

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10904

研究課題名(和文) 骨格筋を形成する筋芽細胞融合の制御機構におけるSTAT6分子の役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of STAT6 in the regulatory mechanisms of myoblast fusion that form skeletal muscle

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞の融合は筋の発生、成長や再生のために必須である。しかしながらその制御機構は明らかにされていない。本研究では筋芽細胞の融合における STAT6 の役割を *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを目的とした。その結果、STAT6を高発現させると分化能や融合能が低下し、一方でSTAT6を低発現させると分化能や融合能が向上した。また *in vivo* 実験の結果、STAT6欠損マウスは、薬剤による筋損傷から5日後に野生型マウスよりも優れた再生能力を示した。これらの結果は、STAT6が筋芽細胞の融合を阻害する分子であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSTAT6が筋芽細胞の融合を抑制していることを明らかにした。筋芽細胞の融合は、筋の発生、成長や再生に必須であることが知られている。したがって、筋芽細胞の融合の機序を解明することは、筋の発生の理解あるいは効果的な筋肥大や筋再生方法の確立のために重要である。高齢社会を迎えた我が国において、加齢に伴う筋萎縮を抑制し、筋肉量を増加させることは健康寿命延伸のために重要である。また、スポーツ選手における筋損傷後の競技への早期復帰のためには筋再生を促進させることが重要である。本研究の成果はそれら問題を解決するために役立てられる。

研究成果の概要(英文)：While myoblast fusion is necessary for muscle genesis, development and regeneration, the clarification of the mechanisms of myoblast fusion is required. This study was conducted elucidate the role of STAT6 in myoblast fusion in *in vitro* and *in vivo*. STAT6 overexpression decreased, but STAT6 knockdown increased the differentiation index and the fusion index. Furthermore, STAT6 inhibited myogenin protein expression. Results of *in vivo* experiments show that STAT6 knockout mice exhibited better regeneration than wild-type mice 5 days after cardiotoxin-induced injury. Results suggest that STAT6 functions as an inhibitor of myoblast fusion.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：骨格筋 筋芽細胞 筋芽細胞融合 STAT6 IL-4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、現代人の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、転写因子 STAT6 が筋芽細胞の融合に関与している可能性を見出しているが、その詳細は明らかではない。本研究では、筋芽細胞の融合の制御メカニズムにおける STAT6 の役割を生体および培養レベルで解明する。本研究の成果は、加齢や不活動により進行する筋萎縮の対策の確立に寄与し健康寿命の延伸に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、筋芽細胞の融合の制御メカニズムを解明するために STAT6 に着目し、培養および生体レベルでその役割を検証することであった。

3. 研究の方法

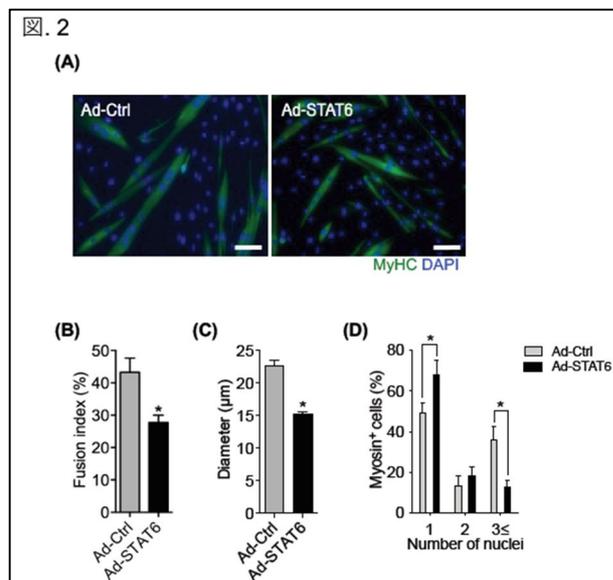
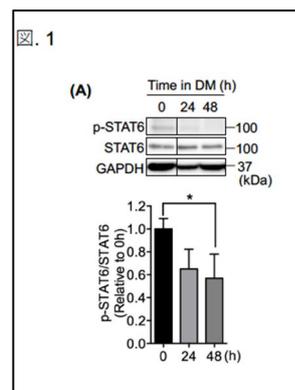
雄性マウス（7-9 週齢）から筋芽細胞を単離し、分化培地を用いて筋管細胞の形成過程における STAT6 の変化を評価した。また、リポフェクションおよびアデノウィルスを用いて STAT6 の低発現および高発現細胞を作成し、それら細胞における分化能および融合能を免疫細胞染色法、ウェスタンブロット法および qRT-PCR 法を用いて評価した。さらに、生体内での STAT6 の役割を明らかにするために STAT6 欠損マウスを用いて筋損傷後の筋再生過程を培養実験と同様の方法によって評価した。

4. 研究成果

まず、マウスから筋芽細胞を単離し、分化培地で 24 時間（24 h）および 48 時間（48 h）培養し、筋管細胞の形成中におけるリン酸化 STAT6（p-STAT6）の発現動態を調査した。その結果、増殖培地（0 h）と比較して分化培地で培養後 24 時間で p-STAT6 の発現が減少し始め、48 時間で有意に減少した（図 1A）。

