

コラーゲン受容体を標的にした
新規抗血小板薬の作用機序の解明

東北大学大学院薬学研究科
生命薬学専攻細胞情報薬学分野
A8YD1010 岩下真也

目次

第一章 緒言	1
第二章 インドナガコショウの血小板凝集抑制作用とその活性成分の探索	
2-1 序論	5
2-2 実験方法	8
2-3 実験結果	14
2-4 考察	23
第三章 ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集抑制作用機構の解明	
3-1 序論	29
3-2 実験方法	33
3-3 実験結果	39
3-4 考察	53
第四章 結語	59
謝辞	61
参考文献	62

略語表

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

ADP	adenosine 5'-diphosphate
$\alpha_2\beta_1$	integrin $\alpha_2\beta_1$
BSA	bovine serum albumin
cAMP	adenosine cyclic 3',5'-monophosphate
COX	cyclooxygenase
CRP	collagen-related peptide
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FcR	Fc receptor
GPCR	G protein-coupled receptor
GPVI	glycoprotein VI
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IP ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LAT	linker for activation of T cells
MAPK	mitogen-activated protein kinase
ODS	octadecyl-silica
PAGE	polyacrylamidegel electrophoresis

PBS	phosphate buffered saline
PG	prostaglandin
PKC	protein kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PRP	platelet rich plasma
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLP-76	SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kD
TBST	Tris-buffered saline containing Tween 20
TCA	trichloroacetic acid
TMPPA	β-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propionic acid
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TX	thromboxane
TXS	thromboxane synthase

第一章 緒言

近年、社会環境はめまぐるしく変動しており、これに伴って人間が侵される疾病も大きく変化してきている。戦前の死亡原因として深刻だった結核、肺炎及び胃腸炎などの感染症は、化学療法や抗生物質の進歩によって撲滅に近づいている。これに変わって悪性新生物、心疾患及び脳血管障害が日本人の三大死因になっている (1)。

心疾患及び脳血管障害の死亡率の推移は、救急医療の発達もあり全体的に横ばいになっているが、その内訳は大きく変化している。測定機器及び降圧薬の進歩によって血圧がコントロールできるようになったことから、出血性の循環障害は減少し、代償的に梗塞性の循環障害が増加している。特に脳血管障害においては脳梗塞の割合が非常に増えており、大きな問題になっている。心疾患においても心筋梗塞などの虚血性心疾患の占める割合は多く、脳血管障害及び心疾患における虚血性疾患を合わせて考えると、その死亡率は高い。また、心疾患及び脳血管障害の死亡率の推移は横ばいであるが、それら虚血性疾患の罹患者数は増加の一途をたどっている。虚血性疾患の治療及び予防は主に薬剤を用いて行われており、今日臨床応用されている薬剤の売上金額第一位及び第二位は、虚血性疾患の予防及び治療を目的に用いられる高脂血症治療薬リピトール（アトルバスタチン）及び抗血小板薬プラビックス（クロピドグレル）で、虚血性疾患の罹患者数の多さを反映している。更に、脳梗塞は脳血管性認知症の発症に関係するなど、多くの合併症を引き起こす虚血性疾患は問題視されている (2)。このような虚血性疾患は未だ治療の満足度が低く、アンメット・メディカル・ニーズとされており、変化してきた虚血性疾患に対応した効果的で副作用の少ない新たな薬物の開発が望まれている (3)。

虚血性疾患には様々な病態があるが、その主な原因は血管内で形成される血栓であると考えられている。血栓形成はfigure 1のように、血管内皮細胞の剥離によって露出したコラーゲンと血小板の相互作用によって惹起される(4,5)。血小板は骨髄中の巨核球(巨大核細胞)から細胞質がちぎれた無核細胞である。通常直径2 - 3 μm の扁平な円盤状の形態をとっており、形態変化、粘着反応、放出反応及び凝集反応などの多彩な機能を発揮して、止血機構において重要な役割を担っている(6)。血小板は血管障害部位などでコラーゲンを始めとした様々な因子によって活性化されると、まず偽足の伸張や球状化などの形態変化及び粘着反応によって障害部位に接着する。その後、細胞内情報伝達を介して血小板膜リン脂質からトロンボキサン(TX) A_2 を産生すると共に、濃染顆粒からアデノシン-5'-二リン酸(ADP)、セロトニンなどを放出する(7-9)。これらが二次メディエーターとして働き血小板凝集を基本とした一次血栓を惹起する。また、 α 顆粒からは血液凝固因子が放出され、血液凝固系を活性化する(10)。この働きによって不可逆的な血液凝固も加わり、二次血栓が形成される。通常、このような血栓形成は血管破綻部位での止血機構において見られ、止血機構で形成された血栓は最終的に線溶系によって溶解され、血管の破綻部位が完全に修復される。しかし、このような血栓が正常な血管内で形成されてしまうと、虚血性疾患へと繋がってしまう。従って、虚血性疾患の治療には、血栓の形成を抑制する抗血小板薬や抗凝固薬及び血栓を溶かす血栓溶解薬が用いられている。

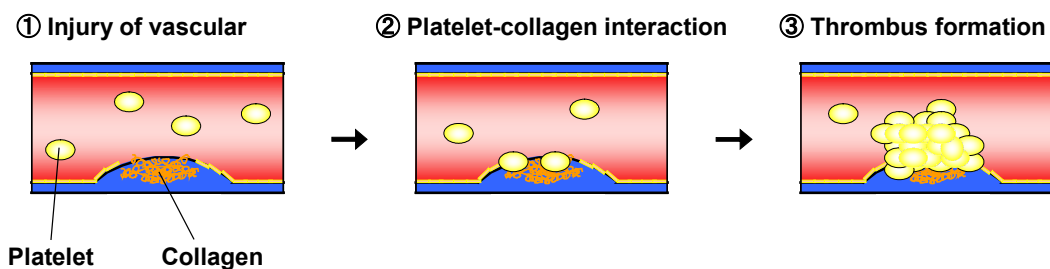


Figure 1 Model of thrombus formation.

しかし、それら既存薬には様々な問題がある。抗血小板薬の中ではシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬が汎用されているが、それらは胃腸障害、喘息誘発及び出血傾向などの副作用を有している。また、副作用の軽減を目的に多剤併用投与が行われることもあるが、抗血小板薬による多剤併用については効果が少ないという問題点も有している (11,12)。抗凝固薬の中ではワルファリンが汎用されているが、これは出血傾向の副作用、催奇形性の危険性及び数多くの薬物や食物との相互作用を有している。血栓溶解薬である組織型プラスミノゲン活性化因子アルテプラゼは出血傾向の副作用を示すとともに、用法には厳しい制限がある。専門施設において、脳梗塞においては発症後 3 時間以内に投薬、心筋梗塞においては発症後 6 時間以内に投薬しなければならない。このように虚血性疾患に用いられる既存薬には様々な問題点がある。特に、出血傾向の副作用はいずれの薬物にも共通する大きな問題点であり、今日、そのような出血傾向の副作用が少ない新たな薬物の開発が望まれている。

近年、生活習慣病に対する一次予防の重視及びセルフメディケーション推進の観点から、伝統的に用いられてきた漢方薬、生薬及びその機能性食品が注目されている。その理由として、漢方薬及び生薬は経験的に副作用の少ない薬物である可能性を有していること、また、その機能性食品は安価で長期間摂取できる可能性を有していることなどが挙げられる。しかしながら、それら漢方薬、生薬及び機能性食品の生体に与える詳細な薬理作用については未解明な部分が多く、科学的な検討に基づいたエビデンスの確立と、そのエビデンスに沿った応用が望まれている。

東南アジアに分布するコショウ科の常緑樹木であるインドナガコショウ (*Piper longum* L.) は、漢方薬や機能性食品として市販されている天然物である。インドナガコショウは古くギリシア時代や唐王朝時代から生薬として使用されており、今日でも伝承医薬、機能性食品及び香辛料として幅広く用いられ

ている。特に漢方やアーユルヴェーダにおいて、インドナガコショウは血液循環改善作用を有していることから、冷え症の治療に応用されている。しかしながら、インドナガコショウやその構成成分においても、血液循環改善作用における詳細な薬理作用については未だ明らかになっていない。従って、インドナガコショウの血液循環改善作用の機序を解明し、その分子機構に基づき使用することによって、より効果的な応用が可能になるとと思われる。また、血液循環改善作用は血液循環の主要を成している血小板の凝集反応抑制作用や血管の拡張作用に起因している可能性が高いと思われるが、血小板凝集抑制作用や血管拡張作用を有する薬物は虚血性循環障害の治療及び予防に用いられることから、インドナガコショウ中の活性成分の解明及びその作用機序の解明は効果的で副作用の少ない虚血性循環障害の治療及び予防薬の開発に結び付く可能性も有している。

本研究では、虚血性疾患の原因となる血栓形成のトリガーとして重要な役割を果たす血小板に着目して、インドナガコショウの作用を検討した。第二章では、ウサギ及びヒト洗浄血小板を用いてインドナガコショウの血小板凝集抑制作用の検討と活性成分の探索を試みた。その結果、インドナガコショウ成分であるピペロングミンが強いコラーゲン誘発性血小板凝集抑制活性を示したので、第三章では、ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集抑制作用機構の解明を目的に検討を行った。

第二章 インドナガコショウの血小板凝集抑制作用 とその活性成分の探索

2 - 1 序論

近年、漢方薬などの生薬は、副作用が少ないことや食品として日常的に簡単に摂取できることなどから、その有用性が見直されてきている。生薬は複数の成分を含み、それぞれの成分の作用が効果的に組み合わせられて有効な作用を引き起こすものと考えられる。一方、現代医療における薬物治療では単一化合物を単独もしくは数種を組み合わせ用い、低濃度で効果的な治療を目指している。経験的に用いられてきた生薬も成分を単離精製して用いることによって、より大きな効果を得ることやより副作用を軽減することに繋がる可能性がある。

機能的食品としても市販され、伝承医学において血液循環改善を目的に使用されている生薬にインドナガコショウがある。インドナガコショウに含まれる成分としては、コショウ属に広く含有されているピペリンが主成分としてある他、インドナガコショウ特異的に含有されているピペロングミンなどがある。また、我々は β -(3,4,5-trimethoxyphenyl)propionic acid (TMPPA) が含有されていることを明らかにした (13)。

これまでに、インドナガコショウやその含有成分の薬理作用に関する報告がいくつかなされている。それは、インドナガコショウ水抽出物中の精油成分がラットにおいてカラゲニン誘発性の浮腫を抑制すること (14)、インドナガコショウ EtOH 抽出物及びその含有成分であるバクチオール、ババキン、イソババカルコンが B16 mouse melanoma cell からのメラニン産生を抑制すること (15)、インドナガコショウ EtOH 抽出物がネッタイシマカに対する殺虫効果を示すこ

とである (16)。しかし、血液循環改善作用に対する薬理作用はこれまでに明らかになっていない。

今日、虚血性循環障害を改善する薬物としては、抗血小板薬、抗凝固薬及び血栓溶解薬がある。それぞれの薬物の適応であるが、抗血小板薬は動脈性の心筋梗塞、脳梗塞及び外科手術などを中心に幅広く使用されるのに対して、抗凝固薬は静脈性の肺塞栓などの病態に、血栓溶解薬は虚血性循環障害の超急性期に限って使用されている。そこで、私は最も幅広く応用されている抗血小板薬に着目した。

血小板は形態変化、粘着反応、放出反応及び凝集反応などの多彩な機能を有している。それら機能の中で、血栓形成において最も中心的な役割を果たしているのは血小板凝集反応である。凝集反応を惹起する生理活性物質には前述したようにコラーゲン、TXA₂、ADP、セロトニン及びトロンビンなど様々なものがあり、抗血小板薬のターゲットとなっている (17)。本章では、虚血性循環障害の病態時に血小板凝集反応を最初に惹起するコラーゲンと、抗血小板薬として最も汎用されているCOX阻害薬によって産生が抑制されるTXA₂の受容体刺激薬U46619 と、血小板活性化の情報伝達が多岐に渡っていると共に血液凝固においても中心的な役割を担っているトロンビンを用いて (figure 2)、三種の血小板凝集惹起物質によって誘発される凝集反応に対するインドナガコショウ抽出物、分画物及びその成分の抑制作用を検討し、活性成分の探索を行った。

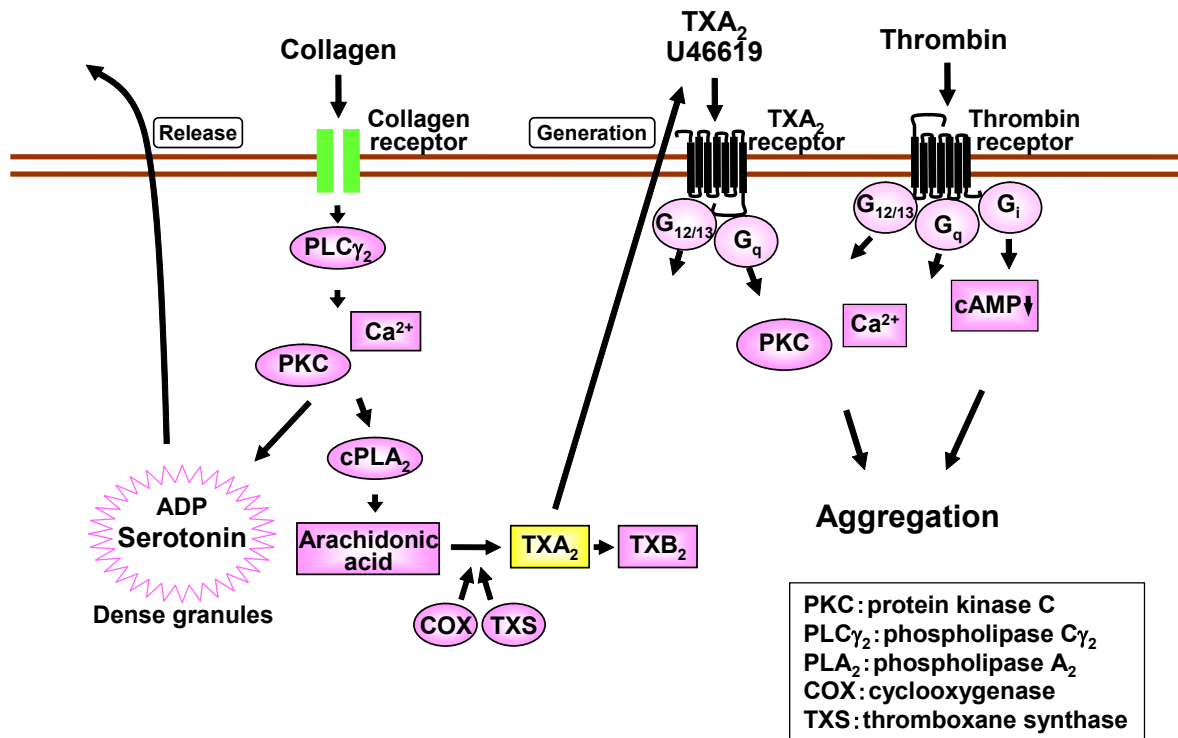


Figure 2 Mechanisms of collagen-, U46619- and thrombin-induced platelet aggregation.

2 - 2 実験方法

2 - 2 - 1 インドナガコショウ EtOH 抽出物の調製法

インドナガコショウ EtOH 抽出物は、丸善製薬株式会社によって以下のように調製されたものを用いた。インドナガコショウの果穂 (200 g) を粉碎した後、EtOH を 2 l 添加し、24°C で 3 時間攪拌しながら抽出を行った。抽出液を濾紙で濾過した後、残渣部には再び EtOH を 2 l 添加し、24°C で 3 時間攪拌しながら抽出を行った。同様に抽出液を濾紙で濾過した後、それら二つの濾液を合わせ 40°C で減圧濃縮した。その後、試料を凍結乾燥させ 14.42 g の EtOH 抽出物を得た。実験にはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ用いた。

2 - 2 - 2 ODS カラムによるインドナガコショウ EtOH 抽出物の分画

インドナガコショウ EtOH 抽出物 (1.07 g) を ODS カラムにかけ、50% MeOH、70% MeOH、100% MeOH 及びアセトンの順に溶出して、分画物 50% MeOH 溶出部 131 mg、70% MeOH 溶出部 378 mg、100% MeOH 溶出部 451 mg 及びアセトン溶出部 34 mg を得た (figure 3)。実験にはこれらの分画物を DMSO に溶解させ用いた。

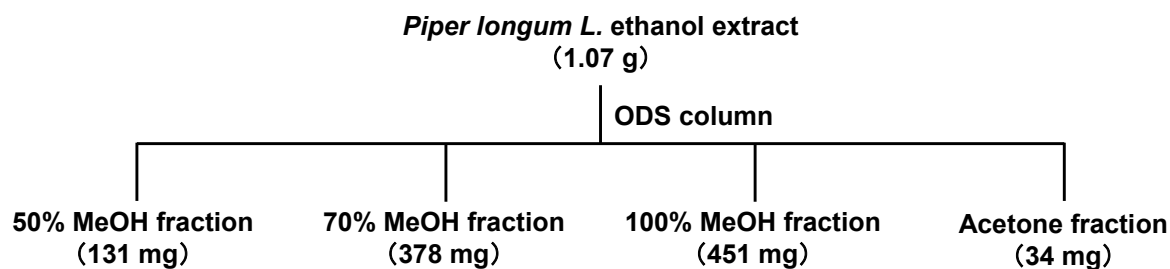


Figure 3 Preparation of several fractions from the ethanol extract of *Piper longum* L. by using ODS column.

2 - 2 - 3 インドナガコショウ EtOH 抽出物含有成分の精製

インドナガコショウ EtOH 抽出物 (100 g) を 2 - 2 - 2 と同様に ODS カラムを用いて分画し、70% MeOH 溶出部 7.48 g 及び 100% MeOH 溶出部 9.05 g を得た。70% MeOH 溶出部はシリカゲルカラム (n-hexane-EtOAc = 2 : 1 → 1 : 1) にて粗分画した後、ODS カラム (60% MeOH 及び 70% MeOH) 並びに HPLC (条件は下記参照) にて分画、精製した。100% MeOH 溶出部はシリカゲルカラム (n-hexane-EtOAc = 1 : 1)、並びに HPLC (条件は下記参照) にて分画、精製した。化合物の同定は、¹H-NMR、¹³C-NMR、各種 2D-NMR のスペクトルデータによって帰属した。

*HPLC 条件

HPLC : Recycling Preparative HPLC LC-908 (日本分析工業株式会社)

カラム : 1) JAIGEL GS-310、500 × 21.5 mm (日本分析工業株式会社)

2) YMC-Pack Pro C18 5 μm、250 × 20 mm (株式会社ワイエムシイ)

(2) は 100% MeOH 溶出部の分離、精製時のみ)

カラム温度 : 室温

移動層：1) MeOH

2) 80% MeOH (2) は 100% MeOH 溶出部の分離、精製時のみ)

検出器：UV 検出器 (254 nm)、RI 検出器

2 - 2 - 4 ウサギ洗浄血小板の調製

日本白色ウサギ (体重 2.5 - 4.0 kg、雄) を固定箱に入れて耳介動脈を怒張させた後、19 G 注射針を挿入して動脈血を遠沈管に採取した。または、ウサギをペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg、筋注) で麻酔後、頸動脈よりシリコン処理ガラス注射筒を用いて採血した。遠沈管及び注射筒には、あらかじめ採血量の六分の一容量の抗凝血剤 ACD 液 (65 mM クエン酸、85 mM クエン酸ナトリウム、2% グルコース) を準備しておき、採血後速やかに血液と混ぜた。

血液を 250 × g で 12 分間遠心分離してその上清を回収後、更に 90 × g で 5 分間遠心分離を行い、混入した赤血球及び白血球を取り除いた多血小板血漿 (PRP) を得た。この PRP を 450 × g で 15 分間遠心して血小板を沈渣とした後、Tyrode-HEPES 液 (pH 6.35) に浮遊させた。Tyrode-HEPES 液の組成は、140 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.0 mM MgCl₂·6H₂O、4.0 mM NaHCO₃、0.42 mM NaH₂PO₄·2H₂O、10 mM HEPES、0.10% グルコース、0.35% 牛血清アルブミン (BSA) である。これを再び 400 × g で 10 分間遠心し、沈渣を Tyrode-HEPES 液 (pH 6.35) に浮遊させた。この洗浄操作をもう一度行い、最終的にそれぞれの実験に適した濃度になるように Tyrode-HEPES 液 (pH 7.35) に浮遊させ、洗浄血小板を調製した。

全ての実験は日本薬理学会の動物実験指針に従い、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の承認を得て行った (承認番号 22 薬動-18)。

2 - 2 - 5 ヒト洗浄血小板の調製

ボランティアの成人健常者の上腕静脈に 23G 注射針を挿入し、シリコン処理プラスチック注射筒を用いて 20 ml の静脈血を採取した。その後、3.3 ml ACD 液を準備しておいた遠沈管に採取した血液を移し、速やかに混ぜた。

その後の調製は、2 - 2 - 4 の方法と同様に行った。また、全ての実験は東北大学大学院薬学研究科・ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 08-6）。

2 - 2 - 6 血小板凝集反応の測定

血小板凝集反応は、アグリゴメーター（PAM-6C、メバニクス社製）を用いた比濁法によって測定した。洗浄血小板浮遊液（ 3×10^8 /ml）を、小型の攪拌子を入れたアグリゴメーター専用のキュベットに 0.3 ml 入れ、1,000 rpm で攪拌しながら 37°C に加温した。3 分間プレインキュベート後、最終濃度 1 mM CaCl_2 を加え、その 3 分後に 100 倍濃度のインドナガコショウ EtOH 抽出物または各種阻害薬を 3 μl 加えた。5 分間処理した後、100 倍濃度の血小板凝集惹起物質を 3 μl 添加し反応を観察した。凝集反応の割合は、血小板浮遊液の光透過率を 0%、血小板を含まない Tyrode-HEPES 液（pH 7.35）の光透過率を 100% とし、薬物刺激による光透過率の時間的変化を記録することにより算出した。

2 - 2 - 7 走査型電子顕微鏡を用いた血小板の形態観察

2 - 2 - 6 の血小板凝集反応の測定と同様に洗浄血小板をアグリゴメーターのキュベット中で刺激し一定時間後、最終濃度が 1% となるようにグルタルアルデヒドを加え、4°C で 30 分間血小板を固定した。ポリ-L-リジン処理したカバーガラスの上に血小板固定液を入れ、4°C で一晩インキュベートして血小板を吸着させた。カバーガラスは 0.1% ポリ-L-リジンで 10 分間処理して、残存するポリ-L-リジンをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で除去した後、風乾して使用した。未吸着の血小板は冷却した PBS で 3 回洗浄して取り除いた後、上昇エタノール系列及び *tert*-ブチルアルコールで脱水を行い、*tert*-ブチルアルコール中で凍結させた。試料はフリーズドライヤー (ES-2030、日立) を用いて凍結乾燥させ、イオンスパッター (E-1010、日立) を用い白金・パナジウムによるコーティングを行った。観察には走査型電子顕微鏡 (S-3200、日立) を使用した。

2 - 2 - 8 薬物及び試薬

実験は下記の薬物及び試薬を用いて行った。

コラーゲン (Collagenreagent Horm) は Nycomed Pharma GMBH より、U46619 は Cayman Chemical Company より、また、トロンビンは和光純薬工業より購入した。

その他の試薬については、市販の特級試薬あるいはこれに相当するものを用いた。

2 - 2 - 9 データ解析

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差の検定は、Tukey's Kramer test を用いた。

2 - 3 実験結果

2 - 3 - 1 血小板凝集反応に対するインドナガコショウ EtOH 抽出物の作用

アグリゴメーターを用いて血小板の反応を測定すると、凝集反応は光透過率の増大として現れ(下方向)、形態変化は光透過率の減少として現れる(上方向)。Figure 4 のようにU46619 (3 μ M) 及びトロンビン (0.05 U/ml) で血小板を刺激すると一過性の形態変化(上へのチャートの変化)の後、速やかな凝集反応(下へのチャートの変化)が惹起された。一方、コラーゲン (3 μ g/ml) で血小板を刺激すると緩やかな形態変化の後、凝集反応が惹起された。コラーゲン誘発性血小板凝集反応が他の反応と異なり遅延的に現れるのは、TXA₂の産生などを介して形態変化及び凝集反応が惹起されることに起因していると考えられる。

コラーゲン、U46619 及びトロンビンの使用濃度は、最大凝集反応得られる濃度域の中で最小の濃度を用いた。また、最大凝集反応は、各々の凝集反応の濃度依存性から同程度に惹起されることを確認した。

上記の血小板凝集反応に対するインドナガコショウ EtOH 抽出物の作用を検討した結果、インドナガコショウ EtOH 抽出物はコラーゲン及び U46619 誘発性血小板凝集反応を強く抑制した (figure 4)。一方、トロンビン誘発性血小板凝集反応では顕著な抑制は見られなかった。

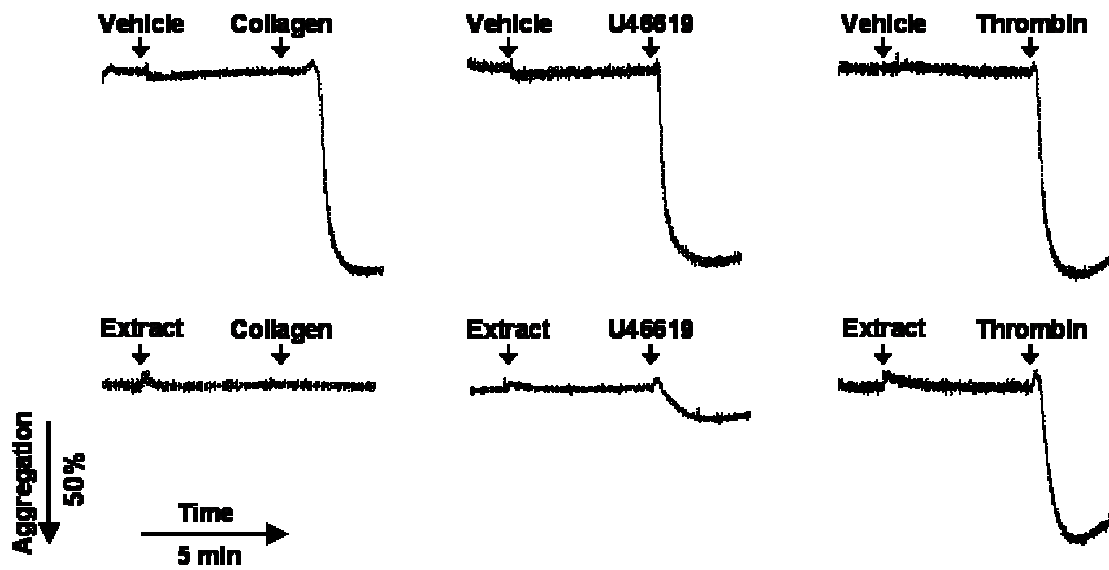


Figure 4 Representative traces of collagen-, U46619- and thrombin-induced platelet aggregation with or without ethanol extract of *Piper longum* L.. The ethanol extract (100 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) was preincubated for 5 min before the addition of collagen (3 $\mu\text{g/ml}$), U46619 (3 μM) or thrombin (0.05 U/ml) in the presence of 1 mM CaCl_2 , as shown by arrows.

2 - 3 - 2 血小板凝集反応に対するインドナガコショウ EtOH 抽出物の分画物の作用

インドナガコショウ EtOH 抽出物に含まれている活性成分を同定するために、抽出物を ODS カラムで分画し、成分を濃縮した。そのフラクションを用いてコラーゲン (3 $\mu\text{g/ml}$)、U46619 (3 μM) 及びトロンビン (0.05 U/ml) 誘発性血小板凝集反応に対する作用を検討した。その結果、50% MeOH、70% MeOH 及び 100% MeOH フラクションはコラーゲン誘発性血小板凝集反応を有意に抑制した (figure 5)。また、50% MeOH 及び 100% MeOH フラクションは U46619 誘発性血小板凝集反応を有意に抑制した。一方、抽出物及びいずれのフラクションもトロンビン誘発性血小板凝集反応を抑制しなかった。

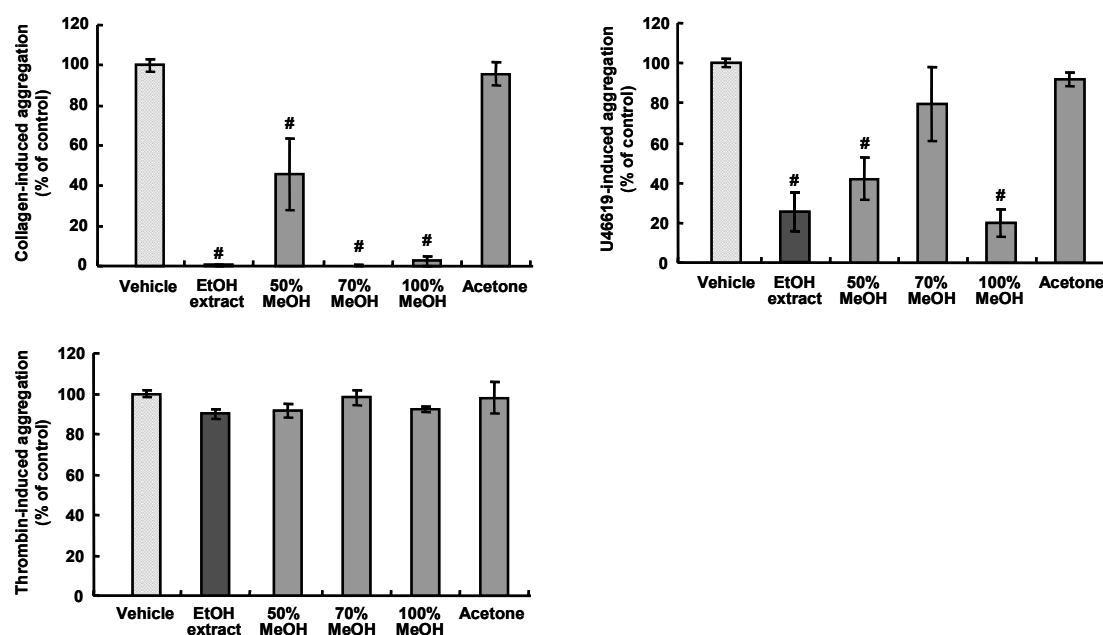


Figure 5 Effect of several fractions of *Piper longum* L. ethanol extract on collagen-, U46619- or thrombin-induced platelet aggregation. Platelet aggregation was measured by turbidimetric method. *Piper longum* L. extract and fractions (100 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) was preincubated for 5 min before addition of collagen (3 $\mu\text{g/ml}$), U46619 (3 μM) or thrombin (0.05 U/ml) in the presence of 1 mM CaCl_2 . The extent of aggregation in the presence of *Piper longum* L. extract and fractions was normalized to vehicle. Results were means \pm S.E.M. of four independent experiments ($^{\#}P < 0.05$ compared with vehicle, Tukey's Kramer test).

2 - 3 - 3 インドナガコショウ EtOH 抽出物含有成分の精製

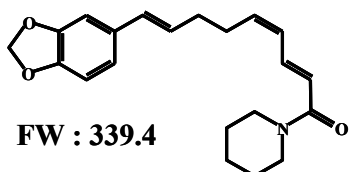
ODS カラムによって分画したフラクションのうち、抑制効果を示し、かつ収量の多かった 100% MeOH フラクション及び 70% MeOH フラクションにおいて、HPLC を用いて含有されている化合物の単離を試みた。

その結果、100% MeOH フラクションからは(4Z)-デヒドロピペノナリン、デヒドロピペノナリン、ピペノナリン及びピペルンデカリジンの4つの化合物が単離された (figure 6, 1- 4)。なお、(4Z)-デヒドロピペノナリンについては新規化合物の可能性があり、名称については仮称である。デヒドロピペノナリン、ピペノナリン及びピペルンデカリジンはスペクトルデータを文献値 (18) と比較して同定した。

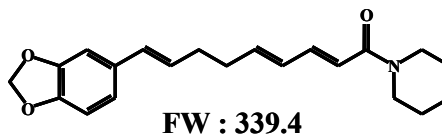
また、70% MeOH フラクションからはピペロングミニン、5,6-ジヒドロピペロングミニン及びメチルピペレート of 3つの化合物が単離された (Figure 6, 5 - 7)。これらについてもスペクトルデータを文献値 (19) と比較して同定した。

先行研究においてインドナガコショウに含有されることが明らかになっているピペロングミン、ピペリン及び TMPPA についても同様に化学構造式を示した (Figure 6, 8 - 10)。ピペロングミン及びピペリンは 70% MeOH フラクションに、TMPPA は 50% MeOH フラクションに含有されていることが明らかになっている。

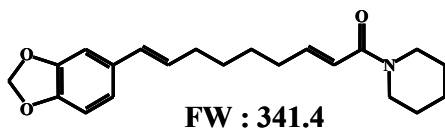
[1] (4Z)-Dehydropiperlonginaline



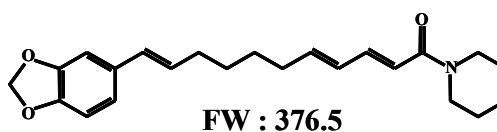
[2] Dehydropiperlonginaline



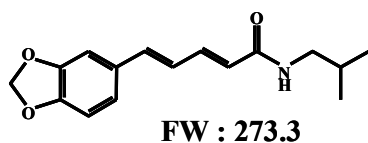
[3] Piperlonginaline



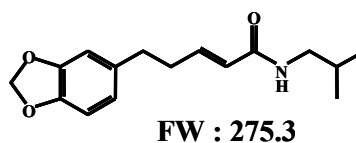
[4] Piperundecalidine



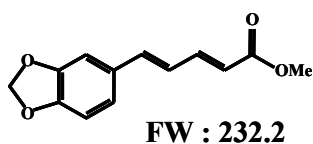
[5] Piperlongminine



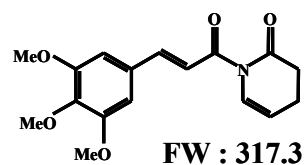
[6] 5,6-Dihydropiperlongminine



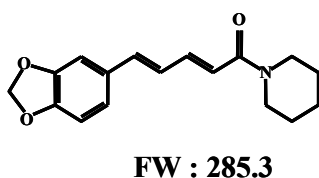
[7] Methyl piperate



[8] Piperlongumine



[9] Piperine



[10] β -(3,4,5-Trimethoxyphenyl) propionic acid (TMPPA)

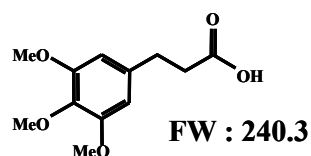


Figure 6 Chemical structures of (4Z)-dehydropiperlonginaline, dehydropiperlonginaline, piperlonginaline, piperundecalidine, piperlongminine, 5,6-dihydropiperlongminine, methyl piperate, piperlongumine, piperine and TMPPA purified from *Piper longum* L. extract.

