

網膜障害および血管新生に対する黒米アントシアニンの
作用に関する薬理学的研究

田中 潤司

目 次

序論	1 頁
第 1 章 可視光誘発網膜障害に対する黒米エキスおよびその構成成分の作用	7 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 2 章 小胞体ストレス誘発網膜障害に対する黒米エキスおよびその構成成分の作用	28 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 3 章 網膜血管新生に対する黒米エキスおよびその構成成分の作用	49 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
総括および結論	71 頁
謝辞	75 頁
引用文献	76 頁
略語一覧表	88 頁

序 論

眼は、光を受容する感覚器官であり、視神経 (optic nerve) を介して視覚が生じる。眼球の構造は外壁と内容物からなり、外壁は大きく分けて 3 層から成り立っている。外側から外膜 [角膜 (cornea), 強膜 (sclera)], 中膜 [脈絡膜 (choroid), 虹彩 (iris), 毛様体 (ciliary)] および内膜 [網膜 (retina)] となっている。その網膜は、組織学的にさらに 10 層に大別され、内側より内境界膜 (inner limiting membrane), 神経線維層 (nerve fiber layer), 神経節細胞層 (ganglion cell layer), 内網状層 (inner plexiform layer), 内顆粒層 (inner nuclear layer), 外網状層 (outer plexiform layer), 外顆粒層 (outer nuclear layer), 外境界膜 (external limiting membrane), 視細胞層 (photoreceptor layer), および網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium) からなる (Fig. 1)。一方、内容物は、水晶体 (lens), 硝子体 (vitreous body) および眼房水 (aqueous humor) である。

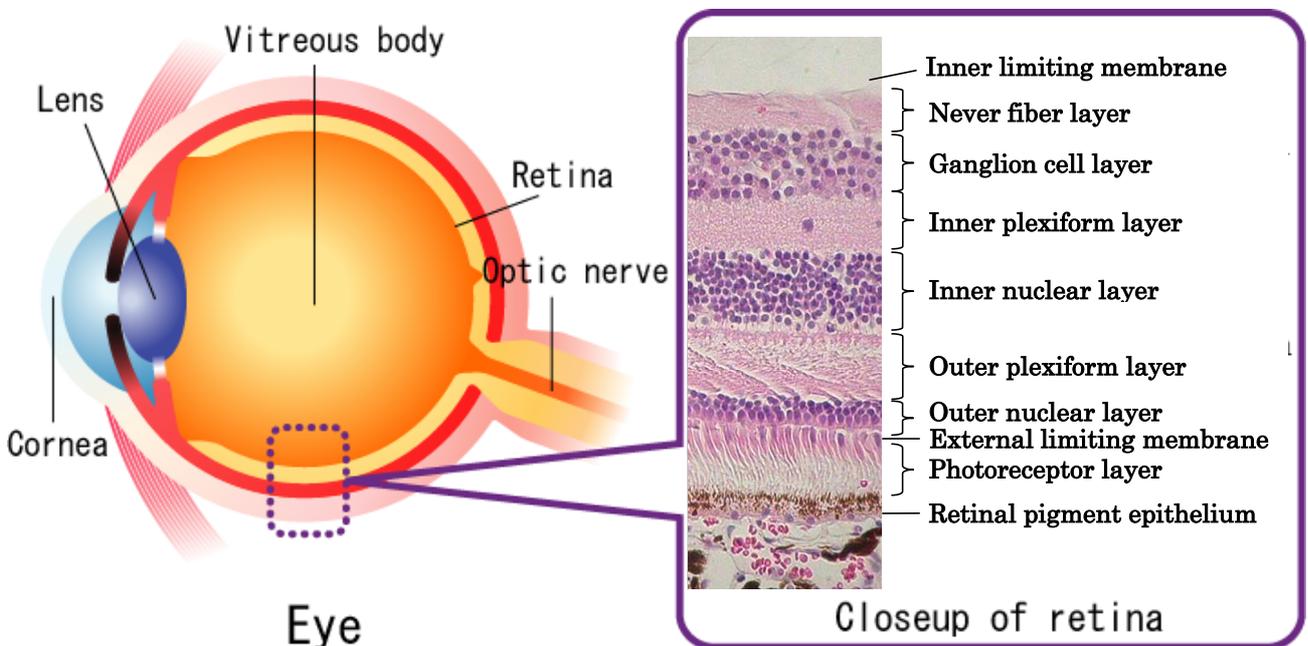


Fig. 1 Structure of ocular tissue.

網膜では、眼に入った光刺激は水晶体や硝子体を通り、視細胞層に存在する光受容細胞である視細胞によって感受される。視細胞は錐体細胞および杆体細胞に分けられ、錐体細胞は網膜の中心部の黄斑に集中して存在し、視力や色覚を担う。その錐体細胞には、赤を感じる錐体 (L 錐体)、緑を感じる錐体 (M 錐体)、青を感じる錐体 (S 錐体) の3種類がある。一方、杆体細胞は黄斑より周辺に多数分布して、色素としてロドプシンを含む事により周辺の視野や暗い中で光を感じる事ができる。視細胞で光から神経刺激 (活動電位) へと変換された後、外網状層および内顆粒層に存在する双極細胞、水平細胞およびアマクリン細胞などを経て、最終的に網膜の内側の神経節細胞層に存在する網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) に到達する。その後、その信号は網膜神経線維から視神経を経て、脳中枢へ情報が伝えられる事により映像として認知される。

わが国における中途失明原因疾患の第1位は緑内障であり、第2位が糖尿病網膜症、第3位が網膜色素変性症、第4位が加齢黄斑変性症となっており、いずれも網膜を含む後眼部疾患である (Fig. 2)。また、加齢黄斑変性症は欧米での中途失明原因の第1位である。しかしながら、現在これらの疾患に対する確実

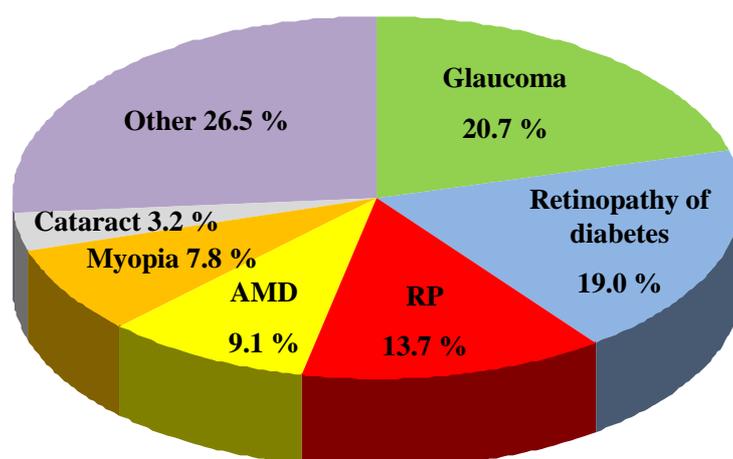


Fig. 2 Cause of blindness in Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare).

AMD; age-related macular degeneration, RP; retinitis pigmentosa.

な薬物的および外科的な治療法は確立していない。緑内障は、日本国内で治療中の患者は約 60 万人（厚生労働省 2008 年）であり、疫学調査報告（多治見スタディー：2000～2001 年）により 40 歳以上の 5.0% (20 人に 1 人) に発症していることが判明している (Yamamoto *et al.*, 2005)。緑内障は、「視神経と視野に特徴的な変化を有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患である。」と定義されており、これまでの治療は、手術または眼圧下降薬などによって眼圧を下げることに主眼が置かれてきた。しかしながら、眼圧下降が十分であるにもかかわらず視野障害が進行する正常眼圧緑内障等が多く報告されており (Tomidokoro, 2006), 多治見スタディーでは全緑内障患者の約 70%を占めていた。このように、緑内障の発症に眼圧以外の因子が関与していることが示唆されており、その一つとして RGC の細胞死が挙げられる。RGC の細胞死には、興奮性アミノ酸 (McKinnon, 1997), 酸化ストレス (Muller *et al.*, 1998), 一酸化窒素 (Neufeld, 1999) および小胞体ストレス (Gould *et al.*, 2007) などの様々な因子により引き起こされる。このように様々な因子によって細胞死が引き起こされる RGC は、緑内障に対する新たな治療戦略になることが期待される。糖尿病網膜症は、糖尿病 3 大合併症のひとつであり、進行の程度により単純糖尿病網膜症、前糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症の 3 段階に分類される。このうち、増殖糖尿病網膜症では糖代謝の異常に伴う動脈硬化の進展により、網膜上の微細血管網が閉塞し、虚血状態に陥ることで新たな血管新生が誘導される。血管新生は様々な増殖因子と抑制因子のバランスの上で制御されているが、血管内皮細胞の増殖には血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が主要な制御因子として働いている。実際、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中には過剰な VEGF が蓄積されており、網膜血管新生の誘導に重要な役割を持つと考えられている

(Funatsu *et al.*, 2003)。異常な血管新生が繰り返されることで、硝子体出血や牽引性網膜剥離などの病変を引き起こし、最終的には失明に至る。このように、糖尿病網膜症の病態の進行には、VEGF による異常な血管新生が重要な役割を果たしていると考えられる。加齢黄斑変性症は、50 歳以上の人約 1%にみられ、加齢とともに網膜の中心部である黄斑部が障害される疾患であり、大きく分けると萎縮型と滲出型の 2 つに分類される。萎縮型は網膜色素上皮が徐々に萎縮していき、黄斑部が障害される疾患である。滲出型は脈絡膜から網膜色素上皮の下あるいは網膜と網膜色素上皮の間に異常な新生血管が侵入し、黄斑部が障害される疾患である。いずれも、視力が徐々に低下していき、やがて失明に至る。この原因として、加齢および異常な血管新生以外に、可視光や紫外線による発症および病態の進行も報告されている (Hirakawa *et al.*, 2008)。また、集団ベースの住民を対象とした症例対照研究において、可視光は網膜色素変性症の原因の一つになると報告されている (Tomany *et al.*, 2004)。このように、加齢黄斑変性症および網膜色素変性症の病態の進行には、可視光および紫外線が重要な役割を果たしていると考えられる。

近年、高齢化社会に突入したわが国において医療費の高騰が懸念されており、西洋医療とは別に代替医療・予防医療が注目されている。病気になる前に病気を防ぐことで生活の質 (quality of life: QOL) の低下を防ぐ事が可能となる。そのため、代替医療・予防医療として、様々な薬効を有し、かつ副作用の少ない漢方薬や機能性食品 (サプリメント等) などが使用されている。また、この機能性食品の市場は、2010 年に 6,488 億円となっており、年々増加している(富士経済)。しかしながら、これら機能性食品には明確な根拠が乏しい物質も数多く存在し、代替医療・予防医療に対する科学的根拠(エビデンス)の要求が高まっている。

黒米 [*Oryza sativa* L. (Gramineae)] は、有色米であり、東南アジア、中国および日本で栽培されている (Fig. 3)。黒米糠には紫黒色素 (アントシアニン) が含まれており、食品着色剤としてパン、アイスクリームおよび酒に幅広く使用されている。黒米およびアントシアニンの化学成分や生理活性に関する研究は多く実施され、これまでに抗酸化作用 (Ichikawa *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2006; Jang and Xu, 2009), α -グルコシダーゼ阻害作用 (Yao *et al.*, 2010), 抗変異原活性 (Nam *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006), 肝保護作用 (Hou *et al.*, 2010), ヒアルロニダーゼ阻害作用 (Bralley *et al.*, 2008), 抗糖尿病作用 (Guo *et al.*, 2008) および抗炎症作用 (Hu *et al.*, 2003) が報告されている。脱脂黒米糠抽出物 (purple rice bran extract; PRE) の化学的および生物学的特性における著者らの以前の研究において、3種類のアントシアニン (cyanidin 3-*O*-glucoside, peonidin 3-*O*-glucoside および cyanidin 3-*O*-gentiobioside) を単離・同定している (Tamura *et al.*, 2010)。この cyanidin 3-*O*-glucoside が眼の視細胞に多く含まれているロドプシンの再合成を促進し、暗順応の改善や眼精疲労を軽減することが報告されている (Matsumoto *et al.*, 2003; Morazzoni *et al.*, 1996)。また、ビルベリーアントシアニンにおいて、マウス網膜血管新生抑制および興奮性アミノ酸である *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 誘発マウス網膜障害抑制作用が報告されている (Matsunaga *et al.*, 2009, 2010a)。アントシアニン摂取後の眼内移行に関して、Matsumoto らはアントシアニンのラット経口および腹腔内投与またはウサギ静脈内投与後に、血漿および眼全体でアントシアニンの存在を確認している (Matsumoto *et al.*, 2006)。また、ラット腹腔内投与時の眼全体およびいくつかの眼組織中のアントシアニン濃度は血漿中よりも高かった事を報告している。さらに、Kalt らはブタを用いたアントシアニンの経口投与で、眼、肝臓および脳でその存在を確認している (Kalt *et al.*, 2008)。これらの報告で、アントシアニンは体内に吸収され、そのまま眼組

織内に分散されることが明らかとなった。したがって、これらの知見は、黒米アントシアニンの摂取もまた血液網膜関門を通過し眼内に移行することを示唆している。しかしながら、黒米アントシアニンの先に述べたような眼疾患に対する作用については明らかにされていない。



Fig. 3 Pictures of purple rice.

本研究では、眼疾患に対する黒米エキスおよびその主要成分 (cyanidin および peonidin) の有効性を動物実験で立証するため、可視光誘発網膜障害、小胞体ストレス誘発網膜障害および VEGF 誘発網膜血管新生に対する作用について検討した。

第 1 章 可視光誘発網膜障害に対する黒米エキスおよびその構成成分の作用

第 1 節 緒言

可視光は、太陽からだけではなく、蛍光灯および発光ダイオード (LED) やテレビ、携帯電話およびパソコンのモニターの人工的な照明によって生成される。網膜視細胞は、暗所における物の見え方や視野の広さなどに関係する桿体細胞、中心の視力や色覚などに関わる錐体細胞の 2 種類の細胞で構成されている。長期の可視光照射によって、マウスおよびラットにおける網膜視細胞の変性が引き起こされ (Noell *et al.*, 1996; LaVail *et al.*, 1987), 過剰な可視光照射は眼に障害をもたらすと考えられる。さらに、太陽光照射は、加齢黄斑変性症 (age-related macular degeneration: AMD) の発症原因の一つであるとともに、病態の進行を促進し (Hirakawa *et al.*, 2008), 集団ベースの住民を対象とした症例対照研究において、網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa: RP) の原因の一つになると報告されている (Tomany *et al.*, 2004)。日本およびアメリカにおいて AMD および RP は、成人の主な中途失明原因である。この AMD および RP はいずれも、最終的に視細胞のアポトーシスを惹起する。網膜において唯一の光

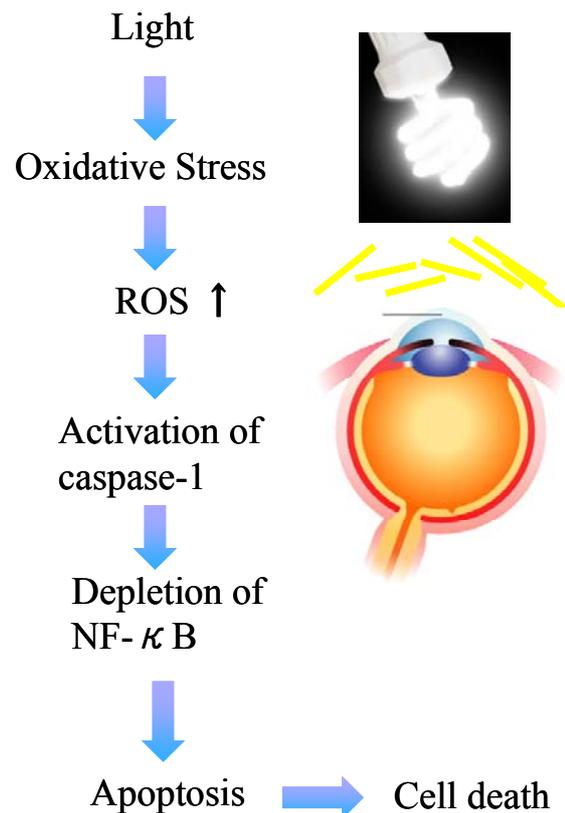


Fig. 4 Mechanism of light-induced photoreceptor cell death.

受容体である視細胞の細胞死は、不可逆的損傷であり、夜盲症（鳥目）および視野狭窄を引き起こし、最終的に中心の視野欠損に至る。可視光誘発の視細胞死は、酸化ストレス、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生, caspase-1 の活性化および NF- κ B の枯渇といった順で様々な細胞機構によって引き起こされる (Fig. 4) (Krishnamoorthy *et al.*, 1999)。

ヒトの網膜は生体中で最も酸素消費が激しく (13 ml/100 g/min) , それ故にスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) , ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) および過酸化水素 (H_2O_2) の ROS を容易に生じやすい。ROS はミトコンドリアの ATP 合成過程や細菌感染の防御過程において重要な働きをしているが、生体内の ROS と抗酸化活性のバランスが崩れると、DNA、タンパク質および脂質の細胞構成物質が酸化され、アテローム性動脈硬化症、脳梗塞および糖尿病網膜症の各種疾患の発症に関与することが知られている。ROS の中でも $\cdot\text{O}_2^-$ の酸化能は弱いけれども、生体組織における金属と反応し、紫外線に曝されるとすぐに $\cdot\text{OH}$ に変化する。このラジカルは最も酸化力が強く、連鎖的に脂質過酸化を促進し DNA および細胞膜の障害を引き起す。これまで、ROS が光照射により誘導されることにより視細胞障害が惹起されることに着目し、抗酸化剤である ascorbic acid 等の有効性が動物実験において明らかにされている (Li *et al.*, 1985; Organisciak *et al.*, 1985)。しかしながら、酸化ストレス状態はこの内部の抗酸化システムを制圧するため、結果として網膜疾患を含む多くの疾患の進行を促進する。

序論で述べたように脱脂黒米糠抽出物 (purple rice bran extract; PRE) の化学的および生物学的特性における著者らの以前の研究において、3 種類のアントシアニン (cyanidin 3-*O*-glucoside , peonidin 3-*O*-glucoside および cyanidin 3-*O*-gentiobioside) を単離・同定している (Tamura *et al.*, 2010)。これらのアントシアニンが青色光誘発の A2E (リポフスチンの蛍光色素分子) 含有網膜色素上皮

細胞障害に対する抑制作用を示す事より (Jang *et al.*, 2005), PRE も可視光誘発網膜細胞障害に対して保護作用を示すのではないかと考え, 本研究を実施した。

本章では, PRE およびその主要成分であるアントシアニン (cyanidin および peonidin) の可視光誘発視細胞障害に対する作用について検討した。初めにマウス由来視細胞である 661W を用いて, 可視光障害に対する作用について検討した。また, その作用機序解明のために可視光誘発の ROS 産生に対する作用と共に, 電子スピン共鳴法 (electron spin resonance: ESR) を用いて, PRE, cyanidin および peonidin の抗酸化活性を測定した。最後にマウス光障害モデルを用いて光誘発視細胞障害に対する PRE の作用を検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

シアニジン3-*O*-グルコシド (cyanidin 3-*O*-glucoside), ペオニジン3-*O*-グルコシド (peonidin 3-*O*-glucoside), シアニジン (cyanidin) およびペオニジン (peonidin) は, Extrasynthese (Genay Cedex, France), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は, Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan), Hoechst 33342およびpropidium iodide (PI) は, Molecular Probes (Eugene, OR, USA), 5-(and -6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA) は, Invitrogen Co. (Eugene, OR, USA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)および6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (trolox) は, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) は, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan), hypoxanthine, xanthine oxidase, 過酸化水素およびFeSO₄は, Wako Pure Chemical Co., Ltd. (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 黒米エキス (PRE) の抽出

黒米糠 (100 g) は *n*-hexane (500 ml) で脱脂した。室温で脱脂黒米糠を乾燥後, 50%エタノール (500 ml, 50°C) で2時間抽出した。抽出液をろ過後, 濃縮・乾固して抽出物を得た。その抽出物を DIAION HP-20 column (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan) に吸着させ, 水で洗浄した。その後, 70%エタノールで溶出させ, 溶出液を濃縮・乾固し黒米エキス (PRE) 2.8 g を得た。

2-2-2 HPLC 分析

PRE 中のアントシアニン含量は C18 カラム (Develosil ODS-UG-5, 4.6 mm *i.d.*

× 250 mm, Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いて HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) にて分析した。移動相には 10%ギ酸 v/v (A) およびギ酸/アセトニトリル/メタノール/水 (10/22.5/22.5/45) (B) を用いた。グラジエント条件は, 0 min, 90% (A), 10% (B) ; 40 min, 65% (A), 35% (B) を用いた。流量は 1 mL/min とし, 測定には 520 nm の波長を用いた。PRE 中の cyanidin-3-*O*-glucoside および peonidin-3-*O*-glucoside の含量はそれぞれ 2.9% および 0.2% であった。

2-2-3 細胞培養

マウス視細胞 (photoreceptor cell) である 661W は, Dr. Muayyad R. Al-Ubaidi (University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA) より譲与された。661W は 10%FBS, ペニシリン (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 µg/ml) 含有 DMEM 培地で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。細胞は 2 ~ 3 日おきにトリプシン処理により継代した。

2-2-4 可視光誘発視細胞死試験

661W を 5×10^3 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後, 1% FBS を含む DMEM 培地に置換し, 各試料を添加して 1 時間培養後, 白色蛍光灯 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて, 2,500 lux の光照射条件下で 24 時間培養した。生細胞数は WST-8 (Cell Counting Kit-8) を用いて, ホルマザンの測定を行った。492 nm (参照波長, 660 nm) の波長を spectrophotometer (Varioskan; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いて測定し, ホルマザンの生成量から細胞数を計数した。死細胞率の評価は, Hoechst 33342 (8 µM) および PI (1.5 µM) を添加し, 核染色を行い, OLYMPUS IX70 の蛍光倒立顕微鏡で撮影した。

2-2-5 可視光誘発 ROS 産生の測定

661W を 5×10^3 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で 24 時間培養した。その後、1% FBS を含む DMEM 培地に置換し、各試料を添加して 1 時間培養後、白色蛍光灯 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて、2,500 lux の光照射条件下で 24 時間培養した。光照射後、CM- H_2DCFDA ($10 \mu\text{M}$) を添加し、1 時間、 37°C でインキュベートした。蛍光は、488 nm/525 nm の励起/蛍光波長を spectrophotometer (Varioskan[®]; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いて測定し、ROS 産生率を算出した。

2-2-6 電子スピン共鳴法 (ESR)

DPPH ($200 \mu\text{M}$) および各試料溶液を等量ずつ混合した。試料を電子スピン共鳴装置測定用のセルに入れ、電子スピン共鳴スペクトルの測定を行った。なお、DPPH ラジカルの測定は、試料を混合してから 2 分後に開始した。

$\cdot\text{O}_2^-$ は hypoxanthine-xanthine oxidase 反応により生成した。各試料溶液、DMPO (0.5 M)、hypoxanthine (5 mM) および xanthine oxidase (0.4 units/ml) を等量ずつ混合した。試料を電子スピン共鳴装置測定用のセルに入れ、電子スピン共鳴スペクトルの測定を行った。なお、 $\cdot\text{O}_2^-$ の測定は、xanthine oxidase を加えてから 1 分後に開始した。

$\cdot\text{OH}$ は Fenton 反応により生成した。各試料溶液、DMPO (1.8 mM)、過酸化水素 (2 mM) および FeSO_4 (0.2 mM) を等量ずつ混合した。試料を電子スピン共鳴装置測定用のセルに入れ、電子スピン共鳴スペクトルの測定を行った。なお、 $\cdot\text{OH}$ の測定は、 FeSO_4 を加えてから 1 分後に開始した。

電子スピン共鳴装置 (JES-FA 200, JEOL, Tokyo, Japan) の測定条件は、以下の

ように設定した (center field 330 mT, sweep width 1.5×10 mT, sweep time 4 min, field modulation width 2×0.1 mT, amplitude 5.0×100 , time constant 0.3 s, microwave power 4.0 mW (DPPH ラジカル) または 8.0 mW ($\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$)。また, 電子スピン共鳴装置の測定ピークは標準物質であるマンガンの電子スピン共鳴スペクトルで補正した。DPPH ラジカル, $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ の存在量は電子スピン共鳴スペクトルの面積から算出し, そこから各試料の 50%阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration: IC_{50}) を算出した。

2-2-7 実験動物

すべての動物実験は, 岐阜薬科大学動物実験委員会に動物実験承認申請を行い, 許可を得て実施した。また, 「視覚および眼科研究における動物の使用についての ARVO 宣言 (The Association for Research in Vision & Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)」に準じて実験動物を使用した。7 週齢雄性 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。動物は自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用いて飼育した。

2-2-8 可視光誘発マウス網膜障害

マウスを 24 時間完全な暗室で飼育し暗順応させた。光照射 30 分前に 1%シクロペントレート (Santen, Osaka, Japan) により散瞳させた後, 鏡張りの光障害モデル作製装置の中で白色蛍光灯 (Toshiba, Tokyo, Japan) を用いて, 8,000 lux の光環境下で 3 時間マウスを飼育することにより網膜障害を惹起した。PRE (10 $\mu\text{g}/\text{eye}$) は, 光照射 2 時間前に硝子体内投与により作用を検討した。投与 5 日後に眼球を摘出し, 組織評価を行った。

2-2-9 組織評価

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を 2 μ l 硝子体内投与し、同液にて 24 時間固定した。ついで 70% エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エタノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間 \times 2 回、キシレン 2 時間 \times 2 回、キシレン 12 時間、融解パラフィン 2 時間 \times 2 回、融解パラフィン 12 時間の順に浸透させた。その後、パラフィンにて眼球を包埋し、マイクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、5 μ m の切片を作製し、スライドグラス (Matsunami, Osaka, Japan) にのせ 37°C にて一晩乾燥し、室温にて保存した。ヘマトキシリン - エオジン染色は、まず初めにパラフィン切片をキシレンに浸してパラフィンを洗浄した。続いて段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ヘマトキシリン液に 2 分間、エオジン液に 5 分間浸して、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透徹しオイキットを用いて封入した。網膜障害の評価は、各サンプルにつき 3 切片を任意に抽出し、視神経乳頭中心から 240 μ m 間隔における耳側および鼻側の外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚さを測定し評価を行った。

2-3 統計学的解析

実験結果はすべて平均 \pm 標準誤差で表し、危険率 5%以下を有意とした。統計学的解析は Dunnett's test および Student's *t*-test を用いて行った。

第3節 結果

3-1 可視光誘発視細胞障害に対する黒米エキスおよびその成分の作用

初めに PRE およびその主要成分の可視光誘発視細胞障害に対する作用を、水溶性テトラゾリウムである WST-8 を発色試薬として用いる WST-8 assay により評価した。可視光照射によって視細胞 (661W) の生存率は 22-57%までに低下した(Fig. 5)。黒米エキス (PRE; 10-30 $\mu\text{g/ml}$) は可視光誘発視細胞障害に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用を示した (Fig. 5)。また、PRE の構成成分である cyanidin (10-30 μM) および peonidin (10-30 μM) においても有意な抑制作用が認められた (Fig. 5)。代表的な抗酸化剤である trolox (10-30 μM) にも有意な抑制作用が認められた (Fig. 5)。つづいて、Hoechst 33342 および PI を用いて核染色を行い、死細胞率を測定した。可視光照射によって 661W の死細胞率は 12%までに増加した(Fig. 6)。PRE (10-30 $\mu\text{g/ml}$) は、可視光誘発細胞死に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用を示した (Fig. 6)。また、PRE の構成成分である cyanidin (10-30 μM) および peonidin (10-30 μM) においても有意な細胞死抑制作用が認められた (Fig. 6)。Trolox (30 μM) も有意な抑制作用が認められた (Fig. 6)。また、これらの濃度における PRE, cyanidin, peonidin および trolox の単独添加は、661W に対する明らかな影響は認められなかった。

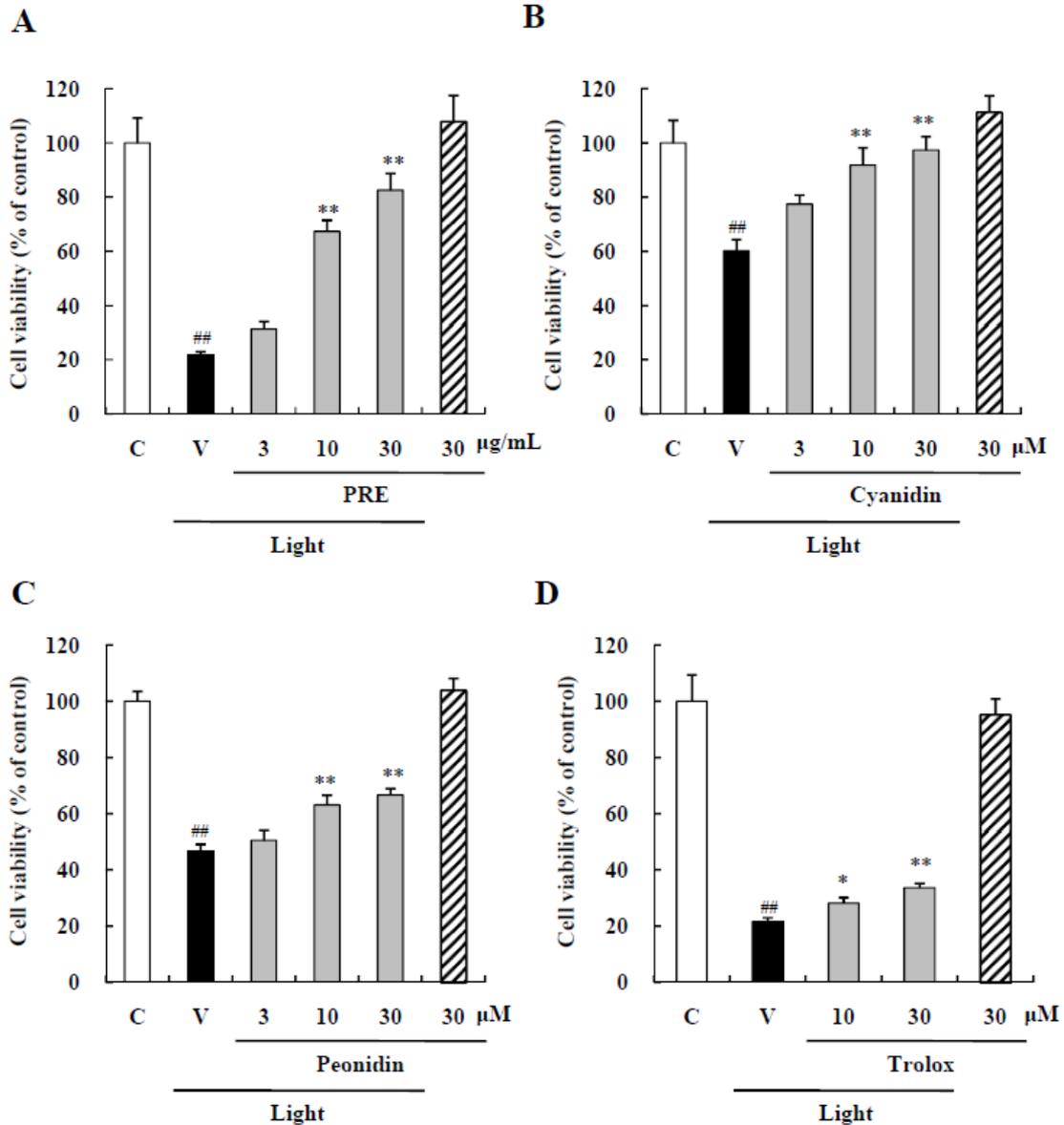


Fig. 5 Effects of PRE and its anthocyanin constituents on visible light-induced 661W cell death, as determined by WST-8 assay.

Cells were cultured in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well, and then incubated for a total of 48 h at 37°C in 5% CO₂. Cell viability was assessed by immersing cells in CCK-8 for 3 h at 37°C, with photometric data being recorded at 492/660 nm. (A-D) Effects of PRE, cyanidin, peonidin, and trolox on light-induced 661W cell death. The last column in each figure show data obtained following the application of each drug alone but without light exposure. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6$). C, control; V, vehicle. ^{##}, $p < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{*}, $p < 0.05$, ^{**}, $p < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

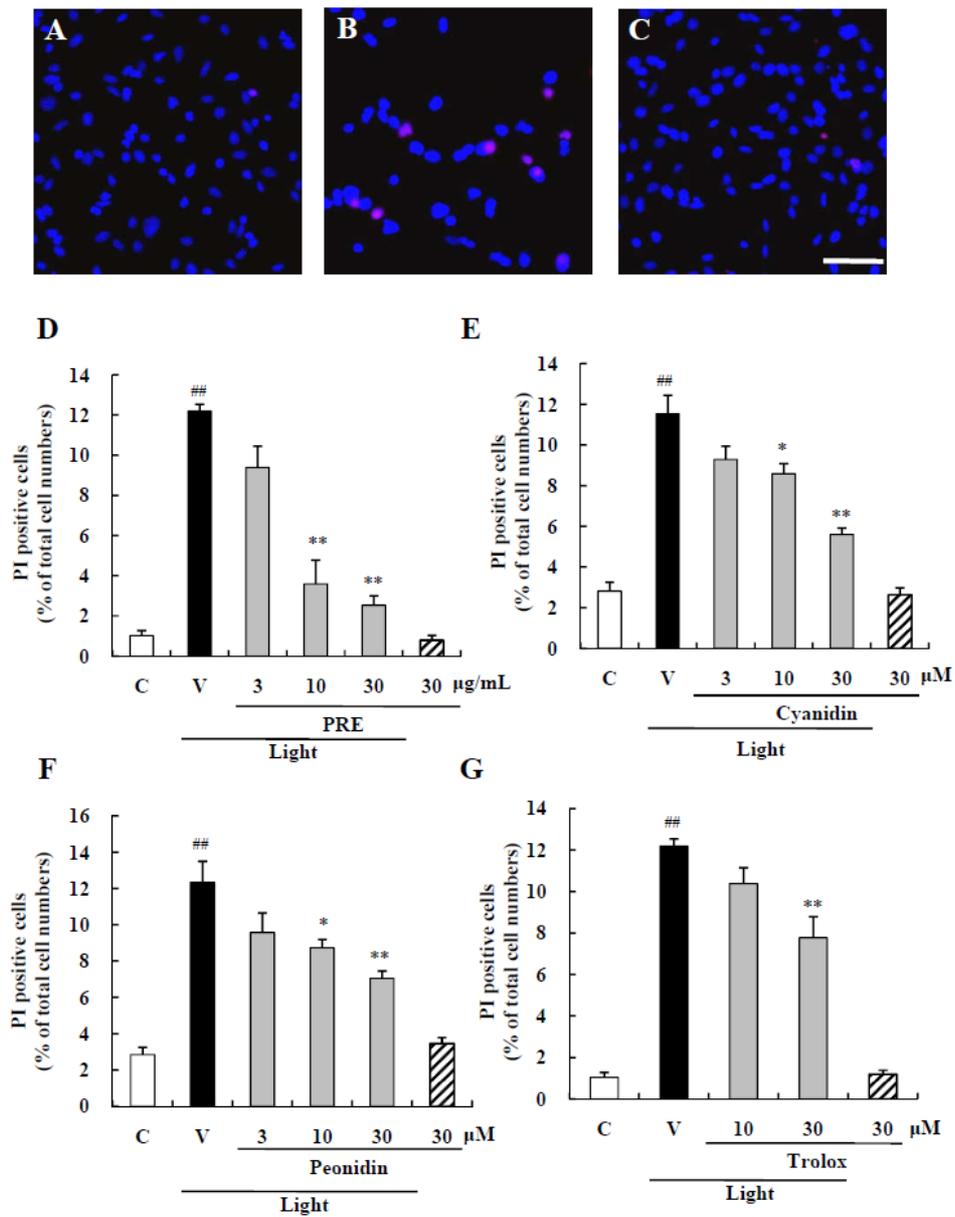


Fig. 6 Effects of PRE and its constituents on photoreceptor cell damage induced by light in 661W cells.

(A-C) Representative fluorescence microscopy of Hoechst 33342 staining at 24 h after light exposure. (A) Nontreated cells showed normal nuclear morphology. (B) Light-induced cell death, with cells showing nuclear condensation. (C) Pretreatment with PRE at 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduced nuclear condensation. (D-G) The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of PI to Hoechst 33342. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 5$ or 6). C, control; V, vehicle. ^{##}, $p < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{*}, $p < 0.05$, ^{**}, $p < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test). The scale bar (C) represents 100 μm .

3-2 可視光誘発視細胞の ROS 産生に対する黒米エキスおよびその成分の作用

黒米エキス (PRE) および主要成分の可視光誘発視細胞死抑制作用の作用機序を明らかにするために、CM-H₂DCFDA を用いて ROS 産生に対する作用を検討した。CM-H₂DCFDA は細胞透過性の無色の物質で、細胞内へ入り込むと細胞内のエステラーゼによりジアセテート (diacetate) 部位が分解され、CM-H₂DCF となり二度と細胞外へ放出されない性質を有している。細胞内の CM-H₂DCF が ROS と反応すると緑色の蛍光を発する。この蛍光強度を測定することで視細胞 (661W) 内の ROS 産生率を計測した。その結果、PRE (3-30 µg/ml) は、661W 内における可視光誘発 ROS の発生を濃度依存的かつ有意に抑制した (Fig. 7)。また、PRE の構成成分である cyanidin (3-30 µM) および peonidin (3-30 µM) は、有意な ROS 産生抑制作用を示した (Fig. 7)。Trolox (30 µM) も有意な抑制作用が認められた (Fig. 7)。

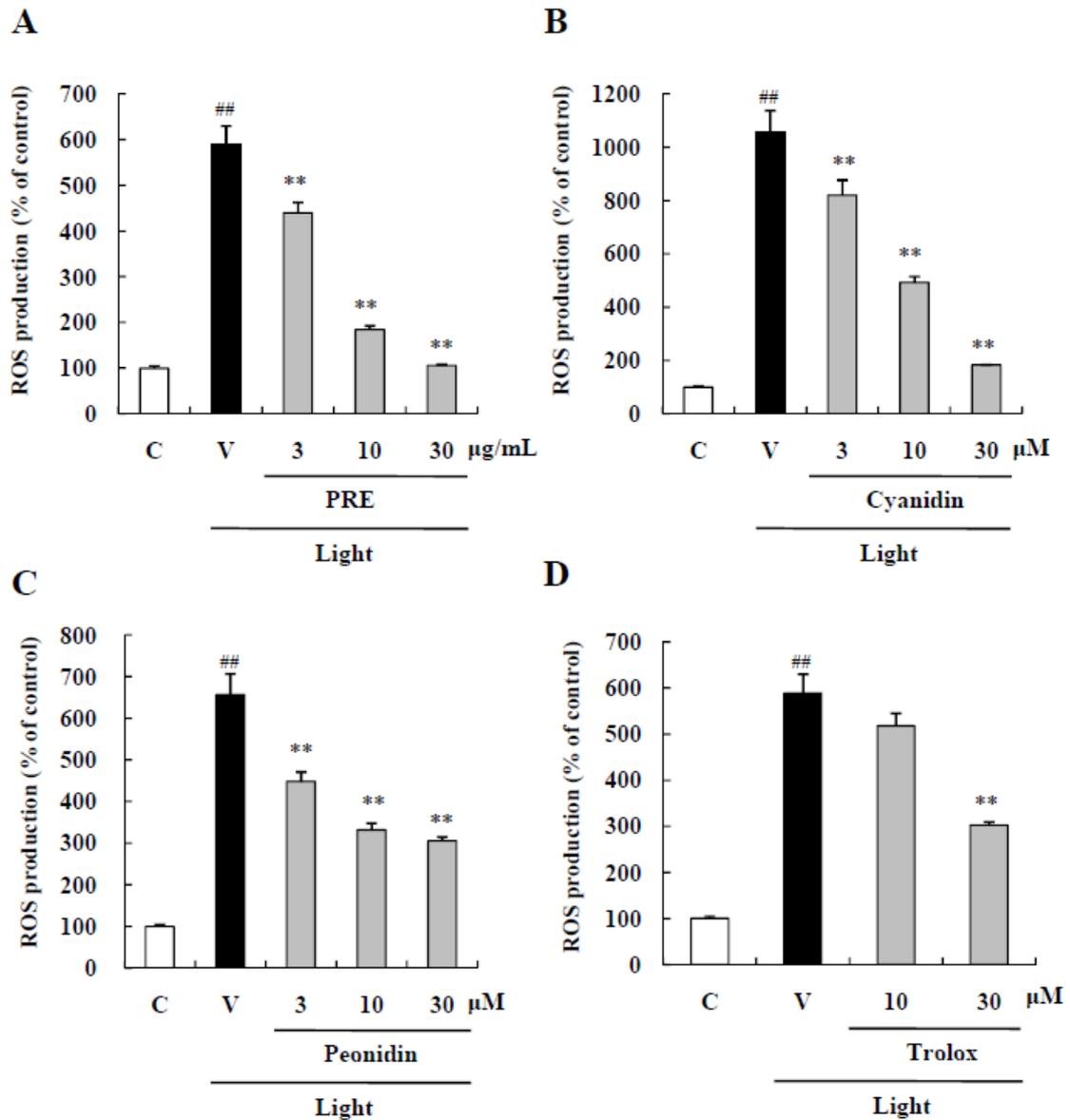


Fig. 7 Effects of PRE and its constituents on light-induced production of ROS.

Intracellular ROS levels were determined by measuring the fluorescence of CM-H₂DCFDA (at excitation 488 nm/emission 525 nm) after light exposure at 24 h in 661W. (A-D) Effects of PRE, cyanidin, peonidin, and trolox on light-induced intracellular radical activation. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6-8$). C, control; V, vehicle. ^{##}, $p < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{**}, $p < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

3-3 電子スピン共鳴装置を用いた DPPH ラジカル、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ の測定

黒米エキス (PRE) および主要成分の可視光誘発視細胞死抑制作用のさらなる作用機序解明のために、電子スピン共鳴装置を用いて DPPH ラジカル、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ に対する作用を検討した。その結果、PRE, cyanidin, peonidin および trolox に DPPH ラジカル消去活性が認められ、その IC_{50} 値はそれぞれ $14.9 \mu\text{g/mL}$, $32.3 \mu\text{M}$, $25.9 \mu\text{M}$ および $31.2 \mu\text{M}$ であった (Table 1)。測定した DPPH ラジカルの電子スピン共鳴スペクトルの典型例を figure 8 に示した。電子スピン共鳴スペクトルはフリーラジカルの種類によって決まった吸収スペクトルを示すが、DPPH ラジカルの電子スピン共鳴スペクトルは、特徴的な 3 本の吸収スペクトルが検出された (Fig. 8)。また、330 および 340 mT 付近には補正用に用いられるマンガンの吸収スペクトルが検出された (Fig. 8)。つづいて、 $\cdot\text{O}_2^-$ に対する作用を検討した結果、PRE, cyanidin, peonidin および trolox は $\cdot\text{O}_2^-$ 消去活性を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ $17.8 \mu\text{g/mL}$, $40.5 \mu\text{M}$, $39.6 \mu\text{M}$ および $522.5 \mu\text{M}$ であった (Table 1)。また、測定した $\cdot\text{O}_2^-$ の電子スピン共鳴スペクトルの典型例を figure 8 に示した。 $\cdot\text{O}_2^-$ の電子スピン共鳴スペクトルは、特徴的な 2 本の吸収スペクトルが検出された (Fig. 8)。最後に $\cdot\text{OH}$ に対する作用を検討した結果、PRE および trolox は $\cdot\text{OH}$ 消去活性を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ $84.3 \mu\text{g/mL}$ および $503.2 \mu\text{M}$ であった (Table 1)。一方、cyanidin および peonidin は明らかな $\cdot\text{OH}$ 消去活性を示さなかった。また、測定した $\cdot\text{OH}$ の電子スピン共鳴スペクトルの典型例を figure 8 に示した。 $\cdot\text{OH}$ の電子スピン共鳴スペクトルは、特徴的な大小異なる 2 本の吸収スペクトルが検出された (Fig. 8)。

Table 1. DPPH radical, $\cdot\text{O}_2^-$, and $\cdot\text{OH}$ scavenging activity of PRE and its constituent anthocyanins

Treatments	Unit	Radical scavenging activity, IC_{50} (95% confidence limits)		
		DPPH	$\cdot\text{O}_2^-$	$\cdot\text{OH}$
PRE	$\mu\text{g/mL}$	14.9 (13.2-16.9)	17.8 (14.8-22.3)	84.3 (67.9-111.5)
Cyanidin	μM	32.3 (26.0-40.3)	40.5 (33.4-50.3)	> 1000
Peonidin	μM	25.9 (21.3-31.9)	39.6 (32.4-49.4)	> 1000
Trolox	μM	31.2 (25.8-39.2)	522.5 (453.0-615.4)	503.2 (394.4-684.9)

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, PRE: purple rice extract

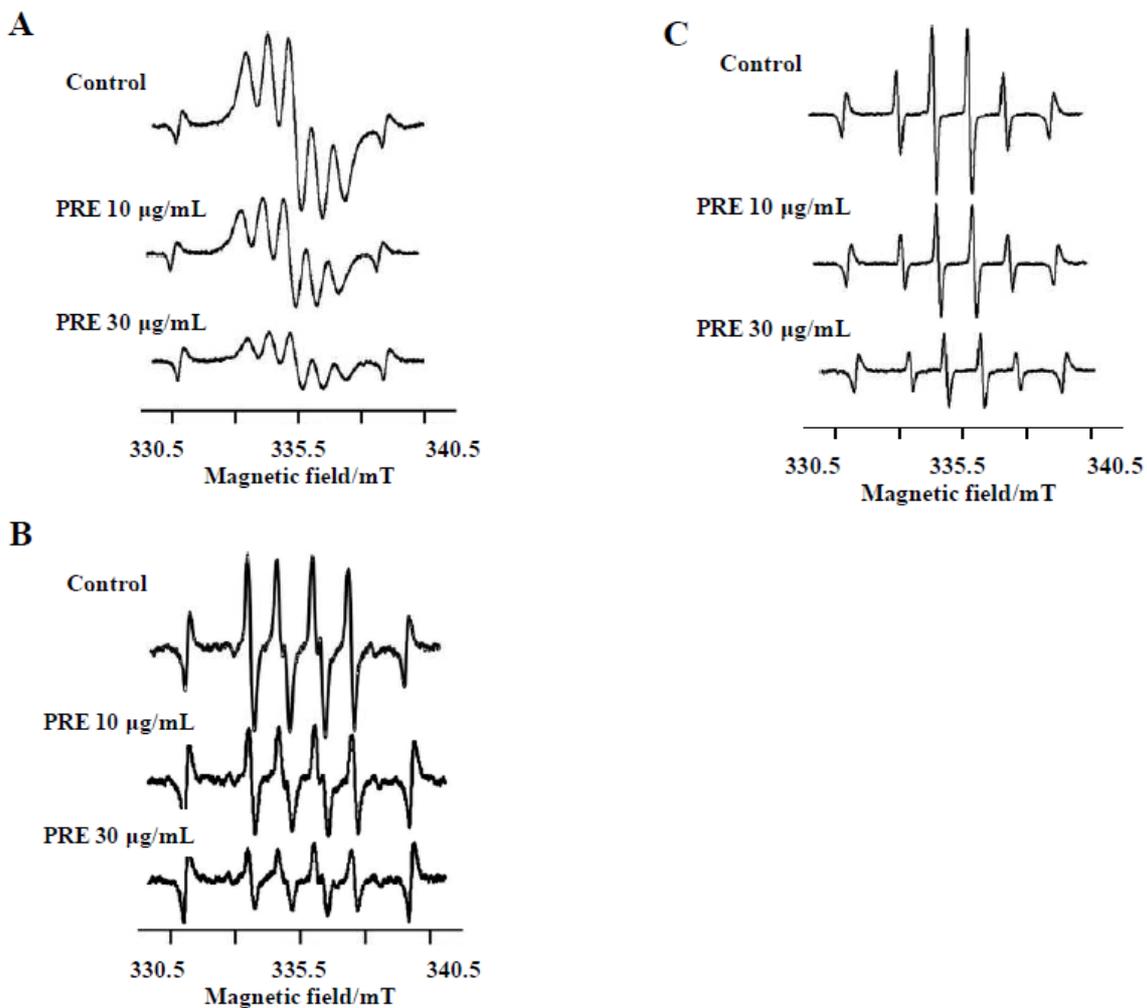


Fig. 8 Representative ESR spectra of the DPPH radical, $\cdot\text{O}_2^-$, and $\cdot\text{OH}$.

