

# ヒト網膜毛細血管細胞に対するビルベリーエキス の作用

～岐阜薬科大学薬効解析学研究室 ・ 株式会社わかさ生活～

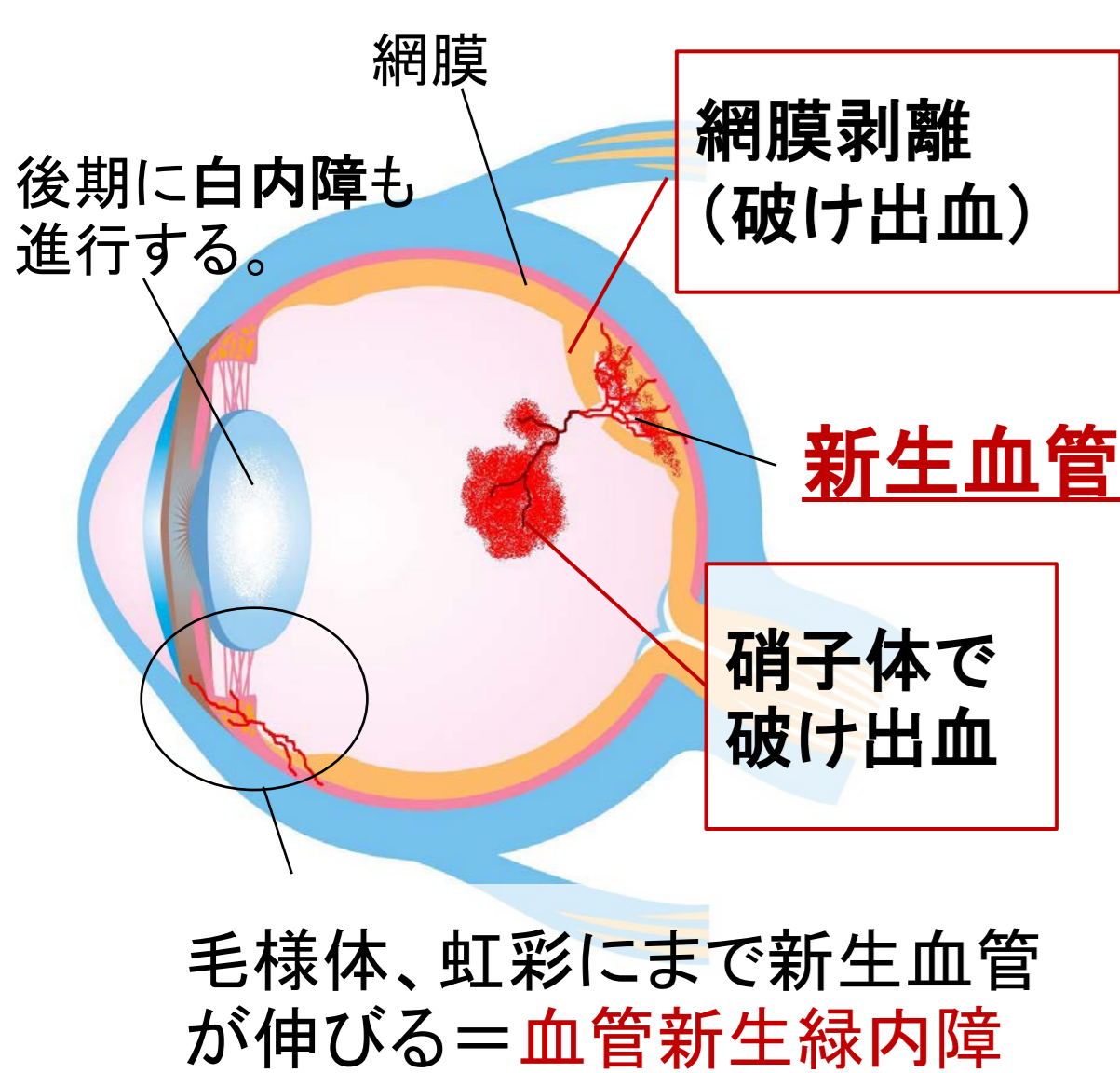
(日本薬学会 第133回年会 学会発表)

## 背景および目的

糖尿病網膜症や加齢性黄斑変性症、または未熟児網膜症において、血管新生の形成と硝子体内での出血、および網膜毛細血管の透過性亢進による浮腫発生は、疾患初期の視力低下を招く原因として問題視されている。これらに対し、治療法としてはレーザー治療、硝子体手術、血管新生や血管透過性亢進の原因因子で知られている血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)抑制剤の眼内注射などが存在するが、長期的には浮腫の再発や治療に伴う合併症などの問題点も挙げられている。我々は、これまでにヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells: HUVECs)に対するビルベリー(*Vaccinium myrtillus* L.)エキスの血管新生阻害作用を見いだしてきた。そこで本研究では、新たにヒト網膜毛細血管内皮細胞培養系(human retinal microvascular endothelial cells: HRMEC)を用いた*in vitro*試験において、血管新生に対するビルベリーエキスおよび主要なアントシアニジンの予防作用を検討した。

### 糖尿病網膜症

#### <糖尿病網膜症の病態>



糖尿病で血流が低下すると、栄養を届けるために異常な新生血管がつけられる。しかし脆弱なために簡単に破れ、出血を引き起こす。結果、視機能が低下する。新生血管が硝子体や毛様体にまで延びると、網膜剥離や線内障の原因になる。

- <糖尿病合併症が起こる割合>
- 糖尿病網膜症・・・30～60%
  - 糖尿病黄斑症・・・10～20%
  - 糖尿病血管新生線内障・・・3～5%
  - 糖尿病白内障・・・20～60%\*
- \*白内障も後期に起こる。

### 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。約150種類あると言われるブルーベリーの中でもアントシアニン含量が多く、その抽出エキスはVMA(*Vaccinium myrtillus* anthocyanoside)と呼ばれ、36%、15種類のアントシアニンを含んでいる。VMAはサプリメント利用がなされている。

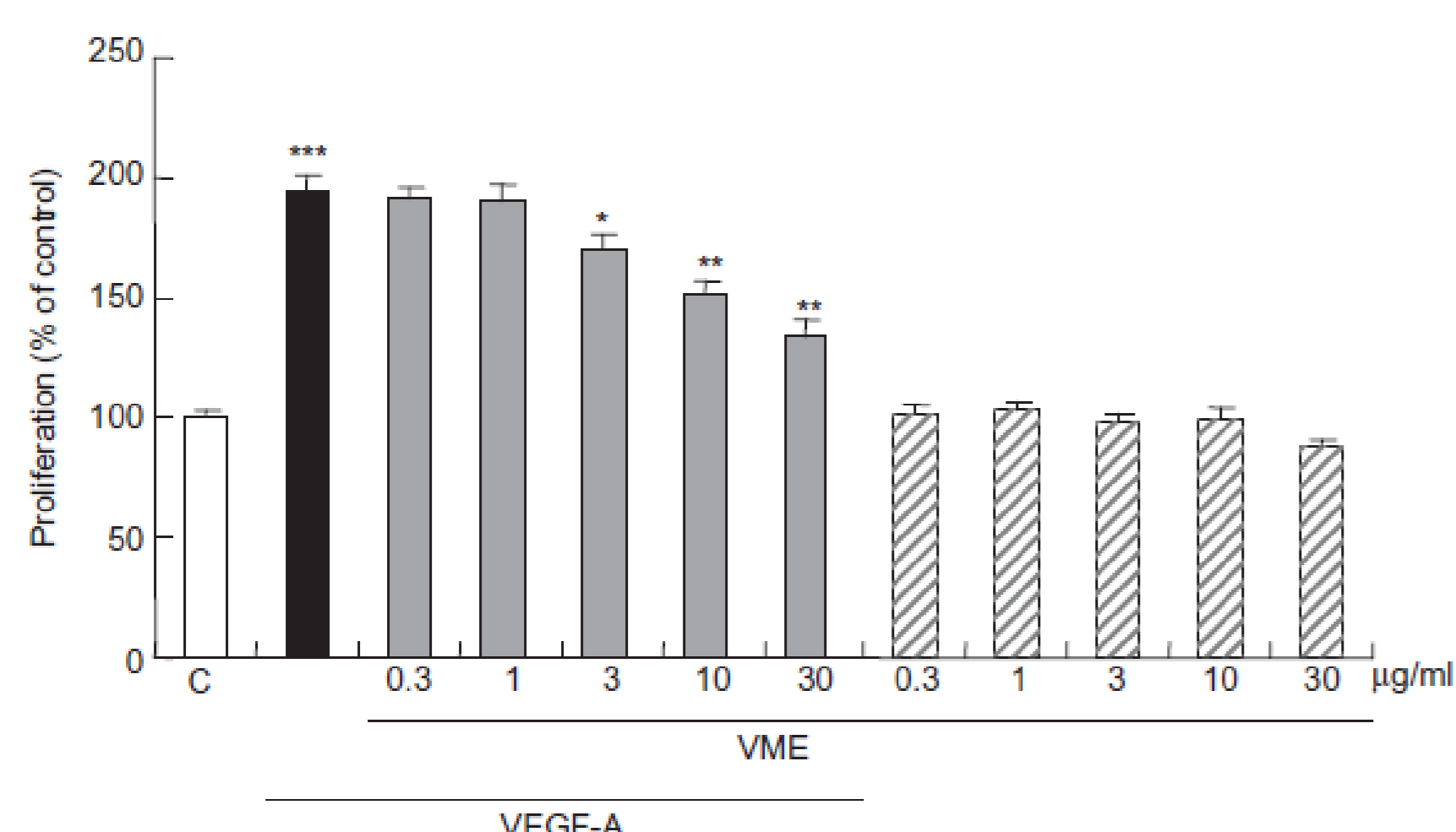


#### <効果>

- ▶ 視覚機能改善作用
- ▶ 眼精疲労改善作用
- ▶ 血小板凝固抑制作用
- ▶ 毛細血管保護作用
- ▶ 血管拡張作用

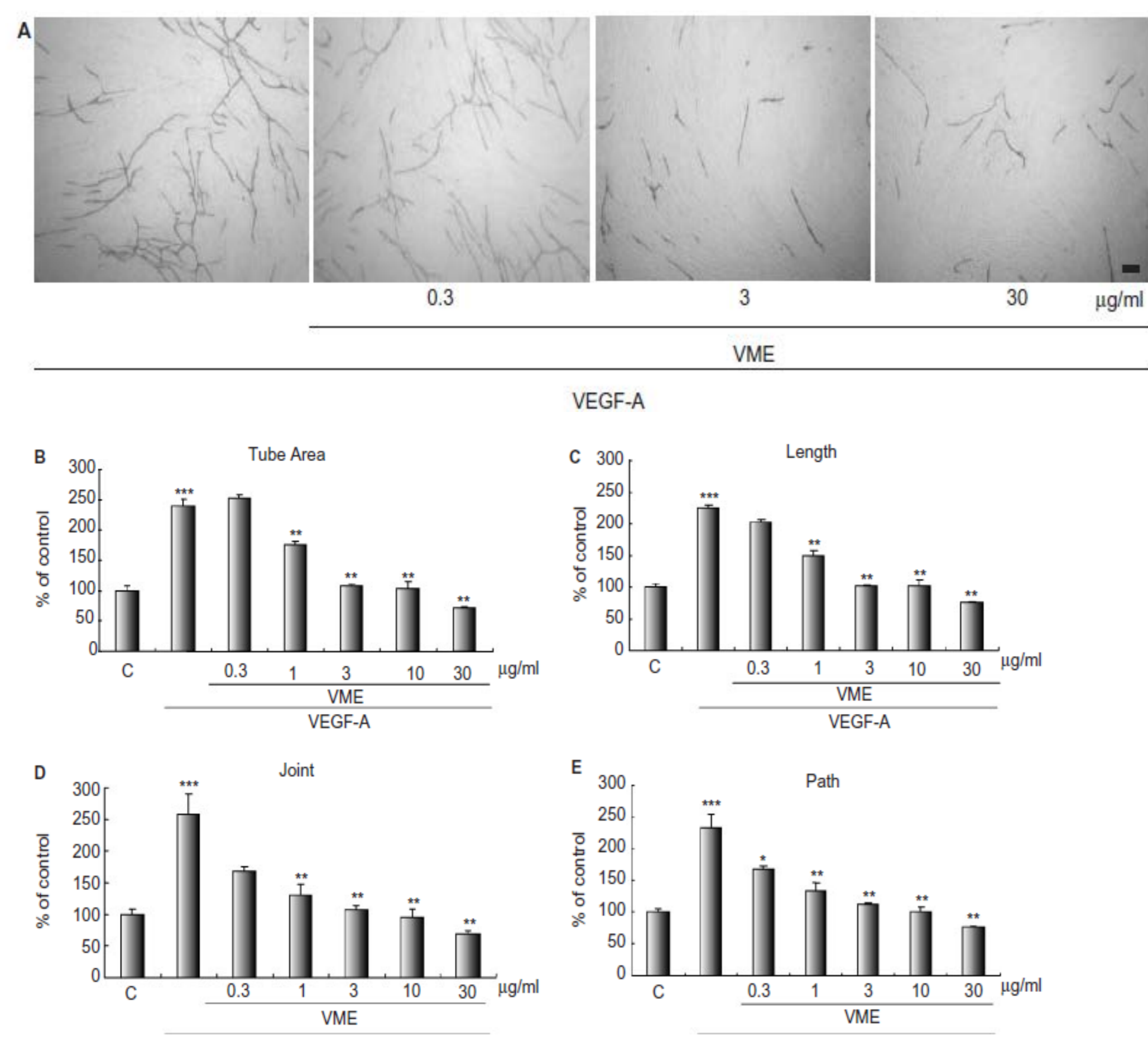
## これまでの関連研究

① VEGF誘発ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)増殖試験に対するビルベリーエキスの抑制作用



VME inhibited proliferation of HUVECs induced by VEGF-A. HUVECs were cultured in 96-well plates at a density of 2000 cells per well, then incubated for a total of 96 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. HUVECs were supplemented with or without VEGF-A (10 ng/ml) plus various concentrations of test drugs, and measurements were made by WST-8 assay. Data are shown as mean ± SEM (n=5-8). C: Control. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01 versus VEGF-A (Dunnett's multiple-comparison test). \*\*\*, P<0.01 versus Control (Student's *t*-test). (参考文献: Matsunaga, N., et al. *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2010,7(1):47-56.)

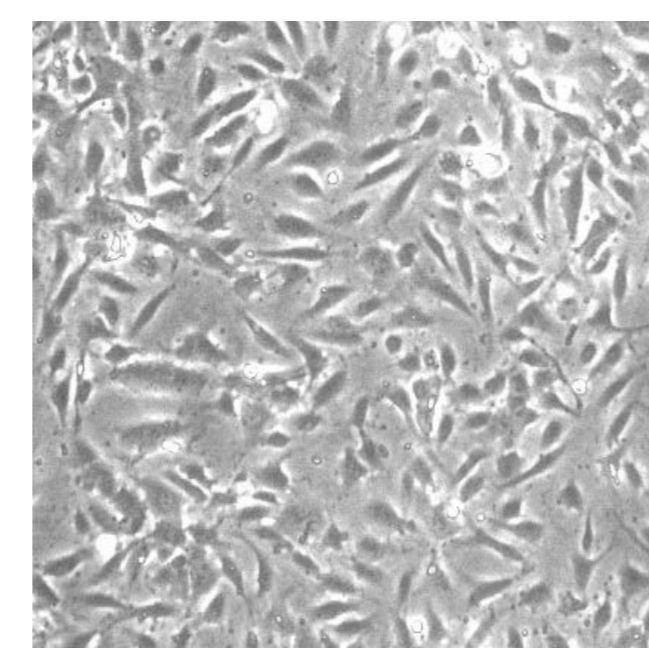
② VEGF誘発管腔形成に対するビルベリーエキスの抑制作用



VME inhibited tube formation induced by VEGF-A. Representative photographs of tube formation (A). Scale bar=100 μm. HUVECs were co-cultured with human fibroblasts, as described in Methods section, and incubated for 11 days with or without the indicated concentrations of VME, with the concomitant addition of VEGF-A (10 ng ml<sup>-1</sup>). Tube formation was observed in five randomly chosen fields, and tube area (B), length (C), joints (D) and paths (E) were measured using an Angiogenesis Image Analyzer. Data are shown as mean ± SEM (n=3-6). C: Control. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01 versus VEGF-A (Dunnett's multiple-comparison test). \*\*\*, P<0.01 versus Control (Student's *t*-test). (参考文献: Matsunaga, N., et al. *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2010,7(1):47-56.)

## 実験方法

### 1. 培養細胞



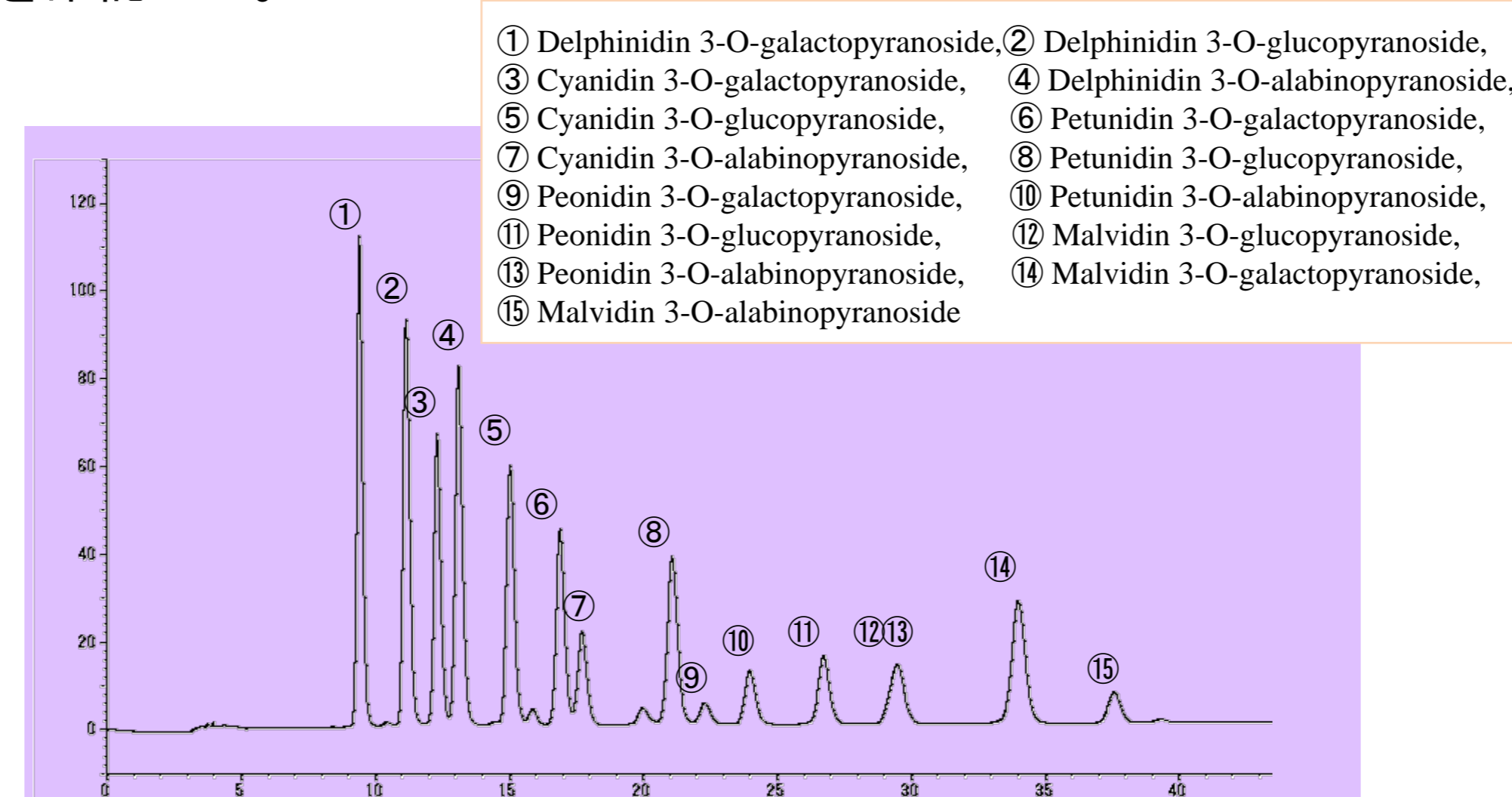
細胞  
ヒト網膜毛細血管内皮細胞: HRMECs  
(Human retinal microvascular endothelial cells: HRMECs)

培養条件  
●CSC-medium, 10% FBS,  
2% Culture Booster (CB)

### 2. 被検試料

#### 〇ビルベリーエキス

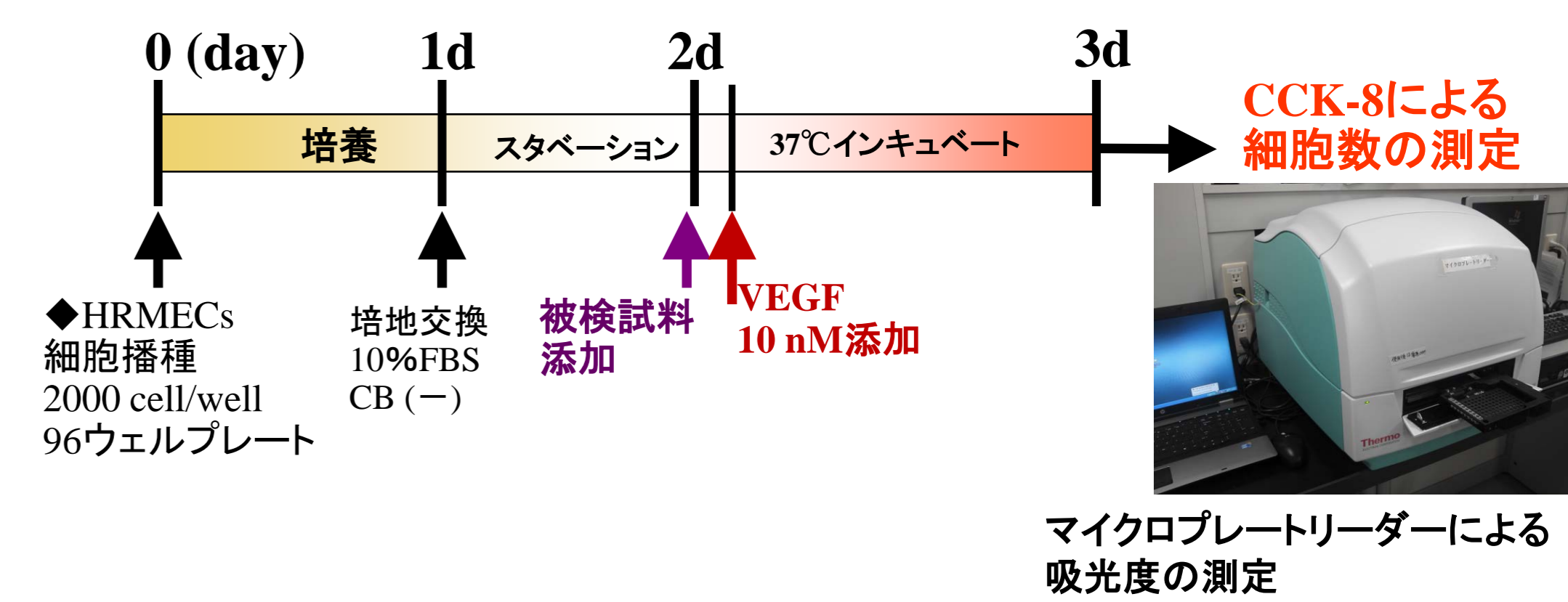
本試験で用いたビルベリーエキス(VMA, わかさ生活)についてHPLC分析にて以下に示すアントシアニン組成であることを確認した。



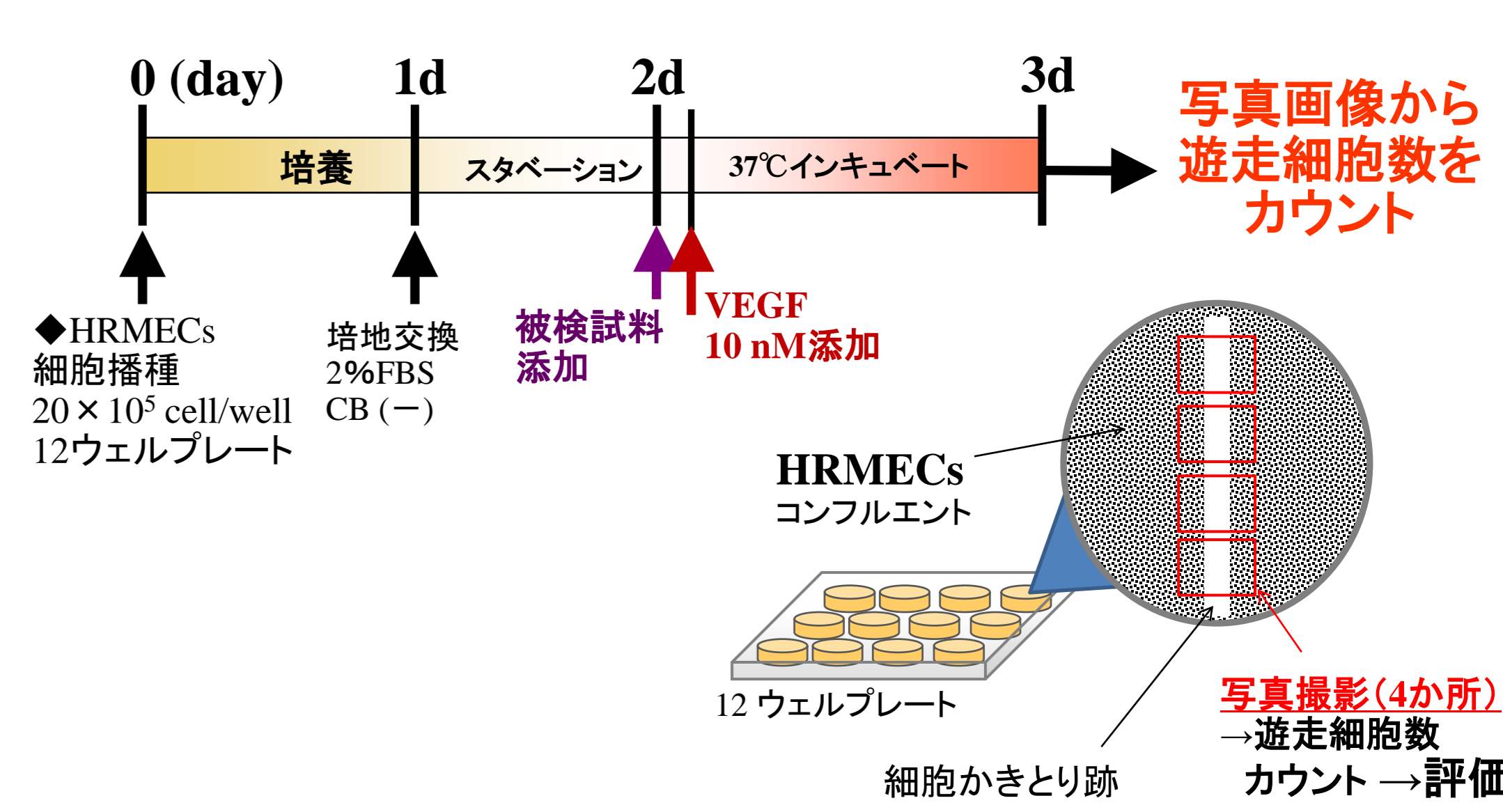
#### 〇アントシアニン



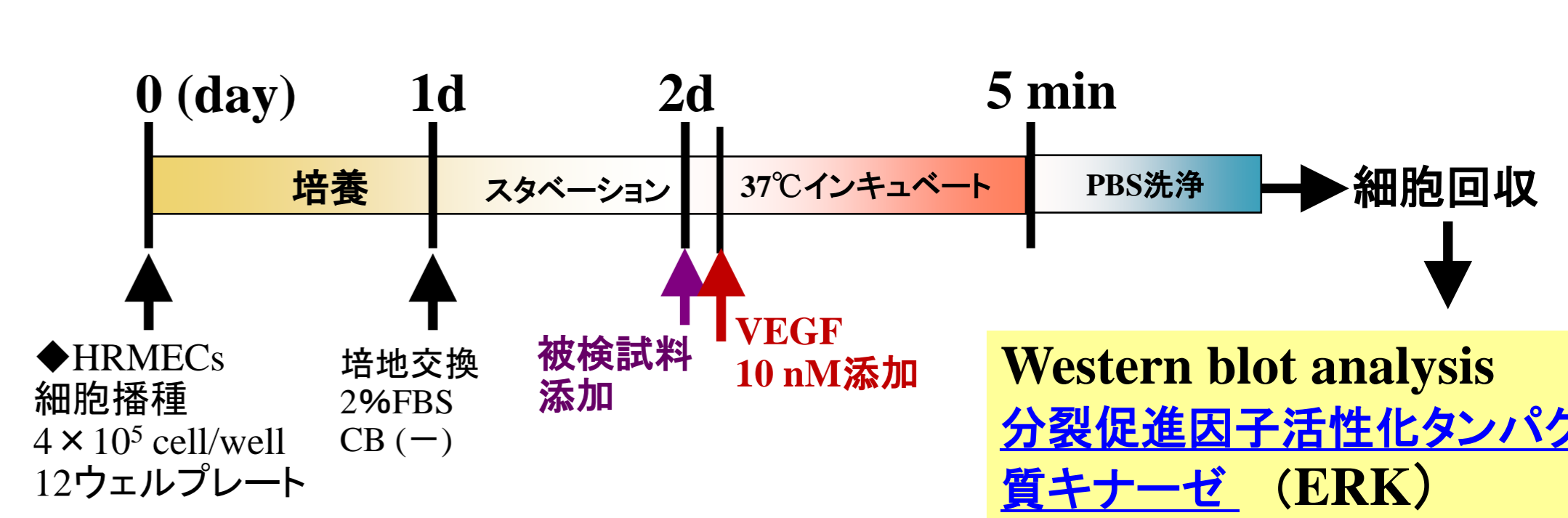
### 3. VEGF誘発HRMECs増殖試験



### 4. VEGF誘発HRMECs遊走試験

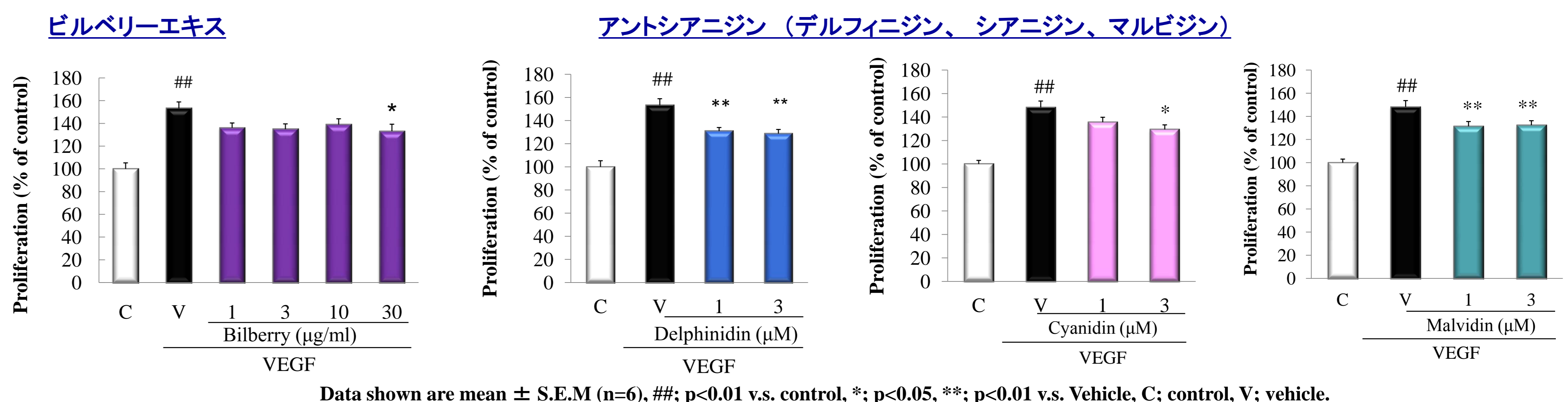


### 5. ウェスタンブロット解析

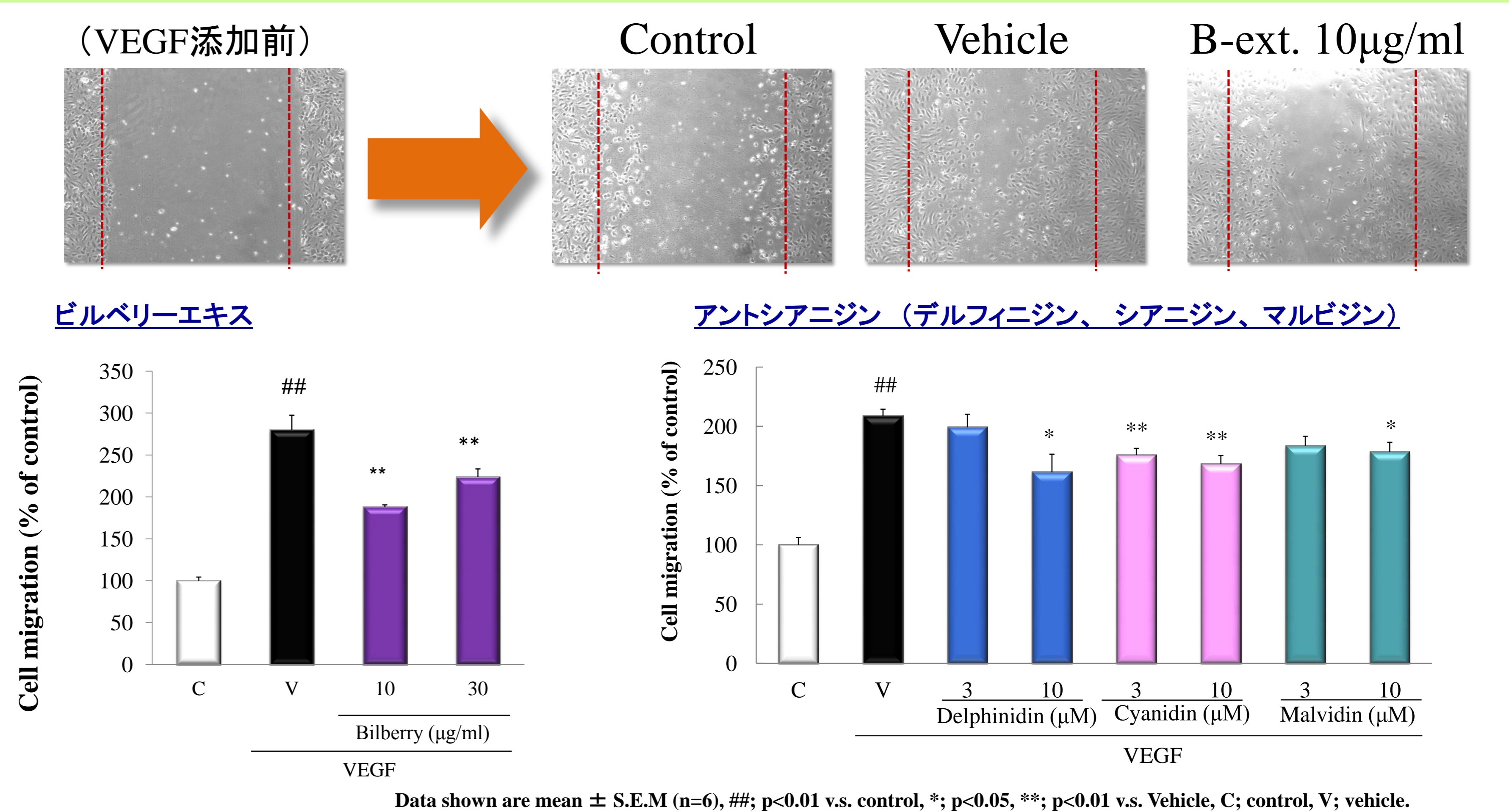


## 実験結果

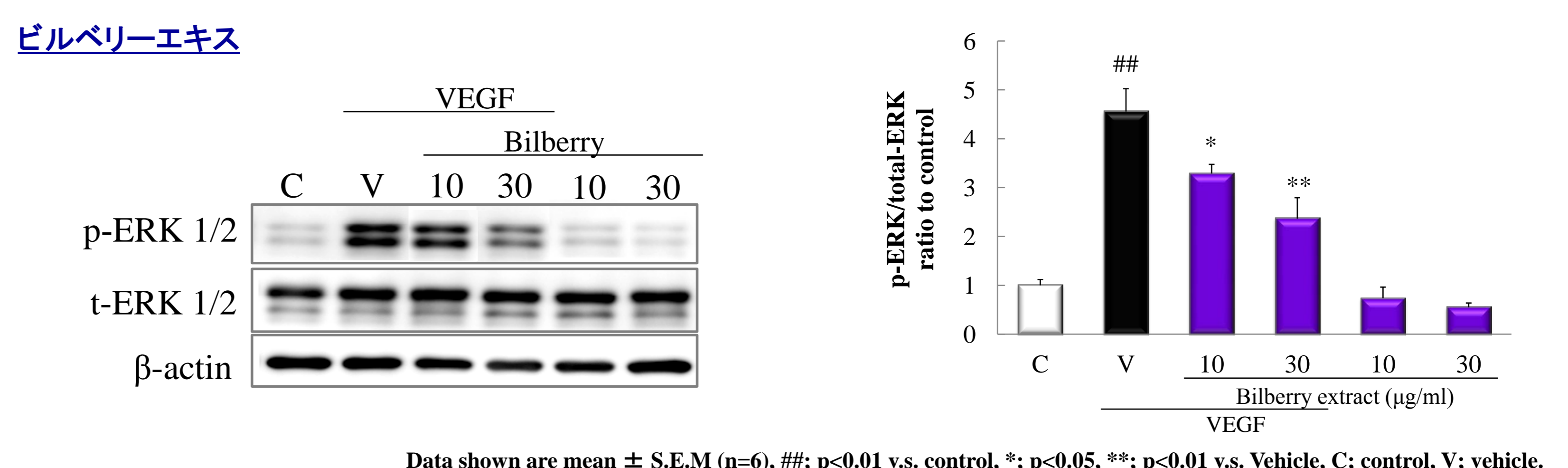
### VEGF誘発HRMECs増殖に対するビルベリーとアントシアニジンの増殖抑制作用



### VEGF誘発HRMECs遊走に対するビルベリーとアントシアニジンの遊走抑制作用



### ウェスタンブロット解析



## 結語

- ◆ビルベリーエキスおよびアントシアニン(Delphinidin, Cyanidin, Malvidin)は、VEGFにより誘発されるHRMECsの細胞増殖を抑制した。
  - ◆ビルベリーエキスおよびアントシアニンはVEGFにより誘発される細胞遊走を抑制した。
  - ◆ビルベリーエキスは、VEGFによるERKのリン酸化を抑制した。
- ビルベリーおよびビルベリーに含まれるアントシアニンは、VEGFにより誘発される血管新生を抑制する作用を有することから、糖尿病網膜症の病態悪化を軽減する可能性が示唆された。