

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790176

研究課題名（和文）動脈硬化症治療薬創製への基盤：酸化 LDL 生成酵素阻害に基づくアプローチ

研究課題名（英文）A basis for the invention of anti-arteriosclerotic agent: A study focusing on agents capable of inhibiting oxidized LDL production

研究代表者

竹田 修三（TAKEDA SHUSO）

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00460379

研究成果の概要（和文）：現在、動脈硬化は国民病となっている。動脈硬化は幾つかの因子が複雑に関わり合い引き起されるが、最近、低密度リポタンパク質(LDL)が酸化されて生成する酸化 LDL が注目されている。LDL の酸化に関与するのが 15-リポキシゲナーゼという酵素である。本研究では、独自に繊維型大麻草成分から見出したカンナビジオール-2',6'-ジメチルエーテル (CBDD) が 15-LOX を強力かつ選択的に阻害することを突き止めた。さらに、その結果、酸化 LDL レベルが低下することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Arteriosclerosis is now well-known as one of the people diseases. The disease can be induced by interactions of many factor(s); however, it is being recognized that an oxidation of the low density lipoprotein (LDL) (*i.e.*, ox-LDL), mediated by 15-lipoxygenase (15-LOX), is a key step for development of the disease. In the present study, we demonstrated that CBDD potently and selectively inhibits 15-LOX enzymatic activity, coupled with abrogation of ox-LDL formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

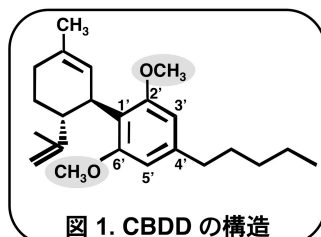
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：カンナビジオール-2',6'-ジメチルエーテル・15-リポキシゲナーゼ・動脈硬化・酸化 LDL・繊維型大麻草

1. 研究開始当初の背景

これまで大麻は乱用の観点から注目されてきたが、アメリカ、カナダなどの諸



外国ではその有用成分が注目され、医療用大麻として医薬品の地位を確立している。我々は、大麻草中に含まれる有用成分のスクリーニングならびにこれに続き候補化合物の合成・誘導体研究を行ってきた。その結果、アラキドン酸カスケードの一翼を担う酵素であるリポキシゲナーゼ(LOX)の阻害成分とし

て、カンナビジオール(CBD)を見出した。さらに、CBD をリード化合物として強力な 15-LOX 阻害活性(IC<sub>50</sub> 値=0.28 μM)を示す CBD-2',6'-ジメチルエーテル(CBDD)を見出すことに成功した(図 1)(Takeda et al., Drug Metab. Dispos., 37: 1733, 2009)。

低密度リポタンパク質(LDL)は酸化修飾を受け、酸化 LDL に変化して動脈硬化発症の引き金になると考えられている(酸化 LDL 仮説)。最近、日本の Ishigaki らにより、酸化 LDL が動脈硬化の主要因であることが実験動物を用いた検討により証明された(Circulation, 118: 75, 2008)。加えて、動脈硬化の病変部異での酸化 LDL の蓄積が確認されている。生体内で LDL の酸化がどのようにして起こるのかは十分にわかっていないが、最近になって血管壁における LOX による LDL 酸化が深く関与していることが明らかになりつつある。この酸化を行う酵素として LOX 分子種のひとつである 15-LOX が注目されている。

研究代表者らは、幸運にも繊維型大麻草の成分(カンナビジオール、CBD)から CBDD を見出すことに成功していた。これまで、15-LOX に対する強力な選択的な阻害剤はなく、医薬品としての 15-LOX 阻害剤も存在しない。動脈硬化症は脂質異常症(高脂血症)、糖尿病、高血圧、喫煙など様々なリスク因子により生じると考えられているが、酸化 LDL が関与する脂質異常症が最大の要因と考えられている。既存の治療薬に LDL レベルを低下させるものがあるが、LDL 全体を低下させることや過度な低下作用による問題点も指摘されている。

本研究の目的は、独自に見出した 15-LOX 阻害分子 CBDD による 15-LOX 阻害メカニズムを明らかにし、CBDD が 15-LOX 阻害剤ならびに酸化 LDL 生成の抑制剤であることを検証する。このことにより、CBDD をベースとした動脈硬化症治療薬開発への新規分子基盤を確立することを目指す。

## 2. 研究の目的

項目 1 でも述べたが、本研究では、繊維型大麻草成分(CBD)をリード化合物として独自に見出したカンナビジオール-2',6'-ジメチルエーテル(CBDD)を応用することにより、動脈硬化症治療薬開発への分子基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) CBDD/候補化合物由来代謝物の安全性評価・in vivo 研究

これまでの in vitro 阻害研究で得られた結果の妥当性を in vivo で検証す目的で、動脈硬化モデル動物(apoE 欠損マウス)を使用し、CBDD を投与しその効果を検討する。本マウスは、apoE を遺伝的に欠損しており、通常の

飼育下で動脈硬化を発症する。

(2) CBDD による 15-LOX 阻害メカニズムの解析

i) CBDD による 15-LOX 阻害メカニズムを反応速度論的解析により解析する。また、分子モデリングにより得られた知見(後述参照)を基に 15-LOX の変異体を作成し、その影響を検討する。酵素源としては、発現細胞画分および精製酵素を用いる。ii) 結晶化実験(X 線構造解析)から得られる情報は有用であるが、その困難さも考慮し、本研究では、CBDD と 15-LOX の分子モデリング解析を実施する(産総研: 福西主任研究員との共同研究)。これにより得られた推定結合部位に関する情報から、CBDD による阻害メカニズムを推測する。さらに、15-LOX のアミノ酸置換変異体を作成し、モデリングの結果の妥当性を検証し、より真実性の高い阻害メカニズム情報を収集する。

## 4. 研究成果

(1) 主な研究成果: ①これまでの検討では、15-LOX の基質としてリノール酸やアラキドン酸などの脂肪酸を用いてきた。これらの脂肪酸はコレステロールエステルの形で LDL 中に含まれている。そこで、コレステロールエステルを 15-LOX の基質として酵素活性に与える CBDD の影響を調査した。その結果、CBDD は濃度依存的に 15-LOX の活性を阻害した。さらに、CBDD がコレステロールエステルが実際に含まれている LDL を 15-LOX の基質とした場合に与える影響を調査した。LDL は、酵素的(15-LOX)あるいは非酵素的(Cu<sup>2+</sup>による酸化)に酸化修飾を受け、酸化 LDL に変化することが知られている。そこで、本検討では、CBDD が LDL から酸化 LDL 生成に与える影響を 15-LOX あるいは Cu<sup>2+</sup>存在下で比較検討した。その結果、CBDD は Cu<sup>2+</sup>による酸化 LDL 生成には影響を与えずに、15-LOX による酵素的反応を介した酸化 LDL 生成を阻害することが判明した(図 2、レーン 3 vs. 5, 9 vs. 10-12)。なお、図中には酸化 LDL を ox-LDL と示しており、Cu<sup>2+</sup>ないしは 15-LOX によって LDL が酸化修飾を受けて ox-LDL に変化すると、分子中の陰性電荷が増大して泳動度が大きくなる。

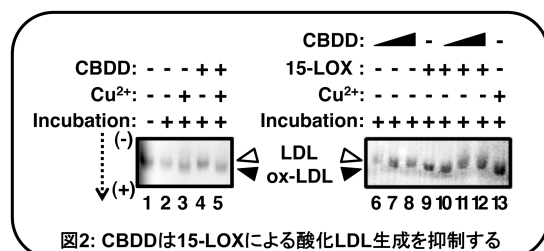


図2: CBDDは15-LOXによる酸化LDL生成を抑制する

②CBDDによる15-LOX阻害メカニズムを検証するにあたり、CBDDと15-LOXとのドッキングシミュレーションを行った。CBDDのリード化合物であるCBD(カンナビジオール)と併せて解析を行った。CBDDは、CBDの2'と6'のフェノール性水酸基(-OH)をジメチル化したものである(図1参照)。CBDDとCBDとの比較で、CBDDと15-LOXとの相互作用は主として油の環境、すなわち疎水性相互作用によることが示唆された(産総研: 福西主任研究員との共同研究)。15-LOXの発現変異体を用いたより詳細な解析は今後の課題となった。

③ 動脈硬化モデルマウスを用いた検討から、CBDDはモデルマウス中の酸化LDLレベルを抑制する傾向にあった。このことは特記すべきことではあるが、同時にマウスの体重が増加するなどの問題点も浮上した。これらは残された課題となり、以下に示す今後の課題となった。

(2)得られた成果の位置づけとインパクト: これまで、LDLが悪玉コレステロールと認識されていたが、最近では、LDLが酸化して生成する酸化LDLが超悪玉コレステロールとして注目されている。しかし、現在までに酸化LDL生成酵素である15-LOXを標的とした医薬品はない。わが国では、食生活の欧米化に伴い生活習慣病患者が増加している。特に動脈硬化は、心筋梗塞や脳梗塞などの基礎疾患であり、その対策は急務である。今後、本研究で得られた成果を基盤として、CBDDをリード化合物とした新規医薬品が誕生することを期待したい。

(3)今後の展望: 本研究では、研究代表者らが独自に見出した15-LOX阻害剤のCBDDを研究ツールとして解析を行った。得られた成果の一部はその先駆性が評価され、先に熊本で開催された第29回九州支部大会学術奨励賞の受賞に繋がった(下に詳細を記す)。しかし、研究の中心はin vitro(試験管内)で得られたものであり、今後はより多くの動物種を用いたin vivo実験を行い(なお、本研究はマウスモデルで実施した)、創薬に向けた基盤を確立しなければならない。

なお、本研究成果の一部が評価され、研究代表者は第29回九州支部大会学術奨励賞を受賞した(2012年12月、熊本大学薬学部にて開催)。受賞演題は、「繊維型大麻草成分カンナビジオールを基盤としたメディシナルケミストリー」である。

## 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3件)

- ① Takeda S., Okajima S., Miyoshi H., Yoshida K., Okamoto Y., Okada T., Amamoto T., Watanabe K., Omiecinski C.J., Aramaki H. Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol. Lett.* **214**:314–319 (2012) (査読有). DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.08.029
- ② Takeda S., Hirayama, H., Urata, S., Mano, N., Fukagawa, K., Imamura, M., Irii, A., Kitajima, M., Masuyama, T., Momiyama M., Tatei, S., Tomota, S., Kudo, T., Noguchi, M., Yamaguchi, Y., Okamoto, Y., Amamoto, T., Fukunishi, Y., Watanabe, K., Omiecinski, C.J., and Aramaki H. Cannabidiol-2',6'-dimethyl ether as an effective protector of 15-lipoxygenase-mediated low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **34**:1252–1256 (2011) (査読有). DOI: org/10.1248/bpb.34.1252
- ③ 竹田修三、Medicinal Chemistry and Pharmacology Focused on Cannabidiol, a Major Component of the Fiber-Type Cannabis, YAKUGAKU ZASSHI (招待による総説) (査読有). 2013年発刊予定であるため、DOIは記載していない。

[学会発表] (計5件)

- ① 竹田修三、繊維型大麻草成分カンナビジオールを基盤としたメディシナルケミストリー (第29回日本薬学会九州支部大会奨励賞受賞講演) (2012年12月)(熊本).
- ② 竹田修三、吉田和貴、西村 肇、渡辺和人、荒牧弘範、繊維型大麻草の主成分であるカンナビジオール酸は乳がん細胞migrationを抑制する。フォーラム2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012年10月)(名古屋).
- ③ 竹田修三、岡本美子、渡辺和人、岡田智子、荒牧弘範. カンナビノイド受容体アゴニストによる高転移性乳がん細胞のmigration抑制機構。第131回日本薬学会年会シンポジウム (2011年3月)(静岡).
- ④ 工藤太智、竹田修三、岡本美子、福西快文、渡辺和人、荒牧弘範.

Cannabidiol-2',6'-dimethyl ether による超悪玉コレステロール生成阻害.  
第 28 回日本薬学会九州支部大会 (2011 年 12 月) (福岡).

- ⑤ 竹田修三、野口桃子、工藤太智、山口泰弘、岡本美子、福西快文、渡辺和人、荒牧弘範. 繊維型大麻草成分誘導体 CBDD による超悪玉コレステロール酸化 LDL 生成の阻害. フォーラム 2011 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011 年 10 月) (金沢).

[その他]

ホームページ等

1. 第一薬科大学分子生物学分野ウェブサイト:

<http://210.151.112.51/kenkyu/sites/bunsi/>

2. 日本薬学会九州支部ウェブサイト:

<http://shibu.pharm.or.jp/kyushu/award/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹田 修三 (TAKEDA SHUSO)

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 00460379

研究代表者(1)のほか、代表者が所属する研究室員の協力により、研究を遂行した。