

機関番号：33304

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790135

研究課題名 (和文) 主要フィトカンナビノイドによるヒト *CYP1A1* 遺伝子の発現誘導機構の解明研究課題名 (英文) Mechanism underlying induction of human *CYP1A1* gene by major phytocannabinoids

研究代表者

山折 大 (YAMAORI SATOSHI)

北陸大学・薬学部・助教

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喫煙による有害作用に着目し、大麻成分が環境化学物質による発がんリスクを決定する1つの要因と考えられている酵素 CYP1A1 の発現を誘導するか否かを解析した。その結果、大麻の非幻覚成分であるカンナビジオールがヒト肝由来の細胞で CYP1A1 の発現を誘導することを明らかにした。その機構として、これまで知られている一般的な経路と特殊な経路を利用している可能性を示すことができた。

研究成果の概要 (英文)：Effects of marijuana component(s), especially phytocannabinoids, on expression of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in human hepatic cells were examined to clarify whether or not marijuana component(s) induces the expression of CYP1A1. Cannabidiol, one of the major phytocannabinoids in marijuana, increased the expression level of hepatic CYP1A1. The induction of CYP1A1 by cannabidiol may be mediated through common and/or uncommon pathway(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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2003～2004年の統計データによると、世界における大麻の乱用者は約1億6000万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 (Δ^9 -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) 及びカンナビノール (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 Δ^9 -THCに比較して少ない。

一般的に、大麻はタバコと同様喫煙によって摂取されるが、煙中の化学成分は大麻がカンナビノイドを含有し、タバコがニコチンを含有することを除けば、発がん物質である多環芳香族炭化水素の種類など両者の特徴は

非常に類似している。これら煙中の PAH は薬物代謝酵素 CYP1A1 の発現を誘導し、この酵素によって代謝的活性化される。CYP1A1 の酵素活性及び発現レベルの程度はこれら環境化学物質による発がんリスクを決定する 1 つの要因となりうる。大麻常習者において、CYP1A1 によって代謝されるテオフィリンの全身クリアランスが非喫煙者に比べて有意に高いことが報告されており、大麻の喫煙が CYP1A1 を誘導することが示唆される。また、 Δ^9 -THC を投与したラットの肺ホモジネートで、CYP1 活性の指標であるベンツピレン 8-水酸化酵素活性が増加することが報告されている。細胞レベルでも、 Δ^9 -THC がマウス肝がん由来 Hepa-1 細胞や初代ヒト気道上皮細胞の CYP1A1 の発現を誘導することが明らかにされている。さらに最近、当研究室において、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて Δ^9 -THC と非幻覚性カンナビノイドである CBD 及び CBN の CYP1A1 発現誘導能を検討した結果、 Δ^9 -THC (10 μ M で 3.4 倍) よりもむしろ CBD (3 μ M で 97 倍) や CBN (10 μ M で 51 倍) の方がより強い誘導能を示すことが明らかとなった。さらに、ヒト肺がん由来 A549 細胞を用いたとき、 Δ^9 -THC では有意な増加は認められず、CBD と CBN が CYP1A1 の発現をそれぞれ 1.9 倍 (3 μ M) 及び 12 倍 (10 μ M) 誘導した。興味深いことに、代表的な CYP1A1 誘導剤である 3-メチルコラントレンは HepG2 細胞で 34 倍、A549 細胞で 22 倍と CYP1A1 の発現を同程度誘導したのに対し、CBD と CBN は HepG2 細胞で顕著に強い発現誘導能を示した。これらのことから、煙中の多環芳香族炭化水素だけでなくカンナビノイド、特に CBD 及び CBN もまた CYP1A1 の発現誘導能を有することが示唆される。しかし、これらカンナビノイドがどのような機構で CYP1A1 の発現を誘導するのかについては全く明らかになっていない。

CYP1A1 の発現誘導機構は、主に AhR という受容体により制御されている。AhR はリガンド依存的な転写因子であり平面構造を持つ多環芳香族炭化水素などのリガンドによって活性化される。活性化された AhR は核内へ移行し AhR 核転送因子 (ARNT) とヘテロ二量体を形成する。AhR-ARNT 複合体は CYP1A1 のプロモーター領域に存在する異物応答配列 (XRE) に結合し、CYP1A1 遺伝子の発現を誘導する。また、オメプラゾールの様に、AhR には直接作用しないが、チロシンキナーゼ (PTK) などの細胞内シグナル伝達経路を介して AhR を活性化し、CYP1A1 遺伝子の発現を誘導することも報告されている。このような AhR による CYP1A1 遺伝子の発現誘導には AhR リプレッサー (AhRR) による負のフィードバック機構も存在する。

大麻成分であるカンナビノイドは、細胞膜

上に局在するカンナビノイド受容体を介して様々な細胞内シグナルを伝達することが知られているが、AhR の様な細胞質受容体や他の核内受容体との直接的な相互作用については全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、フィトカンナビノイドによるヒト CYP1A1 の発現誘導機構を明らかにすることを目的とし、フィトカンナビノイドが AhR の様なカンナビノイド受容体以外の受容体と相互作用するか否かを明らかにする。本研究では、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞及びヒト肺がん由来 A549 細胞をそれぞれ肝及び肺のモデル細胞として用いた。

3. 研究の方法

(1) フィトカンナビノイドによるヒト CYP1A1 の発現誘導の評価。① CBD を HepG2 細胞に数～48 時間処理し、CYP1A1 の発現量の経時変化をリアルタイム PCR 法により解析し、以降の実験の処理時間を決定した。② CBD を処理した HepG2 細胞において、CYP1A1 の発現をウエスタンブロット分析により解析した。③ CBD 関連化合物を HepG2 細胞に処理し、CYP1A1 発現誘導における CBD の構造要求性を解析した。④ 大麻煙中に存在する多環芳香族炭化水素を HepG2 細胞に処理したときの CYP1A1 発現誘導能を CBD と比較した。

(2) AhR を介したヒト CYP1A1 発現誘導の可能性。① HepG2 細胞における AhR 及び ARNT の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。② AhR アンタゴニストを用いて、CBD による CYP1A1 の発現誘導に対する影響を検討した。③ AhR に対する siRNA を用いて、CBD による CYP1A1 の発現誘導に対する影響を検討した。

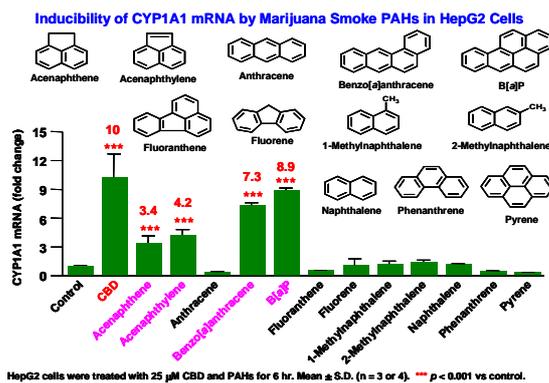
(3) シグナル伝達経路を介したヒト CYP1A1 発現誘導の可能性。① HepG2 細胞におけるカンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。② PTK 阻害剤を用いて、CBD による CYP1A1 の発現誘導に対する影響を検討した。

(4) HepG2 細胞と A549 細胞における CBD 及び CBN の CYP1A1 発現誘導機構の差の解明。① HepG2 細胞と A549 細胞における AhR、ARNT 及び AhRR の発現量をリアルタイム PCR 法により解析し、比較した。② HepG2 細胞と A549 細胞におけるカンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体の発現量をリアルタイム PCR 法により解析し、比較した。

4. 研究成果

(1) CBD を HepG2 細胞に 6 時間処理したとき、CYP1A1 mRNA の発現量は濃度依存的に増加し

た。CYP1A1 mRNA の発現量の変化を経時的に解析したところ、25 μ M CBD 処理後 6 時間で最も高い誘導能を示し、その後減少した。CBD は、テルペン骨格とレゾルシン骨格からなる化合物である。そこで、CBD による CYP1A1 の発現誘導に CBD のどの構造が重要なのかを明らかにするため、CBD 関連化合物を用いて、CYP1A1 の発現誘導能を比較検討した。その結果、 α -リモネン（テルペン骨格に相当）、CBD のモノメチルエーテル体およびジメチルエーテル体は、CYP1A1 mRNA の発現を誘導しなかった。また、オリベトール（レゾルシン骨格に相当）は CYP1A1 mRNA をわずかに誘導したが、その誘導能は CBD に比べて顕著に低かった。これらの結果から、CYP1A1 の発現誘導には、CBD のテルペン骨格とレゾルシン骨格の両方が必要であり、また両フェノール性水酸基も重要な役割を果たしていることが示唆された。CBD の発現誘導能は大麻煙中に存在する多環芳香族炭化水素（PAH）のうちアセナフテン、アセナフチレン、ベンゾ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレンと同程度またはより強いことが示された（下図）。



(2) HepG2 細胞における AhR 及び ARNT の発現量は CBD 処理によって影響を受けなかった。AhR アンタゴニストであるレスベラトロール及びクエルセチンを前処理したとき、いずれも CBD による CYP1A1 mRNA の発現誘導を有意に抑制した。また、AhR siRNA を用いて AhR をノックダウンさせても発現誘導が有意に抑制された。これらの結果から、CBD は AhR を介して CYP1A1 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

(3) HepG2 細胞において、CBD が AhR を介してヒト CYP1A1 の発現を誘導するさらに詳細な機構を明らかにするため、カンナビノイド CB₁ および CB₂ 受容体の発現を PCR 法により解析した。その結果、HepG2 細胞には、いずれのカンナビノイド受容体も発現していなかった。したがって、CBD による CYP1A1 の発現誘導において、少なくともこれら受容体の関与

はないものと考えられた。これまでに、AhR を介した CYP1A1 の発現誘導機構として、3-メチルコラントレンの様に AhR リガンドとして AhR に直接作用し転写を活性化させるものと、オメブラゾールの様に AhR には直接作用しないが、細胞膜に局在するチロシンキナーゼなどの細胞内シグナル伝達経路を介して AhR を活性化するものが知られている。そこで、CBD による CYP1A1 発現誘導における PTK の関与を明らかにするため、チロシンキナーゼ (PTK) 阻害剤（ハービマイシン-A）を用いて発現解析を行った。その結果、CBD による CYP1A1 の発現誘導能は、ハービマイシン-A 処理により有意に抑制された。本実験条件は、オメブラゾールによる CYP1A1 の発現誘導能をハービマイシン-A が効果的に抑制するのに対し、3-メチルコラントレンによる CYP1A1 の発現誘導能は抑制しないことを確認している。これらの結果から、CBD による CYP1A1 の発現誘導機構には、オメブラゾールの様なチロシンキナーゼ (PTK) 活性化経路も存在することが示唆された。

(4) A549 細胞における AhR、ARNT 及び AhRR の発現量は、HepG2 細胞に比べて低い傾向を示した。また、A549 細胞には、HepG2 細胞と同様、いずれのカンナビノイド受容体も発現していなかった。これらのことから、検討した遺伝子の発現パターンでは HepG2 細胞と A549 細胞における CBD の CYP1A1 発現誘導機構の差を説明できなかった。

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 2 件）

- ① Satoshi Yamaori, Mika Kushihara, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors of human CYP1 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 79, 1691-1698 (2010). 査読有
- ② Satoshi Yamaori, Juri Ebisawa, Yoshimi Okushima, Ikuo Yamamoto, Kazuhito Watanabe, Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety. *Life Sci.*, Vol. 88, 730-736 (2011). 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 山折 大、大麻非幻覚成分カンナビジオールによるヒト CYP1A1 発現誘導、フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー

一、平成 21 年 11 月 5 日、沖縄コンベン
ションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山折 大 (YAMAORI SATOSHI)

北陸大学・薬学部・助教

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：