

審査の結果の要旨

ちょう ゆうえい

氏名 張 育薇

女性の多くが月経前に心身の違和感を体験するが、その中でも日常生活や社会生活に支障をきたすものは月経前症候群 (premenstrual syndrome: PMS)、さらに重症化した場合は月経前不快気分障害 (premenstrual dysphoric disorder: PMDD) と呼ばれる。PMDD は不安やうつなどの精神症状を主徴とし、患者の QOL を著しく低下させる。しかしその発症機序については不明な点が多く、PMS との判別法を含め PMDD の明確な診断基準は確立されていない。そこで本研究は、機械学習を用いることで発症機序についての仮説ではなく発症時の発現因子パターンに基づく PMDD 診断法を開発するため、その前段階としてラットを用いた方法論の確立を目的として行われた。

本論文は三章から構成されている。第一章では本研究で用いた各種解析法についての詳細な解説を行っている。第二章では PMDD モデルの検証とモデル個体のクラスタリングを行っている。ラットは非妊娠周期では機能黄体を形成しない不完全性周期動物であるため、PMDD モデルとして用いるためには黄体期のホルモン動態を再現する必要がある。本研究では血中プロゲステロン濃度を中心に検討した結果、PMDD の汎用モデルの一つである子宮頸部の機械的刺激による偽妊娠誘起法を用いている。このモデルでは、偽妊娠誘起後に完全性周期動物の黄体期に類似した約 2 週間のプロゲステロン濃度上昇を確認している。偽妊娠誘起後 0、8、16 日目の動物各 26-27 個体に対して不安傾向を評価するためにオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験、うつ傾向を評価するために強制水泳試験を行い、試験後に海馬を採取している。機械学習の一つ深層学習による解析ツールである DeepLabCut を用いて試験の結果を数値化し、教師なし学習である k-means 法によってクラスタリングを行った結果、5つの群に分類されたとしている。この5群のうち2群はうつ傾向を伴わず不安傾向のみを示す個体群だったためこれ以降の解析からは除外し、残りの3群をうつ・不安傾向が低いものからクラスター1、2、3 (C1, C2, C3) と呼ぶこととしている。各群は C1 が健常者、C2 が PMS 患者、C3 が PMDD 患者にそれぞれ相当すると考察している。3つに分類された計 32 個体のうち、C3 に含まれる動物は偽妊娠 0 日目と 8 日目のそれぞれ 2 個体で、16 日目の動物は含まれていなかった。この分布について、PMDD は排卵前後から発症し月経の発来すなわち黄体期の終了とともに症状が治まることから、本分

類はヒトの PMDD に応用するために妥当であると考察している。

第三章は、PMDD 発症に重要な因子の同定とその発現量を用いた PMDD 診断アルゴリズムの構築を目指して行われた。3つのクラスターから無作為に抽出した各群4個体の海馬について RNA シークエンスを行っている。重要度の高い因子を特定するため、まず発現量がゼロの因子および遺伝子として未同定の因子を除外した後に発現量が C1 から C3 への正もしくは負の勾配をもつことを条件に選抜することで、遺伝子を当初の 32,545 個から 5,047 個まで絞り込んでいる。次に、変数選択アルゴリズム **SelectKBest** で選択した上位 k 個の因子について教師あり学習の一つ **Linear SVM** を用いて予測精度を算出するという一連の作業を交差検証アルゴリズム **Grid Search CV** でパイプライン化し、k が 5,047 から 1 までの場合について交差検証を行なっている。C1、C2、C3 の 3 群比較条件に加え、分布の一部が重複する C1 と C2 を合わせた群と C3 との 2 群条件で検証した結果、最も高い精度は前者で k=1 の条件での 0.694、後者では k=16 での 1.000 となったと述べている。そこで、この 17 遺伝子について全個体で行った qPCR の結果を用いて、6 種類の教師あり学習による PMDD の重症度予測アルゴリズムを構築している。最後に、新たに 26 匹の雌ラットを用いて、実験 2 と同様の偽妊娠誘起と行動実験を行なった後に海馬を採取し、17 遺伝子の発現量に前述のアルゴリズムを適用している。その結果算出された予測分類は、行動学的解析結果に基づく分類との一致率が全てのモデルで 75%以上で、最も高い **Random Forest** による予測モデルは 3 群比較で 96%。2 群比較で 100%を示したため、このモデルが有効であると結論づけている。

本研究は PMDD 発症機構の解明に寄与するだけでなく、疾患モデル動物を用いた診断法の開発研究における機械学習の新たな可能性を提示するものである。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（獣医学）の学位請求論文として合格と認められる。