

Title	ヒト単球・マクロファージにおけるTRPV4の機能解析
Author(s)	渥美,友紀子
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92110
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

ヒト単球・マクロファージにおける

TRPV4 の機能解析

大阪大学 大学院薬学研究科 創成薬学専攻 先端化粧品科学分野 渥美 友紀子

	次

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
1. 背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2.1. 単球の単離・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2.2. 細胞培養法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8
2.3. マクロファージの分化方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9
2.4. 炎症性疾患皮膚サンプル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2.5. RT-qPCR 法 •••••••••••••••••••••••••••••••••••
2.6. ウェスタンブロット法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
2.7. Bioplex 法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13
2.8. ELISA 法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13
2.9. Ca ²⁺ イメージング法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
2.10. siRNA 導入法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
2.11. ルシフェラーゼアッセイ法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16
2.12. フローサイトメトリー法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
2.13. 蛍光ハイブリダイゼーション(FISH)法・・・・・・・・・・・・・・・18
2.14. 統計解析法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.1. ヒト単球・マクロファージにおける TRPV4 の発現確認・・・・・・・・・・・20
3.2. 初代単球における TRPV4 の活性化は、サイトカイン発現を抑制する・・・・・23
3.3. マクロファージにおける TRPV4 の機能的発現の確認・・・・・・・・・・・26
3.4. マクロファージの TRPV4 の活性化は、IL-1β 発現量を減少させる・・・・・・・32
3.5. TRPV4 の活性化は、IL-1βの mRNA 発現、および、NLRP3 の発現を抑制する ・・40
3.6. TRPV4 の活性化は NF-κB シグナルを抑制する・・・・・・・・・・・・・・43
3.7. TRPV4 の活性化は単球から M1 マクロファージへの分化を抑制する・・・・・・50
3.8. アトピー性皮膚炎では TRPV4 陰性の M1 マクロファージが増加する・・・・・57
4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65
4.1. 炎症性皮膚疾患における本研究の位置づけ・・・・・・・・・・・・・・・67
4.2. TRPV4 活性化による NF-κB 経路の抑制メカニズム・・・・・・・・・・・・67
4.3. TRPV4 の下流でおこる IL-1β 発現制御メカニズム・・・・・・・・・・・・68
4.4. M1/M2 マクロファージの性質の違い・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・70
4.5. TRPV4 の生体内、AD における役割の可能性・・・・・・・・・・・・・・・70
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・73
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis、AD) などの皮膚疾患は、免疫異常を始めとする様々な 要因で発症し、その病態はマクロファージなどの免疫細胞によるサイトカイン過剰産生と 関連している。 マクロファージは、 その特性から主に炎症性 M1 マクロファージと抗炎症性 M2 マクロファージに分けられる。この 2 つの状態を行き来することで炎症制御にかかわる 可能性が示唆されるなど、これら特性の解析が進んでいる。しかし、マクロファージがどの ように周囲の環境変化を感知し、性質を制御しているか、その詳細は明らかとなっていない。 TRP チャネルは化学物質刺激に加え、温度や浸透圧、機械刺激などの物理的刺激にも応答 することができる非選択的陽イオンチャネルである。Human protein atlas データベースを用 いて免疫細胞における全 TRP チャネルの発現を調査したところ、TRPV4 がマクロファージ 前駆体である単球に、特異的に発現していることが判明した。TRPV4 は、27~35℃で活性化 する Ca²⁺透過性の高い非選択的陽イオンチャネルであり、マウスマクロファージの機能制 御に関わることが報告されている。しかし、ヒトマクロファージにおける TRPV4 機能と皮 膚免疫疾患との関連の詳細は不明である。そこで、ヒト末梢血から採集した末梢血単核細胞 (PBMC)より単離した、初代単球、およびヒト初代単球から分化誘導したマクロファージ における TRPV4の機能を評価した。本研究において、ヒト単球・マクロファージにおける TRPV4 の活性化は、LPS により誘導される IL-1β 発現を抑制することを明らかにした。ま た、TRPV4 の活性化はホスファターゼであるカルシニューリンを活性化し、NLRP3 発現の 減少と NF-кB シグナル経路の抑制を誘導した。単球からマクロファージを分化させる際に TRPV4 を活性化すると、M1 型 GM-CSF マクロファージへの分化が抑制された。一方で、 M2型 M-CSF マクロファージへの分化は抑制されなかった。さらに、AD ではヒト健常皮膚 と比較して、iNOS 陽性/TRPV4 陰性の真皮マクロファージの数が有意に増加していること が観察された。これらの結果は、TRPV4 の活性化がマクロファージにおける炎症性サイト

カイン発現の抑制と炎症性マクロファージへの分極を制御するという点から、恒常性維持 におけるマクロファージの機能制御に TRPV4 が関連していることを示唆し、また TRPV4 が炎症抑制の創薬ターゲットとなる可能性を提起している。 1. 背景

我々の体は、好中球、単球、B細胞、T細胞などに代表される免疫細胞の働きにより、病 原微生物などの感染を防いでいる。特に、マクロファージは貪食によって異物を取り込み、 細胞内で消化することで異物の排除に働く ^{1,2} とともに、ケモカインやサイトカインを産生 し、ほかの免疫細胞を呼び寄せ、活性化させる役割も果たす 3。皮膚に存在するマクロファ ージとして、表皮に存在するランゲルハンス細胞、真皮マクロファージなどが知られている ^{4,5}。 さらに真皮マクロファージは、組織固着性の組織球と組織を動き回ることのできる単 球由来のマクロファージが存在することが報告されているう。組織球は寿命が長く、高い貪 食能を持っているが、抗原提示能力は低い 5.6。一方、炎症に伴って皮膚に浸潤してきた単球 由来のマクロファージは、真皮内を動き回ることができ、抗原提示や貪食を行う。このタイ プへのマクロファージ分化は皮膚常在菌により誘導されることも示唆されている 7。また、 これらは、通常時にも真皮内に存在しており、炎症時に増加することが報告されている 7。 近年、マクロファージが発現するサイトカインのパターンにより、それらの性質を M1 と M2 タイプに分けることが一般的に浸透している。炎症性サイトカインを多く産生する古典 的活性化型のマクロファージを M1 マクロファージと呼ぶ。一方で、IL-10 などの抑制性サ イトカインの産生力が高いタイプのマクロファージを選択的活性化型の M2 マクロファー ジと呼び、これらのタイプは組織修復にも関わると考えられている²。 M1 と M2 の性質は、 周囲の環境に応じて行き来していると考えられている 8.9。皮膚に定常的に存在する組織常 在性マクロファージは、機能的に M2 タイプである 5,10。通常、マクロファージは外来抗原 などを貪食により排除し、恒常性の維持に役立っているが、一方で接触性皮膚炎 ¹¹ や、アレ ルギー性皮膚炎 12 などの炎症性疾患の発症にも関与していることが報告されている。典型 的なアレルギー性皮膚炎であるアトピー性皮膚炎(AD)では、病変部にマクロファージが 集積している ¹³。Ml マクロファージの分化を誘導する Th2 サイトカインである GM-CSF

は、AD 患者の皮膚では過剰に産生されることも報告されている¹⁴。また、IL-1β¹⁵や IL-10¹⁶ などのマクロファージが産生することができるサイトカインも AD 病変部では過剰に産生 されており、Th2 反応を誘導し AD の発症と進行につながると示唆されている。このように マクロファージ機能の異常は AD の発症・進行に関与するが、細胞外環境や細胞内シグナル がマクロファージの機能を制御するメカニズムは完全には解明されていない。

Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは、化学刺激だけではなく、温度や機械刺激、 電位変化などの物理刺激にも応答することができる非選択的陽イオンチャネルである。 1997 年にカプサイシン受容体である Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) が直接 熱を感知して活性化することが発見され ¹⁷、感覚に関与する受容体ではないかと大きな注目 を集めるようになった。 2022 年現在、 ヒトにおいては 27 種類の TRP チャネルが同定され、 その機能が報告されている。TRP 遺伝子変異による遺伝性疾患だけでなく、後天的な TRP チャネルの異常が後天性疾患やがんの発症につながることもあり ¹⁸⁻²²、TRP チャネルが組 織の恒常性維持に重要であることが示唆されている。皮膚においても、様々な細胞に TRP チャネルが発現しており、表皮の分化、増殖、バリア機能、皮膚免疫など様々な機能が報告 されている ^{23,24}。また、皮膚疾患における発現の変化なども報告されている ^{23,24}。メラノサ イトには数種類の Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM) ファミリーのチャネルが発 現しており、TRPM1 はヒト表皮メラノサイトにおいて、メラニン産生や分化・増殖に関与 している^{25,26}。TRPM1 は転移性メラノーマにおいて発現が低下することや、TRPM2、M7、 M8 はメラノサイトの細胞挙動に関連することが報告されており、これらのチャネルは予後 が悪いことで知られるメラノーマの診断マーカーとなり得ると言われている²⁷。TRPM ファ ミリー以外の TRP チャネルのうち、Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) は接触過 敏症を促進することが示唆されている ²⁸。TRPA1 のノックアウトマウスまたは、TRPA1 阻 害剤による処理は、オキサゾロンやウルシオールに誘導される接触性皮膚炎を抑制する 28。 また、TRPA1 ノックアウトマウスでは、皮膚をハプテン暴露した際の炎症性サイトカイン

の産生やサブスタンス P の産生が抑制されることで、接触性皮膚炎が抑制されることが報告されている²⁸。また、ケラチノサイトにおける Transient Receptor Potential Canonical(TRPC) チャネルは、表皮の正常な分化に必要な Ca²⁺流入に関与しており、乾癬においては TRPC1、 C4、C6 の発現低下が認められる²⁹。さらに、乾癬患者の末梢血由来単核細胞(PBMC)で は TRPM4, TRPM7, TRPV3, TRPV4, TRPC6 の mRNA 発現量が減少しており³⁰、TRP チャネ ルの発現あるいは機能変化と乾癬発症の関連も示唆されている。AD モデルマウスの皮膚で は、33℃以上の温かい温度領域で活性化する TRPV3 発現量が増加していること、さらに TRPV3 の活性化は野生型マウスでは AD 様病変を引き起こすが、TRPV3 阻害によりこれら の炎症が抑制されること、TRPV3 ノックアウトマウスでは病変を起こさないことが報告さ れている³¹。このように、皮膚において、様々な TRP チャネルが発現し、組織の恒常性維 持に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。

27~35°Cで活性化する Ca²⁺透過性の高い非選択的陽イオンチャネルである Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) ³²は、皮膚、肺、脳など全身の多くの細胞に発現して いる。TRPV4 は Anoctamin 1 (ANO1) ³³ や、Angiotensin II receptor type I ³⁴ など他のチャネ ルと相互作用することで、様々な生理機能を発揮し、組織の恒常性維持機能を担うことが示 唆されている。皮膚においては、TRPV4 はケラチノサイトの細胞間結合の形成に関与し、 TRPV4 活性化は皮膚バリア機能の形成と回復に重要であると報告されている ^{35,36}。軟骨で は、TRPV4 の活性化を介した機械刺激や低浸透圧刺激が、一酸化窒素やプロスタグランジ ン E₂ (PGE₂) 産生を抑制し、抗炎症効果を示すことが、ウシ軟骨細胞において報告されて いる ³⁷。また、軟骨の硬化を抑制し、軟骨の保護につながる可能性が示唆された ³⁷。肺にお いては、喘息、嚢胞性線維症 (CF)、急性肺障害/急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) などの肺 の炎症性疾患と TRPV4 の関連が報告されている ³⁸。例えば、TRPV4 のノックアウトマウス に緑膿菌を感染させると、野生型に比べて炎症細胞の浸潤を伴う肺損傷が重篤になり、肺に 保持される緑膿菌も増加していた。さらに IL-6 などの炎症性サイトカイン発現上昇も伴い、

TRPV4 は細菌の排除と炎症性サイトカイン分泌制御に関与する可能性が示されている ³⁹。 また、TRPV4 ノックアウトマウス由来マクロファージを LPS 刺激した条件では、炎症性サ イトカインである IL-1β の産生量が野生型マクロファージに比べて増加する一方、抗炎症性 サイトカインである IL-10 が減少したという報告 ⁴⁰ がある。これらを統合すると、TRPV4 は様々な条件に応じてサイトカイン産生量を調整し、免疫制御および組織恒常性維持、特に 皮膚の恒常性維持を担う可能性が示唆される。そこで、TRPV4 がヒト皮膚に存在するマク ロファージの機能を制御しているのではないかと仮説を立てた。しかし、ヒト組織中に存在 するマクロファージはその数の少なさや単離方法の難しさから実験に使うことは容易では なく、ヒト由来マクロファージにおける TRPV4 の機能についてはほとんどわかっていない。 そこで、Human protein atlas データベースを用いて免疫細胞における TRP チャネルの発現を スクリーニングしたところ、TRPV4 がマクロファージ前駆体である単球に高発現している ことが判明した。本研究では、単球とマクロファージ両方におけるサイトカインの発現やマ クロファージ分化における TRPV4 の機能を調べることで、ヒト単球・マクロファージにお ける TRPV4 の機能を評価した。

2. 方法

2.1. 単球の単離

本研究は、世界医師会のヘルシンキ宣言ガイドラインに従い実施した。ヒトを対象とする 医学・健康科学研究の倫理審査は、大阪大学(承認番号;薬人 2019-1)および名古屋市立大 学(承認番号:60-18-0003)により実施、承認された。すべての実験はこれらの施設で適応 される倫理指針に従った。末梢血試料は、「研究開発における献血の使用に関するガイドラ イン」などに従い、日本赤十字社近畿ブロック血液センターから献血血液の提供を受けた。 16歳から 69歳の健常ボランティアから採取された末梢血からヒトリンパ球分離溶液(GE ヘルスケア、商品名:Ficoll-Paque PLUS)を用い、密度勾配遠心法を用いて末梢血単核細胞 (PBMC)を分離した。次に、ACK buffer(150 mM NH4Cl、10 mM KHCO3、0.1 mM EDTA) を加え、15分室温静置の後、混入した赤血球を溶血した。次に、Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec、型番:130-090-101)で死細胞を磁気標識し、MACS カラム(Miltenyi Biotec、商品 名:LS カラム、型番:130-042-401)に通すことで死細胞を除いた。この末梢血単核細胞を CD14 Micro Beads(Miltenyi Biotec、型番:130-050-201)で標識し、磁気分離によって CD14 陽性細胞群を得た。以降、この細胞群を初代単球と定義した。

2.2. 細胞培養法

2.1 の方法で得られた単球を 20% FBS(ウシ胎仔血清)(SIGMA、型番:172012)含有 RPMI1640 培地(gibco、型番:11875-093)中で培養した。ヒト TLR4a、MD2、CD14 を恒常 発現する HEK293 細胞(InvivoGen、型番:293/hTLR4-MD2-CD14)は、10% FBS および 100 µg/ml Normocin(InvivoGen、型番:ant-nr)、10µg/ml Blasticidin(InvivoGen、型番:ant-bl)、 50µg/ml Hygromycin B(InvivoGen、型番:ant-hg)含有 DMEM(Sigma、型番:D6429)中 で培養した。すべての細胞は、37°C、5% CO₂のインキュベーター内にて培養した。

2.3. マクロファージの分化方法

2.1 の方法で集めた単球を、20% FBS および 1% 抗生物質(gibco、商品名:anti anti)を 含有する RPMI 培地中で 7 日間培養した。M1 マクロファージに分化させるために 50 ng/ml GM-CSF(SHENANDOAH、型番: 100-08)を、M2 マクロファージに分化させるために 50 ng/ml M-CSF(SHENANDOAH、型番: 100-03)をそれぞれ添加し培養した⁴¹。また、培養開 始後 2 日、あるいは 5 日目に、培養開始時と同様の試薬を含む RPMI 培地を追加した。7 日 間培養後の接着細胞を GM-CSF マクロファージまたは、M-CSF マクロファージと定義した。

2.4. 炎症性疾患皮膚サンプル

名古屋市立大学の倫理指針(承認番号:60-18-0003)に基づき、患者より採取した皮膚切 片をホルマリン固定、パラフィン包埋した皮膚ブロックを使用した。ミクロトームを用いて 皮膚の 10 µm 薄層切片を作製し、続いて 2.13 の作業を行った。

<u>2.5. RT-qPCR 法</u>

TRPV4 のmRNA 発現を確認するため、2.1 の方法で得られた初代単球、コントロールと して7日間培養した単球、2.3 の方法で得られたマクロファージを用意した。細胞を PBS で 洗浄し、Trireagent (Molecular Research、型番: TR118) で全 RNA を抽出した。初代単球は、 同じドナー由来細胞の分化誘導が完了するまで Trireagent に溶解した状態で、-80℃に保存 した。

また、IL-1βの mRNA 発現を確認するため、2.1 の方法で得られた初代単球または 2.3 の 方法で得られたマクロファージを、0.5% FBS を含有する RPMI1640 培地 (gibco、型番: 11875-093)中で6時間培養した。TRPV4の阻害剤である HC067047 (TOCRIS、型番:4100) を 30 μM、30 分前処理した後、IL-1β 発現を誘導するために 10 pg/ml または 10 ng/ml LPS (SIGMA、型番:L2630)で刺激した。LPS 刺激と同時に、TRPV4 の活性化剤である

GSK1016790A(wako、型番:073-06491)を100 µM または10 µM 加えた。6 時間培養後、 細胞を PBS で洗浄し、Trireagent (Molecular Research、型番:TR118)で全 RNA を抽出した。 mRNA 検出まで、-80℃で保存した。

RNA 抽出液を室温に戻したのち、クロロホルムを加え、RNA を含む水層を回収し、これ にイソプロパノールを加え、RNA を沈殿させた。70% エタノールで洗浄し RNase free water に溶解し、RNA サンプルを得た。この RNA サンプルから、逆転写酵素(QIAGEN、商品名: QuantiTect reverse transcription kit、型番:205315)を用い、cDNA を作製した。SYBR Green mix(TOYOBO、商品名:THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、型番:QPS-201)を用いて各遺 伝子配列をそれぞれ特異的に増幅した。TRPV4 検出時は、内在性コントロールとして 18s RNA、IL-1β 検出時は、GAPDH を使用した。なお、使用したプライマーは、表1に示した。 **表1 qRT-PCR 法に使用したプライマー配列リスト**

プライマー		配列				
	Fw	5'-CTACGCTTCAGCCCTGGTCTC-3'				
1KF V4	Rv	5'-GCAGTTGGTCTGGTCCTCATTG-3'				
10° DNA	Fw	5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'				
105 KINA	Rv	5'-AGCTGGAATTACCGCGGC-3'				
II 10	Fw	5'-CACGATGCACCTGTACGATCA-3'				
IL-IP	Rv	5'-GTTGCTCCATATCCTGTCCCT-3'				
CADDII	Fw	5'-CATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCC-3'				
UAFDH	Rv	5'-CCAGGATGCCCTTGAGGGGGGCCCTC-3'				

2.6. ウェスタンブロット法

TRPV4 の発現を確認するため、2.1 の方法で得られた初代単球、2.3 の方法で得られたマ クロファージを用意した。また、TRPV4 発現のポジティブコントロールとして pcDNA3.1-TRPV4 (HEK-TRPV4)、ネガティブコントロールとして pcDNA3.1-empty (HEK-mock) を 0.1% polyethyleneimine (Polysciences、型番: 24765-100)を用いて HEK293T 細胞に導入し た。 NLRP3、Caspase-1 のタンパク質発現レベルを確認するため、2.3 の方法でマクロファージ を用意した。0.5% FBS と 30 µM HC067047 を含有する RPMI1640 培地で 30 分培養した後、 マクロファージは 10 ng/ml LPS、10 µM GSK1016790A にて 6 時間刺激した。

IκBαとNF-κB、それらのリン酸化体のタンパク質発現レベルを確認するため、2.3 の方法 で得られたマクロファージを 0.5% FBS と 10 ng/ml LPS と 10 μM GSK1016790A を含有する RPMI1640 培地で培養した。マクロファージはそれぞれ 15 分、30 分、1 時間、6 時間、24 時 間刺激した。

マクロファージマーカーのタンパク質発現レベルを確認するために、2.3 の方法でマクロ ファージに分化誘導した際、TRPV4 の活性化剤である GSK1016790A を 10 μM 加え、7 日 間培養した。

細胞を PBS で洗浄後、プロテアーゼ阻害剤(Roche、商品名: cOmplete mini) およびホス ファターゼ阻害剤(Roche、商品名: PhosSTOP)を含む RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz Biotechnology、型番: sc-24948)、Laemmli Sample Buffer (Biorad、型番: #1610737)で溶解 させた。細胞溶解液に含まれる DNA を超音波により破砕し、さらに 95 °C、10 分加熱する ことでサンプルを調整した。サンプルは、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル(Biorad、 商品名: TGX)を用い、電気泳動した。タンパク質はセミドライ法で polyvinylidene difluoride メンブレン(Biorad、商品名: Trans-Blot Turbo)に転写した。メンブレンは、4% BlockAce (Ds Pharma)中で、室温、30 分ブロッキングした。各タンパク質を検出するために、使用 した一次抗体は、表 2 に示した。タンパク質を定量化するための基準として β-actin を検出 した。一次抗体と反応させた後、メンブレンは 0.1% Tween-20 (SIGMA、型番: P9416)含 有トリス緩衝生理食塩水(TBST)中で洗った。西洋ワサビベルオキシダーゼ(HRP)標識 された二次抗体と反応させた後、TBST で洗い、メンブレンを ECL 溶液(cytiva、型番: RPN2236)により検出した。画像は Amersham Imager 600 (GE Healthcare)を用いて取得し た。バンド強度は ImageJ を用いて定量化した。

目的	一次抗体	÷	会社	型番	濃度
WB	Anti-TRPV4	Abcam		ab39260	1:100
WB	Anti-NLRP3	Abcam		ab263899	1:500
WB	Anti-Caspase-1	Cell Signalin	g Technology	#3366	1:1000
WB	Anti-Phospho-IκBα (Ser32/36)	Cell Signalin	g Technology	#9246S	1:1000
WB	Anti-IκBα	Santa Cruz 3	Biotechnology	sc-371	1:500
WB	Anti-Phospho-NFκB (Ser536)	Cell Signalin	g Technology	#3036	1:1000
WB	Anti-NF-ĸB	Cell Signalin	g Technology	#6956	1:1000
WB	Anti-β-actin	Santa Cruz 3	Biotechnology	sc-1616	1:1000
WB	Anti-iNOS	Abcam		ab178945	1:500
WB	Anti-Arginase-1	Cell Signalin	g Technology	#43933	1:250
WB	Anti-CD14	Abcam		ab183322	1:1000
FISH	Anti-CD11b	Abcam		ab52478	1:100
FISH	Alexa Fluor 647 anti-arginase-1	Cell Signalin	g Technology	#43279	1:100
FISH	APC anti-CD11b		301309	1:100	
FISH	Alexa Fluor 594 anti-iNOS	Santa Cruz 3	Biotechnology	sc-7271	1:100
FISH	Anti-CD68	Cell Signalin	g Technology	#76437	1:100
FISH	Anti-Arginase-1	Cell Signalin	g Technology	#43933	1:100
- 目的			会社	型番	濃度
WB	Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRI	Conjugate	Biorad	#170-6516	1:3000
WB	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP	Biorad	#170-6515	1:3000	
WB	Dnk pAb to Goat IgG (HRP)		abcam	ab6885	1:3000
FISH	Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-a secondary antibody and Alexa Flu	Thermo Fisher	A-11037	1:1000	
FISH	Goat anti-mouse IgG (H+L) cross- secondary antibody and Alexa Flu-	Thermo Fisher	A-11032	1:1000	
FISH	Donkey anti-rabbit IgG (H+L) cross secondary antibody and Alexa Flu	Thermo Fisher	A-31573	1:1000	

secondary antibody and Alexa Fluor 647

表 2 ウェスタンブロット法、FISH 法に使用した抗体情報のリスト

<u>2.7. Bioplex 法</u>

2.1 の方法で得た初代単球を、0.5% FBS を含有する RPMI 培地中で培養した。免疫応答を 誘導するために、10 pg/ml LPS(SIGMA、型番: L2630)、1 µg/ml K3CpG(Gene Design、型 番: CN65003)、10 µg/ml Pam3CSK4(Invivogen、型番: tlrl-pms)、10 µg/ml poly(I;C)(SIGMA、 型番: p1530)をそれぞれ使用した。また、それぞれの試薬単独のものと、TRPV4 の活性化 剤である GSK1016790A を 100 µM を同時添加したものを用意した。6 時間培養後、0.1%に なるよう TritonX-100(SIGMA、型番: T8787)を加え、氷上に置き、細胞を破壊した。14,000 rpm、4°C、5 分遠心分離し、その上清をサンプルとした。Procarta Plex(eBioscience、商品名: Human Inflammation Panel (20plex) 型番: EPX200-12185-901)を用いて、20 種類のサイトカ インを検出した。

<u>2.8. ELISA 法</u>

2.1 の方法で得られた初代単球は、0.5% FBS を含有する RPMI1640 培地 (gibco、型番: 11875-093)中で6時間培養した。TRPV4の阻害剤である 30 μM HC067047 (TOCRIS、型番: 4100)で30分前処理した後、免疫応答を誘導するために10 pg/ml LPS(SIGMA、型番:L2630) で刺激した。LPS 刺激と同時に、TRPV4の活性化剤であるGSK1016790A (wako、型番:073-06491)を100 μM 加えた。IL-1β 検出時は、GSK1016790A の効果に濃度依存性があるのか 確認するため、1、10、および、100 μM で刺激した。

2.3 の方法で得られたマクロファージは、TrypLE express(gibco、型番:12604-013)を添 加し、37°C、15 分処理後、ピペッティングすることで回収した。0.5% FBS を含有する RPMI1640 培地(gibco、型番:11875-093)中で培養した。30 μM HC067047 または 1 μM GSK2193874(SIGMA、型番:SML0942-5ML)は 30 分前処理した。10 ng/ml LPS、10 μM GSK1016790A は同時刺激し、IL-1β 検出時は 6 時間、IL-10、IL-8、IL-13 検出時は 24 時間 刺激した。カルシニューリン阻害の効果を見るために、1 nM FK506(Cayman、型番:10007965)

で 30 分前処理し、10 ng/ml LPS で 6 時間刺激し IL-1β を検出した。LPS 濃度検討時には、 LPS をそれぞれ 1 pg/ml、10 pg/ml、100 pg/ml、1 ng/ml、10 ng/ml 加え、6 時間刺激し IL-1β を検出した。

このようにして調整した細胞に、0.1 v/v%になるよう TritonX-100 を加え、氷上に静置す ることにより、細胞ライセートを調整した。調整したライセートはアッセイに使用するまで、 4°C で保存した。14,000 rpm、4°C、5 分遠心分離し、その上清をサンプルとし、キットのプ ロトコルに従い、IL-1β (R&D、型番:DY201-05)、IL-1α (R&D、型番:DY200-05)、IL-6 (R&D、型番:DY206-05)、TNFα (R&D、型番:DY210-05)、IL-10 (R&D、型番:DY217B-05)、IL-8 (R&D、型番:DY208-05)、IL-13 (R&D、型番:DY213-05)を検出した。プレ ートリーダー (TECAN、商品名:インフィニット F200 PRO) で吸光度 (励起光:450 nm、 バックグラウンド:560 nm)を測定した。

2.9. Ca²⁺イメージング法

細胞質 Ca²⁺のイメージングは、過去の報告を参考に行った ^{42,43}。カバーガラス上に接着さ せた GM-CSF または M-CSF マクロファージをオープンチャンバーに置き、Standard bath solution (140 mM NaCl、5 mM KCl、2 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂、10 mM HEPES、10 mM グ ルコース、pH 7.4)を灌流した。マクロファージ細胞質における遊離 Ca²⁺濃度は、二波長の fura-2 (Invitrogen、Molecular Probes) マイクロフルオロメトリーにより、340/380 nm で励 起、510 nm で発光させることにより測定した。fura-2 Ratio 画像は、IP-Lab 画像処理システ ム (Scanalytics Inc.、Fairfax、VA USA)を使用して計算および取得した。

<u>2.10. siRNA 導入法</u>

マクロファージの TRPV4 遺伝子をノックダウンさせるため、ヒト TRPV4 をターゲット とする small interfering RNA (siRNA) (Ambion、s34001、型番:4392421) (Sense; GGAAGAAGAUCAUAGAGAAtt、Anti sense; UUCUCUAUGAUCUUCUUCCtt) または、 ネガティブコントロール (Ambion、#2、型番:439087) を使用した。

GM-CSF マクロファージは、75 nM の siRNA をエレクトロポレーション(Invitrogen、商 品名:Neon Transfection system)によって導入した。細胞は 20% FBS を含有する RPMI1640 培地中で 2 日間培養した。培養後の GM-CSF マクロファージは、TrypLE express を添加し、 37°C、15 分反応後、ピペッティングすることで細胞を回収した。得られた細胞は、0.5% FBS を含有する RPMI1640 培地中で 10 ng/ml LPS、10 μM GSK1016790A で 6 時間刺激し 2.8 の ように ELISA 法で IL-1β を検出した。

M-CSF マクロファージは、TrypLE express を添加し、37°C、15 分反応後、ピペッティン グすることで細胞を回収し、5.0×10⁴ cells/well で 24-well plate にまきなおした。細胞を接着 させた後、100 nM の siRNA を Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen、型番:13778-150)を 用いて導入した。6 時間後、20% FBS を含有する RPMI1640 培地に変え、2 日間培養した。 培養後の細胞は、0.5% FBS を含有する RPMI1640 培地中で 10 ng/ml LPS、10 μM GSK1016790A で 6 時間または 24 時間刺激し、2.8 のように ELISA 法で IL-1β、または IL-10 を検出した。 ノックダウン効率は 2.5 のように、RT-qPCR 法を用いて検出した。

2.11. ルシフェラーゼアッセイ法

293/hTLR4-MD2-CD14 細胞は 24-well plate で培養した。NanoLuc experimental reporter (Promega、pNL3.2.NF-κB-RE[NlucP/NF-κB-RE/Hygro] vector または pNL1.2[NlucP] vector) と firefly loading control reporter (Promega、pGL4.54[luc2/TK] vector)、pcDNA3.1-TRPV4 また は the pcDNA3.1 empty vector を、0.1% polyethyleneimine (Polysciences、型番: 24765-100)を 用いて共トランスフェクションした。プロモーター応答領域(REs) は pNL1.2[NlucP]の KpnI/HindIII 部位に挿入した。なお、挿入した配列は表 3 に示した。トランスフェクション 後の細胞は、10% FBS 含有 DMEM (Sigma、型番: D6429) 中で 24 時間培養した。その後、 培地を 0.5% FBS 含有 DMEM に変え、1 µg/ml LPS と 50 µM GSK1016790A で同時刺激した。 *カルシニューリン*の阻害効果を見るため pNL1.2[NlucP]の REs に Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) 応答配列を挿入したベクターを導入した細胞を 1 µg/ml LPS と 1 nM FK506 で同時刺激した。TRPV4 阻害による効果を見るため、pNL3.2.NF-κB-RE[NlucP/NF-κB-RE/Hygro] vector または pNL1.2[NlucP]の REs に NFAT 応答配列を挿入したベクターを導入 した細胞を 1 µg/ml LPS と 50 µM HC067047 で同時刺激した。24 時間後、Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) のプロトコルに従い、GloMax (Promega) で発光 を測定した。 表 3 ルシフェラーゼアッセイ法で NanoLuc experimental reporter (pNL1.2[NlucP] vector) に挿入したプロモーター応答領域の配列リスト

転写因子		配列
NFAT	Fw	5'- GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATA CAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT -3'
	Rv	5'-ACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGA AACAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCC-3'
DI ⊺ 1	Fw	5'- TACTCTTTTCCCCTTTCCTTTAACT -3'
P 0.1	Rv	5'- AGTTAAAGGAAAGGGGAAAAGAGTA -3'
AD 1	Fw	5'-TGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGTGACTCAG -3'
Ar-1	Rv	5'- CTGAGTCACTGACTCACTGAGTCACTGACTCACTGAGTCACTGACTCA -3'
CDED	Fw	5'-GCACCAGACAGTGACGTCAGCTGCCAGATCCCATGGCCGTCATACTGTG ACGTCTTTCAGACACCCCCATTGACGTCAATGGGAGAAC -3'
CREB	Rv	5'- GTTCTCCCATTGACGTCAATGGGGTGTCTGAAAGACGTCACAGTATGACG GCCATGGGATCTGGCAGCTGACGTCACTGTCTGGTGC -3'
IDE5	Fw	5'- GCCTAGCACTAACCGAAACCGAAACCTAA GTGCTA -3'
ікгэ	Rv	5'- TAGCACTTAGGTTTCGGTTTCGGTTAGTG CTAGGC -3'

2.12. フローサイトメトリー法

TRPV4 の活性化が初代単球からマクロファージへの分化に与える影響を調べるために、 2.3 の方法でマクロファージに分化誘導した際、TRPV4 の活性化剤である GSK1016790A を 10 μ M 加え、7 日間培養した。その時、TRPV4 の阻害剤である GSK2193874 (SIGMA、型 番:SML0942-5MG) も 1 μ M 同時添加し、培養した。接着細胞は、TrypLE express (gibco、 型番: 12604-013)を添加し、37°C、15 分反応させ、その後ビペッティングすることで回収 した。PBS 溶液で洗浄後、死細胞染色色素(Invitrogen、商品名:LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain kit、型番:L34966)により、死細胞を染色した。抗 CD11b 抗体 (BioLegend、 商品名: APC anti-human CD11b、型番: 301309)を室温で 10 分反応させることで、細胞膜 上のマーカーを染色した。染色後の試料を PBS で洗浄後、細胞内のマーカーである CD68 を 染色するため 0.5 v/v% PFA で固定した。 室温で 10 分反応させた後、0.05% TritonX-100 を 加え、室温で 10 分反応させ、細胞膜透過処理を行った。試料を PBS で洗浄後、抗 CD68 抗 体 (BioLegend、商品名: FITC anti-human CD68、型番: 333806)を室温で 10 分反応させ、 染色した。PBS で洗浄後、PBS で再懸濁し、サンブルを得た。

2.13. 蛍光ハイブリダイゼーション(FISH)法

患者または健常ボランティアより得たホルマリン固定パラフィン包埋皮膚切片を、名古 屋市立大学の倫理指針(承認番号:60-18-0003)に従い作製した。皮膚サンプルを脱パラフ ィンした後に、RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2(ACD、型番:323100)のプロ トコルに従い蛍光 in situ hybridization (FISH)を行った。ヒト TRPV4 プローブ(ACD、 RNAscope Target Probe Hs-TRPV4、型番:452221)を、Opal 520(Akoya Bioscience、Opal 520 Reagent Pack、型番:FP1487001KT)(1:1500)で標識し、DAPI 染色も続いて行った。なお、 コントロールとして、ポジティブプローブ(ACD、RNAscope Positive control Probe Hs-PPIB、 型番:313901)または、ネガティブプローブ(ACD、RNAscope Negative control Probe-DapB、 型番:310043)を用いた。また、続けて免疫染色を行うため、10% FBS と 0.1 v/v% Triton X-100 を含有する PBS で室温、30 分ブロッキングした。一次抗体は 4℃ でオーバーナイト反 応させた。2 次抗体は、室温で 2 時間反応させた。使用した抗体は、表 2 に示した。

染色後、スライドを Prolong Gold (ThermoFisher) で封入し、Olympus research slide scanner VS200 で撮影した。各サンプルの真皮のエリアを 10 視野ずつ撮影し、各エリアに存在する マクロファージの数をカウントした。各マーカーの強度の閾値を設定し、閾値以上の細胞を 陽性、閾値以下の細胞を陰性と定義した。

皮膚切片は以下に示す年齢、性別のものを使用した。

アトピー性皮膚炎患者:19歳女性、30歳男性、44歳女性、40歳女性、29歳男性 健常ボランティア:50歳男性、38歳女性、53歳女性、36歳男性、40歳女性

2.14. 統計解析法

統計解析は、Excel (Microsoft) または、GraphPad Prism7 (MDF) を使用した。サイトカ イン発現、mRNA 発現、NLRP3 と Caspase-1 のタンパク質発現量はスティール検定による 有意差検定を行った。ノックダウン効率、Ca²⁺イメージング、皮膚における TRPV4 陽性ま たは陰性マクロファージ数についてはマンホイットニーの U 検定を行った。LPS に誘導さ れる NF-κB 経路のタンパク質量は、GSK1016790A 刺激をしていないものとしているもので ウィルコクソンの符号順位検定を行った。ルシフェラーゼアッセイは、テューキー・クレー マー検定で有意差の確認をした。皮膚におけるマクロファージの解析は、一元配置分散分析 として、クラスカル・ワリス検定を行い、有意差があるか確認した。

3. 結果

3.1. ヒト単球・マクロファージにおける TRPV4 の発現確認

はじめに、ヒト免疫細胞における TRP チャネルの発現を調べた。Human protein atlas database (www.proteinatlas.org/) を利用し、ヒト免疫細胞 (顆粒球、単球、樹状細胞、NK 細 胞、B 細胞、T 細胞)における 27 種類の TRP チャネルの mRNA 発現パターンを、トランス クリプトームデータを基に検索・解析した。単細胞 RNA 配列データを用いた細胞クラスタ ー解析の結果、TRPV1、V2、V4、M2、M3、M4、M6、M7、M8、C6 が免疫細胞で発現する 可能性が示された。また、PBMC の中でも最も多い数を占める単球クラスターにおいては、 TRPV2、V4、M2、M4、M7 の発現が確認された。これらの TRP チャネルのほとんどは単球 以外の免疫細胞においても発現は確認されたが、TRPV4 は単球でのみ特異的に発現してお り、 ほ か の 細 胞 ク ラ ス タ ー に お い て は 発 現 が 報 告 さ れ て い な か っ た (www.proteinatlas.org/ENSG00000111199-TRPV4/immune+cell)。

発現パターンの調査の結果、TRPV4 が単球を特異的に機能制御する可能性が考えられた ので、まず初めに、ヒト初代単球・マクロファージにおける TRPV4 の発現を確認した。ヒ ト由来末梢血単核細胞(PBMC)から単離した初代単球(day0 Mo)、初代単球から分化誘導 した M1 マクロファージに分類される GM-CSF マクロファージ(GM-CSF Mo)、M2 マクロ ファージに分類される M-CSF マクロファージ(M-CSF Mo)、7 日間培養した初代単球(day7 Mo)における TRPV4 の mRNA 発現を、RT-qPCR 法を用いて確認した。その結果、いずれの 細胞においても TRPV4 の mRNA が検出できた(図 1A)。また、TRPV4 の mRNA 発現量は 初代単球より GM-CSF マクロファージにおいて 6.6 倍、M-CSF マクロファージでは 6.9 倍 高かった。

続いて、TRPV4 のタンパク質発現を確認するため、ウェスタンブロット法を行った。初 代単球、GM-CSF マクロファージ、M-CSF マクロファージのいずれにおいても TRPV4 の発

現が確認できた(図1B)。以上の結果より、ヒト初代単球、初代単球より分化誘導したマク ロファージにおいて TRPV4 が発現していることが確認された。



図1 TRPV4 発現の確認

(A) 初代単球 (day0 Mo)、7 日目単球 (day7 Mo)、GM-CSF マクロファージ (GM-CSF Mφ)、 M-CSF マクロファージ (M-CSF Mφ) における TRPV4 mRNA 発現量の中央値。値は 18s rRNA の発現量で補正した。*p<0.05, Steel test, n=10 donors (B) 初代単球 (day0 Mo)、GM-CSF マクロファージ (GM-CSF Mφ)、M-CSF マクロファージ (M-CSF Mφ) における TRPV4 (90 kDa) と β-actin (40 kDa) のウェスタンブロット。TRPV4 発現のポジティブコントロ ールとして pcDNA3.1-TRPV4 (HEK-TRPV4)、ネガティブコントロールとして pcDNA3.1empty (HEK-mock) をトランスフェクトした HEK293T 細胞ライセートをそれぞれ使用した。

3.2. 初代単球における TRPV4 の活性化は、サイトカイン発現を抑制する

単球、マクロファージは外部刺激によって炎症性サイトカインを分泌することが知られ ている⁴⁴。そこで、TRPV4 の活性化がマクロファージの機能制御、特にサイトカイン発現 に与える影響を確かめるため、初代単球を用いて、20 種類のサイトカインを同時に検出す ることのできる Bioplex を用いてスクリーニングを行った。初代単球を TLR のリガンド(LPS、 K3CpG、Pam3CSK、poly(I:C)) で6時間刺激すると同時に、TRPV4の特異的活性化剤であ る GSK1016790A で刺激し、上清と細胞溶解液の混合液中のサイトカイン量を測定した。そ の結果、GSK1016790A による TRPV4 の活性化は、LPS、Pam3CSK、poly(I:C)によって誘導 された多くのサイトカイン発現を抑制する傾向を確認した(表 4A、B)。その中でも、LPS によって誘導されるサイトカインに対して最も多く 17 種類のサイトカインの発現を抑制す る傾向だった。そこで、LPS に着目し、特に変化量の大きかった炎症性サイトカインである IL-1β、IL-1α、IL-6、TNFα について、ELISA 法を用いてより詳細に定量解析した。Bioplex 法で得られた実験結果と同様に、IL-1β 発現量は TRPV4 の活性化剤である GSK1016790A の 濃度依存的に減少した。また、TRPV4 の阻害剤である HC067047 の前処理により、 GSK1016790A の効果は打ち消される傾向がみられた(図 2A)。また、IL-1α、IL-6、TNFα に ついても IL-1β と同様に、GSK1016790A により、発現量が抑制された。しかし、HC067047 によりその抑制効果が打ち消される現象は確認できなかった(図 2B、C、D)。また、その 際の細胞生存率を確認したが、各薬剤処理による細胞死誘導は観察されなかった(図 2E)。 これらの結果から、初代単球において LPS 刺激によって誘導される IL-1β 発現量は、TRPV4 活性化によって抑制されることが示唆され、この効果は細胞毒性により生じた現象ではな いことが示唆された。そこで次に、初代単球由来マクロファージにおける TRPV4 活性化が IL-1β発現に対してどのような影響を及ぼすのかを検討した。

表4 初代単球におけるサイトカイン発現量の多重的検出

 (A, B) 未刺激または 10 pg/ml LPS、1 μg/ml K3CpG、10 μg/ml Pam3CSK、10 μg/ml poly (I:C) と 100 μM GSK1016790A でそれぞれ 6 時間刺激した初代単球のサイトカイン発現量を(A) に示した。また、(A) に示した数値を基に、未刺激サンプルに対するサイトカインレベルの 比率のヒートマップ(B) で示した。OOR>は検出限界以上、OOR<は検出限界以下を意味 する。

