

がん免疫抑制細胞におけるがん微小環境に応じたカリウムチャネルの機能・発現調節の意義解明

大矢 進

名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学分野

概要

【研究目的】 がん微小環境 (Tumor microenvironment: TME) では、がん関連マクロファージ (Tumor-Associated Macrophage: TAM), 骨髄性抑制細胞, 制御性 T 細胞などの免疫抑制細胞群が腫瘍内に浸潤してがん免疫監視機構を抑制する。がん悪性化には、がん浸潤性免疫抑制細胞群の浸潤・集積が関与しており、臨床的には、がん浸潤性免疫抑制細胞群の浸潤・集積密度が高い症例ほどがん悪性度が高く、予後が不良である。したがって、がん悪性化の原因となる TME ネットワークを形成する非がん細胞の特性や相互作用を解明することが重要である。現在、TME に高密度に集積して免疫監視機構を抑制するがん促進系のがん免疫抑制細胞群が、がん創薬戦略のターゲットとして期待されている。

本研究の目的は、免疫抑制細胞における K^+ チャネル作用薬のがん免疫賦活薬の標的としての潜在性を明らかにすることである。

【研究方法】 ヒト急性単球白血病細胞株 THP-1 を分化調整薬 PMA で 24 時間刺激して M_0 マクロファージに分化させた後、IL-4/IL-13 添加培地で 72 時間培養することにより TAM 様 M_2 マクロファージに分化させた。遺伝子発現は real-time PCR, タンパク発現はウェスタンブロッティング, サイトカイン発現は ELISA 法により解析した。

【結果】 THP-1 由来 M_2 マクロファージにおいて、 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル $K_{Ca3.1}$ 活性化薬 SKA-121 の腫瘍化促進性サイトカインの発現への影響を検討したところ、SKA-121 により IL-8 と IL-10 の転写が有意に低下した。また、TME の細胞外 K^+ レベルを模倣した *in vitro* 実験条件下において、IL-8 と IL-10 の転写および産生はともに有意に上昇し、転写活性化は SKA-121 処置により抑制された。さらに、IL-8 と IL-10 の転写活性は、ERK 阻害剤や JNK 阻害剤の処理により有意に抑制され、SKA-121 は、ERK や JNK のリン酸化を有意に減少させた。

【考察】 $K_{Ca3.1}$ 活性化薬は、ERK-CREB および JNK-c-Jun カスケードを介して IL-8 および IL-10 の転写および産生を阻害することにより、IL-10 誘導性の腫瘍免疫監視逃避および IL-8 誘導性の腫瘍化およびがん転移を抑制する可能性が示された。

1. 研究目的

がん微小環境 (Tumor microenvironment: TME) では、がん関連マクロファージ (Tumor-Associated Macrophage: TAM), および、骨髄性抑制細胞, 制御性 T 細胞などの免疫抑制細胞群が腫瘍内に浸潤してがん免疫監視機構を抑制する。がん悪性化には、がん免疫抑制細胞群の浸潤・集積が関与しており、臨床的には、がん浸潤性免疫

抑制細胞群の浸潤・集積密度が高い症例ほどがん悪性度が高く、予後が不良である¹⁾。したがって、がん悪性化の原因となる TME ネットワークを形成する非がん細胞の特性や相互作用を解明することが重要である。現在、TME に高密度に集積して免疫監視機構を抑制するがん促進系のがん免疫抑制細胞群が、がん創薬戦略のターゲットとして期待されている。

カリウムチャンネルは、細胞内から細胞外へのカリウムイオンの流出を促進することによって細胞内のカリウムイオン濃度を減少させ、その結果生じる膜の過分極は細胞内カルシウムイオン流入の駆動力を増大させ、マクロファージなどの免疫細胞において細胞内カルシウムイオン濃度の持続的な上昇をもたらす。細胞内カルシウムイオン濃度の持続的な上昇は、免疫細胞における増殖、分化、アポトーシス、サイトカイン・ケモカイン・増殖因子等の発現に必須である²⁾。

TME では、低酸素状態により細胞死が誘導され、細胞内のカリウムイオンが漏出することで、細胞外カリウムイオン濃度が上昇する。カリウムイオンのホメオスタシスに焦点を当てたカリウムイオン駆動型がん免疫療法は、がんの治療戦略において注目されているが³⁾、腫瘍浸潤免疫抑制細胞における細胞内カリウムイオン駆動型サイトカイン/ケモカイン制御のメカニズムは、解明されていない。

本研究の目的は、カリウムチャンネル作用薬のがん免疫賦活薬の標的としての潜在性を明らかにすることである。

2. 研究方法

2.1 細胞培養と分化

ヒト単球性白血球細胞株 THP-1 を Phorbol 12-myristate 13-acetate (100 ng/mL) で 24 時間処理することにより、M₀ マクロファージに分化誘導した。培地除去後、細胞を IL-4 と IL-13 (それぞれ 20 ng/mL) を添加した RPMI 1640 培地で 72 時間インキュベートし、M₂ マクロファージに分化させた。M₂ マクロファージへの分化は、CD163 および IL-10 の転写レベルにより確認した。

2.2 膜電位と細胞内カルシウム濃度の測定

膜電位イメージング解析では、膜電位感受性蛍光色素 DiBAC₄(3) を負荷した細胞に波長 490 nm の光を照射した。細胞内カルシウムイメージング解析では、カルシウム指示薬 Fura 2-AM を用いて測定し、Fura 2 を負荷した細胞は波長 340 nm と 380 nm の光を交互に照射した。蛍光画像は、ORCA-Flash2.8 デジタルカメラ (浜松ホトニクス, 浜松, 日本) を用いて記録し、データ収集と解析には、HCLImage システム (浜松ホトニクス) を用いた⁴⁾。

2.3 リアルタイム PCR による mRNA 発現定量解析

総 RNA 抽出および cDNA 合成を行った⁴⁾。リアルタイム PCR 用の遺伝子特異的プライマーは Primer

Express™ software (Ver 1.5, Thermo Fisher Scientific) を用いて設計した。リアルタイム PCR は Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Japan, Tokyo, Japan) を用い、ABI 7500 real-time PCR instrument (Applied Biosystems) で行った⁴⁾。

2.4 タンパクの定量解析

全細胞溶解液を RIPA バッファーで抽出した。等量のタンパク質を SDS-PAGE で電気泳動した後、フィルターに転写した。各種一次抗体でインキュベートした後 (一晚), HRP 標識 IgG 二次抗体でインキュベートした。ECL advance chemiluminescence reagent kit (Nacalai Tesque) を用い発色し、Amersham Imager 600 (GE Healthcare Japan) を用いて可視化解析した⁴⁾。タンパク質バンドシグナルを ImageJ ソフトウェア (Ver.1.42, NIH, USA) を用いて定量化した。

2.5 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。危険率 5%未満を有意差有りとした。

3. 研究結果

3.1 THP-1 由来 M₂ マクロファージ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

THP-1 由来 M₂ マクロファージにおける K_{Ca}3.1 の機能解析を行うために、選択的 K_{Ca}3.1 活性化薬 SKA-121 (1 μM) 誘発過分極反応とそれに伴う細胞内カルシウム濃度 [Ca²⁺]_i の上昇を、DiBAC₄(3) と Fura 2 シグナルを同時に測定したところ、SKA-121 による過分極反応は、[Ca²⁺]_i 上昇と正の相関があった (相関係数 $R = 0.81$, $n = 14$)。また、選択的 K_{Ca}3.1 遮断薬である TRAM-34 (1 μM) は、単独投与では膜電位に有意な変化を及ぼさなかったが、SKA-121 との共投与では、SKA-121 による過分極反応をほぼ完全に抑制した。

3.2 THP-1 由来 M₂ マクロファージ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 活性化薬による IL-10 および IL-8 の転写および産生の抑制

これまで、ヒト T 細胞リンパ腫 HuT-78 細胞において、K_{Ca}3.1 の活性化により IL-10 の発現および産生が抑制されることを報告した⁵⁾。本研究課題では、THP-1 由来 M₂ マクロファージにおいて、SKA-121 (1 μM)

24 時間処理の IL-10, IL-8, VEGF-A, および TGF- β 1 の発現への影響について検討した。

IL-10 および IL-8 mRNA の発現レベルは, SKA-121 (10 μ M) 処理により, いずれも有意に抑制され ($n=4$, $p<0.01$), TRAM-34 (10 μ M) で同時処理により有意に回復した。TRAM-34 単独処置では, IL-10 および IL-8 mRNA の発現レベル有意な変化はなかった。一方, SKA-121 は, VEGF-A および TGF- β 1 mRNA 発現には影響を及ぼさなかった ($n=4$, $p>0.05$)。この結果と同様に, IL-10 および IL-8 の産生は, SKA-121 処理により有意に減少した ($n=4$, $p<0.01$)。以上より, $K_{Ca}3.1$ 活性化薬は, IL-10 と IL-8 の転写を抑制することにより, TAM の免疫亢進と腫瘍促進を抑制することが示唆された。

3. 3 THP-1 由来 M_2 マクロファージにおける高カリウム誘発 IL-10 および IL-8 の発現・産生増大とそれに対する $K_{Ca}3.1$ 活性化薬の効果

低酸素状態の TME では, 壊死したがん細胞から放出されたカリウムイオンが細胞外領域に蓄積する^{3) 6)}。細胞内カリウムイオン濃度解析により, TME における平均カリウムイオン濃度は, 約 29 mM であることが知られている。THP-1 由来 M_2 マクロファージを高カリウム含有 RPMI1640 培地 (最終カリウムイオン濃度: 25 mM) に 24 時間曝露したところ, IL-10 と IL-8 mRNA 発現・産生は 2 倍程度に増加し, 転写発現 ($n=4$, $p<0.01$) および分泌 (各 $n=4$, $p<0.01$) の増加が示された。そこで, 高カリウム刺激による IL-8 および IL-10 発現・産生の増加に対する SKA-121 の 24 時間処理の効果を調べたところ, 10 μ M SKA-121 処理により有意に抑制された ($n=4$, $p<0.01$)。

3. 4 THP-1 由来 M_2 マクロファージにおける IL-10 および IL-8 の転写抑制における ERK-CREB, JNK-c-Jun カスケードの関与

以前の研究により, IL-8 および IL-10 の発現は ERK/JNK/p38 MAPK, PI3K/AKT/mTOR, NF- κ B, カルシニューリン/NFAT などのシグナル伝達経路によって制御されていることが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。10 種類のシグナル伝達経路阻害剤のうち, ERK1/2 阻害薬 SCH772984 (1 μ M) で 24 時間処理すると, THP-1 由来 M_2 マクロファージにおける IL-10 および IL-8

mRNA 発現は抑制された。また, JNK 阻害薬 SP600125 (10 μ M) により, 同様に IL-10 および IL-8 mRNA 発現は抑制された。

次に, ウェスタンブロッティングにより, $K_{Ca}3.1$ 活性化薬のリン酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2), リン酸化 JNK (P-JNK), リン酸化 c-Jun (P-c-Jun) に対する影響を検討した。総 ERK2 に対する P-ERK2 の比率は, SKA-121 処理により有意に減少し ($n=4$, $p<0.01$), 高カリウム (25 mM) への曝露により増加した ($n=4$, $p<0.01$)。同様に, 全 JNK に対する P-JNK の比率も, SKA-121 処理により有意に減少し ($n=4$, $p<0.01$), 高カリウム (25 mM) への曝露により増加した ($n=4$, $p<0.01$)。以上の結果より, THP-1 由来 M_2 マクロファージにおいて, $K_{Ca}3.1$ 活性化による IL-10 および IL-8 の転写抑制に ERK および JNK-c-Jun シグナル伝達経路が関与することが示唆された。

IL-8 および IL-10 遺伝子のプロモーターに結合する転写因子同定されているが, ERK1/2-CREB 経路は, IL-8 および IL-10 の転写に共通して関連する候補である。そこで, CREB 阻害薬 666-15 (1 μ M) の IL-8 および IL-10 の発現に対する効果を検討した。IL-10 と IL-8 mRNA 発現・産生は, 666-15 による 24 時間処理によって有意に減少した。また, 全 CREB に対する P-CREB の比率は, 1 μ M SKA-121 により有意に減少し ($n=4$, $p<0.01$), 高カリウム曝露によって有意に増加した ($n=4$, $p<0.01$)。したがって, ERK-CREB および JNK-c-Jun カスケードは, $K_{Ca}3.1$ を介した IL-10 および IL-8 の発現制御に関与している可能性がある。

3. 5 THP-1 由来 M_2 マクロファージにおける容積感受性アニオンチャネル LRRRC8A 阻害薬による IL-10 および IL-8 の転写および産生の抑制

THP-1 由来 M_2 マクロファージにおいて, Nrf2 阻害薬 ML385 (10 μ M) を 12 時間処置したところ, IL-8 及び IL-10 の転写・産生が抑制された。しかし, SKA-121 によりリン酸化 Nrf2 (P-Nrf2) の核移行は影響を受けなかった。LRRRC8A 阻害薬 endovion (NS3728) (10 μ M) を 12 時間処置したところ, IL-8 及び IL-10 の転写・産生が抑制された ($n=4$, $p<0.01$)。

3. 6 THP-1 由来 M₂ マクロファージにおける IL-10 および IL-8 の転写抑制における NOX2-Nrf2 シグナル経路の関与

Alexa-Fluor-488 で標識した P-Nrf2 抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡により P-Nrf2 の核における局在を観察したところ、endovion 処置により P-Nrf2 陽性細胞の割合が有意に減少した ($n=4$, $p<0.01$)。また、Nrf2 の上流シグナルを検討したところ、Akt や AMPK ではなく、endovion による LRRC8A 阻害が NOX2 (NADPH oxidase 2) を抑制して、P-Nrf2 の核への移行を阻害することが示唆された。

4. 考察

本研究では、THP-1 由来の M₂ マクロファージを用いて、Ca²⁺活性化 K⁺チャネル K_{Ca}3.1 が、TAM によるがんの転移能の亢進と TME における血管新生に関わる可能性があることを示した。本研究の主な結果は以下の通りである。

- (1) THP-1 由来 M₂ マクロファージにおけるプロ腫瘍原性 IL-8 および IL-10 の発現および産生は、K_{Ca}3.1 活性化薬処理により有意に減少した。
- (2) 実験的高カリウム環境により IL-8 および IL-10 の発現および産生は亢進し、K_{Ca}3.1 活性化薬により有意に減少した。
- (3) IL-10 および IL-8 の転写は、ERK-CREB, JNK-c-Jun カスケードを介して促進された。

我々は以前、IL-10 産生 T 細胞リンパ腫、HuT-78 細胞において、K_{Ca}3.1 活性化薬による IL-10 の発現・産生の減少を報告した⁵⁾。HuT-78 細胞では NF- κ B シグナル伝達経路が定常的に活性化しており、IL-10 転写は TGF- β -Smad2/3 シグナル伝達経路を介して制御されている。しかしながら TGF- β シグナル阻害により、THP-1 由来 M₂ マクロファージにおける IL-10 および IL-8 の転写は影響を受けなかった。

TAM は、抗炎症性サイトカイン IL-10 を放出することにより、抗腫瘍性、細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞やナチュラルキラー細胞の機能を妨害する^{11, 12)}。IL-10 の転写調節には、複数の異なるシグナル伝達経路が関与している^{13, 14)}。Native な THP-1 細胞では、IL-10 プロモーターは ERK1/2 シグナル経路を通して CREB によって活性化される¹⁵⁾。本研究でも、ERK1/2 阻害薬また

は CREB 阻害薬の処理により、THP-1 由来 M₂ マクロファージにおける IL-10 の転写が抑制された。また、この結果と一致して、K_{Ca}3.1 活性化薬により、ERK1/2 および CREB のリン酸化レベルが低下した。我々は最近、制御性 T 細胞において、K_{Ca}3.1 阻害薬により JNK/c-Jun カスケードを介して IL-10 発現が亢進することを報告した¹⁶⁾。本研究では、K_{Ca}3.1 活性化薬による IL-10 の発現抑制に JNK/c-Jun カスケードが関与することが示唆された。IL-8 は、IL-10 と同様に腫瘍の免疫抑制に重要な役割を果たすとともに¹⁷⁾、がん幹細胞能、化学療法抵抗性、および腫瘍における血管新生血管に関与している^{17, 18)}。本研究では、K_{Ca}3.1 活性化薬は、THP-1 由来の M₂ マクロファージにおける IL-8 の転写を抑制した。したがって、K_{Ca}3.1 活性化薬は、TAM における IL-8 産生を抑制することにより、がんの遊走と転移を防ぐだけでなく、がんの微小血管密度も低下させる可能性がある。しかし、この仮説を証明するためには、今後さらなる研究が必要である。IL-8 転写は、ERK 阻害剤および JNK 阻害剤によって抑制された。また、K_{Ca}3.1 活性化薬は、ERK1/2, JNK, c-Jun, CREB のリン酸化レベルを低下させた。IL-10 と同様に、K_{Ca}3.1 活性化薬は、ERK-CREB および JNK-c-Jun カスケードを介して TAM の IL-8 発現・産生を阻害することにより、TME における腫瘍化促進や幹細胞獲得を抑制することが示唆された。K_{Ca}3.1 活性化薬は、腫瘍に浸潤した TAM から分泌される IL-8 を減少させることによって、腫瘍の新生血管形成を抑制する新しい創薬戦略として期待される。

また、IL-8 は、TME における TAM の集積に関与する。TAM から分泌される IL-8 は、パラクリン経路を介して、化学療法抵抗性などのがん幹細胞の性質を持つ上皮間葉転換過程に寄与する¹⁹⁾。TAM とがん細胞間の双方向性クロストークは、TAM が IL-8 と IL-10 を TME に分泌することを促進し、固形がんの腫瘍化、転移、血管新生をもたらす²⁰⁾。

Feng ら (2018) は、Nrf2 の活性化が M₂ マーカー (CD163 と Arg1) の発現を亢進することを報告した²¹⁾。したがって、THP-1 細胞の M₂ 分化に伴う IL-10 および IL-8 発現・産生の亢進には、Nrf2 活性化が関与する可能性がある。実際に、THP-1 由来 M₂ マクロファージでは、

Nrf2 の発現レベルが高く、IL-10 および IL-8 発現は、Nrf2 阻害薬 ML385 の 24 時間処理により有意に低下した ($n=4$, $p<0.01$)。K_{Ca}3.1 活性化薬は、リン酸化 Nrf2 陽性細胞の割合を抑制しなかった。一方、IL-10 および IL-8 発現・産生は、容積感受性アニオンチャネル LRRC8A 阻害薬により抑制された。LRRC8A 阻害薬は、ERK や JNK のリン酸化には影響を及ぼさず、リン酸化 Nrf2 陽性細胞の割合を有意に減少させた。したがって、Nrf2 シグナル経路を介した IL-10 と IL-8 の発現・産生の調節には、LRRC8A が関与しており、K_{Ca}3.1 活性化薬と同様に、LRRC8A 阻害薬により、がんの腫瘍化、転移、血管新生、幹細胞化を抑制できる可能性がある。

5. 今後の課題

本研究では、TME における壊死がん浸潤細胞による細胞外カリウム上昇を模倣した実験的高カリウム環境において、IL-10 および IL-8 の発現・産生が亢進した。チャネルのゲーティングを積極的に調節する、強力で選択的な K_{Ca}3.1 活性化薬が開発されているが²²⁾、その臨床的・治療的重要性は依然として不明である。本研究成果は、抗腫瘍戦略としての TAM 標的療法に新たな洞察を与え、強力かつ選択的な K_{Ca}3.1 活性化薬が、がん免疫療法における将来の治療応用のために有用である可能性を示した。がん免疫療法における K_{Ca}3.1 活性化薬の臨床応用の可能性を評価するためには、酸性 pH、低酸素、高乳酸、低グルコースなどの TME 条件下でのさらなる研究が必要である。また、がん細胞や TME 周辺に集積する免疫抑制細胞をリクルートさせるサイトカイン・ケモカインに関するさらなる研究が必要であると考えている。

本報告書において、容積感受性アニオンチャネル LRRC8A に関する研究成果の一部を記述したが、THP-1 由来 M₂ マクロファージにおける LRRC8A を介した IL-10 および IL-8 発現・産生の制御に関する研究成果を原著論文としてまとめるためには、さらに実験が必要であり、今後の課題である。

6. 文献

1. Lin Y., Xu J., Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, 12, 76. doi:

10.1186/s13045-019-0760-3.

2. Vaeth M., Feske S. Ion channelopathies of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **2018**, 52, 39-50. doi: 10.1016/j.coi.2018.03.021.
3. Eil R., Vodnala S.K., Clever D., Klebanoff C.A., Sukumar M., Pan J.H., Palmer D.C., Gros A., Yamamoto T.N., Patel S.J. et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature* **2016**, 537(7621), 539-543. doi: 10.1038/nature19364.
4. Ohya S., Matsui M., Kajikuri J., Endo K., Kito H. Increased Interleukin-10 Expression by the inhibition of Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the recovery phase in an inflammatory bowel disease mouse model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, 377, 75-85. doi: 10.1124/jpet.120.000395.
5. Matsui M., Kajikuri J., Kito H., Endo K., Hasegawa Y., Murate S., Ohya S. Inhibition of Interleukin 10 Transcription through the SMAD2/3 Signaling Pathway by Ca²⁺-Activated K⁺ Channel K_{Ca}3.1 Activation in Human T-Cell Lymphoma HuT-78 Cells. *Mol. Pharmacol.* **2019**, 95, 294-302. doi: 10.1124/mol.118.114405.
6. Vodnala S.K., Eil R., Kishton R.J., Sukumar M., Yamamoto T.N., Ha N.H., Lee P.H., Shin M., Patel S.J., Yu Z. et al. T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. *Science* **2019**, 353(6434), eaau0135. doi: 10.1126/science.aau0135.
7. Hayashi R., Yamashita N., Matsui S., Fujita T., Araya J., Sassa K., Arai N., Yoshida Y., Kashii T., Maruyama M. et al. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Eur. Respir. J.* **2000**, 16, 452-458. doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.016003452.x.
8. Ye L., Xin Y., Wu Z.Y., Sun H.J., Huang D.J., Sun Z.Q. A newly synthesized flavone from luteolin escapes from COMT-catalyzed methylation and inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages via JNK, P38 and NF- κ B signaling pathways. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, 32, 15-26. doi: 10.4014/jmb.2104.04027.

9. Wang L., Tang C., Cao H., Li K., Pang X., Zhong L., Dang W., Tang H., Huang Y., Wei L. et al. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, 16, 1220-1230. doi: 10.1080/15384047.2015.1056409.
10. Maldonado-Perez D., Brown P., Morgan K., Miller R.P., Thompson E.A., Habbour H.N. Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, 1793, 1315-1324. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.03.008.
11. Boutillier A.J., ElSawa S.F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 6995. doi: 10.3390/ijms21155207.
12. Salmaninejad A., Valilou S.F., Soltani A., Ahmadi S., Abarghan Y.J., Rosengren R.J., Sahebkar A. Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. *Cell. Oncol. (Dordr.)* **2019**, 42, 591-608. doi: 10.1007/s13402-019-00453-z.
13. Nguyen H.D., Aljamaei H.M., Stadnyk A.W. The production and function of endogenous interleukin-10 in intestinal epithelial cells and gut homeostasis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, 12, 1343-1352. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.07.005.
14. Sarava M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, 10, 170-181. doi: 10.1038/nri2711.
15. Gee K., Angel J.B., Ma W., Mishra S., Gajanayaka N., Parato K., Kumar A. Intracellular HIV-Tat expression induces IL-10 synthesis by the CREB-1 transcription factor through Ser133 phosphorylation and its regulation and by the ERK1/2 MAPK in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 31647-31658. doi: 10.1074/jbc.M512109200.
16. Matsui M., Kajikuri J., Endo K., Kito H., Ohya S. Kca3.1 inhibition-induced activation of the JNK/c-Jun signaling pathway enhances IL-10 expression in peripherally-induced regulatory T cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2022**, 148, 1-5. doi: 10.1016/j.jphs.2021.09.007.
17. Asokan S., Bandapalli O.R. CXCR8 signaling in the tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2021**, 1302, 25-39. doi: 10.1007/978-3-030-62658_3.
18. Terry S., Engelsen A.S.T., Buart S., Elsayed W.S., Venkatesh G.H., Chouaib S. Hypoxia-driven intratumor heterogeneity and immune evasion. *Cancer Lett.* **2020**, 492, 1-10. doi: 10.1016/j.canlet.2020.07.004.
19. Long X., Ye Y., Zhang L., Liu P., Yu W., Wei F., Ren X., Yu J. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *Int. J. Oncol.* **2016**, 48, 5-12. doi: 10.3892/ijo.2015.3234.
20. Wei C., Yang C., Wang S., Shi D., Zhang C., Lin X., Liu Q., Dou R., Xiong B. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol. Cancer* **2019**, 18, 64. doi: 10.1186/s12943-019-0976-4.
21. Feng R., Morine Y., Ikemoto T., Imura S., Iwahashi S., Saito Y., Shimada M. Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction. *Cell. Commun. Signal.* **2018**, 16, 54. doi: 10.1186/s12964-018-0262-x.
22. Brown B.M., Shim H., Christophersen P., Wulff H. Pharmacology of small-and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2020**, 60, 219-240. doi: 10.1146/annurev-pharmatox-010919-023420.

Significance of K⁺ Channel Function and Expression Regulation in Cancer Immunosuppressor Cells in the Tumor Microenvironment

Susumu Ohya

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

Summary

In the tumor microenvironment (TME), immunosuppressive cells such as tumor-associated macrophages (TAM), myeloid-derived suppressor cells, and regulatory T cells infiltrate the tumors and suppress the tumor immune surveillance system. Clinically, the density of infiltrating immunosuppressive cells is associated with high malignant grade and poor prognosis in cancer. Therefore, immunosuppressive cells forming TME networks are targets for cancer drug discovery strategies. The purpose of this study is to elucidate the potential of K⁺ channel activators in immunosuppressive cells. In the present study, human acute monocytic leukemia cell line THP-1 was differentiated into M₀ macrophages by stimulation with PMA for 24 hr and then differentiated into TAM-like M₂ macrophages with IL-4/IL-13 supplemented medium for 72 hr. Gene expression was analyzed by real-time PCR, protein expression by Western blotting, and cytokine expression by ELISA. We examined the involvement of Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 in THP-1-derived M₂ macrophages in expressing pro-tumorigenic cytokines. In THP-1-derived M₂ macrophages, the expression levels of IL-8 and IL-10 were significantly decreased by treatment with the selective K_{Ca}3.1 activator, SKA-121. Furthermore, under *in vitro* experimental conditions that mimic extracellular K⁺ levels in the TME, IL-8 and IL-10 levels were both significantly elevated, and these increases were reversed by combined treatment with SKA-121. Respective treatments with ERK and JNK inhibitors significantly repressed IL-8 and IL-10 transcriptions, and treatment with SKA-121 significantly reduced the phosphorylation levels of ERK and JNK. These results suggest that the K_{Ca}3.1 activator may suppress IL-10-induced tumor immune surveillance escape and IL-8-induced tumorigenicity and metastasis by inhibiting their production from TAMs through ERK-CREB and JNK-c-Jun cascades.