

200930007A

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21年度 総括・分担研究報告書

平成22年（2010年）5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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 光一

平成22年(2010年) 5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	----- 6
2. 正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の評価 原田高幸	----- 8
3. 正常眼圧緑内障の遺伝子解析 布施昇男	----- 10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
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, EAAC1 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。GLAST, EAAC1 遺伝子の正常眼圧緑内障特異的な遺伝子変異を見つけるため、GLAST, EAAC1 のエクソン、プロモーター領域の配列を解析した。本年度は、GLAST の緑内障関連変異を4個発見した。さらに、GLAST 遺伝子の copy number variation (CNV)の解析を行い、GLAST が1コピーに減少している症例を見つけた。しかし、EAAC1 に関しては、有意な一塩基多型・変異は見つかっていない。また、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明らかにした。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 arundic acid と抗酸化ストレス活性を持つ水素水を見出した。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、1万個の化合物の検索を行った。また新たなグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 は細胞骨格運動を刺激し、視神経損傷後の軸索再生を顕著に亢進することを明らかにした。

研究分担者

原田高幸・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。

さらに緑内障を含む多くの視神経変性疾患において望まれる軸索再生療法の第一歩として、視神経軸索伸長の手法を検討した。特に本研究では、近年新たに発見された Rac1 を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 の細胞内動態と軸索伸長時のシグナル伝達メカニズムの解明を目指

す。

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：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。GLAST遺伝子の10個のエクソン、EAAC1遺伝子は12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<sup>®</sup> を用いて行い、PCR断片はExoSAP-IT<sup>®</sup> で精製、BigDye<sup>™</sup> 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 PRISM<sup>™</sup> 3100 Genetic Analyzerを使用した。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（正常眼圧緑内障276例、開放隅角緑内障163例、正常対照298例）。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 SEQUENCHER<sup>™</sup>を用いた。GLASTのcopy number variationの解析は、GLAST遺伝子のエクソン1と3のTaqManプローブを用いたreal-time PCR法を用いて行った。

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：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 (GLAST+/-および GLAST-/-) と

ASK1 欠損マウス (ASK1<sup>-/-</sup>) との交配を行い、約 6 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。さらに GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> マウスの眼圧、酸化ストレス (malondialdehyde)、グルタチオン産生量を測定した。また緑内障との関係が注目される腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) を ASK1<sup>-/-</sup>由来の培養 Müller グリア細胞に投与し、刺激によって産生される free radical の 1 つである一酸化窒素の産生量を測定した。さらに ASK1<sup>-/-</sup>由来の培養網膜神経節細胞における TNF 耐性を検討した。

3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価: 小野薬品が開発したグリア型グルタミン酸トランスポーター GLAST の活性を促進する化合物である arundic acid および抗酸化ストレス作用のある水素水を、モデル動物に投与し、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。

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用い、グルタミン酸取り込み活性を測定することにより、1 万個の化合物のスクリーニングを行った。

5. 網膜神経節細胞の軸索再生機序の解明とその促進法の開発: 培養網膜神経節細胞に Dock3 を過剰発現し、軸索伸長効果が得られるかを定量的に解析した。さらに脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) と Dock3 による相乗効果の有無を検討するとともに、培養網膜組織片を用いて BDNF による Dock3 の細胞内局在の変化を調べた。続いて Dock3 が Fyn や WAVE と複合体を形成するか、さらに Dock3 のリン酸化が複合体形成に影響を与えるか pull-down assay を利用して検討した。最後に Dock3 過剰発現マウスを作製して視神経挫滅実験を行い、軸索再生に与える影響を解析した。

(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・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (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を解

析した。正常眼圧緑内障 276 例、開放隅角緑内障 163 例、正常 298 例に対し、GLAST の全てのエクソンの解析を終了した。その結果、エクソン 7 に緑内障特異的変異を 3 つ、緑内障で高頻度に見られる変異 ( $P < 0.05$ ) を 1 つ発見した。現在、これら変異の緑内障発症における役割を解析している。GLAST の copy number variation 解析の結果、GLAST のエクソン 1 が 1 コピーに減少している緑内障症例 2 例を見つけた。現在、2 例の患者さんの GLAST 遺伝子の欠失領域の詳細な解析を行っている。

EAAC1 遺伝子のスクリーニングでは、major な多型の rs2228622 (Thr138Thr), rs301430 (Thr370Thr) の存在を確認したが、正常対照群との間に有差を認めなかった ( $p > 0.05$ )。GLAST 遺伝子のように、正常対照群になく正常眼圧緑内障群にのみ認められるような多型は見い出していない。

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<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> マウスにおいては、それぞれ GLAST<sup>+/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup> マウスと比較して、網膜神経節細胞と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 6 か月間に渡って保たれていることがわかった。ただし GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> マウスは正常眼圧を示し、GLAST<sup>+/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup> マウスと比較すると malondialdehyde 濃度の増加やグルタチオン産生量の低下を認めなかった。しかし培養網膜神経節細胞に TNF を投与する実験を行ったところ、ASK1<sup>-/-</sup>由来の細胞では野生型マウス由来の細胞と比較して、細胞死が半分程度にまで抑制されていた。さらに培養 Müller 細胞を用いた実験では、ASK1 の欠損により、TNF による p38 のリン酸化と一酸化窒素の産生量が共に大きく減少することがわかった。

