

学位論文

「TNF- α Suppresses Apelin Receptor Expression in Mouse
Quadriceps Femoris-Derived Cells」

(TNF- α はマウス骨格筋由来細胞における Apelin 受容体(APJ)
発現を抑制する)

DM 19011 小山 智久

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

サルコペニアは加齢に伴い骨格筋量と筋力が徐々に低下することを特徴とする疾患であり、高齢者の自律性の低下につながる。サルコペニアのメカニズムは様々な研究で検討されてきたが、その原因は十分に明らかになっていない。骨格筋における *Apelin* 受容体(APJ)の発現は、加齢に伴い減少することが知られているが、そのメカニズムは不明である。加齢に伴い骨格筋では腫瘍壊死因子(TNF) \cdot α の産生が上昇し、筋萎縮の病態と関連することが報告されている。本研究では加齢に伴う TNF \cdot α の上昇と APJ の減少の相互関係を調べるために、C57BL/6J マウスの大腿四頭筋由来の細胞を用いて、TNF \cdot α の APJ 発現への影響を検討した。3 ヶ月齢(young mice, n=10)と 24 ヶ月齢(old mice, n=10)の C57BL/6J マウス大腿四頭筋を使用した。大腿四頭筋の筋重量と体重を測定し young、old mice の骨格筋量の比較を行った。次いで *Tnfa*、*Apelin*、*Apj* の mRNA 発現を、qPCR を用いて比較した。さらに、APJ 陽性細胞および TNF \cdot α タンパク質をそれぞれ Flow Cytometry および Western Blotting で解析した。さらに、大腿四頭筋由来細胞を 0(コントロール)、2.5、または 25 ng/mL の TNF \cdot α で刺激し、*Apj* mRNA 発現への影響を qRT-PCR により検討した。*Apj* RNA の発現および大腿四頭筋細胞中の APJ 陽性細胞の比率は、young mice に比べ、old mice で有意に低かった。一方、*Tnfa* mRNA と TNF \cdot α タンパク質のレベルは、young mice に比べ old mice で有意に上昇した。young, old mice 由来の大腿四頭筋細胞を TNF \cdot α に 8 時間および 24 時間刺激すると、*Apj* mRNA レベルが有意に減少した。TNF \cdot α は in vitro の筋肉細胞において *Apj* mRNA の発現を抑制した。加齢に伴う骨格筋における TNF \cdot α の増加は、APJ 発現の減少を誘導する可能性がある。TNF \cdot α による筋萎縮・サルコペニアの誘発メカニズムの一端に APJ 低下が関与しているかもしれない。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 動物	2
2-2. RT-PCR	3
2-3. Western Blotting	3
2-4. Flow Cytometry	4
2-5. 筋由来細胞培養	5
2-6. 統計解析	5
3. 結果	
3-1. young, old mice の大腿四頭筋筋量の比較	6
3-2. young, old mice 大腿四頭筋における Apelin, APJ の発現の比較 ..	6
3-3. young, old mice 大腿四頭筋における TNF- α の発現の比較	7
3-4. TNF- α の Apelin, APJ 発現に対する影響	7
4. 考察	8
5. 総括	10
6. 今後の課題	11
7. 謝辞	11
8. 引用文献	11
9. 業績目録	16
10. 図表	16

1. 序論

サルコペニアは、加齢に伴い骨格筋量と筋力が徐々に低下することを特徴とし、高齢者における自律性の低下をもたらす疾患である[1,2]。運動性と移動性の喪失は、高齢者の健康状態の悪化を示す重要な指標の一つであると言われている[3,4]。骨格筋の萎縮/脱力に関する多くの異なる動物およびヒトモデルを用いたにより、サルコペニアの病態に関与する細胞プロセスが次第に明らかになってきた [5-10]。しかし、サルコペニアの根本的な原因を明らかにするためには、他の細胞メカニズムを同定し、既に発見されているメカニズムの理解を深めることが重要である。

G タンパク質共役型 **Apelin** 受容体(APJ)は、全身に広く発現している myokine の一つである。APJ は、エネルギー代謝、心血管系機能、血管新生など、様々な生理的プロセスに関与していることが知られている。最近の研究では、APJ とそのリガンドである **Apelin** が筋肉の代謝に寄与していること、老齢マウスでは APJ の遺伝子発現が低下していることが報告された[11]。しかし、加齢に伴う APJ の減少の原因は十分に解明されていない。

サルコペニア患者の血液や骨格筋組織では、炎症性サイトカイン濃度が上昇することが報告されている[12-18]。ある研究では、腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor; TNF)・ α の血漿濃度が高いと、正常に機能している高齢者の筋肉量と筋力が低下していることが報告された[18]。また、雄性 ICR マウスに TNF・ α (100 μ g/kg)を単回腹腔内投与すると、肋間横隔膜から分離した筋線維の細胞質酸化活性が上昇し、横隔膜の最大力が減少したことが報告された[19]。最近の研究では、老齢マウスの骨格筋における TNF・ α の濃度上昇は、筋萎縮と関連していることが報告されている[20]。さらに、加齢に伴う TNF・ α 上昇は、タンパク質ターンオーバーの変化、筋力低下との強い関連性が示唆されている[20-26]。TNF・ α は、活性酸素を介した NF- κ B の活性化を介して骨格筋細胞のタンパク質減少を誘導した[25]。また、

TNF- α シグナルは筋線維特異的なアポトーシスを誘導した[27]。さらに、TNF- α は、筋タンパク質損失の加速に必須であると思われる Atrogin1/MAFbx をアップレギュレートした[22]。いくつかの研究により、*in vitro* において APJ シグナルがマクロファージ、脂肪細胞、および肝細胞において TNF- α を制御することが報告されている[28-30]。しかし、TNF- α が骨格筋由来細胞で APJ の発現を制御しているかどうかは、まだ不明である。