2 - 3 - 4 血小板凝集反応に対するインドナガコショウ成分の作用

インドナガコショウ EtOH 抽出物に含有されている成分のコラーゲン (3 $\mu\text{g/ml}$)、U46619 (3 μM) 及びトロンビン (0.05 U/ml) 誘発性血小板凝集反応に対する作用について検討した結果、コラーゲン及び U46619 誘発性血小板凝集反応を抑制する傾向が見られた。

そこで、コラーゲン及びU46619 誘発性血小板凝集反応に対する抑制作用の用量依存性を検討し、 IC_{50} 値を算出した (table 1)。その結果、多くの含有成分は凝集反応を抑制したが、その抑制作用はコラーゲン誘発性血小板凝集反応においてU46619 誘発性血小板凝集反応よりも低濃度で見られた。また、含有成分の中ではピペロングミンが最も強い血小板凝集反応抑制作用を示した。

一方、インドナガコショウ含有成分を 200 μM と高濃度で処理した場合においても、トロンビン誘発性の凝集反応は有意に抑制されなかった。コラーゲン及びU46619 誘発性血小板凝集反応を強く抑制したピペロングミン (200 μM) においても、figure 7 に示すようにトロンビン誘発性の凝集反応を 50%抑制することはなかった。他の含有成分を 200 μM で処理した場合においても、凝集反応を 50%抑制することはなく、 IC_{50} 値を算出することはできなかった。これらのことから、インドナガコショウ含有成分はトロンビン誘発性血小板凝集反応を抑制しないことが示唆された。

Table 1 The IC₅₀ values of the compounds from the *Piper longum* L. extract on collagen (3 µg/ml)- or U46619 (3 µM)-induced platelet aggregation.

Compounds	IC ₅₀ values (µM)	
	Collagen 3 µg/ml	U46619 3 µM
[1] (4Z)-Dehydropiperlonginaline	57	175
[2] Dehydropiperlonginaline	64	137
[3] Piperlonginaline	34	120
[4] Piperundecalidine	39	81
[5] Piperlonguminine	51	> 200
[6] 5,6-Dihydropiperlonguminine	23	> 200
[7] Methyl piperate	57	> 200
[8] Piperlongumine	14	50
[9] Piperine	88	> 200
[10] TMPPA	> 200	> 200

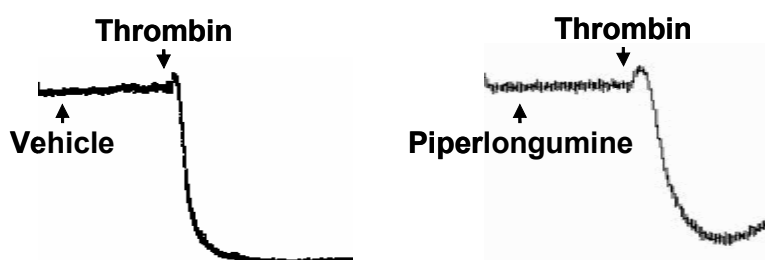


Figure 7 Representative traces of thrombin-induced platelet aggregation with or without piperlongumine. Piperlongumine (200 µM) or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) was preincubated for 5 min before the addition of thrombin (0.05 U/ml) in the presence of 1 mM CaCl₂, as shown by arrows.

2 - 3 - 5 インドナガコショウ成分ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集反応及び形態変化に対する作用

2 - 3 - 4で、インドナガコショウ成分のピペロングミンはコラーゲン誘発性血小板凝集反応を強く抑制することが明らかになった。そこで、その際の血小板の様子を、アグリゴメーターのチャート及び走査型電子顕微鏡の写真を用いて観察した。

血小板はコラーゲン (3 $\mu\text{g/ml}$) 刺激によって、時間依存的に形態変化及び凝集反応を引き起こされた (figure 8)。一方、ピペロングミン (100 μM) 処理した血小板では、コラーゲン誘発性の形態変化及び凝集反応が共に抑制された。

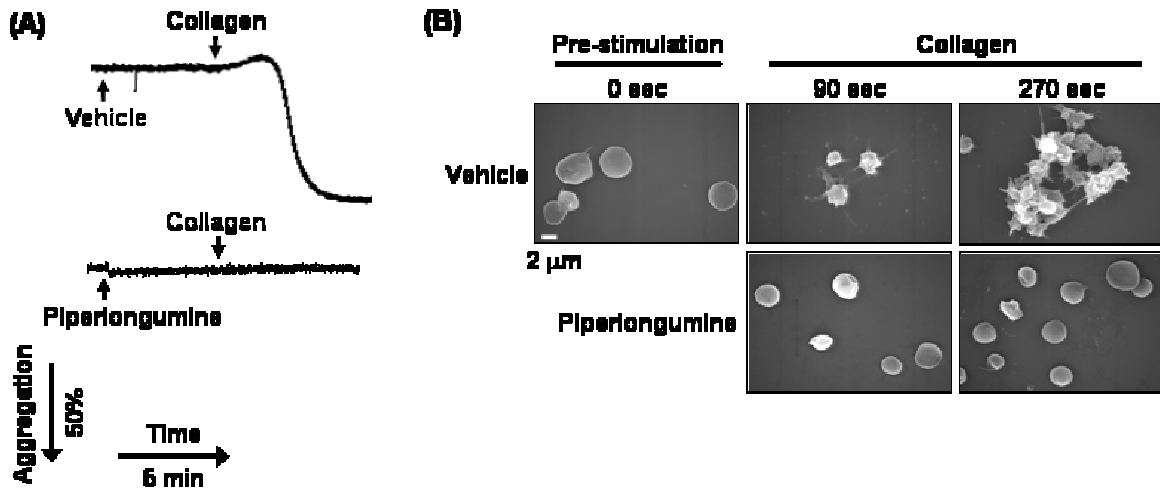


Figure 8 Observation of platelet morphology by aggregometer and scanning electron microscopy. (A) Representative traces of collagen (3 $\mu\text{g/ml}$)-induced platelet aggregation with or without piperlongumine (100 μM). Piperlongumine or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) was preincubated for 5 min before the addition of collagen in the presence of 1 mM CaCl_2 , as shown by arrows. (B) Platelets were preincubated with piperlongumine (100 μM) or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) for 5 min before the addition of collagen (3 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of 1 mM CaCl_2 . Samples were fixed by 1% glutaraldehyde at 0, 90 or 270 sec after stimulation.

2 - 3 - 6 ヒト洗浄血小板におけるコラーゲン誘発性凝集反応に対するピペロングミンの作用

これまでの検討において、ウサギ洗浄血小板を用いインドナガコショウの血小板凝集反応抑制作用及びその活性成分の探索を行ってきた。その結果、インドナガコショウ成分のピペロングミンがコラーゲン誘発性血小板凝集反応を強く抑制することが明らかになった。そこで、ヒト洗浄血小板においても同様の作用が見られるかを検討した。

その結果、ピペロングミンはヒト洗浄血小板においてもコラーゲン (3 $\mu\text{g/ml}$) 誘発性の凝集反応を濃度依存的に抑制した (figure 9)。しかし、ピペロングミンはヒト洗浄血小板のコラーゲン誘発性形態変化を抑制しなかった。

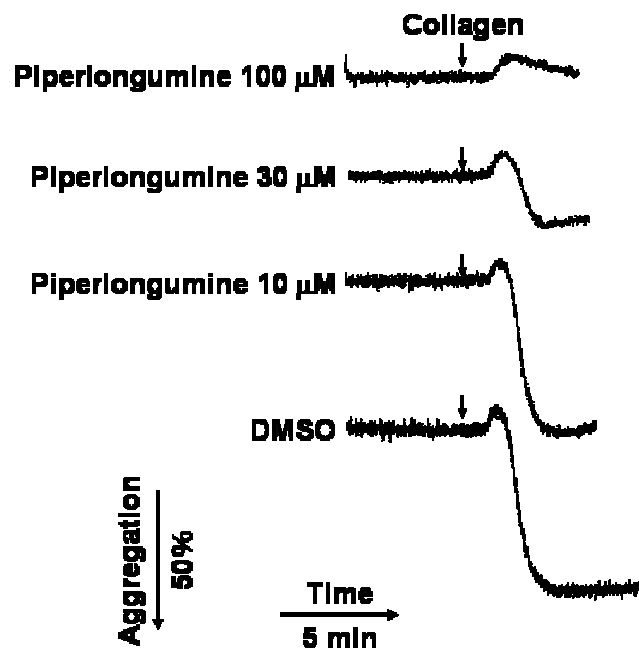


Figure 9 The effect of piperlongumine on collagen-induced human platelet aggregation. Washed human platelets were preincubated with piperlongumine or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) for 5 min before the addition of collagen (3 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of 1 mM CaCl_2 , as shown by arrows.

2 - 4 考察

本章では、インドナガコショウ EtOH 抽出物及びその成分が *in vitro* においてウサギ洗浄血小板及びヒト洗浄血小板のコラーゲン誘発性凝集反応を抑制することを明らかにした。インドナガコショウの血小板凝集反応抑制作用は、これまでに報告されている浮腫抑制作用、メラニン産生抑制作用及び殺虫作用とは異なり、新しいものだった (14-16)。

インドナガコショウの血小板凝集反応に及ぼす作用の検討及び血小板凝集抑制活性を有する成分の探索は、病態時に血小板凝集反応を最初に惹起するコラーゲンと、抗血小板薬として最も汎用されているCOX阻害薬によって産生が抑制されるTXA₂の受容体刺激薬U46619 と、血小板活性化の情報伝達が多岐に渡っていると共に血液凝固においても中心的な役割を担っているトロンビンを用いて行った。Figure 2 には、今回用いた血小板凝集惹起物質によって起こる凝集メカニズムを簡略化して示した。U46619 及びトロンビンはGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であるTXA₂受容体及びトロンビン受容体をそれぞれ刺激することにより速やかな凝集反応を惹起するのに対して、コラーゲンは主にTXA₂、ADP及びセロトニンなど血小板から放出される二次メディエーターを介して凝集反応を惹起するため、figure 4 のように他の凝集反応よりも遅延的に起こる (20)。U46619 はTXA₂受容体に共役するG_qタンパク質を介して細胞内Ca²⁺濃度上昇を引き起こし、血小板を凝集させる (21)。トロンビン受容体を介した凝集反応もG_qタンパク質を主要な経路として凝集反応を引き起こすことでは共通している。しかし、U46619 誘発性血小板凝集反応は細胞外Ca²⁺に依存した反応を起こすのに対して、トロンビン誘発性血小板凝集反応は細胞外Ca²⁺の部分的な寄与はあるものの細胞外Ca²⁺非依存的にも凝集反応を起こすといった違いを有している (22,23)。G_iタンパク質は細胞内cAMP濃度を低下させて凝集反応を

促進するが、G_iタンパク質の関与が二つの受容体間で異なっている可能性も高い(24-26)。すなわち、今回用いた三種の血小板凝集惹起物質は異なったメカニズムで凝集反応を惹起する。

インドナガコショウEtOH抽出物はコラーゲン誘発性凝集反応を強く抑制すると共に、U46619誘発性血小板凝集反応も抑制した (figure 4)。これまでの研究で、インドナガコショウEtOH抽出物はTXA₂受容体遮断作用を有することが明らかになっており、インドナガコショウEtOH抽出物によるU46619誘発性血小板凝集反応の抑制は、TXA₂受容体遮断作用に起因していると考えられる(13)。一方、インドナガコショウEtOH抽出物はトロンビン誘発性血小板凝集反応も高濃度で部分的に抑制した。今回の結果では示していないが、インドナガコショウEtOH抽出物はADP及びセロトニン誘発性血小板凝集反応も高濃度で部分的に抑制した (Iwashita *et al.*, unpublished observation)。TXA₂は様々な血小板活性化に伴うポジティブフィードバック因子として働いているため(7)、インドナガコショウEtOH抽出物のトロンビン、ADP及びセロトニン誘発性血小板凝集反応に対する部分的な抑制作用は、ポジティブフィードバック因子として産生されたTXA₂の受容体への結合が阻害されたことによって起こったと考えられる。TXA₂受容体遮断作用によってトロンビン及びADP誘発性血小板凝集反応が部分的に抑制されることは、これまでにいくつか報告されている(27,28)。また、抽出物には様々な成分が含まれており、複数の作用を示す場合がある。すなわち、インドナガコショウEtOH抽出物もTXA₂受容体遮断作用以外の作用を併せ持っている可能性がある。具体的に、トロンビン、ADP及びセロトニン誘発性血小板凝集反応は、GPCRであるトロンビン、ADP及びセロトニン受容体からG_q、G_i及びG_{12/13}タンパク質を介した細胞内情報伝達経路によって惹起されることから(24-26,29)、そのような細胞内情報伝達分子に作用している可能性がある。更に、トロンビン、ADP及びセロトニン誘発性血小板凝集反応にはJAKや

Cskなどのリン酸化酵素、Rhoなどの低分子量Gタンパク質及び一酸化窒素産生も部分的に関与しているので、それらに作用している可能性もある (30-32)。従って、インドナガコショウの薬理作用を解明するためには、血小板凝集反応の抑制作用メカニズムをより詳細に検討するとともに、インドナガコショウ EtOH抽出物の中で血小板凝集抑制作用を示す活性成分を同定し、単一化合物を用いた検討が必要になると思われた。

そこで、インドナガコショウ EtOH 抽出物に含まれる活性成分を同定するため、インドナガコショウ EtOH 抽出物を ODS カラムによって分画し、分画したフラクションの活性を比較検討した (figure 5)。その結果、100% MeOH フラクションが最も強力な血小板凝集活性を示した。一方、アセトンフラクションにはほとんど活性がないことから、活性物質は脂溶性が高い化合物ではなく、ある程度親水性の性質を有している化合物であると思われた。ODS カラムを用いた分画物の検討から、抑制効果を示しかつ収量の多かった 100% MeOH フラクション及び 70% MeOH フラクションに着目して、HPLC を使用して成分の単離・精製を試みた。その結果、7 種の成分をインドナガコショウ EtOH 抽出物より単離することができたため、これまでにインドナガコショウ EtOH 抽出物に含有することが明らかになっていた 3 種の成分と同時に凝集反応に対する抑制作用を検討した (13)。

その結果、インドナガコショウ成分の多くはコラーゲン及びU46619 誘発性血小板凝集反応を抑制した。また、それら成分はどれも、コラーゲン誘発性血小板凝集反応をU46619 誘発性血小板凝集反応より低濃度で抑制した。U46619 誘発性血小板凝集反応の抑制作用は、(4Z)-デヒドロピペノナリン、デヒドロピペノナリン、ピペノナリン、ピペルンデカリジン及びピペロングミンで見られ、最も強い作用を示したのはピペロングミンであった (table 1)。ピペロングミンのU46619 誘発性血小板凝集反応の抑制作用は、インドナガコショウEtOH抽出

物と同様にTXA₂受容体遮断作用に起因することが明らかになっており (33)、今回抑制作用が見られた残りの4種の成分も構造がピペロングミンと似通っているため同様にTXA₂受容体遮断作用によってU46619 誘発性血小板凝集反応を抑制するものと推察される。しかしながら、それらの検討を行なっておらず、推測の域を出ない。一方、いずれのインドナガコショウ成分もコラーゲン誘発性血小板凝集反応をU46619 誘発性血小板凝集反応より低濃度で抑制したことから、インドナガコショウ成分はコラーゲン誘発性血小板凝集反応の経路に選択的に作用していることが示唆された。

10種のインドナガコショウ成分のコラーゲン誘発性血小板凝集抑制活性を検討したところ、9種の成分は200 μM以下の濃度で凝集反応を50%抑制した。それら成分の中で、どの成分がインドナガコショウ EtOH 抽出物の血小板凝集抑制作用の活性本体か同定するために、成分の含有量を測定した結果、いずれの成分もインドナガコショウ EtOH 抽出物中に含有される量は微量で、それぞれ単独ではインドナガコショウ EtOH 抽出物の凝集抑制作用を説明することは出来なかった。例えば、ピペロングミンの含有量は1.09%で、インドナガコショウ EtOH 抽出物100 μg/mlにはピペロングミンが3.44 μM含まれていたことになる。インドナガコショウ EtOH 抽出物100 μg/mlはコラーゲン誘発性血小板凝集反応を完全に抑制したが (figure 4)、ピペロングミン3.44 μMはまったく抑制しなかった (結果は次章の figure 12)。そこでいくつかの成分が複合的に作用しているのではないかと考え、インドナガコショウ EtOH 抽出物に含まれる10種の成分の含有量から、それらを再構成したときの血小板凝集反応抑制作用について検討を試みた。しかし、単離した10種の成分を再構成し、血小板凝集反応に対する作用を検討してもインドナガコショウ EtOH 抽出物と同様の作用は見られなかった (Iwashita *et al.*, unpublished observation)。従って、インドナガコショウ EtOH 抽出物には未知の成分が含まれており、それが強い血小板凝集抑

