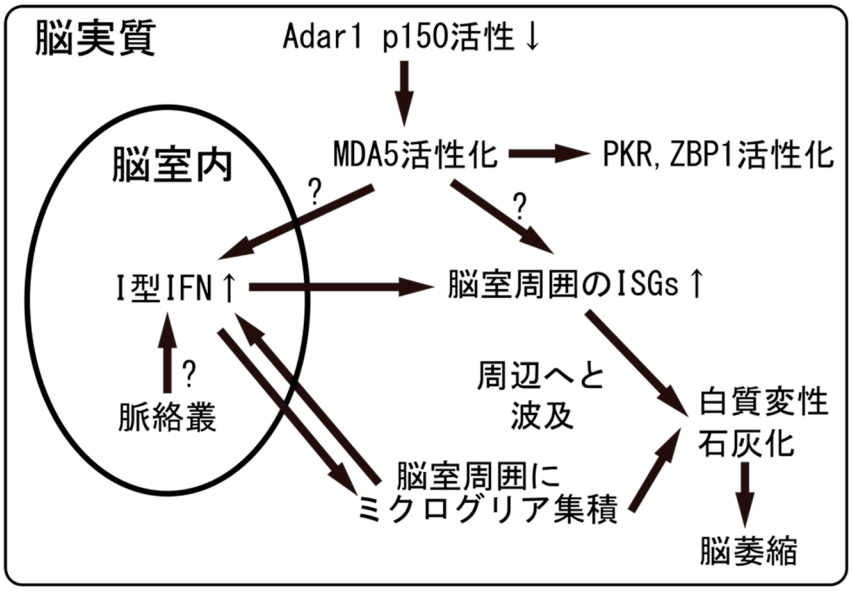
22　RNA編集活性低下による自己免疫性脳症誘発機構の解明	河原　行郎

【目的】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、自己 2 本鎖 RNA が異物と誤認されることを回避するために必須のマーキングである。哺乳類において、この RNA 編集を触媒している酵素が ADAR1 p150 である。ADAR1 p150 欠損マウスにおいては、2 本鎖 RNA センサー分子である MDA5 が活性化し、I 型インターフェロン（IFN）の過剰産生などを伴って胎生致死を呈する。一方、*ADAR1* の遺伝子変異は、エカルディ・グティエール症候群（AGS）と呼ばれる I 型 IFN の過剰産生と脳症を主症状とする自己免疫性脳症の原因の一つとして同定されている。白質変性、頭蓋内石灰化、脳萎縮、脳室拡大などを伴って精神遅滞や運動発達障害を呈し、多くは 10 歳未満で亡くなる。しかし、AGS で脳症に至る機構は不明であり、他の AGS 原因遺伝子を含めて、これまで脳症を再現するモデルがないことが病態解明の障壁となってきた。我々は、ADAR1 p150 の Zα ドメインに W197A 点変異を挿入（KI）することで、マウスに AGS 様脳症を再現できることを明らかにした（Nakahama et al, Immunity, 2021）。本マウスでは ADAR1 p150 の RNA 編集活性が低下しており、MDA5 を同時欠損させると脳症が顕著に改善することも見いだした。しかし、本病態の形成メカニズムや MDA5 活性化以降の分子メカニムズは不明である。そこで本研究では、*Adar1*（W197A）KI マウスに認められる脳症を詳細に解析し、MDA5 の活性化により発現上昇する PKR や ZBP1 を同時欠損させて脳症への影響を評価することで、AGS 様脳症の発症機構を解明することを目的として実施した。

【方法および結果】*Adar1*（W197A）KI マウスを長期間観察し、最長 7 ヶ月まで生存できることを見いだした。6 ヶ月齢で病理解析を行ったところ、著明な白質変性と脳室拡大を認めた。脳実質内の石灰化も検出された。脳室においては、脈絡叢と上衣細胞が脱落と再生を繰り返しており、ミクログリアの集積を認めた。RNA-seq 解析をすると、IFN 誘導遺伝子群（ISGs）の著明な発現上昇が認められたが、空間トランスクリプトーム解析を行うと、特に脳室周囲で顕著であることが分かった。これらの結果は、脳室内で I 型 IFN の過剰産生が生じていることを示唆しているものと考えられた。次に、*Adar1*（W197A）マウスと PKR または ZBP1 欠損マウスを交配したところ、生存率や成長障害が著明に改善し、MDA5 欠損マウスと交配した場合と同程度に回復した。しかし、病理解析を行ったところ脳症は全く改善しておらず、ISGs も発現が上昇したままであることが判明した。これらの結果からは、PKR や ZBP1 は脳症形成には直接関与しておらず、生存率や成長障害の改善は脳症以外に要因があると考察された。

ADAR1 p150 の活性低下による AGS 様脳症発症機構



22. RNA 編集活性低下による自己免疫性脳症誘発機構の解明

河原　行郎

大阪大学 大学院医学系研究科 神経遺伝子学教室

Key words：エカルディ・グティエール症候群，ADAR1，MDA5，I 型インターフェロン，2 本鎖 RNA

緒　言

我々の生体には、ウイルスなど異物の侵入を迅速に感知する自然免疫が備わっている。自然免疫は、ウイルスなどに由来する共通した分子構造を認識しており、2 本鎖 RNA 構造もその一つである。しかし、2 本鎖 RNA は、宿主ゲノムの大半を占めるリピート配列によっても形成されるため、生体内では自己 2 本鎖 RNA を異物と誤認しないような調整がなされている。その主要な機構が、2 本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへ置換する RNA 編集である。イノシン化は、哺乳類において最も豊富に生じている化学修飾であり、部位にして 1 億箇所以上がこの修飾を受けている［1］。

RNA 編集は ADAR ファミリーによって触媒され、哺乳類においては、ADAR1 と ADAR2 の 2 種類の活性型 ADAR が発現している（図 1）。更に、ADAR1 には、同じ遺伝子座から異なるプロモーターによって転写される ADAR1 p110 と ADAR1 p150 という 2 つのアイソフォームが存在している。両者の 2 本鎖 RNA 結合ドメインと脱アミノ化ドメインは全く同一であるが、p150 の N 端側には Z 型核酸結合ドメイン（Zα）に加えて、核外輸送シグナルがある。このため、ADAR1 p110 と ADAR2 は核に局在する一方で、ADAR1 p150 は細胞質に局在している（図 1）。*Adar1* ノックアウト（KO）マウス、不活性型 ADAR1 を発現する（*Adar1*（E861A）KI）マウス、*Adar1 p150*KO マウスは、I 型インターフェロン（IFN）の過剰産生など自然免疫の異常活性化を伴って胎生致死を呈する［1～3］。この主要な原因は、ウイルスなどに由来する外来性 2 本鎖 RNA のセンサー分子である MDA5 が、未イノシン化状態の自己 2 本鎖 RNA を異物と誤認するためである。我々は、こうした機能は ADAR1 p110 や ADAR2 にはなく、ADAR1 p150 特異的な RNA 編集部位があることを報告してきた［3～6］。

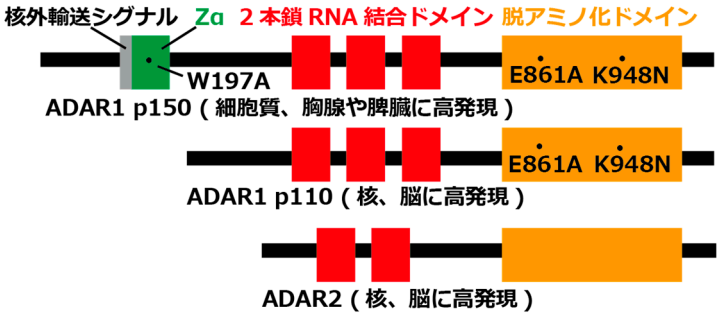


図1. 哺乳類RNA編集酵素ADARの種類と構造

一方、*ADAR1* の遺伝子変異は、エカルディ・グティエール症候群（AGS）と呼ばれる I 型 IFN の過剰産生と脳症を主症状とする自己免疫性脳症の原因の 1 つとして同定されている［7］。白質変性、頭蓋内石灰化、脳萎縮、脳室拡大などを伴って精神遅滞や運動発達障害を呈し、多くは 10 歳未満で亡くなる。しかし、AGS で脳症に至る機構は不明であり、他の AGS 原因遺伝子を含めて、これまで脳症を再現するモデルがないことが病態解明の障壁となってきた。我々は、AGS 型 K948N 点変異や ADAR1 p150 にしかない Zα ドメインに W197A 点変異（図 1）を挿入することで、マウスに AGS 様脳症を再現できることを明らかにした［5，8］。これらのマウスでは、成長障害、IFN 過剰産生、末梢

臓器の炎症に加えて、脳萎縮や脳内石灰化を呈し、アストロサイトやミクログリアが活性化していた。特に *Adar1*（W197A）KI マウスは著しい成長障害、IFN 誘導遺伝子群（ISGs）の発現上昇に加え、白質変性、脳室拡大、アストロサイトやミクログリアの活性化などを認め、半数近い個体が生後 6 週間以内に死亡した[5]。これらの知見は、ADAR1 p150 の機能低下による MDA5 の異常活性化が AGS 病態の根底にあることを示唆している。しかし、なぜ白質変性や頭蓋内石灰化といった特徴的な変化として表出されるのか、また MDA5 活性化以降の分子メカニムズは不明であり、これらを解明することを目的に本研究を実施した。

方法および結果

1. *Adar1*（W197A）KI マウスでは、特に脳室周囲で強い炎症所見を認める

我々の先行研究では、*Adar1*（W197A）KI マウスの表現型解析を生後 6 週齢まで評価して報告したため［5］、まず長期的な経過を観察することとした。その結果、*Adar1*（W197A）KI マウスは 6 週齢までに約半数が死亡し、最長でも 8 ヶ月齢は越えないことが判明した（図 2）。体重も増えず、著しいるい痩が生涯継続した。6 ヶ月齢で脳の病理学的解析を行ったところ、HE 染色にて著明な白質変性と脳室拡大を認めた（図 3）。脳室壁を構成する上衣細胞や髄液産生を担う脈絡叢は脱落と再生を繰り返しており、一部の脳室壁では上衣細胞が失われていた。中脳水道を含め、特に脳室内に物理的な閉塞は認めなかった。これらの結果から、脳室内や周辺で強い炎症が生じ、上衣細胞の数や機能が失われることで髄液が停滞することが脳室拡大を招いていると考えられた。アストロサイトとミクログリアの活性化状態を評価するため、6 ヶ月齢の脳に対して、それぞれに対して GFAP 染色と Iba1 染色を実施した。野生型と比べてどちらも明らかに数が増え染色性が高まっていた。特にミクログリアは脳室周辺に集積しており、脳室周囲の病理学的変化に関与していることが示唆された。von Kossa 染色を実施したところ、*Adar1*（W197A）KI マウスでは、6 ヶ月齢で大脳基底核に石灰化が検出された。

