

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12728

研究課題名(和文)母子間ネットワークにおける高次脳機能発達機序の新展開

研究課題名(英文) Paradigm shift of the mechanisms that development of higher brain function on maternofetal transmission

研究代表者

立道 昌幸 (TATEMACHI, Masayuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00318263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：代理懐胎技術などの高度な生殖補助医療技術が急速に進歩し、実験動物学の技術として広く普及しているが、科学的に安全性や出生する児のリスク評価は十分に検討されたとは言えない。高学習能モデル動物であるTokai High Avoider (THA)ラットを用いて、発生工学技術、代理懐胎、および飼養環境による仔の学習機能に及ぼす影響評価を行った。THAラットの表現型は、低学習能を示したWistarラットを介して出生させた際に顕著な影響が認められた。本研究により、THAラットの表現型の維持に母体の子宮内環境が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：While embryos transfer to recipient females is a useful experimental technique for biology and experimental animal research, it has yet to be determined whether these artificial reproduction technique and the maternal factor affect the phenotype of offspring, especially higher brain function. We showed that high learning ability of Tokai high avoider (THA) rat offspring was not replicate by embryos transfer technique utilizing surrogate female Wistar rats that are low avoidance phenotype. However, a postnatal cross-fostering investigation with the offspring of Wistar rat and THA rat showed that maternal care such as postnatal behavior and lactation trait were not much difference between dams of low avoidance Wistar rat and THA rat. We conclude that the offspring phenotype, although unchanged, has an imperceptible effect on the learning ability of embryos transfer-derived THA rats through the intrauterine environment of the recipient.

研究分野：予防医学

キーワード：母体環境 THAラット

## 1. 研究開始当初の背景

高学歴化などで男女ともに就労率が上昇し、晩婚化や社会経済的要因などが重なり、社会的要因の変遷に伴い不妊人口は増加している。このような社会的背景において、体外授精、胚移植、代理懐胎技術などを中心とした高度な生殖補助医療技術は急速に進歩・普及し、多くの人々にその恩恵がもたらされてきた。我が国において、全ての高度生殖医療が実施されているわけではないが、実験動物学の領域では研究手法の一環として数多く実施されてきた。その一方で、ヒトの生殖補助医療として実施するにあたり、倫理的・法的な整備のみならず、科学的な安全性や発育後の健康へのリスク評価を詳細に調査研究してきたとは言い難い。代理懐胎（代理母）による出産は、遺伝的背景が異なる母体内の子宮内環境下で受精胚が育まれることになるが、出生してくる児のゲノム配列は保たれているためか、出生後の精神発達や発育に対しどのような影響が生じるかを検討されることはほとんど無かった。近年、胎生期または乳児期において栄養状態や酸素濃度をはじめとする子宮内環境に曝露されることで、出生後の子供において生活習慣病の素因が形成され、その後の生活環境の負荷により生活習慣病が発症するという考えをもとに、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) という概念が提唱されている(Baker, Clinical Science, 1998)。DOHaD 仮説によって、疾病の発症には遺伝的素因が重要視されてきた従来の考え方に加えて、環境要因の重要性に改めて注目が集まっている。また、早期の生育環境が子の発達に重要であることは知られているが (Levine, Science, 1957)、保育者の違いによる授乳環境が子の学習・記憶能力にどの程度影響を与えるかは全く不明なままである。

## 2. 研究の目的

代理懐胎による胚の発育は、本来胚が育

つ母体とは異なる母体で生育することになり、全く違った子宮内環境に曝される。さらに、「健康状態の良好な代理母（もしくは乳母となる里親）」を介した出産や保育環境において、特に出生後の記憶・学習機能といった高次脳機能にどのような影響を及ぼすのかを検討した報告はこれまでに無かった。本研究では、申請者らが開発、維持してきた高学習能モデル動物 Tokai High Avoider (THA) ラットを用いて、次世代に受け継がれる高学習能を規定する因子の探索、子宮内環境や母乳成分の相違による次世代の学習・記憶機能への影響を解析し、代理母による妊娠または保育が影響を与える新規の要因と分子機序の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

