

氏名	かみぞの ようこ 神菌 洋子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1769 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 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 plasma $\alpha$ -klotho levels -VN-SEESAW-Klotho Study- (禁煙が血漿 $\alpha$ -クロトに及ぼす影響)		
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	藤田 昌樹
	福岡大学	教授	渡辺 憲太郎
	福岡大学	講師	辻 雅善

## 内 容 の 要 旨

【目的】喫煙は、様々な疾患の危険因子であり、一方、禁煙は心血管疾患リスクを低減することが報告されている。地域を禁煙にする社会実験においても、急性心筋梗塞の発症が減少した報告が多い。抗老化分子として  $\alpha$ -クロトが注目されているが、マウスの実験では、クロトの過剰な発現が有意に寿命を延長した。一方、他の研究では禁煙者の  $\alpha$ -クロト値は低く喫煙者では  $\alpha$ -クロト値の上昇が高かった。禁煙と老化分子である  $\alpha$ -クロト値の関連についてはほとんど知られていない。したがって、日本人喫煙者にて禁煙効果との関連性を明確にしたい。

【対象と方法】禁煙治療介入を 12 週間実施した先行研究：VN-SEESAW Study で、成人 32 名のうち治療を断念した 4 名を除く 28 名を対象とした（男性 23 人、女性 5 人、平均年齢  $46 \pm 12$  歳）。治療開始と治療終了後の比較、禁煙に成功した 21 人、禁煙に失敗した 7 人の治療前と治療後を比較した。検査項目は、体重、BMI、脈拍、収縮期血圧、拡張期血圧、血中  $\alpha$ -クロト、FGF-19、FGF-21、CO 濃度、Cr、Hb である。禁煙の定義は、自己申告と、呼気一酸化炭素濃度が 8ppm 以下のものである。禁煙治療薬バレニクリンを使用した 14 人とニコチンパッチを使用した 14 人の治療前後の結果も比較した。28 名のデータは平均と標準偏差値で表し、データ解析は、治療前後の変化、治療前後の変化量は、スピアマンの順位相関係数、対応のある t 検定等を用い、バレニクリンとニコチンパッチの比較は対応のない t 検定をおこなった。（ $p < 0.05$ ）とした。統計ソフトは、Stat View 5 ; SAS Institute Inc.、Cary, NC, USA を使用した。

【結果】28人の治療者（バレニクリン使用14人、ニコチンパッチ使用14人）を分析した。すべての治療者が $\alpha$ -クロト、ヘモグロビンCO濃度の血中値は、12週間後に有意に低下したがFGF-19、FGF21は変化がなかった。一方、体重、BMIは12週間後に有意に増加した。

禁煙に失敗した7人（バレニクリン使用4人、ニコチンパッチ使用3人）については、治療開始前と治療後において変化に有意差はなかった。治療に成功した群と失敗した群の0週における統計的な有意差はなかったが、12週後は両群ともに $\alpha$ -クロト、Hb、CO濃度は有意な減少を示した。成功群の脈拍、収縮期血圧は12週後に有意に減少したが体重、BMIは有意な増加があった。バレニクリン使用群とニコチンパッチ使用群の体重、BMI、 $\alpha$ -クロト、FGF-19、FGF-21、CO濃度、Hbの0週目は、統計的に有意な差はなかった。12週後では両群とも $\alpha$ -クロト、CO濃度、Hbは有意な減少を示した。両群の体重、BMIは12週後に有意に増加した。

$\alpha$ -クロトの変化量(0 vs. 12週)は、0週目の $\alpha$ -クロト値と負の相関があり、Hbの変化量と $\alpha$ -クロトの変化量には正の相関があった。しかし、CO濃度の変化量と $\alpha$ -クロトの変化量、Hbの変化量に相関はなかった。

【研究の限界】サンプル数が少なく一般化できない。また、本研究は、短期間の $\alpha$ -クロトを評価であった。今後、喫煙と禁煙治療後の $\alpha$ -クロトの変化に対する長期的効果を検証する必要がある。

【結論】禁煙は、抗老化分子である可溶性 $\alpha$ -クロトの血中濃度を有意に低下させた。喫煙者の $\alpha$ -クロトの増加は喫煙ストレスによるものと考えられ、禁煙による $\alpha$ -クロトの低下は代償応答である可能性が示唆された。

## 審査の結果の要旨

Klotho ( $\alpha$ -クロト) - FGF内分泌系は、老化と共に増加する生活習慣病、例えば慢性腎臓病、糖尿病、肥満、動脈硬化などの新しい治療標的となることが期待されている。また、禁煙は、心血管疾患のリスクを低減することが知られているが、禁煙と抗老化分子である可溶性 $\alpha$ -クロト値の関連については、ほとんど知られていない。したがって、本論文は、禁煙前後における $\alpha$ -クロト値の変化に注目していた。つまり、「老化防止分子である $\alpha$ -クロトは、禁煙により代償的に低下する」との仮説を立て、禁煙治療前後の血漿中の $\alpha$ -クロトレベルを測定した。その結果 $\alpha$ -クロトの増加が喫煙ストレスに対する代償応答であることが示唆された。本研究は先行研究であるVN-SEESAW studyの検体を利用して実施された。

## 1. 斬新さ

これまでに禁煙による効果を血漿中の $\alpha$ -クロトレベルの変化にて検討した報告はない。 $\alpha$ -クロトは禁煙によって低下したが、喫煙者では一般に高い。 $\alpha$ -クロトを過発現させたマウスの寿命は野生型と比較して延長したと証明されている。したがって、喫煙によって $\alpha$ -クロトは、生態反応として血管を保護するために高くなっていると考え、禁煙により代償的に低下するとの仮説を証明できたところに斬新さがある。

## 2. 重要性

わが国における冠動脈疾患のリスク要因別関連死亡の原因は喫煙が最も高い。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1年間禁煙をすると、急性心筋梗塞(AMI)再発の相対リスクが1.4倍、2年~5年で1.5倍、6年~10年では、1.1倍といわれているように、心血管疾患においては、禁煙の効果がすぐにでてくる。本研究にて $\alpha$ -クロトが禁煙の効果の一つの指標(マーカー)として考えられた点は、重要であり、今後の禁煙指標(マーカー)の設定や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

本研究のプロトコールは福岡大学病院研究審査委員会#14-5-13で承認され、先行研究であるVN-SEESAW study(並行群間比較試験)のサンプルを用いている。国際誌であるMedicineにも掲載された論文であり、研究方法は評価されている。

## 4. 表現の明確さ、及び結論

目的、方法、結果は適切かつ詳細に表現されている。また、結果にもとづいた考察では、過去の文献比較や海外で行われた結果の相違を比較している。結論は明らかに $\alpha$ -クロトが禁煙に成功、失敗した両群においても低下し、禁煙は老化防止分子である $\alpha$ -クロトの代償応答であると示唆された。

## 5. 主な質疑応答

Q:スライド12枚目、血漿中の $\alpha$ -クロトは老化因子と書いているが?この研究の作業仮説を教えてほしい。

A:老化防止因子の間違いであると訂正された。

作業仮説は、喫煙をすると酸化ストレスが上昇し、FGF-21や $\alpha$ -クロトが上昇する。それは生体が血管を防御する、つまり火消しの役割をするのではないかと考え禁煙をすると低下するとの仮説を立てるに至ったことが追加された。

Q: $\alpha$ -クロトは代償反応で下がっているのものであろうということであるが、非喫煙者の $\alpha$ -クロトの平均値はどのくらいか?

A:一般に報告されている非喫煙者の血中平均は $500 \pm 170$  pg/mlである。

Q:  $\alpha$ -クロトが 770pg/ml をこえると心血管疾患が低くなっているといくつか述べたが上記の平均値との違いは何か?なぜそんなに高くなっているのか?

A: 770 pg /ml は全体が 341 人の研究であり、500±170 pg/ml は全体数が 80 人のデータであり、絶対数や患者背景が違う。

Q: Figure 3 は、0 週の  $\alpha$ クロトの大きい人ほど  $\Delta$ クロトの低下が高いと相関をみているが、交絡因子であり 高ければ当然変動は大きくなるので制限があるのではないか?

A: 指摘の通りである。

Q: ドロップアウトした人と禁煙を持続した人も同じように  $\alpha$ -クロトは低下しているのが気になるが?ドロップアウトした人はいつ失敗したのか?

A: ドロップアウトした人がいつ  $\alpha$ -クロトが下がったかは不明であるが、先行研究ではドロップアウトの次期は詳細に検討している。過去 1 ヶ月間の禁煙の定義は、その間に 1 本でも吸った人は失敗群として捉えていた。CO 濃度が高ければ禁煙していると申告した場合も禁煙不成功群に入れている (1 例あり)。すべての対象者は禁煙を努力しており、したがって、両群とも有意に  $\alpha$ -クロトが低下したと推察される。

Q  $\alpha$ -クロトを測定しているのは理解できるがなぜ FGF-21 を測定したのかよくわからなかった。肺気腫については  $\alpha$ -クロトは肺の中には存在しないといわれているがこのクロトはどこからでてくるのか?どこから出ていると思われるか?

A:  $\alpha$ -クロトとともに FGF-21、FGF-19 も低下するという先行研究があるが FGF-21、FGF-19 を禁煙との関連で詳細に検討した研究はない。FGF-21、FGF-19 は肥満防止因子ともいわれ内分泌系の適応と破綻が普遍的に認められること、 $\alpha$ -クロト類似蛋白が他のホルモン (FGF-19 と FGF-21) の受容体として機能し、摂食時や空腹時の代謝変化を誘導していることから測定した。確かに、今回禁煙をした対象者は体重が増加したので、肥満防止の因子として関連性を検討したいと考えたが、結果は negative だった。 $\alpha$ -クロトは 1012 アミノ酸からなる I 型膜蛋白質で、腎尿細管、脳脈絡膜、副甲状腺で発現が認められる。 $\alpha$ -クロト変異マウスは生後 3~4 週間を過ぎた頃から動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症、異所性石灰化などの症状を示すようになることが追加された。

Q:  $\alpha$ -クロトが上昇していなければ肺気腫にならないという研究があるのか?肺活量は測定したのか?肺活量が上がっていない人は  $\alpha$ -クロトが低い。

A: 今回、肺活量は検査項目としていなかったが、興味あるところである。福岡大学病院

の受診者であるため、後ろ向きでも、そこを調査していきたい。

Q：ずっとタバコを吸い続けたらどうなるのか知りたい。今後知りたい。

A： 大変興味あるテーマと考える。

Q： $\alpha$ -クロトのベースライン値が、各群間で違うことが気になった。バレニクリンとニコチンパッチ、成功した人、しない人も各群間で有意差がでるのではないか。

A： サンプルサイズが小さいため研究限界としてもとらえている。ベースライン値は異なっている、有意な変動の結果は得ているので、研究自体は意義あるものと考えている。

その他の質問に関しても申請者は適切に答えた。本論文は、「老化防止分子である $\alpha$ -クロトは、禁煙により代償的に低下する」との仮説を立て、VN-SEESAW-KLOTHO studyにて検証した。その結果、 $\alpha$ -クロトの増加が喫煙ストレスに対する代償応答であることが示唆された。 $\alpha$ -クロトは禁煙治療の指標になりうる可能性を示唆するもので、学位論文に値すると評価された。