

脳外科患者における術後せん妄の有無と ゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル

山梨 豪彦^{1~3)}, 篠崎 元^{1,2)}

Takehiko Yamanashi, Gen Shinozaki

術後せん妄患者の DNA メチル化プロファイルを検証する研究はこれまでなかった。本研究では、治療抵抗性てんかんに対する脳切除術を受けた患者の手術前後の血液を集め、術後せん妄と関連する DNA メチル化マーカーを発見することを目的とした。10名の術後せん妄症例を含む 37名の患者の手術前後の血液を入手し、DNA サンプルを Illumina 社 EPIC アレイゲノム網羅的プラットフォームを用いて測定した。術後せん妄の有無による血液中の DNA メチル化の差異を検討し、さらに Gene Ontology および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes によるエンリッチメント解析も実施した。術後せん妄症例について、手術前後の DNA メチル化の変化を調べたところ、エンリッチメント解析により、「サイトカイン刺激に対する細胞応答」「免疫系プロセスの制御」「細胞活性化の制御」「サイトカイン産生の制御」といった免疫応答関連経路や炎症性サイトカイン関連経路に統計的に有意な関連シグナルが多く見いだされた。さらに、術後せん妄症例と非術後せん妄症例間の手術や麻酔に関連する共通因子の影響の可能性を除外した後のエンリッチメント解析では、「免疫反応」や「T 細胞の活性化」などの有意なシグナルが示された。術後せん妄に関してゲノム網羅的に DNA メチル化を検証した本研究では、免疫反応、炎症反応、およびせん妄の病態生理に関連すると考えられる他の関連シグナルに関連する有望なシグナルが示された。このデータは、エピジェネティクスがせん妄の病態生理学的メカニズムにおいて重要な役割を果たしているという仮説を支持し、エピジェネティクスに基づく術後せん妄のバイオマーカーの有用性の可能性を示唆するものであった。

索引用語

術後せん妄, エピジェネティクス, DNA メチル化, 炎症, 免疫

はじめに

術後せん妄は手術後に生じるせん妄であり、術後の事故リスクの上昇や対応する医療スタッフの疲弊といった短期的なデメリットのみでなく、長期的な認知機能低下や高い死亡率とも関連している^{13,14,17,20,34)}。せん妄リスクを評価すること、せん妄を早期に検出し対応することは重要であるが、そのためにはせん妄の病態を理解し、バイオマ

ーカーを活用することが必要である。これまでの研究で、高齢のせん妄患者は、炎症マーカーやサイトカインの血清レベルが上昇していることが示されているが^{9,15,35,36)}、報告によるばらつきも大きく、さらなる分子機構の解明が求められる。

DNA メチル化 (DNA methylation : DNAm) は遺伝子の発現を動的に制御する重要なエピジェネティクス機構であり²²⁾、せん妄の主要なリスク因子である加齢とともに制御されることが知られている^{8,19,29)}。これらのことから、

著者所属：1) スタンフォード大学医学部精神科 2) アイオワ大学医学部精神科 3) 鳥取大学医学部附属病院精神科

本論文は PCN 誌に掲載された最新の研究論文⁴¹⁾を編集委員会の依頼により、著者の 1人が日本語で書き改め、その意義と展望などにつき加筆したものである。

doi : 10.57369/pnj.24-002

DNAm はせん妄の分子機構を解明するための有望なターゲットであり、せん妄のバイオマーカーとして機能する可能性があることが示唆される³⁰。これまでに著者らのグループは、せん妄患者において免疫反応、炎症反応、コリン作動性シナプス機能に関連した遺伝子の DNAm に違いがあること²⁷、炎症性サイトカイン遺伝子である TNF- α の DNAm が、せん妄症例では年齢とともに減少すること³⁷、神経栄養因子遺伝子 *BDNF* の DNAm が、せん妄患者において加齢とともに増加すること²⁶、を報告してきた。これらの報告は DNAm がせん妄の病態に寄与しており、またバイオマーカーになることを示唆するものである。しかしこれらの先行研究におけるせん妄症例は、入院に至った経緯の異なる内科的・外科的疾患をもつ集団からのものであり、せん妄の病因が均一ではなかった。また、横断研究であることから、せん妄対象者にみられたエピジェネティックなシグナルが、せん妄そのものによるものか、せん妄の原因疾患によるものか、せん妄発症前の状態を反映したものか、不明であった。

このような限界を克服するため、本研究では治療抵抗性てんかんに対しててんかん外科治療を実施する患者を対象として手術前後で血液を収集し、術後せん妄 (postoperative delirium : POD) に発展した患者における DNAm の特徴を見いだすことを目的とした⁴¹。

