

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K10058  
研究課題名(和文) 生殖補助医療および母体環境要因による高次脳機能への影響の解明とリスク評価系の構築

研究課題名(英文) Elucidation of the effects of assisted reproductive technology and maternal environmental factors on higher brain function and construction of its risk assessment system

研究代表者  
遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)  
東海大学・医学部・講師

研究者番号：10550551  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：健全な子供の発育において、発生過程における環境因子への曝露は次世代の高次脳機能に大きな影響を与えることが知られている。しかしながら、発達期における次世代の学習や記憶に与える影響を評価する方法は確立していない。高学習能モデル動物であるTokai High Avoider (THA)ラットは、発生工学技術に伴う環境変化や妊娠期のストレスによる仔の学習機能に及ぼす影響を感度良く捉えることが可能であった。また、母体の表現型がTHAラットの高学習能を支える要因になっていることが示唆された。本研究により、THAラットは、高次脳機能への影響を評価する上で非常に有用な実験モデル動物になることが考えられた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

健全な子供の発育において、出生前の母体環境や出生後の発育環境について注視することに大きな社会的意義がある。近年では、様々な生殖補助医療技術が急速に進歩・普及する一方で、出生した子供の健康影響について高次脳機能の側面から評価がなされていない。本研究で得られた成果は、母体環境の変化によって引き起こされる次世代の認知機能への影響について適切に評価する方法を提案するものである。周産期ケアに対する新規かつ重要な情報提供の一助となり、次世代を担う子供たちの健やかな発育を考える上で大きな礎になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that in the development of healthy children, exposure to environmental factors during development has a significant impact on the formation of next-generation higher brain functions. However, no method has been established to evaluate the impact on next-generation learning and memory during development. Tokai High Avoider (THA) rats, which are high-learning ability model animals, were able to sensitively grasp the effects of environmental changes associated with developmental engineering technology and stress during pregnancy on the learning function of pups. It was also suggested that the maternal phenotype is a factor that supports the high learning ability of THA rats. This study suggests that THA rats will be very useful experimental model animals for assessing their effects on higher brain function.

研究分野：予防医学

キーワード：次世代影響 THAラット 学習能力

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

健全な子供の発育において、出生前の母体環境や出生後の発育環境について注視することに重要な意義がある。特に、発生過程における環境因子への曝露は、次世代の高次脳機能の形成に大きな影響を与えることがよく知られている。一方で、少子高齢化に至る様々な社会的要因の変化によって、生殖補助医療はこれまで以上に重要な役割を担っていくものと期待されている。しかしながら、生殖補助医療は発展しているものの、胚操作に関わる物理的環境因子の変化や、代理出産で生じる母体環境の変化によって、出生後にどのような影響が生じるかについて不明な点が多く残されている。特に、母体環境や発育環境が、学習や記憶能力といった脳機能に及ぼす影響について検討した例はない。それゆえ、母体環境の変化により生じる次世代影響について、学習や記憶機能への影響を簡便に評価する方法が望まれている。しかしながら、出生前から生まれてくる胎児の学習能力を予想することや判定することは不可能であり、出生後であっても子ども一人ひとりの個体差が大きいため、母体環境が次世代の学習能力に与える影響を正確に評価することは出来ないと考えられてきた。その課題に対し、申請者らが開発した高学習能モデル動物 Tokai High Avoider (THA) ラットを活用することで解決できると考え、研究に着手するに至った。

### 2. 研究の目的

生殖補助医療において、代理母体による胚の発育は、本来、胚が育つ予定であった母体とは異なる母体環境で生育することとなり、受精胚には異なる母体情報が子宮内環境を通して伝達されるものと考えられる。これまでに、本来とは異なる母体を介した出産や出生後の保育環境が、次世代の高次脳機能にどのような影響を及ぼすのかは不明であった。さらに、超低温保存や移植時に胚に生じる急激な温度変化が、子供の表現型にどのような影響を与えるのかについての報告例はほとんどない。本研究の目的は、生殖補助医療技術に伴う環境因子による次世代影響や、母体を介した子宮内環境や保育環境などの変容が、出生後の学習や記憶能力に及ぼす影響について、THA ラットを用いて学習行動試験から評価することである。本研究を通して、THA ラットが高次脳機能に対する *in vivo* スクリーニングの評価系の一端を担う可能性について、科学的根拠を提示する。

### 3. 研究の方法

環境要因（特に母体を介した内的環境変化、または胚操作に伴う外的環境変化）による次世代の高次脳機能への影響を検討するため、THA ラットの出発点になっている Wistar 系ラットと THA ラットを用いて、レバー押しによる回避行動試験を中心に解析を行う。代理懐胎による次世代影響や、妊娠中に生じる軽微なストレス環境による次世代影響について、THA ラットの表現型変化と併せて詳細に検討を行う。最終的に、THA ラットの表現型を支えている分子について、その挙動や意義について検討することで、母子間相互作用を規定する分子の機能を考察し、高次脳機能に対する *in vivo* スクリーニングの評価系の構築を行う。そのために、下記に示す(1)～(3)の項目を中心に研究を展開する。

#### (1) THA ラットの維持と学習能による Wistar ラットの選抜

THA ラットを自家繁殖しているため、当研究室の選抜プロトコルに従って実験に供する THA ラット及び Wistar ラットを選抜した。生後 5 週齢時より、1 日 1 時間のレバー押しによる回避行

動学習試験を10日間行い、5日間終了時点で90%以上の回避率を示した個体を選抜し、10週齢時に選抜個体同士を自然兄妹交配し維持する。Wistarラットも同様の方法で選抜し、5日間終了時点で90%以上の回避率に到達した個体を高回避群、到達しなかった個体を低回避群と規定し実験に用いた。

#### (2) THAラット胚を用いた代理懐胎による次世代影響の検討

THAラットの雌雄を同居させ、膣栓確認後に2細胞期胚に相当するときに受精胚を採取した(図1)。胚移植に関わる人為的操作において、超低温凍結保存を含めた外部環境要因による影響を検討するため、凍結を介さず胚の採取直後に移植した群と、6ヶ月以上液体窒素で凍結保存後に移植した群の出生率の変化と出生後の学習機能への影響を検討した。凍結胚は、THAまたはWistarラットの低回避群に移植し、次世代影響を検討した。

#### (3) 行動制限による母体ストレスを介した学習機能への影響

妊娠後期の雌THAラットを通常の飼育スペースより小さいケージで飼育することで、行動制限による軽微なストレスを与えた。通常飼育と行動制限下で生まれた仔について、一般発育、オープンフィールドテストによる情動行動観察、回避行動学習試験を行い(図2)、産仔のストレスについては血中コルチコステロンをELISA法で定量し評価した。

#### (4) 高学習能に関わる共通分子、THAラットに特異的な分子の探索

学習能に関わる分子やTHAラットの表現型に関わる分子を特定するため、高回避群とTHAラットから海馬を採取し、代謝物の網羅的な検討であるメタボローム分析を行った。代謝物同定後、代謝経路に関わる酵素やタンパクの発現の比較はウェスタンブロット法により検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 胚移植による次世代の学習機能への影響評価

採取した受精胚(図1)について、超低温凍結の有無による影響を検討したところ、出生率は明らかに凍結保存を介さずに移植した群が高い一方で、出生後の学習への影響はほとんどなかったことから、胚移植に関わる温度、保存、融解といった外部環境要因の変化はTHAラットの表現型に影響しないことが分かった。次に、学習能力が異なるレシピエントを用いて胚移植を行い、出生した仔の学習への影響を検討した



ところ、THAラットをレシピエントにして得られた仔の学習成績は、雌雄共に自然交配により出生した仔(自然交配THA)の学習成績と同等だった。一方で、低回避群のWistarラットをレシピエントとして得られた仔の学習能力は、個体差が非常に大きくなり、THAラット本来の学習成績とは大きく異なっていた。この結果から、個体復元させる上で生じる発生工学技術的な要因は、THAラットの表現型にほとんど影響を与えないものの、レシピエントの学習能力の違いが次世代に大きな影響を与えることが分かった。

#### (2) 仔の発達期における母体ストレスが次世代の行動に与える影響の検討

出生後から離乳期間において、対照群と比較し行動制限によるストレスを与えた母体を介し出生した仔の体重は、有意に増加することが分かった(図2)。オープンフィールドテストでは、ストレス群の歩行数が有意に増加したことから、多動傾向を示すことが明らかとなった。回避学習試験において、ストレス群は被刺激回数が有意に多く、記憶・学習機能の明らかな低下が認められた。興味深いことに、両群間において母ラット及び出生した仔の血中コルチコステロン濃度に明確な差はなかったことから、ストレス指標のバイオマーカーが検出できない程度の軽微な

ストレスであったとしても、妊娠中のストレスは次世代の高次脳機能に影響を及ぼすことが示唆された。また、胎生期に受けたストレスによる影響評価は、血中コルチコステロン濃度だけでは不十分であることが示され、THA ラットを用いた次世代のリスク評価と合わせて考察することが有用であると考えられた。

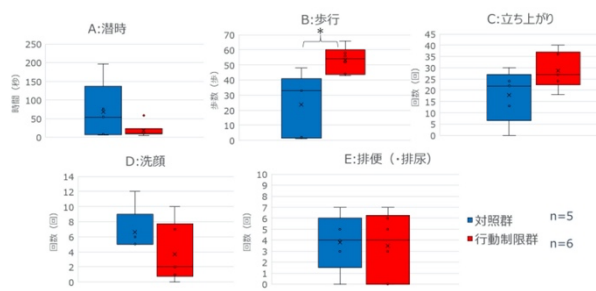


図2 オープンフィールドテストの結果

### (3) Wistar 及び THA ラットから学習・記憶制御に関わる因子の探索

高回避群の Wistar ラットと THA ラットの海馬を用いて、学習機能に関わる因子を同定するためメタボローム分析を行った。得られた代謝物の PCA (principal component analysis) の結果から、両群を特徴づける代謝物は明確に区別されることが分かった。この結果から、THA ラットの元系統は Wistar ラットであるものの、THA ラットは表現型での選抜交配をし続けて確立したことで従来の Wistar ラットとは全く異なる系統になっていることが示唆された。低回避群の代謝物を差し引きし、高学習能に関わる分子についてアミノ酸に限定して調べたところ、アラニン、アルギニン、セリン、トリプトファンなどが共通して増加または減少していることが分かった。一方で、THA ラットに固有な代謝物は、3 種類のアミノ酸 X, Y, Z をはじめ、長期記憶に関わる cAMP、覚醒や集中時に必要とされるアデノシンであった。次に、アミノ酸 X, Y, Z の代謝酵素の発現を検討したところ、Wistar ラットと比較し THA ラットの海馬でより多く発現し、活性化していることが分かった。その代謝酵素の発現は、定常状態において Wistar ラットと比較して差がないものの、学習試験後に誘導または活性化が認められること、週齢に依存しないことなどが分かった。

THA ラットは、生殖補助医療や母体環境の変化など、環境要因が与える高次脳機能への影響を評価する上で非常に有用な実験モデル動物であることが分かった。今後は THA ラットに特有の代謝物の意義についてより詳細に検討することで、次世代影響を評価するバイオマーカーへの活用などに展開し、より高感度かつ簡便な次世代影響評価法の確立を目指していくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terayama H, Qu N, Endo H, Ito M, Tsukamoto H, Umemoto K, Kawakami S, Fujino Y, Tatemichi M, Sakabe K.	4. 巻 28(6)
2. 論文標題 Effect of acetamiprid on the immature murine testes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Environ Health Res.	6. 最初と最後の頁 683-696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09603123.2018.1504897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤整
2. 発表標題 高学習能モデル動物Tokai High Avoider (THA)ラットを規定するメタボローム特性
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤整
2. 発表標題 生殖工学技術によるラットの個体復元と表現型への影響
3. 学会等名 日本実験動物技術者協会関東支部 REG部会第20回特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志田侑華里、菅琴美、遠藤整、大和田賢、立道昌幸
2. 発表標題 Tokai High Avoider (THA)ラットを用いた次世代のストレス適応の検討
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志田侑華里、遠藤整、大和田賢、古屋博行、立道昌幸
2. 発表標題 次世代影響評価における THA ラットの有用性の検討
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志田 侑華里、遠藤 整、大和田 賢、立道 昌幸
2. 発表標題 THAラットを用いた次世代の学習能力への影響を評価する新規分子の探索
3. 学会等名 第20回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海大学医学部基盤診療学系 衛生学公衆衛生学HP <a href="http://health.med.u-tokai.ac.jp/index.html">http://health.med.u-tokai.ac.jp/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大和田 賢  (OWADA Satoshi)  (40756409)	東海大学・医学部・助教    (32644)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	住吉 秀明  (SUMIYOSHI Hideaki)  (60343357)	東海大学・医学部・講師    (32644)	
研究分担者	阿部 幸一郎  (ABE Koichiro)  (90294123)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関