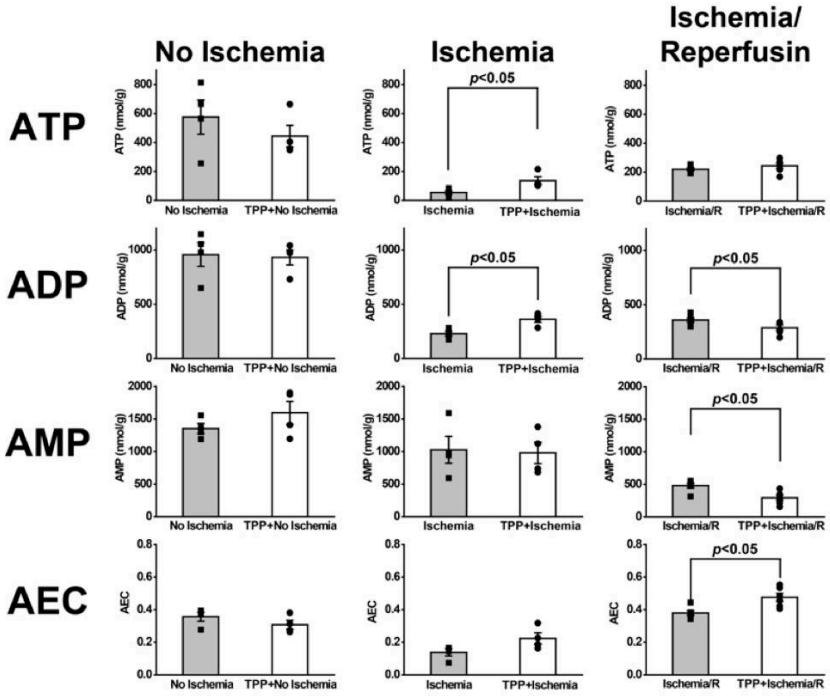
16　虚血ストレスへのビタミンB1組織保護機序の解明	南沢　享

【目的】ビタミン B1（VB1）は糖代謝をはじめエネルギー産生に関わる重要な補酵素である。近年、食生活の変化、アルコール依存症や高齢者の増加によって、潜在的な VB1 欠乏状態が進行しているといわれる。心臓はエネルギー需要が大きいため、VB1 欠乏状態時に虚血ストレスに晒された場合、組織代謝が障害され、より重症化することが予測される。心臓におけるエネルギー産生の主要な場となるミトコンドリアは常に分裂・融合を繰り返し、形態変化をさせつつ、生理機能を維持している。従って、VB1 が心筋ミトコンドリア動態に如何に作用するかを知ることは重要である。VB1 が心筋に対して保護的に働くという実験や臨床研究が報告されているが、網羅的代謝解析（メタボロミクス）を行い、ミトコンドリア動態から VB1 の心筋への効果を検討した報告はない。そこで本研究では、VB1 はミトコンドリア動態や心筋での代謝状態を変化させ、虚血ストレスによる組織傷害に保護的に働くという仮説をたて、その分子機序を動物実験によって検証することを目的とした。

【方法】1. VB1 が虚血再灌流後の心機能、心筋代謝、ミトコンドリア微細構造に及ぼす効果について、ランゲンドルフ灌流装置を用いて、ラット摘出心において検証した。2. 生後 6 週齢のラットに VB1 欠乏食を与えて、VB1 欠乏が心機能、心筋代謝、ミトコンドリア微細構造に及ぼす効果について検証した。

【結果】1. VB1 の事前投与によって、虚血再灌流後の左室機能が有意に改善をした。メタボロミクスの結果、VB1 は虚血後の心筋 ATP 含有量の減少を抑制し、虚血再灌流後のエネルギー状態を改善させることが判明した。この効果は、電子顕微鏡によるミトコンドリアの大きさが保たれることやミトコンドリア分裂促進因子である Drp1 タンパク質のリン酸化が抑制されることと関係する可能性が示唆された。2. VB1 欠乏食によってラットの有意な体重減少や突然死が認められた。VB1 欠乏食群では ANP 上昇など心機能の低下が示唆された。さらにメタボロミクス解析及び電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の検討が必要とされた。

