

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16499

研究課題名(和文)冬眠動物における骨格筋萎縮耐性メカニズムの解明とサルコペニア対策への応用

研究課題名(英文) Response of skeletal muscle in mice and hamster to ketogenic diet feeding

研究代表者

中尾 玲子 (NAKAO, Reiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：20582696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：冬眠動物(ハムスター)、非冬眠動物(マウス)に飢餓、低体温を誘導するケトン体食を摂取させたときの骨格筋重量減少率、筋萎縮マーカー遺伝子であるMafbx発現量はマウス、ハムスターで違いが見られなかったため、冬眠中のハムスターにおける筋量維持機構は飢餓や低体温では誘導されない何らかの因子により惹起されると考えられた。一方、ケトン体食摂取時の体温は普通食に比べて低下するが、骨格筋の運動を支配する坐骨神経を切除したマウスにケトン体食を摂取させると、暗期前半の体温低下がさらに顕著になったことから、飢餓時の体温調節には時刻依存性があり、骨格筋がその機能を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that the mRNA expression of Slc25a25, a Ca²⁺-sensitive ATP carrier in the inner mitochondrial membrane, fluctuates in a circadian manner in mouse skeletal muscle and it was damped in Clock mutant and Bmal1-deficient mice. Furthermore, a ketogenic diet (KD) that induces time-of-day-dependent hypothermia, induced Slc25a25 mRNA expression in skeletal muscle. Sciatic denervation abolished circadian and KD-induced Slc25a25 expression. We measured body temperature (Tb) in sciatic denervated mice fed with KD to determine the functional role of KD-induced Slc25a25 expression. Sciatic denervation abolished Slc25a25 expression and augmented KD-induced hypothermia compared with sham-operated mice. These findings suggest that KD feeding induces expression of the muscle circadian gene Slc25a25 via neural pathways, and that SLC25A25 might be involved in muscle thermogenesis under KD-induced hypothermia in mice.

研究分野：栄養学

キーワード：ケトン体食 熱産生

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、寝たきりの介護者の増加は深刻な社会問題となっている。寝たきりになる原因のうち、約20%は骨格筋を含む運動器の障害(ロコモティブシンドローム)であると言われている。サルコペニア(加齢による骨格筋の萎縮)は身体活動量の低下を招き、さらに筋量が減少するという負の循環を引き起こす。筋萎縮は、筋細胞の増殖因子への応答性の低下と筋タンパク質分解の増加が原因と考えられているが、メカニズムの全貌や筋萎縮の有効な治療法はまだ確立されていない。申請者はこれまで、萎縮した骨格筋において増殖因子 IGF-1 のシグナル伝達分子である IRS-1 が、ユビキチンリガーゼ(分解すべきタンパク質にユビキチン分子を付加する酵素) Cbl-b の働きによって分解されることが筋萎縮の原因の1つであること、Cbl-b 阻害ペプチドが筋萎縮を改善できることを報告したが、筋重量を完全に回復することはできなかった(Nakao et al. Mol Cell Biol. 2009)。現在、筋萎縮を改善するためには主に運動療法(リハビリテーション)が用いられるが、患者にとって大きな負担となっているのが現状である。また、高齢になると食事が減少し、体内の同化作用が働きにくくなることも、筋萎縮を悪化させる要因の1つである。栄養療法、薬剤を含む、より効率的な筋萎縮改善法の開発が求められている。

ヒトやマウスを含めた非冬眠動物では1~2日間の絶食や筋の不活動によって筋肉が萎縮してしまうのに対して、リスやクマなどの冬眠動物は冬の数が月間単に籠もり、活動量、摂餌量、体温等が著しく低下するにも関わらず、春になると再び活発に動くことができる。冬眠動物の骨格筋量は冬眠中もほとんど変化しないため、内在性の筋量維持機構が働くと考えられるが、その分子メカニズムは全く不明である。冬眠は、その発現の仕方によって大きく2種類に分けられる。季節性に冬眠を発現する場合と、日照時間や環境温度の変化により誘導される冬眠である。リス等は前者の季節性冬眠を行うが、シリアンハムスターは、後者の「環境の変化に適応した冬眠」を行う(Ueda et al. Physiol Behav. 1995)。申請者は、シリアンハムスターは飢餓や不活動に対する筋量維持機構を常に発揮できるよう備えているのではないかと考えた。

冬眠中の筋萎縮抑制メカニズムに着目した研究は、リス、クマなどの冬眠動物における冬眠前後の筋重量、筋線維径の比較がわずかに報告されているのみである。冬眠動物と非冬眠動物の比較を行うことは、非冬眠動物が冬眠できないことから、当然ながら不可能であると思われる。申請者の研究グループでは、肥満改善のためのダイエット食として知られる高脂肪・低炭水化物食(ケトン体食)が、非冬眠動物であるマウスに低体温かつカロリー制限の状態を誘導できることを報告

した(Oishi et al. FEBS Open Bio. 2013)。本研究の予備試験として、マウスにケトン体食を7日間摂取させ筋萎縮マーカー遺伝子の発現量を測定した。その結果、ケトン体食を摂取したマウスの骨格筋(腓腹筋)において、筋萎縮マーカー遺伝子であるユビキチンリガーゼ *MAFbx*、*MuRF1*、オートファジータンパク質分解系のマーカーである *Lc3b* の発現が誘導され、筋重量も減少することを確認した。マウスやラットを48時間絶食させた際も同程度の筋萎縮が起こることが知られている(Lecker et al. FASEB J. 2004, Sacheck et al. FASEB J. 2007)。長期間にわたって実験可能なケトン体食負荷は、骨格筋において持続的な飢餓状態、かつ低体温という冬眠様状態を誘導する実験モデルとして利用できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、冬眠動物(シリアンハムスター)、非冬眠動物(マウス)に冬眠様現象を誘導し骨格筋における応答を比較することにより、冬眠動物特異的な筋萎縮耐性メカニズムの原因候補分子を明らかにすることを目的とする。まず、ケトン体食を摂取させたハムスター、マウスの骨格筋において、筋重量、筋萎縮マーカー分子の発現量を比較する。骨格筋量の制御機構は全身のエネルギー代謝調節と密接に関連しているため、肝臓や脂肪組織における脂質・糖代謝に関与する分子の変動についても解析し、飢餓に応じた筋萎縮に対して冬眠動物がどのように適応するのか、分子レベルで比較検討を行う。

3. 研究の方法

(1)ケトン体食摂取が、冬眠動物と非冬眠動物の深部体温、エネルギー代謝に与える影響を調べるために、まず、ハムスターとマウスに短期間(3~5日間)及び長期間(4週間程度)ケトン体食を摂取させる。これらのハムスターとマウスにおける冬眠様状態(飢餓状態(ケトシス)、低体温)の誘導の程度を、深部体温を指標として比較する。

(2)ケトン体食摂取が冬眠動物と非冬眠動物の骨格筋に与える影響を調べる。申請者が行った予備試験では、ケトン体食を7日間摂取したマウスの骨格筋(腓腹筋)重量は、普通食摂取群と比較して約12%減少した。また、筋萎縮遺伝子として知られるユビキチンリガーゼ *MAFbx*、*MuRF1*、オートファジータンパク質分解系のマーカーである *Lc3b* は、ケトン体食摂取により発現誘導された。先に検討を行った冬眠様状態の誘導の程度の差を踏まえて筋重量、筋タンパク質合成/分解に関与する分子の発現量について検討し、短期的、長期的な飢餓に対する骨格筋の応答の違いを考慮に入れ、ハムスターとマウスの筋萎縮の程度を比較する。

4. 研究成果

(1) ハムスターとマウスに短期間(3日間)または長期間(4週間)ケトン体食を摂取させ、冬眠様状態(低体温)の誘導の程度を比較するために深部体温を経時的に測定した。マウス、ハムスターのいずれにおいてもケトン体食摂取により低体温が観察された。

(2) ハムスター、マウスにケトン体食を摂取させたときの骨格筋重量を測定した。ケトン体食を3日間摂取させると、マウスでは普通食摂取時に比較して有意に筋重量が減少したが、ハムスターでは筋重量は減少しなかった。しかし、4週間ケトン体食を摂取させると、ハムスターとマウスの筋重量はともに著しく減少した。また、筋萎縮マーカー遺伝子である *Mafk* 発現量もマウス、ハムスターのどちらの骨格筋においても同程度に誘導されていた。これらの結果から、冬眠中のハムスターにおける筋量維持機構は飢餓や低体温では誘導されない何らかの因子により惹起されると考えられた。

(3) ケトン体食摂取による体温低下の経日変動にマウス、ハムスター間で違いが見られたため、ケトン体食摂取中の体温調節機構に着目した。ケトン体食を摂取したマウスの体温は、普通食を摂取したマウスの体温に比べて低下する。骨格筋の運動を支配する坐骨神経を切除したマウスにケトン体食を摂取させると、暗期前半の体温低下がさらに顕著になったことから、飢餓時の体温調節には時刻依存性があり、骨格筋がその機能を担うことを明らかにした。ケトン体食摂取中の熱産生の責任分子を同定するためにDNAマイクロアレイのデータから *Slc25a25* 分子に着目した。*Slc25a25* はミトコンドリアに発現するATPトランスポーターであり、暗期前半をピークとする日周発現を示したが、この日内リズムは坐骨神経切除により消失し、ケトン体食摂取中の体温変動と一致する発現動態を示した。また、*Slc25a25* 遺伝子発現リズムは *Clock* 変異マウス、*Bmal1* 欠損マウス、坐骨神経を切除したマウスにおいて消失した。このため、*Slc25a25* 遺伝子は体内時計と神経系のシグナルを介して日周発現すると考えられた。これらの結果から、飢餓時の体温調節には骨格筋による熱産生が必要であり、体内時計や神経系によって発現量が制御される *Slc25a25* 遺伝子が寄与する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

(1) Nakao R, Shimba S, Oishi K. Ketogenic diet induces expression of the muscle circadian gene *Slc25a25* via neural pathway that might be involved in muscle thermogenesis. *Sci Rep.* 2017;7(1):2885. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-03119-8.

