

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11428

研究課題名（和文）IL-4の作用を利用した新たなサルコペニア治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new sarcopenia treatment using the action of IL-4

研究代表者

黒坂 光寿（Kurosaka, Mitsutoshi）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：40553970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、IL-4が筋の幹細胞である筋幹細胞（筋芽細胞）の融合を引き起こすメカニズムを明らかにし、その作用を利用して筋再生や筋形成を促進できるかどうかを培養実験および遺伝子改変マウスを用いた実験によって明らかにすることを目的とした。我々は、IL-4シグナルが筋幹細胞特異的な転写調節因子であるMyoDおよびmyogenin、細胞融合因子であるmyomergerの発現を介して、筋幹細胞融合を促進することを明らかにした。また、我々は、マウス骨格筋の筋損傷時におけるIL-4処置が筋再生を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、IL-4シグナルを利用することが筋幹細胞の融合を促進し、筋肉の形成や再生能を効果的に向上させた。この成果をもとに将来的には、IL-4シグナルを標的とした筋肉の肥大や筋肉の再生の促進あるいは筋肉の萎縮を予防のための治療薬への応用に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism by which IL-4 induces fusion of muscle stem cells and to determine whether its action can be used to promote muscle regeneration and muscle formation by in vitro and in vivo.

We have shown that IL-4 signaling promotes muscle stem cell fusion through the expression of the muscle stem cell-specific transcriptional regulators MyoD and myogenin and the cell fusion factor myomerger. We also found that IL-4 treatment promotes muscle regeneration during muscle injury in mouse skeletal muscle.

研究分野：筋生理学

キーワード：IL-4 筋幹細胞 細胞融合 MyoD Myogenin Myomerger

### 1. 研究開始当初の背景

加齢や不活動によって筋肉は萎縮する。この加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）は、筋肉量を減少させるだけでなく、転倒事故や基礎代謝量の低下によってメタボリックシンドロームを引き起こす可能性がある。また、体力低下が社会的に大きな問題となっており、その要因の一つとして運動不足による筋萎縮（不活動性筋萎縮）が指摘されている。したがって、それら筋萎縮を予防・改善する方法の確立は健康寿命の延伸につながると考えられる。

筋肉はそのもとになる筋芽細胞が融合することで形成される。疾患や加齢によりその融合が阻害されると筋肉の恒常性が破綻し、筋萎縮が進行する。したがって、筋芽細胞の融合が生涯にわたり適切に制御され続けることが重要であり、未だ明らかにされていない筋芽細胞の融合メカニズムを解明することは、融合の阻害により破綻する筋肉の恒常性の維持・回復に役立つと考えられる。

我々は、サイトカイン・インターロイキン-4 (IL-4) が筋タンパク質の合成を促進することを培養実験で発見した。また IL-4 は、筋核の供給を促進することが報告されているがそのメカニズムは明らかではない。本研究では、IL-4 シグナルによる筋芽細胞の融合のメカニズムを明らかにし、その作用を利用し、筋形成や筋量の維持に応用できるかどうか生体で検証することを目的とする。本研究の成果は、サルコペニア発症の予防、あるいは遅延させる方法の開発に貢献できる基盤的知見となることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、IL-4 シグナルが筋芽細胞融合を促進するメカニズムを明らかにし、生体におけるその役割を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

株化された筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。増殖培地および分化培地を用いて増殖能、分化能および融合能を評価した。また、RNAi 法を用いて IL-4 受容体  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ) のノックダウン (KD) 細胞を作成し、それら細胞における分化能および融合能を評価した。さらに、Myomerge を高発現させるためにプラスミド DNA を細胞に導入した。また、生体内での IL-4 シグナルの役割を明らかにするために、前脛骨筋に損傷を引き起こした野生型マウスに対して IL-4 処置を行い、再生筋の面積を測定し筋再生能を評価した。上記の分析には、免疫細胞染色法、組織染色法、ウェスタンブロット法および qRT-PCR 法を用いた。

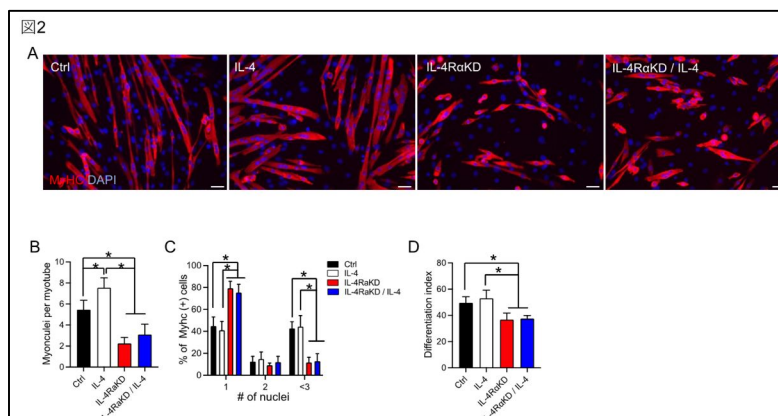
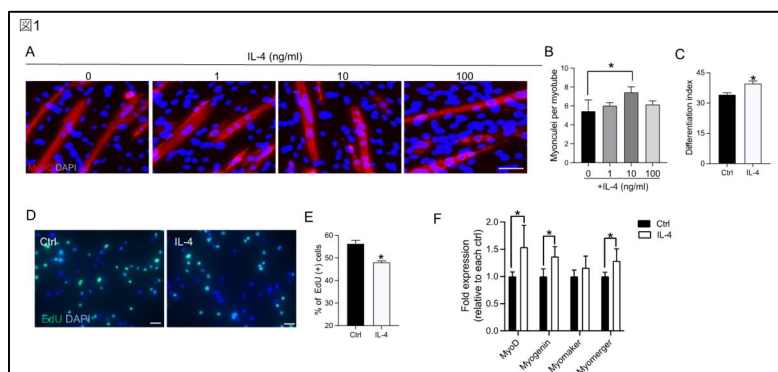
### 4. 研究成果

分化培地における C2C12 細胞に対する IL-4 処置は、分化能および融合能を向上させたが、増殖能は低下させた (図 1 A-E)。また、MyoD、Myogenin および Myomerge の発現を増加させたが Myomaker の発現には影響を及ぼさなかった (図 1 F)。

次に IL-4R $\alpha$ KD 細胞における分化能および融合能を評価した。その結果、IL-4R $\alpha$ KD 細胞では、分化能および融合能が低下した (図 2 A-D)。

また、IL-4R $\alpha$ KD 細胞では、MyoD、Myogenin および Myomerge の発現が減少することが示されたが、Myomaker の発現には影響はなかった (図 3 A-E)。

次に IL-4 と Myomerge の

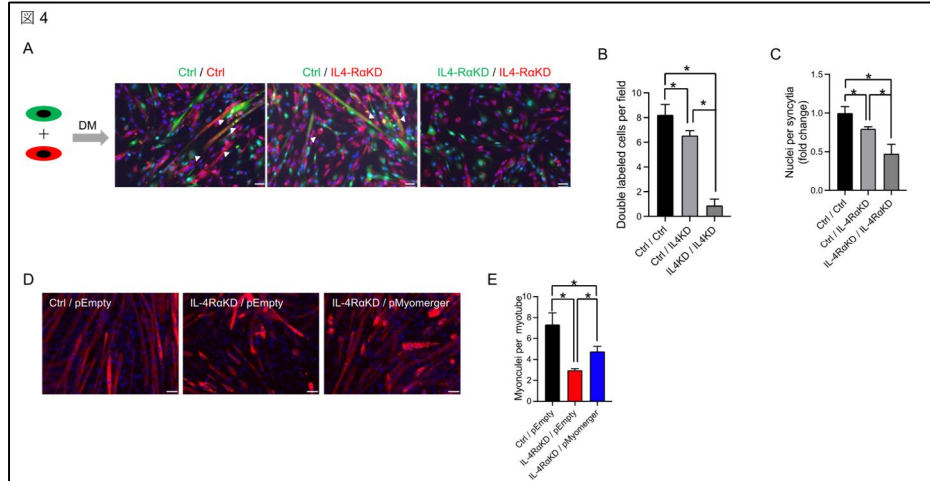
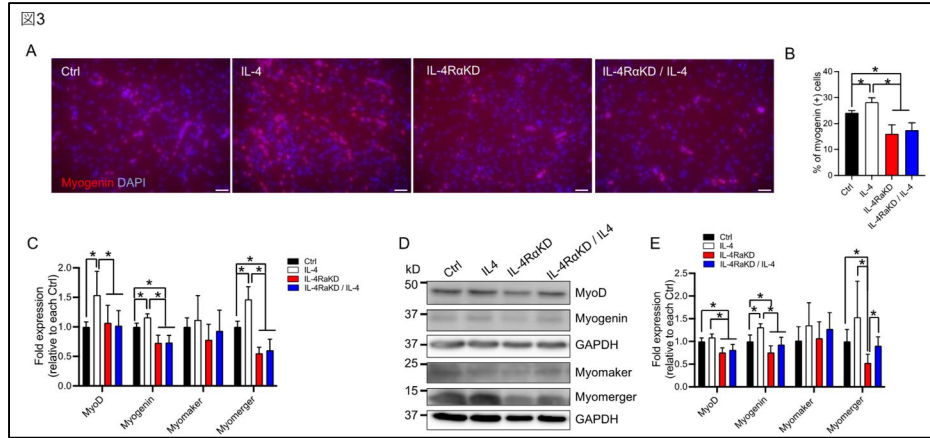


関係を明らかにするために、細胞混合アッセイ (Cell mixing assay) を行った。その結果、IL-4 RaKD 細胞における Myomerger の高発現処置は、融合能の低下を抑制した(図 4A-E)。

MyoD および Myogenin は、Myomerger の発現に与ることが報告されていることから、これらの結果より、IL-4 シグナリングは、MyoD と Myogenin および Myomerger の誘導を介して、筋芽細胞の融合を促進することが示唆された。

最後に、生体における IL-4 シグナルの役割を明らかにするために筋芽細胞の融合が生じる筋損傷・再生モデルを用いて検証した。薬剤によりマウス前脛骨筋損傷後、筋注で IL-4 を投与し、筋損傷後 5 日目まで毎日投与した。なお、コントロール群は、生理食塩水を投与した。その結果、筋損傷 5 日目の筋線維面積がコントロール群と比較して IL-4 投与群で有意に大きかった。

したがって、生体における IL-4 シグナリングは、筋再生を促進することが明らかとなり、筋形成や筋量維持・増加のために応用できる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitsutoshi Kurosaka, Yuji Ogura, Shuichi Sato, Kazuhisa Kohda, Toshiya Funabashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcription factor signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) is an inhibitory factor for adult myogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Skeletal Muscle	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13395-021-00271-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitsutoshi Kurosaka, Yung-Li Hung, Shuichi Machida, Kazuhisa Kohda	4. 巻 12
2. 論文標題 IL-4 Signaling Promotes Myoblast Differentiation and Fusion by Enhancing the Expression of MyoD, Myogenin, and Myomerger	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1284 ~ 1284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12091284	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒坂光寿, 洪永豊, 町田修一, 幸田和久
2. 発表標題 IL-4は細胞融合因子の発現を介して筋芽細胞融合に関与する
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsutoshi Kurosaka, Yung-Li Hung, Shuichi Machida, Kazuhisa Kohda
2. 発表標題 Roles of interleukin-4 in myoblast fusion via induction of myomerger expression
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小倉 裕司  (Ogura Yuji)  (90509952)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師   (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------