

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830048

研究課題名(和文)精神遅滞原因遺伝子IL1RAPL1欠損マウスの疾患モデル動物としての有用性評価

研究課題名(英文)Evaluation of usability of IL1RAPL1 knockout mice as an animal model of neuropsychiatric disorders

研究代表者

安村 美里 (YASUMURA, Misato)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20533897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IL1RAPL1欠損マウスは、大脳皮質2/3層や海馬CA1領域の錐体細胞で、樹状突起上に形成されるスパインの密度が減少していることを明らかにした。IL1RAPL1欠損マウスに網羅的行動テストバッテリーを行い、空間の参照記憶や作業記憶、恐怖記憶の遠隔記憶が障害されていることを明らかにし、IL1RAPL1欠損マウスは知的障害のモデルマウスとなり得ることを示した。また、IL1RAPL1欠損マウスは、軽微な行動様式の限局が見られ、社会性が亢進していることを明らかにした。さらに、IL1RAPL1欠損マウスは、自発的活動が亢進し、広い空間や高さに対する不安が軽減していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The spine density of basal dendrites of cortical layer 2/3 and hippocampal CA1 pyramidal neurons was significantly reduced in IL1RAPL1 knockout mice. We found that the spatial reference and working memories and remote fear memory were impaired in IL1RAPL1 knockout mice. These results suggest that IL1RAPL1 knockout mice are an animal model of intellectual disability. IL1RAPL1 knockout mice also exhibited slightly reduced behavioural flexibility and increased sociability. In addition, IL1RAPL1 knockout mice exhibited high locomotor activity and reduced open-space and height anxiety-like behaviours.

研究分野：神経科学

キーワード：行動解析 シナプスオーガナイザー 知的障害 自閉症

1. 研究開始当初の背景

認知、情動、記憶、学習といった多様な脳高次機能が正常に発現するためには、膨大な数の神経回路網が適切に形成されることが不可欠である。神経回路網の基盤となっているのはシナプスであり、シナプス形成の破綻は統合失調症や知的障害、自閉症などの精神神経疾患の発症に深く関与していると考えられている。近年、種々の大規模解析から精神神経疾患の原因遺伝子や関連遺伝子が多数同定されてきており、後シナプスに局在する各種神経伝達物質の受容体や接着分子が、自閉症をはじめとする精神神経疾患の発症に関与していることを示す多くのデータが報告され始めている。単一遺伝子の機能異常に起因する精神神経疾患の発症頻度は低いものの、その遺伝子の機能や遺伝子産物の異常によって引き起こされる変化をシナプスや神経回路網レベルで明らかにすることは、疾患の病態解明の足がかりとなるのみならず、特定の神経回路網が高次機能の発現にどのように寄与しているかを明らかにするのに役立つと考えられる。また、疾患モデルマウスも同様に病態解明に役立つだけでなく、治療法の確立や治療薬の評価に不可欠のものであると考えられる。

Interleukin-1 receptor accessory protein-like1 (*IL1RAPL1*) 遺伝子は非症候性のX染色体連鎖型知的障害の原因遺伝子として同定され、自閉症家系の患者においても変異が報告されている。*IL1RAPL1*はシナプス後部に局在し、前シナプス膜に発現する受容体型チロシン脱リン酸化酵素のPTP δ と結合し、脳の興奮性シナプスの形成を誘導するシナプスオーガナイザーであることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究では*IL1RAPL1*の欠損が、シナプス構造に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。また、*IL1RAPL1*遺伝子を欠損させたマウスに種々の行動実験を行い、疾患モデルマウスとしての有用性を評価することを目指している。

3. 研究の方法

(1) シナプス密度の解析

*IL1RAPL1*のmRNAは嗅皮質、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部などに発現することが知られている。*IL1RAPL1*欠損マウスの脳切片の各部位を神経細胞用蛍光試薬(DiI)で標識し、樹状突起上のスパイン密度を計測する。

