

令和元年6月24日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09129

研究課題名(和文)心不全におけるKv1.3およびKCa3.1がエフェクターT細胞分化に果たす役割

研究課題名(英文)The roll of Kv1.3 and KCa3.1 for the differentiation of effector T cells in patients with heart failure

研究代表者

佐藤 加代子 (Sato, Kayoko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20246482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本は超高齢化社会となり、心血管疾患の予後に心不全管理が重要な問題となっている。本研究では、心不全増悪におけるT細胞メモリーを制御するカリウムチャンネルKV1.3およびKCa3.1の関与を検討した。

重症心不全患者では、エフェクターメモリーT細胞(TEM)分化を促すKV1.3の発現と機能が、セントラルメモリーT細胞(TCM)分化を促すKCa3.1に比較して亢進していた。そのため、細胞障害性の強いエフェクターT細胞(Teff) Th1やCD8 CTL T細胞の割合が増え、産生される炎症性サイトカインIFN $\gamma$ やGranzyme Bの増加が生じ、心不全の増悪に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、はじめて心不全の病態増悪に関与するT細胞メモリー機構が明らかとなった。重症心不全では細胞障害性の強いTeffが多く、分化初期段階であるTEM分化に重要なKV1.3の発現と機能亢進が認められた。カリウムチャンネルは多様なサブファミリーを形成するが、KV1.3は免疫細胞に特異的に機能発現しており、KV1.3阻害剤の開発はTEM抑制効果を有するため、安全性の高い創薬標的と期待される。

研究成果の概要(英文)：Japan becomes the super aging society, and heart failure management becomes the important problem for a prognosis of the cardiovascular disease. In this study, we examined contribution of potassium channels KV1.3 and KCa3.1 which controlled a T cell memory in the heart failure exacerbation.

Expression and a function of KV1.3 which promoted effector memory T cells (TEM) differentiation were enhanced more than that of KCa3.1 which promoted central memory T cells (TCM) differentiation in the patients with severe heart failure. Therefore, the ratios of cytotoxic effector T cells (Teff) Th1 and CD8 CTL T cells increased and increase of inflammatory cytokine IFN $\gamma$  and Granzyme B was induced, and, as a result, the exacerbation of heart failure might be occurred.

研究分野：循環器内科学。動脈硬化進展および急性冠症候群・更年期女性・心不全における炎症・免疫学的機序の研究。

キーワード：臨床血管学 心不全 T細胞 免疫記憶 カリウムチャンネル サイトカイン 炎症 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 虚血性心疾患とT細胞

研究代表者らは、これまで活性化したエフェクターT細胞(Teff)が動脈硬化進展や粥腫不安定化にどのように関与しているのか検討してきた。急性冠症候群(ACS)患者のCD4 T細胞および粥腫に浸潤しているCD4 T細胞は、標的細胞である血管平滑筋細胞に、CD3とLFA-1からなる細胞障害性免疫シナプスを形成し、ZAP-70のリン酸化に続きT細胞内Ca濃度が上昇し、引き続き標的細胞内Ca濃度上昇が起こりアポトーシスが誘導される( )。また、これらCD4 T細胞はTRAILを強く発現しており、TRAIL/DR5を介する刺激で血管平滑筋細胞や血管内皮細胞にアポトーシスを誘導し粥腫不安定化に関与する( - )。さらに、不安定粥腫に浸潤している活性化形質細胞様樹状細胞はCCL19、CCL21、INF を産生し、CD40L+活性化CD4+T細胞を近傍に浸潤させ、CD4+T細胞上のTRAIL発現を増強することを明らかとした( 、 )。一方、更年期女性やACS患者では強く活性化したCD4 T細胞上にPSGL-1発現が亢進しており、血管内皮細胞にE-/P-selectinを介し強く接着、責任冠動脈に浸潤、標的細胞にアポトーシスを誘導して粥腫不安定化に関与することも報告した( 、 発表論文5)。

