

200828016A

厚生労働科学研究研究費補助金
感覚器障害研究事業

正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年（2009年）3月

主任研究者 田 中 光 一

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 光一

平成21年（2009年） 3月

目次

I. 総括研究報告書	
正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発 田中光一	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. 正常眼圧緑内障の病態解明と治療法の開発 田中光一	----- 5
2. 正常眼圧緑内障の病態解明と新規治療薬の評価 原田高幸	----- 7
3. 正常眼圧緑内障の遺伝子解析 布施昇男	----- 9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発

研究代表者 田中 光一 東京医科歯科大学教授

研究要旨

グルタミン酸トランスポーターGLAST 欠損マウスは正常眼圧緑内障モデル動物になり得ることをすでに報告した。この GLAST の詳細な遺伝子解析を行う中で、本年度は GLAST の新規 SNPs を 5 個発見し、現在、アリル頻度に正常対照群との間に有意差があるか検討中である。また、アリル頻度が正常対照群と有意差のある GLAST の Exon10 の一塩基多型を見つけた。モデル動物における網膜神経節細胞の変性に、酸化ストレスにより細胞死を誘導する ASK1 遺伝子が関与することを見つけた。さらに、正常眼圧緑内障の新規治療薬の候補として、GLAST によるグルタミン酸の取り込み量を増大させる interleukin-1 (IL-1) を見出した。GLAST の活性促進化合物をハイスループットでスクリーニングできる系を確立し、化合物の検索を開始した。

研究分担者

原田 幸幸・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
布施昇男・東北大学・准教授

A. 研究目的

現在我が国における緑内障有病率（40 歳以上）は約 5%とされ、人口から概算して緑内障の潜在患者数は約 400 万人にもものぼる。病型別に見てみると閉塞隅角緑内障に比べ原発開放隅角緑内障の比率が高く、なおかつ本邦においては正常眼圧緑内障が、開放隅角緑内障に対し 10 倍以上の頻度で存在する。また人種間で明らかに正常眼圧緑内障の罹患率に有意な差があり、本邦で正常眼圧緑内障が多いことが示されている。さらに、社会の高齢化に伴い、緑内障の患者数は増加することが予想され、その治療は活力ある高齢化社会を作るためには必要不可欠である。しかし、正常眼圧緑内障の病態は不明であり、有効な治療法はない。我々は、グルタミン酸トランスポーター GLAST, EAAC1 欠損マウスが、ヒト正常眼圧緑内障のモデル動物であることを報告した。本研究では、正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーター遺伝子 GLAST, EAAC1 の詳細な解析を行い新しい診断法を確立するとともに、モデル動物を用いて正常眼圧緑内障の病態解明と新規治療薬の開発を行なう。

B. 研究方法

1. 正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の遺伝子解析: GLAST の 10 個のエクソン、EAAC1 の 12 個のエクソンに対しプライマーを設計し、患者 DNA を用い、GLAST, EAAC1 の全てのエクソンを PCR で増幅し、塩基配列を決定し、患者特異的遺伝子変異の有無を検討した。患者

標本としては、緑内障遺伝子解析研究会が既に収集している標本を用いた。患者 DNA は、遺伝子型と表現型を後で解析できるように、臨床データがきちんと整備された貴重な標本である。

2. モデル動物における網膜神経節細胞の変性機序の解明: DNA チップを用いて、モデル動物の網膜で発現が変化している遺伝子の網羅的解析を行った。また、GLAST 欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性に、酸化ストレスにより細胞死を誘導する ASK1 遺伝子が関与しているかどうかを調べるため、GLAST 欠損マウスと ASK1 欠損マウスを交配し、約 4 か月間にわたる形態学的観察と電気生理学的な機能検討を行った。

3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価: Gozin 教授が新しく合成した新規神経保護薬 ABS75 (抗酸化ストレス作用と抗興奮毒性作用を併せ持つ化合物) を、モデル動物に腹腔投与し、網膜神経節細胞の細胞数を定量することにより、神経保護効果を検討した。また、グリア細胞から精製した lipoprotein の神経保護作用も検討した。

4. グルタミン酸トランスポーターGLAST の活性促進化合物の検索: IL-1 投与の前後で培養 Müller 細胞におけるグルタミン酸取り込み能の定量的解析と Na imaging を行った。GLAST および Na⁺-K⁺ ATPase 発現量の変化を RT-PCR, Westernblot, 細胞染色法などによって検討した。また網膜組織片の培養系を確立し、細胞外にグルタミン酸、IL-1 を投与して、神経細胞死の程度を調べた。さらに IL-1 の眼球内投与実験を行った。同様の実験を GLAST および EAAC1 欠損マウスに対しても行った。

ヒト GLAST を安定に発現した細胞株を作成し、グルタミン酸取り込み活性を測定することにより、GLAST の活性促進化合物を検索する。また、GLAST の活性を制御する遺伝子を単離するため、GLAST と

複合体を形成する蛋白質の網羅的解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者 DNA を用いた研究は、東京医科歯科大学難治疾患研究所の倫理審査委員会の承認を得ている。さらに、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づき、倫理委員会に緑内障遺伝子の解明のために東北大学眼科外来にて DNA 検体を採取することについて申請しその承認を得てある。対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を十分考慮し、説明と同意(インフォームド・コンセント)を得た。また、モデル動物を用いた研究は、東京医科歯科大学の動物実験委員会・組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の遺伝子解析

GLAST の 10 個のエクソン、EAAC1 の 12 個のエクソンに対しプライマーを設計し、患者 DNA からすべてのエクソンの塩基配列が確実に決定できる系を確立した。GLAST のエクソン 1, 5, 7 は、正常眼圧緑内障 170 例、開放隅角緑内障 160 例、正常 60 例の標本に関して解析を終了した。その結果、エクソン 1 に 1 つ、エクソン 7 に 3 つ、新規の SNP を発見した。また、GLAST のエクソン 2, 4, 6, 10 に関しては、Exon2 (Ser23Arg), Exon4 (Asp112Asp, Lys114Lys; Heterogeneity 0.026), Exon6 (Asp219Glu; Heterogeneity 0.048), Exon10 (Thr482Thr) について、正常眼圧緑内障 96 例、正常 96 例を用いて検索したが、正常眼圧緑内障の検体には既報の SNP は認められなかった。正常眼圧緑内障 3 例においてイントロン 5 に新規の 1 塩基置換 (IVS5-32C/T) 認め、遺伝型、アレル頻度共に正常対照と相関解析を行ったが、 $P=0.31$ で有意な差は認められなかった。また、Exon10 に一塩基多型 r2229894 (G/A) を認めた (3' 非翻訳領域)。今のところアレル頻度において正常対照との間に $P=0.04$ の有意な差を認める。引き続きスクリーニングを継続中である。

2. モデル動物における網膜神経節細胞の変性機序の解明

GLAST 欠損マウス、野生型マウスの網膜から RNA を精製し、affymetrix 社の DNA チップを用いて、発現の変化している遺伝子の網羅的解析を行った。変動している遺伝子の pathway 解析の結果、補体およびコレステロール代謝に関与する一群の遺伝子の発現が変化していることがわかった。また、GLAST 欠損マウスと ASK1 欠損マウスを交配して得られたダブルノックアウトマウスにおいては網膜神経節細胞および視神経の変性過程が遅延し、視神経の機能を示す多局所網膜電位の二次核も保たれていることを確認した。ASK1 欠損による緑内障の治療効果は

GLAST^{-/-}よりも GLAST^{+/-}マウスで特に顕著であった。

3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価
ABS75 を生後 3 週齢から 2 週間、腹腔投与し、網膜神経節細胞の細胞数を計測した。ABS75 の 10 μ g/kg の投与では、網膜神経節細胞の保護効果は見られなかった。現在、投与量を増加し、ABS75 の神経保護効果を検討中である。Lipoprotein の神経保護効果に関しては、*in vitro*, *in vivo* で検討中である。

4. グルタミン酸トランスポーターGLAST の活性促進化合物の検索

野生型マウスおよび EAAC1 欠損マウス由来の培養 Müller 細胞におけるグルタミン酸の取り込みは IL-1 の濃度および時間依存的に上昇したが、GLAST 欠損マウスではそのような上昇は見られなかった。また前二者ではグルタミン酸投与により、細胞内 Na⁺濃度の上昇が観察されたが、GLAST 欠損マウスでは細胞内 Na⁺が比較的低濃度に保たれていた。IL-1 による GLAST および Na⁺-K⁺ ATPase の発現上昇はみられなかったが、膜分画の Western blot により Na⁺-K⁺ ATPase の膜移行が促進されていることが確認された。網膜組織片および眼球におけるグルタミン酸と IL-1 の同時投与では、やはり前二者で網膜神経節細胞の有意な細胞数の増加を認めたが、GLAST 欠損マウスにおいては無効であった。

さらに、化合物の検索に必要な、ヒト GLAST を安定に発現した細胞株を作成した。GLAST の発現は、western blot および RI ラベルされたグルタミン酸による取り込み活性で確認した。また、GLAST 抗体を用いた免疫沈降法により、GLAST 複合体を形成する蛋白質を小脳から精製した。現在、質量分析計を用いて、蛋白質の同定を行っている。

D. 考察

1. 正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の遺伝子解析

GLAST のエクソン 1 に 1 つ、エクソン 7 に 3 つ、新規の SNP を発見した。エクソン 1 の SNP は、プロモーター領域にある。また、エクソン 7 の 3 つの SNPs の中、2 つはアミノ酸置換を伴う SNPs であった。エクソン 7 の SNPs は、現在までのところ、緑内障患者群にしか見つかっておらず、例数を増やし、遺伝型、アレル頻度に正常対照群と有意差があるか検討中である。GLAST の exon10 に一塩基多型 r2229894 (G/A) を認めた (3' 非翻訳領域)。アレル頻度において正常対照との間に $P=0.04$ の有意な差を認め、正常眼圧緑内障の発症に関与していると考えられる。

2. モデル動物における網膜神経節細胞の変性機序の解明

モデル動物における網膜神経節細胞の変性過程に、補体およびコレステロール代謝の異常が関与している可能性が示唆された。補体・コレステロール代謝は新規神経保護薬の標的と成り得る。また、GLAST

欠損マウスにおける正常眼圧緑内障様症状の発症にはグルタミン酸毒性に加え、酸化ストレスの関与が明らかとなっている。今後は ASK1 阻害剤の開発や治療研究を推進していきたい。

3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

ABS75 および lipoprotein の神経保護効果に関しては、継続して解析する必要がある。

4. グルタミン酸トランスポーター GLAST の活性促進化合物の検索

ヒト GLAST を安定に発現した細胞株を樹立したので、これを用い、東京医科歯科大学の所有するケミカルライブラリーの化合物をスクリーニングする。GLAST と複合体を形成する蛋白質を同定し、それが GLAST 活性促進化合物の新しい標的になるか検討する。

E. 結論

グルタミン酸輸送活性に影響を与えるトランスポーター GLAST 遺伝子の SNP はヒト正常眼圧緑内障の発症に関与しており、SNP を解析することにより、正常眼圧緑内障の早期診断が可能になる。また、酸化ストレスによって神経細胞死を誘導する ASK1 遺伝子が GLAST 欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性に関与することがわかった。さらに、グルタミン酸輸送体機能の賦活化が緑内障治療に有効である可能性が *in vivo* でも確認された。今後は緑内障治療に有効と考えられる新規薬剤のスクリーニングを行うとともに、電気生理学的な手法を併用するなどして、より詳細な長期投与効果のデータ取得に努めていきたい。また機能性食品などを利用した抗酸化療法の有効性についても検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Namekata, K., Harada, C., Kohyama, K., Matsumoto, Y., and Harada, T. Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization. *Molecular and Cellular Biology* 28(10), 3273-3280, 2008.

相田知海、田中光二. グルタミン酸トランスポーターの中樞神経系における役割.

Clinical Neuroscience 26(10), 1072-1076, 2008.

相田知海、田中光二. グルタミン酸代謝異常疾患としての正常眼圧緑内障.

実験医学 印刷中 2009.

2. 学会発表

Harada T, Harada C, Tanaka K. Glutamate transporter deficient mice as animal models of normal tension glaucoma. XVIII International Congress of Eye Research. 2008

Tanaka K. The role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *Glaucoma Summer Camp in Awajishima*. 2008

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. 第 19 回 日本緑内障学会. シンポジウム「緑内障治療の未来」

原田高幸. 正常眼圧緑内障モデル動物の確立と神経保護・再生療法の探索. *BMB2008* (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム「中枢神経細胞の再生と変性の分子メカニズム」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分 担 研 究 報 告

正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発

分担研究者 田中 光一 東京医科歯科大学教授

研究要旨

グルタミン酸トランスポーターGLAST 欠損マウスは正常眼圧緑内障モデル動物になり得ることをすでに報告した。この GLAST の詳細な遺伝子解析を行う中で、本年度は GLAST の新規 SNPs を発見した。現在、これらの SNPs が正常眼圧緑内障の診断に応用可能か検討している。さらに、GLAST の活性促進化合物をハイスクリーンでスクリーニングできる系を確立し、化合物の検索を開始した。

A. 研究目的

緑内障は40歳以上では約5%が潜在的に罹患していると考えられており、日本人の中途失明原因の第1位となっている。さらに、社会の高齢化に伴い、緑内障の患者数は増加することが予想され、その治療は活力ある高齢化社会を作るためには必要不可欠である。日本における緑内障の約70%は正常眼圧緑内障であるが、その病態は不明であり、有効な治療法はない。我々は、グルタミン酸トランスポーター GLAST, EAAC1 欠損マウスが、ヒト正常眼圧緑内障のモデル動物であることを報告した。本研究では、正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーター遺伝子の詳細な解析を行い新しい診断法を確立するとともに、モデル動物を用いて正常眼圧緑内障の病態解明と新規治療薬の開発を行なう。

B. 研究方法

- 1.正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の遺伝子解析: GLAST の10個のエクソン、EAAC1 の12個のエクソンに対しプライマーを設計し、患者 DNA を用い、GLAST, EAAC1 の全てのエクソンを PCR で増幅し、塩基配列を決定し、患者特異的遺伝子変異の有無を検討した。
- 2.モデル動物における網膜神経節細胞の変性機序の解明: DNA チップを用いて、モデル動物の網膜で発現が変化している遺伝子の網羅的解析を行った。
- 3.神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価: Gozin 教授が新しく合成した新規神経保護薬 ABS75 (抗酸化ストレス作用と抗興奮毒性作用を併せ持つ化合物) を、モデル動物に腹腔投与し、網膜神経節細胞の細胞数を定量することにより、神経保護効果を検討した。また、グリア細胞から精製した lipoprotein の神経保護作用も検討した。
- 4.グルタミン酸トランスポーターGLAST の活性促進化合物の検索: ヒト GLAST を安定に発現した細胞株を作成し、グルタミン酸取り込み活性を測定することにより、GLAST の活性促進化合物を検索する。また、GLAST の活性を制御する遺伝子を単離するため、

GLAST と複合体を形成する蛋白質の網羅的解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者 DNA を用いた研究は、東京医科歯科大学難治疾患研究所の倫理審査委員会の承認を得ている。また、モデル動物を用いた研究は、東京医科歯科大学の動物実験委員会・組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

- 1.正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の遺伝子解析
GLAST の10個のエクソン、EAAC1 の12個のエクソンに対しプライマーを設計し、患者 DNA からすべてのエクソンの塩基配列が確実に決定できる系を確立した。現在まで、正常眼圧緑内障170例、開放隅角緑内障160例、正常60例に対し、GLAST のエクソン1, 5, 7の解析を終了した。その結果、エクソン1に1つ、エクソン7に3つ、新規のSNPを発見した。新しく見つけたSNPsに関して、例数を増やし、遺伝型、アレル頻度に正常対照群と有意差があるか検討中である。
- 2.モデル動物における網膜神経節細胞の変性機序の解明
GLAST 欠損マウス、野生型マウスの網膜から RNA を精製し、affymetrix 社の DNA チップを用いて、発現の変化している遺伝子の網羅的解析を行った。変動している遺伝子の pathway 解析の結果、補体およびコレステロール代謝に関与する一群の遺伝子の発現が変化していることがわかった。
- 3.神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価
ABS75 を生後3週齢から2週間、腹腔投与し、網膜神経節細胞の細胞数を計測した。ABS75 の10 μ g/kg の投与では、網膜神経節細胞の保護効果は見られなかった。現在、投与量を増加し、ABS75 の神経保護効果を検討中である。Lipoprotein の神経保護効果に関しては、in vitro, in vivo で検討中である。
- 4.グルタミン酸トランスポーターGLAST の活性促進

化合物の検索

化合物の検索に必要な、ヒト GLAST を安定に発現した細胞株を作成した。GLAST の発現は、western blot および RI ラベルされたグルタミン酸による取り込み活性で確認した。また、GLAST 抗体を用いた免疫沈降法により、GLAST 複合体を形成する蛋白質を小脳から精製した。現在、質量分析計を用いて、蛋白質の同定を行っている。

D. 考察

1. 正常眼圧緑内障患者のグルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の遺伝子解析

GLAST のエクソン 1 に 1 つ、エクソン 7 に 3 つ、新規の SNP を発見した。エクソン 1 の SNP は、プロモーター領域にある。また、エクソン 7 の 3 つの SNPs の中、2 つはアミノ酸置換を伴う SNPs であった。エクソン 7 の SNPs は、現在までのところ、緑内障患者群にしか見つかっておらず、例数を増やし、遺伝型、アリル頻度に正常対照群と有意差があるか検討中である。

2. モデル動物における網膜神経節細胞の変性機序の解明

モデル動物における網膜神経節細胞の変性過程に、補体およびコレステロール代謝の異常が関与している可能性が示唆された。補体・コレステロール代謝は新規神経保護薬の標的と成り得る。

3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

ABS75 および lipoprotein の神経保護効果に関しては、継続して解析する必要がある。

4. グルタミン酸トランスポーターGLAST の活性促進化合物の検索

グルタミン酸は 3 Na^+ および H^+ と共に細胞内に共輸送される。IL-1 は $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の膜移動を促進し、細胞内 Na^+ を低濃度に維持することによって GLAST によるグルタミン酸の取り込みを増大させたと考えられる。また、ヒト GLAST を安定に発現した細胞株を樹立したので、これを用い、東京医科歯科大学の所有するケミカルライブラリーの化合物をスクリーニングする。GLAST と複合体を形成する蛋白質を同定し、それが GLAST 活性促進化合物の新しい標的になるか検討する。

E. 結論

今回の研究により、グルタミン酸トランスポーターGLAST の新規 SNPs が見つかった。今後、これらの SNPs が緑内障の診断に応用可能か検討する。また、新規神経保護薬 GLAST の活性促進化合物の high throughput screening 系を確立したので、新規薬剤のスクリーニングを行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

相田知海、田中光一. グルタミン酸トランスポーターの中樞神経系における役割.

Clinical Neuroscience 26(10), 1072-1076, 2008.

相田知海、田中光一. グルタミン酸代謝異常疾患としての正常眼圧緑内障.

実験医学 印刷中 2009.

2. 学会発表

Harada T, Harada C, Tanaka K. Glutamate transporter deficient mice as animal models of normal tension glaucoma. XVIII International Congress of Eye Research. 2008

Tanaka K. The role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. Glaucoma Summer Camp in Awajishima. 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

正常眼圧緑内障の病態解明と新規治療薬の評価

分担研究者 原田 高幸 東京都神経科学総合研究所副参事研究員

研究要旨

網膜におけるグルタミン酸輸送体の中で最も活性が高いのは唯一グリアに発現する glutamate /aspartate transporter (GLAST)であり、GLAST 欠損マウスは正常眼圧緑内障モデル動物になり得ることをすでに報告した。この GLAST を賦活化する薬剤等を検討する中で、本年度は interleukin-1 (IL-1) が $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の膜移動を促進し、結果的に GLAST によるグルタミン酸の取り込み量を増大させ得るを見出した。また酸化ストレスによって神経細胞死を誘導する ASK1 遺伝子を抑制することが、緑内障治療に有用である可能性が示された。

A. 研究目的

緑内障は我が国における失明原因のトップとなっている。本邦における特徴の1つとして正常眼圧緑内障の比率が高いことがあげられるが、詳しい発症メカニズムは解明されていない。我々はグルタミン酸輸送体と網膜神経細胞死に関する研究を継続する中で、GLAST および excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1)の遺伝子欠損マウスが正常眼圧緑内障のモデル動物となり得ることを報告した (*J Clin Invest*, 2007)。この成果はグルタミン酸輸送体の機能を賦活化することが、緑内障治療の一助となる可能性を示している。そこで本研究では既存および新規薬剤がグルタミン酸輸送体の活性に与える影響を調べ、治療薬の候補となり得るかどうかを検討した。また酸化ストレスの抑制が緑内障治療に有効であるかどうかについても合わせて検討を行った。

B. 研究方法

1. IL-1 投与の前後で培養 Müller 細胞におけるグルタミン酸取り込み能の定量的解析と Na imaging を行った。GLAST および $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 発現量の変化を RT-PCR, Westernblot, 細胞染色法などによって検討した。また網膜組織片の培養系を確立し、細胞外にグルタミン酸、IL-1 を投与して、神経細胞死の程度を調べた。さらに IL-1 の眼球内投与実験を行った。同様の実験を GLAST および EAAC1 欠損マウスに対しても行った。
2. GLAST 欠損マウスについて ASK1 欠損マウスとの交配を行い、約4か月間にわたる形態学的観察と電気生理学的な機能検討を行った。

C. 研究結果

1. 野生型マウスおよび EAAC1 欠損マウス由来の培養 Müller 細胞におけるグルタミン酸の取り込みは IL-1 の濃度および時間依存的に上昇したが、GLAST 欠損マウスではそのような上昇は見られなかった。

また前2者ではグルタミン酸投与により、細胞内 Na^+ 濃度の上昇が観察されたが、GLAST 欠損マウスでは細胞内 Na^+ が比較的低濃度に保たれていた。IL-1 による GLAST および $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の発現上昇はみられなかったが、膜分画の Westernblot により $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の膜移行が促進されていることが確認された。網膜組織片および眼球におけるグルタミン酸と IL-1 の同時投与では、やはり前2者で網膜神経節細胞の有意な細胞数の増加を認めたが、GLAST 欠損マウスにおいては無効であった。

2. GLAST 欠損マウスと ASK1 欠損マウスを交配して得られたダブルノックアウトマウスにおいては網膜神経節細胞および視神経の変性過程が遅延し、視神経の機能を示す多局所網膜電位の二次核も保たれていることを確認した。ASK1 欠損による緑内障の治療効果は GLAST^{-/-}よりも GLAST^{+/-}マウスで特に顕著であった。

D. 考察

1. グルタミン酸は 3Na^+ および H^+ と共に細胞内に共輸送される。IL-1 は $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の膜移動を促進し、細胞内 Na^+ を低濃度に維持することによって GLAST によるグルタミン酸の取り込みを増大させたと考えられる。
2. GLAST 欠損マウスにおける正常眼圧緑内障様症状の発症にはグルタミン酸毒性に加え、酸化ストレスの関与が明らかとなっている (Harada et al., *J Clin Invest*, 2007)。今後は ASK1 阻害剤の開発や治療研究を推進していきたい。

E. 結論

今回の研究により、グルタミン酸輸送体機能の賦活化が緑内障治療に有効である可能性が *in vivo* でも確認された。今後は緑内障治療に有効と考えられる新規薬剤のスクリーニングを行うとともに、電気生理学的な手法を併用するなどして、より詳細な長期

投与効果のデータ取得に努めていきたい。また機能性食品などを利用した抗酸化療法の有効性についても検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Namekata, K., Harada, C., Kohyama, K., Matsumoto, Y., and Harada, T. Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization. *Molecular and Cellular Biology* 28(10), 3273-3280, 2008.

2. 学会発表

Harada T., Harada C, Tanaka K. Glutamate transporter deficient mice as animal models of normal tension glaucoma. XVIII International Congress of Eye Research

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. 第19回日本緑内障学会, シンポジウム「緑内障治療の未来」

原田高幸. 正常眼圧緑内障モデル動物の確立と神経保護・再生療法の探索. BMB2008 (第31回日本分子生 物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム「中枢神経細胞の再生と変性の分子メカニズム」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

正常眼圧緑内障の遺伝子解析

分担研究者 布施 昇男 東北大学大学院医学研究科眼科准教授

研究要旨

本研究では、正常眼圧緑内障の病態解明のために、グルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 遺伝子のエクソン、プロモーターの配列を解析し、正常眼圧緑内障特異的な遺伝子変異を見つけることを目的とした。GLAST 遺伝子においてイントロン5の新規の塩基置換を認めた (IVS5-32C/T) が、遺伝型、アリル頻度共に正常眼圧緑内障と正常対照との相関解析では、 $P=0.31$ で有意な差は認められなかった。また、Exon10 に一塩基多型 r2229894 (G/A) を認め (3' 非翻訳領域)、アリル頻度において正常対照との間に $P=0.04$ の有意な差を認めた。グルタミン酸トランスポーター GLAST 遺伝子はヒト正常眼圧緑内障の発症に関与していると考えられる。

A. 研究目的

現在我が国における緑内障有病率 (40 歳以上) は約 5% とされ、人口から概算して緑内障の潜在患者数は約 400 万人にもなる。病型別に見てみると閉塞隅角緑内障に比べ原発開放隅角緑内障の比率が高く、なおかつ本邦においては正常眼圧緑内障が、開放隅角緑内障に対し 10 倍以上の頻度で存在する。また人種間で明らかに正常眼圧緑内障の罹患率に有意な差があり、本邦で正常眼圧緑内障が多いことが示されている。その病態解析には、モデル動物を用いたアプローチが有用であると考えられる。当グループは、グルタミン酸トランスポーター GLAST, EAAC1 欠損マウスでは、眼圧が正常であるにも関わらず、網膜神経節細胞が加齢に伴い選択的に変性し、視神経乳頭陥凹が起こることを発見した。これらの表現型は、ヒトの眼圧緑内障に酷似しており、世界で初めての正常眼圧緑内障のモデル動物である。本研究では、正常眼圧緑内障の病態解明のために、緑内障遺伝子解析研究会が収集した患者標本を用い、GLAST, EAAC1 の全てのエクソン、プロモーターの配列を解析し、正常眼圧緑内障特異的な遺伝子変異を見つけることを目的とした。

B. 研究方法

グルタミン酸トランスポーター遺伝子GLAST, EAAC1 遺伝子に焦点を絞った遺伝子解析を計画したが、まずGLAST遺伝子に着目した。GLAST遺伝子のすべての10個のエクソンに対し、イントロン/エクソン境界を含むようにプライマーを設定し、まずそのPCR条件を設定した。PCRがスムーズに試行できていることを確認後、PCRダイレクトシーケンス法にて、一塩基多型 (SNP) やミスセンス変異が無いかどうか確認した。PCRはTakara Ex Taqを用いて行い、PCR断片はExoSAP-ITで精製し、BigDyeTM Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction Kit でシーケンス反応を行った。シーケンサーは、ABI PRISMTM 3100 Genetic Analyzerを使用した。患者標本としては、緑内障遺伝子解析研究会が既に収集している標本をまず96例、正常対照96例を用いている。標本は、遺伝子型と表現型 (臨床型) を後に解析できるように、臨床データがきちんと整備された貴重な標本である。まず、NCBIのSNPデータベースに登録されている以下のSNPが無いかどうかエクソン2, 4, 6, 10を確認した。Exon2 (Ser23Arg), Exon4 (Asp112Asp, Lys114Lys), Exon6 (Asp219Glu), Exon10 (Thr482Thr)について検索した。また、他のイントロンの多型等も解析した。塩基配列の確認は、DNAシーケンスアセンブルソフトウェアSEQUENCHERTMを用いた。

(倫理面への配慮)

この研究課題の計画にあたり、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号) に基づき、倫理委員会に緑内障遺伝子の解明のために東北大学眼科外来にてDNA検体を採取することについて申請しその承認を得てある。対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を十分考慮し、説明と同意 (インフォームド・コンセント) を得た。

C. 研究結果

グルタミン酸トランスポーターGLAST遺伝子のExon 2 (Ser23Arg), Exon4 (Asp112Asp, Lys114Lys; Heterogeneity 0.026), Exon6 (Asp219Glu; Heterogeneity 0.048), Exon10 (Thr482Thr) について検索したが、緑内障遺伝子解析研究会における正常眼圧緑内障の検体には既報のSNPは認められなかった。NTG3例においてイントロン5に新規の塩基置換を認めた (IVS5

-32C/T) が、遺伝型、アリル頻度共に正常対照と相関解析を行ったが、 $P=0.31$ で有意な差は認められなかった。また、Exon10に一塩基多型r2229894 (G/A) を認めた (3' 非翻訳領域)。今のところアリル頻度において正常対照との間に $P=0.04$ の有意な差を認める。引き続きスクリーニングを継続中である。

D. 考察

グルタミン酸トランスポーター *GLAST* 遺伝子の一塩基多型と正常眼圧緑内障には相関があり、正常眼圧緑内障の発症に関与していると考えられる。

E. 結論

グルタミン酸輸送活性に影響を与えるトランスポーター遺伝子のSNPはヒト正常眼圧緑内障の発症に関与しており、SNPを解析することにより、正常眼圧緑内障の早期診断、病態解明も可能になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
相田知海 田中光一	グルタミン酸トランス ポーターと精神神経疾 患	杉山雄一 金井好克	最新トランスポー ター研究2009	メディカル ドゥ	東京	2008	212-217

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Namekata K, Harada C, Kohyama K, Matsumoto Y, Harada T.	Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na ⁺ /K ⁺ -ATPase via actin depolymerization.	Molecular and Cellular Biology	28巻10号	3273-3280	2008
相田知海 田中光一	グルタミン酸トランスポー ターの中樞神経系における役割	Clinical Neuroscience	26巻10号	1072-1076	2008
相田知海 武田拓也 田中光一	グルタミン酸代謝異常疾患と しての正常眼圧緑内障	実験医学	印刷中		2009
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.	臨床眼科	62巻5号	637-643	2008
原田高幸 原田知加子	正常眼圧緑内障とグルタミン 酸輸送体.	あたらしい 眼科	25巻12号	1679-1680	2008
原田高幸 原田知加子	緑内障における神経保護研究.	あたらしい 眼科	26巻1号	71-72	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Interleukin-1 Stimulates Glutamate Uptake in Glial Cells by Accelerating Membrane Trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via Actin Depolymerization[∇]

Kazuhiro Namekata,¹ Chikako Harada,¹ Kuniko Kohyama,² Yoh Matsumoto,² and Takayuki Harada^{1*}

Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Fuchu, Tokyo, Japan,¹ and Department of Molecular Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Fuchu, Tokyo, Japan²

Received 5 December 2007/Returned for modification 7 January 2008/Accepted 29 February 2008

Interleukin-1 (IL-1) is a mediator of brain injury induced by ischemia, trauma, and chronic neurodegenerative disease. IL-1 also has a protective role by preventing neuronal cell death from glutamate neurotoxicity. However, the cellular mechanisms of IL-1 action remain unresolved. In the mammalian retina, glutamate/aspartate transporter (GLAST) is a Na⁺-dependent, major glutamate transporter localized to Müller glial cells, and loss of GLAST leads to glaucomatous retinal degeneration (T. Harada, C. Harada, K. Nakamura, H. A. Quah, A. Okumura, K. Namekata, T. Saeki, M. Aihara, H. Yoshida, A. Mitani, and K. Tanaka, *J. Clin. Invest.* 117:1763–1770, 2007). We show here that IL-1 increases glutamate uptake in Müller cells by a mechanism that involves increased membrane Na⁺/K⁺-ATPase localization, required for counteracting the Na⁺-glutamate cotransport. IL-1 activated the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/capase 11 pathway, which destabilizes the actin cytoskeleton allowing Na⁺/K⁺-ATPase membrane redistribution. Furthermore, pretreatment with IL-1 protected retinal neurons from glutamate neurotoxicity through p38 MAPK signaling. Our observations suggested that IL-1 acts as a potential neuroprotective agent by modulating the functions of the glia-neuron network.

It is well known that the release of excitatory amino acids, such as glutamate, can cause neuronal cell death. Excessive extracellular concentrations of glutamate induce an uncontrolled elevation of intracellular calcium that enters through chronically activated glutamate receptors. Glutamate uptake by glial cells is a well-known mechanism for maintaining low extracellular level of glutamate and promoting efficient inter-neuronal signaling in the central nervous system. In addition, the same process is considered a neuroprotective mechanism during neurodegeneration. Clearance of glutamate from the extracellular space is accomplished primarily by the action of glutamate transporters (9). In the central nervous system, glutamate/aspartate transporter (GLAST) and glutamate transporter 1 (GLT-1) are Na⁺-dependent glutamate transporters found in astrocytes (49, 53). Genetic deletion of GLAST and/or GLT-1 causes abnormal brain development and neurological symptoms such as motor deficits, increased susceptibility to seizures, and exacerbation of noise-induced hearing loss (15, 35, 52, 53). We previously identified GLAST as the only glial-type glutamate transporter in the retina, whereas GLT-1 is expressed in neurons including bipolar cells and photoreceptors (20, 23). Not surprisingly then, GLAST is more active in preventing glutamate neurotoxicity after ischemia than GLT-1 (18). In addition, glaucomatous retinal and optic nerve degeneration were observed in GLAST-deficient mice (20). Since glutamate transport is coupled with the cotransport of 3Na⁺, the efficiency of glutamate uptake is influenced by intracellular

and extracellular Na⁺ concentrations (34, 48). Elevated intracellular Na⁺ is decreased by Na⁺/K⁺-ATPase, which is in turn dependent on ATP levels (2, 11, 16). However, severe ischemia and other states that cause ATP depletion in glial cells lead to elevated intracellular Na⁺ and resultant failure of glutamate uptake (34).

Interleukin-1 (IL-1) is an important mediator of brain injury induced by ischemia or trauma and has been implicated in chronic brain diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple sclerosis (1, 43). Deletion of IL-1 in mice conferred approximately 80% neuroprotection against neuronal damage due to ischemia (4). Now, conflicting evidence has proposed a neuroprotective role for IL-1. For example, pretreatment of IL-1 protects glutamate-induced neuronal cell death in cortical and retinal neurons (6, 30, 47) by increasing the synthesis of neurotrophic factors (8). This neuroprotective effect of IL-1 was reduced by administration of nerve growth factor, nerve growth factor neutralizing antibody, or IL-1 receptor antagonist. These observations suggested that IL-1 might mediate beneficial effects on neurons through its receptor; however, the detailed mechanism and intracellular signaling underlying such a role remain unknown. This study examined the putative role of IL-1 in glutamate uptake by using cultured retinal glial cells as well as possible mechanisms of IL-1-induced neuroprotection. We showed that IL-1 stimulation enhances glutamate uptake without affecting GLAST expression and protects retinal neurons from glutamate neurotoxicity.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan. Phone: 81-42-325-3881. Fax: 81-42-321-8678. E-mail: harada@tmin.ac.jp.

[∇] Published ahead of print on 10 March 2008.

MATERIALS AND METHODS

Animals. C57BL/6J mice were obtained from CLEA Japan (Tokyo, Japan), and all animal procedures were performed in accordance with the Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience Guidelines for the Care and Use of Ani-

imals. Intraocular injection of IL-1 (100 ng/eye; ProSpec-ThermoGene, Rehovot, Israel) and glutamate (8.8 µg/eye; Wako, Osaka, Japan) and induction of ischemia were achieved essentially as previously described (18). Briefly, we introduced sterile saline into the anterior chamber of the left eye at 120 cm of H₂O pressure for 20 min, while the right eye served as a nonischemic control. Animals were sacrificed 6 h after reperfusion, and the posterior parts of the eyes were sectioned sagittally.

Immunohistochemistry. Retinal ganglion cells (RGCs) were retrogradely labeled from the superior colliculus with Fluoro-Gold (Fluorochrome, Englewood, CO) as previously reported (18). The 7-µm-thick retinal sections were double labeled with mouse anti-glutamine synthetase (1.0 µg/ml; Chemicon, CA) and rabbit anti-IL-1 receptor (0.5 µg/ml; IBL, Gunma, Japan), rabbit anti-GLAST (0.5 µg/ml) (23), or rabbit anti-caspase 11 (0.5 µg/ml; Santa Cruz, CA) as primary antibodies. Cy-3-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG; Jackson ImmunoResearch, PA) and Cy-2-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) were used as secondary antibodies. For terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining, paraffin sections were treated with 10 µg/ml proteinase K and then incubated in 0.26 U/µl terminal deoxynucleotidyltransferase in the supplied buffer (Invitrogen, CA) and 20 µmol/liter biotinylated 16-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) for 1 h at 37°C. Sections were viewed by epifluorescence on a light microscope (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) equipped with Plan Fluor objectives and connected to a DP70 camera (Olympus).

Retinal explant culture. Retinal explant cultures were made as described previously (25) with some modification. Briefly, the neural retina without pigment epithelium was placed on a Millicell chamber filter (30-mm diameter, 0.4-µm pore size; Millipore, MA) with the ganglion cell layer (GCL) upwards. The chambers were transferred to a six-well culture plate, with each well containing 1 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium-F-12 medium (Invitrogen) containing 20% heat-inactivated horse serum (Invitrogen), changed every other day. The cells were cultured at 34°C in 5% CO₂. In some experiments, retinas were preincubated with or without 50 ng/ml IL-1 for 24 h and then stimulated with 5 mM glutamate for 1 h. After 72 h, retinal explants were immunostained with antibody against NeuN (1.0 µg/ml; Chemicon).

Glutamate uptake assay. Primary cultured Müller cells were prepared as described previously (19). Müller cells were cultured in 5.5 mM glucose-containing Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The culture media were replaced with a modified Hanks balanced salt solution for a 20-min preincubation, before the addition of 0.025 mCi/ml [³H]glutamate (Amersham, Uppsala, Sweden) and 100 µM unlabeled glutamate to the medium. Uptake was terminated after 7 min by three washes in ice-cold Hanks balanced salt solution, immediately followed by cell lysis in 0.1 M NaOH. Aliquots were taken for scintillation counting, and protein concentration was determined using bovine serum albumin standards. In some experiments, Müller cells were stimulated with IL-1 alone or with both IL-1 and cytochalasin D (0.3 µM; Biomol Research Laboratories, PA) for 12 or 24 h before assay. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (10 µM; Calbiochem, CA) or Jun N-terminal kinase (JNK) (10 µM; Calbiochem) were applied 10 min before IL-1 treatment. MK-801 (100 µM; Tocris Cookson, MO), DNQX (100 µM; Tocris Cookson), QX-314 (3 mM; Calbiochem), or ouabain (10 mM; Calbiochem) was applied to Müller cells 20 min before the assay.

Immunoblotting. Retinas and cultured cells were homogenized in ice-cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail (Roche). Surface proteins were purified using a cell surface protein isolation kit (Pierce, IL) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cell surface proteins were labeled with EZ-Link sulfo-NHS-SS-biotin, which binds to the amino group on the extracellular protein domain, and purified on an avidin column. The bound (cell surface) and unbound (intracellular) proteins were subjected to immunoblot analysis. Protein concentrations were determined using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, CA). Samples were separated on sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and subsequently electrotransferred to an Immobilon-P filter (Millipore). Membranes were incubated with antibodies against GLAST (1:1,000), p38 MAPK (1:1,000; BD Biosciences, Ontario, Canada), phospho-p38 MAPK (1:1,000; BD Biosciences), JNK (1:1,000; BD Biosciences), phospho-JNK (1:1,000; BD Biosciences), Na⁺/K⁺-ATPase (1:1,000; Santa Cruz), cofilin (1:1,000; BD Biosciences), phosphocofilin (1:1,000; BD Biosciences), or IL-1 (1:1,000; Rockland, PA). Primary antibody binding was detected using horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG secondary antibody (Amersham, NJ) and visualized using the ECL Plus Western blotting system (Amersham).

Intracellular Na⁺ measurement. Cultured Müller cells grown on glass-bottomed dishes were imaged live to record the dynamic intracellular ion state using the fluorescent dye CoroNa Green AM, as described previously (36). Müller cells were loaded with 10 µM CoroNa Green AM in Hanks balanced salt solution at

37°C for 45 min and then placed in an open-bath imaging chamber. Cells were excited every 10 s at 345 nm, and the emission fluorescence at 510 nm was recorded. In some experiments, 1 mM ouabain or 3 mM QX-314 was applied together with the CoroNa Green AM. Inhibitors of p38 MAPK or JNK were applied to cells 10 min before IL-1 treatment. Image acquisition was computer controlled using Metaview software (Universal Imaging, PA).

RT-PCR. Total RNA was isolated from cultured Müller cells with Isogen reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan) and then reverse transcribed with a Revertra Ace instrument (Toyobo, Osaka, Japan) to obtain cDNA. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis was performed as previously described (19). The primer sequences used in PCR were as follows: caspase 11, 5'-ATG GCTGAAAACAAACACCC-3' and 5'-TAGCTAAGTCTTCAAGAAG-3'; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA C-3' and 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'. Reactions were conducted under the following conditions: preheating at 94°C for 2 min and then 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and polymerization at 72°C for 30 min. The expected sizes of the amplified cDNA fragments of caspase 11 and actin were 500 and 452 bp, respectively.

RNA interference. RNA oligomers containing 21 nucleotides were synthesized in the sense and antisense directions corresponding to mouse caspase 11 at nucleotides 270 to 288 (5'-GGAAAUGGAGGAACAGAA-3') with dTdT overhangs at each 3' terminus (JBioS, Saitama, Japan). A scrambled sequence, 5'-UUUCUGGUUCCUCCAUCC-3', was used as a negative control. Annealing was performed as described previously (10). Transfection into Müller cells was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Immunocytochemistry. Cells grown on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 15 min. The coverslips were incubated in 5% horse serum in phosphate-buffered saline for at least 1 h at room temperature for blocking and then incubated overnight with rabbit anti-caspase 11 (1.0 µg/ml; Santa Cruz) at 4°C. They were then incubated with Cy-3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). F-actin was also visualized in the cells by incubation with phalloidin conjugated with rhodamine for 30 min at room temperature.

Statistics. Data are presented as means ± standard errors except as noted. When statistical analyses are performed, Student's *t* test was used to estimate the significance of the results. Statistical significance was accepted at *P* < 0.05.

RESULTS

Glutamate uptake by Müller cells is enhanced by IL-1-MAPK signaling. We first examined the expression of IL-1 receptor in mouse retina by immunohistochemical analysis. IL-1 receptor was mainly localized to the inner retina (Fig. 1A), where it colabeled (Fig. 1C) with glutamine synthetase, a marker of Müller glial cells (Fig. 1B). Double-positive cells were also observed in the GCL (Fig. 1D to F), but IL-1 receptor expression was not detected in retrogradely labeled RGCs (Fig. 1G to I). IL-1 receptor is thus found in Müller glial cells but not RGCs.

Glutamate uptake by GLAST in Müller cells (Fig. 1J to L) is important for retinal neuroprotection *in vivo* (20, 23). Since IL-1 receptor was expressed in Müller cells, we examined how IL-1 affects the capacity of glutamate uptake in cultured Müller cells. Glutamate transport activity was measured as uptake of [³H]glutamate. Treatment with 0.1 to 200 ng/ml IL-1 for 24 h significantly increased the glutamate uptake activity in Müller cells (Fig. 2A), and IL-1 at 50 ng/ml increased the activity to significant levels after 6 h (Fig. 2B).

IL-1 activates MAPKs such as p38 MAPK and JNK (14, 40, 50). Based on these previous findings, we carried out immunoblot analysis and found that IL-1 strongly induced p38 MAPK and JNK phosphorylation within 15 min (Fig. 2C). We further examined whether p38 MAPK and JNK are involved in IL-1-dependent glutamate uptake by using SB203580 and JNK inhibitor II, which are pharmacological blockers for p38

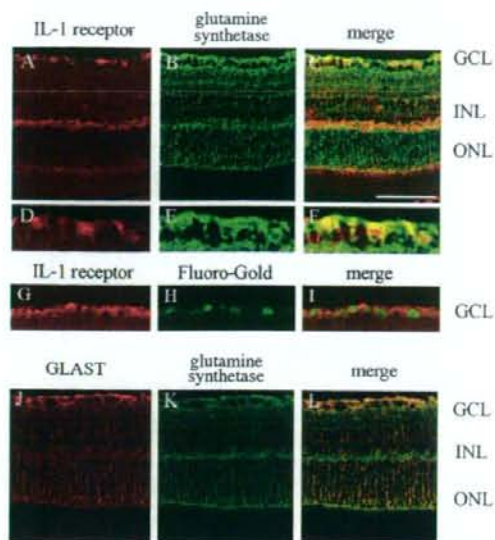


FIG. 1. Expression of IL-1 receptor in the mouse retina. (A to C) Immunohistochemical analysis of mouse retina double stained (C) with antibodies against IL-1 receptor (A) and glutamine synthetase (B), a specific marker for Müller glial cells. (D to F) Enlarged images of the GCL in panels A to C, respectively. (G to I) Expression of IL-1 receptor (G) and retrogradely labeled RGCs (H) in the GCL. (J to L) Immunohistochemical analysis of mouse retina double stained (L) with antibodies against GLAST (J) and glutamine synthetase (K). INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Bars, 50 μm (A to C and J to L) and 25 μm (D to I).

MAPK and JNK, respectively. SB203580 suppressed IL-1-induced enhancement of glutamate uptake, while JNK inhibitor II had no effect (Fig. 2D), indicating that activation of the IL-1-p38 MAPK, but not the IL-1-JNK, pathway is necessary for IL-1-dependent glutamate transport. On the other hand, IL-1 had no effect on GLAST expression levels in cultured Müller cells (Fig. 2E).

Our present data suggested that IL-1 prevents retinal degeneration caused by glutamate neurotoxicity. Retinal explants stimulated with 5 mM glutamate for 1 h (Fig. 3B) showed a clear decrease in the number of NeuN-positive neurons in the GCL compared with nontreated controls (Fig. 3A) 72 h after treatment. However, pretreatment of the cells with IL-1 significantly increased the number of surviving neurons (Fig. 3C and D). Addition of a MAPK inhibitor, SB203580, to the retinal explants at the same time as glutamate and IL-1 abolished the neuroprotective effect of IL-1 (Fig. 3D). Consistent with our *in vitro* study (Fig. 2D), IL-1 thus seemed to protect retinal neurons from glutamate neurotoxicity via the p38 MAPK pathway. We also examined the effect of IL-1 on RGC apoptosis *in vivo*. Intraocular injection of glutamate (8.8 $\mu\text{g}/\text{eye}$) increased the number of TUNEL-positive cells in the GCL (Fig. 3F) compared with nontreated controls (Fig. 3E). IL-1 pretreatment (100 ng/eye) significantly suppressed apoptotic cell death due to glutamate neurotoxicity *in vivo* (Fig. 3G and H).

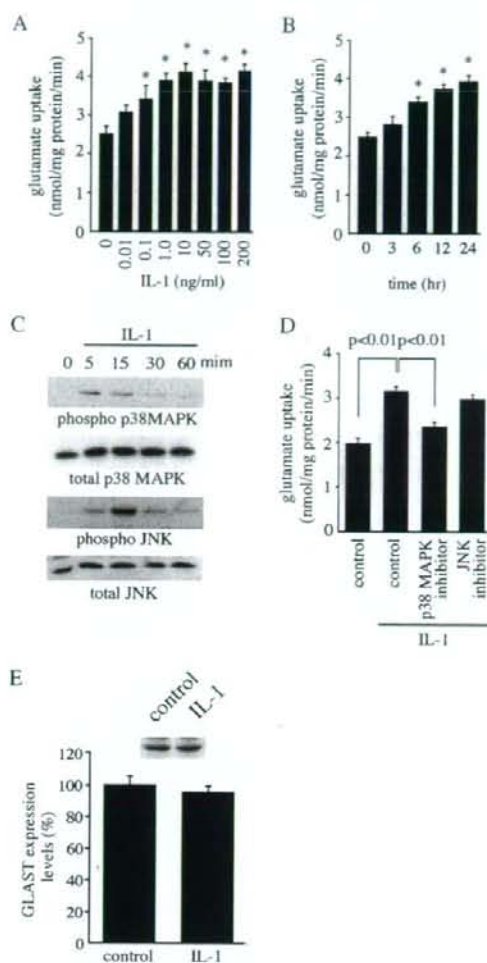


FIG. 2. IL-1 increases glutamate uptake by Müller glial cells. (A) Concentration dependency of glutamate transport activity in Müller cells treated with IL-1 for 24 h. *, $P < 0.05$. (B) Time dependency of glutamate transport activity in Müller cells treated with 50 ng/ml of IL-1. *, $P < 0.05$. (C) Activation of p38 MAPK and JNK in Müller cells treated with 50 ng/ml of IL-1 for indicated times. Two micrograms of proteins was separated on an SDS-polyacrylamide gel followed by immunoblot analysis using anti-p38 MAPK, anti-phospho-p38 MAPK, anti-JNK, and anti-phospho-JNK antibodies. (D) Effect of p38 MAPK or JNK inhibition on IL-1-induced glutamate uptake activity in Müller cells, showing suppression by the p38 MAPK inhibitor but not by the JNK inhibitor. (E) GLAST expression levels in Müller cells treated with 50 ng/ml of IL-1 for 24 h. The data are means \pm standard errors of three samples for each group.

IL-1 suppresses intracellular Na^+ accumulation by altering intracellular Na^+/K^+ -ATPase expression pattern. Glutamate transport is coupled to the cotransport of 3Na^+ ; thus, glutamate uptake by Müller cells may be influenced by intracellular Na^+ concentrations (34, 48). To address this possibility, we used a sodium channel inhibitor, QX-314, or an Na^+/K^+ -ATPase inhibitor, ouabain. The intracellular Na^+