

第 105 回 日本眼科学会総会 宿題報告Ⅲ

眼と神経保護

網膜神経細胞死の分子機構と神経保護

吉村 長久

信州大学医学部眼科学教室

共同研究者

太田 浩一, 片井 直達, 秋元 正行, 黒岩さち子, 渋谷 宏人, 黒川 徹
 新井 純, 宮原 照良, 臥雲 郷子(信州大学医学部眼科学教室)
 菊池 孝信(信州大学機器分析センター)

研究協力者

二階堂敏雄(信州大学大学院臓器発生制御学), 小澤 敬也(自治医科大学),
 内田 浩二(名古屋大学農学部), 淀井 淳司(京都大学ウイルス研究所),
 中山智加男(住友製薬株式会社)

要 約

網膜色素変性, 網膜剝離, 加齢黄斑変性, 緑内障など数多くの難治性眼科疾患において, 網膜神経細胞のアポトーシスが大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた。アポトーシスは, 「死のメッセージ」発現を伴う能動的な細胞死であり, そのため, その「死のメッセージ」を同定し, 発現を阻害すれば, 網膜神経細胞死を阻止できる可能性がある。

本研究では, まずラット網膜虚血・再灌流障害モデルを用いて, このモデルが網膜神経細胞のアポトーシスのモデルとして使用できることを確認した。次いで, DNA マイクロアレイ法を用いてこのモデルにおける「死のメッセージ」の系統的解析を試みた。DNA マイクロアレイ法では総数で約 200 の遺伝子の発現変動が認められた。それらの遺伝子群は, ① 転写因子群, ② 細胞周期関連遺伝子群, ③ 活性酸素消去系遺伝子群, ④ 分子シャペロン遺伝子群に大別された。これらの遺伝子群の網膜虚血・再灌流障害における意義について検討を加えた。さらに, 網膜の神経細胞がその種類を問わず均一な「死のメッセージ」を発現するのか, それとも細胞の種類が異なれば異なった「死のメッセージ」を発現するのかを検討した。

その結果, ラット網膜虚血・再灌流モデルでは, 再灌流時に発生する活性酸素によって生成される過酸化脂質が引き金となってアマクリン細胞に転写因子である c-Jun と細胞周期関連遺伝子である cyclin D1 の発現が起

こり, 細胞周期回転が G1 期で頓挫することが細胞死の一つのメカニズムであることがわかった。一方, 水平細胞では, 細胞周期回転を阻害する p16^{INK4}が発現しており, この細胞は, アポトーシスではなく, ネクローシスで死んでいくことがわかった。このように, 網膜の神経細胞の種類が異なれば, 同一の障害に対しても異なった「死のメッセージ」を使用して細胞が死んでいくことが明らかとなった。また, アポトーシスの抑制は, ネクローシスにつながる可能性があることがわかった。したがって, アポトーシスを抑制するのであれば, その経路のできるだけ上流での抑制が理にかなっていることになる。実際, 網膜・虚血再灌流障害における神経細胞死を上流でブロックすると考えられる内因性活性酸素消去剤である thioredoxin には, 網膜神経保護作用があり, thioredoxin を投与するとアマクリン細胞に認められた c-Jun, cyclin D1 の異常発現は抑制された。

次に, 一般に細胞死に大きな役割を果たしていると考えられている caspase と網膜神経細胞死の関係についてラット網膜虚血・再灌流モデル, 遺伝性網膜変性を発症する RCS ラットについて検討し, caspase-1 遺伝子をもたない caspase-1 knockout mouse の光障害について研究した。また, アポトーシス抑制遺伝子の代表である Bcl-xL の RCS ラット網膜変性に対する神経保護作用を adeno-associated virus を用いた遺伝子治療が可能であるかを検討した。網膜視細胞層では caspase-1 が,

別刷請求先: 390-8621 松本市旭 3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 吉村 長久

(平成 13 年 8 月 13 日受付, 平成 13 年 9 月 18 日改訂受理)

Reprint requests to: Nagahisa Yoshimura, M.D., Ph.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

(Received August 13, 2001 and accepted in revised form September 18, 2001)

内顆粒層では caspase-3 が、そして神経節細胞層では caspase-2 が重要な役割を果たしていることがわかった。網膜虚血・再灌流障害、RCS ラットのいずれにおいても、caspase 阻害剤を投与することによって網膜障害を軽減でき、caspase 阻害剤は神経保護作用をもつことがわかった。また、caspase-1 knockout mouse では wild type mouse と比較して網膜光障害が有意に保護されていた。Bcl-xL の遺伝子治療により、RCS ラットの遺伝性網膜変性を軽減することができた。

本研究により、網膜神経細胞死の分子機構の一端を明らかにするとともに、メカニズムに立脚した実験的神経保護治療法を開発することができた。(日眼会誌 105 : 884-902, 2001)

キーワード：網膜、神経細胞死、アポトーシス、神経保護、DNA マイクロアレイ解析、転写因子、細胞周期関連遺伝子、活性酸素、過酸化脂質、カスパーゼ

A Review

Retinal Neuronal Cell Death : Molecular Mechanism and Neuroprotection

Nagahisa Yoshimura

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

In retinitis pigmentosa, retinal detachment, age-related macular degeneration, and glaucoma, retinal neuronal cells are damaged by a common mechanism, apoptosis. Because apoptosis is an active process that requires de novo expression of a “death message”, this process can be controlled by inhibiting the expression of the “death message”.

We first studied whether a retinal ischemia-reperfusion model can be used as a model for retinal neuronal apoptosis. In the retinal ischemia-reperfusion injuries, typical features of apoptosis, including TUNEL-positive cells, DNA ladder formation, and ultrastructural features of apoptosis were found. Using the model, systematic research to identify the “death message” was done by DNA microarray analysis. About 200 messages were found to be up- or down-regulated during the process of retinal ischemia-reperfusion. These genes were divided into four groups : (1)transcription factor genes, (2)cell cycle-related genes, (3)reactive oxygen scavenger genes and (4)molecular chaperon genes. The possible roles of such genes in neuronal apoptosis following retinal ischemia-reperfusion injury were studied.

In the model, reactive oxygen species produced by reperfusion was found to generate lipid peroxides and induced up-regulation of a transcription factor, c-Jun, that further induced aberrant expression of cell cycle-related genes such as cyclin D1 in amacrine cells. However, because no controlled expression of cell cycle-related genes takes place in retinal neurons, amacrine cells died by a G1 arrest mechanism. On the other hand, horizontal cells never expressed cyclin D1 and the cells were found to die by necrosis. The study revealed a possible mechanism of retinal neuronal apoptosis and it also be-

came apparent that different types of neurons use different “death messages”. Furthermore, the possibility that inhibition of a “death message” sometimes induces necrosis rather than apoptosis was shown. This means that we need to try inhibition of the death mechanism upstream rather than downstream. Administration of thioredoxin, an endogenous reactive oxygen species that blocks generation of lipid peroxides and thus inhibits the death process upstream, was found to be neuroprotective against retinal ischemia-reperfusion injury. Aberrant expression of c-Jun and cyclin D1 was down-regulated by the treatment.

Possible roles of caspases were also studied by using the ischemia-reperfusion injury, RCS rat, and excessive light exposure damage in wild type and caspase-1 deficient mice. Also, application of adeno-associated virus that carries Bcl-xL was tested to find possible neuroprotective effects on RCS rats. Our studies showed that caspase-1 played a more important role in the retinal photoreceptors and caspase-3 was important in neurons in the inner nuclear layer. Caspase-2 was found to be a major caspase in the retinal ganglion cell layer. In agreement with the findings, caspase-1 deficient mice showed less prominent light damage than wild type mice. Gene therapy by Bcl-xL was effective to protect retinal photoreceptor damage in RCS rats. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 884-902, 2001)

Key words : Retina, Neuronal cell death, Apoptosis, Neuroprotection, DNA microarray analysis, Transcription factors, Cell cycle-related genes, Reactive oxygen species, Lipid peroxides, Caspase

I 緒 言

眼球の透明性を回復させることは、眼科学が長年にわたって取り組んできた大きな課題である。近年の白内障手術、硝子体手術の進歩により、眼球の透明性を回復させることは、かなり満足のいくレベルで達成可能となった。しかし、人口の高齢化に伴い、黄斑疾患や緑内障を代表とする網膜や視神経の障害による視機能障害が増加してきている。このような病態の多くでは、その原因を問わず網膜の神経細胞がアポトーシスによって死ぬことが視機能障害の大きな原因であると考えられている^{1)~8)}。

アポトーシスとは、細胞が能動的に「死のメッセージ」を発現して死んでいくことをいう。これに対し、ネクローシスは他の細胞によってもたらされる受動的な細胞死であり、両者は概念的にはかなり異なったものである⁹⁾¹⁰⁾。理屈のうえでは、アポトーシスの過程で発現する「死のメッセージ」を同定し、その発現を阻害することができれば、細胞死を抑制できることになる⁹⁾¹⁰⁾。このような観点から、本研究では、動物モデルを用いて網膜神経細胞死の過程で発現する「死のメッセージ」を検索することにより、細胞死のメカニズムを検討するとともに、できるだけそのメカニズムに立脚した神経保護治療法の開発を試みた。

神経細胞死のメカニズムについては、グルタミン酸毒性をはじめ、さまざまな仮説が提唱されている^{11)~14)}。網膜も中枢神経系の一部であり、その神経細胞だけが一般的な神経細胞死のメカニズムからかけ離れたものであるとは考えにくい。しかし、網膜の神経細胞を主な対象に眼科医の目で実際の病気を想定しながら網膜神経細胞死のメカニズムを少々検討してみることは無駄ではないと考える。

II ラット網膜虚血・再灌流障害モデルでのアポトーシスの証明

網膜神経細胞死の研究には、動物モデルの適切な使用が不可欠である。そして、どのようなモデルを使用するにもそのモデルにおいてアポトーシスによる神経細胞死がどのような時間経過で発生しているかを明らかにする必要がある。今回の検討では、種々の動物モデルを使用した。使用頻度の一番高かったラット網膜・虚血再灌流モデルを代表にアポトーシスの証明を行った。一般にアポトーシスの検出には、① TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling method (TUNEL) 染色、② 核 DNA の限定分解、③ 電子顕微鏡による超微形態観察の3つの方法が使用されている。まず、ラット網膜虚血・再灌流障害がこれらのすべての判定基準を満たしていることを確認することを目的に実験を行った。

図1に TUNEL 陽性細胞出現の時間経過を示す。TUNEL 染色とは、核 DNA の分解が発生していることを組織切片上で検出する方法である¹⁵⁾。この実験では、再灌流9時間後には網膜神経節細胞層、24時間後には内顆粒層に TUNEL 陽性細胞が認められ、48時間後には外顆粒層に陽性細胞が出現している。経時変化を詳しく検討するために、単位面積当たりの陽性細胞数を定量化してグラフに示すと、図2のように、まず神経節細胞層、次に内顆粒層、そして最後に外顆粒層と網膜の内層から外層に向かって TUNEL 陽性細胞が出現していく状況が良くわかる。網膜虚血・再灌流障害では神経細胞にアポトーシスが発生していること、そして、網膜内層から外層へと細胞死が進展していくことをうかがわせる所見が得られた。次に、再灌流12時間後の神経網膜から核 DNA を抽出して電気泳動にかけると、図3の

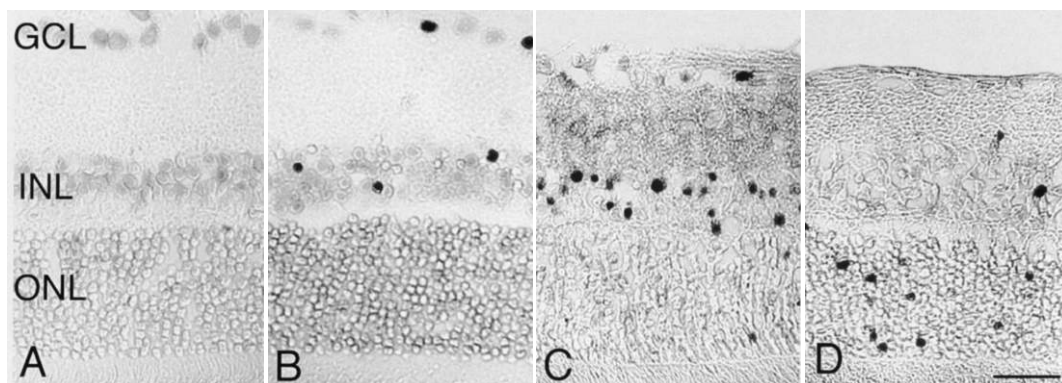


図1 ラット網膜虚血・再灌流障害で出現する TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling method (TUNEL) 陽性細胞。

- A : 虚血・再灌流障害負荷なしでは TUNEL 陽性細胞は認められない。
 B : 再灌流9時間後、網膜神経節細胞層と内顆粒層に陽性細胞が認められる。
 C : 24時間後、内顆粒層の陽性細胞が増加する。
 D : 48時間後、外顆粒層に陽性細胞が認められる。
 GCL : 網膜神経節細胞層, INL : 内顆粒層, ONL : 外顆粒層。
 文献16より許可を得て転載。

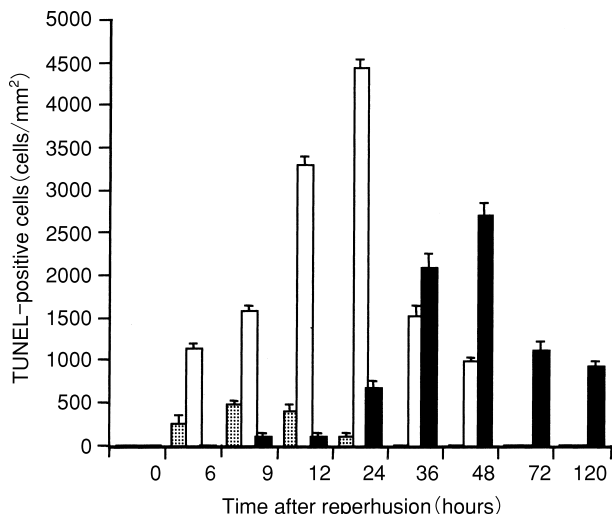


図 2 ラット網膜虚血・再灌流障害で出現する TUNEL 陽性細胞の経時変化。

TUNEL 陽性細胞は、まず網膜神経節細胞層に出現し、内顆粒層、外顆粒層の順に遅い時間帯で認められる。

GCL：網膜神経節細胞層，INL：内顆粒層，ONL：外顆粒層。

文献 16 より許可を得て転載。

■：GCL □：INL ▨：ONL

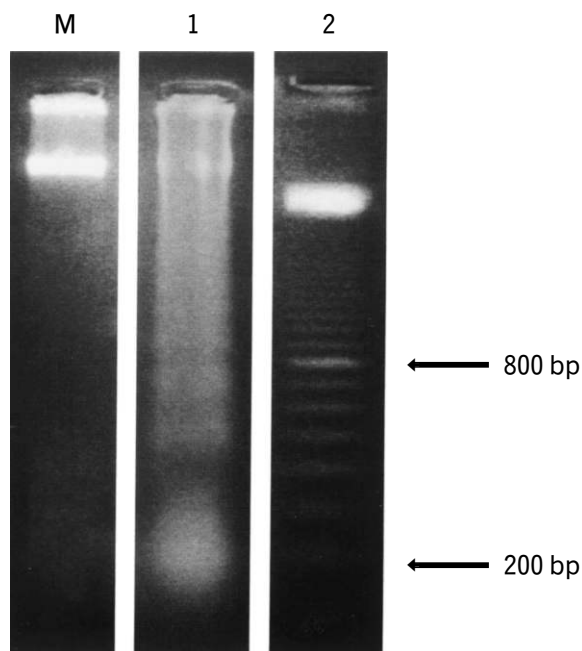


図 3 ラット虚血・再灌流網膜より回収した核 DNA の電気泳動。

再灌流 24 時間後の網膜から DNA を回収、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。約 200 bp の移動度を示す DNA 断片が検出される。

M：マーカー，1：虚血再灌流網膜，2：正常網膜。

文献 16 より許可を得て転載。

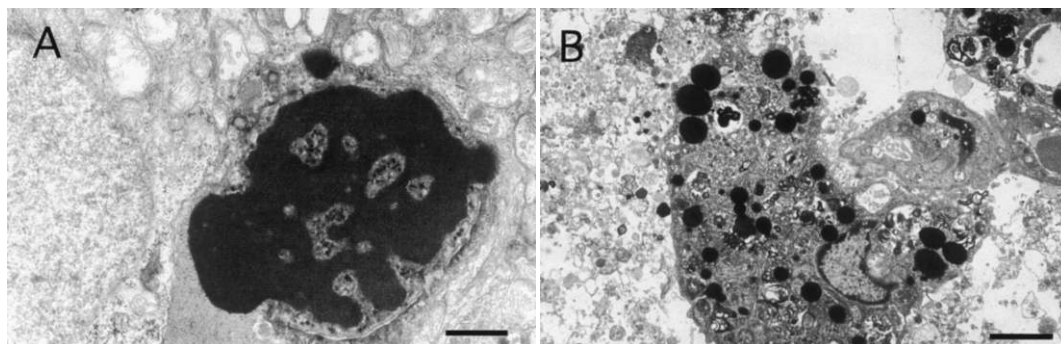


図 4 ラット虚血・再灌流網膜の超微形態像。

A：再灌流 24 時間後の内顆粒層。濃縮した電子密度の高い核をもつ細胞が認められる。バーは 1 μm

B：再灌流 48 時間後の内網状層。大きな胞体を持ち、数多くのアポトーシス小体を貪食した細胞が認められる。バーは 1 μm

文献 16 より許可を得て転載。

ように約 200 bp のバンドが検出された。一般にアポトーシスでは核 DNA が 180 bp の限定分解が発生することが知られている。このことからラット網膜虚血・再灌流障害ではアポトーシスが発生していることが考えられる。電子顕微鏡による超微形態観察でも図 4 に示すように網膜内顆粒層に電子密度の高い核を持ち、一部アポトーシス小体を伴った典型的なアポトーシスの像が認められた。また、内網状層には、多数のアポトーシス小体を貪食したマクロファージが認められた(図 4 B)。こ

のように、ラット網膜虚血・再灌流障害では TUNEL 染色を判定基準にしても、核 DNA の電気泳動からも、また、電子顕微鏡による形態観察でもアポトーシスが発生していることが明らかとなった¹⁶⁾。

III ラット網膜虚血・再灌流障害で発現が変化する遺伝子の DNA マイクロアレイ法による検索

このように、ラット網膜・虚血再灌流障害では典型的

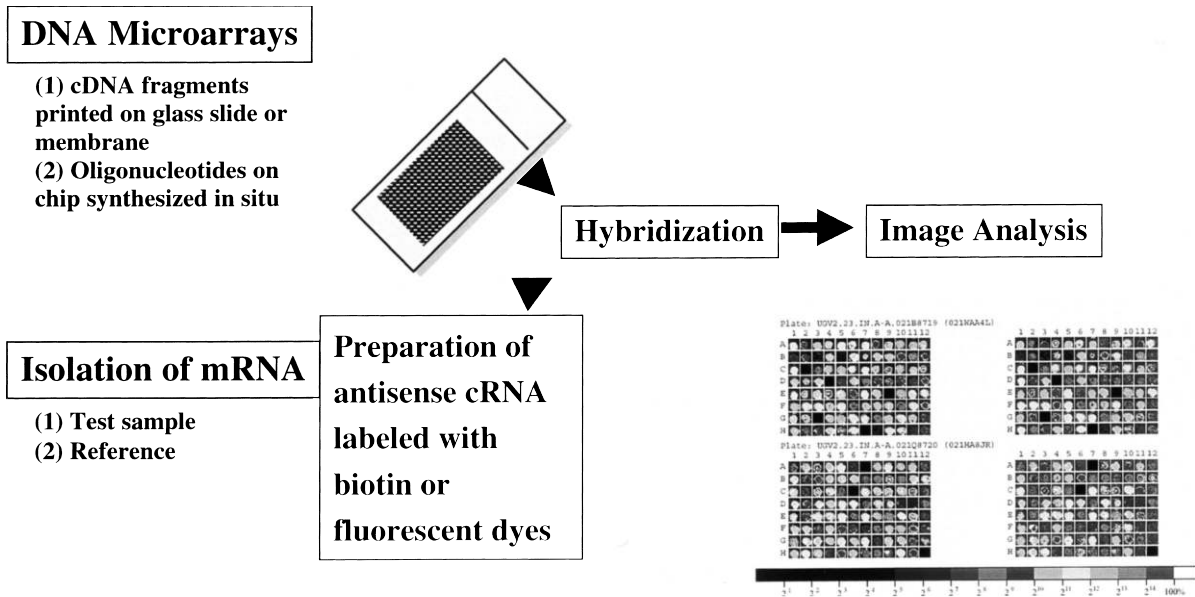


図 5 DNA マイクロアレイ解析の概略。

なアポトーシスが発生することが明らかとなった。そこで、このモデルを材料に遺伝子発現変化を系統的に検索することを考えた。前述のように、アポトーシスとは能動的な細胞死であり、その過程では「死のメッセージ」が発現する。このメッセージを検出することができれば、網膜神経細胞のアポトーシスのメカニズムの一端を明らかにできる可能性がある。この「死のメッセージ」を検出するにはいろいろな方法が考えられる。例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) レベルの変化の検出には Northern blotting が有用である。もちろん RNA protection assay でも reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法でも同様の検討ができる。蛋白レベルでの変化は、western blotting でも enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法でも、あるいは免疫組織化学的な方法でも検出可能であろう。しかし、いずれの方法もいわゆる候補遺伝子を決めてその発現変化を検討するという制約を受ける。候補遺伝子研究では、ある特定の遺伝子に注目する理由付けが明確でない場合もあろうし、特定の遺伝子の役割を過大評価したり、あるいは、もっと重要な遺伝子に十分な注意を払っていない可能性がある。

このような方法論的な欠陥を避けるためには、多数の遺伝子について発現変化を片っ端から検討することが必要であるが、実際にはそのような作業を行うことは不可能に近かった。ところが、最近、DNA マイクロアレイ法が利用できるようになって状況は一変した。DNA マイクロアレイとは、ガラス板やナイロン膜の上に数千個の遺伝子断片をスポットしてあるもので、例えば虚血・再灌流障害前後の網膜から抽出した mRNA を標識してマイクロアレイと反応させることにより、一度に数千個の遺伝子発現変化を定量的に解析することができ

る¹⁷⁾¹⁸⁾。図5に、マイクロアレイ解析の概略を示す。

虚血負荷なしのラット網膜と虚血・再灌流45分後の網膜から mRNA を抽出し、Affimetrix 社製 RAT U 34 マイクロアレイを用いて解析を行った。このマイクロアレイでは、約8,000の遺伝子発現を解析することができる。我々ヒトの遺伝子の総数が約30,000個であることを考えると、8,000個の遺伝子についての検討はかなり系統的なものということになる¹⁹⁾²⁰⁾。図6に、今回の解析で得られた遺伝子発現変化の scatter gram を示す。一つの×印が一つの遺伝子を示している。2本の線の間にある数多くの遺伝子は、その発現が虚血・再灌流負荷によっても2倍以内の増減に留まっているもので、この2本の線の範囲から逸脱している遺伝子は、発現に2倍以上の変化が認められたことを示している。この実験では、数多くの遺伝子発現が変動し、約200個の遺伝子でその発現変動が2倍以上であった。図7は、発現変化の大きさと遺伝子の数を示している。もちろん、発現変動の大きい遺伝子の数は少ないが、かなりの数の遺伝子の発現に変動が起きていることが良くわかる。

マイクロアレイ解析では、未知遺伝子についても検討することが可能である。アレイ上にスポットされている遺伝子には、既知のものだけではなく、expressed sequence tag (EST) といって部分構造だけがわかっている遺伝子断片もある。この EST をクローニングすれば、未知遺伝子を同定することも可能であり、さらに、その機能解析が進めば神経保護作用をもつ新たな蛋白の発見につながる可能性もある。現在、教室ではいくつかの EST についてクローニング作業が進行中である。

大変おおざっぱではあるが、既知遺伝子の遺伝子発現変化をまとめてみると、大きく4群の発現が大きく変動することがわかった。それらは、表1に示すように、転

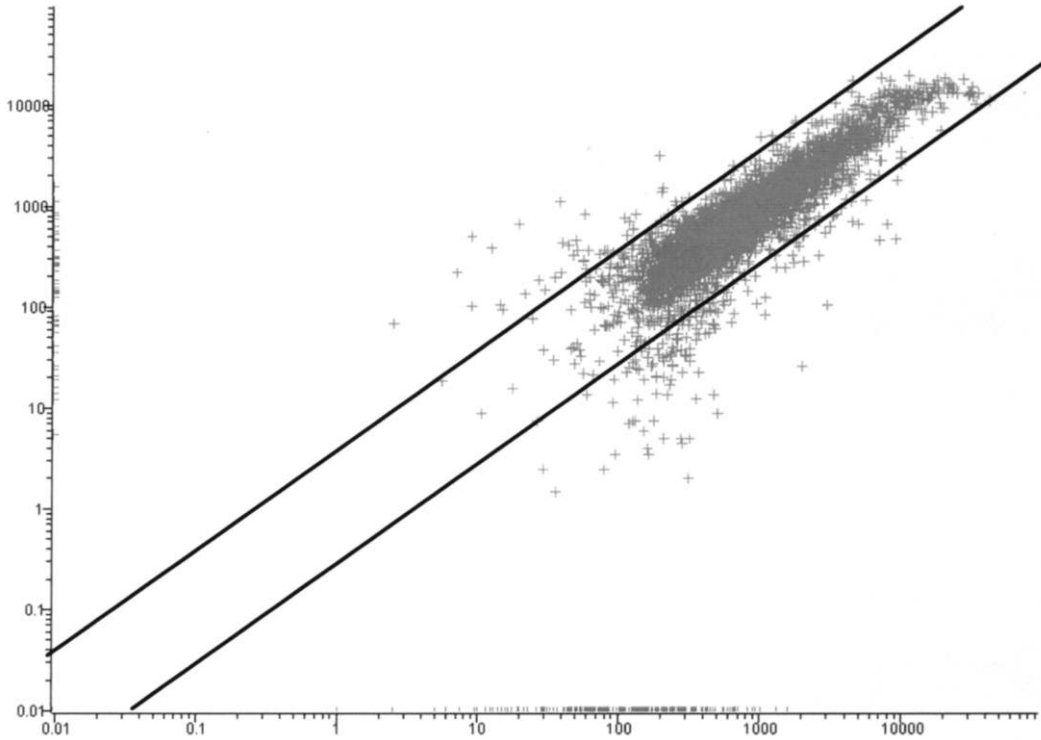


図 6 ラット網膜虚血・再灌流障害前後の遺伝子発現変化.

一つの×印が一つの遺伝子を示す。2本の直線の間にある遺伝子は、発現の変化が2倍以内に留まっている。2本の直線の範囲を逸脱したものは、発現の変化が2倍以上あった遺伝子を示している。

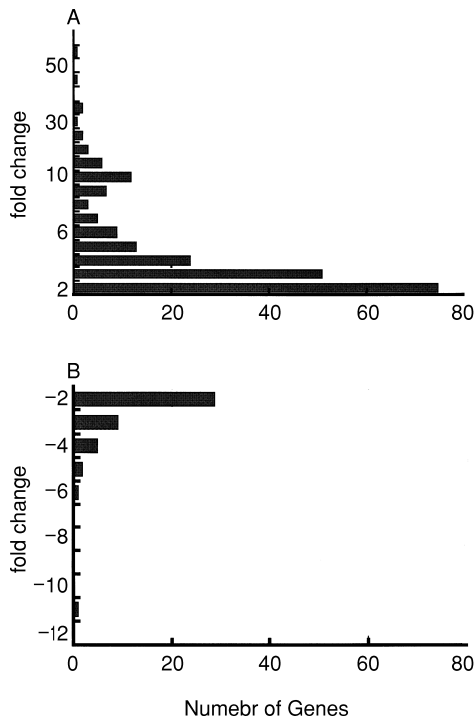


図 7 遺伝子発現変化と遺伝子数.

虚血・再灌流障害によって発現が大きく変化した遺伝子の数と発現変化の度合いを示す。発現が10倍以上増加する遺伝子がかなりの数あることがわかる。発現変化の度合いが少ない遺伝子数は数多く認められる。

表 1 DNA マイクロアレイ解析で発現変動が大きかった遺伝子

1) 転写因子遺伝子群		
Fos-related antigen (Fra-1)		21.6 倍
Jun B		15.5
c-Myc		8.0
c-Jun		3.3
2) 細胞周期関連遺伝子群		
cyclin D2		17.7
cyclin D1		5.9
3) 活性酸素消去系遺伝子群		
heme oxygenase 1		22.1
thioredoxin reductase		4.0
4) 分子シャペロン遺伝子群		
beta A3/A1 crystallin		13.3
heat shock protein 27		4.0

写因子遺伝子群、細胞周期関連遺伝子群、活性酸素消去系遺伝子群、そして分子シャペロン遺伝子群である。それぞれの遺伝子群について網膜虚血・再灌流モデルにおける役割を検討中であるが、今回は、細胞周期関連遺伝子群、活性酸素消去系遺伝子群、そして転写因子遺伝子群について述べたい。

IV 細胞周期関連遺伝子と網膜神経細胞死

細胞が増殖するには、細胞周期が正常に回転すること

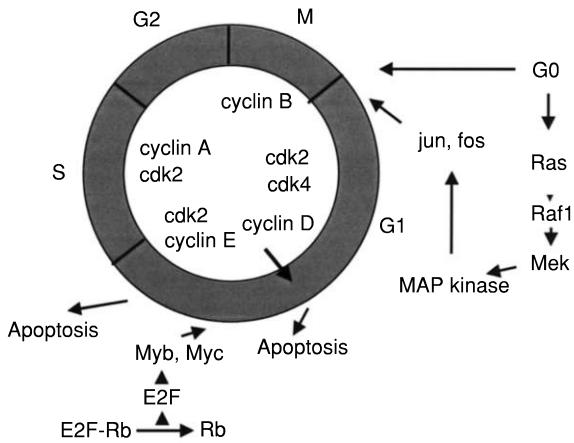


図 8 正常細胞周期.

細胞が増殖するには G1, S, G2, M という細胞周期が秩序正しく回転することが必要である。細胞周期回転をコントロールしている蛋白がサイクリンと cdk である。成熟動物網膜の神経細胞は、細胞周期が休止した G0 期にある。

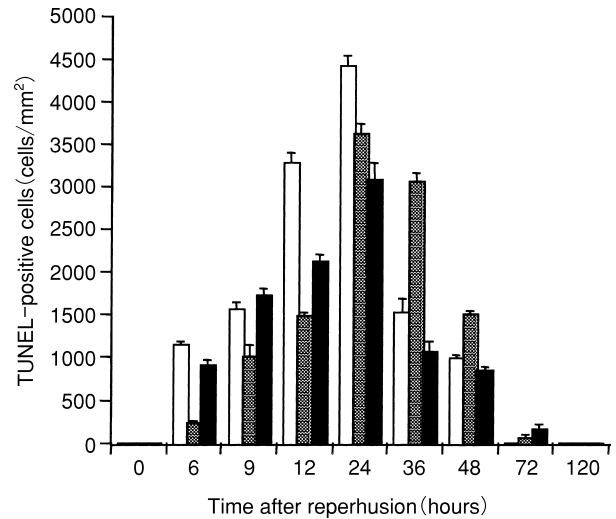


図 10 c-Jun, サイクリン D1 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞出現の経時変化.

c-Jun 陽性細胞, サイクリン D1 陽性細胞, TUNEL 陽性細胞の出現は良く似た経時変化を示す. TUNEL: TUNEL 陽性細胞, cyclin D1: cyclin D1 陽性細胞, c-Jun: c-Jun 陽性細胞.

文献 16 より許可を得て転載.

□: TUNEL ▒: cyclin D1 ■: c-jin

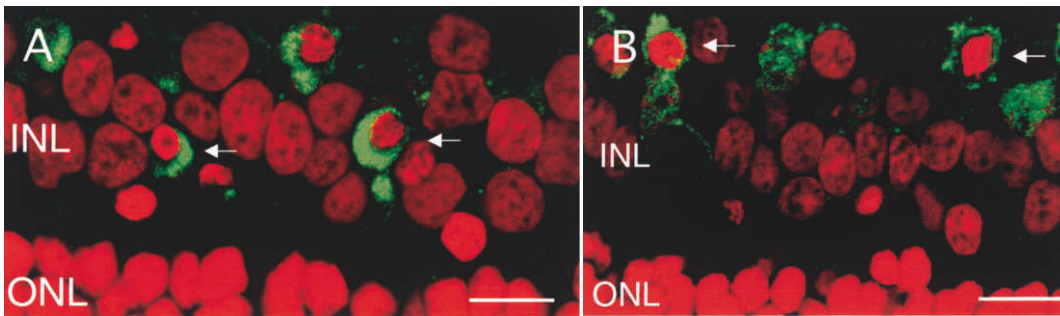


図 9 網膜内顆粒層の dying cell に発現する c-Jun とサイクリン D1.

A: c-Jun 免疫染色と propidium iodide の二重染色. 核が濃染する dying cell に c-Jun が発現している (矢印). INL: 内顆粒層, ONL: 外顆粒層. バーは 10 μm

B: サイクリン D1 免疫染色と propidium iodide の二重染色. c-Jun 同様に dying cell にサイクリン D1 が発現している (矢印). INL: 内顆粒層, ONL: 外顆粒層. バーは 10 μm

文献 16 より許可を得て転載.

が必要である。細胞周期回転には、サイクリンと呼ばれる一群の蛋白と cyclin-dependent kinase(cdk)といわれるリン酸化酵素の秩序正しい作用が必須である(図 8)²¹⁾²²⁾。培養神経細胞では、細胞周期が回転し、細胞数が増加することがあるが、成熟動物の網膜神経細胞の細胞周期は G0 といわれる停止期にあり、正常の状態では分裂・増殖することはない。何らかの刺激が加わると、神経細胞に異常なサイクリンの発現が発生し、細胞周期が G0 期から G1 期まで中途半端に回転するが、それ以上には進めないため、途中で止まってしまうことがある。このような機序により、培養神経細胞にアポトーシスが発生することが知られていた。このような現象を

G1 arrest という²²⁾。ラット網膜虚血・再灌流障害では、先のマイクロアレイ解析によって細胞周期関連遺伝子の発現が上昇していた。このことは、網膜虚血・再灌流障害で異常な細胞周期回転が発生している可能性を推定するものである。そこで、この障害で G1 arrest によるアポトーシスが発生しているかどうかを検討した。また、網膜の神経細胞の種類が違っても G1 arrest による細胞死が普遍的なメカニズムなのか、それとも細胞の種類が異なれば細胞死のメカニズムが異なるのかについても検討した。

免疫組織化学的にサイクリン D1 と c-Jun 陽性細胞を検出してみると、網膜内顆粒層では核が濃染したアポト

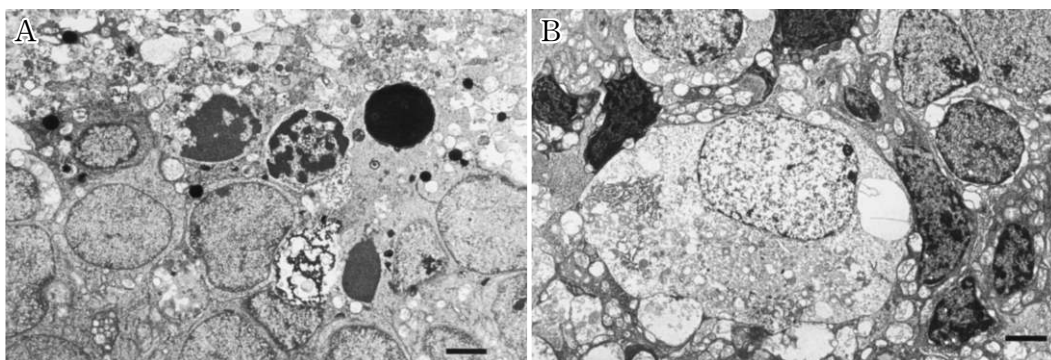


図 11 網膜内顆粒層のアポトーシスとネクローシス.

A：内顆粒層内方には、濃縮した核をもつ典型的なアポトーシスの形態を示す細胞が認められる。バーは 2 μm
 B：一方、内顆粒層外方には膨張した胞体をもつネクローシス様に細胞が存在する。バーは 2 μm
 文献 32 より許可を得て転載。

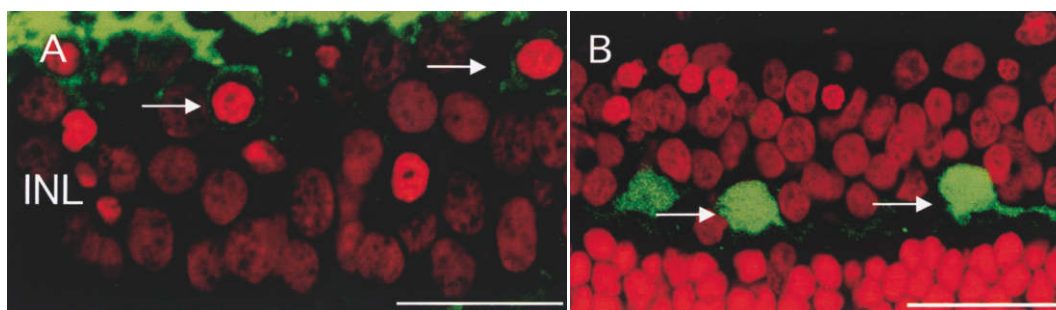


図 12 網膜内顆粒層のアポトーシスとネクローシス.

A：抗 syntaxin 抗体による免疫染色と propidium iodide 染色との二重染色。核が濃染しているアポトーシス様細胞は、syntaxin 陽性のアマクリン細胞であることがわかる(矢印)。バーは 15 μm
 B：内顆粒層外方には、propidium iodide に淡染する、比較的大きな核をもつネクローシス様の形態を示す細胞がある。この細胞は、calbindin 陽性で水平細胞であることがわかる(矢印)。バーは 15 μm
 文献 32 より許可を得て転載。

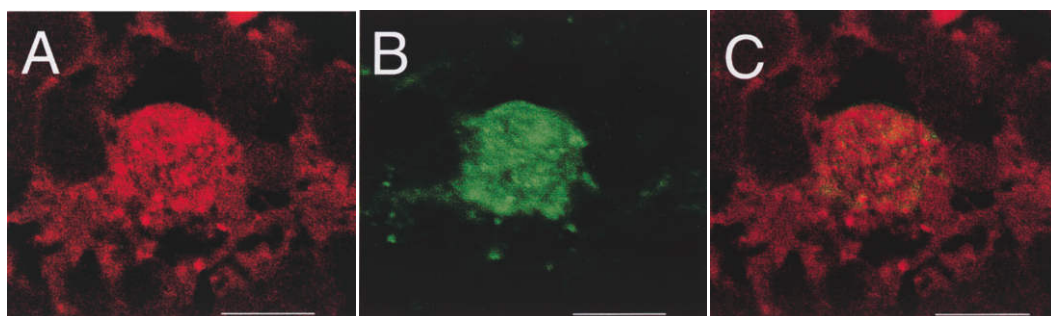


図 13 p16^{INK4} と calbindin の二重染色.

A：抗 calbindin 抗体による免疫染色。バーは 25 μm
 B：抗 p16INK4 抗体による免疫染色。バーは 25 μm
 C：二重染色像。水平細胞に p16INK4 が発現していることがわかる。バーは 25 μm
 文献 32 より許可を得て転載。

ーシスの像を示す細胞には c-Jun とサイクリン D1 が発現していることがわかった(図 9)。c-Jun は、転写因子の一つでサイクリン D1 の発現を誘導していると考えられる²³⁾。また、サイクリン D1 は、G1 期早期に発現するサイクリンで、この異常発現が G1 arrest が発生して

いることの有力な指標であるとされている²⁴⁾。そもそも成熟動物の神経細胞では細胞周期が回転していないのであるから、G1 期に発現するべきサイクリン D1 が発現することは、とりもなおさず異常な発現ということになる。c-Jun 陽性細胞、サイクリン D1 陽性細胞発現の時

表 2 アマクリン細胞と水平細胞のアポトーシスとネクローシス

	Amacrine cells		Horizontal cells	
	9 hours	24 hours	9 hours	24 hours
Apoptotic cells	20/860(23.5%)	746/910(82.0%)*	2/320(0.6%)	11/320(3.4%)*
Necrotic cells	0/860(0%)	10/910(1.1%)\$	22/320(6.9%)	194/320(60.6%)\$

*: アマクリン細胞は、水平細胞に比して有意にアポトーシスに陥りやすい($p < 0.0001$).

\$: 水平細胞は、アマクリン細胞に比して有意にネクローシスに陥りやすい($p < 0.0001$).

文献 32 より許可を得て転載.

間経過を調べてみると、図 10 に示すように、TUNEL 陽性細胞発現の時間経過と良い相関が認められた。このことから G1 arrest による神経細胞死が網膜内顆粒層に発生していることが考えられた。

内顆粒層の神経細胞の形態をより詳しく検討すると、内顆粒層の内層には電子密度の高い核をもつ典型的なアポトーシス様の細胞が認められるのに対し、内顆粒層外層よりには電子密度が低いネクローシス様の細胞がかなりの頻度で認められた(図 11)。このような細胞がどの神経細胞であるのかを知ることは、大変興味深く、重要な課題である。そこで、細胞のマーカ―を使用して同定を試みた。その結果、図 12 のように、アポトーシスの形態を示す細胞はアマクリン細胞のマーカ―である syntaxin 陽性であること²⁵⁾²⁶⁾、ネクローシスの形態を示す細胞は、calbindin 陽性であることがわかった。網膜では calbindin は水平細胞のマーカ―であることがわかっている²⁷⁾²⁸⁾。すなわち、アマクリン細胞は典型的なアポトーシスで死ぬのに対し、水平細胞はむしろネクローシスで死んでいくことが明らかとなった。そして、水平細胞にはこれも細胞周期関連遺伝子である p16^{INK4} という蛋白が発現していることがわかった。Calbindin と p16^{INK4} の二重免疫染色を行うと、図 13 のように間違いなく calbindin 陽性の水平細胞に p16^{INK4} が発現していることがわかる。p16^{INK4} の発現はアマクリン細胞には認められなかった。再灌流 12 時間後にアマクリン細胞と水平細胞のそれぞれについてアポトーシスとネクローシスの割合を調べたところ、アマクリン細胞では 82% がアポトーシスの形態を示すのに対し、水平細胞では 60% 以上の細胞がネクローシスの形態を示した。320 個の水平細胞中アポトーシス様の形態を示した細胞は僅かに 11 個に過ぎなかった(表 2)。

このように、虚血・再灌流という同一の障害に対しても細胞の種類が異なれば細胞死のメカニズムも異なるようである。細胞死のメカニズムについて、さらに詳細な検討を行うことが重要であると考えられる。さて、ここで p16^{INK4} なる耳慣れない蛋白がでてきた。この蛋白は、サイクリン D1 の機能を阻害する作用を持っており、そのため、p16^{INK4} が発現すると細胞周期回転が起これないと考えられる^{29)~31)}。虚血・再灌流障害では何らかの刺激により異常な細胞周期回転が発生するが、p16^{INK4}

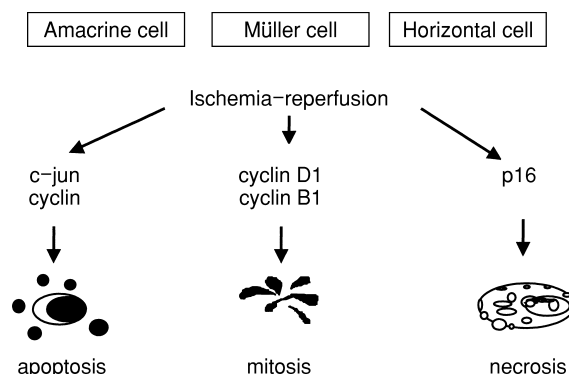


図 14 網膜細胞の種類と細胞死。

アマクリン細胞は、サイクリン D1 の異常発現によって細胞周期が部分的に回転するため、G1 arrest によるアポトーシスを起こす。一方、水平細胞は、p16^{INK4} を発現するため、細胞周期回転が発生しない。このため、ネクローシスで死んでいく。これに対し、ミュラ細胞では正常な細胞周期回転が起こり、少なくとも部分的には細胞増殖へ向かう。

を発現している水平細胞は細胞周期へ入ることがないためアポトーシスに陥らずネクローシスとなるのに対し、この蛋白を発現していないアマクリン細胞では典型的なアポトーシスが発生すると思われる。また、神経細胞ではないミュラ細胞では、細胞周期の後期に発現するサイクリンであるサイクリン B の発現が確認された。ミュラ細胞は、細胞周期を完遂することができ、部分的にせよ増殖に向かうことが可能であることが良く理解できる。

以上のデータから我々なりの仮説を作ってみた。図 14 のように、アマクリン細胞は c-Jun, サイクリン D1 を発現し、いわゆる G1 arrest によってアポトーシスを起こす。一方、ミュラ細胞は細胞周期を完遂し、細胞分裂に向かう。これに対し、水平細胞はサイクリン D に対する阻害作用をもつ p16^{INK4} が発現しているために細胞周期に入ることができず、ネクローシスに陥ることになる³²⁾。

以上の実験結果は、アポトーシスの抑制によって神経保護ができるかという疑問に部分的にせよ答えるものである。アマクリン細胞のように異常な細胞周期回転が発生するとアポトーシスに陥るが、水平細胞のように細胞周期回転が発生しなければ、アポトーシスは起これない

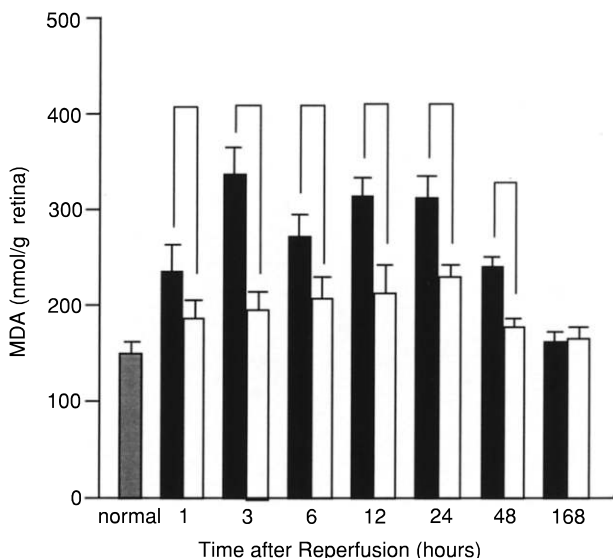


図 15 虚血・再灌流網膜の過酸化脂質。

再灌流後，網膜の過酸化脂質量は増加する．内因性過酸化脂質消去剤である thioredoxin で動物を前処置しておくとして網膜の過酸化脂質量増加が阻害される．

* : p<0.05, ** : p<0.01 Scheffe's post hoc test.

文献 47 より許可を得て転載．

■ : vehicle □ : rhTRX

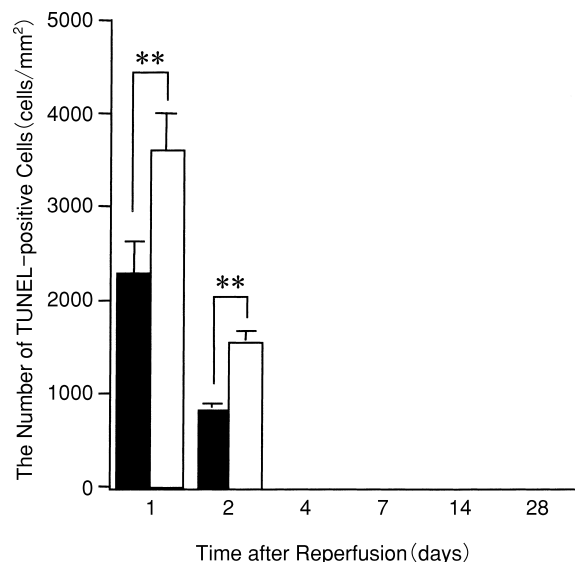


図 16 Thioredoxin による網膜保護作用。

Thioredoxin 投与を行った動物では，TUNEL 陽性細胞数が有意に減少している．

** : p<0.01 Bonferroni post hoc test.

文献 46 より許可を得て転載．

■ : rhTRX □ : vehicle

もののネクロシスが発生する．つまり，神経保護を考えるのであれば，細胞周期回転が発生するよりも上流で出来事を止めてしまう必要があると考えられる．それでは，どのような出来事，どのような遺伝子発現が細胞周期回転の上流に存在するのであろうか．

V 活性酸素消去系と網膜神経細胞死

次に活性酸素と網膜神経細胞死の関係について検討してみた．活性酸素消去系遺伝子の発現もマイクロアレイの検討で大きく変動することが明らかとなっている．網膜虚血・再灌流障害では，虚血中は酸素の供給が断たれている．再灌流時には酸素供給が再開されるが，この時，活性酸素が発生するため，網膜に大量に存在する脂質と反応し，過酸化脂質が形成されると考えられる^{33)~39)}．そこで，まず再灌流に伴う過酸化脂質の形成について検討した⁴⁰⁾．経時的に網膜に存在する過酸化脂質を定量してみると図 15 のようになる．再灌流後，早期から網膜過酸化脂質量が増加し，経時変化は 2 峰性のようなものである．再灌流前に過酸化脂質消去作用をもつチオレドキシ^{41)~45)}を投与しておくとして，網膜で産生される過酸化脂質の量は明らかに減少する．そして，チオレドキシ^{41)~45)}処理によって網膜各層の TUNEL 陽性細胞数が減少する(図 16)．網膜厚を指標として評価してもチオレドキシ^{41)~45)}による神経保護作用が明らかとなった(図 17)．このように，過酸化脂質が網膜虚血・再灌流障害による神経細胞死発生に重要な役割を果たしていることがわかった⁴⁶⁾⁴⁷⁾．

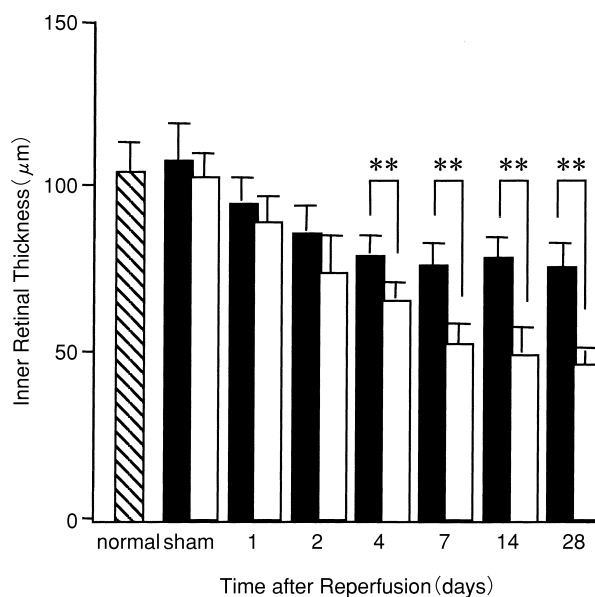


図 17 Thioredoxin による網膜保護作用。

Thioredoxin 投与を行った動物では，網膜内層の菲薄化が有意に阻害されている．

** : p<0.01 Bonferroni post hoc test.

文献 46 より許可を得て転載．

■ : rhTRX □ : vehicle

次に，過酸化脂質産生と細胞死の時間的・空間的關係について検討した．過酸化脂質産生が網膜のどの細胞層でどのような時間帯で発生しているのかがわかれば，活性酸素の役割がかなり明らかとなる．免疫組織化学的な過酸化脂質の検出には，抗 HNE 抗体と抗ニトロタイロ

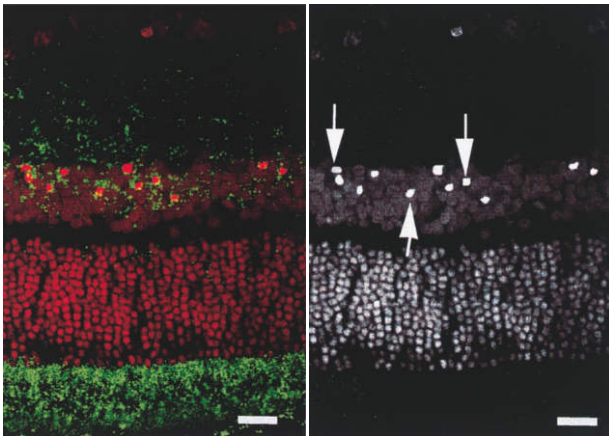


図 18 抗 HNE 抗体による免疫染色。
抗 HNE 抗体によって propidium iodide 染色で核が濃染する dying cell の近傍が染まっている(矢印)。再灌流 12 時間後の組織。バーは 20 μm
文献 47 より許可を得て転載。

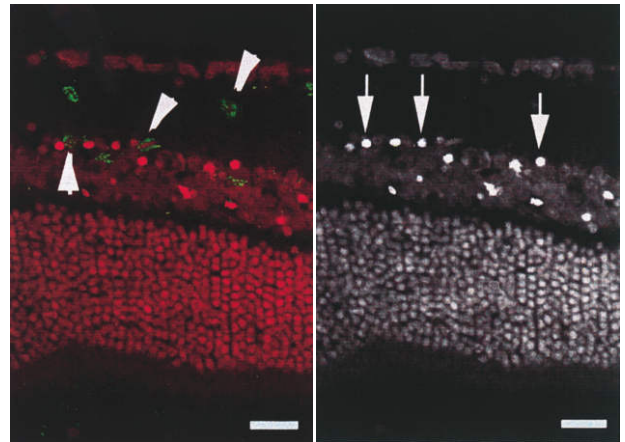


図 19 抗ニトロタイロシン抗体による免疫染色。
抗ニトロタイロシン抗体によって propidium iodide 染色で核が濃染する dying cell の近傍が染まっている(矢印)。再灌流 12 時間後の組織。バーは 20 μm
文献 47 より許可を得て転載。

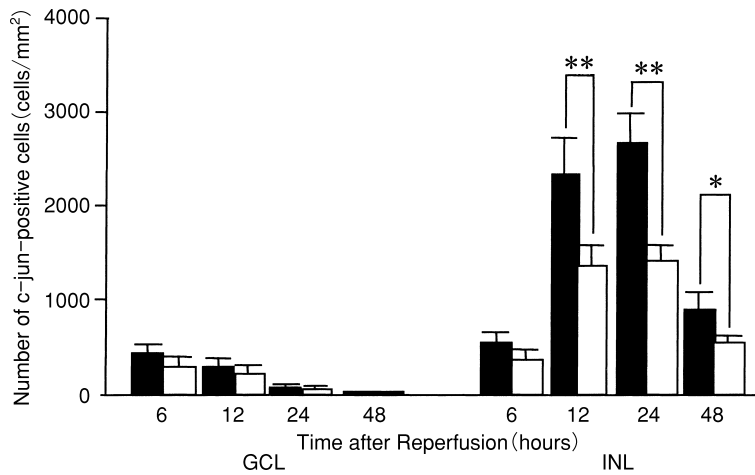


図 20 Thioredoxin による c-Jun 陽性細胞の減少。
Thioredoxin 投与を行った動物では、網膜内顆粒層の c-Jun 陽性細胞が減少している。
** : p < 0.01 Scheffe's post hoc test.
文献 47 より許可を得て転載。 ■ : vehicle □ : rhTRX

シン抗体を使用した⁴⁸⁾⁴⁹⁾。図 18 は抗 HNE 抗体での染色、図 19 は抗ニトロタイロシン抗体による染色像を示す。両抗体ともに核が濃染したアポトーシスを起こしている細胞の近傍に免疫染色が認められた。このように、虚血・再灌流障害時に産生される過酸化脂質が網膜神経細胞のアポトーシスに深く関係していることが明らかとなった。

さらに、チオレドキシ処理したラット網膜における c-Jun, サイクリン D1 の発現を検討してみると、チオレドキシ処理によって両蛋白ともに発現が減弱していることがわかった(図 20, 21)。以上をまとめて活性酸素と網膜神経細胞死のメカニズムをシエマにした。詳細は不明であるが、網膜虚血・再灌流障害は、活性酸素を発生させることにより、神経細胞に異常な細胞周期回

転をもたらす。この異常な細胞周期回転が細胞死の大きな要因であるということになる(図 22)。この実験から、異常細胞周期回転の上流に存在する活性酸素産生を抑制すれば、有効な神経保護治療が実現できる可能性があることがわかった。

VI Caspase と神経細胞死

Caspase と総称される蛋白分解酵素が細胞死の過程に重要な役割を果たしていることが知られている^{50)~53)}。活性酸素などによるストレス刺激が細胞に加わるとミトコンドリアの膜電位が変化し、チトクローム C がミトコンドリア外に漏出し、このチトクローム C が caspase を活性化し最終的にアポトーシスが発生することが知られている。この系の他に、ストレスが caspase-1 を直接

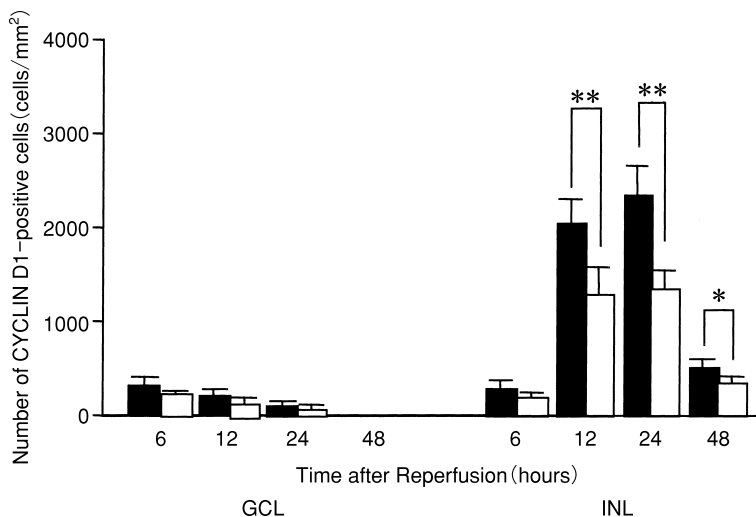


図 21 Thioredoxin によるサイクリン D1 陽性細胞の減少。

Thioredoxin 投与を行った動物では、網膜内顆粒層のサイクリン D1 陽性細胞が減少している。

** : p < 0.01 Scheffe's post hoc test.

文献 47 より許可を得て転載。 ■ : vehicle □ : rhTRX

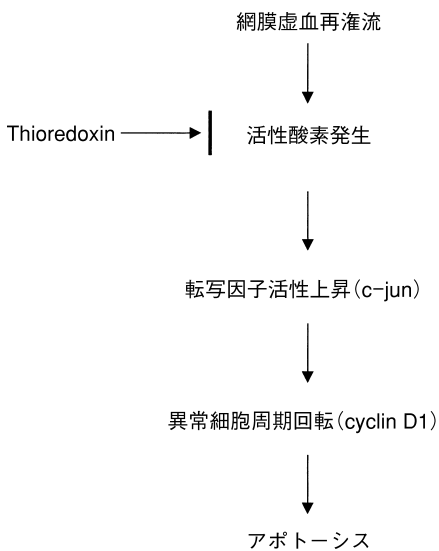


図 22 活性酸素と網膜神経細胞死。

活性酸素は、網膜神経細胞に異常な細胞周期回転を引き起こし、アポトーシスを惹起する。Thioredoxin のような活性酸素消去剤は、活性酸素産生を抑えることにより、異常な細胞周期回転を抑制し、アポトーシスの発生を阻害する。

活性化する系があることもわかっている^{53~55}。しかし、今回のマイクロアレイの検討では、caspase の発現上昇が顕著には認められなかった。この原因としては、①実際に網膜虚血・再灌流の系で caspase がたいした働きをしていない可能性、② caspase の mRNA 発現上昇ではなく、procaspase から caspase への限定分解による活性化起きている可能性、③時間経過の検討が不十分である可能性が考えられる。

最初に、虚血・再灌流障害を材料に caspase-1 と cas-

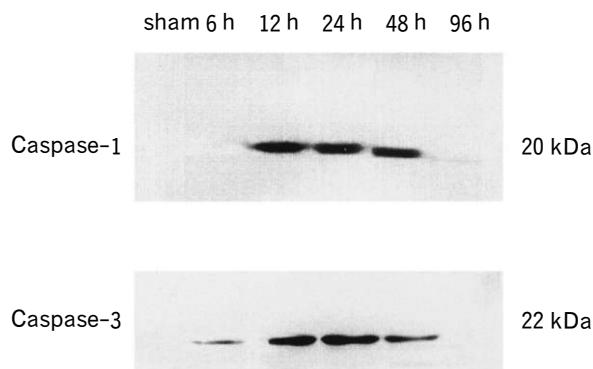


図 23 虚血・再灌流網膜における caspase-1 と-3 の発現。

Caspase-1 も-3 も再灌流後 12 時間から 48 時間で活性型蛋白の発現が上昇している。文献 56 より許可を得て転載。

pase-3 の発現を western blotting で検討してみた。図 23 に示すように、アポトーシスが盛んに起きている時間帯に活性型の caspase-1, -3 が発現していることがわかる。そして、免疫組織化学的に検討してみると、網膜外顆粒層ではどちらかという caspase-1 が、内顆粒層では caspase-3 の発現がより顕著に認められた。免疫陽性細胞数の経時変化を取ってみると、確かに caspase-1 は網膜外層に、caspase-3 は網膜内層により強く発現していることがわかる(図 24)。このことは、網膜外層の神経細胞と内層の神経細胞が均質な「死のメッセージ」によってアポトーシスに陥るのではなく、異なる「死のメッセージ」を利用して死んでいくことを示している⁵⁶。

Caspase には阻害剤が存在する。必ずしもその特異性は高くないが、caspase-1 と-3 を選択的に阻害できる阻害剤として、caspase-1 をより強く阻害する acetyl-tyro-

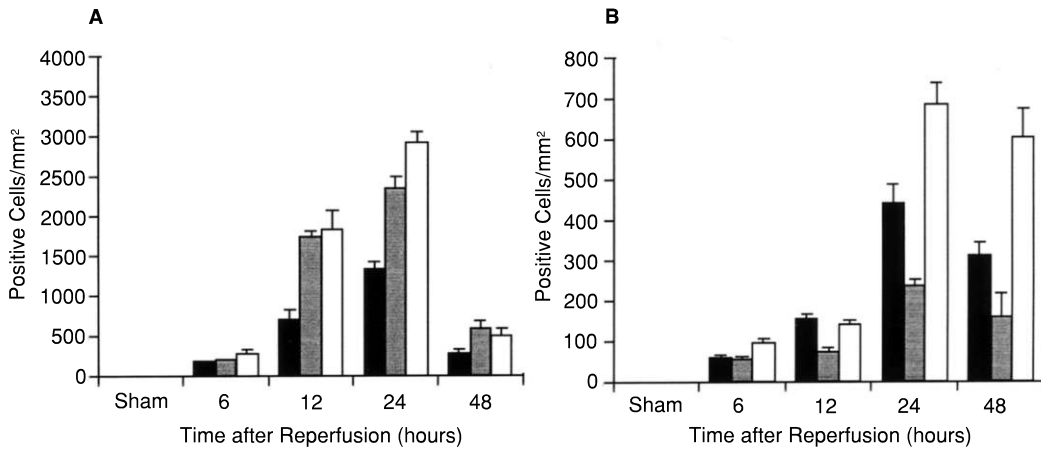


図 24 Caspase 陽性細胞数の経時変化。

A：内顆粒層。Caspase-1 陽性細胞の数よりも caspase-3 陽性細胞数が多い。
 B：外顆粒層。Caspase-1 陽性細胞数が caspase-3 陽性細胞数を上回っている。
 文献 56 より許可を得て転載。 ■：Caspase-1 □：Caspase-3 □：TUNEL

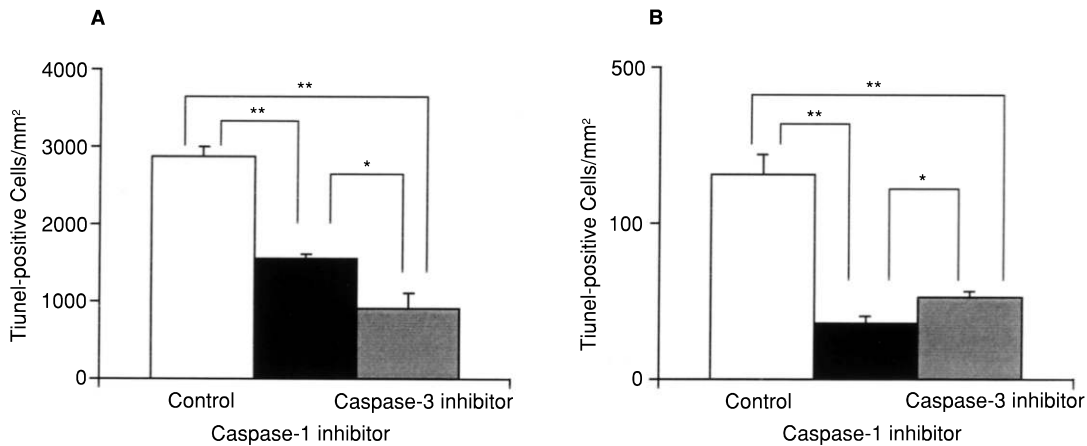


図 25 Caspase 阻害剤の網膜保護効果。

A：内顆粒層。Caspase-1 阻害剤よりも caspase-3 阻害剤により強い神経保護効果が認められる。
 B：外顆粒層。Caspase-3 阻害剤よりも caspase-1 阻害剤により強い神経保護効果を認める。
 *：p<0.05, **：p<0.01 Fisher's post hoc test. 文献 56 より許可を得て転載。

syl-valyl-analanyl-aspart-1-al を腹腔投与したラットでは、網膜外顆粒層の TUNEL 陽性細胞数がより有意に減少した。また、caspase-3 阻害剤である acetyl-aspartyl-glutamyl-valyl-aspart-1-al 投与では、内顆粒層の TUNEL 陽性細胞の減少が認められた。このことは、caspase-1 が網膜外層で、caspase-3 は網膜内層でより重要な役割を果たしている可能性を強く推定するものであるといえよう (図 25)⁵⁶⁾。

網膜外層での神経細胞死に caspase-1 が重要であるかどうかを虚血・再灌流障害以外のモデルで検討するために、代表的な遺伝性網膜変性動物である RCS ラットを使用した。RCS ラット網膜の TUNEL 染色の時間経過を図 26 に示す。生後 28 日をピークとして網膜外顆粒層の細胞がアポトーシスを起こしていることがわかる。Caspase-1 の発現をその活性で調べてみると、やはり生

後 28 日をピークに活性型の発現上昇が認められた (図 27)。免疫組織化学的に caspase-1 陽性細胞を数えてみると、これも同じ時期にピークが認められた。ピーク時に caspase-1 陽性を示す細胞は、対照に使用した SD ラットの約 7 倍に及んだ。網膜虚血・再灌流障害と同様に caspase-1 の阻害剤を与えると、一過性にせよ網膜障害を保護できた (図 28)⁵⁷⁾。このように、網膜外顆粒層の神経細胞死には caspase-1 が重要であるらしい。また、神経細胞死の過程には、上記 ①～③ の可能性のうち、procaspase から caspase への活性化が起こっている可能性と我々の microarray による解析の時間経過の検討が不十分である可能性が考えられた。すなわち、caspase の mRNA 発現上昇はあるが、それ以外にすでに存在する caspase が限定分解によって活性化されることも重要と考えられる。

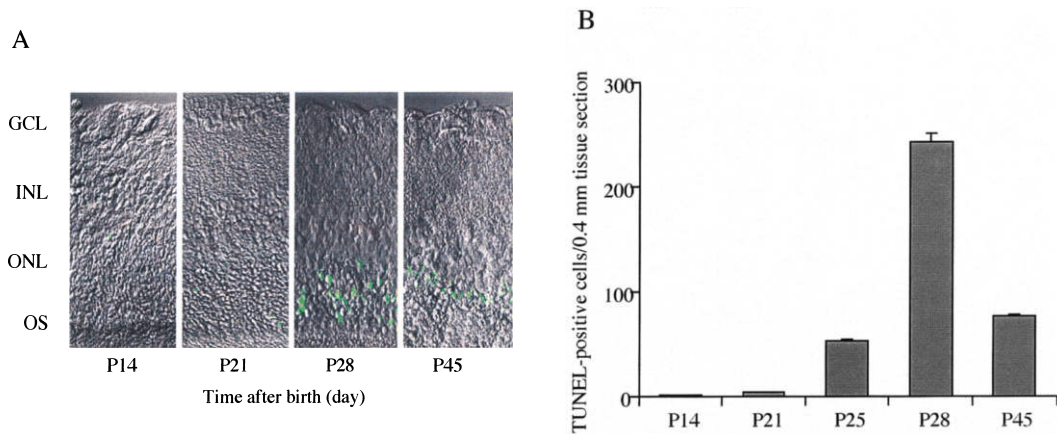


図 26 RCS ラット網膜の神経細胞死.

A：網膜外顆粒層の細胞が TUNEL 陽性である。GCL：神経節細胞層，INL：内顆粒層，ONL：外顆粒層，OS：視細胞外節。

B：TUNEL 陽性細胞数の経時変化。生後 28 日頃に TUNEL 陽性細胞数が最大となる。文献 57 より許可を得て転載。

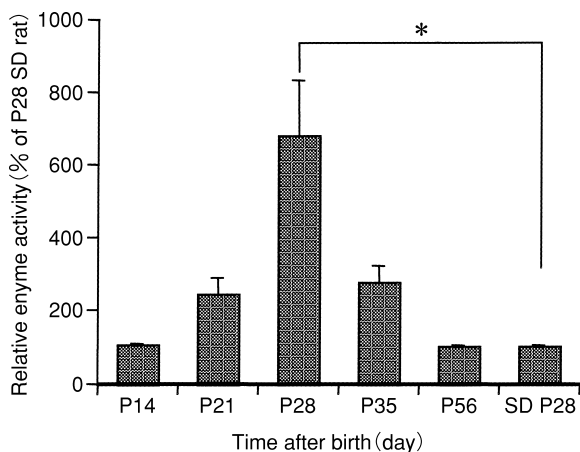


図 27 RCS ラット網膜の caspase-1 発現経時変化.

生後 28 日頃に活性型 caspase-1 の発現が最大となっている。*：p<0.01 Fisher's post hoc test. 文献 57 より許可を得て転載。

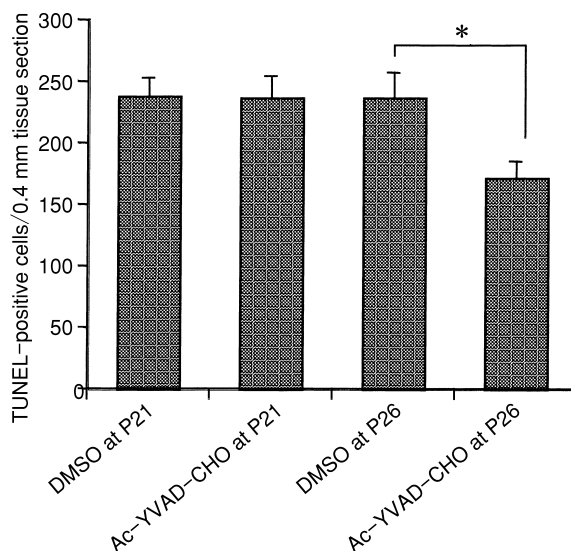


図 28 RCS ラット網膜変成に対する caspase 阻害剤の効果.

生後 21 日目に caspase-1 阻害剤である Ac-YVAD-CHO を投与しても生後 28 日目の TUNEL 陽性細胞数は減少しない。生後 26 日目の投与では TUNEL 陽性細胞数は有意に減少する。*：p<0.01 Fisher's post hoc test. 文献 57 より許可を得て転載。

VII 網膜神経節細胞の細胞死と caspase

それでは、眼科医にとって大きな関心のある網膜神経節細胞の細胞死にはどのような caspase が働いているのであろうか。このことについても検討を加えた。これまでの実験と同様にラット網膜に 45 分間の虚血負荷 (110 mmHg) を加え、その後、経時的に眼球を摘出した。網膜の伸展標本を作製し、TUNEL 染色を行った。伸展標本の場合には、パラフィン切片の染色とは異なり、抗体の組織浸透性が悪いため、neuropore による処置を行った後に染色した。あらかじめ、上丘に蛍光色素である DiI を注入して網膜神経節細胞を逆行性にラベルしておき、細胞死を起こしている神経細胞が間違いなく神経節細胞であることを確認した。虚血負荷後の網膜神経節細胞層に存在する細胞数と TUNEL 陽性細胞数の

時間経過を図 29 に示す。このように、再灌流後 3 時間で既に細胞数の減少が認められ、TUNEL 陽性細胞が出現していることがわかる。この結果は、図 1, 2 に示したパラフィン切片での検討結果と良く合致している。次に、c-Jun, caspase-1, -2, -3 に対する抗体を使って免疫陽性細胞数を検討してみると、図 30 のように c-Jun, caspase-2 陽性細胞がほぼ同数出現していることがわかった。これに対し、caspase-1, -3 陽性細胞はほとんど認められなかった。この系に代表的な神経保護薬である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を加え

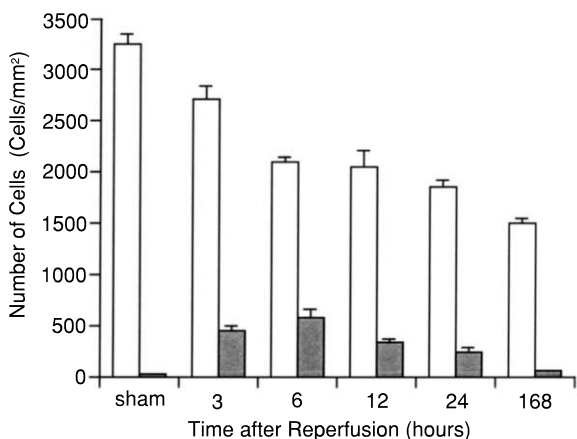


図 29 ラット網膜虚血・再灌流障害時に網膜神経節細胞層に出現する TUNEL 陽性細胞。

再灌流後、速やかに細胞数の減少と TUNEL 陽性細胞の出現が認められる。Total：総細胞数，TUNELL：TUNEL 陽性細胞数。
文献 58 より許可を得て転載。

□：Total ■：TUNEL

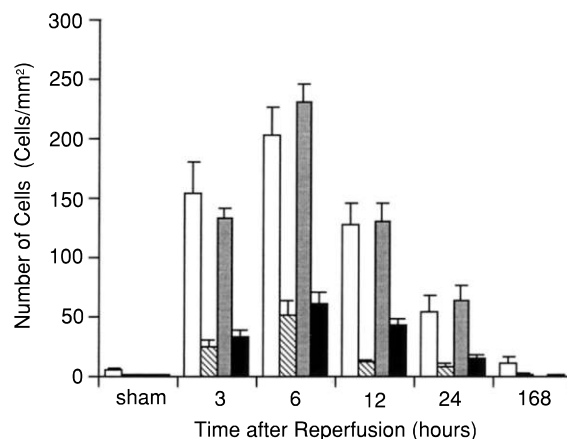


図 30 網膜神経節細胞の c-Jun 陽性細胞と caspase 陽性細胞。

再灌流後 6 時間で c-Jun 陽性細胞数は最大となる。Caspase-1 陽性細胞，caspase-3 陽性細胞は殆ど出現しないが，caspase-2 陽性細胞は，c-Jun 陽性細胞とほぼ同数が同様の時間経過で出現している。c-Jun：c-Jun 陽性細胞，Caspase-1：caspase-1 陽性細胞，Caspase-2：caspase-2 陽性細胞，Caspase-3：caspase-3 陽性細胞。文献 58 より許可を得て転載。

□：c-Jun ▨：Caspase-1 ■：Caspase-2
■：Caspase-3

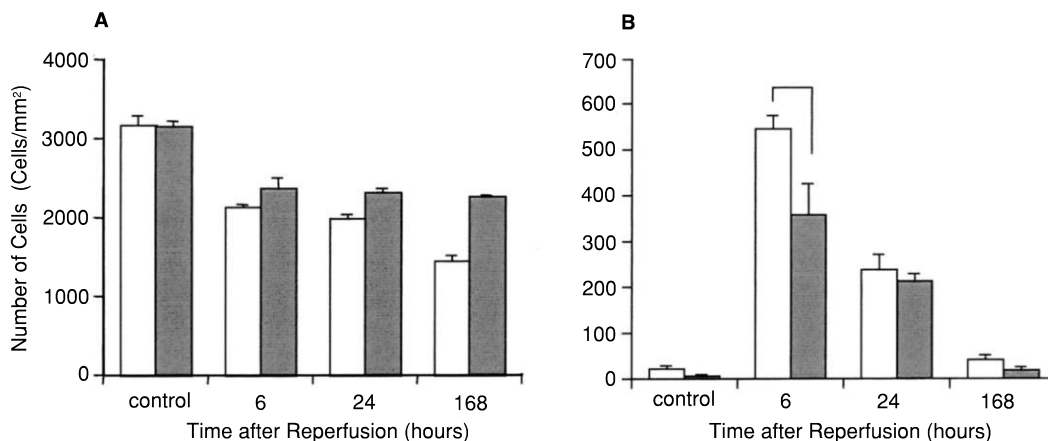


図 31 BDNF の網膜神経節細胞に対する保護効果。

A：神経節細胞層に存在する細胞数の経時変化。BDNF は再灌流 6 時間から 168 時間後の細胞数減少に対して保護効果がある。

B：神経節細胞層の TUNEL 陽性細胞数の経時変化。BDNF は再灌流 6 時間後の TUNEL 陽性細胞数を有意に減少させる。

*：p<0.05 Fisher's post hoc test.

文献 58 より許可を得て転載。 □：Butter ■：BDNF

ると、図 31 A のように網膜神経節細胞層にある神経細胞数の減少が有意に抑制された。また、TUNEL 陽性細胞数も減少した(図 31 B)。しかし、c-Jun 陽性細胞数は、有意な減少を示さなかった(図 32 A)。これに対し、caspase-2 陽性細胞数は、有意な減少が認められた(図 32 B)。また、c-Jun 陽性細胞の形態を検討してみると、強く凝縮した核を持つ細胞が免疫陽性であることがわかった。このような形態を示す細胞が再び正常な形態を

回復するとは考えにくく、c-Jun 陽性細胞は dying cell として差し支えないと考えた。もし、そのように考えれば、BDNF によっても c-Jun 陽性の細胞数が変化しないのであるから、c-Jun の下流に caspase-2 があるのではなく、c-Jun を介する細胞死の系と c-Jun を介さず、他の因子を介して caspase-2 に至る細胞死の系の 2 つが独立して存在すると考えられる(図 33)。これに対して、もし c-Jun の発現がむしろ神経保護的に働いているとす

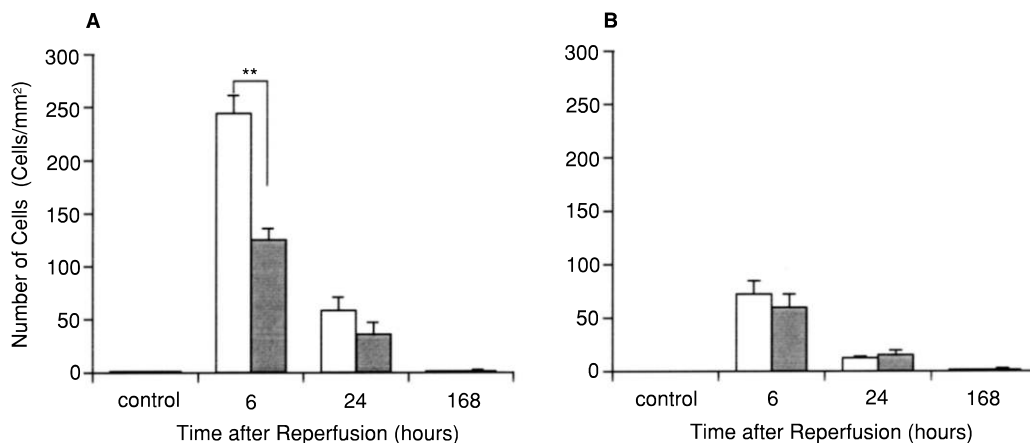


図 32

A：神経節細胞層の caspase-2 陽性細胞数の経時変化。BDNF は再灌流 6 時間後の caspase-2 陽性細胞数を有意に減少させる。

B：神経節細胞層の c-Jun 陽性細胞数の経時変化。BDNF は c-Jun 陽性細胞数には影響を与えない。

**：p<0.01 Fisher's post hoc test.

文献 58 より許可を得て転載。 □：Butter ■：BDNF

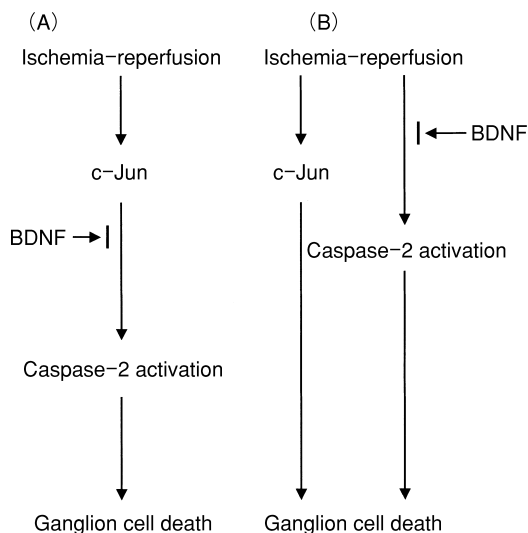


図 33 BDNF の網膜神経節細胞に対する保護効果の作業仮説。

網膜神経節細胞の細胞死には(B)に示すように、c-Jun を介する系と c-Jun を介さず直接 caspase-2 を活性化する系がある。前者の系で c-Jun の下流にどのような「死のメッセージ」が働いているのかは不明である。BDNF は、c-Jun の系には作用せず、caspase-2 の系を抑制することによって神経保護効果を発揮するらしい。(A)のような図式は、今回の実験からは考えにくい。

れば、BDNF は c-Jun を介さず直接に caspase-2 の発現を抑制することによって神経保護作用を発揮していることになる。しかしながら、前述のように c-Jun 陽性細胞の形態はこの可能性よりも図 33 のような可能性をより強く考えさせる⁵⁸⁾。

VIII おわりに

以上を要約すると、以下のようなメカニズムを提示することができる。

まず、網膜虚血・再灌流障害では、再灌流時に発生した活性酸素、過酸化脂質が、大きなストレス刺激となり、止まっていた神経細胞の細胞周期が回転を始める。アマクリン細胞は、G0 期から G1 期へ細胞周期を進める cyclin D1 が異常発現するが、G1 以降への細胞周期回転を完遂するのに必要な他の cyclin や cdk の発現がないため、いわゆる G1 arrest を起こしてアポトーシスに陥る。一方、水平細胞は cyclin D1 の機能を抑制する p16^{INK4} が発現しているため、この細胞では細胞周期回転が発生しない。このため、水平細胞はアポトーシスではなくネクローシスを起こす。これに対し、ミュラ細胞は細胞周期を完遂でき、部分的にはあるが細胞増殖へと向かう。

神経細胞死には caspase が重要な役割を果たしている。そして、網膜の神経細胞の種類が違えば、異なった caspase が「死のメッセージ」となっているようである。さらに、網膜神経細胞の種類によって特定の caspase を選択的に「死のメッセージ」として使用している可能性を示した。また、網膜神経節細胞死に細胞増殖因子である BDNF が有効に阻害し、その機構として c-Jun を介さず直接 caspase-2 の発現を抑制する系が考えられることを示した。

実際の講演では、網膜光障害モデル、caspase-1 knock out マウスに対する光障害、RCS ラット網膜変性に対する Bcl-xL 遺伝子治療、hepatocyte growth factor (HGF) による網膜虚血・再灌流障害への保護作用⁵⁹⁾などについても述べた。本稿でもこれらの話題について取り

上げたかったが、これらは論文の発表がまだ終わっていないため、この総説では具体的な内容についての記載はできない。これらの仕事でも多くの共同研究者のお世話になった。Caspase-1 knock out マウスの実験では、Vertex Pharmaceutical Co. の杭田慶介先生に、Bcl-xL 遺伝子治療の研究では自治医科大学の小澤啓也教授のグループの先生方に、また、HGF の研究では大阪大学の中村敏一教授、松本邦夫助教授に大変お世話になった。ここに記して謝意を表したい。

文 献

- 1) **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.
- 2) **Tso MO, Zhang C, Abler As, Chang Cj, Wong F, Chang GQ**, et al : Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 2693—2699, 1994.
- 3) **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.
- 4) **Lolley RN** : The rd gene defect triggers programmed rod cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 4182—4191, 1994.
- 5) **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.
- 6) **Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC** : Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61 : 33—44, 1995.
- 7) **Wong F** : Photoreceptor apoptosis in animal models. Implications for retinitis pigmentosa research. *Arch Ophthalmol* 113 : 1245—1247, 1995.
- 8) **Adler R** : Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. From the cell biology of the 1990 s to the ophthalmology of the 21st century? *Arch Ophthalmol* 114 : 79—83, 1996.
- 9) **Henderson CE** : Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 17 : 579—585, 1996.
- 10) **Nagata S** : Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355—365, 1997.
- 11) **Meldrum B, Garthwaite J** : Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* 11 : 379—387, 1990.
- 12) **Lipton SA, Rosenberg PA** : Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330 : 613—622, 1994.
- 13) **Lucas D, Newhouse JP** : The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58 : 193—201, 1957.
- 14) **Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos, SM, Lipton, SA** : Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 114 : 299—305, 1996.
- 15) **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA** : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493—501, 1992.
- 16) **Kuroiwa S, Katai S, Shibuki H, Kurokawa T, Umihira J, Nikaido T**, et al : Expression of cell cycle-related genes in dying cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 610—617, 1998.
- 17) **Fador SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL** : Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364 : 555—556, 1993.
- 18) **Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO** : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 : 467—470, 1995.
- 19) **Lander ES, Linton LM, Bierren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J**, et al : Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 : 953—958, 2001.
- 20) **Science** : The human genome : Science genome map. *Science* 291 : 1218, 2001.
- 21) **Morgan DO** : Cyclin-dependent kinases : Engines clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell Biol* 13 : 261—291, 1997.
- 22) **Sherr CJ, Roberts JM** : CDK inhibitors : Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13 : 1501—1512, 1999.
- 23) **Shaulian E, Karin M** : AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20 : 2390—2400, 2001.
- 24) **Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A** : Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* 15 : 46—54, 1996.
- 25) **Inoue A, Obata K, Akagawa K** : Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J Biol Chem* 267 : 10613—10619, 1992.
- 26) **Inoue A, Akagawa K** : Neuron specific expression of a membrane protein, HPC-1 : Tissue distribution, and cellular and subcellular localization of immunoreactivity and mRNA. *Mol Brain Res* 19 : 121—128, 1993.
- 27) **Chu Y, Humphrey MF, Constable IJ** : Horizontal cells of the normal and dystrophic rat retina : A wholemount study using immunolabelling for the 28-kDa calcium-binding protein. *Exp Eye Res* 57 : 141—148, 1993.
- 28) **Rabić A, Thomasset A, Parkes CO, Clavel MC** : Immunocytochemical detection of 28000-MW calcium-binding protein in horizontal cells of the rat

- retina. *Cell Tissue Res* 240 : 493—496, 1985.
- 29) **Quelle DE, Zindy F, Shmun RF, Sherr CJ** : Alternative reading frames of the INK 4 α tumor suppresser gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83 : 993—1000, 1995.
 - 30) **Serrano M, Hannon GJ, Beach D** : A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK 4. *Nature* 366 : 704—707, 1993.
 - 31) **Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Dowling JR, Ashmun RA, et al** : Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91 : 649—659, 1997.
 - 32) **Kuroiwa S, Katai N, Yoshimura N** : Apoptosis and necrosis in retinal ischemia-reperfusion injury : A possible role of p16^{INK4} in the determination of cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* p16^{INK4} 40 : 528—533, 1999.
 - 33) **McCord JM** : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312 : 159—163, 1985.
 - 34) **Ernster L** : Biochemistry of reoxygenation injury. *Criti Care Med* 16 : 947—953, 1988.
 - 35) **Nayak MS, Kita M, Marmor MF** : Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2018—2022, 1993.
 - 36) **Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P** : Free radical-mediated effects in reperfusion injury : A histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res* 23 : 225—234, 1991.
 - 37) **Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P** : Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 1471—1478, 1991.
 - 38) **Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Berman ER, Photiou S, Rothman Z, et al** : Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res* 57 : 351—357, 1993.
 - 39) **Muller A, Pietri S, Villain M, Frejaville C, Bonne C, Culcas M** : Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res* 64 : 637—643, 1997.
 - 40) **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K** : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 : 351—358, 1979.
 - 41) **Teshigawara K, Maeda M, Nishino K, Nikaido T, Uchiyama T, Tsudo M, et al** : Adult T leukemia cells produce a lymphokine that augments interleukin 2 receptor expression. *J Mol Cell Immunol* 2 : 17—26, 1985.
 - 42) **Tagaya Y, Okada M, Sugie K, Kasahara T, Kondo N, Hamuro J, et al** : IL-2 receptor (p 55)/ Tac-inducing factor. Purification and characterization of adult T cell leukemia-derived factor. *J Immunol* 140 : 2614—2620, 1988.
 - 43) **Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Mitsui H, Hamuro J, et al** : ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin ; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J* 8 : 757—764, 1989.
 - 44) **Holmgren A** : Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54 : 237—271, 1985.
 - 45) **Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, et al** : Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J Biol Chem* 263 : 15506—15512, 1988.
 - 46) **Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Yodoi J, Yoshimura N** : Protective effect of adult T cell leukemia-derived factor on retinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1470—1477, 1998.
 - 47) **Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, and Yoshimura N** : Lipid peoxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3607—3614, 2000.
 - 48) **Uchida K, Szweda LI, Chae H, Stadtman ER** : Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8742—8746, 1993.
 - 49) **Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S** : Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 94 : 2407—2413, 1994.
 - 50) **Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR** : The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75 : 641—652, 1993.
 - 51) **Fraser A, Evan G** : A license to kill. *Cell* 85 : 781—784, 1996
 - 52) **Nicholson DW, Thornberry NA** : Caspases : Killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22 : 299—306, 1997.
 - 53) **Kumar S** : ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 20 : 198—202, 1995.
 - 54) **Friedlander RM, Gagliardini V, Rotello RJ, Yuan J** : Functional role of Interleukin-1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis. *J Exp Med* 184 : 717—724, 1996.
 - 55) **Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, et al** : Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 2007—2012, 1997.
 - 56) **Katai N, Yoshimura N** : Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed

- by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2697—2705, 1999.
- 57) **Katai N, Kikuchi T, Shibuki H, Kuroiwa S, Arai J, Kurokawa T**, et al : Caspase-like proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College of Surgeons rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1802—1807, 1999.
- 58) **Kurokawa T, Katai N, Kurimoto Y, Yoshimura N** : BDNF diminishes caspase-2 but not of c-Jun in retinal ganglion cells after ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 3006—3011, 1999.
- 59) **Shibuki H, Katai N, Kuroiwa S, Kurokawa T, Arai J, Matsumoto K**, et al : Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
-