

平成 19 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

虚血網膜における apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1) シグナルの伝達機構と機能解明

原田知加子

財団法人東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門

要 約

ストレス応答機構の破綻が癌, アレルギー, 糖尿病, 神経変性など, 多様な疾患の原因となることが明らかとなりつつある. 例えば mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) ファミリーの中で自然免疫応答に必須の働きをもつ apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1) は, さまざまな環境ストレスにตอบสนองして細胞の生死や分化を制御することが注目を集めている. ASK 1 は生後のマウス網膜において主に網膜神経節細胞層に発現するが, 発生過程における網膜神経節細胞のプログラム細胞死には関与しない. しかし, 虚血負荷後の網膜を解析すると, ASK 1 ノックアウトマウスでは野生型マウスよりも虚血耐性が高まる一方, 細胞死

誘導に関与する p38 MAPK および caspase-3 の活性は低下していた. また ASK 1 ノックアウトマウス由来の培養網膜神経節細胞に対する酸化ストレス刺激では, 野生型マウス由来の網膜神経節細胞と比較して, 細胞死が 50% 以下に抑制されていた. 以上から ASK 1 は網膜神経細胞死に深く関与することが明らかになり, 虚血および酸化ストレスの影響が示唆される緑内障などの新たな治療標的として有用である可能性が示された. (日眼会誌 112 : 965—974, 2008)

キーワード : ASK 1, ストレス応答, 網膜神経細胞死, 虚血, 酸化ストレス

A Review

Role of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK 1) -mediated Signaling Pathway during Ischemic Retinal Injury

Chikako Harada

Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

Abstract

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1) is one of a growing number of mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinases identified in the c-Jun N-terminal kinase and p38 MAPK pathways. ASK 1 mediates diverse biological signals leading to cell death, differentiation, survival, and senescence, in response to cellular stress and the innate immune response. In the retina, ASK 1 is mainly expressed in retinal ganglion cells, and loss of ASK 1 leads to mild damage after ischemic injury. Consistently, ASK 1

deficient retinal ganglion cells were resistant to hydrogen peroxide. Our findings suggest that ASK 1 is involved in retinal cell death due to oxidative stress and may be a new therapeutic target for retinal degeneration.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 965—974, 2008)

Key words : ASK 1, Stress response, Retinal cell death, Ischemia, Oxidative stress

別刷請求先 : 183-8526 東京都府中市武蔵台 2-6 東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門 原田知加子
(平成 20 年 4 月 7 日受付, 平成 20 年 6 月 9 日改訂受理) E-mail : charada@tmin.ac.jp

Reprint requests to : Chikako Harada, M.D., Ph.D. Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu-shi, Tokyo 183-8526, Japan

(Received April 7, 2008 and accepted in revised form June 9, 2008)

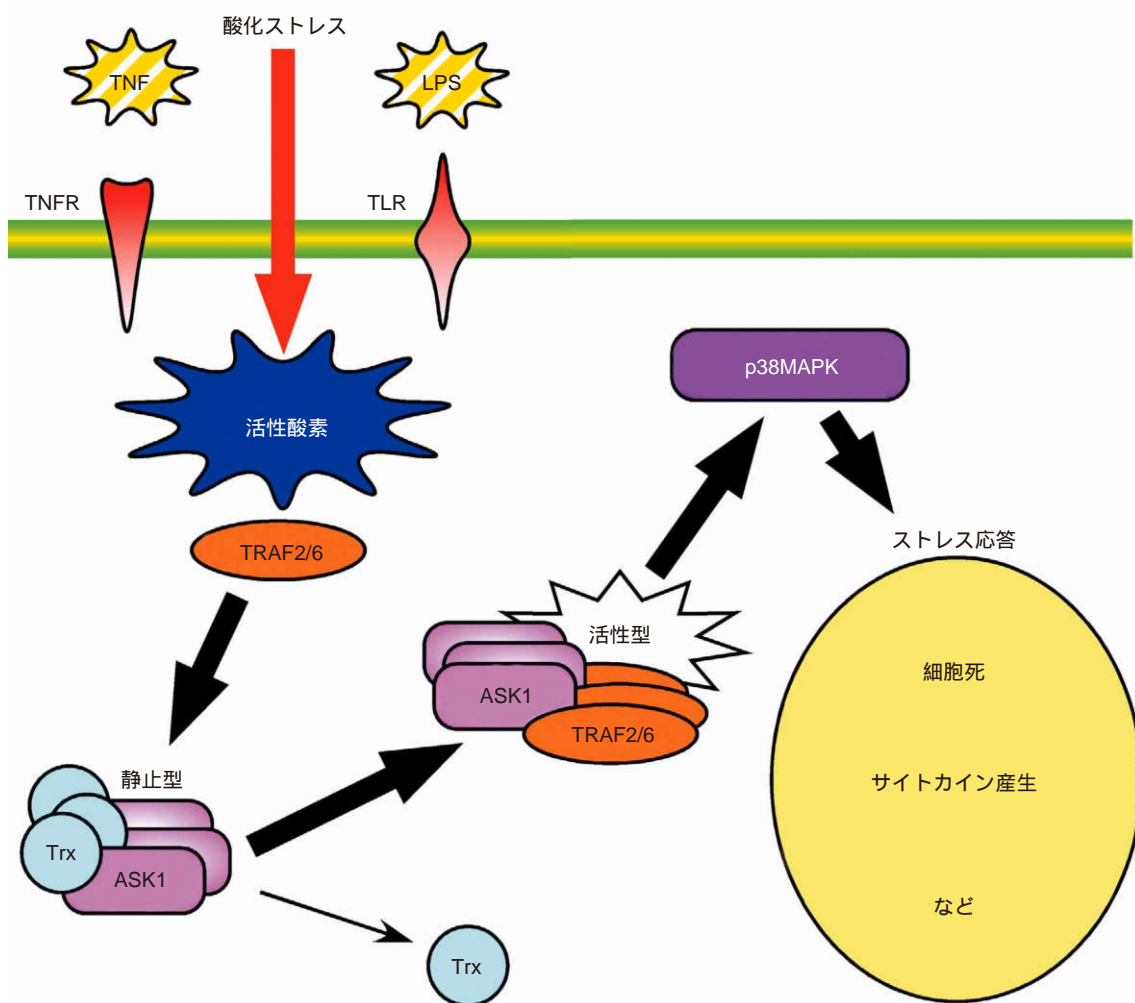


図 1 Apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK 1)の活性化機構.

ASK 1はさまざまな環境刺激によって細胞内で活性化され、細胞死のコントロールや自然免疫応答を担うシグナル伝達系として機能している。

TNF : tumor necrosis factor, TNFR : tumor necrosis factor receptor, LPS : lipopolysaccharide, TLR : Toll-like receptor, TRAF 2/6 : tumor necrosis factor receptor-associated factor 2/6, Trx : Thioredoxin.

I はじめに

ストレス応答機構の破綻が癌，アレルギー，糖尿病，神経変性など，多様な疾患の原因となることが明らかになりつつあるが，そのシグナル伝達機構については不明な点が多い。最近の研究結果から mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) ファミリーの 1 つである apoptosis signal-regulating kinase (ASK) ファミリーが酸化ストレス，小胞体ストレス，紫外線ストレスなどに応答して細胞の生死や分化をコントロールすることが分かってきた¹⁾。ASK ファミリーとしてはこれまでに ASK 1, ASK 2, ASK 3 が発見されているが，しばしば細胞死との関連が問題となる酸化ストレスについては特に ASK 1 を中心とした解析が進んでいる。すなわち，活性酸素により ASK 1 阻害因子である Thioredoxin が ASK 1 から解離すると，代わって ASK 1 活性

化因子である TNF receptor-associated factor 2 (TRAF 2) および TRAF 6 が ASK 1 と複合体を形成することにより ASK 1 が活性化される²⁾。また，ASK 1 はある種の培養細胞においてはアミロイド β 蛋白質の下流で活性化することが分かり，アルツハイマー病との関与も示唆されている³⁾。さらに，ASK 1 は一部の Toll-like receptor の下流で，主に p38 MAPK の活性を変化させることにより，自然免疫応答に必須の働きをもつことが確認されている⁴⁾。つまり，ASK 1 はさまざまな環境変化に応じて下流の MAPK 経路などの活性を制御し，多種多様なストレス応答のシグナル伝達に寄与する MAPKKK と考えられる (図 1)。

一方，さまざまな網膜変性疾患において細胞死を誘導する遺伝子の検討や細胞死経路の抑制による神経保護療法が研究されている^{5)~7)}。しかし，眼球においてはこれまでに ASK ファミリーの発現自体が確認されていない

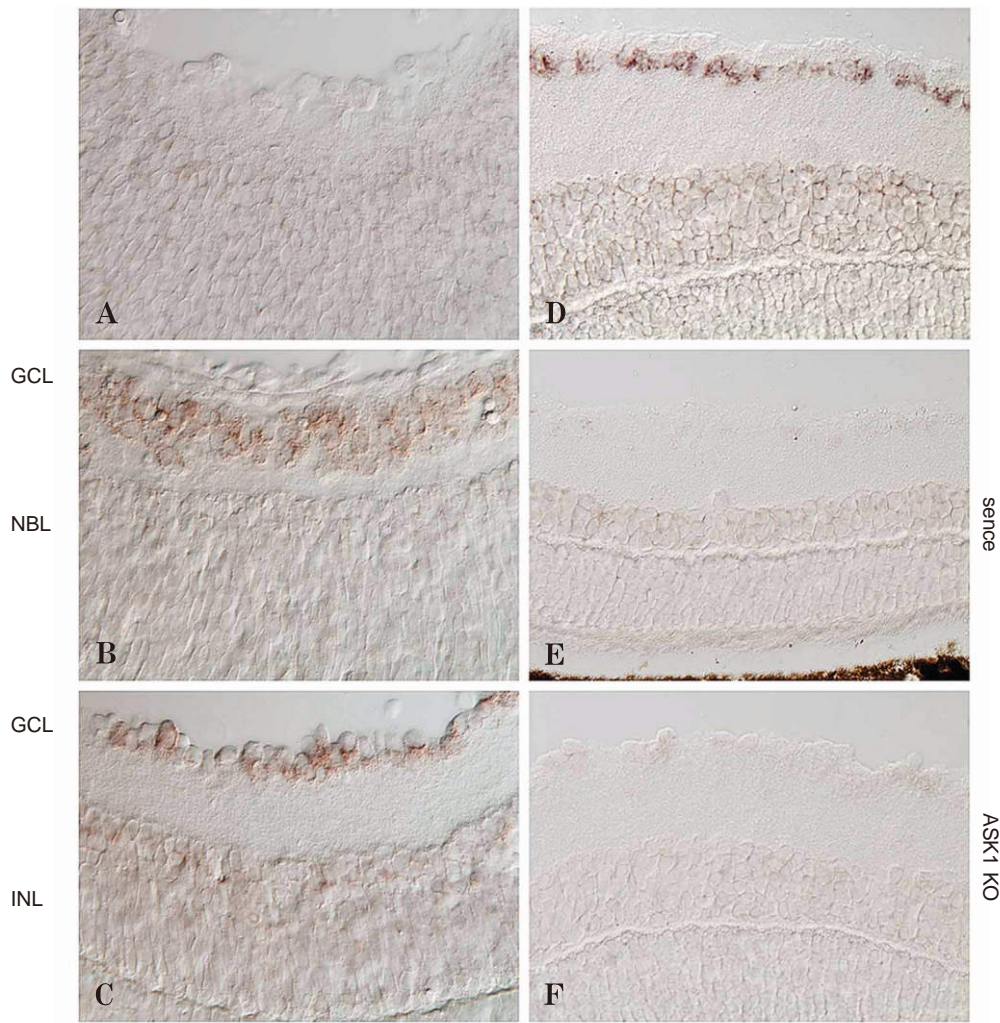


図 2 網膜発生過程における ASK 1 の発現.

In situ ハイブリダイゼーションによる野生型マウス (A~E) および ASK 1 ノックアウトマウス (ASK 1 KO: F) の検討. A: 胎生期 15 日, B: 生後 0 日, C: 生後 7 日, D~F: 生後 90 日齢の網膜. E: センスプローブを用いた陰性対照. GCL: ganglion cell layer, NBL: neuroblast layer, INL: inner nuclear layer. バーは 50 μm .

