

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTS

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

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

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

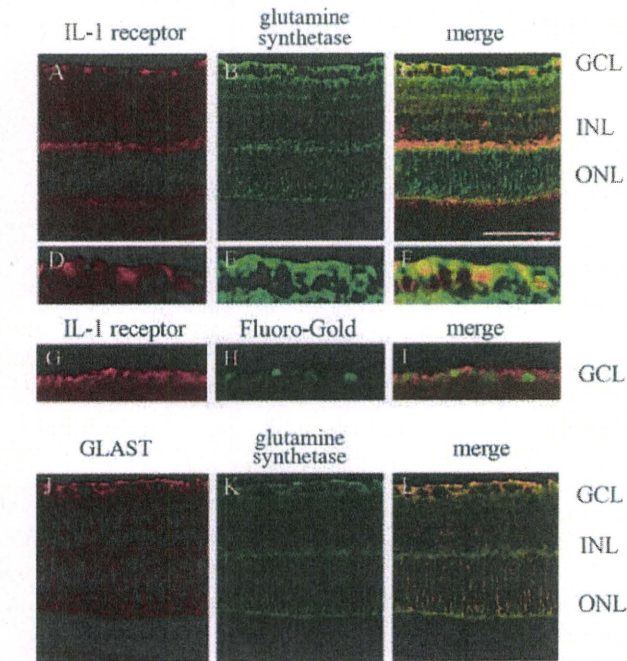


FIG. 1. Expression of IL-1 receptor in the mouse retina. (A to C) Immunohistochemical analysis of mouse retina double stained (C) with antibodies against IL-1 receptor (A) and glutamine synthetase (B), a specific marker for Müller glial cells. (D to F) Enlarged images of the GCL in panels A to C, respectively.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

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

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

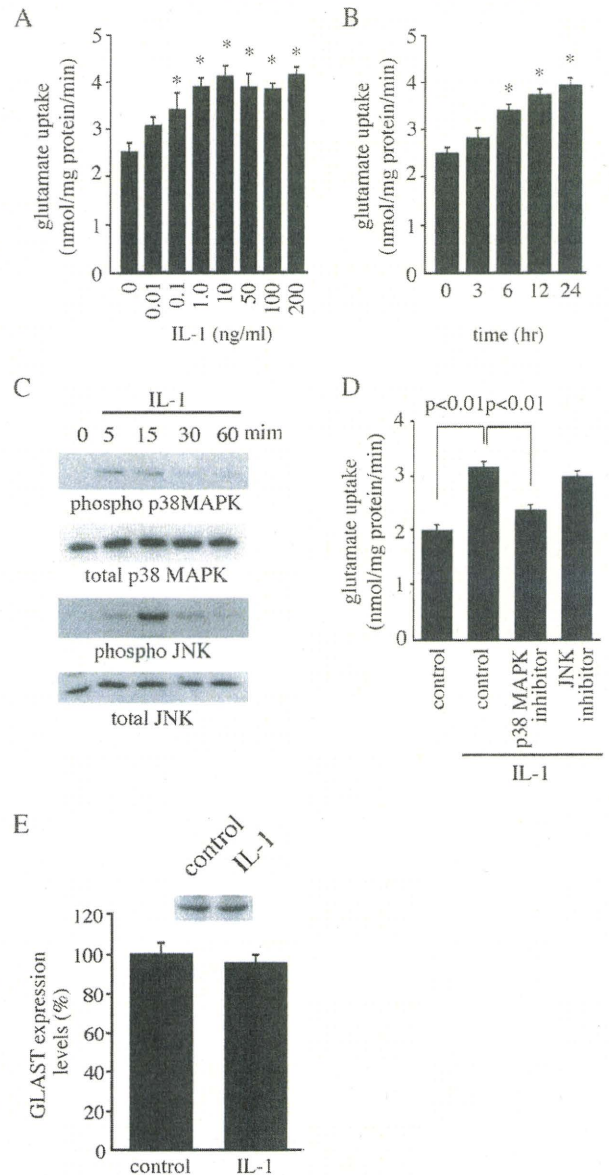


FIG. 2. IL-1 increases glutamate uptake by Müller glial cells. (A) Concentration dependency of glutamate transport activity in Müller cells treated with IL-1 for 24 h. *, $P < 0.05$. (B) Time dependency of glutamate transport activity in Müller cells treated with 50 ng/ml of IL-1. *, $P < 0.05$. (C)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

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

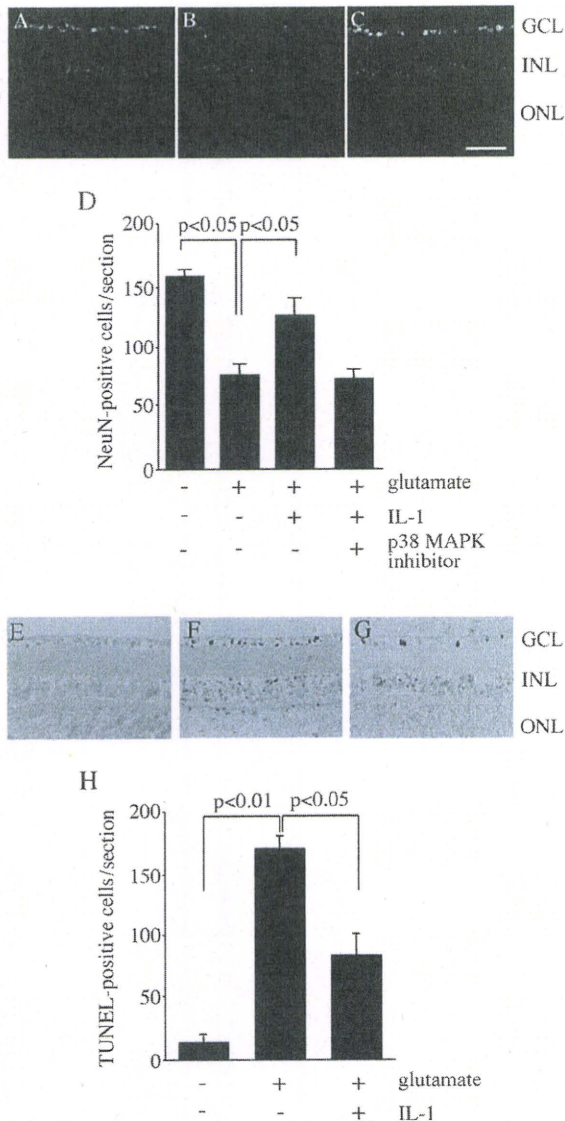


FIG. 3. IL-1 protects retinal neurons from glutamate neurotoxicity. (A to C) Immunohistochemical analysis of mouse retinal explants stained with anti-NeuN antibody. Explants were nontreated (A), treated with glutamate alone (B), or treated with both IL-1 and glutamate (C). (D) Quantification of NeuN-positive cells in the GCL. (E to G) TUNEL staining of mouse retinal sections. Retinas were nontreated (E), treated with glutamate alone (F), or treated with both IL-1 and glutamate (G). (H) Quantification of TUNEL-positive cells in the GCL. The data are means $\pm$ standard errors of three samples for each group. INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Bar, 50 μ m.

concentration was decreased in cultured Müller cells by QX-314 and increased by ouabain (Fig. 4A). In contrast, glutamate uptake was increased by QX-314 and decreased by ouabain (Fig. 4B). In addition, ouabain suppressed IL-1-induced glutamate uptake. Two glutamate receptor inhibitors, MK-801 and DNQX, had no effect on glutamate uptake activity. We next evaluated the effect of IL-1 on Na^+ concentration in cultured Müller cells. Intracellular Na^+ concentration was increased after stimulation with 2 mM glutamate, but IL-1 pretreatment suppressed the upregulation (Fig. 4C). KCl induces cell depolarization and Na^+ influx through voltage-gated Na^+ channels. As for gluta-

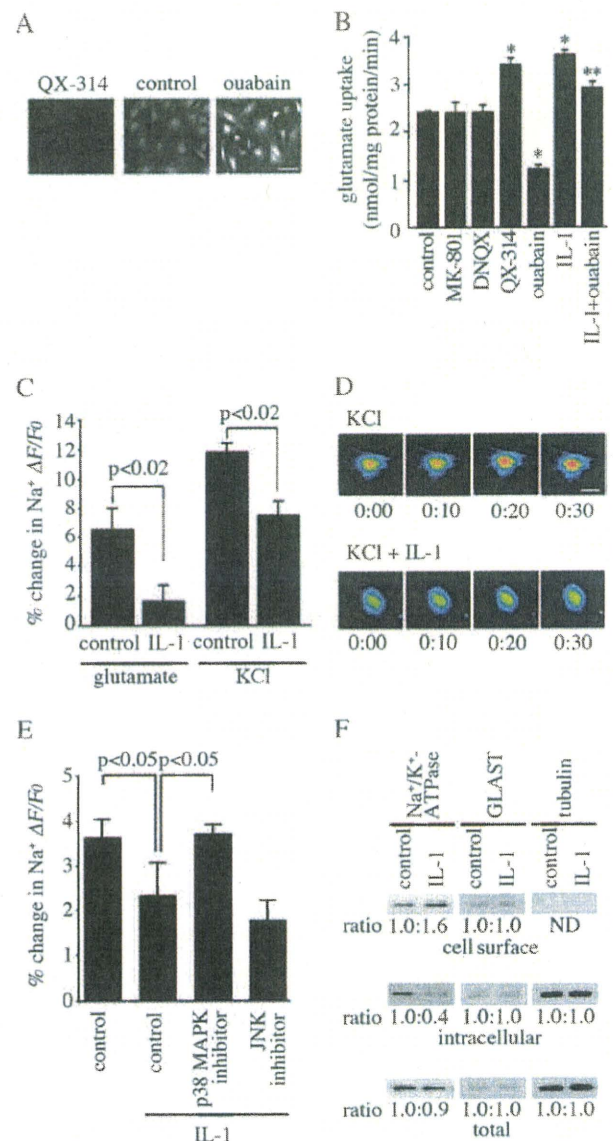


FIG. 4. IL-1 suppresses intracellular Na^+ accumulation in Müller cells. (A) Na^+ imaging of Müller cells after treatment with QX-314 or ouabain. Müller cells were loaded with Na^+ indicator CoroNa Green and stimulated with bath application of 3 mM QX-314 or 1 mM ouabain. Bar, 40 μ m. (B) Glutamate uptake activity by Müller cells after treatment with MK-801, DNQX, QX-314, ouabain, IL-1, or both IL-1 and ouabain. *, $P < 0.01$ versus control. **, $P < 0.05$ versus IL-1. (C) Quantification of Na^+ accumulation in Müller cells stimulated with bath application of 2 mM glutamate or 50 mM KCl. Pretreatment of IL-1 suppressed glutamate- and KCl-induced Na^+ accumulation. The data are means $\pm$ standard errors of 9 to 15 cells for each group from three independent cultures. (D) Na^+ imaging of Müller cells treated with KCl. Fluorescence images are shown in pseudocolor, with blue and red representing the lowest and highest intensities, respectively. The indicated times are seconds after initial application. Pretreatment of IL-1 (lower panels) suppressed KCl-induced Na^+ accumulation (upper panels). Bar, 20 μ m. (E) Effect of p38 MAPK or JNK inhibition on KCl-mediated Na^+ accumulation in Müller cells, showing suppression by the p38 MAPK inhibitor but not by the JNK inhibitor. The data are means $\pm$ standard errors of 10 to 13 cells for each group from three independent cultures. (F) IL-1 altered the intracellular localization of Na^+/K^+ -ATPase in Müller cells. After 24 h of IL-1 treatment, cell surface proteins were labeled with biotin and purified using avidin column. The bound (cell surface) and unbound (intracellular) proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblot analysis using anti- Na^+/K^+ -ATPase, anti-GLAST, and antitubulin antibodies. ND, not detectable.

mate, KCl increased the intracellular Na⁺ concentration in cultured Müller cells, and IL-1 significantly suppressed the accumulation (Fig. 4C and D). In addition, SB203580 masked the inhibitory effect of IL-1 on KCl-mediated Na⁺ accumulation, while JNK inhibitor II had no effect (Fig. 4E). Since Na⁺ extrusion is mediated mainly by Na⁺/K⁺-ATPase, we examined its intracellular localization by immunoblot analysis after biotinylation of cell surface proteins. Interestingly, IL-1 increased Na⁺/K⁺-ATPase expression on the cell surface, whereas less was found in the intracellular fraction (Fig. 4F). Total expression levels of Na⁺/K⁺-ATPase were not influenced by IL-1 treatment. As shown in Fig. 2E, IL-1 had no effect on intracellular localization of GLAST.

IL-1 stimulates actin disassembly and membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase. Actin filament assembly is essential for numerous cellular events, including membrane trafficking (29, 39, 42, 54), and thus may participate in IL-1-induced relocalization of Na⁺/K⁺-ATPase. Cytochalasin D, which disrupts actin filaments by inhibiting polymerization, further enhanced Na⁺/K⁺-ATPase accumulation on the cell surface of Müller cells when used in combination with IL-1 (Fig. 5A). Cytochalasin D also synergistically suppressed Na⁺ accumulation (Fig. 5B) and stimulated glutamate uptake (Fig. 5C). Cofilin promotes depolymerization of actin filaments (3), and IL-1 may affect cofilin expression levels in cultured Müller cells. Immunoblot analysis revealed that both total and phosphorylated cofilin expression levels were upregulated by IL-1 (Fig. 5D and E). These results suggested that IL-1 stimulates membrane accumulation of Na⁺/K⁺-ATPase through actin depolymerization.

A recent study showed that caspase 11 promotes cofilin-mediated actin depolymerization (33). Since actin depolymerization enhanced IL-1-dependent glutamate uptake (Fig. 5C), we examined the effect of IL-1 on caspase 11 expression in cultured Müller cells. Caspase 11 mRNA and protein were undetectable in nontreated Müller cells but clearly upregulated after IL-1 treatment (Fig. 6A and B). Intracocular injection of IL-1 (Fig. 6C) and ischemic retinal injury (Fig. 6D) also increased caspase 11 expression in Müller cells *in vivo*. This upregulation occurred concomitantly with IL-1 upregulation at 3 and 6 h after ischemic injury (Fig. 6E).

We next examined whether caspase 11 is involved in actin depolymerization in cultured Müller cells. Stimulation with IL-1 induced strong caspase 11 expression in some cells. F-actin in such cells was clearly reduced compared that in with other cells expressing low caspase 11 (Fig. 7A). Caspase 11 induction was p38 MAPK, but not JNK, pathway dependent (Fig. 7B). We further investigated whether caspase 11 is involved in IL-1-dependent glutamate uptake. Cultured Müller cells transfected with caspase 11 small interfering RNA (siRNA) showed a decrease in IL-1-induced caspase 11 expression to about 50% (Fig. 7C and D). In this situation, caspase 11 siRNA significantly decreased IL-1-induced glutamate uptake (Fig. 7E). Scrambled siRNA had no effect on caspase 11 expression and glutamate uptake. These results suggested that IL-1 induces caspase 11 expression and promotes actin depolymerization, leading to membrane accumulation of Na⁺/K⁺-ATPase in Müller cells.

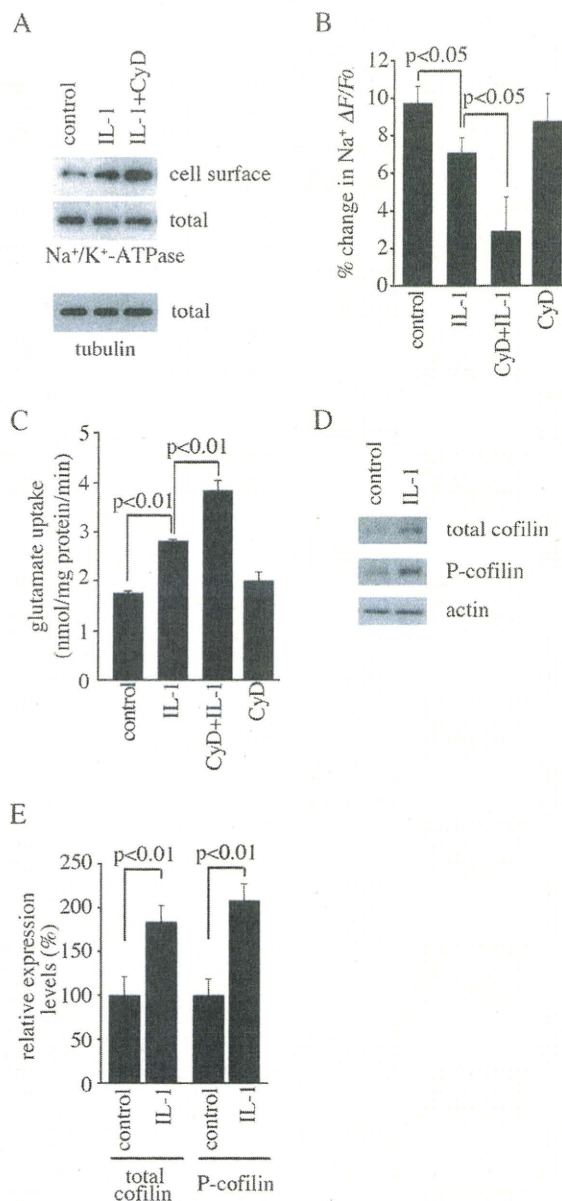


FIG. 5. Effects of actin assembly on IL-1-induced glutamate uptake. (A) Effect of IL-1 and cytochalasin D (CyD) on membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase. After treatment with IL-1 alone or with both IL-1 and CyD, cell surface proteins were biotinylated and purified on avidin affinity columns. Samples were separated on SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblot analysis using anti-Na⁺/K⁺-ATPase and antitubulin antibodies. (B) Effect of IL-1 and CyD on KCl-induced Na⁺ accumulation. The data are means $\pm$ standard errors of 12 to 18 cells for each group from three independent cultures. (C) Effect of IL-1 and CyD on glutamate uptake activity. The data are means $\pm$ standard errors of three samples for each group. (D) Increased cofilin expression after IL-1 treatment in Müller cells treated with IL-1 for 24 h, lysed, and subjected to immunoblot analysis using anticofilin and anti-phosphorylated cofilin (anti-P-cofilin) antibodies. (E) Quantification of total and P-cofilin expression levels. The data are means $\pm$ standard errors of three samples for each group.

DISCUSSION

Here we showed that IL-1 increases glutamate uptake by Müller glial cells and pretreatment of IL-1 partially protects retinal neurons from glutamate neurotoxicity. Together with

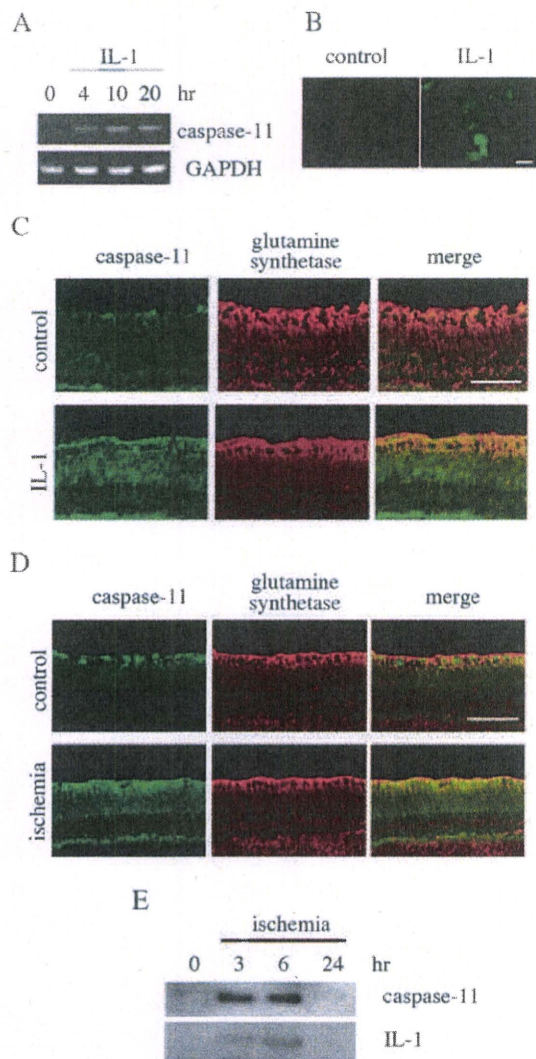


FIG. 6. IL-1 induces caspase 11 expression in Müller cells. (A) RT-PCR analysis of caspase 11 expression in Müller cells treated with IL-1 for the indicated times. Total RNA was isolated, reverse transcribed, and subjected to PCR analysis. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. (B) Immunocytochemical analysis of caspase 11 in Müller cells following 24 h of IL-1 treatment. The cells were fixed and immunostained with anti-caspase 11 antibody. Bar, 20 μ m. (C) Effect of IL-1 on caspase 11 expression in the mouse retina, which was double stained with antibodies against caspase 11 (green) and glutamine synthetase (red) 6 h after intraocular injection of IL-1. Bar, 50 μ m. (D) Effect of ischemia on caspase 11 expression in the mouse retina. After 3 h of ischemia, mouse retinas were double stained with antibodies against caspase 11 (green) and glutamine synthetase (red). Bar, 50 μ m. (E) Immunoblot analysis of ischemic retina. Two micrograms of proteins from ischemic retinas was separated on SDS-polyacrylamide gels followed by immunoblot analysis using anti-caspase 11 and anti-IL-1 antibodies.

IL-1 receptor expression pattern, IL-1 seems to mediate neuroprotection through Müller cells. Because GLAST is a major, glial-type glutamate transporter, we investigated the mechanisms by which IL-1 stimulates the function of GLAST. A Na^+/K^+ -ATPase inhibitor, ouabain, stimulated Na^+ accumulation and suppressed glutamate uptake. IL-1 had no effect on the expression levels of GLAST, total Na^+/K^+ -ATPase, and ATP (data not shown). However, IL-1 stimulated the mem-

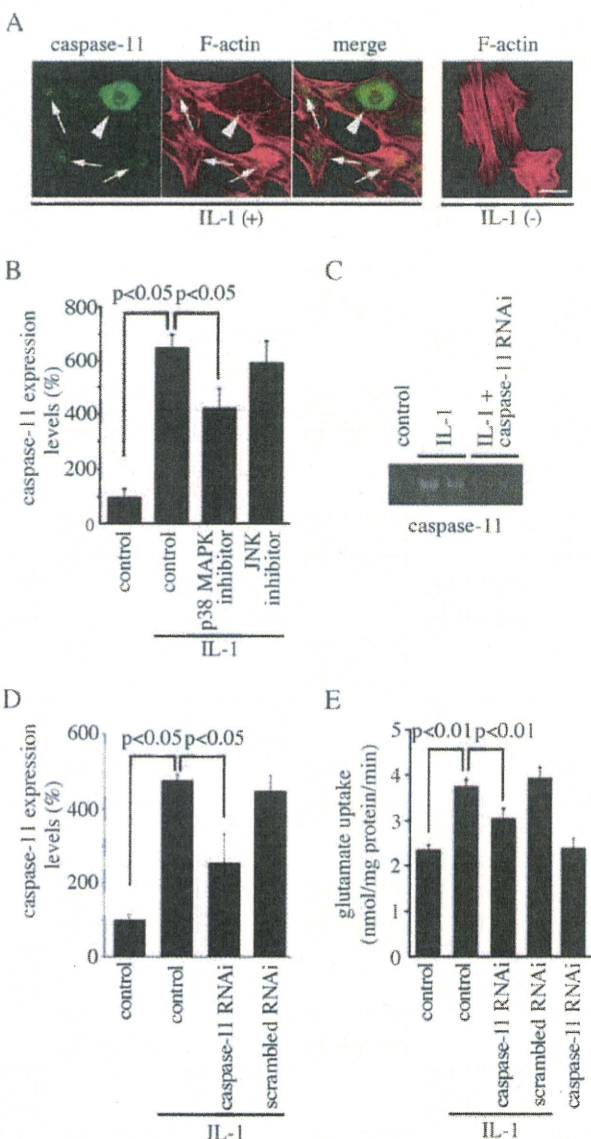


FIG. 7. Effect of caspase 11 on IL-1-induced glutamate uptake by Müller cells. (A) Effect of caspase 11 expression on actin filaments. After IL-1 treatment, cells were stained with anti-caspase 11 antibody (green) and rhodamine-labeled phalloidin (red). F-actin was reduced in the cell expressing caspase 11 (arrowhead) compared with other cells (arrows). Bar, 20 μ m. (B) Effect of p38 MAPK or JNK inhibition on caspase 11 expression. IL-1-induced caspase 11 expression was suppressed by the p38 MAPK inhibitor but not by the JNK inhibitor. The data are means $\pm$ standard errors of three samples for each group. (C) RT-PCR analysis of caspase 11 expression levels in Müller cells. (D) Quantification of caspase 11 expression levels in Müller cells. The data are means $\pm$ standard errors of three samples for each group. (E) Quantification of glutamate uptake by Müller cells. The data are means $\pm$ standard errors of three samples for each group.

brane trafficking of Na^+/K^+ -ATPase, suppressed Na^+ accumulation, and increased glutamate uptake. In this study, IL-1 increased total cofilin expression levels in Müller cells, implying a role for IL-1 in actin network dynamics. In addition, cytochalasin D enhanced the membrane trafficking of Na^+/K^+ -ATPase and suppressed Na^+ accumulation after IL-1 treatment. Furthermore, phosphorylated cofilin binds to and activates Na^+/K^+ -ATPase (28, 31, 32). Our find-

ings therefore suggested that IL-1 suppresses intracellular Na^+ concentrations by accumulating Na^+/K^+ -ATPase at the cell surface via cofilin-mediated actin depolymerization and directly stimulating Na^+/K^+ -ATPase activity in Müller cells. Since IL-1 stimulates glutamate uptake in cultured astroglia from mouse brain (data not shown), this mechanism may be a more general phenomenon in glial cells. Recent study showed that GLAST also directs cell surface expression of Na^+/K^+ -ATPase in human astrocytes (13).

Caspase 11 expression is induced by stimulation with lipopolysaccharide and mediates the activation of caspase 1 by physical interaction, inducing IL-1 secretion (51). In the present study, we detected strong caspase 11 expression in Müller cells after intraocular injection of IL-1. Thus, IL-1 might stimulate IL-1 production and secretion in an autocrine manner. A recent study showed caspase 11 forming a complex with cofilin and promoting actin depolymerization that resulted in enhanced cell migration (33). We showed a reduction of actin staining in cultured Müller cells that strongly expressed caspase 11 after IL-1 treatment, suggesting that caspase 11 expression promotes cofilin-mediated actin depolymerization and the membrane trafficking of Na^+/K^+ -ATPase. Consistent with this, caspase 11 knockdown suppressed IL-1-dependent glutamate uptake. On the other hand, cytochalasin D or caspase 11 siRNA alone had no effect on intracellular Na^+ concentration and glutamate uptake. These results suggest that IL-1 activates multiple signal transduction pathways regulating intracellular localization of Na^+/K^+ -ATPase. For example, IL-1 is known to activate Rho family GTPases, which regulate actin assembly (26, 27, 46).

MAPKs such as p38 MAPK and JNK regulate a spectrum of processes including inflammation, cell proliferation, differentiation, and cell death (18, 37). IL-1 activates p38 MAPK and JNK in several cell types (14, 40, 50). In epithelial cells, IL-1 reduced Na^+ accumulation by downregulating Na^+ channels via p38 MAPK signaling (44). In addition, stimulation of p38 MAPK in hepatocytes suppressed Na^+ accumulation during hypoxia, whereas p38 MAPK inhibition increased membrane Na^+ permeability (7, 12). In cultured Müller cells, we demonstrated that inhibition of p38 MAPK, but not JNK, suppressed caspase 11 expression, Na^+ accumulation, and glutamate uptake. Taken together, our observations suggested that the IL-1/p38 MAPK signaling pathway is essential for maintaining intracellular Na^+ concentration and modulating glutamate uptake activity in Müller cells (Fig. 8).

Glutamate excitotoxicity is involved in various eye diseases including retinal artery occlusion, diabetic retinopathy, and glaucoma. We recently reported that GLAST is essential not only to keep the extracellular glutamate concentration below the neurotoxic level but also to maintain glutathione levels in Müller cells (20). Glutathione is a tripeptide of glutamate, cysteine, and glycine and is central in protecting RGCs against oxidative stress. Oxidative stress is also involved in glaucoma and other forms of retinal degeneration (1). Since glutamate uptake is a rate-limiting step in glial glutathione synthesis (24, 45), GLAST activation by IL-1 may be an effective strategy by which to manage these pathological conditions. On the other hand, a major part of the available intracellular glutamate is used for glutamine synthesis catalyzed by glutamine synthetase. In the retina, this enzyme is exclusively located in

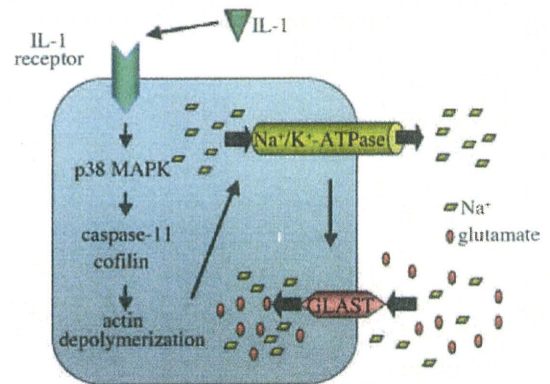


FIG. 8. Proposed model for IL-1-induced glutamate uptake in Müller cells. Activation of IL-1/p38 MAPK signaling increases caspase 11 and subsequently induces cofilin activation, in turn disrupting the F-actin network. This actin depolymerization stimulates membrane trafficking of Na^+/K^+ -ATPase, suppresses Na^+ accumulation in Müller cells, and enhances glutamate uptake.

Müller cells, which in turn have rapid glutamate turnover (41). Taken together, overexpression of glutamine synthetase/GLAST, in combination with IL-1 stimulation, may have synergistic effects on retinal neuroprotection. Future studies will thus examine the therapeutic effect of IL-1 in various animal models of retinal degeneration, including normal tension glaucoma (20).

In conclusion, this study demonstrated that IL-1, a mediator of brain injury, might also protect retinal neurons via stimulating the major glutamate transporter in Müller glial cells. We suggest that such a glia-neuron network is functional in various forms of neurodegenerative diseases (19, 21). Furthermore, recent studies showed that Müller cells could proliferate after neurotoxic damage and produce some neural cell types in the adult mammalian retina (22, 38). Therefore, Müller cells may be a new therapeutic target for both neuroprotection and regeneration in retinal degenerative diseases (5, 17).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank X. Guo and K. Nakamura for technical assistance and valuable discussion.

This study was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (K.N., C.H., and T.H.); the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists (C.H.); and the Novartis Foundation, the Terumo Life Science Foundation, the Kowa Life Science Foundation, the Suzuken Memorial Foundation, the Takeda Science Foundation, the Naito Foundation, the Uehara Memorial Foundation, and the Japan Medical Association (T.H.).

REFERENCES

- Allan, S. M., and N. J. Rothwell. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:734–744.
- Ames, A., III, Y. Y. Li, E. C. Heher, and C. R. Kimble. 1992. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na^+ transport. *J. Neurosci.* 12:840–853.
- Bamburg, J. R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:185–230.
- Boutin, H., R. A. LeFeuvre, R. Horai, M. Asano, Y. Iwakura, and N. J. Rothwell. 2001. Role of IL-1 α and IL-1 β in ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 21:5528–5534.
- Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne, and A. Reichenbach. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 25:397–424.
- Brown, J. M., C. W. White, L. S. Terada, M. A. Grosso, P. F. Shanley, D. W.

- Mulvin, A. Banerjee, G. J. Whitman, A. H. Harken, and J. E. Repine. 1990. Interleukin 1 pretreatment decreases ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5026–5030.
7. Carini, R., M. Grazia De Cesaris, R. Splendore, and E. Albano. 2001. Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na⁺ overload in pre-conditioned hepatocytes. *FEBS Lett.* 491:180–183.
 8. Carlson, N. G., W. A. Wiegand, J. Chen, A. Bacchi, S. W. Rogers, and L. C. Gahring. 1999. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J. Immunol.* 163:3963–3968.
 9. Danbolt, N. C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1–105.
 10. Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498.
 11. Erecinska, M., and I. A. Silver. 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43:37–71.
 12. Feranchak, A. P., T. Berl, J. Capasso, P. A. Wojtaszek, J. Han, and J. G. Fitz. 2001. p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na⁺ permeability. *J. Clin. Investig.* 108:1495–1504.
 13. Gegelashvili, M., A. Rodriguez-Kern, L. Sung, K. Shimamoto, and G. Gegelashvili. 2007. Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXR2/gamma subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes. *Neurochem. Int.* 50:916–920.
 14. Guay, J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J. N. Lavoie, J. Huot, and J. Landry. 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* 110:357–368.
 15. Hakuba, N., K. Koga, K. Gyo, S. I. Usami, and K. Tanaka. 2000. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J. Neurosci.* 20:8750–8753.
 16. Hansen, A. J. 1984. Ion and membrane changes in the brain during anoxia. *Behav. Brain Res.* 14:93–98.
 17. Harada, C., Y. Mitamura, and T. Harada. 2006. The role of cytokines and trophic factors in epiretinal membranes: involvement of signal transduction in glial cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 25:149–164.
 18. Harada, C., K. Nakamura, K. Namekata, A. Okumura, Y. Mitamura, Y. Iizuka, K. Kashiwagi, K. Yoshida, S. Ohno, A. Matsuzawa, K. Tanaka, H. Ichijo, and T. Harada. 2006. Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress-induced neural cell apoptosis in vivo. *Am. J. Pathol.* 168:261–269.
 19. Harada, T., C. Harada, S. Kohsaka, E. Wada, K. Yoshida, S. Ohno, H. Mamada, K. Tanaka, L. F. Parada, and K. Wada. 2002. Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* 22:9228–9236.
 20. Harada, T., C. Harada, K. Nakamura, H. M. Quah, A. Okumura, K. Namekata, T. Sacki, M. Aihara, H. Yoshida, A. Mitani, and K. Tanaka. 2007. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Investig.* 117:1763–1770.
 21. Harada, T., C. Harada, N. Nakayama, S. Okuyama, K. Yoshida, S. Kohsaka, H. Matsuda, and K. Wada. 2000. Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 26:533–541.
 22. Harada, T., C. Harada, and L. F. Parada. 2007. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev.* 21:367–378.
 23. Harada, T., C. Harada, M. Watanabe, Y. Inoue, T. Sakagawa, N. Nakayama, S. Sasaki, S. Okuyama, K. Watake, K. Wada, and K. Tanaka. 1998. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4663–4666.
 24. Huster, D., A. Reichenbach, and W. Reichelt. 2000. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: effect of pathological conditions. *Neurochem. Int.* 36:461–469.
 25. Inoue, T., M. Hojo, Y. Bessho, Y. Tano, J. E. Lee, and R. Kageyama. 2002. Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129:831–842.
 26. Jefferies, C., A. Bowie, G. Brady, E. L. Cooke, X. Li, and L. A. O'Neill. 2001. Transactivation by the p65 subunit of NF- κ B in response to interleukin-1 (IL-1) involves MyD88, IL-1 receptor-associated kinase 1, TRAF-6, and Rac1. *Mol. Cell. Biol.* 21:4544–4552.
 27. Jefferies, C. A., and L. A. O'Neill. 2000. Rac1 regulates interleukin 1-induced nuclear factor κ B activation in an inhibitory protein κ B α -independent manner by enhancing the ability of the p65 subunit to transactivate gene expression. *J. Biol. Chem.* 275:3114–3120.
 28. Jung, J., T. Yoon, E. C. Choi, and K. Lee. 2002. Interaction of cofilin with triose-phosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na,K-ATPase via Rho-mediated signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277:48931–48937.
 29. Kaksonen, M., Y. Sun, and D. G. Drubin. 2003. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* 115:475–487.
 30. Kido, N., M. Inatani, M. Honjo, S. Yoneda, H. Hara, N. Miyawaki, Y. Honda, and H. Tanihara. 2001. Dual effects of interleukin-1beta on N-methyl-D-aspartate-induced retinal neuronal death in rat eyes. *Brain Res.* 910:153–162.
 31. Kim, M., J. Jung, C. S. Park, and K. Lee. 2002. Identification of the cofilin-binding sites in the large cytoplasmic domain of Na,K-ATPase. *Biochimie* 84:1021–1029.
 32. Lee, K., J. Jung, M. Kim, and G. Guidotti. 2001. Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin. *Biochem. J.* 353:377–385.
 33. Li, J., W. M. Brieher, M. L. Scimone, S. J. Kang, H. Zhu, H. Yin, U. H. von Andrian, T. Mitchison, and J. Yuan. 2007. Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nat. Cell Biol.* 9:276–286.
 34. Longuemare, M. C., C. R. Rose, K. Farrell, B. R. Ransom, S. G. Waxman, and R. A. Swanson. 1999. K⁺-induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na⁺. *Neuroscience* 93:285–292.
 35. Matsugami, T. R., K. Tanemura, M. Mieda, R. Nakatomi, K. Yamada, T. Kondo, M. Ogawa, K. Obata, M. Watanabe, T. Hashikawa, and K. Tanaka. 2006. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12161–12166.
 36. Meier, S. D., Y. Kovalchuk, and C. R. Rose. 2006. Properties of the new fluorescent Na⁺ indicator CoroNa Green: comparison with SBFI and confocal Na⁺ imaging. *J. Neurosci. Methods* 155:251–259.
 37. Nebreda, A. R., and A. Porras. 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* 25:257–260.
 38. Ooto, S., T. Akagi, R. Kageyama, J. Akita, M. Mandai, Y. Honda, and M. Takahashi. 2004. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:13654–13659.
 39. Perrais, D., and C. J. Merrifield. 2005. Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev. Cell* 9:581–592.
 40. Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis. 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270:7420–7426.
 41. Reichelt, W., J. Stabel-Burow, T. Pannicke, H. Weichert, and U. Heinemann. 1997. The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience* 77:1213–1224.
 42. Rodal, A. A., L. Kozubowski, B. L. Goode, D. G. Drubin, and J. H. Hartwig. 2005. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. *Mol. Biol. Cell* 16:372–384.
 43. Rothwell, N. J., and G. N. Luheshi. 2000. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23:618–625.
 44. Roux, J., H. Kawakatsu, B. Gartland, M. Pespenti, D. Sheppard, M. A. Matthey, C. M. Canessa, and J. F. Pittet. 2005. Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 280:18579–18589.
 45. Schulz, J. B., J. Lindenau, J. Seyfried, and J. Dichgans. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267:4904–4911.
 46. Singh, R., B. Wang, A. Shirvaikar, S. Khan, S. Kamat, J. R. Schelling, M. Konieczkowski, and J. R. Sedor. 1999. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J. Clin. Investig.* 103:1561–1570.
 47. Strijbos, P. J., and N. J. Rothwell. 1995. Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *J. Neurosci.* 15:3468–3474.
 48. Szatkowski, M., B. Barbour, and D. Attwell. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348:443–446.
 49. Tanaka, K., K. Watake, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, and K. Wada. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699–1702.
 50. Uciechowski, P., J. Saklatvala, J. von der Ohe, K. Resch, M. Szamel, and M. Kracht. 1996. Interleukin 1 activates jun N-terminal kinases JNK1 and JNK2 but not extracellular regulated MAP kinase (ERK) in human glomerular mesangial cells. *FEBS Lett.* 394:273–278.
 51. Wang, S., M. Miura, Y. K. Jung, H. Zhu, E. Li, and J. Yuan. 1998. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92:501–509.
 52. Watanabe, T., K. Morimoto, T. Hirao, H. Suwaki, K. Watake, and K. Tanaka. 1999. Amygdala-kindled and pentylenetetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice. *Brain Res.* 845:92–96.
 53. Watake, K., K. Hashimoto, M. Kano, K. Yamada, M. Watanabe, Y. Inoue, S. Okuyama, T. Sakagawa, S. Ogawa, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, K. Wada, and K. Tanaka. 1998. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10:976–988.
 54. Yarrar, D., C. M. Waterman-Storer, and S. L. Schmid. 2005. A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 16:964–975.

グルタミン酸トランスポーターの 中枢神経系における役割

相田知海 田中光一

Clinical Neuroscience 別冊

Vol. 26 No. 10 2008 年 10 月 1 日発行

中 外 医 学 社

グルタミン酸トランスポーターの中枢神経系における役割

相田 知海 田中 光一

はじめに

グルタミン酸は哺乳類の中枢神経系において記憶・学習などの高次機能を調節する主要な興奮性神経伝達物質として知られている¹⁾。一方で、細胞外グルタミン酸の上昇は、グルタミン酸受容体の過剰な活性化によりグルタミン酸興奮毒性と呼ばれる神経細胞障害作用を持ち、多くの急性・慢性の神経変性疾患に関与している。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、神経伝達役を終えた後、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)。アストロサイトに取り込まれたグルタミン酸はグルタミン合成酵素によ

りグルタミンに変換されたのち、アストロサイトから放出され、神経細胞に取り込まれる。このグルタミンは、神経細胞内でグルタミン酸へ再び変換され、シナプス小胞に蓄えられ、神経伝達に用いられる。このグルタミン酸-グルタミンサイクルは、神経伝達物質のホメオスタシス維持のみならず、同時にアストロサイト中のグルコース解糖系とカップリングしており、乳酸の産生・神経細胞への供給を介して、神経細胞でのATP合成を促進し、神経活動亢進に伴うエネルギー消費増大を支えている。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。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)。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、

あいだ ともみ 東京医科歯科大学大学院/疾患生命科学部
分子神経科学
たなか こういち 同 教授

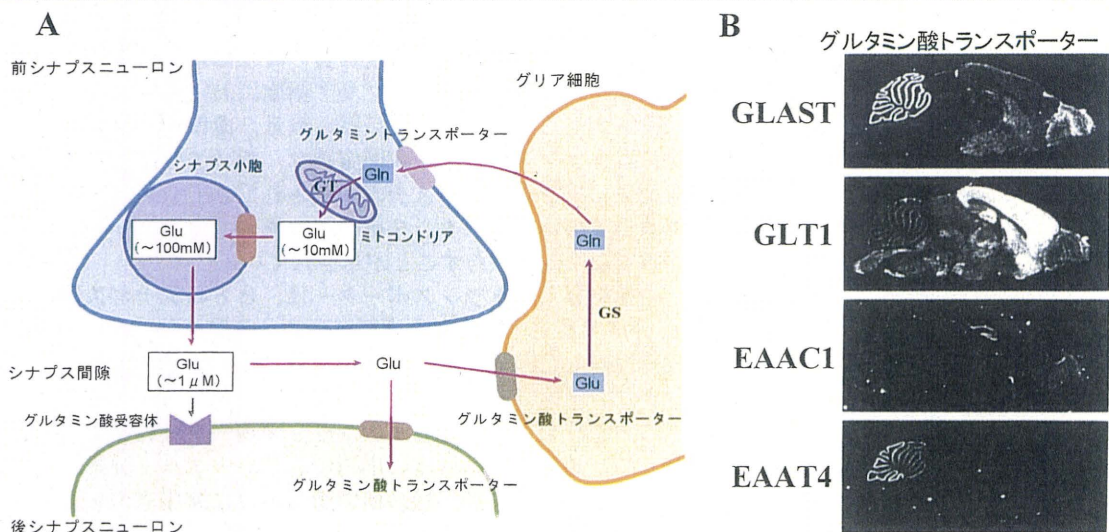


図1 シナプスのグルタミン酸動態(A)とグルタミン酸トランスポーター mRNA の脳内局在(B)
Glu: グルタミン酸, Gln: グルタミン, GS: グルタミン合成酵素, GT: グルタミンナーゼ, Bはマウス脳の矢状断

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。本稿では、グルタミン酸トランスポーターによる神経伝達制御、遺伝子欠損マウスが示す表現型、最近の大規模ゲノム解析から明らかになったグルタミン酸トランスポーターの精神疾患への関与を併せて概説する。

シナプス伝達調節における グルタミン酸トランスポーターの機能

シナプス間隙における神経伝達物質のクリアランスは、シナプス伝達の時間経過を決定する大きな要因であり、特にグルタミン酸トランスポーターの活性により規定される。その機能破綻は、神経終末直下のグルタミン酸受容体神経伝達に影響するのみならず、漏れ出したグルタミン酸が近傍のシナプスに存在する受容体にも作用し、シナプス伝達の独立性を損なう。

海馬 CA1 網状分子層の oriens-lacunosum moleculare (O-LM) interneuron に多く存在する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 は、グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT1 および GLAST により、活性が制御されている。GLT1 と GLAST を抑制すると、mGluR1 依存性興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSC) の振幅が増加し、interneuron の発火が増強され、結果として CA1 錐体細胞の抑制が増強された²⁾。また、GLT1 欠損マウスでは、海馬 CA1 領域の NMDA 受容体成分が増強され、長期増強の発現が障害されていた³⁾。このように、グリア型グルタミン酸トランスポーターは、代謝型グルタミン酸受容体や NMDA 受容体の活性化を制御することにより、神経回路網全体の活動に大きな影響をもたらすと考えられる。

小脳では Purkinje 細胞にグルタミン酸トランスポーター EAAC1, EAAT4 が、Purkinje 細胞を取り囲む Bergmann glia には GLAST, GLT1 が発現している。欠損マウスの解析から、平行線維・Purkinje 細胞間シナプス、登上線維・Purkinje 細胞間シナプスにおいて、グルタミン酸が放出された直後の高濃度のグルタミン酸の除去は GLAST により、放出されてしばらく時間が経過した後の低濃度のグルタミン酸の除去は EAAT4 により行われていることがわかった⁴⁾。さらに EAAC1 と EAAT4 の選

択的機能阻害により隣接するシナプスへのグルタミン酸 spillover が起こり、mGluR1 依存性 EPSC が増強、長期抑圧が促進される⁵⁾。

これらの結果は、グルタミン酸トランスポーターの活性変化により、神経伝達の変化やシナプス間の crosstalk が起こり得ることを示している。

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⁶⁾

GLT1 は前脳・海馬で特に強い発現を示し、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、Huntington 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。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。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。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 (GLT1 欠損マウスで細胞外グルタミン酸濃度が大きく上昇)、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 (GLT1 欠損マウスでは細胞外グルタミン酸濃度上昇が少ない)、細胞外グルタミン酸上昇の機構であることが明らかになった⁶⁾。すなわち GLT1 は虚血初期には神経細胞保護的に働くが、虚血後期には逆に神経細胞死を悪化させるように働く。GLT1 欠損マウスは、生後 2~3 週目以降、致死性のてんかん発作により突然死する⁶⁾。GLT1 欠損マウスでは、興奮毒性による脳損傷モデルである低温誘発性障害による脳損傷が悪化しており、海馬 CA1 の錐体細胞や、大脳皮質第 2 層神経細胞の減少、グリオシスが観察され (図 2)^{6,7)}、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明らかになった。家族性 ALS の原因遺伝子である SOD1 の

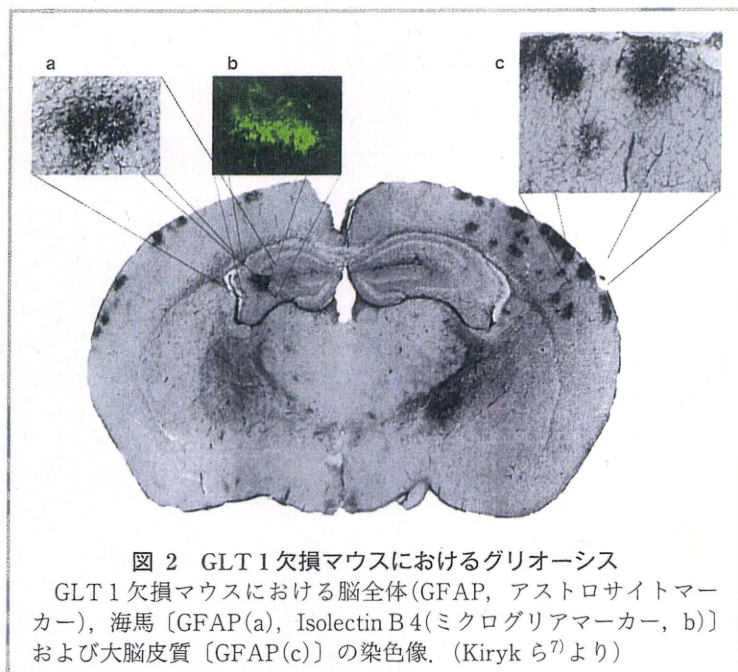


図 2 GLT1 欠損マウスにおけるグリオシス

GLT1 欠損マウスにおける脳全体 (GFAP, アストロサイトマーカー), 海馬 [GFAP (a), Isolectin B 4 (ミクログリアマーカー, b)] および大脳皮質 [GFAP (c)] の染色像. (Kiryk ら⁷⁾より)

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が, GLT1 欠損マウスでは明らかな運動麻痺の兆候は観察されず, その関連は未だ不明である.

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, とくに小脳の 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⁸⁾. 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⁹⁾. GLAST は網膜のグリア細胞である Müller 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)¹⁰⁾. 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剤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, 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.

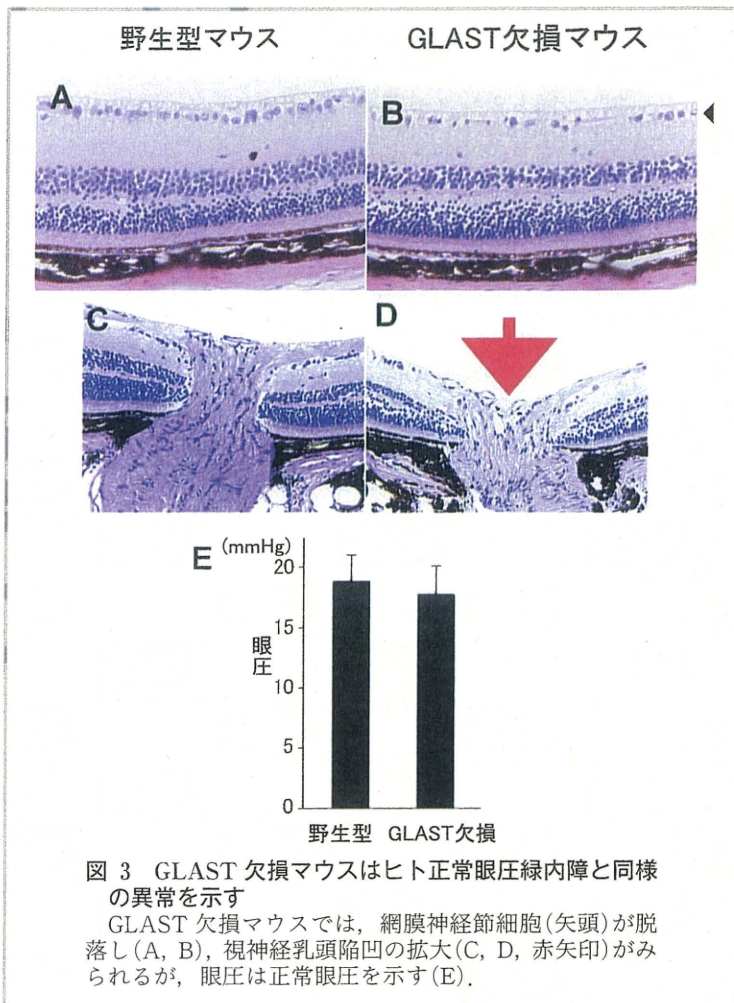


図 3 GLAST 欠損マウスはヒト正常眼圧緑内障と同様の異常を示す

GLAST 欠損マウスでは, 網膜神経節細胞 (矢頭) が脱落し (A, B), 視神経乳頭陥凹の拡大 (C, D, 赤矢印) がみられるが, 眼圧は正常眼圧を示す (E).

3. GLAST/GLT1 二重欠損マウス¹¹⁾

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成した. 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, ある程度回復した. この結果より, 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系の発生に多大な影響を与えることが明らかになった。従って、正常な神経発生には、GLAST と GLT 1 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、網膜神経節細胞等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 GLT 1 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持つ。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¹⁰⁾。青山らは、EAAC1 欠損マウスにおいて、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¹²⁾。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上で重要であると考えられる。

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。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成り得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¹³⁾、脳の形成に極めて重要な役割を持つ¹¹⁾。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¹³⁾。最近、自閉症患者 2 名以上を含む 1181 家系を対象とした、過去最大となるゲノムワイドな連鎖解析が報告された¹³⁾。この大規模解析により 11 番染色体の 11 p 12-13 が自閉症に関連があることが明らかになった。大変興味深いことに、この領域は GLT 1 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 9 p 24 は、EAAC1 の遺伝子座である。さらにコンソーシアムメンバーであるコロニ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 5 p 11, 13-14 等

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 (<http://www.agre.org>)¹³⁾。この領域は GLAST の遺伝子座である。最近、われわれは GLAST(+/-)& GLT 1(+/-) 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 受容体阻害剤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。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 mGluR 2/3 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¹⁴⁾。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。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¹⁵⁾。この患者では GLAST の上流に位置する SKP 2 (細胞周期関係遺伝子) 遺伝子の Exon 3 から、GLAST の Exon 3 までの約 500 Kbp が欠失し、SKP 2 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/GLT 1 二重欠損マウスの脳室拡大¹¹⁾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。従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、一つの仮説を形成しつつある¹⁶⁾。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持つことによる¹⁶⁾。また、うつ病患者の脳ではGLAST, GLT1が減少している¹⁷⁾。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、mGluR 2/3のアンタゴニストは動物モデルで改善作用を示す¹⁸⁾。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¹⁹⁾。従って、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。

むすび

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、神経伝達制御機構の破綻に加えて、様々な精神疾患の病態に関与することが明らかになりつつある。従って、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。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²⁰⁾。

文 献

- 1) Tanaka K. Role of glutamate transporters in astrocytes. *Brain Nerve*. 2007; 59: 677-88.
- 2) Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, et al. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 2004; 24: 4551-9.
- 3) Katagiri H, Tanaka K, Manabe T. Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction. *Eur J Neurosci*. 2001; 14: 547-53.
- 4) Takayasu Y, Iino M, Kakegawa W, et al. Differential roles of glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *J Neurosci*. 2005; 25: 8788-93.
- 5) Brasnjo G, Otis TS. Neuronal glutamate transporters control activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors and influence cerebellar long-term depression. *Neuron*. 2001; 31: 607-16.
- 6) Tanaka K, Watase K, Manabe T, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 1997; 276: 1699-702.
- 7) Kiryk A, Aida T, Tanaka K, et al. Behavioral characterization of GLT 1 (+/-) mice as a model of mild glutamatergic hyperfunction. *Neurotox Res*. 2008; 13: 19-30.
- 8) Watase K, Hashimoto K, Kano M, et al. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci*. 1998; 10: 976-88.
- 9) Hakuba N, Koga K, Gyo K, et al. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci*. 2000; 20: 8750-3.
- 10) Harada T, Harada C, Nakamura K, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1763-70.
- 11) Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, et al. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT 1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 12161-6.
- 12) Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, et al. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci*. 2006; 9: 119-26.
- 13) Autism Genome Project Consortium, Szatmari P, Paterson AD, et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*. 2007; 39: 319-28.
- 14) Patil ST, Zhang L, Martenyi F, et al. Activation of mGluR 2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med*. 2007; 13: 1102-7.
- 15) Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008; 320: 539-43.
- 16) Paul IA, Skolnick P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 1003: 250-72.
- 17) Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 15653-8.
- 18) Shimazaki T, Iijima M, Chaki S. Anxiolytic-like activity of MGS 0039, a potent group II metabotropic glutamate receptor antagonist, in a marble-burying behavior test. *Eur J Pharmacol*. 2004; 501: 121-5.
- 19) Liang KY, Wang Y, Shugart YY, et al. Evidence for potential relationship between SLC1A1 and a putative genetic linkage region on chromosome 14q to obsessive-compulsive disorder with compulsive hoarding. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008; PMID: 18286588.
- 20) Tanaka K. Antibiotics rescue neurons from glutamate attack. *Trends Mol Med*. 2005; 11: 259-62.

連載 今月の話題

正常眼圧緑内障モデル動物の確立と治療研究への展開

原田 高幸 原田知加子

臨 床 眼 科

第62巻 第5号 別刷

2008年5月15日 発行

医学書院

正常眼圧緑内障モデル動物の確立と治療研究への展開

原田 高幸* 原田知加子

正常眼圧緑内障の原因については諸説あるが、発症メカニズムの解明はまだ十分に
は進んでいない。本稿では、筆者らが最近見いだした世界初の正常眼圧緑内障モデル
動物（グルタミン酸輸送体欠損マウス）を紹介するとともに、これまでの緑内障研究
の問題点や、同モデルを用いた今後の治療研究の展望を概説してみたい。

緑内障研究の現状

緑内障はわが国における最大の失明原因であり、日本緑内障学会による最近の疫学調査（多治見スタディ）では、40歳以上の日本人における緑内障の有病率が5%にもものぼることが判明した¹⁾。また、正常眼圧緑内障が緑内障全体の約7割を占めることが明らかになり、眼圧に依存しない網膜神経節細胞および視神経変性メカニズムの解明や、神経保護療法に関する期待が高まりつつある。しかし、これまでの緑内障の基礎研究は人為的に作製した高眼圧眼（線維柱帯の光凝固による房水流出の抑制、前房内への点滴注入による圧負荷など）や遺伝的に高眼圧を呈する動物種（DBA/2Jマウスなど）を対象としており²⁾、疾患モデルの作製が困難な正常眼圧緑内障の研究にはあまり目が向けられてこなかった部分がある。

一方さまざまな臨床研究の結果から、緑内障は遺伝的要素と環境的因子の双方が関与する多因子疾患と考えられ、高眼圧、血管因子（虚血）、加齢、酸化ストレス、視神経の脆弱性などが広く検討されている。例えば視神経の脆弱性に人種差があれば、日本人で正常眼圧緑内障の比率が高い原

因を説明できる可能性がある。実際、多治見スタディによると日本人の平均眼圧は14.5~14.6±2.7 mmHgで、外国を中心としたこれまでの多くの調査結果（12.5~18.7 mmHg）よりはやや低値となっている¹⁾。そこで、視神経や網膜神経節細胞の耐性に関連する感受性遺伝子が判明すれば、正常眼圧緑内障の発症予測が可能になるかもしれない。

これまでに開放隅角緑内障の原因遺伝子として myocilin, optineurin, WDR36, CYP11B1, noelin 2 などが同定されている。また、正常な myocilin を過剰発現させたマウスでは眼圧上昇がみられないが³⁾、変異 myocilin を過剰発現させたマウスではわずかな眼圧上昇と生後1年で20%程度の網膜神経節細胞数の減少が起きることがわかっている⁴⁾。しかし optineurin については当初正常眼圧緑内障との関与が注目されたものの⁵⁾、日本人の開放隅角緑内障患者の0.25%にしかこの遺伝子異常が認められないなど⁶⁾、他のいずれの遺伝子も家族性緑内障などに関係する非常に稀な緑内障遺伝子であることが判明しつつある。したがって、より普遍性の高い正常眼圧緑内障発症機構の解明と疾患モデルの確立が待たれる状況にある。

Establishment of disease model of normal tension glaucoma and its potential use for clinical research

* Takayuki Harada, Chikako Harada 財団法人東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門

別刷請求先：原田高幸（はらだ・たかゆき）〒183-8526 府中市武蔵台 2-6 財団法人東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門

緑内障とグルタミン酸毒性

グルタミン酸は中枢神経系において約 80% の神経細胞が用いる興奮性神経伝達物質であり、学習・記憶などの高次機能に加えて、視覚もグルタミン酸作動性シナプスによって支えられている。しかし過剰濃度のグルタミン酸は、まさに興奮毒性と表現される神経毒性をもち、さまざまな神経変性疾患における神経細胞死の原因と考えられている。そして緑内障においても、このグルタミン酸毒性が眼圧以外の発症因子として関与する可能性が指摘されている。これは前出の血管因子（虚血）を支持する立場からはごく自然なものであり、虚血後に起きる神経細胞死の原因が過剰濃度のグルタミン酸による興奮毒性であることは、すでに知られているとおりである⁷⁾。

こうした予想に應える形で、Dreyer ら⁸⁾は緑内障患者では硝子体中のグルタミン酸濃度が有意に上昇していると発表した。この論文は当初非常に大きな発見と考えられ、米国で高額な研究費を獲得するに至ったが、結果的に捏造によるものと判明したことで⁹⁾、グルタミン酸仮説は消滅したかに思われた。

しかし緑内障の発症年齢を考慮すれば、軽微かつ慢性的なグルタミン酸濃度の上昇が緑内障を引き起こす可能性は否定できない。逆に硝子体中のグルタミン酸濃度が上昇するほどであれば、網膜内のグルタミン酸濃度はその何倍も高く、緑内障の進行はもっと急激になるのではないだろうか。したがって正常眼圧緑内障の原因を考えると、グルタミン酸毒性の検証は今後ますます重要になると思われる。

最近米国ではグルタミン酸受容体の 1 つである NMDA 受容体の阻害薬 memantine が Alzheimer 病の治療薬として認可され¹⁰⁾、現在緑内障患者に対する臨床試験が行われている。Alzheimer 病患者では開放隅角緑内障の有病率が高いことも報告されており¹¹⁾、この臨床試験の結果によっては、緑内障におけるグルタミン酸毒性の関与が広く認知されることになるかもしれない。

網膜のグルタミン酸輸送体と遺伝子改変動物を用いた研究の経過

視覚伝達物質としてのグルタミン酸の重要性はすでに知られているとおりであるが、網膜のグルタミン酸作動性シナプスには海馬などのそれとは異なる点がある。グルタミン酸シナプスは大きく conventional synapse と ribbon synapse に大別される。前者は海馬や小脳におけるシナプスで、活動電位に応じてシナプス前細胞がグルタミン酸を放出する。しかし、網膜における ribbon synapse では、シナプス前細胞が膜電位を連続的に変化させることでグルタミン酸放出量を調節していることから、シナプス間隙のグルタミン酸濃度調節（グルタミン酸除去）がより迅速に行われる必要がある。シナプス間隙のグルタミン酸濃度は拡散とグルタミン酸輸送体による取り込みによって制御される。つまりグルタミン酸輸送体以外にグルタミン酸濃度を能動的にコントロール可能なシステムはなく、これがいかに重要な機能をもつものであるかは容易に想像される。

グルタミン酸輸送体は細胞膜、ミトコンドリア、シナプス小胞に存在するが、本稿では網膜神経細胞または Müller 細胞（グリア）の細胞膜上に存在する輸送体について解説する。このグルタミン酸輸送体は現在までに 5 種類が同定されており、網膜では GLAST (EAAT1), GLT1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT5 の 4 種類が存在する（表 1）。このうち特に重要なのが唯一グリアに存在する GLAST であり、Müller 細胞に取り込まれたグルタミン酸は、グルタミン合成酵素によりグルタミンに変換されたのちに神経終末に運ばれ、グルタミン-グルタミン酸サイクルを経て、再びシナプス小胞に蓄積されて再利用される（図 1）。したがってグルタミン合成酵素が存在する Müller 細胞は、細胞内グルタミン酸濃度を低く抑えることで神経細胞より多くのグルタミン酸を吸収し、また神経細胞におけるグルタミン酸合成にも貢献していることになる。

以上の点を考慮すると、特に網膜においては GLAST がグルタミン酸興奮毒性に対する強い神経保護効果をもつと予想される。しかし、グルタミン酸輸送体に対するサブタイプ特異的な阻害剤

表 1 網膜におけるグルタミン酸トランスポーターの分布

	GLAST (EAAT1)	GLT1 (EAAT2)	EAAC1 (EAAT3)	EAAT4	EAAT5
神経節細胞層			○		
内顆粒層					
神経細胞					
アマクリン細胞					
双極細胞		○	○		○
水平細胞					
Müller 細胞	○				
外顆粒層 (視細胞)		○			○

がないことなどから、詳しい解析は長らく不可能となっていた。また眼研究の分野でも、網膜内分布や発生過程における発現検討などが報告されるのみで、実際の機能は不明のままであった。

そこで筆者らは、あらかじめ作製した GLAST および GLT1 の遺伝子欠損マウスを用いて、一過性高眼圧負荷による網膜虚血障害の影響を検討した¹²⁾。その結果、GLAST 欠損マウスでは正常マウスと比較して著しい網膜神経細胞死の増悪が観察された。GLT1 欠損マウスも正常マウスと比較すれば、虚血による強い神経変性が起きていた。これらのマウスでは、虚血負荷後に上昇した細胞外グルタミン酸を十分に除去できなかったものと想定される。また GLT1 は主に網膜内層のニューロンに発現するが、やはり上述の理由により、Müller 細胞に発現する GLAST のほうが機能的に重要なことがこの結果からも示唆された。

以上の研究はいまから約 10 年前の筆者の学位論文の仕事であるが、その後これらの遺伝子改変マウスと C57BL/6 マウスとの交配を 10 代程度まで進めたところ、遺伝子背景の変化によるものか、最近になって新たな表現型が現れてきた。

正常眼圧緑内障におけるグルタミン酸輸送体の役割

例えば GLT1 欠損 (GLT1^{-/-}) マウスでは以前からてんかん発作が確認されており、生後 12 週齢までに約 80% が死亡することがわかっていたが、現在は胎生致死となり、個体レベルの解析は GLT1^{+/-} マウスでしか行えなくなっている。ただし GLT1^{+/-} マウスの網膜を生後 8 か月齢まで観察しても、形態的な異常は観察されていない。

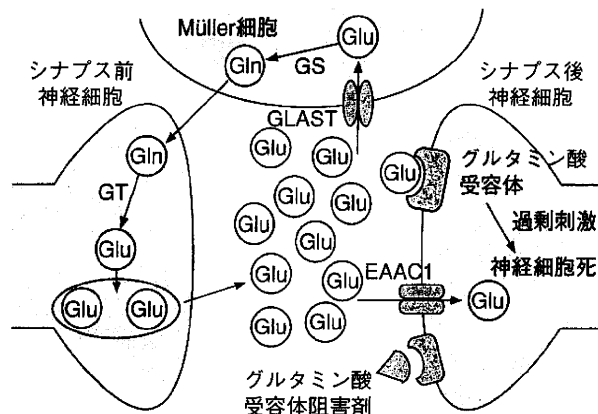


図 1 シナプスにおけるグルタミン酸の動態とグルタミン酸輸送体

シナプス前細胞の神経終末から遊離されるグルタミン酸は、シナプス後細胞に発現するグルタミン酸受容体に作用するが、過剰濃度では興奮毒性を引き起こし、神経細胞死に至る。シナプス近傍の Müller 細胞にはグリア型グルタミン酸トランスポーター GLAST が発現し、主要なグルタミン酸除去分子として働いている。Glu: グルタミン酸, GS: グルタミン合成酵素, Gln: グルタミン, GT: グルタミンナーゼ。

しかし同月齢の GLAST 欠損 (GLAST^{-/-}) マウスの網膜を改めて調べてみたところ、網膜神経節細胞の減少 (図 2) に加えて、視神経乳頭の陥凹と視神経線維の減少がみられることを発見した (図 3)。同様の変化は GLAST^{+/-} マウスに加えて EAAC1^{-/-} および EAAC1^{+/-} マウスでも観察されたが、発症のタイミングは GLAST^{-/-} マウスが最も早く、生後 3 週齢には網膜神経節細胞の減少がみられた。視機能評価の目的で、緑内障患者では異常が現れやすいとされる多局所網膜電位の二次核成分を測定したところ¹³⁾、特に GLAST^{-/-} マウスにおいて網膜神経節細胞のダメージとほぼパラレルな電位の減弱が認められた。このような緑内

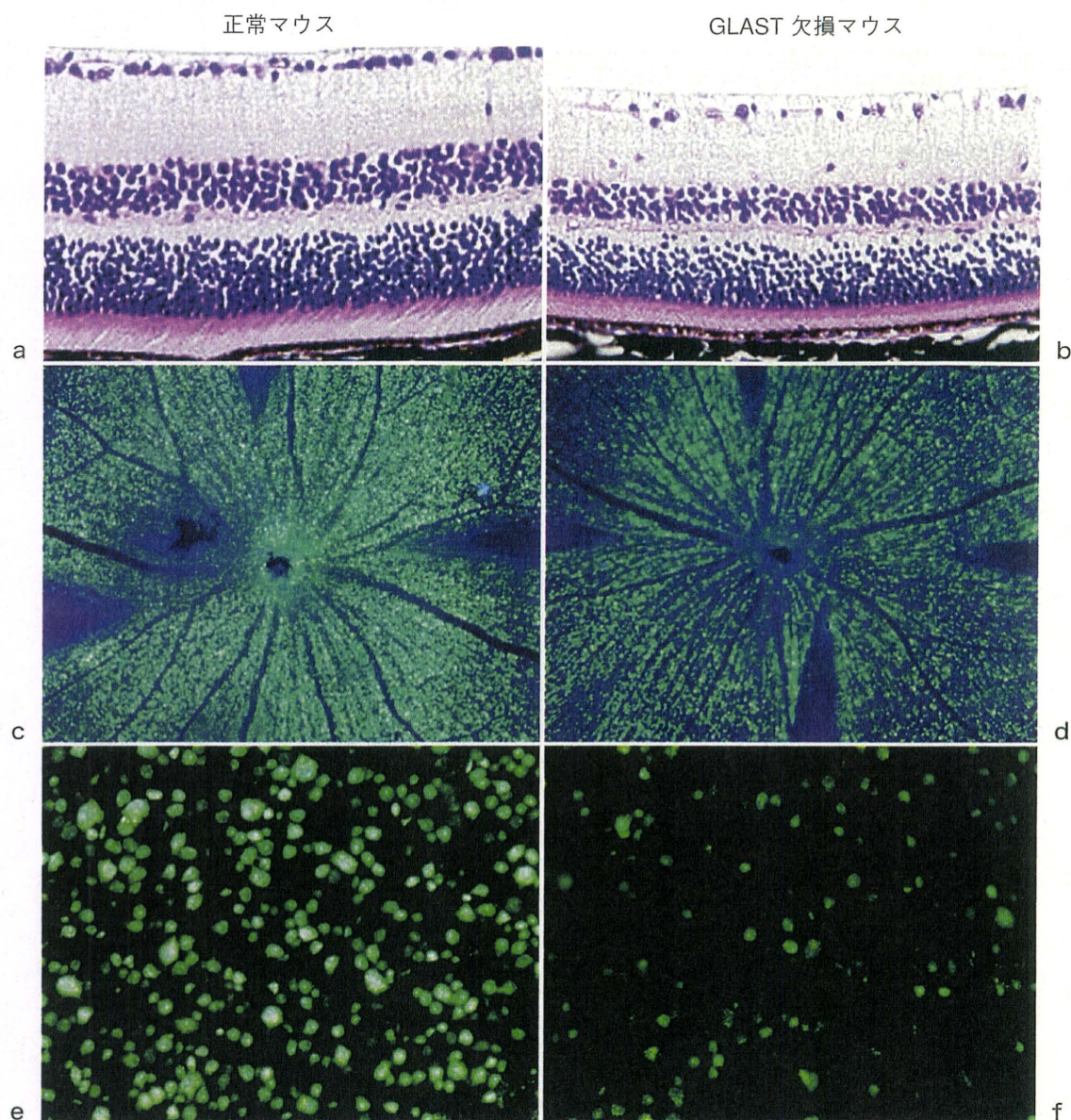


図 2 GLAST 欠損マウスで観察された網膜神経節細胞数の減少
a, b: 生後 8 か月齢の GLAST 欠損マウスでは、網膜神経節細胞層における細胞数の減少と網膜内層の菲薄化が観察された。c, d: 逆行性ラベリングにより網膜神経節細胞数の減少が確認された。e, f: c, d それぞれの拡大図。

障様の表現型を示しながらいずれのマウスも開放隅角であり、かつ眼圧は正常範囲内であった。したがって、これらのマウスは正常眼圧緑内障様の症状を示す疾患モデルと考えられる¹⁴⁾。

次に発症原因の探索を行った。まず前述した硝子体中のグルタミン酸濃度を測定したが、どのマウスでも濃度上昇は確認されなかった。しかし、これらのマウスに NMDA 受容体阻害剤である memantine を連続的に投与すると一部の網膜神経節細胞が保護されたことから、やはり網膜局所におけるグルタミン酸毒性が正常眼圧緑内障の発症

に關与する可能性が残された。続いて眼圧、グルタミン酸毒性以外の緑内障の発症原因として注目される酸化ストレスの影響を検討した¹⁵⁾。酸化ストレスの指標とされる脂質ヒドロペルオキシドの網膜内濃度を測定したところ、GLAST および EAAC1 欠損マウスの両者で上昇がみられた。さらに網膜における主要な抗酸化成分であるグルタチオンの網膜内濃度を測定したところ、GLAST 欠損マウスでのみ低下が認められた。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンから合成され、網膜では特に Müller 細胞で

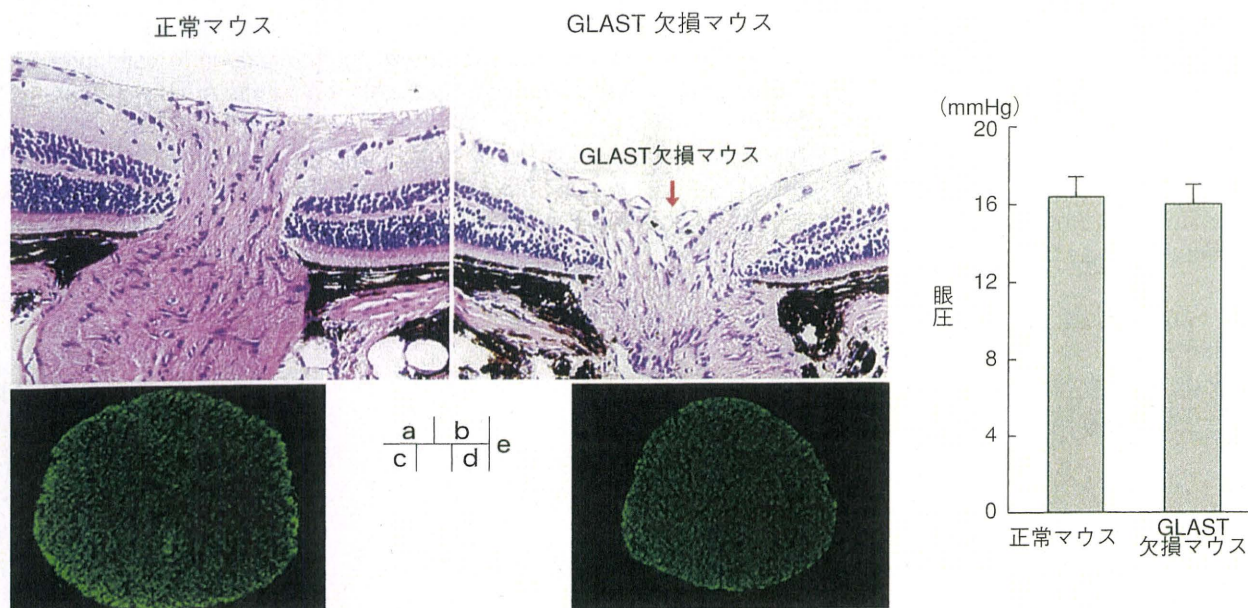


図 3 GLAST 欠損マウスで観察された視神経変性と正常眼圧

a, b: 生後 8 か月齢の GLAST 欠損マウスでは、視神経乳頭陥凹が観察された (矢印)。
c, d: 視神経断面積 (視神経線維) の減少が確認された。e: GLAST 欠損マウスは正常眼圧を示す。

の発現が高いことが報告されている。そこで野生型マウスおよび GLAST 欠損マウス網膜から作製した培養 Müller 細胞におけるグルタチオン濃度を測定したところ、後者では大幅な濃度低下が確認された。また GLAST 欠損マウス由来の Müller 細胞と野生型網膜神経節細胞の混合培養細胞に過酸化水素を負荷した場合には、ともに野生型由来の場合と比較して著しい網膜神経節細胞死の増加が観察された。したがって、GLAST 欠損マウスの Müller 細胞ではグルタミン酸の取り込みが低下するだけでなく、それが抗酸化物質の産生減少にもつながっていることが想定される (図 4)。

以上の結果から、筆者らの正常眼圧緑内障の疾患モデルにおいては、眼圧非依存性の網膜・視神経変性の原因として、グルタミン酸毒性に加えて酸化ストレスの複合的な関与が示唆されたといえる。

今後の緑内障研究への展望

これまでにサル、ラットなどを用いた緑内障モデルが実験に用いられてきたが、遺伝子改変技術を利用できるマウスを用いることにより、何とかここ数年で開放隅角緑内障モデルが確立されつつある。マウスには篩状板が存在せず、視神経乳頭

の構造や血管走行などもヒトと異なるなどの問題点が指摘されているが、正常眼圧緑内障の治療研究に第一歩を踏み出せるとすれば、今回のモデル動物の確立は有用であろう。実際にヒト緑内障患者では網膜におけるグルタミン酸輸送体の発現量が低下するほか¹⁶⁾、血中グルタチオン濃度が減少することが報告されており¹⁷⁾、筆者らの疾患モデルはこうした病態を的確に再現している。一般的な緑内障の発症時期を考慮すれば、老化などによるグルタミン酸輸送体の機能低下が緑内障に関与する可能性は十分に考えられる。

ただし筆者らのモデルでも、臨床的にみられる緑内障性視神経乳頭変化および網膜神経線維層欠損などの部位特異性を説明しきれないという問題点が残されている。また細かい点でいえば、変性開始時期がヒトよりも早い印象がある。ただし筆者らのモデルでは、いったん網膜の形成がきちんに行われることは間違いない。

さらに網膜神経節細胞障害が他のモデルよりかなりはつきりしていることから、比較的短期間に、かつ確実な薬効評価が可能とも考えられる。これまでの緑内障治療薬は眼圧降下薬が主流であったが、現在は多くの研究者や企業が神経保護薬の開発に力を注いでいる。今回は 1 例として

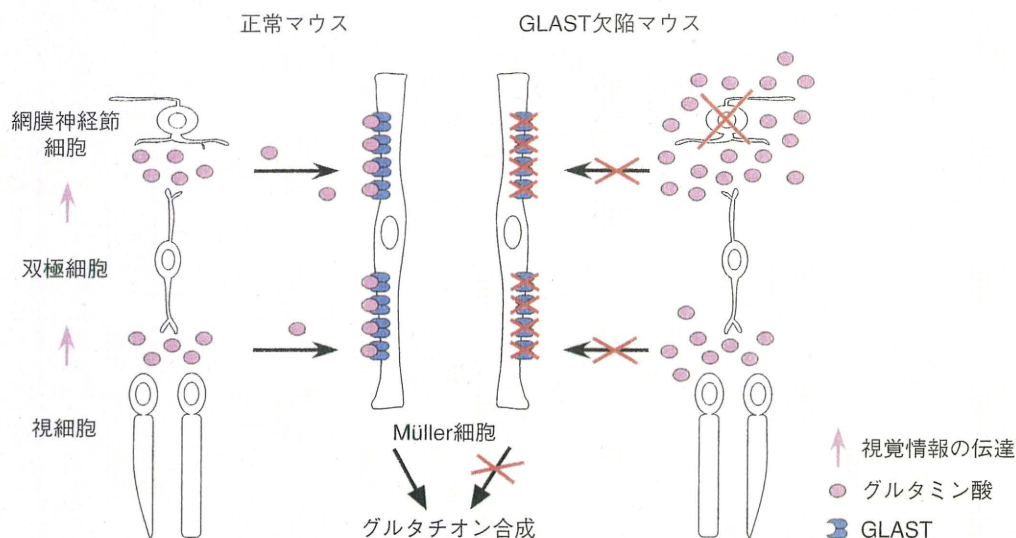


図 4 予想される GLAST 欠損マウスにおける正常眼圧緑内障の発症メカニズム
GLAST 欠損マウスでは細胞外グルタミン酸濃度の慢性的な上昇により、網膜神経節細胞死と視神経変性が発症すると推定される。また、グルタミン酸取り込み量の減少はグルタチオンの産生減少にもつながる可能性がある。

memantine を取り上げたが、筆者らの疾患モデルは、将来開発されるであろうこうした新薬のスクリーニングにも有用な可能性がある。さらにグルタミン酸輸送体の機能を賦活化できるような薬剤を見いだすことができれば、正常眼圧か高眼圧かを問わず多くの緑内障患者が利用するような新薬となり得るかもしれない。

筆者らは疾患モデルを用いた細胞保護および神経再生研究を継続する一方で、今後は緑内障患者におけるグルタミン酸輸送体の遺伝子変異を検索していきたいと考えている。われわれ眼科臨床医が自らこうした研究に参画し、協力し合えば、研究は大いに進展する可能性がある。今後も専門家を含めた本誌読者のアドバイスや、関心をおもちの多くの先生方の研究協力をいただけると幸いです。

稿を終えるにあたり、ご助言いただいた大野重昭北海道大学教授、真島行彦先生、相原一先生、吉田寛先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Iwase A, Suzuki Y, Araie M et al : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese. The Tajimi Study. *Ophthalmology* **111** : 1641-1648, 2004
- 2) Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE et al : Intracocular pressure in genetically distinct mice. An update and strain survey. *BMC Genet* **2** : 12, 2001
- 3) Gould DB, Reedy M, Wilson LA et al : Mutant myocilin nonsecretion in vivo is not sufficient to cause glaucoma. *Mol Cell Biol* **26** : 8427-8436, 2006
- 4) Senatorov V, Malyukova I, Fariss R et al : Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J Neurosci* **26** : 11903-11914, 2006
- 5) Rezaie T, Child A, Hitchings R et al : Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* **295** : 1077-1079, 2002
- 6) Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y et al : Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- α polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 4359-4367, 2004
- 7) 原田高幸・原田知加子・田中光一：網膜視神経疾患の神経保護と再生療法. NEW MOOK 眼科. 第5巻. 最新の神経眼科. 48-56, 金原出版, 東京, 2003
- 8) Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA et al : Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* **114** : 299-305, 1996
- 9) Dalton R : Private investigations. *Nature* **411** : 129-130, 2001
- 10) Lipton SA : Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J Alzheimers Dis* **6** : S61-S74, 2004