

## 高血圧の細胞膜機能異常と血管内分泌因子による調節機序からみたメタボリックシンドロームの病態生理 電子スピン共鳴法による検討

津田 和志

**要旨:**メタボリックシンドロームの基盤には内臓脂肪の蓄積があり、高血圧や心血管病変の成因となるが、その機序は明らかではない。本研究では高血圧を主体としたメタボリックシンドローム患者の細胞膜流動性 (fluidity) を電子スピン共鳴法にて測定し、肥満に関連した血管内分泌因子の膜機能に対する作用や治療による影響を検討した。高血圧患者の赤血球膜fluidityは正常血圧群に比べ低下していた。一方、血漿nitric oxide (NO) 代謝産物濃度が低く、内因性NO合成阻害物質 (asymmetric dimethylarginine: ADMA) 濃度が高いほど赤血球膜fluidityは低下していた。さらに血漿アディポネクチン濃度が高いほど赤血球膜fluidityは上昇し、両者とも血漿NO代謝産物濃度と有意な相関を示した。また、これら膜機能の悪化はCa拮抗薬のbenidipineにより有意に改善した。以上より肥満に関連した血管内分泌因子が高血圧の細胞膜機能に重要な影響を及ぼし、それらの調和破綻がメタボリックシンドロームの心血管病変の成因に一部関与する可能性が示唆された。

(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 391-395)

Key words: membrane fluidity, nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, adiponectin, benidipine

### 緒言

メタボリックシンドロームの基盤には内臓脂肪の蓄積があり、高血圧や心血管病変の成因となるが、その機序は明らかではない。最近、高血圧の病態生理を細胞膜機能異常からとらえようとする考え方が提唱されている。一方、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<sup>1)</sup>。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<sup>1-5)</sup>。このことは高血圧患者の細胞膜が固くなり、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。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、血管内分泌因子の膜機能に及ぼす影響をnitric oxide (NO) との関連から検討した。さらにCa拮抗薬の膜機能に対する影響について考察を加えた。

### 電子スピン共鳴法による赤血球膜fluidityの測定

本態性高血圧患者、ならびに正常血圧者<sup>6-8)</sup>を30分間安静臥床させた後、肘静脈より採血し洗滌赤血球を作成した。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、EPR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 3,280 ± 50 G, sweep time 8 min, response time 1.0 sec)<sup>2-5)</sup>。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

関西医療大学保健医療学部内科学分野循環器代謝疾患研究センター

2007年3月17日受付 2007年7月1日受理

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. 1)<sup>2-5)</sup>。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。各spectrumから算出したorder parameter(S)値ならびにpeak height ratio( $h_0/h_{-1}$ )値が大きいくほど細胞膜fluidityは低下していることを表している<sup>2-5)</sup>。

### 本態性高血圧患者の赤血球膜fluidity

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 (hypertensive subjects: HT)で正常血圧群 (normotensive controls: NT)に比し有意に高値を示した(S: HT  $0.729 \pm 0.002$ , mean  $\pm$  SEM, n = 27, NT  $0.719 \pm 0.002$ , n = 18,  $p < 0.01$ ;  $h_0/h_{-1}$ : HT  $5.28 \pm 0.02$ , n = 27, NT  $5.14 \pm 0.03$ , n = 18,  $p < 0.01$ )<sup>2)</sup>。この成績は、本態性高血圧群の赤血球膜fluidityが正常血圧群に比し低下していることを表している。

### 高血圧患者の赤血球膜fluidityとNOとの関連について

次に本態性高血圧患者の血漿NO代謝産物濃度を正常血圧者と比較検討した。血漿NO代謝産物濃度は本態性高血圧群で正常血圧群に比し有意に低値を示した(HT:  $37.3 \pm 1.9 \mu\text{mol/L}$ , n = 38; NT:  $52.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$ , n = 35,  $p < 0.001$ )<sup>3)</sup>。一方、内因性NO合成阻害物質 (asymmetric dimethylarginine: ADMA)濃度は高血圧群で正常血圧群に比し有意に高値であった(HT:  $0.42 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ , n = 38; NT:  $0.37 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ , n = 35,  $p < 0.05$ )<sup>3)</sup>。