制を示す可能性が考えられる。また、分画及び単離精製の操作において化合物の消失や化合物の変性などが起こって活性が減少してしまっている可能性も否定できない。今後はそれらについても検討を重ねる必要があると思われる。

次にインドナガコショウ成分の構造とコラーゲン誘発性血小板凝集反応の抑制活性及びTXA₂受容体遮断活性の相関性を比較した。コラーゲン及びU46619誘発性血小板凝集反応を最も強く抑制した化合物はピペロングミンであり、ピペロングミンは3,4,5-トリメトキシフェニル基を有している。同様の構造を有している化合物にはTMPPAがある。しかし、TMPPAはコラーゲン及びU46619誘発性血小板凝集反応を抑制しなかった。従って、3,4,5-トリメトキシフェニル基はコラーゲン誘発性血小板凝集反応の抑制活性及びTXA₂受容体遮断活性の双方に関与していないと思われる。また、U46619誘発性血小板凝集を抑制する化合物は、(4Z)-デヒドロピペノナリン、デヒドロピペノナリン、ピペノナリン、ピペルンデカリジン及びピペロングミンであり、これらには共通してカルボキシル基とピペリジンのアミノ基が脱水縮合した構造が含まれている。従って、その構造がTXA₂受容体の遮断に重要であると考えられる。一方、コラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制した化合物は多かったが、構造と活性に目立った相関はなかった。唯一コラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制しなかったTMPPAは、主鎖に二重結合を有しておらず、カルボキシル基を有していることから、それらが活性に影響を与えていると思われる。今後は誘導体を作製するなどして、凝集抑制活性に重要な構造について詳細に検討していくことが必要であると思われる。

インドナガコショウ成分は強いコラーゲン誘発性血小板凝集抑制作用を示したので、その際の様子を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。また、ヒト洗浄血小板におけるコラーゲン誘発性の凝集反応に対する作用も検討した。それらの検討には、最も強力な凝集抑制作用を示したと共にインドナガコショウに特

異的に含まれる成分であるピペロングミンを用いた。コショウ類の中で血液循環改善作用を有するのはインドナガコショウのみで、ピペリンなどピペロングミン以外の成分は広くコショウ類に含有されているが、ピペロングミンはインドナガコショウにしか含有されていない。そこで、コラーゲン誘発性の血小板活性化に対するピペロングミンの作用を検討した結果、100 μ M ピペロングミンは、コラーゲン刺激によって惹起される凝集反応を抑制すると共に、形態変化も抑制することが明らかになった (figure 8)。しかしながら、ヒト洗浄血小板において 100 μ M ピペロングミンは、コラーゲン刺激によって惹起される凝集反応は抑制したが、形態変化は抑制しなかった (figure 9)。血小板膜上に存在するコラーゲン受容体にはいくつかあるが、その中の一つである糖タンパク質 VI (GPVI) のアミノ酸配列は、ヒト GPVI とカニクイザル GPVI との相同性が 90%であるのに対して、ヒト GPVI とマウス GPVI との相同性は 63%と低い (34)。ウサギにおいて GPVI はクローニングされていないが、種差によってコラーゲン受容体及びその下流の情報伝達経路に違いがあり、形態変化の抑制作用の差になって現れていると思われる。

本章では、インドナガコショウ EtOH 抽出物及びその成分が血小板凝集抑制作用を有することを見出した。これはインドナガコショウの持つ血液循環改善作用の一つのメカニズムであると考えられる。しかし、含有成分の血小板凝集抑制活性を検討したが、活性本体を同定するには至らなかった。単離されていない含有成分が存在する可能性がある。一方、多くのインドナガコショウ成分は、虚血性循環障害の原因となる血栓形成に重要なコラーゲン誘発性血小板凝集反応を強く抑制することが明らかになった。そこで第三章では、最もコラーゲン誘発性血小板凝集抑制活性が高かったピペロングミンを用いて、コラーゲン誘発性血小板凝集反応に対する抑制作用機構の解明を目的に検討を行った。

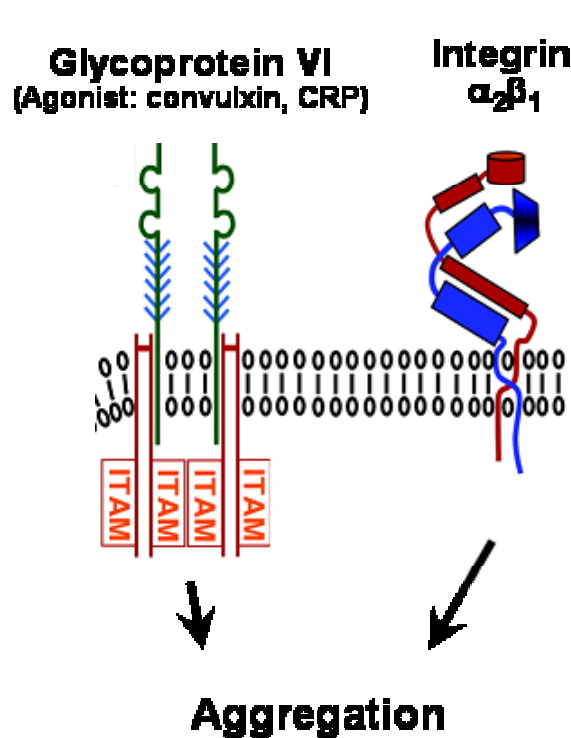
第三章 ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集抑制作用機構の解明

3 - 1 序論

虚血性循環障害の治療及び予防に用いられている薬物は、前述したような多くの問題を抱えている。特に出血傾向の副作用は、虚血性循環障害を治療及び予防していく上で大きな弊害になっている。その問題を解決するには、既存薬とは異なった新たな作用機序を有する薬物を開発することが必要だと思われる。虚血性循環障害の原因となる血管内での血栓形成は、血管内皮細胞の剥離によって露出したコラーゲンと血小板の相互作用、それに続く二次メディエーターの放出反応や血小板凝集反応、更には血液凝固系の亢進が起こり伸展していく。このような病態発生メカニズムを考えると、病態時の血栓形成を惹起するファーストステップはコラーゲンによる血小板の活性化であり、それを標的とした薬物は虚血性循環障害の有用な治療薬になりうると思われる。しかしながら、今日コラーゲンによる血小板活性化の抑制を標的とした薬物は開発されていない。既存薬の標的の分子機構は古くから明らかにされていたのに対して、コラーゲンの血小板活性化における分子機構は最近まで明らかになっていなかったことが一つの要因だと思われる。

コラーゲンは、動物の細胞外マトリックス（結合組織）を構成する成分の一つで、骨、軟骨、靭帯、腱、皮膚及び血管などの組織に豊富に存在するタンパク質である。生体内においては最も多いタンパク質であり、総タンパク質中の約 30%を占める（35）。細胞接着において中心的な役割を担っているコラーゲンは臓器形成などの恒常性維持に寄与しており、その産生は多細胞生物への進

化の過程において重要で、今日に見られる多細胞生物（動物・原生生物・真菌類）は全てこのコラーゲンの生産に成功した種の子孫であると考えられている。コラーゲンの α 鎖は Gly-X-Y（X と Y は任意のアミノ酸）の繰り返し配列を持つ約 1,000 個のアミノ酸から構成されており、分子量 10 万程度のタンパク質である。コラーゲン α 鎖は左巻きのらせん構造を有しており、3 本の α 鎖が互いに巻きあって 1 本鎖のらせん構造（トリプルヘリックス）を構成してコラーゲン分子になっている。コラーゲン分子の長さは 300 nm にもおよび、その種類は現在 27 種類報告されている（36）。それぞれ I - XXVII 型コラーゲンと呼ばれており、分子種によって発現する部位や産生される細胞が異なっている。通常、コラーゲン分子は多量体で存在して繊維状又は網目状の構造を形成しているが、一般的にコラーゲンと言われているのは I 型、III 型及び V 型コラーゲンが集まって形成される繊維状コラーゲンで、血管にもこれが多く分布している。血小板凝集作用が強いのもこれらの分子であり（37）、広く血小板凝集能測定用試薬



として用いられている「Horm」は、I 型及び III 型コラーゲンを中心とした繊維状コラーゲンである。

コラーゲンは血小板膜に存在する 2 種類のコラーゲン受容体、GPVI 及びインテグリン $\alpha_2\beta_1$ ($\alpha_2\beta_1$) に作用して血小板凝集反応を引き起こす (figure 10) (37)。GPVI は血小板内へ情報を伝達し血小板の活性化を惹起することに重要な役割を果たしており、 $\alpha_2\beta_1$ は流動下において

Figure 10 Collagen receptor.

血小板とコラーゲンの物理的な接着に重要な役割を果たしていると考えられている (38,39)。どちらもコラーゲン誘発性血小板凝集反応に関与しているが、GPVIは必須の関与を、 $\alpha_2\beta_1$ は部分的な関与をしていると言われている (40)。血小板活性化において中心的な役割を担っているGPVIはイムノグロブリンスーパーファミリーに属し (37,39)、Fc受容体 (FcR) γ -鎖と会合して細胞膜に存在している (41)。GPVIの細胞内領域にはSrcファミリーチロシンキナーゼのSH3ドメインが結合するプロリンリッチドメインが存在し (42,43)、一方のFcR γ -鎖には免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) が存在しており、Lyn/FynなどのSrcファミリーチロシンキナーゼがリクルートされるとITAMはリン酸化される (44-46)。リン酸化されたITAMにはSykが結合し、活性化されたSykによってlinker for activation of T cells (LAT) 及びSH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kD (SLP-76) などの分子がリン酸化を受け、最終的にホスホリパーゼC (PLC) γ_2 へと情報が伝達される (46,47)。活性化されたPLC γ_2 は、イノシトールリン脂質水解反応によってイノシトール 1,4,5-トリスホスフェート (IP₃) 及びジアシルグリセロール (DAG) といったセカンドメッセンジャーを介して、細胞内Ca²⁺濃度の上昇やプロテインキナーゼC (PKC) の活性化を惹起する (48,49)。これらが細胞質型ホスホリパーゼA₂ (cPLA₂) の活性を上げ、血小板膜からのアラキドン酸遊離を促す。アラキドン酸はCOX-1 及びトロンボキサン合成酵素 (TXS) によって代謝されることでTXA₂に転化し、強力な血小板凝集惹起物質として作用する (20)。しかし、TXA₂は化学的に不安定で、その半減期は約 30 秒と非常に短く、非酵素的に安定代謝物であるTXB₂へ変換される。また、PKCシグナルはADP及びセロトニンなどの血小板凝集惹起物質を貯蔵している濃染顆粒の放出反応を惹起する (50)。

このように血小板活性化によって放出されたTXA₂、ADP及びセロトニンはGPCRである各々の受容体を介して強固な血小板凝集反応を惹起するため、今

日臨床応用されている抗血小板薬はそのような二次メディエーターの産生又は受容体シグナルを阻害している。具体的には、TXA₂産生を阻害するアスピリンなどのCOX阻害薬、オザグレルなどのTXS阻害薬、トロンビン作用を阻害するヘパリンなどの抗トロンビン薬、ADPシグナルを阻害するクロピドグレルなどのP2Y₁₂受容体遮断薬、セロトニンシグナルを阻害するサルポグレラートなどのセロトニン受容体遮断薬、GPCRのG_iシグナルを抑制するシロスタゾールなどのホスホジエステラーゼ阻害薬である (figure 11) (17,51)。

第二章でインドナガコショウ成分は、虚血性循環障害の治療及び予防薬の新たな標的として注目されているコラーゲン誘発性血小板凝集反応を強く抑制することが示唆された。従って、第三章では、インドナガコショウより単離された成分の中で最も強いコラーゲン誘発性血小板凝集反応抑制作用を示したピペロングミンを用いて、既存薬との比較を行いながら、その作用メカニズムの解明を目的に検討を行った。

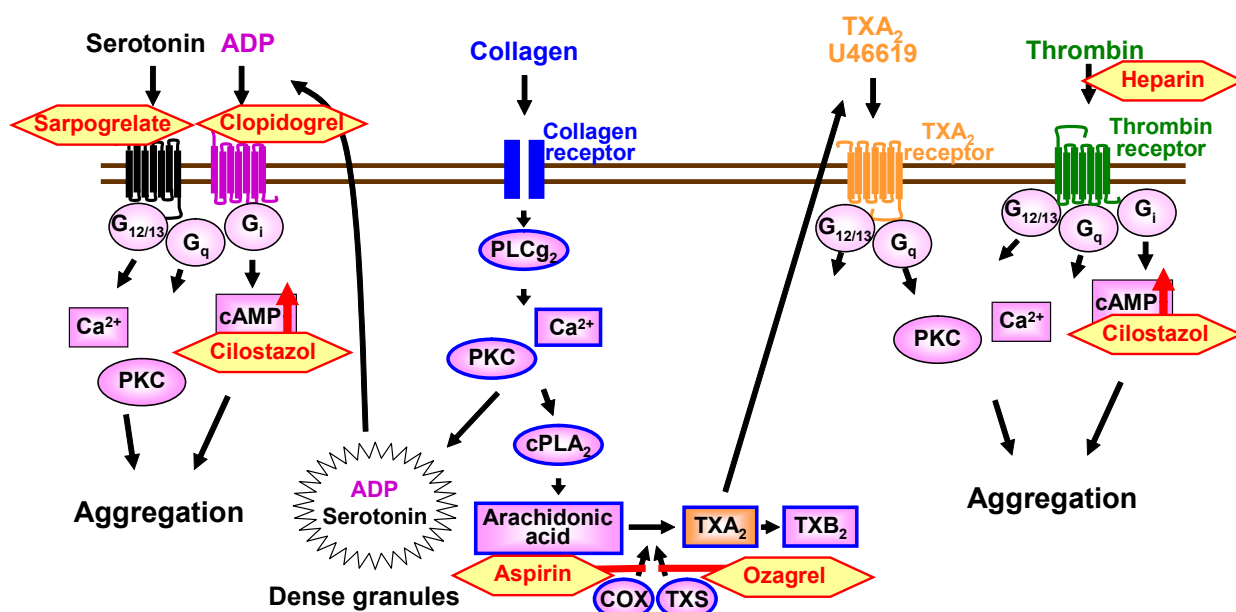


Figure 11 Mechanisms of platelet aggregation and antiplatelet drugs.

