

エネルギー摂取量の増加が筋肥大を誘導するメカニズムの解明 —臓器連関の視点からの解析—

三 浦 征^{*,**} 富 賀 裕 貴^{**,***} 川 中 健太郎^{**,***}

MECHANISMS OF MUSCLE HYPERTROPHY INDUCED BY ENERGY SURPLUS: AN INTER-ORGAN CROSSTALK PERSPECTIVE

Ikuru Miura, Yuki Tomiga, and Kentaro Kawanaka

Key words: muscle hypertrophy, adipose tissue, energy surplus, organ cross talk.

緒 言

骨格筋は体重の約40%を占める生体最大の臓器であり、運動や身体活動の中心的な役割を担っている。骨格筋量の増加は、筋発揮パワーを高め、運動パフォーマンスの向上に寄与することから、スポーツ競技者にとって重要である。また、高齢化の進展に伴い、中高齢者層における加齢性筋萎縮（サルコペニア）や身体虚弱（フレイル）の蔓延が社会問題として顕在化してきている。これらは、健康寿命の短縮や生命の質（quality of life; QOL）の低下に直結する疾病病態であり、早急な対策が求められている。以上より、骨格筋量を維持・増加させるための新しい方策を見だし、普及していくことは多くの人々に恩恵をもたらすことが期待される。

競技スポーツの場では、筋量増加のための方法として「食トレ」などと称し、食事量、つまりエネルギー摂取量を増やすことが行われている。実際に、スポーツ栄養学分野のテキストにもこの方

法が記載されているが⁶⁾、エネルギー摂取量の増加と筋量の増加を直接的に結びつける科学的根拠は十分とはいえないのが現状である。

エネルギー摂取量の増加に伴い、体脂肪量も増加することはいうまでもない。脂肪組織はエネルギー貯蔵庫としての機能のみならず、アディポカインと呼ばれる生理活性物質を分泌する内分泌器官としての側面も有している。食の欧米化や慢性的な運動不足などに起因する肥満人口の増加は、高齢化と並ぶ社会問題として認識されていることもあり、インスリン抵抗性や炎症障害を誘導する悪玉のアディポカインに注目が集まりがちである。一方、近年では、レプチン、アディポネクチン、FGF-21など、複数のアディポカインが骨格筋に作用し、筋合成シグナルを活性化させることが報告されている^{5,7)}。Collins らの報告では¹⁾、遺伝子操作によって脂肪組織を除去したマウスは筋量が低下するものの、外的にレプチンを導入することで筋量減少が軽減されることが示されている。レプチンの代表的な作用は中枢神経系を介した食欲

* 筑波大学医学医療系 Institute of Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

** 福岡大学身体活動研究所 Institute for Physical Activity, Fukuoka University, Fukuoka, Japan.

*** 福岡大学スポーツ科学部 Faculty of Sports and Health Science, Fukuoka University, Fukuoka, Japan.

抑制であり、食事によってその血中濃度が上昇することが知られている。また、肥満者ではレプチンの血中濃度が慢性的に上昇することも報告されている⁴⁾。

以上の先行研究を踏まえると、エネルギー摂取量の増加は液性因子（アディポカイン）の分泌状態を変化させることで筋量増加を誘導する可能性が示唆される。本研究では、高脂肪食を異なる期間摂餌させたマウスの内臓脂肪移植を行うことで、エネルギー摂取量ならびに体脂肪量の増加が骨格筋量に与える影響を検討した。総エネルギー摂取量および移植する脂肪量を変化させるため、食事介入期間を1週間ごとに区切り、最大4週間行う実験を立案した。しかしながら、2週間を超える食事介入では、内臓脂肪量がレシピエントマウスの腹腔内容量の物理的な限界を超えてしまったため、食事介入期間を2週間までとした。

方 法

A. 実験動物

実験動物には、雄性 C57BL/6J マウスを使用した。マウスは室温23℃、湿度60%に保たれた飼育室で12時間ごとの明暗サイクル環境下に飼育した。飼料ならびに飲水は自由摂取とした。すべての動物実験は、関連法規ならびに、福岡大学および筑波大学が定める動物実験規定に則り、それぞれの動物実験委員会に実験計画書を事前に提出し、承認を受けたうえで実施した（承認番号：福岡大学 2307025、筑波大学 25-400）。

