

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20590130

研究課題名(和文)：マリファナ乱用防止のためのEBM：分子薬理学・生化学・毒性学的研究

研究課題名(英文)：The molecular pharmacological, biochemical and toxicological studies on the marihuana constituents (cannabinoids)-for the prevention of abused marihuana based on EBM

研究代表者

山本郁男 (YAMAMOTO IKUO)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50069746

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでマリファナ(大麻)の薬理および毒性に関して、三大主成分(カンナビノイド)、THC(tetrahydrocannabinol)、CBD(cannabidiol)、CBN(cannabinol)の代謝を中心に報告してきた。本研究においては、シクロヘキサン環を酸化して芳香環化に関与するCYP19(アロマターゼ)によるTHCの代謝を検討した結果、代謝物の1つが8-ヒドロキシCBNであることを同定した。そこで、CYP19が芳香環化と同時にCBNのヒドロキシル化に関与することを示唆した。一方、CYP19によってTHCとCBDからCBNが形成されることをGC/MS方法によって確認した。さらに、これらのカンナビノイドのステロイド代謝(CYP19と17 β -HSD(17 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素)によるアンドロステロン(AND)、テストステロン(TES)およびエストロン(E1)の代謝)に及ぼす影響を検討した。その結果、CYP19によってエストラジオール(E2)へのTESの代謝においてTHC、CBDおよびCBN(50 μ M)が、それぞれ16、60、46%阻害することが判明した。一方、CYP19によるTESのAND、およびE1のE2への代謝は、THC、CBDおよびCBNによってそれぞれ約20%阻害された。

したがって、本研究において、カンナビノイドが性ホルモンの代謝に深く関係していることが明らかとなり、内分泌かく乱作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported the metabolism of three major constituents of marijuana, THC (tetrahydrocannabinol), CBD (cannabidiol) and CBN (cannabinol) in relation to the pharmacological and toxicological effects of these cannabinoids so far. In the present study, we examined the metabolism of these cannabinoids by CYP19 (aromatase). As results, we indicated the 8-hydroxy-CBN metabolite, which is aromatized and/or hydroxylated from THC. Farther, the formation of CBN from THC and CBD by CYP19 was confirmed by GC/MS methods.

On the other hands, we examined the effects of these cannabinoids on the metabolism of steroids (androsterone; AND, testosterone; TES and estrone; E1) by CYP19 (aromatase) and 17 β -HSD (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase). We found that THC, CBD and CBN (50 μ M) inhibited 16, 60 and 46%, respectively, the metabolism of TES to estradiol (E2). The metabolism of AND to TES and E1 to E2 by CYP19 were inhibited about 20% with THC, CBD and CBN, respectively. This result suggests not only the interactions of these cannabinoids with the estrogen receptor, but also the endocrine disruptor-like effects of the marijuana constituents including their metabolites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：大麻、カンナビノイド、アロマトラーゼ (CYP19)、テトラヒドロカンナビノール (THC)、カンナビジオール (CBD)、カンナビノール (CBN)、芳香環化、ステロイド、内分泌かく乱作用

1. 研究開始当初の背景

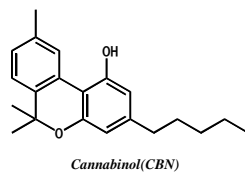
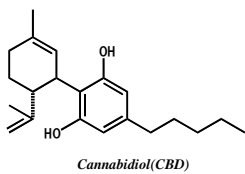
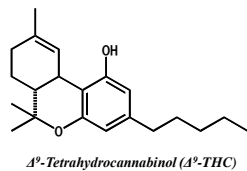
近年、マリファナ（大麻）は、「大麻取締法」によって厳しく規制されているにもかかわらず、依然として乱用者が増加。特に、大学生を含む青少年層への蔓延は大きな社会問題になっている。

最近の動向としては、マリファナは「安全である」といった誤った知識の情報が流布している。

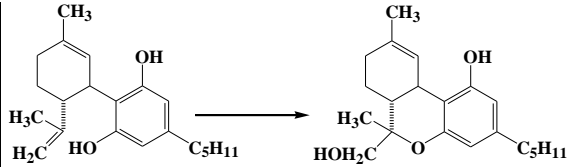
このような状況の中で、マリファナの薬理および毒性に焦点を絞り、またその乱用の根絶を目的とした EBM (Evidence Based Medicine) を確立することが、マリファナ乱用に至る「衝動的欲求」を理性的かつ科学的に抑止することによって乱用防止に寄与することを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