加齢に伴う TNF- α の上昇と APJ の減少との間の相互関係の可能性を調べるために、我々は、C57BL/6J マウスの大腿四頭筋由来の細胞における APJ 発現に対する TNF- α の影響を調査した。

2. 方法

2-1. 動物

本研究は、雄性 C57BL/6J マウス(Jackson Laboratory Japan, Yokohama, Japan)を用いて実施された。C57BL/6J マウスは、Jackson Laboratory Japan (Kanagawa, Japan)において、温度($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度($55\% \pm 10\%$)、光(12 時間明暗サイクル)を制御したセミバリアシステム下で飼育された。研究プロトコルは、北里大学医学部動物愛護委員会の承認を得た(資料番号：2021-046)。

以前の研究で、24 ヶ月齢の C57BL/6 マウスは 3 ヶ月齢の C57BL/6 マウスと比較して筋肉/体重が減少していることが示された[31]。そこで、3 ヶ月齢のマウス($n = 10$)を「young mice」群、24 ヶ月齢のマウス($n = 10$)を「old mice」群に分類した。体重(g)および大腿四頭筋の筋肉重量(mg)を測定し、筋肉重量(mg)/体重(g)を算出した。大腿四頭筋における *Apelin*、*Apj* および *Tnfa* mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で調べ、2 つの年齢群の間で比較した。さらに、TNF- α タンパク質の発現を Western Blotting で調べた。TNF- α が骨格筋における *Apelin* と APJ の発現に

影響するかどうかを調べるために、young mice(n = 5)および old mice(n = 5)の大腿四頭筋組織をコラゲナーゼで処理し、筋由来細胞を採取し、0 ng/mL (コントロール：培養液のみ), 2.5 ng/mL, 25 ng/mL TNF- α に 8 時間および 24 時間暴露した。刺激した細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて *Apelin* および *Apj* の mRNA 発現を測定した。

2-2. Real-Time PCR

C57BL/6J マウスをイソフルラン吸入麻酔で麻酔後、屠殺した。メスを用いて、大腿部の皮膚と筋膜を除去し、大腿四頭筋を採取した。次に、採取した組織を TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で処理し、total RNA を抽出した SuperScript III RT(Thermo Fisher Scientific, CA, USA)を使用して cDNA を形成後、TB Green Premix Ex Taq(Takara, Kyoto, Japan)、プライマーを用いて定量 PCR を行った。プライマー配列は、Primer Blast ソフトウェア上で決定し、Hokkaido System Science Co., Ltd. (Sapporo, Japan)により作製された。表 1 に本研究で使用したプライマー配列を示す。増幅産物はメルトカーブ解析により特異性を検討した。定量的 PCR は CFX connect real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用い、95 °C 1 分間の変性、95 °C 5 秒、60 °C 30 秒を 40 サイクル行った。 β -actin 遺伝子は若齢マウスと老齢マウスで異なるため、目的の各 mRNA のレベルは GAPDH で正規化した。

2-3. Western Blotting

TNF- α のタンパク質レベルは、Western Blotting を用いて測定した。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)サンプルバッファーで筋肉細胞をホモジナイズした後、ホモジネートは直ちに 95°C で 10 分間加熱された。タンパク質濃度は、ビシンコニン酸

(BCA)アッセイキット(Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA)により測定した。Coomassie Brilliant Blue 染色において、タンパク質の分解がないことを確認した。ホモジェネート(5 μ g/レーン)を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。次に、ゲル内で分離したタンパク質を blotting buffer 中でポリビニリデン・ジフルオリド膜に電気泳動的に転写した。その後、膜を TBST 中の 10% スキムミルクで 25°C・30 分間処理して非特異的反応を防止してから、抗 TNF- α 抗体(1:1000; catalog number. Ab6671, Abcam Cambridge, UK)または抗 GAPDH 抗体(1:5000; FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)で 25°C、60 分間インキュベーションを行った。さらに、HRP を結合した Goat anti Rabbit IgG 抗体(catalog number. 211-035-109, RRID: AB_2339150, Jackson Immuno Research Laboratories; West Grove, PA, USA)と 25°C で 60 分間インキュベートした後、膜を最終的に洗浄した。続いて、化学発光試薬(catalog number 07880, Chemi-Lumi One L; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)および CCD イメージャ付き発光画像分析装置(LAS-4000mini; Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)を使用してタンパク質バンドを可視化した。相対的な TNF- α のタンパク質発現は GAPDH に対して正規化した。

2-4. Flow Cytometry

young および old mice から採取した大腿四頭筋の組織サンプル(n=5)を、0.1% コラゲナーゼ(Catalog Number. 03222364, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)により 37°C で 1 時間処理した。次に、処理した試料をナイロンメッシュフィルター(pluriStrainer 100 μ m, pluriSelect, Leipzig, Germany)でろ過し、細胞懸濁液とした。次に、この細胞を抗 CD45-PE/Cy7 (Clone: 30-F11, Catalog number 103113, BioLegend, CA, USA) および抗 Sca1-APC-Cy7

(CClone: D7, Catalog number 108126, BioLegend)抗体により 4°Cで 1 時間処理を行った。CD45 は汎造血系細胞のマーカーであり、Sca1 は成熟筋細胞のマーカーである。さらに fixation/permeabilization solution kit (catalog number 420801, BioLegend)で処理した後、FITC conjugation kit(Lightning-Link conjugation kit, Abcam)を用いて調製した FITC 標識抗 APJ 抗体と非標識抗 APJ 抗体(Cat. No. 20341-1-AP, Proteintech, CA, USA)と 4°Cで 30 分間反応させた。洗浄バッファーで 2 回洗浄した後、標識細胞を flow cytometry を用いて解析した。BD FACSVerser システム(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いて総イベント数 50,000 を取得し、FlowJo v10.7 (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて分析した。ネガティブゲートは、アイソタイプコントロールを基準に設定した。

2-5. 筋由来細胞培養

young および old mice(n = 5)の大腿四頭筋から単核細胞を抽出するため、組織サンプルを 0.1% I 型コラゲナーゼの 20 mL 溶液で 37°C、60 分間処理した。有核細胞(1×10^4 cells/cm²)を α -minimal essential media (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) と 10% fetal bovine serum (Gibco Life Technologies; lot no. 42Q0170K) により 6 穴プレート上で 7 日間培養を行った。その後、培養細胞を 0 ng/mL (コントロール: 培養液のみ), 2.5 ng/mL mouse TNF- α , または 25 ng/mL TNF- α に 8 時間または 24 時間処理し、筋肉由来細胞における *Apelin* および *Apj* の mRNA 発現を、リアルタイム PCR を用いて上記と同様の方法で測定した。

2-6. 統計解析

統計解析は SPSS version 28.0.0.0 (190) (IBM, Armonk, NY, USA)を用いて実施した。正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定を、分散の均質性の検定には Levene

の検定を用いた。2つの年齢グループ間の体重と筋肉量の比較には、Mann-Whitney U 検定を使用した。2つの年齢群間の筋肉量／体重の比較には、対応のない t 検定を用いた。遺伝子およびタンパク質発現データは正規分布ではなかったため、2つの年齢グループ間の遺伝子およびタンパク質発現を比較するために Mann-Whitney U 検定を用いた。Bonferroni 事後検定を用いた二元配置 ANOVA を使用して、コントロール、2.5 ng/mL TNF- α 、および 25 ng/mL TNF- α 刺激細胞の間で遺伝子発現を比較した。p < 0.05 を有意とした。すべての値は、平均値 \pm 標準偏差(SD)として表される。

3. 結果

3-1. young, old mice の大腿四頭筋量の比較

体重は、old mice(32.6 \pm 2.9 g)が young mice(24.5 \pm 1.3 g、p < 0.001; 図 1A)より有意に高かった。筋肉量は、young mice(186.5 \pm 16.1 mg)と old mice(191.9 \pm 45.0 mg)の間で有意差はなかった(p = 0.481; Figure 1B)。しかし、筋肉量／体重は、old mice(5.8 \pm 1.0 mg/g)が young mice(7.6 \pm 0.6 mg/g、p < 0.001; 図 1C)より有意に小さかった。

3-2. young, old mice 大腿四頭筋における Apelin, APJ の発現の比較

Apelin mRNA 発現は有意差を認めなかったが(1.00 \pm 0.12 (young) vs. 0.79 \pm 0.06 (old), p = 0.253, 図 2A)、*Apj* mRNA 発現は young mice と比較して old mice で著しく低かった(1.00 \pm 0.06 (young) vs. 0.38 \pm 0.06 (Old)、p < 0.001, 図 2B)。さらに、Sca1 陽性細胞および Sca1 陰性細胞の両者において、APJ 陽性細胞の比率も old mice で減少した(Sca1 陽性: 1.26 \pm 0.50 (young) vs. 0.08 \pm 0.04 (old), p = 0.016, Sca1 陰性: 0.72 \pm 0.22 (young) vs. 0.11 \pm 0.02 (old), p = 0.016,

図 3A、図 3B)。

3-3. young, old mice 大腿四頭筋における TNF- α の発現の比較

Tnfa の mRNA 発現は、young mice と比較して old mice で有意に上昇した (1.00 ± 0.26 (young) vs. 2.47 ± 0.52 (old)、 $p = 0.034$ 、図 4A)。Western Blotting では、TNF- α のタンパク質発現が同様に old mice で増加したことを示した (1.00 ± 0.09 (young) vs. 2.52 ± 0.26 (old)、 $p = 0.006$ 、図 4B)。

3-4. TNF- α の Apelin, APJ 発現に対する影響

APJ の発現量が young mice と old mice で異なることがわかったため、次に、筋肉由来細胞の TNF- α に対する応答も両齢間で異なるかどうかを評価した。young mice 由来の細胞における相対的な *Apelin* mRNA 発現を図 5A で示した。すなわち、コントロール(8 時間、 1.00 ± 0.07 ; 24 時間、 1.00 ± 0.08)、2.5 ng/mL TNF- α (8 時間、 1.64 ± 0.06 ; 24 時間、 0.93 ± 0.01) および 25 ng/mL TNF- α (8 時間、 1.64 ± 0.07 ; 24 時間、 1.31 ± 0.01) であった。外因性 TNF- α は、young mice 由来の筋肉細胞において、8 時間(コントロール vs. 2.5 ng/mL TNF- α : $p < 0.001$, コントロール vs. 25 ng/mL TNF- α : $p < 0.001$, 図 4A) および 24 時間(コントロール vs. 25 ng/mL TNF- α : $p < 0.001$; 図 5A) の刺激で *Apelin* mRNA 発現を著しく上昇させた。

old mice 由来細胞における相対的な *Apelin* mRNA 発現を図 5B に示す。すなわち、コントロール(8 時間、 1.00 ± 0.21 、24 時間、 1.00 ± 0.22)、2.5 ng/mL TNF- α (8 時間、 1.37 ± 0.20 ; 24 時間、 1.21 ± 0.17) および 25 ng/mL TNF- α (8 時間、 1.24 ± 0.20 ; 24 時間、 1.05 ± 0.18) であった。old mice 由来の筋細胞では、有意な増加は認められなかった。

young mice 由来細胞における相対的な *Apj* mRNA 発現を図 5C に示す。すなわち、コントロール(8 時間、 1.00 ± 0.07 ; 24 時間、 1.00 ± 0.08), 2.5 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ (8 時間、 0.59 ± 0.06 ; 24 h, 0.57 ± 0.05) および 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ (8 時間、 0.42 ± 0.01 ; 24 h, 0.39 ± 0.03) であった。

old mice 由来細胞における相対的な *Apj* mRNA 発現を図 5D に示す。コントロール(8 時間、 1.00 ± 0.19 、24 時間、 1.00 ± 0.20)、2.5 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ (8 時間、 0.35 ± 0.06 、24 時間、 0.60 ± 0.07)、25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ (8 時間、 0.17 ± 0.02 ; 24 時間、 0.18 ± 0.03) であった。

Apj mRNA は、young および old mice 由来両者の筋細胞において、外因性 $\text{TNF-}\alpha$ の 8 時間刺激(young、コントロール vs. 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$, $p < 0.001$; old、コントロール vs. 2.5 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$, $p = 0.012$, control vs. 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$: $p = 0.009$, 図 5B) および 24 時間刺激(young、コントロール vs. 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$, $p < 0.001$; old、コントロール vs. 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$: $p = 0.007$, 図 5C、D)により有意に減少した。

4. 考察

本研究の目的は、加齢に伴う $\text{TNF-}\alpha$ の上昇と APJ の減少の相互関係を検討することである。その結果、old mice は young mice に比べ、APJ の発現が低下し、APJ 陽性細胞の割合が減少していることがわかった。一方、 $\text{TNF-}\alpha$ の濃度は young mice よりも有意に高かった。さらに、筋肉由来の細胞を外因性 $\text{TNF-}\alpha$ にさらすと、*Apj* mRNA の発現が有意に減少した。これらの結果から、old mice における APJ の減少は、 $\text{TNF-}\alpha$ の増加と関連している可能性が示唆された。

サルコペニアは、マウスモデルを用いて広範囲に研究されている。マウスの寿命は 2~3 年である[32]。筋肉と体重の比率は、マウスのサルコペニア指標として有

用であることが提案されている[33]。以前の研究では、24ヶ月齢の C57BL/6J マウスで初めて筋肉量(筋肉重量/体重)の減少が明らかになると報告されている[31]。先行研究[31]と同様に、old mice(24ヶ月齢)では、young mice と比較して、筋肉重量/体重が低いことが観察された。そこで、24ヶ月齢のマウスを高年齢モデルとして使用した。サルコペニアは、重症度の指標として、(1)筋力、(2)筋肉の量・質、(3)身体能力の3つのパラメーターの測定値が低いことで定義されている[6]。本研究では、筋力、筋の質、身体的パフォーマンスは評価しなかった。また、筋肉量は young mice と old mice の間で差がなかった。したがって、本研究で使用したマウスはサルコペニアモデルとして不十分である可能性がある。

APJ は、加齢に伴う筋萎縮と関連することが以前から報告されている[11]。Pax7 を発現する筋幹細胞は APJ を発現し、これらの細胞数は加齢とともに減少する。一方、Apelin が筋管のグルコース取り込みと Akt リン酸化を促進することから、成熟筋原細胞も APJ を発現していることが示唆される。これまでの研究で、Sca1 が筋原細胞の分化の制御因子として関与していることが示されている[34]。筋芽細胞は Sca1 陰性であるが、筋原細胞の分化に伴い mRNA の発現が増加する。本研究では、Sca1 陽性細胞、Sca1 陰性細胞の両方に APJ 陽性細胞が存在し、その比率が old mice で減少していることが確認された。したがって、加齢に伴う APJ の発現低下は、未熟な筋原細胞と成熟した筋原細胞の両方における発現の低下を反映していることが示唆された。

いくつかの研究により、TNF- α はマウスやヒトで加齢とともに上昇することが示されている[20,27,35]。血漿中 TNF- α 蛋白レベルは、加齢とともに増加する[27]。TNF- α の mRNA とタンパク質のレベルは、健康な若い男女と比較して、虚弱高齢者の骨格筋で上昇している[35]。リアルタイム PCR とフローサイトメトリー解析により、免疫細胞における TNF- α mRNA の発現と TNF- α タンパク質陽性のマク

ロファージが老齡マウスの骨格筋で増加することが示されている[20]。以前の報告[20]と同様に、骨格筋における $\text{TNF}\cdot\alpha$ mRNA およびタンパク質の発現が、若 *young mice* と比較して *old mice* で有意に上昇していることを確認した。 $\text{TNF}\cdot\alpha$ で刺激すると、*young, old mice* の筋肉由来細胞における APJ の発現が、コントロールと比較して有意に減少した。*old mice* における APJ 発現の低下は、 $\text{TNF}\cdot\alpha$ レベルの上昇と関連している可能性がある。

以前の研究で、 $\text{TNF}\cdot\alpha$ がマウスとヒトの脂肪組織で *Apelin* の発現を刺激することが報告された[29]。この報告と一致するように、 $\text{TNF}\cdot\alpha$ は *young mice* 由来の筋肉細胞においても *Apelin* の mRNA の発現を刺激した。しかし、*old mice* 由来の筋肉細胞では、 $\text{TNF}\cdot\alpha$ は *Apelin* の発現を刺激することができなかった。*Apelin* は $\text{TNF}\cdot\alpha$ による肝細胞の生理的変化を改善することから[28]、*Apelin* は $\text{TNF}\cdot\alpha$ による炎症に対して抗炎症作用を示すことが示唆された。*Apelin* によるネガティブフィードバックの欠如は、*old mice* の筋肉の $\text{TNF}\cdot\alpha$ による炎症状態の上昇をもたらすかもしれない。

炎症刺激に対する若い細胞と老化した細胞の反応の違いが報告されている[36,37]。例えば、老齡マウスの脂肪細胞は、若年マウスの脂肪細胞と比較して、IL-6、 $\text{TNF}\cdot\alpha$ 、PGE2 を多く産生される[37]。さらに、分化条件によってもサイトカイン応答が変化する可能性がある[38]。本研究の筋肉由来の使用細胞は、異種集団であり、分化した細胞/未分化細胞の割合は、*young mice* 由来細胞と *old mice* 由来細胞で異なっていた。加齢に伴う細胞表現型の変化、あるいは細胞集団の割合の違いが、*young, old* の筋肉由来細胞間の *Apelin* 発現における $\text{TNF}\cdot\alpha$ に対する反応の違いに関連している可能性がある。

5. 総括

TNF- α は in vitro の筋肉細胞において APJ の発現を抑制する。加齢に伴う骨格筋における TNF- α の増加は、APJ の発現を低下させる可能性がある。

6. 今後の課題

この研究にはいくつかの限界があった。第一に、2つの時点しか調査していないため、さらなる研究で、より多くの時点における変化を解析する必要がある。第二に、サルコペニアの病態の指標として筋肉量のみを用い、組織の病態を検討することができなかったため、病理組織学的検討を行う必要がある。

7. 謝辞

研究期間中、小林あかり、峰尾歩、南里佑太、石井大輔、土屋真穂、齋藤広樹、真壁基紀のご協力に関して感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Anker SD, Morley JE, von Haehling S. Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. J. Cachexia Sarcopenia Muscle. 2016;7:512–4.
2. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. Age Ageing. 2010;39:412–3.
3. Filippin LI, Teixeira VN, da Silva MP, Miraglia F, da Silva FS. Sarcopenia: A predictor of mortality and the need for early diagnosis and intervention. Aging Clin. Exp. Res. 2015;27:249–54.
4. Murphy RA, Ip EH, Zhang Q, Boudreau RM, Cawthon PM, Newman AB, et

al. Transition to sarcopenia and determinants of transitions in older adults: A population-based study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2014;69:751–8.

5. Christian CJ, Benian GM. Animal models of sarcopenia. *Aging Cell.* 2020;19:e13223.

6. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyere O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 2019;48:16–31.

7. Doherty TJ. Invited review: Aging and sarcopenia. *J. Appl. Physiol.* (1985) 2003;95:1717–27.

8. Marzetti E, Calvani R, Tosato M, Cesari M, Di Bari M, Cherubini A, et al. Sarcopenia: An overview. *Aging Clin. Exp. Res.* 2017;29:11–7.

9. Tournadre A, Vial G, Capel F, Soubrier M, Boirie Y. Sarcopenia. *Jt. Bone Spine.* 2019;86:309–14.

10. Xie WQ, He M, Yu DJ, Wu YX, Wang XH, Lv S, et al. Mouse models of sarcopenia: Classification and evaluation. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12:538–54

11. Vinel C, Lukjanenko L, Batut A, Deleruyelle S, Pradere JP, Le Gonidec S, et al. The exerkin apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat. Med.* 2018;24:1360–71.

12. Bian AL, Hu HY, Rong YD, Wang J, Wang JX, Zhou XZ. A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF-alpha. *Eur. J. Med. Res.* 2017;22:25.

13. Cesari M, Kritchevsky SB, Baumgartner RN, Atkinson HH, Penninx BW, Lenchik L, et al. Sarcopenia, obesity, and inflammation--results from the Trial

of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;82:428–34.

14. Cohen TV, Many GM, Fleming BD, Gnocchi VF, Ghimbovschi S, Mosser DM, et al. Upregulated IL-1beta in dysferlin-deficient muscle attenuates regeneration by blunting the response to pro-inflammatory macrophages. *Skelet. Muscle.* 2015;5:24.

15. De Almeida P, Tomazoni SS, Frigo L, de Carvalho Pde T, Vanin AA, Santos LA, et al. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: Low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? *Lasers Med. Sci.* 2014;29:653–8.

16. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* 2004;39:687–99.

17. Schrager MA, Metter EJ, Simonsick E, Ble A, Bandinelli S, Lauretani F, et al. Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J. Appl. Physiol.* (1985) 2007;102:919–25

18. Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: The Health ABC Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2002;57:M326–32.

19. Hardin BJ, Campbell KS, Smith JD, Arbogast S, Smith J, Moylan JS, et al. TNF-alpha acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force myofibrillar force in murine skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985) 2008;104:694–9.

20. Li J, Yi X, Yao Z, Chakkalakal JV, Xing L, Boyce BF. TNF

Receptor-Associated Factor 6 Mediates TNF α -Induced Skeletal Muscle Atrophy in Mice During Aging. *J. Bone Miner. Res.* 2020;35:1535–48.

21. Lang CH, Frost RA, Nairn AC, MacLean DA, Vary TC. TNF- α impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002;282:E336–47.

22. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 2005;19:362–70.

23. Li YP, Lecker SH, Chen Y, Waddell ID, Goldberg AL, Reid MB. TNF- α increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *FASEB J.* 2003;17:1048–57.

24. Li YP, Reid MB. NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279:R1165–70.

25. Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumor necrosis factor α . *FASEB J.* 1998;12:871–80.

26. Reid MB., Li YP. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: A cellular perspective. *Respir. Res.* 2001;2:269–72.

27. Phillips T, Leeuwenburgh C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF- α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.* 2005;19:668–70.

28. Chu J, Zhang H, Huang X, Lin Y, Shen T, Chen B, et al. Apelin ameliorates

TNF- α -induced reduction of glycogen synthesis in the hepatocytes through G protein-coupled receptor APJ. PLoS ONE. 2013;8:e57231.

29. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, et al. TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. FASEB J. 2006;20:1528–30.

30. Zhang X, Ye Q, Gong D, Lv Y, Cheng H, Huang C, et al. Apelin-13 inhibits lipoprotein lipase expression via the APJ/PKC α /miR-361-5p signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. Acta Biochim. et Biophys. Sin. 2017;49:530–40.

31. Shavlakadze T, McGeachie J, Grounds MD. Delayed but excellent myogenic stem cell response of regenerating geriatric skeletal muscles in mice. Biogerontology. 2010;11:363–76.

32. Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J. Cancer and ageing in mice and men. Br. J. Cancer. 1975;32:411–26.

33. Edstrom E, Ulfhake B. Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. Aging Cell. 2005;4:65–77.

34. Mitchell PO, Mills T, O'Connor RS, Kline ER, Graubert T, Dzierzak E, et al. Sca-1 negatively regulates proliferation and differentiation of muscle cells. Dev. Biol. 2005;283:240–52.

35. Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor α in frail elderly humans. FASEB J. 2001;15:475–82.

36. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune

system in humans. *Semin. Immunol.* 2012;24:331–41.

37. Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, et al. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J. Immunol.* 2007;179:4829–39.

38. Uchida K, Urabe K, Naruse K, Ujihira M, Mabuchi K, Itoman M.

Comparison of the cytokine-induced migratory response between primary and subcultured populations of rat mesenchymal bone marrow cells. *J. Orthop. Sci.* 2007;12:484–92.

9. 業績目録

なし

10. 図表

表 1. プライマー配列

Gene	Direction	Primer sequence (5'–3')	Product size (bp)
<i>Apelin</i>	F	TGA ATC TGA GGC TCT GCG TG	223
	R	ATG GGG CCC TTA TGG GAG AG	
<i>Apj</i>	F	TAC GCC AGT GTC TTT TGC CT	159
	R	CAC CAT GAC AGG CAC AGC TA	
<i>Tnfa</i>	F	CTG AAC TTC GGG GTG ATC GG	122
	R	GGC TTG TCA CTC GAA TTT TGA GA	
<i>GAPDH</i>	F	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG	223
	R	ACA CATT GGG GGT AGG AAC A	

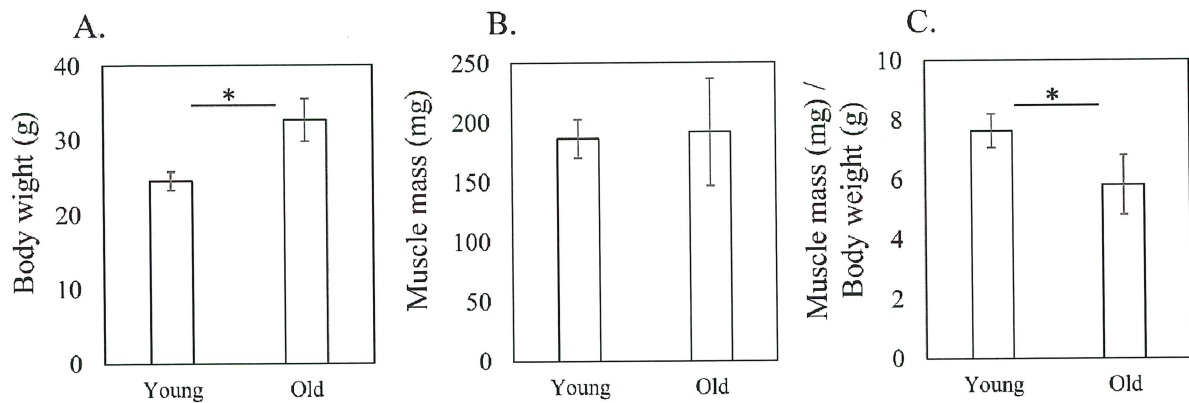


図 1. young および old mice の大腿四頭筋の筋肉量。

A) 若齢(3 ヶ月齢)および老齢(24 ヶ月齢)マウスの体重(g)

B) 筋量(mg)

C) 筋量(mg)/ 体重(g)

体重は、old mice が young mice よりも有意に多かった($p < 0.001$; 図 1A)。

筋肉量は、young mice と old mice の間で有意差はなかった($p = 0.481$; 図 1B)。

しかし、筋肉量／体重は、old mice が young mice よりも有意に低かった($p < 0.001$;

図 1C)。データは平均値±標準偏差(SD)で表した。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。

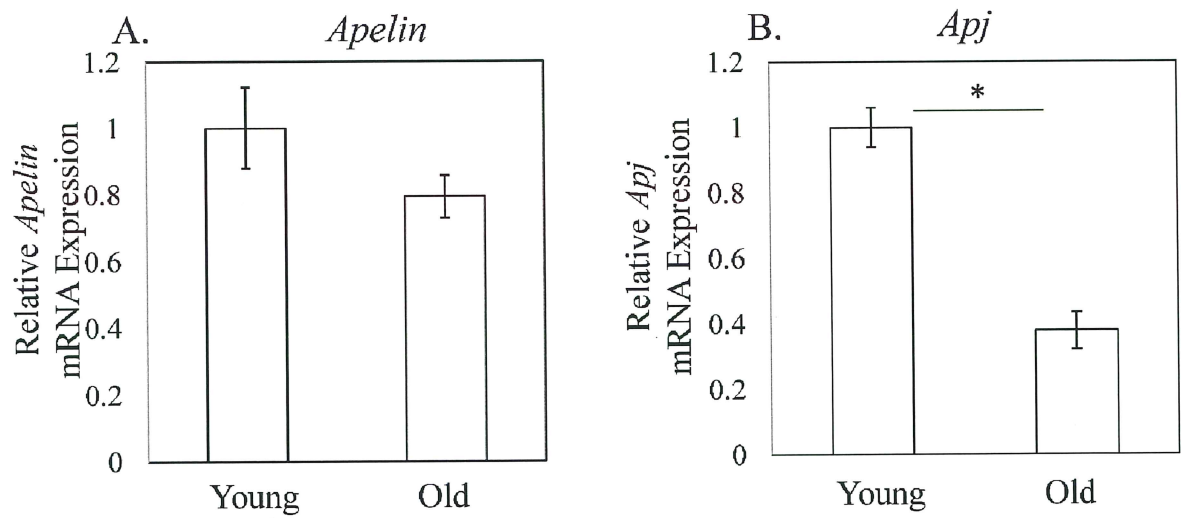


図 2. 大腿四頭筋における *Apelin* と *Apj* mRNA の相対的発現量。

A) *Apelin*、および B) *Apj* の young (3 ヶ月齢) および old (24 ヶ月齢) mice における mRNA 発現。young mice と old mice で *Apelin* mRNA 発現に有意差は認めなかった(図 1A)。 *Apj* mRNA の発現は、young mice より old mice の方が有意に低かった ($p < 0.001$ 、図 1B)。 データは、平均±標準偏差 (SD) として表される。 アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。

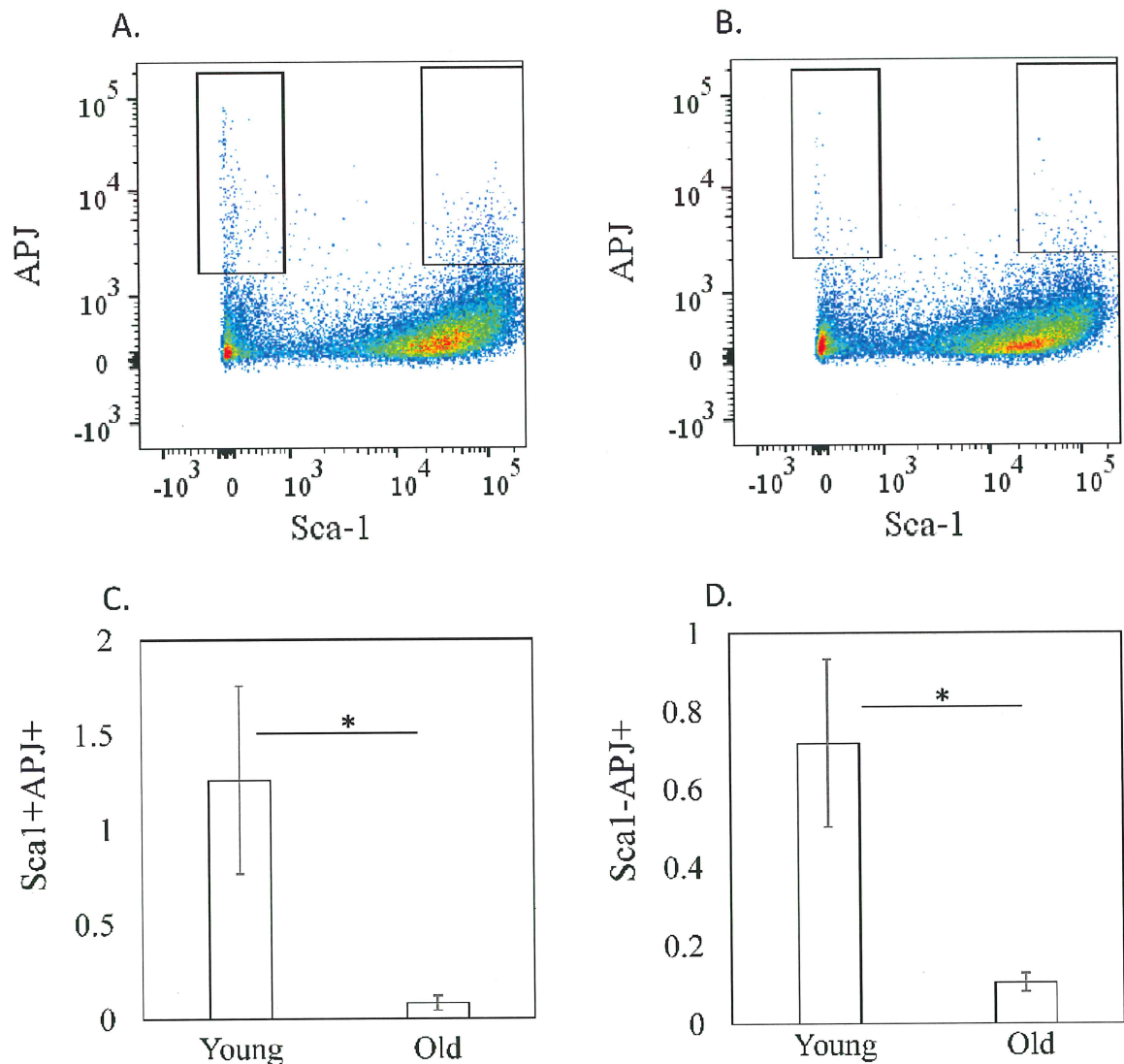


図 3. 大腿四頭筋における APJ 陽性細胞

A-B: CD45(-)の筋原性細胞のドットプロット解析。X 軸は Sca-1、Y 軸は APJ。

C-D: young(3 ヶ月齢)および old(24 ヶ月齢)mice における CD45 陰性/Sca1 陰性細胞および CD45 陰性/Sca1 陽性細胞中の APJ 陽性細胞の比率。Sca1 陽性細胞 ($p=0.016$)および Sca1 陰性細胞($p=0.016$)において、APJ 陽性細胞の有意な減少が見られた。データは平均値±標準偏差(SD)で表した。アスタリスクは $p<0.05$ を示す(Man-Whitney U test)。

