

## 総説

## 緑内障性視神経障害における神経細胞死機構

村上 晶, 沖坂 重邦

防衛医科大学校眼科学教室

## 要約

実験緑内障モデルや緑内障患者の網膜神経節細胞にアポトーシスが観察されていることから、緑内障性視神経障害にプログラム細胞死と類似した細胞死機構が関与していることが推定されている。神経栄養因子の枯渇、虚血、グルタミン酸の過剰分泌、一酸化窒素代謝異常などが視神経障害に関与していることが疑われているが、これらのいずれもが神経細胞の自死機構を始動し得る因子であることが明らかになっている。異なる因子によりもたらされる死のシグナルがたどり着く共通したスイッチの一つがミトコンドリアに存在し、癌遺伝子 Bcl-2 やその関連遺伝子産物によりコントロールされていることが明

らかになっている。近年、分子生物的手法を駆使した神経細胞生物学は、細胞死のメカニズムを分子レベルで明らかにすると同時に、細胞死のプログラムに直接に介入する手段を持ちつつあり、これらの緑内障研究への導入は緑内障性視神経障害の進行抑制、修復、そして再生への新しい治療への道を開くものとなるであろう。(日眼会誌 102: 645—653, 1998)

キーワード: 緑内障, プログラム細胞死, アポトーシス, ミトコンドリア, Bcl-2

## A Review

## Neuronal Cell Death Mechanism in Glaucomatous Optic Neuropathy

Akira Murakami and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

## Abstract

Apoptosis of retinal ganglion cells has been observed in experimental glaucomatous models and human glaucomatous eyes in recent pathological studies. It seems that retinal ganglion cells in glaucomatous optic neuropathy die by a process similar to programmed cell death. Deprivation of neurotrophic factors, ischemia, chronic elevation of glutamate, and disorganized NO metabolism are suspected to be factors affecting neuronal loss in glaucoma, and most of these factors are known to activate the mechanism of cellular suicidal death. One of the common switches for the death mechanism seems to

be in the mitochondria and to be controlled by Bcl-2 family proteins. A major goal of neuronal cell death research in glaucomatous neuropathy is to identify its molecular components and mechanisms of regulation. This information will lead to therapeutic agents that can modulate the cell death process in the treatment of glaucomatous neuropathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 645—653, 1998)

Key words: Glaucoma, Programmed cell death, Apoptosis, Bcl-2, Mitochondria

## I 緒言

近年、実験緑内障モデルや緑内障患者の網膜神経節細胞にアポトーシスが観察されていることから、緑内障性

視神経障害にプログラム細胞死と共通した細胞死機構が関与していることが推定されている<sup>1)~4)</sup>。一般に、発生の過程や個体での細胞の新旧交代を通じて個体の生存を保証している細胞死は、細胞内に備えられている自殺機構

別刷請求先: 359-8513 埼玉県所沢市並木 3-2 防衛医科大学校眼科学教室 村上 晶  
(平成10年1月14日受付, 平成10年6月10日改訂受理)

Reprint requests to: Akira Murakami, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College,  
3-2 Namiki Tokorozawa-shi, Saitama-ken 359-8513, Japan

(Received January 14, 1998 and accepted in revised form June 10, 1998)



の活性化により起こると考えられており、プログラム細胞死(programmed cell death)<sup>5)</sup>と記載される。アポトーシス(apoptosis)<sup>6)</sup>は形態学的に定義される細胞死の一つの形で、しばしばプログラム細胞死において認められる。アポトーシスは細胞死のプロセスが細胞膜の構造が保持されたまま進行し、ほとんど炎症反応を伴わずに自ら細かく分断し隣接する細胞に取り込まれていくのが特徴で、細胞膜の小胞(bleb)の形成、核と細胞質の濃縮、アポトーシス小体などが電子顕微鏡により観察される。細胞膜の変化が早期から起き、細胞内の内容物をまき散らし炎症を引き起こす壊死(ネクローシス,necrosis)としばしば対比される<sup>6)</sup>。

網膜を含めた神経組織においてイオンチャンネルや受容体(リセプター)とレセプターが刺激された後の細胞内応答反応のネットワークは、興奮の伝導と伝達のみならず、細胞の生存や分化に深く関与している。さらに、細胞接着蛋白質群、サイトカインや神経栄養因子を介する細胞間の情報伝達機構も神経細胞の生存や分化に欠かせないことが明らかになってきている。そして、細胞レベルでの死もまた、このような情報伝達機構の中でコントロールされている。

神経変性疾患や虚血、外傷後などで神経細胞が少なからずアポトーシスの形態をとって死に至ること明らかになってきており<sup>7)~9)</sup>、生理的な細胞死のみならず、感染や虚血により障害を受けたり、遺伝情報に異常を来した細胞の除去にもプログラム細胞死と同じ、あるいは類似したメカニズムが働いていると考えられている。また、細胞死の分子レベルでの知見が蓄積されるにつれ、プログラム細胞死、あるいはしばしばこれとほぼ同義語として用いられるアポトーシスの概念も変容しつつある<sup>10)</sup>。

網膜の発生過程における生理的な細胞死<sup>11)</sup>、そして病的な細胞死<sup>12)~16)</sup>のいずれにもアポトーシスが観察されており、眼科領域でも大きな関心が持たれている。ヒト緑内障や実験緑内障において観察されている視神経乳頭の変形と細胞外基質の変化、神経軸索流の停滞と軸索障害、さらに近年報告されているグルタミン酸<sup>17)</sup>や一酸化窒素(NO)代謝の変化<sup>18)</sup>はどのように、あるいはどの程度、神経節細胞死に関与しているのであろうか。本論文では緑内障における網膜神経節細胞の細胞死と、これにかかわると考えられる主要な因子について総説を試みた。

## II 緑内障におけるアポトーシスの観察とその意義

アポトーシスは組織や細胞により形態学、生化学的現象のあらわれ方が変化するため、その検出は複数の方法による検討を行い、総合的に判断する必要があるとされている。通常の組織病理標本では光学顕微鏡的観察による核の濃縮やDNA結合色素を用いた観察などからある程度可能であるが、ネクローシスとの厳密な区別は電子

顕微鏡的観察を併せて行う必要がある<sup>6)</sup>。

アポトーシスを起こしている細胞、あるいは組織からDNAを分離して電気泳動を行うと、約180塩基対(bp)の整数倍から成るDNA断片の梯子状配列(DNAラダー)が観察されることが多い<sup>19)</sup>。しかし、アポトーシスが少数の細胞でしか起きていない時や、段階的に起こるDNA断片化が数kbpにまでしか至らないままの細胞も少なからずあり、このような場合は通常の電気泳動では観察が困難である<sup>20)</sup>。核内のDNA断片化を*in situ*で検出するterminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling method(TUNEL法)<sup>21)</sup>を用いると、光学顕微鏡を用いて比較的容易にアポトーシスを起こしている細胞を検出することができる。本法はアポトーシスのDNA断片化に伴い出現する多数のフリーのDNA 3'OH端を標識し、検出する方法であるが、ネクローシスを起こしている細胞などでも検出感度に至るDNA断裂が存在することがあるために判別に注意を要する<sup>22)</sup>。アポトーシスを起こしている核は均一に濃染され、ネクローシスや標本の処理・保存が不適切な場合は核の周辺が濃く、中央は薄く染色されることが多いために判別可能なことも多い。我々はヘマトキシリン・エオシン染色による細胞構造の観察を組み合わせることにより十分な特異性が得られ、定量的な観察に耐え得ると考えている。

Quigleyら<sup>1)</sup>はサルを用いた実験緑内障モデルにおいて、TUNEL法と電子顕微鏡的観察から網膜神経節細胞のアポトーシスを証明した。DNA電気泳動によるDNA断片化は検出されなかったが、その理由の一つとしてアポトーシスを起こしている細胞が少数であるため、検出感度に足る低分子化したDNA断片量が組織に存在しない点を挙げている。Garcia-Valenzuelaら<sup>2)</sup>はラットの輪部静脈の焼灼によって作製した還流障害による眼圧上昇・緑内障モデルにおいて、同様に網膜神経節細胞層にTUNEL陽性細胞を認めている。プログラム細胞死はしばしば転写や翻訳を阻害することにより抑制されるが、このGarcia-Valenzuelaらの実験では蛋白合成阻害剤サイクロホスファマイドの投与によりTUNEL陽性細胞数の減少が観察されている。Okisakaら<sup>3)</sup>は続発緑内障で失明した摘出眼球で、同様にTUNEL法と電子顕微鏡所見から網膜神経節細胞にアポトーシスが起きていることを報告しているが、高齢者では非緑内障でも網膜神経節細胞のアポトーシスが観察されることを指摘している。Kerriganら<sup>4)</sup>は原発開放隅角緑内障(POAG)剖検眼において、TUNEL陽性の出現頻度が対照眼に比べて約15倍と有意に高いことを報告した。同時に糖尿病および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の剖検眼においても陽性細胞が多いことを報告している。ヒト緑内障の組織標本において、TUNEL陽性細胞の出現頻度は平均で網膜神経節細胞層の細胞10,000当たり1.76であり、アポトーシ



スが一般におおよそ 24 時間で完了する現象であることと、TUNEL 法で検出可能な時間的ウィンドウを考慮すると、典型的な POAG における網膜神経節細胞の消失速度から期待される観察頻度とよく一致すると考察している。

これらの報告から、緑内障眼での網膜神経節細胞の消失の少なくとも一部はアポトーシスの形をとる細胞死であることは疑いがないと考えられる。しかし、緑内障の病初期から末期までにわたって典型的なアポトーシスの形態を呈する細胞死が網膜神経節細胞の消失の主体であるかについては検討の余地が残る。また、電子顕微鏡による観察により緑内障眼網膜神経節の段階的なアポトーシスの形態を捕えることができて<sup>11,33</sup>、細胞死機構の全体からみると観察されているのは、最終段階に近い、ごく短い時間的ウィンドウの中での現象であり、細胞の障害から細胞死機構起動に至るまでの間の微細構造変化は未だ明らかではない。多数症例の病理学組織学的な検討や適切な動物モデルによる観察が必要であると思われる。

### III 神経細胞死と緑内障性視神経症障害

#### 1. 篩状板部軸索障害と神経栄養因子供給障害

緑内障性視神経障害の原因を、主に篩状板部での網膜神経節細胞軸索障害とする仮説は現在最も有力なものの一つである<sup>23)~25)</sup>。神経細胞が生存していくにはシナプスを介した神経栄養因子が供給される必要があり、その枯渇は細胞死を引き起こす<sup>26)27)</sup>。

神経栄養因子の代表的なものとして神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) がある。NGF の神経生存化作用については頸部交感神経節細胞を用いた多くの研究があり、少なくともこの神経細胞には発生の過程のみならず、成体においても必要であることが示されている。緑内障においても網膜神経節細胞の消失は、軸索障害により上位中枢からの神経栄養因子の逆行性供給不足が強く疑われてきた (神経栄養因子枯渇説)。ラットの視神経を切断すると、切断後数日から網膜神経節細胞の細胞死が起こり、典型的なアポトーシスが観察されている<sup>28)29)</sup>。同様の現象はサルやウサギを用いた実験でも確認されている<sup>1)</sup>。切断直後<sup>30)31)</sup>あるいは切断後 5~6 日以内<sup>31)</sup>に脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を硝子体内に投与することにより細胞死の抑制が観察されている。その他の神経栄養因子や成長因子においても細胞死抑制効果のあるものが知られている<sup>32)33)</sup>。生理的条件での成熟した網膜神経節細胞の生存の BDNF がどの程度必要であるかは未だ明らかにされていないが、その受容体である TrkB は網膜神経節細胞に存在していることが示されている<sup>34)</sup>。緑内障眼にアポトーシスが観察されたことは、この神経栄養因子枯渇説を支持する根拠の一つになっている。神経栄養因子の枯渇によるアポトーシスの細胞内の情報伝達の解明はまだ

限られたものであるが、c-Jun の活性化が明らかにされている<sup>35)</sup>。

眼の発生過程で、網膜神経節細胞は急速にプログラム細胞死によりその数を減らす<sup>36)</sup>。シナプス形成前の網膜発生初期の細胞死は、一時的に NGF が neurotrophin receptor p 75 (p 75) を介して活性化されることが観察され<sup>37)</sup>、BDNF によりその細胞死は抑制されることが観察されている<sup>38)</sup>。

PAOG にみられるような慢性の眼圧負荷による機械的ストレスは視神経乳頭部の構造変化を介して、あるいは直接に神経膠細胞 (グリア) や結合組織に変化をもたらすことが確認されている<sup>39)~44)</sup>。I 型コラーゲン、IV 型コラーゲンの増加、基底膜成分の沈着、プロテオグリカンの沈着といった細胞外基質成分の変化は、機械的ストレスに反応したそれぞれの遺伝子の発現レベルでの変化や、これを修飾する酵素の発現の変化によると考えられる。細胞接着分子の一つであるインテグリンは多彩なイソフォームを持つ細胞表面に存在する蛋白質で、細胞を取り巻く環境の変化を細胞に伝えることにより、増殖や分化、あるいは細胞死を支配する細胞内刺激伝達に関与していると考えられている。視神経乳頭部におけるインテグリンの組成の変化<sup>45)</sup>が星状膠細胞 (アストロサイト) や線維芽細胞の変化にどのように関与しているかは明らかにされていないが、このように、再構築された視神経乳頭の構造やグリアの変化は、神経軸索にとっては必ずしも有利ではない疑いがある。

グリアは神経組織においては軸索障害に対して種々の神経栄養因子 (NGF, BDNF など) を分泌し、細胞保護へと働くことが観察されているが、さまざまな負荷が過重である場合には神経膠細胞の機能障害による神経節細胞死が起こり得るであろう。前述した p 75 を介するアポトーシスはミクログリアに結合した NGF により起こることが観察されているが<sup>46)</sup>、神経軸索切断や神経変性疾患においてはミクログリアの活性化が観察されており、またしばしばこのような環境では成熟した神経細胞が p 75 を発現していることが知られている<sup>47)</sup>。緑内障視神経障害には、このような細胞の生死に関する細胞内シグナル伝達と細胞間シグナル伝達、そしてそれらのクロストークのネットワークの混乱が起こっていることが推定される。

#### 2. グルタミン酸代謝異常

脳や網膜虚血の研究から、遅発性の細胞障害に興奮性アミノ酸、特にグルタミン酸の過剰分泌が関与していることが明らかになっている。グルタミン酸は網膜の神経シナプスの神経伝達物質として重要な働きをしている。グルタミン酸受容体はイオンチャンネル型とメタボトロピック型があり、網膜にもその大半が存在し<sup>48)49)</sup>、網膜特異的リセプターも明らかにされている<sup>50)</sup>。イオンチャンネル型受容体は、一般にグルタミン酸のアゴニストであ



る N-methyl-D-aspartate (NMDA) に感受性の NMDA 受容体と非感受性の非 NMDA 受容体に大別される。神経細胞に対するグルタミン酸毒性は NMDA 受容体の活性化と、それによる  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入が中心的な役割を果たしていると考えられているが<sup>51)</sup>、非 NMDA 受容体もまた遅発性神経細胞死に関与していることが知られている<sup>52)</sup>。

実験的緑内障の後部硝子体中やヒト緑内障の眼内液中に、グルタミン酸濃度が正常の約 2 倍に上昇していると報告<sup>17)</sup>されている。また、同濃度のグルタミン酸の曝露により網膜神経細胞の消失が実験モデルで示されている<sup>53)</sup>。グルタミン酸の代謝異常が緑内障神経障害の主たる病因になり得るかは疑問があるが、これが神経障害の悪化を招く因子である可能性は高いと考えられている。脳組織においては、グルタミン酸の過剰分泌により神経細胞はアポトーシス、ネクローシスいずれの形もとることが報告されている。低濃度の NMDA の負荷では培養網膜神経節細胞はプログラム細胞死を起こすことが観察されている<sup>54)</sup>。しかし、前述の動物を使ったグルタミン酸負荷実験<sup>48)</sup>における細胞死の詳細な形態学的記載はみられない。生理的な状態の神経組織では、細胞外のグルタミン酸の濃度は L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) により主に規定されていると考えられる<sup>55)</sup>。GLAST は網膜においてミュラー細胞、星状膠細胞に、また視神経においては星状膠細胞に存在することが観察されている<sup>56)57)</sup>。In vitro の観察では、グルタミン酸の負荷により星状膠細胞の GLAST の活性はアップレギュレートされる<sup>58)</sup>。培養下でミュラー細胞は網膜神経節細胞に対するグルタミン酸毒性を減少させる保護作用があることが示されている<sup>59)</sup>。続発性緑内障<sup>60)</sup>や実験緑内障サル眼<sup>61)</sup>において、glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現増加が星状膠細胞とミュラー細胞に観察されており、緑内障網膜のグリアが分子レベルでは大きく変化している可能性が推定されている。

生体内のグリアでグルタミン酸受容体がどのように働いているかは未だ不明な点が多いが、視神経のグリアには非 NMDA 受容体の一つである amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体の発現が観察され、グルタミン酸毒性の感受性<sup>62)</sup>があることが示されている。

緑内障の硝子体中グルタミン酸の上昇は、神経節細胞の破壊に伴うグルタミン酸やグルタミン酸合成酵素の漏出であるのか、神経シナプスの異常を反映したものか、あるいはグリアの代謝異常を反映したものか、また、視神経のレベルでの軸索障害とどのように関連しているか関心が持たれる。

### 3. 一酸化窒素(NO)代謝異常

NO は拡散の容易さと多彩な生理活性が特徴である<sup>63)</sup>。NO は NO 合成酵素 (NOS) により L-アルギニンの

グアニシドが酸化され、L-シトルリンへと転換されるときに生成され、容易に拡散により極めて迅速に標的分子に働く。その典型的な標的分子はグアニールシクラーゼで、その活性を刺激し、cyclic guanosine monophosphate (cGMP) を産生させる。cGMP の濃度上昇により細胞内のカルシウムイオンが低下し、血管の平滑筋細胞は弛緩する。すなわち、NO は強力な血管拡張作用をもつ。また NO は、生理的条件下では神経組織において低濃度存在し神経伝達物質として働いている。

NOS の発見当初、神経組織において、神経細胞には神経型 NOS (NOS 1) が、グリアには誘導型 NOS (NOS 2) が、血管内皮には内皮型 NOS (NOS 3) が存在すると考えられていたが、必ずしも細胞特異性がないことが明らかになっている。NOS 2 遺伝子発現はリポ多糖類やサイトカインにより起こり、酵素が誘導されるのに対し、NOS 1 と NOS 3 はそれぞれ、神経細胞や血管内皮の構成成分として存在しているため構成型 NOS と総称される。

構成型 NOS と誘導型 NOS の相違点は、その発現様式に加え、活性の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性にある。構成型 NOS は  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇により直ちに活性化されるが、その作用時間は短い。一方、誘導型 NOS は発現までに時間を要するが、大量の NO を産生し細菌や腫瘍細胞に対する防御機構の重要な役割をもつ。しかし、NOS の発現の遷延化、NO の過剰産生は障害を招く。生理的な状態では NOS 1 は神経伝達物質として中枢神経での記憶などの高次機能に、末梢神経では心血管系、消化器などでの神経調節に関与している。NOS 3 は、ミリスチル化とパルミトレイル化の二つの脂質修飾を受ける。その修飾により NOS 3 は膜に固定され、膜のカベオラに局在していることが明らかになっている。血管内皮においては伸展などの物理的刺激に対応していることが推定されている。

脳や網膜虚血においてみられるグルタミン酸の放出に伴う神経毒性の一部は、NMDA 型受容体を介する NOS 1 の活性化による NO の発生によるとされている。過剰に産生された NO は、アポトーシスあるいはネクローシスのいずれかの形の細胞死を引き起こすことが示されている<sup>64)</sup>。

Neufeld ら<sup>18)</sup>は緑内障視神経乳頭部の NOS 発現増加を免疫組織学的に観察している。彼らによると、神経乳頭部の星状膠細胞で NOS 1、NOS 3 の増加を、また視神経乳頭部血管内皮で NOS 3 の増加が観察されている。血管内皮での NOS 3 の発現増加は、血管拡張、血流量の増加を促し細胞保護へと反応しているとも考えられるが、その意義は不明である。緑内障にみられる NOS の発現の増加は、局所において NO 発生増加を示唆するものであるが、この NO が細胞障害性に働き得るものかは今後の検討を要する。視神経切断後のラット網膜神経節細胞には NO は生存支持へと働いているとする報告<sup>65)</sup>や免疫組織化学的観察から、NOS は網膜神経節細胞死に大きな



役割は持っていないと推定している報告<sup>66)</sup>がある。

緑内障において慢性的に高濃度となった NO は、視神経軸索に大量に存在するミトコンドリア内の非ヘム電子伝達系内酵素などの活性低下を招いたり、ミトコンドリアから漏れ出る  $O_2^{\cdot -}$  と反応し、障害作用の強いペルオキシ亜硝酸 ( $ONOO^-$ ) 生成が起こり得ることが推定される。 $ONOO^-$  は SH 基の酸化、脂質過酸化やチロシンなどの芳香族アミンのニトロ化により細胞障害を起こす。NO は局所の酸素分圧により毒性が大きく変わることが知られている。組織が虚血状態にあると NO は  $ONOO^-$  となる。視神経乳頭内の血管分布が分葉的であるために分水嶺に当たるような低灌流領域の存在が想定されているが、拡散性が強い NO が視神経の特定の部に障害を強く起こしている可能性も推定される。

神経節細胞にはいくつかの細胞型が存在するが、各細胞型の種類により高眼圧に対する感受性の差があることが指摘されている。多くは大型の神経節細胞あるいは太い軸索をもつ神経節細胞が緑内障早期に消失する傾向が観察されている<sup>67)~69)</sup>。グルタミン酸受容体の発現の違いによるグルタミン酸毒性に対する感受性の差<sup>70)</sup>、圧の加重に伴う物理的負荷に伴う軸索流の障害そのものによる感受性の差、あるいは二次的な細胞障害因子に対する感受性の差があるのか明確な答えはない。太い軸索は免疫組織化学的な検討から L 型ニューロフィラメント (NFL) が多く発現しているが、Alzheimer 病や ALS においても NFL の多い神経細胞の障害が起きやすいことが観察されている。少なくとも、これらの神経変性疾患の病態には NO による組織障害が関与していることが強く疑われているが、アミノ末端近くにチロシンが固まって存在する NFL は、ニトロ化による障害を受けやすいことが神経細胞障害の感受性と関連しているのかも知れない<sup>63)</sup>。ALS で TUNEL 陽性網膜神経節細胞が多く認められていること<sup>4)</sup>も、この点が関与していると思われる。

#### IV 細胞死機構の研究の現況と将来

最近の有力な細胞死の回路の仮説を組み合わせてみると、アポトーシスとネクローシスは細胞を死へと導く機構を共有していて、これにミトコンドリアが深く関与していることが明らかになってきている<sup>66)67)</sup>(図 1)。ネクローシスの形をとるかアポトーシスを呈するかは、細胞内 adenosine triphosphate (ATP) レベルに規定されている可能性が高い<sup>72)73)</sup>。活性酸素、栄養因子の枯渇、受容体を介する自殺シグナルなどの外的ストレスはさまざまな経路をへてミトコンドリアに変化を起こす。その変化については、膜透過性異常 permeability transition (PT) 説<sup>74)</sup>、アポトーシス誘導物質による膜孔の形成説、外膜の物理的な断裂説などの説がある<sup>75)</sup>。いずれにしても、これらの変化が引き金となり、ミトコンドリア蛋白であるシトクローム C<sup>76)</sup> やアポトーシス誘導因子 (apoptosis in-

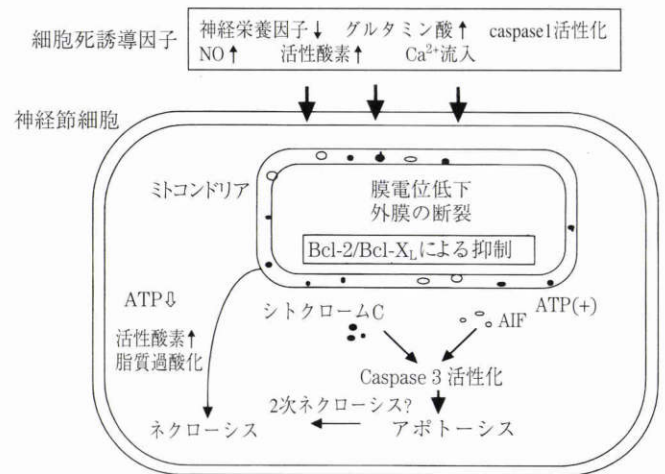


図 1 細胞死の経路。

種々の細胞障害により細胞死の誘導因子が発生し、細胞死のプログラムが開始される。その実行にはミトコンドリアを通過する経路をとり、ミトコンドリアからシトクローム C と apoptosis inducing factor (AIF) が細胞質に漏出するとアデノシン 3 リン酸 (ATP) を消費してアポトーシスが実行されると考えられている。アポトーシスの実行に当たる蛋白分解酵素の代表として caspase 3 がある。Bcl-2 や Bcl-XL はミトコンドリアのレベルでこの経路を制御している。細胞質内の ATP レベルが低下している場合はアポトーシスの形をとらずネクローシスの形をとる。

ducing factor, AIF) と呼ばれているプロテアーゼの前駆体が細胞質に漏出する。その結果、カスパーゼ 3 に代表される細胞死実行プロテアーゼが活性化されることが観察されている<sup>77)</sup>。Bcl-2 や Bcl-x はミトコンドリアからのシトクローム C の漏出を制御していて、アポトーシスの発生を抑制すると考えられている<sup>71)78)</sup>。また、培養神経細胞のアポトーシス初期に観察されているミトコンドリアの腫脹 (swelling) と外膜の断裂は Bcl-x により抑制されることが観察されている<sup>78)</sup>。すべての神経細胞がこのようにミトコンドリア依存性の高い細胞死機構を持っているのかは明らかではないが、緑内障性視神経障害の病因を考える上で示唆に富む仮説であると思われる。

網膜神経節細胞の軸索は視神経乳頭部に集約される形で存在し、篩状板でその直径が狭められ、軸索内には狭い管の中で引き伸ばされたような形で、高密度のミトコンドリアが観察される<sup>79)</sup>。緑内障性視神経障害では、このような解剖学的にミトコンドリアに負荷のかかりやすい背景に起こっている可能性が十分考え得る。臨床的に眼圧がコントロールされてもしばしば緑内障が進行するのは、篩状板部の再構築が不完全なためにグリアからの保護が行きわたりにくくなり、神経栄養因子の供給低下、グルタミン酸、NO の負荷により容易にミトコンドリア障害が引き起こされるためとも疑われる。一つの神経節細胞の中で、まず軸索の一部のミトコンドリアのみが変化を起こし、やがてこれが細胞全体へと波及し細胞死が起



こるであろうことも想像される。適切な緑内障動物モデル眼から得られるアーチファクトのない良好な組織病理標本を用いた視神経軸索のミトコンドリア微細構造の観察は、答えの一部を導き出してくれるものと思われる。

機能障害を起こしている細胞の機能を回復させて生き残らせるためには、細胞死の経路で後戻りのできなくなるポイントの前で細胞保護をはかることが有効な治療となる。また、急性の障害では、時間を稼ぎながら根治的な治療に取りかかったり、状況の改善をはかる方法が考えられる。前述したように、網膜神経細胞におけるグルタミン酸毒性に関する多くの研究が網膜虚血モデルを使われて行われている。Kikuchiら<sup>80)</sup>が、ビタミン B<sub>12</sub> が網膜神経に対するグルタミン酸毒性を抑制することを示しているように、病態の違いはあるとしても、すでに確立された神経保護研究のアプローチの多くが緑内障研究へ導入可能である。

一方、種々の原因により過剰に細胞死機構が働いていると考えられる状況においては、細胞死機構の実行そのものを抑制する方法が有効となるはずである。カスパーゼ酵素活性の抑制はアポトーシスを抑制するであろうが、ネクロシスへと至る経路には及ばないであろう。しかし、Bcl-2 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは視神経切断によるアポトーシスの抑制がみられることから<sup>81)</sup>、bcl-2 や bcl-x を一時的に過剰発現させる試みには期待が持てる。興味深いことに、この Bcl-2 は神経細胞の分化誘導や再生とも深く関わっていることが明らかになっている<sup>82)</sup>。分子生物学的なアプローチを用いたマウスやラットといった動物種の緑内障モデルは、確実に分子レベルでの病態解明を進められると思われる。開放隅角緑内障のトランスジェニックモデルの作製も、家族性 POAG 遺伝子ミオシリンの発見とクローニング<sup>83)84)</sup>により現実的なものとなりつつある。また、単純化した神経細胞死の実験モデル<sup>85)</sup>を用いた研究から、細胞死のメカニズムに共通した重要な因子の抽出が進むものと思われる。このようなモデルに緑内障眼における機械的な要因や循環状態を、生化学的あるいは分子生物学的に加工した「生化学的緑内障モデル」の開発が望まれる。

#### 文 献

- 1) Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ: Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 774—786, 1995
- 2) Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC: Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61: 33—44, 1995.
- 3) Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, Ito J: Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jpn J Ophthalmol* 41: 84—88, 1997.
- 4) Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME: TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115: 1031—1035, 1997.
- 5) Lockhin RA, Williams CM: Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10: 643—649, 1964.
- 6) Kerr JFR, Wyllie AHR, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239—257, 1972.
- 7) Raff MC, Barres BA, Burne JF, Cole JF, Ishizaki Y, Jacobson MD: Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262: 695—700, 1993.
- 8) Linnik M, Zobrist R, Hatfield M: Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24: 2002—2008, 1993.
- 9) Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK: Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 147: 1575—1583, 1995.
- 10) Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J, Mignotte B: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9: 1277—1278, 1995.
- 11) Yong RW: Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229: 367—373, 1984.
- 12) Buchi ER: Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: An electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 55: 605—613, 1992.
- 13) Chang GQ, Hao Y, Wong F: Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11: 595—605, 1993.
- 14) Lolley RN, Rong H, Craft CM: Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 358—362, 1994.
- 15) Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R: Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 974—978, 1994.
- 16) Chang CJ, Lai WW, Edward DP, Tso MO: Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans. *Arch Ophthalmol* 113: 880—886, 1995.
- 17) Dreyer EB, Zurakowski D, Schumert RA, Podos SM, Lipton SA: Elevated glutamate levels in the



- vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. Arch Ophthalmol 114: 299—305, 1997.
- 18) **Neufeld AH, Hernandez R, Gonzalez M**: Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. Arch Ophthalmol 115: 497—503, 1997.
  - 19) **Wyllie AH**: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555—556, 1980.
  - 20) **Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M**: Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. Biotechniques 15: 1032—1040, 1993.
  - 21) **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sason SA**: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 11: 493—501, 1992.
  - 22) **Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y**: A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. Neuroreport 7: 61—64, 1995.
  - 23) **Quigley H, Anderson DR**: The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. Invest Ophthalmol Vis Sci 15: 606—616, 1976.
  - 24) **Minckler DS, Bunt AH, Johanson GW**: Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 33—50, 1977.
  - 25) **Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE**: Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. Arch Ophthalmol 99: 635—649, 1981.
  - 26) **Brade YA**: Trophic factors and neuronal survival. Neuron 2: 1525—1534, 1989.
  - 27) **Lewin GR, Barde YA**: Physiology of neurotrophins. Annu Rev Neurosci 19: 289—317, 1996.
  - 28) **Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma S**: Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. J Neurobiol 25: 431—438, 1994.
  - 29) **Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ**: Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. J Neurosci 14: 4368—4374, 1994.
  - 30) **Mey J, Thanos S**: Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats *in vivo*. Brain Res 602: 304—317, 1993.
  - 31) **Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang GM, Bray GM, Aguayo AJ**: Effect of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1632—1636, 1994.
  - 32) **Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, Berry M**: Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. Neurosci Lett 76: 157—162, 1987.
  - 33) **Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M**: Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3 and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative *in vivo* study. Invest Ophthalmol Vis Sci 37: 489—500, 1996.
  - 34) **Cellerino A, Kohler K**: Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. J Comp Neurol 386: 149—160, 1997.
  - 35) **Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr**: Altered gene expression in neurons during programmed cell death: Identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. J Cell Biol 127: 1717—1727, 1994.
  - 36) **Rakic P, Riley KP**: Overproduction and elimination of retinal axons in the fetal rhesus monkey. Science 219: 1441—1444, 1983.
  - 37) **Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA**: Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. Nature 383: 166—168, 1996.
  - 38) **Frade JM, Bovolenta P, Martinez-Morales JR, Arribas A, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A**: Control of early cell death by BDNF in the chick retina. Development 124: 3313—3320, 1997.
  - 39) **Hernandez MR, Andrzejewska WM, Neufeld AH**: Changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head in primary open-angle glaucoma. Am J Ophthalmol 109: 180—188, 1990.
  - 40) **Morrison J, Dorman-Pease ME, Dunkelberger GR, Quigley HA**: Optic nerve head extracellular matrix in primary optic atrophy and experimental glaucoma. Arch Ophthalmol 108: 1020—1024, 1990.
  - 41) **Hernandez MR**: Ultrastructural immunocytochemical analysis of elastin in the human lamina cribrosa: Changes in elastic fibers in primary open angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 2891—2903, 1992.
  - 42) **Fukuchi T, Sawaguchi S, Hara H, Shirakashi M, Iwata K**: Extracellular matrix changes of the optic nerve lamina cribrosa in monkey eyes with experimentally chronic glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 230: 421—427, 1992.
  - 43) **Hernandez MR, Ye H, Roy S**: Collagen type IV gene expression in human optic nerve heads with primary open-angle glaucoma. Exp Eye Res 59: 41—52, 1994.
  - 44) **Quigley HA, Dorman-Pease ME, Brown AE**: Quantitative study of collagen and elastin of the



- optic nerve head and sclera in human and experimental glaucoma. *Curr Eye Res* 10:877—888, 1991.
- 45) **Elmer SG, Elmer VM**: The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 696—701, 1996.
  - 46) **Frade JM, Brade YA**: Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20: 35—41, 1998.
  - 47) **Kreutzberg GW**: Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312—318, 1996.
  - 48) **Hartveit E, Brandstatter JH, Enz R, Wassle H**: Expression of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR 1 to 7) in the rat retina. An *in situ* hybridization study on tissue sections and isolated cells. *Eur J Neurosci* 7: 1472—1483, 1995.
  - 49) **Zhang C, Hammassaki-Britto DE, Britto LR, Duvoisin RM**: Expression of glutamate receptor subunit genes during development of the mouse retina. *Neuroreport* 8: 335—340, 1996.
  - 50) **Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, et al**: Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR 6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 268: 11868—11873, 1993.
  - 51) **Sucher NJ, Wong LA, Lipton SA**: Redox modulation of NMDA receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  flux in mammalian central neurons. *Neuroreport* 1: 29—32, 1990.
  - 52) **Mosinger JL, Price MT, Bai HY, Xiao H, Wozniak DF, Olney JW**: Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the *in vivo* adult mammalian retina. *Exp Neurol* 113: 10—17, 1991.
  - 53) **Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB**: Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1618—1624, 1996.
  - 54) **Dreyer EB, Zhang D, Lipton SA**: Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA mediated cell death. *Neuroreport* 6: 942—955, 1995.
  - 55) **Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W**: Structure, expression, and functional analysis of a  $\text{Na}^{(+)}$ -dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10955—10959, 1992.
  - 56) **Derouiche A, Rauen T**: Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporters (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreaction in retinal glia: Evidence for coupling of GLAST and GS in transmitters clearance. *J Neurosci Res* 42: 131—143, 1995.
  - 57) **Lehre KP, Davanger S, Danbolt NC**: Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res* 744: 129—137, 1997.
  - 58) **Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A**: Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 8: 261—265, 1996.
  - 59) **Kitano S, Morgan J, Caprioli J**: Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 63: 105—112, 1996.
  - 60) **Hiscott PS, Grierson I, Trombetta CJ, Rahi AH S, Marshall J, McLeod D**: Retinal and epi-retinal glia—an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 68: 698—707, 1984.
  - 61) **Tanihara H, Hangai M, Sawaguchi S, Abe H, Kageyama M, Nakazawa F, et al**: Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115: 752—756, 1997.
  - 62) **Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan L, Miledi R**: Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8830—8835, 1997.
  - 63) **Beckman JS, Koppenol WH**: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271 (Cell Physiol 400): C1421—C1437, 1996.
  - 64) **Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton S**: Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7162—7166, 1995.
  - 65) **Huxlin KR, Bennett MR**: NADPH diaphorase expression in the rat retina after axotomy/a supportive role for nitric oxide. *Eur J Neurosci* 7: 2226—2239, 1995.
  - 66) **Patel JI, Gentleman SM, Jen LS, Garey LJ**: Nitric oxide synthase in developing retinas and after optic tract section. *Brain Res* 761: 156—160, 1990.
  - 67) **Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR**: Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 484—491, 1991.
  - 68) **Glovinsky Y, Quigley HA, Pease ME**: Foveal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 395—400, 1993.
  - 69) **Vickers JC, Schumer RA, Podos SM, Wang RF, Riederer BM, Morrison JH**: Differential vulnerability of neurochemically identified subpopulations of retinal neurons in a monkey model of glaucoma.



- Brain Res 680: 23—35, 1995.
- 70) **Dreyer EB, Pan ZH, Storm S, Lipton SA**: Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuroreport* 5: 629—631, 1994.
- 71) **Kroemer G**: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine* 3: 614—616, 1997.
- 72) **Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C**: Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 378: 107—110, 1996.
- 73) **Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y**: Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57: 1835—1840, 1997.
- 74) **Zoratti M, Szabo I**: The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139—176, 1995.
- 75) **Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X**: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 145—157, 1996.
- 76) **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD**: The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132—1136, 1997.
- 77) **Susin SA, Zamzai N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A**, et al: Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptosis protease. *J Exp Med* 184: 1331—1341, 1996.
- 78) **Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT**: Bcl-x<sub>L</sub> regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 28: 627—637, 1997.
- 79) **Hollander H, Makarov F, Stefani FH, Stone J**: Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Res* 27: 296—309, 1995.
- 80) **Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A**: Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B<sub>12</sub> analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 848—854, 1997.
- 81) **Bonfanti L, Strettoi E, Chierzi S, Cenni MC, Liu XH, Martinou J-C**, et al: Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *J Neurosci* 16: 4186—4194, 1996.
- 82) **Chen DF, Schneider GE, Martinou JC, Tonegawa S**: Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385: 434—439, 1997.
- 83) **Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SLF**, et al: Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275: 668—670, 1997.
- 84) **Kubota R, Noda S, Wang Y, Minoshima S, Asakawa S, Kudo J**, et al: A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 41: 360—369, 1997.
- 85) **Ellerby HM, Martin SJ, Ellerby LM, Maiem SS, Rabizadeh S, Salvesen GS**, et al: Establishment of a cell-free system of neuronal apoptosis: Comparison of premitochondrial, mitochondrial, and postmitochondrial phases. *J Neurosci* 17: 6165—6178, 1997.