

平成 31 年 4 月 10 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08354

研究課題名(和文)危険ドラッグ合成CB受容体アゴニストのヒトCYPによる代謝および毒性発現機構解析

研究課題名(英文)CYP-Mediated Metabolism and Toxicity of Dangerous Drugs, Synthetic Cannabinoids,

研究代表者

渡辺 和人 (WATANABE, KAZUHITO)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30113038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1)13種の合成カンナビノイドの中で9種がヒト肝ミクロソーム(HLMs)のcytochrome P450(CYP)に結合することを明らかにした。2)マウスneuroblasatoma C1300N18細胞およびヒト乳がんMCF-7細胞に対して、delta-9,11-THCは、delta-9-THCよりもやや強い細胞毒性を示した。この毒性発現は受容体非依存である。3)HLMsによるHU-210およびHU-211の代謝および代謝に関するCYP分子種(CYP3A4)を明らかにした。4)5種の合成カンナビノイドの3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化誘導能の促進作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、合成CB受容体アゴニスト(特にJWH-018, JWH-073, HU-210など)のヒト肝ミクロソームによる代謝を明らかにしたものであり、関与するCYP分子種の情報や細胞毒性も含めて、薬物相互作用や薬理毒性などの健康被害を考える上で有用な基礎的な知見を与える学術的意義がある。また、代謝の情報は関連薬物を生体試料から検出する際に極めて重要であり、社会的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：1)Among 13 synthetic cannabinoids examined, JWH-018, JWH-073, JWH-133, AM251, SR144,528, Rimonabant, delta-9,11-THC, HU-210 and HU-211 exhibited Type I spectra with human liver microsomal cytochrome P450 (CYP).2)Delta-9,11-THC showed more potent cytotoxic effect to MCF-7 cell compared to delta-9-THC.3)HLMs metabolism of HU-210 and HU-211 was studied, and important role of CYP3A4 was clarified.4)Synthetic cannabinoids, JWH-018, JWH-073, HU-211, WIN-55212-1 and WIN-55212-2 induced differentiation of 3T3-L1 cell to adipocyte cells.

研究分野：衛生薬学

キーワード：危険ドラッグ HU-210 HU-211 代謝 細胞毒性 シトクロムP450 CYP発現系

1. 研究開始当初の背景

大麻の化学的研究は 19 世紀中頃よりスタートし、1930 年代後半から活性成分であるテトラヒドロカンナビノール (THC) をリード化合物とする膨大な数の関連化合物の合成例が報告されている。しかし、近年までこれら化合物が乱用されることは全くなかった。2007 年にインターネットなどを介して市場に出回る脱法ハーブ等の法規制を目的として指定薬物制度が施行された。ところが、この法規制と前後して、脱法ハーブ製品中に合成 CB 受容体アゴニストを含有するものが登場してきた。これらの基本骨格は、一部は THC に類似するもの (synthetic cannabinoids) もあるが、大部分は THC と構造が大きく異なり (synthetic cannabimimetics)、THC よりも受容体親和性が高く、作用もより強力なものが多い。その代表的な化合物群が JWH 化合物である (図 2)。これらは同じ原料化合物から同じ反応様式で多数の誘導体が合成可能であることから、法規制と新規乱用化合物の登場が、いたちごっこの様相を呈したため、平成 25 年には一連の化合物群が包括指定による法規制の対象となった。また、これら違法ハーブ製品による交通事故や健康被害が頻発したことから、厚生労働省および警察庁は、危険性を認知させることを目的として平成 26 年には、これらの呼称を危険ドラッグに統一した。

危険ドラッグ製品に含有される合成カンナビノイド受容体アゴニストの多くは、CB 受容体親和性が判明しているものの、ヒトでの代謝経路、代謝酵素、薬理・毒性など大部分未解明であり、これらの基礎研究は早急に行われる必要がある。

2. 研究の目的

合成 CB 受容体アゴニストは、基本骨格から大きく 3 群に分類される。すなわち、1) THC の基本骨格を有するもの (HU-210、CP55,940 など)、2) 内因性カンナビノイド関連化合物 (アラキドン酸エタノールアミドおよび 2-アラキドノイルグリセロール関連化合物)、3) その他 THC とは基本骨格が異なるもの (WIN-55212-2、JWH 化合物群など) である。本研究では、このうちの 1) および 2) の代表的な化合物について、代謝経路および代謝酵素、薬理・毒性などについて検討を加える。

本研究で得られる成果は、合成 CB 受容体アゴニストの薬理毒性を含めたヒトへの健康被害を考える上で有用な基礎的な知見を与えることになる。

3. 研究の方法

- 1) インドールとナフトイルクロリドからナフトイルインドールを合成し、さらにペンチルおよびブチルクロリドを反応させ、JWH-018 および JWH-073 を合成する。
(Huffman et al., Bioorg. Med. Chem., 11, 539 (2003))
- 2) ヒト肝ミクロソーム (HLMs) をリン酸緩衝液に懸濁した溶液を調製し、日立 UV3900 (積分球装着) 分光光度計を用いて各合成カンナビノイドの基質結合差スペクトルを測定する。
- 3) マウス神経芽腫細胞 C1300N18 を培養し、delta-9-THC および delta-9,11-THC をそれぞれ暴露し、ATP assay により細胞生存率を測定し、IC50 を算出する。
- 4) 合成カンナビノイドとして HU-210 および HU-211 を用いて、HLMs と NADPH 存在下反応し、生成する代謝物を酢酸エチルで抽出し、さらに TMS 誘導体とした。その後、Hewlett Packard HP6890 GC-JEOL JMS700 MS システム、あるいは Agilent 7890B GC-JEOL LMS Q1500 MS システムを用いて GC/MS 分析を行った。代謝物の同定には、各代謝物の Diagnostic ions を用いた (D.J. Harvey, Mass Spectrom. Rev., 6, 135 (1987))。代謝反応は、空気中および $^{18}\text{O}_2$ 気相下の両条件で行い、 ^{18}O の取り込みを各マスイオンの解析から比較検討した。
- 5) 12 種の薬物代謝型ヒト recombinant CYP 発現系 (CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5)、CYP 選択的阻害剤およびヒト CYP 抗体を用

いて、HLMsにおけるHU-210およびHU-211の代謝反応に關与するCYP分子種を特定する。

- 6) 3T3-L1細胞を用いて、isobutylmethylxanthine、dexamethasoneおよびinsulineによる成熟脂肪細胞への分化誘導能について、10種のカンナビノイド(delta-9-THC, delta-9,11-THC, AM251, AM630, HU-210, HU-211, WIN-55,212-2, WIN-55,212-3, JWH-018, JWH-073)の影響を検討した。分化誘導能は、Oil Red O染色による脂肪滴の数および大きさを顕微鏡により観察した。また、AdipoRed試薬添加による蛍光強度の変化も測定した。

4. 研究成果

- 1) CB受容体アゴニストとして、JWH-018およびJWH-073をHuffman et al. (Bioorg. Med. Chem., 11, 539 (2003))の方法に準じて合成した。
- 2) 13種の合成カンナビノイド(JWH-018, JWH-073, JWH-133, AM251, SR144,528, Rimonabant, delta-9,11-THC, HU-210, HU-211, CP-55,940, AM630, WIN-55,212-2およびWIN-55,212-3)の中で前9種のカンナビノイドは、HLMsのcytochrome P450 (CYP)との間でdelta-9-THCやCBDと同様なType I型(peak ~385 nm, trough ~420 nm)基質結合差スペクトルを与えた。
- 3) マウスneuroblastoma C1300N18細胞およびヒト乳がんMCF-7細胞に対して、delta-9,11-THCは、delta-9-THCよりもやや強い細胞毒性を示した。delta-9,11-THCは、delta-9-THCよりもCB受容体親和性が極めて低いことから、この毒性発現は受容体非依存的であることが示唆された。
- 4) HLMsによるHU-210およびHU-211の代謝実験から、少なくとも6種のモノ水酸化体の生成が示唆された(M-1~M-6, GCの保持時間順)。GC/MSの結果から、いずれもHU-210およびHU-211のモノ水酸化体の3TMS誘導体に相当するM⁺ (m/z = 618)が確認された。また、各代謝物に特徴的なイオンは、m/z 425 (M-1)、m/z 173 (M-2)、m/z 359 (M-3)、m/z 131 (M-4)、m/z 117 (M-5)およびm/z 505 (M-6)であった。これらの結果をふまえた代謝物のFragmentationパターンなどから、M-1 (7'-hydroxy 体)、M-2 (2'-hydroxy 体)、M-3 (7 -hydroxy 体)、M-4 (5'-hydroxy 体)、M-5 (6'-hydroxy 体)およびM-6 (7'-hydroxy 体)を同定した。この同定結果は、¹⁸O₂気相下に生成した代謝物についてのマスマスペクトルの結果からも、¹⁸Oの導入位置と代謝物TMS誘導体のフラグメントイオンの関係が矛盾なく解析された。
- 5) 11種のヒトrecombinant CYP発現系および各種CYP選択的阻害剤および抗体阻害での検討から、HU-210およびHU-211のM-1~M-6の生成はCYP3Aの阻害剤であるketoconazoleによって強く阻害され、CYP3A4の抗体添加によっても生成量が大幅に低下した。また、これら代謝物はいずれもrecombinant CYP3A4発現系を用いた代謝反応により生成することが確認された。したがって、HU-210およびHU211のHLMsによる代謝には、主にCYP3A4が関与すること明らかとなった。
- 6) 3T3-L1細胞を用い、合成カンナビノイド類の脂肪細胞への分化に与える影響を検討した結果、delta-9-THCの他JWH-018, JWH-073, HU-211, WIN-55212-1, WIN-55212-2などが3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化誘導能の促進作用を示した。

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 17 件)

- 1) Hiroyuki Okazaki, Shuso Takeda, Hiroyuki Ishii, Saki Matsuo, Erika Furuta, Kazuhiro Watanabe and Hironori Aramaki, HU-210, a synthetic analog of Δ⁹-THC, is not a modifier of estrogen signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Fundamental Toxicological Sciences*, 3(2), 55-61. 2016. (査読あり)
- 2) Masashi Kitamura, Masako Aragane, Kou Nakamura, Kazuhiro Watanabe, and Yohei Sasaki, Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of *Cannabis sativa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(7),

1252-1256.2016. (査読あり)

- 3) Kazuhiro Watanabe, Go Honda, Takeaki Miyagi, Masanori Kanai, Noriyuki Usami, Satoshi Yamaori, Yoshiaki Iwamuro, Satoshi Chinaka, Hironori Aramaki and Ikuo Yamamoto. The Duquenois reaction revisited: mass spectrometric estimation of chromophore structures derived from major phytocannabinoids. *Forensic Toxicology*, 35 (1), 185-189. 2017. (査読あり)
- 4) Masashi Kitamura, Masako Aragane, Kou Nakamura, Kazuhiro Watanabe, and Yohei Sasaki. Rapid identification of drug-type strains in *Cannabis sativa* using loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Natural Medicine*, 71 (1), 86-95. 2017. (査読あり)
- 5) Shuso Takeda, Taichi Himeno, Kazuhiro Kakizoe, Hiroyuki Okazaki, Tomoko Okada, Kazuhiro Watanabe and Hironori Aramaki. Cannabidiolic acid-mediated selective down regulation of *c-fos* in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. *Journal of Natural Medicine*, 71 (1), 286-291. 2017. (査読あり)
- 6) Masayo Suzuki, Shuso Takeda, Hiroyuki Okazaki, Kazuhiro Watanabe, Masufumi Takiguchi and Hironori Aramaki. Cannabidiolic acid-mediated interference with AP-1 transcriptional activity in MDA-MB-231 breast cancer cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. *Natural Product Communications*, 12 (5), 759-761. 2017. (査読あり)
- 7) Satoshi Yamaori, Rongrong Jiang, Chikako Maeda, Risa Ogawa, Hiroyuki Okazaki, Hironori Aramaki and Kazuhiro Watanabe. Expression levels of 39 Cyp mRNA in the mouse brain and neuroblastoma cell lines, C-1300N18 and NB2a – strong expression of Cyp 1b1. *Fundamental Toxicological Sciences*, 4 (5), 195-200. 2017. (査読あり)
- 8) Kazuhiro Watanabe, Satoshi Yamaori, Kazufumi Masuda, Takashi Katsu, Shizuo Narimatsu, and Ikuo Yamamoto. Cannabinoids as potent inhibitors of human CYP1 enzymes. in *The Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, ed.by V.R. Preedy, Elsevier, Cambridge MA, USA, pp. 813-820 (2017). (査読あり)
- 9) Shuso Takeda, Eriko Ikeda, Hiroyuki Okazaki, Kazuhiro Watanabe, Hironori Aramaki. Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human breast cancer. in *The Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, ed.by V.R. Preedy, Elsevier, Cambridge MA, USA, pp. 722-728 (2017).
- 10) 渡辺 和人, 危険ドラッグ・合成カンナビノイドの法規制 第一薬科大学研究年報 2017, 33, pp. 18-30. (査読あり)
- 11) Satoshi Yamaori, Noriyuki Araki, Mio Shionoiri, Kurumi Ikehata, Shinobu Kamijyo, Shigeru Ohmori and Kazuhiro Watanabe. A specific probe substrate for evaluation of CYP4A11 activity in human tissue microsomes and highly selective CYP4A11 inhibitor: luciferin-4A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 366 (3), 446-457. 2018. (査読あり)
- 12) Masashi Kitamura, Masako Aragane, Kou Nakamura, Tatsushi Adachi, Kazuhiro Watanabe, and Yohei Sasaki. Rapid identification of drug-type strains in *Cannabis sativa* using loop-mediated isothermal amplification assay. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 41 (8), 1303-1306. 2018. (査読あり)
- 13) 渡辺 和人, 危険ドラッグ・合成カンナビミメティクスの In Vitro 代謝 第一薬科大学研究年報 2018, 34, pp. 28-37.
- 14) Toshiyuki Kimura, Makiko Takaya, Noriyuki Usami, Kazuhiro Watanabe and Ikuo Yamamoto. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, a major marijuana component, enhances the anesthetic effect of pentobarbital through the CB₁ receptor. *Forensic Toxicology*, 37, 207-214. 2019. (査読あり)
- 15) Masayo Hirao-Suzuki, Shuso Takeda, Kazuhiro Watanabe, Masufumi Takiguchi and Hironori Aramaki. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol upregulates fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) via PPAR α induction: a possible evidence for the cancellation of PPAR β/δ -mediated inhibition of PPAR α in MDA-MB-231 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 662, 219-225. 2019

(査読あり)

- 16) 渡辺 和人, 正山 征羊. 大麻成分フィトカンナビノイドの変遷. **第一薬科大学研究年報** 2019, 35, pp. 28-37. (査読あり)
- 17) Kazuhito Watanabe, Noriyuki Usami, Shiegehiro Osada, Shizuo Narimatsu, Ikuo Yamamoto, Hidetoshi Yoshimura. Cannabidiol metabolism revisited: tentative identification of novel decarbonylated metabolites of cannabidiol formed by human liver microsomes and recombinant cytochrome P4503A4. **Forensic Toxicology**, in press. (査読あり)
〔学会発表〕(計 20 件)
- 1) 北村 雅史、荒金 眞佐子、中村 耕、渡辺 和人、佐々木 陽平. LAMP 法による大麻草判別方法の開発. 日本薬学会第 136 年会、2016.3.28、横浜.
- 2) Kazuhito Watanabe, Noriyuki Usami, Satoshi Yamaori, Shizuo Narimatsu and Ikuo Yamamoto. Metabolism of tetrahydrocannabinols by human intestinal microsomes. *TIAFT 2016, the 54th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists*, 2016.9.1, Brisbane Australia.
- 3) 北村 雅史、荒金 眞佐子、中村 耕、渡辺 和人、佐々木 陽平. LAMP 法による大麻草の種及び THC 品種の on-site 判定法の開発. 日本生薬学会第 63 回年会、2016.9.25、富山.
- 4) 北村 雅史、山室 匡史、荒金 眞佐子、中村 耕、足立 達司、地中 啓、渡辺 和人、岩田 祐子、佐々木 陽平. LAMP 法による大麻草 DNA の on-site 判定法の開発. 日本法科学技術学会第 22 回学術集会、2016.11.10、東京.
- 5) Masashi Kitamura, Masako Aragane, Kou Nakamura, Tatsuji Adachi, Kazuhito Watanabe and Yohei Sasaki. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of *Cannabis sativa*. *International Conference on DNA Technology for Authentication, Quality Control and Conversation of Herbal*, 2016.12.12-14, Hong Kong.
- 6) 渡辺 和人、岡崎 裕之、荒牧 弘範、宇佐見 則行、山本 郁男、ヒト小腸マイクロソームによるカンナビジオールおよびカンナビノールの代謝に關与する主要な CYP 分子種. 日本薬学会第 137 年会、2017.3.27、仙台.
- 7) Kazuhito Watanabe, Satoshi Yamaori, Yousuke Nagata, Noriyuki Usami, Hiroyuki Okazaki and Hironori Aramaki. Metabolic interactions of major phytocannabinoids with human CYP2J2 enzyme. *ICRS (International Cannabinoid Research Society) 2017, the 27th Annual Symposium on the Cannabinoids*, 2017.6.23~27, Montreal Canada.
- 8) 竹田 修三、鈴木 雅代、岡崎 裕之、渡辺 和人、瀧口 益史、荒牧 弘範. 繊維型大麻草成分 cannabidiolic acid (CBDA) によるアクチンストレスファイバー形成の調節とその意義. 第 44 回日本毒性学会学術年会、2017.7.10~12、横浜.
- 9) 鈴木 雅代、竹田 修三、岡崎 裕之、渡辺 和人、荒牧 弘範、瀧口 益史. 繊維型大麻草成分 cannabidiolic acid (CBDA) による PPAR β を介した COX-2 の発現抑制機構. フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017.9.1~2、仙台.
- 10) 岡崎 裕之、竹田 修三、鈴木 雅代、渡辺 和人、瀧口 益史、荒牧 弘範. 繊維型大麻草成分 cannabidiolic acid (CBDA) によるがん細胞 migration の抑制：アクチンストレスファイバーの形成に關したメカニズム. フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017.9.1~2、仙台.
- 11) 李 任時、福森 良、武田 知起、宋 穎霞、森元 聡、渡邊 和人、有竹 浩介、山口 拓、花尻(木倉) 瑠理、田中 嘉孝、山本 経之、石井 祐次. 合成カンナビノイド JWH-018 による脳の内因性カンナビノイド anandamide および 2-arachidonoylglycerol の増加とその機構：CB1-KO マウスを用いた解析. 第 34 回日本薬学会九州支部大会、2017.11.25~26、熊本.
- 12) 渡辺 和人、山折 大、宇佐見 則行、竹田 修三、小松 生明、荒牧 弘範、繊維型大麻草主成分 Cannabidiolic acid の抗侵害作用. 日本薬学会第 138 年会、2018.3.27、金沢.

- 13) 鈴木 雅代、竹田 修三、岡島 隼輔、三好 弘子、渡辺 和人、瀧口 益史、荒牧 弘範、乳がん細胞 migration の正の調節因子としての fatty acid 2-hydroxylase (FA2H)の可能性. 日本薬学会第 138 年会、2018.3.28、金沢.
- 14) 渡邊 和人、山折 大、宇佐見 則行、長谷川 雄司、荒牧 弘範、HU-210 のヒト肝ミクロソームによる代謝および関与する主な CYP 分子種. 日本法中毒学会第 37 年会、2018.7.6、東京.
- 15) 李 任時、福森 良、武田 知起、宋 穎霞、森元 聡、渡邊 和人、有竹 浩介、山口 拓、花尻(木倉) 瑠理、田中 嘉孝、山本 経之、石井 祐次、合成カンナビノイド JWH-018 による学習記憶障害機構: DNA マイクロアレイ解析. 日本法中毒学会第 37 年会、2018.7.6、東京.
- 16) Kazuhito Watanabe, Noriyuki Usami, Satoshi Yamaori, Yuji Hasegawa and Hironori Aramaki. Comparative metabolism of HU-210 and HU-211 in human liver microsomes: Role of particular CYP enzymes. *TIAFT (The International Association for Forensic Toxicologists) 2018*, 2018. 8.26~30, Ghent Belgium.
- 17) 李 任時、福森 良、武田 知起、宋 穎霞、森元 聡、渡邊 和人、有竹 浩介、山口 拓、花尻(木倉) 瑠理、田中 嘉孝、山本 経之、石井 祐次、合成カンナビノイド JWH-018 による内因性カンナビノイドの増加および生体影響. フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー、2018.9.10~11、佐世保.
- 18) 渡邊 和人、山折 大、宇佐見 則行、長谷川 雄司. ヒト CYP2J2 によるカンナビノイドの代謝. フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー、2018.9.10~11、佐世保.
- 19) 渡邊 和人、長谷川 雄司、長谷川 雄司、長田 茂宏、HU-210 および HU-211 市販品に含有する代謝物としての不純物. 日本法科学技術学会第 24 回学術集会、2018.11.8、東京.
- 20) 増田 和文、加藤 久登、貝原輝昭、石井みほ、高塚雄太、山折大、渡辺 和人、カンナビノイドによるヒト CYP1 酵素の EROD 活性阻害機構の分子ドッキング研究. 日本薬学会第 139 年会、2019.3.22、千葉.