

血管内分泌因子による調節機構からみた高血圧ならびに メタボリックシンドロームの細胞膜機能異常と心血管病変 —電子スピン共鳴法を用いた検討—

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細胞レベルでの機序は明らかではない。最近、高血圧や心血管病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。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、肥満に関連した内分泌因子の膜機能に対する作用や心血管病変との関連を検討した。高血圧患者の赤血球膜 fluidity は正常血圧群に比べ低下し、微小循環障害につながる可能性が示唆された。また膜 fluidity 低下群では high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) が高値であり、細胞膜機能異常が心血管病変に一部関連していると考えられた。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)濃度が高いほど膜 fluidity は低下していた。さらに高血圧では血漿ホモシステイン濃度が正常血圧群に比して高値で、膜 fluidity ならびに血漿 NO 代謝産物の低下と有意に相関した。また、これら膜機能障害は減塩や一部の降圧薬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合併症の成因に一部関与すると考えられた。

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 59-63)

Key words: membrane fluidity, nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, high-sensitivity CRP, homocysteine

緒 言

肥満は高血圧、糖尿病をはじめとする生活習慣病の危険因子のひとつであり、メタボリックシンドロームの基盤となるが、肥満の血圧上昇作用や心血管病変を引き起こすメカニズムについては不明な点が多い。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ている¹⁾。既に我々は電子スピン共鳴(electron spin resonance: ESR)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

細胞膜流動性(fluidity)が高血圧群で低下(microviscosityが悪化)していることを報告した²⁻⁹⁾。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、肥満に関連した内分泌因子の膜機能に対する作用や心血管病変との関連を検討した。

電子スピン共鳴法による 赤血球膜流動性 (fluidity) の測定

本態性高血圧患者、ならびに正常血圧者を 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) でスピンラベルを行い、電子スピン共鳴 (ESR) 装置にて細胞膜流動性 (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 sec)²⁻⁹⁾。スピンラベル剤の 5-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、スピンラベル剤が細胞膜に取り込まれた状態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)²⁻⁹⁾。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²⁻⁹⁾。

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 (S: HT 0.725 ± 0.001, mean ± SEM, n = 38, NT 0.713 ± 0.001, n = 35, P < 0.001)⁷⁾。この成績は、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。

高血圧患者の赤血球膜 fluidity と asymmetric dimethylarginine (ADMA) との関連について

近年、赤血球にも nitric oxide (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、我々も NO が細胞膜 fluidity を改善させることを示してきた⁹⁾。一方、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⁷⁾。対照的に内因性 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 ± 0.01 μmol / L, n = 38, NT 0.37 ± 0.01 μmol / L, n = 35, P < 0.05)⁷⁾。また、NO 代謝産物濃度と order parameter (S) 値の間には有意な負の相関が、さらに内因性 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 (Fig. 2)⁷⁾。

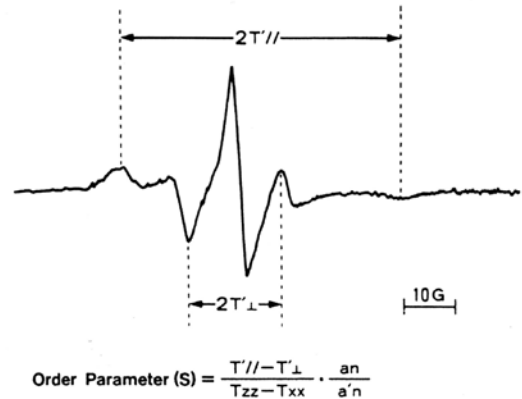


Figure 1 Electron spin resonance (ESR) spectrum for 5-nitroxide stearate in erythrocyte membranes. The greater the order parameter (S) was, the lower was the membrane fluidity of erythrocytes.

これは血漿 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唆するものと考えられる。

高血圧患者の赤血球膜 fluidity と high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) との関連について

次に炎症反応を示す指標であり、動脈硬化の進展と深く関連するとされる high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) の血漿濃度を本態性高血圧患者、正常血圧者との間で比較検討した。血漿 hs-CRP 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 (HT 0.157 ± 0.022 mg / dL, n = 29, NT 0.072 ± 0.009 mg / dL, n = 18, P < 0.01)。さらに hs-CRP 値と order parameter (S) 値の間には有意な正の相関が認められた (r = 0.416, n = 47, P < 0.01)。これは血漿 hs-CRP 値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、hs-CRP 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。また、hs-CRP 値は血漿 NO 濃度と逆相関した (r = -0.291, n = 47, P < 0.05)。一方、in vitro の成績において CRP は NO 合成酵素活性を抑制することが報告されていることから¹⁰⁾、CRP は NO 産生を抑制することにより赤血球膜 fluidity を低下させている可能性が考えられた。

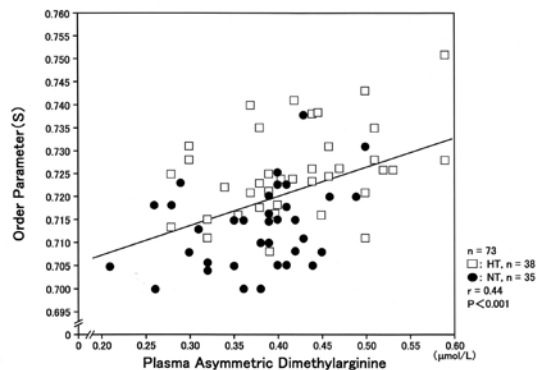


Figure 2 Relationship between membrane fluidity of erythrocytes (order parameter: S) and plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in hypertensive and normotensive subjects.

HT: hypertensive subjects, NT: normotensive subjects

高血圧患者の赤血球膜 fluidity とホモシステインとの関連について

本態性高血圧患者の血漿ホモシステイン濃度を正常血圧者と比較検討したところ、血漿ホモシステイン濃度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 (HT $12.9 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$, $n=27$, NT $9.9 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$, $n=19$, $P<0.05$)。また、血漿ホモシステイン濃度は血漿 NO 代謝産物濃度と有意に逆相関した ($r=-0.339$, $n=46$, $P<0.05$)¹¹⁾。さらに、血漿ホモシステイン濃度と order parameter (S) 値の間には有意な正の相関が認められた (Fig. 3)¹¹⁾。これは血漿ホモシステイン濃度が高値であるほど赤血球膜 fluidity が低下していることを示す成績であり、ホモシステインが NO の減少を介して細胞膜 fluidity 調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。

高血圧患者の赤血球膜 fluidity と食塩摂取量との関連について

次に本態性高血圧患者の食塩摂取量による細胞膜 fluidity の変化について検討した¹²⁾。Fig. 4 は本態性高血圧患者の摂取食塩量に伴う赤血球膜 fluidity の変動を示したものである。食事内容を食塩摂取量 ($5\sim7 \text{g/day}$) から 1 週間減塩食 ($2\sim3 \text{g/day}$) にすると赤血球膜 fluidity は改善するが (order parameter 値は低下)、高食塩食 (10g 以上 / day) を 1 週間摂取すると赤血球膜 fluidity は再び

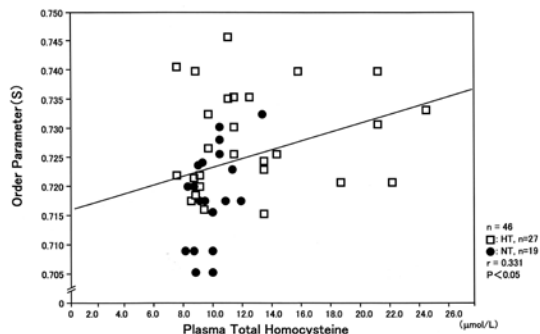


Figure 3 Relationship between membrane fluidity of erythrocytes (order parameter: S) and plasma homocysteine levels in hypertensive and normotensive subjects.

HT: hypertensive subjects, NT: normotensive subjects

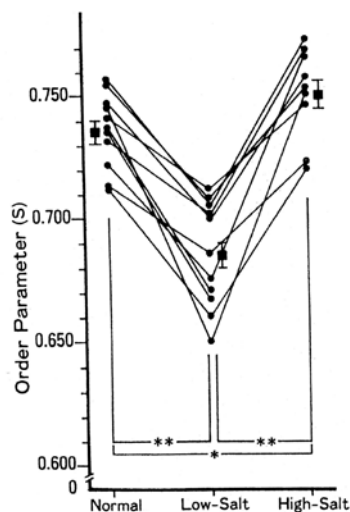


Figure 4 Effects of salt intake on membrane fluidity of erythrocytes (order parameter: S) in subjects with essential hypertension.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

低下する (order parameter 値は大きくなる)¹²⁾。食塩摂取量と膜機能との関連についてはなお不明な点が多いが、高塩食は内皮機能を減弱させることが報告されており¹³⁾、減塩による NO bioavailability の改善が膜 fluidity の上昇につながる可能性が考えられる。

高血圧患者の赤血球膜 fluidity に及ぼす benidipine の影響について

Ca 拮抗薬である benidipine を本態性高血圧患者に経

口投与すると、赤血球膜 order parameter (S)値が有意に減少(膜 fluidity は上昇, 膜 microviscosity は改善)した¹⁴⁾。さらにその変化は有意な降圧と血漿 NO 濃度の上昇を伴っていた¹⁴⁾。我々は既に *in vitro* において benidipine が NO を介して赤血球膜 fluidity を改善させることを報告しているが⁸⁾、今回の成績と一致するものと考えられる。さらにこれらの成績は benidipine が膜 microviscosity の悪化を防ぐひとつの defense mechanism として作用し、高血圧の細胞膜機能を改善し得る可能性を示唆していると考えられる。

結 語

以上より、心血管病変の指標である CRP やホモシステインなどの内分泌因子が NO を介して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減塩や 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詳細に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): III–19–24.
- 3) Tsuda K, Kinoshita Y, Kimura K et al: Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effect of 17 β -estradiol on membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal 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. *Am J Hypertens*, 2005, **18**: 1243–1248.
- 8) Tsuda K, Nishio I: A calcium channel blocker, benidipine, improves 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.
- 10) Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I et al: Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 2002, **106**: 1439–1441.
- 11) Tsuda K: Hyperhomocysteinemia and membrane fluidity of red blood cells in normotensive and hypertensive men: an electron paramagnetic resonance investigation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, **34** (suppl 1): S70–72.
- 12) Masuyama Y, Tsuda K, Shima H et al: Membrane abnormality of erythrocytes is highly dependent on salt intake and renin profile in essential hypertension—an electron spin resonance study. *J Hypertens*, 1988, **6** (suppl 4): 266–268.
- 13) Tzemos N, Lim PO, Wong S et al: Adverse cardiovascular effects of acute salt loading in young normotensive individuals. *Hypertension*, 2008, **51**: 1525–1530.
- 14) Tsuda K: Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effect of benidipine on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Heart Vessels*, 2008, **23**: 134–139.

Membrane Fluidity of Erythrocytes and Cardiovascular Disorders in the Metabolic Syndrome—An Electron Spin Resonance Study—

Kazushi Tsuda

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

Key words: membrane fluidity, nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, high-sensitivity CRP, homocysteine

It has been shown that abnormalities in the physical properties of cell membranes may underlie the defects that are strongly 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 by using an electron spin resonance method. We demonstrated that membrane fluidity of erythrocytes was significantly lower in hypertensive subjects than in normotensive subjects. It was shown that the reduced membrane fluidity of erythrocytes was associated with decreased plasma nitric oxide (NO) metabolite and increased asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels. Plasma high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and homocysteine levels were significantly higher in hypertensive subjects than in normotensive subjects. Membrane fluidity of erythrocytes was inversely correlated with plasma hs-CRP and homocysteine levels. Low-salt intake significantly improved membrane fluidity of erythrocytes in subjects with essential hypertension. Administration of the calcium channel blocker, benidipine, also ameliorated membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive subjects with a concomitant increase in plasma NO metabolite levels. We propose that the reduced membrane fluidity of erythrocytes might cause a disturbance in blood rheologic behavior and microcirculation, and might have a crucial role in the pathogenesis of circulatory disorders in subjects with hypertension and the metabolic syndrome.

(J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 59–63)