

10. 高学習能の母子間伝達シグナルの分子学的解明

立道 昌幸

*東海大学 医学部 基盤診療学系 公衆衛生学

Key words : 学習能力, 母体環境, 母子間相互作用, 生殖工学技術, 代理出産

緒言

胎生期および出生後の発育環境が次世代の発達に影響を与えることは広く知られている¹⁾。現在、母子保健の領域において子供の学習能、情緒などの高次機能に影響する因子の同定は極めて重要な課題である。子供の発育環境において、母子間の相互作用は最も重要な要因の一つであるが、代理懐胎による出産や代理保育行動が次世代の学習・記憶能力にどのような変化が生じるかを正確に評価することは非常に困難であり、特に個体レベルで高次脳機能に及ぼす次世代影響を捉えるモデル動物は存在していなかった。さらに、代理出産を行うに当たって、受精胚の採取、超低温保存、凍結胚の融解など温度変化を含めた一般環境要因による影響も不明なままであった。本研究は、母体側の要因として、子宮内環境や保育環境の違いに主たる焦点を当て、次世代の高次脳機能の形成に母子間シグナルネットワークが関与する可能性について検討することを目的とした。そこで、高学習能力を有していることが生まれながらに保証されたモデル動物 Tokai High Avoider (THA) ラットの受精胚を用いて、学習能力の異なる母体 (レシピエント) に移植し、代理懐胎により出生した THA ラットの表現型について評価を行った。また、THA ラットの高学習能を規定する因子を探索し、母子間シグナルがどのような分子に影響を及ぼしうるのかを考察した。

方法および結果

1. 高学習能モデル動物 Tokai High Avoider (THA) ラットの確立

THA ラットは、Jcl:Wistar ラットが由来であり、レバー押しによる電気ショック回避行動学習試験により好成績を示す個体同士を掛け合わせて作製された (図 1)。2 世代目からは、同腹仔において高学習能力を示した雌雄を選抜し、自然兄妹交配を繰り返し行うことで、近交系の高学習能モデル動物 THA ラットを確立、維持してきた。THA ラットは、微量化学物質曝露による中枢神経系の次世代影響を評価する目的で作製された²⁾。従来の実験動物では、出生前の学習レベルは未知であり、かつ出生後の学習能力は個体差が大きいため、化学物質曝露による次世代の中枢神経系への影響を正確に評価することが不可能である。一方、THA ラットはこのような問題を全て解決しているため、金属、アルコール、環境汚染物質などの微量曝露による次世代の学習機能への影響の検出および解析が可能である^{3, 4)}。これまでの研究成果から、THA ラットは、生まれながらに高い学習能力と安定した情動性を示し、かつ個体差が極めて小さい実験動物であることが証明されている。

THA ラットの系統維持、および本研究に関わる実験動物の学習能力は、シドマン型スケジュールに準拠した学習行動試験により評価した⁵⁾。シドマン型スケジュールとは、スキナーボックス内の動物に対し、5 秒毎に 1 回 0.5 秒間の電気ショックを動物の足下にあるグリッド部より発生させ、一方で、ボックス内にあるレバーを押すと嫌悪刺激を回避し 30 秒間の休息が与えられる内容である。電気ショックの嫌悪刺激発生の際、音や光などの条件提示や回避行動成功時の食餌などの報酬は無い。電気ショックは 100 V、0.7 mA とした。この学習行動試験は、毎日 1 時間ずつ計 10 日間行った。本研究では 102 から 105 世代目の THA ラットを用いて種々の検討を行った。

