

カリウムチャネル阻害による抗炎症性サイトカイン IL-10 産生増大機構の解明

大矢 進, 鬼頭 宏彰

名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学分野

概要 カルシウムシグナル制御は, Tリンパ球やマクロファージの増殖, 分化, アポトーシス及びサイトカイン産生に重要な役割を果たす。これまで我々は, カルシウム活性化カリウムチャネルを介したカルシウムシグナル制御がアレルギー, 炎症性疾患に関与することを明らかにした。免疫系疾患の予防及び治療戦略の中で, 炎症慢性化のシグナルネットワーク制御機構の解明が注目されているが, 炎症慢性化過程の細胞機能変動において, Tリンパ球, マクロファージに機能発現するカリウムチャネルがどのような病態生理学的役割を果たしているのかは明らかでない。本研究では, Tリンパ球のIL-10発現・産生におけるカリウムチャネルの役割に着目し, 以下のことを明らかにした。

1. 炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) 亜慢性モデルマウスにおけるカルシウム活性化カリウムチャネル $K_{Ca3.1}$ 阻害剤の効果

デキストラン硫酸ナトリウム誘発性 IBD 亜慢性モデルマウスに, 1 mg/kg 体重の TRAM-34 を皮下投与したところ, 大腸炎症などの病態スコアが有意に改善した。また, 脾臓から高速セルソーターにて制御性 T 細胞 ($CD4^+CD25^+$ 細胞) を単離して IL-10 mRNA 発現を解析したところ, 対照群と比較して TRAM-34 投与群において IL-10 の有意な発現亢進が観察された。さらに, IL-10 転写因子として報告されている E4BP4 が発現亢進していた。以上より, $K_{Ca3.1}$ 阻害剤投与による IBD 症状の改善には, 制御性 T 細胞における IL-10 産生亢進が少なくとも一部寄与していることが示唆された。

2. ヒト T 細胞腫 HUT-78 細胞株における $K_{Ca3.1}$ 活性化剤による IL-10 転写抑制とその調節機構の解明

ヒト T 細胞のモデル細胞として使用される HUT-78 におけるカルシウム活性化カリウムチャネル及びサイトカイン発現を検討したところ, $K_{Ca3.1}$ と IL-10 が高発現しており, $K_{Ca3.1}$ 活性, IL-10 産生能ともに高レベルであった。HUT-78 細胞を $K_{Ca3.1}$ 活性化剤 SKA-31 (1 μ M) で 6 時間処置したところ, 50% 程度 IL-10 転写・産生が抑制された。この抑制反応は, $K_{Ca3.1}$ 阻害剤 TRAM-34 によりほぼ完全に抑制された。IL-10 転写に関わる Smad2/3 のリン酸化を検討したところ, $K_{Ca3.1}$ 活性化剤の処置により, リン酸化 Smad2 のタンパク発現量が有意に減少した。次に, カルモジュリンキナーゼ II 阻害剤 KN-62 (10 μ M) で 1 時間前処置した後に $K_{Ca3.1}$ 活性化剤を処置したところ, IL-10 転写・産生の抑制, Smad2 リン酸化の抑制がともに消失した。以上より, $K_{Ca3.1}$ を介した IL-10 転写制御機構にカルモジュリンキナーゼ II を介した Smad2/3 シグナルが関与することが示唆された。

1. 研究目的

カルシウムシグナル制御は, T 細胞やマクロファージの増殖, 分化, アポトーシスおよびサイトカイン産生に重要な役割を果たす。これまで我々は, カルシウム活性化カリウムチャネルを介したカルシウムシグナル制御がアレルギー, 炎症性疾患に関与することを明らかにした^{1,2)}。免疫系

疾患の予防および治療戦略の中で, 炎症慢性化のシグナルネットワーク制御機構の解明が注目されているが, 炎症慢性化過程の細胞機能変動において, T 細胞, マクロファージに機能発現するカリウムチャネルがどのような病態生理学的役割を果たしているのかは明らかでない。我々は, 炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease,

