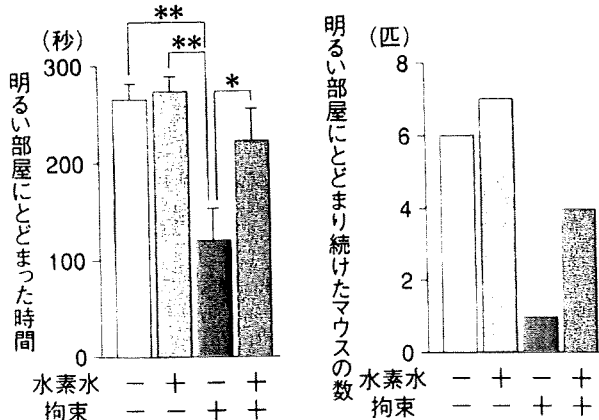


## 今後の課題と将来性

炎症、激しい運動、心筋梗塞、血流の停止や臓器移植などのさまざまな状況により、急性の酸化ストレスが引き起こされる。H<sub>2</sub>がOHを除去することで、強い酸化ストレスから細胞と組織を防御することが示唆された。しかしながら、細胞内においてH<sub>2</sub>がOH以外の強い酸化力をもつ物質を直接的あるいは間接的に還元することで酸化ストレスから細胞を防御している可能性も否定できない。別の考えとしては、H<sub>2</sub>が細胞保護因子を誘導するかもしれないし、H<sub>2</sub>の効果はすべてOHの消去だけで説明できるかもしれない。現在は、H<sub>2</sub>が多岐にわたる生体に及ぼす効果のメカニズムを解明しようと研究を進めている。当初予測していた濃度よりもはるかに低い濃度の水素水を飲んだ効果も明らかにされつつあるので、全く新しい概念で水素分子の効果を考え直さなければならないかもしれない。今後の研究により、H<sub>2</sub>がどのような機構で酸化ストレスから細胞と組織を防御しているのかがより明確になるであろう。

図9 身体的拘束したマウスの記憶力の低下の抑制効果

6週間身体的拘束し、水素水あるいは対照水を飲ませた[拘束あり(+)、拘束なし(-)、水素水(+)、対照水(-)]。記憶力は、受動的回避試験にて判定した。原理は、マウスは明るい部屋に入れると本能に従って暗い部屋に速やかに移動する。しかし、暗い部屋に入ると電気ショックを与える。1日後に明るい部屋に入ると、電気ショックの記憶が残っていると本能に逆らって明るい部屋にとどまろうとする。明るい部屋に長くともまればとどまるほど、記憶力が残っていると判定する。身体的拘束により記憶力が低下するが、水素水を飲んでると記憶力低下が抑制されることがわかる。



(Nagata, et al.: Neuropsychopharmacol, 2008. より改変)

興味深いことには最近CO (一酸化炭素) やH<sub>2</sub>S (硫化水素) のような毒性の強いガスが抗酸化物質として注目されている<sup>30, 31</sup>。このような毒ガスは微量でしか使えないので、微量でもその効果を発揮する分子機構の解明が注目される。H<sub>2</sub>の効果と共通する機構があるのかもしれない。

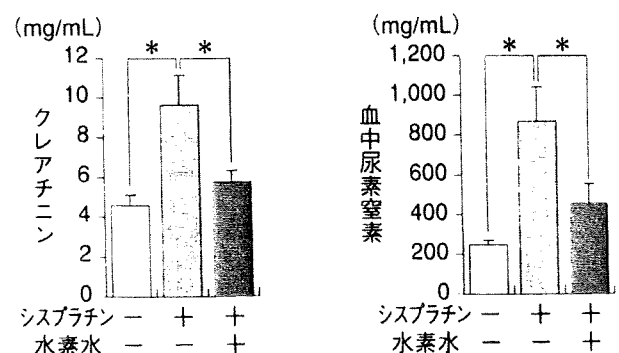
現在、筆者たちは、急性の酸化ストレスに対して水素ガスを吸引させる治療法を確立したいと研究を進めている。また、生活習慣病や老年病に対してはモデル動物を用いて水素水の飲用による予防効果について検討している。そのためには、老化促進モデルが必要である。最近、筆者らは老化促進モデルマウスを作製した<sup>32</sup>。このマウスに水素水を飲ませてどのような効果が発揮されるか研究を進めている。

水素ガスは4.7%以上の濃度にならないと火もつかない。水素には気泡になりにくい性質があるので、水素ガスの吸引はすでに深海へのダイバーの潜水病予防に利用されており、高い安全性が示されている<sup>33-35</sup>。

わが国では、水素分子を食品内に用いることが

図10 水素水の自然摂取による抗癌剤(シスプラチン)の副作用の抑制効果

マウスにシスプラチン(十と一)を投与し、水素水を飲ませ続けた(十と一)。シスプラチンの副作用として腎障害が認められたが、水素水の飲用は腎障害を抑制した。腎機能の指標として、クレアチンと血中尿素窒素を測定した。\*p<0.05。



1995年に認可されている。また、2004年には水素水の販売がすでに認可されている。現在の研究段階は動物実験が中心で、効果効能を謳える段階には達していないが、飲用水として水素水を販売することについては何ら問題がない。実際に研究段階を待たずに飲用水として普及する可能性もある。水素分子が医学的に明らかにされた新しい概念の抗酸化物質として治療や予防に実際に応用されることを期待したい。

現在、水素ガス、水素生食、水素水の効果に関して、臨床試験が展開されようとしており、水素分子の効果により明確に謳えることが期待される。

最後に、「電解還元水」、「活性水素水」、「飲む水素」、「マイナス水素イオン」などの健康飲料あるい

は健康サプリメントと称する類とは、本研究ならびに本稿は、全くの無関係であることを明記する。特に、活性水素（原子状H）やマイナス水素イオン（H<sup>-</sup>）は水溶液中には存在しえないものであり、非科学的なものである。また、ペットボトルからは水素分子は抜け出てしまうので、ペットボトルに入った「水素水」と称する商品には水素分子は含まれていない。

#### 利益相反開示

筆者は、㈱ブルー・マーキュリー（本社、東京都中央区）の科学顧問であり、当社からの受託研究を行っている。また、当社の寄付により、筆者の所属する研究所には、2008年4月に寄付研究センターが設置された。

#### 文献

- 1) Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007; 13: 688-694.
- 2) Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S: Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacol* 2009; 34: 501-508. [Epub 2008 Jun 18]
- 3) Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344.
- 4) Balaban RS, Nemetz S, Finkel T: Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483-495.
- 5) Wallace DC: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, ageing, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.
- 6) Bedard K, Krause KH: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
- 7) Halliwell B, Gutteridge JMC: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992; 307: 108-112.
- 8) Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* 2003; 278: 3170-3175.
- 9) Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG: Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 722-728.
- 10) Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J: Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11: 173-186.
- 11) Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T: Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 2005; 97: 967-974.
- 12) Murad F: Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 2004; 24: 452-474.
- 13) Winterbourn CC: Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicol* 2002; 181: 223-227.
- 14) Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J: Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; 392: 559.
- 15) Naidu KA: Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003; 2: 7.
- 16) Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C: Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2007; 297: 842-857.
- 17) Sheu SS, Nauduri D, Anders MW: Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1762: 256-265.
- 18) Cai J, Kang Z, Liu WW, Qiang S, Zhang JH, Ohta S, et al: Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett* 2008; 441(2): 167-172.
- 19) Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S: Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 670-674.
- 20) Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki

- K, Kimura K, et al: Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 30–35. [Epub 2008 Jun 9]
- 21) Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Nakao A, et al.: Hydrogen Inhalation Ameliorates Oxidative Stress in Transplantation Induced Intestinal Graft Injury. *Am J Transplant*. 2008; 8: 2015–2024.
- 22) Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Sun X, et al.: Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res* 2008; Nov 27. [Epub ahead of print]
- 23) Mao Y-F, Zheng X-F, Cai J-M, You X-M, Deng X-M, Sun X-J, et al.: Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. Epub 2009 Feb. 27.
- 24) Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S: Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 377:1195–1198. [Epub 2008 Nov 6]
- 25) Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K: Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334: 115–124.
- 26) Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, and Ohta S: Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; Jan 16. [Epub ahead of print]
- 27) Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Ohno K, et al.: Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009; Feb 12. [Epub ahead of print]
- 28) Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, Ishigami A, et al.: Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375: 346–350. [Epub 2008 Aug 14]
- 29) Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, et al.: Supplementaion of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 2008; 28: 137–142.
- 30) Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, et al.: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 15560–15565.
- 31) Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R: Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med* 2008; 34: 649–658.
- 32) Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S: Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial ALDH2 activity. *J Neurosci* 2008; 28: 6239–6249.
- 33) Fontanari P, Badier M, Guillot C, Tomei C, Burnet H, Gardette B, et al.: Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive. *Eur J Appl Physiol* 2000; 81: 325–328.
- 34) Lillo RS, Parker EC: Mixed-gas model for predicting decompression sickness in rats. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2107–2116.
- 35) Lillo RS, Parker EC, Porter WR: Decompression comparison of helium and hydrogen in rats. *J Appl Physiol* 1997; 82: 892–901.

## 5 酸化ストレスと 心筋老化

さ の もとあき  
■佐野 元昭  
慶應義塾大学医学部再生医学教室



佐野 元昭  
1994年慶應義塾大学医学部卒業。  
慶應義塾大学医学部内科助手（呼  
吸循環器内科）で臨床研修し2000  
年から05年まで米国Baylor医科大  
学循環器内科に留学。帰国後慶應  
義塾大学医学部再生医学教室講  
師。06年から独立行政法人科学技  
術振興機構さきがけタイプ（代謝  
と機能制御）兼任。研究テーマは  
分子循環器病学、内分泌代謝学、  
生化学。趣味はマラソン、テニス。

Key words : 老化, 酸化ストレス, グルタチオン,  
アルデヒド, ホルメシス

### Abstract

「加齢」は心機能低下の独立した危険因子である。心筋細胞はミトコンドリアでの酸化的リン酸化によって大量のエネルギーを産生し、生涯収縮・弛緩を活発に繰り返している。その過程で不可避免的に大量に産生される活性酸素が心筋細胞老化の原因となっている。高度な機能を獲得した心筋細胞は細胞周期から逸脱し、細胞分裂によって細胞内環境を浄化することができない。したがって、酸化ストレスによる傷は加齢とともに蓄積し、細胞機能の低下と細胞死を引き起こす。心筋細胞の酸化ストレス応答と老化の分子機構について概説する。

### はじめに

加齢とともに心臓の機能は低下する。心筋細胞の脱落、肥大、細胞外マトリックスの蓄積は、心筋収縮力、心拍数を低下させる。心臓を構成する心筋細胞の総数は加齢とともに減少する。成熟したおとなの心筋細胞は終末分化した細胞であり、多核化するが細胞分裂は起こらない。最近、少なくとも齧歯類においては 2<sup>nd</sup> heart field 由来 (islet-陽性) や心臓神経堤由来 (nestin-陽性) の幹細胞が心筋内に局

在しその一部が生後の成長過程で心筋細胞へと分化する現象が確認されている。しかし、心臓に局在する幹細胞は生後著明に数が減少してゆき、成獣（あるいは成人）の心臓においては、量的にも機能的にも心筋細胞の再生や障害修復過程に積極的に寄与するほどの能力は持っていない。したがって、加齢に伴う心筋細胞の減少は、残存心筋細胞の肥大と間質への細胞外マトリックスの蓄積で代償され、残存心筋細胞の力学的負担は増加の一途をたどる。

心筋老化は個々の心筋細胞の老化に基づく。非心筋細胞、特に血管細胞、線維芽細胞、神経細胞の老化とそれに基づく心筋細胞と非心筋細胞間のクロストークの障害、細胞外マトリックスの蓄積も心筋老化に関与してくる。ここでは、心筋細胞老化に焦点をあてて話をすすめていく。

「心筋細胞老化とは何か？」分裂能力のない心筋細胞の老化は複製老化では説明できない。心筋細胞老化は細胞内ホメオスタシス維持機構の低下を伴う現象である。

*Oxidative stress and cardiomyocyte senescence* : Motoaki Sano,  
Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine.

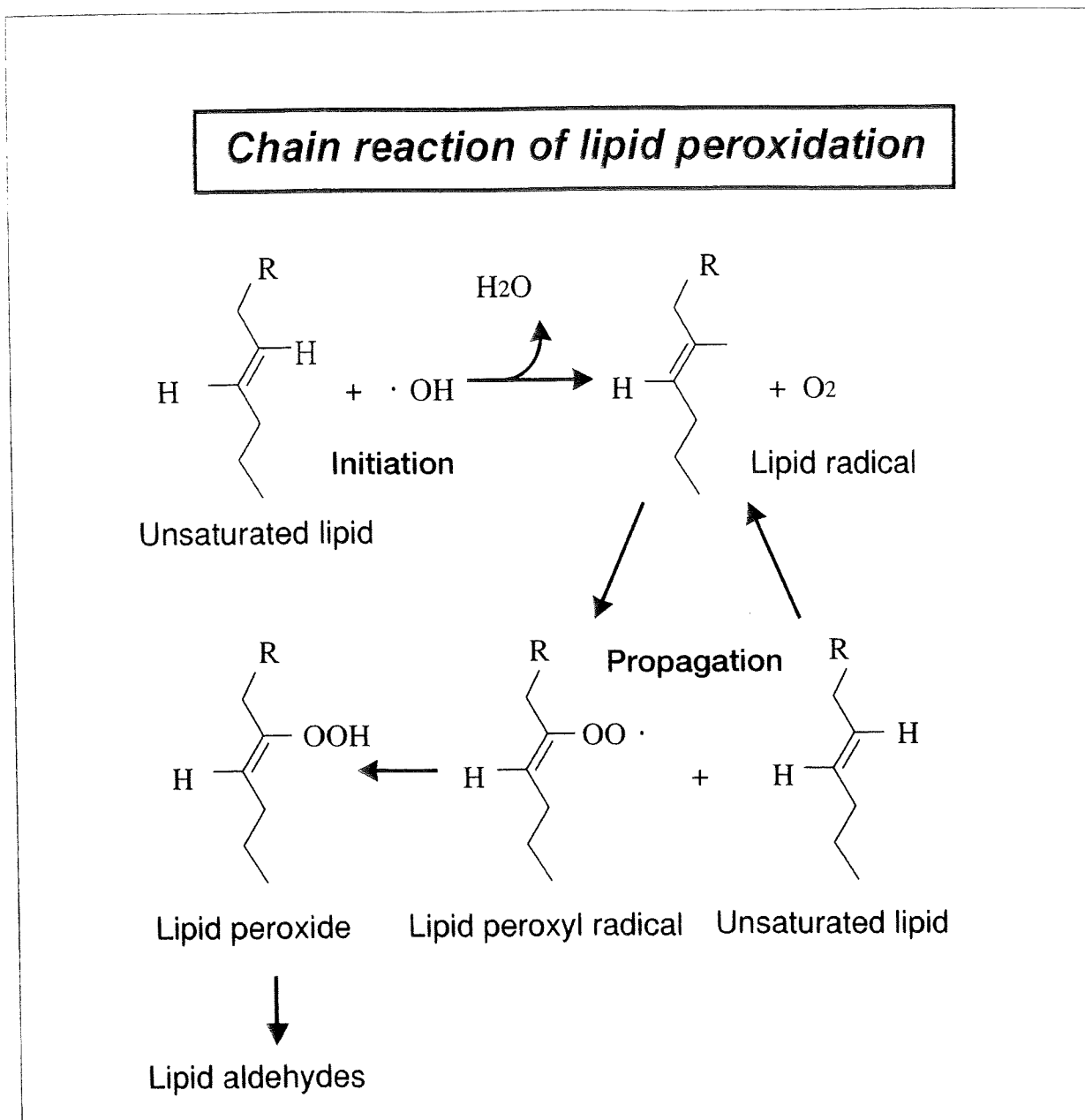


図1 連鎖的脂質過酸化反応

1. ミトコンドリアから放出される  
活性酸素が老化の原因である

老化の原因として鍵を握るのは活性酸素である。スーパーオキシド  $\text{O}_2\cdot$  は NAD(P)H

oxidase をはじめとする様々なoxidase酵素反応に付随しても生じるが、主要な  $\text{O}_2\cdot$  の発生源は何といてもミトコンドリア呼吸鎖である。私たちが呼吸で取り込む酸素 ( $\text{O}_2$ ) は、ミトコンドリア呼吸鎖の働きでエネルギー合成に使用されて  $\text{H}_2\text{O}$  に変換されるが、1-5%の

$O_2$  はミトコンドリア呼吸鎖の途中でリークした電子と反応して  $O_2\cdot^-$  になる。特に、心筋細胞はミトコンドリアが豊富に存在し細胞容積の 1/3 をミトコンドリアが占めているため相当量の  $O_2\cdot^-$  が常時作られていることになる。この  $O_2\cdot^-$  は superoxide dismutase (SOD)-2 の作用で過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に代謝される。 $H_2O_2$  はさらに glutathione peroxidase (GPX) で水 ( $H_2O$ ) に変換される。 $H_2O_2$  は  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$  の存在下では Fenton 反応を起こしてヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) を発生する。 $\cdot OH$  は非常に酸化力が強く、DNA, 蛋白質, 脂質などの生体内高分子を酸化する。生体内には  $\cdot OH$  を直接還元する酵素は存在しない。 $\cdot OH$  の攻撃によってミトコンドリア DNA に傷が蓄積されていくと正常な呼吸鎖酵素が出来なくなり、活性酸素が高頻度に発生しやすくなる。 $\cdot OH$  が生体膜脂質の高価不飽和脂肪酸を攻撃すると脂質ラジカルが生じ、この脂質ラジカル ( $L\cdot$ ) が、酸素分子 ( $O_2$ ) と反応して脂質ペルオキシラジカル ( $LOO\cdot$ ) となり、他の脂質 (LH) と反応して、過酸化脂質 ( $LOOH$ ) と新たな脂質ラジカル ( $L\cdot$ ) が生成される反応が、連鎖的に繰り返され障害が増幅される (ラジカル連鎖反応) (図 1)。心筋細胞に豊富に存在する GPX4 (phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase) は、還元型 Glutathione (GSH) を使って脂質ヒドロペルオキシドを直接還元して消去できる唯一の酵素である。さらに、過酸化脂質が分解すると 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) などの脂肪族アルデヒドが産生される。脂肪族アルデヒドは反応性が高く、蛋白質と付加体を形成してその機能を障害する。また、脂肪族アルデヒドは前駆体である活性酸素と比べて比較的安定で細胞内を長距離移動可能であるため、酸

化ストレス障害の主要な実行分子として作用している可能性が示唆されている。生体はこの有害な脂肪族アルデヒドを消去させるために、aldehyde dehydrogenase (ALDH), aldoketoreductase, glutathione s-transferase (GST) などの酵素を備えている。

このように酸素を使ってエネルギーを合成していることが老化の主要な原因ということになる。活性酸素を除去する酵素が十分に働いていれば問題ないのだが、加齢とともに酸化酵素の発現量や活性は低下していき、残念ながら活性酸素による障害は加齢とともに蓄積してくる。DNA, タンパク質, 脂質の酸化的障害が蓄積して心筋細胞の機能は低下し細胞死を起こしていく。加齢した心筋細胞に認められる lipofuscin は酸化された蛋白質や脂質が凝集したものである。老化した心筋細胞にはミトコンドリア DNA に変異を持つ巨大なミトコンドリアもしばしば観察されるが、これらの異常なミトコンドリアからはさらに多くの活性酸素が発生して心筋細胞の老化を加速させている。

心筋梗塞後の死亡率を比べたとき、70 歳以上の高齢者では、60 歳未満の若年者の 6 倍以上高い。動物実験レベルでも Langendorff 摘出灌流心を用いた実験で加齢心では虚血再灌流障害に対する抵抗性が減弱していることが報告されている。

## 2. ホルメシス効果

生体は、活性酸素やアルデヒドをシグナル伝達物質として利用することによって、酸化ストレス防御機構を活性化させ、その後にくより強い酸化ストレスに対して抵抗性を獲

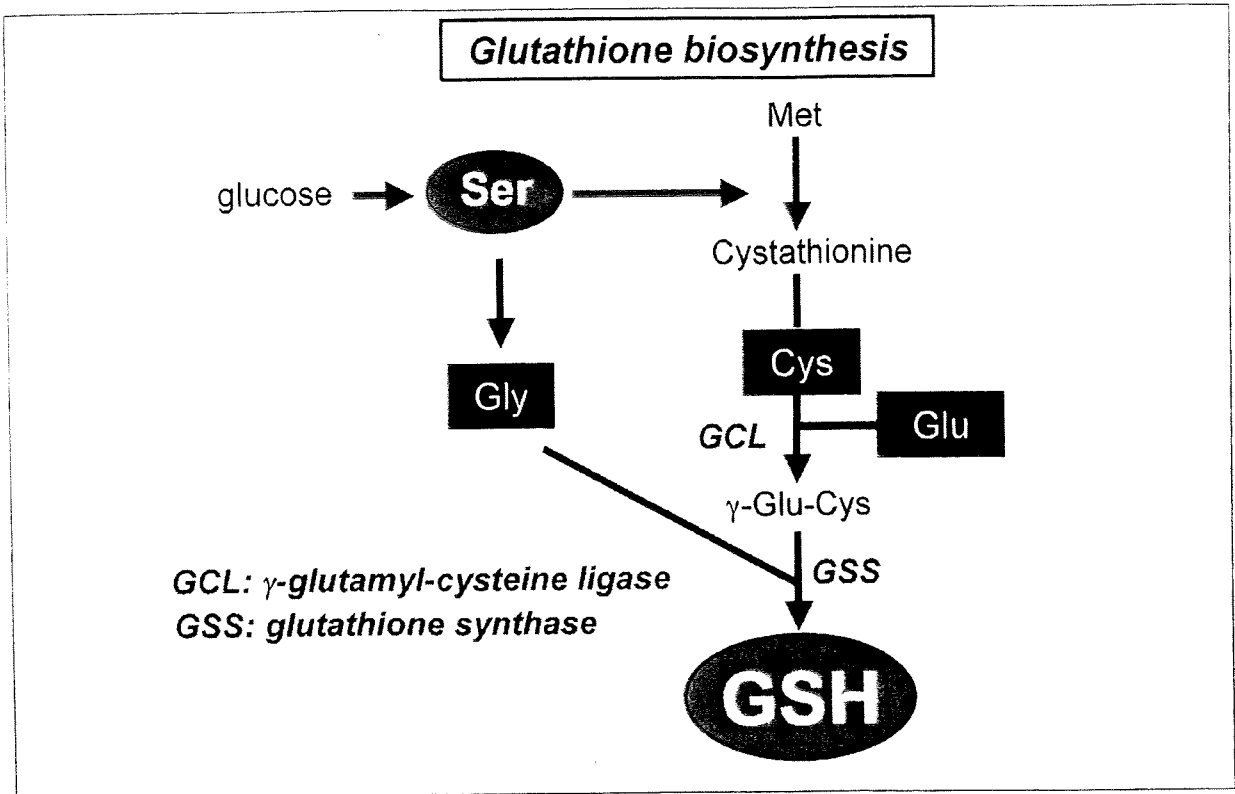


図2 グルタチオン生合成経路

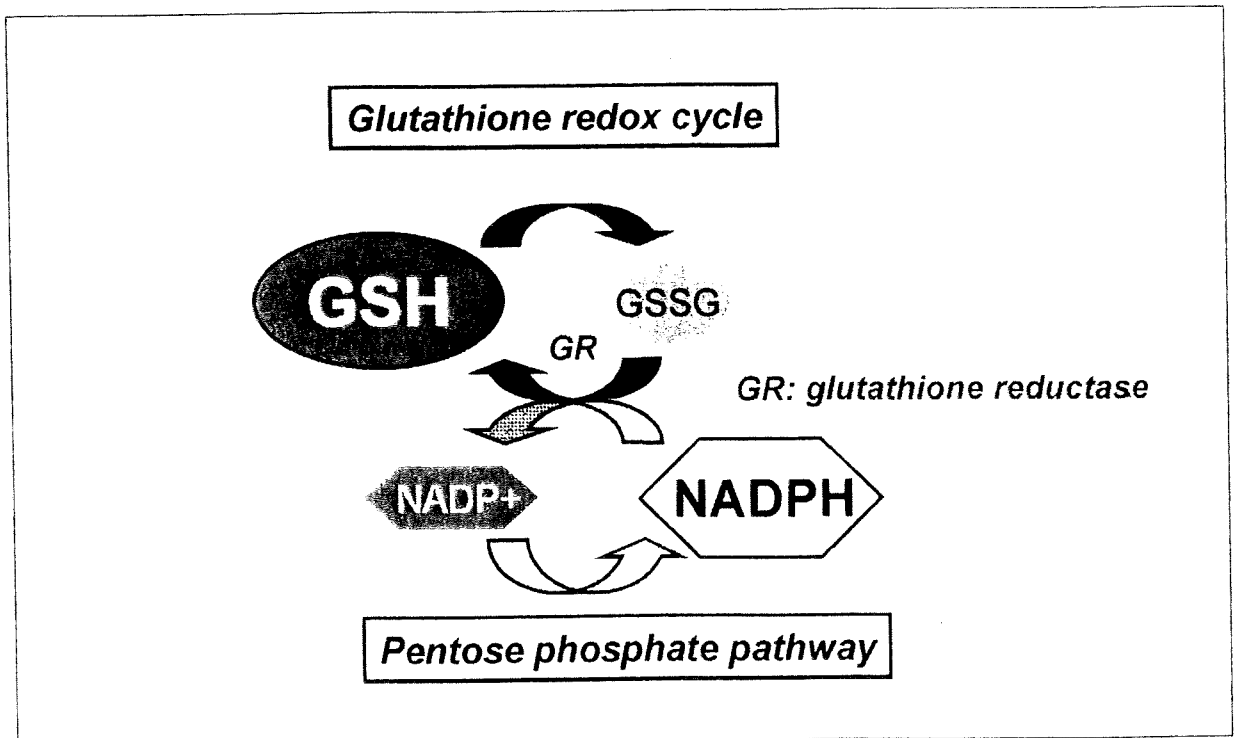


図3 グルタチオン・レドックスサイクル

得した臓器や固体に変化していく適応能力をもっている。このように大量では生体にとって有害な作用をもたらす物質が、少量では内因性ストレス応答機構を活性化させて生体にとって有益な作用をもたらす現象をホルメシス効果と呼ぶ。たとえば、培養心筋細胞をあらかじめ非致死量の 4-HNE で刺激しておくことで致死量の 4-HNE に対して抵抗性をしめすようになる。臨床的にもホルメシス効果は観察される。心臓は予め短い虚血刺激を経験すると、その後続く長時間の虚血再灌流障害に対して抵抗性を獲得する現象が知られている。この現象は「preconditioning」と呼ばれているがこれも一種のホルメシス効果である。

加齢とともにホルメシス効果に基づく内因性ストレス応答機構の活性化も減弱する。preconditioning 効果が加齢した心臓では低下していることが実験動物で示されている。臨床的に若年者では48時間以内に狭心症の発作があった患者の方が狭心症の発作がなかった患者よりもその後の心筋梗塞発作後の心筋壊死範囲が小さく院内死亡率や心不全の罹患率も低いことが知られている。高齢者ではこの preconditioning 効果が消失している。

### 3. Glutathione

Glutathione (GSH) は L-glutamate, L-cysteine, L-glycine の3つのアミノ酸からなる。生体内における GSH 合成は、 $\gamma$ -glutamyl-cysteine ligase と GSH synthetase の2つの酵素によって L-glutamate, L-cysteine, L-glycine から合成される。各臓器における GSH 合成速度は、 $\gamma$ -glutamyl-cysteine ligase の活性と前駆体アミノ酸とくに L-cysteine の供給量によって規定さ

れている (図2)。

GSH は細胞内における主要な還元物質である。また GPX の基質として働き過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) や過酸化脂質を還元して無毒化する。その結果、還元型 Glutathione (GSH) は酸化型 Glutathione (GSSG) になるが NADPH を補酵素とする glutathione reductase の働きで還元型 Glutathione (GSH) に戻され再利用されている (glutathione redox cycle) (図3)。

虚血再灌流によって細胞内 GSH 濃度は減少する。虚血再灌流前に GSH 合成の前駆体である N-acetylcysteine (NAC) や  $\gamma$ -glutamyl-cysteine ethyl ester を投与して細胞内 GSH 含量を増加させておくと虚血再灌流障害に伴う心筋障害が軽減する。反対に、GSH 合成阻害剤 Buthionine-sulfoximine (BSO) によって細胞内 GSH 含量を低下させておくと虚血再灌流障害に伴う心筋障害が増悪する。このように心筋細胞内 GSH 含量は酸化ストレスに対する忍容性を規定している。

### 4. 酸化ストレス応答としての心筋代謝リモデリング

持続的な酸化ストレスに対して心筋はどのように適応するのか? この疑問に答えるために我々は酸化ストレス実行分子のひとつであるアルデヒドの代謝を心筋で障害したトランスジェニックマウスを作製した。アルデヒドの蓄積は、虚血性心疾患、慢性心不全、加齢した心臓、動脈硬化巣、アルツハイマー病患者の脳で観察される。実際に脳においてアルデヒドの代謝を障害すると加齢に伴う神経細胞へのアルデヒドの蓄積が加速化して、海馬や大脳皮質錐体細胞が細胞死をおこし脱落し



ていく。マウスは記憶力低下などのアルツハイマー病様の病態を呈した。

心臓でアルデヒドの代謝を障害させても予想に反して心筋収縮機能は維持され続けた。どうやら心臓は脳よりもアルデヒド蓄積に対してより耐性であることが分かった。さらに驚いたことに虚血再灌流障害後の機能回復が野生型マウスと比べて早く心筋障害も軽度に抑えられることがわかった。

この一見矛盾する現象はアルデヒドによるホルメシス効果によって説明できる。詳細は割愛するが、遺伝子発現や代謝産物を網羅的に解析した結果、アルデヒドに慢性的に暴露されたマウスの心臓では細胞内 GSH 含量を高く維持できるように代謝経路のリモデリングがおきていることが分かった。第一に GSH の前駆体アミノ酸の合成経路や細胞外からの取り込みが亢進していた。第二に、グルコース代謝が活性化され、解糖系からペントースリン酸経路への代謝流速が増加していた。ペントースリン酸経路の活性化によって NADPH の供給が亢進 glutathione reductase による触媒される酸化型 Glutathione (GSSG) から還元型 Glutathione (GSH) へのリサイクルが

活性化されていると考えられる。以上の実験結果から心筋細胞は持続的な酸化ストレスに暴露された場合、アルデヒドの細胞内濃度の上昇を感知して、代謝経路のリモデリングを引き起こし細胞内 GSH 量が高く維持するストレス応答機構を内因性に持っていることが分かった。

### おわりに

酸素を使ってエネルギーを合成していることが活性酸素を作り出し老化の主要な原因になっている。心筋細胞はさまざまな抗酸化機構を駆使して酸化ストレスを軽減するよう努力しているが、加齢とともにこのストレス応答機構は低下し心機能は低下していく。心臓は脂質の過酸化反応の終末代謝産物であるアルデヒドを感知して酸化ストレスに強い表現型へと代謝経路をリモデリングさせる能力を持っている。このストレス応答のメカニズムを標的にした治療は心臓のアンチエイジングに有効であると考えられる。

# 心筋ミトコンドリアの酸化的障害に対する代謝応答

Metabolic response to mitochondrial stress



佐野元昭

Motoaki SANO

慶應義塾大学医学部再生医学教室

◎高齢者では“ストレス応答の低下”から心不全を患う頻度が高い。したがって、心筋のストレス応答機構の解明は心不全の治療法や予防法の開発、アンチエイジングを考えていくうえできわめて重要である。ミトコンドリアの酸化的障害は老化に伴う心機能障害の鍵を握っている。著者らは最近、ミトコンドリアの酸化的障害に対してエネルギー代謝経路を変化させて還元物質グルタチオンの生合成を活性化することで恒常性を維持する心筋代謝応答機構を明らかにした<sup>1)</sup>。この分子機序は、活性酸素による脂質過酸化反応の終末代謝産物であるアルデヒドがシグナル伝達因子として働き、eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )リン酸化シグナルを活性化することに基づく。

**Key word** : 心筋ミトコンドリア, ホルミシス, アルデヒド, eIF2 $\alpha$ , グルタチオン, メタボローム, フラクソーム

われわれは心理的重圧や精神的動揺、過度の肉体的負担などのストレスにさらされて生活している。過度なストレスは病気を引き起こし、ときには死につながることもある。慢性的な強いストレスは動脈硬化病変の形成を加速させ、そこに急性の強いストレスが加わるとプラークが破裂して心筋梗塞を発症し、心室細動や心室破裂により突然死を起こす。しかし、反対に適度なストレスは健康を促進することも知られている。日常的に適度なストレスを受けていたほうがいざというときに病気になりにくく、重症化しにくい。これは適度のストレスが、内因性のストレス応答機構を誘導して生存に有利に働くための分子や代謝経路を選択的に活性化するためである。このように過剰であれば生物に対して有害な作用を示すものが、微量であれば逆に生体にとって好ましい反応を示す場合、この生理的刺激作用をホルミシスという(図1)。ホルミシス(「サイドメモ1」参照)は臓器保護効果や寿命延長効果と密接にかかわっている<sup>2)</sup>。

アメリカにおける一般住民を対象としたコホート研究である Framingham Heart Study において、

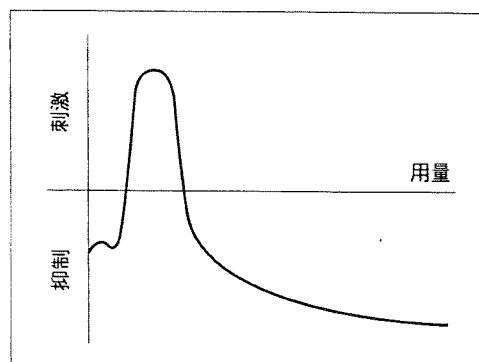


図1 ホルミシス

過剰であれば生物に対して有害な作用を示すものが、微量であれば逆に生体にとって好ましい反応を示す場合がある。この用量反応曲線のこと、あるいは生理的刺激作用を指してホルミシスという。

サイド  
メモ  
1

## ホルミシス

ホルミシス(hormesis)という言葉の語源はギリシャ語の「刺激する "normaen"」に由来する "hormo" で、ホルモンという語も "hormo" から造語された用語である。

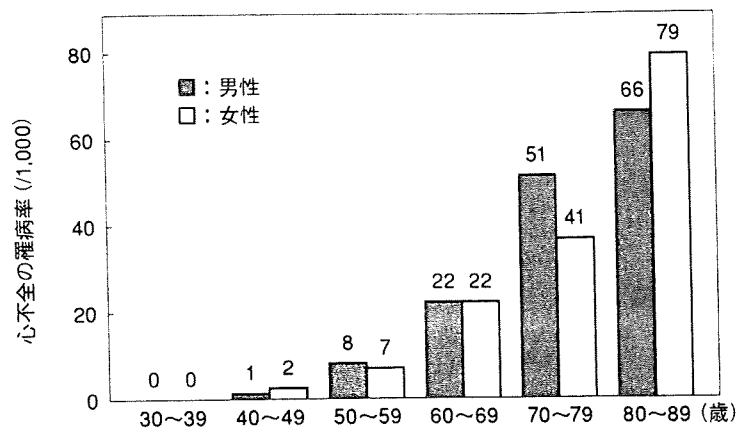


図 2 高齢者では心不全罹病率が増加する<sup>8)</sup>  
 アメリカにおける一般住民を対象としたコホート研究である Framingham Heart Study において、50 歳代、60 歳代、70 歳代と高齢になるほど、慢性心不全の罹病率が高いことが報告されている。

50 歳代、60 歳代、70 歳代と高齢になるほど、慢性心不全の罹病率が高いことが報告されている (図 2)。ミトコンドリアの酸化的障害は、老化に伴う心不全発症の鍵を握っている。高齢者では、心筋細胞のストレス応答(ストレスに対して内因性防御機構を活性化してストレスに対抗する能力)が低下している。したがって心筋ミトコンドリアの酸化的障害に対するストレス応答機構の解明は、心不全の治療法や予防法の開発やアンチエイジング(抗加齢医療)を考えていくうえできわめて重要である。

ミトコンドリアの酸化的障害、すなわち過剰な活性酸素の産生、脂質過酸化、酸化的 DNA 障害は心臓の病的リモデリングを促進することがさまざまな心疾患モデル動物で示されてきた。これまでの心臓保護・抗老化戦略はミトコンドリアの活性酸素を除去することに主眼がおかれてきた。しかし臨床試験ではビタミン E などの抗酸化剤が心不全の予後を改善させる、あるいはアンチエイジングに有効という結果は得られていない。この矛盾は、活性酸素のもつ二面性によって説明される。活性酸素は 100% 悪者ではなく、シグナル伝達分子として働いて抗酸化ストレス応答機構を活性化させる作用ももつためと考えられる。このような考察に基づいて著者らはミトコンドリアから産生される活性酸素のよい面(ストレス応答機構の誘導による心保護作用)に注目して新しい視点

から酸化ストレスに対峙する治療法の確立をめざして研究を進めてきた<sup>3,4)</sup>。

### アルデヒドはミトコンドリアからの SOS 危険信号か

過剰な活性酸素種に曝露され、障害されたミトコンドリアから何らかの SOS 危険信号を核に伝える (mitochondrial retrograde signaling) ためには、セカンドメッセンジャーが必要である。著者らは、活性酸素種による脂質過酸化反応の終末代謝産物であるアルデヒドに着目した。アルデヒドはミトコンドリアから産生される活性酸素に端を発する脂質過酸化反応によって産生され、心不全患者<sup>5)</sup>や高齢者の心臓でアルデヒドの蓄積が増加していることが病理組織学的に確認されている。また培養細胞においてアルデヒドは高用量では細胞障害性に働くが低用量ではシグナル伝達因子として働き、内因性ストレス応答機構を誘導する作用をもつことが知られている。

### ミトコンドリア酸化ストレスマウス

#### —ALDH2\*2トランスジェニックマウス

アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) (「サイドメモ 2」参照) はミトコンドリアでのアルデヒドの無毒化において中心的な役割を果たす (図 3)。この ALDH2 には ALDH2\*2 とよばれる遺伝子多型が存在する。ALDH2\*2 は野生型の ALDH2 (ALDH2

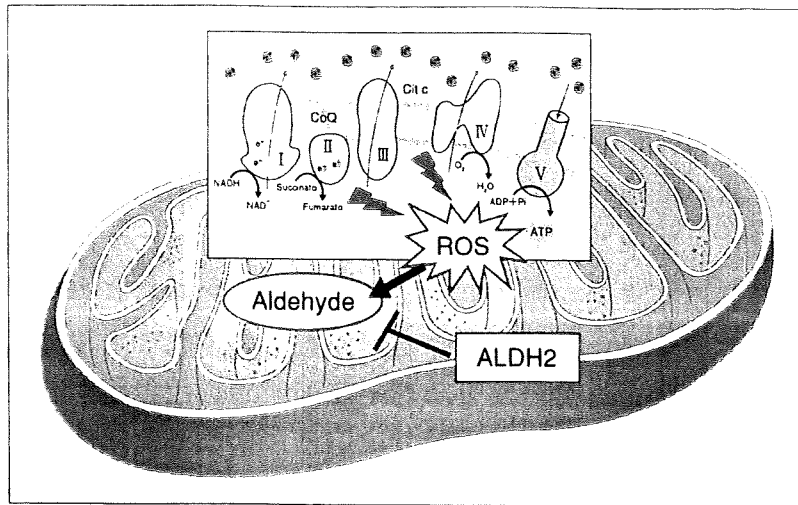


図 3 ALDH2はミトコンドリアの抗酸化酵素

活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)による脂質ラジカル連鎖反応で過酸化脂質ができる。過酸化脂質は非酵素的に分解され、4-ヒドロキシノネールに代表されるアルデヒドができる。

\*1)に対して優性抑制型に作用する。このALDH2  
\*2)を心筋に過剰発現させたマウスを作製した。このトランスジェニックマウスでは心筋ミトコンドリアにアルデヒドが集積し、マトリックスが酸化状態に傾いて呼吸機能も低下し、構造上もミトコンドリアの障害が明らかであった(図4)。

しかし、心筋線維化や細胞死の増加もなく心収縮機能も生後2年まで野生型と同レベルに維持さ

れていた(図5)。さらに注目すべき点は、このトランスジェニックマウスはミトコンドリアに酸化ストレス障害が存在しているにもかかわらず、虚血再灌流障害に対して野生型の心臓よりも抵抗性を示した(図6)。

### ☂ ミトコンドリア酸化ストレスは eIF2 $\alpha$ リン酸化シグナルを活性化する

この一見矛盾するような現象は、ミトコンドリア酸化ストレス下においてミトコンドリア由来のアルデヒドがセカンドメッセンジャーとして働き、ストレス応答機構を刺激して、臓器保護効果を発揮している、すなわち、ホルミシスで説明できる。著者らは、ミトコンドリアで過剰に産生されるアルデヒドが eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )リン酸化シグナルを活性化し続けていることでこのホルミシスが維持されていることを見出した(図7)。

eIF2 $\alpha$ リン酸化シグナルは酵母から哺乳類の細胞まで種を超えて存在しているストレス応答シグナルで、哺乳類の細胞では酸化ストレス、小胞体ストレス、アミノ酸飢餓ウイルス感染など多彩なストレスシグナルがすべて eIF2 $\alpha$ のリン酸化に集約され、引き金となったストレス源を軽減する方向に作用することから integrated stress response

#### サイドメモ2

#### ALDH2

ALDH2は、肝におけるアルコール代謝で有名な酵素である。飲酒後体内でエタノールから代謝されたアセトアルデヒドはALDH2で酢酸に代謝される。アジア人にはALDH2の遺伝子多型ALDH2\*2が存在する。この遺伝子多型をヘテロでもつヒトはお酒が弱く、ホモでもつヒトはお酒が飲めない。ALDH2はミトコンドリアに局在し、魚類から哺乳類までその存在が確認されている。肝以外にも脳、心臓などミトコンドリアが豊富に存在する臓器には高発現を認め、その本来の機能はミトコンドリアにおける脂質過酸化反応の終末代謝産物であるアルデヒド類の解毒(抗酸化酵素)である<sup>6)</sup>。また、最近ではニトログリセリンからNOを生成する鍵酵素であることが報告されている(お酒の弱い人はニトログリセリンの効能が弱い)。

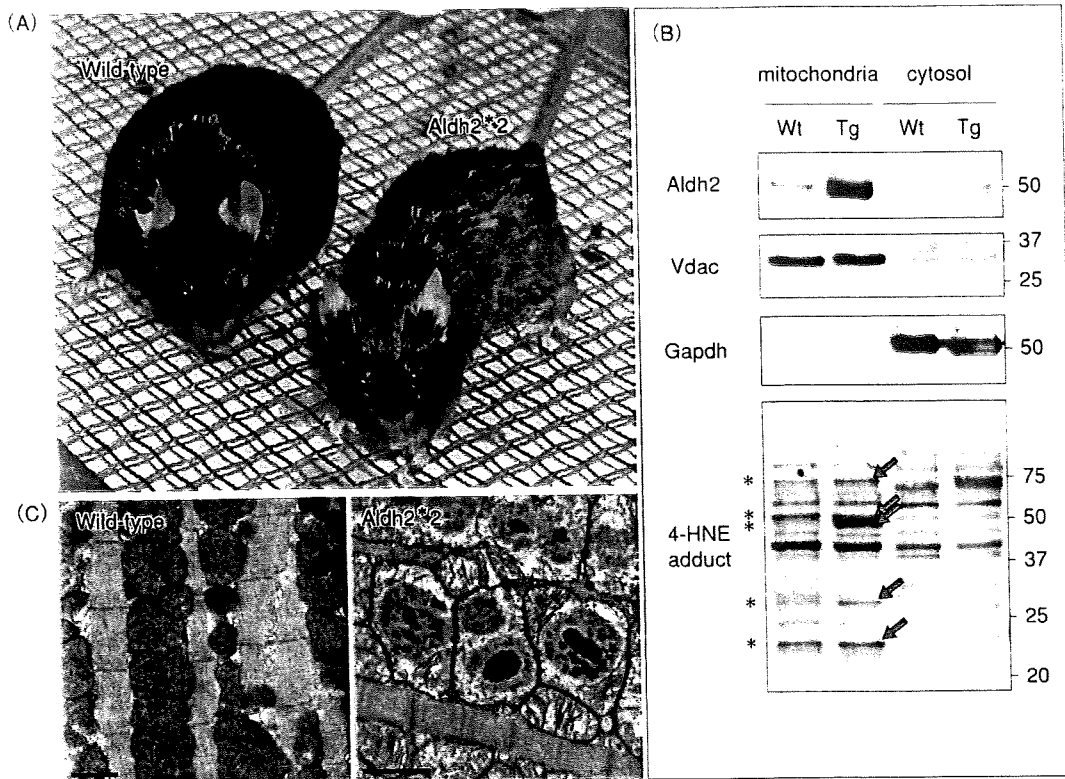


図 4 ALDH2\*2トランスジェニックマウス

- A: ALDH2\*2 トランスジェニックマウスの全貌。  
 B: ミトコンドリア ALDH 活性の低下によってアルデヒドが蓄積。  
 C: 電子顕微鏡によるミトコンドリアの観察。トランスジェニックマウスのミトコンドリアは内膜構造が壊れて電子密度の高い蓄積物を認める。

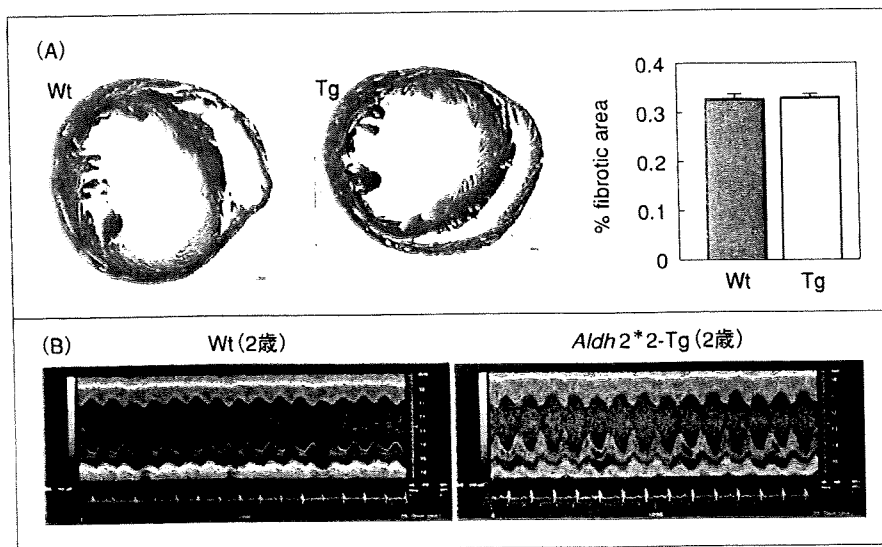


図 5 ALDH2\*2トランスジェニックマウスの心機能

- A: ALDH2\*2 トランスジェニックマウスの心臓の AZAN 染色。間質の線維化は認めない。  
 B: 心エコー検査上、左室収縮機能は正常に保たれている。

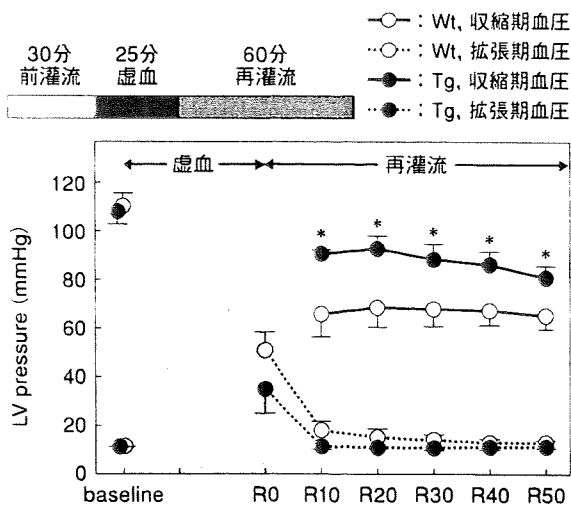


図 6 ALDH2\*2トランスジェニックマウスは虚血再灌流障害に対して抵抗性を示す

Langendorff 摘出灌流心を用いて 25 分間虚血にさらして再灌流の左室機能を評価。トランスジェニックマウスのほうが野生型マウスより再灌流時の左室機能の回復がよいことに注目。

と称される(図 8)<sup>7)</sup>。eIF2 $\alpha$ リン酸化の結果、蛋白翻訳過程を一般的に抑制しエネルギーを節約しながら、一方で転写因子 ATF4(activating transcription factor 4)などの翻訳を選択的に促進してアミノ酸代謝、グルタチオン合成遺伝子の発現を誘導するストレス応答機構である。実際にこのトランスジェニックマウスの心筋細胞内グルタチオン濃度はミトコンドリア内が酸化状態に傾いているにもかかわらず、野生型に比べて上昇していた。

## メタボローム・フラクソーム解析による心筋代謝応答

ミトコンドリア酸化ストレスマウスと野生型マウスの心臓を対象にしてキャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)によるメタボローム解析により解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路、脂肪酸 $\beta$ 酸化、アミノ酸、核酸などの中心代謝経路の代謝産物の網羅的定量を行った。その結果、ミトコンドリア酸化ストレスマウスでは、解糖系の上流半分とペントースリン酸回路の中間代謝産物増加、および NADPH/NADH 比の増加を認め、<sup>13</sup>C-glucose を用いたフラクソーム解析の結果、解糖系の活性化に加えて、グルコースのバイオトランスフォーメーションがペントースリン酸回路やアミノ酸セリンの合成経路へシフトしていることが確認された。NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに戻して再利用するときの補酵素に使われ、アミノ酸セリンはグルタチオンの前駆体アミノ酸(グリシンやシステイン)の合成に使われると考えられる。以上の結果から、ミトコンドリア酸化ストレスによるホルミシスは、グルタチオンレドックスサイクルを活性化させるように代謝経路のリモデリングを起こして細胞全体として還元状態を維持することにより達成されていると考えられた。

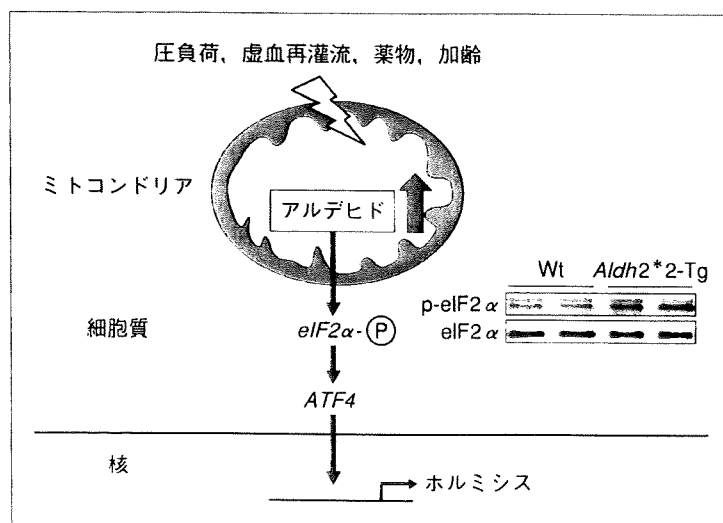


図 7 ミトコンドリア由来のアルデヒドが誘導するホルミシス応答の機序

eIF2 $\alpha$ リン酸化シグナルの活性化が心筋にホルミシスを生み出す。

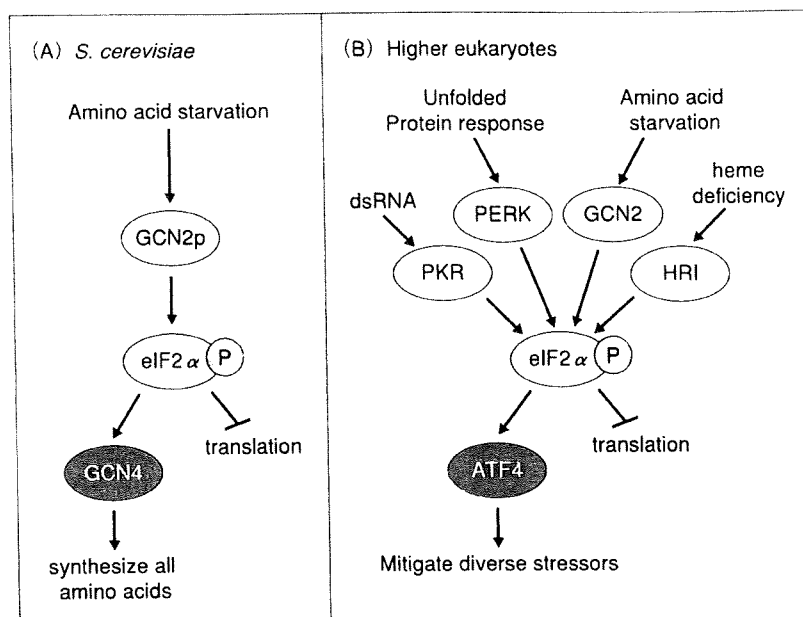


図 8 eIF2 $\alpha$ リン酸化シグナル

酵母では、培地中のアミノ酸が不足すると eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナルが活性化されて 20 個すべてのアミノ酸合成が活性化される(A)。哺乳類の細胞では、eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナルは integrated stress response と称されアミノ酸飢餓だけでなく、酸化ストレス、小胞体ストレスなど多彩な SOS シグナルがすべて eIF2 $\alpha$  のリン酸化に集約される。eIF2 $\alpha$  リン酸化の結果、蛋白翻訳過程を一般的に抑制しエネルギーを節約しながら、一方で転写因子 ATF4 (activating transcription factor 4) の翻訳を選択的に促進して、引き金となったストレス源を軽減する方向に働く分子や代謝経路を活性化させる(B)。

## おわりに

心臓にはミトコンドリアに酸化的障害が存在しても代謝経路を変化させて恒常性を維持するストレス応答機構が存在する。この分子機序は、eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナル(integrated stress response)を介した代謝応答によりグルタチオンレドックスサイクルを活性化させ細胞全体を還元状態に維持することに基づく。このストレス応答によって酸化ストレス障害による心筋細胞死(心筋梗塞)に対して耐性を示すようになる(ホルミシス)。ラットでは加齢に伴って心筋 eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナルが減弱することが報告されている。ミトコンドリアに障害を与えずに eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナルを誘導させる方法(模擬的ホルミシス; Hormesis memetics)は、心不全の治療や予防、アンチエイジ

ングに有効と考えられる。

## 文献

- 1) Endo, J. et al. : *Circ. Res.*, **105**(11): 1118-1127, 2009.
- 2) Calabrese, E. J. et al. : *Risk Anal.*, **19**(2): 261-281, 1999.
- 3) Sano, M. and Fukuda, K. : *Circ. Res.*, **103**(11): 1191-1193, 2008.
- 4) Hayashida, K. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**(1): 30-35, 2008.
- 5) Nakamura, K. : *Circulation*, **105** : 2867-2871, 2002.
- 6) Ohta, S. et al. : *Ann. NY Acad. Sci. USA*, **1011** : 36-44, 2004.
- 7) Harding, H. P. et al. : *Mol. Cell*, **11**(3): 619-633, 2003.
- 8) Lakatta, E. G. and Levy, D. : *Circulation*, **107** : 346-354, 2003.

\* \* \*

# Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart

Jin Endo,\* Motoaki Sano,\* Takaharu Katayama,\* Takako Hishiki, Ken Shinmura, Shintaro Morizane, Tomohiro Matsuhashi, Yoshinori Katsumata, Yan Zhang, Hideyuki Ito, Yoshiko Nagahata, Satori Marchitti, Kiyomi Nishimaki, Alexander Martin Wolf, Hiroki Nakanishi, Fumiyuki Hattori, Vasilis Vasiliou, Takeshi Adachi, Ikuroh Ohsawa, Ryo Taguchi, Yoshio Hirabayashi, Shigeo Ohta, Makoto Suematsu, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda

**Rationale:** Aldehyde accumulation is regarded as a pathognomonic feature of oxidative stress-associated cardiovascular disease.

**Objective:** We investigated how the heart compensates for the accelerated accumulation of aldehydes.

**Methods and Results:** Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) has a major role in aldehyde detoxification in the mitochondria, a major source of aldehydes. Transgenic (Tg) mice carrying an *Aldh2* gene with a single nucleotide polymorphism (*Aldh2*\*2) were developed. This polymorphism has a dominant-negative effect and the Tg mice exhibited impaired ALDH activity against a broad range of aldehydes. Despite a shift toward the oxidative state in mitochondrial matrices, *Aldh2*\*2 Tg hearts displayed normal left ventricular function by echocardiography and, because of metabolic remodeling, an unexpected tolerance to oxidative stress induced by ischemia/reperfusion injury. Mitochondrial aldehyde stress stimulated eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  phosphorylation. Subsequent translational and transcriptional activation of activating transcription factor-4 promoted the expression of enzymes involved in amino acid biosynthesis and transport, ultimately providing precursor amino acids for glutathione biosynthesis. Intracellular glutathione levels were increased 1.37-fold in *Aldh2*\*2 Tg hearts compared with wild-type controls. Heterozygous knockout of *Atf4* blunted the increase in intracellular glutathione levels in *Aldh2*\*2 Tg hearts, thereby attenuating the oxidative stress-resistant phenotype. Furthermore, glycolysis and NADPH generation via the pentose phosphate pathway were activated in *Aldh2*\*2 Tg hearts. (NADPH is required for the recycling of oxidized glutathione.)

**Conclusions:** The findings of the present study indicate that mitochondrial aldehyde stress in the heart induces metabolic remodeling, leading to activation of the glutathione–redox cycle, which confers resistance against acute oxidative stress induced by ischemia/reperfusion. (*Circ Res.* 2009;105:1118-1127.)

**Key Words:** cardiac metabolism ■ oxidative stress ■ aldehyde ■ stress response

Aldehydes are the major end products of lipid peroxidation. They are highly electrophilic and react with biomolecules, such as proteins and nucleic acids, to generate various adducts.<sup>1</sup> Increased levels of aldehyde adducts have been detected in oxidized lipoproteins, atherosclerotic lesions, hearts with coronary artery disease, and Alzheimer brains.<sup>2-4</sup> In addition to the pathogenic effect associated with oxidative stress, sublethal levels of aldehydes interact with

signaling systems to upregulate gene expression to counteract stressor challenges and to reestablish homeostasis.<sup>5-7</sup>

In mammalian cells, reactive aldehydes are detoxified by oxidation to carboxylates, a reaction catalyzed by aldehyde dehydrogenases (ALDHs).<sup>1</sup> The ALDHs are a superfamily of NAD(P)<sup>+</sup>-dependent enzymes,<sup>8</sup> and, to date, 19 distinct *ALDH* genes have been identified in the human genome.<sup>9</sup> ALDH2 is localized to the mitochondria, a major source of

Original received June 19, 2009; resubmission received August 3, 2009; revised resubmission received September 25, 2009; accepted September 29, 2009. From the Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics (J.E., M. Sano, T.K., S. Morizane, T.M., Y.K., Y.Z., H.I., F.H., K.F.); Cardiology Division (J.E., T.K., T.M., Y.K., S. Ogawa), Department of Internal Medicine; Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology (T.H., Y.N., T.A., M. Suematsu); and Division of Geriatric Medicine (K.S.), Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO) (M. Sano), Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan; Department of Biochemistry and Cell Biology (K.N., A.M.W., I.O., S. Ohta), Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan; Department of Pharmaceutical Sciences (S. Marchitti, V.V.), University of Colorado Health Sciences Center, Denver; Department of Metabolome (H.N., R.T.), University of Tokyo, Japan; and Neuronal Circuit Mechanisms Research Group (Y.H.), Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan.

\*Authors contributed equally to this work.

Correspondence to Dr Motoaki Sano, Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan. E-mail msano@sc.itc.keio.ac.jp  
© 2009 American Heart Association, Inc

*Circulation Research* is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206607

Downloaded from [circres.ahajournals.org/](http://circres.ahajournals.org/) at Nippon Med School on April 25, 2010



reactive oxygen species and a target of membrane lipid peroxidation. ALDH2 has been implicated in cellular antioxidant processes because ALDH2 deficiency increases oxidative stress.<sup>10,11</sup> Furthermore, the cardioprotective effects of moderate alcohol consumption are well documented in animal models and humans,<sup>12</sup> and ethanol exposure, followed by sufficient time to metabolize the alcohol before ischemia, induces a delayed form of preconditioning-like cardioprotection.<sup>13</sup> The mitochondrial translocation of protein kinase C $\epsilon$  and the subsequent activation of ALDH2 have been shown to contribute to the cardioprotective effects of alcohol.<sup>14</sup> Indeed, administration of a small-molecule activator of ALDH2 to rats before an ischemic event reduced infarct size by 60%.<sup>15</sup>

A single nucleotide polymorphism of *ALDH2* (*ALDH2*\*2), acts as a dominant-negative gene and is found in Asian populations (Figure 1 in the Online Data Supplement, available at <http://circres.ahajournals.org>). ALDH2 acts as a homo- or heterotetramer, and all tetramers that contain at least 1 ALDH2\*2 subunit are inactive.<sup>16</sup> People homozygous for the ALDH2\*2 allele ( $\approx$ 8% of the Japanese population) do not have any ALDH2 activity, whereas activity in individuals heterozygous for the ALDH2\*2 allele ( $\approx$ 40% of the Japanese population) is as low as 1 in 16 of that in ALDH2\*1 (wild-type [Wt]) homozygous individuals.<sup>17</sup> Notably, the *Aldh2*\*2 allele has been reported to affect the metabolism of acetaldehyde, as well as other aldehydes, such as benzaldehyde (a metabolite of toluene) and chloroacetaldehyde (generated during the metabolism of vinyl chloride). The ALDH2\*2 allele is associated with alcohol flushing syndrome, increased serum lipid peroxide levels,<sup>18</sup> and an increased risk for late-onset Alzheimer's disease.<sup>19</sup> Previously, we demonstrated that in stable transfectants of the PC12 neuronal cell line expressing mouse *Aldh2*\*2, mitochondrial, but not cytosolic, Aldh activity was repressed.<sup>10,11</sup> The resultant Aldh-deficient transfectants were highly vulnerable to oxidative insult by exogenous 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) or antimycin A. Furthermore, transgenic (Tg) mice expressing *Aldh2*\*2 in their brains exhibited decreased ability to detoxify 4-HNE in cortical neurons and an accelerated accumulation of 4-HNE in the brain. Consequently, age-associated neurodegeneration accompanied by memory loss appeared in these mice after 1 year of age.<sup>20</sup> This phenotype mimics late-onset Alzheimer's disease in human.

In this study, we developed a Tg loss-of-function model for aldehyde-detoxifying enzymes to exploit the overexpression of *Aldh2*\*2 in the heart, which simulates heterozygotes for the *ALDH2*\*2 allele in individuals already expressing Wt *ALDH2*\*1 in the heart. Despite a significant accumulation of 4-HNE adduct proteins in the mitochondrial matrices, left ventricular systolic and diastolic function were equivalent to that in Wt littermates until at least 2 years of age. Furthermore, the hearts exhibited enhanced tolerance to ischemia/reperfusion (I/R) injury. This is markedly different to the *Aldh2*\*2 Tg brain, where accumulation of 4-HNE in the brain was accompanied by neuronal cell death, indicating that the heart has a superior ability to resist mitochondrial aldehyde stress than the brain and exploits the hormesis-like effect of aldehydes. Thus, we subsequently investigated the molecular

#### Non-standard Abbreviations and Acronyms

ALDH	aldehyde dehydrogenase 2
ATF4	activating transcription factor-4
eIF2 $\alpha$	$\alpha$ -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2
Gcl	glutamate cysteine ligase
GSH	glutathione
GSSG	glutathione disulfide
GST	glutathione S-transferase
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
I/R	ischemia/reperfusion
PHGDH	3-phosphoglycerate dehydrogenase
SLC	solute carrier
Tg	transgenic
Wt	wild type

basis underlying this aldehyde-induced, hormesis-like stress response in *Aldh2*\*2 Tg hearts.

#### Methods

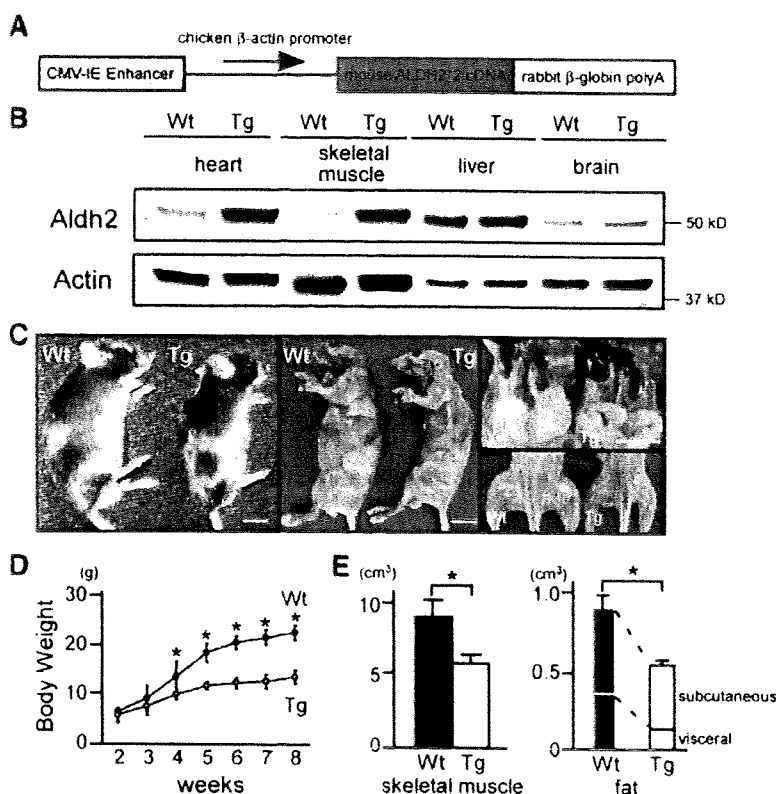
*Aldh2*\*2 Tg mice were generated by pronuclear injection of a plasmid carrying *Aldh2*\*2 with a single nucleotide mutation at the same locus as the human *ALDH2*\*2 polymorphism. The mice used for these experiments were more than 10 generations back-crossed to C57BL/6 mice. For fluxome analysis, hearts were perfused with a modified Krebs–Henseleit buffer (120 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 5.9 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1.75 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L glucose, 10  $\mu$ U/mL insulin, 0.4 mmol/L oleate, and 1% BSA) gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at 37°C, according to the Langendorff procedure. After equilibration, the buffer was switched to modified Krebs–Henseleit buffer containing 10 mmol/L <sup>13</sup>C-glucose instead of 10 mmol/L glucose.

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement at <http://circres.ahajournals.org>.

#### Results

##### *Aldh2*\*2 Tg Mice Represent a Loss-of-Function Model of Aldh Activity

We created a loss-of-function model for aldehyde-detoxifying enzymes by Tg expression of *Aldh2*\*2 under control of the CAG promoter (Figure 1A). Strong expression of the *Aldh2*\*2 protein was observed in the heart and skeletal muscles (Figure 1B). During development to reproductive maturity, *Aldh2*\*2 Tg mice exhibited small body size (Figure 1C and 1D), reduced muscle mass, diminished fat content (Figure 1E), osteopenia, and kyphosis. These phenotypes are not observed in *Aldh2*-null mice (ie, mice in which normal Aldh2 activity is blocked by knockout of the *Aldh2* gene).<sup>21</sup> These data indicate that the phenotypes observed in *Aldh2*\*2 Tg mice are not attributable simply to a lack of Aldh2 activity. We suspect that *Aldh2*\*2 inactivates not only Aldh2, but also other Aldh subfamilies, presumably by forming heterotetramers.<sup>22,23</sup> Consistent with this, the forced expression of *Aldh2*\*2 impaired Aldh activity against aliphatic aldehydes, including 4-HNE, whereas genomic disruption of *Aldh2* did not (Online Table 1).



**Figure 1.** Characterization of *Aldh2*\*2 Tg mice. **A**, Design of the targeting construct. Recombinant murine *Aldh2* (Glu487Lys) is expressed under the control of the CAG promoter. **B**, Tissue-specific expression of the *Aldh2*\*2 transgene. **C**, Senescence-like phenotypes of *Aldh2*\*2 Tg mice. Bars = 1 cm. **D**, Growth curves of mice fed normal chow. **E**, Computed tomographic quantification of the composition of muscle and fat. Data are the means  $\pm$  SEM ( $n=6$  to 8). \* $P<0.05$  (unpaired Student's *t* test).

### Mitochondrial Oxidative Stress in *Aldh2*\*2 Tg Hearts

A cell fractionation study revealed that the *Aldh2*\*2 protein is localized in the mitochondria (levels 8-fold higher than those of endogenous *Aldh2*; Figure 2A). Consistent with this, we found that levels of some 4-HNE adduct proteins were increased in the mitochondrial fraction of *Aldh2*\*2 Tg hearts. However, there was little increase in 4-HNE adduct protein levels in the cytosolic fraction of *Aldh2*\*2 Tg hearts.

The hearts of *Aldh2*\*2 Tg mice were smaller (in proportion to body size) than those of their Wt littermates (Figure 2B; Online Figure II, A). Light microscopic examination of *Aldh2*\*2 Tg hearts revealed normal alignment of thinner cardiomyocytes. Furthermore, there was no evidence of interstitial fibrosis or cellular degeneration/death (Figure 2C; Online Figure II, C). Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy revealed that the sarcomere structure of the myofibrils in *Aldh2*\*2 Tg hearts was intact. Of note, some mitochondria contained electron-dense deposits on a few cristae (Figure 2D). Finally, a decline of mitochondrial function (Figure 3A) and a shift toward the oxidative state were found in mitochondrial matrices of *Aldh2*\*2-expressing cells (Figure 3B).

### *Aldh2*\*2 Tg Hearts Exhibit Greater Tolerance to Oxidative Stress

Echocardiographic examination of 3-month-old *Aldh2*\*2 Tg mice revealed normal left ventricular systolic and diastolic function (Online Figure III), indicating adaptation of the heart

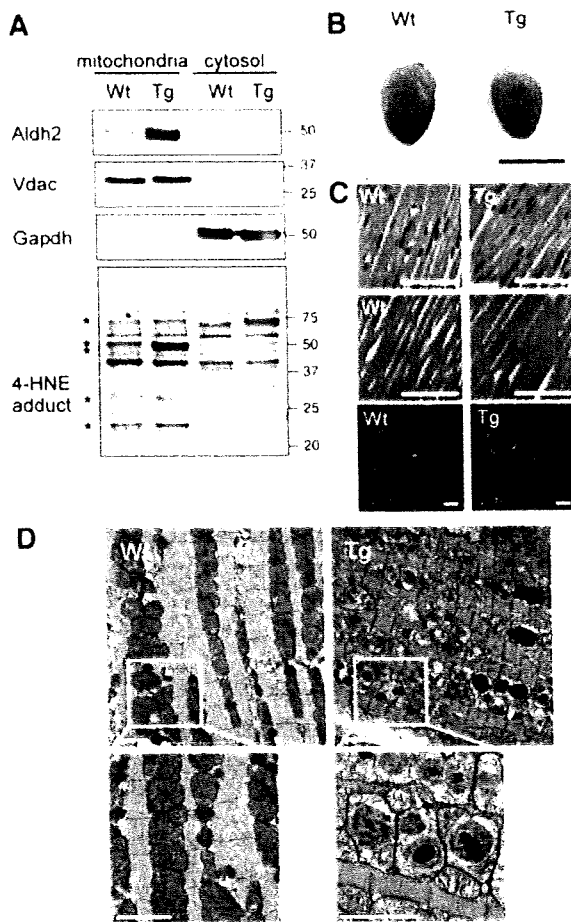
to persistent mitochondrial oxidative stress, at least under unstressed conditions.

To determine whether *Aldh2*\*2 Tg hearts are susceptible or resistant to exogenous oxidative stress elicited by I/R injury, isolated hearts were subjected to 30 minutes total global ischemia, followed by 60 minutes aerobic reperfusion. Notably, *Aldh2*\*2 Tg hearts exhibited significantly improved recovery of left ventricular developed pressure and  $\pm$ dP/dt during reperfusion compared with the control group ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ; Figure 4A and 4B). Consistent with these findings, total lactate dehydrogenase release into the perfusate during reperfusion was significantly lower in *Aldh2*\*2 Tg compared with control hearts ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ; Figure 4C). In addition, we confirmed improved handling of I/R injury in *in vivo* hearts. Reperfusion injury was reduced in hearts from *Aldh2*\*2 Tg mice, as reflected by a reduction in the size of the necrotic zone per area at risk ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ; Figure 4D).

### Induction of Genes in *Aldh2*\*2 Tg Hearts

Gene chip analysis revealed that the expression of genes for the major antioxidant enzymes was not induced in *Aldh2*\*2 Tg hearts, with the exception of the expression of the glutathione (GSH) *S*-transferase- $\alpha$ 1 and - $\alpha$ 2 (*Gsta1* and *Gsta2*) genes (Online Figure IV). Furthermore, there was no change in the expression of genes involved in the production of lipid mediators and reactive oxygen species, including *Xdh* and components of NADPH oxidase, in *Aldh2*\*2 Tg hearts (data not shown).

We found significant upregulation of genes encoding enzymes involved in amino acid biosynthesis and transport in



**Figure 2.** Characterization of hearts from *Aldh2*\*2 Tg mice. **A**, 4-HNE adduct proteins were determined in both mitochondrial and cytosolic fractions using Western blot analysis. Membranes were stripped and reprobed with ALDH2, VDAC (mitochondrial protein), and GAPDH (cytosolic protein). \*Note that the intensity of 2 bands around 50 kDa, a band around 70, 30, and 23 kDa was stronger in the mitochondrial fraction for *Aldh2*\*2 Tg hearts vs Wt controls. **B**, Gross morphology of hearts. **C**, Microscopic analyses of hearts: hematoxylin/eosin staining (top images), Azan (middle images), and TUNEL (bottom images). Bars=100  $\mu$ m. **D**, Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy. Bars=2  $\mu$ m.

*Aldh2*\*2 Tg hearts (Figure 5A), including genes encoding 3-phosphoglycerate dehydrogenase (*Phgdh*), phosphoserine aminotransferase 1 (*Psat1*), and phosphoserine phosphatase (*PspH*), all of which are involved in the 3-step conversion of 3-phosphoglycerate (a glycolytic intermediate) to serine. Serine hydroxymethyltransferase 1/2 (*Shmt1/2*) catalyzes the conversion of serine and tetrahydrofolate (THF) to glycine and 5,10-methylene THF, and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 catalyzes the interconversion of 5,10-methylene THF and 10-formyl THF. Cystathionase (*Cth*) is involved in cysteine biosynthesis in the *trans*-sulfuration pathway. These metabolic pathways eventually converge on GSH biosynthesis (for a metabolic map, see Figure 5B). Accordingly, despite the significant oxidative stress in the mitochondrial matrix, the intracellular concentration of GSH

was increased 1.37-fold in *Aldh2*\*2 Tg compared with Wt hearts ( $n=8$ ;  $P<0.05$ ; Figure 6A). The synthesis of GSH from its constituent amino acids, namely L-glutamate, L-cysteine, and L-glycine, involves 2 enzymatic steps catalyzed by  $\gamma$ -glutamyl-cysteine ligase (Gclm, Gclc) and GSH synthetase (Gss).<sup>24</sup> However, induction of GSH biosynthetic enzymes was not particularly evident in *Aldh2*\*2 Tg hearts (Figure 5 and Online Figure V). The solute carrier (SLC) family of amino acid transporters, including members involved in cysteine biosynthesis or transport (*Slc1A4*, *Slc3A2*), was also upregulated in *Aldh2*\*2 Tg hearts. Notably, transcripts for the ATF/CREB (cyclic AMP response element-binding protein) (*Atf4*, *Atf5*) families of transcription factors, master regulators of amino acid metabolism,<sup>25–28</sup> were increased in *Aldh2*\*2 Tg hearts.

### Glucose Biotransformation Is Shifted Toward the Pentose Phosphate Pathway

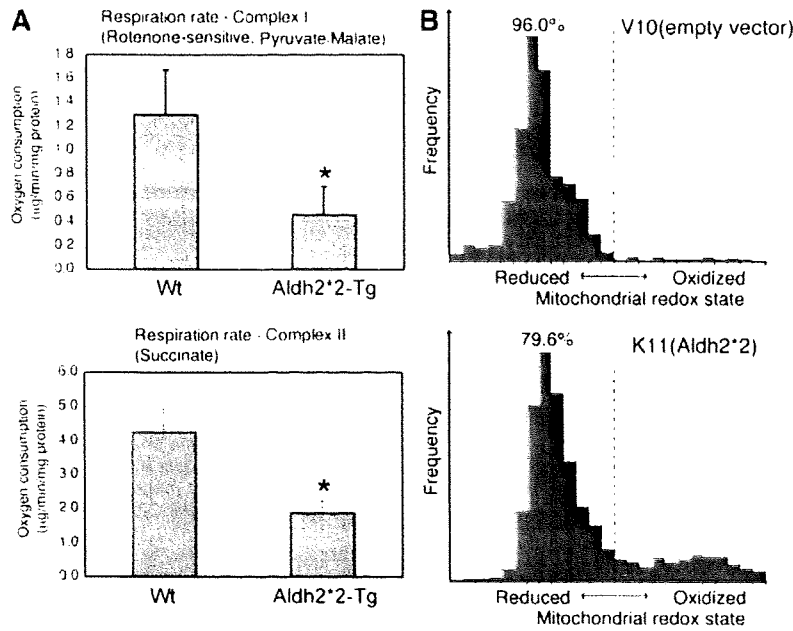
To further delineate changes in cardiac metabolism, intracellular concentrations of metabolites were measured by high-throughput metabolomics using capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE-MS). The *Aldh2*\*2 Tg hearts exhibited characteristic changes in levels of metabolic intermediates of the glycolysis pathway (Online Figure VI). Specifically, levels of upstream glycolytic metabolites tended to increase, whereas those of downstream glycolytic metabolites tended to decrease in *Aldh2*\*2 Tg hearts. Notably, *Aldh2*\*2 Tg hearts contained higher levels of intermediate metabolites of the pentose phosphate pathway, including 6-phosphogluconate (1.42-fold increase) and ribose 5-phosphate (1.57-fold increase;  $n=6$ ;  $P<0.05$  vs Wt littermates). The myocardial NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio was elevated in *Aldh2*\*2 Tg mice ( $n=6$ ;  $P<0.05$  versus Wt littermates; Figure 6B through 6D). There were no differences in glycogen content between Wt and *Aldh2*\*2 Tg hearts ( $0.016\pm 0.002$  and  $0.018\pm 0.003$   $\mu$ g/mg tissue, respectively).

Consistent with the upregulation of genes involved in amino acid metabolism and GSH biosynthesis, intracellular levels of glycine, homocysteine, and cystathionine were significantly higher in *Aldh2*\*2 Tg than Wt hearts ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ; Figure 6E through 6G).

To verify the changes in glucose metabolism, we performed *in vivo* pulse-chase analysis of <sup>13</sup>C-labeled glucose (fluxome analysis) in Langendorff-perfused hearts (Figure 7). <sup>13</sup>C-labeled metabolites were quantified by CE-MS 5 and 20 minutes after administration of <sup>13</sup>C-labeled glucose. <sup>13</sup>C-labeled intermediate metabolites of the glycolytic and pentose phosphate pathways were higher in *Aldh2*\*2 Tg versus Wt hearts at both time points ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ).

*Phgdh*, a rate-limiting enzyme for serine biosynthesis from intermediate metabolites of the glycolytic pathway (3-phosphoglycerate), was highly induced in *Aldh2*\*2 Tg hearts (Figure 8A). Accordingly, <sup>13</sup>C-labeled serine was markedly induced in *ex vivo* (Langendorff-perfused) and *in vivo* hearts (Online Figure VII).

To examine whether glucose uptake is actually augmented in *Aldh2*\*2 Tg hearts, Langendorff-perfused hearts were incubated with 2-deoxy-D-glucose (2-DG) for 5 minutes. When 2-DG is taken up into cells by glucose transporters, it



**Figure 3.** Characterization of *Aldh2*\*2-expressing mitochondria. **A**, Comparison of oxygen consumption through complex I (top) and complex II (bottom) in mitochondria isolated from *Aldh2*\*2 Tg and Wt mice. Data are the means  $\pm$  SEM (n=5). \**P*<0.05 vs Wt control (unpaired Student's *t* test). **B**, Comparison of redox status at the mitochondrial matrix between control (V10) and *Aldh2*\*2 transfectants (K11). The mitochondrial redox state vs frequency is shown by histograms. The dashed line indicates 50% of roGFP1 oxidized/reduced. The percentage shows the relative number of cells with a >50% reduction in matrix.

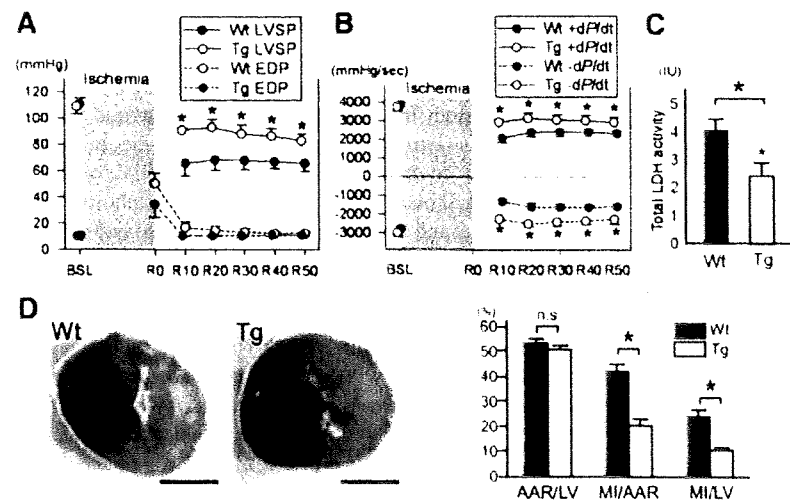
is phosphorylated to 2-deoxy-d-glucose-6-phosphate (2-DGP). Because it cannot undergo further glycolysis, 2-DGP can be used as a measure of glucose uptake. As expected, intramyocardial accumulation of 2-DGP was 1.69-fold higher in *Aldh2*\*2 Tg compared with Wt hearts (n=6; *P*<0.05).

**ATF4 Is a Key Transcriptional Regulator in Response to Aldehydes in the Heart**

It is known that phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) and subsequent translational activation of ATF4 result in the induction of additional members of the ATF/CREB family of transcription factors, which, together, upregulate a coordinately expressed set of genes involved in amino acid biosynthesis in mammalian cells.<sup>25-28</sup> Consistent with this, Western blot analysis demonstrated increased Ser51 phosphorylation on eIF2 $\alpha$  and

increased protein expression of *Atf4* and *Phgdh* (Figure 8A) in *Aldh2*\*2 Tg versus Wt hearts.

To clarify the role of *Atf4* in aldehyde-induced activation of amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Aldh2* Tg mice were mated with *Atf4*-knockout mice.<sup>29</sup> Homozygous *Atf4* knockout was lethal, whereas *Atf4* heterozygous knockout (*Atf4*<sup>+/-</sup>) mice, having half the Wt levels of *Atf4* expression (Figure 8B), were viable with no cardiac anomalies under unstressed conditions. The increased expression of cardiac genes involved in amino acid metabolism in *Aldh2* Tg mice was significantly attenuated in *Aldh2* Tg mice carrying heterozygous alleles of *Atf4* (Figure 8C). Western blot analysis demonstrated that the increased levels of *Phgdh* protein in *Aldh2* Tg mice were reduced by half in *Aldh2* Tg mice carrying heterozygous alleles of *Atf4*. In addition, the increased intracellular GSH levels in *Aldh2* Tg



**Figure 4.** Function of the *Aldh2*\*2 Tg heart. Langendorff-perfused hearts were subjected to 30 minutes of total global ischemia, followed by aerobic reperfusion. **A** and **B**, Recovery of left ventricular systolic (LVSP) (**A**) and diastolic pressure (EDP) and  $\pm$ dP/dt (**B**). **C**, Lactate dehydrogenase (LDH) release in the perfusate. **D**, Representative images of hearts from *Aldh2*\*2 Tg and Wt control mice after I/R injury (left). Quantification of infarct size (right). AAR indicates area at risk; BSL, baseline; LV, total left ventricular area; MI, area of myocardial infarction. \**P*<0.05 vs Wt control (unpaired Student's *t* test).