

ケトジェニックダイエット摂取に対する骨格筋の応答

中尾 玲子

1. はじめに

骨格筋量や筋力の減少（筋萎縮）は、活動量の減少や筋の脱神経だけでなく、絶食、がん、感染症などによる生体のエネルギー不足を補うため、筋タンパク質がエネルギー基質として動員された結果起こる。栄養状態の悪化により引き起こされる筋萎縮の分子メカニズム解明を目的として、マウスやラット等の実験動物を24～48時間の絶食に供する実験モデルが多く用いられてきた。しかし、個体の活動量や筋タンパク質代謝の制御分子の発現量は絶食開始から短時間で大きく変動していくため、絶食時間の長さが数時間違うだけで、観察された生理的応答の解釈がまったく異なる場合がある。したがって、絶食モデルにおける筋萎縮で得た知見が、現代社会で問題になっているサルコペニア、神経性食欲不振、嚥下障害や消化吸收障害等、慢性的な低栄養状態で起こる筋萎縮のメカニズムと一致しない点があると考えられる。一方、ケトジェニックダイエット（KD）は炭水化物を制限し、代替として脂質を摂取する食事であり、飢餓時の代謝状態を模倣できることから、近年は糖尿病や肥満の食事療法の一つとして注目されている。本稿では、マウスにおけるKD誘導性の筋萎縮と、絶食や加齢による筋萎縮との共通点・相違点について紹介し、新たな筋萎縮モデルとしてのKDの利点と限界を考察する。

2. ケトジェニックダイエットとは

ケトジェニックダイエット（KD）は、糖質の摂取量を制限し、代替エネルギーとして脂質を摂取することでエネルギー基質を糖質から脂肪酸にシフトさせ、肝臓におけるケトン体合成と血中ケトン体を増加させることからその名

称が用いられる（図1A）。KDは1921年に初めててんかんの治療食として用いられたことで機能性が広く認識されるようになった。抗てんかん薬が開発された後はてんかん治療にKDが用いられる例は少なくなり、近年はがん、アルツハイマー病、パーキンソン病等に対する治療効果が期待されているが、これらの病態に対するKDの作用メカニズムは明らかになっていない。KDは絶食と似た代謝状態を引き起こす一方で長期間の摂食が可能であることから、最近では体脂肪減少を目的とした肥満の食事療法に用いられる。ヒトがKDを摂取すると血中ケトン体濃度は4～5mM程度に上昇するが、血液のアシドーシスは起こらないため、KDはリスクの低い食事療法であると考えられている。しかし、長期的なKD摂取により現れる副作用として、低カルシウム血症・骨萎縮、胆石、脱毛等が報告されている。除脂肪体重はKD摂取により増加、または減少するいずれの結果も報告され、議論が続いている。

3. KD摂取マウスでみられた筋萎縮

筆者らは、KDが慢性的な低栄養とそれに伴う筋萎縮を引き起こすか検討するために、10週齢のICRマウスを2群にわけ、普通食（AIN-93M）またはKDを7日間摂取させた後に血液、骨格筋を採取し、代謝パラメーターや筋重量を測定した。KDを摂取させたマウスでは、血糖値や血中インスリン、アルブミン量が普通食摂取群に比べて低下し、反対に、血中コルチコステロン（グルココルチコイド）、遊離脂肪酸、ケトン体（ β -ヒドロキシ酪酸）は増加した（図1B～F）。これらの結果は、KD摂取マウスが絶食モデルと同じく低栄養状態にあり骨格筋のエネルギー基質がグルコースから脂質、およびケトン体へとシフトしたことを示すものである。

このときの筋重量は、普通食摂取群に比べて、腓腹筋で23%、前脛骨筋で11%、ヒラメ筋で16%減少した。また、KD群の腓腹筋線維の横断面積は20%、握力は22%、それぞれ普通食群に比べて低値を示し、KDが筋量・筋力の低下を引き起こすことが示された（図2A, B）。KDで起こる筋萎縮の特徴を明らかにするために骨格筋におけるタンパク質分解に寄与する遺伝子の発現量を測定すると、ユビキチンリガーゼ *Maifbx* や *Murfl*（図2C）、これらの発現を正に制御する転写因子である *Foxo1/3* や *Klf15* の発現が

徳島大学大学院医歯薬学研究部生体栄養学分野（〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15）

Response of skeletal muscle under ketogenic diet

Reiko Nakao (Department of Nutritional Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, 3-18-15 Kuramotocho, Tokushima 770-8503, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940730

© 2022 公益社団法人日本生化学会

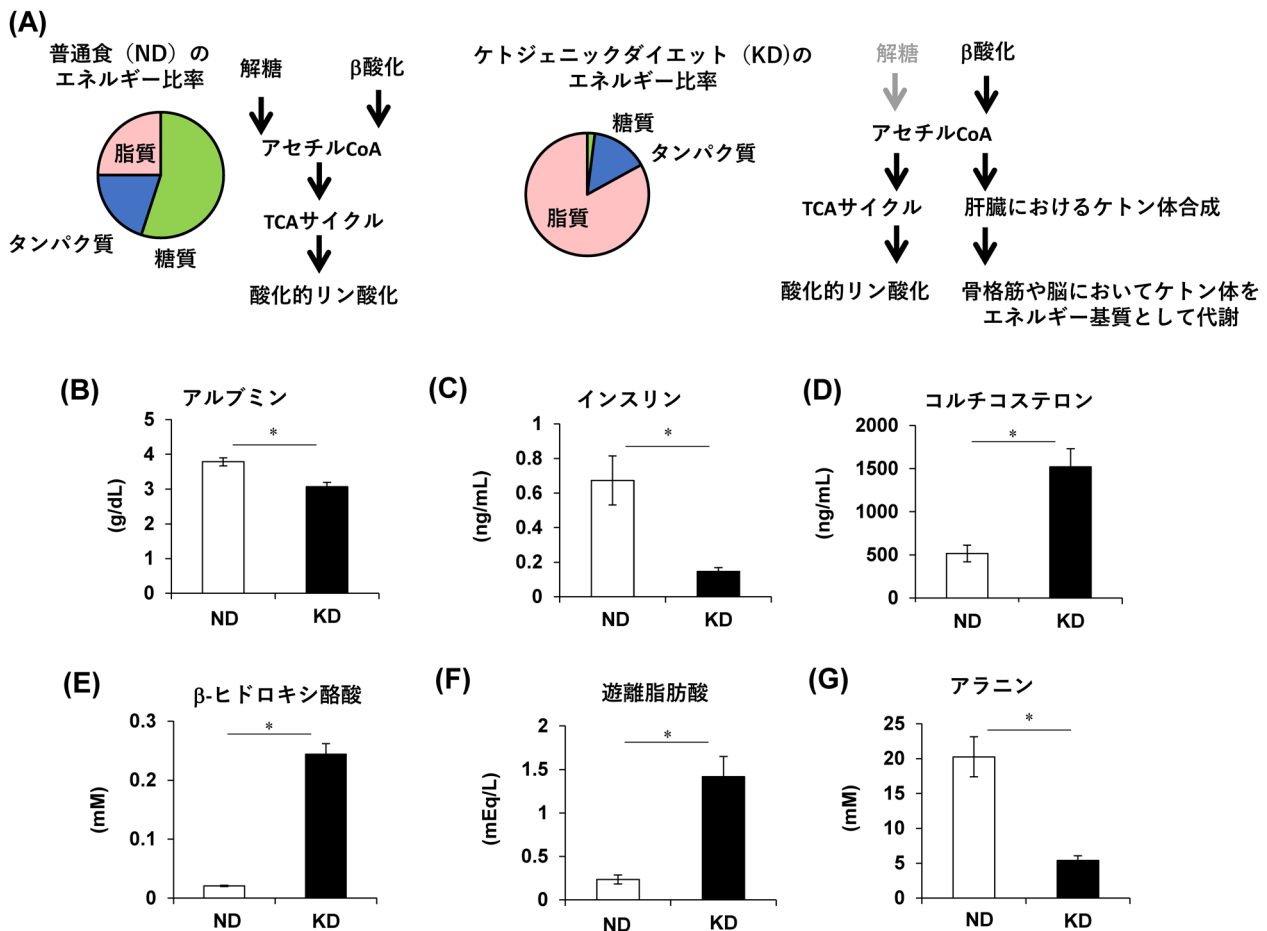


図1 ケトジェニックダイエット摂取による代謝変動

(A) ケトジェニックダイエット (KD) は、糖質の摂取量を制限し、代替エネルギーとして脂質を摂取する食事である。KD 摂取時は解糖系によるエネルギー供給が減少する一方で、脂肪酸の代謝により得られるアセチル CoA が TCA サイクルに入る。また、アセチル CoA を基質としてケトン体が合成され、脂肪酸を代謝できない脳やエネルギー消費の多い骨格筋や心臓へと供給される。KD は飢餓時の代謝状態を模倣できることから、近年は糖尿病や肥満の食事療法の一つとして用いられている。(B)~(G) KD を摂取したマウスの血中代謝パラメータを示す。ND: 普通食。KD: ケトジェニックダイエット。* $P < 0.05$, ND との比較 (Nakao et al., *Sci. Rep.*, 2019 より一部改変)。

