

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591056

研究課題名(和文)喫煙による血管障害におけるニコチン依存度とトロンボスポンジンの関与と機序

研究課題名(英文)Role of thrombospondin and nicotine dependence in vascular damage from smoking

## 研究代表者

竹本 恭彦 (Takemoto, Yasuhiko)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20364002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙者に禁煙補助薬バレニクリンの禁煙治療を実施し、血管内皮依存性血管拡張反応(FMD)の改善を認めた。血管内皮NO産生に關与する可能性のあるThrombospondin-1(TSP1)濃度を、禁煙の前後で測定したが、有意な変化をみとめなかった。同じくNO産生に關連するVEGFと喫煙による血管障害に炎症が關与する観点からIL-6についても検討したが、いずれも禁煙前後で有意な変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated alterations of flow-mediated dilation (FMD) in smokers during smoking cessation with varenicline therapy and found significant increases of FMD. Thrombospondin-1 increases nitric oxide (NO) and suggests the possibility of FMD improvements. However, there were no significant differences of thrombospondin-1 plasma levels between before and after smoking cessation with varenicline therapy. VEGF also increases nitric oxide (NO) and suggests the possibility of FMD improvements. IL-6 induces vascular inflammations and suggests the possibility of FMD deteriorations. However, there were no significant differences of VEGF and IL-6 levels between before and after smoking cessation with varenicline therapy.

研究分野：循環器学

キーワード：禁煙 血管障害 ニコチン依存度 トロンボスポンジン 血管内皮機能

## 1. 研究開始当初の背景

喫煙は、重大な社会問題である。

ニコチン依存度が強いほど喫煙量が増え、血管障害に伴うイベント発生リスクが増大する傾向があるが、同程度の喫煙量であっても血管障害が生じる程度に個人差が認められる。Thrombospondin-1(TSP1)は、一酸化窒素(NO)の産生やNO下流のシグナル伝達を抑制、調節を行う。我々は、TSP1には遺伝子多型が存在し、血管内皮細胞におけるNO産生能の差異につながる可能性を見出した。同程度のニコチン依存度や喫煙量であっても血管障害度に個人差が生じる機序にTSP1が関与する可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ニコチン依存度や喫煙量が同程度であっても血管障害度に個人差が生じる機序において、TSP1の果たす役割を明らかにすることである。TSP1血中濃度と内皮依存性血流増加反応や内皮非依存性血流増加反応との関係の検討を行い、TSP1が喫煙者における血管障害度の個人差に与える機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管機能測定

高解像度超音波装置を用い、血管内皮依存性血管拡張反応評価(flow-mediated dilation:FMD)を行った。高解像度超音波装置を用い、ニトログリセリンを用いた血管内皮非依存性血管拡張反応評価(nitroglycerin-induced dilation:NID)を行った。

### (2) 血管形態評価

高解像度超音波装置を用い、超音波装置からみて遠位側の上腕動脈内膜中膜複合体厚(brachial arterial intima-media thickness:baIMT)を測定した。

### (3) TSP1

末梢血採取を行い、TSP1血中濃度を測定した。TSP1血中濃度は間接的ELISA法を用い測定した。

### (4) TSP1以外の因子

TSP1以外にNO産生に関わるVEGFの血中濃度、喫煙による血管障害への炎症関与の可能性を考え、IL-6の血中濃度についても検討をおこなった。これらの測定を、禁煙治療開始前、開始5ヵ月後に行なった。

## 4. 研究成果

(1) 禁煙を目的に禁煙外来を受診した連続212例を対象に検討を行った。212例中、112例(59±12歳、男性77例)が、禁煙に成功し、かつ禁煙前後に、血管機能測定、血管形態評価、各種測定、が実施可能であった。

