



Association Between Indoxyl Sulfate and Skeletal Resistance in Hemodialysis Patients

後藤, 俊介

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5314

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005314>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Association Between Indoxyl Sulfate and Skeletal Resistance in Hemodialysis Patients

血液透析患者におけるインドキシル硫酸と骨抵抗性との関連

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

腎臓内科学

(指導教員：西 慎一 特命教授)

後藤 俊介

背景

副甲状腺ホルモン(PTH)の骨に対する作用は尿毒症では低下している。それ故透析患者において、正常の骨回転を保つためには正常上限の2~3倍のPTHが必要である。この尿毒症でのPTH作用不全は“PTHの骨抵抗性”と言われている。

尿毒症でのPTH抵抗性のメカニズムは様々な因子を含んでいる。骨におけるPTH受容体の減少、7-84PTH・尿毒症物質・オステオプロテグリン(OPG)の増加、そしてBMP-7の低下である。尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸はPTHの骨抵抗性を引き起こす因子の一つとして見なされている。

PTHの骨抵抗性のメカニズムとして、我々は以前インドキシル硫酸がOAT3を介して骨芽細胞に取り込まれ、酸化ストレスを亢進し、その結果骨芽細胞機能の低下とPTH受容体の発現低下が起こることを示した。腎障害の進行に伴い骨芽細胞のPTH受容体のmRNAが低下することもラットのモデルで示されている。インドキシル硫酸の蓄積を阻害する経口吸着剤の投与は骨芽細胞のPTH受容体遺伝子の低下を改善させることができている。人では、末期腎不全での骨芽細胞のPTH受容体のmRNAは健常人に比べ低下しているが、インドキシル硫酸と腎臓病患者のPTH骨抵抗性との関連について調べた論文はない。本研究では、我々はインドキシル硫酸がヒトのPTHの骨抵抗性に関与しているかどうか決めるために、血液透析患者においてインドキシル硫酸と骨代謝マーカーに関連があるか調べた。

方法

患者選択

我々は一つの透析施設から患者を選んだ。少なくとも1年以上血液透析をした状態の安定している患者を本研究の候補とした。糖尿病患者やビタミンCやEを服用している患者は除外した。基準にあった47人の患者が研究に参加した。

測定方法

血液検体は最後の透析から二日空いた透析前の空腹時に得た。ヘモグロビン、アルブミン、クレアチニン、尿素窒素、カルシウム、リン、ALP、CRPは自動計測装置にて測定した。インタクトPTHは電気化学発行免疫測定法、BAPは酵素免疫測定法、TRACP5bはフラグメント吸収免疫補足酵素測定法、8-OHdGはELISAキットを用いて測定した。8-OHdGのELISAキットはモノクローナル抗体を用い、測定範囲は0.125~10ng/mLである。

統計方法

すべてのデータは平均土標準偏差か頻度で表した。骨代謝マーカー(ALP、BAP、TRACP5b)や8-OHdGに関与する因子を調べるために、単回帰および重回帰を行った。重

回帰分析において、インドキシル硫酸、性別、年齢、透析期間および単回帰分析で有意であった変数を投入した。セルロース膜と合成膜を使用した患者間での 8-OHdG の比較は T 検定を行った。P<0.05 を統計学的に有意とした。すべての解析は SPSS II for Windows, version 11.0J で行った。

結果

患者背景

参加者の 68% は男性で平均年齢は 61.5 ± 11.7 歳であった。すべての女性は閉経後であった。平均透析期間は 18.1 ± 5.4 年であった。血清インドキシル硫酸値は $37.6 \pm 16.5 \mu\text{g/mL}$ で、それらは以前報告された健常人の値よりずっと高値であった。18 人の患者はセルロース膜を使っており、29 人は合成膜を使っていた。

骨代謝マーカーに対するインドキシル硫酸や他の臨床的な変数の影響

単回帰分析では、インドキシル硫酸と BAP で有意な負の相関を認めた。インドキシル硫酸は ALP とも負の相関を認めたが、統計学的に有意ではなかった。インドキシル硫酸と TRACP 5b とは相関を認めなかった。ALP と BAP は透析期間やインタクト PTH と有意な相関を認めた。TRACP 5b はリンやインタクト PTH と有意な相関を認めた。

重回帰分析では、インドキシル硫酸はインタクト PTH と独立して ALP や BAP と負の相関を認めた。インドキシル硫酸と TRACP 5b とは相関を認めなかった。ALP は透析期間やインタクト PTH と相関していた。BAP もインタクト PTH と相関していた。さらに TRACP 5b もインタクト PTH と相関していた。

8-OHdGに対するインドキシル硫酸や他の臨床的な変数の影響

単回帰分析では、インドキシル硫酸と 8-OHdG との間に相関は認めなかったが、8-OHdG は CRP と有意な相関を認めた。

参加者すべてを膜の種類で 2 群に分けた。2 群間では 8-OHdG に差を認めなかった（セルロース膜群 vs. 合成膜群 ; 0.81 ± 0.28 vs. $0.82 \pm 0.22 \text{ ng/mL}$, P=0.91）。

重回帰分析では、インドキシル硫酸は 8-OHdG と相関を認めなかった。性別のみが 8-OHdG と有意な相関を認めた。

考察

この研究では血液透析患者において PTH と独立してインドキシル硫酸と骨形成マーカーと負の相関を認めていた。これはインドキシル硫酸が蓄積することは骨形成の抑制を表していることを示唆している。この結果は骨芽細胞の PTH 受容体遺伝子はインドキシル硫酸

の濃度に依存して発現が低下し、インドキシル硫酸の蓄積を抑えることで、骨芽細胞の PTH 受容体遺伝子の発現低下が改善するという我々の以前の知見と一致している。

尿毒症での PTH の破骨細胞への作用は骨芽細胞と同じように低下している。Mozar らはインドキシル硫酸が破骨細胞様細胞の分化を抑えることを示している。しかし我々は本研究でインドキシル硫酸と骨吸収マーカーとの相関を示すことができなかつた。以前我々は尿毒症ラットモデルで骨吸収は骨形成ほど抑制されなかつたことを報告しており、このことが本研究でインドキシル硫酸と骨吸収マーカーとの相関を認めなかつたことの説明となるかもしれない。インドキシル硫酸が破骨細胞の機能に影響を与えるかどうかを明らかにするためにさらなる研究が必要である。

インドキシル硫酸は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、我々も骨芽細胞にて酸化ストレスが増加することを示している。しかし本研究ではインドキシル硫酸と酸化ストレスとに相関を認めなかつた。酸化ストレスは年齢、糖尿病、貧血、エリスロポエチン、CRP、セルロース膜、低栄養を含む様々なものと関連している。我々は 8-OHdG と関連したいくつかの因子は解析したが、先ほど挙げた因子すべては解析していない。それ故、我々の解析しなかつた因子がインドキシル硫酸と 8-OHdG との相間に影響したのかもしれない。

性別と閉経は骨代謝と関連している。本研究では ALP、BAP、TRACP 5b が女性で男性より、統計学的に有意ではないものの高値であった。ただ性別を含んだ重回帰分析でインドキシル硫酸は BAP、ALP と負の相関を認めており、インドキシル硫酸と BAP、ALP の相関は性別と独立していると思われる。

栄養状態が血液透析患者において骨代謝に関連しているかもしれない。しかし我々の研究では BMI や血清アルブミン値は骨代謝マーカーとは相関しなかつた。さらに栄養状態を加えた重回帰分析でインドキシル硫酸は BAP や ALP と負の相関を認めたため、インドキシル硫酸と BAP、ALP の負の相関は栄養状態と独立していると思われる。

血液透析患者において毒物や生体分子を評価するとき、透析による除去が結果に影響を与えることがある。インドキシル硫酸、ALP、BAP、TRACP 5b は透析でほとんど除去されない。PTH はいくつかの膜で吸着されるため、透析前後の PTH 変化は透析膜に影響される。しかし PTH の半減期は極めて短いため、透析前の PTH の値は膜による影響は少ないと思われる。透析後の血清の 8-OHdG 値は透析の方法により異なる。しかし本研究では膜の種類と 8-OHdG の値に相関はなかつた。それ故本研究において膜の種類がこれらの毒物や生体分子に与える影響は少ないと思われる。

我々の研究はいくつかの限界がある。初めにサンプルサイズが相対的に少ないと、インドキシル硫酸と PTH の骨抵抗性の関連に影響を与える多くの因子を調べることはできなかつた。しかし PTH のような重要な因子とは独立してインドキシル硫酸が骨形成と負の相関を認めていることは示した。2 つ目に本研究は横断研究であるため、インドキシル硫酸と骨形成との間に負の相関があることは示したが、インドキシル硫酸が骨形成を抑制してい

るか決めることはできなかった。血液中に蓄積しているインドキシル硫酸が骨形成を抑制することを確かめるためには、インドキシル硫酸を低下させることが人の低回転骨を改善させるかどうかを調べることが必要である。3つ目は他の酸化ストレスマーカーや抗酸化マーカーを評価しなかったことである。4つ目は他の尿毒症物質を評価しなかったことである。フェニル酢酸は骨代謝を阻害する候補の一つかもしれない。他の尿毒症物質と PTH の骨抵抗性との関連を調べるためにさらなる研究が必要である。最後に我々は骨回転の評価のゴールドスタンダードである骨生検による骨形態計測のパラメーターでは評価しなかった。BAP や TRACP 5b は末期腎不全患者においても有用なマーカーで骨形態計測パラメーターと相談しているが、骨代謝マーカーは骨回転の評価にはいくつかの限界がある。骨形態によるさらなる研究が我々の結果をサポートするのに必要である。

結論

我々はインドキシル硫酸が PTH と独立して骨形成マーカーと負の相関を認める음을示した。しかし、インドキシル硫酸は骨吸収マーカーや酸化ストレスマーカーとは相関しなかった。これらの結果は血中のインドキシル硫酸の蓄積が少なくとも一部は血液透析患者の低回転骨を引き起こしていることを示している。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2184 号	氏名	後藤俊介
論文題目 Title of Dissertation	Association Between Indoxyl Sulfate and Skeletal Resistance in Hemodialysis Patients 血液透析患者におけるインドキシル硫酸と骨抵抗性との関連		
審査委員 Examiner	主査 黒坂昌弘 Chief Examiner 副査 宇野達一 Vice-examiner 副査 飯島一誠 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

背景

副甲状腺ホルモン(PTH)の骨に対する作用は尿毒症では低下している。それ故透析患者において、正常の骨回転を保つためには正常上限の2~3倍のPTHが必要である。この尿毒症でのPTH作用不全は“PTHの骨抵抗性”と言われている。本研究では、インドキシル硫酸がヒトのPTHの骨抵抗性に関与しているかどうか決めるために、血液透析患者においてインドキシル硫酸と骨代謝マーカーに関するか調べた。

方法

患者選択

少なくとも1年以上血液透析をした状態の安定している患者を本研究の候補とした。糖尿病患者やビタミンCやEを服用している患者は除外した。基準にあつた47人の患者が研究に参加した。

測定方法

血液検体は最後の透析から二日空いた透析前の空腹時に得た。ヘモグロビン、アルブミン、クレアチニン、尿素窒素、カルシウム、リン、ALP、CRPは自動計測装置にて測定した。インタクトPTHは電気化学発行免疫測定法、BAPは酵素免疫測定法、TRACP5bはフラグメント吸収免疫補足酵素測定法、8-OHdGはELISAキットを用いて測定した。8-OHdGのELISAキットはモノクローナル抗体を用い、測定範囲は0.125~10ng/mLである。

統計方法

すべてのデータは平均±標準偏差か頻度で表した。骨代謝マーカー(ALP、BAP、TRACP5b)や8-OHdGに関する因子を調べるために、単回帰および重回帰を行った。重回帰分析において、インドキシル硫酸、性別、年齢、透析期間および単回帰分析で有意であった変数を投入した。セルロース膜と合成膜を使用した患者間での8-OHdGの比較はT検定を行った。P<0.05を統計学的に有意とした。すべての解析はSPSS II for Windows, version 11.0Jで行った。

結果

患者背景

参加者の68%は男性で平均年齢は61.5±11.7歳であった。すべての女性は閉経後であった。平均透析期間は18.1±5.4年であった。血清インドキシル硫酸値は37.6±16.5μg/mLで、それらは以前報告された健常人の値よりずっと高値であった。18人の患者はセルロール膜を使っており、29人は合成膜を使っていた。

骨代謝マーカーに対するインドキシル硫酸や他の臨床的な変数の影響

単回帰分析では、インドキシル硫酸とBAPで有意な負の相関を認めた。インドキシル硫酸はALPとも負の相関を認めたが、統計学的に有意ではなかった。インドキシル硫酸とTRACP 5bとは相関を認めなかった。ALPとBAPは透析期間やインタクトPTHと有意な相関を認めた。TRACP 5bはリンやインタクトPTHと有意な相関を認めた。

重回帰分析では、インドキシル硫酸はインタクトPTHと独立してALPやBAPと負の相関

を認めた。インドキシル硫酸とTRACP 5bとは相関を認めなかった。ALPは透析期間やインタクトPTHと相関していた。BAPもインタクトPTHと相関していた。さらにTRACP 5bもインタクトPTHと相関していた。

8-OHdGに対するインドキシル硫酸や他の臨床的な変数の影響

単回帰分析では、インドキシル硫酸と8-OHdGとの間に相関は認めなかつたが、8-OHdGはCRPと有意な相関を認めた。

参加者すべてを膜の種類で2群に分けた。2群間では8-OHdGに差を認めなかつた（セルロース膜群 vs. 合成膜群； 0.81 ± 0.28 vs. 0.82 ± 0.22 ng/mL, P=0.91）。

重回帰分析では、インドキシル硫酸は8-OHdGと相関を認めなかつた。性別のみが8-OHdGと有意な相関を認めた。

考察

この研究では血液透析患者においてPTHと独立してインドキシル硫酸と骨形成マーカーと負の相関を認めていた。これはインドキシル硫酸が蓄積することは骨形成の抑制を表していることを示唆している。この結果は骨芽細胞のPTH受容体遺伝子はインドキシル硫酸の濃度に依存して発現が低下し、インドキシル硫酸の蓄積を抑えることで、骨芽細胞のPTH受容体遺伝子の発現低下が改善するという研究者らの以前の知見と一致している。

インドシキル硫酸は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、研究者らも骨芽細胞にて酸化ストレスが増加することを示している。しかし本研究ではインドキシル硫酸と酸化ストレスとに相関を認めなかつた。酸化ストレスは年齢、糖尿病、貧血、エリスロポエチン、CRP、セルロース膜、低栄養を含む様々なものと関連している。研究者らは8-OHdGと関連したいくつかの因子は解析したが、先ほど挙げた因子すべては解析していない。それ故、研究者らの解析しなかつた因子がインドキシル硫酸と8-OHdGとの相関に影響したのかもしれない。

血液透析患者において毒物や生体分子を評価するとき、透析による除去が結果に影響を与えることがある。インドキシル硫酸、ALP、BAP、TRACP 5bは透析でほとんど除去されない。PTHはいくつかの膜で吸着されるため、透析前後でのPTH変化は透析膜に影響される。しかしPTHの半減期は極めて短いため、透析前のPTHの値は膜による影響は少ないとと思われる。透析後の血清の8-OHdG値は透析の方法により異なる。しかし本研究では膜の種類と8-OHdGの値に相関はなかつた。それ故本研究において膜の種類がこれらの毒物や生体分子に与える影響は少ないと思われる。

本研究はインドキシル硫酸がPTHと独立して骨形成マーカーと負の相関を認めることを示し、血中のインドキシル硫酸の蓄積が血液透析患者の低回転骨を引き起こしていることを示唆した。今後の透析患者の骨代謝治療に重要な情報を与える価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。