

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06797

研究課題名（和文）糖尿病におけるケトン体代謝シフトの意義と長期予後予測

研究課題名（英文）Significance of ketone body metabolic shift in diabetes and long-term prognosis prediction

研究代表者

佐藤 洋美（Sato, Hiromi）

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30506887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では2型糖尿病患者（T2DM）の心血管イベントリスク（CVR）の総合的予測を目指した。T2DMを対象に実施されたACCORD試験の被験者個別情報を活用し、個別に全病期の疾患時間を推定した。推定疾患時間に基づき全死亡リスクが増加し、科学的に妥当な予測と見込まれた。また、SGLT2阻害薬の心保護作用で示唆されている代謝シフトと組織炎症の相関を特に心外膜脂肪を想定して検討した。SGLT2阻害薬は抗炎症作用を示し、一部のアミノ酸や糖代謝経路が炎症及び治療に連動して変化した。将来的には疾患数理モデルのパラメータに代謝シフトから探索するバイオマーカー情報を追加することで精密予測を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病の真のリスクは合併症の予防であり、特に生命に関わる心血管イベントリスク（CVR）の増加を避けることが肝要となる。本研究はCVRの精密かつ定量的な予測に向き合い、病態発症からの疾患時間の推定とその予測に将来資する新規バイオマーカーとしてSGLT2阻害薬で着目されている代謝シフトの関与に挑んだ。今後とも継続的な調査によって予測の精度を高め、また代謝シフトの側面から病態の合理的な理解を進めることができれば、糖尿病および心筋梗塞や心不全などの疾患領域に対しても、個々の患者に適した治療選択や予後予測に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to predict overall cardiovascular event risk (CVR) in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), utilizing individual subject information from the ACCORD study conducted in T2DM to individually estimate disease time for all disease stages. The increased risk of all-cause mortality based on estimated disease time was expected to be a scientifically valid prediction. The correlation between metabolic shifts and tissue inflammation suggested by the cardioprotective effects of SGLT2 inhibitors was also examined, especially assuming epicardial fat; SGLT2 inhibitors showed anti-inflammatory effects, and some amino acid and sugar metabolic pathways were altered in conjunction with inflammation and treatment. In the future, we aim to add biomarker information explored by metabolic shift to the parameters of the disease mathematical model for precise prediction.

研究分野：薬理学

キーワード：SGLT2阻害薬 脂肪細胞 マクロファージ 心血管イベントリスク 糖尿病 メタボローム 炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の真の恐ろしさは無自覚・無症状のままに合併症を誘発するまで進行することにある。特に不可逆で生命に関わる心筋梗塞や脳卒中などの大血管障害が生じる心血管リスク(CVR)は顕在化されている範囲でさえ非糖尿病患者の2~3倍も高まる。これまでに慢性糖尿病患者のCVRに強力な治療介入がどの程度寄与するのか、被験者1万例を超える規模のACCORD試験やADVANCE試験で検討されている。驚くべきことに、ACCORD試験においては血糖強化療法の方が標準療法よりも心血管疾患による死亡率が有意に高く、また血圧や脂質の強化療法も標準療法に比べて有意なイベントリスクの低下を得られなかった(The ACCORD Study Group, *N Eng J Med* 2008;2010;2010;2011)。このように進行性の長期慢性疾患の予後予測は容易でなく、治療介入が決して一義的には立ちいかないことが示された。一方、近年は企業や医師主導の一部の臨床試験の情報公開が開始されている。このようなレポジトリはCTDS(Clinical Trial Data Sharing)とよばれ、匿名化された被験者個別情報を適切な申請プロセス後に広く研究者が活用できるように準備されている。実際にACCORD試験の情報は2013年に公開されてから複数の研究者によって幅広い目的でpost hoc解析が実施され、2020年9月までに30報を超える研究論文が存在する。申請者らは国内のアカデミア研究者として先陣を切ってCTDSの情報を利用した複数の研究を展開しており、慢性閉塞性肺疾患の進行や心疾患の病態分析に活用して経験を積んできている。

CVRリスク削減の観点で、本研究でもう一つ着目したのがSGLT2阻害薬である。この薬効群は尿糖の再吸収の大部分を担う腎臓近位尿細管に発現するトランスポーター、sodium glucose cotransporter 2(SGLT2)を阻害することで体外へ糖を排出し、血糖値を下げるものである。本邦で6薬剤が承認されており、申請者らはこの6薬剤について尿糖排泄量の能力で規格化した用量をベースに6薬剤の臨床試験のHbA1c観測値を統合し、同一の薬力学的モデルで長期エンドポイントである血糖降下作用の用量反応性を示せるのではないかと考え、モデルメタアナリシスを実施し、実際にその傾向を捉えてきた。このうちエンパグリフロジン(Empa)とカナグリフロジン(Cana)の2剤でそれぞれ心血管疾患既往歴のある2型糖尿病患者を組み入れた大規模臨床試験の結果、心血管死を減少させる結果が報告されている(Zinman *et al*, *N Eng J Med* 2015, Perkovic *et al*, *N Engl J Med* 2019)。さらにEmpa、Canaおよびダパグリフロジン(Dapa)では腎保護作用も期待されている。SGLT2阻害薬の薬効は血糖の日内変動に依らず平均血糖値を低下させるため、細胞代謝のエネルギー源をグルコース依存性から脂肪酸をエネルギー源とするいわゆる飢餓応答の代謝に切り替え、脂肪酸分解産物としてケトン体が生じる。特に生体ケトン体の7割を占めるβヒドロキシ酪酸(BHB)は、このように代謝シフトのキーとなる中間代謝物およびシグナル伝達因子の両面で有用性が見直されている。このような代謝シフトがSGLT2阻害薬の心保護作用の一端を説明する可能性を追究し、またその作用機構を探ることで、心筋梗塞や心不全の病態の発生機序を新たな側面から理解できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

生涯疾患である糖尿病の長期予後改善のため、特に心血管イベントリスク(CVR)の総合的予測を目指し、疾患時間軸に基づいてリスクを分析する疾患数理モデルの構築と精密予測に寄与する新規バイオマーカーの創出に取り組んだ。モデル構築には被験者個別の公開臨床試験情報を活用し、短期間のバイオマーカー情報から全病期の長期推移を予測するため後述する独自技術を用いる。さらにCVRに寄与する新規バイオマーカーとして、SGLT2阻害薬の臓器保護作用で見いだされたケトン体代謝を含め、代謝シフトと組織炎症の相関について検討した。本研究においては、特に心筋梗塞などの発症要因として注視される心外膜脂肪を想定し、脂肪組織を構成する脂肪細胞とマクロファージに対するSGLT2阻害薬の作用を検討した。将来的には疾患数理モデルのパラメータに代謝シフトから探索するバイオマーカーの情報を追加することで精密予測へ貢献することを目指した。

3. 研究の方法

本研究は3つのステップで糖尿病の長期予後予測を目指した。すなわち①基本となる疾患時間推定を行う数理モデルの構築、②ケトン体もしくはケトン体代謝機構関連因子のCVR予測マーカーとしての可能性の探索、③CVR予測曲線の作成(①および②を活用)である。ただし③は新規バイオマーカーを含む臨床試験情報が必要となるため、将来の課題とし、研究期間中は①および②に集中して取り組んだ。

(1) ACCORD試験の被験者個別情報を活用したCVR予測のための疾患モデルの作成

米国BioLINCCデータベースで公開されている2型糖尿病患者の血糖強化療法がCVRに与える影響が検討されたAction to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)試験について、全被験者の個別情報と一部被験者の検体試料(2の検討で使用)の提供手続きを進めた。なお申請手続きは千葉大学大学院薬学研究院倫理審査委員会の承認を得て行った。入手データを整理し、臨床試験実施当時の再現や強化治療群と標準治療群の見逃された差がないか、全死亡、心血管死、心不全、心筋梗塞などの各種リスクごとに種々のサブグループ解析を行い、全死亡、

心血管 (CV) 死、腎機能障害リスクなどに対する疾患時間を定量的に予測する疾患モデルの構築を進めた。本解析は、研究分担者の樋坂が以前に開発した Statistical Restoration of Fragmented Time-course (SReFT)解析(Ishida T et al, CPT Systems Pharmacol, 2019: 105:436-447)に機械学習を組み合わせた SReFT-ML を用いて行った。

(2) SGLT2 阻害薬(SGLT2i)が脂肪組織炎症に与える影響と代謝シフトの関与

脂肪組織の炎症を想定し、脂肪組織を構成する主要な細胞種として脂肪細胞およびマクロファージの炎症惹起条件に対する SGLT2i(empagliflozin, dapagliflozin)の影響を確認した。組織炎症に関与する白色脂肪細胞のモデルには、マウス脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導後、サイトカインによる炎症惹起を行った。マクロファージのモデルは、ヒト単球由来 THP-1 細胞を M0 マクロファージに分化誘導後、M1 または M2 マクロファージに分極させて評価した。SGLT2 阻害剤が炎症状態に与える変化は、脂肪組織炎症に関与する炎症マーカー (TNF- α ,IL-6 等) と抗炎症マーカー (adiponectin) の遺伝子発現レベルで確認した。一方、代謝シフトの評価は、同条件で回収した細胞及び上清中のメタボライトを回収し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置により極性代謝物を一斉分析した。有意に変動の見られた代謝物の情報からパスウェイ解析を行った。加えて、以上から得られる機序仮説に関連して、ACCORD 試験に参加した2型糖尿病患者で心筋梗塞を発症した患者の血清検体を BioLINCC より入手し、メタボローム解析によりパイロット的な仮説の検証を行った。

4. 研究成果

(1) SGLT2i が脂肪組織炎症に与える影響



図 1. 脂肪細胞及びマクロファージにおける SGLT2 タンパク質

脂肪細胞およびマクロファージにおいて、腎臓に比べると微弱であるものの SGLT2 のタンパク質発現を明瞭に認めた(図 1)。したがって SGLT2i による薬理作用が起こりうると考えられた。まず MTT assay による毒性試験や先行研究を参考に、いずれの細胞においても初発の検討は SGLT2i の濃度域を 10-30 μ M に決定した。炎症惹起により炎症性アディポカイン(IL-6)の有意な増加と抗炎症性アディポカイン (adiponectin) の有意な減少を認めた。炎症下の SGLT2i 添加は、IL-6 の有意な減少と adiponectin の有意な上昇がみられた(図 2)。

脂肪細胞のメタボロームの変化では、まず炎症条件の有無、そして SGLT2i 添加による影響を確認した。既報のケトン体として 2-hydroxy- β butyric acid および 3-hydroxy- β butyric acid の 2 種は薬物により緩徐な増加傾向を認めたものの、有意な変化ではなかった。そこでケトン体に限らず測定可能な全ての極性代謝物の変化を網羅的に確認した。メタボロームの変化について複数の評価方法を探索的に開拓しており、申請者らが別に転移性脳腫瘍の研究テーマで着手していた動的な代謝フラックスを精密に評価する方法と、ある時点の静的な一斉評価の 2 種を大別して検討し、本研究においては経路が絞りきれないため、最終的に後者の、一斉評価によって情報を極力捨てない方策を選択することとした。その結果、炎症により Pentose phosphate pathway、Glycolysis/Gluconeogenesis、Citrate cycle (TCA cycle) などの糖代謝および Pyrimidine metabolism、Purine metabolism などの核酸代謝が亢進した(図 3)。図 (上位 8 位までの経路)には含まれない

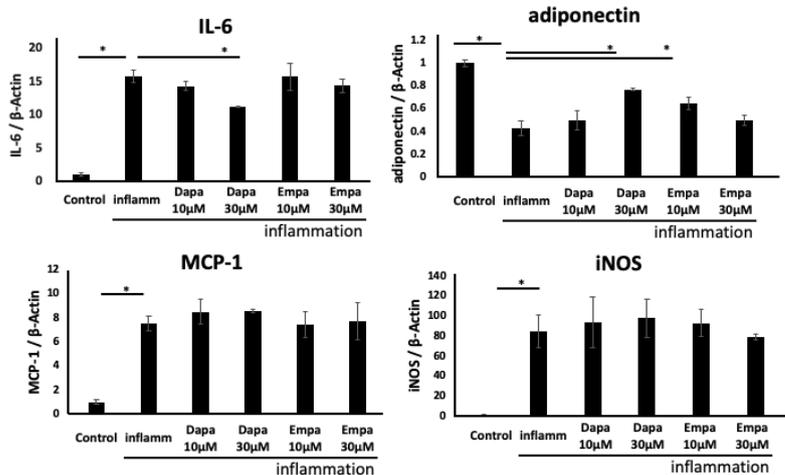


図 2. SGLT2i が脂肪細胞の炎症関連マーカーmRNA に与える影響

が、グルタミン酸関連の代謝の変動も複数確認された。一方、炎症下の SGLT2i 曝露ではこれらの経路が抑制された。一連の SGLT2i の薬理作用をマクロファージでも確認したところ、脂肪細胞よりもさらに 1 オーダー低い濃度域で抗炎症効果を示した。メタボローム解析では、脂肪細胞と同様に糖代謝関連のほか、NO 合成の観点から炎症との関連が報告されるアルギニン代謝の経路も増加した。ただし SGLT2i による本経

路への影響は明瞭ではなかった。また、ACCORD 試験の一部の被験者血清検体のメタボローム解析では、心筋梗塞を起こした患者ではイベントの前後に脂肪細胞やマクロファージの炎症条件下で生じるメタボローム変化と同様、一部の糖代謝および核酸代謝経路の亢進傾向を認めた。血清メタボロームが全身代謝の平均的状況を反映し、脂肪組織で生じる変化と類似するとの前提に立てば、脂肪細胞やマクロファージで観察された変化は実際のヒト心外膜脂肪の炎症の状態を部分的に再現しており、炎症状態変化を代謝変動の軸から新たに解釈することは有用と考えられる。さらに、本検討の結果、SGLT2i によって脂肪細胞以上にマクロファージに対する抗炎症効果が強く認められたため、本作用が SGLT2i を介するものであるのか、代謝シフトが説明因子としてどの程度寄与するのか、今後追究する予定である。以上の検討により、糖尿病の心血管リスクに加えて、心筋梗塞や心不全などの病態自体を新たに捉え直すことができると考えている。

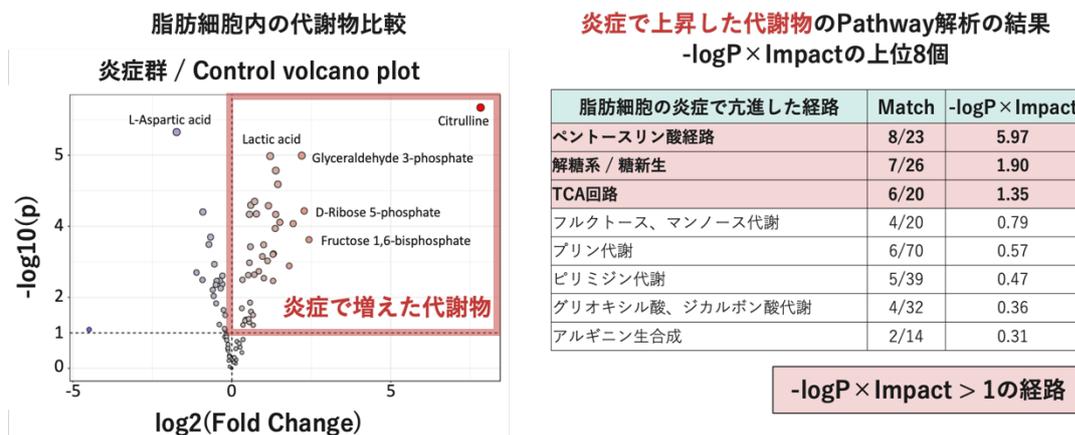


図 3. 脂肪細胞の炎症および炎症条件下で SGLT2i がメタボロームに与える影響

(2) 2型糖尿病患者の CVR 予測のための疾患モデルの構築

ACCORD 試験の被験者個別情報を活用し、糖尿病が発症してからの疾患時間を予測するため、SReFT-ML による解析を行った。解析のためのバイオマーカーを探索的に検討し、血糖指標、バイタル（血圧、心拍数）、腎機能、脂質、その他の生化学検査値、身体・精神状態の QOL を評価するための各種アンケート指標のカテゴリの中から 33 種を本解析の対象に含めた。これらのバイオマーカー変化を疾患時間軸に沿って推定した結果を示す（図 4）。特徴的な変化を青枠で囲ってある。まず糖尿病 3 大合併症に注目した。糖尿病の進行と腎機能の悪化はよく知られた関係であり、本検討においても eGFR は疾患時間が進むほど低下する向きに推定された（図 4、左下）。また、糖尿病性網膜症のスコアとして ETDRS、糖尿病性神経障害のスコアとして MINSI があり、いずれも疾患時間軸に沿って増加の傾向を認めた（図 4、右下）。

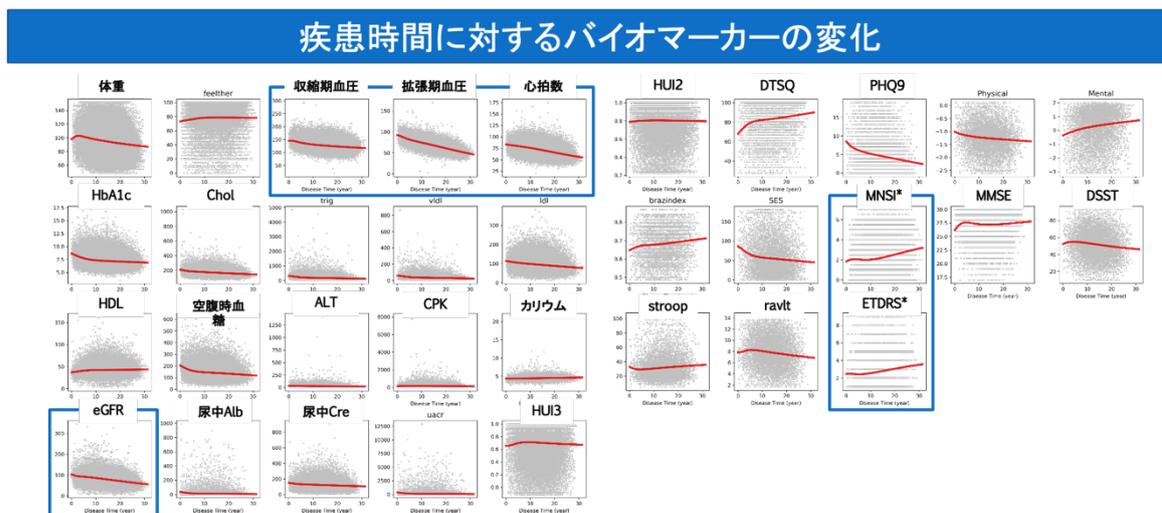


図 4. SReFT-ML で推定された各種バイオマーカーの疾患時間軸における推移

さらに、推定された疾患時間軸で生存時間解析および全死亡のハザードを確認したところ、糖尿病の疾患進行に応じて明確な死亡リスクの上昇が推定された（図 5、青線および青ハイライトの信頼区間）。なおこれらのリスクに関する情報は SReFT-ML の解析に用いておらず、結果として描画されたものである。

疾患時間に対するイベントリスクの変化

全死亡の予測はGompertz分布で説明可能であった:

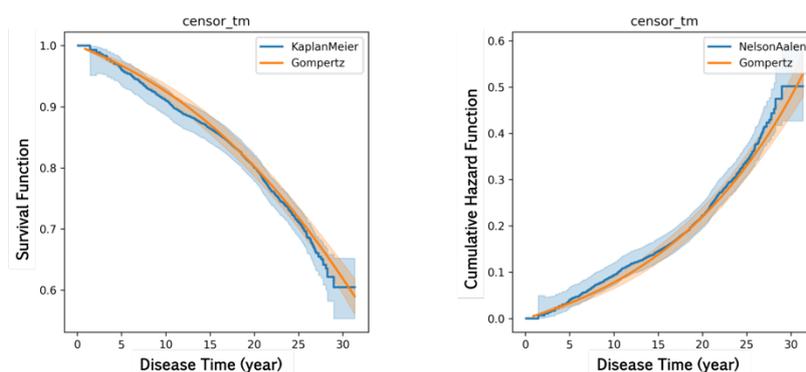


図 5. 推定された疾患時間で描画した生存時間解析(左)とハザード関数(右)

ACCORD 試験は患者の血糖値レベルを維持するための強化療法または標準治療が行われており、HbA1c の変化は緩徐に維持されていた(図 4、左上から 2 番目)。ただし、当該試験においては血圧および脂質の調節強度が CVR に与える影響を評価することも目的であったため、患者は血糖・血圧・血清脂質のそれぞれの強度調節のため大きく 8 区分のアームに割り付けられており、バイタルや血清脂質の変化は薬物治療の強度による影響を受けていると考えられる。現在、これらの影響を排除するため、バイタルや血清脂質を除いた解析を並行して検討中である。この場合でも全死亡や CV リスクの疾患時間に沿った上昇は観察されており、解析が妥当な方向に推定されていることは確認されている。このような疾患時間の精密な推定により、バイオマーカー同士の関係性や、患者背景因子の影響がどのバイオマーカーにいつ頃の時期に大きく出ののかなどの定量的な見積もりが可能になると期待される。(1) で示した新たなバイオマーカー候補といずれ統合することにより、心血管イベントのリスクの新しい評価指標が生まれ、各ステージでの治療法選択に役立てることを目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊池望恵、吉友 葵、後藤杏子、白根大貴、田中浩揮、秋田英万、樋坂章博、佐藤洋美
2. 発表標題 cGAMP導入がアストロサイトのグルタミン酸関連物質の代謝フラックスに与える影響
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toyoshima T, Kogane M, Kikuchi M, Hisaka A, Sato H
2. 発表標題 Investigation of Adipose Tissue Inflammation to Elucidate the Mechanism of Cardioprotective Effects of SGLT2 Inhibitors.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato H, Goto M, Kato K, Sato K, Okawa T, Kikuchi M, Usuki K, Tanaka H, Matsumoto C, Akita H, Hisaka A.
2. 発表標題 Role of astrocytes in building tumor microenvironment around metastatic brain tumors.
3. 学会等名 The 24th Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池望恵、吉友 葵、小金正空、後藤杏子、大川柊弥、原 来実、白根大貴、松本千佳、田中浩揮、秋田英万、樋坂章博、佐藤洋美
2. 発表標題 転移性脳腫瘍から発信されるcGAMPがアストロサイトの代謝に与える影響の速度論的評価
3. 学会等名 第143回日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小金正空、豊島拓斗、後藤杏子、樋坂章博、佐藤洋美
2. 発表標題 SGLT2阻害薬Dapagliflozinが脂肪細胞のメタボロームに与える影響
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小金 正空、豊島 拓斗、加藤 大皓、後藤 杏子、樋坂 章博、佐藤 洋美
2. 発表標題 脂肪細胞におけるSGLT2阻害薬の代謝調節および抗炎症作用の連関
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤洋美、豊島拓斗、小金正空、井澤 涼、樋坂章博
2. 発表標題 SGLT2阻害剤による脂肪組織の炎症抑制および代謝シフトに関する検討
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野大和、神 亮太、佐藤洋美、樋坂章博
2. 発表標題 機械学習による糖尿病の長期病態進行モデルの構築とイベントリスク解析
3. 学会等名 第44回日本臨床薬理学会年会
4. 発表年 2023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	樋坂 章博 (Hisaka Akihiro) (80420206)	千葉大学・大学院薬学研究院・教授 (12501)	

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