The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ADAR1 regulates early T cell development via MDA5-dependent and -independent pathways
Author(s)	Vongpipatana, Tuangtong
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/77530
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	VONGPIPATANA Tuangtong
論文題名 Title	ADAR1 regulates early T cell development via MDA5-dependent and -independent pathways (ADAR1はMDA5依存／非依存経路を介してT細胞初期成熟を制御する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

Adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing, the most prevalent RNA modification found in mammals, is mediated by adenosine deaminase acting on RNA1 (ADAR1). ADAR1 deficient and editing-inactive knock-in mice are embryonic lethal with high expression of type I interferon (IFN) and IFN-stimulated genes (ISGs). Intriguingly, these phenotypes are rescued by concurrent depletion of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5), a cytosolic sensor molecule of exogenous dsRNA, suggesting that ADAR1-catalyzed RNA editing prevents MDA5 recognition of self-dsRNA as non-self. Although MDA5 deletion rescues ADAR1 deficient mice to live for a few days after birth, depletion of MDA5 prolongs editing-inactive knock-in mice survival until adulthood. These data indicate editing-independent roles of ADAR1 which remain to be investigated *in vivo*. ADAR1 is abundantly expressed in thymus. It has been reported that RNA editing mediated by ADAR1 is essential for establishment of central tolerance during late T cell development by preventing MDA5 pathway activation. In this study, we aimed to investigate the roles of ADAR1 during early stage of T cell development.

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

We deleted ADAR1 at double-negative stage (DN) of T cell development by mating *ADAR1*$^{flox/flox}$ with *Lck*^{cre} mice, in which Cre recombinase is controlled by proximal *Lck* promoter. Deficiency of ADAR1 at early T cell development in mice caused thymic atrophy, increased apoptosis and impairment of transition from DN3 to DN4 stage due to lack of T cell receptor (TCR) expression. The enhanced apoptosis in ADAR1-deleted DN thymocytes was caused by excessive expression of type I ISG. As we expected, concurrent depletion of MDA5 almost completely rescued expression of type I ISGs and apoptosis in ADAR1-deleted DN thymocytes but not TCR expression due to accumulation of out-of-frame *TCRβ* transcripts, suggesting that ADAR1 regulates TCR expression by an MDA5-independent pathway. In contrast, enforcement of in-frame TCR expression ameliorated DN3-to-DN4 transition but did not rescue differentiation from DN to DP stage. Furthermore, forced in-frame TCR expression failed to restore increased apoptosis in *ADAR1*$^{flox/flox}$ *Lck*^{cre} mice. These results indicated that expression of TCR was insufficient to achieve the DN-to-DP transition. Finally, we combined the effects of MDA5 depletion and forced in-frame TCR expression in ADAR1-deleted DN thymocytes by deleting MDA5 in *ADAR1*$^{flox/flox}$ *Lck*^{cre} mice expressing in-frame TCR. We found that these combinations synergistically rescued the transition from DN to DP stage.

〔総　括(Conclusion)〕

Our data led us to conclude that MDA5-dependent and -independent functions of ADAR1 are required for normal early T cell development.

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） Tuangtong Vongpipatana			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	河原 行郎
	副　査	大阪大学教授	石井 優
	副　査	大阪大学教授	竹田 潔

論文審査の結果の要旨

２本鎖RNA中のアデノシンがイノシンへと置換されるA-to-I RNA編集は、広範な生物で保存されており、生存に必須の転写後修飾である。この化学修飾を触媒するADAR1という酵素は、胸腺や脾臓で高発現しており、Tリンパ球の分化・増殖に必要不可欠な役割を担っていることが予測されてきた。
これまでに、マウスにおいて胸腺thymocyteの分化後期選択的にADAR1をノックアウトすると、その後の分化異常が生じ、全身に炎症が生じることを報告してきた(Nakahama, Kato, Kim, **Vongpipatana** et al, EMBO Rep, 2018)。しかし、分化早期におけるADAR1の役割は不明であった。
本論文では、Lck-Cre TgマウスとADAR1 floxマウスを交配することで、thymocyteのdouble negative (DN) stageの段階でADAR1を選択的にノックアウトしたマウスを作成した。その結果、後期選択的な場合と異なり、著しいapoptosisを伴ってthymocyteの数が激減し、分化が停滞して胸腺が萎縮する表現型を呈することが分かった。また、インターフェロン誘導遺伝子群（ISGs)の発現上昇も伴っていた。
先行研究から、ADAR1を欠損すると、内在する２本鎖RNAがMDA5によって異物と認識され自然免疫が惹起されることが分かっている。このため、Lck-Cre Tg/ADAR1 floxマウスからMDA5を欠損させると、apoptosis やISGsの発現上昇は抑制され、胸腺萎縮も改善することを確かめた。しかし、完全には回復せず分化も停滞したままであったことからよく解析してみると、分化に必要不可欠なT cell receptor (TCR)の発現が回復していないことが分かった。そこで次に、Lck-Cre Tg/ADAR1 floxマウスとHY-TCR Tgマウスを交配し、TCRを強制発現させてみた。すると今度はapoptosisが抑制されず、分化の停滞も一部改善したのみであった。このため、最後にLck-Cre Tg/ADAR1 flox/HY-TCR TgマウスからMDA5を欠損させると、apoptosisやISGsの発現上昇は抑制された上で、分化停滞が大きく改善し、胸腺もほぼ正常な大きさまで回復した。
以上の結果から、タイトルにあるように胸腺thymoyteの分化早期には、ADAR1によるMDA5に依存した経路の抑制と非依存的な機能の両者が協調することが必要不可欠であるとの結論に至り、Tリンパ球の成熟におけるADAR1の新たな役割を解明した。
以上から、博士（医学）の学位授与に価するものと認める。