

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 6月21日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590562

研究課題名（和文） 飲酒の抗血栓作用に関連する血小板TRPチャネルの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism for anti-thrombotic action of alcohol drinking related to TRP channels of platelets.

研究代表者

丸茂 幹雄（MARUMO MIKIO）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：40333950

研究成果の概要（和文）：

アルコールによる血小板機能抑制機序の詳細は不明である。本研究では、血小板の容量性Ca²⁺流入（CCE: capacitative calcium entry）およびジアセリグリセロール(DG)依存性のCa²⁺流入および凝集におよぼすエタノール及びメタノールの影響について検討した。

エタノールによる血小板凝集抑制作用は刺激の種類によらず非特異的に認められ、SFP変法による全血凝集においても同様の結果が得られた。一方、エタノールはCCE及びDG依存性Ca²⁺流入へは相反する作用を示し、トロンビンによる生理的血小板活性化機構へのエタノールの作用にはこれら両者が関与することが示唆された。一方、メタノールはCCE及びDG依存性Ca²⁺流入、thrombin刺激時のCa²⁺流入のいずれにおいても影響を及ぼさなかった。しかしながら、メタノール添加によりthrombin刺激による血小板凝集は有意に亢進した。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism for the inhibitory action of alcohol on platelet aggregation is unknown. In this study, effects of ethanol and methanol on capacitative Ca²⁺ entry and the subsequent aggregation and diacylglycerol-dependent Ca²⁺ entry and the subsequent aggregation in platelets were investigated. Both Ca²⁺ entry pathways are known to be mediated by TRP channels. Aggregation of washed platelets was significantly inhibited by ethanol irrespective of the kind of stimulant for platelets, and similar inhibition was found in platelets in the whole blood by using the modified SFP method. On the other hand, capacitative Ca²⁺ entry and diacylglycerol-dependent Ca²⁺ entry were significantly inhibited and augmented, respectively, by ethanol. Therefore, ethanol showed diverse effects on Ca²⁺ entry through different mechanisms such as intracellular Ca²⁺-store depletion and stimulation by diacylglycerol. Consequently, thrombin-induced Ca²⁺ entry, which is thought to be the sum of the above two kinds of Ca²⁺ entry, was not significantly altered by ethanol. Methanol showed no significant effects on capacitative Ca²⁺ entry and diacylglycerol-dependent Ca²⁺ entry, while thrombin-induced platelet aggregation was significantly augmented by methanol. Thus, the effects of alcohol on platelet function vary with the kind of alcohol as well as the kind of stimulant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：予防医学・血栓症

1. 研究開始当初の背景

高血圧を介して飲酒は出血型脳卒中の誘因となる。一方、飲酒者では虚血性心疾患の頻度が低いことが報告されており、飲酒の抗動脈硬化作用としてHDLコレステロール上昇などの血中脂質を介する作用とともに抗血小板作用が知られている。アルコールが血小板機能を抑制することは古くから知られているが、血小板でのアルコールの作用点についての詳細は明らかでなく、血栓症における飲酒の影響については功罪両面があり、一定の見解が得られていない。

今回我々は、カルシウムチャネルを介する血小板へのカルシウム流入とそれにより惹起される血小板凝集へのエタノールの直接作用について検討した。また、異なった血小板凝集測定法を用いた場合における血小板のアルコール感受性の差異について検討した。

2. 研究の目的

細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇はさまざまな細胞を活性化させる重要なシグナルである。本研究では、最近明らかになった受容体作動性陽イオンチャネル（receptor-operated cation channel: ROCC）であるTRP（transient receptor potential）チャネルを介する血小板へのカルシウム流入とそれにより惹起される血小板凝集へのエタノールの直接作用について検討した。TRPチャネルを構成するTRPCサブファミリーにはTRPC1からTRPC7までの7種類が存在し、さらにTRPCサブファミリーは3つのグループ（TRPC1/4/5, TRPC3/6/7, TRPC2）に大別される。TRPC1/4/5の活性化は細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇によって誘発されることから[いわゆる容量性 Ca^{2+} 流入（capacitative Ca^{2+} entry: CCE）]、その刺激には Ca^{2+} -ATPase阻害剤であるthapsigarginを用いた。一方、TRPC3/6/7はジアセリグセロール（DG）によって活性化されることから、その刺激剤としてDGアナログである1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol（OAG）を用いた。

一方、メタノールはエタノールとの誤飲による失明症例や代謝性アシドーシスによる死亡例が知られており、その中毒により意識障害や痙攣、視力障害などの臨床症状が認められる。しかし、メタノールの血小板に対する作用についての知見は得られておらず、メタノールとエタノールの血小板への効果の