VB1（TPP）が虚血再灌流後の心筋 ATP 含有量など高エネルギー産生物質量に及ぼす影響



16. 虚血ストレスへのビタミンＢ１組織保護機序の解明

南沢　享

東京慈恵会医科大学 医学部 細胞生理学講座

Key words：サイアミン，虚血再灌流，ミトコンドリア，エネルギー代謝，心筋

緒　言

ビタミンB1（VB1）は糖代謝をはじめエネルギー産生に関わる重要な補酵素であり、その欠乏は脚気の原因となる。かつて国民病として恐れられていた脚気は過去の病気と思われていたが、近年、食生活の変化、アルコール依存症や高齢者の増加によって、潜在的なVB1欠乏状態が進行しているといわれる［1］。心臓はエネルギー需要が大きいため、VB1 欠乏状態時に各種ストレスに晒された場合、組織代謝が障害され、より重症化することが予測される。事実、心不全患者では VB1 欠乏状態になることが多く［2］、VB1 補充療法が心筋障害に対して保護的に働くという実験や臨床研究が報告されている［3］。我々も先行研究において VB1 の事前投与が摘出した心臓での虚血再灌流による心筋傷害を改善し、心機能が速やかに回復することを見出した。しかし、近年の技術革新により可能となった網羅的代謝解析・メタボロミクスの観点から、VB1 の心筋への効果を検討した報告はない。一方、心臓におけるエネルギー産生の主要な場となるミトコンドリアは常に分裂・融合を繰り返し、形態変化をさせつつ、生理機能を維持している。最近の研究では、ミトコンドリアの分裂・融合に伴う形態変化は、ミトコンドリアのエネルギー産生能力に影響を及ぼし、神経変性疾患など様々な疾患の病態形成に大きく寄与することが明らかになっている［4］。しかし、VB1 がミトコンドリアの形態や機能に影響を与える可能性について、ミトコンドリア動態からは詳しく調べられてはいない。そこで本研究では、VB1 はミトコンドリア動態や心筋での代謝状態を変化させ、虚血ストレスによる組織傷害に保護的に働くという仮説をたて、その分子機序を動物実験によって検証することを目的とした。

方法および結果

1.　虚血再灌流による心機能及び心筋代謝へのVB1の効果について

Sprague Dawley 雄ラット（8～10 週齢）から心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流装置（Tyrode 灌流液、80 mmHg 灌流圧、34℃を保持）用いて、15 分以上灌流し、状態を安定させた。その後、40 分間灌流を遮断して虚血状態にした後、灌流を再開し 60 分間かけて、虚血再灌流心筋を作製した。予め灌流液に thiamine pyrophosphate（TPP）を 3.0×10^{-4} mol/l 加えたもの（TPP 群）と加えないもの（対照群）を比較して、VB1 が心機能や心筋代謝に及ぼす効果について、虚血 40 分間直後（ischemia 群）と虚血後再灌流 60 分（ischemia/reperfusion 群）において検証した。

1）左室発生圧（LVDP、left ventricular developed pressure）によって心機能を評価した。虚血前の状態では、TPP 群と対照群に LVDP に有意な差を認めなかった。虚血開始直後から、両群共に LVDP は 0 mmHg となり、その状態が 40 分間の虚血の間持続した。再灌流後から LVDP は徐々に増加したが、再灌流 60 分後の LVDP は対照群が 10.4±2.1 mmHg、TPP 群が 24.5±4.4 mmHg（n = 7）であり、有意に TPP 群の LVDP が高かった。

2）VB1 の効果を心筋代謝産物の網羅的解析によって評価した。虚血前（n = 4）、虚血 40 分直後（n = 4）、再灌流 60 分後（n = 6）の左室心筋を直ちに凍結保存し、その後抽出液を CE-TOFMS 法（capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry）によって代謝産物を検出し、解析を行った。高エネルギー産生物質として ATP とその関連物質の解析結果を図 1 に示す。組織のエネルギー状態を示す指標であるアデニル酸エネルギーチャージ（AEC：adenylate energy charge）は ATP、ADP、AMP 値から算出した。ATP、ADP、AMP 値及び AEC は、虚血前では対照群と TPP 群で差がなかった。ATP、ADP、AMP 値は虚血前に比べ、虚血 40 分直後に著しく低下した。

ATP、ADP 値は再灌流後にやや回復したが、AMP 値はさらに低下した。対照群と TPP 群の比較では、ATP 値は虚血 40 分直後の値が TPP 群において有意に高かったが、再灌流後では差がなかった。ADP 値は虚血 40 分直後の値が TPP 群において有意に高かったが、再灌流後ではむしろ有意に低くなっていた。AMP 値は虚血 40 分直後の値に有意差がなく、再灌流後では TPP 群において有意に低くなっていた。AEC からみた心筋組織のエネルギー状態を対照群と TPP 群で比較すると、虚血 40 分直後の値に有意差がなく、再灌流後では TPP 群において有意に高くなっていた。

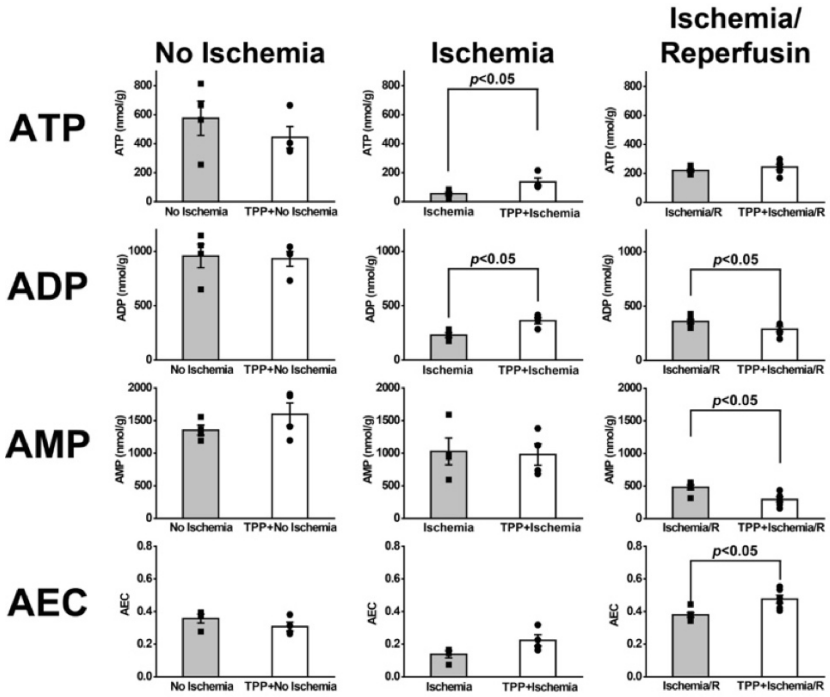


図 1. 高エネルギー代謝産物への VB1 の影響
虚血前（No Ischemia、n＝4）、虚血 40 分直後（Ischemia、n＝4）、再灌流後（Ischemia/Reperfusion、n＝6）における ATP、ADP、AMP 量とアデニル酸エネルギーチャージ（AEC）。結果を平均値±標準誤差で示し、ノンパラメトリック検定（Mann–Whitney's U test）による統計解析を行った。

2. VB1 が虚血時のミトコンドリアに及ぼす影響について

網羅的代謝解析の結果、虚血 40 分間直後において ATP 値が有意に TPP 群で高かったため、VB1 が心筋虚血によってミトコンドリアに及ぼす影響を検証した。

1）TTC（triphenyl-tetrazolium chloride）染色

虚血 40 分直後に心臓を水平断面で心尖部、中間部、心底部に区分し、5%TTC で 20 分間（37℃）に浸した後、組織固定した。ミトコンドリア代謝活性を示す TTC 染色では、代謝活性の低下を示す白色領域が虚血 40 分直後に TPP 群で有意に減少していた。この結果から VB1 がミトコンドリア活性を維持し、虚血ストレスによる心筋傷害を減弱させることが示唆された。

2）電子顕微鏡検査

虚血 40 分直後の心筋組織を小片に刻み、エポキシ樹脂（Epon 812）に包埋して、H-7500 透過型電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ）を使い、微細構造の観察を行った。TPP 群は有意に虚血後のミトコンドリアの大きさが大きかった（図 2A）。さらに詳しくミトコンドリアの大きさのバラツキを検討したところ、ミトコンドリアの大きさに 2 つのピーク（断面積 0.05 to 0.06 μm^2 と 0.07 to 0.08 μm^2）を認め、TPP 群では 0.07 to 0.08 μm^2 への偏位が大きくなった（図 2B、C）。