IBD)の亜慢性モデルマウスにカルシウム活性化カリウムチャンネル $K_{Ca3.1}$ 阻害剤を *in vivo* 投与することにより, IBD 症状が改善することに加えて, 制御性 T リンパ球における抗炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-10 発現が顕著に増加することを明らかにした。本研究の目的は, 炎症慢性化による T 細胞におけるカリウムチャンネル発現・活性制御の病態生理学的意義を解明し, カリウムチャンネル活性制御による抗炎症性サイトカイン発現調節機構を明らかにすることである。

2. 研究方法

2-1 炎症性腸疾患モデルマウスの作成

8 週齢の雌性マウス(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 50000 (DSS) 含有水を 7 日間自由飲水させた後, 通常水に戻し, さらに 5 日間飼育した³⁾。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, 脾臓と大腸を摘出して実験に使用した。本動物実験は学内(京都薬科大学および名古屋市立大学)の動物実験委員会において審査され, 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 (Ca^{2+} and Mg^{2+} free PBS with 0.1% BSA and 2 mM EDTA, pH 7.4) に懸濁した後, Dynabeads FlowComp Mouse $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg Cells kit を用いて CD4 陽性 CD25 陽性細胞と CD4 陽性 CD25 陰性細胞をそれぞれ単離した。また, CD4 陽性細胞を単離するために, Dynabeads FlowComp Mouse $CD4^{+}$ Isolation kit を用いた。目的細胞の割合が 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, 機能解析に用いた。

2-3 細胞培養

ヒト T リンパ腫細胞株 HuT-78 細胞は, RPMI1640 培地 (10% ウシ胎児血清, 抗生物質含有) で $37^{\circ}C$, 5% CO_2 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 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura 2 による膜電位および細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

浜松フォトニクス社の 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 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura 2 の蛍光変

化をそれぞれ膜電位, 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化として計測した²⁾。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 T 細胞から RNA を抽出し, Rever Tra Ace™ (東洋紡) を用いて cDNA を合成した。Applied Biosystems リアルタイム PCR システム ABI 7500 fast を用いて SYBER Green 法により定量的 PCR 実験を行った^{1,2)}。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) 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 ウェスタンブロッティング法

HuT-78 細胞を, RIPA バッファーを用いて可溶化したタンパク試料を 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 Smad2/3 抗体, 抗リン酸化 Smad2 抗体, 抗リン酸化 Smad3 抗体 (Cell Signaling) に浸して $4^{\circ}C$, 1 晩インキュベートした。Tween-PBS で洗浄後, 抗ウサギ 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, イメージングシステム LAS4000 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と重量を測定した後, 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 ($5\ \mu m$) をスライドガラスに固定し, 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 分間浸漬した後に水洗し, エタノールおよびキシレンを用いて脱水した。光学顕微鏡観察下 (倍率 $\times 100$), 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⁴⁾。

2-8 共焦点レーザー顕微鏡を利用した r リン酸化 Smad2/3 の核内移行の可視化解析

各種薬物処理した HuT-78 細胞をホルマリン固定した後, Triton-X100 を含む細胞透過溶液で処置した。その後, 抗リン酸化 Smad2 抗体, 抗リン酸化 Smad3 抗体をインキュ

ベートシ(一晚), anti-rabbit IgG (H+L) (Alexa Fluor 488)により蛍光標識した。核を DAPI により染色し, 細胞内, 核内におけるリン酸化 Smad2 および Smad3 の分布を共焦点レーザー顕微鏡 LSM810 により観察した⁵⁾。

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. 研究結果および考察

3-1 炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) 亜慢性モデルマウスの脾臓 CD4⁺ T 細胞におけるカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 の病態生理学的役割

3-1-1 亜慢性 IBD モデルマウスの CD4 陽性 T 細胞におけるカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 の発現亢進

亜慢性 IBD モデルマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を単離し, K_{Ca}3.1 の mRNA 発現をリアルタイム PCR により検討したところ, 正常マウスと比較して K_{Ca}3.1 の有意な発現亢進が見られた。

3-1-2 亜慢性 IBD モデルマウスにおける K_{Ca}3.1 阻害剤投与による IBD 症状の軽減

亜慢性 IBD モデルマウス作成過程(5 日目および 7 日目)に K_{Ca}3.1 阻害剤 TRAM34 を腹腔内投与(1 mg/kg 体重)したところ, 血便, 下痢スコアが有意に低下した。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, 炎症性細胞浸潤が有意に軽減された。陰窩障害については軽減される傾向がみられた。

