

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590901

研究課題名(和文)細胞膜機能と骨代謝動態からみたメタボリックシンドロームの病態生理

研究課題名(英文) Membrane Function and Bone-Metabolism in the Pathophysiology of the Metabolic Syndrome

研究代表者

津田 和志 (TSUDA, KAZUSHI)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90217315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高血圧での慢性腎臓病(CKD)と細胞膜機能異常との関連を検討した。高血圧患者の赤血球膜fluidityは正常血圧群に比し低下していた。また、estimated-glomerular filtration rate(eGFR)が低いほど膜fluidityは減少し、eGFRと膜fluidityの低下は酸化ストレスの増加や血漿nitric oxide代謝産物の減少と有意に相関した。一方、高齢女性高血圧患者の骨塩含量は正常血圧群に比し減少していた、以上からCKDによる膜機能調節機構や骨代謝動態が高血圧やメタボリックシンドロームの成因に一部関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to examine possible relationship between kidney function and membrane fluidity of red blood cells (RBCs) in hypertensive and normotensive subjects using an electron spin resonance and spin-labeling method. Membrane fluidity was significantly decreased in hypertensive subjects. The decreased eGFR value might be associated with reduced membrane fluidity of RBCs, suggesting that CKD might have a close correlation with microcirculatory disorders. The reduced levels of both membrane fluidity of RBCs and eGFR were associated with increased plasma 8-iso-prostaglandin F2alpha (an index of oxidative stress) and decreased plasma nitric oxide-metabolites. On the other hand, bone mineral density was significantly lower in hypertensive elderly women than in normotensive elderly women. We propose that CKD-related changes in membrane function and bone-metabolism might have a crucial role in the pathophysiology of hypertension and the metabolic syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：高血圧 メタボリックシンドローム 細胞膜fluidity 電子スピン共鳴 赤血球 nitric oxide 酸化ストレス 慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜 microviscosity は細胞の変形能、可塑性と密接に結びついており、微小循環調節に重要な役割を果たしている。一方、高血圧に伴う腎動脈硬化症(腎硬化症)は chronic kidney disease (CKD) の最大原因のひとつである。そして心腎連関により CKD 自身が心血管疾患の危険因子となり、腎機能低下は循環障害を引き起こすが、そのメカニズムは不明である。本研究では、高血圧の病態生理を細胞膜レベルの変化からみるため、その細胞膜機能を電子スピン共鳴法にて測定し、高血圧による CKD と微小循環障害との関連を細胞膜機能異常や酸化ストレス、ならびに内皮機能不全の関与から考察した。さらに近年、高血圧を中心とする生活習慣病と骨代謝との間に共通の病因、病態の存在が示唆されている。この様に心血管系をはじめ、血球成分や骨組織をも含む広範な組織に存在すると考えられる高血圧やメタボリックシンドロームの細胞膜異常と情報伝達系の変化を細胞レベルから解析し、その調節機構を検討することは新しい試みであり、メタボリックシンドローム、ならびに骨代謝異常の成因の解明や病態を理解するのみならず、その治療効果の判定や合併症を予防する上で有意義であると考えられる。

## 2. 研究の目的

最近、高血圧に伴う chronic kidney disease (CKD)自身が心血管疾患の危険因子となり、腎機能低下は循環障害を引き起こすことが報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では高血圧による CKD と微小循環障害との関連を、細胞膜機能異常や酸化ストレス、ならびに内皮機能不全の関与から検討した。また、本態性高血圧患者ならびに正常血圧者の骨塩含量を測定した。

## 3. 研究の方法

### I. 高血圧の細胞膜機能異常と腎機能、ならび

### に血管内分泌因子との関連について

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、生理食塩水にて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 (electron spin resonance: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 0.2 mT(tesla), scan width  $328\pm 5$  mT(tesla), sweep time 8 min, response time 1.0 sec)。そして各 spectrum から order parameter (S)を算出し、細胞膜 fluidity の指標とする。すなわち、order parameter (S) 値の大きいほど、細胞膜 fluidity は低下していることを表している。

### II. 高血圧の骨塩含量の変化について

本態性高血圧患者ならびに正常血圧者の骨塩含量 (bone mineral density:BMD)を dual energy X-ray absorptiometry (DXA) 法にて測定した。

統計学的検討には analysis of variance (ANOVA), Student's t-test, Wilcoxon signed rank-sum test, Mann-Whitney U-test、ならびに multiple regression analysis を用い、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) 高血圧患者の赤血球膜 Fluidity

本法を用いて赤血球膜より得られた order parameter (S) 値は高血圧群で正常血圧群に比し有意に高値を示し、高血圧患者の赤血球膜 fluidity が正常血圧者に比し低下していることが示された。この成績より、高血圧では赤血球膜機能からみた微小循環機構が障害されている可能性が考えられる。

### (2) 赤血球膜 Fluidity と Estimated Glomerular Filtration Rate(eGFR)との関連

高血圧患者の estimated glomerular

filtration rate (eGFR) は正常血圧群に比し、有意に減少していた。さらに赤血球膜の order parameter (S) 値は eGFR と有意に逆相関した。この成績は eGFR が減少しているほど、赤血球膜 fluidity が低下していることを示している。また、多変量解析にて年齢、body mass index(BMI)、血清総コレステロール値、血糖値、収縮期血圧値を補正後も、eGFR は赤血球膜 fluidity の独立した予測因子であった。

### (3) 赤血球膜 Fluidity と血中酸化ストレス、血漿 Nitric Oxide (NO) レベルとの関連

我々は血中酸化ストレスレベルの指標として血漿 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-isoPGF<sub>2α</sub>) 濃度を測定した。血漿 8-isoPGF<sub>2α</sub> 濃度は高血圧群で正常血圧群に比し有意に増加していた。また、赤血球膜の order parameter (S) 値は血漿 8-isoPGF<sub>2α</sub> 濃度と有意に相関した。この成績は血中酸化ストレスレベルが高いほど、赤血球膜 fluidity が低下していることを示している。

一方、我々は内皮機能の指標のひとつとして血漿 nitric oxide (NO) 濃度を測定した。高血圧群では正常血圧群に比し血漿 NO 濃度は有意に減少していた。また、血漿 NO 濃度は血漿 8-isoPGF<sub>2α</sub> 濃度、ならびに赤血球膜の order parameter (S) 値と有意な負の相関を示した。この成績は血漿 NO 濃度が低いほど、血中酸化ストレスが高く、赤血球膜 fluidity は低下していることを示している。

### (4) 高血圧の Estimated Glomerular Filtration Rate(eGFR) と血中酸化ストレス、血漿 Nitric Oxide (NO) レベルとの関連

本研究において我々は高血圧患者ならびに正常血圧者の eGFR は血漿 8-isoPGF<sub>2α</sub> 濃度と有意な逆相関を示し、血漿 NO 濃度と正相関することを見出した。これらの成績は腎機能低下が酸化ストレスや内皮機能不全と密接に関連している可能性を示唆するものと考えられる。

### (5) 高血圧患者の骨塩含量

全身の Ca 代謝調節ならびに骨代謝動態のひとつの指標として dual energy X-ray absorptiometry (DXA) 法による骨塩含量測定を施行し、その基礎的検討を行った。高血圧患者で正常血圧対照群に比し骨塩含量 (BMD) が低下し、特に高齢女性高血圧患者では骨塩含量の減少が著明であることが示された。

### 総括と結語

本研究から高血圧による CKD は膜機能調節に重要な役割を果たし、腎硬化症に関連する血管内分泌因子の調和異常が心血管病変の成因に一部関与すると考えられた。一方、高血圧患者で骨塩含量が有意に低下し、特に女性高血圧患者では骨塩含量の減少が著明であった。この成績はメタボリックシンドロームの構成因子である高血圧が骨代謝動態に重要な役割を果たし、動脈硬化における血管の石灰化、骨から血管への Ca-shift theory、ならびに骨血管相関のメカニズムを一部説明し得るものと考えられた。以上から、心血管系をはじめ血球成分や骨組織をも含む広範な組織に存在すると考えられる高血圧やメタボリックシンドロームの細胞膜異常と情報伝達系の変化を細胞レベルから解析し、その調節機構を検討することは新しい試みであり、メタボリックシンドロームならびに骨代謝異常の成因の解明や病態を理解するのみならず、その治療効果の判定や合併症を予防する上で有意義であると考えられる。

### 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)

[雑誌論文](計 24 件)

1) **Tsuda K**: Role of hyperleptinemia in the regulation of cardiac function.

**Hypertension**. 2014;63:e1.

2) **Tsuda K**: Sympatho-inhibitory effect of diltiazem and prevention of aneurysm

formation. *Hypertension*. 2014;63:e12.

3) **Tsuda K**: Asymmetric dimethylarginine and DDAH transcript variants in cardiovascular and cerebrovascular diseases.

*Am J Hypertens*. 2014;27:497.

4) **Tsuda K**: Letter regarding article, Serum alkaline phosphatase and phosphate in cerebral atherosclerosis and functional outcomes after cerebral infarction.

*Stroke*. 2014;45:e46.

5) **Tsuda K**: Chronic kidney disease predicts impaired membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects. an electron spin resonance study.

*Int Heart J*. 2013;54:154-159.

6) **Tsuda K**, Nautiyal M, Chappell MC, Diz DI: Angiotensin-(1-7) and bradykinin in baroreceptor reflex sensitivity in hypertension. *Hypertension*. 2013;61:e19-20.

7) **Tsuda K**, Carter JR, Fu Q, Minson MT, Joyner MJ: Roles of sex steroid hormones and nitric oxide in the regulation of sympathetic nerve activity in women.

*Hypertension*. 2013;61:e36-37.

8) **Tsuda K**, Brambilla P, Antolini L, Street ME, Giussani M, Galbiati S, Valsecchi MG, Stella A, Zucchotti GV, Bernasconi S, Genovsi S: Low serum adiponectin levels and endothelial dysfunction in childhood hypertension. *Am J Hypertens*. 2013;26:717-718.

9) **Tsuda K**: Hyperhomocysteinemia and oxidative stress levels are associated with impaired membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance investigation. *Int J Clin Med*. 2013;4:58-65.

10) **Tsuda K**, Pena-Silva RA, Faraci FM, Heistad DD: Letter regarding article, Impact of ACE2 deficiency and oxidative

stress on cerebrovascular function with aging. *Stroke*. 2013;44:e34-35.

11) **Tsuda K**, Xing W, Ji L, Li Y, Gao F, Yan W, Liu P, Sun L, Tao L, Zhang H: Hypoadiponectinemia and endogenous nitric oxide synthase inhibitor in hypertension. *Hypertension*. 2013;62:e4-5.

12) **Tsuda K**, Staalso JM, Romner B, Olsen NV: Letter regarding article, Low plasma arginine:asymmetric dimethylarginine ratios predict mortality after intracranial aneurysm rupture. *Stroke*. 2013;44:e92-93.

13) **Tsuda K**, Vargic J, Ferrario M: Angiotensin-(1-7) in the central nervous system regulation of blood pressure and renin-angiotensin system.

*Am J Hypertens*. 2013;26:1174-1175.

14) **Tsuda K**, Ye ZU, Li DP, Pan HL: Glutamate receptors and presympathetic neuronal hyperactivity of the central nervous system in hypertension.

*Hypertension*. 2013;62:e33-34.

15) **Tsuda K**: Chronic kidney disease and membrane microviscosity in hypertension -an electron spin resonance study. *J Jpn Coll Angiol*. 2013;53:179-183.

16) **Tsuda K**, Ovbiagele B, Kidwell CS: Letter regarding article, Association of Chronic kidney disease with cerebral microbleeds in patients with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2013;44:e231-232.

17) **Tsuda K**, Dimeo F, Pagonas N, Westhoff TH: Aerobic exercise and circulatory dysfunction in resistant hypertension. *Hypertension*. 2012;60:e45-46.

18) **Tsuda K**: Associations between high-sensitivity C-reactive protein and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive elderly men:an electron spin

resonance study.

**Int J Hypertens.** 2012;2012:292803.  
doi.10.1155/2012/292803.

19) **Tsuda K**: Renin-angiotensin system and sympathetic neurotransmitter release in the central nervous system of hypertension.

**Int J Hypertens.** 2012;2012:474870.  
doi.10.1155/2012/474870.

20) **Tsuda K**: Associations of oxidative stress and inflammation and their role in the regulation of membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance investigation.

**Adv Biosci Biotech.**2012;3:1020-1027.

21) **Tsuda K**: Roles of adiponectin and oxidative stress in the regulation of membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive men –an electron spin resonance study. **Journal of Obesity.** 2011;2011:548140.doi.10.1155/2011/54814.

22) **Tsuda K**, Knottnerus ILH, Staals J, van Oostenbrugge RJ: Letter regarding article, Endothelial activation in lacunar stroke subtype. **Stroke.** 2011;42:e34-35.

23) **Tsuda K**, Walker MD, Silverberg SJ: Letter regarding article, Vitamin D deficiency is associated with subclinical carotid atherosclerosis: the Northern Manhattan study. **Stroke.** 2011;42:e639-640.

24) **Tsuda K**, Chrissobolis S, Russo AF, Faraci FM: Letter regarding article, Receptor activity-modifying protein-1 augments cerebrovascular responses to calcitonin gene-related peptide and inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction. **Stroke.** 2011; 42:e24-25.

[学会発表](計 13 件)

1) **津田和志**:細胞膜機能からみた高血圧の血管内皮障害と Adipokine による調節機構-電子スピン共鳴法を用いた検討- .第 5 4 回日本脈管学会総会シンポジウム. 2 0 1 3 年 1 0 月, 東京 .

2) **Tsuda K**: Resistin predicts impaired membrane microviscosity of red blood cells and microcirculatory dysfunction in hypertensive men: an electron spin resonance study. Featured Research Sessions at the 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March, 2013.Tokyo, Japan.

3) **Tsuda K**: Cystatin C predicts membrane microviscosity of red blood cells and microcirculatory dysfunction in hypertension -an electron spin resonance study. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March, 2013, Tokyo, Japan.

4) **Tsuda K**: Resistin is associated with chronic kidney disease (CKD) and microcirculatory dysfunction in hypertensive subjects. The 36th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension. October, 2013, Osaka, Japan.

5) **津田和志**:電子スピン共鳴からみた高血圧の細胞膜 Microviscosity と腎動脈硬化 -特に CKD 関連動脈硬化と酸化ストレスとの関連から-. 第 5 3 回日本脈管学会シンポジウム. 2 0 1 2 年 1 0 月. 東京.

6) **Tsuda K**: Oxidative stress, hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive men -an electron spin resonance study. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March, 2012, Fukuoka, Japan.

7) **Tsuda K**: Chronic kidney disease predicts impaired membrane microviscosity of red blood cells and microcirculatory disorders in hypertension: an electron spin resonance study. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March, 2012, Fukuoka, Japan.

8) **Tsuda K**: Chronic kidney disease with albuminuria is associated with impaired membrane microviscosity in hypertensive subjects: an electron spin resonance study. The 35th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension (International Session). September, 2012, Nagoya, Japan.

9) **Tsuda K**: Role of hypercholesterolemia in the regulation of membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance study. Asian Pacific Stroke Conference 2012, September, 2012, Tokyo.

10) **Tsuda K**: Adiponectin and oxidative stress in the regulation of membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance study. Asian Pacific Stroke Conference 2012, September, 2012, Tokyo.

11) **Tsuda K**: Electron spin resonance study on the modulatory effect of benidipine, a Ca-channel blocker, on membrane microviscosity of erythrocytes in hypertensive subjects. Asian Pacific Stroke Conference 2012, September, 2012, Tokyo.

12) **Tsuda K**: Electron spin resonance study on modulatory effects of a Ca-channel blocker, benidipine, on membrane microviscosity of erythrocytes in

hypertensive subjects. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Nephrology, June, 2011, Yokohama, Japan.

13) **Tsuda K**: Electron spin resonance study on modulatory effects of adiponectin and oxidative stress on membrane microviscosity of erythrocytes in hypertensive men. The 34th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension. October, 2011, Utsunomiya, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

1) **Tsuda K**: Bone mineral density in men and women with essential hypertension. In '**Hypertension and Bone Loss**', edited by Afroz Afghani, pp.15-28. 2011, Nova Science Publishers, Inc., New York, NY, USA.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 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 0 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 なし

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
関西医療大学保健医療学部(教授)  
津田和志  
研究者番号：90217315