

^{123}I -BMIPP の心臓への集積欠損を呈する心疾患 症例における CD36遺伝子の解析

新潟大学医学部内科学第一教室（主任：相澤義房教授）

小 川 祐 輔

Analysis of Molecular Defects of the CD36 Gene in Patients Showing
a Loss of Accumulation of ^{123}I -BMIPP in Hearts.

Yusuke OGAWA

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

Recently, ^{123}I - β -methyl-iodophenyl pentadecanoic acid (BMIPP) has been used in myocardial scintigraphy to evaluate fatty acid metabolism and myocardial viability. Some investigators reported absence of BMIPP-accumulation in the hearts of few patients with heart diseases. The mechanism and clinical significance of absence of BMIPP-accumulation in heart are not known. CD36, glycoprotein IV expressed in platelet membrane, is a receptor for collagen, thrombospondin, oxidised LDL and long-chain fatty acids. CD36 may play a role in platelet aggregation as well as in formation and progression of arteriosclerosis, and in myocardial fatty acid metabolism. The expression and genetic abnormality of CD36 were investigated in this study in relation to myocardial accumulation of BMIPP.

There are two types of platelet CD36 deficiency; types I and II, associated with the absence and presence of CD36 on monocytes, respectively. In 200 patients with various heart diseases in this study, 24 cases revealed CD36 deficiency including 8 type I and 16 type II. No myocardial BMIPP-accumulations were observed in all 8 type I cases, while significant accumulation was seen in all type II cases. Genetic analysis of CD36 was carried in 3 of 8 cases with type I deficiency. Deletions of 52 base in exon 4 and 70 base in exon 9 were documented in mRNA of CD36 in all 3 cases by means of sequence analysis after RT-PCR. Genomic DNA of CD36 was also analyzed

Reprint requests to: Yusuke OGAWA,
First Depart of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-Dori 1-757,
Niigata 951-8510, JAPAN.

別刷請求先：
〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学医学部内科学第一教室
小川 祐 輔

by using a PCR-direct sequence method, and there were two types of point mutation, namely, ⁹⁷⁰T→C/Ile→Thr (one of 3 cases) and ⁴⁷⁸C→T/Pro→Ser (other 2 cases). The point mutation at ⁴⁷⁸T was previously reported by other researchers. This is the first report to show the alternative splicing in exons 4 and 9 and the point mutation at ⁹⁷⁰C. CD36 deficiency may contribute the pathogenesis of heart diseases and arteriosclerosis through abnormal fatty acid metabolism.

Key words: ¹²³I-BMIPP myocardial scintigraphy, CD36, hypertrophic cardiomyopathy, gene abnormality
¹²³I-BMIPP 心筋シンチグラフィー, CD36, 肥大型心筋症, 遺伝子異常

1 はじめに

心臓は休むことなく全身に血液を拍出しており、その機能維持のため心筋細胞は大量のエネルギーを消費し続けている。心筋細胞がエネルギー産生に利用する基質として空腹時は全エネルギー産生の60%~90%を脂肪酸で賄い、食後は約70%を糖質の代謝から得ている。脂肪酸は血中から心筋の細胞質内へ移行した後、アシル化され一部はトリグリセリドプールへ移行し、残りはカルニチンシャトルを介してミトコンドリア内へ移行しβ酸化を受ける。¹²³I-β-methyl-iodophenyl pentadecanoic acid (BMIPP) は ²⁰¹Tl C1 (T1) などの心筋血流画像では得られない脂肪酸代謝異常を検出でき、虚血性心疾患や心筋疾患の診断と病態評価に応用されている^{1)~5)}。健常人では BMIPP の良好な心筋集積像が得られ、虚血性心疾患や心筋疾患では部分的な集積低下を認めることが多い。一方、稀に BMIPP の心臓への集積が全く見られない心疾患症例が報告され、その機序や臨床的意義が問題になっている⁵⁾⁶⁾。

クラスター分類 (CD) 36は血小板の第IV糖蛋白であり、トロンボスポンジやコラーゲン受容体、さらに酸化 LDL 受容体としての役割が指摘されてきた。近年 CD 36は長鎖脂肪酸の細胞内への取込みに関与していることが明らかとなり、動脈硬化の成因との関連が注目されている^{7)~11)}。また CD36欠損症の一部では BMIPP の心筋への無集積が報告され CD36欠損症と心疾患および心筋脂肪酸代謝障害の関連が注目されている。

今回、心疾患における CD36欠損症の頻度と BMIPP 心筋無集積、さらに遺伝子異常との関係を検討した。

2 対象と方法

対象：新潟大学医学部付属病院または燕労災病院循環器内科外来に各種心疾患で通院中の 200 名 (肥大型心筋

症44例、拡張型心筋症16例、心筋梗塞症26例、狭心症55例、その他59例)を対象とした。全例で末梢血単球及び血小板の CD36発現様式を検索し、T1と BMIPP 心筋シンチグラフィーは178例で、心臓カテーテル検査は133例で施行した。男性112例、女性88例で、年齢は30才から86才までの平均62±5才であった。

T1心筋シンチグラフィー：T1心筋シンチグラフィーはエルゴメータ運動負荷を行い最高運動量で ²⁰¹Tl を111~148 MBq を静注し、15分後 (初期像) と3時間後 (後期像) に SPECT 像を撮像した。BMIPP 心筋シンチグラフィーは6時間の絶食後、¹²³I-BMIPP を111~148 MBq 静注し、15分後 (初期像) と3時間後 (後期像) に planer 像と SPECT 像を撮像した。使用機器は低エネルギー汎用コリメータを装着した r-カメラ (シーメンス社 ZLC-ORBITER75) を用い、Planer 像は5分間、SPECT 像は5.6度毎スライスを25秒、180度収集で撮像し、データ処理は島津社シンチパック 24000 を用いた。

心臓カテーテル検査：心臓カテーテル検査は133例に施行した。診断的両心カテーテル法に引き続いて左室造影と冠動脈造影を行った。冠れん縮性狭心症の18例では methylergometrine maleate を用いて冠れん縮を誘発した⁵⁾¹²⁾。肥大型心筋症と拡張型心筋症では左室内膜心筋生検を行い、黒滝三重染色、H-E 染色、Azan 染色で観察した。

フローサイトメトリー：CD36の発現はフローサイトメトリー法を用いて評価した。各種モノクローナル抗体、FACScanTM (B.D., Becton Dickinson 社) フローサイトメータ、および Lysis IITM (B.D.) ソフトウェアを用いた。血小板は末梢血から得られた血小板濃縮血漿を FITC 標識抗 CD36抗体 (Coulter 社) にて直接ラベルし、light scatter にて血小板に gate を設定し、発現の有無を検索した^{7)~11)}。単球は末梢血から比重遠

心法にて得られた単核細胞を FITC 標識抗 CD36抗体と PE 標識抗 CD14抗体 (B.D.) にて直接ラベルして CD14陽性単球に gate を設定し, CD36の発現の有無を検索した^{13)~15)}. 単球と血小板の両者ともに CD36を欠損している症例を I 型, 血小板のみ CD36を欠損している症例を II 型とした.

遺伝子解析: 遺伝子解析は ¹²³I-BMIPP の取り込みが欠損し, フローサイトメトリーにて血小板と単球の両方に CD36が欠損していた I 型 CD36欠損症 3 例について行った (表 1). 患者および正常対照者の末梢血から比重遠心法により単核球を分離し, total RNA および genomic DNA を抽出した. 得られた total RNA から random primer を用いて reverse transcriptase にて cDNA を合成し, CD36遺伝子すべての open reading frame を含む14個の各 exon を網羅するように設定した primer を用いて RT-PCR を行った (表 2). PCR 産物は 3% agarose gel 上で電気泳動を行いそれぞれの PCR 産物が 1 種類の場合はオートシーケンサーを用いて direct sequence 法により塩基配列を決定した. 複数の PCR 産物が存在した場合にはそれぞれを gel より抽出した後サブクローニングを行い, サブクローニングした複数のクローンに

ついてそれぞれオートシーケンサーにて塩基配列を決定した. 同様に genomic DNA の exon 相当部位についても前後の intron に primer を設定し PCR-direct sequence 法により塩基配列を決定した.

上記いずれの検査も患者に説明のうえ同意を得て施行した.

結 果

CD36欠損症の頻度: 単球と血小板ともに CD36の発現が完全に欠損している I 型欠損症は肥大型心筋症 2 例, 拡張型心筋症 1 例, 心筋梗塞症 2 例, 狭心症 3 例, の計 8 例 (4%) にみられた (図 1). 血小板のみ欠損する II 型 CD36欠損症は肥大型心筋症 3 例, 拡張型心筋症 1 例, 心筋梗塞症 1 例, 狭心症 8 例, その他 3 例の計 16 例 (8%) にみられた.

CD36欠損症と BMIPP 心筋集積の関係: I 型 CD36欠損症の 8 例では全例で BMIPP の心筋への集積が全くみられなかった (図 2). II 型 CD36欠損症の 16 例中 13 例で BMIPP 心筋シンチグラフィーを施行し, 13 例全例で BMIPP の心筋への集積がみられた. CD36 陽性例では BMIPP 心筋無集積例はなかった. I 型 CD36欠損症 8 例と II 型 CD36欠損症 13 例の T1 心筋シ

表 1 CD36 欠損症例

症例	年齢	性	診断	¹²³ I-BMIPP 取込み	CD36発現 (Plt)	CD36発現 (Mono)
1	57	M	Dilated phase HCM	no uptake	(-)	(-)
2	70	M	OMI	no uptake	(-)	(-)
3	57	M	HCM	no uptake	(-)	(-)

HCM; hypertrophic cardiomyopathy, OMI; old myocardial infarction

表 2 Primer setting

sense primer			antisense primer		
1 R	aaaattcatgtcttctgtt	(exon 2)	1 L	acagaagtttacagacagtttt	(exon 4)
2 R	ctggctgtgttgaggatttct	(exon 3)	2 L	ggaaaatgtaaccaggagcgt	(exon 5)
3 R	agtgatgatgaacagcagcaaca	(exon 4)	3 L	ccaagtcagaactttgagagaact	(exon 6)
4 R	gatcctcaattcacttattaacaa	(exon 6)	4 L	ttgttgagaaaagccaggtta	(exon 9)
5 R	tattgggaaagtcactgcgac	(exon 8)	5 L	cttctcattttctgtatgcaagt	(exon11)
6 R	gcctttgcctctccagtga	(exon10)	6 L	gtaactggaaaaataaacctcct	(exon14)
7 R	actatattgtgcctattcttgg	(exon13)	7 L	gccaaagaataggcacaatatagt	(exon14)
8 R	ggtccttttatctggctgactcaaggctgc	(intronC)	8 L	taagtacatttcaatacatgac	(intronD)
9 R	ctaatactttgccactcgatt	(intronH)	9 L	agcatacttatacttcagtatctgttta	(intronI)
10R	ggttaaaacaggcacagaag	(exon 4)	10L	ttgttgagaaaagccaggtta	(exon 9)

