

Tリンパ球における two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 の生理的役割と その新規阻害機構の解明

大矢 進, 鬼頭 宏彰

京都薬科大学薬理学分野

概要 Two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 は、細胞膜 4 回貫通型の電位非依存性 K⁺チャネルであり、静止膜電位の維持や細胞内 Ca²⁺動態に重要な役割を果たしている。K_{2p}5.1 の機能異常は自己免疫疾患(多発性硬化症, 関節リウマチ), 各種癌, 骨疾患などの病態と深く結びついていることが報告されている。しかし, K_{2p}5.1 選択的阻害剤が存在しないことが K_{2p}5.1 K⁺チャネルの生理学的, 病態生理学的意義を明らかにする上で障害になっている。本研究では, 免疫疾患モデルを用いて CD4 陽性 T 細胞における K_{2p}5.1 K⁺チャネルの病態生理学的意義を解明する。最近我々は, ヒト及びマウスリンパ組織から K_{2p}5.1 K⁺チャネルの新規スプライシング体(K_{2p}5.1B)を単離した。そこで, K_{2p}5.1 を機能発現する T 細胞モデルにスプライシング阻害剤を適用し, pre-mRNA スプライシング制御に着目した新規 K_{2p}5.1 K⁺チャネル阻害機構の解明を目指した。

1. 炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)モデルマウスの CD4 陽性 T 細胞における two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 発現・機能亢進

デキストラン硫酸ナトリウム誘発性 IBD モデルマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を単離して K_{2p}5.1 発現, 活性を検討したところ, K_{2p}5.1 発現の有意な亢進とアルカリ pH 誘発性過分極反応を指標として測定した K_{2p}5.1 活性の有意な上昇が観察された。

2. K_{2p}5.1 ノックアウトによる IBD 症状の軽減

K_{2p}5.1 のノックアウトマウスを用いて IBD モデルを作成したところ, 下痢, 血便の症状が有意に軽減するとともに, 大腸肥厚, 大腸陰窩障害, 炎症性細胞浸潤が有意に減弱した。この現象には, K_{2p}5.1 ノックアウトマウスによる CD4 陽性 T 細胞におけるインターフェロン γ の発現減少が関与していることが示唆された。

3. K_{2p}5.1 の N 末端領域欠損スプライスバリエントの単離とその機能解析

ヒト, マウスのリンパ組織から PCR クローニングにより K_{2p}5.1 の N 末端領域欠損スプライスバリエント K_{2p}5.1B を単離した。K_{2p}5.1B は完全長 K_{2p}5.1A と二量体を形成することにより, K_{2p}5.1A の細胞膜トラフィッキングを阻害した。K_{2p}5.1A を高発現するヒト白血病細胞株 K562 に K_{2p}5.1B を過剰発現させたところ, K_{2p}5.1 活性は有意に減少し, 細胞増殖能が抑制された。

4. Pre-mRNA スプライシング阻害剤による K_{2p}5.1B 転写亢進と K_{2p}5.1 活性抑制

K562 細胞を pre-mRNA スプライシング阻害剤 pladienolide B で 4-18 時間処置したところ, K_{2p}5.1A 転写に影響を及ぼすことなく K_{2p}5.1B 転写が亢進し, K_{2p}5.1 活性が有意に抑制された。この結果は, pre-mRNA スプライシング阻害剤が炎症性腸疾患などの K_{2p}5.1 関連疾患に有効であることを示唆した。

1. 研究目的

本研究の第一の目的は, 自己免疫疾患, アレルギー性

疾患, 癌の創薬標的分子として注目されている two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 の Tリンパ球における病態生理学

的意義を明らかにすることである。実際には、炎症性腸疾患モデルマウスから CD4 陽性 T 細胞を単離して、K_{2p}5.1 の機能発現解析を行うとともに、K_{2p}5.1 ノックアウトにより炎症性腸疾患の病態がどのように変化するかを明らかにする。最近我々は、ヒト及びマウスリンパ組織から K_{2p}5.1 K⁺チャンネルの新規スプライシング体 (K_{2p}5.1B) を単離した。本研究の第二の目的は、pre-mRNA スプライシング阻害剤による K_{2p}5.1B 転写後調節に着目し、pre-mRNA スプライシング制御を介した新規 K_{2p}5.1 阻害機構を解明することである。

2. 研究方法

2.1 炎症性腸疾患モデルマウスの作成

5-6 週齢の雄性マウス(系統:C57BL/J)を一週間程度馴化させ、5% (wt/vol) デキストラン硫酸ナトリウム 5000 (DSS) 含有水を 7 日間自由飲水させた^(1,2)。頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、下痢、血便レベルをスコア化するとともに、脾臓及び大腸を摘出して実験に使用した。本動物実験は学内の動物実験委員会において承認された。

2.2 マウス脾臓からの CD4 陽性細胞の単離

マウス脾臓を Isolation buffer に懸濁した後、Dynabeads FlowComp Mouse CD4 Isolation kit を用いて CD4 陽性細胞を単離した。CD4 陽性細胞の割合が 90%以上であることをフローサイトメーターにより確認した後、得られた細胞を発現解析、機能解析に利用した。K_{2p}5.1 ノックアウトマウス (B6;CB-Kcnk5^{Gt(pU-21)811meg}) は熊本大学生命資源研究・支援センターから購入した。

2.3 細胞培養

ヒト白血病細胞株 K562 細胞は、RPMI1640 培地 (10% ウシ胎児血清、抗生物質含有) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

2.4 膜電位感受性蛍光指示薬 DiBAC₄(3) と Ca²⁺ 蛍光指示薬 Fura 2-AM による膜電位及び細胞内 Ca²⁺ 濃度の測定

浜松フォトニクス の ORCA-Flash2.8 digital camera を搭載した蛍光イメージング装置を用いて、膜電位感受性蛍光指示薬 DiBAC₄(3) と Ca²⁺ 蛍光指示薬 Fura 2 の蛍光変化をそれぞれ膜電位、細胞内 Ca²⁺ 濃度変化として計測した⁽¹⁾。データ収集、解析には HC Image System を用いた。

2.5 リアルタイム PCR 実験

2.2 で単離した CD4 陽性 T 細胞から RNA を抽出し、Rever Tra Ace™ (東洋紡) と dN6 ランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した。Applied Biosystems リアルタイム PCR システム 7500 を用いて SYBER Green 法により定量的 PCR 実験を行った⁽¹⁾。単一の PCR 産物が生成していることを「解離曲線」にて確認した。β-アクチン (ACTB) の発現量を内在性標準として、対象となる転写物の発現量を ACTB に対する比として算出した。本研究で用いた PCR プライマーの配列情報については省略した。

2.6 ウェスタンブロットング法

2.2 で単離した CD4 陽性 T 細胞を可溶化し、タンパク試料を SDS-PAGE (10.0%) により電気泳動し、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 2%ウシ血清アルブミンを添加した PBS/0.1% Tween20 (Tween-PBS) でブロッキングした。Tween-PBS で 1:200 に希釈した抗 K_{2p}5.1 抗体 (G14 または H170) (Santa Cruz Biotechnology) に浸して 4 °C、1 晩インキュベートし、Tween-PBS で 5 分間、4 回洗浄した。次に、抗ヤギまたはウサギ IgG-HRP 標識抗体で 1 時間インキュベートし、同様に洗浄した。ECL Advance Western Blotting kit (Amersham Biosciences)、イメージングシステム VersaDoc 5000 を用いて可視化解析した。

2.7 大腸組織の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

摘出した大腸の長さ重量を測定した後、2%リン酸緩衝ホルマリン液で 15 分間固定した後、10%リン酸緩衝ホルマリン液で 48 時間以上固定した。脱水、パラフィン包埋の後、薄切切片 (5 μm) をスライドグラスに固定し、エタノールにより脱パラフィンし、水洗した。標本を Mayer's hematoxylin solution に 25 分間浸漬した後水洗し、エタノール及びキシレンを用いて脱水した。光学顕微鏡観察下 (倍率 × 100)、デジタルカメラで拡大像を撮影し、Dieleman らの方法により炎症細胞の浸潤度、陰窩障害度をスコア化した⁽³⁾。

2.8 共焦点レーザー顕微鏡を利用した K_{2p}5.1 タンパクの細胞内分布の可視化解析

蛍光タンパク質融合発現ベクター pECFP 及び pEYFP (Clontech) にそれぞれヒト K_{2p}5.1A 及びヒト K_{2p}5.1B をサブクローニングし、Lipofectamine 2000 を用いてヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後における細胞膜、細胞膜における蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 META により

観察した。また、ヒト K_{2p}5.1A 及びヒト K_{2p}5.1B をヒト哺乳動物細胞発現ベクター-pcDNA3.1(+)/Neo^r にサブクローニングし、エレクトロポレーション装置 NEPA21 またはリポフェクション試薬 Lipofectamine LTX を用いてトランスフェクションした⁽⁴⁾。

2. 9 統計学的解析

2 群間の検定には Student's または Welch's t 検定を用い、多群の検定には、一元配置分散分析を行った後に Tukey's 多重比較検定を行った。組織染色スコア等の非連続データの検定には、Mann-Whitney U 検定を行った。危険率 5%未満を有意差有りとした。

3. 研究結果及び考察

3. 1 炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) モデルマウスにおける two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 の病態生理学的意義

3. 1. 1 IBD モデルマウスの CD4⁺ 陽性 T 細胞における two-pore 型 K⁺チャネル K_{2p}5.1 発現・機能亢進 DSS 誘発性 IBD モデルマウスの脾臓から CD4⁺ 陽性 T

細胞を単離し、K_{2p}5.1 の mRNA 発現、タンパク発現を検討したところ、正常マウスと比較して K_{2p}5.1 発現量の有意な亢進が見られた (Fig. 1A-C)⁽¹⁾。また、細胞外液 (pH7.4) をアルカリ pH 溶液 (pH8.5) で置換したところ、細胞膜の過分極による膜電位感受性蛍光指示薬 DiBAC₄(3) の蛍光強度の減少が観察された (Fig. 1D, E)⁽¹⁾。アルカリ pH 誘発性過分極反応は K_{2p}5.1 阻害剤 clofilium (5 μM) により抑制された。また、磁気ビーズ細胞分離キットにより、CD4⁺CD25⁻ (炎症性 T 細胞) 及び CD4⁺CD25⁺ (制御性 T 細胞) サブセットを分取し、K_{2p}5.1 mRNA 発現量を比較したところ、IBD モデルの CD4⁺CD25⁻ 細胞サブセットにおいて高発現していた⁽¹⁾。

3. 1. 2 K_{2p}5.1 ノックアウトによる IBD 症状の軽減

K_{2p}5.1 ノックアウトマウスを用いて上記と同様に IBD モデルマウスを作成したところ、K_{2p}5.1 ホモ欠損マウスでは下痢、血便症状、大腸肥厚が軽減された (Fig. 2A-C)⁽¹⁾。また、HE 染色像から陰窩障害、炎症性細胞浸潤をスコア化して評価したところ、K_{2p}5.1 ホモ欠損マウス (-/-) では両パラメーターのスコアが有意に低下した (Fig. 2E-G)⁽¹⁾。

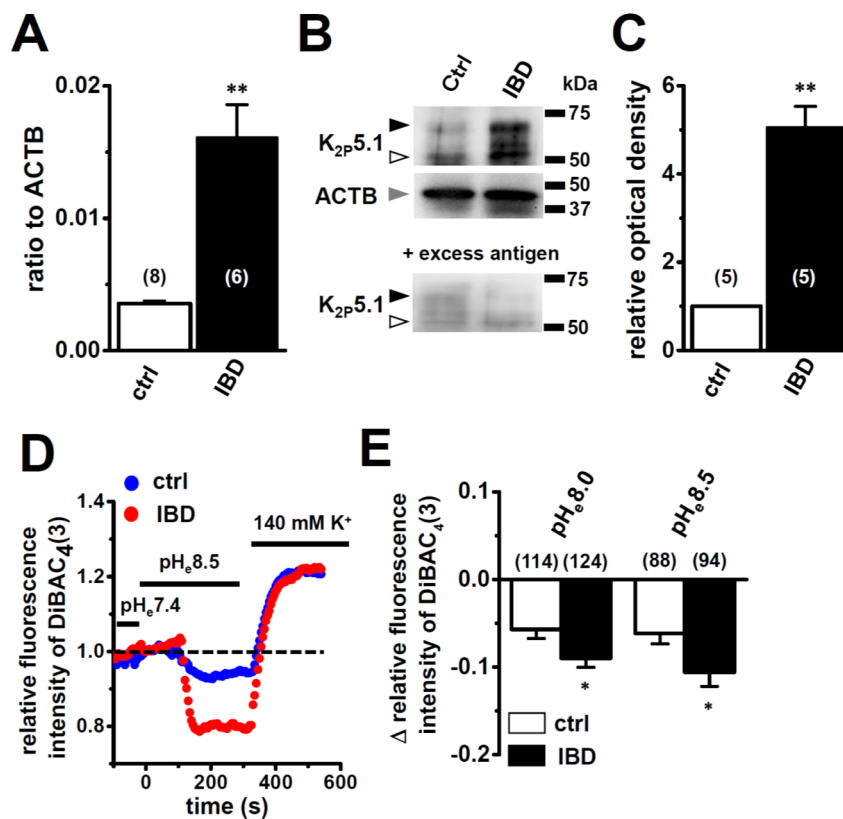


Figure 1. Expression levels of K_{2p}5.1 transcripts (A) and proteins (B, C) and alkaline pH-induced hyperpolarization in splenic CD4⁺ cells of IBD model mice

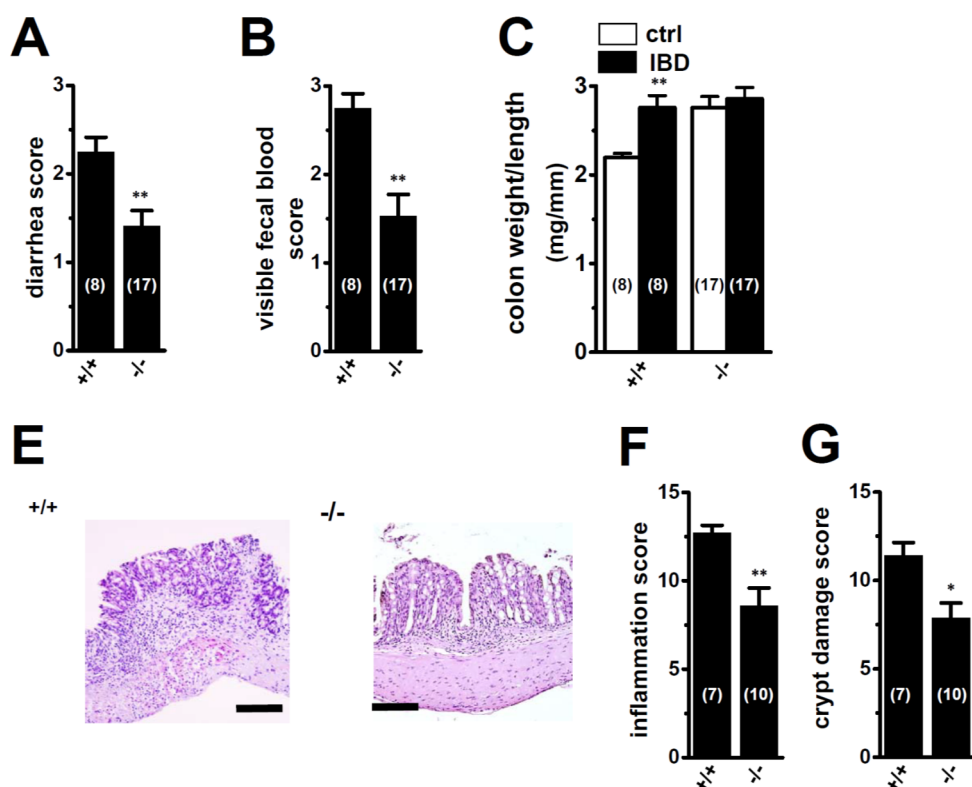


Figure 2. Macroscopic disease activities and histopathological assessments in the IBD model from wild-type (+/+) and homozygous $K_{2p5.1}$ knockout mice (-/-)

3. 1. 3 まとめ

関節リウマチ, 多発性硬化症患者の末梢血 T 細胞において two-pore 型 K^+ チャネル $K_{2p5.1}$ の機能発現が亢進することから, $K_{2p5.1}$ は自己免疫疾患の治療標的分子として注目されている^(5, 6)。また, 乳癌をはじめとする癌の治療標的分子としても注目されている^(7, 8)。本研究では, 炎症性腸疾患モデルの CD4 陽性 T 細胞において, $K_{2p5.1}$ の機能発現が亢進していることを明らかにした。また, $K_{2p5.1}$ ノックアウトマウスを用いて, $K_{2p5.1}$ が大腸炎症をはじめとする IBD 症状の増悪分子であることを示唆した。強力かつ選択性の高い $K_{2p5.1}$ 阻害剤の開発が, $K_{2p5.1}$ の創薬研究, 臨床研究を進める上で重要な課題である。

3. 2 two-pore 型 K^+ チャネル $K_{2p5.1}$ スプライスバリエントの単離と pre-mRNA 阻害剤による $K_{2p5.1}$ 発現・活性制御

3. 2. 1 $K_{2p5.1}$ の N 末端領域欠損スプライスバリエントの単離とその機能解析

K^+ チャネルの活性制御において, pre-mRNA スプライ

シングは重要な役割を果たしている。研究代表者の大矢らは, 2008 年から 2010 年に実施されたソルト・サイエンス研究財団の医学プロジェクト研究において, 中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル $K_{Ca3.1}$ の N 末端欠損変異スプライスバリエントを単離し, それが $K_{Ca3.1}$ 活性を阻害することを報告した⁽⁹⁾。本研究において, $K_{2p5.1}$ の PCR クローニングを行ったところ, ヒト脾臓から exon 3 を欠損するスプライスバリエント h $K_{2p5.1B}$, マウス脾臓から exon 3 の全部と exon2/4 の一部を欠損するスプライスバリエント m $K_{2p5.1B}$ を単離した。いずれも N 末端の細胞膜貫通ドメインを欠失していた⁽⁴⁾。完全長 (機能型) $K_{2p5.1A}$ と $K_{2p5.1B}$ に異なる蛍光タンパクを融合させて, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を解析したところ, $K_{2p5.1B}$ は $K_{2p5.1A}$ の細胞膜移行を阻害した (Fig. 3)⁽⁴⁾。また, 内因性に $K_{2p5.1}$ を機能発現するヒト白血病細胞株 K562 細胞に $K_{2p5.1B}$ を過剰発現させたところ, $K_{2p5.1}$ は有意に抑制された (Fig. 4)⁽⁴⁾。以上の結果より, $K_{2p5.1B}$ の発現亢進により, $K_{2p5.1}$ 活性が抑制されることが示唆され, $K_{2p5.1}$ の新規阻害機構を見出した。

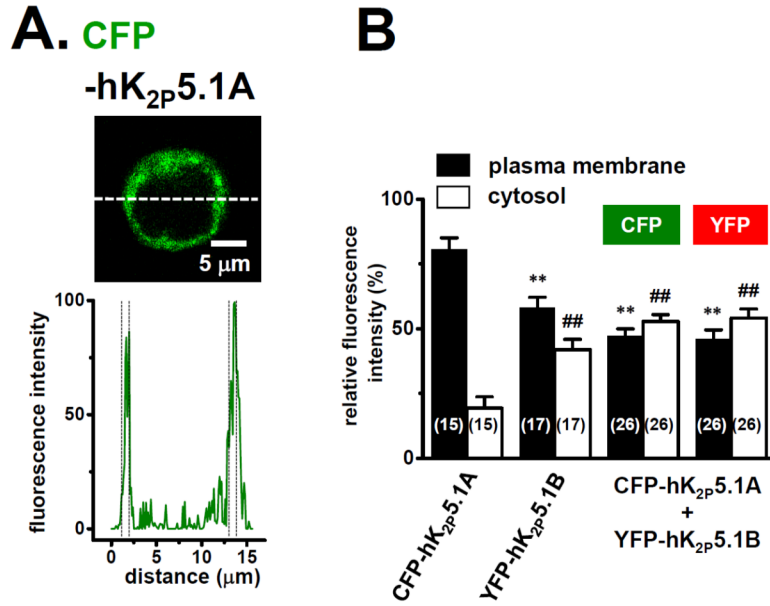


Figure 3. Cellular distribution of hK_{2p}5.1A (Green) (A) and hK_{2p}5.1B (RED) in HEK293 cells. Summarized data on the distribution of fluorescence signals in plasma membrane and cytosolic region were showed in 'B'

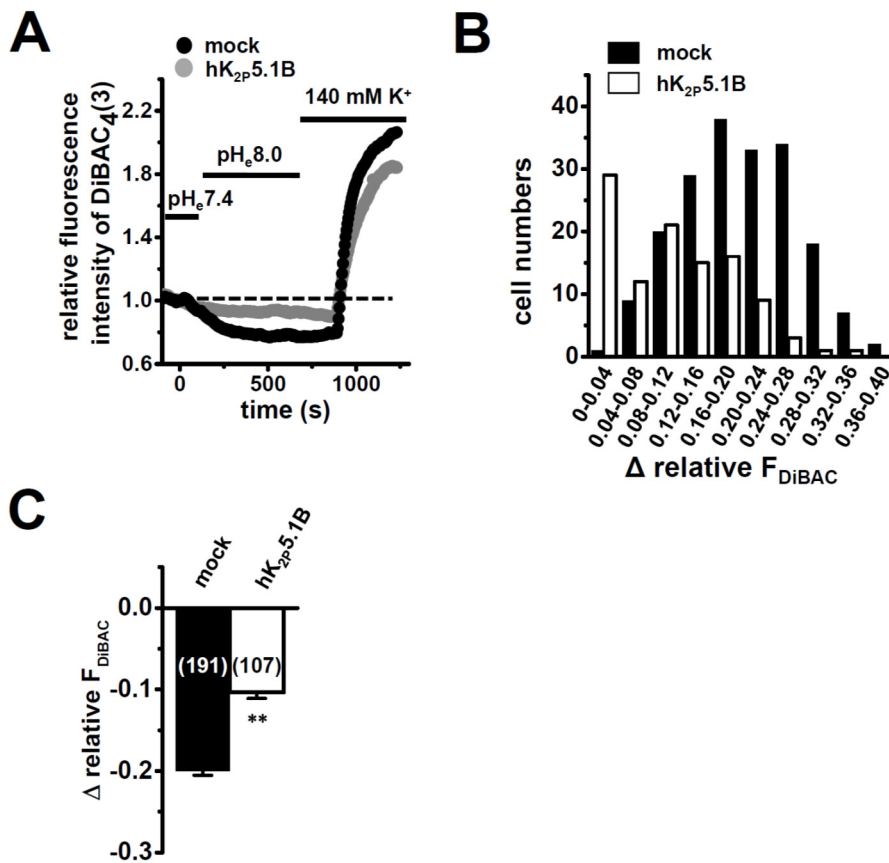


Figure 4. Inhibition of the activity of K_{2p}5.1 by overexpression of K_{2p}5.1B in human leukemic K562 cells. Alkaline-induced hyperpolarizing responses were estimated as the activity of K_{2p}5.1

3. 2. 2 Pre-mRNA スプライシング阻害剤による K2P5.1B 転写亢進と K2P5.1 活性抑制

最近、癌をはじめとするいくつかの疾患において、pre-mRNA スプライシング制御が注目されており、pre-mRNA スプライシング阻害剤が開発されている⁽¹⁰⁻¹²⁾。本研究では、K562 細胞を pre-mRNA スプライシング阻害剤 pladienolide B で 4-18 時間処理することにより生じる発現・活性変動を解析した。K562 細胞を 1 μ M Pladianolide B で処置したところ、処置後 4 時間から K2P5.1B 転写が亢進した (Fig. 5A)。また、K562 細胞における K2P5.1 活性は処置後 12 時間では有意に変化しなかったが、18-24 時間経過後には有意に抑制された (Fig. 5B)⁽⁴⁾。以上より、pre-mRNA 阻害剤により、K2P5.1B 転写亢進を介して K2P5.1 活性が抑制されることを明らかにした。以上の結果より、関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性疾患、乳癌において、pre-mRNA スプライシング阻害剤が間接的に K2P5.1 を阻害し、それらの疾患に奏功する可能性が示された。

3. 2. 3 まとめ

本研究では、pre-mRNA 阻害により two-pore 型 K⁺チャネル K2P5.1 のドミナントネガティブ体 K2P5.1B の発現を亢進させ、K_{2p}5.1 活性を阻害するという新規 K_{2p}5.1 阻害機構を明らかにした。本研究では、pre-mRNA 阻害剤を病態モデルに投与した際の K_{2p}5.1B 発現及び K_{2p}5.1 活性への影響については検討することができなかった。したがって、*in vivo* 投与による pre-mRNA 阻害の K_{2p}5.1 関連疾患の治療効果を検討することが今後の課題である。

4. 展 望

K_{2p}5.1 K⁺チャネルは、細胞容量調整や細胞増殖・分化の制御に重要な役割を果たしており、自己免疫疾患、炎症性疾患、癌の治療標的として期待されている。我々は、IBD モデルマウスを用いて、K_{2p}5.1 K⁺チャネルが IBD の新規治療標的であることを示すとともに、pre-mRNA スプライシング阻害剤が K_{2p}5.1 活性を抑制することを明らかにした。本知見は、pre-mRNA スプライシング阻害剤がイオンチャネルの転写後修飾によりその活性を制御することを示した初めての研究成果である。転写後修飾に関わる化合物としてヒ素トン脱アセチル化酵素阻害剤も開発されており、イオンチャネルのエピジェネティック制御を利用した阻害、活性化機構も今後明らかになるとと思われる。本研究成果を基盤として、イオンチャネル発現制御に着目したイオンチャネル創薬の実現に向けてさらに研究を進展させたい。

【本研究助成による研究成果一覧】

1. Nakakura S, Matsui M, Sato A, Ishii M, Endo K, Muragishi S, Murase M, Kito H, Niguma H, Kurokawa N, Fujii M, Araki M, Araki K, Ohya S. Pathophysiological significance of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in splenic CD4⁺ CD25⁻ T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Front Physiol.* 2015;6:299. (PMID: 26578971)

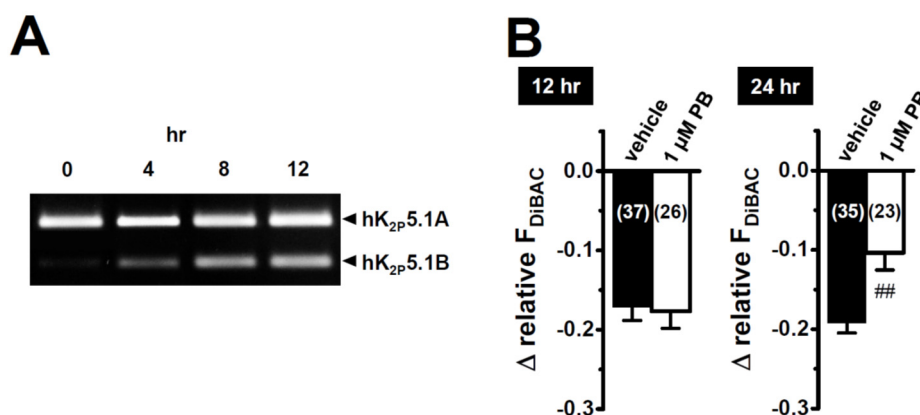


Figure 5. Effects of a pre-mRNA splicing inhibitor pladienolide B on K_{2p}5.1B expression and K_{2p}5.1 activity in K562 cells

2. Endo K, Kurokawa N, Kito H, Nakakura S, Fuji M, Ohya S. Identification of the dominant-negative, splicing isoform of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in lymphoid cells and enhancement of their expression by splicing inhibition. *Biochem Pharmacol*. 2015;98;440-52. (PMID: 26475531)
 3. Ohya S, Kanatsuka S, Hatano N, Kito H, Matsui A, Fujimoto M, Matsuba S, Niwa S, Zhan P, Suzuki T, Katsuhiko Muraki K. Downregulation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 by histone deacetylase inhibition in human breast cancer cells. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4:e00228. (PMID: 27069638)
5. 引用文献
1. Nakakura S, Matsui M, Sato A, Ishii M, Endo K, Muragishi S, Murase M, Kito H, Niguma H, Kurokawa N, Fujii M, Araki M, Araki K, Ohya S. Pathophysiological significance of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in splenic CD4⁺CD25⁻ T cell subset from a chemically-induced murine inflammatory bowel disease model. *Front Physiol*. 2015;6;299.
 2. Ohya S, Fukuyo Y, Kito H, Shibaoka R, Matsui M, Niguma H, Maeda Y, Yamamura H, Fujii M, Kimura K, Imaizumi Y. Up-regulation 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-G885.
 3. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Buck RO, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterol*. 1994;107;1643-1652.
 4. Endo K, Kurokawa N, Kito H, Nakakura S, Fuji M, Ohya S. Identification of the dominant-negative, splicing isoform of the two-pore domain K⁺ channel K_{2p}5.1 in lymphoid cells and enhancement of their expression by splicing inhibition. *Biochem Pharmacol*. 2015;98;440-52.
 5. Bittner S, Bobak N, Feuchtenberger M, Herrmann AM, Göbel K, Kinne RW, Hansen AJ, Budde T, Kleinschniz C, Frey O, Tony HP, Wiendl H, Meuth SG. Expression of K_{2p}5.1 potassium channels on CD4⁺ T lymphocytes correlates with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2011;13;R21.
 6. Bittner S, Bobak N, Herrmann AM, Göbel K, Meuth P, Höhn KG, Stenner MP, Budde T, Wiendl H, Meuth SG. Upregulation of K_{2p}5.1 potassium channels in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;68;58-69.
 7. Williams S, Bateman A, O'Kelley I. Altered expression of two-pore domain potassium (K2P) channels in cancer. *PLoS One*. 2013;8;e74589.
 8. Cid LP, Roa-Rojas HA, Niemeyer MI, Gonzalez W, Araki M, Araki K, Sepulveda FV. TASK-2: a K_{2p} K⁺ channel; with complex regulation and diverse physiological functions. *Front Physiol*. 2013;4;198.
 9. Ohya S, Niwa S, Yanagi A, Fukuyo Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Involvement of dominant-negative spliced variants of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, K_{Ca}3.1 in immune function of lymphoid cells. *J Biol Chem*. 2011;286;16940-16952.
 10. Barrie ES, Smith RM, Sanford JC, Sadee W. mRNA transcript diversity creates new opportunities for pharmacological intervention. *Mol Pharmacol*. 2012;81;620-630.
 11. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2012;18;472-482.
 12. Bonnal S, Vigevani L, Valcárcel J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11;847-859.

Physiological Role of the Two-Pore Domain K⁺ Channel K_{2p5.1} in T Cells and Novel Strategy to Regulate K_{2p5.1} Activity by Pre-mRNA Splicing Inhibition

Susumu Ohya, Hiroaki Kito

Kyoto Pharmaceutical University

Summary

The two-pore domain K⁺ channel K_{2p5.1} is as a possible therapeutic target for autoimmune and inflammatory disorders and cancers. K_{2p5.1} K⁺ channel plays an important role in regulation of Ca²⁺ signaling in T lymphocytes and cancer cells. However, the lack of selective K_{2p5.1} blockers has led to difficulties conducting experimental studies on K_{2p5.1} K⁺ channel. First, we elucidate the pathological significance of the K_{2p5.1} K⁺ channel in inflammatory bowel disease (IBD). Significant levels of increase in both expression and activity of K_{2p5.1} K⁺ channel were observed in the CD4⁺ T cells of the IBD model. The knockout of K_{2p5.1} in mice significantly suppressed the disease severity in the IBD model. These suggest that dysregulated K_{2p5.1} K⁺ channel may stimulate the Th1 imbalance in IBD, and provide evidence for K_{2p5.1} K⁺ channel as a potential therapeutic target for IBD. Second, we identified an N-terminus-lacking, novel splicing isoform of K_{2p5.1} K⁺ channel, K_{2p5.1B} from the human lymphoid tissues. In a heterologous expression system, K_{2p5.1B} inhibited the plasma membrane trafficking of K_{2p5.1A}. The K_{2p5.1} activity was significantly suppressed by K_{2p5.1B}-overexpression in human leukemia K562 cells, resulting in the prevention of cell viability. A pre-mRNA splicing inhibitor, pladienolide B significantly enhanced the expression levels of K_{2p5.1B} without changes in those of K_{2p5.1A} in K562 cells, resulting in decreases in the K_{2p5.1} activity. These suggest that the pre-mRNA splicing mechanism underlying the posttranscriptional regulation of K_{2p5.1} K⁺ channel may be a new therapeutic strategy for inflammatory disorder and cancers. The target-oriented development of pre-mRNA splicing inhibitors is expected as a novel strategy of drug development for K_{2p5.1} K⁺ channel