3-1-3 亜慢性 IBD モデルマウスへの K_{Ca}3.1 阻害剤 TRAM-34 腹腔内投与による脾臓由来 CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞における抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現亢進

K_{Ca}3.1 阻害剤 TRAM34 を腹腔内投与(1 mg/kg 体重)した亜慢性 IBD モデルマウスから CD4⁺CD25⁺および CD4⁺CD25⁺細胞を分取し, CD4⁺CD25⁺細胞(制御性 T 細胞)における IL-17A, IL-10, IL-10 転写因子 E4BP4 の発現をリアルタイム PCR にて解析した。CD4⁺CD25⁺細胞は

フローサイトメーターで確認した。また, リアルタイム PCR により, CD25 および Foxp3 が高発現することを確認した。TRAM34 を投与した亜慢性 IBD モデルマウスでは, IL-17A および IL-10 の発現が有意に亢進していた。また, IL-10 の転写因子の一つとして知られている E4BP4 発現も有意に亢進していた。

3-1-4 まとめ

炎症慢性化や炎症からの緩解期におけるカリウムチャンネルの病態生理学的意義についてはほとんど検討されていない。急性 IBD モデルにおいては, K_{Ca}3.1 阻害剤投与による制御性 T 細胞における IL-10 や IL-17A の発現亢進は観察されなかった。したがって, 本研究で得られた知見により, 炎症慢性化におけるカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 の新しい役割を明らかにすることができた。IL-17A は Th17 細胞が産生するサイトカインであり, 一般的には炎症性サイトカインとして分類される。一方, IL-17 を発現する制御性 T 細胞が報告されており, IBD などの炎症疾患において炎症を抑制することも知られている^{6,7)}。本研究では, K_{Ca}3.1 阻害剤投与による IL-17A や IL-10 の亢進に関与するシグナル伝達機構をできなかったが, 今後の研究により, 制御性 T 細胞における新たな IL-17A および IL-10 の産生調節機構が明らかになる可能性がある。

3-2 ヒト Tリンパ腫由来 HuT-78 細胞におけるカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 活性化剤による IL-10 転写抑制とその調節機構の解明

3-2-1 HuT-78 細胞におけるカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 の機能発現

HuT-78 細胞における Th1 サイトカイン(インターフェロン- γ), Th2 サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13), および IL-10 の発現をリアルタイム PCR で解析したところ, IL-10 のみが高発現していた。また, ELISA アッセイの結果, HuT-78 細胞において有意な IL-10 産生が見られた。また, 膜電位感受性蛍光指示薬 DiBAC₄(3)を用いた蛍光イメージング解析では, K_{Ca}3.1 活性化剤 DCEBIO(1 μ M)または SKA-31(1 μ M)の処置により K_{Ca}3.1 活性化に伴う有意な過分極反応が観察され, K_{Ca}3.1 活性化剤による過分極反応は, K_{Ca}3.1 阻害剤 TRAM-34(1 μ M)の同時投与により観察されなくなった。カルシウム蛍光指示薬 Fura-2を用いた蛍光イメージング解析では, K_{Ca}3.1 活性化剤による中程度の

細胞内カルシウム濃度上昇が観察された。

3-2-2 HuT-78細胞におけるK_{Ca}3.1活性化剤6時間処置によるIL-10転写・産生抑制

HuT-78細胞をK_{Ca}3.1活性化剤DCEBIO(1 μM)およびSKA-31(1 μM)により6時間処置し、リアルタイムPCRにより定量発現解析したところ、IL-10転写が50%程度有意に抑制された。この時、薬剤処置6-24時間におけるIL-10産生量をELISAアッセイにて定量解析したところ、IL-10産生量が30%程度有意に抑制された。これらの現象は、K_{Ca}3.1活性化剤3時間処置では観察されなかった。また、K_{Ca}3.1活性化剤によるIL-10転写・産生抑制は、TRAM-34(1 μM)の同時投与により観察されなくなった。IL-10転写はSmadシグナルの活性化により促進されることが報告されている⁸⁾。HuT-78細胞におけるK_{Ca}3.1活性化剤によるリン酸化Smad2(P-Smad2)およびリン酸化Smad3(P-Smad3)への影響をそれぞれに特異的な抗体を用いてウェスタンブロット解析したところ、P-Smad2の相対的発現量が有意に減少した。この時P-Smad3については有意な変化は観察されなかった。そこで、P-Smad2およびP-Smad3の核移行に対するK_{Ca}3.1活性化剤の影響について共焦点レーザー顕微鏡を用いてイメージング解析し

た。細胞内および核内におけるAlexa Fluor 488の蛍光強度を定量解析したところ、P-Smad2の核内移行がK_{Ca}3.1活性化剤処置により有意に抑制された。P-Smad3の核移行については有意な変化は観察されなかった。

3-2-3 HuT-78細胞におけるK_{Ca}3.1活性化剤によるIL-10転写抑制へのカルモジュリンキナーゼII(CaMKII)の関与

Smadシグナル伝達機構(Smadのリン酸化を介した核内移行)の過程が、CaMKIIによるリン酸化により抑制されることが報告されている^{9,10)}。本研究において、HuT-78細胞をK_{Ca}3.1活性化剤で処置する1時間前にCaMKII阻害剤KN-62(10 μM)を前処置したところ、K_{Ca}3.1活性化剤によるIL-10転写および産生の抑制は観察されなかった。また、P-Smad2のタンパク発現量の減少や核移行の抑制も観察されなくなった。

3-2-4 まとめ

HuT-78細胞において、K_{Ca}3.1活性化剤によりCaMKIIが活性化されることによりP-Smad2の核内移行が抑制され、Smadシグナルを介したIL-10転写が抑制されることが明らかとなった。図1にまとめ図を示した。

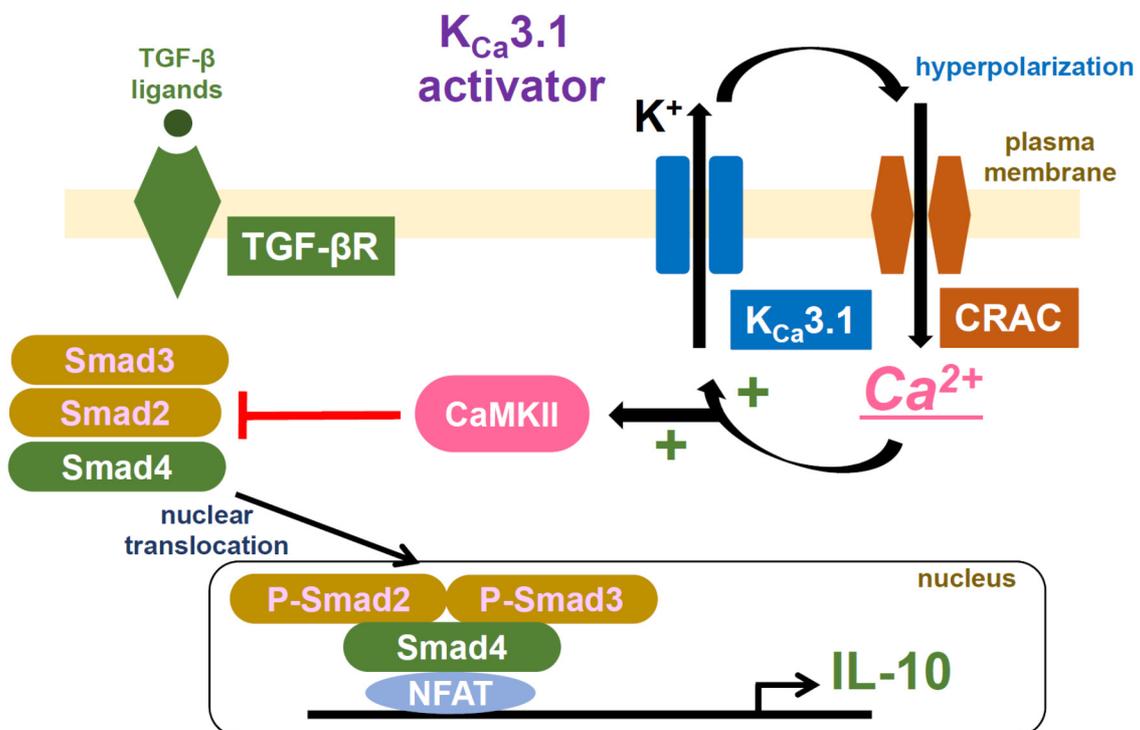


図1

3-3 炎症性腸疾患モデルマウスの脾臓由来 CD4⁺細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の発現亢進とHDACによるカルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 転写制御

3-3-1 炎症性腸疾患モデルマウスの脾臓由来 CD4⁺T細胞におけるHDACの発現亢進

IBDモデルにおいて、HDAC阻害剤が炎症性サイトカイン産生を抑制することにより病態を改善することから、HDAC阻害剤がIBD治療薬として期待されている¹¹⁻¹³⁾。我々は、IBDモデルマウスのCD4⁺T細胞において、K_{Ca}3.1発現が亢進すること²⁾、ヒト乳がん細胞においてK_{Ca}3.1転写がHDAC阻害剤 vorinostatにより抑制されることをこれまで明らかにしている¹⁴⁾。また、選択的HDAC阻害剤、siRNAを用いた実験により、K_{Ca}3.1転写制御にHDAC2とHDAC3が関与することを示した。

本研究において、IBDモデルの脾臓由来CD4⁺T細胞を単離してHDAC1-11の発現をリアルタイムPCRにより解析したところ、HDAC1、HDAC2、HDAC3発現が正常マウスと比較して有意に亢進していた。IBDモデルマウス脾臓から単離したCD4⁺T細胞をコンカナバリンA存在下で培養し、非選択的HDAC阻害剤 vorinostat (1 μM)で24時間処置したところ、有意なK_{Ca}3.1発現が観察され、それに伴いK_{Ca}3.1活性(K_{Ca}3.1阻害剤による脱分極反応)が減弱した。選択的HDAC阻害剤を用いて同様の実験を行った結果、ヒト乳がん細胞で得られた結果と同様に、HDAC2またはHDAC3を阻害することによりCD4⁺T細胞のK_{Ca}3.1発現が抑制された。

3-3-2 まとめ

本研究では、単離したCD4⁺T細胞を用いてHDAC阻害剤のK_{Ca}3.1転写・機能に対する効果を検討し、T細胞においてもK_{Ca}3.1発現にHDAC2およびHDAC3の両方が関与することを示した。しかし、コンカナバリンA刺激した細胞がIBD発症時の細胞と同等性を有している保証はない。HDAC阻害剤を*in vivo*投与したIBDモデルマウスから急性単離したCD4⁺T細胞を用いて同様の検討を行うことが今後の課題である。

4. 展望

自己免疫疾患、炎症性疾患、組織線維化において、カルシウム活性化カリウムチャンネル K_{Ca}3.1 阻害剤は、治療

薬として期待されており、その機序として炎症性サイトカイン産生の抑制が知られている。本研究では、炎症慢性化または炎症緩解時における抗炎症性サイトカイン IL-10 産生にK_{Ca}3.1が関与しており、その阻害により制御性T細胞のIL-10産生能が増大する可能性を示した。今後、慢性炎症モデルや慢性炎症疾患患者の病理組織を用いて、炎症慢性化とK_{Ca}3.1発現・活性との関係を明らかにするとともに、慢性炎症疾患におけるK_{Ca}3.1阻害剤の有効性を実証したい。また、本研究では、IL-10高産生Tリンパ腫細胞においてK_{Ca}3.1活性化剤がIL-10産生を抑制することを明らかにした。がん免疫逃避機構においてがん細胞またはがん微小環境に浸潤した制御性T細胞から産生されるIL-10はがん細胞増殖を促進する。K_{Ca}3.1活性化剤はIL-10産生を抑制することにより免疫監視機構の維持(逃避機構の抑制)に関与する可能性がある。したがって、がん細胞免疫監視機構におけるK_{Ca}3.1の役割や抗がん剤としてのK_{Ca}3.1活性化剤の有効性についても今後検討したい。

5. 引用文献

1. Ohya S, Nakamura E, Horiba S, Kito H, Matsui M, Yamamura H, Imaizumi Y. Role of the K_{Ca}3.1 K⁺ channel in auricular lymph node T-lymphocyte function of the delayed-type hypersensitivity model. *Br J Pharmacol.* 2013;169: 1011-1023.
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.* 2014;306: G873- G885.
3. Sha T, Igaki K, Yamasaki M, Watanabe T, Tsuchimori N. Establishment and validation of a new semi-chronic dextran sulfate sodium-induced model of colitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2013;15: 23-29.
4. 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.
5. 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.
 6. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zhang B, Littman DR, Liu YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106; 4793-4798.
 7. Jung MK, Kwak JE, Shin EC. IL-17A-producing Foxp3⁺ regulatory T cells and human diseases. *Immune Netw.* 2017;17; 276-286.
 8. Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. Transforming growth factor (TGF)- β -producing T cells induce Smad-mediated Interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. *J Exp Med.* 2003;198; 1179-1188.
 9. Ming M, Manzini I, Le W, Krieglstein K, Spittau B. Thapsigargin-induced Ca²⁺ increase inhibits TGF- β 1-mediated Smad2 transcriptional responses via Ca²⁺/calmodulin-independent protein kinase II. *J Cell Biochem.* 2010;111; 1222-1230.
 10. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM, Chantry A. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol.* 2000;20; 8103-8111.
 11. Felice C, Lewis A, Armuzzi A, Lindsay JO, Silver A. Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41; 26-38.
 12. Edwards AJ, Pender SL. Histone deacetylase inhibitors and their potential role in inflammatory bowel diseases. *Biochem Soc Trans.* 2011;39; 1092-1095.
 13. Ali MN, Choijookhuu N, takagi H, Srisowanna N, Nguyen Nhat Huynh M, Yamaguchi Y, Synn Oo P, Tin Htwe Kyaw M, Sato K, Yamaguchi R, Hishikawa Y. The HDAC inhibitor, SAHA, prevents colonic inflammatory cytokines and chemokines in DSS-induced colitis. *Acta Histochem Cytochem.* 2018;51; 33-40.
 14. Ohya S, Kanatsuka S, Hatano N, Kito H, Matsui A, Fujimoto M, Matsuba S, Niwa S, Zhan P, Suzuki T, 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.

Molecular Mechanism Underlying Enhancement of IL-10 Production by K⁺ Channel Inhibition in Regulatory T Cells

Susumu Ohya, Hiroaki Kito

Department of Pharmacology, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

Summary

The intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 is one of major K⁺ channels expressing in T cells. K_{Ca}3.1 activation-induced hyperpolarization increases Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels, and generally promotes cell proliferation, differentiation, and cytokine production. The present study showed that K_{Ca}3.1 activators significantly suppressed anti-inflammatory cytokine IL-10 transcription in human T-cell lymphoma HuT-78 cells. IL-10 transcription was significantly inhibited by treatment with K_{Ca}3.1 activators (DCEBIO and SKA-31), and IL-10 reduction was almost completely recovered by co-treatment with 1 μM TRAM-34, a selective K_{Ca}3.1 blocker. K_{Ca}3.1 activator-induced repression of IL-10 transcripts was disappeared by pre-treatment with the calmodulin kinase II (CaMKII) inhibitor, KN-62. Significant changes in the protein expression ratio, Phosphorylated Smad2 (P-Smad2)/total Smad2 by treatments with K_{Ca}3.1 activators were found in Western blotting. Concomitant with the results from Western blotting, nuclear translocation of P-Smad2 was significantly inhibited by K_{Ca}3.1 activators. These suggest that K_{Ca}3.1 activators may repress IL-10 transcription through activation of CaMKII and subsequent prevention of nuclear translocation of P-Smad2 in IL-10-producing T cells. The transcriptional factors of IL-10, E4BP4, Blimp-1, and cMAF did not change their transcriptional expression by treatment with K_{Ca}3.1 activators. Our results describe a mechanism for K_{Ca}3.1-induced negative regulation of IL-10 through Smad signaling pathway. Activation of K_{Ca}3.1 inhibited the translocation of phospho-Smad2. K_{Ca}3.1 activators are a possible therapeutic option to suppress tumor promoting activities of IL-10.