### (2) 心不全とT細胞メモリー機構

虚血性心疾患を背景とする心不全の全死亡は、非虚血性心疾患患者より優位に高いことが知られている。また、本邦の心不全の約3分の1の原因が虚血性心疾患による。したがって、虚血性心疾患発症後に生じる可能性の高い慢性心不全の病態を左右する神経体液性因子の異常を解明し治療介入することは、虚血性心疾患や心不全の予後改善に非常に重要である。心不全患者では、TNF、interleukin(IL)-1、IL-6、interferon(IFN) が上昇しており、心機能障害の増悪に寄与することが報告されているが、T細胞を中心とした獲得免疫の異常については明らかではない。また、心筋のような興奮性細胞では、K<sup>+</sup>チャンネルは静止膜電位の維持や活動電位の再分極相形成に関与し、多様なサブファミリーが存在している。しかし、非興奮性細胞であるリンパ球では、電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルであるKv1.3とCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャンネルであるK<sub>Ca</sub>3.1が特異的に機能発現し、細胞増殖、分化、アポトーシス、遊走の制御に関与している。ヒトにおいてT細胞受容体(TCR)刺激によりT細胞が活性化した際、Kv1.3はエフェクターメモリーT細胞(TEM)で発現亢進し、膜電位やCa<sup>2+</sup>シグナルの制御に寄与する。一方、ナイーブT細胞(TN)やセントラルメモリーT細胞(TCM)ではK<sub>Ca</sub>3.1が発現亢進している( )。また、TCR刺激によりKv1.3とK<sub>Ca</sub>3.1はT細胞と抗原提示細胞の接着面に形成される免疫シナプスにクラスター形成しT細胞の活性化に関連していることが知られている( 、 )。しかし、虚血性心疾患や心不全患者において、静止状態およびTCR刺激後の活性化状態におけるTN、TCM、TEM、およびTeffでのカリウムチャンネルの役割は解明されていない。

## 2. 研究の目的

心不全患者における(1)心不全の重症度とT細胞フェノタイプ、T細胞の免疫記憶(TN、TCM、TEM、Teff)を解析し、T細胞におけるK<sup>+</sup>チャンネル(Kv1.3、K<sub>Ca</sub>3.1)の発現と機能解析を行う。(2)Kv1.3、K<sub>Ca</sub>3.1特異的K<sup>+</sup>チャンネル阻害剤によるT細胞エフェクター機能への影響、およびKv1.3阻害効果を持つアミオダロン(AMD)投与例での獲得免疫への影響と臨床所見の検討を行う。以上の結果より、虚血性心疾患や心不全の病態や予後を評価する新規バイオマーカーの開発および新しい機序の創薬の基盤研究を行う。

## 3. 研究の方法

Teff細胞であるヘルパーT細胞(CD4<sup>+</sup>Th)サブセット、細胞障害性T細胞(CTL)、およびT細胞から産生されるサイトカインが心血管疾患の予後を規定する慢性心不全の病態増悪に寄与しているか調べるため、正常コントロール群と慢性心不全群(虚血性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、弁膜症性心筋症)で以下の検討を行う。慢性心不全患者における、(1)血中液性因子、T細胞サイトカインと臨床所見の検討。(2)免疫記憶(TN、TCM、TEMの発現)とエフェクターT細胞の検討:CD4<sup>+</sup>Thサブセット(Th1、Th2、Th17、Treg)、CD8<sup>+</sup>CTL。(3)TN、TCM、TEM、Teffへの分化・増殖に必要なT細胞の電位依存性K<sup>+</sup>チャンネル(Kv1.3)とCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャンネル(K<sub>Ca</sub>3.1)の発現解析とK<sup>+</sup>チャンネル電流の確認。(4)特異的Kv1.3およびK<sub>Ca</sub>3.1阻害剤のTeffへの影響の検討。

## 4. 研究成果

### (1)慢性心不全における血中液性因子、T細胞サイトカインと臨床所見の検討

正常コントロール末梢血(Cont 群)、心不全患者(HF 群)の末梢血より得た血清中のT細胞性サイトカイン:IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN、TNF、perforin、granzyme B、hsCRPを測定し対比した。また、心不全重症度の指標であるNYHA分類により変化があるか検討した。

