

氏 名	金 子 貴 雄
(ふ り が な)	(かねこ たかお)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 8 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Microarray analysis of human blood during electroconvulsive therapy (電気けいれん療法におけるヒト末梢血を用いたマ イクロアレイ研究)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 矢 野 貴 人 教授 木 村 文 治 教授 小 野 富 三 人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒 言》

電気けいれん療法 (Electroconvulsive therapy : ECT) の有用性は確立されているが、効果発現の分子メカニズムは解明されていない。動物モデルでは電気けいれんショック (Electroconvulsive shock : ECS) によって N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体及び α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-related receptors (AMPA) 受容体が活性化されて海馬神経形成が促進されること、遺伝子発現については、Neuropeptide Y (NPY) の mRNA がラットの背側脊髄、海馬、歯状回および梨状皮質で増加し、その受容体である Nyp1r、Npy2r、および Npy5r の発現は減少すると報告されている。これまでの遺伝子発現の研究は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 quantitative polymerase chain reaction (qPCR) を用いたもので、機能的な関連を示唆された遺伝子に限定されているが、マイクロアレイは多数の遺伝子を一度に解析できるという点で優れ

ており、新たな生物学的知見を得るために有効な技術と考えられる。今回、我々は ECT 施行前後での患者末梢血における mRNA 遺伝子の発現量の変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、得られた候補遺伝子を qPCR で確認することで ECT の分子生物学的基盤について検討した。

《対 象》

The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV Text Revision (DSM-IV TR) に基づいて統合失調症と診断され、修正型電気けいれん療法 (modified ECT: mECT) を受けた統合失調症のうち、陽性・陰性症状評価尺度 (Positive and Negative Syndrome Scale : PANSS) が 20%以上改善した 5 名を対象とした。尚、本研究は大阪医科大学倫理委員会で承認されており、対象者より文書による同意を得た。

《方 法》

mECT は、開始前にベンゾジアゼピン系抗不安剤および抗けいれん剤の服用を停止し、睡眠、食習慣、喫煙、服薬の影響を最小限に抑えるために入院下で実施した。mECT 導入前と 6 回目の mECT 施行後に採取した末梢血液（全血）より RNA を抽出し、この RNA から cDNA を合成した。マイクロアレイ解析は Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrics 社) を用いて行った。ECT 施行前後で発現量の変化 ($p < 0.01$) が認められた 145 個の遺伝子のうち、統合失調症の病因に機能的に関連すると考えられる 4 遺伝子について、さらに qPCR を用いて遺伝子発現を検証した。

《結 果》

マイクロアレイ解析で発現が検出された転写産物は47,000個のうち23,188個であった。次に治療前後の発現量変化を t 検定で比較し、 $p < 0.01$ であった 145 遺伝子 (0.68%) を抽出した。このうち機能的な関連性が推測される AKT3 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3)、TCF7 (transcription factor 7)、PPP3R1 (protein phosphatase 3)、GADD45B (growth arrest and DNA-damage-inducible) について、ECT 導入前と 6 回目の ECT 施行後に得たサンプルに加え、3 回目施行後に得たサンプルも追加し、qPCR を用いて解析したところ、TCF7 のみに有意な発現量の増加を認めた ($p=0.0095$)。

《考 察》

本研究の結果、ECT 施行前後で末梢血における TCF7 の発現量が有意に増加することが明らかになった。TCF ファミリー遺伝子は、TCF7、TCF7L1、TCF7L2、および LEF1 からなっている。ECT の作用機序の一つとして神経新生作用の促進が報告されているが、TCF ファミリーは古典的 Wnt/ β -カテニンシグナル経路を通して転写因子として作用し、神経新生に関与すると考えられている。統合失調症との遺伝的関連が報告されているのは TCF7L2 であるが、TCF7 は TCF7L2 の機能を抑制するといわれており、両者は機能的関連性があると考えられることから、ECT の臨床効果には TCF ファミリー遺伝子群の発現量変化による神経新生が関与する可能性が考えられた。本研究の限界としては、末梢血と中枢神経系での発現量変化が相関するかが明らかではないことや、ECT 前後の治療薬が厳密にコントロールされていないことで遺伝子発現量に影響が生じた可能性があることが考えられる。

Iacob ら (2004) は、難治性うつ病患者 22 名を対象に、機能的な関連を示唆される 9 遺伝子について qPCR を用い、ECT 施行前後での白血球内における mRNA 発現量が変化したことを報告し、ASIC (acid-sensing ion channel) 遺伝子ファミリーと難治性うつ病との関係性について述べている。今回我々のマイクロアレイによる研究で抽出した 145 の

遺伝子の中に、Iacob らの報告した 9 遺伝子は含まれておらず、このような差異については研究手法の違いなどの要因が考えられる。しかしながら、今回の我々の研究結果が ECT の作用機序によるものなのか、統合失調症の病因に由来するものなのかについて更なる研究を進めるために、うつ病などの他疾患や ECT による治療効果が乏しい統合失調症症例に対する検討が必要であると考えられた。

また Altar ら（2004）は、げっ歯類の脳における、ECS による mRNA 発現量の変化について、マイクロアレイを用いて調査し、120 個の遺伝子を抽出して mitogen-activated protein kinase signaling pathway の一部を構成する遺伝子の重要性を報告している。しかしながら今回我々のマイクロアレイによる研究で抽出した 145 の遺伝子の中に、Altar らの報告した 120 遺伝子は全く含まれていない。このような差異については、やはり研究手法の違いなどの要因が想定されるが、機能的経路が一部重なっているとも考えられ、今後、更なる研究が必要であると考えられた。

《結 論》

ECT 施行前後に TCF ファミリーの遺伝子発現量の変化が示されたことから、同ファミリーが ECT の分子メカニズムおよび統合失調症の病因に関与することが示唆された。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

統合失調症の病態における分子生物学的基盤は確立されていないが、統合失調症に対して有効な治療法である電気けいれん療法 (Electroconvulsive therapy : ECT) の作用機序を明らかにすることで、統合失調症の分子生物学的病態を解明する一助となる可能性がある。

申請者は、統合失調症に対する電気けいれん療法の作用機序を分子生物学的に明らかにすること目的とし、今まで行われてきた機能的な候補遺伝子を用いるのではなく、関与する遺伝子をより多く検出する網羅的な解析が必要であると考え、ECT により臨床症状が改善した患者 5 名の末梢血における mRNA 遺伝子の発現量変化に関してマイクロアレイを用いて解析を行った。マイクロアレイ解析によって 145 遺伝子 (0.68%、 $p < 0.01$) に発現量の変化が認められた。この中から先行研究により候補遺伝子と考えられている AKT3 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3)、TCF7 (transcription factor 7)、PPP3R1 (protein phosphatase 3)、GADD45B (growth arrest and DNA-damage-inducible) を選択し、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative polymerase chain reaction : qPCR) を用いてより詳細に解析を行った結果、TCF7 のみに有意な発現量の増加が認められた ($p=0.0095$)。TCF ファミリーは神経新生に関与していることが報告されており、ECT の作用機序に神経新生が関与する可能性が考えられた。今回の研究成果から統合失調症の分子生物学的病態に神経新生が関与している可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

The Journal of ECT

2015 Mar 24, doi: 10.1097/YCT.0000000000000234

〈オンライン掲載〉 In press