1. 研究の方法および結果

1. リクルートと患者情報取得

本研究は、アイオワ大学の Human Subjects Research Institutional Review Board により承認され実施した。2015 年 4 月から 2019 年 7 月の間に、アイオワ大学病院で治療抵抗性てんかんのため脳切除手術が予定された被験者を募集した^{3,4}。研究登録に際して、書面によるインフォームドコンセントを取得した。被験者が未成年の場合は、その両親から同意を得た。病歴、手術歴、人口統計情報を電子カルテと患者インタビューから入手した。脳切除術後にせん妄に発展したかを調査するために、詳細なカルテレビューを実施した。術後 7 日目、または退院のいずれか早いほうまでにせん妄を呈した患者を POD 群、せん妄に発展しなかった患者を non-POD 群とした。カルテに意識状態や精神状態の変動が記録されている場合か、Confusion Assessment Method for the ICU (CAM-ICU) 陽性の記録がある場合にせん妄ありと判断した。

2. 血液サンプル収集と処理

合計で 37 名の被験者から血液サンプルを入手した。手術室で手術の前後に全血を採取し、採取した全血を血球と血漿に遠心分離した後に -80°C で保存した。血球から DNA を抽出し、各 500 ng の DNA をバイサルファイト処理した。その後、Infinium HumanMethylationEPIC Bead-Chip Kit (WG-317-1002, Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、ゲノムワイド DNAm を解析した。アレイは、Illumina iScan プラットフォームでスキャンした。すべての統計解析に R を使用した²³。メチル化データの解析には、R パッケージの ChAMP と Minfi を使用した。データのロード中に、(i) 検出 P 値 > 0.01 、(ii) プローブあたり少なくとも 5% のサンプルで < 3 ビーズ、(iii) 非 CpG、SNP 関連、マルチヒットプローブ、(iv) X または Y 染色体に配置されている場合はプローブがフィルターアウトされた。サンプルをベータミクスチャー量子化で正規化してから差分メチル化分析を実行した。

CD8 T 細胞、CD4 T 細胞、ナチュラルキラー細胞、B 細胞、および単球の推定細胞比率は、オンラインで入手可能な DNAm Age Calculator により算出した^{10~12}。各 CpG 部位における DNA メチル化の差は、RnBeads により limma 法を用いて評価した^{2,24}。1) 術前サンプル、2) 術後サンプルにおいて、POD 群と non-POD 群間の DNAm の差異を検証した。また、3) 術前術後サンプル比較 (3a) 全コホート、3b) POD 症例のみ、3c) non-POD コントロールのみ) により、術後の DNAm の変化を評価した (図)。年齢、性別、および細胞タイプの割合を共変量として解析に含んだ。ゲノムワイドの有意性は、 P 値が $5.0\text{E}-08$ 未満であることをとした。

エンリッチメント解析として Gene Ontology (GO 解析) および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes terms (KEGG 解析) を行った。各エンリッチメント解析は R パッケージ missMethyl を用いた gometh 解析により、各遺伝子で検査した CpG 部位の数が変動することを調整して行った²¹。limma で抽出した各比較について、GO 解析と KEGG 解析で $P < 0.05$ の上位 1,500 の CpG サイトを含めて、潜在的に関連する経路を捕捉した。上記の術前・術後のサンプル比較の一環として、術前・術後 POD 症例群に特有のメチル化差のある CpG 部位セットを解析した。この CpG 部位のサブセットは、以下のプロセスで決定した。(i) POD 症例群と non-POD 対照群は、 $P < 0.05$ の CpG 部位についてフィルターにかけた。(ii) 有意な CpG

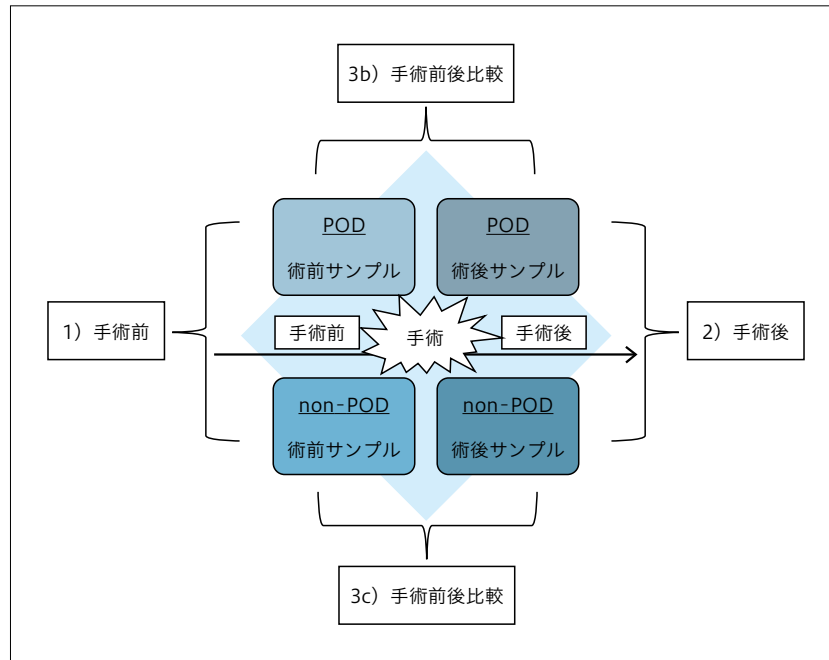


図 サンプル比較の図

本研究では各参加者の手術前後のサンプルを集め、POD 群と non-POD 群に分けたうえで各比較を行った。1) POD 群と non-POD 群の術前サンプルの比較, 2) POD 群と non-POD 群の術後サンプルの比較, 3) 3a) 全コホート全参加者の術前後サンプルの比較, 3b) POD 症例のみの術前後サンプルの比較, 3c) non-POD 症例のみの術前後サンプルの比較
(文献 41 より和訳して引用)

サイトの 2 つのサブセット間で共通する CpG サイトを決定した。(iii) 共通する CpG サイトのセットを有意な POD 症例 CpG サイトのセットから除去した。(iv) POD 症例に固有の CpG サイトのこの新しいセットから、GO および KEGG パスウェイの変化を検出するために上位 1,500CpG サイトを含めた。

3. 結果

1) 参加者背景

脳外科手術が予定され、本研究に登録された合計 37 名の患者の血液サンプルを入手した。患者の平均年齢は 32.8 歳 (SD=15.3), 35.1% が女性, 97.3% が非ヒスパニック系白人であった。そのなかで、10 名の患者が術後せん妄を発症し (POD 群), 27 名が発症しなかった (non-POD 群)。POD 群の平均年齢は 41.0 歳 (SD=15.6), 10 名中 5 名 (50.0%) が女性であった。non-POD 群の平均年齢は 29.8 歳 (SD=14.3), 27 名中 8 名 (29.6%) が女性であった。POD のある患者とない患者では、年齢に有意差があった (表 1)。

2) エピゲノムワイド解析における POD 群と non-POD 群の比較

術前サンプルの比較, 術後サンプルの比較のいずれにおいても、POD 群と non-POD 群で DNAm レベルに有意に差がある CpG サイトはなかった。全患者、POD 群、non-POD 群の各集団において、術前と術後のサンプルを比較しても、手術前後で有意に DNAm レベルが変化した CpG サイトはなかった。

3) エンリッチメント解析 (GO and KEGG)

術前サンプルの比較, 術後サンプルの比較のいずれにおいても、POD 群と non-POD 群で有意に差のあるパスウェイは確認されなかった。全患者を対象にして術前後のサンプルを比較した際に、エンリッチメント解析では、GO 解析で「リポ多糖への反応」「炎症反応」「インターロイキン 6 産生」、KEGG 解析で「NF- κ B シグナル伝達経路」などのパスウェイが示されたが、これらは false discovery rate (FDR) 有意水準には達していなかった。

10 名の POD 症例のみを対象に、手術前後の DNAm の変化をエンリッチメント解析で調べた。GO 解析からは「サイトカイン刺激に対する細胞応答」「サイトカインに対

表 1 患者背景

Classification	All Subjects			P	Statistical test
		POD	non-POD		
N	37	10	27		
平均年齢	32.8	41.0	29.8	0.046	t = -2.07
SD	15.3	15.6	14.3		
性別, 女性 (n)	13	5	8	0.44	$\chi^2 = 0.59$
%	35.1	50.0	29.6		
人種, 白人 (n)	36	10	26	>0.99	$\chi^2 < 0.01$
%	97.3	100.0	96.3		
飲酒 (n)	12	3	9	>0.99	$\chi^2 < 0.01$
%	32.4	30.0	33.3		
喫煙 (n)	15	5	10	0.74	$\chi^2 = 0.11$
%	40.5	50.0	37.0		
平均 ASA-PS	2.4	2.2	2.5	0.13	t = 1.56
SD	0.5	0.4	0.5		
平均 BMI	29.6	29.7	29.5	0.96	t = -0.06
SD	10.4	8.6	11.1		
平均麻酔時間 (分)	535.9	533.8	536.7	0.93	t = 0.09
SD	88.4	88.4	90.0		
平均手術時間 (分)	353.6	355.3	353.0	0.95	t = -0.07
SD	88.0	95.4	87.0		
平均出血量 (mL)	169.3	145.0	178.3	0.46	t = 0.74
SD	120.8	165.3	102.1		

POD : post operative delirium, SD : standard deviation, ASA-PS : American Society of Anesthesiologists physical status, BMI : body mass index (文献 41 より和訳して引用)

する応答」「免疫系プロセスの制御」「細胞活性化の制御」「サイトカイン生産の制御」などのパスウェイ, KEGG 解析からは「HIF-1 シグナル伝達経路」「T 細胞受容体シグナル伝達経路」「Th17 細胞分化」「NF- κ B シグナル伝達経路」「Toll 様受容体シグナル伝達経路」といったパスウェイが, FDR 有意水準, もしくは有意傾向 ($P=0.058$) なものとして検出された (表 2)。一方, non-POD 群の手術前後を比較したエンリッチメント解析では, GO 解析で「免疫反応にかかわる細胞の活性化」「好中球の脱顆粒」「好中球を介した免疫」, KEGG 解析で「長寿調節経路」などのパスウェイが示されたが, これらは FDR 有意水準ではなかった (表 3)。