比較はまだ報告されていない。そこで本研究では異なる血小板活性化経路を介した血小板凝集についてエタノール及びメタノールの効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 健常人より採血し、全血及び調整した洗浄血小板浮遊液を検体とした。

(2) 血小板凝集能は従来法である比濁法に加え、全血凝集法及びレーザー散乱光を用いた粒子計測法により測定し、血小板内遊離カルシウムイオン濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）の変化は Ca^{2+} 感受性蛍光色素Fura2-AMを用いて測定した。

(3) 血小板刺激には Ca^{2+} -ATPase阻害剤であるthapsigargin及びdiacylglycerolのアナログである1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol（OAG）を用い、生理的アゴニストとしてthrombinを用いた。

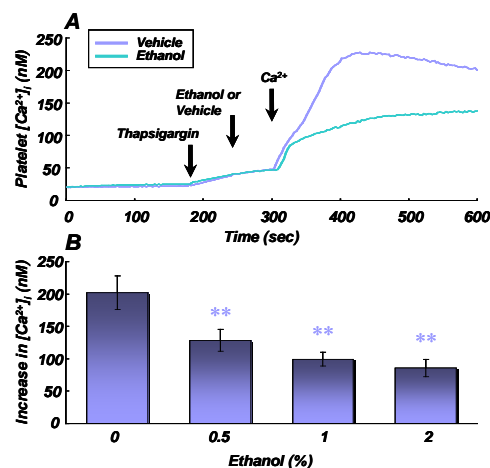
(4) さらにCCEの受容体拮抗剤であるSKF-96365の影響も検討した。

(5) 同様に、メタノールの細胞内カルシウム流入及びそれに伴う血小板凝集能を測定した。

4. 研究成果

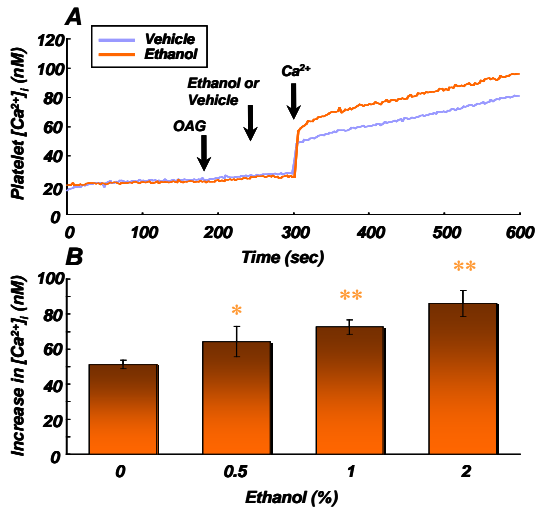
(1) 容量依存性カルシウム流入（CCE）はエタノール添加により濃度依存的に抑制され（Fig. 1A, B）、CCEに伴う血小板凝集も同様に、エタノールの前添加により濃度依存的に抑制された。

Fig. 1A, B



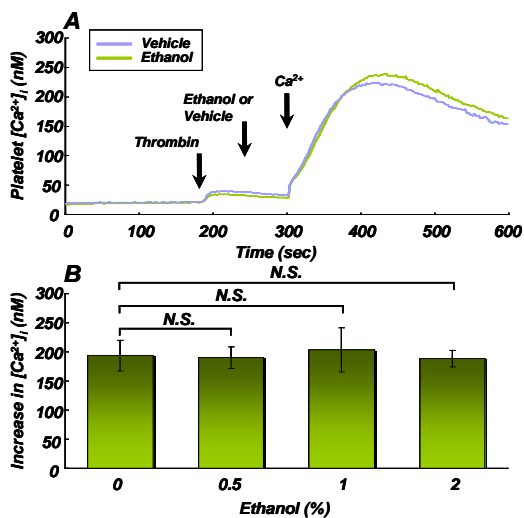
(2) OAG 刺激下では、細胞内カルシウム濃度は亢進したが (Fig. 2A, B)、血小板凝集はエタノールにより濃度依存的に抑制された。

Fig. 2A, B



(3) thrombin 刺激下では、細胞内カルシウム濃度にはエタノールは有意な影響を示さなかったが (Fig. 3A, B)、血小板凝集はエタノールの前添加により濃度依存的に抑制された。

Fig. 3A, B



(4) SKF 前添加による CCE 抑制状態に於ける Thrombin 刺激時には、OAG 刺激時と同様にエタノール前添加により細胞内カルシウム濃度は亢進したが、血小板凝集は抑制された。

Effects of alcohol on platelet functions

	Thapsigargin	OAG	Thrombin
Ca influx	↓	↑	→
Aggregation	↓	↓	↓

上記(1)-(4)より、エタノールは血小板にお

ける thapsigargin 刺激時の容量依存性カルシウム流入 (CCE) を低下させることにより、それに伴う血小板凝集を抑制することが明らかになった。逆に OAG 刺激下では、細胞内カルシウム流入はエタノール前添加によって亢進したが、血小板凝集はエタノールにより濃度依存的に抑制された。以上より、両刺激物質による血小板凝集をエタノールは抑制したのに対して、Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) を介するカルシウムストア依存性のカルシウム流入 (CCE) と、diacylglycerol (DG) 活性化による細胞外カルシウム流入のそれぞれへのエタノールの作用は異なることが示された。一方、生理的アゴニストである thrombin 刺激時には、 IP_3 を介する CCE 及び DG を介するカルシウム流入機構が共に活性化されるが、両者へのエタノールの効果が相殺される結果、全体としての細胞内カルシウム濃度上昇にはエタノールによる有意な影響は認められなかったと推察される。

(5) 透過光式血小板凝集能測定装置、レーザー散乱光を用いた粒子計測法及び SFP 変法 (Modified Screen Filtration Pressure Method) による全血凝集計のいずれにおいてもエタノールは濃度依存的に thrombin 刺激による血小板凝集を抑制した。

(6) 従来法での血小板凝集抑制効果がエタノール 85mM 以上にて認められたのに対し、粒子計測法ではエタノール 21.25mM においても凝集抑制を認めた。

(7) 従来法が 0.2U/ml の thrombin による凝集に対してエタノール添加、非添加群の差異を認めた。一方、全血凝集計では 0.05U/ml の thrombin による凝集に対してそれらの差異を認めた。

(8) 全血凝集において、エタノールによる血小板凝集抑制効果は thapsigargin 凝集に対して著明に認められたが (Fig. 4)、OAG 凝集に対してはその効果は弱く (Fig. 5)、生理的アゴニストである thrombin 及び ADP 凝集に対してはそれらの中間的な抑制効果を認めた。

Fig. 4

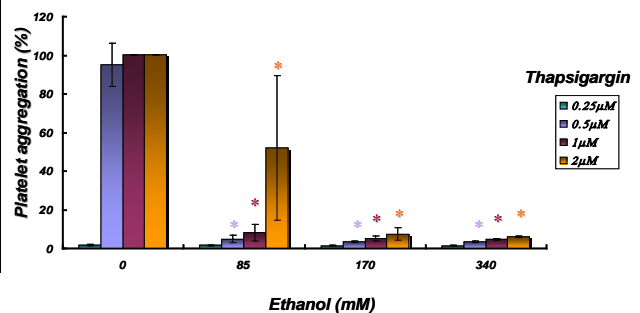
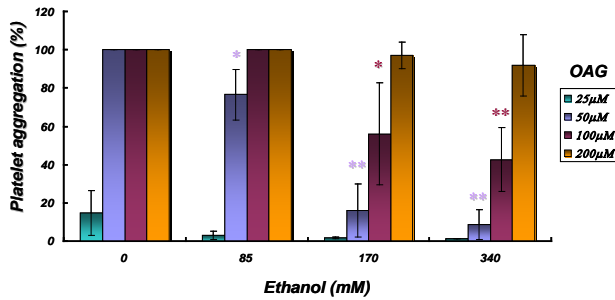


Fig. 5

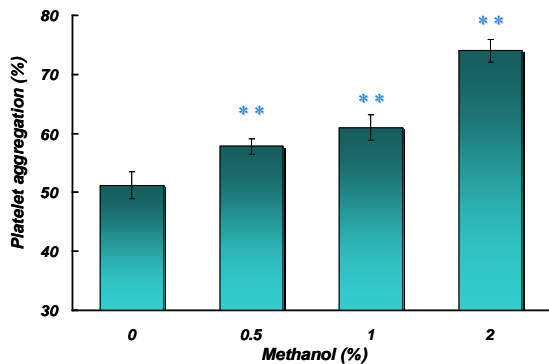


上記(5)-(8)より、いずれの方法でもエタノールは血小板における凝集を濃度依存的に抑制したが、従来法である透過光式血小板凝集能測定装置と比して粒子計測法は低いエタノール濃度(0.125%)における抑制効果の検出感度に優れていた。また、全血凝集計は血小板凝集を低濃度の thrombin (0.05U/ml) より検出可能であった。thapsigargin と OAG ではエタノールでの血小板凝集抑制の程度が異なり、血小板活性化経路によりエタノールの感受性が異なる可能性が示唆された。

(9)メタノール(0.5 - 2%)はCCE及びDG依存性Ca²⁺流入には影響を及ぼさず、thrombin刺激時のCa²⁺流入もメタノールの影響を受けなかった。

(10)メタノール(0.5 - 2%)添加により thrombin 刺激による血小板凝集は有意に亢進した(Fig. 6)。

Fig. 6



	Ca influx			Aggregation
	Thapsigargin	OAG	Thrombin	Thrombin
Ethanol	↓	↑	→	↓
Methanol	→	→	→	↑

上記(9)-(10)より、メタノールはCCE及びDG依存性Ca²⁺流入へ影響を与えず、さらに

thrombin刺激においても細胞内Ca²⁺濃度の変化を引き起こさなかった。メタノールによるCa²⁺流入がその流入経路に係らず影響を受けなかった事より、メタノールはエタノールとは異なり細胞内Ca²⁺上昇を介する血小板活性化機構に影響を及ぼさないと考えられたが、thrombin刺激による血小板凝集反応を濃度依存性に亢進させた。このCa²⁺流入に非依存性の血小板凝集亢進作用の機序は現在のところ不明であり、今後更なる研究が待たれる。

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4件)

1. 丸茂幹雄, 丸茂久美子, 若林一郎. 血小板のカルシウム流入および凝集能へのアルコール類の作用. アルコールと医学生物学 2012;31:103-7 査読無
<http://www.toyoshoten.co.jp/>

2. Marumo M, Nakano T, Takeda Y, Goto K, Wakabayashi I. : Inhibition of thrombin-induced Ca²⁺ influx in platelets by R59949, an inhibitor of diacylglycerol kinase. J Pharm Pharmacol. 2012 Jun;64(6):855-61. doi: 10.1111/j. 2042-7158. 2012.01485. x. Epub 2012 Mar 12. 査読有

3. 丸茂幹雄, 丸茂久美子, 若林一郎: エタノールの血小板抑制作用に関する異なった測定法による評価; アルコールと医学生物学, 30: 84-87; 2011 査読無
<http://www.toyoshoten.co.jp/>

4. Marumo M, Wakabayashi I. : Diverse effects of ethanol on Ca²⁺ entry and subsequent aggregation of platelets. Alcohol; 44(4): 343-50. 2010 doi: 10.1016/j.alcohol. 2010. 02. 002 査読有

[学会発表] (計9件)

1. 丸茂幹雄, 中野知之, 武田裕司, 後藤薫, 若林一郎: DGKインヒビター、R59949によるトロンビン惹起カルシウム流入の抑制効果; 第35回日本血栓止血学会、2013.06.01. (山形)

2. 丸茂幹雄, 若林一郎: 全血中での血小板凝集へのエタノールの抑制作用; 第32回アルコール医学生物学研究会学術集会、2013.01.26. (東京)

3. M. Marumo; I. Wakabayashi: Effects of Alcohol on Ca²⁺ Entry and Subsequent

Aggregation of Platelets Through Different Pathways. (Symposium) 16th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism. 9-12 September, 2012 (Sapporo, Japan)

4. M. Marumo; I. Wakabayashi: Effects of Ethanol on Ca^{2+} Entry and Aggregation of Platelets Through Different Signal Transduction Pathways. 16th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism. 9-12 September, 2012 (Sapporo, Japan)

5. 丸茂幹雄、若林一郎: アルコールによる血小板機能抑制作用のメカニズム; 第 82 回日本衛生学会、2012. 03. 25. (京都)

6. 丸茂幹雄、若林一郎: 血小板のカルシウム流入および凝集能へのアルコール類の作用; 第 31 回アルコール医学生物学会学術集会、2012. 01. 28. (金沢)

7. 丸茂幹雄、若林一郎: 異なった機序に基づく血小板凝集能測定におけるエタノールの血小板凝集抑制効果; 第 30 回アルコール医学生物学会、2010. 11. 26. (久留米)

8. 丸茂幹雄、若林一郎: 血小板のカルシウム流入機構へのエタノールの異なった作用; 第 45 回日本アルコール薬物医学会、2010. 10. 09. (小倉)

9. 丸茂幹雄、若林一郎: 血小板の異なるメカニズムを介するカルシウム流入および凝集能へのアルコールの作用; 第 33 回日本血栓止血学会、2010. 04. 24. (鹿児島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸茂 幹雄 (MARUMO MIKIO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40333950

(2) 研究分担者

若林 一郎 (WAKABAYASHI ICHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70220829

武田 裕司 (TAKEDA YUJI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 90302299

(3) 連携研究者

()

研究者番号: