

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591883

研究課題名（和文）

勃起（海綿体）神経の再生医療—神経栄養因子による遺伝子治療と神経再生の機序の研究

研究課題名（英文）

Cavernous nerve regeneration and recovery of erectile function following cavernous nerve injury

研究代表者

久末 伸一 (HISASUE SHIN-ICHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90404673

研究成果の概要（和文）：ウィルスベクターを用いて、神経栄養因子neurturinを神経損傷後の海綿体神経に導入し、勃起能回復や海綿体神経再生促進させることに成功した。神経剥離のみで神経機能低下が起こることそれには炎症が関与している可能性が高いことがわかった。パートナーである雌の存在が勃起能回復を促進することが示された。ヒトの海綿体神経の解剖について新たに前立腺周囲の勃起神経の神経線維分布についても検討を行い、術前勃起障害がある患者では線維数が減少していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We successfully induced the cavernous nerve regeneration following cavernous nerve injury via herpes simplex virus vector-mediated delivery of neurturin. We found that cavernous nerve dissection alone caused nerve injury-related erectile dysfunction, and the inflammatory response could play the role. We also found that cohabitation with young female partner enhances the functional recovery. In the study of cavernous nerve distribution around the prostate in human, it is revealed that fiber distribution is decreased in the patients with erectile dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：再生医学、アンドロロジー、海綿体神経

1. 研究開始当初の背景

我が国で増加している前立腺癌の根治療法として根治的前立腺摘除術が挙げられる。その手術に伴う特徴的な合併症として勃起障害が挙げられる。神経温存術が導入され勃

起能の温存が可能になったが十分ではなく、機能回復には期間を要する。早期勃起能回復は手術の適応となる前立腺がん患者の生活の質を考えるうえで重要な問題である。

2. 研究の目的

(1) SD ラットを用いて複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターを用いて、神経栄養因子 neurturin を神経損傷後の海綿体神経に導入し、勃起能回復や海綿体神経再生促進を検討する。

(2) ラット神経損傷モデルにはさまざまなものがあるが、神経温存根治的前立腺摘除術のモデルとして新たに神経を剥離するだけのモデルを確立し、その機能回復のメカニズムを探る。

(3) 勃起能回復において、より好ましい環境を検討する目的にパートナーである雌と共棲させたモデルとを用いて検討を行う。

(4) ヒト海綿体神経に特異的な nNOS をマーカーとして神経非温存の根治的前立腺摘除術標本を用いて、ヒトの前立腺周囲の神経走行を免疫染色で検討する。

3. 研究の方法

(1) 8 週齢雄 SD ラットを用いてラット海綿体神経を部分的に損傷させ、神経損傷モデルとする。神経損傷後、2 週、4 週、8 週、12 週程度の間隔で、勃起能と神経損傷（再生）の程度を評価する。複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターは、Department of Molecular Genetics & Biochemistry, University of Pittsburgh において作成されたものを使用する。ラットの勃起能は、海綿体内圧/血圧比にて評価する。陰茎海綿体脚に、圧モニターに接続したチューブを挿入し、血圧と同時に陰茎海綿体内圧を測定する。勃起は、骨盤神経節や骨盤神経を電極にて電気刺激することにより、誘導する。機能評価の約一週間前に陰茎海綿体脚に逆行性トレーサーである Fluorogold (FG) を注射し、その骨盤神経節での発現状態を確認することにより、神経損傷あるいは再生の程度を評価する。海綿体神経損傷後に、前述した神経栄養因子を組み込んだウイルスベクターを局所に投与し、経時的に勃起能の変化を検討する。神経再生の状態を、FG による逆行性ト्रेसなどにより検討する。ウイルスベクターは、その用量依存性も検討する。

(2) SD ラットを両側海綿体神経剥離群、両側海綿体神経切断群、正常コントロールに分け、それぞれの神経を処置し、1, 2, 4, 8 週後の ICP/BP, FG 陽性細胞数、nNOS 陽性細胞数を検討した。

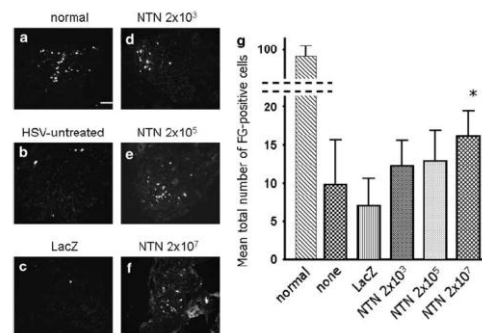
(3) 試験開始前に挫滅による両側海綿体神経損傷術および両側精管結紮術を施行した群 (n=5) と両側海綿体神経損傷と両側精管結

紮術 1 週間後に同週齢の雌 SD ラットと共棲させた群 (n=5)、雌をケージごとで一週間おきにローテーションする群；共棲回転群 (n=5) に分けた。海綿体神経損傷 1 ヶ月後に片側骨盤神経の電気刺激による海綿体内圧測定 (ICP) を施行し、勃起能の評価を行った。

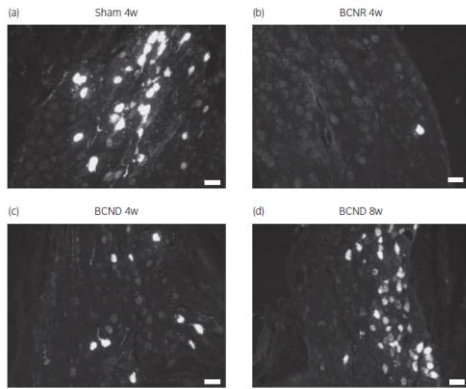
(4) 対象は神経非温存根治的前立腺摘除術を受けた限局性前立腺癌患者 23 人から採取した前立腺標本 46 側である。平均年齢は 67.2 歳、IIEF 平均値は 10.9、平均夜間陰茎周増大値は 2.27cm であった。前立腺尖部、中部、底部の 3 箇所において、左右半割面を 6 等分し 0-1 時、1-2 時、2-3 時、3-4 時、4-5 時、5-6 時で検討した。ヒト海綿体神経に特異的な nNOS をマーカーとして神経非温存の根治的前立腺摘除術標本を用いて、ヒトの前立腺周囲の神経走行を免疫染色で検討する。

4. 研究成果

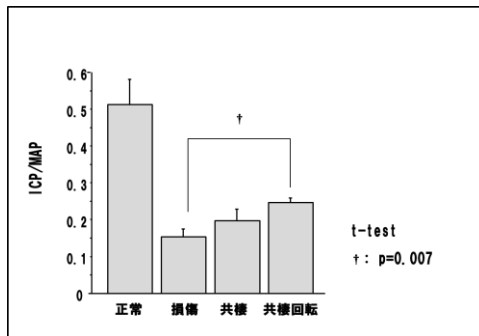
(1) 神経損傷後 2, 4 週目に、勃起能の評価として海綿体内圧/血圧比 (ICP/AP) を測定した。その結果、海綿体神経損傷後は術後 2 週から有意に ICP/AP が低下、4 週目でさらに低下した。神経再生の評価目的に、逆行性トレーサーである Fluorogold (FG) を組織採取 7 日前に投与し、骨盤神経節での発現を検討した。その結果、骨盤神経節での FG 陽性細胞数は 4 週目まで経時的に減少した。HSV-neurturin 導入後には、コントロールベクター投与群やウイルス非投与群に比し、用量依存性に有意に ICP/AP の回復が見られ、骨盤神経節で FG 陽性細胞数の増加が見られた。現在までの結論として、神経栄養因子 neurturin の導入は、海綿体神経損傷後の勃起能回復、神経再生促進に対して有用と考えられた。



(2) 神経を剥離するだけのモデルで 2 週、4 週で有意に勃起能低下を認めた。た、nNOS 陽性神経細胞数と FG 陽性細胞数も低下した。IL-6 と IL-6 受容体の発現の亢進を認め、この炎症が海綿体神経機能低下に密接にかかわっている可能性が示唆された。(図は FG 陽性細胞。BCNR (海綿体神経切断)、BCND, (海綿体神経剥離))

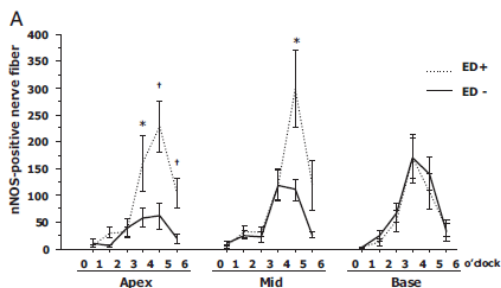


(3)海綿体神経損傷 4 週後の ICP/BP (血圧) は損傷群で 0.153 ± 0.049 (Mean \pm SD) と正常群 0.513 ± 0.156 と比較して有意に低かった ($p=0.001$)。またパートナーとの共棲群では 0.196 ± 0.075 であり、損傷群と有意な差を認めなかった ($p=0.315$) 共棲回転群は 0.247 ± 0.030 と損傷群と比較して有意に上昇した ($p=0.007$)。パートナーの存在は勃起能回復に影響を与えている可能性が示唆された。ま



た、パートナーとの単独共棲では優位な回復が得られなかったが、クーリッジ効果 (新しい雌の投入で性行動が新たに亢進すること) を利用することによって勃起能回復は有意に改善した。