B. エネルギー付加および精巢上体脂肪移植

エネルギー摂取量を増加させるため、9週齢の C57BL/6J マウスに60%高脂肪食（high fat diet; HFD）を摂餌させた（ドナーマウス）。食事介入期間は最大4週間までを計画していたが、2週間を超える介入では移植可能な脂肪量の上限を超えてしまうことより、1週間または2週間の介入とした。介入期間終了後、下肢骨格筋を採取し、重量を測定した。同時に、精巢上体を摘出し、同週齢同系統のマウスの肝臓直下に移植した（レシピエントマウス）。対照群には、開腹処置のみを施した。その後、すべてのレシピエントマウスを通常食摂餌下で飼育し、2週間後に下肢骨格筋を採

取し、重量を測定した。

C. 細胞実験

9週齢の C57BL/6J マウスを通常食摂餌群、1週間高脂肪食摂餌群、2週間高脂肪食摂餌に分け、2週間の食餌介入を行った。通常食摂餌群は2週間通常食（normal chow; NC）を摂餌させ、高脂肪食摂餌の2群には、介入終了から数えてそれぞれ1週間または2週間60%高脂肪食を摂餌させた。介入終了後、すべてのマウスを安楽死させ、下大静脈より採血を行った。全血を遠心分離し、血清を回収した。血清は使用するまで-80℃で保存した。

細胞実験にはマウス筋芽細胞（C2C12）を使用した。細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）および1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培養用培地（Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM）を用いて37℃、5% CO₂の環境下で培養した C2C12筋芽細胞がコンフルエンスに達した時点で、2%ウマ血清を添加した DMEM（分化誘導培地）に培地交換し、5日間培養することで成熟した筋管細胞へと分化させた。分化後の C2C12筋管細胞の培地を無血清培地に交換し、上述の各マウスの血清を10%濃度で添加した。対照には血清添加を行わず、無血清培地のみで培養した。血清添加から4時間後に細胞を回収し、使用するまで-80℃で保存した。

D. タンパク定量および Western blotting

回収した C2C12筋管細胞を RIPA buffer 中で懸濁し、タンパク質を抽出した。このライセートの総タンパク量を BCA assay にて定量した。等量のタンパク質ライセートと sample loading buffer を混合し、加熱処理した後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写し、Blocking one-P または Blocking one（nacali tesque）を用いてブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンを一次抗体（p-p70S6K CST#9205, t-p70S6K CST#9202, p-4EBP1 CST#2855, t-4EBP1 CST#9452）とともに4℃で一晩インキュベートした。翌日、メンブレンを TBS-T で洗浄し、二次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。メンブレンを再度 TBS-T で洗浄した後に、標的タンパク質を化学発

光試薬にて可視化し、画像解析ソフト (Image Lab, Bio-Rad) によりシグナル強度を解析した。各タンパク質のリン酸化レベルはそれぞれの総タンパク質のシグナル強度で除して算出した。

E. 統計処理

すべての結果は平均値 ± 標準誤差 (mean ± standard error of the mean) で示した。統計解析には SPSS Statistics version 26 (IBM Corp) を使用した。2 群間の比較には T 検定を、3 群以上の比較には、one-way ANOVA および Tukey の多重比較検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

F. 筋合成促進因子の絞り込みおよび同定

動物・細胞実験の結果を照合し、エネルギー摂取量の増加により発現量が増加するアディポカイン等の作動物質およびその受容体を絞り込み、抽出する。抽出した因子について、高脂肪食を摂餌したドナーマウスおよびレシピエントマウスにおける血中濃度を測定する。エネルギー摂取量の増加および脂肪移植により発現量が増加する因子を探索し、筋合成促進因子を同定する。なお、本実験は現在進行中である。

