

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23986

研究課題名（和文）禁煙に伴う腸内細菌叢を介したHDL機能制御のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Exploring the association between HDL functionality and gut microbiota after smoking cessation

研究代表者

高田 耕平（Takata, Kohei）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：50765279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：喫煙に関する情報を有し、胸部マルチスライスCTによる冠動脈石灰化スコアを算出された一般集団の計315名を対象とし、喫煙と冠動脈石灰化の関連性における腸内細菌叢の関与について検証した。門レベルでSpirochaetes・Saccharibacteria・Firmicutesといった腸内細菌が喫煙状況と関連していた。多変量解析により、現在の喫煙と冠動脈石灰化の関係の25.7%が、一方で禁煙と冠動脈石灰化の関係の4.7%が腸内細菌叢を介している可能性が示された。なお禁煙補助薬の出荷停止やCOVID-19感染症流行を受けて、研究内容を上述のような遂行可能な形で行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般集団における検討で、喫煙状況による冠動脈石灰化との関連性を一部の腸内細菌が調節している可能性が示された。現在喫煙者と非喫煙者、さらには現在喫煙者と直近30日以内の禁煙者の比較における腸内細菌の差異に注目し、さらにはこれらの腸内細菌を増やすような介入（食生活・運動、プレ/プロバイオティクス、抗生物質、糞便移植等）を行うことで、動脈硬化性心血管病のリスク低下がもたらされる可能性がある。このようなアプローチに基づき、動脈硬化性心血管疾患の発症を抑制することで、高騰する医療費抑制につながり、社会的にも貢献し得ると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study examined the roles of gut microbiota in the associations between cigarette smoking and coronary artery calcium score (CACs) assessed by multi-detector row computed tomography. Microbial DNA was extracted from the fecal samples and sequenced by 16S rRNA gene sequencing. The relative abundance of Spirochaetes was higher in current smokers and subjects with CACs ≥ 10 . Smoking cessation also impacted on Saccharibacteria. Based on comparison of multivariable logistic regression models including conventional risk factors with/without further adjustment of gut microbiota, % mediated effects of Spirochaetes were estimated to be 25.7% of the associations between current smoking status and CAC, and those of Saccharibacteria were estimated to be 4.7% of the attenuated association of CAC with smoking cessation. Our findings support the potentials of gut microbiota in the development of atherosclerosis.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 冠動脈石灰化 喫煙 禁煙 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

人体には 1000 種類弱、数 100 兆個以上の細菌が常在し、それらの約 90%は消化管内に生息し、腸内細菌叢を形成する。腸内細菌叢の構成は宿主により異なるが、主な門 (phylum)は Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia の 5 つである。腸内細菌叢は食物の消化・吸収・代謝に関与するだけでなく、腸管免疫系を介して慢性炎症に関連し、生活習慣病による腸内細菌叢の変化 (dysbiosis)は動脈硬化性心血管疾患と関連する。例えば、dysbiosis の指標として Firmicutes と Bacteroidetes の比 (F/B 比)が広く知られているが、冠動脈疾患をはじめとした動脈硬化性心血管疾患で F/B 比は高値となることが報告されてきた一方で、喫煙による F/B 比の低下が報告されるなど、喫煙や禁煙による腸内細菌叢への影響は不明な点が多い。

2. 研究の目的

冠動脈石灰化に対する喫煙状況の影響と腸内細菌叢の関与について検証した。

3. 研究の方法

一般集団で健康診断を受診した 618 名のうち、喫煙に関する情報を有する 315 名を研究対象とした。身体計測データ (身長・体重・腹囲)および、血液検査データ [低比重リポ蛋白コレステロール値 (LDL-C 値)・高比重リポ蛋白コレステロール値 (HDL-C 値)・中性脂肪値 (TG 値)・推算糸球体濾過量 (eGFR)・HbA_{1c}]は健康診断の受診結果を採用し、腸内細菌叢は便サンプルを用いた 16S rRNA 解析による phylum レベルでの評価を行った。冠動脈石灰化スコアは胸部マルチスライス CT 検査で冠動脈壁の CT 値 ≥ 130 HU を石灰化病変と定義し、一般的に広く用いられている Agatston スコアによる冠動脈石灰化スコア (CACS: coronary artery calcium score)の算出を行った。CACS を用いた群分けにおいては、健康診断受診者を対象とした一般集団であることを考慮し、心血管病リスクの中等度リスクか否かである CACS 10 をカットオフ値とした (J Am Coll Cardiol. 2007;49:1860-1870.)。また喫煙に関する情報は質問紙法により取得し、禁煙群を過去 30 日以内に禁煙した群 (abstainers)と定義した。

データの統計解析は SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute)を用いて行った。統計量の表示は中央値 (四分位範囲)とし、連続変数の群間比較は Mann-Whitney U test によって行った。喫煙状況と腸内細菌叢の関連性を多変量ロジスティック回帰モデルで解析し、両者の関連性における腸内細菌叢による媒介効果については proportion of treatment effect を用いて下記の計算式に基づき検証した (Statist. Med. 2003;22:3449-3459.)。

- Model 1: $Y = \beta_1 X_1 + \text{intercept}$
- Model 2: $Y = \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \text{intercept}$
- % mediating effect of $X_2 = \{(\beta_1 - \beta_2) / \beta_1\} \times 100$ (%)

なお本研究助成申請後より禁煙補助薬の出荷停止を受け、研究の展開に関する方向性を変更した。さらに COVID-19 感染症の流行による健診受診者の減少を受け、実施可能な範囲での研究となった。

4. 研究成果

1) 315 名の対象者のうち、現在喫煙者 (current smokers)は 33 名 (11%)と健康診断受診者を対象集団とした影響が低頻度であった。一方で非喫煙者 (non-smokers)が 282 名でこれらのうち、98 名が過去 30 日以内の禁煙群 (abstainers)に該当した。現在の喫煙状況を基にした患者特性のうち、現在喫煙者と非喫煙者の 2 群で比較した患者特性を表 1 に示す。非喫煙者と比較し、現在喫煙者は若年で (67 vs. 63 歳, $P=0.01$)、男性が多く (44% vs. 88%, $P<0.001$)、腹囲が大きく (83 vs. 87 cm, $P=0.01$)、HDL-C 値 (68 vs. 59 mg/dL, $P=0.002$)・LDL-C 値 (137 vs. 125 mg/dL, $P=0.04$)・eGFR (70 vs. 65 mL/min/1.73m², $P=0.03$)が低値であった。

2) 喫煙状況と CACS の関係を表 2 に示す。current smokers と non-smokers、さらには current smokers と abstainers の比較において、いずれも CACS における群間差は認めていなかった。

表 1. Clinical Demographics

	current smokers (n=33)	non-smokers (n=282)	P value
Age (years)	62.9 (60.2-65.6)	66.5 (65.6-67.5)	0.01
Male, n (%)	29 (88)	123 (44)	<0.0001
Body mass index (kg/m ²)	23.9 (22.8-24.9)	22.8 (22.4-23.1)	0.06
Waist circumference, (cm)	87.3 (84.4-90.3)	83.1 (82.1-84.1)	0.008
SBP (mmHg)	123.6 (118.5-128.7)	127.4 (125.6-129.1)	0.17
DBP (mmHg)	75.0 (71.3-78.6)	74.0 (72.8-75.3)	0.63
TG (mg/dL)	158.3 (123.9-192.6)	123.4 (111.5-135.2)	0.06
HDL-C (mg/dL)	58.5 (52.6-64.4)	68.3 (66.3-70.4)	0.002
LDL-C (mg/dL)	124.8 (113.6-136.0)	136.9 (133.0-140.7)	0.046
HbA _{1c} (%)	5.8 (5.6-5.9)	5.7 (5.6-5.8)	0.63
eGFR (mL/min/1.73m ²)	64.9 (60.9-69.0)	69.7 (68.3-71.1)	0.03

表 2. Smoking status and CACS

	CACS	P value
① current vs. non-smokers		
current smokers	193.4 (61.2-325.6)	0.38
non-smokers	130.8 (85.2-176.5)	
② depending on the presence of smoking cessation		
smoking cessation (abstainers) within the last 30 days	230.6 (122.5-338.7)	0.73
current smokers	193.4 (80.3-378.7)	

3) 喫煙状況と腸内細菌叢の関係を表3および、図1-2に示す。16S rRNA 菌叢解析において、過去の報告と同様に Firmicutes と Bacteroidetes が全体の80%以上を占めていた。current smokers と non-smokers の比較において、Firmicutes・Spirochaetes・Saccharibacteria の3つの門で群間差を認めていた一方で(図1)、F/B比はcurrent smokersで低値の傾向を認めていた(0.94 vs. 1.17, P=0.08)。次にcurrent smokers と abstainers の比較では、Saccharibacteria のみが群間差を有していたが(図2)、F/B比は二群間で同等であった(P=0.18)。

表3. Average Proportion of each Bacterial Phylum

		Average Proportion of Each Phylum (median)			
		0-0.5%	0.5-5.0%	5-15%	30-50%
Current Smokers vs. Non-Smokers	<i>Euryarchaeota</i>				
	<i>Lentisphaerae</i>				
	<i>Spirochaetes</i>		<i>Actinobacteria</i>		<i>Firmicutes</i>
	<i>Synergistetes</i>		<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>
	<i>Tenericutes</i>		<i>Cyanobacteria</i>		
	<i>Saccharibacteria</i>		<i>Fusobacteria</i>		
Smoking Cessation (Abstainers) within the last 30 days vs. Current Smokers	<i>Lentisphaerae</i>		<i>Actinobacteria</i>		<i>Firmicutes</i>
	<i>Spirochaetes</i>		<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>
	<i>Synergistetes</i>		<i>Cyanobacteria</i>		
	<i>Tenericutes</i>		<i>Euryarchaeota</i>		
	<i>Saccharibacteria</i>		<i>Fusobacteria</i>		

図1. Current smokers vs. non-smokers

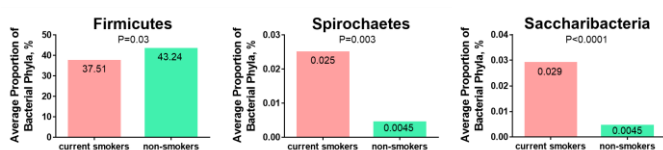
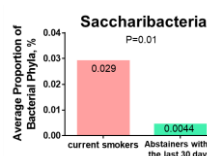


図2. Current smokers vs. abstainers



4) CACS \geq 10 を従属変数とした current smokers との関連を検証した多変量ロジスティック回帰モデルを表4に示す。まず腸内細菌叢を投入せずに解析を行うと、年齢・性別・current smokers が有意な関連を示した(その他にBMI, 収縮期血圧, LDL-C, HDL-C, TG, HbA1cを独立変数として投入するもこれらは有意な関連なし)。次にcurrent smokers と non-smokers の群間比較で有意差を認めていた Firmicutes・Spirochaetes・Saccharibacteria を独立変数として追加した結果、current smokers と CACS \geq 10 の関連性は有意なものではなくなった。これらの標準偏回帰係数より算出された腸内細菌叢による媒介効果は25.7%であった。

5) CACS \geq 10 を従属変数とした禁煙 (smoking cessation) との関連を検証した多変量ロジスティック回帰モデルを表5に示す。表4と同様に群間差を認めた腸内細菌を追加する解析アプローチとしたが(投入した独立変数も同様)、本解析ではcurrent smokers と abstainers の群間比較で有意差を認めていた Saccharibacteria を独立変数として追加した結果、smoking cessation と CACS \geq 10 の関連性は有意なものではなくなり、Saccharibacteria による媒介効果は4.7%であった。

表4. Current smoking and CACS \geq 10

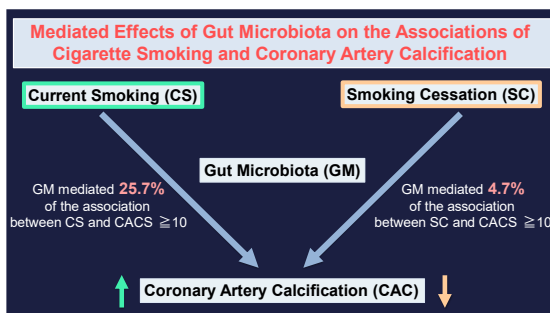
	Std β	95% CI	P value	Std β	95% CI	P value
Age	0.08	1.05-1.13	<0.0001	0.08	1.04-1.14	0.0005
Gender	-1.49	0.13-0.41	<0.0001	-1.35	0.13-0.52	0.0001
SBP	0.02	1.00-1.04	0.08	0.02	0.99-1.04	0.16
Current smokers	1.13	1.20-7.95	0.02	0.84	0.76-7.12	0.14
<i>Spirochaetes</i>				1224.20	<0.001->999.99	0.09
<i>Firmicutes</i>				-0.30	0.096-5.67	0.77
<i>Saccharibacteria</i>				-785.30	<0.001->999.99	0.22

表5. Smoking cessation and CACS \geq 10

	Std β	95% CI	P value	Std β	95% CI	P value
Age	0.11	1.05-1.18	0.0001	0.12	1.06-1.21	0.0003
Gender	-2.82	0.02-0.24	<0.0001	-2.78	0.02-0.27	0.0002
LDL-C	0.01	1.00-1.03	0.07	0.01	1.00-1.03	0.15
Smoking Cessation	-1.29	0.09-0.84	0.02	-1.23	0.08-1.03	0.055
<i>Saccharibacteria</i>				-767.80	<0.001->999.99	0.16

6) CENTRAL ILLUSTRATION

表4-5で示したように、有意であった喫煙や禁煙とCACSとの関係性が腸内細菌叢の調整で減弱化していた。タバコと冠動脈疾患の関係性は多くの先行研究で確立されているが、腸内細菌叢がこれらを媒介している可能性が本研究より示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kohei Takata, Hisatomi Arima, Satoshi Imaizumi, Masahiro Ogawa, and Shin-ichiro Miura
2. 発表標題 A Potential of Gut Microbiota for Mediating the Associations between Cigarette Smoking and Coronary Artery Calcification: Fukuoka Epidemiological Study of Atherosclerosis (FESTA)
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022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
研究協力者	有馬 久富 (Arima Hisatomi)		
研究協力者	石田 晋太郎 (Ishida Shintaro)		

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