

機関番号：14602
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590230
 研究課題名 (和文) エストロゲンの酸化ストレス軽減による精神性ストレス時の血圧調節メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) Mechanisms of inhibitory effects of estrogens on psychological stress-induced pressor response via suppression of oxidative stress
 研究代表者 森本 恵子 (MORIMOTO KEIKO)
 奈良女子大学・生活環境学部・教授
 研究者番号：30220081

研究成果の概要 (和文)：健康な若年男女および閉経前・後の中年女性を対象とした実験より、エストロゲンが減少する閉経後には、マイルドな精神性ストレス時に前腕血管抵抗が増大するが、これには酸化ストレスが関与することが示唆された。また、閉経モデルラットを用いた実験では、精神性ストレス時の循環反応に対するエストロゲン補充の抑制作用には、すくなくとも一部に、酸化ストレス軽減を介した作用が関与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The findings of experiments with volunteers or ovariectomized rats suggested that the menopause enhanced forearm vascular resistance to mental stress, and estrogen replacement attenuated pressor responses through its anti-oxidative activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：環境生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：精神性ストレス、エストロゲン、閉経後女性、閉経モデルラット、酸化ストレス、血圧調節、血管収縮反応、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

精神性ストレスにさらされると、視床下部-下垂体-副腎皮質系や交感神経系が賦活化し、種々のストレス反応が起こる。このストレス反応は生体防御反応の1つであるが、これが破綻すると、虚血性心疾患などの重大なストレス関連疾患を引き起こす。しかし、精神性ストレスがどのような機序で心血管疾患の発症や進展に関与するのかは未だ明らかでない。特に、本研究のごとく、精神性ストレスが酸化ストレスを増大させる可能性を検討した研究は、国内外において数編の論文 (Oishi et al., Acta Physiol Scand 1999;

Sivonova et al., Stress 2004) があるのみである。近年、エストロゲンの抗酸化作用に関しては多くの研究成果が報告されているものの、本研究のようにエストロゲンの酸化ストレス軽減作用と精神性ストレス時の血圧調節作用とを関連づけたものはない。最も関連の深い研究としては、エストロゲンがラット脳の一酸化窒素 (NO) 増加を介して、拘束ストレス時の昇圧反応を抑制するとの報告 (Cherney et al., Am J Physiol, 2003) がある程度である。

我々は、種々のストレス時の血圧調節機序や運動の精神性ストレス緩和効果に関する

生理学的研究を行ってきた(J Physiol 1992& 1993, Eur J Physiol 2000)。さらに、女性ホルモンであるエストロゲンの心血管疾患予防効果に着目し、閉経モデル動物である卵巣摘出ラットを用い、エストロゲンは末梢血管作用を介して、精神性ストレスによる昇圧反応を緩和することを世界に先駆けて報告し(Am J Physiol. 2004)、エストロゲンの新たな作用を提示した。それ以後、末梢血管系ではもちろんのこと中枢神経系に対するエストロゲンの作用にも注目し、酸化ストレス軽減と血圧調節作用の因果関係を探る研究を実施している。

近年、酸化ストレスが高血圧、喫煙、糖尿病などの病態では増加するとの報告が多いが、日常的でマイルドな精神性ストレスに伴う酸化ストレスの変動については解明されていない。我々は、共同研究者である木村らが開発した高感度の時間分解蛍光測定法を用いて、閉経後女性は若年女性に比べて、精神性ストレス負荷時の血圧上昇が大きく、負荷終了後にも高い血圧が持続し、酸化ストレスマーカーである 4-hydroxynonenal (HNE) が上昇することを見出した (Life Sciences 2007)。さらに、予備実験にて、マイルドな精神性ストレスであるケージ交換ストレス負荷により卵巣摘出+偽薬補充群では血漿 Nitrotyrosine (NT) 濃度が増加し、一酸化窒素代謝物 (NOx) が減少するが、卵巣摘出+エストロゲン補充群ではどちらも変化しないことを確認した。

そこで、本研究では、女性ホルモンであるエストロゲンの精神性ストレスによる昇圧反応緩和作用のメカニズムとして酸化ストレス軽減を介した作用に着目し、末梢血管というストレス時の血圧調節に重要な部位に焦点を当て、活性酸素産生系とそれに対抗する抗酸化系への作用の両面から検討を加えた。

2. 研究の目的

本研究では、健康な若年男女と閉経前・後の中年女性を対象に、精神性ストレス時の循環反応をモニターし、末梢血管エコーや血漿酸化ストレスマーカーなどの測定を行うことによって、ストレス時の血圧調節反応における性差、月経周期や閉経の影響について検討した。さらに、エストロゲンの作用メカニズムを解明するため、抗酸化系や NO 産生系に及ぼすエストロゲンの影響について検討した。加えて、昇圧反応と酸化ストレス増大との因果関係を調べるために、閉経後女性に酸化ストレス抑制効果のあるビタミン C の慢

性投与後に同様の実験を行い、その効果について検討を加えた。これらの実験によって、閉経後女性におけるエストロゲン欠乏と精神性ストレス時の血漿酸化ストレス、昇圧反応の増大と遷延化との因果関係を考察した。

ヒトを対象にした実験と平行して、閉経モデル動物である卵巣摘出ラットを用いて、精神性ストレス時の酸化ストレスや昇圧反応に対するエストロゲンの作用メカニズムについて検討した。まず、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏によって、精神性ストレスにより血液や血管などの酸化ストレスが増大するか、エストロゲン補充により、酸化ストレスが軽減されるかどうかを検討した。続いて、エストロゲンの作用機序を明らかにするため、活性酸素産生系および抗酸化系酵素の発現や活性に与える影響を血液や血管などで検討した。さらに、活性酸素産生系酵素の阻害剤投与後にケージ交換ストレス負荷実験を行い、酸化ストレスの軽減が卵巣摘出ラットの過剰な昇圧反応を抑制するかを検討し、酸化ストレスと血圧調節の因果関係を探り、エストロゲンの作用機序を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒトを対象とした精神性ストレス負荷実験

①若年男女および閉経前・後の中年女性に対する精神性ストレス負荷実験

健康な若年男女および 40-50 歳代の閉経前と閉経後女性の被験者各 11 名を対象に急性の精神性ストレスとしてカラーワードテストを実施した。若年女性は月経期と排卵前期の 2 期に行なった。血圧・心拍数の連続測定下に、安静時、ストレス負荷時、回復期に採血を行なうとともに、超音波診断装置を用いて上腕動脈内径・血流速度を測定した。得られた血漿から、神経系のストレスマーカーとして Catecholamine を、酸化ストレスマーカーとして HNE、NT を、抗酸化系として Superoxide dismutase (SOD) 活性等を測定した。酸化ストレスと関連する NOx も測定した。また、血漿 Estradiol 濃度と精神性ストレス負荷時の各指標との関係についても検討した。

②閉経前・後の中年女性のビタミン C 経口投与下における精神性ストレス負荷実験

閉経前及び閉経後女性、各 10 名を対象に、精神性ストレス時の血圧及び末梢血管収縮反応と酸化ストレスの変動との因果関係を検討する目的で、酸化ストレス抑制効果のあるビタミン C を 5 日間経口投与後にカラ

ワードテストを行なった。生理学的・生化学的ストレス反応の解析や血管エコー検査の結果から、酸化ストレス軽減が末梢血管収縮反応に与える影響について検討を加えた。

(2) 閉経モデルラットを用いた精神性ストレス負荷実験

① ケージ交換ストレスによる血中酸化ストレスに対するエストロゲン作用の評価

ウィスター系成熟雌性ラットを用い、正常雌性ラット群、卵巣摘出後プラセボ補充群と卵巣摘出後エストロゲン補充群の3群（各群10匹）を作成した。各群ラットに、飼育している通常のケージから、1 cmの深さの温水が入った別のケージに移す、ケージ交換ストレスを負荷した。安静時および負荷中、回復期に留置静脈カニューレを介して採血を行なった。血中の酸化ストレスと抗酸化能を血漿 HNE・NT 濃度、SOD 活性等から評価し、血漿 NOx を測定した。

