
総 説

糖尿病網膜症の分子メカニズム：蛋白糖化(AGEs)と その受容体(RAGE)の分子動態

山岸 昌一, 今泉 勉

久留米大学医学部第3内科学教室

要 約

終末糖化産物-AGE 受容体(AGE-RAGE)系は、血管構成細胞における細胞内酸化ストレスの産生亢進を介して、糖尿病網膜症の発症、進展に関わるものと考えられる。終末糖化産物(AGEs)の形成阻害やAGE-受容体(RAGE)による情報伝達経路を遮断することで、糖尿病網膜症の進展、増悪を阻止することが可能となるかも

しれない。(日眼会誌 109 : 338-345, 2005)

キーワード : AGEs, Receptor for AGEs(RAGE), PEDF, 酸化ストレス, 糖尿病網膜症, 血管新生, 血栓傾向

A Review

Molecular Mechanism of Diabetic Retinopathy : Role of Advanced Glycation end Products(AGEs) and their Receptor(RAGE) in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy

Sho-ichi Yamagishi and Tsutomu Imaizumi

Department of Internal Medicine III, Kurume University School of Medicine

Abstract

There is a growing body of evidence that advanced glycation end product-receptor(AGE-RAGE) interaction elicits oxidative stress generation, thus indicating that it is involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Inhibition of AGE formation or blockade of the downstream RAGE signaling is a promising therapeutic strategy for treatment of

patients with diabetic retinopathy.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 338-345, 2005)

Key words : AGEs, Receptor for AGEs(RAGE), PEDF

I はじめに

近年, Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)やUnited Kingdom Prospective Diabetes Study(UKPDS)などの大規模臨床研究により, 厳格に血糖をコントロールすることで糖尿病血管合併症の発症, 進展を抑制できることが報告¹⁾²⁾された。しかしながら, 様々なインスリン製剤や経口血糖降下剤の使用が可能となった今日においても, 血糖の完全な正常化には困難を要し, 血管合併症をかかえた糖尿病患者の生命予

後は必ずしも改善されていない。事実, 糖尿病腎症, 網膜症は増加の一途を辿っており, 新規透析導入, 後天的失明に至る原因疾患の第1位となっている。したがって, 糖尿病血管合併症の進展機構を明らかにし, 治療のための新しい原理を見出すことは緊急に取り組みねばならない重要課題の一つといえる。

ごく最近, 糖尿病血管合併症のメカニズムを考える上で興味深い報告³⁾⁴⁾がなされた。DCCT 試験終了後の追跡調査の結果によれば, 1型糖尿病の初期に厳格に血糖をコントロールすれば, その後血糖コントロールが次第

別刷請求先 : 〒 830-0011 久留米市旭町 67 久留米大学医学部第3内科学教室 山岸 昌一
(平成 16 年 8 月 2 日受付, 平成 16 年 11 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to : Sho-ichi Yamagishi, M.D. Department of Internal Medicine III, Kurume University School of Medicine. 67 Asahi-cho, Kurume 830-0011, Japan

(Received August 2, 2004 and accepted in revised form November 2, 2004)

に悪くなくても、少なくとも 4 年間は細小血管症の進展が抑制でき、6 年後の頸動脈肥厚度の進展も有意に抑えられるという。このことは、初期の血糖コントロールが不十分であれば、その後厳格に血糖を管理できても合併症の進展を食い止めるのは難しく、ヒトの糖尿病血管症においても‘高血糖の記憶(hyperglycemic memory)’が存在することを示唆している。終末糖化産物(advanced glycation end products: 以下, AGEs)は、血糖コントロールの程度とその持続期間により不可的に生成されることから、AGEs 病因仮説は‘hyperglycemic memory’という現象と最もよく符号する。

本稿では、蛋白糖化の分子動態について解説し、AGEs およびその受容体(receptor for AGEs: 以下, RA-GE)の糖尿病網膜症発症、進展における役割について概説するとともに、網膜症阻止のための新しい治療戦略についても言及する。

