

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460176

研究課題名(和文) 主要フィトカンナビノイドのヒト脳および肺における代謝ならびにその毒性学的意義

研究課題名(英文) Metabolism of major phytocannabinoids in human brain and lung microsomes and its toxicological implication

研究代表者

渡辺 和人 (Watanabe, Kazuhito)

北陸大学・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：主要大麻成分(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)のヒト脳、肺および胎盤における毒性発現機構解明の一環として、以下の点を明らかにした。(1) ヒト脳ミクロソームによる代謝、(2) ヒト肺ミクロソームによる代謝、(3) ヒト胎盤ミクロソームおよびCYP19による代謝、(4) ヒト脳および肺ミクロソームによるMALDO活性、(5) ヒト脳および肺ミクロソームにおけるアナンダミドおよび2-アラキドノイルグリセロール加水分解阻害作用、(6) THC代謝物のカンナビノイド受容体を介した細胞毒性(マウス肺マクロファージJ774-1細胞)。

研究成果の概要(英文)：Metabolic interactions of major phytocannabinoids (tetrahydrocannabinol, THC; cannabidiol, CBD; cannabinol, CBN) with microsomes from human brain, lung and placenta were investigated as part of toxicological study of these cannabinoids on extrahepatic tissues and following points were clarified: (1 & 2) metabolism of cannabinoids with human brain and lung microsomes. (3) metabolism of cannabinoids with human placenta microsomes and CYP19. (4) microsomal aldehyde oxygenase (MALDO) activity in human brain and lung microsomes for 11-oxo-THC. (5) inhibitory effects of cannabinoids on hydrolysis of anandamide and 2-arachinoylglycerol with human brain and lung microsomes. (6) Cytotoxicity of THC metabolites to mouse lung macrophage J774-1 cells.

研究分野：衛生化学裁判化学

キーワード：大麻成分 テトラヒドロカンナビノール カンナビジオール カンナビノール 脳 肺 代謝 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

大麻中にはカンナビノイドと総称される C、H、O から成る特異成分が 70 種以上含有される。この中でテトラヒドロカンナビノール (THC)、カンナビジオール (CBD) およびカンナビノール (CBN) が主成分である。このうち、THC が向精神作用の本体である。近年、THC と類似の作用を有する合成カンナビノイドを含む脱法ハーブの乱用が大きな社会問題になっている。これらと区別するために大麻に含有されるものを通常フィトカンナビノイドと称している。フィトカンナビノイドはいずれも高い脂溶性を有し、生体内に摂取されると主に肝臓中の薬物代謝酵素により化学変換を受け数多くの代謝物を生成する。動物実験からフィトカンナビノイドの代謝の概略が明らかにされており、シトクロム P450 (CYP) が主要な代謝酵素である。THC については、これまでに酸化的代謝物に限っても、*in vitro* および *in vivo* を併せると 100 種を超える代謝物の報告がある。これらの中には 11-hydroxy-THC、11-oxo-THC、epoxyhexahydrocannabinol (EHHC) のように THC を上回る薬理・毒性を有する活性代謝物も知られており、THC の代謝は作用発現と密接に関連することが明らかにされている。また、主要フィトカンナビノイドは、ヒトにおいても主に肝小胞体に存在する CYP により酸化的代謝を受けることが明らかになっている (K. Watanabe et al., *Biochem. Pharmacol.*, 46, 405 (1993); *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27, 741(1995); *Foren. Toxicol.*, 24, 80 (2006); *Life Sci.*, 80, 16 (2007) & 89, 165 (2011))。

2. 研究の目的

フィトカンナビノイドは主に吸煙により肺から吸収され、主に脳へ移行し向精神作用を発揮することを考慮すると、肺および脳での代謝は肝以上に重要なことが推察される。しかし、フィトカンナビノイドの肺および脳における代謝の報告としては、過去には当研究

室で報告した THC の動物脳ミクロソームでの代謝 (K. Watanabe et al., *BBRC*, 157, 75 (1988) およびイヌ肺の灌流実験 (M. Widman et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 27, 842 (1975)) が報告されているのみであった。これに加えて最近、当研究室ではマウス脳ミクロソームにおける THC の代謝に CYP3a 酵素の関与する知見を得ている (K. Watanabe et al., *Foren. Toxicol.*, 29, 56 (2011))。このマウス脳ミクロソームでの主要な代謝物は、4'-hydroxy- および 5'-hydroxy-THC であり、肝での主要な代謝反応である 11-hydroxy-THC とは異なる。しかし、ヒト脳および肺におけるフィトカンナビノイドの代謝については、未解明のままである。脳および肺に発現している CYP 分子種は、肝とは異なるパターンを示すことから、フィトカンナビノイドのこれら臓器における代謝を明らかにすることは、臓器毒性学的見地から重要であるのみならず、ヒト脳および肺における CYP による化学物質の代謝の観点からも重要な知見を与えることになる。この他にも、肝以外の組織として胎盤を用いてフィトカンナビノイドの代謝反応の検討を加えた。

3. 研究の方法

- 1) ヒト脳ミクロソームによる主要カンナビノイドの代謝反応を行い、GC-MS により解析し、生成する代謝物および代謝に関与する CYP 分子種を解析した。
- 2) ヒト肺ミクロソームによる主要カンナビノイドの代謝反応を行い、GC-MS により解析し、生成する代謝物および代謝に関与する CYP 分子種を解析した。
- 3) ヒト胎盤ミクロソームおよび CYP19 による主要カンナビノイドの代謝反応を行い、GC-MS により解析し、生成する代謝物および代謝に関与する CYP 分子種を解析した。
- 4) ヒト脳および肺ミクロソームによるフィトカンナビノイドの代謝に関連して、11-oxo-THC を基質とした Microsomal

aldehyde oxygenase (MALDO) について、反応の有無と $^{18}\text{O}_2$ を用いた分子状酸素からの取り込みを GC-MS により解析した。

5) 内因性カンナビノイド (アナンダミド および 2-アラキドノイルグリセロール) のヒト脳および肺における代謝を検討し、主要カンナビノイドの阻害作用を解析する。

6) ヒト脳および肺における主要フィトカンナビノイドの代謝物について、マウス肺マクロファージ J774-1 細胞に対する細胞毒性とその機構をカンナビノイド受容体の関与を含めて解析する。

4. 研究成果

1) ヒト脳ミクロソーム (Ms) により、 Δ^8 -THC は 7α - および 11-hydroxy- Δ^8 -THC へ、 Δ^9 -THC は 8α - および 11-hydroxy- Δ^9 -THC へ、CBN は 8- および 11-hydroxy-CBN へとそれぞれ代謝された。この結果は、先に我々が報告した各種動物脳 Ms によるこれらカンナビノイドの主代謝物がペンチル側鎖の 4'-または 5'-hydroxy 体であることと大きな相違が見られた。また、ヒト脳 Ms による CBD の主要な代謝物は、 6α -、 6β - および 7-hydroxy-CBD であり、さらにペンチル側鎖の 1'-、4'- および 5'-hydroxy 体が認められた。側鎖の酸化代謝物中では、4'-hydroxy-CBD の生成量が最も多かった。ヒト脳 Ms における CBD の代謝物生成のパターンは、ヒト肝 Ms に比較的類似していた。さらに、ヒト脳 Ms における CBD の代謝物生成活性は、CYP2C、CYP2D および CYP3A 抗体の添加により一部阻害された。

2) ヒト肺 Ms による主要カンナビノイドの代謝においても、脳 Ms と同様な代謝様式が認められた。

3) ヒト CYP19 およびヒト胎盤 Ms により、 Δ^9 -THC は選択的に 8α -hydroxy- Δ^9 -THC へと代謝された。 Δ^8 -THC については、いずれの酵素源を用いた場合にも代謝物の生成は確認出来なかった。CBN はいずれの酵素源を用いた場合にも、8-hydroxy-CBN および

11-hydroxy-CBN が主要代謝物として生成した。生成比は 8-hydroxy-CBN > 11-hydroxy-CBN であった。CBD は、CYP19 により 6α -hydroxy-CBD > 6β -hydroxy-CBD > 7-hydroxy-CBD = 1'-hydroxy-CBD へと代謝された。CYP19 およびヒト胎盤 Ms によるフィトカンナビノイドの代謝活性は、いずれも CYP19 の典型的な阻害剤であるアンドロステンジオンおよび 2-アミノグルテチミドにより強く阻害された。 Δ^9 -THC、CBN および CBD は、CYP19 の代謝活性 (基質: ジベンジルフルオレスセイン) を阻害した ($\text{IC}_{50} = 25 \sim 35 \mu\text{M}$)。また、 Δ^9 -THC および CBN の CYP19 による主要代謝物 (8α -hydroxy- Δ^9 -THC および 8-hydroxy-CBN) の CYP19 阻害作用は、母化合物と同等かやや弱かった。

4) ヒト脳および肺 Ms により 11-oxo-THC はカルボン酸体 (THC-11-oic acid) へと代謝された。脳および肺 Ms によるいずれの反応においても、酸素-18 気相下に生成した THC-11-oic acid には酸素-18 の取り込みが認められた。したがって、反応は一原子酸素添加反応により進行することが明らかとなり、ヒト脳および肺 Ms 中に microsomal aldehyde oxygenase (MALDO) の存在が明らかとなった。

5) 主要カンナビノイド (Δ^9 -THC、CBN および CBD、 $129 \mu\text{M}$) は、ヒト脳ミクロソームのアナンダミド水解酵素活性をいずれも有意に阻害した。また、これらカンナビノイドはヒト肝ミクロソーム中のアナンダミド水解酵素活性には、同条件下影響を与えなかった。これらは先に報告したマウスの結果 (K. Watanabe et al., Biol. Pharm. Bull., 19, 1109-1111 (1996) と同様な傾向であったが、ヒトでの阻害作用はマウスよりもかなり弱かった。 Δ^9 -THC および CBD $129 \mu\text{M}$) は、脳ミクロソーム中の 2-アラキドノイルグリセロール水解活性を阻害した。CBN を含む主要カンナビノイドは、肝ミクロソーム中の 2-アラキドノイルグリセロール水解活性には

影響を与えなかった。

6)マウス肺マクロファージ J774-1 細胞に対する細胞毒性を検討したところ、 Δ^8 -THC は、11-hydroxy- Δ^8 -THC および 11-oxo- Δ^8 -THC より強い細胞毒性を示した (IC_{50} = $5.38 \mu M$)。また、 Δ^8 -THC-11-oic acid は $20 \mu M$ までほとんど細胞毒性を示さなかった。(毒性の強さは Δ^8 -THC >> 11-hydroxy- Δ^8 -THC = 11-oxo- Δ^8 -THC >>> Δ^8 -THC-11-oic acid の順)

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 12 件)

- 1) Kazuhito 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, in press (2016). (査読あり)
- 2) Satoshi Yamaori, Yuka Kinugasa, Rongrong Jiang, Shuso Takeda, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Cannabidiol induces expression of human cytochrome P450 1A1 mediated through aryl hydrocarbon receptor signaling via protein tyrosine kinase activation in HepG2 cells. *Life Sci.*, 136, 87-93 (2015). (査読あり)
- 3) Shuso Takeda, Eriko Ikeda, Shengzhong Su, Mari Harada, Hiroyuki Okazaki, Yasushi Yoshioka, Hajime Nishimura, Hiroyuki Ishii, Kazuhiro Kakizoe, Aya Taniguchi, Miki Tokuyasu, Taichi Himeno, Kazuhito Watanabe, Curtis J. Omiecinski and Hironori Aramaki: Δ^9 -THC modulation of fatty acid 2-hydroxylase (FAH2) gene expression: possible involvement of induced levels of PPAR α in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology*, 326: 18-24 (2014). (査読あり)
- 4) Shuso Takeda, Hiroyuki Okazaki, Eriko Ikeda, Satomi Abe, Yasushi Yoshioka, Kazuhito Watanabe and Hironori Aramaki: Down-regulation of cyclooxygenase-2

(COX-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells. *J. Toxicol. Sci.*, 39 (5): 711- 716 (2014). (査読あり)

- 5) Satoshi Yamaori, Yoshimi Okushima, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Characterization of the structural requirement for potent mechanism-based inhibition of human cytochrome P4501A1 by cannabidiol. *Chem. Biol. Interact.*, 215: 62-68 (2014). (査読あり)
- 6) Satoshi Yamaori, Mika Kushihara, Kyoko Koeda, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Significance of CYP2C9 genetic polymorphism in inhibitory effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on CYP2C9 activity. *Forensic Toxicol.*, 31: 70-75 (2013). (査読あり)
- 7) Shuso Takeda, Mari Harada, Shengzhong Su, Shunsuke Okajima, Hiroko Miyoshi, Kazutaka Yoshida, Hajime Nishimura, Yoshiko Okamoto, Toshiaki Amamoto, Kazuhito Watanabe, Curtis J. Omiecinski and Hironori Aramaki: Induction of the fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) gene by Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human breast cancer cells. *J. Toxicol. Sci.*, 38 (2), 305-308 (2013). (査読あり)
- 8) Kazuhito Watanabe, Misa Miyamoto, Satoshi Yamaori, Koutarou Hasegawa, Kanako Watanabe, Oosamu Suzuki: Human brain microsomes: their abilities to metabolize tetrahydrocannabinols and cannabinol. *Forensic Toxicol.*, 31(2), 307-311 (2013). (査読あり)
- 9) Rongrong Jiang, Satoshi Yamaori, Yasuka Okamoto, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 28 (4), 332-338 (2013). (査読あり)
- 10) Satoshi Yamaori, Yoshimi Okushima, Kazufumi Masuda, Mika Kushihara, Takashi Katsu, Shizuo Narimatsu, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Structural Requirements for potent direct inhibition of human cytochrome P450 1A1 by cannabidiol: role of pentylresorcinol moiety. *Biol. Pharm. Bull.*, 36(7), 1197-1203 (2013). (査読あり)
- 11) Shuso Takeda, Kazutaka Yoshida, Hajime Nishimura, Mari Harada, Shunsuke Okajima, Hiroko Miyoshi,

Yoshiko Okamoto, Toshiaki Amamoto, Kazuhito Watanabe, Curtis J. Omiecinski and Hironori Aramaki: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol disrupts estrogen-signaling through up-regulation of estrogen receptor β (ER β). *Chem. Res. Toxicol.*, 26(7), 1073-1079 (2013). (査読あり)

12) Satoshi Yamaori, Hirosuke Ishii, Kenzo Chiba, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Δ^8 -Tetrahydrocannabinol induces cytotoxicity in macrophage J774-1 cells: involvement of cannabinoid receptor 2 and p38 MAPK. *Toxicology*, 314: 254-261 (2013). (査読あり)

[学会発表] (計 21 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 136 年会、横浜市、パシフィコ横浜展示ホール(2016.3.28).

2) 北村雅史、地中 啓、中村 耕、荒金眞佐子、渡辺和人、佐々木陽平、発芽過程における大麻草種子 mRNA の発現変化、日本法科学技術学会第 21 回学術集会、柏市、柏の葉カンファレンスセンター(2015.11.12).

3) Satoshi Yamaori, Yosuke Nagata, Shigeru Ohmori, Ikuo Yamamoto and Kazuhito Watanabe: Potency and mechanism of CYP2J2 inhibition by major phytocannabinoids. 20th North American ISSX Meeting, Orlando, USA, October 18-22 2015

4) Kazuhito Watanabe, Kiyo Inoue, Maki Murai, Noriyuki Usami, Satoshi Yamaori and Ikuo Yamamoto: Metabolism of major phytocannabinoids by human placenta microsomes and CYP19. TIAFT 2015, the 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, Firenze, Italy, August 30-September 4, 2015

5) Kazuhito Watanabe, Satoshi Yamaori, Rongrong Jiang, Yuka Kinugasa, Yoshimi Okushima and Ikuo Yamamoto: Inducibility of CYP enzymes by cannabidiol. 25th Annual

Symposium of the ICRS, Wolfville, Canada, June 28-July 3, 2015

6) 渡辺和人、金井正鷹、宮城岳晃、本田 剛、宇佐見則行、岩室嘉晃、地中 啓、山本郁男、大麻主成分の Duquenois 反応-反応呈色物質の質量分析による構造解析、日本法中毒学会第 34 年会、福岡市、九州大学医学部百年講堂(2015.6.26).

7) 渡辺和人、合成カンナビノイドの歴史的経緯 (シンポジウム: 合成カンナビノイドを考える)、日本法中毒学会第 34 年会、福岡市、九州大学医学部百年講堂(2015.6.26).

8) 渡辺和人、井上貴代、村井真紀、宇佐見則行、山本郁男、ヒト CYP19 による主要フィトカンナビノイドの代謝、日本薬学会 135 年会、神戸市、神戸サンボーホール(2015.3.28).

