

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, Ohta S, Sun X, Xu W, Tao H, Li R.	Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model.	Neurosci Lett.	441(2)	167-172	2008
Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S.	Age-Dependent Neurodegeneration Accompanying Memory Loss in Transgenic Mice Defective in Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 Activity.	J. Neurosci	28(24)	6239-6249	2008
Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K.	Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury.	Biochem Biophys Res Commun	373(1)	30-35	2008
Katsura K-I, Takahashi K, Asoh S, Watanabe M, Sakurazawa M, Ohsawa I, Mori T, Igarashi H, Ohkubo S, Katayama Y, Ohta S.	Combination therapy with transductive anti-death FNK protein and FK506 ameliorates brain damage with focal transient ischemia in rat.	J. Neurochem	106	258-270	2008
Nakashima-Kamimura N, Nishimaki K, Mori T, Asoh S, Ohta S	Prevention of chemotherapy-induced alopecia by the anti-death FNK protein	Life Sci.	82(3-4)	218-225	2008
Asoh S, Ohta S.	PTD-mediated delivery of anti-cell death proteins/peptides and therapeutic enzymes.	Adv Drug Deliv Rev.	60(4-5)	499-516	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, Abe K.	Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	J. Neurosci. Res.	86(13)	3028-3037	2008

### 3. PGC-1 と心機能・心筋代謝

慶應義塾大学医学部再生医学教室講師 佐野元昭

**key words** energy metabolism, PGC-1 $\alpha$ , mitochondria, ubiquitine-proteasome system

#### 動 向

マイクロアレイ技術の普及に伴って mRNA レベルでの発現変化が容易に解析できるようになると、組織レベルでの代謝流速の変化が転写段階で制御されていることが明らかになってきた。代謝酵素の発現において転写因子が重要な役割を担っていることはいうまでもないが、転写コアクチベーターレベルでの遺伝子発現調節機構の重要性に関しても最近注目が集まっている。転写コアクチベーターとは、DNA 上に直接結合することはなく、転写因子と結合することによって標的遺伝子のプロモーター上に取り込まれて、クロマチン構造の修飾や転写因子と基本転写装置との間の橋渡しの役割を果たすことによって標的遺伝子の発現を促進する転写調節因子である。この転写コアクチベーターが、細胞内外の代謝環境の変化に応答して惹起される情報伝達経路の標的となつて、臓器特異的に代謝過程を遺伝子発現段階で調節して、生体の恒常性を維持している例が次々と知られるようになってきている。その中でも特に解析が進んでいる分子が PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) とよばれる転写コアクチベーターである。

#### A. PGC-1 $\alpha$ は「ミトコンドリア活性化因子」である

PGC-1 $\alpha$  は、その名の通り、脂肪細胞分化における master regulator である核内受容体型転写因子 PPAR $\gamma$  に結合する因子として褐色脂肪細胞からクローニングされた分子である<sup>1)</sup>。同じ転写因子 PPAR $\gamma$  の標的遺伝子であるにもかかわらず、脂肪を蓄積する白色脂肪細胞では脂肪酸結合タンパク aP2 が、逆に脂肪を燃焼させて熱を産生する褐色細胞では uncoupling protein 1 (Ucp1) が特異的に発現するが、これは、褐色脂肪細胞には PGC-1 $\alpha$  が発現しているため、実際に白色脂肪細胞に PGC-1 $\alpha$  を強制発現させると、UCP-1 の発現が誘導され、ミトコンドリアの増加、脂肪酸  $\beta$  酸化の活性化も起こり褐色脂肪細胞としての表現型へと変化する。

PGC-1 $\alpha$  の機能をひとことで表すのならば、それは「ミトコンドリア活性化因子」であるといえる。すなわち、PGC-1 $\alpha$  は、ミトコンドリアにおける酸化的代謝過程とミトコンドリアの生合成を活性化させる分子である。ミトコンドリアはいうまでもなく酸化的エネルギー代謝において中心的な役割を担うオルガネラであり、ミトコンドリア固有の DNA も保持している。しかし、ミトコン

ドリアタンパク質の大部分は、核DNAにコードされており、ミトコンドリア機能を転写段階で総合的に活性化させるためには核とミトコンドリア双方からの遺伝子発現を協調的に制御させるシステムが必要である。PGC-1 $\alpha$ は、転写因子 Estrogen-related receptor (ERR)  $\alpha$  や nuclear respiratory factor (NRF)-1, -2などの転写活性化能を高めて、TCA回路、呼吸鎖複合体に含まれる酵素群の発現をうながすと同時に、NRF-1, -2によるミトコンドリア転写因子 mitochondrial Transcription factor A (*Tfam*) の発現を誘導し、ミトコンドリアDNAの複製とミトコンドリアDNAからの転写を促進する。したがって、PGC-1 $\alpha$ を細胞に過剰発現させると、ミトコンドリアの数とミトコンドリア代謝酵素遺伝子の発現増加が観察される。このように、PGC-1 $\alpha$ は、転写因子ネットワークをさらに上の階層から制御することによって、核、ミトコンドリア双方のDNAからのミトコンドリア代謝酵素の発現を協調的に調節して効率よくミトコンドリアにおける酸化的エネルギー代謝を活性化できる鍵分子である。したがって、細胞内外の代謝環境の変化に際してPGC-1 $\alpha$ が細胞内情報伝達経路の直接的標的となり、その発現や機能が多彩に修飾を受けていることは容易に想像される。

PGC-1 $\alpha$ は、心臓、骨格筋、褐色脂肪、肝臓、腎臓、脳などミトコンドリアが豊富に存在して酸化的エネルギー代謝が活発に行われている臓器に高発現している。PGC-1 $\alpha$ は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化過程の活性化という基本的な作用に加えて、臓器特異的な機能も発揮する。褐色脂肪では、寒冷刺激によってPGC-1 $\alpha$ が誘導され、PPAR $\gamma$ に結合してuncoupling protein-1 (*Ucp1*) の発現が誘導され熱産生がおこり体温維持に働く。肝臓では、飢餓刺激によってPGC-1 $\alpha$ が誘導され、glucocorticoid receptor (GR) に結合して、phosphoenolpyruvate carboxykinase,

glucose-6-phosphatase を誘導して糖新生を促進するように働く。このようにPGC-1 $\alpha$ は、糖、脂質、エネルギー代謝の恒常性維持にとって中心的な役割を果たしており、その機能異常が、肥満や、糖尿病、脂質代謝異常などの生活習慣病や心不全などの病態に関与しており、創薬の標的分子としても最近注目が集まっている<sup>2)</sup>。ここでは、多彩なPGC-1 $\alpha$ の生物学的機能の中で、とりわけ心筋における作用に焦点を絞って、我々の最近の実験結果も踏まえて概説させていただく。

## B. 心不全はエネルギー飢餓状態である

心不全の成因のひとつに、心筋細胞のエネルギー代謝障害に基づくエネルギー産生予備能力の低下があげられる。心不全を発症した心臓は「エネルギー飢餓状態」にあり、全身の組織が要求する十分な血液を駆出するために必要なエネルギーを合成できない状態に陥っている。細胞レベルでのエネルギーホメオスタシスの指標であるリン酸化クレアチン [PCr] は心不全の初期から低下をはじめ、末期になるとATPの濃度 [ATP] も減少を始める。したがって、心筋リン酸化クレアチンとATPの濃度比 [PCr]/[ATP] のレベルは左室駆出率で表される心臓の収縮力、NYHA分類による心不全症状の重症度、あるいは生命予後とよく相関する。治療の面においても、レニン-アンギオテンシン系や交感神経系の活性化を抑制し、心筋のエネルギー消費を抑えてエネルギーバランスを維持させるような治療は心不全の予後を改善し、反対に強心薬のように心筋のエネルギー消費を増加させエネルギーバランスをさらに負に傾けるような治療は心不全の予後を悪化させることが大規模臨床研究でもはっきりと示されている。したがって、心筋エネルギー代謝異常を回復させることが心不全患者の予後を改善する新規治療戦略の標的になると考えられる。そのためには、

まず心不全におけるエネルギー代謝障害の分子基盤を明らかにする必要がある。

### C. 心筋エネルギー代謝を制御している転写ネットワーク

心臓における代謝の第一義的な目的は、いかに効率よくエネルギーを産生して絶え間ない心筋のポンプとしての機械的な仕事を円滑に維持するかである。したがって、心筋細胞では、細胞容積の30%を占めるミトコンドリアにおいて、主として脂肪酸を代謝燃料として活発に酸化的リン酸化を行いATPを合成している。PGC-1 $\alpha$ は、PPAR $\alpha$ 、ERR $\alpha$ 、NRF-1、NRF-2を介してミトコンドリアでの脂肪酸の $\beta$ 酸化、TCA回路、電子伝達経路に関与する酵素類の発現を制御し代謝酵素量を調節している。PPAR $\alpha$ は、ミトコンドリア内の脂肪酸の $\beta$ 酸化に加えて、脂肪酸の酸化経路にかかわる一連の酵素群、①細胞外からの遊離脂肪酸の取り込み: fatty acid translocator (CD36)、②細胞質での脂肪酸の acyl CoA への変換: fatty acyl-CoA synthetase、③fatty acyl-CoA のミトコンドリアへの取り込み: carnitine palmitoyl transferase の遺伝子の発現を包括的に制御して、一方で pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase, isozyme 4 (*Pdk4*) を誘導し、グルコースから解糖系を経てTCA回路へ流れる代謝流速をミトコンドリア内膜PDH複合体レベルでブロックすることによって、代謝燃料としてのグルコースの利用を抑えて選択的に脂肪酸の燃焼が促進するように働く。ERR $\alpha$ は、脂肪酸代謝に関わる酵素群に加えて、TCA回路 (citrate synthetase)、呼吸鎖複合体に含まれる酵素群 (NADH dehydrogenase, cytochrome c, cytochrome c oxidase, ATP synthetase) の遺伝子発現も NRF-1、NRF-2 と協調的に制御している。さらに、PPAR $\alpha$  や ERR $\alpha$  の発現自体も PGC-1 $\alpha$  によって正に制

御されており、PGC-1 $\alpha$  にはじまった転写カスケードのシグナルが増幅して下流の標的遺伝子へと伝播される仕組みとなっている。最近、これらの転写因子や転写コアクチベーター PGC-1 $\alpha$  の gain-of-, loss-of-function マウスモデルにおける心臓の機能解析結果が相次いで報告され、転写段階でのエネルギー代謝酵素群の発現制御が、心不全の病態形成においていかに重要な意義をもっているかに関して、具体的な知見が集積しつつある<sup>3,4)</sup>。

### D. 心筋エネルギー代謝における PGC-1 $\alpha$ の重要性

心筋エネルギー代謝における PGC-1 $\alpha$  の重要性は、2005年に Spiegelman<sup>1)</sup> と Kelly<sup>3)</sup> のグループによって独立して報告されたノックアウトマウス (PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>) の解析により明らかとなった<sup>3,5)</sup>。PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> の心臓では、野生型と比べて脂肪酸代謝 [fatty acid transporter (CD36), fatty acyl-CoA synthetase, medium chain, carnitine palmitoyl transferase 1)], 酸化的リン酸化 (cytochrome c, cytochrome c oxidase 5b) に関与する遺伝子の転写産物、ミトコンドリア転写因子 mitochondrial transcription factor A (*Tfam*)、ミトコンドリアDNAからの転写産物 (cytochrome b)、さらには PGC-1 $\alpha$  の標的転写因子 (ERR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) の発現レベルも30~50%低下していた。このエネルギー代謝に関わる遺伝子群の発現低下と一致してTCAサイクル、呼吸鎖複合体の酵素活性が30%低下、心筋 [PCr], [ATP] 含量も10~20%低下しており、定常状態での心筋のポンプ機能の低下を認めた。PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> の心臓のエネルギー産生障害に基づく潜在的な機能低下は、ストレス下においてより顕著になった。すなわち、PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> の心臓はカテコラミン負荷によって、心拍数や心臓の取

縮・弛緩といった物理的仕事量を増加させる能力が鈍化しており、また圧負荷刺激に対して容易に心不全に陥ることが示された。さらに、PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>の心臓は加齢に伴って生後7~8カ月以降拡張型心筋症様の収縮不全を呈してくることも明らかとなった。以上の結果から、PGC-1 $\alpha$ がエネルギー代謝に関連する遺伝子群の発現を包括的に制御することによって、心筋の収縮力の維持に必須であることが証明された。PGC-1 $\alpha$ のgain-of-functionの実験結果から明らかにされてきた非常に強力なPGC-1 $\alpha$ の作用から予想されたPGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>の表現型と比べて、PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>の表現型が軽かった原因として、PGC-1 $\alpha$ と機能的重複を認めるPGC-1 $\beta$ による代償機能が働いている可能性が示唆された。

基本転写因子TFIIHの中でキナーゼ活性をもつMAT-1-cyclin H-Cdk7の複合体は、これまで信じられてきたようにRNA polymerase IIのC末端ドメイン(CTD)のリン酸化を介して、すべてのmRNAの発現に関与しているわけではなく、組織特異的にある一群の遺伝子発現を制御していることが示唆されていた。我々は、心臓に特異的なMAT-1のノックアウトマウス(MAT-1<sup>-/-</sup>)を解析したところ、偶然にもMAT-1がPGC-1 $\alpha$ とPGC-1 $\beta$ 双方の転写コアクチベーターとしての機能に必須であることを見出した。心臓特異的なMAT-1<sup>-/-</sup>マウスは、正常に生まれてくるものの、生後の成長過程で観察される心臓のエネルギー代謝関連酵素群の発現量の増加が観察されずに、重篤なエネルギー産生障害から成獣に達する前に心不全を発症した。以上より、PGC-1ファミリーの転写コアクチベーターの欠損によってエネルギー産生障害を引き起こすだけで重篤な心不全が起こりうることが実証された<sup>5)</sup>。

## E. 病的な心肥大におけるPGC-1 $\alpha$ の機能異常は、ミトコンドリアエネルギー代謝障害を介して心不全の発症に深く関与している

心筋細胞は終末分化した細胞であり、生後の心臓の臓器としての成長は、心臓を構成する主要な細胞である心筋細胞の肥大によって達成される。心肥大は、生理的な心肥大と病的な心肥大に分けて考えられる。前者は、生後の成熟過程に伴う心臓の成長や運動に伴う心臓の肥大が相当し、成長や活動度の増加に伴う全身組織のエネルギー需要の増加に見合うだけの心拍出量の維持を可能にする反応で、長期的にも心臓の機能には悪影響を及ぼさない。一方、後者は、高血圧・弁膜症による心臓のメカニカルストレスや心筋梗塞による作業心筋の欠損、あるいは細胞骨格や筋原線維を構成する分子の遺伝的変異に起因する心肥大が相当し、一過性には、心拍出量を維持するように働くようにもみえるが、早晚、代償不全に陥り心不全を発症する。心臓は、全身に血液を絶え間なく送る続けるために必要な膨大なエネルギーを生み出すために、豊富に存在するミトコンドリアで、主として脂肪酸を代謝燃料としてエネルギー産生を行っている。生理的な肥大過程においては、ミトコンドリアの質的・量的な活性化によって、さらにエネルギー産生能力を高めて、エネルギー需要の増大に適応している。一方で、病的肥大過程では、主要な代謝燃料の脂肪酸からグルコースへのシフトがoccurり、またミトコンドリアでの酸化的リン酸化能の低下とATPの効率的な細胞内運搬機構の障害から早晚エネルギーの相対的な不足状態に陥る。以上の生理的vs病的な心肥大における相反するエネルギー代謝動態の変化に一致して、PGC-1 $\alpha$ の発現は、生理的な肥大においては増加し、病的肥大では減少している。

運動負荷時におけるPGC-1 $\alpha$ を中心とした転

写ネットワークの活性化の分子メカニズムは、骨格筋においてよく検討されている<sup>7)</sup>。持続的な運動負荷によって、ミトコンドリア含量や酸化的リン酸化能が上昇するだけでなく、筋原線維が遅筋型 (type IIb) から遅筋型 (type I, IIa) に変換する。運動負荷によってCaMKIIが活性化されると、class II HDACがリン酸化され核外に移行し、その結果class II HDACによるMEF2の抑制が解除され、class II HDACにかわってPGC-1 $\alpha$ がMEF2と結合し、MEF2依存性の遅筋型筋原線維特異的な遺伝子群 [Troponin I (slow), myoglobin] の発現が活性化される。PGC-1 $\alpha$ 自身の発現もPGC-1 $\alpha$ -MEF2経路によって正に制御されており、これによって酸化的リン酸化能力が高くミトコンドリアが豊富な筋線維へとリモデリングしていく。

心筋において、PGC-1 $\alpha$ の発現が、生理的、病的ストレス下で、まったく正反対に制御される分子メカニズムは、まだ充分には解明されてはいない。CaMKIIによるリン酸化部位に変異を加えたシグナル非感受性HDAC5のトランスジェニックマウスやMEF2Aのノックアウトマウスの心臓では、PGC-1 $\alpha$ の発現低下とミトコンドリア代謝酵素の発現低下を認めることから、HDAC-MEF2-PGC-1 $\alpha$ 経路が、骨格筋同様心筋においてもPGC-1 $\alpha$ の転写産物の量を規定するのに中心的な役割を担っていることが予想される<sup>8)</sup>。しかし、MEF2の転写活性は、生理的な心臓の発生・成長過程だけでなく、病的な心肥大においても活性化されているにもかかわらず、病的な心肥大においてPGC-1 $\alpha$ の発現は逆説的に減少している。この現象は、PGC-1 $\alpha$ の発現を負に制御するリプレッサーの存在によって説明しうる。このリプレッサーの候補分子として我々は、cyclin-dependent kinase 9 (Cdk9) を想定している (図1)。Cdk9は、RNA polymerase IIのC末端ドメイン (CTD) のリン酸化を介して、RNA polymerase IIによ

る転写の伸長反応を促進させるpositive transcription elongation factor b (p-TEFb) である。RNA polymerase IIのCTDのリン酸化とCdk9の活性は、病的な心肥大を惹起するG $\alpha$ q (Angiotensin IIやcatecholamineなどの血管作動性因子はいずれもsmall GタンパクG $\alpha$ q共役型の7回膜貫通型受容体を介して細胞内にシグナルを伝達している) やcalcineurin (細胞内のカルシウム濃度の上昇に伴って活性化されるカルシウム依存性脱リン酸化酵素) シグナル、さらにはpressure-overloadによって特異的に増加する<sup>9)</sup>。Cdk9の活性化は、RNA polymerase IIのC末端ドメイン (CTD) のリン酸化や病的な心肥大形成における包括的な転写活性化に必須であるが、一方で

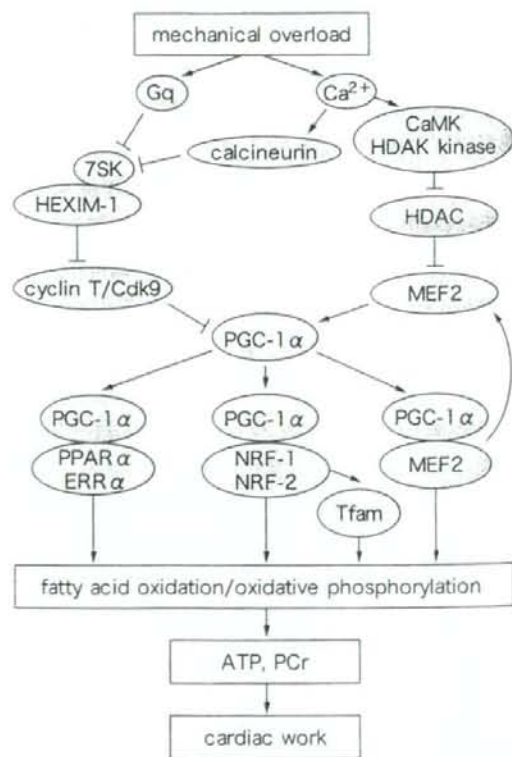


図1

PGC-1 $\alpha$ は心筋細胞の機能維持にとって必須の分子である。ストレス下におけるPGC-1 $\alpha$ の機能異常は、心筋エネルギー飢餓状態を引き起こし心不全発症へと導く。

PGC-1 $\alpha$ のプロモーター上への転写開始複合体形成を負に制御することによってPGC-1 $\alpha$ の発現を選択的に抑制することを明らかにした。さらに、Cdk9の活性化に伴う心筋細胞のアポトーシスに対する感受性亢進も、外因性のPGC-1 $\alpha$ を過剰発現させることによって救済される<sup>10)</sup>。

#### F. PGC-1 $\alpha$ は、ユビキチン化されプロテアソーム系で速やかに分解を受ける半減期の短いタンパク質であるが、一方で潜在的な核内において凝集体を形成しやすい性質ももった分子である

代謝ストレス下においてPGC-1 $\alpha$ は臓器特異的な代謝プログラムを制御することによって生体の恒常性の維持やストレス応答に大切な働きをしている。一方で、非生理的レベルのPGC-1 $\alpha$ の過剰な活性化は、ミトコンドリアの過増殖を引き起こし細胞障害性に働く。強力な転写活性作用をもつPGC-1 $\alpha$ は、その作用を終えたあとは、速やかに分解され、次なる刺激に対して迅速に反応できるように定常状態ではタンパク質としての発現量は低く維持しておく必要があると予想された。実際PGC-1 $\alpha$ にはアミノ酸配列上、哺乳類から鳥類、魚類まで種を超えて非常によく保存されている2つのPEST配列(半減期の短い分解を受けやすいタンパク質に共通して認められる配列)が存在していたことから我々はこの仮説を検証することを試みた。

ウエスタンブロット法および免疫組織学的検討からPGC-1 $\alpha$ は予想されたように高度にユビキチン化を受けてプロテアソーム系によって速やかに分解を受ける半減期の短い分子であった。ただ、予想外であったのは、MG132などによって薬理的にプロテアソーム機能を阻害するとユビキチン化されたPGC-1 $\alpha$ が核内における局在を変化させて、凝集体を形成する性質もっている

ことであった。PGC-1 $\alpha$ (アミノ酸1-798)は構造上、N末側(アミノ酸1-564)とC末側(アミノ酸565-798)の2つの領域に分けられる。N末側にはHAT活性をもったp300/CBPやSRC-1と結合することが証明されている転写活性化ドメイン、核内受容体結合配列LXXLLモチーフをはじめ転写因子との結合部位などが存在し、およそ転写コアクチベーターとして機能を発揮するのに十分な構造がすべて含まれている。一方C末側はアミノ酸のアルギニン、セリンに富んだRSドメインやRRMといういまだ機能未知で、他の転写コアクチベーターにはみられないユニークな構造を含んでいる。そこで、PGC-1 $\alpha$ のどのドメイン構造がこのようなPGC-1 $\alpha$ の分解・凝集という特性に寄与しているのかに関してC末側とN末側を欠失させた各種変異体を用いて検討した。すると、C末側ドメインを欠失させたPGC-1 $\alpha$ (アミノ酸1-564)は、ユビキチン化を受けなくなり、プロテアソーム阻害剤存在下でも凝集体を形成しなくなったが、反対にN末側を欠失させたPGC-1 $\alpha$ (アミノ酸565-798)はユビキチン化を受けて、強制発現によって用量依存性に、①野生型PGC-1 $\alpha$ のタンパク質発現量を増加させ、②PGC-1 $\alpha$ 依存性遺伝子であるミトコンドリア呼吸鎖酵素cytochrome c, ATP synthase  $\beta$ のプロモーター活性を上げることから、PGC-1 $\alpha$ のC末端側にユビキチン化酵素との結合に必要な領域が含まれていると結論付けられた。しかし、C末端側だけではユビキチン化されたPGC-1 $\alpha$ のプロテアソームによるタンパク分解には不十分であり、N末側の2つのPEST配列を含んだ領域の存在がタンパク分解には必須であった。以上の実験結果から、潜在的にユビキチン化され凝集体形成を起こしやすいC末側ドメインの機能を、N末側の領域がPEST配列を使った蛋白分解を介して抑制することによってPGC-1 $\alpha$ のタンパク質としてのターンオーバーと核内局在を同時に制御し、この転写



共役因子の核内の転写の場における availability を決定していると PGC-1 $\alpha$  の分子内制御機構の存在が示唆された<sup>11)</sup>。

病的な心肥大や心不全における PGC-1 $\alpha$  の機能異常のすべてを数十%程度の mRNA レベルでの PGC-1 $\alpha$  の発現低下だけで説明するのは少し短絡的かもしれない。今後は、病的な心肥大や心不全において活性化されるシグナルによって、ユビキチン・プロテアソーム系を介する PGC-1 $\alpha$  のタンパク質としての半減期と核内局在の制御がどのような影響を受けるのかを、心不全におけるプロテアソーム系の機能障害が PGC-1 $\alpha$  の核内凝集体形成を引き起こしている可能性も含めて検討していく必要がある。

### むすび

心筋細胞におけるエネルギー代謝の恒常性維持において PGC-1 $\alpha$  が中心的な役割を果たしていることが明確に示された今、これらの知見をいかにヒトの心不全治療に発展・応用していくかを模索していかなければならない段階にある。そのためには、PGC-1 $\alpha$  の転写段階や翻訳後修飾、タンパク質-タンパク質会合による機能制御の分子メカニズムと心筋ストレスシグナルとのクロストークの全貌を解明し治療標的分子を探索していく必要がある。

### 文献

- 1) Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* 2006; 27: 728-35.
- 2) Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005; 1: 361-70.
- 3) Arany Z, He H, Lin J, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 2005; 1: 259-71.
- 4) Huss JM, Imahashi K, Dufour CR, et al. The Nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab.* 2007; 6: 25-37.
- 5) Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005; 3: e101.
- 6) Lin J, Wu H, Tarr PT, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002; 418: 797-801.
- 7) Czubyrt MP, McAnally J, Fishman GI, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 1711-6.
- 8) Sano M, Abdellatif M, Oh H, et al. Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med.* 2002; 8: 1310-7.
- 9) Sano M, Izumi Y, Helenius K, et al. Menage-a-trois 1 is critical for the transcriptional function of PPARgamma coactivator 1. *Cell Metab.* 2007; 5: 129-42.
- 10) Sano M, Wang SC, Shirai M, et al. Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J.* 2004; 23: 3559-69.
- 11) Sano M, Tokudome S, Shimizu N, et al. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of PGC-1alpha. *J Biol Chem.* 2007; 282: 25970-80.

### Ⅲ アンチエイジング(抗加齢)医学の臨床

#### 臓器(専門領域)別アンチエイジング

—その重要な疾患の診断と治療のアップデート—

## 心臓とアンチエイジング

心臓は生体内における血液循環ポンプとして全身臓器の代謝需要に応じて十分な循環血液量を供給するという生命維持にとって必要不可欠な役割を担っている。このために、心臓は、さまざまなストレス状況下において内因性および外因性機能調節機構を介して広範囲にわたってポンプ機能を変化させうる能力を備えている。つまり、心筋細胞は生体内でストレス応答機構が最もよく発達している細胞といえる。

高齢者の心臓で観察されるさまざまな組織学的、生化学的变化は、必ずしも機能破綻に結びつく maladaptation ではなく、ストレス応答の結果として導き出された好ましい変化も含まれると考えられる。一方で、ストレス応答反応は短期的には好ましい効果を示すものの長期的には悪い影響を及ぼすものもある。また、不十分なストレス応答反応や機能調節機構のゆらぎもまた機能破綻を引き起こす原因となる。心筋の老化はこれら一連の変化が積み重なった終末像であり、機能調節機構やストレス応答反応に関する知見の蓄積が、心筋アンチエイジング療法の臨床応用に結びついてゆくものと考えられる。

### 心臓の老化

高齢者の心臓は、若年者の心臓と比べて、形態学的にも、組織学的にも、また、生理学的にもさまざまな変化が観察される。高齢者は、高血圧や虚血性心疾患などの基礎疾患を有することが多く、加齢に伴う一次的な心臓の変化を合併する基礎疾患による二次的な影響から完全に区別することはときに難しい。ここでは、まず、

病気によらない生理的な加齢に伴う心臓の変化についてこれまで知られている知見をまとめてみたいと思う(図1)。

#### 形態学的変化

健康な高齢者の心重量は、若年者と比べておおむね重くなる(肥大)傾向があるようだが、変化がない、あるいはむしろ軽くなる(萎縮)症例もあり、実にさまざまである。基礎心疾患の有無に加えて個人のアクティビティや栄養状態などによっても心重量は影響を受けるためと考えられる。解剖学的には、高齢者では、上行大動脈の右方への屈曲・進展に伴って、心臓の長軸径(心基部—心尖部径)が短縮し、心室中隔はS字状となる。左房は拡大し、大動脈弁、僧帽弁の弁尖肥厚と弁輪拡大・石灰化が観察される。心外膜の脂肪沈着、冠動脈の屈曲蛇行、石灰化も加齢に伴って進行する。

#### 組織学的変化

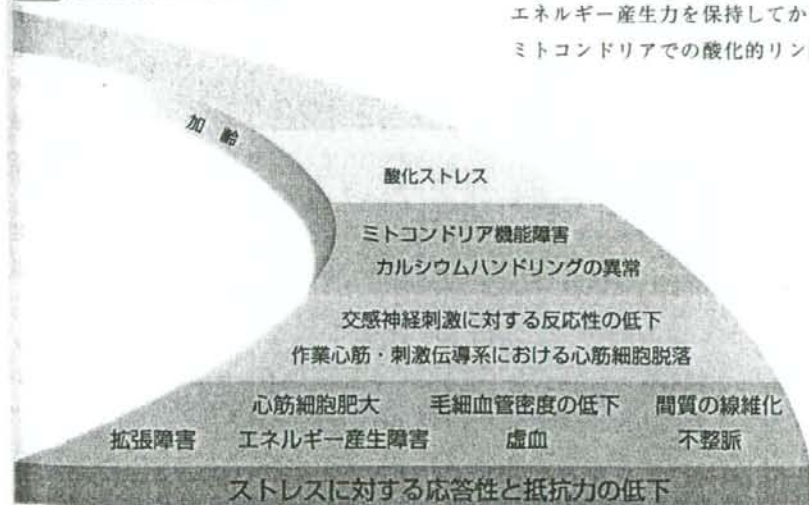
心筋細胞は終末分化した細胞で生後分裂能力を失う。心筋内に潜在する、あるいは骨髄由来の心筋幹細胞からの心筋再生能力は極端に低く、傷害を受けて脱落した心筋細胞を補う能力は絶対的に不足している。したがって、結果的に加齢に伴って作業心筋を構成する心筋細胞の数は減少していく。残存した心筋細胞は肥大(細胞容積の増大)し、多核化した細胞の比率は増加し、また lipofuscin や amyloid などの老廃物が蓄積した心筋細胞も多く出現するようになる。心筋細胞の減少は作業心筋だけにとどまらず、洞結節などの刺激伝導系を構成する細胞においても認められる。高齢者に洞機能不全症候群やI度の房室ブロック、脚ブロックを高頻度に認める

のはこのためである。脱落した心筋細胞は、線維化組織によって置換されていく。心筋内毛細血管網の密度も低下し、個々の心筋細胞の肥大とあいまって、血管内皮細胞から心筋細胞への酸素の拡散距離が延長し、心筋細胞は相対的に虚血状態に陥ってくる。

## Ⅱ 心筋の収縮弛緩機能の変化

加齢に伴って心筋の収縮機能に低下は認められない。しかし、拡張機能は低下してくる。若年者は、僧帽弁開放後の急速流入期に十分に左心室を充填することができるが、高齢者では、左室の弛緩速度がゆっくりで、急速流入期における左室への血液流入が遅延するため、心房収縮による心室充填への依存度が高くなる。心房への負担の増加によって高齢者では心房細動などの上室性不整脈の出現頻度が高くなる。高齢者の心臓は、 $\beta$ -受容体を介する交感神経系刺激に対する応答が低下しており、あたかも若年者が $\beta$ -受容体拮抗薬を内服しているような状態にある。運動時には、若年者は心拍数を増加させて心拍出量を増加させているが、高齢者では心拍数応答反応が若年者に比して鈍化しているため、心室充填容量を増加させ Frank-Starling の法則に頼って心拍出量を維持している。

図1 心臓老化のメカニズム



高齢者における心筋の拡張障害の背景には、前述した心筋の線維化、肥大などの構造上の変化に基づく左室の stiffness の増加以外に、心筋収縮タンパクの組成の変化、カルシウムハンドリングの変化などが存在する。myosin heavy chain (MHC) には2つのアイソフォーム ( $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC) が存在する。 $\alpha$ -MHC は ATPase 活性が高く収縮速度が速い。一方で、 $\beta$ -MHC は ATPase 活性が低く収縮速度が遅い。MHC アイソフォームの発現比率は、胎児期には  $\beta$ -MHC が優位だが、成人では  $\alpha$ -MHC が優位となっている。ところが、加齢とともに  $\beta$ -MHC の比率が増加してくる。

細胞内  $Ca^{2+}$  は、心筋細胞収縮弛緩の調節において中心的役割を演じている。心筋細胞膜興奮に引き続いて細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は一過性に上昇・下降するが、この細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇・下降 ( $Ca^{2+}$  トランジェント) が老化した心筋では遷延化している。これは、心筋細胞膜からの  $Ca^{2+}$  流入量の増加、筋小胞体やミトコンドリアによる  $Ca^{2+}$  取り込み速度の減少に起因するが結果的に心筋細胞の弛緩速度の原因となっている。

## Ⅲ ミトコンドリア機能の変化

心臓が血液循環ポンプとして、全身臓器の代謝需要に応じて十分な循環血液量を供給できるのは、心筋細胞において非常に発達しているミトコンドリアでの酸化的リン酸化を介して高いエネルギー産生力を保持してからである。このミトコンドリアでの酸化的リン酸化能は加齢に

伴って減少する。これは、心筋内の毛細血管密度の減少とミトコンドリア自体の機能異常に起因する。心筋エネルギーリザーブが低下している高齢者の心臓は、仕事量の増加に対応できず、機能不全に陥りやすい。若年者の心臓では、脂肪酸を主たる代謝燃料としているが、高齢者の心臓では、解糖系への代謝流速が増えており、代謝燃料としてグルコースに依存する比率が増えている。この一連のエネルギー代謝の変化は、圧負荷刺激下において若年者の心臓で観察される変化と同じである。圧負荷刺激下におけるエネルギー代謝経路の変化の背景には、PPAR $\gamma$  coactivator-1 (PGC-1)/PPAR/ERR といった核内受容体型転写因子ネットワークの抑制と AMP-activated protein kinase の活性化が関与していることが知られているが、加齢に伴うエネルギー代謝の変化の背景にも同様な分子メカニズムが存在している可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。

ミトコンドリアにおけるエネルギー合成の過程で不可避免的に活性酸素が発生する。酸化エネルギー産生と活性酸素の発生は表裏一体である。ミトコンドリア DNA は、核 DNA とは異なってクロマチン構造をもたないために活性酸素による攻撃に対して無防備である。したがって、ミトコンドリア DNA への変異の蓄積は加齢とともに進行し、それがさらなる活性酸素の産生や呼吸鎖複合体の機能異常を引き起こしている可能性が示唆されている。ミトコンドリア由来の活性酸素による生体高分子の障害はすべての細胞において普遍的に認められる現象であり、老化に深く結びついていると想定されている<sup>2)</sup>。とりわけミトコンドリアが豊富でエネルギー合成が活発に行われており、かつ分裂能力のない心筋細胞の老化の分子メカニズムを考えるうえで、活性酸素による高分子機能障害は本質的な役割を演じていると考えられる。

単離したミトコンドリアを用いた検討では、老化したラットでは若年のラットに比してより多くの O<sub>2</sub><sup>-</sup> を産生する。反対に、活性酸素を除去する superoxide dismutase, catalase, glutathione per-

oxidase などの抗酸化酵素の活性は加齢に伴って低下してくる。glutathione は、抗酸化分子として働くのみならず、抗酸化酵素 glutathione peroxidase の基質としても作用し、過酸化水素や過酸化脂質(脂質ヒドロペルオキシド)の除去にとって重要な役割を果たしている。この glutathione の濃度は老化したマウスの心筋では低下している。以上の観察は、心臓が加齢とともに強い酸化ストレスに暴露されている予測を支持している。

## 心筋ストレス応答機構と老化

高齢者は、高血圧や心房細動などのメカニカルストレスや発熱、感染症などの代謝性ストレスによって容易に心不全を発症する。また、虚血や再灌流障害に対する抵抗力も低下している。つまり、高齢者の心臓は、加齢に伴う組織学的変化と機能的変化(カルシウムハンドリングの異常やエネルギーリザーブの低下)を基盤として、ストレスに対する抵抗力が減弱しており、容易に代償破綻を起こしやすい状態にある。これまでのところ、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の阻害剤には心筋拡張障害の進行を予防する効果が臨床的に認められている。

心筋梗塞などの虚血性心疾患は、欧米のみならず日本においても、高齢者の主要な死亡原因となっている。高齢者では虚血再灌流障害に対する抵抗性の減弱による梗塞量の増加と梗塞期の炎症治療能力の低下から、左室腔拡大を伴う adverse remodeling が進行し心不全に陥りやすい<sup>3)</sup>。したがって、虚血や再灌流による障害を抑制し、炎症治療能力を活性化するような治療法は、心臓のアンチエイジング療法として最も重要な位置を占めてくる。

高齢者の心臓では、解糖系への代謝流速が増加しているが、遺伝子操作マウスを使った実験 (GLUT1-TG mice) では、解糖系への代謝流速の恒常的な増加(脂肪酸酸化能は維持されたうえで)が、加齢に伴う拡張機能障害を抑制し、さらに虚血再灌流後の左室機能の回復を促進する方向へ働くという結果が示されている<sup>4)</sup>。この結果は、加齢に伴う解糖系への代謝流速の増加が内

因性のアンチエイジング応答として好ましい効果を発揮している可能性を示唆する。ただし、脂肪酸酸化への代謝流速を強く抑制し解糖系の代謝流速を増加させた遺伝子操作マウス (lipoprotein lipase knockout mice) は、圧負荷下に耐えられず機能破綻を起こすことから、ある程度の脂肪酸酸化が心筋の圧負荷応答に必須であるのも事実である<sup>6)</sup>。以上より、代謝調節薬剤 metabolic modulator を使った心臓のアンチエイジング療法は、狭い therapeutic window を対象とした微調節が必要なものになる。

解糖系への代謝流速の恒常的な増加は、嫌気的なエネルギー合成によって、特に虚血時に心筋保護的に働くことが予想される。さらに、解糖系の中間代謝産物は、解糖系から分岐する別の代謝経路へ流れている可能性もある。例えば、glucose-6-phosphate から分岐するペントースリン酸経路を介して産生される NADPH は、glutathione reductase のコファクターとして働き、酸化ストレス防御に重要な glutathione を酸化型から還元型へ戻してリサイクルするのに必須である。事実、ペントースリン酸経路を介する NADPH の産生を抑制したマウス (G6pdx knockout mice) の心筋では、還元型 glutathione 濃度の低下に伴う酸化ストレスの蓄積によって、加齢とともに間質の線維化が進行し、心筋収縮拡張機能が低下する<sup>6)</sup>。つまり、解糖系への代謝流速の恒常的な増加は、多彩な代謝経路を介して心筋保護的に働いている可能性が示唆される。

## 結語

さまざまなストレス状況下でもポンプ機能を維持するために心臓は多彩なストレス応答機構を働かせることができる。加齢とともにストレスによる障害因子が増加し、あるいはストレス応答反応やストレスに対する抵抗性が低下することによって、代償破綻をきたし機能の低下が顕在化する。したがって、従来型のストレスそのものを軽減させることに主眼をおいた治療法だけでなく、内因性のストレス応答反応を賦活化させ、ストレスに対する抵抗性を獲得させるような治療もまた心臓のアンチエイジング療法にとって重要と考えられる。これまで、カロリー制限など個体の寿命を延長させるような介入が、心筋のストレス応答を増強させ、心筋のアンチエイジングに有効である事実が確認されつつある<sup>7)</sup>。一般に、生物に対して通常有害な作用を示すものが、微量であれば逆に内因性ストレス応答機構を誘導し生体にとって好ましい反応を示す場合がある。この生理的刺激作用のことを“ホルミシス”とよぶ。心臓においても先行する短時間の虚血がその後続く長時間の虚血に際して耐性を獲得させる（梗塞サイズを縮小させ致死性不整脈の出現を抑制する）pre-conditioning 効果という現象が古くから知られている。著者は、有害なストレスに暴露することなく pre-conditioning 効果を積極的に引き出す分子メカニズムの解明こそが究極的な心臓のアンチエイジング療法の開発につながると考えている。（佐野元昭）

## 文献

- 1) Preston CC, Oberlin AS, Holmuhamedov EL, et al: Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart. *Mech Ageing Dev* 2008 Mar 4.
- 2) Trifunovic A, Larsson NG: Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med* 2008 Feb; 263(2): 167-78.
- 3) Bujak M, Kweon HJ, Chatila K, et al: Aging-related defects are associated with adverse cardiac remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008 Apr 8; 51(14): 1384-92.
- 4) Luptak I, Yan J, Cui L, et al: Long-term effects of increased glucose entry on mouse hearts during normal aging and ischemic stress. *Circulation* 2007 Aug 21; 116(8): 901-9.
- 5) Augustus AS, Buchanan J, Park TS, et al: Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. *J Biol Chem* 2006 Mar 31; 281(13): 8716-23.
- 6) Jain M, Brenner DA, Cui L, et al: Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes. *Circ Res* 2003 Jul 25; 93(2): e9-16.
- 7) Shinmura K, Tamaki K, Saito K, et al: Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 2007 Dec 11; 116(24): 2809-17.

## 4. メタボローム

慶應義塾大学医学部再生医学講師 佐野元昭

同 医化学教室 菱木貴子

同 教授 末松 誠

東京大学大学院医学系研究科メタボローム講座 中西広樹

同 教授 田口 良

key words metabolomics, lipidomics, mass spectrometry

### 動 向

分子生物学的解析法の普及に伴って心血管疾患の生理や病態に対する理解は格段に深まってきた。心血管系の発生や機能維持に必要な転写因子が次々とクローニングされ、これら転写因子群のhierarchyによる遺伝子発現ネットワークの全貌が明らかにされつつある。一方では、様々な病的ストレスによって活性化されるシグナル伝達分子(経路)によって、この遺伝子発現ネットワークがどのように調節され、その結果としてどのように個々の病態形成に関わっているのか、その分子基盤が少なくとも部分的には説明可能となってきた。DNAチップによる網羅的解析手法が可能になると、正常と病態における遺伝子発現プロファイルと比較検討することによって、解析の対象である病態特異的な表現型の形成に最も関与している可能性が高い遺伝子を容易に取捨選択できるようになった。そして、培養細胞、線虫、ショウジョウバエ、小型魚類、齧歯類などの実験動物を用いて、標的遺伝子のgain-of-function, loss-of-functionの実験を行い、仮説の検証をすすめていくという方法が広く取られるようになってきた。しかし、このような実験方法は必ずしも万能とは

いえない。細胞や臓器の機能の変化は、遺伝子発現プロファイルだけをながめていても説明できないケースも多々ある。昨今めざましい発展を遂げているバイオインフォマティクスを駆使しても、標的遺伝子の同定に関しては我々の直感的取捨選択よりとりわけ勝っているものではない。さらに、細胞機能の変化が、蛋白の細胞内局在の変化、合成・分解の速度の調節、翻訳後修飾に基づく場合は、遺伝子発現プロファイルの変化をかならずしも伴わない。

私は、心血管系疾患の病態を理解するための新しいツールとしてメタボロミクスに注目している。すなわち、正常と病態における代謝産物の量的変動プロファイルに関する情報を比較検討することによって病態特異的に変化している代謝経路を同定し、従来のDNAチップによる遺伝子発現プロファイルから得られる情報と照らし合わせて、解析の対象となっている表現型の形成に最も関与している可能性が高い分子や経路を包括的に同定していこうという試みである。

メタボロミクスと一言でいっても、対象とする代謝物の物性によって抽出法や分離法、測定法が異なる。したがって、メタボロミクスではどのよ

うな代謝物を解析の対象とするかのターゲットを絞る必要がある。本稿では、①糖、アミノ酸、核酸の代謝経路の中間代謝産物などのイオン性の低分子化合物、②脂溶性である脂質代謝産物について、それらの代謝産物を測定する意義とそれらを測定対象として選んだ場合の基盤技術に関して簡単に紹介させていただく。

## A. 水溶性代謝産物の測定方法

生命科学の理解には生化学的知識が必要不可欠である。生化学の教科書に書かれている複雑な代謝図のなかで、臓器特異的、疾患特異的に活性化されている代謝経路を同定し、その病態生理学的意義を明らかにしていくためには細胞内の低分子代謝物を網羅的・包括的に定量する技術の確立が必要不可欠であった。TCA回路、ミトコンドリア電子伝達系などのエネルギー代謝経路や、糖、アミノ酸、核酸の代謝経路の中間体のほとんどが、

リン酸基、カルボキシル基、アミノ基等をもつイオン性の低分子化合物である(図1)。キャピラリー電気泳動 capillary electrophoresis (CE) は、そのイオン性低分子化合物に対してきわめて高い分離能を有す。したがって、CEにより分離して高感度の質量分析計 mass spectrometry (MS) で検出するCE/MS法は、代謝中間体の定量に最も適した解析法である。代謝中間体は陽イオン性(アミノ基等の塩基性官能基をもつ)、陰イオン性(カルボキシル基等の酸性官能基をもつ)、核酸類(リン酸基をもつ)、の3種類に分類され、CE/MSではそれぞれの性質に適した3種類の測定条件を用いてほとんどの代謝物質を直接定量できる。これが、CE/MS法によるメタボローム解析の原理である<sup>1-4)</sup>。各代謝物質はキャピラリーカラム内で電気泳動により分離後、MSで検出される。CE内で陽イオン性の物質は陰極へ、陰イオン性の物質は陽極へ移動するが、その時の各代謝物質のキャピラリー内での保持時間 re-

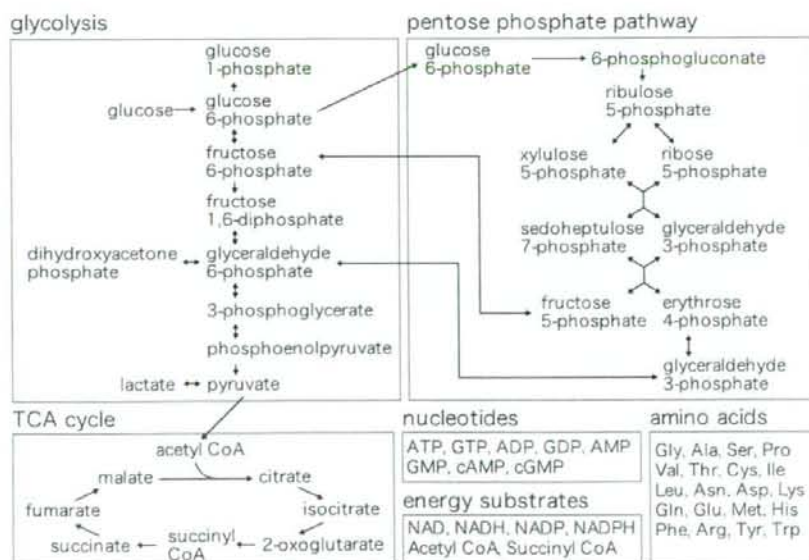


図1 CE/MSによる定量可能な代謝物質の一部

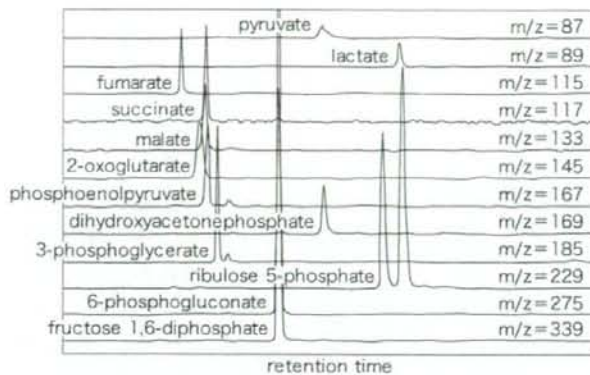


図2 CE/MS法による解析データ一例

retention timeは物質の電荷/水合イオン半径の比に基づく。また、MS内の測定は各分子の質量数をイオンのもつ電荷数で割った質量電荷比 (m/z) によって選択的に行う。したがって、各代謝物質の濃度を retention time と m/z の特性に基づき特異的に同定することができる<sup>1)</sup> (図2)。

*in vivo*代謝流速をより詳細に検討する方法としてフラクソーム解析も有用である。非放射性質量同位体をマウス個体に投与し、経時的にサンプリングすることによって得られた代謝物質の濃度変化を追跡することにより、*in vivo*での代謝酵素の酵素活性や反応速度、さらには代謝経路の律速段階に関する情報が系統的に探索可能である。

## B. 脂溶性代謝産物

脂質は生体における主要な代謝産物であり、生体膜構成成分、エネルギー源としてだけでなく、アラキドン酸から生合成されるエイコサノイド (プロスタグランジン、ロイコトリエン) に代表されるように脂質メディエーターとして生理活性をもつ。生理活性脂質は、細胞内では核内受容体の生理的なアゴニストとして、細胞外では細胞膜上のGタンパク質共役型受容体のリガンドとし

て働き多彩な機能を果たす。

膜を構成する脂質の組成には細胞特異性があり、さらに病態下において動的に変化する。また、細胞膜脂質の多価不飽和脂肪酸が生体内で生じた活性酸素によって攻撃を受けると、ラジカル連鎖反応が起こって、一次酸化生成物として過酸化脂質 (脂質ヒドロペルオキシド) が生じる。さらに過酸化脂質の分解反応によってアルデヒドなどの二次酸化生成物が生成されてくる。これらの脂質過酸化物は、反応性が非常に高く、タンパク質との共有結合や核酸内部での分子間相互作用を介して細胞機能に有害な影響を及ぼし、動脈硬化、心筋虚血再灌流障害などの酸化ストレスによる疾病発症の一因となっていると考えられる。一方で、脂質過酸化物のなかには、脂質メディエーターとして生理活性をもつものが次々と同定されており、反対に、炎症の終焉、抗酸化機構の誘導にも一役買っている化合物も存在することが知られている。したがって、心臓の虚血再灌流障害、動脈硬化の分子メカニズムの解明には、脂質やその酸化代謝産物の質的・量的変化の情報を時間・空間的に包括的に捉えることが必要になってくる。

脂質メタボローム (リピドミクス) では、このように組織、疾病特異的に目まぐるしく代謝回転



している脂質やその酸化代謝産物を包括的に捉えることで生体機能を解明することを目指している<sup>1,5,7)</sup>。サンプル調製では、解析すべき代謝物に応じて溶媒抽出や固相抽出が用いられる。解析手法としては、対象を絞らない網羅的・包括的解析手法、特定の構造特性をもつ代謝物にフォーカスした手法、特異的な代謝物にターゲットを定めた手法の3種類が主に用いられている。

グローバル解析法は、特定の分子群に限定せずに一定の抽出条件で液体クロマトグラフィー(LC)により分離されてくる分子を、イオン強度の高い順にできるだけすべて質量分析MSまたはタンデム質量分析(MS/MS)測定するという包括的な手法である。MS/MS測定で同定できる分子種は含量の多い代謝物に限定されるので、微量成分を検出するにはLC分析の前に主要成分と微量成分を分離する等の前処理が必要とされる。脂質全体をプロファイリングし、変動を包括的に解析するのに適している。

第2の手法は、三連四重極型質量分析計 triple-stage quadrupole MS (TSQMS) のMS/MS分析を利用した特定のクラス内の分子種を網羅的に検出する方法(フォーカス解析)であり、プレカーサーイオンスキャン precursor ion scanningやニュートラルロススキャン neutral loss scanningを用いて、特定の部分構造をもつグループに属する分子群を選択的、かつ包括的に同定する手法である。

第3の手法は、選択的反応モニタリング selected reaction monitoring(SRM)またはmultiple reaction monitoring(MRM)とよばれ、特

定のクラス内の特定分子種分子を対象とした個別かつ特異的同定法(ターゲット解析)である。特定の $m/z$ 値をもつプレカーサーイオンとそこから生じた特徴的なプロダクトイオンの $m/z$ 値の組み合わせを用いてスキャンするため、高いシグナル/ノイズ(S/N)比が得られ、定量法としても用いることができる。生体内に微量かつ不特定多数の分子種をもつ酸化脂質(酸化リン脂質・酸化脂肪酸)の測定には、この手法が用いられる。

今後、イメージングマスマスベクトロメトリーやレーザーマイクロダイセクション等の分子の局在を見ることのできる新しい解析手法が加わることで、多くの脂質代謝物の局所的な情報を加味した生理機能や病態への関与が明らかになってくることが期待されている。

## 文献

- 1) 富田 勝, 他, 編. メタボローム研究の最前線. 東京: シュプリンガー・フェアラーク東京; 2003.
- 2) Soga T, et al. Pressure-associated capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Anal Chem.* 2002; 74: 2233-9.
- 3) Soga T, et al. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem.* 2006; 281: 16768-76.
- 4) 曾我朋義. CE-MSによるメタボローム解析とバイオマーカーの探索. *細胞工学.* 2006; 25: 1381-7.
- 5) 田口 良. 脂質生物学がわかる(脂質メタボローム). 東京: 羊土社; 2004. p.127-31.
- 6) 田口 良. メタボロミクスの現状と未来. *細胞工学.* 2006; 25: 1374-9.
- 7) 田口 良. リピドミクスによる肥満・炎症の包括的解析. *実験医学.* 2008; 26: 30-4.



## Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia–reperfusion injury

Kentaro Hayashida<sup>b</sup>, Motoaki Sano<sup>a,d,\*</sup>, Ikuroh Ohsawa<sup>e,f</sup>, Ken Shinmura<sup>c</sup>, Kayoko Tamaki<sup>c</sup>, Kensuke Kimura<sup>b</sup>, Jin Endo<sup>b</sup>, Takaharu Katayama<sup>b</sup>, Akio Kawamura<sup>b</sup>, Shun Kohsaka<sup>b</sup>, Shinji Makino<sup>a</sup>, Shigeo Ohta<sup>e</sup>, Satoshi Ogawa<sup>b</sup>, Keiichi Fukuda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>b</sup> Division of Cardiology, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>c</sup> Division of Geriatric Medicine, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>d</sup> Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

<sup>e</sup> Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Science, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Kawasaki city 211-8533, Japan

<sup>f</sup> Department of Biochemistry and Cell Biology, The Center of Molecular Hydrogen Medicine, Institute of Development and Aging Science, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Kawasaki city 211-8533, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 May 2008

Available online 9 June 2008

#### Keywords:

Ischemia–reperfusion injury

Anti-oxidant

Myocardial infarction

H<sub>2</sub>

### ABSTRACT

Inhalation of hydrogen (H<sub>2</sub>) gas has been demonstrated to limit the infarct volume of brain and liver by reducing ischemia–reperfusion injury in rodents. When translated into clinical practice, this therapy must be most frequently applied in the treatment of patients with acute myocardial infarction, since angioplastic recanalization of infarct-related occluded coronary artery is routinely performed. Therefore, we investigate whether H<sub>2</sub> gas confers cardioprotection against ischemia–reperfusion injury in rats. In isolated perfused hearts, H<sub>2</sub> gas enhances the recovery of left ventricular function following anoxia–reoxygenation. Inhaled H<sub>2</sub> gas is rapidly transported and can reach 'at risk' ischemic myocardium before coronary blood flow of the occluded infarct-related artery is reestablished. Inhalation of H<sub>2</sub> gas at combustible levels during ischemia and reperfusion reduces infarct size without altering hemodynamic parameters, thereby preventing deleterious left ventricular remodeling. Thus, inhalation of H<sub>2</sub> gas is promising strategy to alleviate ischemia–reperfusion injury coincident with recanalization of coronary artery.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Acute myocardial infarction is a leading cause of death worldwide. Reduction of infarct size is an important therapeutic goal, since the size of the infarct is directly linked to short-term and long-term morbidity and mortality [1]. The prognosis of acute myocardial infarction has been improved dramatically with the development of highly successful approaches to restore blood flow by primary percutaneous coronary intervention (PCI) to the ischemic tissue [2]. Paradoxically, while coronary reperfusion improves the prognosis of acute myocardial infarction, it also leads to myocardial reperfusion injury by extending myocardial damage within the ischemic period [3]. Studies in animal models of acute myocardial infarction show that reperfusion injury accounts for up to 50% of the final size of a myocardial infarct [4]. Therefore, intervention to alleviate reperfusion injury at the time of coronary recanalization has been considered to be the promising strategy to further

decrease infarct size and improve the prognosis after myocardial infarction.

The accelerated generation of reactive oxygen species (ROS) by reperfusion of the ischemic myocardium is a potential mediator of reperfusion injury [5–7]. Many attempts have been made to inhibit ROS production to limit the extent of reperfusion injury. However, the administration of ROS scavengers at the time of reperfusion has produced conflicting results [8,9]. That can be partially explained by the dual role of ROS in ischemia–reperfused hearts. The majority of detrimental effects associated with lethal reperfusion injury are attributed to hydroxy radical (<sup>•</sup>OH), the most highly reactive oxygen species. By comparison, superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) have less oxidative energy and, paradoxically, are implicated as crucial signaling components in the establishment of favorable tolerance to oxidative stress upon ischemia–reperfusion [10,11]. Consequently, the inhibition of both pathways can be deleterious.

Recently, Ohsawa et al. demonstrated that molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) is a novel anti-oxidant with certain unique properties. (1) H<sub>2</sub> is permeable to cell membranes and can target organelles,

\* Corresponding author. Address: Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. Fax: +81 3 5363 3875.

E-mail address: [msano@sc.itc.keio.ac.jp](mailto:msano@sc.itc.keio.ac.jp) (M. Sano).

including mitochondria and nuclei; (2) H<sub>2</sub> specifically quenches exclusively detrimental ROS, such as <sup>•</sup>OH and peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), while maintaining the metabolic oxidation–reduction reaction and other less potent ROS, such as O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and nitric oxide (NO<sup>•</sup>); (3) inhalation of H<sub>2</sub> gas limits the infarct volume of brain and liver if given at the appropriate time during reperfusion [12,13]. However, clinical application of reperfusion therapy for these organs is limited. When translated into the clinical practice, H<sub>2</sub> gas inhalation therapy must be most frequently applied in the treatment of patients with acute myocardial infarction, since angioplastic recanalization of occluded infarct-related coronary artery is routinely performed.

The aim of this study was to investigate whether inhalation of H<sub>2</sub> gas exerts cardioprotective effects during myocardial ischemia–reperfusion. We showed the inhaled H<sub>2</sub> gas is rapidly transported and can reach even ‘at risk’ ischemic myocardium before coronary blood flow of the occluded infarct-related artery is reestablished. Inhalation of H<sub>2</sub> gas during ischemia and reperfusion significantly reduces infarct size without altering hemodynamic parameters, thereby preventing deleterious left ventricular (LV) remodeling.

## Materials and methods

**Animals.** All experimental procedures and protocols were approved by the Animal Care and Use Committees of the Keio University and conformed to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eight-week-old male Wistar rats were artificially ventilated under anesthesia with ketamine (60 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) given intraperitoneally. Temperature was maintained at 37.5 ± 0.5 °C using a thermostatically controlled heating blanket connected to a thermometer probe placed in the rectum. H<sub>2</sub> gas was administered through a ventilator and the flow volume was controlled by a gas flowmeter TF-1 (YUTAKA Engineering Corporation, Tokyo, Japan). The concentration of H<sub>2</sub> in the gas mixture was determined using the Breath Gas Analyzer Model TGA-2000 (TERAMECS, Kyoto, Japan). Saturation of arterial oxygen level (SaO<sub>2</sub>) was monitored by Clip sensor (PDR-43C) connected to Stand Alone Pulseoxymeter (CANL4255V). A Millar transducer catheter (SPR-320) was placed in the LV cavity via the left internal artery to monitor LV pressure using Polygraph system (NIHON KODEN; PEG-1000).

**Myocardial ischemia–reperfusion model.** Regional myocardial ischemia was induced by transient occlusion of the left anterior descending coronary artery. After 30 min of ischemia, we removed the tube for myocardial reperfusion and closed the thorax with the suture intact. The suture around the coronary artery was retied 24 h after reperfusion and 2% Evans blue dye was injected into the LV cavity to retrospectively delineate the area at risk of myocardial infarction. The heart was removed, washed in phosphate buffered saline, and then sliced into sequential 1 mm thick sections. We stained the sections with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (3%) then measured the infarct (white), non-infarct (red), non-ischemic, (blue), and at risk areas (AAR) (white and red).

**Echocardiography.** Rats were anesthetized by inhalation with 1.5% isoflurane. Animals were anchored to a positionable platform in a supine position. Short axis echocardiography was accomplished with a Vevo 660 system (VisualSonics) with the use of a 600 series real-time microvisualization scanhead probe.

**Measurement of H<sub>2</sub> gas concentration.** H<sub>2</sub> gas concentration was measured in tissues using a needle-type H<sub>2</sub> sensor (Unisense). The electrode current was measured with a picoammeter (Keithley) attached to a strip chart. The negative current obtained from the H<sub>2</sub> sensor was converted to regional H<sub>2</sub> concentration using a

calibration curve generated from known levels of H<sub>2</sub> saturated saline.

**Langendorff-perfusion of the heart.** Hearts were excised quickly from heparinized Wistar male rats (350 g) and perfused with modified Krebs–Henseleit buffer (118 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.75 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/l EDTA, 11 mmol/l glucose, and 5 mmol/l pyruvate) equilibrated with a gas mixture comprised of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Coronary perfusion pressure was maintained at 70 mmHg. A plastic catheter with a latex balloon was inserted into the LV. Before the induction of anoxia, hearts were paced at 5 Hz, and the LV end-diastolic pressure was adjusted to 10 mmHg by filling the balloon with water. Pacing was turned off during anoxia and turn on 10, 20, 30, or 40 min after reoxygenation to measure the recovery of LV function. Indices of LV function [LV systolic pressure, LVSP; LV diastolic pressure, LVDP; LV developed pressure (LVDP = LVSP – LVDP<sub>0</sub>); and LV peak positive and negative dP/dt] were recorded as described previously [14–17].

**Immunohistochemical procedures.** Sample fixation, embedding, sectioning, and blocking were performed as described previously [18]. Briefly, hearts were perfused from the apex with PBS, perfusion-fixed with 4% paraformaldehyde/PBS, dissected, subsequently cryoprotected in sucrose solutions at 4 °C, embedded in OCT compound (Miles Scientific, Naperville, IL), and quickly frozen in liquid nitrogen. The fixed hearts were sectioned (8 μm) using a CM3050S cryostat (Leica, Nussloch, Germany). For immunostaining, sections were blocked in 5% BSA for 30 min at room temperature and stained with anti-8OH-dG (MOG-020P; Japan Institute for the Control of Aging; 1:800) antibodies overnight at 4 °C. Secondary antibodies conjugated Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 1:200) were applied for 1 h at 4 °C. Nuclei were stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes) in a mounting medium. Slides were observed under Fluorescence Microscope (LYMPUS BX-60). The 8-OHdG positive area as percentage of total left ventricles at serial short axis sections was measured by planimetry using ImageJ software from the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

**Statistical analyses.** Values are presented as means ± SEM. Statistical significance was evaluated using the unpaired Student's *t*-tests for comparisons between two mean values. Multiple comparisons between more than three groups were performed using ANOVA. A value of *P* < 0.05 was considered statistically significant.

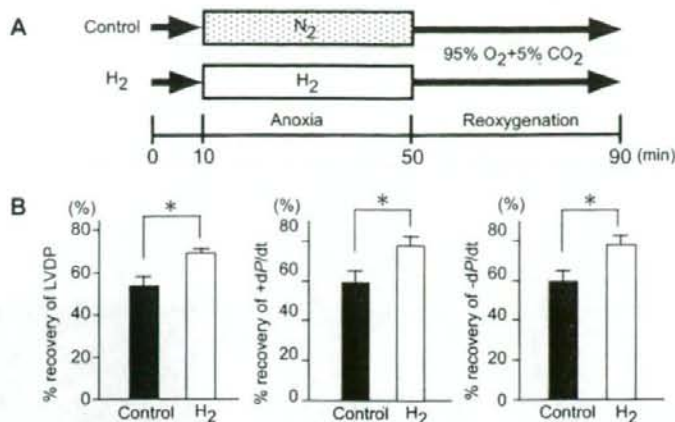
## Results

### H<sub>2</sub> gas improves the recovery of left ventricular function during reoxygenation after anoxia in isolated perfused hearts

We first studied the effect of H<sub>2</sub> gas on the functional recovery after anoxia–reoxygenation in Langendorff-perfused rat hearts. Hearts were subjected to 40 min of anoxic perfusion with buffer equilibrated with either 100% N<sub>2</sub> (Control group) or 100% H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub> group) followed by 40 min of aerobic reperfusion with buffer equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (Fig. 1A). H<sub>2</sub> gas significantly improved the recovery of LV developed pressure (LVDP), positive dP/dt, and negative dP/dt 40 min after reoxygenation (*n* = 10, \**P* < 0.05, compared to control group, Fig. 1B).

### Inhalation of H<sub>2</sub> gas immediately increases the intramyocardial H<sub>2</sub> gas concentration

Before we determined whether inhalation of hydrogen (H<sub>2</sub>) gas confers cardioprotection against ischemia–reperfusion injury, the regional delivery of inhaled H<sub>2</sub> gas was investigated by monitoring the time-course of changes in H<sub>2</sub> levels using a needle-shaped



**Fig. 1.** H<sub>2</sub> gas improves the recovery of left ventricular function during reoxygenation after anoxia in isolated perfused hearts. (A) Experimental protocol of anoxia-reoxygenation. Isolated perfused rat hearts were subjected to 40 min of anoxia with buffer equilibrated with either 100% N<sub>2</sub> (control group) or 100% H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub> group) followed by 40 min of aerobic reperfusion. (B) Comparison of percentage recovery of LVDP and peak positive and negative dP/dt 40 min after reoxygenation between control group and H<sub>2</sub> inhalation group ( $n = 10$ , \* $P < 0.05$ , compared to control group).

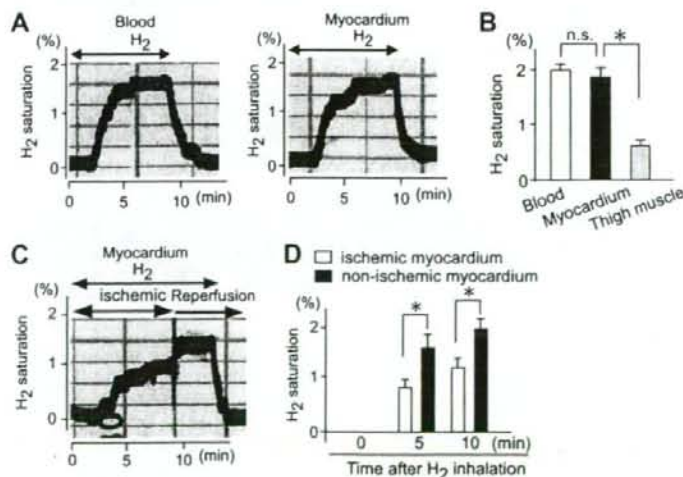
hydrogen sensor electrode inserted directly into the tissues. When 2% H<sub>2</sub> gas was inhaled, the arterial H<sub>2</sub> levels started to increase 2 min after inhalation of H<sub>2</sub> gas and reached a maximum level after 5 min [ $1.82 \pm 0.02\%$  ( $n = 5$ )]. The incremental rate of H<sub>2</sub> saturation for the non-ischemic myocardium was similar to that observed in arterial blood with attaining a maximum of  $1.73 \pm 0.02\%$  ( $n = 5$ ) (Fig. 2A). By contrast, the rate of increase in the H<sub>2</sub> saturation was slower in the center of the thigh muscle with attaining a maximum level of  $0.50 \pm 0.03\%$  ( $n = 5$ ) after 30 min (Fig. 2B and Supplementary Fig.).

Of note, H<sub>2</sub> gas levels were increased even in the ischemic myocardium (Fig. 2C). Although the incremental rate of H<sub>2</sub> saturation was slower in the ischemic myocardium than in the non-ischemic myocardium, the peak level of H<sub>2</sub> in the ischemic myocardium was reached at approximately two thirds of the value observed in the

non-ischemic myocardium (Fig. 2D). After restoration of coronary artery blood flow, the level of H<sub>2</sub> in the ischemic myocardium immediately increased to the level observed in the non-ischemic myocardium.

#### Inhalation of H<sub>2</sub> gas protects the heart from ischemia-reperfusion injury

To investigate whether inhalation of H<sub>2</sub> gas protects the heart from ischemia-reperfusion injury, rats were subjected to coronary artery occlusion for 30 min followed by reperfusion for 24 h. H<sub>2</sub> gas was administered at the onset of ischemia and continued for 60 min after reperfusion. H<sub>2</sub> gas has no adverse effect on heart rate and arterial oxygenation (Fig. 3A). There was no significant difference in the temporal profile of LV end-systolic



**Fig. 2.** Inhalation of H<sub>2</sub> gas increases the intramyocardial H<sub>2</sub> gas concentration. H<sub>2</sub> gas at 2% was administered by respiration to intubated rats receiving mechanical ventilation and the concentration of H<sub>2</sub> in tissue was recorded continuously. (A) A needle-type H<sub>2</sub> sensor was inserted in LV cavity (arterial blood) and non-ischemic LV myocardium. (B) Comparison of peak H<sub>2</sub> gas levels between arterial blood, non-ischemic LV myocardium, and thigh muscle ( $n = 5$ , \* $P < 0.05$ , compared to the level of arterial blood). (C) The changes in the concentration of H<sub>2</sub> in 'at risk' area for infarction during ischemia and reperfusion. (D) Comparison of change in the H<sub>2</sub> concentration between non-ischemic and ischemic myocardium after H<sub>2</sub> inhalation ( $n = 5$ , \* $P < 0.05$ , compared to the level of non-ischemic myocardium).