代理懐胎や保育環境が与える次世代の高次脳機能への影響を的確に評価するため、THA ラットを用いて学習行動試験を中心に解析を行う。さらに、次世代の学習・記憶能力に影響を与える子宮内環境及び母体中液性因子の関与を検討する。代理懐胎及び里親（保育飼養者）の交換を行い、次世代の 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、母子間相互作用を規定する分子の機能を個体レベルで解析し、新たな母子間ネットワークの証明とその分子連関を解明する。そのために、下記に示す(1)～(3)の項目を中心に検討を行う。

### (1) 回避行動学習試験における THA ラットの維持と低学習群の選抜

THA ラットは、研究室で確立したプロトコルに従って系統維持する。すなわち、5 週齢時から 1 日 1 時間の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する。10 週齢時に選抜した個体を自然兄妹交配し維持する。Wistar ラットは、飼育環境に十分順化させるため、THA ラットの維持管理区域と同室の動物飼育

施設で1度繁殖させた個体を用いる。5週齢時にTHAラットと同様の学習試験を行い、低学習群を選別する(図1)。

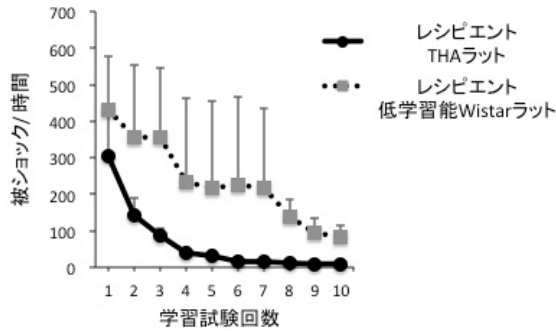


図1. レシピエントの学習能の比較

(2) 発生工学技術および子宮内環境による影響の検討

雌雄のTHAラットを通常継代方法に従い兄妹交配させ、2細胞期胚を採取する。一定期間液体窒素で保存後、レシピエントの性周期に合わせて移植し個体復元を行う。レシピエントはレバー押し型回避試験で高学習能を確認したTHAラットと、上述したように低成績を示したWistarラットを使用する。学習能力が全く異なる母胎に高学習能THAラット由来受精卵を移植し、子宮内環境を介して母体側の学習レベルが次世代の学習行動に与える影響を検討する。

(3) 母乳など保育環境による影響の検討

自然交配により得たTHAラットの産子を出生直後から離乳までの期間、低学習能のWistarラットが里親となり保育する。仮に、保育環境の違いが学習行動に与えるとの結果が得られた場合、THAラットとWistarラットの母乳および産子から血液を採取し解析を行う。

4. 研究成果

(1) 発生工学技術および学習能の異なるレシピエントによるTHAラットの学習能への影響

母体の学習能力が、代理懐胎により発生した仔の学習能力に与える影響を検討するため、学習能の異なる(低学習能を示したWistar

ラットと高学習能THAラット)レシピエントを用いて、THAラット由来の2細胞期胚を移植した。代理懐胎により得た産子の学習能力をレバー押し回避行動試験で評価したところ、THAラットをレシピエントにした仔(THA/THA)の学習成績は、雌雄共に自然交配により得られた仔(自然交配THA)の学習成績と同等であった。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ことが分かった(図2)。

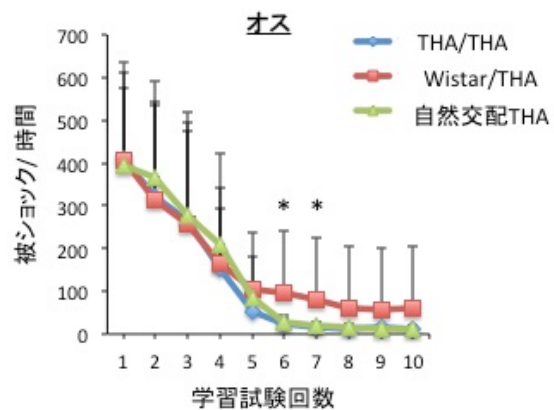


図2. 代理懐胎により出生した仔の学習能力の検討

一方で、低学習能を示したWistarラットをレシピエントにして得られた産子(Wistar/THA)の学習成績は、自然交配またはTHAラットをレシピエントにして生まれた仔の学習成績と比較し、明らかな被ショック数の増加が認められた。このような仔の学習成績の低下は、特にオスにのみ認められた。しかしながら、雌雄共に低学習能Wistarラットをレシピエントにし出生した仔の学習成績は、個体差が非常に大きくなることが分かった。よって、低学習能のWistarラットをレシピエントにした代理懐胎の場合のみ、THAラット表現型の特徴の一つである個体差の均一性が完全に消失する結果を得た。