3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

arundic acid と水素水を生後 3 週齢から 2 週間、経口投与し、網膜神経節細胞の細胞数を計測した。arundic acid の 10mg/kg および水素水の経口投与で、網膜神経節細胞の保護効果が見られた。arundic acid と水素水は、人体に毒性がないことが示されているので、臨床研究への応用を検討する。

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

昨年度作成したヒト GLAST を安定に発現した細胞株を用い、RI ラベルされたグルタミン酸による取り込み活性を指標に、1 万個の化合物の 1 次スクリーニングを行った。1 次スクリーニングの結果、3 個の候補化合物が見つかったので、2 次スクリーニングによりグルタミン酸輸送能の促進活性を再確認中である。

5. 網膜神経節細胞の軸索再生機序の解明とその促進法の開発

培養網膜神経節細胞に Dock3 を過剰発現すると 40%

程度の軸索伸長効果が確認されたが、BDNF の投与を行うと、さらに 30%程度の相乗効果を得られることがわかった。また細胞内において Dock3 は細胞質に局在するが、BDNF 刺激により細胞膜へ移行することが確認された。さらに pull-down assay により Dock3 は Fyn および WAVE と複合体を形成することが明らかとなったが、膜へ移行した Dock3 はリン酸化修飾を受けることにより、WAVE から解離することが判明した。

Dock3 過剰発現マウスの網膜および視神経においては、野生型マウスに比べて 5 倍程度の Dock3 が発現していた。視神経損傷後の軸索再生は野生型マウスではほとんど見られないが、Dock3 過剰発現マウスにおいては多くの軸索において再生現象が確認された。

#### 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 7 に見つけた 4 つ緑内障関連変異の中で、2 つはアミノ酸置換を伴うミスセンス変異で、のこりの 2 つはアミノ酸置換を伴わないサイレンス変異であった。現在、アミノ酸置換を伴う変異に関しては変異体を作成し、グルタミン酸取り込み能に対する影響を解析している。アミノ酸置換を伴わない変異に関しては、スプライシングへの影響を検討中である。GLAST 遺伝子が 1 コピーである 2 症例に関しては、GLAST 遺伝子の欠損領域の同定を行っている。さらに、DNA チップを用いゲノムワイドな CNV 解析も行っている。CNV の結果は、緑内障が common disease multiple rare variant 仮説で説明される可能性があり、ゲノムのリシーケンスが有用であると考えられる。

##### 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

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て、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)。ヒト緑内障患者においても血中グルタチオン濃度の低下が報告されるなど、酸化ストレスが緑内障の病態に関与する可能性が考えられることから、今後は ASK1 など酸化ストレスを制御する因子が、緑内障の新たな治療標的の候補となるかもしれない。

##### 3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

モデル動物において網膜神経節細胞の保護効果が見られた arundic acid と水素水は、人体に毒性がないことが示されているので、臨床研究への応用を検討する。さらに、グルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1 の活性を促進する化合物、NMDA 受容体のサブタイプ特異的阻害剤、抗酸化ストレス化合物の候補物質がいくつかあるので、それらの網膜神経節細胞保護効果も、継続して検討する。

##### 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用い、さらに数万個の化合物のスクリーニングを行い、新規グルタミン酸トランスポーター活性化化合物を同定する。

##### 5. 網膜神経節細胞の軸索再生機序の解明とその促進法の開発

Dock3 の機能解明はまだ始まったばかりであるが、アクチン重合を制御し、細胞骨格構築に関与するタンパクである WAVE との直接結合は大きな発見であった。Dock3 は神経栄養因子等の刺激に応じて細胞膜に移動するが、その際にリン酸化を受けて WAVE と解離し、WAVE を細胞膜付近に供給した上で Rac1 を活性化することにより、効率的な軸索伸長を誘導すると考えられる。また Dock3 過剰発現マウスを作製することにより、in vivo における軸索伸長効果を確認できたことも大きな収穫となった。

#### 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 の緑内障特異的遺伝子変異が見つかった。さらに、GLAST の欠損を持つ可能性のある症例が見つかった。これらの GLAST の遺伝子多型は、緑内障の早期診断に用いることができる。さらに、これら変異のグルタミン酸トランスポーターの機能に及ぼす影響を解明すれば、緑内障発症のメカニズム解明へと発展する。また、グルタミン酸トランスポーター遺伝子でも、GLAST と EAAC1 では病態への関与が異なると考えられる。

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。今後は、抗酸化作用を持つ機能性食品などを利用した、緑内障の予防研究を行う。

緑内障の新規治療薬に成り得る arundic acid と水素水を見つけた。さらに、GLAST の活性促進化合物の high throughput screening を継続し、新規神経保護薬の候補化合物を同定する。

GLAST 欠損マウスを活用した Dock3 による遺伝子治療の有効性を検討し、視神経再生療法の確立に向けた基礎研究を推進する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Harada, C., Namekata, K., Guo, X., Yoshida, H., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Ichijo, H., and Harada, T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Differentiation* (in press)

Namekata, K., Harada, C., Taya, C., Guo, X., Kimura, H.,

Parada, L.F., and Harada, T. Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 107(16), 7586-7591, 2010.

(この成果は毎日新聞などにおいて報道された。  
<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20100502-00000003-mai-soci>)

Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., and Harada, T. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. Neuroscience Letters 465(2), 160-164, 2009.

Woltjer, R.L., Duerson K., Fullmer, J.M., Mookherjee, P., Ryan, A.M., Montine, T.J., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Silbert, L., Erten-Lyons, D., Leverenz, J.B., Bird, T.D., Pow, D.V., Tanaka, K., Watson, S., Cook, D.G. Aberrant detergent-insoluble EAAT2 accumulates in Alzheimer's disease. Journal Neuropathology and Experimental Neurology (in press)

## 2. 学会発表

原田高幸. 正常眼圧緑内障モデル動物の確立と神経保護・再生療法への展開. 第 113 回 日本眼科学会総会. 第 14 回 ROHTO AWARD 受賞記念講演会.

原田高幸. グルタミン酸トランスポーターノックアウトマウスと正常眼圧緑内障モデル. 第 113 回 日本眼科学会総会 教育セミナー 「正常眼圧緑内障の実験モデルと網膜神経節細胞死の基礎研究」

原田高幸. 緑内障の発症メカニズムと最新の研究について. 財団法人東京都医学研究機構 平成 21 年度 都民講演会 「失明しないために -緑内障、糖尿病網膜症の予防と治療-

布施昇男: 緑内障性視神経症 (GON) に対する分子遺伝学の切れ味

第 30 回西中国眼疾患フォーラム, 山口, 2009. 10. 1

布施昇男:

緑内障遺伝子治療

11 回 Japan Glaucoma Council 「緑内障診療 UPDATE」, 東京, 2009. 12. 12

## H. 知的財産権の出願・登録状況

Tanaka K. & Harada T. Mouse deficient in glutamate transporter GLAST function. U.S. Patent Application No:

10/553,051 米国で特許査定となる (2009年8月18日)



## II. 分 担 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）  
分担研究報告書

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 の疾患関連変異 4 種類を発見した。さらに、GLAST 遺伝子の copy number variation (CNV) の解析を行い、GLAST が 1 コピーに減少している症例を見つけた。また、正常眼圧緑内障の新規治療薬の候補となる arundic acid (GLAST の発現を増強する化合物) と水素水 (抗酸化ストレス効果がある物質) の神経保護効果を GLAST 欠損マウスの網膜で評価し、両者とも神経保護効果のあることがわかった。

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。GLAST の copy number variation の解析は、GLAST 遺伝子のエクソン 1 と 3 の TaqMan プロブを用いた real-time PCR 法を用いて行った。
2. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価: 小野薬品が開発したグリア型グルタミン酸トランスポーターGLAST の活性を促進する化合物である arundic acid および抗酸化ストレス作用のある水素水を、モデル動物に投与し、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。
3. 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用い、グルタミン酸取り込み活性を測定することにより、1 万個の化合物のスクリーニングを行った。  
(倫理面への配慮)

患者さんの DNA を用いた研究は、東京医科歯科大学 難し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 の遺伝子解析  
GLAST の 10 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を解析した。正常眼圧緑内障 276 例、開放隅角緑内障 163 例、正常 298 例に対し、GLAST の全てのエクソンの解析を終了した。その結果、エクソン 7 に緑内障特異的変異を 3 つ、緑内障で高頻度に見られる変異 ( $P < 0.05$ ) を 1 つ発見した。現在、これら変異の緑内障発症における役割を解析している。GLAST の copy number variation 解析の結果、GLAST のエクソン 1 が 1 コピーに減少している緑内障症例 2 例を見つけた。現在、2 例の患者さんの GLAST 遺伝子の欠失領域の詳細な解析を行っている。
2. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価  
arundic acid と水素水を生後 3 週齢から 2 週間、経口投与し、網膜神経節細胞の細胞数を計測した。arundic acid の 10mg/kg および水素水の経口投与で、網膜神経節細胞の保護効果が見られた。arundic acid と水素水は、人体に毒性がないことが示されているので、臨床研究への応用を検討する。
3. 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  
昨年度作成したヒト GLAST を安定に発現した細胞株を用い、RI ラベルされたグルタミン酸による取り込み活性を指標に、1 万個の化合物の 1 次スクリーニングを行った。1 次スクリーニングの結果、3 個の候補化合物が見つかったので、2 次スクリーニングによりグルタミン酸輸送能の促進活性を再確認中である。

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の遺伝子解析

GLASTのエクソン7に見つけた4つ緑内障関連変異の中で、2つはアミノ酸置換を伴うミスセンス変異で、のこりの2つはアミノ酸置換を伴わないサイレンス変異であった。現在、アミノ酸置換を伴う変異に関しては変異体を作成し、グルタミン酸取り込み能に対する影響を解析している。アミノ酸置換を伴わない変異に関しては、スプライシングへの影響を検討中である。GLAST遺伝子が1コピーである2症例に関しては、GLAST遺伝子の欠損領域の同定を行っている。さらに、DNAチップを用いゲノムワイドなCNV解析も行っている。

### 2. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

モデル動物において網膜神経節細胞の保護効果が見られた arundic acid と水素水は、人体に毒性がないことが示されているので、臨床研究への応用を検討する。さらに、グルタミン酸トランスポーターGLAST, EAAC1の活性を促進する化合物、NMDA受容体のサブタイプ特異的阻害剤、抗酸化ストレス化合物の候補物質がいくつかあるので、それらの網膜神経節細胞保護効果も、継続して検討する。

### 3. 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用い、さらに数万個の化合物のスクリーニングを行い、新規グルタミン酸トランスポーター活性化化合物を同定する。

### 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の緑内障特異的遺伝子変異が見つかった。さらに、GLASTの欠損を持つ可能性のある症例が見つかった。これらのGLASTの遺伝子多型は、緑内障の早期診断に用いることができる。さらに、これら変異のグルタミン酸トランスポーターの機能に及ぼす影響を解明すれば、緑内障発症のメカニズム解明へと発展する。また、緑内障の新規治療薬に成り得る arundic acid と水素水を見つけた。さらに、GLASTの活性促進化合物の high throughput screening を継続し、新規神経保護薬の候補化合物を同定する。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Harada, C., Namekata, K., Guo, X., Yoshida, H., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Ichijo, H., and Harada, T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma. Cell Death and Differentiation (in press)

Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K.,

Matsumoto, Y., Tanaka, K., and Harada, T. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. Neuroscience Letters 465(2), 160-164, 2009.

Woltjer, RL., Duerson K., Fullmer, JM., Mookherjee, P., Ryan, AM., Montine, TJ., Kaye, JA., Quinn, JF., Silbert, L., Erten-Lyons, D., Leverenz, JB., Bird, TD., Pow, DV., Tanaka, K., Watson, S., Cook, DG. Aberrant detergent-insoluble EAAT2 accumulates in Alzheimer's disease. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology (in press)

### 2. 学会発表 なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

Tanaka K. & Harada T. Mouse deficient in glutamate transporter GLAST function. U.S. Patent Application No: 10/553,051 米国で特許査定となる(2009年8月18日)

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の評価

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 網膜における主要なグルタミン酸輸送体である glutamate /aspartate transporter (GLAST) の欠損マウスが、正常眼圧緑内障のモデル動物となり得ることをすでに報告した。本年度は酸化ストレスによって神経細胞死を誘導する ASK1 遺伝子の欠損マウスと交配することにより、GLAST 欠損マウスで観察される緑内障様症状の進行を抑制可能であることを見出した。また新たなグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 は神経細胞内において WAVE タンパクと複合体を形成するが、細胞膜上でリン酸化を受けることにより解離し、細胞膜近傍に WAVE を供給することを発見した。Dock3 はこうした仕組みを通じて細胞骨格運動を刺激し、効率良く軸索伸長を促進するものと考えられる。さらに新たに作製した Dock3 過剰発現マウスにおいては、視神経損傷後の軸索再生が顕著に亢進することを明らかにした。

#### 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である 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 (Harada *et al. J Clin Invest*, 2007)。これらの疾患モデルではグルタミン酸毒性に加えて、酸化ストレスの関与が示唆されたが、後者を標的とした治療研究はまだ行われていない。そこで本研究では酸化ストレスに反応して細胞死を誘導する mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase の1つである apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の機能に注目し、緑内障症状の緩和が可能か検討した。

さらに緑内障を含む多くの視神経変性疾患において望まれる軸索再生療法の第一歩として、視神経軸索伸長の手法を検討した。特に本研究では、近年新たに発見された Rac1 を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 の細胞内動態と軸索伸長時のシグナル伝達メカニズムの解明を目指す。

#### B. 研究方法

1. GLAST 欠損マウス (GLAST<sup>+/+</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>) と ASK1 欠損マウス (ASK1<sup>-/-</sup>) との交配を行い、約 6 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。さらに GLAST<sup>+/+</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> マウスの眼圧、酸化ストレス (malondialdehyde)、グルタチオン産生量を測定した。また緑内障との関係が注目される腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) を ASK1<sup>-/-</sup>由来の培養 Müller グリア細胞に投与し、刺激によって産生される free radical の1つである一酸化窒素の産生量を測

定した。さらに ASK1<sup>-/-</sup>由来の培養網膜神経節細胞における TNF 耐性を検討した。

2. 培養網膜神経節細胞に Dock3 を過剰発現し、軸索伸長効果が得られるかを定量的に解析した。さらに脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) と Dock3 による相乗効果の有無を検討するとともに、培養網膜組織片を用いて BDNF による Dock3 の細胞内局在の変化を調べた。続いて Dock3 が Fyn や WAVE と複合体を形成するか、さらに Dock3 のリン酸化が複合体形成に影響を与えるか pull-down assay を利用して検討した。最後に Dock3 過剰発現マウスを作製して視神経挫滅実験を行い、軸索再生に与える影響を解析した。

#### C. 研究結果

1. GLAST<sup>+/+</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> マウスにおいては、それぞれ GLAST<sup>+/+</sup> および GLAST<sup>-/-</sup> マウスと比較して、網膜神経節細胞と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 6 か月間に渡って保たれていることがわかった。ただし GLAST<sup>+/+</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> および GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> マウスは正常眼圧を示し、GLAST<sup>+/+</sup> および GLAST<sup>-/-</sup> マウスと比較すると malondialdehyde 濃度の増加やグルタチオン産生量の低下を認めなかった。しかし培養網膜神経節細胞に TNF を投与する実験を行ったところ、ASK1<sup>-/-</sup>由来の細胞では野生型マウス由来の細胞と比較して、細胞死が半分程度にまで抑制されていた。さらに培養 Müller 細胞を用いた実験では、ASK1 の欠損により、TNF による p38 のリン酸化と一酸化窒素の産生量が共に大きく減少することがわかった。

2. 培養網膜神経節細胞に Dock3 を過剰発現すると 40%程度の軸索伸長効果が確認されたが、BDNF の投与を行うと、さらに 30%程度の相乗効果を得られることがわかった。また細胞内において Dock3 は細胞

質に局在するが、BDNF 刺激により細胞膜へ移行することが確認された。さらに pull-down assay により Dock3 は Fyn および WAVE と複合体を形成することが明らかとなったが、膜へ移行した Dock3 はリン酸化修飾を受けることにより、WAVE から解離することが判明した。

Dock3 過剰発現マウスの網膜および視神経においては、野生型マウスに比べて 5 倍程度の Dock3 が発現していた。視神経損傷後の軸索再生は野生型マウスではほとんど見られないが、Dock3 過剰発現マウスにおいては多くの軸索において再生現象が確認された。

#### D. 考察

1. 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て、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)。ヒト緑内障患者においても血中グルタチオン濃度の低下が報告されるなど、酸化ストレスが緑内障の病態に関与する可能性が考えられることから、今後は ASK1 など酸化ストレスを制御する因子が、緑内障の新たな治療標的の候補となるかもしれない。

2. Dock3 の機能解明はまだ始まったばかりであるが、アクチン重合を制御し、細胞骨格構築に関与するタンパクである WAVE との直接結合は大きな発見であった。Dock3 は神経栄養因子等の刺激に応じて細胞膜に移動するが、その際にリン酸化を受けて WAVE と解離し、WAVE を細胞膜付近に供給した上で Rac1 を活性化することにより、効率的な軸索伸長を誘導すると考えられる。また Dock3 過剰発現マウスを作製することにより、in vivo における軸索伸長効果を確認できたことも大きな収穫となった。

#### E. 結論

今回の研究により、緑内障においても抗酸化療法が有効な可能性が示されたため、今後は機能性食品などを利用した治療研究を行う。一方 GLAST 欠損マウスを活用した Dock3 による遺伝子治療の有効性を検討し、視神経再生療法の確立に向けた基礎研究を推進する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Harada, C., Namekata, K., Guo, X., Yoshida, H., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Ichijo, H., and Harada, T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Differentiation* (in press)

Namekata, K., Harada, C., Taya, C., Guo, X., Kimura, H.,

Parada, L.F., and Harada, T. Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 107(16), 7586-7591, 2010.

(この成果は毎日新聞などにおいて報道された。  
<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20100502-00000003-mai-soci>)

Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., and Harada, T. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. *Neuroscience Letters* 465(2), 160-164, 2009.

##### 2. 学会発表

原田高幸. 正常眼圧緑内障モデル動物の確立と神経保護・再生療法への展開. 第 113 回 日本眼科学会総会. 第 14 回 ROHTO AWARD 受賞記念講演会.

原田高幸. グルタミン酸トランスポーターノックアウトマウスと正常眼圧緑内障モデル. 第 113 回 日本眼科学会総会 教育セミナー 「正常眼圧緑内障の実験モデルと網膜神経節細胞死の基礎研究」

原田高幸. 緑内障の発症メカニズムと最新の研究について. 財団法人東京都医学研究機構 平成 21 年度 都民講演会 「失明しないために -緑内障、糖尿病網膜症の予防と治療-

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

Tanaka K. & Harada T. Mouse deficient in glutamate transporter GLAST function. U.S. Patent Application No: 10/553, 051 米国で特許査定となる (2009 年 8 月 18 日)

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。グルタミン酸トランスポーターGLAST遺伝子のrare variantが遺伝型、アリル頻度において、正常眼圧緑内障に統計学的に有意となり、GLAST遺伝子はヒト正常眼圧緑内障の発症に関与している可能性があると考えられた。緑内障は、common disease common variant仮説に基づくと考えられているが、GLAST遺伝子の変異のように、緑内障の一部はcommon disease multiple rare variant仮説に基づく病態を取るとも考えられる。また、現在のところEAAC1遺伝子のスクリーニングでは有意な一塩基多型は見つかっておらず、同じグルタミン酸トランスポーター遺伝子でも、病態への関与の相違が考えられる。

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患者数は約400万人にもものぼる。病型別に見てみると原発開放隅角緑内障の比率が高く、なおかつ正常眼圧緑内障が、開放隅角緑内障に対し10倍以上の頻度で存在する。本邦において、正常眼圧緑内障の病態解明は急務の課題である。近年、ゲノムワイドアソシエーションスタディ(GWAS)を用いたその病態解析には、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報告した。本研究では、正常眼圧緑内障の病態解明のために、東北大学病院眼科緑内障外来において収集した患者標本を用い、GLAST遺伝子のエクソン、プロモーター配列の解析を行っていることを報告したが、それに加えEAAC1の全てのエクソン、プロモーターの配列のスクリーニングを開始し、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。GLAST遺伝子の10個のエクソン、EAAC1遺伝子は12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<sup>®</sup>を用いて行い、PCR断片はExoSAP-IT<sup>®</sup>で精製、BigDye<sup>™</sup> 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 PRISM<sup>™</sup> 3100 Genetic Analyzerを使用した。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(正常

