

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32672

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19652

研究課題名(和文)骨格筋および神経機能低下はケトン食で改善可能か? -サルコペニア予防を目指して-

研究課題名(英文)The effect of short-term of ketogenic diet on neuromuscular components in the mouse

研究代表者

鴻崎 香里奈 (Kouzaki, Karina)

日本体育大学・保健医療学部・助教

研究者番号：30739769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ケトン食が骨格筋と神経へ作用する分子メカニズムの解明と、ケトン食による骨格筋と神経の機能低下を抑制可能かを検証するために、マウスを対象として脂質10%、糖質80%、タンパク質10%からなる通常食または脂質90%、糖質0%、タンパク質10%からなるケトン食を6週間摂取させた。ケトン食を摂取したマウスでは、ミオシン重鎖SLOWタイプのタンパク質発現量が有意に増加(約6%)していた。また筋横断面積は、通常食を摂取したマウスと比較して増加傾向( $p=0.059$ )であった。これらの結果から、6週間のケトン食摂取は筋線維サイズの変化や、遅筋線維の増加をもたらす可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では、低糖質・高脂質食の総称とされるケトン食を摂取すると、身体へ様々な影響をもたらすことが明らかとされている。しかし一方で、骨格筋へ対して、ケトン食がどのような効果をもたらすかは完全に明らかとされていない。本研究では、実験動物を対象としてケトン食を6週間摂取させると、体重増加を抑制するが骨格筋量は増加させる可能性を見出した。また、姿勢維持や持久的な運動に大きな役割を果たす筋(遅筋)においてケトン食がもたらす効果が大きい可能性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of 6-weeks ketogenic diet intervention on the neuromuscular components. Male C57BL/6J mice were divided into normal diet (Fat: 10%, Carbohydrate: 80%, Protein: 10%) group and ketogenic diet (Fat: 90%, Carbohydrate: 0%, Protein: 10%) group. After 6-weeks, gastrocnemius muscle tissue was analyzed. The expression of SLOW type myosin heavy chain (MHC) was significantly increased (approximately 6%) in the ketogenic diet group compared to the normal diet group. Muscle cross sectional area (CSA) was also increased ( $p=0.059$ ) than the normal diet group. These results indicate that 6-weeks of ketogenic diet intervention may result in change of muscle fiber size and shift of slow-twitch muscle fibers.

研究分野：健康科学

キーワード：ケトン食 サルコペニア 神経筋接合部 筋委縮 骨格筋 ミオシン重鎖

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢性筋萎縮として知られるサルコペニアは、筋量減少や筋力低下に加え、それらに起因した肥満症、糖耐能変化、インスリン抵抗性などの代謝異常を伴う。本研究では、サルコペニアの予防・改善のための新たな手段として、ケトン食による効果に注目した。ケトン食は、糖質由来のエネルギー産生に代わり、脂質由来のエネルギー産生を亢進させ、さらにその副産物であるケトン体 ( $\beta$ ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、アセトンの総称) の利用を促進すると考えられている。近年では、健康増進や肥満症の改善のためにケトン食が用いられるなど (Dashti et al. 2004)、幅広い世代の人々からもケトン食による効果への関心が高まりつつある。しかし、ケトン食が骨格筋や神経系へもたらす影響や、その作用メカニズムについては完全に明らかとなっていない。また、骨格筋や神経系へケトン食を実施した既報では、介入期間が数ヶ月~1年以上など長期間が多数を占める (Wallace et al., Zhou et al. 2021)。本研究によって、骨格筋や神経系へ対するケトジェニックダイエットの作用機序、および短期間での介入効果が解明できれば、臨床へ応用するための大きな一歩となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスを対象とした基礎的実験によって、6週間の継続的なケトン食が骨格筋や神経系へもたらす影響を検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### 対象と餌、介入期間

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを対象とし、通常食を摂取する群 (糖質 80%、タンパク質 10%、脂質 10%、以下 ND 群) とケトン食を摂取する群 (糖質 0%、タンパク質 10%、脂質 90%、以下 KD 群) に分類して6週間の飼育を行った。6週間経過後、体重測定を実施した後に安楽死させて解剖し、ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋を摘出して重量を測定した。また、病理学的・生化学的解析には、主に腓腹筋を用いた。

#### 免疫組織化学染色による筋線維横断面積 (CSA) の評価

クライオスタットを用いて腓腹筋を厚さ  $10\mu\text{m}$  に薄切し、スライドガラスに接着させた。その後、採取した切片を冷風で乾燥させ、4%パラホルムアルデヒドを切片に15分間浸含させ、組織の固定処理をおこなった。固定処理後、0.1Mリン酸緩衝液で5分×3回洗浄した。次に0.2% Triton-100X、および4% BSA含有の0.1Mリン酸緩衝液にて、室温で1時間ブロッキングをおこなった。その後、ブロッキング溶液に希釈した Laminin 抗体溶液 (1:1000, L8721, シグマアルドリッチジャパン, 日本) を用い4°Cにて一晩反応させた。翌日に0.1Mリン酸緩衝液で5分×3回洗浄した後、ブロッキング溶液に希釈した二次抗体 Alexa fluor 594-conjugated secondary antibody (1:2000, 品番: 150160, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用い、室温で2時間反応させた。共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000) を用いて撮影した後、画像解析ソフト Myovision を用い、1つの筋サンプル当たり 200 線維以上の面積を ND4 四分、KD4 四分測定した。

#### ウエスタンブロットによるタンパク質発現解析

腓腹筋はホスファターゼインヒビターおよびプロテアーゼインヒビターを溶解した RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は濃度測定後、サンプル濃度を  $1\text{mg/ml}$  に調製し、7.5%、10%、12% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) のゲルを用いて電気泳動させた。電気泳動後、PVDF メンブレンへタンパク質を転写させ、5%スキムミルクで室温1時間のブロッキング処理をおこなった。ブロッキング後、一次抗体として MHC SLOW (1:4000, M8421, Sigma-Aldrich)、MHC FAST (1:2000, M4276, Sigma-Aldrich)、を用いて4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体は Mouse IgG 抗体 (#7076, CSA) を 1:2000-1:4000 で使用し室温で1時間振盪させた。その後、発光基質 (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo

Fisher Scientific, MA, USA)で発光させ、検出し定量評価を実施した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1 体重及び筋湿重量

6週間の介入後、ND群およびKD群の体重を測定したところ、KD群の体重はND群より有意な低値を示した(図1A)ことから、ケトン食を継続的に摂取しても、体重はNDを摂取した場合より増加が鈍化する可能性が示された。また、遅筋線維および速筋線維によって構成される腓腹筋、主に遅筋線維の割合が多く占めるヒラメ筋、速筋線維の割合が多く占める足底筋の3種類の異なる下腿三頭筋を摘出した。その結果、体重においては群間で有意な差が認められたにもかかわらず、ヒラメ筋、足底筋および腓腹筋における筋湿重量は、ND群とKD群との間で有意な差は認められなかった(図1B-D)。

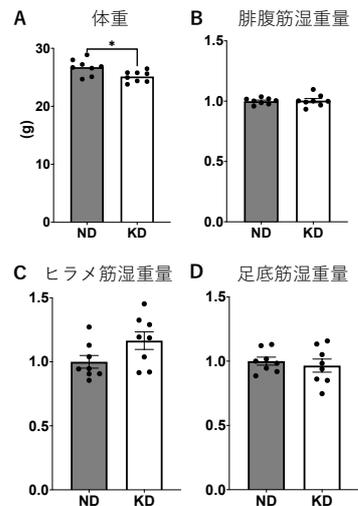


図1. 6週間介入後の体重および下腿三頭筋筋湿重量

##### 4-2 腓腹筋線維横断面積(CSA)

マウス1匹あたりの腓腹筋サンプルから20枚前後の画像をND群4匹分、KD群4匹分撮像した。その後、各サンプルから得られた腓腹筋の画像を、画像解析ソフト Myovision を用いて CSA を算出した結果、ND群とKD群の間で有意な差は認められなかった。しかしながらKD群では、ND群より腓腹筋 CSA は増加傾向を示していることが明らかとなった( $p = 0.057$ , 図2A, B)。

