

講演番号：4F37p06

講演日時、会場：3月29日 15:05～ F校舎37会場

*all-trans* レチナールによる網膜色素上皮細胞の細胞死誘導機構の解析とピリドキサミンによる保護効果の検証

Cytoprotective action of pyridoxamine against *all-trans*-retinal-induced cell death in human retinal pigment epithelial cells

○井出 涼子<sup>1</sup>、甲斐 建次<sup>2</sup>、須山 享三<sup>3</sup>、赤川 貢<sup>2</sup> (<sup>1</sup>大阪府大・生命環境、<sup>2</sup>大阪府大院・生命環境、<sup>3</sup>東北大院・医学)

○Ryoko Ide<sup>1</sup>, Kenji Kai<sup>2</sup>, Kyozo Suyama<sup>3</sup>, Mitsugu Akagawa<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>Tohoku Univ. Sch. of Med.)

【目的】加齢黄斑変性症は、加齢に伴い網膜中心部の黄斑に障害が生じることで視力低下を引き起こし、深刻なケースでは視力の喪失をもたらす難治性疾患である。欧米では成人の失明原因の第1位であり、日本でも50歳以上の約1%が罹患しており、高齢化社会の到来とともに患者数が急増している。発症要因としては、加齢に伴う *all-trans*-retinal (atRa1) 代謝の衰弱・遅延によって atRa1 濃度が上昇し、黄斑部に存在する網膜色素上皮細胞に atRa1 由来の蛍光性加齢色素(リポフスチン)が蓄積することによって細胞が損傷され、アポトーシスが惹起されるというメカニズムが示唆されている。しかしながら分子レベルでの詳細な発症機構は未だ解明されていない。一方、一級アミンでありビタミンB6化合物として知られるピリドキサミン(PM)は、脂質過酸化やメイラード反応によって生じるカルボニル化合物を捕捉することで糖尿病合併症の発症を予防する効果が報告されている。そこで本研究では、atRa1によって誘導される網膜色素上皮細胞死のメカニズムを解析するとともに、PMによるリポフスチン生成の抑制効果および細胞死の阻害効果を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】はじめに、atRa1によるタンパク質中のリポフスチン形成を調べるために atRa1 と BSA を 37℃、遮光条件下でインキュベートし、SDS-PAGE で分離後に蛍光スキャナで解析したところ、蛍光性の付加体の形成が明らかとなった。また、atRa1 と *N*α-Boc-Lys を同様の条件でインキュベートし、生成物を蛍光 HPLC、NMR および ESI-LC/MS によって解析したところ、リジン残基の ε-アミノ基に 2 分子の atRa1 が結合した蛍光性付加体の生成が確認された。さらにヒト由来網膜色素上皮細胞 ARPE-19 を使って細胞レベルでの検証を行ったところ、atRa1 処理細胞の蛍光顕微鏡観察において atRa1 濃度依存的かつ経時的なリポフスチンの蓄積が見られ、細胞増殖アッセイによって細胞死の誘導が観察された。また、細胞内タンパク質中にリポフスチンが形成されるかどうかを SDS-PAGE による分離後に蛍光スキャナで分析した結果、atRa1 濃度依存的かつ経時的なタンパク質の蛍光化が認められた。そこでこれら atRa1 の効果に対する PM の抑制効果を調べるために、PM と BSA または *N*α-Boc-Lys を上記の条件でインキュベートし、同様に解析を行った。その結果、PM は BSA の蛍光化および atRa1 と *N*α-Boc-Lys の反応による蛍光性付加体の生成を顕著に抑制することが判明した。さらに PM は濃度依存的に ARPE-19 細胞のリポフスチン形成、細胞死およびタンパク質の蛍光化を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、PM は atRa1 由来のリポフスチン生成を抑制し、網膜色素上皮細胞を保護することが判明した。

Age-related macular degeneration, *all-trans*-Retinal, Pyridoxamine