

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11062

研究課題名(和文)ポリフェノール類によるTRPチャネルを介する血小板機能抑制の新しい分子メカニズム

研究課題名(英文) Inhibitory effects of polyphenols on the TRP channel-mediated pathways in human platelets

研究代表者

丸茂 幹雄 (Marumo, Mikio)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40333950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血小板におけるTRPチャネルを介する容量性Ca²⁺流入(CCE)及びジアセリグリスロール(DG)依存性Ca²⁺流入に対するポリフェノールの効果について、血小板凝集と細胞内Ca²⁺濃度を評価して検討した。受容体活性化目的でのトロンビン刺激及びCCE惹起目的でのタプシガルギン刺激の際の血小板凝集とCa²⁺流入を検討したところ、それぞれの刺激に対する反応は12.5 μMおよび6.25 μM以上のレスベラトロールにより有意に抑制された。一方、OAGによるDG依存性Ca²⁺流入に対しては50 μM以下では抑制を認めなかった。従ってレスベラトロールはCCEに作用して血小板活性化を抑制すると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、抗酸化物質であるポリフェノール類は、その抗血栓作用を介して動脈硬化性疾患のリスクを低下させることが知られていた。本研究により、代表的なポリフェノール類であるレスベラトロールには直接的な血小板凝集抑制作用があり、この作用は血小板のTRPチャネルを介する容量性カルシウム流入の低下によることが示唆された。超高齢化社会である今日の我が国では、健康寿命の延伸は医療経済面からも緊迫の課題であり、動脈硬化性疾患の一次予防は極めて重要である。本研究はポリフェノール類を含有する機能性食品の開発や創薬に繋がる基礎研究として、需要に答え得るシーズを創造する可能性があり、その学術的意義および社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Resveratrol has been shown to inhibit platelet aggregation. However, the mechanism for this action of resveratrol remains to be clarified. The purpose of this study was to elucidate the Ca²⁺-related mechanism for the inhibitory action of resveratrol on platelet aggregation.

Thapsigargin-induced Ca²⁺ entry into platelets and subsequent platelet aggregation were significantly inhibited in the presence of resveratrol at 6.25 μM or higher concentrations, while OAG-induced Ca²⁺ entry and subsequent platelet aggregation were not affected by resveratrol at concentrations up to 50 μM. Thrombin-induced Ca²⁺ entry into platelets and subsequent platelet aggregation were significantly inhibited in the presence of resveratrol at 12.5 μM or higher concentrations. The results suggest that resveratrol inhibits thrombin-induced platelet aggregation through inhibiting capacitative Ca²⁺ entry into platelets.

研究分野：血小板機能、イオンチャネル

キーワード：血小板 血栓症 容量依存性カルシウム流入 TRPチャネル ポリフェノール類 レスベラトロール

1. 研究開始当初の背景

レスベラトロールはスチルベノイドポリフェノール的一种であり、ブドウの果皮に含まれる抗酸化物質として知られている。乳脂肪や肉類の摂取量の多いフランスにおいて、血中コレステロール値が他のヨーロッパ諸国と変わらないにもかかわらず冠動脈疾患 (CHD) 死亡率が低率であるという、いわゆる“フレンチパラドックス”と呼ばれる現象が報告されている [1]。これらの疫学調査において赤ワイン消費量と CHD 死亡率に強い相関が認められた事より、レスベラトロールの心血管関連疾患への予防効果が期待された。しかしながらこの報告では個人間で異なる交絡因子を検証する事ができず、その抗血栓作用のメカニズムについても明らかにされていない。レスベラトロールはマウスでは寿命延長効果が示されているが [2]、「レスベラトロールの抗血栓効果はヒトでも検証可能であるか、そしてどの様な作用機序を介して血小板に作用するのか」については未だ明らかにされていない。

また、大豆に含まれるイソフラボンはエストロゲン類似作用を持つ事で知られるポリフェノール類の一種である。日本人を対象としたコホート研究では大豆製品の摂取量と脳梗塞発症予防の関連性が示されており [3]、抗血栓効果が期待されるが、イソフラボンの血小板への作用機序も明らかではない。

一方、血小板活性化経路については TRP (transient receptor potential) チャネル [4] を介した Ca^{2+} 流入が主要な役割を演じている事が明らかとなっており、これが容量性 Ca^{2+} 流入 (capacitative Ca^{2+} entry: CCE) の分子の実体とされている。血小板には CCE 以外のジアセलगリセロール (DG) 依存性の Ca^{2+} チャネルも存在するが、上記のポリフェノール類の抗血栓効果がどの活性化経路へ影響を及ぼしているかも不明のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、レスベラトロールをはじめとするポリフェノール類が、フレンチパラドックスで示された抗血栓作用を示す際のメカニズムを解明することにある。特にレスベラトロールが血小板機能に対する直接的な効果を有しているかについては検討された報告がほとんど無く、血小板活性化シグナル経路に特異的なアゴニストを用いて凝集能を検討したものは皆無である。そこで今回我々は、*in vitro* におけるレスベラトロールの血小板機能抑制効果について検討するために、生理的アゴニストであるトロンピンをはじめとして、CCE の活性化を目的として Ca^{2+} -ATPase 阻害剤であるタプシガルギンおよび、ジアセलगリセロール (DG) 依存性 Ca^{2+} 流入を惹起するために DG アナログである 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) を用いた。トロンピンは PIP_2 の活性化を介してイノシトール3リン酸 (IP_3) と DG によって引き起こされる Ca^{2+} 流入を誘導する [5, 6]。 IP_3 は血小板細胞内の Ca^{2+} 放出を誘導することにより CCE をもたらす [7]。タプシガルギンは細胞内貯蔵 Ca^{2+} の再取り込みを抑制することにより、 Ca^{2+} ストアの枯渇をトリガーとする CCE を惹起する [8]。一方で、DG アナログである OAG は CCE とは独立した活性化 Ca^{2+} チャネルを介して Ca^{2+} 流入を引き起こす [9,10]。これらのチャネル特異的な血小板活性化を計測することにより血小板活性化経路別にレスベラトロールの抗血栓効果をそれぞれ検討することとした。

3. 研究の方法

検体の作成

血液は、実験前に少なくとも 10 日間投薬を受けていなかった健康なドナーから採取した。実験には血液検体から洗浄血小板浮遊液を作成して、各測定に供した。この研究は兵庫医科大学の倫理委員会 (No. 1799) によって承認され、実験手順はヘルシンキ宣言に従った。血液 (18 ml) を 2 ml の 3.2% クエン酸ナトリウムを含むプラスチックチューブに採取し、 $150\times g$ で 10 分間遠心分離し、多血小板血漿 (PRP) として上清を得た。続いて、PRP をヘペス (NaCl 150 mM、KCl 5 mM、グルコース 10 mM、HEPES 10 mM) (pH 7.4) で緩衝し、1 mM の EGTA にて抗凝固した 40ml の Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まないタイロード溶液と混合した。再度 $150\times g$ で 10 分間遠心分離し、上清をさらに $400\times g$ で 5 分間遠心分離した後、得られたペレットを上記のタイロード - ヘペス溶液 40 ml で浮遊させ、次に $400\times g$ で 5 分間さらに遠心分離した。ペレットを 2ml の Ca^{2+} を含まないタイロード溶液 (NaCl 150 mM、KCl 5 mM、 $MgCl_2$ 1 mM、グルコース 10 mM、および HEPES 10 mM) (pH 7.4) で浮遊させ、得られた洗浄血小板浮遊液を実験に使用した。検体は採血後 2 時間以内に各実験に供した。

細胞内 Ca^{2+} 測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度については、上記手法にて洗浄血小板浮遊液を作成する過程で蛍光 Ca^{2+} 試薬である fura - 2 / AM (終濃度 5 μM) を 37 で 30 分間負荷することにより検体を作成した。そして蛍光測定は、分光光度計 (F-2500、日立ハイテクノロジーズ株式会社) を用いて 37 に加温した 0.4 ml のキュベットを使用して、2 波長励起 1 波長蛍光で実施された (励起波長: 340 および 380 nm、蛍光波長: 510 nm)。

血小板凝集の測定

血小板凝集は、ヘペス (NaCl 150 mM、KCl 5 mM、MgCl₂ 1 mM、グルコース 10 mM、および HEPES 10 mM) (pH 7.4) で緩衝された Ca²⁺ フリータイロッド溶液に懸濁された血小板を使用して測定され、透過光式血小板凝集能測定装置 (PRP313M、株式会社タイヨウ) を用いて評価した。

4. 研究成果

血小板凝集測定の結果の一例を Figure 1 に示す。血小板の刺激惹起剤は a: トロンビン (0.025 U/ml)、b: タブシガルギン (100 nM)、c: OAG (100 μM) をそれぞれ添加している。レスベラトロールを終濃度 12.5 μM にて投与するとトロンビン及びタブシガルギン刺激の際には血小板凝集の抑制を認めたが、OAG 刺激の際にはレスベラトロールによる影響は見られなかった。

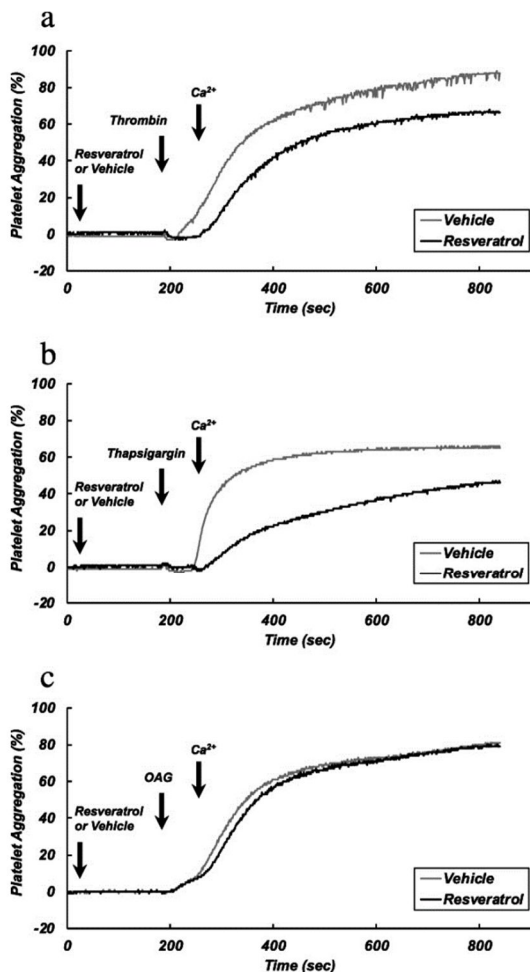


Figure 1. Representative charts of platelet aggregation. Washed platelets were incubated in nominally Ca²⁺-free solution. After stabilization, platelets were pretreated with resveratrol (12.5 μM) or a vehicle for 3 min. The platelets were then stimulated with thrombin (0.025 U/ml) (A), thapsigargin (0.1 μM) (B), or OAG (100 μM) (C). At 1 min after the addition of each stimulant, CaCl₂ (0.5 mM) was added to the platelet suspension to induce platelet aggregation.

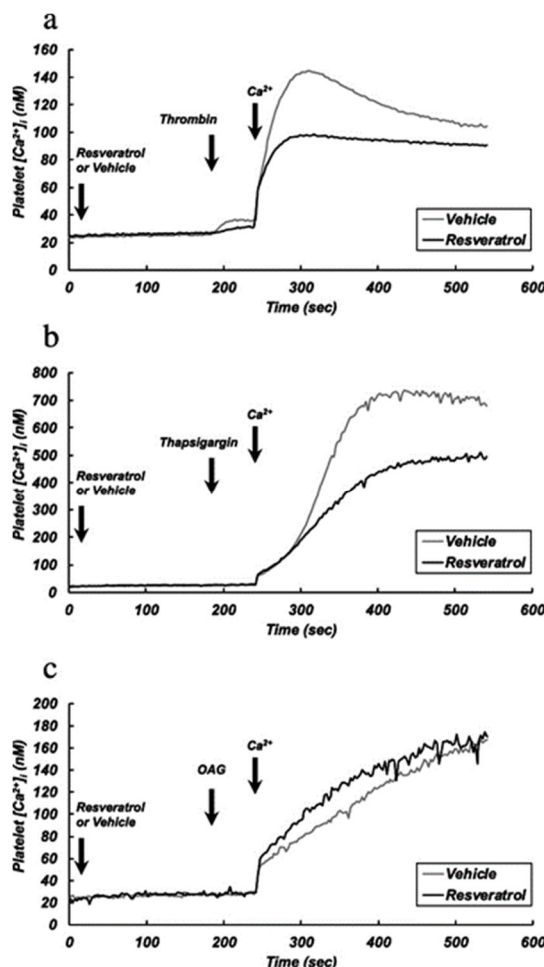


Figure 2. Representative charts of changes in [Ca²⁺]_i. Washed platelets were incubated in nominally Ca²⁺-free solution. After stabilization, platelets were pretreated with resveratrol (12.5 μM) or a vehicle for 3 min. The platelets were then stimulated with thrombin (0.025 U/ml) (A), thapsigargin (0.1 μM) (B), or OAG (100 μM) (C). At 1 min after the addition of each stimulant, CaCl₂ (0.5 mM) was added to the platelet suspension to induce Ca²⁺ entry.

血小板の細胞内 Ca²⁺ 濃度の測定結果の一例を Figure 2 に示す。同様に血小板の刺激惹起剤は a: トロンビン (0.025 U/ml)、b: タブシガルギン (100 nM)、c: OAG (100 μM) をそれぞれ添加している。レスベラトロールを終濃度 12.5 μM にて投与すると凝集測定時と同様トロンビン及びタブシガルギン刺激の際には血小板凝集の抑制を認めたが、OAG 刺激の際にはレスベラトロールによる影響は見られなかった。

上記所見より、血小板凝集及び細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化に対する種々の濃度のレスベラトロール添加による抑制効果をトロンビン、タブシガルギン、OAG の各アゴニスト刺激により検討した (Table 1)。トロンビン刺激では 12.5 - 50 μM のレスベラトロール存在下で濃度依存的に血小板凝集、細胞内 Ca²⁺ 濃度ともに抑制された。タブシガルギン刺激では 6.25 - 50 μM のレスベラトロール存在下で濃度依存的に血小板凝集、細胞内 Ca²⁺ 濃度ともに抑制された。しかしながら OAG 刺激下では血小板凝集、細胞内 Ca²⁺ 濃度のいずれもレスベラトロール添加の影響を

受けなかった。

Table 1. Effects of different concentrations of resveratrol on platelet aggregation (upper lines) and Ca²⁺ entry into platelets (lower lines) induced by thrombin, thapsigargin and OAG.

| Resveratrol (μM) | 0 | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| Thrombin | | | | | | |
| Aggregation (%) | 81.83 (4.02) | 73.38 (3.46) | 66.25 (5.50)* | 58.33 (12.09)** | 40.8 (6.53)** | 21.75 (9.57)** |
| Ca ²⁺ entry (nM) | 125.34 (29.13) | 104.73 (19.32) | 101.63 (25.94) | 92.59 (18.37)* | 83.65 (4.98)** | 63.52 (11.55)** |
| Thapsigargin | | | | | | |
| Aggregation (%) | 69.88 (3.08) | 71.00 (5.18) | 63.86 (7.40)** | 49.17 (10.61)** | 38.00 (9.17)** | 20.50 (8.34)** |
| Ca ²⁺ entry (nM) | 604.78 (128.07) | 465.95 (126.16) | 396.62 (129.83)** | 395.69 (70.90)** | 351.37 (37.91)** | 320.73 (68.26)** |
| OAG | | | | | | |
| Aggregation (%) | 76.60 (4.40) | 75.00 (3.00) | 77.33 (2.31) | 74.00 (4.42) | 70.50 (3.41) | 67.00 (6.90) |
| Ca ²⁺ entry (nM) | 93.31 (16.64) | 90.57 (6.92) | 95.54 (5.45) | 88.64 (12.48) | 79.67 (11.28) | 77.19 (12.11) |

Data are means (%) with standard deviations indicated in parentheses. Platelets were stimulated with thrombin (0.025 U/ml), thapsigargin (0.1 μM) and OAG (100 μM). Asterisks denote significant differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$) from the control in the absence of resveratrol. N = 5-9.

引用文献

1. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339(8808): 1523-6.
2. Baur JA, Pearson KJ et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006; 444 (7117): 337-42.
3. Kokubo Y, Iso H et al. Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation*. 2007; 116 (22): 2553-62.
4. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989; 2(4): 1313-23.
5. Rendu F, Marche P et al. Signal transduction in normal and pathological thrombin-stimulated human platelets. *Biochimie*. 1987; 69(4): 305-13.
6. Zhang X, Gueguinou M et al. Store-Independent Orai Channels Regulated by STIM. In: Kozak JA, Putney JW Jr, editors. *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 11.
7. Boulay G, Brown DM et al. Modulation of Ca²⁺ entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca²⁺ entry *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(26): 14955-60.
8. Treiman M, Caspersen C et al. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *Trends Pharmacol Sci*. 1998; 19(4): 131-5.
9. Tu P, Kunert-Keil C et al. Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J Neurochem*. 2009; 108(1): 126-38.
10. Berna-Erro A, Galan C et al. Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(8): 1242-51.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 丸茂幹雄 | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 血小板機能検査法の多様性 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 兵庫医科大学医学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 45-50 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Marumo M, Ekawa K, Wakabayashi I. | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Resveratrol inhibits Ca ²⁺ signals and aggregation of platelets | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Environ Health Prev Med. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12199-020-00905-1. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|-----------|---|--------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 若林 一郎 (Wakabayashi Ichoro) (70220829) | 兵庫医科大学・医学部・教授 (34519) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|