

特集 2 せん妄を科学する

4. せん妄のエピジェネティクス仮説に基づいた候補遺伝子探索およびゲノム網羅的アプローチによる研究

篠崎 元*

抄録：本稿では、せん妄の発症メカニズムにおけるエピジェネティクスの役割を解明することをめざしたこれまでの研究を概説する。まず、DNAメチル化とせん妄発症の関連に焦点を当て、Grady Trauma Project コホートを用い、TNF-alpha 遺伝子のメチル化が年齢と負の相関を、同時に発現が正の相関をすることを見出した。この傾向は、脳のグリア成分でも保たれていることを確認したが、ニューロンでは失われていることを報告した。さらに、せん妄患者と非せん妄患者の比較から、せん妄群における TNF-alpha 遺伝子のメチル化低下が示され、せん妄発症におけるこの変化の重要性が示唆された。また、神経栄養因子遺伝子のメチル化パターンの年齢依存的な変化も観察され、これがせん妄リスクの増加に関連している可能性も示された。最後に、せん妄患者と非せん妄患者間の DNAメチル化パターンの違いをゲノム網羅的に分析し、免疫応答や細胞活性化の経路に関連する遺伝子のメチル化変化を特定した。これらの結果は、せん妄の発症メカニズムにおけるエピジェネティックな変化の重要性を強調している。

日本生物学的精神医学会誌 35 (1) : 40-45, 2024

Key words : delirium, epigenetics, DNA methylation, neuroinflammation, cytokine, microglia, neurotrophic factor

序論：せん妄のエピジェネティクス仮説

せん妄は高齢者に頻発する予後不良の疾患であるが、これまでのところ正確な病態理解は進んでおらず、臨床現場で実用に耐えうる精度のバイオマーカーも存在していない。筆者は、せん妄の最大のリスクファクターである年齢に注目し、加齢による変化をもたらす分子メカニズムに病態の一因があるとの仮説を立て、複数のコホートの患者から得られた血液や脳を含むサンプルを用いて検証を行った。本稿ではこれまでの研究データを、仮説の構築から研究データの蓄積の流れに沿って紹介する。

そもそも、せん妄のエピジェネティクス仮説は、8年ほど前に学会場で基調講演を聞きながら筆者が夢想した中で着想を得たものであるが、以下にその流れを紹介する。その基調講演では、若年マウスと高齢マウスを比較する多くの実験データが示され、高齢マウスでは感染や手術後に認知機能低下を起

しやすく、その体内では全身でも中枢でも炎症が亢進し、ミクログリアが活性化することが紹介されていた⁴⁾。高齢や手術侵襲はまさしく既知のせん妄のリスクファクターでもあり、ヒトのせん妄の病態をよく反映していると考えられ、せん妄の病態機序として、神経炎症という概念が重要であるということであった。神経炎症すなわち、脳内における炎症、ということである。ならば高齢者でせん妄が頻発する、ということは、その炎症が、高齢者では亢進している、ということになる。では、炎症が亢進する、とはどういうことかと考えれば、すなわち、炎症性サイトカインが増加している、ということにほかならない。だとしたら、そうしたサイトカインの増加するメカニズムが高齢者に特有に起こっている、ということになる。サイトカインが増加するということは、サイトカインも遺伝子にコードされるタンパクである以上、遺伝子の発現メカニズムが年齢によって変化することを意味する。そこまで考えた段

Epigenetic Hypothesis of Delirium: Candidate gene approach and genome-wide investigation

*スタンフォード大学医学部精神科 (〒94304 アメリカ合衆国カリフォルニア州 パロアルト ポータードライブ 3165) Gen Shinozaki : Stanford University School of Medicine Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, 3165 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304

