

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

目次

要旨	2
1. 背景	4
2. 方法	8
2.1. 単球の単離	8
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	9
2.5. RT-qPCR 法	9
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	20
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-1 β 発現量を減少させる	32
3.5. TRPV4 の活性化は、IL-1 β 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- κ B 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- κ B 経路の抑制メカニズム	67
4.3. TRPV4 の下流でおこる IL-1 β 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	74

要旨

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 チャン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ンネルである。Human protein atlas データベースを用いて免疫細胞における全 TRP チャン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°Cで活性化する Ca^{2+} 透過性の高い非選択的陽イオンチャンネルであり、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-1 β 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- κ B 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⁵。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。M1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-1 β ¹⁵ 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) チャンネルは、表皮の正常な分化に必要な Ca^{2+} 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 チャン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°C 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 チャンネルが発現し、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。

$27\sim 35^{\circ}\text{C}$ で活性化する Ca^{2+} 透過性の高い非選択的陽イオンチャンネルである 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 I³⁴ など他のチャン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 E_2 (PGE_2) 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-1 β 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 チャン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）、10 μg/ml Blasticidin（InvivoGen、型番：ant-bl）、50 μg/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。マイクロームを用いて皮膚の 10 μ m 薄層切片を作製し、続いて 2.13 の作業を行った。

2.5. RT-qPCR 法

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°Cに保存した。

また、IL-1 β 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 μ M、30分前処理した後、IL-1 β 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 μ M または 10 μ M 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°C 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-1 β 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
TRPV4	Fw	5'-CTACGCTTCAGCCCTGGTCTC-3'
	Rv	5'-GCAGTTGGTCTGGTCCTCATTG-3'
18s RNA	Fw	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
	Rv	5'-AGCTGGAATTACCGCGGC-3'
IL-1 β	Fw	5'-CACGATGCACCTGTACGATCA-3'
	Rv	5'-GTTGCTCCATATCCTGTCCCT-3'
GAPDH	Fw	5'-CATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCC-3'
	Rv	5'-CCAGGATGCCCTTGAGGGGGCCCTC-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 μ M 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 μ M GSK1016790A にて 6 時間刺激した。

I κ B α と NF- κ B、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 μ M 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 μ M 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 を超音波により破碎し、さらに 95 $^{\circ}$ 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。西洋ワサビペルオキシダーゼ (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。

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

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 Signaling Technology	#3366	1 : 1000
WB	Anti-Phospho-IκBα (Ser32/36)	Cell Signaling Technology	#9246S	1 : 1000
WB	Anti-IκBα	Santa Cruz Biotechnology	sc-371	1 : 500
WB	Anti-Phospho-NFκB (Ser536)	Cell Signaling Technology	#3036	1 : 1000
WB	Anti-NF-κB	Cell Signaling Technology	#6956	1 : 1000
WB	Anti-β-actin	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616	1 : 1000
WB	Anti-iNOS	Abcam	ab178945	1 : 500
WB	Anti-Arginase-1	Cell Signaling 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 Signaling Technology	#43279	1 : 100
FISH	APC anti-CD11b	BioLegend	301309	1 : 100
FISH	Alexa Fluor 594 anti-iNOS	Santa Cruz Biotechnology	sc-7271	1 : 100
FISH	Anti-CD68	Cell Signaling Technology	#76437	1 : 100
FISH	Anti-Arginase-1	Cell Signaling Technology	#43933	1 : 100

目的	二次抗体	会社	型番	濃度
WB	Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	Biorad	#170-6516	1 : 3000
WB	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Biorad	#170-6515	1 : 3000
WB	Dnk pAb to Goat IgG (HRP)	abcam	ab6885	1 : 3000
FISH	Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody and Alexa Fluor 594	Thermo Fisher	A-11037	1 : 1000
FISH	Goat anti-mouse IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody and Alexa Fluor 594	Thermo Fisher	A-11032	1 : 1000
FISH	Donkey anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody and Alexa Fluor 647	Thermo Fisher	A-31573	1 : 1000

2.7. Bioplex 法

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。

2.8. ELISA 法

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-1 β 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-1 β 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-1 β (R&D、型番：DY201-05)、IL-1 α (R&D、型番：DY200-05)、IL-6 (R&D、型番：DY206-05)、TNF α (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。

2.10. siRNA 導入法

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; GGAAGAAGAUCAUAGAGAAAtt、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 μ M GSK1016790A で 6 時間刺激し 2.8 のように ELISA 法で IL-1 β 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、 5.0×10^4 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 μ M GSK1016790A で 6 時間または 24 時間刺激し、2.8 のように ELISA 法で IL-1 β 、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- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-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 μ g/ml LPS と 50 μ M 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 μ g/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- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-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 μ g/ml LPS と 50 μ M 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'- GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT -3'
	Rv	5'-ACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGA AACAGTTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTTCCTCC-3'
PU.1	Fw	5'- TACTCTTTTCCCCTTTTCCTTTAACT -3'
	Rv	5'- AGTTAAAGGAAAGGGGAAAAGAGTA -3'
AP-1	Fw	5'-TGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGTGACTCAG -3'
	Rv	5'- CTGAGTCACTGACTCACTGAGTCACTGACTCACTGAGTCACTGACTCA -3'
CREB	Fw	5'-GCACCAGACAGTGACGTGAGTCCAGATCCCATGGCCGTCACTACTGTG ACGTCTTTTCAGACACCCCATTTGACGTCAATGGGAGAAC -3'
	Rv	5'- GTTCTCCCATTTGACGTCAATGGGGTGTCTGAAAGACGTACAGTATGACG GCCATGGGATCTGGCAGCTGACGTCACTGTCTGGTGC -3'
IRF5	Fw	5'- GCCTAGCACTAACCGAAACCGAAACCTAA GTGCTA -3'
	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、その後ピ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、サンプルを得た。

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°C 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イ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 チャン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 チャンネルの 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 チャン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 M ϕ)、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 M ϕ)、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

現を確認できた (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。

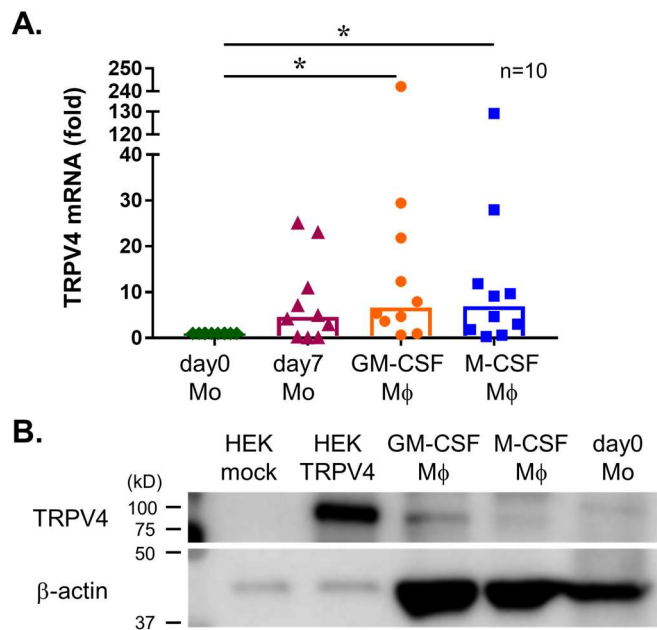


図1 TRPV4 発現の確認

(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 pcDNA3.1-empty (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-1 β 、IL-1 α 、IL-6、TNF α 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-1 β 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-1 α 、IL-6、TNF α についても IL-1 β 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-1 β 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-1 β 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。

A.

pg/ml	ctrl		LPS		K3CpG		Pam3CSK		poly(I:C)	
	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A
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 >	OOR >	OOR >	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

B.

fold	ctrl		LPS		K3CpG		Pam3CSK		poly(I:C)	
	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A	-	GSK1016790A
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 >	OOR >	OOR >	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 < low ctrl high OOR >

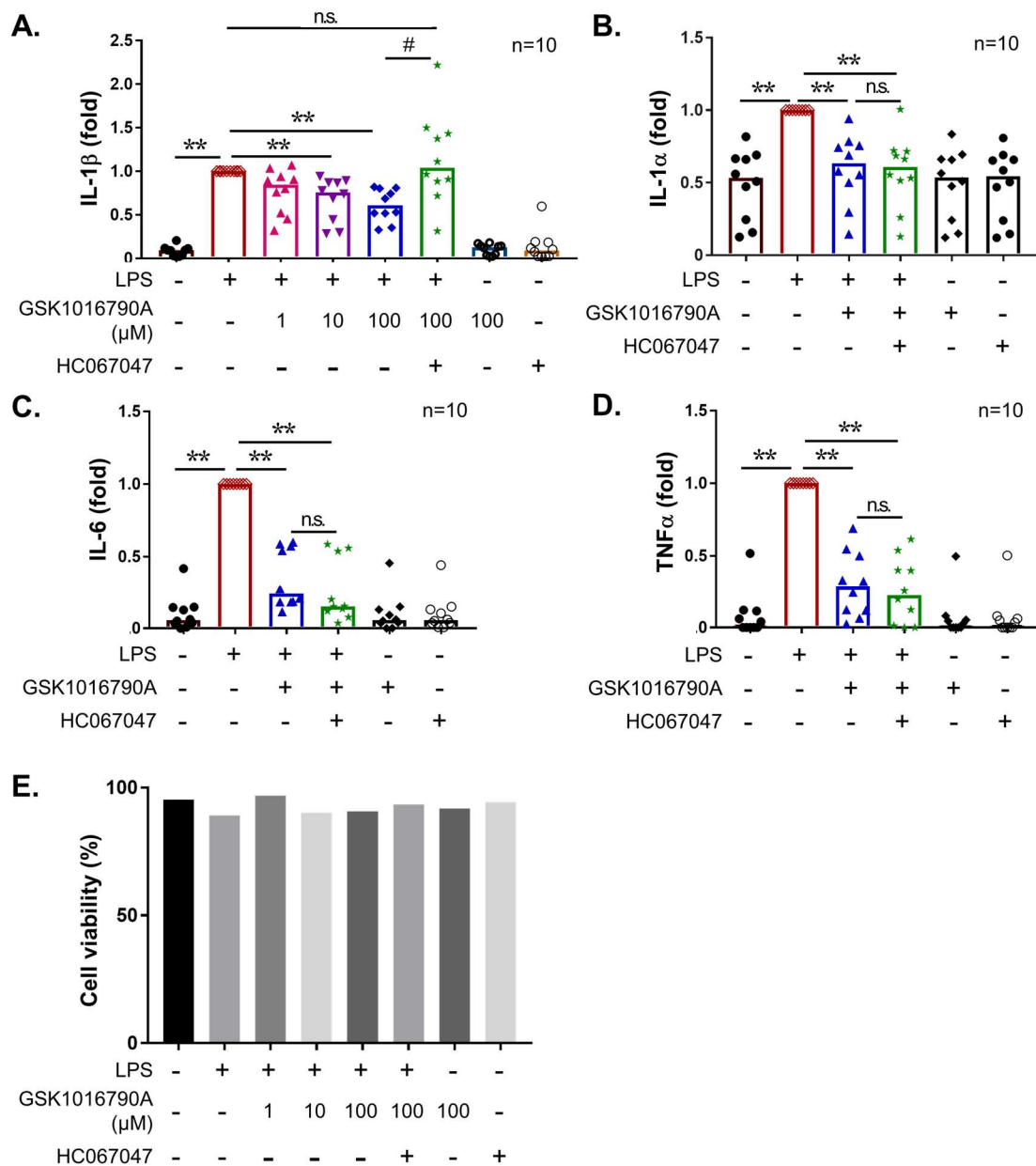


図2 初代単球における TRPV4 の活性化は、Th1 サイトカイン発現を抑制する

(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⁺濃度へ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-1β 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。

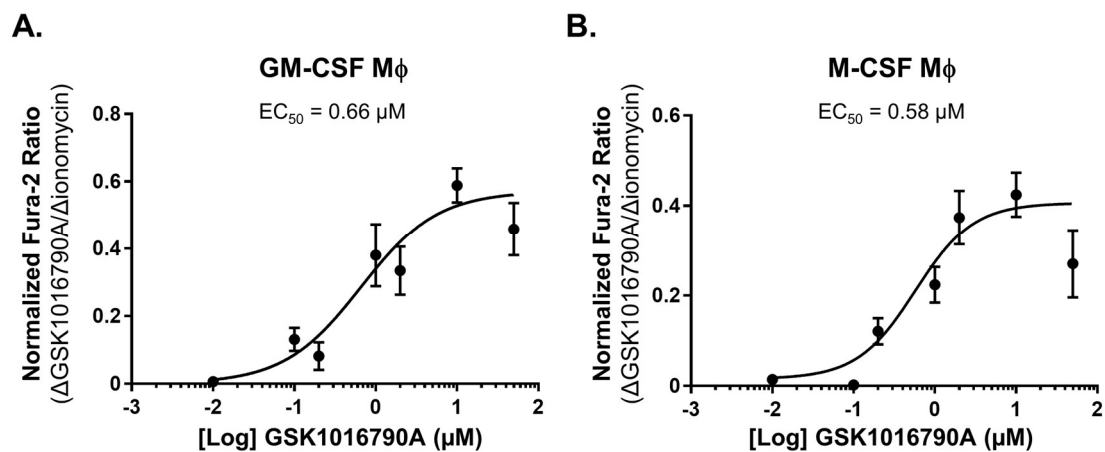


図3 細胞内 Ca^{2+} 濃度を基準としたマクロファージに対する TRPV4 活性化剤 GSK1016790A の 50%効果濃度 (EC_{50})

(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 μM) の EC_{50} を、細胞質 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 濃度上昇を測定した。値は 10 μM イオノマイシンで処理した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって補正した。データは平均値 \pm SEM で示した。50%効果濃度 (EC_{50}) の値は、GM-CSF マクロファージ (n=10-49, 2 donors) は 0.66 μM 、M-CSF マクロファージ (n=6-90, 3 donors) は 0.58 μM と算出された。

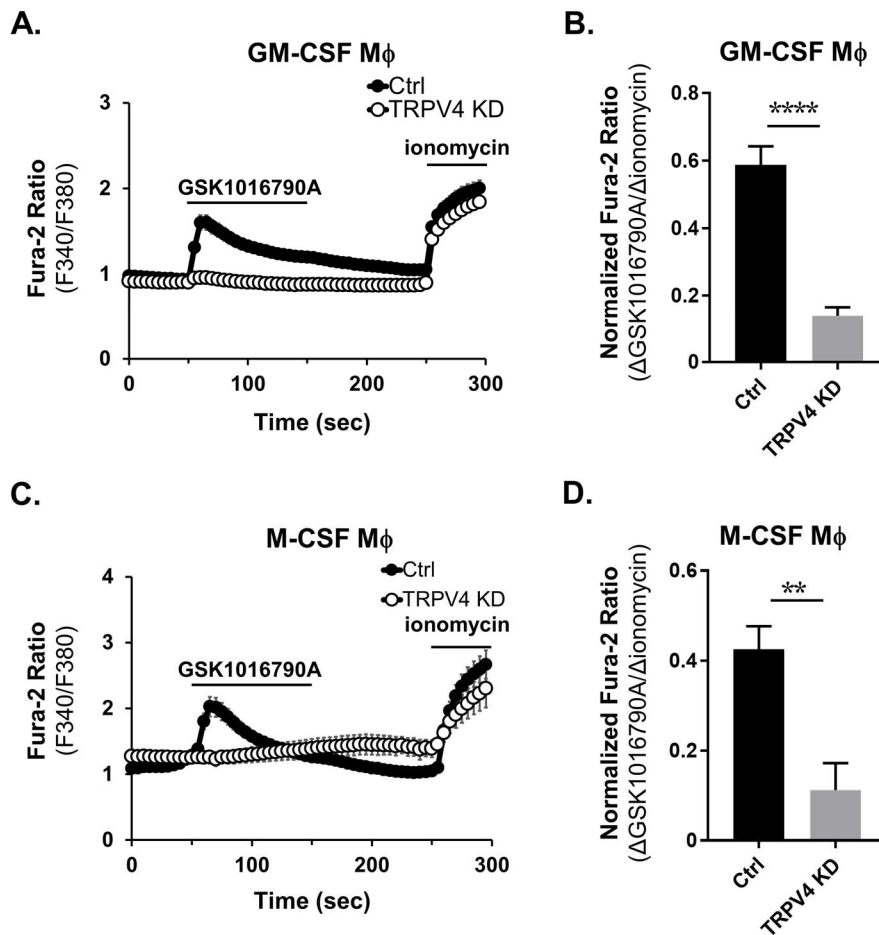


図4 GSK1016790Aによるマクロファージ細胞質へのCa²⁺流入はTRPV4を介する

(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.

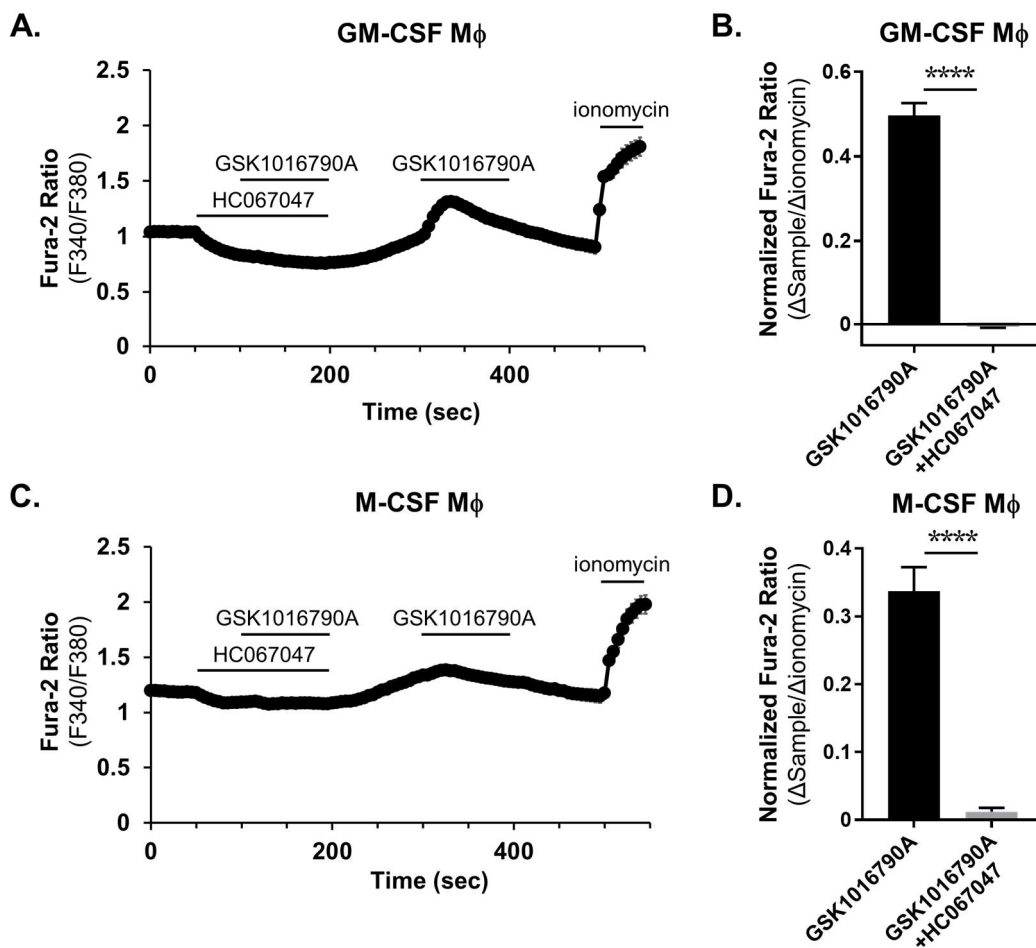


図5 HC067047はGSK1016790Aによるマクロファージ細胞質へのCa²⁺流入を阻害する

(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

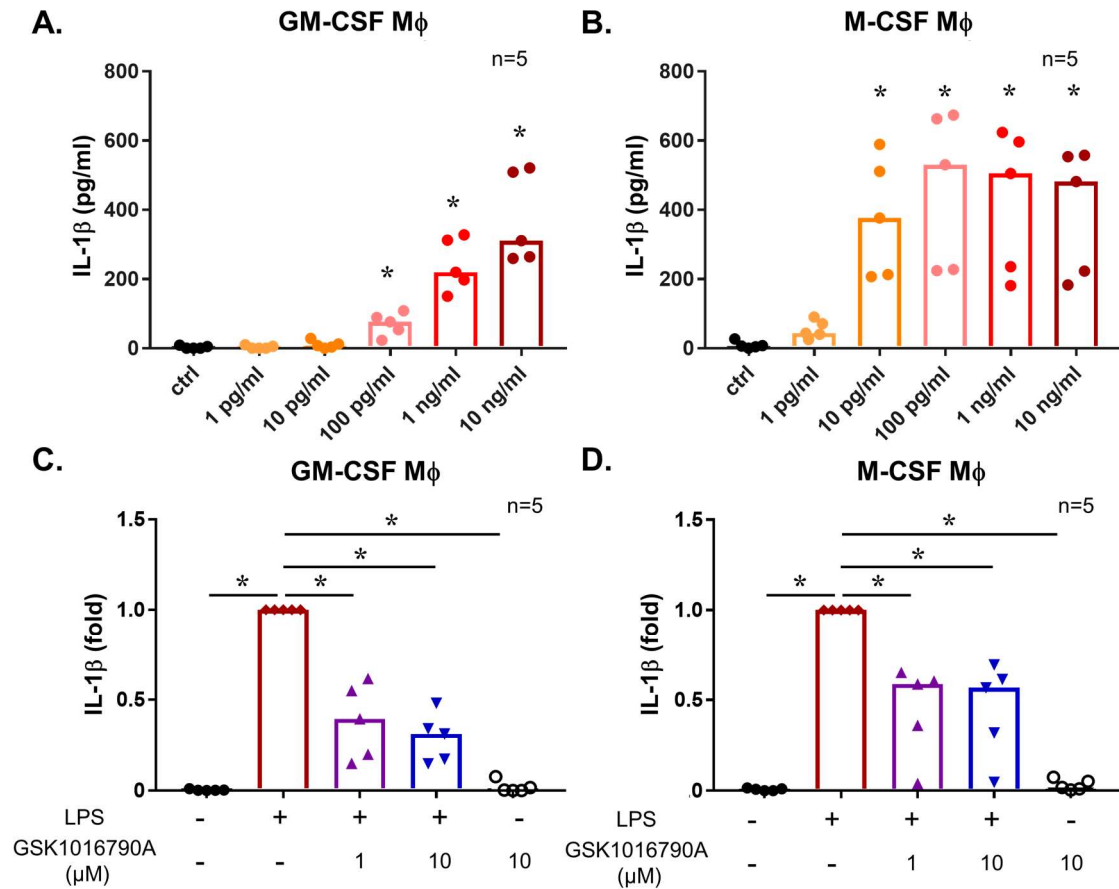


図6 マクロファージにおける GSK1016790A 刺激は LPS により誘導される IL-1 β 発現を抑制する

(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-1 β 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-1 β 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-1 β 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-1 β 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-1 β 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-1 β 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-1 β 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 チャン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-1 β 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-1 β 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-1 β 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 μ M 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、GSK2193874 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-1 β 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-1 β 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 μ M GSK1016790A を加えた際の LPS により誘導される IL-1 β 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-1 β 発現量は変化しなかった。TRPV4 KD 細胞でも、IL-1 β 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-1 β 発現は TRPV4 の活性化により抑制され、この現象は IL-1 β 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-1 β 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-1 β の発現が有意に減少した (図 10)。一方で、

GSK1016790A により IL-1 β 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-1 β 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-1 β 発現を抑制することが強く示唆された。

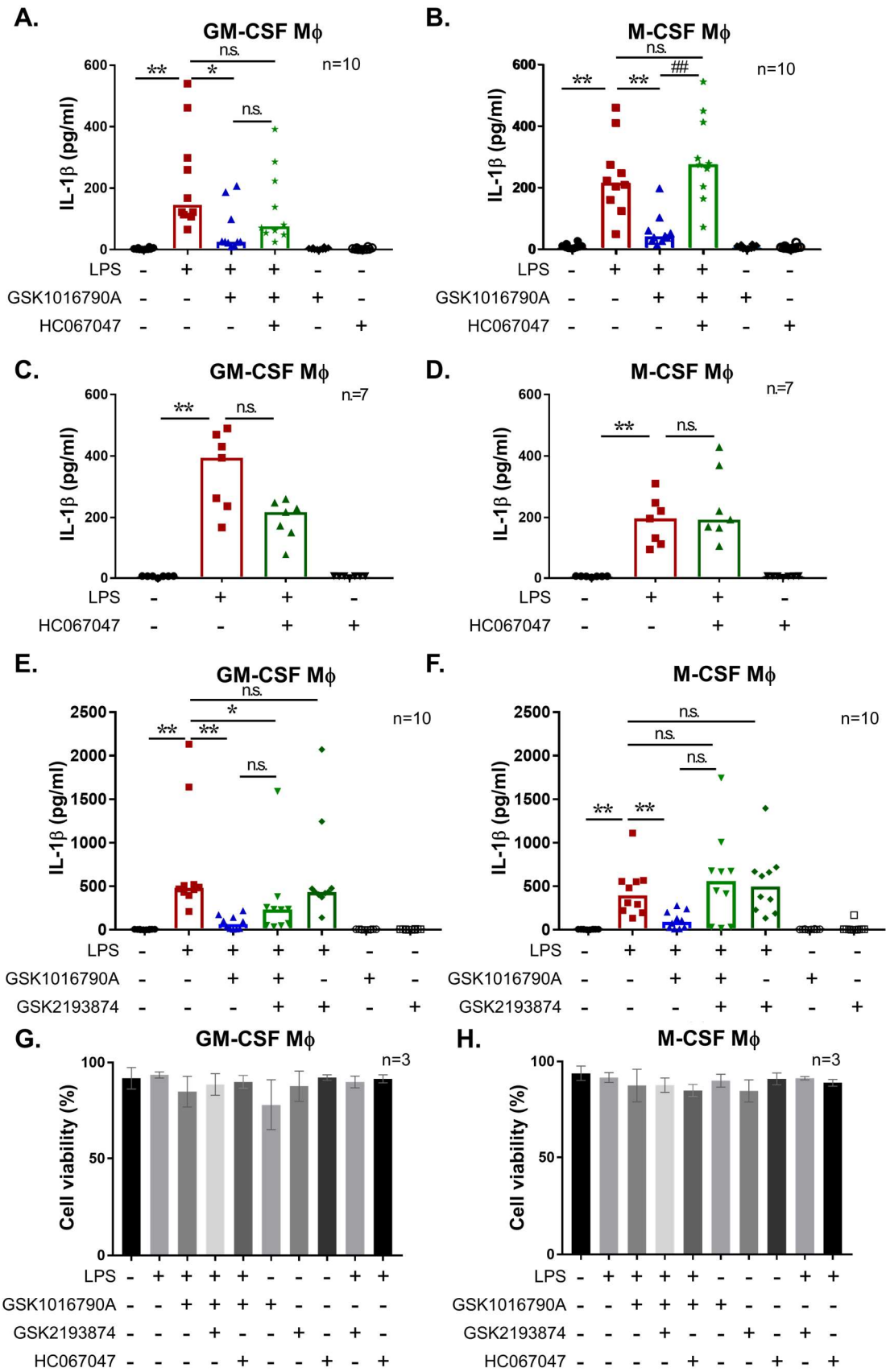


図7 マクロファージにおける TRPV4 の活性化は、IL-1 β 発現を抑制する

(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。ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit (Thermo 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 \pm SEM を示す。n=3 donors

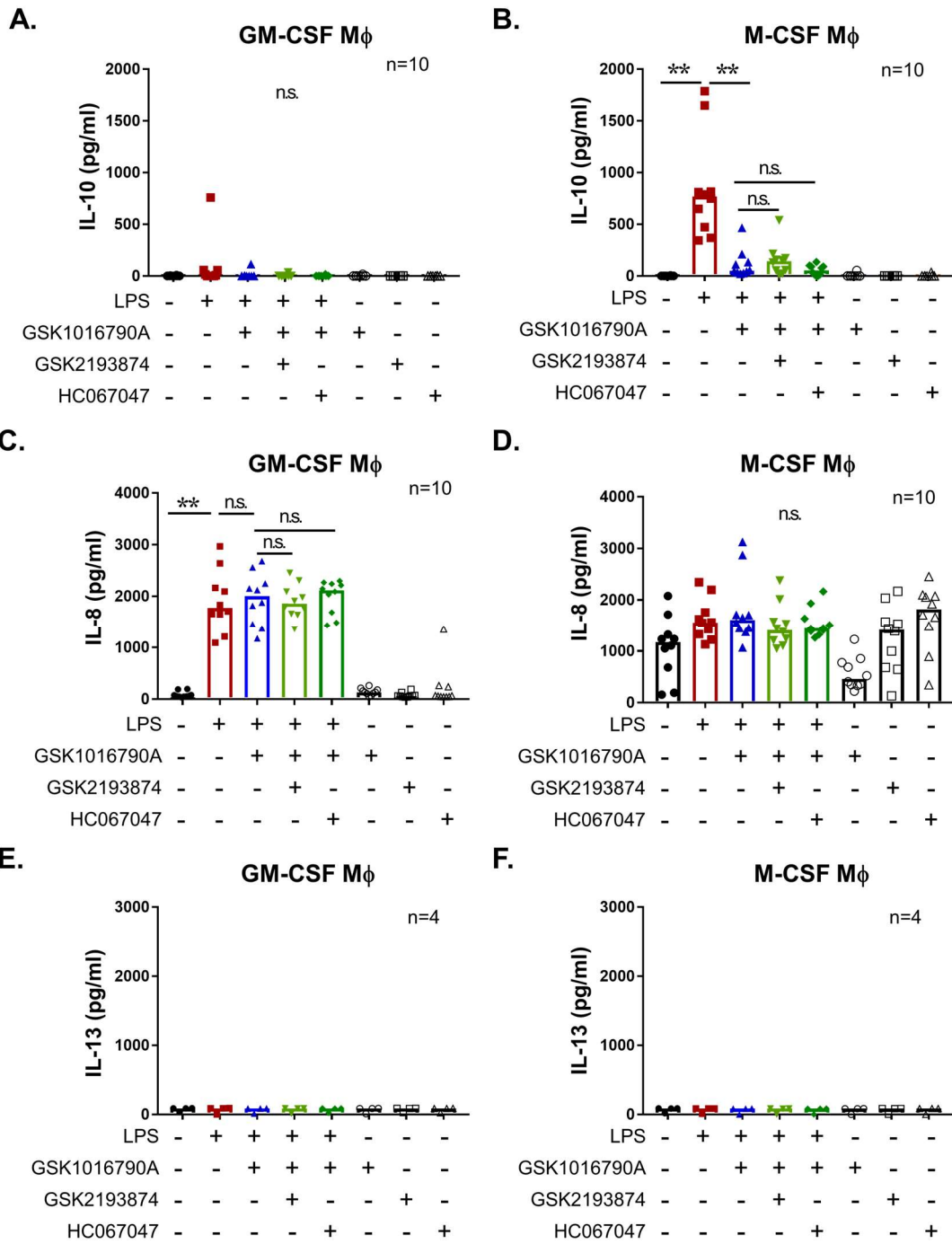


図8 マクロファージにおける TRPV4 の活性化が、サイトカイン発現に与える影響

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.

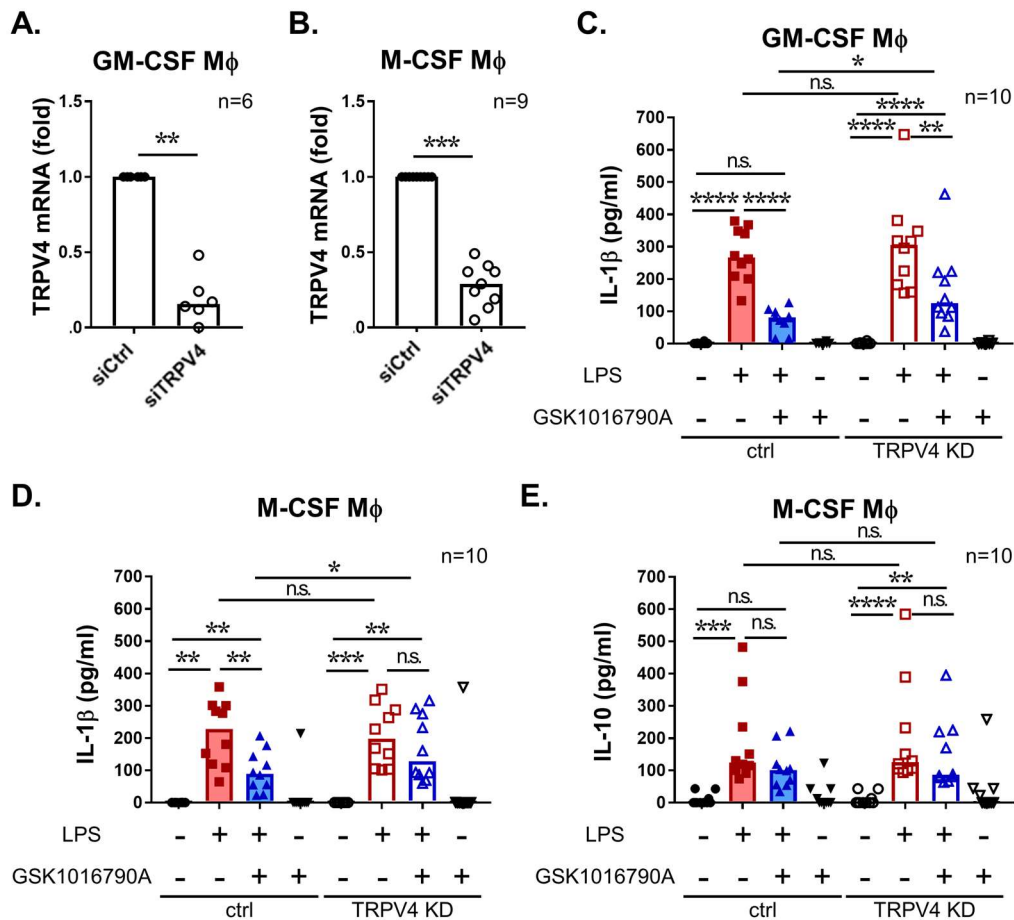


図9 TRPV4 をノックダウンしたマクロファージにおけるサイトカイン発現量

(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 M ϕ : n=6 donors, M-CSF M ϕ ; 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-1 β 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.

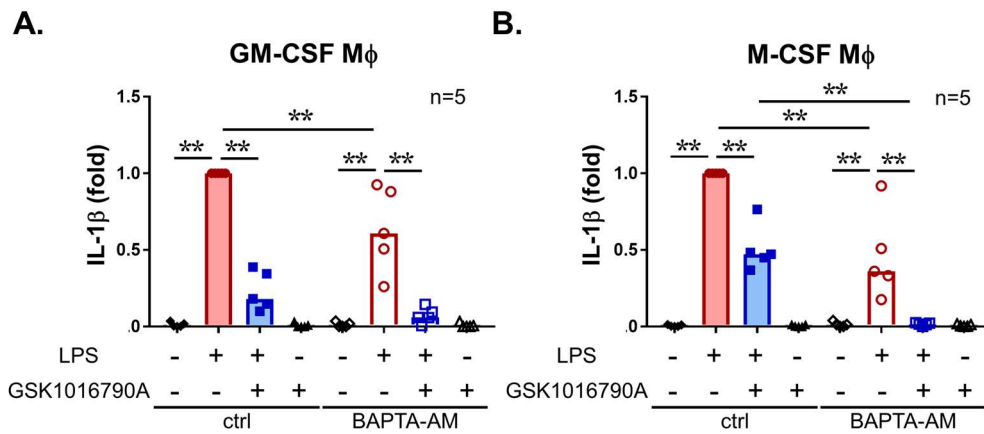


図 10 BAPTA-AM 処理時におけるマクロファージによる IL-1β 発現量

(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.

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

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-1 β 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-1 β mRNA に加え、NLRP3 のタンパク質発現を抑制することにより IL-1 β の発現を抑制していることが分かった。

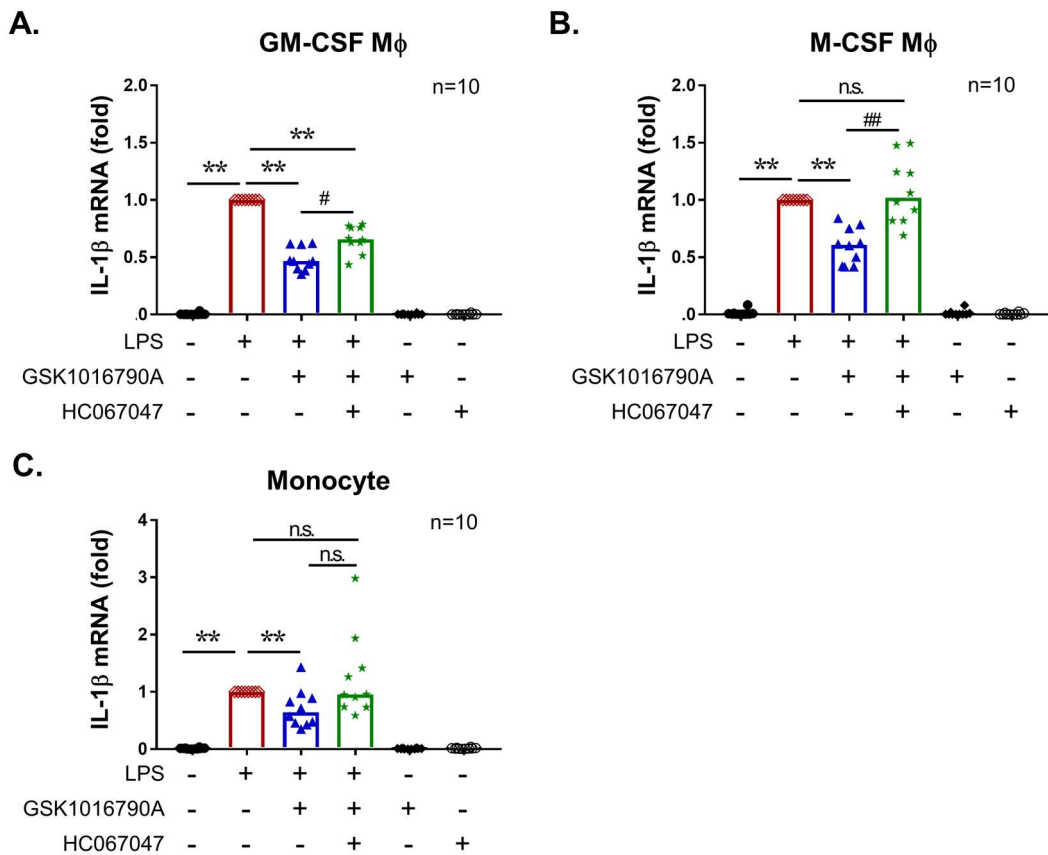


図 11 TRPV4 の活性化は、マクロファージと初代単球における IL-1 β mRNA の発現を抑制する

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

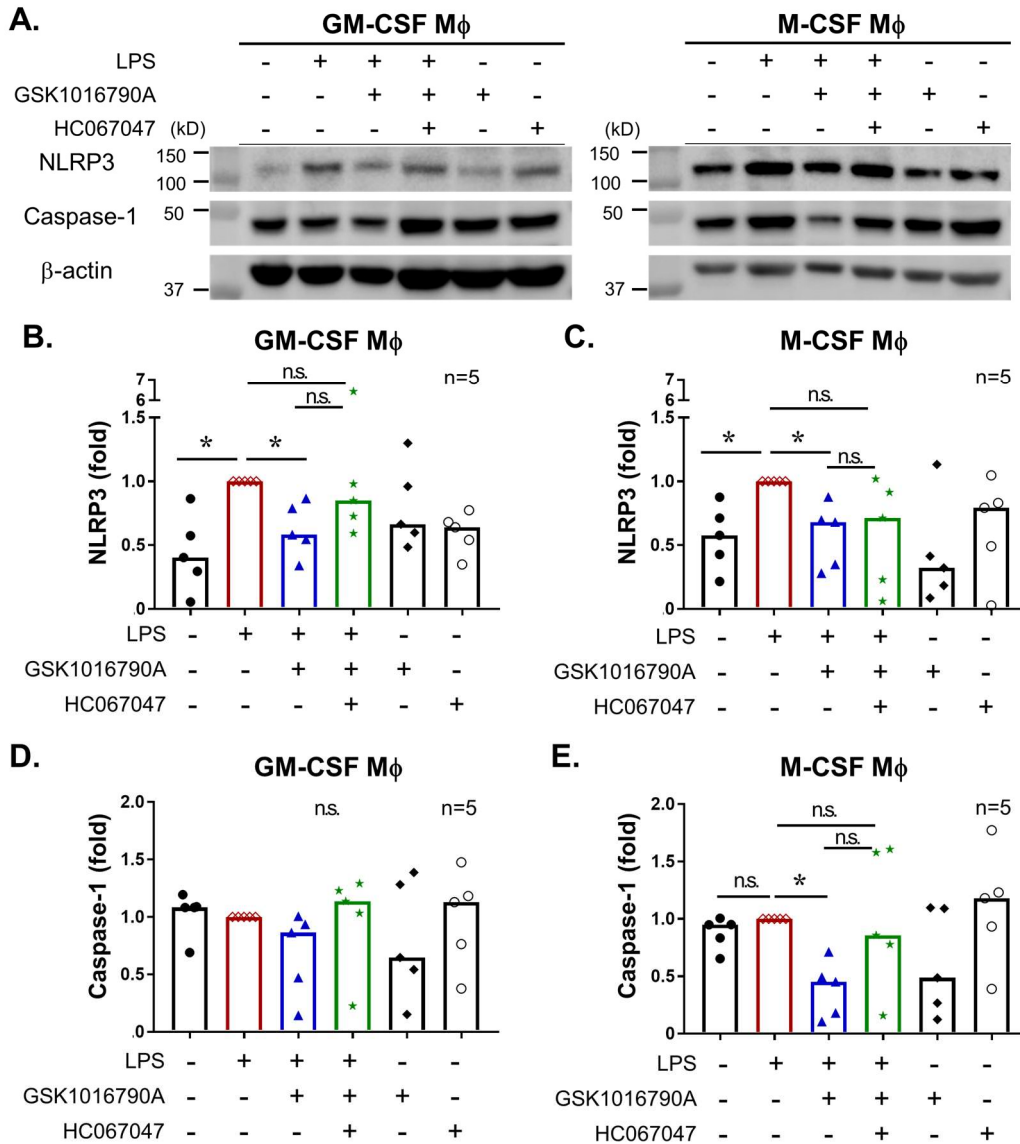


図 12 TRPV4 の活性化は、マクロファージにおける NLRP3 の発現を抑制する

(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 μ M HC067047 で 30 分前処理後、10 ng/ml LPS と 10 μ M 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- κ B シグナルを抑制する

IL-1 β と NLRP3 の発現は 転写因子である NF- κ B 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- κ B、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- κ B、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- κ B 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- κ B シグナルを抑制することが示唆され、NF- κ B シグナルの抑制が IL-1 β 発現の抑制を引き起こす可能性が考えられた。さらに、NF- κ B、NFAT の活性が、TRPV4 阻害により変化するののかも調べた。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- κ B 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 B α 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 B α 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- κ B 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-1 β 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-1 β 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-1 β 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-1 β 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- κ B 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-1 β 発現を制御している可能性が示唆された。

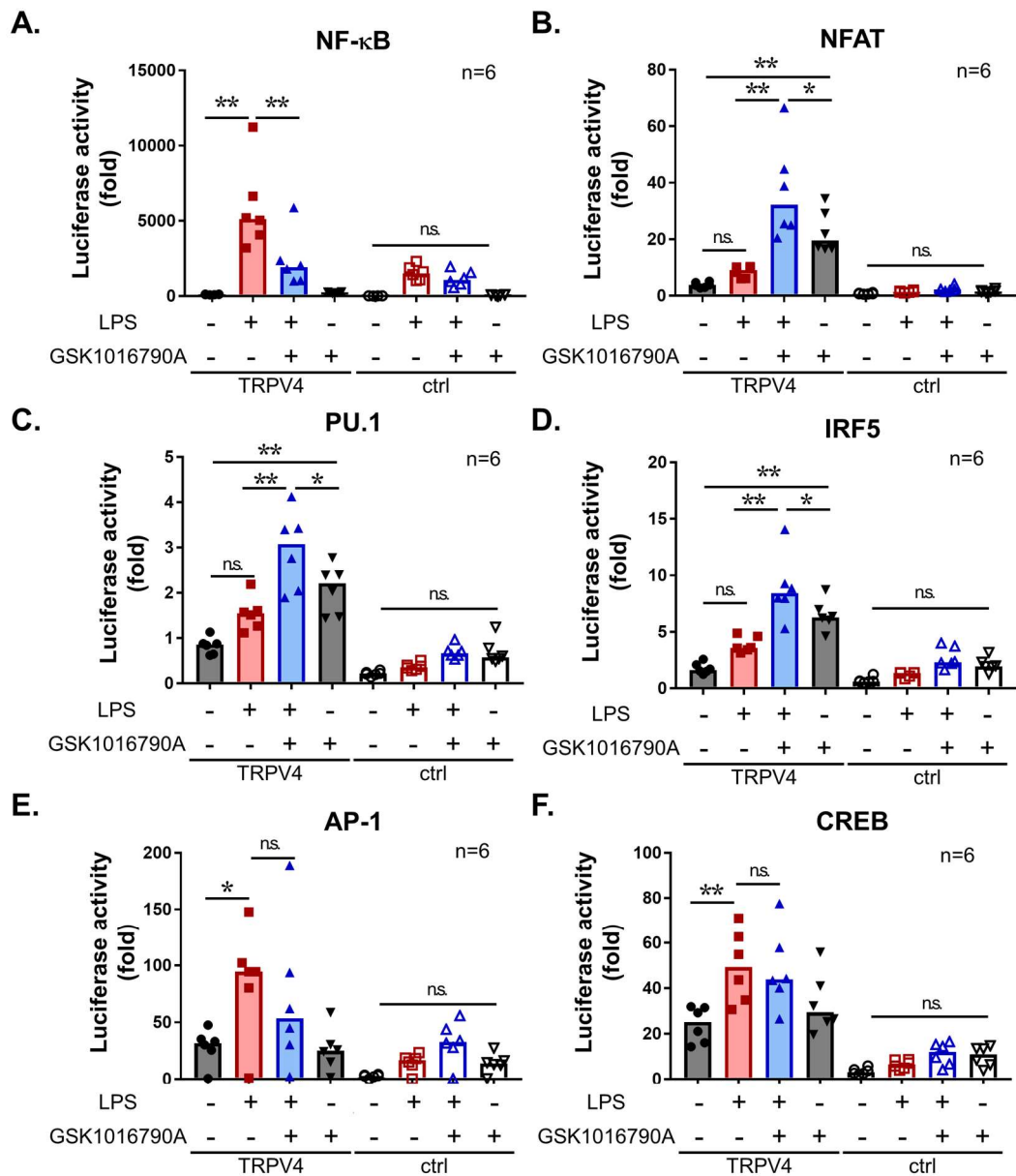


図 13 ルシフェラーゼアッセイ法を用いた転写因子活性の測定

(A)NF-κB、(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 μg/ml LPS と 50 μM 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

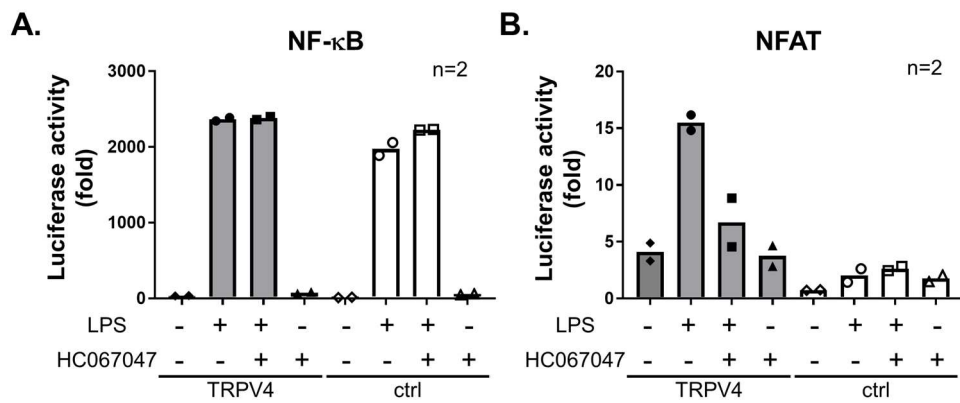


図 14 TRPV4 の阻害は、NFAT 活性を阻害するが NF-κB 活性に影響しない

(A) NF-κB 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 μg/ml LPS と 50 μM 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.

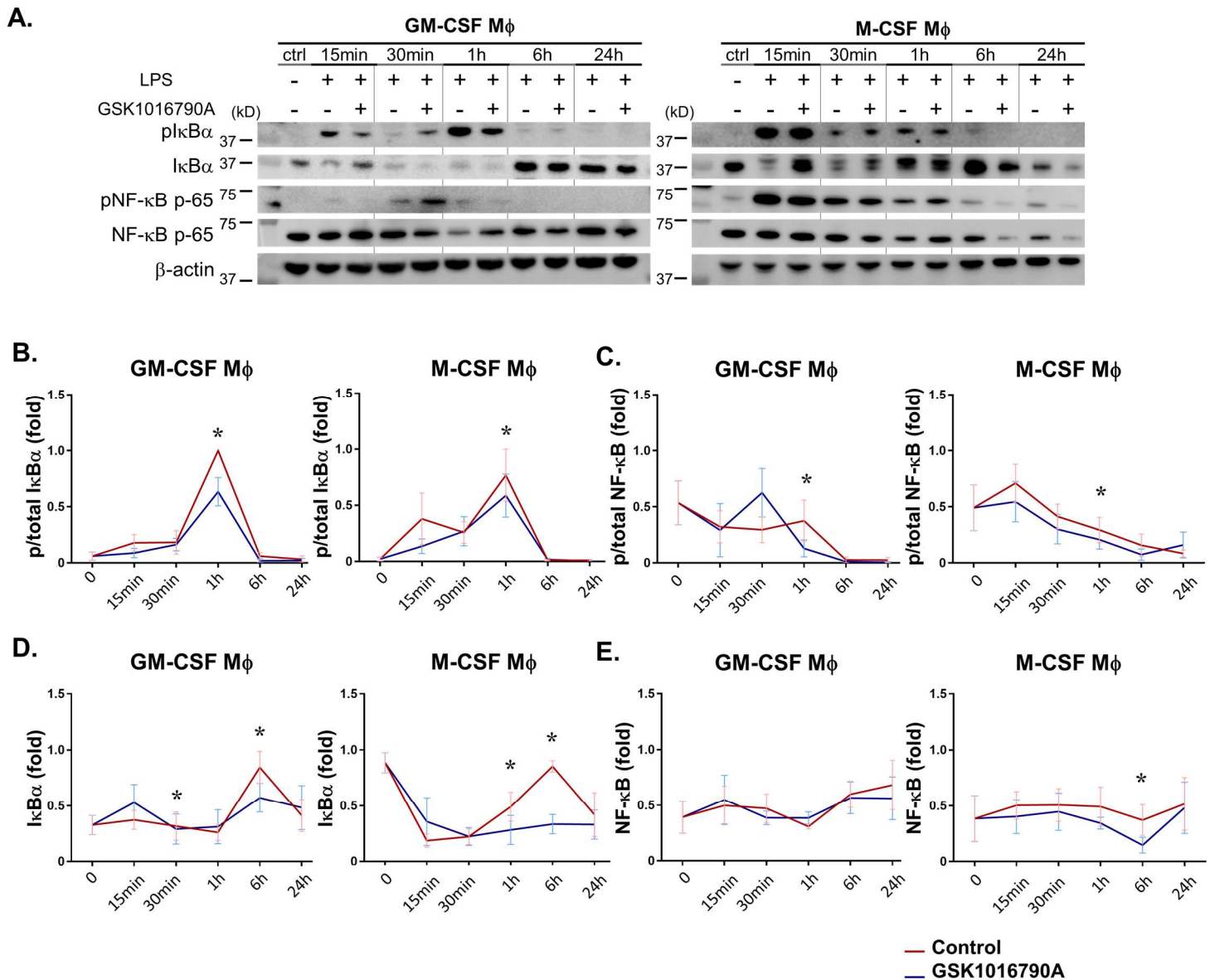


図 15 TRPV4 の活性化はマクロファージにおける $\text{IkB}\alpha$ と $\text{NF-}\kappa\text{B}$ のリン酸化を抑制する

(A) GM-CSF または M-CSF マクロファージにおけるリン酸化および総 $\text{IkB}\alpha$ (39 kDa)、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (65 kDa)、および $\beta\text{-Actin}$ (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 μM 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) $\text{IkB}\alpha$ リン酸化率(p/total $\text{IkB}\alpha$)、(C) $\text{NF-}\kappa\text{B}$ リン酸化率(p/total $\text{NF-}\kappa\text{B}$)、(D) 総 $\text{IkB}\alpha$ ($\text{IkB}\alpha/\beta\text{-Actin}$)、および (E) 総 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ($\text{NF-}\kappa\text{B}/\beta\text{-Actin}$) 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 \pm SEM を示す。* $p < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test, one-sided, $n=4$ donors.

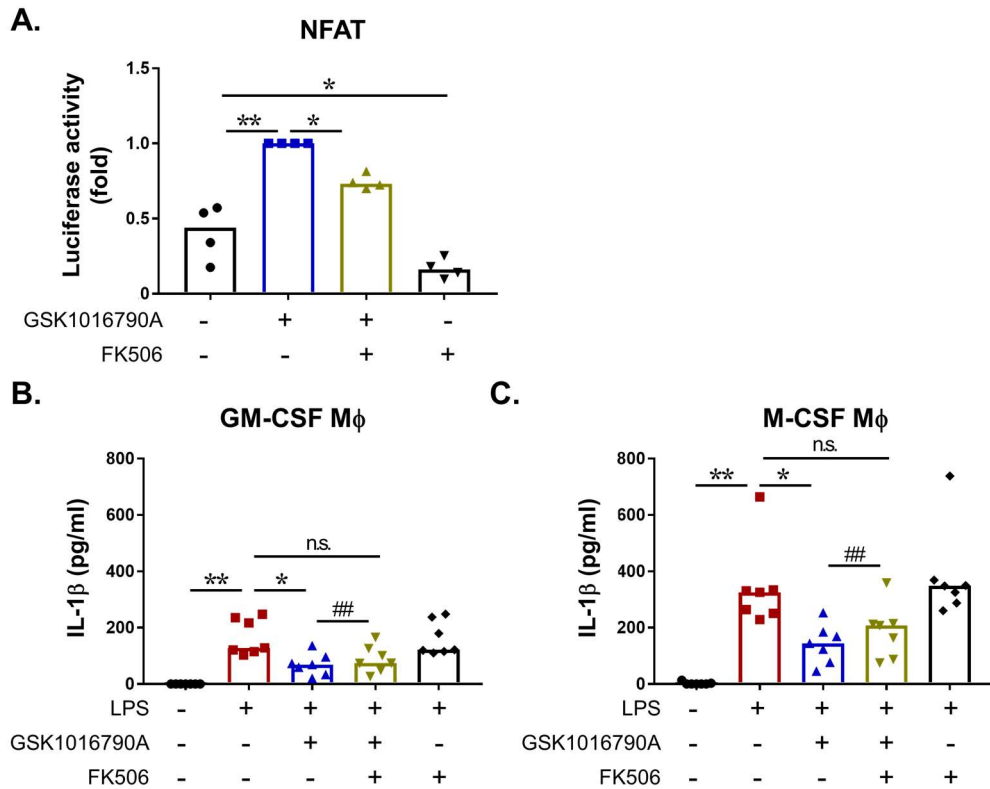


図 16 TRPV4 の活性化はカルシニューリン活性化を介して IL-1 β 発現を抑制する

(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-1 β 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 マクロファ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。

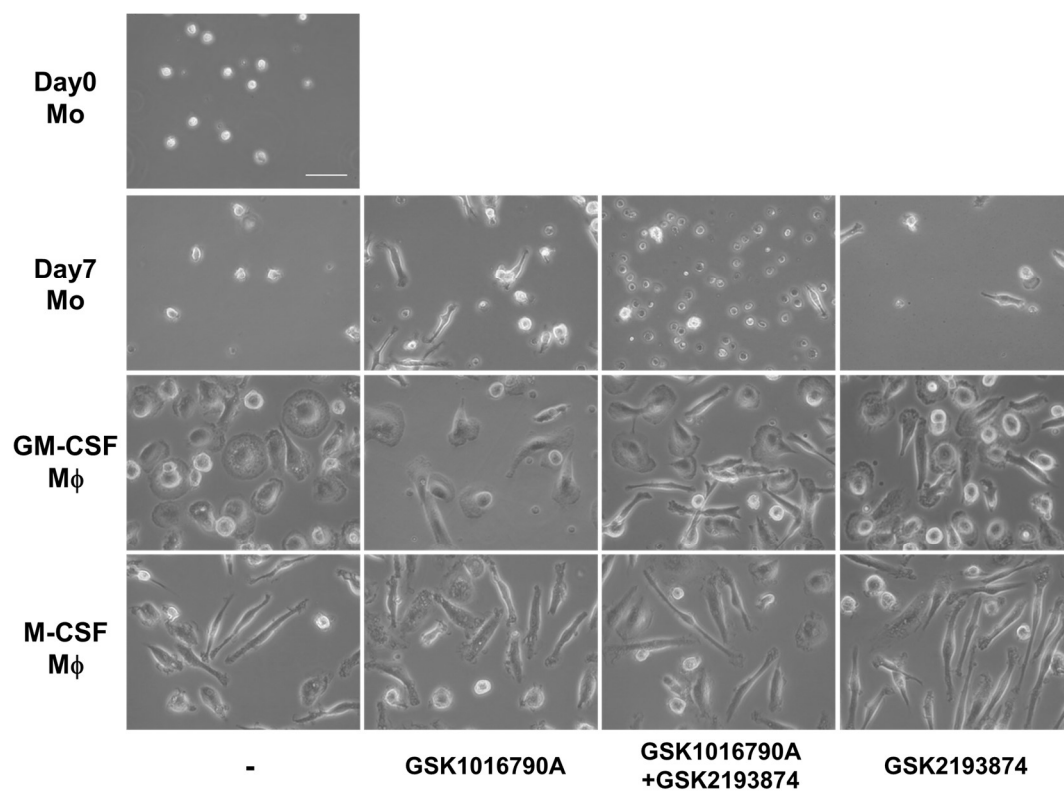


図 17 初代単球からマクロファージへの分化誘導時における TRPV4 活性化の影響

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 μ M GSK1016790A または 1 μ M GSK2193874 で刺激した際の明視野画像。scale bar = 50 μ m

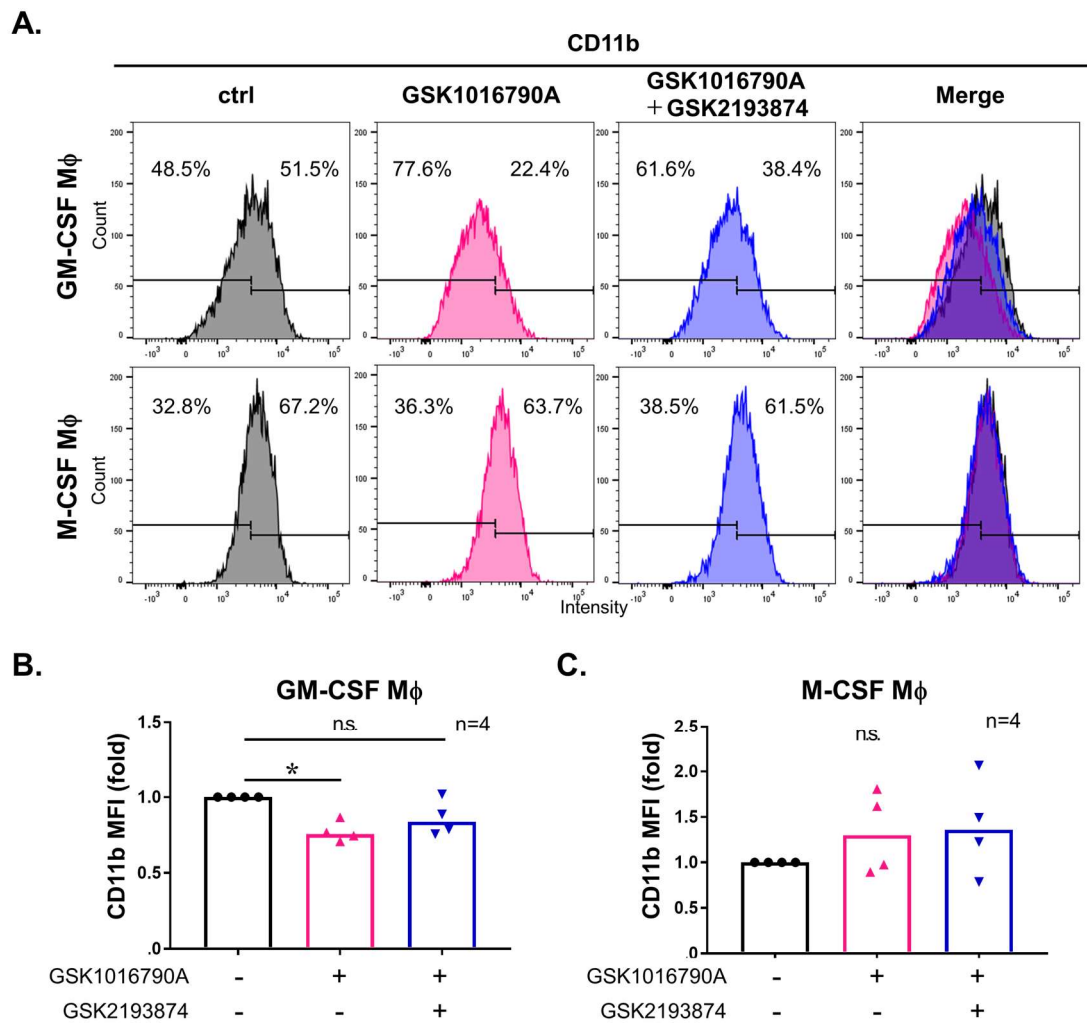


図 18 GM-CSF マクロファージ分化における TRPV4 の活性化は、マクロファージマーカー CD11b の発現量を抑制する

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 μ M GSK1016790A または 1 μ M 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.

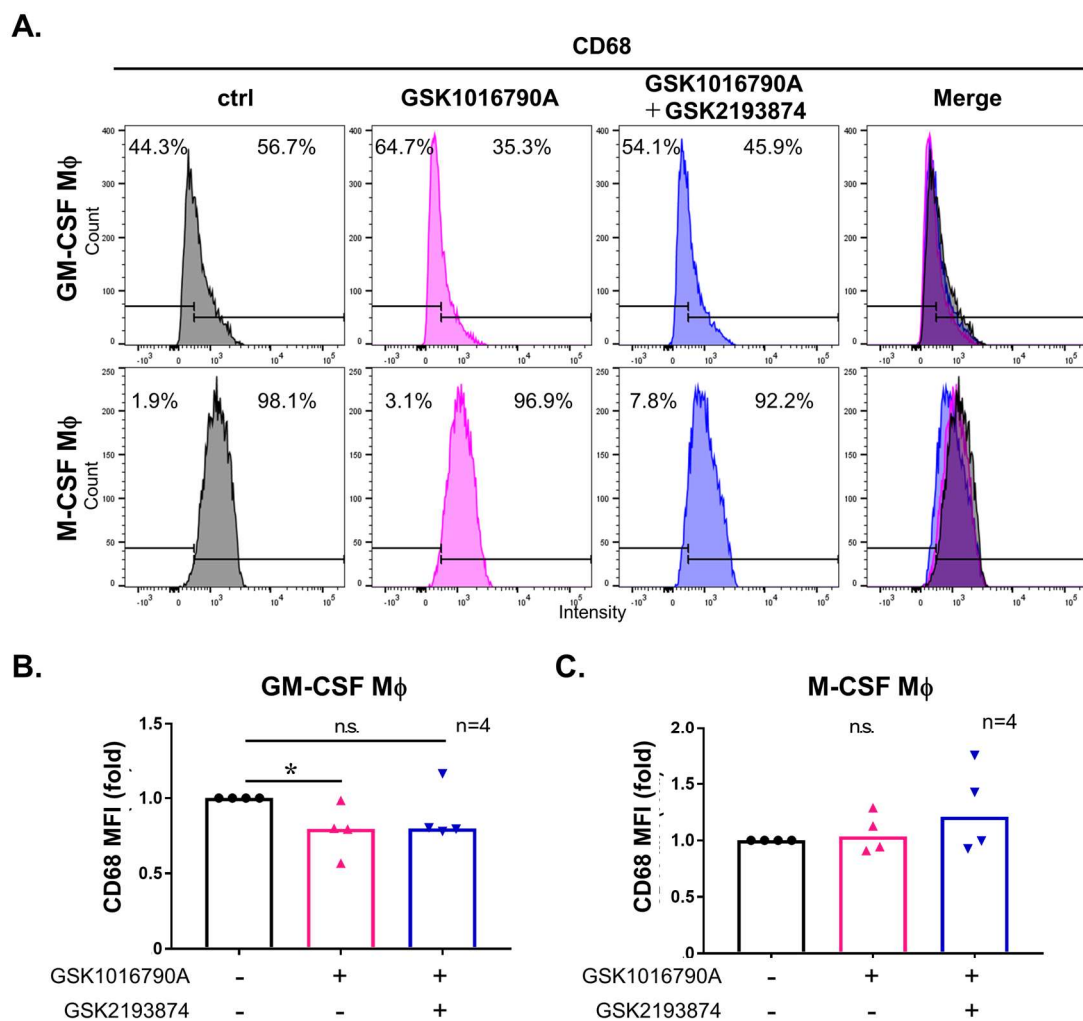


図19 GM-CSF マクロファージ分化における TRPV4 の活性化は、マクロファージマーカー CD68 の発現量を抑制する

(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 μ M GSK1016790A または 1 μ M 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

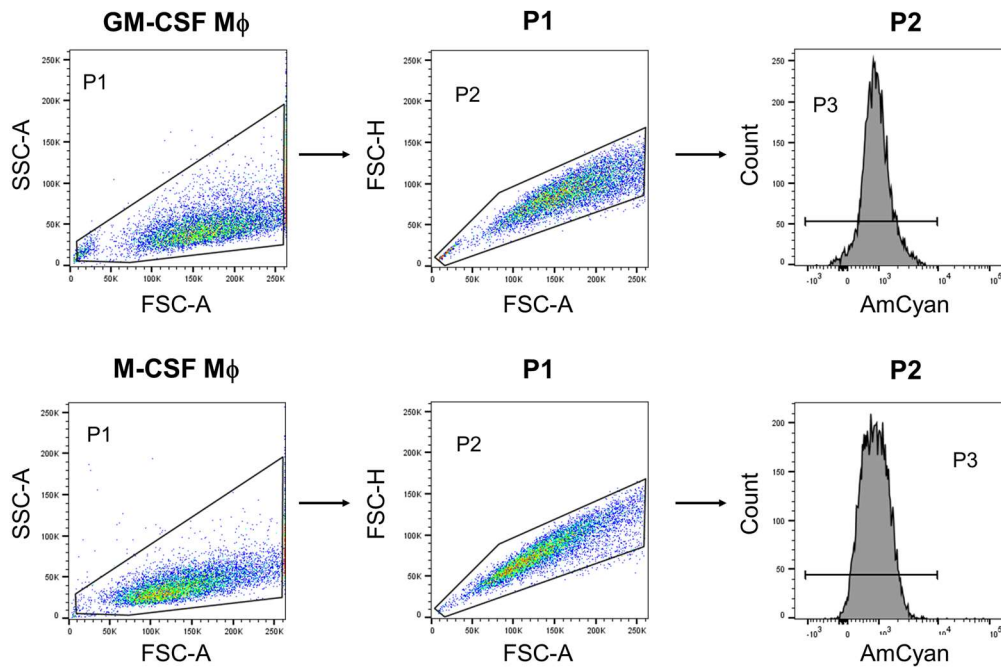


図 20 フローサイトメトリーのゲーティング戦略

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。

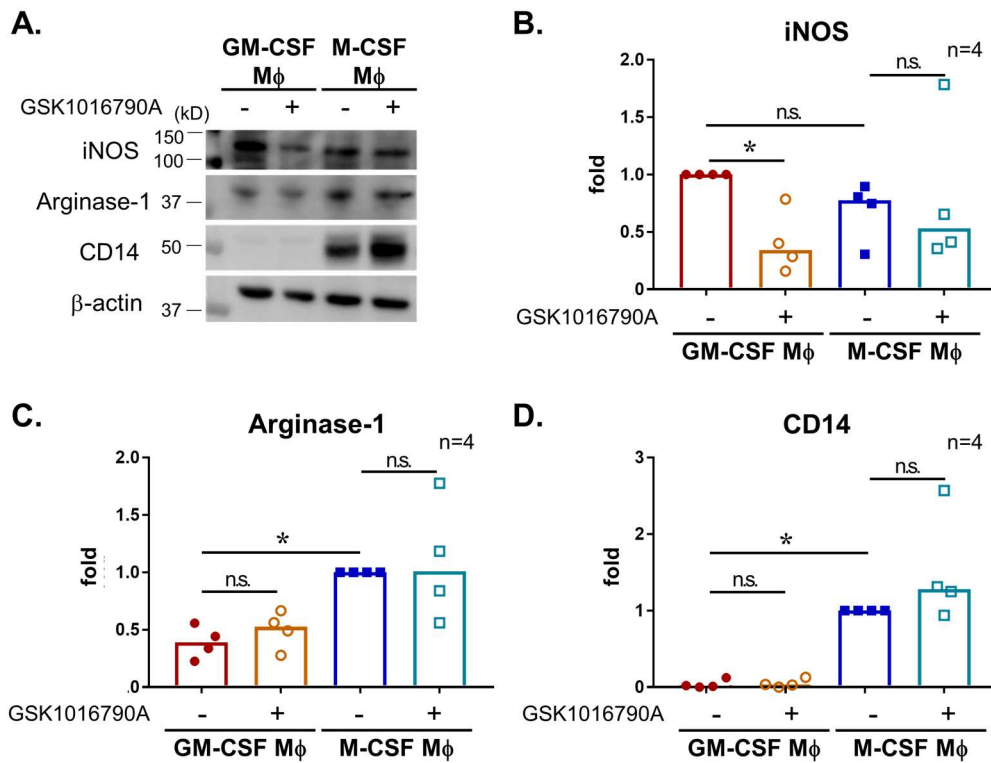


図 21 TRPV4 の活性化は M1 マクロファージの分化を抑制する

(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 μ M 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-1 β 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、特にアトピー性皮膚炎 (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。

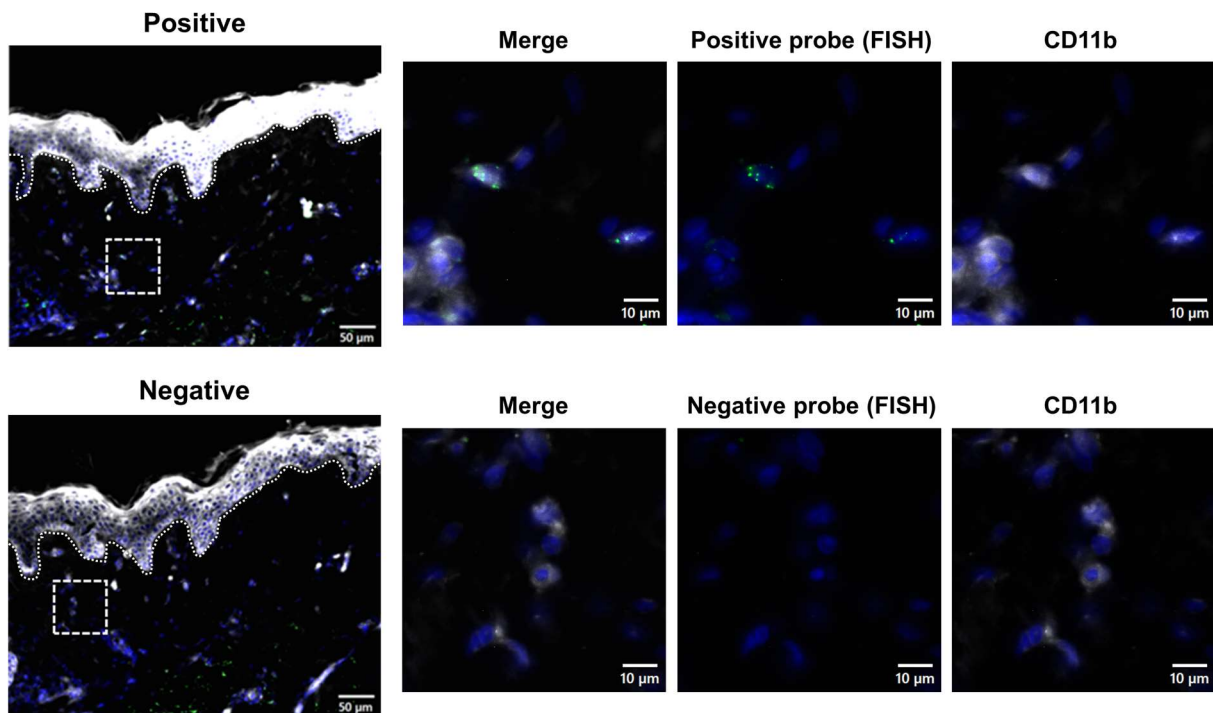


図 22 FISH 法のコントロールプローブによる染色画像

健全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。

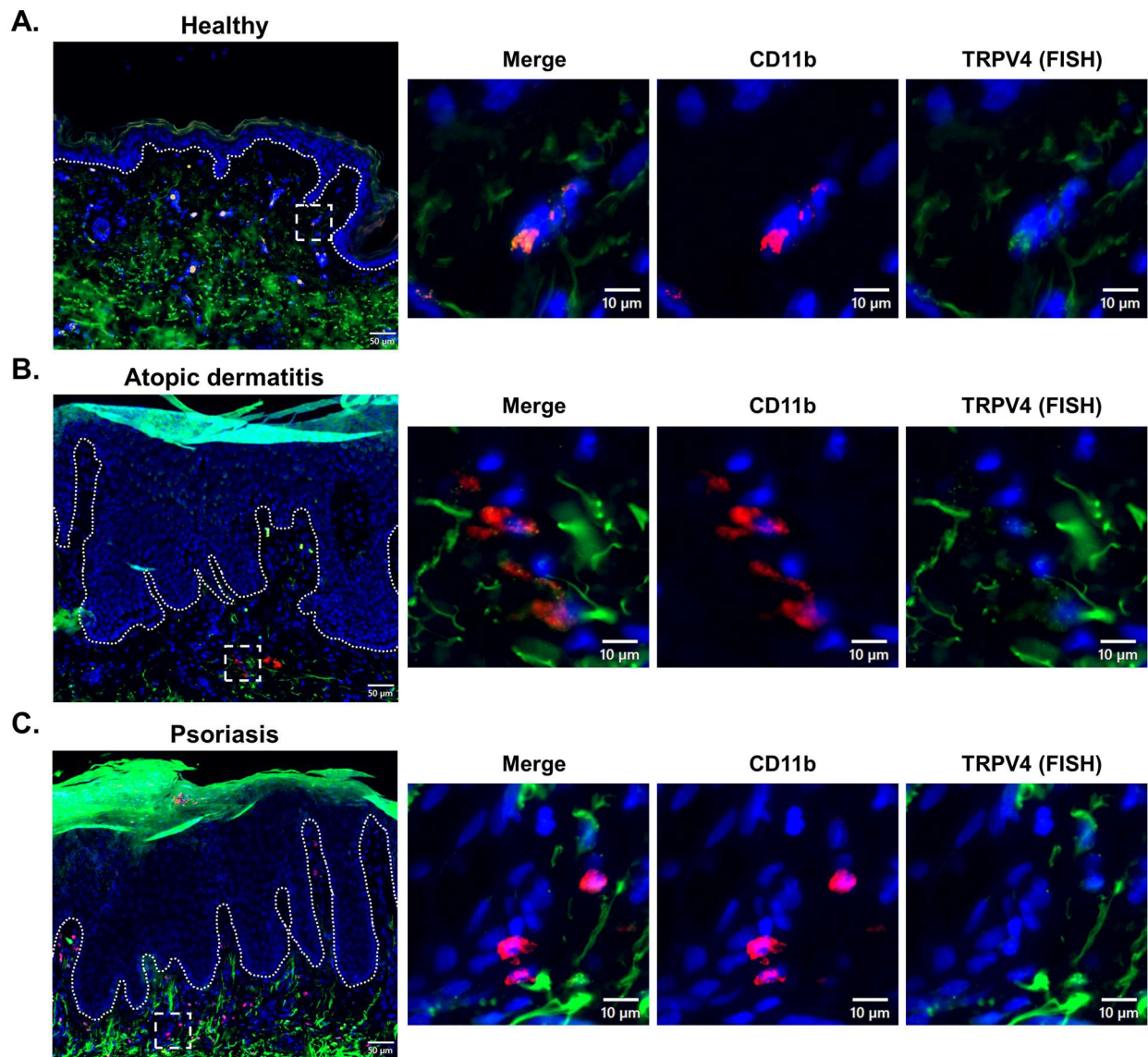
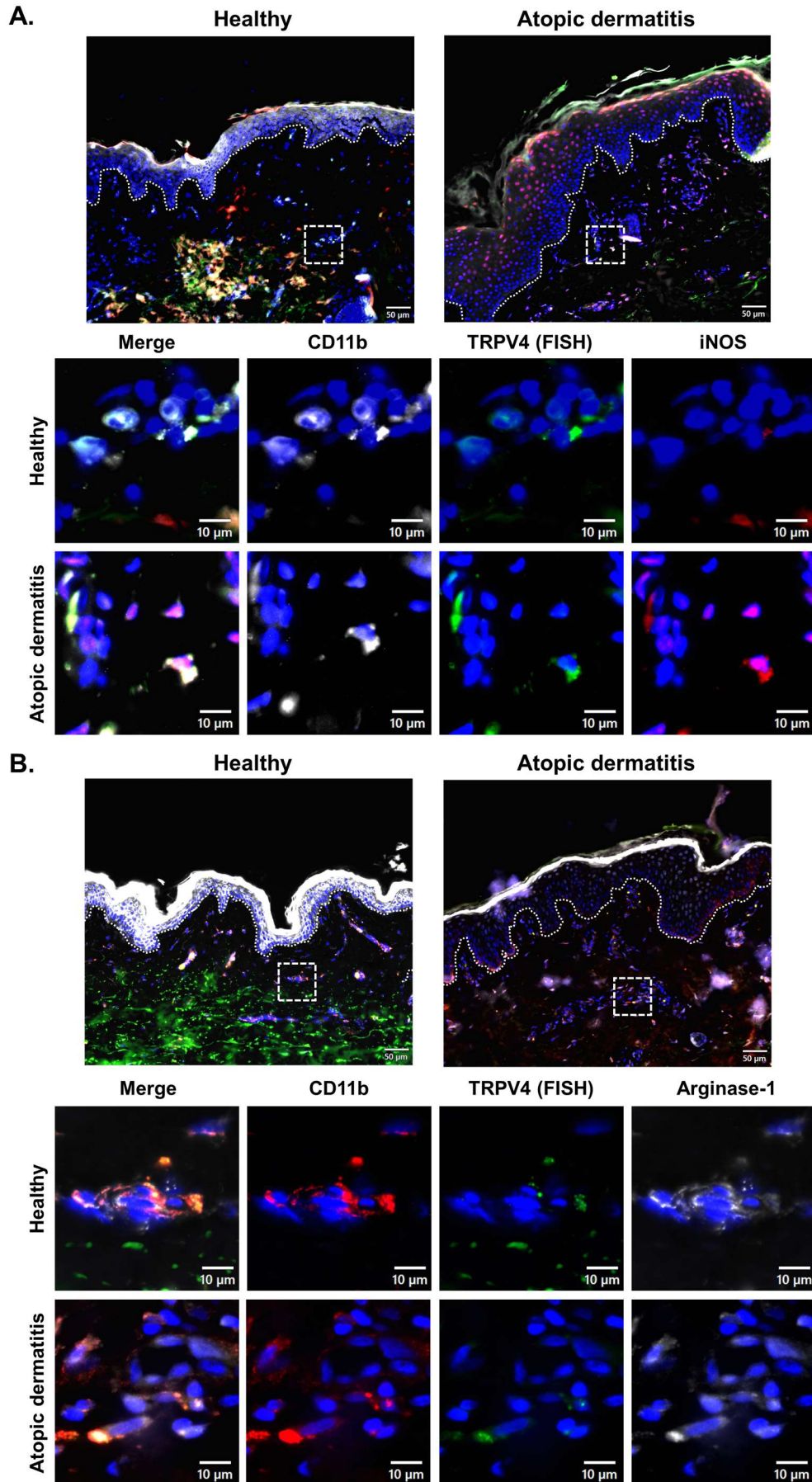


図 23 炎症性皮膚疾患におけるマクロファージ分布と TRPV4 発現パターン

(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。



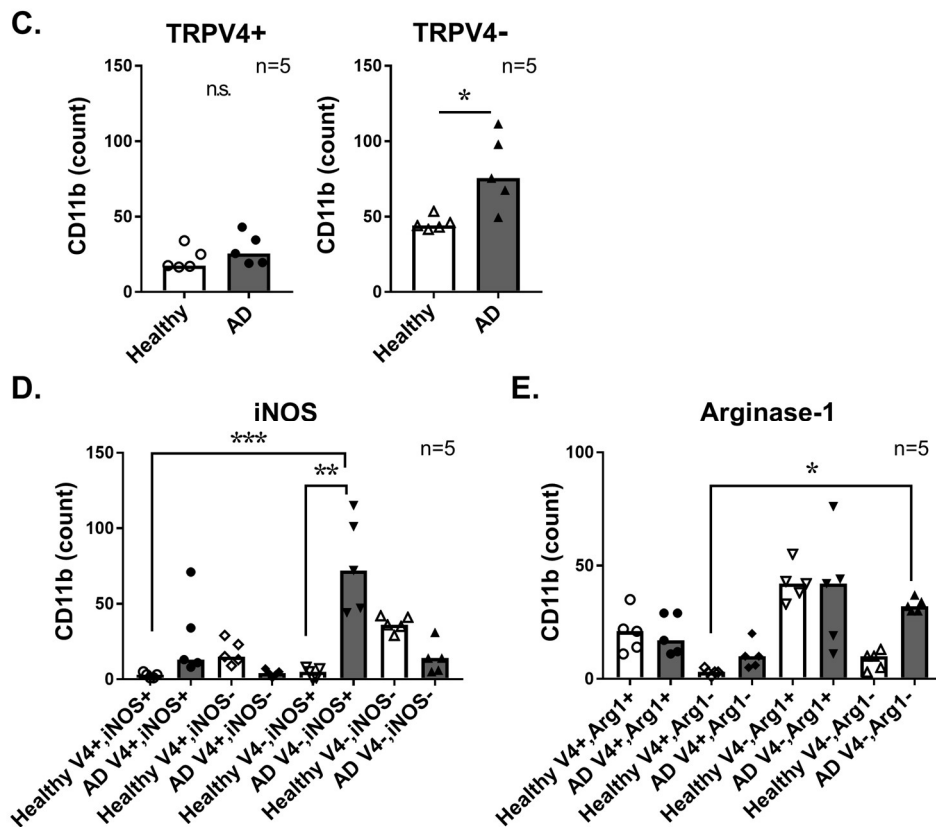
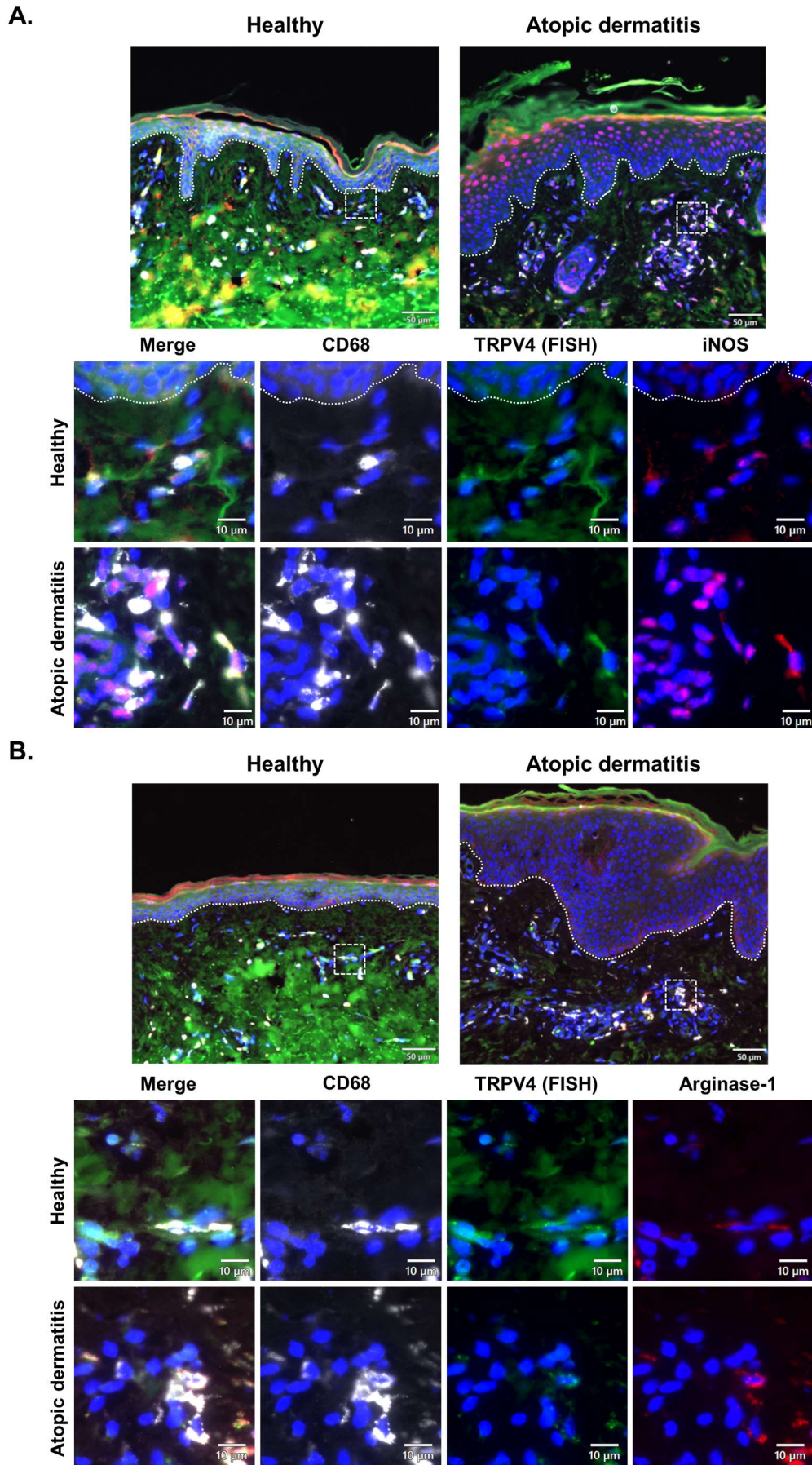


図 24 AD 病変部では TRPV4 陰性、iNOS 陽性、CD11b 陽性マクロファージが増加している

(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 μ m)。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 μ m)。(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 μ m)。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 μ m)。(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.