次にアデノウィルスベクターを用いて STAT6 を高発現した細胞（Ad-STAT6）を作成し、分化培地で 48 時間培養し免疫細胞染色を行い筋管細胞の形成過程を評価した（図 2A）。その結果、STAT6 を高発現させた細胞では、通常の細胞（コントロール群（Ad-Ctrl）: Ctrl）と比較して、融合指数（図 2B）が有意に低く、また筋管細胞の直径（図 2C）が有意に細かった。また、STAT6 を過剰発現させた細胞は、通常の細胞と比較して 1 個の核を有するミオシン陽性細胞の割合が有意に増加したが、3 個以上の核を有する細胞の割合が有意に減少した（図 2D）。これらの結果は、STAT6 の発現上昇は筋芽細胞の融合を阻害していることを示唆している。

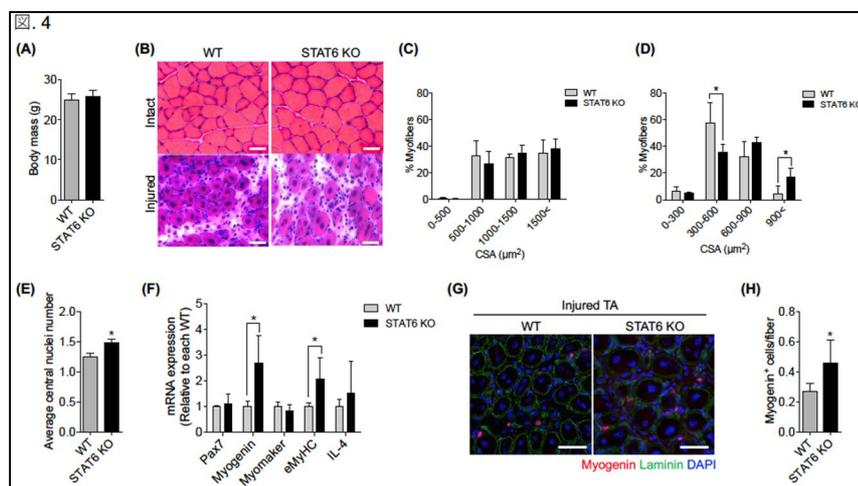
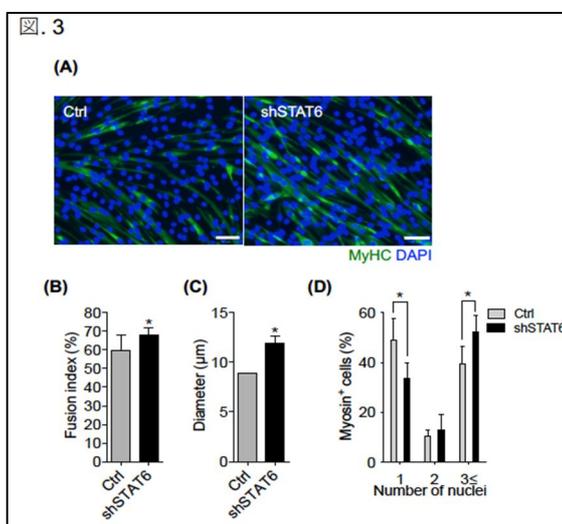
次に shSTAT6 ベクターを用いて STAT6 の低発現細胞（shSTAT6）を作成し、分化培地で 48 時間培養後に免疫細胞染色を行い筋管細胞の形成過程を評価した（図 3A）。STAT6 の低発現細胞では、通常の細胞と比較して融合指数が有意に高く、筋管細胞の直径が有意に太かった（図 3B,C）。また、STAT6 の低発現細胞では、通常の細胞と比較してミオシン陽性細胞の割合は、核が 1 個の細胞の割合は有意に減少したが、3 個



以上の核を持つ細胞の割合では、3 個以上の核を持つ細胞の割合は有意に増加した（図 3D）。これらの結果は、STAT6 の発現低下は筋芽細胞の融合を促進していることを示唆している。

生体における STAT6 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・再生モデルおよび STAT6 を欠損したマウス（STAT6KO）を用いて調査した。その結果、コントロールのマウス（野生型マウス： WT）と STAT6 欠損マウスの体重には有意な差はなかった（図 4A）。筋損傷を引き起こす薬剤（カルディオトキシン）をコントロールのマウスおよび STAT6 欠損マウスの左脚の前脛骨筋に注射して筋損傷を誘発し、その後の筋再生過程を評価した。損傷後 5 日目では、右の無傷の前脛骨筋における筋線維面積の分布に有意な差は見られなかった（図 4B, C）。しかし、損傷した前脛骨筋では、STAT6 欠損マウスがコントロールのマウスと比較して、300~600 μm^2 の筋線維の割合が有意に低く、一方で 900 μm^2 以上の筋線維の割合は有意に高かった（図 4D）。また、前脛骨筋の再生筋線維における中心核の平均数は、STAT6 欠損マウスではコントロールのマウスと比較して有意に多かった（図 4E）。

次に損傷した前脛骨筋における pax7、myogenin、myomaker、embryonic MyHC（eMyHC）および IL-4 の遺伝子発現を調査した。その結果、pax7 や myomaker の遺伝子発現には有意な差がなかったが、myogenin や eMyHC の STAT6 欠損マウスの遺伝子発現はコントロールのマウスと比較して有意に高かった（図 4F）。また、損傷した前脛骨筋に対して免疫組織化学染色を行い分化マーカーである myogenin の陽性細胞数を調査した。その結果、STAT6 欠損マウスではコントロールのマウスと比較して、myogenin 陽性細胞数が有意に多かった（図 4G,H）。これらの結果は、STAT6 欠損マウスでは、分化と融合が促進されることにより損傷後の筋再生が促進されることを示唆している。以上の結果より、STAT6 は筋芽細胞の融合を阻害する分子であることが明らかとなった。



また、前脛骨筋の再生筋線維における中心核の平均数は、STAT6 欠損マウスではコントロールのマウスと比較して有意に多かった（図 4E）。

次に損傷した前脛骨筋における pax7、myogenin、myomaker、embryonic MyHC（eMyHC）および IL-4 の遺伝子発現を調査した。その結果、pax7 や myomaker の遺伝子発現には有意な差がなかったが、myogenin や eMyHC の STAT6 欠損マウスの遺伝子発現はコントロールのマウスと比較して有意に高かった（図 4F）。また、損傷した前脛骨筋に対して免疫組織化学染色を行い分化マーカーである myogenin の陽性細胞数を調査した。その結果、STAT6 欠損マウスではコントロールのマウスと比較して、myogenin 陽性細胞数が有意に多かった（図 4G,H）。これらの結果は、STAT6 欠損マウスでは、分化と融合が促進されることにより損傷後の筋再生が促進されることを示唆している。以上の結果より、STAT6 は筋芽細胞の融合を阻害する分子であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Ogura Y, Kakehashi C, Yoshihara T, Kurosaka M, Kakigi R, Higashida K, Fujiwara SE, Akema T, Funabashi T. | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Ketogenic diet feeding improves aerobic metabolism property in extensor digitorum longus muscle of sedentary male rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0241382 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0241382 | 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 Ogura Y, Sato S, Kurosaka M, Kotani T, Fujiya H, Funabashi T. | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Age-related decrease in muscle satellite cells is accompanied with diminished expression of early growth response 3 in mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Biology Reports | 6. 最初と最後の頁 977-986 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-019-05189-5 | 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 Kotani T, Goto K, Ohno M, Ogura Y, Kurosaka M, Yatabe K, Kumai T, Niki H | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Long-Term Effects of ACL Transection on the Gastrocnemius Muscle in Rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sports Injuries & Medicine | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 Ogura Y, Sato S, Kurosaka M, Kotani T, Fujiya H, Funabashi T | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Age-related decrease in muscle satellite cells is accompanied with diminished expression of early growth response 3 in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular biology reports | 6. 最初と最後の頁 977-986 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-019-05189-5 | 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 Kurosaka M, Ogura Y, Sato S, Kohda K, Funabashi T | 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 1-14 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林哲士, 植原健二, 木城智, 皆川直毅, 鈴木智裕, 小倉祐司, 黒坂光寿, 後藤勝正, 仁木久照 |
| 2. 発表標題 ACL断裂症例のオーダーメイドリハビリプログラムの実現に向けて(第5報)-健側脚伸展筋力と筋線維タイプの関係- |
| 3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小谷貴史, 大野真弘, 小倉裕司, 黒坂光寿, 後藤勝正, 谷田部かなか, 熊井隆智, 藤谷博人, 仁木久照 |
| 2. 発表標題 ACL切断がラット腓腹筋に及ぼす長期的影響-切断側と対側の比較- |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林哲士, 植原健二, 木城智, 皆川直毅, 鈴木智裕, 小倉裕司, 黒坂光寿, 後藤勝正, 仁木久照 |
| 2. 発表標題 ACL断裂症例のオーダーメイドリハビリプログラムの実現に向けて(第6報)-筋線維タイプからみた至適な手術日- |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 STAT6は筋芽細胞の分化・融合を負に制御する |
| 2. 発表標題 黒坂光寿, 小倉裕司, 幸田和久, 船橋利也 |
| 3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuji Ogura, Mitsutoshi kurosaka, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi |
| 2. 発表標題 Involvement of early growth response 3 in myoblast proliferation |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuji Ogura, Mitsutoshi Kurosaka, Shuichi Ssato, Takashi Kotani, Hiroto Fujiya, Toshiya Funabashi |
| 2. 発表標題 Possible involvement of early growth response 3 in age-related reduction of muscle satellite cells |
| 3. 学会等名 2018 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mitsutoshi Kurosaka, Yuji Ogura, Kazuhisa Kohda, Toshiya Funabashi |
| 2. 発表標題 STAT6 promotes myoblast fusion via regulating myoblast differentiation |
| 3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuji Ogura, Mitsutoshi Kurosaka, Chiaki Kakehashi, Ryo Kakigi, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi |
| 2. 発表標題 Ketogenic diet induces slow-type shift of skeletal muscle in male rat |
| 3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|