

平成 22 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19790075  
 研究課題名（和文）血液細胞間クロストークに着目した  
 長期透析合併症の予防法の確立  
 研究課題名（英文）Prevention of long term dialysis related complications induced by  
 crosstalk among blood cells  
 研究代表者  
 伊藤 佐生智（ITO SAOTOMO）  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：70308013

研究成果の概要（和文）：血液透析の際には、人工物である透析膜と血液成分の接触により活性化される白血球が産生する活性酸素が透析アミロイドーシスや動脈硬化などの長期透析合併症を引き起こすと考えられている。本研究では血液細胞間の相互作用に着目してこのメカニズムを解析した。その結果、透析膜と血小板の接触により血小板表面に接着分子 P-セレクチンの発現が誘導され、白血球表面のリガンド分子（PSGL-1）を介して血小板と好中球の複合体が形成され、これにより好中球からの活性酸素産生が誘導されることを明らかにした。また透析膜と血漿の接触により補体が活性化し、これに伴って生じる C5a が好中球表面の PSGL-1 の集積を引き起こして血小板と好中球の複合体形成と活性酸素産生を増強することを示した。さらにこの血小板 - 好中球相互作用を妨害する薬物として α-トコフェロールとグリチルリチンを見出し、両薬物が血液透析に伴う白血球の活性化を抑制しうることを示した。

研究成果の概要（英文）：During hemodialysis, the contact of blood components with artificial hemodialysis membranes induce the activation of leukocytes and production of reactive oxygen species (ROS), followed with development of long-term dialysis related complications. In this study, I revealed the mechanism of leukocyte activation induced by hemodialysis membranes, i.e. the contact of blood with hemodialysis membrane evokes expression of P-selectin on activated platelets, formation of platelet-neutrophil microaggregates and production of ROS by neutrophils. The contact of plasma with hemodialysis membrane also activates complement system and induces formation of anaphylatoxin C5a and cap formation of P-selectin ligand on neutrophils which enhances formation of the microaggregates. I found alpha-tocopherol and glycyrrhizin could prevent the interaction of platelets and neutrophils and activation of neutrophils during hemodialysis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,100,000	0	1,100,000
平成 20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞生物学

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全患者に対し長期にわたって血液透析療法を行うことにより、透析アミロイドーシスや動脈硬化など特有の合併症（長期透析合併症）が生じることが知られている。血液透析の際には血液と人工物である透析膜の接触が不可避であり、この際、血液細胞や補体など血液成分の活性化が引き起こされ、これによって生じる白血球の活性化および活性酸素産生がこの長期透析合併症の一因であると考えられている。血液透析療法の開始直後から、この望まれない血液成分の活性化を回避するため、透析膜の改良が行われてきた。これまでの透析膜の改良は主にいかに補体の活性化を軽減するかを目的に行われてきた。近年、血液透析直後の血液中で血小板や赤血球、白血球の凝集体が観察されることが報告されて以来、血液細胞間のサイトカインや接着分子を介した相互作用とそれによって引き起こされる血液細胞の活性化も長期透析合併症の原因として考えられつつある。しかしながらこの接着分子や液性分子を介した血液成分、細胞間の相互作用（クロストーク）についてはいまだ未知な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は長期透析合併症の原因である、血液透析膜との接触によって引き起こされる血液細胞の活性化について特に細胞接着分子の役割を中心に解析し、そのメカニズムを明らかにすることである。またその知見を元に、血液細胞間相互作用に干渉する薬物を探索し、長期透析合併症の予防法を見出すことである。

### 3. 研究の方法

材料：血液透析膜は市販のダイアライザーより取り出し、無菌的に細断（1mm）し、実験に供した。血小板、好中球は健常人の血液より、常法により調製した。

血小板の機能解析法：血小板表面のP-セレクチンの発現は抗P-セレクチン抗体を用いたCell-based ELISAおよびフローサイトメトリーにより評価した。

好中球の機能解析法：好中球と血小板の複合体形成は抗体あるいは蛍光色素で蛍光標識した血小板と好中球を混和し、好中球の蛍光強度をフローサイトメーターで測定することにより評価した。好中球の活性酸素産生はチトクロムC還元法またはDCFH-DAを用いたフローサイトメトリーによって評価した。好中球表面のPSGL-1の局在変化は免疫蛍光染

色により評価した。

### 4. 研究成果

透析膜との接触による血小板の活性化とP-セレクチンの発現

現在用いられている、各種透析膜による血小板表面のP-セレクチン発現について検討した結果、疎水性であるポリスルホン(PS)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)膜は血小板表面のP-セレクチンの発現を強く誘導し、一方でエチレンビニルアルコール共重合体(EVAL)膜は再生セルロース(RC, Data not shown)はP-セレクチン発現を誘導しなかった。親水性の膜の方が疎水性膜にくらべ補体活性化が高いことが知られており、これまでの透析膜の改良は疎水性を高め補体活性化を抑える点でなされてきたが、血小板の活性化の点では親水性膜の方が有利であることが示された。

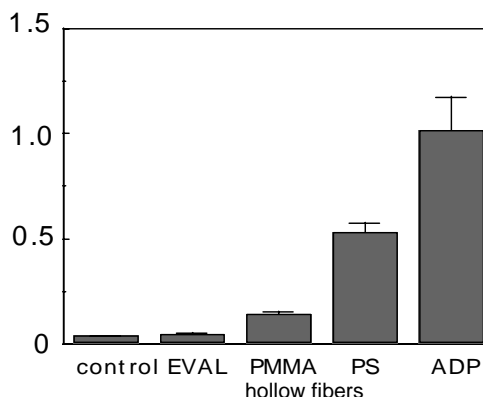


図1 各種透析膜環での血小板表面 P-セレクチン発現誘導の比較

透析膜による好中球と血小板の複合体形成および好中球の活性酸素産生

血液と透析膜をインキュベートした際の好中球血小板複合体の形成能について各種透析膜間で比較した。その結果、複合体形成はPS, PMMA膜とのインキュベートにより誘導され、EVAL膜とのインキュベートでは誘導されず、前述の透析膜による血小板表面のP-セレクチン発現誘導と同じ傾向が認められた(Data not shown)。続いて透析膜と血小板および好中球をインキュベートした際の好中球からの活性酸素産生について検討した。親水性で血小板活性化能の低いRC膜、EVAL膜では血小板の有無にかかわらず好中球からの活性酸素産生は誘導されなかったが、PMMA膜では血小板存在下でのみ、好中球から

の過剰活性酸素産生が認められた。PS 膜では血小板非存在下でも好中球からの活性酸素産生が認められ、血小板存在下では活性酸素産生が促進された。以上より透析膜によって活性化された血小板が P-セレクトリンを発現し、これを介して好中球と複合体を形成することにより、好中球からの活性酸素産生を誘導していることが示された (Itoh et al., Biomed Mater Res A. 2006)。

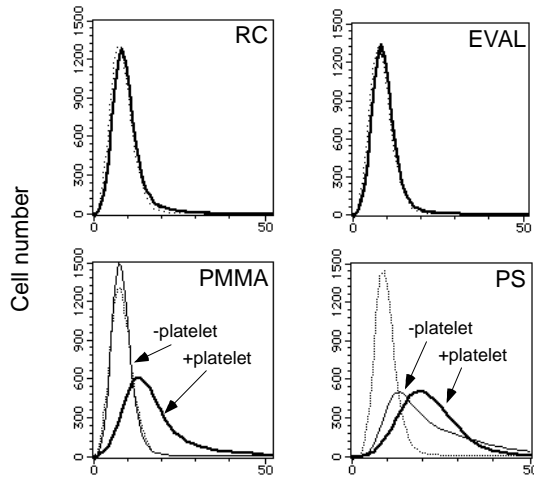


図 2 血小板存在/非存在下での透析膜による好中球からの活性酸素産生

透析膜とのインキュベーションによる好中球表面の PSGL-1 のキャップ形成  
透析膜とのインキュベーションによる好中球側の変化を調べるため、血液と透析膜をインキュベーションした際の好中球表面の PSGL-1 の分布変化を調べた。その結果 PS 膜とのインキュベーションにより好中球表面の PSGL-1 が細胞表面の一箇所に集積 (キャップ形成) することが明らかになった。

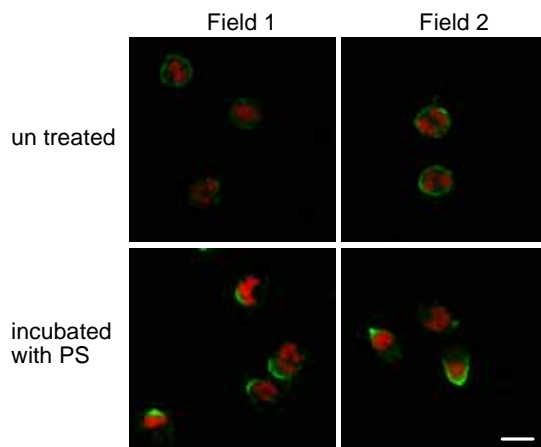


図 3 透析膜とのインキュベーションによる好中球表面の PSGL-1 のキャップ形成

この現象はあらかじめ透析膜とインキュベーションした血漿によっても誘導されることや、

RC 膜など補体活性化能の高い膜と血漿をインキュベートした際に強く誘導されること、アナフィラトキシン C5a 受容体のアンタゴニストで抑制されることから、透析膜との接触によって補体系が活性化され、それに伴って生じた C5a が好中球表面の PSGL-1 のキャップ形成を誘導していることが示された。我々は以前に、PSGL-1 のキャップ形成が低濃度のケモカインなどで誘導され、これが好中球と血小板の複合体形成や、PSGL-1 が教示の好中球からの活性酸素産生を増強することを報告している (Itoh et al., J Leukoc Biol. 2007)。透析膜処理血漿も同様に好中球血小板の複合体形成を促進したことから血液透析の際にも同様のメカニズムで好中球血小板複合体形成と活性酸素産生の促進が起きていると考えられた (Itoh et al., Biomaterials. 2008)

### 薬剤による血液透析時の血液細胞間相互作用の低減の試み

前述の結果より血液細胞間相互作用を妨害することにより長期透析合併症の予防ができる可能性が考えられた。トコフェロールは血小板の P-セレクトリン発現を抑制することが、グリチルリチンは P-セレクトリン - PSGL-1 相互作用を妨害することが報告されている。これらの透析膜による血小板活性化、好中球 血小板複合体形成、好中球の活性酸素産生に対する作用を検討した。その結果、トコフェロールは透析膜による P-セレクトリン発現を抑制することにより、グリチルリチンは P-セレクトリン依存性細胞接着を抑制することにより、透析膜と血液をインキュベーションした際の好中球 血小板複合体形成、好中球からの活性酸素産生を抑制することが示された。

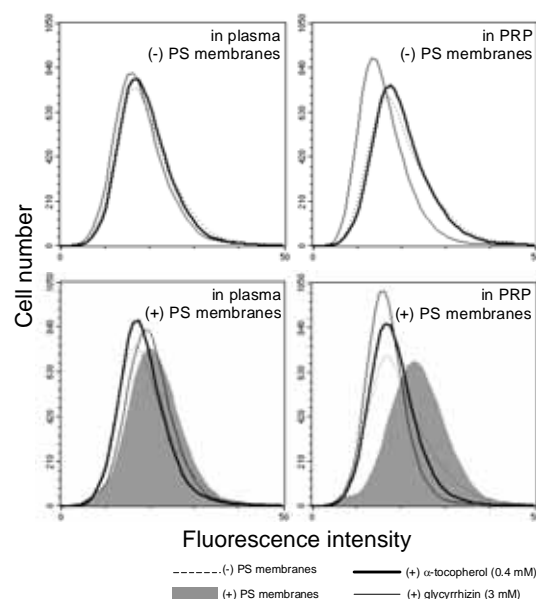


図4 トコフェロール, グリチルリチンによる透析膜誘導性の好中球活性酸素産生の抑制

したがって両薬剤は血液透析時の血液細胞間相互作用を介した白血球活性化を低減し, 現在使用されている透析膜の生体適合性を向上させ長期透析合併症を予防できる可能性が示された(Takeshita et al., Int J Artif Organs 2009) .

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1 . Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway.

Itoh S, Hamada E, Kamoshida G, Yokoyama R, Takii T, Onozaki K, Tsuji T.

Mol Immunol. 2010 47(4):932-938.

2 . Preventive effect of alpha-tocopherol and glycyrrhizin against platelet-neutrophil complex formation induced by hemodialysis membranes.

Takeshita K, Susuki C, Itoh S, Tsuji T.

Int J Artif Organs. 2009 32(5):282-290

3 . Redistribution of P-selectin ligands on neutrophil cell membranes and the formation of platelet-neutrophil complex induced by hemodialysis membranes.

Itoh S, Takeshita K, Susuki C, Shige-Eda K, Tsuji T.

Biomaterials. 2008 29(21):3084-3090.

4 . Changes in adhesive and migratory characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) cells induced by expression of alpha3beta1 integrin.

Mizuno H, Ogura M, Saito Y, Sekine W, Sano R, Gotou T, Oku T, Itoh S, Katabami K, Tsuji T.

Biochim Biophys Acta. 2008 1780 (3):564-570.

5 . Redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) in chemokine-treated neutrophils: a role of lipid microdomains.

Itoh S, Susuki C, Takeshita K, Nagata K, Tsuji T.

J Leukoc Biol. 2007 1(6):1414-1421.

[学会発表](計4件)

1 . 血液透析膜による P-セレクトリン依存的な血液細胞の活性化と薬物による抑制

伊藤佐生智, 竹下佳奈, 辻勉(星薬大)

日本薬学会第128年会 . 2008年3月27日横

浜

2 .The redistribution of P-selectin ligand-1 in neutrophils: A role in neutrophil activation and platelet-neutrophil complex formation

Itoh S, Shigeeda K, Takeshita K, Tsuji T.

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 2007年12月11-15日 横浜

3 . 血液透析膜によって誘導される血小板白血球相互作用と薬物による制御

竹下佳奈, 伊藤佐生智, 辻勉

第51回日本薬学会関東支部大会 2007年10月6日 東京

4 . 血液透析膜による血液細胞の活性化～血小板好中球複合体の薬物による制御～

竹下佳奈, 伊藤 佐生智, 辻勉

第8回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2007年6月7-8日金沢

[図書](計1件)

伊藤 佐生智, 辻 勉 東京医学社

透析膜の生体適合性, 2010, p48 - 57

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 佐生智 (ITOH SAOTOMO)

名古屋市立大学大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70308013

(2)研究分担者  
なし

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし

研究者番号：