

in animal experiments, high doses of antioxidants were required to obtain a significant effect; for example, the effect at 250 mg/kg dose of vitamin C or vitamin E was shown to protect against oxidative renal damage induced by cisplatin in mice [12]. If the same dose is given to humans (15 g for 60 kg body weight), the amount would be much higher than the tolerable upper intake concentration of vitamin C (2 g/day) or vitamin E (1 g/day), as recommended by the Food and Nutrition Board of the U.S. Institute of Medicine [38]. Moreover, it is known that excess vitamin C functions as a pro-oxidant [39]. Compared to these antioxidants, hydrogen has an advantage to protect cells within a safe dosage. Notably, hydrogen water was ad libitum provided to mice in this study. Moreover, even when too much hydrogen is taken in, the excess would be expired via the lungs. Thus, hydrogen gas or hydrogen water should be applicable for patients with cancer to reach efficient amounts.

Low concentrations of ROS, such as superoxide anion and hydrogen peroxide, function as signaling molecules and regulate apoptosis, cell proliferation, and differentiation [40, 41]. In fact, recent studies have suggested that excessive antioxidant increased mortality and rates of cancer, because it may interfere with essential defensive mechanisms [42–44]. Hydrogen selectively reduces hydroxyl radicals but not superoxides and hydrogen peroxides having physiological roles [14]; thus, we suggest that the side effects of hydrogen must be small, different from other antioxidants. Inhalation of hydrogen gas does not influence physiological parameters such as body temperature, blood pressure, pH and pO_2 in the blood, as shown previously [14]. Hydrogen has already been used for human in the prevention of decompression sickness in divers at the level of 2 MPa partial pressure of hydrogen, suggesting that 16 mM hydrogen in blood could be safe [45].

This study showed that inhalation of hydrogen gas has effective protection against cisplatin. For acute and strong oxidative stress induced by ischemia/reperfusion, 1% of hydrogen gas is sufficient protection, as shown previously [14, 17, 46–48]. Inhalation of 1 or 2% hydrogen gas may be applicable for short-term treatments. Such a low concentration of hydrogen gas is safe because hydrogen cannot burn or explode under 4.7% of hydrogen gas. In addition to hydrogen gas, this study demonstrated that drinking hydrogen water ad libitum was sufficient to obtain a significant effect. We showed that hydrogen from the stomach delivered to blood in 3 min and that it reduced the level of oxidative stress (Fig. 3). Even with no administration of hydrogen water, a small amount of hydrogen was detected in blood (Fig. 3). This hydrogen is probably derived from hydrogen produced by large intestinal bacteria.

The brain, heart and liver were protected from oxidative stress by inhalation of 1% hydrogen gas, whose concentration in blood was expected to be 8 μ M because the

saturated level of hydrogen in water reaches 800 μ M under atmosphere pressure [14, 17, 46]. It is possible that continuous consumption of hydrogen protects the kidney from chronic oxidative stress even at much lower concentrations than 8 μ M. In this study, we presented that the incorporation of hydrogen from the stomach into blood reaches the level of several μ M orders. The water volume that we placed in the stomach corresponds to almost one tenth of consumption volume for 24 h. Frequency of drinking episodes was 11.13 ± 1.28 (mean \pm SE) per day in mice [49]. Thus, these data suggest that mice having free access to hydrogen water would take several μ M hydrogen into blood 11 times a day. Continuous exposure to hydrogen may change blood components towards the reductive state, and indirectly influence the oxidative state in the kidney. In fact, a randomized clinical test has recently shown that drinking water dissolving hydrogen reduced an oxidative stress marker of patients with diabetes [50]. It is very convenient to drink hydrogen water to take hydrogen during chemotherapeutic treatments; thus, hydrogen has potential to improve quality of life during chemotherapy. Furthermore, we expect that hydrogen would allow higher doses of cisplatin to patients by efficiently mitigating the side effects.

Acknowledgments We thank Blue Mercury Inc. (Tokyo, Japan) for the generous gift of hydrogen water. This work was supported by grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (19659331, S. O. and 20500723 to N. N.-K.).

Conflict of interest statement Dr. Ohta is a director of Mitos Co. Ltd. (Kawasaki, Japan), and a scientific adviser to Blue Mercury Inc. (Tokyo, Japan). Blue Mercury Inc. supplied the fresh hydrogen water used in this study and has donated a research division to our institute.

References

- Lebwohl D, Canetta R (1998) Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 34:1522–1534
- Wolfgang GH, Dominick MA, Walsh KM, Hoeschele JD, Pegg DG (1994) Comparative nephrotoxicity of a novel platinum compound, cisplatin, and carboplatin in male Wistar rats. *Fundam Appl Toxicol* 22:73–79
- Masuda H, Tanaka T, Takahama U (1994) Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1175–1180
- Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF (1997) Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 280:638–649
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV (1998) In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 53:394–401
- Zhang JG, Lindup WE (1993) Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 45:2215–2222
- Khynriam D, Prasad SB (2002) Changes in glutathione-related enzymes in tumor-bearing mice after cisplatin treatment. *Cell Biol Toxicol* 18:349–358

8. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A (1998) The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 131:518–526
9. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS (2005) Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* 148:107–121
10. Pabla N, Dong Z (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 73:994–1007
11. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K (2007) Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 334:115–124
12. Ajith TA, Usha S, Nivitha V (2007) Ascorbic acid and alpha-tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clin Chim Acta* 375:82–86
13. Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG et al (2004) Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 40:1713–1723
14. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K et al (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13:688–694
15. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S (2009) Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34:501–508
16. Lee S, Moon SO, Kim W et al (2006) Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 21:2085–2095
17. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S (2007) Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 361:670–674
18. Samali A, Cotter TG (1999) Measurement of cell death in culture. In: Jenkins N (ed) *Animal cell biotechnology*. Humana Press, Totowa, pp 155–164
19. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H (1997) Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 12:2478–2480
20. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128
21. Fang J, Sawa T, Akaike T et al (2003) In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 63:3567–3574
22. Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265–7279
23. Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307–320
24. Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7:573–584
25. Appenroth D, Frob S, Kersten L, Splinter FK, Winnefeld K (1997) Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. *Arch Toxicol* 71:677–683
26. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO (2004) Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 195:221–230
27. Giri A, Khyndriam D, Prasad SB (1998) Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutat Res* 421:139–148
28. De Martinis BS, Bianchi MD (2001) Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol Res* 44:317–320
29. Baldew GS, van den Hamer CJ, Los G, Vermeulen NP, de Goeij JJ, McVie JG (1989) Selenium-induced protection against *cis*-diamminedichloroplatinum(II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res* 49:3020–3023
30. Silva CR, Greggi Antunes LM, Bianchi ML (2001) Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 43:561–566
31. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A (2005) Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 212:116–123
32. Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L et al (2000) The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 14:553–560
33. Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J (2005) Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. *Hear Res* 201:81–89
34. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E et al (2003) Oral erdoesteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res* 47:149–156
35. Sogut S, Kotuk M, Yilmaz HR, Ulu R, Ozyurt H, Yildirim Z (2004) In vivo evidence suggesting a role for purine-catabolizing enzymes in the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats and effect of erdoesteine against this toxicity. *Cell Biochem Funct* 22:157–162
36. Nisar S, Feinfeld DA (2002) *N*-Acetylcysteine as salvage therapy in cisplatin nephrotoxicity. *Ren Fail* 24:529–533
37. Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, Peterson DR, Kraemer DF, Neuwelt EA (2008) Effect of *N*-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol* (in press)
38. Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J et al (2005) Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 81:736–745
39. Li Y, Schellhorn HE (2007) New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr* 137:2171–2184
40. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173–186
41. Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97:967–974
42. Bjelakovic G, Gluud C (2007) Surviving antioxidant supplements. *J Natl Cancer Inst* 99:742–743
43. Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E (2005) Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142:37–46
44. Salganik RI (2001) The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr* 20:464S–472S
45. Fontanari P, Badier M, Guillot C et al (2000) Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive. *Eur J Appl Physiol* 81:325–328
46. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I et al (2008) Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia–reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 373:30–35
47. Cai J, Kang Z, Liu WW et al (2008) Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett* 441:167–172
48. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R et al (2008) Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 8:2015–2024
49. Ritskes-Hoitinga M (2004) Nutrition of laboratory mice. In: Hedrich H (ed) *The laboratory mouse*. Elsevier, London, pp 463–479
50. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M et al (2008) Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 28:137–143



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet



Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease

Yuan Fu^a, Mikako Ito^a, Yasunori Fujita^b, Masafumi Ito^b, Masatoshi Ichihara^c, Akio Masuda^a, Yumi Suzuki^a, Satoshi Maesawa^d, Yasukazu Kajita^e, Masaaki Hirayama^f, Ikuroh Ohsawa^g, Shigeo Ohta^g, Kinji Ohno^{a,*}

^a Division of Neurogenetics, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

^b Department of Longevity and Aging Research, Gifu International Institute of Biotechnology, Kakamigahara 504-0838, Japan

^c Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, Kasugai 487-8501, Japan

^d Department of Neurosurgery, Nagoya Central Hospital, Nagoya 453-0801, Japan

^e Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

^f Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2008

Received in revised form 23 January 2009

Accepted 7 February 2009

Keywords:

Parkinson's disease
Molecular hydrogen
Oxidative stress

ABSTRACT

Molecular hydrogen serves as an antioxidant that reduces hydroxyl radicals, but not the other reactive oxygen and nitrogen species. In the past year, molecular hydrogen has been reported to prevent or ameliorate eight diseases in rodents and one in human associated with oxidative stress. In Parkinson's disease, mitochondrial dysfunction and the associated oxidative stress are major causes of dopaminergic cell loss in the substantia nigra. We examined effects of ~50%-saturated molecular hydrogen in drinking water before or after the stereotaxic surgery on 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. Methamphetamine-induced behavioral analysis showed that molecular hydrogen prevented both the development and progression of the nigrostriatal degeneration. Tyrosine hydroxylase staining of the substantia nigra and striatum also demonstrated that pre- and post-treatment with hydrogen prevented the dopaminergic cell loss. Our studies suggest that hydrogen water is likely able to retard the development and progression of Parkinson's disease.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, affecting ~0.3% of the population over age 50. PD is characterized by resting tremor, bradykinesia, and rigidity. PD is caused by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Although the pathomechanisms of PD remain mostly unknown, oxidative stress to dopaminergic neurons is one of the major causes leading to dopaminergic neuronal cell loss [33]. Mitochondrial dysfunction and the associated oxidative stress in PD are directly or indirectly supported by studies of genetic forms of PD including *PINK1* [2], *DJ1* [19], and *HTRA2* [38], as well as by mitochondrial toxins including 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) [15] and rotenone [3].

Molecular hydrogen (H₂) can reduce only hydroxyl radicals ([•]OH), but not superoxide (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), or nitric oxide (NO[•]) [5,25]. To date, H₂ has no known side effects in rodents or humans. Being prompted by these unique features of

H₂, studies of molecular hydrogen for oxidative stress-associated disorders have flourished this past year. Molecular hydrogen in the form of gas reduces the cerebral infarction volume in rats [25], suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice [12], reduces the infarct size of myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [16], reduces apoptosis in neonatal hypoxic brain injury in rats [8], and mitigates small intestinal transplantation-induced inflammation in rats [4]. Effects on the neonatal hypoxic brain injury are also shown in peritoneal injection of H₂-saturated saline [7]. Molecular hydrogen dissolved in drinking water similarly prevents stress-induced learning impairment in mice [23], improves lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in humans [18], reduces atherosclerotic lesions in mice [26], and prevents cisplatin-induced nephrotoxicity [24].

Intrastratial injection of the catecholaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) exerts its toxic effect by increasing oxidative stress in dopaminergic neurons [30]. The technique has been widely used to evaluate neuroprotective effects of therapeutic modalities. For example, the rat PD model has been treated with vitamin E [6], serofendic acid [17], estrogen [28], and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) [27]. Compared to MPTP, 6-OHDA triggers

* Corresponding author. Fax: +81 52 744 2449.

