IL1RAPL1 欠損マウスの表現型解析

安村 美里¹⁾, 吉田 知之²⁾, 三品 昌美³⁾

要約: Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) は非症候性の X 染色体連鎖型知的障害の原因遺伝子の 1 つであり, 自閉症の発症にも関連している。最近我々は, 後シナプス膜に発現する IL1RAPL1 が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 PTPδ と結合することで, 興奮性シナプスの形成を制御していることを明らかにした。このことから, IL1RAPL1 に遺伝子変異を持つ患者では, シナプス形成不全が知的障害や自閉症の発症の引き金になっていると考えられる。今回, 我々は IL1RAPL1 の欠損が脳機能に及ぼす影響について, 網羅的行動テストバッテリーを用いて検証した。IL1RAPL1 欠損マウスは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, 行動の柔軟性も野生型マウスに比べると減少していることが明らかになった。したがって, IL1RAPL1 欠損マウスは知的障害のモデルマウスとなると思われる。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なった。これらの結果は脳の興奮性シナプス形成を制御する IL1RAPL1 の欠損が興奮-抑制のバランスを崩し, 様々な脳機能に影響を及ぼしていることを示唆している。

1. はじめに

知的障害は, 神経発達障害のひとつであり, アメリカ精神医学会の診断基準 DSM-V によると, ①言語, 読み書き, 数学などの領域 (conceptual domain), ②共感, 社会的判断, コミュニケーションなどの領域 (social domain), ③仕事への責任能力, 金銭管理などの自己管理の領域 (practical domain) における適応機能と知能指数で診断される (1)。知的障害の遺伝学的

要因は染色体異常, 遺伝子のコピー数の変化, 単一遺伝子異常などが挙げられる。X 染色体連鎖性知的障害は全体の 5~10% を占めると考えられており, これまでに約 100 遺伝子の変異が報告されている (2)。

Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) 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 (3-11), 自閉症家系の患者においても変異が報告されている (3, 4, 8)。IL1RAPL1 遺伝子に変異をもつ患者の知的障害の程度は様々で, 兄弟間でも差が見られるが, 歩き始めた時期や言葉を発した時期が健常者に比べて遅いということは共通している (3-11)。IL1RAPL1 は細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン様ドメイン, 細胞質内に Toll/IL-1 受容体 (TIR) ドメインを持つ IL-1 受容体ファミリー膜タンパク質である。しかしながら IL-1 サイトカインを介する免疫応答には関与せず (12), 中枢神経系に選択的に発現していることが報告されている (3, 12)。培養細胞やマウスを用いた研究から, IL1RAPL1 は neuronal calcium sensor 1 を介して N タイプの電位開口性カルシウムチャネルの調節をしたり, c-Jun キナーゼの活性を制御することによって足場タンパク質 PSD-95 のシナプス部位への局在を調節することが報告されている (13-15)。

2. IL1RAPL1 は脳の興奮性シナプス形成を制御する

IL1RAPL1 は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 PTPδ と結合する (16, 17)。IL1RAPL1 を繊維芽細胞に発現させ, 大脳皮質初代培養神経細胞と共培養すると, 繊維芽細胞に接した神経細胞に興奮性のシナプス前終末が誘導される。IL1RAPL1 の持つシナプス前終末の誘導能は, PTPδ 欠

キーワード: IL1RAPL1, 知的障害, 自閉症, シナプスオーガナイザー, 行動解析

¹⁾ 山梨大学大学院 医学工学総合研究部基礎医学系 リエゾンアカデミー (〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110)

²⁾ 富山大学大学院 医学薬学研究部 (医学) 分子神経科学 (〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630 番地)

³⁾ 立命館大学 総合科学技術研究機構 脳科学 (〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1 丁目 1-1)

E-mail: misatoy@yamanashi.ac.jp 原稿受領日: 2015 年 1 月 15 日, 依頼原稿

Title: Phenotypic analysis of IL1RAPL1 knockout mice Author: Misato Yasumura, Tomoyuki Yoshida, Masayoshi Mishina

損マウス由来の神経細胞を用いると消失する(16). 逆に PTP8 を繊維芽細胞に発現すると興奮性のシナプス後終末が誘導されるが, IL1RAPL1 欠損マウス由来の神経細胞を用いると誘導能は半分程度にまで減少する(18). これらの結果から, IL1RAPL1 は PTP8 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. 実際に, IL1RAPL1 遺伝子を欠損させたマウスでは, 大脳皮質や海馬の錐体細胞でスパイン密度や興奮性シナプス数が野生型に比べ減少していることも明らかとなっている(15, 18).