II AGEs

1. 概 念

これまでの概念によれば、AGEs は特有の蛍光、褐色化、分子内および分子間での架橋形成といった物理化学的な性状と、マクロファージなどの細胞膜レセプターに認識されるという生物学的な特徴を有するものとされる。ただし、これまでの AGEs 研究の流れから、このような特徴を有さない構造、例えばカルボキシメチルリジン [N-(carboxymethyl)lysine, CML] やピラリン(pyrraline)なども AGEs の概念の中に含めて考えられているのが現状である。現在までに構造が明らかにされた AGEs として、CML やピラリンの他、ペントシジン(pentosidine)、クロスリン(crosslines)、イミダゾロン(imidazolones)などが知られている⁹⁾。しかし、これらは生体内に存在する全 AGEs の数% にすぎず、どのような AGEs 構造が糖尿病血管合併症などの各種慢性疾患の発症・進展に関わっているのかは未だ明らかではない。

2. 生体内 AGEs の生成代謝経路

近年、AGEs はグルコースからだけでなく、グルコースの自動酸化および分解産物(glucose degradation products, GDPs)から生成したグリオキサール(glyoxal, GO)、メチルグリオキサール(methylglyoxal, MGO)、3-デオキシグルコソン(3-deoxyglucosone, 3-DG)などのジカルボニル化合物からも生成されることが報告⁶⁾されている。糖尿病患者血中 MGO および 3-DG レベルは、健常者と比べて有意に高くなっており、また、これらの化合物は分子内にカルボニル基を 2 個有することから、アルデヒド化合物に比べてより反応性が高いとして注目されてきている。しかしながら、我々のこれまでの経験から、これらのジカルボニル化合物よりもむしろグリセルアルデヒドやグリコールアルデヒドなどの α -ヒ

ドロキシアルデヒドの方が、より蛋白質との反応性が高くかつ生成された AGEs はより生物作用が強力であることが明らかとなってきている⁶⁾。

一方、生体内には AGEs の消去系も存在している。Amadoriase はアマドリ化合物をグルコソンとアミノ酸に分解する酵素で、3-DG の生成を阻害する。また、MGO は glyoxalase によって代謝され lactate に分解される。これら消去系の酵素は、高血糖状態によってその活性が抑制されることが報告⁷⁾されており、さらなる AGEs の蓄積が助長される。

III 糖尿病網膜症発症、進展の分子機構とその制御

1. 糖尿病網膜症における壁細胞の役割

糖尿病性血管障害の主座となる細小血管は、血管の内側を覆う内皮細胞とそれを取り囲む周皮細胞から形成されている。従来から周皮細胞は、大中血管における平滑筋細胞に相当すると目され、細小血管における血流調節を担うと考えられてきた。しかし、その生物学的な役割や挙動に関してはほとんど明らかでなかった。

糖尿病網膜症の初期には、網膜周皮細胞の選択的消失(pericyte loss)と局所的な血管新生像である毛細血管瘤(microaneurysm)が特徴的に観察される。また、これらの初期病変に引き続いて、網膜症が進展、増悪することが知られている。これらの事実は、糖尿病網膜症の発症・進展に pericyte loss が深く関わっていることを示唆している。そこで我々は、まず試験管内で内皮細胞と網膜周皮細胞の共存培養系を作製し、周皮細胞が内皮細胞の増殖と機能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

その結果、内皮細胞を周皮細胞上に直接重層すると、内皮細胞の増殖が周皮細胞との共存により有意に抑制されることが見出された^{8)~10)}。しかし、口径 $0.45 \mu\text{m}$ の transwell を介して 2 つの細胞の物理的な接触を阻止すると、周皮細胞による内皮細胞増殖抑制効果は認められなかった。このことから、糖尿病網膜症の初期では pericyte loss によって、周皮細胞による内皮増殖抑制効果が解除され、血管新生傾向に陥るものと考えられる。実際に *in vivo* においても、内皮細胞と周皮細胞は基底膜を介しているものの直接接触しあっており、これら 2 つの細胞の細胞間相互作用の破綻が初期網膜症の発症に関わることが推定される。

次いで、内皮細胞から産生される抗血栓性のプロスタノイドであるプロスタサイクリン産生能に及ぼす周皮細胞の影響について検討した。培地中に分泌されるプロスタサイクリンの安定代謝産物を酵素結合免疫吸着法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 法)で測定すると、内皮細胞におけるプロスタサイクリン産生能は、周皮細胞との共存により高められることが見出され

た⁸⁾⁹⁾。したがって、糖尿病網膜症にみられる網膜周皮細胞の選択的消失が起きると、内皮細胞のプロスタサイクリンの産生能が抑制され、血栓傾向を示すことがわかった。

また、糖尿病患者においては酸化ストレスが亢進しており、血中過酸化脂質のレベルが上昇していることが知られている。そこで、過酸化脂質の一つであるリノール酸ヒドロペルオキシドを作製し、これによる内皮細胞障害が、周皮細胞との共存によりどのような影響を受けるかについて検討した。その結果周皮細胞との共存により、リノール酸ヒドロペルオキシドによる内皮細胞障害が軽減されることが見出された⁸⁾⁹⁾。また、周皮細胞による内皮障害保護作用は、feeder 層として用いた周皮細胞の密度に依存していた。したがって、周皮細胞は血管のトーンスを調節するのみならず、細小血管のホメオスターシスの維持にも重要な役割を演じていることが推定される。

さらに、下層の feeder 層を内皮細胞、上層を周皮細胞として、周皮細胞の増殖に及ぼす内皮細胞の作用について検討した。その結果、2つの細胞の接触、非接触に関係なく周皮細胞の増殖は、内皮細胞との共存により高められた¹¹⁾。したがって、内皮細胞は何らかの分泌性の因子を介して、網膜周皮細胞に働き増殖を促進させることが予測される。

内皮細胞から分泌される血管作動性ペプチドであるエンドセリン1は、周皮細胞の大中血管における counterpart である平滑筋細胞の増殖を促進させる。そこで我々は、エンドセリン1が周皮細胞の増殖促進活性を担う内皮細胞メディエータではないか、と仮説をたて検討を加えた。周皮細胞の単純培養系にエンドセリン1を添加すると、周皮細胞の増殖は添加したエンドセリンの濃度に依存して促進された。また、エンドセリン1に対する中和抗体の添加により、内皮細胞による周皮細胞の増殖促進効果が完全に消失することが見出された。したがって、エンドセリン1は血流や血圧のコントロールだけでなく、パラクリンに働いて周皮細胞の増殖に促進的に作用することが明らかとなった。

エンドセリン1のタイプA受容体は、平滑筋細胞の他に周皮細胞にも存在する。このことから、周皮細胞は内皮細胞から分泌されたエンドセリン1に対する反応系を備えていることが予測される。

以上、pericyte loss により細小血管を構成する内皮-周皮細胞連関が破綻すると、血管新生、血栓傾向、内皮細胞障害が惹き起こされることが推定される。最近、内皮特異的に platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) 遺伝子を欠損させたヘテロ接合体のマウスでは、pericyte loss とともに糖尿病網膜症が進展しやすくなることが報告¹²⁾されてきている。周皮細胞障害の分子機構を明らかにできれば、初期網膜症の発症、進展を抑えられ

るかも知れない。

2. 糖尿病網膜症における AGE-RAGE の役割

ではなぜ、糖尿病網膜症のその初期において pericyte loss が特徴的に惹き起こされるのであろうか。ブドウ糖などの還元糖は蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応し、Schiff 塩基、アマドリ化合物を経て、その後緩徐にはあるが不可逆的な脱水、縮合などの反応を繰り返し特有の蛍光を持つ黄褐色の物質、AGEs を形成することが知られている⁶⁾。慢性的な高血糖状態では、循環血液中や組織で AGEs が促進的に形成、蓄積されることから、我々は AGEs の周皮細胞増殖、障害に及ぼす作用について検討した。

グルコース、グリセルアルデヒド、グリコールアルデヒドなどの様々な還元糖に由来する AGE-bovine serum albumin (AGE-BSA) を試験管内で作製した後、網膜周皮細胞に添加すると、周皮細胞の増殖は添加した各 AGE-BSA の濃度に依存して抑制された。さらに、いずれの AGEs も周皮細胞にアポトーシスを誘導することが見出された¹³⁾¹⁴⁾。これらの AGEs 作用は、AGEs 受容体の一つである RAGE に対するアンチセンス DNA の投与で抑制される一方、RAGE を過剰に発現する細胞系では増強されることから、AGEs は周皮細胞表面の RAGE を介して認識され、周皮細胞にアポトーシスを惹き起こし得るものと考えられた。また、抗酸化剤である N-acetylcysteine の添加で AGEs 作用が抑えられることから、AGE-RAGE を介した細胞内酸化ストレスの亢進が周皮細胞のアポトーシスに関与するものと推定される¹⁵⁾。AGEs は Bcl-2 の発現を抑えることで周皮細胞のアポトーシスを惹き起こすらしい。さらに AGEs による周皮細胞障害は、PGI₂ アナログであるベラプロストナトリウムなどのサイクリック AMP アゴニストによってもほぼ完全に抑制された¹⁵⁾。サイクリック AMP アゴニストは、好中球の膜型 NADPH oxidase の活性化を阻害して、酸化ストレスの産生を抑制することが知られている。AGEs は NADPH oxidase を介して細胞内酸化ストレスを産生させ、サイクリック AMP アゴニストはこの分子の活性化を抑えることで AGE-RAGE の情報伝達系に抑制的に作用しているのかも知れない。

我々は最近、アンジオテンシン II (angiotensin II : 以下、Ang II) や飽和脂肪酸であるパルミチン酸が周皮細胞 RAGE の遺伝子発現を上昇させ、AGEs 作用を増強することを見出した¹⁶⁾。コントロール不良の糖尿病状態では、局所のレニン-アンジオテンシン系の活性化に加えて血中遊離脂肪酸ことに飽和脂肪酸が増加しており、これらが AGEs と相まって pericyte loss に拍車をかけるのであろう¹⁷⁾。Ang II タイプ 1 (AT₁) 受容体阻害剤であるテルミサルタンの投与で周皮細胞における細胞内酸化ストレスの産生亢進が抑えられ、AGEs 作用が軽減される事実は、初期網膜症の治療を考える上で注目さ

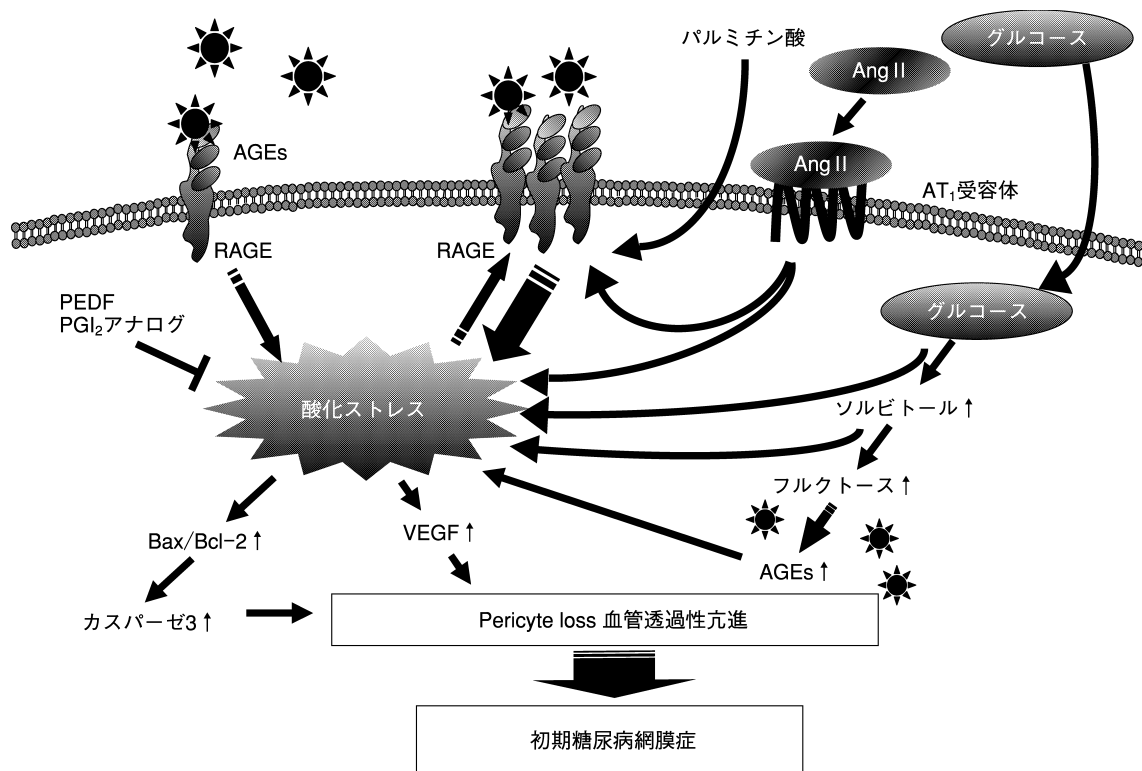


図 1 終末糖化産物(AGEs)による初期糖尿病網膜症発症, 進展の分子機構とその阻止. Ang II: アンジオテンシン II, RAGE: 終末糖化産物受容体, PEDF: pigment epithelium-derived factor, PGI₂: プロスタグランジン I₂, VEGF: 血管内皮増殖因子, AGEs: 終末糖化産物

れる。

AGEs は, 上記のように周皮細胞にアポトーシスを誘導する一方, これらの細胞を活性化させる. 我々はいずれの還元糖に由来する AGEs によっても, 周皮細胞における血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: 以下, VEGF)の遺伝子発現が誘導されることを見出した¹³⁾¹⁸⁾. VEGF は, 血管新生活性とともに強い血管透過性亢進活性を持つため, AGEs によって誘導される VEGF は, 初期網膜症に見られる網膜血管の透過性亢進に関わっているのかも知れない. 糖尿病モデル動物において aminoguanidine を投与することにより AGEs の形成を阻害してやると, 網膜症の初期に見られる blood-retinal-barrier の破綻が抑えられることが報告されており, 血管壁細胞における AGEs を介した VEGF の発現の関与が推定される.

以上, 糖尿病状態で促進的に形成される AGEs は, 周皮細胞に作用して, 壁細胞の機能異常を惹き起こし網膜症の発症, 進展に関わるものと考えられる. 我々は最近, 網膜色素上皮細胞から分泌される pigment epithelium-derived factor (PEDF)が, グルタチオンペルオキシダーゼの活性を高め, 抗酸化的に作用し AGEs による周皮細胞のアポトーシスと機能異常を是正できることを明らかにしてきている¹⁵⁾(図 1).

AGEs が周皮細胞に対して増殖抑制的に作用するのと

は対照的に, いずれの還元糖に由来する AGEs も微小血管内皮細胞の増殖を促進させことが見出された²⁰⁾. この AGE-BSA による内皮細胞の増殖促進効果は, AGE-BSA に対する中和抗体でだけでなく, AGE-RNase A に対する中和抗体によっても阻止されることから, AGEs 蛋白に共通した構造体が血管新生活性を持ち得ることが考えられる.

我々は以前に, 代表的な血管新生誘導因子である低酸素暴露が, 細小血管を構成する血管内皮細胞と周皮細胞における VEGF のオートクリンあるいはパラクリン分泌を促進させ, 内皮細胞の増殖や管腔形成を誘導させることを明らかにしてきた^{21)~23)}. そこで, AGEs による血管新生機構においても血管 VEGF の発現が重要な役割を演じているのではないかと考え検討を加えた.

VEGF には 5 つの mRNA 分子種が存在するが, 微小血管内皮細胞を AGE に曝すと分泌型の VEGF, VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅をコードする mRNA の発現が誘導された. さらに, VEGF に対するモノクローナル抗体の添加で AGEs の血管新生作用がほぼ完全に中和された. このことから AGEs は, オートクリン VEGF の分泌促進を介して血管新生活性を持ち得るものと考えられた. また, 血管新生活性をもち得る AGEs 濃度は, 周皮細胞障害を惹き起こす場合同様 50~100 μg/ml で, 糖尿病患者の血中濃度に匹敵していた. AGEs は隣接す

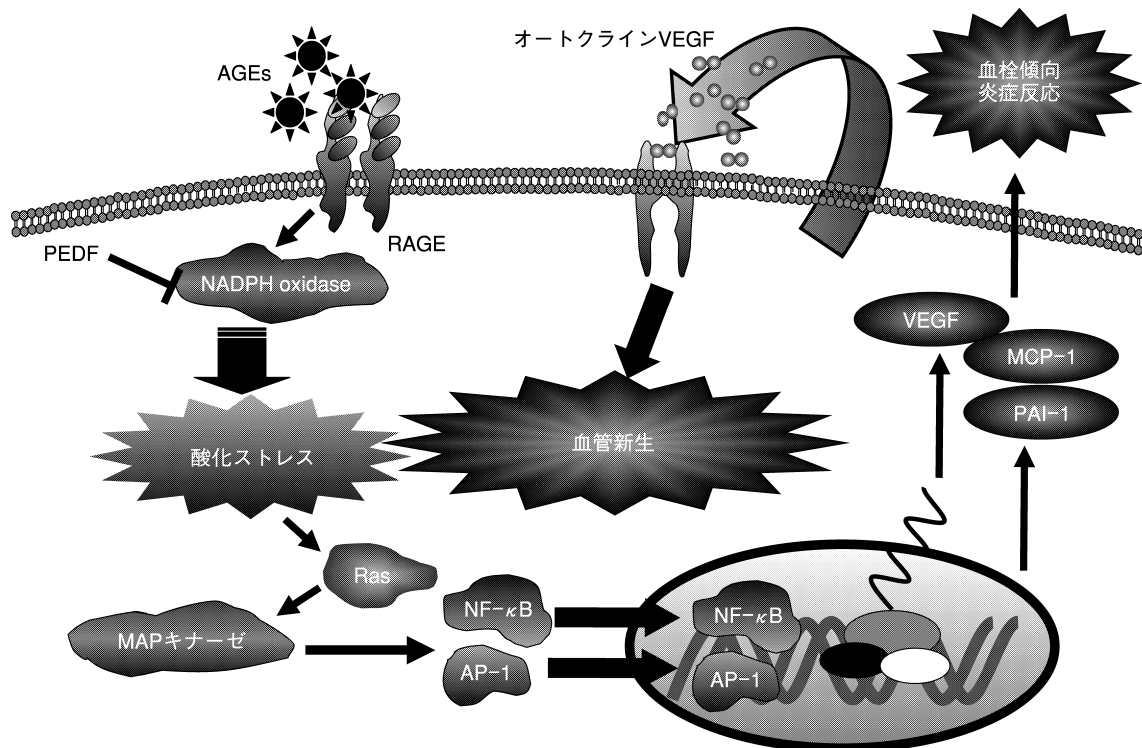


図2 AGEsによる増殖糖尿病網膜症発症，進展の分子機構とその阻止。

る周皮細胞の減少・消失を介して内皮細胞の増殖抑制を解除させるので二重の血管新生活性をもち得ることになる。

さらに，AGEsにより微小血管内皮細胞の管腔形成も促進されることが明らかになった。また，AGEsの管腔形成促進作用も VEGF に対する中和抗体の添加で完全に消失することが示された。RAGE に対するアンチセンス DNA の添加により AGEs の血管新生活性が抑制される一方，RAGE を過剰に発現する内皮細胞で AGEs 作用が増強することから，AGEs は内皮細胞における RAGE を介して認識され，オートクライン VEGF の分泌を介して血管新生作用を持ち得ることが考えられる。我々は最近，RAGE を介して認識された AGEs が細胞内酸化ストレスの産生を亢進させ，転写因子 NF- κ B，AP-1 を活性化させて VEGF mRNA の発現誘導を惹き起こすことを明らかにした。AGE の作用が Ras の阻害剤で抑制されることから，AGEs-RAGE-酸化ストレス-Ras-NF- κ B，AP-1-VEGF の情報伝達経路が推定される²⁴⁾²⁵⁾。実際，高脂血症治療薬であるスタチン製剤の投与で Ras の farnesylation を阻害すると，AGE-RAGE による VEGF 誘導のシグナルが完全に抑えられる。スタチン系の薬剤は，糖尿病血管合併症の治療を考える上で最も実践的な AGEs 情報伝達阻害剤の一つかも知れない。

血管新生活性を有する濃度の AGEs を臍静脈内皮細胞，微小血管内皮細胞に添加すると，プロスタサイクリン産生を抑制し血栓傾向を惹き起こす²⁶⁾²⁷⁾。これらの

AGEs 効果もアンチセンス RAGE DNA でほぼ完全に防止されることから RAGE を介するものと考えられる。したがって，AGEs に曝された場合の内皮細胞変化，すなわち内皮細胞増殖とプロスタサイクリン産生抑制は周皮細胞の共存を欠いた場合の内皮変化と酷似していることが見出された。

さらに，AGEs は RAGE を介して微小血管内皮細胞におけるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター（以下，PAI-1）の *de novo* 合成を促進し，線溶活性を阻害していったん出来た血栓の安定化にも関与することが明らかにされた。この AGEs 効果はプロスタサイクリンアナログであるベラプロストナトリウムなどのサイクリック AMP アゴニストによってほぼ完全に抑制されることから，AGE-RAGE 系の細胞内情報伝達系にサイクリック AMP が抑制的に作用することが推定される²⁶⁾²⁷⁾。以上，AGEs によってもたらされる血栓傾向は網膜局所の虚血や hypoxia を惹き起こし，血管 VEGF の産生亢進をさらに亢進させて網膜症を進展，増悪させる可能性が考えられる。

我々は最近，PEDF が AGEs による NADPH oxidase の活性化を抑え細胞内酸化ストレスの産生亢進を抑制することで RAGE 以下の情報伝達を阻害することを見出した。PEDF により VEGF とともにケモカインの一つである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現も抑えられることから²⁸⁾，PEDF は AGEs シグナルをブロックすることで pericyte loss のみならず，血管透過性の亢進や血管閉塞，血管新生をも抑制し

得るかも知れない(図 2)。

我々は, noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) のモデル動物である Ostuka Long-Evans Tokushima fatty ラット(以下, OLETF ラット)を用いて, 糖尿病網膜症進展, 増悪に及ぼす AGEs の役割についても検討を加えた。その結果, OLETF ラットは 60 週齢においても検眼鏡的には糖尿病性網膜症を発症しなかったが, 網膜電図で検討すると網膜の初期の変化である律動様小波(以下, OP 3)の潜時の延長が観察された。さらに, この OP 3 の延長と血清 AGEs レベルとは正の相関を示した。また, 血清 AGEs レベルは網膜における VEGF mRNA レベルとも相関したことから, 糖尿病網膜症においてはその病初期から AGEs によって VEGF が誘導され, 機能的な異常を来しているものと思われる³⁰⁾。また, ごく最近我々は, IDDM, NIDDM いずれの患者群においても血中の AGEs レベルが網膜症のステージと相関することを明らかにしてきている³¹⁾³²⁾。さらに, 硝子体液中の AGEs レベルが VEGF と正に相関する一方, 抗酸化活性とは逆相関することも見出し始めている。

IV おわりに

以上のことから, AGE-RAGE 系は細胞内酸化ストレスの産生亢進を介して, 網膜血管構成細胞に作用し, 糖尿病網膜症の発症, 進展に関わるものと考えられる^{33)~35)}。AGEs 形成阻害剤や抗 AGEs 抗体, RAGE mRNA に相補的なアンチセンス DNA, RAGE や VEGF に対する中和抗体, プロスタサイクリンアナログやスタチンなどの AGEs 情報伝達阻害剤や PEDF などの抗酸化活性を有する血管保護因子などの手段を用いて, AGE-RAGE の情報伝達経路をどこかの段階で断ち切ることで, 糖尿病網膜症の進展, 増悪を阻止することが可能となるかも知れない。

文 献

- 1) **The Diabetes Control and Complications Trial Research Group** : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329 : 977—986, 1993.
- 2) **UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group** : Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk complications in patients with type 2 diabetes(UKPS 33). *Lancet* 352 : 837—853, 1998.
- 3) Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N Engl J Med* 342 : 381—389, 2000.
- 4) **Writing Team For The Diabetes Control And Complications Trial/Epidemiology Of Diabetes Interventions And Complications Research Group** : Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy : The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 290 : 2159—2167, 2003.
- 5) **Takeuchi M, Yamagishi S** : Alternative routes for the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (TAGE) *in vivo*. *Med Hypo* 63 : 453—455, 2004.
- 6) **Yamagishi S, Takeuchi M, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi T** : Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Int J Clin Pharm Res* 23 : 129—134, 2003.
- 7) **Yamagishi S, Imaizumi T** : Diabetic vascular complications : Pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des* (in press)
- 8) **Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H** : Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability, and protect against lipid peroxide-induced injury, of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190 : 418—425, 1993.
- 9) **Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Fujimori H, Yamamoto H** : AGE and endothelial cells. *J Arterioscler Thromb* 4 : 141—143, 1998.
- 10) **Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA** : An active form of transforming growth factor- β was produced by co-cultures of ECs and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 4544—4548, 1989.
- 11) **Yamagishi S, Hsu CC, Kobayashi K, Yamamoto H** : Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 191 : 840—846, 1993.
- 12) **Hammes HP, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, et al** : Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 51 : 3107—3112, 2002.
- 13) **Yamagishi S, Hsu CC, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, et al** : Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products. *Biochem Biophys Res Commun* 21 : 681—687, 1995.
- 14) **Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Koga K, Sasaki N, et al** : Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290 : 973—978, 2002.
- 15) **Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T,**

- Takeuchi M, Makita Z** : Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal pericytes from advanced glycation end product-induced injury through its anti-oxidative properties. *Biochem Biophys Res Commun* 296 : 887—882, 2002.
- 16) **Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Takeuchi M, Makita Z** : Beraprost sodium, a prostaglandin I₂ analogue, protects against advanced glycation end products-induced injury in cultured retinal pericytes. *Molecular Medicine* 8 : 546—550, 2002.
 - 17) **Yamagishi S, Okamoto T, Amano S, Inagaki Y, Koga K, Koga M**, et al : Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. *Mol Med* 8 : 178—183, 2002.
 - 18) **Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Inoue H, Takeuchi M**, et al : Angiotensin II-type 1 receptor interaction up-regulates vascular endothelial growth factor messenger RNA levels in retinal pericytes through intracellular reactive oxygen species generation. *Drugs Exp Clin Res* 24 : 75—80, 2003.
 - 19) **Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M**, et al : Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human cultured mesangial cells. *J Biol Chem* 277 : 20309—20315, 2002.
 - 20) **Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I**, et al : Advanced glycation endproducts-driven angiogenesis *in vitro*. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272 : 8723—8730, 1997.
 - 21) **Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamamoto H** : Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270 : 28318—28324, 1995.
 - 22) **Yamagishi S, Kawakami T, Fujimori H, Yonekura H, Tanaka N, Yamamoto Y**, et al : Insulin stimulates the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *Microvasc Res* 57 : 329—339, 1999.
 - 23) **Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Fujimori H, Sakurai S, Tanaka N**, et al : Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 79 : 501—509, 1999.
 - 24) **Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Koga K, Abe R**, et al : Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J* 16 : 1298—1230, 2002.
 - 25) **Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Takeuchi M, Kikuchi S**, et al : Incadronate disodium inhibits advanced glycation end products-induced angiogenesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 297 : 419—424, 2002.
 - 26) **Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu CC, Yamamoto H** : Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Lett* 384 : 103—106, 1996.
 - 27) **Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H** : Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41 : 1435—1441, 1998.
 - 28) **Inagaki Y, Yamagishi S, Okamoto T, Takeuchi M, Amano S** : Pigment epithelium-derived factor prevents advanced glycation end products-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in microvascular endothelial cells by suppressing intracellular reactive oxygen species generation. *Diabetologia* 46 : 284—287, 2003.
 - 29) **Segawa Y, Shirao Y, Yamagishi S, Higashide T, Kobayashi M, Katsuno K** : Upregulation of retinal vascular endothelial growth factor mRNAs in spontaneously diabetic rats without ophthalmoscopic retinopathy. *Ophthalmic Res* 30 : 333—339, 1998.
 - 30) **Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, Takeuchi M, Yamamoto H, Makita Z** : Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation end products are correlated to severity of microvascular complications in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 17 : 16—21, 2003.
 - 31) **Koga K, Yamagishi S, Takeuchi M, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T** : Serum levels of glucose-derived advanced glycation end products (AGE) are associated with severity of diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without renal dysfunction. *Int J Clin Pharmacol Res* 22 : 23—27, 2002.
 - 32) **Nishikawa T, Edelstein D, Du X, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y**, et al : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 404 : 787—790, 2000.
 - 33) **Yamagishi S, Takeuchi M, Unoki H** : Can we identify genes for susceptibility to diabetic microangiopathies using stroke-prone spontaneously hypertensive rat models? *Medical Hypotheses* 56 : 510—512, 2001.
 - 34) **Yamagishi S, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M** : Leptin induces mito-

chondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 274 : 25096—25100, 2001.

35) **Yamagishi S, Edelstein D, Du XL, Brownlee M** : Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50 : 1491—1494, 2001.
