

氏 名	西 口 昌 樹
(ふ り が な)	(に し ぐ ち ま さ き)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 29 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	Increases in iPS transcription factor (Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4) gene expression after modified electroconvulsive therapy (修正型電気けいれん療法後における iPS 転写因子の遺伝子発現量の増加)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 小 野 富 三 人 教授 木 村 文 治 教授 千 原 精 志 郎

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

修正型電気けいれん療法 (modified electroconvulsive therapy ; mECT) は、難治性の精神疾患、特に薬物抵抗性のうつ病や緊張型の統合失調症に対して効果がみられる治療の一つである。しかしmECTの分子生物学的な作用機序は十分に解明されていない。

これまで行われてきた動物モデルの研究では電気刺激により、N-methyl-D-aspartate (NMDA) とDL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 関連のレセプターが活性化され、海馬の神経新生が増大されること、また記憶の基礎を形成する長期増強(LTP) は海馬においてNMDAレセプター依存的に機能し、慢性的なストレスによって引き起こされるラットの海馬のLTP障害が、電気刺激によって回復すること、さらにNMDAレセプターの機能が活性化されるにつれて、神経可塑性に関連した遺伝子の転写

が誘導され、その中には山中4因子と呼ばれるiPS転写因子であるOct4、Sox2、c-Myc、Klf4が含まれていることが報告されている。そこで我々は、ECT作用における分子生物学的メカニズムを解明するために、山中4因子について、ECT前後におけるmRNA発現量の変化を検討した。

《方 法》

対象はDSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, text revision) に基づいて診断したうつ病6例、統合失調症6例の患者である。すべての対象者は薬物療法として抗うつ薬もしくは抗精神病薬を、最大投与量で4週間以上かつ2種類以上処方されるも治療効果を十分に示さず、大阪医科大学附属病院でmECTを施行した。この研究は大阪医科大学の倫理委員会によって承認されており、参加者全員から文書による同意を得た。mECTは全身麻酔下で全10回、週2回の頻度で実施した。電気刺激はサイマトロン® (Somatics LLC, Lake Bluff, IL, USA) を用い、両側性にパルス波で行った。初回の電気刺激量はhalf-age法に従って設定し、有効なけいれん発作が得られなければ、電気刺激量を1.5倍に増やした。全身麻酔としてプロポフォール1.0mg/kgを静脈注射し、筋弛緩薬としてスキサメトニウム0.8mg/kgを使用した。睡眠、食事、喫煙、薬物療法の影響を最小化するため、全例とも入院下でmECTを行った。初回mECT前日、3回目mECTの翌日、6回目mECTの翌日、10回目mECTの翌日の朝10時に静脈血(全血)3mlを採取した。RNAはmRNA Isolation Kit for Bloodを用いて採取し、その後cDNAを合成した。遺伝子解析はライトサイクラー® (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて、Oct4、Sox2、c-Myc、klf4とhousekeeping geneであるGAPDHに対して行った。初回mECT前日のそれぞれの遺伝子におけるmRNAの発現量を1として、その後のECTとの発現量の比をとり解析した。統計的な解析はSPSSを用いてt検定を行った。

《結 果》

うつ病はHAM-D (21項目) を、統合失調症はPANSSを用いて、臨床症状を評価したとこ

ろ、mECTにより改善示した。またmECT後、全てのiPS転写因子においてmRNAの発現量が増加傾向を示した。t検定においては、Oct4における3回目のmECT、Sox2における6回目と10回目のmECT、c-Mycにおける3、6、10回目のmECTのmRNAの発現量で有意差を認めた。統合失調症群とうつ病群のデータをそれぞれ解析したところ、統合失調症群におけるc-Mycの遺伝子発現量が有意な増加を示した。

《考 察》

成熟細胞に山中 4 因子を導入することにより、発達の初期段階に起こるエピジェネティックな制限が再プログラムされることが知られている。また受精卵や胚幹細胞に類似した特徴をもつ iPS 細胞は、多様性を獲得する方向に導かれる。神経新生における遺伝子発現量のピークの速度やタイミングは、iPS 転写因子のそれぞれにおいて異なり、共同して作用しているとされている。今回 mECT 前後でリプログラミングを制御するとされる 4 因子が若干のピークの経時的な違いはあるものの、総じて上昇傾向を認めた。分化した神経細胞の初期化の後に神経新生がみられ、mECT が神経新生に関わる遺伝子を誘導し、このことが mECT の作用機序として関連する可能性が考えられた。また統合失調症群にのみ c-Myc における mECT 3、6 回目の mRNA の発現量に有意差を認められたことから、iPS 転写因子の中でも特に c-Myc が統合失調症の病態の改善をもたらしている可能性が考えられた。倫理的な面から健常人に mECT を行うことはできないが、うつ病、統合失調症の発症にはエピジェネティクスが関与していること、Dengke(2009)らが ECT によって DNA メチル化を解除してマウスの神経新生をもたらしていると報告していることをふまえると、mECT によって健常人に神経新生をもたらす可能性は、うつ病、統合失調症に比して低いと考えられる。今後対象者数を増やし、さらに神経可塑性に関連した他の遺伝子についても解析する必要があると考えられた。

論文審査結果の要旨

修正型電気けいれん療法 (modified electroconvulsive therapy ; mECT) は、難治性の精神疾患、特に薬物抵抗性のうつ病や緊張型の統合失調症に対して効果がみられる治療の一つである。動物モデルの研究では電気刺激により、N-methyl-D-aspartate (NMDA) と DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 関連のレセプターが活性化され、海馬の神経新生が増大されること、また記憶の基礎を形成する長期増強 (LTP) は海馬において NMDA レセプター依存的に機能し、慢性的なストレスによって引き起こされるラットの海馬の LTP 障害が、電気刺激によって回復すること、さらに NMDA レセプターの機能が活性化されるにつれて、神経可塑性に関連した遺伝子の転写が誘導され、その中には山中 4 因子と呼ばれる iPS 転写因子である Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 が含まれていることが報告されている。そこで申請者は mECT の分子生物学的な作用機序を明らかにするために、ECT 前後におけるうつ病、統合失調症患者の iPS 転写因子の mRNA 発現量の変化を検討した。

その結果、mECT後、全てのiPS転写因子においてmRNAの発現量が増加傾向を示し、統合失調症群におけるc-Mycの遺伝子発現量が有意な増加を示した。

mECTの有効性については世界中で認められているが、その分子生物学的な機序については解明されていない。本研究は細胞再生に関与すると考えられる山中4因子に着目し、mECT前後のiPS転写因子のmRNA発現量が増加していることを示し、mECTが神経新生を主体とした遺伝子を誘導することによって治療効果を示す可能性を示した。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2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)

Psychiatry Investigation 12(4): 2015 <オンライン掲載> in press