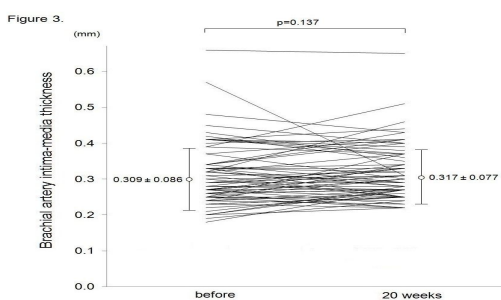
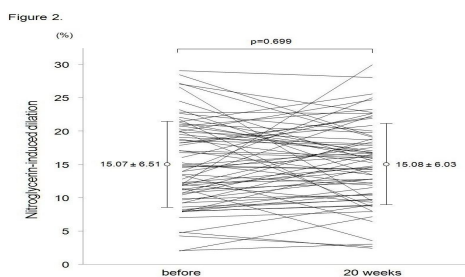
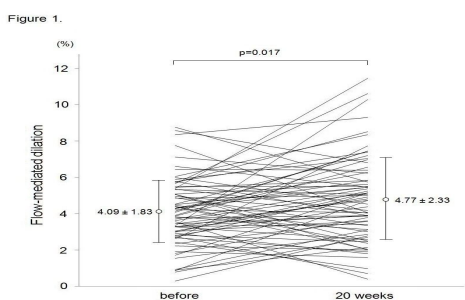
(2) 現在本邦において、禁煙治療を実施する際に、バレニクリンとニコチン代替薬が、用いられている。バレニクリン使用による心血管イベント発生増加の報告がある一方、増加しないとする報告もある。そこで、禁煙に成功した112例のうち、禁煙補助薬バレニクリンを使用した連続72例において、その影響を検討した。

連続72例の年齢は、57±12歳であった。46名の正常健康ボランティア(24±3歳)にもおいても血管機能測定、血管形態評価、各種測定を実施し、比較検討した。

72例において、COは禁煙前20.1±11.1ppmから禁煙後1.9±1.5ppmへと有意に低下した( $p<0.001$ )。FMDは、禁煙前4.09±1.83%から禁煙後4.77±2.33%へと有意に増加した( $p=0.010$ )(Figure 1)。一方、NIDは禁煙前15.07±6.51%、禁煙後15.08±6.03%( $p=0.699$ )(Figure 2)baIMTは禁煙前0.309±0.086mm、禁煙後0.317±0.077mm( $p=0.137$ )上腕動脈血管径禁煙前4.07±0.70mm、禁煙後4.11±0.67mm( $p=0.814$ )(Figure 3)であり、いずれも有意な変化を示さなかった。体重は、66.7±13.4kgから68.8±14.1kg( $p<0.001$ )BMIは24.1±3.9から24.9±4.2( $p<0.001$ )へと有意に増加した。

以上より、禁煙補助薬バレニクリンを用いた禁煙治療において、体重、BMIの有意な

増加にもかかわらず、FMD の改善をみとめた。一方、NID には有意な変化を認めず、baIMT や上腕動脈血管径にも有意な変化を認めず、血管平滑筋や血管形態の変化ではなく、血管内皮機能の改善に基づき、FMD が改善している可能性が考えられた。したがって、禁煙補助薬バレンクリンを用いた禁煙治療では、血管内皮機能は改善し、心血管イベント発生が増加する方向には進みにくいものと推察された。



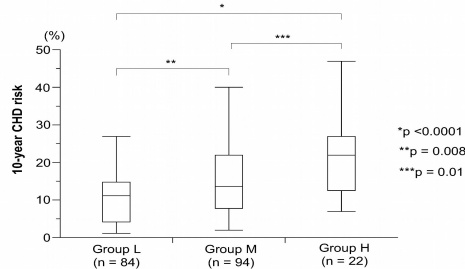
( 3 )

血管形態評価は、これまで頸動脈超音波検査による総頸動脈 IMT(carotid IMT : cIMT) が主として計測され、有用性が証明されており、baIMT の動脈硬化指標としての有用性は充分には検討されていない。そこで、baIMT とフラミングハムリスクスコアとの関連を検討した。

本研究では、フラミングハムリスクスコアから算出された今後 10 年間の冠動脈疾患

発症率 (10-year CHD risk)との関連を検討した。baIMT が 0.3mm 未満群(Group L)、0.3mm 以上 0.4mm 未満群(Group M)、0.4mm 以上群 (Group H)、の 3 群に分け比較検討したところ、10-year CHD risk は Group L で 11.8% ± 9.5%、Group M で 15.9% ± 10.5%、Group H は 22.3% ± 11.8%で、baIMT が肥厚するに従い、10-year CHD risk は有意に増加した (Figure 4)。

Figure 4.



動脈硬化病変は、一般に血管機能異常から血管形態異常へと進展していく。そこで、FMD による血管機能異常評価と baIMT による血管形態異常評価を組み合わせ評価した。FMD5.5%以上かつ baIMT0.3mm 以下の群を Group A、FMD5.5% 以上かつ baIMT0.3mm を超える群を Group B、FMD5.5%未満かつ baIMT0.3mm 以下の群を Group C、FMD5.5%未満かつ baIMT0.3mm を超える群を Group D、とした。その結果、10-year CHD risk は、Group A 11.0% ± 10.2%、Group B 12.9% ± 9.7%、Group C 13.2% ± 8.2%、Group D 19.0% ± 11.3%、であった。血管機能低下も血管形態異常も認めない状況から、血管機能低下と血管形態異常のどちらかをみとめる状況、さらには血管機能低下と血管形態異常をともに認める状況へと動脈硬化が進展するに従い、10-year CHD risk が上昇することが示された。

( 4 )

Thrombospondin-1(TSP1)は、一酸化窒素 (NO) の産生や NO 下流のシグナル伝達を抑制、調節を行う。我々は、TSP1 には Thr523Ala 遺伝子多型が存在し、血管内皮細胞における NO 産生能の差異につながる

可能性を見出した。同程度のニコチン依存度や喫煙量であっても血管障害度に個人差が生じる機序に TSP1 が関与する可能性が示唆される。そこで、TSP1 血中濃度の禁煙前から禁煙後への変化の有無を検討した。

禁煙を目的に禁煙外来を受診した連続 212 例を対象に検討を行った。TSP1 血中濃度は 212 例中 72 例において計測を行った。2 度計測し、その平均は、禁煙前  $1.80 \pm 1.49 \text{ ng/ml}$ 、禁煙 5 か月後  $1.74 \pm 1.77 \text{ ng/ml}$  であり、有意な変化はなかった ( $p=0.684$ )。そこで、禁煙成功群のみで検討、禁煙に成功した男性群のみでの検討、禁煙に成功した女性群のみでの検討、禁煙補助薬バレニクリンを用い禁煙に成功した群のみでの検討、と詳細に解析を実施したが、いずれの群においても TSP1 血中濃度は禁煙前後で有意差を認めなかった ( $p=0.751$ 、 $p=0.573$ 、 $p=0.797$ 、 $p=0.631$ )。そこで、血管内皮 NO 産生に関連する VEGF についても検討した。73 例で検討を行い、TSP-1 と同様に、73 例全体と上記 の各群で詳細に検討を実施したが、いずれの群でも有意差はなかった (全体  $p=0.789$ 、 $p=0.807$ 、 $p=0.630$ 、 $p=0.898$ 、 $p=0.738$ )。喫煙による血管障害に炎症が関与する観点から、IL-6 についても検討を行った。58 例にて検討を行い、TSP-1 と同様に、58 例全体と上記 の各群で詳細に検討を実施したが、いずれの群でも有意差は示されなかった (全体  $p=0.671$ 、 $p=0.665$ 、 $p=0.720$ 、 $p=0.534$ 、 $p=0.639$ )。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Kobayashi, M., Takemoto, Y., Fujio, Y., Azuma, J., Yoshiyama, M., Hirohashi, K. Vascular Functional and Morphological Alterations in Smokers during Varenicline Therapy. Osaka City Med J in press, 2015, 査読有
2. Otsuka, K., Yoshiyama, M. Serial

- assessment of arterial stiffness by cardio-ankle vascular index for prediction of future cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Hypertens Res 37, 1014-1020, 2014, 査読有, 10.1038/hr.2014.116
3. Sano S., Yoshiyama, M. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. Biochem Biophys Res Commun, 445, 327-33, 2014, 査読有, 10.1016/j.bbrc.2014.01.183
  4. Iguchi, T., Yoshiyama, M. Insulin resistance is associated with coronary plaque vulnerability: insight from optical coherence tomography analysis. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 15, 284-291, 2013, 査読有, 10.1093/ehjci/jet158
  5. Iguchi, T., Takemoto, Y., Hirohashi, K., Yoshiyama, M. Simultaneous assessment of endothelial function and morphology in the brachial artery using a new semiautomatic ultrasound system. Hypertens Res, 36, 691-697, 2013, 査読有, 10.1038/hr.2013.35
  6. Nakanishi, K., Yoshiyama, M. Prognostic value of coronary flow reserve on long-term cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. Am J Cardiol, 112, 928-32, 2013, 査読有, 10.1016/j.amjcard.2013.05.025
  7. Otsuka K., Yoshiyama, M. Napkin-ring sign on coronary CT angiography for the prediction of acute coronary syndrome. JACC Cardiovasc Imaging, 6, 448-457, 2013, 査読有, 10.1016/j.jcmg.2012.09.016
  8. Takemoto, Y., Shimada, K., Yoshiyama, M. Absence of coronary calcification with normal endothelial function: a unique entity for preemptive medical care. Circ J, 76, 2544-2545, 2012, 査読有, 10.1253/circj.CJ-12-1175
  9. Tomiyama, H., Takemoto, Y. A multicenter study design to assess the clinical usefulness of semi-automatic measurement of flow-mediated

- vasodilatation of the brachial artery. *Int Heart J*, 53, 170-175, 2012, 査読有, 10.1536/ihj.53.170
10. Higuchi, K., Fujio, Y. Endothelial Gab1 deletion accelerates angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circ J*, 76, 2031-2040, 2012, 査読有, 10.1253/10.1253/11-1507
11. Fukuda, S., Yoshiyama, M. Circadian variation in coronary flow velocity reserve and its relation to  $\alpha$ 1-sympathetic activity in humans. *Int J Cardiol*, 31, 157, 216-20, 2012, 査読有, 10.1016/j.ijcard.2010.12.052
12. Washio, I., Nonen, S., Fujio, Y., Azuma, J. Cigarette smoke extract induces CYP2B6 through constitutive androstane receptor in hepatocytes. *Drug Metab, Dispos*, 39, 1-3, 2011, 査読有, 10.1124/dmd.110.034504
13. Shioyama, W., Fujio, Y. Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-Met signaling. *Circ. Res*, 108, 664-675, 2011, 査読有, 10.1161/CIRCRESAHA.110.232223
14. Yamashita, T., Fujio, Y. IL-6-mediated Th17 differentiation ROR $\gamma$ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc, Res*, 91, 640-648, 2012, 査読有, org/10.1093/cvr/cvr148
15. Rokutanda, T., Yoshiyama, M. Passive exercise using whole-body periodic acceleration enhances blood supply to ischemic hindlimb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 2872-2880, 2011, 査読有, 10.1161/ATVBAHA.111.229773
16. Kubo, T., Yoshiyama, M. Comparison of coronary microcirculation in female nurses after day-time versus night-time shifts. *Am J Cardiol*, 108, 1665-1668, 2011, 査読有, 10.1016/j.amjcard.2011.07.028
17. Shimada, K., Yoshiyama, M. Aromatherapy alleviates endothelial dysfunction of medical staff after night-shift work: preliminary observations. *Hypertens Res*, 34, 264-267, 2011, 査読有, 10.1038/hr.2010.228
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. Kobayashi, M., Takemoto, Y., Maeda, M., Fujio, Y., Azuma, J., Yoshiyama, M. Vascular Functional and Morphological Alterations in Smokers during Varenicline Therapy. European Society of Cardiology Congress, 2014 年 9 月 2 日, Barcelona (Spain)
2. 小林 正宜、竹本 恭彦. 医学部 4 年生を対省とした医療面接を取り入れた禁煙講義の試み、日本医学教育学会、2014 年 7 月 18 日、和歌山県立医科大学 (和歌山県・和歌山市)
3. 竹本 恭彦. 内皮機能検査「FMD」の最新の知見:baIMT と FMD: どう使う? 血管機能評価と血管形態評価、日本動脈硬化学会、2014 年 7 月 10 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)
4. 小林 正宜、竹本 恭彦. 医学部生に対する禁煙指導—ロールプレシミュレーションによる成果—、日本シミュレーション医療教育学会、2014 年 6 月 28 日、宮崎大学医学部 (宮崎県・宮崎市)
5. 小林 正宜、竹本 恭彦、広橋一裕. 喫煙習慣・生活習慣は禁煙の妨げとなるか: 禁煙達成成否要因の検討、日本プライマリ・ケア連合学会、2014 年 5 月 10 日、岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
6. Maeda, M., Fujio, Y., Takemoto, Y., Azuma, J. A report from the Japanese pharmacogenomics clinical trial; CYP2A6 Gene Polymorphisms Influence Nicotine Dependence and Monoamine Oxidase Gene Polymorphism Does Smoking Cessation Behavior. Scientific Session American Heart Association, 2013 年 11 月 17 日, Dallas (USA)
7. 小林 正宜、竹本 恭彦、広橋一裕. 禁煙

による体重変化と代謝変化の関係、日本プライマリ・ケア連合学会、2013年5月17日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

8. Iguchi, T., Takemoto, Y., Yoshiyama, M. Assessment of Brachial Intima-media Thickness and Flow-Mediated Dilatation in Patients with Atherosclerotic Risk Factors and No Coronary Heart Disease. Annual meeting of the Japanese Circulation Society, 2013年3月16日, パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
9. Iguchi, T., Takemoto, Y., Yoshiyama, M. Simultaneous Assessment of Endothelial Function and Morphology in Brachial Artery Using a New Semi-automatic Ultrasound System. Scientific meeting of American College of Cardiology, 2013年3月10日, San Francisco (USA)
10. 前田 真貴子、藤尾 慈、竹本 恭彦、東 純一。喫煙者におけるインターロイキン-6 (IL-6)遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型が肥満とニコチン依存性に及ぼす影響、日本臨床薬理学会、2012年12月1日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）
11. 小林 正宜、竹本 恭彦、広橋一裕。禁煙成功率と禁煙に伴う変化：禁煙専門外来における検討、日本プライマリ・ケア連合学会、2012年9月1日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
12. 井口 朋和、竹本 恭彦、葭山 稔。血管中内膜複合体厚と内皮依存性血管拡張反応の関連性、日本高血圧学会臨床高血圧フォーラム、2012年5月12日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府・豊中市）
13. Iguchi, T., Takemoto, Y., Yoshiyama, M. Effects of remote ischemic conditioning on vascular endothelial function in healthy subjects. Scientific meeting of American College of Cardiology, 2012年3月25日, Chicago (USA)
14. Iguchi, T., Takemoto, Y., Yoshiyama, M. Simultaneous Functional and Morphological

Assessment of the Vascular Endothelium from the Brachial Artery with A Validation Study. Annual meeting of the Japanese Circulation Society, 2012年3月16日, 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

15. 井口 朋和、竹本 恭彦、葭山 稔。血管中内膜厚と内皮依存性血管拡張反応の関連性：同時測定による検討、日本高血圧学会、2011年10月22日、栃木県総合文化センター（栃木県・宇都宮市）  
〔図書〕(計3件)

1. 竹本 恭彦、葭山 稔。日本臨床社 医師・薬剤師のための医薬品副作用ハンドブック、2013、613(467-469)
2. 竹本 恭彦、葭山 稔。日本臨床社、医薬品副作用学、2012、776(589-592)
3. 竹本 恭彦、葭山 稔。科学評論社、循環器内科、2012、149(1-5)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

竹本 恭彦 (TAKEMOTO, YASUHIKO)  
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 研究者番号：20364002

##### (2) 研究分担者

葭山 稔 (YOSHIYAMA, MINORU)  
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 研究者番号：30240956

廣橋 一裕 (HIROHASHI, KAZUHIRO)  
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 研究者番号：00145799

東 純一 (AZUMA, JYUNICHI)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：30144463

藤尾 慈 (FUJIO, YASUSHI)  
大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授  
研究者番号：20359839

前田 真喜子 (MAEDA, MAKIKO)  
大阪大学・薬学研究科(研究院)・講師  
研修者番号：70461168

南畝 晋平 (NONEN, SHINPEI)  
兵庫医療大学・薬学部・講師  
研究者番号：40467527