

氏名 (生年月日) ^{えん どう きょう こ} 遠藤京子 (1992年1月12日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬第185号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 炎症性腸疾患モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞における two-pore 型カリウムチャンネル $K_{2p}5.1$ 活性化の分子機構解明

論文審査委員 (主査) 教授 田中 智之

(副査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 加藤 伸一

論文内容の要旨

序章

T 細胞において、カリウム (K^+) チャンネルは、カルシウム (Ca^{2+}) シグナルや細胞容量を調整することを通じて、細胞増殖、分化、アポトーシス、遊走、遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。 K^+ チャンネルは、イオンチャンネルの中でも最も多様なサブタイプ (100 以上) により構成されており、免疫系細胞では、電位依存性 K^+ チャンネル、 $K_v1.3$ と Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル、 $K_{Ca}3.1$ が主に機能発現している。現在、自己免疫疾患やアレルギー性疾患の治療薬として、 K^+ チャンネル阻害薬が注目されている。

Two-pore 型 K^+ (K_{2p}) チャンネルは、4 回膜貫通型構造を有し、二量体として機能発現する K^+ チャンネルであり、静止膜電位の形成、維持に重要な役割を果たす。デキストラン硫酸ナトリウム誘発性炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞では、 K_{2p} サブタイプのひとつである $K_{2p}5.1$ の発現、及び活性が亢進しており、その結果、炎症性サイトカインの産生が促進されることが明らかとなっている。 $K_{2p}5.1$ の活性制御機構に関しては未だ不明な点が残されており、その解明は、IBD に対する新たな治療法の開発につながる可能性がある。

本研究では、リンパ組織を対象に $K_{2p}5.1$ 遺伝子をクローニングし、mRNA スプライシングを介する活性制御機構の可能性を検討した。また、炎症時の低酸素環境に着目し、低酸素環境で活性化される転写因子 HIF による $K_{2p}5.1$ の発現制御機構について検討を行った。

第1章 $K_{2p}5.1$ スプライズバリエーションの同定及び活性機能への影響

リンパ組織 (脾臓、胸腺、腸間膜リンパ節) を対象とした $K_{2p}5.1$ 遺伝子のクローニングにより、ヒトおよびマウスにおいて、新規 $K_{2p}5.1$ スプライズバリエーション ($K_{2p}5.1B$) を単離した。 $K_{2p}5.1B$ は、N 末端側の膜貫通部位を大部分欠損するが、二量体形成に関与する C 末端側は保持していることが推定された。シアン蛍光タンパク (CFP) とイエロー蛍光タンパク (YFP) をそれぞれ融合発現する CFP- $K_{2p}5.1A$ (完全長) と YFP- $K_{2p}5.1B$ のプラスミドベクターを作成し、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に単独発現または共発現させ、各蛍光タンパクの細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で解析した結果、CFP- $K_{2p}5.1A$ 単独発現では、CFP が細胞膜に局在したが、YFP- $K_{2p}5.1B$ の共発現により CFP- $K_{2p}5.1A$ の細胞膜への移行が阻害された。高い $K_{2p}5.1$ 活性を有するヒト白血病細胞株 K562 細胞

株に K_{2p}5.1B を過剰発現させたところ、K_{2p}5.1 活性を評価するアルカリ pH 誘発性過分極反応とそれに伴う細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、有意に減少した。以上の結果より、N 末端欠損 K_{2p}5.1 スプライスバリエント K_{2p}5.1B は、K_{2p}5.1A と二量体を形成して K_{2p}5.1A の細胞膜移行を阻害するという、K_{2p}5.1 活性制御の新規機構を発見した。現在のところ、K_{2p}5.1 の選択的かつ強力な阻害薬は開発されていない。そこで、pre-mRNA スプライシング阻害薬による K_{2p}5.1 発現・活性制御について検討した。K562 細胞を 1 μM pladienolide B (PB) で処置したところ、K_{2p}5.1B 発現の亢進に伴い、K_{2p}5.1 活性が減少した。また、活性化マウス脾臓細胞を 1 μM PB で処置したところ、同様に K_{2p}5.1 活性が減少した。したがって、pre-mRNA スプライシング阻害薬により K_{2p}5.1B 発現が亢進し、K_{2p}5.1 活性が抑制されることが示唆された。

第2章 炎症性腸疾患モデルマウスの CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現亢進機構

マウス脾臓から単離した CD4 陽性 T 細胞における HIF の発現を解析したところ、IBD モデルにおいて HIF-1α の発現亢進が観察された。コンカナバリン A 刺激したマウス脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を、低酸素 (1.5% O₂) に 24 時間曝露したところ、正常酸素 (20.8% O₂) 群と比較して K_{2p}5.1 発現が亢進した。膜電位の蛍光イメージング解析により、低酸素曝露群ではアルカリ pH 誘発性過分極反応が有意に増大しており、K_{2p}5.1 活性が上昇していた。低酸素曝露による K_{2p}5.1 転写亢進は、活性化マウス胸腺細胞やマウス T 細胞株 CTLL-2 においても観察された。次に、低酸素曝露時に HIF 阻害剤 FM19G11 (1 μM) で処置したところ、CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 転写亢進は抑制され、K_{2p}5.1 活性化が阻害された。一方、選択的 HIF-2α 阻害剤 HIF-2 antagonist 2 (10 μM) の処置は K_{2p}5.1 発現・活性に影響を及ぼさなかった。以上より、HIF-1α により K_{2p}5.1 転写が制御されることが示唆された。

低酸素シグナルを介した転写調節は、エピジェネティック制御や翻訳後修飾の影響を受けることが知られている。また、IBD 患者や IBD モデルにおいてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC/SIRT) 発現・活性が変動し、HDAC 阻害薬により IBD 症状が改善することが報告されている。最近我々は、K_{Ca}3.1 転写が HDAC 阻害により減少することを報告した。しかし、マウス脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を HDAC 阻害薬 vorinostat (1 μM) や SIRT-1/2 阻害薬 NCO-01 (50 μM) で 24 時間処置したが、K_{2p}5.1 発現への影響はほとんど見られなかった。

以上の結果及び K_{2p}5.1 は 5'非翻訳領域に hypoxia response element (HRE) を有していることから、K_{2p}5.1 転写亢進には HDAC/SIRT を介したエピジェネティック制御ではなく、主に HIF-1 複合体の HRE への結合が関与することが考えられる。

総括

本研究では、CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 の発現・活性制御機構の解明を目的として、リンパ組織から新規 K_{2p}5.1 スプライスバリエント K_{2p}5.1B を分子同定し、K_{2p}5.1B が完全長 K_{2p}5.1A の細胞膜移行を阻害するドミナントネガティブ体として、チャネル活性を負に制御することを明らかにした。興味深いことに、pre-mRNA スプライシング阻害薬は、K_{2p}5.1B 発現を亢進させ、K_{2p}5.1 活性を抑制した。また、低酸素曝露による HIF-1 シグナル活性化により、K_{2p}5.1 の活性が転写レベルで増大することを明らかにした。本研究で得られた K_{2p}5.1 阻害機構を利用することにより、IBD をはじめとする自己免疫疾患の新規薬物治療戦略を考案、検証することが今後の課題である。

審査の結果の要旨

【緒言】

カリウム(K⁺)チャネルには多様なサブタイプがあるが、それらには未だ生理的機能が明らかではないものも数多く残されている。そうした K⁺チャネルのひとつである Two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 に関しては、炎症性腸疾患モデルを用いた検討から、CD4 陽性 T 細胞において誘導されること、また K_{2p}5.1 遺伝子を欠損するマウスでは炎症病態が改善することが明らかとなった。このことは、K_{2p}5.1 が炎症性腸疾患の新たな治療法の標的となることを示している。一方で、K_{2p}5.1 の活性制御機構についてはほとんど知見がないことから、本研究では、K_{2p}5.1 の発現およびチャネル活性の制御機構を明らかにすることを目的として、リンパ組織を対象にヒトおよびマウスの K_{2p}5.1 遺伝子をクローニングした。また、炎症時に認められる低酸素環境に着目し、低酸素環境で活性化される転写因子 HIF による K_{2p}5.1 の発現制御機構について検討を行った。

【審査結果】

第1章では申請者はリンパ組織より K_{2p}5.1 遺伝子をクローニングし、ヒトおよびマウスにおいてスプライシングバリエントである K_{2p}5.1B の発現を見出した。K_{2p}5.1B は一部が欠失するバリエントであるが、発現系における検討より全長の K_{2p}5.1 とヘテロ二量体を形成すること、またその結果、形質膜への輸送が抑制され、結果としてチャネル活性が低下することが示唆された。Pre-mRNA スプライシング阻害薬である pladienolide B の処理はバリエントフォームを増加させ、このときチャネル活性も低下した。このことは、mRNA スプライシングにより生じる K_{2p}5.1B がチャネル活性を負に制御するバリエントであることを示唆している。主査および副査からは、ヒトバリエントにおける翻訳開始点の推測の妥当性、および発現実験におけるコンストラクト作成に関する説明の不備が指摘された。

第2章では炎症性腸疾患モデルにおける K_{2p}5.1 の発現誘導のメカニズムが検討され、低酸素条件下で活性化される転写因子である HIF-1 が関与することが示唆された。一方でヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬である vorinostat にはほとんど作用が認められず、エピジェネティックなゲノムの修飾は K_{2p}5.1 の発現誘導には関わらないことが示唆された。副査からは、K_{2p}5.1 の発現レベルの変化がサイトカイン産生のような CD4 陽性 T 細胞の機能にどの程度影響を与えるかが不明であること、また HIF-1 による転写亢進は低酸素条件とリンクしているのかといった点について指摘があった。

主査および副査からの質疑に対して申請者は本論文に複数の追加の記述を加えることによって対応した。一方で、さらなる実験が必要と考えられた課題については、現有するデータや過去の文献を用いて推測することが可能な範囲で対応し、データに対して過剰な本文中の表現はこれを修正した。

【結論】

本研究の新規性は、発現レベルおよび活性調節機構に関する知見の乏しい K⁺チャネルサブタイプのひとつである K_{2p}5.1 に着目し、選択的スプライシングを介して生じるバリエントがチャネルの活性を負に制御する因子であることを明らかにしたこと、また転写レベルの制御には低酸素条件下で活性化する転写調節因子のひとつである HIF-1 が関与することを、分子生物学および細胞生物学の手法を駆使して見出したことである。K_{2p}5.1 の分子レベルでの活性制御が炎症性疾患の病態形成とどのように関連するかは今後の研究の展開に委ねられることとなったが、K⁺チャネルの新たな活性制御機構の発見として意義のある研究成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。