E-mail address: ohnok@med.nagoya-u.ac.jp (K. Ohno).

more prominent dopaminergic cell loss that cannot be readily prevented by neuroprotective methodologies [1].

In an effort to examine a neuroprotective effect of molecular hydrogen for PD, 6-OHDA-induced PD rats were given free access to ~50%-saturated hydrogen water starting either before or after the stereotactic surgery. Behavioral and pathological analyses demonstrated that molecular hydrogen efficiently prevents both the development and progression of the nigrostriatal degeneration in rats.

Seven-week-old male Sprague–Dawley rats, ranging from 245 to 255 g, were purchased from Charles River Laboratories (Osaka, Japan). Rats were housed in a room temperature-controlled environment at 25 °C under a 12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. The animal studies were approved by the Animal Care and Use Committee of the Nagoya University Graduate School of Medicine.

Fifteen rats were randomly divided into three groups: a control group (Ctr, $n=5$) with unlimited access to dehydrogenized water, a pretreatment group (PreH, $n=5$) with unlimited access to hydrogen water starting from 7 days before surgery, and a post-treatment group (PostH, $n=5$) with unlimited access to hydrogen water starting from 3 days after surgery. Rats were supplied with fresh hydrogen water 7 days a week. We also confirmed before surgery that the weight gains and the amounts of drinking water were not statistically different between the Ctr and PreH groups.

As the immunostaining of 8-hydroxy-dG (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) failed to stain any cells in the substantia nigra and striatum 4 weeks after surgery (data not shown), we examined the rat brains 48 h after surgery. We randomly divided six additional rats into three groups. The Ctr and PreH groups were essentially the same as above. The third group was a sham operation group that was infused with saline into the striatum and supplied with dehydrogenized water.

Hydrogen water was provided by Blue Mercury (Tokyo, Japan) or TYK (Tokyo, Japan). For both suppliers, we measured that the hydrogen concentration was more than 0.4 mM (equivalent to 50% saturation at room temperature) immediately before transferring to a 50-ml closed glass vessel equipped with an outlet line having two ball bearings. With the glass vessel, the hydrogen concentration remained more than 0.2 mM after 24 h. We measured the hydrogen concentrations with a hydrogen electrode (ABLE, Tokyo, Japan). To make dehydrogenized water, we left hydrogen water uncovered overnight at room temperature and confirmed the complete removal of hydrogen gas.

We administered 6-OHDA (Sigma–Aldrich Japan, Tokyo, Japan) stereotactically into the right striatum as previously described [22]. Briefly, each rat was anesthetized by an intraperitoneal injection of chloral hydrate (400 mg/kg) and was placed in a stereotactic frame. We infused 20 µg of 6-OHDA in 2 µl of saline containing 0.02% ascorbic acid each into two sites of the right striatum that corresponded to the following coordinates: AP 1.6 mm, ML 2.4, and DV 4.2; and AP 0.2, ML 2.6, and DV 7.0.

On days 3, 7, 14, 21, and 28 after surgery, rats were intraperitoneally injected with 5.0 mg/kg of methamphetamine (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) to provoke dopamine release from the dopaminergic nerve terminals. We started counting turns at 10 min and counted the total number of turns in the following 30 min. We only counted turns with a diameter of 20 cm or less in order not to include counts when the rats walked along the edge of a 40-cm round platform. The investigator was blinded whether the rats were taking dehydrogenized or hydrogen water.

The rats were deeply anesthetized with chloral hydrate and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. The brains were frozen at –80 °C, and cut into coronal sections. After blocking the sections with horse serum, we incubated the sections either with an anti-TH rabbit polyclonal antibody (Biomol International,

Plymouth Meeting, PA) at a dilution of 1:200, an anti-8-OHdG monoclonal antibody (JaICA, Nikken SEIL, Shizuoka, Japan) at 1:100, or an anti-4-HNE monoclonal antibody (JaICA, Nikken SEIL) at 1:40 at 4 °C overnight. We next incubated the sections with the biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) at a dilution of 1:200, followed by incubation with the avidin–biotin–horseradish peroxidase complex (the Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) and the ImmPACT DAB Substrate (Vector Laboratories). The images of the striatum were reconstructed by the BZ-8000 microscope (Keyence, Woodcliff Lake, NJ). Two blinded investigators counted the numbers of TH-positive cells.

We counted the number of clockwise turns in 30 min in response to an intraperitoneal injection of methamphetamine (Fig. 1). In two rats before surgery, we confirmed that methamphetamine induced no turn with a diameter of 20 cm or less. The Ctr group exhibited gradual development of hemiparkinsonism over the course of 4 weeks. On the contrary, the PreH group demonstrated a gradual and significant decrease of the number of turns over the course (Fig. 1A). In the PostH group, the number of turns was similar to that of the Ctr group on day 3. After the rats started drinking hydrogen water on day 3, however, the number of turns gradually decreased in 2 weeks, and the improved state persisted up to the end of our observation period of 4 weeks (Fig. 1B).

The rats were sacrificed 4 weeks after surgery. We then immunostained the substantia nigra and striatum for TH (Fig. 2). TH is a rate-limiting enzyme in catecholamine synthesis, and is a marker for dopaminergic neurons in the central nervous system [9]. We counted the number of TH-positive cells at the nigra and found that the 6-OHDA-treatment reduced the number of TH-positive

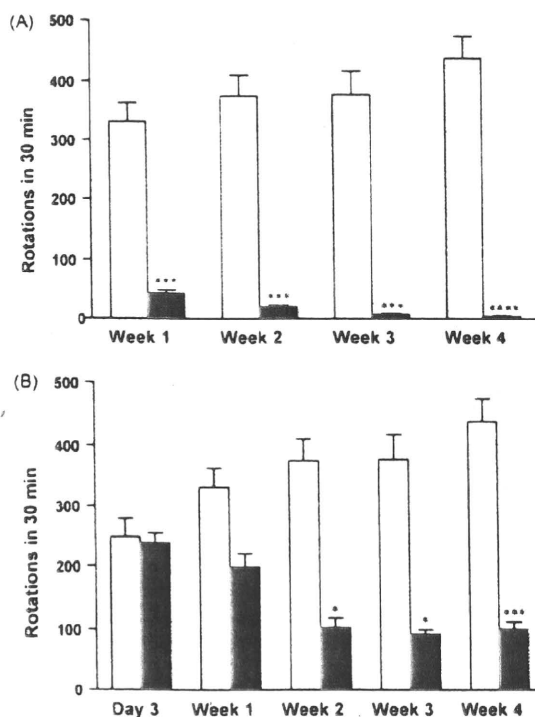


Fig. 1. Behavioral assays of 6-OHDA-treated rats. (A) Temporal profiles of the Ctr (open bars) and PreH (closed bars) rats. (B) Temporal profiles of the Ctr (open bars) and PostH (closed bars) rats. Vertical bars represent means ± S.E.M. of the number of turns in 30 min after intraperitoneal injection of methamphetamine in five rats. Student's *t*-test results are indicated by asterisks: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

Please cite this article in press as: Y. Fu, et al., Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* (2009), doi: 10.1016/j.neulet.2009.02.016

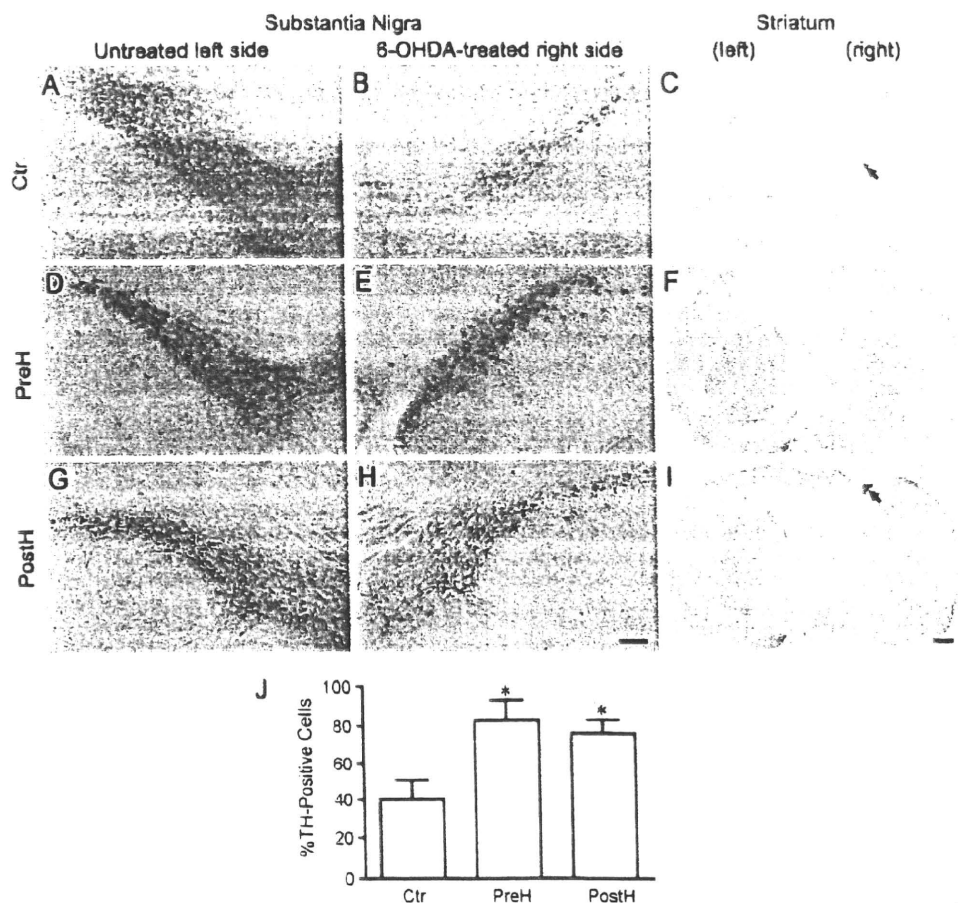


Fig. 2. Representative TH staining of the substantia nigra and striatum of 6-OHDA-treated rats. (A–C) Ctr; (D–F) PreH; (G–I) PostH. (A, D, and G) Untreated left side of the nigra; (B, E, and H) 6-OHDA-treated right side of the nigra; (C, F, and I) the striatum. Arrows point to bleeding scars by the stereotaxic needle. (J) The number of TH-positive cells at the substantia nigra on the treated side is divided by that of the untreated side to calculate the ratio of the remaining dopaminergic cells (mean ± S.D., $n = 5$ for each group). Asterisks indicate $p < 0.001$ compared to Ctr (Student's t -test). Bar = 200 μm for A, B, D, E, G, and H; bar = 1 mm for C, F, and I.

cells to $40.2 \pm 10.6\%$ (mean ± S.D., $n = 5$) in the Ctr group, whereas the pre- and post-treatment with hydrogen water increased the ratios to $83.0 \pm 10.2\%$ and $76.3 \pm 7.0\%$, respectively (Fig. 2j). We did not observe TH-positive nerve terminals in the striatum in the Ctr group, whereas in the PreH and PostH groups we observed patchy sparing of TH-positive nerve terminals (Fig. 2C, F, and I).

The rats were sacrificed 48 h after surgery, and the substantia nigra and striatum were immunostained for TH, 8-OHdG, and 4-HNE (Fig. 3). We observed patchy loss of TH staining (Fig. 3A and B), as well as appearance of 8-OHdG-positive (Fig. 3D and E) and 4-HNE-positive cells (Fig. 3G and H) in the ipsilateral striatum in the Ctr and PreH groups. We observed no effects on the substantia nigra in 48 h after surgery. Smith and Cass similarly report that 4-HNE-positive cells and reduced dopamine concentrations are observed in the striatum but not in the substantia nigra in day 1 after surgery [36]. Forty-eight hours were likely to be too short for 6-OHDA to exert its toxic effect on the substantia nigra.

In the substantia nigra, the oxidative damage and the loss of TH-staining were similar between the Ctr and PreH groups, and H_2 showed no discernible protection against oxidative stress in 48 h.

Our current studies demonstrate that molecular hydrogen in drinking water before the stereotaxic surgery efficiently prevents development of PD in a 6-OHDA rat model. In humans, parkinsonian

symptoms appear after 80% reduction of striatal dopamine concentration [29] or 50–70% dopaminergic cell loss at the substantia nigra [11]. We observed a loss of 17.0% TH-positive cells in the substantia nigra in the PreH group, which was likely to be below the threshold of the development of PD.

The formation of hydroxyl radical and the subsequent lipid peroxidation and protein oxidation maximize 48 h after 6-OHDA administration and persist for 7 days [30]. We thus examined the oxidative stress in 48 h after surgery, and observed appearance of 8-OHdG-positive and 4-HNE-positive cells, as well as loss of TH-staining, in the ipsilateral striatum. Pretreatment with H_2 , however, exhibited no apparent protective effect. This is likely because the acute toxicity of 6-OHDA has exceeded the capacity that molecular hydrogen in drinking water can scavenge. Alternatively, as the treated rats were scarcely capable of drinking water 24 h after surgery, our experimental protocol of *ad libitum* administration of hydrogen water might not be suitable for protecting the acute oxidative stress posed by 6-OHDA. The protective effect against the dopaminergic cell loss in the substantia nigra is thus not likely due to immediate extinction of 6-OHDA in the striatum, but to prevention of the delayed toxic effect of 6-OHDA on the dopaminergic neurons in the substantia nigra. This can also explain why we observed the similar but less efficient effect with the PostH group.

Please cite this article in press as: Y. Fu, et al., Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* (2009), doi:10.1016/j.neulet.2009.02.016

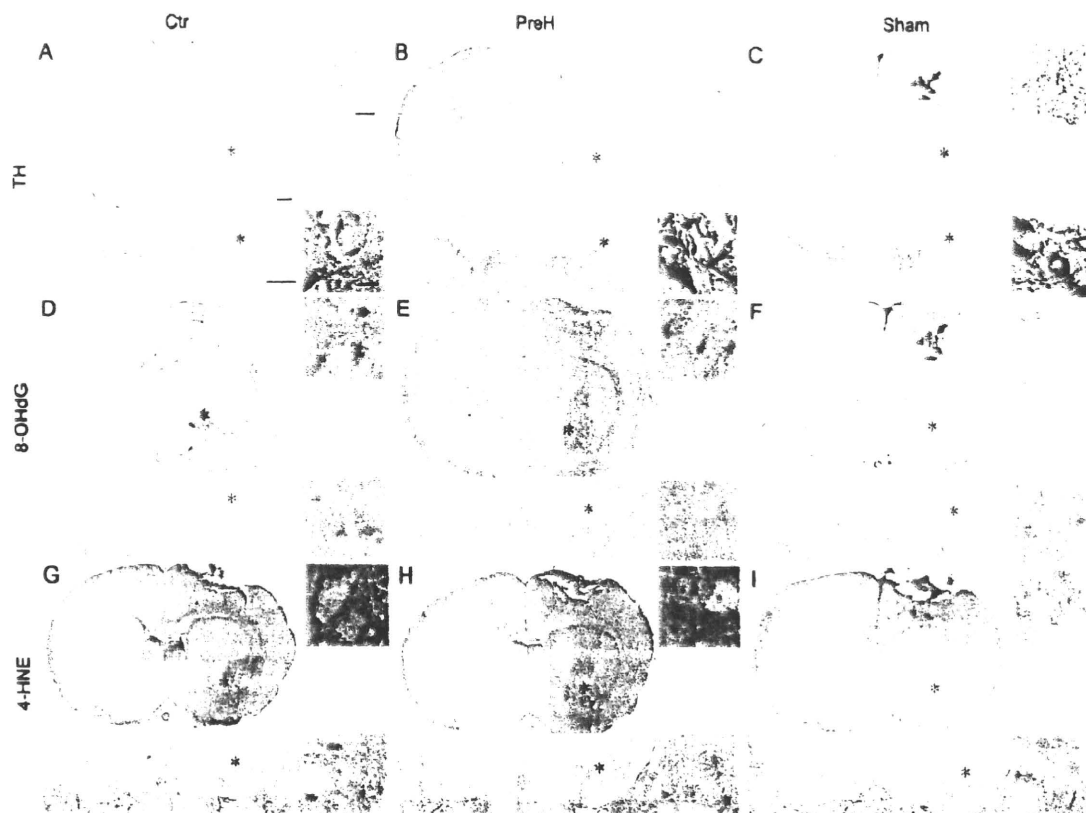


Fig. 3. Representative TH, 8-OHdG, and 4-HNE staining of the substantia nigra and striatum of 6-OHDA-treated and sham-operated rats at 48 h after surgery. (A–C) TH staining; (D–F) 8-OHdG staining; (G, H, and I) 4-HNE staining and nuclear staining with hematoxylin. (A, D and G) Ctr; (B, E, and H) PreH; (C, F, and I) sham-operation. For each panel, the upper part shows the striatum and the lower part shows the substantia nigra. High magnification images are attached on the right side of each panel, and the stars point to the magnified positions. The ipsilateral side is shown on the right side. Arrows point to bleeding scars by the stereotaxic needle, where cells are positive for 8-OHdG and 4-HNE even in the sham-operated brain. Bars = 1 mm for low magnification images on the left; 10 μ m for high magnification images on the right.

When we administered 3 ml of 0.4 mM hydrogen water directly into the rat stomach, the H_2 concentration in the carotid artery increased by 0.011 mM in 10 min (unpublished data), which was similar to an increase by 0.009 mM when rats were placed in 2% H_2 gas [25]. Hydrogen in drinking water, however, should not stay in the body as long as the inhaled hydrogen. In addition, the scavenging activity of hydroxyl radicals is observed at 0.2 mM or higher concentrations of H_2 in cell-free systems, and is demonstrated at 0.6 mM H_2 in culture cells [25]. The amount of H_2 taken by the rats was likely to be too low to reduce a large amount of hydroxyl radicals generated by 6-OHDA. One possible explanation would be that H_2 activates yet unidentified pathways that culminate in activation of the antioxidant activities. Indeed, H_2 prevents formation of $O_2^{\bullet-}$ in brain slices [31]. As H_2 cannot directly reduce $O_2^{\bullet-}$ [5,25], a subtle reduction of hydroxyl radicals might have exerted beneficial effects on the integrity of mitochondria and led to reduced production of $O_2^{\bullet-}$, but the exact molecular mechanisms remain to be elucidated.

α -Tocopherol demonstrates a neuroprotective effect for PD in rats [6], but not in humans in a double-blind placebo-controlled study [14,34]. Coenzyme Q_{10} similarly exerts a neuroprotective effect in cultured cells and in rodents [20]. Coenzyme Q_{10} , however, may [35] or may not [37] be beneficial in humans in double-blind placebo-controlled trials. Neuroprotective effects of vitamin C and β -carotene are not observed in patients with PD even in open trials [10]. In contrast to the other radical scavengers, molecular hydrogen can reduce only hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$), but not the other reactive

oxygen and nitrogen species including superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and nitric oxide (NO^{\bullet}) [5,25]. Reactive oxygen and nitrogen species other than the hydroxyl radical play essential roles in biological processes including cell proliferation [32], defense against bacterial infection [39], neurotransmission [13], and vasodilation [21]. Lack of therapeutic effects of α -tocopherol, coenzyme Q_{10} , vitamin C, and β -carotene in PD may be owing to aberrations of the biological processes mediated by the reactive oxygen species. On the other hand, hydroxyl radical has no known biological activities. The ability of molecular hydrogen to exclusively reduce hydroxyl radical may hold the greatest promise for a dependable and efficient neuroprotective modality for PD.

Acknowledgements

We thank Hitoshi Taki for technical assistance. This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neulet.2009.02.016.

Please cite this article in press as: Y. Fu, et al., Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* (2009), doi:10.1016/j.neulet.2009.02.016

References

- [1] M.T. Armentero, G. Levandis, P. Bramanti, G. Nappi, F. Blandini, Dietary restriction does not prevent nigrostriatal degeneration in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 212 (2008) 548–551.
- [2] A. Beilina, M. Van Der Brug, R. Ahmad, S. Kesavapany, D.W. Miller, G.A. Petsko, M.R. Cookson, Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 5703–5708.
- [3] R. Betarbet, T.B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A.V. Panov, J.T. Greenamyre, Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 1301–1306.
- [4] B.M. Buchholz, D.J. Kaczorowski, R. Sugimoto, R. Yang, Y. Wang, T.R. Billiar, K.R. McCurry, A.J. Bauer, A. Nakao, Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am. J. Transplant.* 8 (2008) 2015–2024.
- [5] G.V. Buxton, C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross, Critical view of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($^{\bullet}\text{OH}/^{\bullet}\text{OH}^-$) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17 (1988) 513–886.
- [6] J.L. Cadet, M. Katz, V. Jackson-Lewis, S. Fahn, Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res.* 476 (1989) 10–15.
- [7] J. Cai, Z. Kang, K. Liu, W. Liu, R. Li, J.H. Zhang, X. Luo, X. Sun, Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res.* (2008).
- [8] J. Cai, Z. Kang, W.W. Liu, X. Luo, S. Qiang, J.H. Zhang, S. Ohta, X. Sun, W. Xu, H. Tao, R. Li, Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci. Lett.* 441 (2008) 167–172.
- [9] P.R. Dunkley, L. Bobrovskaya, M.E. Graham, E.I. von Nagy-Felsobuki, P.W. Dickson, Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J. Neurochem.* 91 (2004) 1025–1043.
- [10] M. Ertninan, S.S. Gill, A. Samii, Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* 4 (2005) 362–365.
- [11] J.M. Fearnley, A.J. Lees, Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5) (1991) 2283–2301.
- [12] 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.
- [13] J. Garthwaite, Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur. J. Neurosci.* 27 (2008) 2783–2802.
- [14] T.P.S. Group, Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. The Parkinson Study Group. *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 176–183.
- [15] P. Hantraye, E. Brouillet, R. Ferrante, S. Palfi, R. Dolan, R.T. Matthews, M.F. Beal, Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat. Med.* 2 (1996) 1017–1021.
- [16] K. Hayashida, M. Sano, I. Ohsawa, K. Shinmura, K. Tamaki, K. Kimura, J. Endo, T. Katayama, A. Kawamura, S. Kohsaka, S. Makino, S. Ohta, S. Ogawa, K. Fukuda, Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (2008) 30–35.
- [17] M. Inden, Y. Kitamura, J. Kondo, K. Hayashi, T. Yanagida, K. Takata, D. Tsuchiya, D. Yanagisawa, K. Nishimura, T. Taniguchi, S. Shimohama, H. Sugimoto, A. Akaike, Serofendic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced nigral neurodegeneration and drug-induced rotational asymmetry in hemi-parkinsonian rats. *J. Neurochem.* 95 (2005) 950–961.
- [18] S. Kajiyama, G. Hasegawa, M. Asano, H. Hosoda, M. Fukui, N. Nakamura, J. Kitawaki, S. Imai, K. Nakano, M. Ohta, T. Adachi, H. Obayashi, T. Yoshikawa, Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr. Res.* 28 (2008) 137–143.
- [19] R.H. Kim, P.D. Smith, H. Aleyasin, S. Hayley, M.P. Mount, S. Pownall, A. Wakeham, A.J. You-Ten, S.K. Kalia, P. Horne, D. Westaway, A.M. Lozano, H. Anisman, D.S. Park, T.W. Mak, Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 5215–5220.
- [20] P. Kooncumchoo, S. Sharma, J. Porter, P. Govitrapong, M. Ebadi, Coenzyme Q(10) provides neuroprotection in iron-induced apoptosis in dopaminergic neurons. *J. Mol. Neurosci.* 28 (2006) 125–141.
- [21] J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin, The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 156–167.
- [22] S. Maesawa, Y. Kaneoke, Y. Kajita, N. Usui, N. Misawa, A. Nakayama, J. Yoshida, Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. *J. Neurosurg.* 100 (2004) 679–687.
- [23] K. Nagata, N. Nakashima-Kamimura, T. Mikami, I. Ohsawa, S. Ohta, Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34 (2008) 501–508.
- [24] N. Nakashima-Kamimura, T. Mori, I. Ohsawa, S. Asoh, S. Ohta, Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2009).
- [25] 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.
- [26] I. Ohsawa, K. Nishimaki, K. Yamagata, M. Ishikawa, S. Ohta, Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (2008) 1195–1198.
- [27] A. Quesada, B.Y. Lee, P.E. Micevych, PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev. Neurobiol.* 68 (2008) 632–644.
- [28] A. Quesada, P.E. Micevych, Estrogen interacts with the IGF-1 system to protect nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxydopamine lesions. *J. Neurosci. Res.* 75 (2004) 107–116.
- [29] P. Riederer, S. Wuketich, Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J. Neural Transm.* 38 (1976) 277–301.
- [30] S. Sanchez-Iglesias, P. Rey, E. Mendez-Alvarez, J.L. Labandeira-Garcia, R. Soto-Otero, Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 32 (2007) 99–105.
- [31] Y. Sato, S. Kajiyama, A. Amano, Y. Kondo, T. Sasaki, S. Handa, R. Takahashi, M. Fukui, G. Hasegawa, N. Nakamura, H. Fujinawa, T. Mori, M. Ohta, H. Obayashi, N. Maruyama, A. Ishigami, Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375 (2008) 346–350.
- [32] H. Sauer, M. Wartenberg, J. Heschler, Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11 (2001) 173–186.
- [33] A.H. Schapira, Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7 (2008) 97–109.
- [34] I. Shoulson, DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism. *Ann. Neurol.* 44 (1998) S160–S166.
- [35] C.W. Shults, D. Oakes, K. Kieburtz, M.F. Beal, R. Haas, S. Plumb, J.L. Juncos, J. Nutt, I. Shoulson, J. Carter, K. Kompoliti, J.S. Perlmutter, S. Reich, M. Stern, R.L. Watts, R. Kurlan, E. Molloy, M. Harrison, M. Lew, Effects of coenzyme Q₁₀ in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch. Neurol.* 59 (2002) 1541–1550.
- [36] M.P. Smith, W.A. Cass, Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 144 (2007) 1057–1066.
- [37] A. Storch, W.H. Jost, P. Vieregge, J. Spiegel, W. Greulich, J. Durner, T. Muller, A. Kupsch, H. Henningsen, W.H. Oertel, G. Fuchs, W. Kuhn, P. Niklowitz, R. Koch, B. Herting, H. Reichmann, Randomized, double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 64 (2007) 938–944.
- [38] K.M. Strauss, L.M. Martins, H. Plun-Favreau, F.P. Marx, S. Kautzmann, D. Berg, T. Gasser, Z. Wszolek, T. Muller, A. Bornemann, H. Wolburg, J. Downward, O. Riess, J.B. Schulz, R. Kruger, Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2099–2111.
- [39] C.C. Winterbourn, Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 181–182 (2002) 223–227.

Please cite this article in press as: Y. Fu, et al., Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* (2009), doi:10.1016/j.neulet.2009.02.016

特集

心臓血管の発生, 疾患に関与する新しい注目すべき分子

心筋組織修復促進因子としての
Thymosin beta-4の可能性*

佐野元昭**

Key Words : Thymosin β 4, AKT, vasculogenesis, epicardial progenitor cell

心筋の再生能力はきわめて乏しい。急性心筋梗塞によってある一定以上の心筋が障害を受けると、病的リモデリングが進行して心不全に陥る。心不全の発症を予防するためには、①虚血による心筋細胞死を抑制して梗塞サイズを最小限に食い止めること、②側副血行路の成長を促進することによって心筋リモデリングを遅延化させることが肝要である。Thymosin β 4は、胎生期において心筋細胞の生存や遊走、冠血管発生に必須であるが、成体においてThymosin β 4を投与すると心筋細胞死を抑制し、心外膜に存在する前駆細胞の増殖、平滑筋細胞や血管内皮細胞への分化を誘導して、広義の血管新生を惹起することによって心臓の潜在的損傷治療能力を活性化することがマウスで実証され、現在、急性心筋梗塞患者を対象とした臨床試験が進行中である(<http://www.regenerx.com>, 平成21年12月現在で第1相試験が終了)。

Thymosin β 4は43個のアミノ酸からなるペプチドで、細胞内において球状アクチン(Gアクチン)と結合してアクチンフィラメントへと重合するのを妨げる主要な「Gアクチン隔離ペプチド」とみなされ、細胞遊走、血管新生、創傷治癒、形態形成、腫瘍の転移などにかかわる多機能の

ペプチドである。

2004年にBock-MarquetteとSrivastavaらは、Thymosin β 4が胚の心臓で心筋細胞と内皮細胞の移動を促し、出生後の心筋細胞の生存を促すこと、さらに、マウスの冠動脈結紮後にThymosin β 4を投与すると心筋細胞の生存が促進され、4週間後の平均左室駆出率(ejection fraction)がVehicle群で28.2%、Thymosin β 4群で57.7%(Sham-operated群では~75%)と心機能が改善されることをNature誌に報告した¹⁾。さらにその分子機序としては、Thymosin β 4が細胞内に取り込まれたあとLIMドメインを持つ蛋白質であるPINCHやインテグリン結合キナーゼ(ILK)と機能的複合体を形成し、その結果、生存を促進するキナーゼAktが活性化されることが関与することを確認し、Thymosin β 4が急性心筋梗塞治療に有効である可能性を示唆した(図1)。

2007年にSmart, Rileyらは、shRNAによって心筋細胞特異的にThymosin β 4の発現をノックダウンさせたThymosin β 4のloss-of-functionモデルを用いて、Thymosin β 4が胚形成期の肝血管の血管発生(vasculogenesis)を調節していることを示した²⁾。

冠血管は心外膜原基(proepicardium)から形成される。心外膜原基は心筋を覆う心外膜を形成するだけでなく、一部の細胞は上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transformation :

* Basic characteristics of Thymosin β 4.

** Motoaki SANO, M.D.: 慶應義塾大学医学部再生医学教室(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35); Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, JAPAN

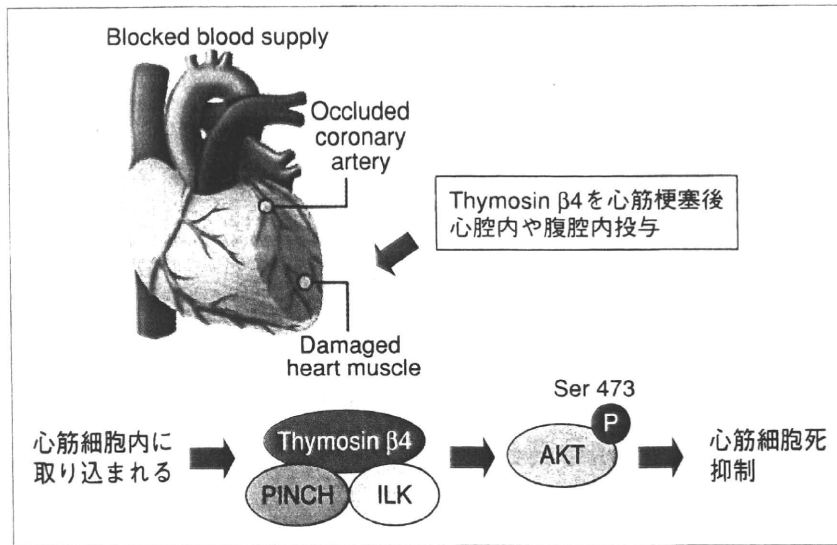


図1 Thymosin $\beta 4$ は Akt を活性化し心筋細胞死を抑制する
Thymosin $\beta 4$ が細胞内に取り込まれたあと LIMドメインを持つ蛋白質である PINCH やインテグリン結合キナーゼ(ILK)と機能的複合体を形成し、その結果、生存を促進するキナーゼ AKT が活性化される。

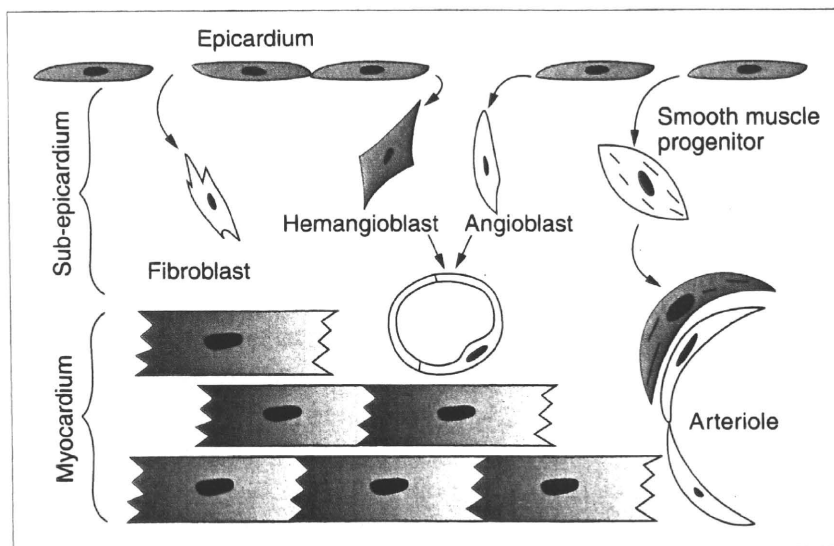


図2 Thymosin $\beta 4$ は冠血管の血管新生を促進することによって心筋リモデリングを抑制する

心外膜前駆細胞は Thymosin $\beta 4$ によって潜在的な多能性が誘導され、胚発生期にみられたように増殖、遊走を開始し、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞への分化が進むことを示して、心臓損傷後の血管新生において血管前駆細胞の供給源となる。

EMT) を起こして心外膜下の心筋組織内に侵入していき、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、線維芽細胞に分化して原始冠血管網を形成していく³¹⁻⁷⁾。また、一部は心筋細胞にも分化していく。

shRNA によって心筋細胞特異的に Thymosin $\beta 4$ の発現をノックダウンさせたトランスジェニックマウスでは心外膜前駆細胞の遊走が起こらず、冠

血管の血管発生が著しく損なわれる。それに伴って心筋細胞死が起こりマウスは耐性致死となる。

2006年に Lepilina, Poss らが、ゼブラフィッシュの心臓再生では心外膜のダイナミックな損傷応答が心臓再生中の前駆細胞の活性を保持することを報告していた⁸⁾。ゼブラフィッシュでは心尖部を切断しても2か月で完全に再生する現象が

知られている。その過程で、損傷を受けて露出した心筋組織を心外膜が覆い、心外膜細胞が上皮-間葉転換を起こして血管新生を誘導して心筋組織を再生していく。

成体においても多能性を持つ心外膜前駆細胞 (epicardial progenitor cell) は心外膜に残存しているが、基本的に活動静止状態にあると考えられている。Smart, Rileyらは、成体マウスの心外膜移植片をThymosin β 4で刺激することによって、眠っていた心外膜前駆細胞が先祖がえりを起こして多能性が誘導され、胚発生期にみられたように増殖、遊走を開始し、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞への分化が進むことを示して、心臓損傷後の血管新生において血管前駆細胞の供給源となりうる可能性を明らかにした(図2)。

その後の研究によって、心外膜が損傷刺激を受けて活性化され血管前駆細胞の供給源として心筋再生に寄与している現象は、マウスだけでなくヒトにおいても確認されている^{9)~12)}。

shRNAによって心筋細胞特異的にThymosin β 4の発現をノックダウンさせたトランスジェニックマウスの心筋では野生型マウスの心筋と比べてAKTリン酸化レベルが高かったことから、Thymosin β 4は、生理的な発現量ではAKTリン酸化レベルの制御因子ではないと考えられる。もちろん外から過剰量のThymosin β 4を投与した場合は、AKTリン酸化を促進して心筋保護的に働く可能性はある。最近、血行力学的負荷に対して、肥大した心筋組織における不十分な血管新生が相対的虚血状態を生み出し、その結果心不全が進行するという概念が提唱されている。Thymosin β 4の心筋梗塞後の心機能改善作用の一部は、冠血管の血管新生の促進作用に依存している可能性も示唆される。

文 献

- 1) Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, et al. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 2004 ; 432(7016) : 466.
- 2) Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007 ; 445(7124) : 177.
- 3) Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, et al. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* 2002 ; 46(8) : 1005.
- 4) Dettman RW, Denetclaw W Jr, Ordahl CP, et al. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 1998 ; 193(2) : 169.
- 5) Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008 ; 454(7200) : 104.
- 6) Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008 ; 454(7200) : 109.
- 7) Luttun A, Carmeliet P. *De novo* vasculogenesis in the heart. *Cardiovasc Res* 2003 ; 58(2) : 378. Review.
- 8) Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 2006 ; 127(3) : 607.
- 9) Urayama K, Guilini C, Turkeri G, et al. Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 ; 28(5) : 841.
- 10) van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, et al. Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells *in vitro*. *Stem Cells* 2007 ; 25(2) : 271.
- 11) Winter EM, Grauss RW, Hogers B, et al. Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* 2007 ; 116(8) : 917.
- 12) Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* 2007 ; 101(12) : 1255.

細菌学・ウイルス学

C型肝炎ウイルス研究の新知見

—肝脂質代謝とのかかわり

Modification of lipid metabolism as well as lipid transfer system by HCV infection

脂肪摂取の過多により、肝疾患が惹起される頻度が高くなる。脂肪摂取過多に加えて炎症を伴う場合、あるいはインスリン抵抗性が加わってみられる肝組織変化にNASH(non-alcohol steato-hepatitis)と診断されるものが存在するが、NASHは肝疾患増悪の要因と考えられる。

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎を引き起こし、さらに肝硬変、肝癌の発症をもたらす。世界的には約1億7千万人、わが国では約200万人がHCVに感染していると推定されている。C型慢性肝炎患者の15~20%が重篤な肝疾患の犠牲になると推定される。わが国では肝癌患者の約8割は

HCV陽性である。

HCV感染者の多くに肝脂質代謝の変化がみられる。それらのなかにはインスリン抵抗性を示す患者も多い。これまでにHCV感染と肝脂質代謝変化との間に何らかの関連が示唆されていた。事実、HCV蛋白質のなかには脂質代謝活性を高める働きをもつものがある。また、HCV感染者の血液内に存在するウイルス粒子はリポ蛋白質と会合していることが示されていた。しかし、これらのウイルス蛋白質による脂質代謝活性促進やリポ蛋白質とウイルス粒子との会合のウイルス学的な意義、および疾患との関連については不明な点が多い。近年、培養細胞を用いた

HCV感染増殖系が樹立され、その意義についてもしだいに解明されつつある。

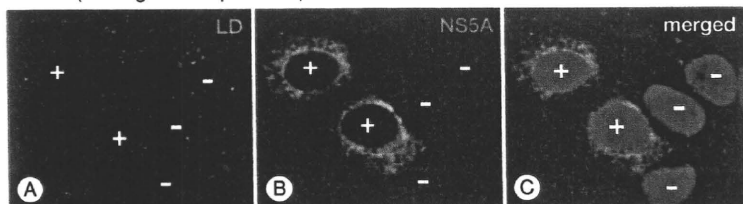
培養細胞で効率よく感染増殖する系を用いた脂質代謝活性化の解析

劇症肝炎患者から単離されたHCVゲノムがヒト肝癌由来の培養細胞で効率よく増殖することが見出された¹⁾。この系は限られたHCVゲノムと限られた培養細胞(HuH7)でのみ効率よく感染増殖するものであるが、HCVの生活環を解析する優れた系のひとつである。HuH7細胞にHCVゲノムを導入すると、ウイルスゲノム複製に加えて粒子産生が観察される。その際に、細胞内の脂肪滴が増加することが明らかになった(図1)。脂肪滴周辺にウイルス蛋白質が会合していること、会合できない変異HCVゲノムからは感染性粒子が産生されないことから、この脂肪滴を利用してウイルス粒子の形態形成が行われると考えられる²⁾。

HCVはリポ蛋白質の合成あるいは細胞外輸送経路を利用して増える

肝細胞は脂質を合成し、それをリポ蛋白質として細胞外に放出する。リポ蛋白質は血流を通して他の組織細胞に吸収される。肝細胞でつくられるリポ蛋白質であるVLDL(very low density lipoprotein)合成に関与する酵素(microsomal triglyceride transfer protein: MTP)を阻害すると、ウイルス粒子の細胞外への放出も阻害される。また、培養上清中のウイルス粒子の浮遊密度の解析から、粒子には脂質に富む成分が会合していると考えられる。つまりウイルス粒子は、リポ蛋白質合成とその輸送系を使って細胞の外に放出される。

JFH^{dC3} (lacking core expression)



JFH1 (wild)

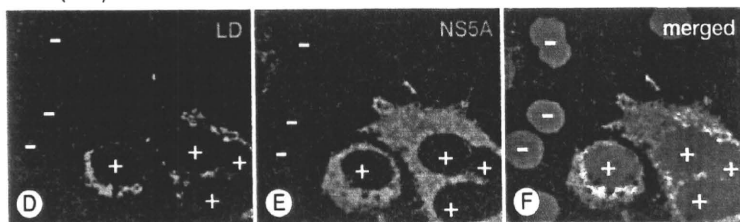


図1 HCV複製細胞における脂肪滴の産生

野生型のHCVを感染させた培養細胞[JFH1(Wild):下段]において、HCVゲノムが複製している細胞(+で示した)では脂肪滴の量が増えている。一方、コア蛋白質を欠くHCVを感染させた細胞(JFH1^{dC3})では、ゲノムが複製している細胞(A, Bの+の細胞。Bの赤い色は複製の結果ウイルス蛋白質が産生されていることを示す)でも脂肪滴の量は増えていない。すなわち、脂肪滴はコア蛋白質依存的に増加している。

写真はレーザー共焦点顕微鏡観察で、LDは脂肪滴の染色(A, D)、NS5Aはウイルス蛋白質(NS5A)の産生をNS5Aの染色で示したもの(B, E)。CはAとB、FはDとEの重ね合わせ。CとFの青色は核を示す。

リポ蛋白質構成蛋白質のなかのアポリポ蛋白質E (Apo-E)がウイルスの感染性に重要である

Apo-E が産生されない細胞に HCV を感染させた場合でも、細胞内でウイルスゲノムの複製は正常に行われる。また、ウイルス粒子の産生は 50% に減弱する程度で、粒子産生に大きな影響はない。しかし、ウイルスの感染性は極端に低下する。Apo-E の発現を戻した細胞では、元のおり感染性粒子の産生が回復する。培養上清のウイルス粒子には Apo-E が会合して存在する。Apo-E 特異的な抗体で Apo-E と会合しているウイルスを除き、残りのウイルスを調べると感染性はみられない。つまり HCV の感染性には、Apo-E との会合が必要である。

Apo-E 受容体が HCV の感染に重要である

リポ蛋白質の受容体は数種類存在する。そのなかで肝細胞に発現している受容体は LDLR, SR-B1, LRP5 など数種類存在する。これらのリガンドは Apo-B, Apo-E である。LDLR および SR-B1 が HCV の受容体のひとつとして機能していることが知られている。どちらの受容体が重要なのかについては結論がついていない。しかし、LDLR あるいは SR-B1 を別々に発現抑制させた細胞に対する感染実験から、両方の受容体が HCV の感染初期に機能していると考えられる。

Apo-E アイソフォームにより HCV 感染性は異なる

Apo-E にはアイソフォーム (Apo-E2, E3, E4) が存在する。Apo-E3 が正常型で、8 割以上のヒトは Apo-E3 (ヘテロも含めて) をもっている。Apo-E2 および Apo-E4 をもつ個体では、それぞ

れ脂質代謝異常、神経疾患との関連が示されている。異なる Apo-E アイソフォームを発現する細胞から産生される HCV の感染性を調べると、Apo-E2 と会合しているウイルス粒子の感染性が著しく低い。Apo-E2 は LDLR との親和性が Apo-E3, E4 に比べ低いことが知られているので、Apo-E2/HCV の低い感染性は LDLR との親和性が低いためである可能性が考えられる。

おわりに

HCV が複製増殖する過程で宿主細胞の脂質代謝および輸送系が、ここに紹介したように種々の形で変化していることが明らかになりつつある。脂肪摂取過多によ

る脂肪肝とは異なり、HCV による積極的な脂質代謝の修飾が感染細胞内の脂質量を変化させ、さらには脂質成分の細胞外への輸送にも影響を与えているかもしれない。このような状態のなかで、ウイルス感染により惹起される炎症が加わり、NASH 様症状が現れるものと考えられる。したがって、HCV 感染者に対して脂質代謝を制御する方法は、抗 HCV のひとつの方法になる。

- 1) Wakita, T. et al.: *Nat. Med.*, 11: 791-796, 2005.
- 2) Miyanari, Y. et al.: *Nat. Cell Biol.*, 9: 1089-1097, 2007.

下遠野邦忠 / Kunitada SHIMOTOHNO
千葉工業大学附属総合研究所

循環器内科学

ホルミシス応答による心筋保護

Cardioprotection by hormesis

われわれは心理的重圧、精神的動揺、過度の肉体的負担など、さまざまなストレスに囲まれて生活している。過度なストレスは病気の原因となる。慢性ストレスは動脈硬化を進め、そこへ急性ストレスが加わるとプラークの破綻から心筋梗塞を引き起こし、突然死の原因となる。反対に適度なストレスは健康を増進することが知られている。たとえば、適度なカロリー制限や運動は冠動脈疾患、高血圧、糖尿病、癌の発症を抑制し、加齢に伴う認知機能低下を遅延させる効果をもつ。このようにストレスに対する生体の用量反応関係 (dose-response) は二方向性で、ストレスが軽度である場合は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させて健康を増進する方向に作用するのに対して、ストレスが過度になると早期老化や臓器障害の原因となる。このような二方向性の用量反応関係のことを“ホ

ルミシス”とよぶ。最近では、とくに低用量のストレスのもつ健康増進・疾病抑制効果に注目が集まっている。本稿ではホルミシス応答による心筋保護について、著者らの最近の研究成果を解説する。

アルデヒド

活性酸素はミトコンドリアでの酸化エネルギー合成の副産物として、あるいは NADPH 酸化酵素 (NADPH オキシダーゼ) によって能動的に生成される。活性酸素により脂質 (高価不飽和脂肪酸) は酸化されて (水素が抜かれる) 脂質ラジカルとなり、さらに酸素分子と結合し脂質ペルオキシラジカルへと変化していく。この脂質ペルオキシラジカルは他の脂質を連鎖的に攻撃して、それから水素を引き抜き、自分は脂質ヒドロペルオキシド (過酸化脂質) となる。脂質ヒドロペルオキシドの分解生成物として、マロンジアルデヒド

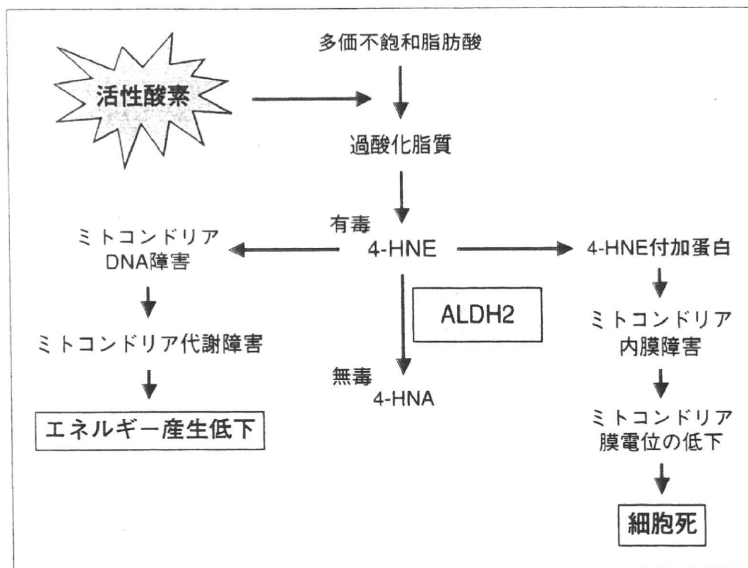


図 1 アルデヒドによる障害機序

(malondialdehyde : MDA)や 4-ヒドロキシ-2-ノネナル(4-hydroxy-2-nonenal)などのアルデヒドが体内で生成される。これらのアルデヒドの蓄積は酸化 LDL や動脈硬化巣、虚血性心筋症、心不全心、さらには Alzheimer 病の脳組織に認められ、酸化ストレスのバイオマーカーとして使用されている。しかし、アルデヒドは単なる Bystander ではなくて、酸化ストレスによる臓器障害の実行犯であることが証明されてきている¹⁾(図 1)。