ンチグラフィーでは全例で T1 の心筋への集積がみられた。

I 型 CD36 欠損症の遺伝子解析：検索した 3 例の I 型 CD36 欠損症において exon 4 を含む primer の 2 R と 2 L を用いた RT-PCR 法により 2 種類の PCR 産物がみとめられた (図 3)。それぞれをサブクローニングした後、2 種類のクローンについて塩基配列を決定したところ正常塩基配列の他に、exon 4 の開始部分から 52 塩基が欠損し、その結果 frameshift により ⁴³⁷TGA

stop codon を生じるような配列をみとめた (図 4)。また、exon 9 を含む primer の 5 R と 5 L を用いた RT-PCR においても 2 種類の PCR 産物をみとめ、同様に塩基配列を決定したところ正常塩基配列の他に、exon 9 の 70 塩基が欠損しており、その結果として ¹⁰⁴⁷TGA stop codon を生じるような配列をみとめた (図 5)。一方、exon 4 と exon 9 の genomic DNA には対応する塩基欠損をみとめなかった (図 6, 7)。この 2 カ所の RNA の欠損が同じ allele より生じているか否かを判定するために、exon 4 と exon 9 の欠損部位に重なるように primer を設定して RT-PCR を行った。正常対照者と症例 2, 3 においてはバンドをみとめたが、症例 1 ではバンドを認めなかった (図 8)。また cDNA の塩基配列では上記異常の他に症例 1 に ⁹⁷⁰T→C/Ile→Thr, 症例 2, 3 に ⁴⁷⁸C→T/Pro→Ser という 2 種類のホモ変異の point mutation をみとめ、それぞれの変異部位の genomic DNA にも同様の point mutation をみとめた (図 4-7)。対照とした健常者にはいずれの異常もみとめなかった。

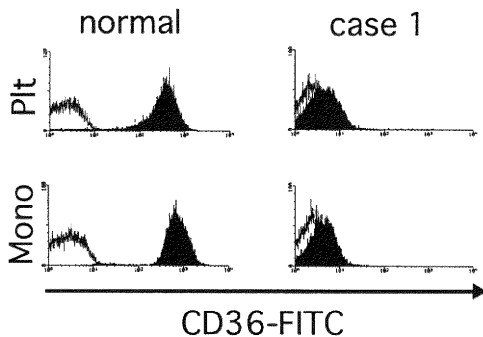


図 1 I 型 CD36 欠損症におけるフローサイトメトリー。左は正常コントロールであり、右が症例 1 の血小板 (上段) と単球 (下段) の CD36 の発現を示す。血小板、単球ともに CD36 の発現がみられない。

考 察

BMIPP の心筋無集積の機序として、①BMIPP 薬剤自体の問題、②撮影上の問題、③患者側因子、が考えられる。心筋無集積を呈する症例においても良好な肝臓集積をみとめているので薬剤自体の問題は否定的である。撮影法に関しても心筋無集積症例は再現性をもって無集積を呈することから技術的要因の可能性は少なく、撮影

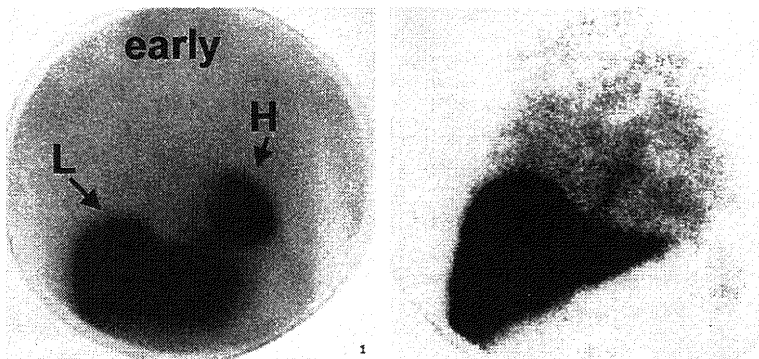


図 2 I 型 CD36 欠損症の BMIPP 心筋シンチグラフィー。左は正常コントロールであり右は症例 1 である。症例 1 では BMIPP の肝臓への集積は良好であるが心臓への集積は全くみとめない。

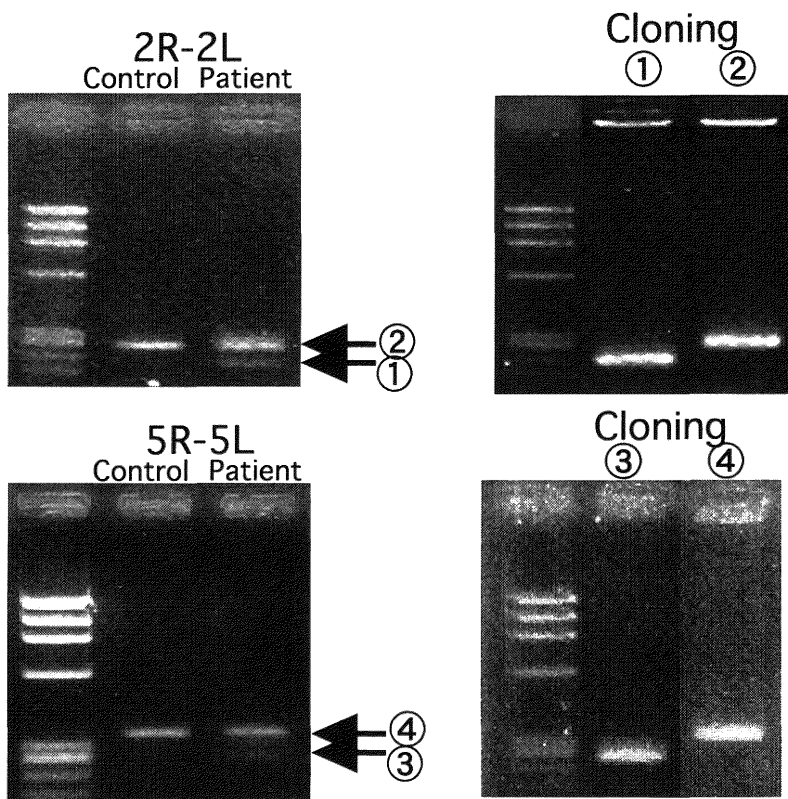


図3 exon 4 と exon 9 の cDNA. exon 4 を含む primer の 2 R と 2 L を用いた RT-PCR 法により 2 種類の PCR 産物が認められた. また exon 9 を含む primer の 5 R と 5 L を用いた RT-PCR 法においても 2 種類の PCR 産物を認めた.

上の問題も考えにくい. 従って患者側因子の可能性が高い. BMIPP 心筋無集積が局所的でなく心臓全体に及んでいるということは, 虚血性心疾患や心筋疾患にみられる心筋障害所見とは異なっており, 何らかの脂肪酸輸送の異常が全ての心筋内血管内皮細胞や心筋細胞に均質に生じているものと考えられる⁶⁾⁷⁾¹¹⁾. CD36は当初, 血小板の第4番目に発見された糖蛋白であり血小板の粘着に関わる因子として研究されてきたが, その後様々な機能を有していることが明らかになってきた^{13)–15)}. 特に長鎖脂肪酸の膜輸送システムに深く関与していることが明らかになってきた. 我々の検索でも I 型 CD36欠損症の8例全例で BMIPP の心筋無集積をみとめていることから BMIPP の心筋無集積は I 型 CD36欠損が原因と考えられる.

肥大型心筋症は約半数がサルコメア遺伝子の異常によ

る疾患であると報告されているが, 残る約半数の原因は未だ不明である. 最近では心筋細胞膜異常やエネルギー代謝異常も原因として考えられている. 実験的には心筋細胞に脂肪酸代謝異常が生じると心筋細胞が肥大することが報告されている. 肥大型心筋症の中に I 型および II 型 CD36欠損症を高率にみとめるという報告があり, 今回の我々の検索でも肥大型心筋症と虚血性心疾患の中に CD36欠損症がみられた. CD36欠損症では脂肪酸の心筋内への取り込みが障害されと考えられることから, 心筋エネルギー代謝障害や心肥大が引き起こされ, 一部の肥大型心筋症の原因に関連している可能性がある.

冠れん縮性狭心症では非発作時に施行した T1 などの心筋血流画像では異常所見を得られないことが多い. これに対して狭心症発作後の数日間は虚血にさらされた心筋細胞に脂肪酸代謝障害が生じ, BMIPP 心筋

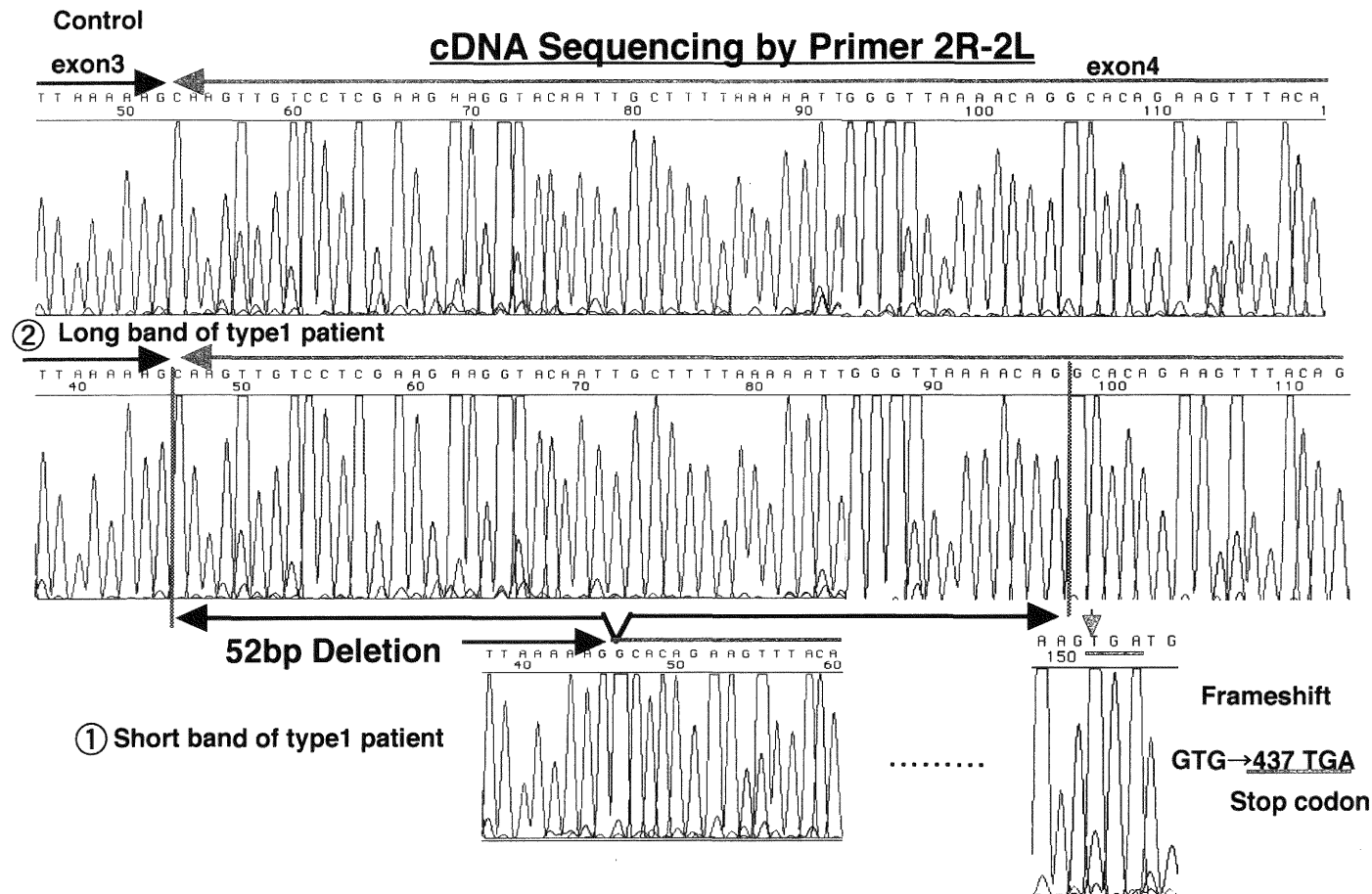


図4 exon 4 の cDNA の塩基配列. exon 4 を含む 2 種類の PCR 産物のうち塩基配列の短いものは exon 4 の開始部分から 52 塩基が欠損しており, frameshift により ⁴³⁷TGA stop codon を生じるような欠損であった.

