

## ケトン体の骨格筋細胞における生理作用

乗鞍 敏夫<sup>1)\*</sup>

1) 青森県立保健大学 栄養学科

**Key Words** ① ケトン体 ② アセト酢酸 ③ 3-ヒドロキシ酪酸 ④ C2C12 細胞

### I. はじめに (または「緒言」等)

ケトジェニックダイエット (KD) は、糖質 (炭水化物) の摂取量を極端に制限し、その代替エネルギー源として脂質を摂取する食事法であり、体重減少を目的としたダイエット法として認知されてきている。KD では、エネルギー源として糖の代わりにケトン体が利用されるため、血液中のグルコース濃度の低下とケトン体濃度の上昇がみられる。ケトン体の血中濃度は、一般的な食事をしている時は 0.1 mM 程度であるが、数日間の絶食状態では約 3 mM まで、KD では約 5 mM まで、1 型糖尿病患者では約 25 mM まで上昇することが報告されている<sup>1)</sup>。

骨格筋細胞の培養には、慣用的に高濃度のグルコース (450 mg/dL) を含む DMEM 培地が用いられている<sup>2)</sup>。この培養条件は、私たちの身体状況に照らし合わせると、超高血糖状態に晒された状態であるといえる。さらに、DMEM 培地には、健常者の血中濃度の 4~10 倍程度のアミノ酸が含まれている。このような栄養素の濃度は、細胞の消費による濃度低下を防ぐために設定されているが、明らかに生理的な状態とは解離している。

これまで、高濃度のグルコースを含む DMEM 培地に添加したケトン体は、骨格筋細胞のたんぱく質合成が促進されることが報告されているが<sup>3)</sup>、この培養条件は糖尿病性ケトアシドーシスを模倣した状態であるといえる。一方、これまでに生理的な栄養素濃度におけるケトン体の筋肉における生理作用はいまだ報告されていない。

### II. 目的

本研究は、DMEM 培地 (グルコース 100 mg/dL アミノ酸濃度 従来比 25%) にケトン体を添加した状態、つまりケトジェニックダイエットや、飢餓状態 (低栄養状態) の血中濃度を模倣した培地を用いて、高ケトン体状態が骨格筋細胞の筋形成やミトコンドリア合成におよぼす生理作用を明らかにすることを目的とする。

### III. 研究方法 (または「研究の経過」等)

#### 1. 培養条件

疎水性メンブレンを装着したフラスコ (図 1-C) を用いることで、従来のシャーレ (図 1-A) やフラスコ (図 1-B) の約 15 倍量の培地を用いた条件でマウス由来の筋芽細胞 (C2C12 細胞) を培養した。

#### 2. 培地のグルコース濃度の測定

従来のシャーレ (図 1-A) と疎水性メンブレンを装着したフラスコ (図 1-C) を用いて、本培養を開始した 24 時間後、48 時間後の培地中のグルコース濃度を Glucose Assay Kit-WST (Dojindo) を用いて測定した。

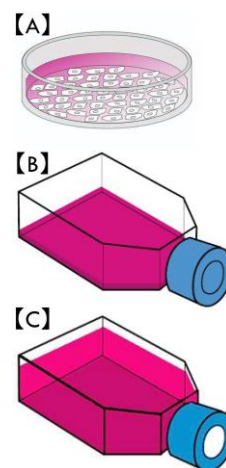


図 1 培養条件

### 3. 細胞生存率の測定

3-ヒドロキシ酪酸（以下 HB）とアセト酢酸（以下 LA）を添加した分化誘導培地で 48 時間培養した。これらのケトン体が細胞生存率に及ぼす影響を Neutral Red 法を用いて測定した。

### 4. リアルタイム PCR

ケトン体を添加した分化誘導培地で 48 時間培養した細胞の mRNA の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で相対定量 ( $\Delta \Delta Ct$  法) した。