【篠崎 元 E-mail : gens@stanford.edu】

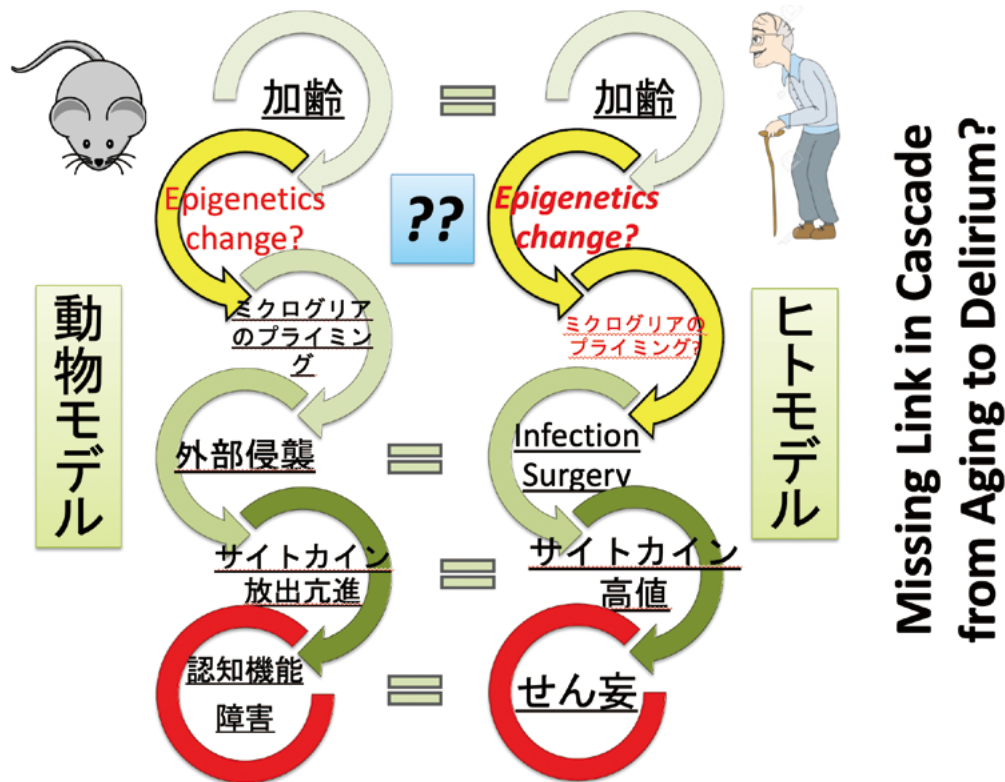


図1 せん妄のエピジェネティクス仮説の概念図

加齢がせん妄発症につながる病態メカニズムのカスケードにおけるエピジェネティクスの役割を想定し、研究による解明が必要と考えた。(Saito T, et al: J Psychiatr Res, 129: 61-65, 2020³⁾より改変して引用)

階で、では、そうした分子メカニズムは何だろうか、と考えたとき、エピジェネティクス、特にDNAのメチル化がかかわっているのでは、という仮説に辿り着いた。なぜなら、DNAのメチル化は、遺伝子の転写制御に密接にかかわるだけでなく、年齢に応じて変化していく性質が近年頻繁に報告されていたからである¹⁾(図1)。基調講演を聞きながらここまで考えて仮説に確信をもった筆者は、研究室に戻るとすぐに研究に取り掛かったのだった。

まず、筆者の仮説と同じことが研究されていないか調べるため、PubMedにて「delirium」と「epigenetics」を検索すると、ヒット数は1であった。しかもその論文はdementiaに関するさまざまなトピックを集めた総説論文で、上記のような病態理解に基づく仮説などは何も含まれていなかった。そこで、実際に仮説を試すためにデータを得ようと考え、最初に行ったのが、研究者仲間のもつコホートで利用可能なメチル化データによる検証であった。上記のように、もしサイトカインが年齢に応じて亢進するのであれば、おそらくメチル化は年齢とともに低下するであろうと思われた(メチル化は特に遺伝子のプロモーター領域にて増加すると、転写を抑制することがよく知られている)。そこで、エモリー大

学のGrady Trauma Project (GTP) という数百人からなるトラウマ研究のコホートをもつ研究者に依頼し、サイトカイン遺伝子のメチル化と年齢の相関の度合いを調べてもらうことにした。遺伝子としてはIL-1beta, IL6, IL8, それにTNF-alphaを選択したが、結果は驚くべきことに、TNF-alpha遺伝子のみ、遺伝子上にあるCpGサイトのすべてで年齢と負の相関を示していたのだった⁵⁾(図2)。実は、この研究グループはPTSDのエピジェネティクス研究コンソーシウムであり、同時に他の2つのコホートでも同じ検討をしたのであるが、他の2つのコホートでも結果はまったく同じであった。残念ながら他の2つのコホートからはデータの出版の許可が得られなかったためGTPコホートだけで論文化することになったのであるが、GTPが最大のコホートであったのは幸いであった。また、GTPはRNA発現のデータも同時にもっており、TNF-alphaの発現は、はたして年齢に応じて増加していたのであった⁵⁾(図2)。まさに、仮説で考えたように、年齢に応じてサイトカインであるTNF-alpha遺伝子のメチル化が低下すると同時に、その発現は増加する、すなわち、高齢者ほど炎症性サイトカインが上昇し、炎症しやすい、という証左が得られたのである。

