

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460926

研究課題名(和文)細胞膜機能と骨血管相関からみた高血圧ならびに肥満関連生活習慣病の病態生理

研究課題名(英文)Membrane Function and Bone-Blood Vessel Interaction in 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高血圧の細胞膜機能と内皮障害との関連について、細胞膜機能における nitric oxide (NO) や adipokine の役割とその調節機構を中心に検討した。高血圧患者の赤血球膜 fluidity は正常血圧群に比し有意に低下していた。さらに adipokine であるレジスチンの血中濃度と血漿 NO 代謝産物レベルとは有意な逆相関を示し、レジスチンの増加は膜 fluidity の低下を伴っていた。一方、高齢高血圧女性では対照群に比し骨塩含量は有意に減少していた。以上から、adipokine による膜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病態生理に深く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 is to elucidate the possible relationships among adipokines, endothelial function and membrane fluidity of red blood cells (RBCs) in hypertensive and normotensive subjects using an electron spin resonance (ESR) and spin-labeling method. The ESR study demonstrated that membrane fluidity was significantly decreased in hypertensive subjects compared with normotensive subjects. Furthermore, higher levels of plasma resistin were associated with decreased levels of plasma nitric oxide (NO) metabolites and reduced membrane fluidity of RBCs. On the other hand, bone mineral density was significantly lower in hypertensive elderly women than in normotensive elderly women. We propose that adipokine-mediated 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

キーワード：高血圧
塩含量 メタボリックシンドローム 膜 fluidity 電子スピン共鳴 赤血球 Adipokine 内皮機能 骨

1. 研究開始当初の背景

微小循環障害は脳血管疾患や虚血性心疾患の一因となるが、そのメカニズムとして内皮機能不全や、レオロジー的な面から赤血球膜などの細胞膜機能異常が注目されてきた。最近、細胞膜の physicochemical properties のひとつである膜流動性 (fluidity) は、膜の可塑性や変形能、さらには膜の酵素活性を規定する重要な因子として考えられ、細胞の収縮など各種の生理反応に関与する可能性が示されている。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を用いて、赤血球膜や血管平滑筋細胞の膜 fluidity が高血圧群で低下していることを報告した。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、微小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。そして、細胞膜レベルから高血圧における各組織に共通した異常を解明することは、メタボリックシンドロームの病態生理を理解する上で重要と考えられるが、その調節メカニズムについては明らかではない。本研究では、メタボリックシンドロームをはじめとする肥満関連生活習慣病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、特に高血圧における微小循環障害を細胞膜機能異常や内皮機能不全、adipokine などの肥満関連血管作動物質の関与から考察する。

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。本研究では高血圧患者における骨代謝動態を骨塩含量の変化から観察し、全身の Ca 代謝と高血圧との関連について検討を加える。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、肥満関連生活習慣病や骨代謝異常の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

血管内皮障害による nitric oxide (NO) 作用不全は高血圧をはじめ循環器疾患の成因のひとつであるが、その調節機構については不明な点が多い。本研究ではまず、高血圧の細胞膜機能と内皮機能との関連、ならびに膜機能における各種肥満関連内分泌因子の役割とその調節機構を中心に検討を加えた。

一方近年、生活習慣病と骨代謝の間に共通の病因、病態の存在が示唆されている。そして細胞レベルでの Ca 代謝異常は全身の Ca-balance と関連し、さらにそれは動脈硬化の特徴のひとつである血管壁 Ca 沈着とも密接に結びついている可能性がある。そこで本研究では女性高血圧患者を中心に骨密度の変化を含めた骨代謝動態について考察した。

この様に肥満関連生活習慣病の病態生理を細胞膜機能や分子レベルの変化からとらえようとすることは新しい試みであり、さらに全身の Ca 代謝、骨代謝動態、将来の動脈硬化病変や臓器障害との関連を考察することは、疾患の治療や合併症予防の上からも有用であると考えられる。

3. 研究の方法

I. 高血圧の細胞膜機能の解析

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。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. 高血圧の骨塩含量測定

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

4. 研究成果

1). 電子スピン共鳴からみた高血圧の赤血球膜 fluidity

本法を用いて我々は赤血球膜より得られた order parameter (S) 値は高血圧患者、ならびに遺伝性高血圧ラット (spontaneously hypertensive rats: SHR) で正常血圧対照群に比し有意に高値を示し、高血圧で赤血球膜 fluidity が低下していることを明らかにした。これらの成績より高血圧では膜 stiffness が増大していることが示唆され、膜機能からみた微小循環調節機構の障害されている可能性が考えられる。

2). 赤血球膜 fluidity と内皮機能との関連

我々は内皮機能の指標のひとつとして血漿 NO 代謝産物濃度の測定を行った。高血圧群では正常血圧群に比し、血漿 NO 代謝産物濃度は有意に減少していた。また、赤血球膜の order parameter (S) 値は血漿 NO 代謝産物濃度と有意に負の相関を示した。この結果は血漿 NO 代謝産物濃度が低いほど、赤血球膜 fluidity は低下していることを示している。対照的に血漿内因性 NO 合成酵素阻害物質 (asymmetric dimethylarginine: ADMA) 濃度は高血圧群では正常血圧群に比し有意に増加し、血漿 ADMA 濃度が高いほど赤血球膜 fluidity は低下していた。既に我々は in vitro において、NO donor が高血圧患者の赤血球膜 fluidity を有意に改善させることを観察しており、NO-bioavailability の障害が膜 fluidity の悪化につながる可能性が示唆され

る。

3). 赤血球膜 fluidity に及ぼす各種 adipokine の影響

脂肪細胞で産生される adipokine のひとつであるレプチンは肥満で増加するとされ、血漿レプチン濃度は body mass index (BMI) と比例した。最近、レプチンが NO 産生を刺激すると報告されている。我々も血漿レプチン濃度は血漿 NO 代謝産物濃度と有意に相関することを見出している。さらに in vitro でレプチンは NO を介して赤血球膜 fluidity を上昇させ、さらにその効果は高血圧患者で正常血圧者に比し著明であった。以上から、レプチンは NO を介して高血圧の細胞膜機能調節に重要な役割を果たし、微小循環の改善に寄与すると考えられる。

一方、高血圧患者では正常血圧者に比し血漿アディポネクチン濃度は有意に低値であった。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。さらに血漿アディポネクチン濃度と赤血球膜の order parameter (S) 値は有意に負の相関を示した。対照的に、血漿レジスチン濃度は血漿 NO 代謝産物濃度と有意に逆相関した。さらに血漿レジスチン濃度と赤血球膜の order parameter (S) 値は有意に正相関を示した。これらの成績は血漿アディポネクチン濃度が低いほど、また血漿レジスチン濃度が高いほど赤血球膜 fluidity は低下していることを示している。以上より adipokine であるアディポネクチンやレジスチンは高血圧の細胞膜機能調節に深く関与し、その作用の一部は NO を介する可能性が示唆される。

4). 高血圧の骨塩含量の変化

DXA 法で測定した骨塩含量 (BMD) は年齢と共に減少した。また、女性高血圧患者で女性正常血圧対照群に比し、骨塩含量 (BMD) が有意に低下していた。一方、男性高血圧患者では正常血圧者に比し、骨塩含量 (BMD) に有意な変化はみられなかった。

さらに骨塩含量 (BMD) と血圧値との関連を検討してみると、女性対象者において骨塩含量 (BMD) と収縮期血圧値の間には有意な負の相関がみられた。この成績は、特に女性において、高血圧が骨粗鬆症の病態に深く関与している可能性を示唆するものと考えられる。

以上より、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、肥満関連生活習慣病ならびに骨代謝異常の成因の解明や病態の理解のみならず、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 21 件)

- 1) **Tsuda K**: Association of resistin with impaired membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects: an electron paramagnetic resonance study. *Heart and Vessels*. 2016;31:1724-1730.
- 2) **Tsuda K**: Associations between inflammation and endothelial dysfunction in resistant hypertension. *Am J Hypertens*. 2016;29:e4.
- 3) **Tsuda K**: Letter regarding article, Association between visceral and subcutaneous adipose depots and incident cardiovascular disease risk factors. *Circulation*. 2016;133:e590.
- 4) **Tsuda K**, Ifergane G, Goldbart A, Novack V: Letter regarding article, Obstructive sleep apnea in acute stroke: a role for systemic inflammation. *Stroke*. 2016;47:e213-214.
- 5) **Tsuda K**, Weinert LS, Reichelt AJ,

Oppermann MLR, Camargo JL, Silveiro SP: Calcium metabolism and its relation to blood pressure during pregnancy. *Am J Hypertens*. 2015;28:283-284.

6) **Tsuda K**, Catena C, Colussi G, Sechi LA: Plasma homocysteine levels and endothelial dysfunction in cerebro- and cardiovascular diseases in the metabolic syndrome. *Am J Hypertens*. 2015;28:1489-1490.

7) **Tsuda K**: Electron spin resonance study on membrane abnormality and microcirculatory dysfunction in subjects with hypertension and the metabolic syndrome: In relation to endothelial function and obesity-associated vasoactive substances. *J Jpn Coll Angiol*. 2015;55:111-116.

8) **Tsuda K**, Denton KM, Lankadeva YR, Singh RR, Parkington HC, Tare M, Moritz KM: Letter regarding article, Renal dysfunction is associated with a reduced contribution of nitric oxide and enhanced vasoconstriction after a congenital renal mass reduction in sheep. *Circulation*. 2015;132:e193-195.

9) **Tsuda K**, Sandsmark DK, Kasner SE: Letter regarding article, Proteinuria, but not eGFR, predicts stroke risk in chronic kidney disease; Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Stroke*. 2015;46:e239-240.

10) **Tsuda K**: Associations of leptin with endothelial function and blood pressure control. *Hypertension*. eLetters, published on-line, April 15, 2016.

11) **Tsuda K**, Samuelsson AM, Clark J, Rudyk O, Schattock MJ, Bae SE, South T, Pombo J, Redington K, Uppal E, Coen CW, Poston L, Tayler PD: Role of hyperleptinemia in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Hypertension*. 2014;63:e1-2.

12) **Tsuda K**, Mieth A, Revermann M, Babelova A, Weigert A, Schermuly RT, Brandes RP: Sympathoinhibitory effect of diltiazem and prevention of aneurysm formation.

Hypertension. 2014;63:e12-13.

13) **Tsuda K**, Alsmadi O, Melhem M, Hebbar P, Channanath A, Thareja G, John SE, Alkayal F, Behbehani K, Thanaraj TA: Leptin and nitric oxide in blood pressure regulation in humans.

Am J Hypertens. 2014;27:1428-1430.

14) **Tsuda K**, Zhou JP, Kuang DB, Chen XP: Asymmetric dimethylarginine and DDAH1 transcript variants in cardiovascular and cerebrovascular diseases.

Am J Hypertens. 2014;27:497-499.

15) **Tsuda K**, Tanahashi K, Akazawa N, Maeda S: Aerobic exercise and endothelial function in pre- and postmenopausal women. **Am J Hypertens.** 2014;27:989-990.

16) **Tsuda K**: Role of adipokines in the regulation of endothelial function and membrane fluidity in hypertension: an electron spin resonance study-.

J Jpn Coll Angiol. 2014;54:123-127.

17) **Tsuda K**: Letter regarding article, Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates N-omega-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence.

Circulation. 2014;130:e83.

18) **Tsuda K**, Kim J, Heo JH: Letter regarding article, Serum alkaline phosphatase and phosphate in cerebral atherosclerosis and functional outcomes after cerebral infarction. **Stroke.** 2014;45:e46-47.

19) **Tsuda K**: Bradykinin and sympatholytic action of angiotensin converting enzyme inhibitor in prenatally programmed hypertension. **Hypertension.** eLetters, published on-line, January 15, 2014.

20) **Tsuda K**: Sympatho-inhibitory action of calcitonin gene-related

peptide in angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension.** eLetters, published on-line, April 22, 2014.

21) **Tsuda K**: Central action of neuropeptide Y and its contribution to sympathetic nerve activity regulation in prenatal hypoxia. **Hypertension.** eLetters, published on-line, November 14, 2014.

[学会発表](計 13 件)

1) **Tsuda K**: Visfatin predicts membrane microviscosity of red blood cells and microcirculatory dysfunction in hypertensive subjects by a nitric oxide-dependent mechanism. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March, 2017, Kanazawa, Japan.

2) **Tsuda K**: Arterial stiffness is independently associated with membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects: an electron spin resonance study. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. July, 2016, Tokyo, Japan.

3) **Tsuda K**: Independent association between retinol-binding protein 4 and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects: an electron spin resonance study. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. July, 2016, Tokyo, Japan.

4) **Tsuda K**: Cardiac hypertrophy is independently associated with impaired membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive subjects -an electron spin resonance study. Featured Research Sessions at the 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March, 2016, Sendai, Japan.

5) **Tsuda K**: Monocyte chemoattractant protein-1 predicts membrane microviscosity of red blood cells and microcirculatory dysfunction in hypertension via an asymmetric dimethylarginine-dependent mechanism. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March, 2016, Sendai, Japan.

6) **Tsuda K**: Atherosclerosis is closely associated with impaired membrane fluidity of red blood cells and microcirculatory dysfunction in hypertension –an ESR study. The 39th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension. September-October, 2016, Sendai, Japan.

7) **Tsuda K**: Independent association between carotid artery atherosclerosis and membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive subjects-an electron spin resonance study. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. April, 2015, Osaka, Japan.

8) **Tsuda K**: Tumor necrosis factor-alpha predicts impaired membrane microviscosity of erythrocytes and microcirculatory dysfunction in hypertensive subjects via an asymmetric dimethylarginine-dependent mechanism. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. April, 2015, Osaka, Japan.

9) **Tsuda K**: Retinol-binding protein 4 and adiponectin modulate membrane fluidity of red blood cells in hypertension via the nitric oxide-dependent mechanism. The 38th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension.

October, 2015, Matsuyama, Japan.

10) **津田和志**：ここまで進歩した脈管の基礎研究：電子スピン共鳴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微小循環障害。

第55回日本脈管学会総会シンポジウム。
2014年10月，倉敷。

11) **Tsuda K**: Urinary albumin excretion and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects: an electron spin resonance study.

The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. May, 2014, Tokyo, Japan.

12) **Tsuda K**: Resistin is associated with reduced kidney function and impaired membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men.

The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. May, 2014, Tokyo, Japan.

13) **Tsuda K**: Chronic kidney disease and plasma cystatin C levels are closely associated with impaired membrane fluidity in hypertension. The 37th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension. October, 2014, Yokohama, Japan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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