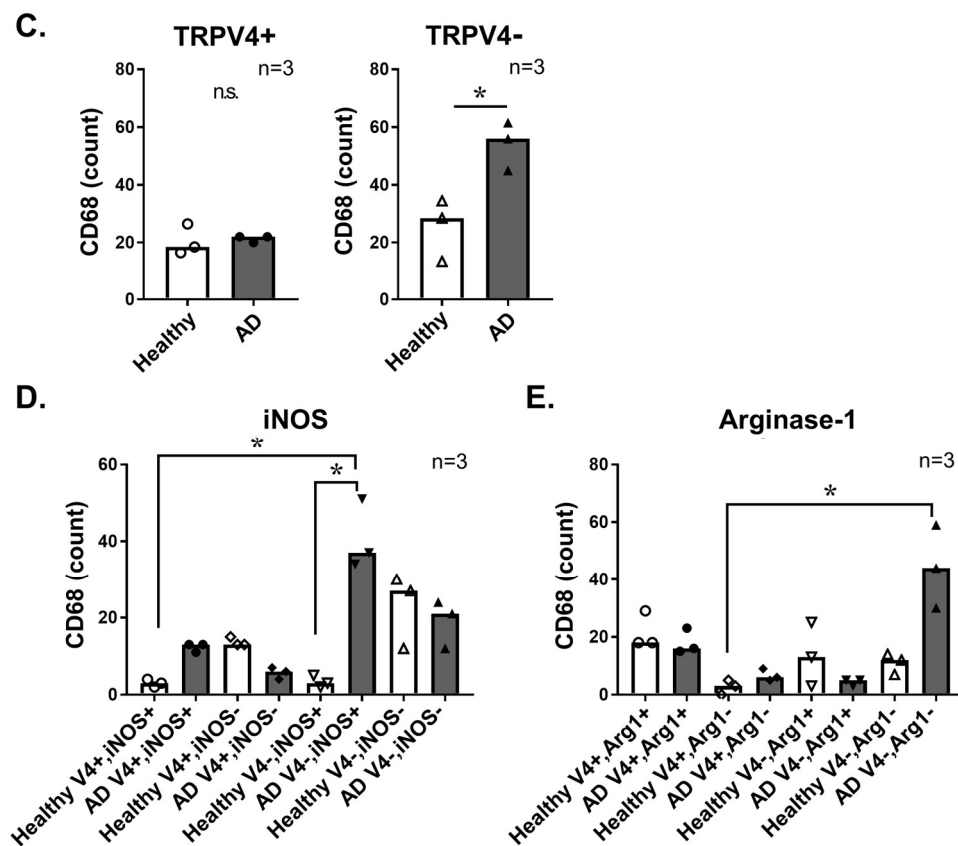


図 25 AD 病変部では、TRPV4 陰性、iNOS 陽性、CD68 陽性マクロファージが増加している

(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 μ m)。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 μ m)。(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 μ m)。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 μ m)。(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- κ B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-1 β 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-1 β 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- κ B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。

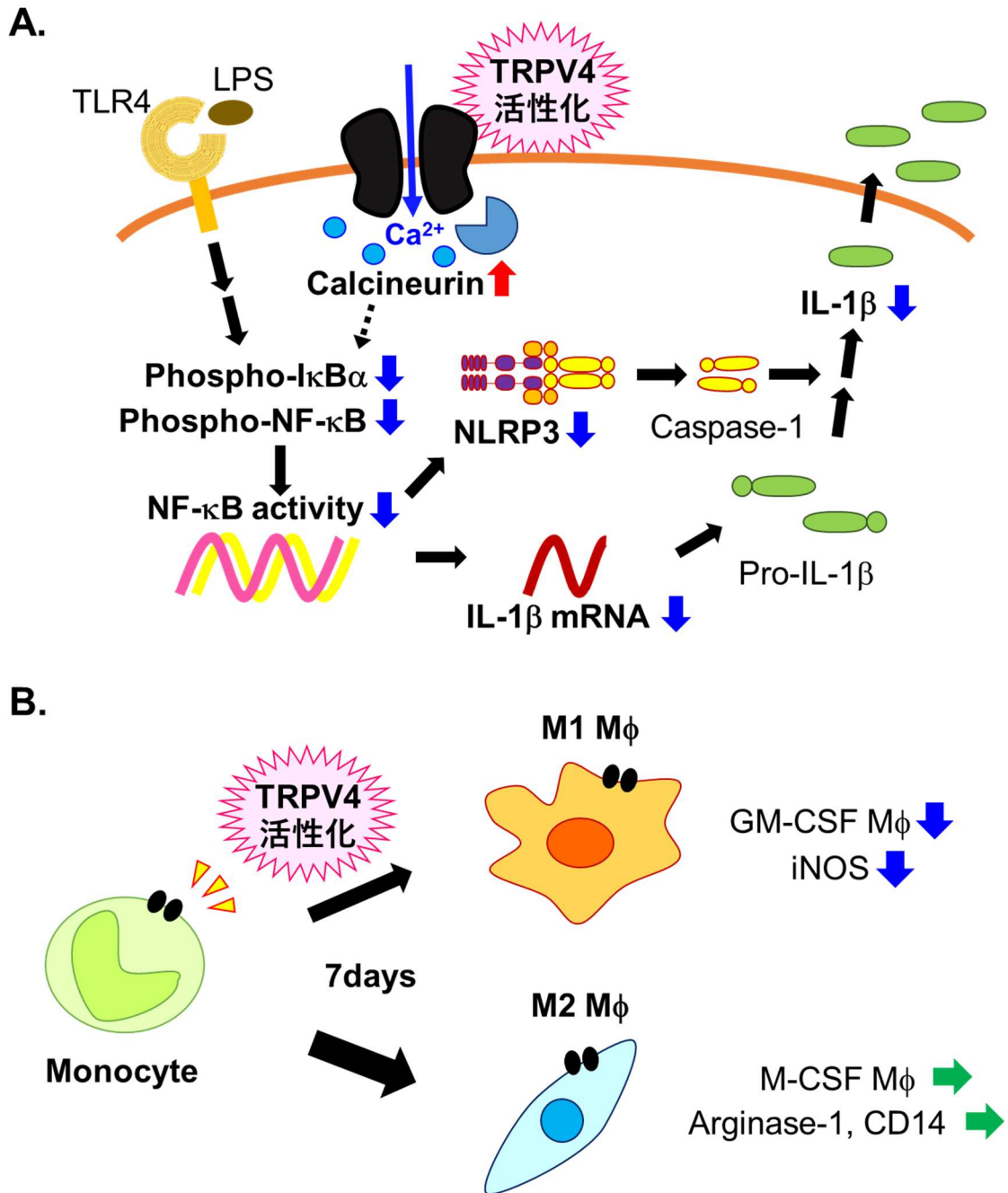


図 26 TRPV4 活性化による抗炎症メカニズムイメージ図

(A) TRPV4 活性化による Ca^{2+} 流入は、カルシニューリンの活性化と NF- κ B 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-1 β 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-1 β 発現量を制御するのか、また NF- κ B 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- κ B 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、TNF α 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- κ B 経路の抑制メカニズム

本研究では、TRPV4 の活性化により NF- κ B 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-1 β 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- κ B 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 Ca^{2+} 流入は、NF- κ B の発現を増加させるとともに NF- κ B 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 Ca^{2+} 流入が NF- κ B 経路の負のフィードバックを誘導することで、IL-1 β 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-1 β 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 インフラサ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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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-1 β の発現が有意に減少した (図 10)。さらに、TRPV4 活性化による IL-1 β 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-1 β の発現や NF- κ B の活性化には、細胞内の Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 流入が NF- κ B 活性抑制を介した IL-1 β 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、 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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-1 β 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、 Ca^{2+} 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 TNF α 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マクロファージよりも早く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 チャンネルの、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、これらのチャン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-1 β 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-1 β 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'-エポ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

皮膚疾患における 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-1 β 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見られ、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、株式会社マングラム 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は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。

引用文献

1. Elie Metchnikoff. Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation. (1892).
2. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
3. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
4. 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).
6. Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
7. 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).
8. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **5**, (2014).

9. Willenborg, S. *et al.* CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* **120**, 613–625 (2012).
10. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
11. 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).
12. Egawa, M. *et al.* Inflammatory Monocytes Recruited to Allergic Skin Acquire an Anti-inflammatory M2 Phenotype via Basophil-Derived Interleukin-4. *Immunity* **38**, 570–580 (2013).
13. 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).
14. 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).
15. 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).
16. 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).

17. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).
18. 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).
20. Lehen'kyi, V. & Prevarskaya, N. Study of TRP Channels in Cancer Cells. in *TRP Channels* (ed. Zhu, M. X.) (CRC Press/Taylor & Francis, 2011).
21. 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).
23. 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).
24. Ho, J.-C. & Lee, C.-H. TRP channels in skin: from physiological implications to clinical significances. *BIOPHYSICS* **11**, 17–24 (2015).
25. Oancea, E. *et al.* TRPM1 Forms Ion Channels Associated with Melanin Content in Melanocytes. *Sci. Signal.* **2**, ra21 (2009).

26. 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).
27. Guo, H., Carlson, J. A. & Slominski, A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp. Dermatol.* **21**, 650–654 (2012).
28. 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).
30. 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).
31. 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).

33. 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).
34. 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).
36. 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 anti-inflammatory blocking IL-1 β mediated articular cartilage matrix destruction. *Osteoarthritis Cartilage* **29**, 89–99 (2021).
38. 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).
39. Scheraga, R. G. *et al.* TRPV4 Protects the Lung from Bacterial Pneumonia via MAPK Molecular Pathway Switching. *J. Immunol.* **204**, 1310–1321 (2020).

40. Scheraga, R. G. *et al.* TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. *J. Immunol.* **196**, 428–436 (2016).
41. Lacey, D. C. *et al.* Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *J. Immunol.* **188**, 5752–5765 (2012).
42. 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).
43. 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).
44. 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).
47. Boaru, S. G. *et al.* NLRP3 inflammasome expression is driven by NF- κ B in cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 700–706 (2015).
48. Nakano, H. Signaling crosstalk between NF- κ B and JNK. *Trends Immunol.* **25**, 402–405 (2004).

49. 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).
50. 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).
51. 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).
53. Kobayashi, T. *et al.* Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity* **42**, 756–766 (2015).
54. 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).
56. 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 vanilloid transient receptor potential channel 4 Ca^{2+} sparklets stimulate airway smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 1064–1075 (2014).
58. Thippogowda, P. B. *et al.* Ca^{2+} influx via TRPC channels induces NF- κ B-dependent A20 expression to prevent thrombin-induced apoptosis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **298**, C656–C664 (2010).
59. Sahin Ozkartal, C. & Aricioglu, F. Future Directions of Cytokine Hypothesis in Depression: ‘NLRP3 inflammasome’. *Bull. Clin. Psychopharmacol.* **23**, 1 (2013).
60. Schappe, M. S. *et al.* Chanzyme TRPM7 Mediates the Ca^{2+} Influx Essential for Lipopolysaccharide-Induced Toll-Like Receptor 4 Endocytosis and Macrophage Activation. *Immunity* **48**, 59-74.e5 (2018).
61. 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).
62. Güler, A. D. *et al.* Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *J. Neurosci.* **22**, 6408–6414 (2002).

63. 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).
67. 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 PPAR γ . *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).
70. 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).
73. Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 289–301 (2014).