

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C)一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20590710

研究課題名（和文）細胞膜機能と血管内分泌因子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）Modulatory Effects of Vascular Humoral Factors on Membrane Function in 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

研究成果の概要（和文）：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。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、血中総ホモシステイン濃度が高値であるほど血中 NO 代謝産物濃度は低値であり、赤血球膜 fluidity の低下と有意に相関した。また、これらの細胞膜機能異常は高齢女性において、エストロゲン作用を持つ selective estrogen receptor modulator (SERM)、tamoxifen 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の成因に一部関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been 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 metabolic disorders by using an electron spin resonance (ESR) method. We demonstrated that membrane fluidity of erythrocytes was significantly lower in hypertensive subjects than in normotensive subjects. It was shown that the lower was the plasma nitric oxide (NO) metabolite level, the lower was the membrane fluidity of erythrocytes. In contrast, the higher was the plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) level, the lower was the membrane fluidity of erythrocytes. Plasma homocysteine concentration was significantly increased in hypertensive subjects compared with normotensive subjects. The reduced membrane fluidity of erythrocytes was

associated with higher plasma homocysteine levels. In an in vitro study, the selective estrogen receptor modulator (SERM), tamoxifen, significantly restored membrane fluidity of erythrocytes in elderly women, which was partially mediated by the NO-dependent mechanism. We propose that reduced membrane fluidity of erythrocytes might cause a disturbance in the blood rheologic behavior and the microcirculation, and that improvement of membrane function could contribute, at least in part, to the prevention against circulatory disorders in subjects with hypertension and the metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成21年度	700,000	210,000	910,000
平成22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：総合診療、メタボリックシンドローム、高血圧、細胞膜異常、血管内分泌因子

1. 研究開始当初の背景

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。さらに肥満は糖尿病、高血圧をはじめとする成人病の危険因子のひとつであり、特に肥満と血圧値と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ひとつでもある。最近、脂肪細胞でレプチンやアディポネクチン等のアディポサイトカインが生成、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。

従来より、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) ならびにスピンラベル法を用いて、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、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。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。

2. 研究の目的

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、高血圧を主体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、肥満に関連した血管内分泌因子の膜機能に及ぼす影響を検討した。さらに女性ホルモン（エストロゲン）作用を持つとされる **selective estrogen receptor modulator (SERM)** の膜機能に対する効果について考察を加えた。この様に、心血管系をはじめ、血球成分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。

3. 研究の方法

電子スピン共鳴からみた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に関する検討

(方法)

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) ならびに 16-nitroxide stearate (16-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 2.0 gauss; G, scan width 3280±50 G, sweep time 8 min, response time 1.0 sec)。スピンラベル剤の 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、スピン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。このねじれの程度を各種の parameter をとることによって算出し、細胞膜 fluidity の指標とする。すなわち、各 spectrum から算出した order parameter (S) 値ならびに peak height ratio (h_0/h_{-1}) 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。

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

4. 研究成果

(1) 本態性高血圧患者の赤血球膜 Fluidity

電子スピン共鳴法により赤血球膜から得られた 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 (S 値: 高血圧群 0.725 ± 0.001 , mean±SEM, $n=38$, 正常血圧群 0.713 ± 0.001 , $n=35$, $P < 0.001$,

h₀/h₋₁ 値: 高血圧群 5.28±0.02, n=27, 正常血圧群 5.14±0.03, n=18, P<0.01)。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。

(2) 高血圧患者の赤血球膜 Fluidity と内因性 NO 合成阻害物質 (Asymmetric Dimethylarginine:ADMA) との関連について

最近、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 in vitro で NO が高血圧患者の赤血球膜 fluidity を有意に改善させることを示してきた (Tsuda K 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)。一方、本研究において、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 (高血圧群 37.3±1.9 μmol/L, n=38, 正常血圧群 52.1±3.6 μmol/L, n=35, P<0.05)。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 (高血圧群 0.42±0.01 μmol/L, n=38, 正常血圧群 0.37±0.01 μmol/L, n=35, P<0.05)。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 (r=-0.38, n=73, P<0.01)、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。さらに multiple regression analysis 法を用いた解析においても、血漿 NO 代謝産物濃度、ならびに内因性 NO 合成阻害物質 (ADMA) は赤血球膜 fluidity の有意な規定因子であることが示された。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 ならびに内因性 NO 合成阻害物質 (ADMA) が高血圧の細胞膜 fluidity 調節に重要な役割を果たしていると考えられた。

(3) 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 (高血圧群 12.9±1.0 μmol/L, n=27, 正常血圧群 9.9±0.4 μmol/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=47, P<0.05)。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。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 が減少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すことを示唆している。

(4) 高血圧患者の赤血球膜 Fluidity に及ぼす Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) の影響について

次に SERM のひとつである tamoxifen の赤血球膜 fluidity に対する影響を検討した。Tamoxifen は in vitro で濃度依存性に閉経後女性の赤血球膜 order parameter (S) 値ならびに peak height ratio (h₀/h₋₁) 値を低下 (膜 fluidity を上昇、膜 microviscosity を改善) させた。先述のごとく、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、我々も NO が細胞膜 fluidity を改善させることを示してきた。本研究において、tamoxifen の赤血球膜 fluidity に対する作用は NO substrate で

ある L-arginine や NO donor である S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)、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 NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) や内因性 NO 合成阻害物質 (ADMA) で抑制された。また、その作用は閉経後高血圧女性群で閉経後正常血圧女性群に比し有意に大であった。このことは tamoxifen の細胞膜 fluidity に対する作用が一部 NO を介することを表している。さらにこれらの成績は tamoxifen 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。

(総括と結語)

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。本研究では心血管系をはじめ、血球成分をも含む広範な組織に存在すると考えられる高血圧の細胞膜異常とメタボリックシンドロームとの関連を検討するため、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 は正常血圧群に比し有意に低下していた。一方、血漿内因性 NO 合成阻害物質 (ADMA) 濃度が高いほど膜 fluidity は低下していた。さらに血漿ホモシステイン濃度が高いほど膜 fluidity は低下し、血漿ホモシステイン濃度は血漿 NO 代謝産物濃度と有意な逆相関を示した。また、これら膜機能の悪化は selective estrogen receptor modulator (SERM) のひとつである tamoxifen により有意に改善した。

以上から、内因性 NO 合成阻害物質

(ADMA) 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た。また、これらの細胞膜機能異常はエストロゲン作用を持つ SERM (tamoxifen) 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血管内分泌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ゆく必要があると考えられる。

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 14 件)

- ① Tsuda K: Oxidative stress and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men. An electron spin resonance investigation. *International Heart J*. 2010;51:121-124.
- ② Tsuda K, Pouwels S, Lalmohamed A, Leufkens HG, de Boer A, Cooper C, van Staa T, de Vries F: Risk of fracture and bone mineral density in stroke. *Stroke*. 2010;41:e59-e60;2010.
- ③ Tsuda K: Neuroprotective effect of isoflurane and N-methyl-D-aspartate receptors in ischemic brain injury. *Stroke*. 2010;41:e-578-579.
- ④ Tsuda K, Valerio A, Nisoli E: Neuroprotective effects of leptin and nitric oxide against cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40:e406-e407.
- ⑤ Tsuda K, Maas R, Boger R, Seshadri S:

Asymmetric dimethylarginine and hypertension in carotid artery disease. *Stroke*. 2009;40:e703-704.

⑥ **Tsuda K**, Carter AM: C-reactive protein and nitric oxide production in ischemic stroke. *Stroke*. 2009;40:e471-472.

⑦ **Tsuda K**, Pilz S, Dobnig H, Tomaschitz A, Fischer JE, Wellnitz B, Seelhorst U, Boehm BO, Marz W: Low vitamin D levels and bone mineral density in stroke. *Stroke*. 2009;40:e36-38.

⑧ **Tsuda K**, McCarthy CA, Vinh A, Callaway JK, Widdop RE: Angiotensin AT₂ receptor-mediated neuroprotection and nitric oxide-bioavailability in stroke. *Stroke*. 2009;40:e493-494.

⑨ **Tsuda K**, Tietjen GE: Role of estrogen and endothelium in migraine in young women. *Stroke*. 2009;40:e705-706.

⑩ **Tsuda K**, Min J, Majid A: Bradykinin and catecholamines in cardiac dysfunction after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40:e712-713.

⑪ **Tsuda K**: Statins and gender-related differences in endothelial function in cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2009;40:e543.

⑫ **Tsuda K**: Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effect of benidipine on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Heart and Vessels*. 2008;23:134-139;2008.

⑬ **Tsuda K**, Zhang F, Wang S, Signore AP, Chen J: Leptin and nitric oxide production against ischemic neuronal injury. *Stroke*. 2008;39:e3-4.

⑭ **Tsuda K**, Reeves M, Gargano JW, Majid A, Jacobs BS: Statin and nitric oxide

production against ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39:e170-171.

[学会発表] (計 4 件)

① **Tsuda K**: High-sensitivity C-reactive protein and membrane microviscosity in red blood cells in hypertensive and normotensive men -an electron spin resonance study.

XX World Congress of International Society for Heart Research, May, 2010, Kyoto, Japan.

② **Tsuda K**: 2-methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, ameliorates membrane microviscosity in red blood cells in normotensive and hypertensive postmenopausal women -an electron spin resonance study.

XX World Congress of International Society for Heart Research, May, 2010, Kyoto, Japan.

③ **Tsuda K**: Association between homocysteine and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men.

The 17th Asian Pacific Congress of Cardiology. May, 2009, Kyoto, Japan.

④ 津田和志：血管内分泌因子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-

第49回日本脈管学会総会シンポジウム
2008年10月, 東京.

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