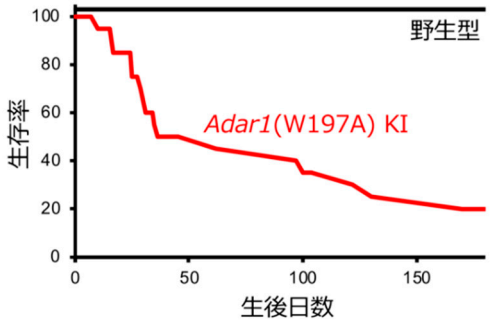


図 2. *Adar1*（W197A）KI マウスの生存率解析
野生型（n＝10）、*Adar1*（W197A）KI マウス（n＝20）。

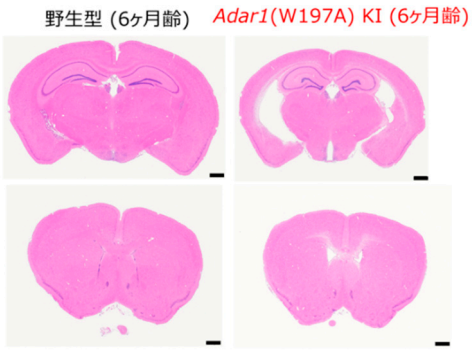


図 3. *Adar1*（W197A）KI マウスの脳病理解析
6 ヶ月齢での HE 染色解析。スケールバー：500μm。

2. *Adar1*（W197A）KI マウスでは、特に脳室周囲で高い ISGs の発現上昇を認める

Adar1（W197A）KI マウスでは、定量 RT-PCR 法で評価すると、特に脳で ISGs の発現が上昇している［2］。本研究で再度 RNA-seq 法で評価したが、やはり特に脳で ISGs の発現が高まっていることが確かめられた。この ISGs の発現上昇が脳全体で均一に生じているのかどうかを評価するため、1 ヶ月齢の脳に対して、10x Genomics 社の Visium を用いて空間トランスクリプトーム解析を実施した。その結果、*Adar1*（W197A）KI マウスにおいては、*Ifit* 遺伝子や *Oasl2* 遺伝子など多くの ISGs が、特に脳室周囲で発現上昇していた（図 4）。この結果は、脳室内で I 型 IFN の過剰産生が生じていることを示唆しているものと考えられ、脳室周囲に強い炎症所見を認めることと合致している。髄液中の I 型 IFN 量が増加していることは AGS でもよく知られているが、それがどこで産生されているのかは解明されていない。特に脳には ADAR1 p150 の発現量が少なく［3〜6］、*Adar1*（W197A）KI マウス脳では MDA5 も発現量が多少増加しているが、特に脳室周囲で上昇してはいなかった（図 4）。I 型 IFN は脈絡叢でも産生されることが知られており、*Adar1*（W197A）KI マウス脳で強い変性所見を認めていることから、脈絡叢が I 型 IFN の産生源の可能性もあると考えられた。

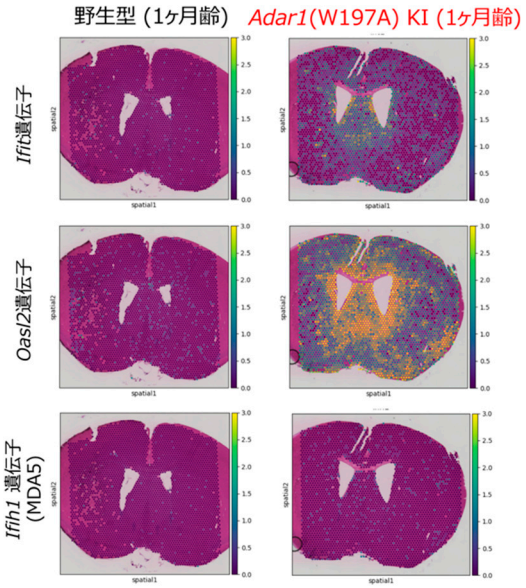


図 4. *Adar1*（W197A）KI マウス脳の空間トランスクリプトーム解析
1 ヶ月齢での解析結果。*Ifit* 遺伝子、*Oasl2* 遺伝子、*Ifih1* 遺伝子（MDA5 をコード）の解析結果を示す。

3. PKR や ZBP1 は、*Adar1*（W197A）KI マウスで認められる脳症病態に関与しない

PKR は、2 本鎖 RNA に結合して活性化し、翻訳抑制して細胞増殖を抑制する。また、ZBP1 は Z 型 2 本鎖 RNA に結合して活性化し、細胞死を誘導する。*Adar1* KO マウスや *Adar1 p150* KO マウスは、MDA5 を欠損させると胎生致死を回避できるようになるが、生後まもなく死に至る。最近になって、MDA5 に加え、PKR または ZBP1 を欠損させると、更に寿命が延長できることが報告された［9，10］。特に、*Adar1 p150* KO マウスについては、MDA5 と PKR を同時欠損させると長期生存が可能となる。しかし、PKR や ZBP1 は ISGs の一種であり、MDA5 が活性化するとこれらの発現量も増加する。このため、これら先行研究では MDA5 依存的な機能と非依存的な機能を切り分けることが困難であった。一方、我々は、*Adar1*（W197A）KI マウスにおいて MDA5 を同時欠損させると、脳症がほぼ完全に消失することを見いだしている［5］。すなわち、AGS 様脳症は MDA5 依存的によって形成されることから、その下流で発現上昇する PKR や ZBP1 の役割を解析しやすい。そこで、我々は、*Adar1*（W197A）マウスと PKR または ZBP1 欠損マウスを交配したところ、生存率や成長障害が著明に改善し、MDA5 欠損マウスと交配した場合と同程度に回復した。しかし、病理解析を行ったところ脳症は全く改善しなかった（図 5）。更に RNA-seq 解析を実施すると、脳内の

ISGs の発現量は上昇したままであることが判明した。これらの結果からは、PKR や ZBP1 は脳症形成には直接関与しておらず、生存率や成長障害の改善は脳症以外に要因があると考えられた。

