

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K08484

研究課題名(和文) ”慢性炎症性疾患”におけるリンパ球K+チャンネル(Kv1.3)の、病的・治療的意義

研究課題名(英文) Usefulness of lymphocyte Kv1.3 channels in chronic inflammatory disease

研究代表者

風間 逸郎 (KAZAMA, ITSURO)

宮城大学・看護学群・教授

研究者番号：60593978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ球K+チャンネル(Kv1.3)の生理的・病的意義について検討するため、リンパ球に対する電気生理学的実験および末期腎不全モデルラットに対する治療実験を行った。その結果、一部の降圧薬やスタチン系薬剤は、Kv1.3阻害作用を介し、腎不全に伴う腎線維化の進行を抑制した。慢性腎臓病では、腎間質における本チャンネルの過剰発現が、リンパ球の活性化や増殖を介し、病態の進行を促すと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、慢性閉塞性肺疾患や炎症性腸疾患、外傷・手術後の癒痕、全身性炎症反応症候群・敗血症などの疾患動物モデルに対するKv1.3阻害薬の効果が明らかになれば、ヒトに対する臨床試験など、治療の実用化に向けた共同研究へと駒を進めていくことが可能になる。

研究成果の概要(英文)：The overexpression of lymphocyte Kv1.3-channels contributes to the progression of chronic kidney disease (CKD) by promoting cellular proliferation and interstitial fibrosis. In our patch-clamp studies, since benidipine and simvastatin were highly potent as Kv1.3-channel inhibitors, they could exert therapeutic efficacy in the progression of CKD. Therefore, using a rat model with advanced stage chronic renal failure (advanced CRF), we examined the effects of these drugs on the histopathological features of the kidneys and the cortical expression of pro-inflammatory cytokines. In the cortical interstitium of advanced CRF rat kidneys, these drugs significantly ameliorated the progression of renal fibrosis. Both drugs reduced the number of proliferating leukocytes with a significant decrease in the pro-inflammatory cytokine expression. The studies indicated the therapeutic potency of Kv1.3-channel inhibitors in the treatment or the prevention of chronic inflammatory disease.

研究分野：生理学一般、病態生理学

キーワード：慢性炎症性疾患 リンパ球Kv1.3 慢性腎臓病 線維化

1. 研究開始当初の背景

電位依存性遅延整流型 K⁺チャンネル Kv1.3 は、胸腺由来 T リンパ球の細胞膜上に多く存在し、その活性がリンパ球の増殖や活性化を促す。これまでの研究により、悪性腫瘍や自己免疫疾患では、癌細胞やリンパ球における Kv1.3 の過剰発現が、病気の発症や進展に大きく関与することが分かっているが、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) などの慢性疾患における Kv1.3 の病的意義については明らかにされていない。最近では、悪性腫瘍や自己免疫疾患だけでなく、慢性腎臓病をはじめとした生活習慣病、慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD) や炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) など、いわゆる慢性疾患の病態形成過程においても、臓器局所における慢性炎症や、免疫反応の過剰な賦活化が関与することが明らかになってきた。中でも、腎不全末期の腎臓では、実際に、マクロファージやリンパ球などの炎症性細胞や線維芽細胞の活性が上昇しており、それらの増殖が盛んであることも分かっている。従って、これらの慢性疾患においても、悪性腫瘍や自己免疫疾患の場合と同様、リンパ球 Kv1.3 を介した炎症性細胞の増殖や活性化が、病態の進行過程に関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 末期腎不全の腎臓では、リンパ球 Kv1.3 の過剰発現により、炎症・線維化が進行し、(2) 実際に、Kv1.3 阻害作用を持つ薬剤によって、その進行が抑えられることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 6週齢の雄 SD ラットに対し 5/6 腎摘術を施行後、12 週の回復期間を置いて末期腎不全モデルを作成した。腎臓を摘出後にパラフィン固定し、Kv1.3 に対する抗体染色法を行い、Kv1.3 蛋白の発現分布を調べた。また、リンパ球やマクロファージの細胞マーカー: CD3, ED-1 に対する抗体を Kv1.3 抗体と共染色し、Kv1.3 が、特にどの細胞で過剰発現するのかを検討した。

(2) 末期腎不全モデルラットに対し、Kv1.3 特異的チャンネル阻害薬 (Margatoxin) または Benidipine, Simvastatin を治療的に投与した。投与終了後に腎臓を摘出し、チャンネル阻害薬非投与群の腎臓と比較した。血清クレアチニン値のほか、線維化のマーカー (Collagen III, α -SMA) の発現も調べた。

(3) 4~5 週齢 *day* マウスから胸腺を摘出し、細胞外液 (NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl₂, 1.0; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; BSA, 0.01%; pH 7.2) で、リンパ球を単離した。単離した後、細胞外液中に拡散し、細胞含有液とした。なお、本細胞を用いた以下の実験は、細胞採取後 8 時間以内に、室温 (22~24) 条件下で行った。

(4) EPC-9 patch-clamp amplifier system (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) を用いたホールセル・パッチクランプ法によって全細胞膜電流を測定した。細胞に Benidipine (10 μ M) または Simvastatin (10 μ M) を投与し、投与前後の全細胞膜電流を比較した。

4. 研究成果

(1) リンパ球 Kv1.3 チャンネル活性と腎線維化の進行

T リンパ球においては、Kv1.3 チャンネルを介した外向きのカリウムイオンの移動が細胞内へのカルシウムの流入を引き起こし、Calcineurin pathway が活性化される。その結果、サイトカインの産生や、リンパ球の増殖が促され、細胞性免疫が賦活化される。CKD では一般に、病期の進行とともに血液中のサイトカイン濃度が上昇することが知られているが、われわれの研究結果からも、5/6 腎摘術後の末期腎不全ラットの腎臓では病態の進行とともに、腎皮質領域における炎症性細胞の浸潤が著しくなり、腎間質領域の拡大と著しい線維化の進行が認められた。また、細胞増殖マーカーである Ki-67 による抗体染色の結果、末期腎不全ラットの腎間質では、著しい細胞増殖が認められたが、これらの細胞のほとんどが、CD3 または ED-1 陽性の T リンパ球やマクロファージなどの炎症性細胞であった。

正常ラットの腎臓や腎不全の初期において Kv1.3 チャンネルは、主に近位尿細管や集合管に発現することが知られているが、われわれが行った研究の結果、腎不全の進行に従い、増殖の著しいリンパ球やマクロファージにおいて過剰発現が認められた。そこで、CKD の病態における本 K⁺チャンネルの関与を明らかにするために、末期腎不全ラットに対して選択的 Kv1.3 チャンネル阻害薬である Margatoxin の治療的投与を試みた。その結果、Margatoxin 投与群では非投与群に比べ、腎間質領域における炎症性細胞の浸潤が抑えられ、腎線維化の進行も有意に抑制された。従って CKD では、腎臓リンパ球における Kv1.3 チャンネルの過剰発現がリンパ球自身の増殖を促し、サイトカインの産生や線維芽細胞の活性化を介して、腎臓の線維化を進行させると考えられた。

(2) Benidipine が有する "Kv1.3 阻害作用" と腎線維化の抑制

Margatoxin はリンパ球において、Kv1.3 チャンネルを阻害することにより炎症性サイトカイン

の産生を抑え、免疫抑制作用を発揮することが分かっている。しかし、Maragatoxinをはじめとする数多くの選択的 Kv1.3 チャンネル阻害薬は、神経や筋肉に対する副作用が強いため、未だ治療薬としての実用化には至っていない。一般診療の中で頻用されている非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）抗生物質、降圧薬の中にも、本来の薬理作用に加え、免疫抑制作用を併せ持つものがあるが、それらの作用機序についてはよく分かっていない。われわれがマウス胸腺由来リンパ球を用いて行った電気生理学的実験（パッチクランプ法）の結果、NSAIDs（Diclofenac, Salicylate, Indomethacin）マクロライド系抗生物質（Clarithromycin）ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬（Nifedipine, Benidipine）は、いずれも Kv1.3 チャンネル電流を有意に抑制致したことから、これらの薬剤は Maragatoxin と同様、リンパ球 Kv1.3 チャンネルを阻害することによって炎症性サイトカインの産生を抑え、免疫抑制作用を発揮すると考えられた。