POD 群と non-POD 群の間の手術や麻酔に関連する共通因子の影響を除いて比較するために, 両群のいずれにおいても手術前後の変化としてとらえられた CpG 部位を non-POD から共通のシグナルとして除外し, 手術後のせん妄の発症に関連する CpG サイトを抽出した。エンリッチメント解析の結果, 上位の GO パスウェイは, FDR 有意水準

で「免疫反応」「免疫系プロセス」「T 細胞活性化」「免疫系プロセスの制御」であった。KEGG パスウェイは, 「HIF-1 シグナル伝達経路」と「T 細胞受容体シグナル伝達経路」を FDR 有意水準で示した (表 4)。

II. 考 察

——本研究の意義, 苦労・工夫したことなどを含めて——

今回の研究では, 術後せん妄のエピジェネティクスをゲノムワイド DNAm 解析を用いて調査した。術後せん妄患者を対象として, 手術前後の DNAm の変化を調べた研究は初である。今回のデータでは, POD 症例において術前と術後のサンプルでサイトカインへの反応, 免疫系プロセスの制御, 細胞の活性化とサイトカイン生産, 免疫反応のポジティブ制御など, 術後せん妄に関連する多数のネットワークの重要なエビデンスを示した。さらに, 術後せん妄の発症に関連するシグナルを手術や麻酔の潜在的な影響を

表2 GOおよびKEGG解析の結果 (POD群)

手術前から手術後の変化, 上位20パスウェイ

GO ($P < 0.05$, $\beta > 0.03791$, 1,500 CpGs)						KEGG ($P < 0.05$, $\beta > 0.03791$, 1,500 CpGs)				
TERM	Ont	N	DE	P.DE	FDR	Pathway	N	DE	P.DE	FDR
<u>cellular response to cytokine stimulus</u>	BP	1,120	94	1.3E-08	2.9E-04	<u>HIF-1 signaling pathway</u>	109	21	3.2E-06	0.001
<u>response to cytokine</u>	BP	1,210	98	3.2E-08	3.6E-04	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	193	26	4.1E-05	0.007
cytokine-mediated signaling pathway	BP	794	69	5.1E-08	3.9E-04	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	78	17	1.3E-04	0.015
<u>regulation of immune system process</u>	BP	1,512	116	8.9E-08	5.1E-04	Inflammatory bowel disease	63	11	2.7E-04	0.023
<u>regulation of cell activation</u>	BP	573	58	1.7E-07	7.6E-04	Ras signaling pathway	231	30	3.6E-04	0.024
positive regulation of immune response	BP	651	60	6.9E-07	0.002	Prostate cancer	97	17	4.7E-04	0.027
T cell activation	BP	482	51	7.3E-07	0.002	Hepatitis B	162	20	6.8E-04	0.031
alpha-beta T cell activation	BP	145	24	9.1E-07	0.002	Human immunodeficiency virus 1 infection	211	24	7.2E-04	0.031
regulation of T cell activation	BP	331	39	9.8E-07	0.002	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	89	14	8.8E-04	0.033
positive regulation of immune system process	BP	985	81	1.2E-06	0.003	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	102	16	0.001	0.034
regulation of leukocyte activation	BP	528	52	1.7E-06	0.003	Insulin resistance	108	16	0.001	0.035
CD4-positive, alpha-beta T cell activation	BP	97	18	1.9E-06	0.004	Renal cell carcinoma	68	12	0.002	0.055
regulation of lymphocyte activation	BP	440	46	2.0E-06	0.004	<u>Th17 cell differentiation</u>	105	15	0.002	0.055
alpha-beta T cell differentiation	BP	106	20	2.9E-06	0.005	Human T-cell leukemia virus 1 infection	216	25	0.002	0.055
CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	BP	78	16	3.0E-06	0.005	<u>NF-kappa B signaling pathway</u>	103	13	0.003	0.055
<u>regulation of cytokine production</u>	BP	790	62	4.0E-06	0.006	Hepatocellular carcinoma	168	21	0.003	0.055
regulation of leukocyte cell-cell adhesion	BP	328	36	5.9E-06	0.008	Shigellosis	243	25	0.003	0.055
lymphocyte activation	BP	687	62	6.2E-06	0.008	B cell receptor signaling pathway	80	12	0.003	0.058
leukocyte cell-cell adhesion	BP	363	38	9.2E-06	0.011	Viral carcinogenesis	193	21	0.003	0.058
positive regulation of cytokine production	BP	443	42	9.4E-06	0.011	<u>Toll-like receptor signaling pathway</u>	104	11	0.003	0.058

GO : Gene Ontology, KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, FDR : false discovery rate
 β のカットオフは、 P 値カットオフを $P < 0.05$ としたとき、上位1,500のCpGサイトをとらえるように決定された。下線は注目すべきパスウェイを示す。

(文献41より和訳して引用)

除外してとらえるために解析したところ、免疫反応、T細胞の活性化、T細胞受容体のシグナル伝達経路、HIF-1のシグナル伝達経路が示された。実際、これらの上位シグナルは、過去にわれわれが検証した入院患者コホートから得られたせん妄患者と非せん妄患者の比較から得られた上位シグナルと一致している²⁷⁾。このデータは、術後せん妄が手術によって誘導されるプロセスだけでなく、せん妄の発症に影響を及ぼす動的なエピジェネティクスプロセスがあ