## IV. 結果・考察

48 時間培養後の培地中のグルコース濃度は、従来のシャーレでは超低血糖状態 (42 mg/dL) まで低下したが、疎水性メンブレンを装着したフラスコを用いることで生理的な濃度範囲内 (87 mg/dL) にコントロールすることができた (図 2)。よって、以下の実験では、疎水性メンブレンを装着したフラスコ (図 1-C) を用いて、生理的な栄養素濃度の DMEM 培地 (グルコース 100 mg/dL アミノ酸濃度 従来の 25%) で骨格筋細胞を培養した。

LA と HB の添加による細胞生存率への影響を調べたところ、これらのケトン体の添加による細胞生存率の低下は認められなかった (図 3)。よって、以下の実験では LA (2 mM) と HB (8 mM) を上限濃度に設定した。

ケトン体の添加により、筋芽細胞の分化の指標 (Myod1 と Myog) とミトコンドリア生合成の指標 (Cs と Sirt1) の遺伝子発現量が有意に低下した (図 4)。

これらの結果より、生理的な栄養素の培養条件において、ケトン体の濃度上昇は、筋芽細胞の分化誘導を阻害し、筋細胞のミトコンドリア生合成を阻害することで、筋機能の低下を引き起こすことが示唆された。

## V. 考察

本研究では、これまでのケトン体による筋形成の促進作用の報告<sup>3)</sup>とは全く異なる結果が得られた。今後は、これらの結果の相違が培養条件 (特にグルコース濃度) の違いに起因するののかについて、さらに研究をすすめていく予定である。

## VI. 文献

- 1) S. Nasser et al. 2020, World J. Diabetes
- 2) Y. Furuichi et al. 2021, Front. Cell Dev. Biol.
- 3) T. Vandoorme et al. 2017, Front. Physiol.

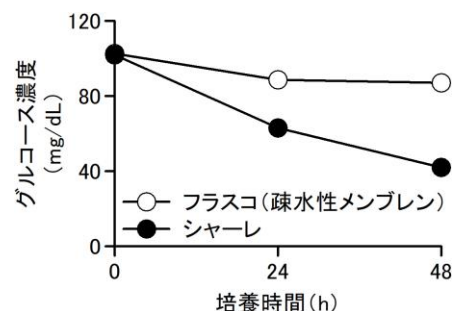


図 2 培地のグルコース濃度

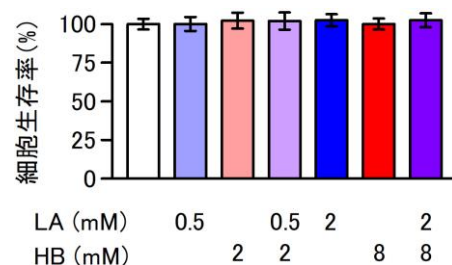


図 3 細胞生存率

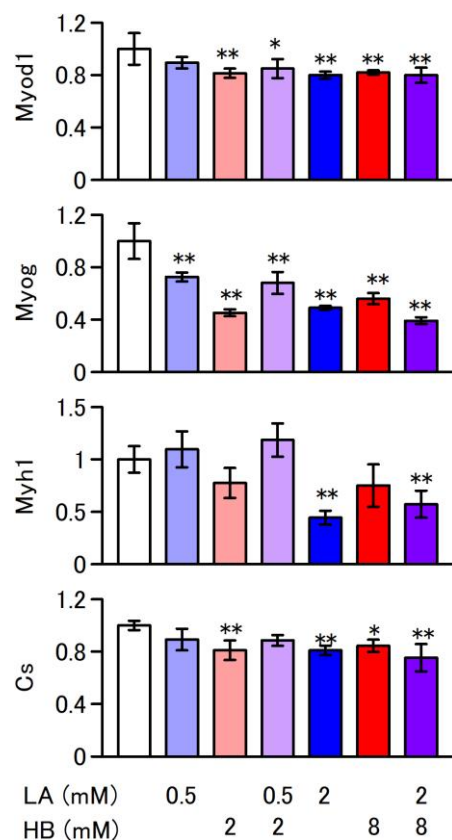


図 4 細胞内の遺伝子発現変動