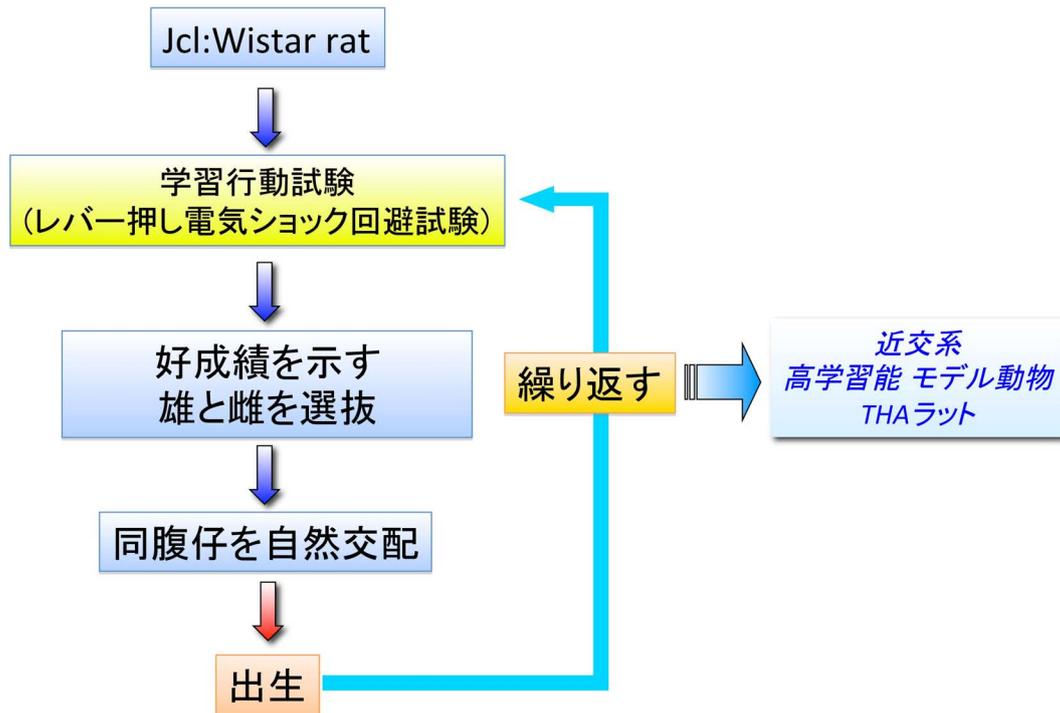


図1. 高学習能モデル動物 THA ラットの系統確立および維持の概略図

THA ラットは、Jcl: Wistar ラットを由来とし、レバー押しによる電気ショック回避行動学習試験により、好成績を示す個体同士を掛け合わせて作製した。

2. 生殖工学技術を用いた THA ラット受精胚の採取、保存と代理懐胎による出産が学習能に及ぼす影響の検討

雌雄の THA ラットを通常継代方法に従い兄妹交配させ、2細胞期胚の採取を試みた。性成熟に達している10-12週齢の THA ラットを用いて、プラグとギムザ染色による膈垢検査（性周期と精子侵入）を確認後、2細胞期胚の採取とガラス化保存を行った⁶⁾。THA ラットの2細胞期胚は、排卵誘発を使用せずとも一般飼育環境下で採取することが十分可能であった。レシピエントの学習能力が THA ラットの高学習能に与える影響を検討するため、THA ラットおよび THA ラットと比較し明らかに低学習能を示した Wistar ラットをレシピエントとする母体に THA ラットから採取した受精胚を移植し（図2A）、代理懐胎により出生した仔の学習試験を被ショック数により評価した。低学習能 Wistar ラット由来の仔の被ショック数は、自然交配により生まれた THA ラットと比較し、大きな個体差が認められ、有意に増加することが分かった（図2B）。一方で、THA ラットをレシピエントとして出生した仔の被ショック数は、自然交配により得た THA ラットと比較し明白な差が認められず、高学習能への影響はなかった。代理出産による仔の学習能力への顕著な影響は、雄ラットに認められ、雌では個体差のバラツキが現れたものの、有意な差が認められなかった（図2C）。この結果より、生殖技術に伴う環境変動が THA ラットの受精胚に与える影響は少なく、レシピエントの学習能力が母体を介して THA ラットの表現型に大きな影響を与えることが明らかとなった。次に、低学習能 Wistar により代理出産で生まれた THA ラット個体同士を自然交配により掛け合わせ、F1 世代を得たところ、学習能への影響は雌雄共にどの組合せにおいても確認できなかった（図3 A、B）。すなわち、代理出産による THA ラットの学習能力への影響は、自然交配による出産で消去されることが分かった。

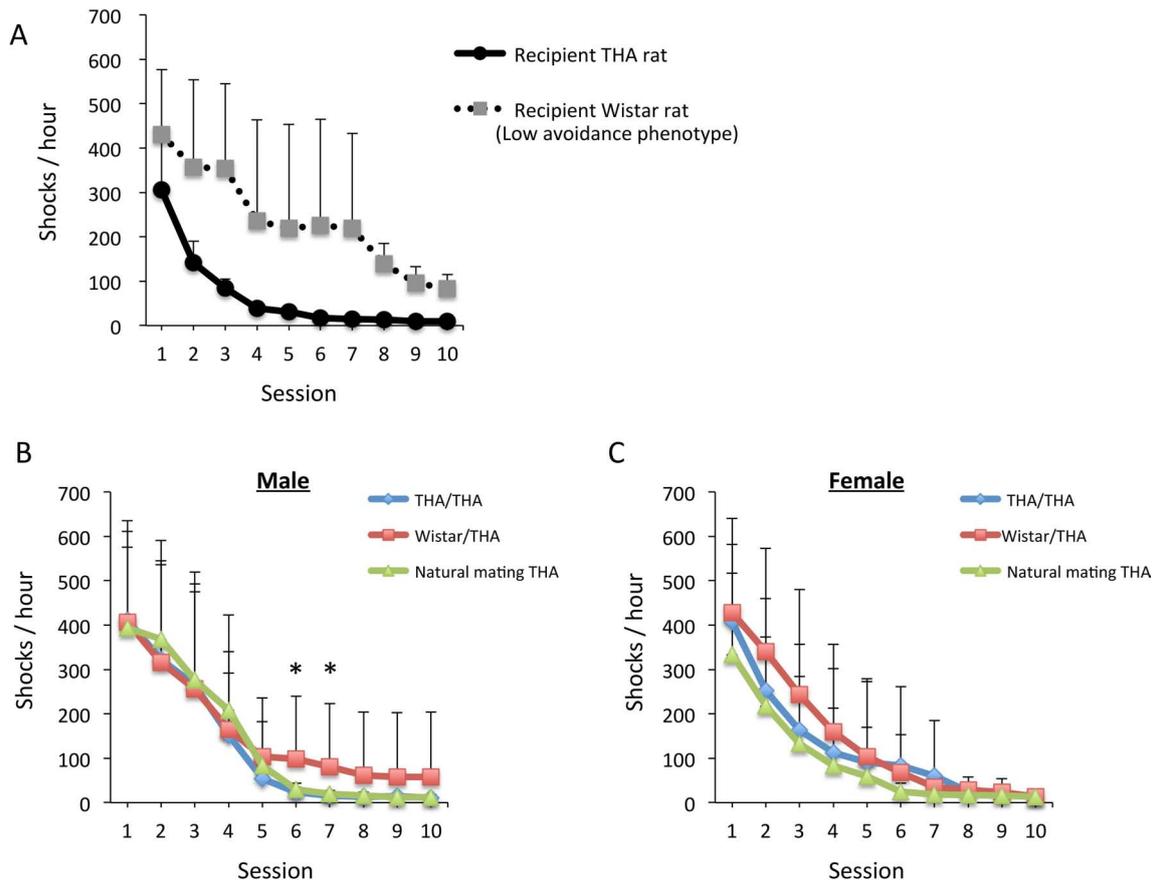


図2. 学習能力の異なるレシピエントを介して出生した THA ラットへの影響評価
 (A) 代理懐胎に用いたレシピエント (THA および低学習能 Wistar ラット) におけるレバー押し回避学習行動試験の比較。(B, C) 自然交配 (Natural mating THA)、レシピエント THA ラット (THA/THA)、レシピエント Wistar ラット (Wistar/THA) により出生した仔の学習試験の結果。統計処理は、一元配置の分散分析により行った。Error bar: SD. Asterisk: $P < 0.05$.

