

Fig. 6. A,B: Decreased number of cleaved caspase 9-, cleaved caspase 3-, and TUNEL-positive cells in the L4 lumbar cords of G93A SOD1 Tg mice intrathecally infused with TAT-modified Bcl-X_L for 28 days. Compared with WT mice (Aa,e,i), note the increased number of cleaved caspase 9-, cleaved caspase 3-, and TUNEL-positive cells in G93A mice treated with aCSF (Ab,f,j, arrows, B) or TAT-GFP (Ac,g,k, arrows, B), and the attenuation of this increase in mice treated with TAT-modified Bcl-X_L (Ad,h,l, arrows, B). Data are mean ± SD. ***P* < 0.01 compared with aCSF (one-factor ANOVA followed by Tukey-Kramer post hoc comparison). Representative photomicrographs of cleaved caspase 9 (Aa–d, arrows)-, cleaved caspase 3 (Ae–h, arrows)-, and TUNEL (Ai–l, arrows)-positive cells in the ventral horns of WT or G93A mice. Larger scale bar in i = 50 μm for a–i; smaller scale bar in j = 10 μm for j–l.

motor neurons (Fig. 2Ab, arrows, Ch), than the amounts previously reported for intraperitoneal or intravenous administration [1.7 nmol (Schwarze et al., 1999), 5 mg/kg (Asoh et al., 2002), 3 mg/kg (Cao et al., 2002), 0.6 nmol (Kilic et al., 2002), 0.6 nmol (Kilic et al., 2003), 10 mg/kg (Kim et al., 2005)]; thus, intrathecal infusion of TAT-fused proteins using an osmotic minipump is a better method of delivering therapeutic proteins into the spinal cord.

Antiapoptotic members of the Bcl-2 family, Bcl-2 and Bcl-X_L, block cytochrome c release from mitochondria (Reed, 1997; Halestrap et al., 2000), and this blockage interferes with the proapoptotic actions of BAX

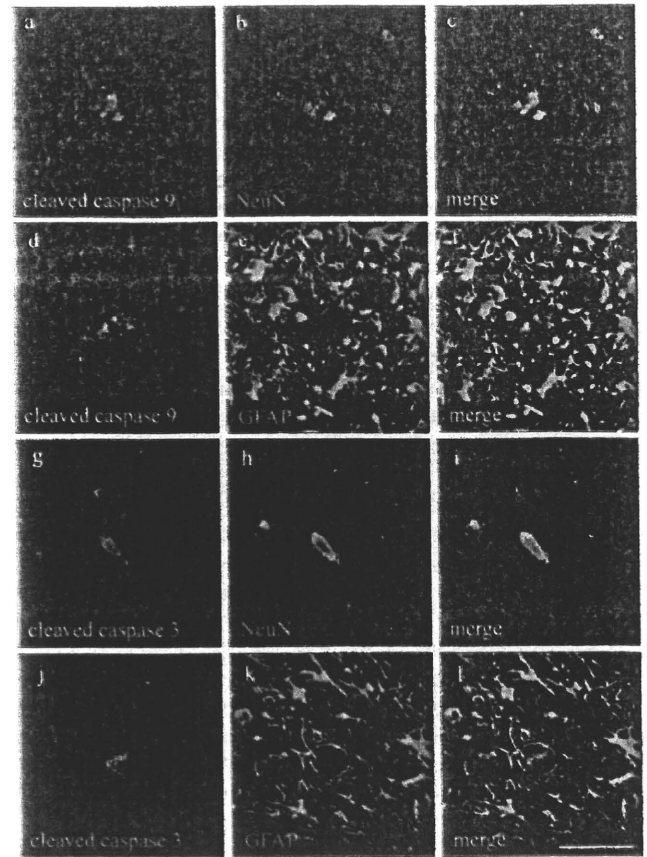


Fig. 7. Expression of cleaved caspase 9 and cleaved caspase 3 in motor neurons of the ventral horn in the lumbar cord of G93A SOD1 Tg mice. Representative pictures show the expression of cleaved caspase 9 and 3 in large neurons with a diameter greater than 20 μm in the ventral horns of G93A mice, suggesting the expression of these molecules in motor neurons. Note that the immunofluorescence signals for cleaved caspase 9 (a,d, green) or cleaved caspase 3 (g,j, green) and NeuN (b,h, red) are colocalized (c,i, overlay), but those for cleaved caspases and GFAP are not colocalized (e,k, red, f,l, overlay). Scale bar = 50 μm.

(Cheng et al., 2001; Sathasivam et al., 2001). In G93A mice, the levels of Bcl-2 and Bcl-X_L tend to decrease gradually from the asymptomatic stage, and the level of BAX increases slightly during the asymptomatic stage, but much more drastically during the early symptomatic stage (Vukosavic et al., 1999). Overexpression of Bcl-2 delays the activation of caspases (Vukosavic et al., 2000) and transgenic overexpression of Bcl-2 or intraspinal injection of adeno-associated virus encoding Bcl-2 during the asymptomatic stage produce neuroprotective effects (Kostic et al., 1997; Azzouz et al., 2000); thus, Bcl-2 and Bcl-X_L can be used as therapeutic proteins for the treatment of ALS. We constructed a modified Bcl-X_L with three amino acid substitutions in Phe, Asn, and Lys in place of Tyr²², Gln²⁶, and Arg¹⁶⁵, respectively (Asoh et al., 2000). Because a modified Bcl-X_L has a more powerful antiapoptotic effect rather than original Bcl-X_L (Asoh et al., 2000, 2002) and G93A mice gener-