(A) The antioxidant effect of PRE at 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ against ESR spectra of DPPH radical.

(B) The antioxidant effect of PRE at 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ against ESR spectra of $\cdot\text{O}_2^-$.

(C) The antioxidant effect of PRE at 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ against ESR spectra of $\cdot\text{OH}$.

3-4 可視光誘発マウス網膜障害に対する黒米エキスの作用

マウスへの可視光照射 (白色光, 8,000 lux, 3 時間) は, 正常網膜と比較して光照射 5 日後に外顆粒層 (ONL) が有意に萎縮した (Fig. 9)。黒米エキス (PRE; 10 $\mu\text{g}/\text{eye}$) 投与群は, 可視光照射による ONL の萎縮を有意に抑制した (Fig. 9)。

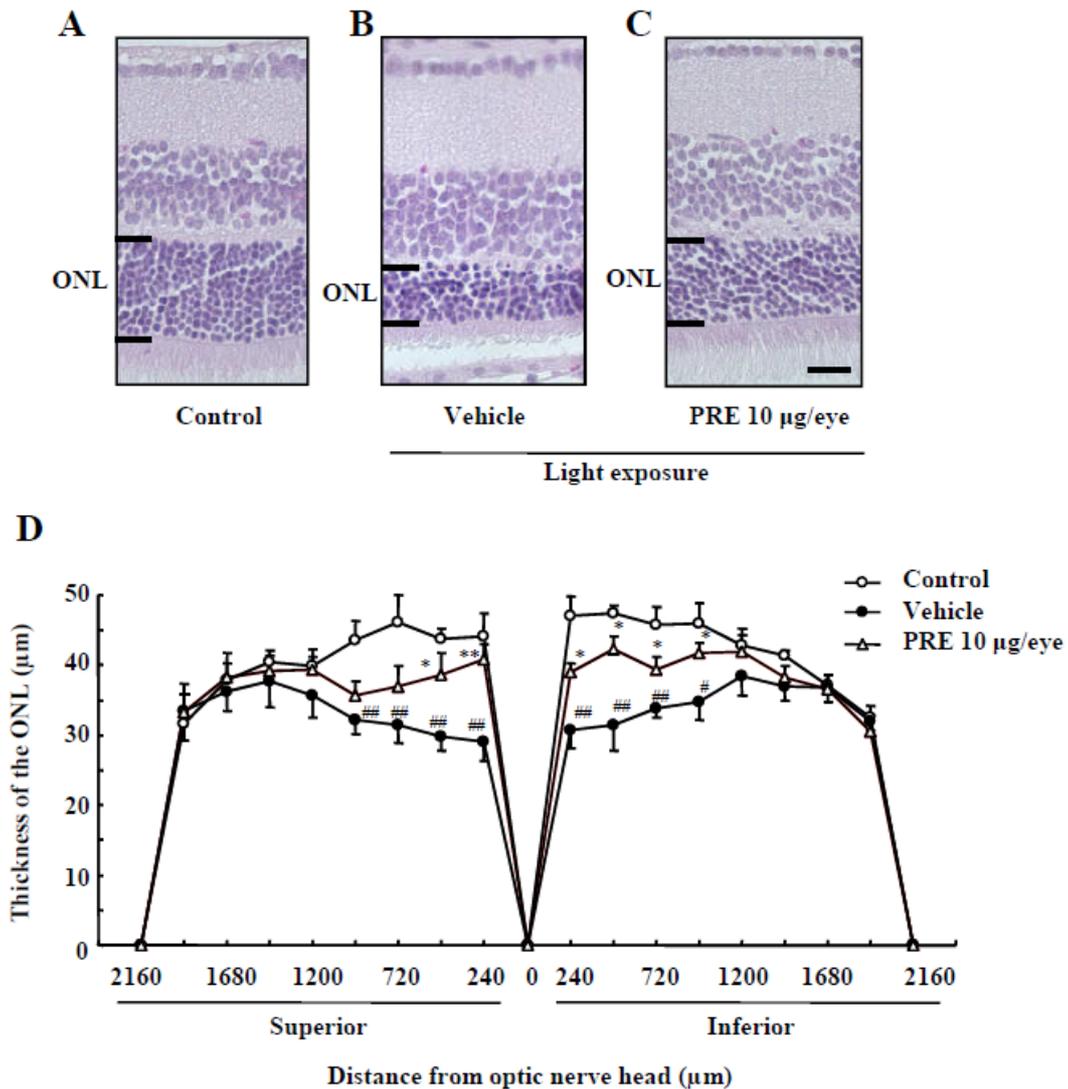


Fig. 9 Effects of PRE on retinal damage induced by exposure to light in mice.

(A) Nontreated, (B) Light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated, and (C) Light exposure plus PRE-treated (10 $\mu\text{g}/\text{eye}$) retinal cross sections at 5 days after light exposure in mice. (D) Measurement of the thickness in the outer nuclear layer (ONL) at 5 days after light exposure. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 5$ or 6). #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$ versus control, and *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ versus vehicle (Student's t -test). The scale bar (C) represents 25 μm .

第4節 考察

本研究では、黒米エキス (PRE) およびその主要成分である cyanidin および peonidin, またビタミンE誘導体 trolox は、マウス視細胞 (661W) における可視光誘発視細胞障害に対する抑制作用を示した。これまでの研究において、cyanidin (10 μ M) は VEGF 誘発血管新生抑制 (Matsunaga *et al.*, 2010b) および SIN-1 誘発網膜神経節細胞死抑制作用を有することが明らかにされている (Matsunaga *et al.*, 2009)。代表的な抗酸化剤である trolox (10 μ M) は、網膜神経節細胞における過剰な可視光照射誘発細胞死に対して保護作用を示し、その作用機序として ROS の関与が示唆されている (Wood *et al.*, 2007)。これらの知見に基づいて、アントシアニン (3-30 μ M) および trolox (10-30 μ M) の *in vitro* 評価を行った。

661W は、可視光に対する光受容体細胞として *in vitro* モデルに広く使用され、可視光誘発の細胞死経路を示す事より、*in vivo* における視細胞と同様な評価ができる (Krishnamoorthy *et al.*, 1999)。本試験における 661W に対する白色蛍光灯照射 (2,500 lux, 24 時間) は、fig. 5 および 6 に示すようにアポトーシス等の細胞障害が認められた。PRE, cyanidin, peonidin および trolox は、可視光誘発視細胞死に対して抑制作用を示した。これまでの報告で、cyanidin および cyanidin glycoside (glucoside, galactoside および arabinoside) は、青色光誘発 A2E 酸化に対する保護作用を示し、さらに cyanidin galactoside は、青色光誘発の A2E 含有網膜色素上皮細胞障害に対する抑制作用を示す (Jang *et al.*, 2005) ことが報告されている。それ故に、PRE の可視光誘発視細胞死抑制作用に関する活性成分として cyanidin および peonidin の関与が示唆された。

過剰な光照射は、網膜機能障害を誘発する事が知られている (Noell *et al.*, 1966; LaVail *et al.*, 1987)。そこで、可視光誘発マウス網膜障害に対する PRE の作

用について HE 染色による評価を行った。光照射 5 日後、生理食塩水投与マウス (溶媒投与群) は、外顆粒層 (ONL) 厚の萎縮が認められた。これに対して PRE の硝子体内投与は可視光誘発網膜障害 (ONL 厚の萎縮) を抑制した。以前の報告で光照射は ONL におけるアポトーシスを引き起こし (Abler *et al.*, 1996), そのアポトーシスは ascorbic acid (Li *et al.*, 1985; Organisciak *et al.*, 1985), dimethylthiourea (Organisciak *et al.*, 1992) および thioredoxin (Tanito *et al.*, 2002) 等の抗酸化剤によって抑制された。光誘発細胞死の主な作用としてアポトーシス経路や ROS 産生の関与が知られている (Krishnamoorthy *et al.*, 1999)。 H_2O_2 , $\cdot O_2^-$ および $\cdot OH$ 等の ROS は、転写因子活性 (Schreck *et al.*, 1991), 遺伝子発現 (Lo *et al.*, 1995) および細胞増殖 (Murrell *et al.*, 1990) を含む多くの重要な細胞機能の調節に関与している。しかしながら、過剰な ROS 産生は様々な細胞において細胞死を惹起する (Wolfe *et al.*, 1994)。661W の ROS レベルは溶媒投与群において光照射 24 時間後で増加し、PRE, cyanidin, peonidin および trolox 処理により抑制された (Fig. 7)。Cyanidin は、ラット肝 Clone 9 細胞において、グルタチオン関連酵素の活性化および H_2O_2 誘発 caspase-3 の活性化阻害作用による細胞内酸化活性を高める事が報告されている (Shih *et al.*, 2007)。以上の結果より、PRE および含有アントシアニンの可視光誘発網膜障害抑制作用に細胞内 ROS 産生抑制が関与している事が示唆された。また、cyanidin および peonidin は、PRE の可視光誘発細胞内 ROS 産生に対する抑制作用の活性成分の一つであると考えられる。

MAP (mitogen-activated protein)キナーゼカスケードは、MAPKKK-MAPKK-MAPK という 3 種類の蛋白質リン酸化酵素によって構成されるシグナル伝達であり、酵母からヒトに至る全ての真核生物に相同な分子が存在する細胞内情報伝達の根幹をなす。MAPK 経路の制御異常が起こると、癌、アレルギー、自己

免疫疾患，糖尿病および神経変性疾患（アルツハイマー病，パーキンソン病等）等の疾病を引き起こすことが知られている。代表的な MAPK である JNK および p38 の活性化は，虚血，紫外線照射および酸化ストレス等の様々なストレスによって惹起され，細胞分化およびアポトーシスに関与している。Yang らの報告により，*in vitro* 網膜光障害において MAPK が活性化されることが明らかにされている (Yang *et al.*, 2007)。また，*in vivo* 網膜光障害モデルにおいても p38, JNK および ERK 1/2 が光照射により活性化される (Imai *et al.*, 2010)。さらに，activator protein-1 (AP-1) は可視光誘発の網膜変性における重要な因子である (Grimm *et al.*, 2000)。AP-1 は，Fos および Jun ファミリータンパク質のヘテロダイマーまたは Jun ファミリーのホモ二量体のいずれかで構成される複合体である。光照射はマウス網膜における AP-1 の活性化を誘導し，そしてそれらの複合体は，主に c-Fos および c-Jun タンパク質から構成されている。さらに，網膜色素上皮細胞において AP-1 は，JNK および p38 による c-Jun および c-Fos のリン酸化を通じて活性化される (Roduit *et al.*, 2008)。これらの報告より，マウス網膜における p38 または JNK を介しての AP-1 の活性化は，可視光誘発視細胞死に深く関与していると考えられる。Cyanidin-3-*O*-glucoside は，JB6 細胞において紫外線 (UV) 誘発の ERK, JNK, p38 および AP-1 の活性化を抑制する (Ding *et al.*, 2006)。したがって，cyanidin-3-*O*-glucoside を含有する PRE は，p38 および JNK のリン酸化を抑制する事による AP-1 活性化阻害作用が期待できる。しかしながら，可視光誘発マウス網膜障害における正確な作用機序解明のためには更なる研究が必要である。

最後に，PRE の可視光誘発視細胞死抑制作用における，抗酸化機能の関与を調べるために ESR を用いて，PRE および構成成分のラジカル捕捉活性を評価した。ESR は，不対電子が特定周波数下において，マイクロ波を吸収する性質を

利用して金属原子やフリーラジカル中の不対電子を検出する方法である。この方法は、superoxide dismutase (SOD) を用いた酵素的な検出法以外ではフリーラジカルの存在を証明する唯一の方法である。また、ESR は不対電子を直接検出するため、試料中の有色成分の影響を受けることなくフリーラジカルの測定が可能である。過剰な光照射は、活性酸素種を含む多量の ROS を誘発するが、その産生は SOD のような網膜防御機構によって抑制される (Dong *et al.*, 2006)。本試験において、PRE は trolox と比較して、DPPH ラジカル、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ に対する強い捕捉活性が認められた。PRE は以前にも trolox よりも 10~25 倍強い $\cdot\text{O}_2^-$ 捕捉活性を有することが報告されている (Ichikawa *et al.*, 2001)。また、PRE は HepG2 細胞において $\cdot\text{O}_2^-$ および ROS を抑制し、結果として SOD およびカタラーゼ活性を増加させる (Chiang *et al.*, 2006)。Cyanidin および peonidin もまた trolox と比較して、DPPH ラジカルおよび $\cdot\text{O}_2^-$ に対する強い捕捉活性を示したが $\cdot\text{OH}$ に対する捕捉活性は trolox よりも弱かった。したがって、これらのアントシアニジンは、PRE の $\cdot\text{OH}$ 捕捉活性に関与しておらず、他のポリフェノール化合物の関与が示唆される。Han らは、PRE より oryzafuran, quercetin および protocatechuic acid を単離し、これらの化合物が ascorbic acid より強い DPPH ラジカル捕捉活性を示す事を明らかにしている (Han *et al.*, 2004)。Quercetin および protocatechuic acid も同様に、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ 捕捉活性を示す (Mahakunakorn *et al.*, 2004; Ohsugi *et al.*, 1999)。よって、cyanidin および peonidin は、PRE の活性成分の一部であり、PRE 中の他のポリフェノール成分との相乗・相加作用に関する更なる研究が必要である。以上、これらの知見は、PRE が強い抗酸化活性を示す事で可視光誘発の $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ を含むフリーラジカルを除去し、結果的に視細胞死に対する保護作用が明らかとなった。

本研究から、PRE およびその活性成分であるアントシアニジン (cyanidin およ

び peonidin) が, *in vitro* および *in vivo* の両方で, 可視光誘発視細胞変性に対する網膜細胞保護作用を示すことを明らかにした。光誘発網膜障害モデルは, ドライ型萎縮性 AMD の優れたモデルの一つであるので (Marc *et al.*, 2008), PRE は, 網膜疾患の予防のための機能性食品として有用性が示唆された。次章では, さらに PRE の新規機能性を探索するため, 近年, 神経変性疾患や糖尿病および緑内障の病態作用機序において関与が示唆されている小胞体ストレスに注目し, 網膜神経節細胞を用いて小胞体ストレス誘発細胞死に対する PRE の作用を検討した。

第2章 小胞体ストレス誘発網膜障害に対する黒米エキスおよびその構成成分の作用

第1節 緒言

小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) は、タンパク質の折りたたみや切断、ジスルフィド結合、糖鎖修飾等のタンパク質の成熟に関わるプロセッシングや細胞内の Ca^{2+} レベルの制御に関わる細胞内小器官である (Rao *et al.*, 2004)。小胞体内腔に折りたたみ不全のタンパク質 (unfold protein) が蓄積すると、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる小胞体ストレス応答機構が活性化する。これら小胞体ストレスのシグナル伝達経路として、小胞体膜上に存在する inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK) および activating transcription factor 6 (ATF6) の小胞体ストレスセンサー分子が異常タンパク質の蓄積を核内に伝える。核内では、小胞体ストレスを回避するために 70 kDa の heat shock protein ファミリーである immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) 等の分子シャペロンが誘導され、タンパク質修復が行われる (Katayama *et al.*, 2001)。また、これまでのいくつかの報告で、細胞内での BiP の誘導は小胞体ストレス誘発の神経細胞死を抑制する事が明らかとなっている (Gao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003)。しかしながら、この修復プロセスを上回る過剰な折りたたみ不全のタンパク質が蓄積すると、UPR が活性化し C/EBP homologous protein (CHOP) と呼ばれる転写因子を発現誘導させ、最終的に細胞死を誘導することが知られている (Wang *et al.*, 1996) (Fig. 10)。一方、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンは、カスパーゼ 2 および 9 のようなイニシエーター・カスパーゼを含むカスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導する (Cheung *et al.*, 2006)。カスパーゼ 2 は、カスパーゼ 3 の活性化に先行する初期のイベントであり、カスパーゼ

基質ポリ ADP- リボースポリメラーゼを切断し、細胞死を招く。以上の事より、カスパーゼ 3 の活性化を介した細胞死経路は小胞体ストレス誘発細胞死において重要な役割担っている。このような小胞体ストレスと病態の関係はこれまでに数多く報告されており、代表的なものとしてアルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病および緑内障などの神経変性疾患や糖尿病および動脈硬化症などに関与することが報告されている (Katayama *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2002; Oyadomari *et al.*, 2002; Joe *et al.*, 2003; Gould *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2011)。

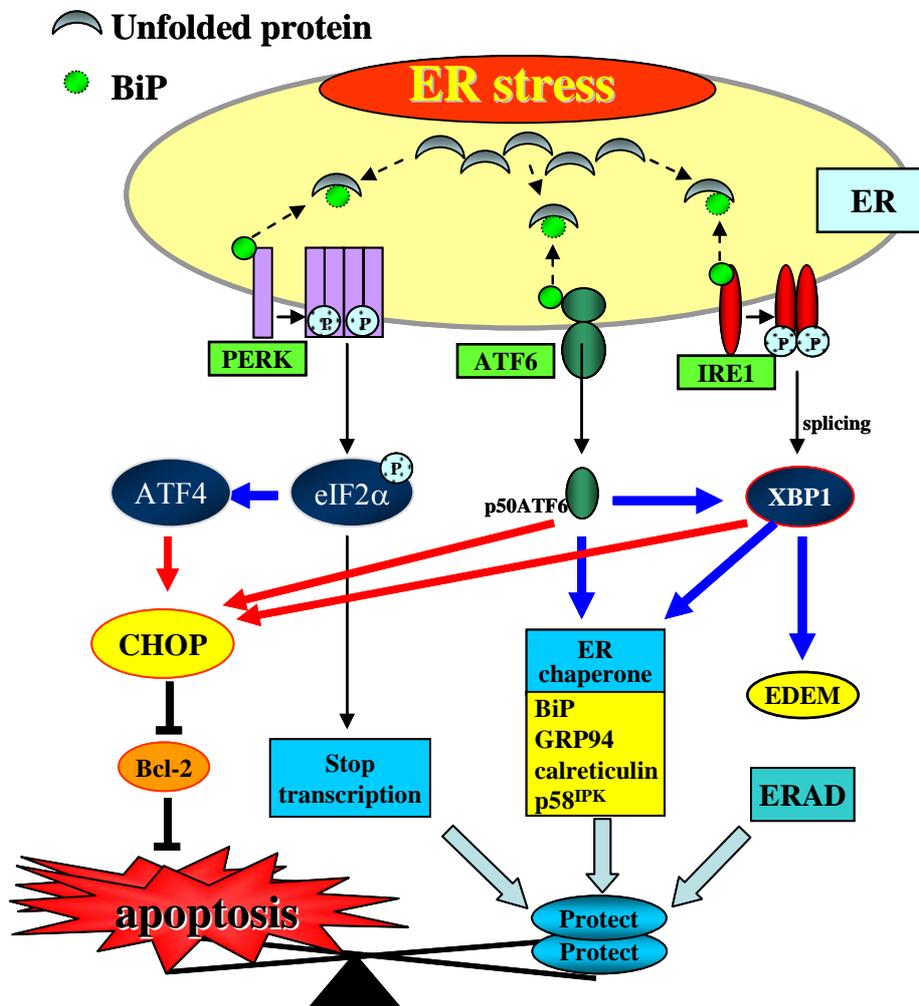


Fig. 10 Endoplasmic reticulum stress pathway.

ER: endoplasmic reticulum, PERK: PKR-like ER kinas, ATF: activating transcription factor, IRE1: inositol-requiring enzyme 1, XBP1: X-box-binding protein-1, BiP: immunoglobulin heavy chain-binding protein, CHOP: C/EBP homologous protein.

網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) 死は、緑内障などの多くの眼疾患の共通の特徴である。緑内障は酸化ストレス、興奮性アミノ酸 (グルタミン酸) 産生および小胞体ストレスなどの様々なメカニズムによって引き起こされる (Bonne *et al.*, 1998; Atlante *et al.*, 2001; Inokuchi *et al.*, 2009)。さらに、これまでの報告で、糖尿病網膜症および網膜色素変性症等の網膜変性モデルにおける小胞体ストレスの関与が示されている (Roybal *et al.*, 2004; Inokuchi *et al.*, 2009; Shimazawa *et al.*, 2007a,b; Ito *et al.*, 2011)。

フラボノイドの一種である chrysin は、ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞における小胞体ストレス誘発細胞死に対して保護作用を示す (Izuta *et al.*, 2008)。したがって、同様にフラボノイドの一種である cyanidin を豊富に含有する黒米エキスも小胞体ストレスによる網膜障害に対して保護作用が期待できるかもしれない。そこで、本研究では、黒米エキスおよびその含有成分の過酸化水素誘発およびツニカマイシンによる小胞体ストレス誘発細胞死に対する作用を網膜神経節細胞腫 (RGC-5) を用いて検討した。さらに、ツニカマイシン硝子体内投与によるマウス網膜障害に対する黒米エキスの作用についても併せて検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

シアニジン 3-*O*-グルコシド (cyanidin 3-*O*-glucoside), ペオニジン 3-*O*-グルコシド (peonidin 3-*O*-glucoside), シアニジン (cyanidin), ペオニジン (peonidin) デルフィニジン (delphinidin) およびマルビジン (malvidin) は, Extrasynthese (Genay Cedex, France), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は, Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan), 過酸化水素およびツニカマイシン(tunicamycin)は, Wako Pure Chemical Co., Ltd. (Osaka, Japan), radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer, protease inhibitors cocktail, phosphatase inhibitors cocktail 1, phosphatase inhibitors cocktail 2 および mouse anti- β -actin antibody は, Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA), BCA Protein Assay Kit, SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate および goat anti-mouse antibody horseradish peroxidase-conjugated は, Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA), Mouse anti-BiP/GRP78 antibody は BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), Mouse anti-Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible 153 (B-3) は, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), CaspACE[™] Fluorometric Assay System は, Promega Co. (Madison, WI, USA)よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 黒米エキス (PRE) の抽出

黒米糠 (100 g) は *n*-hexane (500 ml) で脱脂した。室温で脱脂黒米糠を乾燥後, 50%エタノール (500 ml, 50°C) で2時間抽出した。抽出液をろ過後, 濃縮・乾固して抽出物を得た。その抽出物を DIAION HP-20 column (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan) に吸着させ, 水で洗浄した。その後, 70%エタノールで溶出さ

せ、溶出液を濃縮・乾固し黒米エキス (PRE) 2.8 g を得た。

2-2-2 HPLC 分析

PRE 中のアントシアニン含量は、C18 カラム (Develosil ODS-UG-5, 4.6 mm *i.d.* × 250 mm, Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いて HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) にて分析した。移動相には 10%ギ酸 v/v (A) およびギ酸/アセトニトリル/メタノール/水 (10/22.5/22.5/45) (B) を用いた。グラジエント条件は、0 min, 90% (A), 10% (B) ; 40 min, 65% (A), 35% (B) を用いた。流量は 1 mL/min とし、測定には 520 nm の波長を用いた。PRE 中の cyanidin-3-*O*-glucoside および peonidin-3-*O*-glucoside の含量は、それぞれ 2.9% および 0.2% であった。

2-2-3 2-hydroxy-5-[(3*S*)-3-hydroxybutyl]phenyl-β-D-glucoside (HHPG) の単離・同定

PRE (150 g) を 50%メタノール (4 L) に溶解し、polyvinylpyrrolidone (PVPP particle, Shinwa Foods Chemical Co., Ltd. Tokyo, Japan, 600 g) を加えた。30分間攪拌混合後、ろ液より非吸着画分を得た。非吸着画分を濃縮・乾固した抽出物 (39 g) を 30%エタノール (100 ml) に懸濁した。その懸濁液を octadecyl silica (ODS, 300 g) column に吸着させ、30%エタノールで溶出した。溶出液を濃縮・乾固し粗抽出物 (3 g) を得た。粗抽出物を分取用 HPLC column (Inertsil, Prep-ODS, GL Science, Tokyo, Japan, φ20 mm×250 mm) にて精製し HHPG を得た。HHPG は NMR (¹H, ¹³C, DQF-COSY, HMQC, HMBC) スペクトルを用いて 2-hydroxy-5-[(3*S*)-3-hydroxybutyl]phenyl-β-D-glucoside として同定した (Fig. 11) (Shimoda *et al.*, 2007)。

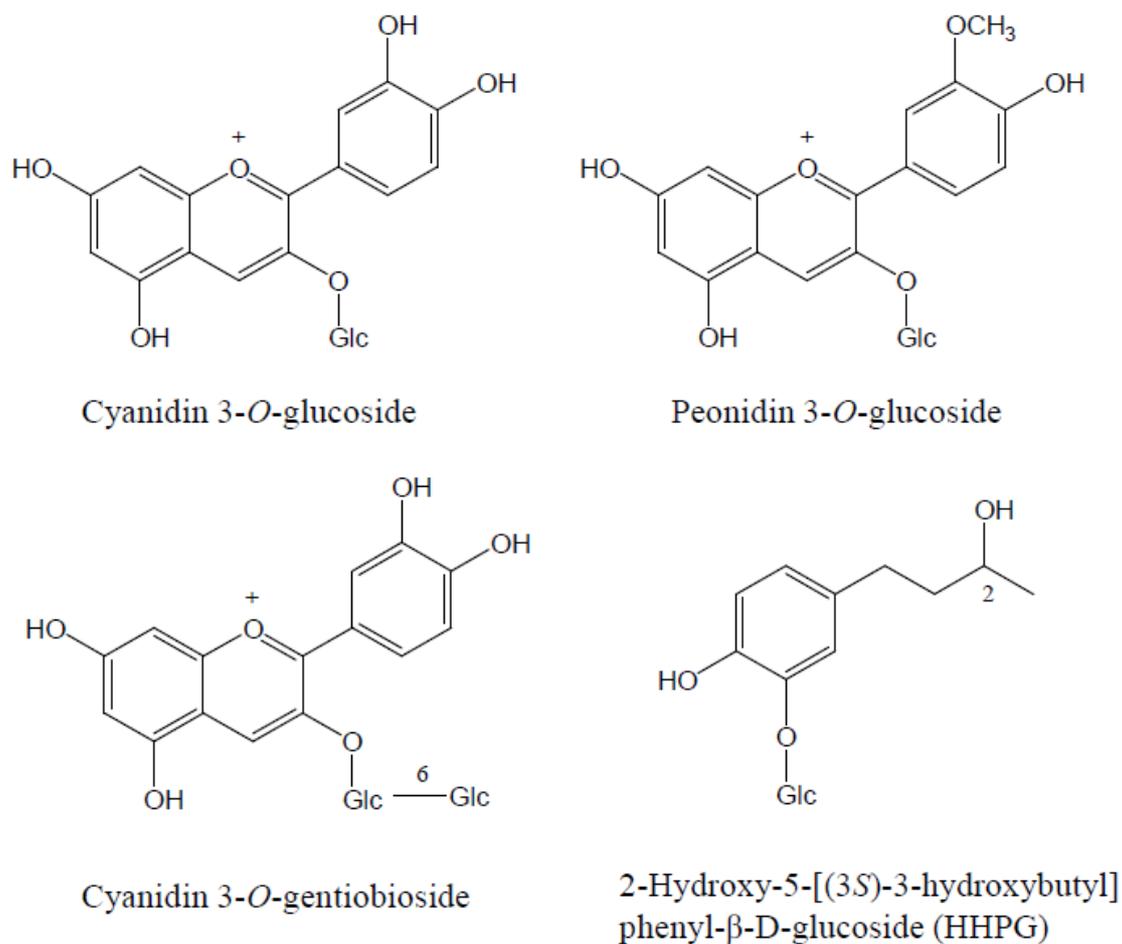


Fig. 11 Structures of compounds isolated from purple rice bran extract.

Glc: β-D-glucopyranosyl, 2-hydroxy-5-[(3S)-3-hydroxybutyl]phenyl-β-D-glucoside: HHPG

2-2-4 細胞培養

網膜神経節細胞 (retinal ganglion cells ; RGCs) のセルラインである RGC-5 は, Dr. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center, Fort Worth, TX, USA) より譲与された。RGC-5 は 10%FBS, ペニシリン (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 μg/ml) 含有 DMEM 培地で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。細胞は 3~4 日おきにトリプシン処理により継代した。

2-2-5 ツニカマイシンまたは過酸化水素誘発細胞死試験

RGC-5 を 1×10^4 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、1% FBS を含む DMEM 培地に置換し、各試料を添加して 1 時間培養後、ツニカマイシン (2.0 µg/ml) もしくは過酸化水素 (0.3 mM) 条件下で 24 時間培養した。生細胞数は WST-8 (Cell Counting Kit-8) を用いて、ホルマザンの測定を行った。492 nm (参照波長、660 nm) の波長を spectrophotometer (Varioskan; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いて測定し、ホルマザンの生成量から細胞数を計数した。

2-2-6 ウェスタンブロット

12-well plate に 5×10^4 cells/well の RGC-5 を播種し、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し、試料を添加して 1 時間培養後、ツニカマイシン (2.0 µg/ml) 条件下で 24 時間培養した。細胞を氷冷した PBS で洗浄後、protease inhibitor cocktail および phosphatase inhibitor cocktail I/II を含む RIPA buffer を加え、細胞抽出液を回収した。細胞抽出液は BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を定量後、10% 2-mercaptoethanol 含有 sample buffer に懸濁し、5 分間煮沸した。その後、10% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動した。1 次抗体 [抗 BiP/GRP78 抗体、抗 anti-GADD 153 (B-3) 抗体および抗 β アクチン抗体] および 2 次抗体を用いて抗体反応を行い、Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate で発色後、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で撮影した。BiP および CHOP のバンド強度は β アクチンを用いて補正した。

2-2-7 カスパーゼ 3 活性

カスパーゼ 3 活性の測定は、CaspACE[™] Assay System, Fluorometric を用いて

行った。10 cm ディッシュに 2×10^5 cells/ml の RGC-5 を播種し、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し、各試料を添加して 1 時間培養後、ツニカマイシン (2.0 $\mu\text{g/ml}$) 条件下で 24 時間培養した。細胞はトリプシン処理後に cell lysis buffer に懸濁した。細胞懸濁液は、CaspACE™ Assay 基質と 1 時間反応させた。蛍光は、492 nm/660 nm の励起/蛍光波長を spectrophotometer を用いて測定し、カスパーゼ 3 活性を算出した。

2-2-8 実験動物

すべての動物実験は、岐阜薬科大学動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を得て実施した。また、「視覚および眼科研究における動物の使用についての ARVO 宣言 (The Association for Research in Vision & Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)」に準じて実験動物を使用した。7 週齢雄性 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。動物は自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用いて飼育した。

2-2-9 ツニカマイシン誘発マウス網膜障害

マウスを 3% isoflurane (30% O₂, 70% N₂O) で麻酔し、その後、animal general anesthesia machine (Soft Lander; Sin-ei Industry Co. Ltd., Saitama, Japan) を用いて麻酔を 1.5% isoflurane で維持した。ツニカマイシン (1 μg) を角膜輪部より 33G 針を用いて硝子体内に投与することにより網膜障害を惹起させた。PRE は、硝子体内投与により作用を検討した。投与 7 日後に眼球を摘出し、組織評価を行った。

2-2-10 組織評価

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を 2 μ l 硝子体内投与し、同液にて 24 時間固定した。ついで 70% エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エタノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間 \times 2 回、キシレン 2 時間 \times 2 回、キシレン 12 時間、融解パラフィン 2 時間 \times 2 回、融解パラフィン 12 時間の順に浸透させた。その後、パラフィンにて眼球を包埋し、ミクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、5 μ m の切片を作製し、スライドグラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ 37°C にて一晩乾燥し、室温にて保存した。ヘマトキシリン - エオジン染色は、まず初めにパラフィン切片をキシレンに浸してパラフィンを洗浄した。続いて段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ヘマトキシリン液に 2 分間、エオジン液に 5 分間浸して、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透徹しオイキットを用いて封入した。網膜障害の評価は、各サンプルにつき 3 切片を任意に抽出し、視神経乳頭中心から 375~625 μ m の範囲 (250 μ m) における耳側および鼻側の視神経節細胞層 (ganglion cell layer: GCL) 中の細胞数、内網状層 (inner plexiform layer: IPL), 内顆粒層 (inner nuclear layer: INL) および外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚さを測定し評価を行った。

2-3 統計学的解析

実験結果はすべて平均 \pm 標準誤差で表し、危険率 5%以下を有意とした。統計学的解析は Dunnett's test および Student's *t*-test を用いて行った。

第3節 結果

3-1 過酸化水素誘発網膜神経節細胞障害に対する黒米エキスおよびその成分の作用

初めに黒米エキス (PRE) およびその主要成分の過酸化水素誘発網膜神経節細胞 (RGC-5) 障害に対する作用を検討した。過酸化水素の添加によって RGC-5 の生存率は 60%までに低下した。PRE (100 $\mu\text{g/ml}$) は過酸化水素誘発網膜神経節細胞障害に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用を示した (Fig. 12)。PRE の主成分である cyanidin (10-30 μM) においても有意な抑制作用が認められた (Fig. 12)。また、これらの濃度における PRE および cyanidin の単独添加は、RGC-5 に対する明らかな作用は認められなかった。

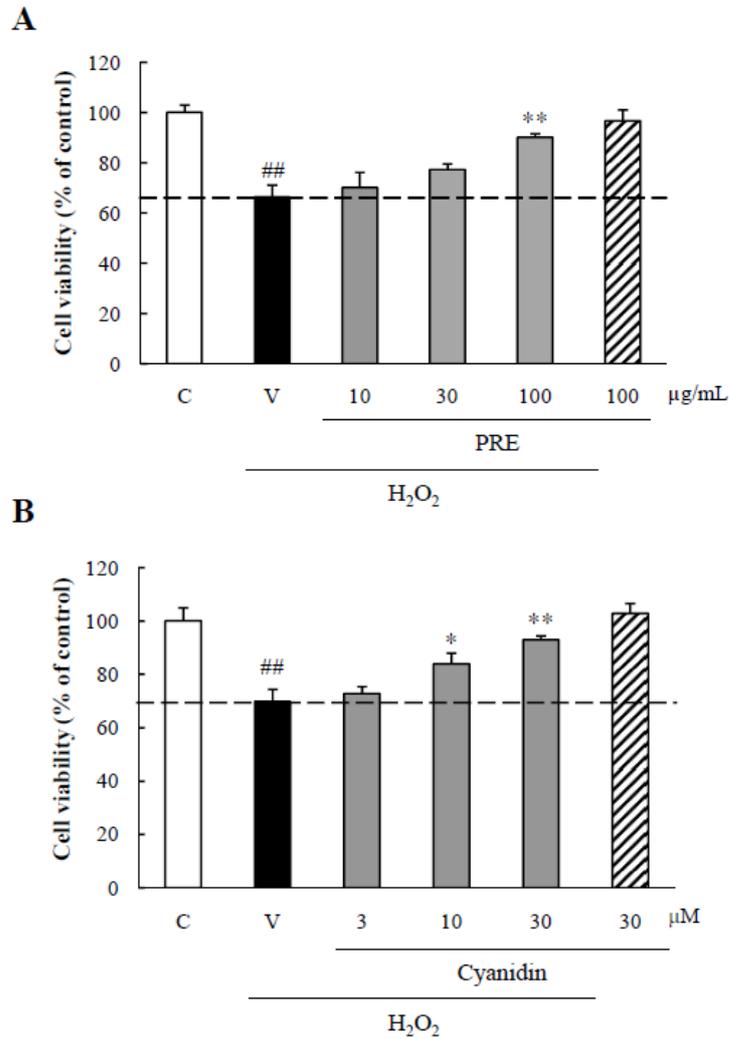


Fig. 12 Effects of PRE and its constituent on H₂O₂-induced RGC-5 death.

Cells (1×10^4 cells/ml) were cultured in 96-well plates, and then incubated for a total of 48 h. Cell viability was assessed by immersing cells in CCK-8 for 3 h, with photometric data being recorded at 450/660 nm. (A, B) Effects of PRE and cyanidin on H₂O₂-induced RGC-5 death. The columns with diagonal lines are data from control cells treated with each drug alone but without H₂O₂ treatment. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 4$ or 6). C, control; V, vehicle. ##, $p < 0.01$ versus control (Student's t -test), and *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

3-2 ツニカマイシン誘発網膜神経節細胞障害に対する黒米エキスおよびその成分の作用

つづいて黒米エキス (PRE) およびその構成成分のツニカマイシン誘発網膜神経節細胞 (RGC-5) 障害に対する作用を検討した。ツニカマイシンの添加によって RGC-5 の生存率は 40-60%までに低下した。PRE (30-100 $\mu\text{g/ml}$) は、ツニカマイシン誘発網膜神経節細胞障害に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用を示した (Fig. 13)。PRE の構成成分である cyanidin (30 μM) および 2-hydroxy-5-[(3*S*)-3-hydroxybutyl]phenyl- β -D-glucoside (HHPG, 30 μM) においても有意な抑制作用が認められた (Fig. 13)。また、cyanidin-3-*O*-glucoside (30 μM) も cyanidin と同様に有意な抑制作用が認められた (データ未提示)。一方、peonidin (3-30 μM) は明らかな作用を示さなかった。さらに、他のアントシアニンである delphinidin および malvidin についても同様な評価を行った結果、delphinidin (30 μM) は有意な抑制作用を示したが、malvidin (3-30 μM) は明らかな作用を示さなかった (Fig. 13)。また、これらの濃度における PRE, cyanidin, HHPG, peonidin, delphinidin および malvidin の単独添加は、RGC-5 に対する明らかな作用は認められなかった。

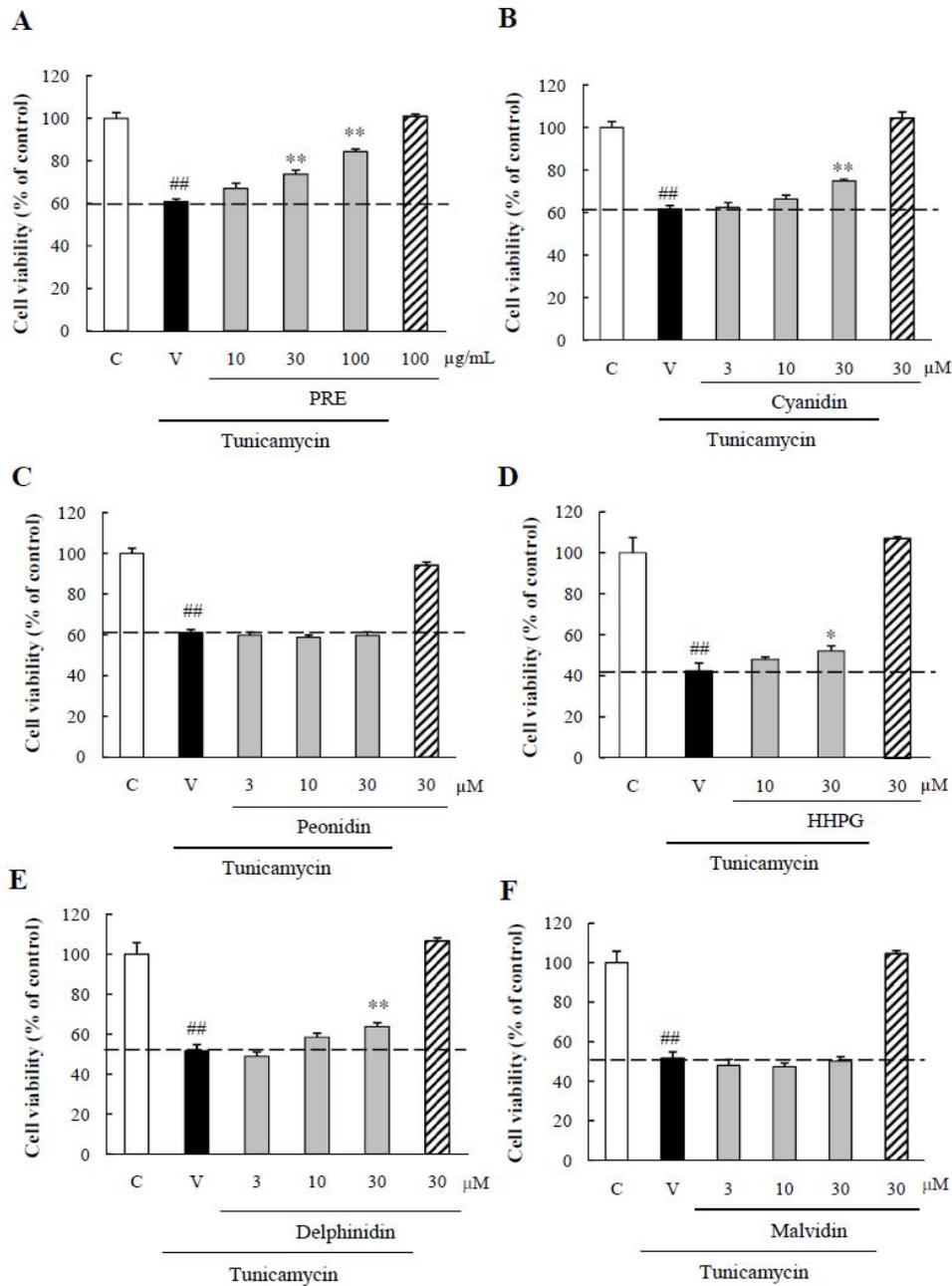


Fig. 13 Effects of PRE and its constituents on tunicamycin-induced RGC-5 death.

Cells (1×10^4 cells/ml) were cultured in 96-well plates, and then incubated for a total of 48 h. Cell viability was assessed by immersing cells in CCK-8 for 3 h, with photometric data being recorded at 450/660 nm. (A-F) Effects of PRE, cyanidin, peonidin, HHPG, delphinidin, and malvidin on tunicamycin-induced RGC-5 death. The columns with diagonal lines are data from control cells treated with each drug alone but without tunicamycin treatment. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6$). C, control; V, vehicle. ^{##}, $p < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{*}, $p < 0.05$, ^{**}, $p < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

3-3 小胞体ストレス関連タンパク質の発現に対する黒米エキスの作用

黒米エキス (PRE) のツニカマイシン誘発網膜神経節細胞障害抑制作用の作用機序を明らかにするために、ウェスタンブロット法を用いて小胞体に局在する分子シャペロン BiP および小胞体ストレス応答の主要な転写因子である CHOP の発現に対する作用を検討した。BiP および CHOP の発現は、ツニカマイシン処理により有意に上昇したが、PRE (100 $\mu\text{g/ml}$) はこの BiP および CHOP の発現上昇には影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。また、PRE 単独添加は BiP および CHOP の発現量に影響を及ぼさなかった。

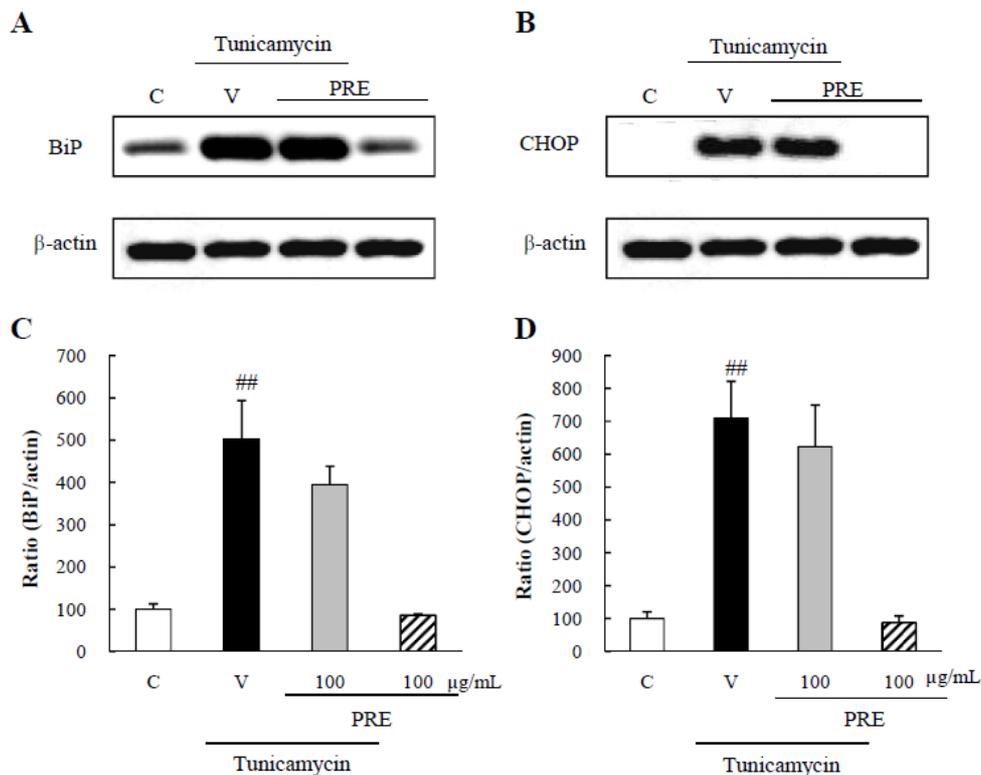


Fig. 14 Effects of PRE on tunicamycin-induced expression of BiP and CHOP in RGC-5 cultures.

(A, B) BiP and CHOP expressions were detected by Western blotting. RGC-5 cultures were pretreated with vehicle or PRE at 100 $\mu\text{g/ml}$ and then exposed to 2 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin for 24 h. (C, D) BiP and CHOP expressions were quantified by densitometry and corrected by reference to β -actin. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 5$ or 6). C, control; V, vehicle. ^{##}, $p < 0.01$ versus control (Student's t -test).

3-4 カスパーゼ 3 活性化に対する黒米エキスおよびその成分の作用

黒米エキス (PRE), cyanidin および 2-hydroxy-5-[(3S)-3-hydroxybutyl]phenyl- β -D-glucoside (HHPG) のツニカマイシン誘発網膜神経節細胞障害抑制作用について、作用機序解明のためにカスパーゼ 3 活性化に対する作用を検討した。CaspACE™ Fluorometric Assay System を用いて、カスパーゼ 3 の活性化を評価した。ツニカマイシン処理はカスパーゼ 3 の活性化を増加させたが、PRE (100 μ g/ml), cyanidin (30 μ M) および HHPG (30 μ M) は、ツニカマイシン処理によって活性化されたカスパーゼ 3 を有意に抑制した (Fig. 15)。

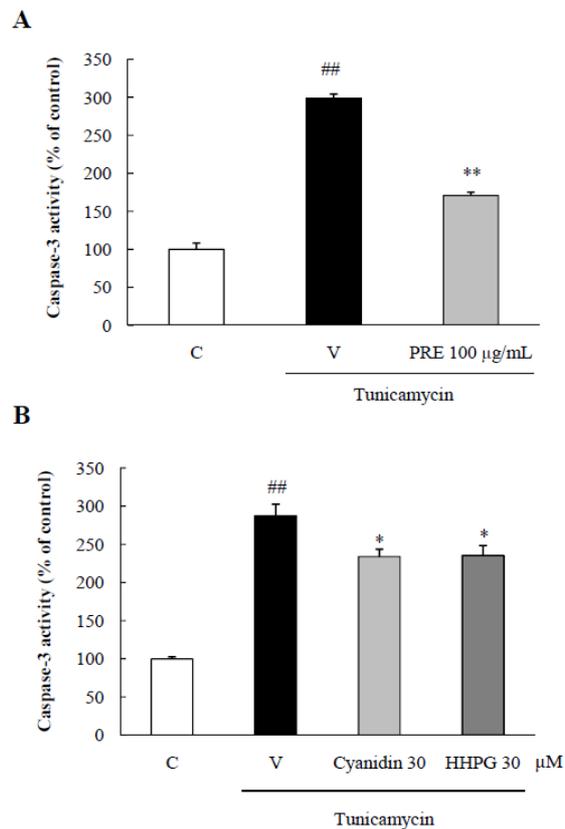


Fig. 15 Effects of PRE on tunicamycin-induced caspase-3 activity in RGC-5 cultures.

Caspase-3 activity was evaluated with a CaspACE™ Fluorometric Assay System. (A, B) The activity was measured after a 24 h pretreatment with tunicamycin or with PRE at 100 μ g/ml, cyanidin at 30 μ M (approx. 10 μ g/ml), or HHPG at 30 μ M (approx. 10 μ g/ml). Data are shown as mean \pm S.E.M. (n = 4). C, control; V, vehicle. ##, $p < 0.01$ versus control, and *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ versus vehicle (Student's t -test).

3-5 ツニカマイシン誘発マウス網膜障害に対する黒米エキスの作用

マウス硝子体内へのツニカマイシン (1 $\mu\text{g}/\text{eye}$) 投与は、正常群と比較して視神経節細胞層 (GCL) 中の細胞数を有意に減少させた。黒米エキス (PRE, 10 $\mu\text{g}/\text{eye}$) 投与群は、ツニカマイシン投与による GCL 中の細胞減少を有意に抑制した (Fig. 16)。内網状層 (IPL), 内顆粒層 (INL) および外顆粒層 (ONL) 厚もツニカマイシン投与によって同様に減少したが、PRE 投与群はツニカマイシン投与群に比べて明らかな作用は認められなかった [IPL 厚, Normal 群: 20.8 ± 0.4 , $n=7$, Vehicle (ツニカマイシン投与) 群: 14.1 ± 1.0 , $n=6$, PRE 投与群: 15.0 ± 0.8 , $n=6$, INL 厚, Normal 群: 15.0 ± 0.5 , $n=7$, Vehicle (ツニカマイシン投与) 群: 10.4 ± 1.3 , $n=6$, PRE 投与群: 12.3 ± 1.2 , $n=6$, ONL 厚, Normal 群: 21.7 ± 0.7 , $n=7$, Vehicle (ツニカマイシン投与) 群: 12.2 ± 1.2 , $n=6$, PRE 投与群: 12.3 ± 3.0 , $n=6$]。

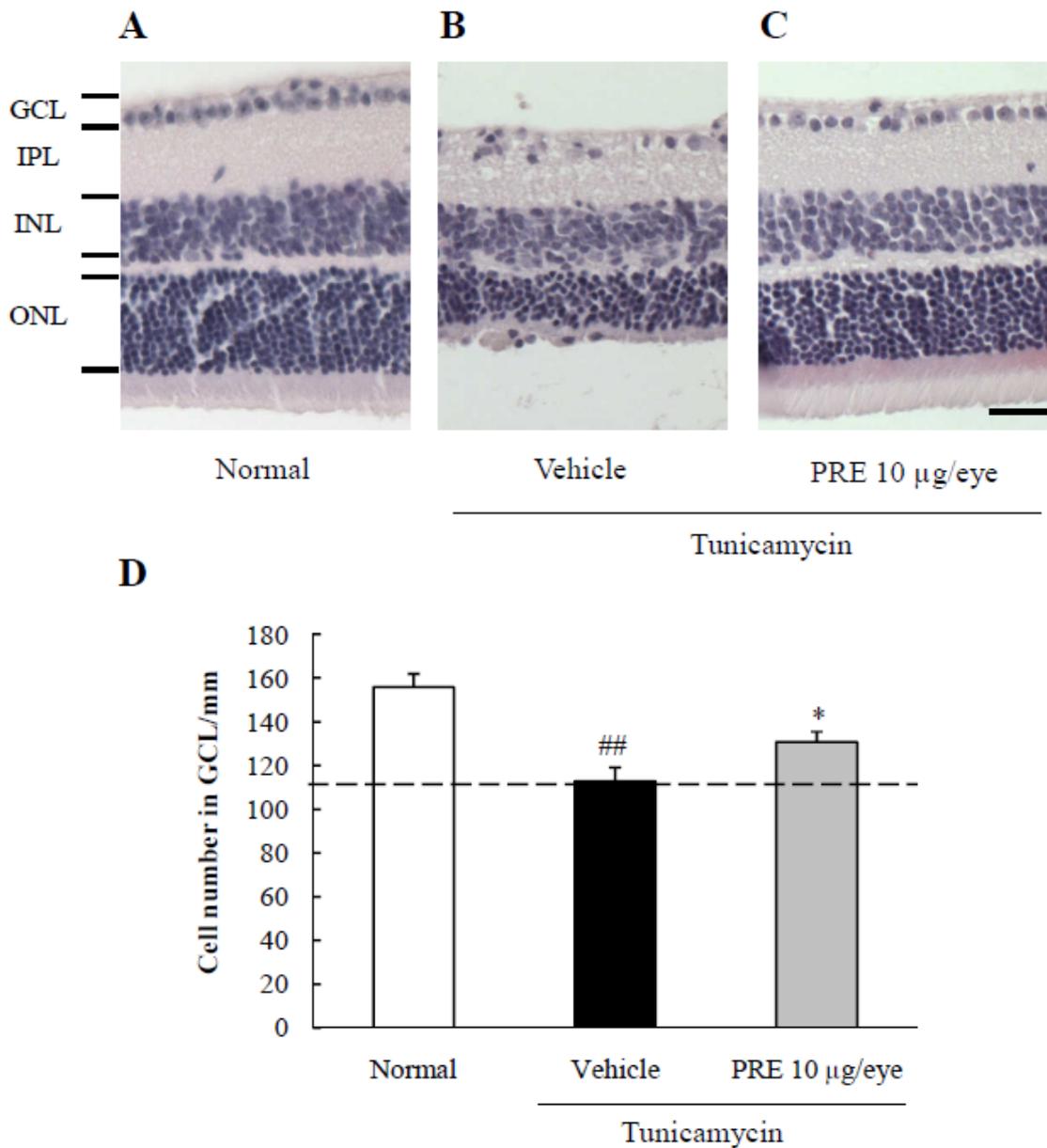


Fig. 16 Effects of PRE on *in vivo* tunicamycin-induced retinal damage induced in mice. Representative photographs (hematoxylin and eosin staining of retinal sections) showing: (A) non-treated; (B) tunicamycin plus vehicle-treated; (C) tunicamycin plus PRE at 10 µg/eye. Figure (D) shows retinal damage evaluated by counting cell numbers in the GCL 7 days after intravitreal injection of tunicamycin (1 µg/eye). The cell numbers in the GCL were counted at a distance between 375 and 625 µm from the optic disc. Data are shown as mean ± SEM ($n = 6$ or 7). ##, $p < 0.01$ versus control, and *, $p < 0.05$ versus vehicle (Student's t -test). The scale bar in (C) represents 25 µm.

第4節 考察

著者はこれまで、黒米エキス (PRE) は 30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で可視光誘発視細胞死抑制作用 (第1章, Tanaka *et al.*, 2011) を有する事を明らかにした。そこで、本研究の *in vitro* 試験では、PRE およびその含有成分である cyanidin, peonidin および 2-hydroxy-5-[(3S)-3-hydroxybutyl]phenyl- β -D-glucoside (HHPG) について、過酸化水素 (H_2O_2) またはツニカマイシン誘発網膜神経節細胞 (RGC-5) 障害に対する作用について検討を行った。

WST-8 assay よって明らかな過酸化水素誘発細胞死が認められたが、PRE および cyanidin はその細胞死を抑制した (Fig. 12)。過酸化水素誘発の網膜神経節細胞死は ROS 産生に伴うアポトーシス依存的経路によって引き起こされる (Nakajima *et al.*, 2009)。第1章で示したように、PRE および cyanidin は、DPPH およびスーパーオキシドアニオンラジカルの捕捉活性を示し、ビタミン E 誘導体 trolox よりもその作用は強かった。また、PRE および cyanidin は可視光誘発視細胞内の ROS 産生を抑制した。さらに、PRE は HepG2 細胞におけるスーパーオキシドアニオンラジカルおよび ROS の産生を抑制し、SOD およびカタラーゼ活性を上昇させる事が報告されている (Chiang *et al.*, 2006)。以上の事より、PRE は、過酸化水素誘発の RGC-5 内における ROS 産生を抑制する事により細胞死抑制作用を示し、その活性成分として cyanidin の関与が示唆された。

RGC-5 は、網膜神経節細胞障害の *in vitro* 試験に広く使用されており、ツニカマイシン誘発マウス網膜障害における網膜神経節細胞死経路と同様な経路を示す事が明らかとなっている (Inokuchi *et al.*, 2009)。グルコサミン含有ヌクレオシド系抗生物質であるツニカマイシンは、ストレプトミセス属より生成される。ツニカマイシンは、小胞体におけるタンパク質の折りたたみに重要な N-グリコシド結合蛋白質の N-結合グリコシル化および形成を阻害し、最終的に小胞体ス

トレスを誘発する。PRE はツニカマイシン誘発網膜神経節細胞死を抑制した。PRE 中の活性成分を探索するためにバイオアッセイ法を用いて、新たに HHPG を単離・構造決定し (Shimoda *et al.*, 2007), cyanidin と共にツニカマイシン誘発網膜神経節細胞死抑制作用を明らかにした (Fig. 13)。HHPG (Fig. 11) は、黒米はもとより天然物より初めて単離された化合物であり、レッドラズベリー (*Rubus idaeus*) の主要な芳香族化合物である 4-(4-hydroxyphenyl) butan-2-one (ラズベリーケトン) の配糖体である。ラズベリーケトンには、抗肥満、抗菌および抗がん作用が報告されている (Morimoto *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2011)。さらに、HHPG と構造が類似しているフェルラ酸においても、小胞体ストレス誘発ヒト神経芽細胞 (SK-N-SH) 死に対する抑制作用が報告されている (Hiratsuka *et al.*, 2010)。以上の事より、PRE はツニカマイシン誘発細胞死抑制作用を示し、その活性成分として cyanidin および HHPG の関与が示唆された。一方、PRE 中の他の含有アントシアニンである peonidin には明らかな作用が認められなかったため、我々は、他のアントシアニンである delphinidin および malvidin を用いて、ツニカマイシン誘発細胞死におけるアントシアニンの構造活性相関について検討を行った。Delphinidin は、ツニカマイシン誘発細胞死を抑制したが、malvidin は明らかな作用を示さなかった。この事より、アントシアニンの抗小胞体ストレス活性にはB環のヒドロキシル基の存在が重要であると考えられる。

PRE は、ツニカマイシンに対して網膜神経節細胞保護作用を示したことから、小胞体ストレス関連タンパク質である BiP や CHOP への関与についてウェスタンブロット法を用いて検討した。しかしながら、PRE はツニカマイシン処理によって上昇する BiP および CHOP の発現レベルに影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。以上、PRE の保護作用は、直接的に小胞体ストレスに作用するものではないことが示唆された。

小胞体ストレスおよび酸化ストレスによって活性化されるカスパーゼ 3 (Cheung *et al.*, 2006; Tamm *et al.*, 2008) に対する作用について検討を行った。PRE (100 µg/ml), cyanidin (30 µM) および HHPG (30 µM) は、ツニカマイシン誘発カスパーゼ 3 の活性化を抑制した(Fig. 15)。ラット肝 Clone 9 細胞において、cyanidin はグルタチオン関連酵素の活性化を含む細胞内抗酸化活性を上昇させ、過酸化水素誘発のカスパーゼ 3 活性化を抑制することが報告されている (Shih *et al.*, 2007)。また、アントシアニンと同様のフラボノイドである chrysin は、カスパーゼ 3 の活性化抑制を介した小胞体ストレス誘発ヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) 死に対する抑制作用が明らかとなっている (Izuta *et al.*, 2008)。他のフラボノイドである luteolin もまた、カスパーゼ 3 の活性化抑制を介したツニカマイシン誘発ヒト神経芽細胞死を抑制する事が報告されている (Ishisaka *et al.*, 2011)。さらに、PRE はアントシアニンを含有するだけではなく、quercetin および ferulic acid などのポリフェノールも含んでいる (Han *et al.*, 2004; Laokuldilok *et al.*, 2011)。その quercetin および ferulic acid も小胞体ストレス誘発細胞死抑制作用を示すことが報告されている (Hiratsuka *et al.*, 2010; Wiseman *et al.*, 2010)。以上、PRE の保護作用の作用機序としてカスパーゼ 3 の活性化抑制作用が明らかとなり、その活性成分の一部として cyanidin および HHPG の関与と quercetin および ferulic acid 等の他の成分との相互作用が示唆された。しかしながら、PRE 中のアントシアニンと他のポリフェノール成分の相互作用については、さらなる研究が必要であると考えられる。

ツニカマイシン硝子体内投与によるマウス網膜障害において、マウス網膜中の BiP および CHOP 発現の増加が報告されている (Inokuchi *et al.*, 2009)。ツニカマイシン硝子体内投与によるマウス網膜障害には小胞体ストレスの関与が示唆される。そこで、ツニカマイシン硝子体内投与によるマウス網膜障害における

PRE の作用について HE 染色を用いて評価した。ツニカマイシン投与 7 日後、正常群と比較して溶媒投与群に視神経節細胞層 (GCL) の細胞数の減少が認められた (Fig. 16)。PRE の硝子体内投与は、その細胞減少を抑制した。

本研究から PRE およびその含有成分である cyanidin および HHPG に過酸化水素およびツニカマイシン誘発網膜神経節細胞死抑制作用を有することが明らかとなった。また、PRE のツニカマイシン誘発網膜神経節細胞死抑制作用の一部にカスパーゼ 3 の活性化抑制が関与している事が示唆された。さらに、ツニカマイシン誘発マウス網膜障害モデルにおいても PRE の有効性が明らかとなった。以上、PRE は小胞体ストレスによって引き起こされる網膜疾患に対して保護作用を示す可能性が示唆された。次章では、さらに PRE の新規機能性を探索するため、PRE および主要成分について網膜血管新生に対する薬理学的作用について検討した。

第3章 網膜血管新生に対する黒米エキスおよびその構成成分の作用

第1節 緒言

血管新生は既存の血管から新たな血管枝が分岐する現象であり，多細胞生物の発達における必須過程である (Risau, 1997)。胎児の生育期や子宮内膜および胎盤の増殖，創傷治癒，虚血組織の再血管開通などの過程において栄養要求を満たすために必要不可欠な生体反応である。しかしながら，健常な成人では血管が新生する必要は通常ない。全ての新生血管生成は，Matrix metalloprotease (MMP) 等の消化酵素の活性化による細胞外マトリックスのリモデリング，細胞外への血管内皮細胞の遊走，血管内皮細胞の増殖，管腔形成や周辺細胞の結合などが協調して起こる (Fig. 17) (Plank and Sleeman, 2003)。血管新生の調節が損失すると結果的に制御されていない過剰な血管新生をもたらし，これはしばしば関節リウマチ，アテローム性動脈硬化症および腫瘍の成長等を含む多くの病態の進行に深く関わっている (Folkman, 1995)。眼科領域では角膜や虹彩，網膜および脈絡膜など様々な眼組織で血管新生が誘導されるが，糖尿病網膜症，未熟児網膜症および加齢黄斑変性症 (age-related macular degeneration: AMD) 等の疾患では網膜や脈絡膜において血管新生の異常亢進が認められ，不可逆的な視力低下や失明の原因となっている (Aiello *et al.*, 1994; Ferrara *et al.*, 2003; Brogi *et al.*, 1994)。

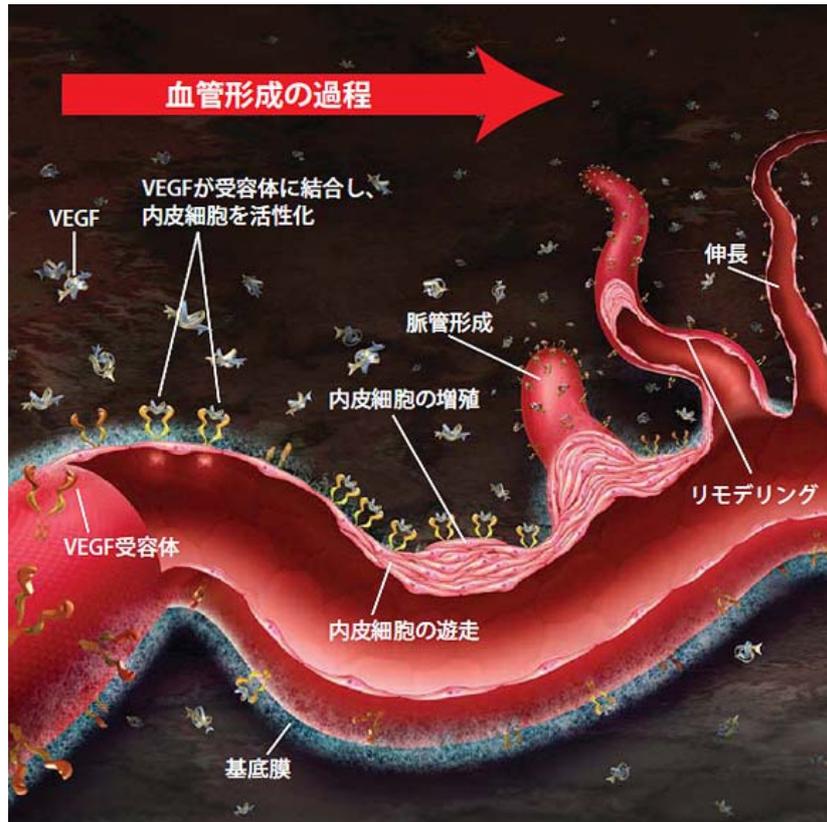


Fig. 17 Angiogenesis events.

The figure was drawn by Novartis Pharma K.K.

血管新生には、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) , 血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) および線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) 等様々な増殖因子が関与している。VEGF は、側副血管の形成を促進し、微小血管の透過性を増大させる (Senger *et al.*, 1983; Keck *et al.*, 1989)。VEGF の発現は、高血糖と低酸素によって誘導され、この成長因子は、正常と異常の両方の血管新生に重要な役割を果たしている (Millauer *et al.*, 1994; Sone *et al.*, 1996)。VEGF 受容体はチロシンキナーゼ型受容体であり、VEGFR (VEGF receptor)-1, VEGFR-2 および VEGFR-3 の3種類が知られている。このうち、血管内皮細胞には VEGFR-1 および VEGFR-2 が発現し

ており、血管新生において中心的な役割を担っている。VEGF が VEGFR-2 に結合すると細胞内で mitogen-activated protein kinase (MAPK) である extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 1/2 や p38 mitogen activated protein kinase (p38) のリン酸化酵素が活性化し、血管新生が誘導される。ERK 1/2 は細胞増殖や生存シグナルとして働き、p38 は細胞遊走に関わることが知られている (Wu *et al.*, 2000; Rousseau *et al.*, 1997)。

PRE の主成分である cyanidin に関してヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) と線維芽細胞の共培養系における VEGF 誘発管腔形成抑制作用を見出している (Matsunaga *et al.*, 2010b)。アントシアニンを含む PRE も VEGF 誘発血管新生に対して阻害作用を有する事が考えられるが、血管新生に対する作用は報告されていない。

本章では、PRE およびその主要成分であるアントシアニン (cyanidin および peonidin) の血管新生阻害作用について検討を行うことを目的として、VEGF 誘発管腔形成、細胞増殖および細胞遊走に対する作用を HUVECs およびヒト網膜毛細血管内皮細胞 (human retinal microvascular endothelial cells: HRMECs) を用いて検討した。また、その作用機序解明のために VEGF 誘発 ERK 1/2 および p38 のリン酸化に対する作用を検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

シアニジン3-*O*-グルコシド (cyanidin 3-*O*-glucoside), ペオニジン3-*O*-グルコシド (peonidin 3-*O*-glucoside), シアニジン (cyanidin) およびペオニジン (peonidin) は, Extrasynthese (Genay Cedex, France), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail 1およびphosphatase inhibitor cocktail 2は, Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA), HUVECs, 血管新生キット, HuMedia-EB2, human epidermal growth factor (hEGF), human fibroblast growth factor B (hFGF B), ヒドロコルチゾン (hydrocortisone), ヘパリン (heparin), アンホテリシン B (amphotericin B), ゲンタマイシン (gentamicin), VEGF, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT), 抗CD31抗体は, Kurabo Industries Ltd. (Osaka, Japan), HRMECs, CS-C mediumは, DS Pharma Biomedical Co., Ltd. (Osaka, Japan), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は, Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan), タイプIコラーゲン (Cellmatrix type I-C) は, Nitta Gelatin Inc. (Osaka, Japan), 25 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) 含有DMEMは, Invitrogen Co. (Eugene, OR, USA), bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit, SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate, goat anti-rabbit HRP-conjugated および goat anti-mouse HRP-conjugated は, Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA), 10% 2-mercaptoethanol 含有 sample buffer および 10% SDS-PAGE ゲルは Wako Pure Chemical Co., Ltd. (Osaka, Japan), Phosphorylated-p38 rabbit monoclonal antibodyは, Promega Co. (Madison, WI, USA), p38 mouse monoclonal antibodyは, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), Phosphorylated-ERK rabbit polyclonal

antibodyおよびERK rabbit polyclonal antibodyは、Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 黒米エキス (PRE) の抽出

黒米糠 (100 g) は *n*-hexane (500 ml) で脱脂した。室温で脱脂黒米糠を乾燥後、50%エタノール (500 ml, 50°C) で2時間抽出した。抽出液をろ過後、濃縮・乾固して抽出物を得た。その抽出物を DIAION HP-20 column (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan) に吸着させ、水で洗浄した。その後、70%エタノールで溶出させ、溶出液を濃縮・乾固し黒米エキス (PRE) 2.8 g を得た。

2-2-2 HPLC 分析

PRE 中のアントシアニン含量は、C18 カラム (Develosil ODS-UG-5, 4.6 mm *i.d.* × 250 mm, Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いて HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) にて分析した。移動相には 10%ギ酸 v/v (A) およびギ酸/アセトニトリル/メタノール/水 (10/22.5/22.5/45) (B) を用いた。グラジエント条件は、0 min, 90% (A), 10% (B) ; 40 min, 65% (A), 35% (B) を用いた。流量は 1 mL/min とし、測定には 520 nm の波長を用いた。PRE 中の cyanidin-3-*O*-glucoside および peonidin-3-*O*-glucoside の含量は、それぞれ 2.9%および 0.2%であった。

2-2-3 細胞培養

HUVECs は HuMedia-EG2 培地で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。HuMedia-EG2 培地は HuMedia-EB2 培地に 2% FBS, 10 ng/ml hEGF, 5 ng/ml hFGFB, 1 µg/ml ヒドロコルチゾン, 10 µg/ml ヘパリン, 50 ng/ml アンホテリシン B, 50

μg/ml ゲンタマイシンが含まれている。また、HRMECs は 10% FBS, 50 μg/ml ゲンタマイシン, 50 ng/ml アンホテリシン B および culture boost (成長因子) 含有 CS-C medium で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

2-2-4 *in vitro* 管腔形成試験

管腔形成の評価は血管新生キットを用いた。HUVECs と線維芽細胞の共培養下に VEGF (10 ng/ml) および各試料を添加し, 11 日間培養した。培養開始 1, 4, 7, 9 日後に VEGF および試料を置換した。11 日後, 70%エタノールで固定し, 一次抗体としてマウス抗ヒト CD31 抗体を反応させ, つぎに二次抗体ヤギ抗マウス IgG-アルカリフォスファターゼ抗体を用いて反応させた。その後, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) を基質として HUVECs の管腔を染色した。管腔形成の評価は, 明視野顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) で画像取得し, 血管新生定量ソフトウェア Ver.2 (Kurabo) を用いて管腔面積 (tube area), 管腔長 (tube length), 分岐点数 (joints) および枝数 (paths) の 4 つのパラメーターについて評価した。

2-2-5 細胞増殖試験

96-well plate に 2×10^3 cells/well の HUVECs および HRMECs を播種し, 24 時間培養した。その後, HUVECs および HRMECs は, それぞれ 2% FBS 含有 HuMedia-EB2 および 10% FBS 含有 CS-C medium に置換し, さらに 24 時間培養した。培地に VEGF (10 ng/ml) および各試料を添加し, HUVECs は 72 時間, HRMECs は 24 時間さらに培養した。細胞増殖は cell counting kit-8 を用いて, ホルマザンの測定を行った。492 nm (参照波長, 660 nm) の波長を spectrophotometer (Varioskan; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いて測定し, ホルマ

ザンの生成量から細胞数を計数した。

2-2-6 2次元細胞遊走試験 (Wound healing assay)

2次元細胞遊走試験は細胞の双方向への移動能を評価する試験である (Fig. 18)。タイプ I コラーゲン (Cellmatrix type I-C) を外被した 12-well plate に 4×10^4 cells/well の HRMECs を播種し、48 時間培養した。細胞が 80%コンフルエントの状態に達した時点で、2% FBS 含有 CS-C medium に置換し、さらに 24 時間培養を行った。1 ml チップを用いて細胞を中央線にそって剥ぎ取り、倒立顕微鏡 (Olympus Co., Tokyo, Japan) で撮影した。その後、VEGF (10 ng/ml) および各試料を加えて、24 時間培養し、同領域を再度撮影した。細胞遊走の評価は、剥ぎ取った領域に進展してくる細胞数より求めた。

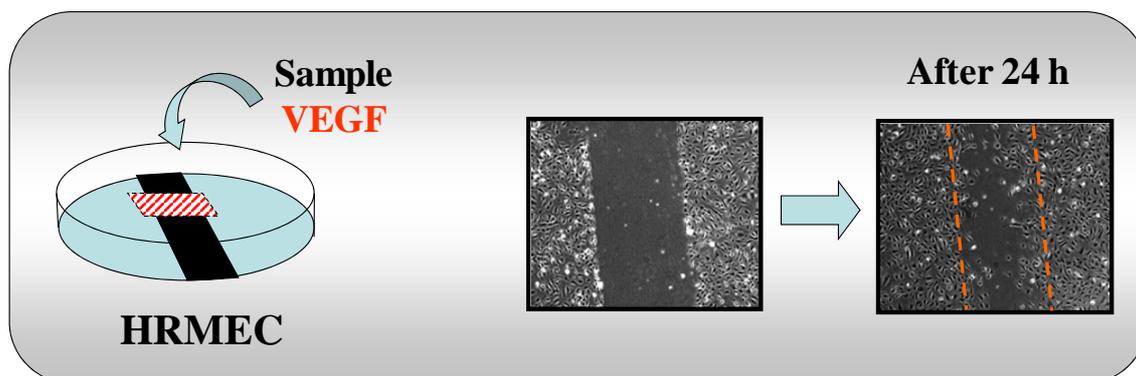


Fig. 18 Wound healing assay (two dimension migrated cell assay).

Migrated cells were estimated by counting the cell numbers in 4 randomly chosen fields within the wounded region.

2-2-7 ウェスタンブロット

12-well plate に 4×10^4 cells/well の HRMECs を播種し、24 時間培養した。その後、2% FBS 含有 CS-C medium に置換し、さらに 24 時間培養を行った。25 mM HEPES および 2% FBS 含有 DMEM に置換し、さらに 1 時間培養した。その後、VEGF (10 ng/ml) および各試料を添加し、5 分間培養した。細胞を氷冷した PBS

で洗浄後, protease inhibitor cocktail および phosphatase inhibitor cocktail I/II を含む RIPA buffer を加え, 細胞抽出液を回収した。細胞抽出液は BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を定量後, 10% 2-mercaptoethanol 含有 sample buffer に懸濁し, 5 分間煮沸した。その後, 10% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動した。1 次抗体 (抗リン酸化 ERK 1/2 抗体, 抗 ERK 1/2 抗体, 抗リン酸化 p38 抗体および抗 p38 抗体) および 2 次抗体を用いて抗体反応を行い, Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate で発色後, LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で撮影した。リン酸化 ERK およびリン酸化 p38 のバンド強度はそれぞれ総 ERK および p38 を用いて補正した。

2-3 統計学的解析

実験結果はすべて平均±標準誤差で表し, 危険率 5%以下を有意とした。統計学的解析は Dunnett's test および Student's *t*-test を用いて行った。

第3節 結果

3-1 VEGF 誘発ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の管腔形成に対する黒米エキスおよび peonidin の作用

黒米エキス (PRE) およびその主要成分の血管新生に対する作用を検討するため、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) および線維芽細胞の共培養系を用いて VEGF 誘発管腔形成試験を行った。VEGF の添加によって HUVECs の管腔形成 (管腔面積, 管腔長, 分岐点数および枝数) が促進した。PRE (3–30 $\mu\text{g/ml}$) は VEGF 誘発管腔形成に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用を示した (Fig. 19)。また, PRE の含有成分である peonidin (1–10 μM) においても管腔形成の有意な抑制作用が認められた (Fig. 20)。同時に細胞形態を観察したが, PRE または peonidin の添加による異常な形態変化や細胞死は認められなかった。

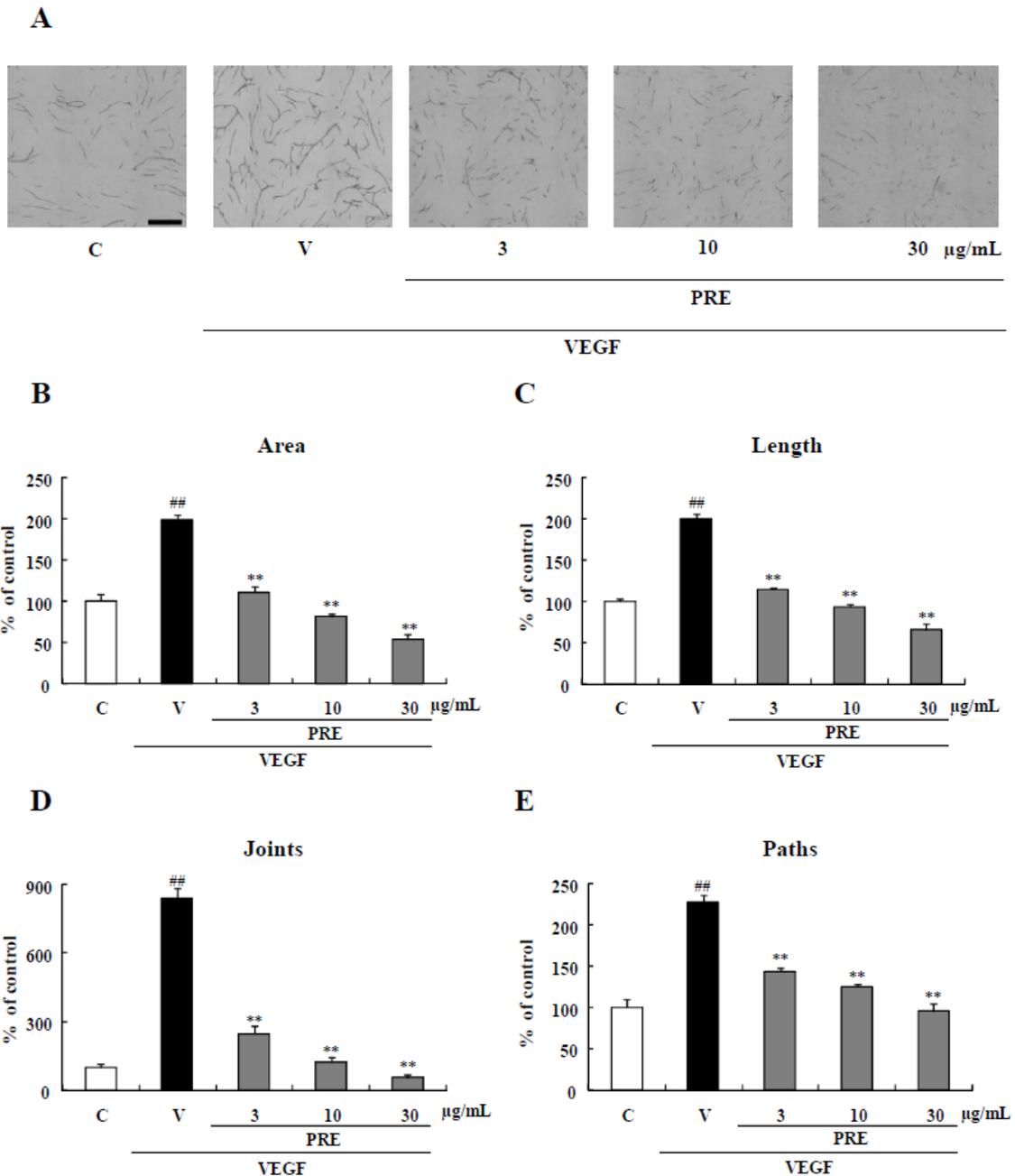


Fig. 19 Effects of PRE on tube formation induced by VEGF.

(A) Representative photographs of tube formation. HUVECs were co-cultured with human fibroblasts, as described in the Methods section, and incubated for 11 days with or without the indicated concentrations of PRE, with the concomitant addition of VEGF (10 ng/mL). Tube formation was evaluated by measurements of (B) tube area, (C) length, (D) joints, and (E) paths after treatment with PRE. Data are shown as means \pm SEM ($n = 3$). C: control; V: vehicle. ^{##}, $P < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{**}, $P < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test). The scale bar indicates a 1 mm length.

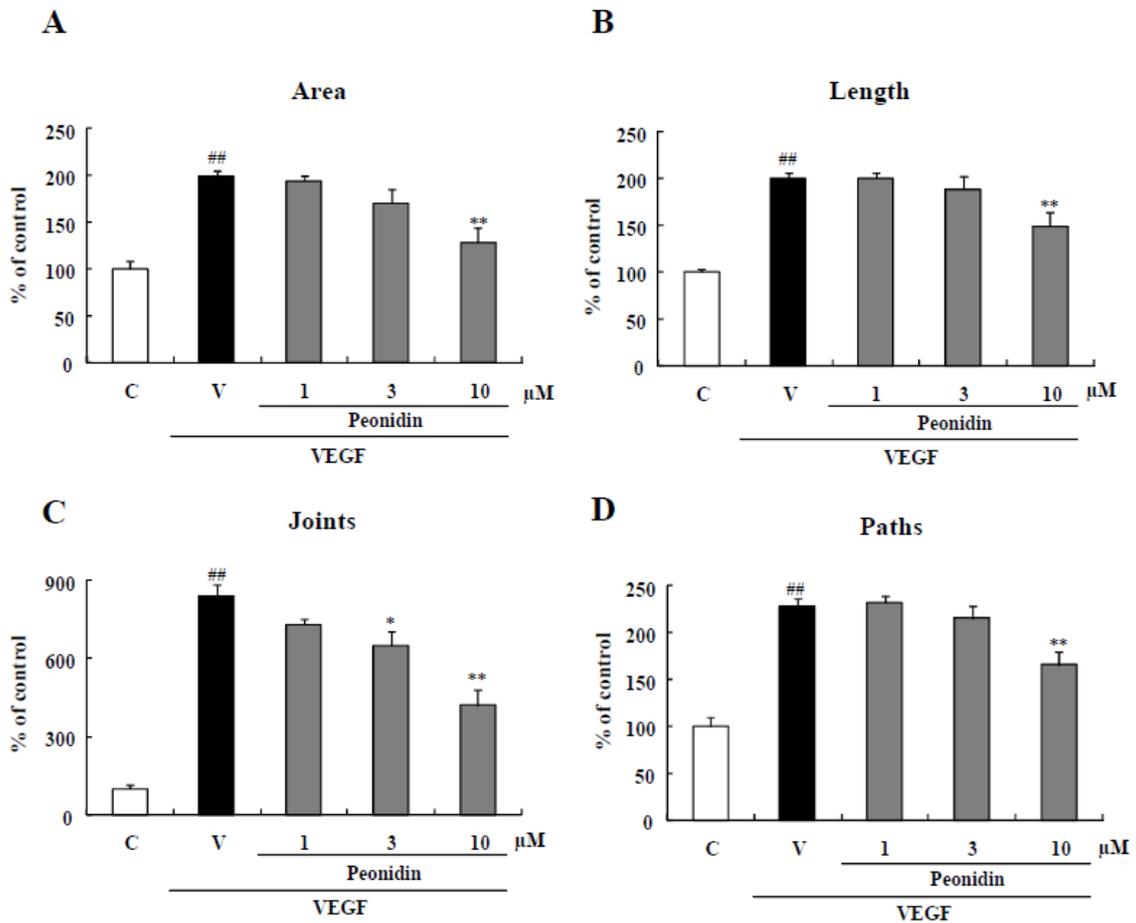


Fig. 20 Effects of peonidin on tube formation induced by VEGF.

HUVECs were co-cultured with human fibroblasts, as described in the Methods section, and incubated for 11 days with or without the indicated concentrations of peonidin, with the concomitant addition of VEGF (10 ng/mL). Tube formation was evaluated by measurements of (A) tube area, (B) length, (C) joints, and (D) paths after treatment with peonidin. Data are shown as means \pm SEM ($n = 3$). C: control; V: vehicle. ##, $P < 0.01$ versus control (Student's t -test), and *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

3-2 VEGF 誘発ヒト臍帯静脈血管内皮細胞およびヒト網膜毛細血管内皮細胞の増殖に対する黒米エキス, cyanidin および peonidin の作用

血管新生の初期段階である血管内皮細胞増殖に対する黒米エキス (PRE) およびその構成成分 (cyanidin および peonidin) の作用を検討するため, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) およびヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) を用いて VEGF 誘発細胞増殖に対する作用を検討した。その結果, VEGF (10 ng/ml) 添加により, HUVECs および HRMECs は対照群と比較してそれぞれ 1.4-3.6 倍および 1.7-2.3 倍細胞数が増加した。PRE (10-30 μ g/ml), cyanidin (10-30 μ M), peonidin (3-30 μ M) および trolox (10-30 μ M) は, VEGF 誘発 HUVECs の増殖に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用が認められた (Fig. 21)。同様に PRE (3-30 μ g/ml), cyanidin (10-30 μ M), peonidin (30 μ M) および trolox (3-30 μ M) は, VEGF 誘発 HRMECs の増殖に対しても有意な抑制作用が認められた (Fig. 22)。また, これらの濃度における PRE, cyanidin, peonidin および trolox の単独添加は, HUVECs および HRMECs に対する明らかな作用は認められなかった。

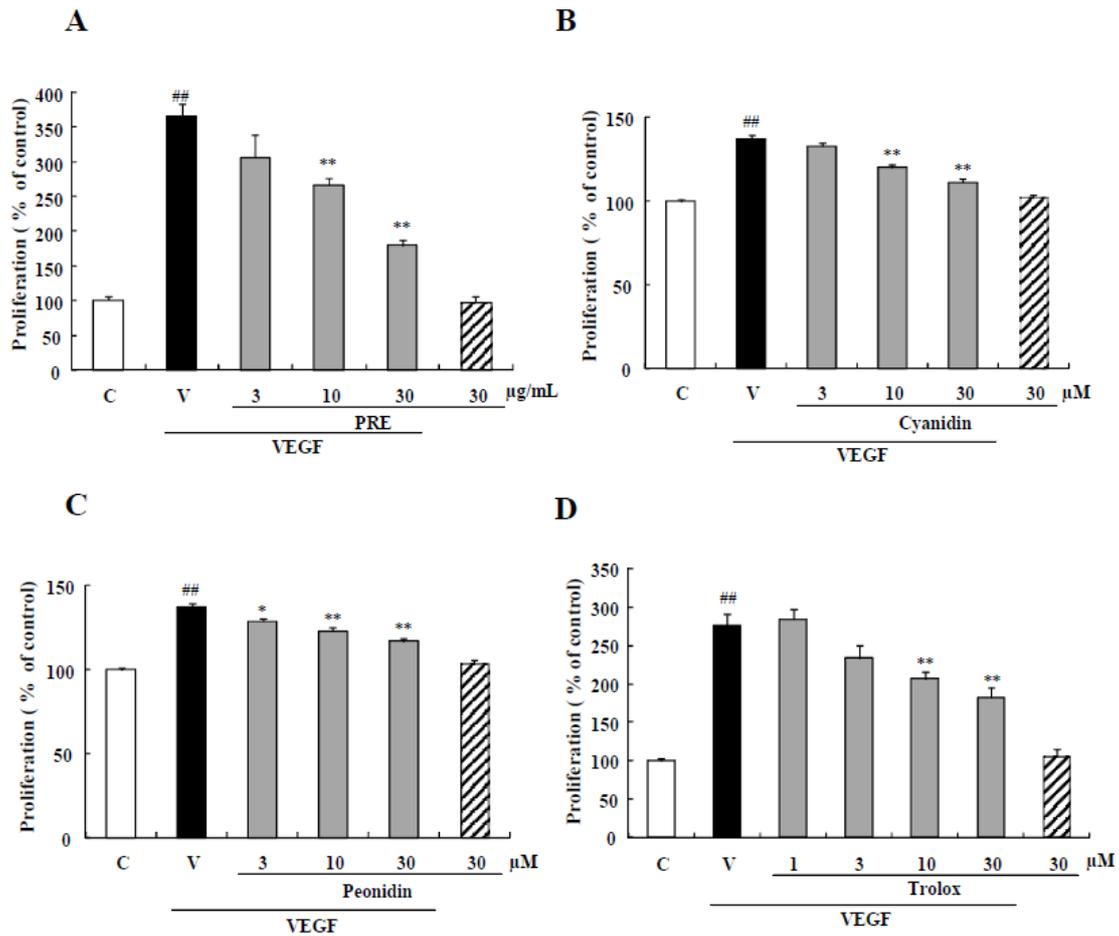


Fig. 21 Effects of PRE and anthocyanidins on VEGF-induced proliferation in HUVECs. HUVECs were incubated with the indicated concentrations of (A) PRE, (B) cyanidin, (C) peonidin, and (D) trolox in the presence or absence of VEGF (10 ng/mL) for 3 days at 37°C in 5% CO₂ with humidity. Cell proliferation was estimated using a cell counting kit-8 (CCK-8). VEGF treatments increased cell viability vs. control. PRE (10-30 µg/mL), cyanidin (10-30 µM), peonidin (3-30 µM), and trolox (10-30 µM) inhibited the proliferation. Data are shown as means ± SEM ($n = 5$ or 6). C: control; V: vehicle. ^{##}, $P < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{*}, $P < 0.05$, ^{**}, $P < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

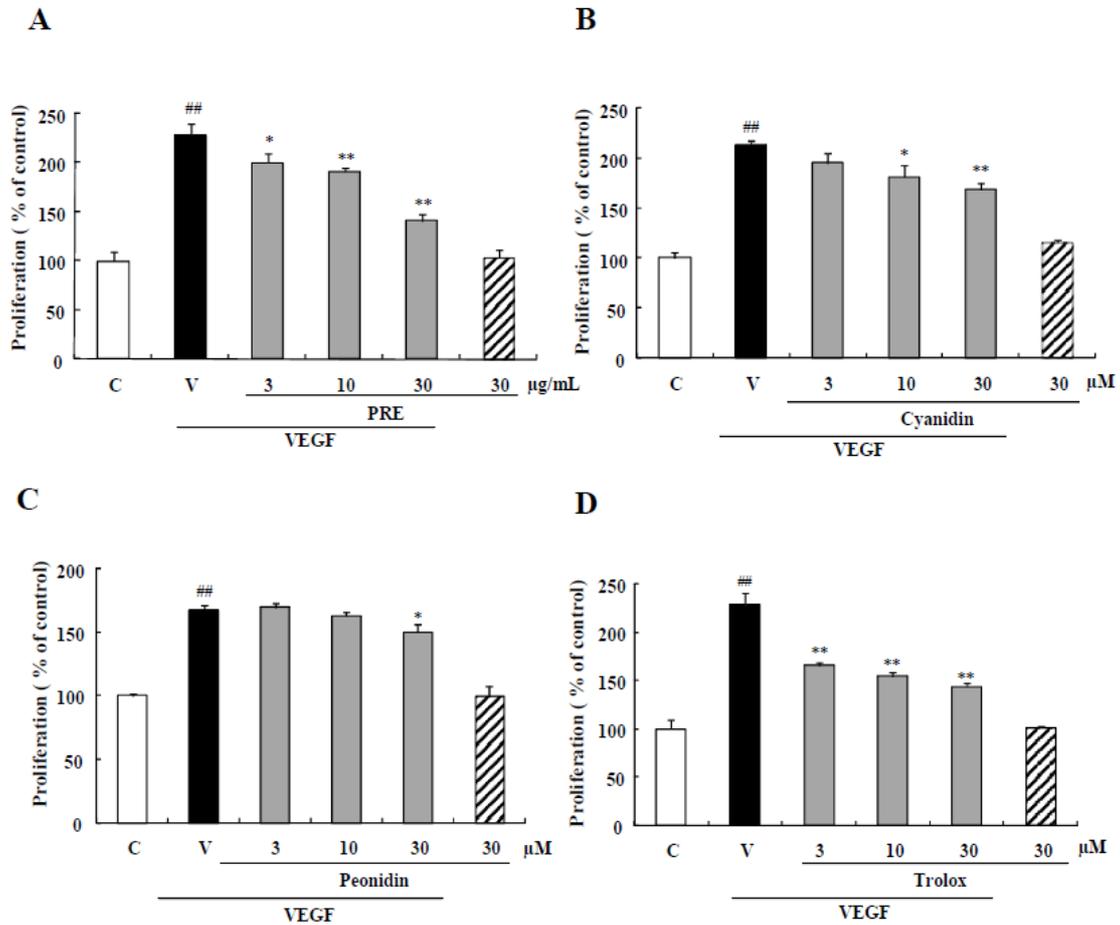


Fig. 22 Effects of PRE and anthocyanidins on VEGF-induced proliferation in HRMECs. HRMECs were incubated with the indicated concentrations of (A) PRE, (B) cyanidin, (C) peonidin, and (D) trolox in the presence or absence of VEGF (10 ng/mL) for 24 h at 37°C in 5% CO₂ with humidity. Cell proliferation was estimated using a cell counting kit-8 (CKK-8). VEGF treatments increased cell viability vs. control. PRE (3-30 µg/mL), cyanidin (10-30 µM), peonidin (30 µM), and trolox (3-30 µM) inhibited the proliferation. Data are shown as means ± SEM ($n = 6$). C: control; V: vehicle. ^{##}, $P < 0.01$ versus control (Student's t -test), and ^{*}, $P < 0.05$, ^{**}, $P < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test).

3-3 VEGF 誘発ヒト網膜毛細血管内皮細胞の遊走に対する黒米エキス, cyanidin および peonidin の作用

黒米エキス (PRE) およびその構成成分 (cyanidin および peonidin) のさらなる血管新生に対する作用を評価するために、ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) を用いて VEGF 誘発細胞遊走に対する作用を検討した。その結果、VEGF (10 ng/ml) 添加により HRMECs は、対照群と比較して 1.9-2.4 倍の細胞遊走が認められた。PRE (10-30 μ g/ml), cyanidin (10-30 μ M), peonidin (10-30 μ M) および trolox (30 μ M) は、VEGF 誘発 HRMECs の遊走に対して濃度依存的かつ有意な抑制作用が認められた (Fig. 23)。

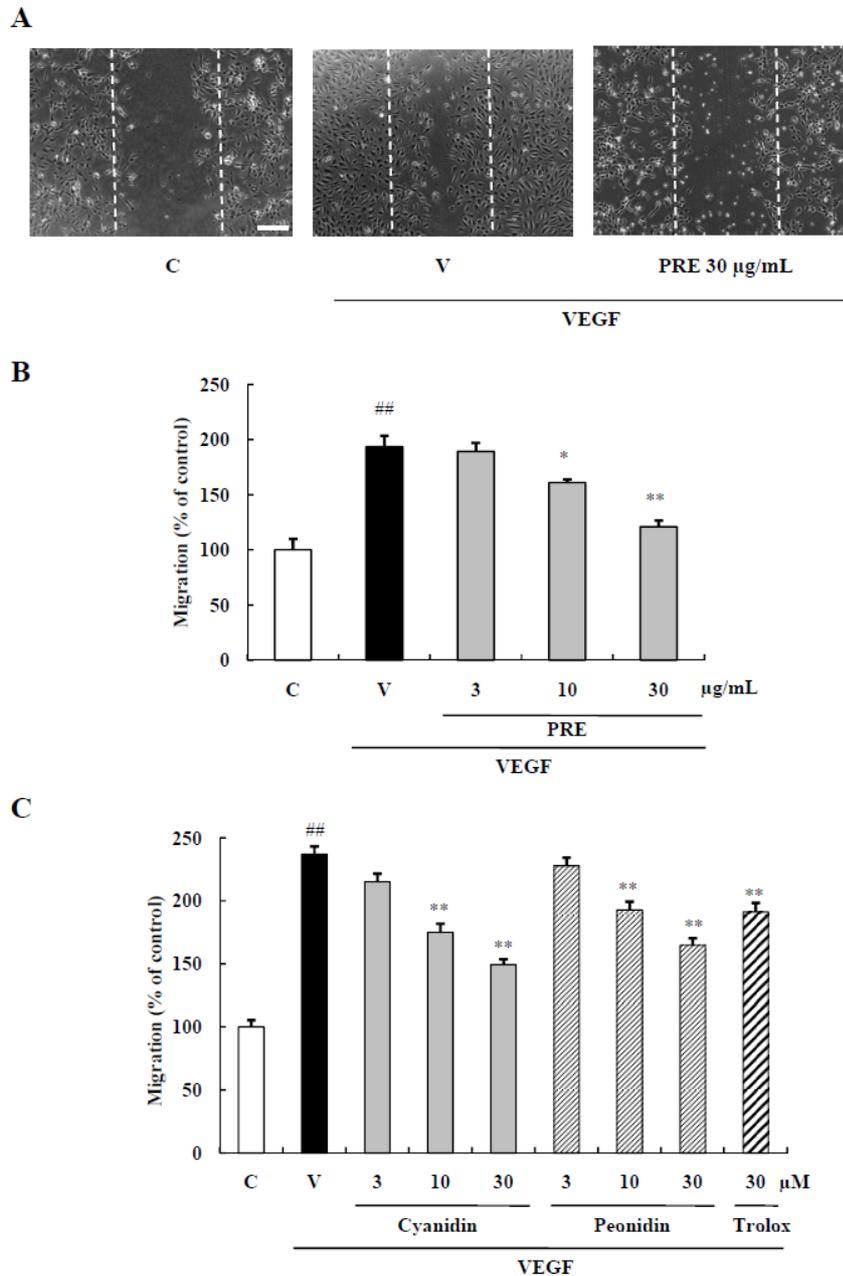


Fig. 23 Effects of PRE and anthocyanidins on VEGF-induced migration and *in vitro* wound healing.

(A) Images of wounded monolayers of HRMECs taken 24 h after treatment with control, VEGF alone (10 ng/mL), or VEGF plus PRE (30 µg/mL). Migration was estimated by measuring the cell numbers within the wounded region after treatment with VEGF plus: (B) PRE or (C) cyanidin, peonidin, and trolox. Data are shown as means \pm SEM ($n = 3$ or 4). C: control; V: vehicle. ##, $P < 0.01$ versus control (Student's t -test), and *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ versus vehicle (Dunnett's test). The scale bar indicates a 250 µm length.

3-4 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの解析

これまでの研究において黒米エキス (PRE) およびその構成成分 (cyanidin および peonidin) に VEGF 誘発血管新生に対する阻害作用が認められた。つぎに、さらなる作用機序を検討するために VEGF 誘発血管新生において重要な細胞内シグナル伝達因子である分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) に注目した。リン酸化 ERK1/2 は VEGF 誘発細胞増殖に関与し、リン酸化 p38 は VEGF 誘発細胞遊走に関与する事が既に報告されている (Wu *et al.*, 2000; Rousseau *et al.*, 1997)。そこで、PRE を用いて VEGF 刺激による MAPK 活性化に対する作用を検討した。VEGF (10 ng/ml) 刺激によって ERK および p38 のリン酸化レベルは、それぞれ 2.4 倍および 2.1 倍に増加した (Fig. 24)。VEGF 誘発 ERK1/2 および p38 のリン酸化は、PRE (30 μ g/ml) 添加により有意な抑制作用が認められた (Fig. 24)。また、PRE 単独添加は ERK および p38 の総発現量およびリン酸化に影響を及ぼさなかった。

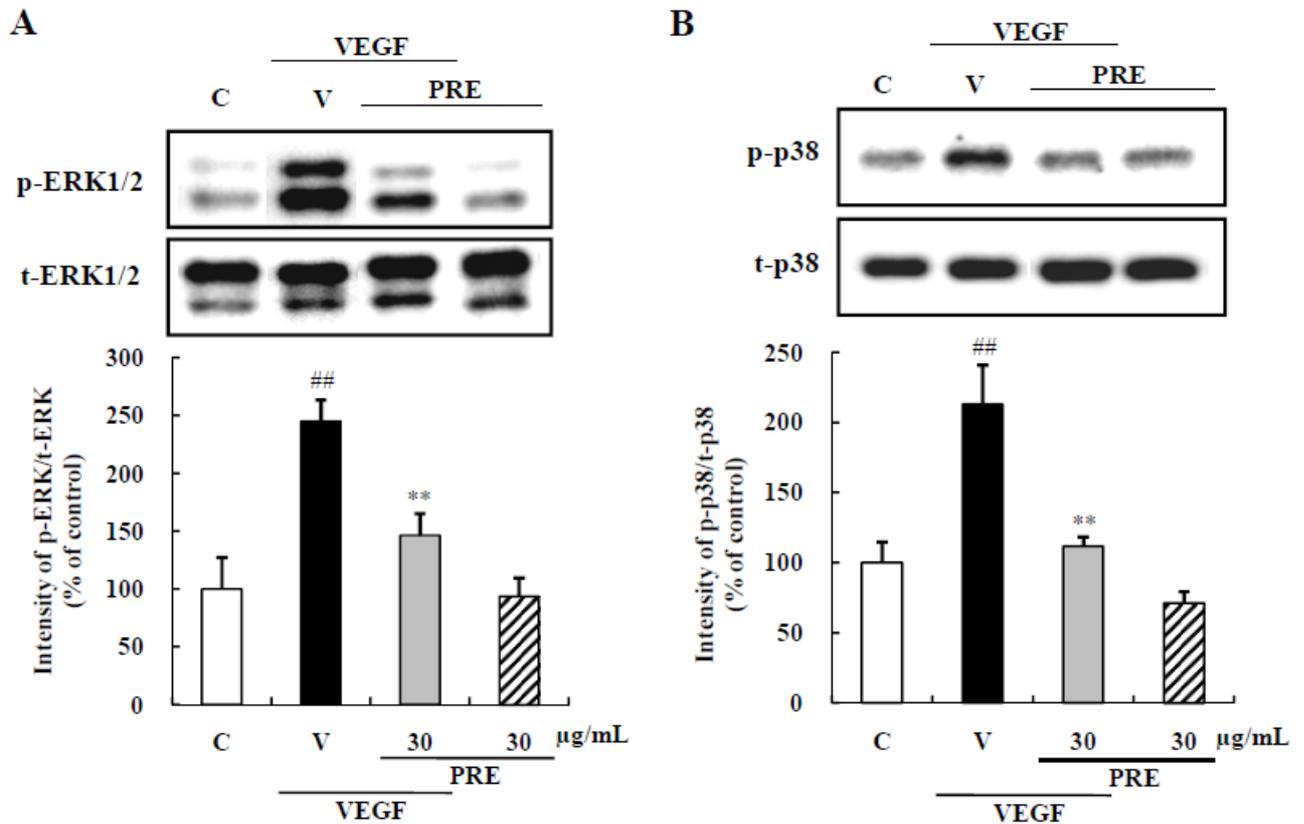


Fig. 24 Effects of PRE on phosphorylation of ERK 1/2 and p38 induced by VEGF.

HRMECs were incubated in 2% FBS DMEM containing HEPES for a further 1 h, and the medium was then changed to one containing VEGF (10 ng/mL) with or without PRE (30 µg/mL). Phosphorylation of (A) ERK1/2 and (B) p38 was determined by immunoblotting assays. Blots were scanned and quantified by densitometric analysis, with the phosphorylated-ERK and -p38 blots (p-ERK1/2 and p-p38) expressed relative to the total-ERK and -p38 (t-ERK1/2 and t-p38). Data are shown as means \pm SEM ($n = 5$). C: control; V: vehicle. ##, $P < 0.01$ versus control, and **, $P < 0.01$ versus vehicle (Student's t -test).

第4節 考察

本研究では、黒米エキス (PRE) およびその構成成分である peonidin のヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) における VEGF 誘発管腔形成に対する作用について検討した。PRE および peonidin は、HUVECs とヒト線維芽細胞の共培養系における VEGF 誘発管腔形成を抑制した。さらに、以前の研究で cyanidin (10 μ M) による VEGF 誘発管腔形成抑制作用が明らかにされている (Matsunaga *et al.*, 2010b)。VEGF は、*in vitro* および *in vivo* の両方において内皮細胞の増殖および遊走、細胞外マトリックスのリモデリングおよび管腔の形成等の血管新生の多くの過程を促進する (Ferrara, 1995)。抗 VEGF 抗体、soluble VEGF receptor-1 (sVEGFR-1) およびアンチセンス VEGF シーケンス等は、血管新生を阻害する事が報告されている (Kim *et al.*, 1993; Kendall and Thomas, 1993; Saleh *et al.*, 1996)。これらの知見より、VEGF は血管新生を制御する最も重要なファクターの一つであると言える。

血管新生は数段階によって引き起こされる、すなわち、細胞外マトリックスの分解、内皮細胞の遊走および増殖、管腔形成や周皮細胞の接着の順に進展する。そこで、PRE およびその主要成分 (cyanidin および peonidin) の VEGF 誘発管腔形成抑制作用について、その作用機序解明のために HUVECs およびヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) の増殖および遊走に対する作用について検討を行った。PRE (10 および 30 μ g/ml), cyanidin (10 および 30 μ M) および peonidin (10 および 30 μ M) は、HUVECs または HRMECs の VEGF 誘発増殖および遊走に対して有意な抑制作用を示した。これらの抑制作用より、PRE および含有アントシアニンの VEGF 誘発管腔形成抑制に内皮細胞の増殖および遊走の両方の抑制作用が関与している事が示唆された。また、PRE の血管新生抑制作用に関する活性成分として cyanidin および peonidin の関与が示唆された。Han らは、黒

米から oryzafuran, quercetin および protocatechuic acid を単離しており、これらの化合物が ascorbic acid と比較して強いラジカル捕捉活性を有する事を報告している (Han *et al.*, 2004)。Quercetin もまた HUVECs における VEGF 誘発管腔形成抑制作用を示すことから (Kim *et al.*, 2006), PRE の今回の検討における活性成分の一つであると考えられる。

スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロキシラジカル等の活性酸素種は血管新生を促進することが知られている (Yasuda *et al.*, 1999)。また、酸化ストレスは、*in vitro* 下で VEGF の産生を促進し、糖尿病ラットおよび高コレステロール血症ブタにおいては VEGF 発現上昇を誘発する (Obrosova *et al.*, 2001; Chade *et al.*, 2004)。それに対して抗酸化薬である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) は、VEGF 誘発の *in vitro* 管腔形成を抑制する (Redondo *et al.*, 2000)。また、ビタミン E 誘導体である trolox は、ラット高酸素負荷網膜血管新生モデルにおいて血管新生を抑制する (Penn *et al.*, 1997)。これらの結果は、*in vitro* および *in vivo* において抗酸化薬が血管新生阻害作用を有することを示唆しており、活性酸素種は血管新生において重要な役割を果たしていると考えられる。本研究においても trolox (30 μ M) は、HUVECs および HRMECs における VEGF 誘発細胞増殖および遊走に対する抑制作用が認められた。また、第 1 章で述べたように電子スピン共鳴法 (electron spin resonance: ESR) を用いた試験では、PRE は trolox と比較して強い抗酸化活性を有する (Tanaka *et al.*, 2011)。PRE はまた、同濃度の trolox よりも 10-25 倍強いスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性を有する (Ichikawa *et al.*, 2001)。以上、PRE の VEGF 誘発血管新生抑制作用の機序の一部に抗酸化作用が関与する可能性が示唆された。

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) である ERK 1/2 のリン酸化は HUVECs の増殖に重要である (Wu *et al.*, 2000)。Ali らは、ERK 1/2 阻害薬

である PD98059 を用いて VEGF 誘発 HUVECs 増殖抑制作用を報告しているが、遊走作用については抑制作用を示さない事も同時に報告している (Ali *et al.*, 2005)。したがって、作用機序解明のために、HRMECs における PRE の VEGF 誘発リン酸化 ERK 1/2 に対する作用について検討した。本研究では、PRE (30 $\mu\text{g/ml}$) は HRMECs における VEGF 誘発 ERK 1/2 のリン酸化に対する有意な抑制作用を示した。一方、以前の研究において p38 は分子シャペロンである heat shock protein-27 のリン酸化を誘導し、最終的に VEGF 誘発アクチン再構成および細胞遊走を調節する事が報告されている (McMullen *et al.*, 2005)。Rousseau らもまた、p38 阻害薬である SB203580 を用いて HUVECs における VEGF 誘発細胞増殖および ERK 1/2 のリン酸化に対して抑制作用を示さない事を明らかにしている (Rousseau *et al.*, 1997)。そこでつぎに HRMECs における PRE の VEGF 誘発リン酸化 p-38 に対する作用について検討した。PRE (30 $\mu\text{g/ml}$) は VEGF 誘発 p38 のリン酸化を抑制し、PRE の単独添加では p38 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。以上の結果より、PRE の VEGF 誘発増殖抑制作用に ERK 1/2 上流のシグナル抑制が関与している事が考えられた。また、PRE の VEGF 誘発遊走抑制作用に p38 上流のシグナル抑制が関与している事が示唆された。フラボンおよび PD98059 等のフラボノイドは、ERK 1/2 のリン酸化を抑制する事が報告されている (Reiners *et al.*, 1998) ことから、フラボノイド骨格であるアントシアニンも直接細胞内のシグナル経路に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。アントシアニンである cyanidin は、血管平滑筋細胞における p38 の活性化を抑制する事により、VEGF の発現を阻害する (Oak *et al.*, 2006)。以上の結果より、PRE の HRMECs における VEGF 誘発 ERK 1/2 および p38 のリン酸化抑制作用の活性成分の一つに cyanidin および peonidin の関与が示唆された。

本研究から、PRE およびその主要成分である cyanidin および peonidin に顕著

な血管新生阻害作用が認められた。また、その血管新生阻害作用には、MAPK経路の活性化に対する阻害作用が関与している可能性が示唆された (Fig. 25)。

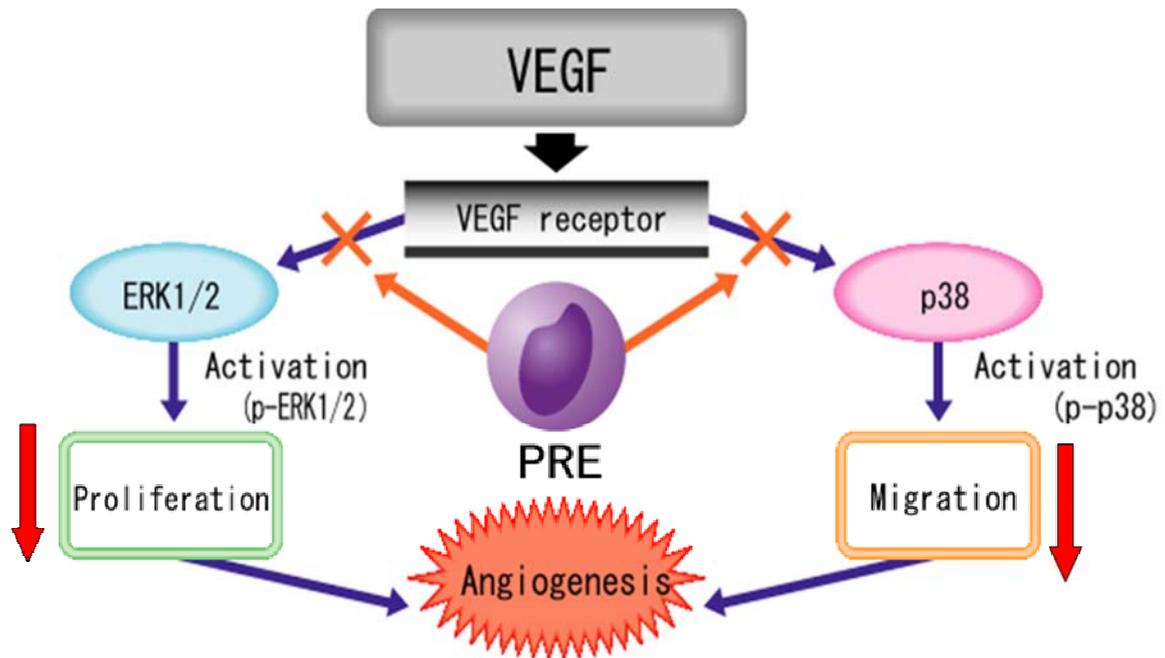


Fig. 25 Putative mechanism of PRE on VEGF-induced angiogenesis.

PRE reduces the VEGF-induced proliferation through inhibiting direct and/or upstream of ERK 1/2 and the VEGF-induced migration through inhibiting direct and/or upstream of p38.

PRE: purple rice extract.

