

2010 27030 A

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

## 正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23年（2011年）5月

研究代表者 田 中 光 一

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 光一

平成23年（2011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    | ----- 1  |
| 田中光一                   |          |
| 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 | ----- 5  |
| 田中光一                   |          |
| 2. 正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の評価 | ----- 7  |
| 原田高幸                   |          |
| 3. 正常眼圧緑内障の遺伝子解析       | ----- 9  |
| 布施昇男                   |          |
| 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

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、昨年度見つけた GLAST の緑内障関連変異 4 個のうち、アミノ酸置換を伴う 2 種類のミスセンス変異に関し、グルタミン酸取り込み活性を測定したところ、1 種類の変異で取り込み活性の低下を確認した。EAAC1 に関しては、例数を増やして遺伝子解析を行ったが、緑内障に有意な一塩基多型・変異は見つからなかった。また、正常眼圧緑内障の新規治療薬の候補として、グルタミン酸受容体 NR2B を選択的に阻害する化合物 HON0001 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し、8 万個の化合物の中から 13 個の GLAST 活性化化合物を見つけた。さらに、昨年みつけた視神経の軸索再生を促進するグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 及び網膜グリア細胞の神経栄養因子の受容体 TrkB の活性化が、網膜神経節細胞の保護作用を持つ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、グルタミン酸トランスポーターの遺伝異常が緑内障の発症に関与しているかどうか明らかにし、新しい診断法を確立する。また、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。

さらに昨年度明らかにした視神経の軸索伸長作用のある遺伝子 Dock3 および網膜グリア細胞が、網膜神経節細胞の保護効果があるかどうか検討した。

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® を用いて行い、PCR断片はExoSAP-IT® で精製、BigDye™ 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™ 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™を用いた。

2.緑内障特異的に見つかったGLASTミスセンス変異のグルタミン酸取り込み活性の測定：ヒトGLASTのcDNAにPCRを用いて緑内障患者に見出した2種類のアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、pcDNA3.1に挿入して発現 plasmid を作製した。作製した発現 plasmid をヒト胎児由来細胞株 HEK293T に遺伝子導入し、トリチウムで標識したグルタミン酸を用い、取り込み活性を測定した。

3.神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価：グルタミン酸受容体 NR2B 選択的阻害剤である HON0001、EAAC1 を活性化する Am80 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、8万個の化合物のスクリーニングを行った。

5. Dock3の網膜神経節細胞保護効果の解析

Dock3 過剰発現マウスを作製し、GLAST 欠損マウスと交配し、網膜神経節細胞の数を定量し、Dock3に網膜神経節細胞を保護する機能があるか解析した。

6. グリア細胞を標的にした神経保護法の開発

神経細胞あるいはグリア細胞に発現している TrkB の機能を解析するため、網膜グリア細胞特異的あるいは網膜神経節細胞特異的 TrkB 欠損マウスを作製し、グルタミン酸興奮毒性に対する網膜神経細胞死を解析した。

(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、東京医科歯科大学および東京都神経科学総合研究所の動物実験委員会・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。昨年度同定したGLASTの緑内障関連変異4個のうち、アミノ酸置換を伴う2種類のミスセンス変異に関し、グルタミン酸取り込み活性を測定したところ1種類の変異で取り込み活性の低下を確認した。

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( $p>0.05$ )。例数を増やして遺伝子解析を行ったが、緑内障にのみ認められる一塩基多型・変異は見つからなかった。

2. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

HON0001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。HON0001の10mg/kgの経口投与で、網膜神経節細胞の保護効果が見られた。Am80には、神経保護効果が観察されなかった。

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

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、8万個の化合物の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、新たに13個の候補化合物が見つかった(昨年度の3個と合わせ、合計16個の化合物が見つかった)。2次スクリーニングにおいても、16個の化合物のGLAST活性化作用が確認された。

4. Dock3の網膜神経節細胞保護効果の解析

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。Dock3 過剰発現マウスとGLAST 欠損マウスを交配すると、GLAST 欠損マウスで見られる網膜神経節細胞の変性は抑制された。

5. グリア細胞を標的にした神経保護法の開発

網膜グリア細胞特異的あるいは網膜神経節細胞特異的 TrkB 欠損マウスにおいて、グルタミン酸興奮毒性による網膜神経細胞死の程度は同じであった。

## 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。アミノ酸置換を伴う変異に関して変異体を作成し、グルタミン酸取り込み能を調べたところ、1種類のミスセンス変異では取り込み能の低下を確認できた。この結果は、GLASTの遺伝子異常によるグルタミン酸輸送活性の低下が、緑内障の発症に関与していることを示している。

この結果は、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. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価

HON0001は新しい緑内障治療薬の候補なので、毒性試験を行う予定である。

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

本研究で見つけたヒト GLAST を活性化させる16種類の化合物に関しては、類似化合物の再評価、選択性試験、毒性試験を行い、モデル動物で神経保護効果を評価する。

4. Dock3の網膜神経節細胞保護効果の解析

Dock3の機能解明はまだ始まったばかりであるが、Dock3は軸索伸長効果のみならず、網膜神経節細胞の変性抑制効果もあることがわかった。今後、Dock3の神経保護作用の分子メカニズムを解明する予定である。

5. グルタミン酸興奮毒性への耐性は、網膜神経節細胞

に発現する TrkB だけでなく、周囲のグリア細胞に発現する TrkB によっても規定されることを示している。従って、緑内障の治療において直接的な神経保護だけでなく、グリア細胞を標的にした新たな神経保護法の有用性が期待できる。グリア細胞は神経細胞よりも耐性が高く、遺伝子治療のベクターも効率よく導入されることが知られていることから、今後の発展が期待できる。

## 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 の遺伝子変異が緑内障の発症に関与することが明らかになった。これらの結果は、緑内障の早期診断に役立つだけでなく、緑内障の個別化医療にも応用できる。また、緑内障の新規治療薬に成り得る HON0001 を見つけた。さらに、GLAST の活性促進化合物の high throughput screening を行い、新規神経保護薬の候補化合物を同定した。

Dock3 及び網膜グリア細胞の神経栄養因子の受容体 TrkB の活性化が、網膜神経節細胞の保護作用を持つことを明らかにした。

## 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* 17, 1751-1759, 2010.

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>)

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* 69, 667-676, 2010.

Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L.F., and Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2, 189-177, 2011

### 2. 学会発表

行方和彦、原田知加子、郭曉麗、原田高幸.

軸索伸長における Dock3 と WAVE の機能解析.  
平成 22 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド  
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学会大会)

原田高幸.

網膜・視神経変性疾患の病態解明と治療法.  
平成 22 年 10 月 29 日 東京都 新宿明治安田  
生命ホール

第 33 回 神経研シンポジウム「神経科学研究の新たな展開」

木村敦子、行方和彦、田中光一、原田高幸.  
グルタミン酸毒性と酸化ストレスに対しての  
Dock3 による網膜神経細胞保護.

平成 22 年 9 月 3 日 神戸ポートアイランド  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回  
日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会  
大会)

行方和彦、原田知加子、郭曉麗、原田高幸.  
軸索伸長における Dock3 と WAVE の機能解析.  
平成 22 年 9 月 2 日 神戸ポートアイランド  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回  
日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会  
大会)

原田高幸、行方和彦、原田知加子.  
正常眼圧緑内障モデルにおける Interleukin-1 の  
神経保護効果の検討.  
平成 22 年 4 月 15 日 名古屋国際会議場  
第 114 回 日本眼科学会総会

## 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、本年度は昨年度見つけた GLAST の緑内障関連変異 4 個のうち、アミノ酸置換を伴う 2 種類のミスセンス変異に関し、グルタミン酸取り込み活性を測定したところ 1 種類の変異で取り込み活性の低下を確認した。EAAC1 に関しては、例数を増やして遺伝子解析を行ったが、緑内障に有意な一塩基多型・変異は見つからなかった。また、正常眼圧緑内障の新規治療薬の候補となる HON0001（グルタミン酸受容体 NR2B 選択的な阻害剤）の神経保護効果を GLAST 欠損マウスの網膜で確認した。さらに、GLAST の活性を亢進させる新規化合物を 13 個見つけた。

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. 緑内障特異的に見つけた GLAST ミスセンス変異のグルタミン酸取り込み活性の測定：ヒト GLAST の cDNA に PCR を用いて緑内障患者に見出した 2 種類のアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、pcDNA3.1 に挿入して発現 plasmid を作製した。作製した発現 plasmid をヒト胎児由来細胞株 HEK239T に遺伝子導入し、トリチウムで標識したグルタミン酸を用い、取り込み活性を測定した。
3. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価：グルタミン酸受容体 NR2B 選択的阻害剤である HON0001、EAAC1 を活性化する Am80 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、8 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。昨年度同定した GLAST の緑内障関連変異 4 個のうち、アミノ酸置換を伴う 2 種類のミスセンス変異に関し、グルタミン酸取り込み活性を測定したところ 1 種類の変異で取り込み活性の低下を確認した。EAAC1 に関しては、例数を増やして遺伝子解析を行ったが、緑内障に有意な一塩基多型・変異は見つからなかった。
2. 神経保護薬のモデル動物を用いた薬効評価  
HON0001 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。HON0001 の 10mg/kg の経口投与で、網膜神経節細胞の保護効果が見られた。Am80 には、神経保護効果が観察されなかった。
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  
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、8 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、新たに 13 個の候補化合物が見つかった（昨年度の 3 個と合

わせ、合計 16 個の化合物がみつかった)。2 次スクリーニングにおいても、16 個の化合物の GLAST 活性化作用が確認された。

#### 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 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。アミノ酸置換を伴う変異に関して変異体を作成し、グルタミン酸取り込み能を調べたところ、1 種類のミスセンス変異では取り込み能の低下を確認できた。この結果は、GLAST の遺伝子異常によるグルタミン酸輸送活性の低下が、緑内障の発症に関与していることを示している。

##### 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 HON0001 は、NR2B 特異的阻害剤であり、網膜神経節細胞の変性には NR2B 受容体に関与していることを示している。サブタイプ特異性が明らかになったことで、副作用の少ない神経保護薬の開発に貢献すると考えられる。

##### 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、16 個の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した。この化合物の構造・機能連関を調べることで、新規緑内障治療薬の開発に大きな貢献すると期待される。

#### 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 の遺伝子変異が緑内障の発症に関与することが明らかになった。これらの結果は、緑内障の個別化医療に応用できる。また、緑内障の新規治療薬に成り得る既知および新規の化合物を同定した。

#### 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* 17, 1751-1759, 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., Pow, DV., Tanaka, K., Watson, S., Cook, DG.  
Aberrant detergent-insoluble EAAT2 accumulates in

Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69, 667-676, 2010

Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, LF., and Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2, 189-177, 2011

##### 2. 学会発表

木村敦子、行方和彦、田中光一、原田高幸.  
グルタミン酸毒性と酸化ストレスに対しての Dock3 による網膜神経細胞保護.

平成 22 年 9 月 3 日 神戸ポートアイランド  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会)

#### 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。本年度は軸索伸長促進作用のあるグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 が、網膜神経節細胞の変性を抑制することを、Dock3 過剰発現マウスを用い明らかにした。さらに、網膜神経細胞の変性に網膜のグリア細胞に発現している神経栄養因子の受容体である TrkB が関与していることを明らかにした。この結果は、グリア細胞を標的にした新しい神経保護法の可能性を示している。

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)。本年度は、軸索伸長作用のある Rac1 を活性化させるグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dock3 が、網膜神経節細胞の保護効果があるかどうか検討した。さらに、神経細胞自身ではなくグリア細胞を標的にした新しい神経保護法の可能性を検討した。

B. 研究方法

1. Dock3 の網膜神経節細胞保護効果の解析  
Dock3 過剰発現マウスを作製し、GLAST 欠損マウスと交配し、網膜神経節細胞の数を定量し、Dock3 に網膜神経節細胞を保護する機能があるか解析した。
2. グリア細胞を標的にした神経保護法の開発  
神経細胞あるいはグリア細胞に発現する TrkB の機能を解析するため、網膜グリア細胞特異的あるいは網膜神経節細胞特異的 TrkB 欠損マウスを作製し、グルタミン酸興奮毒性に対する網膜神経細胞死を解析した。

C. 研究結果

1. Dock3 の網膜神経節細胞保護効果の解析  
Dock3 の機能解明はまだ始まったばかりであるが、Dock3 は軸索伸長効果のみならず、網膜神経節細胞の変性抑制効果もあることがわかった。今後、Dock3 の神経保護作用の分子メカニズムを解明する予定である。
2. グリア細胞を標的にした神経保護法の開発  
網膜グリア細胞特異的あるいは網膜神経節細胞特異的 TrkB 欠損マウスにおいて、グルタミン酸興奮毒性