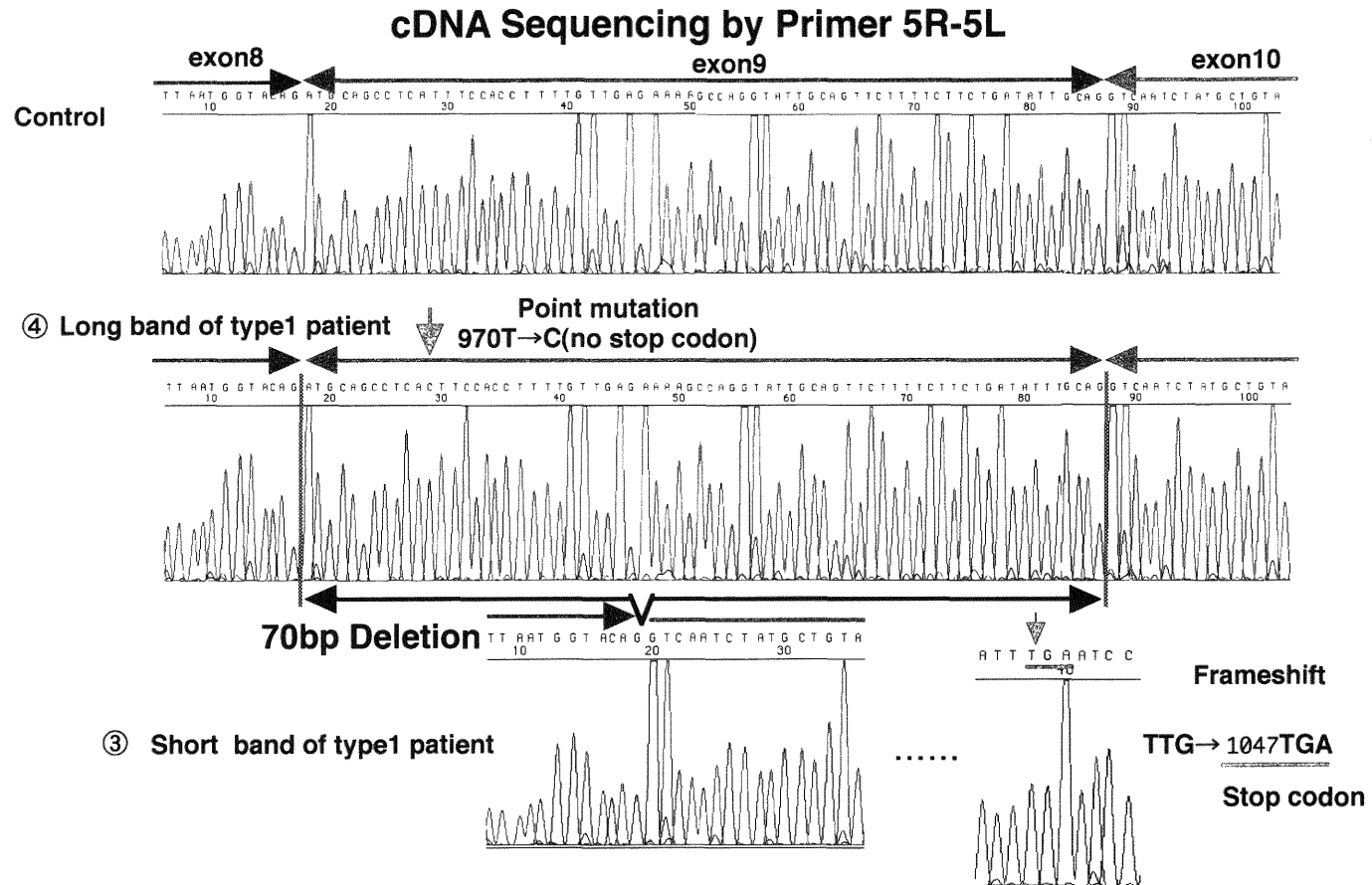


図5 exon 9 の cDNA の塩基配列. exon 9 を含む 2 種類の PCR 産物のうち塩基配列の短いものは exon 9 全体の70塩基が欠損しており, frameshift により ¹⁰⁴⁷TGA stop codon を生じるような欠損であった. またこの他に症例 1 に T→⁹⁷⁰C/Ile→Thr というのホモ変異の point mutation を認めた.

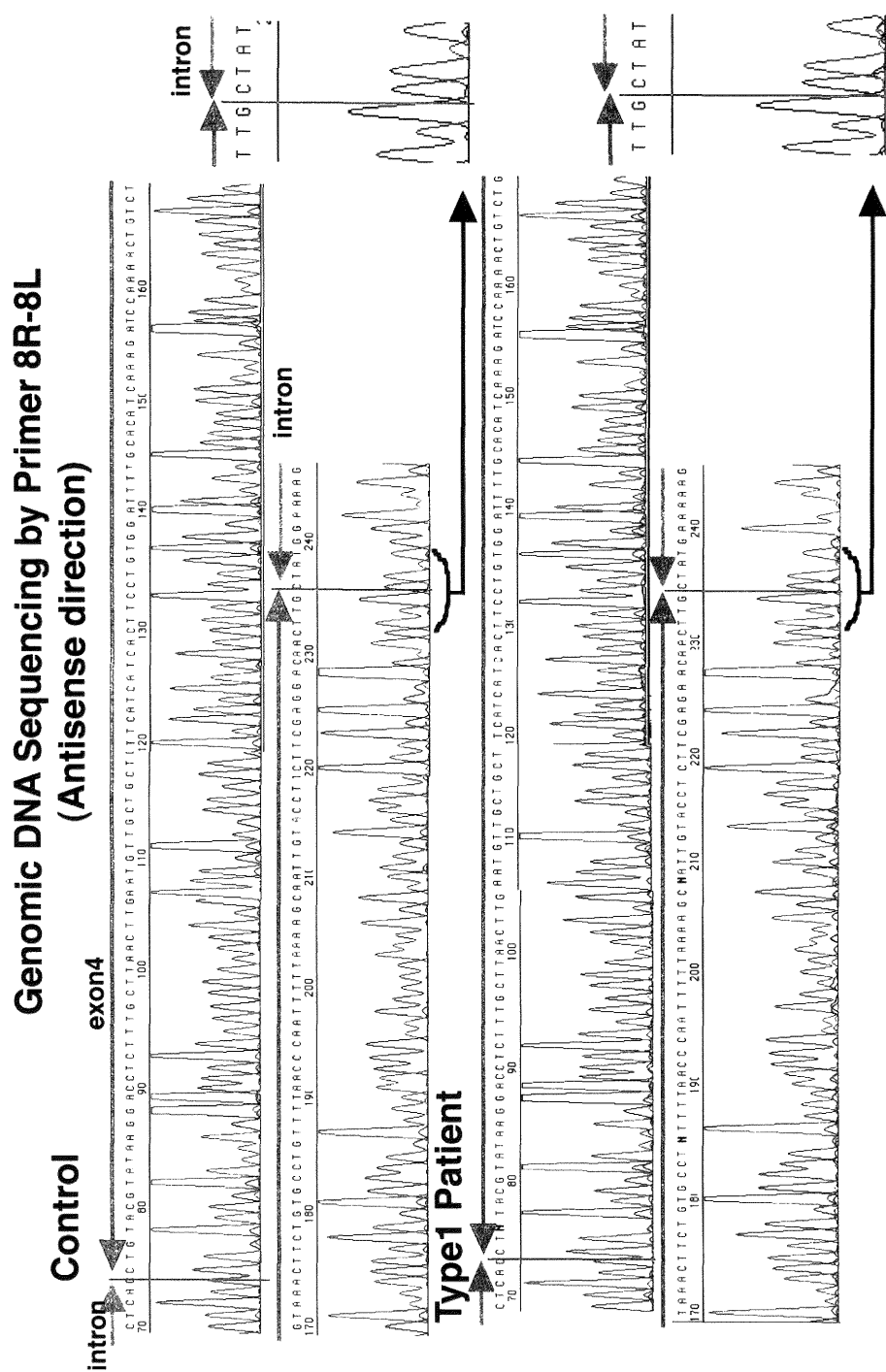


図6 exon 4 の genomic DNA には塩基欠損, point mutation を認めなかった。

Genomic DNA Sequencing by Primer 9R-9L

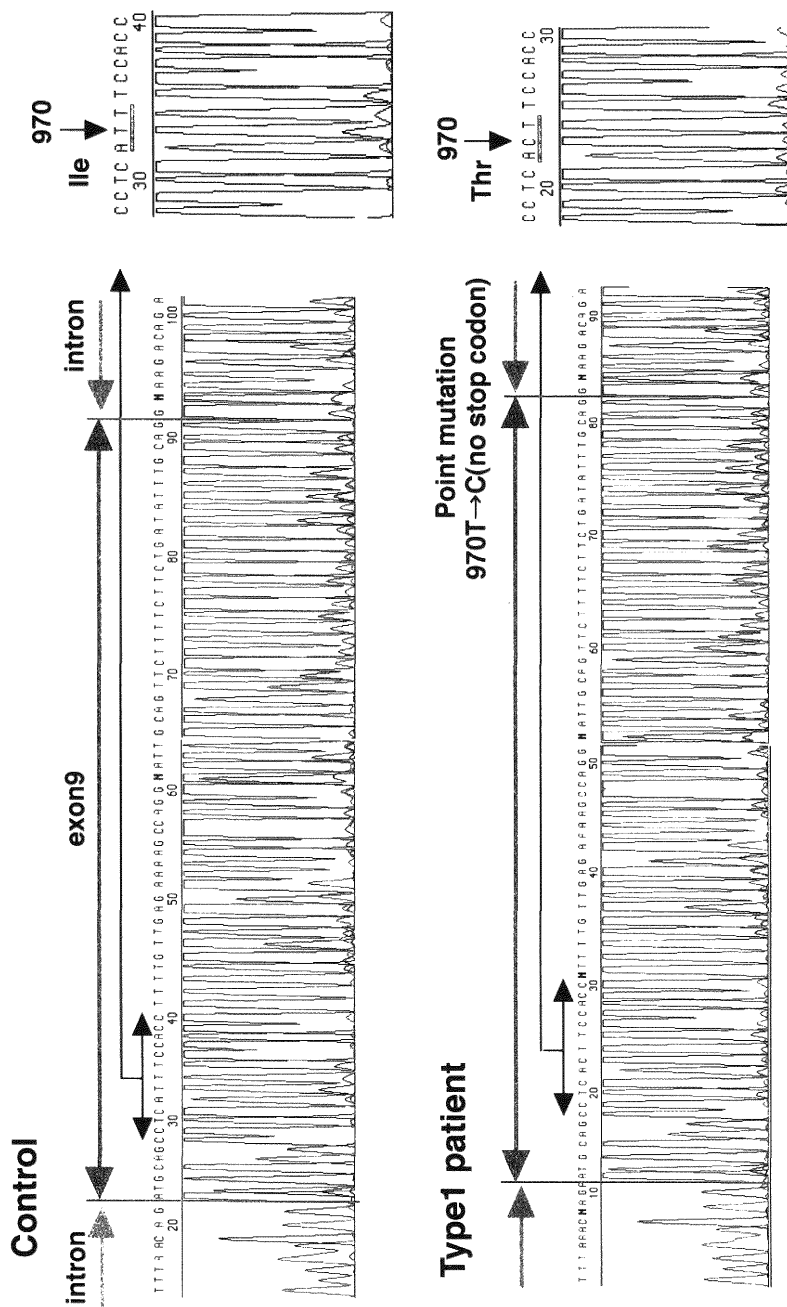


図7 exon 9の genomic DNA には塩基欠損を認めなかったが cDNA と同様に T→790 C/Ile→Thr というのホモ変異の point mutation を認めた.

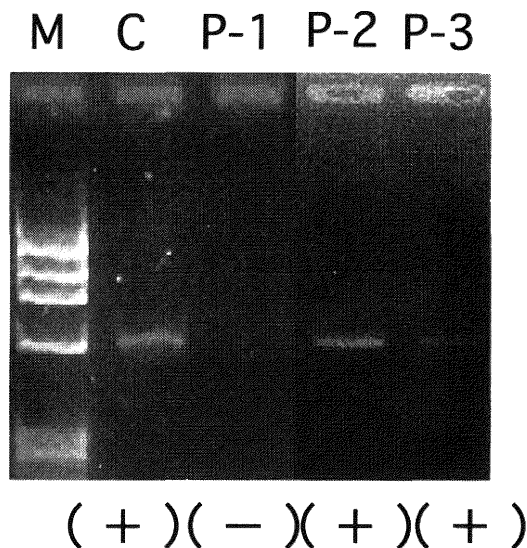


図8 exon 4 と exon 9 の 2 カ所の欠損が同じ allele より生じているか否かを判定するために、欠損した 2 カ所の exon に重なるように primer を設定して RT-PCR を行った。正常対照者と症例 2, 3 においては PCR 産物を認めたが、症例 1 では認めなかった。

シンチグラフィーにより異常を検出できることがある^{1) - 5) 12)}。一般に陳旧性心筋梗塞や冠れん縮性狭心症での BMIPP 心筋シンチグラフィー所見は障害心筋領域に一致した局所的な欠損像を呈する⁷⁾。冠れん縮性狭心症の中で BMIPP の心筋無集積を呈する I 型 CD36 欠損症は 18 例中 1 例で特に頻度が高いわけではなかった。一方、II 型を含む CD36 欠損症の総数は冠れん縮性狭心症の 18 例中 4 例 (22%) であり、正常人にみられる CD36 欠損症の頻度より高かった。したがって、CD36 欠損による血管内皮や血管平滑筋の脂肪酸代謝障害が冠れん縮性狭心症の成因に関与している可能性が考えられる。

これまで I 型 CD36 欠損症の遺伝子異常としては ⁴⁷⁸T の変異体 (pro90 の ser への置換)、exon 5 における 2 塩基の欠失、exon 10 における 1 塩基挿入などの異常により細胞表面に CD36 が発現されないことが報告されている^{10) 13) - 15)}。今回の我々の解析では症例 2, 3 において ⁴⁷⁸T の変異体のみとめたが、さらに過去に報告のない新たな遺伝子異常をみとめた。3 症例とも exon 4 と exon 9 に cDNA の塩基欠損をみとめたが、症例 1

においては Figure 6 の結果よりこの 2 カ所の欠損が異なる allele より生じるために正常な CD36 が合成されないものと考えられた。症例 1 の ⁹⁷⁰T→C/Ile→Thr という point mutation が CD36 欠損に関与しているか否かは不明である。症例 2, 3 においては exon 4 および exon 9 の欠損が同一の allele より生じていると考えられるが、過去の報告と同様に genomic DNA の exon 4 に存在する ⁴⁷⁸T のホモ変異 (pro90 の ser への置換) のために CD36 合成が阻害されていると考えられた。Exon 4 と exon 9 における cDNA 塩基配列の欠損は genomic DNA には変異を認めないことより転写時における splicing site の miss reading によると考えられるが、その詳しい機序については不明である。

CD36 欠損によって脂肪酸取り込み障害が生じると心筋細胞のエネルギー代謝に異常を生じ、心肥大や心機能障害などが出現してくることが考えられる。本研究では症例数が少ないこともあり CD36 欠損例と非欠損例、BMIPP 心筋無集積例と集積例との比較で臨床所見に差は見られなかった。CD36 欠損は健常者よりも心疾患症例に高率にみとめられることから CD36 欠損症と脂肪酸代謝異常、動脈硬化、血管内皮異常や心肥大などとの関連が推測され、今後同様な症例で詳細な検討が必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究のご指導をいただいた新潟大学第一内科 塙 晴雄先生、鳥羽 健先生、新潟薬科大学 渡辺賢一教授、また論文作成にご助言をいただいた新潟大学第一内科 増子正義先生、小玉 誠先生、相澤義房教授に深謝します。

参 考 文 献

- 1) 植原敏男, 西村恒彦, 汲田伸一郎, 下永田剛, 林田孝平, 岡 尚嗣: ¹²³I-BMIPP (¹²³I-β-methyl-iodophenyl-pentadecanoic acid) による虚血性心疾患の診断。核医学, 29: 347~358, 1992.
- 2) Tamaki, N., Kawamoto, M., Yonekura, Y., Fujibayashi, Y., Takahashi, N. and Konishi, J.: Regional metabolic abnormality in relation to perfusion and wall motion in patients with myocardial infarction: assessment with emission tomography using branched fatty acid analog. J. Nucl. Med. 33: 659~667, 1992.

- 3) 田中 健, 相澤忠範, 加藤和三, 小笠原憲, 桐谷 肇, 岡本 淳: Tc-99m PYP, Tl-201, I-123 MIBG, In-111 AM, I-123 BMIPP 心筋 SPECT 像が興味ある所見を示した PTCT 成功例. 呼吸と循環 40: 609~614, 1992.
- 4) 山辺 裕, 横山光宏: 新しい核医学的手法による心筋の病態評価. 呼吸と循環 42: 732~742, 1994.
- 5) 渡辺賢一: 臨床医のための核医学. 医歯薬出版, 1996.
- 6) Kudoh, T., Tanaka, N., Magata, Y., Konisi, J., Nohara, R. and Iwasaki, A.: Metabolism substrate with negative myocardial uptake of Iodine-123-BMIPP. J. Nucl. Med. 38: 548~553, 1997.
- 7) Tanaka, N., Sohmiya, K. and Kawamura, K.: Is CD36 deficiency an etiology of hereditary hypertrophic cardiomyopathy? J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 121~127, 1997.
- 8) Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T. and Protter, A.A.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. J. Biol. Chem. 268: 11811~11816, 1993.
- 9) Yamamoto, N., Akamatsu, N., Sakuraba, H., Yamazaki, H. and Tanoue, K.: Platelet Glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (Type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. Blood 83: 3545~3552, 1994.
- 10) Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Kosugi, Y., Shiraga, M., Lipsky, R.H. and Kanayama, Y.: Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency. Blood 83: 3545~3552, 1994.
- 11) 渡辺賢一, 宮島静一, 草野頼子, 田辺直仁, 広川陽一: ¹²³I-BMIPP 心筋無集積と I 型 CD36欠損がみられた肥大型心筋症について. 核医学 34: 481~486, 1997.
- 12) 渡辺賢一, 落合幸江, 猪俣孝元, 宮北 靖, 小山 仙, 鈴木正孝: ¹²³I-BMIPP 心筋シンチグラフィーが冠れん縮の推定に有用であった冠れん縮性狭心症について. 呼吸と循環 43: 1119~1122, 1995.
- 13) Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Honda, S., Kosugi, S., Shiraga, M. and Nagao, N.: Molecular basis of CD36 deficiency—Evidence that a 478C-T substitution (proline 90-serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. J. Clin. Invest. 95:1040~1046, 1995.
- 14) Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B. and Tomiyama, Y.: Reduced uptake of oxidized low-density lipoproteins in monocyte derived macrophages from CD36 deficient subjects. J. Clin. Invest. 96: 1859~1865, 1995.
- 15) Abumrad, N.A., El-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E. and Grimaldi, P.A.: 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: 17665~17668, 1993.

(平成11年 7月13日受付)