

## 電子スピン共鳴からみた高血圧の細胞膜機能と血管内分泌因子の役割 特にエストロゲンの作用を中心として

津田 和志 西尾 一郎

**要 旨**：細胞膜fluidityやmicroviscosityをはじめとする細胞膜機能はrheologic behaviorの変化を介してvascular biology やmicrocirculationに強い影響を及ぼし、高血圧や動脈硬化の進展に関与する。一方、エストロゲンなどの性ホルモンは心血管障害の成因、予後において重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細については不明な点が多い。本研究では高血圧の細胞膜機能とその調節機序を検討するため、電子スピン共鳴法を用いて細胞膜fluidityを測定し、さらにエストロゲンや血管内分泌因子の膜機能に及ぼす影響とその作用機序を検討した。エストロゲン(17 $\beta$ -estradiol)は濃度依存性に赤血球膜fluidityを上昇(microviscosityを改善)させた。そして、その作用はnitric oxide(NO) donor(S-nitroso-N-acetylpenicillamine)や8-bromo-cGMPで増強され、逆にNO synthase inhibitor(N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester, asymmetric dimethylarginine)で抑制されることより、一部NOを介すると考えられた。また、閉経後高血圧女性の赤血球膜fluidityは閉経後正常血圧女性に比し有意に低下しており、血漿NO代謝産物(nitrite, nitrate)レベルが低値であるほど膜fluidityの減少の程度は大であった。さらに、閉経後女性にホルモン補充療法を実施すると赤血球膜fluidityは改善し、同時に血漿NO代謝産物レベルの増加を認めた。以上より、電子スピン共鳴からみた赤血球膜fluidityは閉経後高血圧女性で低下し、この膜機能異常からmicrocirculationの悪化や組織へのoxygen diffusionの障害を介し循環器疾患の惹起される可能性が示唆される。また、エストロゲンならびにNOは細胞膜機能改善に重要な役割を果たし、高血圧のvascular biology調節に一部関与すると考えられた。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 933-940)

Key words: estrogen, membrane fluidity, electron paramagnetic resonance, postmenopausal women, hormone replacement therapy, nitric oxide

### 序 言

細胞膜fluidity(流動性)やmicroviscosityをはじめとする細胞膜機能はrheologic behaviorの変化を介してvascular biologyやmicrocirculationに強い影響を及ぼし、高血圧や動脈硬化の進展に関与する。すでにわれわれは電子スピン共鳴法を用いて本態性高血圧患者や高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rats: SHR)の細胞膜流動性細胞膜fluidityが正常血圧群に比し低下し、細胞膜機能異常が高血圧の病態生理に深く関与する可能性を示してきた<sup>1-6)</sup>。一方、閉経後女性では心血管事故の頻度が増加することが報告され、エストロゲンな

どの性ホルモンは心血管障害の成因、予後において重要な役割を果たすと考えられている<sup>7,8)</sup>。しかし、その詳細については不明な点が多い。そこで本研究では高血圧の細胞膜機能とその調節機序を検討するため、電子スピン共鳴法を用いて細胞膜fluidityを測定し、さらにエストロゲンや血管内分泌因子の膜機能に及ぼす影響とその作用機序を検討した。

### 閉経後女性の細胞膜fluidityに及ぼす エストロゲンの影響

閉経後正常血圧女性の洗浄赤血球を作製し、スピンドラベル剤である5-nitroxide stearate(5-NS)ならびに16-

和歌山県立医科大学循環器内科

2005年1月5日受付 2005年6月6日受理

nitroxide stearate( 16-NS )でラベリング後, 電子スピン共鳴法にて膜fluidityを測定した( power 5mW, modulation frequency 100kHz, modulation amplitude 2.0gauss, field  $3,280 \pm 50$ gauss, response time 1.0sec ). そしてorder parameter( S )ならびにpeak height ratio(  $h_0/h_{-1}$  )を算出し( Fig. 1 ), 膜fluidityの指標とした。order parameter( S )ならびにpeak height ratio(  $h_0/h_{-1}$  )とも値が大きいくほど, 膜fluidityは逆に低下していることを表している<sup>1-5</sup>。さらに膜fluidityに及ぼすエストロゲンやnitric oxide( NO ) donor, ならびにNO synthase inhibitorの影響を観察した。

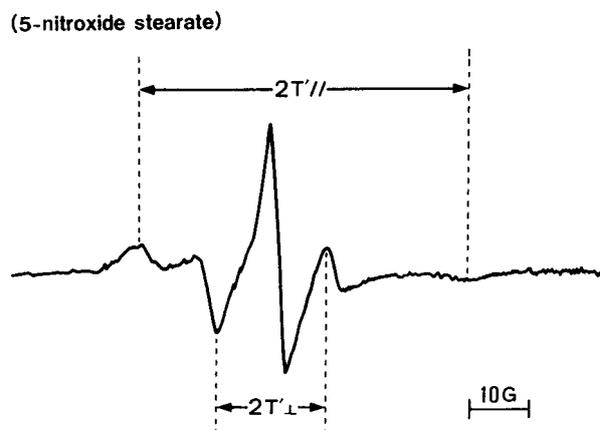
各種のエストロゲンのなかで $17\beta$ -estradiol(  $E_2$  )が最も生物活性が強いとされている。Fig. 2 は *in vitro* における $E_2$ の細胞膜fluidityに及ぼす影響を示したものである。 $E_2$ は濃度依存性に閉経後女性の赤血球膜から得られたorder parameter( S )ならびにpeak height ratio(  $h_0/h_{-1}$  )値を減少させた。この成績は $E_2$ が細胞膜fluidityを上昇させ, 膜microviscosityを改善させることを示している<sup>9</sup>。他のエストロゲン製剤であるestriol(  $E_3$  ), estrone(  $E_1$  )も同様に細胞膜fluidityを上昇させたが<sup>10,11</sup>, その効果は $E_2$ の場合より弱いものであった。

### エストロゲンとNO donor, cyclic GMP-analog ならびにNO synthase inhibitorとの相互作用

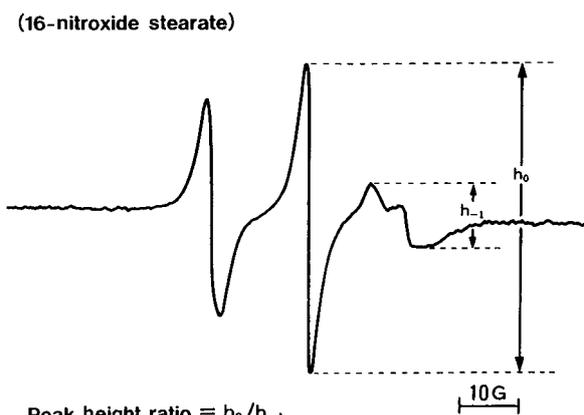
次に $E_2$ とNO donor, cyclic GMP-analogならびにNO synthase inhibitorとの相互作用を検討した。NO donorであるS-nitroso-N-acetylpenicillamine( SNAP )存在下で $E_2$ の細胞膜fluidity上昇作用は有意に増強した<sup>9</sup>。同様にcyclic GMP-analogである8-bromo-cyclic GMP( 8-br-cGMP )によって $E_2$ の細胞膜fluidityに対する作用は有意に増強した<sup>9</sup>。逆に, NO synthase inhibitorであるN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester ( L-NAME )やasymmetric dimethylarginine( ADMA )により $E_2$ の細胞膜fluidityに対する作用は有意に拮抗された<sup>9</sup>。これらの成績は $E_2$ が一部NOを介し細胞膜fluidityを上昇させ, 膜microviscosityを改善する可能性を示している。

### エストロゲンの閉経後高血圧女性の細胞膜fluidityに及ぼす影響

電子スピン共鳴装置にて5-NS, 16-NSでラベリングした赤血球からorder parameter( S )ならびにpeak height ratio(  $h_0/h_{-1}$  )を求めると, 閉経後高血圧女性ではこれら



$$\text{Order parameter (S)} = \frac{T'// - T'_{\perp}}{T_{zz} - T_{xx}} \cdot \frac{an}{a'n}$$



$$\text{Peak height ratio} = h_0/h_{-1}$$

**Figure 1** Typical electron paramagnetic resonance spectra of erythrocytes for the fatty acid spin-label agents (upper: 5-nitroxide stearate, lower: 16-nitroxide stearate).

The greater the values of the order parameter (S) and the peak height ratio ( $h_0/h_{-1}$ ), the lower the membrane fluidity of erythrocytes.

S: order parameter,  $2T'//$  in G: outer hyperfine splitting,  $2T'_{\perp}$  in G: inner hyperfine splitting,  $T_{zz}$  and  $T_{xx}$ : hyperfine constants,  $an/a'n$ : isotropic coupling constant

の値が閉経後正常血圧女性に比し有意に高値であった。このことは閉経後高血圧女性の赤血球膜fluidityは閉経後正常血圧女性に比し低下し, 膜microviscosityが悪化していることを表している( Fig. 3 )。次に,  $E_2$ の赤血球膜fluidityに及ぼす影響を閉経後高血圧女性と閉経後正常血圧女性の間で比較検討した。 $E_2$ は閉経後高血

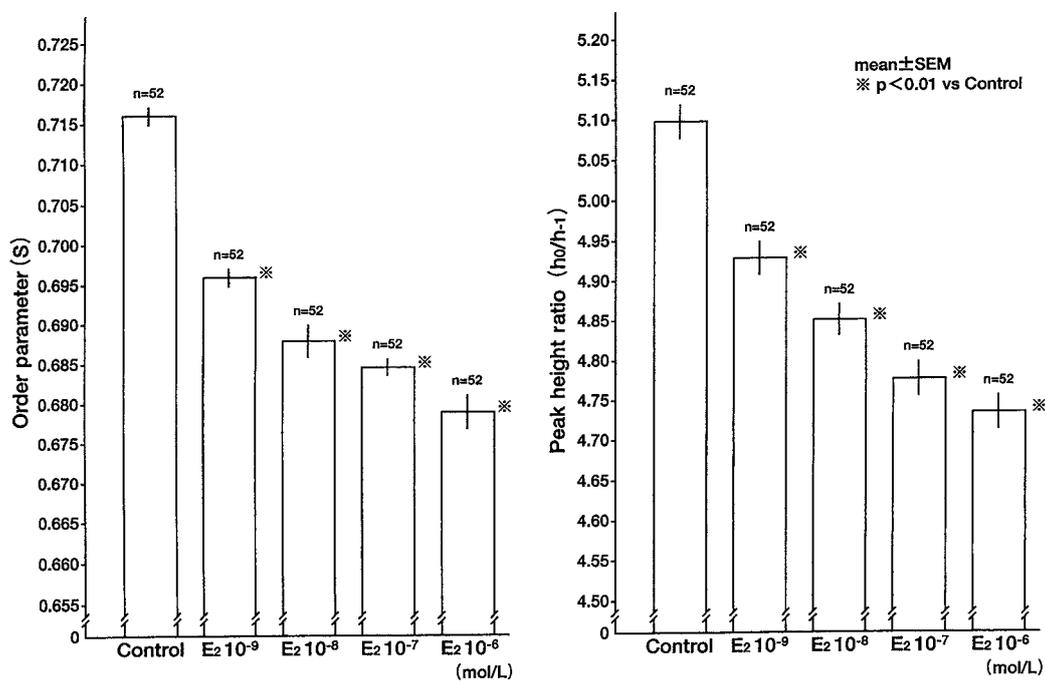


Figure 2 Effects of 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) on membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women *in vitro*.

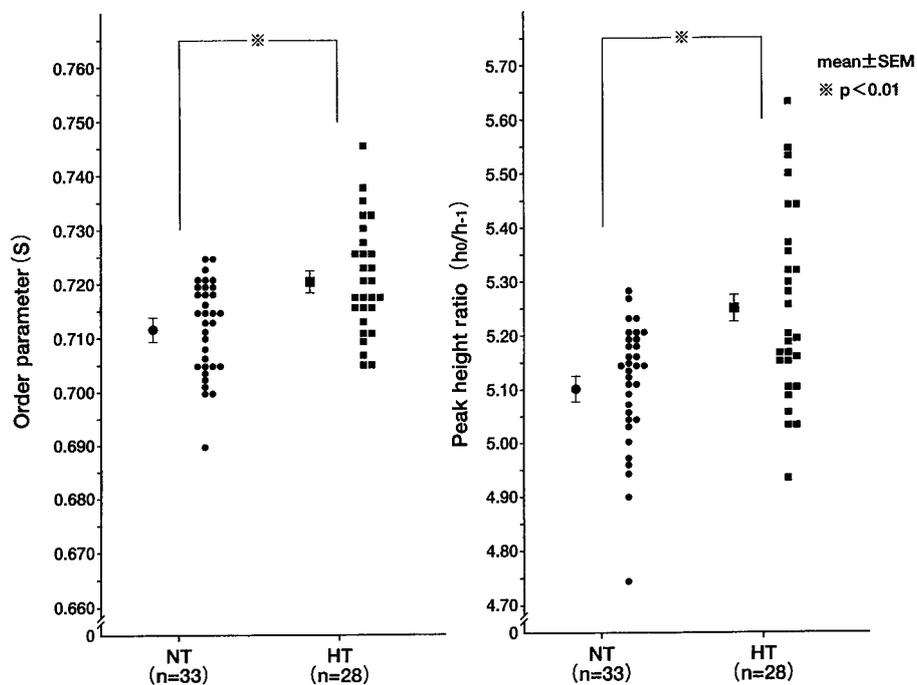
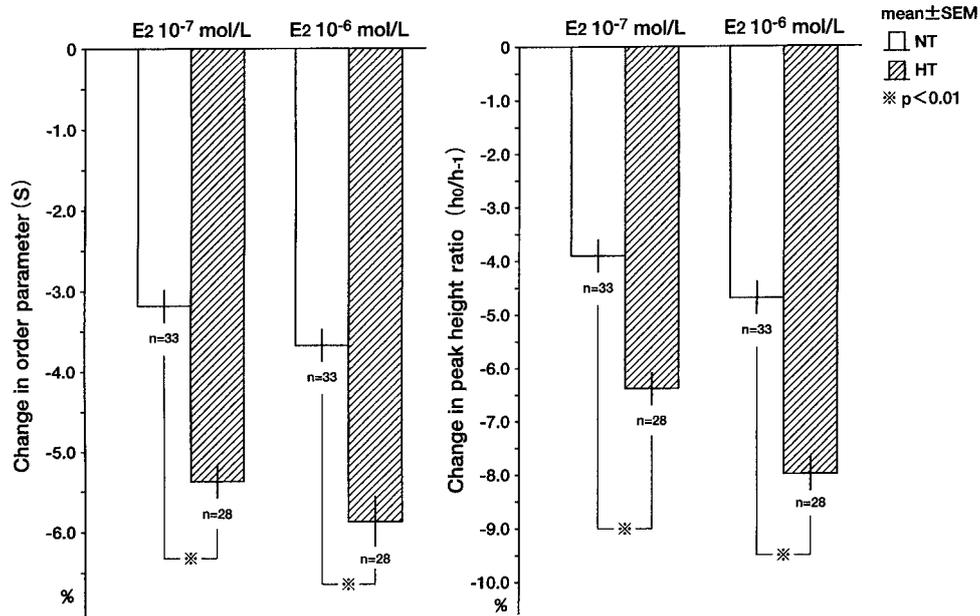


Figure 3 Membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive and normotensive postmenopausal women. NT: normotensive postmenopausal women, HT: hypertensive postmenopausal women

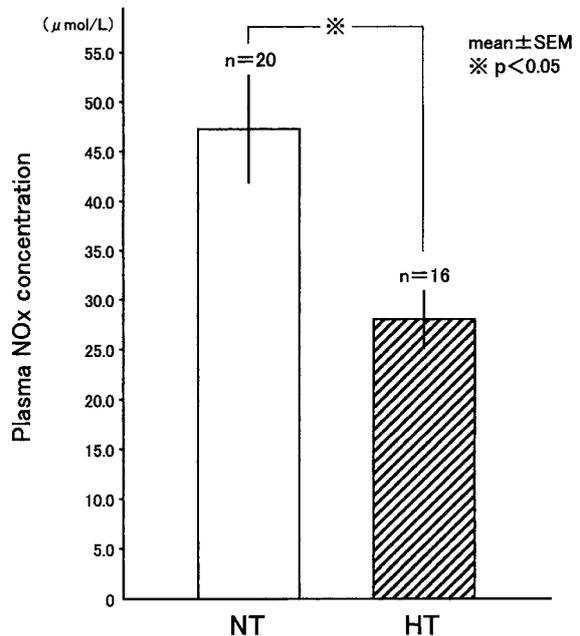


**Figure 4** Effects of 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) on membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive and normotensive postmenopausal women. NT: normotensive postmenopausal women, HT: hypertensive postmenopausal women

圧女性と閉経後正常血圧女性の赤血球膜から得られた order parameter (S) ならびに peak height ratio (h<sub>0</sub>/h<sub>-1</sub>) をともに減少 (膜 fluidity は上昇) させたが、その効果は閉経後高血圧女性で有意に亢進していた (Fig. 4)。このことはエストロゲンの膜 fluidity 改善作用が閉経後高血圧女性で大であることを表しており、エストロゲンは NO を介して高血圧の細胞膜 microviscosity 悪化に対するひとつの defence として作用する可能性が示唆された。

#### 細胞膜 fluidity と血漿 NO 代謝産物 (nitrite, nitrate) レベルとの関連

Fig. 5 は閉経後高血圧女性と閉経後正常血圧女性の血漿 NO 代謝産物 (nitrite, nitrate) レベルを示している。血漿 NO 代謝産物レベルは閉経後高血圧女性で正常血圧群に比し有意に減少していた。また、閉経後女性の細胞膜 fluidity と血漿 NO 代謝産物レベルとの関連を検討してみると、血漿 NO 代謝産物レベルと order parameter (S) 値は逆相関し、血漿 NO 代謝産物が低値であるほど膜 fluidity の減少の程度は大であった<sup>12)</sup>。この成績も NO が細胞膜 fluidity の重要な規定因子であり、NO の産生ある



**Figure 5** Plasma nitric oxide (NO) metabolite (NO<sub>x</sub>) concentration in hypertensive and normotensive postmenopausal women. NT: normotensive postmenopausal women, HT: hypertensive postmenopausal women

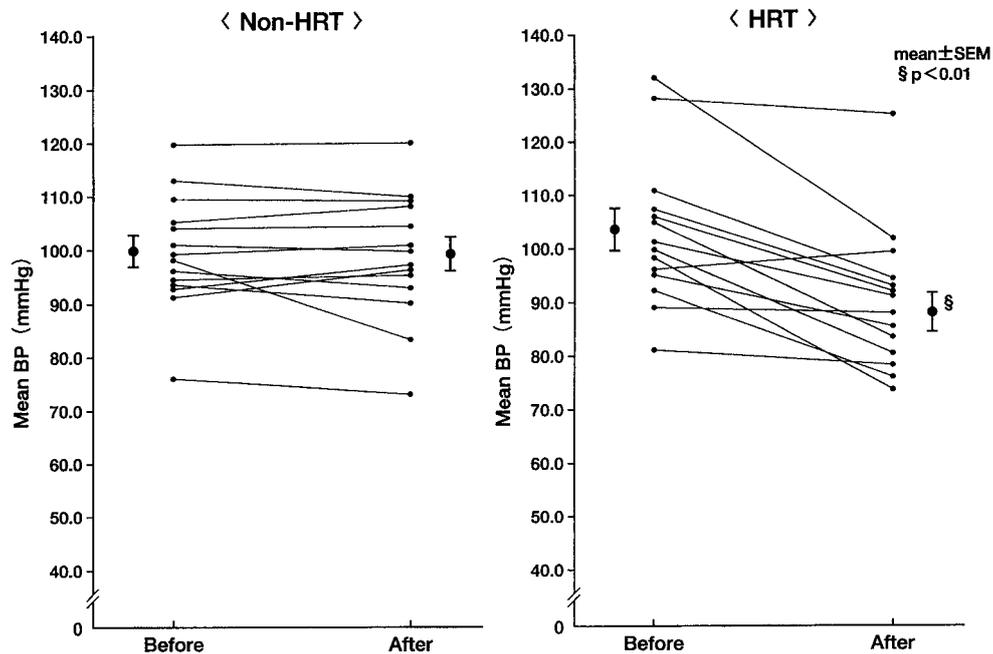


Figure 6 Effects of hormone replacement therapy (HRT) on mean blood pressure in postmenopausal women.

いは作用不全が細胞膜fluidityの低下を引き起こす可能性を示唆する成績と考えられる。

### ホルモン補充療法の細胞膜fluidityに及ぼす作用

次に実際に閉経後女性にホルモン(エストロゲン)補充療法を実施した際の細胞膜fluidityの変化を検討した<sup>13)</sup>。ホルモン補充療法群では血圧値は有意に低下した(Fig. 6)。また、ホルモン補充療法により閉経後女性の赤血球膜order parameter(S)は有意に減少した<sup>13)</sup>。このことはホルモン補充療法が細胞膜fluidityを上昇させ、膜microviscosityを改善させることを表している。さらにホルモン補充療法により同時に血漿NO代謝産物レベルの増加が認められることより<sup>13)</sup>、NOがホルモン補充療法時の細胞膜fluidity改善に一部寄与する可能性が示唆された。しかし、細胞膜fluidity改善の程度と血圧降下度との間には直接の相関はなかった。

### 考 察

動脈硬化性疾患の発症は女性では閉経前には少なく、閉経後に著明に増加するという特徴がある。この要因として閉経後のエストロゲン低下による心血管系

への保護作用の欠落が関係すると考えられ、従来より数多くの実験的ならびに臨床的な成績からエストロゲンが抗動脈硬化を持つことが示されてきた。一方、赤血球膜fluidityの変化は赤血球の変形能、可塑性、microviscosityの決定因子のひとつであり、赤血球のrheologic behaviorならびにmicrocirculation調節において重要な役割を担っている<sup>6)</sup>。そこで本研究では電子スピン共鳴ならびにスピラベル法を用いて赤血球膜fluidityに及ぼすエストロゲンの影響とその作用機序を検討した。エストロゲンは閉経後女性の赤血球膜fluidityを有意に上昇させ、膜microviscosityを改善させることが示された。また、その作用はNO donorであるSNAPならびにcGMP-analogである8-br-cGMP存在下で増強し、逆にNO synthase inhibitorであるL-NAMEやADMAによって拮抗された。このことはエストロゲンの効果が一部NO-cGMP系を介することを示唆するものと考えられる。最近、赤血球にもNO synthaseが存在し、赤血球そのもので産生されたNOがその生理機能調節に深く関与すると考えられている<sup>14,15)</sup>。NOの赤血球膜機能における意義や病的状態での変化については不明な点が多いが、エストロゲンはNOを介して膜機能ならびに微小循

環調節に重要な役割を果たしているものと考えられる。また、従来よりエストロゲンの作用は核内レセプターを介するとされていたが (genomic receptor), 最近、細胞膜にもレセプターが存在することが想定されている (non-genomic receptor)<sup>6,17)</sup>。今回示したエストロゲンの赤血球膜への効果も non-genomic receptor を介したものと考えられるが<sup>18,19)</sup>、その詳細については不明であり今後さらなる検討を必要とする。

閉経後女性にホルモン補充療法を実施した際の細胞膜 fluidity の変化を検討すると、ホルモン補充療法群では赤血球膜 fluidity は有意に上昇し、ホルモン補充療法が閉経後女性の膜 microviscosity ならびに microcirculation を改善させることが示された。また、血漿 NO 代謝産物が低値であるほど膜 fluidity の減少の程度は大であり、さらにホルモン補充療法により血漿 NO 代謝産物レベルの増加が認められることより、NO が閉経後女性に対するホルモン補充療法施行時の細胞膜 fluidity 改善に一部関与するものと考えられる。しかし、細胞膜 fluidity 改善の程度と血圧降下度との間には直接の相関はみられなかった。エストロゲンには Ca channel blocker 様の作用がみられるとの報告もあり<sup>20)</sup>、エストロゲンによる血圧値の低下は NO 産生量増加作用以外の効果も深く関与している可能性が示唆される。

一方、Women's Health Initiative (WHI) に発表された成績では、エストロゲンが必ずしも閉経後女性の心血管事故を抑制しないと報告されている<sup>21)</sup>。この成績はエストロゲンの血栓形成促進などの副作用や、ホルモン補充療法の際にエストロゲンと同時に投与されるプロゲステロンに起因すると考えられている。さらにホルモン補充療法の効果は投与量や投与方法、人種によっても影響を受けると考えられるが、その適用には十分な注意が必要である。最近、エストロゲンに代わる将来有望な薬剤としてエストロゲン受容体調節薬 (selective estrogen receptor modulator: SERM) が注目されている。実際、SERM のひとつである tamoxifen はエストロゲンレセプター陽性乳癌の治療薬として用いられているが、tamoxifen 治療を受けている患者では心血管事故の少ないことが報告されている<sup>22)</sup>。今後 SERM などエストロゲンの beneficial な面を強調した薬剤の開発、ならびにその心血管系への作用機序についての詳細な検討が期待される。

## まとめ

以上より、電子スピン共鳴からみた赤血球膜 fluidity は閉経後高血圧女性で低下し、この膜機能異常から microcirculation の悪化や組織への oxygen diffusion の障害を介し循環器疾患が惹起される可能性が示唆される。また、エストロゲンは閉経後女性の赤血球膜 fluidity を上昇させ、膜 microviscosity を改善させることが示された。さらにその作用の一部は NO ならびに cGMP を介するものと考えられ、エストロゲンは閉経後女性の細胞膜機能改善ならびに vascular biology 調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。ただ、microcirculation の調節には血球成分のみならず血管そのものの物理的、機能的変化や他の多くの内分泌因子が関与し、それらが細胞膜機能にどのような影響を及ぼすのかについては今後慎重に検討を続けていく必要がある。

## 文 献

- 1) Tsuda K, Iwahashi H, Minatogawa Y et al: Electron spin resonance studies of erythrocytes from spontaneously hypertensive rats and humans with essential hypertension. *Hypertension*, 1987, **9**: III19-III24.
- 2) Tsuda K, Tsuda S, Minatogawa Y et al: Decreased membrane fluidity of erythrocytes and cultured vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats: an electron spin resonance study. *Clin Sci*, 1988, **75**: 477-480.
- 3) Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y: The role of sodium-potassium adenosine triphosphatase in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in spontaneously hypertensive rats: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 1997, **10**: 1411-1414.
- 4) Tsuda K, Kinoshita Y, Nishio I et al: Adrenomedullin and membrane fluidity of erythrocytes in mild essential hypertension. *J Hypertens*, 1999, **17**: 201-210.
- 5) Tsuda K, Kimura K, Nishio I et al: Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **275**: 946-954.
- 6) Tsuda K, Nishio I: Membrane fluidity and hypertension. *Am J Hypertens*, 2003, **16**: 259-261.
- 7) Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC et al: Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*,

- 1991, **325**: 756–762.
- 8 Oparil S: Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. Hormones and vasoprotection. *Hypertension*, 1999, **33**: 170–176.
- 9 Tsuda K, Kinoshita Y, Kimura K et al: Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effect of 17 $\beta$ -estradiol on membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1306–1312.
- 10 Tsuda K, Shimamoto Y, Kimura K et al: Estriol improves membrane fluidity of erythrocytes by the nitric oxide-dependent mechanism: an electron paramagnetic resonance study. *Hypertens Res*, 2001, **24**: 263–269.
- 11 Tsuda K, Kinoshita-Shimamoto Y, Kimura K et al: Effect of oestrone on membrane fluidity of erythrocytes is mediated by a nitric oxide-dependent pathway: an electron paramagnetic resonance study. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002, **29**: 972–979.
- 12 Tsuda K, Kinoshita-Shimamoto Y, Kimura K et al: Nitric oxide is a determinant of membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2003, **16**: 244–248.
- 13 Tsuda K, Kinoshita-Simamoto Y, Mabuchi Y et al: Hormone replacement therapy improves membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2003, **16**: 502–507.
- 14 Jubelin BC, Gierman JL: Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens*, 1996, **9**: 1214–1219.
- 15 Chen LY, Mehta JL: Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, **32**: 57–61.
- 16 Matsuda S, Kadowaki Y, Ichino M et al: 17 $\beta$ -estradiol mimics ligand activity of the c-erbB2 protooncogene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 10803–10807.
- 17 Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ: Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci*, 1996, **16**: 595–604.
- 18 Jacobsohn GM, Siegel ET, Jacobsohn MK: 17 $\beta$ -estradiol transport and metabolism in human red blood cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1975, **40**: 177–185.
- 19 Puca GA, Sica V: Identification of specific high affinity sites for the estradiol receptor in the erythrocyte cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **103**: 682–689.
- 20 Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ et al: Relaxant effects of 17- $\beta$ -estradiol in cerebral arteries through Ca<sup>2+</sup> entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, **21**: 422–429.
- 21 Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results: From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, **288**: 321–333.
- 22 McDonald CC, Alexander FE, Whyte BW et al: Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial: the Scottish Cancer Trials Breast Group. *BMJ*, 1995, **311**: 977–980.

## Estrogen and Regulating of Membrane Fluidity in Hypertension An Electron Paramagnetic Resonance Investigation

Kazushi Tsuda and Ichiro Nishio

Division of Cardiology, Department of Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

---

**Key words:** estrogen, membrane fluidity, electron paramagnetic resonance, postmenopausal women, hormone replacement therapy, nitric oxide

Abnormalities in physical properties of the cell membranes may underlie the defects that are strongly linked to hypertension, stroke, and other cardiovascular diseases. The present study was performed to investigate the effects of estrogen on cell membrane fluidity (a reciprocal value of membrane microviscosity) in hypertensive and normotensive postmenopausal women using an electron paramagnetic resonance and spin-labeling method. In an *in vitro* study, estrogen increased the membrane fluidity, leading to improvement in the membrane microviscosity of erythrocytes via the nitric oxide (NO)-dependent mechanism. The effect of estrogen on the membrane fluidity was more pronounced in hypertensive postmenopausal women than in normotensive postmenopausal women. In addition, the hormone replacement therapy significantly improved the membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women with a concomitant increase in plasma NO metabolite levels. These results showed that estrogen may benefit hypertensive postmenopausal women in regulating the blood rheologic behavior and in the improvement of the microcirculation.

(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 933–940)