

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460111

研究課題名(和文) 免疫疾患、癌治療標的分子としての酸感受性カリウムチャネルの制御機構解明

研究課題名(英文) Acid-sensitive K⁺ channels as therapeutic targets for immune diseases and cancers

研究代表者

大矢 進 (Ohya, Susumu)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70275147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、アレルギー性疾患、炎症性疾患の発症や癌悪性化におけるpH感受性カリウムチャネルK2P5.1の病態生理学的役割を明らかにすることである。本研究では、炎症性腸疾患(クローン病、潰瘍性大腸炎)モデルマウスを用いて、K2P5.1阻害により炎症、下痢、血便などの病態が改善することを見出し、炎症性サイトカイン産生の増加にCD4陽性T細胞におけるK2P5.1の発現・活性亢進が関与していることを示唆した。また、K2P5.1の機能不全型スプライスパリアントを単離し、Tリンパ球モデル細胞においてpre-mRNAスプライシング阻害剤がK2P5.1活性を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The two-pore domain K⁺ (K2P) channels are possible therapeutic targets for autoimmune diseases and several cancers. We elucidate the pathological significance of the K2P5.1 K⁺ channel in inflammatory bowel disease (IBD). Significant upregulation of K2P5.1 K⁺ channel were observed in the CD4⁺ T cells of the IBD model. The knockout of K2P5.1 in mice significantly suppressed the disease severity in the IBD model. Additionally, we identified an N-terminus-lacking, novel splicing isoform of K2P5.1 K⁺ channel, K2P5.1B from the human lymphoid tissues. In a heterologous expression system, K2P5.1B inhibited the plasma membrane trafficking of K2P5.1A. The pre-mRNA splicing inhibitor significantly enhanced the expression levels of K2P5.1B in human leukemic K562 cells, resulting in decrease in the K2P5.1 activity. The pre-mRNA splicing mechanism underlying the posttranscriptional regulation of K2P5.1 K⁺ channel may be a new therapeutic strategy for autoimmune diseases and cancers.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：イオンチャネル カリウムチャネル 炎症性腸疾患 Tリンパ球 スプライシング阻害 癌細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) Two-pore domain カリウム (K_{2p}) チャネルファミリーに属する pH 感受性カリウムチャネルは、酸性 pH により活性が抑制される。 $K_{2p3.1}$ (TASK-1)、 $K_{2p5.1}$ (TASK-2)、 $K_{2p9.1}$ (TASK-3) サブタイプにより構成され、 $K_{2p3.1}$ と $K_{2p9.1}$ とは相同性が高く、 $K_{2p5.1}$ は $K_{2p3.1}$ 、 $K_{2p9.1}$ との相同性が比較的低い。 $K_{2p3.1}$ 、 $K_{2p5.1}$ 、 $K_{2p9.1}$ 活性化を介した細胞内カルシウム動員はリンパ球活性化、癌細胞増殖を促進するため、その阻害薬が免疫疾患、癌治療薬として期待されている (Meuth *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008; Patel & Lazdunski, *Pflügers Arch.*, 2004; Enyedi & Czirják, *Physiol. Rev.*, 2010)。最近、自己免疫疾患 (多発性硬化症・関節リウマチ) 患者から採取した T リンパ球の $K_{2p5.1}$ 活性、発現が増大し、それらが病態スコアと相関することが報告され (Bittner *et al.*, *Arthritis. Res. Ther.*, 2011; Bittner *et al.*, *Ann. Neurol.*, 2010)、pH 感受性カリウムチャネルは免疫疾患の治療標的分子として注目されている。しかし、*in vivo* 薬理実験で使用可能な選択的な阻害剤はほとんどなく、病態時における酸感受性カリウムチャネル活性・発現制御の分子機構も明らかにされていない。

(2) 電位依存性カリウムチャネル $K_v1.3$ やカルシウム活性化カリウムチャネル $K_{Ca3.1}$ は、抗原刺激時に免疫シナプス接触面にて様々な分子群と協同してクラスター形成するが、 $K_{2p3.1}$ 、 5.1 、 9.1 では 14-3-3 のような機能促進に関与する分子群が一部明らかになっているものの (Zuzarte *et al.*, *J. Physiol.*, 2009)、活性化 T 細胞やアポトーシス耐性、抗癌剤耐性を獲得した癌細胞における pH 感受性カリウムチャネル活性・発現制御やそのクラスター形成に関わる分子群との複合体形成・機能協同の分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) モデルマウスを用いて、自己免疫疾患の炎症性 T 細胞における pH 感受性カリウムチャネル $K_{2p5.1}$ の病態生理学的意義を解明するとともに、免疫シナプスにおける機能的複合体形成の分子機構・病態的意義を明らかにすることである。乳癌細胞増殖、悪性化における pH 感受性カリウムチャネルの役割とエピジェネティック制御についても明らかにする。また、免疫疾患の発症・進展や癌悪性化 (転移、薬剤耐性) を予防、治療するための pH 感受性カリウムチャネル関連分子の探索を目指す。

3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患モデルマウスの作成 : 6-7 週齢の雄性 C57BL/J マウスに 5% (wt/vol) デキストラン硫酸ナトリウム 5000 (DSS) 含有水を 7 日間自由飲水させた。頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、下痢、血便レベルをスコア化するとともに、脾臓及び大腸を摘出して実験に使用した (Nakakura *et al.*, 2015)。

(2) マウス CD4 陽性細胞の単離 : マウス脾臓を生理溶液に懸濁した後、Dynabeads FlowComp Mouse CD4 Isolation kit を用いて CD4 陽性細胞を単離した。CD4 陽性細胞の割合が 90% 以上であることをフローサイトメーターにより確認した後、得られた細胞を発現解析、機能解析に利用した。 $K_{2p5.1}$ ノックアウトマウス (B6;CB-Kcnk5^{Gt (pU-21) 81Imeg}) は熊本大学生命資源研究・支援センターから購入した。

(3) 膜電位感受性蛍光指示薬 DiBAC₄(3) による膜電位の測定 : 浜松フォトリクス社の ORCA-Flash2.8 digital camera を搭載した蛍光イメージング装置を用いて、膜電位感受性蛍光指示薬 DiBAC₄(3) の蛍光変化を膜電位変化として計測した (Nakakura *et al.*, 2015)。データ収集、解析には HC Image System を用いた。

(4) リアルタイム PCR 実験 : 単離した CD4 陽性 T 細胞から RNA を抽出し、ReverTra Ace™ (東洋紡) と dN6 ランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した。Applied Biosystems リアルタイム PCR システム 7500 を用いて SYBER Green 法により定量的 PCR 実験を行った。単一の PCR 産物が生成していることを解離曲線にて確認し、対象となる転写物の発現量を内在性標準 β -アクチン (ACTB) の発現量に対する比として算出した。

(5) ウェスタンブロットティング法 : 単離した CD4 陽性 T 細胞を可溶化し、タンパク試料を SDS-PAGE (10.0%) により電気泳動し、PVDF 膜に転写した。ブロッキング後、一次抗体として抗 $K_{2p5.1}$ 抗体 (G14 または H170) (Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体として抗ヤギまたはウサギ IgG-HRP 標識抗体で処理し、ECL Advance Western Blotting kit (Amersham Biosciences)、イメージングシステム VersaDoc 5000 を用いて可視化解析した。

(6) 大腸組織の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色 : 摘出した大腸をリン酸緩衝ホルマリン液で 48 時間以上固定した後、脱水、パラフィン包埋し薄切切片をスライドグラスに固定し、脱パラフ

インした。標本を Mayer's hematoxylin solution に浸漬した後に水洗し、エタノール及びキシレンを用いて脱水した。光学顕微鏡観察下 (倍率 x100)、デジタルカメラで拡大像を撮影し、炎症細胞の浸潤度、陰窩障害度をスコア化した (Nakakura et al., 2015)。

(7) 共焦点レーザー顕微鏡を利用した $K_{2p}5.1$ タンパクの細胞内分布の可視化解析: 蛍光タンパク質融合発現ベクター-pECFP 及び pEYFP にそれぞれヒト $K_{2p}5.1A$ 及びヒト $K_{2p}5.1B$ をサブクローニングした。次に、Lipofectamine 2000 を用いてヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後における細胞膜、細胞膜における蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META により観察した (Endo et al., 2015)。

(8) ヒト白血病細胞株 K562 細胞における $K_{2p}5.1A$ 、 $K_{2p}5.1B$ 過剰発現: K562 細胞は、RPMI1640 培地 (10% ウシ胎児血清、抗生物質含有) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。ヒト $K_{2p}5.1A$ 及びヒト $K_{2p}5.1B$ をヒト哺乳動物細胞発現ベクター-pcDNA3.1 (+)/Neo^r にサブクローニングし、エレクトロポレーション装置 NEPA21 またはリポフェクション試薬 Lipofectamine LTX を用いて K562 細胞にトランスフェクションした (Endo et al., 2015)。

※全ての実験は、学内の動物実験委員会、遺伝子組換え委員会において承認された実験計画に従い、実施された。

4. 研究成果

(1) 炎症性腸疾患 IBD モデルマウスにおける $K_{2p}5.1$ カリウムチャネルの病態生理学的意義

DSS 誘発性 IBD モデルマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を単離し、 $K_{2p}5.1$ の mRNA 発現、タンパク発現を検討したところ、正常マウスと比較して $K_{2p}5.1$ 発現量の有意な亢進が見られた。また、アルカリ pH 溶液 (pH8.0, 8.5) で刺激したところ、細胞膜の過分極反応が観察された。また、磁気ビーズ細胞分離キットにより、CD4⁺CD25⁻ (炎症性 T 細胞) 及び CD4⁺CD25⁺ (制御性 T 細胞) サブセットを分取し、 $K_{2p}5.1$ mRNA 発現量を比較したところ、IBD モデルの CD4⁺CD25⁻ 細胞サブセットにおいて $K_{2p}5.1$ が高発現していた。

次に、 $K_{2p}5.1$ ノックアウトマウスを用いて IBD モデルマウスを作成したところ、 $K_{2p}5.1$ ホモ欠損マウスでは下痢、血便症状、大腸肥厚の軽減が観察された。また、HE 染色像から陰窩障害、炎症性細胞浸潤をスコア化して評価したところ、 $K_{2p}5.1$ ホモ欠損マウス (-/-) では両パラメータ

一のスコアが有意に低下した。

(2) $K_{2p}5.1$ N 末端領域欠損スプライスバリエントの単離と pre-mRNA 阻害剤による $K_{2p}5.1$ 発現・活性制御

$K_{2p}5.1$ の PCR クローニングを行ったところ、ヒト脾臓から exon 3 を欠損するスプライスバリエント h $K_{2p}5.1B$ を単離した。h $K_{2p}5.1B$ は、N 末端の細胞膜貫通ドメインを欠失していた。完全長 $K_{2p}5.1A$ と $K_{2p}5.1B$ に蛍光タンパク CFP、YFP をそれぞれ融合させて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を解析したところ、 $K_{2p}5.1B$ は $K_{2p}5.1A$ の細胞膜移行を阻害した。また、内因性に $K_{2p}5.1$ 機能発現するヒト白血病細胞株 K562 細胞に $K_{2p}5.1B$ を過剰発現させたところ、 $K_{2p}5.1$ 活性は有意に抑制された。以上の結果より、 $K_{2p}5.1B$ 発現により、 $K_{2p}5.1$ 活性が抑制されることが示唆され、 $K_{2p}5.1$ の新規阻害機構が見出された。

最近、癌をはじめとするいくつかの疾患において、pre-mRNA スプライシング制御が注目されており、pre-mRNA スプライシング阻害剤が開発されている (Barrie et al., 2012; Singh et al., 2012; Bonnal et al., 2012)。本研究では、K562 細胞を pre-mRNA スプライシング阻害剤 pladienolide B で 4-18 時間処理することにより生じる発現・活性変動を解析した。K562 細胞を 1 μ M Pladienolide B で処置したところ、処置後 4 時間から $K_{2p}5.1B$ 転写が亢進した。また、K562 細胞における $K_{2p}5.1$ 活性は 18-24 時間経過後に有意に抑制された。以上より、pre-mRNA スプライシング阻害剤が間接的に $K_{2p}5.1$ を阻害し、関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性疾患等自己免疫に奏功する可能性が示された。

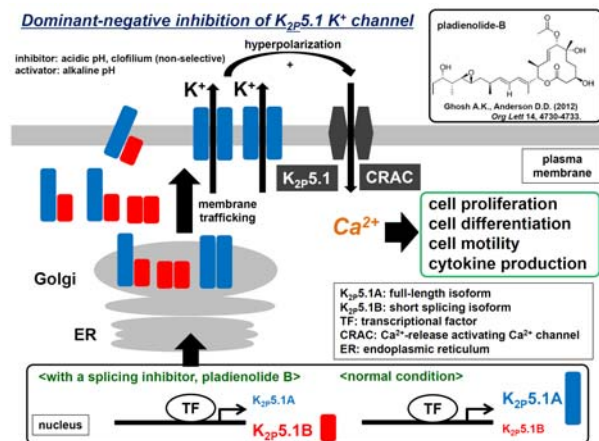


図1. Two-pore 型 K^+ チャネルスプライスバリエントの役割. Graphic Abstract (Endo et al., 2015 から引用)。

(3) まとめと展望

$K_{2p}5.1$ K^+ チャネルは自己免疫疾患、癌の治療標的分子として注目されている (Bittner et al., 2010, 2011; Williams et al., 2013)。本研究課