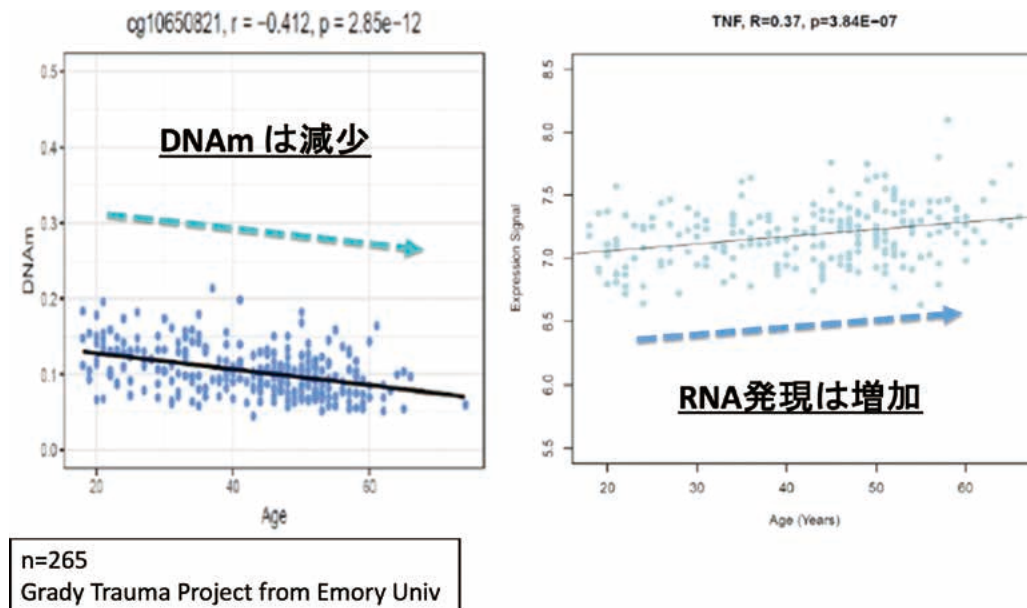


図2 加齢に伴う TNF-alpha 遺伝子の DNA メチル化の減少と RNA 発現の増加 (Saito T, et al : J Psychiatr Res, 129 : 61-65. 2020³⁾ より改変して引用)

ただ、難点は、このデータは大勢のコホートの血液サンプルからもたらされた、ということであった。メチル化の年齢による変化が発現にも寄与することを示すことはできたが、では神経炎症は、脳内では、どうであろうか、という問題がある。その疑問に答えるために、次に筆者らは脳組織での検討を行った。幸いなことに、当研究室では別の研究の一環として脳組織のメチル化測定を行っていた。脳組織は薬剤抵抗性てんかんの治療として行われる脳切除術から提供され、fluorescence-activated cell sorting (FACS) によりグリアとニューロンを分けたものを使用した。想像に難くないように、こうしたサンプルはきわめて貴重であり、サンプル数6人という限られたデータで検討することになる。しかしながら、今回も TNF-alpha 遺伝子に注目してメチル化レベルと年齢との相関を調べると、再び驚くべきことに、グリア成分においては同遺伝子上のすべての CpG サイトにおいて負の相関が維持されていたものの、ニューロン成分ではその傾向が失われていた⁵⁾。すなわち、サイトカインを放出するグリア成分において、年齢が進むにつれて TNF-alpha 遺伝子のメチル化は低下し、発現しやすくなっていると考えられた。これも仮説を支持するデータであった。

1. せん妄患者と非せん妄患者の比較

それでも、これらのデータは、せん妄患者からのものではない、という限界があった。そのため次の

検討として、筆者らが別途行っていた、せん妄検出のための新規脳波デバイス開発研究でリクルートする患者さんに、エピジェネティクス研究にも参加していただき、血液、唾液、口腔粘膜なども収集することとした。そのコホート (Epigenetics of Delirium : EOD コホートとよぶ) のサンプルを解析して TNF-alpha 遺伝子のメチル化を再度検討したところ、口腔粘膜では違いがみられなかったものの、血液ではせん妄患者群と対称群ではっきりと違いをみることができた。すなわち、せん妄群では TNF-alpha 遺伝子のメチル化の年齢に伴う低下が保たれていたが、対称群ではその傾向がなくなるか、あってもきわめて弱くなっていることが示された⁷⁾。こうしたせん妄、非せん妄群における TNF-alpha 遺伝子のメチル化の差は、上記てんかん脳外科患者コホート (Neurosurgery : NSG コホートとよぶ) のサンプルにおける術後せん妄 (post-operative delirium : POD) で同様に再現された。また、他のサイトカインも含めた術後の DNA メチル化レベルに基づいて作成された「炎症メチル化指数 (inflammatory methylation index : IMI)」が、せん妄を診断するバイオマーカーとしても有用なことも示された⁶⁾。

2. 神経栄養因子遺伝子の検討

一方で、サイトカイン、炎症だけがせん妄の原因とは考えにくい。特に、ベースの認知機能、認知症

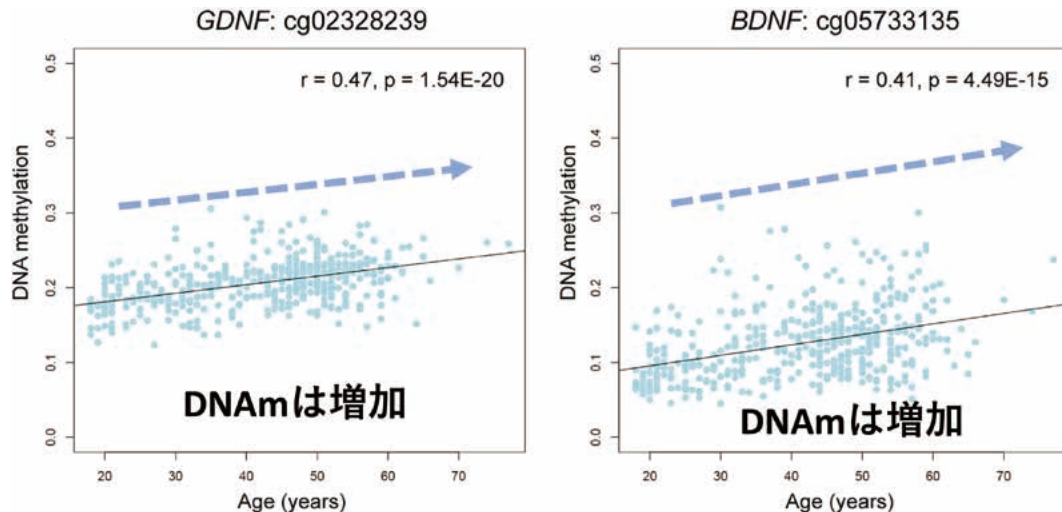


図3 加齢に伴う神経栄養因子遺伝子の DNA メチル化の増加
(Yamanashi T, et al : Transl Psychiatry, 11 : 627. 2021⁶⁾ より改変して引用)

の既往は、せん妄のもう1つの大きなリスクファクターであることが知られている。そのため次に筆者らは、神経栄養因子などの、認知症とかかわる遺伝子のメチル化の状態と年齢との相関を調べることとした。アプローチは同様に、GTP, NSG, および EOD コホートによる検討である。ただしこの場合、そうした神経栄養因子のメチル化は、年齢とともに増加し、それに伴い発現が抑制されるのでは、という仮説であった。特に brain-derived neurotrophic factor (BDNF) および glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) 遺伝子の DNA メチル化と年齢との関連を分析したところ、結果は仮説通り、GTP においては、高齢化とともに BDNF などの神経栄養因子遺伝子の DNA メチル化レベルが増加することが示され (図3), また NSG の脳組織, EOD におけるせん妄群でも同様であった²⁾。これは、高齢に伴い、神経栄養因子の減少が予測され、脳がせん妄に対してより脆弱になることを示唆していると考えられるこの研究は、老化が脳の栄養因子状態とせん妄の感受性にどのように影響するかを理解するうえでの別の病態整理の側面を提示したといえる。

これらの研究結果は、高齢化がサイトカインや神経成長因子の遺伝子のメチル化にどの程度影響を及ぼすか理解されていなかったところから、仮説に基づいて検討したところ、高齢化に関連したエピジェネティック変化、特に DNA のメチル化の変化が、せん妄の病態生理において重要な役割を果たす可能性を示唆したといえる。

ここまでは、病態仮説に基づく候補遺伝子に注目したアプローチであったが、DNA のメチル化測定的手法として用いたのは主にイルミナ社の EPIC ア

レイを用いたゲノム網羅的手法であり、先に述べた候補遺伝子以外にも非常に多くのメチル化情報 (EPIC アレイは実に約 85 万の CpG サイトを測定する) を利用可能であった。したがって、仮説に縛られない検討方法として、アレイ上のすべての CpG サイトにおけるメチル化情報を検討することとした。

この研究では、先の EOD コホートから年齢と性別をマッチさせたそれぞれ 40 人強のせん妄患者群と非せん妄患者群 (合計 80 人強) を抽出し、群間での DNA メチル化の違いを特定し、せん妄の有用なエピジェネティックバイオマーカーを同定することを目的とした。まず、トップヒットを調べると、ゲノムワイドでも統計的に有意に近い CpG サイトが見出された。さらに、ゲノムワイドのデータを利用して、トップヒットで見出された CpG サイトがある遺伝子群のエンリッチメント解析を行ったところ、統計的に有意なトップヒットとしてさまざまな免疫応答や炎症反応、細胞活性化に関連する重要な経路が明らかになった³⁾。

さらにこの結果の妥当性を検証するために、NSG コホートにおける POD のケースについて同様の検討を行った。術前と術後での血液サンプルにおける DNA のメチル化の変化の度合いを、POD を起こした患者群と起こさなかった患者群と比較したエンリッチメント解析では、驚くべきことに、EOD コホートでの結果とほとんどまったく同じ、免疫応答や細胞活性化の経路が有意なトップヒットとして見出された⁸⁾。つまり、まったく異なる、内科を中心とした入院患者のコホート (EOD コホート) と、脳外科てんかん患者のコホート (NSG コホート)

| Inpatient EOD cohort | | | | |
|--|------|----|----------|----------|
| Gene Ontology Term | N | DE | p value | FDR |
| immune response | 1925 | 82 | 3.99E-10 | 7.11E-06 |
| myeloid leukocyte activation | 635 | 41 | 6.24E-10 | 7.11E-06 |
| cell activation involved in immune response | 698 | 42 | 1.60E-09 | 1.21E-05 |
| leukocyte activation involved in immune response | 694 | 41 | 3.60E-09 | 2.05E-05 |
| cell activation | 1331 | 65 | 8.84E-09 | 4.03E-05 |
| neutrophil activation | 496 | 33 | 1.13E-08 | 4.28E-05 |
| granulocyte activation | 503 | 33 | 1.40E-08 | 4.56E-05 |
| leukocyte activation | 1181 | 58 | 2.17E-08 | 6.18E-05 |

| Surgery NSG cohort | | | | |
|-------------------------------------|------|-----|----------|-------|
| Gene Ontology Term | N | DE | p value | FDR |
| immune response | 1577 | 108 | 1.31E-06 | 0.030 |
| immune system process | 2455 | 162 | 6.12E-06 | 0.046 |
| T cell activation | 503 | 49 | 7.79E-06 | 0.046 |
| regulation of immune system process | 1358 | 100 | 8.04E-06 | 0.046 |
| leukocyte activation | 876 | 72 | 1.32E-05 | 0.060 |

図4 EOD コホートと NSG コホートにおけるエンリッチメント解析

(Yamanashi T, et al : Neurobiol Aging, 105 : 310-317. 2021⁷⁾, Yamanashi T, et al : Psychiatry Clin Neurosci, 77 : 48-55. 2023⁸⁾ より改変して引用)

において、せん妄発症の有無により区分けされた群間のメチル化を比較すると、まったく同じ経路が同定された、ということである。しかもそれらはせん妄の発症メカニズムにきわめて重要な役割を果たすであろう機能が示されており、メチル化の変化がそうした機能をもたらす遺伝子群に起こることが、せん妄の発症につながる可能性を強く示唆しているといえる。これらの結果は、せん妄の病態生理における、エピジェネティクス、特にDNAのメチル化の変化が果たす役割をさらに支持する結果といえる。

まとめ

これらの研究データは、せん妄のエピジェネティクスに関する当研究室における研究のさまざまな側面を反映しており、理論的枠組みに基づく仮説と、それを支持する実験的根拠を結び付けていると考えられる。これらのアプローチは、せん妄の複雑なメカニズムを解明するだけでなく、臨床現場で有効となるバイオマーカーの確立も可能とし、最終的には、特に高齢化社会において今後ますます増加することが確実な、せん妄患者への潜在的な介入法および治療法への道を開くことになることを期待している。

本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。

利益相反

Gen Shinozaki has pending patents as follows : 'Non-invasive device for predicting and screening delirium,' PCT application no. PCT/US2016/064937 and US provisional patent no. 62/263,325 ; 'Prediction of patient outcomes with a novel electroencephalography device,' US provisional patent no. 62/829,411. 'DEVICES, SYSTEMS, AND METHOD FOR QUANTIFYING NEURO-INFLAMMATION,' United States Patent Application No. 63/124,524.

文 献

- 1) Numata S, Ye T, Hyde TM, et al (2012) DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am J Hum Genet*, 90 : 260-272.
- 2) Saito T, Braun PR, Daniel S, et al (2020) The relationship between DNA methylation in neurotrophic genes and age as evidenced from three independent cohorts : differences by delirium status. *Neurobiol Aging*, 94 : 227-235.
- 3) Saito T, Toda H, Duncan GN, et al (2020) Epigenetics of neuroinflammation : Immune response, inflammatory response and cholinergic synaptic involvement evidenced by genome-wide DNA methylation analysis of delirious inpatients. *J Psychiatr Res*,

- 129 : 61-65.
- 4) Schreuder L, Eggen BJ, Biber K, et al (2017) Pathophysiological and behavioral effects of systemic inflammation in aged and diseased rodents with relevance to delirium : a systematic review. *Brain Behav Immun*, 62 : 362-381.
- 5) Shinozaki G, Braun PR, Hing BWQ, et al (2018) Epigenetics of delirium and aging : potential role of DNA methylation change on cytokine genes in glia and blood along with aging. *Front Aging Neurosci*, 10 : 311.
- 6) Yamanashi T, Nagao T, Wahba NE, et al (2021) DNA methylation in the inflammatory genes after neurosurgery and diagnostic ability of post-operative delirium. *Transl Psychiatry*, 11 : 627.
- 7) Yamanashi T, Saito T, Yu T, et al (2021) DNA methylation in the TNF-alpha gene decreases along with aging among delirium inpatients. *Neurobiol Aging*, 105 : 310-317.
- 8) Yamanashi T, Crutchley KJ, Wahba NE, et al (2023) The genome-wide DNA methylation profiles among neurosurgery patients with and without post-operative delirium. *Psychiatry Clin Neurosci*, 77 : 48-55.

■ ABSTRACT

Epigenetic Hypothesis of Delirium: Candidate gene approach and genome-wide investigation

Gen Shinozaki

Stanford University School of Medicine Department of Psychiatry and Behavioral Sciences

This article aims to outline the hypothetical framework and empirical evidence in the epigenetic investigation of delirium pathophysiology. Delirium, prevalent in the elderly, remains poorly understood in terms of pathophysiology. Our research investigates how aging-related epigenetic changes, particularly in DNA methylation, influence the pathophysiological mechanism of delirium.

We initially used blood samples from Grady Trauma Project to examine the correlation between cytokine gene methylation and age, discovering a negative correlation with the TNF-alpha gene methylation, together with an increase in RNA expression with age. Subsequent analysis of brain tissue obtained from resected brain tissue through the treatment of medication refractory epilepsy patients revealed this trend in glial components, not neurons, indicating an age-related decrease in TNF-alpha gene methylation in glia, facilitating increased inflammation in older brain.

Further, comparisons between delirious and non-delirious patients showed maintained methylation decline in the delirious group, indicating a potential role in delirium onset. Additionally, we found increased DNA methylation of neurotrophic factor genes such as BDNF in the elderly, implying a vulnerability to delirium due to reduced neurotrophic support.

Finally, a genome-wide approach identified differences in DNA methylation between delirious and non-delirious groups, with significant pathways related to immune response and cell activation. These findings suggest a crucial role for epigenetic changes, especially in DNA methylation, in the pathophysiology of delirium.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 35 (1) : 40-45, 2024)