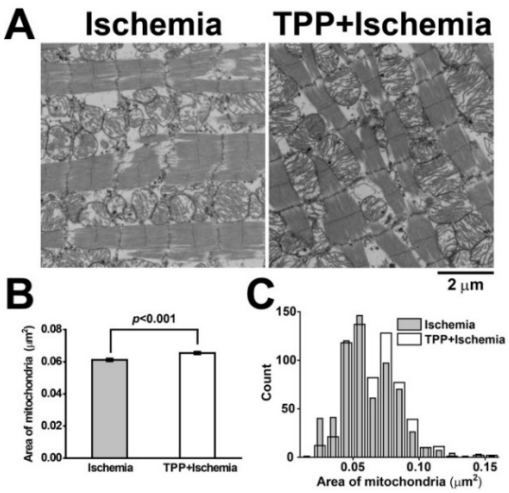


図 2. 心筋虚血後のミトコンドリア形態への VB1 の効果

A) 虚血後 40 分の電子顕微鏡像（スケールバー：2 μ m）。

B) ミトコンドリア断面積（n＝4、それぞれ 600 以上のミトコンドリアを計測）。結果を平均値±標準誤差で示し、ノンパラメトリック検定（Mann–Whitney's U test）に　よる統計解析を行った。

C) ミトコンドリア断面積の分布図。

3) ミトコンドリア動態制御因子への VB1 の影響

虚血 40 分直後の心筋組織において、ミトコンドリア分裂を調整するタンパク質 DRP1：（リン酸型 p-DRP1（Ser616）（3455 ； CellSignalingTechnology）、total-DRP1 （8570 ； CellSignalingTechnology）、ミトコンドリア融合にミトコンドリア外膜に働く Mitofusin1（MFN1）（ab57602 ; Abcam）、Mitofusin2（MFN2）（ab56889 ; Abcam）と内膜に働く OPA1（612607 ; BDBiosciences）の発現変化をウェスタンブロット法を用いて VB1 事前投与の有無で比較した。比較検討のために GAPDH（2118 ; CellSignalingTechnology）を用いた。TPP 群では有意に DRP1 のリン酸型の発現が低下していた（図 3A）。一方、MFN1、MFN2、OPA1 のタンパク質発現に有意な差は認めなかった（図 3B～D）。

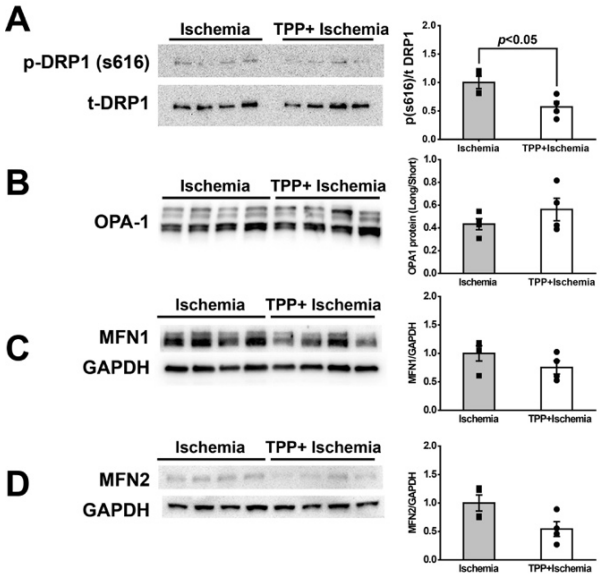


図 3. 心筋虚血後のミトコンドリア形態への VB1 の効果

A. DRP1（s616、total）、B. OPA1、C. MFN1、D. MFN2（n = 4）。結果を平均値±標準誤差で示し、ノンパラメトリック検定（Mann–Whitney's U test）による統計解析を行った。

3. VB1 欠乏モデルラットにおける心機能への影響

生後 6 週齢の Sprague Dawley 雄ラット 16 匹を、通常食群（n = 8）と VB1 欠乏食群（n = 8）に分けて、13 週齢まで経過を観察した。12 週齢で心エコー検査を行い、13 週齢において安楽死させ、心臓を摘出した。食餌を変更して 3 週後から VB1 欠乏食群において有意な体重減少が見られた。また、VB1 欠乏食群では 13 週齢まで生存できたのは 8 匹中 4 匹のみであった。心エコー検査では、駆出分画と内径短縮率には両群に有意な差を認めなかった。一方、心室中隔壁厚、左心後壁厚は拡張期、収縮期ともに VB1 欠乏食群で有意に低下した。また、心拍数も VB1 欠乏食群で有意に低下していた。13 週齢における心重量／体重比は、VB1 欠乏食群で有意に増加した。乳頭筋レベルの心臓短軸切断標本にて Masson's Trichrome 染色を行い、心臓内腔比率（内腔面積／心臓面積）及び線維化面積率を計測した（図 4A、B）。VB1 欠乏食群では有意な内腔拡大が認められた。一方、線維化面積率には両群で差がなかった。さらに心臓凍結サンプルより、mRNA を抽出し、心不全マーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）と脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）を RT-PCR 法にて測定した。ANP と BNP ともに VB1 欠乏食群で上昇傾向にあったが、有意差は認めなかった（図 4C、D）。

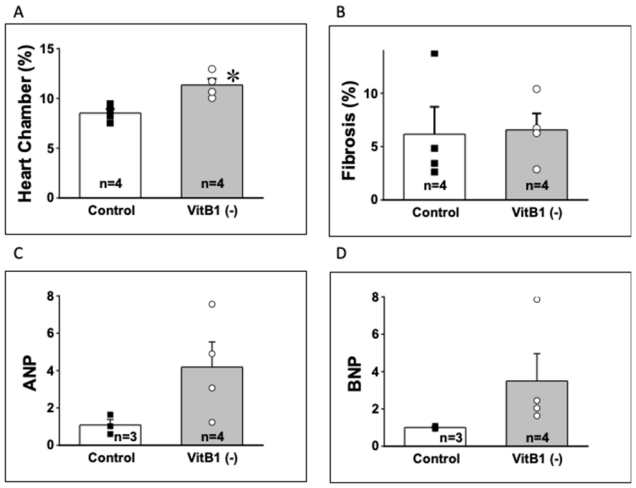


図 4. VB1 欠乏モデルラットにおける心機能への影響

A. 心臓内腔比率、B. 線維化面積率、C. ANP、D. BNP。結果を平均値±標準誤差で示し、ノンパラメトリック検定（Mann–Whitney's U test）による統計解析を行った。*：$p < 0.05$。

考　察

本研究においてVB1を事前投与しておくことで、虚血後の心筋ミトコンドリアの大きさが保たれること、ミトコンドリア分裂を促進するDRP1のリン酸化が抑制されること、網羅的代謝解析の結果、虚血による心筋ATP含量の低下が抑制されることが判明した。この結果は、心筋への再灌流後に生じる心筋傷害を改善し、心機能が速やかに回復することに寄与していることを示唆する。一方、VB1欠乏食を与えたラット心臓では、従来の報告と同じように心機能が悪化することが判明した。それがミトコンドリアの形態変化や代謝動態の変化にどのように関連しているかについては、明らかにすることが出来なかった。しかし、ランゲンドルフ灌流装置を用いたVB1の事前投与実験の結果から、VB1欠乏食を与えたラットの心筋ではATP含量の低下やミトコンドリア分裂促進が認められる可能性が示唆され、今後、さらに検討を続けてゆく予定である。

心臓においては、ミトコンドリア微細形態維持に伴うミトコンドリア動態が心臓の活動に大きく寄与すると考えられるが、その分子機序はいまだ十分に明らかにされていない。一方で、アルツハイマー病やハンチントン舞踏病などの神経系疾患では、ミトコンドリア動態が病態と深く関わっていることが示唆されている［4］。今回のVB1投与によるミトコンドリア微細形態に関する知見は、新たにVB1とミトコンドリアをターゲットとした全身に渡る新規予防法・治療法への応用の足がかりとなり得る。特に高齢者には潜在的なVB1不足患者が多く、かつ糖尿病や心筋症などの合併

症を併発している患者も多いことから、VB1の補充投与が、将来的に発病危険度の高い虚血ストレスによる心疾患や中枢性疾患などの予防に寄与することが期待される。最近、慢性閉塞性肺疾患患者の骨格筋でもミトコンドリアが減少していることが報告された［5］。VB1投与がミトコンドリア減少を抑制する効果が明らかになることにより、VB1の補充療法が高齢者サルコペニアやフレイル予防となる発展性も期待される。このように本研究の結果は、高齢化社会で深刻化している疾患に対して広く、VB1の補充が新たな予防法や治療法として期待出来ることを示唆している。本研究で示した結果と同様に、糖尿病や薬物による心筋障害や心筋梗塞に対してVB1補充療法の有効性を示す多くの報告がある［6〜8］。その一方、VB1の補充治療の有効性を疑問視する臨床研究も近年、報告されている［9］。ヒトへの応用を考える際に、有効性とともにVB1補充療法の安全性は強調されるべき点である。上述したVB1の補充治療の有効性を疑問視する臨床研究でも、有害事象は認めてられていない。VB1は水溶性ビタミンであり、過剰摂取による副作用は殆ど考慮しなくて済む。安全性が高く担保されていることから、高齢者や高血圧・糖尿病などの慢性疾患を有する患者に対し、疾病発症予防を目的としたVB1補充療法の有効性を確認するための発展的な臨床応用研究が推進されることを期待したい。そのためには、さらなる大規模な臨床研究によって、その有用性を検証するとともに、分子機序に関する基礎的研究も並行して深めてゆく必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学細胞生理学講座の草刈洋一郎准教授である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Pourhassan M, Biesalski HK, Angersbach B, Lueg G, Klimek C, Wirth R. Prevalence of thiamine deficiency in older hospitalized patients. Clin Interv Aging. 2018;13:2247-50. Epub 2018/11/23. PMID: 30464433. doi: 10.2147/CIA.S183102.

2) Wohl MG, Brody M, Shuman CR, Turner R, Brody J. Thiamine and cocarboxylase concentration in heart, liver and kidney, of patients with heart failure. J Clin Invest. 1954;33(11):1580-6. Epub 1954/11/01. PMID: 13211813. doi: 10.1172/JCI103037.

3) DiNicolantonio JJ, Niazi AK, Lavie CJ, O'Keefe JH, Ventura HO. Thiamine supplementation for the treatment of heart failure: a review of the literature. Congest Heart Fail. 2013;19(4):214-22. Epub 2013/08/06. PMID: 23910704. doi: 10.1111/chf.12037.

4) Flannery PJ, Trushina E. Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease. Mol Cell Neurosci. 2019;98:109-20. Epub 2019/06/20. PMID: 31216425. doi: 10.1016/j.mcn.2019.06.009.

5) Gifford JR, Trinity JD, Kwon OS, Layec G, Garten RS, Park SY, et al. Altered skeletal muscle mitochondrial phenotype in COPD: disease vs. disuse. J Appl Physiol (1985). 2018;124(4):1045-53. Epub 2018/01/24. PMID: 29357496. doi: 10.1152/japplphysiol.00788.2017.

6) Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. J Appl Physiol (1985). 2006;100(1):150-6. PMID: 16166234. doi: 10.1152/japplphysiol.00988.2005.

7) Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, et al. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. Cardiovasc Toxicol. 2020;20(2):111-20. Epub 2019/07/05. PMID: 31270735. doi: 10.1007/s12012-019-09536-7.

8) Larrieu A, Yazdanfar S, Redovan E, Eftychiadis A, Kao R, Silver J, et al. Beneficial effects of cocarboxylase in the treatment of experimental myocardial infarction in dogs. Am Surg. 1987;53(12):721-5. PMID: 3425997

9) Lomivorotov VV, Moroz G, Ismoilov S, Shmyrev V, Efremov S, Abubakirov M, et al. Sustained High-dose Thiamine Supplementation in High-risk Cardiac Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass: A Pilot Feasibility Study (The APPLY trial). J Cardiothorac Vasc Anesth. 2020;34(3):594-600. Epub 2019/09/29. PMID: 31558398. doi: 10.1053/j.jvca.2019.08.044.