中でも Benidipine は、少ない用量でも本チャンネル電流を強力、かつ持続的阻害したため、われわれは末期腎不全モデルラットに対して、本薬剤の治療的投与を試みた。その結果、Benidipine 投与群では非投与群に比べ、腎間質領域における炎症性細胞の浸潤・増殖や、IL-2 や IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生が抑えられ、腎線維化の進行も有意に抑制されていた。Benidipine はカルシウム拮抗薬として、L および T タイプの Ca²⁺チャンネルに拮抗するため、腎臓系球体の輸入・輸出細動脈ともに拡張することが分かっている。これにより系球体内圧を低下させ、とくに保存期腎不全においては、腎臓への蛋白負荷を減らすとされている。しかし、われわれの研究結果から、末期腎不全モデルラットでは、Benidipine 投与によっても全身血圧・尿蛋白量ともに高値が維持されたことから、末期腎不全の状態では、本薬剤は腎血行動態を変化させることなく、腎線維化の進行を抑制すると考えられた。従って、CKD において Benidipine は、腎臓リンパ球で過剰発現した Kv1.3 チャンネルを阻害することによって、リンパ球の増殖やサイトカインの産生を抑え、腎線維化の進行を抑制すると考えられた。

（３） Simvastatin が有する “ Kv1.3 阻害作用 ” と腎線維化の抑制

マウス胸腺由来リンパ球を用いて行った電気生理学的実験（パッチクランプ法）の結果、スタチン系抗コレステロール薬のひとつである Simvastatin も Benidipine と同様、少ない用量でリンパ球 Kv1.3 チャンネル電流を強力、かつ持続的阻害した。そこでわれわれは、末期腎不全モデルラットに対し、本薬剤の治療的投与も試みた。その結果、Simvastatin 投与群では非投与群に比べ、腎間質領域における炎症性細胞の浸潤・増殖や腎線維化の進行が有意に抑制されていた。しかし、Benidipine の場合と異なり、Simvastatin は系球体硬化病変の進行も抑制した。従って、Simvastatin が腎線維化を抑制するメカニズムについては、リンパ球 Kv1.3 阻害による抗炎症作用のほかにも、系球体硬化の改善がもたらす二次的な効果も除外しきれないと考えられた。

（４） 結論および今後の課題

CKD では、腎間質リンパ球における Kv1.3 チャンネルの過剰発現がリンパ球を増殖させ、腎線維化の進行を促していた。従って Benidipine や Simvastatin など、“ Kv1.3 阻害作用 ” を有する薬剤は、腎線維化に対する治療薬としても有用であると考えられた。近年では CKD 以外にも、慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD）炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease; IBD）などの、“慢性炎症性疾患”の病態形成過程においても、臓器局所における慢性炎症や、免疫反応の過剰な賦活化が関与することが明らかになってきた。そこで今後は広く、“慢性炎症性疾患”や“臓器の線維化”におけるイオンチャンネルの病的・治療的意義についても明らかにし、これらの疾患に対する新規治療（予防）法の開発にも貢献していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kazama I	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Targeting lymphocyte Kv1.3-channels to suppress cytokine storm in severe COVID-19: Can it be a novel therapeutic strategy?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discov Ther	6. 最初と最後の頁 143-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2020.03046	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 Abe N, Toyama H, Ejima Y, Saito K, Tamada T, Yamauchi M, Kazama I.	4. 巻 2020:3214186
2. 論文標題 1-Adrenergic Receptor Blockade by Prazosin Synergistically Stabilizes Rat Peritoneal Mast Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Research International	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/3214186. eCollection 2020	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 Saito K, Abe N, Toyama H, Ejima Y, Yamauchi M, Mushiake H, Kazama I	4. 巻 2019:6261951
2. 論文標題 Second-Generation Histamine H1 Receptor Antagonists Suppress Delayed Rectifier K+-Channel Currents in Murine Thymocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Research International	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6261951. eCollection 2019	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 該当する
1. 著者名 Abe N, Saito K, Toyama H, Ejima Y, Yamauchi M, Mushiake H, Kazama I	4. 巻 2019:7567638
2. 論文標題 Delayed Rectifier K+-Channel Is a Novel Therapeutic Target for Interstitial Renal Fibrosis in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Research International	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7567638. eCollection 2019	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 該当する

1. 著者名 Kon N, Abe N, Miyazaki M, Mushiake 1, Kazama I	4. 巻 80
2. 論文標題 Partial exposure of frog heart to high-potassium solution: an easily reproducible model mimicking ST segment changes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 578-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0010.	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 Hatano R, Takeda A, Abe Y, Kawaguchi K, Kazama I, Matsubara M, Asano S	4. 巻 8
2. 論文標題 Loss of ezrin expression reduced the susceptibility to the glomerular injury in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22846-0	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 Kazama I, Nakajima T	4. 巻 26
2. 論文標題 Acute enterocolitis causing an appendicitis like syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infez Med	6. 最初と最後の頁 176-177
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 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 Gamo S, Tamada T, Murakami K, Muramatsu S, Aritake H, Nara M, Kazama I, Okazaki T, Sugiura H, Ichinose M	4. 巻 103
2. 論文標題 TLR7 agonist attenuates acetylcholine-induced, Ca ²⁺ -dependent ionic currents in swine tracheal submucosal gland cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Physiol	6. 最初と最後の頁 1543-1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/EP087221	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 6) Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Saito K, Yamauchi M, Miura C, Kazama I	4. 巻 22
2. 論文標題 Less Contribution of Mast Cells to the Progression of Renal Fibrosis in Rat Kidneys with Chronic Renal Failure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 159-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22846-0	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 Kazama I, Nakajima T	4. 巻 96
2. 論文標題 Postrenal Acute Kidney Injury in a Patient with Unilateral Ureteral Obstruction Caused by Urolithiasis: A Case Report	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e8381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000008381	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 Kazama I	4. 巻 79
2. 論文標題 High-Calcium Exposure to Frog Heart: A Simple Model Representing Hypercalcemia-induced ECG Abnormalities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.16-0413	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 Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Matsubara M, Saito K, Yamauchi M, Miura C, Kazama I	4. 巻 38
2. 論文標題 Anti-Allergic Drugs Tranilast and Ketotifen Dose-dependently Exert Mast Cell-Stabilizing Properties	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem	6. 最初と最後の頁 15-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000438605.	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 Kazama I, Saito K, Baba A, Mori T, Abe N, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Matsubara M, Yamauchi M	4. 巻 61
2. 論文標題 Clarithromycin Dose-dependently Stabilizes Rat Peritoneal Mast Cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 295-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000445023.	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 Mori T, Abe N, Saito K, Toyama H, Endo Y, Ejima Y, Yamauchi M, Goto M, Mushiake H, Kazama I	4. 巻 68
2. 論文標題 Hydrocortisone and Dexamethasone Dose-dependently Stabilize Mast Cells Derived from Rat Peritoneum	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Pharmacol Rep	6. 最初と最後の頁 1358-1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharep.2016.09.005.	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 ステロイド薬による抗アレルギー作用と電気生理学的手法による定量化
3. 学会等名 2020年度生理学研究所研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 腎不全に合併する腹膜線維化における肥満細胞の関与
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木駿輔、風間逸郎
2. 発表標題 被嚢性腹膜硬化症の病態生理にもとづいた看護的介入
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 抗ヒスタミン薬が有する抗アレルギー作用と電気生理学的手法による定量化
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 腎間質リンパ球Kv1.3チャンネルをターゲットとした腎線維化の抑制
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 薬剤性血小板減少症の病態生理についての電気生理学的検討
3. 学会等名 2018年度生理学研究所研究会『体内環境の維持機構における上皮膜輸送の多角的・統合的理解』
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 Electrophysiological evidence for increased thrombopoiesis in the bone marrow in CRF rat model
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会, FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 リンパ球K ⁺ チャネルの生理的・病的意義の解明と、疾患治療への応用
3. 学会等名 ソルト・サイエンス研究財団・第29回研究助成発表会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 腹膜線維化の病態生理と肥満細胞における電気生理現象
3. 学会等名 2017年度生理学研究所研究会『体内環境の維持機構における上皮膜輸送の多角的・統合的理解』(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近睦章、風間逸郎、宮崎優大、村田喜理、虫明元
2. 発表標題 虚血性心疾患における心電図異常のメカニズム：ウシガエル心臓モデルでの解析
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 末期腎不全ラットにおける腎線維化の進行とリンパ球Kv1.3チャネルの役割
3. 学会等名 第59回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 リンパ球Kv1.3チャネルの機能異常と慢性腎臓病の病態生理への関与
3. 学会等名 2016年度生理学研究所研究会『上皮膜輸送調節蛋白の異常と病態生理学の融合』
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 風間逸郎
2. 発表標題 腎間質免疫系細胞の電気生理現象とCKDにおける病的・治療的意義
3. 学会等名 第110回東京腎生理集談会
4. 発表年 2016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
---------	---------