題では、炎症性腸疾患モデルを用いて、K_{2p}5.1 K⁺チャネルが新規治療標的であることを示唆するとともに、pre-mRNA スプライシング阻害剤がK_{2p}5.1 活性を抑制することを明らかにした。しかし、*in vivo* 投与による pre-mRNA 阻害の K_{2p}5.1 関連疾患の治療効果を検討することが今後の課題である。

本研究課題の目的として「免疫シナプスにおける機能的複合体形成の分子機構・病態的意義の解明」を掲げていた。酵母 Two-hybrid 実験により K_{2p}5.1 と相互作用する炎症関連細胞表面分子の単離に成功し、この分子をノックダウンすると K_{2p}5.1 活性が抑制されることを見出した。また、この分子は乳癌細胞にも比較的高発現しており、乳癌細胞の K_{2p}5.1 活性調節にも関与する可能性がある。現在、この分子による K_{2p}5.1 活性調節の分子機構を解明し、免疫疾患の発症・進展や癌悪性化（転移、薬剤耐性）を予防、治療するための標的分子としての可能性を見出しつつある。

転写後修飾に関わる化合物としてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が開発されている。癌をはじめ炎症性疾患においても HDAC 阻害剤の有効性が報告されており、これら疾患の発症、進展、悪性化にエピジェネティック制御を介したイオンチャネル阻害が関与している可能性がある。本研究成果を基盤として、イオンチャネル発現制御に着目したイオンチャネル創薬の実現に向けてさらに研究を進展させたい。

<引用文献>

- ① Meuth SG, Bittner S, Meuth P, Simon OJ, Budde T, Wiendl H. TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 1 (TASK1) and TASK3 critically influence T lymphocyte effector functions. *J Biol Chem* 283 (2008) 14559-14570.
- ② Patel AJ, Lazdunski M. The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch* 448 (2004) 261-273.
- ③ Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 90 (2010) 559-605.
- ④ Bittner S, Bobak N, Feuchtenberger M, Herrmann AM, Göbel K, Kinne RW, Hansen AJ, Budde T, Kleinschnitz C, Frey O, Tony HP, Wiendl H, Meuth SG. Expression of K_{2p}5.1 potassium channels on CD4⁺ T lymphocytes correlates with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 13 (2011) R21.
- ⑤ Bittner S, Bobak N, Herrmann AM, Göbel K, Meuth P, Höhn KG, Stenner MP, Budde T, Wiendl H, Meuth SG. Upregulation of K_{2p}5.1 potassium channels in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68 (2010) 58-69.
- ⑥ Zuzarte M, Heusser K, Renigunta V, Schlichthörl G, Rinné S, Wischmeyer E, Daut J, Schwappach B, Preisig-Müller R. Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J Physiol* 587 (2009) 929-952.
- ⑦ Endo K, Kurokawa N, Kito H, Nakakura S, Fujii M, Ohya S. Identification of the dominant-negative, splicing isoform of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in lymphoid cells and enhancement of their expression by splicing inhibition. *Biochemical Pharmacology* 98 (2015) 440-452.
- ⑧ Nakakura S, Matsui M, Sato A, Ishii M, Endo K, Muragishi S, Murase M, Kito H, Niguma H, Kurokawa N, Fujii M, Araki M, Araki K, Ohya S. Pathophysiological significance of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in splenic CD4⁺CD25⁻ T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Frontiers in Physiology* 6 (2015) 299.
- ⑨ Barrie ES, Smith RM, Sanford JC, Sadee W. mRNA transcript diversity creates new opportunities for pharmacological intervention. *Mol Pharmacol* 81 (2012) 620-630.
- ⑩ Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* 18 (2012) 472-482.
- ⑪ Bonnal S, Vigevani L, Valcárcel J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov* 11 (2012) 847-859.
- ⑫ Williams S, Bateman A, O' Kelley I. Altered expression of two-pore domain potassium (K2P) channels in cancer. *PLoS One* 8 (2013) e74589.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Susumu Ohya, Hiroaki Kito, Noriyuki Hatano, Katsuhiko Muraki. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression.