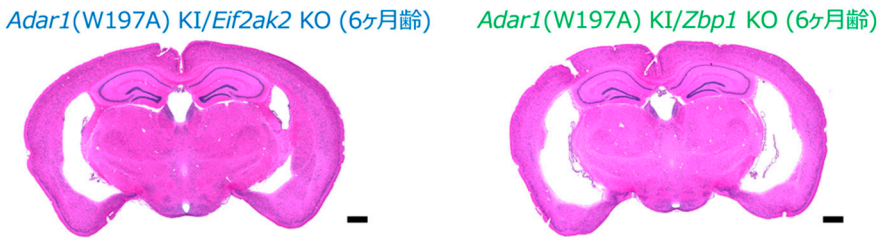


図 5. *Adar1*（W197A）KI マウス脳症における PKR と ZBP1 の関与の解析
Adar1（W197A）KI マウスにおいて *Eif2ak2* 遺伝子（PKR をコード）または *Zbp1* 遺伝子を同時欠損させ、6 ヶ月齢にて HE 染色解析を行い、脳症の程度を評価した。スケールバー：500 μm。

考　察

AGS は脳症を主症状とする難病だが、過剰な I 型 IFN がどの細胞で産生されるのか、なぜ白質変性や頭蓋内石灰化といったかたちで脳症が表出するか、その発症過程は長年不明である。本研究を通して、*Adar1*（W197A）KI マウスの脳室内で I 型 IFN の濃度が高まり、脳室周囲で強い炎症が進むことが明らかとなった。その結果、脳室に近接する白質にも影響が及んで変性が進むものと考察された。また、AGS と比べると軽度ではあるが、大脳基底核にも 6 ヶ月齢の時点で石灰化を認めており、これも I 型 IFN の持続的な過剰産生によるものと考えられた。一方、この I 型 IFN を産生している主な細胞が、ニューロンなのか、アストロサイトやミクログリアなのか、現時点では未解明である。ニューロンから産生されている場合、なぜ脳室内に蓄積するのか不明である。また、特に脳には ADAR1 p150 の発現量が少なく［3〜6］、*Adar1*（W197A）KI マウス脳では MDA5 も発現量が多少増加していたが、特に脳室周囲で上昇してはいなかった（図 4）。一方、ミクログリアは脳室周囲に集積しており、産生源である可能性が考えられる。今後、CSF1R 阻害剤を投与しミクログリアを除去した場合に、どのように脳症が変化するか解析する予定である。また、脈絡叢も産生源として有力な候補となるが、そうであった場合には、なぜ脈絡叢で強い I 型 IFN の産生がなされるのか解明する必要がある。いずれにせよ、*Adar1*（W197A）KI マウスは、AGS 脳症の発症機構を解明する上で、非常に有用なモデルとなるものと考えられる。

MDA5、PKR、ZBP1 はいずれも 2 本鎖 RNA センサータンパク質であり、ADAR1 p150 は RNA 編集依存的かつ非依存的に、これらセンサーが自己 2 本鎖 RNA を感知しないように機能している［2, 9, 10］。PKR と ZBP1 は ISGs であるため、MDA5 が活性化すると発現量が増加する。このため、これら 3 分子の役割がどのように異なるのか未解明である。*Adar1*（W197A）KI マウスにおいて MDA5 を同時欠損させると、成長障害や脳症などはほぼ消失し長期生存が可能となる［5］。一方で、PKR や ZBP1 を同時欠損させると、生存率や成長障害が著明に改善したが、脳症は改善せず、脳 ISGs も発現上昇したままであった。この結果は、脳症が I 型 IFN 依存的に形成されており、PKR や ZBP1 を欠損させてもこれを抑制することができないことを示唆している。脳室内の過剰な I 型 IFN がどこからもたらされるのかを明らかにすることが、AGS 脳症の発症機構理解の鍵を握っている。

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学大学院医学系研究科神経遺伝子学教室のスタッフ・学生の協力を得て行った。この場を借りて感謝申し上げる。

文　献

1) Nakahama T, Kawahara Y. The RNA-editing enzyme ADAR1: a regulatory hub that tunes multiple dsRNA-sensing pathways. Int Immunol. 2023 Mar 14;35(3):123-133. PMID: 36469491 DOI: 10.1093/intimm/dxac056

