

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07905

研究課題名（和文）単球・ミクログリア機能に着目した生活習慣病に伴う新規脳心腎連関進展予測指標の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel predictive index for the progression of cerebro-heart renal involvement in lifestyle-related diseases focusing on monocyte and microglial functions

研究代表者

山陰 一（Yamakage, Hajime）

独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・内分泌代謝高血圧研究部・研究員

研究者番号：40598900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、国立病院機構多施設共同糖尿病・肥満症コホートにおいて血中sTREM2高値が糖尿病患者の認知機能低下と関連することを示した。また、非肥満糖尿病患者HbA1cの増悪群では、sTREM2の初期高値が2年後の認知機能低下と有意に関連し、sTREM2が認知機能低下の新規予測指標となると報告した。また、シスタチンCで換算したeGFRcysの経時的な低下がCVDの発症と関連することを認めた。さらに、SGLT2阻害薬による腎機能改善効果を報告した。また、新規に構築した認知症・軽度認知障害コホートではTREM2に着目した糖尿病性認知症の特徴を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、多施設肥満症・糖尿病コホートと認知症コホートを基盤に、肥満・糖尿病における認知症・腎症進展における単球・ミクログリア機能・sTREM2の病態意義について報告した。今後さらに、糖尿病・肥満症の脳心腎連関アウトカム・リスクに対する血中sTREM2との関連解析、糖尿病・肥満の有無別、薬物治療別などのサブ解析を行い、TREM2に着目した脳心腎連関進展予防戦略を提案する。特に未だ詳細が解明されていない肥満の認知症への影響、糖尿病性腎症及び認知症の病態・特徴を明らかにし、糖尿病・肥満に伴う脳心腎連関進展における革新的な早期診断法・高リスク群抽出法と先制医療の構築を目指す。

研究成果の概要（英文）：This study showed that high blood sTREM2 levels were associated with cognitive decline in diabetic patients in the National Hospital Organization Multicenter Diabetes and Obesity Cohort. We also reported that in the non-obese diabetic HbA1c exacerbation group, initially high levels of sTREM2 were significantly associated with cognitive decline at 2 years, and that sTREM2 is a novel predictive indicator of cognitive decline. We also observed that a decrease over time in eGFRcys, converted by cystatin C, was associated with the development of CVD. Furthermore, we reported that SGLT2 inhibitors improved renal function. We also reported the characteristics of diabetic dementia focusing on TREM2 in a newly constructed cohort of dementia and mild cognitive impairment.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：TREM2 脳心腎連関 糖尿病 肥満 早期予測バイオマーカー 治療戦略 単球・ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

本邦では食生活の欧米化による肥満・糖尿病・メタボリックシンドローム (MetS) の急増に伴い、心血管病 (CVD) と慢性腎臓病 (CKD) 発症予防や医療費対策が課題であり、特に CVD と CKD の関連 (心腎連関) が提唱され、心腎連関進展の早期治療法の確立が急務である。また、超高齢社会の本邦では認知症患者が急増し (2025 年: 高齢者の 1/4; 厚生労働省 2015)、肥満・糖尿病・MetS との関連が報告されつつある。更に 2018 年に、腎機能悪化と認知機能低下との関連性が日本人集団にて報告され (Alzheimers Dement, 2018)、新たな多臓器間ネットワークとして、これまでの心腎連関に脳も加えた「脳心腎連関」が注目されている。脳心腎連関における炎症・動脈硬化の重要性が提唱され、炎症や動脈硬化と密接に関連する単球・マクロファージ (M₁) 機能が注目されている。近年、マウスにて腎臓の組織 M₁ が腎障害や腎臓の回復に関与する事や心臓と腎臓の機能的連関における M₁ 機能の重要性が報告された (J Am Soc Nephrol, 2011, Nat Med 2017)。しかし、認知症発症や脳心腎連関への関与の詳細は不明であり、特にヒトにおける脳心腎連関進展予防の為に至適血球マーカーに関する大規模研究はない。

単球や M₁ の活性化は炎症の起点となり、動脈硬化進展全段階で重要な役割を果たす。近年、肥満脂肪組織にて M₁ の浸潤増加と質的变化 (抗炎症性・M₂ M₁ から炎症性・M₁ M₁ への転換) が認められ、M₁/M₂ 極性悪化が全身の炎症亢進に関与する事が明らかになった (J Clin Invest, 2007)。また、単球にも多様性が存在しており、一般住民研究より単球中に占める CD14^{high}CD16⁻単球 (炎症性単球) の割合が高いほど CVD 発症リスクが有意に高く、CD14^{high}CD16⁻単球が CVD 発症の予知因子となる事が報告され、単球の Heterogeneity の重要性が示された (Circ Cardiovasc Genet, 2012) (図 1)。申請者らは、これまでに構築した本邦初の肥満症・糖尿病コホートにて、肥満症や糖尿病において単球中の M₁/M₂ 極性悪化・炎症亢進 (M₁ 発現上昇・M₂ 発現低下) を認め、その動脈硬化進展との関連を明らかにした (Diabetes Care, 2010)。また、糖尿病薬や脂質代謝改善薬・EPA など生活習慣病薬による炎症指標や動脈硬化指標・CAVI の改善 (Hypertens Res, 2008; Diabetes Care, 2003; ATVB, 2007, 2008) と単球機能 (M₁/M₂) の改善効果を証明した (Diabetes Care, 2007, 2012; Metabolism, 2013)。さらに、インクレチンが単球のオートファジー機能を活性化させ、抗動脈硬化作用を発揮する事も報告した (Metabolism, 2015)。また、申請者は糖尿病における単球の M₁/M₂ 極性悪化と頸動脈プラークの状態との関連を認めた (J Atheroscler Thromb, 2016)。

最近、申請者らは肥満・糖尿病モデルマウスを用い、単球機能異常に関わる遺伝子を網羅的に探索した結果、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) にて認知症との関連が示唆される遺伝子・Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) の高発現を見出した。TREM2 は主に単球・M₁・ミクログリアに発現する細胞表面受容体であるが、酵素的に切断されて可溶性 TREM2 (soluble TREM2; sTREM2) として細胞外に放出され、M₁・ミクログリアに結合して活性化し炎症を亢進させる (J Exp Med 2017)。申請者は認知症モデルマウスやコホートの検討から、TREM2 発現ミクログリアは脳内炎症亢進・認知機能低下に関わることや、糖尿病患者における血清 sTREM2 上昇は認知機能低下と関連することを明らかにした (Diabetes Metab 2017)。よって、脳心腎連関の新規メディエーターとして、単球の M₁/M₂ 極性・TREM2・sTREM2 の関与が考えられる。

以上の背景より、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、肥満・糖尿病・MetSにおいて、単球/ミクログリア機能(M1/M2比)・TREM2は、脳心腎関連進展に如何に関与するか、脳心腎関連の新規予知指標/バイオマーカーとなりうるか、である。

2. 研究の目的

本研究は日本人肥満・糖尿病・MetSに伴う脳心腎関連の進展機序の解明と予知因子の同定を目的とする。特に、単球-M¹-ミクログリア機能(M1/M2比)とそこに発現するTREM2分子に着目し、糖尿病・肥満症コホートを基盤に、糖尿病・肥満に伴う脳心腎関連の実態・規定因子を大規模に検討し、単球機能・TREM2の臨床的意義を解明する。基礎的にはTREM2欠損マウス、肥満・糖尿病及び腎不全モデルマウスにて、脳・心臓・腎臓における炎症状態や単球・M¹活性化レベル・TREM2発現、血清sTREM2レベルを明らかにし、脳心腎関連におけるM1/M2極性・TREM2の病態意義を明らかにする。以上、臨床的・基礎的に、糖尿病・肥満における脳心腎関連の進展機序の解明と新規予知指標の開発を目指す。

3. 研究の方法

肥満症・糖尿病/一般住民コホートにて、炎症・単球機能(M1/M2・TREM2)と脳心腎関連進展との関連を検討する。さらに、臨床研究成績を裏付ける基礎検討として、TREM2欠損マウス、肥満・糖尿病及び腎不全モデルマウスにて、脳・心臓・腎臓における炎症状態や単球・M¹活性化レベル・TREM2発現、血清sTREM2レベルを明らかにし、脳心腎関連におけるM1/M2極性・TREM2の病態意義を明らかにする。

・肥満症・糖尿病コホートと一般住民コホートにおける臨床研究:(A)肥満症・糖尿病の前向き多施設コホート集団(JOMS/J-DOS)及び(B)自治医大(連携研究者・小谷)の一般住民コホートを対象に下記評価項目を測定し、横断解析する。

1. 登録対象:下記の条件を満たす者。

(A)多施設共同肥満症・糖尿病コホート(JOMS/J-DOS):年齢20~80歳。計2000例。肥満症(BMI25以上), 2型糖尿病(HbA1c [NGSP] 6.5%以上)。

(B)一般住民コホート:自治医大コホート(Hum Genet. 2010)の登録例。

2. 治療指針:食事・運動療法による減量治療を基本として、各学会の診療ガイドラインに準拠し、必要に応じて薬物療法(脂質異常改善薬、糖尿病薬、降圧剤)を併用する。

3. 観察ポイント:減量前、減量治療6, 12, 24, 36, 48, 60ヶ月後。下記の評価項目を測定する。

4. 臨床評価項目:

1)主要アウトカム項目: 複合心血管イベント:心血管死および入院治療が必要な非致死性急性心筋梗塞・脳卒中、急性冠症候群、大動脈及び末梢動脈疾患、心不全。心腎合併症(心筋梗塞・狭心症・脳卒中・腎障害等)の新規発症・進展。 認知機能検査:Mini-Mental State Examination (MMSE)

2)副次アウトカム項目: CKDリスク:a) 推算糸球体濾過量(eGFR), CKDstage, b) 血中Cre, 尿中Alb, Cre, 血中・尿中シスタチンC, 尿中L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP), 尿中NGAL

CVDリスク:動脈硬化指標(PWV/CAVI) 炎症指標(高感度CRP) 認知症:脳MRI 3)主要観察項目: 単球マーカー(CD14), M1マーカー(TNF- α , IL-6等), M2マーカー(IL-

10, CD163 等), 血清 TREM2 濃度, 単球 TREM2 発現, オートファジー機能(LC3, ATG5 等)。

4) 副次観察項目: 肥満・糖尿病歴、生活歴(喫煙、飲酒、身体組成: 体重、腹囲、血圧、糖脂質代謝、アディポサイトカイン、遺伝素因

5. データ解析

(横断解析): 単球・M 機能(M1/M2・オートファジー関連蛋白・TREM2)と脳心腎連関進展(CKD・CVD リスクや心血管イベント発症、認知機能低下)との関連解析より、脳心腎連関と最も関連ある因子を同定する。

(縦断解析): 各単球・M 関連マーカー・TREM2(ベースライン値及び変化量)とアウトカム指標(脳心腎連関進展)との関連解析。病態別、治療効果別、各生活習慣病薬(糖尿病薬、高脂血症薬)有無別に 同様のサブグループ解析を行う。

II. 基礎研究

TREM2 KO、肥満・糖尿病及び腎不全モデルマウスを用い、基礎的検討より単球 M1/M2 極性・TREM2 の病態意義を明らかにし、肥満・糖尿病に伴う脳心腎連関の分子機構を解明する。

A)脳心腎連関における M1/M2 極性・TREM2 の病態意義: TREM2 KO、db/db マウスに高脂肪食を与え、体組成、糖代謝、単球機能(M1/M2・TREM2)、血清 sTREM2 値を測定する。また、腎障害マーカー(尿中アルブミン、L-FABP、Kim-1、NGAL 等)を ELISA にて測定する。さらに、脳、心臓、腎臓における炎症や組織傷害レベルを遺伝子発現・免疫組織学的解析により検討する(M1/M2 マーカー発現・TREM2 発現、単球・M の浸潤や活性化レベル)。各指標間の関連を解析し、肥満・糖尿病に伴う脳・心・腎間の病的変化の連動性を M1/M2 極性・TREM2 を基軸に検討する。マウス腎虚血再灌流障害による腎不全モデルにおいても同様に検討する。

B)脳心腎連関における sTREM2 の病態意義: 上記 A)と同様のマウスの尾静脈に精製 sTREM2 を投与し、脳・心・腎各組織をサンプリングし、各組織における炎症亢進を分子生物学的・組織学的に検討する。

C)脳心腎連関の新規規定分子の同定: マウスから脳・心・腎各組織をサンプリングし、DNA マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を施行する。高脂肪食有無における発現プロファイルから、肥満・糖尿病に伴い発現レベルが変化する遺伝子群のうち、特に単球・M ・ミクログリア機能に関連する液性因子や受容体に着目し、その中で、脳・心・腎間で遺伝子発現変化に連動性が見られる候補遺伝子を絞り込む。マウス M 細胞株(RAW264.7)やミクログリア細胞株(BV-2)を用いて候補遺伝子の過剰発現またはノックダウンを行い、細胞機能への影響(炎症亢進やパラクライン・オートクライン的作用機序等)を検討することで、脳心腎連関の新規因子を明らかにする。

4. 研究成果

申請者は既に肥満・糖尿病の心血管病(CVD)リスクとしての単球機能異常(M1/M2 極性)を報告してきた。マウス骨髄のマイクロアレイから、糖尿病・肥満の骨髄単球にて TREM2 の発現亢進を新規に認めた。本研究では、糖尿病・肥満に伴う脳心腎連関進展における単球・ミクログリア機能・TREM2 の病態意義の解明を目指す。申請者は国立病院機構多施設共同糖尿病・肥満症コホートにおいて血中 sTREM2 高値が糖尿病患者の認知機能低下と関連し(Diabetes Metab 2019)、久山町一般住民では血中 sTREM2 値と 10 年後の認知症発症と有意に関連し、認知症の新規予知指標となる事を示した(Ann Neurol 2019)。さらに、非肥満糖尿病患者

HbA1c の増悪群では、sTREM2 の初期高値が 2 年後の認知機能低下と有意に関連し、sTREM2 が認知機能低下の新規予知指標となると報告した (Front. Endocrinol 2022)。また、初期 sTREM2 と 2 年間の eGFR 変化量に相関傾向を認め、肥満症では、シスタチン C で換算した eGFRcys の経時的な低下が CVD の発症と関連することを認め、eGFRcys はクレアチニン換算の eGFRcre より、肥満・糖尿病患者の CVD 発症予測に適することを報告した (Obes Sci Pract. 2022)。さらに、SGLT2 阻害薬による腎機能改善効果を報告した (Intern Med 2020)。新規に構築した認知症・MCI コホートでは TREM2 に着目した糖尿病性認知症の特徴を報告した (Diabetes Res Clin Pract 2022)。また、認知症マウスにてタキシフォリン投与による海馬の TREM2 発現抑制による認知症改善効果を報告した (Proc Natl Acad Sci U S A 2019)。現在、TREM2 欠損マウスにおいて脳心腎連関における TREM2・単球機能の意義を解明している。

以上より、本研究において、多施設肥満症・糖尿病コホートと新規に構築した認知症コホートを基盤に、肥満・糖尿病における認知症・腎症進展における単球・ミクログリア機能・sTREM2 の病態意義について英文誌を多数報告し、脳心腎連関進展における TREM2 の病態意義が示された。

今後さらに、NHO 多施設共同糖尿病・肥満症コホート、健診コホートや新規に構築した認知症コホートの長期追跡・縦断解析を推進し、糖尿病・肥満症の脳心腎連関アウトカム・リスクに対する血中 sTREM2 との関連解析、糖尿病・肥満の有無別、薬物治療別などのサブ解析を行い、TREM2 に着目した脳心腎連関進展予防戦略を提案する。特に未だ詳細が解明されていない肥満の認知症への影響、糖尿病性認知症の病態・特徴を明らかにし、糖尿病・肥満症に伴う脳心腎連関進展における革新的な早期診断法・高リスク群抽出法と先制医療の構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanaka Masashi, Yamakage Hajime, et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Higher Serum Soluble TREM2 as a Potential Indicative Biomarker for Cognitive Impairment in Inadequately Controlled Type 2 Diabetes Without Obesity: The DOR-KyotoJ-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.880148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohara Tomoyuki, Hata Jun, Tanaka Masashi, Honda Takanori, Yamakage Hajime, Inoue Takayuki, Hirakawa Yoichiro, Kusakabe Toru, Shibata Mao, Kitazono Takanari, Nakao Tomohiro, Satoh Asahara Noriko, Ninomiya Toshiharu	4. 巻 70
2. 論文標題 Association of daily sleep duration with the incident dementia by serum soluble <scp>TREM2</scp> in a community	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Geriatrics Society	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgs.17634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 浅原 哲子、田中 将志、山陰 一、井上 隆之	4. 巻 3
2. 論文標題 TREM2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 老年内科	6. 最初と最後の頁 739-748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Masashi, Yamakage Hajime, Inoue Takayuki, Odori Shinji, Kusakabe Toru, Shimatsu Akira, Satoh-Asahara Noriko	4. 巻 59
2. 論文標題 Beneficial Effects of Ipragliflozin on the Renal Function and Serum Uric Acid Levels in Japanese Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, 12-week, Open-label, Active-controlled Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 601 ~ 609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3473-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Takayuki, Saito Satoshi, Tanaka Masashi, Yamakage Hajime, Kusakabe Toru, Shimatsu Akira, Ihara Masafumi, Satoh-Asahara Noriko	4. 巻 116
2. 論文標題 Pleiotropic neuroprotective effects of taxifolin in cerebral amyloid angiopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 10031 ~ 10038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1901659116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Masashi, Yamakage Hajime, Inoue Takayuki, Odori Shinji, Kusakabe Toru, Shimatsu Akira, Satoh-Asahara Noriko	4. 巻 59
2. 論文標題 Beneficial Effects of Ipragliflozin on the Renal Function and Serum Uric Acid Levels in Japanese Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, 12-week, Open-label, Active-controlled Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 601 ~ 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3473-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamakage Hajime, Tanaka Masashi, Inoue Takayuki, Odori Shinji, Kusakabe Toru, Satoh Asahara Noriko	4. 巻 none
2. 論文標題 Effects of dapagliflozin on the serum levels of fibroblast growth factor?21 and myokines and muscle mass in Japanese patients with type?2 diabetes: A randomized, controlled trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 none
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山陰一、田中将志、井上隆之、村中和哉、和田啓道、長谷川浩二、日下部徹、浅原哲子
2. 発表標題 認知症・心血管病の早期評価系構築のための多施設共同大規模肥満症コホート研究
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山陰一、浅原哲子、JOMS/J-DOS2 Study Group
2. 発表標題 認知症・心血管病の早期評価系構築のための多施設共同大規模肥満症コホート研究
3. 学会等名 第5回日本糖尿病・生活習慣病ヒューマンデータ学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上隆之、田中将志、山陰一、村中和哉、池上健太郎、日下部徹、浅原哲子
2. 発表標題 認知症発症予知因子・TREM2の脂肪組織における病態生理学的意義の解明
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山陰一、田中将志、井上隆之、村中和哉、和田啓道、長谷川浩二、日下部徹、浅原哲子
2. 発表標題 生活習慣病における新規認知症予知バイオマーカー候補・sTREM2 の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山陰一、田中将志、井上隆之、村中和哉、和田啓道、長谷川浩二、日下部徹、浅原哲子
2. 発表標題 生活習慣病における新規認知機能低下予知バイオマーカー・sTREM2の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第4回日本糖尿病・生活習慣病ヒューマンデータ学会年次学術集会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	浅原 哲子 (佐藤哲子) (Satoh-Asahara Noriko) (80373512)	独立行政法人国立病院機構 (京都医療センター臨床研究センター)・内分泌代謝高血圧研究部・研究部長 (84305)	

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