

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	東 海 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	THAラットの高学習能力の解明と次世代影響評価法への応用		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①THAラット、②次世代影響、③学習・記憶、④リスク評価、⑤化学物質		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
遠 藤 整	東海大学 医学部医学科	准 教 授	研究統括、学習行動試験、分子生物学的解析

○研究分担者

[illegible]

THA ラットの高学習能力の解明と次世代影響評価法への応用

1. 研究の目的

発生および発育過程における化学物質への曝露において、特に中枢神経系は感受性が高く、学習機能に障害として残存する可能性が高い。しかし、次世代における学習能力への影響は、*in vivo* で評価することは不可能であった。動物個体ごとの知能は個体差が大きく、知能の低下が生まれつきなのか、化学物質の影響であるのか、を判別できないためである。そのため、この課題を乗り越えるような、次世代の学習能力への影響を評価できるモデル動物は存在しなかった。

申請者らが開発した Tokai High Avoider (THA) ラットは、Wistar ラット（一般的な市販のラット）をもとに、頭の良い個体をかけ合わせ続けて系統化した、ユニークな高学習能モデル動物である。THA ラットは、生まれながらに高学習能力が担保され、かつ強固な記憶能力を示し、個体差が極めて小さい実験動物である。この特徴は、次世代の学習能力への影響評価において乗り越えられなかった課題を全て克服し、周産期における仔への影響を鋭敏に検出することができると考えた。

本研究の目的は、化学物質曝露による次世代の学習能力への影響を高感度に捉えるバイオマーカーの確立、全く新しい次世代影響評価法の開発と提供、である。そのため、独自の実験動物 Tokai High Avoider (THA) ラットをフル活用し、実装可能な次世代影響評価系の開発を行う。本研究では、THA ラットの高学習能を規定する分子機構を包括的に理解するとともに、その分子が次世代影響評価法につながるバイオマーカーになり得るのか、次世代影響が懸念されている化学物質の安全性について再評価を行うこととした。

2. 研究の計画

本年度の研究計画は、THA ラットの表現型を規定する因子とその制御機構を包括的に解析することに焦点を当て、学習能を制御する分子の同定を試みた。さらには、学習能を規定する分子を標的とした遺伝子改変THAラットの作成を目指し、ラットでの遺伝子改変動物作製に向けた基盤構築に着手した。以下に取り組んだ項目を示す。

- ① 学習試験の結果から高学習能を示した個体を選別し、THAラットの維持を行った。THAラットは、回避率が95%以上の個体を兄妹交配することで維持されてきた系統であるが、表現型のさらなる均一化を図るため、選抜基準をより明確にして系統維持を行った。レバー押し回避学習行動試験（以下、学習試験）は、一定間隔で発生する電気ショックに対し、レバー押しにより回避する内容である。これは、5秒に1回の間隔で電気刺激が発生し、飼育ボックス内のレバーを押すことで30秒間の回避時間が与えられる。この試験は、1日1時間10回行い、電気ショックの回避率により学習能力を評価した。
- ② WistarラットとTHAラットを用いて学習試験の前後において海馬の遺伝子発現を網羅的に検討した。遺伝子発現のクラスター解析およびネットワーク解析を行い、高学習能を規定する分子動態を把握した。その遺伝子群を中心に、学習や記憶が成立する過程を時系列に沿って遺伝子発現を検討した。
- ③ THAラットに特徴的な代謝産物の解析を行うため、網羅的に代謝物を比較するメタボローム解析を行った。WistarラットとTHAラットの海馬由来の代謝物の定量を行い、表現型を説明できる代謝物の抽出を試みた。
- ④ 卵管内の胚に直接遺伝子を導入する（胚の体外操作を必要としない）画期的なゲノム編集技術「*i*-GONAD法」により、短期間で遺伝子改変THAラットを作成するプロトコルの確立を目指した。

3. 研究の成果

(1) THA ラットの系統維持と表現型のさらなる純化

THA ラットは、Wistar ラットをもとに高学習能を示した個体を選別し兄妹交配を繰り返し行うことで確立した、高学習能モデル動物である。学習能力は、学習試験によって得られた回避率から客観的に評価することができる。THA ラットの表現型の均一化を目指すため、選抜交配の基準をより明確にして系統維持を行った。学習成績の選抜基準は、10 回の学習試験で 5 回目の回避率が 90%以上、6 回目以降から 95%以上の回避率を示すものとした。現在では、ほぼ全ての個体でその選択基準を満たし、学習効率が良く、Wistar ラットのような大きなバラツキは全くない系統であることが示された。

(2) Wistar ラットと THA ラットの表現型と海馬における遺伝子発現の比較

学習や記憶を担う遺伝子を調べるため、学習試験の成績をもとに、低学習能 Wistar ラット (Wistar-L)、高学習能 Wistar ラット (Wistar-H)、THA ラット (THA) の 3 グループに分けた。学習試験 5 日後、3 つのグループの脳組織 (海馬) から RNA を抽出し、マイクロアレイ (Agilent technologies 社) による網羅的な遺伝子発現解析を行った。Wistar-L に比べ Wistar-H で 2 倍以上発現が上昇した遺伝子数は 404 個、2 倍以上発現が低下した遺伝子数は 374 個であった。一方で、Wistar-L に比べ THA で 2 倍以上発現が上昇した遺伝子数は 988 個、2 倍以上発現が低下した遺伝子数は 634 個であった。次に、Wistar-L と比較し Wistar-H と THA で共通して遺伝子発現が 2 倍以上の上昇または低下したものは、olfactory 遺伝子群、G タンパク質共役受容体 (GPCR) 遺伝子群、MHC class I 遺伝子群に属する遺伝子であった。これらの遺伝子には多数のサブファミリーが存在し、学習・記憶を司る高次脳機能のみならず、多様な生理機能に関与することが報告されている。系統が異なる Wistar と THA における共通遺伝子群の同定から、学習行動に関わる普遍的な分子の存在が示唆されたものの、学習や記憶に関わる分子の複雑性も示された結果となった。

