



Accelerated epigenetic aging and decreased natural killer cells based on DNA methylation in patients with untreated major depressive disorder

新藤, 良太

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9000号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492509>

※ 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。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Accelerated epigenetic aging and decreased natural killer cells
based on DNA methylation in patients with untreated major
depressive disorder

未治療の大うつ病性障害患者における DNA メチル化に基づくエピジ
ェネティックな老化の促進とナチュラルキラー細胞の減少

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻菱本明豊教授)

新 藤 良 太

[はじめに]

大うつ病性障害（うつ病）は世界で一般的な精神疾患であり、推定 2 億 8000 万人が罹患している。うつ病は様々な併存疾患や自殺など全死因の早期死亡リスクの上昇に関連している。細胞老化のマーカーであるテロメアの短縮とも関連が報告されており、先行研究では抗うつ薬がテロメアの短縮を防ぐことが示されている。

近年、ゲノム全体の DNA メチル化プロファイルを用いて、生物学的老化を推定するエピジェネティッククロックが開発された。研究に広く用いられている 5 つのエピジェネティッククロック(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 DNA メチル化データの種類やサンプル組織が異なることから、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、DNA メチル化に基づく 7 つの年齢関連血漿蛋白も年齢予測因子として報告されている。さらに DNA メチル化に基づくテロメア長 (DNAmTL) や DNA メチル化に基づく白血球組成を算出する方法も開発され、生物学的老化の評価に広く用いられている。

うつ病におけるエピジェネティッククロックの解析について、これまで複数の報告があるが、その結果は一致していない。うつ病は DNA メチル化に基づく生物学的老化の加速と関連しているが、抗うつ薬の使用がうつ病におけるメチル化の変化を調節した可能性が考えられる。我々は、抗うつ薬の投与を受けたことのない未治療うつ病患者と健常者の 5 つのエピジェネティッククロックと DNAmTL、GrimAge の構成要素、および DNA メチル化に基づく白血球組成を算出し、比較検討した。

[対象および方法]

【対象】

本研究では、一般に公開されている Gene Expression Omnibus database から DNA メチル化データセット (GSE201287) を利用した。GSE201287 は、未治療のうつ病患者群 (n = 40) と健常対照群 (n = 40) で構成され、被験者はすべてアジア人である。患者群は全て急性うつ病エピソードにあり、これまで投薬による治療を受けていなかった。被験者から末梢血サンプルを採取し、Illumina Infinium 450k Human DNA methylation Beadchip を用いて、ゲノムワイドの DNA メチル化プロファイルを測定した。

【DNA メチル化年齢の解析】

DNA メチル化年齢 online calculator[<https://horvath.genetics.ucla.edu/html/dnamage/>]を用いて、5 つのエピジェネティッククロックと DNAmTL を算出し、予測される値との差(AgeAccelHorvath、AgeAccelHannum、AgeAccelSkinBlood、

AgeAccelPheno、AgeAccelGrim、および DNAmTLadjAge)について患者群と健常対照群で比較検討した。DNA メチル化に基づく白血球組成についても同様に online calculator を用いて算出、患者群と健常対照群で比較検討した。GrimAge 構成要素である、DNA メチル化に基づく 7 つの年齢関連血漿蛋白と喫煙量 (DNAmPACKYRS) も算出し、患者群と健常対照群で比較検討した。
(統計分析)

カテゴリー変数は χ^2 検定で、2 群間の連続変数は Mann-Whitney U 検定でそれぞれ解析した。重回帰分析を用いて年齢、性別などの交絡因子の影響を補正した。連続変数間の相関を調べるために、スピアマンの順位相関係数を用いた。

[結果]

患者群では AgeAccelHannum ($p < 0.001$)、AgeAccelPheno ($p = 0.018$)、AgeAccelGrim ($p < 0.001$)、DNAmTLadjAge ($p = 0.015$) が有意に高かった。GrimAge の構成要素は、DNAmADM ($p = 0.00012$)、DNAmCystatinC ($p = 0.00536$)、DNAmPAI-1 ($p = 0.000587$)、DNAmTIMP-1 ($p = 0.000149$) において、患者群で有意な増加を示した。DNA メチル化に基づく白血球組成は、患者群では CD8+T 細胞の増加 ($p = 0.0013$) と NK 細胞の減少 ($p < 0.001$) に有意な関連を認めた。

対象群と患者群の年齢に有意差があったため、40 歳未満の被験者 (対照群: $n = 39$ 、患者群: $n = 17$) について全年齢の解析時と同じ方法、手順でサブグループ解析を行なったところ、AgeAccelHannum ($p < 0.001$)、AgeAccelGrim ($p = 0.0016$)、DNAmADM ($p = 0.00287$)、DNAmPAI-1 ($p = 0.00304$)、DNAmTIMP-1 ($p = 0.00089$)、CD8+ T 細胞 ($p = 0.0012$) の有意な増加、NK 細胞 ($p < 0.001$) の有意な減少を認めた。

[考察]

本研究では 5 つのエピジェネティッククロック、DNAmTL、GrimAge 構成要素、および DNA メチル化に基づく白血球組成を評価することで、未治療のうつ病患者においてエピジェネティックな老化が促進する根拠を示した。また、年齢や性別などの交絡因子を調整した後、HannumAge と GrimAge において、エピジェネティックな老化の促進が未治療のうつ病患者と有意に関連していることを見出した。さらに未治療のうつ病患者では、3 つの GrimAge 構成要素の増加、CD8+T 細胞の増加、NK 細胞の減少が認められた。うつ病のエピジェネティッククロックを解析した先行研究は複数存在するが、患者背景や使用したサンプル、エピジェネティッククロックによって結果が異なっており、5 つのエピジェネティッククロックを用いた、患者背景の詳細なデータを含むさらなる研究が必要である。

DNAmTLは未治療のうつ病患者で短くなる傾向が観察された。先行研究でも慢性うつ病患者や未治療のうつ病患者が対照群よりもテロメア長が有意に短いことや、抗うつ薬がテロメア短縮を防ぐ可能性があることが示されている。

未治療のうつ病患者では DNAmADM、DNAmPAI-1、DNAmTIMP-1 レベルが増加し、DNAmCystatinC が増加する可能性が高いことを見いだした。先行研究でも、DNAmCystatinC レベルの上昇とうつ病との関連や、うつ病患者における血清シスタチン C レベルの上昇が報告されている。シスタチン C は内因性システインプロテアーゼ活性を阻害し、腎機能のマーカーとして確立されており、免疫調節や炎症に関与している。さらにシスタチン C は、NK 細胞や T 細胞から主に分泌される IFN- γ のシグナル伝達経路にも関与している。ADM はストレス因子によって活性化される視床下部-下垂体-副腎（HPA）軸の調節および保護的役割を果たすと考えられている。また、うつ病患者の血清中 PAI-1 および TIMP-1 濃度は、対照群に比べて有意に高いという報告がある。今回の結果は先行研究と一致しているが、うつ病の病態生理の解明やバイオマーカーの開発には、実際の血漿や血清を用いたより大きなサンプルサイズでの結果の再現性を確認するためのさらなる研究が必要である。

未治療のうつ病患者では、DNA メチル化に基づく NK 細胞の著しい減少が観察された。先行研究からは、自殺につながる急性の心理的ストレスは NK 細胞を増加させ、慢性的ストレスは NK 細胞を減少させることが示唆されている。NK 細胞のさらなる研究が、うつ病患者におけるうつ病の重症度を理解するのに役立つと考えられる。

未治療のうつ病患者では CD8+細胞の有意な増加を認めたが、先行研究ではうつ病の重症度は CD4/CD8 比の低下と関連していることが示されており、今回の結果と一致している。うつ病の病態仮説として神経炎症仮説が支持されているが、まだ結論は出ておらず、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、サンプル数が少なく、全血検体しか使用しなかった。第二に、我々は GrimAge の構成要素及び白血球組成について DNA メチル化プロファイルに基づいて血漿レベルを推定しているが、実際の血漿を用いて同様の結果が得られるか検証が必要である。第三に、被験者の病歴、喫煙歴、小児期の逆境体験など、DNA メチル化への影響が報告されている情報を得られていない。第四に、対照群はうつ病群よりはるかに若く、40 歳未満の参加者のサブグループ分析を行ってもなおバイアスが残る、結果に影響を与えた可能性がある。最後に、うつ病治療患者と未治療患者を比較することができず、うつ病のエピジェネティッククロックにおける抗うつ薬の効果を直接評価することができなかった。

〔結論〕

未治療のうつ病患者において、5 つのエピジェネティッククロック、DNAmTL、

GrimAge の構成要素、および **DNA** に基づく白血球組成を用いてエピジェネティックな老化を解析した。その結果、未治療のうつ病患者では、**HannumAge** と **GrimAge** においてエピジェネティックな老化の促進がみられた。さらに、未治療のうつ病患者では、いくつかの **DNA** メチル化に基づく血漿蛋白と、2 つの **DNA** メチル化に基づく白血球組成の変化と関連していることが示唆された。これらの所見から、うつ病の病態生理やバイオマーカー、抗うつ薬の知られざる作用機序の解明に寄与することが考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3410 号	氏 名	新藤 良太
論 文 題 目 Title of Dissertation	未治療の大うつ病性障害患者における DNA メチル化に基づくエピジェネティックな老化の促進とナチュラルキラー細胞の減少 Accelerated epigenetic aging and decreased natural killer cells based on DNA methylation in patients with untreated major depressive disorder		
審 査 委 員 Examiner	主 査 古屋敷 智之 Chief Examiner 副 査 野津 寛之 Vice-examiner 副 査 矢野 育子 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

【目的】

うつ病は世界的にも最も障害を引き起こす精神疾患であり、様々な併存疾患や自殺などによる早期死亡リスクにも繋がる。うつ病はテロメア長短縮を指標とした生物学的老化や認知症など老化に伴う精神症状を促進することが報告されている。近年、生物学的年齢を算出する技術として DNA メチル化プロファイルに基づくエピジェネティッククロックが確立しており、うつ病におけるエピジェネティッククロックの報告も複数あるが、結果は一致していない。我々は、うつ病は DNA メチル化に基づく生物学的老化を加速する一方、抗うつ薬の使用がうつ病患者の DNA メチル化を調節する可能性があると考えた。そこで、抗うつ薬の投与を受けたことのない未治療うつ病患者のエピジェネティッククロックと DNA メチル化に基づくテロメア長 (DNAmTL)、GrimAge の構成要素、および DNA メチル化に基づく白血球組成を解析することとした。

【方法】

サンプルとして、一般に公開されている、抗うつ薬の投与を受けたことのない未治療うつ病患者 40 名と健常者 40 名で構成される DNA メチル化データセットを利用した。DNA メチル化 online calculator を用いて 5 つのエピジェネティッククロックと DNAmTL を算出し、予測される値との差 (AgeAccelHorvath、AgeAccelHannum、AgeAccelSkinBlood、AgeAccelPheno、AgeAccelGrim、および DNAmTLadjAge) について患者群と健常対照群で比較検討した。DNA メチル化に基づく白血球組成についても同様に online calculator を用いて算出、患者群と健常対照群で比較検討した。GrimAge 構成要素である、DNA メチル化に基づく 7 つの年齢関連血漿蛋白と喫煙量 (DNAmPACKYRS) も算出し、患者群と健常対照群で比較検討した。

カテゴリー変数は χ^2 検定で、2 群間の連続変数は Mann-Whitney U 検定でそれぞれ解析した。重回帰分析を用いて年齢、性別などの交絡因子の影響を補正した。連続変数間の相関を調べるために、スピアマンの順位相関係数を用いた。

【結果】

患者群では AgeAccelHannum ($p < 0.001$)、AgeAccelPheno ($p = 0.018$)、AgeAccelGrim ($p < 0.001$)、DNAmTLadjAge ($p = 0.015$) が有意に高かった。GrimAge の構成要素は、DNAmADM ($p = 0.00012$)、DNAmCystatinC ($p = 0.00536$)、DNAmPAI-1 ($p = 0.000587$)、DNAmTIMP-1 ($p = 0.000149$) において、患者群で有意な増加を示した。DNA メチル化に基づく白血球組成は、患者群では CD8+T 細胞の増加 ($p = 0.0013$) と NK 細胞の減少 ($p < 0.001$) に有意な関連を認めた。

対象群と患者群の年齢に有意差があったため、40 歳未満の被験者 (対照群: $n = 39$ 、患者群: $n = 17$) について全年齢の解析時と同じ方法、手順でサブグループ解析を行なった。

ところ、AgeAccelHannum ($p < 0.001$)、AgeAccelGrim ($p = 0.0016$)、DNAmADM ($p = 0.00287$)、DNAmPAI-1 ($p = 0.00304$)、DNAmTIMP-1 ($p = 0.00089$)、CD8+ T 細胞 ($p = 0.0012$) の有意な増加、NK 細胞 ($p < 0.001$) の有意な減少を認めた。

【結論】

未治療のうつ病患者では、HannumAge と GrimAge においてエピジェネティックな老化の促進がみられた。さらに、未治療のうつ病患者では、いくつかの DNA メチル化に基づく血漿蛋白と、2つの DNA メチル化に基づく白血球組成の変化と関連していることが示唆された。

以上、本研究は、未治療のうつ病患者においてエピジェネティックな老化が促進する事を明らかにしたものであり、うつ病の病態生理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。