さらに血漿NO代謝産物濃度と赤血球膜fluidityとの関連を検討してみると、血漿NO代謝産物濃度とorder parameter(S)値の間には有意な負の相関が (Fig. 2)<sup>3)</sup>、また、内因性NO合成阻害物質 (ADMA)濃度とorder parameter(S)値の間には有意な正の相関が認められた<sup>7)</sup>。このことは血漿NO代謝産物濃度が低く、内因性NO合成阻害物質 (ADMA)濃度が高いほど赤血球膜fluidityは低下していることを示す成績であり、NOが高血圧の細胞膜fluidity調節に重要な役割を果たしていることを示している。一方、*in vitro*の成績においてもNO donorであるS-nitroso-N-acetylpenicillamineは有意に細胞膜fluidityを上昇させることより<sup>9)</sup>、NOはmicrocirculationの改善に

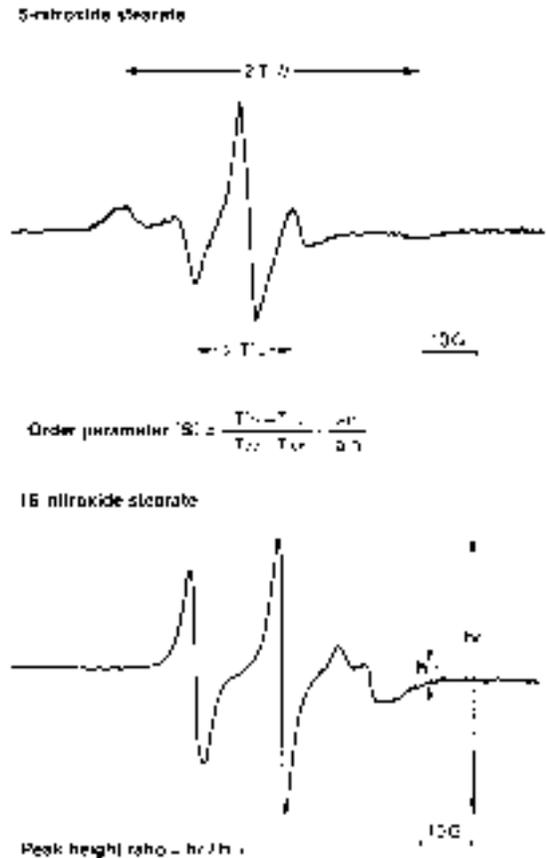
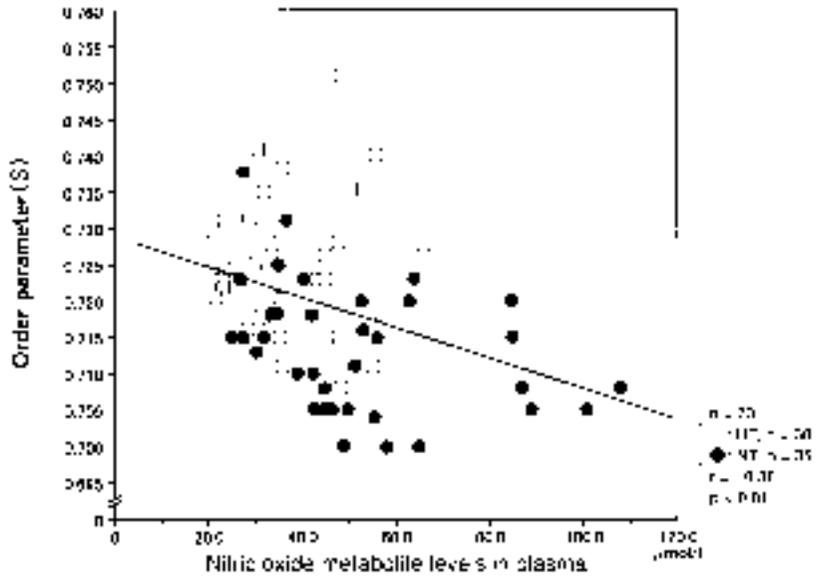


Figure 1 EPR spectra for erythrocyte membranes. The greater the values of the order parameter (S) and the peak height ratio ( $h_0/h_{-1}$ ), the lower is the membrane fluidity of erythrocytes.

