

血管新生に対するビルベリー抽出物の作用

(岐阜薬科大学、株式会社わかさ生活)

和漢医薬学会大会第23回、日本薬学会第126年会

目的

眼内に異常血管が新生することによって引き起こされる「血管新生緑内障」、「加齢黄斑変性症」及び「糖尿病網膜症」などは失明につながる重篤な疾患である。したがって、異常血管の新生を抑制することは、これらの疾患の予防・治療において重要である。

本研究では、ビルベリー抽出物の血管新生に対する作用を明らかにするために、*in vitro*における管腔形成及び血管内皮細胞の増殖・遊走に対する作用を検討した。さらに、*in vivo*における網膜の異常血管新生に対する作用について、高酸素負荷マウス網膜血管新生モデルを用いて検討した。

ビルベリー (*Vaccinium myrtillus*)

- ブルーベリーの一つで主に北ヨーロッパ、北アメリカなどで自生している。樹高が15~40 cmと低く、耐寒性がある。4月から6月に開花する。
- 約150種類あると言われるブルーベリーの中でも最もアントシアニン含量が多く、25%含んでいる¹⁾。また、15種類のアントシアニンを含む²⁾。
- 近年、ビルベリーの抗酸化作用²⁾、コラーゲンの安定化作用、血小板の凝集抑制作用³⁾などの薬理作用が報告されている。



図1. ビルベリー (*Vaccinium myrtillus*)

方法

血管管腔形成

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と線維芽細胞を共培養した血管新生キット(クワボウ)を用いて測定した。予め全ての培地中に血管新生促進物質であるvascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) を10 ng/mlになるように添加し、その培地へビルベリー抽出物をそれぞれ0.3、1.0、3.0、10及び30 µg/mlとなるように添加した。

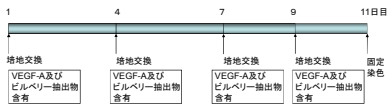


図2. 血管新生キットにおける培養スケジュール

11日目において形成された管腔中のCD31を染色し、血管新生定量ソフトウェアVer.2(クワボウ)を用いて、新生血管の面積、長さ、分岐点数及び枝数を計測した。

Tube area (面積)・・・管腔の面積

Length (長さ)・・・管腔の長さ

Joint (分岐点数)・・・管腔と管腔の交差した分岐点数

Path (枝数)・・・1本の管腔から派生した管腔の枝数

細胞増殖

1ウェルあたり 2×10^3 cellsのHUVECを96穴マイクロプレートに播種した。細胞増殖はCCK8(同仁・WST法)を添加し、3時間後に吸光度(492 nm)を測定することにより定量した。

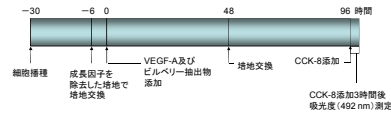


図3. 細胞増殖試験スケジュール

細胞遊走

HFN(ヒトフィブロネクチン)によりコーティングした8µm穴のセルカルチャーインサート(バクtonディッキンソン)の上部チャンパーへ 5.0×10^4 cellsのHUVECを播種した。下層に遊走した細胞のみをヘマトキシリンにより染色を行い、その細胞を数え、測定した。

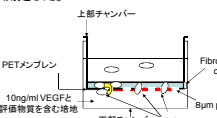


図4. 細胞遊走試験のモデル

上部チャンパー: HUVEC (5.0×10^4 cells)、評価物質(ビルベリーエキス)
下部チャンパー: 10 ng/ml VEGF、評価物質(ビルベリーエキス)をそれぞれいれ、5%CO₂、37°Cにて4時間インキュベートした。インキュベート後、PETメンプレスをメスで切り取り、ヘマトキシリンによって遊走したHUVECを染色した。

・イムノブロットング

成長因子を除いたHUVECにVEGF及びビルベリー抽出物添加し、5分後にRIPA Bufferを加え、細胞を破壊し、細胞抽出物を回収した。

一次抗体として抗リン酸化PLCγ抗体、抗PLCγ抗体、抗リン酸化ERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体(Cell Signaling)を用いた。また、抗β-アクチン抗体(Sigma)を用いた。

・高酸素負荷マウス網膜血管新生 (*in vivo* 評価方法)

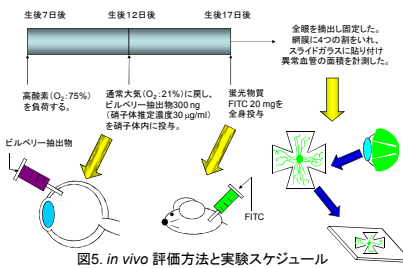


図5. *in vivo* 評価方法と実験スケジュール

結果

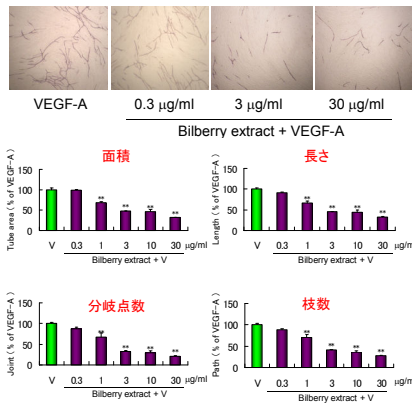


図6. VEGF依存性血管管腔形成に対するビルベリー抽出物の作用

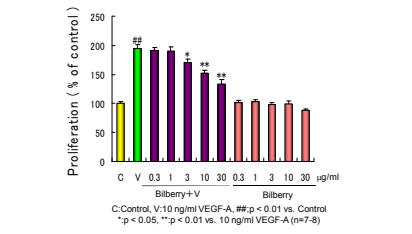


図7. VEGF依存性HUVEC増殖に対するビルベリー抽出物の作用

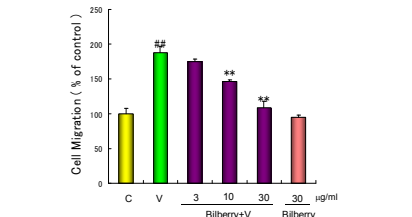


図8. VEGF依存性HUVEC遊走に対するビルベリー抽出物の作用

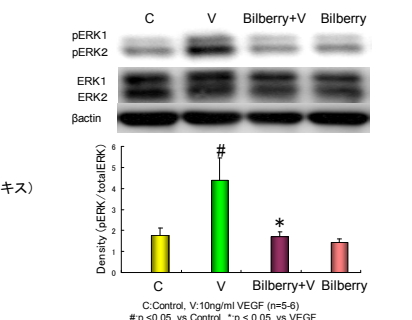


図9. ERK1/2のリン酸化に対するビルベリー抽出物の作用

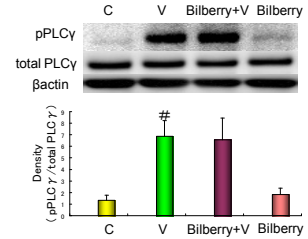


図10. PLCγのリン酸化に対するビルベリー抽出物の作用

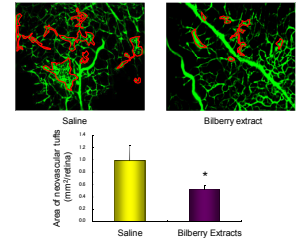


図11. 高酸素負荷マウス網膜血管新生に対するビルベリー抽出物の作用

結果のまとめ

- ビルベリー抽出物(1 ~ 30 µg/ml)はVEGF依存性の血管管腔形成を有意に抑制した(図6)。
- ビルベリー抽出物(10 ~ 30 µg/ml)はVEGF依存性の血管内皮細胞の増殖及び遊走を有意に抑制した(図7, 8)。
- ビルベリー抽出物はVEGFによるリン酸化ERK1/2の亢進を有意に抑制した(図9)。一方、VEGFによるリン酸化PLCγの亢進に対して明らかな作用は見られなかった(図10)。
- ビルベリー抽出物は硝子体内投与(300 ng;硝子体推定濃度30 µg/ml)により高酸素負荷マウス網膜の異常血管の新生を有意に抑制した(図11)。

ビルベリー抽出物の作用点

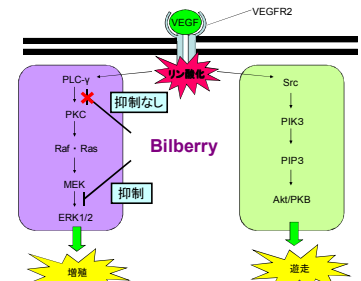


図12. VEGFのシグナル経路とビルベリー抽出物の作用点

まとめ

ビルベリー抽出物は*in vitro*血管管腔形成抑制作用及び*in vivo*マウス網膜における異常血管新生抑制作用を有することが明らかとなった。これらの作用はビルベリー抽出物の血管内皮細胞に対する増殖及び遊走抑制作用によることが示唆された。

さらに、ビルベリー抽出物の増殖抑制作用の機所の一部にERK1/2のリン酸化亢進抑制作用が関与していることが示唆された。

これらの結果から、ビルベリー抽出物は網膜の異常血管新生によって引き起こされる疾患(例えば、糖尿病網膜症など)に対する予防効果が期待される。

参考文献

- Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, Rémy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr*. 133:4178-4182, 2003.
- Nakajima JI, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, and Saito K. LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *J Biomed Biotechnol*, 5:241-247, 2004.
- Morazzoni, P & Magistretti, M. J. Activity of Myrtocyanin®, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. *Fitoterapia* 61:13-21, 1990.