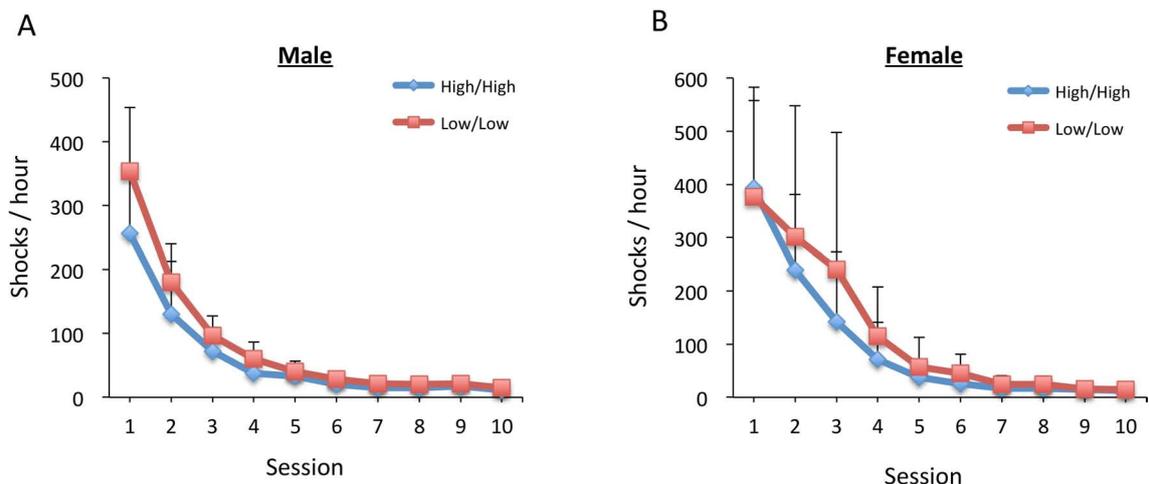


図 3. 代理出産を介した THA ラットを掛け合わせて作出した次世代の学習への影響
 (A, B) 代理出産により出生した仔を掛け合わせて作出した F1 世代における学習試験の比較。高学習能同士を掛け合わせて得た仔 (High/High)、および低学習能同士を掛け合わせて得た仔 (Low/Low) の成績を示す。Error bar: SD.

3. 保育行動が THA ラットの学習能に与える影響の検討

授乳を含めた保育行動が、仔の学習機能に与える影響を調べるため、cross-fostering による里親の交換を行った。出産後すぐに雌 THA ラットと雌低学習能ラットを交換することで、THA ラットが低学習能 Wistar ラット由来の仔を育て、低学習能 Wistar ラットに THA ラット由来の仔を保育させた。離乳後に学習試験を行ったところ、里親の学習能力の違いは、雌雄共に仔の学習能力に影響を与えないことが分かった (図 4 A, B)。この結果より、代理出産による THA ラットの学習能力への影響は、保育環境によるものではなく、レシピエントの子宮内環境が要因の一つであると考えた。

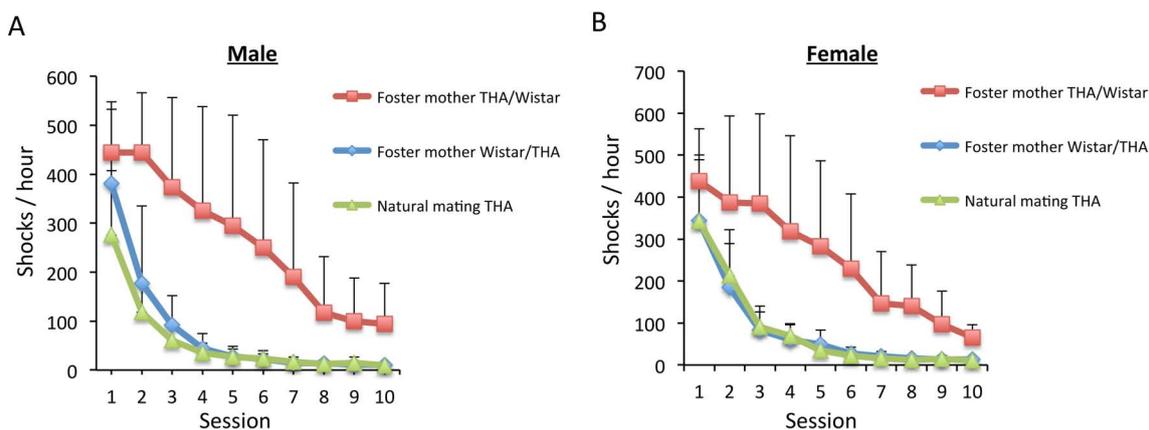


図 4. Cross-fostering による保育環境変化が仔の学習能力に与える影響
 (A, B) 出生後に里親交換を行った仔の学習試験の比較。自然交配により得た仔 (Natural mating THA)、里親が THA ラットで仔が Wistar ラット (Foster mother THA/Wistar)、里親が Wistar ラットで仔が THA ラット (Foster mother Wistar/THA) における学習試験の結果。Error bar: SD.

4. THA ラットを特徴付ける代謝産物の検討

高学習能 THA ラットと低学習能 Wistar ラット (図 5A) の相違点を見出すため、血清中の代謝産物についてメタボローム解析を行い、代謝産物の網羅的な比較検討を試みた。総代謝産物について主成分分析を行いグループ化したところ、THA ラットと低学習能 Wistar ラットでは見事に2つのグループに分かれたことから、全く異なった代謝産物によって特徴付けられることが明らかとなった (図 5B)。特に特徴的な差が認められた代謝産物は、必須アミノ酸であり分岐鎖アミノ酸 BCAA (Branched Chain Amino Acids) として知られる、バリン、ロイシン、イソロイシンであった (図 6A)。BCAA に着目し定量的に検討したところ、THA ラットの血清中 BCAA 濃度は、低学習能 Wistar ラットと比較して学習試験実施前から有意に高値を示した (図 6B)。非常に興味深いことに、THA ラットの血清中 BCAA は、学習試験前後の比較においても有意な亢進を認めたが、低学習能 Wistar ラットの BCAA 濃度に変化はなかった。以上の結果より、BCAA が THA ラットの表現型を規定していることが示唆されたため、母子間シグナルにおける BCAA の役割や意義について、現在詳細な検討を進めている。

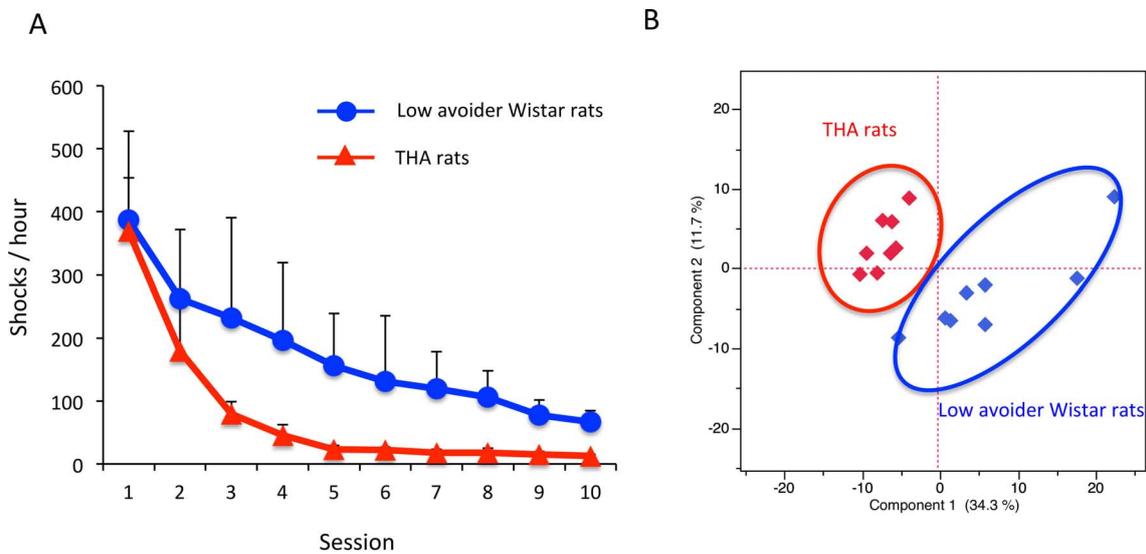


図 5. THA ラットと低学習能 Wistar ラットの相違点の比較検討

THA ラットと低学習能 Wistar ラットの表現型及び代謝産物の比較。(A) メタボローム解析に用いた THA および低学習能 Wistar ラットにおけるレバー押し回避学習行動試験の比較。Error bar: SD. (B) 血清におけるメタボローム解析により得られた代謝産物の主成分分析による比較。

