

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07080

研究課題名（和文）RNA編集不全によって引き起こされる遺伝性脳症の病態形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of genetic encephalopathy caused by defects in RNA editing

研究代表者

中濱 泰祐（Nakahama, Taisuke）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10636187

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：RNA編集酵素ADAR1の遺伝子変異は、インターフェロンの過剰産生や脳症を特徴とするエカルディ・グティエール症候群（AGS）を引き起こす。現状ではAGS脳症を再現するモデルは存在せず、その病態形成機構は十分には解明されていない。本研究では、Adar1遺伝子にAGS型点変異（K948N）をノックインした（AGS KI）マウスが、RNAセンサーMDA5の活性化に起因するAGS様脳症を示すことを見出した。さらに、これらの異常はADAR1 isoformであるp150のみを発現させることで正常化することが判明した。このため、MDA5の基質候補としてADAR1 p150選択的編集部位を網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状ではAGSの治療法は未確立であり、病態解明が急務であるが、これまでAGS症状を再現するモデル動物は確立されていなかった。本研究では、新規に樹立したAdar1遺伝子点変異マウスが、MDA5活性化に起因する脳症を示すことを明らかにした。このため、本マウスを用いることによってAGS病態の解明のみならず、新規治療候補の評価にも活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Mutations in the RNA-editing enzyme ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome (AGS), which is characterized by interferon (IFN) overproduction and encephalopathy. To date, no model recapitulates AGS encephalopathy, and thus its pathogenesis is not fully understood. In this study, we found that AGS knock-in (KI) mice carrying an AGS-associated K948N point mutation in the Adar1 gene reproduce AGS-like encephalopathy with activation of the RNA sensor MDA5. In addition, the pathological abnormalities found in AGS KI mice were ameliorated by the sole expression of ADAR1 p150, an isoform of ADAR1. Therefore, we comprehensively identified the ADAR1 p150-specific editing sites as potential substrates for MDA5.

研究分野：免疫学

キーワード：RNA編集 ADAR1 AGS 脳症 MDA5

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エカルディ・グティエール症候群(AGS)は、インターフェロン(IFN)の発現亢進を特徴とする先天性自己炎症疾患である。白質ジストロフィーや大脳基底核の石灰化を伴う脳症を主症状とし、多くは10歳前後で死に至る。しかし、患者数が少ないことから発症機構の解明は進んでおらず、根治治療法は未確立である。これまでに9つの原因遺伝子が特定されており、その中にADAR1やMDA5が含まれる(Rice et al, Nat Genet, 2012; Rice et al, Nat Genet, 2014)。ADAR1は2本鎖RNA中のアデノシンをイノシンへと変換するRNA編集酵素であり、同じ遺伝子座から異なるプロモーターを使って転写されるp150とp110の2つのisoformが存在する(図1)。本編集は、ヒトではADAR1(p150、p110)とADAR2によって触媒され、全転写産物の85%、1億箇所以上にも及ぶ極めて豊富な転写後修飾の1つである。一方、MDA5はウイルスなどに由来する2本鎖RNAを感知する細胞質センサータンパクであり、近年、内在2本鎖RNAに生じる編集がMDA5による非自己としての感知を回避させる機能を持つことが明らかになってきた(Liddicoat et al, Science, 2015)。すなわち、この機構の破綻がAGS病態の根底にあると考えられるが、ADAR1をノックアウト(KO)したマウスや編集活性を喪失する点変異をノックイン(KI)したマウスは脳形成以前の胎生期に死亡するため、AGS脳症の病態形成機構はよくわかっておらず、MDA5を活性化する内在2本鎖RNAについても不明であった。

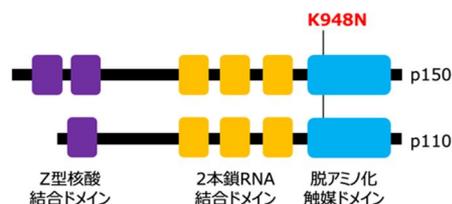


図1. ADAR1タンパクのドメイン構造

2. 研究の目的

Adar1遺伝子にAGS型点変異(K948N)をKIした(AGS KI)マウスを樹立したところ、RNA編集活性の低下や脳をはじめとする様々な臓器においてIFN誘導遺伝子群(ISG)の発現上昇が認められ、AGS症状を再現するマウスとなる可能性が示唆された。そこで本研究では、樹立したAGS KIマウスのモデルとしての妥当性を評価し、そのうえで、MDA5を活性化する基質を特定することで、ADAR1によるMDA5の活性化回避機構の破綻がAGS脳症を引き起こす一連の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AGS KIマウスにおける脳症病態解析及びMDA5活性化の有無の検証：

AGS KIマウスがAGS様脳症を示すかを検証するため、脳を単離し、組織学的・病理学的観察を実施した。また、AGS KIマウスとMDA5 KOマウスを交配させ、AGS KI : MDA5 KOマウスを作製した。そのうえで、AGS KIマウスが示すISGの発現上昇が、MDA5を欠損させることによって正常化するかを定量RT-PCR法にて検証した。

(2) MDA5活性化回避に不可欠なADAR1 isoformの決定：

ADAR1の948番目のリジン残基はp110とp150の2つのisoform間で共通の触媒ドメイン内に位置するため(図1)、どちらのisoformにおけるK948N変異がMDA5の活性化を引き起こすのかを解析した。すなわち、p110のみを選択的に欠損させたマウスとAGS KIを交配させ、片方のアレルからはK948N変異型ADAR1(p110とp150)、他方のアレルからは野生型p150のみを発現するマウスを樹立した。そのうえで、AGS KIマウスが示すISGの発現上昇が、野生型p150のみで正常化するかを検証した。

(3) K948N変異によって編集効率が低下するp150選択的基質の同定及びそのMDA5活性化能の評価：

野生型、ADAR1 p110 : ADAR2ダブルKO、ADAR1 p150 KO、AGS KIマウスから脳を単離し、RNA抽出後、RNA-Seq解析により、RNA編集部位及びその各編集効率を網羅的に解析した。RNA編集によって生じたイノシンはグアノシンに構造が近いため、cDNAライブラリーの調整過程でグアノシンへと変換される。RNA-Seqの解析結果を参照ゲノム配列と比較し、アデノシンからグアノシンへと変異が生じた部位をRNA編集部位とし、ADAR1 p150選択的に編集される部位を解析した。さらにその中からAGS KIマウスにおいて編集効率が著しく低下する部位をMDA5活性化候補基質として同定した。絞り込んだ候補については、その編集部位を含む2本鎖RNA形成領域をクローニングし、全てのRNA編集酵素(ADAR1とADAR2)を欠損させたHEK293T細胞に導入した。MDA5の発現を誘導し、ISGの発現上昇が認められるかを定量RT-PCR法にて検証した。

4. 研究成果

(1) AGS KI マウスの脳では ISG の発現上昇が認められたものの、2 ヶ月齢では明らかな病理学的異常は認められなかった。このため、1 年齢まで観察を継続したところ、グリオーシスや白質変性、脳質周囲に軽微な石灰化が認められた(図 2)。さらに、AGS KI マウスを MDA5 KO マウスと交配させたところ、ISG の発現レベルが正常化した(図 3)。以上より、AGS KI マウスは、遅発性ではあるものの、MDA5 の活性化に起因する一連の AGS 病態を再現するモデルとなり得ることが示唆された。

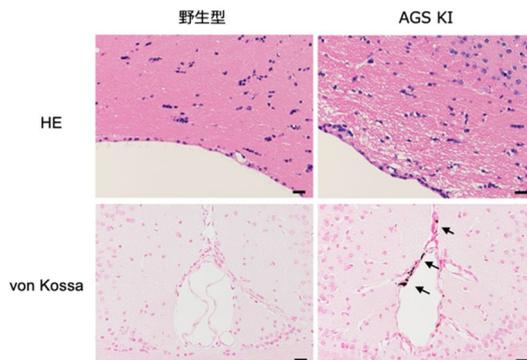


図2. AGS KIマウスが示す白質脳症

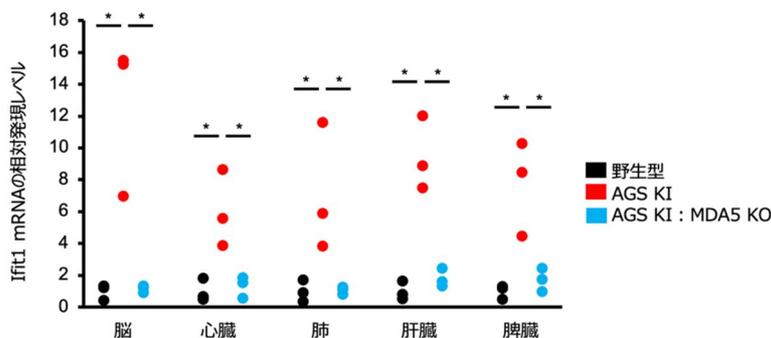


図3. AGS KIマウスにおけるISGの発現上昇はMDA5を欠損させると正常化する

(2) K948N 変異は p150、p110 isoform 間で共通の触媒ドメイン内に位置するため(図 1)、どちらの isoform における変異が MDA5 活性化の原因となっているかを明らかにする目的で、AGS KI マウスを p110 選択的 KO マウスと交配させた。その結果、ISG の発現レベルが完全に正常化することが明らかになった(図 4)。すなわち、p150 における K948N 変異が MDA5 活性化を引き起こしていることが明らかになった。

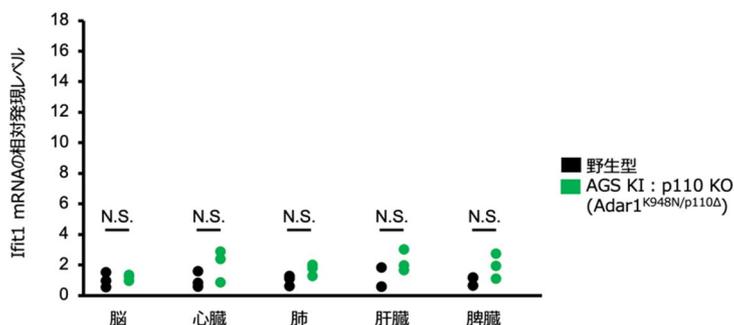


図4. AGS KIマウスにおけるISGの発現上昇は野生型p150を発現させると正常化する

(3) 野生型、ADAR1 p110 : ADAR2 ダブル KO、ADAR1 p150 KO マウスの脳における RNA 編集部位を RNA-Seq にて網羅的に解析し、比較した。脳においては、p110 や ADAR2 の発現が高く、p150 の発現は極めて低いため、p150 しか発現しない ADAR1 p110 : ADAR2 ダブル KO において編集が残存した 116 箇所(野生型 : 8561 箇所)を p150 選択的編集部位とした。また、これらの部位における編集が ADAR1 p150 KO マウスでは著しく低下することも確認した。そのうえで、AGS KI マウスにおいて、これらの p150 選択的部位の編集効率を定量したところ、増加する部位と低下する部位が存在することが判明した(図 5)。p150 は ISG の一種であるため、AGS KI マウスにおい

てはその発現量が増加し、これに伴い編集効率が上昇するものと考えられた。その一方で、編集効率が補償されない部位も存在することが明らかになったため、これらの編集部位を含む 2 本鎖 RNA 形成領域をクローニングし、ADAR1 を含む全ての RNA 編集酵素を欠損させた細胞株に導入した。現時点では、MDA5 活性化基質は特定できておらず、今後は候補基質をさらに増やして検討する予定である。

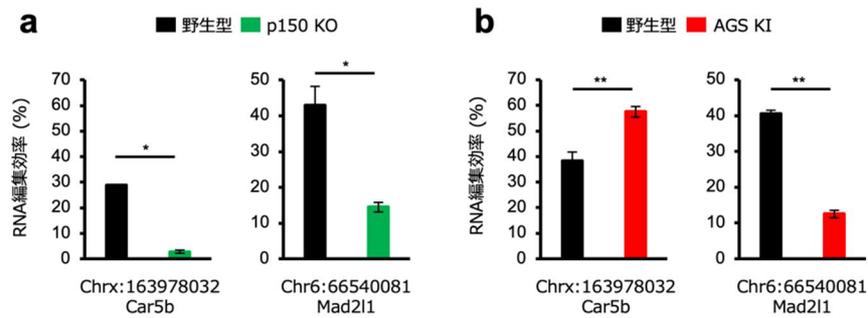


図5. p150選択的部位にはK984N変異で著しく編集効率が低下する部位が存在する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Xing Yanfang, Nakahama Taisuke, Wu Yuke, Inoue Maal, Kim Jung In, Todo Hiroyuki, Shibuya Toshiharu, Kato Yuki, Kawahara Yukio	4. 巻 299
2. 論文標題 RNA editing of AZIN1 coding sites is catalyzed by ADAR1 p150 after splicing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104840 ~ 104840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104840	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 中濱泰祐	4. 巻 第80巻第5号
2. 論文標題 RNA編集酵素ADAR1による二本鎖RNAセンサーシステムの制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 599
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 無
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 中濱泰祐、河原行郎	4. 巻 第80巻第4号
2. 論文標題 ウイルス感染症におけるRNA編集の役割	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 427
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 無
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 35
2. 論文標題 The RNA-editing enzyme ADAR1: a regulatory hub that tunes multiple dsRNA-sensing pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac056	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 中濱泰祐、河原行郎	4. 巻 第77巻第6号
2. 論文標題 RNAのイノシン化修飾の破綻はエカルディ・グティエール症候群様症状をひき起こす	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 737-743
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 無
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 中濱泰祐、河原行郎	4. 巻 Vol.40 No.15
2. 論文標題 RNA制御とI型インターフェロノパシー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2505-2512
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 無
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, Shibuya Toshiharu, Inoue Maal, Kim Jung In, Vongpipatana Tuangtong, Todo Hiroyuki, Xing Yanfang, Kawahara Yukio	4. 巻 54
2. 論文標題 Mutations in the adenosine deaminase ADAR1 that prevent endogenous Z-RNA binding induce Aicardi-Goutieres-syndrome-like encephalopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1976 ~ 1988.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.08.022	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 22
2. 論文標題 Deciphering the Biological Significance of ADAR1-Z-RNA Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11435 ~ 11435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111435	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 Inoue Maal, Nakahama Taisuke, Yamasaki Ryuichiro, Shibuya Toshiharu, Kim Jung In, Todo Hiroyuki, Xing Yanfang, Kato Yuki, Morii Eiichi, Kawahara Yukio	4. 巻 207
2. 論文標題 An Aicardi-Goutieres Syndrome-Causative Point Mutation in Adar1 Gene Invokes Multiorgan Inflammation and Late-Onset Encephalopathy in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3016 ~ 3027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100526	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中濱 泰祐
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1による自然免疫制御の新たな展開
3. 学会等名 The 1st Kansai RNA club (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama
2. 発表標題 Regulatory mechanisms underlying ADAR1 p150-mediated RNA editing
3. 学会等名 ABZ Meeting 2022 (A, B and Z: The Structure, Function and Genetics of Z-DNA and Z-RNA) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中濱泰祐, 河原行郎
2. 発表標題 ADAR1によるZ型RNAへの結合の破綻はエカルディ-グティエール症候群様脳症を引き起こす
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama and Yukio Kawahara
2. 発表標題 An Aicardi-Goutieres syndrome-causative point mutation in Adar1 gene invokes multi-organ inflammation and late-onset encephalopathy in mice
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama
2. 発表標題 Immune regulation by RNA editing
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中濱 泰祐
2. 発表標題 自然免疫応答を引き起こすZ型RNAの同定
3. 学会等名 OTRI RNA-FS部門第1回シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama, Yuki Kato, Toshiharu Shibuya, Maal Inoue, Jung In Kim, Tuangtong Vongpipatana, Hiroyuki Todo, Yanfang Xing, Yukio Kawahara
2. 発表標題 Disruption of Z-RNA-binding of ADAR1 induces Aicardi-Goutieres syndrome-like encephalopathy in mice
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama, Yukio Kawahara
2. 発表標題 Disruption of Z-RNA-binding of ADAR1 induces Aicardi-Goutieres syndrome-like encephalopathy in mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------