



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CD36のヒト早期血清脂肪酸クリアランスにおける必要性
Author(s)	森本, 美恵; 柳内, 秀勝; 藤原, 広臨 他
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 14, 1-6
Issue Date	2001-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37658
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_1-6.pdf



原 著

CD36のヒト早期血清脂肪酸クリアランスにおける必要性

森本 美恵¹⁾・柳内 秀勝²⁾・藤原 広臨²⁾

千葉 仁志²⁾・松野 一彦¹⁾

CD36 is Required for Fast Plasma Fatty Acid Clearance in Humans

Mie Morimoto¹⁾, Hidekatsu Yanai²⁾, Hironobu Fujiwara²⁾

Hitoshi Chiba²⁾, Kazuhiko Matsuno¹⁾

Abstract

Previous *in vitro* studies have shown that CD36 participates in the cellular fatty acid (FA) uptake that fuels heart and skeletal muscles. *In vivo* evidence for a physiologic role of human CD36 in this process remains obscure. We examined the role of this protein in human plasma FA clearance. Apparently healthy young females were divided into three groups on the basis of CD36 phenotypes and genotypes as follows: normals (n=10), type II deficiency (n=5), and type I deficiency (n=5). Glucose was orally loaded to suppress lipolysis, and serum FA disappearance was observed at various time points up to 180 min. FA levels fell to below 30% in 30 min in normals, while they remained higher than those in normals at 30 min in type II deficiency ($P<0.05$). In type I deficiency, FA levels decreased gradually and were significantly higher than those in type II deficiency over the range 60-120 min ($P<0.01$ to <0.001). Two kinetically distinct mechanisms underlie human plasma FA clearance: the faster is predominant and mediated by CD36, while the slower is CD36-independent and normally concealed by the former. These results indicate the important role of CD36 in the energy supply to heart and skeletal muscles.

Key Words: CD36, glucose, insulin, triglyceride, deficiency

要 旨

以前の*in vitro*の研究で、CD36が細胞の脂肪酸取り込みに関与していることが示された。

しかし*in vivo*でのヒトCD36の脂肪酸取り込みにおける生理学的役割は、いまだ明らかになっていない。今回、ヒトCD36の脂肪酸クリアランスにおける役割を検討した。健康な若年女性

1) 北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科(〒060-0812 札幌市北区北12条西5丁目)

2) 北海道大学医学部附属病院検査部

1) Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology, Hokkaido University

2) Department of Laboratory Medicine, Hokkaido University Hospital

をCD36の表現型により、正常者 (n=10)、Type II (n=5)、およびType I (n=5)に分類した。脂肪分解を抑制するため、経口的にグルコースを投与し、180分まで血清脂肪酸のクリアランスを観察した。脂肪酸は、30分後には正常者で30% 未満に減少したのに対し、Type IIでは依然高値を示した ($P<0.05$)。Type I では脂肪酸が緩やかな減少を示したのみで、60-120分の間、Type II より有意な高値を示した ($P<0.01 \sim 0.001$)。

ヒトの脂肪酸クリアランスには2つの機序があり、急速相においては主にCD36が関与し、遅延相はCD36非依存性で通常前者により隠されていると考えられる。このような結果は、心臓や骨格筋へのエネルギーの供給におけるCD36の重要な役割を示唆している。

緒 言

血清遊離脂肪酸は受動輸送や転送蛋白などによる促進輸送により組織に取り込まれる¹⁾。転送蛋白として、これまでにfatty acid binding protein (FABP)、fatty acid transporter protein (FATP)、CD36などが知られている²⁻⁴⁾。特にCD36は、最近の *in vitro* の実験により脂肪酸の取り込みにおける生理学的機能が明らかになりつつあるが、ヒトの脂肪酸代謝に及ぼす影響に関する検討は殆どなされていない。

CD36は血小板、単球などに発現する88kDの膜糖蛋白であり、その欠損例が報告されている⁵⁾。CD36欠損は、血小板、単球の両方に欠損しているType I と、血小板においてのみ欠損しているType II とに分類される⁶⁾。この欠損の日本における頻度は約6.8%であり、東南アジアに多く、欧米諸国で少ないことが知られている⁷⁻⁹⁾。現在までに3つの遺伝子変異が報告されており、プロリンからセリンへのアミノ酸置換を生じるnt478でのCT置換、フレームシフトによりストップコドンを生じるnt539での2塩基欠失、nt1159での1塩基挿入である¹⁰⁻¹²⁾。最近、

