

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15470

研究課題名(和文) 血液透析の予後改善を目指したCPP吸着カラムの開発

研究課題名(英文) Development of CPP-removing columns for improving prognosis of hemodialysis patients

研究代表者

黒尾 誠 (Kuro-o, Makoto)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10716864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全で透析を受けている患者の血中には、CPPというコロイド粒子が出現する。CPPには自然免疫反応や細胞障害を誘導する活性がある。最近の臨床研究で、血中CPP値が慢性炎症や血管石灰化と相関することが報告され、CPPが透析患者の生命予後を悪化させる原因物質である可能性が示された。本研究ではCPP吸着カラムを作成し、透析回路に接続して血中からCPPを除去すれば、慢性炎症や血管石灰化が治療できることを、ミニブタ血液透析モデルを用いて検証することを目的とした。コストの関係で、実験はミニブタを4頭しか使えず、確定的な結論得られなかったが、CPP吸着カラムの使用で血管内皮機能が改善するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：Calciprotein particles (CPPs) are colloids that appear in the blood of dialysis patients and induce innate immune responses and cell damages. Clinical studies showed that blood CPP levels positively correlated with measures for chronic inflammation and vascular calcification, suggesting that CPPs may be responsible for these complications. Aiming at removing CPPs from the blood during dialysis sessions, we developed a column that captured CPPs and connected it in series with the dialysis circuit. We introduced renal failure to mini-pigs by removing bilateral kidneys and treated them by hemodialysis every other day with or without the column. Due to the insufficient budget, we were able to use only 2 pigs for each group and thus failed to attain significant statistical power. However, preliminary analysis indicated that use of the column improved vascular endothelial function. The CPP-removing column is expected to be a new device that may improve prognosis of dialysis patients.

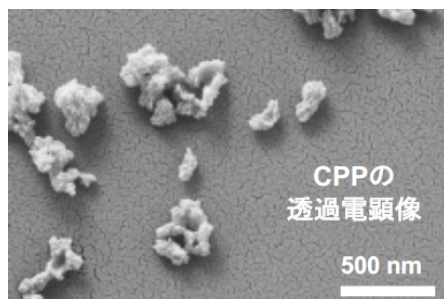
研究分野：腎臓病学

キーワード：血管石灰化 血液透析

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 人口の高齢化に伴い、慢性腎臓病の患者が増加している。慢性腎臓病とは、腎障害が3ヶ月以上持続した状態を指し、その原因は問わないが、高血圧や糖尿病の合併症として、あるいは老化現象の一環として起こる場合が多く、日本人成人の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においては血液透析への依存が突出しており、透析患者数は毎年1万人のペースで増え続け、2011年にはついに30万人を超えた。透析の直接費用だけで1.3兆円、心血管合併症のインパクトも含めると、慢性腎臓病のために全医療費の2割を消費していると見積もられている。慢性腎臓病の進行を抑制し、透析患者の予後を改善することは、現代医療に課せられた喫緊の課題である。

(2) 血液透析患者の血中には、CPPと呼ばれるコロイド粒子が出現する。CPPとはリン酸カルシウムと血清蛋白 Fetuin-A の複合体のことである。一般に哺乳類は、水に溶けない物質を血中に「溶かす」ために、それを蛋白に吸着させ、コロイド粒子にして血中に分散させるという戦略をとる。水に溶けない生体内物質の代表が脂質とリン酸カルシウムである。脂質はアポ蛋白に吸着され、リポ蛋白 (LDL、HDL など) というコロイド粒子となって血中に分散する。同様に、水に溶けないリン酸カルシウムは、Fetuin-A に吸着され、CPP というコロイド粒子となって血中に分散する。脂質とリン酸カルシウムは、最終的には脂肪組織と骨にそれぞれ貯蔵される。しかし何らかの原因で、これらの不溶性物質が本来の貯蔵先ではなく、血管に貯まってしまうと、動脈硬化を引き起こす。すなわち、脂質が血管に貯まると粥状硬化を、リン酸カルシウムが血管に貯まると血管石灰化を引き起こす。しかも CPP には、あたかも「病原体」のように自然免疫反応や細胞障害を誘導する活性があり、透析患者の主な死因である心血管合併症の原因物質と考えられている。



(3) 最近の臨床研究で、血中 CPP レベルが慢性炎症や血管石灰化の重症度と相関することが報告され (Hamano T *et al. J Am Soc Nephrol* 21, 1998, 2010, Smith ER *et al. Nephrol Dial Transplant* 27, 1957, 2012)、CPP が透析患者の生命予後を悪化させる原因物質である可能性が示された。

### 2. 研究の目的

本研究では「CPP 吸着カラム」を作成し、血液透析回路に接続して血中から CPP を除去すれば、慢性炎症や血管石灰化が治療できることを、ミニブタ血液透析モデルを用いて概念実証 (proof-of-concept) する。成功すれば、透析患者の生命予後を大きく改善する新たな治療法の開発につながる可能性がある。

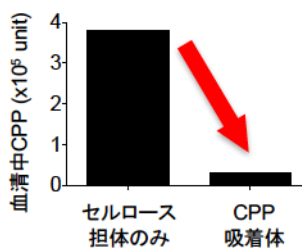
### 3. 研究の方法

#### (1) 血中 CPP 測定法の開発

これまでの臨床研究では、以下の方法で血中 CPP を測定している。①血清の Fetuin-A 濃度を ELISA で測定する。②血清を高速で長時間 (16,000g で 2 時間) 遠心して CPP を沈殿させる。③上清の Fetuin-A 濃度を測定する。④遠心前後の Fetuin-A の濃度差 (= CPP 中の Fetuin-A の量) で CPP 濃度に代用する。この従来法には 2 つの限界がある。まず、CPP 濃度が低いほど遠心前後の Fetuin-A 濃度差が小さくなり、その差がキットの %CV 値 (5% 前後) に近づくと、原理的に測定不能となる。しかも、市販の Fetuin-A 測定キットはヒト用しか信頼できるものがなく、実験動物では CPP が測定できない。これらの限界を克服するため、申請者は、新しい原理に基づく CPP 測定系を開発した。CPP に結合する蛍光プローブを血清に加えた後、ゲル濾過スピンカラムで分画し、CPP を含む高分子量画分の蛍光を定量する、という方法である。CPP のリン酸カルシウム結晶の部分に蛍光プローブで直接検出するため、高感度で、しかも動物種を選ばない (特許申請済)。この新規 CPP 測定法の開発によって、ミニブタ透析モデルを使う実験が初めて可能となった。

#### (2) CPP 吸着カラムの作成 :

CPP に結合する化学物質 (特許申請準備中のため物質名は伏せる) をセルロース担体に結合させ、CPP 吸着体を複数作成した。その中から、*in vitro* で透析患者の血清サンプル中の CPP を最も効率よく除去できる吸着体を選定し、それを用いて CPP 吸着カラムを作成した。



#### (3) ミニブタ血液透析モデルの作成 :

ミニブタ (NIBS、8 ヶ月♂) の両腎を摘出し、腎不全を導入した。翌日から、ヒトに使用するのと同じ透析装置、透析回路、透析液を用いて (下表を参照) 隔日に透析を行い、30 日間維持した。このモデルでは、30 日後には透析患者と同様、心肥大や血管石灰化などの心血管合併症を発症することが確認されている。

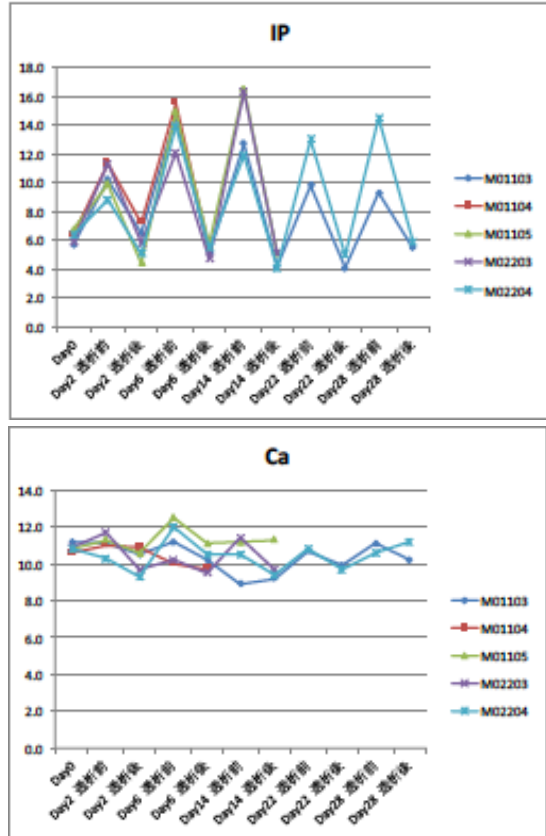
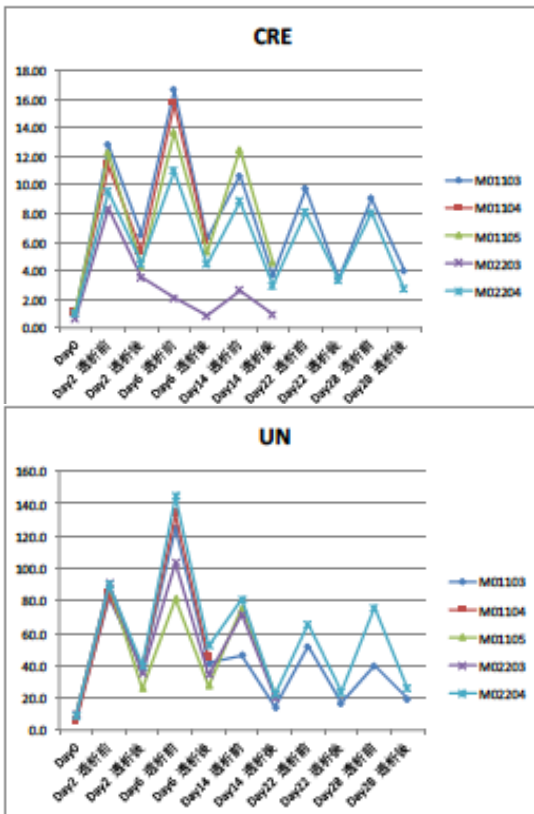
透析装置	個人用透析装置 (ニプロ)
透析液	AKソリタFL
透析回路	シュワーフローN (ニプロ)
血液流量	150 ml/min
透析流量	300 ml/min
透析間隔	2日に1回
透析期間	30日



(4) ミニブタ血液透析モデルにおける CPP 吸着カラムの治療効果:透析時に CPP 吸着カラムを使用した群と使用しなかった群 (各群 N=2) を設け、Day 0、2、6、14、22、28 の透析前後で採血し、一般血液検査および CPP、炎症マーカーを測定した。実験終了時、心エコー施行後に解剖し、血管石灰化および血管内皮機能の検査を行った。

#### 4. 研究成果

血液検査の途中結果 (クレアチニン、尿素窒素、リン、カルシウム) を以下に示す。



図中、M01103 と M01104 と M01105 が CPP 吸着カラムを使用しなかったミニブタ (M01104 は実験途中で死亡)、M0223 と M02204 が CPP 吸着カラムを使用したミニブタである。上記の様に、透析セッションによって、上昇していた血中クレアチニン、尿素窒素、リンが顕著に低下し、透析の効率は十分であったことがわかる。現在、CPP と炎症マーカーの測定を計画中である。

コストの関係でミニブタの数を増やすことができず、確定的なことは結論できないが、CPP 吸着カラムを使用した群で血管内皮機能が改善する傾向が認められており、結果は有望である。今後は、別の研究費を獲得し、個体数を増やして検討する必要がある。

#### 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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

黒尾 誠 (KURO-O, Makoto)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10716864

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )