

助成番号 0735

食塩感受性高血圧における細胞膜機能異常とその調節機構に関する研究 — 電子スピン共鳴法を用いた検討 —

津田 和志

関西医療大学保健医療学部内科学分野

概要 本研究では本態性高血圧患者の細胞膜流動性(fluidity)を電子スピン共鳴法にて測定し、Ca や Na をはじめとする電解質や各種内因性因子の膜機能に対する影響を検討した。高血圧患者の赤血球膜 fluidity は正常血圧群に比し低下していた。また、この変化は Ca の影響を強く受け、高血圧群では Ca による膜 fluidity の変化の程度は大であった。さらに高食塩摂取下や Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor である ouabain 存在下でも膜 fluidity は低下し、血漿内因性 digitalis 様因子が高値であるほど膜 fluidity の減少の程度は大であった。以上より高血圧では細胞膜機能に異常がみられ、Ca、Na、さらにそれらと関連した内因性因子が細胞膜機能調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

1. 緒言

食塩感受性の亢進は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。最近、高血圧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。一方、細胞膜流動性(fluidity)や microviscosity をはじめとする細胞膜機能は rheologic behavior の変化を介して vascular biology や microcirculation に強い影響を及ぼし、高血圧や動脈硬化の進展に関与する^(1,2,3)。本研究では、高血圧の食塩感受性と細胞膜機能との関連をみるため、高血圧患者を対象としてその細胞膜機能を電子スピン共鳴(electron paramagnetic resonance: EPR)ならびにスピンラベル法にて測定し、Ca や Na をはじめとする電解質や、内因性 digitalis 因子などの血管内分泌因子と膜機能との関連を検討した。

2. 方法

電子スピン共鳴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

(EPR) 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)⁽⁴⁻¹⁰⁾。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)⁽⁴⁻¹⁰⁾。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。各 spectrum から算出した 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⁽⁴⁻¹⁰⁾。

3. 成績と考案

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(Fig. 2)。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。一方、二次性高血圧群では有意な変化はなかった。

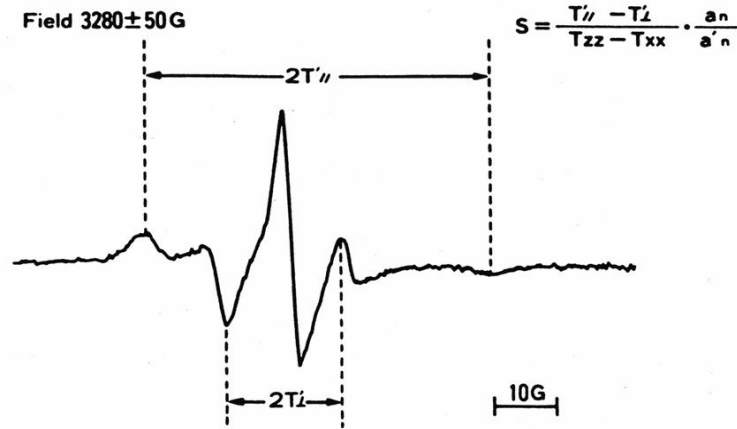


Fig. 1. A representative electron paramagnetic resonance spectrum for erythrocyte membranes. The greater the value of the order parameter (S), the lower the membrane fluidity of erythrocytes.

