

太田 本日は皆さんお忙しいところ、お集まりいただきまして、ありがとうございます。今日は『ミトコンドリア医学のひろがりと発展』というテーマで、先生方にお話しいただきたいと思います。

先生方は、若いころからずっとミトコンドリアの研究を、おそらく30年以上、この道一筋でされてきたわけです。30年も研究を続けていると本質的なところは解決してしまっていてやる事がなくなってしまい、重箱の隅をつつくような話ばかりになってしまうということをよく耳にしますが、このミトコンドリア分野はますます発展してきて、重要な発見が続いているわけです。また、いろいろな医学分野とのかかわり合いが出てきました。

この座談会では、いままでのこのミトコンドリア分野の発展といろいろなほかの分野とのかかわりも含めて、これからの夢についてお話ししていただきたいと思います。ミトコンドリアには遺伝子があり、エネルギーとも、細胞死とも、カルシウムや活性酸素といったシグナルとも関係しますので、病気にかかわるのは当たり前ですが、逆に当たり前ということでは明確な証拠がなくても、なんとなくミトコンドリアが原因にされてしまいかねないところがあります。きちんとした研究法に

基づいて、ひとつひとつ明確にしていくことが大事だということについても語っていただきたいと思います。

2009年は、ミトコンドリア病が特定疾患に認定されました。10月1日からと聞いていますが、そういう意味で記念すべき年になると思います。さらに、ミトコンドリア病以外のいろいろな疾患との関係がはつきりしてきて、その分子メカニズムが明らかになってきました。

※ミトコンドリアの基本について図1~3に示しました。

● ミトコンドリアは30年前にゲノム研究の時代に

太田 まず、おひとりずつ簡単に自己紹介として、現在まで行ってきたことを背景も含めてお話しいただき、今後の課題へ話をつなげていただきたいと思います。とくに予想外の経験などがあれば、ご紹介いただければと思います。

では、田中先生からお願いします。

田中 私が30年前に研究をはじめたころは、ミトコンドリア酵素のシトクロムcオキシダーゼの

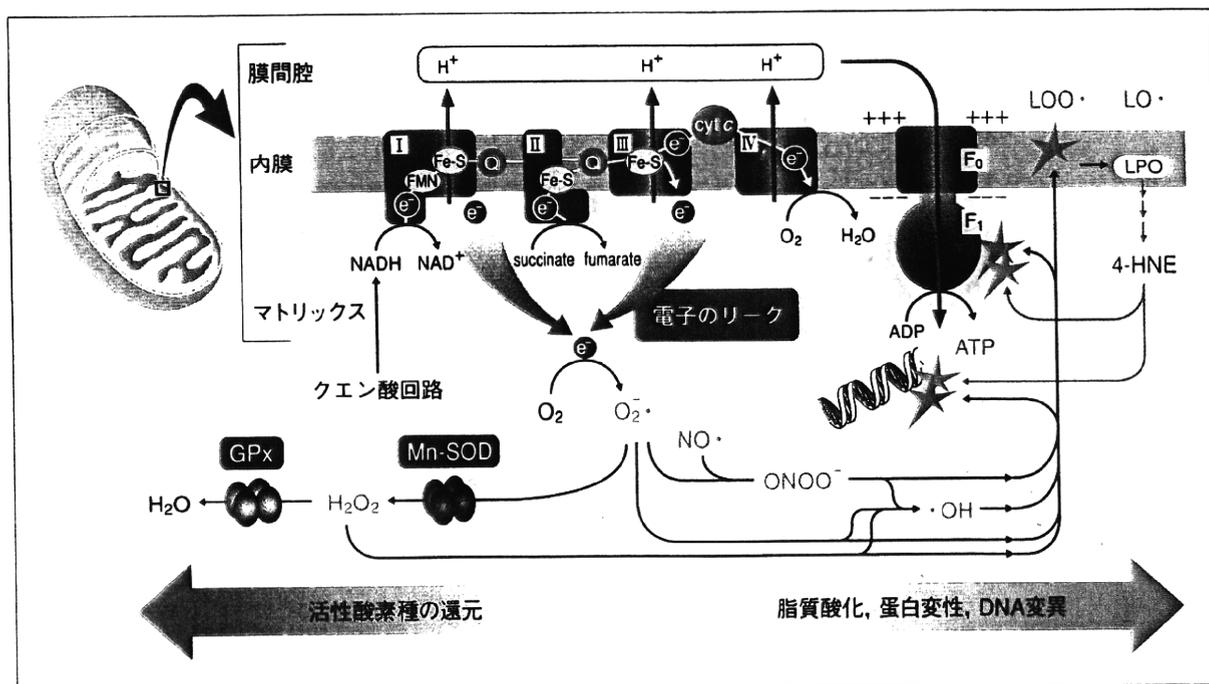


図1 ミトコンドリアの呼吸鎖とATP合成酵素の概略と活性酸素種の還元消去系

I, II, III, IVはそれぞれ呼吸鎖複合体(complex) I, 複合体II, 複合体III, 複合体IV. Fe-Sは鉄-硫黄クラスター。(図提供: 太田成男)

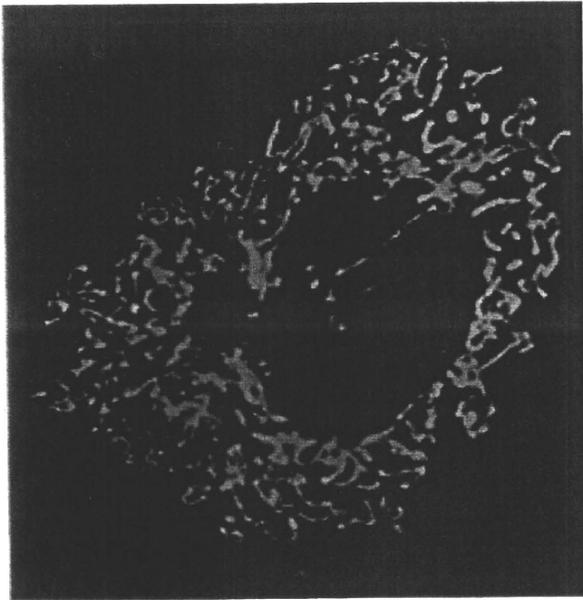


図3 生きた細胞のミトコンドリア

ミトコンドリアを特異的に蛍光染色するMitoTrackerRedでHeLa細胞を処理し、共焦点レーザー顕微鏡で写真を撮った。赤色がミトコンドリア。(写真提供：太田成男)

たね。

● 寄生虫ミトコンドリアの研究が ヒトの抗がん剤の開発に

太田 つぎは北先生お願いします。

北 ミトコンドリア病は私にも、とても関係があります。もともと大腸菌の呼吸鎖を研究していたのですが、酸素分圧が高いか低いかで、呼吸鎖が大きく変わることに関心がありました。このようなエネルギー代謝のスイッチがおもしろくなって、「真核生物でも同様なものがあるのではないか」と考えるようになりました。回虫が同じようなシステムだということを知り、順天堂大学の寄生虫学研究室に移ったところ、すぐ前に脳神経内科の研究室があり、ちょうどミトコンドリア病の話と出会ったのです。私はミトコンドリアを精製することと酵素活性の測定は得意でしたので、助教授の先生からぜひと協力を頼まれました。興味としては大腸菌の呼吸鎖の変化からはじまったのですが、ミトコンドリア病の研究と回虫の研究を同時進行でどんどん進めていくようになりました。また、寄生虫のミトコンドリアはわれわれ哺乳

類と違うので、とてもよい薬のターゲットになると当時から考えていました。

もう一つは、寄生虫の宿主としてのヒトミトコンドリアの研究、とくに呼吸鎖が対象です。私の場合には、呼吸鎖酵素のなかでもプロトンポンプ活性のない complex(複合体) II をずっと研究していて、「なぜそんなおもしろくないものをやるんだ」と言われていたのですが(笑)、こつこつとやっていると道は開けてくるものです。最近のがんと関係に新しい展開を導入することができました。hypoxia-inducible factor(HIF; 低酸素誘導因子)の誘導物質としてコハク酸があります。Complex IIの機能低下によって基質のコハク酸が蓄積するとHIFが増加します。つまり嫌気の状態と同じような状況が起こる。最近、ある種のがん細胞、たとえば膵臓癌では、酸素のない場合のATPの合成システムが回虫と同じ戦略を使っていることがわかってきました。そこで、ここをターゲットとする薬、やさしく言いますと寄生虫の薬でがんを治すことができる可能性がある。

太田 いわゆる“虫下し”ですね。

北 そうです。昔は考えていただけのことが、実際にデータとして出せるようになってきました。非常に思いがけない展開になりました。

この発展については、薬の開発のところでまた話をしたいと思います。

● がん転移に関係していた ミトコンドリアDNA

太田 では、林先生お願いします。

林 懐かしい話が出ましたが(笑)、私もちょうど30年前に埼玉県立がんセンター研究所に勤めていて、もらったテーマは、がんミトコンドリアの関係を明らかにすることでした。北先生が話されたように、がん細胞にはハイポキシア(低酸素)状態でも生存するという、いわゆるWarburg効果があり、「どうもミトコンドリアとがんとは関係があるようだ。しかも、ミトコンドリアのなかにどうやら独自のDNAがあるらしい」という時代でしたので、ミトコンドリアDNAの変化はがんとの関係があるのではないだろうか、ということでも

タートしました。最初は「TCA サイクルが下がるから代償的に解糖系が上がる」という仮説だったのですが、解糖系はがんにより働いているが、TCA サイクルが必ずしも働かなくなっているわけではなかった。ごく最近では、TCA サイクルが下がらなくても解糖系は上がるし、HIF などが安定化することで低酸素状態でも生存できるという考えが見直されている状況にあります。

ただ、だからといって本当にがん化にミトコンドリア DNA が関係しているかどうかは、まだはっきりしていません。私のがんセンターで研究をはじめたころ、ミトコンドリア DNA を正常細胞とがん細胞で交換してみても変化が見られなかった。つまり、がん細胞由来のミトコンドリア DNA を正常細胞に入れても正常細胞のままだし、正常細胞のミトコンドリア DNA をがん細胞に入れてもがん細胞のままだった。これは、がんセンターをやめるか、テーマを変えなくちゃいけないかと思いました(笑)。

ただ、ちょうどそのときに先生方が話されたミトコンドリア病が出てきて、医学に関係することなら研究を続けてもよいのでは、と言っていた。その際、がん研究のためのミトコンドリア研究のテクニックがミトコンドリア病の研究に応用できるだろうということが考えられ、当時、名古屋大学にいらっしゃった田中先生や自治医大にいらっしゃった太田先生とともに共同研究させていただきました。私たちが若かりしころ、本当に研究に燃えて、第一線の研究をさせてもらえたという思い出がよみがえってきました(笑)。

おかげで埼玉がんセンターにもいられたのですが、がんとミトコンドリア DNA の関係は明確には見られなかった。それが見えてきたのは、筑波大に移ってしばらくしてからですね。もしかすると、正常細胞ががんになるときではなくて、がん細胞が悪性化するときに関係するかもしれない、でも、そんなことはありえないだろうと考えた。しかし、それを否定しようと思ってマウスの細胞で実験をはじめたら、ミトコンドリア DNA の変異が悪性化に関係していた(石川、林の項、729 頁参照)。これは非常に大きな驚きだったのです。

ミトコンドリア DNA の変異は実際に Warburg

効果を引き起こし、解糖系を上げることもあるのですが、同時に活性酸素も増加させる。実は、この活性酸素のほうが悪性化の原因で、血管新生を誘発したり、細胞死を抑えることで、がん細胞の生存・転移につながっていた。現在、われわれはこの変異をもったマウスをつくって調べています。しかし、これはあくまでもマウスのお話なので、ヒトで同じような変異がどの程度あるのか、転移にどれだけ関係しているのか、転移にもいろいろな原因があるので、たとえば 100 例あったら、そのうちどのぐらいがミトコンドリア DNA が原因なのかというのは、いまはまったく見当がつかない。今後は、そういった方向に研究を進めていきたいと思っています。

太田 林先生が話された Warburg 効果ですが、Warburg が提唱しはじめたのは 80 年も昔のことです。ミトコンドリアは昔からいろいろな面で注目されてきました。Warburg がノーベル賞を受賞された後もミトコンドリアに関連する研究で今までに 7 回ノーベル賞がとられていますので、今後もミトコンドリアに関してノーベル賞が出るのではないかと期待しているわけです。

われわれの世代ですと、ミトコンドリア病が見つけれられた時期がちょうどオーバーラップしています。この病気をどう解決するかを目標に、ミトコンドリアを扱うテクニックや考え方が開発され、それからミトコンドリアの概念もずいぶん新しくなってきました。それがいま、いろいろな疾患の研究に使われているという意味では、これらの基礎となる研究が医学の発展につながっているのだと思います。

● ミトコンドリア DNA と疾患のリスク —— 遺伝子多型とさまざまな疾患

太田 つぎに田中先生のご専門と関係があると思うのですが、ミトコンドリアはエネルギーを使い細胞死を制御する場所という観点から、糖尿病、脂肪肝といった疾患におけるエネルギー代謝との関係が注目されてきており、またパーキンソン病や統合失調症などの神経精神疾患とも関係していることが明らかになってきています。これらの疾



太田成男 おおた しげお

日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 教授、同大学老人病研究所 教授。1974年3月 東京大学理学部卒、1979年3月 同大学院薬学系研究科博士課程修了、1979年4月 群馬大学医学部助手、1980年6月 同講師、1981年12月 スイス国バーゼル大学バイオセンター研究所研究員、1985年2月 自治医科大学講師、1991年11月 同助教授、1994年10月より現職(日本医科大学老人病研究所教授)、2003年4月より同大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野 教授(兼任)。

患に対して、ミトコンドリアはどのぐらい影響を及ぼしているのでしょうか。人間の病気は非常に複雑ですから原因は1つだけではなく、多くの関係があると考えられます。とくにがんでも、直接的な原因なのかあるいは悪性度に関係するのか、全体的なところをきちんとつかみながら考えないと言い過ぎになってしまうこともあるでしょうし、あるいは見逃してしまうこともあるかもしれません。その点、田中先生から見てミトコンドリアはどのぐらい、いろいろな疾患に関係しているとお考えでしょうか。

田中 仮説をさまざまな疾患で一度に検証できるように、岐阜県で約3,000人の生活習慣病の患者さんを対象に研究をさせていただきました。それぞれのミトコンドリアDNAのタイプ、ハプログループを分析して、糖尿病の疾患感受性に関するもの、メタボリック症候群に関するもの、心筋梗塞、脳梗塞に関しても、それぞれ危険因子または防御因子になるタイプを見つけることができました。それぞれの寄与度は少ないかもしれませんが、たとえば感受性が2倍ぐらいになっている

人が日本人の5%にいるというようなことは証明できたと思っています。

また、パーキンソン病とかアルツハイマー病に関しては研究が進んでいないのですが、私の研究所では約30年前から剖検例の収集をはじめました。現在、約7,500例を対象にして、凍結組織やパラフィン包埋切片を用いてミトコンドリアDNAのタイピングが終わりました。いろいろな疾患、成人発症性疾患にどう関与しているかということは、これから解明できると期待しています。

太田 核の遺伝子の多型、たとえば高血圧症や糖尿病のなりやすさと関連する多型が報告されています。それらと比較して話していただければ、「こんなにリスクが大きい」、「これしかリスクとしてはいいのか」と、わかりやすいと思いますが、いかがでしょうか。

田中 近年、大規模関連解析が多く行われ、核の遺伝子多型の common disease に対する寄与度がわかってきていますが、なりやすさ(オッズ比)はせいぜい1.3とか高くて1.5ぐらいしかありません。ミトコンドリアDNAの多型を調べますと、それぞれの多型は一般の集団で40%や20%、低いものになると5%とか10%しか頻度がないのですが、これを調べて見つかってくるものは、オッズ比が3とか結構高い。つまりリスクが3分の1になったり、3倍になったりする多型がやっと見つかってくる。核の遺伝子の多型より多くの検体数を調べないと信頼性が出てこないのですが、3,000例は低頻度でもオッズ比の高いものだけがやっと見つかる検出力(パワー)になっているわけですね。

核の多型も現在は common な変異ではなく、頻度の低いものを探していくという方向が出てきているのですが、ミトコンドリアの場合はすでに相当詳細な塩基配列の決定が行われているので、先行しているのではないかと考えています。

林 ミトコンドリアDNAは短いから多くの例数を調べやすいと思います。核の場合はサイズが非常に大きいので、対象をある特定の遺伝子に制限することになります。核ゲノムは長過ぎ、遺伝子が多すぎるため、全ゲノム配列解析はまだあまり

多くあるわけではないのでは？

田中 核の場合は多型頻度が5%以下であると研究対象にしないとか制限を設けています。また、ゲノムのなかの間隔で言うと相当間延びした解析しかできていないと思います。ミトコンドリアの場合は日本人の多型はすべて把握できているので、140 数カ所を一度に分析するというシステムでやっています。

林 頻度を比較するとき、ミトコンドリア DNA は全部簡単に決められるので、対象数もどんどん増えていきます。一方、核の場合はある特定の領域の遺伝子を見ていくのですが、本来の原因遺伝子を見逃すということはないのでしょうか。

田中 最新のビーズチップなどで一度に調べられる多型部位は約1メガです。100 万カ所の SNP とコピー数多型を見るというものが実用化されています。しかし、それでも標的となる多型部位の間隔は1~3 kb です。詳細な塩基配列を決定するために次世代シーケンサーも現在方々で導入されていますが、日本の場合、その性能を活かし切るだけの手当てができるかどうかが問題だと思います。1,000 人ゲノム計画などは、日本人の DNA を含めて北京で解析が行われています。

核が中心で、ミトコンドリアはサポートみたいにいる人が結構いるのですが、今までわかった範囲では、ミトコンドリア遺伝子の多型のリスクとしての影響は核よりも大きいというのが現実だと思います。

● ミトコンドリアDNAと核DNA —期待される変異マウスのバンキング

太田 いま、ミトコンドリアといろいろな疾患との関係を調べる研究が多くのところできてきています。ミトコンドリアを多くの人が注目してくれるのはわれわれにとってはありがたいことですが、最初からミトコンドリアが原因と決めつけては、重要なことを見逃すかもしれません。林先生はずっとミトコンドリア DNA の役割について厳密な研究をされてきたわけですが、ミトコンドリア研究では、こういうところをきちんと考えないといけないといった助言はありますでしょうか。

林 ミトコンドリア DNA とミトコンドリアの機能は切り離して考えなくてはいけないと思います。ミトコンドリア DNA がミトコンドリアの機能に関係しているというのは正しいです。しかし、ミトコンドリアの機能は複合体も含めて、核 DNA が関連している部分とミトコンドリア DNA が関連している部分と両方合わさって巨大なオルガネラをつくっています。どこからどこまでがミトコンドリア DNA が関わっているのか、両方関連しているところもあるでしょうし、独立なところもあると思うのですが、区別をつけるとしても、ミトコンドリア全体のオルガネラを理解するのはとてもできないので……

太田 でも、林先生ができなかったら誰もできないということになってしまいます(笑)。

林 いや、全体ではいろいろなおもしろい現象がありますが、まずはミトコンドリア DNA だけに限定して、そこに変異が起こったら生命現象としてどのような表現型が出るかを網羅的に調べ、全体から引き算したら、残りが核 DNA の関連ということにもなります。

そのためには、やはり非常に多くのモデルマウスをつくる必要があります。培養細胞だけでは表現型が病気にかかわるのかどうかはわかりませんので、やはり生きていたマウスで多くのミトコンドリア DNA の変異の影響を見なくてはなりません。

核遺伝子では変異遺伝子を導入することが可能ですが、ご存じのように、人工的にミトコンドリア DNA に変異をつくり、ミトコンドリアに入れてやるのが今のところできません。いろいろなところでこの方法を開発しようと研究されていますが成功していません。ミトコンドリア DNA は多数コピーであり、ミトコンドリア自身も二重膜で覆われているためかもしれません。したがって、特定の体細胞変異のあるミトコンドリア DNA だけをもつ培養細胞をなんとか工夫して分離して、そのミトコンドリアを ES 細胞に入れて、ミトコンドリア DNA の変異をもったマウスをつくるという研究が必要になってきます。いろいろな変異を入れたマウスをバンクとしてもつことによって、そのマウスがミトコンドリア病になるのか、



林 純一 はやし じゅんいち
筑波大学大学院生命環境科学研究科情報生物科学専攻 教授。1977年3月 東京教育大学大学院理学研究科博士課程動物学専攻修了、同年6月 埼玉県立がんセンター研究所生化学部研究員(この間、1985~1986年 テキサス大学健康科学センターダラス校研究員)、1988年4月 同主任研究員。1993年4月 筑波大学生物科学系助教授、1998年11月より現職(この間、2002年4月~2005年3月 筑波大学生物学類長、2005年4月~2008年3月 筑波大学第二学群長、生命環境学群長)。

糖尿病になるのか、精神疾患もどこまでかかわってくるのかを明らかにすると、ほかの研究者の参考にもなるだろうと思います。

太田 そうですね。私のところにもいろいろな研究をされている方から電話がかかってくるのですが、とくに「ミトコンドリアのタンパク質が変化した、それが原因ではないか」というような話は結構あるのです。ところがミトコンドリアは二次的な影響も受けやすいので、原因なのか、結果なのかというのはなかなか難しく、多くの場合は原因ではなくて結果なのです。

*1 NAC(N-acetyl cysteine): 活性酸素種(ROS)を除去するために、もっとも一般的に用いられている薬剤。

*2 エピジェネティックなコントロール: 後成遺伝学的調節、つまり遺伝子の発現が遺伝子の突然変異を伴わずに何らかの因子により可逆的に調節(コントロール)されること。多くの場合、ヒストンの修飾や遺伝子の転写調節領域の塩基修飾による。これに対しジェネティックなコントロールの場合は、遺伝子の突然変異によって遺伝子発現や遺伝子の機能に差が生じ、不可逆的でもとに戻ることはない。

● ミトコンドリアDNA枯渇と核DNA不安定性——がんの悪性化に関与？

田中 林先生のがんとミトコンドリアとの関係ですが、細胞のなかで鉄・硫黄クラスターの唯一の供給源がミトコンドリアであり、酵母ではミトコンドリア DNA のコピー数を減らすと鉄・硫黄クラスターができなくなります。その結果、それを必要とする核ゲノムの修復系の働きが悪くなるということが報告されています。関係する酵素としては、ヘリカーゼは塩基除去修復に関係し、プライマーゼは DNA のラギング鎖を合成するのにかかわります。

林 遺伝子の修復ができなくて死んでしまうと。

田中 ええ。ミトコンドリアの機能が悪くなると LOH(ヘテロ接合性消失)が出てきて、いろいろな遺伝子が修復できなくなった状態が起こるわけです。がん細胞で、たとえばミトコンドリア DNA の機能がなくなるとか枯渇が起こることが、核のほうの変異促進にかかわっているのではないかと、という仮説です。がん細胞の悪性度が高まる原因に、二次的にミトコンドリアの、たとえば DNA の枯渇が核の不安定性を高めているという可能性があると思うのですが、いかがでしょうか。

林 私たちの系は可逆的で、たとえば活性酸素種(ROS)を出している高転移性のがん細胞に NAC(N-acetyl cysteine)*¹を加えて ROS を除去すると転移性が落ちるというもので、いわゆるエピジェネティックなコントロール*²の下にあって遺伝的な変異ではないと思っています。われわれの見た現象はあくまで可逆的なんですね。

でも、ゲノムの不安定性はがんの大きな特徴ですし、ミトコンドリア DNA の枯渇なり、機能喪失が核の遺伝的不安定性を誘導しているということはあるかもしれないですね。

田中 アメリカの研究者が、たとえば ρ^0 細胞(ミトコンドリア DNA 欠損細胞)を HeLa 細胞とか、オステオサルコーマ(骨肉腫)からつくとゲノムがどんどん変化していく。それでもミトコンドリアを入れ直すと核の遺伝的不安定性はそこでなくなる、ということを行っていますよね。 ρ^0 をス

タートとしてわれわれはよく実験を行っているのですが、継代を続けていくと、もとの細胞の状態と違ってしまふ。

太田 わたしの経験でも、そうですね。

林 核遺伝子の変化が ρ^0 の間は進むけれど、ミトコンドリアを入れ直したときにそれ以上進まなくなるということですが、定量的にはどうやって見ているのでしょうか。

田中 染色体の安定性を FISH (fluorescence *in situ* hybridization) で見て、変化が止まるということだと思います。ローズウェルパークがん研究所の研究者が最近それを主張しているようです。

太田 つまり、ミトコンドリア DNA が核のゲノムの安定性を規定しているということですね。それに加えて、 ρ^0 に野生型のミトコンドリア DNA を入れると、多核体になりやすくなりますよね。林先生からいただいた細胞も染色体数が倍になっていたのもあった。

林 それで、ふつうに増えている？ それは知らなかった。

太田 それは、すぐ言わないといけなかった(笑)。ずいぶん前にわかっていて、伝えてあるとばかり思っていました。

ミトコンドリアDNA変異の蓄積と老化 —変異ミトコンドリアDNAポリメラーゼ γ の導入実験

田中 もう1つ、老化とミトコンドリア DNA の変異の蓄積との関係が大きな課題だと思うのですね。たとえば校正機能を低下させた変異 DNA ポリメラーゼ γ 遺伝子を導入したマウスは、ミトコンドリア DNA に変異が蓄積するだけでなく細胞数がどんどん減りますが……

林 アポトーシスで？

田中 ええ、そうではないかと言われていますよね。しかし、あまり酸化ストレスは高くなく、ROS は発生していないようです。むしろ組織幹細胞、前駆細胞か何かが再生できなくなっている。ミトコンドリアの機能が低下すると組織幹細胞の維持ができなくなって老化症状が起こる、という仮説が出されていますよね。

加齢した動物や人間で調べると、ミトコンドリア DNA 変異はあまり多くないですが、変異が蓄積した細胞は排除されている。もしも何か変異蓄積を促進する因子が加われば、早く老化をもたらすことになる。

このような仮説で林先生の欠失型ミトコンドリア DNA をもつ動物モデル(ミトマウス)などでは、説明がつくと考えられますでしょうか？

林 ミトマウスは老化の表現型を出しません。また先の例のがん転移が促進される変異をもったマウスは ROS を額面どおり出してはいませんが、このマウスを老化させてみないと何ともいえません。ただし産まれてくるので致死ではないということはわかりました。Germ line (生殖系) を経ているということは、致死性ではないですね。

太田 だけど、それが普通の病気のわけですよね。生まれなかったら病気にならないわけだから、先ほど話しましたように、それも原因と結果がどちらなのかという問題ですね。なくなったものは見えないわけですから、たとえば、よく言われるのは、アルツハイマー病の脳を見るとアポトーシスが見えない。しかし、アポトーシスを起こした細胞は消えてなくなっているのですから見えるはずがない。なくなったものをないと言っても、過去にあったかどうかということはなかなか証明できないわけですね。

林 ミトコンドリア DNA ポリメラーゼ γ の校正機能^{*3}を失わせると高頻度でミトコンドリア DNA に変異がたまり実際に呼吸欠損になります。しかし、その後にアポトーシスが起こるという考え方は、本当にそれが正しいのかどうかはまだわからないと思います。

田中 そうでしょうね。そこは確かめられていないですね。

林 通常であればゆっくり分裂するのが、アポトーシスで細胞がどんどん死んでいったときに幹

^{*3} ミトコンドリア DNA ポリメラーゼ γ の校正機能：ミトコンドリア DNA の複製は核にコードされている DNA ポリメラーゼ γ によって行われる。この酵素がもつ複製時の校正機能を異常にしたマウスでは、ミトコンドリア DNA の複製ミスが校正されずに体細胞突然変異として蓄積し、呼吸欠損や早老症的症状が発現し、かつ寿命が短くなることが報告されている。



北 潔 きた きよし

東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物医学化学教室 教授。1974年 東京大学薬学部卒、1980年 同薬学系研究科博士課程修了。1980年 東京大学理学部助手、1983年 順天堂大学医学部助手、講師。この間 1984~1985年 国際協力事業団パラグアイ厚生省中央研究所プロジェクト・チームリーダー。1991年 東京大学医科学研究所助教授。1998年3月より現職。2003~2006年 日本寄生虫学会理事長。2009年 日本生化学会会長。

細胞にストレスがかかるとします。分裂してテロメアが短くなって、そのせいかどうかはわかりませんが、本当にアポトーシスが誘導されるのであれば、なぜそのアポトーシスが誘導されたのか。たとえば、われわれのつくったミトマウスはそんなにアポトーシスが誘導されていないので、むしろ呼吸欠損になると ATP が枯渇してアポトーシスに必要なエネルギーがなくなるためにアポトーシスができなくなるのではないかとと思われるぐらいです。その辺は、ミトコンドリア DNA ポリメラーゼγの校正機能が失われたマウスでは、変異が蓄積する原因がわかっていて老化が促進するという結果もきれいに出ているのですが、その間がまだブラックボックスでわかりません。アポトーシスが起きている。しかし、呼吸欠損でも、ROS は出ていないという話のようなので……

北 ROS があまり発生していないという点についても ROS でダメージを受けたかどうかの結果を見ているので、細胞が死んでしまうと見えなわけですね。だから、ROS が出ていないと言うのも難しい。

太田 アポトーシスカ、そうでないメカニズムで

死ぬかということは、最近、その境があいまいになってきています。アポトーシス研究会を10何年続けてきたのですが、今年から名前を“日本 Cell Death 学会”に変えました。死には何でもかまわない、アポトーシスにこだわっては道を踏み外す、ということで変えたわけです。老化すると細胞が減るのは確かですので、細胞死と大きくかかわっているという面でも、ミトコンドリアは老化を予防するキーポイントになるのではないかとされているのだと思います。

● 活性酸素、ミトコンドリアDNAのコピー数と老化は関係するのか？

北 石井直明先生(東海大)の *mev-1* は寿命が短くなる線虫の変異体を分離したのですが、complex II のアミノ酸が違っただけでミトコンドリア内膜から電子がリークしやすくなって、活性酸素が発生しやすくなっています。活性酸素が多く出ていると、ミトコンドリアを取り出しても *in vitro* で活性酸素を見ることができます。*in vivo* でそんなに出たら寿命が短くなるということですが、生理学的なこととの間のギャップを、どう埋めるかというのがなかなかむずかしい。

太田 そうですね。

北 一般の人にはわかりやすいし、間違いなく活性酸素が老化の原因だと思うのですが、逆にそれをあまり言うと、怪しげな研究者集団だと思われるかもしれません(笑)。その意味では、生理学と両輪で研究していくことがすごく重要だな、と思うわけですね。

田中 ROS の量自体が細胞内のミトコンドリアのコピー数を決めているというのはどうでしょうか。分化した細胞ではミトコンドリアが多いですが、酸化ストレスもはるかに大きいですよ。未分化の細胞に比べれば必ず酸化的状況にあります。

そこから老化が進むとミトコンドリア DNA などが減少していき、ミトコンドリア自体の数も減ったりしますよね。だから、サルコペニア(筋肉量減少)とかオステオペニア(骨減少)、さらに筋減弱症や骨粗鬆症の共通の原因として“マイトペニア”とでも言いますか、コピー数がどんどん減っ

てきてしまう。それが老化に伴ういろいろな予備能の低下につながるのではないかと思います。

林 それはコピー数が減ることで、先ほどの鉄・硫黄クラスターのフィードバックがおかしくなるという流れでしょうか。

田中 ただ、酵母のモデルで鉄・硫黄クラスターがなくなるというのは、相当枯渇の厳しい状態なのです。

林 老化は、そうでもないのですね。

田中 ええ、老化しても、ある程度は保たれていると思います。

林 コピー数が減ったときに老化の表現型にまで至るシナリオは、どう考えればよいのでしょうか。

田中 老化まではいかなくても、たとえば糖尿病におけるインスリン感受性を考えますと、ミトコンドリアが働いて代謝系が糖を利用できるようにしているわけですから、ミトコンドリア DNA のコピー数が減れば耐糖能異常やメタボリック症候群のようなことが骨格筋では起こると思うわけですね。インスリンを分泌する側のβ細胞でもコピー数が下がれば、分泌低下が起こるかもしれません。

林 たとえばさっき話された、骨粗鬆症や老化の表現型とのかかわりはどのようなシナリオでしょうか。コピー数が減って十分な ATP 供給ができなくなると骨幹細胞が細胞死を起こすのでしょうか。

田中 老化にともなう細胞数の減少は確実にあるのではないかと思います。少なくとも肝臓では、以前から細胞数が減少すると言われていますので、骨粗鬆症だけではなくて、筋肉の衰えは骨折の原因となるような転倒にも大きく関係しますし、運動できなくなればアルツハイマー病にもつながるかもしれません。

林 幹細胞がちゃんとした機能を営めなくなることが老化の基本的な表現型が現れる原因としますと、幹細胞のミトコンドリアのコピー数の枯渇がその引き金になっていると。

田中 しかし、それは仮説に過ぎなくて、きちんとコピー数を評価することを多くの症例で検証しないといけないと思います。

林 コピー数の減少は核の、たとえば Tfam あるいは PGC-1α とか、ミトコンドリアの biogenesis

に関連している遺伝子の異常が原因か、ミトコンドリアそのものに何らかの変異が蓄積することによるのか、どこに原因があるのでしょうか。そこが問題ですね。

● 運動でミトコンドリアを増やして抗老化

太田 逆にミトコンドリアをどうやって増やせるかはわかってきています。ATP が枯渇することによってミトコンドリア DNA は増えますし、ミトコンドリア自体も増えます。やはり運動をどう行うかがミトコンドリアの維持に重要です。運動で90歳になっても筋肉を増やすことができますので、転ばないで健康を維持するためには運動してミトコンドリアを増やすことが一番よい、という主張をしています。

北 ROS の出ないミトコンドリアだったら？

太田 ええ、ROS の出ないミトコンドリアとは何かと考えますと、ミトコンドリアがたくさんある細胞にたどり着きます。つまり1つ1つのミトコンドリアが ATP をつくる量が少なくなるわけですから、1つあたりの負担も少なくなって ROS も出ない。ミトコンドリアをたくさん増やせば老化も進まないし、長く元気で暮らせる。それを証明したいと思っています。

林 その運動はどのような運動なのでしょう。aerobic(有酸素)な？

太田 aerobic というより、少しきつめの運動ですね。85%ぐらいのきつめの運動を加えてやるとミトコンドリアが増えやすい。

林 有酸素運動を？

太田 いや、有酸素運動ではなくて、ミトコンドリアを増やすには無酸素運動ぐらいの強さですね。

林 具体的には、どのような運動でしょうか？

太田 サーキット運動のような、有酸素運動と無酸素運動を繰り返して行います。たとえば30分歩くと有酸素運動になりますが、そうではなくてきつい運動を最初に入れば、そこですぐ有酸素運動にもなりますし、ミトコンドリアも増えるからよい。ミトコンドリア活性ダイエットというのがあるのですが(笑)。それが老化を予防する方法だろうと思っています。ミトコンドリアのクオリ



田中雅嗣 たなか まさし
東京都健康長寿医療センター研究所老化制御研究
チーム健康長寿ゲノム探索研究部長、1978年3月
名古屋大学医学部卒、1982年3月 同大学大学院
医学研究科博士課程修了、1982年4月 同大学医
学部助手、1991年7月 同助教授、1997年4月
岐阜県国際バイオ研究所副部長、1998年4月 同
部長、2005年1月 東京都老人総合研究所健康長
寿ゲノム探索研究部長、2009年4月より研究所の
改称により現職。

ティの面から考えても、どのようなミトコンドリアをどう増やすかが大事だと思います。

北 マイトファジー*4という現象もありますが、これはミトコンドリアは高い品質を保っていないと機能が保てないわけで、質の悪いものをどんどん壊していくことですね。ミトコンドリアというのは非常にダイナミックなもので、これはヒトから下等なミトコンドリア生物まで共通していると考えてよいと思います。

太田 その異常なミトコンドリアを除くメカニズムに問題が生じた場合にも疾患につながっていくということだと思いますが、これについて今、いろいろな方面で研究がすごいスピードで進んでいますね。パーキンソン病などがいい例かもしれません。

*4 マイトファジー：ミトコンドリアを丸ごと分解するための選択的オートファジー(自食作用)のこと。過剰のミトコンドリアや傷ついたミトコンドリアを除去し、ミトコンドリアの量や品質を管理するしくみであると考えられている。(東京工業大学・岡本浩二)

● カロリー制限と活性酸素 — “良いミトコンドリア” とは？

太田 それから重要なテーマのひとつは、カロリー制限とミトコンドリアの関係ですね。“良いミトコンドリア”を「ATPはちゃんとつくって活性酸素はあまり出さない」と設定し、そのようなミトコンドリアはどうやったらつくれるか、ということカロリー制限と結びつけて考えているところです。カロリー制限したラットのミトコンドリアは、ATPは十分つくりますが活性酸素の発生が少ない。

林 それは、単離したミトコンドリアを使って活性酸素を検出するのでしょうか？

太田 カロリー制限したラットから心筋をとってミトコンドリアを単離して、ATPをどのぐらいつくっているか調べる。それで、そこから活性酸素がどのぐらい出るかを測ると、活性酸素はやはり少ないと。

林 単離して測れるのでしょうか。

北 活性酸素は、実験では見る方法は確かにあります。しかし、普通に生きているときには、そんなに多く出ているわけではないでしょうから、たぶんその蓄積ですよ。

太田 ええ、見えないぐらいしか出ないですね。でも、最近は普通の状態の細胞から出るわずかな活性酸素もだんだん測れるようになってきています。

動物レベルでは、活性酸素の影響については、短い期間の研究では結果が出ないのです。活性酸素の影響は短期間ではとても小さいので、どうしても長期にわたってその効果を調べなくてはならなくなってしまいます。3、4カ月ぐらいで結果を求めないで、1年とか1年半でやっと結果がうまくと見えるという実験をしないとイケない。

そうすると、かなり根気が必要で、たとえばマウスを1年半ぐらい飼うのですが、ほかの実験に使われちゃったりするんですね(笑)。そうすると5匹足りないとか、また1年間待たなきゃいけないといったことになりますから、大学院生の研究テーマとしては無理だったり、研究体制の問題も大きいと思います。長くかかわれる人がいないと、

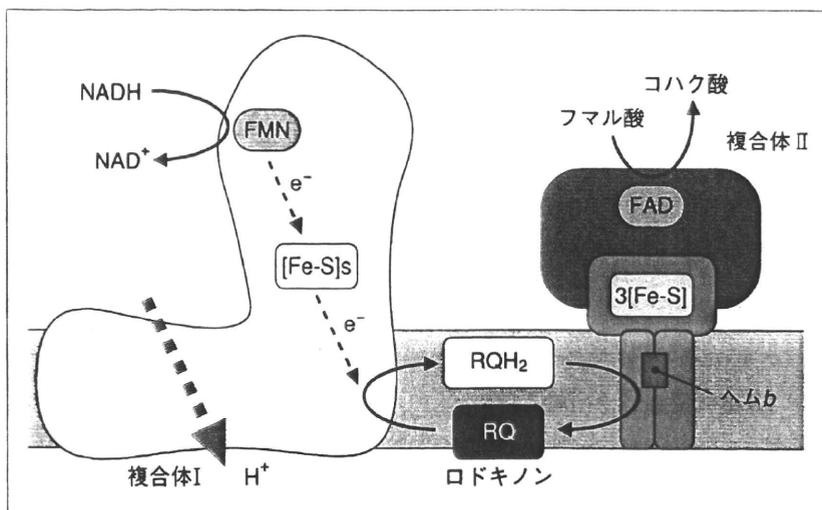


図 4 抗寄生虫および抗がん剤の標的の NADH-フマル酸還元系
 成虫の NADH-フマル酸還元系では、NADH からの還元力は呼吸鎖の脱水素酵素である NADH-ロドキノン還元酵素複合体(複合体 I)によって低電位のロドキノンを伝達され、最終的に複合体 II の QFR 活性によってフマル酸を還元しコハク酸を生成する。(図提供：北 潔)

このような長期の研究はどうしてもできない。長期的にわたって少しずつ出るようなモデルをつくと、人間の歳でいう 80 歳ぐらいに認知症と似たような表現型になってくる。この結果からミトコンドリアから出る酸化ストレスは、やはり大きな影響をもつだろうと考えるようになりました。

● いろいろな生物の多彩なミトコンドリア

太田 北先生はいろいろな環境のミトコンドリアを見られているわけですが、環境によってミトコンドリア全体はどのぐらい変わるのでしょうか。
 北 とくに私たちは寄生虫を使っていますので、想像できないぐらいがらりと変わります。

アフリカ睡眠病は病原体のトリパノソーマをツェツェバエが媒介します。これは、ハエのなかにいるときはミトコンドリアもとても発達していて、完全に酸化的リン酸化で ATP 合成を行います。つまり、人間のミトコンドリアと全く同じ酸素の使いかたです。

ところが、いったんハエが血を吸ったときにヒトに入ってくると、ミトコンドリアの外観は保っているのですが、内部構造のクリステなどはまったくなくなって、ATP の合成は基本的に解糖系が行うようになります。ところが、やっぱりミトコ

ンドリアの呼吸は必要なのです。というのは、解糖系でできた NADH を再酸化しないと解糖系は動かない。NADH の再酸化にミトコンドリアの呼吸系が使われるのです。

別の例もあります。普通 complex II にはサブユニットが 4 つしかない。しかし、ほ乳類のミトコンドリアとは違うシステムがあるのではないかとずっと思っていて、探してみると実はトリパノソーマの呼吸鎖にありました。この complex II はサブユニットが 12 個あるのです。このような生物の多様性が薬剤のターゲットになりうるのです。

それから、もう 1 つすごくドラスティックな変化の例は回虫ですが、受精卵が感染幼虫にまで発生するには酸素が必要です。このときのミトコンドリアはヒトとまったく同じです。ところが、体内に入り小腸で成熟するのですが、そのときには呼吸鎖酵素の complex III や IV はほとんどなくなり、complex II では通常ミトコンドリアの TCA 回路の逆反応をし、酸素なしでも complex I の共役部位が働いて ATP を作れるようになります(図 4)。効率は 3 分の 1 ですが、これらは同じ寄生虫のライフサイクルのなかで、ミトコンドリアがまったく違う機能をもつ例です。

また、よく知られているマラリア原虫ではミトコンドリア DNA が短く、ミトコンドリアが退化

しつつある途中なのです。

林 ちなみにトリパノソーマの場合、ヒトに感染した後はミトコンドリア DNA はどうなるのでしょうか。ある意味、必要なくなるように思えますが、存在するのでしょうか。たとえばヒトの体中に入ってしまうと、そこでは必要ないですよね。
北 ミトコンドリア DNA は必要です。酸素のあるところで生きているときには ComplexⅢやⅣが必要なので、必ずミトコンドリアは利用されています。

林 すべてではなく、一部しか必要でない欠失を起こして、小さくなったりしないのでしょうか？

太田 でも、生活環のなかで、また戻っていきなげないから。

北 究極のものがあるんですよ。最近、一般にも知られてきているのですが、マイトソームという、要するに DNA のないミトコンドリアです。たとえばアメーバとかジアルジアとか、原虫という単細胞の寄生虫で酸素のないところで暮らすものです。アメーバだと大腸とか、トリコモナスはミトコンドリアをもっていないのですが、先祖がミトコンドリアと一緒にこのものをもっていて、それは DNA がありません。

しかし、いずれの場合もミトコンドリアの機能は必要です。

太田 人間の場合も、発生過程でも、臓器によっても、病態によっても環境は随分変わるわけですね。その環境によってミトコンドリアはどのくらい変わって、機能もどのくらい変わるのかということとはとてもおもしろいと思うのですが、それについてはいかがでしょうか。

北 たとえば形態的には、精子のミトコンドリアと肝のミトコンドリアは明らかに違いますよね。

太田 そうですね。

北 教科書にはこれまでも載っていたのですが、分子のレベルで研究してきた人たちは少ないと思います。これも今後の課題ですね。

● ミトコンドリア病治療薬開発の現状： アルギニンとピルビン酸

太田 ミトコンドリア病に対する薬については、

古賀靖敏先生の研究についてはいかがでしょうか。治療薬について田中先生に欠席裁判をお願いしますでしょうか。

田中 久留米大学の古賀先生が行われている臨床試験は、MELAS で脳梗塞に似た脳虚血が起こるメカニズムとして、NO 不足を考えたことによります。その NO のもとになるアルギニンを投与することによって血管の攣縮れんのようなものがよくなるのではないかと、という期待ではじまったわけですね。

いまのところは、血管はむしろ拡張しているという意見もありますが、それでもアルギニンは効果があるので、NO 産生以外のメカニズムがあるのではないかと期待されて研究が続けられていると思います。

一方、私が対象としているのは Leigh 脳症というもっと重症のタイプで、ピルビン酸を投与しています。シトクロム c オキシダーゼの機能欠損やピルビン酸脱水素酵素欠損症の方にピルビン酸を飲んでいただくと、ピルビン酸は乳酸になるときに NADH の過剰を緩和してくれます。ミトコンドリアは NADH を酸化してなくしてくれるわけで、NAD が再生されて解糖系を進めることになります。私のピルビン酸療法は、ミトコンドリアはもうあてにできないと考え、解糖系をいかに ATP 供給源にするかというものです。乳酸が高くなり過ぎておきにピルビン酸を与えることによって、解糖系を賦活化できるのではないかと考えています。数例の患者さんに試していただいて、有効であるということをお報告しています。

● ミトコンドリアをターゲットとした新しい抗がん剤——“虫下し”の効果

太田 北先生のところで開発されているミトコンドリアをターゲットとする薬の状況はどうでしょうか。

北 1つは先ほどのがんに対する“虫下し”ですが、まだ基礎研究の段階です。でも、実際に江角浩安先生(国立がんセンター東病院)のところで動物実験をしています。将来的には先進国でも非常に使える、ミトコンドリアをターゲットとした薬

になると思います。

林 がんといっても、いろいろあると思うのですが、どのがんでしょうか。

北 いま考えているのは膵臓癌や大腸癌で、血管新生があまりない嫌氣的な状況、低栄養、低酸素環境のもので、実際に *in vitro* の実験でもグルコースを除いて、はじめて、がん細胞に回虫と同じような代謝(図 4)が働きはじめます。がん細胞は強いからです、酸素をかなり低濃度にしても生きています。そのときにメタボローム解析で調べたら、コハク酸がたまっていたわけです。要するに回虫と同じ嫌氣的ミトコンドリアの系が動いていて、そこに虫下しであるピルビニウムを入れるとその嫌氣的反応も阻害されるので、その細胞は死んでしまうというわけです。

林 解糖系は抑えられるのですか。

北 グルコースがないので、解糖系は動かないのです。

太田 栄養がないから動けないということですね。

北 そうですね。炭素源はアミノ酸で、実際に慶応大の曾我朋義先生のグループと一緒にがんの組織を直接メタボローム解析すると、やはりアミノ酸を使っているのです。

同じがんでも白血病から固形癌まで全然違うのですが、とくにターゲットとして考えているのは固形癌の中心部あたりで低栄養、低酸素で、血管の新生などが全然ないようなところ。逆に言うと化学療法がなかなか効かないところ。化学療法は肝臓癌など血管新生するところでは、効果がありますが、膵臓癌だとあまり効かない。そのようなときには、このミトコンドリアをターゲットとした薬が使えるだろうと思います。

● 実用も近いアフリカ睡眠病に対する TAO 阻害剤：アスコフラノン

北 いま一番力を入れているのは、先ほどもお話ししました、アフリカ睡眠病の原虫がもつ TAO (trypanosome alternative oxidase) というミトコンドリアの酸化酵素の阻害剤です。この酵素はシアン耐性の特殊な酵素なのです。私たちが見つけたアスコフラノンという、これは糸状菌がつくる物

質なのですが、とても低濃度でこの酸化酵素を阻害します。リコンビナントの TAO で測定すると IC₅₀ が 0.13 nM で、実際に培養した原虫は数分で死んでしまいます。マウスへの投与実験でも血中にうようよいた原虫が、30 分後にはきれいになくなります。いまケニアで中型の動物実験をしていまして、ヤギに原虫を感染させるとふつうは間違いなく次の日に死ぬのですが、アスコフラノンを投与すると次の日の朝には檻を破って逃げていってしまうぐらいになります。ヒトの睡眠病も治したいのですが、まずナガナ病という家畜の睡眠病があって、これはアフリカの経済や食糧面でも大きな問題なのですが、これに対しては比較的早い時期に使えるようになることを期待しています。

太田 いまの話ですと、抗生物質の場合は真核生物と原核生物の違いを利用して選択性が高い薬剤を開発しますが、考え方は同じで、ミトコンドリアがヒトと病原体とで違うのであれば、ミトコンドリアをターゲットとした治療薬ができるということですね。抗生物質と同じように副作用がなく、効果が高いものができるわけです。

● ミトコンドリア研究の楽しさとは？

北 ミトコンドリアは基礎生物学としても非常におもしろいのですが、このようなことを見つけると応用研究としてもとても重要だと実感します。一番シンプルだと思っていた complex II でもこのような展開があるくらい、基礎生物学から臨床まで興味が尽きないと同時に、臨床的にもとても大事だと感じます。呼吸鎖をやっていてよかったなと、これから、また大きな展開が出てくると思います。

私は基本的にはずっと基礎分野で研究してきたのですが、実はこの 10 月(2009 年)から少しギアチェンジをして、基礎も続けるつもりですが、実用化に向けた研究を行っていくつもりです。いまはもう誘導体を 200 ぐらいつくって、たぶん世界ではじめて TAO の結晶化に成功して 2.7 オングストロームでの立体構造解析ができました。ただ、新しいタイプの酵素なので、構造解析にも分子置換法を使えないので、ちょっと時間がかかっている

るのですが。

淀川長治さんではないですが、ミトコンドリアというのは本当におもしろいですね、と(笑)。

太田 私も、よく「同じものを30年も研究していると飽きないのですか」と言われますが(笑)、飽きないで、ずっと楽しくやってこられていますね。

北 ますます、おもしろくなってきますよね。

林 埼玉がんセンターで一人で研究をしていたころは、論文の数とか責任を果たさなくちゃいけないということが気になって、結局すぐに論文になるような仕事をやっていました。また、がんの研究という制限がありましたので、常にそこに収束していかななくてはいけなかった。

しかし、大学に来てからは研究の自由と、学生がいて人数が多いということもあり、いろいろなテーマにチャレンジができる。そうすると失敗も多いのですが、自分が最初に思っていたこととは違う、思いがけない結果が出てくる。また、そのときには期待はずれ、でも、後ですごくおもしろくなっていくということがときどき起こるのですが、こういった経験はエキサイトします。自由に研究をやっているうちに、たまたま転んで下を見たらよいものを拾っちゃったというような偶然があり、ミトコンドリアをやればやるほどおもしろくなっていくと思っています。

田中 私は若い頃はミトコンドリアを単離しないと研究ができないと思っていたのですが、このごろはゲノム解析という武器でヒトでも研究できるようになりました。

この次は、ミトコンドリアの代謝に注目して、非侵襲的に全身の代謝を測るといった新しいアプローチをしようとしています。非放射性同位元素の基質を飲み、呼吸で脳の代謝を非侵襲的に測り、アルツハイマー病の早期診断にも使えるのではないかと考えています。まだまだ、ミトコンドリアを対象に考えれば、新しい画期的な方法が見つかる可能性があると思います。



おわりに

—わが国のミトコンドリア研究の現在

太田 ミトコンドリア自体は、小さな細胞内外の変化によって大きく変化するわけですので、ミトコンドリア全体をさまざまな視点で見るといろいろなことがわかってくる可能性があると思います。実際、いろいろな疾患とミトコンドリアの関連についての研究がたくさんされていまして、検索するととても重要な論文がたくさん見つかります。

最近、「mitochondria」と「Japan」というキーワードで検索し、その中からミトコンドリアが主にかかわっている論文を探したのですが、この2年間でどのぐらい出ていると思われるでしょうか？

田中 「Japan」というキーワードが入ってですね？

太田 はい。日本人の研究室でどのぐらいミトコンドリアを研究しているか、論文が2年間でどのぐらい出ているかと。

林 論文ですか。

太田 ええ。実は、100ぐらいあるのです。著者がオーバーラップしないようにしてリストアップすると100カ所ぐらいの研究室から、この2年間でミトコンドリアと疾患の関係の研究が報告されています。

今回の特集号では、ミトコンドリアと疾患について執筆をお願いしたのですが、ミトコンドリアとそれぞれの疾患との関連が分子機構として解明されているレベルにまで到達していると思います。今回執筆していただいた以外のいろいろな疾患についても、ミトコンドリアは重要な役割を果たしていることが実証されてきています。

最後に、ミトコンドリアは常に新しいいろいろな側面があつて、疾患との関係を分子レベルで明確にすることで、治療や予防に貢献することができると 생각합니다。今後のミトコンドリア医学の発展に期待したいと思います。

先生方、本日はありがとうございました。

(2009年10月15日収録)



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

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

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

^b Division of Cardiology, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

^c Division of Geriatric Medicine, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

^d Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

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

^f 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

H₂

ABSTRACT

Inhalation of hydrogen (H₂) 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 H₂ gas confers cardioprotection against ischemia–reperfusion injury in rats. In isolated perfused hearts, H₂ gas enhances the recovery of left ventricular function following anoxia–reoxygenation. Inhaled H₂ 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 H₂ gas at incombustible levels during ischemia and reperfusion reduces infarct size without altering hemodynamic parameters, thereby preventing deleterious left ventricular remodeling. Thus, inhalation of H₂ 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 (·OH), the most highly reactive oxygen species. By comparison, superoxide anion radical (O₂^{·-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂) 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 (H₂) is a novel anti-oxidant with certain unique properties. (1) H₂ 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 (M. Sano).

including mitochondria and nuclei; (2) H₂ specifically quenches exclusively detrimental ROS, such as ·OH and peroxynitrite (ONOO⁻), while maintaining the metabolic oxidation–reduction reaction and other less potent ROS, such as O₂⁻, H₂O₂, and nitric oxide (NO[·]); (3) inhalation of H₂ 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, H₂ 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 H₂ gas exerts cardioprotective effects during myocardial ischemia–reperfusion. We showed the inhaled H₂ 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 H₂ 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. H₂ 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 H₂ in the gas mixture was determined using the Breath Gas Analyzer Model TGA-2000 (TERAMECS, Kyoto, Japan). Saturation of arterial oxygen level (SaO₂) was monitored by Clip sensor (PDR-43C) connected to Stand Alone Pulseoxymeter (CANL425SV). 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 H₂ gas concentration. H₂ gas concentration was measured in tissues using a needle-type H₂ sensor (Unisense). The electrode current was measured with a picoammeter (Keithley) attached to a strip chart. The negative current obtained from the H₂ sensor was converted to regional H₂ concentration using a

calibration curve generated from known levels of H₂ 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 NaHCO₃, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l MgSO₄, 1.2 mmol/l KH₂PO₄, 1.75 mmol/l CaCl₂, 0.5 mmol/l EDTA, 11 mmol/l glucose, and 5 mmol/l pyruvate) equilibrated with a gas mixture comprised of 95% O₂/5% CO₂ 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); 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 Image/J 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

H₂ gas improves the recovery of left ventricular function during reoxygenation after anoxia in isolated perfused hearts

We first studied the effect of H₂ 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% N₂ (Control group) or 100% H₂ (H₂ group) followed by 40 min of aerobic reperfusion with buffer equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ (Fig. 1A). H₂ 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 H₂ gas immediately increases the intramyocardial H₂ gas concentration

Before we determined whether inhalation of hydrogen (H₂) gas confers cardioprotection against ischemia–reperfusion injury, the regional delivery of inhaled H₂ gas was investigated by monitoring the time-course of changes in H₂ levels using a needle-shaped

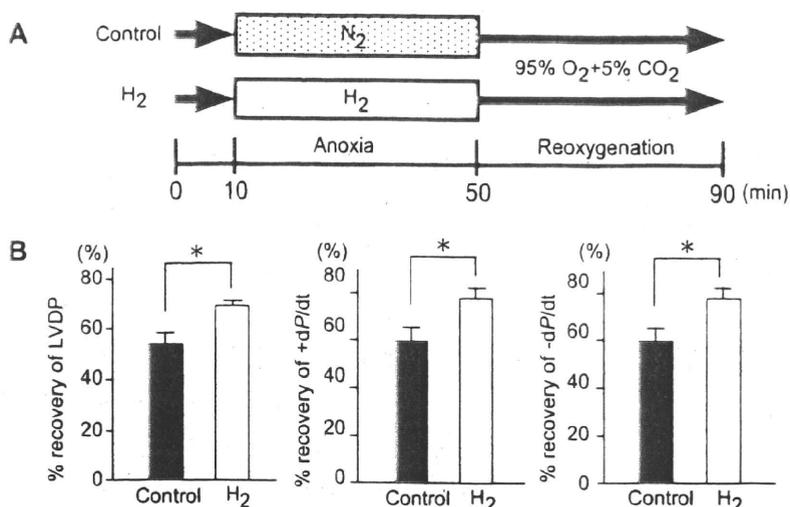


Fig. 1. H₂ gas improves the recovery of left ventricular function during reoxygenation after anoxia in isolated perfused hearts. (A) Experimental protocol of anoxia-reoxygenation. Isolated perfused rat hearts were subjected to 40 min of anoxia with buffer equilibrated with either 100% N₂ (control group) or 100% H₂ (H₂ 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 H₂ inhalation group (n = 10, *P < 0.05, compared to control group).

hydrogen sensor electrode inserted directly into the tissues. When 2% H₂ gas was inhaled, the arterial H₂ levels started to increase 2 min after inhalation of H₂ gas and reached a maximum level after 5 min [1.82 ± 0.02% (n = 5)]. The incremental rate of H₂ saturation for the non-ischemic myocardium was similar to that observed in arterial blood with attaining a maximum of 1.73 ± 0.02% (n = 5) (Fig. 2A). By contrast, the rate of increase in the H₂ saturation was slower in the center of the thigh muscle with attaining a maximum level of 0.50 ± 0.03% (n = 5) after 30 min (Fig. 2B and Supplementary Fig.).

Of note, H₂ gas levels were increased even in the ischemic myocardium (Fig. 2C). Although the incremental rate of H₂ saturation was slower in the ischemic myocardium than in the non-ischemic myocardium, the peak level of H₂ 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 H₂ in the ischemic myocardium immediately increased to the level observed in the non-ischemic myocardium.

Inhalation of H₂ gas protects the heart from ischemia–reperfusion injury

To investigate whether inhalation of H₂ gas protects the heart from ischemia–reperfusion injury, rats were subjected to coronary artery occlusion for 30 min followed by reperfusion for 24 h. H₂ gas was administered at the onset of ischemia and continued for 60 min after reperfusion. H₂ 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

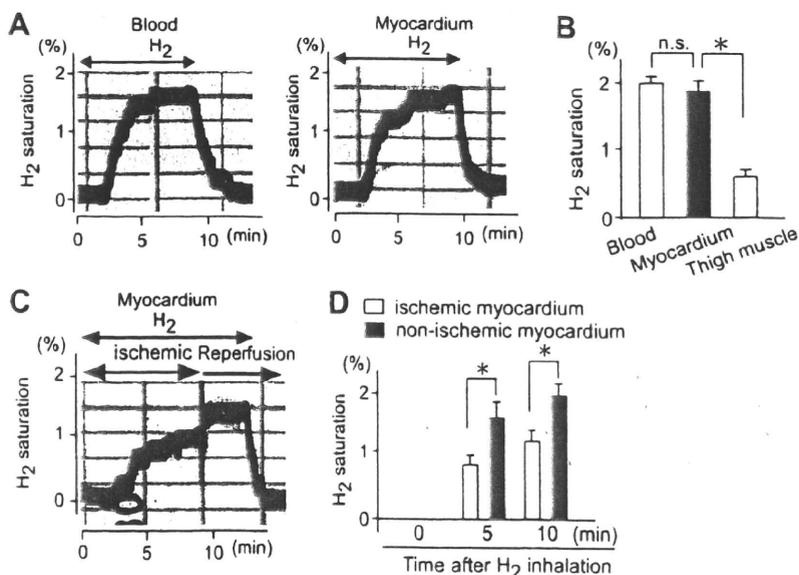


Fig. 2. Inhalation of H₂ gas increases the intramyocardial H₂ gas concentration. H₂ gas at 2% was administered by respiration to intubated rats receiving mechanical ventilation and the concentration of H₂ in tissue was recorded continuously. (A) A needle-type H₂ sensor was inserted in LV cavity (arterial blood) and non-ischemic LV myocardium. (B) Comparison of peak H₂ 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 H₂ in 'at risk' area for infarction during ischemia and reperfusion. (D) Comparison of change in the H₂ concentration between non-ischemic and ischemic myocardium after H₂ inhalation (n = 5, *P < 0.05, compared to the level of non-ischemic myocardium).

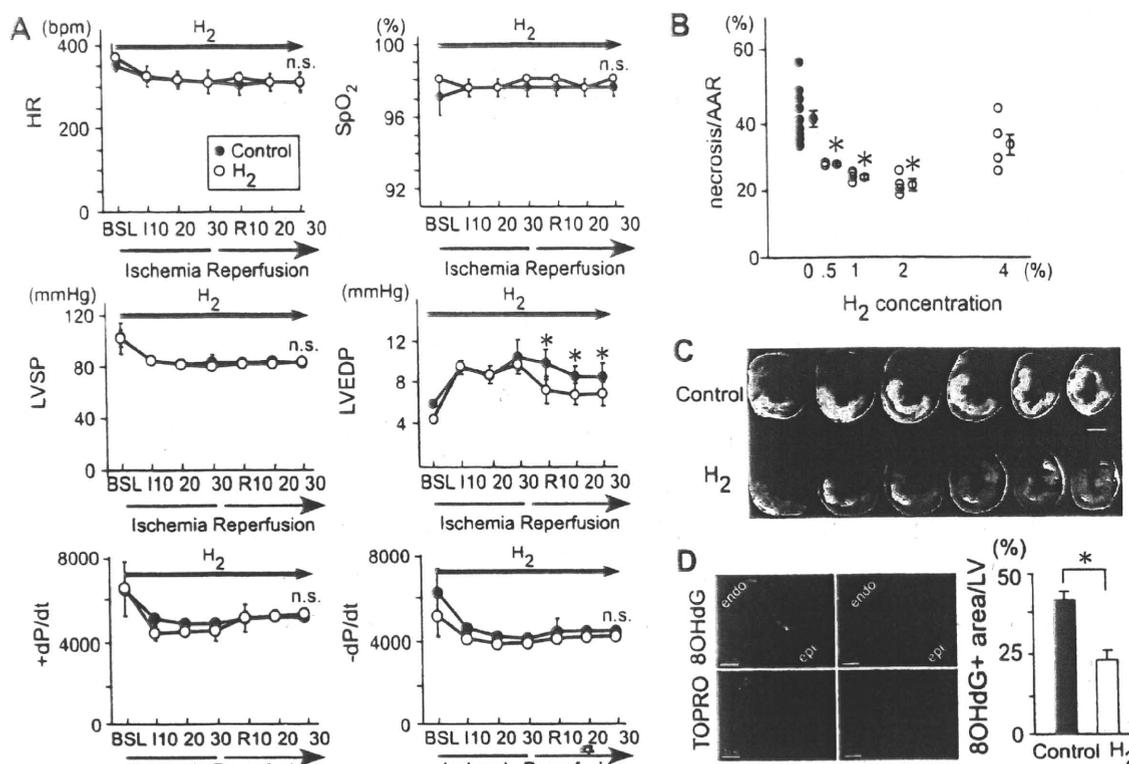


Fig. 3. Inhalation of H₂ reduces infarct size induced by ischemia–reperfusion injury. (A) Changes in heart rate (HR), oxygen saturation by pulse oximetry (SpO₂), and LV systolic pressure (LVSP), LV diastolic pressure (LVEDP) and LV peak positive and negative dP/dt were monitored during ischemia–reperfusion injury ($n = 5$ in each group). (B) H₂-dependent decrease in infarct size is expressed as the ratio of total infarct area/AAR ($P < 0.05$, compared to control group). (C) Representative photographs of serial heart sections obtained from rats subjected to myocardial ischemia–reperfusion injury in the presence or absence of H₂ inhalation. Bar = 2 mm. (D) Immunohistochemical staining with antibodies against 8-OHdG was performed 24 h after ischemia–reperfusion injury. Quantification of 8-OHdG immunoreactive area was expressed as percentage of total LV area at serial short axis sections ($n = 5$, $P < 0.05$, H₂ inhalation group compared to control group). endo, endocardium; epi, epicardium.

pressure, LV peak positive and negative LV dP/dt, between the control group and the 2% H₂ gas inhalation group. Notably, LV-end-diastolic pressure after reperfusion was significantly lower in H₂ gas inhalation group compared to control group ($n = 5$, $P < 0.05$).

In the absence of H₂ gas inhalation, infarct size following ischemia–reperfusion was $41.6 \pm 2.5\%$ of the area at risk ($n = 9$). By comparison, inhalation of 0.5–2% H₂ gas significantly reduced infarct size, with 2% H₂ gas providing the most prominent effects ($21.2 \pm 1.6\%$ of area at risk, $n = 4$, Fig. 3B and C). There was no significant difference in area at risk/LV among control group and H₂ gas inhalation groups (data not shown). Consistent with those observations, the quantitative determination of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) immunoreactive area, a biomarker of oxidative stress, revealed that the level of oxidative injury elicited in the 'at risk' area was significantly smaller in the group receiving 2% H₂ gas inhalation than that of control group ($n = 5$, $P < 0.05$, Fig. 3D).

Inhalation of H₂ gas reduces LV remodeling after ischemia–reperfusion injury

To determine the impact of H₂ inhalation at the time of ischemia–reperfusion on pathological LV remodeling, LV morphology and function were monitored by echocardiography 30 days after myocardial ischemia–reperfusion injury. Control rats showed maladaptive pathological remodeling after myocardial infarction, including dilatation of LV cavity, reduced LV systolic function. Notably, inhalation of H₂ gas during myocardial ischemia–reperfusion reduced pathological remodeling after myocardial infarction (Fig. 4).

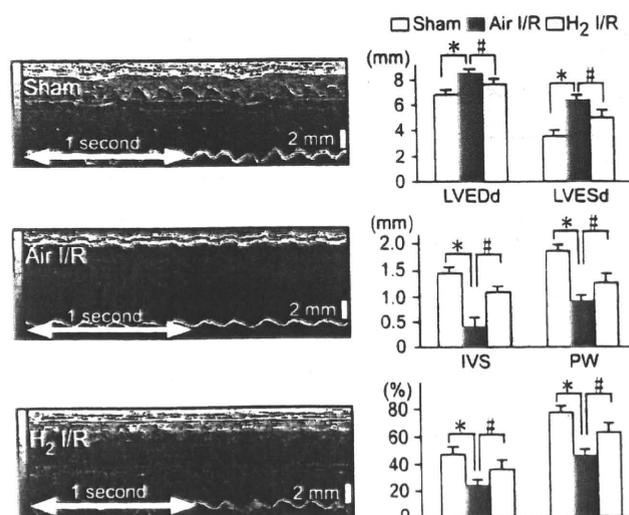


Fig. 4. Inhalation of H₂ gas reduces adverse LV remodeling. Representative M-mode echocardiographic images of sham-operated (sham), ischemia–reperfusion with air inhalation (Air I/R), and ischemia–reperfusion with H₂ inhalation (H₂ I/R). Measurement of M-mode echocardiographic images in each group. LVEDd, LV end-diastolic diameter (μm); LVESd, LV end-systolic diameter (μm); IVC, intraventricular septum diameter (μm); PW, posterior wall thickness (μm); FS, fractional shortening (%); EF, ejection fraction (%) ($n = 5$, $P < 0.05$, compared to sham-operated group; $^{\#}P < 0.05$, compared to Air I/R group).

Discussion

This is the first study to demonstrate that inhalation of H₂ gas, at an incombustible level, limit the extent of myocardial infarction

resulting from myocardial ischemia–reperfusion injury, and thereby preserve LV function *in vivo*. The cardioprotective effect of H₂ gas was also confirmed *ex vivo* Langendorff-perfused hearts subjected to anoxia–reoxygenation injury. The anti-oxidant properties of H₂ were confirmed by the demonstration that (1) H₂ improves the recovery of LV function during reoxygenation after anoxia, one of the oxidative stress model, in isolated perfused hearts; (2) inhalation of H₂ gas ameliorates the level of 8-OHdG immunoreactivity in the ‘at risk’ area for infarction. The anti-oxidant action of molecular H₂ may be explained, at least partially, by direct ROS scavenging effect. However, it remains unclear if the anti-oxidant action of H₂ is also ascribed to the activation of the reperfusion injury salvage kinase pathways or a direct effect on mitochondrial energetics.

Gas inhalation as disease therapy has received recent interest. There are three endogenous gas signaling molecules, known as gasotransmitters, include nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and hydrogen sulfide (H₂S). The increased production of these gases under stress conditions may reflect the active involvement of these gases in the protective response. In pre-clinical experimental models of disease, including ischemia–reperfusion injury, the inhalation of exogenous CO or H₂S has produced a favorable outcome for most vital organs [19–22]. However, the inherent toxicity of these gases must be investigated for gas inhalation to be considered an effective therapeutic strategy. It is unknown if the therapeutically effective threshold for CO or H₂S can be attained locally in target organs without delivering a potentially toxic level of the gasses via the lungs.

H₂ is not produced endogenously in mammalian cells since the hydrogenase activity responsible for the formation of H₂ gas has not been identified [23]. The spontaneous production of H₂ gas in the human body occurs via fermentation of undigested carbohydrates by resident enterobacterial flora. H₂ is transferred to the portal circulation and excreted through the breath in significant amounts. We demonstrated that inhaled H₂ at therapeutic dose has no adverse effects on the saturation level of arterial oxygen (SpO₂) or hemodynamic parameters including heart rate and LV pressure. H₂ dissolved in the blood is distributed to tissues proportional to regional blood flow, and is rapidly eliminated by the lungs. Accordingly, the H₂ gas clearance method was employed to measure local blood flow in various tissues [24]. Since the heart is one of the most highly perfused tissues, the intramyocardial H₂ concentration increases immediately following inhalation of H₂, and attaining to almost compatible levels of that observed in arterial blood within 10 min. Of note, the regional H₂ concentration in the ischemic myocardium reaches at two thirds of the value observed in the non-ischemic myocardium. This may occur through gaseous diffusion from the blood in the ventricular cavity and/or adjacent non-ischemic myocardium. These findings indicate that administration of H₂ gas by inhalation, in patients with totally coronary artery occlusion, can efficiently increase the regional concentration of H₂ in the ‘at risk’ area for myocardial infarction before reestablishing coronary blood flow within the occluded infarct-related artery.

We demonstrated that inhalation of H₂ gas is promising strategies to alleviate ischemia–reperfusion injury at the time of recanalization of coronary artery. When translated into the clinical practice, inhalation of H₂ gas must be most frequently applied in the treatment of patients with acute myocardial infarction in conjunction with routinely performed PCI procedures. Further understanding of the mechanisms underlying the signaling pathways involved in H₂-mediated anti-oxidant activity, and the capacity of H₂ to influence cellular metabolism, is required to fully exploit inhalation of H₂ gas as a therapeutic strategy.

Acknowledgments

We thank M. Okada (NIHON KODEN), S. Kotouda (LMS laboratory and Medical Supplies), C. Ogawa, K. Nishimaki, M. Kamimura, M. Abe, Y. Miyake, H. Kawaguchi, H. Shiozawa, and M. Ono for their technical assistance. M. Sano is a core member of the Global Center-of-Excellence (GCOE) for Human Metabolomics Systems Biology from MEXT. This work was supported by a PRESTO (Metabolism and Cellular Function) grant from the Japanese Science and Technology Agency awarded to M. Sano.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.165.

References

- [1] A. Volpi, C. De Vita, M.G. Franzosi, E. Geraci, A.P. Maggioni, F. Mauri, E. Negri, E. Santoro, L. Tavazzi, G. Tognoni, Determinants of 6-month mortality in survivors of myocardial infarction after thrombolysis. Results of the GISSI-2 data base. The Ad hoc Working Group of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-2 Data Base, *Circulation* 88 (1993) 416–429.
- [2] E.C. Keeley, J.A. Boura, C.L. Grines, Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials, *Lancet* 361 (2003) 13–20.
- [3] E. Braunwald, R.A. Kloner, Myocardial reperfusion: a double-edged sword?, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 1713–1719.
- [4] D.M. Yellon, D.J. Hausenloy, Myocardial reperfusion injury, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 1121–1135.
- [5] J.L. Zweier, Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1353–1357.
- [6] R. Bolli, B.S. Patel, M.O. Jeroudi, E.K. Lai, P.B. McCay, Demonstration of free radical generation in “stunned” myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.* 82 (1988) 476–485.
- [7] T. Vanden Hoek, L.B. Becker, Z.H. Shao, C.Q. Li, P.T. Schumacker, Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion, *Circ. Res.* 86 (2000) 541–548.
- [8] J.T. Flaherty, B. Pitt, J.W. Gruber, R.R. Heuser, D.A. Rothbaum, L.R. Burwell, B.S. George, D.J. Kereiakes, D. Deitchman, N. Gustafson, et al., Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction, *Circulation* 89 (1994) 1982–1991.
- [9] V.J. Richard, C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer, Therapy to reduce free radicals during early reperfusion does not limit the size of myocardial infarcts caused by 90 minutes of ischemia in dogs, *Circulation* 78 (1988) 473–480.
- [10] C. Penna, R. Rastaldo, D. Mancardi, S. Raimondo, S. Cappello, D. Gattullo, G. Losano, P. Pagliaro, Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation, *Basic Res. Cardiol.* 101 (2006) 180–189.
- [11] J.M. Downey, M.V. Cohen, A really radical observation—a comment on Penna et al., *Basic Res. Cardiol.* 101 (2006) 190–191.
- [12] I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi, M. Watanabe, K. Nishimaki, K. Yamagata, K. Katsura, Y. Katayama, S. Asoh, S. Ohta, Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals, *Nat. Med.* 13 (2007) 688–694.
- [13] K. Fukuda, S. Asoh, M. Ishikawa, Y. Yamamoto, I. Ohsawa, S. Ohta, Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361 (2007) 670–674.
- [14] M. Tani, Y. Suganuma, H. Hasegawa, K. Shinmura, Y. Hayashi, X. Guo, Y. Nakamura, Changes in ischemic tolerance and effects of ischemic preconditioning in middle-aged rat hearts, *Circulation* 95 (1997) 2559–2566.
- [15] K. Shinmura, K. Tamaki, R. Bolli, Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K⁺ channels in both young and aged hearts, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 285–296.
- [16] K. Shinmura, K. Tamaki, K. Saito, Y. Nakano, T. Tobe, R. Bolli, Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase, *Circulation* 116 (2007) 2809–2817.
- [17] J.P. Headrick, Aging impairs functional, metabolic and ionic recovery from ischemia–reperfusion and hypoxia–reoxygenation, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 (1998) 1415–1430.
- [18] J. Endo, M. Sano, J. Fujita, K. Hayashida, S. Yuasa, N. Aoyama, Y. Takehara, O. Kato, S. Makino, S. Ogawa, K. Fukuda, Bone marrow derived cells are involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy in response to pressure overload, *Circulation* 116 (2007) 1176–1184.