

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07233

研究課題名(和文) ナノ炭素材料が生体の異物処理機構に及ぼす影響と生体安全性に関する網羅的評価

研究課題名(英文) Study of Effects of Nanocarbon on the Expression and Activities of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters for Safety Assessment

研究代表者

灘井 雅行 (Nadai, Masayuki)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：00295544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ナノ炭素材料のDDSへの利用を視野に、ナノ炭素材料の生体に対する安全性、および生体が有する異物処理機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、ナノ炭素材料が、ヒトおよびラット肝において、第Ⅰ相および第Ⅱ相薬物代謝酵素の発現と酵素活性に及ぼす影響、ヒト消化管由来細胞の薬物トランスポーターの発現に及ぼす影響を中心として検討した。その結果、ナノ炭素材料は薬物代謝酵素の発現や酵素活性、ならびに薬物トランスポーターの発現に影響を及ぼすものが存在することが明らかになった。したがって、ナノ炭素材料をDDSに利用するためには、異物処理機能に及ぼす影響についてさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーボンナノチューブ等のナノ炭素材料は、医療材料としての需要拡大と同時に、その生体に対する安全性の評価が求められている。

生体の主要な異物処理臓器である肝臓や腎臓では、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現が高いが、ナノ炭素材料がこれら臓器及び細胞の生理状態や異物処理機能に影響を及ぼす可能性がある。したがって、ナノ炭素材料を生体主要臓器(細胞)に暴露した際の生理学的・生化学的变化について、生体の異物処理機構である薬物代謝酵素やトランスポーターに及ぼす影響を中心に、毒性学、薬物動態学的観点から検討することは、ナノ炭素材料の工学材料、医療材料としての安全性と有用性の評価に不可欠である。

研究成果の概要(英文)：Recently, clinical application of nanocarbon, including single-walled carbon nanotube (SWCNTs), has been proposed as drug delivery agents. However, there is a growing concern about the toxicity of SWCNTs on the biological systems.

The present study aimed to elucidate the effect of nanocarbon, especially SWCNTs, on the expression and activities of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes in the human and rat liver in vitro. In addition, the effects of nanocarbon on the expression of drug transporters in Caco-2 cell and Cellartis Intestinal Epithelial Cells, which are small intestinal epithelial cells derived from human iPS cells, were examined.

Results of this study suggested that SWCNTs affect the expression and activities of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. The effects of SWCNTs were different among isoforms of the enzymes or transporters, and that the effect may be dependent on the physicochemical properties of SWCNT.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ナノ炭素材料 単層カーボンナノチューブ 第Ⅰ相薬物代謝酵素 第Ⅱ相薬物代謝酵素 薬物トランスポーター 肝臓 消化管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNT)やフラーレン、グラフェン等のナノ炭素材料は、構造部材、導電性材料のほか、薬物デリバリー(DDS)のキャリアへの利用が考えられている。その一方で、これらナノ炭素材料、特にCNTの生体内挙動は、そのアスベスト様構造に由来するところが大きいと考えられ、生体に対する安全性についての情報は十分とは言い難い。そこで、ナノ炭素材料の工業材料、医療材料としての需要拡大の進展と同時に、その生体に対する影響を明らかにし、安全性を評価することが求められている。

ナノ炭素材料の生体への影響を評価するには、その侵入経路と、処理・排泄経路について考える必要がある。外的環境と生体を隔てている肺や小腸、大腸などの消化管では、上皮細胞のバリア機能が発達し、異物の侵入を阻止するとともに、受動拡散により細胞膜を通過した異物を代謝する薬物代謝酵素や、能動的に細胞外へ排出するトランスポーターが存在している。我々は単層CNT(SWCNT)の暴露が、呼吸器由来細胞のストレス関連遺伝子や、一部の薬物代謝酵素の遺伝子発現が低下すること、またヒト肝由来のミクロソームにおいて薬物代謝酵素活性変化させることを明らかにしているが、その詳細なメカニズムは不明である。また、生体の主要な異物処理臓器である肝臓や腎臓では、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現が高いが、ナノ炭素材料がこれら臓器及び細胞の生理状態や異物処理機能に影響を及ぼす可能性がある。すなわち、ナノ炭素材料自身の代謝(解毒)排泄に影響を及ぼすのみならず、ナノ炭素材料をDDSのキャリアとして投与した薬物の体内動態が変化し、期待した薬理効果が得られない可能性も懸念される。したがって、ナノ炭素材料を生体主要臓器(細胞)に暴露した際の生理学的・生化学的变化について、生体の異物処理機構である薬物代謝酵素やトランスポーターに及ぼす影響を中心に、毒性学、薬物動態学的観点から検討することで、ナノ炭素材料の工学材料、医療材料としての安全性と有用性の評価が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ炭素材料のDDSへの利用を視野に入れ、ナノ炭素材料の生体に対する安全性、および生体が有する異物処理機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

本実験は名城大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(1) ナノ炭素材料

SO-SWCNT、FH-P-SWCNT、EC1.5-P-SWCNTは名城ナノカーボン(愛知)より購入した。また、カーボンブラック、フラーレン-C60およびフラーレン-C70、多層CNTは、Sigma-Aldrich(USA)より購入した。

(2) SO-SWCNTによるラット肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

5-6週齢雄性Wistar系ラットを用い、2段階コラゲナーゼ灌流法によってラット肝細胞を分離し、100 µg/mL SO-SWCNT分散液を24時間暴露した。その後、肝細胞からRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを得た。得られたcDNAを用いて、RT2 Profiler PCR Array System (Rat Drug Metabolism: Phase I Enzymes, Qiagen, Netherlands)により、ラット第 相薬物代謝酵素の発現変動を解析した。また、SO-SWCNT分散液を50から1000 µg/mLの濃度でラット肝細胞に曝露し、CYP3A2とCYP3A1/23のmRNA発現量をリアルタイムPCR法で定量した。

(3) SO-SWCNTによるヒト肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

ヒト肝細胞はCorning(USA)から購入した。ヒト肝細胞に100 µg/mL SO-SWCNT分散液を24時間暴露した。RT2 Profiler PCR Array Human Drug Metabolism: Phase I Enzymes(Qiagen)により、ヒト第 相薬物代謝酵素の発現変動を解析した。得られたデータをQIAGEN社ポータルサイトのRT2 Profiler PCR Array Data Analysisを用いて解析し、比較定量法にてfold changeを算出した。

(4) SO-SWCNTによるラット肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

(2)と同様にラット肝細胞を調製し、100 µg/mL SO-SWCNT分散液を24時間暴露した。RT2 Profiler PCR Array Rat Drug Metabolism: Phase I Enzymes(Qiagen)により、ヒト第 相薬物代謝酵素の発現変動を解析した。

(5) ナノ炭素材料によるヒト CYP 酵素活性の変動

プールドヒト肝ミクロソーム(Corning)を用いて、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ナノ炭素材料存在下において、CYP2D6 の指標活性であるデキストロメトルフアン 0-脱メチル酵素活性と CYP3A4/5 の指標活性であるミダゾラム 1'-水酸化酵素活性を測定した。生成した代謝物は全て LC-MS/MS にて定量した。

(6) ナノ炭素材料によるヒト UGT 酵素活性の変動

プールドヒト肝ミクロソーム(Corning)を用いて、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ナノ炭素材料存在下において、UGT1A1 の指標活性である β -エストラジオール 3-グルクロン酸抱合活性、UGT1A4 の指標活性であるイミプラミン *N*-グルクロン酸抱合活性、UGT1A6 の指標活性であるセロトニングルクロン酸抱合活性、UGT1A9 の指標活性であるプロポフォールグルクロン酸抱合活性を、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ナノ炭素材料存在下で測定した。生成した代謝物は全て LC-MS/MS にて定量した。

(7) ナノ炭素材料とヒト UGT との相互作用の検討

ヒト肝ミクロソームとナノ炭素材料分散液を混合した後、遠心分離し、上清に存在するナノ炭素材料と結合していない遊離型の UGT1A1 タンパク質を、SDS-PAGE/ウェスタンブロット分析にて定量した。一次抗体として、ウサギ抗 UGT1A1 抗体 (ab157476、Abcam、UK) を用いた。

(8) ナノ炭素材料によるヒト薬物トランスポーターの発現変動

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に、EC1.5-P-SWCNT と SO-SWCNT、および多層カーボンナノチューブを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 3 日間曝露した。得られた cDNA を用いて、RT2 Profiler PCR Array Human Drug Transporters(Qiagen)により、薬物トランスポーターの発現変動を解析した。また、ヒト iPS 細胞由来小腸型腸管上皮細胞である Cellartis Intestinal Epithelial Cells (タカラバイオ、滋賀) に 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EC1.5-P-SWCNT を 3 日間曝露し、同様に RT2 Profiler PCR Array Human Drug Transporters により、薬物トランスポーターの発現変動を解析した。

(9) 統計学的処理

有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。なお、 $p < 0.05$ の時、有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) SO-SWCNT によるラット肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

PCR array に搭載されている 84 遺伝子のうち、コントロール群と比較して 1/2 倍以下の有意な減少が認められた遺伝子はアルデヒド脱水素酵素や CYP、ジヒドロピリミジン脱水素酵素、フラビン含有モノオキシゲナーゼなど、13 種であった。一方、2 倍以上の有意な増加が認められた遺伝子は CYP3A9、CYP7B1、Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 の 3 種であった (図 1)。

肝で薬物代謝を担う主要な酵素である CYP3A2 および CYP3A1/23 は、SO-SWCNT 濃度依存的な発現量の低下が認められた (図 2)。

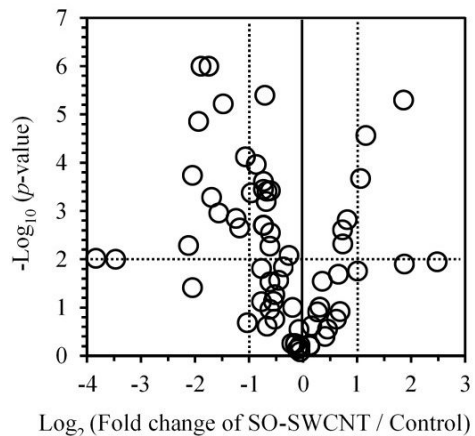


図 1. SO-SWCNT によるラット肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

(2) SO-SWCNT によるヒト肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

PCR array に搭載されている 84 遺伝子のうち、コントロールと比較して 1/2 以下の有意な減少が認められた遺伝子は、ラットと類似しており、アルデヒド脱水素酵素や CYP、フラビン含有モノオキシゲナーゼなど、14 種であった。また、2 倍以上の有意な増加が認められた遺伝子は Dehydrogenase/reductase 2、Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 の 2 種であった (図 3)。

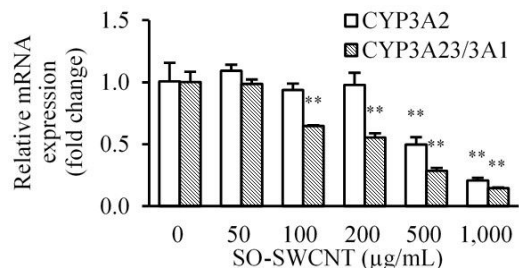


図 2. SO-SWCNT によるラット肝 CYP3A の発現変動

(3) SO-SWCNT によるラット肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

PCR array に搭載されている 84 遺伝子のうち、コントロール群と比較して 2 倍以上の有意な増加が認められた遺伝子は Prostaglandin E synthase のみであった。第 相薬物代謝酵素と比べて、第 相薬物代謝酵素では、SO-SWCNT による影響はほとんど認められず、薬物代謝酵素により受ける影響が異なることが明らかになった (図 4)。

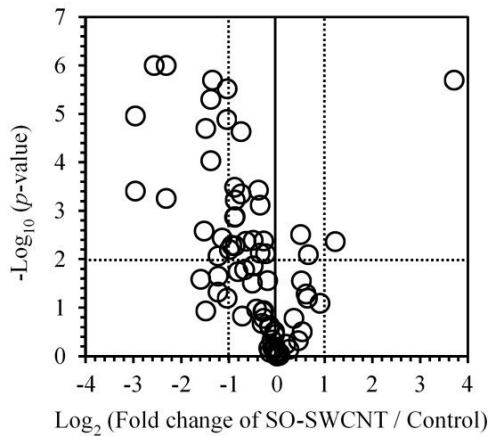


図 3. SO-SWCNT によるヒト肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

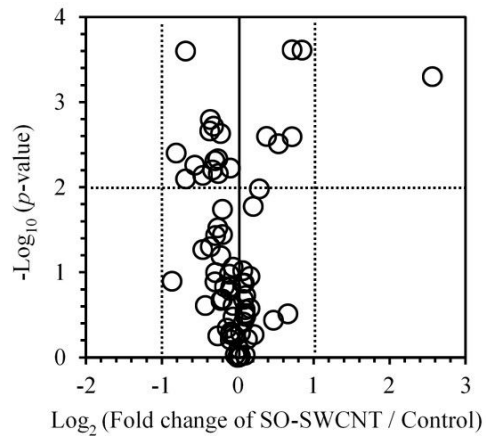


図 4. SO-SWCNT によるラット肝第 相薬物代謝酵素の発現変動

(4) ナノ炭素材料によるヒト CYP 酵素活性の変動

デキストロメトルファン の脱メチル酵素活性は SO-SWCNT により 40% 阻害された。また、ミダゾラム 1'-水酸化酵素活性は SO-SWCNT により 15% 阻害された。しかし、極めて強い阻害作用が認められたわけではなかった。

(5) ナノ炭素材料によるヒト UGT 酵素活性の変動

β -エストラジオール 3-グルクロン酸抱合活性 (図 5A)、イミプラミン *N*-グルクロン酸抱合活性 (図 5B) は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EC1.5-P-SWCNT と FH-P-SWCNT により低下したが、その他のナノ炭素材料では影響が認められなかった。また、セロトニングルクロン酸抱合活性 (図 5C) は、検討した全てのナノ炭素材料で大きな変動は認められなかった。一方、プロポフォルグルクロン酸抱合活性 (図 5D) は、FH-P-SWCNT の存在下で有意に上昇することが明らかになった。

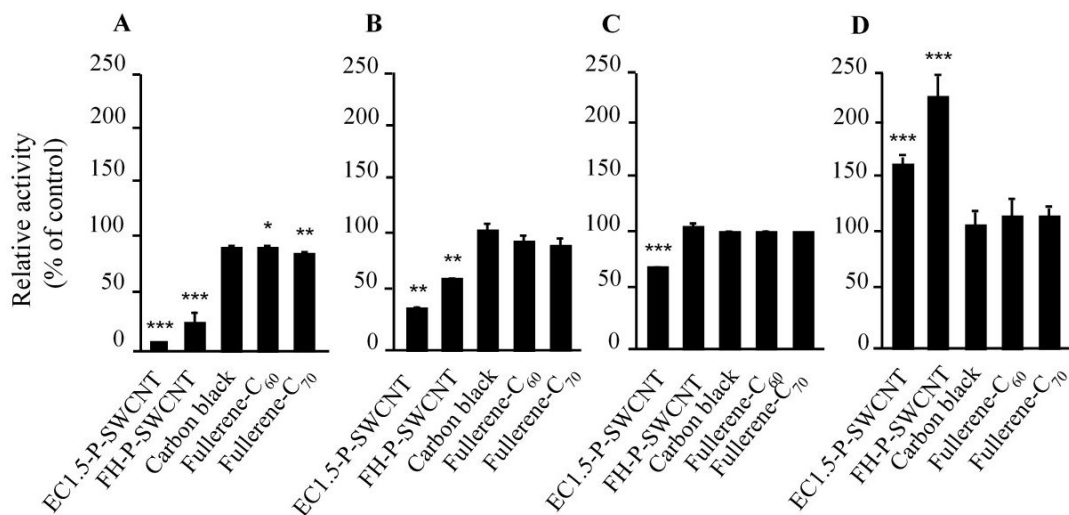


図 5. ナノ炭素材料によるヒト UGT1A 酵素活性に及ぼす影響

FH-P-SWCNT 存在下でのプロポフォルグルクロン酸酵素活性について、速度論的解析を行ったところ、ミカエリス定数はコントロールで $6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$ 、FH-P-SWCNT 存在下で $5.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$ であり、大きな変化は認められなかったが、最大酵素反応速度 (V_{max}) は、コントロールで $903.3 \pm 48.4 \text{ pmol/min/mg protein}$ 、FH-P-SWCNT 存在下で $1,589.7 \pm 48.3 \text{ pmol/min/mg protein}$ であり、上昇したことが明らかになった。

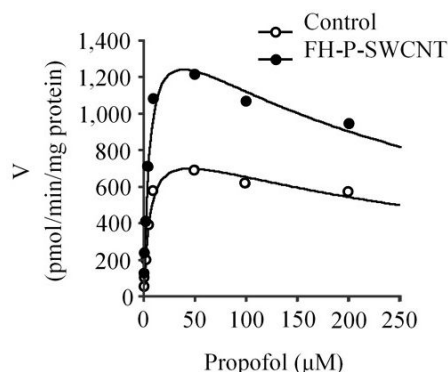


図 6. FH-P-SWCNT によるプロポフォルグルクロン酸抱合活性の速度論的解析

(6) ナノ炭素材料とヒト UGT1A1 との相互作用の検討

EC1.5-P-SWCNT と FH-P-SWCNT 存在下では遊離型の UGT1A1 タンパク質が減少し、カーボンブラックでは影響が認められなかったため(図 7)、SWCNT による UGT1A1 酵素活性の低下は、SWCNT と UGT1A1 タンパク質との直接的な相互作用に起因することが明らかになった。

(7) ナノ炭素材料によるヒト薬物トランスポーターの発現変動

Caco-2 細胞において、PCR array に搭載されている 84 遺伝子のうち、コントロールと比較して EC1.5-P SWCNT、SO-SWCNT とともに 1/2 以下の有意な減少が認められた遺伝子は、一部の ABC トランスポーターであり、SLC トランスポーターには影響を及ぼさなかった。一方で、多層カーボンナノチューブでは、いずれのトランスポーターでも変動は認められなかった。また、2 倍以上の有意な増加が認められた遺伝子はなかった。Caco-2 細胞において、PCR array に搭載されている薬物トランスポーターの一部の発現量が低かったことから、変動した遺伝子数が少ない可能性がある。

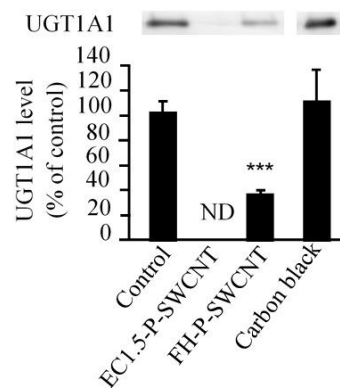


図 7. ナノ炭素材料と UGT1A1 の相互作用

そこで、ヒト iPS 細胞由来小腸型腸管上皮細胞である Cellartis Intestinal Epithelial Cells に EC1.5-P-SWCNT を曝露し、同様の検討を行った。その結果、1/2 以下の有意な減少が認められた遺伝子は 2 種であり、いずれも ABC トランスポーターであった。また、2 倍以上の有意な増加が認められた遺伝子は 7 種であり、そのうち 6 種は SCL トランスポーターであった。iPS 由来腸管上皮細胞では Caco-2 よりも薬物トランスポーターの発現量が高いものが多かったため、多くのトランスポーターに影響を及ぼした可能性が考えられる。特に、iPS 由来腸管上皮細胞では SLC トランスポーターに多く変動が認められた。

以上より、ナノ炭素材料は薬物代謝酵素の発現や酵素活性、ならびに薬物トランスポーターの発現に影響を及ぼすものが存在することが明らかになった。したがって、ナノ炭素材料の DDS への利用を推進するためには、本研究で認められたナノ炭素材料による薬物代謝酵素の発現や活性、ならびに薬物トランスポーターの発現の変化を、今後さらに詳細に検討し、その情報を集積することで、デリバリーを必要とする薬物の体内動態や薬理作用に及ぼす影響、ひいては DDS キャリアとしての有効性、安全性を確保することが不可欠である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asai Yuki, Nadai Masayuki, Katoh Miki	4. 巻 45
2. 論文標題 The Effect of Single-Walled Carbon Nanotubes on UDP-Glucuronosyltransferase 1A Activity in Human Liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 446 ~ 451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	加藤 美紀 (Katoh Miki) (70345594)	名城大学・薬学部・准教授 (33919)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関