② ケージ交換ストレスによる血管の酸化ストレスに対するエストロゲン作用の評価

別の3群のラットを用い、ケージ交換ストレス負荷後に安楽死させ、肝臓、大動脈、腸間膜動脈、下肢筋を摘出した。Western Blot 法により、各臓器の HNE・NT 修飾蛋白質について検討するとともに、NADPH オキシダーゼのサブユニットの発現量についても検討を加えた。さらに、抗酸化能の指標として SOD 活性についても測定した。

③ テレメトリーシステム下での精神性ストレスによる昇圧反応における末梢アンジオテンシン II / NADPH オキシダーゼ系を介した酸化ストレスに対するエストロゲン作用の評価

別の卵巣摘出後プラセボ補充群と卵巣摘出後エストロゲン補充群（各群10匹）を作成した。14週齢にて腹部大動脈にカテーテルを留置し、送信機を体内に埋め込んだ。このテレメトリーシステムによる血圧・心拍数の連続測定下で、ケージ交換ストレスによる昇圧反応が、NADPH オキシダーゼ阻害剤であるアポシニン及びアンジオテンシン II タイプ I 受容体拮抗薬のロサルタン前投与により影響を受けるかどうかを比較し、エストロゲン補充の作用を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒトを対象とした精神性ストレス負荷実験

① 精神性ストレス時の血管反応における性

差及び閉経の影響

カラーワードテストによる昇圧反応には、性差や閉経による影響は見られなかった。しかし、カラーワードテストにより若年男性及び閉経後女性では前腕血流量が減少したのに対し、若年女性・閉経前中年女性では、変化しなかった。また、若年男性ではカラーワードテスト終了後15分目に SOD 活性の上昇が見られたが若年女性では変化がなかった。一方、閉経前に比べ閉経後の中年女性では SOD 活性が低下していたが、カラーワードテストにより増加する傾向を示した。さらに、若年男女は閉経前後の中年女性よりも血漿 NOx 濃度が高かったが、カラーワードテストによる変化はなかった。一方、中年女性は閉経にかかわらず、テスト10分目と終了後5分目に血漿 NOx が増加した。

② 閉経前・後の中年女性における精神性ストレス時の血管反応におけるビタミンCの経口投与の影響

閉経前・後の中年女性に、酸化ストレス抑制効果のあるビタミンCを実験前5日間の経口投与後にカラーワードテストによる精神性ストレス負荷を行なった。対象として、非投与下でも同様の実験を行なった。閉経前・後の女性ともに、カラーワードテストによる血圧・心拍数増加反応にはビタミンC非投与と投与の間に差は見られなかった。一方、閉経後女性では、ビタミンCの投与後にカラーワードテストによる前腕血管抵抗の増加が抑制される傾向を示し、NOxの血中濃度の上昇が見られた。しかし、閉経前女性では、このビタミンCによる効果は認められなかった。以上より閉経後女性のカラーワードテストによる末梢動脈収縮反応には酸化ストレスの関与が考えられたが、さらに例数を増やして検討する必要がある。

(2) 閉経モデルラットを用いた精神性ストレス負荷実験

ケージ交換による血中酸化ストレス増大に対するエストロゲンの作用

正常雌群、卵巣摘出後プラセボ補充群と卵巣摘出後エストロゲン補充群の3群にケージ交換ストレスを負荷した。酸化ストレスマーカーである血漿 NT 濃度は、プラセボ補充群ではエストロゲン補充群より高く、プラセボ補充群でのみストレスによりさらなる上昇を示した。一方、血漿 NOx は、プラセボ補充群ではストレスにより低下したが、エストロゲン補充群では変化しなかった。以上より、閉経モデルラットでは精神性ストレスにより血中で酸化ストレスの増大と一酸化窒素の低下が