(文献 8 より許可を得て転載)

ことから、眼疾患とのかかわりなどは全く不明であった。そこで本研究では、ノックアウトマウスの解析が可能な ASK 1 に注目し、網膜の発生や変性過程における ASK 1 の発現検討および機能解析を行ったので、その結果を概説する⁸⁾。

II 発生網膜における ASK 1 の発現と機能解析

網膜においては ASK 1 の発現が報告されていなかったため、我々はまず *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析を行った。胎生期には発現シグナルが弱いものの、生後 0 日以降は網膜神経節細胞層にほぼ限局した分布が観察された (図 2)。網膜神経節細胞数を制御する因子として、これまでに胎生初期では p 75 受容体⁹⁾、sortilin¹⁰⁾¹¹⁾、それ以降では神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-4/5 (NT-4/

5) などの関与が知られている¹²⁾¹³⁾。そこで ASK 1 が網膜発生過程に与える影響を ASK 1 ノックアウト (KO) マウスを用いて解析した。胎生期 15 日から生後 14 日目までを検討したが、同腹の野生型マウスと比較していずれの時点においても網膜層形成および網膜神経節細胞数に変化は認められなかった (図 3)。以上から ASK 1 の網膜における発現パターンが明らかになったものの、発生過程における網膜のプログラム細胞死には影響を与えないことが判明した。上述の各遺伝子と比較した場合、ASK 1 の発現時期が主に生後に限られ、網膜幹 (前駆) 細胞の分化過程への影響が乏しいことなども、網膜発生に変化がみられない理由の一つと考えられるかもしれない。

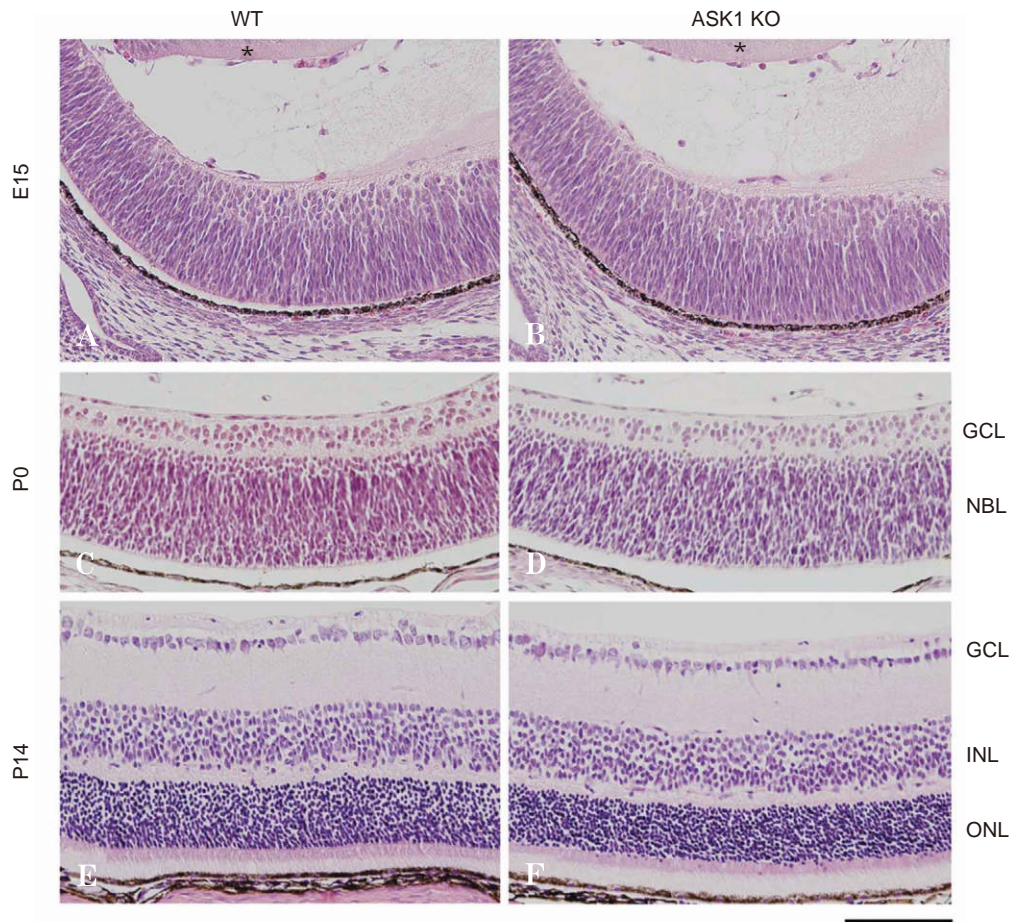


図 3 ASK1 ノックアウトマウスにおける網膜発生過程。

ヘマトキシリン・エオジン染色による野生型マウス (WT: A, C, E) および同腹の ASK1 ノックアウトマウス (ASK1 KO: B, D, F) の検討。A, B: 胎生期 15 日, C, D: 生後 0 日, E, F: 生後 14 日齢の網膜。図中 A, B の * はレンズを示す。GCL: ganglion cell layer, NBL: neuroblast layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. バーは 50 μm 。

(文献 8 より許可を得て転載)

III 変性網膜における ASK1 の機能解析

網膜変性症に対する神経保護療法として、神経栄養因子などを用いた細胞保護に加えて、神経細胞死を誘導するシグナル伝達の阻害による手法が検討されて久しい。例えば主に網膜内層の神経細胞死を誘発する虚血障害に対しては BDNF、線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) などの有用性が報告されており、網膜血管閉塞症や緑内障などの疾患に対する効果が想定される⁶⁾¹⁴⁾。また、p38 MAPK の阻害剤である SB 203580¹⁵⁾ や、細胞死実行因子である caspase の各種阻害薬¹⁶⁾ により網膜神経節細胞の保護が可能とする報告も多数見受けられる。これまでの検討から ASK1 の下流には c-Jun N-terminal kinase (JNK) と p38 MAPK が存在し、この両経路を介して細胞死が誘導されるという報告があるが、網膜はもちろん広く神経細胞において、同様の現象が確認されたことはない。そこで我々は ASK1 の発現部位を考慮して、虚血網膜における網膜神経節細胞死に

ASK1 が関与する可能性を検討することにした。高眼圧負荷後 7 日目に網膜の形態を観察し、網膜内層厚および網膜神経節細胞数の定量化を行ったところ、野生型マウスでは網膜内層の菲薄化と網膜神経節細胞の減少を認めた。しかし、ASK1 KO マウスでは虚血による網膜損傷の軽症化が確認された (図 4)。また、逆行性ラベリングによって網膜神経節細胞を可視化したところ、ASK1 KO マウスでは単位面積あたりの網膜神経節細胞数が有意に増加していた (図 5)。次に虚血負荷 1 日後の網膜切片を用いて Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end-labeling (TUNEL) 染色を行った。野生型マウスでは網膜神経節細胞層を中心に多くの TUNEL 陽性像が観察されたが、ASK1 KO マウスにおいては、著明なアポトーシスの抑制が確認された (図 6 A, B)。また、野生型マウスでは網膜神経節細胞層を中心に活性型 caspase-3 およびリン酸化 (活性型) p38 MAPK の発現が認められたが、ASK1 KO マウスではこれらの発現も低下していた (図 6 C~F)。一方、ASK

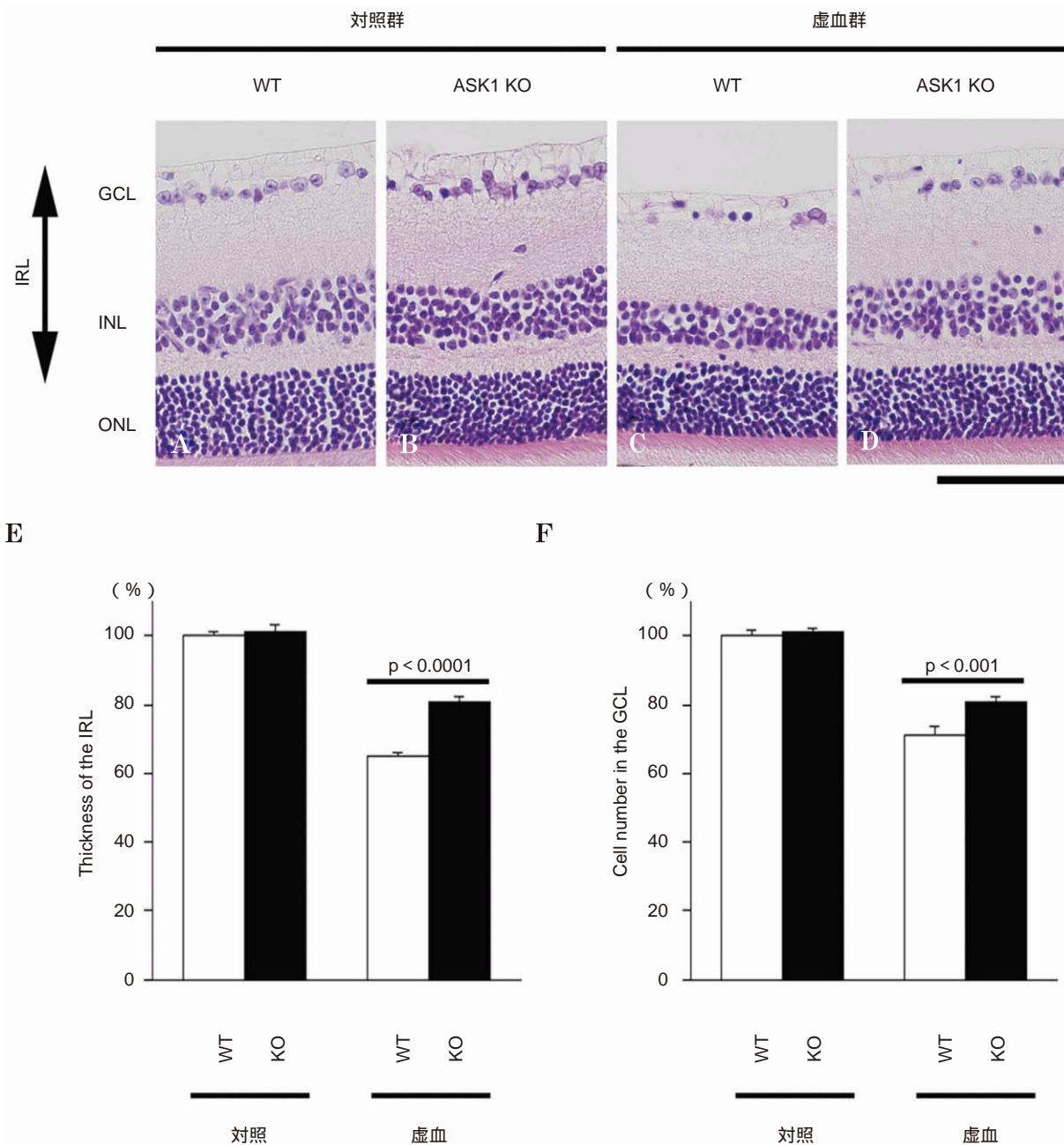


図 4 ASK 1 ノックアウトマウスにおける網膜虚血障害の定量的解析.

A~D: ヘマトキシリン・エオジン染色による野生型マウス(WT: A, C)および同腹の ASK 1 ノックアウトマウス(ASK 1 KO: B, D)の検討. A, B: 虚血負荷を行わない対照群, C, D: 20 分間の虚血負荷後 7 日目の網膜. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer, IRL: inner retinal layer. バーは 50 μ m.

E, F: 野生型マウス(WT)および ASK 1 ノックアウトマウス(KO)における網膜内層厚(E)および網膜神経節細胞層中の細胞数(F)の定量. 野生型マウスの対照群を 100% とする. 統計処理は Student's *t*-test による.

(文献 8 より許可を得て転載, 一部改変)

1 の下流で p38 MAPK と同様に細胞死を誘導するとされる JNK の発現に変化は認められなかった. 次に p38 MAPK の活性の変化を定量的に評価する目的で, 網膜全体から精製した蛋白質を用いた Western blotting を行った. 虚血網膜においてもリン酸化および非リン酸化 p38 MAPK の総和に大きな変化はなかったが, 野生型

マウスでは虚血後 3 時間以降に明確なリン酸化 p38 MAPK の発現が認められた(図 7). 一方, ASK 1 KO マウスでは虚血負荷後も p38 MAPK のリン酸化は抑制されており, 24 時間後にはほとんど観察できないレベルにまで落ち込んでいた. 以上の結果は網膜虚血による網膜神経節細胞死の誘導に ASK 1 から p38 MAPK に至

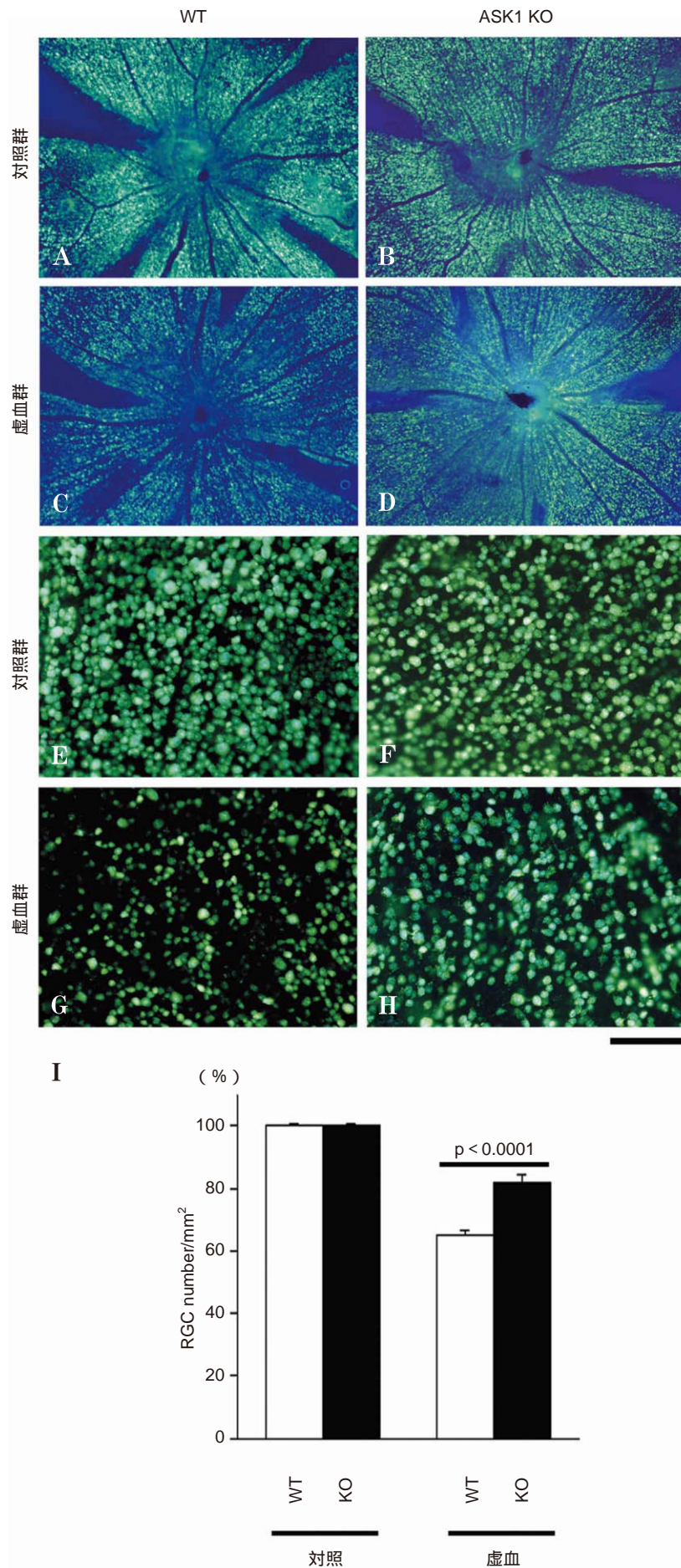


図 5 ASK1 が虚血障害による網膜神経節細胞死に与える影響の解析.

A~H: Fluoro-Gold を用いた網膜神経節細胞の逆行性ラベリングによる野生型マウス (WT: A, C, E, G) および同腹の ASK1 ノックアウトマウス (ASK1 KO: B, D, F, H) の検討. A, B, E, F: 虚血負荷を行わない対照群, C, D, G, H: 20 分間の虚血負荷後 7 日目の網膜. E~H はそれぞれ A~D の拡大画像. バーは A~D が 500 μ m, E~H が 100 μ m.

I: 野生型マウス (WT) および ASK1 ノックアウトマウス (KO) における一平方ミリメートルあたりの網膜神経節細胞 (RGC) 数の定量. 野生型マウスの対照群を 100% とする. 統計処理は Student's *t*-test による.

(文献 8 より許可を得て転載, 一部改変)

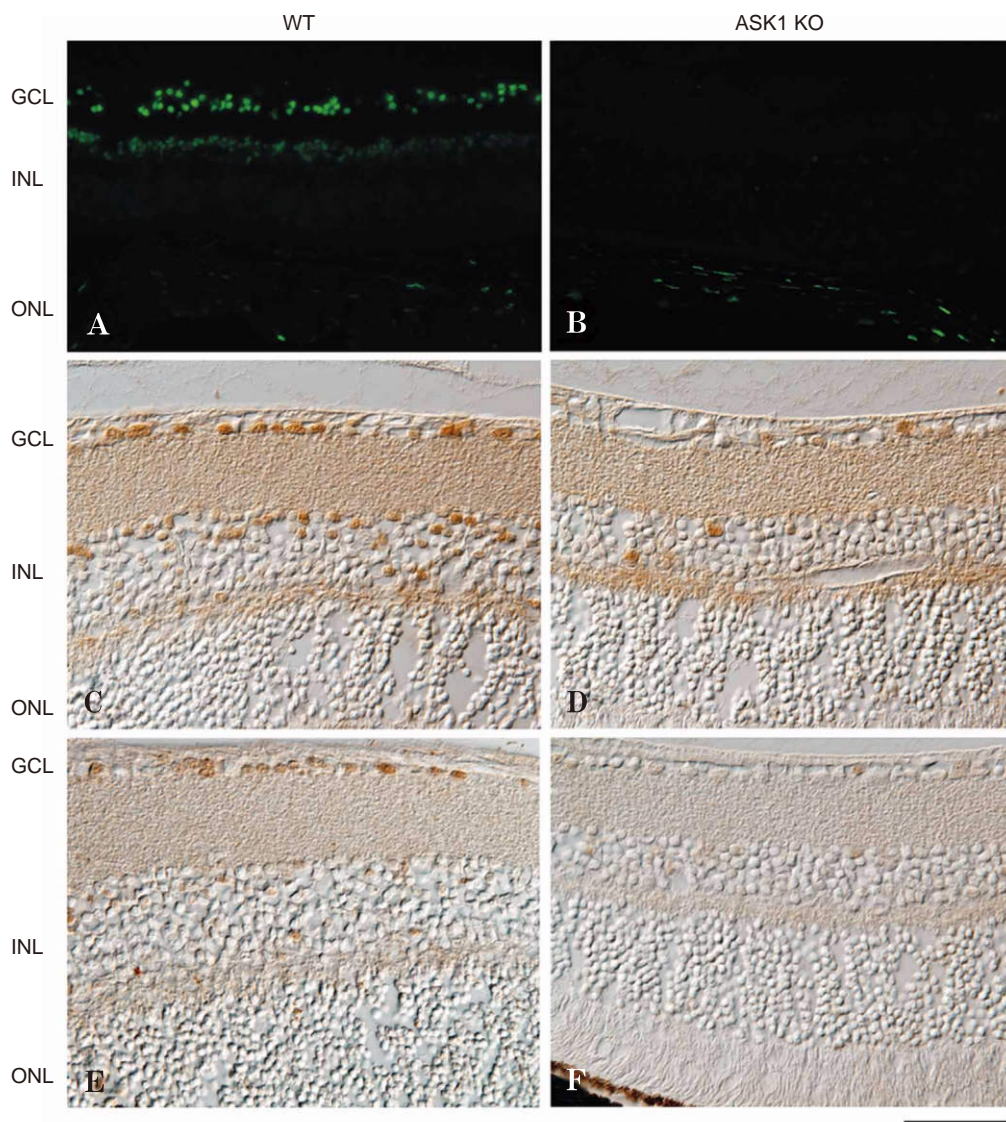


図 6 ASK 1 ノックアウトマウス網膜におけるアポトーシス関連因子の解析.

野生型マウス (WT : A, C, E) および同腹の ASK 1 ノックアウトマウス (ASK 1 KO : B, D, F) の検討. A, B : 20 分間の虚血負荷後 24 時間経過した網膜における Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end-labeling (TUNEL) 法による解析. C~F : 20 分間の虚血負荷後 3 時間経過した網膜における活性型 caspase-3 抗体 (C, D) およびリン酸化 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体 (E, F) による免疫染色. GCL : ganglion cell layer, INL : inner nuclear layer, ONL : outer nuclear layer. バーは A~B が 90 μm , C~F が 50 μm .

(文献 8 より許可を得て転載)

る経路が関与することを示しているが、これは JNK が関与する多くの細胞種と比較して特徴的な点である。また、虚血網膜においては ASK 1—p38 MAPK を標的とした新たな細胞保護療法の可能性が示されたとも考えることができる。

IV 培養網膜神経節細胞における ASK 1 の機能解析

虚血による網膜神経細胞死に関してはグルタミン酸毒性、酸化ストレスなど、多因子の関与が指摘されている¹⁷⁾¹⁸⁾。そこで、次に野生型マウスと ASK 1 KO マウス

の各々から培養網膜神経節細胞を作製し、代表的な酸化ストレスとされる過酸化水素による刺激を行った後に、細胞死量の定量化を行うこととした。我々はまず逆行性ラベリングによって網膜神経節細胞を標識した後に培養細胞を作製し、核染色像との比較を行った(図 8 A~C)。その結果、野生型マウスから作製した培養細胞の約 90% が二重染色され(黄色)、ほぼ純粋な網膜神経節細胞であることが確認された(図 8 C)。次に過酸化水素による細胞死を細胞外液中に放出される乳酸脱水素酵素 Lactate Dehydrogenase (LDH) を指標に定量化したところ、ASK 1 KO マウス由来の網膜神経節細胞では野生型

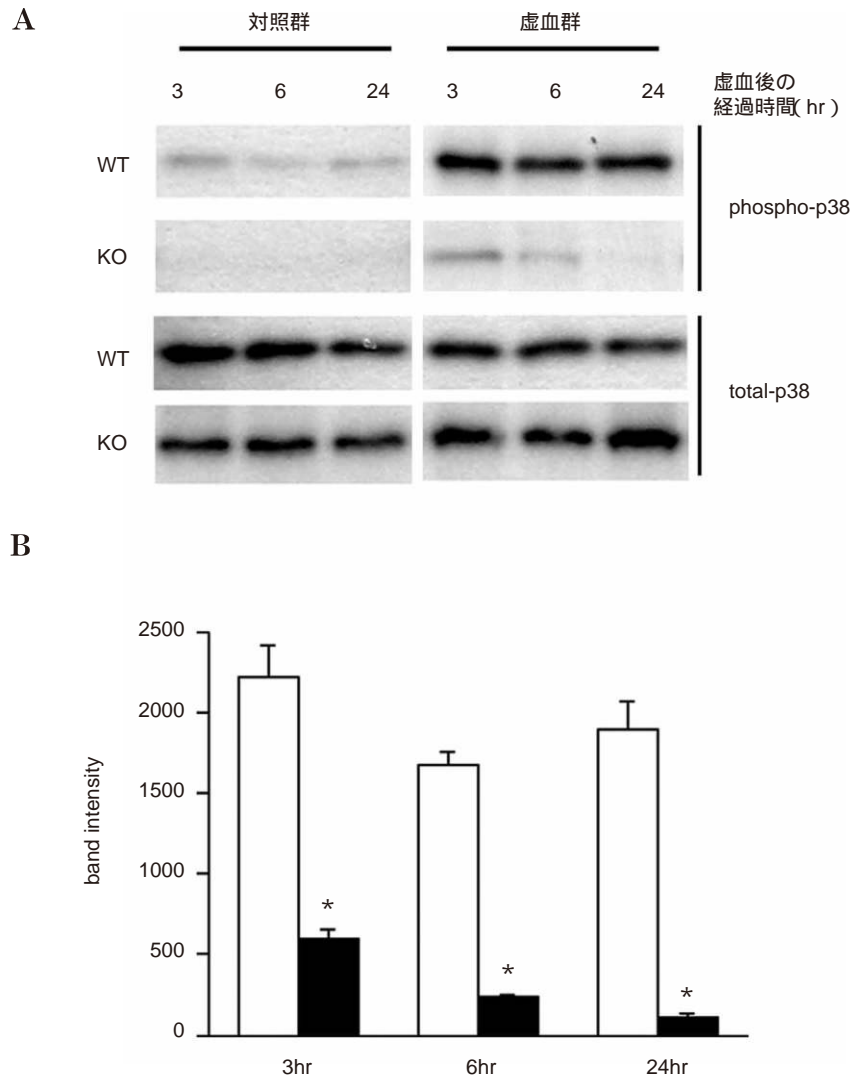


図 7 ASK 1 ノックアウトマウス網膜における p38 MAPK 活性の解析.

A: 野生型マウス (WT) および ASK 1 ノックアウトマウス (KO) の虚血網膜における p38 MAPK 抗体 (total-p38) およびリン酸化 p38 MAPK 抗体 (phospho-p38) による蛋白質発現変化の検討 (Western blotting 法).

B: リン酸化 p38 MAPK 蛋白質の定量的解析. □: WT, ■: KO. *Student's *t*-test. $p < 0.01$.

(文献 8 より許可を得て転載, 一部改変)

由来と比較して, 細胞死が 50% 以下に抑制されることが分かった (図 8D). 以上の結果は ASK 1 の抑制によって網膜神経節細胞のストレス耐性が高まることを示しており, ASK 1 阻害剤を利用した網膜保護療法の可能性を示唆するものである.

V おわりに

以上, 網膜における ASK 1 の発現と機能について, 主に虚血網膜における網膜神経節細胞死との関係を中心に解説した. ASK 1 と酸化ストレスの関係はこれまでも虚血後再灌流が問題となる循環器疾患の分野などで取り上げられてきたが¹⁹⁾, 眼疾患における研究はまだ始まったばかりである. 酸化ストレスと眼疾患との関係では古くから視細胞死に関する研究が行われており, 黄斑

変性症をはじめとする加齢に伴うさまざまな眼疾患との関与が注目を集めている^{20)~23)}. 今後は視細胞変性網膜などにおける ASK 1 の発現パターンの変化や機能解析にも興味をもたれる.

一方, 最近我々はグルタミン酸輸送体 (GLAST) KO マウスが, 正常眼圧緑内障モデル動物として利用できる可能性を報告した¹⁸⁾. GLAST KO マウスの Müller 細胞ではグルタミン酸取り込み量の低下に伴い, グルタミン酸・システイン・グリシンから合成される網膜の主要な抗酸化成分であるグルタチオンの産生が減少している. このことは緑内障の原因として, よく知られているグルタミン酸毒性などに加えて, 酸化ストレスの亢進や ASK 1 の活性が関与する可能性を示唆している²⁴⁾. そこで現在は, GLAST KO マウスと ASK 1 KO マウスを交

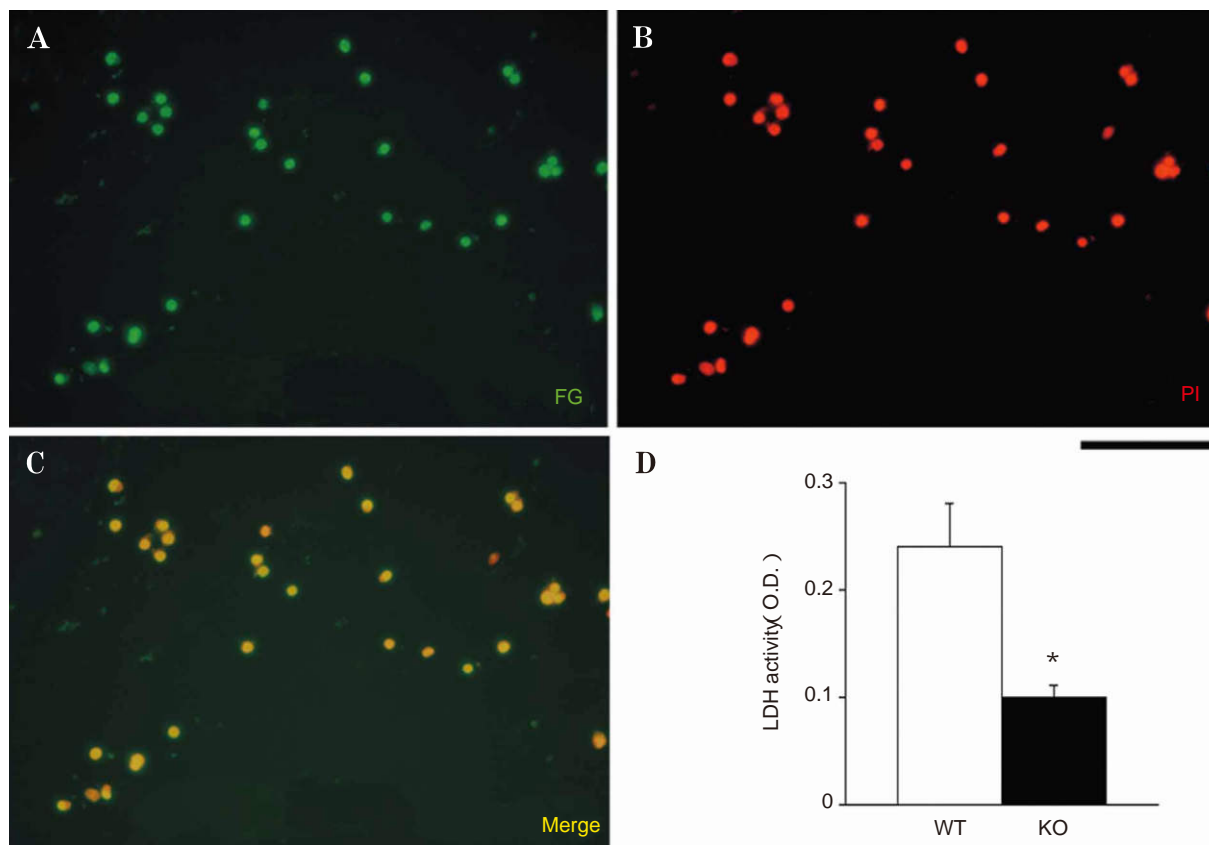


図 8 ASK 1 が酸化ストレスによる網膜神経節細胞死に与える影響の解析.

A～C：培養マウス網膜神経節細胞の純度の確認. Propidium iodide (PI) によって核染色される培養細胞 (B)のうち, 約 90% が Fluoro-Gold (FG) により逆行性ラベリングされた網膜神経節細胞 (A)であることが確認された (C). バーは 100 μm .

D：野生型マウス (WT) および ASK 1 ノックアウトマウス (KO) 由来の培養網膜神経節細胞に対する過酸化水素刺激後にみられた細胞死の定量的解析. LDH: Lactate Dehydrogenase. * Student's *t*-test. $p < 0.05$.

(文献 8 より許可を得て転載)

配することにより, 緑内障様症状の進行を抑制できるか検討中である. また, 最近では緑内障とアミロイド β 蛋白との関係が指摘されている²⁵⁾が, ある種の細胞においては ASK 1 がアミロイド β 蛋白の下流で活性化することが報告されている点も興味深い³⁾. 今後は ASK 1 を標的としたさまざまな眼疾患治療の可能性について, さらに解析を進める予定である.

稿を終えるにあたり, 受賞講演の機会を与えて下さいました学術奨励賞選考委員会委員各位, 第 112 回日本眼科学会総会長の新家 眞教授に心より感謝申し上げます. また, 研究のご指導を賜りました東京大学 一條秀憲教授, 松沢 厚先生, 山梨大学 柏木賢治講師, 飯塚洋子先生, 千葉大学 三田村佳典准教授, 北海道大学 大野重昭教授, 吉田和彦講師, 東京医科歯科大学 田中光一教授, および東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所の原田高幸部門長と研究員の皆さんに深謝いたします.

文 献

- 1) Takeda K, Noguchi T, Naguro I, Ichijo H: Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 199—225, 2008.
- 2) Noguchi T, Takeda K, Matsuzawa A, Saegusa K, Nakano H, Gohda J, et al: Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem* 280: 37033—37040, 2005.
- 3) Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, et al: Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK 1 activation. *Cell Death Differ* 12: 19—24, 2005.
- 4) Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et al: ROS-dependent activation of the TRAF 6-ASK 1-p38 pathway is selectively required for TLR 4-mediated innate

- immunity. *Nat Immunol* 6 : 587—592, 2005.
- 5) 若倉雅登 : 網膜視神経障害に対する予防的神経保護治療へ向けての実験的研究. *日眼会誌* 105 : 843—865, 2001.
 - 6) 原田高幸, 原田知加子 : 神経栄養因子を介したグリア細胞間の相互作用と網膜神経細胞死の調節機構. *日眼会誌* 108 : 674—681, 2004.
 - 7) 谷原秀信 : 分子基盤に基づいた眼疾患の理解と新しい眼薬物療法. *日眼会誌* 109 : 917—959, 2005.
 - 8) Harada C, Nakamura K, Namekata K, Okumura A, Mitamura Y, Iizuka Y, et al : Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress-induced neural cell apoptosis *in vivo*. *Am J Pathol* 168 : 261—269, 2006.
 - 9) Harada C, Harada T, Nakamura K, Sakai Y, Tanaka K, Parada LF : Effect of p75^{NTR} on the regulation of naturally occurring cell death and retinal ganglion cell number in the mouse eye. *Dev Biol* 290 : 57—65, 2006.
 - 10) Nakamura K, Namekata K, Harada C, Harada T : Intracellular sortilin expression pattern regulates proNGF-induced naturally occurring cell death during development. *Cell Death Differ* 14 : 1552—1554, 2007.
 - 11) Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard SS, et al : Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci* 10 : 1449—1457, 2007.
 - 12) Harada C, Harada T, Quah HMA, Namekata K, Yoshida K, Ohno S, et al : Role of neurotrophin-4/5 in neural cell death during retinal development and ischemic retinal injury *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 669—673, 2005.
 - 13) Harada T, Harada C, Parada LF : Molecular regulation of visual system development : more than meets the eye. *Genes Dev* 21 : 367—378, 2007.
 - 14) Harada C, Mitamura Y, Harada T : The role of cytokines and trophic factors in epiretinal membranes : involvement of signal transduction in glial cells. *Prog Retin Eye Res* 25 : 149—164, 2006.
 - 15) Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA : Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20 : 5037—5044, 2000.
 - 16) Singh M, Savitz SI, Hoque R, Gupta G, Roth S, Rosenbaum PS, et al : Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J Neurochem* 77 : 466—475, 2001.
 - 17) Osborne NN, Melena J, Chidlow G, Wood JP : A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head : possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol* 85 : 1252—1259, 2001.
 - 18) Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HMA, Okumura A, Namekata K, et al : The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest* 117 : 1763—1770, 2007.
 - 19) Watanabe T, Otsu K, Takeda T, Yamaguchi O, Hikoso S, Kashiwase K, et al : Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death. *Biochem Biophys Res Commun* 333 : 562—567, 2005.
 - 20) 大野京子 : 加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管の分子機構—特に色素上皮由来因子の役割について—. *日眼会誌* 107 : 657—673, 2003.
 - 21) 坪田一男 : 活性酸素・炎症 : エイジング仮説. *日眼会誌* 111 : 193—205, 2007.
 - 22) 高木 均 : 加齢と網膜血管障害. *日眼会誌* 111 : 207—230, 2007.
 - 23) Bazan NG : Cell survival matters : docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci* 29 : 263—271, 2006.
 - 24) 原田高幸, 原田知加子 : 正常眼圧緑内障モデル動物の確立と治療研究への展開. *臨眼* 62 : 637—643, 2008.
 - 25) Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, et al : Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 13444—13449, 2007.