

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 18日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790159

研究課題名（和文） 大麻成分による薬毒物および内因性物質の代謝阻害の分子機構

研究課題名（英文） Mechanisms underlying inhibition of human cytochrome P450 enzymes by major phytocannabinoids

研究代表者

山折 大（YAMAORI SATOSHI）

信州大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40360218

研究成果の概要（和文）：本研究では、大麻の薬理・毒性研究の一環として大麻摂取による有害作用に着目し、大麻の3大成分である THC、CBD および CBN が薬毒物や内因性物質の代謝に関わるシトクロム P450（CYP）の活性を阻害するか否かを解析した。その結果、これら主要フィトカンナビノイドが種々の CYP 分子種（CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2J2、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP4F2、CYP4F3B、CYP4F12）の活性を阻害することを明らかにした。その機構として、可逆的な阻害（競合、非競合、混合）や不可逆的な阻害など CYP 分子種によって異なる阻害様式を示した。

研究成果の概要（英文）：Effects of three major phytocannabinoids, THC, CBD and CBN, on human cytochrome P450 (CYP) activities were investigated. THC, CBD and CBN inhibited many CYP activities (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP4F2, CYP4F3B, CYP4F12) to various extents. Inhibitions by THC, CBD and CBN were reversible (competitive, noncompetitive and mixed types) and/or irreversible depending on CYP isoforms examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：中毒学、異物代謝、分子毒性学

1. 研究開始当初の背景

大麻は「大麻取締法」により厳しく規制されている乱用薬物である。国連薬物犯罪オフィスによる2007年度の統計データによると、世界における大麻の乱用者は約1億4300万～1億9000万人と試算されている。大麻摂取による生体への有害作用についてはこれまで多くの研究がなされ、幻覚作用をはじめ多くの薬理・毒性作用が大麻の主成分の1つである Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール（THC）に起因することが報告されている。一方、別の大麻主成分であるカンナビジオール（CBD）およびカンナビノール（CBN）については向

精神作用をほとんど示さないことから、毒性的な知見は THC に比較して少ない。

これら主要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で代謝され、多くの酸化的代謝物が生成される。これらフィトカンナビノイドの代謝に関与する主要な酵素は CYP であり、特にヒトにおいては CYP2C および CYP3A が重要な役割を果たしている。この代謝過程において、多くの薬毒物と代謝的相互作用が引き起こされることが予測されるが、その詳細は不明であり、特にヒト CYP に関する報告はほとんどない。しかし、最近、申請者は THC、CBD、

CBNがヒトCYP1酵素(CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1)の活性を強く阻害し、特にCBDがCYP1A1を、これまで報告されているCBDの阻害作用の中で最も強く阻害(K_i 値 0.155 μ M、競合型)することを明らかにした。さらに、CBDは全てのCYP1酵素に対して代謝機構依存的阻害(mechanism-based inhibition)を引き起こすことも見出した。CYP1酵素はフィトカンナビノイドの主要な代謝酵素ではないため、フィトカンナビノイドとの代謝的相互作用を臨床的に予測することは容易ではない。また、CYPには上述の薬毒物の代謝に関与する酵素だけでなく、脂肪酸やステロイド、ビタミンなどの内因性物質の生合成・分解に関わる酵素も存在する。フィトカンナビノイドの構造はステロイドに類似していることから、ステロイドの生合成・分解系の酵素に影響を及ぼすことが考えられており、当研究室でも一部報告している。しかしながら、大部分の内因性物質の代謝に対するフィトカンナビノイドの影響は明らかになっていない。

2. 研究の目的

大麻の主成分であるTHC、CBDおよびCBNのヒトCYP活性に対する阻害作用とその機構を明らかにする。本研究では、薬物代謝型CYPとして、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5の11種類の組換え酵素、内因性物質代謝型CYPとして、CYP2J2(アラキドン酸エポキシ化酵素)、CYP3A7(デヒドロエピアンドロステロン3-硫酸16 α -水酸化酵素)、CYP4A11(脂肪酸 ω 酸化酵素)、CYP4F(エイコサノイド ω 酸化酵素;CYP4F2、CYP4F3B、CYP4F12)、CYP19(アロマトラーゼ)の7種類の組換え酵素を用いた。

3. 研究の方法

本研究では、各ヒトCYP分子種の活性の指標として、7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性(CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1)、クマリン 7-水酸化酵素活性(CYP2A6)、7-ベンゾキシレゾルフィン *O*-脱ベンジル化酵素活性(CYP2B6)、*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性並びにジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性(CYP2C9)、OMF *O*-脱メチル化酵素活性(CYP2C19)、AMMC *O*-脱メチル化酵素活性並びにデキストロメトर्फアン *O*-脱メチル化酵素活性(CYP2D6)、MFC *O*-脱メチル化酵素活性(CYP2E1)、ジルチアゼム *N*-脱メチル化酵素活性(CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7)、ルシフェリン-2J2/4F12 *O*-脱アルキル化酵素活性(CYP2J2)、ルシフェリン-4A *O*-脱メチル化酵素活性(CYP4A11)、ルシフェリン-4F2/3 *O*-脱アルキル化酵素活性(CYP4F2、CYP4F3B)、ルシフェリン-4F12 *O*-脱アルキル化酵素活性(CYP4F12)、DBF *O*-脱ベンジル化酵素活性

(CYP19)を用いた。

(1)直接阻害の解析;ヒト組換え酵素およびヒト肝ミクロソーム(HLMs)を用いて、各CYP分子種の酵素活性に対する主要フィトカンナビノイドの阻害作用を検討した。阻害した場合、 IC_{50} 値を算出し、さらに、阻害の速度論的解析を行い、阻害様式および K_i 値を算出した。

(2)代謝依存的阻害の解析;ヒト組換え酵素およびHLMsを用いて、フィトカンナビノイドおよびNADPH存在下、20minプレインキュベーションした時の IC_{50} 値を算出した。プレインキュベーションにより IC_{50} 値が低下した場合、不活性化の速度論的解析を行い、 $k_{inactivation}$ および K_i 値を算出した。

(3)構造阻害相関の解析;CBDがヒトCYPの活性を強く阻害した場合、CBD関連化合物(オリベトール、*o*-リモノン、CBDのフェノール性水酸基をメチル化した化合物CBDMおよびCBDD、CBDのペンチル側鎖がプロピル側鎖に置換された化合物CBDV、レゾルシノール、オルシノール、ペンチルベンゼンなど)を用いてヒトCYPに対する阻害効果を検討した。

(4)分子モデリングの解析;ヒトCYP1A1のホモロジーモデルはヒトCYP1A2(Protein Data Bank# 2HI4)の結晶構造を鋳型として、また、ヒトCYP1B1のホモロジーモデルはヒトCYP1A2とウサギCYP2C5の結晶構造を鋳型として、Swiss-Modelによって構築した。これらのモデルを用いてCBDとのドッキングシミュレーションを行った。

4. 研究成果

(1)最も多くの医薬品の代謝に関わるCYP3A4とCYP3A5はTHC、CBD、CBNによって阻害されたが、中でもCBDによる阻害(競合型)が最も強かった。 K_i 値はCYP3A4で1.00 μ M、CYP3A5で0.195 μ Mであったことから、CBDによる阻害はCYP3A4よりもCYP3A5に対してより高い選択性を示した。CYP3Aに次いで多くの医薬品の代謝に関与するCYP2D6もまた、CBDによる阻害(競合型)が最も強かった。THCとCBNの主要な代謝酵素であるCYP2C9はTHC、CBD、CBNによって同等に阻害された(K_i 値 0.882-2.31 μ M)。THCの阻害様式は混合型を示したが、CBDとCBNは用いた基質に依存して競合型または混合型を示した。CBDの主要な代謝酵素であるCYP2C19はTHC、CBD、CBNによって同等に阻害された(K_i 値 1.02-2.49 μ M)。THCの阻害様式は競合型を示したが、CBDとCBNは混合型を示した。ニコチンの主要な代謝酵素であるCYP2A6とCYP2B6はTHC、CBD、CBNによって阻害され、

各々の酵素に対する阻害様式は非競合型および混合型であった。CYP2E1に対する主要カンナビノイドの阻害効果は弱かった (IC_{50} 値 $38 \mu M$ 以上)。HLMsを用いた検討では、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9の組換え酵素を用いた結果と同様の結果が得られた。

CYP3A7はTHC、CBD、CBNによって同程度阻害された (IC_{50} 値 $23-31 \mu M$)。CBDによる阻害の速度論的解析を行ったところ、混合型の阻害様式を示し、 K_i 値は $12.3 \mu M$ であった。CYP2J2はTHC、CBD、CBNによって阻害され、 K_i 値はそれぞれ 1.06 、 0.705 、 $0.229 \mu M$ であった。THCとCBNの阻害様式は混合型を示したが、CBDは競合型を示した。CYP4A11に対するTHC、CBD、CBNの阻害効果はいずれも弱かった (IC_{50} 値 $50 \mu M$ 以上)。CYP4F2に対するTHC、CBD、CBNの阻害効果 (IC_{50} 値) はそれぞれ 15.8 、 7.42 、 $11.9 \mu M$ であり、CBDが最も強く阻害した。また、CYP4F3Bに対するTHC、CBD、CBNの阻害効果 (IC_{50} 値) はそれぞれ 13.3 、 9.39 、 $11.2 \mu M$ であり、CYP4F2と同様、CBDが最も強い阻害作用を示した。CYP4F12はTHC、CBD、CBNによって同程度阻害された (IC_{50} 値 $1.74-2.38 \mu M$)。CYP19に対するTHC、CBD、CBNの阻害効果は検討した最大カンナビノイド濃度 ($10 \mu M$) においてほとんど認められなかった。

(2) THC、CBD、CBNはいずれもCYP2A6とプレインキュベーションすることにより阻害が増強した。そこで、不活性化の速度論的解析を行ったところ、THCでは $k_{inactivation} = 0.0169 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_i = 0.862 \mu M$ であり、CBNでは $k_{inactivation} = 0.00909 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_i = 1.01 \mu M$ であった。一方、CBDによる阻害はプレインキュベーション時間依存性および濃度依存性のいずれも示さなかった。CYP2C9に対する阻害効果は、CBDとプレインキュベーションしても変化しなかったが、THCやCBNとプレインキュベーションすると減弱した。これは、HLMsを用いても同様の結果であった。CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 (HLMs)、CYP2J2については、主要フィトカンナビノイドおよびNADPH存在下で20分間プレインキュベーションしても、顕著な阻害の増強は認められなかった。

(3) CBD阻害における構造要求性を明らかにするために、CBDの関連化合物を用いて阻害実験を行った。その結果、CYP3A4、CYP3A5、CYP2D6、CYP2B6、CYP1A1、CYP3A7、CYP2J2に対するCBDの阻害にはペンチルレゾルシン構造が重要な役割を果たしていることが示された。ただし、CYP2D6以外の酵素については、その構造だけでは不十分であり、テルペン骨格を含めたCBD全体の構造が強い阻害作用に必要な不可欠であった。さらに、ペンチルレゾルシン骨格中の2つ (CYP2J2の場合、どちら

か一方)の遊離フェノール性水酸基やペンチル側鎖がCBDの阻害作用に重要であることも明らかになった。

(4) CBDがヒトCYP1分子種の中でCYP1A1を最も強く阻害する機序を推定するため、CBDと各ヒトCYP1分子種のドッキングシミュレーションを行った。CBDはレゾルシン構造のベンゼン環がCYP1A1の224番目のPheとスタッキング相互作用を形成していた。また、CBDの2つの遊離フェノール性水酸基は221番目のAsn側鎖にあるカルボニル基の酸素原子および312番目のLeu骨格にあるカルボニル基の酸素原子と水素結合している可能性が示された。CYP1A2の場合、CBDはレゾルシン構造のベンゼン環が226番目のPheとスタッキング相互作用していた。CBDの2つの遊離フェノール性水酸基のうち、1つは312番目のAsn骨格にあるカルボニル基の酸素原子と水素結合している可能性が示唆された。しかし、もう一方の遊離フェノール性水酸基は、CYP1A1の221番目に相当するアミノ酸がCYP1A2では223番目のThrとなっていたため水素結合することができなかった。CYP1B1の場合、CBDはレゾルシン構造のベンゼン環が231番目のPheとスタッキング相互作用していた。CBDの2つの遊離フェノール性水酸基のうち、1つは228番目のAsn側鎖にあるカルボニル基の酸素原子と水素結合している可能性が示唆されたが、もう一方の遊離フェノール性水酸基は、周辺に水素結合する可能性のあるアミノ酸が見出されなかった。これらのことから、CBDはCYP1A1の活性中心内では3ヶ所の相互作用によって結合しているが、CYP1A2およびCYP1B1の活性中心内では1ヶ所のスタッキング相互作用と少なくとも1ヶ所の水素結合によって結合しており、CYP1A1の方が結合箇所が多いことが示された。このように、結合数の多さが、CBDがヒトCYP1A1を選択的に阻害する要因であると考えられた。

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4件)

- ① Rongrong Jiang, Satoshi Yamaori, Yasuka Okamoto, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19. Drug Metab. Pharmacokinet., in press. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-129. 査読有
- ② Satoshi Yamaori, Mika Kushihara, Kyoko Koeda, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Significance of CYP2C9

genetic polymorphism in inhibitory effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on CYP2C9 activity. Forensic Toxicol., Vol. 31, 70-75 (2013). DOI; 10.1007/s11419-012-0148-3. 査読有

- ③ Satoshi Yamaori, Kyoko Koeda, Mika Kushihara, Yui Hada, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Comparison in the *in vitro* inhibitory effects of major phytocannabinoids and polycyclic aromatic hydrocarbons contained in marijuana smoke on cytochrome P450 2C9 activity. Drug Metab. Pharmacokinet., Vol. 27, 294-300 (2012). DOI; 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-107. 査読有
- ④ Satoshi Yamaori, Yasuka Okamoto, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Cannabidiol, a major phytocannabinoids, as a potent atypical inhibitor for CYP2D6. Drug Metab. Dispos., Vol. 39, 2049-2056 (2011). DOI; 10.1124/dmd.111.041384. 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 山折 大、岡本泰佳、大森 栄、山本郁男、渡辺和人、大麻主成分カンナビジオールは強力かつ非典型的な CYP2D6 阻害剤である、日本薬物動態学会、2012年11月20日、タワーホール船堀 (東京都)
- ② Satoshi Yamaori、Inhibitory effects of major phytocannabinoids in marijuana on human drug-metabolizing cytochrome P450s and their possible mechanisms、The International Association of Forensic Toxicologists、2012年6月8日、アクトシティ浜松 (静岡県)
- ③ 蔣 融融、山折 大、山本郁男、渡辺和人、大麻主成分カンナビジオールによる CYP2C19 の阻害とその機構、日本薬学会、2012年3月30日、北海道大学 (北海道)
- ④ 山折 大、小枝恭子、山本郁男、渡辺和人、大麻煙含有成分の CYP2C9 活性に対する影響、日本薬学会、2012年3月30日、北海道大学 (北海道)
- ⑤ Rongrong Jiang、Satoshi Yamaori、Shuso Takeda、Ikuo Yamamoto、Kazuhito Watanabe、Metabolism of cannabidiol by cytochrome P450s in human liver microsomes、International Cannabinoid Research Society、2011年7月7日、Pheasant Run (IL、USA)
- ⑥ Satoshi Yamaori、Yasuka Okamoto、Ikuo Yamamoto、Kazuhito Watanabe、Inhibitory mechanism of major phytocannabinoids on cytochrome P450 2D6 activity、International Cannabinoid Research Society、2011年

7月7日、Pheasant Run (IL、USA)

- ⑦ 山折 大、前田千佳子、山本郁男、渡辺和人、大麻主成分カンナビノイドによるニコチン代謝酵素 CYP2A6 および CYP2B6 の阻害機構、日本法中毒学会、2011年6月11日、長崎大学中部講堂 (長崎県)
- ⑧ 山折 大、大麻成分の代謝的相互作用とその個人差、日本法中毒学会、2011年6月10日、長崎大学中部講堂 (長崎県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山折 大 (YAMAORI SATOSHI)
信州大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40360218

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：