Α.		ctrl		LPS		K3CpG		Pam3CSK		poly(I:C)	
	pg/ml	-	GSK1016 790A	-	GSK1016 790A	-	GSK1016 790A	-	GSK1016 790A	-	GSK1016 790A
	E-Selectin	4202.5	3508.33	5762.08	4786.47	3508.33	4202.5	9287.71	6484.43	8395.03	6484.43
	GM-CSF	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	4360.36	3894.93	6290.78	6752.32
	IFN-α	3.55	1.54	7.03	3.67	3.67	2.74	17.83	5.42	14.13	6.91
	IFN-γ	2.62	1.51	13.11	4.83	OOR <	3.17	44.61	14.77	39.08	20.84
	IL-1α	61.29	54.88	107.61	93.66	48.14	56.46	223.05	159.14	314.3	192.98
	IL-1β	22.71	24.18	125.57	105.06	13.41	27.59	1386.44	2999.29	1678.68	2316.91
	IL-10	OOR <	OOR <	120.92	OOR <	OOR <	OOR <	751.88	189.48	790.64	298.96
	IL-12p70	1.76	1.76	5.77	2.44	1.6	1.6	19.45	7.41	14.28	9.03
	IL-13	48.19	56.58	177.01	80.06	48.19	116.09	443.44	177.01	270.37	230.13
	IL-17a	27.32	23.78	34.61	30.27	27.32	27.32	49.86	36.25	46.14	42.45
	IL-4	198.38	100.43	242.38	198.38	111.56	149.8	607.31	451.19	663.53	607.31
	IL-6	899.5	669	2307.22	1123.71	853.76	717.92	OOR >	2569.3	OOR >	20623.75
	IL-8	OOR >	OOR >	OOR >	OOR >						
	IP-10	3.82	3.03	6.56	4.38	3.13	3.33	10.27	6.65	10.79	7.22
	MCP-1	98.36	29.09	164.07	39.14	80.8	32.04	547.7	33.81	271.05	34.28
	MIP-1α	385.92	316.56	OOR >	1162.39	324.44	343.9	OOR >	OOR >	OOR >	OOR >
	MIP-1β	4541.63	1056.87	18763.65	6076.39	3394.96	1337.32	153573.6	18807.54	28346000	102350.3
	P-Selectin	10640.49	10973.95	11307.17	13139.17	8543.96	12535.21	12993.34	17401.1	15312.94	16913.92
	sICAM-1	12866.45	8949.84	14910.03	13503.92	7975.86	11630.83	17050.55	17465.78	21127.62	20977.67
	TNF-α	25.23	15.21	54.24	35.96	13.91	21.54	153.22	78.35	462.65	152.72
в		CI	trl	LPS		K3CpG		Pam3CSK		poly(I:C)	
υ.	fold	-	GSK1016 790A		GSK1016 790A	-	GSK1016 790A	-	GSK1016 790A	-	GSK1016 790A
	E-Selectin	1	0.83482	1.371108	1.138958	0.83482	1	2.210044	1.542993	1.997628	1.542993
	GM-CSF	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	-	-	-	-
	IFN-α	1	0.433803	1.980282	1.033803	1.033803	0.771831	5.022535	1.526761	3.980282	1.946479
	IFN-γ	1	0.576336	5.003817	1.843511	OOR <	1.209924	17.02672	5.637405	14.91603	7.954198
	IL-1α	1	0.895415	1.755751	1.528145	0.785446	0.921194	3.639256	2.596508	5.12808	3.148638
	IL-1β	1	1.064729	5.529282	4.626156	0.590489	1.214883	61.04976	132.0691	73.9181	102.0216
	IL-10	OOR <	OOR <	-	OOR <	OOR <	OOR <	-	-	-	-
	IL-12p70	1	1	3.278409	1.386364	0.909091	0.909091	11.05114	4.210227	8.113636	5.130682
	IL-13	1	1.174103	3.673169	1.661341	1	2.409006	9.201909	3.673169	5.6105	4.775472
	IL-17a	1	0.870425	1.266837	1.10798	1	1	1.825037	1.326867	1.688873	1.553807
	IL-4	1	0.506251	1.221797	1	0.562355	0.755116	3.061347	2.274372	3.344742	3.061347
	IL-6	1	0.743747	2.565003	1.249261	0.94915	0.798132	OOR >	2.856365	OOR >	22.92802
	IL-8	OOR >	OOR >	OOR >	OOR >						
	IP-10	1	0.793194	1.717277	1.146597	0.819372	0.871728	2.688482	1.740838	2.824607	1.890052
	MCP-1	1	0.29575	1.668056	0.397926	0.821472	0.325742	5.56832	0.343737	2.755693	0.348516
	MIP-1α	1	0.820274	OOR >	3.011997	0.840692	0.891117	OOR >	OOR >	OOR >	OOR >
	MIP-1β	1	0.232707	4.131479	1.337932	0.74752	0.294458	33.81465	4.141143	6241.371	22.53604
	P-Selectin	1	1.031339	1.062655	1.234828	0.802967	1.178067	1.221122	1.635366	1.43912	1.589581
	sICAM-1	1	0.695595	1.15883	1.049545	0.619896	0.903966	1.325195	1.357467	1.642071	1.630416
	TNF-α	1	0.602854	2.149822	1.425287	0.551328	0.853746	6.072929	3.10543	18.3373	6.053111
						OOR		ct	rl	high O	



図2 初代単球における TRPV4 の活性化は、Th1 サイトカイン発現を抑制する

(A-D) ELISA で測定した初代単球における(A) IL-1 β 、(B) IL-1 α 、(C) IL-6、(D) TNF α の発現 量。初代単球を 30 μ M HC067047 で 30 分前処理した後、10 pg/ml LPS と(A) 1、10、100 μ M GSK1016790A、(B-D) 100 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激した。値は LPS 単独処理群のサイ トカイン発現量に対する比で表した。グラフは中央値を示す。** p < 0.01, # p < 0.05, n.s.; not significant, Steel test, * v.s. LPS, # v.s. LPS+GSK1016790A, n=10 donors. (E) 初代単球を 30 μ M HC067047 で 30 分前処理した後、10 pg/ml LPS と 1、10、100 μ M GSK1016790A で 6 時 間刺激した際の細胞生存率。初代単球は、Acridine Orange/Propidium Iodide Stain (logos 社製、 型番: F23001)を用いて染色し、細胞生存率を計算した。n=1 donor

3.3. マクロファージにおける TRPV4 の機能的発現の確認

はじめに、ヒトマクロファージが TRPV4 を機能的に発現しているか、Ca²⁺イメージング 法により確認した。GM-CSFマクロファージ、M-CSFマクロファージのそれぞれを、0.01、 0.1、0.2、1、2、10、50 μM の GSK1016790A で刺激し、細胞質 Ca²⁺濃度の変化を Ca²⁺蛍光 インジケーターを用いて観察した。用量反応曲線から、GM-CSF および M-CSF マクロファ ージにおける EC₅₀ は、それぞれ 0.66 μM および 0.58 μM であった (図 3A、B)。また、siRNA を導入することで TRPV4 をノックダウンしたマクロファージでは、10 μM GSK1016790A に よる細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が有意に抑制された(図 4A-D)。このことから、GSK1016790A による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は TRPV4 依存的であると考えられた。さらに、TRPV4 の阻害 剤である HC067047 が細胞内 Ca²⁺濃度ヘ与える影響を調べた。GM-CSF および M-CSF マク ロファージ双方において、30 μM HC067047 が GSK1016790A による細胞内 Ca²⁺濃度上昇を 有意に抑制することがわかった(図 5A-D)⁴⁰。 これらのデータは、ヒトマクロファージが 機能的な TRPV4 を発現していることを示唆している。これらの細胞における TRPV4 の生 理機能を検討するために、TRPV4の活性化が LPS によって誘導された IL-1β 発現に与える 影響について解析した。 まずは、 マクロファージにおいて IL-1β を十分に発現できる LPS 濃 度検討を行った。GM-CSF または M-CSF マクロファージを、1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml LPS で 6 時間刺激し、培養上清および細胞溶解液中の IL-1β 量を ELISA 法で 検出した(図 6A、B)。その結果、GM-CSF マクロファージは濃度依存的に IL-18 発現量が 増加した。一方で、M-CSFマクロファージでは 10 pg/ml の低濃度の LPS にも応答し、IL-1β を発現した。これらの結果より、マクロファージは 10 ng/ml LPS で刺激し、サイトカイン発 現を誘導することとした。続いて、細胞を 10 ng/ml LPS と同時に、1 または 10 μM GSK1016790A で6時間共刺激し、培養上清および細胞溶解液中の IL-1β 量を ELISA 法で検 出した(図 6C、D)。その結果、GSK1016790A のいずれの濃度においても、IL-1β 発現量は

LPS 単独刺激時よりも有意に減少した。Ca²⁺イメージングと ELISA 結果の考察を考慮し、 今後の実験は 10 μM GSK1016790A を TRPV4 の活性化に用いることとした。



図 3 細胞内 Ca²⁺濃度を基準としたマクロファージに対する TRPV4 活性化剤 GSK1016790A の 50%効果濃度(EC₅₀)

(A) GM-CSF または(B) M-CSF マクロファージにおける GSK1016790A (0.01, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 50 μ M)の EC₅₀を、細胞質 Ca²⁺濃度の増加を測定することによって算出した。fura-2 を用いて GSK1016790A による細胞内 Ca²⁺濃度上昇を測定した。値は 10 μ M イオノマイシンで処理した時の細胞内 Ca²⁺濃度上昇によって補正した。データは平均値±SEM で示した。50%効果濃度 (EC₅₀)の値は、GM-CSF マクロファージ (n=10-49, 2 donors) は 0.66 μ M、M-CSF マクロファージ (n=6-90, 3 donors) は 0.58 μ M と算出された。



図4 GSK1016790A によるマクロファージ細胞質への Ca²⁺流入は TRPV4 を介する

(A) fura-2を用いて測定した、GM-CSF マクロファージにおける細胞内 Ca²⁺濃度の変化。黒 横線は 10 µM GSK1016790A と 10 µM イオノマイシンを添加した時間を示している。コン トロール (Ctrl、黒丸) および TRPV4 をノックダウンした (TRPV4 KD、白丸) 細胞におけ るトレースをそれぞれ示す。 (B) (A) で得られたデータを平均±SEM で示した。値は 10 µM イオノマイシンで処理した時の細胞内 Ca²⁺濃度上昇によって補正した。Ctrl; n = 52, TRPV4 KD; n=110, 2 donors. (C) fura-2 を用いて測定した M-CSF マクロファージにおける 細胞内 Ca²⁺濃度の変化。コントロール(Ctrl、黒丸)および TRPV4 をノックダウンした(TRPV4 KD、白丸) 細胞におけるトレースをそれぞれ示す。 (D) (C) で得られたデータを平均±SEM で示した。10 µM GSK1016790A による細胞内 Ca²⁺濃度の変化を、10 µM イオノマイシンに よる細胞内 Ca²⁺濃度の変化で補正した。Ctrl; n=29, TRPV4 KD; n=6, 2 donors. ** p < 0.01, および **** p < 0.0001, Mann-Whitney U test.



図5 HC067047はGSK1016790Aによるマクロファージ細胞質へのCa²⁺流入を阻害する (A) GM-CSF マクロファージを 30 µM HC067047 で前処理し、その後 10 µM GSK1016790A で刺激した際の fura-2 を用いて測定した細胞内 Ca²⁺濃度の変化。(B) (A) で示したデータ の平均±SEM。GSK1016790AまたはGSK1016790A + HC067047による細胞内 Ca²⁺濃度の変 化は、10 µM イオノマイシンによる細胞内 Ca²⁺濃度の変化で補正した。n = 57, 1 donor. (C) M-CSF マクロファージを 30 µM HC067047 で前処理し、その後 10 µM GSK1016790A で刺 激した際の fura-2 を用いて測定した細胞内 Ca²⁺濃度の変化。(D) (C) で示したデータの平 均±SEM。GSK1016790AまたはGSK1016790A+HC067047による細胞内 Ca²⁺濃度の変化は、 10 µM イオノマイシンによる細胞内 Ca²⁺濃度の変化で補正した。n = 14, 1 donor, **** p < 0.0001, Mann-Whitney U test



図 6 マクロファージにおける GSK1016790A 刺激は LPS により誘導される IL-1β 発現を 抑制する

(A, B) 1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml LPS で 6 時間刺激した、(A) GM-CSF または (B) M-CSF マクロファージにおける IL-1β の発現量を ELISA 法で測定した。グラフ は中央値を示す。* p < 0.05, Steel test, vs ctrl, n=5 donors. (C, D) (C) GM-CSF または (D) M-CSF マクロファージにおける IL-1β の発現量を ELISA で測定した。細胞を 10 ng/ml LPS と 1 または 10 μ M GSK1016790A で 6 時間共刺激した。値は、LPS 単独刺激時の IL-1β 発現量 に対する比で表した。グラフは中央値を示す。* p < 0.05, Steel test, n=5 donors.

3.4. マクロファージの TRPV4 の活性化は、IL-1β 発現量を減少させる

続いて、TRPV4 の活性化がマクロファージの IL-1β 発現に与える影響について詳細に調 べるため、TRPV4 の阻害剤を用いた ELISA 解析を行った。GM-CSF、M-CSF マクロファー ジのいずれにおいても GSK1016790A を加えることにより、LPS 単時刺激時と比較して有意 に IL-1β 発現量が抑制された (図 7A、B)。また、初代単球での結果と同様にこれらの効果 は 30 μ M HC067047 により打ち消される傾向がみられた。一方で、LPS 刺激時に HC067047 で処理しても IL-1β 発現量は LPS 単独刺激時と変わらなかった (図 7C、D)。高濃度の HC067047 は TRPV4 以外の TRP チャネルも非選択的に阻害することが知られる。そこで、 TRPV4 の他の阻害剤である GSK2193874 を用いて同様の実験を行った (図 7E、F)。その結 果、いずれのマクロファージにおいても 1 μ M GSK2193874 は TRPV4 の活性化による IL-1β 発現抑制効果を打ち消す傾向がみられた。また LPS と GSK2193874 のみを処理しても IL-1β 発現量は LPS 単独刺激時と変わらないことが分かった。また、この際の細胞生存率も確認 した (図 7G、H)。これらの結果より、TRPV4 の活性化はマクロファージにおいて LPS に より誘導される IL-1β 発現を抑制することが強く示唆された。

初代単球における TRPV4 の活性化は、ケモカインや Th2 サイトカインを含む複数のサイ トカイン発現を抑制する傾向がみられた (表 4)。そこで、マクロファージのサイトカイン 発現における TRPV4 の役割を詳細に探るため、抗炎症性 IL-10、ケモカインである IL-8、 Th2 サイトカインである IL-13 について ELISA 法によって定量解析した。IL-10 は、M2 マ クロファージが高発現する抗炎症性サイトカインである。事前に予想された通り、M1 型で ある GM-CSF マクロファージではほとんど検出できなかった (図 8A)。一方で、M2 型であ る M-CSF マクロファージでは、24 時間の 10 ng/ml LPS 刺激により、IL-10 が発現した (図 8B)。また、10 µM GSK1016790A の同時刺激により IL-10 発現量は有意に減少した。しか し、この効果は HC067047、GSK2193847 のいずれの阻害剤によっても打ち消されなかった。 次に、ケモカインである IL-8、Th2 サイトカインである IL-13 の発現についても調べた。IL-

8 の発現量は、TRPV4 の活性化に関わらず LPS 単独刺激時と差がなかった(図 8C、D)。IL-13 は、いずれのマクロファージにおいても LPS 刺激をしても検出できなかった(図 8E、 F)。これらの結果より、マクロファージにおける TRPV4 の活性化は、LPS に誘導される IL-16 を特異的に抑制していると考えられた。

TRPV4 の活性化剤である GSK1016790A は高い特異性を持つが、TRPV4 の阻害剤である HC067047、GSK2193874 は高濃度処理時において他の TRP チャネルにも作用することが知 られている^{45,46}。IL-1β発現を抑制する効果が TRPV4 の活性化によるものであるかを確認す るために、ヒト TRPV4 をターゲットとする siRNA を用いて、マクロファージの TRPV4 を ノックダウンした(図 9A、B)。非ターゲット siRNA を導入した細胞(ctrl)と TRPV4 をノ ックダウンした細胞(TRPV4 KD)を比較すると、どちらのマクロファージにおいても、 TRPV4 KD 細胞では、10 μM GSK1016790A を加えた際の LPS により誘導される IL-1β 発現 量が有意に増加した(図 9C、D)。一方で、LPS 単独刺激時の IL-1β 発現量は変化しなかっ た。TRPV4 KD 細胞でも、IL-1β 産生が抑制される効果がみられたが、ノックダウンしきれ なかった TRPV4 によることが考えられる。また、M-CSF マクロファージが発現する IL-10 についても同様の実験を行った。ctrl 細胞において、未刺激時と LPS+GSK1016790A で刺激 した際の IL-10 発現量に有意差は見られなかった。また、ctrl 細胞と TRPV4 KD 細胞間で LPS+GSK1016790A 刺激時の IL-10 発現量を比較しても、有意な差はなかった(図 9E)。こ れらの結果により、GM-CSF マクロファージ、M-CSF マクロファージのいずれにおいても、 LPS に誘導される IL-1β 発現は TRPV4 の活性化により抑制され、この現象は IL-1β 特異的 であることが示唆された。

ここで TRPV4 は Ca²⁺透過性の高い非選択的陽イオンチャネルである。細胞内 Ca²⁺を BAPTA-AM でキレートすることで、GSK1016790A による IL-1β 発現への影響を検討した。 その結果、マクロファージを Ca²⁺イオンキレーターBAPTA-AM で処理すると、処理しなか ったものと比較し、LPS 単独刺激時の IL-1β の発現が有意に減少した(図 10)。一方で、

GSK1016790A により IL-1β 発現が抑制される傾向は BAPTA-AM 処理に関わらず確認され た。この結果から、IL-1βの発現には、十分な細胞内 Ca²⁺イオン濃度が必要であることが示 唆された。

これらの結果により、ヒト M1 マクロファージ、M2 マクロファージのいずれにおいても、 TRPV4 の活性化は LPS により誘導される IL-1β 発現を抑制することが強く示唆された。


図7 マクロファージにおける TRPV4 の活性化は、IL-1B 発現を抑制する

(A-F) ELISA で測定した GM-CSF または M-CSF マクロファージにおける IL-1 β の発現量。 (A, B) 細胞を 30 μ M HC067047 で 30 分間前処理した後、10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激した。n=10 donors. (C, D) 30 μ M HC067047 で 30 分間前処理した後、10 ng/ml LPS で 6 時間刺激した。n=7 donors. (E, F) 1 μ M GSK2193874 で 30 分間前処理した後、10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激した。n=10 donors. グラフは中央値を示す。 * p < 0.05 および ** p < 0.01, ## p < 0.01, * v.s. LPS, # v.s. LPS+GSK1016790A, n.s.; not significant, Steel test (G, H) (G) GM-CSF マクロファージ、(H) M-CSF マクロファージにおけ る細胞生存率。マクロファージは、30 μ M HC067047 または 1 μ M GSK2193874 で 30 分前処 理した後、10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激した。ReadyProbesTM Cell Viability Imaging Kit (Tharmo Fisher 社製、型番:R37609) で染色し、細胞生存率を計算した。 グラフは平均値±SEM を示す。n=3 donors





ELISA で測定した GM-CSF または M-CSF マクロファージにおける(A, B) IL-10、(C, D) IL-8、(E, F) IL-13 の発現量。30 μ M HC067047 または 1 μ M GSK2193874 のいずれかで細胞を 30 分間前処理した後、10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 24 時間刺激した。グラフは中央 値を示す。* p < 0.05 および ** p < 0.01, n.s.; not significant, Steel test, IL-10, IL-8; n=10 donors, IL-13; n=4 donors.





(A, B) コントロール siRNA および TRPV4 siRNA で処理した(A) GM-CSF マクロファージま たは(B) M-CSF マクロファージにおける TRPV4 mRNA の発現量。RT-qPCR により測定した。 グラフは中央値を示す。** p < 0.01 または*** p < 0.001, Mann-Whitney U test. GM-CSF Mφ: n=6 donors, M-CSF Mφ; n=9 donors. (C, D) コントロール siRNA (ctrl) および TRPV4 siRNA

(TRPV4 KD) で処理した(C) GM-CSF または(D) M-CSF マクロファージにおける IL-1β 発 現量。細胞を 10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 6 時間共刺激し、ELISA 法を用いて検 出した。グラフは中央値を示す。* p < 0.05, ** p < 0.01,*** p < 0.001, **** p < 0.0001, n.s.; not significant, Holm-Sidak's multiple comparisons test, n=10 donors. (E) コントロール siRNA (ctrl) および TRPV4 siRNA (TRPV4 KD) で処理した M-CSF マクロファージにおける IL-10 発現 量。細胞を 10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 24 時間刺激し、ELISA 法を用いて IL-10 を検出した。グラフは中央値を示す。 n=10 donors. グラフは中央値を示す。** p < 0.01,*** p < 0.001, **** p < 0.0001, n.s.; not significant, Holm-Sidak's multiple comparisons test, n=10 donors.



図 10 BAPTA-AM 処理時におけるマクロファージによる IL-1β 発現量

(A) GM-CSF または (B) M-CSF マクロファージにおける IL-1β の発現量を ELISA 法で測 定した。細胞を、2.5 μM BAPTA-AM で 30 分前処理した後、10 ng/ml LPS、10 μM GSK1016790A で6時間共刺激した。値は、LPS 単独刺激時の IL-1β 発現量に対する比で 表した。グラフは中央値を示す。** p < 0.01, Turkey's test, n=5 donors.

<u>3.5. TRPV4 の活性化は、IL-1β の mRNA 発現、および、NLRP3 のタンパク質発</u> 現を抑制する

次に、TRPV4 の活性化がどのようにして IL-1 β の発現を抑制しているのか、そのメカニ ズムを解明するために、RT-qPCR 法を用いて IL-1 β の mRNA 発現量を調べた。その結果、 GM-CSF マクロファージ、M-CSF マクロファージのいずれにおいても、TRPV4 の活性化剤 である GSK1016790A の処理により IL-1 β の mRNA 量は有意に減少した(図 11A、B)。ま た、TRPV4 の阻害剤である HC067047 の前処理は、この効果を打ち消す傾向を示した。さ らに、この効果はマクロファージの前駆細胞であるヒト初代単球においても見られた(図 11C)。これらの結果により、TRPV4 活性化は mRNA 発現の段階で IL-1 β 発現を抑制するこ とが示唆された。

成熟前の IL-1β タンパク質は、NLR ファミリーである pyrin-domain-containing 3 (NLRP3) と Caspase-1 からなるインフラマソームによって切断され、成熟する。そこで、TRPV4 の活 性化が NLRP3 と Pro-Caspase-1 の発現を制御するか、ウェスタンブロット法を用いて検討し た (図 12A)。GM-CSF または M-CSF マクロファージにおいて、NLRP3 の発現量は LPS 単 独刺激時に比べて、GSK1016790A を加えることによって有意に減少した (図 12B、C)。ま た、この効果は HC067047 の前処理により弱まる傾向がみられた。M-CSF マクロファージ における Pro-Caspase-1 は、GSK1016790A 処理により LPS 単独刺激時よりも有意に減少し たが、GM-CSF マクロファージでは減少する傾向は見られたものの、有意差は認められなか った (図 12D、E)。

これらの結果より、TRPV4 の活性化は IL-1β mRNA に加え、NLRP3 のタンパク質発現を 抑制することにより IL-1β の発現を抑制していることが分かった。



図 11 TRPV4 の活性化は、マクロファージと初代単球における IL-1β mRNA の発現を抑 制する

RT-qPCR で測定した(A) GM-CSF または(B) M-CSF マクロファージ、(C) 初代単球における IL-1 β の mRNA 発現レベル。マクロファージは、30 μ M HC067047 で 30 分前処理した後、10 ng/ml LPS および 10 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激した。初代単球は、30 μ M HC067047 で 30 分前処理した後、10 pg/ml LPS および 100 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激した。GAPDH mRNA 発現量で補正し、LPS 単独刺激群の IL-1 β /GAPDH 値に対する比で表した。グラフは 中央値を示す。** p<0.01, # p<0.05 および ## p<0.01, * v.s. LPS, # v.s. LPS+GSK1016790A, n.s.; not significant, Steel test, n=10 donors



図 12 TRPV4 の活性化は、マクロファージにおける NLRP3 の発現を抑制する

(A) GM-CSF または M-CSF マクロファージにおける NLRP3 (110 kDa)、Caspase-1 (48 kDa) および β-Actin (40 kDa) のウェスタンブロット。細胞は 30 µM HC067047 で 30 分前処理後、 10 ng/ml LPS と 10 µM GSK1016790A で 6 時間刺激した。 (B-E) ImageJ を用いて定量化した (A) のバンド強度。値は、β-actin 強度で補正し、LPS 単独群に対する比で表した。グラフ は中央値を示す。* p < 0.05, n.s.; not significant, Steel test, n=5 donors.

3.6. TRPV4 の活性化は NF-κB シグナルを抑制する

IL-Iβと NLRP3 の発現は 転写因子である NF-κB 活性によって制御されており、その活 性は JNK や cAMP-CREB シグナルなどの経路とのクロストークによって厳密に制御され ている ⁴⁷⁻⁴⁹。そこで、TRPV4 の活性化がこれらのシグナル伝達経路、あるいは転写因子を 制御しているかどうかを調べた。まずはヒト TLR4a、MD2、CD14 を恒常発現する HEK293 細胞に TRPV4 を過剰発現させ、NF-κB、NFAT、PU.1、IRF5、AP-1、CREB 活性を調べるた めルシフェラーゼアッセイを行った ^{50,51}。6 つの転写因子のうち、NF-κB、NFAT、PU.1、IRF5 の活性化は、LPS 単独刺激時と比較して、GSK1016790A と LPS の同時刺激時に有意に変化 した(図 13A-F)。特に、NFAT、PU.1、IRF5 活性は GSK1016790A により活性が促進したが (図 13B-D)、反対に NF-κB 活性は有意に抑制された(図 13A)。興味深いことに、予想に 反してすべての転写因子活性は TRPV4 の過剰発現により促進された。これらの結果から、 TRPV4 の活性化は、NFAT、PU.1、IRF5 を活性化する一方で、NF-κB シグナルを抑制するこ とが示唆され、NF-κB シグナルの抑制が IL-Iβ 発現の抑制を引き起こす可能性が考えられ た。さらに、NF-κB、NFAT の活性が、TRPV4 阻害により変化するのかも調べた。LPS 刺激 中に HC067047 を処理すると、LPS 単独刺激と比較して NFAT 活性は低下する傾向にあった が、NF-κB 活性はほとんど変化しなかった(図 14)。

TRPV4 活性化による NF- κ B の転写活性の抑制メカニズムをより詳細に理解するため、 NF- κ B シグナルに関わる因子のトータル発現量およびリン酸化体発現量を、マクロファー ジにおいて時間依存的に調べた。GM-CSF または M-CSF マクロファージを、10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で同時刺激し、I κ Ba と NF- κ B p-65 の総量およびそれらのリン酸化 体のタンパク質発現をウェスタンブロット法で調べた。実験の結果、GM-CSF マクロファー ジと M-CSF マクロファージでは、各因子の発現パターンに違いが観察された。M-CSF マク ロファージでは、I κ Ba と NF- κ B p-65 の発現は LPS 刺激から 15 分後に観察された(図 15A 右図)。一方、GM-CSF マクロファージでは、M-CSF マクロファージと比較して、活性化の

タイミングは遅く、そのピークは 30 分後以降であった(図 15A 左図)。そこで、TRPV4 の 活性化が NF- κ B 経路のどの段階に働き、活性を抑制しているのか統計解析を行った。その 結果、いずれのマクロファージにおいても、GSK1016790A により、LPS 刺激により誘導さ れる I κ B α と p-65 のリン酸化が有意に抑制されることが分かった(図 15B-E)。これらの結 果より、TRPV4 は NF- κ B 経路のリン酸化抑制を引き起こすことにより、NF- κ B 活性を抑制 する可能性が考えられた。

ルシフェラーゼアッセイを用いた解析により、TRPV4の活性化は、NF-κB 経路を抑制す る一方で、JNK-NFAT シグナルを活性化することが示唆された(図 13、15)。NFAT の活性 は、リン酸化と脱リン酸化のバランスによって制御されていることから、TRPV4 がキナー ゼまたはホスファターゼ活性を調節している可能性があると考えた。Zaccor らは、TRPV4 の活性化による Ca²⁺ の流入が、ホスファターゼであるカルシニューリンを活性化すること を報告している³⁴。そこで、カルシニューリンの特異的阻害剤である FK506 を用い、TRPV4 活性化によって誘導される効果を阻害できるかどうか実験した。まずは、ルシフェラーゼア ッセイにより、カルシニューリンの阻害が TRPV4 活性化により誘導される NFAT の活性化 を阻害するかを実験した。その結果、FK506 によるカルシニューリン阻害は、GSK1016790A による NFAT 活性の増加を有意に低下させることが確認された(図 16A)。続いて、マクロ ファージにおいて、カルシニューリンの阻害が、GSK1016790A による IL-1β 発現抑制効果 を打ち消すことができるかを実験した。その結果、FK506、GSK1016790A、LPSの共刺激は、 LPS 単独処理時と比較して IL-18 発現量に有意な差が認められないこと、また、LPS と GSK1016790A の共刺激群と比較し、IL-1β 発現量が有意に増加することが確認された(図 16B、C)。この結果よりカルシニューリンの阻害は TRPV4 活性化による NFAT 活性化と IL-1β発現抑制効果を打ち消すことが分かった。これらの結果より、TRPV4 活性化による Ca²⁺ 流入は、カルシニューリンの活性化を誘導することが示唆された。NF-κB 経路の制御におけ る FK506 の直接的な効果を検討することはできなかったものの、TRPV4-カルシニューリン

経路がいくつかのシグナル伝達経路を制御することで、IL-1β発現を制御している可能性が 示唆された。



図 13 ルシフェラーゼアッセイ法を用いた転写因子活性の測定

(A) NF-кB、(B) NFAT、(C) PU.1、(D) IRF5、(E) AP-1、(F) CREB に応答し NanoLuc ルシフェ ラーゼを発現するベクターを導入した 293/hTLR4-MD2-CD14 細胞の、ルシフェラーゼ活性 を示す。コントロールとして TK プロモーターに応答し firefly ルシフェラーゼを発現するベ クターを導入した。TRPV4 を強制発現させるため、pcDNA3.1-TRPV4 (TRPV4) または空ベ クター (ctrl)を共導入した。遺伝子導入の翌日、1 μ g/ml LPS と 50 μ M GSK1016790A で 24 時間刺激した。数値は firefly 活性に対する各転写因子活性の相対値。グラフは中央値を示 す。* p < 0.05 および ** p < 0.01, n.s.; not significant, Tukey-Kramer test, n=6



図 14 TRPV4 の阻害は、NFAT 活性を阻害するが NF-κB 活性に影響しない

(A) NF- κ B または(B) NFAT に応答し、NanoLuc ルシフェラーゼを発現するベクターを導入した 293/hTLR4-MD2-CD14 細胞における、ルシフェラーゼ活性を示す。コントロールとして TK プロモーターに応答し、firefly ルシフェラーゼを発現するベクターを導入した。TRPV4 を強制発現させるため、pcDNA3.1-TRPV4 (TRPV4) または空ベクター (ctrl)を共導入した。 導入後、1 μ g/ml LPS と 50 μ M HC067047 で 24 時間刺激した。数値は firefly ルシフェラーゼ 活性に対する相対値。グラフは中央値を示す。n=2 donors.





(A) GM-CSF または M-CSF マクロファージにおけるリン酸化および総 I κ B α (39 kDa)、NF- κ B (65 kDa)、および β -Actin (40 kDa) 発現量のウェスタンブロット。マクロファージを 10 ng/ml LPS 単独、または 10 ng/ml LPS+10 μ M GSK1016790A で 15 分、30 分、1 時間、6 時間、24 時間刺激した。 (B-E) ImageJ ソフトウェアで定量した (A) のバンド強度を示す。(B) I κ B α リン酸化率(p/total I κ B α)、(C) NF- κ B リン酸化率(p/total NF- κ B)、(D) 総 I κ B α (I κ B α / β -Actin)、および(E) 総 NF- κ B (NF- κ B/ β -Actin)の各値を示す。各群の値はすべて最大値を 1 とする比で表した。折れ線グラフは平均値±SEM を示す。* p < 0.05, Wilcoxon signed-rank test, one-sided, n=4 donors.



図 16 TRPV4 の活性化はカルシニューリン活性化を介して IL-1β 発現を抑制する

(A) NFAT に応答し NanoLuc ルシフェラーゼを発現するベクターを導入した 293/hTLR4-MD2-CD14 細胞における、ルシフェラーゼ活性を示す。細胞には、コントロールとして TK プロモーターに応答し、firefly ルシフェラーゼを発現するベクターと pcDNA3.1-TRPV4 を 共導入した後、50 μ M GSK1016790A および 1 nM FK506 で 24 時間刺激した。数値は firefly ルシフェラーゼ活性で補正し、GSK1016790A 単独処理群に対する比で表した。棒グラフは 中央値を示す。* p < 0.05 および ** p < 0.01, Tukey-Kramer test, n=4. (**B**, **C**) ELISA 法で測定 した(**B**) GM-CSF または(**C**) M-CSF マクロファージにおける IL-1β 発現量。細胞は、1 nM FK506 で 30 分間前処理した後、10 ng/ml LPS と 10 μ M GSK1016790A で 6 時間共刺激した。 グラフは中央値を示す。* p < 0.05 および ** p < 0.01; Steel test, ## p < 0.01; paired T test (LPS+GSK1016790A v.s. LPS+GSK1016790A+FK506), n.s.; not significant, n=7 donors. 3.7. TRPV4 の活性化は初代単球から M1 マクロファージへの分化を抑制する

TRPV4 は初代単球、マクロファージの両者で発現が確認されており、その発現量はマク ロファージ分化に伴い増加する。初代単球からマクロファージへの分化に TRPV4 が関与し ているのかを調べるために、初代単球を GM-CSF または M-CSF を含む培地中で7日間培養 し、GM-CSF マクロファージ(M1型)または M-CSF マクロファージ(M2型)を分化誘導 した。培養の際、TRPV4活性化剤を同時に加え、分化への影響を調べた。

GM-CSF マクロファージは丸く広がった形態を示し、M-CSF マクロファージは、縦に細 く伸びた細胞に分化した(図17)。TRPV4の活性化剤である GSK1016790A を添加して培養 した細胞では、特に GM-CSF マクロファージにおいて丸く広がっている細胞は減少し、分 化が抑制されていることが示唆された。また、TRPV4の阻害剤である GSK2193874 を同時 添加したところ、GSK1016790A の効果は打ち消されている様子であった。M-CSF マクロフ アージについては目視では違いを判断できなかった。分化マーカー発現量を定量的に解析 するため、マクロファージ分化マーカーである CD11b、CD68 をフローサイトメトリーで調 べた(図 18A、19A)。その結果、GM-CSF マクロファージ分化時に GSK1016790A を加える と、CD11b^{high}集団が有意に減少した。またその効果は、TRPV4の阻害剤である GSK2193874 の同時添加により打ち消された(図 18B)。一方、M-CSF マクロファージにおける CD11bの 発現量は GSK1016790A、GSK2193874 を処理しても変化しなかった(図 18C)。他のマクロ ファージの分化マーカーである CD68 発現量においても同様の傾向が見られた。すなわち、 GM-CSF マクロファージ分化誘導時においては、GSK1016790A を加えて分化させることに より CD68^{high} 集団は有意に減少し、GSK2193874 により打ち消された(図 19B)。一方で、 M-CSF マクロファージ分化誘導時では CD68 発現量は変化しなかった(図 19C)。なお、フ ローサイトメトリーのゲートストラテジーは図20に示している。

さらに、M1 マクロファージのマーカーである iNOS、M2 マクロファージのマーカーであ る Arginase-1、CD14 の TRPV4 の活性化による発現量の変化をウェスタンブロット法で調べ

た (図 21A)。 GM-CSF マクロファージに発現している iNOS は、GSK1016790A 刺激によ り減少した (図 21B)。一方で、M-CSF マクロファージに発現している iNOS は、 GSK1016790A 刺激をしても変化しなかった。さらに、Arginase-1、CD14 は、GSK1016790A 刺激を行っても特徴的な変化は見られなかった (図 21C、D)。

以上の結果により、TRPV4 の活性化は、M1 型である GM-CSF マクロファージへの分化 を抑制するが、M2 型である M-CSF マクロファージへの分化には影響を与えないことが示 唆された。



図 17 初代単球からマクロファージへの分化誘導時における TRPV4 活性化の影響 初代単球を、GM-CSF または M-CSF マクロファージに分化させる際、10 µM GSK1016790A または 1 µM GSK2193874 で刺激した際の明視野画像。scale bar = 50 µm



図 18 GM-CSF マクロファージ分化における TRPV4 の活性化は、マクロファージマーカーCD11b の発現量を抑制する

初代単球を、GM-CSF または M-CSF マクロファージに分化させる際、10 µM GSK1016790A または 1 µM GSK2193874 で 7 日間刺激した。 (A) フローサイトメトリーにより測定した各 マクロファージにおける CD11b 発現量。 (B) GM-CSF および(C) M-CSF マクロファージに おける CD11b の MFI。MFI は FlowJo ソフトウェアを用いて定量した。棒グラフは中央値を 示す。Steel test, *p<0.05, n.s.; not significant, n=4 donors.



図 19 GM-CSF マクロファージ分化における TRPV4 の活性化は、マクロファージマーカ ーCD68の発現量を抑制する

(A) 初代単球を、GM-CSF または M-CSF マクロファージに分化させる際、10 µM GSK1016790A または1 µM GSK2193874 で刺激し、フローサイトメトリーにより CD68 発 現量を測定した。(B) GM-CSF および(C) M-CSF マクロファージにおける CD68 の MFI。 MFI は FlowJo ソフトウェアを用いて定量した。棒グラフは中央値を示す。Steel test, *p<0.05, n.s.; not significant, n=4

Α.



図 20 フローサイトメトリーのゲーティング戦略

死細胞除去のためのゲーティング戦略を示す。マクロファージを FSC-A および SSC-A で P1 としてゲーティングし、次に細胞を FSC-H および FSC-A で P2 として単一細胞をゲーティ ングした。AmCyan 陰性の集団を P3 としてゲーティングし、CD11b、CD68 の発現を調べ た。



図 21 TRPV4 の活性化は M1 マクロファージの分化を抑制する

(A) GM-CSF または M-CSF マクロファージにおける iNOS (130 kDa)、Arginase-1 (40 kDa)、 CD14 (50 kDa) および β-Actin (40 kDa) のウェスタンブロット。細胞を分化誘導させる際、 7 日間 10 µM GSK1016790A で刺激した。 (B-D) ImageJ を用いて定量化した (A) のバンド 強度。値は、β-actin 強度で補正した。 (B) iNOS については、未刺激 GM-CSF マクロファー ジに対する比で表した。 (C) Arginase-1、(D) CD14 については、未刺激 M-CSF マクロファ ージに対する比で表した。グラフは中央値を示す。* p<0.05, n.s.; not significant, Kruskal-Wallis test, n=4 donors.

3.8. アトピー性皮膚炎では TRPV4 陰性の M1 マクロファージが増加する

ここまでの結果により、TRPV4の活性化がヒトにおいてマクロファージや初代単球の IL-1β 発現を抑制すること、また炎症性 M1 マクロファージへの分化を抑制することから、 TRPV4 が炎症反応を抑制する役割を持つ可能性が示唆された。TRPV4 の生理機能をさらに 考察するため、炎症性皮膚疾患、特にアトビー性皮膚炎(AD)と乾癬のヒト皮膚検体にお ける TRPV4 の発現とマクロファージ分極マーカーとの関係を調べた。TRPV4 mRNA とマ クロファージマーカーを蛍光 in situ hybridization(FISH)と蛍光免疫染色を併用して観察し た。なお、FISH 法のコントロールプローブによる染色画像は図 22 に示した。その結果、マ クロファージは健常皮膚、AD、乾癬のいずれにおいても、表皮ではなく真皮に主に存在す ることが確認され、その数は健常皮膚より AD と乾癬において増加する傾向がみられた(図 23A-C)。また、健常皮膚と AD においては、TRPV4 mRNA を発現しているマクロファージ が観察された。しかし、乾癬においては、表皮では TRPV4 mRNA シグナルが観察されたが、 真皮マクロファージは TRPV4 mRNA をほとんど発現していなかった。

そこで、マクロファージにおける TRPV4 の生理的・病理的機能を調べるために、AD に 着目し、マクロファージ分極と TRPV4 発現の関係を調べた。TRPV4 mRNA を検出するため に FISH 法を用いて蛍光標識した。一方、マクロファージマーカーである CD11b と CD68 は 免疫蛍光染色法を用いて検出した。さらに、マクロファージの特徴を調べるため、M1 マク ロファージマーカーである iNOS、または M2 マクロファージマーカーである arginase-1 で 共染色した。真皮マクロファージにおける M1/M2 の分極の特徴と TRPV4 の発現パターン を調べ、定量的に解析した (図 24、25)。まず、真皮マクロファージの数を定量したところ、 AD では、TRPV4 陰性マクロファージの数が健常皮膚と比較して有意に増加していた (図 24C、25C)。さらに M1/M2 マクロファージマーカーごとに比較したところ、AD では iNOS 陽性かつ TRPV4 陰性マクロファージ数が健常皮膚に比べて有意に増加していた (図 24D、 25D)。一方、Arginase-1 陽性マクロファージにおいては TRPV4 の有無による有意な差は認

められなかった(図 24E、25E)。また、iNOS と Arginase-1、TRPV4 発現パターンの結果は、 CD11b、CD68 いずれのマクロファージマーカーにおいても共通して確認された。これらの 結果から、AD において、健常皮膚と比較し TRPV4 陰性の M1 マクロファージが増加して いることが示唆された。TRPV4 陽性マクロファージにおいては、AD と健常皮膚で有意な差 はなかったことから、マクロファージにおける TRPV4 の減少が AD 発症あるいは疾患の進 行に関与する可能性が考えられた。



図 22 FISH 法のコントロールプローブによる染色画像

健常皮膚をポジティブまたはネガティブプローブ(緑、FISH)で、核を DAPI で染色した蛍 光画像。また、CD11b(白)を免疫蛍光染色法で染色した。点線は表皮と真皮の境界を示し ている。左図の白い破線枠内を右図に拡大して示す。



図 23 炎症性皮膚疾患におけるマクロファージ分布と TRPV4 発現パターン

(A) 健常皮膚、(B) アトピー性皮膚炎、(C) 乾癬由来の皮膚を CD11b(赤)、TRPV4(緑、 FISH)、DAPI を用いて染色した蛍光画像。点線は表皮と真皮の境界を示している。左図の 白い破線枠内を右図に拡大して示す。





図 24 AD 病変部では TRPV4 陰性、iNOS 陽性、CD11b 陽性マクロファージが増加している

(A) 健常皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚における CD11b (白)、TRPV4 (緑、FISH)、iNOS (赤) および DAPI で染色した蛍光画像(scale bar = 50 µm)。点線は表皮と真皮の境界を示してい る。白い破線枠内を拡大して下図に示した(scale bar = 10 µm)。(B) 健常皮膚とアトピー性 皮膚炎皮膚における CD11b (赤)、TRPV4 (緑、FISH)、Arginase-1 (白)、DAPI で染色した 蛍光画像(scale bar = 50 µm)。点線は表皮と真皮の境界を示している。白い破線枠内を拡大 して下図に示した(scale bar = 10 µm)。(C) 健常皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚における真 皮 CD11b 陽性マクロファージ数。TRPV4 陽性または TRPV4 陰性集団において比較した。 Mann-Whitney U test, *p<0.05, healthy; n=5 donors, AD; n=5 donors. (D) TRPV4 陽性または陰性、 iNOS 陽性または陰性の各特徴を持つ CD11b 陽性マクロファージの数。(E) TRPV4 陽性ま たは陰性、Arginase-1 陽性または陰性の各特徴を持つ CD11b 陽性マクロファージの数。* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001, n.s.; not significant, Kruskal-Wallis test, healthy; n=5 donors, AD; n=5 donors.



В.







図 25 AD 病変部では、TRPV4 陰性、iNOS 陽性、CD68 陽性マクロファージが増加して いる

(A) 健常皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚における CD68 (白)、TRPV4 (緑、FISH)、iNOS (赤) および DAPI で染色した蛍光画像 (scale bar = 50 µm)。点線は表皮と真皮の境界を示してい る。白い破線枠内を拡大して下図に示した (scale bar = 10 µm)。 (B) 健常皮膚とアトピー性 皮膚炎皮膚における CD68 (白)、TRPV4 (緑、FISH)、Arginase-1 (赤)、DAPI で染色した 蛍光画像 (scale bar = 50 µm)。点線は表皮と真皮の境界を示している。白い破線枠内を拡大 して下図に示した (scale bar = 10 µm)。 (C) 健常皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚における真 皮 CD68 陽性マクロファージ数。TRPV4 陽性または TRPV4 陰性集団において比較した。 Mann-Whitney U test, *p<0.05, healthy; n=3 donors, AD; n=3 donors. (D) TRPV4 陽性または陰性、 iNOS 陽性または陰性の各特徴を持つ CD68 陽性マクロファージの数。 (E) TRPV4 陽性また は陰性、Arginase-1 陽性または陰性の各特徴を持つ CD68 陽性マクロファージの数。* p < 0.05, ** p < 0.01, n.s.; not significant, Kruskal-Wallis test, healthy; n=3 donors, AD; n=3 donors.

4. 考察

本研究の結果により、TRPV4 の活性化は、NLRP3 の発現抑制と NF-кВ シグナル経路の抑 制を介してヒト初代単球・マクロファージの IL-1β の発現量を抑制することが明らかとなっ た(図 1-15、26A)。さらに、カルシニューリンの阻害剤である FK506 は、TRPV4 活性化剤 により誘導される NFAT 活性の増加と IL-1β 発現抑制効果を打ち消し、TRPV4 活性化はカ ルシニューリン活性化を介している可能性が示唆された(図 16)。TRPV4-カルシニューリ ン経路は、NFAT 経路を活性化しながらも NF-кB 経路を抑制し、サイトカイン発現を抑制す ることが示唆された。

さらに、初代単球からマクロファージへの分化を誘導する際の TRPV4 の活性化は、M1 型 である GM-CSF マクロファージへの分化を抑制することが示唆された(図 17-21、26B)。 AD 真皮において、健常皮膚と比較し TRPV4 陰性/iNOS 陽性マクロファージ数が有意に増 加しており、ヒト皮膚においても TRPV4 の発現と M1 マクロファージ分化との関連が示唆 された(図 22-25)。これらの結果より、TRPV4 はヒトマクロファージにおいて炎症抑制の 役割を持つ可能性が示された。



図 26 TRPV4 活性化による抗炎症メカニズムイメージ図

(A) TRPV4 活性化による Ca²⁺流入は、カルシニューリンの活性化と NF-κB シグナルの抑制、 NLRP3 発現抑制をそれぞれ誘導し、結果的に IL-1β の発現を抑制する。カルシニューリン がどのようなメカニズムで IL-1β 発現量を制御するのか、また NF-κB シグナルの抑制機構 の詳細は明らかではないものの、TRPV4 による各シグナルの厳密な制御機構の存在が示唆 された。 (B) 初代単球からマクロファージを分化誘導する際の TRPV4 活性化は、炎症性 M1 マクロファージの分化を抑制するが、抗炎症性 M2 マクロファージの分化には影響しな い。

4.1. 炎症性皮膚疾患における本研究の位置づけ

本研究において炎症性サイトカインを誘導するために使用した LPS は、グラム陰性菌の 細胞壁成分であり、TLR4 のリガンドとして働く。TLR4 の活性化は、NF-κB および MAPK シグナル経路を活性化し、炎症性サイトカインの発現を誘導する。皮膚疾患における皮膚微 生物叢の変化は広く観察され⁵²、この変化が疾患の原因である可能性が指摘されている。常 在細菌叢の変化により皮膚免疫系が調節されることはよく知られており、例えば、黄色ブド ウ球菌感染症が AD 症状を悪化させることが報告されている ^{53,54}。Takeuchi らは、TLR4 KO マウスでは、黄色ブドウ球菌膜成分由来のリポタイコ酸(LTA)でマウスを刺激しても、TNFa の発現が WT マウスに比べて有意に減少することを報告しており、黄色ブドウ球菌感染症 が TLR4 シグナルを活性化することが強く示唆されている ⁵⁵。これらの報告から、AD 病変 において TLR4 が活性化されている可能性が考えられる。今回、皮膚に存在する免疫細胞で あるマクロファージにおいて、TRPV4 の活性化は TLR4 シグナルに続くサイトカイン発現 を抑制した。また、AD における TRPV4 の発現とマクロファージの分極バランスの関係が 本研究により見いだされた。今後、生体内の TRPV4 および TLR4 シグナルに関する研究が 進むことで、AD の病態解明や新規治療法の確立につながる可能性がある。

4.2. TRPV4 活性化による NF-κB 経路の抑制メカニズム

本研究では、TRPV4 の活性化により NF-κB 経路タンパク質のリン酸化が抑制されること が示唆されたにも関わらず、TRPV4 の活性化がサイトカイン発現を抑制するメカニズムの 詳細は明らかにできていない。研究結果より、TRPV4 の活性化によってホスファターゼで あるカルシニューリンが活性化され、IL-1β の発現量を制御している可能性が考えられた。 これまでに、TRPV4 による Ca²⁺流入は、ホスファターゼであるカルシニューリンを直接活 性化することが報告されている^{34,56,57}。これらの報告から、カルシニューリン阻害剤である FK506 で処理し、GSK1016790A による TRPV4 活性化の効果が打ち消されるかを解析した。

その結果、FK506 による処理は GSK1016790A の効果を有意に打ち消す効果が見られたが、 その効果は完全ではなく、LPS 単独刺激時の 50%程度までしか回復しなかった (図 16)。ま た、FK506 の濃度を変化させても濃度依存的変化は見られず、いずれも部分的な効果のみが 観察された。これらの結果は、カルシニューリンにより NF-кB 経路が制御されている可能 性を示すと同時に、TRPV4 がサイトカイン発現を抑制する別のシグナル経路の存在を示唆 している。先行研究では、TRPC1 を介した Ca²⁺流入は、NF-кB の発現を増加させるととも に NF-кB 経路の負のフィードバックを引き起こす A20 タンパク質発現を増加させることが 報告されている ⁵⁸。TRPV4 においても、活性化による Ca²⁺流入が NF-кB 経路の負のフィー ドバックを誘導することで、IL-1β などのサイトカイン発現を抑制する経路が存在する可能 性も考えられる。

4.3. TRPV4 の下流でおこる IL-1β 発現制御メカニズム

今回、TRPV4 の活性化によりいくつかのサイトカイン発現が抑制されたが、TRPV4 阻害 剤によりその効果が打ち消されたのは IL-1 β のみで、IL-1 α 、IL-6、TNF α 、IL-10 は回復しな かった(図2、8)。IL-6、TNF α 、IL-10 などと違い⁵⁹、IL-1 β は、成熟に NLRP3 インフラマ ソームを必要としている。このことから、TRPV4 が NLRP3 の制御にも関与し、IL-1 β 発現 をより厳密に制御している可能性が考えられる。また、各転写因子に対して TRPV4 が異な る影響を与える点も考察したい。LPS 刺激時に TRPV4 を GSK1016790A で活性化すると、 NF- κ B 活性は著しく低下したが、NFAT, PU.1, IRF5 活性は上昇した(図13)。これに対し、 LPS 刺激中に HC067047 を処理すると、LPS 単独刺激と比較して NFAT 活性は低下する傾向 にあったが、NF- κ B 活性はほとんど変化しなかった(図14)。このデータから、NFAT の制 御は Ca²⁺濃度変化に対する高い感度を有する可能性が示唆された。このように、LPS 単独 刺激時と、LPS と GSK1016790A、HC067047 同時処理条件下では条件が異なり、細胞内カル シウム濃度と転写因子の厳密なバランスの違いによって、他のサイトカイン発現に影響を 及ぼしている可能性があると考えられる。

TRPV4 の過剰発現は各転写因子の活性を低下させると予想していたが、HEK293/hTLR4-MD2-CD14 細胞では TRPV4 の過剰発現が転写活性を上昇させた(図 13)。TRPV4 を過剰発 現させた細胞では、通常の TRPV4 発現細胞と比較して、細胞内への Ca²⁺イオンの流入がよ り顕著に誘発されるのではないかと考えている。この仮説を確認するために、細胞内カルシ ウムを BAPTA-AM でキレートした影響を調べた。その結果、マクロファージを Ca²⁺イオン キレーターBAPTA-AM で処理すると、処理しないものと比較し、LPS 単独刺激時の IL-16の 発現が有意に減少した(図 10)。さらに、TRPV4 活性化による IL-1β 発現が抑制される効果 はBAPTA-AMで処理しても、処理しなかったものと同様に観察された。これらの結果から、 IL-1βの発現や NF-κBの活性化には、細胞内の Ca²⁺イオンが必要であることが示唆された。 また、TRPV4 活性化による細胞内への Ca²⁺流入が NF-κB 活性抑制を介した IL-1β の発現抑 制に重要であることが示唆された。TLR を介したサイトカイン発現において、Ca²⁺イオンは 様々な役割を持つことが報告されている。サイトカイン発現を促進するチャネルとして、 TRPM7 が挙げられ、LPS に誘導される TLR4 のエンドサイトーシスに不可欠であることが 報告されている ⁶⁰。TRPM7 は、TRPV4 と同じく Ca²⁺透過性の高い非選択的陽イオンチャネ ルだが、温度感受性はなく、酵素キナーゼドメインを持つという特徴がある。この報告では、 マウスマクロファージにおいて、LPS 刺激が TRPM7 を介した Ca²⁺流入を誘導する可能性が 示されている⁶⁰。また、TRPM7の欠損は、TLR4のエンドサイトーシスを抑制し、IL-16や IL-6 の mRNA 発現を抑制したと報告されている ⁶⁰。また、サイトカイン発現を抑制するチ ャネルとして、TRPM8 が挙げられる。TRPM8 はメントールや低温刺激によって活性化さ れ、Ca²⁺流入を引き起こすチャネルである。メントールによる TRPM8 の活性化は、マウス マクロファージにおいて LPS に誘導される TNFα 発現を抑制したとの報告がある ⁶¹。また、 LPS に誘導される IL-10 発現は、メントールによって増加し、TRPM8 の欠損によりこの効

果は見られなくなった。このように、Ca²⁺流入によってサイトカイン発現の調節を起こす例 も報告されている⁶¹。TRPV4 を介した Ca²⁺流入が、どのように IL-1β や NF-κB の制御をし ているか、今後さらなる検討が必要である。

4.4. M1/M2 マクロファージの性質の違い

M1/M2 マクロファージの生理的な詳細な役割の違いは、明らかとなっていない部分が残 されている。健康な皮膚において、真皮に存在するマクロファージは M2 型に分極している と言われている¹⁰ (図 24、25)。今回、これらの先行研究から想定されなかった、いくつか の結果が得られた。まず、M2 型であり抗炎症性と言われる M-CSF マクロファージは、炎 症性であり M1 型に分類される GM-CSF マクロファージと比較して、予想とは異なり NLRP3 を高レベルで発現していた(図12)。また、M-CSF マクロファージでは、GM-CSF マクロフ アージよりも早く NF-κB 成分が活性化される傾向がみられた(図 15)。さらに、M-CSF マ クロファージの方が GM-CSF マクロファージよりも低濃度の LPS に応答することができた (図 6A、B)。これらの結果より、真皮に存在する M2 マクロファージは、M1 マクロファ ージよりも迅速に免疫反応を開始することで、組織の恒常性維持に寄与する役割を持つの ではないかと推察している。一方、GM-CSF マクロファージにおける NLRP3 の発現は M-CSF マクロファージよりも少ないが、IL-1β を含む炎症性サイトカインの発現レベルはほぼ 同じであった(図7、8)。しかし、GM-CSF マクロファージでは抗炎症性サイトカイン IL-10 はほとんど発現されなかった (図 8A、B)。今回のデータだけの考察ではマクロファージ の生理的機能の詳細を議論することは難しいものの、M1マクロファージは抗炎症性の反応 を強く誘導しないため、組織での炎症反応を維持、促進する役割があると推察している。
4.5. TRPV4 の生体内、AD における役割の可能性

温度感受性 TRP チャネルの、至適温度での活性化状態には未解明な部分が残っている。 至適温度においてもリガンドや低張状態、アゴニストの効果が発揮されることから、これら のチャネルの至適温度での活性化は部分的であると考えられている⁶²。従って、TRPV4 は リガンドやアゴニストがない状態では生理的温度で十分に活性化されないと仮定した。図 9C、D の結果、37[°]Cで培養した LPS+GSK1016790A 刺激サンプルでは、Ctrl 細胞より TRPV4 KD 細胞の方が IL-1β 発現量が有意に多く、TRPV4 をノックダウンしたことで TRPV4 活性 化の効果が見られなくなることが示唆された。一方、LPS 単独処理サンプルでは 37[°]Cで細 胞を培養しても Ctrl、TRPV4 KD 細胞の IL-1β 発現量に有意差は見られなかった。前述のよ うに、37[°]Cにおける TRPV4 の活性化は部分的であり、リガンド/アゴニスト無しでは TRPV4 は十分に活性化されず、これが Ctrl 細胞と TRPV4 KD 細胞で LPS 処理サンプルに有意差が ない理由であると推測された。

近年の報告で、気候的な要因と AD の関係が示唆されており、低温・低湿は皮膚バリア機 能障害を引き起こし、皮膚炎のリスクを高めると考えられている ⁶³。しかし、免疫反応、温 度、皮膚疾患との関係はまだ不明である。TRPV4 の内因性リガンドとして、アラキドン酸 のチトクローム P450 代謝物である 5', 6'-エボキシエイコサトリエン酸(EET) が同定されて いる ^{64,65}。マクロファージの機能は、脂肪酸代謝のバランスによって制御されていることを 示唆する報告が多くあり ⁶⁶、エポキシ脂肪酸が抗炎症作用や組織保護作用を持つことも報告 されている ^{67,68}。また、EET の代謝酵素である CYP2J2 はヒト単球やマクロファージに発現 しており ^{69,70}、脂肪酸代謝のバランスと TRPV4 活性の両方を制御している可能性が考えら れる。AD では健常組織に比べ CYP2J2 の発現が低下していることが報告されている⁷¹。さ らに、CYP2J2 の発現が低下することで EET の発現が低くなり、TRPV4 が活性化出来ず、 その結果、AD 患者の皮膚では免疫反応が亢進している可能性が考えられる。AD 以外の皮

71

膚疾患における EET および CYP2J2 の発現量については明らかでないため、今後検討が必要である。

本研究では、ヒト初代単球・マクロファージにおける TRPV4 の活性化は、LPS により誘 導される IL-1β 発現を抑制、炎症性 M1 マクロファージへの分化を抑制することから、TRPV4 がマクロファージの機能を制御し、炎症を抑制する役割を持つ可能性を示した(図 26)。IL-1 ファミリーシグナルの調節異常は、いくつかの皮膚疾患でみられ、乾癬や AD の病態との 関連も報告されている^{15,72,73}。また、AD では、Th2 サイトカインが過剰に産生され、Th1 主 導の反応への移行が妨げられることが分かっている¹⁶。TRPV4 の活性化は、M-CSF マクロ ファージにおける IL-10 発現を抑制したため(図 8B)、Th2 優位の反応を防ぐことができる 可能性が考えられる。さらに AD 真皮では、TRPV4 陰性 M1 マクロファージの数が、ヒト 健常皮膚と比較して有意に増加することが観察された(図 24、25)。今回の研究では、皮膚 における TRPV4 の発現制御機構や、活性化の制御機構を明らかにすることは出来なかった が、TRPV4 の発現の変化がこれらの病態につながる可能性を考えている。今後、サイトカ イン刺激などによる TRPV4 の発現制御に焦点を当てた研究を行い、これらの疾患と TRPV4 の関係をより詳細に探ることで、AD の新規治療薬に繋がる研究に発展することを期待して いる。

謝辞

『「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募』により日本赤十字社近 畿ブロック血液センターから献血血液の提供を受けました。感謝申し上げます。

本研究に際し、日頃よりご丁寧かつ多くのご指導およびご助言を賜りました、大阪大学大 学院薬学研究科 先端化粧品科学分野 藤田郁尚先生、鳥山真奈美先生、加藤寛子先生に心よ り感謝申し上げます。

また、本研究を遂行・考察するうえで多くの知識とご指導をくださった、東京大学医科学 研究所 医薬基盤・健康・栄養研究所 石井健先生、生理学研究所 総合研究大学院大学 富永 真琴先生、名古屋市立大学大学院医学研究科 森田明理先生、中村元樹先生、株式会社マン ダム 岡田文裕 先生に深くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科 先端化粧品科学分野 齋藤香織先 生、高石雅之先生、Defri Rizaldy 先生、山口楓さん、田中未来さんをはじめ、研究室のメン バーの皆様には日頃より種々の議論、ご指導を賜り、精神的にも支えていただきました。謹 んで感謝申し上げます。

学部において御指導賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 元情報・計量薬学分野 高木 達也先生、田雨時先生、一條知昭先生並びに情報・計量薬学研究室の皆様に厚く御礼申し上 げます。

最後に、日頃から温かく見守ってくださり、支えていただきました家族や友人に深く感謝 いたします。

73

引用文献

- 1. Elie Metchnikoff. Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation. (1892).
- Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969 (2008).
- Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686 (2004).
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995 (2013).
- 5. Nakamizo, S. 皮膚とマクロファージ. in 実験医学 vol. 第 36 巻 14 号 2320-2325 (羊土社, 2018).
- Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449 (2016).
- Tamoutounour, S. *et al.* Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 39, 925–938 (2013).
- Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5, (2014).

- Willenborg, S. *et al.* CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* 120, 613–625 (2012).
- Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5, (2014).
- Natsuaki, Y. *et al.* Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat. Immunol.* 15, 1064–1069 (2014).
- Egawa, M. *et al.* Inflammatory Monocytes Recruited to Allergic Skin Acquire an Antiinflammatory M2 Phenotype via Basophil-Derived Interleukin-4. *Immunity* 38, 570–580 (2013).
- Kiekens, R. c. m. *et al.* Heterogeneity within tissue-specific macrophage and dendritic cell populations during cutaneous inflammation in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 145, 957–965 (2001).
- Pastore, S. *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J. Clin. Invest.* **99**, 3009–3017 (1997).
- Martin, P., Goldstein, J. D., Mermoud, L., Diaz-Barreiro, A. & Palmer, G. IL-1 Family Antagonists in Mouse and Human Skin Inflammation. *Front. Immunol.* 12, 695 (2021).
- Ohmen, J. D. *et al.* Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Immunol.* 154, 1956–1963 (1995).

- Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824 (1997).
- Nilius, B. TRP channels in disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Basis Dis.* 1772, 805–812 (2007).
- 19. Yue, L. & Xu, H. TRP channels in health and disease at a glance. J. Cell Sci. 134, jcs258372 (2021).
- Lehen'kyi, V. & Prevarskaya, N. Study of TRP Channels in Cancer Cells. in *TRP Channels* (ed. Zhu, M. X.) (CRC Press/Taylor & Francis, 2011).
- Prevarskaya, N., Zhang, L. & Barritt, G. TRP channels in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA -Mol. Basis Dis.* 1772, 937–946 (2007).
- 22. Tominaga, M. TRP チャネル研究の現在と未来. in 実験医学 vol. 第 32 巻 4 号 504–511 (羊土社, 2014).
- Kido, M. A. & Yoshimoto, R. U. 温度感受性 TRP チャネルと上皮バリア. in 別冊・医学の あゆみ TRP チャネルのすべて 58–65 (医歯薬出版株式会社, 2020).
- Ho, J.-C. & Lee, C.-H. TRP channels in skin: from physiological implications to clinical significances. *BIOPHYSICS* 11, 17–24 (2015).
- Oancea, E. *et al.* TRPM1 Forms Ion Channels Associated with Melanin Content in Melanocytes.
 Sci. Signal. 2, ra21 (2009).

- Devi, S. *et al.* Calcium homeostasis in human melanocytes: role of transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) and its regulation by ultraviolet light. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C679-687 (2009).
- Guo, H., Carlson, J. A. & Slominski, A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp. Dermatol.* 21, 650–654 (2012).
- Liu, B. *et al.* TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis.
 FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 27, 3549–3563 (2013).
- 29. Leuner, K. *et al.* Reduced TRPC Channel Expression in Psoriatic Keratinocytes Is Associated with Impaired Differentiation and Enhanced Proliferation. *PLOS ONE* **6**, e14716 (2011).
- Özcan, S. S., Gürel, G. & Çakır, M. Gene expression profiles of transient receptor potential (TRP) channels in the peripheral blood mononuclear cells of psoriasis patients. *Hum. Exp. Toxicol.* 40, 1234–1240 (2021).
- Qu, Y., Wang, G., Sun, X. & Wang, K. Inhibition of the Warm Temperature–Activated Ca2+-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel Attenuates Atopic Dermatitis. *Mol. Pharmacol.* 96, 393–400 (2019).
- 32. Güler, A. D. et al. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 22, 6408–6414 (2002).

- Takayama, Y., Shibasaki, K., Suzuki, Y., Yamanaka, A. & Tominaga, M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 2238–2248 (2014).
- Zaccor, N. W., Sumner, C. J. & Snyder, S. H. The nonselective cation channel TRPV4 inhibits angiotensin II receptors. J. Biol. Chem. 295, 9986–9997 (2020).
- 35. Sokabe, T., Fukumi-Tominaga, T., Yonemura, S., Mizuno, A. & Tominaga, M. The TRPV4 Channel Contributes to Intercellular Junction Formation in Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 18749–18758 (2010).
- Kida, N. *et al.* Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pflugers Arch.* 463, 715–725 (2012).
- 37. Fu, S. *et al.* Activation of TRPV4 by mechanical, osmotic or pharmaceutical stimulation is antiinflammatory blocking IL-1β mediated articular cartilage matrix destruction. *Osteoarthritis Cartilage* 29, 89–99 (2021).
- Scheraga, R. G., Southern, B. D., Grove, L. M. & Olman, M. A. The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Pulmonary Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 8, (2017).
- Scheraga, R. G. *et al.* TRPV4 Protects the Lung from Bacterial Pneumonia via MAPK Molecular Pathway Switching. *J. Immunol.* 204, 1310–1321 (2020).

- Scheraga, R. G. *et al.* TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. *J. Immunol.* 196, 428–436 (2016).
- Lacey, D. C. *et al.* Defining GM-CSF– and Macrophage-CSF–Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *J. Immunol.* 188, 5752–5765 (2012).
- Fujita, F., Uchida, K., Takaishi, M., Sokabe, T. & Tominaga, M. Ambient Temperature Affects the Temperature Threshold for TRPM8 Activation through Interaction of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Neurosci.* 33, 6154–6159 (2013).
- Takaishi, M., Uchida, K., Fujita, F. & Tominaga, M. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. *J. Physiol. Sci.* 64, 47–57 (2014).
- Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5, 491 (2014).
- 45. Everaerts, W. *et al.* Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19084–19089 (2010).
- 46. Thorneloe, K. S. *et al.* An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Sci. Transl. Med.* **4**, 159ra148 (2012).
- Boaru, S. G. *et al.* NLRP3 inflammasome expression is driven by NF-κB in cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 700–706 (2015).
- 48. Nakano, H. Signaling crosstalk between NF-κB and JNK. Trends Immunol. 25, 402–405 (2004).

- Wen, A. Y., Sakamoto, K. M. & Miller, L. S. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. J. Immunol. 185, 6413–6419 (2010).
- Zheng, M., Ambesi, A. & J. McKeown-Longo, P. Role of TLR4 Receptor Complex in the Regulation of the Innate Immune Response by Fibronectin. *Cells* 9, 216 (2020).
- Takahashi, Y. *et al.* Porphyromonas gingivalis Mfa1 fimbria putatively binds to TLR2 and induces both IL-6 and IL-8 production in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 589, 35–40 (2022).
- 52. Grice, E. A. & Segre, J. A. The skin microbiome. Nat. Rev. Microbiol. 9, 244-253 (2011).
- Kobayashi, T. *et al.* Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity* 42, 756–766 (2015).
- Ogonowska, P., Gilaberte, Y., Barańska-Rybak, W. & Nakonieczna, J. Colonization With Staphylococcus aureus in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown. *Front. Microbiol.* 11, (2021).
- 55. Takeuchi, O. *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443–451 (1999).
- Masuyama, R. *et al.* TRPV4-Mediated Calcium Influx Regulates Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Cell Metab.* 8, 257–265 (2008).

- 57. Zhao, L., Sullivan, M. N., Chase, M., Gonzales, A. L. & Earley, S. Calcineurin/nuclear factor of activated T cells-coupled vanilliod transient receptor potential channel 4 ca2+ sparklets stimulate airway smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50, 1064–1075 (2014).
- 58. Thippegowda, P. B. et al. Ca2+ influx via TRPC channels induces NF-κB-dependent A20 expression to prevent thrombin-induced apoptosis in endothelial cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 298, C656–C664 (2010).
- Schappe, M. S. *et al.* Chanzyme TRPM7 Mediates the Ca2+ Influx Essential for Lipopolysaccharide-Induced Toll-Like Receptor 4 Endocytosis and Macrophage Activation. *Immunity* 48, 59-74.e5 (2018).
- Khalil, M. *et al.* Transient receptor potential melastatin 8 ion channel in macrophages modulates colitis through a balance-shift in TNF-alpha and interleukin-10 production. *Mucosal Immunol.* 9, 1500–1513 (2016).
- Güler, A. D. *et al.* Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. J. Neurosci. 22, 6408–6414 (2002).

- Engebretsen, K. A., Johansen, J. D., Kezic, S., Linneberg, A. & Thyssen, J. P. The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **30**, 223–249 (2016).
- 64. Watanabe, H. *et al.* Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434–438 (2003).
- 65. Berna-Erro, A. *et al.* Structural determinants of 5',6'-epoxyeicosatrienoic acid binding to and activation of TRPV4 channel. *Sci. Rep.* **7**, 10522 (2017).
- 66. Oishi, Y. *et al.* SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* **25**, 412–427 (2017).
- Thomson, S. J., Askari, A. & Bishop-Bailey, D. Anti-Inflammatory Effects of Epoxyeicosatrienoic Acids. *Int. J. Vasc. Med.* 2012, 605101 (2012).
- 68. Li, R. *et al.* CYP2J2 attenuates metabolic dysfunction in diabetic mice by reducing hepatic inflammation via the PPARγ. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **308**, E270–E282 (2014).
- 69. Nakayama, K., Nitto, T., Inoue, T. & Node, K. Expression of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 in human monocytic leukocytes. *Life Sci.* **83**, 339–345 (2008).
- Bystrom, J. *et al.* Endogenous Epoxygenases Are Modulators of Monocyte/Macrophage Activity.
 PLoS ONE 6, e26591 (2011).

- 71. Ewald, D. A. *et al.* Meta-analysis derived atopic dermatitis (MADAD) transcriptome defines a robust AD signature highlighting the involvement of atherosclerosis and lipid metabolism pathways. *BMC Med. Genomics* **8**, 60 (2015).
- 72. Matejuk, A. Skin Immunity. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 66, 45-54 (2018).
- Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation.
 Nat. Rev. Immunol. 14, 289–301 (2014).