2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

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		

〇研究代表者

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

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
大　塚　正　人	東海大学 医学部医学科	教　　授	実験動物作成、表現型解析
宮　沢　正　樹	東海大学 健康学部 健康マネジメント学科	准　教　授	生化学、分子生物学的評価

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

神経発達過程における化学物質曝露は、高次脳機能に不可逆的な障害を及ぼす懸念がある。しかし、次世代の学習能力に対する影響を、従来の実験動物モデルで精緻に評価することは困難であった。既存の汎用ラットでは個体間の学習能力差が大きく、化学物質曝露による影響と個体本来のばらつきを判別できないためである。すなわち、学習能力の変化を鋭敏かつ客観的に評価可能なモデル動物が不在であることが、本領域における主要な課題となっている。

申請者らが作出した「Tokai High Avoider（THA）ラット」は、高学習能力を有する個体を系統選抜することで得られた独自のモデルである。THA ラットは、生まれつき極めて高い学習能力を有し、かつ個体間のばらつきが極めて小さいという特性を持つ。この「遺伝的均質性」は、従来の課題を克服し、周産期曝露による神経毒性を鋭敏に検出することを可能にする。

本研究の目的は、THA ラットの特性をフル活用し、化学物質曝露が次世代の学習能力に及ぼす影響を高感度に捉える「次世代影響評価系」を開発することである。具体的には、THA ラットの高学習能力を規定する分子機構を解明し、それを指標とした次世代型評価プロトコールを確立する。併せて、本評価系を用いて次世代影響が懸念される化学物質の安全性を再評価し、学習機能の低下を早期に予測し得る血清バイオマーカーの特定を目指す。

2. 研究の計画

本年度は、昨年度までに得られた遺伝子発現および代謝物プロファイルの知見に基づき、THA ラットの高学習能力を規定する BCAA 代謝関連分子を特定し、遺伝子改変系統を作出した。さらに、次世代影響評価法への応用を見据え、個体レベルの学習試験、化学物質曝露、およびメタボローム解析を統合した次世代影響評価系を構築した。詳細を以下に示す。

① **遺伝子改変THAラットの作出：**THAラットの選抜規定（回避率95%以上）を満たす個体を1対1で自然交配させた。ゲノム編集にはi-GONAD法を採用した。膣栓確認当日の雌ラットより両側卵管を露出し、実体顕微鏡下でBCAA代謝関連遺伝子を標的とするsgRNAおよびCas9タンパク質の複合体を卵管膨大部へ注入後、エレクトロポレーションを施行した。得られたF0個体の組織片からDNAを抽出し、遺伝子変異の有無を選別した。

② **遺伝子改変系統の表現型解析：**BCAA代謝の抑制因子をコードするBCAA-I遺伝子ノックアウト（代謝亢進モデル）、および異化因子をコードするBCAA-A遺伝子ノックアウト（代謝抑制モデル）を作出した。各系統に対し、遺伝子変異の確認、血清中BCAA濃度の定量、ウェスタンブロットによる標的タンパク質の発現解析、および行動学試験を実施し、ノックアウト個体の表現型を多角的に評価した。

③ **化学物質曝露による次世代影響評価プロトコールの構築：**WistarラットおよびTHAラットを用い、内分泌攪乱物質であるビスフェノールA（濃度：0〜10 mg/kg/day）の周産期曝露試験を行った。交配確認直後の雌ラット背部皮下に浸透圧ポンプ（Alzet, model 2006）を留置し、胎児期（妊娠後期14日間）から授乳・離乳期（生後28日間）に至る計42日間の連続曝露を実施した。次世代の学習機能への変容を鋭敏に検出するため、離乳後の生後5週齢時に学習試験を実施した。

④ **血清バイオマーカーの探索と特定：**化学物質曝露に伴う母体および出生仔の生理的変化を網羅的に捉えるため、血清メタボローム解析を実施した。得られたデータから、曝露群において有意に変動し、かつ仔の学習能力と高い相関を示す代謝物群に着目した。さらに、次世代の学習能力低下を予測し得る母子に共通した代謝変化を抽出し、バイオマーカーとしての有用性を検証した。

3. 研究の成果

(1) ゲノム編集技術 i-GONAD 法を用いた BCAA 代謝酵素関連遺伝子の編集と機能解析

昨年度確立した THA ラットにおける i-GONAD 法を用い、BCAA 代謝関連遺伝子の欠損系統の作製を開始した。まず、BCAA 代謝の抑制因子をコードする遺伝子（以下、BCAA-I 遺伝子）のノックアウト個体を構築した。具体的には、BCAA-I 遺伝子の exon 9-11 を標的とする gRNA を設計し、エレクトロポレーションを施行した結果、約 500 bp の欠失を伴う個体を得た。

当該欠損がタンパク質発現および代謝活性に及ぼす影響を検証するため、海馬、肝臓、骨格筋、褐色脂肪組織を対象にウェスタンブロット解析を行った。その結果、全組織において BCAA-I の欠損が確認され、BCAA 代謝活性化の指標であるリン酸化 BCKDC の顕著な減少が認められた。これより、全身性かつ組織横断的な BCAA 代謝の亢進が実証された。加えて血清中の BCAA 濃度を定量した結果、ホモ欠損型では野生型と比較して約 4 分の 1 へ、海馬組織中では約 3 分の 1 へと有意に低下しており、全身的な BCAA 代謝亢進モデルの構築が完了した。

次に、BCAA の異化に関与する遺伝子（以下、BCAA-A 遺伝子）の欠損系統の作製に着手し、exon 4-5 を標的とした gRNA の導入により、遺伝子欠損を示唆する複数の変異体を得た。現在、系統化に向けた戻し交配を進めている。