ally experience disease onset at about 100 days of age (Ohta et al., 2006), we intrathecally infused the modified Bcl-X_L protein fused with TAT, for 28 days, in G93A mice at 91 days of age. This treatment method successfully resulted in clinical benefits (delay of disease onset, longer survival, improvement in motor performance, and inhibition of motor neuron death; Figs. 3–5). The uptake of TAT-fused protein into the brain peaks at 4–8 hr after infusion, after which it gradually decreases (Cao et al., 2002). In the present study, infusion of TAT-modified Bcl-X_L stopped at 118 days of age (28 days after minipump placement), and the amount of TAT-modified Bcl-X_L reaching the spinal cord was expected to decrease gradually along with its antiapoptotic effects. However, at 133 days of age (15 days after the termination of TAT-modified Bcl-X_L injection), the numbers of cells positive for cleaved caspases 9 and 3, as well as TUNEL, were much lower in mice treated with TAT-modified Bcl-X_L than in those treated with aCSF or TAT-GFP (Fig. 6). This result suggests that the antiapoptotic effects of TAT-modified Bcl-X_L continued for at least 15 days after it stopped being infused. Double-immunofluorescence studies using anticaspase 9 or 3 antibodies plus anti-NeuN or anti-GFAP antibodies revealed that neurons, including motor neurons, expressed apoptotic markers (Fig. 7), consistently with previous reports (Vukosavic et al., 2000; Inoue et al., 2003). Therefore, we considered TUNEL-positive cells to be neurons, including motor neurons, consistent with previous reports (Martin et al., 2007). Cao et al. (2002) reported that most of the TAT-Bcl-X_L was delivered into neurons but some into astrocytes. We considered that TAT-modified Bcl-X_L might have transduced in some astrocytes of spinal cord of G93A mice and that the astrocytes might act as inhibitors of apoptosis for motor neurons.

Although we showed that intrathecal infusion of TAT-modified Bcl-X_L results in therapeutic effects in ALS model mice, the therapeutic effectiveness we showed was consistent with previous data (Shoemaker et al., 2007); that is, blocking apoptotic pathways only is not fully sufficient to treat ALS (Migheli et al., 1999; Gould et al., 2006). However, we also showed that a TAT-fused protein was effectively transferred into spinal cord neurons, including motor neurons, when delivered intrathecally (Fig. 2). In the future, other potential therapeutic proteins for the treatment of ALS, which cannot usually cross cell membranes, can be used in therapy by making fusion proteins with TAT.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Steven F. Dowdy for the generous gift of pTAT-HA-GFP vectors. This work was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (B) 15390273 and (Hoga) 15659338 and the National Project on Protein Structural and Functional Analyses from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan, and by grants (to Itoyama Y, Kimura I and

Kuzuhara S) from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Abe K, Morita S, Kikuchi T, Itoyama Y. 1997. Protective effect of a novel free radical scavenger, OPC-14117, on wobbler mouse motor neuron disease. *J Neurosci Res* 48:63–70.
- Asoh S, Ohsu T, Ohta S. 2000. The super anti-apoptotic factor Bcl-xFNK constructed by disturbing intramolecular polar interactions in rat Bcl-xL. *J Biol Chem* 275:37240–37245.
- Asoh S, Ohsawa I, Mori T, Katsura K, Hiraide T, Katayama Y, Kimura M, Ozaki D, Yamagata K, Ohta S. 2002. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17107–17112.
- Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC, Zurn AD, Aebischer P, Bueler H. 2000. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet* 9:803–811.
- Brown RH Jr, Robberecht W. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. *Semin Neurol* 21:131–139.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851–1854.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723–749.
- Cao G, Pei W, Ge H, Liang Q, Luo Y, Sharp FR, Lu A, Ran R, Graham SH, Chen J. 2002. In vivo delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 22:5423–5431.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705–711.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, Warner C, Deng G, Soriano E, Smyth C, Parge HE, Ahmed A, Roses AD, Halliwell RA, Periak-Vance MA, Siddique T. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047–1051.
- Dietz GP, Kilic E, Bahr M. 2002. Inhibition of neuronal apoptosis in vitro and in vivo using TAT-mediated protein transduction. *Mol Cell Neurosci* 21:29–37.
- Farah CA, Nguyen MD, Julien JP, Leclerc N. 2003. Altered levels and distribution of microtubule-associated proteins before disease onset in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 84:77–86.
- Gmel R, Ho T, Maragakis NJ, Jackson M, Steiner JP, Rothstein JD. 2006. Selective up-regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiol Dis* 21:556–567.
- Ghadge GJ, Lee JP, Bindokas VP, Jordan J, Ma L, Miller RJ, Roos RP. 1997. Mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis: molecular mechanisms of neuronal death and protection. *J Neurosci* 17:8756–8766.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. 2006. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26:8774–8786.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Canto MCJ, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772–1775.

- Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. 2000. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28:170-177.
- Inoue H, Tsukita K, Iwasato T, Suzuki Y, Tomioka M, Tateno M, Nagao M, Kawata A, Saido TC, Miura M, Misawa H, Itohara S, Takahashi R. 2003. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J* 22:6665-6674.
- Julien JP. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104:581-591.
- Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, Fisher EM, Greensmith L. 2005. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol* 169:561-567.
- Kilic E, Dietz GP, Hermann DM, Bahr M. 2002. Intravenous TAT-Bcl-X1 is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann Neurol* 52:617-622.
- Kilic U, Kilic E, Dietz GP, Bahr M. 2003. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 34:1304-1310.
- Kilic U, Kilic E, Dietz GP, Bahr M. 2004. The TAT protein transduction domain enhances the neuroprotective effect of glial-cell-line-derived neurotrophic factor after optic nerve transection. *Neurodegen Dis* 1:44-49.
- Kim DW, Eum WS, Jang SH, Kim SY, Choi HS, Choi SH, An JJ, Lee SH, Lee KS, Han K, Kang TC, Won MH, Kang JH, Kwon OS, Cho SW, Kim IY, Park J, Choi SY. 2005. Transduced Tat-SOD fusion protein protects against ischemic brain injury. *Mol Cells* 19:88-96.
- Kirkinezos IG, Bacman SR, Hernandez D, Oca-Cosio J, Arias LJ, Perez-Pinzon MA, Bradley WG, Moraes CT. 2005. Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J Neurosci* 25:164-172.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 277:559-562.
- Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H, Setoguchi Y, Abe K. 2002. Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Apoptosis* 7:329-334.
- Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H, Abe K. 2003. Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 25:195-200.
- Manfredi G, Xu Z. 2005. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* 5:77-87.
- Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ. 2002. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Int* 40:543-551.
- Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. 2007. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondrial pathology and cell death. *J Comp Neurol* 500:20-46.
- Migheli A, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Girelli M, Schiffer D, Bendotti C. 1999. Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med* 5:966-967.
- Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Murakami T, Yokoyama M, Shoji M, Abe K. 2005. Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 235:61-68.
- Ohta Y, Nagai M, Nagata T, Murakami T, Nagano I, Narai H, Kurata T, Shiote M, Shoji M, Abe K. 2006. Intrathecal injection of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes proliferation of neural precursor cells in the spinal cords of mice with mutant human SOD1 gene. *J Neurosci Res* 84:980-992.
- Ozaki D, Sudo K, Asoh S, Yamagata K, Ito H, Ohta S. 2004. Transduction of anti-apoptotic proteins into chondrocytes in cartilage slice culture. *Biochem Biophys Res Commun* 313:522-527.
- Rabizadeh S, Gralla EB, Borchelt DR, Gwinn R, Valentine JS, Sisodia S, Wong P, Lee M, Hahn H, Bredesen DE. 1995. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3024-3028.
- Rao MV, Nixon RA. 2003. Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review. *Neurochem Res* 28:1041-1047.
- Reed JC. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-776.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Bergh RVD, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. 2001. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:257-274.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285:1569-1572.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. 1996. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-X₁. *Cancer Res* 56:2161-2166.
- Shoemaker JL, Seely KA, Reed RL, Crow JP, Prather PL. 2007. The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J Neurochem* 101:87-98.
- Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N, Przedborski S. 1999. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 73:2460-2468.
- Vukosavic S, Stefanis L, Jackson-Lewis V, Guegan C, Romero N, Chen C, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 2000. Delaying caspase activation by Bcl-2: a clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 20:9119-9125.
- Warita H, Itoyama Y, Abe K. 1999. Selective impairment of fast anterograde axonal transport in the peripheral nerves of asymptomatic transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res* 819:120-131.
- Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiro Y, Nagano I, Abe K. 2001. Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Apoptosis* 6:345-352.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105-1116.

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 2nd 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

Chain reaction of lipid peroxidation

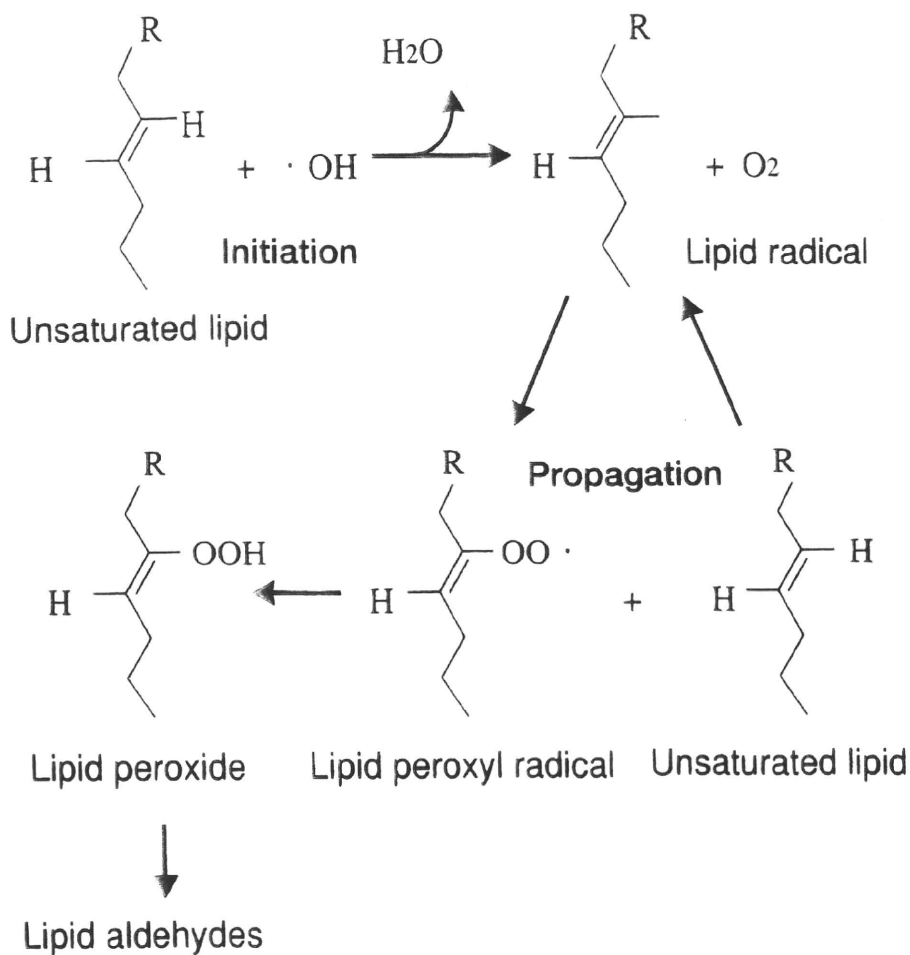


図1 連鎖的脂質過酸化反応

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 (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 H_2O 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、加齢とともに抗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

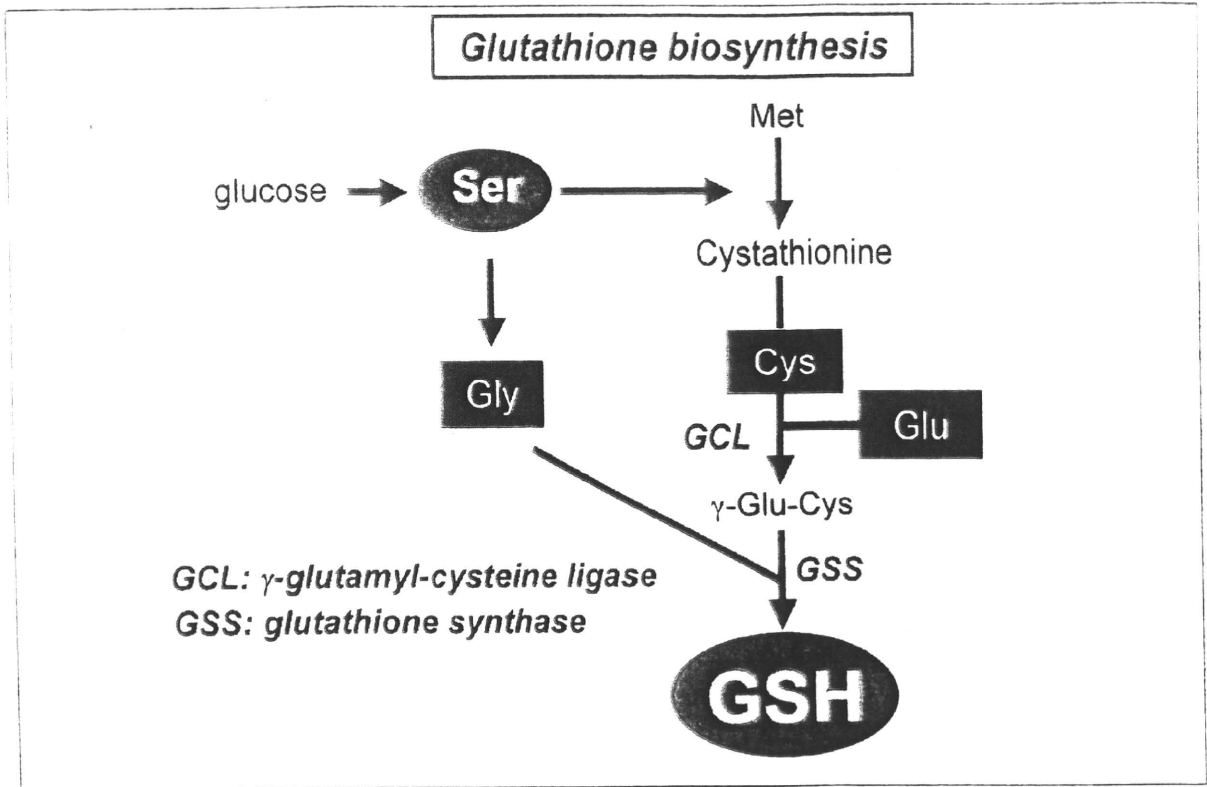


図2 グルタチオン生合成経路

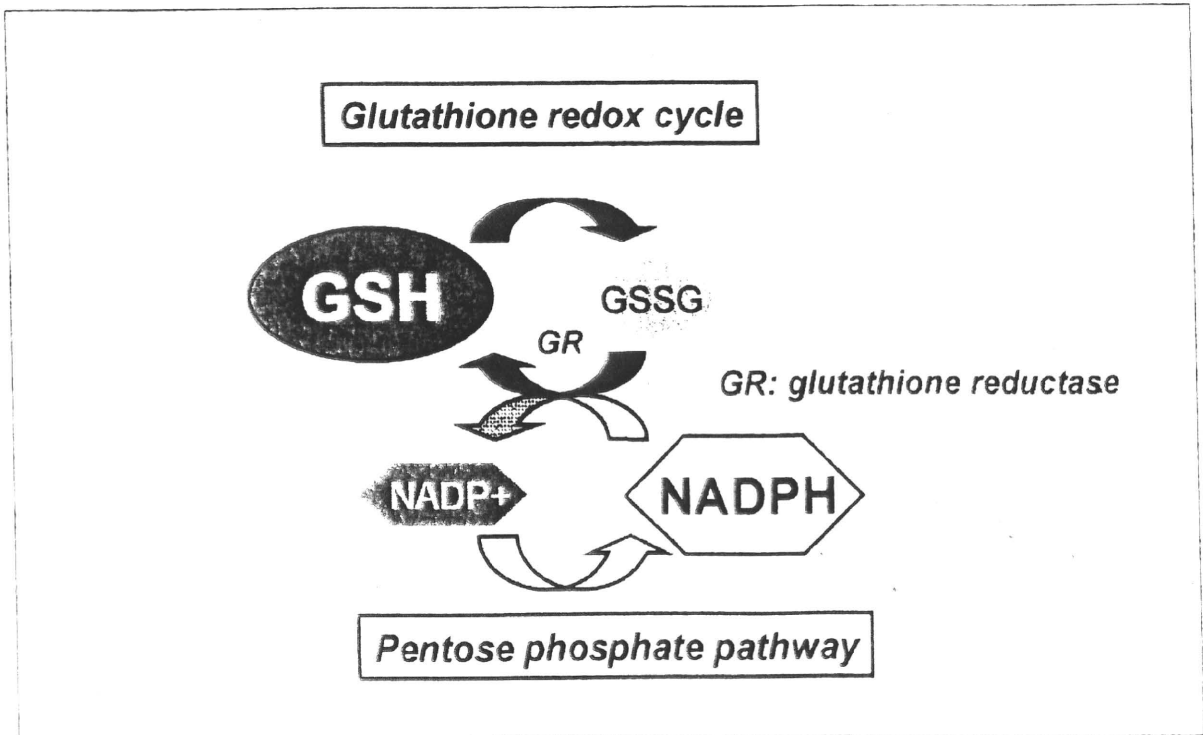


図3 グルタチオン・レドックスサイクル

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、 γ -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、 γ -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 γ -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¹⁾。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 α (eIF2 α)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 α , 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²⁾。

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、

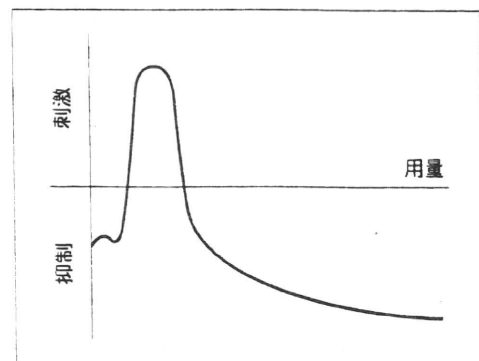


図1 ホルミシス

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。

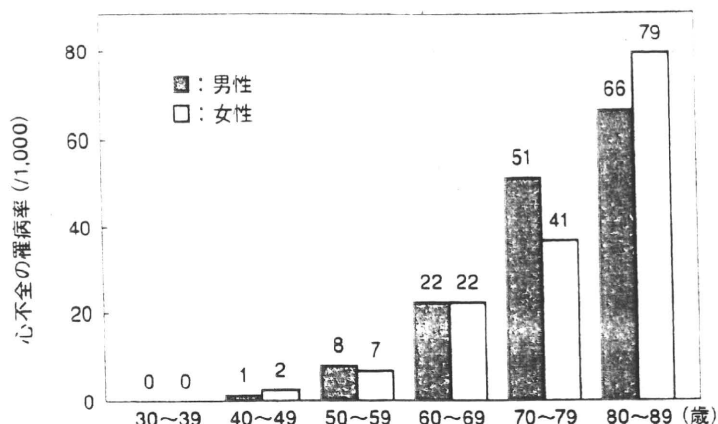


図 2 高齢者では心不全罹病率が増加する⁸⁾

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障害、すなわち過剰な活性酸素の産生、脂質過酸化、酸化 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% 患者ではなく、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^{3,4)}。

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⁵⁾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

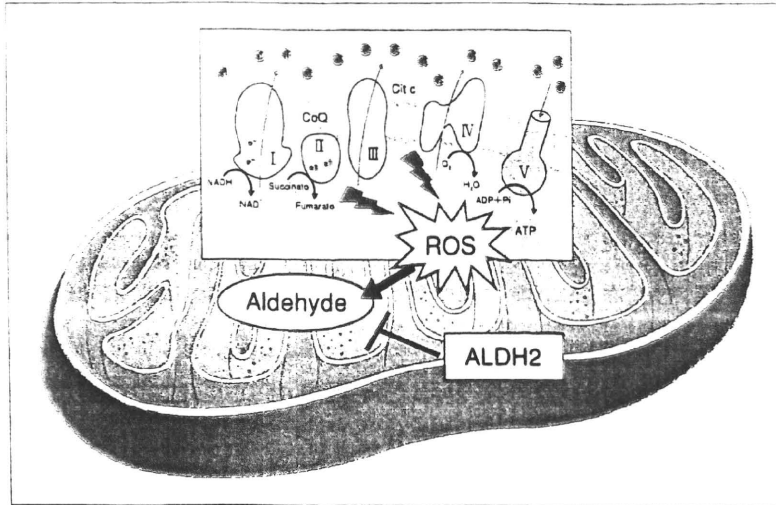


図 3 ALDH2はミトコンドリアの抗酸化酵素

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-ヒドロキシノネナ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 α 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 α (eIF2 α) 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 α 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 α 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

サイト
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⁶⁾。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)。

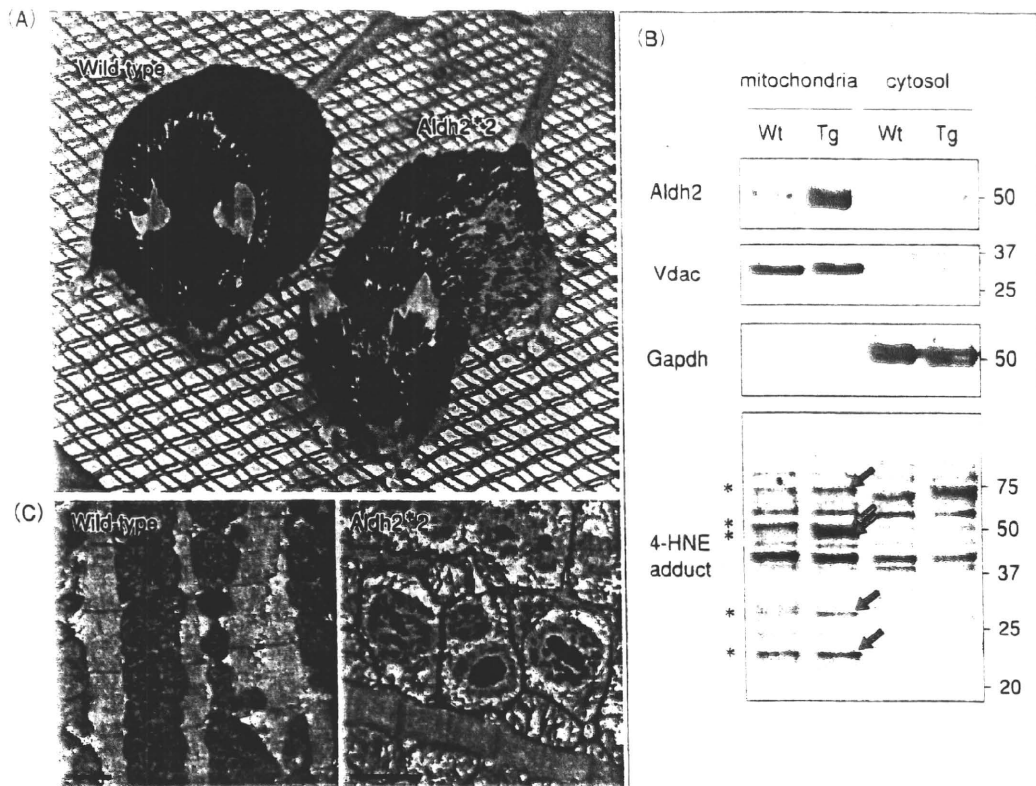


図 4 ALDH2*2トランスジェニックマウス

- 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。

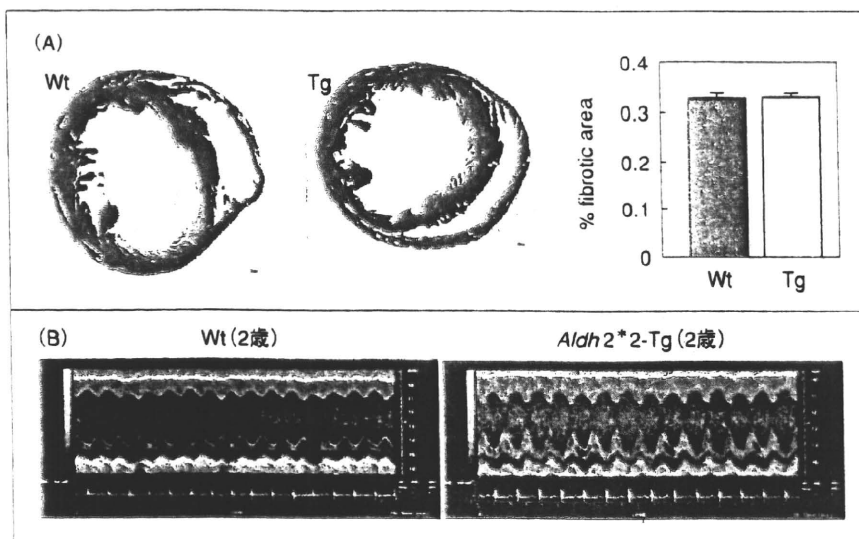


図 5 ALDH2*2トランスジェニックマウスの心機能

- 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。

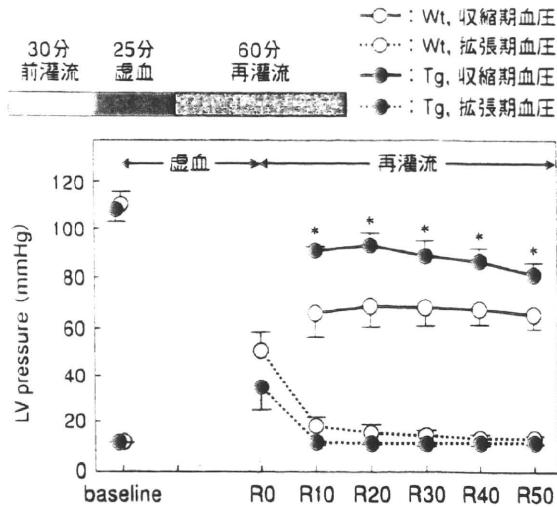


図 6 ALDH2*2トランスジェニックマウスは虚血再灌流障害に対して抵抗性を示す
Langendorff 摘出灌流心を用いて 25 分間虚血にさらして再灌流の左室機能を評価。トランスジェニックマウスのほうが野生型マウスより再灌流時の左室機能の回復がよいことに注目。

と称される(図 8)⁷⁾。eIF2 α 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 β 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 比の増加を認めた。¹³C-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。

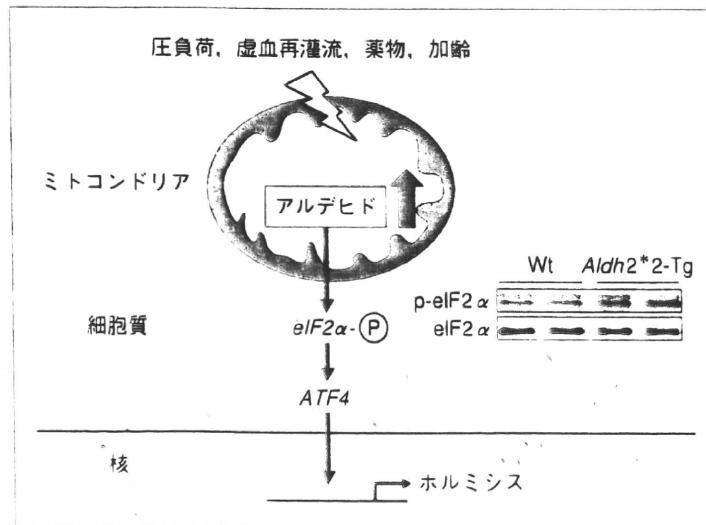


図 7 ミトコンドリア由来のアルデヒドが誘導するホルミシス応答の機序
eIF2 α リン酸化シグナルの活性化が心筋にホルミシスを生み出す。

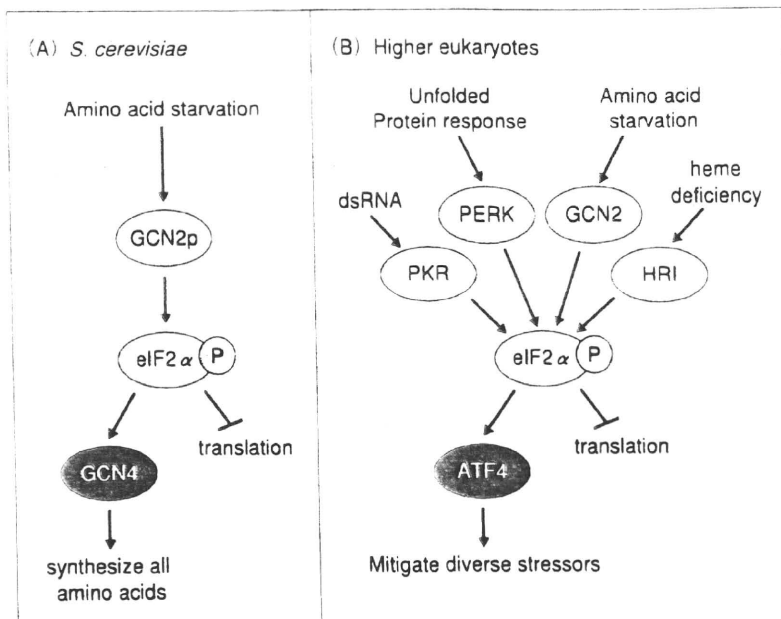


図 8 eIF2 α リン酸化シグナル

酵母では、培地中のアミノ酸が不足すると eIF2 α 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 α 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 α のリン酸化に集約される。eIF2 α 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 α 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 α 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 α 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 Matsushashi, 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 α 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.¹ Increased levels of aldehyde adducts have been detected in oxidized lipoproteins, atherosclerotic lesions, hearts with coronary artery disease, and Alzheimer brains.^{2–4} 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.^{5–7}

In mammalian cells, reactive aldehydes are detoxified by oxidation to carboxylates, a reaction catalyzed by aldehyde dehydrogenases (ALDHs).¹ The ALDHs are a superfamily of NAD(P)⁺-dependent enzymes,⁸ and, to date, 19 distinct *ALDH* genes have been identified in the human genome.⁹ 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 Metabolism (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/ 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.^{10,11} Furthermore, the cardioprotective effects of moderate alcohol consumption are well documented in animal models and humans,¹² and ethanol exposure, followed by sufficient time to metabolize the alcohol before ischemia, induces a delayed form of preconditioning-like cardioprotection.¹³ The mitochondrial translocation of protein kinase C ϵ and the subsequent activation of ALDH2 have been shown to contribute to the cardioprotective effects of alcohol.¹⁴ Indeed, administration of a small-molecule activator of ALDH2 to rats before an ischemic event reduced infarct size by 60%.¹⁵

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.¹⁶ 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.¹⁷ 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,¹⁸ and an increased risk for late-onset Alzheimer's disease.¹⁹ 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.^{10,11} 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.²⁰ 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 α	α -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 NaHCO₃, 5.9 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO₄, 1.75 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L glucose, 10 μ U/mL insulin, 0.4 mmol/L oleate, and 1% BSA) gassed with 95% O₂/5% CO₂ at 37°C, according to the Langendorff procedure. After equilibration, the buffer was switched to modified Krebs-Henseleit buffer containing 10 mmol/L ¹³C-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).²¹ 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.^{22,23} 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).

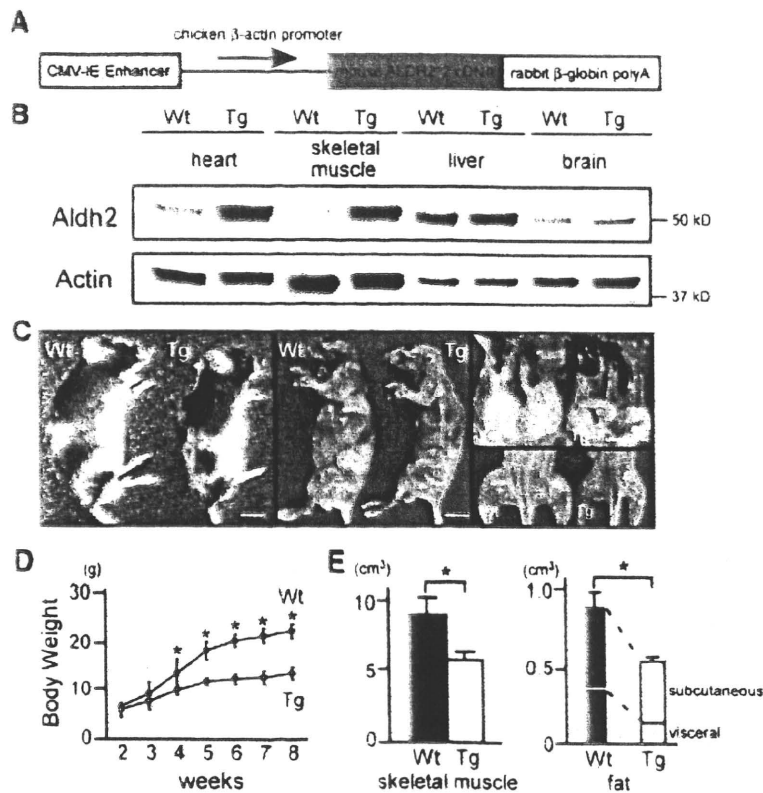


Figure 1. Characterization of *Aldh2**2 Tg mice. **A**, Design of the targeting construct. Recombinant murine *Aldh2* (Glu487Lys) is expressed under the control of the CAG promoter. **B**, Tissue-specific expression of the *Aldh2**2 transgene. **C**, Senescence-like phenotypes of *Aldh2**2 Tg mice. Bars=1 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 *Aldh22 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 *Aldh22 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- α 1 and - α 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

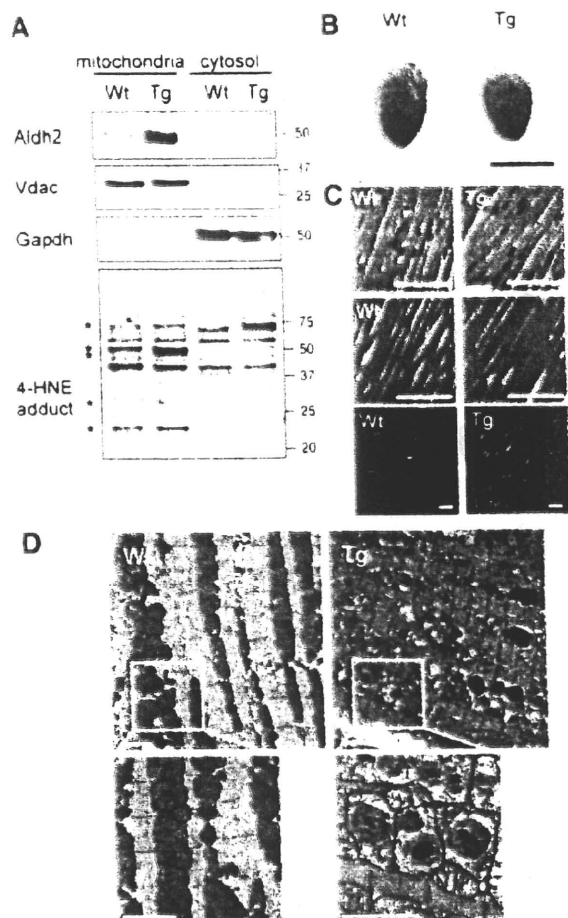


Figure 2. Characterization of hearts from *Aldh2**2 Tg mice. **A**, 4-HNE adduct proteins were determined in both mitochondrial and cytosolic fractions using Western blot analysis. Membranes were stripped and reprobed with ALDH2, VDAC (mitochondrial protein), and GAPDH (cytosolic protein). *Note that 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 μ m. **D**, Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy. Bars=2 μ 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 γ -glutamyl-cysteine ligase (Gclm, Gclc) and GSH synthetase (Gss).²⁴ 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,^{25–28} 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⁺ 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 ± 0.002 and 0.018 ± 0.003 μ 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 ¹³C-labeled glucose (fluxome analysis) in Langendorff-perfused hearts (Figure 7). ¹³C-labeled metabolites were quantified by CE-MS 5 and 20 minutes after administration of ¹³C-labeled glucose. ¹³C-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, ¹³C-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

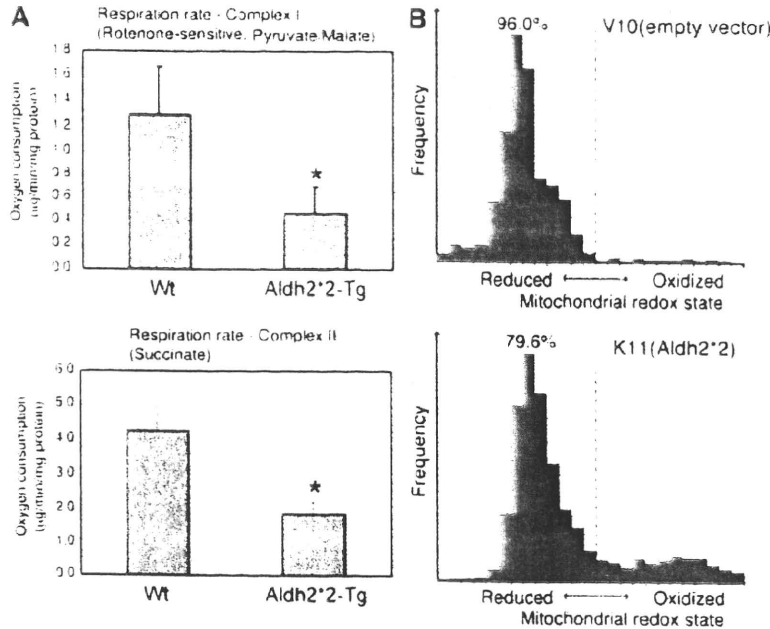


Figure 3. Characterization of *Aldh2*2*-expressing mitochondria. **A**, Comparison of oxygen consumption through complex I (top) and complex II (bottom) in mitochondria isolated from *Aldh2*2* Tg and Wt mice. Data are the means \pm SEM (n=5). **P*<0.05 vs Wt control (unpaired Student's *t* test). **B**, 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 α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) 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.²⁵⁻²⁸ Consistent with this, Western blot analysis demonstrated increased Ser51 phosphorylation on eIF2 α 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.²⁹ Homozygous *Atf4* knockout was lethal, whereas *Atf4* heterozygous knockout (*Atf4*^{+/-}) 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

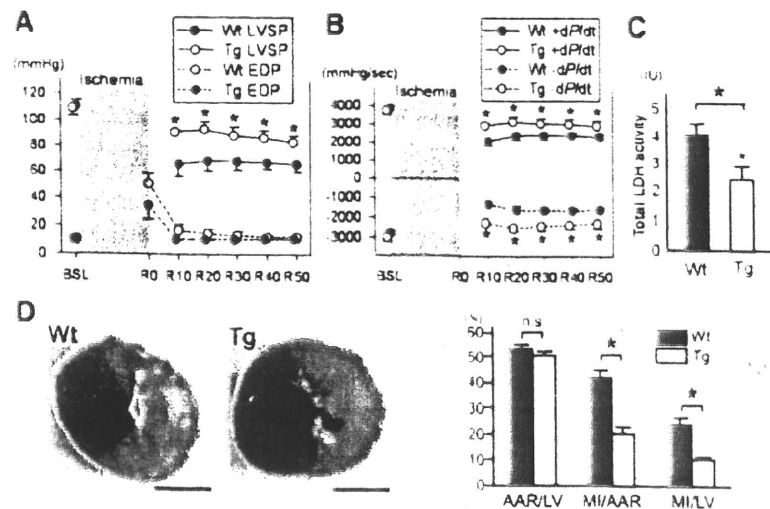


Figure 4. Function of the *Aldh2*2* Tg heart. Langendorff-perfused hearts were subjected to 30 minutes of total global ischemia, followed by aerobic reperfusion **A** and **B**. Recovery of left ventricular systolic (LVSP) (**A**) and diastolic pressure (EDP) and \pm dP/dt (**B**). **C**, Lactate dehydrogenase (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).