ることを示唆している。

これまでの研究で、全身および脳の炎症がせん妄の発症に重要な役割を果たすことが示唆されている^{1,5,6,33)}。実際に、POD患者では血中および脳脊髄液中の炎症マーカーが上昇することが示されている¹⁶⁾。免疫から脳への伝達経路がミクログリア細胞による炎症性サイトカイン産生につながるため、末梢で産生されたサイトカインが脳に作用して異常行動を引き起こすと考えられている⁷⁾。実際、げっ

表3 GO および KEGG 解析の結果 (non-POD 群)

手術前から手術後の変化, 上位 20 パスウェイ

GO ($P < 0.05$, $\beta > 0.0816$, 1,500 CpGs)						KEGG ($P < 0.05$, $\beta > 0.0816$, 1,500 CpGs)				
TERM	Ont	N	DE	P. DE	FDR	Pathway	N	DE	P. DE	FDR
positive regulation of molecular function	BP	1,811	143	2.2E-06	0.049	Pyrimidine metabolism	57	9	0.001	0.322
tertiary granule cytoplasm	CC	164	20	1.2E-05	0.139	Amoebiasis	100	13	0.005	0.781
positive regulation of catalytic activity	BP	1,458	114	6.4E-05	0.301	Autophagy-other enzymes	32	5	0.023	1
<u>cell activation involved in immune response</u>	BP	717	54	6.6E-05	0.301	Drug metabolism-other enzymes	80	6	0.032	1
leukocyte activation involved in immune response	BP	713	53	9.5E-05	0.361	Autophagy-animal	136	14	0.032	1
enzyme activator activity	MF	519	50	1.7E-04	0.423	<u>Longevity regulating pathway</u>	89	11	0.033	1
neutrophil activation	BP	500	40	1.7E-04	0.423	Phospholipase D signaling pathway	147	17	0.033	1
positive regulation of cell adhesion	BP	426	43	1.7E-04	0.423	Sphingolipid signaling pathway	118	13	0.034	1
<u>neutrophil degranulation</u>	BP	485	39	2.1E-04	0.423	Sphingolipid metabolism	49	6	0.035	1
granulocyte activation	BP	507	40	2.1E-04	0.423	Shigellosis	243	20	0.035	1
neutrophil activation involved in immune response	BP	488	39	2.2E-04	0.423	Nucleotide excision repair	46	5	0.036	1
myeloid leukocyte activation	BP	659	49	2.7E-04	0.438	AMPK signaling pathway	119	13	0.042	1
protein localization to phagosome assembly site	BP	12	5	2.9E-04	0.438	Renin-angiotensin system	23	3	0.043	1
tertiary granule membrane	CC	73	11	3.0E-04	0.438	Systemic lupus erythematosus	120	7	0.045	1
myeloid cell activation involved in immune response	BP	547	42	3.1E-04	0.438	Metabolic pathways	1,477	80	0.046	1
<u>neutrophil mediated immunity</u>	BP	499	39	3.3E-04	0.438	Phosphatidylinositol signaling system	97	11	0.05	1
myeloid leukocyte mediated immunity	BP	553	42	3.6E-04	0.438	Starch and sucrose metabolism	35	4	0.062	1
leukocyte migration involved in inflammatory response	BP	16	5	3.7E-04	0.438	DNA replication	36	4	0.062	1
leukocyte degranulation	BP	535	41	4.3E-04	0.468	Lipoic acid metabolism	4	1	0.064	1
						Galactose metabolism	30	4	0.064	1

GO : Gene Ontology, KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, FDR : false discovery rate

β のカットオフは, P 値カットオフを $P < 0.05$ としたとき, 上位 1,500 の CpG サイトをとらえるように決定された。下線は注目すべきパスウェイを示す。

(文献 41 より和訳して引用)

歯類に末梢性リポ多糖を注射したり, 開腹手術や肝切除などの外科手術を行うことで, 脳内で IL-1 β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインが増加し, 認知障害関連行動を引き起こすことが示されている²⁸⁾。手術によるエピジェネティクスの影響については Sadahiro, R.らの報告が新しく, 高齢者を対象とした種々の手術により, 末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells : PBMC) の免疫系遺伝子の DNAm の急速な変化がもたらされることが示されており, 今回のデータと一致している²⁵⁾。本研究は, エピジェネティックな観点からせん妄の病態生理の理解をさらに深めるものであり, エンリッチメント解析で観察された POD 患者における炎症と免疫に関連する遺伝子の

DNAm の変化は, 末梢の炎症と免疫, そしてその後の神経炎症とせん妄の発症に関与していることが示唆される。

この研究にはいくつかの強みがある。まず, 手術の種類は治療抵抗性てんかんに対する脳外科手術のみであったことである。したがって, 本研究の参加者は, コホート全体で比較的類似した侵襲を経験したことになる。これは, 多様な背景とせん妄の病因をもつ入院患者を用いたわれわれの以前のアプローチと比較して, 決定的な利点である^{26,27,37)}。第2に, 手術前サンプル採取の設計により, 同一人物から手術前と手術後の比較を行い, DNAm シグナルに対する手術の影響を直接測定し, POD 症例と non-POD 症例の間の違いを見つけることができたことである。