による網膜神経細胞死の程度は同じであった。

D. 考察

1. Dock3 の機能解明はまだ始まったばかりであるが、Dock3 は軸索伸長効果のみならず、網膜神経節細胞の変性抑制効果もあることがわかった。今後、Dock3 の神経保護作用の分子メカニズムを解明する予定である。
2. グルタミン酸興奮毒性への耐性は、網膜神経節細胞に発現する TrkB だけでなく、周囲のグリア細胞に発現する TrkB によっても規定されることを示している。従って、緑内障の治療において直接的な神経保護だけでなく、グリア細胞を標的にした新たな神経保護法の有用性が期待できる。グリア細胞は神経細胞よりも耐性が高く、遺伝子治療のベクターも効率よく導入されることが知られていることから、今後の発展が期待できる。

E. 結論

今回の研究により、新しい神経保護法として、Dock3 の発現亢進およびグリア細胞の TrkB の活性化が有効であることを明らかにし、緑内障の新規治療法への道を切り開いた。

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* 17, 1751-1759, 2010  
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>)

Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L.F., and Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. Nature Communications 2, 189-177, 2011

## 2. 学会発表

行方和彦、原田知加子、郭曉麗、原田高幸.  
軸索伸長における Dock3 と WAVE の機能解析.  
平成 22 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド  
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学会大会)

原田高幸.  
網膜・視神経変性疾患の病態解明と治療法.  
平成 22 年 10 月 29 日 東京都 新宿明治安田  
生命ホール  
第 33 回 神経研シンポジウム「神経科学研究の新たな展開」

木村敦子、行方和彦、田中光一、原田高幸.  
グルタミン酸毒性と酸化ストレスに対しての  
Dock3 による網膜神経細胞保護.  
平成 22 年 9 月 3 日 神戸ポートアイランド  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回  
日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会  
大会)

行方和彦、原田知加子、郭曉麗、原田高幸.  
軸索伸長における Dock3 と WAVE の機能解析.  
平成 22 年 9 月 2 日 神戸ポートアイランド  
Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回  
日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会  
大会)

原田高幸、行方和彦、原田知加子.  
正常眼圧緑内障モデルにおける Interleukin-1 の  
神経保護効果の検討.  
平成 22 年 4 月 15 日 名古屋国際会議場  
第 114 回 日本眼科学会総会

## 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** 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に研究を行った。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、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らなかった。

### 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400万人にもなる。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

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が存在していた。

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意差を認めなかった( $p>0.05$ )。Intron2にrs10974624 (C/T)を認めたが、正常対照群との間に有意差を認めなかった。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なかった。

### 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

なし

2. 学会発表

布施昇男: 緑内障の遺伝子診断

第 21 回日本緑内障学会シンポジウム、福岡、2010.9.25

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  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------|-----------|------|
| 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                                | 17巻11号  | 1751-1759 | 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          | 69巻7号   | 667-676   | 2010 |
| Harada C, Guo X, Namekata K, Kimura A, Nakamura K, Tanaka K, Parada LF, Harada T                                                                                             | Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration.       | Nat Commun                                                    | 2巻      | 189-197   | 2011 |



#### IV. 研 究 成 果 の 刊 行 物 ・ 別 刷

# ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST-deficient mice, a model of normal tension glaucoma

C Harada<sup>1</sup>, K Namekata<sup>1</sup>, X Guo<sup>1</sup>, H Yoshida<sup>2</sup>, Y Mitamura<sup>3</sup>, Y Matsumoto<sup>4</sup>, K Tanaka<sup>5</sup>, H Ichijo<sup>6</sup> and T Harada<sup>\*,1,2</sup>

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an evolutionarily conserved mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase and has an important role in stress-induced retinal ganglion cell (RGC) apoptosis. In the mammalian retina, glutamate/aspartate transporter (GLAST) is a major glutamate transporter, and the loss of GLAST leads to optic nerve degeneration similar to normal tension glaucoma (NTG). In GLAST<sup>-/-</sup> mice, the glutathione level in the retina is decreased, suggesting the involvement of oxidative stress in NTG pathogenesis. To test this hypothesis, we examined the histology and visual function of GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice by multifocal electroretinograms. ASK1 deficiency protected RGCs and decreased the number of degenerating axons in the optic nerve. Consistent with this finding, visual function was significantly improved in GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice compared with GLAST<sup>+/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup> mice, respectively. The loss of ASK1 had no effects on the production of glutathione or malondialdehyde in the retina or on the intraocular pressure. Tumor necrosis factor (TNF)-induced activation of p38 MAPK and the production of inducible nitric oxide synthase were suppressed in ASK1-deficient Müller glial cells. In addition, TNF-induced cell death was suppressed in ASK1-deficient RGCs. These results suggest that ASK1 activation is involved in NTG-like pathology in both neural and glial cells and that interrupting ASK1-dependent pathways could be beneficial in the treatment of glaucoma, including NTG.

*Cell Death and Differentiation* (2010) 17, 1751–1759; doi:10.1038/cdd.2010.62; published online 21 May 2010

It is estimated that glaucoma affects nearly 70 million individuals worldwide, including at least 6.8 million who are bilaterally blind.<sup>1</sup> The disease is characterized by the slow progressive degeneration of the retinal ganglion cells (RGCs) and their axons, which are usually associated with elevated intraocular pressure (IOP). Recent studies have shown that glaucoma is affected by multiple genes and environmental factors,<sup>2,3</sup> and there are several inherited and experimentally induced animal models of high IOP glaucoma, including DBA/2J mice and laser-induced chronic ocular hypertension model.<sup>4–6</sup> There is a subtype of glaucoma termed normal tension glaucoma (NTG), however, that presents with statistically normal IOP. The number of NTG patients has been thought to be small relative to the total number of glaucoma patients, but recent studies have revealed an unexpectedly high prevalence of NTG.<sup>7</sup> These findings suggest that non-IOP-dependent factors may contribute to

disease progression, and elucidating these factors is necessary to better understand the pathogenesis of glaucoma, especially in the context of NTG. For this purpose, an animal model representing disease characteristics of NTG would be extremely useful. To date, some animal models have been introduced, for example, the optic nerve ligation model shows RGC loss with normal IOP,<sup>8</sup> but this is more suitable as a model of ischemia or optic nerve injury. In addition, preparation of these artificial models requires a high level of technical skills, but unfortunately, long-term reproducibility seems to be somewhat limited. Thus, there has been a great demand to create suitable animal models of NTG.

In addition to more extensively studied factors such as reduced ocular blood flow and systemic blood pressure changes, excessive stimulation of the glutamatergic system has been proposed to contribute to the death of RGCs in glaucoma. Excessive extracellular concentrations

<sup>1</sup>Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Neuro-ophthalmology, Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan; <sup>4</sup>Department of Molecular Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Laboratory of Molecular Neuroscience, School of Biomedical Science and Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan and <sup>6</sup>Laboratory of Cell Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Strategic Approach to Drug Discovery and Development in Pharmaceutical Sciences, Global Center of Excellence program, and Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

\*Correspondence: T Harada, Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan. Tel: +81 42 325 3881; Fax: +81 42 321 8678; E-mail: harada-tk@igakuken.or.jp

**Keywords:** glaucoma; ASK1; glutamate transporter; glia; neural cell death

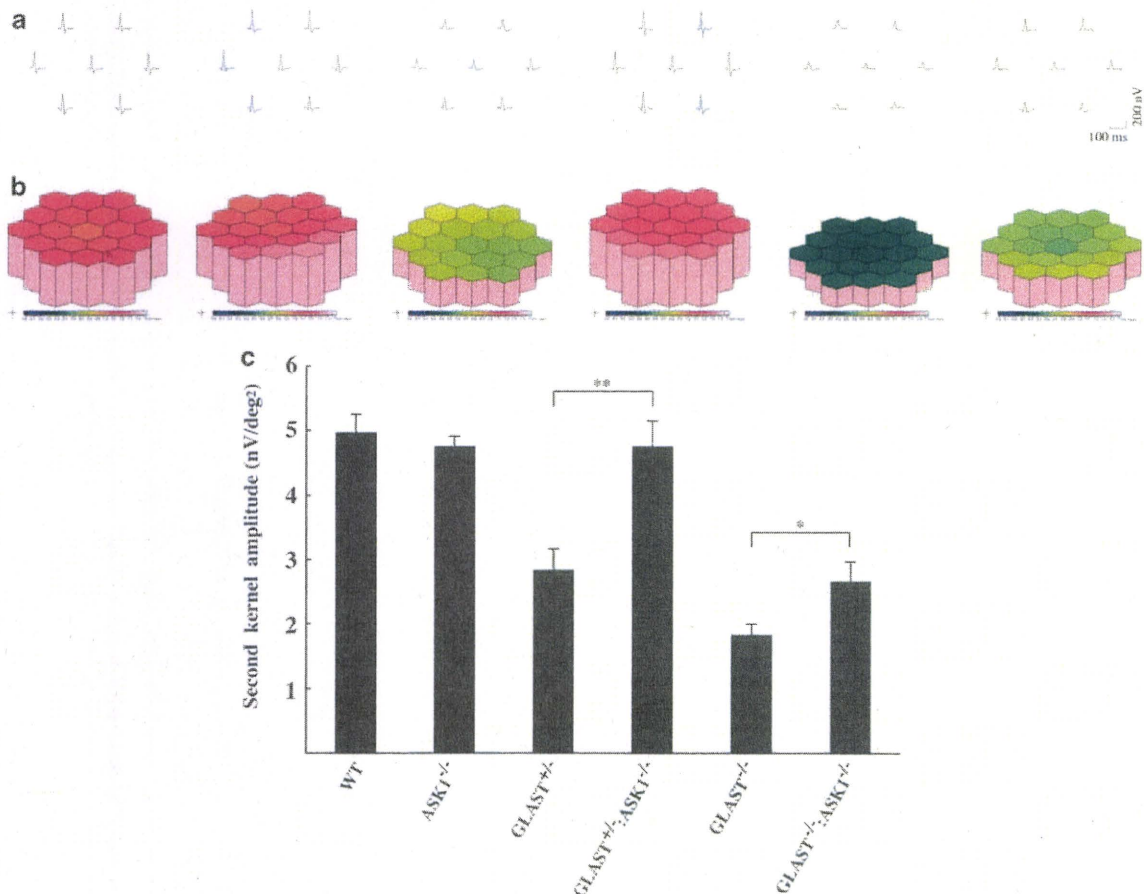
**Abbreviations:** ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; GLAST, glutamate/aspartate transporter; NTG, normal tension glaucoma; A $\beta$ , amyloid beta; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GLT-1, glutamate transporter 1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL-1, interleukin-1; IOP, intraocular pressure; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mfERGs, multifocal electroretinograms; NO, nitric oxide; NTN, neurturin; RGC, retinal ganglion cell; ROS, reactive oxygen species; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF, tumor necrosis factor

Received 28.12.09; revised 22.3.10; accepted 15.4.10; Edited by N Bazan; published online 21.5.10

of glutamate induce uncontrolled elevation of intracellular calcium, which enters through chronically activated glutamate receptors. Glutamate uptake by the glial cells is a well-known mechanism to maintain low extracellular levels of glutamate and promote efficient interneuronal signaling in the central nervous system (CNS). Furthermore, the same process is considered to be neuroprotective during neurodegeneration. Clearance of glutamate from the extracellular space is accomplished primarily by the action of glutamate transporters.<sup>9</sup> In the CNS, the glutamate/aspartate transporter (GLAST) and glutamate transporter 1 (GLT-1) are Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters found in astrocytes. Genetic deletion of GLAST and/or GLT-1 causes abnormal brain development and neurological symptoms such as motor deficits.<sup>9–11</sup> We have previously reported that GLAST, located in Müller glial cells, is the only glial-type glutamate transporter in the retina, whereas GLT-1 is expressed in neurons, including bipolar cells and photoreceptors.<sup>12</sup> Not surprisingly, GLAST is more active than GLT-1 in preventing glutamate neurotoxicity after ischemia.<sup>12</sup> In addition, we recently found that GLAST-deficient (GLAST<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>+/-</sup>) mice show spontaneous RGC death and optic nerve degeneration without elevated IOP.<sup>13</sup> Interestingly, GLAST is essential

not only to keep the extracellular glutamate concentration below a neurotoxic level but also to maintain glutathione levels by transporting glutamate, which is a substrate for glutathione synthesis, into Müller cells. As retinal concentration of glutathione, a major cellular antioxidant in the retina, was decreased in GLAST-deficient mice, both glutamate neurotoxicity and oxidative stress may be involved in NTG-like pathology.<sup>13</sup> Together with the evidence that downregulation of GLAST (human EAAT1) in the retina and of glutathione level in the plasma are found in human glaucoma patients,<sup>14,15</sup> it is appropriate to consider GLAST-deficient mice as a valid and adequate model that offer a powerful system to determine the mechanisms of and evaluate new treatments for NTG.

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) has key roles in human diseases closely related to the dysfunction of cellular responses to oxidative stress and endoplasmic reticulum stressors, including neurodegenerative diseases.<sup>16,17</sup> We have previously reported that ASK1 is primarily expressed in RGCs, and ASK1<sup>-/-</sup> mice are less susceptible to ischemic injury.<sup>18</sup> The role of ASK1 in glaucoma, however, is unknown. In an attempt to identify the apoptotic signals regulating RGC death in GLAST-deficient mice, we generated



**Figure 1** Effect of ASK1 on visual response in GLAST<sup>+/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup> mice. (a) Summed responses of the second-order kernel examined using multifocal electroretinograms. (b) Averaged responses of the second-order kernel are demonstrated using three-dimensional plots. The degree of retinal function is presented in the color bar. A higher score (red) indicates highly sensitive visual function and a lower score (green) indicates retinal dysfunction. (c) Quantitative analysis of the visual response amplitude. Note the improved visual function of GLAST<sup>+/-</sup>;ASK1<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup>;ASK1<sup>-/-</sup> mice compared with GLAST<sup>+/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup> mice, respectively. Values are given in nV per square degree (nV/deg²). \*\**P*<0.01, \**P*<0.05



GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice and determined the effect of ASK1 deficiency on the NTG-like phenotype.

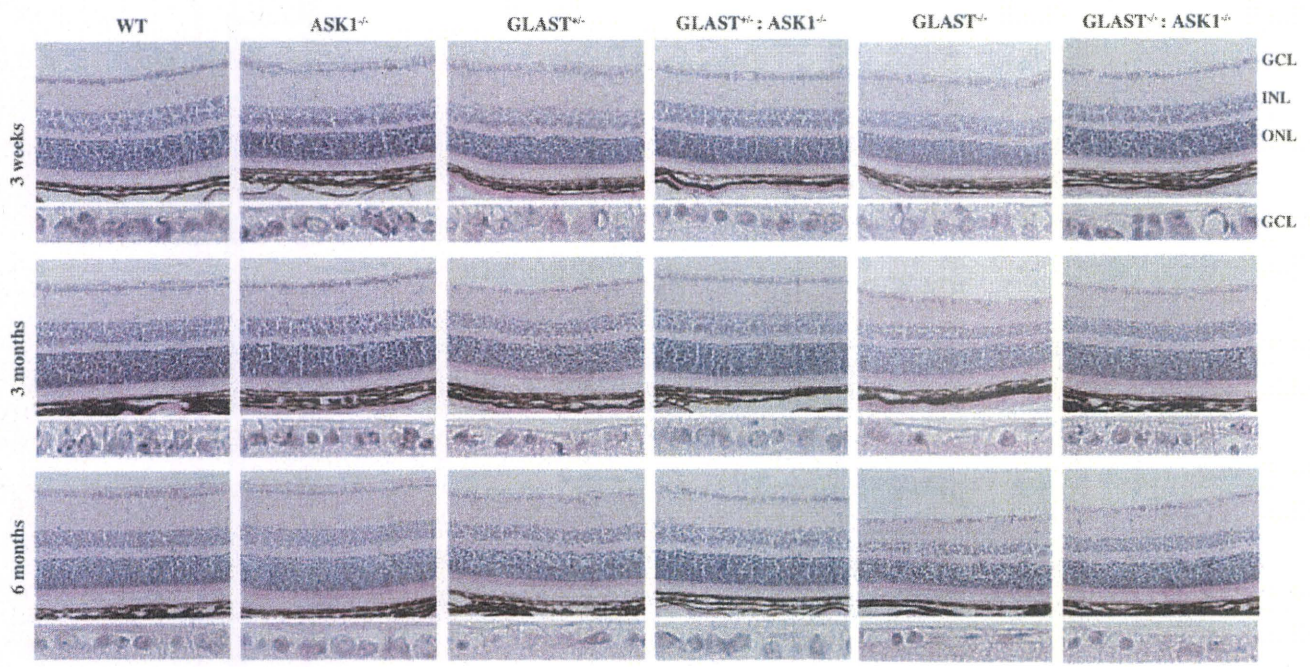
## Results

**ASK1 deficiency protects visual function in GLAST-deficient mice.** To determine whether ASK1 deficiency is capable of preventing the NTG-like phenotype in GLAST-deficient mice,<sup>13</sup> GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>+/-</sup> mice were interbred and genotyped at weaning. GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice were born in accordance with Mendelian inheritance ratios, survived into adulthood and were fertile. We first examined the visual function of these mice at 3 months of age (3M) using multifocal electroretinograms (mfERGs), an established noninvasive method.<sup>13</sup> Figure 1a and b show the averaged responses of the second-order kernel in each group. The visual function of WT and ASK1<sup>-/-</sup> mice was indistinguishable (Figure 1c). As we have previously reported, visual function in the GLAST<sup>+/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup> mice was impaired in all visual fields, but was clearly improved by ASK1 deficiency (Figure 1a–c). In particular, the amplitude of the secondary kernel in GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice ( $4.7 \pm 0.4$  nV/deg<sup>2</sup>;  $n=8$ ) was not significantly different compared with WT mice ( $5.0 \pm 0.3$  nV/deg<sup>2</sup>;  $n=9$ ) ( $P=0.67$ , Figure 1c). These results suggest that ASK1 deficiency has no harmful effects during development and prevents visual disturbances in GLAST-deficient mice.

**ASK1 deficiency protects retinal neurons in GLAST-deficient mice.** We next analyzed the histopathology of the

retina. Consistent with the results of the mfERGs, the retina of ASK1<sup>-/-</sup> mice showed normal organization at 3 weeks (3W), 3M and 6M (Figure 2). Cell number in the ganglion cell layer (GCL) was significantly decreased after 3M in GLAST<sup>+/-</sup> mice and after 3W in GLAST<sup>-/-</sup> mice (Figures 2 and 3a). In addition, the thickness of the inner retinal layer (IRL) was decreased after 3M in both strains (Figure 3b). In GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice, however, GCL cell number was significantly increased at 3M and 6M compared with GLAST<sup>+/-</sup> mice (Figure 3a). IRL thickness was increased to a normal level ( $105 \pm 11\%$  at 3M and  $95 \pm 11\%$  at 6M;  $n=6$ ) in GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice (Figure 3b). In GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice, IRL thickness was significantly increased at 3M and 6M compared with GLAST<sup>-/-</sup> mice (Figure 3b). In addition, GCL cell number was increased at 3W and 3M, but not at 6M (Figure 3a). These results suggest that ASK1 deficiency prevents the loss of RGCs and secondary retinal degeneration in GLAST-deficient mice.

**ASK1 deficiency prevents optic nerve degeneration in GLAST-deficient mice.** As nearly half of the cells in the rodent GCL are displaced amacrine cells, we needed to distinguish RGCs from displaced amacrine cells by retrograde labeling.<sup>18</sup> As ASK1 deficiency was most effective in 3M GLAST<sup>+/-</sup> mice, we examined RGC number in WT, ASK1<sup>-/-</sup>, GLAST<sup>+/-</sup> and GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice at 3M (Figure 4a–h). RGC number per square millimeter in ASK1<sup>-/-</sup> mice ( $4200 \pm 238$ ;  $n=3$ ) was normal compared with WT mice ( $4050 \pm 170$ ;  $n=3$ ) ( $P=0.64$ , Figure 4m). In GLAST<sup>+/-</sup> mice, RGC number ( $3358 \pm 180$ ;  $n=3$ ) was significantly reduced compared with WT mice ( $P<0.05$ ). However, RGC number in GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice ( $4067 \pm 121$ ;  $n=3$ ) was clearly increased compared with



**Figure 2** Effect of ASK1 on the progress of glaucoma. H&E staining of retinal sections at 3 weeks, 3 months and 8 months. WT, GLAST<sup>+/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup> mice were littermates. GLAST<sup>+/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> and GLAST<sup>-/-</sup>:ASK1<sup>-/-</sup> mice were littermates. Scale bar: 100 and 400  $\mu$ m in the upper and lower rows, respectively. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer