

アントシアニン含有素材の  
眼細胞障害に関する薬理学的研究

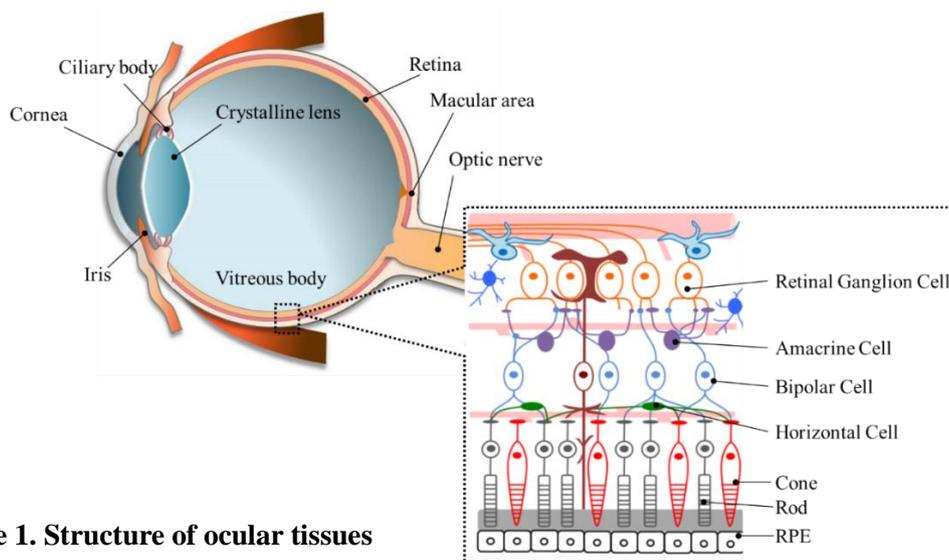
大江 絵美

## 目 次

序論	1 頁
第 1 章 酸化ストレス誘発網膜視細胞障害に対するインディゴ・ローズ抽出物の作用	
第 1 節 緒言	7 頁
第 2 節 実験材料及び方法	9 頁
第 3 節 結果	16 頁
第 4 節 考察	27 頁
第 2 章 青色 LED 誘発網膜視細胞障害における小胞体ストレス関連因子の関与及びビルベリーエキスの保護作用	
第 1 節 緒言	32 頁
第 2 節 実験材料及び方法	38 頁
第 3 節 結果	45 頁
第 4 節 考察	63 頁
第 3 章 青色 LED 誘発角膜上皮細胞障害に対するビルベリーエキスの保護作用	
第 1 節 緒言	71 頁
第 2 節 実験材料及び方法	74 頁
第 3 節 結果	79 頁
第 4 節 考察	88 頁
総括及び結論	91 頁
謝辞	95 頁
引用文献	96 頁
略語一覧表	129 頁

## 序論

眼は光を受容する感覚器官であり、眼で受け取った光の情報が電気信号に変換され後頭葉の視覚野に伝わることで我々は視覚情報を得ている。眼に届く光の情報は、前眼部の角膜 (Cornea) 及び水晶体 (Crystalline lens) で屈折し、硝子体 (Vitreous body) を通過して網膜 (Retina) に到達する。毛様体筋 (Ciliary body) は水晶体の厚みを変化させ、網膜に到達する光の像のピント調節を行っており、虹彩 (Iris) によって眼に入る光の量は調節されている。網膜は層状構造をとり、内側から視神経 (Optic nerve)、網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell: RGC)、アマクリン細胞 (Amacrine cell)、双極細胞 (Bipolar cell)、水平細胞 (Horizontal cell)、視細胞 (Photoreceptor cell)、網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelial cell : RPE) からなる (Fig. 1) (Roche et al. 2016)。

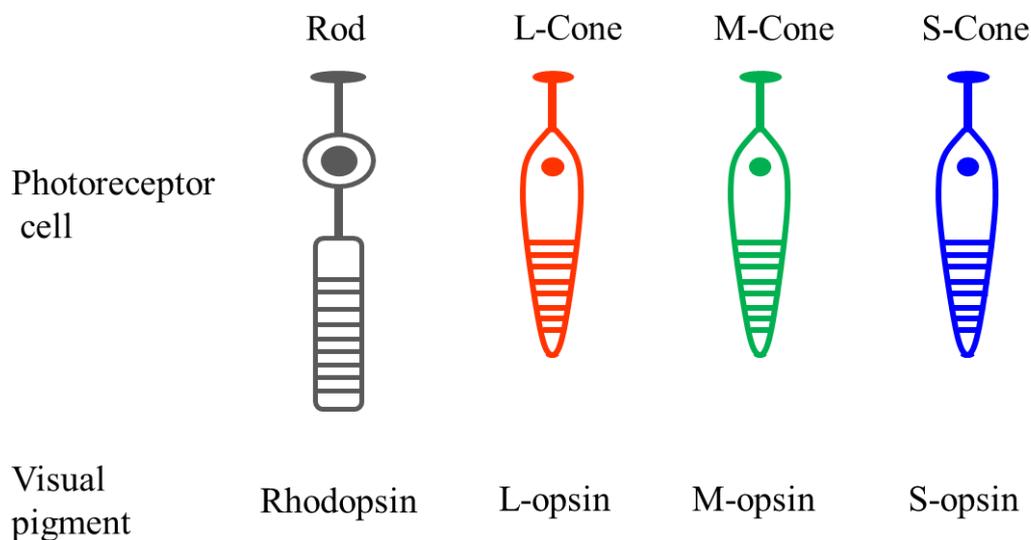


**Figure 1. Structure of ocular tissues**

Figure modified from Roche S. L., et al. *Int. J. Dev. Biol.* 60, 4-6, 127-39., 2016

網膜に到達した光刺激は、光受容器である視細胞によって感受される。視細胞は外節の形態が異なる、杆体細胞と錐体細胞が存在する。杆体細胞は視物質としてロドプシンを有しており、周辺視野や暗がりでの光の感知に関わってい

る (Rippes et al. 1987; Hess et al. 1989)。錐体細胞は網膜の中心窩に集中して存在し、視力や色覚を担っている。錐体細胞は視物質の種類によって3種類に分類され、受け取る光の波長が異なる。3種類の錐体細胞はそれぞれ、赤を感受する錐体 (L 錐体)、緑を感受する錐体 (M 錐体)、青を感受する錐体 (S 錐体) である (Fig. 2)。3種類の錐体細胞は、それぞれ特定の範囲の波長に最も反応するオプシタンパク質を含む。いずれの視細胞も、視物質が光子を受け取ることで、細胞内に電圧の変化が生じる (Drachev et al. 2018)。



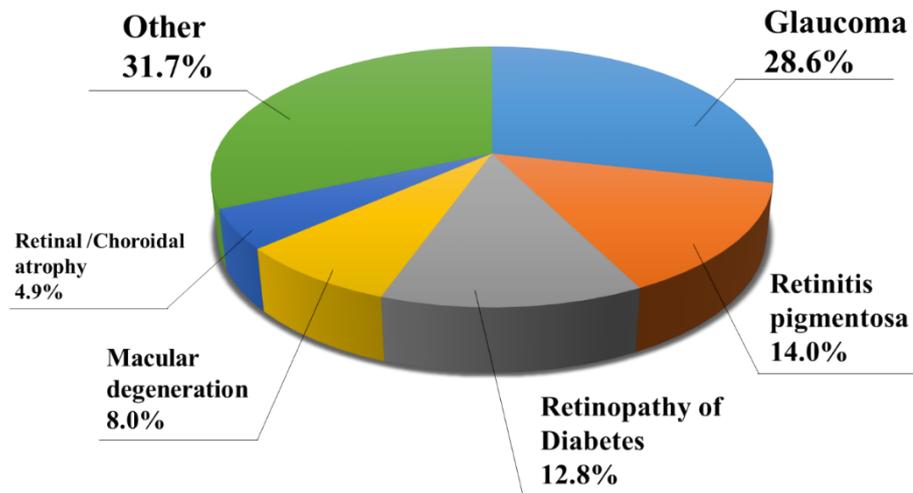
**Figure 2. Combination of photoreceptor cells and visual pigment**

Figure modified from Drachev L A., et al. *Biochem Biophys Res Commun.* S0006-291X, 30118-9., 2018.

この電気信号は、外網状層及び内顆粒層に存在する双極細胞、水平細胞及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 RGC に到達し、視神経を経て脳へ情報が伝えられることにより映像として認識される (Grinvald et al. 1994; Shimazu et al. 1999)。

本邦における中途失明原因の上位には、緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変

性症、加齢黄斑変性などが挙げられており、これらはいずれも後眼部領域の疾患である (Fig. 3)。



**Figure 3. Cause of blindness in Japan**

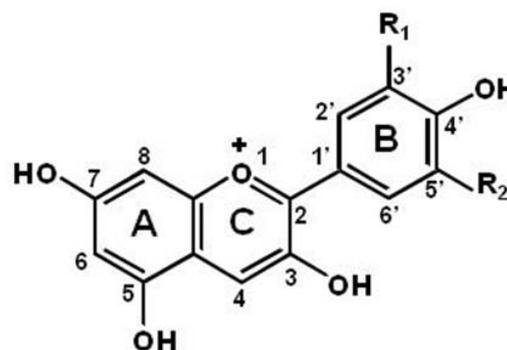
Figure modified from Health and labor sciences research grants intractable disease policy research project, Research Report, 2017.

これらの疾患の中でも、加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD) や網膜色素変性症 (Retinitis pigmentosa : RP) の発症や病態進行のリスク要因として、長期的な紫外線や可視光線の曝露の関与が報告されている (Margrain et al. 2004; Glazer-Hockstein et al. 2006; Cécile et al. 2014)。また、こうした眼疾患の発症及び進行には、光刺激によって誘発される種々のストレスの関与が示唆されている。過度の光曝露は視物質の代謝、すなわち視覚サイクルを過剰に活性化させ、活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) が蓄積することで酸化ストレスの一因となることが報告されている (Grimm et al. 2000; Wenzel et al. 2005; Narimatsu et al. 2013)。また、過度の光曝露によって網膜視細胞の細胞死及びポリユビキチン化タンパク質の蓄積が起こることや (Nakanishi

et al. 2013)、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に伴う小胞体 (ER) 内  $\text{Ca}^{2+}$ 恒常性の破壊が ER ストレスを誘発するという可能性が示唆されている (Donovan et al. 2001; Verkhratsky. 2005; Concannon et al. 2008)。このように、病態形成のメカニズムは徐々に明らかにされつつあるが、現状、根本的な治療法がないことから、罹患前の予防医療が重要である。

わが国は超高齢社会に突入し、生活スタイルや食生活の変化、環境ストレスなどの影響による医療費の増大が社会問題化している。医療費削減の観点からも、代替医療や予防医療の介入が注目されており、疾病罹患による Quality of life (QOL) の低下を防ぐ目的で、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。近年の機能性食品市場は毎年成長を続けている。H・B フーズマーケティング便覧 2020 (富士経済) によると、2011 年度は約 7,880 億円の市場規模であったが 2018 年度には約 9,247 億円まで成長している。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ものも数多く存在し、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。

アントシアニン (Anthocyanin) は赤~青紫色の天然色素で、フラボノイド骨格を有するフェノール成分の一種である (Fig. 4)。ナスや紫キャベツ、黒豆などの野菜や、ぶどうやベリー類といった果実に含まれている。これまでにアントシアニンは、抗酸化作用や血糖上昇抑制作用 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用) (Matsui et al. 2001a, 2001b)、動脈硬化予防 (Xia et al. 2006; Ellingsen et al. 2008)、抗腫瘍作用 (Harris et al. 2001; Lazze et al. 2004) など、様々な薬理作用が報告されている。とくに、視機能に対する作用に関しては、ブルーベリー、ビルベリー、カシス、マキベリー、黒米などのアントシアニン含有素材で報告があり、アントシアニンによるロドプシンの再合成促進作用 (Bastide et al., 1968) や、網膜神経節細胞保護作用 (Matsunaga et al. 2009, Nakamura et al. 2017)、血管新生抑制作用 (Matsunaga et al. 2010)、網膜炎症抑制作用 (Miyake et al. 2012)、毛様体筋弛緩作用 (Matsumoto et al. 2005)、視細胞障害抑制作用 (Tanaka et al. 2013; Ogawa et al. 2013, 2014, Osada et al. 2017) などが報告されている。一方、アントシアニンの臨床研究として、Visual Display Terminal (VDT) 作業による眼精疲労軽減作用 (Ozawa et al. 2014) や、糖尿病網膜症における網膜出血の減少 (Morazzoni 1996) などの報告があるが、いまだに十分な知見は得られていない。また、アントシアニン摂取後の眼内移行に関しては、ラット経口投与及び腹腔内投与またはウサギ静脈内投与後に、眼全体にアントシアニンが



Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH

Figure 4. Structure of anthocyanidins

移行し、分布することが確認されている (Matsumoto et al., 2006)。さらに、アントシアニン含有素材であるブルーベリーをブタに経口投与すると、眼、肝臓及び脳にアントシアニンが移行することが報告されている (Kalt et al., 2008)。したがって、アントシアニン含有素材の継続摂取は、眼をはじめとする臓器の機能維持に役立つと考えられる。

本研究では、眼疾患に対するアントシアニン含有天然物及びその主要成分の機能性を明らかにするために、網膜視細胞障害モデル並びに角膜上皮細胞障害モデルを用いた細胞障害に対する天然物の保護作用を検討した。まず第一章では、新規のアントシアニン含有食材である日本産インディゴ・ローズの成分分析並びにそれらの酸化ストレス関連網膜視細胞障害に対する作用について検討した。第二章では、*in vitro* 青色発光ダイオード (Light-emitting diodes : LED) 光による網膜視細胞障害に対する小胞体ストレス関連因子の関与について検討した。続けて、ビルベリーエキスとその主な含有成分であるアントシアニンの視細胞の保護作用における小胞体ストレス経路の関与について検討を行った。最後に第三章では、青色 LED 光誘発角膜上皮細胞障害に対するビルベリーエキスとその含有成分であるアントシアニンの作用について検討した。

## 第1章 酸化ストレス誘発網膜視細胞障害に対するインディゴ・ローズ抽出物の作用

### 第1節 緒言

トマト (*Solanum lycopersicum*) は、リコピンや $\beta$ -カロテンなど、カロテノイド類を豊富に含んでおり、動脈硬化、糖尿病、癌の予防に有用な野菜のひとつである (Navab et al, 2001; Chen et al, 2014; Daniels et al, 2014)。野生種トマトの品種の中には、紫外線などから果実を保護するため、果皮に高濃度のアントシアニンを含むものが存在し、大量の紫外線曝露は、植物におけるアントシアニンの合成を増加させることが報告されている (Lätti AK. et al, 2008; Akerström et al, 2010)。アントシアニンは赤~青紫色の天然色素であり、ブドウやリンゴ、ナスなど多くの野菜や果物の皮に含まれている。アントシアニンはいわゆるポリフェノールの一種で高い抗酸化作用を持っており、様々な機能を期待して機能性食品の原料として利用されてきた。例えば、アントシアニンを非常に多く含む食品素材のひとつであるブルーベリーやビルベリーでは、眼の健康維持に役立つとされ、網膜神経節細胞保護作用や酸化ストレス誘発視細胞障害に対する保護作用、異常血管新生阻害作用などが報告されている (Matsunaga et al, 2009, 2010; Ogawa et al, 2013, 2014)。

本章では、日本 (岐阜県大垣市) 産の、アントシアニン含有トマトであるインディゴ・ローズに含まれるアントシアニン及びカロテノイドの分析を行った。本検討で使用しているインディゴ・ローズは、伝統的な交配技術を使用して米国オレゴン州立大学にて開発され、世界各地で広く栽培されている。インディゴ・ローズは、トマトの特徴であるカロテノイドのリコピンと、インディゴ・ローズに特徴的なアントシアニンの両方を併せ持つ健康果実として期待できるが、インディゴ・ローズが有する健康作用に関する報告は見当たらない。

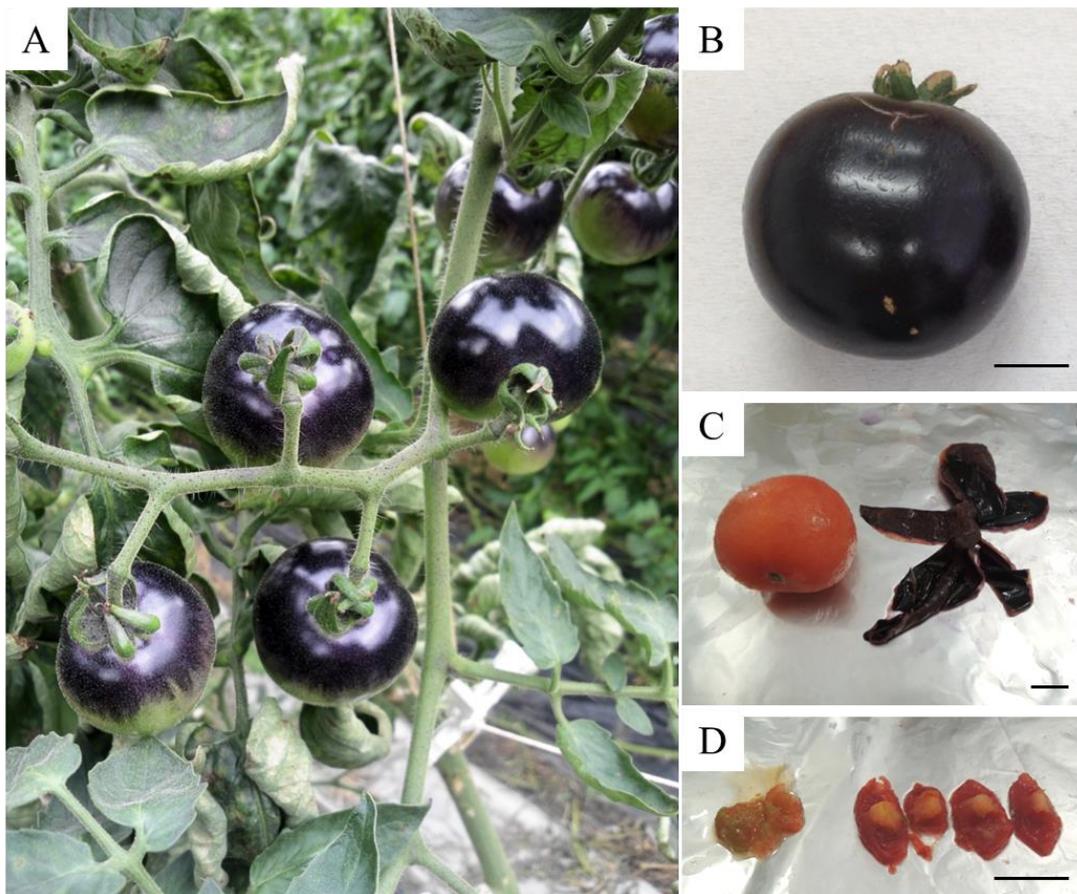
このトマトは日光にさらされることで生じるアントシアニンによって果皮が紫色に変化する。通常、光の当たらない部分ではアントシアニンが生じないが、本検討では、トマトの栽培時に土壌にも反射板を置く新規の栽培方法によって、上下両方から紫外線を含む太陽光を照射して栽培した。本章では、新規方法にて栽培した、新鮮な大垣産インディゴ・ローズに含まれるアントシアニン及びカロテノイドの種類を明らかにし、さらに、マウス由来網膜視細胞(661W)細胞を用い、酸化ストレスに誘発される視細胞障害に対してインディゴ・ローズ抽出物が保護作用を有するかを検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

Delphinidin-3-O-glucoside、petunidin-3-O-glucoside、malvidin-3-O-glucoside、cyanidin-3-O-glucoside、リコピン及び $\beta$ -カロテン、以上のアントシアニン及びカロテノイドの標準品は Extrasynthese (Genay, France) から、トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid : TFA)、トリエチルアミン (Triethylamine acid : TEA)、Hypoxanthine、xanthine oxidase、過酸化水素及び FeSO<sub>4</sub> は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。ABTS [2,2'-azinobis (3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid)] は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 及び 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

インディゴ・ローズ果実は British Seed Ltd. から種子を購入し、エアルーム・トマト・ファーム (Ogaki, Gifu, Japan) から譲与された。研究に用いた果実は岐阜県大垣市で 2013 年 5 月から温室栽培され、播種約 80 日後に収穫されたものを本研究で用いた。本検討で用いたインディゴ・ローズは、温室内で土壤に反射板を置き、上下両方から紫外線を含む太陽光を照射する特別な方法で栽培した。トマト果皮にてアントシアニンが合成され、青紫色を呈したものを試験に用いた (Fig. 5)。



**Figure 5. The blue tomato (Indigo Rose) used in this study**

(A) Cultivation of blue tomatoes in greenhouse. (B) Ripe blue tomato, which was exposed to sunlight from above and below by reflection, containing rich anthocyanin pigments on the entire surface. (C) Separation of peel, (D) seed and pulp from the blue tomato. The scale bar represents 1 cm.

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 アントシアニン及びカロテノイドの抽出

インディゴ・ローズから果皮、種子及び果肉を分離し (Fig. 5C-D)、直ちに液体窒素中で凍結させた。次いで、Wonder Blender (Osaka Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて、凍結した果皮、種子及び果肉を粉砕処理した。続いて、それぞれのピースに 0.5%TFA を含む 70%エタノール溶液を約 3 倍量加え、30 分間混合してアントシアニンを抽出し (Ogawa et al, 2008)、抽出液は 2600×g、10 分間の条件で遠心分離を行い、上清を回収した。この抽出操作を 2 回繰り返した上清をアントシアニン抽出液とした。既報を参照して(Olives Barb et al, 2006)、2 回の抽出操作後の残渣にヘキサン/アセトン/エタノール (50:25:25 = v : v : v) 溶液を加え、混合した後、リコピン及びβ-カロテンを含むカロテノイドを抽出した。こちらのカロテノイド抽出液も、2600×g で 10 分間遠心分離して上清を回収し、2 回抽出後の溶液をカロテノイド抽出液とした。2 種類の抽出液は、エバポレーター及び凍結乾燥機にて水分を除去し、粉末状の果実抽出物を得た。抽出物は遮光、4°C の冷暗所で保管した。

### 2-2-2 アントシアニン成分の高速液体クロマトグラフィー分析 (HPLC-DAD)

インディゴ・ローズの果皮、種子及び果肉抽出物を 0.5%TFA 含有 50%エタノールに溶解し、次いでフィルター (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いて濾過した。インディゴ・ローズのアントシアニンの定量には、C<sub>18</sub> 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 (Ogawa et al, 2008)。各種抽出物は 10 μL 量を注入した。移動相には 0.5%TFA 溶液 v/v (A) 及び 0.1%TFA 含有アセトニトリル (B) を用いた。グラジエント条件は、0

min、92% (A)、8% (B) ; 50 min、85% (A)、15% (B) ; 60 min、70% (A)、30% (B) ; 65 min、40% (A)、60% (B) ; 75 min、40% (A)、60% (B) を用いた。流量は 1 mL/min、カラム温度は 25°C とし、540 nm の波長でアントシアニンを測定した。

### 2-2-3 カロテノイド成分の高速液体クロマトグラフィー分析 (HPLC-DAD)

インディゴ・ローズの果皮、種子及び果肉抽出物は、メタノール/アセトニトリル溶液 (90 : 10 v/v) に溶解し、フィルター (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いて濾過した。インディゴ・ローズのリコピン及び  $\beta$ -カロテンの定量は、C<sub>18</sub>カラム (Develosil ODS-UG-5, 4.6 mm *i.d.* × 250 mm, Nomura Chemical Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いて分析した (Olives Barb et al, 2006)。各種抽出物は 10  $\mu$ L 量を注入した。移動相は 9  $\mu$ M TEA 含有メタノール/アセトニトリル溶液 (90 : 10 v/v) を用い、流量は 0.9 mL/min、カラム温度は 30°C とし、470 nm の波長でアントシアニンを測定した。

### 2-2-4 アントシアニン成分の高速液体クロマトグラフィー分析(HPLC-ESI-MS/MS)

インディゴ・ローズの各抽出物に含まれるアントシアニンを、HPLC-ESI-MS/MS システムによって定性分析した (Ogawa et al, 2008)。インディゴ・ローズの果皮、種子、及び果肉抽出物を 0.5%TFA 含有 50%エタノールに溶解し、次いでフィルター (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を用いて濾過した。それぞれの濾液を、CAPCELL PAK ACR (2.0 mm *i.d.* × 250 mm, S-5, 5  $\mu$ M, Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて分析した。各種抽出物は 5  $\mu$ L 量を注入した。移動相は 2%ギ酸水溶液 v/v (A)と 2%ギ酸含有アセトニトリル溶液 (B) を用いた。

グラジエント条件は、0 min、93% (A)、7% (B) ; 40 min、75% (A)、25% (B) ; 55 min、3% (A)、97% (B) ; 65 min、3% (A)、97% (B) ; 66 min、93% (A)、7% (B) ; 75 min、93% (A)、7% (B)を用いた。流量は0.2 mL/min、カラム温度は40°Cに維持し、アントシアニンを含むフラボノイド類は、280 nmの波長で検出した。各抽出物は、ESI (4000 QTRAP®, AB SCIEX, Massachusetts, USA) を備えたイオントラップエレクトロスプレー質量分析計に導入した。質量分析計は、正イオンモード下で、以下の条件で操作した。

Spray voltage, 3000 V; Source temperature, 600 °C; Curtain gas, 20 psi.;

Declustering potential (DP), 60 V; collision energy (CE), 10 V; lit fill time, 1 ms;

An enhanced product ion (DP, 60 V; CE, 30 and 50 V; lit fill time, 5 ms)

#### 2-2-5 2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) ラジカル消去活性

ABTSは過硫酸カリウムとの反応により、カチオンラジカルを生じ深青色を呈し、ラジカル消去活性を有する物質によってラジカルが消失すると、無色の状態に戻る (Re et al, 1999)。100 mLの7 mM ABTS ラジカルエタノール溶液を調製し、734 nmにおける吸光度が0.80から0.90となる用にエタノールを加え調製した。200 µLのABTS<sup>+</sup>溶液を、インディゴ・ローズ抽出物、アントシアニン及びアントシアニン標準品、リコピン標準品及び陽性対照薬トロロックスまたはBlankとして50%エタノール (1% DMSO 含有) 水溶液のいずれかの50 µL 試料溶液と混合した。反応液を室温で5分間静置した後、波長734 nmで吸光度の変化を測定した。Trolox (0-100 µg/ mL) のABTSラジカル消去活性を標準として、各試料のラジカル消去活性を算出した。ラジカル消去活性はTroloxで作成した検量線を用いて、各試料の添加量に相当するTrolox量として

求めた (Trolox mg/100 mg)。

縦軸に 734nm における吸光度値 ( $A_{734}$ ) をプロットし、横軸に Trolox 及び各試料濃度をプロットし、各試料の ABTS 消去活性の検量線及び回帰直線を作成した。作成した Trolox の検量線を基に、各試料のラジカル消去活性は下記計算式を用いて求めた。

$$\text{各試料のラジカル消去活性} = (Y - b_1) \div a_1$$

Y : Trolox 100 mg (もしくは 100  $\mu\text{mol}$ ) の  $A_{734}$ 、 $a_1$  : 各試料の回帰直線の傾き、

$b_1$  : 各試料の回帰直線の y 切片

#### 2-2-6 電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance: ESR)

DPPH (200  $\mu\text{M}$ ) 及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石英セルに入れ、電子スピン共鳴スペクトルの測定を行った。