また、BCAA-I 野生型およびホモ欠損型個体を用いて学習試験を実施した。対照群である野生型 THA ラットは、THA 系統特有の速やかな学習曲線と均質な成績を維持しており、ゲノム編集によるオフターゲット影響は極めて限定的であることが示唆された。対照的に、BCAA-I 欠損個体は野生型を大幅に上回る高い学習能力と、個体差の極小化を示した。特筆すべきは、初回学習試験から優れた成績を収め、試験 3 回目までに回避率 95%以上に到達した点である。選抜交配による系統化個体をも凌駕するこの成績向上は、BCAA 代謝の亢進が学習機能を飛躍的に高める要因であることを示唆するものである。

(2) 化学物質曝露が次世代の学習能力に及ぼす影響評価プロトコールの策定と妥当性の評価

次世代の学習能力に対する化学物質の影響を精緻に評価するには、神経発達における脆弱期を網羅した曝露デザインが不可欠である。本研究では、ヒトとげっ歯類の神経発達プロセスの相同性に基づき、最適な曝露期間および手法を策定した。

ヒトにおける中枢神経系は、受精後 28 日頃の神経管形成から始まり、神経細胞の増殖・移動、髄鞘形成、シナプス形成、小脳顆粒細胞の生成を経て、出生後 2 歳頃まで複雑な発達プロセスを継続する。げっ歯類において、これら一連の発達工程は受精後 7 日から離乳期の生後 4 週齢に集約される。この期間は外的環境因子に対して極めて脆弱であり、高次脳機能の形成を左右する決定的なフェーズである。本研究では、この脆弱期を確実にカバーするため、母体を介した経胎盤および経母乳曝露を連続的に行う「周産期曝露」を採用した。これにより、周産期における化学物質曝露の及ぼす影響について、発生学的根拠に基づき評価することができる。

評価モデルの妥当性を検証するため、汎用系統の Wistar ラットを用い、NOAEL 量（5.0 mg/kg/day）のビスフェノール A による次世代影響を評価した。曝露母体より出生した仔の体重は、対照群との間に有意差は認められず、一般的な成長過程には顕著な毒性を及ぼさないことが分かった。

一方、学習試験において、試行 10 回目までに学習および記憶の成立過程は観察されたものの、個体間の学習成績に極めて大きなばらつきがあった。この膨大な背景ノイズにより、汎用系統では学習能力への微細な影響を捉えることが困難であった。

(3) 無毒性量（NOAEL）における次世代影響評価：THA ラットを用いた検証

Wistar ラットと同様に、THA ラットにおいても仔の体重推移には曝露群と対照群との間に有意差はなかった。

学習試験において、対照群は試験 4 回目までに全個体が回避率 95%前後に到達し、以降の試行においても極めて小さな個体間ばらつきを維持した。この結果は、THA ラットの特徴である「高い学習能力」と「遺伝的均質性」を正しく保持していることを示した。

この均質なバックグラウンドの下でビスフェノール A 曝露による影響を解析した結果、対照群と比較して有意な回避率の低下が認められた。特に雌個体においては、学習初期段階から

継続的な回避率の低下が観察され、ビスフェノール A の曝露が学習機能の獲得過程に負の影響を及ぼすことが示唆された。

(4) 次世代影響を予測する血清バイオマーカーの探索と特定

ビスフェノールA曝露による次世代の学習能力への影響を早期予測するため、血清メタボローム解析を用いて網羅的な代謝プロファイリングを実施した。

対照群および曝露群の出生仔から、学習試験の前後で採血し解析した。得られた多変量データを主成分分析（PCA）により可視化したところ、各群はスコアプロット上で明瞭なクラスターを形成した。特筆すべきは、第1主成分（PC1）が学習試験（経験）の有無に、第2主成分（PC2）がビスフェノールA曝露の有無にそれぞれ高い相関を示した点である。この結果は、血清代謝物中に学習過程と化学物質曝露の両因子を反映する分子が含まれていることを示唆している。

解析結果をヒートマップで検討したところ、曝露の有無に関わらず学習試験前後で代謝プロファイルが劇的に変化する動態が確認された。また、曝露群では学習試験前の段階で既に対照群とは異なる特異的な代謝パターンが見出された。そこで、学習能力への影響を反映するバイオマーカーを特定するため、学習試験の有無に関わらず顕著な変動を示した代謝物を絞り込んだ。その結果、アミノ酸およびペプチド分子から構成される「代謝シグネチャー」を同定した。これら分子の動態解析は、次世代の学習能力低下を予測する高感度なバイオマーカーとして有用である。その中の一つの代謝物変動は母体血清でも観察されたことから、母体血清測定により、次世代個体の将来的な学習能力への影響を予測できる可能性を示した。

4. 研究の反省・考察

本研究において BCAA 代謝経路のノックアウト個体を解析した結果、BCAA-I 遺伝子の欠損が代謝亢進を介して学習能力を飛躍的に向上させる一方、異化因子である BCAA-A 遺伝子の欠損が学習抑制を招くことが明らかとなった。今後、この代謝系がどのような神経可塑性シグナルと連動しているのか、電気生理学的アプローチを含めた解明が急務である。

メタボローム解析により特定した代謝シグネチャーは、ビスフェノール A 曝露に対し、神経発生過程で最も敏感に反応する代謝物であると考えられる。この代謝シグネチャーの変動をトリガーとして、神経分化のどの段階（神経管形成、神経細胞移動、シナプス形成）が阻害されているのかを時系列的に追跡することで、化学物質による毒性発現の機序をさらに精緻に記述できると考えている。

今後は、in vitro 評価系と組み合わせ、他の環境化学物質の安全性評価にも応用することで公衆衛生の向上に寄与する社会実装を目指していきたい。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし