

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月10日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790851

 研究課題名（和文） 脂肪酸トランスポーターCD36の欠損マウスを用いた心筋症の
発症機序の解明

 研究課題名（英文） Investigation of the pathogenic mechanism of the cardiomyopathy using
the knockout mouse of fatty acid transporter CD36

研究代表者

増田 大作（MASUDA DAISAKU）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：20568753

研究成果の概要（和文）：心筋障害時における脂肪酸からグルコースへのエネルギーシフトと心機能の関係について、脂肪酸トランスポーターCD36を欠損させたCD36KOマウスを用いて検討した。負荷をかけない状態でのCD36KOマウスでは、小動物用PETの検討にはGLUT1の発現亢進による心筋グルコース取り込みが亢進し、メタボロミクス解析を行うとCD36KOマウスではacetyl CoA、長鎖脂肪酸（オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸など）、ATP、Phosphocreatinが高値でありCitric acidが低値であったが、これはAcetyl CoAからの脂肪酸生合成が亢進していることを示唆する。心エコー検査では心肥大傾向にあり、TACによる圧負荷時をかけると心重量、肺重量が増大し心肥大から心不全となったが、S6 ribosomal proteinのリン酸化が存在するがアポトーシスや血管障害は存在しなかった。CD36KOマウスでは心筋内のエネルギーが過剰状態であり、心筋への圧負荷を行うと早期にエネルギー状態が破綻し心肥大から収縮障害に陥ると推察された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the relationship between the cardiac function and the energy shift from free fatty acids (FFA) to glucose at a time of cardiac dysfunction using CD36 knockout (CD36KO) mouse, which is a transporter of FFA. The analysis of positron emission tomography revealed that the cardiac uptake of glucose was more increased in CD36KO mice compared with wild-type mouse, along with the overexpression of GLUT-1. By the metabolomics analysis, intracellular levels of acetyl CoA, long chain fatty acid (oleic acid, linoleic acid and palmitic acid), ATP and Phosphocreatin were higher and the level of citric acid were lower in CD36KO mouse, suggesting that the de novo production of FFA originated from acetyl CoA might be increased. Analyzed by ultrasound cardiography, the heart in CD36KO mouse tended to be hypertrophic. After the pressure overload by Thoracic Aortic Constriction (TAC), the weights of heart and lung were increased and the cardiac function got worse from the cardiac hypertrophy to the heart failure. In the heart of the CD36KO mouse, although phosphorylation of S6 ribosomal protein existed, neither apoptosis nor a vascular defect existed. These results suggested that the energy in the cardiomyocyte in CD36KO mouse was in the superfluous state, the energy state failed at an early stage from the state of cardiac hypertrophy to the heart failure when the pressure overload to the heart was performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

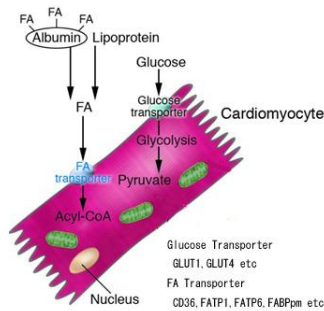
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：心筋・脂肪酸代謝・糖代謝・CD36・FDG-PET

1. 研究開始当初の背景

ヒト心筋は右図のようにエネルギー源としてグルコースおよび脂肪酸を利用しているが、これらの代謝障害に伴う心機能不全が報告



されている (J.M. Huss, et al. *J Clin Invest* 2005)。CD36は長鎖脂肪酸(LCFA)の細胞表面トランスポーターで心筋に発現し、CD36欠損症ではBMIPPを用いた心筋シンチグラフィで完全欠損を来し、FDG-PETでの検討で心筋にグルコースが有意に多く取り込まれ、高頻度に心筋症様の心機能低下を発症しており心筋での脂質代謝障害と心機能低下の関与を示唆する。

CD36ノックアウト(CD36KO)マウスは通常の飼育条件では心不全にならないが、CD36KOマウス心臓に対する冠動脈結紮や無酸素などの障害後の心機能回復は、グルコース代謝を抑制した状態では野生型マウスよりも回復が遅延するなど、心筋におけるエネルギーシフトが心機能に大きな影響を与え低下させる傾向に有ることが示唆される。我々は世界初の小動物用FDG-PET(MIP100)

/MRIを用いてマウス心筋におけるグルコース利用をin vivoで評価することに成功し、明らかにCD36KOマウス心臓でFDG取り込み量が増加していた。このよ

うなエネルギーシフトを具体的に評価できる系が確立されたことから、今後心機能との関連を評価しうようになってきた。

2. 研究の目的

脂肪酸トランスポーターで心筋に発現するCD36を遺伝的に欠いたCD36欠損症では心筋細胞内の脂肪酸代謝が障害されグルコース代謝をエネルギー源として用いていると考えられている。このCD36欠損症患者では高頻度に心筋症様の心機能障害を合併しており、代謝障害に伴う心筋障害を来す好例であると考えられる。本疾患患者ではインス

リン抵抗性、脂質代謝異常および高血圧が集積しており、先天的な遺伝子異常にさらに後天的な代謝障害の負荷がかかり心筋障害が出現しているものと思われる。本研究はCD36欠損症をモデルに長鎖脂肪酸の代謝障害に伴う心筋の機能低下のメカニズムを検討し心筋障害時の代謝障害に関する分子を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 定常状態 (非負荷時) における検討

① 心筋内エネルギー代謝に関連する遺伝子発現量検討 (RT-PCR および Microarray による網羅的解析) ; GLUT4 上流の PIK3、AKT、核内受容体など

② 心筋糖・脂質代謝関連蛋白定量

(WesternBlot 法およびプロテオミクス解析) ; GLUT1、GLUT4 等、FATP1、FATP6、FABPpm 等および心肥大マーカー (BNP、ANF) 等

③ CD36KO マウス心筋における代謝マップの作成 ; ①と②の結果得られた遺伝子・蛋白の発現を差別的に検討

(2) 心負荷時における検討

① 大動脈縮窄 (TAC) 負荷による心機能低下 / 心不全の出現の検討

対象) 8-12 週齢の WT あるいは CD36KO マウス
方法) 麻酔下開胸し TAC を行い (26gauge)、通常食飼育を行い、心エコーによる心機能評価、心重量・肺重量の測定、マウス予後の検討 (Kaplan-Meyer 曲線の作成)、摘出心の重量評価および組織学的検討 (HE、Masson Trichrome、Sirius Red、TUNEL 染色など) を行う。

② 心不全を発症した CD36KO マウス心筋の性状・代謝障害・遺伝子発現・ATP 産生の変化検討

対象) 上記①により心不全を発症した CD36KO マウスおよび WT マウス

方法) 負荷前および負荷後 (1 週間おき) の心筋の代謝および機能検討を行う。方法としては、以下の通り。

A. FDG を tracer とした PETstudy による経時的な心筋グルコース代謝の変化の検討、

B. (可能であれば) 脂肪酸を tracer とした PETstudy による経時的な心筋脂肪酸代謝の変化の検討

C. 心エコーによる心機能評価、負荷後心筋の遺伝子 (RT-PCR 法・Microarray) ・蛋白 (WesternBlot 法・プロテオミクス解析) 発現量の網羅的解析 (候補としては糖代謝 ; GLUT1、GLUT4、IRSs、PIK3、AKT、PPARs、脂肪酸代謝 ; FATP1、FATP6、FABPpm 等関連遺伝子・蛋白)

D. 心不全(BNP, ANF, actin など)各項目の差次的発現因子の同定

E. 心筋エネルギーATP 産生量の定量評価 ; 本学生命機能研究科生体機能イメージング講座が開発したマウス生体での経時的な MR spect による Pcreatin/ATP 比測定(世界初の画期的な手法であり心肥大・虚血心でみられる PCr/ATP 比の低下を捉える Chacko VP, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000)心摘出後のルシフェラーゼアッセイ法による ATP 産生量測定

4. 研究成果

(1) 定常状態(心筋に負荷をかけない場合)での検討結果 :

小動物用 PET により、心臓のグルコース取り込みを可視化、定量化したところ CD36KO マウスでは心臓グルコース取り込みが亢進していた。この機序を解析するために、超遠心法により抽出した膜蛋白分画を用いて、グルコーストランスポーター (GLUT)1 および GLUT4 の発現量を western blot 法で評価した。CD36KO マウスにおいて GLUT1 の発現は亢進していたが、GLUT4 の発現量は WT と同等であった。このことから GLUT1 の発現亢進によって CD36 欠損状態のグルコース取り込みが亢進していると考えられた。またメタボロミクス解析により心臓における中間代謝産物を評価した。CD36KO マウスでは、acetyl CoA 高値および Citric acid 低値を認め、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸などの長鎖脂肪酸含量が増加していた。さらに ATP 量、Phosphocreatin 量はマウスで高値であった。以上から、脂肪酸取り込み障害時には、グルコース取り込みが亢進しており、Acetyl CoA からより多くの脂肪酸を生合成していること、CD36KO マウスではむしろエネルギー産生が過剰になっていることが推察される。さらにシグナル解析では、蛋白合成を促進させる方向に働く S6 ribosomal protein は CD36KO マウスでは WT マウスに比してリン酸化が亢進しており、肥大を来しやすい素因があると考えられる。

(2) 心負荷時の検討結果 :

非負荷時には WT, CD36KO マウス間で有意な心重量、肺重量の差は認めないが、TAC による圧負荷時において CD36KO マウスでは WT マウスに比して心重量、肺重量の増大を認める。CD36KO マウスでは S6 ribosomal protein のリン酸化が亢進しやすく、CD36KO マウスでは WT マウスに比して強い肥大反応を来していると考えられる。また心エコー解析では肥大期の後、KO では早期に心機能不全に陥りやすい。病理組織学的解析によるアポトーシス、血管数の評価では、負荷時においても WT マウスと CD36KO マウス間に明らかな差は認め

ず、アポトーシス、血管数の差異による心機能障害は否定的と判断した。

以上の結果をまとめると、CD36KO マウスでは非負荷時はエネルギー状態がむしろ過剰であり、圧負荷後早期に肥大反応を来しやすく、結果的に早期にエネルギー状態が破綻し収縮障害に陥ると推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

①中谷和弘、増田大作、他 hypertrophy and impaired cardiac function of CD36 knockout mice in a pressure overload condition

日本動脈硬化学会総会、2012 年 7 月 19 日、ヒルトン福岡シーホーク (福岡県)

②中谷和弘、増田大作、他 hypertrophy and impaired cardiac function of CD36 knockout mice in a pressure overload condition

ESC congress 2012(ヨーロッパ心臓病学会)、2012 年 8 月 29 日、Internationales Congress Center München (ドイツ、ミュンヘン)

③中谷和弘、増田大作、他 圧負荷時の CD36 欠損マウスにおける心肥大および心機能不全の解析

日本心臓病学会年次学術集会、2012 年 9 月 14 日ホテル日航金沢 (石川県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 1 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 大作 (MASUDA DAISAKU)

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・
特任研究員

研究者番号：20568753