

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：急性腎障害 AKI の創薬ターゲット創出研究

Research on drug target discovery for acute kidney injury (AKI)

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：西堀 正洋

NISHIBORI MASAHIRO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人岡山大学 学術研究院医歯薬学域 創薬研究推進室 教授（特任）

Department of Translational Research and Drug Development, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

II 研究開発の概要

【研究開発の目的と背景】

本研究は、確度の高い臨床エビデンス（ビッグデータ）と研究開発代表者らが開発した斬新で独創的なターゲット同定法に基づき、腎保護に働く新規薬物開発のためのターゲット同定と、作用機序解析を目的としている。

臨床エビデンスの探索の結果、Antithrombin (AT) の抗炎症作用や抗急性腎障害 (AKI) 作用には、特異的受容体刺激が介在する可能性が考えられた。事前プロジェクトにおいて、AT に対する特異的受容体の存在を仮説として提示し、新規に確立された可溶性血漿タンパクを細胞膜係留型リガンドとして発現させる HEK293T 細胞系で候補受容体探索が開始された。その結果、申請者らは、腎近位尿細管上皮に高発現し、尿細管細胞の酸化ストレスからの保護やアポトーシスの抑制に働く可能性のある AT 受容体候補として、Transmembrane and immunoglobulin domain containing 1 (TMIGD1) を同定した。

本研究では、TMIGD1 が、急性腎障害 (AKI) や慢性腎障害 (CKD) の予防と治療に重要な創薬ターゲットになるかどうかを調べるため、TMIGD1 検出法を確立し、TMIGD1 と相互作用する細胞内シグナル分子を解明することによって、AT と TMIGD1 の結合が真の機能的受容体であるかどうか、in vivo で AT が投与された時の抗 AKI 作用が TMIGD1 受容体を介して出現しているのかどうかを調査した。

【研究結果・成果の概要】

ヒト TMIGD1 の細胞外ドメインタンパクを Fc との融合タンパク (exTMIGD1-Fc) を CHO 細胞で作製し、精製して以後の実験に用いた。exTMIGD1-Fc 融合タンパクは、Surface Plasmon Resonance で、AT と直接結合する事を証明した。その結合親和性は、 $2.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ と推定された。exTMIGD1-Fc をラットに免疫し、Elisa と Western blot でスクリーニングすることによって、exTMIGD1 特異的単クローン抗体を 4 種類得た。4

種類ともに近位尿細管細胞を染色したが、その内の3種類は、マウスの近位尿細管冊子縁を強く染色した。一方、1種類は、冊子縁の点状染色と細胞全体を弱く染色するという違いが見られた。それぞれの抗体の認識するエピトープの解析には至らなかったが、抗体の特性により認識構造が異なっている可能性が示唆された。

マウスのAKIは、シスプラチンあるいはLPSの投与によって誘導した。シスプラチンAKIモデルでは、BUNの上昇、腎ATの低下、NGALの近位尿細管内誘導、体重減少、TMIGD1の発現低下が認められた。高用量の外因性ヒト組換えAT(500 IU/kg)の投与によって、マウスのBUNの上昇、尿中NGAL排泄と体重減少が抑制され、AKIの治療薬ATによる抑制がin vivoモデルで確認された。培地に添加されたシスプラチンは、濃度依存的に培養HEK293T細胞の生存率を低下させた。TMIGD1を高発現した培養HEK293T細胞のシスプラチンによる細胞死は、ヒト組換えATにより濃度依存的に抑制されたが、TMIGD1非導入細胞では、そのような効果は認められなかった。In vitroの実験結果から、HEK293T細胞においてATによるTMIGD1の刺激は、細胞死を防止する方向に働くことが強く示唆された。今回の研究で、健常マウスの腎近位尿細管細胞内に、抗マウスAT抗体による免疫染色で、ATが局在することが確認された。このATレベルは、AKI誘導により一過性に低下した。内因性ATの動態と存在意義の解明は重要な課題であり、これに関して更なる追求が必要である。

TMIGD1の下流因子を検討するために、TMIGD1と結合する可能性の因子をHEK293Tの発現系と免疫沈降法並びに質量分析法を用いて探索した。その結果、候補分子44種類が同定されたが、その中から細胞生存と増殖に関与することが推定された因子、DNA-PK、SAAL1、ATXN10を選抜し、その後の検討を実施した。まず、3因子とTMIGD1の結合性をプルダウン法で再度検討したところ、ATXN10のみとの結合性が確認された。TMIGD1高発現によるリン酸化タンパクの検出では、MSK2/RSK2, ERK1/ERK2の活性化体が上昇していることが分かった。さらにTMIGD1高発現細胞では、p63が高発現していることを見出し、高発現アイソフォームとして Δ Np63aを同定した。

【研究の意義】

本研究で示されたIn vivoのAKIモデルにおけるATの腎保護効果と、In vitroにおけるシスプラチン誘発性HEK293T細胞死に対するATのTMIGD1依存的な生存維持効果から、ATには近位尿細管に発現する受容体TMIGD1刺激を介する腎保護効果が一定程度存在する事が示唆される。さらに、AT-TMIGD1の下流因子解析で、ATXN10, ERK1/ERK2, MSK2/RSK2, p63が存在する可能性が強く示唆され、近位尿細管におけるこの経路刺激により、尿細管の生存が制御されている可能性があると推定された。TMIGD1安定発現HEK293T細胞ではTAp63のisoformsとして Δ Np63 α が特異的かつ大量に発現していることが確認できた。 Δ Np63 α はp53の作用に拮抗し、各種細胞死誘導刺激から細胞を保護する効果があることが報告されている。これらの知見から、近位尿細管の冊子縁に発現するTMIGD1とその下流因子群は、新規のシグナル伝達系を介し細胞保護に働いていることが強く示唆されると考える。申請者の研究グループは、ATの受容体としてCLEC1Aも同定し報告している。好中球上に存在するCLEC1Aの刺激は、好中球の静穏化と逸脱した活性化の抑制に働き、NETosisの抑制を介して種々の炎症性疾患抑制に寄与する可能性がある。このように、ATはトロンビン等の凝固因子の活性を抑制するだけでなく、多機能分子としての特徴を併せ持っていると言える。急性尿細管障害を含め、腎臓疾患に対する治療薬が極めて限られている中で、本研究の展開として新規シグナル伝達系のさらに詳しい機構を解明することは、治療ターゲットに関する情報を得ることにつながると考え

る。さらに、本研究で見出された近位尿細管に存在する AT の動態と機能的役割の解明は、重要な研究テーマである。

【今後の展望と課題】

本研究で用いた AT は臨床上の使用として、トロンビン活性の制御を主目的にヘパリンと併用し DIC 病態で用いられている。一方、AT には抗炎症作用や抗敗血症作用の存在が示唆されているため、我が国で製造・販売業務を担っている（一般社団法人）日本血液製剤機構（JB）との間で過去 8 年間にわたって、頻繁な情報交換を実施し、MR 用資材の作製では、監修の機能を果たしてきた。本研究結果から、AT 作用の多様性の中に TMIGD1 介在性の作用があることが強く示唆されており、JB との間で適応拡大に向けた新たな共同研究を提案できると考える。近位尿細管に局在する AT については世界的にこれまで報告がなく、新規の発見である。その病態生理的な意義に関する研究がさらに必要である。本研究内で作製された複数の抗 TMIGD1 単クローン抗体は、今後の研究においてアカデミアの共同研究者の間で共有的に使用する予定である。

[Research and Purpose and Background]

This research aims to identify targets and analyze the mechanisms of action for the development of novel drugs that protect the kidneys, based on highly reliable clinical evidence (big data) and a novel and original target identification method developed by the principal investigators.

Based on the search for clinical evidence, it was suggested that the anti-inflammatory and anti-acute kidney injury (AKI) effects of antithrombin (AT) may be mediated by specific receptor stimulation. The applicant initiated candidate receptor search using the HEK293T cell line, which expresses a newly established soluble plasma protein as a cell membrane-tethered ligand. As a result, transmembrane and immunoglobulin domain containing 1 (TMIGD1) was identified as a candidate AT receptor that is highly expressed in the renal proximal tubular epithelium and may function in protecting tubular cells from oxidative stress and suppressing apoptosis.

In this study, to investigate whether TMIGD1 could be an important drug target for the prevention and treatment of acute kidney injury (AKI) and chronic kidney disease (CKD), we established a method for detecting TMIGD1 and elucidated intracellular signaling molecules that interact with TMIGD1. This allowed us to investigate whether the binding of AT to TMIGD1 is a true functional receptor and whether the anti-AKI effect of AT administration in vivo is mediated through the TMIGD1 receptor.

[Summary of Research Results]

A fusion protein (exTMIGD1-Fc) of the extracellular domain protein of human TMIGD1 with Fc was created in CHO cells and used in experiments. The exTMIGD1-Fc fusion protein was shown to directly bind to AT via Surface Plasmon Resonance. Rats were immunized with exTMIGD1-Fc to obtain four types of exTMIGD1-specific monoclonal antibodies. Three of these antibodies strongly stained the proximal tubular margins of mice. One antibody, however, showed punctate staining of the margins and weak staining of the entire cell.

AKI in mice was induced by administration of cisplatin or LPS. In the cisplatin-induced AKI model, elevated BUN, decreased renal AT, induction of NGAL into the proximal tubules, weight loss, and decreased TMIGD1 expression were observed. Administration of high doses of exogenous human recombinant AT (500 IU/kg) suppressed elevated BUN levels, urinary NGAL excretion, and weight loss in mice, confirming the suppression of AKI by AT as a therapeutic agent in an in vivo model. Cisplatin-induced cell death in cultured HEK293T cells highly expressing TMIGD1 was suppressed in a concentration-dependent manner by human recombinant AT, but no such effect was observed in cells without TMIGD1. In vitro experimental results strongly suggest that AT-mediated stimulation of TMIGD1 in HEK293T cells acts to prevent cell death.

To investigate downstream factors of TMIGD1, factors potentially binding to TMIGD1 were searched using the HEK293T expression system, immunoprecipitation, and mass spectrometry. As a result, factors presumed to be involved in cell survival and proliferation, DNA-PK, SAAL1, and ATXN10 were selected and further investigated. When the binding affinity of the three factors to TMIGD1 was re-examined using the pull-down method, binding to ATXN10 only was confirmed. Detection of phosphorylated proteins due to high TMIGD1 expression revealed elevated levels of activated MSK2/RSK2 and ERK1/ERK2. Furthermore, we found that p63 was highly expressed in TMIGD1-high-expression cells, and identified Δ Np63 α as the high-expression isoform.

[Significance of the Study]

The renal protective effect of AT in an in vivo AKI model and the TMIGD1-dependent survival maintenance effect of AT against cisplatin-induced HEK293T cell death in vitro, as demonstrated in this study, suggest that AT has a certain degree of renal protective effect mediated by TMIGD1 stimulation, a receptor expressed in the proximal tubules. Furthermore,

downstream factor analysis of AT-TMIGD1 strongly suggested the presence of ATXN10, ERK1/ERK2, MSK2/RSK2, and p63, and it was hypothesized that tubular survival may be regulated by stimulation of this pathway in the proximal tubules. In TMIGD1 stably expressing HEK293T cells, Δ Np63 α was specifically and excessively expressed as an isoform of TAp63. Δ Np63 α has been reported to antagonize the action of p53 and protect cells from various cell death-inducing stimuli. These findings strongly suggest that TMIGD1, expressed on the tubular margin of the proximal tubule, and its downstream factors play a role in cytoprotection through a novel signaling pathway. The applicant's research group has also identified and reported CLEC1A as a receptor for AT. Stimulation of CLEC1A present on neutrophils may contribute to the suppression of various inflammatory diseases by quiescentizing neutrophils and inhibiting their deviant activation, thereby suppressing NETosis. Thus, AT not only suppresses the activity of coagulation factors such as thrombin, but also possesses characteristics of a multifunctional molecule. Given the extremely limited range of therapeutic drugs for kidney diseases, including acute tubular injury, we believe that further elucidating the detailed mechanisms of this novel signaling pathway will lead to obtaining information on therapeutic targets. Furthermore, elucidating the dynamics and functional role of AT present in the proximal tubule, as discovered in this study, is an important research theme.