

細胞膜機能異常からみたメタボリックシンドロームの病態生理と治療戦略 電子スピン共鳴法による検討

津田 和志

要 旨：最近，循環器疾患の病態生理を細胞膜機能の変化からとらえようとする考え方が提唱され，われわれも高血圧患者の細胞膜流動性 (fluidity) が低下 (microviscosityが悪化) していることを報告してきた。本研究では肥満と高血圧との関連を細胞膜レベルの変化からみるため，高血圧やメタボリックシンドローム患者の細胞膜fluidityを電子スピン共鳴法にて測定し，インスリンやレプチンなどの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。高血圧患者の赤血球膜fluidityは正常血圧群に比し低下しており，血漿インスリン濃度が高値であるほど減少の程度は大であった。*in vitro*においてインスリンは濃度依存性に細胞膜fluidityを低下させ，その作用はCa存在下で増強した。一方，レプチンは濃度依存性に細胞膜fluidityを上昇 (microviscosityを改善) させ，その作用は一部にNOを介すると考えられた。また，有酸素運動療法は細胞膜fluidityを改善させ，その効果はインスリン感受性の変化を伴うものであった。以上より，細胞膜fluidityの低下が膜のrheologic behaviorやmicrocirculationの異常を惹起する可能性が示唆される。また，細胞膜機能異常を改善することがメタボリックシンドロームにおける心血管病の予防に一部寄与すると考えられた。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 359-364)

Key words: membrane fluidity, electron paramagnetic resonance, erythrocytes, insulin, leptin, exercise

緒 言

細胞膜流動性 (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¹⁾。すでにわれわれは電子スピン共鳴 (electron paramagnetic resonance: EPR) ならびにスピンラベル法により赤血球膜や血管平滑筋細胞の細胞膜fluidityが高血圧群で減少していることを報告した¹⁻⁵⁾。このことは高血圧患者の細胞膜が硬くなり，膜の可塑性が低下していることを示し，末梢循環障害を引き起こして脳血管障害や心血管系疾患の発症に結びつく可能性を示唆している。一方，肥満は糖尿病，高血圧をはじめとする成人病の危険因子の一つであり，特に肥満と血圧値の間には有意な相関が認められるが，体重増加が高血圧をもたらすメカニズムに

については不明な点が多い。また，肥満や糖尿病の最大の内分泌学的特徴はインスリン作用不全やインスリン抵抗性であり，それはまた高血圧の成因の一つでもある。最近，肥満遺伝子 (*ob* 遺伝子) によって脂肪細胞でレプチンが生成，分泌されることが明らかとなり，摂食抑制作用や糖脂質代謝調節のみならず，直接血圧調節にも関与することが示唆されている。本研究では，肥満，糖尿病ならびに高血圧の関連を細胞膜レベルの変化からみるため，特に高血圧を中心としたメタボリックシンドローム患者を対象として，その細胞膜機能を電子スピン共鳴法にて測定し，インスリンやレプチンなどの血管内分泌因子の膜機能に及ぼす影響をCa代謝機構やnitric oxide (NO) との関連から検討した。さらに有酸素運動療法の膜機能に対する影響について考察を加えた。

和歌山県立医科大学循環器内科

2006年1月5日受付 2006年5月3日受理

電子スピン共鳴法による細胞膜fluidityの測定

対象者を30分間安静臥床させた後、肘静脈より採血し洗浄赤血球を作成した。赤血球はTris-HCl buffer内に浮遊させ、5-nitroxide stearate(5-NS)ならびに16-nitroxide stearate(16-NS)でスピラベルを行い、電子スピン共鳴装置にて細胞膜fluidityを測定した(power 5 mW, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 2.0 gauss; G, scan width 3280 ± 50 G, sweep time 8 min, response time 1.0 sec²⁻⁵)。スピラベル剤の5-NSや16-NSはbuffer内では自由な動きをするため、得られたラジカルシグナルは3本の対称なピークとして記録される。しかし、スピラベル剤が細胞膜に取り込まれた状態(5-NSは膜の比較的表層、16-NSは膜の比較的深層に取り込まれる)で記録するとそれらの動きが膜の状態によって制限され、異方性の強いものとなる(Fig. 1²⁻⁵)。この異方性の程度を各種のparameterをとることによって算出し、細胞膜fluidityの指標とする。そして、各spectrumから算出したorder parameter(S)値ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})値が大きいほど細胞膜fluidityは低下していることを表している²⁻⁵)。

