

肺高血圧症に關与する 2 ポアドメイン型カリウムチャネルの機能解析

山村 寿男, 鈴木 良明, 今泉 祐治

名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野

概要

【目的】肺高血圧症の中で最も典型的な臨床像を示すのが、臨床分類第 1 群の肺動脈性肺高血圧症 (PAH) である。PAH では、肺血管の過収縮 (攣縮) や肥厚 (リモデリング) が起こるため、内腔が狭小化する。その結果、肺血管抵抗が上昇し、肺動脈圧の持続的な上昇が起こる。最終的には、右室に負荷がかかり、右心不全に陥る難病である (指定難病 86)。PAH の 5 年生存率は、近年の選択的 PAH 治療薬の開発により、70% 程度にまで改善している。しかし、依然として、PAH の根治治療には至っていない。そのため、新たな作用メカニズムを有する選択的 PAH 治療薬の開発が期待されている。本研究では、肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) を膜電位により間接的に制御する K^+ チャネル、特に、2 ポアドメイン型 K^+ ($\text{K}_{2\text{P}}$) チャネルに注目し、発現機能解析を行った。

【方法】正常ヒトおよび特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 患者由来 PASMCs から樹立した細胞株を用いた。mRNA 発現解析にはリアルタイム PCR 法、タンパク質発現解析には免疫細胞染色法を用いた。また、ホールセルパッチクランプ法を用いて、 $\text{K}_{2\text{P}}$ チャネル電流を測定した。細胞増殖試験は、MTT アッセイ法を用いた。

【結果】mRNA 発現解析の結果、正常ヒト PASMCs (対照群) と比較して、IPAH 患者由来 PASMCs では、 KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャネルの発現量が顕著に増加していた。一方、 KCNK3 (TASK1) と KCNK6 (TWIK2) チャネルの発現量は減少していた。IPAH 患者由来 PASMCs における KCNK1 (TWIK1) チャネルのタンパク質発現量は、対照群より増加していた。正常ヒトおよび IPAH 患者由来 PASMCs において、電位非依存性の K^+ 電流が観察された。一部の IPAH 患者由来 PASMCs においては、+20 mV 以上の脱分極電位で外向き整流性や、-80 mV 以下の過分極電位で内向き整流性が認められた。MTT 増殖試験の結果、IPAH 患者由来 PASMCs の過剰な増殖が、 $\text{K}_{2\text{P}}$ チャネル阻害薬であるキニーネによって抑制された。

【考察】PASMCs などの血管平滑筋細胞の静止膜電位は、主に K^+ チャネル活性により形成される。膜電位は収縮や細胞増殖を調節する $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を規定するため、 K^+ チャネルは細胞内 Ca^{2+} シグナルを制御する重要な分子といえる。加えて、 K^+ チャネル活性は、PASMCs のアポトーシス機構にも関与することが知られている。本研究で注目した $\text{K}_{2\text{P}}$ チャネルファミリー ($\text{KCNK1} \sim 18$, ただし KCNK8 , 11 , 14 は除く) は、近年になって同定された新しい分子群である。 $\text{K}_{2\text{P}}$ チャネルの生理機能としては、主に静止膜電位の形成があげられる。また、pH, 温度, 脂質, 機械刺激, 吸入麻酔薬などに感受性を示す。さらに、うつ病, 心不全, 不整脈, 高血圧, 疼痛, 悪性腫瘍, 免疫疾患などに関与することも明らかになっている。本研究での発現解析の結果、IPAH 患者由来 PASMCs では、 KCNK3 (TASK1) と KCNK6 (TWIK2) チャネルが、それぞれ 26% と 31% まで発現低下していた。しかしながら、これらのチャネルは既に PAH に関連する遺伝子として同定されており、加えて IPAH で発現低下することから、創薬標的としては不向きである。一方、 KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャネルは、IPAH 患者由来 PASMCs での発現が、それぞれ 35 倍と 2 倍に増加していた。そのため、イオンチャネル創薬の標的候補分子として適している。ホールセルパッチクランプ法を用いた機能解析においても、IPAH 患者由来 PASMCs で認められた電流の一部に $\text{K}_{2\text{P}}$ チャネルに特徴的な外向きまたは内向き整流性を示す成分が認められた。この電流成分の一部

に KCNK1 (TWIK1) または KCNK2 (TREK1) チャネルが寄与していることが推測された。本研究の中で最も重要な成果は、IPAH 患者由来 PSMCs の過剰な増殖に対して、 K_{2P} チャネル阻害薬が抑制効果を示したことである。この結果は、 K_{2P} チャネルが PSMCs の過剰な増殖による PAH リモデリングに関与すること、さらに、 K_{2P} チャネル阻害薬が PAH 治療薬の標的分子になり得ることを示唆するものである。

【結論】PAH の発症や病態機構に関与する分子が複数報告されているが、全容解明には至っていない。長年、PAH には適切な治療薬が存在せず、薬物療法や患者の QOL 改善が不十分であった。近年、肺血管拡張作用を期待した選択的 PAH 治療薬が導入されたが、依然として十分な薬物治療が確立されたとは言い難い。本研究では、IPAH 患者由来 PSMCs において、 K_{2P} チャネルファミリーに属する KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャネルが発現増加していることを見出した。本研究成果は、PAH 病態機構の解明および標的創薬 (イオンチャネル創薬) につながることを期待される。

1. 研究目的

肺高血圧症とは、様々な要因により慢性的に肺動脈圧が上昇する病態である。肺高血圧症治療ガイドライン (2017 年改訂版) では、安静時の平均肺動脈圧が 25 mmHg 以上の場合を肺高血圧症と定義している⁽¹⁾。肺高血圧症は、その発症原因により 5 群に分類される。肺高血圧症臨床分類の第 1 群「肺動脈性肺高血圧症 (PAH)」は、肺血管の障害によって形成される。第 2 群「左心性心疾患に伴う肺高血圧症」は、左室の収縮・拡張不全や弁膜症などで起こる。第 3 群「肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症」は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、間質性肺疾患、睡眠呼吸障害、高所における慢性低酸素暴露などに合併する。第 4 群「慢性血栓性肺高血圧症 (CTEPH)」は、器質化血栓によって肺動脈が慢性的に閉塞する。第 5 群は「詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症」である。

肺高血圧症の中で最も典型的な臨床像を示すのが、第 1 群の PAH である。PAH では、肺血管の過収縮 (攣縮) や肥厚 (リモデリング) が起こるため、内腔が狭小化する。その結果、肺血管抵抗が上昇し、肺動脈圧の持続的な上昇が起こる。最終的には、右室に負荷がかかり、右心不全に陥る。本邦では、難病に指定されている (指定難病 86)。PAH の約半数を占める特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) は、家族歴や特定の危険因子を伴わない原因不明の疾患である⁽¹⁾。一方、遺伝性肺動脈性肺高血圧症 (HPAH) は、BMPR2 (骨形成タンパク質受容体 2 型)、ALK1 (アクチビン受容体様キナーゼ 1 型)、ENG (エンドグリン)、SMAD9、CAV1 (カベオリン 1 型)、KCNK3 (TASK1 チャネル) などの遺伝子変異によって発症する。

その他、食欲抑制薬 (アミレックス、フェンフルラミン誘導体) などの薬剤によっても PAH が誘発される。結合組織病、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症、門脈圧亢進症、先天性心疾患、住血吸虫症における PAH の合併率は高い。

PAH の 5 年生存率は、近年の選択的 PAH 治療薬の開発により、70% 程度にまで改善している。現在、プロスタサイクリン (PGI_2)、エンドセリン、一酸化窒素 (NO) 経路に作用する 3 系統の薬剤が、PAH 治療薬として承認されている⁽¹⁾。ただし、多くの PAH 症例では、単剤投与で十分な治療効果が得られないため、作用機構の異なる 2 剤さらには 3 剤を用いた併用療法が広く行われている。しかし、依然として、PAH の根治治療には至っておらず、また既存薬に抵抗性を示す症例も多い。そのため、新たな作用メカニズムを有する選択的 PAH 治療薬の開発が期待されている。

肺血管の中膜を構成する肺動脈平滑筋細胞 (PSMCs) において、筋収縮・弛緩、細胞増殖・分化・死などの細胞機能を制御する最も重要なシグナルは、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) 変化である⁽²⁾。 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇は、細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離によって起こる。主な Ca^{2+} 流入経路は、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC)、受容体作動性 Ca^{2+} (ROC) チャネル、ストア作動性 Ca^{2+} (SOC) チャネルである (Fig. 1)。VDCC は、脱分極によって開口し、細胞内へ Ca^{2+} を流入させる。ROC チャネルは、エンドセリンやセロトニン、血小板由来成長因子 (PDGF) や上皮成長因子 (EGF) などの受容体シグナルの下流で Ca^{2+} 流入経路として機能する。SOC チャネルは、筋小胞体 (SR) 内の Ca^{2+} 枯渇によって活性化され、細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進する。また、 K^+ チャネルや Cl^- チ

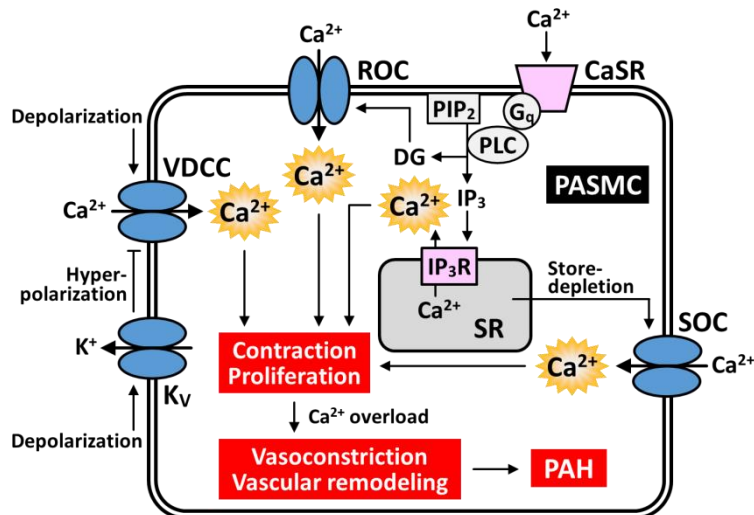


Fig. 1. Ca^{2+} signaling in PAH.

In PSMCs, VDCCs activate by membrane depolarization and induce Ca^{2+} influx. Activation of K_V channels by depolarization causes hyperpolarization and thereby reduces Ca^{2+} influx through VDCCs. Stimulation of G_q protein-coupled receptors including CaSR activates phospholipase C (PLC) and produces from phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) to diacylglycerol (DG) plus inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3). DG activates ROC channels consisted of TRPC6 and promotes Ca^{2+} influx. IP_3 binds to IP_3R receptor (IP_3R) on the SR and facilitates Ca^{2+} release. Ca^{2+} depletion in the SR evokes the activity of SOC channels consisted of Orai/STIM complex and/or TRPC6 channels and facilitates Ca^{2+} influx. An increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ triggers contraction and proliferation of PSMCs. Enhanced Ca^{2+} signaling by the upregulation of Ca^{2+} channels causes vasoconstriction and vascular

チャンネルも膜電位を介して、間接的に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を調節する。生理的範囲内での $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇は、PSMCsの収縮や増殖に働く。しかし、 Ca^{2+} チャンネルの発現機能亢進による過度の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加は、PSMCsの過収縮や過剰な増殖を惹起する。その結果、PAHの原因である肺血管攣縮やリモデリングにつながる。これまでに、PAHの病態形成に関与する様々な Ca^{2+} チャンネルが同定されている^(3, 4)。我々も、PAHの病態形成に関連する Ca^{2+} 関連イオンチャンネル・受容体として、transient receptor potential canonical チャンネル (TRPC6)⁽⁵⁻⁷⁾、transient receptor potential vanilloid チャンネル (TRPV1, TRPV4)^(8, 9)、transient receptor potential melastatin チャンネル (TRPM7)⁽⁸⁾、Orai/STIM チャンネル (Orai1, Orai2, STIM2)⁽⁵⁾、 Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR)^(10, 11)などの発現機能変化を明らかにした。

本研究では、PSMCsの $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を膜電位により間接的に調節する K^+ チャンネルに注目した。特に、HPAHの原因遺伝子であるKCNK3 (TASK1)が、2ポドメイン型 K^+ (K_{2P})チャンネル (Fig. 2)のため、IPAHにおいても、 K_{2P} チャ

ネルが発現機能変化し、PAHの病態機構に関与しているという仮説を検証した。

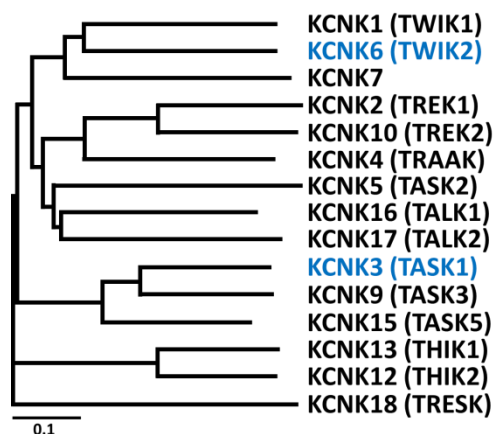


Fig. 2. K_{2P} channel family.

K_{2P} channel family consists of 6 subfamily and contains 15 genes (KCNK1-18 except for KCNK8, 11, and 14). KCNK3 and KCNK6 have reported to be associated with PAH.

2. 研究方法

2.1 細胞培養法

正常ヒト PSMCs の細胞株は Lonza から購入した。IPAH 患者由来 PSMCs から樹立した細胞株も用いた^(10, 12)。PSMCs は、10% ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO/Invitrogen), 50 µg/ml D-バリン (Sigma-Aldrich), 20 µg/ml 血管内皮細胞増殖サプリメント (ECGS, BD Biosciences), 100 U/ml ペニシリン G (Wako Pure Chemical Industries), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma) を添加した Medium199 培地 (Sigma-Aldrich) を用いて、37°C で培養した。

2.2 リアルタイム PCR 法

PSMCs から総 RNA を抽出し、逆転写酵素反応を経

て、cDNA を合成した。LightCycler 96 リアルタイム PCR システム (Roche Diagnostics) を用いて、mRNA 発現を解析した。ヒト K_{2P} チャネルのプライマー配列は、Table 1 に示した。

2.3 免疫細胞染色法

PSMCs を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で 10 分間、室温で固定した後、KCNK1 (TWIK1) 抗体 (100 倍希釈, APC-110, Alomone Labs), または、KCNK2 (TREK1) 抗体 (100 倍希釈, APC-047, Alomone Labs) で 12 時間、4°C で処理した。その後、Alexa Fluor 488 融合二次抗体 (1000 倍希釈, A-11008, Molecular Probes/Invitrogen) で 1 時間、室温で処理した。蛍光染色画像は、A1R 共焦点蛍光顕微鏡システム (Nikon) で取得し、解析した。

Table 1. Specific primers of human K_{2P} channel genes for real-time PCR analysis.

Gene	GenBank Accession number		Sequence	Product size (bp)
KCNK1 (TWIK1)	NM_002245	(+)	GAA CTG GGA CTT CAC CTC CG	110
		(-)	AGA TGA TGC AGA AGG CCT TAC	
KCNK2 (TREK1)	NM_001017424	(+)	AAC ATC TCA CCA CGC ACA GAA	140
		(-)	TCC ACT TTG GCA ATT CCT TTT C	
KCNK3 (TASK1)	NM_002246	(+)	ATC ACC GTC ATC ACC ACC ATC	74
		(-)	AAC ATG CAG AAC ACC TTG CC	
KCNK4 (TRAAK)	NM_033310	(+)	TGG CAT CGG TCA CAT TGA AG	120
		(-)	GTG GGC GTG AGG ACA AAG AG	
KCNK5 (TASK2)	NM_003740	(+)	CCA TCA CAG GGA ACC AGA CC	150
		(-)	CCC CGA AGA GAC CAT AGA AAA	
KCNK6 (TWIK2)	NM_004823	(+)	CCC TCT ACA AGG TGC TGG TC	147
		(-)	CAT TGA AAC TGG CAG GGC AC	
KCNK7	NM_033347	(+)	TTC CCT CAG CCC TGC TCT TC	141
		(-)	TGG CCA CGA GAG CTA AGG AG	
KCNK9 (TASK3)	NM_001282534	(+)	TGC TGA AGA GAG GGC ATC C	131
		(-)	AGG TGC AGG AGC ACA CAG AC	
KCNK10 (TREK2)	NM_021161	(+)	TTG TTG GCC TTG CCT ACT TTG	140
		(-)	GAA CTC AGC CGT GAC ATT GG	
KCNK12 (THIK2)	NM_022055	(+)	TCG TCA CCT TCA GCA CCA TC	131
		(-)	GAG CGA GTA AAT GCA GCA CAC	
KCNK13 (THIK1)	NM_022054	(+)	ACT TCA CCG GCG CCT TCT AC	127
		(-)	GTG CTG GAA CAC CCA ACA AG	
KCNK15 (TASK5)	NM_022358	(+)	CCT TCC TCA ACC TGG TGG TC	171
		(-)	GCA CGT GGC AGA AGA CAG AG	
KCNK16 (TALK1)	NM_001135105	(+)	AGG GAC CAG TTT CAG TTG GAG	145
		(-)	TGC TGG GGT TGG TAG AGT TG	
KCNK17 (TALK2)	NM_031460	(+)	CGA CAA GTG GGA GCT GTT G	120
		(-)	CTG GTG GTG TTG CTG AGG AG	
KCNK18 (TRESK)	NM_181840	(+)	TTT TCT GCT GCA CGG TGT TC	139
		(-)	ATG TCG CCT GTG TCC GTG AG	
ACTB (β-actin)	NM_001101	(+)	AGG CCA ACC GCG AGA AGA TG	101
		(-)	GCC AGA GGC GTA CAG GGA TA	

2. 4 ホールセルパッチクランプ法

単一 PASMCS にホールセルパッチクランプ法を適用し、 K_{2P} チャネル電流を測定した。細胞外液として用いた HEPES 緩衝溶液の組成は、137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 14 mM glucose, 10 mM HEPES, 10 mM tetraethylammonium (TEA)-Cl (pH 7.4)。細胞内液の組成は、140 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 2 mM $ATPNa_2$, 10 mM HEPES, 0.05 mM EGTA (pH 7.2)。

2. 5 MTT アッセイ法

PASMCS (5×10^3 cells/well) を 96 穴プレートに播種し、 $37^\circ C$ で 6 時間培養した後、薬物存在下で 48 時間培養した。細胞生存率の測定には、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 法を基礎とした Cell Counting Kit-8 (Dojin) を用いた。吸光度 (450 nm) は、Multiskan JX (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

2. 6 統計解析

実験結果は、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表した。2 群間の有意差検定には、Student の t 検定を用いた。

3. 研究結果

3. 1 IPAH 患者由来 PASMCS における K_{2P} チャネルの発現変動

正常ヒト (対照群, normal) および IPAH 患者由来 PASMCS において、 K_{2P} チャネルファミリー (KCNK1 ~ 18, ただし KCNK8, 11, 14 は除く) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。正常ヒト PASMCS において、KCNK2 (TREK1), KCNK3 (TASK1), KCNK6 (TWIK2) チャネルの発現が認められた (Fig. 3A)。IPAH 患者由来 PASMCS では、KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャネルの発現量が、対照群と比較して顕著に増加していた (Fig. 3B)。一方、KCNK3 (TASK1) と KCNK6 (TWIK2) チャネルの発現量は、対照群よりも減少していた。

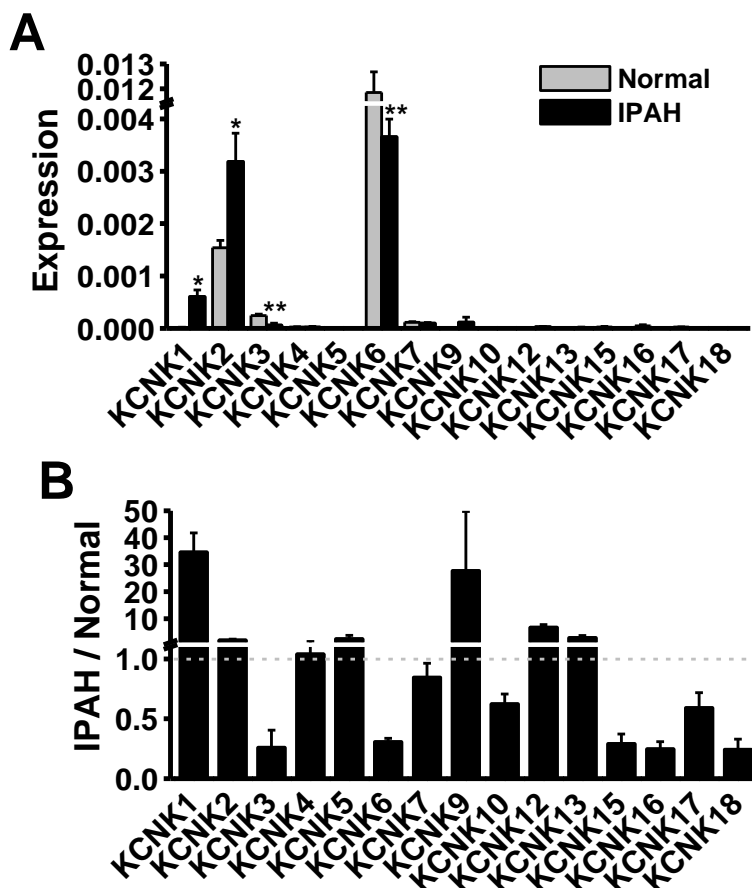


Fig. 3. Expression profiles of KCNK (K_{2P} channel) genes in PSMCs from normal subjects and IPAH patients.

Expressions of KCNK (K_{2P} channel) genes (KCNK1-18 except for KCNK8, 11, and 14) in normal- and IPAH-PSMCs was examined by quantitative real-time PCR. **A.** Expressions of KCNK genes in normal- and IPAH-PSMCs ($n=4$). The mRNA expression of KCNK was normalized by that of β -actin (ACTB). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. normal-PSMCs. **B.** Comparative analysis of KCNK expressions between normal- and IPAH-PSMCs ($n=4$). Note that the expressions of KCNK1 (TWIK1) and KCNK2 (TREK1) were upregulated, whereas those of KCNK3 (TASK1) and KCNK6 (TWIK2) were downregulated in IPAH-PSMCs compared to normal-PSMCs.

3. 2 IPAH 患者由来 PSMCs における KCNK1 (TWIK1) および KCNK2 (TREK1) チャンネルの発現解析

正常ヒト (対照群, normal) および IPAH 患者由来 PSMCs において, KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャンネルのタンパク質発現を免疫細胞染色法で比較解析した。IPAH 患者由来 PSMCs における KCNK1 (TWIK1) チャンネルのタンパク質発現量は, 対照群より増加していた (**Fig. 4A**)。一方, KCNK2 (TREK1) チャンネルの発現変化は, 本実験条件下では認められなかった (**Fig. 4B**)。

3. 3 正常ヒトおよび IPAH 患者由来 PSMCs における K_{2P} チャンネル電流解析

正常ヒト (対照群, normal) および IPAH 患者由来 PSMCs にホールセルパッチクランプ法を適用し, 電位

固定下で K_{2P} チャンネル電流を記録した。電位依存性 K^+ (K_V) チャンネルや大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャンネルを抑制するため, 灌流溶液に 10 mM TEA を添加した。また, 細胞内液には 0.05 mM EGTA を添加し, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を低く維持した。脱分極刺激は, 保持電位 -80 mV から -100 ~ +100 mV のランプ波を 120 ミリ秒間, 5 秒毎に行った。正常ヒト PSMCs においては, 電位非依存性の電流が観察された (**Fig. 5A**)。その電流の逆転電位は, K^+ の平衡電位である -80 mV 付近だった。一方, IPAH 患者由来 PSMCs においても対照群と同様の電流が観察されたが, 一部, +20 mV 以上の脱分極電位で外向き整流性や -80 mV 以下の過分極電位で内向き整流性が認められた (**Fig. 5B**)。それらの電流の逆転電位も, -80 mV 付近だった。

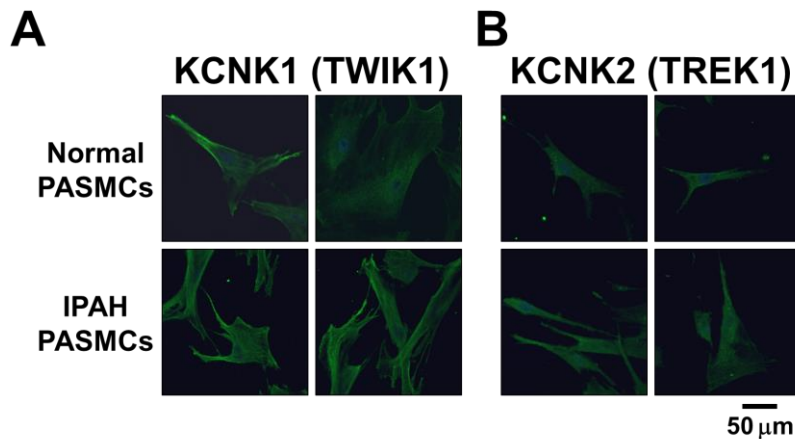


Fig. 4. Upregulation of KCNK1 (TWIK1) protein expression in PSMCs from IPAH patients.

Expressions of KCNK1 (TWIK1) and KCNK2 (TREK1) channel proteins in normal- and IPAH-PSMCs were examined by immunocytochemical staining. **A.** Representative immunocytochemical images of KCNK1 (TWIK1) protein in normal- and IPAH-PSMCs. Similar results were obtained from 11 independent experiments. **B.** Representative immunocytochemical images of KCNK2 (TREK1) protein in normal- and IPAH-PSMCs. Similar results were obtained from 13 independent experiments.

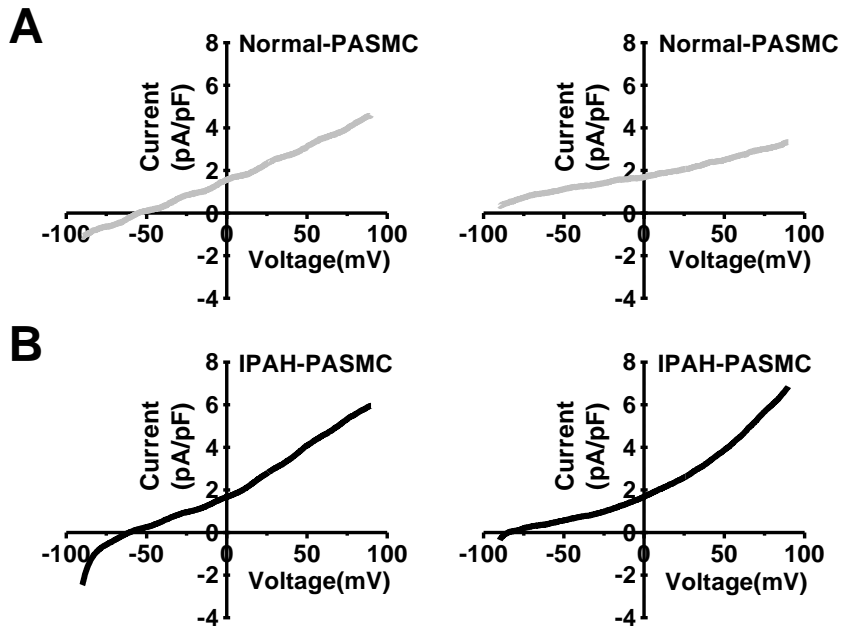


Fig. 5. K_{2P} channel currents in PASMCS from normal subjects and IPAH patients. K_{2P} currents were recorded in normal- and IPAH-PASMCS under the whole-cell voltage-clamp configuration. K_V and BK_{Ca} currents were abolished by 10 mM TEA in the extracellular solution. Single cells were depolarized from the holding potential of -80 mV to test potentials (-100~+100 mV) using a ramp pulse for 120 ms every 5 s. **A.** Representative traces of K_{2P} currents in normal-PASMCS. **B.** Representative traces of K_{2P} currents in IPAH-PASMCS.

3. 4 IPAH 患者由来 PASMCS の過剰増殖における K_{2P} チャンネル阻害薬の効果

IPAH 患者由来 PASMCS で観察される過剰な増殖に対する K_{2P} チャンネル阻害薬の効果をも MTT 法で測定した。

IPAH 患者由来 PASMCS は、48 時間の培養によって、1.5 倍程度にまで増殖した (**Fig. 6**)。次に、 K_{2P} チャンネル阻害薬である 300 μ M キニーネ存在下で同様に 48 時間培養した結果、その過剰な細胞増殖は抑制された。

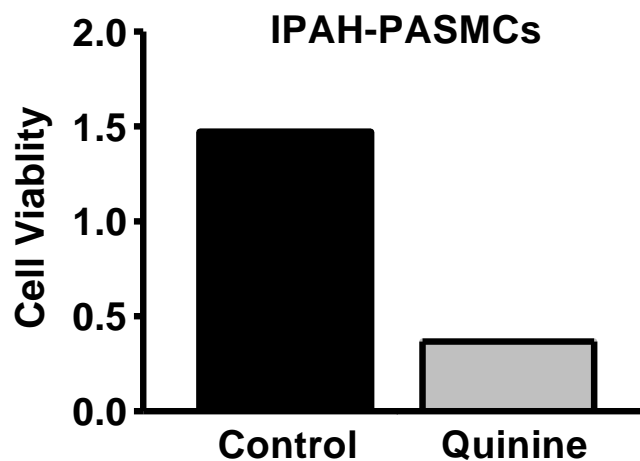


Fig. 6. Inhibitory effects of K_{2P} channel blocker on the proliferation of PASMCS from IPAH patients. Effects of a K_{2P} channel blocker, 300 μ M quinine, for 48 h on excessive proliferation of IPAH-PASMCS were examined by MTT assay. Data were normalized by 0 h.

4. 考 察

PASMCs などの血管平滑筋細胞の静止膜電位は、主に K^+ チャネル活性により形成される。膜電位は収縮や細胞増殖を調節する $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を規定するため、 K^+ チャネルは細胞内 Ca^{2+} シグナルを制御する重要な分子といえる。加えて、 K^+ チャネル活性は、PASMCs のアポトーシス機構にも関与することが知られている⁽²⁾。

K_{2P} チャネルファミリー(KCNK1 ~ 18, ただし KCNK8, 11, 14 は除く)は、近年になって同定された新しい分子群である。 K_{2P} チャネルは、構造類似性より 6 つのサブファミリー(TWIK, TREK, TALK, TASK, THIK, TRESK)に分類され、15 種類のサブタイプが存在する⁽¹³⁾(Fig. 2)。 K_{2P} チャネルの生理機能としては、主に静止膜電位の形成があげられる。また、pH, 温度, 脂質, 機械刺激, 吸入麻酔薬などに感受性を示す。さらに、うつ病, 心不全, 不整脈, 高血圧, 疼痛, 悪性腫瘍, 免疫疾患などに関与することも明らかになっている⁽¹⁴⁾。現在までに、PAH には KCNK3(TASK1)と KCNK6(TWIK2)チャネルの遺伝子変異が同定されている^(1, 14)。遺伝子変異は遺伝子診断には適しているが、治療薬開発の標的としては不向きである。本研究での mRNA 発現解析の結果、IPAH 患者由来 PASMCs では、KCNK3(TASK1)と KCNK6(TWIK2)チャネルが、それぞれ 26%と 31%まで発現低下していた。しかしながら、これらのチャネルは既に PAH に関連する遺伝子として同定されており、加えて IPAH で発現低下することから、創薬標的としての魅力は低い。一方、KCNK1(TWIK1)と KCNK2(TREK1)チャネルは、IPAH 患者由来 PASMCs での発現が、それぞれ 35 倍と 2 倍に増加していた。そのため、本研究におけるイオンチャネル創薬の標的候補分子として、KCNK1(TWIK1)と KCNK2(TREK1)チャネルに注目した。

免疫細胞染色解析の結果、IPAH 患者由来 PASMCs において、KCNK1(TWIK1)チャネルの発現増加は認められたが、KCNK2(TREK1)チャネルの発現変動は認められなかった。KCNK1(TWIK1)チャネルは、mRNA レベルで 35 倍の発現増加だったため、免疫細胞染色法でも容易に発現増加が検出されたと考えられる。一方、KCNK2(TREK1)チャネルは、mRNA レベルで 2 倍程度の発現増加であったため、免疫細胞染色法では発現変動を検出するのが困難だったと推測される。今後は、ウエ

スタンブロット法を用いて、タンパク質レベルでも定量的に発現解析を進める必要がある。

次に、 K_{2P} チャネル活性を解析するため、ホールセルパッチクランプ法を用いて、 K_{2P} チャネル電流を測定した。PASMCs に発現する K_V や BK_{Ca} チャネルを 10 mM TEA で遮断した条件下、正常ヒトおよび IPAH 患者由来 PASMCs において、電位非依存性の電流が観察された。これらの電流の逆転電位が -80 mV 付近であることから、 K^+ 電流と推測される。ただし、IPAH 患者由来 PASMCs で認められた電流の一部において、+20 mV 以上の脱分極電位で外向き整流性を示す成分や、-80 mV 以下の過分極電位で内向き整流性を示す成分が認められた。まだ少数例のため統計学的検討が必要ではあるが、+50 mV における電流量は、対照群に比べて、IPAH 患者由来 PASMCs で増加する傾向だった。これらの結果は、外向き整流性または内向き整流性成分の一部に KCNK1(TWIK1)または KCNK2(TREK1)チャネルが寄与していることを示唆するものである。

最後に、PAH の病態形成における K_{2P} チャネルの病態生理学的な重要性を検討するため、IPAH 患者由来 PASMCs の過剰な増殖に対する K_{2P} チャネル阻害薬の効果を検討した。その結果、 K_{2P} チャネル阻害薬によって、IPAH 患者由来 PASMCs の過剰な増殖は顕著に抑制された。以上の結果は、 K_{2P} チャネルが PASMCs の過剰な増殖による PAH リモデリングに関与すること、さらに、 K_{2P} チャネル阻害薬が PAH 治療薬の標的分子になり得ることを示唆するものである。

5. 今後の課題

PAH の発症や病態機構に関与する分子が複数報告されているが、全容解明には至っていない。長年、PAH には適切な治療薬が存在せず、薬物療法や患者の QOL 改善が不十分であった。近年、肺血管拡張作用を期待した選択的 PAH 治療薬が導入されたが、依然として十分な薬物治療が確立されたとは言い難い。そのため、新規作用機序を有する PAH 治療薬の開発が切望されている。これまでに PAH の病態形成に関与する K^+ チャネルとして、 K_V チャネル($K_V1.5$, $K_V2.1$)が報告されている^(3, 4)。ごく最近、我々は、 BK_{Ca} ($K_{Ca}1.1$)チャネルが IPAH 患者由来 PASMCs で発現低下していることを見出した⁽¹⁵⁾。さらに本

研究では、IPAH 患者由来 PSMCs において、K_{2P} チャンネルファミリーに属する KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャンネルが発現増加していることを見出した。残念ながら、これらのイオンチャンネルに選択的かつ特異的な阻害薬は殆ど存在しない⁽¹⁴⁾。今後は、siRNA 法などを用いて、IPAH 患者由来 PSMCs で発現・機能する KCNK1 (TWIK1) と KCNK2 (TREK1) チャンネルの重要性をさらに検討する予定である。本研究成果は、PAH 病態機構の解明および標的創薬(イオンチャンネル創薬)につながる事が期待される。

6. 文 献

- 1) Fukuda K, Date H, Doi S, Fukumoto Y, Fukushima N, Hatano M, Ito H, Kuwana M, Matsubara H, Momomura SI, Nishimura M, Ogino H, Satoh T, Shimokawa H, Yamauchi-Takahara K, Tatsumi K, Ishibashi-Ueda H, Yamada N, Yoshida S, Abe K, Ogawa A, Ogo T, Kasai T, Kataoka M, Kawakami T, Kogaki S, Nakamura M, Nakayama T, Nishizaki M, Sugimura K, Tanabe N, Tsujino I, Yao A, Akasaka T, Ando M, Kimura T, Kuriyama T, Nakanishi N, Nakanishi T, Tsutsui H; Japanese Circulation Society and the Japanese Pulmonary Circulation and Pulmonary Hypertension Society Joint Working Group. Guidelines for the treatment of pulmonary hypertension (JCS 2017/JPCPHS 2017). *Circ J*, 83(4):842-945 (2019).
- 2) Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 54(Suppl 1):S20-S31 (2009).
- 3) Olschewski A, Papp R, Nagaraj C, Olschewski H. Ion channels and transporters as therapeutic targets in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther*, 144(3):349-368 (2014).
- 4) 山村彩. 肺高血圧症で発現変動するイオンチャンネル. *日薬理誌*, 148(5):226-230 (2016).
- 5) Smith KA, Voirit G, Tang H, Fraidenburg DR, Song S, Yamamura H, Yamamura A, Guo Q, Wan J, Pohl NM, Tauseef M, Bodmer R, Ocorr K, Thistlethwaite PA, Haddad GG, Powell FL, Makino A, Mehta D, Yuan JX. Notch activation of Ca²⁺ signaling in the development of hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 53(3):355-367 (2015).
- 6) Tang H, Yamamura A, Yamamura H, Song S, Fraidenburg DR, Chen J, Gu Y, Pohl NM, Zhou T, Jiménez-Pérez L, Ayon RJ, Desai AA, Goltzman D, Rischard F, Khalpey Z, Black SM, Garcia JG, Makino A, Yuan JX. Pathogenic role of calcium-sensing receptors in the development and progression of pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 310(9):L846-L859 (2016).
- 7) 山村寿男, 鈴木良明, 山村彩. 肺動脈性肺高血圧症における TRPC6 チャンネルの病態生理学的役割. *日薬理誌*, in press.
- 8) Song S, Yamamura A, Yamamura H, Ayon RJ, Smith KA, Tang H, Makino A, Yuan JX. Flow shear stress enhances intracellular Ca²⁺ signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(4):C373-C383 (2014).
- 9) Song S, Ayon RJ, Yamamura A, Yamamura H, Dash S, Babicheva A, Tang H, Sun X, Cordery AG, Khalpey Z, Black SM, Desai AA, Rischard F, McDermott KM, Garcia JG, Makino A, Yuan JX. Capsaicin-induced Ca²⁺ signaling is enhanced via upregulated TRPV1 channels in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic PAH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 312(3):L309-L325 (2017).
- 10) Yamamura A, Guo Q, Yamamura H, Zimnicka AM, Pohl NM, Smith KA, Fernandez RA, Zeifman A, Makino A, Dong H, Yuan JX. Enhanced Ca²⁺-sensing receptor function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*, 111(4):469-481 (2012).

- 11) Yamamura A, Yamamura H, Guo Q, Zimnicka AM, Wan J, Ko EA, Smith KA, Pohl NM, Song S, Zeifman A, Makino A, Yuan JX. Dihydropyridine Ca²⁺ channel blockers increase cytosolic [Ca²⁺] by activating Ca²⁺-sensing receptors in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res*, 112(4):640-650 (2013).
- 12) Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(38):13861-13866 (2004).
- 13) Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90(2):559-605 (2010).
- 14) Feliciangeli S, Chatelain FC, Bichet D, Lesage F. The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol*, 593(12):2587-2603 (2015).
- 15) Babicheva A, Ayon RJ, Zhao T, Ek Vitorin JF, Pohl NM, Yamamura A, Yamamura H, Quinton BA, Ba M, Wu L, Ravellette KS, Rahimi S, Balistrieri F, Harrington A, Vanderpool RR, Thistlethwaite PA, Makino A, Yuan JX. MicroRNA-mediated downregulation of K⁺ channels in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 318(1):L10-L26 (2020).

Functional Expression of Two-Pore Domain K⁺ Channels in Pulmonary Hypertension

Hisao Yamamura, Yoshiaki Suzuki, Yuji Imaizumi

Department of Molecular and Cellular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and fatal disease of the pulmonary artery. The major pathogenesis is sustained vasoconstriction and vascular remodeling of the pulmonary artery. These cause progressive elevations in pulmonary vascular resistance and pulmonary arterial pressure. Elevated pulmonary arterial pressure leads to right heart failure and finally death. The vascular remodeling is caused by the enhanced proliferation and reduced apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). The excessive PASMC proliferation is triggered by increase in cytosolic Ca²⁺ concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$). $[Ca^{2+}]_{cyt}$ is predominantly determined by the balance of the activity of ion channels. In the present study, the functional expression of two-pore domain K⁺ (K_{2p}) channels (KCNK family; KCNK1-18 except for KCNK8, 11, and 14) was examined in PASMCs from normal subjects and patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH). Expression analyses revealed that, in PASMCs from IPAH patients, the expressions of KCNK1 (TWIK1) and KCNK2 (TREK1) channels were upregulated, whereas those of KCNK3 (TASK1) and KCNK6 (TWIK2) channels were downregulated. K_{2p} channel currents with inward and outward rectifications were detected in PASMCs from IPAH patients. The excessive proliferation of PASMCs from IPAH patients was inhibited by a K_{2p} channel blocker, quinine. In conclusion, these results suggest that upregulated KCNK1 (TWIK1) and KCNK2 (TREK1) channels facilitate the proliferation of PASMCs, leading to the development of PAH. Therefore, KCNK1 (TWIK1) and KCNK2 (TREK1) channels may be novel therapeutic targets for PAH.