

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 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 透析医療用 CPP 吸着カラムの臨床応用
(英語) Clinical application of CPP adsorption column to hemodialysis

研究開発実施期間: 令和2年9月2日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 黒尾 誠
(英語) Makoto Kuro-o

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 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
(英語) Professor, Division of Anti-aging Medicine, Center for Molecular Medicine,
Jichi Medical University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

CPP (Calciprotein particle) とは、不溶性のリン酸カルシウムを吸着した血清蛋白 Fetuin-A の凝集体である。血中にコロイド粒子として分散している。CPP は、食事で摂取したリンとカルシウムを骨へ運ぶ血中の担体として、また、リン利尿ホルモン FGF23 の産生刺激として生理的に機能すると考えられているが、CPP に関する研究は世界的に見ても緒に就いたばかりであり、CPP に起因する生命現象の全貌は不明な点が多い。しかし、これまでの研究で、CPP が骨ミネラル化やリン恒常性維持などの生理機能に重要な役割を果たすと同時に、慢性炎症を基盤病態とする老化や生活習慣病、特に慢性腎臓病とその致命的合併症である血管石灰化の原因物質であることが明らかになりつつある (Kuro-o M. Phosphate as a pathogen of arteriosclerosis and aging. *J Atheroscl Thromb* 2021; 28:203-213)。

我々は、コロイド物理学の手法を用いて CPP の形成・成熟過程を明らかにした。血中のリンとカルシウムは過飽和の状態であり、リン濃度が上昇すると、まず非晶質 (結晶構造をとらない) リン酸カルシウムが析出する。非晶質リン酸カルシウムは速やかに Fetuin-A 蛋白に吸着され、成長が止まる。その結果、微小な非晶質リン酸カルシウムを吸着した Fetuin-A 分子が形成される。これが最初に形成される CPP で、Fetuin-A が一分子で構成されていることから、特に calciprotein monomer (CPM) と呼ばれている。CPM は粒子径が 9 nm 程であるが、時間の経過とともに相互に凝集し、さらにリン酸カルシウムが非晶質から結晶へと

相転移を起こして、粒子径 35 nm 超の多分散粒子へと成熟していく。リン酸カルシウムが相転移を起こしていない（つまり、リン酸カルシウムが全て非晶質の）CPP を primary CPP (CPP1)、相転移を起こしている（つまり、リン酸カルシウム結晶を含む）CPP を secondary CPP (CPP2) と呼んで区別している。これは、CPP1 と CPP2 とでは、コロイド物性だけでなく生物学的活性が大きく異なるからである。CPP1 と CPP2 は、あたかも病原体のように Toll 様受容体を介して培養マクロファージに自然免疫反応を誘導する活性がある。さらに CPP2 には、培養血管平滑筋細胞に石灰化を誘導する活性がある。

血中 CPP の定量法として、最初に報告されたのは以下のような方法である。まず血清の Fetuin-A 濃度を ELISA で測定する。次に血清を 16,000g で 2 時間遠心して CPP を沈殿させた後、上清中の Fetuin-A 濃度を測定する。遠心前後の Fetuin-A の濃度差をもって CPP の量に代替する、という方法である。この「Fetuin-A 法」には二つの原理的な限界がある。第一に、16,000g で 2 時間遠心しても沈澱しない低密度の CPP が存在するなら、それは測定できていないことになる。第二に、遠心前後の Fetuin-A の濃度差が小さい場合（ELISA の %CV 値に近い場合）誤差が大きくなる。これらの限界を克服するために我々は、血漿／血清中の CPP2 の新たな定量法を開発した。血漿／血清サンプルにリン酸カルシウム結晶に結合する蛍光プローブ（近赤外線蛍光色素で標識したビスホスホネート）を加えると、CPP2 にプローブが結合する。CPP2 に結合しなかった余分なフリーのプローブをゲル濾過スピンカラムで除去し、flow-through 画分の蛍光強度を測定して CPP2 を定量する、という方法である（特許第 6566697 号）。

この「ゲル濾過法」や「Fetuin-A 法」を用いて、血中 CPP に関する臨床研究が行われてきた。その結果、血中 CPP 値を規定する独立した因子として血清リン値が同定された（血清リン値が高いほど CPP 値も高い）。さらに、血中 CPP 値は血管石灰化（冠動脈石灰化スコア）や動脈の硬さ（大動脈脈波速度）や慢性炎症（高感度 CRP）などと相関すること、CPP 高値は心血管イベントの危険因子であることなどが明らかとなった。CPP の *in vitro* での活性を考えると、これら臨床研究で観察された相関関係は、実は因果関係であるという仮説が成り立つ。すなわち、CPP が血管石灰化や慢性炎症の原因物質（病原体）である、という仮説である。我々はこの仮説を「CPP 病原体説」として提唱してきた。

CPP 病原体説を検証するため、我々は「CPP 吸着カラム」を開発した。このカラムは、血液透析回路に直列に接続して患者の血中から物理的に CPP を吸着除去するデバイスである。CPP 吸着カラムを使用することで血液透析患者の血管石灰化や慢性炎症が抑制されて予後が改善すれば、CPP 病原体説が証明されたことになる。

CPP 吸着カラムの安全性と有効性を検証するため、まずミニブタ血液透析モデルを用いた非臨床試験を行った。ミニブタの両腎を摘出して腎不全を導入後、血液透析を隔日に実施した。透析患者に用いるのと同じ透析装置、ダイヤライザー、透析液を使って 4 週間維持すると、透析患者と同様に血管石灰化、心肥大、転移性肺石灰化、慢性炎症などの合併症を呈する。このミニブタ血液透析モデルに対して CPP 吸着カラムまたは対照カラム（CPP 吸着能のない同容量のカラム）を使用し、合併症を比較した。この実験の結果は英文原著論文にまとめて投稿中であるため、詳細をここで開示することはできないが、CPP 吸着カラム使用群では対照カラム使用群と比較して合併症が劇的に改善することを確認した。

この非臨床試験の成功を受けて、血液透析患者を対象とした臨床試験の準備を開始した。CPP 吸着カラムの詳細設計を決定し、GLP 生物学的安全性試験と PMDA 相談を実施、さらに CPP 吸着カラムの工場製造ラインを確立した。

臨床試験は、まず CPP 吸着カラムの安全性の確認および治療効果が最も顕著に認められる臨床指標の同定を目的とした探索的臨床試験（パイロット試験）を実施し、次にパイロット試験で同定した臨床指標を主要評価項目とした検証的臨床試験（ピボタル試験）を実施する計画とした。

パイロット試験について PMDA 相談を重ねた結果、以下のプロトコールで実施することが決まった。

- 患者選択基準：既存の治療（リン制限の食事療法およびリン吸着薬 2 剤以上の投与）では、血清リン

値が日本透析医学会の診療ガイドラインで推奨される目標（6.0 mg/dL 以下）を達成できない維持血液透析患者。

- 治験デザイン：多施設共同無作為化 2 群オープン試験。
- 治験期間：6 ヶ月。
- 目標症例数：治療群（CPP 吸着カラムを毎回使用）20 例、対照群（通常の血液透析）20 例。
- 主要評価項目：安全性および血清リン値（治療前および対照群より低下）。CPP 吸着カラムの治験における主要評価項目は学術上は本来、血清 CPP 値であるべきだが、血清 CPP の測定は未だ研究段階であり、臨床検査として確立しているとは言えず、基準値なども確定していないため、治験の主要評価項目とするのは相応しくない、と判断された。そこで、血清 CPP 値の代替指標として血清リン値を主要評価項目とすることとした。慢性腎臓病患者を対象とした我々の観察研究によれば、血清 CPP 値と血清リン値は強い正相関を示し、血清リン値が血清 CPP 値の独立した規定因子であることがわかっているからである。
- 副次評価項目：心臓超音波検査と CT と CAVI による血管石灰化、血管の硬さ、大動脈弁石灰化、心肥大の指標の推移（画像診断に関しては評価委員会を設置）、血清 CPP 値の推移、痒みスコアの推移。

2022 年 7 月 26 日に First Patient In、11 月中に目標症例数に達した。したがって、2023 年 5 月にはパイロット試験が終了する予定である。その後は、ピボタル試験を実施し、薬事承認・保険償還を目指す。

上述したように、我々は既に血中 CPP の定量法として「ゲル濾過法」を確立している（特許第 6566697 号）。本研究開発では、CPP の「量」だけでなく「質」、すなわちコロイド物性の測定法の開発にも成功した。同じ量の CPP でもコロイド物性が異なれば、その生理作用は大きく異なる。合成 CPP を用いた細胞レベルの実験で我々は、1) 粒子径 (= CPP の凝集の進行度)、2) ミネラル: 蛋白比 (= Fetuin-A 一分子あたりのリン酸カルシウム吸着量)、3) 結晶: 非晶質比 (= リン酸カルシウムの相転移の進行度) が大きいほど、CPP の病原活性（細胞傷害や炎症反応や石灰化を誘導する活性）が強いことを見出した。本研究開発では、これら合成 CPP の物性測定系を臨床検体にも適用できるように最適化し、臨床検査として使えるレベルにまで実用化した。

1) 粒子径の測定法: 未発表の新しい方法なので、詳細はここでは開示できないが、ナノ粒子追跡法と呼ばれるコロイド物理学的方法を用いて、CPP の粒度分布（粒子径のヒストグラム）を測定することに成功した。

2) ミネラル: 蛋白比の測定法: ビスホスホネートを固相化したマグネティック・ビーズを用いて、血漿/血清サンプルから CPP を pull-down した後、ビーズを EDTA で処理してリン酸カルシウムを溶解することで CPP の蛋白成分を溶出する。溶出液中の蛋白量を紫外吸収法などで測定し、あらかじめゲル濾過法で測定しておいた CPP 中のリン酸カルシウム結晶の量との比をと計算することに成功した。

3) 結晶: 非晶質比の測定法: 血漿/血清サンプルを 25°C で 24 時間インキュベートすると、CPP 中の非晶質リン酸カルシウムがリン酸カルシウム結晶へと相転移を起こす。ゲル濾過法は、CPP 中のリン酸カルシウム結晶の量を測定する方法なので、インキュベート前後でゲル濾過法を用いて CPP 量を測定すれば、その差がサンプル中に存在していた非晶質リン酸カルシウムの量を反映することになる。一方、インキュベート前の測定値はサンプル中にもともと存在していたリン酸カルシウム結晶の量を反映するので、結晶: 非晶質比が計算できる。この方法を用いて、血液透析患者 183 例の血清サンプル中の CPP の結晶: 非晶質比を測定した。結晶: 非晶質比が低い患者ほどヘモグロビン値が高く、血清 FGF21 値が低いことが分かった。血液透析患者では、ヘモグロビン低値と FGF21 高値は予後悪化因子であることが報告されている。したがって今回の結果は、結晶: 非晶質比が低いほど予後が良い可能性を示している。CPP の「量」だけでなく「質」も血液透析患者の予後を規定する、という仮説を支持するデータと考えられる。この知見は英文原著論文として発表した (Nakamura K, Isoyama N, Nakayama Y et al. Association between amorphous calcium-phosphate ratios in circulating calciprotein particles and prognostic biomarkers in hemodialysis patients. *Sci Rep* 2022; 12:13030)。

本邦の血液透析患者数は約 33 万人であり、そのうち血清リン値が 6.0 mg/dL を超えている患者は、およそ 4 人に

1人程度(8万人)と見積もられている。さらに世界では透析患者は300万人を超えたと見積もられており、CPP吸着カラムの潜在的需要は非常に大きいと考えられる。現在進行中の臨床治験でCPP吸着カラムの安全性と有効性が証明されれば、世界中の血液透析患者の予後改善に貢献できるものと期待される。

Calciprotein particles (CPP) are colloidal mineral-protein complexes mainly composed of solid-phase calcium-phosphate and serum protein fetuin-A. CPP appear in the blood upon dietary phosphate intake. We and others have clarified the process of CPP formation and maturation. Because the blood is a super-saturated solution regarding calcium and phosphate ions, a postprandial increase in the serum phosphate concentration triggers precipitation of amorphous calcium-phosphate. These precipitates are immediately adsorbed by fetuin-A and prevented from further growth. Consequently, single fetuin-A molecules laden with tiny amorphous calcium-phosphate are generated. These molecules are the most primitive form of CPP and specifically called calciprotein monomers (CPM). CPM are nanoparticles with a diameter around 9 nm and filtrated through glomeruli to be cleared from the blood. However, the postprandial increase in CPM is enhanced and prolonged as decline of glomerular filtration rate in CKD patients, facilitating self-aggregation of CPM and formation of primary CPP (CPP1) with a diameter of ~35 nm. Primary CPP mature into secondary CPP (CPP2) when calcium-phosphate in primary CPP undergoes amorphous-to-crystalline phase transition. The formation of CPM and the maturation of CPM into primary CPP and secondary CPP are not a biological process but a thermodynamical process that progresses spontaneously over time.

Recent studies have indicated that secondary CPP induce calcification when applied to cultured vascular smooth muscle cells and innate immune responses when applied to cultured macrophages. In addition, accumulating evidence in clinical studies has demonstrated that blood CPP levels are increased with decline of renal function and associated with complications of chronic kidney disease (CKD), including vascular calcification, arterial stiffness, chronic inflammation, cardiovascular events, and high mortality. These observations have led us to hypothesize that secondary CPP may be a causative agent of CKD complications. To test this hypothesis, we have developed a column that adsorbs secondary CPP. In general, end-stage renal disease patients receiving hemodialysis have high blood CPP levels and suffer from chronic inflammation and high mortality due to cardiovascular complications. Therefore, we have decided to prove the hypothesis by showing that clinical outcomes of hemodialysis patients are improved when secondary CPP are removed from the blood by inserting the CPP adsorption column into the hemodialysis circuit.

Before proceeding to a clinical trial of the CPP adsorption column, we performed a pre-clinical study using a miniature pig hemodialysis model. Briefly, miniature pigs were subjected to bilateral nephrectomy and then maintenance hemodialysis every other day. They were randomly assigned to either the treatment group receiving hemodialysis using the CPP adsorption column or the control group receiving hemodialysis using a control column without the ability to adsorb CPP. We cannot disclose the details of the results here because we have not published them yet, but we observed significant improvement of clinical outcomes in the treatment group when compared with the control group.

Based on the success of the pre-clinical study, we have started a pilot clinical trial to verify the safety of the CPP adsorption column and to identify a clinical parameter(s) on which therapeutic effects of the CPP adsorption column are observed most significantly. Forty hemodialysis patients whose serum

phosphate levels were 6.0 mg/dL or over have been recruited and randomly assigned to either the treatment group using the CPP adsorption column or the control group without using the column (20 patients per group) to be followed up for 6 months. The primary outcome is the serum phosphate level, which correlates with the serum CPP level. The secondary outcomes include the changes in serum CPP levels, itch scores, vascular calcification determined by CT images, and cardiac hypertrophy determined by ultrasound cardiography. The first-patient-in was on July 26th, 2022. As the planned number of patients have been registered by last November, the pilot clinical trial will be done by the end of this May.

Based on results of the pilot clinical trial, we will finalize a protocol for a pivotal clinical trial and aim at obtaining the pharmaceutical approval. If successful, the CPP adsorption column is verified as a novel therapeutic device that improves clinical outcomes of hemodialysis patients and expected to be used worldwide, potentially contributing to elimination of the trade deficit in medical equipment in Japan.

III 事後評価総合所見

CPP が心血管病・慢性炎症の原因物質であるとする仮説に基づく CPP 吸着カラムという新しい概念のもとにチャレンジングな取り組みが進められた。PMDA との最終合意を得て、パイロット試験開始に至ったこと、また、カネカによりカラムの設計・検証と生産体制構築及び将来に向けた改良品の試作を果たしたことは高く評価出来る。

一方、パイロット試験が遅れた事に伴う CPP の「質」や貧血の評価、またミニブタ血液透析モデルでの治療効果確認について課題を残している。社会実装に向けて、更なるデータに基づく明確な結論付けが求められる。

今後、現状の透析治療に対する優位性を明らかにすると共に、製品化に向けた開発を進め、事業化計画に則ってカラムの国内上市及び将来に向けた改良品の実用化が果たされることを期待する。