9) 石井宏幸、池田恵理子、竹田修三、岡崎裕之、姫野太一、谷口彩、吉岡靖史、西村肇、渡辺和人、荒牧弘範、大麻主成分 Δ^9 -THC による PPAR α を介した FA2H の発現制御メカニズムの解明、第 31 回日本薬学会九州支部会、福岡市、第一薬科大学(2014.12.6).

10) 池田恵理子、岡崎裕之、竹田修三、渡辺和人、荒牧弘範、大麻主成分 Δ^9 -THC のマウス概日時計機構に与える影響、第 21 回日本時間生物学会学術大会、福岡市、九州大学百年講堂(2014.11.7).

11) 渡辺和人、宮本美佐、岩田佳祐、宇佐見則行、山折 大、長谷川弘太郎、渡部加奈子、鈴木 修、山本郁男、ヒト脳ミクロソームによる主要カンナビノイドの代謝、フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば市、つくば国際会議場(2014.9.20).

12) 吉岡靖史、池田恵理子、竹田修三、石井宏幸、西村肇、渡辺和人、荒牧弘範: PPAR α にアゴニスト作用を示さない Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールによる PPAR α の活性化と制御下遺伝子 FA2H の発現、フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば市、つくば国際会議場(2014.9.20).

13) 姫野太一、岡崎裕之、池田恵理子、垣添和弘、吉岡靖史、徳安美紀、谷口彩、石井宏幸、竹田修三、渡辺和人、荒牧弘範、大麻主成分 Δ^9 -THC による子宮機能障害: ER α 機能破綻と細胞外マトリックス分解酵素の発現誘導、フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば市、つくば国際会議場(2014.9.20).

14) Satoshi Yamaori, Mio Shionoiri, Shigeru Ohmori and Kazuhiro Watanabe: Evaluation of luciferin-4A O-demethylase activity as a CYP4A11 marker in human liver and kidney microsomes. 19th ISSX and 29th JSSX, San Francisco, USA, October 13-23 2014

15) Kazuhiro Watanabe, Satoshi Yamaori, Yoshimi Okushima and Ikuo Yamamoto: Characterization of structural requirement for potent mechanism-based inhibition of human CYP1A1 by cannabidiol. 24th Annual Symposium of the ICRS, Baveno, Italy, June 28-July 3, 2014

16) 渡辺和人、桐山貴衣、小林未奈美、西澤美奈子、山本郁男、長谷川弘太郎、渡部加奈子、鈴木 修、ヒト脳および肺 microsomal aldehyde oxygenase (MALDO) による 11-oxo-tetrahydrocannabinol の代謝、日本薬学会 133 年会、熊本市、熊本市総合体育館(2014.3.28).

17) 吉岡靖史、竹田修三、西村肇、池田恵理子、渡辺和人、Shengzhong Su, Curtis J Omiecinski、荒牧弘範、大麻主成分 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールによる fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) の発現誘導: PPAR α を介したメカニズム、日本薬学会九州支部会、佐世保市、長崎国際大学(2013.12.7).

18) 渡辺和人、山折 大、長谷川弘太郎、渡部加奈子、鈴木 修、山本郁男、ヒト肝 Microsomal Aldehyde Oxygenase (MALDO) による各種アルデヒド類の代謝、フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー、福岡市、九州大学医学部百年講堂

(2013.9.13) .

19) 吉田和貴、竹田修三、西村肇、池田恵理子、渡辺和人、荒牧弘範、 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールによる ER β 発現誘導を介したエストロゲン/ER α 機能抑制、フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー、福岡市、九州大学医学部百年講堂 (2013.9.13) .

20) Satoshi Yamaori, Yoshimi Okushima, Kazufumi Masuda, Mika Kushihara, Takashi Katsu, Shizuo Narimatsu, Shigeru Ohmori, Ikuo Yamamoto and Kazuhiro Watanabe: Structural requirements for potent direct inhibition of human CYP1A1 by cannabidiol. 23rd Annual Symposium of the ICRS, Vancouver, British Columbia, Canada, June 21-26 2013

21) Kazuhiro Watanabe (an invited speaker): Inhibitory effects of major phytocannabinoids on human cytochrome P450s and its toxicological significance in drug interactions. Symposium on Preventive Pharmacy and Public Health, 2013 Spring Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, Suncheon, Korea, April 18-19, 2013

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 和人 (WATANABE KAZUHITO)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号: 30113038