Type I 欠損が既知変異のホモ接合体で、Type II 欠損がヘテロ接合体であることが明らかになっている⁷⁾。

CD36は心臓、骨格筋、脂肪細胞など脂肪酸代謝を活発に行なっている組織にも多く発現しているが^{3,13)}、これらの組織におけるType I およびType II 欠損による発現量の差異および脂肪酸代謝に及ぼす影響は明らかになっていない。今回、糖負荷により脂肪酸代謝を高めることにより、Type I およびType II 欠損の血清脂肪酸代謝に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

1. CD36欠損の表現型決定

表現型は、EDTA加血を採取し、fluorescein-isothiocyanate (FITC)標識抗CD36モノクローナル抗体(FA6-152;Immunotech,Miami,Fl)を用いたフローサイトメトリー法にて決定した⁷⁾。血小板、単球のゲーティングに、それぞれ、phycoerythrin 標識抗CD42bモノクローナル抗体 (AN51;Dako, Copenhagen, Denmark)、FITC標識抗CD14モノクローナル抗体(MY4-FITC; Coulter, Miami, Fl)を用いた。血小板CD36は、多血小板血漿をEPICS Profile II (Coulter)にて、単球CD36は、Multi-Q-PREP (Coulter)にて溶血処理後XL-MCL(Coulter)にて解析した。

2. CD36欠損の遺伝子型決定

以前報告した方法によりDNAをEDTA加血より抽出し、restriction fragment length polymorphism (RFLP)-polymerase chain reaction (PCR) 法にて、nt478でのCT置換 (nt478T)、nt539での2塩基欠失 (nt539delAC)、nt1159での1塩基挿入 (nt1159insA)を解析した⁷⁾。

表 1 各CD36 表現型の遺伝子型と臨床所見

表現型	正常者	type I deficiency	type II deficiency
遺伝子型	wt/wt(n=10)	nt478T ^a /nt478T(n=4) nt478T/nt1159insA ^b (n=1)	nt478T/wt(n=2) nt1159insA/wt(n=3)
年齢	21.8±0.42	22.8±1.9	21.5±1.9
Body Mass Index (kg/m ²)	21.3±1.7	20.9±1.9	20.9±1.3
収縮期血圧 (mmHg)	119±3	120±3	116±7
拡張期血圧 (mmHg)	72±2	71±2	73±6
空腹時グルコース (mg/dl)	93±5	88±6	88±4
空腹時インスリン (μU/ml)	7.8±3.4	5.6±1.8	5.6±2.1
空腹時遊離脂肪酸 (mEq/l)	652±250	700±337	428±198
空腹時トリグリセライド (mg/dl)	70±27	60±25	59±19
総コレステロール (mg/dl)	160±21	171±45	159±15
HDL-コレステロール (mg/dl)	68±10	74±30	71±8
LDL-コレステロール (mg/dl)	78±20	85±18	76±9

提示したデータは、mean±SDである。どのデータも3群間で有意な差を認めなかった。
wt:wild type, nt478T:nt478TでのCT置換、nt1159insA:nt1159での1塩基挿入。

3. 実験プロトコール

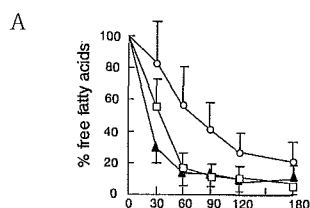
対象は上記の方法にてCD36表現型を決定した正常者10例、Type I 5例、およびType II 5例の女子学生ボランティアである。3群間の年齢、Body Mass Index、血圧、空腹時の血清脂質、グルコース、インスリン等に有意な差を認めなかった(表1)。15時間絶食後、75gのブドウ糖液を経口負荷し、30分ごとに180分間採血して血漿グルコース、血清インスリン、遊離脂肪酸を含めた脂質を測定した。血漿グルコースおよび血清インスリンはClinilog (A & T Co., Tokyo, Japan) と自動化ELISA (TOSO, Tokyo, Japan) にて測定した。血清脂質は酵素法にて自動測定した。総コレステロールはDeterminer TC (Kyowa Medex Co., Tokyo, Japan)、トリグリセライドはAutoSera S TG-N (Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan)、HDLコレステロールはDeterminer HDL-C (Kyowa Medex)、LDLコレステロールはCholestest LDL (Daiichi Pure Chemicals)、そして血清遊離脂肪酸はLabosat NEFA (Shinotest Co., Tokyo, Japan)にて測定した。

4. 統計学的解析

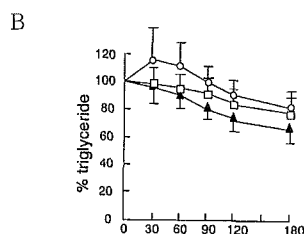
各種測定した検体の解析の際に、3群間の有意差の検定はone-factor ANOVAを用い、さらにScheffe's F testで2群間の差を解析した。P<0.05をもって有意差ありと判定した。

図1 糖負荷による影響

血液は、正常者 (n=10, ▲)、Type I (n=5, ○)、Type II (n=5, □) より採取した。



血清遊離脂肪酸の空腹時濃度に対する相対値



血清トリグリセライドの空腹時濃度に対する相対値

C

			time (min)				
			30	60	90	120	180
% free fatty acids	ANOVA, F-test multiple comparison	P-value	0.0009	< 0.0001	< 0.0001	0.0014	0.0833
		type I vs normal	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.01	NS
		type I vs type II	NS	< 0.01	< 0.001	< 0.01	NS
		type II vs normal	< 0.05	NS	NS	NS	NS
% triglyceride	ANOVA, F-test multiple comparison	P-value	0.1744	0.0281	0.0068	0.0059	0.0563
		type I vs normal	NS	< 0.05	< 0.01	< 0.01	NS
		type I vs type II	NS	NS	NS	NS	NS
		type II vs normal	NS	NS	NS	< 0.05	NS

3 群間の統計学的比較

結 果

遺伝子解析の結果、Type I はnt478Tのホモ接合体と、nt478Tとnt1159insAの複合ヘテロ接合体であった。またType IIでは4名がnt478Tのヘテロ接合体、1名がnt1159insAのヘテロ接合体であった(表1)。

血清遊離脂肪酸は、正常者において糖負荷により急速な減少を示した(図1A,C)。Type IIでは、糖負荷後30分においてのみ、空腹時濃度を100%とした時の相対値が陽性者に比べ有意な高値を示した(図1A,C)。一方、Type Iにおいては、糖負荷後120分間、陽性者に比べ有意な高値を示し、60-120分の間、Type IIよりも有意な高値を示した(図1A,C)。

脂肪酸を除く血清脂質で唯一有意な変化を示したのがトリグリセライドであり、陽性者で持続的な減少を示したのに対し、Type Iではむしろ60分までの奇異的上昇および減少の遅延がみられた(図1B,C)。この減少の遅延はType IIにおいても認められ、120分の値が陽性者に比べ有意な高値を示した(図1B,C)。

血漿グルコースおよびインスリン濃度は、どの時点においても3群間で有意な差を認めなかった(データ提示せず)。

考 察

筋肉にCD36を過剰発現させたラットの空腹時脂肪酸濃度が有意な低値を示し、また収縮に

よりコントロールの約3倍の脂肪酸を燃焼させるなどの報告があり、in vitroや実験動物を用いた研究において、CD36の脂肪酸トランスポーターとしての機能が示唆されていた¹⁴⁾。ヒトCD36欠損においては、長鎖脂肪酸のアナログである¹²³I beta-methyl-iodophenyl-pentadecanoic acidの心筋での取り込みが低下していることが報告されている^{15),16)}。しかし、Type I、Type II欠損での脂肪、筋肉組織での発現の差違および両欠損の代謝への影響は現在のところ明らかになっていない。本研究の結果で、CD36陽性者で糖負荷後の速やかな脂肪酸レベルの低下を示したのに対し、Type I欠損で早期脂肪酸クリアランスの著明な低下を認め、血清脂肪酸のクリアランスには、少なくとも2つ以上の機序があり、そのうちの1つは急速かつCD36依存性であることが示唆された。

血清トリグリセライドは、陽性者において糖負荷により持続的な減少を示し、インスリンによるリポ蛋白リパーゼの活性化が示唆されたが¹⁷⁾、Type I欠損において一時的な奇異的增加および減少の遅延を認めた。この結果は、CD36-null mouseで血清トリグリセライドが高値で、CD36のトランスフェクションにより低下した以前報告された研究結果に合致する^{14),18)}。このトリグリセライドの高値の機序としては、代謝の遅延した遊離脂肪酸がCD36非依存性に肝臓に取り込まれ¹⁹⁾、肝臓でのトリグリセライド合成を促進させたためと考えられる。

以前、CD36欠損がインスリン抵抗性の原因であると報告されたが²⁰⁾、今回の検討では、各時点のグルコースおよびインスリン濃度にCD36欠損者と正常者の間で有意な差を認めず、ヒトにおけるCD36欠損のインスリン抵抗性への関与は否定的であった。しかし、今回検討した対象者は20歳前後の若年者であり、インスリン抵抗性が問題になるのは中年以降であることを考慮すると、加齢による影響の検討も必要であると考えられた。

我々は、以前CD36欠損者においてLDLコレステロールが高値を示すことを報告したが²⁰⁾、今回の対象者の空腹時血清脂質においては有意な差を認めず、加齢などによる影響の検討も必要であると考えられた。また、CD36欠損と動脈硬化との関連に関してはいまだ結論が出ておらず、日本において欠損者が6.8%と高頻度であることを鑑み、今後さらなる検討が必要である。

謝 辞

本研究の一部は、平成12年度北海道大学医療技術短期大学部研究助成金により行われた。

引用文献

- 1) Luiken JJ, Schaap FG, van Nieuwenhoven FA, et al.: Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 34: 169-75, 1999.
- 2) Stremmel W, Strohmeyer G, Borchard F, et al.: Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4-8, 1985.
- 3) Abumrad NA, El Maghrabi MR, Amri EZ, et al.: Expression cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation: Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268: 17665-8, 1993.
- 4) Schaffer JE, Lodish HF: Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79: 427-36, 1994.
- 5) Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, et al.: Membrane glycoprotein CD36: A review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood* 80:1150-5, 1992.
- 6) Yamamoto N, Akamatsu H, Sakuraba H, et al.: Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the presence (type II) or the absence (type I) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood* 83: 392-7, 1994.
- 7) Yanai H, Chiba H, Fujiwara H, et al.: Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency type I and II. *Thromb Haemost* 84:436-41, 2000.
- 8) Curtis BR, Aster RH: Incidence of Naka-negative platelet phenotype in African Americans in similar to that of Asians. *Transfusion* 36: 331-4, 1995.
- 9) Kiefel V, Kroll H, Bonnert J: Platelet alloantigen frequencies in Caucasians: a serological study. *Transfus Med* 3: 237-42, 1993.
- 10) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, et al.: Molecular basis of CD36 deficiency. *J Clin Invest* 95: 1040-6, 1995.
- 11) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi S, et al.: Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency. *Blood* 83: 3545-52, 1994.
- 12) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S,

- et al.: A single nucleotide insertion in codon 317 of the CD36 gene leads to CD36 deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1026-32, 1996.
- 13) Van Nieuwenhoven FA, Verstijnen CP, Abumrad NA, et al.: Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 747-52, 1995.
 - 14) Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, et al.: Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* 274: 26761-6, 1999.
 - 15) Tanaka T, Sohmiya K, Kawamura K.: Is CD36 deficiency an etiology of hereditary hypertrophic cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol* 29: 121-7, 1997.
 - 16) Fukuchi K, Nozaki S, Yoshizumi T, et al.: Enhanced myocardial glucose use in patients with a deficiency in long-chain fatty acid transport (CD36 deficiency). *J Nucl Med* 40: 239-43, 1998.
 - 17) Chan BL, Lisanti MP, Rodriguez-Boulon E, et al.: Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. *Science* 241: 1670-2, 1988.
 - 18) Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, et al.: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 274: 19055-62, 1999.
 - 19) Van Nieuwenhoven FA, Willemsen PH, Van der Vusse GJ, et al.: Co-expression in rat heart and skeletal muscle of four genes coding for proteins implicated in long-chain fatty acid uptake. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 489-98, 1999.
 - 20) Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, et al.: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genet* 21: 76-83, 1999.
 - 21) Yanai H, Chiba H, Morimoto M, et al.: Human CD36 deficiency is associated with elevation in low-density lipoprotein-cholesterol. *Am J Med Genet* 93: 299-304, 2000.