

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11760

研究課題名（和文）単球・ミクログリア由来蛋白を標的とした生活習慣病に伴う認知症予防法の確立

研究課題名（英文）Establishment of dementia prevention method associated with lifestyle diseases targeting monocyte / microglia-derived proteins

研究代表者

井上 隆之（INOUE, TAKAYUKI）

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：50581386

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、肥満・糖尿病モデルマウスにて、脳および脂肪組織（皮下及び内臓）において、対照群より、炎症マーカーの増加、免疫細胞活性化指標の発現と共に、TREM2発現の有意な増加を認めた。また、TREM2欠損マウスの検討では、12週間の高脂肪食負荷にて、TREM2欠損マウスでは対照群に比べて、体重抑制の傾向が認められている。さらに、認知症マウスにおいて、抗酸化作用を有するフラボノイド・タキシフォリンによる海馬TREM2発現抑制と認知機能改善効果を認め、TREM2が薬効評価の指標となることを世界に先駆け見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は超高齢社会における認知症抑制を目指し、日本人糖尿病・肥満に伴う認知症の進展機序の解明と予知因子の同定を目的とする。特に、脳内炎症の鍵となる単球-M<sub>1</sub>-ミクログリア機能（M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>比）とそこに発現するTREM2分子に着目している。

本研究成果により、糖尿病・肥満における認知機能低下の実態把握と発症規定因子の同定が初めて可能になることで、認知症高リスク群の同定が初めて可能になる。さらに、単球・ミクログリア機能の病態意義が初めて解明されることで、M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>比・TREM2を標的とした糖尿病・肥満合併認知症の新規予知・評価系の開発や創薬が可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, in obesity / diabetes model mice, TREM2 expression was significantly increased in the brain and adipose tissue (subcutaneous and visceral) with an increase in inflammatory markers and an expression of immune cell activation index compared to the control group.

In addition, in a study of TREM2-deficient mice, a tendency of body weight suppression was observed in TREM2-deficient mice at a high-fat diet load for 12 weeks compared to the control group.

Furthermore, in mice with dementia, the flavonoid taxifolin, which has an antioxidant effect, was found to suppress hippocampal TREM2 expression and improve cognitive function, and was the first in the world to find that TREM2 is an index for drug efficacy evaluation.

研究分野：肥満、糖尿病、内分泌

キーワード：肥満 糖尿病 脳内炎症 脂肪組織 ミクログリア マクロファージ TREM2

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦では認知症が急増しており、2025年には軽度認知障害を含め認知症患者が約1300万人(高齢者の1/3)に達するとされている。認知症は糖尿病・肥満の食事・薬剤管理の遵守や予後に影響し、対策は喫緊の課題である。認知症は脳血管性(VaD)とアルツハイマー型(AD)が約8割を占め、いずれにも糖尿病はリスク因子であるが(Neurology 2011)、未だ糖尿病・肥満に伴う認知症の発症・進展機序の分子機構や最大規定因子は不明である。リスク因子として、高血糖以外にインスリン抵抗性や炎症・動脈硬化等が考えられている。近年、炎症担当細胞である単球・マクロファージ(M)について、肥満に伴う抗炎症性M2Mから炎症性M1Mへの質的变化(炎症性M1/抗炎症性M2比悪化)が注目され、申請者らも糖尿病患者において単球の極性(M1/M2比)悪化がCVDリスクとなることを報告してきた(Diabetes Care 2010; J Atheroscler Thromb 2016)。

最近、AD患者単球やADモデルマウスの炎症性ミクログリアでは、炎症応答に関連する細胞表面分子であるTriggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) 遺伝子の発現亢進が報告された(J Exp Med 2015)。TREM2は主にミクログリアやMに発現する細胞表面タンパク質である。ADマウスでは、TREM2は脳内ではM1単球由来ミクログリアに高発現し、炎症性サイトカインを誘導し、AD進展の関与が報告されている(J Exp Med 2015; Cell 2015)。さらに、AD患者では単球におけるTREM2発現が亢進し、TREM2発現レベルと認知機能が負の相関を示すことが報告された(J Alzheimers Dis 2014)。また、GWASよりTREM2の遺伝子変異と認知症との関連も示唆されている(N Engl J Med 2013)。申請者もマイクロアレイ解析から、糖尿病・肥満マウスの骨髄中単球にてTREM2遺伝子の高発現を見出し、その視床下部や腹腔内M1MでもTREM2発現亢進も認めている。

申請者らがこれまで構築してきた本邦初の糖尿病・肥満症コホートにおいて、脂質の質(sdLDL・酸化LDL)や動脈硬化指標のみならず、単球のM1/M2極性がCVDリスクとなり、認知機能改善効果が示唆される3不飽和脂肪酸(EPA)や糖尿病薬(インクレチン関連薬)によるM1/M2比改善効果を報告している(Diabetes Care 2012他; Metabolism 2013等)。最近、糖尿病患者の血中TREM2高値が高血糖・炎症と認知機能・MMSEと関連し、TREM2高値が認知機能低下を反映する新規バイオマーカーである可能性を認めている(Diabetes Metab 2017)。また、申請者らは、アミロイド(A)が脳血管壁に沈着し、認知症モデルである脳アミロイド血管症モデルマウス(cerebral amyloid angiopathy [CAA]モデルマウス)にて、A凝集抑制作用を有するフラボノイド・タキシフォリンの投与により、脳内A減少や脳血流量・認知機能回復作用を明らかにした(Ann Clin Transl Neurol 2014; Acta Neuropathol Commun 2017)。さらに、同モデルにおいてタキシフォリン投与は海馬のTREM2遺伝子を減少させ、認知機能低下に対する脳内TREM2発現の関与が示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究は超高齢社会における認知症抑制を目指し、日本人糖尿病・肥満に伴う認知症の進展機序の解明と予知因子の同定を目的とする。特に、脳内炎症の鍵となる単球-M-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・肥満に伴う認知症の実態・規定因子を大規模に検討し、TREM2の臨床的意義を解明する。基礎的にはTREM2欠損マウスや脳アミロイド血管症モデルマウスを用い、TREM2の病態生理学的意義を解明し、認知症の新規予知因子・治療戦略の開発を目指す

### 3. 研究の方法

本研究では、糖尿病・肥満に伴う認知症の早期予知指標・規定因子として、単球・ミクログリア機能(M1/M2比・TREM2)に焦点を当て、糖尿病・肥満症コホートにて、糖尿病・肥満における認知機能低下の実態・要因を世界に先駆け検討する。さらに、モデルマウスを用い糖尿病・肥満合併認知症におけるTREM2の病態生理学的意義を解明する。

#### 研究計画 (臨床研究：初年度～最終年度)

申請者らが構築した本邦初の糖尿病・肥満症コホートを基盤とし、以下の項目に沿って認知機能低下の実態と要因・関連因子を同定し、M1/M2比・TREM2の臨床的意義を解明する。

1. 研究デザイン：多施設共同前向きコホート観察研究
2. 対象：2型糖尿病(HbA1c 6.5%)かつ/または肥満(BMI 25)、20歳以上 京都医療センターと関連施設の外来通院または入院患者。
3. 治療指針：ガイドラインに準拠した食事・運動指導・必要に応じた薬物療法
4. 評価項目：登録後学会ガイドラインに準拠した診療を行い、0, 1, 2年後に評価。  
(1) 主要アウトカム指標：認知機能検査：Mini-Mental State Examination (MMSE)

- (2) 主要観察項目：年齢、糖代謝、肥満度、単球機能 (M1/M2・TREM2 発現)
- (3) 副次アウトカム指標：脳 MRI (MMSE26 点以下、主治医が必要と判定時)
- (4) 副次観察項目：問診 (肥満・糖尿病歴等)、血圧、内臓脂肪量、脂質代謝、肝腎機能、血漿 A・タウ蛋白、血清 TREM2 濃度、動脈硬化指標 (PWV/CAVI) 等
5. ○横断解析) 単球機能 (M1/M2 比・TREM2) 及び血清 TREM2 濃度等との関連解析  
○縦断解析) 認知機能の変化と M1/M2 比・TREM2 の変化との関連解析

## 研究計画 (基礎研究：初年度～最終年度)

### 基礎研究①

野生型と db/db、ob/ob マウスにて高脂肪食負荷 (12 週間) 糖尿病薬 (インクレチン関連薬、ピオグリタゾン等)、3 不飽和脂肪酸 (EPA/DHA) やタキシフォリン投与によるミクログリア機能 (M1/M2 比)、TREM2、脳内炎症や認知機能の変化を検討する。

1. 身体組成、内臓・皮下脂肪組織重量、糖脂質代謝・インスリン感受性等
2. 認知機能 (モリス水迷路試験による行動解析)
3. 神経細胞傷害状態 (A 蓄積量、ERK リン酸化、神経細胞死: ELISA、免疫組織染色)
4. ミクログリア形質 [ M1/M2 サイトカイン産生、TREM2 発現、可溶性 TREM2 レベル、TREM2 切断酵素 ADAM10 等の発現、TREM2 シグナル関連分子の活性化 (MAPK、NF- $\kappa$ B 等)、活性化マーカー Iba-1 発現、グルタミン酸産生等; qPCR、ELISA、ウエスタン、免疫組織染色 ]
5. 低酸素応答 (HIF-1 $\alpha$ 、下流の標的遺伝子等発現等; qPCR、ウエスタン)
6. 酸化ストレス応答 (抗酸化蛋白; qPCR、ウエスタン)
7. メチル化解析: 糖尿病・肥満合併認知症の発症・進展または改善との関連が示唆される TREM2 を含む候補遺伝子について、エピジェネティック変化を検討 (関連メチル基転移酵素発現、注目遺伝子のプロモーター領域のメチル化等; qPCR、ウエスタン等、次世代シーケンサー)

### 基礎研究②

TREM2 欠損マウスと CAA モデルマウスである Tg-SwDI マウス (申請者らにより作製済) において高脂肪食負荷を行い、高脂肪食負荷 (12 週間負荷) さらに糖尿病薬 (インクレチン、インスリン抵抗性改善薬等)、3 不飽和脂肪酸 (EPA/DHA)、抗血小板薬・タキシフォリン投与による M1/M2 比・TREM2 を標的とした脳内炎症抑制効果を検討する。

1. 前項 1-7 に準じた実験・解析を実施

## 4. 研究成果

申請者らがこれまで構築してきた本邦初の糖尿病・肥満症コホートにおいて、脂質の質 (sdLDL・酸化 LDL) や動脈硬化指標のみならず、単球の M1/M2 極性が CVD リスクとなり、認知機能改善効果が示唆される 3 不飽和脂肪酸 (EPA) や糖尿病薬 (インクレチン関連薬) による M1/M2 比改善効果を報告している (Diabetes Care 2012 他; Metabolism 2013 等)。最近、糖尿病患者の血中 TREM2 高値が高血糖・炎症と認知機能・MMSE と関連し、TREM2 高値が認知機能低下を反映する新規バイオマーカーである可能性を認めている (Diabetes Metab 2017)。

申請者らは、肥満・糖尿病モデルマウス (遺伝性・db/db マウスおよび後天性・高脂肪食負荷マウス) にて、脳および脂肪組織 (皮下及び内臓) において、対照群より、炎症マーカー (TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL6 等) の増加、免疫細胞活性化指標 (Iba-1, F4/80)、誘導型一酸化窒素酵素 (iNOS) の発現と伴に、TREM2 発現の有意な増加を認めた。また、TREM2 欠損マウスの検討では、12 週間の高脂肪食負荷にて、TREM2 欠損マウスでは対照群に比べて、体重抑制の傾向が認められている。

さらに、申請者らは認知症モデルマウスである脳アミロイド血管症 (cerebral amyloid angiopathy: CAA) モデルマウスを用い、強い抗酸化作用を有するタキシフォリンの投与によって、脳血流増加や認知機能改善作用を世界初で報告した (Acta Neuropathol Commun 2017)。そして、その認知症改善作用がタキシフォリンによる海馬の TREM2 発現抑制を介していることを証明した (Proc Natl Acad Sci USA 2019)。

また、九州大学・久山町研究との共同研究より久山町一般住民における血中 sTREM2 と全認知症、アルツハイマー型、脳血管型いずれの認知症においても 10 年後の発症率との有意な関連を認め、血中 sTREM2 が認知症予知指標となることを報告した (Annals of Neurology 2019)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kusakabe Toru, Yokota Shigefumi, Shimizu Mika, Inoue Takayuki, Tanaka Masashi, Ohue-Kitano Ryuji, Muranaka Kazuya, Yamakage Hajime, Wada Hiromichi, Hasegawa Koji, Satoh-Asahara Noriko	4. 巻 8
2. 論文標題 Differential effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor and low-carbohydrate diet on body composition and metabolic profile in obese diabetic db/db mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001303 ~ e001303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjdr-2020-001303	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 Tanaka Masashi, Saito Satoshi, Inoue Takayuki, Satoh-Asahara Noriko, Ihara Masafumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Potential Therapeutic Approaches for Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1992 ~ 1992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21061992	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 Yamakage Hajime, Tanaka Masashi, Inoue Takayuki, Odori Shinji, Kusakabe Toru, Satoh Asahara Noriko	4. 巻 Nov 13
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 Epub ahead
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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, Yamakage Hajime, Tanaka Masashi, Kusakabe Toru, Shimatsu Akira, Satoh-Asahara Noriko	4. 巻 8
2. 論文標題 Oxytocin Suppresses Inflammatory Responses Induced by Lipopolysaccharide through Inhibition of the eIF-2 / ATF4 Pathway in Mouse Microglia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 527 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8060527	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 Tanaka Masashi, Saito Satoshi, Inoue Takayuki, Satoh-Asahara Noriko, Ihara Masafumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel Therapeutic Potentials of Taxifolin for Amyloid- $\beta$ -associated Neurodegenerative Diseases and Other Diseases: Recent Advances and Future Perspectives	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2139 ~ 2139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20092139	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 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上隆之、田中将志、山陰一、村中和哉、日下部徹、浅原哲子
2. 発表標題 認知症発症予知マーカー・TREM2の肥満・脂肪組織における病態生理学的意義の検討
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 2020年

1. 発表者名 1.井上隆之、田中将志、山陰一、村中和哉、日下部徹、浅原哲子
2. 発表標題 脂肪組織における認知症発症予知因子・TREM2 の病態生理学的意義の解明
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 2. 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

〔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)	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	
	(Asahara Noriko)  (80373512)	  (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
---------	---------