

サルコペニア予防を目的とした卵と腸内細菌のシンバイオティクスの開発

京都府立医科大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科学・病院助教 岡村 拓郎

■ 緒言

2型糖尿病の罹患率は世界的に増加している¹⁾。過食²⁾、運動不足³⁾が2型糖尿病の主な原因であり、それに伴う内臓脂肪の増加や筋肉量の減少、あるいはサルコペニア⁴⁾、肥満が本疾患の病態基盤である。我々は以前に、サルコペニア肥満と2型糖尿病に関する様々なヒトおよび動物実験の結果を報告し、過食と運動不足を特徴とするレプチン受容体異常の *db/db* マウスがサルコペニア肥満を示すことを明らかにした⁵⁾。このように、2型糖尿病の発症・増悪を防ぐためには、サルコペニア型肥満の予防が重要である。

サルコペニアの予防策として、一般的に栄養介入と運動介入が推奨されている⁶⁾。栄養介入としては、全卵や卵白が有効であると考えられ、その摂取は筋肉量や筋機能の維持・向上に有効であるとされている⁷⁻⁹⁾。全卵(卵黄を含む)は、そのアミノ酸プロファイルと消化性から、高品質のタンパク質食品源と考えられている¹⁰⁾。全卵は100gあたり、154kcal、タンパク質12.3g、炭水化物0.7g、総脂肪11.9gを含み、そのうち飽和4.4g、不飽和7.0g、コレステロール420mgである⁸⁾。全卵は、タンパク質消化率補正アミノ酸スコアから、ホエイ、カゼイン、大豆などの他の高品質完全タンパク質源と同等である¹⁰⁻¹²⁾。van Vlietらは、レジスタンストレーニングを受けた男性において、下半身の急性運動後に全卵を摂取すると、mTOR経路のp70S6Kや4E-BP1などのタンパク質キナーゼのリン酸化を促進し、運動後の筋線維タンパク質合成速度を卵白摂取より大きく向上させたことを報告している¹³⁾。

サルコペニアと腸内細菌叢の関連については、様々な報告がなされている¹⁴⁾。例えば、*Lactobacillus acidophilus* と *Bifidobacterium bifidum* の補給は、高齢マウスの筋肉量、筋力、持久力を著しく改善した¹⁵⁾。腸-筋肉軸は、加齢に伴う筋肉の衰えや機能不全に対する新しいターゲットを提供する可能性がある。牛乳投与による代謝変化は、栄養補給だけでなく腸内細菌叢の様々な変化を伴うことがいくつかの動物実験で報告されている¹⁶⁾。しかし、卵によって変化した糞便微生物叢移植(FMT)の筋肉への影響を示した研究は、これまでなかった。

そこで本研究では、サルコペニア性肥満モデルマウスである *db/db* マウスを用いて、乾燥全卵を摂取したマウスからFMTを行い、卵摂取による抗サルコペニア性肥満効果を明らかにすることを目的としました。

■ 方法

実験動物

すべての実験手順は、京都府立医科大学動物実験委員会(承認番号:M2022-84)により承認された。雄の *db/db* マウスを用い、無作為化・医師盲検化試験を実施した。

ステージ1

7週齢の *db/db* 雄性マウスを清水実験材料から購入し、病原体のない管理された環境で飼育した。実験には、清水ラボラトリーサプライで生まれた同腹のマウスを使用した。個別ケージに収容されたマウスには、8週齢から8週間、普通食(ND; 345kcal/100g、脂肪kcal 4.6%; CLEA, Tokyo, Japan)を与え、ペアフィーディングには同量の飼料が供給された。サンプルサイズは、相対的握力を目安にEZR(自治医科大学付属さいたま医療センター)を用いて解析した。両群間の平均差は1.02、平均標準偏差は0.44、有意水準は0.05、検出力は80%で計算すると、必要なサンプルサイズは6であった。したがって、サンプルサイズは6匹とした。6匹のマウスを、(1)乾燥全卵を与えないマウス、(2)乾燥全卵(キューピー株式会社)を与えるマウスの2群に分けた(図1A)。

ステージ2

FMTは、腸内細菌叢に関連する疾患モデルにおいて、腸内細菌叢の因果関係を明らかにするアプローチとして、広く認知されている。より良い生着率を得るために、抗生物質(アンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール:各1g/L、バンコマイシン:0.5g/L、200 μ L/日、経口胃内投与)を用いてレ

シピエントの腸内細菌叢を殺菌した：を用いて、FMT 前の 6～8 週齢から 2 週間実施した。3 日間の回復後、FMT を週 2 回実施した¹⁷⁾。簡単に説明すると、卵を与えずに飼育した 16 週齢の *db/db* マウスと卵を与えたマウスから、200～300mg の新鮮な便を採取した。便を 5mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でホモジナイズし、重力下で 2 分間沈降させた。こうして得られた上清の 200 μ L を各マウスに投与した¹⁸⁾。その後、マウスを一晩絶食させ、16 週齢で麻酔 (4.0 mg/kg midazolam、0.3 mg/kg medetomidine、5.0 mg/kg butorphanol) にさらして安楽死させた (図 4A)。

運動量の測定

マウスは、ランニングホイール (MK-713：室町機械株式会社) を設置したケージに個別に収容された。各ケージに設置した走行輪の回転数は、走行輪に接続したコンピュータ内のソフトウェア (CompACT AMS Ver.3：室町機械) を用いて、12 時間の夜間サイクルでそれぞれ記録した。運動量はサクリファイスの 5 日前から測定した。

腹腔内ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験

15 週齢のマウスをに対して 16 時間絶食後の腹腔内ブドウ糖負荷試験 (iPGTT) (2g/kg 体重) および 5 時間絶食後のインスリン負荷試験 (ITT) (0.5U/kg 体重) を実施した。血液サンプルは尾静脈から採取した。血糖値はグルコメーター (Gultest mint II；株式会社三和化学研究所) を用いて測定した。iPGTT および ITT は、異なるマウスで実施した。血糖値は注射後 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分にモニターした。iPGTT と ITT の結果の曲線下面積 (AUC) を分析した (n=6)。

握力測定

握力は 16 週齢のマウスに対して、マウス用握力計 (モデル DS2-50N、株式会社イマダ) を用いて測定した。1 分間隔で 6 回の連続測定を行った。研究者は、マウスのグループ分けについて盲検化されていた。握力は体重で正規化した。

ヒラメ筋の組織学的解析

マウスからヒラメ筋組織を採取し、10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。筋切片を作成し、ヘマトキシリン & エオジン (HE) で染色した。筋肉は最大膨隆部で切断した。BZ-X710 蛍光顕微鏡 (キーエンス) を用いて画像を取り込み、断面積と直径を Image J (NIH) で測定した。

マウスの骨格筋における遺伝子発現解析

マウスの足底筋を摘出し、直ちに液体窒素で凍結した。氷冷した QIAzol Lysis reagent (Qiagen) を用い、ボールミルで 4000rpm、2 分間ホモジナイズし、メーカーの指示に従い total RNA を抽出した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて、製造者の指示に従って、全 RNA (0.5 μ g) を cDNA に逆転写した。足底筋における *Foxo1*、*Mstn*、*Fbxo32*、および *Trim63* の mRNA の発現は、RT-PCR を用いて定量した；TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) をメーカーの指示に従い使用した。PCR 条件は、50°C で 2 分、95°C で 20 秒の 1 サイクル、その後 95°C で 1 秒、60°C で 20 秒の 40 サイクルであった。各標的遺伝子の相対発現は、*Gapdh* の閾値サイクル (Ct) 値に対して正規化し、比較閾値サイクル 2- Δ Ct 法を用いて定量化した。卵を投与していないマウスのシグナルは相対値 1.0 を割り当てた。各群 6 匹のマウスの発現量を測定し、RT-PCR を各サンプルについて 3 連で実施した (n = 6)。

空腸と結腸の組織学的解析

マウスから摘出した空腸を直ちに 10%ホルムアルデヒドで 22°C、24 時間固定し、パラフィンに包埋して 4 μ m 厚の切片にし、HE 染色を行った。結腸はカルノア液中で同様に固定し、PAS 染色を行った。染色した切片の画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を用いて撮影した。絨毛の高さ / 幅および陰窩の深さは、6 匹の動物の各グループについて、スライドあたり 5 箇所 HE 染色切片を用いて、ImageJ を用いて測定した。ムチン粒および杯細胞 (PAS+) を ImageJ ソフトウェアを用いて 10 個のクリプトあたりの平均杯細胞 (PAS+) の数として報告した¹⁹⁾。

空腸の mRNA シークエンス

マウスの空腸を摘出し、直ちに液体窒素で凍結した。RNA 抽出方法は、" マウスの骨格筋における

遺伝子発現解析"の項に記載したものと同様である。TruSeq® Stranded mRNA kit(Qiagen)を用いて、cDNA ライブラリーを構築した。ペアエンドシーケンスは、Illumina NovaSeq6000 プラットフォームを使用して実施した(n=3)。アミノ酸、脂肪酸、グルコーストランスポーターに関連する mRNA 発現は、ボルケーノプロットとヒートマップを用いて可視化した。

血清中、骨格筋中のリジン濃度の測定

マウス血清および腓腹筋中のリジン濃度は、Agilent 7890B/7000D システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で実施したガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)を用いて測定した⁵⁾。

16S rRNA シーケンシング

QIAamp DNA Feces Mini Kit(Qiagen)を用いて、メーカーの説明書に従って、凍結した盲腸糞便サンプルから DNA を抽出した。細菌ユニバーサルプライマーセット(341F および 806R)を用いて、DNA から 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅させた。PCR は、EF-Taq(ソルジェント社)を用い、30 μ L の反応混合液に 20ng のゲノム DNA を鋳型として、以下のサーモサイクルのパラメータで実施した：95°C、2 分間で Taq ポリメラーゼを活性化し、95°C、55°C、72°C を各 1 分間で 35 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間のステップを行った。増幅産物は、マルチスクリーンフィルタープレート (Millipore Corp) を用いて精製した。MiSeq シーケンサー (Illumina,) を用いて、メーカーの説明書に従って 16S rRNA のシーケンスを行った (Macrogen)。配列の品質フィルタリングには、QIIME バージョン 1.9.1. を用いて、スコアが 75% 未満のバーコードまたはプライマーは、ファイルから除外した。運用分類単位 (OTU) の数は、類似度 97% で UCLUST アルゴリズムを用いて決定した^{20,21)}。また、BLAST (UNITE, 2017) を用いて、Greengenes コアセットの UNITE 配列セットを UCLUST と ITS で整理した 16S rRNA の分類学的割り当てを行った。KEGG オルソログ存在量予測は、Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt2) ソフトウェアを用いて得た²²⁾。グループ内の門の相対的な存在量は、Holm-Šidák 多重比較検定付き一元配置分散分析を用いて評価した。アルファ多様性は、Shannon²³⁾、Gini-Simpson 指数²⁴⁾ を用いて解析した。グループ間の細菌属の相対的存在量は、効果量測定 (LEfSe) と組み合わせた線形判別分析 (LDA) (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>) を使用して評価した。正規化された相対存在量行列を用いて、LEfSe は有意に存在量が異なる分類群を示し、LDA を用いてその特徴の効果量を推定した²⁵⁾。さらに、FMT の有効性を判断するために主座標分析 (PCoA) を行い、Tinn-R Gui version 1.19.4.7, R version 1.36 を用いて、生成するクラスター数を 2 と事前指定した非階層 K 平均クラスター分析を実施した²⁶⁾。

統計解析

データの解析には、JMP ver. 14.0 ソフトウェア (SAS) を使用した。2 つのグループの比較には、paired t-test を使用した。4 群の比較には、Holm-Šidák 多重比較検定付き One-way ANOVA を用いた。統計的有意性は、 $p < 0.05$ とした。図は、GraphPad Prism ソフトウェア (バージョン 9.3.1) を用いて作成した。

■ 結果

体重は乾燥全卵投与群 (Egg+) において対照群 (Egg-) と比較し 9 週齢から既に統計学的有意差をもって、低値であった (図 1B)。また運動量は卵投与群で対照群と比較し明期、暗期ともに増加していた (図 1C)。次に耐糖能の評価を実施すると、iPGTT、ITT ともに卵投与群で血糖の低下を認めた (図 1D)。握力についても絶対値、体重比ともに卵投与群で高値であった (図 1E)。

骨格筋の評価も実施した (図 2A)。ヒラメ筋の最大膨隆部断面積は卵投与群で有意に高値であり (図 2B)、ヒラメ筋、足底筋ともに絶対値、体重比ともに対照群と比較して卵投与群において高値であった (図 2C, D)。腓腹筋は絶対値においては両群間に明らかな差異を認めなかった一方で、体重比は卵投与群において高値であった (図 2E)。一方、精巣上体周囲脂肪は絶対値、体重比ともに対照群と比較して卵投与群で低値であった (図 2F)。RT-PCR で評価した遺伝子発現においても筋萎縮関連遺伝子である *Foxo1*、*Mstn*、*Fbxo32*、*Trim63* の遺伝子発現は対照群と比較して卵投与群で有意に低値であった (図 2G)。

次に小腸および大腸の評価を行った (図 3A)。絨毛の高さ、幅ともに卵投与群で対照群と比較して有意に高値であった一方で、陰窩の深さは低値であった (図 3B)。さらに杯細胞の数は卵投与群で有意に高値であった (図 3C)。小腸の mRNA シークエンス結果において乾燥全卵投与群では *Slc6a18* や

Slc6a19、*Slc38a6* などのアミノ酸輸送体の遺伝子発現が上昇していることがわかった。

FMT 実施群でも同様の解析を行った(図 4A)。体重は卵投与マウス FMT 群(FMT(E))で対照群(FMT(Db))と比較し低値であったが統計学的有意差をもって低値であったのは 9 および 10 週齢時のみであった(図 4B)。FMT(E)群では運動量は照群と比較し明期、暗期ともに増加していた(図 4C)。iPGTT、ITT とともに FMT(E)群で血糖の低下を認めた(図 4D)。握力についても絶対値、体重比ともに FMT(E)群で高値であった(図 4E)。

ヒラメ筋の最大膨隆部断面積は FMT(E)群で有意に高値であり(図 5A、図 5B)、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋ともに絶対値、体重比ともに対照群と比較して FMT(E)群において高値であった(図 5C-E)。精巣上体周囲脂肪は絶対値、体重比ともに対照群と比較して FMT(E)群で低値であった(図 5F)。Foxo1、Mstn、Fbxo32、Trim63 の遺伝子発現は対照群と比較して FMT(E)群で有意に低値であった(図 5G)。

また、リジンの血清中および骨格筋中の濃度を測定すると、対照群(Egg-)と比較し卵投与群にて、対照群(FMT(Db))と比較し FMT(E)群にてリジン濃度は高値であった(表 1)。

腸内細菌叢解析においてまず最初に 4 つのグループにおける異なる門の相対的な存在比を調べた(図 6A)。対照群と比較し、卵投与群、FMT(E)群は Bacteroidetes 門が多く、Firmicutes 門が少なかった。多様性の指標である Chao1、Shannon index、Simpson index は、対照群と比較し、卵投与群、FMT(E)群で有意に高かった(図 6B)。LEfSe アルゴリズムを用いて、Egg- 群、Egg+ 群と FMT(Db)群と FMT(E)群の間で変動的に分布する特定の菌叢を比較しました。Egg+ 群では、Egg- 群に比べて 10 の分類群(Vampirovibrio 属、Parasutterella 属、Lactococcus 属、Flavonifractor 属など)が過剰に、6 つの分類群(RuminoCoccus2 属など)が過小に存在した(図 6C)。また、FMT(E)群では FMT(Db)群に比べて 15 の分類群(Vampirovibrio 属、Parasutterella 属など)が過剰発現し、5 つの分類群(Escheria_Shigella 属など)が過小発現した(図 6D)。次に、PICRUSt を用いて、Egg- 群と Egg+ 群、および FMT(Db)群と FMT(E)群の間の腸内細菌叢の KEGG パスウェイの差異を解析した。KEGG パスウェイクラス I では Egg- 群と比較し Egg+ 群で Organismal Systems のパスウェイが、FMT(Db)群と比較し FMT(E)群において Human Diseases のパスウェイが抑制されていた(図 5E、表 2)。KEGG パスウェイクラス II のうち、Egg- 群と比較し Egg+ 群で Amino acid metabolism、Metabolism of Other Amino Acids のパスウェイが増加しており、FMT(Db)群でも同様であった(図 5F、表 3)。最後に FMT の有効性を PCoA を用いて判定した。重み付けなし、重み付けありのクラスタリングの結果、Egg- 群と FMT(Db)群、Egg+ 群と FMT(E)群は同じクラスタに属することがわかった(図 5F)。

■ 考 察

KEGG パスウェイ解析では乾燥全卵投与群、FMT(E)群ともにアミノ酸代謝に関連する腸内細菌群が増加していた。さらには小腸の mRNA シークエンスではアミノ酸トランスポーターである *Slc6a18* や *Slc6a19*、*Slc38a6* の遺伝子発現が乾燥全卵投与群で有意に増加していた。以上のことから、卵の投与による腸内細菌叢の改変が小腸のアミノ酸吸収を促進することで、骨格筋の増加に寄与した可能性が示唆された。

さらに卵投与群および FMT(E)群において血中および骨格筋中のリジン濃度が上昇した。ラットの骨格筋において、mTORC1 経路がリジンによって活性化されることが報告されている²⁷⁾。さらに、リジンは C2C12 筋管において、mTORC1 経路のリン酸化を促進することでタンパク質の分解を抑制することが報告されてる²⁸⁾。乾燥全卵投与によりリジンの吸収が増えたことで骨格筋の増大に寄与した可能性がある。

■ 要 約

今回、サルコペニア肥満モデルマウスに乾燥全卵を投与したところ、筋力と筋肉量が増加し、内臓脂肪量が減少したため、身体活動量が有意に増加した。さらに、乾燥全卵投与群の糞便をサルコペニア肥満モデルマウスに移植すると、サルコペニア肥満が改善されるだけでなく、耐糖能異常も有意に改善された。このことから、栄養補給だけでなく、卵の投与による腸内細菌叢の改変がサルコペニア肥満の改善に関与している可能性が示唆された。

■ 文 献

1. IDF Diabetes Atlas|Tenth Edition. <https://diabetesatlas.org/>. Accessed 20 Oct 2022.
2. Ly C, Gomez R. Unique associations of reinforcement sensitivity theory dimensions with social interaction anxiety and social observation anxiety. *Pers Individ Dif*. 2014 ; 60 : 20-4.
3. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health-2004. <https://www.who.int/publications/item/9241592222>. Accessed 20 Oct 2022.
4. Mesinovic J, Zengin A, De Courten B, Ebeling PR, Scott D. Sarcopenia and type 2 diabetes mellitus : a bidirectional relationship. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019 ; 12 : 1057-72.
5. Okamura T, Hamaguchi M, Bamba R, Nakajima H, Yoshimura Y, Kimura T, et al. Brazilian green propolis improves gut microbiota dysbiosis and protects against sarcopenic obesity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022 ; 13 : 3028-47.
6. Morley JE, Argiles JM, Evans WJ, Bhasin S, Cella D, Deutz NEP, et al. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc*. 2010 ; 11 : 391-6.
7. Van Vliet S, Shy EL, Sawan SA, Beals JW, West DWD, Skinner SK, et al. Consumption of whole eggs promotes greater stimulation of postexercise muscle protein synthesis than consumption of isonitrogenous amounts of egg whites in young men. *Am J Clin Nutr*. 2017 ; 106 : 1401-12.
8. Bagheri R, Hooshmand Moghadam B, Jo E, Tinsley GM, Stratton MT, Ashtary-Larky D, et al. Comparison of whole egg v. egg white ingestion during 12 weeks of resistance training on skeletal muscle regulatory markers in resistance-trained men. *Br J Nutr*. 2020 ; 124 : 1035-43.
9. Bagheri R, Hooshmand Moghadam B, Ashtary-Larky D, Forbes SC, Candow DG, Galpin AJ, et al. Whole Egg Vs. Egg White Ingestion During 12 weeks of Resistance Training in Trained Young Males : A Randomized Controlled Trial. *J Strength Cond Res*. 2021 ; 35 : 411-9.
10. Wilson J, Wilson GJ. Contemporary issues in protein requirements and consumption for resistance trained athletes. *J Int Soc Sports Nutr*. 2006 ; 3.
11. Asensio-Grau A, Peinado I, Heredia A, Andrés A. Effect of cooking methods and intestinal conditions on lipolysis, proteolysis and xanthophylls bioaccessibility of eggs. *J Funct Foods*. 2018 ; 46 : 579-86.
12. Jäger R, Kerksick CM, Campbell BI, Cribb PJ, Wells SD, Skwiat TM, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand : protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017 ; 14.
13. Van Vliet S, Shy EL, Sawan SA, Beals JW, West DWD, Skinner SK, et al. Consumption of whole eggs promotes greater stimulation of postexercise muscle protein synthesis than consumption of isonitrogenous amounts of egg whites in young men. *Am J Clin Nutr*. 2017 ; 106 : 1401-12.
14. Siddharth J, Chakrabarti A, Pannérec A, Karaz S, Morin-Rivron D, Masoodi M, et al. Aging and sarcopenia associate with specific interactions between gut microbes, serum biomarkers and host physiology in rats. *Aging*. 2017 ; 9 : 1698-720.
15. Ni Y, Yang X, Zheng L, Wang Z, Wu L, Jiang J, et al. Lactobacillus and Bifidobacterium Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. *Mol Nutr Food Res*. 2019 ; 63.
16. Trinchese G, Cavaliere G, Canani RB, Matamoros S, Bergamo P, De Filippo C, et al. Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J Nutr Biochem*. 2015 ; 26 : 1136-46.
17. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, et al. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2009 ; 183 : 6041-50.
18. Wang S, Huang M, You X, Zhao J, Chen L, Wang L, et al. Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Sci Rep*. 2018 ; 8.
19. Motta JP, Flannigan KL, Agbor TA, Beatty JK, Blackler RW, Workentine ML, et al. Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 ; 21 : 1006-17.
20. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010 ; 7 : 335-6.
21. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 ; 26 :

- 2460-1.
22. Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol.* 2020 ; 38 : 685-8.
 23. Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal.* 1948 ; 27 : 379-423.
 24. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature* 1949 163 : 4148. 1949 ; 163 : 688-688.
 25. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011 ; 12.
 26. Ding C, He X. K-means clustering via principal component analysis. *Proceedings, Twenty-First International Conference on Machine Learning, ICML 2004.* 2004 ; : 225-32.
 27. Sato T, Ito Y, Nagasawa T. Dietary L-Lysine Suppresses Autophagic Proteolysis and Stimulates Akt/mTOR Signaling in the Skeletal Muscle of Rats Fed a Low-Protein Diet. *J Agric Food Chem.* 2015 ; 63 : 8192-8.
 28. Sato T, Ito Y, Nedachi T, Nagasawa T. Lysine suppresses protein degradation through autophagic-lysosomal system in C2C12 myotubes. *Mol Cell Biochem.* 2014 ; 391 : 37-46.

表 1. 血中および骨格筋中のリジン濃度

		Egg ⁻	Egg ⁺	FMT(Db)	FMT(E)
リジン	血清 (μmol/L)	53.1 (2.3)	234.5 (6.2)	58.3 (19.4)	93.7 (15.9)
	骨格筋 (μmol/mg)	2.0 (0.2)	3.3 (0.2)	1.6 (0.2)	2.4 (0.4)

表 2. KEGG パスウェイ Class I

	Egg ⁻		Egg ⁺		p-value	FMT(Db)		FMT(E)		p-value
	Mean	SD	Mean	SD		Mean	SD	Mean	SD	
Cellular Processes	5.04	0.29	5.08	0.41	0.90	4.86	0.70	5.40	0.02	0.26
Environmental Information Processing	15.68	0.35	16.22	0.31	0.11	14.91	1.11	16.71	0.32	0.05
Genetic Information Processing	22.45	0.48	22.51	0.17	0.85	23.02	0.41	22.45	0.33	0.13
Human Diseases	0.94	0.01	0.90	0.03	0.15	0.94	0.01	0.91	0.01	0.03
Metabolism	55.00	0.33	54.43	0.46	0.16	55.41	1.38	53.70	0.08	0.10
Organismal Systems	0.89	0.01	0.86	0.01	0.01	0.86	0.01	0.84	0.01	0.09

表 3. KEGG パスウェイ Class II

		Egg-		Egg+		p-value	FMT(Db)		FMT(E)		
		Mean	SD	Mean	SD		Mean	SD	Mean	SD	p-value
Cellular Processes	Cell Communication	0.00	0.00	0.00	0.00	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	Cell Growth and Death	0.63	0.02	0.63	0.02	0.70	0.65	0.00	0.63	0.01	0.04
	Cell Motility	3.89	0.32	3.98	0.43	0.80	3.72	0.79	4.33	0.06	0.25
	Transport and Catabolism	0.51	0.07	0.47	0.03	0.45	0.50	0.09	0.44	0.04	0.38
Environmental Information Processing	Membrane Transport	13.17	0.35	13.78	0.28	0.07	12.55	0.89	14.19	0.30	0.04
	Signal Transduction	2.30	0.07	2.24	0.18	0.59	2.15	0.23	2.33	0.02	0.27
Genetic Information Processing	Signaling Molecules and Interaction	0.21	0.00	0.20	0.00	0.06	0.21	0.01	0.19	0.00	0.06
	Folding, Sorting and Degradation	2.89	0.06	2.83	0.05	0.30	2.97	0.08	2.82	0.05	0.04
	Replication and Repair	10.07	0.24	10.09	0.11	0.92	10.39	0.29	10.02	0.15	0.12
	Transcription	3.10	0.08	3.09	0.08	0.94	2.89	0.12	3.12	0.03	0.04
Human Diseases	Translation	6.40	0.26	6.50	0.04	0.54	6.77	0.17	6.49	0.15	0.10
	Cancers	0.14	0.00	0.13	0.01	0.11	0.14	0.00	0.13	0.00	0.27
	Cardiovascular Diseases	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50
	Immune System Diseases	0.04	0.00	0.04	0.00	0.71	0.04	0.01	0.04	0.00	0.24
	Infectious Diseases	0.45	0.01	0.43	0.02	0.36	0.46	0.01	0.44	0.01	0.07
	Metabolic Diseases	0.13	0.00	0.13	0.00	0.17	0.13	0.01	0.12	0.00	0.15
	Neurodegenerative Diseases	0.17	0.01	0.17	0.01	0.79	0.17	0.00	0.17	0.00	0.93
	Amino Acid Metabolism	10.88	0.16	10.93	0.16	0.00	11.17	0.33	10.76	0.03	0.01
	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	1.16	0.05	1.11	0.06	0.33	1.10	0.08	1.06	0.04	0.43
	Carbohydrate Metabolism	12.01	0.34	11.83	0.19	0.47	11.66	0.17	11.63	0.10	0.79
	Energy Metabolism	6.89	0.10	6.77	0.14	0.27	7.12	0.14	6.77	0.10	0.03
	Enzyme Families	2.41	0.07	2.47	0.08	0.37	2.46	0.10	2.43	0.04	0.64
	Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	3.40	0.22	3.25	0.03	0.31	3.43	0.31	3.14	0.12
Lipid Metabolism		3.31	0.06	3.21	0.02	0.05	3.19	0.01	3.17	0.01	0.13
Metabolism of Cofactors and Vitamins		5.03	0.13	4.97	0.08	0.55	5.17	0.05	4.94	0.05	0.00
Metabolism of Other Amino Acids		1.70	0.02	1.67	0.05	0.01	1.69	0.07	1.62	0.03	0.01
Metabolism of Terpenoids and Polyketides		1.84	0.06	1.83	0.04	0.82	1.91	0.04	1.80	0.03	0.02
Nucleotide Metabolism		4.59	0.08	4.61	0.05	0.70	4.74	0.15	4.58	0.03	0.14
Xenobiotics Biodegradation and Metabolism		1.80	0.00	1.79	0.00	0.02	1.75	0.02	1.80	0.01	0.01
Circulatory System		0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50
Organismal Systems	Digestive System	0.05	0.00	0.04	0.00	0.25	0.04	0.00	0.04	0.00	0.07
	Endocrine System	0.39	0.01	0.37	0.01	0.04	0.38	0.01	0.37	0.01	0.36
	Environmental Adaptation	0.20	0.02	0.20	0.01	0.93	0.19	0.02	0.20	0.00	0.57
	Excretory System	0.03	0.00	0.02	0.00	0.35	0.03	0.01	0.02	0.00	0.35
	Immune System	0.11	0.00	0.11	0.00	0.03	0.11	0.00	0.10	0.00	0.02
	Nervous System	0.11	0.00	0.11	0.01	0.62	0.11	0.01	0.11	0.00	0.39
	Sensory System	0.00	0.00	0.00	0.00	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-

