

氏名・(本籍)	たか た こう へい 高 田 耕 平 (広島県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
報告番号	甲第1548号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)		
学位論文題目	Impact of Cigarette Smoking Cessation on High-Density Lipoprotein Functionality – VN-SEESAW-HDL – (HDL 機能における禁煙のインパクト – VN- SEESAW-HDL –)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教 授	朔 啓二郎
	(副 査) 福岡大学	教 授	斉 藤 喬 雄
	福岡大学	教 授	渡 辺 憲太朗
	福岡大学	准教授	藤 田 昌 樹

内 容 の 要 旨

背景

喫煙が冠動脈疾患をはじめとした動脈硬化性疾患のリスク因子であることは広く知られている。また禁煙によりそのリスクが著しく低下することも分かっており、磯らの報告によると、禁煙群では禁煙1年以内の冠動脈疾患による死亡率が、喫煙継続群の0.33倍と著明に低下していた。一方で喫煙による冠動脈疾患の罹患および死亡リスク上昇、および禁煙によるリスク低下に関する詳しいメカニズムは解明されていない。

そこで、我々は善玉コレステロールと呼ばれている HDL (high-density lipoprotein : 高比重リポ蛋白) に注目した。HDL は超遠心法で比重が1.063 ~ 1.21g/mL に分離されるリポ蛋白で、様々な脂質やタンパク質から構成される。HDL の構成物質は体内環境により変化し、機能面へ大きな影響を及ぼすことが知られている。HDL の機能としては、①コレステロール逆転送作用(末梢組織の過剰なコレステロールを引き抜き肝臓に運ぶ)、②抗酸化作用(LDL : low-density lipoprotein やリン脂質の酸化を防ぐ)、③抗炎症作用、④血小板凝集抑制作用、⑤血管内皮機能改善作用(NO 産生増大)、⑥抗アポトーシス作用などがある。また HDL は超遠心法で、その比重により HDL2・HDL3 に分けられ、キャピラリー等速電気泳動では、その電荷により fast-/intermediate-/slow-migrating HDL に分けられる。

近年 HDL の機能面が注目を集めており、Khera らは HDL-C (HDL コレステロール) 値ではなく、HDL 機能の一つであるコレステロール引抜き能が冠動脈疾患とより密接に関係していると報告している。喫煙および禁煙の HDL 機能に対する影響は不明であり、禁煙による HDL 機能への影響についての

検討を行った。

目的

禁煙による HDL 機能への影響を検討するため、福岡大学病院禁煙外来通院者を対象に禁煙前後での HDL 機能の評価を行った。

対象と方法

27～64歳の日本人32名が登録された。無作為にバレニクリンもしくはニコチネルパッチによる禁煙介入を施行し、禁煙前(0週)と禁煙後(12週)の臨床データおよび血液サンプルを用いて解析を行った。

主な評価項目は脂質プロファイル、アポ蛋白 A-I、キャピラリー等速電気泳動による HDL 亜分画、過酸化脂質であるマロンジアルデヒド、HDL のコレステロール引抜き能および、HDL の抗酸化能を示す HDL inflammatory index (HII) とし、禁煙前後での検討、および禁煙成功群と不成功群の比較検討を行った。禁煙成功の定義は、禁煙の自己申告と呼気中の CO 濃度が 8ppm 未満であることとした。

結果

禁煙達成率は 75% であった。禁煙前におけるコレステロール引抜き能は、アポ蛋白 A-I 値および HDL-C 値と正に相関し、BMI (Body mass index) と負に相関していた。禁煙成功・失敗に関わらず、アポ蛋白 A-I 値、HDL-C 値および HDL 亜分画に関しては、禁煙の前後で有意な変化を認められなかった。一方で血漿マロンジアルデヒド濃度および HDL 中のマロンジアルデヒド濃度はいずれも、禁煙成功群においてのみ有意に減少していた。この結果から、禁煙による酸化ストレスの軽減が HDL においても認められることが示された。

禁煙後のコレステロール引抜き能と HII は、禁煙成功群で禁煙前と比較し有意な改善を認めた。一方で禁煙失敗群では、有意な変化は認められなかった。また禁煙成功群と失敗群との比較においても、コレステロール引抜き能と HII の変化量は禁煙成功群が有意な改善を示した。また、禁煙前後でのコレステロール引抜き能の変化と呼気中 CO 濃度の変化には、有意な負の相関関係が認められた。一方でコレステロール引抜き能と HII の間には、相関関係は認められなかった。HDL はタンパク質や脂質など、様々な構成成分からなる集合体であり、これらの結果はそれぞれが、HDL の異なる部分を反映している可能性が示唆された。

結論

禁煙により apoA-I 値、HDL-C 値や HDL 亜分画とは関係なく、HDL 機能の改善がもたらされることが明らかとなった。禁煙に伴う HDL 機能の改善は、禁煙による冠動脈疾患のリスク減少に対して関与している可能性がある。

審査の結果の要旨

禁煙後に冠動脈疾患の発症相対リスクは速やかに低下することが知られているが、禁煙が高比重リポ蛋白 (HDL) 代謝に及ぼす影響は不明である。

本論文は、禁煙前後における高比重リポ蛋白 (HDL) の機能解析の変化に注目した。つまり、禁煙により HDL 機能が改善するとの仮説を立て、HDL 機能解析の指標としてコレステロール引抜き能と抗酸化能についての検討を行った。その結果、HDL-C 値やアポ蛋白 A-I、HDL 亜分画等の量的解析とは関連なく、HDL の質的改善がもたらされることが明らかになった。

1. 斬新さ

禁煙による HDL 機能の変化について検討した報告はない。禁煙により HDL 機能が改善する事をアポ蛋白 A-I 値や、HDL-C 値、HDL 亜分画等の量的変化によるものではなく、HDL への修飾（禁煙による HDL 中のマロンジアルデヒドの減少）によるものである可能性を示唆した点、さらには臨床試験で初めて禁煙により HDL 機能が改善する事を明らかにした点に斬新さがある。

2. 重要性

喫煙は様々な疾病の重要な発症因子であり、虚血性心疾患においては日本人男性の約半分は喫煙が原因で発症する。一方で、禁煙による急性効果として、禁煙後 1 年以内に冠動脈疾患の発症相対リスクが 0.33 倍にまで低下すると報告されており、本研究で認めた禁煙後急性期の HDL 機能改善が関与していることが考えられる。HDL-C 値を上昇させる CETP 阻害薬の臨床試験がポジティブな結果を得られていない現状で、本研究のように HDL の量ではなく、質が改善したという結果は、現在の HDL を取り巻く様々な論争において重要なエビデンスである。さらに今後の禁煙啓発活動においても、有用である。

3. 実験方法の正確性

本研究のプロトコルは福岡大学の臨床研究審査委員会 FU-H#14-5-13 で承認されている。国際誌である Circulation Journal にも掲載された論文であり、研究方法は評価されている。また、本研究で用いた HDL の抗酸化能（HDL inflammatory index）解析に関して、我々が過去に行った inter assay 及び intra assay coefficient of variation は、それぞれ 5.5%、2.3% であった。

4. 表現の明確さ、及び結論

本研究において、禁煙による HDL の量ではなく、HDL 機能改善を確認した。さらに HDL 中の過酸化脂質の変化を確認しており、HDL 機能改善の機序を示した。結論としては、禁煙後の冠動脈疾患発症リスクの低下に、禁煙に伴う急性効果としての HDL 機能改善が関与した。

5. 主な質疑応答

Q：コレステロール引抜き能の具体的な測定方法は？

A：マクロファージを培養して、トリチウムラベルしたコレステロールを取り込ませた。

そこに患者血漿から得た HDL を添加し、4 時間さらに培養し、HDL 側に取り込まれたコレステロールと、マクロファージ側に残っているコレステロールのトリチウムレベルをカウンターで定量し、引抜き能を計算した方法論が説明された。

Q：コレステロール引抜き能の測定においてどのようにして HDL を抽出したのか？

A：リントングステン酸とマグネシウム塩を含む沈殿液により、アポ B 含有リポ蛋白を沈殿させて、残った分画を HDL として用いた。リポ蛋白は、比重により超遠心分離を行い、抽出する方法もあるが、超遠心の過程で、HDL の構成タンパクなどの喪失の問題などもある。NEJM などの一流雑誌においても PEG 沈殿法は採用されている。

Q：コレステロール引抜き能の測定方法は in vitro の測定系しかないのか？

A：今回測定しているものは HDL のコレステロール逆転送系の第一段階である。HDL が肝臓に SR-B1 (受容体) を介して取り込まれ、その後胆汁へ、最終的に糞便中に排泄される。この一連の流れを、肝臓の転写因子や糞便中のコレステロール (アイソトープ標識した) を測定するコレステロールバランススタディ、HDL 代謝回転実験等が実験動物レベルでは行われているが、ヒトでは実際的でないことが説明された。そのため、本研究での方法はヒトサンプルの HDL によるコレステロール引抜き

能の評価方法としては標準的なものとして評価された方法である。

Q：引抜き能の測定の際に HDL の用量を 2% と記載しているが、どういう意味か？

また 2% 以上で添加したらどうなるのか？

A：アポ B 含有リポ蛋白を沈殿させた血漿の volume が培地量の 2% になる量で添加したことが説明された。本測定系においては 2% が標準的であり、最近の NEJM の文献においても使用されている量であること、さらに増量した場合は、ある程度比例的に増えるが、プラトーになる説明が追加された。

Q：禁煙前後での引抜き能の改善が数値的にはごく微量だが、これでも有意といえるのか？

A：現在までの報告をみても、わずかな引き抜き能の差が予後や冠動脈疾患の有病率と関係しており、本研究での改善の程度でも十分な意味がある。

Q：12 週間後のデータだが、禁煙直後に評価してみたらどうか？

A：生体でのリポ蛋白の代謝は時間がかかる。具体的に、HDL の半減期が 1 週間、LDL で 2 週間ほどの代謝回転の期間を要する。そのため、リポ蛋白への影響を見る場合は、介入してから 3 か月後くらいに評価することが多い。

Q：日時を変えて、HDL 機能を測定しても同じような値になるのか？

A：自分たちの実験系において、健常者の測定サンプルは同じヒトのサンプルを用いるが、毎回同様の値になる。

また、1 週間ほど間隔を空けた同一患者での評価を行っているが、日時を変えても値は変わらなかった。

Q：LCAT は測定していないのか？遊離コレステロールとコレステロールエステルの比率を見たりはしていないのか？

A：遊離コレステロールやコレステロールエステルの測定は行っていない。また LCAT 活性の測定も行っていない。キャピラリー等速電気泳動で亜分画に変化がなかったことから、コレステロール引抜きに優れた小型の pre β -HDL (HDL 亜分画では slow-migrating HDL に含まれる) は変化していないと判断したことや、さらには LCAT の測定系が安定した結果を得られないことが理由である。

Q：具体的にはタバコのどの成分が HDL 機能を障害しているのか？

A：タバコのガス相成分だけと、ガス相と粒子相成分のそれぞれを HDL に添加して、コレステロール引抜き能を検討した基礎実験が過去に報告されている。その結果、ガス相成分では引抜き能は低下していなかったため、粒子相成分に含まれる物質が影響していると考えられる。粒子相成分にはニコチンやタールが含まれるが、このどちらが悪いかは不明である。

Q：腎不全では HDL 以外のリポ蛋白は問題にならない。HDL の機能が分かるもっと簡単な方法が望まれる。また、最近では腎機能が悪い症例にはスタチンは効果がないとガイドラインにも記載されているが、腎不全において機能はどうなるのか？

A：透析患者のコレステロール引抜き能や抗炎症作用が障害されているという報告は 2012 年度の JACC で報告されている。また 2013 年度の Journal of American Society Nephrology では質量分析を用いて HDL の解析を行い、透析患者の HDL 構成成分としてのアポ蛋白 C-III や血清アミロイド蛋白 A が増え、これが HDL 機能障害と関連する報告が紹介された。

上記以外の質問にも、申請者は適切に対応した。本論文は、禁煙により HDL 機能が改善する事、さ

らにその改善が HDL-C 値とは関係なく、HDL の構成成分の酸化や修飾の軽減による可能性を証明し、学位論文に値すると評価された。