

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 型カリウムチャネル K_{2p}5.1 活性化の分子機構解明

2019 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】薬理学分野

遠藤 京子

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 : 遠藤 京子 (Kyoko Endo)
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

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 (Ca²⁺) 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 Ca²⁺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 スプライズバリエント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 スプライズバリエント (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 スプライズバリエント 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、チャン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。

本論文は、以下の報告内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。

1. Kyoko Endo, Natsumi Kurokawa, Hiroaki Kito, Sawa Nakakura, Masanori Fujii, Susumu Ohya. Molecular identification of the dominant-negative, splicing isoform of the two-pore domain K⁺ channel K_{2P}5.1 in lymphoid cells and enhancement of its expression by splicing inhibition. *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452. [第1章]
2. Kazutaka Tagishi, Ayaka Shimizu, Kyoko Endo, Hiroaki Kito, Satomi Niwa, Masanori Fujii, Suumu Ohya. Defective splicing of the background K⁺ channel K_{2P}5.1 by the pre-mRNA splicing inhibitor, pladienolide B in lectin-activated mouse splenic CD4⁺ T cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **2016**, 132, 205-209. [第1章]
3. Kyoko Endo, Hiroaki Kito, Ryo Tanaka, Junko Kajikuri, Satoshi Tanaka, Elghareeb E. Elboray, Takayoshi Suzuki, Susumu Ohya. Possible contribution of inflammation-associated hypoxia to increased K_{2P}5.1 K⁺ channel expression in CD4⁺ T cells of the mouse model for inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 38 [第2章]

目次

序論	1
1. 自己免疫疾患	1
2. カリウムチャネルの機能	1
3. T細胞におけるカリウムチャネル	2
4. two-pore型カリウムチャネル	3
5. 自己免疫疾患における K _{2p} 5.1 チャネル	4
6. 本研究の目的	5
第1章 K_{2p}5.1 スプライスバリエントの同定及び活性機能への影響	6
第1節 緒言	6
第2節 実験材料及び方法	8
1. 細胞培養	8
2. 溶液組成	8
3. 実験動物	8
4. 使用薬物	8
5. マウス脾臓細胞培養	9
6. RNA抽出、逆転写反応及びリアルタイムPCR	9
7. PCR及びアガロースゲル電気泳動、シーケンス解析	10
8. プラスミドベクター作製	10
9. 免疫沈降及びウェスタンブロッティング	11
10. 遺伝子移入	11
11. 細胞内分布	12
12. 細胞膜電位及び細胞内カルシウム濃度測定	12
13. 免疫化学染色	12
14. ダブルチミジンブロック	12
15. 細胞増殖能	13
16. 統計解析	13
第3節 結果	14
1. K _{2p} 5.1 スプライスバリエント K _{2p} 5.1Bの同定及び組織分布	14
2. HEK293発現系における K _{2p} 5.1A/Bの細胞内分布	20
3. K562細胞における K _{2p} 5.1B過剰発現による K _{2p} 5.1活性への影響	23
4. 細胞周期に対する K _{2p} 5.1の寄与及び細胞増殖能に対する K _{2p} 5.1Bの影響	25
5. スプライソソーム阻害剤による K _{2p} 5.1B発現及び K _{2p} 5.1活性への影響	28

6. マウス CD4 陽性 T 細胞における pladienolide B による K _{2p} 5.1 発現・活性への影響.....	31
第 4 節 考察.....	32
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	36
第 1 節 緒言.....	36
第 2 節 実験材料及び方法.....	39
1. 溶液組成.....	39
2. 実験動物.....	39
3. 使用薬物.....	40
4. DSS 誘発性炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウスの作製及び脾臓細胞の回収	40
5. 細胞培養.....	40
6. RNA 抽出、逆転写反応およびリアルタイム PCR.....	41
7. ウェスタンブロッティング.....	42
8. 細胞膜電位測定.....	42
9. 統計解析.....	43
第 3 節 結果.....	44
1. DSS 誘発性 IBD モデルマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞における HIF-1 α 発現.....	44
2. マウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞における低酸素 (1.5% O ₂) 曝露による K _{2p} 5.1 発現・活性変動.....	46
3. CD4 陽性 T 細胞における K _{2p} 5.1 発現・活性に対する HIF 阻害剤の影響.....	50
4. IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が K _{2p} 5.1 発現・活性に及ぼす影響.....	52
5. IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞及び低酸素曝露 T 細胞における K _{2p} 5.1 補償の関与.....	53
第 4 節 考察.....	56
総括.....	59
引用文献.....	60
謝辞.....	67

略語表

ACTB	β -actin
ANOVA	analysis of variance
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFP	cyan fluorescent protein
con-A	concanavalin-A
CRAC	Ca ²⁺ -release activated Ca ²⁺
DSS	dextran sulfate sodium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	fecal calf serum
FIH	factor-inhibiting HIF
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
HER	hypoxia response element
HIF	hypoxia-inducible factor
hr	hour(s)
IBD	inflammatory bowel disease
IFN	interferon
IL	interleukin
K _{2P}	two-pore domain K ⁺ (channel)
K _{Ca}	Ca ²⁺ -activated K ⁺ (channel)
kDa	kilodaltons
Kir	inward rectifying K ⁺ (channel)
Kv	voltage-gated K ⁺ (channel)
min	minute(s)
MS	multiple sclerosis
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide
NGS	normal goat serum
PB	pladienolide B
PVDF	polyvinylidene difluoride
PFA	paraformaldehyde
PI	propidium iodide
PHD	prolyl hydroxylase
RA	rheumatoid arthritis
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate

sec	second(s)
SEM	standard error of the mean
SIRT	sirtuin
SOCS	suppressor of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription
TASK	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ (channel)
TALK	TWIK-related alkaline-pH-activated K ⁺ (channel)
TEM	effector memory T (cell)
Th	helper T (cell)
THIK	tandem pore domain halotane-inhibited K ⁺ (channel)
T _{reg}	regulatory T (cell)
TREK	TWIK-related K ⁺ (channel)
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ (channel)
TRP	transient receptor potential
TWIK	tandem of pore domain in a weak inwardly-rectifying K ⁺ (channel)
VDCC	voltage dependent Ca ²⁺ (channel)
YFP	yellow fluorescent protein

序論

1. 自己免疫疾患

正常では自己成分に対して免疫反応を示さない（免疫寛容）が、何らかの原因で崩れ、免疫系が自己抗原と非自己抗原を識別できなくなると、自己の正常な細胞や組織を攻撃する自己免疫反応が起こり、これが続くと慢性的に炎症が起こる [1,2]。自己免疫疾患として挙げられる疾患は 100 近く存在し、その患者数は世界中の 3~5%程度といわれている。また、疫学研究より、主に先進国でその頻度が増加している。これらの自己免疫疾患の病因として遺伝的要因や環境要因が考えられているが、未だ不明な点が多い [3,4]。そのため、自己免疫疾患の根治的治療薬は未だ存在せず、主な治療法は免疫抑制薬を用いた免疫異常の是正や対症療法的に症状を抑制することしかできない現状である。

潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は、大腸及び小腸の粘膜に慢性の炎症や潰瘍を引き起こす原因不明の疾患であり、自己免疫疾患の一つであると考えられている。日本において、これらの疾患は厚生労働省の指定難病となっており、2013 年度の統計では、潰瘍性大腸炎患者数は約 17 万人、クローン病患者数は約 4 万人であり、現在に至るまで増加している。IBD の主な症状としては下痢や血便、腹痛などが挙げられる。病因は明らかになっていないが、遺伝的要因、環境的要因、微生物学的要因の関与や、リンパ球などの免疫反応が過剰に反応することで発症、増悪に至ると考えられている。治療には、栄養療法や食事療法による消化管病変の改善の他、内科治療として、腸の炎症を抑えることを目的とした 5-アミノサリチル酸製剤であるサラゾスルファピリジンや副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬などが用いられている。近年、抗 TNF- α 抗体をはじめとする抗体製剤の登場により、IBD の治療は大きく進歩した [5,6,7]。しかし、副作用や治療抵抗例なども報告されており、さらなる治療オプションが必要である。

2. カリウムチャネルの機能

イオンチャネルは、細胞膜を貫通し、イオンを選択的に透過する膜タンパクである。イオンチャネルのうち、カリウムチャネルは主に細胞の膜電位の調節を介して細胞内カルシウム濃度制御に寄与している。神経細胞や心筋、平滑筋といった興奮性細胞において、カリウムチャネルが活性化し、細胞外へカリウムが流出することで引き起こされる細胞膜の再分極（過分極）反応により、興奮性細胞において主に寄与する電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent Ca^{2+} channel, VDCC) の活性を抑制するため、膜電位を静止状態に維持し、活動電位の発火頻度を減少させる (Fig. 1A) [8-10]。一方、T 細胞をはじめとする免疫細胞やがん細胞などの非興奮性細胞では、VDCC ではなく電位非依存性カルシウムチャネルである transient

receptor potential (TRP) チャンネル及びカルシウム遊離活性化カルシウム (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} , CRAC) チャンネルがカルシウム流入に主に寄与するため、カリウムチャンネルの活性化による細胞膜の過分極反応は、電位非依存性カルシウムチャンネルの電氣的駆動力を増大して細胞内カルシウム流入を促進する。そのため、非興奮性細胞において、カリウムチャンネルの活性化は細胞内カルシウムシグナルの活性化を引き起こし、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、細胞遊走、遺伝子発現など様々な細胞機能の亢進を引き起こす (Fig. 1B) [10-12]。実際に Guéguinou らは、細胞膜電位と細胞内カルシウム濃度の同時測定により、細胞膜電位の低下（再分極、過分極反応）時に、興奮性細胞では細胞内カルシウム濃度が減少し、非興奮性細胞では細胞内カルシウム濃度が増加することを示している [10]。

イオンチャンネルの中でもカリウムチャンネルは 100 以上の最も多様なサブタイプにより構成されており、他のイオンチャンネルと比べて組織特異的に発現している [13]。そのため、疾患治療において、カルシウムチャンネルを標的とした薬剤よりも、カリウムチャンネルを標的とした薬剤の方が他の臓器への副作用が少ない薬物治療が期待できる。

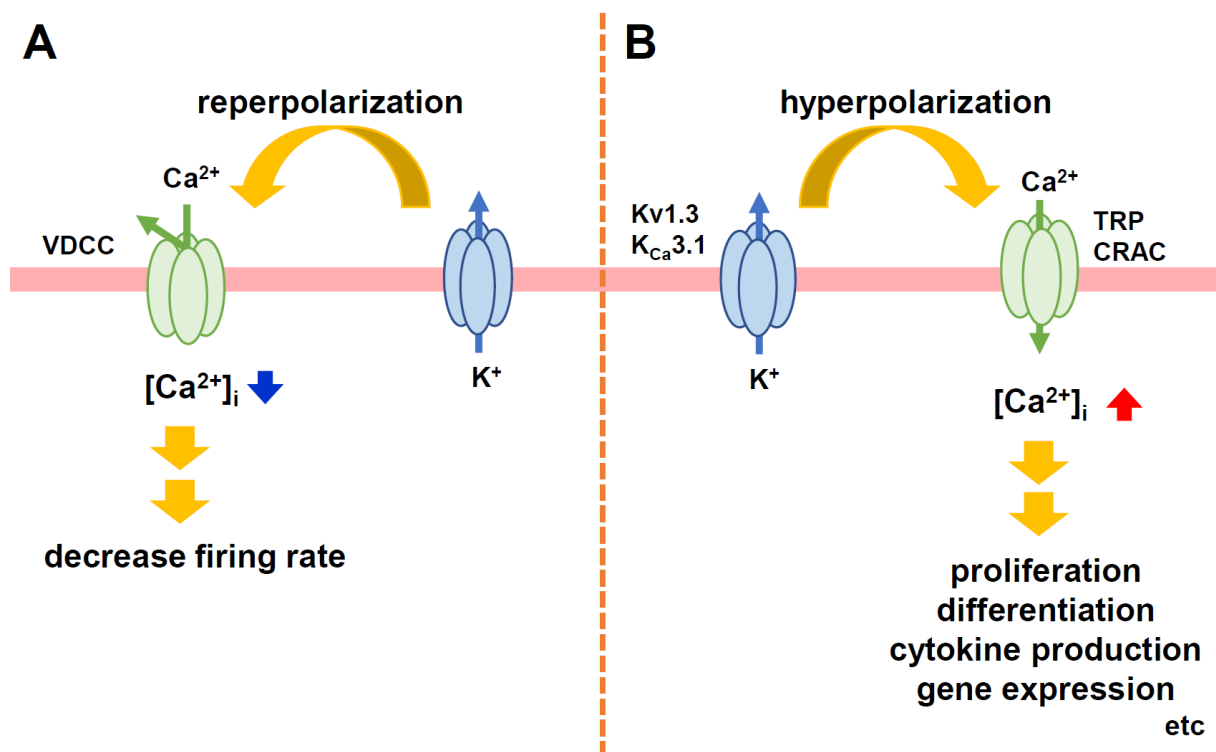


Figure 1. The role of K^+ channel in excitable (A) and non-excitable cells (B).

VDCC: voltage-dependent Ca^{2+} channel, TRP: transient receptor potential channel, CRAC: Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channel

3. T細胞におけるカリウムチャンネル

T細胞において、電位依存性カリウムチャンネル $\text{Kv}1.3$ 及びカルシウム活性化カリウムチャンネル $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ が機能発現していることが知られており、多くの研究成果が報告された。例えば、

これらのカリウムチャンネルは T 細胞の活性化、分化状態によりその発現が変動し、ヘルパー T (Th) 1 及び Th2 細胞では $K_{Ca}3.1$ が、Th17 細胞やエフェクターメモリー T (T_{EM}) 細胞では $Kv1.3$ が主なカリウムチャンネルとして機能する [12]。 $Kv1.3$ は多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) や関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA)、自己免疫性 1 型糖尿病の患者の末梢血及び病変組織における T_{EM} 細胞において発現が亢進しており、これらの疾患モデル動物において、 $Kv1.3$ 阻害薬が病態改善に有効であることが報告されている [14-16]。また、IBD や MS、RA などの自己免疫疾患や、アレルギー性鼻炎、喘息といった炎症疾患モデル動物において、 $K_{Ca}3.1$ 阻害による症状改善効果が報告されている [17-20]。以上のことから、自己免疫疾患や炎症性疾患において、T 細胞に発現するカリウムチャンネルが治療標的として着目されており、臨床研究も進められている。実際に、乾癬患者を対象とした臨床試験において、 $Kv1.3$ 阻害薬は T 細胞活性化マーカーの発現を調節し、血中の炎症メディエーターを阻害することで乾癬の皮膚病変を改善した [21]。

4. two-pore 型カリウムチャンネル

1996 年、Lasage らにより新たなカリウムチャンネルとして two-pore 型カリウム (K_{2P}) チャンネルが同定された [22]。 Kv チャンネルや K_{Ca} チャンネルは 6 回膜貫通型構造で、1 つの分子中に 1 つのイオン孔 (ポア, pore) ドメインを持ち、四量体を形成して機能する (Fig. 2A)。一方、 K_{2P} チャンネルはこれらのチャンネルとは異なり、4 回膜貫通型構造で、1 分子中に 2 つのポアドメインを保持しているため、二量体を形成することでチャンネル機能を発揮する (Fig. 2B)。 K_{2P} チャンネルは、「背景カリウムチャンネル」とも呼ばれ、静止膜電位の維持や調節に重要な役割を果たしている。 K_{2P} チャンネルは、現在までに 15 のサブタイプが分子同定されており、遺伝子相同性と機能類似性に基づき、TWIK (Tandem of pore domain in a Weak Inwardly-rectifying K^+)、TREK (TWIK-RElated K^+)、TASK (TWIK-related Acid-Sensitive K^+)、TALK (TWIK-related ALkaline-pH-activated K^+)、THIK (Tandem pore domain Halotane-Inhibited K^+)、TRESK (TWIK-RElated Spinal cord K^+) の 6 つのサブファミリーに分類され、それぞれ様々な特徴を持つ (Fig. 2)。これらのサブファミリーのうち、TASK サブファミリーに属する $K_{2P}3.1$ (TASK1/KCNK3) 及び $K_{2P}9.1$ (TASK3/KCNK9)、TALK サブファミリーに属する $K_{2P}5.1$ (TASK2/KCNK5)、 $K_{2P}16.1$ (TALK16/KCNK16)、 $K_{2P}17.1$ (TALK2/KCNK17) は pH 感受性を持ち、特に TASK サブファミリーは酸性 pH により阻害され、TALK サブファミリーはアルカリ pH により活性化される [23, 24]。また、 $K_{2P}3.1$ 、 $K_{2P}5.1$ 、 $K_{2P}9.1$ は T 細胞において機能発現することが報告され、これらのチャンネルを阻害することで、細胞増殖やインターフェロン(IFN)- γ などのサイトカイン産生が抑制される [25]。さらに、 $K_{2P}5.1$ は低浸透圧下における細胞容量の調節にも関与しており、T 細胞恒常性に重要な役割を果たす [26-28]。

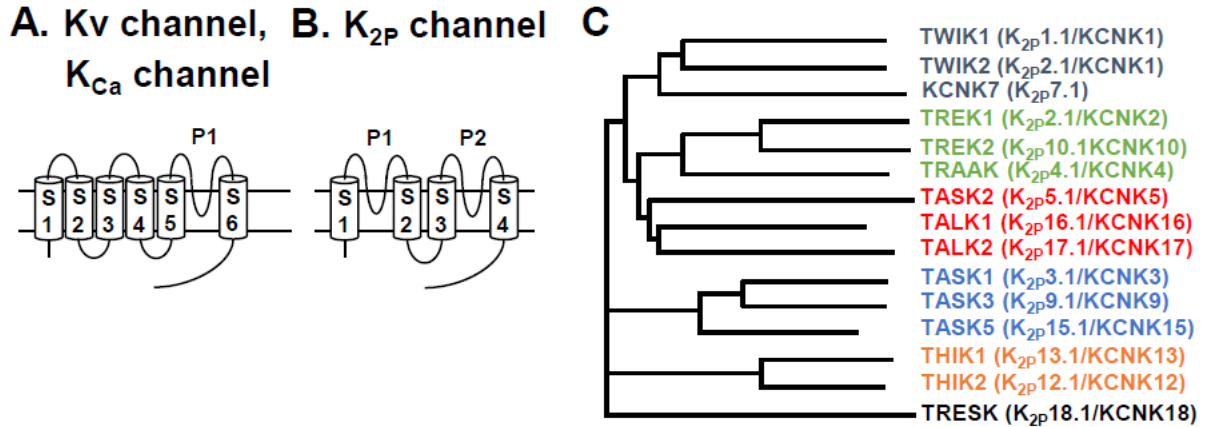


Figure 2. K^+ channel structures (A, B) and dendrogram of the K_{2P} channel subtypes (C).

A, B: S and P indicate the transmembrane segment and pore-forming domain, respectively. C: The 15 K_{2P} channel subtypes were classified into 6 subfamilies according to their sequence homology and functional similarity.

5. 自己免疫疾患における $K_{2P}5.1$ チャンネル

T細胞において発現が報告された K_{2P} チャンネルのうち、 $K_{2P}5.1$ は MS 患者及び RA 患者の末梢血由来 T細胞において発現亢進が認められた。MS 患者及び RA 疾患において、疾患の重症度と $K_{2P}5.1$ 発現量との間にはいずれも正の相関があり、MS や RA の病態悪化に $K_{2P}5.1$ が関与することが示唆された [29, 30]。また RA 患者において、抗リウマチ薬や生物学的製剤による治療により、症状の改善と共に $K_{2P}5.1$ 発現が減少すること、症状が再発した患者では、病態スコアの悪化の前に $K_{2P}5.1$ 発現増加が見られ、 $K_{2P}5.1$ 発現が診断マーカーとして有用である可能性が示された [30]。自己免疫疾患における $K_{2P}5.1$ の病態生理学的意義を明らかにするために、我々は 5%デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran Sulfate Sodium, DSS) 溶液を自由飲水させることで作製した IBD モデルマウスを用いた。IBD モデルマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T細胞において、 $K_{2P}5.1$ 発現・活性亢進及びそれに伴う細胞内カルシウム流入の促進、IFN- γ 、インターロイキン (IL)-17A などの炎症性サイトカイン産生の増加が認められた。また、 $K_{2P}5.1$ ノックアウトマウスを用いて IBD モデルを作製したとき、炎症性サイトカイン産生量の減少や IBD の主症状である下痢や血便の軽症化、大腸の炎症及び陰窩障害の改善が見られた。これらの結果より、IBD において、 $K_{2P}5.1$ が治療標的となり得ることが示唆された [31]。 $K_{2P}5.1$ は、キニジン、リドカインなどの局所麻酔薬や非選択的カリウムチャンネル阻害剤である clofilium によって阻害され、ハロタンなどの揮発性麻酔薬によって活性化される [32, 33]。しかし、 $K_{2P}5.1$ の選択的かつ強力な阻害剤は未だ開発されておらず、さらに $K_{2P}5.1$ 発現・活性制御機構に関しても不明な点が多い。そのため、 $K_{2P}5.1$ 発現・活性制御機構の解明は $K_{2P}5.1$ 関連疾患の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

6. 本研究の目的

本研究では、K_{2p}5.1 の発現・活性機構を解明することで、K_{2p}5.1 が関与することが想定される IBD を含む各種疾患に対する新規治療戦略の提唱を目標に、以下の検討を行った。第 1 章では、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 スプライシング機構を介する活性制御の可能性を検討した。第 2 章では、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 hypoxia-inducible factor (HIF) による K_{2p}5.1 の発現制御機構について検討した。

第1章 K_{2p}5.1 スプライスバリエントの同定及び活性機能への影響

第1節 緒言

DNA から転写された mRNA 前駆体 (pre-mRNA) は、スプライシングを受けることで成熟 mRNA となる。選択的スプライシングにより、1 つの遺伝子から塩基配列の異なる複数種類の mRNA が生成されることで、アミノ酸配列が異なる複数種類のタンパクが合成される (Fig. 3)。ヒトでは 95%以上の遺伝子で選択的スプライシングが起こることが知られており、選択的スプライシングによりヒトのプロテオームの形態、機能は大幅に拡大している [34, 35]。しかし、選択的スプライシング異常は様々な疾患に繋がり、パーキンソン病や骨髄性筋萎縮症、筋ジストロフィーといった神経・筋疾患におけるスプライシング調節不全が報告されている。これらの疾患において、RNA の結合とスプライシングに関与するタンパクが、運動失調を引き起こす様々なタンパクと相互作用することが知られており、RNA スプライシングを標的とした治療により症状が改善することが明らかになっている [36-38]。また、がん領域では、様々な腫瘍タイプにおいて、RNA スプライシングに関与するタンパクをコードする遺伝子の変異が比較的高い頻度で発生し、がん化により多くの遺伝子の選択的スプライシングが破壊される。がんにおける選択的スプライシングは、発がん性タンパクを生成するだけでなく、抗腫瘍タンパクを生成するため、腫瘍の形成や転移といったがん悪性化に関与するだけでなく、アポトーシスを導くことでがん抑制化に働く場合もある [37-42]。がん治療において、pre-mRNA スプライシング機構を標的とした小分子阻害薬が開発されており、それらが様々ながん細胞種において抗腫瘍活性を示すことが報告されている [42]。この mRNA スプライシング阻害薬のほとんどは、スプライシングにおいて重要な役割を持つスプライソソームを阻害する。スプライソソームは多くの RNA 及びタンパクで構成される巨大分子複合体であり、RNA-RNA 相互作用や RNA-タンパク相互作用に関与している [35, 43]。スプライソソーム阻害薬の多くがイントロンにおいて分岐部位配列を認識してイントロン除去に寄与する SF3b 複合体阻害作用を持つ。その中でも天然由来マクロライド化合物である pladienolide B (PB) はスプライシング阻害により細胞のアポトーシスを誘導することで抗がん作用を示す [44]。PB 及びその誘導体はすでにごん治療領域において臨床試験が行われている [45, 46]。

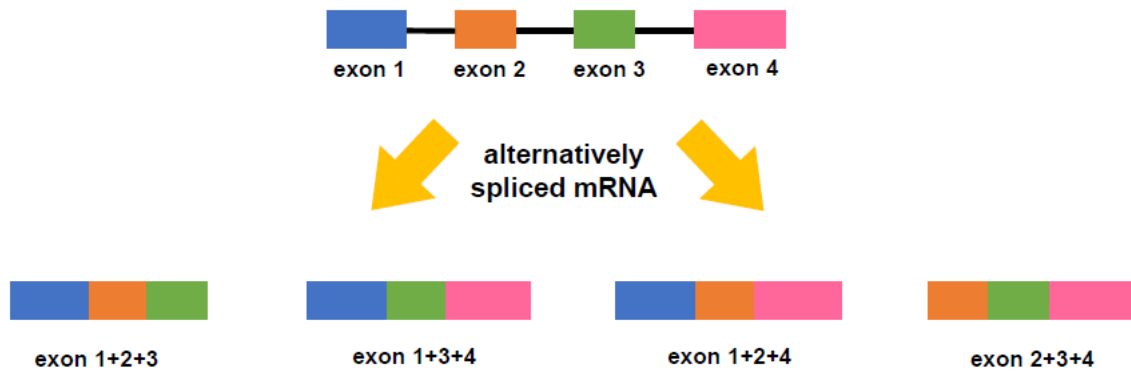


Figure 3. Alternative splicing

Exons and final transcripts are shown as boxes while lines represent introns.

イオンチャネルの選択的スプライシングにより、チャネルの細胞内分布や多量体形成の調節不全、開口確立の変化などによる機能変化、薬物やイオンの反応性、発現分布などチャネルの機能や特性に影響を及ぼす [13, 47, 48]。T 細胞に機能発現する $K_{Ca}3.1$ のスプライスバリエントについて、主に細胞膜上に発現する野生型 $K_{Ca}3.1a$ に対して、N 末端欠損 $K_{Ca}3.1$ スプライスバリエント $K_{Ca}3.1b$ は主に細胞内に発現しており、 $K_{Ca}3.1a$ 細胞膜移行を阻害することで $K_{Ca}3.1$ のチャネル活性を抑制する。また、マウス胸腺細胞において、 $K_{Ca}3.1b$ 発現亢進により CD4 陽性 CD8 陽性細胞を CD4 陰性 CD8 陰性細胞へと分化させ、胸腺細胞の細胞増殖を抑制することが報告されている [49]。また、 K_{2p} チャネルのスプライスバリエントに関してもいくつか報告がある。機械的刺激に感受性を持つ $K_{2p}10.1$ (TREK2/KCNK10) のスプライスバリエントとして N 末端領域が異なる 2 種類のスプライスバリエント $K_{2p}10.1b$ 及び $K_{2p}10.1c$ が同定された。これらのスプライスバリエントはチャネル活性における違いはないものの、その組織分布が異なり、腎臓や膵臓において高発現する $K_{2p}10.1b$ に対して $K_{2p}10.1c$ は主に脳で発現した [50]。また、 $K_{2p}5.1$ と同様にアルカリ pH に感受性を持つ $K_{2p}16.1$ (TALK1/KCNK16) は、ヒト膵臓から 3 種類のスプライスバリエントが単離された。この 3 つのスプライスバリエントのうち、チャネル機能を持つ $K_{2p}16.1b$ は野生型 $K_{2p}16.1a$ と C 末端領域のアミノ酸配列が異なり、pH 感受性に変化が生じた [51]。

本章では、ヒト及びマウスのリンパ組織からの $K_{2p}5.1$ 遺伝子クローニングにより、 $K_{2p}5.1$ 新規スプライスバリエントである $K_{2p}5.1B$ を同定し、 $K_{2p}5.1B$ による完全長 $K_{2p}5.1A$ の機能活性に及ぼす影響を検討した。また、スプライシング機構に着目し、スプライソソーム阻害薬 pladienolide B (PB) による $K_{2p}5.1B$ 発現及び $K_{2p}5.1$ 活性への影響を検討した。

第2節 実験材料及び方法

1. 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 及びヒト白血病細胞株 K562 は、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (JCRB 細胞バンク、大阪) より購入した。D-MEM (HEK293, 富士フィルム和光純薬、大阪)、又は RPMI-1640 (K562, 富士フィルム和光純薬) にそれぞれ 10%FCS (fecal calf serum, Sigma-Aldrich, MO, USA) 及び 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (富士フィルム和光純薬) を添加し、37°C、5% CO₂ で維持された CO₂ インキュベーター内で培養した。

2. 溶液組成

Tris-buffered ammonium chloride (ACTB)

0.017 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.75% NH₄Cl

Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

RIPKA buffer

10 mM Tris-HCl (pH7.4), 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate

Normal HEPES

137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 14 mM glucose, 10 mM HEPES

10 N NaOH で pH7.4、pH8.0、pH8.5 に調整

High K⁺ HEPES

5.9 mM NaCl, 140 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 14 mM glucose, 10 mM HEPES

10 N NaOH で pH 7.4 に調整

3. 実験動物

5-6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本エスエルシー、静岡) を使用した。実験動物は、照明時間 8:00-20:00、温度 22±1°Cとなる環境下で飼育し、固形飼料及び水を自由に摂取させた。本研究における動物実験は全て京都薬科大学の動物実験委員会に申請、承認を得た上で動物実験実施規定に従って実施した。

4. 使用薬物

clofilium (Sigma-Aldrich)、スプライソソーム阻害剤 pladienolide B (Bioaustralis, NSW, Australia)、

isoginkgetin (Tocris Bioscience, Bristol, UK) を使用した。

5. マウス脾臓細胞培養

マウスより脾臓を摘出し、10%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、5 µg/mL concanavlin-A (con-A, 富士フィルム和光純薬) 添加 RPMI-1640 培地 25 mL 中でスライドガラスのすり加工部分ですりつぶすことで細胞を単離した。氷中で5分間静置後、浮遊細胞を回収し、4°C、1000 rpm、5分遠心し、上清を除去した。赤血球溶血のために、ACTB 溶液 10 mL で懸濁し、室温で1分静置した後、培地 10 mL を加え、再度遠心した後に上清を除去した。培地 10 mL で2回洗浄した後、セルストレイナー (35 µm, CORNING, NY, USA) を通して細胞塊を除去した。細胞密度が 5×10^6 cells/mL となるように調節し、10%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、5 µg/mL con-A 及び 10 U/mL IL-2 (Sigma-Aldrich) 添加 RPMI-1640 培地で 37°C、5%CO₂ 下で培養した。培養後、CD4 陽性 T 細胞を Dynabeads FlowComp™ Mouse CD4 (ベリタス、東京) を用いて単離した。なお、フローサイトメトリーにより、単離した細胞の 95%以上が CD4 陽性であることを確認した。

6. RNA 抽出、逆転写反応及びリアルタイム PCR

細胞はタンパク変性剤の TRI Reagent (Sigma-Aldrich) で溶解し、クロロホルムを用いて液相分離を行い、水相を回収した。イソプロパノール沈殿後、70%エタノールにより RNA 沈殿物を洗浄し、RNase Free H₂O で溶解した。逆転写酵素 ReverTra Ace (東洋紡、東京) 及びランダムプライマー primer random p(dN)₆ (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法により定量化し、mRNA 発現量を各サンプルの β -actin (ACTB) で規格化した。リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ、大阪) を使用し、ABI 7500 Fast real-time PCR 装置 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) により解析した。また、使用したプライマーは primer Express software (ver. 3.0.1, Thermo Fisher Scientific) を用いて設計し、その配列は以下の通りである。

mK_{2P}5.1A+B (GenBank accession number: NM_021542, 791-911), 121 bp

mK_{2P}5.1A (NM_021542, 58-138), 81 bp

hK_{2P}5.1A+B (NM_003740, 1022-1142), 121 bp

hK_{2P}5.1A (NM_003740, 669-768), 100 bp

hK_{2P}3.1 (NM_002246, 622-744), 123 bp

hK_{2P}9.1 (NM_001282534, 1092-1213), 122 bp

hK_{2P}16.1 (NM_001135105, 952-1073), 122 bp

hK_{2P}17.1 (NM_031460, 413-522), 110 bp

β -actin (ACTB) (NM_007393, 418-518), 101 bp

7. PCR 及びアガロースゲル電気泳動、シーケンス解析

RNA を逆転写することで得られた cDNA を、KOD FX Neo DNA polymerase (東洋紡) を用い、サーマルサイクラー (T100, Bio-Rad Laboratories, KY, USA) で増幅させた。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、臭化エチジウム染色により可視化した。

使用したプライマーは primer Express software を用いて設計し、その配列は以下の通りである。

ヒト及びマウス K_{2p}5.1A、K_{2p}5.1B 検出

mK_{2p}5.1 (NM_021542, 358-877), 520 bp (mK_{2p}5.1A), 244 bp (mK_{2p}5.1B)

hK_{2p}5.1 (NM_003740, 416-767), 352 bp (hK_{2p}5.1A), 185 bp (hK_{2p}5.1B)

hK_{2p}5.1 エキソン検出

hK_{2p}5.1 exon1 (NM_003740, 73-614), 542 bp

hK_{2p}5.1 exon2 (NM_003740, 527-679), 153 bp

hK_{2p}5.1 exon4 (NM_003740, 775-1023), 249 bp

hK_{2p}5.1 exon5 (NM_003740, 972-2035), 1064 bp

また、シーケンス解析には、ABI PRIZM3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

8. プラスミドベクター作製

クローニングした K_{2p}5.1 の N 末端側に蛍光タンパクを付加するために、プラスミドベクター pECFP-C1 または pEYFP-C1 (BD Biosciences, CA, USA) に以下のプライマーで増幅した hK_{2p}5.1A、hK_{2p}5.1B、mK_{2p}5.1A、mK_{2p}5.1B をサブクローニングし、pECFP-hK_{2p}5.1A、pEYFP-hK_{2p}5.1B、pECFP-mK_{2p}5.1A、pEYFP-mK_{2p}5.1B を作製した。

hK_{2p}5.1A

forward: 5'-CTCCGAATTCTATGGTGGACCGGGGCCCTCT-3'

reverse: 5'-AAGCCGATGGTGGAGATG-3'

hK_{2p}5.1B

forward: 5'-CTCCGAATTCTATGGTGGACTGAGGGGTGGAA-3'

reverse: 5'-AAGCCGATGGTGGAGATG-3'

mK_{2p}5.1A/B

forward: 5'-CTCCCTCGAGCTATGGTGGACCGGGGTCCTTT-3'

reverse: 5'-CTCCGGATCCTCACGTGCCCTGGGGTTAT-3'

また、実験方法7で使用したプライマー (NM_003740, 416-767) を用いて、pcDNA3.1(+)/Neo^r (Invitrogen, NY, USA) に hK_{2p}5.1B をサブクローニングし、pcDNA3.1(+)-hK_{2p}5.1B を作製した。

9. 免疫沈降及びウェスタンブロットティング

K_{2p}5.1A 及び K_{2p}5.1B を発現させた HEK293 細胞を RIPKA 溶液に溶解し、K_{2p}5.1 の N 末端側領域を認識する抗 K_{2p}5.1 抗体 (G-14, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) と 4°C で一晩反応させた。その後、Dynabeads Protein G (ベリタス) を用い、免疫沈降を行った。

RIPKA 溶液で溶解したマウス脾臓ライセート又は免疫沈降によって得られたタンパクサンプルを用いてウェスタンブロットティングを行った。SDS-PAGE (10%ゲル、5-20 µL/lane) によりタンパク質を分離し、タンク式トランスファー装置を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写した。転写した PVDF 膜は 3%BSA を含む 0.1% Tween PBS に浸して室温で 2 時間もしくは 4°C で一晩インキュベートすることでブロッキングを行った。一次抗体として、K_{2p}5.1 C 末端領域を認識する抗 K_{2p}5.1 抗体 (H-170, Santa Cruz Biotechnology) (希釈倍率 1:200)、抗 ACTB 抗体 (Sigma-Aldrich) (希釈倍率 1:10,000) を 0.1% Tween PBS で希釈し、4°C で一晩反応させた。0.1% Tween PBS で 5 分間振盪し、溶液を交換して再度振盪を 5 回繰り返すことで PVDF 膜を洗浄し、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Millipore, Temecula, CA, USA) (希釈倍率 1:20,000) を 0.1% Tween PBS で希釈し、4°C で 2 時間反応させた。再度 0.1% Tween PBS で PVDF 膜を洗浄した後、化学発光検出試薬 ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を反応させ、LAS3000 (富士フイルム、東京) もしくは VersaDoc5000MP (Bio-Rad Laboratories) にてバンドシグナルを検出した。バンドシグナルの定量解析には、ImageJ software (Ver. 1.42, National Institutes of Health, MA, USA) を用い、各サンプル中の ACTB で規格化した。

10. 遺伝子移入

Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、HEK293 細胞にプラスミド DNA (pECFP-h/mK_{2p}5.1A, pEYFP-h/mK_{2p}5.1B) をトランスフェクションし、48-72 時間後に可視化解析した。K562 細胞には NEPA21 Type II (NEPAGENE、千葉) を用いたエレクトロポレーションにより pcDNA3.1(+)-hK_{2p}5.1B 又はコントロールベクターをトランスフェクションし、48-72 時間後に機能解析した。

11. 細胞内分布

遺伝子導入 HEK293 細胞内における CFP および YFP の蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。観察する前日に細胞をガ

ラスボトムディッシュ（松浪硝子工業、大阪）に播いた。蛍光強度の定量解析には Image J software を用いた。

12. 細胞膜電位及び細胞内カルシウム濃度測定

細胞膜電位は膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)（同仁化学研究所、熊本）、細胞内カルシウム濃度はカルシウム蛍光プローブ Fura-2 AM（同仁化学研究所）を用いて蛍光イメージング解析した。

ガラスボトムディッシュに PBS で希釈した fibronectin（5 μM, 200 μL/シャーレ、富士フィルム和光純薬）を 37°C、一晩インキュベートすることでコーティングした。余分な fibronectin を PBS で洗浄後、K562 細胞を播種し、CO₂ インキュベーターで 90 分以上インキュベートすることで接着させた。細胞を 100 nM DiBAC₄(3)、10 μM Fura-2 AM を添加した Normal HEPES 溶液（pH7.4）中、室温暗所で 30 分インキュベートした。蛍光強度が安定するまで Normal HEPES 溶液（pH7.4）で還流し、その後 Normal HEPES 溶液（pH8.0 又は 8.5）を 5 分、High K⁺ HEPES 溶液を 5 分還流した。膜電位測定時には、Normal HEPES 及び High K⁺ HEPES 溶液に 100 nM DiBAC₄(3)を添加した。細胞は励起波長 490 nm（DiBAC₄(3)）及び 340 nm、380 nm（Fura-2 AM）で励起させた。蛍光イメージングには浜松ホトニクス of イメージングシステム（ORCA-Flash 2.8 digital camera, HCImage）を用いた。

13. 免疫化学染色

K562 細胞を 2%パラホルムアルデヒド（PFA）含有 PBS で 10 分間（室温）静置することで固定した。PBS で 3 回洗浄し、0.1% Triton 100 及び 1% NGS（normal goat serum）含有 PBS で懸濁し、10 分間静置して細胞を穿孔後、PBS で 2 回洗浄した。一次抗体として抗 K_{2p}5.1 抗体（G-14、希釈倍率 1:50）と 4°C、一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体 Alexa Fluor 488 anti-goat IgG（Invitrogen、希釈倍率 1:200）と 4°C、2 時間反応させ、その後 PBS で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META にて K_{2p}5.1 の細胞内分布を観察した。蛍光強度の定量は Image J software を用いて解析した。

14. ダブルチミジンブロック

K562 細胞を 2.5 mM チミジン（Sigma-Aldrich）含有 RPMI-1640 培地で 24 時間培養後、チミジンを除去し、15 時間培養した。再度 2.5 mM チミジン含有 RPMI-1640 培地で 24 時間培養した。チミジン除去後、通常の RPMI-1640 培地で培養し、2 時間毎に細胞を回収した。回収した細胞は RIPKA 溶液にて溶解し、ウェスタンブロッティング解析に用いた。

15. 細胞増殖能

96 well プレートに K562 細胞を細胞密度 1×10^4 cells/well で播き、Lipofectamine LTX reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて pcDNA-hK_{2p5.1A/B} をトランスフェクションした。WST-1 (同仁化学研究所) を 10 μ L/well 加え、2 時間後に microplate reader MULTISCAN FC (Thermo Fisher Scientific) を用い、蛍光波長 450 nm 及び 620 nm (レファレンス) で測定した。

16. 統計解析

データは平均±標準誤差 (SEM) として表した。2 群間の比較では、F 検定を行った後、student の *t* 検定もしくは Welch の *t* 検定を行った。多群間の比較では ANOVA を行った後、Tukey 検定を行った。いずれの検定においても、危険率 5%未満を有意とした。統計解析には、Origin Pro (ライトストーン、東京) を使用した。

第3節 結果

1. K_{2p}5.1 スプライスバリエント K_{2p}5.1B の同定及び組織分布

ヒトの腎臓、脾臓、リンパ節を対象に、K_{2p}5.1 遺伝子クローニングを行ったところ、脾臓において予想よりも短い PCR 産物が検出された (Fig. 4C)。DNA シークエンス解析の結果、この産物が 5 つのエキソンから成る完全長 hK_{2p}5.1 (hK_{2p}5.1A) のエキソン 2 の一部及びエキソン 3 の全てが欠損しており、フレームシフトを起こすことが明らかとなった (Fig. 4A, D)。予想される構造として、K_{2p}5.1A と同じ翻訳開始点から翻訳され、フレームシフトしたことで翻訳が終了した結果、N 末端側の膜貫通部位 S1 から S3 のみを保持する構造、もしくはフレームシフトにより新たにエキソン 4 中に生じた翻訳開始点から翻訳された S3 以降の C 末端側のみを保持する構造がある。N 末端側のアミノ酸配列を認識する抗 K_{2p}5.1 抗体 (G-14) を使用したウェスタンブロッティングでは、K_{2p}5.1A と異なる分子量のバンドシグナルは観察されなかった。一方、C 末端側のアミノ酸配列を認識する抗 K_{2p}5.1 抗体 (H-170) を使用した際には K_{2p}5.1A と異なる分子量のバンドシグナルが観察された。そのため、Fig. 4E に示すように S1 から S3 までの N 末端側の細胞膜貫通部位を欠いた構造をとることが推定された (GenBank accession number, AB743589)。マウス脾臓からも同様に、エキソン 1 の途中からエキソン 4 の途中までが欠損しており、Fig. 4E に示すように N 末端側の細胞膜貫通部位 S2 のみが欠けた構造を有することが推定される mK_{2p}5.1B を単離、同定した (GenBank accession number, AB743801) (Fig. 4B, D, E)。

ヒト組織及びヒト由来白血病細胞株における K_{2p}5.1 スプライスバリエントの発現をリアルタイム PCR 法により測定した。K_{2p}5.1B のみを測定することは不可能であるため、K_{2p}5.1A/B に共通して存在する配列部位を標的としたプライマー (K_{2p}5.1A+B) と、K_{2p}5.1B では欠損した配列部位を標的とすることで K_{2p}5.1A のみを標的とするプライマー (K_{2p}5.1A) を用い、その発現量を比較した。これまでの報告 [52] と一致して、腎臓において K_{2p}5.1 が高発現していた。また、リンパ組織中では脾臓において K_{2p}5.1 の発現が高く、マウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞においても発現が見られた (Fig. 5A, B)。ヒト由来白血病・リンパ腫細胞株である K562、HL60、THP-1、U937、Jurkat E6、CCRF-CEM、Daudi、Raji のうち、K562 において K_{2p}5.1 が高発現していた (Fig. 5C)。しかし、Jurkat E6、CCRF-CEM、Daudi、Raji の 4 つの細胞株では K_{2p}5.1 発現は検出されなかった (データ未掲載)。K_{2p}5.1 の全長を PCR にて増幅し、アガロース電気泳動を行ったところ、K562 において K_{2p}5.1B のバンドシグナルが見られた一方、腎臓では見られなかった (Fig. 5D)。選択的スプライシングは、様々な細胞においてその機能的多様性を高める重要なメカニズムであるが、一方で、PCR クローニング実験から得られた多くのスプライスバリエントはほとんど翻訳されず、機能性タンパクを産生しないことが報告さ

れている [34, 35]。そこで、今回得られた K_{2p}5.1B がマウス脾臓において翻訳されているかどうか明らかにするために、C 末端側のアミノ酸配列を認識する抗 K_{2p}5.1 ポリクローナル抗体 (H-170) を使用してウェスタンブロット解析を行った。マウス脾臓の組織ライセートにおいて mK_{2p}5.1A (56 kDa) 及び mK_{2p}5.1B (46 kDa) の 2 つのバンドシグナルが検出され、これらのシグナルは過剰抗原で前処置した一次抗体を用いると消失した (Fig. 5E)。

次に、K_{2p}5.1B が K_{2p}5.1A と二量体を形成するかどうか検討するために、CFP-hK_{2p}5.1A 及び YFP-hK_{2p}5.1B を共発現させた HEK293 細胞のライセートを用いて免疫沈降実験を行った。N 末端側のアミノ酸配列を認識する抗 K_{2p}5.1 ポリクローナル抗体 (G-14) を使用して K_{2p}5.1A を選択的に免疫沈降させ、得られたタンパクを C 末端認識抗 K_{2p}5.1 抗体 (H-170) を用いてウェスタンブロット解析した。K_{2p}5.1B のバンドシグナルが観察されたことから、K_{2p}5.1A と K_{2p}5.1B の間で二量体を形成する可能性が示唆された (Fig. 5F)。

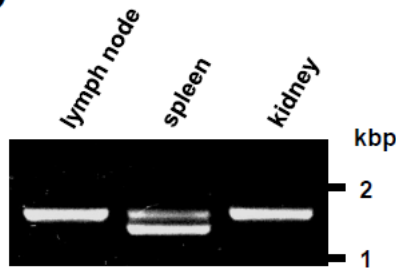
A. human $K_{2p}5.1$

			S1	
hK _{2p} 5.1A	1	MVDRGPLLTS	AIIFYLAIGAAIF	FEVLEEPHWKEAKKNYYTQKLHLLKEFPCLGQEGLDKILEVVS
			P1	S2
hK _{2p} 5.1A	81	NNWNWPNAMIFAATVIT	TIGYGNVAPKTPAGRLFCV	FYGLFGVPLCLTWISALGKFFGGR
			S3	P2
hK _{2p} 5.1A	161	TCTAIFIVWGLVHLVIPP	FVFMVTEGWN	YIEGLYYSFITISTIGFGDFVAGVNP
hK _{2p} 5.1B	1	M*****		
hK _{2p} 5.1A	241	FVNWKVSMFVEVHKAIK	RRRRRKESFESSPHSRKALQ	VKGSTASKDVNIFSFLSKKEETYNDLIKQIGK
hK _{2p} 5.1B	59	*****		
hK _{2p} 5.1A	321	TGPGPGLGPQGGGLPAL	PPSLVPLVVYSKNRVPTLE	EVSQTLRSKGHVSRSPDEEAVARAPEDSSPA
hK _{2p} 5.1B	139	*****		
hK _{2p} 5.1A	401	ECEPWAQDYHPLIFQD	ASITFVNTEAGLSDEETS	SKSLEDNLAGEESPQQGAEAKAPLNMGEPSS
hK _{2p} 5.1B	219	*****		
hK _{2p} 5.1A	481	VPYEQLMNEYNKANS	PKGT	
hK _{2p} 5.1B	299	*****		

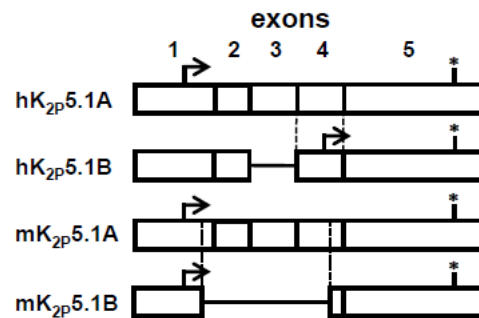
B. mouse $K_{2p}5.1$

			S1	
mK _{2p} 5.1A	1	MVDRGPLLTS	AIIFYLAIGAAIF	FEVLEEPHWKEAKKNYYTQKLHLLKEFPCL
mK _{2p} 5.1B	1	M*****		
			P1	S2
mK _{2p} 5.1A	81	NNWNWPNAMIFAATVIT	TIGYGNVAPKTPAGRLFCV	FYGLFGVPLCLTWISALGKFFGGR
mK _{2p} 5.1B	81	*****		
			S3	P2
mK _{2p} 5.1A	161	TCTAIFIVWGLVHLVIPP	FVFMVTEGWN	YIEGLYYSFITISTIGFGDFVAGVNP
mK _{2p} 5.1B	69	*****		
mK _{2p} 5.1A	241	FVNWKVSMFVEVHKAIK	RRRRRKESFESSPHSRKALQ	MAGSTASKDVNIFSFLSKKEETYNDLIKQIGK
mK _{2p} 5.1B	149	*****		
mK _{2p} 5.1A	321	RVPGPGLGGLPQGDRL	PTIPASLAPLVVYSKNRV	PSLEEVSQTLKKNKGHVSRPLGEE
mK _{2p} 5.1B	229	*****		
mK _{2p} 5.1A	401	SEEGEPWEALDYHPLI	FQANITFENEETGLSDEETS	SKSVEDNLTSKEQPEQGPMAEAPLSSTGE
mK _{2p} 5.1B	309	*****		
mK _{2p} 5.1A	481	ELSVPYEQLMNEYNK	ADNPRGT	
mK _{2p} 5.1B	389	*****		

C



D



E

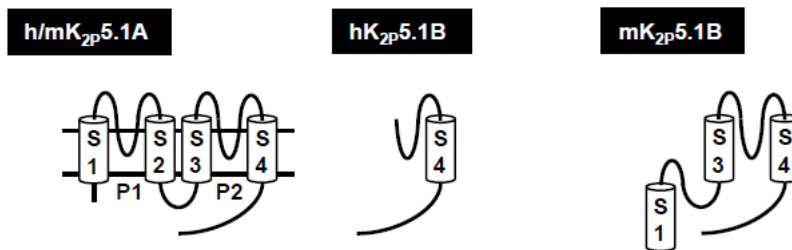
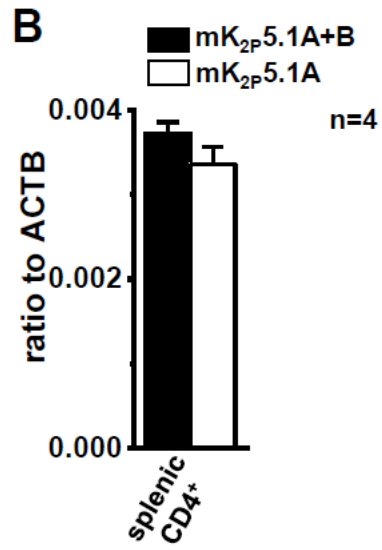
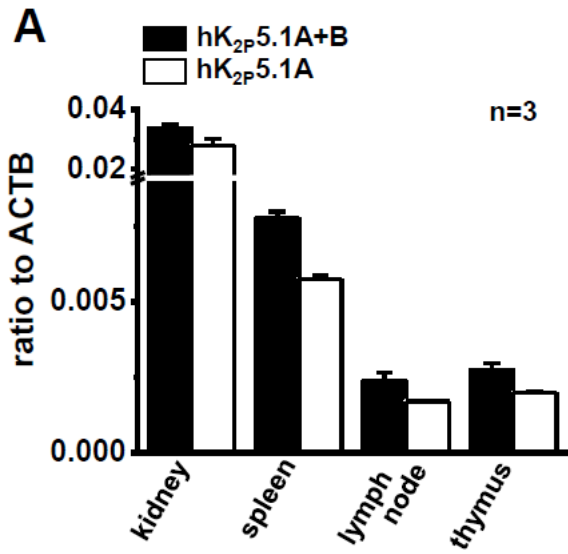


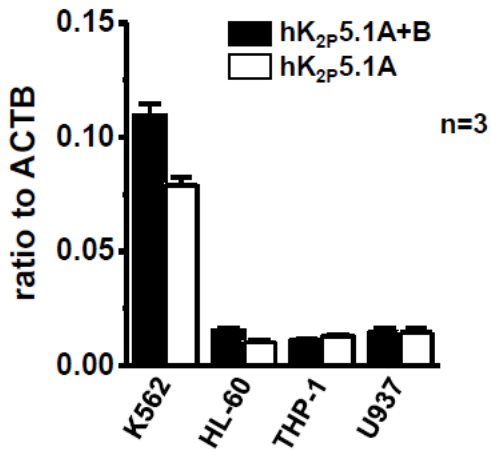
Figure 4. Molecular identification of the novel splicing isoform of mammalian K_{2p}5.1.

A, B: The alignment of the amino acid sequences of human (A) and mouse (B) K_{2p}5.1 splicing isoforms. Residues identical to full-length K_{2p}5.1, K_{2p}5.1A are shown as asterisks, and dashes indicated gaps introduced into the sequence to improve alignment. S1-S4 and P1, P2 indicate the transmembrane segment 1-4 and pore-forming domain, respectively. C: RT-PCR examinations for full-length K_{2p}5.1A and K_{2p}5.1B in the human kidney, spleen, and lymph node. A DNA molecular weight marker is indicated on the right on the gel. D: mRNA splicing patterns of hK_{2p}5.1 and mK_{2p}5.1. The arrows and asterisks indicate the initiation methionine codons and termination codons. E: Diagrammatic representation of the K_{2p}5.1 structure showing four transmembrane domains (S1-S4) and two pore-domains (P1 and P2): full-length h/mK_{2p}5.1A, hK_{2p}5.1B and mK_{2p}5.1B.

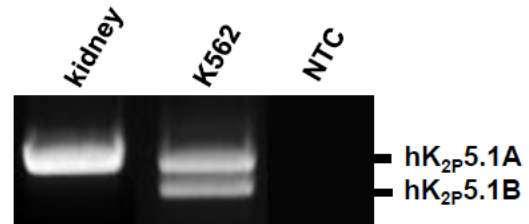
Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452



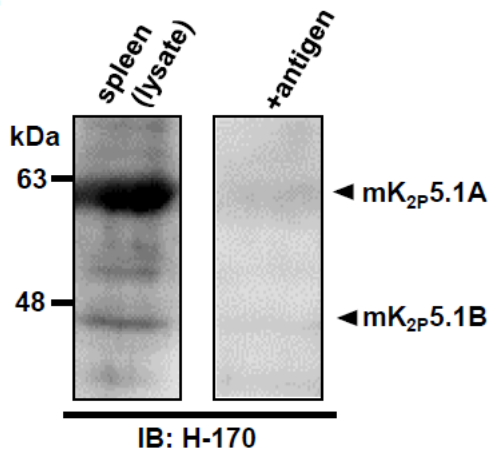
C. leukemic cell lines



D



E



F

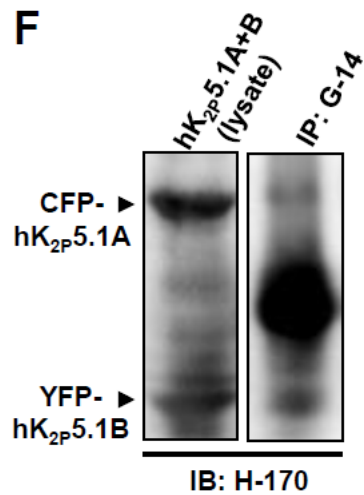


Figure 5. Tissue and cell distribution of a novel spliced variant K_{2P}5.1B.

A-C: A quantitative, real-time PCT assay for the expression of K_{2P}5.1 in the human kidney and lymphoid tissues (spleen, lymph node and thymus) (A), mouse splenic CD4⁺ cells (B), and human leukemic cell lines (K562, HL-60, THP-1 and U937) (C). PCR primers specific for the conserved region of h/mK_{2P}5.1A and h/mK_{2P}5.1B (h/mK_{2P}5.1A+B) and h/mK_{2P}5.1A alone (h/mK_{2P}5.1A) were used. D: RT-PCR examination for the spliced region of hK_{2P}5.1 in the human kidney and K562. NTC shows ‘no template control’. The migration of predicted PCR products for hK_{2P}5.1A and hK_{2P}5.1B is shown on the right of the gel. E: Protein expression of mK_{2P}5.1A and mK_{2P}5.1B in mouse spleen lysate. In ‘+antigen’ (right lane), anti-K_{2P}5.1 (H170) antibody was pre-incubated by excess antigen. Protein lysates were probed by immunoblotting with anti-K_{2P}5.1 (H-170) antibody, which recognized the C-terminal region of K_{2P}5.1. Molecular mass standards are shown in kilodaltons (kDa) on the left side of the panel. Arrowheads indicate the migration positions of mK_{2P}5.1A and mK_{2P}5.1B. F: Co-immunoprecipitation of hK_{2P}5.1B with hK_{2P}5.1A. ‘IP: G-14’, protein lysates from CFP-hK_{2P}5.1A and YFP-hK_{2P}5.1B-cotransfected HEK293 cells immunoprecipitated with anti-K_{2P}5.1 (G-14) antibody which recognized the N-terminal region of K_{2P}5.1. Protein lysates were probed by immunoblotting with anti-K_{2P}5.1 (H-170) antibody. Arrowheads indicate the migration positions of CFP-hK_{2P}5.1A and YFP-hK_{2P}5.1B. Results are expressed as means ± SEM. Numbers used for the experiments are shown in parentheses.

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-45

2. HEK293 発現系における K_{2p}5.1A/B の細胞内分布

シアン蛍光タンパク (CFP) 又はイエロー蛍光タンパク (YFP) を N 末端側にタグ付けした hK_{2p}5.1A (CFP-hK_{2p}5.1A) 及び hK_{2p}5.1B (YFP-hK_{2p}5.1B) をヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に一過性に発現させ、その蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META にて観察することで、K_{2p}5.1 の細胞内局在を解析した。HEK293 細胞にベクターのみ発現させると、CFP 又は YFP シグナルは細胞全体で観察された (データ未掲載)。また、CFP シグナルが YFP 検出条件において、YFP シグナルが CFP 検出条件において、検出されないことを確認した。

HEK293 細胞に CFP-hK_{2p}5.1A を単独発現させた場合、CFP 蛍光シグナルは主に細胞膜に局在した (Fig. 6A)。一方、YFP-hK_{2p}5.1B 単独発現時では、YFP 蛍光シグナルは細胞全体に観察された (Fig. 6B)。CFP-hK_{2p}5.1A 及び YFP-hK_{2p}5.1B を共発現させた細胞では、CFP シグナルが細胞膜だけでなく細胞質にも見られ、CFP シグナル (緑) と YFP シグナル (赤) はほとんど重なって (黄) 観察された (Fig. 6C)。Image J にて蛍光強度のプロファイルプロットを作成し、細胞膜及び細胞内における局在を定量したところ、CFP-hK_{2p}5.1A 単独発現では CFP の蛍光が約 80%細胞膜に局在していたのに対し、CFP-hK_{2p}5.1A、YFP-hK_{2p}5.1B 共発現では CFP の局在は細胞膜と細胞内で同程度であり、hK_{2p}5.1A の細胞膜局在が hK_{2p}5.1B 共発現により阻害されることが示された (Fig. 6D)。

マウス K_{2p}5.1 バリエーションの細胞内発現分布についても同様に検討した。CFP-mK_{2p}5.1A 単独発現細胞では mK_{2p}5.1A が約 80%細胞膜に局在したが、CFP-mK_{2p}5.1A 及び YFP-mK_{2p}5.1B 共発現細胞では、CFP の局在は細胞膜上と細胞質中に同程度であり、mK_{2p}5.1B により mK_{2p}5.1A 細胞膜移行が阻害されることが示された (Fig. 7)。しかし、ヒト K_{2p}5.1 バリエーションと異なり、マウス K_{2p}5.1 バリエーションでは核内でもシグナルが観察された。

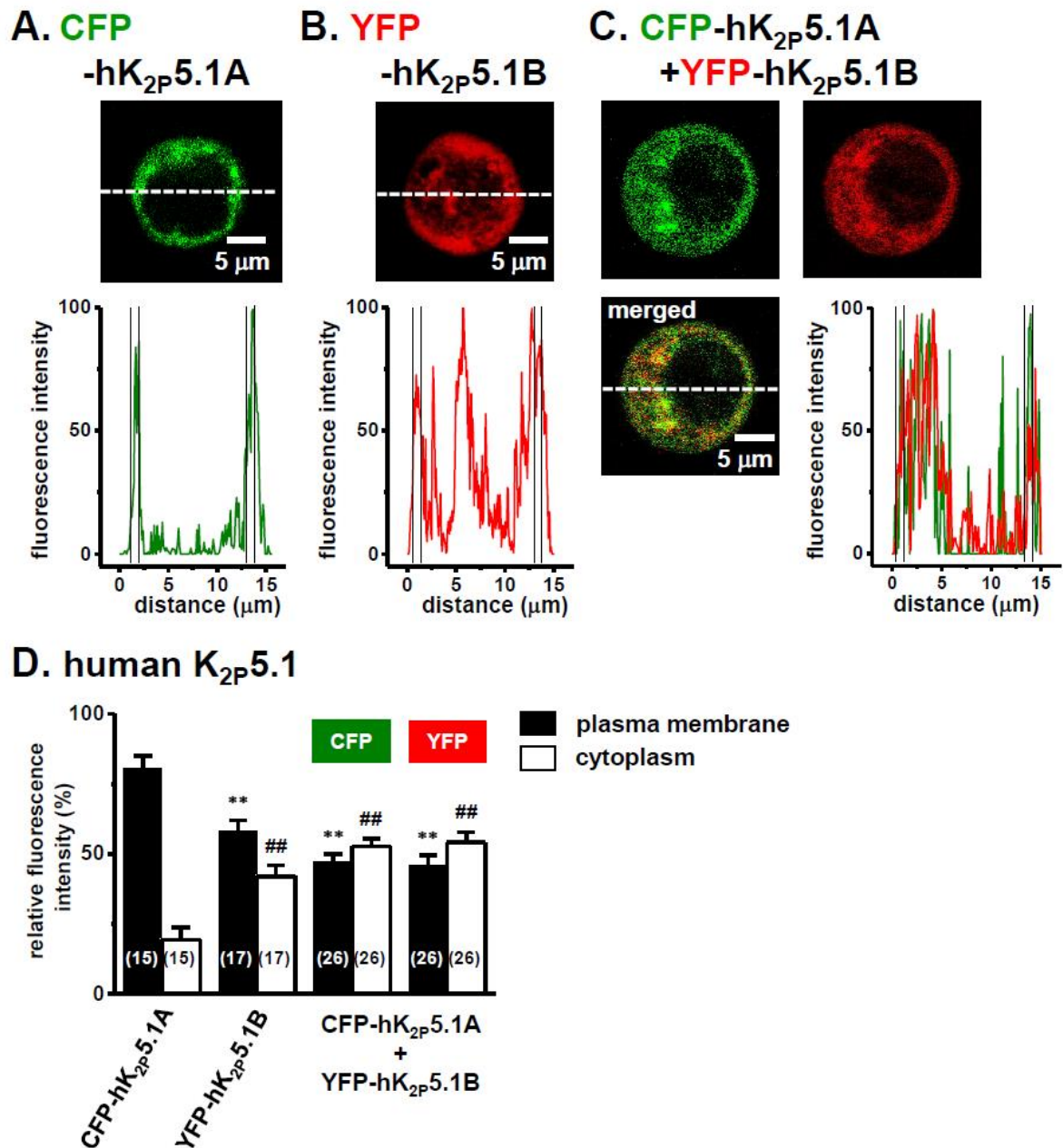


Figure 6. Cellular distribution of hK_{2P}5.1 and hK_{2P}5.1B in the HEK293 expression system.

A: CFP-tagged hK_{2P}5.1A-transfected HEK293 cells. CFP image (upper) and the fluorescence profile on the dotted line in the CFP image (lower) and shown in green. B: YFP-tagged hK_{2P}5.1B-transfected HEK293 cells YFP image (upper) and the fluorescence profile on the dotted line in the YFP image (lower) are shown in red. C: CFP-tagged hK_{2P}5.1A and YFP-tagged hK_{2P}5.1B cotransfected HEK293 cells. CFP and YFP images were shown in green and red, respectively, and the merged image ‘merged’ and the fluorescence profiles of CFP and YFP on the dotted line in the merged image. D: Summarized data from A, B, and C. Results are expressed the means ± SEM. Cell numbers used for the experiments are shown in parentheses. **: P<0.01 vs. CFP-tagged hK_{2P}5.1A (plasma membrane). ##: P<0.01 vs. CFP-tagged hK_{2P}5.1A (cytoplasm).

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452

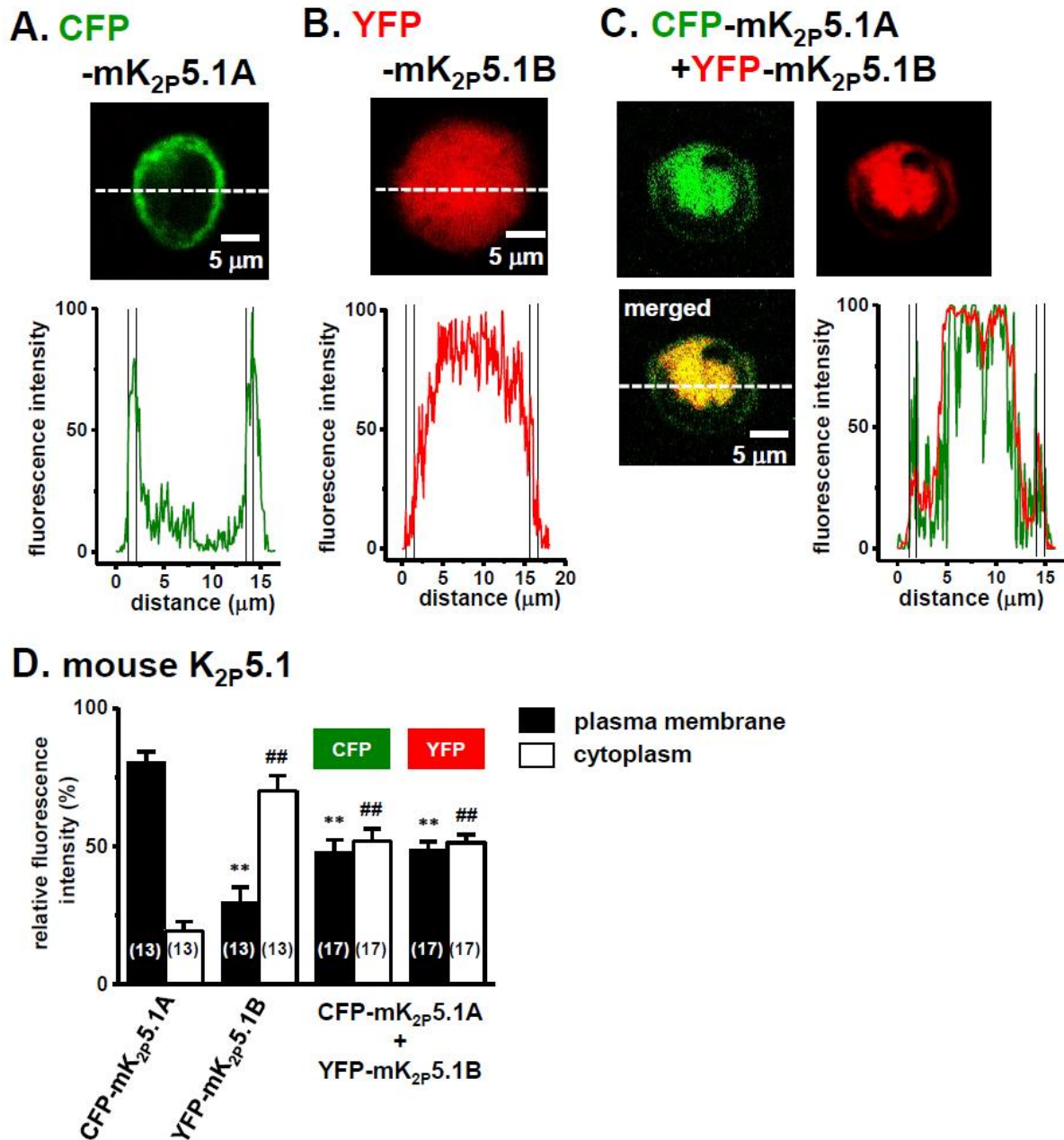


Figure 7. Cellular distribution of mK_{2P}5.1 and mK_{2P}5.1B in the HEK293 expression system.

A: CFP-tagged mK_{2P}5.1A-transfected HEK293 cells. CFP image (upper) and the fluorescence profile on the dotted line in the CFP image (lower) and shown in green. B: YFP-tagged mK_{2P}5.1B-transfected HEK293 cells YFP image (upper) and the fluorescence profile on the dotted line in the YFP image (lower) are shown in red. C: CFP-tagged mK_{2P}5.1A and YFP-tagged mK_{2P}5.1B cotransfected HEK293 cells. CFP and YFP images were shown in green and red, respectively, and the merged image ‘merged’ and the fluorescence profiles of CFP and YFP on the dotted line in the merged image. D: Summarized data from A, B, and C. Results are expressed the means ± SEM. Cell numbers used for the experiments are shown in parentheses. **: P<0.01 vs. CFP-tagged mK_{2P}5.1A (plasma membrane). #: P<0.01 vs. CFP-tagged mK_{2P}5.1A (cytoplasm).

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 2015, 98, 440-452

3. K562 細胞における K_{2p}5.1B 過剰発現による K_{2p}5.1 活性への影響

K_{2p}5.1B による K_{2p}5.1A 細胞膜移行阻害効果の K_{2p}5.1 機能への影響を明らかにするために、K_{2p}5.1 が高発現している K562 細胞にベクター (mock) 又は hK_{2p}5.1B をトランスフェクションし、K_{2p}5.1 活性を測定した。活性測定は、細胞外をアルカリ性 (pH 8.0) にすることで K_{2p}5.1 を活性化させた際の過分極反応の大きさ、すなわち膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)の蛍光強度の減少率を指標として評価した。測定プロトコルの最後に細胞外液をカリウムイオン濃度 140 mM にした際に脱分極反応を示した細胞からデータを得た。Fig. 8A に示すように、アルカリ pH により誘発される過分極反応は、mock 細胞と比べ、hK_{2p}5.1B トランスフェクション細胞で小さかった。この過分極反応の大きさを DiBAC₄(3)の相対蛍光強度の変化量 (ΔF_{DiBAC}) で評価したところ、hK_{2p}5.1B トランスフェクション細胞群で有意に低かった (Fig. 8B)。また、細胞膜の過分極により引き起こされる細胞内カルシウム流入は、過分極反応と同様に、hK_{2p}5.1B トランスフェクション細胞群において有意に低かった (Fig. 8C)。細胞膜電位と細胞内カルシウム濃度の関係について、mock 群におけるアルカリ pH 誘発性過分極反応と細胞内カルシウム濃度上昇の間の相関を調べたところ、これらの間に正の相関関係が認められた (Fig. 8D)。以上より、hK_{2p}5.1B により K_{2p}5.1 活性が抑制され、細胞膜の過分極に伴う細胞内カルシウム濃度上昇も抑制されることが明らかになった。

K_{2p}5.1 以外のアルカリ pH により活性化されるチャネルの関与について検討を行った。K562 細胞において、pH に感受性を持つ K_{2p}3.1、K_{2p}9.1、K_{2p}16.1 及び K_{2p}17.1 発現を測定したところ、これらの K_{2p} チャネルはほとんど発現していなかった (Fig. 8E)。また、K562 細胞を非選択的 K_{2p}5.1 阻害剤 clofilium (5 μ M) で測定前 30 分から前処置し、clofilium 存在下でアルカリ pH 誘発性過分極反応を測定したところ、アルカリ pH で誘発される過分極反応は消失した ($\Delta F_{\text{DiBAC}} < 0.02$, n=21)。そのため、K562 細胞において観察されたアルカリ pH 誘発性過分極反応が K_{2p}5.1 活性によるものであることが示された。

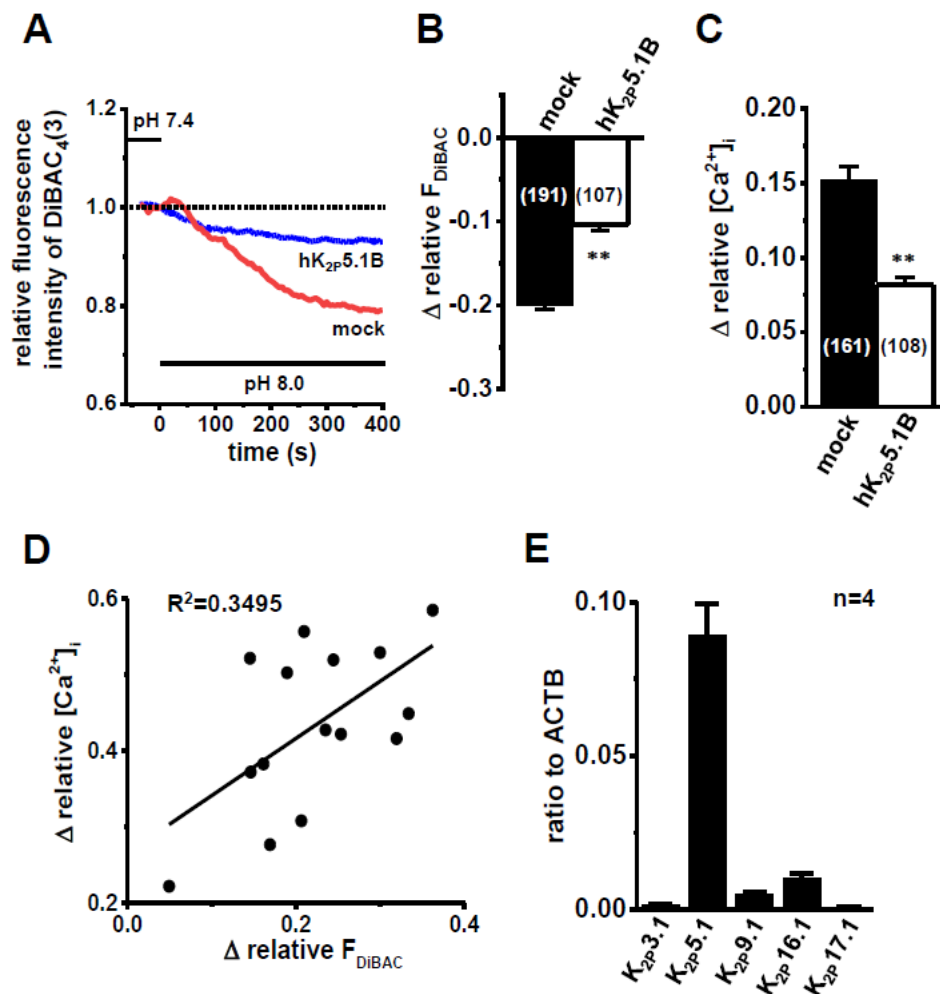


Figure 8. Suppressive effects of the alkaline pH-induced hyperpolarizing response and cell proliferation by K_{2p}5.1B-overexpression in K562 cells.

A: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in mock- and hK_{2p}5.1B-transfected K562 cells. The fluorescence intensity of DiBAC₄(3) at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. B: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in mock- and hK_{2p}5.1B-transfected K562 cells. C: Measurements of changes in intracellular Ca²⁺ concentrations by alkaline pH (pH8.0)-induced hyperpolarizing responses using DiBAC₄(3) and Fura-2 AM, a Ca²⁺ indicator. Summarized data are shown as alkaline pH (pH8.0)-induced Δ relative [Ca²⁺]_i in mock- and hK_{2p}5.1B-transfected K562 cells. D: Simultaneous measurements of changes in the membrane potential and intracellular Ca²⁺ concentration by hyperpolarizing (pH8.0) non-transfected K562 cells. E: Real-time PCR assay for the expression of K_{2p}3.1, K_{2p}5.1, K_{2p}9.1, K_{2p}16.1, and K_{2p}17.1 transcripts in K562. Results are expressed as means \pm SEM. Cell numbers used for the experiments are shown in parentheses. **: P<0.01 vs. mock-transfected K562.

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452、一部改変

4. 細胞周期に対する K_{2p}5.1 の寄与及び細胞増殖能に対する K_{2p}5.1B の影響

K562 細胞における K_{2p}5.1 発現について、細胞免疫化学染色によって測定したところ、大きさの異なる細胞において K_{2p}5.1 の発現分布に違いが見られた。約 30%存在する細胞直径が 20 μm 以上の大きな細胞では、K_{2p}5.1 シグナルが主に細胞膜に観察された (Fig. 9A, C)。一方、70%程度存在する細胞直径 17 μm 以下の細胞では、細胞全体で弱い K_{2p}5.1 シグナルが観察された (Fig. 9B, C)。この細胞の大きさによる K_{2p}5.1 シグナルの差異が、細胞周期の違いによるものと予想した。PI 染色により、K562 細胞における細胞周期分布を解析したところ、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の細胞集団はそれぞれ $54.9\pm 1.5\%$ 、 $30.0\pm 1.3\%$ 、 $15.2\pm 0.4\%$ 存在した (n=6)。K562 細胞をダブルチミジンプロック法により細胞周期を同調させ、2 時間毎に回収し、各細胞周期における K_{2p}5.1A 発現をウェスタンブロッティングにより解析した。回収した細胞の細胞周期については、PI 染色を行い、フローサイトメトリーにより解析した。Fig. 9D に示すように、K_{2p}5.1 タンパク発現は G1 期から S 期への移行時に増加し、G0/G1 期及び G2/M 期では非常に低かった。以上の結果は、K_{2p}5.1 が細胞容量調節を介して K562 細胞の G1 期から S 期への移行に重要な役割を果たしていることを示唆する。

K562 細胞における hK_{2p}5.1B 過剰発現が細胞増殖、細胞容量調節、細胞周期分布に及ぼす影響について検討を行った。しかし、hK_{2p}5.1 過剰発現による細胞容量調節及び細胞周期分布に対する有意な変化は認められなかった (データ未掲載)。細胞増殖への影響について、K562 細胞に hK_{2p}5.1B をトランスフェクションし、48 時間後における細胞増加率を WST-1 法にて測定したところ、hK_{2p}5.1B のみをトランスフェクションした細胞では mock 細胞と比べて細胞増殖能の変化は見られなかった。しかし、hK_{2p}5.1A を過剰発現させた細胞では、細胞増殖の有意な増加が認められ、この増殖亢進は、hK_{2p}5.1B を共発現させることで抑制された (Fig. 9E)。以上より、K_{2p}5.1B は K562 細胞において、K_{2p}5.1A による細胞増殖能の亢進を抑制することが示された。

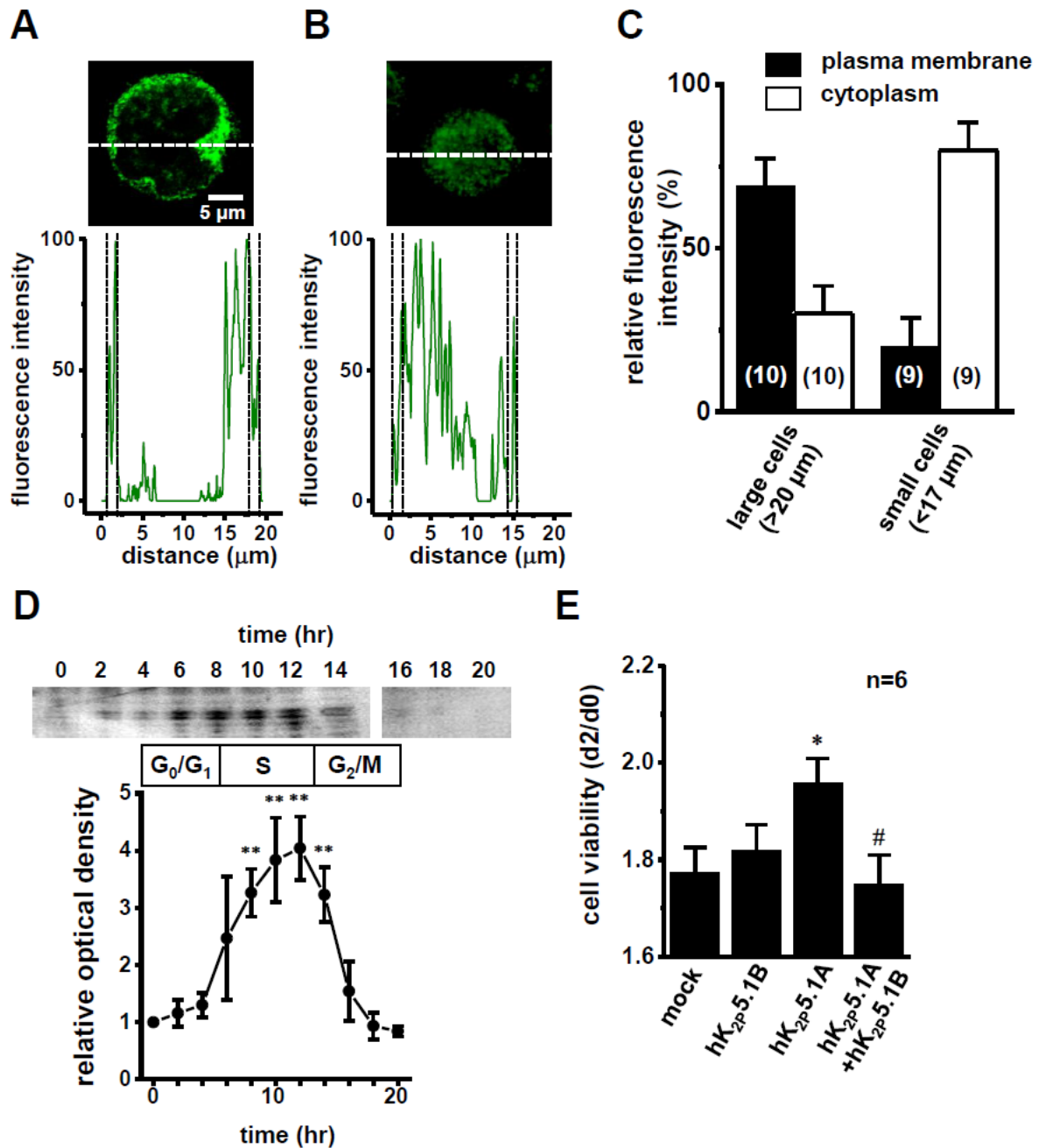


Figure 9. Cellular distribution and cell cycle-dependent expression of the K_{2P5.1A} protein in K562 and inhibition of cell proliferation in hK_{2P5.1}-overexpression K562 cells by hK_{2P5.1B} transfection.

A, B: Immunocytochemical staining of K562 cells for K_{2P5.1}. Confocal images of a cell labeled with anti-K_{2P5.1} (G-14) and Alexa Fluor 488 anti-goat IgG antibodies (upper panel) and the fluorescence profile on the dotted line in the Alexa Fluor 488 image (lower) are shown in green. ‘A’ and ‘B’ show the result in larger (more than 20 μm in the diameter) and smaller cells (less than 17 μm in diameter), respectively. C: Summarized data on the distribution of the K_{2P5.1} protein in the plasma membrane and cytoplasm. D: Changes in K_{2P5.1} protein expression during cell cycle progression in K562 cells. Protein lysates from cells were also extracted every 2 hr and K_{2P5.1} expression was determined by western

blotting (50 µg protein/lane). The optical band density of the 50 kDa, band was expressed relative to the value at 0 hr, which was taken as 1.0 (n=4 for each). E: Measurement of cell viability using a WST-1 assay in mock-, hK_{2p5.1A}-, hK_{2p5.1B}-, or hK_{2p5.1A}+hK_{2p5.1B}-transfected K562 cells. Relative cell viability (d2/d0) was expressed as the ratio of cell viability after a 2-day (d2) culture with one at day 0 (d0). Results are expressed as means ± SEM. Cell numbers used for the experiments are shown in parentheses. *: P<0.05 vs. mock-transfected K562. #:P<0.05 vs. hK_{2p5.1A}-transfected K562.

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452

5. スプライソソーム阻害薬による K_{2p}5.1B 発現及び K_{2p}5.1 活性への影響

薬理的な K_{2p}5.1B 発現変動について、スプライシング機構に着目し、スプライソソーム阻害剤を用いた検討を行った。K562 細胞に 1 μM pladienolide B (PB) を 4, 8, 12 時間処置した。エキソン 2 からエキソン 4 の間を増幅する PCR にて得られる hK_{2p}5.1A (352 bp) 及び hK_{2p}5.1B (185 bp) の異なる PCR 産物について、非定量的 PCR 測定を行った。PB 未処置 (0 hr) では、hK_{2p}5.1B のシグナルは見られなかったが、PB 処置により hK_{2p}5.1B の PCR 産物が増加した (Fig. 10A)。エキソン 1, 2, 4 及び 5 にそれぞれ特異的なプライマーを使用し、PB 処置 K562 細胞における各エキソンの PCR を行ったところ、それぞれ予測された長さの PCR 産物が得られた (Fig. 10B)。次に、定量的リアルタイム PCR により、hK_{2p}5.1B 転写を測定した。PB 処置により hK_{2p}5.1A+B 発現量に変化はなかったものの、hK_{2p}5.1A 発現量は減少しており、hK_{2p}5.1A+B に対する hK_{2p}5.1A 発現比率が顕著に減少したことから、hK_{2p}5.1B 転写が増加したことが示唆された (Fig. 10C, D)。K562 細胞における PB 処置による K_{2p}5.1 活性への影響についてアルカリ pH 誘発性過分極反応を測定した。PB 処置 12 時間後における過分極反応は、vehicle 及び PB 処置群の間で差が見られなかった。PB 処置 24 時間後では、PB 処置による過分極反応の有意な減少が認められた (Fig. 11E)。

PB 以外のスプライソソーム阻害剤についても検討を行った。イチヨウの葉から単離された天然ビフラボノイドであるスプライソソーム阻害剤 isoginkgetin [53] を濃度 10, 50, 100 nM で K562 細胞に処置し、8 時間後における hK_{2p}5.1A+B 及び hK_{2p}5.1A 発現をリアルタイム PCR によって測定した。PB 処置と同様に isoginkgetin 処置により hK_{2p}5.1A 発現が濃度依存的に有意に減少したが、hK_{2p}5.1A+B 発現は PB 処置時と異なり vehicle と比べて約 2 倍に増加した (Fig. 10E)。

これらの結果より、スプライソソーム阻害剤により 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された。

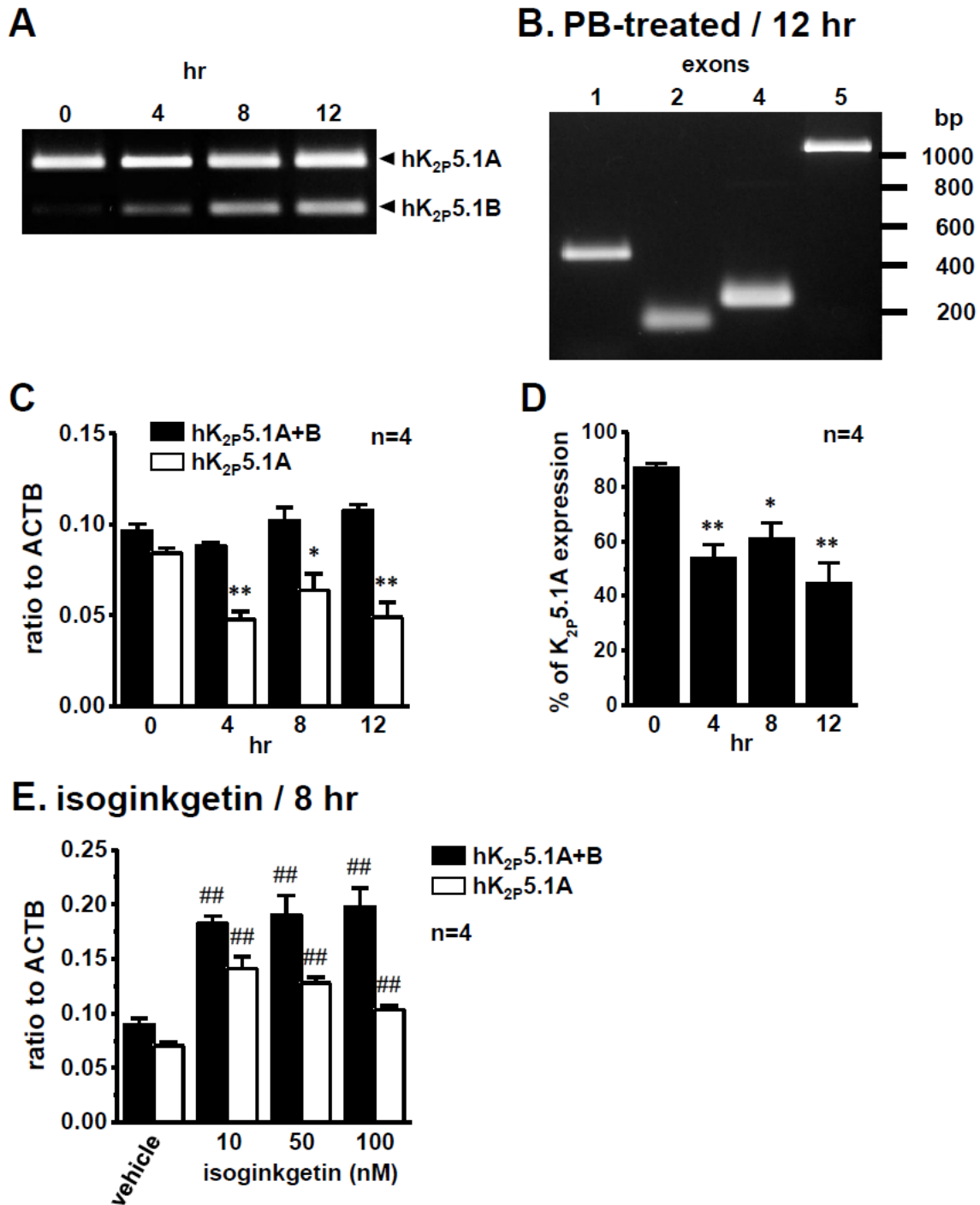


Figure 10. Effects of the pre-mRNA splicing inhibitors, pladienolide B (PB) and isoginkgetin on the expression of K_{2P}5.1 splicing isoforms in K562 cells.

A: RT-PCR examinations for the splicing region of K_{2P}5.1 in 1 μ M PB-treated K562 cells. Arrowheads indicate the molecular weights of the predicted PCR products for hK_{2P}5.1A and hK_{2P}5.1B. B: RT-PCR examinations for exons 1, 2, 4, and 5 of K_{2P}5.1 in 1 μ M PB-treated K562 cells for 12 hr. A DNA molecular weight marker is indicated on the right of the gel. C: Real-time PCR assay for the expression of K_{2P}5.1 in 1 μ M PB-treated K562 cells. PCR primers specific for the conserved region of hK_{2P}5.1A

and hK_{2P}5.1B (hK_{2P}5.1A+B) and hK_{2P}5.1A alone (hK_{2P}5.1A) were used. D: Percentages of K_{2P}5.1A expression calculated from the results of 'C'. E: Real-time PCR assay for the expression of K_{2P}5.1 in isoginkgetin-treated K562 cells (10, 50 and 100 nM for 8 hr). Results are expressed as means ± SEM. Numbers used for the experiments are shown in parentheses. *, **:P<0.05, 0.01 vs. at 0 hr.

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452

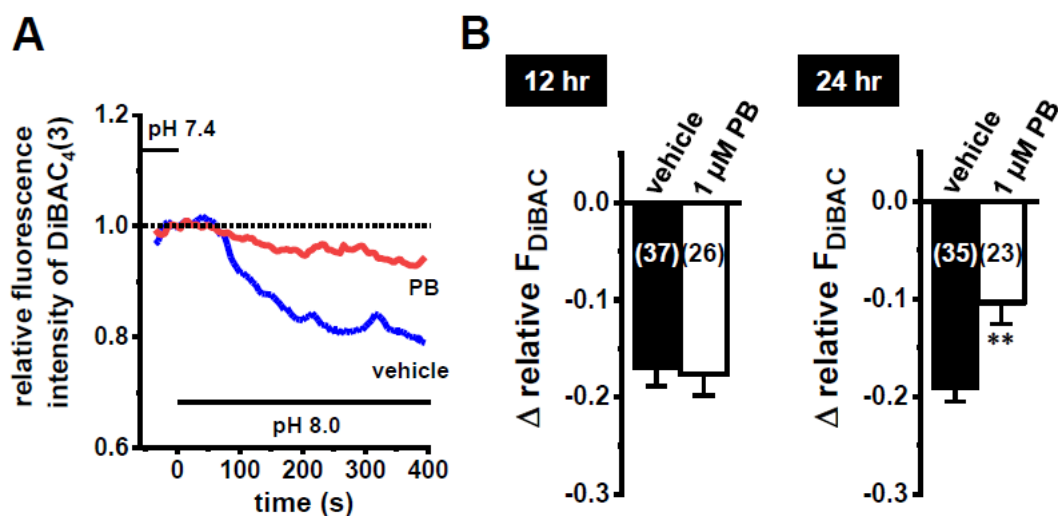


Figure 11. Effect of the pre-mRNA splicing inhibitor, pladienolide B (PB) on the alkaline pH-induced hyperpolarizing responses in K562 cells.

A: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in vehicle- and PB-treated K562 cells. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. B: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in vehicle- and PB-treated K562 cells. Results are expressed as means ± SEM. Cell numbers used for the experiments are shown in parentheses. **: P<0.01 vs. vehicle.

Endo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, 98, 440-452、一部改変

6. マウス CD4 陽性 T 細胞における pladienolide B による K_{2P}5.1 発現・活性への影響

K562 細胞で見られた PB による K_{2P}5.1B 発現亢進とそれに伴う K_{2P}5.1 活性抑制効果について、同様の結果がマウス T 細胞において得られるのか検討した。マウス脾臓細胞を con-A 及び IL-2 存在下で 48 時間培養後、1 μM PB を 18 時間処置し、CD4 陽性 T 細胞における K_{2P}5.1 を PCR クローニングした。Fig. 12A に示すように、PCR を 40 サイクル行った際に、vehicle 処置細胞において約 1.7 kbp の mK_{2P}5.1A と予測される PCR 産物が観察されたが、PB 処置細胞では観察されなかった。シーケンス解析により、PB 処置により生じた短い PCR 産物から、hK_{2P}5.1B と同様に N 末端側の 3 つの膜貫通ドメイン S1-S3 及びポアドメイン P1 が欠損している構造である K_{2P}5.1 X1 (GenBank accession number, XM_006518590) が単離された。

PB 処置による K_{2P}5.1 活性への影響を検討するために、アルカリ pH 誘発性過分極反応を測定した。細胞外を pH8.5 にした際の過分極反応は、1 μM PB 処置により有意に抑制された (Fig. 12B-D)。以上より、K562 細胞と同様に、マウス CD4 陽性 T 細胞において、PB により K_{2P}5.1 スプライスバリエーションの発現が亢進し、K_{2P}5.1 活性が抑制されることが明らかとなった。

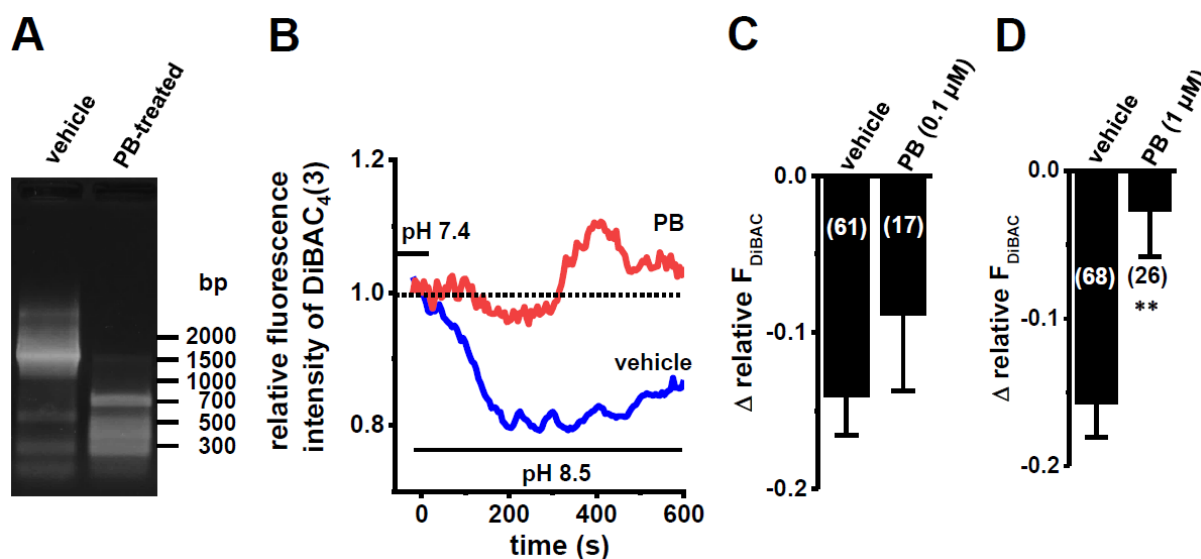


Figure 12. Molecular cloning of full-length K_{2P}5.1 from mouse splenic CD4⁺ cells treated with vehicle and PB (1 μM) for 18 h, and effects of the PB treatment on alkaline pH (pH8.5)-induced hyperpolarizing responses in activated CD4⁺ cells.

A: A representative gel image of PCR products (for 40 cycles) from activate CD4⁺ cells treated with vehicle and PB (1 μM) for full-length K_{2P}5.1. B: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in activated CD4⁺ cells treated with PB. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. C, D: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DIBAC}) in vehicle- and PB [0.1 (C) and 1 μM (D)]-treated groups. Results are expressed as means \pm SEM. Cell numbers used for the experiments are shown in parentheses. **:P<0.01 vs. vehicle.

Tagishi *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, 2016, 132, 205-209、一部改変

第4節 考察

T細胞において、K_{2p}5.1はカルシウムシグナル伝達の制御に重要な役割を果たしており、IBDなどの自己免疫疾患の治療標的として期待されているカリウムチャンネルである [31]。しかし、選択的かつ強力な K_{2p}5.1 阻害剤は未だ開発されていない。本章では、ヒト及びマウス脾臓より K_{2p}5.1 のスプライスバリエントである K_{2p}5.1B (hK_{2p}5.1B, mK_{2p}5.1B) を同定した (Fig. 4)。選択的スプライシングにより、N末端領域を欠損した短縮型タンパクが生成されることがある (Alternative Translation Initiation) [54-56]。実際に、N末端またはC末端を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロッティングより、N末端を認識する抗 K_{2p}5.1 抗体では K_{2p}5.1A 以外のバンドシグナルが見られなかったのに対し、C末端を認識する抗体では、K_{2p}5.1A とは異なるバンドシグナルが観察され、K_{2p}5.1 の選択的スプライシングにより N末端領域を欠損した K_{2p}5.1B が生成することが示唆された。

K_{2p}5.1A 及び K_{2p}5.1B 共発現 HEK293 細胞を用いた免疫沈降により、K_{2p}5.1A の N末端側を大きく欠損した K_{2p}5.1B は K_{2p}5.1A とヘテロ二量体を形成することが可能であることが示された (Fig. 5F)。K_{2p}5.1B による細胞膜移行への影響について、CFP タグを付けた K_{2p}5.1A 及び YFP タグを付けた K_{2p}5.1B を用いて HEK293 発現系による細胞内分布解析を行った。CFP-K_{2p}5.1A 単独発現細胞において、主に細胞膜上で蛍光が認められたのに対し、YFP-K_{2p}5.1B 共発現細胞では、CFP-K_{2p}5.1A 単独発現と比べて細胞内における蛍光が増加した。YFP-K_{2p}5.1B 発現分布はヒト及びマウスで異なる部分が見られた。ヒトでは YFP-hK_{2p}5.1B 単独発現細胞において、YFP 蛍光シグナルの分布は核を除く細胞内に分布し、また細胞膜付近に多く見られた。CFP-hK_{2p}5.1A 及び YFP-hK_{2p}5.1B 共発現細胞では、核を除く細胞全体に分布が認められた。一方、マウスでは YFP-mK_{2p}5.1B 単独発現細胞において、YFP 蛍光シグナルは核を含む細胞全体に観察され、CFP-mK_{2p}5.1A 及び YFP-mK_{2p}5.1A 共発現細胞では、主に細胞膜と核内に分布していた。ヒト、マウス間での K_{2p}5.1B 細胞内分布の違いについて詳細な検討は行っておらず理由は不明だが、どちらも K_{2p}5.1B 共発現により K_{2p}5.1A の細胞膜分布が減少したことから、K_{2p}5.1B は K_{2p}5.1A の細胞膜輸送を阻害することが示された (Fig. 6, 7)。以上のことから、K_{2p}5.1 の N末端領域には重要な膜輸送モチーフが含まれ、K_{2p}5.1 の C末端領域がチャンネルの二量体化に重要であることが示唆された (Fig. 5F, 6, 7)。

K_{2p}5.1B による K_{2p}5.1 チャンネル機能への影響について、K_{2p}5.1A を比較的高発現する K562 細胞に hK_{2p}5.1B を過剰発現させ、蛍光イメージング解析を行った。hK_{2p}5.1B 過剰発現により、アルカリ pH 誘発性過分極反応で評価される K_{2p}5.1 活性が抑制された。また、細胞膜過分極に伴う細胞内カルシウム流入も hK_{2p}5.1 発現により阻害された (Fig. 8)。カリウムチャンネル活性化による細胞内カルシウム濃度上昇により、細胞増殖能などの T細胞機能が亢進する。が

ん細胞において、カリウムチャネルは早期 G1 期や G1/S 期、G2/M 期への遷移や細胞容量の調節を介して細胞増殖を制御しており、K_{2p}5.1 は、乳癌細胞において G1 期から S 期への細胞周期チェックポイントに関与することが報告されている [42, 43]。本研究では、細胞免疫化学染色により、K562 細胞の大きさにより K_{2p}5.1 発現分布が異なることを示し、各細胞周期中の K_{2p}5.1 発現をウェスタンブロッティングにより解析した。K562 細胞において K_{2p}5.1 が G0/G1 期から S 期への移行時に活性化され、G2/M 期への移行時には不活性化されることを明らかにし、T 細胞でも K_{2p}5.1 が細胞容量の調節を介して G1/S 期への移行に重要な役割を果たすことが示された (Fig. 9)。しかし、K562 細胞における hK_{2p}5.1B 過剰発現は細胞周期分布や細胞容量調節には影響を与えなかった。また、細胞増殖能について、hK_{2p}5.1B 過剰発現は影響が見られなかったが、hK_{2p}5.1A 過剰発現により亢進した細胞増殖は、hK_{2p}5.1B を同時に発現させることにより阻害された (Fig. 9E)。これらの結果から、K_{2p}5.1B が K_{2p}5.1 チャネルのドミナントネガティブ体として機能し、K_{2p}5.1A を高発現する細胞において、細胞増殖などの細胞機能を変化させることを示唆した。

選択的スプライシングを受ける過程で、スプライシング部位やイントロン-エキソン間の境界が変化し、スプライシングに影響を及ぼした結果、様々な疾患に繋がる [37]。本研究において、IBD の発症に K_{2p}5.1B 発現低下による K_{2p}5.1 活性亢進が関与している可能性を考え、マウス脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1B 発現を測定したが、健常マウス由来 CD4 陽性 T 細胞において K_{2p}5.1B 発現は見られず (Fig. 5B)、生体由来 T 細胞における K_{2p}5.1B の生理学的、病態生理学的重要性を直接示すデータは得られなかった。しかし、K_{2p}5.1B はチャネル活性抑制効果を持つことから、K_{2p}5.1B 発現を誘導する薬物の開発は、自己免疫疾患などの K_{2p}5.1 関連疾患治療において画期的な薬物の開発に繋がる可能性がある。本研究では、スプライソソーム阻害剤 pladienolide B (PB) を使用した K_{2p}5.1 スプライスバリエーション発現亢進によるチャネル活性抑制効果を見出した。K562 細胞において、PB は K_{2p}5.1 全体の発現量を変化させることなく K_{2p}5.1A 発現減少及び K_{2p}5.1B 発現増加を引き起こすことで、K_{2p}5.1 活性抑制効果を示した (Fig. 10, 11)。マウス脾臓細胞に PB を処置した場合においても、K_{2p}5.1B と類似の構造をとる K_{2p}5.1 X1 発現を増加させ、K_{2p}5.1 活性を抑制した (Fig. 12)。一方、PB とは異なる機序でスプライソソームを阻害する isoginkgetin を K562 細胞に処置した場合、K_{2p}5.1A 発現の減少は見られたものの、K_{2p}5.1 全体の発現量も変化した (Fig. 10E)。スプライソソーム阻害剤による K_{2p}5.1B 発現への影響について、当初は K_{2p}5.1B 発現が減少し、K_{2p}5.1A 発現が増加することで、K_{2p}5.1 活性が亢進すると予想した。しかし、実際には K_{2p}5.1A 発現が減少し、K_{2p}5.1B 発現が増加した結果、K_{2p}5.1 活性抑制が認められた。スプライシングを担うスプライソソームには固有の基質がなく、多数の競合する基質変異体が存在しているため、スプライソソーム阻害剤処置により選択的スプライシングが変化することが知られている

[57]。本研究において、PB 処置によりスプライソソーム中のスプライス部位認識因子 SF3b 複合体が阻害され、別のスプライス部位認識因子が働いた結果、K_{2p}5.1A やイントロンが保持されたスプライスバリエーションではなく、K_{2p}5.1A よりも短い K_{2p}5.1B や K_{2p}5.1 X1 の発現が増加した可能性が考えられる。

我々は以前、IBD モデルマウスにおいて、炎症性 CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現・活性亢進が IFN- γ といった炎症性サイトカイン産生亢進などを介して IBD の病因に関与している可能性があることを報告した [31]。DSS 誘発性 IBD モデルマウスにおいて、実験的に IBD の病態スコアとして使用される体重減少、大腸炎、下痢、血便、結腸の肥厚に対する PB (0.1 mg/kg/day) 皮下投与の効果について検討した。DSS 自由飲水開始後 5 日目に PB を単回投与したが、病態スコアの有意な改善は認められなかった (データ未掲載)。本来であれば、最適な投与量や投与スケジュール、投与経路を検討すべきであったが、PB の生産が一時中止されたため、IBD 治療に対する PB を利用した K_{2p}5.1 阻害効果を解明することはできなかった。PB は細胞毒性が高く、がん治療における臨床研究でもその細胞毒性による副作用が原因で中止された [45]。PB の細胞毒性を軽減させ、現在がん治療において臨床試験を受けている PB の誘導体や PB と同様の作用機序を示すスプライソソーム阻害剤は、K_{2p}5.1A 発現亢進を阻害することで K_{2p}5.1 活性及びそれに伴う細胞内カルシウム流入を抑制し、T 細胞分化や炎症性サイトカイン産生を抑制するため、IBD などの自己免疫疾患や炎症性疾患に対して有用である可能性がある。

本章では、K_{2p}5.1 新規スプライスバリエーション K_{2p}5.1B が、完全長 K_{2p}5.1A の細胞膜移行を阻害することで、K_{2p}5.1 活性を抑制することを明らかにした。K_{2p}5.1B による K_{2p}5.1 活性抑制は、細胞内カルシウム流入を抑制することで K_{2p}5.1A により亢進した細胞増殖能を抑制した。また、スプライソソーム阻害剤は、K_{2p}5.1 スプライスバリエーションの発現を亢進させ、K_{2p}5.1 活性を抑制することで T 細胞機能を制御することを明らかにした。本研究で用いたスプライソソーム阻害剤 PB は細胞毒性が強く、重大な副作用が発生したため臨床研究は中止されたが、毒性が軽減されたスプライソソーム阻害剤により、IBD などの K_{2p}5.1 発現亢進が認められる自己免疫疾患の新規治療戦略を提案できる可能性がある。また、スプライシング機構に着目したイオンチャネル活性制御はこれまで報告がなく、スプライソソーム阻害剤によるイオンチャネル活性抑制は K_{2p}5.1 以外のイオンチャネルへの応用が期待できる。

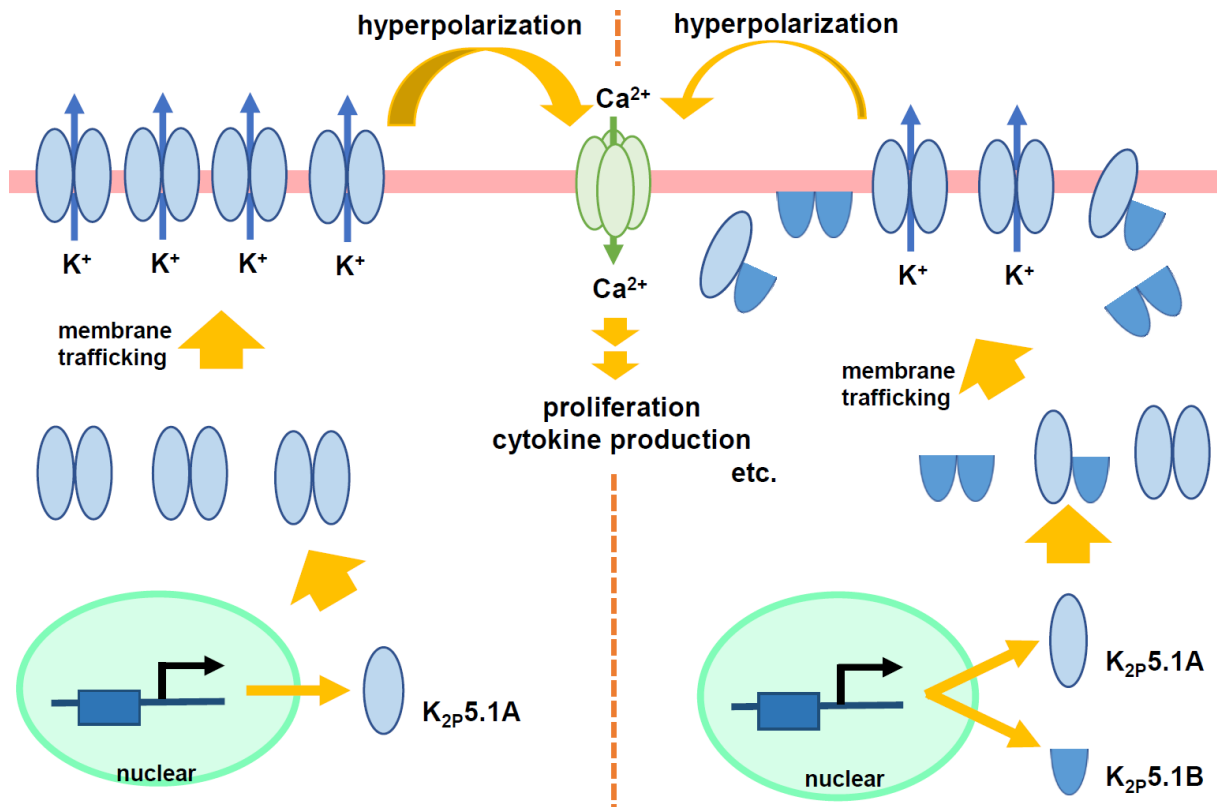


Figure 13. Mechanism of $K_{2P5.1}$ inhibition by $K_{2P5.1B}$.

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

第1節 緒言

潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される炎症性腸疾患 (IBD) は、日本において指定難病に登録されている自己免疫疾患の一つである。我々は、5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性 IBD モデルマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞において、K_{2p}5.1 発現・活性が亢進し、それに伴う細胞内カルシウム流入が増大することを報告した。また、K_{2p}5.1 ノックアウトマウスでは、IBD モデルマウスにおける下痢や下血、腸炎や陰窩障害、さらには炎症性サイトカインである IFN- γ 産生の増大がいずれも抑制されたことから、IBD の発症、悪化に K_{2p}5.1 が関与する可能性を示した [31]。しかし、K_{2p}5.1 発現調節機構については未だ不明な点が多い。

一般に、炎症部位では病変部位における血管機能不全や微小血管系の破壊による酸素供給量の減少、及び好中球や単球などの免疫細胞が大量に動員されること、またこれらの細胞により活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) やミエロペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなどの次亜塩素酸が生成されることによる酸素要求量の増加により、健常組織では酸素濃度が 5~10%程度に対し、炎症組織では 1~2%程度の低酸素環境となる [58-60]。実際に、炎症性腸疾患 (IBD) や多発性硬化症 (MS)、関節リウマチ (RA) といった慢性免疫疾患の病変部位が低酸素環境となり、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 発現が上昇することが報告されている [60-63]。

低酸素により誘導される HIF は低酸素環境への細胞適応のための重要な転写因子であり、酸素濃度依存的に発現が制御される α サブユニットと恒常的に発現する β サブユニットの間でヘテロ二量体を形成することで転写活性を示す。 α サブユニットには、HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の 3 つのサブタイプが存在する。HIF-1 α と HIF-2 α は塩基配列や機能的に類似性が高いが、ユビキタスに発現する HIF-1 α と比べ、HIF-2 α の分布は血管内皮細胞やII型肺細胞、骨髄系細胞など特定の細胞に選択的に発現する。HIF-3 α は、複数のスプライスバリエーションとして存在し、そのいくつかは HIF-1 α 及び HIF-2 α 活性をドミナントネガティブに阻害することが報告されているが、低酸素環境での細胞応答における役割は未だ不明な点が多い [59, 60]。酸素濃度による α サブユニットの発現調節は、主に転写後レベルで起こる。正常酸素濃度下では、 α サブユニットは連続的に産生されるが、酸素依存性プロリルヒドロキシラーゼ (prolyl hydroxylase, PHD) によってヒドロキシル化を受けることでユビキチンプロテアソーム依存的に急速に分解される。また、アスパラギンヒドロキシラーゼである factor-inhibiting HIF (FIH)

-1による酸素依存性ヒドロキシル化により HIF α と転写活性化補助因子である p300/CBP の間の相互作用を阻害、HIF 転写活性を阻害する。一方、低酸素環境では、これらのヒドロキシラーゼは不活性であるため、 α サブユニットが安定化され、核内へ移動し、HIF-1 β サブユニットと二量体化する。その後、HIF 標的遺伝子のプロモーター領域である hypoxia response element (HRE) に結合し、様々な遺伝子の転写が亢進される (Fig. 14) [59-61]。僧帽弁閉鎖不全症によって低酸素に曝された心筋細胞において、活動電位の調節に重要な役割を果たす内向き整流性カリウムチャンネル Kir6.2 発現が HIF-1 α により調節される [64]。また、内部が低酸素環境となる固形がんにおいて、HIF-1 α によりカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}2.2 発現が亢進することが報告されており、一部のカリウムチャンネルも HIF-1 α を介した発現制御を受ける [65, 66]。しかし、炎症疾患の免疫細胞におけるイオンチャンネルの発現制御は報告されていない。

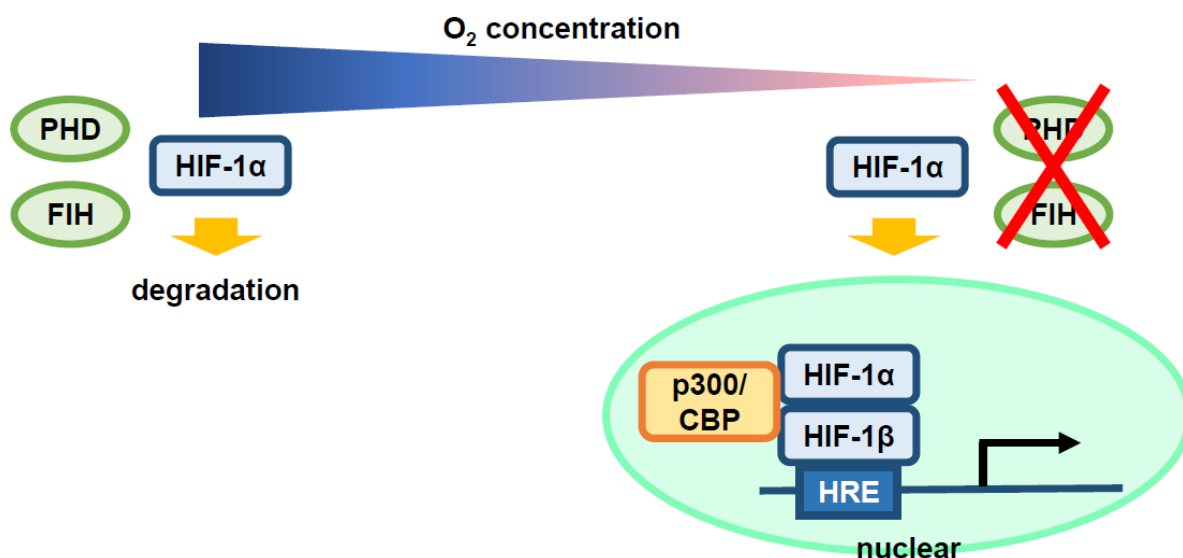


Figure 14. Mechanism of oxygen-dependent regulation of HIF-1

PHD: prolyl hydroxylase, FIH: factor inhibiting HIF, HRE: hypoxia response element

遺伝子の発現は、ヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferase, HAT) 及びヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) によるエピジェネティック制御を受ける。HDAC はヒストンや非ヒストンタンパク質のリジン残基からアセチル基を除去することにより転写活性調節に関与する酵素であり、18 種類のサブタイプが存在する。HDAC はその相同性から 4 つのグループに分類されており、クラスIには HDAC1-3, 8、クラスIIには HDAC4-7, 9, 10、クラスIIIには sirtuin (SIRT) 1-7、クラスIVには HDAC11 が属する [67, 68]。クラスIIIに属する SIRT ファミリーは、酵素の活性化にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を必要とするため、低酸素による NAD⁺の減少は、SIRT1 活性を低下させる [69, 70]。IBD 患者及び

IBD モデルマウスにおいて SIRT1 発現が低下しており、SIRT1 は signal transducer and activator of transcription (STAT) -3、Smad7、NF- κ B など炎症経路の制御に関する様々なタンパク発現を負に制御していることから、SIRT1 活性化により炎症性サイトカイン産生抑制を介した IBD の腸管損傷を軽減させることが報告されている [71, 72]。しかし、炎症に関連したイオンチャネルの SIRT1 を介した発現変化についての報告はない。

最近、免疫疾患や炎症性疾患を含む様々な疾患治療への HDAC 阻害剤の応用が研究されている。例えば、非選択的 HDAC 阻害剤 vorinostat の投与は、IBD モデルマウスの CD4 陽性 T 細胞における TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生低下によって腸炎が改善した [67, 73, 74]。また、IBD モデルマウスの炎症粘膜及び CD 患者の炎症生検において、ヒストンアセチル化の有意な上昇が見られる [75]。HDAC サブタイプのうち、主に HDAC2, 3, 6, 9, 10 が慢性腸炎に関与する [67]。我々の研究でも、IBD モデルマウスにおける HDAC の関与を報告している。5%DSS 溶液を 7 日間自由飲水させることで作製した IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞において、HDAC1-11 のうち、HDAC2 及び HDAC3 の発現が亢進していた。*in vitro* において、IBD モデルマウス由来脾臓 CD4 陽性 T 細胞の HDAC2 及び 3 を薬理的に阻害したところ、K_{Ca}3.1 発現及び活性が抑制されたことから、IBD モデルマウスにおける K_{Ca}3.1 発現亢進に HDAC2、HDAC3 が寄与することを明らかにした [76]。

本章では、IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現亢進機構を解明することを目的として、HIF シグナル伝達経路及び HDAC を介したエピジェネティック制御の関与について検討した。

第2節 実験材料及び方法

1. 溶液組成

tail buffer

50 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mg/mL proteinase K

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA

phosphate-buffered balanced salt solution (PBBS)

123 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 3.2 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂,
0.8 mM MgSO₄, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA

Tris-buffered ammonium chloride (ACTB)

0.017 M Tris-HCl (pH8.0), 0.75% NH₄Cl

phosphate buffered saline (PBS)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

Sample buffer for SDS-PAGE

0.12 M Tris-HCl (pH6.8), 30% glycerol, 4% SDS, 0.002% bromophenol blue

Normal HEPES

137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 14 mM glucose, 10 mM HEPES

10 N NaOH で pH7.4 又は pH8.5 に調整

High K⁺ HEPES

5.9 mM NaCl, 140 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 14 mM glucose, 10 mM HEPES

10 N NaOH で pH7.4 に調整

2. 実験動物

DSS 誘発性炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウスの作製 (下記参照) には、5-6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本エスエルシー、静岡) を使用した。また、ジーントラップ法により確立された C57BL6 背景 K_{2p5.1} ホモノックアウトマウス (K_{2p5.1}^{-/-}) [B6; CB-Kcnk5Gt(pU-21)81Imeg] はヘテロ接合体雄 (K_{2p5.1}^{+/-}) とヘテロ接合体雌 (K_{2p5.1}^{+/-}) を交配させることで作製した。各マウスの核ゲノム DNA は tail buffer 中の指もしくは尻尾を 50°C で 3 時間インキュベートし、フェノール、クロロホルムを用いて液相分離を行い、イソプロパノール沈殿後、70%エタノールにより核酸沈殿物を洗浄し、TE buffer で溶解することで得た。得られた DNA を用い、以下のプライマーを用いて PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動、臭化エチジウム染色により可視化した。

K_{2p}5.1 野生型

forward: 5'-GCTGAGAACAATAGGGACAG-3'

reverse: 5'-TCACCCAGCTTTGGGATTCC-3'

trapped gene

forward: 5'-GCTGAGAACAATAGGGACAG-3'

reverse: 5'-TACAGGCATCGTGGTGTAC-3'

実験動物は、照明時間 8:00-20:00、温度 22±1°Cとなる環境下で飼育し、固形飼料及び水を自由に摂取させた。本研究における動物実験は全て京都薬科大学及び名古屋市立大学の動物実験委員会に申請、承認を得た上で各大学の動物実験実施規定に従って実施した。

3. 使用薬物

clofilium、HIF 阻害剤 FM19G11、選択的 HIF-2 阻害剤 HIF-2 antagonist 2 は Sigma-Aldrich (MO, USA) より購入した。また、非選択的 HDAC 阻害 vorinostat 及び SIRT-1, 2 阻害剤 NCO-01 は大阪大学 産業科学研究所 複合分子化学研究分野 鈴木孝禎教授より御供与頂いた。

4. DSS 誘発性炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウスの作製及び脾臓細胞の回収

IBD モデルマウスは、5% (wt/vol) デキストラン硫酸ナトリウム 5000 (DSS, 富士フィルム和光純薬、大阪) 含有水を 7 日間自由飲水させることで作製した。対象群には、水を与えた。作製した IBD モデルマウス及び対象マウスより脾臓を摘出し、氷冷 PBBS 溶液 25 mL 中でスライドガラスのすり加工部分ですりつぶすことで細胞を単離した。水中で 5 分間静置後、浮遊細胞を回収し、4°C、1000 rpm、5 分遠心し、上清を除去した。赤血球溶血のために、ACTB 溶液 10 mL で懸濁し、室温で 1 分静置した後、PBBS 溶液 10 mL を加え、再度遠心した後に上清を除去した。PBBS 溶液 10 mL で 2 回洗浄した後、セルストレイナー (35 µm, CORNING, NY, USA) を通して細胞塊を除去した。その後、CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞を、それぞれ Dynabeads FlowComp™ mouse CD4 及び CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Cells (ベリタス、東京) を用いて回収した。なお、フローサイトメトリーにより、単離した細胞の 95%以上が CD4 陽性もしくは CD4 陽性 CD25 陰性であることを確認した。

5. 細胞培養

マウスより脾臓を摘出し、10%FCS (Merck, Darmstadt, Germany)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (富士フィルム和光純薬)、5 µg/mL concanavlin A (con-A, 富士フィルム和光純薬) 添加 RPMI-1640 培地 25 mL 中でスライドガラスのすり加工部分ですりつぶすことで細胞

を単離した。氷中で5分間静置後、浮遊細胞を回収し、4°C、1000 rpm、5分遠心し、上清を除去した。赤血球溶血のために、ACTB 溶液 10 mL で懸濁し、室温で1分静置した後、培地 10 mL を加え、再度遠心した後に上清を除去した。培地 10 mL で2回洗浄した後、セルストレイナーを通して細胞塊を除去した。細胞密度が 5×10^6 cells/mL となるように調節し、10% FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、5 μ g/mL con-A 及び 10 U/mL IL-2 (Sigma-Aldrich) 添加 RPMI-1640 培地で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。低酸素刺激は、培養開始 24 時間後に BIONIX 低酸素培養キット (スギヤマゲン、東京) を用いて 1.5%O₂ 環境とすることで行った。培養後、CD4 陽性 T 細胞を Dynabeads FlowComp™ mouse CD4 を用いて回収した。

マウス胸腺細胞は、10%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、5 μ g/mL con-A 添加 RPMI-1640 培地 25 mL 中でスライドガラスのすり加工部分ですりつぶすことで細胞を単離した。氷中で5分間静置後、浮遊細胞を回収し、4°C、1000 rpm、5分遠心し、上清を除去した。細胞密度が 5×10^6 cells/mL となるように調節し、10% FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、5 μ g/mL con-A 及び 10 U/mL IL-2 添加 RPMI-1640 培地で 37°C、5% CO₂ 下で培養し、実験には全細胞を使用した。

マウス T 細胞株 mCTLL-2 は理研バイオリソース研究センター (RIKEN BRC, 筑波) より購入した。RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬) に 10%FCS 及び 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、100 U/mL IL-2 を添加し、37°C、5%CO₂ で維持された CO₂ インキュベーター内で培養した。

6. RNA 抽出、逆転写反応およびリアルタイム PCR

回収した CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞は TRI Reagent (Sigma-Aldrich) でタンパク変性し、クロロホルムを用いて液相分離を行い、水相を回収した。イソプロパノール沈殿後、70%エタノールにより RNA 沈殿物を洗浄し、RNase free H₂O で溶解した。RNA 濃度は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) により定量し、逆転写酵素 ReverTra Ace (東洋紡、東京) 及びランダムプライマー primer random p(dN)₆ (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により定量化し、mRNA 発現量を各サンプルの β -actin (ACTB) で規格化した。リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ、大阪) を使用し、ABI 7500 Fast real-time PCR システム (Thermo Fischer Scientific) により解析した。また、使用したプライマーは primer Express software (ver. 3.0.1, Thermo Fisher Scientific) を用いて設計し、その配列は以下の通りである。

K_{2p}5.1 (GenBank accession number: NM_021542, 792-921), 130 bp

K_{2p}3.1 (NM_010608, 692-812), 121 bp

K_{2P}9.1 (NM_001033876, 757-877), 121 bp

K_{2P}16.1 (NM_029006, 192-312), 121 bp

HIF-1 α (NM_010431, 963-1062), 100 bp

HIF-2 α (NM_010137, 737-856), 120bp

β -actin (ACTB) (NM_007393, 418-518), 101 bp

7. ウェスタンブロッティング

回収した CD4 陽性 T 細胞を sample buffer に溶解し、DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, KY, USA) を用いてタンパク濃度測定を行った。各サンプルに 2-メルカプトエタノールを 10% となるように加え、95°C で 5 分間加熱することで熱変性を行った。SDS-PAGE (10%ゲル、5-20 μ L/lane) によりタンパク質を分離し、タンク式トランスファー装置を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore, CA, USA) に転写した。転写した PVDF 膜は 3%BSA を含む 0.1%Tween PBS に浸して室温で 2 時間もしくは 4°C で一晩インキュベートすることでブロッキングを行った。一次抗体として、抗 HIF-1 α 抗体 (28b, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (希釈倍率 1:200)、抗 ACTB 抗体 (Sigma-Aldrich) (希釈倍率 1:10,000) を 0.1%Tween PBS で希釈し、4°C で一晩反応させた。0.1%Tween PBS で 5 分間振盪し、溶液を交換して再度振盪を 5 回繰り返すことで PVDF 膜を洗浄し、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Millipore) (希釈倍率 1:20,000) を 0.1% Tween PBS で希釈し、4°C で 2 時間反応させた。再度 0.1%Tween PBS で PVDF 膜を洗浄した後、化学発光検出試薬 Chemi-Lumi One (ナカライテスク、京都) を反応させ、Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) によりバンドシグナルを検出した。バンドシグナルの定量解析には、ImageJ software (Ver. 1.42, NIH, MA, USA) を用い、各サンプル中の ACTB で規格化した。

8. 細胞膜電位測定

細胞膜電位は膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) (同仁化学研究所、熊本) を用いた蛍光イメージング解析により測定した。

単離した CD4 陽性 T 細胞は、fibronectin (5 μ M、富士フィルム和光純薬) でコートしたガラス片に播種し、氷上で 30 分静置することで接着させた。細胞を、100 nM DiBAC₄(3) 添加 Normal HEPES 溶液 (pH7.4) 中、室温暗所で 30 分インキュベートした。蛍光強度が安定するまで Normal HEPES 溶液 (pH7.4) で還流し、その後 Normal HEPES 溶液 (pH8.5) を 5 分、High K⁺ HEPES 溶液を 5 分還流した。膜電位測定時には、Normal HEPES 及び High K⁺ HEPES 溶液に 100 nM DiBAC₄(3) を添加した。細胞は励起波長 490 nm で励起させた。蛍光イメージング解析には、浜松ホトニクス of イメージングシステム (ORCA-Flash 2.8 digital camera,

HCIImage) を用いた。

9. 統計解析

データは平均±標準誤差 (SEM) として表した。2 群間の比較では、F 検定を行った後、student の t 検定もしくは Welch の t 検定を行った。多群間の比較では ANOVA を行った後、Tukey 検定を行った。いずれの検定においても、危険率 5%未満を有意とした。統計解析には、Origin Pro (ライトストーン、東京) もしくは XLSTAT (version 2013.1, Microsoft Japan、東京) を使用した。

第3節 結果

1. DSS 誘発性 IBD モデルマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞における HIF-1 α 発現

5%DSS 溶液を 7 日間自由飲水させることで作製した IBD モデルマウスでは、以前の報告 [31] と同様に脾臓由来 CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞中の K_{2p}5.1 及び IFN- γ 発現が有意に亢進した (Fig. 15A, B)。脾臓由来 CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞における HIF mRNA 発現を測定したところ、HIF-1 α mRNA 発現は対象群と比較して約 50%亢進した (Fig. 15C) が、HIF-2 α については発現量が少なく、両群間に差は見られなかった (Fig. 15D)。HIF-1 α タンパク発現をウェスタンブロット解析した結果、mRNA 発現の結果と同様に、IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞における HIF-1 α タンパク発現は対象マウスと比較して有意に高かった (Fig. 15E, F)。

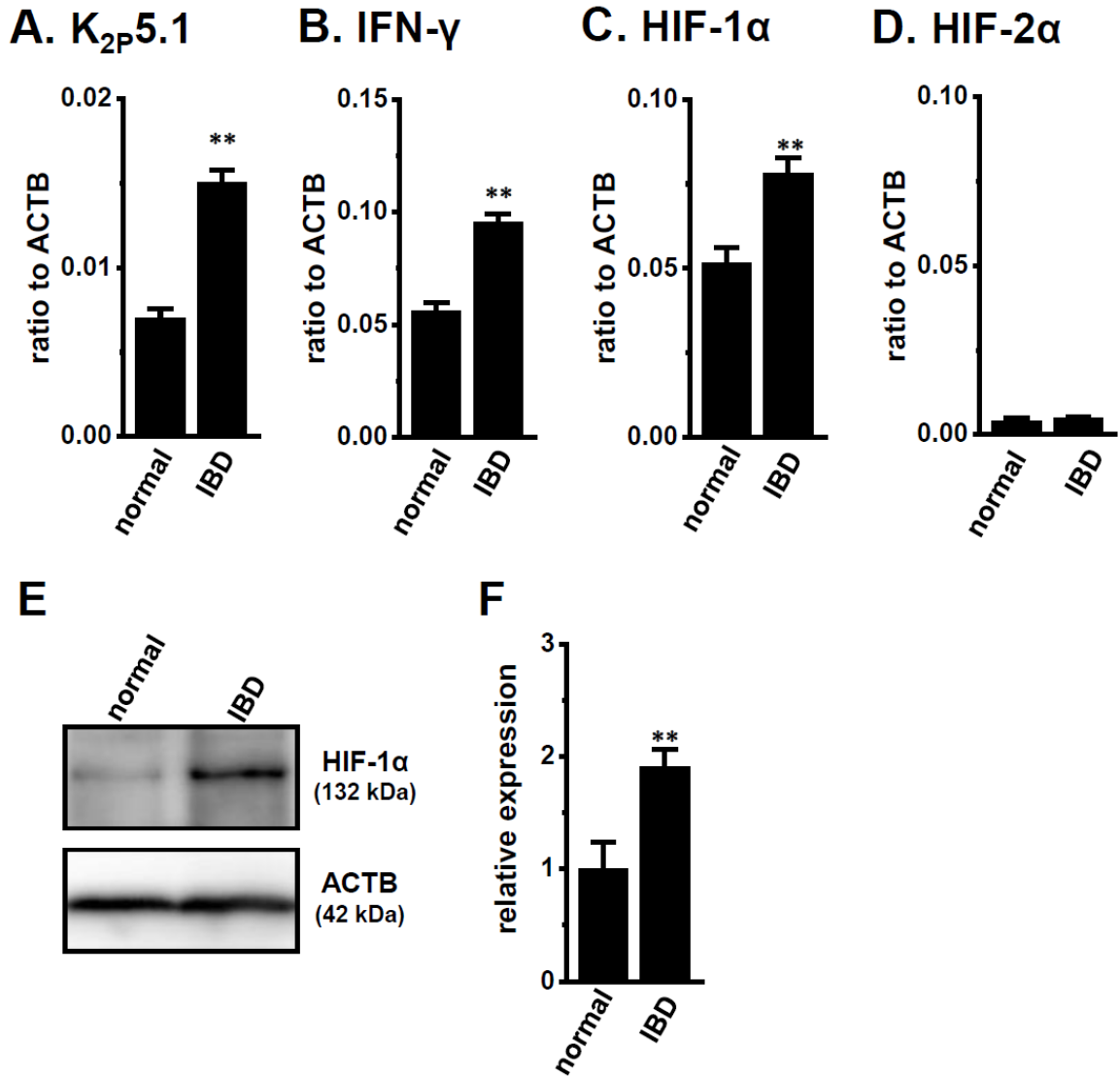


Figure 15. Expression levels of K_{2p}5.1, IFN-γ, HIF-1α and HIF-2α expressions in splenic CD4⁺ T cells of DSS-induced IBD model mice.

A, B, C, D: Real-time PCR assay for K_{2p}5.1 (A), IFN-γ (B), HIF-1α (C) and HIF-2α (D) in splenic CD4⁺CD25⁻ T cells of ‘normal’ and ‘IBD’ model mice (n=4 for each). Expression levels were shown as a ratio to ACTB. E, F: HIF-1α protein expression (132 kDa) in the splenic CD4⁺ T cells of ‘normal’ and ‘IBD’ model mice. Protein lysates of the examined cells were probed by immunoblotting with anti-HIF-1α (132 kDa, upper panel) and anti-ACTB (42 kDa, lower panel) antibodies on the same filter (E). Summarized results were obtained as the optical density of HIF-1α and ACTB band signals (F). After compensation for the optical density of the HIF-1α protein band signal with that of the ACTB signal, the HIF-1α signal in ‘normal’ was expressed as 1.0 (n=4 for each). Results are expressed as means ± SEM. **: P<0.01 vs. normal mice (normal).

2. マウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞における低酸素 (1.5% O₂) 曝露による K_{2p}5.1 発現・活性変動

HIF-1 α による K_{2p}5.1 発現への影響について詳細に解析するために、*in vitro* において低酸素刺激を行った。単離した脾臓細胞を、細胞生存のために concanavalin-A (con-A, 5 μ g/mL) 及び IL-2 (10 U/mL) を添加した培地で 24 時間培養した後に、炎症部位で見られる酸素濃度である 1.5% の低酸素環境下で培養した。低酸素曝露 12 時間後において、通常酸素濃度下 (20.8% O₂) で培養した細胞と比べて HIF-1 α mRNA 発現が増加し、K_{2p}5.1 mRNA 発現についても通常酸素濃度下と比べて約 50% 亢進した (Fig. 16A, B)。HIF-1 α タンパク発現をウェスタンブロッティングで測定した。24 時間低酸素環境で培養した細胞では、132 kDa 付近に見られる HIF-1 α のバンドシグナルに差が見られなかった (Fig. 16Cc)。しかし、低酸素曝露を 6 時間及び 12 時間行った細胞では、通常酸素濃度下で培養した細胞と比べて高い HIF-1 α 発現が認められた (Fig. 16Ca, b)。

次に、マウス CD4 陽性 T 細胞における低酸素曝露による K_{2p}5.1 活性について解析した。細胞外液を pH 8.5 に変更した際の K_{2p}5.1 活性化による細胞膜の過分極反応を測定したところ、低酸素曝露による K_{2p}5.1 転写亢進と同様に、低酸素に曝露された CD4 陽性 T 細胞において、より大きいアルカリ pH 誘発性過分極反応が見られた (Fig. 17A, B)。Fig. 17C, D に示すように、非選択的 K_{2p}5.1 阻害剤 clofilium (5 μ M) 存在下では、アルカリ pH 誘発性過分極反応が阻害された。

低酸素曝露による HIF-1 α 及び K_{2p}5.1 発現亢進は、con-A 刺激マウス胸腺細胞 (Fig. 18A, B) 及び K_{2p}5.1 を発現するマウス T 細胞株 mCTLL-2 (Fig. 18C, D) において同様に観察された。mCTLL-2 細胞では、低酸素曝露による有意な K_{2p}5.1 活性亢進が認められた (Fig. 18 E, F)。

以上の結果から、低酸素曝露により K_{2p}5.1 発現・活性が増加することが明らかとなった。

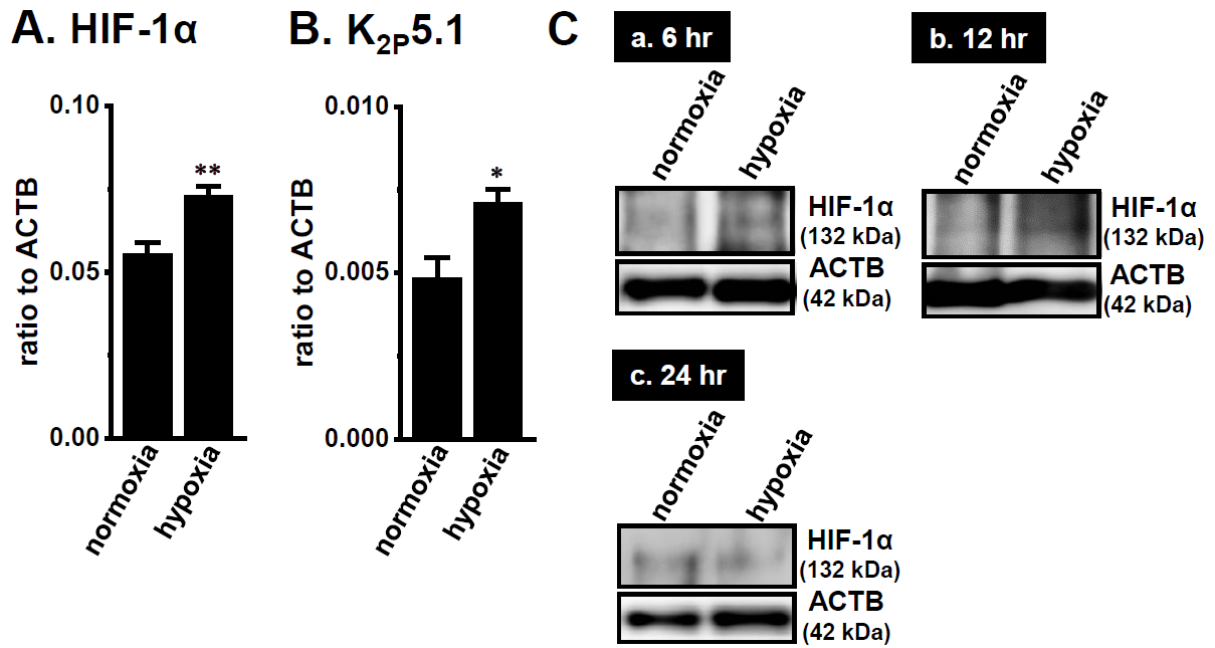


Figure 16. Upregulation of K_{2P}5.1 by hypoxia for 12 hr in con-A-stimulated splenic CD4⁺ T cells of mice.

A, B: Real-time PCR assay for HIF-1 α (A) and K_{2P}5.1 (B) in splenic CD4⁺ T cells exposed to hypoxia conditions (1.5%O₂) (n=4 for each). C: HIF-1 α protein expression (132 kDa) in splenic CD4⁺ T cells exposed to hypoxia conditions for 6 (a), 12 (b) and 24 (c) hr. Protein lysates of the examined cells were probed by immunoblotting with anti-HIF-1 α (132 kDa, upper pane) and anti-ACTB (42 kDa, lower panel) antibodies on the same filter. Results are exposed as means \pm SEM. *, **: P<0.05, 0.01 vs. normoxia.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 38

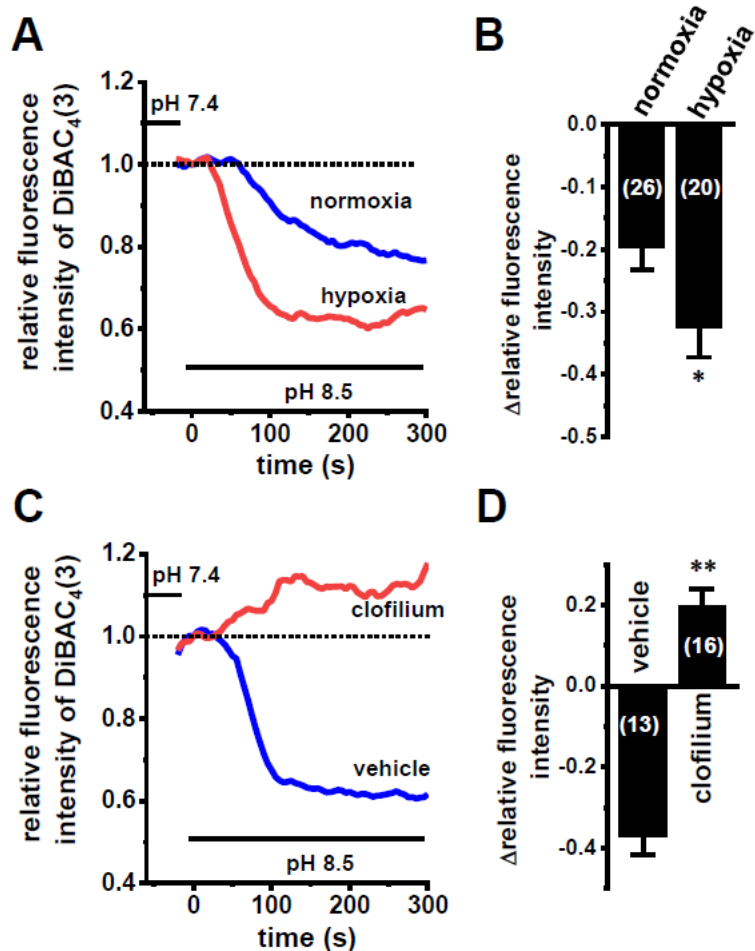


Figure 17. Enhanced $K_{2P5.1}$ activity by hypoxia for 24 hr in stimulated splenic $CD4^+$ T cells of mice and disappearance of $K_{2P5.1}$ activity by application of clofilium ($5 \mu M$) in hypoxia-exposed splenic $CD4^+$ T cells.

A: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in splenic $CD4^+$ T cells. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. B: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in splenic $CD4^+$ T cells. Cells were isolated from 4 different mice in each group. C: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in the presence ('clofilium') and absence ('vehicle') of $5 \mu M$ clofilium in hypoxia-exposed splenic $CD4^+$ T cells. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. D: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in hypoxia-exposed splenic $CD4^+$ T cells. Cells were isolated from 2 different mice in each group. Results are expressed as means \pm SEM. Cell numbers used in experiments are shown in parentheses. *: $P < 0.05$ vs. normoxia. **: $P < 0.01$ vs. vehicle.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 38

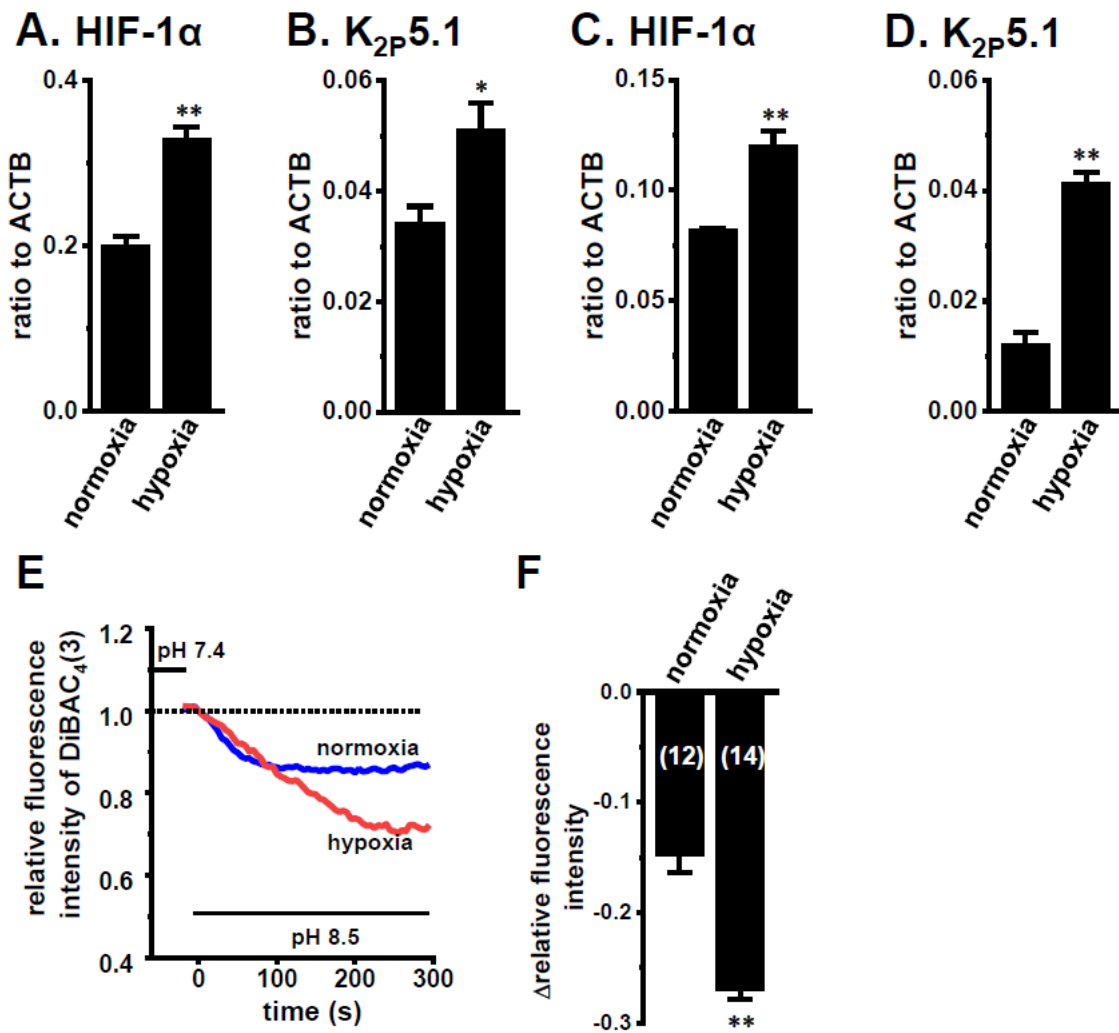


Figure 18. Upregulation of HIF-1 α and K_{2p}5.1 by hypoxia (1.5% O₂) for 24 hr in the stimulated thymocytes of mice and mouse T cell line mCTLL-2 and enhanced K_{2p}5.1 activity by hypoxia for 24 hr in mCTLL-2 cells.

A-D: Real-time PCR assay for HIF-1 α (A, C) and K_{2p}5.1 (B, D) in stimulated thymocytes (A, B) and mCTLL-2 cells (C, D) exposed to hypoxic conditions (n=4). Expression levels are shown as a ratio to ACTB. E: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in normoxia- and hypoxia-exposed mCTLL-2 cells. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. B: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in normoxia- and hypoxia-exposed mCTLL-2 cells. Cell numbers used in experiments are shown in parentheses. Results are expressed as means \pm SEM. *, **: P<0.05, 0.01 vs. normoxia.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 38

3. CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現・活性に対する HIF 阻害剤の影響

低酸素環境下で培養したマウス CD4 陽性 T 細胞に HIF 阻害剤 FM19G11 (1 μM) を 24 時間処置した際の K_{2p}5.1 発現及び活性を測定した。FM19G11 処置は低酸素曝露と同時に行った。Fig. 19A に示すように低酸素曝露により増加した K_{2p}5.1 発現が、FM19G11 処置により有意に抑制された。K_{2p}5.1 活性について測定したところ、FM19G11 処置により有意にアルカリ pH 誘発性過分極反応が減少した (Fig. 19B, C)。一方、選択的 HIF-2 阻害剤である HIF-2 antagonist 2 (HIF-2 inh, 10 μM) を処置した際には、K_{2p}5.1 発現・活性への影響は見られなかった (Fig. 19D, E, F)。

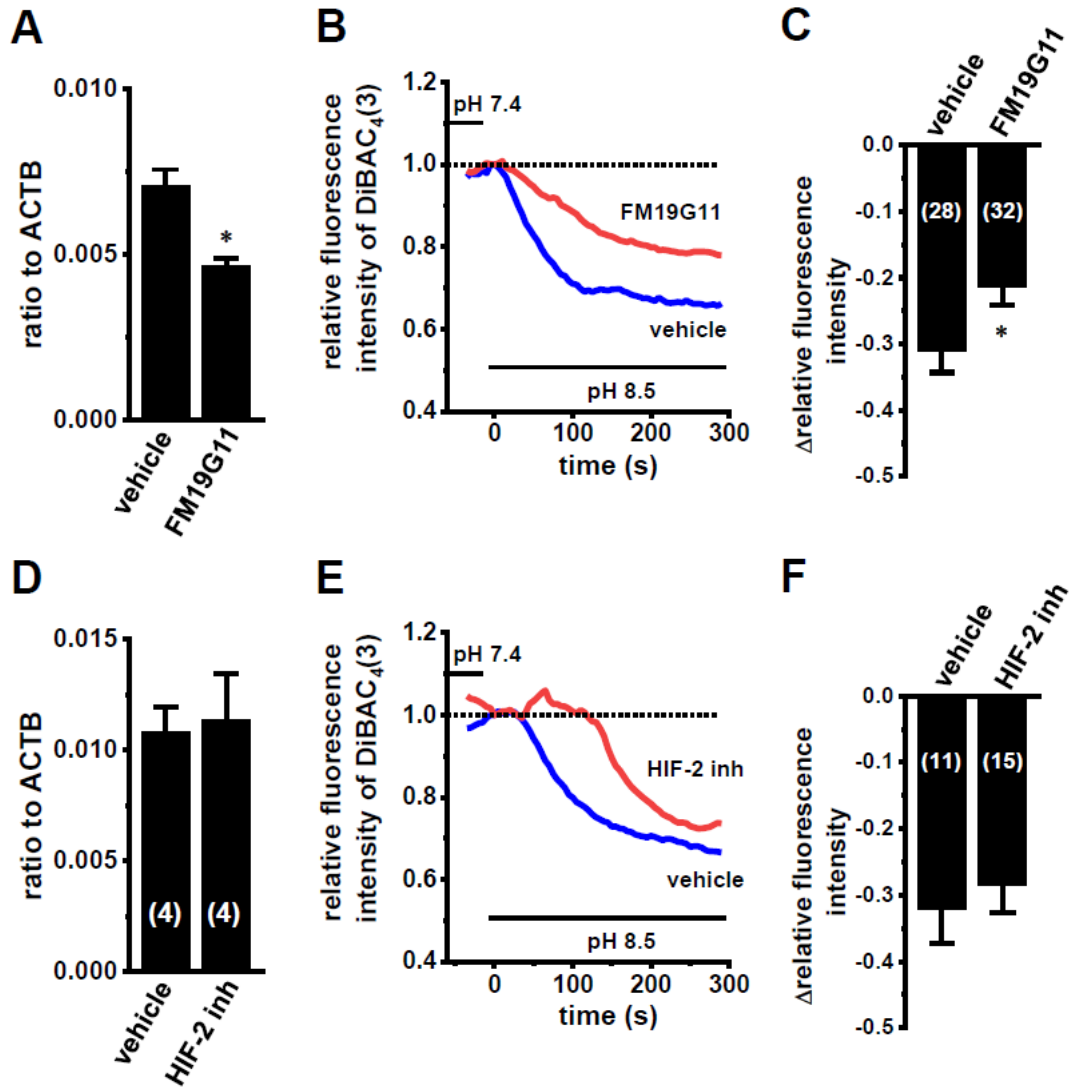


Figure 19. Decreased $K_{2p5.1}$ expression level and activity by the pharmacological inhibition of HIF in hypoxia-exposed splenic $CD4^+$ T cells.

A, D: Real-time PCR assay for $K_{2p5.1}$ in hypoxia-exposed splenic $CD4^+$ T cells, which were treated with vehicle, FM19G11 (1 μ M) (A), and HIF-2 antagonist 2 (HIF-2 inh) (10 μ M) (D) for 24 hr ($n=4$ for each). B, E: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in vehicle-, FM19G11- (B), and HIF-2 inh- (E) treated groups. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. C, F: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in vehicle-, FM19G11- (C), and HIF-2 inh- (F) treated groups. Cells were isolated from 4 different mice in each group. Cell numbers used in experiments are shown in parentheses. Results are expressed as means \pm SEM. *: $P < 0.05$ vs. vehicle control.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 38

4. IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が K_{2P}5.1 発現・活性に及ぼす影響

IBD モデルマウス由来脾臓細胞を con-A 及び IL-2 含有培地で 24 時間培養後、非選択的 HDAC 阻害剤 vorinostat (1 μ M) 又は SIRT1/2 阻害剤 NCO-01 (50 μ M) を 24 時間処置した。CD4 陽性 T 細胞における K_{2P}5.1 発現量を測定したところ、vorinostat 処置細胞及び NCO-01 処置細胞のいずれにおいても、vehicle 処置細胞と比べて発現量に差が見られなかった (Fig. 20A)。同様に、健常マウス由来胸腺細胞及びマウス T 細胞株 mCTLL-2 における vorinostat、NCO-01 処置による K_{2P}5.1 発現変動について検討した。胸腺細胞において、vorinostat 処置により K_{2P}5.1 発現亢進が認められたが、NCO-01 処置では発現変動は見られなかった (Fig. 20B)。mCTLL-2 細胞では、vorinostat、NCO-01 処置どちらにおいても K_{2P}5.1 発現変動は認められなかった (Fig. 20C)。

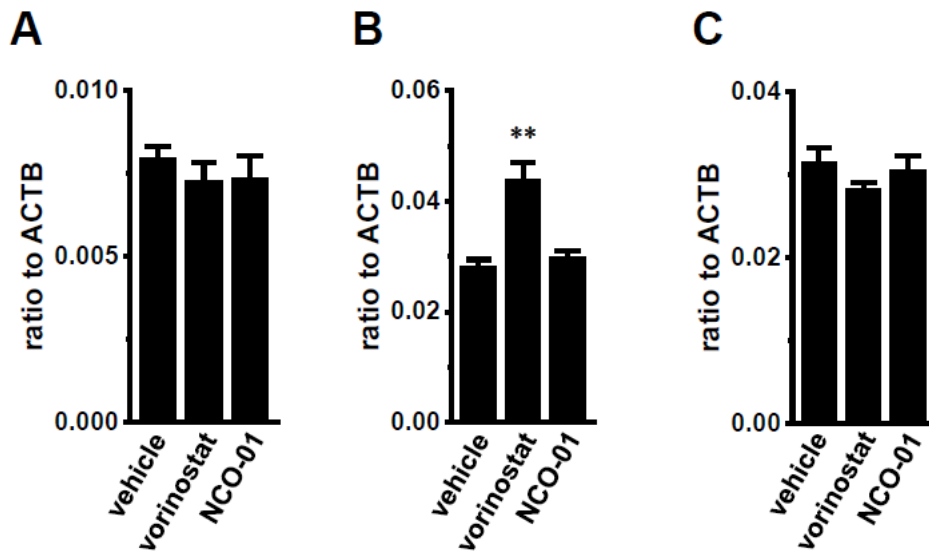


Figure 20. No significant changes in K_{2P}5.1 expression by the pharmacological inhibition of HDAC and SIRT in splenic CD4⁺ T cells of IBD model mice.

A-C: Real-time PCR assay for K_{2P}5.1 in splenic CD4⁺ T cells of IBD model (A), stimulated thymocytes (B), and mCTLL-2 cells (C), all of which were treated with vehicle, vorinostat (1 μ M), and NCO-01 (50 μ M) for 24 hr [n=4 mice (A, B) and n=4 batches (C)]. Results are expressed as means \pm SEM. **: P<0.01 vs. vehicle.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 38

5. IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞及び低酸素曝露 T 細胞における K_{2p}5.1 補償の関与

これまでに、K_{2p}5.1 ノックアウトマウスにおいて K_{2p}3.1 が代償的に発現亢進することが報告されている [77]。7 週齢の K_{2p}5.1 ノックアウト (K_{2p}5.1^{-/-}) マウスから単離した CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}3.1 発現を測定したところ、野生型 (K_{2p}5.1^{+/+}) と同様に K_{2p}3.1 発現レベルは低く (Fig. 21A)、アルカリ pH 誘発性過分極反応も見られなかった (Fig. 21B, C)。一方、20 週齢の K_{2p}5.1 ノックアウトマウスでは、K_{2p}3.1 発現の有意な増加が見られ (Fig. 21A)、アルカリ pH 誘発性過分極反応の亢進も認められ、K_{2p}3.1 による補償機構が働いていることが示された (Fig. 21B, C)。K_{2p}5.1 以外の pH 感受性 K_{2p} チャネルである K_{2p}9.1 及び K_{2p}16.1 発現は、K_{2p}5.1 ノックアウトマウス由来 CD4 陽性 T 細胞においてかなり低く、ACTB 比で 0.001 未満であった (データ未掲載)。IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}3.1 発現を測定したところ、K_{2p}5.1 発現レベルと比べて K_{2p}3.1 発現は低く、正常マウスと IBD モデルマウス間に有意な差は認められなかった (Fig. 22A)。同様に、低酸素曝露したマウス CD4 陽性 T 細胞 (Fig. 22B)、胸腺細胞 (Fig. 22C) 及び mCTLL-2 細胞 (Fig. 22D) 中の K_{2p}3.1 発現量についても、正常酸素濃度下で培養した細胞と差が見られず、本研究において見られた K_{2p}5.1 発現・活性に K_{2p}3.1 による補償は関与していないことが示唆された。

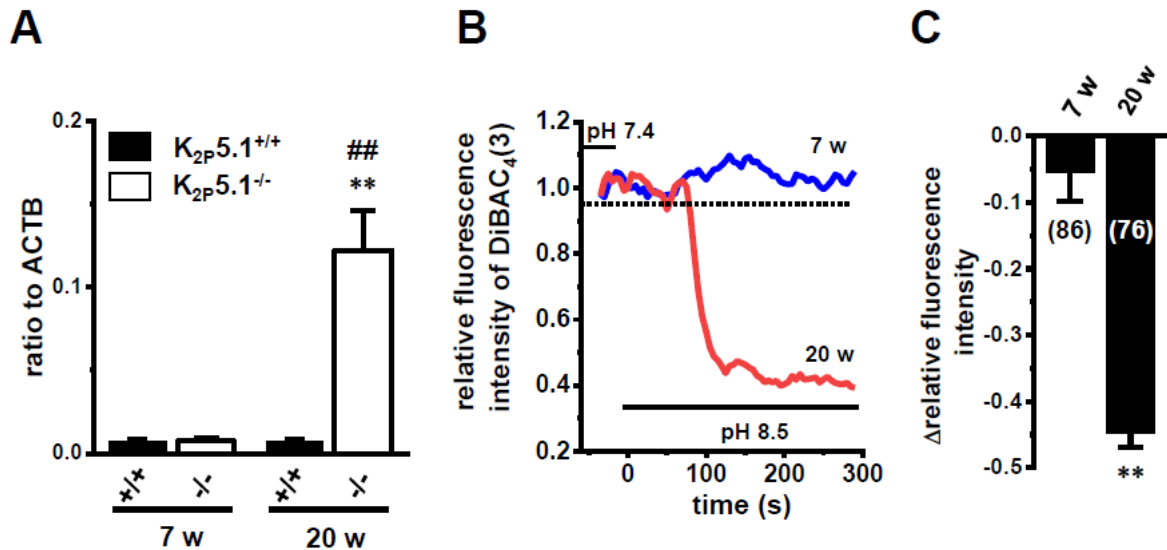


Figure 21. Compensatory increase in K_{2p}3.1 expression and activity in the splenic CD4⁺ T cells of adult K_{2p}5.1 homozygous knockout mice.

A: Real-time PCR assay for K_{2p}3.1 in the splenic CD4⁺ T cells of wild type (K_{2p}5.1^{+/+}) and K_{2p}5.1 homozygous knockout (K_{2p}5.1^{-/-}) mice at 7 and 20 weeks old (n=4). B: Time course of changes in the fluorescent intensity of DiBAC₄(3) in the splenic CD4⁺ T cells of K_{2p}5.1^{-/-} mice at 7 and 20 weeks. Fluorescent intensity at 0 sec (pH7.4) is expressed as 1.0. C: Summarized data are shown as changes in the relative fluorescent intensity of DiBAC₄(3) (Δ relative F_{DiBAC}) in the splenic CD4⁺ T cells of K_{2p}5.1^{-/-} mice at 7 and 20 weeks. Cells were isolated from 3 different mice in each group. Cell numbers used in experiments are shown in parentheses. Results are expressed as mean \pm SEM. **: P<0.01 vs 7 weeks K_{2p}5.1^{-/-}, ##: P<0.01 vs. 20 weeks K_{2p}5.1^{+/+}.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 38

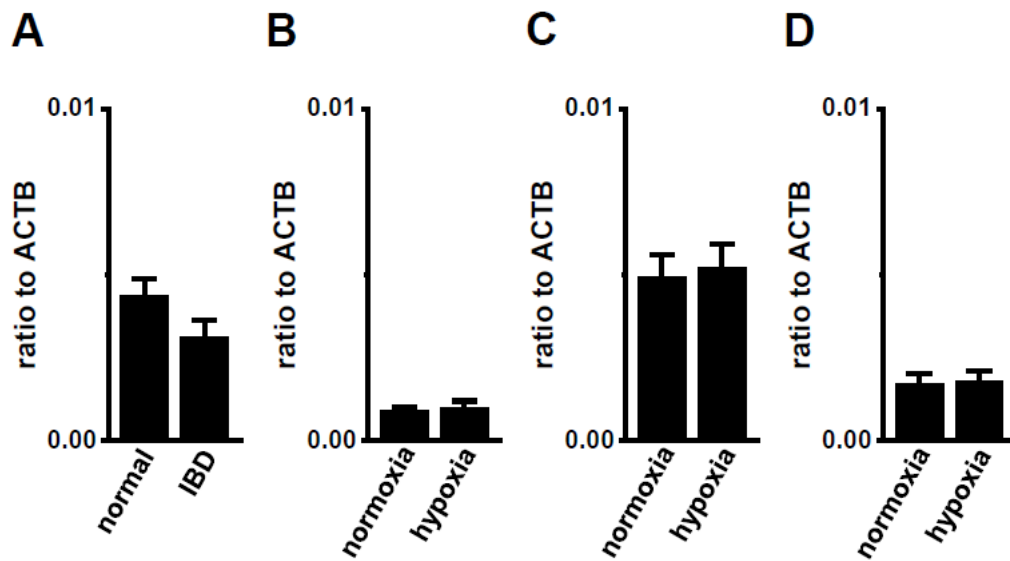


Figure 22. No compensatory changes in the expression levels of $K_{2p3.1}$ transcripts in the splenic $CD4^+$ T cells of IBD model mice or hypoxia-exposed T cells.

A-D: Real-time PCR assay for $K_{2p3.1}$ in the splenic $CD4^+$ T cells of ‘normal’ and ‘IBD’ model mice (A), hypoxia-exposed splenic $CD4^+$ T cells (B), hypoxia-exposed thymocytes (C), and hypoxia-exposed mCTLL-2 cells (D) [n=4 mice (A-C) and n=4 batches (D)]. Results are expressed as means \pm SEM.

Endo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 38

第4節 考察

IBD などの自己免疫疾患における炎症性微小環境の重要な特徴の一つに低酸素がある。低酸素によるシグナル伝達は、腸管における炎症反応を促進することにより IBD の病因に関与している [60]。本章では、二次リンパ組織である脾臓から単離した IBD モデルマウス由来炎症性 CD4 陽性 T 細胞において、リアルタイム PCR 法及びウェスタンブロッティングにより低酸素誘導因子 HIF-1 α の有意な発現亢進が見られた (Fig. 15)。IBD モデルマウスにおいて、炎症により胸腺が縮小し、脾臓が肥大する。胸腺から分化した CD4 陽性 T 細胞は、全身を循環する際に、炎症部位において低酸素曝露を受ける。また、肥大した脾臓では、酸素需要量が増大する。以上の要因により、IBD モデルマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞における HIF-1 α 発現が増大した可能性が考えられる。

IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現亢進への HIF-1 α の関与を詳細に解析した。マウス脾臓細胞を培養し、酸素濃度 1.5% の低酸素環境で 24 時間培養したところ、K_{2p}5.1 発現増大及びアルカリ pH 誘発性過分極反応で測定される K_{2p}5.1 活性亢進が認められた (Fig. 16, 17)。同様に、マウス胸腺細胞や mCTLL-2 細胞などの T 細胞系において、HIF-1 α による K_{2p}5.1 発現・活性亢進が認められた (Fig. 18)。この発現・活性亢進は、低酸素曝露時に HIF 阻害剤 FM19G11 を同時に処置することにより消失したが、選択的 HIF-2 α 阻害剤 HIF-2 antagonist 2 処置では影響が見られなかった (Fig. 19)。以上の結果より、低酸素曝露による K_{2p}5.1 発現・活性亢進は、主に HIF-1 α が関与していることが明らかとなった。第1章において、K_{2p}5.1 スプライスバリエント K_{2p}5.1B が K_{2p}5.1 細胞膜移行を阻害することにより K_{2p}5.1 活性を抑制することを示したが、低酸素条件下におけるマウス CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1B 発現変動は認められなかった (データ未掲載)。

転写因子として働く HIF-1 複合体は、標的とする遺伝子の HRE 領域に結合することで、標的遺伝子の転写活性を亢進させる [78]。K_{2p}5.1 のプロモーター領域には低酸素シグナルに関与する転写因子のうち、NF- κ B や AP-1、HIF の結合部位が存在することが明らかになっている。これらの転写因子の内、NF- κ B はプロモーター領域に結合部位があるにもかかわらず K_{2p}5.1 転写に関与しないことが報告されている。しかし、AP-1 や HIF など他の転写因子については検討がなされていなかった [79]。本研究では、CD4 陽性 T 細胞において HIF-1 α により K_{2p}5.1 転写が亢進することを明らかにした (Fig. 16-19)。また、Shin らにより、B 細胞において K_{2p}5.1 が HIF-1 α 依存的に低酸素条件下で発現増加することが報告され [80]、これは本研究結果と一致する。しかし、HIF-1 α を介した K_{2p}5.1 発現増加の根底にあるメカニズムは未だ不明である。低酸素状態では Th1 細胞において STAT3 のリン酸化が増加し、HIF-1 α 転写を引き起こす。増加した HIF-1 α は STAT3 の負の調節因子である suppressor of cytokine signaling

(SOCS) 3 発現を抑制することで STAT3 の活性化を促進するため、HIF-1 α と STAT3 の間に正のフィードバックループが形成される [81]。そのため、CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現に対する STAT3 シグナル伝達経路の関与について検討した。しかし、マウス CD4 陽性 T 細胞に STAT3 阻害剤 (10 μ M static, Abcam, Cambridge, UK) を 12 時間処置したところ細胞死を引き起こしたため、K_{2p}5.1 発現、活性を測定できなかった。con-A 刺激は STAT3 リン酸化を介して細胞増殖を促進するため、STAT3 阻害剤処置により con-A による T 細胞増殖が抑制された可能性がある [82]。

K_{2p} チャンネルのうち、pH に感受性を持ち、アルカリ pH によりチャンネル活性を増加させるチャンネルとして TASK サブファミリーに属する K_{2p}3.1、K_{2p}9.1、及び TALK サブファミリーに属する K_{2p}5.1、K_{2p}16.1、K_{2p}17.1 が存在する (K_{2p}17.1 のマウスホモログ報告されていない)。マウス CD4 陽性 T 細胞では、K_{2p}5.1 を除くこれらの K_{2p} サブタイプの発現は非常に低く、また低酸素曝露による有意な発現変化は見られなかった。Bittner らは、K_{2p}5.1 ノックアウトマウスにおいて、K_{2p}3.1 が補償的に発現上昇することを明らかにした [77]。本研究において、7 週齢 K_{2p}5.1 ノックアウトマウスの脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞では K_{2p}3.1 発現が見られず、アルカリ pH 誘発性過分極反応が見られなかった。しかし、20 週齢 K_{2p}5.1 ノックアウトマウスにおいて、K_{2p}3.1 発現増加及びアルカリ pH 誘発性過分極反応が認められ、K_{2p}3.1 が K_{2p}5.1 に対して補償的に働くことが示された (Fig. 21)。一方、IBD モデルマウス脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞や健常マウス由来 CD4 陽性 T 細胞、胸腺細胞、mCTLL-2 細胞における K_{2p}3.1 発現は K_{2p}5.1 よりも低く、低酸素曝露による発現変化も見られなかった (Fig. 22)。これらの結果は、本研究で見られたアルカリ pH 誘発性過分極反応が主に K_{2p}5.1 活性化によるものであることを示唆している。

低酸素は DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などエピジェネティック機構に影響を及ぼす [83]。IBD 患者の生検及び IBD モデルマウスにおいて、高レベルのヒストンアセチル化が検出されており、HDAC は炎症の調節因子として重要な役割を果たす [75]。HDAC 阻害剤は IBD モデルマウスの炎症性サイトカイン産生を抑制することにより、疾患の重症度を低下させる [74]。T 細胞に機能発現する主なカリウムチャンネルサブタイプの 1 つである K_{Ca}3.1 は、IBD モデルマウスの CD4 陽性 T 細胞においてその発現、活性が亢進する [84]。この IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞において、K_{Ca}3.1 発現はクラス I HDAC である HDAC2 及び HDAC3 によって調節される [76]。一方、HIF-1 下流分子であるクラス III HDAC SIRT1 は IBD 患者及び IBD モデルマウスにおいて発現低下することが報告されている [71, 72]。Fig. 20 に示すように、マウス CD4 陽性 T 細胞や胸腺細胞、マウス T 細胞株 mCTLL-2 において、HDAC 阻害剤 vorinostat 及び SIRT1 阻害剤 NCO-01 を 24 時間処置した際の K_{2p}5.1 発現変化は見られなかった。したがって、HDAC 及び SIRT1 は IBD モデルマウスの CD4 陽性 T 細胞に

における $K_{2p5.1}$ 発現亢進機構に関与しないことが示唆された。

本章では、IBD モデルマウス由来 CD4 陽性 T 細胞における $K_{2p5.1}$ 発現亢進機構として、HDAC/SIRT を介したエピジェネティック制御ではなく、HIF-1 α シグナル伝達経路が関与していることを明らかにした。しかし、HIF-1 α による $K_{2p5.1}$ 発現亢進が直接 $K_{2p5.1}$ プロモーター領域に存在する HRE に結合することで起こるのか、もしくは HIF-1 α により発現増加や活性亢進した他の転写因子により $K_{2p5.1}$ 発現調節を受けるのかについては明らかにしておらず、今後さらに検討が必要である。

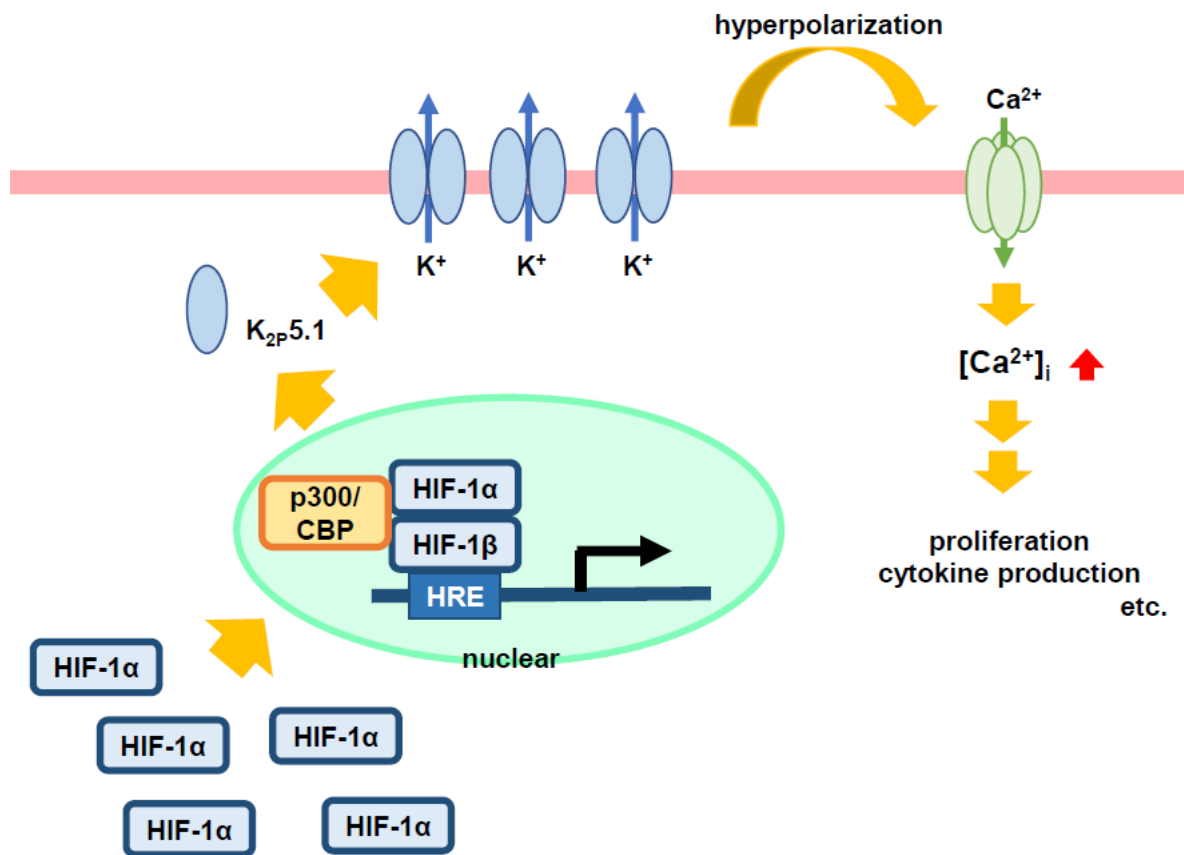


Figure 23. Mechanism of $K_{2p5.1}$ upregulation via HIF-1 α

HRE: hypoxia response element

総括

免疫系疾患の治療薬開発において、カリウムチャネル阻害薬が期待されており、T 細胞における機能発現が初期に報告された電位依存性カリウムチャネル Kv1.3 やカルシウム活性化カリウムチャネル K_{Ca}3.1 では、強力かつ選択性の高い阻害薬が開発され、前臨床試験や臨床試験が実施されている。これまで当研究室では、IBD モデルマウスを用いて自己免疫疾患における K_{2p}5.1 の病態生理学的役割と治療標的としての潜在性を報告した。しかし、K_{2p}5.1 の選択的かつ強力な阻害薬は未だ開発されていない。本研究では、自己免疫疾患の CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 発現・活性亢進の分子機構と K_{2p}5.1 の新規阻害機構の解明を目的として、以下のことを明らかにした。

