



Epigenetic clock analysis in methamphetamine dependence

竹村，幸洋

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2023-04-19

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3430号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485861>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

(論文博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Epigenetic clock analysis in methamphetamine dependence

覚せい剤依存症におけるエピジェネティッククロック解析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

精 神 医 学

(指導教員：菱本明豊教授)

竹 村 幸 洋

[はじめに]

メタンフェタミン（MA）は違法薬物であり深刻な公衆衛生、社会問題、神経変性変化を引き起こしている。MA を含むアンフェタミン系覚せい剤は、世界中で大麻に次いで最もよく使用されている違法薬物であり、MA の使用は国際的な公衆衛生問題である。MA 依存症患者の死亡率は他の薬物（コカイン、アルコール、大麻など）使用者よりも高く、MA 依存症の標準化死亡率（SMR）は 4~6 である。そこで私たちは MA 依存症患者では生物学的老化が加速しているという仮説を立てた。

近年、老化の研究において DNA メチル化（DNAm）などのエピジェネティックな変化と老化との関連が注目されている。ゲノム全体の DNAm プロファイルに基づいていくつかの「エピジェネティッククロック」が確立し、DNAm に基づく生物学的年齢（DNAm 年齢）を算出することが可能となっている。よく研究に用いられている 5 つの DNAm 年齢（HorvathAge、HannumAge、SkinBloodAge、PhenoAge、GrimAge）は、それぞれ固有の CpG 部位に基づいており、開発に使用した DNAm データの種類や組織サンプルが異なることから、生物学的老化における異なった側面を捉えていると考えられている。また GrimAge の構成要素である DNAm に基づく 7 つの血漿蛋白と喫煙量も年齢予測因子として報告されているものである。

テロメアは染色体の末端に位置する繰り返し塩基配列であり、加齢に伴い短縮するためテロメア長も生物学的老化のバイオマーカーとして研究されている。さらに、DNAm に基づくテロメア長（DNAmTL）を算出する方法も確立している。

MA 依存症患者は一般集団に比べて死亡率が高い。また MA 依存症患者の脳試料を用いたゲノムワイドの DNAm 解析により、神経変性に関連する遺伝子のメチル化の差異が確認されている。これらの知見は MA 使用が生物学的老化へ影響している可能性を示唆している。

本研究では、MA 依存症患者と健常対照者の末梢血試料から得られた DNA を用いて、ゲノムワイドの DNAm プロファイルを測定し、5 つの DNAm 年齢と DNAmTL、および GrimAge の構成要素を算出し、患者群と健常対照群で比較検討した。

[対象および方法]

(対象)

MA 依存症患者 24 名（男性 19 名、女性 5 名）と年齢と性別が一致した健常対照者 24 名。（DNAm 年齢の解析）

末梢血試料から DNA を抽出し、Illumina Infinium HumanMethylationEPIC BeadChip を用いてゲノムワイドの DNAm プロファイルを測定した。さらに DNAm 年齢 online calculator (<https://horvath.genetics.ucla.edu/html/dnamage/>) を用いて、5 つの DNAm 年齢（HorvathAge、HannumAge、SkinBloodAge、PhenoAge、GrimAge）と DNAmTL を算出し、予測される値との差（AgeAccelHorvath、AgeAccelHannum、AgeAccelSkinBlood、

AgeAccelPheno、AgeAccelGrim、および DNAmtLadjAge) について MA 依存症者群と健常対照群で比較検討した。

さらに、GrimAge 成分である 7 つの DNAmt に基づく年齢関連血漿蛋白 (adrenomedullin [ADM]、beta-2-microglobulin [B2M]、cystatin C、growth differentiation factor-15 [GDF-15]、leptin、plasminogen activation inhibitor-1 [PAI-1]、tissue inhibitor of metalloproteinases-1 [TIMP-1]) および DNAmt に基づく喫煙量 (DNAmethylation-based smoking pack-years: DNAmtPACKYRS) についても算出し、MA 依存症者群と健常対象群で比較検討した。

(統計解析)

2 群間の連続変数は Mann-Whitney U 検定で、3 群以上は Kruskal-Wallis 検定（ポストホックテスト；Steel-Dwass 多重比較検定）で解析した。カテゴリー変数は χ^2 -test または Fisher's exact test を用いて解析した。連続変数の相関は Spearman 相関解析を用いた。さらに重回帰分析により年齢、性別、body mass index (BMI)、DNAmtPACKYRS といった老化と関連する交絡因子の影響を補正した。

[結果]

MA 依存症患者群では健常対照群に比べ、AgeAccelPheno ($p = 0.009$) と AgeAccelGrim ($p < 0.001$) が有意に高かった。重回帰分析で交絡因子を補正したところ、AgeAccelPheno ($p = 0.014$)、DNAmtLAdjAge ($p = 0.038$) と MA 依存症と有意な関連を認めた。

AgeAccelGrim については、DNAmtPACKYRS を含めた重回帰分析では有意な関連を認めなかつた。しかし DNAmtPACKYRS 自体が GrimAge の構成要素であることから、DNAmtPACKYRS を除く交絡因子で解析したところ、MA 依存症と有意な関連を認めた ($p < 0.001$)。

GrimAge の構成要素については、DNAmtB2M が交絡因子を補正しても MA 依存症と有意な関連を認めた ($p = 0.025$)。

喫煙については、MA 依存症患者ではほとんどが現在の喫煙者 (24 名中 22 名) であることから、DNAmtPACKYRS と喫煙歴との関係を解析した。その結果、喫煙歴のない健常対照者では予想通り有意な低値を示したが、喫煙歴のない MA 依存症患者であっても、現在の喫煙者と同程度の高値を示す傾向が観察された。

[考察]

我々の研究では、MA 依存症患者群において健常対照者群よりもエピジェネティックな老化が加速している可能性が示唆された。交絡因子を補正後において、AgeAccelPheno の AgeAccelGrim の加速、DNAmtLadjAge の減少、DNAmtB2M の増加が MA 依存症と有意に関連していた。

PhenoAge と GrimAge は死亡までの時間や様々な健康問題の発生率を予測することに関する他の DNAm 年齢より優れていることが報告されている。MA 依存症患者の死亡率は一般集団の死亡率よりもかなり高いことが知られている。我々の研究から、MA 依存症は生物学的老化と関連しており、AgeAccelPheno および AgeAccelGrim は MA 依存症患者の生物学的加齢と健康リスクの評価に有用であることが示唆された。

DNAmPACKYRS は GrimAge の構成要素の一つである。MA 依存症患者のうち、喫煙経験のない患者の DNAmPACKYRS は、調査時に喫煙していた患者と同様の傾向を示した。MA 使用が喫煙歴とは別個に DNAmPACKYRS の増加と関連している可能性があり、MA 使用と喫煙には DNAm の変化について、共通のメカニズムが存在する可能性が示唆された。

TL は生物学的老化を評価するために広く使用されているバイオマーカーである。TL 短縮は MA 依存患者で見られ、MA 使用期間が長いほど TL は短くなることが報告されている。我々の研究では、交絡因子調整後の DNAmTLadjAge の低下と MA 依存症が有意に関連していたことから、先行研究と一致する結果であった。

DNAmB2M について、MA 依存症患者群において有意な高値を認めた。B2M は神経毒性があり神経新生に悪影響を及ぼし認知機能の低下や精神病の発症につながることが報告されている。MA 使用が B2M 濃度を上昇させ、精神症状の発現に関連する可能性が示唆された。その病態機序の解明にはさらなる研究が必要である。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、サンプル数が比較的少なく、また末梢血由来のサンプルデータしか使用していない。第二に、我々は DNAm に基づく血漿蛋白を解析したが、これらは DNAm プロファイルに基づいて予測されたものであり、実際の測定値を用いて同様の結果が得られるかの検証が必要である。第三に、我々は DNAm への影響が報告されている教育、幼少期の虐待、身体活動、食事などに関する情報を得られていない。

今回の研究で、我々は MA 依存症患者の DNAm 年齢、DNAm に基づく血漿蛋白について調査した。その結果、AgeAccelPheno の増加、AgeAccelGrim の増加、DNAmTLadjAge の減少、DNAmB2M の増加について、MA 依存症と有意な関連を認めた。これにより MA 使用による生物学的老化の加速と、年齢と関連する特定の DNAm が変化している可能性が示唆された。これらの知見により、MA 依存症の病態生理や身体的影響の解明に寄与することが考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (論文博士)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2180号	氏名	竹村 幸洋
論文題目 Title of Dissertation	覚せい剤依存症におけるエピジェネティッククロック解析 Epigenetic clock analysis in methamphetamine dependence		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	古屋敷 知之	
	副査 Vice-examiner	矢野 邦子	
	副査 Vice-examiner	竹村 陸司	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