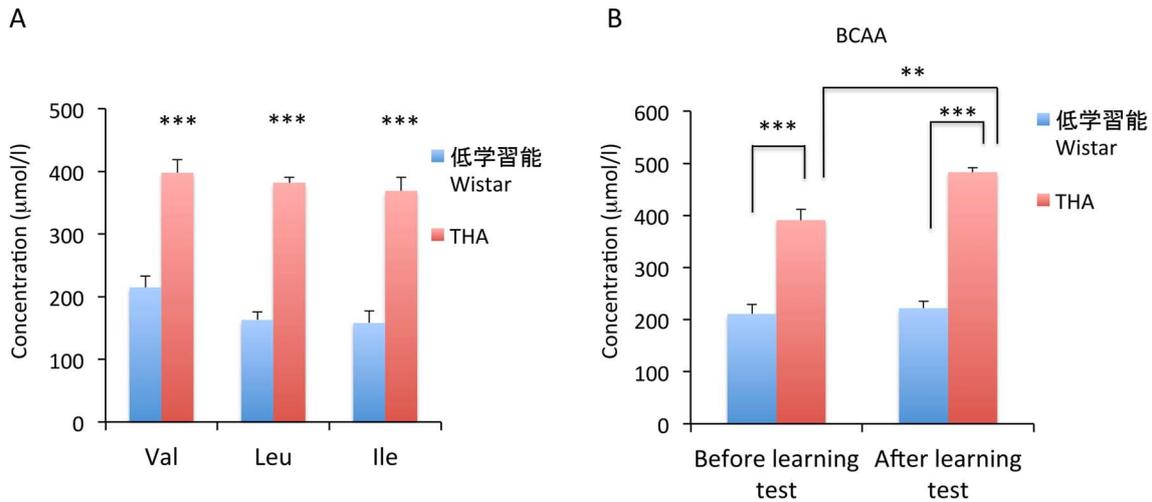


図6. THA ラットと低学習能 Wistar ラットにおける血清中代謝産物の比較
 (A) THA ラットと Wistar ラットにおける血清中の Val : バリン、Leu : ロイシン、Ile : イソロイシン濃度の比較。(B) 学習試験前後における THA ラットと Wistar ラットの血清中 BCAA 濃度の比較。統計処理は、unpaired Student's t-test を行った。Error bar: SD. *: P < 0.01, *** P < 0.001.

考 察

体外授精、胚移植、代理母体を介した出産などを中心とする生殖工学技術は、方法論が確立されており、特にマウスにおいて遺伝子改変個体の復元や系統保存の目的から一般的に行われてきた。代理出産による個体復元は、レシピエントに用いる系統によって復元率が異なることや、表現型に軽微な相違が出現することは経験から知られている。しかしながら、代理出産は、遺伝的背景が異なる母体内で受精胚が育まれるが、出生してくる仔のゲノム配列は保たれているため、出生後の高次脳機能にどのような影響が生じるかを検討されることは無かった。本研究は、レシピエントの学習能力が THA ラットの仔の学習能力に影響を及ぼすことを明らかにした。これまで、THA ラットは母体を介した仔の学習能力への影響を鋭敏に検出することが出来るモデル動物であることを報告しており³⁻⁵⁾、本研究において代理出産による影響をも評価することが出来たと考えている。保育行動による影響はなかったことから、レシピエントの子宮内環境が、THA ラットの高学習能という表現型形成に重要であることが考えられた。代謝産物の解析から、THA ラットの示す学習機能に BCAA が重要な役割を担っていることが示唆された。それゆえ、母体の学習能力に関連した子宮内環境動態と BCAA 代謝機構に焦点を当て解析することで、代理出産による子宮内環境を介した次世代の高次脳機能への影響について、分子機序のより詳細な解明が期待出来る。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東海大学医学部基盤診療学系衛生学公衆衛生学の遠藤整および大和田賢である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*. 2011;21;472(7343):347-50. doi: 10.1038/nature09972. PubMed PMID: 21512572; PubMed Central PMCID: PMC3084180.
- 2) Shigeta S, Aikawa H, Misawa T, Yoshida T, Momotani H, Suzuki K. Strain difference in learning impairment in rats following lead administration during brain development. *Tokai J Exp Clin Med*. 1986;1(4):241-7. PubMed PMID: 3617108.
- 3) Shigeta S, Miyake K, Misawa T. Critical period of brain development in learning caused by lead exposure in rats. *Tokai J Exp Clin Med*. 1989;14(2):147-52. PubMed PMID: 2638762.

- 4) Furuya H, Aikawa H, Yoshida T, Okazaki I. Effects of ethyl alcohol administration to THA rat dams during their gestation period on learning behavior and on levels of monoamines and metabolites in the brain of pups after birth. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20(9 Suppl):305A-310A. PubMed PMID: 8986228.
- 5) Clark FC, Hull LD. Free operant avoidance as a function of the response-shock = shock-shock interval. *J Exp Anal Behav.* 1966;9(6):641-7. doi: 10.1901/jeab.1966.9-641. PubMed PMID: 5970385; PubMed Central PMCID: PMC1338257.
- 6) Eto T. Strain preservation of rats: vitrification of two-cell stage embryos for multiple inbred strains. *Cryo Letters.* 2015;36(2):114-9. PubMed PMID: 26017290.