

エカルディ・グティエール症候群における脳症形成機構の解明

大阪大学大学院医学系研究科 神経遺伝子学

中濱 泰祐

1.緒言

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) の異常産生を伴う先天性脳症である¹⁾。自己免疫疾患の一種であるが治療法はなく、病態解明が急務である。現在までに 7 つの原因遺伝子が報告されており、その中には ADAR1 と MDA5 が含まれている^{2,3)}。ADAR1 は、二重鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへ置換する RNA 編集酵素であり、ヒトでは 10 万カ所以上の編集部位が存在する⁴⁾。近年、RNA 編集は二重鎖構造を緩めることで、RNA センサー分子 MDA5 による非自己としての認識を回避することが報告された⁵⁾。しかし、ADAR1 ノックアウト (KO) マウスや RNA 編集活性欠損型ノックイン (KI) マウスは、IFN 異常産生を示すが胎生致死を呈するため、AGS の主症状である脳症を再現できない^{5,6)}。更に、AGS で変異の同定されている他の遺伝子変異マウスの多くが IFN の異常産生や致死性を示すものの、脳症を呈する AGS モデルは存在せず、AGS 病態解明の障壁となっている。そこで申請者は、ADAR1 遺伝子変異が多数同定されている触媒ドメインに AGS 型点変異の 1 つをノックイン (AGS KI) したマウスを予備的に樹立した。その結果、ホモ個体は致死にはならず体重減少などの異常を示すことが判明し、AGS モデルとなる可能性を見いだした。本研究では、AGS KI マウスを用いて、AGS 脳症の病態形成機構を解明し、将来的な AGS の治療に向けた分子基盤情報の確立を目的とした。

2.方法

2-1) AGS KI マウスにおける脳症などの病態形成機構の解析

AGS KI マウスの AGS モデルとしての妥当性を評価するため、AGS KI マウスから脳を摘出後、組織染色を実施し、脳症の有無について観察した。また、AGS では脳以外の臓器においても多彩な症状が認められるため、肺、肝臓、大腸などにおいても異常所見が認められるかどうかを検証した。

2-2) AGS KI マウスにおける MDA5 経路の異常活性化の検証

AGS KI マウスにおいて、MDA5 経路の異常活性化の有無を検証するため、AGS KI マウス由来の様々な臓器から RNA を抽出し、MDA5 活性化マーカーである IFN 誘導遺伝子群 (ISG)

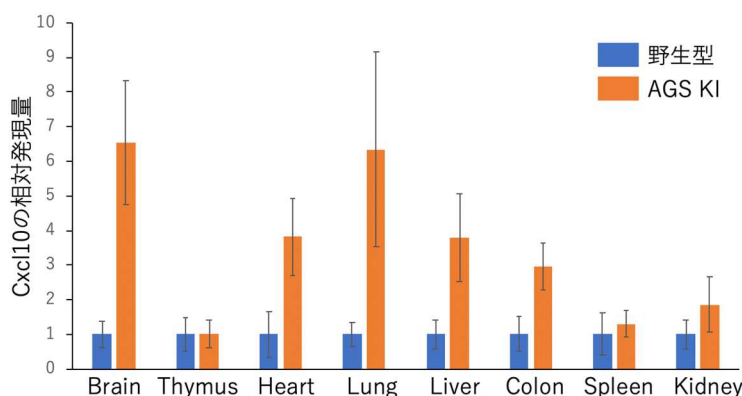
の発現レベルを定量 RT-PCR 法にて解析した。

2-3) AGS KI マウスにおける RNA 編集部位・効率の決定

AGS KI マウスから脳および肺を単離し、RNA を抽出した。これを材料とし、RNA-Seq により RNA 編集効率や部位を網羅的に解析した。RNA 編集によって生じたイノシンは構造的に近いグアノシンとして振る舞うため、cDNA ライブラリーの調整段階でイノシンはグアノシンへと変換される。このため、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 編集部位として同定した。さらに、野生型と比較し、AGS KI マウスで RNA 編集効率が低下・消失しているかどうかを検証した。