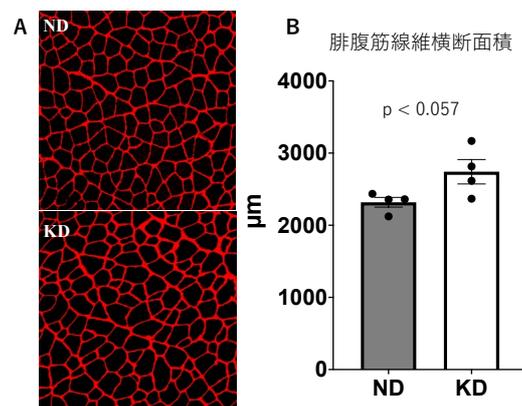


図2. 6週間介入後の体重および下腿三頭筋筋湿重量

##### 4-3 タンパク質発現量解析

上述したように、ND群とKD群で腓腹筋湿重量に有意な差は認められなかった。また、腓腹筋 CSA については、有意差は認められなかったものの、KD群において高値を示す傾向であった。次に、腓腹筋のウェスタンブロット解析によって、ミオシン重鎖(MHC) SLOWおよびFASTのタンパク質発現量を定量化した。その結果、MHC (FAST)のタンパク質発現量は群間で差が認められなかったが(図3A, B)。一方 MHC (SLOW)については、ND群と比較してKD群でタンパク質発現が有意に高値を示す結果となった(図3A, C)。

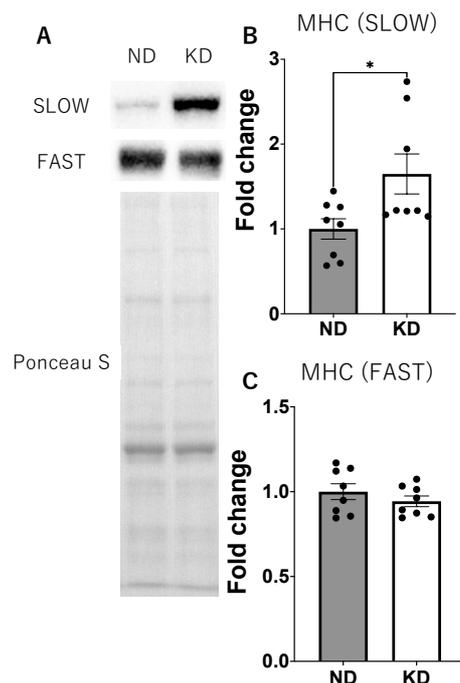


図3. 腓腹筋におけるMHCタンパク質発現量

#### 4-4 本研究成果を踏まえた今後の検討課題

若齢の C57BL/6J マウスを対象とした 6 週間のケトン食による介入によって、特に遅筋線維の筋湿重量の維持や、CSA の増加に一部寄与する可能性が明らかとなった。現在、腓腹筋の病理サンプルを用いて筋線維タイプ別に染色を実施し、それぞれの筋線維タイプが占める割合を解析途中である。また、ヒラメ筋や足底筋の解析は未実施であるため、遅筋線維優位なヒラメ筋や、速筋線維優位な足底筋を対象とした解析も、課題であると言える。さらに今後の展望として、筋線維の遅筋化に関与する主要なシグナルである NFAT-カルシニューリンシグナル、あるいはそれ以外のシグナル分子の関与について検討する必要があると考える。

#### 引用文献

1. Dashti et al. Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients, *Exp Clin Cardiol*, 2004 Fall;9(3):200-5.
2. Wallace et al. The ketogenic diet preserves skeletal muscle with aging in mice, *Aging Cell*, 2021 Apr;20(4):e13322
3. Roberts et al. A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice, *Cell Metab*, 2017 Sep 5;26(3):539-546. e5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鴻崎 香里奈、田村 優樹、小谷 鷹哉、中里 浩一
2. 発表標題 6週間の継続的なケトン食摂取はC57BL/6Jマウス腓腹筋の遅筋化を促す
3. 学会等名 第77回 日本体力医学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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