

令和元年6月19日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19314

研究課題名(和文) ケトン体増加がPGC1 α -Ucp1転写制御により加齢性代謝不全に与える影響の検討研究課題名(英文) The effect of ketone body increase on age-related metabolic failure by PGC1 α -Ucp1 transcription regulation

研究代表者

香川 正太 (KAGAWA, Syota)

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30463201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：市販品のケトン食(F3666)とコントロール食(AIN76A)を20週齢の老化促進モデルマウス(SAMP8)に対して30日間摂餌させた。F3666摂餌群では血中ケトン体濃度は著しく上昇し、SAMP8(加齢)において高かった随時血糖をケトン食が低下させていたので、経口ブドウ糖負荷試験を行ったところ、ブドウ糖投与による血糖の上昇を抑制した。体重がケトン食群で低値を示していたので、脂肪燃焼に関わる褐色脂肪でのPpargc1a(PGC1 α)とUcp1の遺伝子発現を検討したところ、Ppargc1aの遺伝子発現は著しく上昇したが、Ucp1の遺伝子発現上昇まで見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血中ケトン体増加が高齢者の代謝疾患を改善するのではないかという疑問の元、直接的に血中ケトン体を増加させるケトン食を与えた場合における表現型の変化を検討した。その中でも糖代謝やエネルギー代謝に焦点を当てた研究を行った。高齢者における糖代謝異常をケトン体は是正できたものの、体重の減少はエネルギー代謝(Ucp1遺伝子発現の上昇)によるものではなかった。これらの結果より、ケトン食による血中ケトン体の増加は、体重の減少による糖代謝亢進に繋がるものの、その体重の変化は、加齢性エネルギー代謝不全の改善によるものではなく、不用意なケトン食の適用が高齢者の「飢餓」に結びついてしまう可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The ketone diet (F3666) and the control diet (AIN76A) were fed for 30 days to a 20-week-old accelerated aging model mouse (SAMP8). In the F3666 feeding group, the ketone diet increased blood ketone body concentration and reduced the blood glucose level that was high in SAMP8, so an oral glucose tolerance test was performed. As a result, feeding of ketone body suppressed the rise of blood glucose by glucose administration. Because body weight was low in the ketogenic diet group, the gene expression of Ppargc1a (PGC1 α) and Ucp1 in brown adipose tissue was examined. The gene expression of Ppargc1a was increased, but the gene expression of Ucp1 could not be increased.

研究分野：代謝性疾患

キーワード：ケトン体 糖代謝 エネルギー代謝 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

独居高齢人口は近年著しく増加し、低栄養・栄養欠乏の状態にある。結果、加齢に伴う基礎代謝低下とサルコペニア (Exp Gerontol 47, 38-44, 2012) から起因する衰弱 (フレイリティ) に陥り、高齢者の ADL (Activities of Daily Living) 増悪は不可避である。「加齢による栄養摂取不良」が健康長寿へのストッパーとなっている (厚生労働省: 日本人の食事摂取基準 (2015 年版) (案))。基礎代謝低下やフレイリティは行動範囲や活動量を激減させ、サルコペニア肥満と、それに起因する生活習慣病罹患人口も増加している (PLoS ONE 5(5): e10805, 2010)。一方で、肥満・生活習慣病予防としては、カロリー制限があるが、近年、糖質制限 (低炭水化物食) が議論の的となっている。しかしながら、その有効性や安全性に対する基礎研究は皆無である。

申請者はその点に着目し、自然発症老化促進マウス SAMP8 (P8) と正常老化マウス SAMR1 (R1) に同総カロリーで 8% 低炭水化物食 (LC) もしくは 56% 炭水化物含有普通食 (NC) を摂餌させたところ、P8/LC の体重は常に最低値、自発行動量も低く、しかし、摂餌エネルギーは最高、直腸温も高い傾向にあったことが解った。

さらに、P8/LC の摂餌後 20 週の褐色脂肪は、ミトコンドリアからのエネルギー供給に重要な Ucp1 遺伝子発現量が他のマウス群の 2.5 倍近く増加しており、摂餌後 30 週では、P8/LC の内臓白色脂肪における Ucp1 遺伝子発現量が、同様に脂肪萎縮している R1/LC と比して 20 倍にも増加、UCP1 抗体を用いた免疫染色では、P8/LC のみに UCP1 陽性細胞群を認め、最終的に白色脂肪の褐色化を惹起することがわかった。その表現型として P8/LC は酸素消費量 (VO₂) が増加しており、呼吸商 (RQ) が低値を示すことから、脂肪をエネルギー源にして体温調節などの生体機能維持を補完していることがわかった。

すなわち、加齢と長期にわたる糖質制限は、生体機能の補完として、「脂肪」におけるエネルギー代謝が亢進し、その結果として、褐色脂肪活性化と、続いて内臓脂肪の褐色化が起こることを観察した。この研究で最も興味深いことは、血中ケトン体濃度と協調して Ucp1 遺伝子発現を転写制御し、脂肪のエネルギー代謝を調節する Ppargc1a (PGC1) 遺伝子発現が P8/LC で高値を示していることにある。最近の研究では、ケトン食が褐色脂肪でミトコンドリア生成に関与していること、UCP1 蛋白発現を上昇させていることが報告されている (FASEB J. 26, 2351-2362, 2012; IUBMB Life. 65(1):58-66, 2013)。

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえて、本研究では、血中ケトン体濃度の上昇が、加齢性代謝疾患を改善する可能性に着目し、直接的に血中ケトン体濃度を上昇させる「ケトン食」を、加齢のモデルである老化促進モデルマウスに摂餌させた場合の様々な「代謝」の表現型に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

20 週齢の老化促進モデルマウス (SAMP8) および正常老化マウス (対照マウス: SAMR1) に 30 日間ケトン食 (F3666) およびコントロール食 (AIN76A) を摂餌させた。

その間、3 日ごとに体重、随時血糖値および血中ケトン体濃度を測定し、糖代謝およびエネルギー代謝に与える血中ケトン体の影響をモニタリングした。

糖代謝の評価として、各個体に関して一昼夜空腹の後、経口ブドウ糖負荷試験を行い、ブドウ糖負荷による血糖値の上昇を改善する効果に関して検討を行った。

さらに、体重の変化とエネルギー代謝に関して、その機序の一端として、PGC1-Ucp1 転写系に着目し、褐色脂肪組織の Ppargc1a (PGC1) および Ucp1 遺伝子発現量を検討した。

4. 研究成果

まず費用を抑える目的で、オリジナルのケトン食 (可溶性無窒素由来カロリー比 2.1%、粗蛋白由来カロリー比 8.7%、粗脂肪由来カロリー比 89.2%) を作成し、SAMP8 および SAMR1 に摂餌させた。その際に血中ケトン体濃度を測定した。しかし、摂餌前と比べ、血中ケトン体の上昇は確認できず、実験系が成立しなかった (図 1 参照)。そこで、市販されているケトン食 (F3666) とコントロール食である AIN76A を用いて、再度、血中ケトン体濃度の測定を実施した。

ケトン食を与えた SAMP8 および SAMR1 (SAMP8-Ket および SAMR1-Ket) とコントロール食を与えた SAMP8 および SAMR1

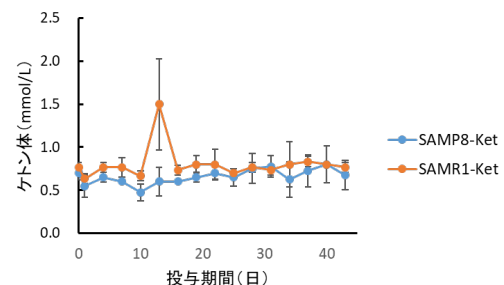


図 1: オリジナルケトン食による血中ケトン体濃度の変化

(SAMP8-ND および SAMR1-ND) における血中ケトン体濃度、随時血糖および体重を測定した。すると、F3666 摂餌による血中ケトン体濃度は AIN76A と比較して高濃度を維持し、実験系が成立することとなった(図2 参照)。

また、十分な血中ケトン体濃度の上昇において、SAMP8-Ket では、SAMP8-ND による血糖値上昇がある程度抑制され(図3 参照)、体重が減少していた(図4 参照)。

これらのことから、血中ケトン体濃度の上昇が、加齢による糖代謝異常やエネルギー代謝異常に対して有効に作用している可能性を考えた。ケトン食およびコントロール食を30日間摂餌させた後、糖代謝異常を改善する可能性を探るため、糖負荷試験を行った。

糖負荷試験の結果を図5に示したが、ケトン食摂餌により増加した血中ケトン体濃度の条件下で、SAMP8-Ket および SAMR1-Ket の両者において、ブドウ糖負荷による血糖値の上昇を抑制した。これら、随時血糖と糖負荷試験の両結果から、増加したケトン体は加齢性の糖代謝異常を抑制することがわかった。

また、ケトン食摂餌による体重の減少がエネルギー代謝不全を緩和する可能性を考えて、エネルギー代謝に関わる褐色脂肪組織における Ppargc1a (PGC1) および Ucp1 の各遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で検討した。褐色脂肪組織の Ppargc1a (PGC1) 遺伝子発現は、SAMP8-Ket および SAMR1-Ket において有意に増加していた(図6)。これは既報と比較しても同様な結果が得られた。

一方で褐色脂肪組織での Ucp1 遺伝子発現を検討したところ、既報とは異なり、SAMP8-Ket および SAMR1-Ket において有意な発現の増加を見出すことはできなかった(図6)。

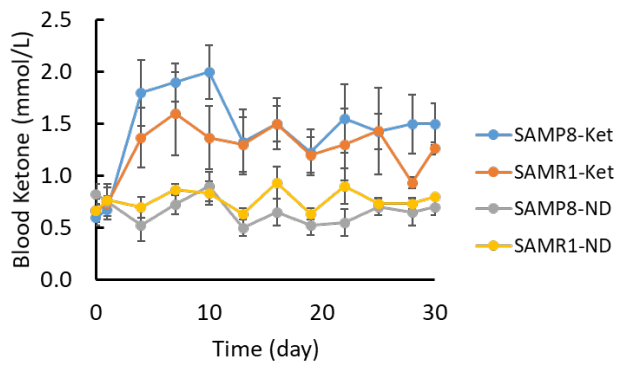


図2：ケトン食 F3666 による血中ケトン体濃度の変化

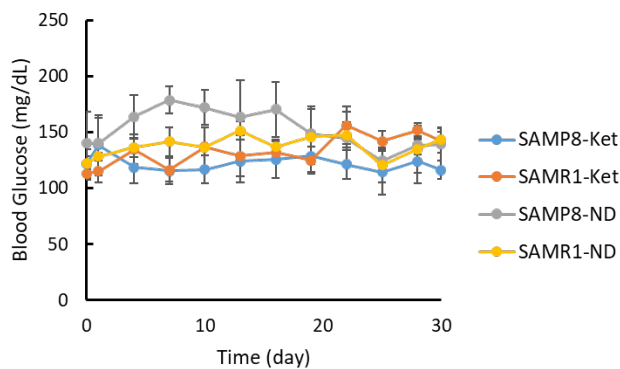


図3：ケトン食 F3666 による随時血糖の変化

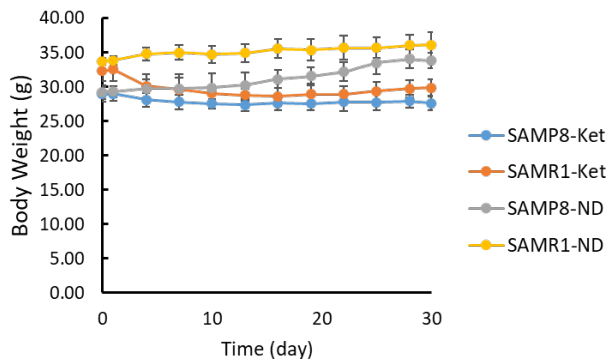


図4：ケトン食 F3666 による体重の変化

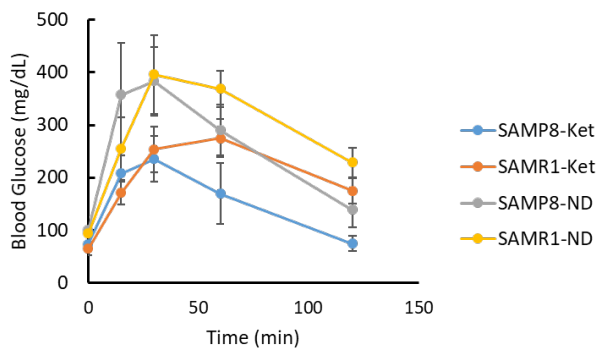


図5：ケトン食摂餌による経口ブドウ糖負荷試験の結果

以上の結果より、ケトン食による直接的な血中ケトン体濃度の上昇は、加齢に伴う糖代謝異常をある程度改善する作用を持っていることが解ったが、一方で、体重の減少は、褐色脂肪組織における PGC1-Ucp1 遺伝子発現の上昇を介したエネルギー代謝亢進によるものではなく、おそらくケトン食の栄養状態不良による「飢餓」状態が体重減少を促進したものと考えられた。

今後の展開として、ケトン食摂餌によるエネルギー代謝亢進の表現型を詳しく解析するため、マウス直腸温や体表温度を測定し、体重の減少が、熱産生亢進によるものかどうかを検討したいと考えている。また、褐色脂肪組織に偏らず、皮下脂肪組織(白色脂肪組織)の

エネルギー代謝亢進の可能性を考え、皮下脂肪組織の PGC1- β Ucp1 転写調節系や脂質代謝酵素群の遺伝子発現を精査することを考えている。

さらに、血中ケトン体濃度の上昇が糖代謝異常を回復させているため、インスリン抵抗性改善の指標となるインスリン負荷試験を実施し、インスリン標的組織である肝、骨格筋および内臓脂肪組織のインスリンシグナル伝達の変化を解析する予定である。

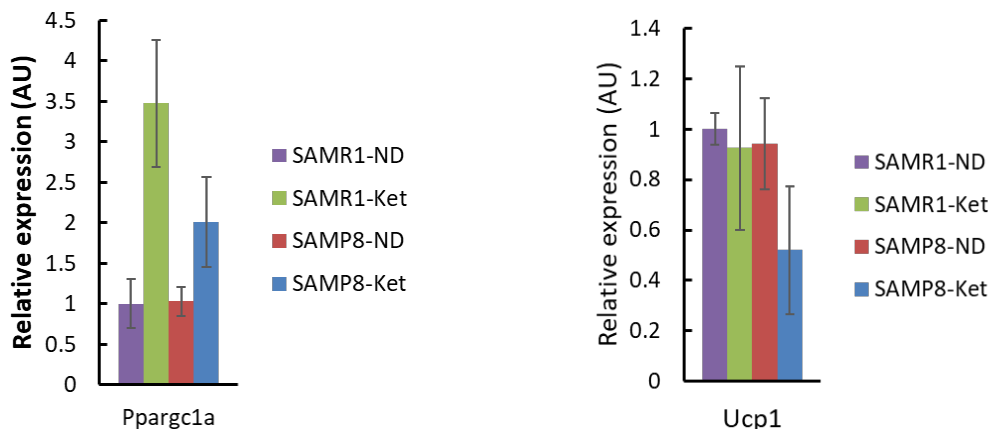


図 6：ケトン食摂餌による Pparg1a および Ucp1 遺伝子発現の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kimura I, Kagawa S, Nishimura K. Self-administered rhubarb-free kyoseihatekigan has novel anti-asthma effects: Two case reports. *Traditional & Kampo Medicine*. 査読有 4(1) : 2017, 58-61. doi : 10.1002/tkm2.1070.

〔学会発表〕(計 6 件)

越智啓行、香川正太、市来唯、高橋伸明、福山彰吾、長島史裕．八味地黄丸は肝および内臓脂肪のインスリンシグナルを介して個体のインスリン抵抗性を改善する、日本薬学会第 139 回年会、2019 年 3 月 20 日 - 23 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）

佐藤慎太郎、橋本眞奈、山内麻央、香川正太、長島史裕．大腸菌の増殖抑制作用を有する苔類のテルペノイド成分、日本薬学会第 139 回年会、2019 年 3 月 20 日 - 23 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）

金城華菜、香川正太、川床拓也、越智啓行、市来唯、長島史裕．過食肥満モデル Ay/+ は高脂肪食負荷により非アルコール性脂肪肝炎を発症する、日本薬学会第 138 回年会、2018 年 3 月 25 日 - 28 日、ANA クラウンプラザホテル金沢（石川県金沢市）

香川正太、田部勝也、長島史裕、谷澤幸生．過食肥満動物 Agouti マウスは高脂肪食負荷により非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を発症する、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年 5 月 18 日 - 20 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

香川正太、田部勝也、金城華奈、川床拓也、谷澤幸生、長島史裕．糖質制限は、老化促進マウス SAMP8 において白色脂肪褐色化と個体のエネルギー消費を促進する、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 3 日 - 4 日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）

香川正太、田部勝也、福田尚文、奥屋茂、谷澤幸生．継続的な糖質制限は加齢における褐色脂肪機能亢進ならびに白色脂肪褐色化を惹起する、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 20 日 - 21 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。