

学 位 論 文 要 旨

氏 名 小山 智久



論 文 題 目

「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)

指 導 教 授 承 認 印

高 桐 雄 士



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)

氏名 小山 智久

【背景】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、高齢者における自律性の低下を引き起こす。サルコペニアは転倒・骨折をもたらし、高齢者の要介護状態や死亡のリスクを高め、様々な疾患に関連して予後に影響を及ぼす。しかし、早期介入により、病態の進行を遅らせたり、改善することが明らかにされ、サルコペニアの予防、診断、治療への関心が高まっている。今日の高齢化社会において、健康寿命の延伸や介護・医療コストの削減など、社会的な観点からもサルコペニア対策は喫緊の課題である。

多くの動物およびヒトモデルを用いた研究を通じて蓄積された知見により、筋萎縮に関与する細胞プロセスが徐々に理解されるようになった。しかし、サルコペニアの原因は未だ十分に解明されていない。

近年、骨格筋における Apelin 受容体(APJ)の発現が、加齢に伴い減少することが報告され、Apelin/APJ シグナル経路は筋肉の代謝に影響を与えている可能性が指摘された。その報告では高齢マウスは若齢マウスと比較し筋量・筋力の低下を認め、さらに骨格筋内 Apelin・APJ 発現が低下していたことが報告された。しかし、加齢に伴う APJ 減少のメカニズムは十分明らかではない。

一方、加齢に伴う生体内の慢性炎症状態は、筋機能に影響を及ぼす可能性が指摘されている。高齢者において血清中の腫瘍壊死因子(TNF- α)高値と低筋量・低筋力が相関す

ることや、骨格筋では加齢に伴う TNF- α レベルの上昇が観察され、筋萎縮と関連していることが報告されている。

そこで、加齢に伴う TNF- α の上昇と APJ の減少の関連性を調査するために、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 の影響を検討した。

【方法】4ヶ月齢(young mice、n=10)と24ヶ月齢(old mice、n=10)の C57BL/6J 雌性マウス大腿四頭筋を使用した。北里大学医学部動物管理委員会の承認を得た(参照番号: 2021-046)。

まず、C57BL/6J マウスを屠殺後、大腿部の皮膚と筋膜を除き大腿四頭筋を採取した。大腿四頭筋の筋重量(mg)と体重(mg)を測定後、筋重量/体重を算出し、young、old mice の骨格筋量の比較を行った。

次いで、採取した大腿四頭筋の *Tnfa*、*Apelin*、*Apj* の mRNA 発現を、qPCR を用いて比較した。さらに、young、old mice の TNF- α タンパク質の発現を調査するため、上記と同様に young mice、old mice(それぞれ n=5)の大腿四頭筋を採取した後、ウェスタンブロッティングで分析した。

また、筋原性細胞における young, old mice の APJ 陽性細胞の比較調査のため、フローサイトメトリーを行った。young mice と old mice(それぞれ n=5)の大腿四頭筋を同様に採取し、0.1%コラゲナーゼで処理し、細胞を採取した。その後、造血系細胞マーカーの CD45 と成熟筋細胞マーカーの Sca1 の抗体、APJ 抗体で処理し、幼弱筋原細胞(CD45(-)Sca1(-))と成熟筋原細胞(CD45(-)Sca1(+))の両者における APJ 陽性細胞の分布を調査した。

最後に、young, old mice(それぞれ n=5)より採取した大腿四頭筋を 0.1%コラゲナーゼで処理し α -MEM に 10%ウシ胎児血清を添加した培養液で 7 日間培養した。その後、

採取した筋由来細胞を 0 ng/mL(コントロール)、2.5 ng/mL、25 ng/mL の濃度の TNF- α に 8、もしくは 24 時間曝露し検体を採取した。その後 RNA を抽出し、*Apelin*、*Apj* mRNA 発現への影響を qRT-PCR により調査した。

統計解析には SPSS を用いた。正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定、分散の均質性の検定には Levene 検定を用いた。young、old mice の筋量、重量、筋量/重量は、Mann-Whitney U 検定、もしくは対応のない t 検定を使用して平均値(SD)の差を比較した。遺伝子とタンパク質の発現は Mann-Whitney U 検定を使用し比較した。二元配置分散分析と Bonferroni 多重比較検定を使用して 0 ng/mL(コントロール)、2.5 ng/mL、25 ng/mL の TNF- α により 8、24 時間で刺激した細胞群の遺伝子発現の差を決定した。p<0.05 を有意とした。

【結果】 young mice と old mice の大腿四頭筋量の比較

体重は old mice が有意に重く(p<0.001)、筋重量は 2 群に有意差を認めなかった(p=0.481)。old mice は young mice と比較し筋肉量/体重が有意に低かった(p<0.001)。

young と old mice の大腿四頭筋における *Apelin*、APJ 発現の比較

大腿四頭筋 *Apelin* mRNA 発現は 2 群間で有意差を認めなかったが、*Apj* mRNA は old mice で有意に低かった(*Apelin*; p=0.253, *Apj*; p=0.016)。フローサイトメトリーにおいては、APJ(+)細胞は Sca1(+)・(-)細胞共に存在していることが確認された。また、両者は共に old mice で有意に減少していた(Sca1(+)細胞; p=0.016、Sca1(-)細胞; p=0.016)。

young と old mice の大腿四頭筋における TNF- α 発現の比較

Tnfa mRNA と TNF- α タンパク質のレベルは、young mice と比較し old mice で有意に高かった(mRNA; p=0.034、タンパク質; p=0.006)。

TNF- α 刺激による *Apelin*、APJ 発現への影響

APJ の発現量が young mice と old mice で異なることがわかったため、筋由来細胞の TNF- α に対する応答も両者で異なるか評価した。TNF- α は、young mice 由来筋細胞において、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 : $p < 0.001$ ）および 24 時間（コントロール vs 25 ng/mL TNF- α : $p < 0.001$ ）後、*Apelin* mRNA の発現を著しく上昇させた。一方、old mice 由来筋細胞における *Apelin* mRNA 発現では、有意差は認められなかった。

young、old mice の両者の筋由来細胞において、*Apj* mRNA 発現は、8 時間（young, コントロール vs. 25 ng/mL TNF- α , $p < 0.001$; old, コントロール vs. 2.5 ng/mL TNF- α : $p = 0.012$, コントロール vs. 25 ng/mL TNF- α : $p = 0.009$ ）、および 24 時間（young, コントロール vs. 25 ng/mL TNF- α , $p < 0.001$; old, コントロール vs. 25 ng/mL TNF- α : $p = 0.007$ ）後、共に有意に減少した。

【考察】本研究において、old mice は young mice と比べ *Apj* mRNA、APJ(+)細胞が有意に低く、*Tnfa* mRNA、TNF- α タンパク質共に有意に高いことがわかった。また、筋由来細胞の TNF- α 刺激で *Apj* mRNA 発現が減少した。このことから old mice における骨格筋内 APJ 減少は TNF- α 増加と関連している可能性が示唆された。

本研究において筋細胞には成熟筋原細胞マーカーである Sca1(+), (-) 細胞の両者が存在していた。筋芽細胞は Sca1 陰性であるが、筋原性細胞の分化が進むにつれ *Sca1* mRNA が増加することが報告されており、本研究での結果は、加齢に伴う APJ の発現低下が未熟な筋原性細胞と成熟した筋原性細胞の両方における発現低下を反映している可能性が示唆された。

TNF- α はマウスやヒトで加齢とともに上昇していることや、TNF- α の mRNA とタンパク質レベルはフレイルの高齢者の骨格筋で上昇することが報告されている。また、

old mice 骨格筋では、免疫細胞における *Tnfa* mRNA 発現と TNF- α 陽性マクロファージが増加しているという報告もあり、本研究でも同様に old mice では TNF- α 発現が有意に高いことがわかった。

in vitro において TNF- α 刺激が *Apj* mRNA 発現を低下させた。old mice における APJ 発現の低下は、TNF- α 上昇と関連している可能性がある。また、in vitro における TNF- α 刺激は young mice 由来筋細胞において *Apelin* mRNA 発現が有意に増加したが、old mice 由来筋細胞では有意差を認めなかった。Apelin は TNF- α による肝細胞の生理的変化を改善することから、Apelin は TNF- α 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 TNF- α による炎症状態の上昇をもたらすかもしれない。本研究の筋由来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、old mice 由来の細胞間で異なっていた。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 筋由来細胞間の *Apelin* mRNA 発現における TNF- α への反応の違いに関連している可能性がある。

以上より加齢に伴う TNF- α 上昇が加齢に伴う APJ 発現低下・Apelin 感受性の低下をきたす可能性が示唆された。TNF- 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。

【結語】TNF- α は in vitro の筋肉由来細胞において APJ の発現を抑制した。骨格筋で観察される加齢に伴う TNF- α の増加は、APJ 発現の減少を誘導する可能性がある。TNF- 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。