(2) Nakao R, Okauchi H, Hashimoto C, Wada N, Oishi K. Determination of reference genes that are independent of feeding rhythms for circadian studies of mouse metabolic tissues. *Mol Genet Metab.* 2017;121(2):190-197. 査読有
DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.04.001.

(3) Nakao R, Nikawa T, Oishi K. The skeletal muscle circadian clock: current insights. *ChronoPhysiology and Therapy.* 2017;7:47-57. 査読有
DOI: <https://doi.org/10.2147/CPT.S116569>

(4) Nakao R, Shimba S, Oishi K. Muscle *Bmal1* is Dispensable for the Progress of Neurogenic Muscle Atrophy in Mice. *J Circadian Rhythms.* 2016;14:1-7. 査読有
DOI: 10.5334/jcr.141

(5) Yasumoto Y, Hashimoto C, Nakao R, Yamazaki H, Hiroshima H, Nemoto T, Yamamoto S, Sakurai M, Oike H, Wada N, Yoshida-Noro C, Oishi K. Short-term feeding at the wrong time is sufficient to desynchronize peripheral clocks and induce obesity with hyperphagia, physical inactivity and metabolic disorders in mice. *Metabolism.* 2016;65(5):714-727.
DOI: 10.1016/j.metabol.2016.02.003.

[学会発表](計12件)

(1) 中尾玲子、榛葉 繁紀、大石 勝隆、骨格筋特異的な日周発現遺伝子 *Slc25a25* は飢餓時の熱産生を制御する、2017年9月1日、第18回運動器科学研究会、大和ミュージアム(広島)

(2) Reiko Nakao, Shigeki Shimba, Katsutaka Oishi. Chronic starvation induces expression of the muscle circadian gene *Slc25a25* via neural pathway that might be involved in muscle thermogenesis. XV European Biological Rhythms Society Congress. 2017年8月1日. Academic Medical Centre (オランダ)

(3) 中尾玲子、岡内宏樹、橋本千秋、大石勝隆、末梢組織におけるハウスキーピング遺伝子の日周発現と食餌リズムの影響、第71回日本栄養食糧学会大会、2017年5月20日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

(4) 中尾玲子、榛葉繁紀、大石勝隆、骨格筋特異的な日周発現遺伝子 *Slc25a25* は飢餓時の熱産生を制御する、第23回日本時間生物学学会学術大会、2016年11月12日、名古屋大学(愛知)

(5) 中尾玲子、榛葉繁紀、大石勝隆、飢餓時の体温維持における骨格筋熱産生の役割 骨格筋特異的な日周発現遺伝子

Slc25a25 の機能、第3回時間栄養科学研究会、2016年8月26日、東京農業大学(東京)

(6) 中尾玲子、榛葉繁紀、大石勝隆、骨格筋特異的な熱産生遺伝子 *Slc25a25* は飢餓時の熱産生を制御する、第2回日本筋学会学術集

会、2016年8月5日、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター（東京）

(7) 中尾玲子、山崎春香、野呂知加子、榛葉繁紀、大石勝隆、骨格筋特異的な日周発現遺伝子 Slc25a25 は飢餓時の熱産生を制御する、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月13日、武庫川女子大学（兵庫）

(8) 中尾玲子、山崎春香、安本佑輝、大石勝隆、骨格筋におけるエネルギー代謝関連遺伝子の日周発現とその制御機構、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日、神戸ポートピアホテル（兵庫）

(9) 中尾玲子、山崎春香、大石勝隆、飢餓時の体温維持に関わる骨格筋特異的な日周発現遺伝子、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会、2015年12月1日、神戸ポートピアホテル（兵庫）

(10) 中尾玲子、山崎春香、野呂知加子、大石勝隆、低栄養性の低体温によって発現が誘導される骨格筋特異的な日周発現遺伝子、第22回日本時間生物学会学術大会、2015年11月21日、東京大学（東京）

(11) 中尾玲子、山本幸織、堀川和政、安本佑輝、二川健、向井千秋、大石勝隆、骨格筋における末梢時計の制御メカニズムとその役割、第2回時間栄養科学研究会、2015年9月2日、早稲田大学（東京）

(12) 中尾玲子、山本幸織、堀川和政、安本佑輝、二川健、向井千秋、大石勝隆、Aberrant expression of circadian clock genes in denervated mouse skeletal muscle、European Biological Rhythms Society (EBRS)/World Congress of Chronobiology (WCC)、2015年8月2日、The University of Manchester（イギリス）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 玲子（NAKAO, Reiko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学系）・講師

研究者番号：20582696

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し