

氏名	古賀 陽子		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9 4 5 6 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Effects of Hemodialysis Membranes on Activation of Blood Cells (血液透析膜の血球活性化に与える影響に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	徳永 幸彦
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹

論 文 の 要 旨

慢性腎臓病は糸球体腎炎などの腎臓病や生活習慣病によって慢性的に腎臓の障害が続いている病態であり、悪化すると腎機能が正常の30%ほどに低下した慢性腎不全となる。慢性腎不全では腎機能の回復は見込めないため、血液透析などの腎代替療法が必要となる。血液透析は、患者の血液を人工腎臓内で透析膜と接触させ、水分や尿毒素を血液から除去し血液を浄化する治療法である。血液透析は血液浄化の効果の他にも生体に様々な影響を与えることが知られており、その1つに膜との接触による血球の活性化、特に、血小板と白血球の活性化がある。血小板は活性化に伴い付着性が高まるが、血液透析では膜への血小板の付着や血中の血小板数の低下が報告されている。疫学的には、透析患者の血小板数が低くなると、死亡の相対リスクが増加することが報告されている。一方、白血球は活性化すると活性酸素などの傷害性物質を産生する。透析患者では白血球の活性酸素産生量や酸化ストレスマーカーの増加が報告されており、血管機能障害や心血管疾患の発症に関与する可能性が考えられている。しかし、血液透析における血小板や白血球の活性化における生物学的な理解は乏しい。そこで著者は、市販されている5種類の血液透析膜（NV-U膜、CX-U膜、APS-SA膜、PES-SEæco膜、FX-Cordiax膜）を用いて、血液透析膜が血小板と白血球の活性化に与える影響を解析した。

その結果、CX-U膜では内膜表面上に多数の血小板が顕著な伸展を伴って付着したが、NV-U膜では血小板の付着数は極わずかであり、付着血小板の形態変化もほとんど認めないことが分かった。さらに、APS-SA膜、PES-SEæco膜、FX-Cordiax膜では、NV-U膜よりも多く、CX-U膜よりも少ない血小板の付着と形態変化が認められたが、APS-SA膜は残りの2種の膜と比較して軽度であった。以上より、今回検討した5種の膜は、血小板の活性化に与える影響が異なることが明らかとなった。次に著者は、接着分子の阻害抗体や接着分子リガンドの結合配列（RGD）由来のペプチドを用いて膜の種類によって血小板活性化が大きく異なる原因を解析した。CX-U膜への血小板の付着は抗GPIIb/IIIa抗体およびGRGDSPペプチドにより抑制されたが、抗GPIIa抗体あるいは抗GPIb抗体の影響をほとんど受けなかった。また、NV-U膜への血小板付着も抗GPIIb/IIIa

抗体およびGRGDSPペプチドにより抑制された。これらの結果から著者は、血小板はGPIIb/IIIaとRGD配列を有するリガンドの相互作用を介して膜に付着すること、また2種の膜への付着介在分子は同一であるにも関わらず、血小板の活性化の程度が異なると結論した。

次に著者は、透析膜の種類が好中球の活性化に与える影響を明らかにするため、好中球の活性型CD11b発現量および活性酸素の産生を解析した。その結果、CX-U膜では好中球の活性型CD11b発現量と活性酸素産生量が有意に増加し、他の3種の膜は有意な活性型CD11b発現量増加と活性酸素産生の増加が認められるものの、その程度はNV-U膜とCX-U膜の間であった。そこで著者は、接着分子の阻害抗体とGRGDSPペプチドを用いて好中球の活性化機構詳細検討した。その結果、CX-U膜による好中球活性化は、抗CD11b (Mac-1の α 鎖) 抗体あるいは抗 α v β 3抗体により部分的に抑制され、また抗CD11b抗体と抗 α v β 3抗体の併用、あるいはGRGDSPペプチドにより大部分が抑制された。NV-U膜による好中球の活性化についてもCX-U膜とほぼ同様の結果であった。したがって、Mac-1、 α v β 3とRGD配列を有するリガンドの相互作用を介して好中球は活性化しており、その過程ではMac-1などの接着分子を介して一時的に膜に付着している可能性が考えられた。さらに2つの膜による好中球活性化の介在分子は同一であるにも関わらず、好中球活性化の程度が異なることがわかったため、透析膜に付着するフィブリノーゲンの膜への吸着量を解析した。その結果、フィブリノーゲン吸着量は、CX-U膜が最も多く、次いでFX-Cordiax、PES-SE α eco、APS-SAの順に多く、NV-U膜は最も吸着量が少なかった。またフィブリノーゲン吸着量は、血小板の付着量や好中球の活性酸素産生量と有意に正の関係性が認められた。これらの結果から著者は、膜への血漿由来のフィブリノーゲン吸着量は血小板や好中球の活性化の規定因子の1つであることを見出した。

先行研究において透析患者では血球間相互作用により形成される血球複合体が増加することが報告されている。そこで著者は、これまでの結果をもとに血球の活性化が最も大きいCX-U膜と最も小さいNV-U膜を代表的な膜として用いて血球間相互作用を検討した。その結果、CX-U膜は血小板と好中球の複合体形成を促進したが、NV-U膜は複合体の形成にほとんど影響を与えなかった。さらに、膜と血小板それぞれが好中球の活性化に与える影響を検討するため、血小板の共存なし、あるいは共存ありの条件下で膜による好中球活性化を検討した。その結果、CX-U膜では、膜が好中球の活性化を増加させ、それが血小板の共存によりさらに増強した。NV-U膜では、膜による好中球活性化は認められず、また血小板共存の影響もなかった。したがって、CX-U膜は単独で好中球を活性化し、血小板によりさらに好中球活性化が増強されるが、NV-U膜は血小板の有無に関わらずほとんど好中球の活性化に影響しないことが示された。

審 査 の 要 旨

著者は、血液透析治療において問題となっている血球細胞の活性化を理解するために細胞生物学的ならびに分子生物学的な実験系を構築し、血液透析膜が血小板と白血球の活性化に与える影響を詳細解析した。その結果、透析膜に吸着したフィブリノーゲンが血球細胞の活性化の初期原因となり、GPIIb/IIIaを介した血小板の活性化、および、Mac-1と α v β 3を介した好中球の活性化をそれぞれ引き起こし、さらに、活性化した血小板と好中球は血球間相互作用を促進し、血球複合体の形成や好中球活性化の増強をもたらすことを見出した。本研究の成果は、血液透析治療における血球細胞の活性化機構の生物学的な理解から、血液透析治療において血球活性化を惹起しない透析膜を開発するための指針を提示している。総じて、本研究は生物科学領域において独創性に秀でており、学術的な価値が極めて高いと評価された。

令和2年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(生物科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。