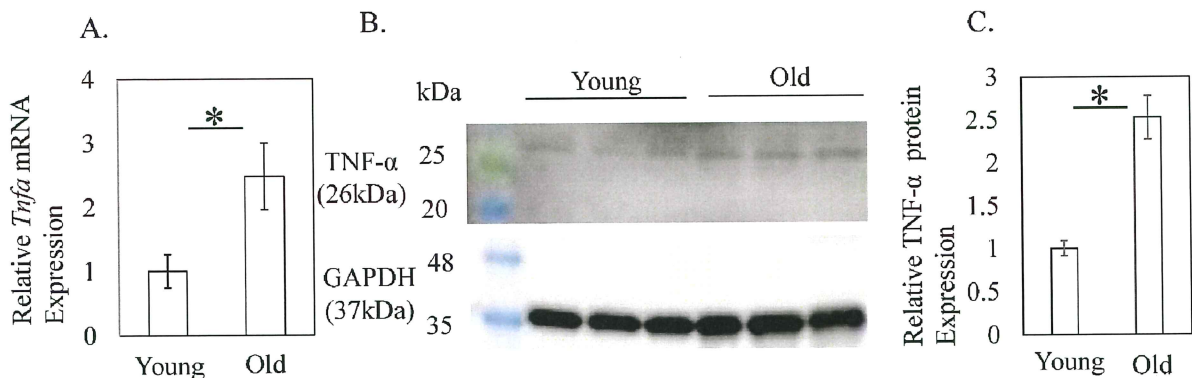


図 4. 大腿四頭筋における *Tnfa* mRNA と TNF- α タンパク質の発現

A) young(3 ヶ月齢)および old(24 ヶ月齢) mice における *Tnfa* mRNA 発現。

B) young (3 ヶ月齢)および old(24 ヶ月齢)の GAPDH に対する TNF- α タンパク質発現を示す Western blotting の画像。

C) young(3 ヶ月齢)および old(24 ヶ月齢) mice の大腿四頭筋における TNF- α タンパク質レベルの比較。old mice では TNF- α の mRNA およびタンパク質レベルの有意な上昇が認められた。データは平均値 \pm 標準偏差(SD)で表される。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。

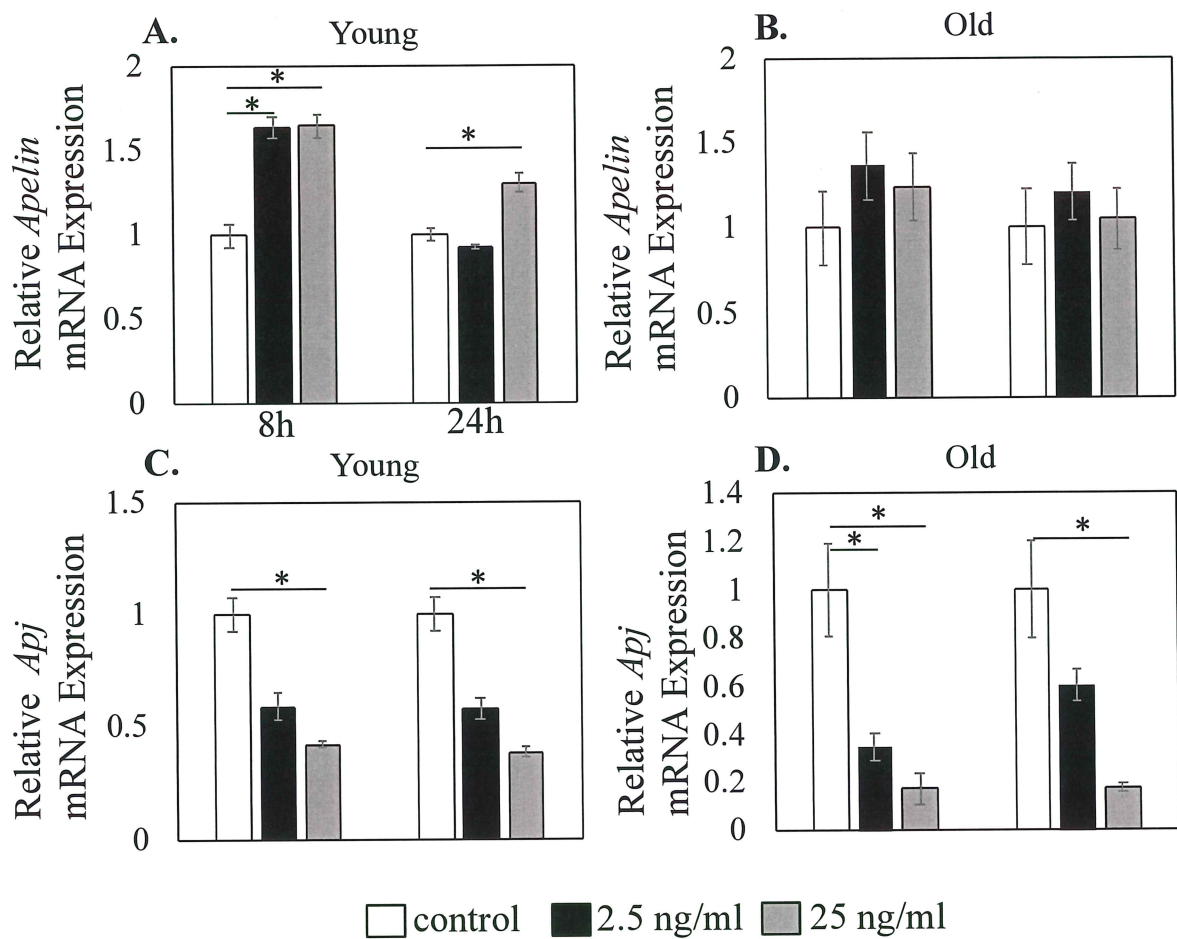


図 5. Apelin と Apj の発現に対する $\text{TNF-}\alpha$ の影響

0(コントロール)、2.5、25 ng/mL mouse recombinant $\text{TNF-}\alpha$ で 8 時間および 24 時間刺激した young および old mice 由来の筋肉細胞における *Apelin*(A、B) および *Apj*(C、D)の相対的 mRNA 発現量。

Apelin mRNA の発現の有意な上昇は、8 時間および 24 時間の $\text{TNF-}\alpha$ 刺激後の young mice 由来の筋肉細胞でのみ観察された(図 5A、B)。*Apj* mRNA の発現は、young および old mice 由来の筋肉細胞の両方で、8 時間および 24 時間の $\text{TNF-}\alpha$ 刺激後に有意に減少した(図 5C、D)。データは、平均値±標準偏差(SD)で表した。アスタリスクは $p < 0.05$ を示す。