2) Pestal K, Funk CC, Snyder JM, Price ND, Treuting PM, Stetson DB. Isoforms of RNA-Editing Enzyme ADAR1 Independently Control Nucleic Acid Sensor MDA5-Driven Autoimmunity and Multi-organ Development. Immunity. 2015 Nov 17;43(5):933-44. PMID: 26588779 DOI: 10.1016/j.immuni.2015.11.001

3) Kim JI, Nakahama T, Yamasaki R, Costa Cruz PH, Vongpipatana T, Inoue M, Kanou N, Xing Y, Todo H, Shibuya T, Kato Y, Kawahara Y. RNA editing at a limited number of sites is sufficient to prevent MDA5 activation in the mouse brain. PLoS Genet. 2021 May 13;17(5):e1009516. eCollection 2021 May. PMID: 33983932 DOI: 10.1371/journal.pgen.1009516

4) Costa Cruz PH, Kato Y, Nakahama T, Shibuya T, Kawahara Y. A comparative analysis of ADAR mutant mice reveals site-specific regulation of RNA editing. RNA. 2020 Apr;26(4):454-469. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31941663 DOI: 10.1261/rna.072728.119

5) Nakahama T, Kato Y, Shibuya T, Inoue M, Kim JI, Vongpipatana T, Todo H, Xing Y, Kawahara Y. Mutations in the adenosine deaminase ADAR1 that prevent endogenous Z-RNA binding induce Aicardi-Goutieres-syndrome-like encephalopathy. Immunity. 2021 Sep 14;54(9):1976-1988.e7. PMID: 34525338 DOI: 10.1016/j.immuni.2021.08.022

6) Xing Y, Nakahama T, Wu Y, Inoue M, Kim JI, Todo H, Shibuya T, Kato Y, Kawahara Y. RNA editing of AZIN1 coding sites is catalyzed by ADAR1 p150 after splicing. J Biol Chem. 2023 Jul;299(7):104840. Epub 2023 May 18. PMID: 37209819 DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104840

7) Rice GI, Kasher PR, Forte GM, Mannion NM, Greenwood SM, Szynkiewicz M, Dickerson JE, Bhaskar SS, Zampini M, Briggs TA, Jenkinson EM, Bacino CA, Battini R, Bertini E, Brogan PA, Brueton LA, Carpanelli M, De Laet C, de Lonlay P, del Toro M, Desguerre I, Fazzi E, Garcia-Cazorla A, Heiberg A, Kawaguchi M, Kumar R, Lin JP, Lourenco CM, Male AM, Marques W Jr, Mignot C, Olivieri I, Orcesi S, Prabhakar P, Rasmussen M, Robinson RA, Rozenberg F, Schmidt JL, Steindl K, Tan TY, van der Merwe WG, Vanderver A, Vassallo G, Wakeling EL, Wassmer E, Whittaker E, Livingston JH, Lebon P, Suzuki T, McLaughlin PJ, Keegan LP, O'Connell MA, Lovell SC, Crow YJ. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature. Nat Genet. 2012 Nov;44(11):1243-8. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23001123 DOI: 10.1038/ng.2414

8) Inoue M, Nakahama T, Yamasaki R, Shibuya T, Kim JI, Todo H, Xing Y, Kato Y, Morii E, Kawahara Y. An Aicardi-Goutieres Syndrome-Causative Point Mutation in Adar1 Gene Invokes Multiorgan Inflammation and Late-Onset Encephalopathy in Mice. J Immunol. 2021 Dec 15;207(12):3016-3027. Epub 2021 Nov 12. DOI: 10.4049/jimmunol.2100526

9) Hubbard NW, Ames JM, Maurano M, Chu LH, Somfleth KY, Gokhale NS, Werner M, Snyder JM, Lichauco K, Savan R, Stetson DB, Oberst A. ADAR1 mutation causes ZBP1-dependent immunopathology. Nature. 2022 Jul;607(7920):769-775. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35859177 DOI: 10.1038/s41586-022-04896-7

10) Hu SB, Heraud-Farlow J, Sun T, Liang Z, Goradia A, Taylor S, Walkley CR, Li JB. ADAR1p150 prevents MDA5 and PKR activation via distinct mechanisms to avert fatal autoinflammation. Mol Cell. 2023 Nov 2;83(21):3869-3884.e7. Epub 2023 Oct 4. PMID: 37797622 DDOI: 10.1016/j.molcel.2023.09.018