

<特集「医薬品開発の最前線」>

消化器関連疾患とNADPH oxidase阻害薬

松 本 み さ き*

和歌山県立医科大学薬学部病院薬学

Potential Use of NADPH Oxidase Inhibitors in Digestive Diseases

Misaki Matsumoto

*Department of Clinical Pharmacology and Pharmacotherapy, School of Pharmaceutical Sciences
Wakayama Medical University*

抄 録

NADPH oxidaseは細胞内のNADPHを基質として酸素分子を還元しスーパーオキシドアニオン($O_2^{\cdot-}$)や H_2O_2 を生成する酵素複合体であり、様々な疾患で亢進する酸化ストレスの産生源として注目されている。NADPH oxidaseを構成する触媒サブユニットには5つのNOXアイソフォームと2つの関連酵素DUOXが存在するが、肝疾患をはじめとする消化器関連疾患で最も注目されているのはNOX1である。NOX1およびNOX4を標的とするNADPH oxidase阻害薬Setanaxib (GKT-831)は開発後早期に、原発性胆汁性胆管炎を対象として治験が開始された。近年は、肝癌や大腸癌に対するNOX1/NADPH oxidase阻害薬の抑制効果が動物モデルで検証されており、消化器関連疾患における創薬が期待されている。NADPH oxidase各アイソフォームの生化学的な違い、発現様式の違い、病態への関わりを理解しながら、アイソフォーム選択的な治療戦略を確立することが重要である。

キーワード：活性酸素種，阻害薬，線維化，肝臓。

Abstract

NADPH oxidase is attracting attention as a source of reactive oxygen species (ROS). Its catalytic subunit has seven isoforms; NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 and DUOX2. Among them, the roles of NOX1 have been extensively studied in liver and intestinal disease. A clinical trial of Setanaxib (GKT-831), a NOX1/4 dual inhibitor, for primary biliary cholangitis (PBC) is ongoing. Recent researches also suggest a potential use of NOX1 inhibitor in hepatocellular carcinoma and colon cancer. Understanding the different roles of each NADPH oxidase isoform is critical for the further development of isoform-specific therapeutic strategies.

Key Words: Reactive oxygen species, Inhibitor, Fibrosis, Liver.

令和5年4月25日受付 令和5年4月26日受理

*連絡先 松本みさき 〒640-8156 和歌山県和歌山市七番丁25番1

misaki-m@wakayama-med.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.132.06.369

はじめに

生体内における活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生源として, NADPH oxidase, ミトコンドリアの電子伝達系, キサンチンオキシダーゼ等の酵素反応, 細胞内鉄イオンによる酸化還元反応が知られている. 中でも NADPH oxidase は細胞内の NADPH を基質としてスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) や H_2O_2 を主要生成物として産生する酵素であり, 反応過程の副産物として ROS を産生する他の産生源とは一線を画する. 加えて, NADPH oxidase は細胞膜貫通領域を有する NOX あるいは DUOX から構成されるように, 細胞膜あるいは細胞内コンパートメントの膜画分に存在することも特徴的である. 遺伝子欠損マウスを用いた近年の解析から, 様々な疾患モデルにおける NADPH oxidase の寄与が明らかにされた. 特に肝臓の線維化に関する研究は先行しており, 原発性胆汁性胆管炎を対象とした第 II 相臨床試験は 2017 年に

開始され, 現在も治験は継続中である. このように NADPH oxidase の研究は進んでいるが, NADPH oxidase と一口に言ってもその活性中心タンパクには 7 つのアイソフォームが存在し, それぞれの違いによって解析手法や理解が複雑になるのが本研究分野の難しいところである. 本稿ではこれらのアイソフォームの違いについて概説し, 消化器関連疾患における NADPH oxidase 研究の最前線を紹介する.

7 つの NADPH oxidase アイソフォーム

NADPH oxidase はひとつの触媒サブユニットとそれに会合する複数のタンパクによって構成され, この複合体形成によって ROS 産生機能を発揮する. 触媒サブユニットには複数のアイソフォームが存在し, 6 回膜貫通タンパクの NOX と 7 回膜貫通タンパクの DUOX (dual oxidase) に分けられる (図 1). NOX については, ヒトにおいては 5 つのアイソフォーム (NOX1 ~ NOX5) が同定されており, マウスやラット等の齧歯類

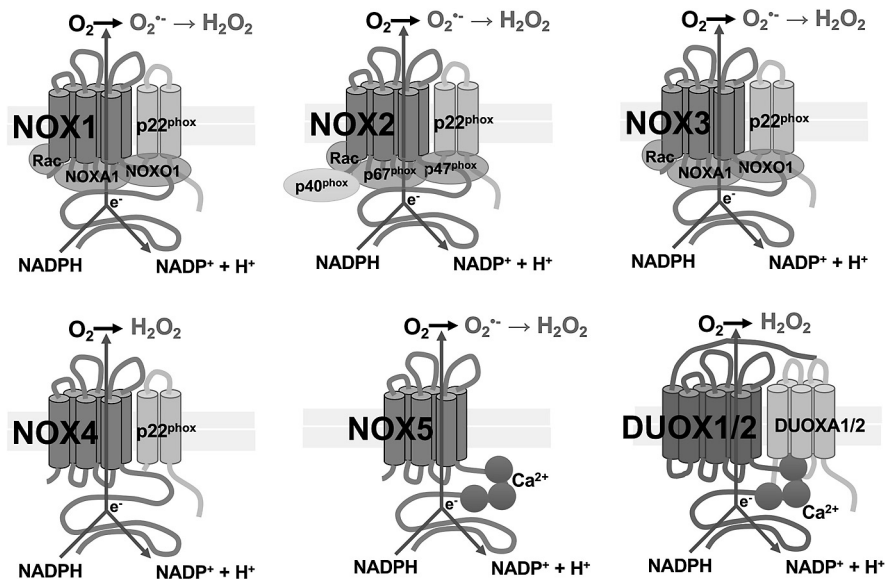


図1 7つのNADPH oxidase アイソフォーム

NOX1~3およびNOX5はスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) および過酸化水素 (H_2O_2) を産生し, NOX4, DUOX1/2は H_2O_2 のみを産生する. NOX5は p22^{phox} を必要とせず, マウスやラットなどの齧歯類には存在しない. NOX5と DUOX1/2は細胞内カルシウムイオンによって活性化される.

には NOX5 は存在しない。DUOX については 2 つのアイソフォーム (DUOX1, DUOX2) があり、計 7 つの NADPH oxidase アイソフォームが存在することになる。NOX1~3 および NOX5 はスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) およびその二次的代謝産物として過酸化水素 (H_2O_2) を産生するが、NOX4, DUOX1/2 は H_2O_2 のみを産生することが証明されている¹⁾。また、NOX2 は他のアイソフォームと異なって通常活性化されておらず、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化による会合タンパク p47^{phox} のリン酸化をもって初めて活性化されることが特徴的である。他方、NOX5 と DUOX1/2 は細胞内カルシウムイオンによって活性化される。このように 7 つの NADPH oxidase は生化学的に異なる特徴を有する²⁾。

先述したように NOX および DUOX は 6 回または 7 回膜貫通タンパクであり抗体による検出は容易ではないことに留意する必要がある。抗体の特異性は、標的タンパクの遺伝子欠損サンプルで確認することが最善であるが、市販されている抗体やそれらを用いた文献では特異性を担保していないものも数多く見受けられる。実際に私たちの保有する *Nox1* 遺伝子欠損マウスで評価したところ、当時市販されている複数の抗 NOX1 抗体では特異性が確認できなかった。そこで著者は独自に抗 NOX1 抗体の作製に取り組み、特異性を担保したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を開発した³⁾。この結果、NOX1 は糖鎖修飾を受けていること、およびその検出のために適した界面活性剤を選択しサンプル調整の工夫が必要であることが明らかとなった。NOX1 に限らず他の NOX アイソフォームについても、抗体解析だけで定量化し結語したような文献の解釈には注意が必要である。

肝疾患における NADPH oxidase

正常の肝臓において最も発現が高いアイソフォームは NOX4 である。そのほとんどは実質細胞である肝細胞に集中しており、星細胞や類洞内皮細胞における発現は少ない。肝細胞特異的 *Nox4* 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、

NOX4 は非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) モデルにおける肝障害、炎症、線維化に関わっていることが明らかにされた⁴⁾。他方、NOX1 や NOX2 の発現は肝細胞よりも星細胞、類洞内皮細胞 (図 2)、クッパー細胞などの非実質細胞に集中しており⁵⁾⁶⁾、NOX4 とは異なる部位で肝疾患に関与すると考えられる。遺伝子欠損マウスの解析により、NOX1 と NOX2 は胆管結紮モデルにおける肝線維化に重要であることが明らかにされた⁶⁾。著者らの研究グループはさらに、単離培養した星細胞ではその活性化に伴って NOX1 mRNA が発現増加すること、さらに NOX1 由来の ROS が脱リン酸化酵素 PTEN を酸化修飾 (不活化) することで細胞増殖シグナルを正に制御すること、すなわち線維化を促進することを見出した⁷⁾。また一方で、類洞内皮細胞に発現増加する NOX1 が非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) における肝微小循環系の内皮機能障害に関わることも見出している⁸⁾。このように NADPH oxidase 由来の ROS が NASH 進展におけるセカンドヒットの一つとして関わっていることが認識されつつある。後述するように、NOX1 および NOX4 の Dual inhibitor である Setanaxib は肝線維化治療薬として期待されている。

近年の解析から、肝癌における NADPH oxidase の関与も明らかになりつつある。377 症例の肝癌患者の検体を用いた mRNA 発現解析では NOX1, NOX2, NOX5 の高発現は予後不良と関連していた。逆に NOX4 と DUOX1 の高発現は全生存期間と関連していた⁸⁾。この結果と一致して、*Nox1* 遺伝子欠損マウスを用いた実験で肝癌抑制効果が証明されている⁹⁾。興味深いことに肝癌進展に関与するのは肝マクロファージに発現する NOX1 であった。同時に解析された *Nox4* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと同等の発癌が観察された⁹⁾。遺伝子ノックダウン法を用いた別の報告では NOX4 が肝癌細胞増殖を負に制御することが証明されている。このようにアイソフォームごとに対照的な違いがあることは興味深いところであるが、少なくとも NOX4 と

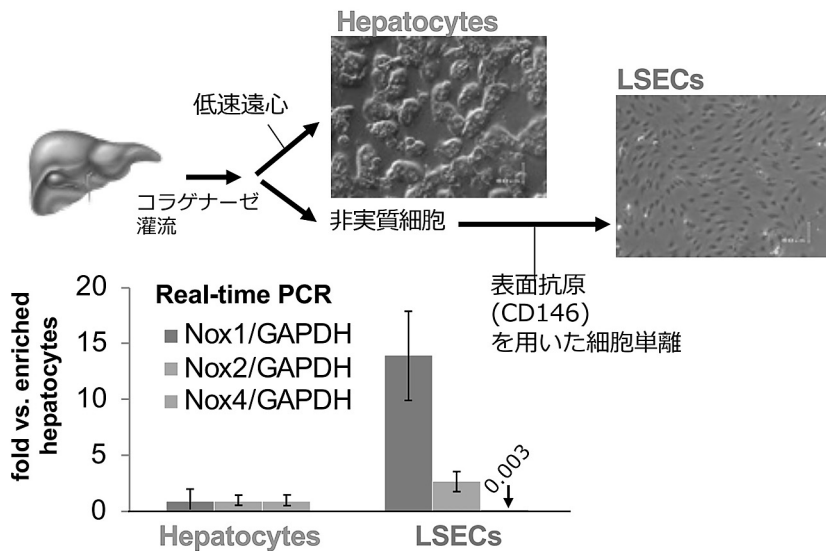


図2 肝臓の細胞分画で異なるNOX mRNAの発現

正常マウスの肝臓をコラゲナーゼで灌流消化し、肝細胞 (hepatocyte) と類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cells: LSECs) を分取した。写真は培養24時間後の細胞の形態を示している。分取後速やかにRNAを採取し、NOX1, NOX2, NOX4のmRNA発現量をリアルタイムPCR法により定量した。なお、NOX3はマウス肝臓に発現していなかった。定量の結果は内標準遺伝子GAPDHで補正している。

DUOX1は上述したように $O_2^{\cdot-}$ ではなく H_2O_2 のみを産生することと関係しているかもしれない。

腸疾患におけるNADPH oxidase

腸管上皮細胞において高発現するアイソフォームはNOX1とDUOX2である。いずれも大腸と盲腸に豊富に発現しており、腸管上皮細胞のアピカル (管腔側) 膜上に整然と発現することが特異的抗体を用いた免疫染色によって証明されている³⁾¹⁰⁾。両者の違いは、NOX1は未分化かつ増殖性細胞の多い陰窩下部に発現することに対して、DUOX2は分化した細胞の存在する陰窩上部に存在していることである。NOX2が好中球における自然免疫に関わっていることから、当初は腸管でもこれらのアイソフォームがROSの産生を介して自然免疫に関わっていると考えられた。実際にDUOX2についてはショウジョウバエやマウスを用いた研究で特定の細菌感染を制御するという結果が報告されている¹¹⁾¹²⁾。一方

でNOX1はレドックスシグナルを制御することによって腸管上皮細胞の細胞増殖に関わっているようである。近年、腸管オルガノイドを用いた研究によりNOX1由来のROSが上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) シグナルを亢進させることによって細胞増殖を促進することが報告された¹³⁾。別の研究グループも*Nox1*遺伝子欠損マウスの大腸において増殖性の腸管上皮細胞数が減少することを報告している¹⁴⁾。さらに潰瘍性大腸炎モデルを用いた粘膜修復過程においても、*Nox1*遺伝子欠損マウスでは腸管粘膜再生が顕著に遅れることが報告されている¹⁵⁾。

このように細胞増殖への関連が指摘されているNOX1は、当然のことながら大腸癌において着目されている。ヒトの大腸癌検体でNOX1タンパクが増加しているという複数の報告があるが、先にも述べたように抗体だけの解析による報告には注意を要する。ごく近年、*Nox1*遺伝子

欠損マウスで大腸癌モデルの発癌過程が有意に抑制されることが証明された¹⁶⁾。この他に、免疫系細胞における NOX1 が腸管の粘膜バリア障害に関わることを著者らの研究グループは発表しており¹⁷⁾、先に述べた肝癌モデルにおける肝マクロファージ NOX1 の報告と同様に免疫系細胞における NOX1 の役割についても注目すべきである。以上のように腸管粘膜においては NOX1 が善か悪か明確な結論は出ておらず、今後の研究結果を待つ必要がある。

NADPH oxidase 阻害薬とその展望

まず肝疾患を対象に現在治験が進められている NADPH oxidase 阻害薬 Setanaxib (GKT-831) を紹介したい。Setanaxib は NOX1/4 の Dual inhibitor であり経口投与可能である。Geneve・Kyoto・Texas の研究者が中心となって立ち上がったバイオベンチャー Genkyotex 社 (2021 年 Calliditas 社に統合) により開発された。Kyoto の研究者は本学薬理学教室の前教授である矢部千尋先生である。Setanaxib は第 1 相試験完了後まず糖尿病性腎症と原発性胆汁性胆管炎 (Primary Biliary Cholangitis: PBC) を対象に治験が開始された。糖尿病性腎症に対しては主要評価項目を満たさず治験は終了している。一方、PBC に対しては治験期間 24 週後において主要評価項目 (γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 値の低下) を達成しなかったものの、副次的評価項目であるアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および線維化の指標である肝硬度を減少させた¹⁸⁾。現在は Calliditas 社が引き継ぎ、PBC に対する治験第 2b/3 相 (治験期間

52 週間) が進められている。同時に、Setanaxib の頭頸部癌に対する治験も進められている。同じく Genkyotex 社が開発した NOX1 特異的阻害薬 GKT-771 は治験開始前であるが、動物実験を用いて肝癌および大腸癌モデルに対する抑制効果が報告されている¹⁶⁾¹⁹⁾。さらに、中国のバイオベンチャー YouJia Bio 社は NOX1 を標的とする siRNA 薬を開発し、肝線維化疾患を対象に近く臨床試験実施申請を行うと発表している²⁰⁾。この他に、Larvol 社が開発した経口投与可能な pan NOX 阻害剤 Isuzinaxib (APX-115) の治験が進められており、2021 年の発表によると糖尿病性腎症を対象とした第 2 相試験でアルブミン尿を抑制したとされる²¹⁾。また、Glucocx 社が開発した NOX4 特異的阻害薬 GLX7013114 は動物モデルにおいて糖尿病性網膜症に対する抑制効果が報告されている²²⁾。このように糖尿病領域においても酸化ストレスの産生源として NADPH oxidase が着目されている。

おわりに

消化器関連疾患における NADPH oxidase の役割が次々と明らかになり、特に肝疾患領域でその阻害効果が期待されている。肝線維化や肝癌は難治性の病態であることから、今後の治験結果が注目される。過去に試された数々の抗酸化薬が到達できなかった治療効果が、NADPH oxidase という特異的な標的を狙うことで新たな展開に繋がることを期待してやまない。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

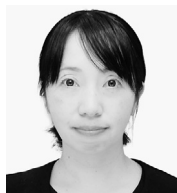
- 1) Augsburg F, Filippova A, Rasti D, Seredenina T, Lam M, Maghzal G, Mahiout Z, Jansen-Durr P, Knaus UG, Doroshow J, Stocker R, Krause KH, Jaquet V. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors. *Redox Biol*, 26: 101272, 2019.
- 2) Vermot A, Petit-Hartlein I, Smith SME, Fieschi F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants* (Basel), 10:2021.
- 3) Matsumoto M, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Zhang J, Zhu K, Nauseef WM, Yabe-Nishimura C. Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med*, 68: 196-204, 2014.
- 4) Bettaieb A, Jiang JX, Sasaki Y, Chao TI, Kiss Z, Chen

- X, Tian J, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C, Xi Y, Szyndralewicz C, Schroder K, Shah A, Brandes RP, Haj FG, Torok NJ. Hepatocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 4 Regulates Stress Signaling, Fibrosis, and Insulin Sensitivity During Development of Steatohepatitis in Mice. *Gastroenterology*, 149: 468-480 e410, 2015.
- 5) Matsumoto M, Zhang J, Zhang X, Liu J, Jiang JX, Yamaguchi K, Taruno A, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Cui W, Matsuno K, Marunaka Y, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*, 115: 412-420, 2018.
 - 6) Paik YH, Iwaisako K, Seki E, Inokuchi S, Schnabl B, Osterreicher CH, Kisseleva T, Brenner DA. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91 (phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*, 53: 1730-1741, 2011.
 - 7) Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Matsumoto M, Zhang J, Zhu K, Katsuyama M, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) oxidase promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Hepatology*, 54: 949-958, 2011.
 - 8) Eun HS, Cho SY, Joo JS, Kang SH, Moon HS, Lee ES, Kim SH, Lee BS. Gene expression of NOX family members and their clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 7: 11060, 2017.
 - 9) Liang S, Ma HY, Zhong Z, Dhar D, Liu X, Xu J, Koyama Y, Nishio T, Karin D, Karin G, McCubbin R, Zhang C, Hu R, Yang G, Chen L, Ganguly S, Lan T, Karin M, Kisseleva T, Brenner DA. NADPH Oxidase 1 in Liver Macrophages Promotes Inflammation and Tumor Development in Mice. *Gastroenterology*, 156: 1156-1172 e1156, 2019.
 - 10) Grasberger H, Gao J, Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Zhang M, Kamada N, Eaton KA, El-Zaatari M, Shreiner AB, Merchant JL, Owyang C, Kao JY. Increased Expression of DUOX2 Is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine. *Gastroenterology*, 149: 1849-1859, 2015.
 - 11) Grasberger H, El-Zaatari M, Dang DT, Merchant JL. Dual oxidases control release of hydrogen peroxide by the gastric epithelium to prevent *Helicobacter felis* infection and inflammation in mice. *Gastroenterology*, 145: 1045-1054, 2013.
 - 12) Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 310: 847-850, 2005.
 - 13) van der Post S, Birchenough GMH, Held JM. NOX1-dependent redox signaling potentiates colonic stem cell proliferation to adapt to the intestinal microbiota by linking EGFR and TLR activation. *Cell Rep*, 35: 108949, 2021.
 - 14) Coant N, Ben Mkaddem S, Pedruzzi E, Guichard C, Treton X, Ducroc R, Freund JN, Cazals-Hatem D, Bouhnik Y, Woerther PL, Skurnik D, Grodet A, Fay M, Biard D, Lesuffleur T, Deffert C, Moreau R, Groyer A, Krause KH, Daniel F, Ogier-Denis E. NADPH oxidase 1 modulates WNT and NOTCH1 signaling to control the fate of proliferative progenitor cells in the colon. *Mol Cell Biol*, 30: 2636-2650, 2010.
 - 15) Leoni G, Alam A, Neumann PA, Lambeth JD, Cheng G, McCoy J, Hilgarth RS, Kundu K, Murthy N, Kusters D, Reutelingsperger C, Perretti M, Parkos CA, Neish AS, Nusrat A. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest*, 123: 443-454, 2013.
 - 16) Stalin J, Garrido-Urbani S, Heitz F, Szyndralewicz C, Jemelin S, Coquoz O, Ruegg C, Imhof BA. Inhibition of host NOX1 blocks tumor growth and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Life Sci Alliance*, 20219.
 - 17) Liu J, Iwata K, Zhu K, Matsumoto M, Matsumoto K, Asaoka N, Zhang X, Ibi M, Katsuyama M, Tsutsui M, Kato S, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase in bone marrow-derived cells modulates intestinal barrier function. *Free Radic Biol Med*, 147: 90-101, 2020.
 - 18) ClinicalTrials.gov: GKT137831. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03226067>
 - 19) Vandierendonck A, Degroote H, Vanderborght B, Verhelst X, Geerts A, Devisscher L, Van Vlierberghe H. NOX1 inhibition attenuates the development of a protumorigenic environment in experimental hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 40: 40, 2021.
 - 20) 日経バイオテク. 中国 YouJia Bio 社, 肝線維症, 抗ウイルスの2つの RNA 干渉薬を中国で IND へ. 2022.9.20.
 - 21) ClinicalTrials.gov: APX-115. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04534439>
 - 22) Dionysopoulou S, Wikstrom P, Bucolo C, Romano GL, Micale V, Svensson R, Spyridakos D,

Mastrodimou N, Georgakis S, Verginis P, Walum E, Thermos K. Topically administered NOX4 inhibitor,

GLX7013114, is efficacious in treating the early pathological events of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2023.

著者プロフィール



松本みさき Misaki Matsumoto

所属・職：和歌山県立医科大学薬学部病院薬学

2003年3月 長崎大学薬学部薬科学科 卒業

2005年3月 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻修士課程
修了

2008年3月 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻博士課程
修了

2009年10月～2017年3月

京都府立医科大学大学院医学研究科 病態分子薬理学教室・
助教

2017年4月～2023年3月

同・学内講師

2023年4月～

和歌山県立医科大学薬学部病院薬学・准教授

専門分野：薬理学

- 主な業績：1. Matsumoto M, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Zhang J, Zhu K, Nauseef WM, Yabe-Nishimura C. Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. **Free Radic Biol Med.** **68**: 196-204. 2014.
2. Matsumoto M, Zhang J, Zhang X, Liu J, Jiang JX, Yamaguchi K, Taruno A, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Cui W, Matsuno K, Marunaka Y, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radic Biol Med.** **115**: 412-420. 2018.
3. Matsumoto M, Liu J, Iwata K, Ibi M, Asaoka N, Zhang X, Katsuyama M, Matsuda M, Nabe T, Schröder K, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase is involved in the LPS-induced exacerbation of collagen-induced arthritis. **J Pharmacol Sci.** Jun; **146**(2): 88-97. 2021.
4. Matsumoto M, Sawada H, Iwata K, Ibi M, Asaoka N, Katsuyama M, Shintani-Ishida K, Ikegaya H, Takegami S, Umemura A, Yabe-Nishimura C. Bortezomib is an effective enhancer for chemical probe-dependent superoxide detection. **Front Med** (Lausanne) **9**: 941180. 2022.