眼圧緑内障176例、正常対照165例)。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SEQUENCHER<sup>™</sup>を用いた。

なおこの研究課題の計画にあたり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(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

GLAST遺伝子のスクリーニングを行った結果、エクソン10(非翻訳領域)に一塩基多型rs2229894(G/A)の関与の可能性を報告したが、引き続きスクリーニングの結果、アリル頻度、遺伝子型において正常対照との間に有意な差は認めなかった( $p>0.05$ )。またExon8(翻訳領域)にmajor allele frequency(MAF=0.232)の新規の一塩基多型(C/T)を見出したが、allele頻度 $p=0.40$ でこれも有意差を認めなかった。しかし、正常眼圧緑内障群において正常対照群には見いだせないminorな多型exon4;Val136Val, exon6;Glu219Asp, exon7;Thr318Thr, Ala329Thr, exon10 His496His等が存在していた( $p=0.07$ )。

EAAC1遺伝子のスクリーニングでは、majorな多型のrs2228622(Thr138Thr), rs301430(Thr370Thr)の存在を確認したが、正常対照群との間に有差を認めなかった( $p>0.05$ )。GLAST遺伝子のように、正常対照群になく正常眼圧緑内障群にのみ認められるような多型は見い出していない。

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可能性があると考えら

れる。common disease multiple rare variant仮説で説明される可能性があり、ゲノムのリシーケンスが有用であると考えられる。

#### 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いる可能性がある。また、グルタミン酸トランスポーター遺伝子 (GLAST, EAAC1 遺伝子) でも、病態への関与の相違が考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., and Harada, T. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. Neuroscience Letters 465(2), 160-164, 2009.

##### 2. 学会発表

布施昇男: 緑内障性視神経症(GON)に対する分子遺伝学の切れ味

第 30 回西中国眼疾患フォーラム, 山口, 2009.10.1

布施昇男:

緑内障遺伝子治療

11 回 Japan Glaucoma Council 「緑内障診療 UPDATE」, 東京, 2009.12.12

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

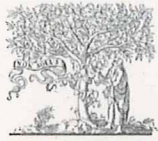
### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



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, Guo X, Kikushima K, Kimura A, Fuse N, Mitamura Y, Kohyama K, Matumoto Y, Tanaka K, Harada T	Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice.	Neuroscience Letters	465巻2号	160-164	2009
Harada C, Namekata K, Guo X, Yoshida H, Mitamura Y, Matumoto Y, Tanaka K, Ichijo H, Harada T	ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma.	Cell death and differentiation	in press		2010
Namekata K, Harada C, Taya C, Guo X, Kimura H, Parada LF, Harada T	Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex.	Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.	107巻16号	7586-7591	2010
Woltjer RL, Duerson K, Fullmer JM, Mookherjee P, Ryan AM, Montine TJ, Kaye JA, Quinn JF, Silbert L, Erten-Lyons D, Leverenz JB, Bird TD, Poe DV, Tanaka K, Watson S, Cook DG	Aberrant detergent-insoluble EAAT2 accumulates in Alzheimer's disease.	Journal of Neuropathology and experimental Neurology	in press		2010

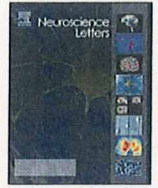
#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)

## Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice

Kazuhiko Namekata<sup>a</sup>, Chikako Harada<sup>a</sup>, Xiaoli Guo<sup>a</sup>, Kenji Kikushima<sup>a</sup>, Atsuko Kimura<sup>a</sup>, Nobuo Fuse<sup>b</sup>, Yoshinori Mitamura<sup>c</sup>, Kuniko Kohyama<sup>d</sup>, Yoh Matsumoto<sup>d</sup>, Kohichi Tanaka<sup>e</sup>, Takayuki Harada<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan

<sup>b</sup> Department of Ophthalmology and Visual Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Miyagi, Japan

<sup>c</sup> Department of Ophthalmology and Visual Science, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

<sup>d</sup> Department of Molecular Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Fuchu, Tokyo, Japan

<sup>e</sup> Laboratory of Molecular Neuroscience, School of Biomedical Science and Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 June 2009

Received in revised form 2 September 2009

Accepted 13 September 2009

#### Keywords:

Interleukin-1

Glutamate transporter

Cell death

Neuroprotection

Glaucoma

Retina

### ABSTRACT

Glaucoma, one of the leading causes of irreversible blindness, is characterized by progressive degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and optic nerves. Although glaucoma is often associated with elevated intraocular pressure, recent studies have shown a relatively high prevalence of normal tension glaucoma (NTG) in glaucoma patient populations. In the mammalian retina, glutamate/aspartate transporter (GLAST) is localized to Müller glial cells, whereas excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) is expressed in neural cells, including RGCs. Since the loss of GLAST or EAAC1 leads to retinal degeneration similar to that seen in NTG, we examined the effects of interleukin-1 (IL-1) on RGC death in GLAST- and EAAC1-deficient mice. IL-1 promoted increased glutamate uptake in Müller cells by suppressing intracellular Na<sup>+</sup> accumulation, which is necessary to counteract Na<sup>+</sup>-glutamate cotransport. The observed trends for the glutamate uptake increase in the wild-type (WT), GLAST- and EAAC1-deficient mice were similar; however, the baseline glutamate uptake and intracellular Na<sup>+</sup> concentration in the GLAST-deficient mice were significantly lower than those in the wild-type mice. Consistently, pretreatment with IL-1 exhibited no beneficial effects on glutamate-induced RGC degeneration in the GLAST-deficient mice. In contrast, IL-1 significantly increased glutamate uptake by Müller cells and the number of surviving RGCs in the wild-type and EAAC1-deficient mice. Our findings suggest that the use of IL-1 for enhancing the function of glutamate transporters may be useful for neuroprotection in retinal degenerative disorders including NTG.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Glaucoma is characterized by a slow, progressive degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and their axons that are usually associated with elevated intraocular pressure (IOP). Recent studies have shown that glaucoma is affected by multiple genes and environmental factors [18,16], and there are several inherited and experimentally induced animal models of high IOP glaucoma [10]. There is, however, a subset of glaucoma – normal tension glaucoma (NTG) – that presents with statistically normal IOP. The number of NTG patients has been thought to be small relative to glaucoma patients as a whole, but recent studies have revealed an unexpectedly high prevalence of NTG [9]. The findings suggest that non-IOP-dependent factors may contribute to disease progression and that elucidating such factors is necessary to better understand the pathogenesis of glaucoma, especially in the context of NTG.

It is well known that an immoderate 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 the cell through chronically activated glutamate receptors. The glutamate transporter is the only mechanism for removal of glutamate from the extracellular fluid in the retina. In the inner plexiform layer where synapses exist across RGCs, three transporters are involved in this task: glutamate transporter 1 (GLT-1) located in the bipolar cell terminals; excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) in RGCs; and glutamate/aspartate transporter (GLAST) in Müller glial cells [5,7]. Previously, we found that GLAST and EAAC1 knockout (KO) mice showed spontaneous RGC death and optic nerve degeneration without elevated IOP [5]. Together with the downregulation of GLAST (human EAAT1) in glaucoma patients [12], these results suggest the involvement of glutamate neurotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. Therefore, one possible treatment for glaucoma may involve increasing glutamate uptake by the glutamate transporters.

\* Corresponding author. Tel.: +81 42 325 3881; fax: +81 42 321 8678.  
E-mail address: [harada-tk@igakuken.or.jp](mailto:harada-tk@igakuken.or.jp) (T. Harada).

**Table 1**

Sequences of PCR primers used in this study.

	Product size (bp)
GLAST (accession no. NM.148938)	
Forward primer	5'-ATGACCAAAAGCAACGGAGA-3' (1–20)
Reverse primer	5'-GATTATGCCAATCACCACAG-3' (400–420)
α Subunit of Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase (accession no. NM.144900)	
Forward primer	5'-CTGAGAACGGTTCTGCC-3' (2612–2640)
Reverse primer	5'-CCTGATAATGAGCTCCGCA-3' (3011–3030)
β Subunit of Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase (accession no. NM.013415)	
Forward primer	5'-ATCCAAGCACAGAAGAATGA-3' (361–380)
Reverse primer	5'-GGTTTGTGTATCCGGAGT-3' (851–870)
β-Actin (accession no. NM.007393)	
Forward primer	5'-ATGGATGACGATATCGCTGCGCT-3' (1–23)
Reverse primer	5'-TGATGCCACGCTCGTCAGAT-3' (577–599)

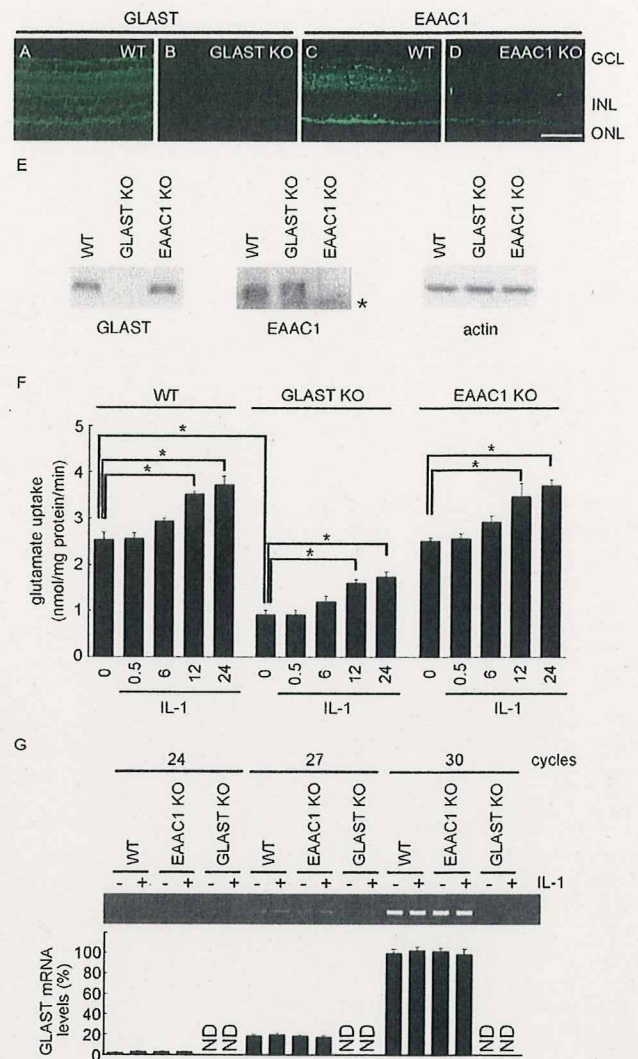
Glutamate transport is coupled with the cotransport of 3Na<sup>+</sup>, and the efficiency of glutamate uptake is influenced by both intracellular and extracellular Na<sup>+</sup> concentrations [17]. We recently showed that IL-1 increases glutamate uptake in mouse Müller glial cells by stimulating membrane trafficking of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and suppressing Na<sup>+</sup> accumulation [11]. Our observations suggest that IL-1 may prevent glutamate neurotoxicity by increasing the activity of glutamate transporters in Müller cells; however, retinal glia may express EAAC1 and GLT-1 as well as GLAST [8]. In this study, we investigated whether IL-1 protects retinal neurons from glutamate neurotoxicity in GLAST and EAAC1 KO mice and elucidated a role of glutamate transporters in the IL-1-mediated retinal neuroprotective effect.

Experiments were performed using GLAST-deficient (GLAST KO) and EAAC1-deficient (EAAC1 KO) mice [5] at 3 weeks of age in accordance with the Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience Guidelines for the Care and Use of Animals. Immunoblotting was performed as previously described [11]. Membranes were incubated with antibodies against GLAST (1:1000) [7] or EAAC1 (1:1000) [13]. Primary antibody binding was detected using horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG secondary antibody (Amersham, Piscataway, NJ, USA) and visualized using an ECL Plus western blotting system (Amersham). For immunohistochemical analysis, 7-μm-thick retinal sections were incubated with one of the three sets of primary antibody mixes: rabbit anti-GLAST (0.5 μg/ml) and mouse anti-glutamine synthetase (1.0 μg/ml; Chemicon International, Temecula, CA, USA); rabbit anti-GLAST (0.5 μg/ml) and mouse anti-IL-1 receptor (0.5 μg/ml; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA); or rabbit anti-EAAC1 and mouse anti-calretinin (1.0 μg/ml; Chemicon International). Retinal explant cultures [11] 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 an antibody against NeuN (1.0 μg/ml; Chemicon International). RGC number was quantified by counting the cells in the ganglion cell layer from one ora serrata through the optic nerve to the other ora serrata, in three sections from three eyes.

Glutamate uptake assay in primary cultured Müller cells was performed as previously reported [6,11]. The effects of IL-1 on cell viability and ATP synthesis in Müller cells were analyzed using assay kits for lactate dehydrogenase (Wako, Osaka, Japan) and ATP (Toyo B-Net, Tokyo, Japan), respectively. 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 [11]. For RT-PCR analysis, total RNA was isolated from the cultured Müller cells using an Isogen reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan) and then reverse-transcribed with a Revertra ace (Toyobo, Osaka, Japan) to obtain cDNA. RT-PCR was carried out using primer

pairs specific for mouse GLAST, α and β subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, and β-actin (Table 1). Reactions were conducted under the following conditions: pre-cycling at 94 °C for 2 min, followed by 24, 27 or 30 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and polymerization at 72 °C for 30 s. The PCR products (10 μL) were size fractionated on agarose gels and detected by ethidium bromide staining. Data are presented as mean ± standard errors unless noted otherwise. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Dunnett's test using JMP7 software from SAS Institute (Cary, NC). Results were considered statistically significant if *p* < 0.05.

Immunohistochemical analysis was performed with retinas of wild-type (WT), GLAST KO and EAAC1 KO mice. As previously



**Fig. 1.** Effect of IL-1 on glutamate uptake by Müller glial cells from WT, GLAST KO and EAAC1 KO mice. (A–D) Immunohistochemical analysis of GLAST (A and B) and EAAC1 (C and D) in retinas from WT (A and C), GLAST KO (B) and EAAC1 KO (D) mice. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar: 50 μm. (E) Immunoblot analysis of neural retinas from WT, GLAST KO and EAAC1 KO mice. (\*) Non-specific bands. (F) Glutamate uptake activity in Müller cells from WT, GLAST KO and EAAC1 KO mice in the presence or absence of IL-1. Müller cells were pretreated with 50 ng/ml IL-1 for the indicated periods. The data are presented as means ± standard errors of three samples for each group. \**p* < 0.01. (G) RT-PCR analysis of GLAST expression levels in Müller cells treated with 50 ng/ml IL-1 for 24 h. Total RNA was isolated from cultured Müller cells, reverse-transcribed, and subjected to PCR analysis at indicated cycle numbers. The densitometric results are expressed as a percentage of the control values (non-treated WT at 30 cycles).