表 4 GO および KEGG 解析の結果 (POD 群)

手術前から手術後の変化, 上位 20 パスウェイ (non-POD 群と重複した上位 CpG 部位を除いた)

GO ($P < 0.05$, $\beta > 0.03655$, 1,500 CpGs)						KEGG ($P < 0.05$, $\beta > 0.03655$, 1,500 CpGs)				
TERM	Ont	N	DE	P. DE	FDR	Description	N	DE	P. DE	FDR
<u>immune response</u>	BP	1,577	108	1.3E-06	0.030	<u>HIF-1 signaling pathway</u>	109	19	3.5E-05	0.012
<u>immune system process</u>	BP	2,455	162	6.1E-06	0.046	<u>EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance</u>	78	17	1.1E-04	0.014
<u>T cell activation</u>	BP	503	49	7.8E-06	0.046	<u>Prostate cancer</u>	97	18	1.3E-04	0.014
<u>regulation of immune system process</u>	BP	1,358	100	8.0E-06	0.046	<u>Ras signaling pathway</u>	234	31	1.6E-04	0.014
<u>leukocyte activation</u>	BP	876	72	1.3E-05	0.060	<u>Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection</u>	194	24	2.4E-04	0.014
<u>lymphocyte activation</u>	BP	717	62	2.1E-05	0.081	<u>Inflammatory bowel disease</u>	63	11	2.5E-04	0.014
<u>CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation</u>	BP	82	15	3.2E-05	0.102	<u>Hepatitis B</u>	162	20	6.1E-04	0.030
<u>regulation of cell activation</u>	BP	602	53	3.8E-05	0.102	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	102	16	9.1E-04	0.038
<u>alpha-beta T cell activation</u>	BP	156	22	4.0E-05	0.102	<u>Hepatocellular carcinoma</u>	168	22	9.8E-04	0.038
<u>cell activation</u>	BP	1,017	79	4.9E-05	0.111	<u>PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer</u>	89	13	2.4E-03	0.084
<u>alpha-beta T cell differentiation</u>	BP	111	18	5.8E-05	0.113	<u>Viral carcinogenesis</u>	193	21	3.0E-03	0.088
<u>leukocyte activation involved in immune response</u>	BP	283	29	6.0E-05	0.113	<u>Human immunodeficiency virus 1 infection</u>	211	22	3.2E-03	0.088
<u>CD4-positive, alpha-beta T cell activation</u>	BP	101	16	6.4E-05	0.113	<u>Toll-like receptor signaling pathway</u>	104	11	3.3E-03	0.088
<u>regulation of immune response</u>	BP	810	62	7.5E-05	0.123	<u>AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications</u>	100	14	3.8E-03	0.088
<u>intracellular signal transduction</u>	BP	2,640	192	8.7E-05	0.133	<u>Cellular senescence</u>	155	19	4.0E-03	0.088
<u>cell activation involved in immune response</u>	BP	287	29	9.5E-05	0.136	<u>African trypanosomiasis</u>	36	6	4.0E-03	0.088
<u>regulation of leukocyte activation</u>	BP	550	47	1.6E-04	0.221	<u>Acute myeloid leukemia</u>	67	11	4.9E-03	0.089
<u>regulation of lymphocyte activation</u>	BP	455	41	1.9E-04	0.237	<u>Th17 cell differentiation</u>	106	14	5.0E-03	0.089
<u>adaptive immune response</u>	BP	438	37	2.0E-04	0.237	<u>Shigellosis</u>	244	24	5.2E-03	0.089
<u>cytidine to uridine editing</u>	BP	12	4	2.2E-04	0.238	<u>Human cytomegalovirus infection</u>	225	24	5.4E-03	0.089

GO : Gene Ontology, KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, FDR : false discovery rate

β のカットオフは, P 値カットオフを $P < 0.05$ としたとき, 上位 1,500 の CpG サイトをとらえるように決定された. 下線は注目すべきパスウェイを示す.

(文献 41 より和訳して引用)

手術後の血液は, POD が発症する前の時期である手術直後に採取された. そのため, 発症前から血液データに基づいて, POD に関連するエピジェネティクスの状態の違いをみることができた. 手術後, POD 発症前に確認された血液に基づくこのようなバイオマーカーは, 症状が出現する前からハイリスク患者を特定できる可能性があり, 今後の臨床に有用であると考えている. 第 3 に, 術前サンプルから得られた DNAm プロファイルは, POD の予測バイオマーカーとして使用できる可能性があることである. 今回のデータでは, 術前サンプルとの有意な差は認められなかったが, サンプルサイズが大きくなれば, POD の予測に

使用できるシグナルが見つかる可能性がある. このようなデータが再現され, 確認されれば, 術前の DNAm プロファイルに基づくアルゴリズムは, POD の高リスク患者を特定するのに役立つ. 適切な介入と予防を採用することができる. 全体として, 今回のデータは, われわれの仮説と一致し, せん妄の病態生理過程におけるエピジェネティクス機構を支持するものである.