(2) 行動解析

*IL1RAPL1*欠損マウスに対し、網羅的な行動テストバッテリーを行い、知的障害、自閉症様行動を示すかどうかを検証する。また、*IL1RAPL1*の欠損が高次機能に及ぼす、その他の影響についても検討する。

4. 研究成果

(1) スパイン密度

生後20日齢のマウスを用いて、大脳皮質2/3層と海馬CA1領域でDiIを用いて錐体細胞を染色し、基底樹状突起上のスパイン密度を測定した。その結果、*IL1RAPL1*欠損マウスでは、野生型マウスと比べてスパイン密度が10-15%程度減少していることが明らかとなった。このスパイン密度の減少の程度は、*IL1RAPL1*の相互作用の相手であるPTP δ の欠損マウスでの減少と同程度であった。

(2) 行動解析

学習・記憶

*IL1RAPL1*遺伝子は知的障害の原因遺伝子であるので、*IL1RAPL1*欠損マウスは学習・記憶に障害があるかどうかを3種類の迷路テスト(バーンズ迷路、八方向放射状迷路、T字迷路)と恐怖記憶テストを用いて評価した。バーンズ迷路テストでは空間の参照記憶を評価した。バーンズ迷路は12の穴が等間隔であいている円板で、その内の1つの穴だけ下部に逃避箱が取り付けられている。マウスに円板上を探索させ、逃避箱に入るまでの時間と他の穴を覗いたエラーの回数を計測した。*IL1RAPL1*欠損マウスは、野生型マウスと同様に訓練試行を重ねるにつれ、逃避箱に入るまでの時間やエラーの回数が徐々に小さくなっていった。しかしながら、野生型マウスと比較すると、これらの値は有意に大きいことが明らかとなった。次に、学習が十分成立した後で逃避箱を取り外し、逃避箱があった穴の位置(ターゲット)にどのくらい滞在するかを測定するプローブテストを行った。訓練終了1日後や8日後では、野生型マウスと同様に*IL1RAPL1*欠損マウスは、ターゲットの位置を正確に覚えていた。これらの結果は、*IL1RAPL1*欠損マウスは野生型マウスに比べ学習に時間を有するが、十分に訓練を行えば参照記憶を獲得できることを示唆している。訓練終了後29日目に行ったプローブテストでは、*IL1RAPL1*欠損マウスはターゲットの位置に滞在する時間が一番長いものの、周囲の穴にも滞在するようになり、野生型マウスに比べて記憶が曖昧になっていることが明

らかとなった。八方向放射状迷路テストと T 字迷路テストで作業記憶を評価したところ、参照記憶と同様に IL1RAPL1 欠損マウスでは作業記憶に軽微な障害が起きていることが明らかとなった。

恐怖記憶は文脈恐怖条件付けと手がかり恐怖条件付けテストを用いて評価した。マウスを床に電線が張ってある箱に入れて音を聞かせ、音がなっている最後の 2 秒間に微電流を流し、電気ショックを与えることを 3 回繰り返した。野生型マウスも IL1RAPL1 欠損マウスも音と電気ショックの対提示を行う毎にすくみ応答をする時間は増加していったが、IL1RAPL1 欠損マウスのほうが有意にその時間は短いことが明らかとなった。条件付け 1 日後の短期記憶と 28 日後の遠隔記憶を評価したところ、文脈条件付けと手がかり条件付けのいずれにおいても IL1RAPL1 欠損マウスのほうが野生型マウスに比べ、有意にすくみ応答の時間が短いことが明らかとなった。これらの結果は、IL1RAPL1 欠損マウスは恐怖記憶の遠隔記憶に障害があることを示唆している。