KD 摂取により誘導されていた。オートファジー flux は腓腹筋において有意に増加しており、KD によりタンパク質分解、特にオートファジーが活性化されることが示された (図 2D)。これらの分子の発現誘導は、絶食やギブス固定、ステロイド剤投与といった筋萎縮モデルにおいて、グルココルチコイドシグナルの増強やインスリンシグナルの減弱を介して起こることが知られており、KD 摂取ではこれらのモデル動物と共通してユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーの活性化によるタンパク質分解亢進が起こると考えられる。一方、サルコペニアではこれらの筋分解マーカー遺伝子の発現誘導やタンパク質分解速度の上昇は起こらず¹⁾、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー系によるタンパク質分解はサルコペニアの原因ではないと考えられるようになっており、KD とサルコペニアは異なるメカニズムで筋タンパク質の異化が進むようであ

る。次に、SUnSET 法を用いて筋タンパク質合成を測定すると、KD によりタンパク質合成が低下することを確認できた (図 2E)。骨格筋形成や同化を制御する *Myod1* や *Igf1* といった遺伝子の発現量は KD 群で減少しており (図 2F)、KD 摂取により骨格筋の同化作用の減弱、および異化作用の亢進の両方が起こることで筋萎縮が誘発されることが示唆された。絶食モデルではタンパク質合成は減少するものの、*Myod1* や *Pgc1a* といった、筋細胞やミトコンドリアの生合成を制御する転写因子の発現が絶食 6~24 時間後まで増加し、骨格筋のリモデリングによる遅筋化がすばやく起こることでエネルギー状態の変化に適応すると考えられている²⁾。一方、サルコペニアが起こったマウスでは転写・翻訳活性が低下しており、筋衛星細胞では *Myod1* 発現も低下する³⁾。いずれのモデルにおいても筋タンパク質の分解が合成を上回っているが、急激な筋リモデリングを伴わ

