

リンパ球 K⁺チャネルの生理的・病的意義の解明と、疾患治療への応用

風間 逸郎

東北大学大学院医学系研究科生体システム生理学分野

概要 電位依存性遅延整流型 K⁺チャネル, Kv1.3 は、胸腺リンパ球の細胞膜上に多く存在し、その活性がリンパ球の増殖や活性化を促す。これまでの研究により、悪性腫瘍や自己免疫疾患では、癌細胞やリンパ球における Kv1.3 の過剰発現が、病気の発症や進展に大きく関与することが分かっているが、慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)をはじめとする“慢性炎症性疾患”における Kv1.3 の病的意義については明らかにされていない。腎不全末期の腎臓では、実際に、マクロファージやリンパ球などの炎症性細胞や線維芽細胞の活性が上昇しており、それらの増殖が盛んであることも分かっている。

われわれは、雄の SD ラットに 5/6 腎摘術を施して作成した末期腎不全モデルラットの腎臓を解析することにより、本病態下では、腎臓リンパ球における Kv1.3 の過剰発現が局所における炎症性細胞の増殖・活性を刺激し、腎臓間質の線維化を促すことを明らかにした。一方で、主に電気生理学的手法を用いた研究によって、非ステロイド性抗炎症薬や一部の抗菌薬に加え、降圧薬(Ca²⁺拮抗薬)やマクロライド系抗生物質、スタチン系脂質降下薬も、リンパ球 Kv1.3 チャネル電流を有意に抑制することにより、免疫抑制作用を発揮することを明らかにした。

中でも、日常診療で頻用されている Ca²⁺拮抗薬: Benidipine やスタチン系脂質降下薬: Simvastatin は、本チャネル電流を強力かつ持続的に阻害したことから、末期腎不全モデルラットに対し、本薬剤の治療的な投与を試みた。その結果、末期腎不全ラットの腎臓では、これらの薬剤の投与により、皮質間質領域における細胞周期マーカーの発現が減少するとともに、炎症性細胞の増殖が抑えられ、これらの細胞由来のサイトカイン産生も有意に抑制された。とくに Benidipine は、糸球体硬化病変の進展には影響を与えなかったが、腎臓間質領域における線維化の進行を、有意に抑制した。従って Benidipine や Simvastatin は、末期腎不全の腎臓において、T-リンパ球やマクロファージで過剰発現した Kv1.3 を阻害することにより、炎症性細胞の増殖や活性を抑え、線維化の進行を抑制すると考えられた。

われわれは、これら一連の研究成果によって、選択的 Kv1.3 チャネル阻害薬だけでなく、本チャネル阻害作用を有する既存の頻用薬も、慢性腎臓病をはじめ、いわゆる“慢性炎症性疾患”に対する治療薬として有用である可能性を示した。

1. 研究目的

電位依存性遅延整流型 K⁺チャネル Kv1.3 は、胸腺由来 T リンパ球の細胞膜上に多く存在し、その活性がリンパ球の増殖や活性化を促す。これまでの研究により、悪性腫瘍や自己免疫疾患では、癌細胞やリンパ球における Kv1.3 の過剰発現が、病気の発症や進展に大きく関与することが分かっているが、慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)などの慢性疾患における Kv1.3 の病的意義については明らかにされていない。最近では、悪性腫瘍

や自己免疫疾患だけでなく、慢性腎臓病をはじめとした生活習慣病、慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD)や炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease; IBD)など、いわゆる慢性疾患の病態形成過程においても、臓器局所における慢性炎症や、免疫反応の過剰な賦活化が関与することが明らかになってきた。中でも、腎不全末期の腎臓では、実際に、マクロファージやリンパ球などの炎症性細胞や線維芽細胞の活性が上昇しており、それらの増殖が盛んであること

も分かっている。従って、これらの慢性疾患においても、悪性腫瘍や自己免疫疾患の場合と同様、リンパ球 Kv1.3 を介した炎症性細胞の増殖や活性化が、病態の進行過程に関与している可能性が高い。そこで本研究では、(1) 末期腎不全の腎臓では、リンパ球 Kv1.3 の過剰発現により、炎症・線維化が進行し、(2) 実際に、Kv1.3 阻害作用を持つ薬剤によって、その進行が抑えられることを明らかにする。

2. 研究方法

2. 1. 末期腎不全モデルの作成と解析

6 週齢の雄 SD ラットに対し 5/6 腎摘術を施行後、12 週の回復期間を置いて末期腎不全モデルを作成した。実験動物の取り扱いについては東北大学の定める「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に準拠した。腎臓を摘出後にパラフィン固定し、Kv1.3 に対する抗体染色法を行い、Kv1.3 蛋白の発現分布を調べた。また、リンパ球やマクロファージの細胞マーカー: CD3, ED-1 に対する抗体を Kv1.3 抗体と共染色し、Kv1.3 が、特にどの細胞で過剰発現するのかを検討した。

2. 2. 薬剤投与実験

末期腎不全モデルラットに対し、Kv1.3 特異的チャンネル阻害薬 (Margatoxin), または Benidipine, Simvastatin を治療的に投与した。これらの薬剤の投与量については、申請者が review 論文の中で報告した、過去の *in vivo* 実験での使用量に準拠し¹⁾、全身性の副作用を生じない範囲内の最大量とした。投与終了後に腎臓を摘出し、チャンネル阻害薬非投与群の腎臓と比較した。血清クレアチニン値のほか、線維化のマーカー (Collagen III, α -SMA) の発現も調べた。

2. 3. 胸腺リンパ球の単離

4~5 週齢 *ddy* マウスから胸腺を摘出し、細胞外液 (NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl₂, 1.0; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; BSA, 0.01%; pH 7.2) で、リンパ球を単離した。単離した後、細胞外液中に拡散し、細胞含有液とした。なお、本細胞を用いた以下の実験は、細胞採取後 8 時間以内に、室温 (22~24°C) 条件下で行った。

2. 4. 全細胞膜電流の測定

EPC-9 patch-clamp amplifier system (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) を用いたホールセル・パッチクラン

プ法によって全細胞膜電流を測定した。パッチパイペット内に電極内液 (KCl, 145; MgCl₂, 1.0; EGTA, 10; HEPES, 5.0 mM; pH 7.2) を満たした時の電気抵抗は 4~6 M Ω であった。細胞外液中に浮遊させたリンパ球に対してギガシールを作成した後、電極内に陰圧を加えて細胞膜の一部を破壊し、ホールセル・モードとした。細胞に Benidipine (10 μ M) または Simvastatin (10 μ M) を投与し、投与前後の全細胞膜電流を比較した。

2. 5. 統計学的解析方法

得られたデータは、PulseFit software (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) 及び Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて解析した。また、Student の *t* test による両方向の分散分析を用いて統計学的有意差を検証した。*p* 値 0.05 以下で統計学的に有意であると判断した。

3. 研究結果と考察

3. 1. リンパ球 Kv1.3 チャンネル活性と腎線維化の進行

T リンパ球においては、Kv1.3 チャンネルを介した外向きのカリウムイオンの移動が細胞内へのカルシウムの流入を引き起こし、Calcineurin pathway が活性化される。その結果、サイトカインの産生や、リンパ球の増殖が促され、細胞性免疫が賦活化される²⁾。

CKD では一般に、病期の進行とともに血液中のサイトカイン濃度が上昇することが知られているが、われわれの研究結果からも、5/6 腎摘術後の末期腎不全ラットの腎臓では病態の進行とともに、腎皮質領域における炎症性細胞の浸潤が著しくなり、腎間質領域の拡大と著しい線維化の進行が認められた。また、細胞増殖マーカーである Ki-67 による抗体染色の結果、末期腎不全ラットの腎間質では、著しい細胞増殖が認められたが (図1A)、これらの細胞のほとんどが、CD3 または ED-1 陽性の T リンパ球やマクロファージなどの炎症性細胞であった。

正常ラットの腎臓や腎不全の初期において Kv1.3 チャンネルは、主に近位尿細管や集合管に発現することが知られているが、われわれが行った研究の結果、腎不全の進行に従い、増殖の著しいリンパ球やマクロファージにおいて過剰発現が認められた (図1A)。そこで、CKD の病態における本 K⁺チャンネルの関与を明らかにするために、末期腎不全ラットに対して選択的 Kv1.3 チャンネル阻害薬であ

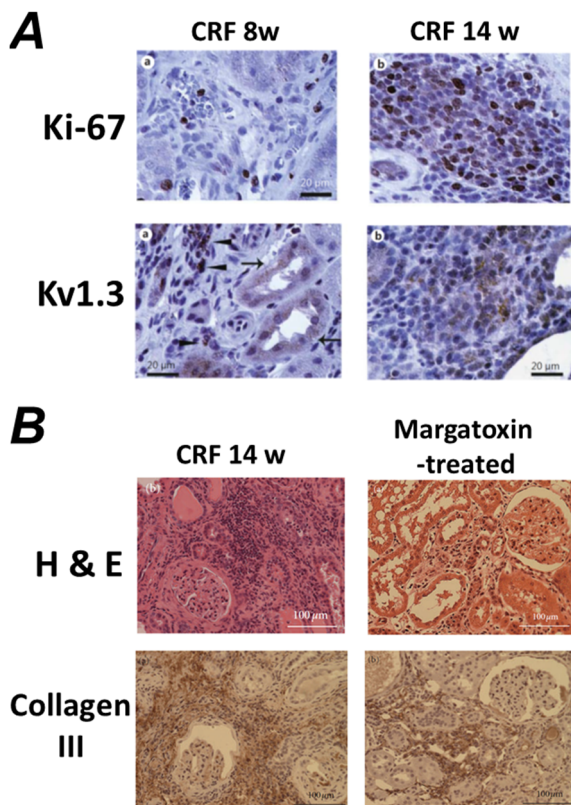


Figure 1. Lymphocyte Kv1.3-channels in the progression of renal fibrosis in advanced chronic kidney disease

(A) Proliferation of lymphocytes and the overexpression of Kv1.3-channels in the renal interstitium of rat models with chronic renal failure (8 weeks or 14 weeks after subtotal nephrectomy). (B) Effects of margatoxin on lymphocyte proliferation and the progression of renal fibrosis.

る Margatoxin の治療的投与を試みた。その結果、Margatoxin 投与群では非投与群に比べ、腎間質領域における炎症性細胞の浸潤が抑えられ、腎線維化の進行も有意に抑制された(図1B)。従ってCKDでは、腎臓リンパ球における Kv1.3 チャンネルの過剰発現がリンパ球自身の増殖を促し、サイトカインの産生や線維芽細胞の活性化を介して、腎臓の線維化を進行させると考えられた。

3. 2. Benidipine が有する“Kv1.3 阻害作用”と腎線維化の抑制

Margatoxin はリンパ球において、Kv1.3 チャンネルを阻害することにより炎症性サイトカインの産生を抑え、免疫抑制作用を発揮することが分かっている⁽³⁾。しかし、Maragatoxin をはじめとする数多くの選択的 Kv1.3 チャネ

ル阻害薬は、神経や筋肉に対する副作用が強いため、未だ治療薬としての実用化には至っていない。一般診療の中で頻用されている非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)、抗生物質、降圧薬の中にも、本来の薬理作用に加え、免疫抑制作用を併せ持つものがあるが、それらの作用機序についてはよく分かっていない。われわれがマウス胸腺由来リンパ球を用いて行った電気生理学的実験(パッチクランプ法)の結果、NSAIDs(Diclofenac, Salicylate, Indomethacin)、マクロライド系抗生物質(Clarithromycin)、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬(Nifedipine, Benidipine)は、いずれも Kv1.3 チャンネル電流を有意に抑制致したことから^(4,6)、これらの薬剤は Margatoxin と同様、リンパ球 Kv1.3 チャンネルを阻害することによって炎症性サイトカインの産生を抑え、免疫抑制作用を発揮すると考えられた。

中でも Benidipine は、少ない用量でも本チャンネル電流を強力、かつ持続的阻害したため⁽⁴⁾(図2A)、われわれは末期腎不全モデルラットに対して、本薬剤の治療的投与を試みた。その結果、Benidipine 投与群では非投与群に比べ、腎間質領域における炎症性細胞の浸潤・増殖や(図2B)、IL-2 や IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生が抑えられ、腎線維化の進行も有意に抑制されていた(図2B)。Benidipine はカルシウム拮抗薬として、LおよびTタイプの Ca^{2+} チャンネルに拮抗するため、腎臓糸球体の輸入・輸出細動脈ともに拡張することが分かっている⁽⁷⁾。これにより糸球体内圧を低下させ、とくに保存期腎不全においては、腎臓への蛋白負荷を減らすとされている。しかし、われわれの研究結果から、末期腎不全モデルラットでは、Benidipine 投与によっても全身血圧・尿蛋白量ともに高値が維持されたことから、末期腎不全の状態では、本薬剤は腎血行動態を変化させることなく、腎線維化の進行を抑制すると考えられた。従って、CKDにおいて Benidipine は、腎臓リンパ球で過剰発現した Kv1.3 チャンネルを阻害することによって、リンパ球の増殖やサイトカインの産生を抑え、腎線維化の進行を抑制すると考えられた。

3. 3. Simvastatin が有する“Kv1.3 阻害作用”と腎線維化の抑制

マウス胸腺由来リンパ球を用いて行った電気生理学的実験(パッチクランプ法)の結果、スタチン系抗コレステロール薬のひとつである Simvastatin も Benidipine と同様、

少ない用量でリンパ球 Kv1.3 チャンネル電流を強力、かつ持続的に阻害した)。そこでわれわれは、末期腎不全モデルラットに対し、本薬剤の治療的投与も試みた。その結果、Simvastatin 投与群では非投与群に比べ、腎間質領域における炎症性細胞の浸潤・増殖や腎線維化の進行が有意に抑制されていた。しかし、Benidipine の場合と異なり、Simvastatin は糸球体硬化病変の進行も抑制した。従って、Simvastatin が腎線維化を抑制するメカニズムについては、リンパ球 Kv1.3 阻害による抗炎症作用のほかにも、糸球体硬化の改善をもたらす二次的な効果も除外しきれないと考えられた。

3. 4. 肥満細胞活性と腎線維化

肥満細胞は、IgE 依存性または非依存性に刺激を受けた後、Histamine や Serotonin, Leukotriene, Prostaglandin

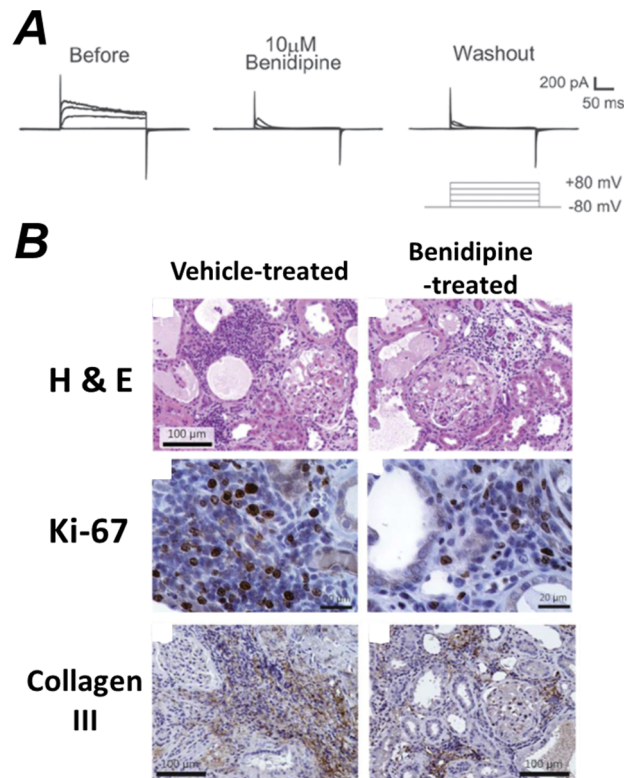


Figure 2. Suppressive effects of benidipine on lymphocyte Kv1.3-channels and renal fibrosis in advance chronic kidney disease. (A) Persistent suppression of benidipine on lymphocyte Kv1.3-channel currents (B) Effects of benidipine on lymphocyte proliferation and the progression of renal fibrosis

などの化学伝達物質を放出し、蕁麻疹や気管支喘息など様々なアレルギー疾患を引き起こす。近年の報告によれば、肥満細胞は、化学伝達物質のほかにも、TNF- α などの炎症性サイトカインや、TGF- β , basic FGF, VEGF などの線維原性因子をも産生することが分かってきており、全身性強皮症や肝硬変など、全身臓器の線維化にも関与することが明らかになっている⁽⁸⁾。そこでわれわれは、腎線維化の進行における肥満細胞の関与を調べた。しかし、末期腎不全ラットの腎臓では、リンパ球やマクロファージに比べ、Tryptase 陽性の肥満細胞の数はごくわずかであり(図3A)、肥満細胞安定化薬である Tranilast の投与によっても、腎線維化の改善はみられなかった(図3B)⁽⁹⁾。従って、慢性腎臓病に伴う腎線維化の進行においては、肥満細胞はほとんど関与していないと考えられた。

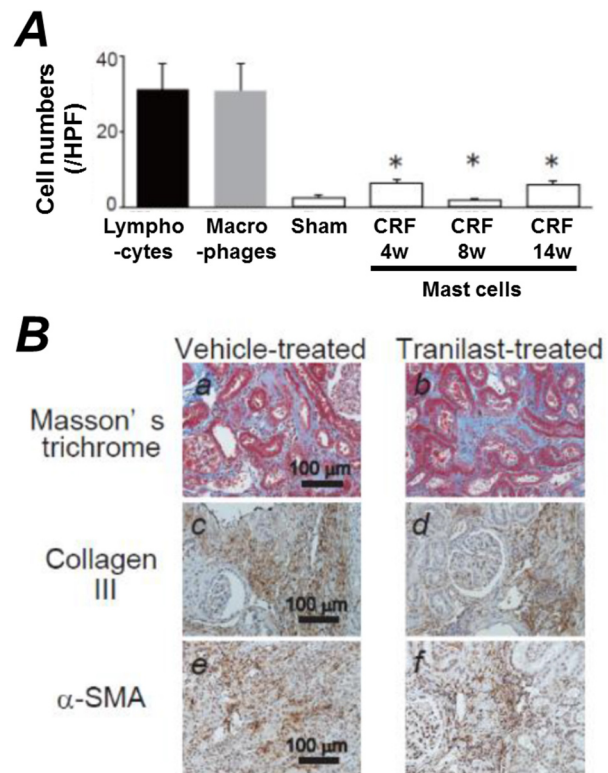


Figure 3. Mast cell involvement in the progression of renal fibrosis in advance chronic kidney disease. (A) Less infiltration of mast cells in the renal interstitium of rat models with chronic renal failure compared to lymphocytes or macrophages (B) Effects of tranilast on the progression of renal fibrosis

4. 結論および今後の課題

CKD では、腎間質リンパ球における Kv1.3 チャンネルの過剰発現がリンパ球を増殖させ、腎線維化の進行を促していた。従って Benidipine や Simvastatin など、“Kv1.3 阻害作用”を有する薬剤は、腎線維化に対する治療薬としても有用であると考えられた。近年では CKD 以外にも、慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD)、炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) などの、“慢性炎症性疾患”の病態形成過程においても、臓器局所における慢性炎症や、免疫反応の過剰な賦活化が関与することが明らかになってきた⁽¹⁰⁾。そこで今後は広く、“慢性炎症性疾患”や“臓器の線維化”におけるイオンチャンネルの病的・治療的意義についても明らかにし、これらの疾患に対する新規治療(予防)法の開発にも貢献していきたいと考えている。

5. 文献等

- 1 Kazama I, Tamada T, Tachi M: Usefulness of targeting lymphocyte Kv1.3-channels in the treatment of respiratory diseases. *Inflamm Res* **64**: 753-65, 2015
- 2 Kazama I: Physiological significance of delayed rectifier K(+) channels (Kv1.3) expressed in T lymphocytes and their pathological significance in chronic kidney disease. *J Physiol Sci* **65**: 25-35, 2015
- 3 Kazama I, Maruyama Y, Murata Y, Sano M: Voltage-dependent biphasic effects of chloroquine on delayed rectifier K(+) channel currents in murine thymocytes. *J Physiol Sci* **62**: 267-74, 2012
- 4 Kazama I, Maruyama Y, Matsubara M: Benidipine persistently inhibits delayed rectifier K(+) channel currents in murine thymocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **35**: 28-33, 2013
- 5 Kazama I, Maruyama Y: Differential effects of clarithromycin and azithromycin on delayed rectifier K(+) channel currents in murine thymocytes. *Pharm Biol* **51**: 760-5, 2013
- 6 Kazama I, Maruyama Y, Murata Y: Suppressive effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac sodium, salicylate and indomethacin on delayed rectifier K+ channel currents in murine thymocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **34**: 874-8, 2012
- 7 Hayashi K, Homma K, Wakino S, Tokuyama H, Sugano N, Saruta T et al.: T-type Ca channel blockade as a determinant of kidney protection. *Keio J Med* **59**: 84-95, 2010
- 8 Mori T, Abe N, Saito K, Toyama H, Endo Y, Ejima Y et al.: Hydrocortisone and dexamethasone dose-dependently stabilize mast cells derived from rat peritoneum. *Pharmacol Rep* **68**: 1358-65, 2016
- 9 Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Saito K et al.: Less contribution of mast cells to the progression of renal fibrosis in Rat kidneys with chronic renal failure. *Nephrology (Carlton)* **22**: 159-67, 2017
- 10 Kazama I, Tamada T: Lymphocyte Kv1.3-channels in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: novel therapeutic implications of targeting the channels by commonly used drugs. *Allergy Asthma Clin Immunol* **12**: 60, 2016

Pathological and Therapeutic Usefulness of Lymphocyte K⁺-Channels

Itsuro Kazama

Tohoku University

Summary

T lymphocytes predominantly express delayed rectifier K⁺-channels (Kv1.3) in their plasma membranes. Patch-clamp studies revealed that the channels play crucial roles in facilitating calcium influx necessary to trigger the lymphocyte activation and proliferation. In addition to selective channel inhibitors that have been developed, we recently showed physiological evidence that the commonly-used drugs, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs, antibiotics, anti-hypertensives and anti-cholesterol drugs, effectively suppress the channel currents in lymphocytes, and thus exert immunosuppressive effects.

Using experimental animal models, previous studies revealed the pathological relevance between the expression of ion channels and the progression of renal diseases. As an extension, we recently demonstrated that the overexpression of lymphocyte Kv1.3-channels contributed to the progression of chronic kidney disease (CKD) by promoting cellular proliferation and interstitial fibrosis. According to one of our patch-clamp studies, since benidipine, a long-acting 1,4-dihydropyridine Ca²⁺ channel blocker, or simvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, were also highly potent as Kv1.3-channel inhibitors, they could exert therapeutic efficacy in the progression of CKD. Therefore, using a rat model with advanced stage chronic renal failure (advanced CRF), we examined the effects of benidipine or simvastatin on the histopathological features of the kidneys, cellular proliferation of leukocytes and the cortical expression of pro-inflammatory cytokines. In the cortical interstitium of advanced CRF rat kidneys, these drugs significantly ameliorated the progression of renal fibrosis. Simvastatin also ameliorated the progression of glomerular injury, but benidipine did not. Both drugs reduced the number of proliferating leukocytes with a significant decrease in the pro-inflammatory cytokine expression. Together with our *in vitro* evidence, the studies indicated the therapeutic potency of Kv1.3-channel inhibitors, such as benidipine and simvastatin, in the treatment or the prevention of CKD.