尚、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。

電子スピン共鳴装置 (JES-FA 200, JEOL, Tokyo, Japan) の測定条件は、center field 330 mT、sweep width  $1.5 \times 10$  mT、sweep time 2 min、field modulation width  $2 \times 0.1$  mT、amplitude  $4.0 \times 100$ 、time constant 0.3 s、microwave power 2.0 mW に設定した。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。サンプルは 50%エタノール (1% DMSO 含有) 水溶液にて調製し、既報に基づき(Tanaka et al, 2013)、DPPH ラジカル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%ラジカル消去濃度 (half maximal effective concentration:  $\text{EC}_{50}$ ) を算出した。

### 2-2-7 細胞培養

本研究は、網膜視細胞を用いて試験を行った。網膜視細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) 含有 DMEM 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。網膜視細胞はトリプシン-EDTA 処理により 2~3 日おきに継代した。

### 2-2-8 過酸化水素水誘発網膜視細胞死評価

網膜視細胞を  $3 \times 10^3$  cells/100 µL ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し、37°C、30 分間インキュベートした。各試料 (blue tomato peer ext、petunidin、petunidin-3-O-glucoside、lycopene、NAC 1 mM) を添加して 1 時間培養後、網膜視細胞に 0.3 mM 過酸化水素を 24 時間処置した。24 時間後、Hoechst 33342 (8.1 µM) 及び Propidium Iodide (PI) (1.5 µM) を添加し、37°C、15 分間インキュベートし核染色した後、蛍光顕微鏡 (DP30BW; Olympus) で撮影した。細胞核を染色した Hoechst 33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} > 490 \text{ nm}$ ) を全細胞とし、死細胞を染色した PI ( $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} > 617 \text{ nm}$ ) をカウントし、死細胞率を算出した。

### 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 Student's *t*-test または Dunnett's test を用いて行った。

### 第3節 結果

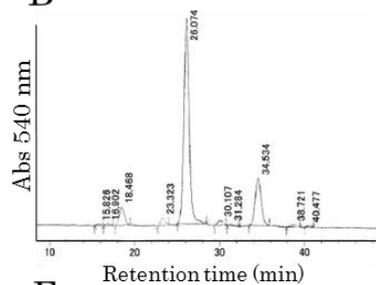
#### 3-1 インディゴ・ローズに含まれるアントシアニン及びカロテノイドの定量

まず、アントシアニンとカロテノイドの分離抽出のために、全体から果皮、種子及び果肉を分離した。本研究で使用したインディゴ・ローズの水分及び抽出物の比率、アントシアニン、リコピン及びβ-カロテンの含有量を Table 1 にまとめた。分離した果皮、種子及び果肉を乾燥させ、重量差から含水量を算出した。各凍結乾燥標品を 0.5%の TFA を含む 70%エタノールで抽出してアントシアニン画分を得、続けて、ヘキサン/アセトン/エタノール (50 : 25 : 25 = v : v : v) を用いてリコピン及びβ-カロテンを抽出した。果皮、種子及び果肉抽出物に含まれるアントシアニン及びカロテノイドの HPLC 分析結果を示した (Fig. 6B-G)。果皮抽出物からは、10 種類のアントシアニン及びリコピンが検出された。種子抽出物からはリコピンとβ-カロテンの両方が検出されたが、アントシアニンは検出されなかった。果肉抽出物からは 2 種類のアントシアニンとリコピンが検出された (Fig. 6F)。各抽出物中のアントシアニン、リコピン及びβ-カロテンの含有量を、標準物質としてシアニジン-3-O-グルコシド、リコピン及びβ-カロテンを用いた HPLC 分析を基に算出した。果皮抽出物には多量のアントシアニンが含まれていたが、種子及び果肉抽出物には、アントシアニンはほとんど含まれていなかった (Table 1)。

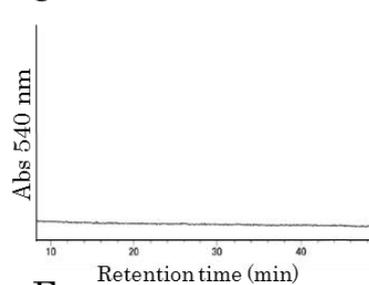
A



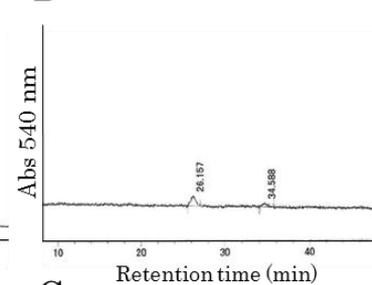
B



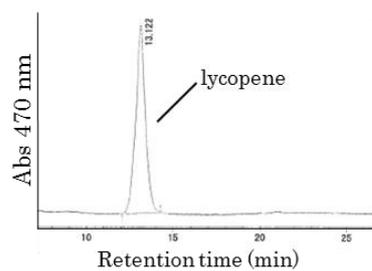
C



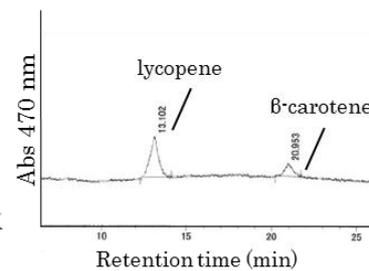
D



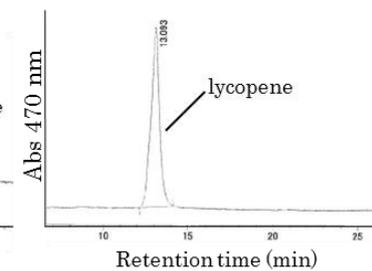
E



F



G



**Figure 6. Quantitative analyses of anthocyanins and carotenoids in the separated parts of Indigo Rose fruit**

(A) The extracts of peel, seed, and pulp. HPLC chromatograms of anthocyanin in peel (B), seed (C), and pulp (D) extracts by analysis at 540 nm. HPLC chromatogram of lycopene and  $\beta$ -carotene in peel (E), seed (F) and pulp (G) extracts by analysis at 470 nm.

**Table 1. Components in the separated parts of Indigo Rose fruit**

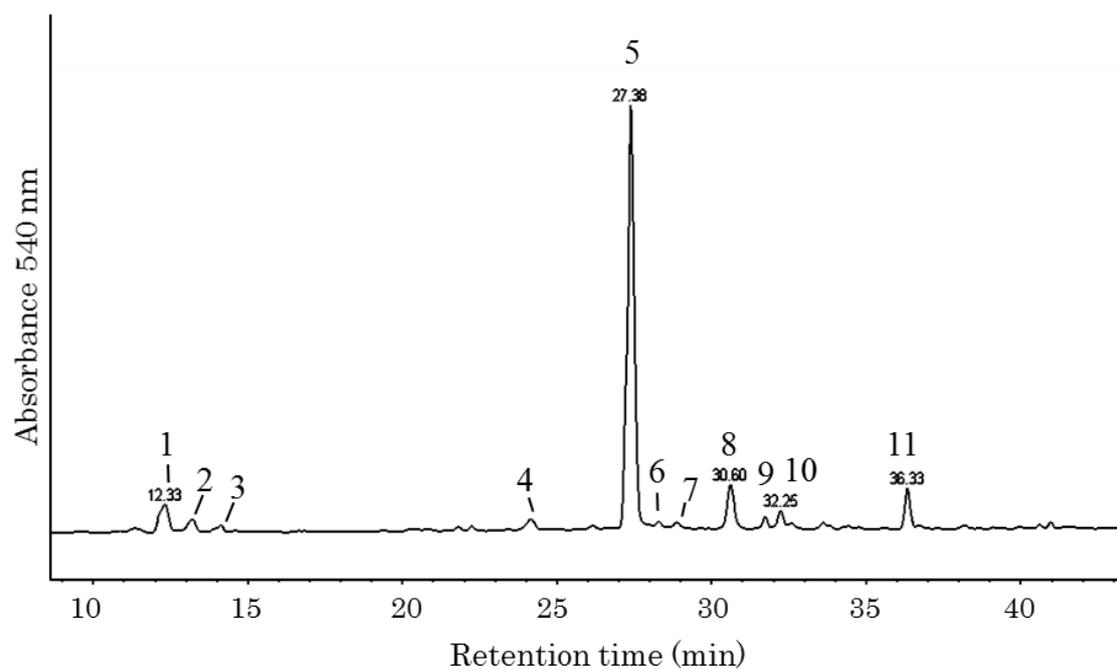
Parts	Components (mg/g extract)		
	Anthocyanin <sup>a</sup>	Lycopene <sup>a</sup>	$\beta$ -Carotene <sup>a</sup>
Peel	17	1.13	N.D.
Seed	N.D.	0.05	0.02
Pulp	0.1	0.68	N.D.

<sup>a</sup>Values are expressed by calculation of high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis for each sample. N.D.: not detected (detection limit: 0.01 mg/ g extract)

### 3-2 インディゴ・ローズ含有アントシアニンの同定

HPLC-ESI-MS/MS 分析結果に基づいてピークの同定を行った (Fig. 7)。標準品が入手できないアントシアニンは、既知の (Peter et al, 2008) アントシアニンとグリコシル及びアシル基の分析結果と比較することで推定し、果皮に含まれるアントシアニンの分析結果を Table 2 に記した。インディゴ・ローズに含まれるアントシアニンと結合している他の成分の予測ができた。しかしながら、アントシアニン全体の構造を決定するには至らなかった。

過去の報告において、アントシアニン含有トマト (米国产) には、3 種類のアントシアニン (delphinidin、petunidin、malvidin) に単量体または複数のグルコース、ルチノース、p-クマル酸及びカフェイン酸が結合した、約 11 から 23 種類以上のアントシアニンが含まれていることが示されている (Jones et al, 2003; Peter et al, 2008)。今回の HPLC-ESI-MS / MS 分析 (Table 2) によって、日本産インディゴ・ローズの果皮からアントシアニンとグリコシル及びアシル基の組み合わせが明らかな 11 種類のアントシアニンを推定した。5 種類はデルフィニジン由来、4 種類は Petunidin 由来、4 種類はマルビジン由来のアントシアニンであった。特に、ピーク 5 (petunidin + p-coumaroyl + rutinose + glyucose) で示されるような Petunidin 由来のアントシアニンは、インディゴ・ローズ果皮抽出物から多く検出された (Fig. 7)。



**Figure 7. HPLC-UV chromatogram of anthocyanin present in Indigo Rose peel extract by using HPLC-ESI-MS/MS system at 540 nm**

For details on peak number, refer to Table 2.

**Table 2. Anthocyanins assigned in Indigo Rose peer**

Peak	RT (min) <sup>a</sup>	Anthocyanins	[M] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	Fragment ions ( <i>m/z</i> )	Reference
1	12.3	delphinidin+rutinoside	611	465, 303	Ogawa et al, 2008
2	13.3	malvidin + caffeic acid + rutinoside	801	639, 493, 303	Mes et al, 2008
3	14.2	delphinidin + caffeic acid + rutinoside	773	611, 465, 303	Mes et al, 2008
4	24.2	delphinidin + <i>p</i> -coumaroyl + rutinoside + glycoside	919	757, 627, 465, 303	Butelli et al, 2008, Su et al, 2016
4	24.2	petunidin + caffeic acid + rutinoside + glycoside	949	787, 641, 479, 317	Li et al, 2011, Su et al, 2016
5	27.3	petunidin + <i>p</i> -coumaroyl + rutinoside + glycoside	933	771, 625, 479, 317	Butelli et al, 2008, Li et al, 2011
6	28.5	malvidin + <i>p</i> -coumaroyl + rutinoside + glycoside	947	493, 331	Li et al, 2011, Su et al, 2016
7	29.2	delphinidin + <i>p</i> -coumaroyl + rutinoside	757	303	Mes et al, 2008
7	29.2	petunidin + <i>p</i> -coumaroyl + rutinoside	771	625, 317	Boches et al, 2011
8	30.6	malvidin + <i>p</i> -coumaroyl + rutinoside	785	493, 331	Mes et al, 2008
9	31.8	petunidin + glycoside	479	317	Ogawa et al, 2008
10	32.2	malvidin + glycoside	493	331	Ogawa et al, 2008
11	45.7	delphinidin	303	-	Mes et al, 2008

<sup>a</sup>Retention time (RT) of HPLC.

### 3-3 インディゴ・ローズ各抽出物、アントシアニン及びリコピンの ABTS ラジカル消去活性

インディゴ・ローズ抽出物及びいくつかの含有成分のラジカル消去能を、各抽出物の ABTS カチオンラジカル消去活性を測定することによって決定した (Table 3)。結果は、Trolox 当量 (trolox equivalence antioxidant capacity: TEAC) によって評価した。ABTS カチオンラジカル消去活性は、インディゴ・ローズ抽出物のうち果皮抽出物で最も高く、続いて果肉及び種子抽出物の順であった。

**Table 3. Antioxidant potency of Indigo Rose extracts and constituents**

Parts	Trolox mg / 100 mg
Peel	2.46 ± 0.46
Pulp	0.53 ± 0.19
Seed	0.16 ± 0.01

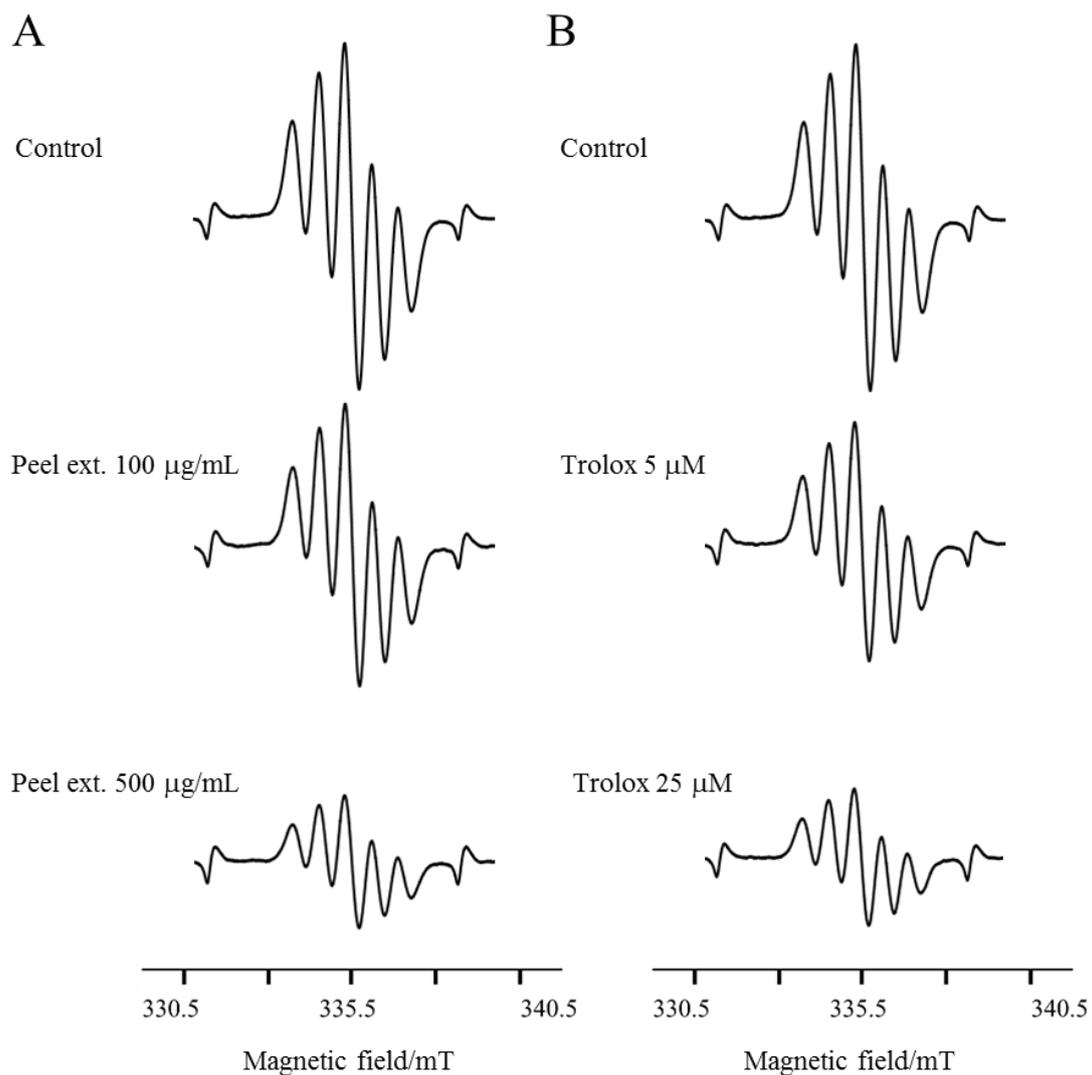
### 3-4 電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いた DPPH ラジカルの測定

インディゴ・ローズの果皮、種子及び果肉抽出物において、電子スピン共鳴装置 ESR を用いて DPPH ラジカルに対する作用を検討した。インディゴ・ローズの果皮、果肉、種子抽出物及び陽性対照薬 Trolox は、DPPH ラジカルに対する捕捉活性を示し、EC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 536.2 µg/ mL、857.6 µg/ mL、930.9 µg/ mL 及び 16.7 µM であった (Table 4 and Fig. 8)。

**Table 4. DPPH radical scavending activity of Indigo Rose extracts**

Samples	Unit	EC <sub>50</sub>	(95% confidence limits)
Peel	µg/mL	536.2	(487.6~597.5)
Pulp	µg/mL	857.6	(763.6~1015.6)
Seed	µg/mL	930.9	(829.4~1102.3)
Trolox	µg/mL	4.17	(3.54~4.82)

4.17 µg/mL = 16.7 µM

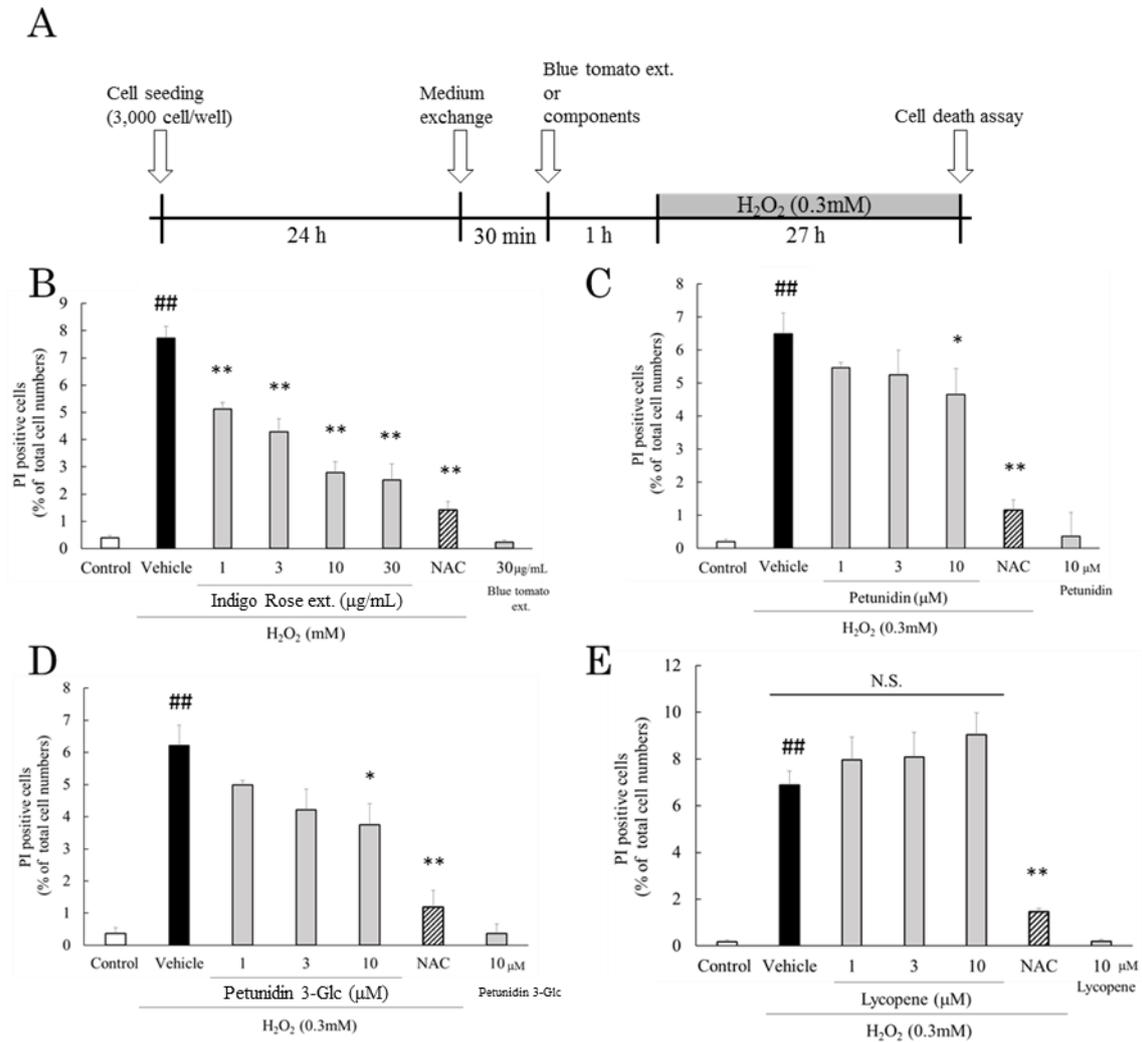


**Figure 8. Representative ESR spectra of the DPPH radical**

The antioxidant effects of (A) blue tomato peel extract at 100 and 500 µg/mL, and (B) Trolox at 5 and 25 µM

### 3-5 過酸化水素誘発マウス由来網膜視細胞障害に対するインディゴ・ローズ抽出物及びその成分の作用

過酸化水素誘発網膜視細胞障害 *in vitro* モデルを用いて、インディゴ・ローズ果皮抽出物、petunidin、petunidin-3-O-Glucoside、リコピン及び陽性対照として抗酸化剤 *N*-acetyl-L-cystein (NAC) の視細胞保護作用を、Hoechst33342 及び PI 核染色による死細胞率より検討した (Fig 9A)。過酸化水素によって網膜視細胞の死細胞率は増加した (Fig. 9)。インディゴ・ローズ果皮抽出物 (1-30  $\mu\text{g/ml}$ ) は、過酸化水素誘発細胞死に対して濃度依存的に有意な抑制作用を示した (Fig. 9B)。また、インディゴ・ローズ果皮抽出物の構成成分である petunidin (10  $\mu\text{M}$ ) 及び petunidin-3-O-glucoside (10  $\mu\text{M}$ ) においても有意な細胞死抑制作用が認められたが (Fig. 9C-D)、リコピン においては、明らかな細胞保護作用は認められなかった (Fig. 9E)。



**Figure 9. Effects of Indigo Rose peel extract and its components on  $H_2O_2$ -induced cell death in 661W cells**

(A) Experimental protocol *in vitro*. Effect of (B) the Indigo Rose peel extract, (C) petunidin, (D) petunidin-3-O-glucoside, and (E) lycopene on  $H_2O_2$ -induced 661W cell death. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted and expressed as a percentage of Hoechst 33342-positive cells. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). NAC, *N*-acetyl-L-cysteine. ## $p < 0.01$  vs. control; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. the vehicle (Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test).

#### 第4節 考察

本研究は、日本 (岐阜県大垣市) 産インディゴ・ローズにおける含有アントシアニンの定量及び機能解析を行った研究である。本章では、インディゴ・ローズの果皮、種子及び果肉抽出物に含まれる抗酸化物質として、アントシアニン及びリコピンや $\beta$ -カロテンなどのカロテノイドの量を測定し、種子や果肉に比べて果皮に、より多くのアントシアニンが含まれていることを見出した。インディゴ・ローズに含まれるアントシアニンとカロテノイドの含量を HPLC で分析した (Table 1)。米国産、アントシアニン含有トマトの皮のアントシアニンの量は、生果実 1 g 当たり 0.206~0.665 mg の範囲であった (Jones et al, 2003)。本研究で使用したインディゴ・ローズにおいては、果皮抽出物 1g あたり 17 mg のアントシアニンが検出された (Table 1)。果実全体に対して抽出物は 13.1% であったことから (Table 1)、生果実に換算すると、既報 (Jones et al, 2003) よりもアントシアニン含有量が高いことが示唆された。アントシアニンをはじめとする天然色素を合成する果物や野菜において、アントシアニンの合成は主に紫外線に曝された果皮の部分で増加するため (Arakawa et al, 1985)、インディゴ・ローズのアントシアニン量も、栽培環境条件によって変わることがある。さらに、インディゴ・ローズの果皮抽出物が、種子及び果肉抽出物と比較して、高レベルのアントシアニンだけでなく、リコピンも果皮抽出物 1g あたり 1.13mg 含むことを見出した (Table 1)。果皮の乾燥重量 1g あたりに含まれるリコピンの量は、2.8~5.4mg と報告されている (Roberto et al, 2008)。既報 (Roberto et al, 2008) と比較すると、本検討によって明らかとなった果皮のリコピン量はやや少なかった。これは、抽出方法の違いによるものと考えられる。本検討では、果皮、果肉及び種子の抽出物を作製する際、アントシアニン抽出後にリコピンを抽出し、それらの分析を実施した。アントシアニン抽出工程で、一部のリコピ

ンが溶出した可能性が考えられる。トマトは果物の皮にいくつかの抗酸化物質を有することが報告されており (Ramandeep et al, 2005)、本研究で用いた日本産インディゴ・ローズの果皮からは高濃度のアントシアニンと、リコピンを検出することができた。果実栽培時に地面に反射板を置き、太陽の光を果実の上下から照射することによって、過去に報告されている米国産のアントシアニン含有トマトよりも、アントシアニンを多く含有する果実を栽培することができた。

本検討では、DPPH 及び ABTS ラジカル消去能評価法の 2 種類の酸化防止剤力価評価を行った。DPPH ラジカル消去活性法では、主に水溶性成分の活性を測定しており、一方 ABTS ラジカル消去活性は水溶性成分と脂溶性成分の両方の活性を測定することができる。両方法は類似の挙動を示すものの、カテコール構造を有する化合物においては DPPH 法が ABTS 法と比較して高い感度を示すことが報告されている (Yamauchi et al, 2014)。本検討で用いたインディゴ・ローズ抽出物は水溶性のアントシアニン及び脂溶性のリコピンの両方を含有している (Table 1, Fig.6)。また、アントシアニンはカテコール構造を有しており (Fig.4)、2 種類のラジカル消去活性法を用いることでより確実な抗酸化能の評価を目指した。DPPH 及び ABTS はどちらも合成ラジカルであり、生体内には存在しない。しかし、単一化合物酸化防止剤の抗酸化活性測定において、高い測定精度を示すとされている (Shimamira et al, 2007)。生体内で作られる活性酸素は、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) や、 $O_2$  から二次的に合成される一連の化合物である。活性酸素は、 $O_2^-$ 、ヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ )、脂質過酸化物質 ( $LOO\cdot$ )、一酸化窒素、過酸化水素、膜質ヒドロペルオキシド等が例として挙げられる。体内では、紫外線や放射線などの外的な要因で細胞内に活性酸素が発生することも考えられる。

数種類のアントシアニンは、DPPH ラジカル消去活性を有していることが示されている (Tanaka et al, 2013)。したがって、インディゴ・ローズ果皮抽出物の抗酸化活性は、アントシアニン含有量に依存する可能性がある。また、今回の結果を基に、過去に報告のある抗酸化活性を有する果実とインディゴ・ローズの間で、抗酸化活性を比較した。インディゴ・ローズ果皮抽出物の抗酸化活性は、イチゴの抗酸化活性 (Trolox の約 1/30-40) とほぼ同等であり、アントシアニン含有食品として一般に知られているブルーベリーと比較して約半分であった (Ogawa et al, 2008)。なお、トマト果皮抽出物の DPPH ラジカル消去能に関して、トマト果皮抽出物 1g あたり、0.25~0.63mg の Trolox と同等であると報告されている (Katalin et al, 2014)。この結果は、各抽出物に含まれる抗酸化物質の濃度に由来すると考えられる。

本研究では、インディゴ・ローズの果皮抽出物と Petunidin 誘導体が、ABTS カチオンラジカルに対して強力な消去能を持っていることを明らかにした。ABTS ラジカル消去活性測定法では、水溶性成分のみならず脂溶性の高い抗酸化成分の評価も可能である。トマト由来のリコピンは高濃度において ABTS ラジカル捕捉活性を有することが報告されている (Campestrin et al, 2019; González-Moscoso et al, 2019)。本検討で使用した濃度では ABTS ラジカル捕捉活性を示さなかったと考えられる。また、カチオンラジカルは X 線などを含む電離放射線などによって DNA 分子から電子が放出される際に生じ、DNA 損傷や切断を引き起こして細胞死を誘起する (Mol et al, 1983)。このことから、インディゴ・ローズ抽出物が過酸化水素誘発網膜視細胞障害を抑制するメカニズムは、抽出物のラジカル消去能に関連することが示唆された。本研究で培養細胞に曝露した過酸化水素は、紫外線分解や鉄錯体による Fenton 反応によってより酸化作用の強いヒドロキシルラジカルを生成する可能性がある (Fischer-

Nielsen et al., 1992)。過酸化水素誘発の網膜視細胞死は 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 (Du et al., 2018)。インディゴ・ローズ果皮抽出物及び Petunidin は、DPPH 及び ABTS の捕捉活性を示したことより、インディゴ・ローズ果皮抽出物は、過酸化水素誘発の網膜視細胞内における ROS 産生を抑制することにより細胞保護作用を示し、その活性成分として Petunidin の関与が示唆された。一方、リコピンは過酸化水素誘発細胞障害による細胞死に影響を及ぼさなかった。リコピンにはスーパーオキシドラジカルとヒドロキシルラジカル消去活性があることが (Trevithick-Sutton et al, 2006)、リコピンは細胞保護効果を示すことが報告されている (Tang et al, 2009; Li et al, 2014)。さらに、リコピンは ウシ乳腺上皮細胞において、NFE2L2 シグナル伝達経路を介して、過酸化水素誘発酸化ストレス、炎症及びアポトーシスを抑制することが報告されている (Xudong et al., 2019)。本研究で、酸化ストレス下で網膜視細胞細胞生存率に対するリコピンの細胞保護効果が観察されなかったのは、細胞種の差異に起因する可能性が考えられる。過酸化水素誘導性網膜視細胞死は、ROS の産生を伴うアポトーシス依存性経路を介して起こることが報告されている (Kunchithapautham et al, 2007)。網膜視細胞障害の中でも、錐体細胞の変性は中心視野が徐々に欠けていき、最終的に失明に至る危険性がある。そのため、錐体細胞の変性の程度に視力の低下は依存する。

本研究では、日本産インディゴ・ローズの成分分析を行い、果皮抽出物に含まれる 11 種類のアントシアニンを推定した。また、酸化ストレス誘発網膜視細胞障害に対するアントシアニン含有日本産インディゴ・ローズ抽出物の保護作用を見出し、petunidin 誘導体を豊富に含むインディゴ・ローズの果皮抽出物が、過酸化水素に誘発される網膜視細胞障害に対して *in vitro* で保護作用を発揮することを明らかにした。酸化ストレスは様々な網膜疾患の主要原因の一つ

であるため、インディゴ・ローズ抽出物は網膜疾患の予防的治療に有用である可能性が示唆される。アントシアニン含有食品としては、ビルベリーやカシスなどは抽出物（エキス）を主原料としたサプリメントが、主に視機能改善を目的として飲用されている一方、インディゴ・ローズは未だ原料としてほとんど利用されていない。しかしながら、本研究結果から新たな研究開発が進むことが期待される。

網膜視細胞は酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスによっても障害を受けることが知られている。青色 LED 照射によって網膜視細胞に酸化ストレスが誘発されること、酸化ストレスによって網膜視細胞に誘発される障害に対するビルベリーエキス及びアントシアニンの保護作用が報告されている。一方、青色 LED 光誘発網膜視細胞障害における小胞体ストレスに関する研究報告は少なく、不明な点が多い。次章では、青色 LED 光誘発網膜視細胞障害に対する小胞体ストレスの関与並びにアントシアニンを豊富に含有するビルベリーエキスの保護作用について検討した。

## 第2章 青色LED誘発網膜視細胞障害における小胞体ストレス関連因子の関与及びビルベリーエキスの保護作用

### 第1節 緒言

我々は日々、様々な波長の光に曝されている。人間が感知できる光は、380～750 nmの間であり、この範囲の光線は可視光と呼ばれる。なかでも、380～530 nmの青色から紫色を呈する光は高エネルギー可視光線と呼ばれ、加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD) や網膜色素変性症の発症や病態の進行に関与している (Margrain et al. 2004; Glazer-Hockstein et al. 2006)。動物実験において、高エネルギー可視光線である青色光の長時間曝露が網膜視細胞の障害を惹起することが報告されている (Grimm et al., 2001; Roehlecke et al., 2011; Narimatsu et al., 2015; Nakamura et al., 2017)。高エネルギー可視光線は太陽光や蛍光灯、発光ダイオード (Light-emitting diodes : LED) に含まれている。特にLEDは蛍光灯などの光源と比べて消費電力が少なく寿命が長いことから、室内灯をはじめとする照明機器や、液晶モニターのバックライトなど広く利用されている。太陽光や蛍光灯は、すべての波長の光が混ざり合うことで白色の光を発しているが、LEDライトは青色と黄色の波長の光を混ぜ合わせることで白色を作り出しており、高エネルギー可視光線である青色光の割合が大きい。

AMDは、加齢により網膜にある黄斑の機能が障害される疾患で、萎縮型加齢黄斑変性と滲出型加齢黄斑変性に分類される。萎縮型加齢黄斑変性は、黄斑における視細胞の進行的な変性により黄斑下の組織が障害されることで、重篤な視力低下につながる。青色光が網膜に及ぼす影響は、ラット *in vivo* モデルにおいて 379～559 nmまでの波長の光照射時に、波長の長さに反比例して網膜への障害性が高まり、青色光で障害性が高いことが報告されている (van Norren and Schellekens 1990)。アカゲザルを用いた研究において、青色LED光

を網膜に照射することで、網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞) 及び視細胞外節において浮腫が認められている(Koide et al. 2001)。青色光は RPE 細胞における bis-retinoid や N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) などのリポフスチン (lipofuscin) の蓄積を惹起し、その結果ミトコンドリアにおける活性酸素種 ROS の産生を促し、RPE 細胞の脂質過酸化を引き起こし障害を惹起する (Sparrow et al. 2002)。青色光照射による RPE 細胞死は、細胞死誘導因子である caspase-3 の活性化を通じて引き起こされ、caspase-3 阻害剤 Z-DEVD-fmk によりアポトーシスは抑制される(Sparrow and Cai 2001)。網膜視細胞障害においても同様に、caspase-3 の誘導及びロドプシンの分解加速や凝集により、細胞死が引き起こされる(J. Wu et al. 2002)。しかし、錐体細胞に局在するオプシンタンパク質の凝集や、小胞体関連応答との関連については明らかにされていない。

小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) は、タンパク質の合成及び折りたたみや切断、ジスルフィド結合、糖鎖修飾等のタンパク質のフォールディングや成熟を行う細胞小器官である。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を活性化させ、タンパク質の恒常性を維持して細胞を守ろうとする (Mori et al., 2000)。

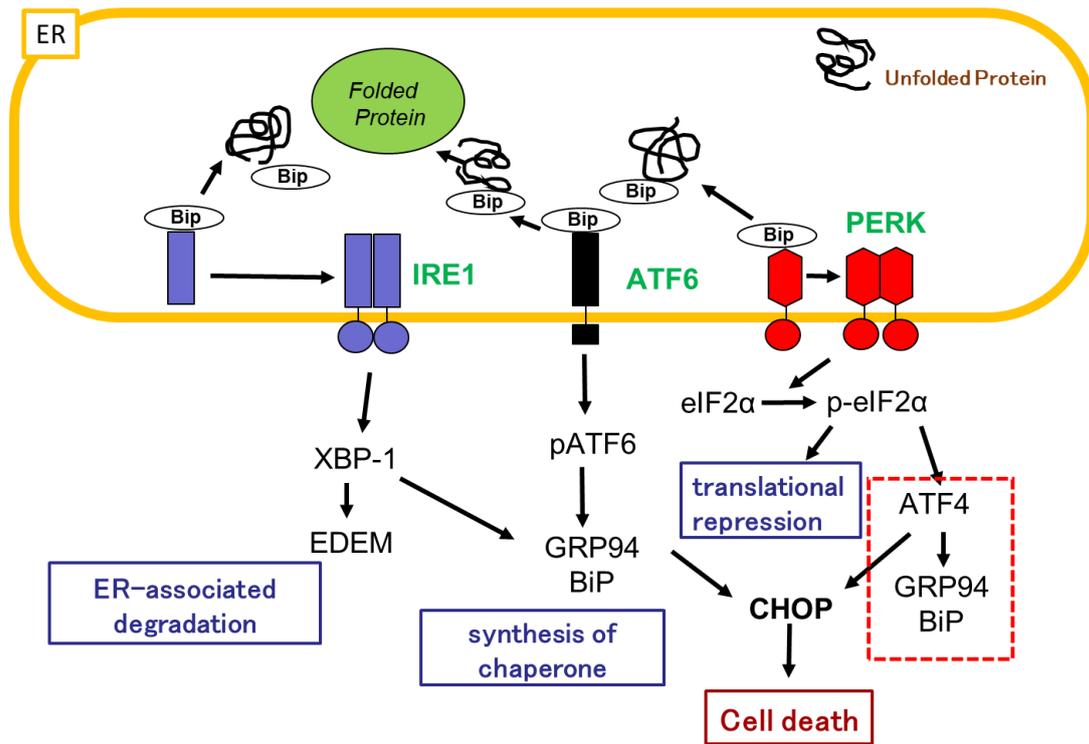


Fig. 10 Endoplasmic reticulum (ER) stress pathway.

UPR 経路には 3 つのシグナル伝達経路が存在しており、それぞれ小胞体膜上に存在する Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、PKR-like ER kinase (PERK) 及び Activating transcription factor 6 (ATF6) など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 (Bhandary et al. 2012)。UPR 経路は、(1) ER シャペロン合成促進、(2) タンパク質の翻訳抑制、(3) ER 関連分解 (ER-associated degradation : ERAD) の促進などを制御する (Triasophon et al. 1998; Harding et al. 1999; Okada et al. 2002)。小胞体ストレスに曝された細胞で PERK タンパク質が活性化されると、下流に存在する翻訳開始因子のサブユニット eIF-2 $\alpha$  がリン酸化され、新たなタンパク質の翻訳を抑制する。これにより多くのタンパク質は ER ストレス下で産生が低下する一方、転写因子の Activation of transcription factor 4 (ATF4) は逆に産生が上昇する (Harding et al, 2000)。ATF4

は ER stress 状況下で優先的に翻訳され核に移行し、細胞を短期のストレスに対して適応させる (Lu et al, 2004)。しかしながら、UPR 経路の活性化による修復作用を超えて ER ストレス状態が続く場合は、転写因子の一種である C/EBP homologous protein (CHOP) を発現誘導させ、アポトーシスにより細胞死を誘導する(Wang et al., 1996; Imaizumi et al., 2001) (Fig. 10)。近年、網膜視細胞に対する過剰な青色 LED 光照射が細胞内 ROS 産生を通じて網膜細胞障害を引き起こすこと、光受容タンパク質の一種である S-オプシンの凝集を引き起こすことが報告されており (Kuse et al., 2014)、この S-オプシンの凝集体は分解されにくいことが明らかになっている (Zhang et al., 2014)。しかし、青色 LED 光照射が S-オプシンの凝集を通じて ER ストレスを惹起するかについて、これまでに報告はない。青色光による網膜細胞障害の予防には、網膜視細胞での酸化ストレスの抑制と、光受容タンパク質の恒常性の維持が重要であると考えられる。

ツツジ科スノキ属に属するビルベリー (英名 : Bilberry、学名 : *Vaccinium myrtillus* L.) はブルーベリーの近縁種に当たる果実で、主に北アメリカや北欧の森林で自生している。ビルベリーは暗青色から紫黒色の実をつけている (Fig. 11)。ビルベリーの果実は内部まで濃い青紫色をしており、その果実は豊富なアントシアニンを含んでいる (Fig. 12)。食用用途として果実を食すだけでなく、機能性食品素材用途としては果実のエキス (抽出物) が利用されてい



Figure 11. Picture of bilberry

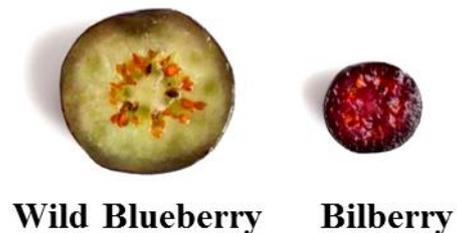


Figure 12. Cross section of Blueberry and Bilberry

る。ビルベリーエキスは、15種類のアントシアニンが同定されており (Baj et al., 1983; Nakajima et al., 2004)、抗酸化活性 (Ogawa et al., 2008)、毛細血管保護及び血流改善に関する作用 (Lietti et al., 1976; Morazzoni et al., 1990; 1996; Colantunoni et al., 1991) を有することが報告されている。特に視機能に着目した報告として、視細胞保護作用 (Tanaka et al. 2012; 2013; Ogawa et al. 2013; 2014)、網膜神経節細胞障害保護作用 (Matsunaga et al. 2009) などがあり、*in vivo* 実験系で視機能改善作用を示すことも報告されている (Miyake et al. 2012; Osada et al. 2017)。さらに、臨床において眼精疲労に対する改善作用が報告されている (Ozawa et al. 2015)。

ビルベリーエキス及びその主要成分であるアントシアニジンが、活性酸素種 (ROS) の産生を阻害することによって、青色 LED 光曝露により誘発される網膜視細胞障害を抑制することが報告されている (Ogawa et al. 2014)。しかしながら、青色 LED 光の曝露は、網膜錐体細胞内での S-オプシンの凝集を誘導し、錐体細胞の急速な変性を引き起こすことから (Zhang et al. 2011)、青色 LED 光照射による障害から視細胞を保護するには、ROS を低下させるだけでなく、S-オプシン凝集の阻害も有用であると考えられる。別の報告では、ビルベリーエキスはアミロイド線維を非毒性形態に変換させることでアミロイド  $\beta$  の凝集体形成を抑制することが報告されている (Yamakawa et al. 2016)。そのため、アントシアニンを含むビルベリーエキスは、異常なタンパク質凝集を抑制し、青色 LED 光照射によって誘導される S-オプシンの凝集を抑制することにより、ER ストレス応答の活性化を軽減することが期待できる。

本章では、マウス由来網膜錐体細胞 (661W) 株を用いた *in vitro* 青色 LED 光障害実験系を用いて、過剰な青色 LED 光照射が小胞体ストレス応答を誘発するか、特に S-オプシン及び Activation of transcription factor 4 (ATF4) に着目して

検討した。また、青色 LED 照射により誘発されたマウス由来網膜視細胞障害に対するビルベリーエキス及びその構成成分である、delphinidin-3-O-glucoside (Dp3G)、cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G) 及び malvidin-3-O-glucoside (Mv3G) の、過剰な青色 LED 光照射による光受容タンパク質への影響を検討すること、さらに、ER ストレスに対するビルベリーエキスの作用を解明することを目的とした。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

マウス由来網膜視細胞株 (661W 細胞) は、Dr. Muayyad R. Al-Ubaidi (University of Houston, Department of Biomedical Engineering, Houston, TX) から譲与された。Mouse anti- GRP78/BiP antibody は Becton Dickinson Company (Franklin Lakes, NJ)、mouse anti-ATF4 antibody、mouse anti-PERK antibody、mouse anti-ubiquitin antibody は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) から、rabbit anti-Opsin (blue) antibody は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) から、mouse anti- $\beta$ -actin antibody は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。Blocking One-P は Nacalai Tesque, Inc., (Kyoto, Japan) 、Canget signal 1/2 は Toyobo (Osaka, Japan) から購入した。Tunicamycin 及び dithiothreitol (DTT) は Wako Pure Chemical Co., Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。Mouse S-opsin の siRNA は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から、negative control siRNA は Nippon Gene Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。460-470nm の波長の光を発する青色 LED 光源は、M-trust Co., Ltd. (Hyogo, Japan) から、電源変圧装置 LM-332 は AS ONE Co., Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。光の照度は AS ONE Luminometer LM-332 (AS ONE, Osaka, Japan)を用いて測定した。ビルベリーエキスは、Wakasa Seikatsu Co., Ltd (Kyoto, Japan) から供与された。本試験で用いたビルベリーエキスのアントシアニンは HPLC による分析の結果、Delphinidin 15.03%、Cyanidin 9.25%、Malvidin 5.73% (残りは Peonidin と Petunidin を併せて 8.34%)、全体としてアントシアニンを 38.35%含有していた。Delphinidin-3-O-glucoside (Dp3G)、cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G)、malvidin-3-O-glucoside (Mv3G) は Tokiwa Phytochemical Co., Ltd. (Chiba, Japan) から購入した。Hoechst 33342 及び propidium iodide (PI)は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から購入

した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 細胞培養

網膜視細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) 含有 DMEM 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。網膜視細胞はトリプシン-EDTA 処理により 2~3 日おきに継代した。

### 2-2-2 青色 LED 光照射装置

青色 LED 光源は、青色 LED (波長 460~470 nm) を 12 球備えた照射装置を使用した。細胞への照射は 450 lux (エネルギー量 : 0.38 mW/cm<sup>2</sup>) となるように調整した。すべての光照射実験は細胞培養用インキュベーターの中で行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で行った。

### 2-2-3 Real-time reverse transcription (RT)-PCR

網膜視細胞を 3×10<sup>4</sup> cells/well ずつ 12-well プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。続けて、1% FBS を含む DMEM 培地に置換し 30 分培養後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 450 lux の青色 LED 光を 3~12 時間照射し、経時的にサンプリングを行った。ビルベリーエキス及びアントシアニンの作用検討試験の際は、1% FBS を含む DMEM 培地に置換し 30 分培養後、各試料 (bilberry extract、Dp3G、Cy3G、Mv3G) を添加して 1 時間培養した。続けて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 450 lux の青色 LED 光を 6 時間照射し、6 時間後にサンプリングを行った。青色 LED 光照射後細胞を回収し、RNA を Nucleo Spin RNA II (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) を用いて抽出した。Real-time RT-PCR は SYBR

Premix Ex TaqII (Takara Bio Inc.) をの製品プロトコールに従い、Thermal Cycler Real Time System (TP-800; Takara Bio Inc.) にて行った。PCR に用いたプライマーの配列を以下に示す。

ATF4            5'-GCA AGG AGG ATG CCT TTT C-3' (forward)  
                  5'-GTT TCC AGG TCA TCC ATT CG-3' (reverse);

GRP94            5'-TTT GAA CCT CTG CTC AAC TGG AT-3' (forward)  
                  5'-CTG ACT GGC CAC AAG AGC ACA-3' (reverse);

GRP78/BiP        5'- CTC CAC GGC TTC CGA TAA TCA -3' (forward)  
                  5'- TCC AGT CAG ATC AAA TGT ACC CAG A -3' (reverse);

GAPDH            5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3' (forward)  
                  5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3' (reverse)

ATF4、GRP94、GRP78/BiP の結果は、それぞれ GAPDH で補正した。

#### 2-2-4 ウェスタンブロッティング解析

12-well plate に  $3 \times 10^4$  cells/well の網膜視細胞を播種し、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し、30 分培養後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 450 lux の青色 LED 光を 3~24 時間照射し、経時的にサンプリングを行った。ビルベリーエキス及び各種アントシアニンの作用検討試験の際は、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し 30 分培養後、各試料 (bilberry extract、Dp3G、Cy3G、Mv3G) を添加して 1 時間培養後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 450 lux の青色 LED 光を 6~9 時間照射し、照射後にサンプリングを行った。細胞をリン酸緩衝液 (1× PBS; 136.9 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) で洗浄後、1% protease inhibitor cocktail 及び phosphatase inhibitor cocktail 2/3 (Sigma-Aldrich) を含む細胞溶解液 (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 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてタンパク質濃度を定量後、タンパク質濃度が均一になるように、10% 2-mercaptoethanol 含有 sample buffer に懸濁し、5 分間煮沸した。その後、5-20% ポリアクリルアミドゲル (SuperSep™) を用いて電気泳動した。ポリアクリルアミドゲルにサンプルをアプライ後、ゲル 1 枚あたり 20mA で 90 分間泳動した。分子量の違いによりタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) 膜 (Immobilon-P; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) に分離タンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜を Blocking One-P を用いてブロッキングした後、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体に浸し、4°C で一晩反応させた。その後、転写膜は 0.05% Tween 20 含有 50mM TBS (T-TBS : 10 mM Tris、40 mM Tris hydrochloride、150 mM NaCl) で洗浄し、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間反応させた。T-TBS で洗浄後、免疫反応のバンドを蛍光基質 (ImmunoStar LD; Wako Pure Chem. Inc., Osaka, Japan) にて検出した。検出バンドの密度は、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で画像撮影し、ゲル解析ソフトウェア (Image Reader LAS-4000; Fujifilm) と検出バンド解析ソフトウェア (Malti Gauge; Fujifilm) で解析することで、各タンパク質量の定量を行った。各タンパク質のバンド強度は  $\beta$ -actin を用いて補正した。

一次抗体には、mouse anti-GRP78/BiP (1:500; Becton Dickinson Company)、rabbit anti-GRP94、rabbit anti-ATF4、mouse anti-ubiquitin (1:1,000; Cell Signaling Technology)、mouse anti- $\beta$ -actin (1:5,000; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit または goat anti-mouse (1:2,000; Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。

#### 2-2-5 免疫染色法

網膜視細胞を Lab-Tec II Chamber slide (Thermo Fisher Scientific Inc.) に  $1.5 \times 10^4$  cells/well で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換した。ビルベリーエキスもしくは各種アントシアニンの影響を検討する際は、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換 30 分後、各試料 (bilberry extract、Dp3G、Cy3G、Mv3G) を添加して 1 時間培養した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 450 lux の青色 LED 光、もしくは 2 µg/mL ツニカマイシンを 6 時間、0.5 mM ジチオトレイトール (DTT) を 9 時間作用させた。その後、PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) で 15 分間固定した。PBS-T で洗浄後、3% goat serum 含有 PBS-T で 30 分間ブロッキングを行い、その後 rabbit anti-Opsin (blue) antibody (1 : 1000) を 4°C で一晩反応させた。二次抗体は、Alexa 488-conjugate goat anti-rabbit IgG を用い、室温で 1 時間反応させ、その後、Hoechst33342 (1: 1000; Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて核染色を行った。フルオロマウント及びカバーガラスを用いて封入した後、共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) にて撮影を行った。

#### 2-2-6 siRNA 導入

網膜視細胞を抗生物質不含有培地を用いて、12-well プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 24 時間培養した。その後、Opti-MEM、50 nM siRNA、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) の混合液を各 well に添加し、製品プロトコールに従って siRNA 導入を行った。siRNA 導入 24 時間後、抗生物質含有 1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 450 lux の青色 LED 光を 9 時間照射して細胞に青色 LED 光による障害を誘発した。障害開始 9 時間後、2-2-3 の方法に準じて、タンパク質の発現量をウエスタンブロッティング法で確認した。

#### 2-2-7 ER ストレス誘導剤誘発網膜視細胞死評価試験

網膜視細胞を  $3 \times 10^3$  cells/100  $\mu\text{L}$  ずつ 96 ウェルプレートに播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM 培地に置換し、 $37^\circ\text{C}$ 、30 分間インキュベートした。各試料 (bilberry extract、Dp3G、Cy3G、Mv3G) を添加して 1 時間培養後、マウス由来網膜視細胞に 3 mM DTT または 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ツニカマイシンを添加し 24 時間処置した。24 時間後、Hoechst 33342 (8.1  $\mu\text{M}$ ) 及び PI (1.5  $\mu\text{M}$ ) を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、15 分間インキュベートし核染色した後、蛍光顕微鏡 (DP30BW; Olympus) で撮影した。細胞核を染色した Hoechst 33342 ( $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm;  $\lambda_{\text{em}} > 490$  nm) を全細胞とし、死細胞を染色した PI ( $\lambda_{\text{ex}} = 535$  nm;  $\lambda_{\text{em}} > 617$  nm) をカウントし、死細胞率を算出した。

#### 2-3 統計学的解析

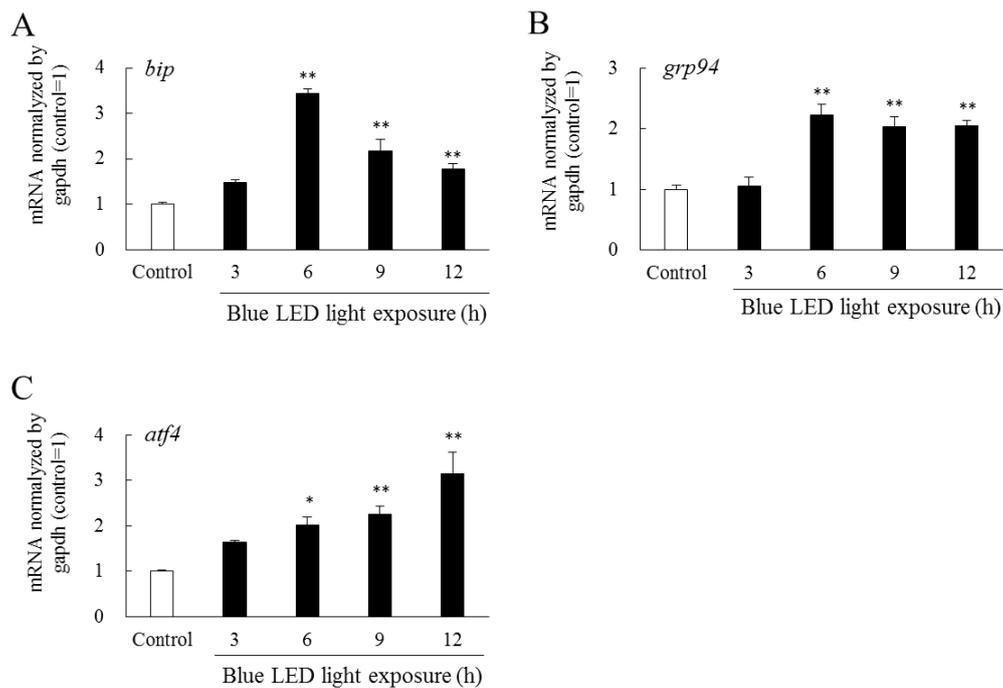
実験結果はすべて平均 $\pm$ 標準誤差で表し、危険率 5% 以下を有意とした。統計学的

解析は Student's *t*-test または Dunnett's test を用いて行った。

### 第3節 結果

#### 3-1 網膜視細胞における青色 LED 光誘発 UPR 関連因子の mRNA 量の変化

網膜視細胞に照度 450 lux の青色 LED 光を照射し、定量的 real-time RT-PCR を用いて経時的に mRNA 量の変化を測定した (Fig. 13)。青色 LED 光照射により、コントロール群と比較して *grp78/bip*、*grp94* 及び *atf4* の mRNA 量が有意に増加した (Fig. 13A~C)。*grp78/bip* 及び *grp94* の mRNA 量は、青色 LED 光照射 6 時間から 12 時間において増加した。さらに、*atf4* の mRNA 量は青色 LED 光照射 6 時間から 12 時間にかけて、照射時間依存的に増加した (Fig. 13C)。

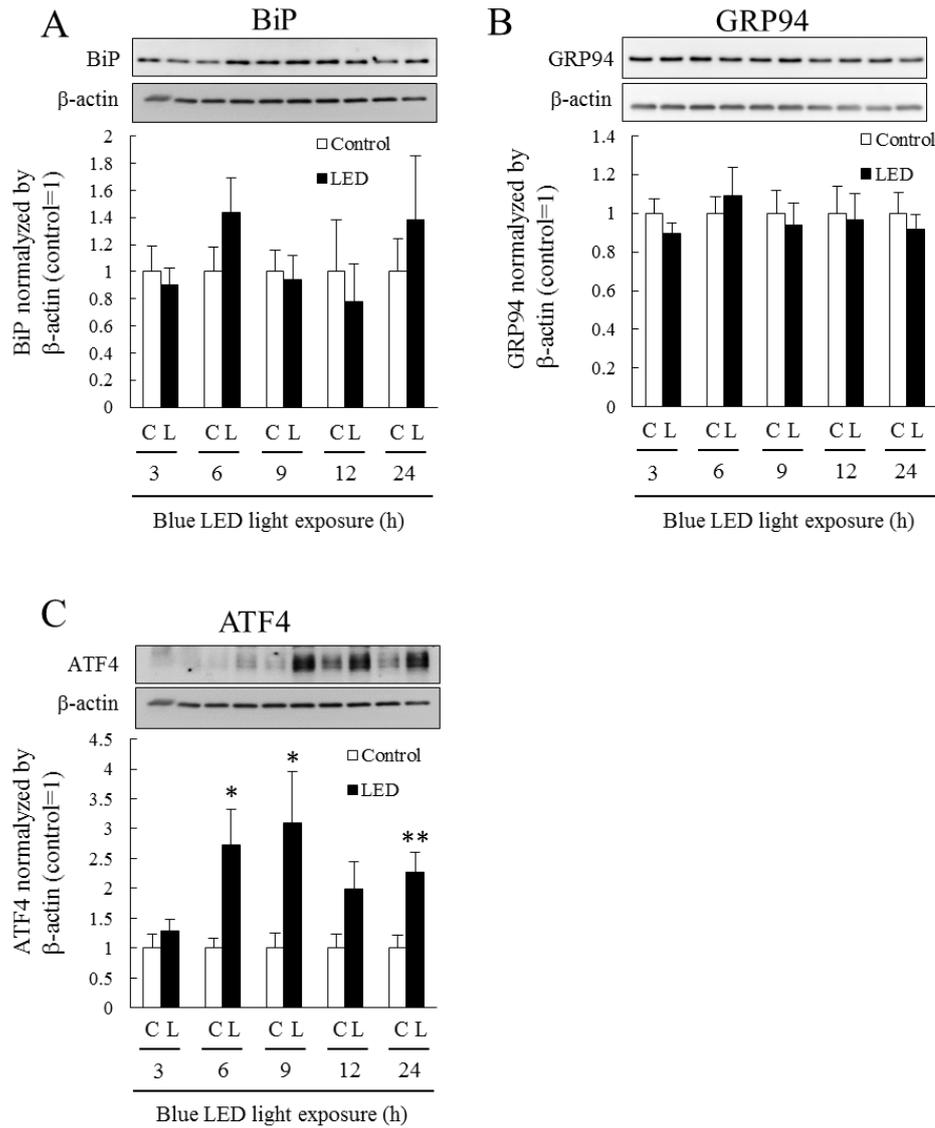


**Figure 13. Unfolded protein response (UPR)-related mRNAs induced in response to blue LED light exposure in murine photoreceptor cells**

Induction of *bip* (A), *grp94* (B), or *atf4* (C) mRNA after blue LED light exposure time by real-time RT-PCR. *Gapdh* mRNA was used as the control. Data are represented as the means  $\pm$  SEM (n = 4). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. Control (Student's *t*-test).

### 3-2 網膜視細胞における青色 LED 光照射誘発 UPR 関連因子のタンパク質量の変化

青色 LED 光の曝露が UPR 関連タンパク質(BiP、GRP94 及び ATF4)の発現に影響を及ぼすか否かについて検討するために、ウエスタンブロッティングによる分析を行った。BiP の発現量は、青色 LED 光照射 6 時間でわずかに増加傾向を示したが、GRP94 は明らかな変化は認められなかった。一方、青色 LED 照射 6、9 及び 24 時間で ATF4 の発現量の顕著な増加が認められ、ATF4 の発現は、網膜視細胞に対する青色 LED 光の曝露に応答して増加した (Fig. 14)。

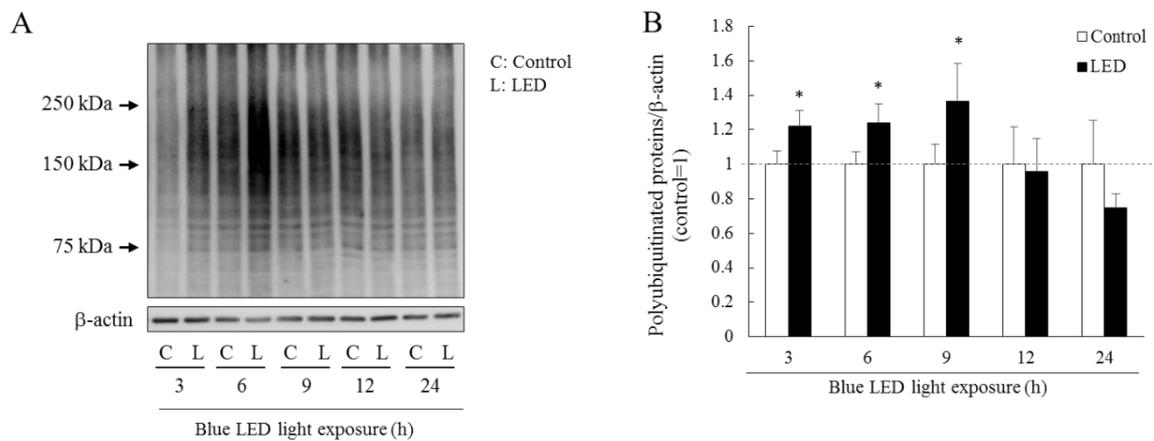


**Figure 14. Change in protein levels induced in response to blue LED light exposure in murine photoreceptor cells**

Immunoblotting show protein levels of UPR factors. The bands indicate protein expression levels at 3, 6, 9, 12 and 24 h for the control and light exposed samples. Representative image (upper) and quantitative data (lower) of BiP (A), GRP94 (B), and ATF4 (C) immunoblots.

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 6 to 14). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. Control (Student's *t*-test).

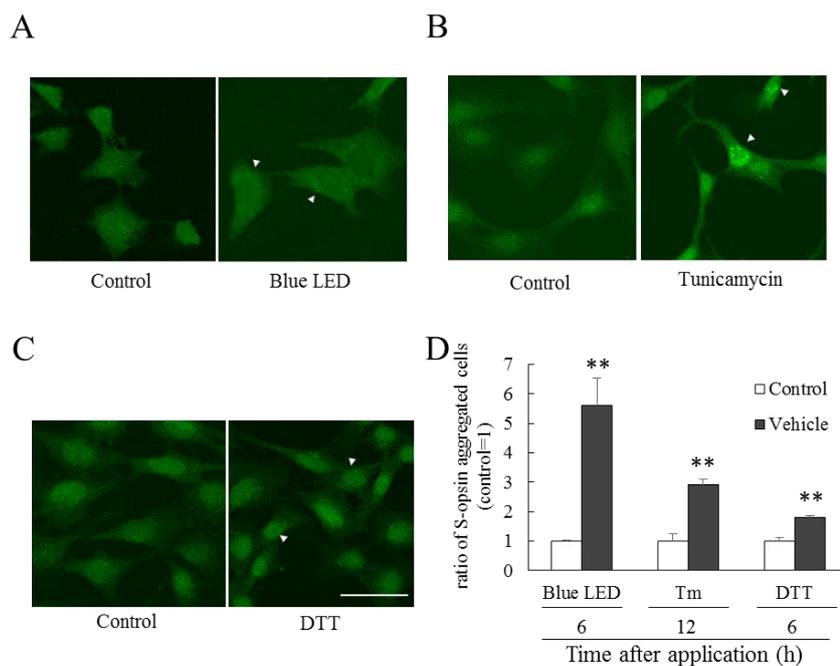
引き続き、青色 LED 光の照射が網膜視細胞におけるポリユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導するかを経時的に検討した。青色 LED 光を 3~12 時間照射して、各時間の細胞内のポリユビキチン化タンパク質の変化を定量した。短時間の曝露 (3~9 時間) ではポリユビキチン化タンパク質の発現量が増加した (Fig. 15)。しかし、青色 LED 光 12 時間以降の曝露では、ポリユビキチン化タンパク質の増加は認められなかった。



**Figure 15. Changes in ubiquitinated protein level induced by blue LED light exposure**  
 Immunoblotting show ubiquitinated protein levels. (A) Representative image and (B) quantitative data of immunoblot. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*p < 0.05 vs. Control (Student's *t*-test).

### 3-3 青色 LED 光照射及び ER ストレス誘導剤による S-オプシン凝集

つぎに、ER ストレス誘導剤であるツニカマイシン及び DTT が、網膜視細胞において S-オプシンの凝集を誘導するか否かについて、免疫染色法を用いて検討した。S-オプシン凝集の観察には、細胞に青色 LED を 6 時間照射、もしくはツニカマイシン (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で 12 時間または DTT (0.5 mM) で 6 時間処置し、細胞核周囲の S-オプシン凝集が認められた (Fig. 16A-C)。総細胞数に対する S-オプシン凝集体を有する細胞の割合を Fig. 16D に示した。青色 LED 光照射、ツニカマイシン及び DTT 処理細胞のいずれにおいても S-オプシン凝集が認められた。

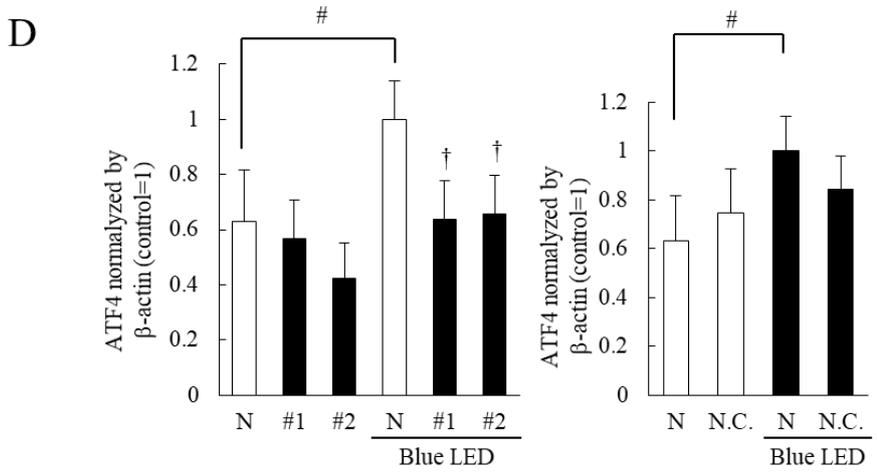
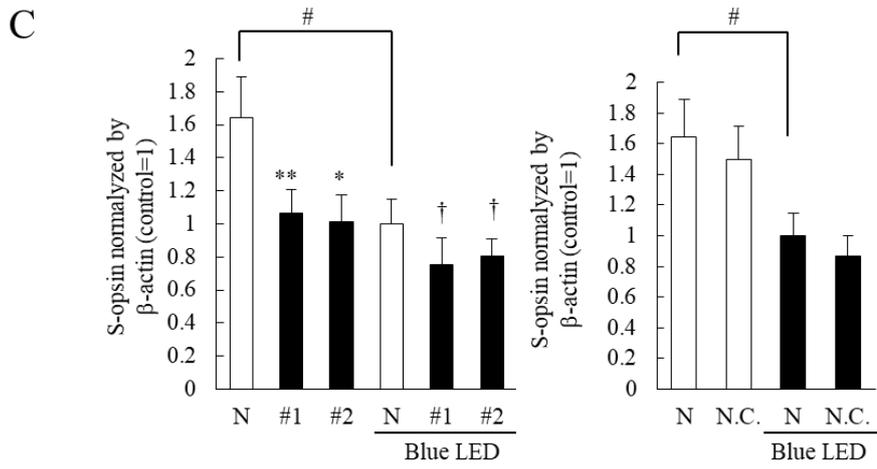
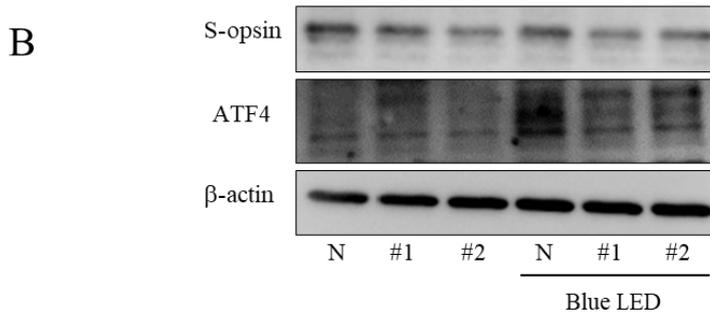
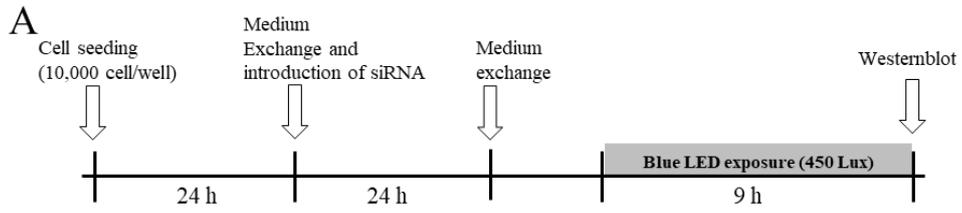


**Figure 16. The aggregation of S-opsin induced by blue LED light exposure or ER stress inducers**

Representative immunostaining images of S-opsin (A) after blue light-emitting diode (LED) light exposure for 6 h, (B) 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tunicamycin (Tm) treated for 12 h, and (C) 0.5 mM dithiothreitol (DTT) treated for 6 h. (D) Quantitative analysis of immunostaining images. The ratio of aggregated S-opsin cells. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  or 4). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs. Control (one-way analysis of variance followed by Dunnett's test). The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . Arrowheads indicate the aggregation of S-opsin.

### 3-4 S-オプシンノックダウン条件下における青色 LED 光照射誘発 ATF4 の挙動

前述までの結果より、青色 LED 光照射に誘発される S-オプシンの凝集と ATF4 タンパク質活性化との間に関連があると予測し、網膜視細胞における S-オプシンのノックダウンが青色 LED 光誘発 ATF4 活性化に影響を及ぼすか検討した (Fig. 17)。S-オプシン siRNA 処置 24 時間後、S-オプシンの発現は減少し (Fig. 17 A, B 左)、ネガティブコントロール siRNA の処理では変化しなかった (Fig. 17B 右)。また、青色 LED 光照射 9 時間後、siRNA の有無にかかわらず S-opsin の発現量は減少した (Fig. 17B)。続いて、青色 LED 光照射後の ATF4 の発現に対する S-オプシン siRNA の効果を検討した。青色 LED 光への曝露は、ATF4 の発現を誘導したが、S-オプシン siRNA#1 または#2 の処理によって、その増加は抑制された (Fig. 17C)。



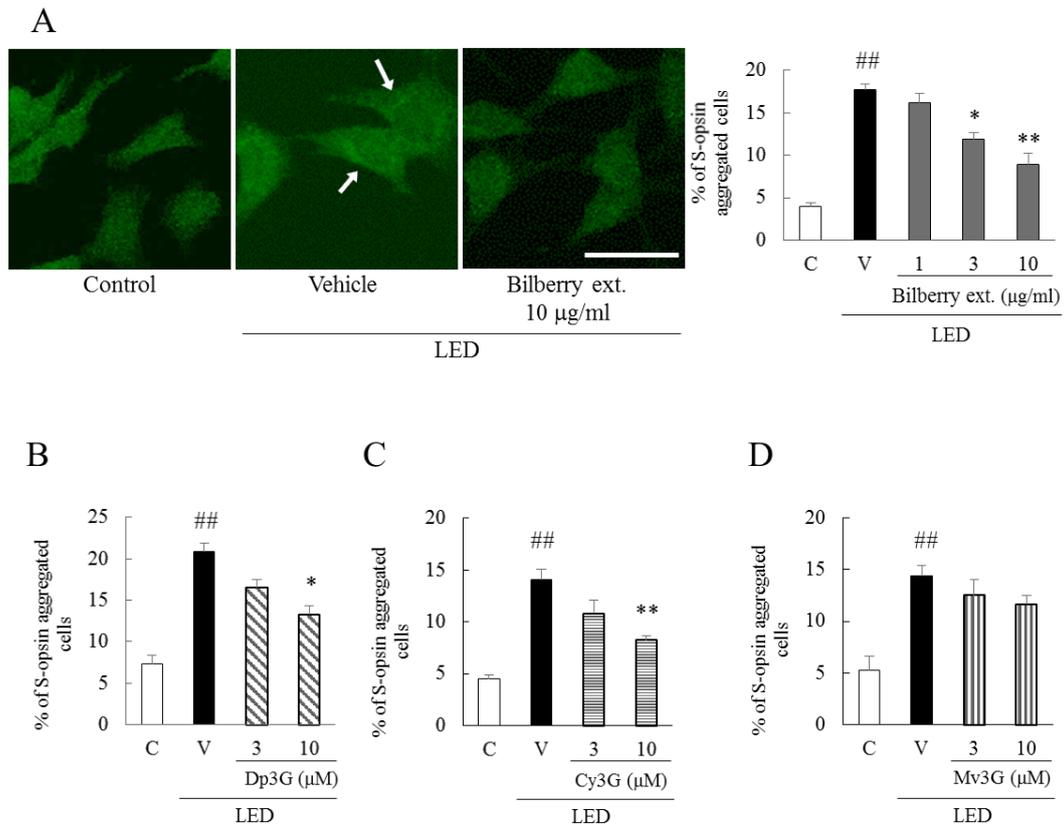
Continued on the next page.

**Figure 17. Effects of S-opsin siRNA on blue LED light exposure in murine photoreceptor cells**

(A) Experimental protocol. (B) Representative immunoblotting images of S-opsin, ATF4, and  $\beta$ -actin. (C) Expression levels of S-opsin and (D) ATF4. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 7 to 9). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, #p < 0.05 vs. Normal (Control); †p < 0.05, †† p < 0.01 vs. normal (blue LED); (Student's *t*-test). N: Normal. N.C.: Negative control siRNA. #1: S-opsin si RNA #1. #2: S-opsin si RNA #2.

3-5 青色 LED 光誘発 S-オプシン凝集に対するビルベリーエキス及び主要成分の作用

マウス由来網膜視細胞を 450 lux の青色光に 6 時間暴露すると、網膜視細胞に特異的なタンパク質である S-オプシンの凝集が誘導される (Fig. 18A) (Kuse et al. 2014)。ビルベリーエキスは 3  $\mu$ g/mL 以上から、Dp3G 及び Cy3G は 10  $\mu$ M で S-オプシンの凝集を阻害した (Fig. 18A~C)。一方、Mv3G は、青色 LED 光誘発 S-オプシンの凝集に対して抑制傾向を示したが、その作用は有意ではなかった (Fig. 18D)。

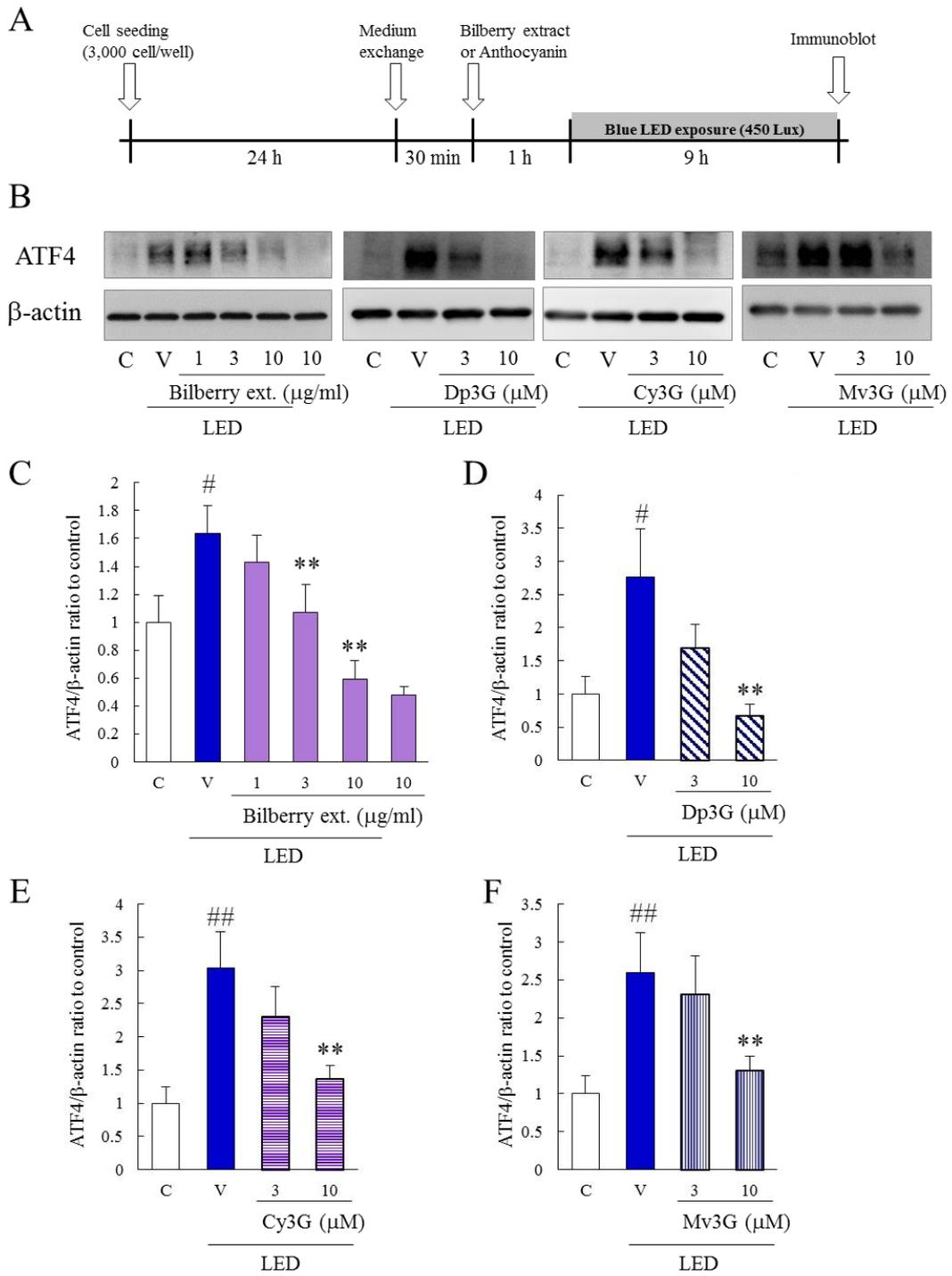


**Figure 18. Effect of bilberry extract and its containing anthocyanins on the aggregation of S-opsin induced by blue LED light exposure**

Representative immunostained images of S-opsin after blue LED light exposure for 6 h and quantitative data after bilberry extract (A), delphinidin-3-O-glucoside (Dp3G) (B), cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G) (C), and malvidin-3-O-glucoside (Mv3G) (D). The quantitative analysis of immunostained images is the ratio of the aggregated S-opsin cells. Data are the means  $\pm$  standard error of the means (SEMs) (n=3 or 4). ## $P$  < 0.01 vs. control; \*\* $P$  < 0.01, \* $P$  < 0.05 vs. the vehicle (Dunnett's multiple comparison tests or Student's  $t$ -tests). The scale bar represents 50  $\mu$ m. Arrows indicate the aggregation of S-opsin.

### 3-6 青色 LED 光誘発 ATF4 の発現に対するビルベリーエキス及び主要成分の作用

青色 LED 光照射に誘発される ATF4 発現に対するビルベリーエキス及びその活性成分 (Dp3G、Cy3G 及び Mv3G) の作用をウエスタンブロットィング法により検討した (Fig. 19)。青色 LED 光 9 時間の照射は、ATF4 タンパク質の発現を有意に増加させた (Fig. 19B, C)。ビルベリーエキスは 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上から濃度依存的に ATF4 の発現の増加を抑制した。また、その活性成分である Dp3G、Cy3G 及び Mv3G は、濃度 10  $\mu\text{M}$  において青色 LED 光照射に誘発される ATF4 の発現の増加を有意に抑制した (Fig. 19B, D~F)。



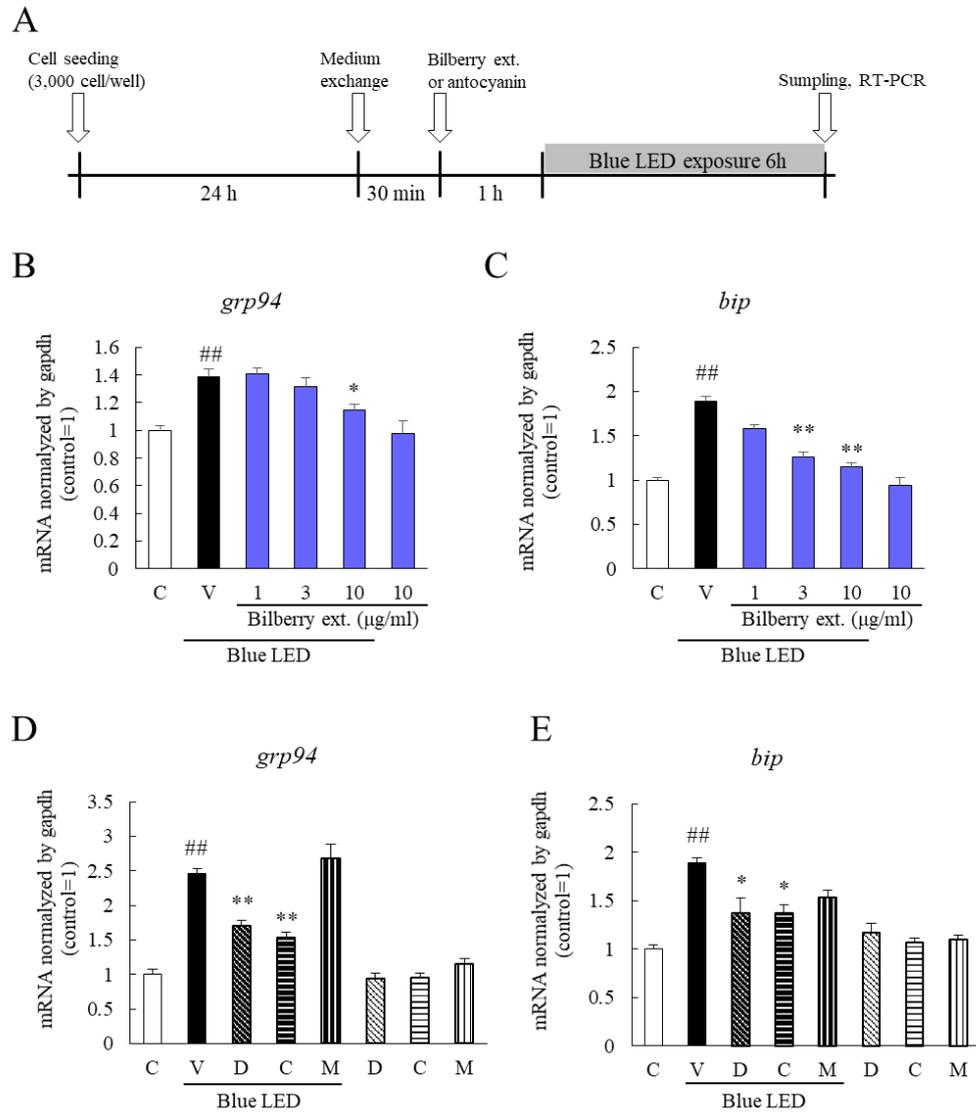
Continued on the next page.

**Figure 19. Effect of bilberry extract and its containing anthocyanins on blue LED light-induced ATF4 activation in 661W cells, a murine photoreceptor cell line, in culture**

Immunoblotting shows the level of the ATF4 protein. After cells were pretreated with bilberry extract, or Dp3G, Cy3G, and Mv3G for 1 h, exposure to 450 lux blue LED light for 9 h. (A) Experimental protocol. (B) Typical photomicrograph and quantitative data of ATF4 protein levels using bilberry extract (C), delphinidin-3-O-Glucoside (D), cyanidin-3-O-glucoside (E), and malvidin-3-O-glucoside (F). Data are the means  $\pm$  SEMs (n = 5 or 6). <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs. control; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs. vehicle (Dunnett's multiple comparison tests or Student's *t*-tests). C: control, V: vehicle, Dp3G: delphinidin-3-O-Glucoside, Cy3G: cyanidin-3-O-glucoside, Mv3G: malvidin-3-O-glucoside.

3-7 青色 LED 光誘発 UPR 因子の遺伝子変化に対するビルベリーエキス及び主要成分の作用

青色 LED 光誘発 UPR 因子の発現変化に対するビルベリーエキス及びアントシアニンの作用を検討した (Fig. 20)。青色 LED 光照射により、網膜視細胞において UPR 因子である *grp94* 及び *grp78/bip* の mRNA 発現を増加させた (Fig. 13)。*Grp94* 及び *grp78/bip* は、ATF4 の下流に存在する UPR 因子であり、青色 LED 光照射が網膜視細胞において ATF4 を活性化させることから妥当な結果と考える。青色 LED の光照射は、*grp94* 及び *grp78/bip* の mRNA の発現を増加させ、ビルベリーエキスは *grp94* の増加を 10  $\mu\text{g/mL}$  で、*grp78/bip* の増加を 3  $\mu\text{g/mL}$  以上で抑制した (Fig. 20B, C)。Dp3G 及び Cy3G は、*grp94* 及び *grp78/bip* の mRNA の発現上昇を抑制したが、Mv3G は影響を及ぼさなかった (Fig. 20D, E)。

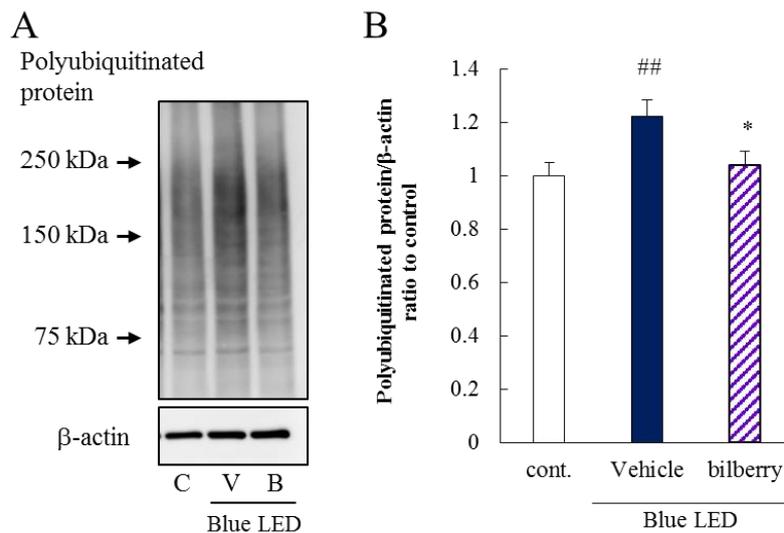


**Figure 20. Effect of bilberry extract and its containing anthocyanins on the expression of unfolded protein response (UPR) factors induced by blue LED light exposure**

Unfolded protein response-related mRNAs, *bip* and *grp94*, in murine photoreceptor cells induced by blue LED light exposure. The levels of mRNA after 9 hours exposure to blue LED light by real-time RT-PCR. (A) Experimental protocol. Induction of the mRNA of *bip* (A), *grp94* (B) treated with bilberry extract of 1 to 10 µg/mL. Induction of *bip* (C) *grp94* (D), mRNA treated with anthocyanins at 10 µM. *Gapdh* mRNA was used as the control. Data are the means ± SEMs (n = 4). <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs. control; <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs. vehicle (Dunnett's multiple comparison test or Tukey's test). C: control, V: vehicle, D: delphinidin-3-O-Glucoside, C: cyanidin-3-O-glucoside, M: malvidin-3-O-glucoside.

### 3-8 青色 LED 光誘発ポリユビキチン化タンパク質に対するビルベリーエキスの作用

網膜視細胞への青色 LED 光の 3~9 時間の曝露は、細胞内タンパク質のポリユビキチン化を増加させた (Fig. 15)。ビルベリーエキスの作用を検討することを目的とし、本検討ではポリユビキチンタンパク質が安定して発現増加した、6 時間の青色 LED 光照射条件下で実施した。青色 LED 光 6 時間の照射は、ポリユビキチン化タンパク質の発現を有意に増加させた。ビルベリーエキスは、青色 LED 光照射に誘発される細胞内タンパク質のポリユビキチン化の増加を抑制した (Fig. 21)。

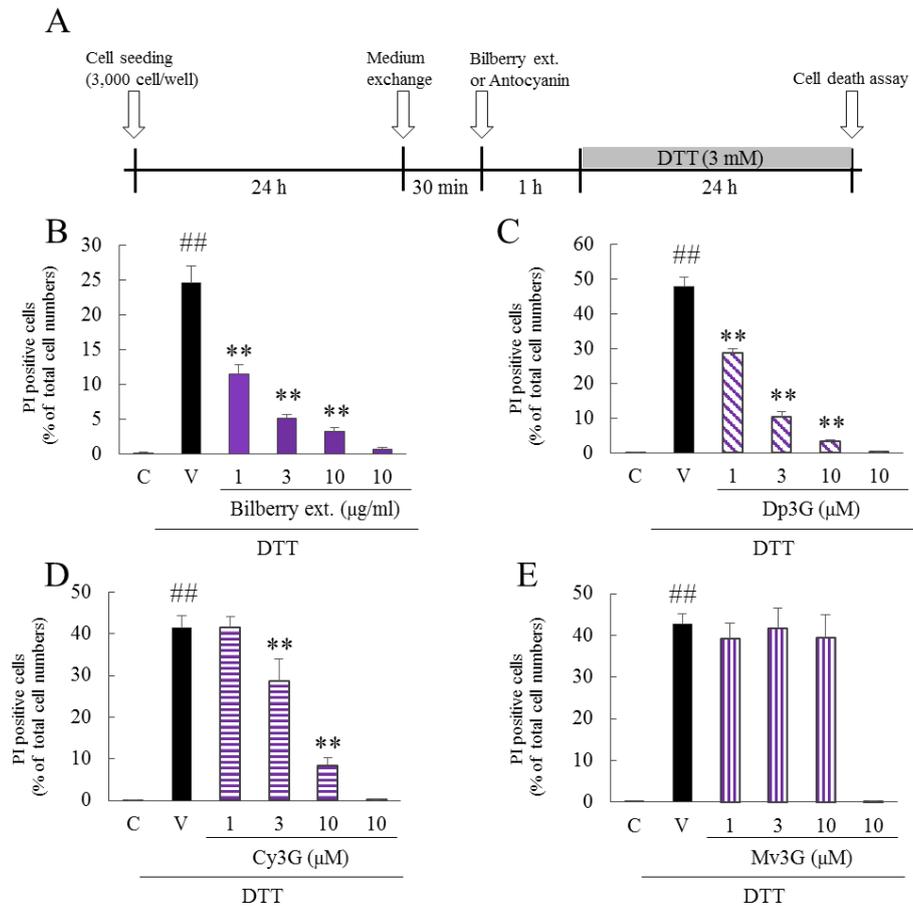


**Figure 21. Effect of bilberry extract on ubiquitinated protein level induced by blue LED light exposure**

Cells were pretreated with bilberry extract 10  $\mu$ g/mL for 1 h and then exposed to 450 lux blue LED light for 6 h. Immunoblotting show ubiquitinated protein levels. (A) Representative image and (B) quantitative data of immunoblot. Data are the means  $\pm$  SEMs (n = 20). <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. control; \* $P < 0.05$  vs. Vehicle (Student's  $t$ -test). C, cont.: control, V: vehicle, B: bilberry extract.

### 3-9 DTT 誘発マウス由来網膜視細胞障害に対するビルベリーエキス及び主要成分の作用

青色 LED 光照射は、S-オペリン凝集、ATF4 タンパク質及び ATF4 の下流因子 (*grp78/bip*、*grp94*) を発現上昇させるため (Fig. 13-16)、青色 LED 光照射が ER ストレスを誘導した可能性がある と推論し、ビルベリーエキス及び主要アントシアニンの DTT 誘発細胞死に対する作用を検討した。酸化還元剤である DTT は ER ストレス誘導作用を有し、*in vitro* において細胞障害を惹起する (Lai et al., 2010)。ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は DTT 誘導性細胞死を濃度依存的に抑制し、それぞれ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、1  $\mu\text{M}$  以上及び 3  $\mu\text{M}$  以上の濃度で細胞保護作用を示した。一方、Mv3G は明らかな作用を示さなかった (Fig. 22)。

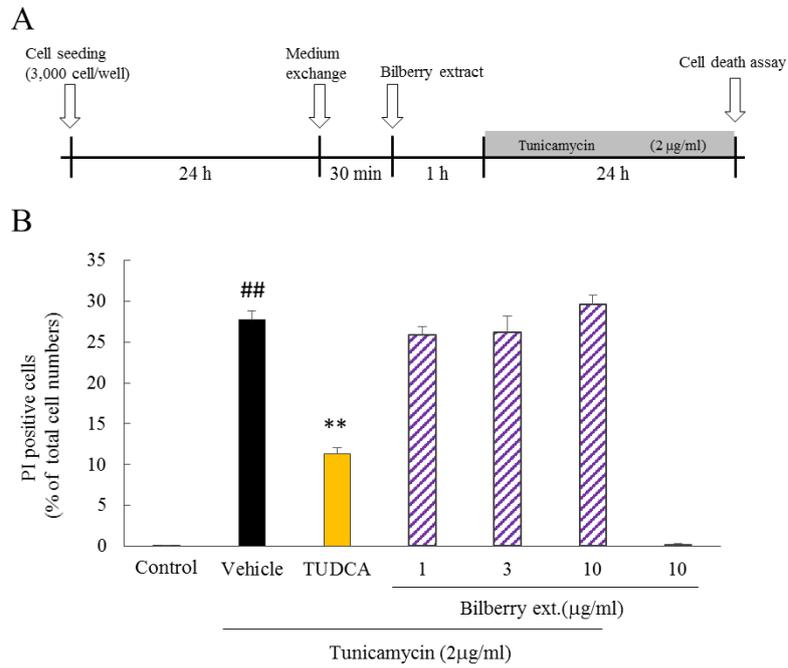


**Figure 22. Effect of bilberry extract and its containing anthocyanins on DTT-induced cell death in murine photoreceptor cell line**

(A) Experimental protocol *in vitro*. Effect of (B) bilberry extract, (C) Dp3G, (D) Cy3G, and (E) Mv3G on DTT-induced cell death in murine photoreceptor cells. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted and expressed as a percentage of Hoechst 33342-positive cells. Data are the means  $\pm$  SEMs ( $n = 5$  or  $6$ ). <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. control; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs. the vehicle (Dunnett's multiple comparison test or Student's *t*-test). C: control, V: vehicle, Dp3G: delphinidin-3-O-glucoside, Cy3G: cyanidin-3-O-glucoside, Mv3G: malvidin-3-O-glucoside. DTT: dithiothreitol.

### 3-10 ツニカマイシン誘発マウス由来網膜視細胞障害に対するビルベリーエキスの作用

ER 誘導剤 DTT が惹起する網膜視細胞障害に対してビルベリーエキス及びその含有アントシアニンが保護作用を示したことから、異なるメカニズムで誘導される ER ストレスに対してもビルベリーエキスが保護作用を示すか否かを検討した。ビルベリーエキスは、ツニカマイシンにより誘発される細胞障害に対する保護効果は示さなかった (Fig. 23)。本検討では、タウロウルソデオキシコール酸 (TUDCA) をポジティブコントロールとして用いた。TUDCA はケミカルシャペロンであり、タンパク質の凝集を効率的に軽減し、ER ストレスによる細胞死を抑制する (Uppala et al., 2017)。ツニカマイシンは N 型糖鎖修飾阻害剤であり、糖タンパク質のフォールディングを阻害することで小胞体内にアンフォールドタンパク質の蓄積と凝集を誘発する小胞体ストレス誘導剤である (Chan et al., 2005)。



**Figure 23. Effect of bilberry extract on tunicamycin-induced cell death in murine photoreceptor cells**

(A) Experimental protocol *in vitro*. Effect of (B) bilberry extract on tunicamycin-induced death of 661W cells. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted and expressed as a percentage of Hoechst 33342-positive cells. Data are the means  $\pm$  SEMs (n = 6). <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs. control (Student's *t*-test).

#### 第4節 考察

本章では、青色 LED 光に曝露されたマウス由来網膜視細胞 (661W) において、ER ストレス関連遺伝子 (*grp78/bip*, *grp94*, *atf4*) の発現及びポリユビキチン化タンパク質の発現レベルが増加することを示した。なかでも、ATF4 の mRNA 及びタンパク質は、網膜視細胞における青色 LED 光曝露に応答して顕著に増加した。さらに、S-オプシン mRNA のノックダウンは、青色 LED 光曝露に応答した ATF4 の発現を抑制した。ヒトロドプシン T17M 変異は網膜色素変性症を引き起こし、その機構には ATF4 の発現上昇を含む UPR が関連することが報告されている (Gorbatyuk et al. 2012)。また、加齢に伴う網膜組織上の UPR 活性化はロドプシンの発現を減少させる報告もある (Lenox et al. 2015)。本章では S-オプシンのノックダウンによる発現量の減少が、続けて起こる UPR の活性化を低下させ、ATF4 の発現減少を引き起こしたことが示唆された。本検討から、LED 光の曝露は網膜視細胞における ER ストレス及び UPR を誘導し、これらは S-オプシンの凝集と関連している可能性が示唆された。ER ストレスは、折りたたみ不全タンパク質の蓄積によって誘導され、これらのタンパク質はユビキチン-プロテアソーム経路を介して分解される (Uehara et al., 2007)。アルツハイマー病やパーキンソン病、緑内障を含む神経変性疾患と ER ストレス応答との関連が明らかにされている (Marciniak et al. 2006; Uehara et al. 2006; Ito et al. 2011; Wang et al. 2012)。さらに、青色 LED 光への過剰な曝露は、酸化ストレス及び S-オプシンの凝集を介した光受容体細胞変性を誘導することが報告されている (Kuse et al. 2014)。そのため、網膜視細胞に対する青色 LED 光曝露による ER ストレスの誘導及び UPR 経路の活性化は S-オプシンの凝集によって開始されると推察される。*grp78/bip*、*grp94* 及び *atf4* mRNA の発現は、青色 LED 光照射された光受容体細胞において時間依存的に増加した

(Fig. 13)。ウエスタンブロッティングによる分析では、青色 LED 光への曝露に  
応答して ATF4 タンパク質の発現が増加することを明らかにした。 GRP78/BiP  
のタンパク質発現は、青色 LED 光照射後わずか 6 時間で増加傾向を示した  
が、GRP94 のタンパク質発現は、対照群と比較して変化しなかった (Fig. 14)。  
したがって、青色 LED 光への曝露は、PKR 様小胞体キナーゼ (PERK) 経路を  
活性化し、網膜視細胞における翻訳抑制を誘導すると考えられる。過度の光曝  
露は光受容体細胞のアポトーシスを誘発し、リン酸化 PERK レベルを増加させ  
ることが報告されている (Yang et al. 2008)。活性化した PERK は、翻訳開始因  
子のサブユニット eIF2 $\alpha$  をリン酸化することで新たなタンパク質の翻訳を抑制  
する (Harding et al. 1999; Proud CG. 2005)。一方、eIF2 $\alpha$  のリン酸化は uORF  
(upstream open reading frame) を持つ一部の mRNA の翻訳を促す。転写因子  
ATF4 は uORF を有するため翻訳誘導される (Saito et al. 2011)。結果として、  
PERK 経路の活性化によりタンパク質全体の翻訳は抑制されたが、その影響を  
受けない ATF4 の翻訳が相対的に増加したと推察される (Harding et al. 2000)。

また本検討では、ポリユビキチン化タンパク質のレベルが青色 LED 光の 3~  
9 時間の曝露によって増加することを見出した (Fig. 15)。この結果は、折りた  
たみ不全タンパク質の増加、もしくは青色 LED 光の曝露後にプロテアソーム  
の活性が低下している可能性が考えられる。S-オプシンは錐体細胞に特異的に  
存在するタンパク質であり、マウス網膜視細胞に存在することが報告されてい  
る (Tang et al. 2011)。したがって、網膜視細胞における ER ストレスと S-オ  
プシン凝集との間に関連があると仮定し、S-オプシン凝集について検討したと  
ころ、ER ストレス誘導剤であるツニカマイシン及び DTT は、S-オプシンの凝  
集を誘導した (Fig. 16)。このことから、凝集した S-オプシンと ER ストレスと  
の関連が示唆された。さらに、UPR 経路の活性化を調べるために siRNA を用

いて S-オプシンのノックダウンを行った。S-オプシン siRNA 処理は、青色 LED 光への曝露に応答して増加する ATF4 の活性化を抑制した (Fig. 17)。このことから、マウス光受容体細胞における、青色 LED 光誘発 ATF4 の活性化は、S-オプシンの凝集をきっかけに引き起こされた可能性が考えられる。過剰な光曝露が網膜視細胞にて S-オプシンの凝集や ER ストレスを惹起すること (Nakanishi et al. 2013)、S-オプシンの凝集が網膜錐体細胞の変性に関与することなどが示されている (Zhang et al. 2011)。S-オプシンは過剰な可視光曝露によって凝集し、その際凝集体は ER マーカーである BiP と共局在していることから (Nakanishi et al. 2013)、本検討においても S-オプシンの凝集体は ER 内腔に局在していると推察される。青色 LED 曝露によって誘発された S-オプシンの凝集体が異常な高次構造をとったタンパクとして ER 内に蓄積し、その結果 ER ストレスを惹起し、ATF4 の活性化を誘導したと考えられる。S-オプシンの凝集は AMD 病態における錐体細胞障害の原因の一つとされている (Zhang et al. 2011)。本検討においても同様に、青色 LED 光曝露が S-オプシンの凝集及び ER ストレスを惹起することを明らかにした。青色 LED 光誘発網膜視細胞障害は、細胞内 ROS 産生量の増加に因ることが示されている (Kuse et al. 2014)。しかしながら、AMD などの病態下では、ROS 以外の遺伝子変異や環境因子によるタンパク質の凝集や ER ストレスも引き起こされることから (Kheitan et al. 2017)、酸化ストレスを抑制するだけでなく、S-オプシンの凝集及び ER ストレスを抑制する必要があることが示唆された。ここまでの検討により、マウス由来網膜視細胞への青色 LED 光の照射は、S-オプシンの凝集を通して、ATF4 活性化を誘導することが明らかとなった。しかし、網膜視細胞が機能不全に陥った後の治療法はいまだ確立されていない。そのため、病気を発症する前の未病の時点から、予防医学的なアプローチを行うことは重要である。

機能性食品素材の中で視機能の改善効果が期待されている代表的なものとして、アントシアニンがある。アントシアニンを高濃度で含むビルベリーエキスは、酸化ストレスに起因する網膜視細胞障害に対して保護作用を示す (Ogawa et al. 2013, 2014)。しかしながら、青色 LED 光誘発網膜視細胞障害に及ぼす ER ストレスの影響については明らかにされていない。そこで引き続き、青色 LED 誘発網膜視細胞障害に対するビルベリーエキスの作用について検討を行った。本研究で用いたビルベリーエキスは、15 種類のアントシアニンが含まれており、5 種類のアントシアニジン (delphinidin, cyanidin, malvidin, petunidin, peonidin) と 3 種類の糖 (glucose, galactose, arabinose) の組み合わせからなる。生体におけるアントシアニンの吸収及び代謝機構はいまだ解明されていないが、ラットを用いたアントシアニン吸収試験においては、血中から検出されたアントシアニンはグリコシドの形をとっておりアグリコンとして検出されなかった (Tsuda et al, 1999)。したがって、本検討ではビルベリーエキスの活性成分として、Dp3G、Cy3G 及び Mv3G の 3 つのグリコシドを使用した。

S-オプシンはマウスの M-オプシンよりも凝集しやすく (Zhang et al, 2013)、青色 LED 光 (Kuse et al. 2014)や ER ストレス誘導剤の DTT やツニカマイシンに曝露されることで核周囲に凝集する (Fig. 16)。青色 LED 光の曝露は S-オプシンの凝集に続き ATF4 の活性化を引き起こす (Fig. 13, 14)。本研究では、ATF4 の活性化及び S-オプシンの凝集に対するビルベリーエキス及びその含有アントシアニンの作用を検討した。ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、網膜視細胞において青色 LED 光曝露によって誘導される S-オプシンの凝集及び ATF4 活性化の両方を抑制した。一方、Mv3G は青色 LED 光照射に誘発される ATF4 活性化を抑制したが、S-オプシンの凝集に対してはわずかな作用しか認めなかった (Fig. 18, 19)。Mv3G は青色 LED 光誘発 S-オプシンの凝集に

は明らかな影響を及ぼさなかったが、酸化ストレスを抑制することによって ATF4 の活性化を抑制したと推察される。過去には、いくつかのアントシアニン及びビルベリーエキスがアミロイド  $\beta$  と分子間相互作用することで、異常凝集を直接抑制することが報告されている (Yamakawa et al, 2016; Prasanna et al, 2018; Saithong et al, 2018; Aimee et al, 2019)。アントシアニンは、ヒドロキシル基を有した 3 つの環構造からなる (Fig. 4) (Matsunaga et al, 2009)。タンパク質高次構造の形成や安定化に関わるケミカルシャペロンの一種である ursodeoxycholic acid や tauroursodeoxycholic acid や ursodeoxycholic acid も環構造及びヒドロキシル基を有する (Bai et al, 1998)。以上より、アントシアニンによる S-オプシンの凝集抑制は、アントシアニンの構造的性質に起因している可能性が示唆される。ケミカルシャペロンとして用いられている 4-phenylbutyric acid は、薬理的に作用するのではなく、物理化学的に変性したタンパク質で露出した疎水領域を保護することでタンパク質同士の凝集を防ぐケミカルシャペロンとして作用するため、高濃度での使用が必要であると示唆されている (Kaneko et al, 2004)。アントシアニンはその構造的性質によってタンパク質の凝集を抑制している可能性が高いと考えられる。

ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、青色 LED 光誘発 ATF4 の活性化を抑制し、さらには *grp78/bip* 及び *grp94* の mRNA の発現を抑制した。しかし、Mv3G は ATF4 の活性化を抑制したが、*grp78/bip* 及び *grp94* の mRNA の発現レベルに影響を及ぼさなかった。このことから、Mv3G は抗酸化作用は有するが、S-オプシンの凝集には影響しないと考えられる。青色 LED 光照射は、網膜視細胞におけるタンパク質のポリユビキチン化を引き起こす (Fig. 15)。ER ストレスは、ミスフォールドタンパク質の蓄積によって引き起こされるが、ミスフォールドタンパク質は、ポリユビキチン化されユビキチン-プロテアソーム

経路にてすばやく分解される (Uehara et al, 2007)。すなわち、青色 LED 光曝露によって、網膜視細胞内で ER ストレスが惹起されていることが示唆される。過去にも、ER ストレスに伴うポリユビキチン化タンパク質の蓄積と神経変性疾患との関連について詳細に報告されている (Uehara et al, 2006; Ito et al, 2011)。プロテアソームによるミスフォールドタンパク質分解のためには、タンパク質の立体構造をほどこき、触媒活性を持つプロテアソーム内腔へ送り込む必要がある (Komatsu and Ichimura, 2012)。したがって、凝集化したタンパク質はプロテアソームでは分解することができず、オートファジーに依存することになる。タンパク質凝集体はユビキチン-プロテアソーム経路が障害された時やユビキチン-プロテアソーム経路の分解容量を超えた時に形成されることから、凝集タンパク質の分解にはオートファジーによる補償機構も働いている (Komatsu and Ichimura, 2012)。網膜視細胞に対する青色 LED 光照射によって細胞内のオートファジーが惹起されることが示されている (Ogawa et al. 2014)。本検討より、網膜視細胞に対する青色 LED 光照射は、細胞内でのユビキチン化タンパク質量を増加させることを示した (Fig. 15)。このことから、青色 LED 光照射は、網膜視細胞内でのユビキチン化タンパク質の量を増加させ、異常タンパク質のプロテアソーム分解を進めるとともに、プロテアソーム分解経路では賄いきれない過剰な異常タンパク質の分解のためにオートファジー経路が活性化された可能性が考えられる。オートファジーは、細胞内における異常なタンパク質蓄積の防止、過剰なタンパク質のリサイクルを担う機構である (Nixon 2013)。網膜視細胞における青色 LED 光照射時に、細胞内でのオートファジー活性化が起こり、ビルベリーエキスはその現象を抑制することが報告されている (Ogawa et al. 2014)。以上より、ビルベリーエキスは青色 LED 光曝露後のミスフォールドタンパク質の増加を抑制し、ER ストレスに対して保護的に働く

可能性が示された。

さらに、青色 LED 光障害によって生じる小胞体ストレス機構を解明するため、既知の小胞体ストレス誘導剤 (Yoshida, 2007) を用いた検討を行った (Fig. 16, 22, 23)。本検討で用いた小胞体ストレス誘導剤 (ツニカマイシン及び DTT) で S-オプシンの細胞内凝集が観察されたが、その割合は青色 LED 光照射の際が最も高かった (Fig. 16)。ツニカマイシンは小胞体で合成される糖タンパク質の正常な合成を阻害し分泌異常を起こし、DTT はタンパク質非特異的にチオエステル結合を破壊する (Yoshida, 2007)。S-オプシンは他のオプシン (M-オプシン、L-オプシン) と比較して凝集しやすいことが報告されており (Zhang et al, 2011)、以上のことから、青色 LED による網膜視細胞における小胞体ストレスは、全タンパク質のミスフォールドではなく、S-オプシン特異的に凝集が起こった可能性が考えられる。ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、DTT 誘発 ER ストレスによる細胞死に対して保護効果を示した (Fig. 22)。DTT は酸化還元剤であり、酸化的な環境である ER 内腔の環境を破壊し、タンパク質のチオエステル結合を破壊することでタンパク質の変性を引き起こし、ER ストレスを惹起する (Yoshida, 2007; Labunskyy et al, 2009; Xiang et al. 2016)。ビルベリーエキスは DTT による細胞ストレスに対して保護作用を示したが、抗酸化物質である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) は DTT 誘発細胞障害に対する保護作用を示さなかった。したがって、本結果が示すビルベリーエキスの細胞保護作用は抗酸化作用によるものではない可能性が考えられる。さらに、ビルベリーエキスは、DTT 誘発細胞死に対して保護効果を示したが、同じく ER ストレス誘導剤であるツニカマイシンに誘発される細胞障害に対する保護効果は示さなかった (Fig. 23)。ツニカマイシンは、タンパク質のフォールディングに関連する *N* 結合グリコシル化を阻害し (Lehrman et al, 2001; Rutkowski et al, 2006)、正常タン

パク質の合成を阻害する。ツニカマイシン誘発網膜神経節細胞障害に対し、アントシアニン含有素材である黒米エキスが保護作用を有すること、さらにその作用には、アントシアニジン B 環のヒドロキシル基の存在が重要であることが示唆されている (Tanaka et al, 2013)。本検討では 5 種類のアントシアニジンを含むビルベリー抽出物を用いて検討を行っており、ツニカマイシン誘発細胞障害に対する保護作用を示すために必要な B 環のヒドロキシル基の濃度に満たなかった可能性が考えられる。

アントシアニンは経口投与によって動物の眼に到達することが示されており (Matsumoto et al, 2006; Kalt et al, 2008)、本検討によって、ビルベリーは視細胞保護作用を有することが見出されたことから、網膜疾患のための有用な予防的健康食品になり得ると考えられる。

本章では、青色 LED 誘発網膜視細胞障害における小胞体ストレスの関与並びに青色 LED 誘発 S-オプシンの凝集及び ATF4 の活性化に対するビルベリーエキス及びアントシアニンの保護作用を見出した。ビルベリーエキスによる青色 LED 光誘発 ATF4 の活性化、S-オプシン凝集の抑制及び DTT 誘発細胞死の保護作用は、ビルベリーエキスに含まれるデルフィニジン及びシアニジンに起因することが示唆された。

一方、青色 LED 光は網膜に到達する前に角膜や水晶体を通過することは知られているが、青色 LED 光による角膜障害に対しては十分に明らかにされていない。青色 LED 光に曝される機会が増えている現代社会では、連続的に角膜が障害を受けている可能性が考えられ、その障害に対する保護及び/または治療効果のある成分の探索は意義があると考えられる。そこで次章では、青色 LED 光誘発角膜上皮障害に対するビルベリーエキスの保護作用について検討することとした。

### 第3章 青色LED誘発角膜上皮細胞障害に対するビルベリーエキスの保護作用

#### 第1節 緒言

前章で述べたように、発光ダイオード (LED) は照明、テレビ、パーソナルコンピュータ及び液晶ディスプレイにおいて広く使用されている。従来の光源と比較してLEDランプは発熱が少なく、また寿命が長く省電力であるなどいくつかの利点がある。光は波長によって様々な色を示す。人間の目で認識することができる可視スペクトルのうち、380~530nmの波長を有する光は高エネルギー可視光とよばれ、加齢黄斑変性症及び網膜色素変性症の病因に関連している (Margrain et al, 2004; Glazer-Hockstein et al, 2006)。

角膜は眼球表面に位置しており、太陽光及びそこに含まれる紫外線 (Ultraviolet; UV)や、可視光である青色光に直接曝されている (Moulton et al, 2009)。角膜、結膜及び涙液層で構成される眼球の表面は、活性酸素からの防御機能を有しており、ドライアイは涙液層による酸化防御機構の欠乏に関連する主な眼障害である (Choy et al, 2011; Uchino et al, 2012a; Uchino et al, 2012b)。シェーグレン症候群のドライアイ患者の涙液及び結膜では、酸化ストレスマーカーが増加し、その変化は重症度と相関している (Wakamatsu et al, 2013)。また、ドライアイの治療法として、炎症を抑制する治療法が用いられている (Gillespie et al, 2008; Brignole-Baudouin et al, 2011; Cavet et al, 2011; Järvinen et al, 2011; Kangari et al, 2013; Li et al, 2014)。可視光線より波長域の短い光線である紫外線B波 (UV-B) は、角膜上皮細胞においてROSの産生量を増やす上に角膜の抗酸化物質を大幅に減少させ、角膜上での抗酸化システムの不均衡が生じ、炎症及び組織損傷を引き起こすことが示唆されている (Andley et al, 1996; Estil et al, 1997; Kennedy et al, 1997; Cejkova et al, 2001; Cullen et al, 2002; Cejková et al,

2004; Rogers et al, 2004)。UV-B の目への曝露は、翼状片や急性光線角膜炎（雪眼炎）との関連が報告されている (Taylor, 1989)。さらに、最近の報告では、*in vivo* モデル及び *in vitro* モデルの両方において青色 LED 光と角膜機能障害との関係が報告されている (Lee et al, 2014; Lee et al, 2016)。これらの青色 LED 光による角膜障害はドライアイ症候群につながる可能性が示唆されている (Lee et al, 2016)。すなわち、様々な波長の発光ダイオード光を 1 日 2 回、10 日間マウスに照射したところ、410 nm の波長の光曝露群において、涙液層の安定性の悪化、角膜上皮障害、活性酸素種の増加及び角膜上皮細胞死が報告されている (Lee et al, 2016)。

青色 LED 光源は、高エネルギー可視光を放射する (Grimm et al, 2001; Roehlecke et al, 2011; Kuse et al, 2014)。青色 LED 光への曝露が光受容細胞における活性酸素種 (ROS) が誘発されることが報告されており (Kuse et al, 2014; Ogawa et al, 2014)、酸化ストレスが網膜色素細胞及び光受容体細胞において細胞死を誘導することが示されている (Cai et al, 2000; Sanvicens et al, 2004; Nakamura et al, 2017)。一方、角膜細胞に及ぼす青色光の影響に関する研究はほとんど見当たらない。網膜と異なり角膜は常に強い光に曝されることから、光受容タンパク質を持たない角膜細胞においても、高エネルギー可視光線である青色 LED 光照射が酸化ストレスを誘発することが推察される。過度の青色光は、網膜神経節細胞内の ROS 蓄積、ミトコンドリアの膜電位の破壊及びミトコンドリア分裂タンパク質 Drp1 の発現上昇を引き起こし、ミトコンドリア機能障害及びアポトーシスを引き起こすことが示されている (Li et al, 2018; Tao et al, 2019)。真核生物では ROS は主にミトコンドリアにおいて好気呼吸の副産物として生成される (Hirai et al, 2016)。

第 2 章で述べた通り、ビルベリー(*Vaccinium myrtillus* L.)は、北ヨーロッパの

森林に自生するツツジ科植物で、抽出物は抗酸化作用を有するアントシアニン  
を 15 種類含む (Baj et al, 1983; Nakajima et al, 2004; Ogawa et al, 2008)。ビルベリ  
ーの主な薬理学的作用は、アントシアニンによるものであると報告されている  
(Kähkönen et al, 2003)。ビルベリーエキスの薬理学的な作用としては、緑内障及  
び白内障の形成予防 (Head KA, 2001)、エンドトキシン誘発ブドウ膜炎(EIU)の  
マウスモデルにおける視覚機能改善作用 (Miyake et al, 2012)、VDT 負荷による  
眼疲労抑制作用などの報告がある (Ozawa et al, 2015)。ビルベリーの後眼部への  
作用としては、NMDA 誘発網膜神経細胞障害に対する神経保護作用や  
(Matsunaga et al, 2009)、酸素誘発性網膜血管新生を抑制することが報告されて  
いる (Matsunaga et al, 2010)。これら種々の報告もあり、フランス、ドイツ、イ  
タリアでは眼科領域の医薬品としてビルベリーエキスが承認されている。さら  
に、ビルベリーエキスは、*in vitro* モデルにおいて UV-A 照射及び青色 LED 光  
照射による網膜視細胞障害に対する保護作用が報告されているが (Ogawa et al,  
2013; Ogawa et al, 2014)、ビルベリーエキスの眼球表面に対する薬理作用を検討  
した報告はほとんど存在しない。

本章では、*in vitro* における青色 LED 光誘発角膜上皮細胞障害に対するビル  
ベリーエキスの保護作用に関して検討した。将来的に LED 光は日常的な光源  
としてますます使用されることが予想されるため、青色 LED 光誘発細胞障害  
を防止する素材の探索は、角膜上皮細胞の機能維持のために有用であると考  
えられる。

## 第2節 実験方法

### 2-1 実験材料

ビルベリーエキスは、Wakasa Seikatsu Co., Ltd (Kyoto, Japan) から供与された。本試験で用いたビルベリーエキスのアントシアニン含有量は、第2章第2節、2-1 実験材料の項に記した。Delphinidin-3-O-glucoside (Dp3G)、cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G)、malvidin-3-O-glucoside (Mv3G) は Tokiwa Phytochemical Co., Ltd. (Chiba, Japan) から購入した。ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T; RCB No. 2280) は、理研バイオリソース研究センターより提供を受けた。Hoechst 33342 及び propidium iodide (PI)、5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) and the JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。N-アセチル-L-システイン(NAC) は和光純薬(Osaka, Japan)から購入した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は、同仁化学研究所(Kumamoto, Japan)から入手した。Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay は、Promega Co. (Madison, WI, USA)から購入した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 細胞培養

本研究は、SV-40 transformed ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T; RCB No. 2280)を用いて試験を行った。角膜上皮細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) 含有 DMEM/F12 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。角膜上皮細胞はトリプシン-EDTA 処理により 2~3 日おきに継代した。

#### 2-2-2 青色 LED 光照射装置

青色 LED 光源は、青色 LED (波長 460~470 nm) を 12 球備えた照射装置を使用した。角膜上皮細胞への照射は 2,000 lux となるように調整した。すべての光照射実験は細胞培養用インキュベーターの中で行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で行った。

### 2-2-3 青色 LED 光照射誘発角膜上皮細胞死評価

ヒト角膜上皮細胞を  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM/F12 培地に置換し、37°C、30 分間インキュベートした。各試料 (bilberry extract、Dp3G、Cy3G、Mv3G、NAC) を添加して 1 時間培養後、ヒト角膜上皮細胞に 2000 lux の青色 LED 光を 24 時間照射した。24 時間後、Hoechst 33342 (8.1  $\mu$ M) 及び PI (1.5  $\mu$ M) を添加し、37°C、20 分間インキュベートし核染色した後、蛍光顕微鏡 (DP30BW; Olympus) で撮影した。細胞核を染色した Hoechst 33342 ( $\lambda_{ex} = 360$  nm;  $\lambda_{em} > 490$  nm) (U-MWU フィルター; Olympus) を全細胞とし、死細胞を染色した PI ( $\lambda_{ex} = 535$  nm;  $\lambda_{em} > 617$  nm) (U-MWIG フィルター; Olympus) をカウントし、死細胞率を算出した。

### 2-2-4 青色 LED 光照射誘発活性酸素種 (ROS) 産生量の測定

ヒト角膜上皮細胞を  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM/F12 培地に置換し、各試料を添加し 1 時間処置した。2,000 lux の青色 LED 光を 24 時間照射した後、直ちに CM-H<sub>2</sub>DCFDA を終濃度 10  $\mu$ M となるよう添加し、37°C、1 時間インキュベートした。CM-H<sub>2</sub>DCFDA は細胞透過性の非蛍光性物質であるが、細胞内のエステラーゼによりジアセテート部位が分解され CM-H<sub>2</sub>DCF となることで細胞

外へ放出されない性質をもつ。その後、細胞内で産生される ROS との反応により緑色の蛍光を発することから、この蛍光強度を SkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 を用いて励起波長 488 nm、蛍光波長 525 nm にて ROS 産生量を測定した。さらに細胞数の違いによる補正を加えるため、Hoechst による核染色にて細胞核を染色し、各ウェル 2 か所撮影後に画像内マウス由来網膜視細胞 (661W 細胞) をカウントした結果を元に、細胞当たりの ROS 産生量を算出した (Tanaka et al, 2011)。

#### 2-2-5 細胞代謝活性評価

ヒト角膜上皮細胞を  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM/F12 培地に置換し、各試料を添加し 1 時間処置した。2000Lux の青色 LED 光を 24 時間照射した。続けて、CCK-8 を 10  $\mu$ L/well ずつ各ウェルに添加し、37°C で 2 時間インキュベートした後、492 nm (参考波長 660 nm) における吸光度を SkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) で測定し、細胞代謝活性を対照群と比較した。

#### 2-2-6 ミトコンドリア膜電位アッセイ

ミトコンドリア膜電位は、JC-1 ミトコンドリア膜電位アッセイキットのプロトコルに従って測定した。ヒト角膜上皮細胞を  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートに播種し、37°C で 24 時間培養した。ついで培地を 1% FBS 含有 DMEM/F12 培地に置換し、37°C で 30 分インキュベートした後、終濃度 10  $\mu$ g/mL のビルベリーエキスを添加した。その後細胞を 2,000 lux の青色 LED 光に 24 時間曝露した後、10  $\mu$ g/ mL の JC-1 を加えて 37°C で 15 分間インキュ

べートし、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan) を使用して画像を撮影した。撮影画像をもとに、JC-1 凝集体を含む健康な細胞 (励起/発光= 540nm / 605nm) 及び JC-1 単量体を含むアポトーシスまたは不健康な細胞 (励起/発光= 480 / 510nm) の比を算出した。

#### 2-2-8 青色発光 LED 光誘発角膜上皮細胞カスパーゼ活性測定

青色 LED 光照射によるヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) におけるカスパーゼ (Caspase-3/7) 活性は、caspase-3/7 assay kit を用いて測定した。青色 LED 光照射 24 時間後、Caspase-Glo® 3/7 試薬を各ウェルに添加し、37°C、1 時間インキュベートした。インキュベート後、蛍光強度を SkanIt Re for Varioskan Flash 2.4 を用いて測定し、caspase-3/7 活性を測定した。さらに細胞数の違いによる補正を加えるため、Hoechst による核染色にて細胞核を染色し、各ウェル 2 か所撮影後に画像内網膜視細胞数をカウントした結果を元に、細胞当たりの caspase-3/7 活性を算出した。

#### 2-2-9 ウェスタンブロッティング法

12-well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well の角膜上皮細胞を播種し、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM/F12 培地に置換し、30 分培養後、各試料 (bilberry extract、Dp3G、Cy3G、Mv3G) を添加して 1 時間培養後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 2000 lux の青色 LED 光を 24 時間照射し、照射後にサンプリングを行った。細胞回収以降の操作は、第 1 章 2-2-4 の方法で行った。一次抗体には、rabbit anti-phospho-p38 MAPK、rabbit anti-p38 MAPK、rabbit anti-phospho-ERK、rabbit anti- ERK (1:1000; Cell Signaling Technology)、 mouse anti- $\beta$ -actin (1:5,000; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、horseradish peroxidase (HRP)-

conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse (1:2,000; Thermo Fisher Scientific Inc.)

を用いた。

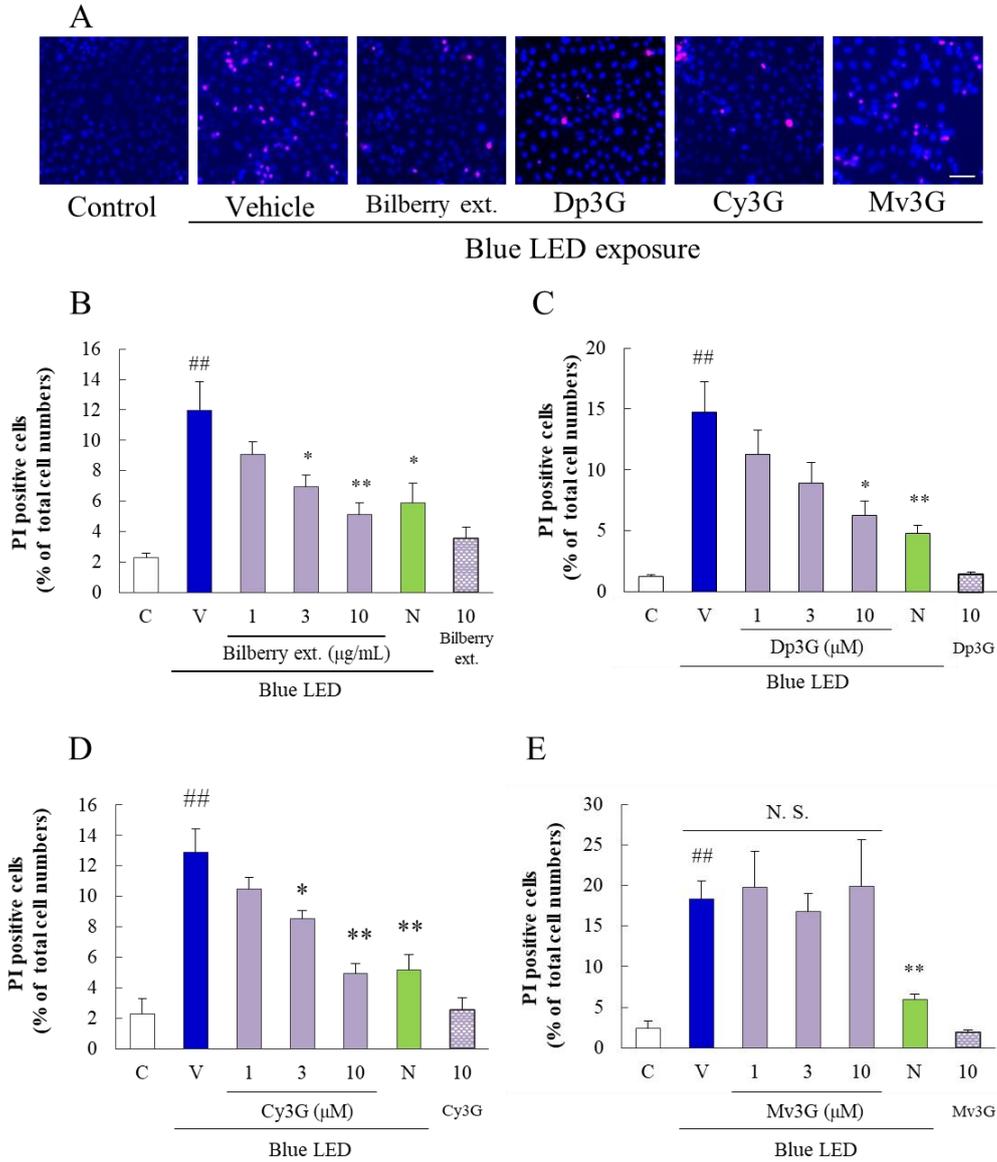
### 2-3 統計学的解析

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 Student's *t*-test、Dunnett's test または Tukey's test を用いて行った。

### 第3節 結果

#### 3-1 青色 LED 光誘発角膜上皮細胞死に対するビルベリーエキス及び主要アントシアニンの保護作用

青色 LED 光誘発ヒト角膜上皮細胞死に対するビルベリーエキス、アントシアニン及び NAC の作用について検討した。PI 蛍光を示す細胞数をカウントし、Hoechst 33342 蛍光を示した細胞数に対する死亡率を算出した。青色 LED 光照射によって誘発された細胞死は、陽性対照薬である NAC (1mM) の添加によって抑制された。さらに、ビルベリーエキス及び Dp3G または Cy3G (3~10  $\mu$ M) は、濃度依存的に角膜上皮細胞死を抑制した (Fig. 24)。一方、Mv3G は角膜上皮細胞における青色 LED 光誘導細胞死に対して明らかな作用を示さなかった。

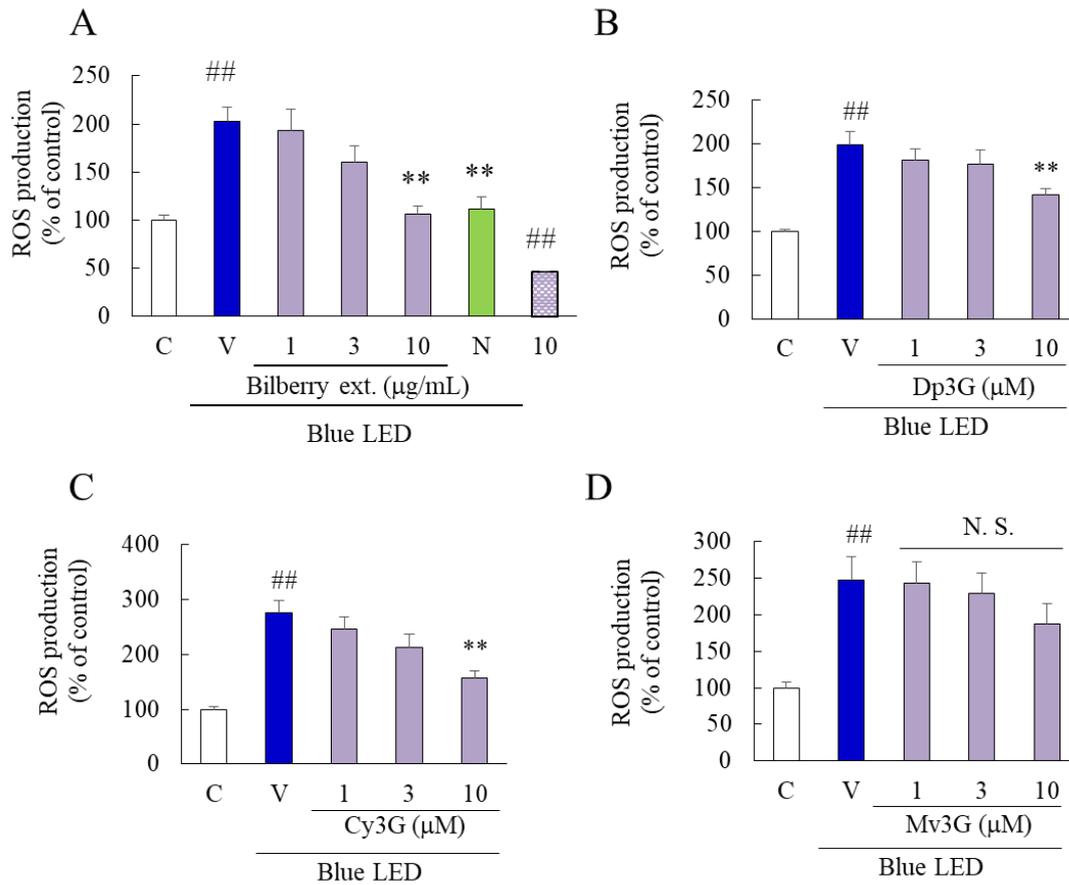


**Figure 24. Effects of bilberry extract or its anthocyanin constituents on blue LED light-induced cell death in HCE-T cells**

HCE-T cells were preincubated in the (A) absence or presence of (B), bilberry extract, (C), Dp3G, (D), Cy3G, or (E), Mv3G prior to blue LED light exposure for 24 h. (A-E) shows the representative fluorescence microscopy of Hoechst 33342 and PI in the cells. The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted and positive cells were expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst 33342-positive cells. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  or 6). <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. control; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. the vehicle (Dunnett's Multiple Comparison test or Student's  $t$ -test). The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . C, control; V, vehicle; Dp3G, delphinidin-3-O-glucoside; Cy3G, cyanidin-3-O-glucoside; Mv3G, malvidin-3-O-glucoside; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine.

### 3-2 青色 LED 光誘発活性酸素種 (ROS) 産生に対するビルベリーエキス及び主要アントシアニンの作用

青色 LED 光曝露誘発細胞障害の主な原因のひとつが細胞内 ROS 蓄積である (Choy et al, 2011; Kuse et al, 2014; Lee et al, 2016; Nakamura et al, 2017)。本研究ではビルベリーエキスまたは含有アントシアニンの存在下で、角膜上皮細胞における青色 LED 光誘発 ROS 産生量について検討した。ROS 産生量は CM-H<sub>2</sub>DCFDA 蛍光試薬を用いて測定した。青色 LED 光 2,000 lux の照射により角膜上皮細胞内の ROS 産生は増加したが、ビルベリーエキス、Dp3G または Cy3G はそれぞれ、角膜上皮細胞における青色 LED 光誘発 ROS 産生量を有意に減少させた。一方、Mv3G は角膜上皮細胞における青色 LED 光誘導 ROS 産生に対して明らかな作用を示さなかった (Fig. 25)。

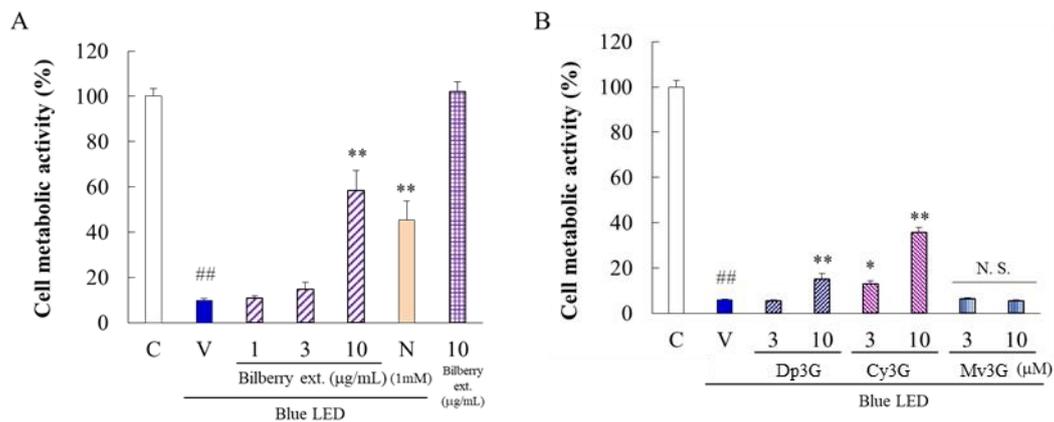


**Figure 25. Effects of bilberry extract or its anthocyanin constituents on blue LED light-induced ROS production in HCE-T cells**

HCE-T cells were preincubated with (A), bilberry extract, (B), Dp3G, (C), Cy3G or (D), Mv3G prior to blue LED light exposure for 24 h. Intracellular ROS levels were then determined by measuring the fluorescence of CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 6 or 12). ##p < 0.01 vs. control; \*\*p < 0.01 vs. the vehicle (Dunnett's Multiple Comparison test or Student's *t*-test). C, control; V, vehicle; Dp3G, delphinidin-3-O-glucoside; Cy3G, cyanidin-3-O-glucoside; Mv3G, malvidin-3-O-glucoside; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine.

### 3-3 青色 LED 光誘発細胞代謝活性の低下に対するビルベリーエキス及び主要アントシアニンの作用

ヒト角膜上皮細胞における青色 LED 光誘発細胞代謝活性の低下に対するビルベリーエキス、Dp3G、Cy3G 及び Mv3G の作用について検討した。青色 LED 光の照射は角膜上皮細胞代謝活性の低下を引き起こし、その作用は NAC (1 mM) の添加によって抑制された。ビルベリーエキス (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、Dp3G (10  $\mu\text{M}$ ) または Cy3G (3 及び 10  $\mu\text{M}$ ) を前処置した角膜上皮細胞では、青色 LED 光によって誘発される細胞代謝活性の低下を有意に抑制した。一方、Mv3G の添加は明らかな作用を示さなかった (Fig. 26)。



**Figure 26. Effects of bilberry extract or its anthocyanin constituents on blue LED light-induced HCE-T cell metabolism**

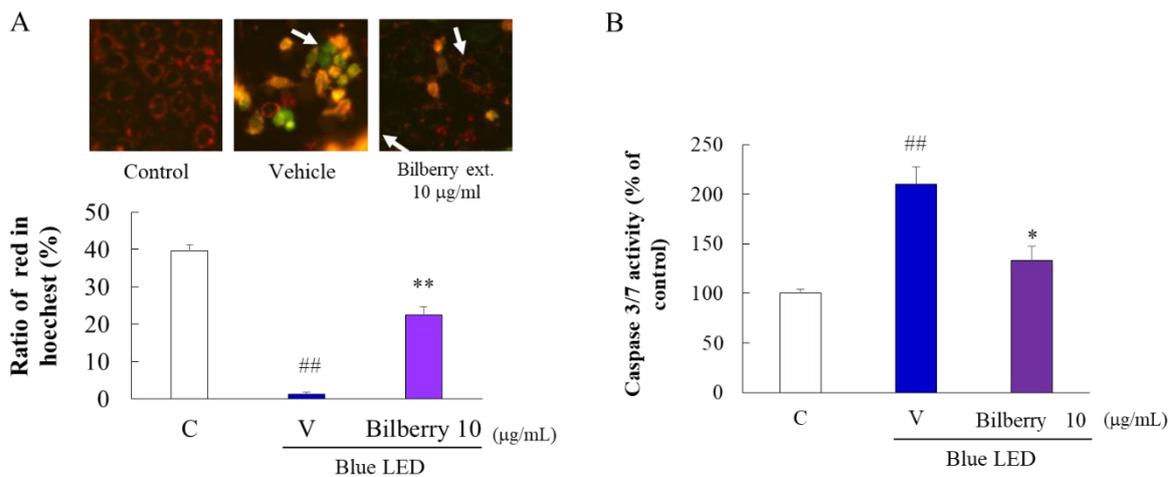
HCE-T cells were preincubated with (A) bilberry extract or (B) Dp3G, Cy3G or Mv3G and cell viability was assessed by immersing the cells in CCK-8 for 2 h at 37°C. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). ##p < 0.01 vs. control; \*\*p < 0.01, \*p < 0.05 vs. the vehicle (Dunnett's Multiple Comparison test or Student's *t*-test). C, control; V, vehicle; Bilberry ext., bilberry extract; Dp3G, delphinidin-3-O-glucoside; Cy3G, cyanidin-3-O-glucoside; Mv3G, malvidin-3-O-glucoside; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine.

### 3-4 青色 LED 光誘発ミトコンドリア膜電位の変化に対するビルベリーエキスの保護作用

角膜上皮細胞における、青色 LED 光誘発ミトコンドリア膜電位変化に対するビルベリーエキスの作用について検討した。 *In vitro* 青色 LED 光誘発網膜視細胞障害モデルにおいて、青色 LED 光照射はミトコンドリアの膜電位の消失を引き起こし、ミトコンドリア機能障害及びアポトーシスを引き起こす (Li et al, 2018; Tao et al, 2019)。本検討では、青色 LED 光に照射された角膜上皮細胞におけるミトコンドリア膜電位の変化を JC-1 色素を用いて検討した。正常な細胞では、JC-1 の重合体 (赤色) が細胞内に蓄積し、アポトーシス細胞では JC-1 の単量体 (緑色) が細胞内に蓄積する。青色 LED 非照射の対照細胞群は赤く染色された。青色 LED 光照射は、アポトーシス様細胞の数を増加させ、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のビルベリーエキスの添加によって赤く染色された正常な細胞の割合が有意に増加した (Fig. 27A)。

### 3-5 青色 LED 光誘発カスパーゼ 3/7 活性化に対するビルベリーエキス の作用

細胞アポトーシス誘導因子であるカスパーゼ (Caspase)-3/7 活性は、caspase-3/7 assay kit を用いて評価した。青色 LED 光 2,000 lux を 24 時間照射後、caspase-3/7 活性は有意に上昇したが、ビルベリーエキス 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の添加により caspase-3/7 活性の増加を有意に抑制した (Fig. 27B)。

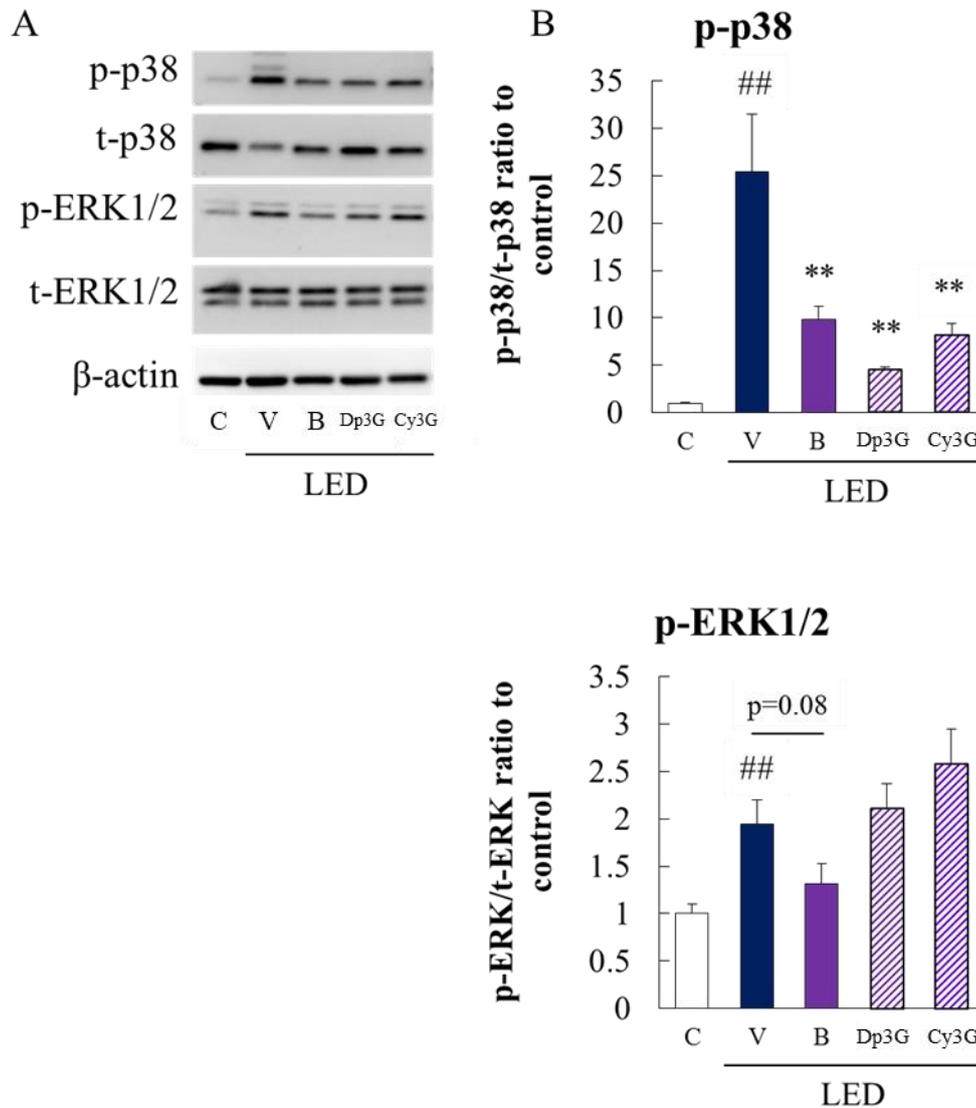


**Figure 27. Effects of bilberry extract on blue LED light-induced mitochondrial dysfunction and caspase-3/7 activation**

HCE-T cells were preincubated with bilberry extract followed by exposure to blue LED light for 1 h. Next, mitochondrial dysfunction was assessed using the JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit. (A) Representative images showing JC-1 stained cells. The healthy cells mainly contain JC-1 aggregates (red) as indicated by the arrowhead and apoptotic or unhealthy cells mainly contain JC-1 monomers (green). Quantitative analysis revealed the ratio of red fluorescence (Hoechst 33342) in whole cells. (B) HCE-T cells were preincubated with bilberry extract followed by exposure to blue LED light for 1 h. Next, caspase-3/7 activity was monitored using the Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  or  $6$ ). ## $p < 0.01$  vs. control; \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs. the vehicle (Student's  $t$ -test). The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . C, control; V, vehicle; B, bilberry extract (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 3-6 角膜上皮細胞における青色 LED 光誘発リン酸化 p38 増加に対するビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G の作用

青色 LED 光照射による角膜上皮細胞障害における、ビルベリーエキス及び主要活性成分について細胞内シグナル伝達因子の変動をウェスタンブロット法を用いて解析した。青色 LED 光 2,000 lux、24 時間照射によりアポトーシス誘導に関与する p38 MAPK のリン酸化の上昇がみられたが、ビルベリーエキス 10 µg/mL の前処置より、そのリン酸化の上昇は抑制された (Fig. 28)。さらに活性成分の特定を行うため、死細胞率及び ROS 産生量において抑制作用の強かった Dp3G 及び Cy3G について同様の検討を行った。それぞれのアントシアニンにおいて有意な p38 MAPK リン酸化亢進抑制作用が認められた (Fig. 28)。また、細胞増殖や生存シグナルとして働く ERK 1/2 についても検討した。青色 LED 光の照射によって、リン酸化 ERK 1/2 量が増加したが、ビルベリーエキスの前処置によって、青色 LED 光誘発された ERK 1/2 のリン酸化は明らかな変化は認められなかった。一方、Dp3G 及び Cy3G は、ERK 1/2 のリン酸化に対して明らかな作用を示さなかった (Fig. 28)。



**Figure 28. Effects of bilberry extract and its anthocyanin constituents on blue LED light-induced activation of p38 MAPK and ERK 1/2 in HCE-T cells**

HCE-T cells were preincubated with bilberry extract or its anthocyanin constituents followed by exposure to blue LED light for 24 h. Next, protein lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies directed against the corresponding proteins. (A) Activation of p38 MAPK and ERK 1/2 was detected by immunoblotting. (B) Quantitative analysis of phospho-p38 MAPK and phospho-ERK1/2 protein levels. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 6 or 9). ##p < 0.01 vs. control; \*\*p < 0.01, \*p < 0.05 vs. the vehicle (Tukey's tests or Student's *t*-test). C, control; V, vehicle; B, bilberry extract; Dp3G, delphinidin-3-O-glucoside; Cy3G, cyanidin-3-O-glucoside.

#### 第4節 考察

本研究では、ヒト角膜上皮細胞における青色 LED 光誘発酸化ストレスに対するビルベリーエキス及び含有アントシアニンの保護作用について検討した。ビルベリーエキスは、アントシアニン、ポリフェノール及びフラボノイドを含んでいる (Marja et al, 2001; Marja et al, 2003)。ビルベリーエキス及びアントシアニンは、青色 LED 光照射によって誘発されるマウスの視細胞障害を抑制した (Ogawa et al, 2014)。この作用は、ROS 産生の減弱並びに p38 MAPK 活性化及びカスパーゼ-3/7 活性調節によることが報告されている (Ogawa et al, 2014)。本研究では、青色 LED 光照射が角膜上皮細胞に細胞障害を誘発するか否か、そしてビルベリーエキスが保護作用を示すか否かについて調べることを目的とした。青色 LED 光照射は、角膜上皮細胞死及び細胞内 ROS 産生の増加を引き起こした (Fig. 24-26)。高エネルギー光線である UV-B に曝露された角膜上皮細胞においては、角膜細胞の抗酸化酵素及びアスコルビン酸が大幅に減少し、酸化促進と酸化防止の不均衡が生じることが示されている (Cejková et al, 2004)。ROS は主にミトコンドリアにおいて生成され (Hirai et al, 2016)、過度の青色光は網膜細胞内の ROS 蓄積、ミトコンドリア機能障害及びアポトーシスを引き起こす (Li et al, 2018; Tao et al, 2019)。青色 LED 照射によって誘発された細胞障害は、ビルベリーエキス、Dp3G、Cy3G 及び陽性対照化合物である NAC によって抑制された。これらの化合物は直接フリーラジカル捕捉活性を有するだけでなく、ROS 産生も抑制すること (Matsunaga et al, 2009)、細胞内抗酸化酵素の量を増加させることが報告されている (Milbury et al, 2007)。ビルベリー抽出物 (10 µg/ml)、Dp3G (10 µM) 及び Cy3G (10 µM) はそれぞれ、青色 LED 光曝露により誘導される ROS 産生を有意に抑制した。スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロキシルラジカルなど脂質過酸化を引き起こすラジカルに対する消

去作用は、delphinidin (3', 4', 5' -OH) > cyanidin (3', 4' -OH) > peralgonidin (4' -OH) と配位する水酸基の数が多いほど高いことが分かっている(Noda et al. 2002)。その理由は分子的にピロガロールまたはカテコール構造を有するアントシアニンは、多くの共鳴構造をもつため生成したラジカルが安定化するからと考えられている(Bors et al. 2004)。従って、アントシアニンでは3-O-配糖体の方が3,5-O-配糖体より多くの共鳴構造を取るために、高い抗酸化作用を有する(Bors et al. 2004)。ビルベリーエキスに含まれるアントシアニンのアグリコンは、デルフィニジン系及びシアニジン系のものが多く、同様にアントシアニン色素を含有するベリー類と比較しても抗酸化能が高い (Ogawa et al, 2008) ことから、青色LED 光照射による細胞内の酸化促進/酸化防止の不均衡によって生じた ROS を、ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G が抑制したと考えられる。また、本研究では、角膜上皮細胞への青色LED 光照射はミトコンドリア膜電位を消失させ、カスパーゼ-3/7 活性化を誘導し、角膜上皮細胞死を引き起こした (Fig. 27)。紫外線照射によるミトコンドリア膜電位の消失は、角膜上皮細胞株角膜上皮細胞におけるカスパーゼ-3/7 活性化を惹き起こすことが報告されている (Nishida et al, 2017)。本研究において、青色LED 光は角膜上皮細胞のミトコンドリア損傷を誘発し、ビルベリーエキスは青色LED 光曝露によって引き起こされるミトコンドリアの機能不全とカスパーゼ-3/7 の活性化を改善した (Fig. 27)。カスパーゼ-3/7 活性化はミトコンドリアからのチトクローム c の放出を通して起こることが報告されており (Kulms and Schwarz, 2002; Li et al, 2010)、ビルベリーエキスはミトコンドリア機能不全を抑制したと考えられる。

ROS は MAPK 活性化を誘導し、炎症、細胞死及び他の細胞プロセスを調節する (Junttila et al, 2008)。可視光の照射は光受容細胞の p38 MAPK を活性化することが示されており (Sun et al, 2007; Kuse et al, 2014)、本研究では、青色LED

光照射が角膜上皮細胞の p38 MAPK を活性化させることを明らかにした。p38 MAPK はアポトーシス関連因子であり、主に酸化ストレス下でスーパーオキシドアニオンラジカルによって活性化される (Aruoma et al, 1989)。角膜上皮細胞は酸化ストレスの影響を受けやすく (Zheng et al, 2013)、UV-B 及び 4-ヒドロキシノネナール (反応性脂質過酸化最終生成物) は、p38 MAPK 及び ERK 1/2 を活性化する (Black et al, 2011; Zheng et al, 2013; Kim et al, 2018)。ビルベリー抽出物のスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性は (Ogawa et al, 2011)、青色 LED 光によって誘発される p38MAPK 活性化の抑制に寄与する可能性が考えられる。

本章では、青色 LED 光の角膜上皮細胞への曝露が ROS 産生を誘導し、それが角膜上皮細胞障害を誘発することを示した。さらに、ビルベリーエキス及びその含有アントシアニンである Dp3G 及び Cy3G は、青色 LED 光誘導角膜上皮細胞障害に対して保護作用を示すことを明らかにした。

## 総括及び結論

眼は光を受容する感覚器官であり、眼で受け取った光の信号が電気信号に変換され脳に伝達されることで、我々は視覚情報を得ている。光刺激は光受容器である網膜視細胞によって感受されており、外界から得る情報の約 8 割は視覚からである。我が国の中途失明原因の上位は、網膜色素変性症や加齢黄斑変性症などの後眼部疾患が占めており、これらの疾患の発症や進行には、紫外線や可視光線の長期的な曝露が関連している可能性がある。疾患のメカニズムに関する報告は徐々に増えてきているが、根本的な治療法がないことから、罹患前の予防が重要と考えられている。本研究では、代替医療・予防医療を目的としてアントシアニン含有素材に着目し、小胞体ストレス網膜視細胞障害に対する作用及び酸化ストレス角膜上皮細胞障害についてビルベリーエキスの機能解析を行った。

第 1 章では、新規のアントシアニン含有素材として、日本産インディゴ・ローズに着目し、成分分析及び抗酸化活性の測定を行った。また、酸化ストレスによる視細胞障害に対してインディゴ・ローズ抽出物の保護作用を検討した。

- 1) HPLC 分析の結果、日本産インディゴ・ローズには 11 種類のアントシアニン、カロテノイドとしてリコピン及び  $\beta$ -カロテンが含まれていた。また、抗酸化物質の含有量は、果皮が最も多く、petunidin 由来のアントシアニンが豊富であった。
- 2) インディゴ・ローズ抽出物の抗酸化活性は、果皮抽出物で最も高かった。また、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルに対する捕捉活性は、果皮抽出物、果肉抽出物、種子抽出物の順であった。
- 3) *In vitro* 過酸化水素誘発網膜視細胞障害モデルにおいて、インディゴ・

ローズ果皮抽出物は過酸化水素誘発細胞死に対して有意な抑制作用を示し、インディゴ・ローズ果皮抽出物の構成成分である petunidin-3-O-glucoside 及び petunidin において細胞死抑制作用が認められた。

第2章では、マウス由来の網膜視細胞株を用いた *in vitro* 青色 LED 光障害実験系を用いて、特に光受容タンパク質 S-オプシンの細胞内凝集に着目して、青色 LED 光照射における小胞体ストレス応答の関与について検討した。さらに、ビルベリーエキス及び構成成分を用いて、青色 LED 光照射による UPR 応答に対する効果を検討した。

- 1) 青色 LED 光照射は、網膜視細胞内において UPR 関連因子である *atf4*、*bip* 及び *grp94* の mRNA を誘導した。
- 2) 青色 LED 光照射は、網膜視細胞内において UPR 関連因子である ATF4 タンパク質を誘導し、ポリユビキチン化タンパク質を増加させた。
- 3) 青色 LED 光照射及び ER ストレス誘導剤 (ツニカマイシン及び DTT) によって、光受容タンパク質 S-オプシンの核周囲への凝集体形成が認められた。
- 4) マウス由来網膜視細胞株において、S-オプシンをロックダウンさせると青色 LED 光照射による ATF4 活性化は減弱した。
- 5) ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、青色 LED 光照射誘発、S-オプシンの凝集を濃度依存的に抑制した
- 6) ビルベリーエキス、Dp3G、Cy3G 及び Mv3G は、青色 LED 光照射誘発 ATF4 活性化を有意に抑制した。
- 7) ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、青色 LED 光照射による UPR 因子 *grp94* 及び *grp78/bip* の mRNA 量の増加を抑制した。

- 8) ビルベリーエキスは、青色 LED 光照射に誘発される細胞内タンパク質のポリユビキチン化を抑制した。
- 9) ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、ER ストレス誘導剤である DTT に誘発される網膜視細胞障害を抑制した。

第 3 章では、ヒト角膜上皮細胞株を用いた *in vitro* 青色 LED 光障害モデルにおいて、過剰な青色 LED 光照射による細胞障害について検討した。さらに、ビルベリーエキス及び構成成分を用いて、青色 LED 光照射による角膜上皮細胞障害に対する作用について検討した。

- 1) ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、青色 LED 光照射誘発角膜上皮細胞障害を濃度依存的に抑制した
- 2) ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、角膜上皮細胞における青色 LED 光照射誘発 ROS 産生及び細胞代謝活性の低下を抑制した
- 3) ビルベリーエキスは、青色 LED 光照射誘発角膜上皮細胞内ミトコンドリア膜電位の脱分極を抑制した。
- 4) ビルベリーエキス、Dp3G 及び Cy3G は、青色 LED 光照射誘発 p38 MAPK のリン酸化の亢進を抑制した

本研究の結果より、新規のアントシアニン含有素材である日本産インディゴ・ローズにおいて、果皮に多くの *petunidin* 由来アントシアニンを含有すること、また、抗酸化作用を有し、過酸化水素誘発細胞死を抑制することを明らかにした。さらに、青色 LED 光誘発網膜障害において小胞体ストレス応答が関連していることを明らかにした。また、アントシアニン含有素材であるビルベリーエキスは、青色 LED 光照射に誘発される S-オプシンの凝集及び ATF4 の活

性化に対する保護作用を有することを見出した。また、青色 LED 光照射誘発角膜上皮細胞障害も抑制した。以上の結果から、アントシアニンを高濃度で含有する食品素材であるアントシアニン含有トマト (インディゴ・ローズ) 及びビルベリーは、酸化ストレス及び小胞体ストレスを伴う網膜色素変性や加齢黄斑変性、ドライアイなどの各種眼疾患に対する予防効果が期待される。

## 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岐阜薬科大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。

また、本研究に際して終始御懇切なるご助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 鳴澤雅光博士並びに講師 中村信介博士、前講師 鶴間一寛博士に深謝致します。また、種々のご協力を頂きました薬効解析学研究室諸氏に心から感謝致します。

本論文の審査を務めて頂き、有益な御助言を賜りました医療薬剤学大講座薬物動態学研究室教授 北市清幸博士、機能分子学大講座生薬学研究室教授 大山雅義博士、医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室准教授 原宏和博士に深謝致します。

最後に、本研究の遂行並びに本論文の作成の機会を与えて頂きました株式会社わかさ生活代表取締役社長 角谷建耀知氏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株式会社わかさ生活研究所グループ諸氏並びに同社従業員の皆様に心から感謝致します。

## 引用文献

Adler R., Curcio C., Hicks D., Price D. and Wong F. Cell death in age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 1999. 5: 31.

Aimee NW. Paula CB. Anthocyanins and Their Metabolites as Therapeutic Agents for Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2019. 8(9): 333.

Akerström A., Jaakola L., Bång U., Jäderlund A. Effects of latitude-related factors and geographical origin on anthocyanidin concentrations in fruits of *Vaccinium myrtillus* L. (bilberries). *J. Agric. Food Chem.* 2010. 58(22):11939-45.

Andley UP., Fritz C., Morrison AR., Becker B. The role of prostaglandins E2 and F2a in ultraviolet radiation-induced cortical cataracts in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1996, 37:1539-1548.

Arakawa O., Hori Y., Ogata R. Relative effectiveness and interaction of ultraviolet-B, red and blue light in anthocyanin synthesis of apple fruit. *Physiol. Plant.* 1985. 64:323-327.

Aruoma OI., Halliwell B., Hoey BM., Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.*, 1989, 6(6):593-7.

Bai C.; Biwersi J.; Verkman A. S.; Matthay M. A. A mouse model to test the *in vivo*

efficacy of chemical chaperones. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 1998, 40, 39-45.

Baj A., Bombardelli E., Gabetta B., Martinelli E.M. Qualitative and quantitative evaluation of vaccinium myrtillus anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1983, 279, 365-372.

Baj A.; Bombardelli E.; Gabetta B.; Martinelli E.M. Qualitative and quantitative evaluation of vaccinium myrtillus anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1983, 279, 365-372.

Baraas R. C.; Hagen L. A.; Dees E. W.; Neitz M. Substitution of isoleucine for threonine at position 190 of S-opsin causes S-cone-function abnormalities. *Vision Res.* 2012, 73, 1-9.

Bastide P., Rouher, F., Tronche, P. [Rhodopsin and anthocyanosides. Apropos of various experimental facts]', *Bull Soc Ophthalmol Fr*, 1968, 68 (9), 801-7.

Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D. & Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2000. 45, 115–34.

Behar-Cohen F., Martinsons C., Viénot F., Zissis G., Barlier-Salsi A., Cesarini J. P.,

Enouf O., Garcia M., Picaud S., Attia D. Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: any risks for the eye? *Prog Retin Eye Res.*, 2011, 30(4):239-57.

Bhandary B., Marahatta A., Kim H. R., Chae HJ. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int J Mol Sci.* 2012. 14(1):434-56.

Black AT, Gordon MK., Heck DE., Gallo MA., Laskin DL., Laskin JD. UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.*, 2011, 81(7):873-80.

Boches P, Peterschmidt B, Myers JR. Evaluation of a Subset of the *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* Core Collection for Horticultural Quality and Fruit Phenolic Content. *HortScience.* 2011, 46(11):1450–1455.

Bors W., Michel C., Stettmaier K., Lu Y., Foo LY. Antioxidant mechanisms of polyphenolic caffeic acid oligomers, constituents of *Salvia officinalis*. *Biol Res.*, 2004, 37 (2), 301-11.

Brignole-Baudouin F., Baudouin C., Aragona P., Rolando M., Labetoulle M., Pisella PJ., Barabino S., Siou-Mermet R., Creuzot-Garcher C. A multicentre, double-masked, randomized, controlled trial assessing the effect of oral supplementation of omega-3 and omega-6 fatty acids on a conjunctival inflammatory marker in dry eye patients. *Acta*

*Ophthalmol.*, 2011, 89(7):e591-7.

Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S, Schijlen EG, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol.* 2008, 26(11):1301-8.

Cai J., Nelson K. C., Wu M., Sternberg P. Jr., Jones D. P. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res.*, 2000, 19(2):205-21.

Campestrini LH, Melo PS, Peres LEP, Calhelha RC, Ferreira ICFR, Alencar SM. A New Variety of Purple Tomato as a Rich Source of Bioactive Carotenoids and Its Potential Health Benefits. *Heliyon.*, 2019, 5(11):e02831.

Cavet ME., Harrington KL., Vollmer TR., Ward KW., Zhang JZ. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.*, 2011, 17:533–542.

Cejkova J., Stipek S., Crkovska J., Ardan T., Midelfart A. Reactive oxygen species (ROS)-generating oxidases in the normal rabbit cornea and their involvement in the corneal damage evoked by UVB rays. *Histol Histopathol.*, 2001, 16:523-533.

Chan SW., Egan PA. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. *FASEB J.* 2005, 19(11):1510-2.

Cejková J., Stípek S., Crkovská J., Ardan T., Pláteník J., Cejka C., Midelfart A. UV rays, the prooxidant/ antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. *Physiol Rev.*, 2004, 53:1-10.

Chen J., O'Donoghue A., Deng Y.F., Zhang B., Kent F., O'Hare T. The effect of lycopene on the PI3K/Akt signalling pathway in prostate cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(6):800-5.

Chen W. J.; Wu C.; Xu Z.; Kuse Y.; Hara H.; Duh E. J. Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light. *Exp. Eye Res.* 2017, 154, 151-158.

Choy CK., Cho P., Benzie IF. Antioxidant content and ultraviolet absorption characteristics of human tears. *Optom Vis Sci.*, 2011, 88(4):507-11.

Colantunoni, A.; Bertuglia, S.; Magistretti, M. J.; Donato, L. Effects of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on arterial vasomotion. *Arzneim. Forsch.* 1991, 41, 905-909.

Concannon C. G., Ward M. W., Bonner H. P., Kuroki K., Tuffy L. P., Bonner C. T., Woods I., Engel T., Henshall D.C., Prehn J.H. NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *J Neurochem.* 2008, 105(3):891-903.

Cullen AP. Photokeratitis and other phototoxic effects on the cornea and conjunctiva. *Int J Toxicol.*, 2002, 21:455-464.

D. Daniels J.A., Mulligan C., McCance D., Woodside J.V., Patterson C., Young I.S., McEneny J. A randomised controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2014, 14;13:16.

Delcourt C, Cougnard-Grégoire A, Boniol M, Carrière I, Doré JF, Delyfer MN, Rougier MB, Le Goff M, Dartigues JF, Barberger-Gateau P, Korobelnik JF. Lifetime Exposure to Ambient Ultraviolet Radiation and the Risk for Cataract Extraction and Age-Related Macular Degeneration: The Alienor Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014, 55(11):7619-27.

de Mol NJ., Posthuma RM., Mohn GR. A Induction of repairable DNA damage in *Escherichia coli* and interaction with DNA in vitro by the radical cation of

chlorpromazine. *Chem Biol Interact.* 1983, 47(2):223-37.

Donovan M., Carmody R. J., Cotter T. G. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem.*, 2001, 276(25):23000-8.

Drachev L. A., Kalamkarov G. R., Kaulen A. D., Ostrovsky M. A., Skulachev V. P. Animal rhodopsin as a photogenerator of an electric potential that increases photoreceptor membrane permeability. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2018, S0006-291X(18)30118-9.

Du J, Huang Y, Li K, Yu X, Jin H, Yang L. Retina-derived endogenous sulfur dioxide might be a novel anti-apoptotic factor. *FEBS Lett.*, 1980, 119(1):125-31.

Ellingsen I., Hjerkin EM., Seljeflot I., Arnesen H., Tonstad S. Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men, 2008, *Br J Nutr*, 99 (3), 674-81.

Estil S., Olsen WM., Huitfeldt HS., Haaskjold E. UVB-induced formation of (6-4) photoproducts in the rat corneal epithelium. *Acta Ophthalmol Scand.*, 1997, 75:120-123.

Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014 Jan 27;6(2):466-88.

Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Loft S. 8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med*. 1992, 13(2):121-6.

Gajendragadkar PR., Hubsch A., Mäki-Petäjä K.M., Serg M., Wilkinson I.B., Cheriyan J. Effects of oral lycopene supplementation on vascular function in patients with cardiovascular disease and healthy volunteers: a randomised controlled trial. *PLoS One*. 2014 Jun 9;9(6):e99070.

Gao J.X., Li Y., Zhang H.Y., He X.L., Bai A.S. Lycopene ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmazie*. 2012 Mar;67(3):256-9.

Gillespie K., Kodani I., Dickinson DP., Ogbureke KU., Camba AM., Wu M., Looney S., Chu TC., Qin H., Bisch F., Sharawy M., Schuster GS., Hsu SD. Effects of oral consumption of the green tea polyphenol EGCG in a murine model for human Sjogren's syndrome, an autoimmune disease. *Life Sci.*, 2008, 83(17-18):581-8.

Glazer-Hockstein C, Dunaief JL. Could blue light-blocking lenses decrease the risk of

age-related macular degeneration? *Retina* 2006, 26:1–4.

González-Moscoso M, Martínez-Villegas NV, Cadenas-Pliego G, Benavides-Mendoza A, Rivera-Cruz MDC, González-Morales S, Juárez-Maldonado A. Activity of myrtocyan, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. *Fitoterapia*. 1990, 61, 13–21.

Grimm C., Wenzel A., Hafezi F., Yu S., Redmond T. M., Remé C. E. Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat. Genet* 2000, 25(1):63-6.

Grimm C.; Wenzel A.; Williams T.; Rol P.; Hafezi F.; Remé C. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001, 42, 497-505.

Grinvald A., Lieke E. E., Frostig R. D., Hildesheim R. Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex. *J Neurosci.* 1994, 14(5 Pt 1):2545-68.

Harding HP., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* 2000. 6(5):1099-108.

Harding HP., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell*. 2000. 6(5), 1099-108.

Harding HP., Zhang Y., Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999. 397(6716):271-4.

Harris GK., Gupta A., Nines RG., Kresty LA., Habib SG., Frankel WL., LaPerle K., Gallaher DD., Schwartz SJ., Stoner GD. Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the Fischer 344 rat 2001, *Nutr Cancer*, 40 (2), 125-33.

Head KA. Natural therapies for ocular disorders, part two: cataracts and glaucoma. *Altern Med Rev.*, 2001, 6(2):141-66.

Hess R. F., Mullen K. T., Sharpe L. T., Zrenner E. The photoreceptors in atypical achromatopsia, *J Physiol*. 1989, 417:123-49.

Hiromoto K., Kuse Y., Tsuruma K., Tadokoro N., Kaneko N., Shimazawa M., Hara H. Colored lenses suppress blue light-emitting diode light-induced damage in photoreceptor-derived cells. *J. Biomed. Opt.*, 2016, 21(3), 035004.

Ichianagi T, Hatano Y, Matsugo S, Konishi T. Kinetic Comparisons of Anthocyanin Reactivities Towards 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) Radicals, Hydrogen Peroxide and Tert-Buthylhydroperoxide by Capillary Zone Electrophoresis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2004. 52(4):434-8.

Imaizumi K., Miyoshi K., Katayama T., Yoneda T., Taniguchi M., Kudo T., Tohyama M. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. 1536(2-3):85-96.

Ito Y.; Shimazawa M.; Inokuchi Y.; Yamanaka H.; Tsuruma K.; Imamura K.; Onoe H.; Watanabe Y.; Aihara M.; Araie M.; Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model. *Eur. J. Neurosci*. 2011, 33, 843-55.

J.H., Navab M., Dwyer K.M., Hassan K., Sun P., Shircore A., Hama-Levy S., Hough G., Wang X., Drake T., Merz C.N., Fogelman A.M.A. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*. 2001, 103(24):2922-2927.

Jones C.M., Mes P., Myers J.R. Characterization and inheritance of the anthocyanin fruit (Aft) tomato. *J. Hered.* 2003, 94(6):449-456.

Junttila MR., Li SP., Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.*, 2008, 22(4):954-65.

Järvinen RL., Larmo PS., Setälä NL, Yang B., Engblom JR., Viitanen MH., Kallio HP. Effects of oral sea buckthorn oil on tear film Fatty acids in individuals with dry eye. *Cornea.*, 2011, 30:1013–1019.

Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49(8):4076-82.

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. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 705-12.

Kaneko M, Nomira Y. Protective effects of HRD1 and 4-phenylbutyric acid against neuronal cell death. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2004, 124, 391-398.

Kangari H., Eftekhari MH., Sardari S., Hashemi H., Salamzadeh J., Ghassemi-Broumand M., Khabazkhoob M. Short-term consumption of oral omega-3 and dry eye syndrome. *Ophthalmology.*, 2013, 120(11):2191-6.

Kennedy M., Kim K. H., Harten B., Brown J., Planck S., Meshul C., Edelhauser H., Rosenbaum J. T., Armstrong C. A., Ansel J. C. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1997, 38(12):2483-91.

Kheitan S, Minuchehr Z, Soheili ZS. Exploring the cross talk between ER stress and inflammation in age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2017, 12(7):e0181667.

Kim YH., Oh TW., Park E., Yim NH., Park KI., Cho WK., Ma JY. Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects of Acer Palmatum Thumb. Extract, KIOM-2015EW, in a Hyperosmolar-Stress-Induced In Vitro Dry Eye Model. *Nutrients.* 2018, 10(3).

Komatsu M., Ichimura Y. [Involvement of ubiquitin system in mammalian autophagy]. *Seikagaku.* 2012, 84(6):472-8.

Kulms D., Schwarz T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2002 64(5-6):837-41.

Kunchithapautham K., Rohrer B. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy* 2007 3:5, 433-441.

Kunte MM, Choudhury S, Manheim JF, Shinde VM, Miura M, Chiodo VA, Hauswirth WW, Gorbatyuk OS, Gorbatyuk MS. ER stress is involved in T17M rhodopsin-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012, 53(7):3792-800.

Kuse Y., Ogawa K., Tsuruma K., Shimazawa M., Hara H. Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci. Rep.* 2014. 4:5223

Kähkönen MP., Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem.*, 2003, 51(3):628-33.

Labunskyy V.M.; Yoo M.H.; Hatfield D.L.; Gladyshev V.N. Sep15, a thioredoxin-like selenoprotein, is involved in the unfolded protein response and differentially regulated by adaptive and acute ER stresses. *Biochemistry* 2009, 48, 8458-65.

Lai CW., Aronson DE., Snapp EL. BiP availability distinguishes states of homeostasis and stress in the endoplasmic reticulum of living cells. *Mol Biol Cell* 2010, 15;21(12):1909-21.

Lavecchia R., Zuurro A. Enhancement of lycopene extraction from tomato peels by enzymatic treatment. *International conference on industrial biotechnology*, 2008, 301-

308.

Lazzè MC., Savio M., Pizzala R., Cazzalini O., Perucca P., Scovassi AI., Stivala LA., Bianchi L. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*, 2004, 25 (8), 1427-33.

Lee HS., Cui L., Li Y., Choi JS., Choi JH., Li Z., Kim GE., Choi W., Yoon KC. Influence of Light Emitting Diode-Derived Blue Light Overexposure on Mouse Ocular Surface. *PLoS One.*, 2016, 11(8):e0161041.

Lee JB., Kim SH., Lee SC., Kim HG., Ahn HG., Li Z., Yoon KC. Blue light-induced oxidative stress in human corneal epithelial cells: protective effects of ethanol extracts of various medicinal plant mixtures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2014, 55(7):4119-27.

Lehrman M.A. Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 8623-6.

Lenox AR, Bhootada Y, Gorbatyuk O, Fullard R, Gorbatyuk M. Unfolded Protein Response Is Activated in Aged Retinas. *Neurosci Lett.* 2015, 609:30-5.

Li JY, Zhang K, Xu D, Zhou WT, Fang WQ, Wan YY, Yan DD, Guo MY, Tao JX, Zhou

WC, Yang F, Jiang LP, Han XJ. Mitochondrial Fission Is Required for Blue Light-Induced Apoptosis and Mitophagy in Retinal Neuronal R28 Cells. *Front Mol Neurosci.* 2018, 11:432.

Li S, Tang L, Bi H. Study on the Interaction Between pelargonidin-3-O-glucoside and Bovine Serum Albumin Using Spectroscopic, Transmission Electron Microscopy and Molecular Modeling Techniques. *Luminescence.* 2016. 31(2):442-452.

Li Y., Xue F., Xu SZ., Wang XW., Tong X., Lin XJ. Lycopene protects bone marrow mesenchymal stem cells against ischemia-induced apoptosis *in vitro.* *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014 18(11):1625-31.

Li Z., Choi JH., Oh HJ., Park SH., Lee JB., Yoon KC. Effects of eye drops containing a mixture of omega-3 essential fatty acids and hyaluronic acid on the ocular surface in desiccating stress-induced murine dry eye. *Curr Eye Res.*, 2014. 39(9):871-8.

Li Z., Jo J., Jia JM., Lo SC., Whitcomb DJ., Jiao S., Cho K., Sheng M. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell.*, 2010. 141(5):859-71.

Lietti, A.; Cristoni, A.; Picci, M. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides.

*Arzneim. Forsch.* 1976, 26, 829-832.

Lu PD., Harding HP., Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol.* 2004, 167: 27–33.

Lätti AK, Riihinen KR, Kainulainen PS. Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J Agric Food Chem.* 2008 56(1):190-6.

Marciniak SJ., Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.* 2006. 86(4):1133-49.

Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. D blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res*, 2004. 23:523–531.

Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res* 2004, 23:523–531.

Matsui T., Ueda T., Oki T., Sugita K., Terahara N., Matsumoto K. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity, *J Agric Food Chem*, 2001, 49 (4), 1948-51.

Matsui T., Ueda T., Oki T., Sugita K., Terahara N., Matsumoto K. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins, *J Agric Food Chem*, 2001, 49 (4), 1952-6.

Matsumoto H., Kamm KE., Stull JT., Azuma H. Delphinidin-3-rutinoside relaxes the bovine ciliary smooth muscle through activation of ETB receptor and NO/cGMP pathway. *Exp Eye Res*, 2005, 80 (3), 313-22.

Matsumoto H.; Nakamura Y.; Iida H.; Ito K.; Ohguro H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Exp. Eye Res.* 2006, 83, 348-56.

Matsunaga N., Chikaraishi Y., Shimazawa M., Yokota S., Hara H. *Vaccinium myrtillus* (bilberry) extracts reduce angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2010 7(1):47-56.

Matsunaga N., Imai S., Inokuchi Y., Shimazawa M., Yokota S., Araki Y., Hara H. Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage *in vitro* and *in vivo*. *Mol Nutr Food Res.* 2009 53(7):869-77.

Matsunaga N., Tsuruma K., Shimazawa M., Yokota S., Hara H. Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis. *Phytother Res.* 2010 24 Suppl 1:S42-7.

Mes PJ, Boches P, Myers JR. Characterization of Tomatoes Expressing Anthocyanin in the Fruit. *J Am Soc Hortic Sci.* 2008, 133(2):262-269.

Milbury PE., Graf B., Curran-Celentano JM., Blumberg JB. Bilberry (Vaccinium myrtillus) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2007. 48(5):2343-9.

Miyake S.; Takahashi N.; Sasaki M.; Kobayashi S.; Tsubota K.; Ozawa Y. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Lab. Invest.* 2012, 92, 102-109.

Miyamoto N.; Izumi H.; Miyamoto R.; Bin H.; Kondo H.; Tawara A.; Sasaguri Y.; Kohno K. Transcriptional regulation of activating transcription factor 4 under oxidative stress in retinal pigment epithelial ARPE-19/HPV-16 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, 52, 1226-34.

Morales S, Juárez-Maldonado A. Impact of Silicon Nanoparticles on the Antioxidant Compounds of Tomato Fruits Stressed by Arsenic. *Foods.* 2019, 8(12):612.

Morazzoni P.; Bombardelli E. *Vaccinium myrtillus*. *Fitoterapia*. 1996, 67, 3–29.

Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000. 101(5):451-4.

Moulton E. A., Becerra L., Borsook D. An fMRI case report of photophobia: activation of the trigeminal nociceptive pathway. *Pain.*, 2009. 145(3):358-63.

Nakajima J.; Tanaka I.; Seo S.; Yamazaki M.; Saito K. LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004, 2004, 241-247.

Nakamura M.; Kuse Y.; Tsuruma K.; Shimazawa M. and Hara H. The involvement of the oxidative stress in murine blue LED light-induced retinal damage model. *Biol. Pharm. Bull.* 2017, 40, 1219-1225.

Nakamura O., Moritoh S., Sato K., Maekawa S., Murayama N., Himori N., Omodaka K., Sogon T., Nakazawa T. Bilberry extract administration prevents retinal ganglion cell death in mice via the regulation of chaperone molecules under conditions of endoplasmic reticulum stress. *Clin Ophthalmol.*, 2017, 11:1825-1834.

Nakanishi T., Shimazawa M., Sugitani S., Kudo T., Imai S., Inokuchi Y., Tsuruma K.,

Hara H. Role of endoplasmic reticulum stress in light-induced photoreceptor degeneration in mice. *J Neurochem* 2013. 125, 111–24.

Narimatsu T., Ozawa Y., Miyake S., Kubota S., Hirasawa M., Nagai N., Shimmura S., Tsubota K. Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013, 54(7):4555-62.

Narimatsu T.; Negishi K.; Miyake S.; Hirasawa M.; Osada H.; Kurihara T.; Tsubota K.; Ozawa Y. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material *in vivo*. *Exp. Eye Res.* 2015, 132, 48-51.

Nishida T., Kuse Y., Mochizuki K., Shimazawa M., Yamamoto T. and Hara H. Protective effects of fluoroquinolones on UV-induced damage of cultured ocular cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 2017. 806, 59-66.

Nixon, RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 2013. 19 (8), 983-97.

Noda Y., Kaneyuki T., Mori A., Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit

extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*, 2002. 50 (1), 166-71.

Ogawa K., Kuse Y., Tsuruma K., Kobayashi S., Shimazawa M., Hara H. Protective effects of bilberry and lingonberry extracts against blue light-emitting diode light-induced retinal photoreceptor cell damage *in vitro*. *BMC Complement Altern Med*. 2014 2;14:120.

Ogawa K., Oyagi A., Tanaka J., Kobayashi S. and Hara H. The protective effect and action mechanism of *Vaccinium myrtillus* L. on gastric ulcer in mice. *Phytotherapy Research*, 2011. 25, 1160-1165.

Ogawa K., Sakakibara H., Iwata R., Ishii T., Sato T., Goda T., Shimo K., Kumazawa S. Anthocyanin composition and antioxidant activity of the crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *J Agric Food Chem*. 2008, 25;56(12):4457-4462.

Ogawa K., Tsuruma K., Tanaka J., Kakino M., Kobayashi S., Shimazawa M., Hara H. The protective effects of bilberry and lingonberry extracts against UV light-induced retinal photoreceptor cell damage *in vitro*. *J Agric Food Chem*. 2013 30;61(43):10345-53.

Okada T., Yoshida H., Akazawa R., Negishi M., Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* 2002, 366(Pt 2):585-94.

Olives Barb A.I., Cámara Hurtado M., Sánchez Mata M.C., Fernández Ruiz V., Sáenz de Tejada López M. Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry* 2006 95;2, 328–336.

Osada H.; Okamoto T.; Kawashima H.; Toda E.; Miyake S.; Nagai N.; Kobayashi S.; Tsubota K.; Ozawa Y. Neuroprotective effect of bilberry extract in a murine model of photo-stressed retina. *PLoS One* 2017, 12, e0178627.

Ozawa Y.; Kawashima M.; Inoue S.; Inagaki E.; Suzuki A.; Ooe E.; Kobayashi S.; Tsubota K. Bilberry extract supplementation for preventing eye fatigue in video display terminal workers. *J. Nutr. Health Aging* 2015, 19, 548-54.

Peter J.M., Peter B., James R.M. Characterization of tomatoes expressing anthocyanin in the fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2008, 133(2):262-269.

Prasanna G, Jing P. Cyanidin-3-O-glucoside Functions Like Chemical Chaperone and Attenuates the Glycation Mediated Amyloid Formation in Albumin. *Arch Biochem Biophys.* 2018, 643:50-56.

Proud CG. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol.* 2005, 16(1):3-12.

Ramandeep K.T., Geoffrey P.S. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res. Int.* 2005, 38, 487-497.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26(9-10):1231-1237.

Ripps H., Noble K. G., Greenstein V. C., Siegel I. M., Carr R. E. Progressive cone dystrophy. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1987, 85:82-100.

Roche SL., Wyse-Jackson AC., Byrne AM., Ruiz-Lopez AM., Cotter TG. Alterations to retinal architecture prior to photoreceptor loss in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Int. J. Dev. Biol.* 2016, 60(4-6):127-39.

Roehlecke C.; Schumann U.; Ader M.; Knels L.; Funk RH. Influence of blue light on

photoreceptors in a live retinal explant system. *Mol. Vis.* 2011, 17: 876-884.

Rogers CS., Chan LM., Sims YS., Byrd KD., Hinton DL., Twining SS. The effects of sub-solar levels of UV-A and UV-B on rabbit corneal and lens epithelial cells. *Exp Eye Res.*, 2004. 78:1007-1014.

Rutkowski D.T.; Arnold S.M.; Miller C.N.; Wu J.; Li J.; Gunnison KM.; Mori K.; Sadighi Akha A.A.; Raden D.; Kaufman R.J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 2006, 4, e374.

Saithong T, Thilavech T, Adisakwattana S. Cyanidin-3-rutinoside reduces insulin fibrillation and attenuates insulin fibrils-induced oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Int J Biol Macromol.*, 2018. 113:259-268.

Saito A., Ochiai K., Kondo S., Tsumagari K., Murakami T., Cavener DR., Imaizumi K. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem.*, 2011. 286(6):4809-18.

Salvyre R., Nègre A., Affany A., Lenoble M., Douste-Blazy L. Protective effect of

plant flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation of membranes. *Prog Clin Biol Res.*, 1988. 280:313-6.

Sanvicens N., Gómez-Vicente V., Masip I., Messeguer A., Cotter T. G. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *J Biol Chem.*, 2004. 279(38):39268-78.

Shahinfar, S., Edward, D. P. & Tso, M. O. A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Curr. Eye. Res.* 1991. 10, 47–59.

Shimazu K., Miyake Y., Watanabe S. Retinal ganglion cell response properties in the transcorneal electrically evoked response of the visual system. *Vision Res.* 1999. 39(13):2251-60.

Su X, Xu J, Rhodes D, Shen Y, Song W, Katz B, Tomich J, Wang W. Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato. *Food Chem.* 2016, 202, 184-8.

Sun MH., Pang JH., Chen SL., Kuo PC., Chen KJ., Kao LY., Wu JY., Lin KK., Tsao YP. Photoreceptor protection against light damage by AAV-mediated overexpression of heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2007. 48(12):5699-707.

Szabo K, Diaconeasa Z, Cătoi AF, Vodnar DC. Screening of Ten Tomato Varieties Processing Waste for Bioactive Components and Their Related Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Antioxidants (Basel)*, 2019. 8(8):292.

Tanaka J., Kadokaru T., Ogawa K., Hitoe S., Shimoda H., Hara H. Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and the constituent delphinidin glycoside inhibit photoreceptor cell death induced by visible light. *Food Chem.* 2013, 15;139(1-4):129-137.

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

Tanaka J., Nakanishi T., Shimoda H., Nakamura S., Tsuruma K., Shimazawa M., Matsuda H., Yoshikawa M. and Hara H. Purple rice extract and its constituents suppress endoplasmic reticulum stress-induced retinal damage *in vitro* and *in vivo*. *Life Sciences*, 2013. 92, 17-25.

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

Tang PH., Buhusi MC., Ma JX., Crouch RK. RPE65 is present in human green/red cones and promotes photopigment regeneration in an in vitro cone cell model. *J. Neurosci.* 2011. 31(50):18618-26.

Tang X., Yang X., Peng Y., Lin J. Protective effects of lycopene against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury and apoptosis in human endothelial cells. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009 23(6):439-48.

Tao JX, Zhou WC, Zhu XG. Mitochondria as Potential Targets and Initiators of the Blue Light Hazard to the Retina. *Oxid Med Cell Longev.* 2019, 6435364.

Taylor HR. The biological effects of UV-B on the eye. *Photochem Photobiol.* 1989 50(4):489-92.

Tirasophon W., Welihinda A. A., Kaufman R. J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 1998, 12(12):1812-24.

Trevithick-Sutton CC., Foote CS., Collins M., Trevithick JR. The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: a chemiluminescence and ESR study. *Mol Vis.* 2006 30;12:1127-35.

Tsuda T.; Horio F.; Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3 - O -  $\beta$  - D - glucoside in rats. *FEBS Lett.* 1999, 449, 179–182.

Uchino Y., Kawakita T., Ishii T., Ishii N., Tsubota K. A new mouse model of dry eye disease: oxidative stress affects functional decline in the lacrimal gland. *Cornea.*, 2012a. 31 Suppl 1:S63-7.

Uchino Y., Kawakita T., Miyazawa M., Ishii T., Onouchi H., Yasuda K., Ogawa Y., Shimmura S., Ishii N., Tsubota K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS One.*, 2012b. 7(10):e45805.

Uehara T. Accumulation of misfolded protein through nitrosative stress linked to neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal.* 2007. 9(5):597-601.

Uehara T., Nakamura T., Yao D., Shi ZQ., Gu Z., Ma Y., Masliah E., Nomura Y., Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature.* 2006. 441(7092):513-7.

Uppala JK., Gani AR., Ramaiah KVA. Chemical chaperone, TUDCA unlike PBA, mitigates protein aggregation efficiently and resists ER and non-ER stress induced HepG2 cell death. *Sci Rep.* 2017. 7(1):3831.

Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev.* 2005. 85(1):201-79.

Viljanen K., Kylli P., Hubbermann EM., Schwarz K., Heinonen M. Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *J Agric Food Chem.*, 2005. 53(6):2022-7.

Viljanen K., Kylli P., Kivikari R., Heinonen M. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *J Agric Food Chem.*, 2004. 52(24):7419-24.

Wakamatsu TH., Dogru M., Matsumoto Y., Kojima T., Kaido M., Ibrahim OM., Sato EA., Igarashi A., Ichihashi Y., Satake Y., Shimazaki J., Tsubota K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2013, 54(1):201-10.

Wang S., Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* 2012. 197(7):857-67.

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

4280.

Wenzel A., Grimm C., Samardzija M., Remé CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2005. 24(2):275-306.

Xia X., Ling W., Ma J., Xia M., Hou M., Wang Q., Zhu H., Tang Z. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice, 2006, *J Nutr*, 136 (8), 2220-5.

Xiang X. Y., Yang X. C., Su J., Kang J. S., Wu Y., Xue Y. N., Dong Y. T., Sun L. K. Inhibition of autophagic flux by ROS promotes apoptosis during DTT-induced ER/oxidative stress in HeLa cells, 2016, *Oncol Rep.*, 35(6):3471-9.

Xudong S, Hongdou J, Qiushi X, Chenxu Z, Chuang X. Lycopene Alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Bovine Mammary Epithelial Cells via the NFE2L2 Signaling Pathway. 2019, *Food Funct.*, 10(10):6276-6285.

Yamakawa M.Y.; Uchino K.; Watanabe Y.; Adachi T.; Nakanishi M.; Ichino H.; Hongo K.; Mizobata T.; Kobayashi S.; Nakashima K.; Kawata Y. Anthocyanin suppresses the toxicity of A $\beta$  deposits through diversion of molecular forms in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease. *Nutr. Neurosci.* 2016, 19, 32-42.

Yamauchi R, Fukamizu S, Kohama Y, Shimamura T, Kashiwagi T, Ukeda H, Akiyama H, Mathui T, Ishikawa H. Comparative DPPH and ABTS Radical Scavenging Activity Assays for Evaluating Natural Antioxidants as Food Additives. *Food preservation science*. 2014, 40(2), 55-63.

Yang LP., Wu LM., Guo XJ., Li Y., Tso MO. Endoplasmic reticulum stress is activated in light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci. Res*. 2008. 86(4):910-9.

Ye P.; Mimura J.; Okada T.; Sato H.; Liu T.; Maruyama A.; Ohyama C.; Itoh K. Nrf2- and ATF4-Dependent Upregulation of xCT Modulates the Sensitivity of T24 Bladder Carcinoma Cells to Proteasome Inhibition. *Mol. Cell. Biol*. 2014, 34(18), 3421–3434.

Yin J., Yu FS. ERK1/2 mediate wounding- and G-protein-coupled receptor ligands-induced EGFR activation via regulating ADAM17 and HB-EGF shedding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2009. 50(1):132-9.

Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J*. 2007, 274(3):630-58.

Zhang T.; Fu Y. A Phe-rich region in short-wavelength sensitive opsins is responsible for their aggregation in the absence of 11-cis-retinal. *FEBS Lett*. 2013, 587, 2430-4.

Zhang, T., Zhang, N., Baehr, W., Fu, Y. Cone opsin determines the time course of cone photoreceptor degeneration in Leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. 108, 8879–84.

Zheng R., Po I., Mishin V., Black AT., Heck DE., Laskin DL., Sinko PJ., Gerecke DR., Gordon MK., Laskin JD. The generation of 4-hydroxynonenal, an electrophilic lipid peroxidation end product, in rabbit cornea organ cultures treated with UVB light and nitrogen mustard. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 2013. 272(2):345-55.

## 略語一覽

ABTS:	2,2'-Azinobis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AMD:	Age-related macular degeneration
ATF4:	Activating transcription factor 4
ATF6:	Activation of transcription factor 6
BiP:	Binding immunoglobulin protein
CCK-8:	Cell Counting Kit-8
CHOP:	C/EBP homologous protein
Cy3G:	Cyanidin-3-O-glucoside
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dp3G:	Delphinidin-3-O-glucoside
DPPH:	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
DTT:	Dithiothreitol
ESI:	Electrospray ionization
ER:	Endoplasmic reticulum
ERK 1/2:	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ESR:	Electron spin resonance
FBS:	Fetal bovine serum
GRP78:	Glucose-regulated protein 78
GRP94:	Glucose-regulated protein 94
HPLC-DAD:	High performance liquid chromatography
EC <sub>50</sub> :	Half maximal effective concentration
IRE1:	Inositol-requiring enzyme 1
LED:	Light-emitting diode

MS:	Mass spectrum
Mv3G:	Malvidin-3-O-glucoside
NAC:	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
NMDA:	<i>N</i> Methyl-D-aspartate
PERK:	PKR-like ER kinase
PI:	Propidium iodide
ROS:	Reactive oxygen species
RP:	Retinitis pigmentosa
RPE:	Retinal pigment epithelial
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
TEA:	Triethylamine acid
TFA:	Trifluoroacetic acid
TUDCA:	Tauroursodeoxycholic acid
uORF:	Upstream open reading frame
UPR:	Unfolded protein response
UV:	Ultraviolet
VDT:	Visual Display Terminal