一方で、このアルデヒドは培養細胞の系において、セカンドメッセンジャーとして細胞内シグナル伝達系を活性化して、遺伝子発現誘導を介してストレス防御機構を活性化させることも知られている。このように活性酸素や脂質過酸化反応の二次生成物であるアルデヒドは、さまざまなストレス(ストレスの原因)の下流で用量依存性に、組織障害性にも臓器保護的にも働きうる普遍的なメディエーターとして作用していると考えられる²⁾。

アルデヒド解毒酵素 ALDH2をめぐる最近の話題

アルデヒドの無毒化にはいくつかの代謝経路があるが、aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2)はアルデヒドをカルボン酸へ酸化することによって無毒化する酵素である。ヒトゲノム上に 19 個の ALDH 遺伝子が存在するが、なかでも ALDH2 は飲酒時に肝でアセトアルデヒドを酢酸に分解する酵素として有名である。しかし、ALDH2 は二日酔い防止のためだけに体内に存在している酵素ではない。ALDH2 は活性酸素の主要な産生場所であるミトコンドリア内に局在し、その本来の機能は脂質過酸化反応の結果生成される 4-HNE などのアルデヒドを無毒化する重要な抗酸化ストレス酵素である。

最近 ischemic preconditioning の分子機序に関して、新しい知見が報告された。Ischemic preconditioning に関する報告は 1986 年の Elizabeth Murphy らの研究が最初であり、その後の解析によって PKC ϵ の活性化が鍵を握ることが明らかにされた。しかし PKC ϵ のリン酸化標的蛋白質は、

これまで同定されていなかった。Daria Mochly-Rosen らは、PKC ϵ がミトコンドリアに移動して ALDH2 をリン酸化して活性化することを報告した。さらに、ALDH2 を活性化する低分子化合物として Alda-1 を探索・発見し、Alda-1 の虚血前投与によってラットの虚血再灌流障害による心筋障害を 40%も減少できることを報告した³⁾。

ALDH2 には遺伝子多型が存在する。アミノ酸がひとつだけ置換された不活性変異体 ALDH2*2 は優性抑制的に作用する。ALDH2 は四量体で作用するが、四量体のなかにひとつでも ALDH2*2 が含まれると酵素活性は消失する。したがって、ALDH2*2 をヘテロでもつ人(日本人の約 40%)は ALDH2*2 をもたない人(活性型 ALDH2*1 のホモのヒト)と比べると、ALDH2 の酵素活性は 1/16 まで低下している。ALDH2*2 のホモのヒト(日本人の約 10% : お酒がまったく飲めない人)は、もちろん ALDH2 の酵素活性はない。ALDH2 がミトコンドリアに局在する重要な抗酸化ストレス酵素であることを考慮すると、ALDH2*2 の遺伝子多型が単にお酒が飲めるか、飲めないかを規定するだけでなく、遅発性 Alzheimer 病や心筋梗塞、ある種の癌、糖尿病の発症などの酸化ストレス関与疾患の発症にも関与しているとする疫学研究の結果も説明できる。

ストレス応答性ホルミシスは、ミトコンドリアが持続性にアルデヒドに曝露されつづけている状態でも樹立される

ミトコンドリア ALDH2 活性の低下が生体にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、ALDH2*2 を過剰発現させたマウスを作製した⁴⁾。興味深いことに

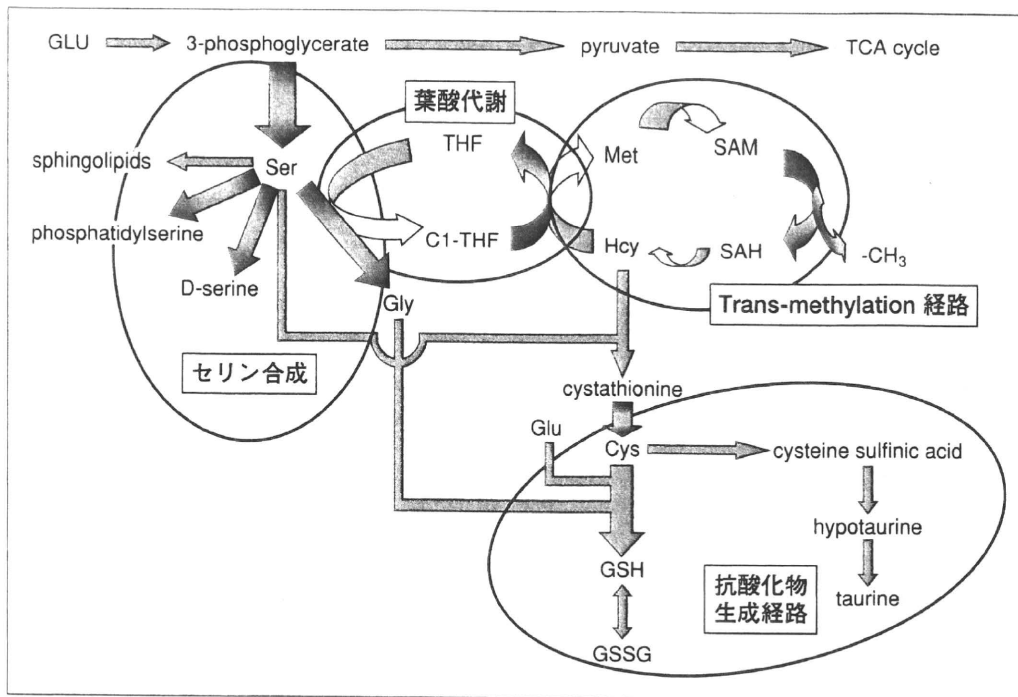


図 2 ALDH2*2過剰発現マウスで亢進したおもな代謝経路

臓器によって表現型は大きく異なった。脳においてALDH2*2を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、加齢に伴って海馬の錐体細胞が変性・脱落していき、記憶力の低下などヒトのAlzheimer病類似の表現型を呈し、寿命も短かった。一方で心臓に過剰発現させたトランスジェニックマウスは、加齢とともに心不全を呈することもなく、虚血再灌流障害に対してはむしろ耐性を示した。心筋細胞のミトコンドリアにはアルデヒドが蓄積し、電子顕微鏡下の観察ではミトコンドリア内に電子密度の高い蓄積物を認め、ミトコンドリアクリスタの構造が障害されていた。この一見矛盾する現象は、ミトコンドリアが持続的にアルデヒドストレスによって曝露された結果、ホルミシス効果が発揮されつづけていることによって説明できると考えた。

その分子機序を検討した結果、catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidaseなどの主要な抗酸化ストレス酵素の発現量

は、野生型と比較しても変わっていない。その代りにセリン合成経路, trans-methylation経路, trans-sulfuration経路のアミノ酸代謝酵素やアミノ酸トランスポーターの発現がきわだって増加していた(図2)。GSH合成経路の律速酵素GCLの発現量には大きな変化がないにもかかわらず、還元型GSH濃度は高く維持されていたことから、このトランスジェニックマウスの心筋細胞ではGSHの合成に必要なアミノ酸の供給を増やすことによってGSH合成を活性化させていることが示唆された。

心筋細胞では、グルコースは解糖系でピルビン酸まで代謝されたあと、ミトコンドリアに取り込まれてTCA回路、電子伝達系でCO₂まで完全に酸化され、ATP合成に使われる。しかし、ミトコンドリアが強く酸化的ダメージを受けているこのトランスジェニックマウスの心筋細胞では、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化能は低下し、代わりに解糖系の流速を増や

すことによって(好氣的解糖)心筋収縮に必要なエネルギーをまかなっていることが示唆された。さらに、グルコースは解糖系でピルビン酸まで代謝されるだけでなく、中間代謝産物からペントース-リン酸経路やアミノ酸セリン、さらにはグルタチオン合成経路へも代謝されるように変化していた。ペントース-リン酸経路を介して合成されるNADPHは、酸化型のGSSGを還元型GSHに戻して再利用するのに使われ、還元型GSH濃度を高く維持するために一役買っていると考えられた。

従来のpreconditioningによる心筋保護は、細胞死を制御するミトコンドリアのMPTPの開口を抑制することによって達成される。しかし、このトランスジェニックマウスでは、酸化ストレスが蓄積したミトコンドリアから核に向けてシグナル(ミトコンドリア・レトログレード・シグナリング)が伝達され、細胞内代謝経路を再構築させることによってホルミシス効果を発揮させていた。ミトコ

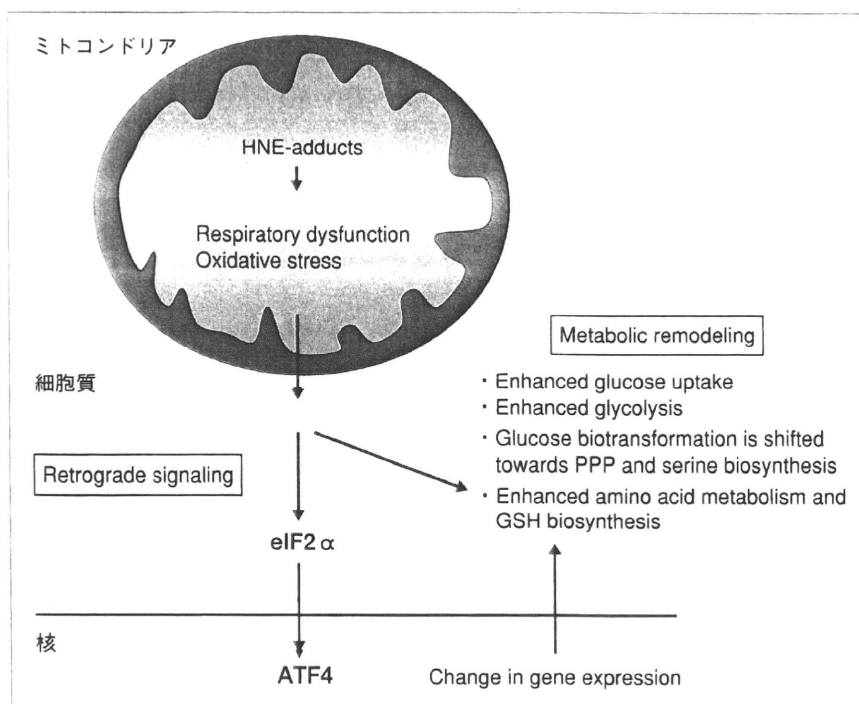


図 3 ミトコンドリア・レトログレード・シグナリングと心筋代謝リモデリング

ンドリア・レトログレード・シグナリングを探索した結果、eIF2αリン酸化シグナルが重要であることがわかった(図 3)。eIF2αリン酸化シグナルは栄養飢餓、小胞体ストレス、酸化ストレス、ウイルス感染などの多彩なストレスを感知し、ストレスが低用量ならば細胞保護に働き、シグナルが強い場合にはアポトーシスを誘導することから、2方向性の用量反応関係の鍵を握る分子のひとつとして、さまざまな心筋ストレスに対する普遍的なストレス応答分子として作用している可能性が示唆される。

おわりに

著者らの研究結果を受けて、“ALDH2*2の遺伝子多型をもつヒトの心臓はホルミシス効果で守られている”と帰結することはできない。しかし、eIF2αリン酸化シグナルを介するミトコンドリア

・レトログレード・シグナリングが、心筋の抗加齢あるいは病態下における心筋細胞保護に実際に関与しているのかどうかは興味深い⁵⁾。加齢に伴ってROSの産生は高まり、ミトコンドリアDNAや蛋白、脂質などの高分子の酸化的ダメージは進行する。それに伴って産生されるアルデヒドによるホルミシス効果が発揮されれば、臓器の恒常性は永久的に保たれることになる。しかし高齢者では、虚血再灌流障害に対する抵抗性が減弱している。それに伴って高齢者では、eIF2αリン酸化シグナルを介するミトコンドリア・レトログレード・シグナリングの反応性が低下している可能性がある。ラットにおいては、eIF2αリン酸化レベルが加齢した組織で低下していることが報告されている。ストレス応答が加齢によって減弱する機序の解明は、老化の機序を解明するうえでこれからの重要な研究

テーマになると考えられる。

- 1) Conklin, D. et al.: Aldehyde metabolism in the cardiovascular system. *Mol. Biosyst.*, **3**: 136-150, 2007.
- 2) Zhang, Y. et al.: 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010.(in press)
- 3) Chen, C. H. et al.: Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*, **321**: 1493-1495, 2008.
- 4) Endo, J. et al.: Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.*, **105**: 1118-1127, 2009.
- 5) Sano, M. and Fukuda, K.: Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ. Res.*, **103**: 1191-1193, 2008.

佐野元昭/Motoaki SANO
慶應義塾大学医学部循環器内科

1. 心筋疾患

話題の心筋症

4) ミトコンドリア異常と心筋病変

佐野元昭^{*1} 木村謙介^{*1}
小平真幸^{*1} 影山智己^{*2}

I. ミトコンドリア病総論

ミトコンドリアは細胞内小器官の一つでありその主要な働きはエネルギー (adenosine 5'-triphosphate: ATP) 産生である。核 DNA とは別にミトコンドリアは独自の DNA をもつ。細胞あたり 100~2,000 個のミトコンドリアがあり、ミトコンドリア内に数個のミトコンドリア DNA がある。エネルギー産生に直接関わる電子伝達系酵素は 100 個以上あるが、ミトコンドリア DNA に書き込まれている遺伝子からつくられるのは蛋白質が 13 種類 (電子伝達系の複合体 I, III, IV, V のサブユニット)、これら 13 種類の蛋白質の翻訳過程に使われる転移 RNA (t-RNA) が 22 種類、リボソーム RNA が 2 種類の合計 37 種だけで、これ以外は全て核 DNA にコードされている。

ミトコンドリアでのエネルギー産生の過程で、電子伝達系から活性酸素が発生するため、ミトコンドリア DNA は核の DNA と比べて変異を起こしやすい。ミトコンドリア DNA の質的異常には欠失・重複変異、点変異が存在する。変異をもつミトコンドリア DNA と正常ミトコンドリア DNA は混在している (heteroplasmy)。受精の際には母親由来の正常ミトコンドリア DNA と変異ミトコンドリア DNA の極一部がランダムに娘細胞に受け継がれるため (genetic bottleneck) 同じ母親から生まれた子供の中でも変異ミトコンドリア DNA と正常ミトコンドリア DNA 比率は様々である (母親より変異ミトコンドリア DNA % が高まる可能性もある)。さらに、その後の発生・分化の過程における細胞分裂でミトコンドリアはランダムに娘細胞に分配されていくため (mitotic segregation)、変異ミトコンドリア DNA と正常ミトコンドリア

ア DNA 比率は細胞ごと、臓器ごとに、あるいは同じ母親から生まれた子供の間でもかなり異なってくる。細胞全体として変異ミトコンドリア DNA の割合がある一定以上を超えるとミトコンドリア呼吸機能障害が出現する (閾値効果 threshold effect)。したがって例え同じ変異ミトコンドリア DNA をもっていても臨床症状は多彩で予測不能である。

例えばロイシン t-RNA 上にある 3243A → G 点変異 [A3243G (tRNA_{Leu})] は MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episode) の患者にみつかるとは代表的なミトコンドリア DNA 点変異だが、実は糖尿病患者の全体の約 1% に A3243G (tRNA_{Leu}) がみつかるといわれているので該当する患者は数万人の規模になる。これらの患者では母系に糖尿病の家族歴、難聴を伴う、合併症として神経障害をもつ頻度が高いなどの特徴がある。神経障害を合併症にもつ糖尿病患者では A3243G (tRNA_{Leu}) がみつかるとは頻度は実に 4% にまで増加する。つまり同じ A3243G (tRNA_{Leu}) をもっていてもある人はミトコンドリア脳筋症を発症し、またある人は糖尿病患者としてメタボリックシンドロームの患者に紛れて治療を受けている。

II. ミトコンドリア異常と心筋病変

ミトコンドリア病はその症状によって病型が分類される。

- CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia)
- MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)
- MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fiber)

MELAS と MERRF の患者からはミトコンドリア

*1 慶應義塾大学医学部循環器内科

*2 さいたま市立病院循環器内科

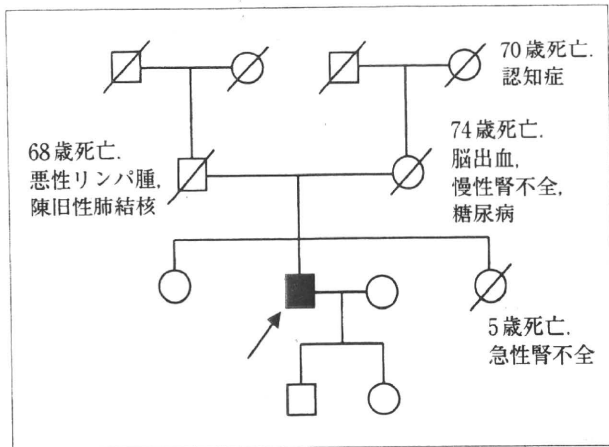


図1 家族歴

DNAの点変異，CPEOの患者からはミトコンドリアDNAの欠失など疾患特異的なミトコンドリアDNA異常がみついている。同じ病型でもその症状は患者によって異なる。

ミトコンドリア病の臨床像は次の3つの要素によって決まる。

- ・変異ミトコンドリアDNAの相対量
- ・変異ミトコンドリアDNAの組織分布
- ・酸化的代謝障害に対する組織の脆弱性

変異ミトコンドリアDNA%がある一定以上を超えたミトコンドリアがたまたま筋細胞に多く存在する場合、心筋症(心機能障害)が临床上顕性化してくる。MELASの約1/5に心合併症(心筋症、伝導障害)を認める。MELASの患者からはA3243G(tRNA^{Leu})に代表されるミトコンドリアDNA点変異が見出される。しかし、A3243G(tRNA^{Leu})をもっているからといって必ずしもMELASを発症するわけではない。先ほど述べたように糖尿病患者の1%にA3243G(tRNA^{Leu})が見つかるとの報告がある。原因不明の心肥大や左収縮機能低下に糖尿病、低身長、感音性難聴などを合併する場合はミトコンドリア異常を伴う心筋症を疑うことが重要である。家族歴も重要で母系に心筋症、糖尿病、感音性難聴を有する人がいないか慎重に聴取することがミトコンドリア心筋症をみつける足がかりになるかもしれない。

心筋症の確定診断には心内膜心筋生検が重要である。光学顕微鏡でのHE、Azan染色による観察に加えて、電子顕微鏡でミトコンドリアの数の増加、巨大ミトコンドリアの出現、類結晶状封入体などのミトコ

ンドリアの異常を認めた場合は、ミトコンドリア心筋症を疑って分子遺伝学的検査(DNA検査)を行う。

Ⅲ. 治療

電子伝達系異常に基づくミトコンドリア病に対する治療にはRCTによるエビデンスが乏しい。coenzyme Q10, idebenone, dichloroacetate, arginineなどの有効性を証明するためのclinical trialが進行中である。中でもcoenzyme Q10およびcoenzyme Q10合成類似体のidebenoneは主として抗酸化作用を期待して経験的に最も広く使われている。

Ⅳ. 症例提示

慶應義塾大学病院で経験したG8363A(tRNA^{Lys})変異を遺伝子診断にて診断し、ミトコンドリア心筋症と診断した1例を呈示する。

【症例】 54歳，男性。

【主訴】 労作時呼吸苦。

【現病歴】 大学生頃から健診にて蛋白尿を指摘されていたが、放置していた。1996年(44歳)より腎機能障害を指摘され、1999年(47歳)に腎生検を施行、慢性糸球体腎炎(メサングウム増殖性糸球体腎炎)の診断となりACE阻害剤等を開始された。

1998年より握力低下を自覚、2000年頃より筋萎縮(下肢から始まり次第に上肢にも進行)を認めるようになったが、日常生活に支障をきたすほどではなかった。

2002年(50歳)より労作時呼吸苦を認めるようになり、2004年にうっ血性心不全と診断されたが、仕事が忙しく内服薬服用は不定期であった。2005年5月に心不全にて他院入院、当院での精査加療を希望され入院となった。

【既往歴】 43歳：頸部脂肪腫，50歳：高血圧。

【家族歴】 図1参照。

【生活歴】 喫煙：10～20本/日×約30年。飲酒：機会飲酒。

【入院時所見】 身長179.5 cm，体重55.7 kg，血圧112/80 mmHg，心拍数88/分(整)；体温36.5℃，頸静脈怒張10 cm高，右室拍動あり，心音：S2p亢進，S3(+)，S4(+)心尖部収縮期逆流性雑音，および拡張期逆流性雑音あり，肺野清，腹部平坦軟，下腿浮腫あり。

神経所見：意識清明，脳神経所見異常なし，握力

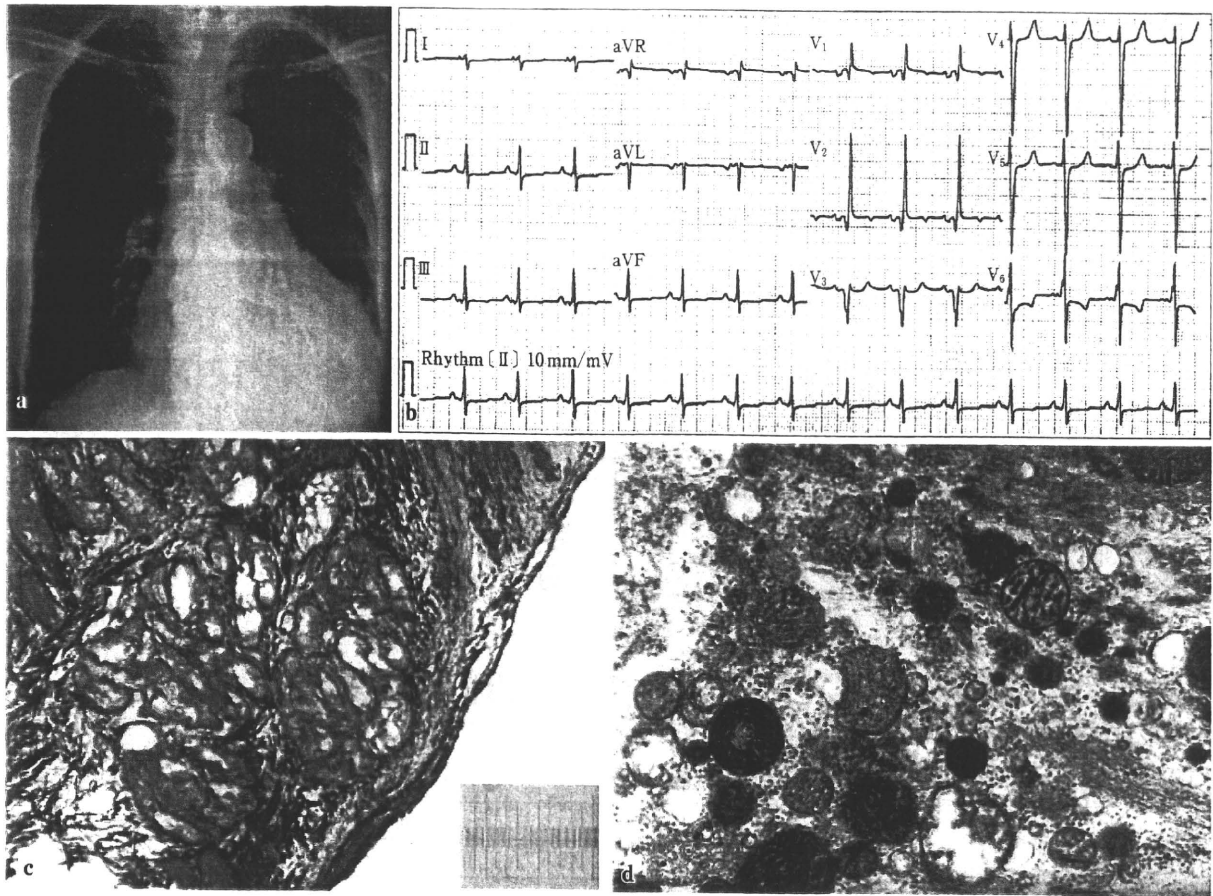


図2 検査所見 a:胸部X線, b:心電図, c: Azan染色, d:電顕像(×60,000). (c, dは虎の門病院病理部 大橋健一先生のご厚意による)

18/15 kg, 筋萎縮上下肢あり(上肢優位), 線維束性攣縮あり, 感覚障害なし, 小脳失調なし, 歩行正常, ミオクローヌスなし, 病的反射なし.

【検査所見】

- ・末梢血: WBC 4,800/ μ L, RBC 362×10^4 / μ L, Hb 11.1 g/dL, Plt 19×10^4 / μ L.
- 凝固系: APTT 26.4sec, PT-INR 0.91, FNG 360 mg/dL.
- 臨床化学: TP 6.4 g/dL, Alb 4.1 g/dL, UN 77.0 mg/dL, Cr 3.9 mg/dL, UA 10.4 mg/dL, Na 142 mEq/L, K 6.1 mEq/L, Cl 108 mEq/L, Ca 8.7 mg/dL, iP 4.9 mg/dL, LDH 313 IU/L, CK 271 IU/L, CK-MB 19 IU/L, Glu 123 mg/dL, HbA_{1c} 5.6 %, TC 121 mg/dL, TG 121 mg/dL, BNP 1,404 pg/mL, TnT 0.29 ng/mL, H-FABP(+), 乳酸6.2 mg/dL, ビルビン酸<0.1 mg/dL.
- 内分泌: TSH 0.53 μ IU/mL, fT3 3.6 pg/mL, fT4

1.5 ng/dL.

感染症: STS(-), TPAB(-), HBS-Ag(-), HCV-Ab(-), HIV-Ab1, 2(-).

- ・尿検査: Pro (2+), Bld (\pm), 硝子脂肪顆粒あり. 蓄尿: Pro 2.14 g/day, クレアチニンクリアランス 17 mL/min.
- ・髄液検査: Cell 0/mm³, TP 71 mg/dL, Cl 124 mEq/L, Glu 60 mg/dL (BS 93 mg/dL), 乳酸17.8 mg/dL, ビルビン酸1.01 mg/dL.
- ・動脈血液ガス分析: (room air) pH 7.314, pO₂ 75.3 torr, pCO₂ 43.1 torr, HCO₃ 21.2 mEq/L, BE -3.9 mmol/L, sO₂ 95.9%.
- ・胸部X線(図2a): 心拡大, CTR 68%.
- ・肺機能検査: VC 2.96l, % VC 64%, FEV₁₀ 2.19 L, FEV_{10%} 75%.
- ・筋電図所見: #1末梢神経障害, #2筋障害.
- ・脳波: well-organized α 波主体, 突発波(-).

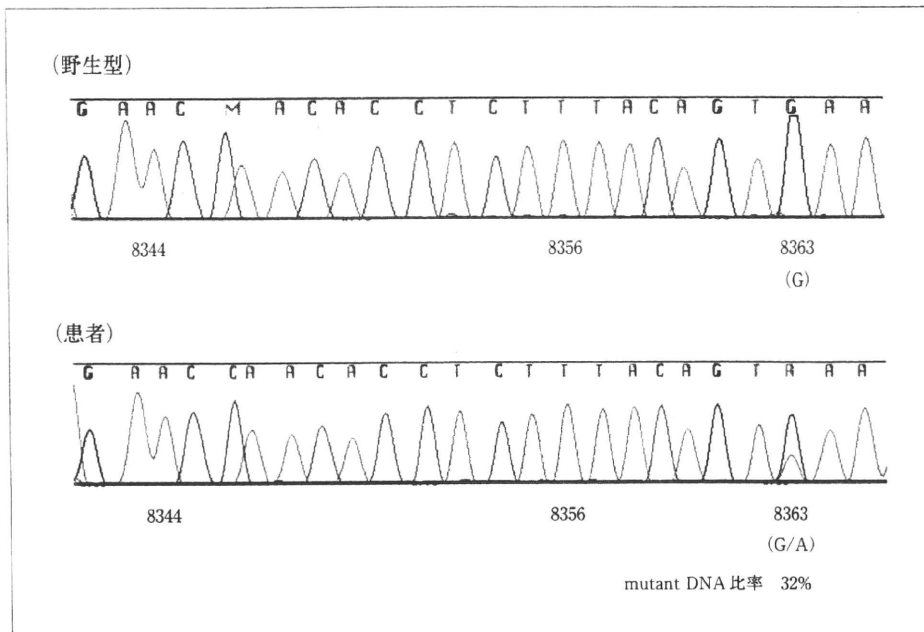


図3 ミトコンドリア遺伝子 (tRNA-Lys) ダイレクトシーケンス解析結果

表1 過去に報告された G8363A 変異を認める家系と本症例との臨床像の比較

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	本症例
心筋症	●	●	●		●	●			●	●
難聴	●	●				●	●			●
外眼筋麻痺	●					●	●			
脂肪腫		●				●				●
ミオクローヌスてんかん			●	●	●	●	●	●		
小脳失調	●	●		●	●	●				
筋症状	●	●	●	●						●
末梢神経障害	●	●			●	●	●			●
認知・運動退行	●	●		●			●	●	●	
自閉症								●	●	
腎障害										●

- ・耳鼻科：左高音部感音性難聴。
- ・眼科：網膜等に異常所見なし。
- ・心筋生検：光顕像では心筋層内に高度の線維化，およびまばらに残存する心筋細胞の肥大を認める (図 2c)。電顕像では一部にミトコンドリアの数の増加を認め，類結晶状封入体も認める (図 2d)。
- ・ミトコンドリア DNA 遺伝子検査 (血液細胞)：リジン t-RNA 内の G8363A 変異を検出 (図 3)。

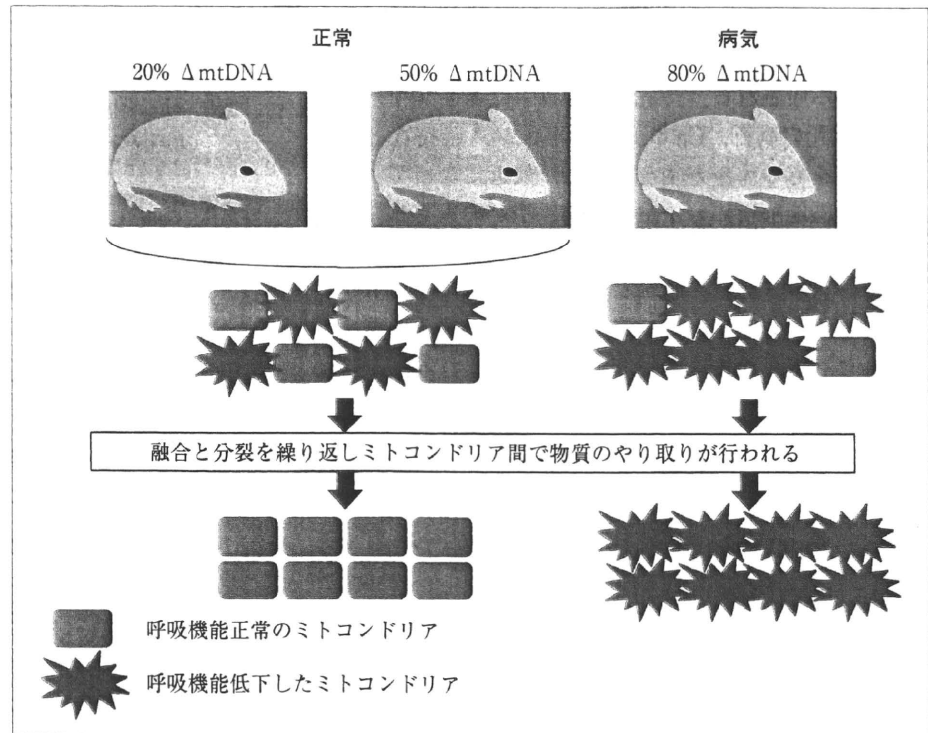
慢性心不全，慢性腎不全，筋力低下で加療中に遺伝子診断によってミトコンドリア心筋症 G8363A

(tRNA^{Lys}) と診断された。ミトコンドリア DNA 異常は heteroplasmy のため，分布が各臓器・組織・細胞により異なり，閾値効果，細胞特性により，各患者で表現される病型が異なるが，本家系では，これまでの報告の G8363A (tRNA^{Lys}) の表現型と異なり腎障害を認めた点が特徴的であった (表 1)。

V. ミトコンドリア DNA 変異と疾患

ミトコンドリア DNA 変異の蓄積によるミトコンドリア電子伝達系の機能異常が疾病発症との間に因果関

図4 閾値効果の分子機序 (文献5より改変)



係があるのだろうか？ この疑問に対して筑波大学の林 純一先生らは変異ミトコンドリア DNA (全ゲノムの1/4以上にあたる4696塩基対を欠失: Δ mtDNA4696) と野生型ミトコンドリア DNA を heteroplasmismy でもつミトコンドリア遺伝子疾患病態マウス (Mito-Mice) を作製して答えを出した。 Δ mtDNA4696 が80%を超えた Mito-Mice において電子伝達系の呼吸活性が低下し、これに伴い低体重と高乳酸血症、聴力障害、腎不全、心臓の伝導障害 (Wenckebach 型)、雄性不妊症、空間記憶の障害などの異常が観察された。

ミトコンドリアは酸化ストレス環境にあり、核の DNA と比べてミトコンドリア DNA には変異が入りやすい。これに対してミトコンドリアは融合と分裂を繰り返して、ミトコンドリアの膜、ミトコンドリア DNA、およびその遺伝子産物を補い合うことで、酸化ストレス障害によってグローバルなミトコンドリア機能が低下しないように代償機転を働かせていると考えられる。その証拠にミトコンドリア DNA 変異 A4269G (tRNA^{Ile}) と A3243G (tRNA^{Leu}) を homoplasmismy にもつ細胞はそれぞれ単一細胞では呼吸活性は認められないが、この2つの異なるミトコンドリア DNA 変異をもつ細胞の融合細胞をつくるとミトコン

ドリア DNA やその遺伝子産物を交換し合うことによって結果的にミトコンドリア呼吸機能は回復していることが実験的に証明された。

Mito-Mice においても Δ mtDNA4696 が75%までは細胞全体としてのミトコンドリア呼吸機能は野生型マウスのミトコンドリアと同程度に維持されるが、 Δ mtDNA4696 が75%を超えるとミトコンドリア呼吸機能が低下し始め、80%を超えるとミトコンドリア呼吸機能が消失して様々な臓器機能障害を呈してくる (図4)。この Mito-Mice の解析結果から、ミトコンドリア DNA 変異をもつ患者において変異型 mtDNA があるレベル以上に蓄積しない限り発症しない閾値効果 threshold effect の分子機序が推察される。

おわりに

ミトコンドリア病の臨床像は、変異ミトコンドリア DNA の相対量、変異ミトコンドリア DNA の組織分布、酸化的代謝障害に対する組織の脆弱性によって規定される。変異ミトコンドリア DNA をもっていても、多くの場合閾値効果によって無症状で経過していると考えられる。変異ミトコンドリア DNA の相対量が閾値以下であっても、加齢とともに代償不全を起こしミ