

201027030B

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20年度～22年度 総合研究報告書

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20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 光一

平成23年（2011年） 5月

目 次

I. 総合研究報告書	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 7
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 10

I. 総 合 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。GLAST の緑内障関連変異 4 個を見つけ、そのうち、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、緑内障に特異的な一塩基多型・変異は見つからなかった。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 interleukin-1 (IL-1) 及び arundic acid、抗酸化ストレス活性を持つ水素水、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できる系を確立し、9 万個の化合物の中から 16 個の GLAST 活性化化合物を見つけた。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だけでなく、網膜神経節細胞の保護作用を持つことを明らかにした。さらに、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、グリア細胞を標的にした新たな神経保護法の開発への基盤を確立した。

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。

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。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。

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^{-/-}) 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^{+/+}:ASK1^{-/-}および GLAST^{-/-}:ASK1^{-/-}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^{-/-}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^{-/-}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: 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、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作成し、グルタミン酸取り込み活性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、9 万個の化合物のスクリーニングを行った。

IL-1 の GLAST 活性促進メカニズムの解析は、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。

5.Dock3 の網膜神経節細胞の軸索促進および網膜神経節細胞保護効果の解析

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。

Dock3 過剰発現マウスと GLAST 欠損マウスを交配し、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。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。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.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^{+/+}:ASK1^{-/-}および GLAST^{-/-}:ASK1^{-/-}マウスにおいては、それぞれ GLAST^{+/+}および GLAST^{-/-}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^{+/+}:ASK1^{-/-} および GLAST^{-/-}:ASK1^{-/-} マウスは正常眼圧を示し、

GLAST^{+/+}および GLAST^{-/-}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^{-/-}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、水素水、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・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。Am80 には、神経保護効果が観察されなかった。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。

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たハイスループットスクリーニングにより、9 万個の化合物から 16 個の GLAST 活性化化合物作用を見つけた。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 Na⁺-K⁺ ATPase の発現上昇はみられなかったが、膜分画の Westernblot 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。

5. Dock3 の網膜神経節細胞の軸索促進および網膜神経節細胞保護効果の解析

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。

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。

6. 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. 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

GLAST 遺伝子改変マウスの網膜神経節細胞の変性を抑制する効果のあった IL-1, arundic acid、水素水、HON0001 のなかで、arundic acid 及び水素水は、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

本研究で見つけたヒト GLAST を活性化する 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。

5. Dock3 の網膜神経節細胞の軸索促進および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、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。

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。

6. グリア細胞を標的にした神経保護法の開発
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。

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。

また、緑内障の新規治療薬に成り得るHON0001, arundic acid、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. 研究発表

1. 論文発表 (英文のみ)

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.

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.

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

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」

Fuse N. Candidate Gene Approach for Primary Open Angle Glaucoma. Glaucoma Summer Camp, Awajishima, Hyogo, 2008

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「失明しないためにー緑内障、糖尿病網膜症の予防と治療ー」

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

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

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

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)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 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
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
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	27巻8号	1291-1295	2009
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
Namekata K, Harada C, Guo X, Kikushima K, Kimura A, Fuse N, Mitamura Y, Kohyama K, Matsumoto 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, Matsumoto 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卷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卷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卷	189-197	2011

Ⅲ. 研 究 成 果 の 刊 行 物 ・ 別 刷

4. グルタミン酸トランスポーターと精神神経疾患

相田知海・田中光一

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性の神経伝達物質であると同時に、グルタミン酸受容体の過剰活性化による神経毒性をもつ。このため細胞外グルタミン酸濃度は、グルタミン酸トランスポーターにより厳密に制御されている。グルタミン酸トランスポーターの機能障害は、緑内障・筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、自閉症・統合失調症などの精神疾患の発症に関与することが、モデル動物・ヒト症例において明らかにされつつある。グルタミン酸トランスポーターを活性化する薬剤は、これら精神神経疾患の新たな治療法となりうる。

はじめに

グルタミン酸は哺乳類の中枢神経系において約8割の神経細胞が用いる主要な興奮性の神経伝達物質であり、記憶・学習など脳の高次機能に重要な役割を果たしている¹⁾。一方で、過剰な細胞外グルタミン酸はグルタミン酸興奮毒性と呼ばれる神経細胞障害作用により神経細胞死を引き起こすことが知られ、多くの急性・慢性の神経変性疾患に関与している²⁾。このためシナプス間隙におけるグルタミン酸濃度は厳密に制御されている必要がある。神経活動に伴いシナプス前終末から放出されたグルタミン酸は、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体に結合し、神経伝達の役割を終えた後、アストロサイトおよび神経後細胞の細胞膜に存在するグルタミン酸トランスポーターによって迅速に細胞内へ回収される(図1A)。これまで哺乳類の中枢神経系において、5種類のグルタミン酸トランスポーターサブタイプEAAT1 (GLAST, SLC1A3), EAAT2 (GLT1, SLC1A2), EAAT3 (EAAC1, SLC1A1), EAAT4 (SLC1A6), EAAT5 (SLC1A7) がクローニング

されている³⁾。GLAST, GLT1は主にアストロサイトに、EAAC1とEAAT4は神経細胞に、EAAT5は網膜に発現している(図1B)⁴⁾。近年、これらのグルタミン酸トランスポーター欠損マウス群を用いた解析により、グルタミン酸トランスポーター各サブタイプの機能的差異が明らかになりつつある⁴⁾。本稿では、これらマウスモデルと最新のゲノム科学の知見を元に、グルタミン酸トランスポーターの精神神経疾患における役割を概説する。

I. グルタミン酸トランスポーター欠損マウスが示す病態

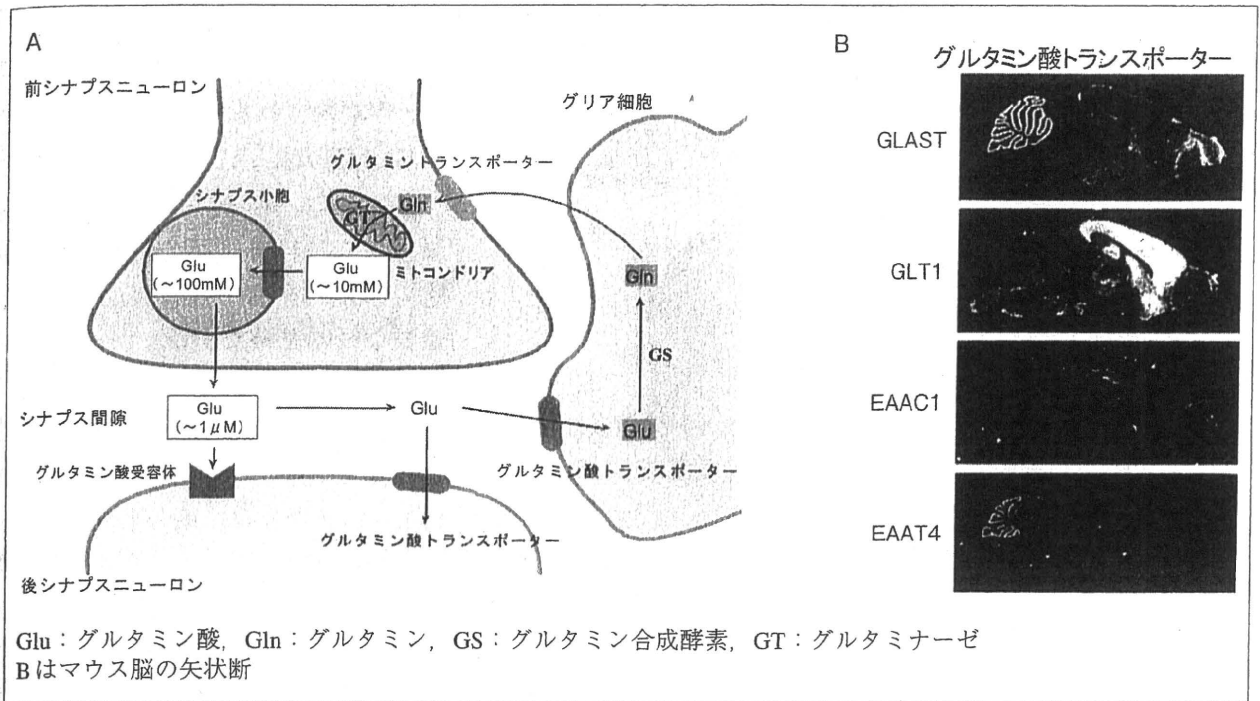
1. GLT1欠損マウス⁵⁾

GLT1は前脳・海馬で特に強い発現を示しており、これらの部位においてグルタミン酸取り込みの95%を担っている最も重要なグルタミン酸トランスポーターである。脳虚血、脳外傷、肝性脳症、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)では、主にGLT1の機能低下が関与していると考えられている⁶⁾。グルタミン酸トランスポーターは細胞内外のナトリウムとカリウ

key words

グルタミン酸トランスポーター, アストロサイト, 興奮毒性, 欠損マウス, 発生, 神経変性疾患, 自閉症, 統合失調症, うつ病, 強迫性障害

図1 シナプスのグルタミン酸動態 (A) とグルタミン酸トランスポーター mRNA の脳内局在 (B)



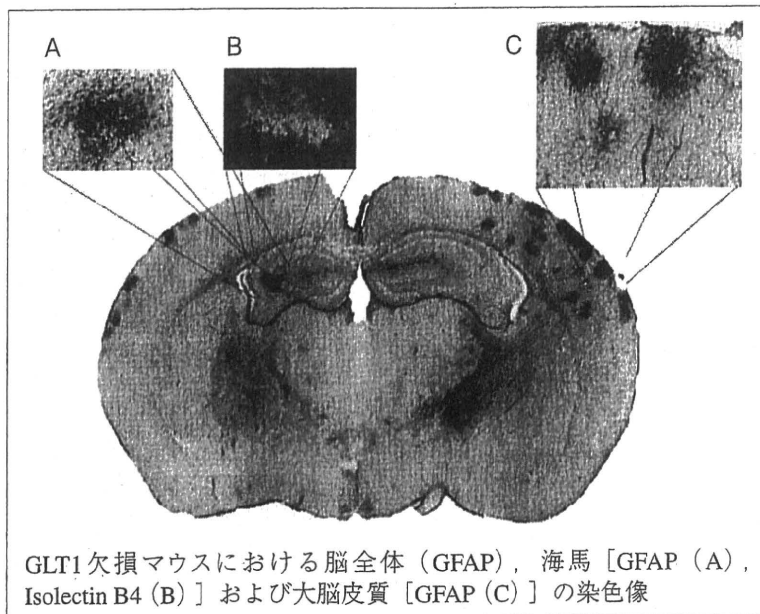
ムのイオン勾配を駆動力にして、グルタミン酸を細胞内へ取り込む。脳虚血・脳外傷時には、ATP枯渇に伴う Na^+/K^+ ポンプの停止により、このイオン勾配が崩壊し、グルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み活性は低下する⁷⁾。さらにイオン勾配の崩壊が進行すると、グルタミン酸トランスポーターは逆作動し、細胞内のグルタミン酸は細胞外へ放出される。家族性ALSの原因遺伝子である *SOD1* のヒト変異体モデルマウスでは、GLT1の減少や活性低下が報告されている。Rothsteinらは弧発性ALS患者にドミナントネガティブのGLT1スプライスバリエントがあり、運動ニューロンが変性することを報告した⁴⁾。しかし、このスプライスバリエントは正常のヒトにも存在していることが報告され、その意義は不明である⁴⁾。GLT1欠損マウスは生後2~3週目以降、致死性の癲癇発作により死亡する⁹⁾。明らかな運動麻痺の兆候は観察されない。GLT1欠損マウスへの虚血負荷実験から、短時間の虚血に対してはGLT1の取り込み能低下が、長時間の虚血に対してはGLT1の逆作動によるアストロサイトからのグルタミン酸放出が、細胞外グルタミン酸上昇の原因であることが明らかになった⁹⁾⁸⁾。GLT1欠損

マウスでは、海馬CA1の錐体細胞や、大脳皮質第二層神経細胞の減少、グリオシスが観察され(図2)⁹⁾、グルタミン酸興奮毒性により神経細胞が障害を受けていることがわかる。

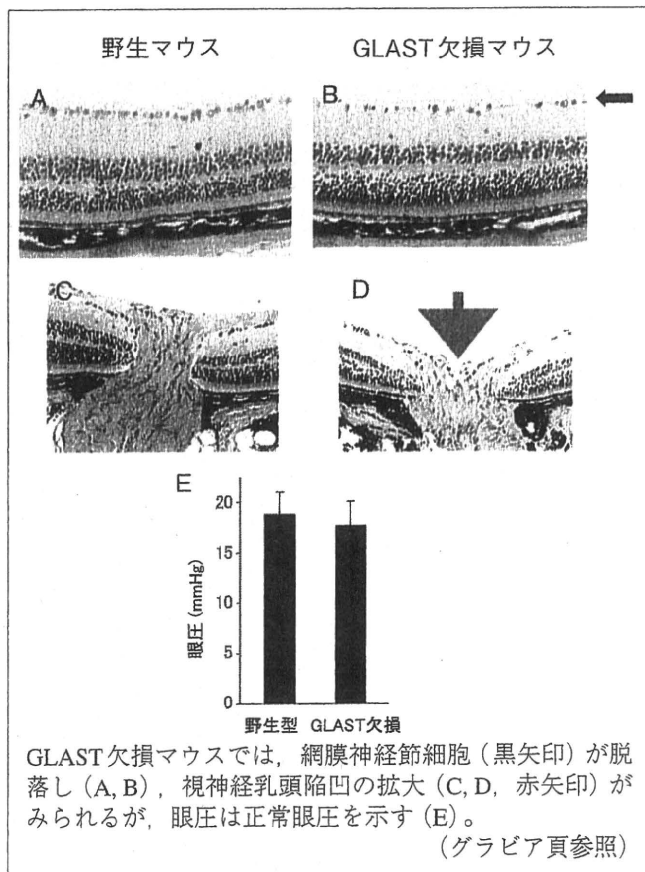
2. GLAST欠損マウス

GLASTは中枢神経系全般のアストロサイトに発現しており、特に小脳のBergmann gliaに多い。このためGLAST欠損マウスでは軽度の協調運動障害や、低温誘発性障害による小脳損傷の悪化が認められる¹⁰⁾。内耳においてGLASTは唯一のグルタミン酸トランスポーターである。GLAST欠損マウスでは、騒音負荷による蝸牛内グルタミン酸濃度上昇が促進され、聴力低下、蝸牛神経終末の障害が悪化する¹¹⁾。GLASTは網膜のグリア細胞であるミュラー細胞にも多く発現している。GLAST欠損マウスは、眼圧は正常であるにもかかわらず、網膜神経節細胞が加齢に伴って変性し、視神経乳頭陥凹、視覚機能異常を示す(図3)¹²⁾。これらの異常は、ヒトの正常眼圧緑内障において認められる所見と一致する。GLAST欠損マウスの網膜神経節細胞の変性は、グルタミン酸受容体阻害薬であるメマンチンの投与により抑制された。緑内障はわが国の40歳以上の約5%に発症し、

図② GLT1 欠損マウスにおけるグリオーシス (文献9より)



図③ GLAST 欠損マウスにおけるヒト正常眼圧緑内障と同様の異常



初めての正常眼圧緑内障のモデルであり、正常眼圧緑内障の病態解明、新規治療薬の開発に大きく貢献することが期待される。

3. GLAST/GLT1 二重欠損マウス¹³⁾

グルタミン酸は、神経系の発生において、神経幹細胞の増殖、神経細胞の移動・生存、神経突起の伸長に重要な役割を果たすことが *in vitro* の実験から示唆されてきた。しかし、グルタミン酸受容体欠損マウスなどグルタミン酸シナプス伝達の loss-of-function モデルは、脳の形成異常を示さない。われわれは、グルタミン酸受容体が過剰に活性化される gain-of-function モデルとして、GLAST/GLT1

二重欠損マウスを作製した。このミュータントマウスは胎齢 17 日前後に死亡し、脳室拡大、神経幹細胞の分裂異常、神経細胞の移動、大脳皮質層構造の形成異常、大脳皮質と他の脳部位を結合する線維連絡などの異常がみられた。これらの異常は、グルタミン酸受容体のアンタゴニスト (NMDA 受容体、AMPA 受容体アンタゴニストの組み合わせ) 投与により、ある程度抑制された。これより、過剰な細胞外グルタミン酸は、*in vivo* においてもグルタミン酸受容体を過剰に活性化し、神経幹細胞の分裂、神経細胞の移動、神経突起の伸長など、神経系の発生に多大な影響を与えることが明らかになった。したがって、正常な神経発生には、GLAST と GLT1 による細胞外グルタミン酸濃度の厳密な制御が必要である。

4. EAAC1 欠損マウス

EAAC1 は大脳皮質、海馬、網膜神経節細胞などの神経後細胞に発現する神経細胞型のグルタミン酸トランスポーターである。EAAC1 は GLAST や GLT1 に比べ、シナプス間隙におけるグルタミン酸除去能は低い、抗酸化分子グルタチオン合成の基質であるシステインを取り込む特性をもつ³⁾¹²⁾。EAAC1 欠損マウスの網膜では、酸化ストレスが亢進しており、これにより網膜神経節細胞の変性が観察される¹²⁾。青山らは、EAAC1 欠損

失明を伴う重篤な疾患で、うち 70% を正常眼圧緑内障が占めている。GLAST 欠損マウスは世界で

マウスにおいて、グルタチオン減少、酸化ストレス亢進、加齢に伴う脳萎縮、行動異常が観察されることを報告した¹⁴⁾。これらの報告から、EAAC1は神経細胞を酸化ストレスから防御するうえで重要であると考えられる。

II. グルタミン酸トランスポーターと精神疾患

近年のゲノム科学の急速な進展により、多数の患者からゲノムワイドに原因遺伝子を探索することが可能になった¹⁵⁾。最新の報告により、様々な精神疾患において、グルタミン酸トランスポーターが直接的に精神疾患の原因となりうる可能性が示唆されつつある。

1. 自閉症

自閉症は、社会性行動の喪失や言語発達の遅延を特徴とする脳高次機能の発達障害である。グルタミン酸神経伝達系の異常は自閉症の重要なリスクであり^{16) 17)}、脳の形成に極めて重要な役割をもつ¹⁸⁾。自閉症様の行動を示す脆弱X症候群や結節性硬化症の患者ではグルタミン酸神経伝達の異常が報告されている^{18) 19)}。2007年3月、欧米の50の機関からなる自閉症ゲノム計画コンソーシアムは、これまでで最大となる自閉症患者2名以上を含む1181家系を対象としたゲノムワイドな連鎖解析の結果をNature Genetics誌に発表した²⁰⁾。この大規模解析により11番染色体の11p12-13が自閉症に関連があることが明らかになった。たいへん興味深いことに、この領域はGLT1の遺伝子座である。同時に感受性遺伝子座として同定された9番染色体の9p24はEAAC1の遺伝子座である。コンソーシアムメンバーであるコロンビア大学のグループによる別の解析結果からは、5番染色体の5p11, 13-14などが自閉症に関連する遺伝子座であることが明らかになっている^{20) 21)}。この領域はGLASTの遺伝子座である。最近、われわれはGLAST (+/-) & GLT1 (+/-) マウスが自閉症様の社会行動の異常、脳の形態異常を示すことを発見した。これらの知見を総合すると、グルタミン酸トランスポーターの機能不全による、グルタミン酸神経伝達系の過剰な活性化が自閉症の病態を説明

する可能性がある。

2. 統合失調症

統合失調症は、幻覚・妄想などの陽性症状と、無為自閉・感情鈍麻・意欲の減退などの陰性症状を示し、世界中でおよそ100人に1人が発症する精神疾患である。NMDA受容体欠損マウスやNMDA受容体阻害薬を投与された動物が統合失調症様の症状を示すことから、グルタミン酸神経伝達の低下が統合失調症の有力な病態であると考えられている²²⁾。しかし、最近の臨床試験結果から、グルタミン酸の放出を抑制する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2/3 のアゴニストが統合失調症の治療薬として有望であることが報告された²³⁾。この報告は、統合失調症では細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、脳全体として興奮性優位となっている可能性を示唆している²²⁾。さらに、統合失調症患者のゲノムワイドな遺伝子解析から、GLAST遺伝子座に染色体欠失がある症例が報告された²⁴⁾。この患者ではGLASTの上流に位置するSKP2 (細胞周期関係遺伝子) 遺伝子のエクソン3からGLASTのエクソン3までの約500Kbpが欠失し、SKP2とGLASTの融合キメラ遺伝子が発現していた。このキメラ遺伝子はGLASTの膜貫通領域の一部を失っていることから、細胞膜への移行が障害され、細胞のグルタミン酸取り込み活性が障害されていると推定される。GLAST/GLT1二重欠損マウスの脳室拡大などの異常は、統合失調症で観察される脳形成異常と似ている。また、周産期の虚血状態は統合失調症の危険因子であり、虚血状態ではグルタミン酸トランスポーターの機能不全により細胞外グルタミン酸濃度が上昇する。したがって、グルタミン酸トランスポーターの機能不全によるグルタミン酸神経伝達系の過剰な活性化が、統合失調症の発症に関与する可能性がある。

3. うつ病

うつ病は、抑うつ気分と興味・喜びの喪失を特徴とする精神疾患である。近年、うつ病においても、グルタミン酸神経伝達系の異常を示唆する証拠が蓄積し、1つの仮説を形成しつつある²⁵⁾。これはNMDA受容体のアンタゴニストがうつ病患

者および動物モデルにおいて抗うつ作用をもつことによる²⁵⁾。また、うつ病患者の脳では GLAST, GLT1 が減少している²⁶⁾。これらの知見から、グルタミン酸トランスポーターの機能不全によるグルタミン酸神経伝達系の過剰な活性化が、うつ病の発症にも関与している可能性がある。

4. 強迫性障害

強迫性障害は、従来、強迫神経症と呼ばれていた、強迫観念・強迫行為を特徴とする不安障害である。強迫性障害の患者ではグルタミン酸神経伝達系の異常が知られ、mGluR2/3 のアンタゴニストは動物モデルで改善作用を示す²⁷⁾。複数の連鎖解析結果から、EAAC1 の遺伝子座 (9p24) が、疾患感受性遺伝子座として同定された²⁸⁾。したがって、強迫性障害にもグルタミン酸神経伝達系の異常が関与している可能性がある。

これらの知見からわれわれは、「グルタミン酸トランスポーターの機能異常による脳の興奮性と抑制性のアンバランスは、主要な精神疾患の共通病態である」という作業仮説を立て、研究を進めている。

おわりに

以上のように、グルタミン酸トランスポーターの機能不全は、様々な精神神経疾患の病態に関与することが明らかになりつつある。したがって、グルタミン酸トランスポーターの制御により、これら疾患の新規治療法の開発が可能になる。これまでグルタミン酸神経毒性に対する神経細胞保護薬の開発は、グルタミン酸受容体アンタゴニストを中心に行われてきたが、シナプス伝達遮断による副作用の問題があり、いまだ臨床応用可能な薬剤の開発は成功していない。われわれのグルタミン酸トランスポーター欠損マウスの解析から、グリア型グルタミン酸トランスポーターを欠損させてもシナプス伝達そのものには大きな影響を与えないことがわかっている。したがって、グリア型グルタミン酸トランスポーターの転写や取り込み活性を促進する薬物、グルタミン酸トランスポーターの逆作動を抑制する薬物は、副作用の少ない新しい神経保護薬として有用であると期待される²⁹⁾。

参考文献

- 1) Nakanishi S, et al : Brain Res Brain Res Rev 26, 230-235, 1998.
- 2) Obrenovitch TP, Urenjak J : Prog Neurobiol 51, 39-87, 1997.
- 3) Danbolt NC : Prog Neurobiol 65, 1-105, 2001.
- 4) Tanaka K : Neurosci Res 37, 15-19, 2000.
- 5) Tanaka K, et al : Science 276, 1699-1702, 1997.
- 6) Tanaka K : Clinical Neuroscience 25, 902-904, 2007.
- 7) Nicholls D, Attwell D : Trends Pharmacol Sci 11, 462-468, 1990.
- 8) Mitani A, Tanaka K : J Neurosci 23, 7176-7182, 2003.
- 9) Kiryk A, et al : Neurotox Res 13, 19-30, 2008.
- 10) Watase K, et al : Eur J Neurosci 10, 976-988, 1998.
- 11) Hakuba N, et al : J Neurosci 20, 8750-8753, 2000.
- 12) Harada T, et al : J Clin Invest 117, 1763-1770, 2007.
- 13) Matsugami TR, et al : Proc Natl Acad Sci USA 103, 12161-12166, 2006.
- 14) Aoyama K, et al : Nat Neurosci 9, 119-126, 2006.
- 15) Couzin J, Kaiser J : Science 316, 820-822, 2007.
- 16) Purcell AE, et al : Neurology 57, 1618-1628, 2001.
- 17) Shinohe A, et al : Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 30, 1472-1477, 2006.
- 18) Belmonte MK, Bourgeron T : Nat Neurosci 9, 1221-1225, 2006.
- 19) Tavazoie SF, et al : Nat Neurosci 8, 1727-1734, 2005.
- 20) The Autism Genome Project Consortium : Nat Genet 39, 319-328, 2007.
- 21) Abrahams BS, et al : Nat Rev Genet 9, 341-355, 2008.
- 22) Lisman JE, et al : Trends Neurosci 31, 234-242, 2008.
- 23) Patil ST, et al : Nat Med 13, 1102-1107, 2007.
- 24) Walsh T, et al : Science 320, 539-543, 2008.
- 25) Paul IA, Skolnick P : Ann NY Acad Sci 1003, 250-272, 2003.
- 26) Choudary PV, et al : Proc Natl Acad Sci USA 102, 15653-15658, 2005.
- 27) Shimazaki T, et al : Eur J Pharmacol 501, 121-125, 2004.
- 28) Liang KY, et al : Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet PMID: 18286588, 2008.
- 29) Tanaka K : Trends Mol Med 11, 259-262, 2005.

参考図書

* Annals of the New York Academy of Sciences 1003,
Glutamate and disorders of cognition and motivation,
Goldman-Rakic PS, Blackwell Synergy, 2003.

参考ホームページ

Autism Genetic Resource Exchange
<http://www.agre.org>

相田知海

2008 年 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育
部博士課程修了
同疾患生命科学研究部分子神経科学特任助教

グルタミン酸輸送体によるグルタミン酸代謝制御の全
貌解明をめざしている。

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

Kazuhiko 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-