

学 位 論 文 題 名

Metabolic Changes in Human CD36 Deficiency  
Displayed by Glucose Loading

(ブドウ糖負荷により明らかになった  
ヒト CD36欠損症における代謝性変化)

学位論文内容の要旨

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。転送蛋白として、これまでに fatty acid binding protein (脂肪酸結合蛋白)、fatty acid transporter protein (脂肪酸転送蛋白)、CD36 などが知られている。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、その欠損症が知られている。CD36 欠損症は、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。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塩基挿入などがある。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を我々は明らかにしている。

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、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。

CD36 欠損症の表現型は、空腹時 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にて決定した。遺伝子型は、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。

対象は、正常者 16 例、Type I 5 例、および Type II 16 例の女性ボランティアで、

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。15 時間絶食後、75g ブドウ糖液を負荷し、30 分ごとに 180 分間採血し、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。

糖負荷後 30 分後、血清遊離脂肪酸は、正常者において急速な減少 (60.1%) を示し、Type II では、31.7% の減少を示した。一方、Type I においては、16.5% の減少を示したのみで、また糖負荷後 120 分間、正常者に比べ有意な高値を示した。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、陽性者で漸減を示したのに対し、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を示した。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。糖負荷後 60、90 分のグルコースが、Type I ( $136.8 \pm 4.6$ 、 $122.2 \pm 8.3$  mg/dl)、Type II ( $122.6 \pm 7.6$ 、 $112.6 \pm 5.2$ ) の両方において、陽性者 ( $101.2 \pm 7.2$ 、 $97.6 \pm 4.3$ ) に比べ有意な高値を示した。しかし、インスリン値は、どの時間においても 3 群間で有意な差を認めなかった。また、インスリン感受性の指標を検討したが、グルコース濃度の 3 時間の積算値が、Type I ( $356.1 \pm 34.0$  mg/dl x h)、Type II ( $335.0 \pm 52.2$ ) の両方で正常者 ( $299.0 \pm 48.7$ ) に比べ有意な高値を示したが、インスリン抵抗性の指標であるインスリンの積算値、homeostasis model assessment (HOMA) 指数、空腹時グルコース・インスリン比に 3 群間で有意な差を認めなかった。

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。しかし、ヒトにおける Type I、Type II での脂肪、筋肉組織での発現の差違および両欠損の脂肪酸を含めた脂質代謝への影響は、現在のところ明らかになっていない。本研究の結果で、正常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、急速でかつ 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暫時的減少を示し、インスリンによるリポ蛋白質リパーゼの活性化が示唆されたが、Type I において、一時的な奇異的増加および減少の遅延を認めた。この結果は、CD36 欠損マウス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という報告に合致する。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 非依存性に脂肪酸を取り込む肝臓に取り込まれ、肝臓でのトリグリセライド合成が促進し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、今回の検討では、インスリン抵抗性の各指標に 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。Type I、Type II の両方で、糖負荷後 60、90 分でのグルコースおよび 3 時間でのグルコースの積算値が有意な高値を示したが、代謝の遅延した脂肪酸の肝臓への流入による糖新生の亢進による

ものと考えられた。しかし、今回検討した対象者は、20歳前後の若年者であったため、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、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、今後更なる検討が必要であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

学 位 論 文 題 名

## Metabolic Changes in Human CD36 Deficiency Displayed by Glucose Loading

(ブドウ糖負荷により明らかになった  
ヒト CD36欠損症における代謝性変化)

血清遊離脂肪酸は、受動輸送や転送蛋白などにより組織に取り込まれる。転送蛋白として、fatty acid binding protein, fatty acid transporter protein, CD36などが知られている。CD36は、血小板、単球などに発現する88kDの膜糖蛋白であり、その欠損症が知られている。CD36欠損症は、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。Type-IはCD36遺伝子変異のホモ接合体と複合ヘテロ接合体であり、Type-IIは変異遺伝子と正常のヘテロ接合体である。今回、申請者は、CD36欠損の血清脂肪酸代謝に及ぼす影響を検討するため、正常者16例、Type-I 5例、およびType-II 16例に75gブドウ糖液負荷試験を施行し、30分ごとに180分間採血し、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。糖負荷30分後、血清遊離脂肪酸は、正常者において急速な減少(60.1%減少)を示し、Type-IIでは、31.7%の減少を示した。一方、Type-Iにおいては、その減少は16.5%にとどまり、糖負荷後120分まで正常者に比べ有意な高値を示した。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、正常者で漸減を示したのに対し、Type-IおよびType-IIに減少の遅延を認めた。糖負荷後60、90分のグルコースが、Type-I、Type-IIの両方において、正常者に比べ有意な高値を示した。しかし、インスリン値は、どの時間においても3群間で有意な差を認めなかった。また、インスリン抵抗性の指標にも3群間で有意な差を認めなかった。正常者が糖負荷後の速やかな脂肪酸クリアランスを示したのに対し、CD36欠損では著明なクリアランスの遅

延を認めることから、血清脂肪酸クリアランスには、少なくとも 2 つ以上の機序があり、そのうちの 1 つは、急速でかつ CD36 依存性であることが考えられた。また、欠損者における糖負荷後のトリグリセライドおよびグルコース濃度の高値の機序として、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、肝臓でのトリグリセライドおよびグルコースの合成を促進したためであると考察した。さらに、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ているが、今回の検討から、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ったため、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る。

公開発表に際し、副査の宮崎勝巳教授から、CD36 転送に係わる脂肪酸の長さ、CD36 分子の糖鎖の含量と機能に関する質問があった。次に、副査の小林邦彦教授から、CD36 とそれ以外の脂肪酸転送蛋白との関係、CD36 欠損とインスリン抵抗性、動脈硬化との関連に関する質問があった。また、主査の石橋輝雄教授からは、肝臓における脂肪酸と糖新生の関係および糖負荷により脂肪酸の取り込みをみた根拠に関する質問があった。最後にフロアーから CD36 の脂肪酸取り込みの速度、取り込みの機序についての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は、自らの論文や参考文献を引用し、妥当な解答を行った。

この論文は、CD36 分子の脂肪酸転送体としての意義を、CD36 欠損症を対象に研究を行い、ヒト生体に於ける CD36 分子の機能とその意義を初めて明らかにしたこと、また、この研究成果から、従来報告されていた CD36 欠損症のインスリン抵抗性への関与は誤りである可能性を示したこと等が高く評価された。今後、人における脂肪酸代謝研究に新しい局面を開くことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。