起こるが、エストロゲン補充により改善した。

② ケージ交換ストレスによる血管の酸化ストレスに対するエストロゲン作用とその分子メカニズム

別の各群ラットを用いて同様のストレス負荷実験を行ない、摘出した肝臓、大動脈、腸間膜動脈、下肢筋をWestern Blot 法にて解析した。肝臓における分子量73 k DaのNT修飾蛋白質の発現量はプラセボ補充群では他の群に比べて多い傾向を示した。なお、血漿及び各臓器のHNEについては、ストレスやエストロゲンの影響は見られなかった。

③ 閉経モデルラットの精神性ストレスによる昇圧反応におけるアンジオテンシンII / NADPHオキシダーゼ系を介した酸化ストレスの関与とエストロゲン作用

17 週齢のプラセボ補充群とエストロゲン補充群に対し、テレメトリーシステムを用いてケージ交換ストレスを負荷したが、血圧、心拍数上昇反応はプラセボ補充群よりエストロゲン補充群では抑制された。アポニン及びロサルタンの前投与下では、プラセボ補充群とエストロゲン補充群間の昇圧反応の差が小さくなった。また、ストレス負荷による血漿レニン活性の上昇はエストロゲン補充により抑制された。一方、アンジオテンシンIIの静脈内投与による昇圧反応にはエストロゲン補充の効果は見られなかった。以上の結果より、エストロゲンは、精神性ストレス時に、アンジオテンシンIIタイプI受容体を介したアンジオテンシンIIの作用を減少させる可能性が示唆された。

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 8 件)

- ① Akira Takamata, Kayo Torii, Kana Miyake, and Keiko Morimoto. Chronic oestrogen replacement in ovariectomized rats attenuates food intake and augments c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus specifically during the light phase. *British Journal of Nutrition* (in press) 2011(査読有)
- ② 森本恵子, 上山敬司. 精神性ストレス時の循環反応に対するエストロゲンの抑制作用と酸化ストレスの関与. 自律神経 (総説) 47(4):321-327, 2010
- ③ Shibasaki M, Aoki K, Morimoto K, Johnson JM, Takamata A. Plasma hyperosmolality elevates the internal temperature threshold for active thermoregulatory vasodilation during heat stress in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(6):R1706-1712, 2009 (査読有)
- ④ Hara Y, Kohno T, Takamata A, Ueyama T, Morimoto K. Effects of estrogen on stress-induced activation of peptide neurons in PVN in ovariectomized rat. *Ann NY Acad Sci* 1148:99-105, 2008 (査読有)
- ⑤ Morimoto K, Morikawa M, Kimura H, Ishii N, Takamata A, Hara Y, Uji M, Yoshida K. Mental stress induces sustained elevation of blood pressure and lipid peroxidation in postmenopausal women. *Life Sci* 82(1-2):92-107, 2008 (査読有)
- ⑥ Morimoto K, Uji M, Ueyama T, Kimura H, Kohno T, Takamata A, Yano S, Yoshida K. Estrogen replacement suppresses pressor response and oxidative stress induced by cage-switch stress in ovariectomized rats. *Ann NY Acad Sci* 1148:213-218, 2008 (査読有)
- ⑦ 本多恭子, 森本恵子. 女子大生の食行動と情動知能 (EQ) との関係について - 食行動と EQ の専攻別比較 - 家政学研究 55(1):1-7, 2008 (査読有)
- ⑧ 本多恭子, 森本恵子, 朝山正巳. 女子大学生の食行動調査表のカテゴリー別得点と情動知能尺度 (EQS) との相関性について. 肥満学研究. 14(1):49-56, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Shoko Tazumi, HsiaoYun Lin, Teiko Koyama, Akira Takamata, Keiko Morimoto. Estrogen replacement suppresses stress-induced pressor response through angiotensin II -dependent mechanism in ovariectomized rats. 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 29 日, 震災のため誌上開催
- ② HsiaoYun Lin, Shoko Tazumi, Yuka Hirose, Akira Takamata, Keiko Morimoto. Effects of estrogen replacement on high fat diet-induced obesity in ovariectomized rats. 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 29 日, 震災のため誌上開催
- ③ Akira Takamata, Sayumi Taguchi, Saori Ikeda, Eri Aida, Keiko Morimoto. c-Fos

- expression in the orexin A and melanin concentrating hormone neurons in the lateral hypothalamic area and food intake responses to reduced glucose availability. 第88回日本生理学会大会. 2011年3月21日, 震災のため誌上開催
- ④ Keiko Morimoto, Kozue Ohyama, Mai Motohiro, Shigenobu Yano, Akira Takamata. Roles of oxidative stress on the reduction of forearm blood flow induced by mental stress in postmenopausal women. 第87回日本生理学会大会, シンポジウム, Molecular mechanisms for the regulation of vascular tone and its abnormalities, 2010年5月19日, 盛岡市
- ⑤ Akira Takamata, Kana Miyake, Kotomi Ueda, Mami Miyake, Megumu Hasegawa, Yuko Nakamura, Yoko Fujita, Keiko Morimoto. Estrogen attenuates food intake and hypothalamic c-Fos expression in response to reduced glucose availability during light phase. 第87回日本生理学会大会, 2010年5月19日, 盛岡市
- ⑥ 森本恵子. 精神性ストレス時の循環反応に対するエストロゲンの抑制作用と酸化ストレスの関与, 第62回日本自律神経学会総会シンポジウム「循環調節異常における酸化ストレスの役割」, 2009年11月6日(国内招待講演), 和歌山市
- ⑦ 森本恵子, 大山こず江, 鷹股亮. 中年女性における精神性ストレスによる末梢血管反応に対する閉経の影響. 日本家政学会第61回大会, 2009年8月31日, 武庫川女子大
- ⑧ 河上瑞穂, 池畑あい, 森本恵子. 卵巣摘出ラットにおけるインスリン抵抗性及びインスリン情報伝達経路に対するエストロゲン補充の影響. 日本家政学会第61回大会, 2009年8月31日, 武庫川女子大
- ⑨ 森本恵子. 精神性ストレスによる循環反応の性差及びエストロゲンの作用, 日本心理学会第73回大会ワークショップ「男のこころ、女のこころ—その生物学的基盤」, 2009年8月26日(国内招待講演), 京都市
- ⑩ Ai Ikehata, Mizuho Kawakami, Sumire Ohkawa, Asumi Yoshida, Masami Uji, Akira Takamata, Ken-ichi Yoshida, Keiko Morimoto. Effects of estrogen replacement on oxidative stress in vasculature related to psychological stress in ovariectomized rats. 36th International Congress of Physiological Sciences, 1 August, 2009, Kyoto

- ⑪ Mizuho Kawakami, Ai Ikehata, Marie Ro, Masami Uji, Ken-ichi Yoshida, Keiko Morimoto. Effects of estrogen replacement on insulin resistance in ovariectomized rats. 36th International Congress of Physiological Sciences, 30 July 2009, Kyoto
- ⑫ Keiko Morimoto, Tomoko Hata, Yurina Omuro, Yasuko Hara, Akira Takamata, Takashi Ueyama. Effects of estrogen on stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in paraventricular hypothalamic nucleus of rats. 36th International Congress of Physiological Sciences, 30 July, 2009, Kyoto

〔図書〕(計1件)

森本恵子, 他, 日本ストレス学会, ストレス科学辞典, 2011, ストレス科学辞典, 1137(3)

〔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

<http://www.nara-wu.ac.jp/life/health/morimoto/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 恵子 (MORIMOTO KEIKO)
奈良女子大学・生活環境学部・教授
研究者番号: 30220081

(2) 研究分担者

鷹股 亮 (TAKAMATA AKIRA)
奈良女子大学・生活環境学部・教授
研究者番号: 00264755

上山 敬司 (UEYAMA TAKASHI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50264875

木村 博子 (KIMURA HIROKO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00053299

吉田 謙一 (YOSHIDA KEN-ICHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40166947