3. 学習・記憶

IL1RAPL1 欠損マウスは学習・記憶に障害があるかどうかを調べるために, 異なる 3 種類のテストを行った.

1) 参照記憶 (reference memory)

参照記憶はバーンズ迷路テストで評価した. バーンズ迷路は照明で明るく照らされた直径 1 m の円板で, 周囲に 12 の穴が等間隔であいている (図 1A). 1 つの穴 (ターゲット) にだけ下部に逃避箱が円板の表面からは見えないように取り付けられている. 明るい場所を嫌うネズミは, 円板上を探索するうちに隠れることができる逃避箱を発見し, その中に入る. 逃避箱に入るま

での時間 (latency) と他の穴をのぞいた回数 (エラー数) を数えることにより空間の参照記憶を評価することができる. 野生型マウスと同様, IL1RAPL1 欠損マウスは訓練試行を重ねるにつれ, latency やエラー数が徐々に小さくなっていった (図 1B). しかしながら, 野生型マウスに比べ, これらの値は有意に大きかった. 次に, 学習が十分成立した後に逃避箱を取り外し, ターゲットの位置にどのくらいの時間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 (図 1C, D). 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, 十分に訓練すれば参照記憶を獲得できることを示唆している. 訓練終了 29 日後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ターゲットの位置の記憶が曖昧になっていた (図 1E). これらの結果は, IL1RAPL1 欠損マウスは参照記憶の保持にやや障害があることを示唆している.

2) 作業記憶 (working memory)

作業記憶は 8 方向放射状迷路テストを用いて評価した. 放射状に伸びた 8 本のアームの先端に餌が置いてあり, 装置の中央に置かれたマウスはアームに入って

図1 IL1RAPL1 欠損マウスにおける空間参照記憶の獲得と保持の障害

Aはバーンズ迷路を上から見た写真と実験のスケジュール. B: 訓練試行は1日3回行い, データは平均値で表している. C~Eはプローブテストの結果で, 左側の図は3分間の計測中に各穴の周辺に滞在した時間を示している. 右側の図は参照記憶の正確性をターゲットの穴周辺に滞在した時間とターゲットの穴とその両隣の穴周辺に滞在した時間の比で表したものである. (文献 18 より改変)

図2 IL1RAPL1 欠損マウスにおける空間作業記憶の障害

Aは8方向放射状迷路を上から見た写真。BとDは最初の8回の進入で異なるアームに入った回数と、すでに餌を食べたアームへの誤進入の回数を数えることにより空間の作業記憶を評価することができる。このテストではIL1RAPL1 欠損マウスは野生型マウスと同様に学習し、その学習曲線は両マウス間で有意差はなかった(図2B, C)。そこで課題を難しくしてみることとした。4個の餌を食べ終えた後、装置中央にマウスを一定時間閉じ込めるといったことを行った。すると、野生型マウスに比べ、IL1RAPL1 欠損マウスの成績が有意に悪くなった(図2D, E)。このことは、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を示している。(文献18より改変)

餌を食べ、次のアームに入るということを全ての餌を食べ終えるまで繰り返す(図2A)。最初の8回の進入で異なるアームに入った回数と、すでに餌を食べたアームへの誤進入の回数を数えることにより空間の作業記憶を評価することができる。このテストではIL1RAPL1 欠損マウスは野生型マウスと同様に学習し、その学習曲線は両マウス間で有意差はなかった(図2B, C)。そこで課題を難しくしてみることとした。4個の餌を食べ終えた後、装置中央にマウスを一定時間閉じ込めるといったことを行った。すると、野生型マウスに比べ、IL1RAPL1 欠損マウスの成績が有意に悪くなった(図2D, E)。このことは、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を示している。

3) 恐怖記憶 (fear memory)

恐怖記憶は文脈恐怖条件付け (contextual fear conditioning) と手がかり恐怖条件付け (cued fear conditioning) テストを用いて評価した。場所 (文脈) や音 (手がかり) など本来恐怖を引き起こさない条件刺激と電気ショックのような恐怖を引き起こす非条件刺激を繰り返し対提示すると、マウスは両者の関連付けを行い、条件刺激のみを提示しただけですぐみ応答

