

出國報告 (出國類別：博士進修)

慢性腎臟病併礦物質與骨骼代謝 異常之基因質體學研究

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：許舜能、主治醫師

派赴國家/地區：英國愛丁堡

出國期間：106年9月11日至111年3月10日

報告日期：111年5月31日

摘要

慢性腎臟病因腎功能惡化導致礦物質與骨骼代謝異常，使得骨骼代謝轉換率、礦物化程度及骨體積量有複雜的變化及併發相關的系統性疾病，其易造成病人心血管鈣化及骨質疏鬆的併發症及死亡率增加。然而所要研究的骨骼器官，是由一種密實且堅韌的結締組織所構成，導致難以萃取高純度骨頭細胞之核糖核酸或蛋白質，來做進一步相關基因訊息表現或機轉調控的分析研究，因此限制了此領域研究的可行性及普遍性。本篇研究透過建立慢性腎臟病的動物鼠模式，研究慢性腎臟病動物鼠的骨代謝異常機轉，嘗試從骨骼組織萃取高品質核糖核酸，利用目前最新的基因質體學核糖核酸定序技術，找出可能影響慢性腎臟病骨病變之關鍵基因及機轉，期能將研究成果應用於臨床醫學。

目次

頁碼

壹、進修緣起.....	4
貳、進修目的.....	5
參、進修過程及成果.....	6
肆、進修心得.....	8
伍、回單位後報告及研究合作.....	8
陸、建議事項.....	8
柒、研究成果應用及未來展望.....	9

壹、進修緣起

出國進修一直是職從國防醫學院畢業後的目標，進入三軍總醫院以後接觸到許多進修回國的學長姐，發現出國進修不僅可以提升自己的專業領域素養，更可以讓自己的專業與世界接軌，提升照顧病人的品質及安全。進入腎臟科後，在朱柏齡教授及林石化教授指導下，開始嘗試病例報告及論文的寫作，之後在許育瑞教授與幾位老師的指導下，進行一些臨床的研究及資料蒐集，所得的研究結果發表於腎臟及相關的雜誌與期刊，啟發職出國進修的信心與興趣。103 年經由評比與林石化院長及科內老師們的大力支持下，獲得於 105 年出國進修博士學位的机会。

因為職在三軍總醫院腎臟科訓練期間對於腎臟病所致的併發症與生理調節特別感興趣，朱柏齡教授是台灣學界專精於腎臟病骨病變的專家，林石化教授則專注於研究各項電解質在腎臟內的調控機制，科裡的教授們在臨床上對於各種腎臟病導致的礦物質、電解質、骨病變及血管鈣化都有豐富的經驗與論文發表。104 年由曾經留學愛丁堡大學的高雄榮民總醫院李恆昇教授及當時林石化院長的推薦，最後決定前往位於英國愛丁堡大學羅斯林研究中心的 Colin Farquharson 教授的骨骼生物學實驗室進修。Farquharson 教授為國際知名的骨礦化研究學者，尤其以研究礦化因子 PHOSPHO1 及 TNAP 調節組織礦化及鈣化聞名。到達英國與教授討論後，決定將博士學程的實驗重點放在 PHOSPHO1 及 TNAP 礦化因子在骨骼組織正常生理與腎臟病理狀態下的調節，進而利用目前最新的基因質體學核糖核酸定序技術，研究其相關的調控機制與機轉，藉由此次的進修機會，讓職深入學習到研究骨病變的方法，並對於各種腎臟病變調控因子的生理及病理機轉有更進一步的認識。

貳、進修目的

職於 106 年 9 月 11 日至英國愛丁堡大學羅斯林研究所之功能基因質體暨發展生物學部門 (Functional Genetics and Development, The Roslin Institute, University of Edinburgh) 進修博士。本單位隸屬愛丁堡大學醫學及獸醫學院研究所，由生物技術和生物科學研究委員會 (Biotechnology and Biological Sciences Research Council, BBSRC) 提供贊助的政府研究機構，本研究所最著名即是由伊恩·威爾穆特、基思·坎貝爾共同研究出世界上第一頭複製羊多利 (Dolly sheep)。研究成員人數眾多，成員來自世界各地且涵蓋各生物醫學領域，包括遺傳學和基因質體學、感染暨免疫學、臨床科學及醫學研究、生物大數據分析，是個快速發展且充滿活力的單位。

慢性腎臟病會造成礦物質和骨頭代謝異常，導致病人易有骨骼疼痛及骨折，而骨骼以外的表現，特別是血管及軟組織的鈣化，更被認為和心血管疾病的致病率和死亡率有關，目前由美國國家腎臟基金會 (National Kidney Foundation, NKF) 提出「腎臟疾病治療成果品質建議指南」(Kidney / Disease Outcomes Quality Initiative, K/DOQI)，關於腎性骨病變在診斷及治療方面的建議，仍缺乏足夠的臨床資料與證據，且多為證據力不足的專家意見。有鑑與此，尋找目前研究鈣化已有相當歷史的歐洲鈣化組織學會(European Calcified Tissue Society, ECTS，成立於 1963 年)，每年有多場在血管及軟組織鈣化的國際研討會，是許多大師級發表傑出研究的重要學會，包括經常在 ECTS 開辦講座的 Colin Farquharson 教授，學習相關的骨骼基礎醫學研究，並應用於慢性腎臟病併礦物質和骨頭代謝異常的動物模式，探討慢性腎臟病人其特殊骨礦化及鈣化異常機轉，以提供較具體的證據及改善病人存活率的方法。主要研究目標如下：

1. 利用體外老鼠骨母細胞進行慢性腎臟病併骨代謝異常之相關基因及蛋白(包括 PHOSPHO1 和組織非特異性鹼性磷酸酶 TNAP)、訊息傳遞及調控機制研究。
2. 利用慢性腎臟病鼠及核糖核酸測序技術，找出相關的致病基因群及機轉。
3. 尋找關鍵影響機制，研究訊息傳遞鏈及蛋白質標記，提供未來疾病治療方法及藥物研發。

參、進修過程及成果

1. 體外老鼠骨母細胞實驗及慢性腎臟病的動物鼠模式研究：

慢性腎臟病是一種不可逆的進行性疾病，其特徵是隨著時間的推移腎臟功能逐漸喪失。患有晚期腎臟病的患者經常出現礦物質和骨代謝異常，而無法維持正常的鈣磷離子、甲狀旁腺激素和成纖維細胞生長因子（FGF-23）的生理調控，導致血中礦物質及荷爾蒙異常，包含高磷酸鹽血症，甲狀旁腺功能亢進症和成纖維細胞生長因子升高，這些腎臟病變導致的病變因子是診斷腎臟病礦物質及骨骼疾病的主要指標，隨著疾病進展至末期腎臟病，可導致骨骼病變及心血管鈣化。

PHOSPHO1 和組織非特異性鹼性磷酸酶（TNAP）是參與骨骼礦化最主要的兩種骨骼磷酸酶。PHOSPHO1 通過水解其基質囊泡 (matrix vesicles) 膜的磷酸膽鹼（PCho）和磷酸乙醇胺（PEA）釋放出磷離子(Pi)，進而導致基質囊泡膜外磷酸鹽/無機焦磷酸鹽（Pi / PPI）的比例增加，而促進礦化過程。TNAP 是一種礦化外切酶，在成骨細胞，軟骨細胞和基質囊泡的膜上有高度的表達。透過水解無機焦磷酸鹽，使羧基磷灰石結晶（HA）在細胞外基質（ECM）中傳播、鏈結並形成礦化物。目前已知在 *Phospho1*^{-/-}; *Alpl*^{-/-} 雙剔除小鼠骨中發現骨骼礦物質完全無法形成，進而證明了 PHOSPHO1 和 TNAP 對於骨礦化的不可或缺及必要性。

為了證明 PHOSPHO1 和組織非特異性鹼性磷酸酶在慢性腎臟病鼠的功能，首先通過新開發的體外老鼠骨母細胞模型的驗證顯示，在所研究的整個時間過程中，藉由持續不斷的磷離子，PTH 和 FGF23 藥物刺激，會誘導成骨母細胞中 *Phospho1* 和 *Alpl* 基因及蛋白表達下降。顯示慢性腎臟病導致內分泌環境的改變，例如高磷酸鹽血症，高副甲狀腺素和高 FGF23 可直接影響關鍵磷酸化酶 PHOSPHO1 和組織非特異性鹼性磷酸酶的表達。另外，此研究建立一個慢性腎臟病鼠誘導的簡化模型，即是添加含有 0.2% 腺嘌呤藥物混和酪蛋白於小鼠的飲食，來誘發結晶堆積於腎臟，導致慢性腎臟病鼠併發一系列骨礦化異常、繼發性甲狀旁腺功能亢進症（SHPT），高血漿 FGF-23 和高磷血症。

2. 慢性腎臟病鼠之基因體核糖核酸測序研究

為了更清楚了解慢性腎臟病鼠的內分泌環境異常是如何導致骨骼代謝及礦化異常，我們使用了完整的轉錄組測序 (RNA-seq) 來鑑定導致「慢性腎臟病骨病變鼠」中可能的相關分子機制。本研究結果提供了第一個詳細的骨骼基因圖譜，該基因圖譜也是第一個用慢性腎臟病鼠模型引起的骨骼代謝和礦化異常的基因資料庫。有趣的是，我們意外發現成骨細胞的線粒體功能不良是導致腎臟病鼠骨骼代謝及礦化異常的關鍵病因之一，此發現有助於了解骨骼中線粒體的功能及角色，以及其如何透過粒線體自噬訊息傳遞鍊來調控腎臟病鼠的骨代謝。

3. 粒線體自噬 (mitophagy) 機轉在骨骼代謝及礦化異常之角色

從近 20 年文獻中可以看出，缺乏專門研究慢性腎臟病骨骼中的線粒體功能障礙的研究。此研究利用粒線體調控螢光鼠(Mito-QC mice)誘發慢性腎臟病骨病變，並取其的骨骼的冷凍切片，用雷射螢光顯微鏡檢視其成骨細胞中的粒線體病變，是如何透過調控活性氧濃度、電子傳遞鍊及粒線體型態變化，誘發腎臟病之骨病變。此外，在體外細胞訊息傳遞驗證實驗，利用常用的尿毒症毒素，硫酸吲哚酚，此被稱為慢性腎臟病患者的代表性毒素，它通過誘導細胞內活性氧過度產生及線粒體受損引起骨毒性的作用，這項結果揭示了尿毒素對鼠成骨母細胞中線粒體質量，活性氧及自由基的產生和細胞代謝的影響。利用線粒體自噬體激活劑 Rapamycin，成功恢復併逆轉線粒體 PARKIN 訊息傳遞鍊的異常，從而改善尿毒素對線粒體的損害。此研究為第一個直接顯示骨骼中粒線體功能異常的體內及體外實驗，寄望有助於提供慢性腎臟病的礦物質骨病變有關的線粒體功能障礙的藥物開發。

肆、進修心得

英國愛丁堡大學羅斯林研究中心在骨病變及基因質體學方面的研究在世界中佔有一席之地，經由此次的進修機會得以學習最新的研究技術與觀念，並對腎臟病造成的骨病變之生理病理機轉作更深入的研究與貢獻。雖然修業初期困難重重，技術突破之路備極艱辛，但在師長與家人們的鼓勵及支持下，最終如期取得學位並有豐富的收穫與成果。職由衷地感謝國防部軍醫局鈞長以及醫院長官、師長的栽培與支持，讓職可以無後顧之憂全力攻讀博士。很榮幸在英國同時有四位指導教授(Colin Farquharson、Vicky MacRae、Katherine Staines、Louise Stephen)及多位資深指導教師們(Kanchan Phadwal、Lance Chih-Jen Lin、Thomas Tan、Oliver Yao-Tang Lin)無私的分享與支持，除了定期的研究進度討論會，即使在第三至四年面臨新冠疫情封城期間，仍持續以視訊方式進行，讓職在這 4 年多取得很多技術性突破與研究進展。

伍、回單位後報告及研究合作

回國後先初步了解目前實驗室的狀況並於 111 年 4 月 19 日 07 時 30 分於三軍總醫院內科部分享進修的研究成果，111 年 5 月 24 日於腎臟科科務會議分享心得。同時進行研究計畫的撰寫與加入腎臟科實驗室團隊，並與國防醫學院牙科及心臟血管外科實驗室進行相關計畫的合作。目標為建立骨病變及基因質體學實驗平台，並應用臨床人體資料庫進行串聯與整合。此外與英國 Colin Farquharson 和 Vicky MacRae 實驗室亦有研究計畫正在進行中，將來也會繼續保持合作關係，互相交流相關實驗所需材料及經驗。

陸、建議事項

1. 提供歸國進修人員彈性的研究時間：職之前負責醫療臨床相關的工作，跨足到英國學術界感覺最大的不同是，國外指導教授會給予博士生非常彈性的工作時間，但要求高品質的工作產出，鼓勵批判性、突破性及有創造力的思考，期待回國後有足夠的”研究時間”可以繼續嘗試更多有技術困難度的骨萃取技術，以延續及貢獻所學，期望帶領更多後進及學弟妹們一起成長前進，進而提升三總腎臟病在骨代謝異常的研究水平至世界頂大的水準。

2. 提供歸國進修人員研究經費或軟硬體資源：由於慢性腎臟病骨代謝異常的研究困難度及限制性，需要很多特殊藥物及抗體、骨骼分析軟體、及基因體分析和蛋白質體學技術。往往每個實驗動則數十至百萬台幣，且常常無法取得一次性成功，有鑑於此，如何取得這些軟硬體及分析儀器，及整合現有資源及人力，勢必是未來要面臨的問題及困難。
3. 保持與國外實驗室的聯繫並拓展合作觸角，隨時取得最新技術及新知。

柒、研究成果應用及未來展望

職腎臟科對於腎臟骨病變及電解質代謝平衡方面的研究已有相當的基礎，此次進修所學相信能與現有之基礎互補，並在現有平台提升其技術水平與門檻，期能在未來的腎臟病併發症研究上有所貢獻，提供更多的實驗方法與經驗，以深入了解疾病之機轉，並對腎臟病骨病變治療方式的開發提供新的方向，相信可使本院腎臟科在腎臟病方面的研究及治療領域在國際上佔有一席之地。