総括および結論

代表的な後眼部疾患としては、緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性症および加齢黄斑変性症が挙げられる。これらの後眼部疾患はわが国および欧米における中途失明原因の上位を占めている。また、患者数が年々増加傾向にあるにも拘わらず、有効な薬物的および外科的な治療法は確立していない。そこで、代替医療・予防医療を目的として上記の後眼部疾患に対する黒米からアントシアニンを抽出したエキス (purple rice extract: PRE) の作用について本研究を行った。まず、初めに網膜色素変性症および加齢黄斑変性症と関連が深い可視光誘発網膜障害に対する PRE および主アントシアニンである cyanidin および peonidin の作用について検討を行った。また、上記後眼部疾患の発症および進行に関わる重要な因子である酸化ストレスに対する PRE の作用を検討するため、電子スピン共鳴法 (electron spin resonance: ESR) を用いて抗酸化活性を評価した。つづいて、緑内障等の神経変性疾患との関連が指摘されている小胞体ストレス誘発網膜細胞死に対する PRE および各種アントシアニンの作用について検討を行った。さらに、糖尿病網膜症および加齢黄斑変性症の発症に関与する VEGF 誘発網膜血管新生に対する PRE およびその構成成分の作用について検討を行った。

第 1 章では、PRE およびその構成成分の可視光誘発網膜障害に対する作用を *in vitro* および *in vivo* モデルを用いて検討した。また、その作用機序を検討するため視細胞内 ROS 産生に対する作用を検討した。さらに、ESR を用いてフリーラジカル消去作用を検討した。

- 1) PRE は、可視光誘発視細胞 (661W) 死に対して抑制作用を示した。また、PRE の構成成分である cyanidin および peonidin においても抑制作用が認めら

れた。

- 2) PRE は, 661W 内における可視光誘発 ROS の発生を抑制した。また, cyanidin および peonidin においても ROS 産生抑制作用が認められた。
- 3) PRE は, 抗酸化剤 (trolox) と比較して, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル, スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) およびヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) に対する強い捕捉活性が認められた。一方, cyanidin および peonidin は, trolox と比べて強い DPPH ラジカルおよび $\cdot\text{O}_2^-$ 消去作用を示したが, $\cdot\text{OH}$ に対して明らかな作用を示さなかった。
- 4) PRE は, 可視光誘発マウス網膜障害に対して網膜の外顆粒層の萎縮を抑制した。

第 2 章では近年, 緑内障およびアルツハイマー病等の神経変性との関連が指摘されている小胞体ストレスに注目し, PRE およびその構成成分の小胞体ストレス誘発網膜神経節細胞死に対する作用について *in vitro* および *in vivo* モデルを用いて検討を行った。また, その作用機序を検討するため, 小胞体ストレス関連遺伝子およびカスパーゼの活性化を介した細胞死の経路に対する作用を検討した。

- 1) PRE およびその主成分である cyanidin は, 過酸化水素誘発の網膜神経節細胞死を抑制した。
- 2) PRE およびその構成成分である cyanidin および 2-hydroxy-5-[(3S)-3-hydroxybutyl] phenyl- β -D-glucoside (HHPG) は, ツニカマイシン誘発の網膜神経節細胞死を抑制した。
- 3) PRE は, 小胞体ストレス関連遺伝子である immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) および C/EBP homologous protein (CHOP) の発現に影響

を及ぼさなかった。

- 4) PRE, cyanidin および HHPG は, ツニカマイシン誘発のカスパーゼ 3 の活性化を抑制した。
- 5) PRE は, ツニカマイシン誘発マウス網膜障害に対して網膜神経節細胞層の細胞減少を抑制した。

第 3 章では, PRE およびその構成成分の網膜血管新生に対する作用を *in vitro* 血管新生モデル (細胞増殖, 細胞遊走および管腔形成試験) を用いて検討した。また, その作用機序を検討するため mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化に対する作用を検討した。

- 1) PRE およびその構成成分である peonidin は, VEGF 誘発による血管内皮細胞の管腔形成を抑制した。
- 2) PRE およびその構成成分である cyanidin および peonidin は, VEGF 誘発による網膜血管内皮細胞増殖を抑制した。
- 3) PRE およびその構成成分である cyanidin および peonidin は, VEGF 誘発による網膜血管内皮細胞遊走を抑制した。
- 4) PRE は, VEGF 誘発 MAPK 活性化に対して抑制作用を示した。

本研究の結果より, PRE およびその構成成分である各種アントシアニンは, 網膜色素変性症および加齢黄斑変性症と関連が深い可視光誘発網膜障害に対して有効であることを明らかにした。また, これらの疾患の病態に重要であると考えられている酸化ストレスに対しても, PRE およびその構成成分は強い抗酸化活性を示した。さらに, PRE およびその構成成分は, 緑内障等の神経変性との関連が指摘されている小胞体ストレスに対して抑制作用を示した。PRE およ

びその構成成分は、糖尿病網膜症および加齢黄斑変性症の発症に関与する VEGF 誘発網膜血管新生に対して強い阻害作用を示した。以上の結果から、PRE および含有アントシアニンは、各種後眼部疾患に対して予防および治療効果が期待される。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原 英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導ならびに御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士および助教 鶴間一寛博士に深謝致します。また，種々の御協力を頂きました薬効解析学研究室の諸氏に心から感謝致します。さらに，ESR の測定において有益な御助言および御指導を賜りました岐阜薬科大学薬物送達学大講座薬品物理化学研究室教授 近藤伸一博士に心より感謝致します。

本論文の審査を務めていただき，有益な御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授 古川昭栄博士，岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣直樹博士並びに岐阜薬科大学医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室教授 足立哲夫博士に深謝致します。

本研究の遂行並びに本論文の作成の機会を与えてくださいましたオリザ油化株式会社代表取締役社長 村井弘道氏，取締役研究開発部長 下田博司博士，単 少傑博士に深く感謝致します。あわせて種々のご協力を頂きました研究開発部諸氏並びに全従業員の皆様に心から感謝致します。

引用文献

Abler, A. S., Chang, C. J., Ful, J., Tso, M. O., Lam, T. T. (1996) Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **92**, 177-189.

Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. V., Aiello, L. M., Ferrara, N. King, G. L. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480-1487.

Ali, N., Yoshizumi, M., Fujita, Y., Izawa, Y., Kanematsu, Y., Ishizawa, K., Tsuchiya, K., Yano, S., Sone, S., Tamaki, T. (2005) A novel Src kinase inhibitor, M475271, inhibits VEGF-induced human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration. *J. Pharmacol. Sci.* **98**, 130-141.

Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E., Passarella, S. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* **497**, 1-5.

Bonne, C., Muller, A., Villain, M. (1998) Free radicals in retinal ischemia. *Gen. Pharmacol.* **30**, 275-280.

Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. L., Hartle, D. K. (2008) Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. *J. Med. Food* **11**, 307-312.

Broggi, E., Wu, T., Namiki, A., Isner, J. M. (1994) Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* **90**, 649-652.

Chade, A. R., Bentley, M. D., Zhu, X., Rodriguez-Porcel, M., Niemeyer, S., Amores-Arriaga, B., Napoli, C., Ritman, E. L., Lerman, A., Lerman, L. O. (2004) Antioxidant intervention prevents renal neovascularization in hypercholesterolemic pigs. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1816-1825.

Chen, P. N., Kuo, W. H., Chiang, C. L., Chiou, H. L., Hsieh, Y. S., Chu, S. C. (2006) Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA

expression. *Chem. Biol. Interact.* **163**, 218-229.

Cheung, H. H., Lynn, Kelly, N., Liston, P., Korneluk, R. G. (2006) Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. *Exp. Cell Res.* **312**, 2347-2357.

Chiang, A. N., Wu, H. L., Yeh, H. I., Chu, C. S., Lin, H. C., Lee, W. C. (2006) Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids* **41**, 797-803.

Ding, M., Feng, R., Wang, S. Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B. H., Shi, X. (2006) Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 17359-17368.

Dong, A., Shen, J., Krause, M., Akiyama, H., Hackett, S. F., Lai, H., Campochiaro, P. A. (2006) Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage. *J. Cell Physiol.* **208**, 516-526.

Ferrara, N. (1995) The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast. Cancer Res. Treat.* **36**, 127-137.

Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669-676.

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27-31.

Funatsu, H., Yamashita, H., Noma, H., Mochizuki, H., Mimura, T., Ikeda, T., Hori, S. (2003) Outcome of vitreous surgery and the balance between vascular endothelial growth factor and endostain. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1042-1047.

Gao, J., Ishigaki, Y., Yamada, T., Kondo, K., Yamaguchi, S., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Sawada, S., Ishihara, H., Oyadomari, S., Mori, M., Oka, Y., Katagiri, H. (2011) Involvement of endoplasmic stress protein C/EBP homologous protein in arteriosclerosis acceleration with augmented biological stress responses. *Circulation*

124, 830-839.

Gould, D. B., Marchant, J. K., Savinova, O. V., Smith, R. S., John, S. W. (2007) Col4a1 mutation causes endoplasmic reticulum stress and genetically modifiable ocular dysgenesis. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 798-807.

Grimm, C., Wenzel, A., Hafezi, F., Remé, C. E. (2000) Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. *Mol. Vis.* **6**, 252-260.

Guo, H., Ling, W., Wang, Q., Liu, C., Hu, Y., Xia, M. (2008) Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂- or TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase activation. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1393-1401.

Han, S. J., Ryu, S. N., Kang, S. S. (2004) A new 2-arylbenzofuran with antioxidant activity from the black colored rice (*Oryza sativa* L.) bran. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **52**, 1365-1366.

Hirakawa, M., Tanaka, M., Tanaka, Y., Okubo, A., Koriyama, C., Tsuji, M., Akiba, S., Miyamoto, K., Hillebrand, G., Yamashita, T., Sakamoto, T. (2008) Age-related maculopathy and sunlight exposure evaluated by objective measurement. *Br. J. Ophthalmol.* **92**, 630-634.

Hiratsuka, T., Matsuzaki, S., Miyata, S., Kinoshita, M., Kakehi, K., Nishida, S., Katayama, T., Tohyama, M. (2010) Yokukansan inhibits neuronal death during ER stress by regulating the unfolded protein response. *PLoS One.* **5**, e13280.

Hou, Z., Qin, P., Ren, G. (2010) Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. Japonica) on chronically alcohol-induced liver damage in rats. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3191-3196.

Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W., Kitts, D. D. (2003) Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5271-5277.

Ichikawa, H., Ichiyonagi, T., Xu, B., Yoshii, Y., Nakajima, M., Konishi, T. (2001) Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *J. Med. Food* **4**,

211-218.

Imai, S., Inokuchi, Y., Nakamura, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H. (2010) Systemic administration of a free radical scavenger, edaravone, protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Eur. J. Pharmacol.* **642**, 77-85.

Inokuchi, Y., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Kurita, T., Kudo, M., Saito, A., Sajiki, H., Kudo, T., Aihara, M., Imaizumi, K., Araie, M., Hara, H. (2009) Effect of inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 334-344.

Ishisaka, M., Kakefuda, K., Yamauchi, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Tsuruta, A., Hara, H. (2011) Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1481-1486.

Ito, Y., Shimazawa, M., Inokuchi, Y., Yamanaka, H., Tsuruma, K., Imamura, K., Onoe, H., Watanabe, Y., Aihara, M., Araie, M., Hara, H. (2011) Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model. *Eur. J. Neurosci.* **33**, 843-855.

Izuta, H., Shimazawa, M., Tazawa, S., Araki, Y., Mishima, S., Hara, H. (2008) Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8944-8953.

Jang, S., Xu, Z. (2009) Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 858-862.

Jang, Y. P., Zhou, J., Nakanishi, K., Sparrow, J. R. (2005) Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* **81**, 529-536.

Joe, M. K., Sohn, S., Hur, W., Moon, Y., Choi, Y. R., Kee, C. (2003) Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 592-600.

Kalt, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A., Graf, B. A., O'Leary, J. M., Milbury, P. E. (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 705-712.

Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., George-Hyslop, P. S., Tohyama, M. (2001) Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J. Biol. Chem.* **276**, 43446-43454.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., Connolly, D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312.

Kendall, R. L., Thomas, K. A., (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10705–10709.

Kim, J. D., Liu, L., Guo, W., Meydani, M. (2006) Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 165-176.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* **362**, 841-844.

Krishnamoorthy, R. R., Crawford, M. J., Chaturvedi, M. M., Jain, S. K., Aggarwal, B. B., Al-Ubaidi, M. R., Agarwal, N. (1999) Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 3734-3743.

Laokuldilok, T., Shoemaker, C. F., Jongkaewwattana, S., Tulyathan, V. Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. (2011) *J. Agric. Food Chem.* **59**, 193-199.

LaVail, M. M., Gorrin, G. M., Repaci, M. A., Thomas, L. A., Ginsberg, H. M. (1987)

Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 1043-1048.

Li, Z. Y., Tso, M. O., Wang, H. M., Organisciak, D. T. (1985) Amelioration of photic injury in rat retina by ascorbic acid: a histopathologic study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**, 1589-1598.

Lin, C. H., Ding, H. Y., Kuo, S. Y., Chin, L. W., Wu, J. Y., Chang, T. S. (2011) Evaluation of *in vitro* and *in vivo* depigmenting activity of raspberry ketone from *Rheum officinale*. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 4819-4835.

Lo, Y. Y., Cruz, T. F. (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 11727-11730.

Mahakunakorn, P., Tohda, M., Murakami, Y., Matsumoto, K., Watanabe, H. (2004) Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 38-46.

Marc, R. E., Jones, B. W., Watt, C. B., Vazquez-Chona, F., Vaughan, D. K., Organisciak, D. T. (2008) Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol. Vis.* **14**, 782-806.

Matsumoto, H., Nakamura, Y., Tachibanaki, S., Kawamura, S., Hirayama, M. (2003) Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3560-3563.

Matsumoto, H., Nakamura, Y., Iida, H., Ito, K., Ohguro, H. (2006) Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Exp. Eye. Res.* **83**, 348-356.

Matsunaga, N., Imai, S., Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Yokota, S., Araki, Y., Hara, H. (2009) Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 869-877.

Matsunaga, N., Chikaraishi, Y., Shimazawa, M., Yokota, S., Hara, H. (2010a) *Vaccinium*

myrtillus (bilberry) extracts reduce angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **7**, 47-56.

Matsunaga, N., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yokota, S., Hara, H. (2010b) Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis. *Phytother. Res.* **24**, 42-47.

McKinnon, S. J. (1997) Glaucoma, apoptosis, and neuroprotection. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **8**, 28-37.

McMullen, M. E., Bryant, P. W., Glembotski, C. C., Vincent, P. A., Pumiqlia, K. M. (2005) Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 20995-21003.

Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., Ullrich, A. (1994) Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* **367**, 576-579.

Morazzoni, P., Bombar, E. D. (1996) *Vaccinium myrtillus*. *Fitoterapia*, **67**, 3-29.

Morimoto, C., Satoh, Y., Hara, M., Inoue, S., Tsujita, T. Okuda, H. (2005) Anti-obese action of raspberry ketone. *Life Sci.* **77**, 194-204.

Muller, A., Maurin, L., Bonne, C. (1998) Free radicals and glutamate uptake in the retina. *Gen Pharmacol.* **30**, 315-318.

Murrell, G. A., Francis, M. J., Bromley, L. (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* **265**, 659-665.

Nakajima, Y., Shimazawa, M., Otsubo, K., Ishibashi, T., Hara, H. (2009) Zeaxanthin, a retinal carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress. *Curr. Eye Res.* **34**, 311-318.

Nam, S. H., Choi, S. P., Kang, M. Y., Kozukue, N., Friedman, M. (2005) Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 816-822.

Neufeld, A. H. (1999) Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage

in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* **43**, S129-135.

Noell, W. K., Walker, V. S., Kang, B. S., Berman, S. (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol.* **5**, 450-473.

Oak, M. H., Bedoui, J. E., Madeira, S. V., Chalupsky, K., Schini-Kerth, V. B. (2006) Delphinidin and cyanidin inhibit PDGF_{AB}-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 283-290.

Obrosova, I. G., Minchenko, A. G., Marinescu, V., Fathallah, L., Kennedy, A., Stockert, C. M., Frank, R. N., Stevens, M. J. (2001) Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **44**, 1102-1110.

Ohsugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Saitoh, T., Tazawa, K., Kadota, S. (1999) Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing- tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *J. Ethnopharmacol.* **67**, 111-119.

Organisciak, D. T., Wang, H. M., Li, Z. Y., Tso, M. O. (1985) The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**, 1580-1588.

Organisciak, D. T., Darrow, R. M., Jiang, Y. I., Marak, G. E., Blanks, J. C. (1992) Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 1599-1609.

Oyadomari, S., Araki, E., Mori, M. (2002) Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* **7**, 335-345.

Penn, J. S., Tolman, B. L., Bullard, L. E. (1997) Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 977-984.

Plank, M. J., Sleeman, B. D. (2003) A reinforced random walk model of tumour angiogenesis and anti-angiogenic strategies. *Math. Med. Biol.* **20**, 135-181.

Rao, R. V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P. C., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* **514**, 122-128.

Rao, R. V., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* **11**, 372-380.

Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., Lee, A. S. (2003) Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 20915-20924.

Redondo, P., Bandres, E., Solano, T., Okroujnov, I., Garcia-Foncillas, J. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. *N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro.* *Cytokine* **12**, 374-378.

Reiners, J. J. Jr, Lee, J. Y., Clift, R. E., Dudley, D. T., Myrand, S. P. (1998) PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Pharmacol.* **53**, 438-445.

Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.

Roduit, R., Schorderet, D. F. (2008) MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. *Apoptosis* **13**, 343-353.

Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J. (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15**, 2169-2177.

Roybal, C. N., Yang, S., Sun, C. W., Hurtado, D., Vander, Jagt, D. L., Townes, T. M., Abcouwer, S. F. (2004) Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J. Biol. Chem.* **279**, 14844-14852.

Ryu, E. J., Harding, H. P., Angelastro, J. M., Vitolo, O. V., Ron, D., Greene, L. A. (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **22**, 10690-10698.

Saleh, M., Stacker, S. A., Wilks, A. F., (1996) Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res.* **56**, 393-401.

Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P. A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo. J.* **10**, 2247-2258.

Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., Dvorak, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985.

Shih, P. H., Yeh, C. T., Yen, G. C. (2007) Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9427-9435.

Shimazawa, M., Inokuchi, Y., Ito, Y., Murata, H., Aihara, M., Miura, M., Araie, M., Hara, H. (2007a) Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol. Vis.* **13**, 578-587.

Shimazawa, M., Ito, Y., Inokuchi, Y., Hara, H. (2007b) Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 3729-3736.

Shimoda, K., Harada, T., Hamada, H., Nakajima, N., Hamada, H. (2007) Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry* **68**, 487-492.

Sone, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Kondo, S., Hanatani, M., Suzuki, H., Yamashita, K. (1996) Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 193-198.

Tamm, C., Zhivotovsky, B., Ceccatelli, S. (2008) Caspase-2 activation in neural stem cells undergoing oxidative stress-induced apoptosis. *Apoptosis* **13**, 354-363.

Tamura, S., Yan, K., Shimoda, H., Murakami, N. (2010) Anthocyanins from *Oryza sativa* L. subsp. indica. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**, 438-440.

Tanaka, J., Nakanishi, T., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Shimoda, H., Hara, H. (2011) Purple rice extract and anthocyanidins of the constituents protect light-induced retinal damage *in vitro* and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 528-536.

Tanaka, J., Nakamura, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Shimoda, H., Hara, H. (2012) Purple rice (*Oryza sativa* L.) extract and its constituents inhibit VEGF-induced angiogenesis. *Phytother. Res.* **26**, 214-222.

Tanito, M., Masutani, H., Nakamura, H., Ohira, A., Yodoi, J. (2002) Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1162-1167.

Tomany, S. C., Cruickshanks, K. J., Klein, R., Klein, B. E., Knudtson, M. D. (2004) Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* **122**, 750-757.

Tomidokoro, A. (2006) Clinical application of glaucoma medications. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **128**, 255-258.

Wang, X. Z., Lawson, B., Brewer, J. W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L. J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L. M., Ron, D. (1996) Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol. Cell Biol.* **16**, 4273-4280.

Wiseman, R. L., Zhang, Y., Lee, K. P., Harding, H. P., Haynes, C. M., Price, J., Sicheri, F., Ron, D. (2010) Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1. *Mol. Cell* **38**, 291-304.

Wolfe, J. T., Ross, D., Cohen, G. M. (1994) A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett.* **352**, 58-62.

- Wood, J. P., Lascaratos, G., Bron, A. J., Osborne, N. N. (2007) The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells. *Mol. Vis.* **14**, 334-344.
- Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Baerwald, M. R., Jaffe, E. A., Wang, D., Warren, R. S., Donner, D. B. (2000) Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **275**, 5096-5103.
- Yamamoto, T., Iwase, A., Araie, M., Suzuki, Y., Abe, H., Shirato, S., Kuwayama, Y., Mishima, H. K., Shimizu, H., Tomita, G., Inoue, Y., Kitazawa, Y. (2006). The Tajimi Study report 2: prevalence of primary angle closure and secondary glaucoma in a Japanese population. *Ophthalmology*, **112**, 1661-1669.
- Yang, L. P., Zhu, X. A., Tso, M. O. (2007) Role of NF-kappaB and MAPKs in light-induced photoreceptor apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 4766-4776.
- Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., Ren, G. (2010) Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 770-774.
- Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T., Kuroiwa, Y. (1999) Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.* **64**, 249-258.
- Yu, Z., Luo, H., Fu, W., Mattson, M. P. (1999) The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* **155**, 302-314.

略語一覽表

AGEs	: advanced glycation end products
ATF6	: activating transcription factor 6
BCA	: bicinchoninic acid
BCIP/NBT	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium
BiP	: immunoglobulin heavy chain-binding protein
BSA	: bovine serum albumin
CCK-8	: cell counting kit-8
CHOP	: C/EBP homologous protein
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC-SOD	: extracellular-SOD
ERK	: extracellular-signal-regulated kinase
ESR	: electron spin resonance
FBS	: fetal bovine serum
FGF	: fibroblast growth factor
GCL	: ganglion cell layer
hEGF	: human epidermal growth factor
HE	: hematoxylin and eosin staining
HEL	: N ϵ -Hexanoyl-Lysine
HEPES	: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
hFGF B	: human fibroblast growth factor B
HPLC	: high performance liquid chromatography

HRMECs	:	human retinal microvascular endothelial cells
HRP	:	horseradish peroxidase
HUVECs	:	human umbilical vein endothelial cells
IC ₅₀	:	half maximal inhibitory concentration
IPL	:	inner plexiform layer
IRE1	:	inositol-requiring enzyme 1
Keap1	:	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDL	:	low-density lipoprotein
LPS	:	lipopolysaccharide
MAPK	:	mitogen-activated protein kinase
MMP	:	matrix metalloproteinase
NADPH	:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMDA	:	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
Nrf2	:	nuclear factor-erythroid-2- related factor 2
p38	:	p38 mitogen activated protein kinase
PAO	:	potential antioxidant
PBS	:	phosphate buffered saline
PDGF	:	platelet-derived growth factor
PERK	:	PKR-like ER kinase
PI	:	phosphatidylinositol
PKC	:	protein kinase C
PRE	:	purple rice extract
RGC	:	retinal ganglion cell
ROS	:	reactive oxygen species

SDS-PAGE	:	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	:	standard error mean
SOD	:	superoxide dismutase
TMB	:	3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine
TNF- α	:	tumor necrosis factor- α
UPR	:	unfolded protein response
VEGF	:	vascular endothelial growth factor
VEGFR	:	VEGF receptor
WST-8	:	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl) -2H tetrazolium monosodium salt