

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ  
「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (AMED-CREST) “Creation of Basic Medical Technologies to Clarify and Control the Mechanisms Underlying Chronic Inflammation” research area  
研究開発課題名：(日本語) 自然免疫における転写後調節を介した慢性炎症抑制メカニズムの解析  
(英語) Analysis of mechanisms underlying chronic inflammation via posttranscriptional regulation of innate immunity

研究開発担当者 (日本語) 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 教授 竹内 理  
所属 役職 氏名：(英語) Inst. Front. Life and Med. Sci., Kyoto Univ. Professor, Osamu Takeuchi

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

### 和文

本研究は、自然免疫による RNA 分解による慢性炎症調節メカニズムを明らかにすることを目的としている。我々は、これまで、マクロファージにおいてインターロイキン (IL-6) を始めとする炎症関連 mRNA を分解する RNA 分解酵素 Regnase-1 を同定し、これがマウスにおいて自己免疫性炎症性疾患発症の抑制に重要である事を明らかにしてきた。本研究では、Regnase-1 関連分子の炎症調節における分子メカニズムを明らかにすると共に、TLR によるサイトカイン mRNA を調節する新規メカニズムに関し検討を加えることをも目標としている。

慢性炎症には、免疫細胞のみではなく非免疫細胞の関与も知られている。また、慢性炎症による病態の一つとして貧血の発症が知られているが、この機構に関しこれまで十分に明らかとなっていなかった。興味深いことに、Regnase-1 を欠損したマウスでは慢性炎症や自己免疫疾患に加え、重度の貧血を発症する。

そこで、本年度、我々は貧血の病態形成における *Regnase-1* の役割を検討した。*Regnase-1* を全身で欠損するマウス、もしくは *Regnase-1* に加えリンパ球の存在しない *Regnase-1/Rag2* 二重欠損マウスを作製したところ、ともに鉄欠乏性貧血を発症することを見出した。また、これらのマウスでは臓器鉄が著明に低下していた。腸管上皮細胞特異的に欠損したマウスを作製、解析したところ、このマウスも貧血を呈し、腸管上皮での鉄代謝の異常が示唆された。また、鉄の腹腔内投与により鉄欠乏性貧血は改善することから、腸管における鉄吸収の低下が原因であることが明らかとなった。そこで、食餌中の鉄が主に吸収される部位である十二指腸での *Regnase-1* の機能解析を進めた。十二指腸でのトランスクリプトーム解析を行ったところ、鉄吸収の制御に関わる *Regnase-1* の標的遺伝子として *PHD3* をコードする *Egln3* を見出した。実際、*PHD3* (*Egln3*)により制御される鉄輸送体遺伝子の発現は *Regnase-1* の欠損により損なわれていた。次に *Regnase-1* 欠損マウスにおいて *Egln3* の活性を喪失させると、貧血と鉄欠乏が改善することが明らかとなった。このことは *Regnase-1* を介した *Egln3* mRNA の分解が鉄吸収の制御にとって重要であることを示唆している。つまり、*Regnase-1* が *Egln3* の mRNA を分解することで、鉄代謝において重要な転写因子である *HIF2 $\alpha$*  を安定化させ、腸管での鉄吸収を促進する役割があることを明らかにした。さらに、*Regnase-1* 自身が *HIF2 $\alpha$*  の標的遺伝子であり、*Regnase-1*、*PHD3*、*HIF2 $\alpha$*  の三者からなる正のフィードバック機構が腸管での鉄吸収を調節していることを見出した。つまり、*Regnase-1* は、免疫細胞のみでなく、非免疫細胞である腸管上皮細胞にも発現し、鉄代謝や貧血など、慢性炎症における様々な病態を制御していることが明らかとなった。本研究を契機として、慢性炎症性貧血などの鉄代謝異常による疾患の病態解明や、新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

## 英文

This study aims to uncover regulatory mechanisms of chronic inflammation controlled by RNA decay in innate immunity. We have previously identified an RNase called *Regnase-1*, which degrades inflammatory mRNAs such as IL-6 in macrophages, and identified that this molecule is important for the suppression of autoimmunity in mice. In this project, we aim to identify molecular mechanisms underlying regulation of inflammation by *Regnase-1* and relating molecules, and novel mechanisms controlling TLR-mediated cytokine mRNA expression.

Chronic inflammation involves immune and non-immune cells, and will develop complex pathology such as anemia. However, the mechanisms of anemia caused by chronic inflammation has not been well defined. Interestingly, *Regnase-1*-deficient (*Regnase-1<sup>-/-</sup>*) mice develop severe anemia.

In this fiscal year, we investigated the roles of *Regnase-1* in controlling anemia. *Regnase-1<sup>-/-</sup>* mice as well as *Regnase-1<sup>-/-</sup>* mice lacking lymphocytes by *Rag2* deficiency developed iron-deficiency anemia. Furthermore, these mutant mice showed severe decrease in organ iron. We found that genetic ablation of *Regnase-1* in the intestinal epithelial cells leads to iron deficiency anemia, suggesting that *Regnase-1* participates in the regulation of iron metabolism in the intestinal epithelium. Moreover, intraperitoneal iron administration to *Regnase-1<sup>-/-</sup>* mice reversed the iron deficiency anemia, suggesting a defect in intestinal iron uptake. These findings motivated us to investigate the role of *Regnase-1* in the duodenum, where dietary iron uptake mainly takes place. Transcriptome analysis of the duodenum revealed a novel target of *Regnase-1* associated with the regulation of dietary iron uptake; *Egln3* mRNA, which encodes *PHD3* protein. Indeed, the expression of *PHD3* (*Egln3*)-

regulated iron transporter genes were impaired in *Regnase-1*<sup>-/-</sup> duodenum. Abrogation of *Egln3* activity in *Regnase-1*<sup>-/-</sup> mice ameliorates the anemia and iron deficiency, suggesting that *Regnase-1*-mediated *Egln3* mRNA decay is essential for the regulation of dietary iron uptake. These data demonstrate that *Regnase-1* negatively regulate the expression of *PHD3*, which destabilizes *HIF2α*, a transcription factor responsible for controlling iron uptake. Furthermore, *Regnase-1* itself is induced by *HIF2α*, indicating that the positive feedback of *Regnase-1*, *PHD3* and *HIF2α* regulates intestinal iron uptake. These results demonstrate that *Regnase-1* expresses not only in immune cells, but also in nonimmune cells such as intestinal epithelial cells, and controls complex pathologies of chronic inflammation such as anemia. This study might lead to the understanding of human anemic diseases and development of novel therapeutic approaches.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 6 件、国際誌 3 件、英文著書 1 件）

1. Tartey S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int. Rev. Immunol.* 2017, 36, 57–73.
2. Uehata T, Takeuchi O. *Regnase-1* is an endoribonuclease essential for the maintenance of immune homeostasis. *J. Interferon Cytokine Res.* *in press*.
3. Yoshinaga M, Nakatsuka Y, Vandenbon A, Ori D, Uehata T, Tsujimura T, Suzuki Y, Mino T, Takeuchi O. *Regnase-1* maintains iron homeostasis via the degradation of transferrin receptor 1 and prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 mRNAs. *Cell Reports* *in press*.
4. Takeuchi O. Posttranscriptional Regulation of Cytokine mRNA controls the Initiation and Resolution of Inflammation. *Chronic Inflammation*, Springer Japan 2016, 319–332.
5. 植畑拓也, 竹内理. 免疫系の表現型解析. 実験医学別冊. 2016, 208–215.
6. 三野享史, 竹内理. 免疫研究における RNA-Seq システム免疫学へのアプローチ. 実験医学別冊 NGS アプリケーション RNA-Seq 実験ハンドブック. 2016, 197–203.
7. 三野享史, 竹内理. *Regnase-1* と *Roquin* による炎症性 mRNA の制御. 医学のあゆみ. 2016, 257, 180–182.
8. 三野享史, 竹内理. *Regnase-1* と *Roquin* による炎症性 mRNA の制御. 日薬理誌 特集. 2016, 147 351–356.
9. 吉永正憲, 竹内理. 慢性炎症における炎症性サイトカインの新たな制御機構. 最新医学. 2016, 71, 23–27.
10. 吉永正憲, 竹内理. 炎症性サイトカイン IL-6 とその転写後調節. 医学のあゆみ. 2016, 259, 371–376.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The ribonuclease Regnase-1 plays a role in iron homeostasis and anemia. Poster. Yoshinaga M, Mino T, Takeuchi O. International Congress of Immunology 2016. Melbourne, Australia. 2016/8/21–26. 海外.
2. Analyses of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains. Poster. Sadahiro A, Fukao A, Takizawa N, Takeuchi O, Fujiwara T. RNA 2016. Kyoto, Japan. 2016/6/28–7/2. 国内.
3. HIV 感染を制御する新規 RNA 分解酵素の同定. 口頭. 山唄大智, 佐藤佳, 中野雄介, 三沢尚子, 神道慶子, 野田岳志, 小柳義夫, 竹内理. 第 19 回 Summer Retrovirus Conference. 京都府京都市. 2016/7/8–8. 国内.
4. SMG 1 阻害剤による Regnase-1 依存性 mRNA 分解の制御. 口頭. 岩井紀貴, 三野享史, 竹内理. RNA フロンティアミーティング 2016. 北海道虻田郡ニセコ町. 2016/8/31–9/2. 国内.
5. ポリオウイルスの細胞種特異的な IRES 依存的翻訳の解析. 口頭. 貞廣暁利, 足達俊吾, 深尾亜喜良, 夏目徹, 竹内理, 藤原俊伸. RNA フロンティアミーティング 2016. 北海道虻田郡ニセコ町. 2016/8/31–9/2. 国内.
6. Stabilization of Regnase-1 protein by antisense morpholino oligos. Poster. Cui X, Takeuchi O. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 2016/9/6–9, 2016. 国内.
7. Identification of a novel RNase as a restriction factor for HIV budding. Poster. Yamasoba D, Sato K, Sindo K, Noda T, Koyanagi Y, Takeuchi O. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 2016/9/6–9, 2016. 国内.
8. ポリオウイルスの細胞種特異的な IRES 依存的翻訳の解析. 口頭. 貞廣暁利, 足達俊吾, 深尾亜喜良, 船上仁範, 夏目徹, 竹内理, 藤原俊伸. 第 39 回日本分子生物学会年会. 神奈川県横浜市. 2016/11/30–12/2. 国内.
9. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1. Oral. Mino T, Takeuchi O. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan. 2016/12/5–7. 国内.
10. A pivotal role of Regnase-1 at the airway epithelium for the protection against pathogens through the enhancement of IgA secretion. Oral. Nakatsuka Y, Mino T, Takeuchi O. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan. 2016/12/5–7. 国内.
11. Novel Cyclin controls neoplastic alterations and bacterial infection by regulating neutrophil homeostasis. Oral. Tartey S, Takeuchi O. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan. 2016/12/5–7. 国内.
12. The ribonuclease Regnase-1 plays a critical role in iron homeostasis and anemia. Poster. Yoshinaga M, Mino T, Takeuchi O. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan. 2016/12/5–7. 国内.
13. Deciphering the role of Cyclin J in regulation of inflammation. Oral. Chong, YK, Tartey S, Takeuchi O. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2017/2/23–24. 国内.

14. Ribonucleases Regnase-1 and Zc3h12a are critical for B cell differentiation. Poster. Yamada S, Ori D, Miyazaki M, Uehata T, Takeuchi O. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2017/2/23–24. 国内.
15. Pertussis toxin triggers degradation of Regnase-1 in the course of autoimmune neuroinflammation. Poster. Michisaka S, Uehata T, Takeuchi O. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2017/2/23–24. 国内.
16. Regulation of Regnase-1-mediated mRNA decay by SMG1 inhibitor. Poster. Iwai N, Mino T, Takeuchi O. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan. 2017/2/23–24. 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 病原体から体を守る免疫のしくみ, 竹内理, 福井県立高志高等学校生による京都大学訪問研修, 2015/12/03, 国内.

(4) 特許出願

該当なし。