



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1971号
学位記番号	第402号
氏名	森 泰毅
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	神経性勃起不全に対する新規治療法の開発
論文審査担当者	主査： 青山 峰芳 副査： 松永 民秀， 中川 秀彦， 肥田 重明

学位論文内容要旨  
神経性勃起不全に対する新規治療法の開発

森 泰毅

【序論】

前立腺がんの根治的な治療法として前立腺全摘術 (radical prostatectomy: RP) が用いられる。しかし、手術の際に前立腺に沿って存在する海綿体神経 (cavernous nerve: CN) を損傷させるため、術後多くの患者で神経性の勃起不全 (erectile dysfunction: ED) を発症する。神経温存療法やロボット支援術などの技術が向上しているものの、RP 後の患者の ED 発症率は依然として改善していない。また、ED の第一治療薬として知られているホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) -5 阻害薬は神経性 ED に対しては治療効果が低いことも知られている。その原因として、神経性 ED の患者では陰茎内の一酸化窒素 (nitric oxide: NO) の産生が低下していることが報告されている。そのため、NO/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 経路において NO の下流の PDE-5 を標的とする PDE-5 阻害薬は効果を示さないことが考えられる。また、NO/cGMP 経路の活性化を標的とした治療は対症療法に過ぎず、神経性 ED の根治的な改善を目指すためには損傷した CN を標的とした治療が有効であることも考えられる。

そこで第一章では陰茎内における NO 放出の制御を可能とする赤色光応答性 NO ドナー「NORD-1」の神経性 ED に対する効果を検討した。また、第二章では神経性 ED の根治的な改善をめざした非細胞性製剤「骨髄由来幹細胞濾液」の神経性 ED に対する効果を検討した。

【本論】

第一章 赤色光応答性 NO ドナー「NORD-1」の神経性 ED に対する効果

背景

序論でも述べたように、RP 後の患者の陰茎内では NO の産生が低下することが知られている。そのため、NO 補充療法は神経性 ED に対して有効な治療法であると考えられている。しかし、NO は半減期の短さや全身性の副作用などの問題があるため臨床応用には至っていない。そこで我々はこれまでに、赤色光の照射により NO の放出を時間的・空間的に制御できる赤色光応答性 NO ドナー「NORD-1」を開発した。これまでに NORD-1 の陰茎内投与と赤色光照射により無処置のラットの勃起機能を増強することを明らかにした。本研究では NORD-1 と赤色光照射が神経性 ED を改善するかを神経性 ED モデルラットとして広く用いられている両側海綿体神経損傷 (bilateral cavernous nerve injury: BCNI) モデルラットを用いて検討した。

方法

8 週齢の雄性 Wistar-ST ラット (n=24) に対し、Sham 手術 (n=12) または BCNI 手術 (n=12) を行った。4 週後に陰茎海綿体内圧 (intracavernous pressure: ICP) 測定法によ

り勃起機能を評価した。ICP 測定中に NORD-1 (n=6) あるいは対照化合物である SiR650 (n=6) を各群に投与し、計 4 群とした。海綿体神経の電気刺激は (i) 試験薬投与前 (赤色光照射なし) (ii) 試験薬投与後 (赤色光照射なし) (iii) 試験薬投与後 (赤色光照射あり) の計 3 回行った。実験終了後に NORD-1 の陰茎内の局在を評価するために陰茎を摘出した。摘出した陰茎を用いて連続凍結切片を作製し、一方は蛍光顕微鏡を用いて NORD-1 の局在を観察し、もう一方は平滑筋マーカーである alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) で平滑筋組織を標識し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

## 結果

Figure 1 に各群の代表的な ICP チャートを示す。(i) 試験薬投与前 (赤色光照射なし) において BCNI 群の ICP は Sham 群と比較して低下しており、(ii) 試験薬投与後 (赤色光照射なし) においても同様の傾向を示した。一方で図内の濃色の背景で示した (iii) 試験薬投与後 (赤色光照射あり) においては Sham 群、BCNI 群それぞれで対照化合物である SiR650 を投与した群と比較して、NORD-1 を投与した群においては赤色光の照射で ICP の上昇が観察された。勃起機能を示す ICP/mean arterial pressure (MAP) 比を解析した結果、(i) 試験薬投与前 (赤色光照射なし) (ii) 試験薬投与後 (赤色光照射なし) において、BCNI + SiR650 群の ICP/MAP は Sham+SiR650 群と比較して有意に低下した。BCNI + NORD-1 群と Sham+NORD-1 群の比較においても同様の傾向がみられた。一方で (iii) 試験薬投与後 (赤色光照射あり) では Sham+NORD-1 群の ICP/MAP は Sham + SiR650 群と比較して有意に上昇した。

BCNI+NORD-1 群の ICP/MAP も BCNI+SiR650 群と比較して有意に上昇した。次に、海綿体神経電気刺激中の全身血圧の変動を評価するために電気刺激終了時の MAP (End-MAP) を電気刺激開始時の MAP (Start-MAP) で割った End-MAP/Start-MAP 比を算出した。その結果、いずれの群においても 3 点の電気刺激において全身血圧の変動に差は見られなかった。次に、実験終了時に摘出した陰茎組織を用いて切片を作製し、NORD-1 の局在を蛍光観察した。その結果、陰茎内に投与した NORD-1 は海綿体内部にのみ存在し、

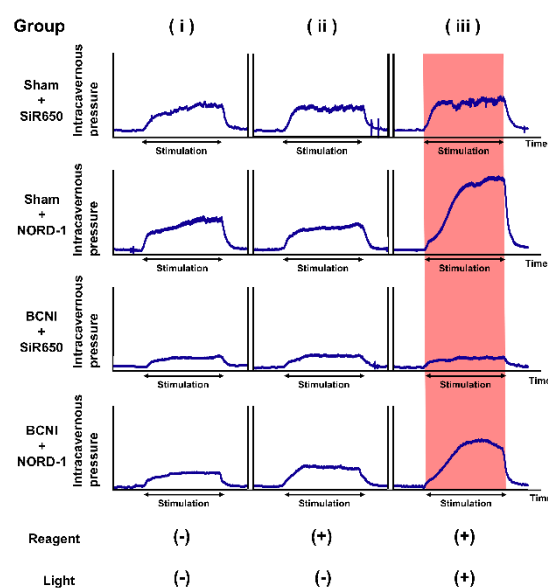


Figure 1. Representative ICP charts in each group during electrostimulation (i) without reagent and light, (ii) with reagent and without light, and (iii) with reagent and light. The electrostimulation period is shown by double headed arrow along time axis. Red-light irradiation (630–690 nm, 115 mW) period is indicated by the dark background.

ICP: intracavernous pressure.

陰茎海綿体の外部には存在しなかった。また、 $\alpha$ -SMA で標識した陰茎組織と対比して観察した結果、NORD-1 は海綿体平滑筋にも到達していることが確認された。

### 考察

本研究の結果より、NORD-1 の投与と赤色光照射により無処置ラットと同様に BCNI モデルラットの勃起機能が改善されることが明らかとなった。また、陰茎内に投与した NORD-1 は海綿体平滑筋部分に到達していた。このことから、NORD-1 は赤色光照射により NO を放出し、海綿体平滑筋を弛緩させることで陰茎内の血液流入量を増加させ、勃起機能の上昇に寄与したと考えられる。また、NORD-1 投与後、赤色光照射中においても全身血圧に変動は見られなかった。このことから本治療により低血圧などの副作用を起すリスクは低いと考えられる。さらに、NORD-1 は海綿体内部にのみ存在し、尿道などの周辺の組織には存在しなかった。したがって、海綿体への局所的な投与により尿道の弛緩による副作用を起す可能性は低いと考えられる。以上のことから NORD-1 は神経性 ED に対して有効な治療法であると考えられ、NO の全身作用による低血圧や尿道の弛緩による副作用を起す可能性は低いと考えられる。また、本研究では本治療による陰茎海綿体組織への影響を検討することはできなかった。生体内で過剰となった NO はフリーラジカルとして組織へ障害を与える可能性が考えられる。したがって陰茎組織内の酸化ストレスマーカーの評価などのさらなる検討が必要である。

## 第二章 非細胞性製剤「骨髄由来幹細胞濾液」の神経性 ED に対する効果

### 背景

損傷した神経を再生させる根治的な治療法として間葉系幹細胞を用いた治療が注目されている。間葉系幹細胞は自己複製能を持つだけでなく、細胞からの分泌物の周囲への作用（パラクライン効果）により、損傷部位の再生能を併せ持つことが知られている。これまでに神経性 ED モデルラットを用いた検討で、骨髄由来間葉系幹細胞（bone marrow-derived mesenchymal stem cells: BM-MSC）を静脈内投与することで勃起機能が改善することが報告されている。そのため、BM-MSC の投与は神経性 ED に有効である可能性を有している。しかし、幹細胞自体を治療に用いる場合、幹細胞の維持や管理に時間とコストがかかることが問題とされている。そこで我々はこれまでに幹細胞を凍結破砕し、内容物のみを抽出した非細胞性製剤「幹細胞濾液（Filtrated stem cell lysate: FSCL）」を開発した。本研究では BM-MSC を用いて作製した「骨髄由来幹細胞濾液（Filtrated bone marrow-derived mesenchymal stem cell lysate: BSCL）」の神経性 ED に対する効果を検討した。

### 方法

8 週齢の雄性 Wistar-ST ラットの大腿骨より BM-MSC を採取し、培養した。その後、細胞を回収し、 $1.0 \times 10^6$  cells/mL になるようにリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）で希釈した。希釈液を凍結破砕した後にフィルターで濾過し BSCL を得て、以下の 3 つの実験を行った。

(実験1) 8週齢の雄性 Wistar-ST ラット (n=24) を無作為に Sham+PBS 群、BCNI+PBS 群、BCNI+BSCL 群の 3 群に分けた (各群 n=8)。Sham+PBS 群のラットには Sham 手術を行ったのちに PBS を陰茎内に投与した。BCNI+PBS 群のラットには BCNI 手術を行った後に PBS を陰茎内に投与した。BCNI+BSCL 群のラットには BCNI 手術を行った後に BSCL を陰茎内に投与した。4 週間の観察期間終了後に ICP 測定法により勃起機能を評価した。

(実験2) 8週齢の雄性 Wistar-ST ラット (n=24) を、(実験1) と同様に無作為に 3 群に分けた (各群 n=8)。手術から 3 週後に逆行性神経トレーサー (fluorogold: FG) を陰茎内に投与した。その 1 週後に骨盤神経叢 (major pelvic ganglion: MPG) を採取し、FG を蛍光観察した。対比染色として神経細胞マーカーである protein gene product 9.5 (PGP9.5) で神経細胞を標識し、蛍光観察した。各群の MPG における FG 陽性細胞数/PGP9.5 陽性細胞数 (FG positive/PGP9.5 positive) を算出し、CN の損傷度を評価した。

(実験3) 11-13 週齢の雄性 Wistar-ST ラットから MPG を摘出し、コラーゲンゲル内に包埋した。その上から、濃度の異なる BSCL (0, 50, 125, 250, 500 ng/mL) を含む無血清培地を添加し、48 時間インキュベーションを行った。その後、Z スタック顕微鏡を用いて MPG から伸長した神経の長さを測定した。各 MPG から最も長く伸長した 3 本の神経を選択し、その平均値を算出することで BSCL の神経伸長効果を評価した。

## 結果

(実験1) Figure 2 に各群の ICP/MAP 比を示す。BCNI+PBS 群の ICP/MAP は Sham+PBS 群と比較して有意に低下した ( $P < 0.01$ )。また、BCNI+BSCL 群の

ICP/MAP は BCNI+PBS 群と比較して有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。

(実験2) Figure 3 に各群の FG positive / PGP9.5 positive 比を示す。BCNI+PBS 群の FG positive/PGP9.5 positive は Sham+PBS 群と比較して有意に低下した ( $P < 0.05$ )。また、BCNI+BSCL 群の FG positive/PGP9.5 positive は BCNI+PBS 群と比較して上昇の傾向が見られた ( $P < 0.1$ )。

(実験3) Figure 4 に各条件における神経伸長の結果を示す。BSCL を含む培地で培養した MPG において、BSCL を含まない場合 (0 ng/mL) と比較してより長く伸長した神経が観察された。また、BSCL の神経伸長効果は濃度依存的であった。

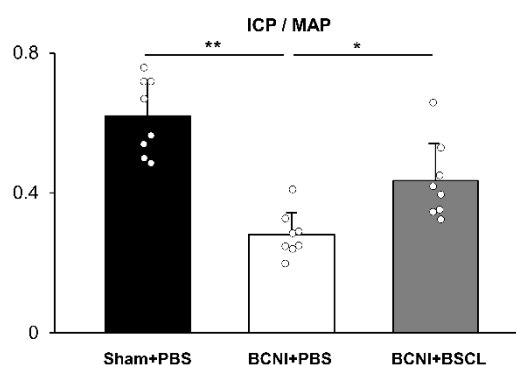


Figure 2. Graph shows ICP to MAP ratios in each group. Data are reported as mean  $\pm$  standard deviation (n=8 per group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , using Bonferroni's multiple  $t$ -tests. ICP: intracavernous pressure. MAP: mean arterial pressure.

## 考察

本研究より、BCNI手術直後にBSCLを陰茎内投与することで4週後の勃起機能が改善することが明らかとなった。そのため、RP術直後のBSCLの投与は神経性EDを根治的に改善する可能性が示唆された。また、逆行性神経トレーサーを用いた検討より、BCNIにより損傷を受けたCNはBSCLの投与により修復される可能性が示唆された。さらに、*in vitro*における検討により、BSCLは神経伸長効果を持つことが示唆された。過去の報告ではBCNI手術から48時間後までにMPGにおいて神経栄養因子の含量が低下し、7日後までには手術前の水準まで戻ることが報告されている。そのため、本研究においてBSCLの投与により勃起機能が改善した機序として、CNの損傷直後に低下した神経栄養因子を、BSCLの投与により補うことでCNの修復が促進された可能性が考えられる。よって、RP適応患者においても、術直後に神経栄養因子を補うことで、術後も勃起機能の維持が期待できると考えられる。

### 【総括】

第一章では陰茎への局所的なNORD-1の投与と赤色光照射により陰茎内のNOを補うことで全身性作用を伴わずに神経性EDを改善できる可能性を見出した。また本研究では単回投与での効果を検討したが、RP術直後からNORD-1の投与と赤色光照射を繰り返し行うことで陰茎海綿体組織の線維化の進行を防ぎ、病態の進行を緩和することが可能であるかもしれない。そのため、本治療の反復使用が勃起機能や陰茎組織に与える影響については今後さらなる検討が必要である。

第二章ではBSCLをCNの損傷直後に投与することでCNの再生が促進され、神経性EDを根治的に改善する可能性を見出した。BSCLは一度に大量に作製し、凍結により長期間保存することも可能である。よって従来の幹細胞治療よりも簡便で安価に使用できるため、臨床応用の実現可能性が高いといえる。今後はBSCLに含まれる有効成分を同定するなど、BSCLが神経

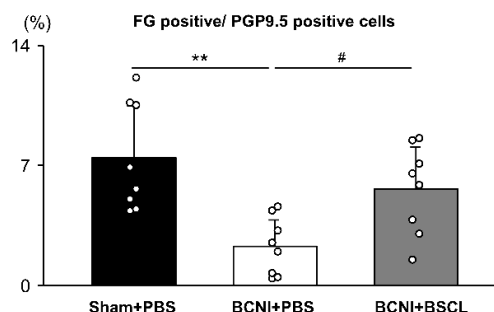


Figure 3. Graph shows the ratios of FG positive/PGP9.5 positive cells in MPG. Data are reported as mean  $\pm$  standard deviation ( $n=8$  per group). #  $P < 0.1$ , \*  $P < 0.05$ , using Bonferroni's multiple  $t$ -tests. PGP9.5: protein gene product 9.5. FG: Fluorogold. MPG: major pelvic ganglion.

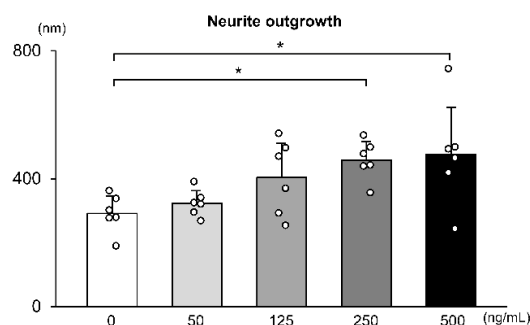


Figure 4. Graph shows neurite outgrowth in each concentration of BSCL. The length of neurite outgrowth in each MPG was defined the average of the 3 longest neurons. Data are reported as mean  $\pm$  standard deviation ( $n=6$  per group). \*  $P < 0.05$ , using Dunnet's multiple  $t$ -tests. MPG: major pelvic

性 ED を改善する機序についてさらなる検討が必要である。

本研究では神経性 ED に対する新たな治療薬の開発を目指し、神経性 ED モデルラットを用いた基礎実験を行った。以上の結果より、本研究で用いた 2 種の製剤はいずれも神経性 ED に対する新たな治療薬になりうる可能性が示された。

(基礎となる報文)

1. T. Mori, Y. Hotta, N. Ieda, T. Kataoka, H. Nakagawa, K. Kimura.  
Efficacy of a Red-Light Controllable Nitric Oxide Releaser for Neurogenic Erectile Dysfunction; a Study Using a Rat Model of Cavernous Nerve Injury  
*The World Journal of Men's Health*, 2022, *In press*
2. T. Mori, Y. Hotta, T. Kataoka, S. Matsumoto, T. Yamamoto, K. Kimura.  
Effect of Filtrated bone marrow-derived stem cells lysate on erectile function and nerve regeneration in rats with neurogenic erectile dysfunction  
*In preparation*

(参考論文)

1. Y. Hotta, T. Kataoka, T. Mori, K. Kimura  
Review of a Potential Novel Approach for Erectile Dysfunction: Light-Controllable Nitric Oxide Donors and Nanoformulations  
*Sexual Medicine Reviews*, 8(2), 297-302, 2020
2. T. Mori, Y. Hotta, D. Nakamura, R. Yahagi, T. Kataoka, K. Kimura  
Enhancement of the RhoA/Rho kinase pathway is associated with stress-related erectile dysfunction in a restraint water-immersion stress model  
*Physiological Reports*. 9(20), e15064. 2021.
3. T. Kataoka, T. Mori, J. Suzuki, Y. Kawaki, Y. Kito, Y. Hotta, Y. Kawade, Y. Maeda, K. Kimura  
Oxaliplatin, an Anticancer Agent, Causes Erectile Dysfunction in Rats due to Endothelial Dysfunction  
*Journal of Sexual Medicine*, 18(8), 1337-1345, 2021
4. T. Kataoka, H. Ito, T. Mori, Y. Hotta, A. Sanagawa, Y. Maeda, Y. Furukawa-Hibi, K. Kimura  
Testosterone improved erectile function by upregulating transcriptional expression of growth factors in late androgen replacement therapy model rats  
*International Journal of Impotence Research*, 2022, doi: 10.1038/s41443-022-00627-8.
5. T. Kataoka, J. Hidaka, J. Suzuki, T. Mori, D. Nakamura, Y. Hotta, A. Sanagawa, Y. Maeda, Y. Furukawa-Hibi, K. Kimura  
Evaluating the Effects of Low Carbohydrate and High Protein Diet on Erectile Function in Rats  
*Sexual Medicine*, 10(2), 100500, 2022