3.結果

AGS KI マウスでは優位な体重減少などが認められたものの、現在までに脳やその他臓器について組織レベルでは異常を検出できていない。一方で、MDA5 活性化マーカーである ISG の発現レベルは脳をはじめとする様々な臓器で高発現しており（下図）、本マウスにおいて部分的に AGS 症状を確認することができた。また、ISG が特に高発現していた脳や肺について RNA 編集部位・効率を RNA-Seq にて網羅的に決定したところ、AGS KI マウスでは RNA 編集効率が 20-30%程度低下していることが明らかになった。現在 AGS KI マウスと MDA5 KO マウスを交配中であり、今後 MDA5 を欠損させることで ISG の発現上昇が抑制されるかどうかを検証していく予定である。



4.考察

AGS は IFN 異常産生を伴う先天性自己免疫疾患である。脳症を主症状とするが、消化器症状など多彩な症候を示す。ADAR1 遺伝子の点変異で生じるが、ADAR1 KO マウスや RNA 編集活性欠損型 KI マウスは、IFN 異常産生を示すが胎生致死を呈するため、AGS の主症状である脳症を再現できない。すなわち、ADAR1 の RNA 編集活性を完全に喪失すると、生存に影響するほどの効果をもたらすと推定され、RNA 編集活性をある程度残したまま減弱させるような工夫が必要であると考えた。AGS では ADAR1 遺伝子両アレルに異なる変異を持つケースが大半であるが、今回挿入した AGS 型点変異はヒトではホモ接合体で発症する。これに合致して、今回作成したホモ接合体である AGS KI マウスが脳をはじめとする様々な臓器で ISG を高発現していることが判明した。一方、AGS 患者では、脳炎に加え、基底核の石灰化や脳脊髄液細胞数の上昇などが高頻度で生じる。現状、組織レベルでは炎症などの病理所見を検出する

ことができていないが、これらの脳症は IFN の異常産生によって形成されるものと考えられるため、今後は長期的に AGS KI マウスの病理解析を実施する予定である。

ADAR1 が触媒する RNA 編集には内在する RNA の二重鎖構造を緩め、RNA センサー分子 MDA5 によって非自己として誤認識されることを回避する作用があると考えられている⁵⁾。AGS で見つかっている変異の多くが ADAR1 の触媒ドメインに生じていることから、RNA 編集活性の低下が AGS 発症の引き金となっていると予想される。しかし、AGS 変異型 ADAR1 が数多く存在する RNA 編集部位に対し、実際に RNA 編集活性が低下しているのか未解明であり、このため本研究では、AGS KI マウスから臓器を単離し、RNA-Seq にて網羅的に編集効率が低下するのかを検証した。その結果、AGS KI マウスでは野生型に比べ、20~30%程度低下編集効率が低下していることを見出した。以上の結果は、RNA 編集レベルは厳密に保持されており、わずかな編集効率の低下が MDA5 活性化につながる可能性があることを示唆している。RNA 編集はイントロンや 3'UTR などの非翻訳領域に生じることから、編集効率の低下に部位特異性があるかどうかを検証していく予定である。

5.結語

本研究では、AGS で見つかっている ADAR1 遺伝子変異をマウスに導入することで、新規の AGS モデルマウスの確立を目指した。その結果、本マウスでは ISG が高発現しており、AGS 症状の一部を再現していることを確認できた。また、本マウスでは RNA 編集効率が低下しており、RNA 編集効率の低下が内在 RNA による MDA5 活性化を引き起こしたと考えられた。今後は本マウスを長期観察し、基底核の石灰化などの他の AGS 症状を再現するかどうかを検証していく予定である。

最後に、多大なるご支援を賜りました大阪難病研究財団に深く感謝いたします。

6.文献

- 1) Crow YJ, et al. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A*. 2015; 167A. 296–312.
- 2) Rice GI, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet*. 2012; 44. 1243–1248.
- 3) Rice GI, et al. Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet*. 2014; 46. 503–509.
- 4) Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010; 79. 321–349.
- 5) Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, Li JB, Seeburg PH,

Walkley CR. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science*. 2015; 349. 1115–1120.

6) Hartner JC, Schmittwolf C, Kispert A, Muller AM, Higuchi M, Seeburg PH. Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1. *J Biol Chem*. 2004; 279. 4894–4902.