

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15186

研究課題名(和文) 内在2本鎖RNAによる獲得免疫調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying the regulation of adaptive immunity by endogenous double-stranded RNA

研究代表者

中濱 泰祐 (Nakahama, Taisuke)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10636187

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)：2本鎖RNA中のアデノシンをイノシンへと置換するRNA編集はADAR1により触媒され、これには内在RNAがセンサー分子MDA5によって非自己として認識されることを防ぐ機能がある。一方、RNA編集は特に胸腺において高頻度で生じるが、その生理的意義は不明であった。本研究では、MDA5経路に依存的・非依存的なADAR1の機能の両方がT細胞成熟に必要であることを見出した。さらに、T細胞特異的ADAR1欠損マウスでは、自己反応性T細胞を除去する負の選択に異常が生じ、自己免疫症状が惹起されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA編集には内在RNAがMDA5によって非自己として認識されることを回避する機能があるが、RNA編集が胸腺において高頻度で生じるにも関わらず、その生理的意義は不明であった。本研究結果は、RNA編集が自己反応性T細胞を適切に排除し、自己免疫症状を抑える作用があることを示すものであり、自己免疫疾患の治療に向けた分子基盤情報の確立に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Adenosine-to-inosine RNA editing catalyzed by ADAR1 is essential to prevent the recognition of endogenous dsRNA as non-self by MDA5. Although RNA editing is especially abundant in the thymus, its physiological role remains elusive. In this study, we revealed that T cell development requires coordinated regulation by ADAR1 via MDA5-dependent and -independent pathways. Furthermore, we found that T cell-specific deletion of ADAR1 in mice caused impaired negative selection to eliminate autoreactive T cells, leading to autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：RNA編集 自己免疫疾患 T細胞成熟

1. 研究開始当初の背景

生体内には、微生物由来の核酸、脂質、タンパク質などを感知する多数のセンサー分子が存在しており、これらのセンサー分子は第一線の感染防御において必要不可欠である。一方で、生体が本来持つ内在分子は、これらのセンサー分子に反応しないよう厳密に品質管理されている。例えば、ヒトゲノムのおよそ40%を占めるレトロトランスポゾンにはリピート配列を持つため、転写後に部分的に2本鎖を形成しやすい性質を持つが、このような2本鎖RNAはセンサー分子MDA5による異物としての認識を受ける危険性があるため、ADAR1によるRNA編集を受ける必要がある(図1)(Liddicoat et al, Science, 2015)。RNA編集は2本鎖RNA中のアデノシンをイノシンへと置換する化学修飾であり、転写産物の85%にも及ぶ。イノシンはウリジンではなくシチジンと塩基対を形成するためグアノシンと性質が近く、したがってアデノシンからイノシンへの置換は2本鎖RNA構造を緩めるため、MDA5の監視を免れる効果があると考えられている。興味深いことに、RNA編集の責任酵素であるADAR1の変異が、エカルディ・グティエール症候群と呼ばれる先天性免疫異常を引き起こすことが報告されている(Rice et al, Nat Genet, 2012)。さらに、MDA5も同疾患の責任遺伝子として同定されていることから(Rice et al, Nat Genet, 2014)、ADAR1によるRNA編集がもたらす一連のMDA5活性化回避機構が、内在2本鎖RNAの自己・非自己認識機構に必須であると考えられる。一方で、RNA編集は胸腺において高頻度で生じていることがわかってきたが、この機構がT細胞の成熟や機能の調節に関与しているかどうかは不明であった。

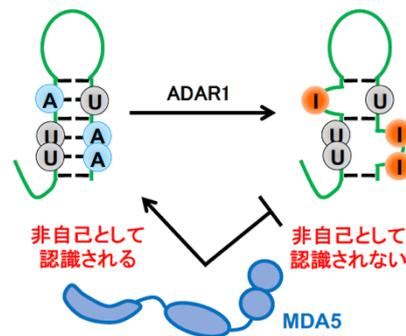


図1. ADAR1によるRNA編集が生じないと内在2本鎖RNAは非自己と認識される

2. 研究の目的

T細胞特異的にADAR1を欠損するマウスが大腸炎などの自己免疫症状を示すことが判明し(図2)、RNA編集による非自己化回避がT細胞の成熟や機能の調節に不可欠な役割を担っているのではないかと着想した。そこで、本研究では、これまで不明であったT細胞におけるADAR1の機能を解明し、将来的な自己免疫疾患の治療に向けた分子基盤情報の確立を目的とした。

