

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17767

研究課題名(和文) ケトン体誘導食が持久性運動能力に及ぼす効果とその作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on the effects of ketogenic diet feeding on endurance performance and its mechanism

研究代表者

掛橋 千彰 (Kakehashi, Chiaki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：80535683

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)：ケトン餌摂取は、ラットの代表的な速筋である長趾伸筋の筋線維組成の遅筋方向への移行を促すことを確認した。ミトコンドリア酵素群、代謝に関わる酵素の発現が増加し、有酸素代謝能力が増すこと示唆された。遅筋化にはSema3Aが関与している事が示唆された。マウスへ移行することを目的として、ケトン餌摂取による筋重量、筋力、筋持久力を評価したが有意な変化は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動効果を高める手段の開発は、運動時間がとれない現代人にとって重要である。運動効果を向上できれば、健康増進に貢献できるからである。我々は、超高脂肪食ともいえるケトン食の摂取が、ラット骨格筋の代謝特性を遅筋型へシフトさせること発見した。これは、食事の内容を工夫するだけで運動をしたような効果があることを示唆しており、また、糖尿病などの運動療法を食事だけで模倣できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Our study confirmed that feeding of a ketogenic diet changed fast-type muscle to slow-type muscle in extensor digitorum longus in rats. In this muscle, mitochondrial and metabolic enzymes were increased. These changes increased the aerobic exercise ability of the rats. Sema3A might be involved in the muscle-type change. After substituting the rats with mice for a second experiment, we examined ketogenic diet effects on muscle weight, strength, and endurance in mice. No statistical significance was found.

研究分野：生理学

キーワード：ケトン餌 筋持久力 筋組成 有酸素運動 遅筋化 ミオシン

1. 研究開始当初の背景

体力の維持・向上には身体運動が非常に有効である。しかし、現代社会では時間的、場所的に運動の実施が制約されることが多い。また、入院や周術期でも運動の実施は困難になる。このような状況では、効率的な運動プロトコルや運動効果を高めるサポートツールが持つ意義は、きわめて大きい。

ケトン食とは、摂取カロリーの約 90%が脂肪、残りがタンパク質とごく微量の炭水化物からなる食事のことである。このような食事により、身体の主エネルギー源はケトン体(ベータヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸)となる。研究代表者は、平成 24 年度の科学研究費(萌芽研究)を起点に、このケトン食の生理効果を、末梢器官の骨格筋で研究してきた。その過程で、ケトン食を雄ラットに 4 週間摂取させると、下肢骨格筋のヒラメ筋で Type I ミオシン重鎖が増加すること、また、摘出筋パフォーマンス評価においてはヒラメ筋の強縮張力を低下させることを発見した。これらの知見は、ケトン食の摂取が、骨格筋を高い酸素利用能力を持つ遅筋型へシフトさせることを示している。これらのことから、ケトン食摂取のみで、骨格筋の有酸素性代謝能力を高め、全身持久力や筋持久力を向上させる効果を持つ可能性が推察された。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、「運動能力の維持・向上をもたらすためのケトン食の有用性とその分子作用メカニズムを解明すること」を最終目的としている。申請期間においては、従来の研究成果を詳細に明らかにするため、ラット骨格筋において、有酸素性代謝能力の改善を示唆する生化学的なエビデンスを得ること、そして、ラットの成果をマウスへ応用し、個体におけるケトン食の効果を全身パフォーマンスレベルで検証した。

3. 研究の方法

(1) ラットを用いた生理生化学的な研究

8 週齢のラットにケトン食(10%タンパク質、90%脂質; KD)あるいはコントロール食(80%炭水化物、10%タンパク質、10%脂質; CON)を 1 か月間摂取させた。体重は毎週計測し、1 か月後に長趾伸筋(EDL)を両側から摘出した。一方の EDL は、生化学分析に供した。他方は即座に筋張力を計測するために使用した。

ミオシン重鎖分析: 凍結保存した筋をホモジェネートし、沈査部分を溶解変性させ、グリセロール電気泳動法によってミオシン重鎖を分離した。分離したミオシンは、Type I、IIa、IIx および IIb が同定され、その組成割合が評価された。

酵素活性: 筋のホモジェネートの一部を用いて、酸化代謝能力の指標としてクエン酸合成酵素(CS)の活性を分光光度計により評価した。CS 酵素活性はホモジェネートのタンパク質濃度で補正し、非活性として示した。

代謝酵素発現: 筋のホモジェネートの一部を用いて、酸化系経路、解糖系経路、ベータ酸化経路に関する酵素、CS、3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素(HAD)およびシトクロム C オキシダーゼのサブユニット IV(COX-IV)の発現をウェスタンブロットング法にて評価した。

ミオシン重鎖発現: 速筋型ミオシンアイソフォームである Type IIa、IIc および IIb について、ウェスタンブロットング法で発現評価をした。

上記ミオシンの遅筋型への移行や有酸素的代謝酵素発現に関わる因子のタンパク質発現をウ

エスタンプロット法で評価した。

筋張力:筋張力はクレブス溶液中でプラチナ電極を用いたフィールド刺激により行い、単収縮、強収縮および疲労について評価した。

(2) マウスにおける個体レベルでのパフォーマンス研究

ラットにおける上記の成果に基づけば、他の動物種においても有酸素代謝およびその結果としての筋持久力や筋力に差が出る可能性がある。そこで、本研究では、マウスに長期間ケトン食を摂取させ、筋力および筋持久力を個体レベルで評価した。

マウス:本研究では、オスの C57BL/6 マウスを利用した。

群分け:マウスとコントロール食群 (CON) とケトン食群 (KD) に体重が等しくなるように群分けした後、12 週間各食餌で飼育した。体重は毎週計測し、食餌の影響を評価した。

パフォーマンス評価:筋力はマウス用筋力系を用いた四肢のグリップストレングスで評価した。マウスを金網の上に乗せ四肢で金網をつかませた。その後、尻尾を後方へ引っ張ることでマウスが反射的に金網を握るように仕向け、その力を計測して発揮筋力とした。複数回計測し、その最高値を最高筋力とし、それぞれのマウスの体重で相対化して評価した。

筋持久力評価:金網ぶら下がりテストを用いた。マウスを 20 センチ四方の金網に乗せ、上下反転させることで、マウスを金網にぶら下がらせ、金網にぶら下がることができた時間 = 掴まり時間 (秒) を計測した。マウスには体重の 30%相当の重りを付け、より骨格筋に負荷がかかるようにして実験した。

4. 研究成果

(1) ケトン食摂取によりラットの体重の増加は有意に抑制された。EDL のミオシン重鎖は速筋線維種の中で IIb II d 方向へのシフトが観察され (図 1)、そのタンパク発現量も同じ傾向を示した。また、ケトン食摂取で、EDL の CS、HAD および COX-IV の発現が有意に増加した (図 2A-C)。骨格筋有酸素性代謝を改善する因子を検討した結果、ケトン食摂取で Semaphorin 3A (Sema3A) のタンパク質発現が有意に増加した (図 2D)。一方で、単収縮、強収縮および疲労曲線には CON と KD の間に差はなかった。

これらの成果は、ケトン食摂取が速筋型骨格筋である EDL の有酸素性代謝能力の改善に寄与することを示唆しており、ケトン食が持続性トレーニングに類する効果を持つ可能性を示している。また、その機序には、Type IIb ミオシン発現を抑制する Sema3A の関与が示唆される。

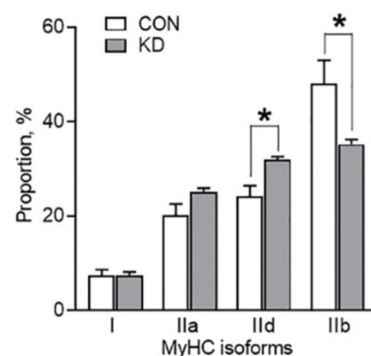
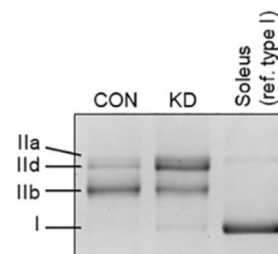


図1 コントロール食 (CON) とケトン食 (KD) のミオシン重鎖組成。* $p < 0.05$

その一方で、摘出筋における筋張力試験では、ケトン食の作用を示すことができなかったが、これは、ケトン食が体重減少などの効果を発揮するにもかかわらず、筋機能を悪化させないとも解釈できる。すなわち、ケトン食は超高脂肪食にも関わらず、体重増加と筋機能への悪影響なしに筋の有酸素性代謝を改善できる可能性があり、運動制限のある人や体重管理の厳しいアスリートらに

対する運動模倣食としての可能性を持つと考えられる。

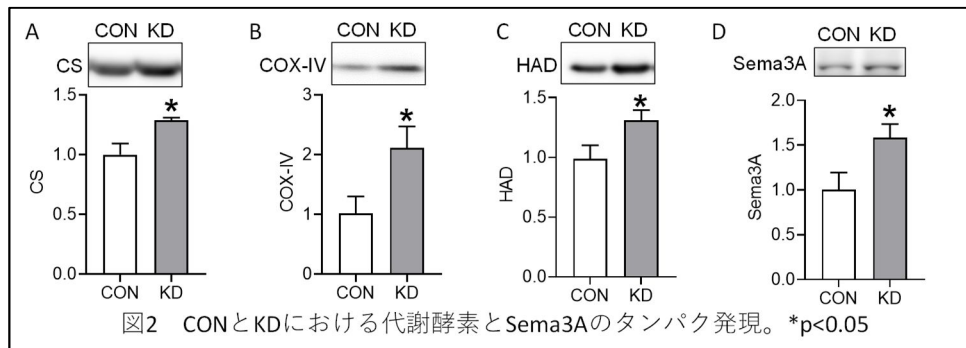


図2 CONとKDにおける代謝酵素とSema3Aのタンパク発現。*p<0.05

(2) ケトン

食の効果を個体レベルのパフォーマンスとして検証するため、マウスにケトン食を12週間摂取させ、体重、グリップストレングスによる最高筋力、金網掴まりテストによる筋持久力を評価した。その結果、体重はラットの知見と同様に、ケトン食摂取で長期にわたりその増加が抑制された(図3A)が、最高筋力および筋持久力には食事による差がなかった(図3B-C)

これらの結果は、仮説とは異なっており、ケトン食摂取が全身性のパフォーマンスの向上には必ずしも寄与しないことを示唆している。パフォーマンスの結果としては、ラット摘出筋の知見と同様であり、ケトン食摂取だけでは、そのパフォーマンス改善にまでは至らない可能性がある。しかしながら、筋力や全身持久性の評価には他の方法があること、ケトン食は中枢機能にも影響があるためマウスのパフォーマンステストへの態度に課題があった可能性など、ケトン食がパ

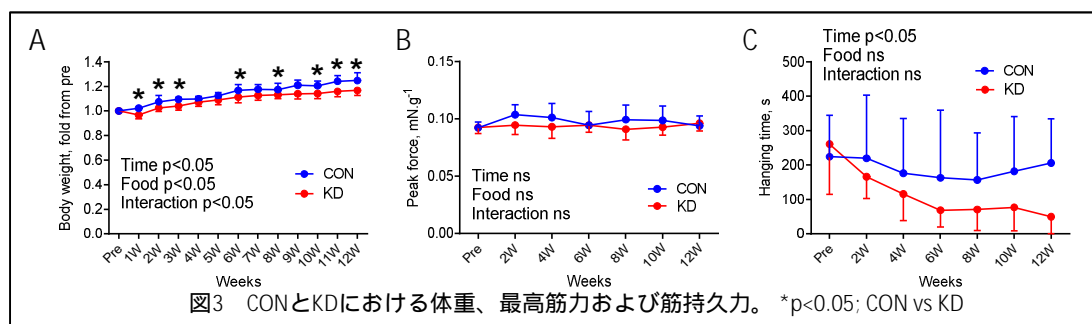


図3 CONとKDにおける体重、最高筋力および筋持久力。*p<0.05; CON vs KD

フォーマンスに影響しないと結論するにはさらなる検討を要する。

まとめると、本研究の結果、ケトン食は骨格筋の生化学的な特徴を有酸素的代謝に好ましい方向へ変化させるが、その変化は摘出筋や全身性のパフォーマンスの改善へ反映されるほどではないことが示唆される。しかしながら、パフォーマンスの評価方法に加え、ケトン食摂取と運動負荷を併用するなど、その介入方法には未だ検討の余地がある。一方で、骨格筋の有酸素性代謝の改善は生活習慣病などの抑制に寄与すると考えられている。またその病態は、肥満症や体重過多とも関連しているため、超高脂肪食であるにも関わらず体重を増加させず、骨格筋の有酸素代謝を改善できるケトン食は、生活習慣病に対する新しい食事介入策になる可能性がある。したがって、さらなる研究によってケトン食の有用性を解明することには、医学的に意義があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Ogura Yuji, Kakehashi Chiaki, Yoshihara Toshinori, Kurosaka Mitsutoshi, Kakigi Ryo, Higashida Kazuhiko, Fujiwara Sei-Etsu, Akema Tatsuo, Funabashi Toshiya	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

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

1. 発表者名 Yuji Ogura, Toshinori Yoshihara, Mitsutoshi Kurosaka, Ryo Kakigi, Sei-etsu Fujiwara, Chiaki Kakehashi, Kazuhiko Higashida, and Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Four-week Ketogenic Diet Improves Aerobic Metabolic Capacity in Extensor Digitrum Longus Muscle of Sedentary Male Rats
3. 学会等名 Experimental Biology 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogura Y, Kurosaka M, Kakehashi C, Kakigi R, Akema T, Funabashi T
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 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ケトン飢による学習機能と筋組成変化
https://www.marianna-u.ac.jp/houjin/academic/20210224_01/index.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------