(2) 代理懐胎由来の個体を用いた次世代影響評価

次に、代理懐胎により生じた学習能への影響は、次世代にまで引き継がれるのかを検討した。Wistar ラットを介し代理懐胎により出生した雌雄の低学習能または高学習を示した個体同士を自然交配させ、F1 産子を得た。予想外なことに、F1 産子の学習能は、自然交配の THA ラットと全く同等であり、代理懐胎により生じた影響は全く残存していなかった。これらの結果から、発生工学技術による個体復元は、THA ラットの表現型に影響を与えないこと、レシピエントの学習能力が THA ラットの個体復元において重要であること、代理懐胎による影響は自然交配による出生により次世代では消失することが明らかとなった。

### (3) 飼養者の違いが次世代の学習能力に与える影響

胎生期や発生後の授乳期における母子間の相互作用は、次世代の高次脳機能の発達に重要な役割を担っていることが知られている。仔のレシピエントとなる母体の学習能力が THA ラットの表現型に影響を及ぼすことが明らかとなったことから、次に里親交換 (cross-fostering) を行い飼養者の学習能力が仔の学習能力に与える影響を検討した。すなわち、出生後速やかに THA ラットは低学習能の Wistar ラットに保育させ、Wistar ラット由来の仔は THA ラットに飼養させた。代理懐胎により認められた THA ラットの学習能への影響は、cross-fostering では認められず、Wistar 由来の仔が示す学習成績においても、特に大きな変化は生じなかった。以上の結果から、授乳期の保育者の違いによる影響は、THA ラットと Wistar ラット共に限定的であった。

### (4) THA ラットの学習能形成に関わる母子間相互作用因子の探索

上述したように、THA ラットの高学習能は、近交系確立に至った遺伝的な要因に加えて、

母体の子宮内環境要因により成立していることが分かった。母体を介して仔に移行する高学習能形成に関与する因子を探索するため、低学習能 Wistar ラットと THA ラットの生体試料を用いてメタボローム解析を行った。総代謝産物の主成分分析の結果より、両者を特徴づける代謝産物は明瞭に区別されることが分かった。この結果から、THA ラットは Wistar 系由来であったとしても、高学習能の選抜交配により樹立したことにより、Wistar とは異なる系統になっていることを示唆している。両者の代謝産物は、多様な経路が変動していたが、ポリアミン代謝産物の一つに大きな差が認められ、THA ラットではこの代謝産物の消費が亢進していることが示唆された。すなわち、THA ラットが示す高学習能という表現型を維持するために、ポリアミン代謝産物の一つが重要な役割を担っていることが考えられる。

今後、本研究で得られた結果をもとに、発生工学技術を利用した代理懐胎と個体復元による影響への理解をより深め流必要がある。また、実験動物学のみならず DOHaD 仮説について科学的根拠を提供し、次世代の高次脳機能へのリスク評価手法の開発につなげていくことが望まれる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Endo H, Eto T, Yoshii F, Owada S, Watanabe T, Tatemichi M, Kimura M. The intrauterine environment affects learning ability of Tokai high avoider rat offspring derived using cryopreservation and embryo transfer-mediated reproduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、22;489(2), 211-216, 2017.

doi:10.1016/j.bbrc.2017.05.133.

- ② Terayama H, Endo H, Tsukamoto H, Matsumoto K, Umezu M, Kanazawa T, Ito M, Sato T, Naito M, Kawakami S, Fujino Y, Tatemichi M, Sakabe K. Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. Int J Environ Res Public Health. 査読有、22;13(10), pii:E937, 2016.  
doi:10.3390/ijerph13100937.

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 立道昌幸、遠藤整、大和田賢、志田侑華  
里 THA ラットを用いた高学習能の母子  
間伝達シグナルの分子学的解明。2017  
年度生命科学系学会合同年次大会、2017  
年12月6-9日、神戸ポートアイランド  
(兵庫県・神戸市)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

東海大学医学部基盤診療学系 衛生学公衆  
衛生学ホームページ

<http://health.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

立道 昌幸 (TATEMACHI, Masayuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00318263

### (2) 研究分担者

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10550551

### (3) 研究協力者

江藤 智生 (ETO, Tomoo)

大和田 賢 (OWADA, Satoshi)