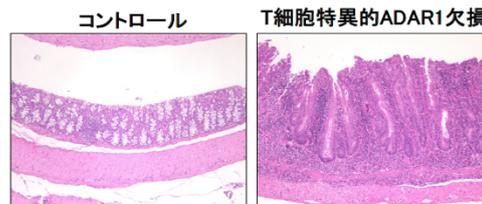


図2. T細胞特異的ADAR1欠損マウスは大腸炎を自然発症する

3. 研究の方法

(1) T細胞成熟におけるADAR1の役割の解明

ADAR1 flox マウスとT細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するLck-CreあるいはCD4-Creトランスジェニックマウスを交配させ、T細胞成熟の初期段階からADAR1を欠損するマウス(ET-A1 KO)および後期からADAR1を欠損する(LT-A1 KO)マウスを樹立した。そのうえで、Flow cytometryにより、胸腺におけるT細胞成熟や末梢組織における炎症性T細胞の増加などについて検証した。

(2) T細胞選択異常の有無の検証

胸腺内での「正の選択」および「負の選択」が正常に生じているかを検証するため、LT-A1 KOマウスとHY-TCRトランスジェニックマウスを交配させた。本マウスでは、雄特異的抗原を認識するMHCクラスI拘束性TCRを発現するため、雌では正の選択によりCD8 single positive(SP)細胞が増加するが、雄では負の選択によりdouble positive(DP)細胞やCD8SP細胞が著しく減少する。このため、コントロールマウスと比較することにより、胸腺内で生じる選択効率にADAR1の欠損が及ぼす影響を検討した。

(3) ADAR1欠損胸腺細胞におけるMDA5経路活性化の有無の検証

ET-A1 KOマウスおよびLT-A1 KOマウスから胸腺細胞を単離し、MDA5の下流で誘導されるインターフェロン誘導遺伝子群(ISG)の発現量をqPCRにて定量した。さらに、これらのマウスをMDA5 KOマウスと交配させ、ISGの発現量やT細胞成熟が正常化するかどうかを検証した。

(4) MDA5経路に依存しないADAR1の機能の解明

ET-A1 KOマウスの胸腺細胞においてTCRの発現低下が認められたが、MDA5を2重で欠損させても正常化しないことが判明した。TCR遺伝子の再構成はランダムに生じるため、out-of-frame型

の TCR トランスクリプトが生成されることがあるが、non-sense mediated mRNA decay (NMD) によって品質管理されている。先行研究において、ADAR1 が NMD に関与することが報告されていたため (Agranat et al, PNAS, 2008)、ADAR1 欠損胸腺細胞における out-of-frame 型 TCR の存在率を定量した。

4. 研究成果

(1) ET-A1 KO マウスから胸腺細胞を単離し、T 細胞成熟について解析したところ、double negative (DN) から DP への移行停止、TCR の発現低下、アポトーシスの亢進を伴う胸腺の著しい萎縮が認められた (図 3)。さらに詳細に解析したところ、DN4 への移行が阻害されていることが明らかになった。一方、LT-A1 KO マウスでは胸腺の萎縮は認められなかったものの、DP から SP への移行が抑制されていた。また、脾臓においては、未分化 T 細胞比率が低く、エフェクター/メモリー T 細胞比率が上昇しており、Th1 や Th17 細胞などの炎症性細胞の増加も認められた。

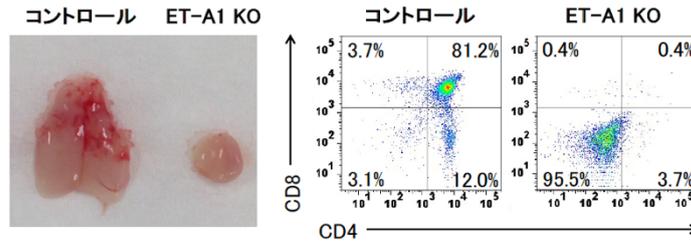


図3. ET-A1 KOマウスではT細胞成熟異常を伴う胸腺の萎縮が生じる

(2) LT-A1 KO マウスと HY-TCR トランスジェニックマウスを交配させたところ、雌では CD8SP 細胞が減少し、雄では DP 細胞および CD8SP 細胞が増加していたため、ADAR1 を欠損することで選択異常が生じていることが明らかになった (図 4)。さらに TCR シグナルの下流にある ZAP-70 や PLC γ 1 のリン酸化レベルが ADAR1 欠損胸腺細胞では著しく低下しており、TCR シグナルの減弱によって適切な選択が生じないことが自己免疫症状の引き金になっていると考えられた。

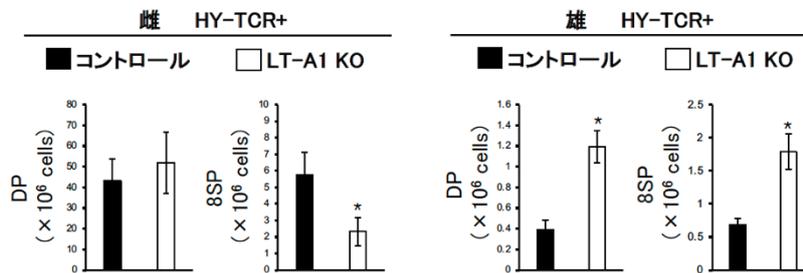


図4. LT-A1 KOマウスでは胸腺での選択異常が生じる

(3) ET-A1 KO マウスおよび LT-A1 KO マウス由来胸腺細胞において、ISG の発現上昇が認められ、MDA5 経路が活性化している可能性が示唆された。このため、LT-A1 KO マウスと MDA5 KO マウスを交配させたところ、ISG の発現は正常化し、TCR シグナルの減弱や末梢組織での炎症性細胞の増加、自己免疫症状が改善していることが明らかになった。一方で、ET-A1 KO マウスにおいては、アポトーシスレベルは完全に正常化したものの、DP から SP への移行や胸腺萎縮は部分的にしかレスキューされておらず、TCR の発現は著減したままであった (図 5)。

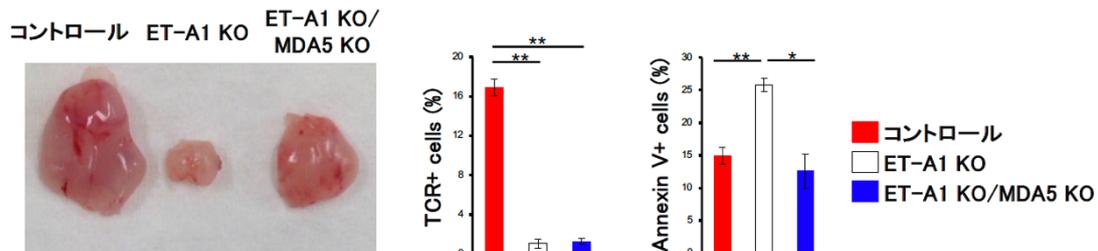


図5. ET-A1 KOマウスで生じる胸腺成熟異常はMDA5を2重欠損させても部分的にしか正常化しない

(4) ET-A1 KO マウスにおける TCR の発現低下は MDA5 を 2 重欠損させても全く正常化しないことから、MDA5 経路に依存しない ADAR1 の機能が存在する可能性が示唆された。さらに、ADAR1 欠損胸腺細胞においては out-of-frame 型 TCR トランスクリプトの存在率が上昇しており、これが TCR の発現低下の原因になっていると考えられた。そこでさらに、TCR トランスジェニック、MDA5 KO による 2 重レスキューマウスを樹立した。その結果、本マウスでは、ET-A1 KO マウスで生じる胸腺異常のほとんどが消失しており(図 6)、T 細胞成熟には、MDA5 経路に依存、非依存的な ADAR1 の機能の両方が必要であることが明らかになった。

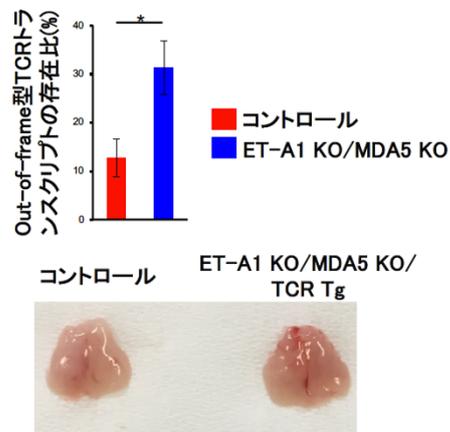


図6. ADAR1はMDA5経路非依存的にout-of-frame型TCRトランスクリプト量を調節する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jung In Kim, Taisuke Nakahama, Ryuichiro Yamasaki, Pedro Henrique Costa Cruz, Tuangtong Vongpipatana, Maal Inoue, Nao Kanou, Yanfang Xing, Hiroyuki Todo, Toshiharu Shibuya, Yuki Kato, Yukio Kawahara.	4. 巻 In Press
2. 論文標題 RNA editing at a limited number of sites is sufficient to prevent MDA5 activation in the mouse brain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genet	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Costa Cruz Pedro Henrique, Kato Yuki, Nakahama Taisuke, Shibuya Toshiharu, Kawahara Yukio	4. 巻 26
2. 論文標題 A comparative analysis of ADAR mutant mice reveals site-specific regulation of RNA editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 454 ~ 469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.072728.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahama Taisuke, Kawahara Yukio	4. 巻 -
2. 論文標題 Adenosine-to-inosine RNA editing in the immune system: friend or foe?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-020-03466-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vongpipatana Tuangtong, Nakahama Taisuke, Shibuya Toshiharu, Kato Yuki, Kawahara Yukio	4. 巻 204
2. 論文標題 ADAR1 Regulates Early T Cell Development via MDA5-Dependent and -Independent Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2156 ~ 2168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahama Taisuke, Kato Yuki, Kim Jung In, Vongpipatana Tuangtong, Suzuki Yutaka, Walkley Carl R, Kawahara Yukio	4. 巻 19
2. 論文標題 ADAR1 mediated RNA editing is required for thymic self tolerance and inhibition of autoimmunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e46303 ~ e46303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201846303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Taisuke Nakahama, Tuangtong Vongpipatana, Yuki Kato and Yukio Kawahara
2. 発表標題 ADAR1 regulates early T cell development via MDA5-dependent and -independent pathways
3. 学会等名 RNA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama, Tuangtong Vongpipatana, Toshiharu Shibuya, Yuki Kato Yukio Kawahara
2. 発表標題 ADAR1 regulates early T cell development via MDA5-dependent and -independent pathways
3. 学会等名 第21回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中濱泰祐
2. 発表標題 ADAR1によるRNA編集を介した自己免疫制御機構
3. 学会等名 第11回若手フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中濱泰祐
2. 発表標題 中枢性免疫寛容成立におけるRNA編集の役割の解明
3. 学会等名 「先進ゲノム支援」2018年度拡大班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakahama Taisuke
2. 発表標題 ADAR1-mediated RNA editing is required for thymic self-tolerance and prevention of autoimmunity
3. 学会等名 第20回武田科学振興財団生命科学シンポジウム「RNAネオバイオロジー」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakahama Taisuke
2. 発表標題 ADAR1-mediated RNA editing is required for thymic self-tolerance and inhibition of autoimmunity
3. 学会等名 Gordon Research Seminar for RNA editing (イタリア)(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------