細胞膜fluidityに及ぼすインスリンの作用とその調節機序について

インスリンの細胞膜fluidityに及ぼす影響を検討するため、*in vitro*において赤血球にインスリンを负荷した際の細胞膜fluidityの変化を観察した。Fig. 2は正常血圧者におけるインスリンのorder parameter(S)値ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})値に対する影響を示している。インスリンは濃度依存性にorder parameter(S)値ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})値を増加させた⁶)。この成績はインスリンによって細胞膜fluidityが減少することを表している。さらに、medium中にCa²⁺(1 mmol/L)が存在するとインスリンの細胞膜fluidityに対する効果は有意に増強した⁶)。このことはインスリンの作用メカニズムの一部に細胞外から細胞内へのCa²⁺流入が関与していることを示唆するものと考えられる。また、Ca channel blockerであるdiltiazemはインスリン単独、あるいはインスリンとCa²⁺によるorder parameter(S)ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})の増加を抑制した⁶)。この成績もインスリンの細胞膜機能に及ぼす作用に一部Ca²⁺が関与することを示すものである。このことより、細胞膜fluidity

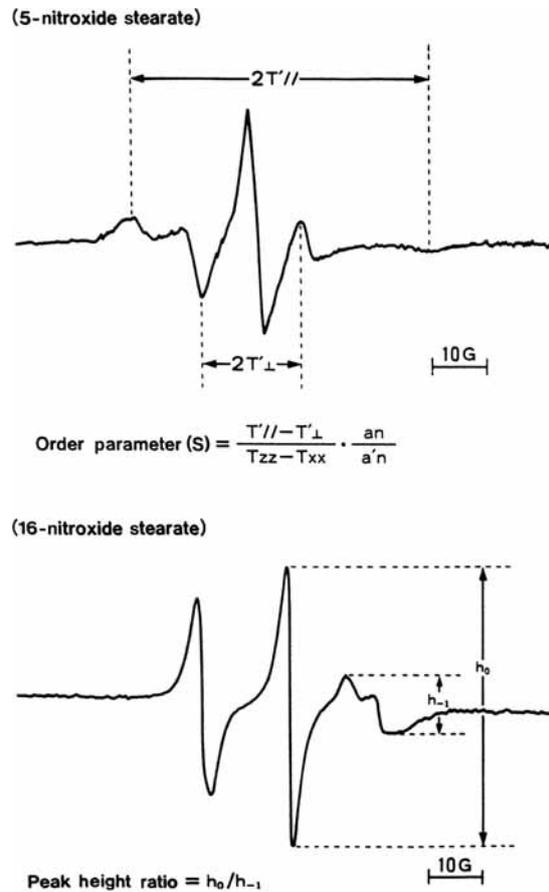


Figure 1 Electron paramagnetic resonance spectra for erythrocyte membranes. The greater the values of the order parameter (S) and the peak height ratio (h_0/h_{-1}), the lower the membrane fluidity of erythrocytes.

の低下にインスリンが関与し、その作用メカニズムの一部は細胞内へのCa²⁺流入を介するものと考えられる。

高血圧患者の細胞膜fluidityとインスリンとの関連について

赤血球膜より得られた order parameter(S)値ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})値は本態性高血圧群で正常血圧群に比し有意に高値を示した⁷)。この成績は先述のごとく、本態性高血圧患者の赤血球膜fluidityが正常血圧群に比し低下していることを表している。

次に本態性高血圧患者の血漿インスリン濃度を正常血圧者と比較検討した。血漿インスリン濃度は本態性

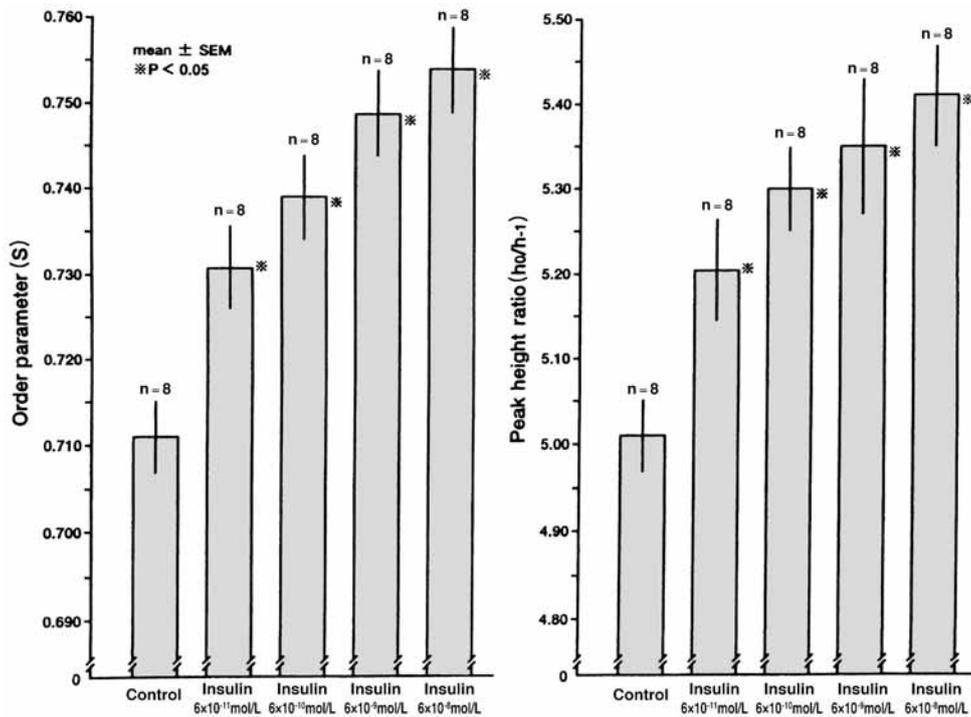


Figure 2 Effects of insulin on membrane fluidity of erythrocytes.

高血圧群で正常血圧群に比し有意に高値を示した(本態性高血圧群 $9.1 \pm 1.0 \mu\text{U/mL}$, $n = 16$, 正常血圧群 $5.6 \pm 0.5 \mu\text{U/mL}$, $n = 17$, $p < 0.05$)。さらに、血漿インスリン濃度とorder parameter(S)値ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})値の間には有意な正相関が認められた⁷⁾。このことは血漿インスリン濃度が高値であるほど赤血球膜fluidityが減少していることを示す成績であり、インスリンが高血圧の細胞膜fluidity調節に重要な役割を持つことを示唆している。一方、*in vitro*での成績ではインスリンによる細胞膜fluidity低下の度合いは高血圧患者で正常血圧者に比しむしろ減少しており⁶⁾、高インスリン血症に対する赤血球膜上のインスリンレセプター減少⁸⁾による代償的变化と考えられる。

高血圧患者の細胞膜fluidityとレプチンとの関連について

次にレプチンの細胞膜fluidityに対する影響をみてみると、レプチンは前述のインスリンとは異なり、濃度依存性に赤血球膜order parameter(S)値ならびにpeak height ratio(h_0/h_{-1})値を減少(細胞膜fluidityを上昇、膜

microviscosityを改善)させた(Fig. 3⁹⁾)。近年、赤血球にもNO合成酵素が存在し、NOが赤血球膜機能に重要な役割を果たす可能性が提唱され、われわれもNOが細胞膜fluidityを改善させることを示してきた⁴⁾。本研究においてもレプチンの赤血球膜fluidityに対する作用はNO donorであるL-arginineやS-nitroso-N-acetylpenicillamine,あるいは8-bromo-cGMPで有意に増強され、逆にNO synthase inhibitorであるN^G-nitro-L-arginine methylesterやasymmetric dimethylarginineで抑制された⁹⁾。この成績はレプチンの細胞膜fluidityに対する作用が一部にNOを介することを示唆している。また、レプチンの細胞膜fluidityに対する作用はCa-ionophore A23187で減弱することより、レプチンの作用はCaと拮抗するものと考えられた。一方、レプチンの作用は本態性高血圧患者で正常血圧者に比し有意に大であった¹⁰⁾。これらの成績はレプチンやNOがインスリンとはopposite effectを示すことによって膜microviscosityの悪化を防ぐ一つのdefense mechanismとして作用し、高血圧の細胞膜機能調節に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられる。さらに男性高血圧患者な

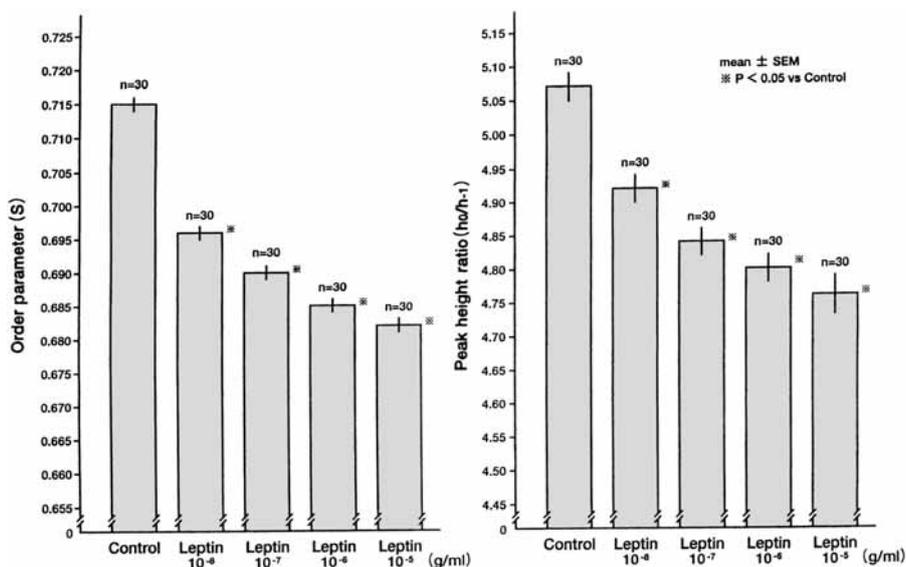


Figure 3 Effects of leptin on membrane fluidity of erythrocytes.

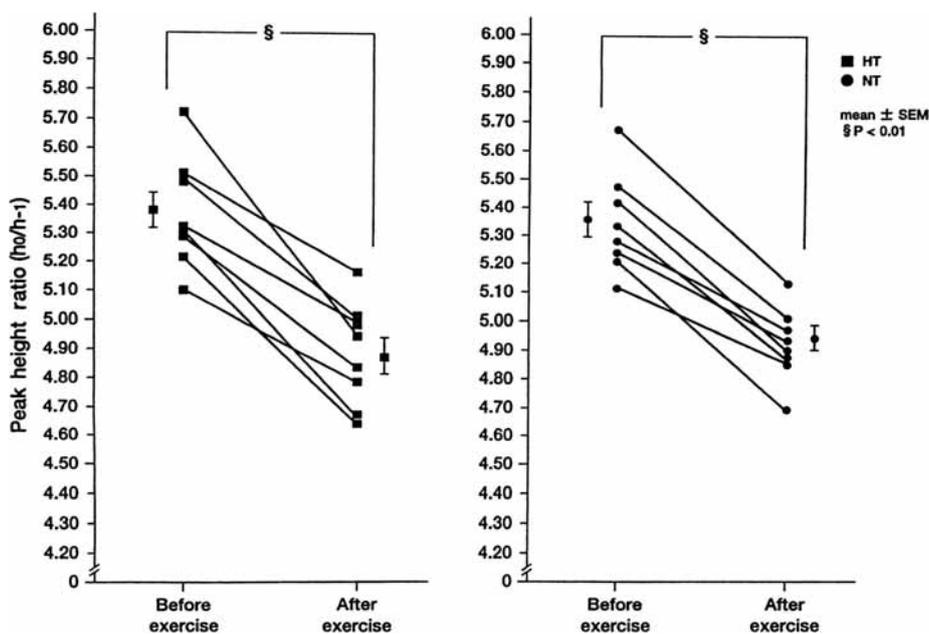


Figure 4 Effects of aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes. HT: hypertensive subjects, NT: normotensive subjects

らびに正常血圧者において、血漿NO代謝産物含量とレプチンとの間には有意な正相関が認められることより¹¹⁾、臨床的にもレプチンの作用はNOと一部関連があるものと考えられる。

有酸素運動療法の細胞膜fluidityに及ぼす影響について

次に有酸素運動療法の細胞膜fluidityに対する影響を

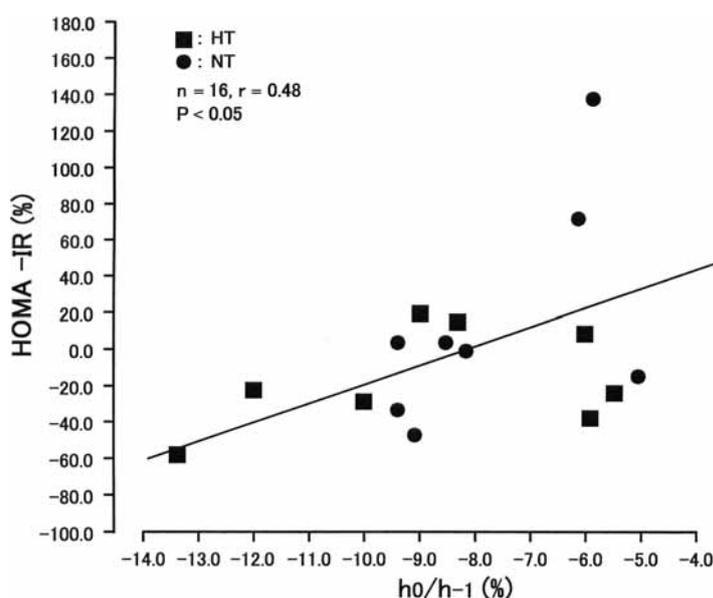


Figure 5 Relationship between exercise-induced changes in membrane fluidity of erythrocytes and HOMA-IR in hypertensive and normotensive subjects. HT: hypertensive subjects, NT: normotensive subjects, HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