マリファナ（大麻）は、約 60 種を超えるカンナビノイド（下図参照）と呼ばれる C_{21} からなる化合物を含有している。これまでに我々は、マリファナの三大主成分、THC (tetrahydrocannabinol)、CBD (cannabidiol) および CBN (cannabinol) を主とする



薬毒理作用の発現機構解明を目的として、生体内代謝を中心に報告している。マリファナには、2 種の異株、CBDA (cannabidiol acid) および THCA (tetrahydrocannabinolic acid) 種があり、前者は丈夫な繊維質のため麻布や麻袋など産業用として幻覚作用を引き起こす成分の THC が生成されないよう産業用に品種改良され、後者は幻覚作用の本体である THC 含量が非常に高い品種で、一般的な嗜好品としてのマリファナを指す。これら 2 種の異株は古くなると CBN (THC 様の幻覚作用を有する) 含量が増加する。一方、下図に示すように CBD (幻覚作用を有さない) が、生体内においてエポキシド体を中間体として、THC に変換することを明らかにしている [I.

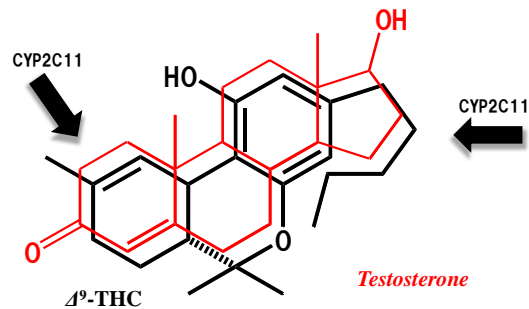


Cannabidiol (CBD)

6-Hydroxymethyl- Δ^9 -THC

Yamamoto, K. Watanabe, T. Matsunaga, T. Kimura, T. Funahashi, H. Yoshimura, "Pharmacology and Toxicology of Major Constituents of Marijuana-On the Metabolic Activation of Cannabinoids and Its Mechanism", J. Toxicol. TOXIN REVIEWS, 22, 577-589 (2003).]. したがって、THC および CBD は、生体内においても芳香環化を受け CBN に変換されることが予測される。

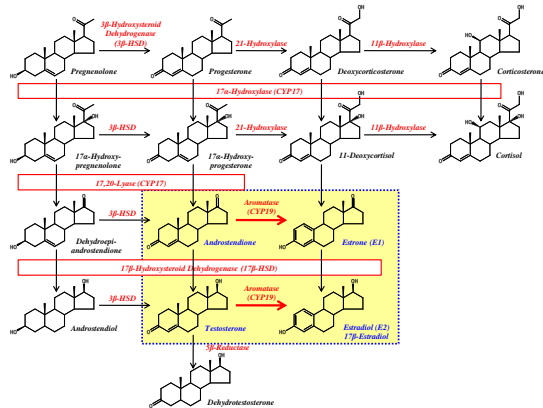
また、THC は下図に示したステロイド骨格に非常に近い構造であり、その代謝の攻撃部位がステロイドと酷似していることから、生体内においてステロイドホルモンの代謝系



に影響を及ぼし、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）様作用を惹起する可能性が考えられる。これらの事実を明らかにすることは、マリファナ乱用時における生理学的有害性が立証できるばかりでなく、マリファナは「安全でない」という事実を明らかにすることができる。特に第 2 次性徴が発現する青少年の成長期に重要な意味を持つ。今回、我々は内分泌攪乱物質様作用機構を明らかにする目的で、主要カンナビノイドの芳香環化に関与する CYP19 (アロマトラーゼ) の関与するアンドロステロン (AND) およびテストステロン (TES) の代謝に及ぼす影響を検討した。

一方、マリファナの生体内の内分泌かく乱作用が、身体的・精神的依存を引き起こす要因であると考え、その証拠を明らかにすることである。したがって、平成 20 年度では生体内におけるマリファナ成分の $THC \Rightarrow CBN$ 、 $CBD \Rightarrow CBN$ を明らかにし、平成 21 年度以降では、性ステロイド代謝に関与する酵素（アロマトラーゼ、CYP19 や 17β -ヒドロキシステロ

イド脱水素酵素、 17β -HSD) に対するマリファナ成分とその代謝物の阻害作用を検討した。



Scheme 1 Metabolic pathways of the steroid, pregnenolone to estradiol

3. 研究の方法

【実験方法 1】THC、CBD および CBN ($100\ \mu\text{M}$) は、 $40\ \text{pmol}$ Human CYP19 (BD Biosciences), $1.3\ \text{mM}$ NADP⁺, $0.4\ \text{U/mL}$ G-6-P dehydrogenase, $3.3\ \text{mM}$ MgCl₂ を含む $100\ \text{mM}$ リン酸緩衝液 (pH 7.4) $0.25\ \text{mL}$ 中、 37°C で 30 分間反応した。反応終了後、反応混液を酢酸エチル $3\ \text{mL}$ で抽出、有機層をエバポレートし、TMS 化した。なお、TMS 化は反応生成物の残渣を CH_3CN $15\ \mu\text{L}$ に溶解後、BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) $15\ \mu\text{L}$ および TMCS (Trichloromethylsilane) $5\ \mu\text{L}$ を加え、 60°C で 1 時間反応を行った。 CH_3CN $100\ \mu\text{L}$ に溶解し、 $10\ \mu\text{L}$ を GC/MS に注入し分析した。≪GC/MS 測定条件≫装置: Agilent 6890N GC/JMS-AMSUN200、カラム: HP-5 ($0.25\ \text{mm i. d.} \times 30\text{m}$, 膜厚 $0.25\ \mu\text{m}$)、カラム温度: $180\text{--}280^\circ\text{C}$ ($10^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温)、注入口および検出器温度: 300°C 、イオン化: $70\ \text{eV}$ 、キャリアーガス (流速): He ($1\ \text{mL}/\text{min}$) の条件下定量を行った。

【実験方法 2】≪CYP19 による THC、CBD および CBN の代謝≫ THC、CBD および CBN ($100\ \mu\text{M}$) は、 $40\ \text{pmol}$ Human CYP19 (BD Biosciences), $1.3\ \text{mM}$ NADP⁺, $0.4\ \text{U/mL}$ G-6-P dehydrogenase, $3.3\ \text{mM}$ MgCl₂ を含む $100\ \text{mM}$ リン酸緩衝液 (pH 7.4) $0.25\ \text{mL}$ 中、 37°C で 30 分間反応した。反応終了後、反応混液を酢酸エチル $3\ \text{mL}$ で抽出、有機層をエバポレートし、TMS 化した。なお、TMS 化は反応生成物の残渣を CH_3CN $15\ \mu\text{L}$ に溶解後、BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) $15\ \mu\text{L}$ および TMCS (trichloromethyl silane) $5\ \mu\text{L}$ を加え、 60°C で 1 時間反応を行った。 CH_3CN $100\ \mu\text{L}$ に溶解し、 $10\ \mu\text{L}$ を GC/MS に注入し分析した。≪GC/MS 測定条件≫装置: Agilent 6890N GC/JMS-AMSUN200、カラム: HP-5 ($0.25\ \text{mm i. d.} \times 30\text{m}$, 膜厚 $0.25\ \mu\text{m}$)、カラム温度: $180\text{--}280^\circ\text{C}$ ($10^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温)、注入口および

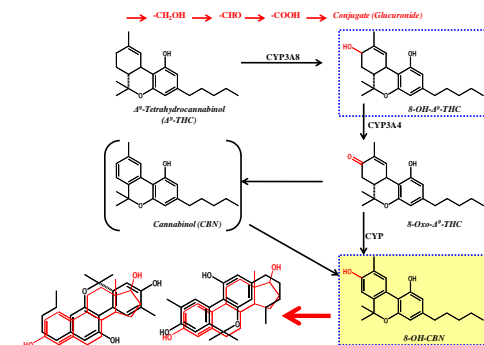
検出器温度: 300°C 、イオン化: $70\ \text{eV}$ 、キャリアーガス (流速): He ($1\ \text{mL}/\text{min}$) の条件下定量を行った。

【実験方法 3】THC、CBD および CBN による CYP19 の阻害: $100\ \mu\text{M}$ 7-methoxy-4-trifluoromethyl-coumarin、 $25\ \text{pmol}$ Human CYP19 (BD Biosciences, MA, U. S. A.), $0.1\ \text{mM}$ NADPH, $0\text{--}2\ \mu\text{M}$ cannabinoids (THC、CBD および CBN) を含む $100\ \text{mM}$ リン酸緩衝液 (pH 7.4) $0.20\ \text{mL}$ 中、 37°C で 30 分間反応し、反応終了後、蛍光マイクロプレートリーダー (Ex: 530nm , Em: 590nm) により測定を行った。なお、CYP19 阻害剤のケトコナゾール (KTC) を比較として用いた。

4. 研究成果

平成 20 年度は、CYP19 の関与するアンドロステロン (AND) →エストロン (E1) およびテストステロン (TES) →エストラジオール (E2) の代謝に及ぼすこれらカンナビノイドの影響について検討すると共に、 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (17β -HSD) による AND→TES および E1→E2 の代謝に及ぼす影響について検討した。

THC および CBD から CBN の生成が認められた。また、今回の条件下、CBN から 8 -hydroxy-CBN の生成が明らかとなった。このことから、生体内における CYP19 による芳香環化が示唆された。我々は、マリファナ主成分が生体内において多くの代謝物を生成することを明らかにしてきたが、CYP19 による THC および CBD の芳香環化が認められたことから、これらカンナビノイドの CYP19 による代謝が性ホルモンの合成系に関与することを示唆した。



Scheme 2 Proposed mechanism of monohydroxy-CBN formation from A⁹-THC and CBN in their metabolism by human CYP19 (aromatase)

TES および AND の E1 および E2 への芳香化に関与する CYP19 は、主要カンナビノイドによる阻害について一部報告があるものの、マリファナ三大主成分の詳細な阻害作用についてはこれまでに報告がなかった。平成 21 年度以降、CYP19 の関与する AND および TES、 17β -HSD (17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素) の関与する AND および E1 の代謝に及ぼす主要カンナビノイドの影響について

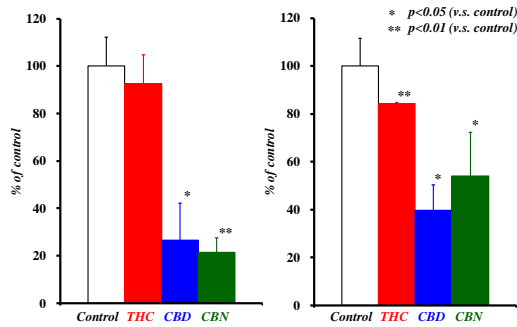


Fig. 1 Inhibition of aromatase (CYP19) by THC, CBD and CBN

Table 1 Inhibition of aromatase (CYP19) by THC, CBD and CBN, major cannabinoids of marijuana

	Androstenedione to estrone (E1)		Testosterone to estradiol (E2)	
	$\mu\text{mol}/\text{mg protein}$	% of control	$\mu\text{mol}/\text{mg protein}$	% of control
Control	48.4 \pm 5.9	100.0 \pm 12.2	11.7 \pm 1.3	100.0 \pm 12.3
THC	44.8 \pm 5.9	92.6 \pm 12.2	9.9 \pm 0.1**	84.2 \pm 0.6**
CBD	12.9 \pm 7.6*	26.6 \pm 15.7*	4.6 \pm 1.2*	39.6 \pm 11.4*
CBN	10.3 \pm 3.0**	21.3 \pm 6.1**	6.3 \pm 2.1*	54.1 \pm 19.3*

Mean \pm S.E. (n=3).

* Significantly different from control (p<0.05).

** Significantly different from control (p<0.01).

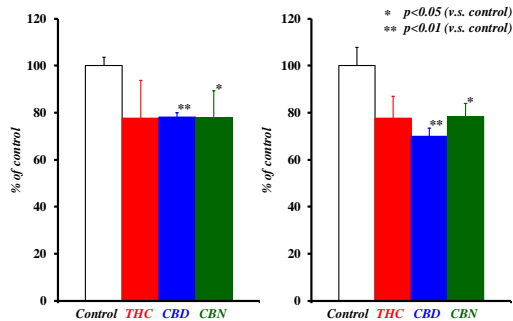


Fig. 2 Inhibition of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) by THC, CBD and CBN

Table 2 Inhibition of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) by THC, CBD and CBN

	Androstenedione to testosterone		Estrone (E1) to estradiol (E2)	
	$\mu\text{mol}/\text{mg protein}$	% of control	$\mu\text{mol}/\text{mg protein}$	% of control
Control	104.6 \pm 3.7	100.0 \pm 3.6	116.9 \pm 9.1	100.0 \pm 7.8
THC	81.3 \pm 16.9	77.7 \pm 16.2	90.8 \pm 10.9	77.7 \pm 9.4
CBD	81.7 \pm 2.0**	78.1 \pm 2.0**	82.0 \pm 4.0**	70.1 \pm 3.5**
CBN	81.6 \pm 11.9*	78.0 \pm 11.4*	91.6 \pm 6.5*	78.3 \pm 5.6*

Mean \pm S.E. (n=3).

* Significantly different from control (p<0.05).

** Significantly different from control (p<0.01).

検討した。CYP19は、主要カンナビノイド(THC、CBDおよびCBN)によって有意に阻害された。TESの酸化代謝では、THC、CBD、CBNによって濃度依存的に有意な阻害が認められた。このことから、ANDからE2への代謝経路においても影響を及ぼすことが示唆された。TESを基質としたCYP19によるアロマターゼ活性阻害は、THC、CBDおよびCBNにより各々16、60および46%であり、ANDでは各々7、73および79%であった。CBDおよびCBNはCYP19による両活性に対して有意な阻害を示した。一方、ANDの17β-HSD活性は、THC、CBD、CBNによりすべて約20%、E1では各々22、30、22%と有意な阻害を示した。また、KTC、THC、CBD

およびCBNのIC₅₀値は、それぞれ0.023、0.73、0.84および1.71 μMであった。このことは、大麻乱用者では、これらカンナビノイドが性ホルモンの生成に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

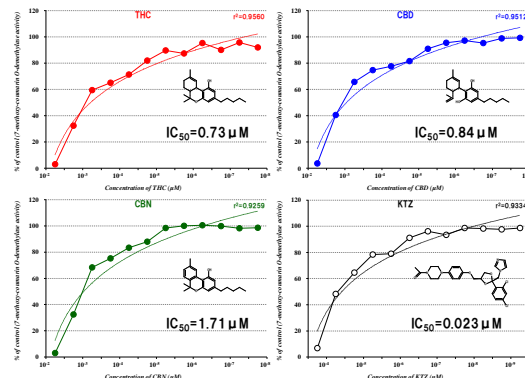


Fig. 3 Inhibition of aromatase (CYP19) by THC, CBD, CBN and ketoconazole (KTZ)

すなわち、ステロイド代謝において芳香環化に関与するCYP19がTHC、CBDおよびCBNにより阻害されたことから、これらカンナビノイドのCYP19による代謝が性ホルモンの合成系に関与することが示唆された。

今後、代謝物を含めたマリファナ成分の内分泌攪乱化学物質様作用を明らかにするため、エストロゲン受容体との相互作用を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5件)

1. Noriyuki Usami, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, General of reactive oxygen species during mouse hepatic microsomal metabolism of cannabidiol and cannabidiol hydroxy-quinone, Life Sciences, 83, 717-724 (2008)
2. 山本郁男、宇佐見則行、井本真澄、渡辺和人、大麻はなぜ怖い？—含有成分の構造とその作用—, 化学, 64, 31-37 (2009)
3. Shuso Takeda, Noriyuki Usami, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Cannabidiol-2',6'-dimethyl ether, a cannabidiol derivative, is a highly potent and selective 15-lipoxygenase inhibitor, Drug Metab. Dispos, 37, 1733-1737 (2009)
4. Shuso Takeda, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Modulation of Δ⁹-tetrahydrocannabinol-induced MCF-7 breast cancer cell growth by cyclooxygenase and aromatase, Toxicology, 259, 25-32 (2009)

5. Takeda S, Jiang R, Aramaki H, Imoto M, Toda A, Eyanagi R, Amamoto T, Yamamoto I, Watanabe K. : Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its major metabolite Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid as 15-lipoxygenase inhibitors. : J. Pharm. Sci., (2010)

[学会発表] (計4件)

1. 宇佐見則行、井本真澄、岸 信行、山本郁男、渡辺和人, ヒト CYP19 による主要大麻成分の代謝, 日本法中毒学会第28年会 (金沢) (2009)
2. 山本郁男、宇佐見則行、井本真澄、岸 信行、渡辺和人, 大麻主成分 (THC、CBD、CBN) の CYP19 によるステロイド代謝の阻害, 日本薬学会第130年会 (岡山) (2010)
3. 宇佐見則行、岸 信行、山本郁男、渡辺和人, 大麻主成分 (THC、CBD、CBN) の CYP19 および 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素によるステロイド代謝に及ぼす阻害機作, 日本法中毒学会第29年会 (東京) (2010)
4. 山本郁男、宇佐見則行、岸 信行、渡辺和人 : カンナビノイド (THC、CBD、CBN) の内分泌かく乱物質作用—カンナビノイドの芳香環化とステロイド代謝阻害, 日本薬学会第131年会 (静岡) (2011.3.)
5. 宇佐見則行、岸 信行、渡辺和人、山本郁男, 大麻主成分 (THC、CBD、CBN) のヒト CYP19 による性ステロイドホルモン代謝阻害機作, 日本法中毒学会第30年会 (長崎) (2011)

[図書] (計 件)

山本郁男, マリファナは怖い〜乱用薬物〜 (改訂版), 薬事日報社 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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0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

山本郁男 (YAMAMOTO IKUO)
九州保健福祉大学・薬学部・教授
研究者番号 : 50069746

(2) 研究分担者

宇佐見則行 (USAMI NORIYUKI)
奥羽大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 60257483

(3) 連携研究者

井本真澄 (IMOTO MASUMI)
第一薬科大学・助教
研究者番号 : 90369174