

令和3年度厚生労働省科学研究費補助金
循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業

「生涯にわたる循環器疾患の個人リスクおよび集団リスクの評価ツールの開発及び臨床応用のための研究(20FA1002)」2021年度分担研究報告書

5. 端野・壮瞥町研究

研究分担者 大西 浩文 札幌医科大学医学部公衆衛生学講座 教授
研究協力者 小山 雅之 札幌医科大学医学部公衆衛生学講座 助教

研究要旨

端野・壮瞥町研究は北海道の2町を対象とした地域一般住民コホート研究であり、これまでに循環器疾患の病態や危険因子の解明を行ってきた。今年度の個別研究として、2型糖尿病や過体重/肥満、メタボリックシンドロームを伴う脂肪肝と定義されるmetabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) という病態と、インスリン抵抗性や動脈硬化進展の一因と考えられるfatty acid-binding protein 4 (FABP4)との関連について検討を行ったので報告する。対象は壮瞥町住民健診受診者男性292名、女性335名の計627名(平均年齢65歳)である。脂肪肝の判定は脂肪肝指数 (FLI) で行い、男性ではFLI \geq 35、女性ではFLI \geq 16を脂肪肝の基準とした。FLIは収縮期血圧およびFABP4 ($r=0.331, P<0.001$)、線維芽細胞増殖因子21、インスリン抵抗性指数としてのhomeostasis model assessment of insulin resistance、尿酸レベルと正の相関があり、HDLコレステロールおよびアディポネクチンレベルと負の相関があった。FLIを従属変数とした重回帰分析では、年齢、性別、収縮期血圧、尿酸、HDLコレステロール、HOMA-IR、アディポネクチン、線維芽細胞増殖因子21で調整後もFABP4が有意な関連要因であった。MAFLDの有無を従属変数とした多重ロジスティック回帰分析では、年齢、性別、糖尿病、高血圧、脂質異常症の有無、尿酸、インスリン抵抗性、アディポネクチン、線維芽細胞増殖因子21の値を調整した後も、FABP4が有意な関連要因となった。FABP4濃度は、中高年者においてFLIと独立に関連し、MAFLDの独立した予測因子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

端野・壮瞥町研究は、北海道の常呂郡端野町(現在の北見市端野町)と有珠郡壮瞥町の2町において1977年より継続されている前向きコホート研究であり、これまでに循環器疾患、動脈硬化性疾患の病態や危険因子の解明を行ってきた。

個別研究として今年度は、2型糖尿病や過体重/肥満、メタボリックシンドロームを伴う脂肪肝と定義される metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD)

という病態と、インスリン抵抗性や動脈硬化進展との一因と考えられる fatty acid binding protein 4 (FABP4)との関連について検討を行ったので報告する。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、慢性肝疾患の一つであり、肥満や生活習慣病と密接な関係がある。本邦では、健康診断を受診した成人における NAFLD の頻度は9~30%であり、近年増加傾向にあると報

告されている。また最近では、飲酒に関係なく、MAFLD という新しい概念が提唱されている。MAFLD の判定は、過体重/肥満、2 型糖尿病の存在、代謝異常の証拠のうちの 1 つに加え、脂肪肝が存在することとされている。疫学研究における NAFLD/MAFLD の診断には、腹部超音波検査や肝生検以外の方法として、非侵襲的に評価可能な指標が用いられている。その中でも、肥満度 (BMI)、ウエスト周囲径 (WC)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、トリグリセリド値を用いて算出する脂肪肝指数 (FLI) は、MAFLD における脂肪肝検出のバイオマーカーとして推奨されている。

また一方で、アディポカインやヘパトカインを含むいくつかの液性因子が、メタボリックシンドロームやその関連病態と関連していることが明らかにされている。FABP4 は脂肪細胞、マクロファージ、毛細血管および損傷した内皮細胞に発現し、インスリン抵抗性および動脈硬化の進展に関連しており、低分子特異的な FABP4 阻害剤や FABP4 中和抗体は、代謝異常や血管障害の新しい治療戦略となる可能性も報告されている。

しかし、MAFLD とアディポカインやヘパトカインなどの液性因子との関係については十分に検討されていないことから、日本人一般集団において、FLI で判定された MAFLD と、FABP4、adiponectin、ヘパトカインの一つである fibroblast growth factor 21 (FGF21) などのいくつかの代謝系マーカーとの関連を検討した。

B. 研究方法

対象は、2016 年の壮瞥町健診受診者 627 名 (男性/女性 : 292 名/335 名) である。測定項目としては、特定健診の肝機能、腎機能、グルコースおよび脂質代謝項目等に加えて、FABP4、adiponectin、FGF21 濃度を

測定した。インスリン抵抗性の指標として、HOMA-R (homeostasis model assessment of insulin resistance) を算出した。FLI は BMI, WC, GGT およびトリグリセリドの値を用いて計算した ($FLI = [e^{(0.953 \times \ln(\text{triglycerides}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \ln(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{WC} - 15.745)}] / [1 + e^{(0.953 \times \ln(\text{triglycerides}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \ln(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{WC} - 15.745)}] \times 100$)。問診票にて喫煙習慣、飲酒習慣、糖尿病・高血圧・脂質異常症治療薬の使用に関する情報を得た。脂肪肝の判定のカットオフ値は既報の男性 $FLI \geq 35$ 、女性 $FLI \geq 16$ を用いた。

MAFLD は、以下の 3 つの基準のうち 1 つに加え、脂肪肝を認めることを基準とした : 過体重/肥満 (アジア人では BMI 23 以上)、2 型糖尿病の存在、代謝異常の証拠 (WC、血圧、脂質、グルコース、HOMA-R、高感度 CRP レベルを含む少なくとも 2 つの代謝リスク異常の存在)。

統計解析 : 2 変数間の相関については Pearson の相関分析を行った。正規分布しない変数は回帰分析のために対数変換された。FLI を従属変数とした重回帰分析により関連する要因を検討するとともに、MAFLD の有無を従属変数とした多重ロジスティック回帰分析により、交絡因子で調整後のオッズ比と 95% 信頼区間を算出した。統計解析には JMP15.2.1 for Macintosh (SAS Institute, Cary, NC) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、「人を対象とする医学系研究における倫理指針」に準拠して行われており、札幌医科大学倫理審査委員会の審議を経て学長の承認を受けて行われている。

C. 研究結果

図左に示すように、log FLI と log FABP4、log FGF21 との間には有意な正の相関を、ま

た log FLI と log adiponectin との間には有意な負の相関を認めた。

Log FLI を従属変数とした重回帰分析においては、年齢、性別、収縮期血圧、尿酸、HDL-C、HOMA-IR、log adiponectin、log FGF21 で調整後も log FABP4 が有意な関連要因であった。

図右に示すように、MAFLD 群と non-MAFLD 群の 2 群に分けて比較を行うと、MAFLD 群において non-MAFLD 群よりも FABP4、FGF21 濃度が有意に高く、adiponectin 濃度は有意に低い結果であった。

MAFLD の有無を従属変数とした多重ロジスティック回帰分析の結果では、年齢、性別、糖尿病、高血圧、脂質異常症の有無、尿酸、インスリン抵抗性、アディポネクチン、線維芽細胞増殖因子 21 の値を調整した後も、FABP4 が有意な関連要因となった (表)。

D. 考察

本研究では、日本人一般集団において、FABP4 濃度が MAFLD の独立した決定因子であることが初めて示された。

FABP4 は脂肪細胞から非典型的な経路で脂肪分解に関連して分泌される。また肝臓の Kupffer 細胞や肝星細胞は NAFLD の発症に重要な役割を果たすことが報告されている。FABP4 は、Kupffer 細胞、肝星細胞、肝細胞癌の肝細胞にも発現していることが報告されているが、これらの肝細胞からの FABP4 の分泌はまだ証明されていない。これまでの研究で、循環血中 FABP4 はアディポカインとして作用し、*in vitro* および *in vivo* でインスリン抵抗性およびアテローム性動脈硬化症を直接発症させることが示されている。また、肥満による代謝異常と肝インスリン抵抗性の関連として、外因性 FABP4 が HepG2 肝細胞の小胞体ストレスを誘導することが報告されており、循環 FABP4 が肝機能障害に直接影響を与え、

MAFLD を発症させることが示唆されている。逆に、慢性肝疾患は交感神経系の活性化を高めることが報告されているので、MAFLD の状態では脂肪組織におけるカテコラミン誘発性脂肪分解の増強を介して循環 FABP4 濃度が上昇する可能性がある。これらの知見は、脂肪細胞やマクロファージなどの脂肪組織だけでなく、一部の肝細胞に由来する循環血中 FABP4 が MAFLD の主要な調節因子の一つであることを示している。

FABP4 の濃度は、2 型糖尿病患者および一般集団の被験者において NAFLD と関連することが報告されている。さらに、FLI は FABP4 濃度と正の相関があることが報告されており、本研究でもそれを支持する結果であった。トランスクリプトーム解析により、肝臓の FABP4 は NAFLD 患者や非アルコール性脂肪肝炎患者で発現が上昇し、FABP4 は NAFLD 患者の予後不良の予測因子であることが示されている。したがって、FABP4 の調節は、ヒトにおける MAFLD およびそれに関連する代謝性および心血管疾患の予後に寄与する可能性がある。今後、未同定受容体の直接阻害、中和、遮断による FABP4 レベルの変化が、本当に MAFLD の病態を反映しているかどうかを前向きに評価する必要がある。

脂肪組織からは、FABP4、アディポネクチン、FGF21 など、アディポカインと呼ばれるホルモンが分泌されている。アディポネクチンは、脂肪細胞に多く発現し、インスリン感受性を直接的に高め、動脈硬化の発症と進行を予防する。FGF21 は、脂肪組織や肝臓などの代謝器官で広く発現・分泌され、アディポカインやヘパトカインのような複合生体分子として、その作用や治療応用の可能性について報告されている。反応性酸化ストレスの増強因子であるキサンチンオキシドレダクターゼ (XOR) の血漿中活性は

肝機能障害と強く関連し、FABP4、アディポネクチン、FGF21 のレベルと独立して関連していたことが報告されている。XOR の活性化が MAFLD とアディポカインやヘパトカインとの関連に関与している可能性がある。本研究では、FABP4 濃度は、adiponectin や FGF21 のレベルとは独立して、FLI および MAFLD のリスクと関連していた。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究は横断的研究であるため、FLI および MAFLD と FABP4 を含む関連バイオマーカーとの因果関係については言及できない。今後、縦断的研究および介入研究によって明らかにする必要がある。第二に、本研究は日本人における結果であり、得られた結果は他の人種に適用できない可能性がある。FLI のカットオフ値は既報の基準を用いたが、性差や人種によって最適な値が異なる可能性がある。最後に、糖尿病、脂質異常症、高血圧の治療薬の中には、FABP4 値に影響を与えるものがあることが報告されており、今回の対象者においても、これらの薬剤が FABP4 のレベルや FLI、MAFLD との関連に影響を及ぼしている可能性がある。

E. 結論

日本人地域一般住民において、FABP4 濃度は、他のアディポカインやヘパトカインとは独立して FLI や MAFLD と関連することが示された。MAFLD 及び関連する病態の新たな治療戦略としての FABP4 の可能性についてはさらなる研究が必要と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka M, Takahashi S, Higashiura Y, Sakai A, Koyama M, Saitoh S, Shimamoto K, Ohnishi H, Furuhashi M. Circulating level of fatty acid-binding protein 4 is an independent predictor of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in middle-aged and elderly individuals. *J Diabetes Investig* 2021 Dec 9. doi: 10.1111/jdi.13735. Online ahead of print.

2) Furuhashi M, Sakai A, Tanaka M, Higashiura Y, Mori K, Koyama M, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K. Distinct Regulation of U-ACE2 and P-ACE2 (Urinary and Plasma Angiotensin-Converting Enzyme 2) in a Japanese General Population. *Hypertension* 2021; 78: 1138-1149. doi: 10.1161/HYPERTENSION.AHA.121.17674.

3) Furuhashi M, Higashiura Y, Sakai A, Koyama M, Tanaka M, Saitoh S, Shimamoto K, Ohnishi H. Plasma Tsukushi Concentration Is Associated with High Levels of Insulin and FGF21 and Low Level of Total Cholesterol in a General Population without Medication. *Metabolites* 2022 Mar 10; 12(3): 237. doi: 10.3390/metabo12030237.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

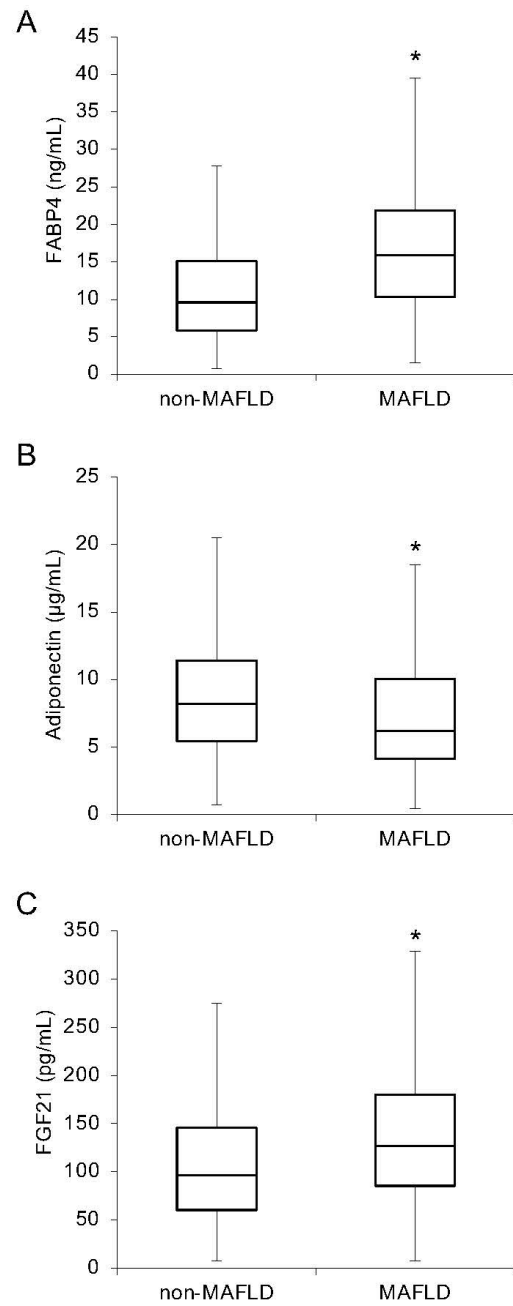
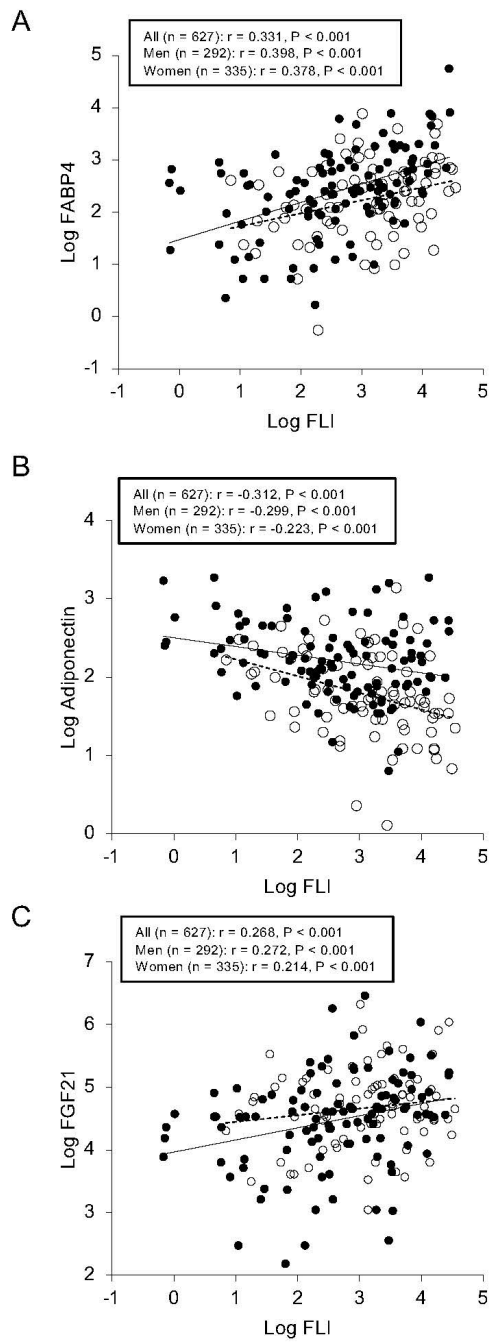


図. FLI、MAFLD と FABP4、Adiponectin、FGF21 との関連

	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
FABP4 (per 1 ng/mL)	1.080 (1.057-1.103)	< 0.001	1.076 (1.053-1.100)	<0.001	1.070 (1.047-1.095)	< 0.001	1.061 (1.037-1.086)	< 0.001
Adiponectin (per 1 µg/mL)	0.943 (0.911-0.976)	0.001	0.934 (0.900-0.969)	<0.001	0.943 (0.908-0.980)	0.003	0.948 (0.911-0.987)	0.009
FGF21 (per 1 pg/mL)	1.001 (1.000-1.002)	0.014	1.001 (1.000-1.002)	0.011	1.001 (1.000-1.002)	0.014	1.002 (1.000-1.003)	0.016
Age (per 1 year)	-	-	1.002 (0.990-1.014)	0.722	0.986 (0.972-0.999)	0.046	0.985 (0.971-1.000)	0.050
Sex (Men)	-	-	0.728 (0.085-0.507)	0.085	0.715 (0.491-1.042)	0.081	0.488 (0.312-0.764)	0.002
Hypertension	-	-	-	-	2.278 (1.495-3.473)	< 0.001	2.064 (1.333-3.194)	0.001
Diabetes mellitus	-	-	-	-	1.127 (0.632-2.008)	0.686	1.018 (0.547-1.893)	0.956
Dyslipidemia	-	-	-	-	1.942 (1.356-2.780)	< 0.001	1.862 (1.276-2.716)	0.001
Uric acid (per 1 mg/dL)	-	-	-	-	-	-	1.284 (1.081-1.524)	0.004

HOMA-R (per 1)	-	-	-	-	-	-	1.087 (1.026- 1.153)	0.005
	$R^2 = 0.102$, AIC: 773		$R^2 = 0.106$, AIC: 774		$R^2 = 0.142$, AIC: 749		$R^2 = 0.168$, AIC: 701	

AIC, Akaike's information criterion; CI, Confidence Interval; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FGF21, fibroblast growth factor 21; HOMA-R, homeostasis model assessment of insulin resistance; MAFLD, metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; OR, odds ratio.

表. MAFLD の有無を従属多重ロジスティック回帰分析の結果

個別研究抄録 1

日本人一般集団における尿中 ACE2 と血漿中 ACE2 の制御に関する検討
Distinct Regulation of U-ACE2 and P-ACE2 (Urinary and Plasma Angiotensin-Converting Enzyme 2) in a Japanese General Population.
(Hypertension 2021; 78: 1138-1149) 文献 2)

目的： 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) における SARS-CoV-2 は、ウイルスのスパイクタンパクに対する宿主細胞受容体としての ACE (アンジオテンシン変換酵素) 2 を介して宿主に侵入する。ACE2 はアンジオテンシン II をアンジオテンシン-1-7 に変換し、切断された ACE2 は尿や血漿中に検出される。ACE 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬などのレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAS 系) 阻害薬によって、ACE2 の発現や活性を亢進することが報告されている。しかし、U-ACE2 (尿中 ACE2) と P-ACE2 (血漿中 ACE2) の制御や、RAS 系阻害薬によるレベルの変化については、特に一般住民においては明らかになっていない。今回我々は日本人一般集団における U-ACE2 と P-ACE2 のレベルや、それらの制御に対する RAS 系阻害薬の影響を検討した。

方法： 2017 年に壮瞥町の健診を受診した 605 名 (男性 280 名、女性 325 名、平均年齢：65±15 歳) を対象に、U-ACE2 と P-ACE2 を同時に測定した。男女間、RAS 系阻害薬の有無の 2 群間で U-ACE2、P-ACE2 レベルの比較を行い、U-ACE2 と P-ACE2 をそれぞれ従属変数とした重回帰分析により、両者を規定する独立因子の検討を行った。

結果： 男性は女性に比べて、U-ACE2 が有意に低く (図 1A)、P-ACE2 が高かった (図 2A)。U-ACE2 と P-ACE2 には有意な相関はなかった (図 3)。P-ACE2 は、RAS 系阻害薬を服用している群では服用していない群よりも有意に低かった (図 2B) が、U-ACE2 については両群間で有意な差はなかった (図 1B)。重回帰分析の結果、U-ACE2 に関しては、女性、収縮期血圧、ヘモグロビン A1c、尿中アルブミン/クレアチニン比の高値、尿酸値の低値が統計学的に有意な独立因子であることが示され、P-ACE2 に関しては、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、推定糸球体濾過量 (eGFR)、尿酸の高値が有意な独立因子であった。

結論： 日本人一般集団において、U-ACE2 と P-ACE2 は異なる制御がなされており、RAS 系阻害薬の使用は、これらのレベルの独立した予測因子ではなかった。U-ACE2 は高血圧、高血糖、微量アルブミン尿、低尿酸値と関連し、P-ACE2 は肝機能障害、高糸球体濾過率、高尿酸値と関連していた。U-ACE2 と P-ACE2 の異なる制御機構をさらに理解することで、COVID-19 だけでなく、代謝性疾患や心血管疾患に対する新たな治療戦略の開発につながる可能性が考えられた。

個別研究抄録 2

薬物治療を受けていない一般集団における血漿 Tsukushi 濃度はインスリンおよび FGF21 の高値と総コレステロールの低値と関連する

Plasma Tsukushi Concentration Is Associated with High Levels of Insulin and FGF21 and Low Level of Total Cholesterol in a General Population without Medication.

(Metabolites 2022; 12(3): 237) 文献 3)

目的： Tsukushi (TSK) は、低分子ロイシンリッチプロテオグリカンファミリーのメンバーで、発生過程や器官形成を制御していることが知られている。TSK は主に肝臓で発現し、肝細胞から分泌され、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) に対応してエネルギーおよび糖脂質の代謝を調節する新しいヘパトカインであることも同定された。しかし、地域一般集団における血漿 TSK の役割については十分に検討されていない。

方法： 2016 年の壮瞥町住民健診受診者 627 名中、高血圧、糖尿病、脂質異常症等の治療を受けていない 253 名（男性 114 名、女性 139 名）を対象に、血漿 TSK 濃度とヘパトカインの一つである FGF21、アディポネクチンなどの液性因子との関連を検討した。

結果： 血漿中 TSK 濃度に有意な性差はなく、脂肪肝指数 (FLI) ($r = 0.131, p = 0.038$)、インスリン値 ($r = 0.295, p < 0.001$)、FGF21 値 ($r = 0.290, p < 0.001$) と正の相関、総コレステロール値 ($r = 0.124, p = 0.049$) と負の相関がみられた。TSK 値と body mass index、ウエスト周囲径、adiponectin、高密度リポ蛋白コレステロール、総胆汁酸との間には有意な相関は認められなかった。血漿 TSK 濃度を従属変数とした重回帰分析の結果、年齢、性別、FLI を調整後も、インスリンと FGF21 の高値および総コレステロールの低値が有意な関連要因であった。

結論： 血漿 TSK 濃度とインスリンや、ヘパトカインの一つである FGF21 の高レベルおよび総コレステロールの低値は独立して関連しているが、肥満やアディポネクチンとは関連していないことが示唆された。