Pharmacology & Therapeutics (査読有) 160 (2016) 11-43.

DOI: [10.1016/j.pharmthra.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.pharmthra.2016.02.001)

- ② 大矢 進. Tリンパ球活性制御におけるカリウムチャネルの役割と病態. *薬学雑誌* (査読有) 136 (2016) 479-483.
DOI: [10.1248/yakushi.15-00246-4](https://doi.org/10.1248/yakushi.15-00246-4)
- ③ Kyoko Endo, Natsumi Kurokawa, Hiroaki Kito, Sawa Nakakura, Masanori Fujii, Susumu Ohya. Identification of the dominant-negative, splicing isoform of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in lymphoid cells and enhancement of their expression by splicing inhibition. *Biochemical Pharmacology* (査読有) 98 (2015) 440-452.
DOI: [10.1016/j.bcp.2015.10.002](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.002)
- ④ Sawa Nakakura, Miki Matsui, Aya Sato, Mizuki Ishii, Kyoko Endo, Sayaka Muragishi, Miki Murase, Hiroaki Kito, Hiroki Niguma, Natsumi Kurokawa, Masanori Fujii, Masatake Araki, Kimi Araki, Susumu Ohya. Pathophysiological significance of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in splenic CD4⁺CD25⁻ T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Frontiers in Physiology* (査読有) 6 (2015) 299.
DOI: [10.3389/fphys.2015.00299](https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00299)
- ④ Susumu Ohya, Yuka Fukuyo, Hiroaki Kito, Rina Shibaoka, Miki Matsui, Hiroki Niguma, Yasuhiro Maeda, Hisao Yamamura, Masanori Fujii, Kazunori Kimura, Yuji Imaizumi. Upregulation of K_{Ca}3.1 K⁺ channel in mesenteric lymph node CD4⁺ T lymphocytes from a mouse model of dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* (査読有) 306 (2014) G873-G885.
DOI: [10.1152/ajpgi.00156.2013](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00156.2013)

[学会発表] (計35件)

- ① たぎし和隆, 清水彩夏, 遠藤京子, 鬼頭宏彰, 藤井正徳, 大矢 進. 活性化CD4陽性T細胞におけるスプライシング阻害剤による背景 K⁺チャネル K_{2p}5.1 活性制御. **日本薬学会第136年会**. 2016年3月27日 (横浜)

- ② 遠藤京子, たぎし和隆, 清水彩夏, 鬼頭宏彰, 藤井正徳, 大矢 進. T細胞における pre-mRNA スプライシング阻害剤による背景カリウムチャネル K_{2p}5.1 活性抑制. **第89回日本薬理学会年会**. 2016年3月9日 (横浜)
- ③ 大矢 進. Tリンパ球活性制御におけるカリウムチャネルの役割と病態. **日本薬学会第135年会**. 2015年3月27日 (神戸)
- ④ 佐藤 綾, 中倉佐和, 石井瑞紀, 遠藤京子, 黒川なつ美, 鬼頭宏彰, 丹羽里実, 藤井正徳, 大矢 進. 炎症性腸疾患の脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞における two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 の発現・機能解析. **第88回日本薬理学会年会**. 2015年3月19日 (名古屋)
- ⑤ Kyoko Endo, Natsumi Kurokawa, Sawa Nakakura, Mizuki Ishii, Masanori Fujii, Susumu Ohya. Identification and functional role of the dominant-negative splice variant of pH-sensitive, two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1. **The 45th NIPS International Symposium**. 2014年11月27日 (愛知)
- ⑥ 中倉佐和, 石井瑞紀, 佐藤 綾, 丹羽里実, 藤井正徳, 大矢 進. 炎症性腸疾患モデルマウスの CD4 陽性リンパ球における two-pore 型カリウムチャネル TASK2 (K_{2p}5.1) の発現・機能亢進. **第125回日本薬理学会近畿部会**. 2014年6月20日 (岡山)
- ⑦ 黒川なつ美, 遠藤京子, 石井瑞紀, 中倉佐和, 藤井正徳, 奈邊 健, 大矢 進. 選択的スプライシングによる酸感受性カリウムチャネル TASK2 活性制御. **日本薬学会 第134年会**. 2014年3月30日 (熊本)

[その他]

ホームページ

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大矢 進 (OHYA, Susumu)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 70275147

(2) 研究分担者

藤井正徳 (FUJII, Masanori)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 4043466