自閉症様行動

IL1RAPL1 遺伝子に変異を持つ家系の中には自閉症と診断されている患者もいる。そこで自閉症患者の特徴に類似した行動である、行動様式の限局や社会性行動の低下、超音波発生の減少といった表現型を IL1RAPL1 欠損マウスが示すかどうかを検証した。行動様式の限局は、バーンズ迷路テストと T 字迷路左右弁別課題の逆転学習テストを用いて評価した。バーンズ迷路テストでは、2 回目のプローブテスト終了後さらに 4 日間訓練試行を行い（原学習）、その後逃避箱を取り付ける穴を反対側に変更して 3 日間訓練試行を行った（逆転学習）。他の穴を覗くエラーの回数と逃避箱に入るまでの時間のいずれも、原学習時よりも逆転学習時のほうが IL1RAPL1 欠損マウスの方が野生型マウスよりも成績は悪かった。しかしながら、訓練試行終了 1 日後に行ったプローブテストでは IL1RAPL1 欠損マウスも野生型マウスと同様に、新しく逃避箱を取り付けた穴周辺での滞在時間が旧ターゲット周辺での滞在時間よりも有意に長く、しっかりと新しく逃避箱が取り付けられた穴の位置を記憶していた。このことは、バーンズ迷路テストにおいて逆転学習速度の低下は見られるが、行動の柔軟性に大きな障害は認められないことを示している。T 字迷路左右弁別課題では、T 字のアームの片方にだけ先端

に餌が置かれている。T 字のどちらのアームにも自由に進入できるようにしておき、1 セッション 10 回の試行中、餌のあるアームに進入した回数を測定した。10 セッション終了後に、餌を置くアームを反対側に変更したところ、IL1RAPL1 欠損マウスの成績は野生型マウスに比べて有意に低下した。この結果は、IL1RAPL1 欠損マウスは以前に餌が置かれていたアームに固執していることを示している。

社会性行動は、新規環境での行動と Crawley らのグループが開発した 3 チャンバーモデルを用いて評価した。別々のケージで飼育されていた 2 匹のマウスを新規環境に置いた時の相互作用の回数や時間等を計測したところ、野生型マウスに比べて IL1RAPL1 欠損マウスでは、相互作用の回数や相互作用の総時間が長い、1 回あたりの相互作用の平均時間は変わっていないことが明らかになった。これらの結果は、IL1RAPL1 欠損マウスでは社会性行動が亢進していることを示している。3 チャンバーモデルでは社会性と社会的新奇性に対する嗜好を調べた。社会性のテストは、左右どちらかのチャンバーに探索されるマウス（新奇マウス）が入った小さなケージを置き、もう片側のチャンバーには空のケージを置いて行った。中央のチャンバーからマウスを入れ自由に探索行動を行わせ、両サイドのチャンバーやケージ周囲での滞在時間を計測した。野生型マウスではケージ周囲の滞在時間は新奇マウスが入っているケージと空のケージの間で有意な差は認められなかった。一方、IL1RAPL1 欠損マウスでは新奇マウスが入っているケージのほうに有意に長く滞在していた。チャンバーの滞在時間についても同様の結果が得られた。これらの結果は、IL1RAPL1 欠損マウスで社会性行動が亢進していることを示唆している。社会的新奇性に対する嗜好は、空のケージに別の新奇マウスを入れて行った。この時、社会性相互作用のテスト時の新奇マウスは馴染みのマウスということになる。中央のチャンバーからマウスを入れて自由に探索行動を行わせ、両チャンバーやケージ周囲での滞在時間を計測した。野生型マウスも IL1RAPL1 欠損マウスも、馴染みのマウスよりも新奇マウスが入っているケージの周囲に長く滞在していたが、チャンバーでの滞在時間では差はないことが明らかとなった。これらの結果は、IL1RAPL1 の欠損は社会的新奇性に対する嗜好には影響を及ぼしていないことを示唆している。

超音波発声は、雌マウスと接した時に雄マ

ウスが発する超音波を測定した。IL1RAPL1 欠損マウスでは、発声の間隔の平均が野生型マウスに比べわずかに短かったが、最初に超音波を発するまでの時間や発声回数、発声のパターン等には違いは見られなかった。これらの結果は、IL1RAPL1 欠損マウスは音声コミュニケーションに明らかな障害は認められないことを示している。

自発的行動、不安様行動

IL1RAPL1 の欠損による自発的活動量や情動（不安）行動への影響をオープンフィールドテスト、明暗選択テスト、高架式十字迷路テストを用いて評価した。マウスは走触性なので、オープンフィールドの周辺部を移動する傾向にあるが、不安が軽減していると中心部の滞在時間が増加する。総移動距離や垂直活動量、反復行動の回数、中心部滞在時間を 2 時間にわたり測定したところ、IL1RAPL1 欠損マウスは野生型マウスよりも総移動距離や中心部滞在時間が有意に長かった。このことは、IL1RAPL1 欠損マウスは自発的活動が亢進し、広い空間に対する不安が軽減していることを示唆している。

明暗選択テストはマウスが明るい場所を嫌うことを利用したテストである。照明で照らされた明るい白い箱と暗い黒い箱が隣接していて、仕切りが開くとマウスは自由に両者の間を行き来することができるようになる。それぞれの箱での総移動距離や明室滞在時間、明暗の移動回数、最初に明室に入るまでにかかった時間を測定した。IL1RAPL1 欠損マウスは明室と暗室のどちらにおいても野生型マウスよりも有意に総移動距離が長く、オープンフィールドテストと同様に自発的活動が亢進していた。しかしながら、明室での滞在時間や明暗の移動回数、最初に明室に入るまでにかかった時間については、野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった。これらの結果は IL1RAPL1 の欠損は明るさに対する不安には影響を及ぼさないことを示唆している。

高架式十字迷路テストは、マウスが高さや開けた場所を嫌うことを利用したテストである。高架式十字迷路は 4 方向にアームが伸びている装置で、地面から 1m 程度の高さに設置した。4 本中 2 本のアームは透明な壁で囲まれているが、残り 2 本のアームには壁がなくマウスは下を覗けるようになっている。アームへの総進入回数や壁のないアームへの進入回数、滞在時間、総移動距離を計測した。IL1RAPL1 欠損マウスは、他の不安様行

動のテストと同様に、総移動距離が野生型マウスも有意に長かった。また、野生型マウスに比べて壁のないアームに進入する回数が多く、滞在時間も長かった。これらの結果は、IL1RAPL1 欠損マウスは高さに対する不安が軽減していることを示している。

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 3 件)

安村美里、吉田知之、三品昌美 IL1RAPL1 欠損マウスの表現型解析 日本薬理学雑誌 145, 187 - 192, 2015 査読無
DOI: 10.1254/fjp.145.187

Hagiwara A, Yasumura M, Hida Y, Inoue E and Ohtsuka T. The planar cell polarity protein Vangl2 bidirectionally regulates dendritic branching in hippocampal neurons. *Molecular Brain*, 7, 2014 査読有
DOI: 10.1186/s13041-014-0079-5

Yasumura M, Yoshida T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Kanno K, Uemura T, Takao K, Sakimura K, Kikusui T, Miyakawa T and Mishina M. IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. *Scientific Reports*, 4, 2014 査読有
DOI: 10.1038/srep06613

[学会発表](計 2 件)

安村美里、三品昌美 IL1RAPL1 遺伝子欠損マウスの表現型解析、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

安村美里、吉田知之、高雄啓三、山崎真弥、阿部学、植村健、宮川剛、崎村建司、三品昌美 IL1RAPL1 欠損マウスの行動学的解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日 (京都国際会議場、京都府京都市)

[図書](計 1 件)

Mishina M, Yoshida T, Yasumura M, Uemura T. (2013) Springer, Cortical development (Chapter 11 Synapse formation in the brain) 229-247.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安村 美里 (YASUMURA, Misato)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20533897

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし