

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：透析医療用 CPP 吸着カラムの開発

Development of CPP adsorption columns for hemodialysis

研究開発実施期間：2017年10月12日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：黒尾 誠

Makoto Kuro-o

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

学校法人自治医科大学 分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部 教授

Professor, Division of Anti-aging Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University

II 研究開発の概要

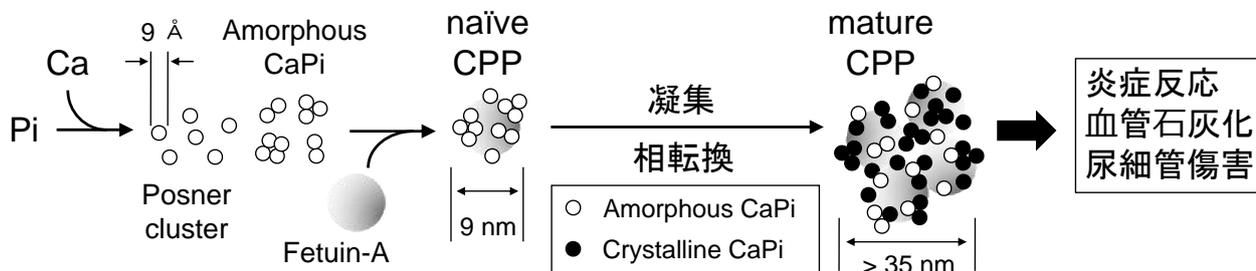
FGF23-Klotho 内分泌系の発見：本研究開発は今から 30 年程前、研究代表者が「早老症を呈する突然変異マウス」を発見し、原因遺伝子を同定したことに端を発する(1)。ギリシャ神話の「生命の糸を紡ぐ女神」の名に因んで **Klotho** と命名したその遺伝子は、欠損すると成長障害、多臓器（性腺、胸腺、皮膚など）の萎縮、血管石灰化を主体とする動脈硬化、心肥大、サルコペニア、骨量減少、認知症など、多彩な老化類似の表現型を呈し、フレイルの状態となって早死にする。その後の研究代表者の研究で、**Klotho** 遺伝子は **FGF23** というホルモンの受容体をコードすることが分かった(2)。**FGF23** (fibroblast growth factor-23) とは、リンを摂取すると骨から分泌されるホルモンで、腎臓に発現する **Klotho** 受容体に結合すると、尿細管におけるリン再吸収を抑制し、尿中リン排泄量を増やす。この **FGF23-Klotho** 内分泌系はリン恒常性維持に必須であり、**Klotho** 欠損マウスは早老症の他、尿中リン排泄障害のために体にリンが貯留し、高リン血症を呈する。しかし、低リン食を与えてリン貯留を是正すれば早老症も完治する。すなわち、**Klotho** 欠損マウスの早老症の原因はリン恒常性の破綻であったことが判明し、「リンが老化を加速する」という概念に至った。

リンが老化を加速するメカニズム：リンが老化を加速するメカニズムとして、我々は「CPP 病原体説」を提唱してきた(3-6)。すなわち「老化を加速する原因物質は、リン濃度上昇の結果として血中や原尿中に形成される CPP であり、CPP が慢性炎症と細胞障害を引き起こして老化を加速する真犯人である」という仮説である。研究代表者は、X 線小角散乱 (SAXS)、動的光散乱 (DLS)、ナノ粒子トラッキング (NTA) などの技術を用いて CPP の形成過程を詳細に検討した (図1)。リン酸カルシウムの最小単位は $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ の化学式で示される直径 9Å の粒子 (Posner cluster) である。これが凝集して非晶質 (amorphous) のリン酸カルシウムへと成長するが、Fetuin-A に吸着されると成長が止まる。その結果、Fetuin-A 一分子に非晶質リン酸カルシウムが付着した粒子径約 9 nm の CPP (naïve CPP) が形成される。naïve CPP は時間の経過とともに凝集したり、非晶質リン酸カルシウ

ムが結晶へ相転換を起こしたりすると、粒子径 35 nm 超の mature CPP へと自発的に変化し (Akiyama K *et al.* Regulation of fibroblast growth factor-23 expression in osteoblasts by calciprotein particles. *Kidney Int in press*)、細胞傷害や炎症反応を誘導する活性を獲得する。

図 1 : CPP の形成過程。

血中 CPP と動脈硬化：最近、血中 CPP が上昇する疾患が同定された。慢性腎臓病である。「腎障害が 3 ヶ月以上継続した状態」と定義される。腎障害の原因は問わないが、慢性糸球体腎炎や嚢胞腎などの腎疾患だけでなく、



高血圧や糖尿病など腎合併症を来す疾患が原因となる場合が多く、本邦では約 1,500 万人 (成人 8 人に 1 人) が患う国民病である。進行して腎不全に至れば、透析か腎移植が必要となる。腎移植例が少ない本邦では血液透析への依存が突出しており、血液透析患者数は現在 33 万人、その直接費用だけで 1.5 兆円の医療費が支出されている。慢性腎臓病患者の主な死因は心血管合併症であり、その危険因子として血管石灰化が同定されている。慢性腎臓病患者において、血中 CPP 値が血管石灰化による動脈硬化や慢性炎症の臨床指標 (冠動脈石灰化スコア、大動脈脈波速度、hs-CRP など) と相関することが報告された。動脈硬化には、粥状硬化と血管石灰化という二つの異なる病態が存在する。粥状硬化の治療標的はリポ蛋白 (LDL) であり、スタチンが治療薬として確立しているのに対し、血管石灰化については治療標的や有効な治療薬も確立していない。どちらの病態も、血管内皮機能障害と非感染性慢性炎症を基盤病態とする。CPP の病理作用を考えると、臨床研究で認められた血中 CPP と血管石灰化・慢性炎症との相関関係は因果関係の可能性がある。すなわち、CPP が血管石灰化や慢性炎症を引き起こす「病原体」である、という仮説が「CPP 病原体説」である。

CPP 病原体説の概念実証： CPP 病原体説を証明するためには、血中から何らかの方法で CPP を除去し、血管石灰化が改善することを示せば良い。一般に、腎不全で血液透析を受けている患者は血中 CPP が非常に高値で、血管石灰化が予後悪化因子に同定されている。したがって「CPP 吸着カラム」を開発して血中から CPP を吸着除去すると血管石灰化が改善するか、検証することを考えた。この構想を (株) カネカに提案し、CPP 吸着カラムを共同で開発した。(株) カネカは、透析アミロイドーシス (β2 ミクログロブリンを前駆蛋白とするアミロイドが関節や血管などに沈着して多彩な骨関節症や臓器障害を引き起こす透析合併症) の治療に現在広く使われている β2-ミクログロブリン吸着カラム (商品名リクセル) を開発・製品化した実績のある企業で、吸着カラムのノウハウを蓄積しており、治験の経験もある。(株) カネカと共同開発した CPP 吸着カラムを用いて、「CPP 病原体説」を証明するための前臨床試験を行った。

日本バイオリサーチセンター (株) のミニブタ施設 (静岡県修善寺) にて、ミニブタ (NIBS、8 ヶ月♂) の両腎を摘出して腎不全を導入し、翌々日から下表の条件で血液透析を行った。透析時に毎回 CPP 吸着カラムを使用する「実験群」と、使用しない「対照群」の 2 群を設定した。Day 0 (腎摘前)、2, 6, 14, 22, 28 に採血し、血液学的検査 (血算) を行い、血清・ヘパリン血漿を分離して凍結保存した。試験終了日 (Day 28) には全身麻酔下で心エコー検査を行って心機能を、冠動脈造影と血管内超音波 (IVUS) を行って血管石灰化を評価した。さらに剖検を行い、心臓と血管 (大動脈、冠動脈、頸動脈、腸骨動脈) と肺を採取した。冠動脈左回旋枝の一部は血管内皮機能検査 (マグヌス試験) に使用した。他の組織は、ホルマリン固定・パラフィン包埋後薄切し、HE 染色および von Kossa 染色で病理組織検査を行った。ホルマリン固定後の心臓と肺を CT 撮影し、石灰化を描出し

た。血清・血漿の解析は自治医大で行った。一般生化学（クレアチニン、BUN、リン、カルシウムなど）、ホルモン（PTH、活性型ビタミンDなど）を測定した（図2）。

透析装置	個人用透析装置(ニプロ)
透析液	AKソリタFL
透析回路	シュワーフローN(ニプロ)
血液流量	150 ml/min
透析流量	300 ml/min
透析間隔	2日に1回
透析期間	28日

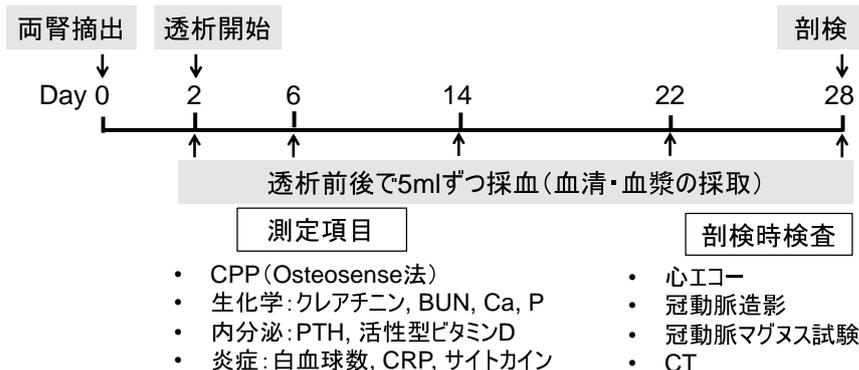


図2：実験のデザイン

現在、本研究についての原著論文を執筆中なので、結果の詳細は公開できない。

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390(6655): 45-51. 1997.
2. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 281(10): 6120-3. 2006.
3. Kuro-o M. Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 9(11): 650-60. 2013.
4. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol* 75:503-33. 2013.
5. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 15(1): 27-44. 2019.
6. Stenvinkel P, Painer J, Kuro-o M, Lanaspa M, Arnold W, Ruf T, Shiels PG, Johnson RJ. Novel treatment strategies for chronic kidney disease: insights from the animal kingdom. *Nat Rev Nephrol* 14(4): 265-84. 2018.

During the evolution of skeletons, terrestrial vertebrates acquired the bone made of calcium-phosphate. By keeping the extracellular fluid in a supersaturated condition regarding calcium and phosphate ions, they create the bone when and where they want simply by providing a cue for precipitation. To secure this strategy, they acquired a new endocrine system to strictly control the extracellular phosphate concentration. In response to phosphate intake, fibroblast growth factor-23 (FGF23) is secreted from the bone and acts on the kidney through binding to its receptor Klotho to increase urinary phosphate excretion, thereby maintaining phosphate homeostasis. The FGF23-Klotho endocrine system, when disrupted, results in hyperphosphatemia and ectopic calcium-phosphate precipitation in mice and humans.

In addition to disturbed phosphate homeostasis, mice lacking Klotho suffer from premature aging. They exhibit multiple organ atrophy, arteriosclerosis, cardiac hypertrophy, sarcopenia, cognition impairment, frailty, and a shortened lifespan associated with chronic non-infectious inflammation, which are a phenocopy of patients with renal failure. It was recently reported that patients with renal failure undergoing hemodialysis bear colloidal nanoparticles containing calcium-phosphate in the blood, which are termed calciprotein particles (CPP) (**Fig. 1**). It was also reported that blood CPP levels correlated with severity of vascular calcification and chronic non-infectious inflammation.

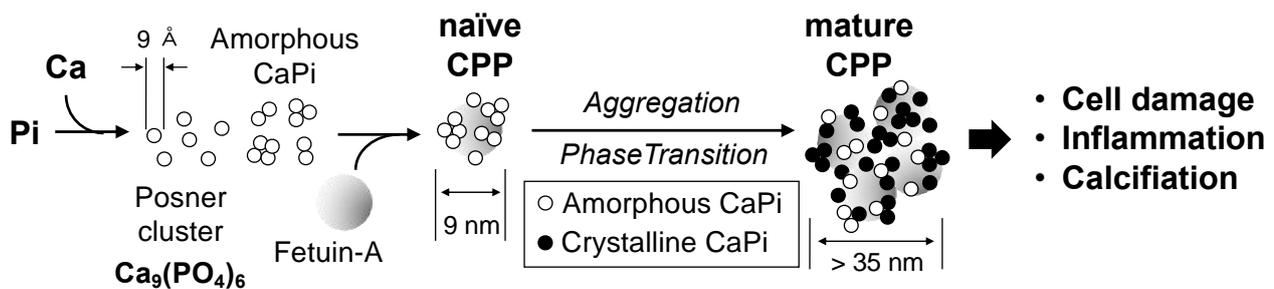


Figure 1: Formation of CPP. The smallest calcium phosphate precipitates (CaPi) are termed Posner clusters. Posner clusters aggregate and form amorphous CaPi, which are adsorbed by serum protein fetuin-A to become naïve CPP. Naïve CPP aggregate and undergo transition from the amorphous phase to the crystalline phase to become mature CPP.

Considering the fact that CPP have the ability to induce cell damage, inflammation, and calcification in vascular endothelial cells, macrophages, and vascular smooth muscle cells in culture, we hypothesized that CPP might be responsible for vascular calcification in hemodialysis patients. To test this hypothesis, we developed a CPP adsorption column in collaboration with Kaneka Co. Ltd. to remove CPP from the blood. We applied the CPP adsorption column to a mini-pig hemodialysis model and determined whether it might exert any therapeutic effects on vascular calcification. At this moment, we are unable to disclose the results because we have not published them yet.

III 事後評価総合所見

これまでの臨床研究で、血中 CPP レベルと動脈硬化の相関が認められたことにより、ミニブタ血液透析モデルを用いて CPP 吸着カラムの有効性を検証する試みは意義があると考えられます。

有効性の検証には多くの動物実験が必要であろう事等の懸念がありますが、将来、本技術の早期社会実装が実現することを期待します。