지자는 증가하는 경향을 나타내었으며, 그 중에서 10개의 표지자는 혈액을 대상으로 한 이전의 연구 결과에서도 나이의 증가에 비례하여 메틸화 정도가 증가하는 결과를 보였다.¹⁸⁾ 또한 88개의 CpG site 중 타액에서 노화에 의해 가장 큰 메틸화 변이를 보이는 세 개의 표지자, EDARADD (EDAR-associated death domain), NPTX2 (neuronal pentraxin 2), TOM1L1 (target of myb1-like 1)을 이용하여 연령 추정 가능성을 가하였고, 그 결과 시료 기증자의 연령 추정이 약 5.2세 오차범위 안에서 가능하다는 것을 보여주었다. 연령 추정에 사용된 3개의 표지

자와 나이가 증가함에 따라 혈액과 타액에서 공통적으로 메틸화가 증가하였던 10개의 표지자는 Table 1 또는 2에 나타내었다.

세포주를 대상으로 하는 연구도 이루어졌는데, Koch 등²⁰⁾은 젊은 사람과 나이가 든 사람의 섬유아세포(fibroblasts)와 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSC)를 대상으로 HumanMethylation27 BeadChip microarray를 이용하여 DNA 메틸화 정도를 비교 측정하고, 각 연령 그룹 별로 DNA 메틸화에 변화를 보이는 CpG site를 보고하였다. 섬유아세포에서는 연령 그룹에 따라 15% 이상의 메틸화 정도 차이를 나타내는 75개의 CpG site가 관찰되었고, 그 중에서 20% 이상의 메틸화 정도 차이를 나타내는 CpG site 표지자를 표 1에 나타내었다. 흥미롭게도 이 75개의 CpG site 중 30개의 CpG site는 간엽줄기세포에서도 연령 그룹에 따라 동일한 메틸화 변이를 나타내었으나, 몇몇의 CpG site는 두 조직에서 서로 다른 변이 경향을 나타내었다. 예를 들면 CDKN2B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B isoform 2)의 경우 섬유아세포에서는 노화에 의해 메틸화가 증가하였으나, 간엽줄기세포에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 두 세포의 기능적 차이에 의해 노화 현상이 세포 특이적인 기작에 의해 조절된다는 것을 시사하는 것이다. 이 외에도 많은 연구자들이 진피(dermis), 표피(epidermis), 혈액(blood), 제대혈(cord blood) 및 자궁경

관도말(uterine cervical smear) 등 다양한 세포 및 조직에서 노화 관련된 DNA 메틸화 패턴을 발견하였고, 그 변이 패턴 또한 주로 세포 또는 조직 특이적인 양상을 보인다는 것을 보고하였다.^{18, 21-23)}

한편 최근의 몇몇 노화와 관련된 연구에서는 조직 특이적이지 않은 DNA 메틸화 변이도 보고되었다. Teschendorff 등²³⁾의 연구에서 PCGTs (Polycomb group protein target gene) 과 관련된 일부 CpG site는 정상 조직, 종양 조직, 배양한 간엽줄기세포를 대상으로 한 실험에서 노화와 연관되어 서로 유사한 변이 경향을 나타내었다. 이 연구에서 Teschendorff 등은 30년의 연령 차이가 나는 261명의 폐경기 여성의 혈액을 대상으로 HumanMethylation27 BeadChip microarray를 수행하여 연령의 증가에 따라 메틸화가 증가하는 69개의 PCGT 관련 CpG site를 발굴하였으며, 이후 정상인의 혈액 및 제1형 당뇨병(type-1 diabetic) 환자의 혈액, 정상 조직과 난소암 조직, 간엽줄기세포 등의 다양한 조직을 이용한 검증 실험을 수행하였다. 다양한 조직에서 이 69개의 PCGT에 포함되는 대부분(59개)의 CpG site가 정도의 차이는 있지만 조직의 종류와 질병의 상태에 상관없이 연령 증가에 따른 동일한 메틸화 변이 경향을 보이는 것을 확인하였다. 다양한 조직에서 연령의 증가에 따라 공통적으로 메틸화가 증가하는 59개의 PCGT 관련 CpG site 중 혈액에서 연령과 메틸화의 선형회귀분석 t 통계량

Table 1. Tissue-Specific Age-Associated DNA Methylation Changes

Target ID*	Symbol	Description	Methylation change [†]	Tissue or cell type	Ref.
cg00059225	GLRA1	Glycine receptor alpha 1	Increase	Blood, saliva	18,19
cg15747595	TSPYL5	TSPY-like 5	Increase	Blood, saliva	18,19
cg16232126	SLC5A7	Solute carrier family 5 member 7	Increase	Blood, saliva	18,19
cg18236477	ATP8A2	ATPase aminophospholipid transporter class I type 8A member 2	Increase	Blood, saliva	18,19
cg19594666	LEP	Leptin	Increase	Blood, saliva	18,19
cg19885761	CPLX2	Complexin 2	Increase	Blood, saliva	18,19
cg19945840	B3GALT6	BetaGal beta 1, 3-galactosyltransferase polypeptide 6	Increase	Blood, saliva	18,19
cg21801378	BRUNOL6	CUGBP Elav-like family member 6	Increase	Blood, saliva	18,19
cg09809672	EDARADD	Edar associated death domain	Decrease	Saliva	19
cg27210390	TOM1L1	Target of myb1-like 1	Decrease	Saliva	19
cg12815142	SPAG7	Sperm associated antigen 7	Increase	Fibroblasts	20
			Decrease	MSC [‡]	20
cg10210238	CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B isoform 2	Increase	Fibroblasts	20
			Decrease	MSC	20
cg16601385	CFD	Complement factor D preproprotein	Decrease	Fibroblasts	20
			Increase	MSC	20
cg06144905	PIPOX	L-pipecolic acid oxidase	Increase	Fibroblasts, MSC	20
cg23081213	PRKAG3	AMP-activated protein kinase; non-catalytic gamma-3 subunit	Decrease	Fibroblasts, MSC	20
cg21660392	ABCA8	ATP-binding cassette; sub-family A member 8	Decrease	Fibroblasts, MSC	20
cg13870866	TBX20	T-box 20	Increase	Blood	25
cg06639320	FHL2	Four and a half LIM domains 2	Increase	Blood	28
cg16419235	PENK	Proenkephalin	Increase	Blood	28

*Target ID: Reference ID of the Infinium HumanMethylation Beadchip platform

[†]Methylation change: Methylation change upon aging

[‡]MSC: Mesenchymal stem cells

값이 4.5 이상을 나타내는 CpG site 표지자는 Table 2에 나타나었다.

Koch 등²⁴⁾도 이전 연구²⁰⁾에서는 노화와 관련된 DNA 메틸화 경향이 세포 특이적인 기작에 의해 조절된다는 것에 주목하였지만, 노화와 관련된 현상을 유발하는 기본 조절 메커니즘을 밝히기 위하여 모든 세포에 공통적으로 나타나는 변이를 밝히고자 하였다. 이를 위하여 이전에 여러 연구에서 발표되었던 진피, 표피, 자궁경관도말(uterine cervical smear), T-림프구와 단핵구(monocyte)를 이용한 5개 세트의 HumanMethylation 27 BeadChip microarray 결과로부터 노화에 의해 과메틸화(hypermethylation)되는 19개의 CpG site를 발굴하였고, 이 과메틸화 표지자 중 4개의 CpG site와 한 개의 저메틸화(hypomethylation) CpG site를 포함하는 총 5개의 표지자로 구성된 연령 추정 모델을 제시하였다(Table 2). 제시된 연령 추정 모델은 정맥혈과 체대혈, 유방 조직 및 구강상피세포 등의 다양한 조직을 대상으로 구축된 8개의 독립적인 데이터 세트를 이용하여 연령 추정 유효성 검증을 수행하였고, 그 결과 균적으로 약 11년의 오차범위 내에서 시료 제공자의 연령 추정이 가능함을 보였다.

최근에는 단순히 나이와 DNA 메틸화 간의 상관관계를 밝히는 데에서 더 나아가 DNA 메틸화 변이와 노화에 관련된 표현형(age-related phenotype) 또는 질병과의 상관관계에 대해 연구하는 후성유전체 전장 연관성 분석(epigenome-wide association study)에 대한 관심이 높아지고 있다. Bell 등²⁵⁾은 32세에서 80세 사이의 172명의 중년 여성 쌍둥이 피험자의 혈액을 대상으로 나이와 상관관계를 보이는 DNA 메틸화 변이 뿐만 아니라 노화와 관련된 표현형과 상관관계를 나타내는 DNA 메틸화 변이를 찾아내려 시도하였다. 이를 위하여 각 피험자의 말단소체 길이, 혈압, 폐 기능, 혈장 내 콜레스테롤

등의 16가지 노화 관련 생체지표²⁶⁾를 대상으로 DNA 메틸화 변이와의 상관관계를 조사하였으며, 그 결과 4개의 노화 관련 표현형 특이적인 메틸화 표지자(age-related phenotype differentially methylated region: ap-DMR)를 발굴하였다. 4개의 ap-DMR 표지자는 LDL-DMR인 STAT5A (signal transducer and activator of transcription 5A), 폐 기능 관련 DMR인 AT1 (angiotensin receptor 1), maternal longevity-DMR인 ARL4A (ADP-ribosylation factor-like 4A)와 TBX20 (T-box 20)을 포함하고 있으며, 이 중에서 maternal longevity-DMR인 TBX20 만이 같은 연구에서 탐색된 490개의 연령 특이적인 메틸화 표지자에 포함되는 결과를 보여주었다(Table 1). 따라서 Bell 등의 연구에서 노화 관련 표현형 메틸화 표지자와 실제 연령 관련 메틸화 표지자 사이의 직접적인 상관관계를 확인하지는 못했지만, 선정된 CpG site를 노화의 정도를 측정하는 표지자로서 활용 가능함을 보여주었다.

또한 최근 microarray 기반의 DNA 메틸화 분석법의 발달로 한번에 45만개 이상의 CpG site에 대한 메틸화 분석이 가능해지면서²⁷⁾ 보다 많은 양의 데이터를 정교하고 표준화된 분석 방법을 이용하여 제시한 연구 결과가 발표되고 있다. Garagnani 등²⁸⁾은 HumanMethylation450 BeadChip microarray를 이용하여 어머니(42세-83세)와 자녀(9세-52세)로 이루어진 두 그룹 총 64명의 혈액을 대상으로 메틸화 패턴을 분석하였고, 두 그룹 간의 메틸화 정도 차이가 가장 많이 나는 상위 5개의 CpG site를 선정하였다. 5개의 CpG site는 ELOVL2 (ELOVL fatty acid elongase 2), FHL2 (four and a half LIM domains 2), PENK (proenkephalin)의 CpG island와 ELOVL2, FHL2의 CpG island 외에 각각 존재하는 것을 확인하였으며 모두 어머니 그룹에서 과메틸화되었다. 9세에서 99세의 피험자 혈액 샘플과, 7개 체대혈 샘플을 포함하는 494개의 또 다른 샘플 그

Table 2. Age-Associated DNA Methylation Changes Common to Various Cell Types

Target ID	Symbol	Description	Methylation change [†]	Cell type	Ref.
cg03664992	BMP8A	Bone morphogenetic protein 8a	Increase	Various cell type	23
cg13921352	FAM19A4	Family with sequence similarity 19 member A4	Increase	Various cell type	23
cg27320127	KCNK12	Potassium channel subfamily K member 12	Increase	Various cell type	18, 19, 23
cg04528819	KLF14	Kruppel-like factor 14	Increase	Various cell type	23
cg02620013	MLNR	Motilin receptor	Increase	Various cell type	23
cg02844545	GCM2	Glial cells missing homolog 2	Increase	Various cell type	23
cg04084157	VGF	VGF nerve growth factor inducible	Increase	Various cell type	23
cg21530890	SOX8	SRY (sex determining region Y)-box 8	Increase	Various cell type	23
cg07533148	TRIM58	Tripartite motif-containing 58	Increase	Various cell type	24
cg01530101	KCNQ1DN	KCNQ1 downstream neighbor	Increase	Various cell type	24
cg12799895	NPTX2	Neuronal pentraxin II	Increase	Various cell type	18, 19, 23, 24
cg25148589	GRIA2	Glutamate receptor ionotropic AMPA 2	Increase	Various cell type	23, 24
cg23571857	BIRC4BP	XIAP associated factor-1	Decrease	Various cell type	24
cg16867657	ELOVL2	ELOVL fatty acid elongase 2	Increase	Various cell type	28, 29

*Target ID: Reference ID of the Infinium HumanMethylation Beadchip platform

[†]Methylation change: Methylation change upon aging

를 대상으로 EpiTYPER[®] (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA) 분석법을 통하여 검증한 결과에서도 ELOVL2, FHL2, PENK의 CpG island에 존재하는 CpG site는 각각 0.92, 0.80, 0.63의 높은 Spearman 상관 계수를 나타내며 연령에 비례하여 증가하는 패턴을 나타내었다(Tables 1, 2).

발굴한 노화 관련 DNA 메틸화 표지자를 이용하여 연령을 효과적으로 추정하기 위해서는 적절한 추정 모델이 제시되어야 하는데, Hannum 등²⁹⁾은 DNA 메틸화 패턴 분석 결과에 성별과 BMI 지수와 같은 임상적 변수를 조합하여 새로운 개념의 연령 추정 모델을 제시하였다. 19세에서 101세 사이의 656명의 혈액 샘플을 이용하여 피험자 그룹을 두 그룹(N1=482, N2=174)으로 나눈 뒤, 첫 번째 그룹을 대상으로 얻은 DNA 메틸화 분석 결과에 Elastic Net³⁰⁾이라는 다변량 회귀 방법을 조합하여 성별, BMI, 민족 등의 공변량을 포함하는 연령 추정 모델을 제시하였다. 이 방법을 통해 연령 추정에 가장 유용한 71개의 DNA 메틸화 표지자를 선정하였으며, 제시한 연령 추정 모델을 이용하여 측정된 나이는 실제 나이와 균 오차범위 3.9세의 정확도로 측정이 가능했다. 두 번째 피험자 그룹과 이전 연구³¹⁾의 독립적인 피험자 그룹을 대상으로 한 검증 실험에서도 비슷한 결과를 나타냈으며, 흥미로운 점은 선정된 표지자의 대부분이 노화 또는 질병에 관련된 유전자 내에 또는 근처에 위치하고 있었다는 점이다. Hannum 등은 혈액을 대상으로 선정된 연령 추정 모델을 유방, 신장, 폐, 피부 조직 등을 대상으로 검증한 결과에서도 추정 연령과 실제 연령 사이에 비교적 높은 상관계수(R = 0.72)를 보이는 것을 확인하였다. 나아가 조직 간 차이점 및 유사점을 밝히기 위하여 메틸화 패턴 분석 결과를 바탕으로 유방, 신장, 폐 조직에서 각각 새로운 연령 추정 모델을 선정한 결과, 서로 다른 조직에서 선정된 대부분의 DNA 메틸화 표지자는 서로 일치하지 않았지만, 두 개의 표지자는 각 조직의 연령 추정 모델에서 공통적으로 선정되었다. 이 두 개의 표지자는 공통적으로 ELOVL2 유전자와 관련된 CpG site로 이전의 연구²⁸⁾에서도 나이와 상관관계가 높은 것으로 보고되었다.

2. DNA 메틸화 표지자의 분석방법

연령 추정을 위한 DNA 메틸화 표지자의 발굴은 주로 microarray 기반의 epigenome-wide 분석을 통하여 이루어져 왔다. Infinium HumanMethylation27 BeadChip과 HumanMethylation450 BeadChip과 같은 microarray 기반의 분석법은 bisulfite 처리된 DNA의 메틸화된 서열과 메틸화되지 않은 서열에 특이적으로 결합하는 두 probe의 intensity의 비율을 측정하여 메틸화 정도 값을 측정하며, 한번에 27,000개(Illumina 27k) 또는 450,000개(Illumina 450k) 이상의 CpG site에 대한 메틸화 정보를 얻을 수 있다.^{27, 32)} 하지만 발굴된 DNA 메틸화 표지자를 범의 분야의 연령 추정에 효과적으로 적용하기 위해서는 미량의 DNA를 가지고도 일정한 수의 표지자를 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 유전자 특이적 분석 방법(gene-specific analysis or locus-specific analysis)을 적용할 필요가 있다.

현재까지 특정 CpG site의 DNA 메틸화 정도에 대한 정성적(qualitative) 정량적(quantitative) 분석 개선을 위한 광범위한 새로운 방법론들이 설계되었으나,³³⁾ 비교적 미세한 DNA 메틸화 정도의 차이라 할지라도 유전자 발현의 변화 수준에서는 매우 큰 차이를 유도할 수 있으므로 정성적 분석보다는 정량적 분석 방법이 선호되는 추세이다.

이런 목적에서 bisulfite를 처리하여 메틸화되지 않은 DNA와 메틸화된 DNA를 구분하는 방법은 후성유전학 분야에서 DNA 메틸화 분석 연구를 촉진시키는 획기적인 발견이 되었다. Bisulfite의 처리에 의해 메틸화되지 않은 CpG site의 cytosine은 uracil로 전환되는 반면 메틸화된 cytosine은 그대로 유지되기 때문에, bisulfite 처리로 인한 nucleotide 서열의 차이를 다양한 방법으로 조사하여 초기의 메틸화 패턴 정보를 얻을 수 있다.³⁴⁾ 실제로 특정 유전자 locus의 DNA 메틸화 정도의 분석 방법은 bisulfite conversion을 이용하는 방법과 이용하지 않는 방법으로 나뉜다(Table 3).

DNA 메틸화 분석 시 bisulfite를 이용하는 방법에는 bisulfite sequencing, EpiTYPER[®], pyrosequencing, methylation-

Table 3. Techniques Allowing the Analysis of DNA Methylation at Specific Gene Loci

Technique*	Bisulfite conversion	CpG sites [†]	Advantages	Inconveniences	Ref.
Bisulfite sequencing	Yes	5-50	Gold standard	Labor-intensive	35
EpiTYPER [®]	Yes	5-50	Commercial service available	Cost	36
Pyrosequencing	Yes	5-20	Commercial service available	Cost	37
MSP	Yes	1-3	Simplicity	Lack of quantitative result	38
COBRA	Yes	1	Sensitivity	Limited to specific restriction targets	39
MS-SnuPE	Yes	1	Sensitivity	Requires a capillary electrophoresis instrument [‡]	40
MSRE-PCR	No	1	Cost and time-saving	Limited to specific restriction targets	41

*MSP: Methylation specific PCR; COBRA: Combined bisulfite restriction analysis of DNA; MS-SnuPE: Methylation-sensitive single nucleotide primer extension; MSRE-PCR: Methylation-sensitive restriction endonuclease PCR

[†]CpG sites: Number of CpG sites interrogated per multiplex assay

[‡]Requiring a capillary electrophoresis instrument is no problem in general forensic laboratories.

specific PCR (MSP), combined bisulfite restriction analysis of DNA (COBRA), methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (MS-SnuPE) 등의 분석법이 널리 이용되고 있다. Bisulfite sequencing은 bisulfite에 의해 변형된 DNA를 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통하여 증폭 시킨 후 증폭 산물을 bacterial vector를 이용한 클로닝 후 몇 개의 clone에 대하여 sequencing을 수행하여 CpG site의 메틸화를 정량적으로 측정하는 기법이다.³⁵⁾ 높은 정확도와 다수의 CpG site의 정보를 한 번에 얻을 수 있다는 점에서 가장 좋은 모델로 알려져 있으나, 노동 집약적인 클로닝 과정을 필요로 하기 때문에 분석 과정을 간소화하기 위한 여러 전략적인 기법들이 제시되었다. EpiTYPER[®]는 mass spectrometry를 이용하여 DNA 메틸화를 정량적으로 분석하는 방법이다.³⁶⁾ Bisulfite를 처리한 DNA를 T7 promoter tag을 붙인 primer를 이용하여 증폭한 후, reverse strand에 대한 In vitro transcription 과정을 수행한다. 이후 RNase A를 이용한 base specific cleavage을 거친 product를 mass spectrometry system을 이용하여 분석하면 메틸화된 template와 메틸화되지 않은 template를 서로 구분할 수 있다. Pyrosequencing은 nucleotide가 결합할 때 방출되는 pyrophosphate를 측정하여 sequencing하는 방법으로 single stranded template에 A/T/C/G 4개의 nucleotide 중 단 한 개의 nucleotide가 상보적으로 결합할 때 발생하는 빛의 양을 측정함으로써 sequence를 결정하는 방법이다.³⁷⁾ 실험방법이 비교적 간단하며 한 번에 다수의 CpG site에 대한 정량적인 분석이 가능한 장점이 있지만 비용이 많이 드는 단점이 있다. MSP는 bisulfite에 의해 변형된 DNA 서열을 대상으로 메틸화되었던 CpG site와 메틸화되지 않았던 CpG site의 서열에 상보적으로 결합하도록 설계된 서로 다른 두 쌍의 primer 조합을 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 수행한 후 증폭산물을 아가로스 겔 전기영동으로 확인하는 방법이다.³⁸⁾ 비록 정량적인 정보는 제공하지 못하지만 민감도가 높고 실험과정이 비교적 간단하기 때문에 DNA 메틸화 분석 시 가장 널리 이용되고 있는 방법 중 하나이다. COBRA는 bisulfite에 의해 변형된 DNA를 중합효소 연쇄 반응으로 증폭 시킨 후 메틸화되었던 DNA 서열만을 선택적으로 인식하여 절단하는 제한효소를 처리하여 분해된 산물과 분해되지 않은 산물의 상대적인 양을 비교하여 DNA 메틸화 정도를 측정하는 기법이다.³⁹⁾ MS-SnuPE 방법은 bisulfite에 의해 변형된 DNA 염기서열을 대상으로 분석하고자 하는 CpG site의 1 bp upstream까지 위치하도록 설계된 프라이머를 이용하여 single-nucleotide primer extension 과정을 수행한 후 반응 산물을 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis)을 이용하여 분석하는 정량적인 분석 방법이다.⁴⁰⁾

Bisulfite를 이용하지 않는 대표적인 DNA 메틸화 분석 방법은 methylation-sensitive restriction endonuclease PCR (MSRE-PCR)이다. 이 방법은 메틸화되지 않은 CpG site를

선택적으로 절단시키는 MSRE를 처리한 후 중합효소 연쇄 반응을 수행하여 DNA 메틸화를 분석하는 기법으로 bisulfite 처리 방법이 사용되기 이전에 가장 널리 사용되었던 고전적인 방법이다.⁴¹⁾ Bisulfite 처리에 사용되는 비용과 시간을 절약할 수 있으나 분석 대상이 특정 제한효소의 인식부위 내에 존재하는 site에 제한되는 단점이 있다.

3. DNA 메틸화를 이용한 연령 추정 방법의 법의 분야에의 적용 가능성 및 전망

DNA 메틸화 표지자를 이용한 연령 추정 방법은 치아나 뼈를 이용하는 기존의 법의학적인 연령 추정 방법과 달리 DNA를 추출할 수 있는 모든 시료를 대상으로 수행이 가능하기 때문에 주로 혈액, 타액, 정액 등 인체 기원의 증거물로부터 DNA를 추출하여 검사를 수행하는 법의 유전학 분야에 매우 유용하게 적용이 가능할 것으로 전망한다. 또한 DNA 메틸화 표지자는 단백질 표지자나 RNA 표지자 보다 화학적 생물학적으로 안정적인 이점이 있으며, 더욱이 일부 표지자의 경우 혈액에서 유전적 변화를 대상으로 한 연령 추정 방법과 비교하여도 정확도와 민감도 면에서 우수한 결과를 나타내고 있다. 게다가 대부분의 DNA 메틸화 분석 방법은 중합효소 연쇄 반응과 모세관 전기영동법을 기반으로 하는 실험기법을 이용하여 분석을 수행할 수 있기 때문에 DNA typing 기반의 법의 실무에서 부가적인 실험 장비나 기술의 습득 없이 적용이 용이한 장점이 있다.

하지만 알려진 바와 같이 DNA 메틸화의 변이는 환경이나 질병에 의해 영향을 받기가 쉬우며, 일부 CpG site는 조직 또는 체액에 따라 서로 다른 메틸화 패턴을 보유하고 있다.^{42, 43)} 따라서, 조직에 따라 다르게 나타나는 노화 현상에 대한 연구를 바탕으로 다양한 조직에서 질병의 유무에 구애받지 않는 안정적인 연령 추정 표지자의 선정이 이루어져야 할 것이다. 특히 법의 실무에서 주된 분석 대상으로 이용되는 체액을 대상으로 하는 DNA 메틸화 연구는 혈액과 타액을 제외하고는 거의 이루어지지 않았으므로, 향후 다양한 체액에서 적절한 DNA 메틸화 표지자를 찾기 위한 노력이 필요하다. 최근 후성유전학 연구의 발달로 epigenome-wide 수준의 DNA 메틸화 분석을 가능하게 하는 보다 다양하고 간편한 분석법의 개발이 이루어졌으므로 이러한 기술을 이용하여 다양한 연령대의 기증자로부터 얻은 조직과 체액에서 DNA 메틸화 패턴을 분석한다면 조만간 법의 영역에서 연령 추정에 유용하게 사용할 수 있는 추가적인 표지자의 발굴과 분석법의 개발이 가능할 것이다.

결론

최근 법의 분야에서 체액과 같은 인체 기원의 증거물로부터 얻을 수 있는 유전정보로 시료를 남긴 사람의 외형적 특징에 대한 추정이 가능하다는 것이 입증되면서 이에 관한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.⁴⁴⁻⁴⁶⁾ 그 중 연령 추정은 눈동자, 머리

카라, 피부 색 등의 추정과 달리 다양한 집단에 공통적으로 적용할 수 있고, 용의자나 신원미상자의 신원을 추정하는데 중요한 정보를 제공할 수 있다. 특히 세포의 노화 현상에서 후성유전 조절 기작의 중요성이 입증되면서 DNA 메틸화를 포함하는 후성유전적 현상이 연령 추정 분야의 새로운 연구 대상으로 주목을 받고 있다. 이에 따라 본 중설에서는 DNA 메틸화를 이용한 연령 추정 방법의 법의 영역에의 적용 가능성에 대하여 논의하고자 지금까지 알려진 노화에 따라 특이적인 변이를 보이는 DNA 메틸화 표지자와 DNA 메틸화 분석 방법에 대하여 알아보았다.

현재까지 후성유전 연구는 비교적 짧은 기간의 역사에 비해 비약적인 연구의 발전을 보여 왔으며 다양하고 간편한 DNA 메틸화 분석법의 지속적인 개발에 따라 법의 분야에서도 후성유전 연구의 효용이 증대될 것으로 예상된다. 한편 노화에 따른 DNA 메틸화 변이가 대체로 조직 특이적인 기작에 의해 조절되는 양상을 보이는 것을 고려해 볼 때, 최근 법의 영역에서 보고된 DNA 메틸화를 이용한 체액 식별 방법의 개발은 DNA 메틸화 표지자를 이용한 연령 추정 방법이 조직 및 체액 식별과 함께 이루어질 경우, 보다 효과적으로 이루어질 수 있을 것임을 의미한다. 또한 국내외의 다양한 연구를 통해 다양한 유전 형질에 관련된 후성유전체 연구 데이터가 축적됨에 따라 환경적 요인과 질병의 영향으로부터 안정적인 DNA 메틸화 표지자를 발굴 할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 하지만 실제 법의 실무 분야에 효과적으로 적용시키기 위해서는 최적의 DNA 메틸화 표지자의 발굴뿐만 아니라 실험 방법의 표준화 및 분석 방법의 자동화를 위한 노력이 필요하며, 정량적인 분석 결과의 정확한 해석을 위한 기준과 소프트웨어의 개발도 수반되어야 할 것이다. 향후 보다 활발한 연구를 통하여 DNA 메틸화 연구가 법의 영역에서 연령 추정을 포함하는 다양한 실무 분야에서 중요한 열쇠가 될 것으로 기대한다.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

참 고 문 헌

1. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011;12:179-92.
2. Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3:154-61.
3. Ohtani S. Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid. *Am J Forensic Med Pathol* 1995;16:158-61.
4. Sato Y, Kondo T, Ohshima T. Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of ad-

- vanced glycation end products in the hippocampus. *Histopathology* 2001;38:217-20.
5. Harley C, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-60.
6. Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, et al. Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Sci Int* 2002;126:197-9.
7. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* 2010;203:34-43.
8. Zubakov D, Liu F, van Zelm MC, et al. Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Curr Biol* 2010;20:970-1.
9. Russo VEA, Martienssen RA, Riggas AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996.
10. Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 2010;109:586-97.
11. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 2007;213:384-90.
12. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
13. Wilson VL, Smith RA, Ma S, et al. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 1987;262:9948-51.
14. Vanyushin BF, Nemirovsky LE, Klimenko VV, et al. The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia* 1973;19:138-52.
15. Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 2004;68:196-204.
16. Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, et al. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2003;252:33-43.
17. Murgatroyd C, Wu Y, Bockmuhl Y, et al. The Janus face of DNA methylation in aging. *Aging* 2010;2:107-10.
18. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res* 2010;20:434-9.
19. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, et al. Epigenetic predictor of age. *PLoS ONE* 2011;6:e14821.
20. Koch CM, Suschek CV, Lin Q, et al. Specific Age-associated DNA methylation changes in human dermal fibroblasts. *PLoS ONE* 2011;6:e16679.
21. Gronniger E, Weber B, Heil O, et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 2010;6:e1000971.
22. Bocker MT, Hellwig I, Breiling A, et al. Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. *Blood* 2011;117:e182-9.
23. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, et al. Age-

- dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res* 2010;20:440-6.
24. Koch C, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging* 2011;3:1018-27.
 25. Bell JT, Tsai PC, Yang TP, et al. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet* 2012;8:e1002629.
 26. Simm A, Nass N, Bartling B, et al. Potential biomarkers of ageing. *Biol Chem* 2008;389:257-65.
 27. Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, et al. Evaluation of the Infinium methylation 450K technology. *Epigenomics* 2011;3:771-84.
 28. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, et al. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell* 2012;11:1132-4.
 29. Hannum G, Ginney J, Zhao L, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 2013;49:359-67.
 30. Zou H, Hastie T. Regularization and variable selection via the elastic net. *J R Statist Soc B* 2005;67:301-20.
 31. Heyn H, Li N, Ferreira HJ, et al. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:10522-7.
 32. Bibikova M, Le J, Barnes B, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium[®] assay. *Epigenomics* 2009;1:177-200.
 33. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett* 2007;251:187-98.
 34. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-31.
 35. Zhang Y, Rohde C, Tierling S, et al. DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones. *Methods Mol Biol* 2009;507:177-87.
 36. van den Boom D, Ehrich M. Mass spectrometric analysis of cytosine methylation by base-specific cleavage and primer extension methods. *Methods Mol Biol* 2009;507:207-27.
 37. Dejeux E, El abdalaoui H, Gut IG, et al. Identification and quantification of differentially methylated loci by the pyrosequencing technology. *Methods Mol Biol* 2009;507:189-205.
 38. Licchesi JD, Herman JG. Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol* 2009;507:305-23.
 39. Brena RM, Plass C. Bio-COBRA: absolute quantification of DNA methylation in electrofluidics chips. *Methods Mol Biol* 2009;507:257-69.
 40. Kaminsky Z, Petronis A. Methylation SNaPshot: a method for the quantification of site-specific DNA methylation levels. *Methods Mol Biol* 2009;507:241-55.
 41. Oakes CC, La Salle S, Trasler JM, et al. Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). *Methods Mol Biol* 2009;507:271-80.
 42. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, et al. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5:517-24.
 43. Lee HY, Park MJ, Choi A, et al. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int J Legal Med* 2012;126:55-62.
 44. Kayser M, Liu F, Janssens AC, et al. Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *Am J Hum Genet* 2008;82:411-23.
 45. Liu F, Wollstein A, Hysi PG, et al. Digital quantification of human eye color highlights genetic association of three new loci. *PLoS Genet* 2010;6:e1000934.
 46. Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, et al. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci* 2007;52:349-54.