第 1 章では、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、スプライソソーム阻害薬 pladienolide B は、K_{2p}5.1B 発現を亢進させ、K_{2p}5.1 活性を抑制した。

また第 2 章では、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。HIF-1 による K_{2p}5.1 発現の詳細な分子機構についての解明はできなかったものの、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC/SIRT によるエピジェネティック制御は関与していないことが示唆された。

IBD モデルにおける病態の発症・進展に伴う K_{2p}5.1 発現・活性亢進に選択的スプライシング変動は関与していなかったが、スプライソソーム阻害薬による K_{2p}5.1 阻害の発見は、革新的イオンチャネル創薬研究に繋がることを期待される。今後、自己免疫疾患モデルを用いた *in vivo* における検証が必要である。また、HIF 発現・活性の亢進は、IBD だけでなく他の自己免疫疾患や癌、循環器疾患など様々な病態の発症・進展と関与しており、自己免疫疾患など病因が明らかになっていない K_{2p}5.1 関連疾患の発症、悪化などについて、より理解が深まることが期待される。

引用文献

1. 赤池昭紀、石井邦雄、越前宏俊、金子周司. 最新薬物治療学. 廣川書店. **2008**
2. Marie Wahren-Herlenius, Thomas Dörner. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet*, **2013**, 382, 819-831
3. Lifeng Wang, Fu-Sheng Wang, M. Eric Gershwin. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J. Intern. Med.*, **2015**, 278, 369-395
4. Noel R. Rose. Prediction and Prevention of Autoimmune Disease in the 21st Century: A Review and Preview. *Am. J. Epidemiol.*, **2016**, 183, 403-406
5. Yi-Zhen Zhang, Yong-Yu Li. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.*, **2014**, 20, 91-99
6. 難病情報センター, <https://www.nanbyou.or.jp/>
7. 日本消化器病学会、炎症性腸疾患 (IBD) 診療ガイドライン 2016
8. Candice Contet, Scott P. Goulding, Dika A. Kuljis, Alison Barth. BK Channels in the Central Nervous System. *Int. Rev. Neurobiol.*, **2016**, 128, 281-342
9. Raquibul Hasan, Jonathan H. Jaggard. Kv channel trafficking and control of vascular tone. *Microcirculation*, **2018**, 25
10. Maxime Guéguinou, Aurélie Chantôme, Gaele Fromont, Philippe Bougnoux, Christophe Vandier, Marie Potier-Caereau. KCa and Ca²⁺ channels: The complex thought. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2014**, 1843, 2322-2333
11. Michael D. Cahalan, K. George Chandy. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev.*, **2009**, 231, 59-87
12. Stefan Feske, Heike Wulff, Edward Y. Skolnik. Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **2015**, 33, 291-353
13. Chiara Villa, Huriye Suphesiz, romina Combi, Enes Akyuz. Potassium channels in the neuronal homeostasis and neurodegenerative pathways underlying Alzheimer's disease: An update. *Mech. Ageing Dev.*, **2020**, 185, 111197
14. Victor Chi, Michael W. Pennington, Raymond S. Norton, Eric Tarcha, Luz Londono, Brian Sims-Fahey, Sanjeev K. Upadhyay, Jonathan T. Lakey, Shawn Ladonato, Heike Wulff, Christine Beeton, K. George Chandy. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*, **2012**, 59, 529-46
15. Eric J. Tarcha, Victor Chi, Ernesto J. Muñoz-Elías, David Bailey, Luz M. Londono, Sanjeev K. Upadhyay, Kayla Norton, Amy Banks, Indra Tjong, Hai Nguyen, Xueyou Hu, Greg W. Ruppert, Scott E. Boley, Richard Slauter, James Sams, Brian Knapp, Dustin Kentala, Zachary Hansen, Michael W. Pennington, Christine Beeton, K. George Chandy and Shawn P. Iadonato. Durable Pharmacological Responses from the Peptide ShK-186, a Specific Kv1.3 Channel Inhibitor That Suppresses T Cell Mediators of Autoimmune Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2012**, 342, 642-653

16. Xiaoli Wang, Guoyi Li, Jingkang Guo, Zhiping Zhang, Shuzhang Zhang, Yudan Zhu, Jiwei Cheng, Lu Yu, Yonghua Ji, Jie Tao. Kv1.3 Channel as a Key Therapeutic Target for Neuroinflammatory Diseases: State of the Art and Beyond. *Front. Neurosci.*, **2020**, 13, 1393
17. Heike Wulff, Aaron Kolski-Andreaco, Ananthakrishnan Sankaranarayanan, Jean-Marc Sabatier, Vikram Shakkottai. Modulators of Small- and Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels and their Therapeutic Indications. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 1437-1457
18. Kristin Friebe, Roland Schönherr, Raimund W. Kinne, Elke Kunisch. Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *J. Cell Physiol.*, **2015**, 230, 1677-1688
19. Hai Lin, Chunquan Zheng, a, Jing Li, Chen Yang, and Li Hu. Lentiviral shRNA against KCa3.1 inhibits allergic response in allergic rhinitis and suppresses mast cell activity via PI3K/AKT signaling pathway. *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 13127
20. Susumu Ohya, Hiroaki Kito. Ca²⁺-Activated K⁺ Channel K_{Ca}3.1 as a Therapeutic Target for Immune Disorders. *Biol. Pharm. Bull.*, **2018**, 41, 1158-1163
21. Eric J. Tarcha, Chelsea M. Olsen, Peter Probst, David Peckham, Ernesto J. Muñoz-Elías, James G. Kruger, Shawn P. Iadonato. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PLoS One*, **2017**, 12, e0180762
22. Florian Lesage, Eric Guillemare, Michel Fink, Fabrice Duprat, Michel Lazdunski, Georges Romey, Jacques Barhanin. A pH-sensitive Yeast Outward Rectifier K_{Graphic} Channel with Two Pore Domains and Novel Gating Properties. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 4183-4187
23. Florian Lesage, Jacques Barhanin. Molecular Physiology of pH-Sensitive Background K_{2P} Channels. *Physiology*, **2011**, 26, 424-37
24. Sylvain Feliciangeli, Frank C. Chatelain, Delphine Bichet, Florian Lesage. The family of K_{2P} channels: salient structural and functional properties. *J. Physiol.*, **2015**, 593, 2587-603
25. Manuela Cerina, Thomas Budde, Sven G. Meuth, Stefan Bittner. The CNS under pathophysiologic attack-examining the role of K_{2P} channels. *Eur. J. Physiol.*, **2015**, 467, 959-972
26. Nicole Bobak, Stefan Bittner, Joseph Andronic, Susanne Hartmann, Friederike Muhlpfordt, Tilman Schneider-Hohendorf, Karen Wolf, Carsten Schmelter, Kerstin Göbel, Patrick Meuth, Heiko Zimmermann, Frank Döring, Erhard Wischmeyer, Thomas Budde, Heinz Wiendl, Sven G. Meuth, Vladimir L. Sukhorukov. Volume regulation of murine T lymphocytes relies on voltage-dependent and two-pore domain potassium channels. *Biochem. Biophys. Acta.*, **2011**, 1808, 2036-2044
27. Joseph Andronic, Nicole Bobak, Stefan Bittner, Petra Ehling, Christoph Kleinschnitz, Alexander M. Herrmann, Heiko Zimmermann, Markus Sauer, Heinz Wiendl, Thomas Budde, Sven G. Meuth, Vladimir L. Sukhorukov. Identification of two-pore domain potassium channels as potent modulators of osmotic volume regulation in human T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **2013**, 1828, 699-707
28. Signe S. Kirkegaard, Pernille Dyhl Strøm, Steen Gammeltoft, Anker Jon Hansen, Else K. Hoffmann.

- The Volume Activated Potassium Channel KCNK5 is Up-Regulated in Activated Human T cells, but Volume Regulation is Impaired. *Cell Physiol. Biochem.*, **2016**, 38, 883-892
29. Stefan Bittner, Nicole Bobak, Alexander M. Herrmann, Kerstin Göbel, Patrick Meuth, Karin G. Höhn, Max-Philipp Stenner, Thomas Budde, Heinx Wiendl, Sven G. Meuth. Upregulation of K_{2P}5.1 Potassium Channels in Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.*, **2010**, 68, 58-69
 30. Stefan Bittner, Nicole Bobak, Martin Feuchtenberger, Alexander M. Herrmann, Kerstin Göbel, Raimund W. Kinne, Anker J Hansen, Thomas Budde, Christoph Kleinschnitz, Oliver Frey, Hans-Peter Tony, Heinx, Wiendl, Sven G. Meuth. Expression of K_{2P}5.1 potassium channels on CD4⁺ T lymphocytes correlates with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.*, **2011**, 13, R21
 31. Sawa Nakakura, Miki Matsui, Aya Sato, Mizuki Ishii, Kyoko Endo, Sayaka Muragishi, Miki Murase, Hiroaki Kito, Hiroki Niguma, Natsumi Kurokawa, Masanori Fujii, Masataka 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. *Front. Physiol.*, **2015**, 6, 299
 32. Juan Tamargo, Ricardo Caballero, Ricardo Gómez, Carmen Valenzuela, Eva Delpón. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cadiovass. Res.*, **2004**, 62, 9-33
 33. Heike Wulff, Boris S. Zhorov. K⁺ Channel Modulators for the Treatment of Neurological Disorders and Autoimmune Diseases. *Chem. Rev.*, **2008**. 108, 1744-1173
 34. Tom I. Bonner. Should Pharmacologists Care About Alternative Splicing? IUPHAR Review 4. *Br. J. Pharmacol.*, **2014**, 171, 1231-1240
 35. Yeon Lee, Donald C. Rio. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, **2015**, 84, 291-323
 36. Donny D. Licatalosi, Robert B. Darnell. Splicing Regulation in Neurologic Disease. *Neuron*, **2006**, 52, 93-101
 37. Pietro Spitali, Annemieke Aartsma-Rus. Splice Modulating Therapies for Human Disease. *Cell*, **2012**, 148, 1085-1088
 38. Jen-Yang Tang, Jin-Ching Lee, Ming-Feng, Hou, Chu-Lin Wang, Chien-Chi Chen, Hurng-Wern Huang, Hsueh-Wei Chang. Alternative Splicing for Diseases, Cancers, Drugs, and Databases. *ScientificWorldJurnal*, **2013**, 2013, 73568
 39. Christian Schwerk, Klaus Schulze-Osthoff. Regulation of Apoptosis by Alternative pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell*, **2005**, 19, 1-13
 40. Sharmistha Pal, Ravi Gupta, Ramana V. Davuluri. Alternative Transcription and Alternative Splicing in Cancer. *Pharmacol. Ther.*, **2012**, 136, 283-294
 41. Sarah L Maguire, Andri Leonidou, Patty Wai, Caterina Marchiò, Charlotte KY Ng, Anna Sapino, Anne-Vincent Salomon, Jorge S Reis-Filho, Britta Weigelt, and Rachael C Natrajan. SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. *J. Pathol.*, **2015**, 235, 571-580
 42. Halima Ouadid-Ahidouch, Ahmed Ahidouch. K⁺ channels and cell cycle progression in tumor cells.

Front. Physiol., **2013**, 4, 220

43. Claudia P. Alvarez-Baron, Philip Jonsson, Christoforos Thomas, Stuart E. Dryer, Cecilia Williams. The Two-Pore Domain Potassium Channel KCNK5: Induction by Estrogen Receptor α and Role in Proliferation of Breast Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.*, **2011**, 25, 1326-1336
44. Momoko Sato, Naoki Muguruma, Tadahiko Nakagawa, Koichi Okamoto, Tetsuo Kimura, Shinji Kitamura, Hiromi Yano, Katsutaka Sannomiya, Takahiro Goji, Hiroshi Miyamoto, Toshiya Okahisa, Hiroaki Mikasa, Satoshi Wada, Masao Iwata, Tetsuji Takayama. High antitumor activity of pladienolide B and its derivative in gastric cancer. *Cancer Sci.*, **2014**, 105, 110-116
45. D. S. Hong, R. Kurzrock, A. Naing, J. J. Wheler, G. S. Falchook, J. S. Schiffman, N. Faulkner, M. J. Pilat, J. O'Brien, P. LoRusso. A Phase I, Open-Label, Single-Arm, Dose-Escalation Study of E7107, a Precursor Messenger Ribonucleic Acid (pre-mRNA) Spliceosome Inhibitor Administered Intravenously on Days 1 and 8 Every 21 Days to Patients With Solid Tumors. *Invest. New Drugs*, **2014**, 32, 436-444
46. Michael Seiler, Akihide Yoshimi, Rachel Darman, Betty Chan, Gregg Keaney, Michael Thomas, Anant A Agrawal, Benjamin Caleb, Alfredo Csibi, Eckley Sean, Peter Fekkes, Craig Karr, Virginia Klimek, George Lai, Linda Lee, Pavan Kumar, Stanley Chun-Wei Lee, Xiang Liu, Crystal Mackenzie, Carol Meeske, Yoshiharu Mizui, Eric Padron, Eunice Park, Ermira Pazolli, Shouyong Peng, Sudeep Prajapati, Justin Taylor, Teng Teng, John Wang, Markus Warmuth, Huilan Yao, Lihua Yu, Ping Zhu, Omar Abdel-Wahab, Peter G Smith, Silvia Buonamici. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat. Med.*, **2018**, 24, 497-504
47. Diane Lipscombe, Summer E. Allen, Cecilia P. Toro. Control of Neuronal Voltage-Gated Calcium Ion Channels From RNA to Protein. *Trends Neurosci.*, **2013**, 36, 598-609
48. Ramón A. Lorca, Monali Prabakaran, Sarah K. England. Functional Insights into Modulation of BKCa Channel Activity to Alter Myometrial Contractility. *Front. Physiol.*, **2014**, 5, 289
49. Susumu Ohya, Satomi Niwa, Ayano Yanagi, Yuka Fukuyo, Hisao Yamamura, Yuji Imaizumi. Involvement of Dominant-negative Spliced Variants of the Intermediate Conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, $K_{Ca3.1}$, in Immune Function of Lymphoid Cells. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 16940-16952
50. Wenli Gu, Günter Schichthörl, Jochen R. Hirsch, Hartmut Engels, Christine Karschin, Andreas Karschim, Christian Derst, Ortrud K. Steinlein, Jürgen Daut. Expression pattern and functional characteristics of two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2. *J. Physiol.*, **2002**, 539, 657-668
51. Jaehee Han, Dawon Kang, Donghee Kim. Functional properties of four splice variants of a human pancreatic tandem-pore K^+ channel, TALK-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2003**, 285, C529-538
52. Roberto Reyes, Fabrice Duprat, Florian Lesage, Michel Fink, Miguel Salinas, Nicolette Farman, Michel Lazdunski. Cloning and Expression of a Novel pH-sensitive Two-Pore Domain K^+ Channel from Human Kidney. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 30863-30869

53. Kristine O'Brien, Arianne J. Matlin, April M. Lowell, Melissa J. Moore. The Biflavonoid Isoginkgetin Is a General Inhibitor of Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 33147-33154
54. Dierk Thomas, Leigh D. Plant, Christina M. Wilkens, Zoe A. McCrossan, Steve A. N. Goldstein. Alternative translation initiation in rat brain yields K_{2P}2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron*, **2008**, 58, 859-870
55. Dina Simkin, Eric J Cavanaugh, Donghee Kim. Control of the single channel conductance of K_{2P}10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. *J. Physiol.*, **2008**, 586, 5651-5663
56. Miwako Fukushima, Takuro Tomita, Agnes Janoshazi, James W. Putney. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J. Cell Sci.*, **2012**, 125, 4354-4361
57. Kerstin A. Effenberger, Veronica K. Urabe, Melissa S. Jurica, Modulating Splicing With Small Molecular Inhibitors of the Spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2017**, 8
58. Hongxia Z. ImtiyazM, Celeste Simon. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **2010**, 345, 105-120
59. Amar J. Majmundar, Waihay J. Wong, M. Celeste Simon. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol. Cell*, **2010**, 40, 294-309
60. Katharina Flück, Joachim Fandrey. Oxygen Sensing in Intestinal Mucosal Inflammation. *Pflügers Arch.*, **2016**, 468, 77-84
61. John Biddlestone, Daniel Bandrra Sonia Rocha. The role of hypoxia in inflammatory disease (review). *Int. J. Mol. Med.*, **2015**, 35, 859-869
62. Celia María Quiñonez-Flores, Susana Aideé González-Chávez, César Pacheco-Tena. Hypoxia and its implications in rheumatoid arthritis. *J. Biomed. Sci.*, **2016**, 23, 62
63. Santiago Martinez Sosa, Kenneth J. Smith. Understanding a role for hypoxia in lesion formation and location in the deep and periventricular white matter in small vessel disease and multiple sclerosis. *Clin. Sci.*, **2017**, 131, 2503-2524
64. Véronique Raeis-Dauvé, Pierre Philip-Couderc, Giuseppe Faggian, Maddalena Tessari, Angela Roatti, Aldo D. Milano, Marie-Luce Bochaton-Piallat, Alex J. Baertschi. Increased Expression of Adenosine Triphosphate-Sensitive K⁺ Channels in Mitral Dysfunction: Mechanically Stimulated Transcription and Hypoxia-Induced Protein Stability? *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2012**, 59, 390-396
65. Nobuyoshi Tajima, Kristina Schönherr, Susanna Niedling, Martin Kaatz, Hiroshi Kanno, Roland Schönherr, Stefan H. Heinemann. Ca²⁺-activated K⁺ Channels in Human Melanoma Cells Are Up-Regulated by Hypoxia Involving Hypoxia-Inducible factor-1alpha and the Von Hippel-Lindau Protein. *J. Physiol.*, **2006**, 571, 349-359
66. Yao Chen, Fang Luo, Shiqiao Luo, Zhongjun Wu, Jian Zhou. The Augmenter of Liver Regeneration Protects the Kidneys After Orthotopic Liver Transplantation Possibly by Upregulating HIF-1 α and O₂-sensitive K⁺ Channels. *Surg. Today*, **2011**, 41, 382-389
67. C. Felice, A. Lewis, A. Armuzzi, J. O. Lindsay, A. Silver. Review article: selective histone

- deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **2015**, 41, 26-38
68. Elizabeth E. Hull, McKale R. Montgomery, Kathryn J. Leyva. HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *Biomed. Res. Int.*, **2016**, 2016, 8797206
 69. Rui Chen, Elhadji M. Dioum, Richard T. Hogg, Robert D. Gerard, Joseph A. Garcia. Hypoxia Increases Sirtuin 1 Expression in a Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Manner. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 13869-13878
 70. Xiaofei Meng, Jin, Tan, Mengmeng Li, Shuling Song, Yuyang Miao, Qiang Zhang. Sirt1: Role Under the Condition of Ischemia/Hypoxia. *Cell Mol. Neurobiol.*, **2017**, 37, 17-28
 71. R Caruso, I Marafini, E Franzè, C Stolfi, F Zorzi, I Monteleone, F Caprioli, A Colantoni, M Sarra, S Sedda, L Biancone, P Sileri, G S Sica, T T MacDonald, F Pallone, G Monteleone. Defective Expression of SIRT1 Contributes to Sustain Inflammatory Pathways in the Gut. *Mucosal Immunol.*, **2014**, 7, 1467-1479
 72. Alicia S. Wellman, Mallikarjuna R. Metukuri, Nevzat Kazgan, Xiaojiang Xu, Qing Xu, Natalie S. X. Ren, Agnieszka Czopik, Michael T. Shanahan, Ashley Kang, Willa Chen, M. Andrea Azcarate-Peril, Ajay S. Gulati, David C. Fargo, Leonard Guarente, Xiaoling Li. Intestinal Epithelial Sirtuin 1 Regulates Intestinal Inflammation During Aging in Mice by Altering the Intestinal Microbiota. *Gastroenterology*, **2017**, 153, 772-786
 73. Rainer Glaubem, Britta Siegmund. Inhibition of Histone Deacetylase in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol. Med.*, **2011**, 15, 426-433
 74. Mohmand Noor Ali, Narantsog Choijookhuu, Hideaki Takagi, Naparee Srisowanna, Mai Nguyen Nhat Huynh, Yuya Yamaguchi, Phyu Synn Oo, Myat Tin Htwe Kyaw, Katsuaki Sato, Ryoji Yamaguchi Yoshitaka Hishikawa. The HDAC Inhibitor, SAHA, Prevents Colonic Inflammation by Suppressing Pro-inflammatory Cytokines and Chemokines in DSS-induced Colitis. *Acta. Histochem. Cytochem.*, **2018**, 51, 33-40
 75. Loukia G. Tsaprouni, Kazuhiro Ito, Jonathan J. Powell, Ian M. Adcock, Neville Punchard. Differential Patterns of Histone Acetylation in Inflammatory Bowel Diseases. *J. Inflamm.* **2011**, 8, 1
 76. Miki Matsui, Kyoko Terasawa, Junko Kajikuri, Hiroaki Kito, Kyoko Endo, Pattaporn Jaikhan, Takayoshi Suzuki, Susumu Ohya. Histone Deacetylases Enhance Ca²⁺-activated K⁺ Channel K_{Ca}3.1 Expression in Murine Inflammatory CD4⁺ T cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 20, 2942
 77. Stefan Bittner, Nicole Bobak, Majella-Sophie Hofmann, Micheal K. Schuhmann, Tobias Ruck, Kerstin Göbel, Wolfgang Brück, Heinz Wiendl, Sven G. Meuth. Murine K_{2p}5.1 Deficiency Has No Impact on Autoimmune Neuroinflammation due to Compensatory K_{2p}3.1- and Kv1.3-Dependent Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16, 1680-16896
 78. Agnieszka Loboda, Alicja Jozkowicz, Jozef Dulak. HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors - Similar but Not Identical. *Mol. Cells.*, **2010**, 29, 435-442

79. Stephen P. Brazier, Helen S. Mason, Alan N. Bateson, Paul J. Kemp. Cloning of the human TASK-2 (KCNK5) promoter and its regulation by chronic hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 336, 1251-1258
80. Dong Hoon Shin, Haiyue Lin, Haifeng Zheng, Kyung Su Kim, Jin Young Kim, Yang Sook Chun, Jong Wan Park, Joo Hyun Nam, Woo Kyung Kim, Yin Hua Zhang, Sung Joon Kim. HIF-1 α -Mediated Upregulation of TASK-2 K⁺ Channels Augments Ca²⁺ Signaling in Mouse B Cells under Hypoxia. *J. Immunol.*, **2014**, 193, 4924-4933
81. Hussein Shehade, Valerie Acolty, Muriel Moser, Guillaume Oldenhove, Cutting Edge: Hypoxia-inducible Factor 1 Negatively Regulates Th1 Function. *J. Immunol.*, **2015**, 195, 1372-1376
82. Naoufal Akla, Jonathan Pratt, Borhane Annabi. Concanavalin-A Triggers Inflammatory Response Through JAK/STAT3 Signaling and Modulates MT1-MMP Regulation of Cox-2 in Mesenchymal Stromal Cells. *Exp. Cell Res.*, **2012**, 318, 2498-2506
83. Hani Choudhry, Adrian L. Harris. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab.*, **2018**, 27, 281-298
84. 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. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2014**, 306, G873-885

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学 医学研究科 薬理学分野 大矢進教授、鬼頭宏彰助教、京都薬科大学 薬理学分野 田中智之教授、藤井正徳准教授、丹羽里実助教に深謝いたします。

非選択的 HDAC 阻害剤 vorinostat 及び SIRT-1, 2 阻害剤 NCO-01 をご供与頂きました大阪大学 産業科学研究所 複合分子化学研究分野 鈴木孝禎教授、Elghareeb E. Elborya 博士に深謝いたします。

本論文の作成にあたり、ご助言、ご高閲を賜りました京都薬科大学 薬物治療学分野 加藤伸一教授ならびに細胞生物学分野 藤室雅弘教授に厚く御礼申し上げます。

末筆ながら、実験にご協力頂いた名古屋市立大学 医学研究科 薬理学分野 梶栗潤子博士、京都薬科大学 薬理学分野 清水彩夏、たぎし和隆、田中涼、黒川なつ美、中倉佐和の諸氏をはじめとした研究室員の皆様に心より御礼申し上げます。