(4)半周の総 nNOS 陽性線維数は 273.7 ± 13.2 本であった。各領域の nNOS 陽性神経線維数の分布率は 0-1 時 $4.7 \pm 1.2\%$ 、1-2 時 $9.4 \pm 1.6\%$ 、2-3 時 $11.2 \pm 2.2\%$ 、3-4 時 $30.8 \pm 2.3\%$ 、4-5 時 $33.7 \pm 2.6\%$ 、5-6 時 $7.8 \pm 2.6\%$ と従来神経血管束とされる 3-5 時で有意に多かった。(Fisher PLSD, $p < 0.01$) 海綿体神経



に特異的な nNOS 陽性神経線維分布の検討結

果はこれまでの S-100 免疫染色による検討結果とほぼ同様であった。神経血管束以外の nNOS 陽性神経線維は約 30%認めた。今後、神経線維数や分布と勃起能の関連について検討を要すると考えられた。

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 10 件)

- ① Hisasue S, Hashimoto K, Kobayashi K, Takeuchi M, Kyoda Y, Sato S, Masumori N, Tsukamoto T: Baseline erectile function alters the cavernous nerve quantity and distribution around the prostate. J Urol 2010;184:2062-2067. (査読有)
- ② Hisasue S, Seney ML, Immerman E, Forger NG: Control of cell number in the bed nucleus of the stria terminalis of mice: Role of testosterone metabolites and estrogen receptor subtypes. J Sex Med 2010;7:1401-1409. (査読有)
- ③ Hashimoto K, Hisasue S, Masumori N, Kobayashi K, Kato R, Fukuta F, Takahashi A, Hasegawa T, Tsukamoto T: Clinical safety and feasibility of a newly developed, simple algorithm for decision-making on neurovascular bundle preservation in radical prostatectomy. Jpn J Clin Oncol 2010;40:343-348. (査読有)
- ④ Giuliano F, Pfau J, Balasubramanian S, Hedlund P, Hisasue S, Marson L, Wallen K: Experimental models for the study of female and male sexual function. J Sex Med 2010;7:2970-2995. (査読有)
- ⑤ Soh J, Kaiho Y, Kikuchi E, Oya M, Yoshioka K, Nakagami Y, Hatano T, Ozu C, Horiguchi Y, Namiki K, Tachibana M, Hisasue S, Tanaka N, Asakawa I: Characteristics and management of erectile dysfunction after various treatments for prostate cancer. Int J Urol 2010;17:689-697. (査読有)
- ⑥ 久末伸一: ED の基礎と臨床 加齢による神経栄養因子受容体の骨盤神経節細胞における遺伝子発現変化. 自律神経 2010;47:86-89. (査読無)
- ⑦ Kato R, Wolfe D, Coyle CH, Wechuck JB, Tyagi P, Tsukamoto T, Nelson JB, Glorioso JC, Chancellor MB, Yoshimura N.: Herpes simplex virus vector-mediated delivery of neurturin rescues erectile dysfunction of

cavernous nerve injury. Gene Ther. 2009 Jan;16(1):26-33. (査読有)

- ⑧ Yamashita S, Kato R, Kobayashi K, Hisasue S, Arai Y, Tsukamoto T.: Nerve injury-related erectile dysfunction following nerve-sparing radical prostatectomy: a novel experimental dissection model.: Int J Urol. 2009 Nov;16(11):905-11. Epub 2009 Sep 22. (査読有)
- ⑨ 加藤隆一, 久末伸一, 小林皇, 橋本浩平, 塚本泰司: 【前立腺全摘除術における海綿体神経温存・再建 update】術後陰茎(ED)リハビリテーションの有用性. 泌尿器外科 2009;22:139-143. (査読有)
- ⑩ 久末伸一, 舛森直哉, 橋本浩平, 高橋聡, 伊藤直樹, 鈴木孝浩, 齋藤豪, 塚本泰司: 根治的子宮摘除術における神経温存の下部尿路機能回復への影響. 泌尿器外科 2009;22:61-66. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 久末伸一:海綿体神経損傷ラットモデルを用いた ED リハビリテーションの有用性の検討 第21回日本性機能学会学術総会 2010年8月27日名古屋
- ② 久末伸一:The distribution of neuronal NOS-positive nerve fibers around the human prostate: 3rd International Consultation on Sexual Medicine 2009年7月10日 フランス (パリ)
- ③ 加藤隆一:神経栄養因子と海綿体神経再生 -ウイルスベクターを用いた研究-第17回泌尿生殖器における信号物質の局在と役割に関する研究会 2008年12月6日 花巻

6. 研究組織

(1)研究代表者

〈2008年度〉

加藤 隆一 (KATO RYUICHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 1 0 3 1 5 5 0 9

〈2009-2010年度〉

久末 伸一 (HISASUE SHIN-ICHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 9 0 4 0 4 6 7 3

(2)研究分担者

小林 皇 (KOBAYASHI KOU)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 3 0 4 0 4 6 6 9

橋本 浩平 (HASHIMOTO KOUHEI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 4 0 4 0 4 6 7 8