図3 IL1RAPL1 欠損マウスの恐怖記憶の障害

Aは実験スケジュール。Bは条件付けを行った日のすみみ応答 (Freezing) を示している。CとDは条件付け1日後に行ったテストの結果を、EとFは条件付け28日後に行ったテストの結果を示している。図中の黒い太線は音の提示を表し、矢印は電気ショックを表している。(文献18より改変)

(freezing) を示すようになる。Freezingの時間を測定することで、恐怖記憶を評価することができる。今回はマウスを床に電線が張ってある箱 (文脈) の中に入れ音を聞かせ、音刺激の最後の2秒間に微電流を流し、電気ショックを与えることを3回繰り返して条件付けを行なった(図3A)。音と電気ショックの対提示を行う毎に、野生型マウスもIL1RAPL1 欠損マウスもfreezingの時間は増加していったが、IL1RAPL1 欠損マウスのほうが有意にfreezingの時間は短かった(図3B)。条件付け終了1日後に同じ実験箱にマウスを入れ、freezing時間を測定したところ、野生型マウスとIL1RAPL1 欠損マウスで有意な差は見られなかった(図3C)。続いて全く形状の違う実験箱にマウスを入れ、3分後に音を3分間聞かせfreezing時間を測定した。音を聞かせる前の3分間は野生型マウスとIL1RAPL1 欠損マウスでfreezing時間に有意な差は認められなかったが、音提示後の3分間ではIL1RAPL1 欠損マウスのほうが有意にfreezingの時間は短かった(図3D)。遠隔記憶 (remote memory) を評価するた

めに条件付け終了28日後に再度freezing時間を測定したところ、文脈条件づけ、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有意にfreezingの時間は短かった(図3E, F)。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。

4. 行動の柔軟性 (behavioral flexibility)

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。自閉症は行動様式の限局、対人相互反応の障害、意思伝達の障害といった特徴がある(19)。これらの特徴と類似したマウスの行動としては、バーンズ迷路テストやT字迷路テストでの逆転学習の成績低下、社会性行動の低下や集団内での孤立、超音波発声の減少や他個体の発する超音波に対する反応の欠如といったものが挙げられる(20)。

行動様式の限局(固執傾向)が見られるかどうかは、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3日間訓練試行を行った(逆転学習)。エラー数、latencyともに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(図4A)。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、新しいターゲット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、しっかりと新しいターゲットの位置を記憶していた(図4B)。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字のアームの片方だけに先端に餌が置かれている(図4C)。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する。10セッション終了後、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(図4D)。これは、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。

5. 社会性行動

社会性行動は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。3チャンバーモデルでは社会性(sociability)と社会的新奇性に対する

図4 IL1RAPL1欠損マウスの逆転学習

A: 訓練試行は1日3回行い、データは平均値で表している。Bは訓練終了1日後に行ったプローブテストの結果で、3分間の計測中に各穴の周辺に滞在した時間を示している。ターゲットからの角度180度の穴が原学習の時のターゲットである。CはT字型迷路を上から見た写真。Dは1セッション10回の試行で、餌が置いている側のアームに進入した割合を示している。(文献18より改変)

嗜好 (preference for social novelty) を調べることができる。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う。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る。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することで、社会性を評価することができる。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(図5A)。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(図5A)。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(図5B)。これらは、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う。このとき、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することで、社会的新奇性に対する嗜好を

図5 IL1RAPL1 欠損マウスの社会性行動

Aはテストに用いた3チャンバーの装置を上から見た写真。片方のケージにのみマウスを入れ、社会性テストを行った (B, C)。次に空ケージに新しいマウスを入れ、社会的な新奇性に対する嗜好テストを行った (D, E)。WT: 野生型マウス, KO: IL1RAPL1 欠損マウスの略。(文献 18 より改変)

評価することができる。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 (図 5C), チャンバーでの滞在時間では差はなかった (図 5D)。これらのことは, IL1RAPL1 の欠損は社会的な新奇性に対する嗜好に影響を及ぼしていないことを示唆している。

6. 自発的活動, 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 (Light-dark transition test), 高架式十字迷路テスト (Elevated plus maze test) を用いて評価した。オープンフィールドは $40 \times 40 \text{ cm}^2$ のプレキシガラス製の箱で, 赤外線フォトセルが取り付けられている。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, 垂直活動量, 反復行動の回数, 中心部滞在時間等を測定することで, 自発的活動量や広い空間に対する不安様行動を評価することができる。2 時間測定をしたところ, 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 (図 6B)。このことは,

図6 IL1RAPL1 欠損マウスの自発的活動, 不安様行動

Aは左側が明暗箱の模式図, 右側が高架式十字迷路を上から見た写真。Bはオープンフィールドテストの結果を示している。データは5分間毎にまとめた値で示している。Cは明暗選択テストで5分間計測した結果を示している。Dは高架式十字迷路で5分間計測した結果を示している。(文献 18 より改変)

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 (図 6A)。それぞれの箱での総移動距離, 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することで, 自発的活動量と明るさへの不安を評価した。IL1RAPL1 欠損マウスは明室, 暗室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 (図 6C)。明室での滞在時間, 明暗の移動回数, 最初に明室に入るまでにかかった時間については野生型マウスとの間に差は認められなかった (図 6C)。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 1 m 程度の高さに設置する (図 6A)。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, 壁のないアームへの進入回数や滞在時間, 総移動距離を計測することで, 自発的活動量と高さへの不安を評価した。IL1RAPL1 欠損マウスは, 他のテスト同様に総移動距離が野生型マウスも有意に長かった (図 6D)。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 (図 6D)。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唆している。

7. おわりに

今回の実験から IL1RAPL1 の欠損は学習, 記憶, 行動の柔軟性, 社会性, 自発活動, 不安といった様々な脳機能に影響を及ぼすことが明らかになった。興奮性

シナプス形成を制御する IL1RAPL1 は脳に広く発現していることから, 多様な神経回路の興奮-抑制のバランス, さらに機能に影響すると考えられる。学習・記憶の障害や多動性は, *IL1RAPL1* 遺伝子に変異を有する知的障害の患者の症状に対応している。IL1RAPL1 欠損マウスではシータバースト刺激によって誘導される海馬の長期増強 (LTP: long-term potentiation) の減弱 (15) や恐怖記憶獲得時の *in vivo* 扁桃体 LTP 誘導の低下が見られる (21)。IL1RAPL1 の欠損によって脳の興奮性シナプスの形成障害が起こり, 神経活動の興奮と抑制のバランスが崩れ, シナプス可塑性が低下することによって知的障害が引き起こされるのではないかと考えられる。また, 行動の柔軟性や社会性の変化は, *IL1RAPL1* 遺伝子の変異を有する自閉症患者の症状に関連すると思われる。今後さらに IL1RAPL1 の機能に関する知見が深まり, 知的障害の分子病態の解明や新たな治療薬, 治療法の開発につながることを期待している。そして, 今回用いた IL1RAPL1 欠損マウスがそれらの有効性評価を行う際に役立つことを期待している。

著者の利益相反: 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. American Psychiatric Association; 2013. p. 33-41.
- 2) Lubs HA, et al. *Am J Hum Genet.* 2012;90:579-590.
- 3) Carrié A, et al. *Nat Genet.* 1999;23:25-31.
- 4) Tabolacci E, et al. *Am J Med Genet.* 2006;140:482-487.
- 5) Bhat SS, et al. *Clin Genet.* 2008;73:94-96.
- 6) Piton A, et al. *Hum Mol Genet.* 2008;17:3965-3987.
- 7) Nawara M, et al. *Am J Med Genet Part A.* 2008;146A:3167-3172.
- 8) Behnecke A, et al. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155:372-379.
- 9) Franek KJ, et al. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155:1109-1114.
- 10) Youngs EL, et al. *Eur J Med Genet.* 2012;55:32-36.
- 11) Barone C, et al. *Am J Med Genet Part A.* 2013;161A:1381-1385.
- 12) Born TL, et al. *J Biol Chem.* 2000;275:29946-29954.
- 13) Bahi N, et al. *Hum Mol Genet.* 2003;12:1415-1425.
- 14) Gambino F, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:9063-9068.
- 15) Pavlovsky A, et al. *Curr Biol.* 2010;20:103-115.
- 16) Yoshida T, et al. *J Neurosci.* 2011;31:13485-13499.
- 17) Valnegri P, et al. *Hum Mol Gene.* 2011;20:4797-4809.
- 18) Yasumura M, et al. *Sci Rep.* 2014;6:613.
- 19) Crawley JN. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:248-258.
- 20) Crawley JN. Neurodevelopment and neurodegeneration: assaying behaviors in infant, juvenile, and aged mice. *Wiley-Liss;* 2007. P. 290-321.
- 21) Houbaert X, et al. *J Neurosci.* 2013;33:13805-13819.