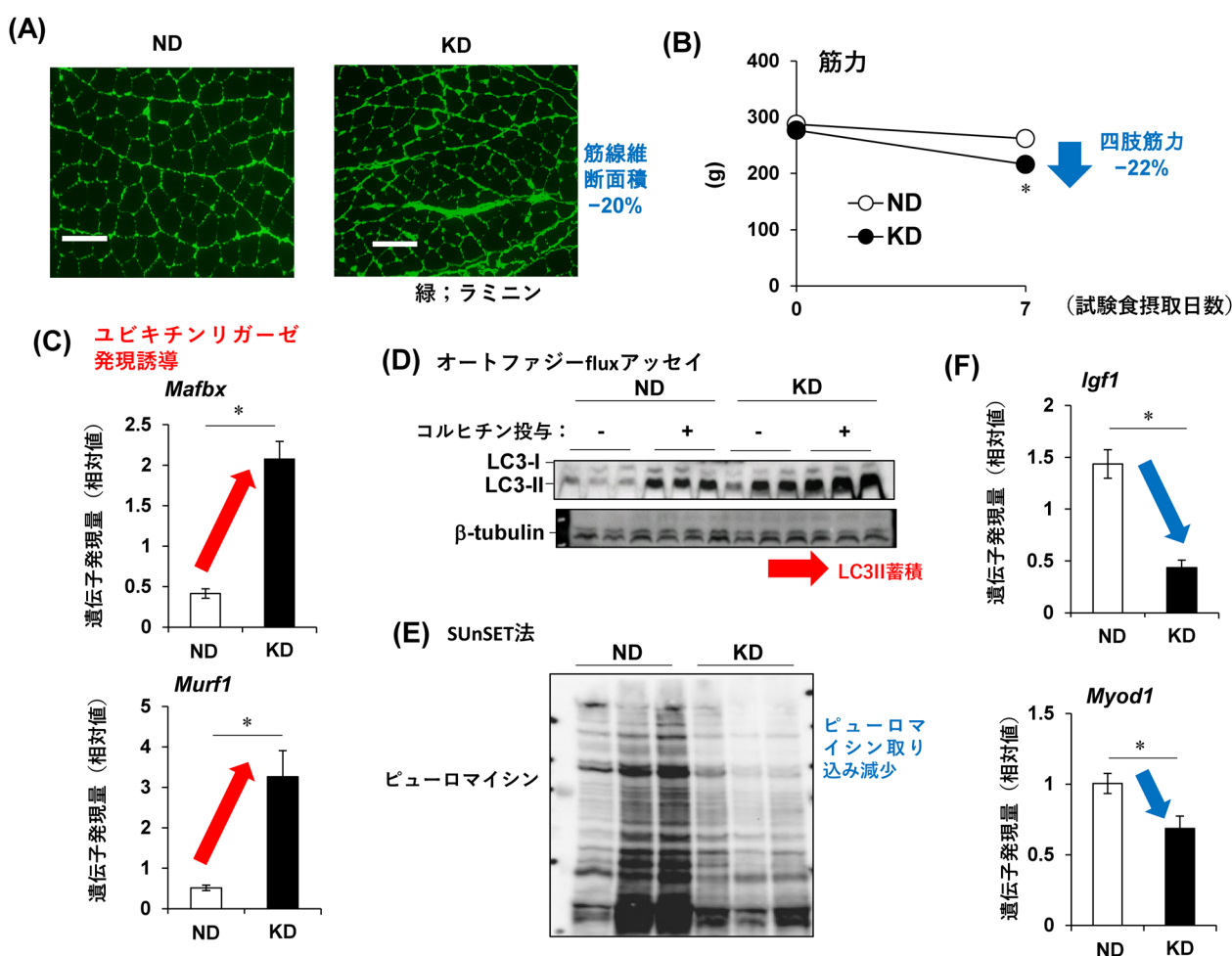


図2 ケトジェニックダイエット摂取による筋萎縮

(A) 腓腹筋凍結切片を用いた抗ラミニン抗体による免疫染色。KD摂取により筋繊維の面積が普通食摂取群に比べて約20%減少した。図中のスケールは100μmを示す。(B) 試験食摂取期間中の握力。KD摂取により四肢の握力が約20%減少した。(C) 筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ遺伝子発現量。(D) KDを摂取したマウスの骨格筋では、オートファジー形成を阻害するコルヒチン投与によりLC3IIの蓄積が確認できた。KDにより骨格筋においてオートファジー活性が亢進していることを意味する。(E) アミノアシルtRNAと類似した構造を持つピューロマイシンは新しく合成されるペプチド鎖に取り込まれるため、それを抗ピューロマイシン抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出することでタンパク質合成速度を評価することができる。KDを摂取したマウスの骨格筋ではピューロマイシンが取り込まれたタンパク質の検出量が普通食摂取群に比べて少なく、タンパク質合成が低下したことを意味する。(F) 骨格筋の同化に関与する遺伝子の発現量。ND: 普通食。KD: ケトジェニックダイエット。* $P<0.05$, NDとの比較 (Nakao et al., *Sci. Rep.*, 2019 より一部改変)。

ない点がKDとサルコペニアにおいて共通する表現型であるといえるのではないだろうか。

低栄養状態では、筋タンパク質の分解産物であるアラニンが肝臓における糖新生の基質として用いられる。絶食モデルでは血中アラニンの増加が骨格筋における異化亢進を裏づける指標の一つとなるが、KDを摂取したマウスの血中アラニンは普通食群と比較して低値を示した (図1G)。この結果は、KDによる筋タンパク質の分解が絶食に比べて緩やかに起こること、または糖新生が亢進することを示唆するものである。一方、メカニズムは明らかにされていないが、サルコペニアが起こる高齢マウスにおいても血中

アラニンは若齢個体に比べて低値を示す⁴⁾。つまり、KDは加齢で起こるような、緩やかで慢性的な筋タンパク質の異化亢進を誘導できる可能性があるといえる。

絶食に供したマウスでは自発活動量が増加する例が多く報告されている。この活動量の増加は、餌の探索に対するモチベーションの増加やストレスによる交感神経活動の増加によるものであると考えられているが、絶食中の急激な自発活動量増加に伴う骨格筋収縮の増加、交感神経活動の上昇、体温の上昇が筋タンパク質代謝に及ぼす影響は不明である。KD摂取開始1~2日後にもマウスの自発活動量は増加するが、3日目から減少に転じ、マウスの休息時間帯

表1 マウスにおける低栄養モデルに対する応答の違い

	ケトジェニック ダイエット ^{5, 14)}	絶食48時間 ⁴⁾	サルコペニア ^{3, 15)}
腓腹筋重量	-23%	-14.5%	-11%
血中インスリン	↓	↓	↑
血中グルココルチコイド	↑	↑	わずかに↑
血中アラニン	↓	↑	↓
筋萎縮ユビキチンリガーゼ	↑	↑	若齢との差なし
オートファジー	↑	↑	↓
自発活動量	↓	↑	↓

である明期に自発活動量、代謝量が著しく低下する日内休眠が誘発される⁵⁾。また、ケトン体 (β -ヒドロキシ酪酸) 自身がシグナル分子として作用し、Gタンパク質共役型受容体の一つであるGPR41を競合阻害することで、交感神経刺激による細胞内シグナル伝達を抑制するものと考えられている⁶⁾。KD摂取は自発活動量増加の影響を排除し、生理的に誘導された低代謝状態における筋萎縮を評価できる系だといえる。

KD摂取が筋タンパク質分解に関連する細胞内シグナルにどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていないが、現在提唱されるメカニズムの一つがAMPKの作用によるものである。AMPKは細胞内AMP/ATP比の上昇、すなわち細胞内エネルギーレベルの低下により活性化されるキナーゼであり、KDを摂取したマウスの骨格筋でもそのリン酸化量が増加する⁷⁾。AMPKはTSC2を基質としてリン酸化することで、筋タンパク質合成のレギュレーターであるmTORの活性を阻害するため、KD摂取下においてタンパク質合成が低下すると考えられている。さらに近年、 β -ヒドロキシ酪酸が、インスリン/IGF1シグナル分子AKTのリン酸化(活性)を阻害することや⁸⁾、 β -ヒドロキシ酪酸がヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害することで転写因子FOXO3の転写を誘導すること⁹⁾が報告されており、ケトン体が直接インスリン/IGF1シグナル分子を阻害し、タンパク質合成を阻害する可能性がある。

4. 改変されたKDによる筋機能改善

てんかん治療用に最初に提案された、いわゆる classic KDの三大栄養素のエネルギー比率は脂質90%、タンパク質6%、炭水化物4%であり、筆者らが用いたKDの組成は classic KDを基にしている。近年、classic KDの「高脂肪」「低タンパク質」の悪影響を考慮し、その組成を変更したKDの摂取により筋肥大や筋機能が改善することを示す報告がある。タンパク質摂取を制限しない「改変型 Atkins diet」と呼ばれるKDでは、タンパク質由来のエネルギー

比率は一日の摂取エネルギーの30~35%と、通常の食事に比べてその比率が高くなるため、AMPKのリン酸化が阻害されるとともにmTORが活性化されることで筋タンパク質合成が刺激され、筋量が維持される可能性があると考えられている¹⁰⁾。一方、KDのエネルギー比率のうち、タンパク質が10%程度の場合でも、老齢マウスの骨格筋では、神経筋接合部のリモデリングやミトコンドリア生合成に関与する遺伝子発現が増加し、下肢の筋重量、筋力の低下が改善すること¹¹⁾が報告されている。1970年代に考案された、中鎖脂肪酸を脂質源とするKDは、ケトン体の血中濃度を効率よく高めることが知られているが、この中鎖脂肪酸KD(タンパク質によるエネルギーが7.5~12.5%)をデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルラットに摂取させると、筋萎縮や筋細胞の壊死、線維化が抑制される¹²⁾。これらの知見から、KDによる筋機能改善には高タンパク質摂取は必須ではなく、ケトン体が作用分子となり筋機能を改善する効果を持つことが期待される。これらのマウスにおけるKDの作用メカニズムは不明だが、改変型KDにおいても classic KD摂取時と同じように低代謝が誘導され、細胞内タンパク質合成・分解速度がともに低下することで、これらの反応に伴い生じる酸化ストレスや小胞体ストレスが減少し、細胞傷害が軽減すること¹³⁾、上述したようにケトン体が直接HDAC活性を阻害することによりFOXO3、MT2といった転写因子の発現量が増加し、その下流にある抗酸化酵素の発現誘導により酸化ストレスが緩和されること⁹⁾が、改変型KDの筋機能保護メカニズムとして考えられている。FOXO3は*Mafbx*や*Murfl*といったユビキチンリガーゼや*Lc3b*や*Bnip3*といったオートファジー制御分子の発現誘導にも寄与するため、ケトン体のシグナル分子としての作用やKDの組成の違いによる代謝状態の変化が骨格筋の同化/異化のバランスをどのように制御するのか、詳細な検討が必要である。

5. おわりに

筆者が行った研究では、古典的なKDを摂取させたマウスにおいて筋萎縮が引き起こされた。筋萎縮関連ユビキチンリガーゼの発現誘導やオートファジー活性の上昇など、絶食や不活動によるモデルマウスと共通する応答が観察されたものの、血中アラニンの低下や自発活動量の減少、低体温など、加齢モデルと共通してKDで観察された所見もあった(表1)。KDは絶食と異なり長期間の摂食が可能であり、慢性的な低栄養状態による筋萎縮モデルとなりうると考えられる。一方で、組成や摂取期間が異なる改変型KDが筋機能改善効果をもたらすことも報告されている。ケトン体分子そのものやケトン体摂取時の代謝状態が筋細胞内シグナル伝達に及ぼす影響についてさらに研究が進み、筋萎縮のリスクを軽減したKDの活用が望まれる。

謝辞

本稿で引用した筆者の研究は、国立研究開発法人産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門食健康機能研究グループ大石勝隆研究グループ長をはじめスタッフ、学生の皆さんとともに実施したものです。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

文 献

- Gaugler, M., Brown, A., Merrell, E., DiSanto-Rose, M., Rathmacher, J.A., & Reynolds, T.H. 4th. (2011) PKB signaling and atroline expression in skeletal muscle of aged mice. *J. Appl. Physiol.*, **111**, 192–199.
- Lange, P., Farina, P., Moreno, M., Ragni, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Burrone, L., Lanni, A., Goglia, F., Lange, P., et al. (2006) Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB J.*, **20**, 2579–2581.
- Moustogiannis, A., Philippou, A., Taso, O., Zevolis, E., Pappa, M., Chatzigeorgiou, A., & Koutsilieris, M. (2021) The effects of muscle cell aging on myogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3721.
- Houtkooper, R.H., Argmann, C., Houten, S.M., Canto, C., Jenning, E.H., Andreux, P.A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2011) The metabolic footprint of aging in mice. *Sci. Rep.*, **1**, 134.
- Oishi, K., Sakamoto, K., Konishi, M., Murata, Y., Itoh, N., & Sei, H. (2010) FGF21 is dispensable for hypothermia induced by fasting in mice. *Neuroendocrinol. Lett.*, **31**, 198–202.
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A., & Tsujimoto, G. (2011) Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8030–8035.
- Kennedy, A.R., Pissios, P., Otu, H., Roberson, R., Xue, B., Asakura, K., Furukawa, N., Marino, F.E., Liu, F.F., Kahn, B.B., et al. (2007) A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **292**, E1724–E1739.
- Yamada, T., Zhang, S.J., Westerblad, H., & Katz, A. (2010) Beta-Hydroxybutyrate inhibits insulin-mediated glucose transport in mouse oxidative muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **299**, E364–E373.
- Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Moan, N.L., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., et al. (2013) Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, **339**, 211–214.
- Paoli, A., Cancellara, P., Pompei, P., & Moro, T. (2019) Ketogenic Diet and Skeletal Muscle Hypertrophy: A Frenemy Relationship? *J. Hum. Kinet.*, **68**, 233–247.
- Wallace, M.A., Aguirre, N.W., Marcotte, G.R., Marshall, A.G., Baehr, L.M., Hughes, D.C., Hamilton, K.L., Roberts, M.N., Lopez-Dominguez, J.A., Miller, B.F., et al. (2021) The ketogenic diet preserves skeletal muscle with aging in mice. *Aging Cell*, **20**, e13322.
- Fujikura, Y., Sugihara, H., Hatakeyama, M., Oishi, K., & Yamanouchi, K. (2021) Ketogenic diet with medium-chain triglycerides restores skeletal muscle function and pathology in a rat model of Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.*, **35**, e21861.
- Roberts, M.N., Wallace, M.A., Tomilov, A.A., Zhou, Z., Marcotte, G.R., Tran, D., Perez, G., Gutierrez-Casado, E., Koike, S., Knotts, T.A., et al. (2017) A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice. *Cell Metab.*, **26**, 539–546.
- Nakao, R., Abe, T., Yamamoto, S., & Oishi, K. (2019) Ketogenic diet induces skeletal muscle atrophy via reducing muscle protein synthesis and possibly activating proteolysis in mice. *Sci. Rep.*, **9**, 19652.
- van Dijk, M., Nagel, J., Dijk, F.J., Salles, J., Verlaan, S., Walrand, S., van Norren, K., & Luiking, Y. (2017) Sarcopenia in older mice is characterized by a decreased anabolic response to a protein meal. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **69**, 134–143.

著者寸描

●中尾 玲子 (なかお れいこ)

徳島大学大学院医歯薬学研究部講師。博士(栄養学)。

■略歴 2010年徳島大学栄養生命科学教育部博士後期課程修了。10～11年JAXAプロジェクト研究員。12～16年国立研究開発法人産業技術総合研究所研究員。17年より現職。

■研究テーマと抱負 骨格筋におけるタンパク質代謝のメカニズム解明に関する研究。概日リズム、概年リズムによる骨格筋機能の制御機構を冬眠動物も用いて調べていきたい。