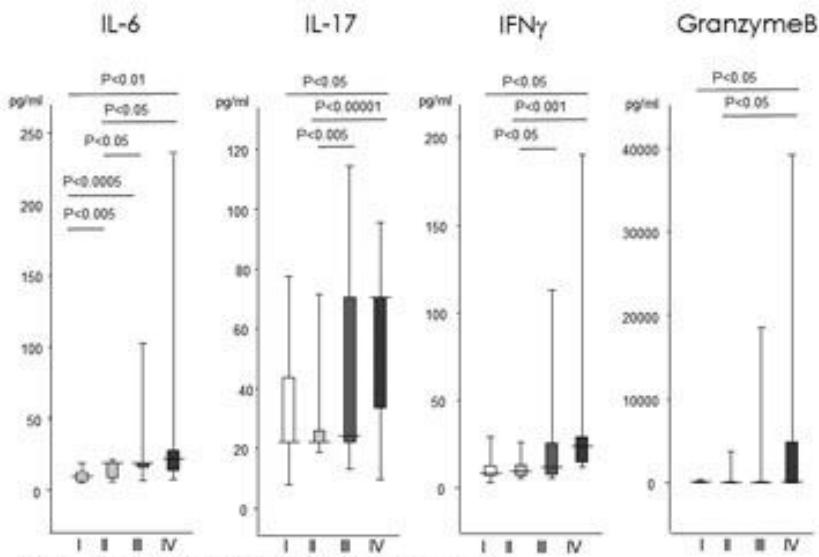


図1. 心不全重症度とT細胞サイトカインレベル

HF群ではCont群に比較してhsCRP (P<0.00001)、炎症性サイトカインIL-6 (P<0.001)、IL-17 (P<0.001)、IFN (P<0.05)が高値であった。さらに、NYHA分類で重症なほど血中サイトカイン上昇を認めた(図1)。すなわち、Teffの活性化、特にTh1、Th17、CD8<sup>+</sup>CTLの活性化が慢性心不全の病態を増悪する体液性因子の一つと考えられた。

(2) 免疫記憶(TN、TCM、TEMの発現)とTeff (Th1、Th2、Th17、Treg、CD8<sup>+</sup>CTL)の検討

Cont群およびHF群より末梢単核球を単離し、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞における免疫記憶の状態をフローサイトメトリーでTN(CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)、TCM(CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、TEM(CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、TEMRA(CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>:Teff)の発現を解析した。また、エフェクター機能を発揮するTeffであるCD4<sup>+</sup>Thサブセット(IFN<sup>+</sup>Th1、IL-4<sup>+</sup>Th2、RoR<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>Th17、Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg)、CTLサブセット(CD4<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup>CTL、CD8<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup>granzymeB<sup>+</sup>CTL)の発現を調べ、心不全で発現の変化を認めるT細胞を検討した。HF群ではCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞ともに活性化しており、TEM(CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、TEMRA(CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>)が増加していた(図2)。また、Th1とTh17、特にCD8<sup>+</sup>CTLの発現亢進を認めた(P<0.05)。すなわち、心不全ではTEMが活性・分化増殖し細部障害性のあるTeffが増え、心不全の病態増悪に関与していると考えられた。

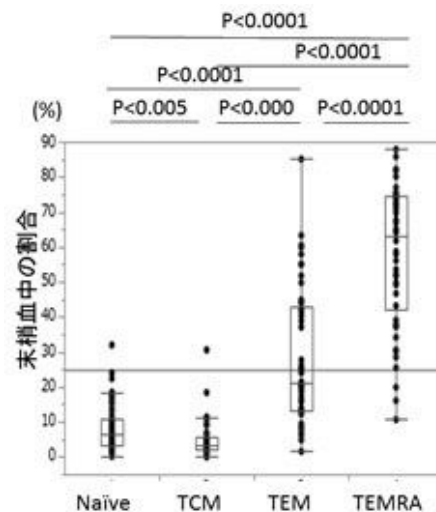


図2. 心不全におけるT細胞メモリー分画

(3) TN、TCM、TEM、Teffへの分化・増殖に必要なT細胞の電位依存性K<sup>+</sup>チャンネル(Kv1.3)とCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャンネル(Kca3.1)の発現解析とK<sup>+</sup>チャンネル電流の確認

ヒトにおいてT細胞静止状態ではKv1.3およびKca3.1は低発現であるが、T細胞受容体(TCR)刺激により活性化状態となるとKv1.3はTEM細胞で発現亢進し、膜電位やCa<sup>2+</sup>シグナルの制御

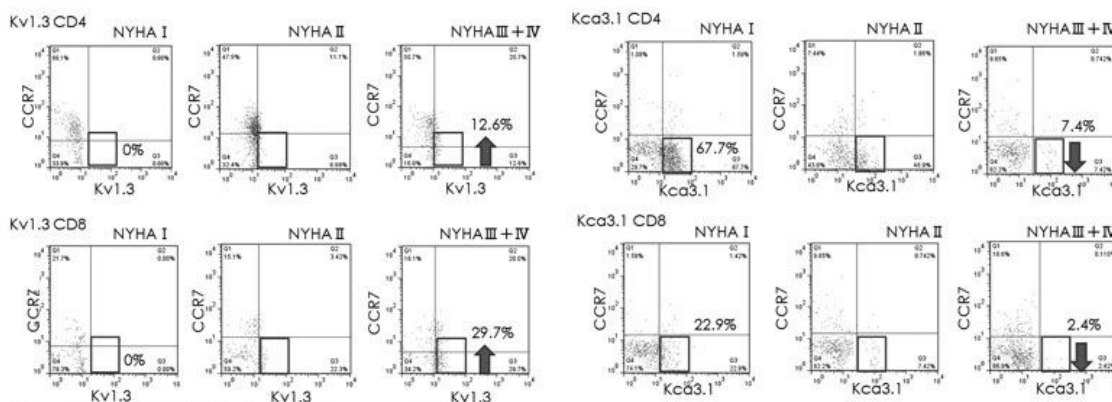


図3. 心不全重症度におけるKv1.3とKca3.1発現

に寄与する。一方、活性化状態の TN や TCM では  $K_{Ca3.1}$  が発現亢進している。そこで、Cont 群と HF 群での TN、TCM、TEM、TEMRA、Teff 上の  $Kv1.3$  および  $K_{Ca3.1}$  発現をフローサイトメトリーで解析し、 $Kv1.3$  および  $K_{Ca3.1}$  の機能はチャンネル電流をパッチクランプ法で解析した。その結果、心不全が重症になるにつれ、TEM、Teff への分化・増殖に重要な  $Kv1.3$  の発現増加が CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともに認められ(図 3)、パッチクランプにて  $Kv1.3$  電流の増加が確認された(図 4)。

(4)  $Kv1.3$  および  $K_{Ca3.1}$  阻害剤の Teff への影響の検討

HF 群で活性化していた T 細胞のエフェクター機能が特異的  $Kv1.3$  および  $K_{Ca3.1}$  阻害剤で抑制されるか調べるために、HF 群と Cont 群より単離した末梢単核球に特異的  $Kv1.3$  である PAP-1、または  $K_{Ca3.1}$  阻害剤または TRAM-34 を処理後、TCR 刺激を加え、 $CD4^+$ Th サブセット、 $CD8^+$ サブセットの発現を検討した。その結果、PAP-1 処理により、Th1 および  $CD8^+$ CTL の発現低下を認めた( $P<0.05$ )。一方、臨床で抗不整脈剤として使用されているアミオダロン(AMD)は  $Kv1.4$ 、 $Kv1.5$ 、

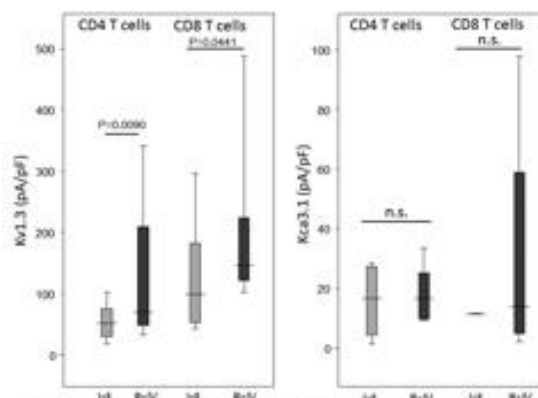


図 4. 心不全重症度における  $Kv1.3$  と  $K_{Ca3.1}$  電流

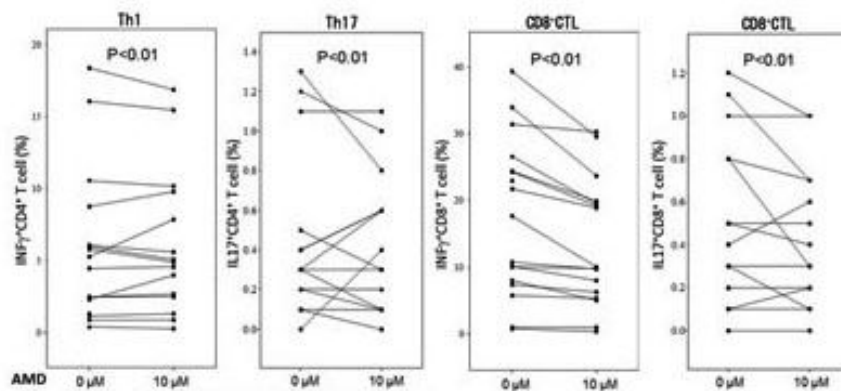


図 5. アミオダロンによるエフェクター T 細胞抑制

AMD で血中 BNP、IL-6 の低下、in vitro で Th1、Th17、 $CD8^+$ CTL 発現減少を認めた(図 5)。

心不全の病態では重症になるほど、T 細胞活性化と  $Kv1.3$  発現および機能亢進が生じている。その結果、T 細胞メモリーが TCM から TEM にシフトし、炎症や細胞障害の強い Th1、Th17、 $CD8^+$ CTL の Teff 分化が進むことが明らかとなった。 $Kv1.3$  阻害により、心不全増悪をもたらす T 細胞の抑制が確認された。今後、虚血性拡張型心筋症、肥大型心筋症の拡張相、治療抵抗性心筋症患者において  $K^+$ チャンネルの異常が認められるのかを明らかにするため、 $Kv1.3$  および  $K_{Ca3.1}$  の SNP 解析や心筋生検組織を調べ、新たな心不全のバイオマーカーおよび  $Kv1.3$  阻害剤の創薬の基盤研究を継続発展する。

#### < 参考文献 >

- T-cell Recognition and Killing of Vascular Smooth Muscle Cells in Acute Coronary Syndrome. Pryshchep S, Sato K, Goronzy JJ, Weyand CM, Circ Res, 98: 1168-1176, 2006.
- TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque. Sato, K, Niesser A, Kopecky, SL., Frye, RL., Goronzy, JJ, Weyand, CM, J Exp Med, 203(1):239-50, 2006.
- Pathogen-sensing Plasmacytoid Dendritic Cells Stimulate Cytotoxic T-Cell Function in the Atherosclerotic Plaque through Interferon-. Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM, Circulation, 114(23):2482-9, 2006.
- Statins reduce endothelial cell apoptosis via inhibition of TRAIL expression on activated CD4 T cells in acute coronary syndrome. Sato K, Nuki T, Gomita K, Weyand CM, Hagiwara N, Atherosclerosis, 213(1):33-39, 2010.
- Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque., Erbel C, Sato K, Merver FB, Kopecky SL., Frye RL., Goronzy JJ, Weyand CM, Basic Res Cardiol, 102(2):123-32, 2007.

$Kv11.1$ 、 $Kv4$ 、 $Kv7$ 、 $KCNJ$  に加え  $Kv1.3$  抑制効果があることが知られている。臨床で AMD が抗不整脈効果に加え心機能や心不全予後改善効果が報告されており、不整脈のある心不全患者で AMD 投与前後の Teff への影響と臨床効果を解析した。

PSGL-1-expressing CD4 T cells induce endothelial cell apoptosis in perimenopausal women. Gomita K, Sato K, Yoshida M, Hagiwara N, Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 19(3):227-236, 2012.

Wulff H, Calabresi PA, Allie R et al: The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. J Clin Invest 111: 1703-1713, 2003.

Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases.

Beeton C, Wulff H, Standifer NE et al: Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17414-17419, 2006.

Nicolaou SA, Neumeier L, Peng Y et al: The Ca(2+)-activated K(+) channel KCa3.1 compartmentalizes in the immunological synapse of human T lymphocytes. Am J Physiol Cell Physiol 292: C1431-1439, 2007.

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) signaling in T cells contributes atherosclerotic development and albuminuria via podocyte dysfunction. Kayoko SATO, Atsushi SUZUKI, Kenta UTO, Nobuhisa HAGIWARA, Annual Report of the Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease, 32, 13-19, 2018.
2. Impact of Recurrent Ventricular Tachyarrhythmia on Outcome in Japanese Heart Transplant Candidates With a Left Ventricular Assist Device. Hattori Hidetoshi, Suzuki Atsushi, Shiga Tsuyoshi, Nishinaka Tomohiro, Saito Satoshi, Yamazaki Kenji, Nunoda Shinichi, Hagiwara Nobuhisa, Circulation Journal, 82 2305-2310, 2018, DOI:10.1253/circj.CJ-18-0294
3. Effects of Intravenous Landiolol on Heart Rate and Outcomes in Patients with Atrial Tachyarrhythmias and Acute Decompensated Heart Failure: A Single-Center Experience. Matsui Yuko, Suzuki Atsushi, Shiga Tsuyoshi, Arai Kotaro, Hagiwara Nobuhisa, Drugs - Real World Outcomes, 6, 19-26, 2019. DOI: 10.1007/s40801-019-0149-1
4. PSGL-1 expressing CD4 T cells contribute plaque instability in acute coronary syndrome. Kazutaka Kitamura, Kayoko Sato, Motoji Sawabe, Masayuki Yoshida, Nobuhisa Hagiwara, Circulation Journal, 82(8),2028-2135,2018.
5. The Role of IL17 and IL17+Th17 in the Atherosclerotic Development and renal dysfunction. Kayoko SATO, Atsushi SUZUKI, Kazutaka KITAMURA, Kenta UTO, Nobuhisa HAGIWARA, Annual Report of the Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease, 31, 19-24, 2017.
6. Oxidative stress-responsive apoptosis inducing protein (ORAIP) plays a critical role in the cardiac injury in patients with heart failure. Tanaka K, Yao T, Sato K, Okumura K, Seko Y, Annals of Pharmacology and Pharmaceutics, 19(2), 1100-1101, 2017.
7. Regional myocardial damage and active inflammation in patients with cardiac sarcoidosis detected by non-invasive multi-modal imaging. Kataoka S, Momose M, Fukushima K, Serizawa N, Suzuki A, Kondo C, Abe K, Sakai S, Hagiwara N, Ann Nucl Med, 31, 135-143, 2017. DOI: 10.1007/s12149-016-1136-1
8. The Role of IL17 and IL17+Th17 in the Atherosclerotic Development. Kayoko SATO, Atsushi SUZUKI, Kazutaka KITAMURA, Nobuhisa HAGIWARA, Annual Report of the Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease: 30, 23-28, 2016.
9. THE ROLE OF PSGL-1-EXPRESSING CD4 T CELLS IN THE ATHEROSCLEROTIC DEVELOPMENT AND

PLAQUE INSTABILITY. Kayoko SATO, Kazutaka KITAMURA, Atsushi SUZUKI, Nobuhisa HAGIWARA, Annual Report of the Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease: 29, 23-27, 2015.

10. Sudden cardiac arrest secondary to cardiac amyloidosis in a young woman with cryopyrin-associated periodic syndrome. Keiko Endo, Atsushi Suzuki, Kayoko Sato, Tsuyoshi Shiga, BMJ Case Reports, 2015. DOI:10.1136/bcr-2015-209468

〔学会発表〕(計6件)

1. Relation between Effector Memory T cells with Activation of Kv1.3 and Severity of Heart Failure. Hidekimi Nomura, Kayoko Sato, Atsushi Suzuki, Yasutaka Imamura, Junya Matsuura, Haruki Sekiguchi, Akiko Sakai, Tsuyoshi Shiga, Nobuhisa Hagiwara, 第83回日本循環器学会学術集会, 2019.
2. Activation of Effector Memory and Effector T Cells in Patients with Heart Failure. Tatsuro Iida, Kayoko Sato, Atsushi Suzuki, Tsuyoshi Shiga, Nobuhisa Hagiwara, 第81回日本循環器学会総会, 2017.
3. 心不全におけるエフェクターメモリーT細胞の活性化:Activation of Effector Memory T Cells in Patients with Heart Failure. Kayoko Sato, Tatsuro Iida, Atsushi Suzuki, Tsuyoshi Shiga, Nobuhisa Hagiwara, 第33回 ISHR 日本部会総会, 2016.
4. The roll of potassium channel on T cells for effector memory and effector T Cells in patients with heart failure. Kayoko Sato, Kazutaka Kitamura, Atsushi Suzuki, Tsuyoshi Shiga, Nobuhisa Hagiwara, 第45回日本免疫学会学術集会, 2016.
5. Activation of Central Effector Memory and Effector T Cells in Patients with Heart Failure. Tatsuro Iida, Kayoko Sato, Kitamura Kazutaka, He Yun-chi, Keigo Kanbayashi, Atsushi Suzuki, Tsuyoshi Shiga, Nobuhisa Hagiwara, 第80回日本循環器学会総会, 2016.
6. 心不全における免疫異常の検討. 佐藤加代子, 第31回吉岡弥生記念講演会(東京女子医科大学学会), 2015.

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 鈴木 敦

ローマ字氏名: (SUZUKI, atsushi)

所属研究機関名: 東京女子医科大学

部局名: 循環器内科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00625626

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 萩原 誠久

ローマ字氏名: (HAGIWARA, nobuhisa)

研究協力者氏名: 西井 明子

ローマ字氏名: (NISHII, akiko)

研究協力者氏名: 喜多村 一考

ローマ字氏名: (KITAMURA, kazutaka)

研究協力者氏名: 志賀 剛

ローマ字氏名: (SHIGA, tsuyoshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。