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(ESR)法による検討—

津田 和志

要 旨：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、膜機能における nitric oxide(NO)の役割とその調節機構、および治療による影響を中心に述べる。電子スピン共鳴(electron spin resonance; ESR)法にて測定した高血圧患者の赤血球膜流動性(fluidity)は正常血圧群に比し有意に低下している。そして血漿 NO 代謝産物濃度が低値であるほど、また内因性 NO 合成酵素阻害物質(asymmetric dimethylarginine; ADMA)濃度が高値であるほど膜 fluidity の減少が大きい。さらに adipokine であるレプチンやアディポネクチンの血中濃度と血漿 NO 代謝産物レベルとは有意な相関を示し、これらの増加は膜 fluidity の上昇を伴っている。一方、外因性の NO donor やレプチン、およびエストロゲンや一部の Ca channel blocker は高血圧患者の赤血球膜 fluidity を有意に改善し、同時に血漿 NO 代謝産物レベルを上昇させる。以上から、NO は細胞膜機能に重要な役割を果たし、adipokine やエストロゲンによる内分泌因子調節機構や一部の降圧療法が、高血圧の微小循環ならびに血管内皮障害の改善に深く関与する可能性が示唆される。(J Jpn Coll Angiol 2014; 54: 123–127)

Key words: adipokine, leptin, adiponectin, nitric oxide, membrane fluidity

緒 言

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。最近、高血圧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^{1,2)}。細胞膜の物理化学的性質のひとつである膜流動性(fluidity)は膜の変形能や可塑性を規定し¹⁻⁴⁾、微小循環調節に深く関与する。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により、赤血球膜や血管平滑筋細胞の膜 fluidity が高血圧群で低下(膜 microviscosity が悪化)していることを報告してきた^{3,5-18)}。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、末梢循環障害を介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。本稿では従来からの我々の成績を中

心に、高血圧の細胞膜機能と内皮障害との関連について、膜機能における NO の役割とその調節機構、および治療による影響を中心に述べる。

電子スピン共鳴からみた高血圧の 赤血球膜 fluidity について

高血圧患者の赤血球膜 fluidity は次のように調べる。空腹時 30 分間安静臥床後、肘静脈から採血し洗浄赤血球を作成する。これを 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 fluidity(a reciprocal value of microviscosity)を測定する(測定条件: power 5 mW, modulation frequency 100 KHz, modulation amplitude 0.2 mT(tesla), scan width 328±5 mT, sweep time 8 min, response time 1.0 sec)³⁾。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

関西医療大学大学院循環器代謝内科学

第 54 回日本脈管学会総会(2013 年 10 月、東京)シンポジウム 7「血管内皮機能改善のための最新治療」にて発表

doi: 10.7133/jca.14-00015

2014 年 4 月 1 日受付 2014 年 6 月 18 日受理

となる³⁾。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示す³⁾。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、高血圧では赤血球膜 fluidity が低下していることを明らかにしてきた^{3, 5-14)}。さらに SHR の培養血管平滑筋細胞においても膜 fluidity は正常血圧 Wistar-Kyoto rats に比し有意に低下している¹⁵⁾。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。

赤血球膜 fluidity と血漿 nitric oxide (NO) レベル、 ならびに血漿 asymmetric dimethylarginine (ADMA) レベルとの関連について

我々は内皮機能の指標のひとつとして、血漿 nitric oxide (NO) 濃度を測定してきた^{16, 17)}。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る¹⁷⁾。また、赤血球膜の order parameter (S) 値は血漿 NO 濃度と有意に負の相関を示す¹⁷⁾。この結果は血漿 NO 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 は低下している¹⁷⁾。すでに我々は 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¹⁸⁾、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。

赤血球膜 fluidity に及ぼすレプチンの影響について

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) と比例する¹⁹⁾。レプチンにはさまざまな生理作用がみられるが、最近、レプチンが NO 産生を刺激すると報告されている²⁰⁻²²⁾。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¹⁹⁾。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る^{23, 24)}。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、中枢視床下部においてもレプチンと NO との関連が示唆されているが、中枢神経を介するレプチンの抗肥満作用における NO の関与については未だ不明な点が多い²⁵⁻²⁸⁾。

赤血球膜 fluidity とアディポネクチンとの 関係について

最近、アディポネクチンの抗動脈硬化作用が注目されている。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り²⁹⁾、低アディポネクチン血症は心血管病変の危険因子であることが報告されている^{30, 31)}。一方、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する³²⁾。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す²⁹⁾。この成績は血漿アディポネクチン濃度が低いほど、赤血球膜 fluidity は低下することを示している。以上から、アディポネク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。

赤血球膜 fluidity, ならびに nitric oxide (NO) 動態に 及ぼす各種治療の影響

次に治療による赤血球膜 fluidity の変化について考察する。すでに各種薬剤の中で、エストロゲンや Ca channel blocker の benidipine には NO 産生作用のあることが報告されている³³⁻³⁶⁾。そこでまず、閉経後女性に対するホルモン (エストロゲン) 補充療法の赤血球膜 fluidity, ならびに NO 動態に及ぼす影響について検討した。閉経後女性に対するホルモン補充療法を施行すると赤血球膜の order parameter (S) 値は有意に低下する³⁷⁾。さらに血漿 NO 代謝産物濃度はホルモン補充療法により有意に上昇する³⁷⁾。In vitro の成績においてもエストロゲンは赤血球膜 fluidity を改善し、その効果は NO 合成酵素阻害剤により抑制される³⁸⁻⁴⁰⁾。一方、Ca channel blocker である benidipine を高血圧患者に経口投与すると、有意な血圧低下と赤血球膜 fluidity の改善を認める⁴¹⁾。同時に benidipine 投与で高血圧患者の血漿 NO 代謝産物濃度は有意に上昇する⁴¹⁾。また、in vitro において benidipine は赤血球膜 fluidity を上昇させ、その効果は NO donor により促進され、逆に NO 合成酵素阻害剤により抑制される⁴²⁾。以上から、エストロゲンや benidipine は NO-bioavailability 改善作用を介して膜 fluidity を上昇させる可能性が示唆される。今後さらに、他の薬剤の赤血球膜 fluidity, ならびに NO 動態に及ぼ

す影響について詳細に検討する必要があると考えられる。

結 語

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、膜機能における NO の役割とその調節機構、および治療による影響を中心にまとめた。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、血漿 NO 代謝産物濃度が低値であるほど、また内因性 NO 合成酵素阻害物質 (ADMA) 濃度が高値であるほど膜 fluidity の減少は大である。一方、adipokine であるレプチンやアディポネクチンの血中濃度と血漿 NO 代謝産物レベルとは有意な相関を示し、これらの増加は膜 fluidity の上昇を伴っている。さらにエストロゲンや Ca channel blocker の benidipine は高血圧患者の赤血球膜 fluidity を有意に改善し、同時に血漿 NO 代謝産物レベルを上昇させる。以上から、NO は細胞膜機能に重要な役割を果たし、adipokine による調節機構やホルモン補充療法、一部の降圧療法が高血圧の微小循環や血管内皮障害の改善に深く関与する可能性が示唆される。今後さらに adipokine と NO 産生や細胞膜機能との関連、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。

利益相反

著者に利益相反はない。

文 献

- 1) Tsuda K, Nishio I: Membrane fluidity and hypertension. *Am J Hypertens* 2003; **16**: 259–261
- 2) Zicha J, Kunes J, Devynck MA: Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension: a review. *Am J Hypertens* 1999; **12**: 315–331
- 3) 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): III19–24
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Tsuda K: Oxidative stress and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance investigation. *Int Heart J* 2010; **51**: 121–124
- 7) Tsuda K: Role of adiponectin and oxidative stress in the regulation of membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance study. *J Obes* 2011; **2011**: 548140
- 8) 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
- 9) 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 study. *Adv Biosci Biotechnol* 2012; **3**: 1020–1027
- 10) Tsuda K: Hyperhomocysteinemia and increased oxidative stress levels are associated with impaired membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron paramagnetic resonance investigation. *Int J Clin Med* 2013; **4**: 58–65
- 11) 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
- 12) Tsuda K, Kinoshita Y, Nishio I, et al: Hyperinsulinemia is a determinant of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001; **14**: 419–423
- 13) Tsuda K, Kinoshita Y, Nishio I: Synergistic role of progesterone and nitric oxide in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in humans: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens* 2002; **15**: 702–708
- 14) 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—とくに Chronic Kidney Disease (CKD) と酸化ストレス、ならびに内皮機能不全との関連から—。 *脈管学* 2013; **53**: 179–183
- 15) Tsuda K, Tsuda S, Minatogawa Y, et al: Decreased membrane fluidity of erythrocytes and cultured vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats: an electron spin resonance study. *Clin Sci* 1988; **75**: 477–480
- 16) Tsuda K, Kinoshita-Shimamoto Y, Kimura K, et al: Nitric oxide is a determinant of membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens* 2003; **16**: 244–248
- 17) 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
- 18) 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
- 19) Tsuda K, Nishio I: Leptin and nitric oxide production in normotensive and hypertensive men. *Obes Res* 2004; **12**: 1223–1237
 - 20) Frühbeck G: Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 1999; **48**: 903–908
 - 21) Beltowski J, Wójcicka G, Borkowska E: Human leptin stimulates systemic nitric oxide production in the rat. *Obes Res* 2002; **10**: 939–946
 - 22) Kimura K, Tsuda K, Baba A, et al: Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **273**: 745–749
 - 23) Tsuda K, Kimura K, Nishio I: Leptin improves membrane fluidity of erythrocytes in humans via a nitric oxide-dependent mechanism—an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **297**: 672–681
 - 24) Tsuda K, Nishio I: Leptin and membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. An electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens* 2004; **17**: 375–379
 - 25) Leshan RL, Greenwald-Yarnell M, Patterson CM, et al: Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance. *Nat Med* 2012; **18**: 820–823
 - 26) Yang SJ, Denbow DM: Interaction of leptin and nitric oxide on food intake in broilers and Leghorns. *Physiol Behav* 2007; **92**: 651–657
 - 27) Sugimoto Y, Hirose H, Yagura T, et al: Leptin inhibits food intake without affecting brain NOx levels in food-deprived mice. *Biol Pharm Bull* 2003; **26**: 105–107
 - 28) Morley JE, Alshaher MM, Farr SA, et al: Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides* 1999; **20**: 595–600
 - 29) Tsuda K: Adiponectin and membrane fluidity of erythrocytes in normotensive and hypertensive men. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**: 1505–1510
 - 30) Hui X, Lam KS, Vanhoutte PM, et al: Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br J Pharmacol* 2012; **165**: 574–590
 - 31) Kim DH, Kim C, Ding EL, et al: Adiponectin levels and the risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension* 2013; **62**: 27–32
 - 32) Tsuda K: Adiponectin and nitric oxide production in normotensive and hypertensive men. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; **34** (suppl 1): S64–66
 - 33) Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, et al: Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 β -estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study. *Hypertension* 1995; **25**: 848–853
 - 34) Cicinelli E, Ignarro LJ, Matteo MG, et al: Effects of estrogen replacement therapy on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1999; **180**: 334–339
 - 35) Takase H, Sugiyama M, Nakazawa A, et al: Long-term effect of antihypertensive therapy with calcium antagonist or angiotensin converting enzyme inhibitor on serum nitrite/nitrate levels in human essential hypertension. *Arzneimittelforschung* 2000; **50**: 530–534
 - 36) Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, et al: A calcium channel blocker, benidipine, inhibits intimal thickening in the carotid artery of mice by increasing nitric oxide production. *J Hypertens* 2001; **19**: 451–458
 - 37) Tsuda K, Kinoshita-Shimamoto Y, Mabuchi Y, et al: Hormone replacement therapy improves membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens* 2003; **16**: 502–507
 - 38) 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
 - 39) Tsuda K, Shimamoto Y, Kimura K, et al: Estriol improves membrane fluidity of erythrocytes by the nitric oxide-dependent mechanism: an electron paramagnetic resonance study. *Hypertens Res* 2001; **24**: 263–269
 - 40) Tsuda K, Kinoshita-Shimamoto Y, Kimura K, et al: Effect of oestrone on membrane fluidity of erythrocytes is mediated by a nitric oxide-dependent pathway: An electron paramagnetic resonance study. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; **29**: 972–979
 - 41) 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
 - 42) 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

Role of Adipokines in the Regulation of Endothelial Function and Membrane Fluidity in Hypertension: An Electron Spin Resonance Study

Kazushi Tsuda

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

Key words: adipokine, leptin, adiponectin, nitric oxide, membrane fluidity

It has been proposed that abnormalities in physical properties of the cell membranes may strongly be linked to hypertension and other circulatory disorders. Recent studies have shown that adipokines might actively participate in the pathophysiology of hypertension and in the metabolic syndrome. The purpose of the present article is to elucidate the possible relationships among adipokines, endothelial function, and membrane fluidity (a reciprocal value of membrane microviscosity) 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 to normotensive subjects. The reduced membrane fluidity of RBCs was associated with decreased levels of plasma nitric oxide (NO)-metabolites and increased levels of plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA; an endogenous NO synthase inhibitor), indicating that endothelial function could be a determinant of membrane fluidity of RBCs. Leptin, an adipokine, significantly increased membrane fluidity of RBCs, at least in part, via the NO-dependent mechanism. Furthermore, higher levels of plasma adiponectin were associated with increased membrane fluidity of RBCs. On the other hand, intervention with hormone (estrogen) replacement therapy or administration of benidipine, a Ca channel blocker, significantly improved membrane fluidity of RBCs with a concomitant increase in plasma NO metabolite levels. In this context, it is strongly suggested that both NO and adipokines might have a crucial role in the regulation of rheologic behavior of RBCs and microcirculation in hypertension.

(J Jpn Coll Angiol 2014; **54**: 123–127)