

## 論文内容の要旨

報告番号		氏名	辻中 大生
Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined stimulation of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of VEGF gene. (和 訳) ヒト網膜色素上皮はヒドロキノンと最終糖化産物の共刺激により、VEGF遺伝子の発現上昇を伴って増殖する			

### 論文内容の要旨

加齢黄斑変性(AMD)は中途失明原因として増加中あり、社会的に重要な疾患である。AMD 発症には糖尿病、加齢、喫煙などが危険因子として知られているが、その発症機序には不明な点も多い。また AMD には網膜色素上皮(RPE)の死を中心とした「萎縮型」と新生血管病変を伴う「滲出型」が存在するが、何がそれぞれの病型への進展を決定づけているかも明確にされてはいない。本研究では糖尿病・加齢で生ずる最終糖化産物(AGE)と喫煙で増加するヒドロキノン(HQ)がRPEの細胞死や増殖に及ぼす影響とそのメカニズムを *in vitro* で検討した。

ヒトRPE培養細胞(ARPE-19、h1RPE7)の培養液中にAGE、HQを単独、並びに併用添加し12時間培養した。その後、生存細胞数をWST-8アッセイを用いて検討したところ、HQ単独添加では生存細胞数の減少を認めたがHQ+AGE群ではHQ単独と比べ生存細胞が多かった。また、その際のアポトーシスをTUNEL法で、DNA複製をIdU取込法で評価した。HQ添加群ではコントロールと比べてアポトーシスが亢進していたが、HQ+AGE群ではHQ単独群と比べ細胞増殖が亢進していた。この時、RPE細胞の増殖作用が知られているVEGF及びそのmRNAがHQ+AGE群で増加していたのでVEGF経路の阻害剤Sulochrin、Ki8751、CBO-P11の添加やsiRNAでVEGFをノックダウンするといずれの場合も生存細胞数が減少した。さらにAGEの受容体としては種々の分子が知られているが、最も代表的なAGE受容体であるRAGEをsiRNAでノックダウンすると同様に生存細胞数が減少した。

そこで、VEGF発現に関わるプロモーター領域とその領域に作用する転写因子をルシフェラーゼアッセイとRNA干渉を用いて明らかにした。5'上流領域を-2303から-102まで欠失させても転写活性は維持されたが、-43まで欠失させると活性は消失した。VEGF遺伝子の-102から-43の領域にはGC boxが3か所あり、そこに結合すると予測される転写因子SP-1をノックダウンするとVEGFのmRNA発現が有意に低下した。つまり、HQで傷害を受けたRPE細胞はアポトーシスにより死に至り、萎縮型変化を起こすと考えられた。一方、糖尿病や加齢でAGEが蓄積・作用するとAGE-RAGE系シグナルにより、VEGFプロモーターの-102~-43のGC boxにSP-1が結合してVEGFが発現し、RPE細胞の増殖、並びに新生血管発症が進行し滲出型変化を引き起こすことが考えられた。