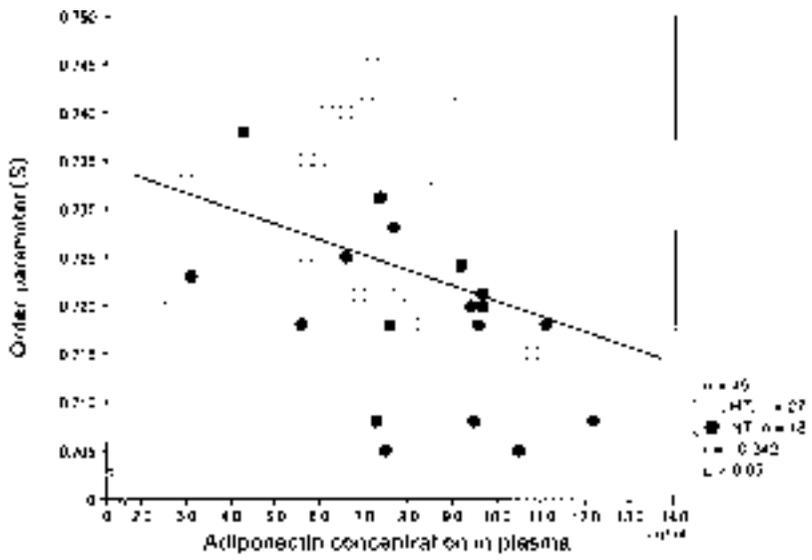
寄与する可能性が示唆される。

### 高血圧患者の赤血球膜fluidityとアディポネクチンとの関連について

本態性高血圧患者の血漿アディポネクチン濃度を正常血圧者と比較検討したところ、血漿アディポネクチン濃度は本態性高血圧群で正常血圧群に比し有意に低値を示した(HT:  $6.8 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ , n = 27; NT:  $8.2 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ , n = 18,  $p < 0.05$ )。また、血漿アディポネクチン濃度は血漿NO代謝産物濃度と有意に相関した<sup>6)</sup>。さらに、血漿アディポネクチン濃度とorder parameter(S)値 (Fig. 3)<sup>3)</sup>ならびにpeak height ratio( $h_0/h_{-1}$ )値の間には有意な負の相関が認められた<sup>6)</sup>。このことは血漿アディポネクチン濃度が低値であるほど赤血球膜fluidityが低



**Figure 2** Relationship between membrane fluidity of erythrocytes [order parameter (S)] and plasma NO metabolite levels in hypertensive and normotensive subjects. HT: hypertensive subjects, NT: normotensive controls



**Figure 3** Relationship between membrane fluidity of erythrocytes [order parameter (S)] and plasma adiponectin levels in hypertensive and normotensive controls. HT: hypertensive subjects, NT: normotensive controls

下していることを示す成績であり、アディポネクチンがNOを介して細胞膜 fluidity調節に重要な役割を果たすことを示唆している。

### 高血圧患者の赤血球膜 fluidity に及ぼす Ca拮抗薬の影響について

Fig. 4はCa拮抗薬であるbenidipineの赤血球膜 fluidityに

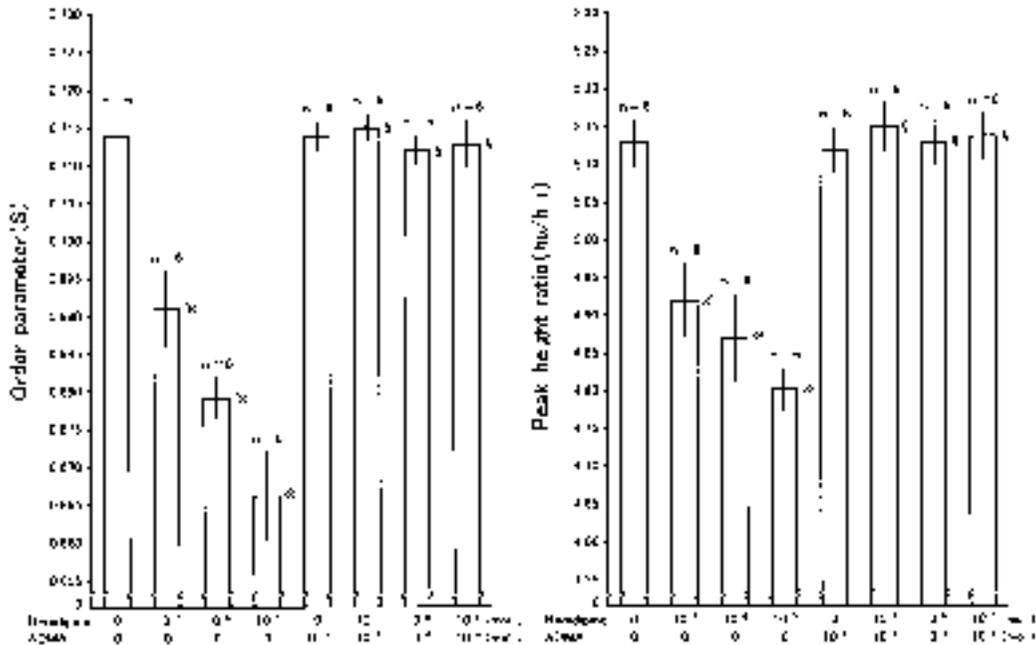


Figure 4 Effects of the Ca channel blocker benidipine in combination with ADMA on membrane fluidity of erythrocytes. mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$  vs control,  $\S p < 0.05$  vs same concentration of benidipine alone

対する影響を表している<sup>8)</sup>。benidipineは*in vitro*で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(膜fluidityを上昇, 膜microviscosityを改善)させた。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, われわれも先述のごとくNOが細胞膜fluidityを改善させることを示してきた<sup>9)</sup>。本研究においてbenidipine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合成阻害物質であるN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylesterやADMAで抑制された(Fig. 4)<sup>9)</sup>。このことはbenidipineの細胞膜fluidityに対する作用が一部NOを介することを示唆している。さらにこれらの成績はbenidipineが膜microviscosityの悪化を防ぐひとつの防御機序として作用し, 高血圧の細胞膜機能を改善しうる可能性を示唆していると考えられる。

### 結 語

以上より, NOやADMA, アディポネクチンなどの内

分泌因子が細胞膜機能調節に重要な役割を果たし, その調和異常が高血圧ならびにメタボリックシンドロームの心血管病変の成因に一部関与すると考えられる。また, これらの細胞膜機能異常はCa拮抗薬であるbenidipineにより一部改善する可能性がある。今後さらに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, メタボリックシンドロームの程度や罹病期間の細胞膜機能に及ぼす影響, ならびにそれらの循環器疾患における意義と治療による改善効果について検討してゆ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, Iwashita 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–III24.
- 3) 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 postmeno-

- pausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1306–1312.
- 4) Tsuda K, Nishio I: A selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, and membrane fluidity of erythrocytes in normotensive and hypertensive postmenopausal women: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2005, **18**: 1067–1076.
- 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: Adiponectin and membrane fluidity of erythrocytes in normotensive and hypertensive men. *Obesity*, 2006, **14**: 1505–1510.
- 7) Tsuda K, Nishio I: An association between plasma asymmetric dimethylarginine and membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive and normotensive men: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2005, **18**: 1243–1248.
- 8) Tsuda K, Nishio I: A calcium channel blocker, benidipine, improves cell membrane fluidity in human subjects via a nitric oxide-dependent mechanism. An electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens*, 2004, **17**: 1143–1150.
- 9) 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.

## Modulatory Effects of Vascular Humoral Factors on Membrane Function in Hypertension and the Metabolic Syndrome —Electron Paramagnetic Resonance Study

Kazushi Tsuda

Cardiovascular and Metabolic Research Center, Kansai University of Health Sciences, Osaka, Japan

**Key words:** membrane fluidity, nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, adiponectin, benidipine

It has been shown that abnormalities in physical properties of the cell membranes may underlie the defects that are closely linked to hypertension, stroke, and other cardiovascular diseases. In this study, we examined the membrane fluidity (a reciprocal value of membrane microviscosity) of erythrocytes in hypertensive subjects with metabolic disorders using an 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 lower the plasma nitric oxide (NO) metabolite levels, the lower the membrane fluidity of erythrocytes. In contrast, the higher the plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, the lower the membrane fluidity of erythrocytes. Plasma adiponectin levels were significantly decreased in hypertensive subjects compared with normotensive subjects. The reduced membrane fluidity of erythrocytes was associated with lower plasma adiponectin levels. In an *in vitro* study, the Ca channel blocker benidipine significantly restored membrane fluidity of erythrocytes, which was counteracted by ADMA. On the basis of our findings, decreased membrane fluidity of erythrocytes appear to cause disturbance in the blood rheologic behavior and microcirculation, and improvement in membrane function may partly contribute to prevention against circulatory disorders in subjects with hypertension and the metabolic syndrome.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 391–395)