結 果

A. エネルギー付加および脂肪移植が骨格筋量に与える影響

高脂肪食を摂餌したドナーマウスでは、同期間通常食を摂餌したマウスと比較して体重および精

巢上体脂肪重量が有意に増加したものの、下肢骨格筋である足底筋、ヒラメ筋の重量に変化は認められなかった (図 1)。

レシピエントマウスの比較では、ドナーマウスの高脂肪食摂餌期間にかかわらず、オリジナルの精巢上体脂肪重量に変化は認められなかった。同様に、下肢骨格筋 (大腿四頭筋、足底筋、ヒラメ筋) の重量も変化せず (図 2)、内臓脂肪移植による筋肥大効果は認められなかった。一方、現状では筋重量の評価に留まっており、エネルギー摂取量の増加による筋肥大促進作用を完全に否定することは困難である。今後、筋横断面積や筋力など他の指標を用いた評価を行う必要がある。

B. 細胞実験

培養筋管細胞へのマウス血清の添加は、筋合成誘導因子である p70S6K の活性化 (リン酸化レベルの増加) を誘導する傾向が確認された。また、その作用は高脂肪食の摂餌期間に依存して増強した。一方、p70S6K と同様に筋合成に関与する 4EBP-1 のリン酸化レベルも血清添加により増加する傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった (図 3)。本結果は、エネルギー摂取量の増加が何らかの液性因子を介した筋合成を促進することを示している。現在、細胞および動物実験の追加解析を実施し、筋合成を誘導する因子の同定に向けた候補因子の絞り込みを行っている。

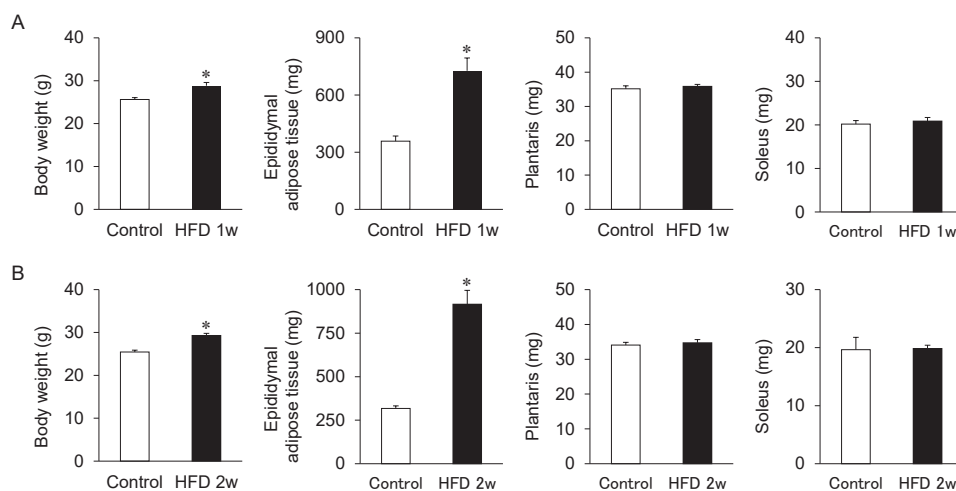


図 1. 高脂肪食摂餌による体重、内臓脂肪重量、骨格筋重量の変化

Fig.1. Changes in body weight, visceral fat mass, and skeletal muscle mass induced by a high-fat diet.

(A) Mice fed a high-fat diet for 1 week (1w). (B) Mice fed a high-fat diet for 2 weeks (2w).

* $P < 0.05$, vs Control group.

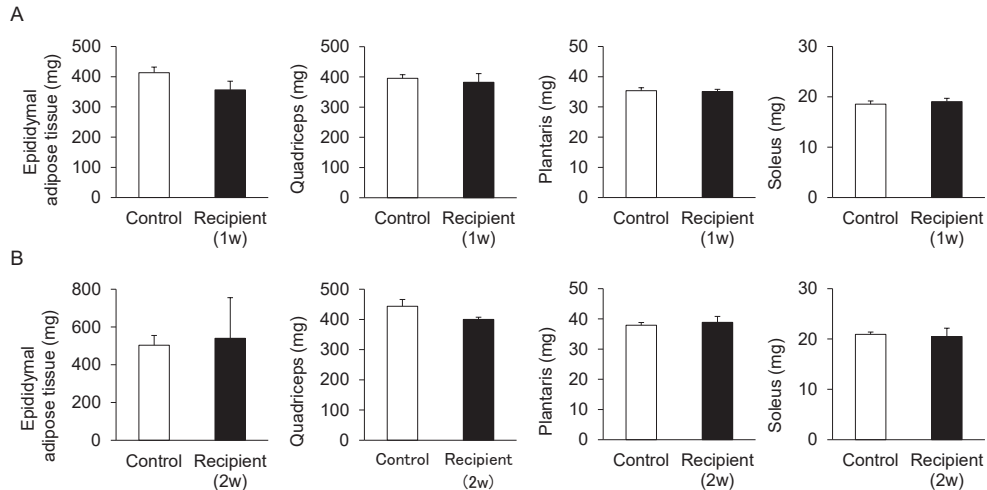


図2. レシピエントマウスの内臓脂肪重量、骨格筋重量

Fig.2. Visceral fat mass and skeletal muscle mass in recipient mice.

(A) Donor mice fed a high-fat diet for 1 week (1w). (B) Donor mice fed a high-fat diet for 2 weeks (2w).

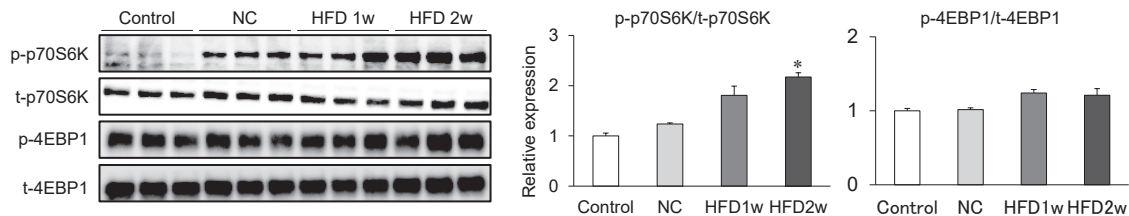


図3. 血清添加によるC2C12細胞における筋合成シグナルの変化

Fig.3. Changes in muscle protein synthesis signaling induced by serum supplementation in C2C12 myotubes.

* $P < 0.05$, vs Control group.

考 察

本研究では、最大4週間までの高脂肪食を摂餌させたマウスの内臓脂肪移植実験を計画していたが、2週間を超える食事介入では、移植する脂肪量がレシピエントマウスの許容量の物理的上限を超えてしまうことより、2週間までの食事介入実験を行った。1週間または2週間の高脂肪食の摂餌により、体重および内臓脂肪（精巣上体脂肪）量の増加が認められたことから、エネルギー摂取量の増加が確認された。しかし、骨格筋重量の増加は認められなかった。同様に、脂肪移植により内臓脂肪を外的に増加させた条件下においても骨格筋重量は変化せず、仮説を支持する結果は得られなかった。一方、本研究では、筋重量のみの評価に留まっているため、エネルギー摂取量の増加ならびに体脂肪量の増加が骨格筋に影響しないと断定はできない。筋横断面積や筋力、筋機能など他の指標を用いた評価が今後必要である。細胞実験では、血清中には筋合成を促進する液性因子が

含まれ、その血中濃度は高脂肪食の摂餌ならびにその期間に依存して増加する可能性が見いだされた。動物実験では、体脂肪量増加と筋肥大の因果関係を見いだすことはできなかったものの、エネルギー摂取量の増加は何らかの液性因子を介して筋肥大を誘導する可能性が示唆された。今後、体脂肪量の増加以外の因子を視野に入れた解析が求められる。

体脂肪量と筋量の指標である除脂肪量には正の相関関係があることは広く知られており²⁾、エネルギー付加やそれに伴う体脂肪量の増加が筋量増加に関与する可能性が示されている。当研究グループで実施した健常男性を対象としたランダム化比較試験では、40%のエネルギー付加を6週間継続することにより、体脂肪量とともに体タンパク質量が増加することが明らかになった³⁾。一般的にエネルギー付加による体成分の増加は、体脂肪量と除脂肪量の比が2:1で増加するとされており、実験レベルでは、骨格筋と比較して体脂肪のほうより早期かつ明確に重量の変化をとら

えられる可能性がある。これらの先行研究を考慮すると、より長期間の介入を行うことで個体レベルでも筋重量の増加を確認できる可能性がある。しかしながら、前述のとおり、現在の実験条件ではドナーマウスの食事介入期間を延長させることは困難である。何らかの代替手段を検討し、新たな実験系を確立したうえで追加解析を行う必要がある。

また、細胞実験の結果は、高脂肪食の摂餌が何らかの液性因子を介して筋細胞の同化作用を促進することを示した。本結果は、エネルギー付加や体脂肪の増加が筋量を増加させるメカニズムを明らかにするうえで興味深いものと考えられる。レプチンを始めとする筋同化作用を有するアディポカインの分泌動態は、エネルギー摂取量や体組成により変化することが示されている⁴⁾。また、2週間の高脂肪食の摂餌は、体重や内臓脂肪量を増加させた(図1)。これより、高脂肪食の摂餌は、アディポカインの分泌動態および循環量を変化させ、これにより筋細胞の同化作用が誘導された可能性が示唆される。一方、本実験の条件では、エネルギー摂取量の増加、脂肪の摂取量増加、体組成の変化などさまざまな要因が絡んでおり、液性因子による筋同化作用が何に起因するものなのか明らかではない。また、脂肪組織の他にも多くの臓器組織が多種多様な生理活性物質を分泌しており、本研究の結果のみではアディポカインによる作用と断定することは困難である。現在、本研究で採取した動物、細胞実験サンプルの追加解析を行い、エネルギー摂取量の増加による筋合成促進を媒介する液性因子の絞り込みと同定に向けた解析を継続している。生体における臓器・細胞間コミュニケーションは複雑に制御されており、その全容を解明するためには更なる詳細な解析が求められる。

総 括

1週間または2週間の高脂肪食によるエネルギー摂取量の増加、ならびに脂肪移植による体脂

肪量の増加はマウスの骨格筋量を増加させず、仮説に反する結果となった。また、本研究ではより長期間の介入実験を実施できなかった。今後は、他の筋量指標を用いた評価を行うとともに、より長期間の介入が可能な実験系を検討していく必要がある。一方、高脂肪食の摂餌は何らかの液性因子を介して筋細胞の同化作用を促進する可能性が細胞実験により見いだされた。今後は、体脂肪量の増加以外の要因にも視野を広げ、エネルギー摂取量の増加による筋合成の促進を媒介する液性因子の同定を目指し、動物、細胞サンプルの追加解析を進捗させる計画である。

謝 辞

本研究の実施にあたり助成を賜りました公益財団法人明治安田厚生事業団ならびに事務局の皆様へ心より感謝申し上げます。また、実験にご協力いただきました福岡大学の分子スポーツ栄養学研究室・運動生理学研究室の皆様へ感謝申し上げます。実験の礎となったすべての実験動物に深い感謝と追悼の意を表します。

参 考 文 献

- 1) Collins K, et al. (2022): Leptin mediates the regulation of muscle mass and strength by adipose tissue. *J Physiol*, **600** (16), 3795-3817.
- 2) Forbes GB. (2000): Body fat content influences the body composition response to nutrition and exercise. *Ann N Y Acad Sci*, **904**, 359-365.
- 3) Hatamoto Y, et al. (2024): Greater energy surplus promotes body protein accretion in healthy young men: a randomized clinical trial. *Clin Nutr*, **43**(12), 48-60.
- 4) Imajo K, et al. (2012): Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab*, **16** (1), 44-54.
- 5) Minard A, et al. (2016): mTORC₁ is a major regulatory node in the FGF21 signaling network in adipocytes. *Cell Rep*, **17**(1), 29-36.
- 6) 鈴木志保子(2018): 理論と実践スポーツ栄養学. 初版, 日本文芸社, 東京.
- 7) Yu A, et al. (2021): Adiponectin promotes myogenic differentiation via a Mef2C-AdipoR1 positive feedback loop. *Gene*, **771**, 145380.