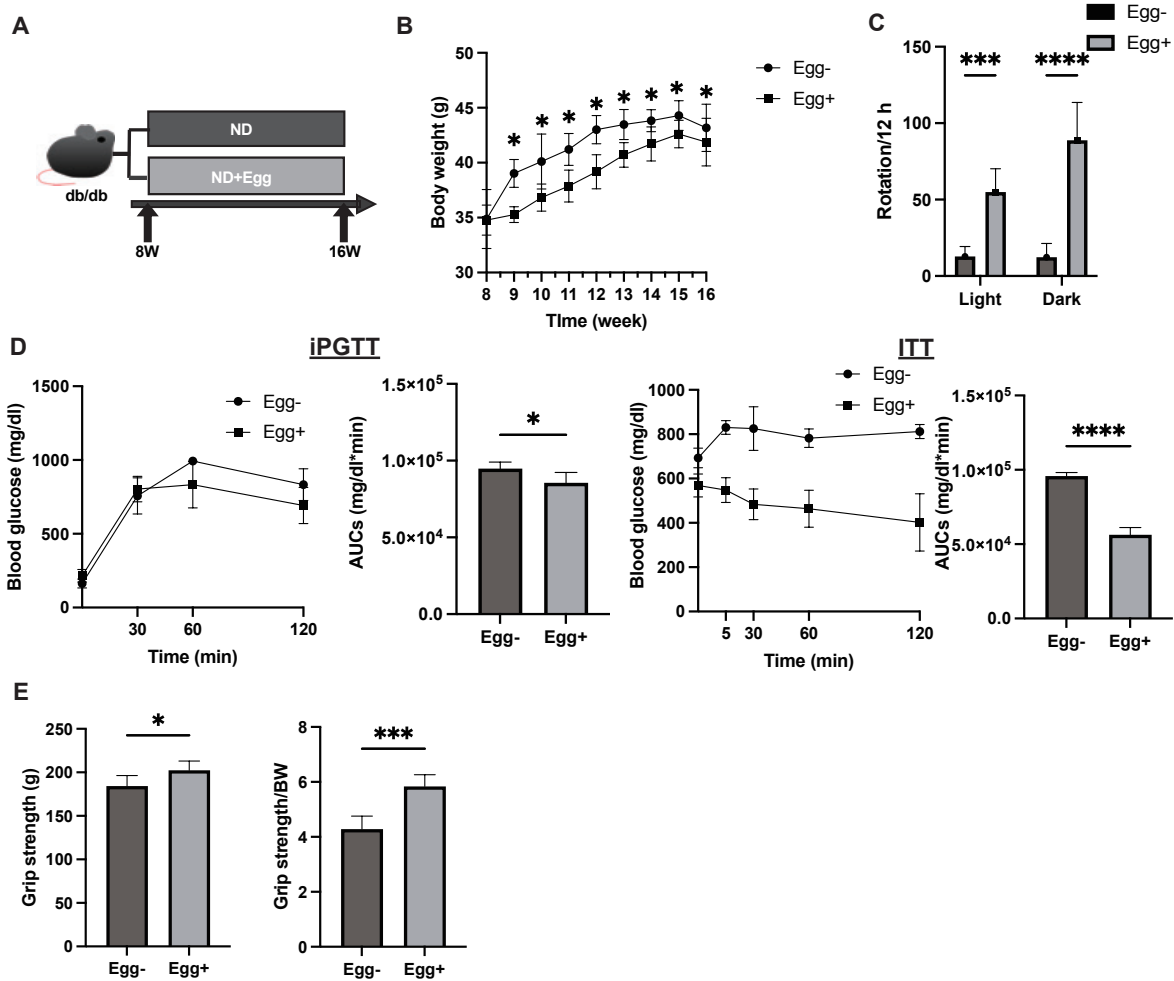


図 1. 牛乳の投与により握力は増加した。

(A)乾燥全卵の投与は 8-16 週齢の間継続した。(B)体重の変化 (n=6)。(C)ランニングホイールを用いた明期と暗期の回転数 (n=6)。(D)15 週齢のマウスの腹腔内ブドウ糖負荷試験 (2g/kg 体重)の結果と曲線下面積 (AUC) (n=6)。15 週齢マウスのインスリン負荷試験 (0.5U/kg 体重)の結果と AUC (n=6)。(E)握力および握力 / 体重比 (n=6)

データは、平均値±SD 値で表した。データは paired t-test を用いて分析した。*p<0.05, ***p<0.001, and ****p<0.0001.

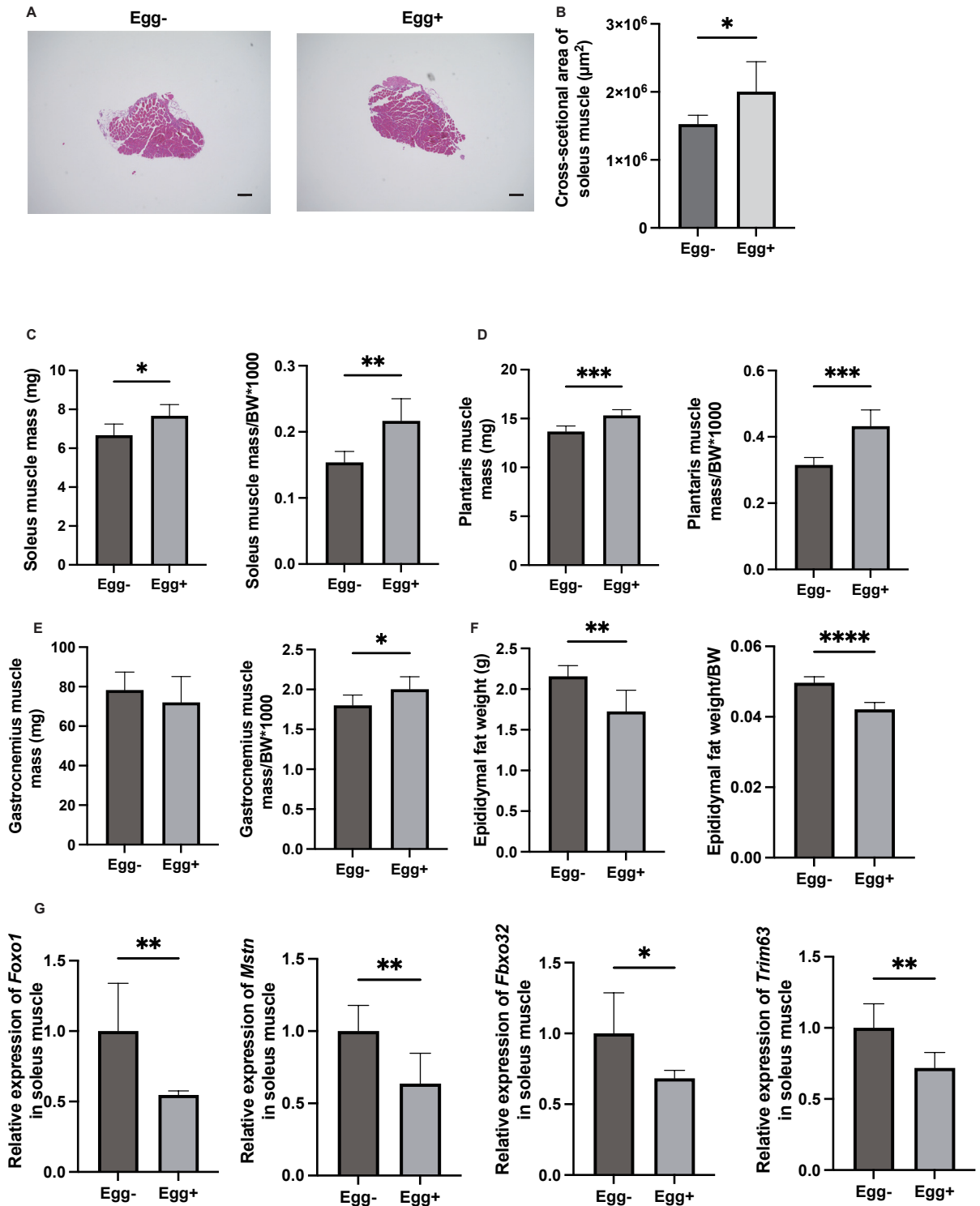


図2. 乾燥全卵の投与は骨格筋量を増加させ、筋萎縮に関連する遺伝子の発現を減少させた (A)ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色したヒラメ筋切片の画像。ヒラメ筋の組織は16週齢で採取した。スケールバーは100 μm を示す。(B)ヒラメ筋の断面積(n=6)。(C)16週齢のマウスにおけるヒラメ筋重量および体重比($\times 1000$)、(D)足底筋重量および体重比($\times 1000$)、(E)腓腹筋重量および体重比($\times 1000$)、(F)精巣上体脂肪重量および体重比(n=6)。(F)ヒラメ筋における *Foxo1*、*Mstn*、*Fbxo32*、*Trim63* の相対的 mRNA 発現量を *Gapdh* の発現量に正規化した(n=6)。データは、平均値 \pm SD値で表される。データは paired t-test を用いて解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ 。

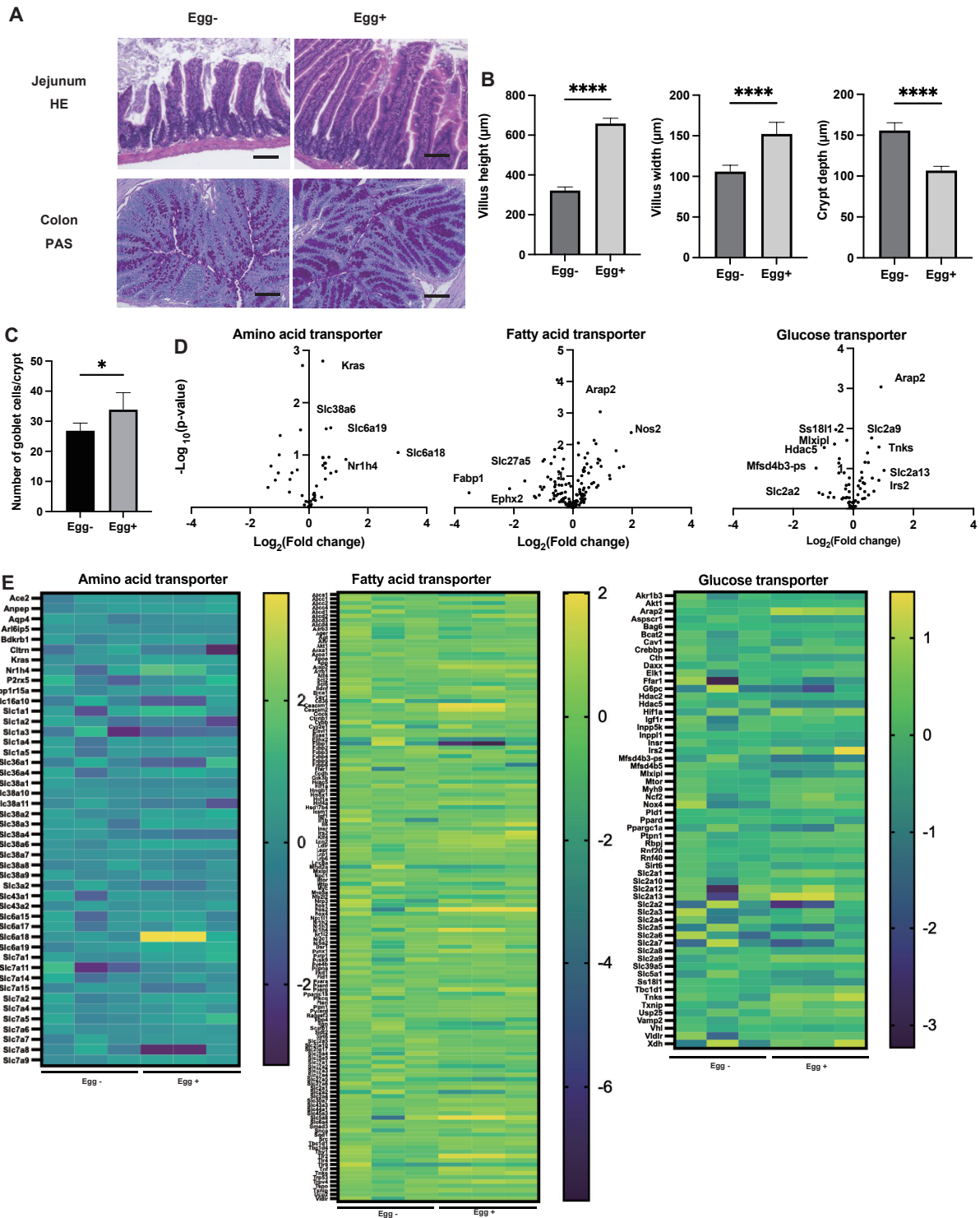


図 3. 乾燥全卵の投与により腸内の変化

(A)ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色空腸および過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色大腸切片の画像。空腸と結腸の組織は16週齢で採取した。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。(B)絨毛の高さと幅、陰窩の深さ($n=6$)。(C)総杯細胞数/陰窩($n=6$)。(D)アミノ酸トランスポーター、脂肪酸トランスポーター、グルコーストランスポーターに関連するmRNA発現をボルケーノプロットとして可視化した($n=3$)。(E)アミノ酸トランスポーター、脂肪酸トランスポーター、グルコーストランスポーターに関連するグローバルなmRNA発現をヒートマップとして可視化した($n=3$)。データは、平均値 \pm SD値で表される。データはpaired t-testで解析した。 $*p<0.05$ 、 $****p<0.0001$ 。

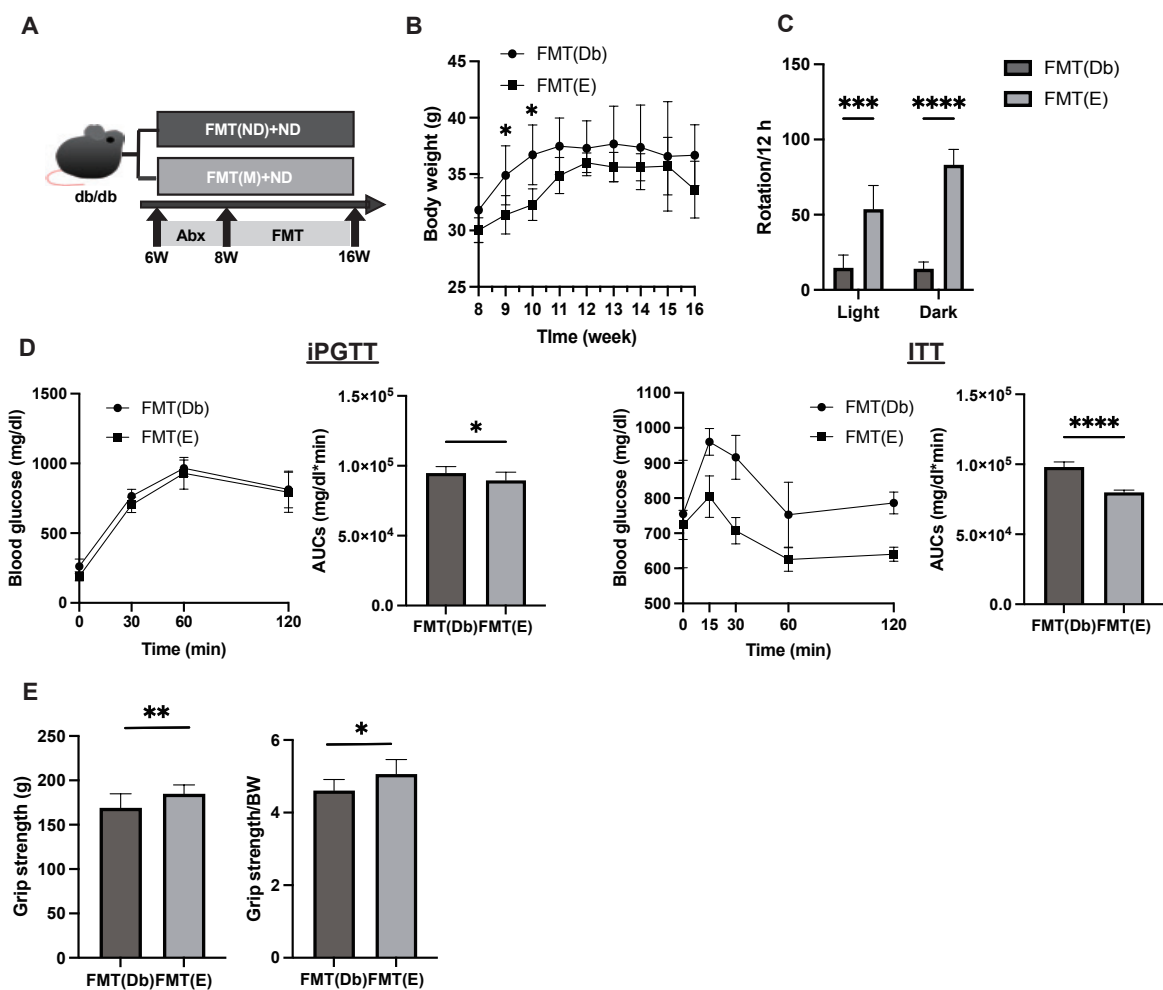


図4. 乾燥全卵を与えた *db/db* マウスの糞便微生物叢移植は握力を増加させた

(A) 糞便微生物叢移植(FMT)に先立ち、抗生物質によるレシピエント腸内殺菌を6~8週齢の2週間実施した。3日間の回復後、FMTを週2回実施した。(B)体重の変化($n=6$)。(C)ランニングホイールを用いた明期と暗期の回転数($n=6$)。(D)15週齢マウスの腹腔内ブドウ糖負荷試験(2g/kg体重)の結果と曲線下面積(AUC)($n=6$)。15週齢マウスのインスリン負荷試験(0.5U/kg体重)の結果とAUC($n=6$)。(E)握力および握力/体重比($n=6$)。データは、平均値 \pm SD値で表した。

データは paired t-test を用いて分析した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, and **** $p<0.0001$ 。

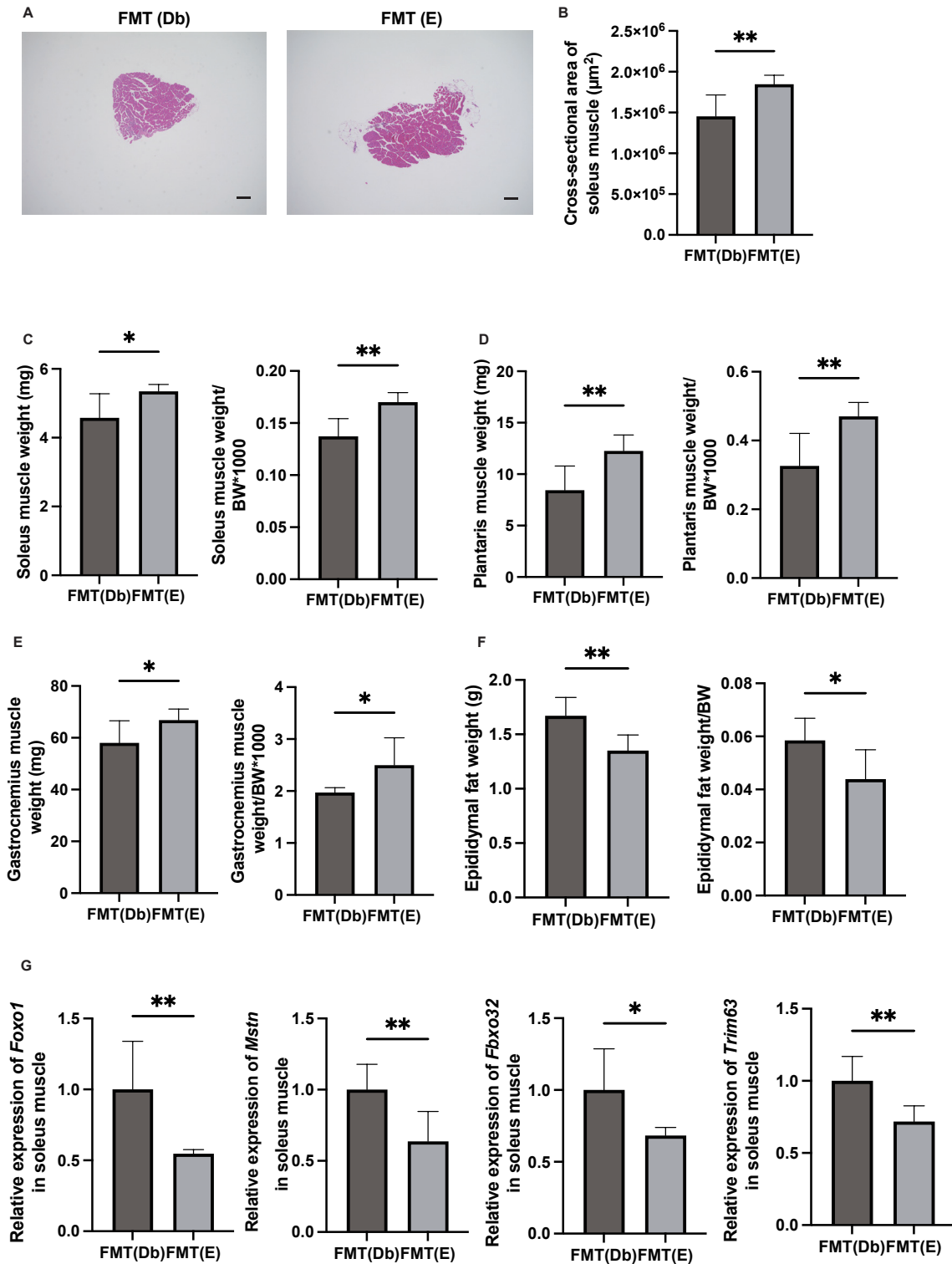


図5. 乾燥全卵を与えた *db/db* マウスの糞便微生物叢移植は骨格筋量を増加させ、筋萎縮に関連する遺伝子の発現を減少させる

(A)ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色したヒラメ筋切片の画像。ヒラメ筋の組織は16週齢で採取した。スケールバーは100 μm を示す。(B)ヒラメ筋の断面積($n=6$)。(C)16週齢のマウスにおけるヒラメ筋重量および体重比($\times 1000$)、(D)足底筋重量および体重比($\times 1000$)、(E)腓腹筋重量および体重比($\times 1000$)、(F)精巢上体脂肪重量および体重比($n=6$)。(F)ヒラメ筋における *Foxo1*、*Mstn*、*Fbxo32*、*Trim63* の相対的 mRNA 発現量を *Gapdh* の発現量に正規化した($n=6$)。

データは、平均値 \pm SD値で表される。データは paired t-test を用いて解析した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

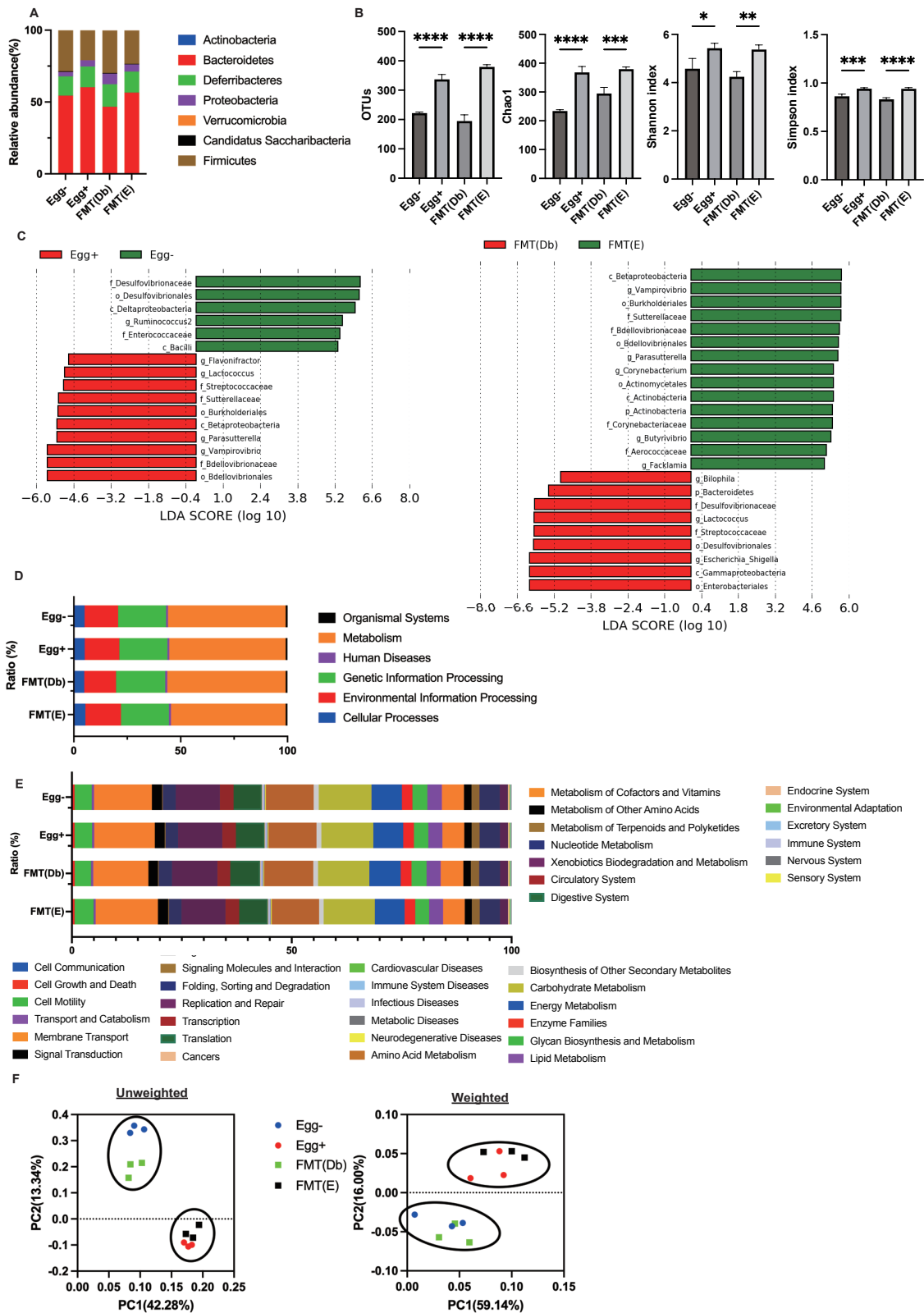


図 6. 腸内細菌叢の構成要素

(A) 腸内細菌叢の門レベルにおける相対的存在量 (n=3)。(B) OTU (n=3)、Shannon-index (n=3)、Simpson index (n=3)。(C) Egg- 群 (緑) と Egg+ 群 (赤)、FMT (E) 群 (緑) と FMT (Db) 群 (赤) の腸内細菌叢の LDA スコア。(D) KEGG パスウェイクラス I (n=3)。(E) KEGG パスウェイ Class II (n=3)。(F) 腸内細菌叢の非重み付け PCoA プロットと k-means クラスタリング、腸内細菌叢の重み付け PCoA プロットおよび k-means クラスタリング。

データは平均値±SD 値である。データは 1-way ANOVA と Holm-Šidák の多重比較検定で分析した。
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, and ****p<0.0001.