メタンフェタミン(MA)は違法薬物であり深刻な公衆衛生、社会問題、神経変性変化を引き起こしている。MAを含むアンフェタミン系覚せい剤は、世界中で大麻に次いで最もよく使用されている違法薬物であり、MAの使用は国際的な公衆衛生問題である。MA依存症患者の死亡率は他の薬物(コカイン、アルコール、大麻など)使用者よりも高く、MA依存症の標準化死亡率(SMR)は4~6である。そこで私たちはMA依存症患者では生物学的老化が加速しているという仮説を立てた。

MA依存症患者は一般集団に比べて死亡率が高い。またMA依存症患者の脳試料を用いたゲノムワイドのDNAメチル化(DNAm)解析により、神経変性に関連する遺伝子のメチル化の差異が確認されている。これらの知見はMA使用が生物学的老化へ影響している可能性を示唆している。

本研究では、MA依存症患者と健常対照者の末梢血試料から得られたDNAを用いて、ゲノムワイドのDNAmプロファイルを測定し、5つのDNAm年齢とDNAmテロメア長(TL)、およびGrimAgeの構成要素を算出し、患者群と健常対照群で比較検討した。

【方法】

(対象)

MA依存症患者24名(男性19名、女性5名)と年齢と性別が一致した健常対照者24名。
(DNAm年齢の解析)

末梢血試料からDNAを抽出し、Illumina Infinium HumanMethylationEPIC BeadChipを用いてゲノムワイドのDNAmプロファイルを測定した。さらにDNAm年齢online calculator(<https://horvath.genetics.ucla.edu/html/dnamage/>)を用いて、5つのDNAm年齢(HorvathAge、HannumAge、SkinBloodAge、PhenoAge、GrimAge)とDNAmTLを算出し、予測される値との差(AgeAccelHorvath、AgeAccelHannum、AgeAccelSkinBlood、AgeAccelPheno、AgeAccelGrim、およびDNAmTLadjAge)についてMA依存症者群と健常対照群で比較検討した。

さらに、GrimAge成分である7つのDNAmに基づく年齢関連血漿蛋白(adrenomedullin[ADM]、beta-2-microglobulin[B2M]、cystatinC、growth differentiation factor-15[GDF-15]、leptin、plasminogen activation inhibitor-1[PAI-1]、tissue inhibitor of metalloproteinases-1[TIMP-1])およびDNAmに基づく喫煙量(DNAmethylation-based smoking pack-years: DNAmPACKYRS)についても算出し、MA依存者群と健常対象群で比較検討した。

【結果】

MA 依存症患者群では健常対照群に比べ、AgeAccelPheno ($p = 0.009$) と AgeAccelGrim ($p < 0.001$) が有意に高かった。重回帰分析で交絡因子を補正したところ、AgeAccelPheno ($p = 0.014$)、DNAmTLAdjAge ($p = 0.038$) と MA 依存症が有意な関連を認めた。AgeAccelGrim については、DNAmPACKYRS を含めた重回帰分析では有意な関連を認めなかつた。しかし DNAmPACKYRS 自体が GrimAge の構成要素であることから、DNAmPACKYRS を除く交絡因子で解析したところ、MA 依存症と有意な関連を認めた ($p < 0.001$)。

GrimAge の構成要素については、DNAmB2M が交絡因子を補正しても MA 依存症と有意な関連を認めた ($p = 0.025$)。

喫煙については、MA 依存症患者ではほとんどが現在の喫煙者 (24 名中 22 名) であることから、DNAmPACKYRS と喫煙歴との関係を解析した。その結果、喫煙歴のない健常対照者では予想通り有意な低値を示したが、喫煙歴のない MA 依存症患者であっても、現在の喫煙者と同程度の高値を示す傾向が観察された。

【結論】

今回の研究で、我々は MA 依存症患者の DNAm 年齢、DNAm に基づく血漿蛋白について調査した。その結果、AgeAccelPheno の増加、AgeAccelGrim の増加、DNAmTLadjAge の減少、DNAmB2M の増加について、MA 依存症と有意な関連を認めた。これにより MA 使用による生物学的老化の加速と、年齢と関連する特定の DNAm が変化している可能性が示唆された。これらの知見により、MA 依存症の病態生理や身体的影響の解明に寄与することが考えられた。

以上、本研究は、覚せい剤使用による生物学的老化の加速と、年齢と関連する特定の DNA メチル化が変化している可能性を明らかにしたものであり、覚せい剤依存症の病態生理や身体的影響を理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。