(3) THA ラットの学習行動に連動する遺伝子発現の特徴

THA ラットの表現型の特徴を分子レベルで捉えるため、学習試験の時系列に沿って海馬組織を採材し、網羅的に遺伝子発現を検討した。THA ラットにおける学習試験成績の特徴は、試験開始後 5 回目までにほぼ全固体が約 95%の回避率を示し、10 回目までその記憶が維持されていることが挙げられる。そこで、THA ラットの学習行動に関わる共通の遺伝子を探索するため、学習試験開始前 (Day 0)、学習試験 5 回目終了時 (Day 5)、学習試験終了時 (Day 10) において海馬を採材し、マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を行った。Day 0 と比較し、Day 5 と Day 10 が 2 倍以上発現変動した遺伝子のうち、発現が上昇した共通の遺伝子は 125 個、減少した共通の遺伝子は 590 個あった。すなわち、上昇した 125 個の遺伝子発現の中には、学習の立ち上がりに関わり、かつ記憶の固定に重要な役割を担う遺伝子が含まれていることが示唆された。続いて、Day 5 と Day 10 に共通して発現が上昇した遺伝子において、Gene Ontology 解析を行い遺伝子のグループ分けを行った。その結果、平滑筋細胞の挙動や増殖に関わる遺伝子群、学習や記憶の制御に重要な γ -アミノ酪酸 (GABA) のシグナル伝達に関わる遺伝子群などが共通していた。

(4) THA ラットに特徴的な代謝産物の解析

THA ラットの高学習能を支える因子を探索するため、代謝物に着目し解析を行った。代謝物は表現型に最も近い因子であるため、高学習能力を表現型とする代謝物の中には、THA ラットに特徴的な因子が含まれていると予想した。これまでの先行研究において、Wistar-L、Wistar-H、および THA ラットの海馬を用いたメタボローム解析の結果から、分岐鎖アミノ酸 BCAA (Branched Chain Amino Acids) が THA ラットに特徴的な代謝物であることを明らかにしてきた。海馬の代謝物について主成分分析による特徴付けを行ったところ、Wistar-L、Wistar-H、および THA ラットのクラスターは、全く異なる位置にグループ化されることが分かった。この結果から、THA ラットは Wistar ラットをもとに系統化されてきたものの、THA ラットの表現型のみならず代謝物の全体像は Wistar ラットと異なるため、独立した別系統であることが明らかとなった。

BCAA は神経系や脳組織において、BCAT1 によって代謝される。また、BCAA 代謝の活性化により代謝経路に関わるキナーゼ BCKDK のリン酸化は抑制される。そこで、海馬における BCAT1 のタンパク発現と BCKDK のリン酸化を検討したところ、Wistar ラットと比較し THA ラットは BCAT1 の発現亢進と BCKDK のリン酸化低下を示し、BCAA 代謝が促進していることが分かった。このことから、BCAA 量が多いことと、その代謝活性化が THA ラットを特徴付ける 1 つであることが分かった。

(5) THA ラットを用いた遺伝子改変動物作製に向けた基盤構築

THA ラットにおける学習や記憶に関わる候補遺伝子を決定するためには、THA ラットを基にして、学習や記憶に関わる候補遺伝子を欠失させ、個体レベルで遺伝子の機能解析を行うことが必要不可欠となる。THA ラットの遺伝子改変動物を作製するため、卵管内の胚に直接遺伝子を導入する（胚の体外操作を必要としない）ゲノム編集技術「*i*-GONAD 法」に着手した。THA ラットでの *i*-GONAD 法の至適条件を決定するため、マウス系統で適応されている条件でラットのゲノム編集個体が得られるかを検討した。雌雄の THA ラットを 1 対 1 で同居させ、陰栓確認日に両側の卵管を摘出し、実体顕微鏡下でターゲット遺伝子 X に対する sgRNA、Cas9 タンパクの混合液を膨大部上部（卵巣側）に注入後、100 V、100 mA の条件下でエレクトロポレーションを行った。しかしながら、効率的なゲノム編集個体の作出は困難であったため、エレクトロポレーションの電流値を変更し条件の再検討を行った。その結果、効率よくゲノム編集された個体を得る電流値を決定することができた。今後はより洗練された *i*-GONAD プロトコルを確立するため、過排卵処置など様々な条件検討に取り組む予定である。

4. 研究の反省・考察

THA ラットの系統維持は、申請者が管理する飼養施設内で自家繁殖しているため、研究に用いるための使用匹数を確保するだけで多大な時間と労力が必要であった。また、学習能力という高次脳機能を評価する上で、飼育条件や行動試験を行う場所の環境を一定にコントロールすることが最重要課題であることを改めて認識した。本研究では、それらの課題を踏まえつつ、THA ラットの高学習能を規定する因子について包括的に解析できたため、得られた研究結果は科学的妥当性が担保された意義のある成果であると考えた。引き続き、THA ラットの高学習能を規定する分子が化学物質曝露による学習能力への影響を評価するバイオマーカーとなり得るのかについて、研究を進めていくことを予定している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Keiji Mochida, Kohtaro Morita, Yoshio Sasaoka, Kento Morita, Hitoshi Endo, Ayumi Hasegawa, Masahide Asano, Atsuo Ogura. Superovulation with an anti-inhibin monoclonal antibody improves the reproductive performance of rat strains by increasing the pregnancy rate and the litter size. Scientific reports, 14, 8294, 2024.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし