

大豆由来フラボノイドGenisteinの抗血小板効果の解明

小田 淳*

北海道大学大学院医学研究科

Anti-platelets Effects of Genistein, an Isoflavonoid from Soybean

Atsushi ODA

Department of Preventive Medicine,
Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638

ABSTRACT

It has been reported that genistein inhibits platelet functions *in vitro*. The mechanisms of the inhibitory effects are poorly understood. Genistein is a well-known inhibitor of protein tyrosine kinases. However, I show here that genistein inhibits platelet activating factor (PAF)-induced elevation of ionized calcium concentrations and IP₃ production in platelets, induced by PAF, in the presence of staurosporin, which abolishes increased protein tyrosine phosphorylation. Thus, it appears that genistein inhibits activation of phospholipase C in stimulated platelets, apparently independent of its effects on tyrosine kinases. I also show that catechins, which might be consumed along with genistein in the Japanese diet, had markedly different effects on platelets in comparison with genistein. As people take different flavonoids simultaneously, it is highly desirable that the combined effects of flavonoids are elucidated in different systems. In this sense, platelets may be useful in these settings. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 145-148, 2004.

Key words : flavonoid, phospholipase C, platelet aggregation, tyrosine kinase, catechin

心筋梗塞などの虚血性心疾患は動脈硬化に起因し、しかも血小板が大きな役割を果たすことが知られている。虚血性心疾患の頻度は米国に比較して、日本で低く、ハワイ在住日本人では、その頻度の上昇が認められることから、和食の摂取が虚血性心疾患の予防に役立つものと考えられている。和食では大豆加工食品が

多量に使用される。大豆に豊富に含まれるイソフラボノイドであるgenisteinは血小板機能を抑制することが知られているが、その作用の分子機構は明確ではなく、本研究の目的はこれを明らかにすることである。さらに和食と共に摂取されることの多い緑茶に含まれるフラボノイドであるカテキン類の血小板に対する効果に関しても若干の検討を加えた。

*〒060-8638 札幌市北区北15西7

方 法

文献1)~3)などに記載された方法により血小板は健康人ボランティアより静脈血を採取し、これから洗浄血小板を調整し、様々のパラメーターを測定した。

1. 血小板凝集および各種顆粒放出に対する影響.
2. 血小板細胞内Caイオン濃度の変化に対する影響.
3. 血小板のCキナーゼおよびミオシン軽鎖キナーゼの活性化に対する影響. 4. 血小板たん白質チロシンリン酸化に対する影響. 5. 血小板細胞骨格改変に対する影響. 6. PAFなどにより惹起されるIP3産生への影響.

さらに、同様の実験を緑茶に含まれる代表的なカテキンである、epigallocatechin (EGC) やEGC gallate (EGCG) に関しても同様の検討を加えた。

結果と考察

当初、大豆由来のフラボノイドの一種であるgenisteinを用いて検討を開始した。その結果、既に諸家の報告にあるようにgenisteinは10~100 μ mol/Lの濃度で用量依存性に様々な血小板活性化物質（トロンビン、PAF、コラーゲンなど）による血小板活性化の各種パラメーターを部分的に抑制した（最大70%程度）。これは諸家の報告結果と一致していて驚くに当たらない、しかしFig. 1および2に示すデータは実に驚くべき

ものであった。

スタウロスポリンはチロシンリン酸化酵素を含めて、多くのたん白質リン酸化酵素を阻害する。実際、血小板たん白質チロシンリン酸化をWestern Blottingで検討したところ、PAF (1 μ mol/L) 添加後の血小板たん白質チロシンリン酸化の上昇は（スタウロスポリン1 μ mol/L) 存在下で完全に抑制される (Fig. 1), ここにgenistein 100 μ mol/Lを添加しても全く変化はなかった (Fig. 1, lane 7~9). 血小板にカルシウムイオン蛍光指示薬Fura-2を負荷し、base lineの血小板細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を1分間測定後PAF (1 μ mol/L) を添加したところ、速やかに $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたが、genistein 100 μ mol/L (Gen) 5分間前処理により抑制される。興味深い事に、この抑制効果はスタウロスポリン (St) 存在下でも認められた。これはgenistein 100 μ mol/Lの有無に関せず認められた。即ち、genisteinはチロシンリン酸化を抑制することで、血小板機能を阻害するとこれまでされていたのが、これが最初から抑制されている状態で、血小板活性化に重要な $[Ca^{2+}]_i$ を阻害するという全く新規のデータが得られたのである。これと全く同様の実験結果であったので、図示しないが、トロンビンやバゾプレッシンなどで血小板を活性化した場合でも全く同様であった。一方、植物由来フラボノイドでもdaidzeinやresveratolにはこのような効果は100 μ mol/Lまでは認められず、genisteinに比較的特異的な作用かもしれない。以上より、代表的植物由来フラボノイドのひとつ

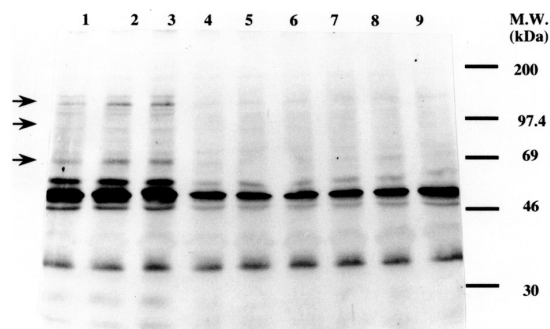


Fig. 1. Protein tyrosine phosphorylation in platelets, induced by PAF, is inhibited by staurosporin irrespective of the presence of genistein. Lane 1, 2, 3- Resting, 10s, 20se after addition of PAF. Lane 4, 5, 6- Resting, 10s, 20se after addition of PAF (pretreated with staurosporin). Lane 7, 8, 9- Resting, 10s, 20se after addition of PAF (pretreated with staurosporin and genistein). Bands of interest are indicated by arrows.

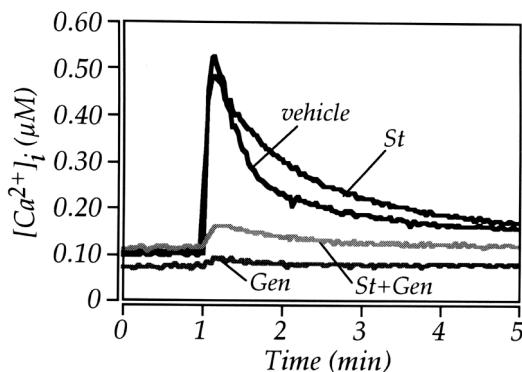


Fig. 2. Rise in ionized calcium concentration in Fura-2 loaded platelets, induced by PAF, is inhibited by genistein irrespective of the presence of staurosporin. PAF was added 1 min following the start of the recording. Vehicle-pretreated with DMSO alone. St-pretreated with staurosporin. Gen-pretreated with genistein alone. St plus Gen-pretreated with staurosporin and genistein.

genisteinに関して全く新規の血小板機能阻害経路が存在する事が明示された。このgenisteinによるチロシンリン酸化酵素阻害効果非依存性の $[Ca^{2+}]_i$ 阻害効果を検討するためにPAF惹起血小板内inositol trisphosphate (IP3) を市販のキットにて測定したところ、スタウロスポリンによりチロシンリン酸化酵素が阻害された状態で、genisteinはIP3産生を抑制することが判明した (Fig. 3)。このことより、genisteinの効果は、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の上流に位置するphospholipase Cのレベルで認められることが示唆された。現在、血小板phospholipase Cを純化し、genisteinの効果を検討中である。

最後に、緑茶に豊富なカテキンEGCの効果も検討した。EGCはgenisteinと異なり、それ自体で血小板凝集を惹起する (Fig. 4)。この血小板凝集惹起作用はsrcチロシンリン酸化酵素阻害剤PP2やgenisteinで阻害された。一方、やはり緑茶に豊富に含まれるEGCGには血小板を強く活性化する作用は認められずむしろコラーゲン惹起血小板凝集などを阻害した (図示せず)。これよりフラボノイドと言っても多種多様な作用があることが示唆された。フラボノイドは様々な食品に含まれるために、単独で摂取されることはあり得ない。今後は、様々なフラボノイドが協調性ないしは拮抗性に発揮する作用についてのさらなる検討を加えたい。

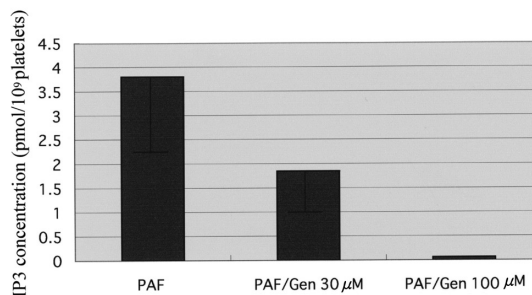


Fig. 3. IP3 concentration in staurosporin-pretreated platelets induced by PAF. Mean and SD of five independent experiments are shown.

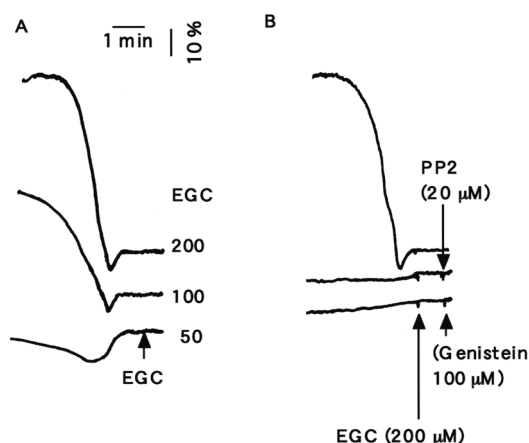


Fig. 4. Platelet aggregation induced by epigallocatechin (EGC) is inhibited by genistein or PP2.

要 約

大豆関連食品に豊富に含まれるgenisteinなどのイソフラボノイドの抗血小板効果に注目が集まっている。genisteinは血小板のplatelet activating factor (PAF) 刺激下などにおける細胞内Caイオン濃度の上昇を抑制し、この効果はチロシンリン酸化酵素阻害効果を介するとされてきた。チロシンリン酸化酵素を阻害するスタウロスポリンを使用して、血小板たん白質チロシンリン酸化上昇を完全に抑制した条件下でも、genisteinは血小板Caイオン濃度の上昇を阻害した。このように既にたん白質チロシンリン酸化の上昇は強く阻害されている状況においても、広くチロシンリン酸化酵素阻害剤として用いられるgenisteinがチロシンリン酸化酵素阻害効果以外の作用で、血小板Caイオン濃度の上昇を阻害する事が示唆された。実際、スタウロスポリン存在下におけるPAF惹起inositol triphosphate (IP3) 産生はgenisteinにより抑制され、genisteinは血小板活性化に中心的な役割を果たすphospholipase Cを直接抑制することが示唆された。また、genisteinと共に摂取されることも多いカテキンの血小板に対する作用に関しても若干の検討を加えた。

文 献

- 1) Oda A, Daley JF, Kang J, Smith M, Ware JA and Salzman EW (1991): Quasi-simultaneous measurement of ionized calcium and alpha-granule release in individual platelets. *Am J Physiol*, **260**, C242-C248.
- 2) Oda A, Wakao H and Fijita H (2002): Calpain is a signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and STAT5 protease. *Blood*, **99**, 1850-1852.
- 3) Oda A, Wada I, Miura K, Okawa K, Kadoya T, Kato T, Nishihara H, Maeda M, Tanaka S, Nagashima K, Nishitani C, Matsuno K, Ishino M, Machesky LM, Fujita H and Randazzo P (2003): CrkL directs ASAP1 to peripheral focal adhesions. *J Biol Chem*, **278**, 6456-6460.