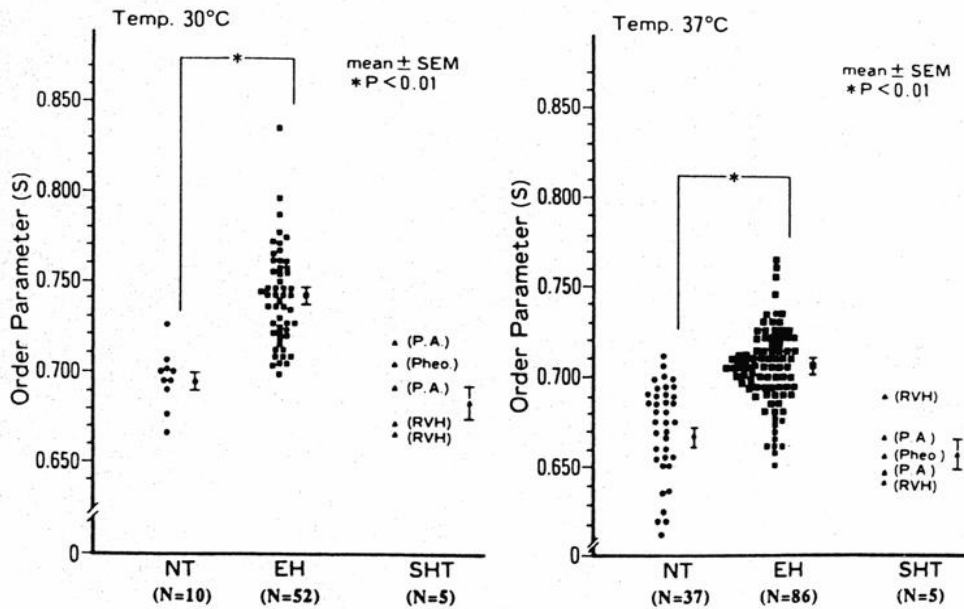


Fig. 2. Membrane fluidity of erythrocytes in subjects with essential hypertension. NT: normotensive subjects, EH: subjects with essential hypertension, SHT: subjects with secondary hypertension..

高血圧患者の赤血球膜 Fluidity と Ca による調節機序について

細胞膜 fluidity は Ca、Na などの電解質、膜上の Na⁺,K⁺-ATPase などの酵素活性、さらに各種内因性因子によって影響を受ける。次に赤血球に Ca を負荷した際の膜 fluidity を観察した。赤血球に Ca を負荷すると膜 fluidity は低下 (order parameter は上昇) するが、その変化は本態性高血圧群で正常血圧群に比し有意に大であった (Fig. 3)。二次性高血圧群では有意な変化はなかった。

この成績は本態性高血圧の細胞膜で Ca に対する感受性が亢進していることを示す成績であり、Ca が本態性高血圧の細胞膜 fluidity 調節に重要な役割を持つことを示唆している。

また、Ca を負荷した際の膜 fluidity は低下 (order parameter は上昇) は plasma renin activity (PRA) と逆相関した (Fig. 4)。このことは低レニン高血圧患者ほど Ca 感受性が亢進している可能性を示すものと考えられる。

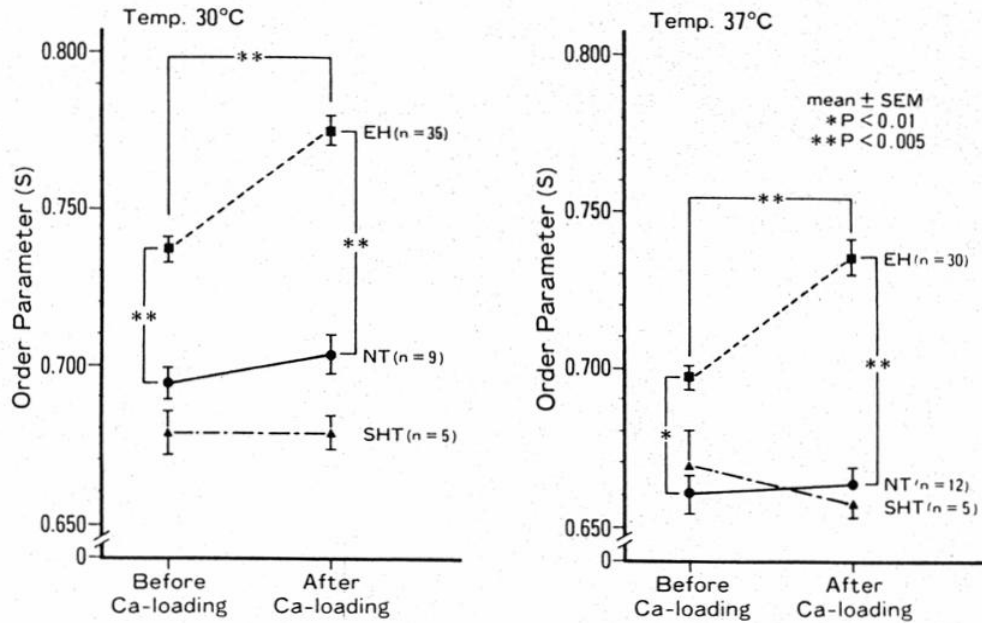


Fig. 3. Ca-induced changes in membrane fluidity of erythrocytes in subjects with essential hypertension. NT: normotensive subjects, EH: subjects with essential hypertension, SHT: subjects with secondary hypertension.

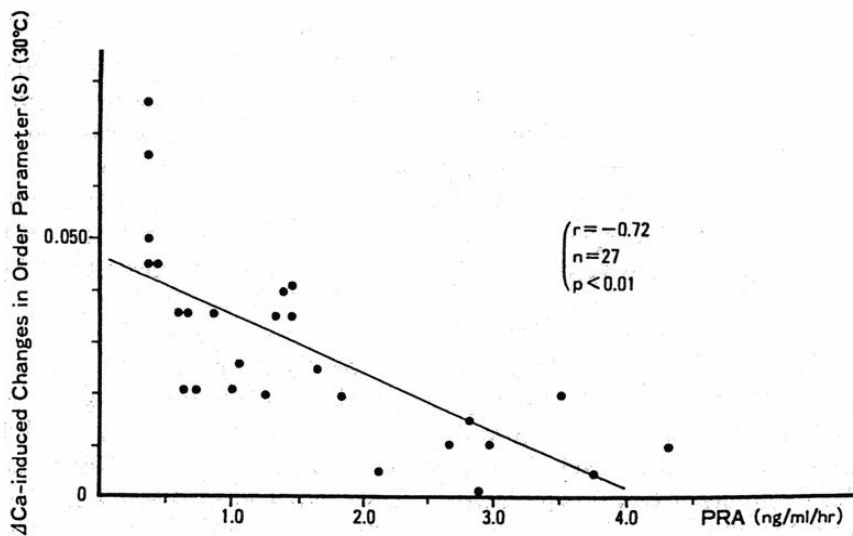


Fig. 4. Relationship between Ca-induced changes in membrane fluidity of erythrocytes and plasma renin activity (PRA)

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。Fig. 5 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。食事内容を正常食塩摂取量(5-7 g/day)から1週間減塩食(2-3 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(10 g 以上/day)を1週間摂取すると赤血球膜 fluidity は再び低下する(order parameter 値は大きくなる)。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、食塩過剰摂取は細胞内 Ca を上昇させることが知られており、細胞内 Ca の変化が膜 fluidity の低下を引き起こす可能性が考えられる。

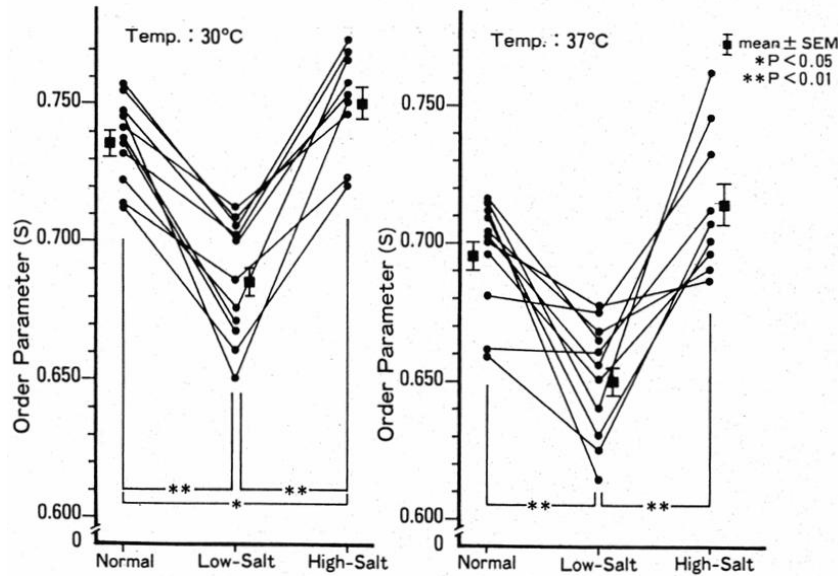


Fig. 5. Effects of salt-intake on membrane fluidity of erythrocytes in subjects with essential hypertension

高血圧患者の赤血球膜 Fluidity と内因性 Digitalis 様因子との関連について

最近、実験高血圧や本態性高血圧患者の血漿中には内因性 digitalis 様因子 (endogenous digitalis-like factor: EDLF) が存在し、膜機能や各種の生理作用に関与しているとの仮説が提唱されるようになった。そこで赤血球に Na^+, K^+ -ATPase inhibitor である ouabain を負荷した際の膜 fluidity の変化を検討した。赤血球に ouabain を負荷すると膜 fluidity は低下するが (order parameter 値は上昇する)、その程度は本態性高血圧群で正常血圧群に比し有意に大であった (Fig. 6)。

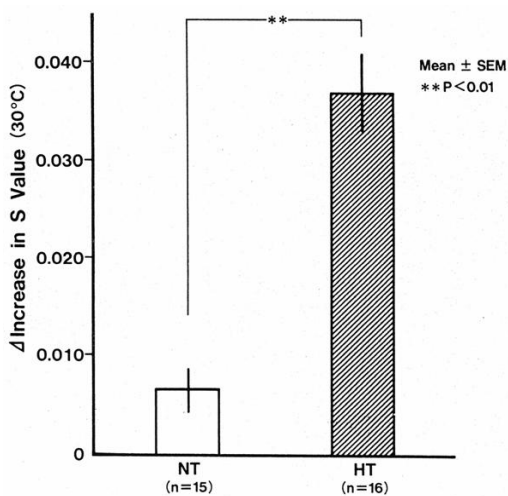


Fig. 6. Effects of ouabain on membrane fluidity of erythrocytes in subjects with essential hypertension

この成績は高血圧の膜 fluidity が Na^+, K^+ -ATPase に強く依存していることを示すものと考えられる。さらに血漿中の EDLF 含量 (in vitro において Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害度で示している) と赤血球膜 fluidity (order parameter 値) との間には有意な相関が認められた (Fig. 7)。つまり血漿中の EDLF 含量が多いほど赤血球膜 fluidity が低下していることを示している。EDLF の細胞レベルでの作用メカニズムについては十分には明らかにされていないが、EDLF は細胞内 Ca 濃度を上昇させるとの報告もみられ、細胞内 Ca 濃度の変化が膜 fluidity 低下の一因となっている可能性が考えられる。

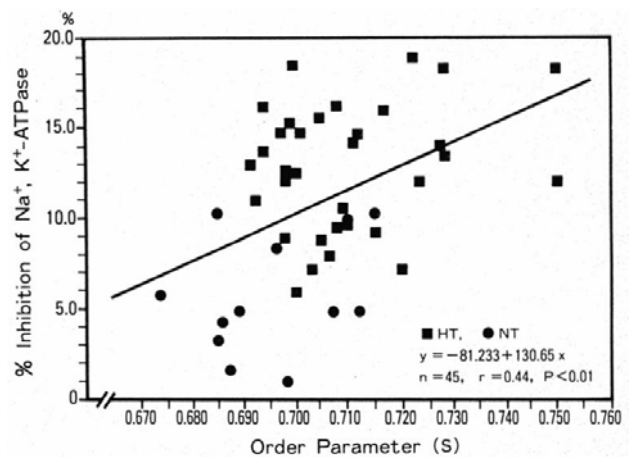


Fig. 7. Relationship between endogenous digitalis-like factor (EDLF) and membrane fluidity of erythrocytes. Plasma EDLF level was expressed as the % inhibition of Na^+, K^+ -ATPase in vitro.

4. 結 語

以上、本態性高血圧患者から得られた赤血球を用い、細胞膜 fluidity の測定と Ca や Na をはじめとする電解質や膜機能に及ぼす因子について検討した。

本態性高血圧患者の赤血球膜 fluidity は正常血圧者の比し低下していたが、これらは Ca の影響を強く受け、高血圧群ではその変化の程度は大であった。また、高食塩下や Na,K-ATPase inhibitor である ouabain 存在下でも膜 fluidity は低下し、血漿中の内因性 digitalis 様因子が多いほど膜 fluidity は低下していた。このように高血圧では細胞膜機能に異常がみられ、Ca、Na、さらにそれらと関連した内因性因子が細胞膜機能調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

文 献

- 1) Tsuda K, Nishio I: Serum homocysteine and endothelial dysfunction in circulatory disorders in women. *Circulation* 110: e37-38, 2005.
- 2) Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, Tanimoto T, Matsuo Y, Masho T, Kitabata H, Tsuda K, Tomobuchi Y, Akasaka T: Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction - Ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 50: 933-939, 2007.
- 3) Tsuda K, Nishio I: Membrane fluidity and hypertension. *Am J Hypertens* 16:259-261, 2003.
- 4) Tsuda K, Iwahashi H, Minatogawa Y, Nishio I, Kido R, Masuyama Y: Electron spin resonance studies of erythrocytes from spontaneously hypertensive rats and humans with essential hypertension. *Hypertension* 9 (suppl III): III-19-24, 1987.
- 5) Tsuda K, Kinoshita Y, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y: Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effect of 17 β -estradiol on membrane fluidity of erythrocytes in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1306-1312, 2001.
- 6) Tsuda K, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y: Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension - an electron paramagnetic resonance investigation -. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 946-954, 2000.
- 7) 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* 18: 1067-1076, 2005.
- 8) 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* 297: 672-681, 2002.
- 9) Tsuda K: Adiponectin and membrane fluidity of erythrocytes in normotensive and hypertensive men. *Obesity* 14: 1505-1510, 2006.
- 10) Tsuda K: Aerobic physical exercise improves membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive and normotensive subjects-An electron paramagnetic resonance study. In *'Focus on Exercise and Health Research'*, edited by Thomas B. Selkirk, New York, Nova Science Publishers, Inc., 2006, pp.1-16.

No. 0735

Membrane Abnormality and Its Regulatory Mechanisms in Salt-Dependent Hypertension - an Electron Paramagnetic Resonance Investigation -

Kazushi Tsuda, MD

Internal Medicine, Kansai University of Health Sciences

Summary

In order to assess the membrane abnormalities in salt-sensitive hypertension, we investigated membrane fluidity of erythrocytes in subjects with hypertension using the electron paramagnetic resonance and spin-labeling method. Membrane fluidity is a physicochemical feature of biomembranes and is an important factor modulating microcirculation. We demonstrated that membrane fluidity of erythrocytes was significantly lower in subjects with essential hypertension than in normotensive subjects.

The decreased membrane fluidity of erythrocytes might cause a disturbance in the blood rheologic behavior and the microcirculation, which could contribute, at least in part, to the pathophysiology of hypertension. It was also shown that both Ca- and ouabain-induced changes in membrane fluidity of erythrocytes were significantly greater in hypertensive subjects compared with normotensive subjects. Low salt-intake significantly improved membrane fluidity of erythrocytes, whereas high salt-intake lowered membrane fluidity of erythrocytes in subjects with essential hypertension. In addition, the higher the plasma endogenous digitalis-like factor (EDLF) levels, the lower the membrane fluidity of erythrocytes.

In this context, it is strongly suggested that Ca- and Na-dependent membrane abnormalities might contribute, at least in part, to the pathophysiology of salt-sensitive hypertension.