

血液透析患者における血漿プロテアソーム濃度と栄養状態との関連性についての検討

深澤洋敬*1 佐久間梢*2 丹羽弘喜*1 松山貴司*1 熊谷裕通*2 古谷隆一*1

*1 磐田市立総合病院腎臓内科 *2 静岡県立大学食品栄養科学部臨床栄養学

key words: プロテアソーム濃度, 蛋白質エネルギー消耗状態, 蛋白分解, 栄養状態, 腹部筋肉面積

要旨

低栄養は透析患者の多くで認められ、動脈硬化や生命予後と関連している。一方、ユビキチン・プロテアソーム系蛋白分解経路は生体内における主要な蛋白分解経路であるにもかかわらず、透析患者における検討はほとんど行われていない。今回、血液透析患者を対象として、腹部CTスキャン画像を用いて測定した筋肉面積・皮下脂肪面積・内臓脂肪面積などの栄養学的指標と血漿プロテアソーム濃度との関連性を検討した。その結果、血漿プロテアソーム濃度は腹部筋肉面積 ($P<0.05$)、クレアチニン産生速度 ($P<0.05$)、ドライウェイト ($P<0.05$)、リン値 ($P<0.001$)、Intact PTH 値 ($P<0.05$) と有意な負の相関が認められた。一方、総コレステロール値 ($P<0.05$) とは有意な正の相関が認められた。重回帰分析を行ったところ、血漿プロテアソーム濃度は腹部筋肉面積の独立した規定因子であることが示された。以上より、血漿プロテアソーム濃度が血液透析患者の栄養状態に重要な役割を果たすことが示唆された。

1 緒言

蛋白質エネルギー消耗状態 (protein-energy wasting; PEW) は、Foqueらによって提唱された低栄養を表す概念であり、原因として慢性炎症、インスリン抵抗

性、アシドーシス、尿毒症状態などが報告されている^{1,2)}。PEWは透析患者の約30%に存在し、動脈硬化や生命予後と関連するとされている^{3,4)}。

ユビキチン・プロテアソーム系蛋白分解経路は生体内における主要な蛋白分解経路であり、その活性化と悪性腫瘍との関連性が多く報告されている^{5,6)}。しかしながら、腎不全との関連や透析患者における検討はほとんどなされておらず、尿毒症状態における筋肉量減少に同経路が関係していることが実験的に報告されている程度である⁷⁾。そのため本研究は、血液透析患者におけるユビキチン・プロテアソーム系蛋白分解経路の異常と栄養状態との関連性を検討することを目的とした。

2 対象患者

磐田市立総合病院 (静岡県磐田市) で維持血液透析を行っている76名を対象とした。原疾患は慢性糸球体腎炎または腎硬化症が62名 (81%)、糖尿病性腎症が8名 (11%)、多発性嚢胞腎が6名 (8%) であった。対象患者は週3回、1回あたり4~5時間の血液透析を行っており、血液流量は180~240 mL/分、透析液流量は500 mL/分であった。すべての対象患者に対して文書および口頭によるインフォームドコンセントを行い、同意書を取得した。また磐田市立総合病院の院内倫理委員会から承認を得て本研究を実施した。

3 方法

3-1 採血および血漿プロテアソーム濃度測定

採血は中2日空いた血液透析開始時に行った。血漿プロテアソーム濃度測定はプロテアソームの中核構成成分である20Sに対するマウスモノクローナル抗体(α 6 subunit, clone MCP 20)を用いてELISA法(BML-PW 0575, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), またはウェスタンブロット法⁸⁾を用いて行った。

3-2 腹部CTスキャン画像を用いた腹部筋肉および脂肪面積の測定

年1回行っている定期検査の腹部単純CTスキャン画像を用いて、筋肉および(皮下と内臓)脂肪面積測定を行った。画像は仰臥位で撮影し、面積測定はImage J(The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて行った⁹⁾。

3-3 クレアチニン産生速度測定

新里らによって報告されている式を用いて算出を行った¹⁰⁾。

3-4 統計学的解析

データは平均値±標準偏差, または中央値と4分位数(25%と75%値)で示した。P<0.05を有意差ありとみなした。2因子間の相関はSpearman順位解析, 2因子間の比較にはMann-Whitney U検定で解析を行った。腹部筋肉量を従属変数とした重回帰分析では, プロテアソーム濃度, 年齢, 透析期間, 身長(モデル1), Log IL-6(モデル2), nPCR(モデル3)を独立変数として解析を行った。統計ソフトはStatView 5(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), またはIBM SPSS, version 19.0(IBM SPSS, Tokyo, Japan)を使用した。

4 結果

4-1 血漿プロテアソーム濃度の測定

ウェスタンブロット法とELISA法によって血漿プロテアソーム濃度の測定を行ったところ, 両者には相関関係が認められた(P<0.05)。ELISA法では著しく高値を呈した患者が2名いたこと(それぞれ110.90 μ g/mL, 70.10 μ g/mL), ウェスタンブロット法で本来のバンドの下にラダー状のバンドが認められ(図1),

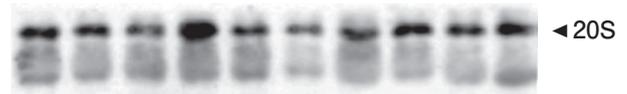


図1 代表的な10症例におけるウェスタンブロット法による結果写真
プロテアソームのバンドは矢頭20Sで示す。

ELISA法ではそれらのバンドも含めた値が血漿プロテアソーム濃度として測定されている可能性があると考えられたことから, 以降の検討ではウェスタンブロット法による血漿プロテアソーム濃度を使用した。

4-2 患者背景

表1に患者背景を示した。年齢の中央値は67.0歳, 透析期間は142.5カ月, 平均BMIは20.3 kg/m²であった。身長, ドライウェイト, 尿素窒素, 血清クレアチニン値, 腹部筋肉面積, クレアチニン産生速度は男性で女性に比し有意に高値であった。一方, 総コレステロール, Kt/V_{urea}は女性で男性に比し有意に高値であった。血漿IL-6濃度, プロテアソーム濃度, 腹部皮下脂肪面積, 腹部内臓脂肪面積は男女間で有意差は認められなかった。

4-3 血漿プロテアソーム濃度と臨床パラメータの相関関係

ドライウェイト(P<0.05), リン値(P<0.001), Intact PTH値(P<0.05), 腹部脂肪面積(P<0.05), クレアチニン産生速度(P<0.05)とは有意な負の相関関係が認められた(表2と図2)。一方, 総コレステロール値(P<0.05)とは有意な正の相関関係が認められた。

4-4 腹部筋肉面積の規程因子

腹部筋肉面積を従属変数とした場合の重回帰分析の結果を表3に示した。その結果, 血漿プロテアソーム濃度は腹部筋肉面積の独立した規定因子であることが示された。さらに腹部筋肉面積をその値に応じて低値群(n=38)と高値群(n=38)に2分割すると, 腹部筋肉面積低値群では血漿プロテアソーム濃度は有意に高値であった(低値群: 1.49±0.58 μ g/mL, 高値群: 1.18±0.46 μ g/mL, P<0.05)。