3 - 2 実験方法

3 - 2 - 1 TXB₂産生量の測定

血小板のTXB₂産生量の測定は血小板凝集反応の測定と同様、1,000 rpmで攪拌しながら37°Cに加温した条件で行った。血小板を刺激した5分後に50 μM インドメタシン/50 mM EDTAを300 μl加え反応を停止させた。この試料を1,700 × gで10分間遠心分離し、上清のTXB₂量をラジオイムノアッセイによって測定した。すなわち、100 μlの試料あるいは10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.6) で希釈したTXB₂標準液 (6.25 - 1,600 pg/100 μl) に、³H]TXB₂溶液 (10 nCi/100 μl) と抗TXB₂抗体 (20,000 倍希釈) をそれぞれ100 μlずつ添加し、4°Cで一昼夜反応させた。³H]TXB₂及び抗TXB₂抗体は0.5% BSA含有100 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.6) で希釈して用いた。抗体結合及び非結合の³H]TXB₂に、氷冷した500 μlのデキストラン-活性炭溶液を添加した後、1,700 × gで5分間遠心分離した。得られた上清500 μlを4 mlのシンチレーションカクテルと混和して、³H]の放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

3 - 2 - 2 COX-1 活性の測定

COX-1 活性はCOX Screening Assay Kit (Cayman Chemical Company) を用いて、アラキドン酸から代謝されたプロスタグランジン (PG) 類をPGF_{2α}に転化させ、エンザイムイムノアッセイによって測定した。COX-1 (1 unit)、ヘム (2 μM) 及び薬物を990 μlのバッファー (0.1 M Tris-HCl、5 mM EDTA及び2 mM フェノール、pH 8.0) にて混和し、37°Cで10分間プレインキュベーションした。そこ

に最終濃度 100 μM のアラキドン酸 10 μl を添加して 2 分間反応させ、1 NのHCl 50 μl を用いて反応を停止させた。更に、50 mg/ml SnCl_2 を 100 μl 添加し、代謝されたPG類を還元して $\text{PGF}_{2\alpha}$ に転化させた。この試料を抗マウスIgG抗体がコートされた 96 ウェルプレートに添加し、マウス由来抗PG抗体及びアセチルコリンエステラーゼを付加したPGを添加して一晩インキュベートした。プレートを 5 回洗浄し、エルマン試薬を添加して 1 時間インキュベート後、405 nmの吸光度を測定した。

3 - 2 - 3 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸標識血小板からのアラキドン酸遊離反応の測定

2 - 2 - 4 のように調製した洗浄血小板に 0.8 $\mu\text{Ci/ml}$ の $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸を添加して、37°Cで 60 分間インキュベートした後、血小板をTyrode-HEPES液 (pH 6.35) で二回洗浄し、最終的にTyrode-HEPES液 (pH 7.35) に浮遊させた。 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸で標識した血小板からのアラキドン酸遊離量の測定は、凝集反応の測定と同じ条件下で行った。 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸標識血小板浮遊液 (350 μl) をアグリゴメーターの中で刺激した 5 分後、50 μM インドメタシン/50 mM EDTAを 350 μl 加え反応を停止させた。この試料を 1,700 \times gで 10 分間遠心分離し、上清 500 μl をシンチレーションカクテル 4 mlと混和して $[^{14}\text{C}]$ の放射活性を測定した。

3 - 2 - 4 ウェスタンブローディング

血小板凝集測定と同様に、アグリゴメーターで凝集反応をモニターしながらピペロングミン存在下、血小板を刺激した。5分後、5×SDS-PAGE サンプルバッファー（最終濃度：75 mM Tris-HCl、pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、3% 2-メルカプトエタノール、0.003% ブロモフェノールブルー）75 µl を加えて混合し反応を停止させ、95°Cで5分間熱処理した。サンプルは10%又は12% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、分離したタンパク質をゲルから polyvinylidene difluoride 膜 (GE Healthcare) へ転写した。転写終了後、TBST (Tris-buffered saline containing Tween 20 : 10 mM Tris、100 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4) に5% BSA を加えた blocking buffer により室温で、2時間処理した。1次抗体は下記に示したように TBST で希釈して用い、4°Cで一晩作用させた。さらに、対応する2次抗体を用いて室温で2時間作用させた後、化学発光検出キット (ECL ; GE Healthcare) を用いて検出した。

*抗体

1次抗体 (希釈倍率)	2次抗体 (希釈倍率)
抗リン酸化cPLA ₂ 抗体 (1,000倍)	HRP標識抗ウサギIgG抗体 (5,000倍)
抗cPLA ₂ 抗体 (1,000倍)	HRP標識抗ウサギIgG抗体 (5,000倍)
抗リン酸化 Syk 抗体 (1,000倍)	HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (5,000倍)
抗β-actin 抗体 (5,000倍)	HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (5,000倍)

3 - 2 - 5 イノシトールリン脂質水解反応の測定

2 - 2 - 4 と同様に血小板を洗浄した後、BSAを除いたTyrode-HEPES液 (pH 7.35) に懸濁させた。[³H]イノシトールを 25 $\mu\text{Ci/ml}$ になるように加え、血小板膜イノシトールリン脂質を 37°C で 1 時間標識した。その後Tyrode-HEPES液 (pH 6.35) で 2 回洗浄し、最終的に $5 - 6 \times 10^8/\text{ml}$ となるようにTyrode-HEPES液 (pH 7.35) に懸濁させ実験に用いた。

標識した血小板浮遊液 150 μl を 37°C で 15 分間プレインキュベート後、最終濃度の 2 倍濃度になるように調製したピペロングミン 200 μl を加え、更に 15 分間インキュベーションした。ピペロングミンの希釈は 2 mM CaCl_2 、20 mM LiCl 及び 2% DMSOを含むTyrode-HEPES液 (pH 7.35) により行った。 Li^+ は、イノシトール-1-ホスフェートからイノシトールへ変換するイノシトールホスフェートモノホスファターゼの活性を阻害し、生成したイノシトールホスフェートを蓄積することが知られている。次に、8 倍濃度に調製した薬物 50 μl を加え 15 分間インキュベーションした。反応は氷冷した 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を 400 μl 加えて停止させ、氷冷放置した。その後、サンプルを $1,100 \times g$ 、4°C で 5 分間遠心分離し、タンパク質を除いた。上清を回収してジエチルエーテルで 3 回洗浄し、TCAを除いた後、47°C に加温して残存するジエチルエーテルを除去した。

総イノシトールホスフェートの分離はNakahataら (52) の方法に従い、陰イオン交換樹脂 0.6 ml (DowexAG1X-8、100-200mesh、formate form; Bio-Rad) を詰めたエコノカラムを用いて分離した。水 8 mlを流してカラムの空気抜きを行った後、1 M ギ酸を 8 ml流してカラムを活性化した。その後、水 8 mlで 2 回洗浄してカラムの調製を行った。サンプルを添加した後、カラムを水 6 mlで洗浄して非吸着成分を溶出し、更に 50 mM ギ酸アンモニウム 6 mlでグリセロホス

ホイノシトールを溶出させた。続いて 1 M ギ酸/0.1 M ギ酸アンモニウム 4 ml によって総イノシトールホスフェートを分取した。これをシンチレーションカクテルと混合し、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ の放射活性を測定した。

3 - 2 - 6 薬物及び試薬

実験は下記の薬物及び試薬を用いて行った。

コラーゲン (Collagenreagent Horm) は Nycomed Pharma GMBH より、U46619 及び SQ29548 は Cayman Chemical Company より、トロンビンは和光純薬工業より、ADP は Sigma Aldrich より、コンブルキシンは Alexis Biochemicals より、collagen-related peptide (CRP) はスクラムより、また、PP2 は Calbiochem より購入した。

$[^3\text{H}]$ TXB₂、 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸及び $[^3\text{H}]$ イノシトールはPerkin Elmer Life Science より購入した。

COX Screening Assay Kit は Cayman Chemical Company より購入した。

抗TXB₂抗体はAssay Designsより、抗リン酸化cPLA₂抗体、抗リン酸化Syk抗体、HRP標識抗ウサギIgG抗体はCell Signaling Technologyより、抗cPLA₂抗体はSanta Cruz Biotechnologyより、抗β-actin抗体はSigma Aldrichより、HRP標識抗マウスIgG抗体はGE Healthcareより購入した。

その他の試薬については、市販の特級試薬あるいはこれに相当するものを用いた。

3 - 2 - 7 データ解析

実験結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差の検定は、Dunnett's test 及び Tukey's Kramer test を用いた。

3 - 3 実験結果

3 - 3 - 1 血小板凝集に対するピペロングミンの濃度依存性

ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集反応抑制作用メカニズムを解明するにあたり、コラーゲン、U46619 及びトロンビン誘発性血小板凝集反応に対するピペロングミンの濃度依存性を詳細に検討した。その結果、ピペロングミンはコラーゲン (3 $\mu\text{g/ml}$) 及びU46619 (3 μM) 誘発性血小板凝集を濃度依存的に抑制したが、トロンビン (0.05 U/ml) 誘発性血小板凝集においては高濃度でわずかにしか抑制しなかった (figure 12)。ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集反応における抑制作用の IC_{50} 値は 14 μM 、U46619 誘発性血小板凝集反応における抑制作用の IC_{50} 値は 50 μM であった。

以前の研究においてピペロングミンは TXA_2 受容体遮断作用を有することが明らかになっている (33)。今回見られたピペロングミンのU46619 及びトロンビン誘発性血小板凝集反応の抑制作用はその TXA_2 受容体遮断作用に起因していると考えられる。一方、ピペロングミンはコラーゲン誘発性血小板凝集を低濃度で (U46619 と IC_{50} 値比較すると約 3.5 倍)、完全に抑制した。

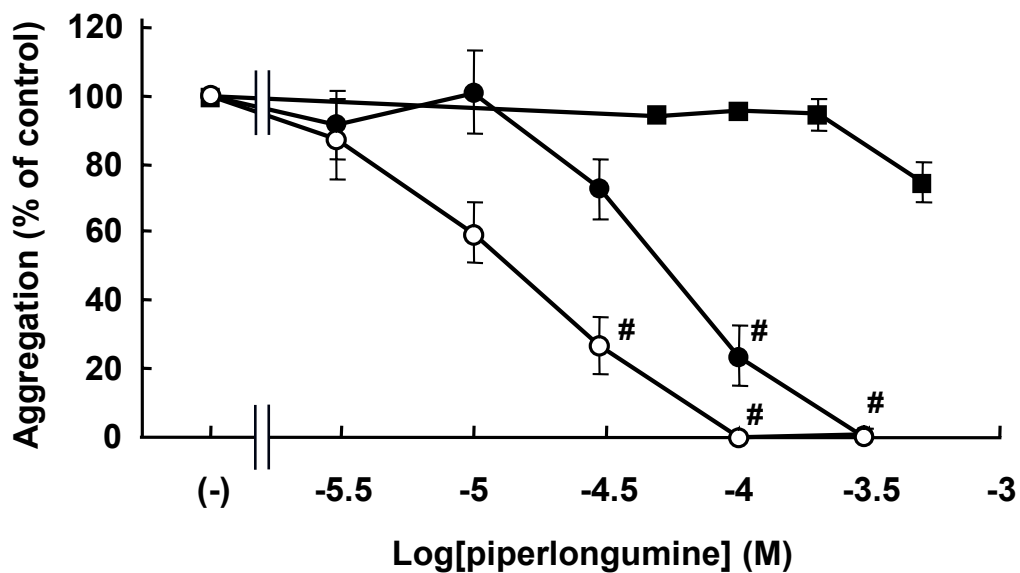


Figure 12 Concentration-dependent inhibition of collagen-, U46619- or thrombin-induced platelet aggregation by piperlongumine. Piperlongumine (3 - 500 μ M) or DMSO (-) was preincubated for 5 min before the addition of collagen (3 μ g/ml; \circ), U46619 (3 μ M; \bullet) or thrombin (0.05 U/ml; \blacksquare) in the presence of 1 mM CaCl_2 . The aggregation in the presence of piperlongumine was expressed as a percentage of that in the absence of piperlongumine. Results were means \pm S.E.M. for four independent experiments ($^{\#}P < 0.05$ compared with (-), Dunnett's test).

3 - 3 - 2 各種血小板凝集惹起物質に対するピペロングミンと SQ29548 の作用

コラーゲン誘発性血小板凝集反応は主にTXA₂産生を介して引き起こされる。従って、TXA₂受容体遮断薬は、結果としてコラーゲン凝集を抑制する。ピペロングミンはTXA₂受容体遮断作用を有するため、ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集反応抑制作用がTXA₂受容体遮断作用に起因しているか否かについて検討した。また、ADP受容体であるP2Y₁₂遮断薬クロピドグレルは今日臨床において使用頻度が高い薬物であり、その作用点との比較も行った。

その結果、コラーゲン (3 µg/ml)、U46619 (3 µM)、トロンビン (0.05 U/ml) 及び ADP (100 µM) の刺激によって、figure 13 上段のチャートのように同程度に凝集反応が惹起されたが、ピペロングミン (100 µM) はコラーゲン誘発性血小板凝集反応を選択的に抑制した。また、ピペロングミン (100 µM) はトロンビン及び ADP 誘発性血小板凝集反応を抑制せず、それらを抑制する既存薬とは異なる作用であることが示唆された。

一方、ピペロングミンはTXA₂受容体遮断作用によってU46619 誘発性血小板凝集反応を部分的に抑制した。しかし、TXA₂受容体アンタゴニストのSQ29548 10 µMは完全にTXA₂受容体シグナルを抑制しU46619 誘発性血小板凝集反応を抑制したのに対して、コラーゲン誘発性血小板凝集反応を完全に抑制するには至らなかった。従って、ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集反応抑制作用はTXA₂受容体遮断作用とも異なっていることが示唆された。

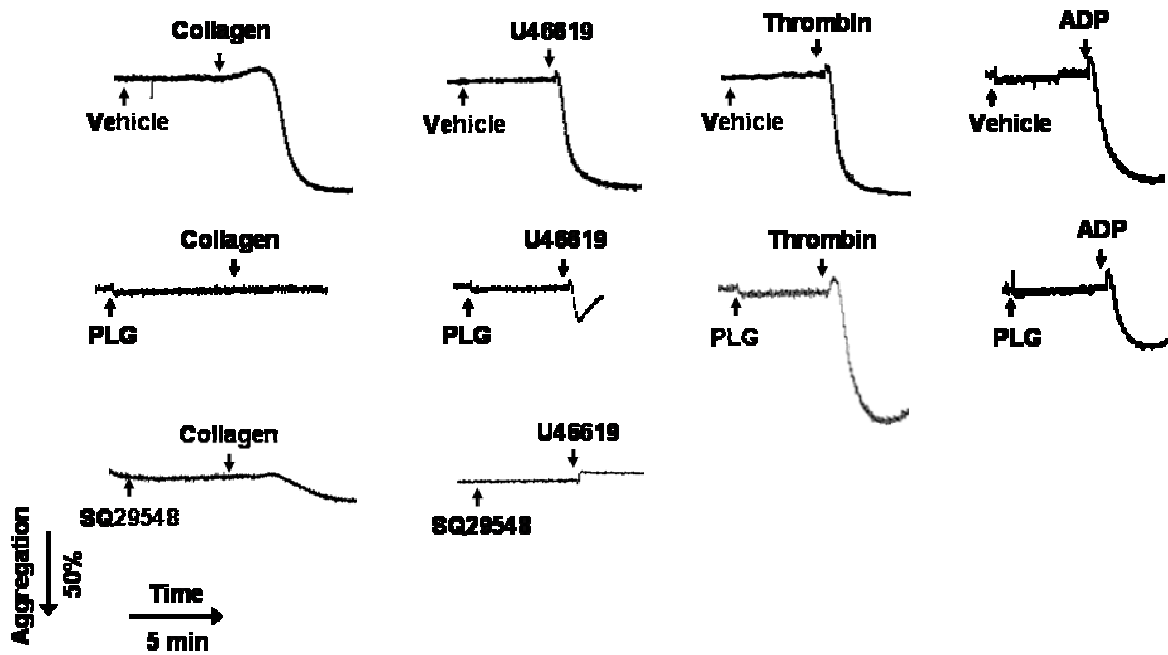


Figure 13 Representative traces of collagen-, U46619-, thrombin- or ADP-induced platelet aggregation with or without piperlongumine. PLG (100 μ M piperlongumine), SQ29548 (3 μ M) or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) was preincubated for 5 min before the addition of collagen (3 μ g/ml), U46619 (3 μ M), thrombin (0.05 U/ml) or ADP (100 μ M) in the presence of 1 mM CaCl_2 , as shown by arrows.

3 - 3 - 3 コラーゲン誘発性TXB₂産生に対するピペロングミンの作用

ピペロングミンはTXA₂受容体遮断薬とは異なりコラーゲン誘発性血小板凝集反応を完全に抑制したこと、及びU46619誘発性血小板凝集反応よりも低濃度でコラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制したことから、TXA₂受容体を介する経路よりも上流に選択的に作用していることが示唆された。コラーゲンは血小板膜上の受容体に結合後、情報伝達を介して主にTXA₂を産生し、凝集反応を引き起こす。そこで次に、TXA₂の安定代謝物であるTXB₂産生に対するピペロングミンの作用を検討した。その結果、コラーゲン (3 µg/ml) 刺激によって誘発されたTXB₂産生をピペロングミンは濃度依存的に抑制した (figure 14)。一方、ピペロングミン単独ではTXB₂産生に影響を与えなかった。TXB₂産生の抑制作用におけるピペロングミンのIC₅₀値は17 µMであった。

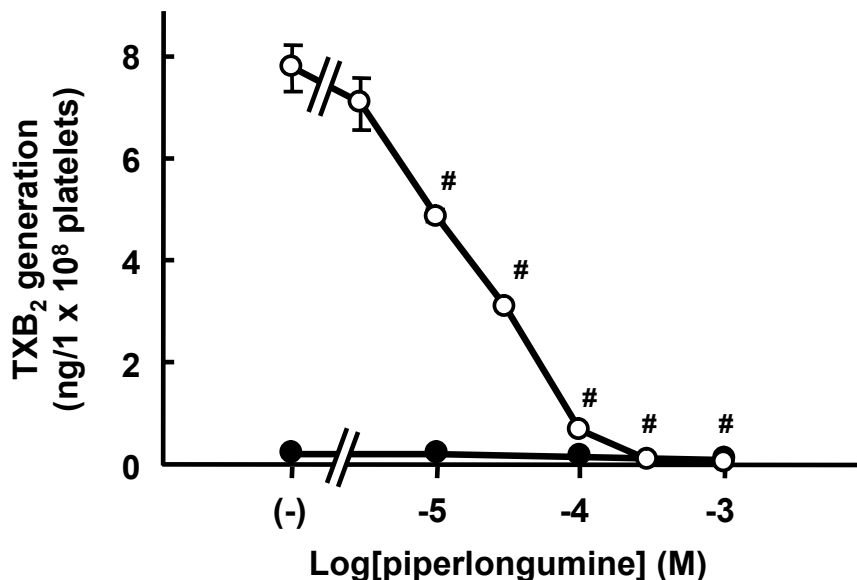


Figure 14 Effect of piperlongumine on collagen-induced TXB₂ generation. Platelets were pretreated with piperlongumine (3 - 1,000 µM) or DMSO (-) for 5 min, and then incubated with 3 µg/ml collagen (○) or control Tyrode-HEPES solution (●) for 5 min in the presence of 1 mM CaCl₂. The reaction was terminated by the addition of 25 µM indomethacin and 25 mM EDTA. Results are means ± S.E.M. of three independent experiments ([#]*P* < 0.05 compared with (-), Tukey's Kramer test).

3 - 3 - 4 COX-1 活性に対するピペロングミンの作用

TXA₂産生は基質となるアラキドン酸がCOX及びTXSによって代謝されることで起こる。COXを阻害する薬物は抗血小板薬の中で臨床において最も汎用されている。ピペロングミンはコラーゲン誘発性TXB₂産生を抑制したので、コラーゲン誘発性のTXA₂産生において中心的な役割を担っているCOX-1 活性に対するピペロングミンの作用を検討した。

その結果、COX-1 の機能を COX 阻害薬であるアスピリン (100 μM) は抑制したが、ピペロングミン (100 μM) は抑制しなかった (figure 15)。従って、ピペロングミンは COX-1 阻害作用を有していないことが明らかになった。

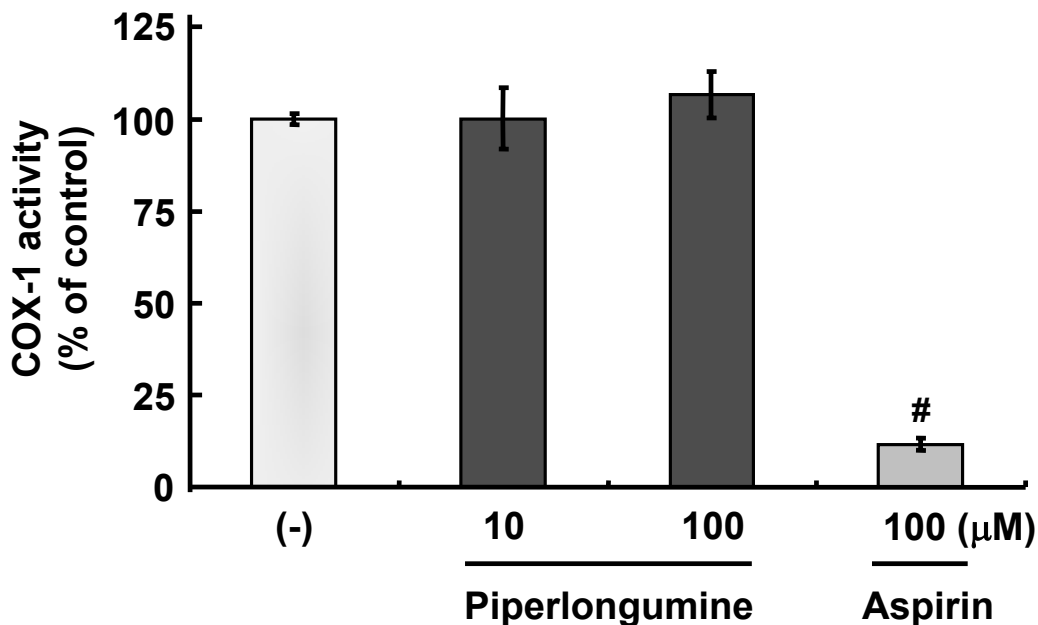


Figure 15 Effect of piperlongumine on COX-1 activity. COX-1 was preincubated with piperlongumine (10 or 100 μM), aspirin (100 μM) or DMSO (-) for 10 min, and then incubated with arachidonic acid (100 μM) for 2 min. The reaction was terminated by the addition of 1 N HCl. Results are means ± S.E.M. of three independent experiments ([#]*P* < 0.05 compared with (-), Tukey's Kramer test).

3 - 3 - 5 コラーゲン誘発性 ^{14}C アラキドン酸遊離に対するピペロングミンの作用

コラーゲン誘発性の TXA_2 産生は、基質となるアラキドン酸が血小板膜リン脂質から切り出され、それが代謝されることによって起こる。そこで、アラキドン酸遊離反応に対するピペロングミンの作用を ^{14}C アラキドン酸標識した血小板を用いて検討した。また、これ以降での検討では血小板活性化によって産生される TXA_2 の影響を除くため、インドメタシン存在下で行った。その結果、コラーゲン (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激によって誘導された ^{14}C アラキドン酸遊離反応をピペロングミンは濃度依存的に抑制した (figure 16)。また、ピペロングミン単独では ^{14}C アラキドン酸遊離反応に影響を与えなかった。ピペロングミンの ^{14}C アラキドン酸遊離反応に対する抑制作用の IC_{50} 値は 17 μM であった。

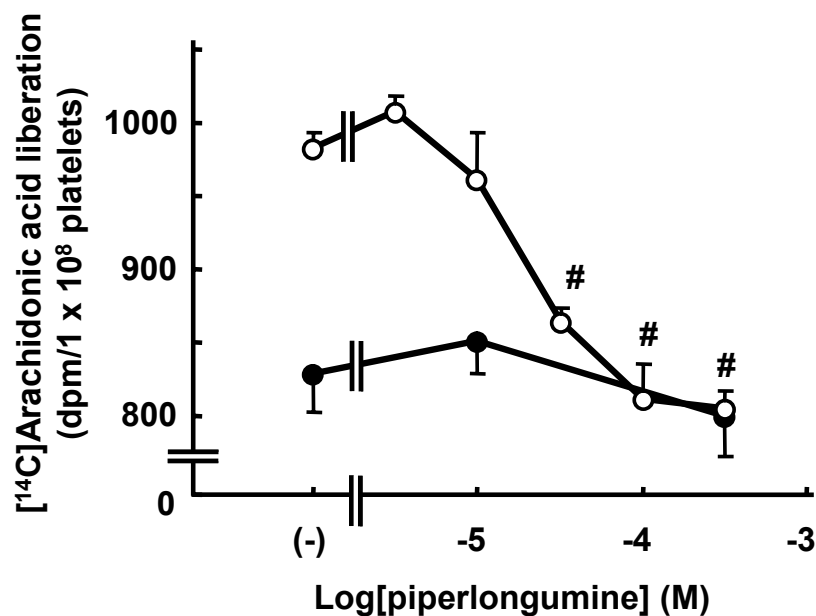


Figure 16 Effect of piperlongumine on collagen-induced ^{14}C arachidonic acid liberation. Platelets were pretreated with piperlongumine (3 - 300 μM) or DMSO (-) for 5 min, and then incubated with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagen (○) or control Tyrode-HEPES solution (●) for 5 min in the presence of 1 mM CaCl_2 . The reaction was terminated by the addition of 25 μM indomethacin and 25 mM EDTA. Results are means \pm S.E.M. of three independent experiments ($^{\#}P < 0.05$ compared with control, Tukey's Kramer test).

3 - 3 - 6 コラーゲン誘発性cPLA₂リン酸化に対するピペロングミンの作用

コラーゲン誘発性のアラキドン酸遊離反応はリン脂質加水分解酵素であるcPLA₂によって惹起される。cPLA₂は細胞内Ca²⁺濃度上昇及びmitogen-activated protein kinase (MAPK) を介するリン酸化によって活性制御されるため、cPLA₂リン酸化に対するピペロングミンの作用をウェスタンブロッティングによって検討した。また、検討はインドメタシン存在下で行った。その結果、ピペロングミンはコラーゲン (3 µg/ml) 誘発性のcPLA₂リン酸化を濃度依存的に抑制した (figure 17)。一方、ピペロングミン単独ではcPLA₂リン酸化に影響を与えなかった。

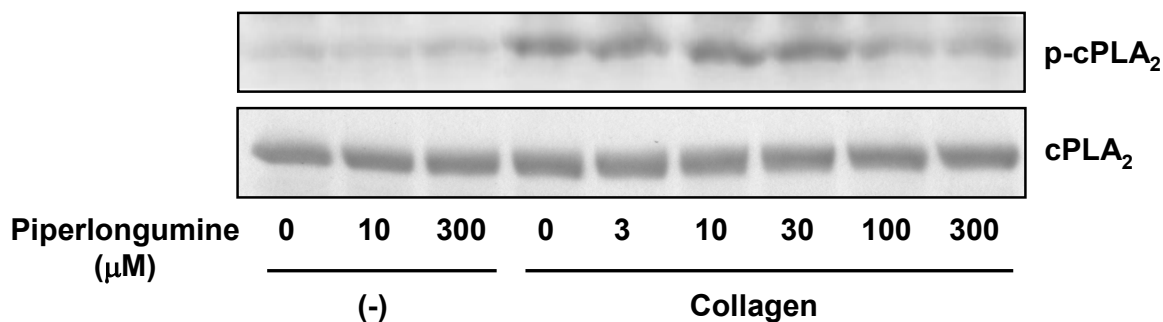


Figure 17 Effect of piperlongumine on collagen-induced cPLA₂ phosphorylation. Platelets were pretreated with piperlongumine (3 - 300 µM) or DMSO for 5 min, and then incubated with collagen (3 µg/ml) or control Tyrode-HEPES solution (-) for 5 min in the presence of 1 mM CaCl₂. The lysates were fractionated on a 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-phospho-cPLA₂ antibody or anti-cPLA₂ antibody as described in "Materials and Methods." The results are representative in three similar experiments.

3 - 3 - 7 コラーゲン誘発性イノシトールリン脂質水解反応に対するピペロングミンの作用

コラーゲンは受容体に結合後、PLC γ_2 活性化によるイノシトールリン脂質水解反応からのセカンドメッセンジャー産生を介してCa $^{2+}$ 濃度及びPKC活性を制御することで、アラキドン酸遊離反応及びADPやセロトニン放出など下流へ情報伝達を行う。そこで、コラーゲン誘発性イノシトールリン脂質水解反応に対するピペロングミンの作用を、 $[^3\text{H}]$ イノシトール標識した血小板を用いて検討した。また、検討はインドメタシン存在下で行った。その結果、ピペロングミンはコラーゲン (3 $\mu\text{g/ml}$) 誘発性のイノシトールリン脂質水解反応を濃度依存的に抑制した (figure 18)。一方、ピペロングミン単独ではイノシトールリン脂質水解反応に影響を与えなかった。

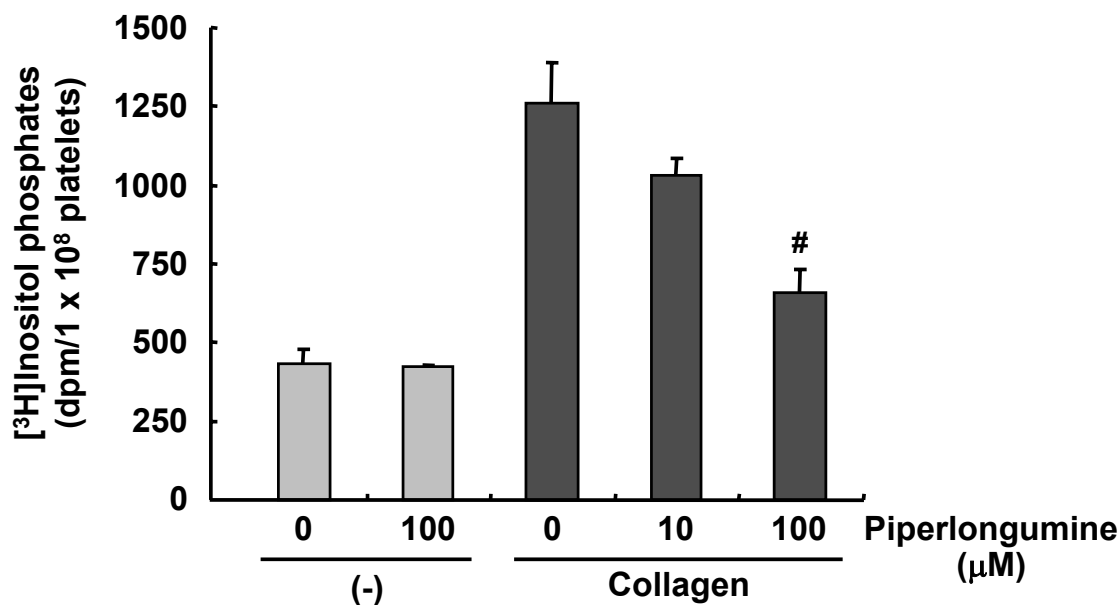


Figure 18 Effect of piperlongumine on collagen-induced phosphoinositide hydrolysis. Platelets were preincubated with piperlongumine (10 or 100 μM) or DMSO for 5 min, and then incubated with collagen (3 $\mu\text{g/ml}$) or control Tyrode-HEPES solution (-) for 15 min. The reaction was carried out in Tyrode-HEPES solution containing 10 mM LiCl, and was terminated by the addition of TCA (final concentration of 5%). Results are means \pm S.E.M. of three independent experiments ($\#P < 0.05$ compared with control, Tukey's Kramer test).

3 - 3 - 8 GPVI 選択的刺激薬誘発性血小板凝集反応に対するピペロングミンの作用

コラーゲン誘発性血小板凝集反応に関与するコラーゲン受容体には、GPVI 及び $\alpha_2\beta_1$ がある。それらのコラーゲン誘発性血小板凝集反応における役割は、 $\alpha_2\beta_1$ が部分的であるのに対して、GPVIは必須の関与であると報告されている。ピペロングミンはコラーゲン誘発性血小板凝集を完全に抑制したことから、GPVIを介した血小板凝集反応に対するピペロングミンの作用を検討した。

GPVI 選択的刺激薬コンブルキシシ (20 ng/ml) 及び CRP (0.5 μ g/ml) 誘発性血小板凝集反応に対するピペロングミンの作用を検討した結果、いずれの凝集反応もピペロングミンは濃度依存的に抑制した (figure 19)。従って、ピペロングミンは GPVI シグナルを抑制することで、コラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制することが示唆された。

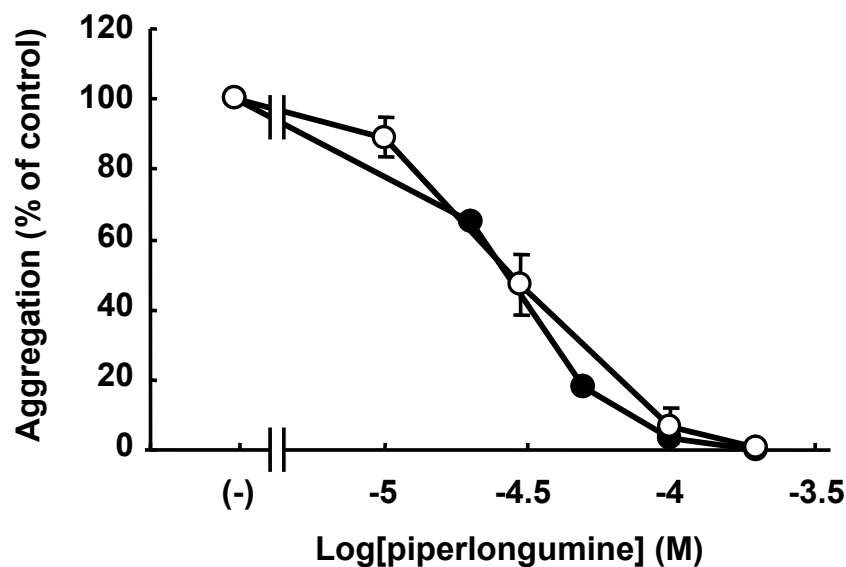


Figure 19 Concentration-dependent inhibition of convulxin- or CRP-induced platelet aggregation by piperlongumine. Piperlongumine (10 - 200 μ M) or DMSO (-) was preincubated for 5 min before the addition of convulxin (20 ng/ml; ○) or CRP (0.5 μ g/ml; ●) in the presence of 1 mM CaCl_2 . The aggregation in the presence of piperlongumine was expressed as a percentage of that in the absence of the compound. Results were means \pm S.E.M. for four independent experiments.

3 - 3 - 9 コンブルキシシ誘発性イノシトールリン脂質水解反応 に対するピペロングミンの作用

GPVIを介した血小板凝集反応には、PLC γ_2 が必要不可欠であると報告されている。そこでピペロングミンのGPVIシグナル抑制作用機序を解明するため、コンブルキシシ誘発性イノシトールリン脂質水解反応に対するピペロングミンの作用を ^3H イノシトール標識した血小板を用いて検討した。また、検討はインドメタシン存在下で行った。その結果、ピペロングミンはコンブルキシシ (20 ng/ml) 誘発性のイノシトールリン脂質水解反応を有意に抑制した (figure 20)。

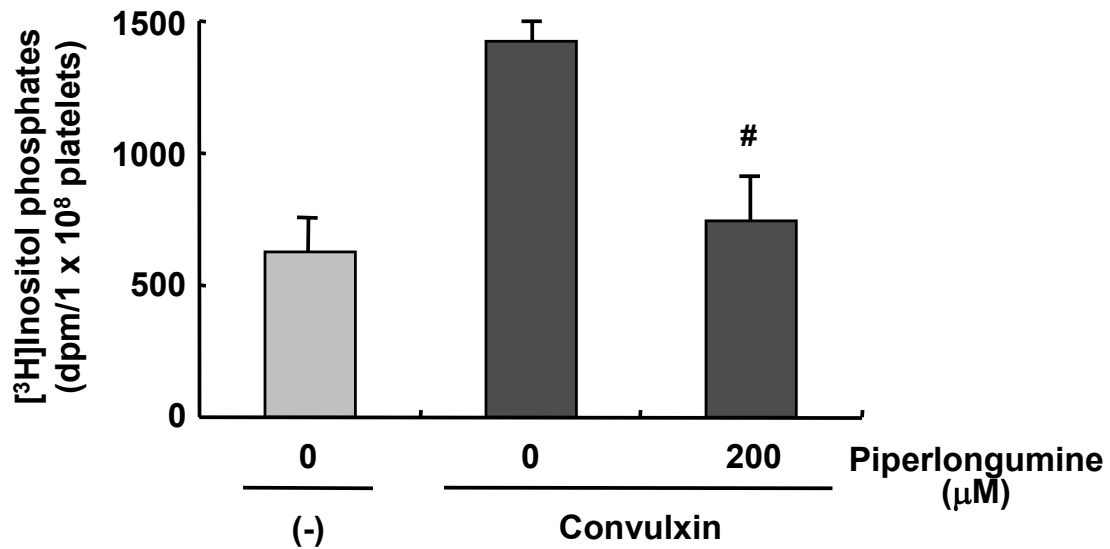


Figure 20 Effect of piperlongumine on convulxin-induced phosphoinositide hydrolysis. Platelets were preincubated with piperlongumine (200 μM) or DMSO for 5 min, and then incubated with convulxin (20 ng/ml) or control Tyrode-HEPES solution (-) for 15 min. The reaction was carried out in Tyrode-HEPES solution containing 10 mM LiCl, and was terminated by the addition of TCA (final concentration of 5%). Results are means \pm S.E.M. of three independent experiments ([#] $P < 0.05$ compared with control, Tukey's Kramer test).

3 - 3 - 10 コンブルキシシ誘発性 Syk リン酸化に対するピペロ ングミンの作用

GPVIからPLC γ_2 への情報伝達においてはSykが重要な役割を担っている。そこで、ピペロングミンのコンブルキシシ誘発性Sykリン酸化に対する作用をウェスタンブロッティングによって検討した。また、検討はインドメタシン存在下で行った。その結果、ピペロングミンはコンブルキシシ (20 ng/ml) 誘発性のSykリン酸化を濃度依存的に抑制した (figure 21)。一方、ピペロングミン単独ではSykリン酸化に影響を与えなかった。

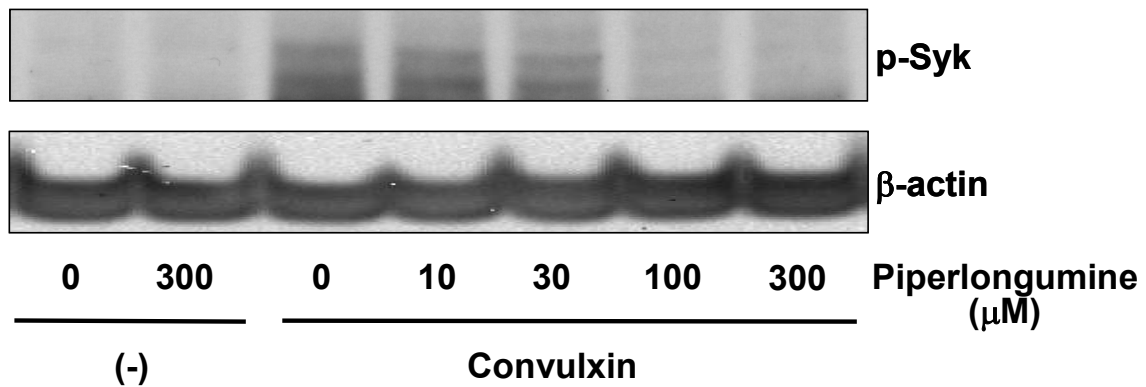


Figure 21 Effect of piperlongumine on convulxin-induced Syk phosphorylation. Platelets were pretreated with piperlongumine (10 - 300 μM) or DMSO for 5 min, and then incubated with convulxin (20 ng/ml) or control Tyrode-HEPES solution (-) for 3 min in the presence of 1 mM CaCl_2 . The lysates were fractionated on a 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-phospho-Syk antibody or anti- β -actin antibody as described in "Materials and Methods." The results are representative in three similar experiments.

3 - 3 - 1 1 コラーゲン誘発性血小板凝集反応に対するピペロングミンと Src 阻害薬 PP2 の作用の比較

コラーゲン誘発性血小板凝集反応には、様々なリン酸化酵素が重要な役割を果たしている。特に、Src ファミリーチロシンキナーゼは Syk のリン酸化において中心を担っている。そこで、コラーゲン及びトロンビン誘発性血小板凝集反応に対するピペロングミンの作用を Src 阻害薬 PP2 と比較検討した。その結果、5 分前処理したピペロングミン (100 μ M) 及び PP2 (10 μ M) は共にコラーゲン (3 μ g/ml) 誘発性血小板凝集反応を抑制したが、トロンビン (0.05 U/ml) 誘発性血小板凝集は抑制しなかった (figure 22)。一方、ピペロングミンまたは PP2 と同時にコラーゲンで刺激した場合の血小板凝集反応においては、ピペロングミンはコラーゲン誘発性の凝集反応を完全に抑制したが、PP2 はコラーゲン誘発性の凝集反応を完全には抑制しなかった。

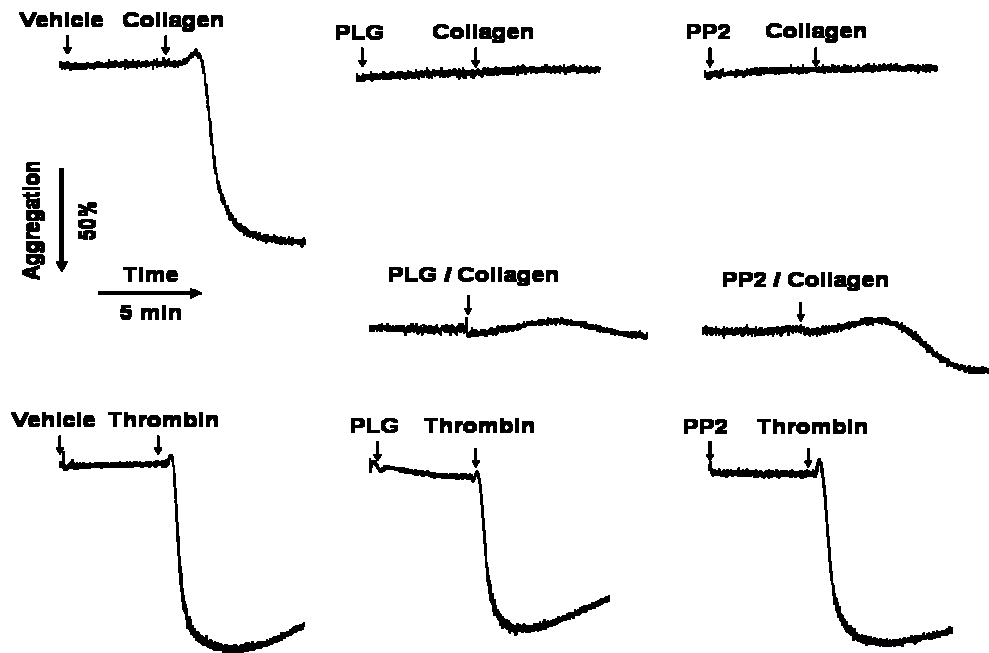


Figure 22 Effects of piperlongumine and Src inhibitor PP2 on collagen- or thrombin-induced platelet aggregation. PLG (100 μ M piperlongumine), PP2 (10 μ M) or vehicle (DMSO; final concentration of 1%) was preincubated for 0 or 5 min before the addition of collagen (3 μ g/ml) or thrombin (0.05 U/ml) in the presence of 1 mM CaCl_2 , as shown by arrows.

3 - 4 考察

本章では、インドナガコショウ成分ピペロングミンがコラーゲン誘発性血小板凝集反応におけるGPVIからSykリン酸化までの経路を阻害して、凝集反応を抑制していることを明らかにした。先行研究にて、インドナガコショウ成分のピペロングミンはTXA₂受容体遮断作用を有することが明らかになっているが(33)、ピペロングミンはU46619 誘発性血小板凝集反応よりも低濃度でコラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制することが明らかになった (figure 12)。従って、ピペロングミンはコラーゲン誘発性血小板凝集反応をより選択的に抑制していることが示唆された。

まず、ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集反応抑制作用がTXA₂受容体遮断作用に起因しているか否かについて検討した。コラーゲン誘発性血小板凝集反応は主にTXA₂産生を介して引き起こされるため、TXA₂受容体遮断薬は結果としてコラーゲン凝集を抑制する。Figure 13 では、コラーゲン誘発性血小板凝集反応はTXA₂受容体アンタゴニストSQ29548 10 μMを処理することで80%から 90%が抑制された。しかしながら、その抑制作用は部分的であり、U46619 誘発性血小板凝集を完全に抑制するような十分量のSQ29548 10 μMを添加してもコラーゲン誘発性の凝集反応は完全に抑制されなかった。阻害されなかった凝集反応はコラーゲン誘発性TXA₂産生に非依存的な凝集反応であり、血小板内の濃染顆粒にストアされているADPやセロトニンの放出反応を介した凝集反応、コラーゲンが直接血小板を活性化し惹起した凝集反応、及びα₂β₁を介して物理的にコラーゲンと血小板が接着することによる凝集反応が関与していると考えられる (53-55)。一方、ピペロングミン 100 μMはTXA₂受容体遮断作用によってU46619 誘発性血小板凝集反応を部分的に抑制したのに対して、コラーゲン誘発性血小板凝集反応を完全に抑制した。従って、ピペロングミンのコ

ラーゲン誘発性血小板凝集反応抑制作用はTXA₂遮断作用とは異なり、TXA₂遮断作用よりも選択的にコラーゲン誘発性血小板凝集反応を阻害していることが明らかになった。

また、ピペロングミンはトロンビン及びADP誘発性血小板凝集反応を抑制しなかった (figure 13)。ピペロングミンはセロトニン誘発性血小板凝集反応も同様に抑制しなかった (Iwashita *et al.*, unpublished observation)。今日、抗血小板薬として用いられている薬物には、抗トロンビン薬、P2Y₁₂受容体遮断薬、セロトニン受容体遮断薬及びホスホジエステラーゼ阻害薬がある (17)。抗トロンビン薬はトロンビン誘発性血小板凝集反応を、P2Y₁₂受容体遮断薬はADP誘発性血小板凝集反応を、セロトニン受容体遮断薬はセロトニン誘発性血小板凝集反応を、ホスホジエステラーゼ阻害薬はトロンビン及びADP誘発性血小板凝集反応をそれぞれ抑制する。従って、ピペロングミンの血小板凝集抑制作用はそれら既存薬とも異なっていることが示唆された。

ピペロングミンのコラーゲン誘発性血小板凝集抑制作用メカニズムを解明するため、コラーゲン誘発性のTXB₂産生及びアラキドン酸遊離反応に対するピペロングミンの作用を検討した結果、ピペロングミンはいずれも濃度依存的に抑制した (figure 14, 16)。コラーゲン誘発性の血小板凝集、TXB₂産生及びアラキドン酸遊離反応におけるピペロングミンの抑制作用のIC₅₀値は、14 μM、17 μM及び17 μMと同程度であったことから、3つの反応に対する抑制作用が関連した事象であること、更にピペロングミンの作用点はアラキドン酸遊離反応の上流であることが示唆された。TXS阻害薬及びCOX阻害薬も、今日抗血小板薬として用いられている薬物であるが、ピペロングミンはそれら既存薬とも異なった作用機序でコラーゲン誘発性血小板凝集を抑制しているということになる。COX阻害薬は抗血小板薬として最も汎用されている薬物であるが、ピペロングミンがCOX-1阻害作用を有していないことは、figure 15のCOX-1活性に対する

ピペロングミンの作用の検討からも明らかである。

次に、アラキドン酸遊離反応に重要な役割を担っているcPLA₂活性化に対するピペロングミンの作用を検討した。一般的に、cPLA₂の活性調節は μM オーダーの細胞内Ca²⁺濃度上昇による局在変化に依存すると言われている (56,57)。しかしながら、ピペロングミンには蛍光試薬の測定に影響を与える作用があり、蛍光試薬fura-2などを用いた細胞内Ca²⁺濃度上昇に対するピペロングミンの作用を検討することができなかった。また、cPLA₂の膜面分への局在変化を指標にした検討を行ったが、タンパク量が少なく検出することができなかった。cPLA₂は505番目のSer残基がMAPKによってリン酸化を受けることで活性が数倍上昇することが報告されている (58)。そこで、コラーゲン誘発性のcPLA₂リン酸化に対するピペロングミンの作用を検討した。その結果、ピペロングミンはcPLA₂リン酸化反応を濃度依存的に抑制することが明らかになった (figure 17)。しかしながら、TXB₂産生及びアラキドン酸遊離反応の抑制作用とは異なり、ピペロングミン 30 μM では十分なリン酸化反応の抑制作用が見られなかった。このような結果が導かれた理由として、アラキドン酸遊離反応を惹起する本質的なcPLA₂活性化とcPLA₂リン酸化が必ずしも一致していないことが考えられる。また、アラキドン酸の遊離反応にはcPLA₂の他にsPLA₂やiPLA₂といった分子も関与している可能性がある (59)。今後はそのような可能性も検討する必要がある。

コラーゲン誘発性のcPLA₂活性化は細胞内Ca²⁺濃度上昇及びMAPKの活性化によって惹起されるが、細胞内Ca²⁺濃度上昇及びMAPK活性化はPLC γ_2 を介したイノシトールリン脂質水解反応の結果生じたIP₃及びDAGによって惹起される。そこで、コラーゲン誘発性イノシトールリン脂質水解反応に対するピペロングミンの作用を検討した結果、これを抑制することが明らかになった (figure 18)。従って、cPLA₂の活性は505番目のSer残基のリン酸化を指標にしか評価できて

いないが、イノシトールリン脂質水解反応の抑制と同様に抑制されていることが示唆された。

コラーゲン誘発性血小板凝集反応に関与するコラーゲン受容体には、GPVI及び $\alpha_2\beta_1$ がある。それらのコラーゲン誘発性血小板凝集反応における役割は、 $\alpha_2\beta_1$ が部分的であるのに対して、GPVIは必須の関与であると報告されている(60)。ピペロングミンはコラーゲン誘発性血小板凝集を完全に抑制したことから、GPVIを介した血小板凝集反応に対するピペロングミンの作用を検討した結果、ピペロングミンはGPVI刺激薬コンブルキシシ及びCRP誘発性血小板凝集反応を抑制した (figure 19)。従って、ピペロングミンはGPVIシグナルを抑制することで、コラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制することが示唆された。しかしながら、ピペロングミンの $\alpha_2\beta_1$ への関与の有無は未だ明らかになっていない。 $\alpha_2\beta_1$ はコラーゲンと血小板の接着に重要な役割を担っており、ピペロングミンの作用機序を解明する上で、 $\alpha_2\beta_1$ に対するピペロングミンの作用を検討することは必要である。しかし、その検討は困難を伴っている。 $\alpha_2\beta_1$ シグナルを阻害する抗 α_2 抗体又はヘビ毒 (Jararhagin) は見出されているが (61,62)、 $\alpha_2\beta_1$ を選択的に刺激するツールや $\alpha_2\beta_1$ シグナル選択的に動く分子は見出されていない。従って、 $\alpha_2\beta_1$ シグナルに対するピペロングミンの作用は検討できておらず、今後の課題となっている。

GPVIを介したPLC γ_2 への情報伝達にはSykの活性化が必須である (46)。そこで、コンブルキシシ誘発性のSykリン酸化に対するピペロングミンの作用を検討した結果、ピペロングミンによってSykリン酸化が抑制されることが明らかになった (figure 21)。しかし、ピペロングミンがどのようなメカニズムでSykリン酸化を抑制しているかは未だ明らかになっていない。Sykのリン酸化において中心的な役割を担っているのは、Srcファミリーチロシンキナーゼである。Figure 22 より、5分前処理したPP2はコラーゲン誘発性血小板凝集を抑制した

が、短時間の処理は凝集反応を部分的にしか抑制しなかった。これは、細胞内に存在するSrcファミリーチロシンキナーゼの阻害において、PP2が細胞内へ拡散するまでに時間がかかることに起因していると考えられる。一方、ピペロングミンは処理時間に関係なく凝集反応を抑制した。間接的ではあるが、ピペロングミンはSrc阻害薬PP2とは異なったメカニズムでコラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制している可能性が示唆された。ピペロングミンは処理時間に依存せずコラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制するため、その作用点は細胞内ではなく血小板膜上やその近傍であると推察できる。しかし、薬効を規定する因子である薬物感受性及び薬物濃度は検討しておらず、ピペロングミンとPP2の阻害作用の差がそれらの因子の差によって現れている可能性は考慮しておかなければならない。

考えられるピペロングミンの作用点であるが、GPVIはFcR γ -鎖と会合して細胞膜に存在しており(41)、リガンドの結合によって二つのGPVI/FcR γ -鎖同士が4量体を形成する。その際SrcファミリーチロシンキナーゼのLyn/FynがFcR γ -鎖の細胞内領域にあるITAMをリン酸化すると共に、Sykも活性化する。その際Sykは脂質ラフトにおいて、リン酸化されたアダプタータンパク質LATと情報伝達複合体の形成を形成すると報告されている(44,63,64)。これらの複合体には、Gads、SLP-76、Btk、Tec及びVav1/3などの分子も関与することが報告されており(65-68)、これら脂質ラフト及び情報伝達複合体を介した一連の情報伝達経路に対してピペロングミンが作用している可能性がある。また、血小板膜表面へのGPVIの発現にはFcR γ -鎖と会合することが必須であると報告されており、GPVIとFcR γ -鎖の相互作用が阻害されるとGPVIを介した情報伝達は起こらなくなる(41)。GPVIとFcR γ -鎖の会合を不安定化するようにピペロングミンが作用している可能性もある。さらにGPVIのリガンド結合部位に直接ピペロングミンが作用している可能性も考えられる。今後はこれらの可

能性を検証し、ピペロングミンの Syk リン酸化抑制メカニズムを解明していきたいと考えている。

本章の結論として、ピペロングミンは既存の抗血小板薬とは異なり、GPVI から Syk リン酸化までの経路を抑制することでコラーゲン誘発性血小板凝集反応を抑制することが明らかになった。

第四章 結語

インドナガコショウは古くから伝承医学において用いられてきたが、これまでに血液循環改善作用の詳細な薬理作用については明らかにされていなかった。本研究で、インドナガコショウはウサギ洗浄血小板及びヒト洗浄血小板の凝集反応を抑制するという一つの作用が明らかになった。

インドナガコショウ EtOH 抽出物及びその成分は、虚血性循環障害の原因となる血栓形成において重要な役割を果たしているコラーゲン誘発性血小板凝集反応を、既存の抗血小板薬と異なって GPVI から Syk リン酸化までの経路に作用して抑制した。今日、このような作用機序を持った薬物は臨床応用されておらず、本研究成果は新しい作用機序を有する新規抗血小板薬の開発への足掛かりにもなると思われる。

他のグループからは、GPVI を標的にした創薬基礎研究として、GPVI の機能を抗体によって消失させ血小板機能を抑制した結果、血栓形成が減弱されたという報告がなされた (34)。さらに、その抗体は出血傾向の副作用が非常に少なかったとされている。標的となっている GPVI は血小板に選択的に発現しており、それを標的にした創薬は組織特異性が高いという特徴を有している。また、GPVI は血管が破綻しない血管内での血栓形成に寄与が大きいという病態特異性も有している。この 2 点から、GPVI を標的にした創薬は既存薬より効果的で出血傾向などの副作用が少ない薬物開発を実現できると思われる。しかし、上記の報告で用いられている抗体の投薬は、投与方法が困難であることや高価であることなどの問題点を有している。一方、低分子化合物で類似の効果を目指す本研究は、日常的に治療及び予防薬を用いるという観点から有用性が高いと考えられる。

ピペロングミンの作用を、最も汎用されている抗血小板薬のアスピリンと比較すると、アスピリンは腸管や気管支などの COX も阻害すると共に、出血時及び病態時双方で血小板の COX を阻害し、血栓形成を抑制するため、大きな副作用が現われる。一方、ピペロングミンは血小板の GPVI を選択的に阻害すると共に、病態時での血栓形成により重要なコラーゲンによる一次的な血小板活性化を選択的に抑制するため、副作用が軽減されると思われる。本研究成果は、近年未だ罹患者数が増加している虚血性循環障害の新たな治療及び予防薬になる可能性を十分有している。

今後、以下のことを検討し、本研究をさらに進展させていきたい。一つ目に、インドナガコショウには更に活性の強い成分が含まれている可能性があるので、その探索を行う。二つ目に、化合物の構造活性相関を検討し、化合物に改良を加え活性を高める。三つ目にコラーゲン誘発性血小板凝集に対する抑制作用機序を解明する。四つ目に、光化学刺激血栓モデル、ヘリウム - ネオンレーザー惹起血栓モデル及び塩化鉄傷害血栓モデルなどの病態モデルを用いて、*in vivo* での効果を検討する。これらの検討を通し、新規虚血性循環障害治療薬の開発を目指していきたい。

謝辞

本研究は東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野にて行われました。御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 故 中畑則道教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、御指導を賜りました東北大学薬学研究科薬理学分野 福永浩司教授、生活習慣病治療薬学分野 平澤典保教授、薬物動態学分野 吉成浩一准教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

終始御協力、御激励を賜りました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 守屋孝洋准教授、小原祐太郎助教、斎藤将樹助教及び小林大策助手に謹んで厚く御礼申し上げます。

実験を遂行するにあたり、インドナガコショウ EtOH 抽出物及び成分を提供していただいた丸善製薬株式会社の諸氏に御礼申し上げます。

最後に、多大なる御協力と御激励をいただきました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野の皆様深く感謝いたします。

参考文献

1. 厚生労働省. 2007. 人口動態統計. ed.
2. Chabriat H, Bousser MG 2006. Vascular dementia: potential of antiplatelet agents in prevention. *Eur Neurol* **55**(2):61-69.
3. ヒューマンサイエンス振興財団 2005. 平成17年度国内基盤技術調査報告書-2015年の医療ニーズの展望-.
4. Baumgartner HR 1977. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I: Reaction of human platelets with α chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* **37**(1):1-16.
5. Furie B, Furie BC 2007. *In vivo* thrombus formation. *J Thromb Haemost* **5 Suppl 1**:12-17.
6. Troxler M, Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S 2007. Platelet function and antiplatelet therapy. *Br J Surg* **94**(6):674-682.
7. Dorsam RT, Kim S, Murugappan S, Rachoor S, Shankar H, Jin J, Kunapuli SP 2005. Differential requirements for calcium and Src family kinases in platelet GPIIb/IIIa activation and thromboxane generation downstream of different G-protein pathways. *Blood* **105**(7):2749-2756.
8. van der Meijden PE, Feijge MA, Giesen PL, Huijberts M, van Raak LP, Heemskerk JW 2005. Platelet P2Y₁₂ receptors enhance signalling towards procoagulant activity and thrombin generation. A study with healthy subjects and patients at thrombotic risk. *Thromb Haemost* **93**(6):1128-1136.
9. Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP 1999. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for P2T_{AC} and α_{2A} receptors. *J*

Biol Chem **274**(41):29108-29114.

10. Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L 2002. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* **415**(6868):175-179.
11. Collaboration AT 2002. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* **324**(7329):71-86.
12. Collaboration AT 1994. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ* **308**(6921):81-106.
13. Iwashita M, Saito M, Yamaguchi Y, Takagaki R, Nakahata N 2007. Inhibitory effect of ethanol extract of *Piper longum* L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A₂ receptor. *Biol Pharm Bull* **30**(7):1221-1225.
14. Kumar A, Panghal S, Mallapur SS, Kumar M, Ram V, Singh BK 2009. Antiinflammatory Activity of *Piper longum* Fruit Oil. *Indian J Pharm Sci* **71**(4):454-456.
15. Ohno O, Watabe T, Nakamura K, Kawagoshi M, Uotsu N, Chiba T, Yamada M, Yamaguchi K, Yamada K, Miyamoto K, Uemura D Inhibitory effects of bakuchiol, bavachin, and isobavachalcone isolated from *Piper longum* on melanin production in B16 mouse melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**(7):1504-1506.
16. Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, Rattanachanpichai E, Jitpakdi A,

- Tippawangkosol P, Chaiyasit D, Champakaew D, Tuetun B, Pitasawat B 2006. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper* spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **48**(1):33-37.
17. McNicol A, Israels SJ 2003. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci* **93**(4):381-396.
 18. Navickiene HM, Alecio AC, Kato MJ, Bolzani VD, Young MC, Cavaleiro AJ, Furlan M 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **55**(6):621-626.
 19. Shoji N, Umeyama A, Saito N, Takemoto T, Kajiwara A, Ohizumi Y 1986. Dehydropiperonaline, an amide possessing coronary vasodilating activity, isolated from *Piper longum* L. *J Pharm Sci* **75**(12):1188-1189.
 20. Roger S, Pawlowski M, Habib A, Jandrot-Perrus M, Rosa JP, Bryckaert M 2004. Costimulation of the G_i-coupled ADP receptor and the G_q-coupled TXA₂ receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation. *FEBS Lett* **556**(1-3):227-235.
 21. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI 1997. Defective platelet activation in G α_q -deficient mice. *Nature* **389**(6647):183-186.
 22. Ohkubo S, Nakahata N, Ohizumi Y 1996. Thromboxane A₂-mediated shape change: independent of G_q-phospholipase C-Ca²⁺ pathway in rabbit platelets. *Br J Pharmacol* **117**(6):1095-1104.
 23. Rink TJ, Smith SW, Tsien RY 1982. Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets: Ca²⁺ thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett* **148**(1):21-26.
 24. Dorsam RT, Kim S, Jin J, Kunapuli SP 2002. Coordinated signaling through both G_{12/13} and G_i pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human

- platelets. *J Biol Chem* **277**(49):47588-47595.
25. Patel YM, Patel K, Rahman S, Smith MP, Spooner G, Sumathipala R, Mitchell M, Flynn G, Aitken A, Savidge G 2003. Evidence for a role for $G\alpha_{i1}$ in mediating weak agonist-induced platelet aggregation in human platelets: reduced $G\alpha_{i1}$ expression and defective G_i signaling in the platelets of a patient with a chronic bleeding disorder. *Blood* **101**(12):4828-4835.
 26. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF 2002. Signaling through G_i family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* **277**(48):46035-46042.
 27. Mitsuhashi M, Tanaka A, Fujisawa C, Kawamoto K, Itakura A, Takaku M, Hironaka T, Sawada S, Matsuda H 2001. Necessity of thromboxane A_2 for initiation of platelet-mediated contact sensitivity: dual activation of platelets and vascular endothelial cells. *J Immunol* **166**(1):617-623.
 28. Jin YR, Cho MR, Ryu CK, Chung JH, Yuk DY, Hong JT, Lee KS, Lee JJ, Lee MY, Lim Y, Yun YP 2005. Antiplatelet activity of J78 (2-Chloro-3-[2'-bromo, 4'-fluoro-phenyl]-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone), an antithrombotic agent, is mediated by thromboxane (TX) A_2 receptor blockade with TXA_2 synthase inhibition and suppression of cytosolic Ca^{2+} mobilization. *J Pharmacol Exp Ther* **312**(1):214-219.
 29. Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S 1999. Activation of G_{12}/G_{13} results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* **144**(4):745-754.
 30. Rodriguez-Linares B, Watson SP 1994. Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets. *FEBS Lett* **352**(3):335-338.

31. Hirao A, Hamaguchi I, Suda T, Yamaguchi N 1997. Translocation of the Csk homologous kinase (Chk/Hyl) controls activity of CD36-anchored Lyn tyrosine kinase in thrombin-stimulated platelets. *Embo J* **16**(9):2342-2351.
32. Stojanovic A, Marjanovic JA, Brovkovich VM, Peng X, Hay N, Skidgel RA, Du X 2006. A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. *J Biol Chem* **281**(24):16333-16339.
33. Iwashita M, Oka N, Ohkubo S, Saito M, Nakahata N 2007. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A₂ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **570**(1-3):38-42.
34. Takayama H, Hosaka Y, Nakayama K, Shirakawa K, Naitoh K, Matsusue T, Shinozaki M, Honda M, Yatagai Y, Kawahara T, Hirose J, Yokoyama T, Kurihara M, Furusako S 2008. A novel antiplatelet antibody therapy that induces cAMP-dependent endocytosis of the GPVI/Fc receptor γ -chain complex. *J Clin Invest* **118**(5):1785-1795.
35. Miksik I, Sedlakova P, Mikulikova K, Eckhardt A 2006. Capillary electromigration methods for the study of collagen. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **841**(1-2):3-13.
36. Myllyharju J, Kivirikko KI 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**(1):33-43.
37. Nieswandt B, Watson SP 2003. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**(2):449-461.
38. Jarvis GE, Atkinson BT, Snell DC, Watson SP 2002. Distinct roles of GPVI and integrin $\alpha_2\beta_1$ in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol* **137**(1):107-117.

39. Clemetson KJ, Clemetson JM 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* **86**(1):189-197.
40. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G 2007. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* **115**(17):2323-2330.
41. Bori-Sanz T, Inoue KS, Berndt MC, Watson SP, Tulasne D 2003. Delineation of the region in the glycoprotein VI tail required for association with the Fc receptor γ -chain. *J Biol Chem* **278**(38):35914-35922.
42. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP 2002. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem* **277**(24):21561-21566.
43. Locke D, Liu C, Peng X, Chen H, Kahn ML 2003. Fc R γ -independent signaling by the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* **278**(17):15441-15448.
44. Ezumi Y, Kodama K, Uchiyama T, Takayama H 2002. Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor γ -chain complex with membrane rafts. *Blood* **99**(9):3250-3255.
45. Briddon SJ, Watson SP 1999. Evidence for the involvement of p59^{fyn} and p53/56^{lyn} in collagen receptor signalling in human platelets. *Biochem J* **338** (Pt 1):203-209.
46. Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs ML, Dunn AR, Lowell CA, Watson SP 2000. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor γ chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn

- regulates a novel feedback pathway. *Blood* **96**(13):4246-4253.
47. Blake RA, Schieven GL, Watson SP 1994. Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ_2 but not phospholipase C γ_1 in human platelets. *FEBS Lett* **353**(2):212-216.
 48. Blake RA, Walker TR, Watson SP 1993. Activation of human platelets by peroxovanadate is associated with tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ and formation of inositol phosphates. *Biochem J* **290** (Pt 2):471-475.
 49. Poole AW, Watson SP 1995. Regulation of cytosolic calcium by collagen in single human platelets. *Br J Pharmacol* **115**(1):101-106.
 50. Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, Rosa JP, Bryckaert M Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood* **115**(20):4083-4092.
 51. Shen RF, Tai HH 1998. Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci* **5**(3):153-172.
 52. Nakahata N, Matsuoka I, Ono T, Nakanishi H 1989. Thromboxane A $_2$ activates phospholipase C in astrocytoma cells via pertussis toxin-insensitive G-protein. *Eur J Pharmacol* **162**(3):407-417.
 53. Menys VC 1993. Collagen induced human platelet aggregation: serotonin receptor antagonism retards aggregate growth in vitro. *Cardiovasc Res* **27**(11):1916-1919.
 54. Moers A, Wettschureck N, Gruner S, Nieswandt B, Offermanns S 2004. Unresponsiveness of platelets lacking both G α_q and G α_{13} . Implications for collagen-induced platelet activation. *J Biol Chem* **279**(44):45354-45359.
 55. Verkleij MW, Morton LF, Knight CG, de Groot PG, Barnes MJ, Sixma JJ 1998. Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not

- under flow conditions: interaction via $\alpha_2\beta_1$ and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces. *Blood* **91**(10):3808-3816.
56. Kudo I, Murakami M 2002. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:3-58.
 57. Kita Y, Ohto T, Uozumi N, Shimizu T 2006. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A₂s. *Biochim Biophys Acta* **1761**(11):1317-1322.
 58. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ 1993. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**(2):269-278.
 59. Schaloske RH, Dennis EA 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* **1761**(11):1246-1259.
 60. Clemetson KJ, Clemetson JM 2007. Collagen receptors as potential targets for novel anti-platelet agents. *Curr Pharm Des* **13**(26):2673-2683.
 61. Keely PJ, Parise LV 1996. The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase C γ_2 in platelets. *J Biol Chem* **271**(43):26668-26676.
 62. Kamiguti AS, Markland FS, Zhou Q, Laing GD, Theakston RD, Zuzel M 1997. Proteolytic cleavage of the β_1 subunit of platelet $\alpha_2\beta_1$ integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen-stimulated phosphorylation of pp72. *J Biol Chem* **272**(51):32599-32605.
 63. Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML 2002. Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* **277**(21):18801-18809.
 64. Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL,

- Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP 1999. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase $C\gamma_2$ and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol* **19**(12):8326-8334.
65. Judd BA, Myung PS, Obergfell A, Myers EE, Cheng AM, Watson SP, Pearce WS, Allman D, Shattil SJ, Koretzky GA 2002. Differential requirement for LAT and SLP-76 in GPVI versus T cell receptor signaling. *J Exp Med* **195**(6):705-717.
66. Judd BA, Koretzky GA 2001. The role of the adapter molecule SLP-76 in platelet function. *Oncogene* **20**(44):6291-6299.
67. Atkinson BT, Ellmeier W, Watson SP 2003. Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. *Blood* **102**(10):3592-3599.
68. Pearce AC, Senis YA, Billadeau DD, Turner M, Watson SP, Vigorito E 2004. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J Biol Chem* **279**(52):53955-53962.

発表論文リスト

- 1 . Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A₂ receptor antagonist

European Journal of Pharmacology、570 巻、38 頁～42 頁、2007 年

- 2 . Inhibitory effect of ethanol extract of *Piper Longum* L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A₂ receptor

Biological & Pharmaceutical Bulletin、30 巻、1221 頁～1225 頁、2007 年