III. 展 望 —今後の課題および方向性—

本研究には以下に記すようにいくつかの限界があり、これらを克服することが同時に今後の課題である。(i) サンプルサイズが小さく、合計 37 名であり、POD 群が 10 名であったこと。(ii) 対象患者が脳切除術を受ける患者であり、脳に直接侵襲が加わった後のせん妄を研究対象としている。さらに、対象患者の年齢層が比較的若い。一般に臨床の場で広くみられるせん妄、すなわち高齢者において中枢以外の身体的問題によって生じるせん妄に、今回の研究結果を般化させることに限界がある。(iii) POD 群と non-POD 群の間で、ゲノムワイドレベルで有意な差をもつ遺伝子や CpG 部位を発見できなかったこと。(iv) 今回のデータは、エピジェネティクスシグナルと POD の関連を示したが、因果関係を示唆するものではないこと。(v) 本研究は単一の施設で実施され、被験者の多くは非ヒスパニック系の白人であったこと。(vi) POD の定義が、電子カルテのレトロスペクティブなチャートレビューにのみ依存しており、偽陽性または偽陰性の症例が存在する可能性があること。これらの限界を克服し、高齢者に広くみられるせん妄に般化できるエピジェネティクスな機序を解明するために、高齢者の大腿骨頸部骨折や悪性腫瘍、心血管系に対する手術におけるエピジェネティクス研究を実施することは重要である。

おわりに

これまでせん妄は症状を観察や問診でとらえることで評価してきた。すなわち、せん妄の診断基準や、せん妄のスクリーニングツールが用いられてきた。時にはベテランスタッフによる「この患者さん、せん妄になりそう」といった直感（それは山勘ではなく、数値化、言語化が難しい、微細なせん妄症状をとらえているのであろうが）がせん妄の早期発見に役立ってきた。これらは無論重要な評価方法であるが、同時に生物学的な機序を理解したうえで、客観的な指標があることで、スタッフや施設による評価のばらつきを少なくすることができる。著者らはこれまでに小型脳波デバイスを用いたせん妄検出に関する研究もしており^{18,31,32,38~40)}、これらのアプローチを組み合わせることで、せん妄の予測、早期検出が可能になり、ハイリスク患

者に早期介入するといったアプローチが可能となることが期待される。

利益相反

篠崎元は Predelix Medical LLC の共同創設者であるが、それに附随する過去の収入はない。また、住友ファーマ株式会社より共同研究費を受けている。山梨豪彦は本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) Alam, A., Hana, Z., Jin, Z., et al. : Surgery, neuroinflammation and cognitive impairment. *EBioMedicine*, 37 ; 547-556, 2018
- 2) Assenov, Y., Müller, F., Lutsik, P., et al. : Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat Methods*, 11 (11) ; 1138-1140, 2014
- 3) Braun, P. R., Han, S., Hing, B., et al. : Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals. *Transl Psychiatry*, 9 (1) ; 47, 2019
- 4) Braun, P. R., Tanaka-Sahker, M., Chan, A. C., et al. : Genome-wide DNA methylation investigation of glucocorticoid exposure within buccal samples. *Psychiatry Clin Neurosci*, 73 (6) ; 323-330, 2019
- 5) Cerejeira, J., Firmino, H., Vaz-Serra, A., et al. : The neuroinflammatory hypothesis of delirium. *Acta Neuropathol*, 119 (6) ; 737-754, 2010
- 6) Cunningham, C., Maclullich, A. M. J. : At the extreme end of the psychoneuroimmunological spectrum : delirium as a maladaptive sickness behaviour response. *Brain Behav Immun*, 28 ; 1-13, 2013
- 7) Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., et al. : From inflammation to sickness and depression : when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9 (1) ; 46-56, 2008
- 8) Day, K., Waite, L. L., Thalacker-Mercer, A., et al. : Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. *Genome Biol*, 14 (9) ; R102, 2013
- 9) Dillon, S. T., Vasunilashorn, S. M., Ngo, L., et al. : Higher C-reactive protein levels predict postoperative delirium in older patients undergoing major elective surgery : a longitudinal nested case-control study. *Biol Psychiatry*, 81 (2) ; 145-153, 2017
- 10) Horvath, S. : DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14 (10) ; R115, 2013
- 11) Horvath, S., Clock Foundation Team : DNA Methylation Age Calculator. 2019 (<https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>) (参照 2023-10-11)
- 12) Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., et al. : DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics*, 13 ; 86, 2012
- 13) Inouye, S. K. : Delirium in older persons. *N Engl J Med*, 354 (11) ; 1157-1165, 2006
- 14) Inouye, S. K., Westendorp, R. G., Saczynski, J. S. : Delirium in elderly people. *Lancet*, 383 (9920) ; 911-922, 2014

- 15) Khan, B. A., Zawahiri, M., Campbell, N. L., et al. : Biomarkers for delirium : a review. *J Am Geriatr Soc*, 59 (Suppl 2) ; S256-261, 2011
- 16) Liu, X., Yu, Y., Zhu, S. : Inflammatory markers in postoperative delirium (POD) and cognitive dysfunction (POCD) : a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*, 13 (4) ; e0195659, 2018
- 17) McCusker, J., Cole, M., Abrahamowicz, M., et al. : Delirium predicts 12-month mortality. *Arch Intern Med*, 162 (4) ; 457-463, 2002
- 18) Nishizawa, Y., Yamanashi, T., Saito, T., et al. : Bispectral EEG (BSEEG) algorithm captures high mortality risk among 1,077 patients : its relationship to delirium motor subtype. *Am J Geriatr Psychiatry*, 31 (9) ; 704-715, 2023
- 19) Numata, S., Ye, T., Hyde, T. M., et al. : DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am J Hum Genet*, 90 (2) ; 260-272, 2012
- 20) Pandharipande, P. P., Girard, T. D., Jackson, J. C., et al. : Long-term cognitive impairment after critical illness. *N Engl J Med*, 369 (14) ; 1306-1316, 2013
- 21) Phipson, B., Maksimovic, J., Oshlack, A. : missMethyl : an R package for analyzing data from Illumina's HumanMethylation450 platform. *Bioinformatics*, 32 (2) ; 286-288, 2016
- 22) Portela, A., Esteller, M. : Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*, 28 (10) ; 1057-1068, 2010
- 23) R Core Team : R : A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing. 2019 (<https://www.r-project.org/>) (参照 2023-10-11)
- 24) Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., et al. : limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 43 (7) ; e47, 2015
- 25) Sadahiro, R., Knight, B., James, F., et al. : Major surgery induces acute changes in measured DNA methylation associated with immune response pathways. *Sci Rep*, 10 (1) ; 5743, 2020
- 26) Saito, T., Braun, P. R., Daniel, S., et al. : 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, 2020
- 27) Saito, T., Toda, H., Duncan, G. N., et al. : 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, 2020
- 28) Schreuder, L., Eggen, B. J., Biber, K., et al. : 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, 2017
- 29) Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., et al. : Epigenetic mechanisms of longevity and aging. *Cell*, 166 (4) ; 822-839, 2016
- 30) Shinozaki, G., Braun, P. R., Hing, B. W. Q., et al. : 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, 2018
- 31) Shinozaki, G., Chan, A. C., Sparr, N. A., et al. : Delirium detection by a novel bispectral electroencephalography device in general hospital. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72 (12) ; 856-863, 2018
- 32) Shinozaki, G., Bormann, N. L., Chan, A. C., et al. : Identification of patients with high mortality risk and prediction of outcomes in delirium by bispectral EEG. *J Clin Psychiatry*, 80 (5) ; 19m12749, 2019
- 33) Simone, M. J., Tan, Z. S. : The role of inflammation in the pathogenesis of delirium and dementia in older adults : a review. *CNS Neurosci Ther*, 17 (5) ; 506-513, 2011
- 34) Spronk, P. E., Riekerk, B., Hofhuis, J., et al. : Occurrence of delirium is severely underestimated in the ICU during daily care. *Intensive Care Med*, 35 (7) ; 1276-1280, 2009
- 35) Vasunilashorn, S. M., Ngo, L., Inouye, S. K., et al. : Cytokines and postoperative delirium in older patients undergoing major elective surgery. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 70 (10) ; 1289-1295, 2015
- 36) Vasunilashorn, S. M., Dillon, S. T., Inouye, S. K., et al. : High C-reactive protein predicts delirium incidence, duration, and feature severity after major noncardiac surgery. *J Am Geriatr Soc*, 65 (8) ; e109-116, 2017
- 37) Yamanashi, T., Saito, T., Yu, T., et al. : DNA methylation in the TNF-alpha gene decreases along with aging among delirium inpatients. *Neurobiol Aging*, 105 ; 310-317, 2021
- 38) Yamanashi, T., Kajitani, M., Iwata, M., et al. : Topological data analysis (TDA) enhances bispectral EEG (BSEEG) algorithm for detection of delirium. *Sci Rep*, 11 (1) ; 304, 2021
- 39) Yamanashi, T., Marra, P. S., Crutchley, K. J., et al. : Mortality among patients with sepsis associated with a bispectral electroencephalography (BSEEG) score. *Sci Rep*, 11 (1) ; 14211, 2021
- 40) Yamanashi, T., Crutchley, K. J., Wahba, N. E., et al. : Evaluation of point-of-care thumb-size bispectral electroencephalography device to quantify delirium severity and predict mortality. *Br J Psychiatry*, 220 (6) ; 322-329, 2022
- 41) Yamanashi, T., Crutchley, K. J., Wahba, N. E., et al. : The genome-wide DNA methylation profiles among neurosurgery patients with and without post-operative delirium. *Psychiatry Clin Neurosci*, 77 (1) ; 48-55, 2023