表1 患者背景

	合計 (n=76)	男性 (n=50)	女性 (n=26)	P
年齢 (歳)	67.0 (60.0 to 73.3)	67.5 (60.3 to 74.0)	65.5 (59.8 to 71.5)	0.493
透析期間 (月)	142.5 (42.3 to 269.8)	136.0 (39.3 to 267.0)	157.5 (85.8 to 282.5)	0.536
身長 (cm)	160.0±8.9	164.1±6.4	152.1±7.5	<0.001
ドライウエイト (kg)	50.3±9.7	53.8±8.9	43.5±7.4	<0.001
BMI (kg/m ²)	20.3±2.9	20.7±2.8	19.6±3.0	0.057
ヘモグロビン値 (g/dL)	11.4±1.1	11.4±1.1	11.4±1.3	0.665
血清アルブミン (g/dL)	3.7±0.4	3.7±0.4	3.7±0.4	0.252
総コレステロール (mg/dL)	152.4±32.5	145.1±31.0	166.3±31.1	<0.05
LDL コレステロール (mg/dL)	86.0±20.8	83.4±21.2	90.8±19.6	0.114
尿素窒素 (mg/dL)	62.1±12.7	64.2±10.8	58.2±15.1	<0.05
血清クレアチニン (mg/dL)	10.7±2.7	11.1±3.0	9.8±1.7	<0.05
ナトリウム (mEq/L)	139.3±2.8	138.7±2.7	140.4±2.7	<0.05
カリウム (mEq/L)	4.6±0.5	4.7±0.5	4.5±0.6	0.277
カルシウム (mg/dL)	9.5±0.9	9.3±0.9	9.7±0.8	0.116
リン (mg/dL)	5.0±1.3	5.1±1.4	4.8±1.2	0.437
Intact PTH (pg/mL)	101.3±107.1	88.0±53.4	127.0±166.6	0.978
β ₂ ミクログロブリン (mg/L)	26.5±6.6	26.1±6.6	27.3±6.7	0.669
Kt/V _{urea}	1.6±0.3	1.5±0.2	1.9±0.3	<0.001
nPCR (g/kg/day)	0.96±0.17	0.97±0.15	0.94±0.21	0.266
CRP (mg/dL)	0.1 (0.0 to 0.3)	0.1 (0.1 to 0.4)	0.0 (0.0 to 0.1)	<0.01
IL-6 (pg/mL)	5.10 (3.10 to 10.45)	5.12 (3.51 to 10.25)	4.65 (2.75 to 10.17)	0.529
プロテアソーム濃度 ELISA (μg/mL)	1.34±1.12	1.26±1.11	1.51±1.13	0.233
プロテアソーム濃度ウエスタン (μg/mL)	1.33±0.53	1.28±0.47	1.46±0.66	0.244
腹部筋肉面積 (cm ²)	96.5 (81.4 to 119.0)	114.6 (90.0 to 128.0)	78.7 (69.0 to 91.3)	<0.001
腹部皮下脂肪面積 (cm ²)	70.6 (49.0 to 108.6)	67.2 (46.1 to 106.0)	75.1 (58.8 to 121.6)	0.178
腹部内臓脂肪面積 (cm ²)	47.8 (22.1 to 87.2)	54.1 (22.7 to 110.8)	34.5 (21.9 to 58.8)	0.090
クレアチニン産生速度 (g/日)	0.83 (0.69 to 1.08)	0.99 (0.72 to 1.19)	0.74 (0.61 to 0.86)	<0.01

平均値±標準偏差, または中央値と4分位数(25%と75%値)を示す。

表2 血漿プロテアソーム濃度と臨床パラメータの相関関係

	プロテアソーム濃度	
	Correlation coefficient	P
年齢	0.133	0.252
性別 (男性)	-0.135	0.246
透析期間	-0.146	0.207
身長	-0.154	0.183
ドライウエイト	-0.242	<0.05
BMI	-0.190	0.099
血清アルブミン	0.077	0.511
総コレステロール	0.240	<0.05
LDL コレステロール	0.144	0.214
尿素窒素	-0.004	0.971
血清クレアチニン	-0.185	0.110
カルシウム	0.019	0.873
リン	-0.391	<0.001
Intact PTH	-0.227	<0.05
β ₂ ミクログロブリン	0.024	0.835
Kt/V _{urea}	0.202	0.080
nPCR	0.049	0.675
Log IL-6	-0.144	0.216
腹部筋肉面積	-0.263	<0.05
腹部皮下脂肪面積	-0.034	0.771
腹部内臓脂肪面積	-0.038	0.745
クレアチニン産生速度	-0.241	<0.05

5 考察

今回の研究により, 血液透析患者における血漿プロテアソーム濃度は腹部筋肉面積の独立した規定因子であることが明らかとなった。さらに血漿プロテアソーム濃度は, クレアチニン産生速度, ドライウエイト, リン値などとも有意な負の相関が認められたことから, 透析患者の栄養状態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

透析患者では低栄養がしばしば認められ, 合併症罹患率や生命予後と関係することが知られている¹¹⁾。実際に透析患者では, 年齢や性別を合致させた健常人と比べ BMI が低いことが報告されており¹²⁾, BMI 高値であるほうが生存率も高いことが知られている^{13, 14)}。また血清 Cr 値を筋肉量のマーカーとした検討では, 血清 Cr が高値である群ほど, つまり筋肉量が多い透析患者ほど生命予後が良好であったことが報告されている¹⁵⁾。近年, このような背景をもとに低栄養を表す概念として PEW が Foque らによって提唱されてい

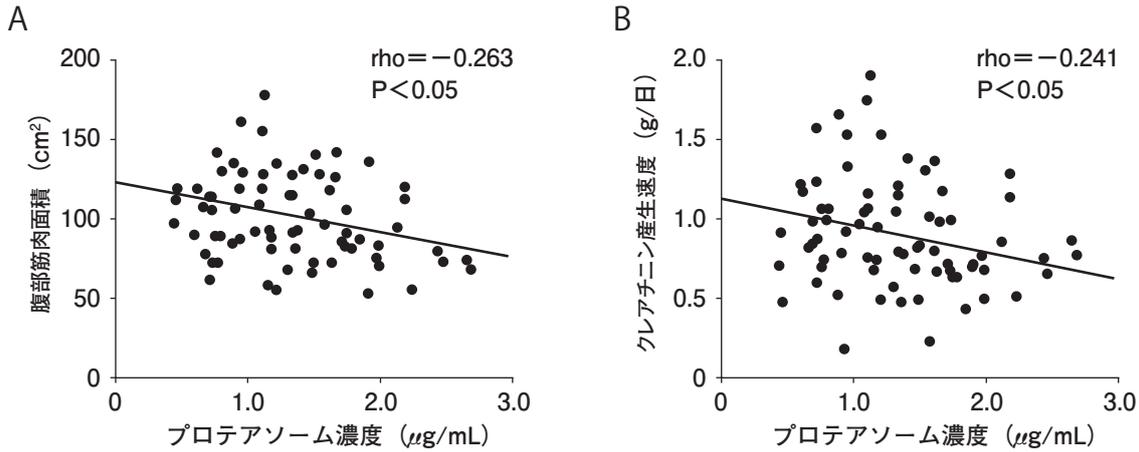


図2 A; 腹部筋肉面積, B; クレアチニン産生速度とプロテアソーム濃度の相関

表3 腹部筋肉面積を従属変数とした重回帰分析

	モデル1		モデル2		モデル3	
	β	P	β	P	β	P
従属変数: 腹部筋肉面積						
プロテアソーム濃度	-0.194	0.044	-0.227	0.021	-0.222	0.024
年齢	-0.032	0.758	0.020	0.855	0.017	0.878
透析期間	-0.139	0.141	-0.125	0.184	-0.107	0.264
身長	0.543	0.001	0.550	0.001	0.563	0.001
Log IL-6	—	—	-0.152	0.128	-0.153	0.126
nPCR	—	—	—	—	-0.089	0.351

独立変数: プロテアソーム濃度, 年齢, 透析期間, 身長 (モデル1), Log IL-6 (モデル2), nPCR (モデル3)

る¹⁾。

ユビキチン・プロテアソーム系蛋白分解経路は、蛋白質に対し特異的に起こる細胞内分解経路であり、同経路によって炎症、造血、骨形成などが制御されているという事実から、透析患者における合併症の発症・進展にも関与していることが予想される⁶⁾。最近の臨床研究において、血中プロテアソーム濃度が種々の悪性腫瘍の悪性度、自己免疫疾患の活動性、肥満およびBMIと相関していることが報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。今回我々は、血中プロテアソーム濃度が透析患者における栄養状態、特に筋肉量に関与していること、つまりプロテアソーム系蛋白分解経路が透析患者の合併症にも関連する可能性を初めて報告した。Mitchらは尿毒症状態における筋肉量減少に同経路が関係していることを報告しており、今回の我々の結果とも合致するものと思われる⁷⁾。

さらに本研究における興味深い結果の一つは、炎症性サイトカインであるIL-6や蛋白摂取量のマーカーであるnPCRで補正を行っても、プロテアソーム濃度が腹部筋肉面積の独立した規定因子であることが示さ

れた点であろう。この結果は、慢性炎症や食事摂取量以外の機序でも血中プロテアソームが筋肉量に影響を及ぼしている可能性を示唆するものである。しかしながら、血中プロテアソームがどのようにして筋肉量に影響を及ぼしているのか、など不明な点も多く今後のさらなる検討が必要と考えられる。

本研究の限界として第一に、比較的少数の患者を対象として検討が行われたことがあげられる。そのため、より多くの対象群における検討が今後望まれる。第二に、本研究は横断的に行われたため、プロテアソーム濃度と腹部筋肉面積の直接的な因果関係は証明できていないことがあげられる。この限界に対してはランダム化比較試験による検討が今後必要であると考えられる。第三に、本研究ではあくまでプロテアソーム濃度を測定しており、本来プロテアソームが有する酵素活性を測定していない点があげられる。

6 結語

血漿プロテアソーム濃度が、血液透析患者における腹部筋肉面積の独立した規定因子であることが明らか

となった。さらに血漿プロテアソーム濃度はクレアチニン産生速度、ドライウエイト、リン値とも相関が認められたことから透析患者の栄養状態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

この研究は平成 23 年度日本透析医学会公募研究助成によってなされた。

文 献

- 1) Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, et al. : A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. *Kidney Int*, 73; 391-398, 2008.
- 2) Basta G, Leonardi D, Mallamaci F, et al. : Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*, 77; 225-231, 2010.
- 3) Qureshi AR, Alvestrand A, Danielsson A, et al. : Factors predicting malnutrition in hemodialysis patients : a cross-sectional study. *Kidney Int*, 53; 773-782, 1998.
- 4) Stenvinkel P, Heimburger O, Paultre F, et al. : Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*, 55; 1899-1911, 1999.
- 5) Glickman MH, Ciechanover A : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway : destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, 82; 373-428, 2002.
- 6) Reinstein E, Ciechanover A : Narrative review : protein degradation and human diseases : the ubiquitin connection. *Annals of internal medicine*, 145; 676-684, 2006.
- 7) Mitch WE, Goldberg AL : Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *The New England Journal of Medicine*, 335; 1897-1905, 1996.
- 8) Yoshida T, Kumagai H, Suzuki A, et al. : Relaxin ameliorates salt-sensitive hypertension and renal fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27; 2190-2197, 2012.
- 9) Fukasawa H, Ishigaki S, Kinoshita-Katahashi N, et al. : Plasma levels of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) are associated with muscle and fat mass in hemodialysis patients : a cross-sectional study. *Nutr J*, 13; 48, 2014.
- 10) Shinzato T, Nakai S, Miwa M, et al. : New method to calculate creatinine generation rate using pre- and postdialysis creatinine concentrations. *Artif Organs*, 21; 864-872, 1997.
- 11) Bergstrom J : Nutrition and mortality in hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*, 6; 1329-1341, 1995.
- 12) Kopple JD, Zhu X, Lew NL, et al. : Body weight-for-height relationships predict mortality in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int*, 56; 1136-1148, 1999.
- 13) Leavey SF, McCullough K, Hecking E, et al. : Body mass index and mortality in 'healthier' as compared with 'sicker' haemodialysis patients : results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 16; 2386-2394, 2001.
- 14) Cabezas-Rodriguez I, Carrero JJ, Zoccali C, et al. : Influence of body mass index on the association of weight changes with mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 8; 1725-1733, 2013.
- 15) Park J, Mehrotra R, Rhee CM, et al. : Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in peritoneal dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 28; 2146-2155, 2013.
- 16) Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, et al. : Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *The Journal of rheumatology*, 29; 2045-2052, 2002.
- 17) Chang TL, Chang CJ, Lee WY, et al. : The roles of ubiquitin and 26S proteasome in human obesity. *Metabolism : clinical and experimental*, 58; 1643-1648, 2009.
- 18) Henry L, Lavabre-Bertrand T, Douche T, et al. : Diagnostic value and prognostic significance of plasmatic proteasome level in patients with melanoma. *Experimental dermatology*, 19; 1054-1059, 2010.
- 19) Sakamoto K, Sato Y, Sei M, et al. : Proteasome activity correlates with male BMI and contributes to the differentiation of adipocyte in hADSC. *Endocrine*, 37; 274-279, 2010.