検討した¹²⁾。ジョギングを中心とした運動療法を6カ月間施行すると高血圧群では平均血圧は有意に低下し、正常血圧者でも低下傾向を示した¹²⁾。Fig. 4は運動療法による赤血球膜fluidityの変化を示している。高血圧者、正常血圧者ともpeak height ratio(h_0/h_{-1})値は有意に減少(細胞膜fluidityは上昇)し、運動療法により膜microviscosityが改善していることが示された。さらに運動療法による細胞膜fluidityの改善の程度はHOMA-IR(homeostasis model assessment of insulin resistance)の変化と有意に相関した(Fig. 5)。この成績は運動療法による細胞膜fluidityの上昇がインスリン感受性の変化を伴うことを示し、有酸素運動療法により膜機能障害は改善しうる可能性を示唆するものと考えられる。

結 語

以上より、インスリンやレプチンなどの内分泌因子が細胞膜機能調節に重要な役割を果たし、その調和異常がメタボリックシンドロームの心血管病の成因に一部関与していると考えられる。また、細胞膜機能異常は有酸素運動療法などの治療により一部改善する可能性があることより、今後さらに内臓脂肪やメタボリックシンドロームに関連した内因性因子と細胞膜機能との関連、ならびにそれらの循環器疾患における意義について検討していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Tsuda K, Nishio I: Membrane fluidity and hypertension. *Am J Hypertens*, 2003, **16**: 259–261.
- 2) 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** (suppl III): III19–24.
- 3) Tsuda K, Kinoshita Y, Kimura K et al: Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effect of 17β -estradiol on membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1306–1312.
- 4) 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.
- 5) Sato B, Nishikida K, Samuels LT et al: Electron spin resonance studies of erythrocytes from patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 1978, **61**: 251–259.
- 6) Tsuda K, Kinoshita Y, Nishio I et al: Role of insulin in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2000, **13**: 376–382.
- 7) Tsuda K, Kinoshita Y, Nishio I et al: Hyperinsulinemia is a determinant of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 2001, **14**: 419–423.

- 8)Corry DB, Joolhar FS, Hori MT et al: Decreased erythrocyte insulin binding in hypertensive subjects with hyperinsulinemia. *Am J Hypertens*, 2002, **15**: 296–301.
- 9)Tsuda K, Kimura K, Nishio I: Leptin improves membrane fluidity of erythrocytes in humans via a nitric oxide-dependent mechanism - an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**: 672–681.
- 10)Tsuda K, Nishio I: Leptin and membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. An electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2004, **17**: 375–379.
- 11)Tsuda K, Nishio I: Leptin and nitric oxide production in normotensive and hypertensive men. *Obes Res*, 2004, **12**: 1223–1237.
- 12)Tsuda K, Yoshikawa A, Kimura K et al: Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, **30**: 382–386.

Abnormalities in Membrane Function and the Metabolic Syndrome —An Electron Paramagnetic Resonance Study—

Kazushi Tsuda

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

Key words: membrane fluidity, electron paramagnetic resonance, erythrocytes, insulin, leptin, exercise

Recent studies have shown that abnormalities in physical properties of the cell membranes may underlie the defects that are strongly linked to hypertension, stroke, and other cardiovascular diseases. In the present study, we examined the membrane fluidity (a reciprocal value of membrane microviscosity) of erythrocytes in hypertensive subjects with hyperinsulinemia and metabolic disorders using the electron paramagnetic resonance method. We demonstrated that membrane fluidity of erythrocytes was significantly lower in hypertensive subjects than in normotensive controls. It was shown that the higher the plasma insulin levels, the lower the membrane fluidity of erythrocytes. In an *in vitro* study, insulin alone and in combination with calcium markedly decreased membrane fluidity. In contrast, leptin increased membrane fluidity and improved the rigidity of cell membranes via the nitric oxide (NO)-dependent mechanism. Intervention with aerobic physical exercise significantly restored membrane fluidity with a concomitant amelioration of insulin-sensitivity. We propose that decreased membrane fluidity of erythrocytes might cause a disturbance in the blood rheologic behavior and the microcirculation, and that improvement of membrane function could partly contribute to the prevention against circulatory disorders in subjects with the metabolic syndrome.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2006, **46**: 359–364)