

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592381

研究課題名(和文) 加齢による海綿体神経の機能回復低下機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of deteriorated recovery of cavernous nerve function with aging.

研究代表者

久末 伸一 (Hisasue, Shin-ichi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90404673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：パートナーである雌の存在と雌を交代させることにより勃起能回復を促進することが示され、クーリッジ効果を利用した実験モデルを確立した。また、抗酸化作用、抗炎症作用を有するとされるエビプロスタットを術前から内服することで海綿体神経損傷後の勃起能障害は有意に改善した。ヒト前立腺周囲に広くnNOS陽性神経細胞による神経節が形成されていることが明らかになり、これらの分布は加齢で減少することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The cohabitation with female rats w/ rotation induces the recovery from ED following CN injury. We established the rehabilitation animal model using the 'Coolidge effect.' Preoperative administration of Eviprostat improved the erectile function following cavernous nerve injury, which implicated that the anti-inflammatory and anti-oxidative effect induces the early recovery of erectile function following cavernous nerve injury. Higher age has a negative impact on the nNOS-positive ganglionic neuron count in human. This result will lead to the rationale why older people show the poor outcome in their recovery of erection following radical prostatectomy.

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 加齢

1. 研究開始当初の背景

わが国でも昨今、前立腺がん罹患率の上昇が問題となってきている。限局性前立腺がんに対する治療は主に根治的前立腺摘除術である。本術式においては術後の勃起障害(ED)が大きな問題であるが、神経温存術をもってしても術後の ED 率はいまだに高い(Shimizu T, Hisasue S et al Int J Urol. 2005)。

前立腺がん患者は高齢者に多いのが特徴である。そもそも、加齢と ED は密接に関連しており、加齢ラットの勃起時の海綿体内圧は若年ラットと比較して有意に低下している。術後の勃起能回復遅延について、加齢ラットでは神経再生や神経可塑性が遅延・低下することが原因の一つと考えられている(Hisasue et al. Neurobiol Aging 2006)。最近では加齢に伴ったテストステロンの低下とメタボリック症候群、さらに酸化ストレスの関与も指摘され、これらが複雑に絡み合って、機能回復に影響を与えているものと考えられる。

本研究計画は加齢およびそれに伴った生物学的変化が、海綿体神経機能回復に与える影響についてまだ解明されていない基礎研究を完成し、高齢者に多い前立腺がん患者の術後勃起能回復について新しい戦略や治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。計画を進めるうえで、申請者は以下のような予備的な研究結果を得ている。

2. 研究の目的

前立腺がんに対する根治的前立腺摘除術後の勃起能の早期回復は、いまだに大きな課題である。早期回復を妨げる原因として前立腺がん患者の罹患年齢が高いことが挙げられている。しかしながら、加齢がいかに海綿体神経(副交感神経)損傷後の機能回復の低下につながるか、そのメカニズムは明らかではない。本研究では加齢による海綿体神経の機能回復低下の機序とその治療戦略を明らかにする。

加齢ラットと若年ラットの海綿体神経損傷モデルを作成し、経時的勃起能/神経機能回復の差を明らかにし、効果的なリハビリモデルを確立する。

抗炎症作用と加齢による神経機能回復の検討について検討を行う。神経損傷に伴った炎症・酸化ストレスが加齢ラットの骨盤神経節内の炎症・酸化ストレス関連遺伝子および神経機能関連遺伝子の発現に与える影響を明らかにする。

前立腺周囲の神経節と加齢の関連について nNOS による免疫染色で検討を行う。

3. 研究の方法

雌と共棲させることによるリハビリテーションモデル作成対象は雄 SD ラット(8 週齢)である。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)に分けた。また、両側精管結紮術のみを施行したラットを正常コントロールとした(n=5)。海綿体神経損傷 1 ヶ月後に損傷群、共棲群、正常群とも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。

抗炎症作用と加齢による神経機能回復の検討。我々は海綿体神経を剥離するだけの海綿体神経損傷ラットモデルを用いて IL-6 を中心とした炎症反応が勃起能回復遅延に関与している可能性を報告してきた。数種の植物エキス複合製剤であるエビプロスタットには抗炎症作用があることが知られている。今回、我々は同薬剤の海綿体神経機能回復に与える影響について検討を行った。8 週齢ラットを対照群(n=7)、海綿体神経損傷群(n=7)、エビプロスタット投与群(n=7)の 3 群に分けて検討した。海綿体神経損傷群は両側海綿体神経を露出後、止血鉗子で 1 分間挫滅損傷を施した後、閉腹した。エビプロスタット投与群は術前 2 週間から 80mg/kg/日(0.1%含有)エビプロスタットを混餌投与を開始し、術後も 4 週間(計 6 週間)投与を行った。

nNOS 陽性の神経節細胞の分布とそれに影響を与える因子についての検討。

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 例である。前立腺周囲 nNOS 陽性神経節細胞の総数を規定する因子として年齢、摘出前立腺重量、IIEF5、夜間陰莖周変化、総神経線維数(いずれも連続変数)を用いて多変量解析を行った。

PDE5 阻害薬の登場により、勃起障害(ED)の治療は劇的に改善した。しかしながら、PDE5 阻害薬によっても効果が得られない ED 患者も約 20%存在する。特に陰茎海綿体の血管平滑筋が線維化を起こしている状態での勃起能回復は難しく、新たな治療法が待たれていた。最近、低強度衝撃波治療による心血管病変への有効性が報告され、それを受けて Vardi らは PDE5 阻害薬に反応する勃起障害(ED)に対する低強度体外衝撃波治療(LI-SWT)の初の RCT を報告した[J. Urol. 2012]。LI-SWT において、有効率は 61%とされており、39%の患者では効果が乏しいことが指摘されている。そのため、治療有効性の予測因子についても今後検討が必要と考えられる今回、我々は 56 例の患者において低強度衝撃波発生装置(ED1000, MEDISPEC, MD, USA)による ED 治療を行い、治療効

果について検討を行った。また、治療有効性の予測因子についても多変量解析にて検討を行った。

LOH 症候群に対するテストステロン補充療法(TRT)の有効性に寄与する因子はいくつか挙げられているが、未だに明らかでないのが現状である。今回、我々は治療前のホルモン値、質問紙による有効性の予測因子について検討を行った。2010年7月から2012年3月まで帝京大学医学部付属病院泌尿器科メンズヘルス外来を受診した患者のうちテストステロン補充療法前後で検討が可能であった212名において検討を行った。午前中の遊離テストステロン、LHの採血、ならびにAMS, SHIM, IPSSによる質問紙評価も行った。治療後のAMSが26点以下に低下したものを正常化として、正常化に寄与する因子について、受診時年齢、遊離テストステロン、LH、IPSS、SHIM、AMS合計得点をパラメーターとしてロジスティック回帰分析による多変量解析を施行した。

ロボット補助下の根治的前立腺摘除術(RARP)について日本人における勃起能についての報告はまだ少ない。今回我々はRARP後の勃起能についての短期成績について検討を行った。対象は順天堂大学、帝京大学にて2012年1月以降RARPを行った患者74名である。術前、1,3,6,9ヶ月の勃起能についてEPIC, SHIM, EHS, エレクトロメーターによる夜間睡眠時勃起を評価した。勃起能評価はここ10数年で、大きく変化した。そのきっかけは極めて有効な経口治療薬であるPDE5阻害薬(PDE5i)が登場したことである。PDE5iの登場以前は心因性勃起障害(心因性ED)と器質性勃起障害(器質性ED)の鑑別が極めて重要とされていた。PDE5i以前の治療はいずれも侵襲的であったことから、心因性EDの除外が必須であった。また、血行再建も考慮に入れることも多かったため、陰茎海綿体における簡便な検査が必要とされた。カラードプラー超音波検査(Color duplex Doppler ultrasonography; CDDU)による海綿体動脈の評価はLueらが1985年に初めて紹介した。本検査は海綿体動脈の血流を収縮期最大血流速度(Peak systolic velocity; PSV)で評価するものである。また、勃起の維持には勃起時の流出静脈の閉塞が極めて重要となってくる。本検査では拡張終末期血流速度(End-diastolic velocity; EDV)を測定し、抵抗係数(Resistive index; RI)を算出することで、静脈溢流の評価が可能である。このようにCDDUは勃起

にかかわる海綿体血管系の評価に有用であるとされる。本検査の問題点としては、通常はPGE1の海綿体内注射やPDE5iの内服などによる勃起誘発を必要とすることが挙げられる。そのため、性機能外来においてもルーチンに行われる検査ではなくなってきている。PDE5iは血管性EDに対しても80%の有効率を有する有用な治療法である。このことから、血管系の評価は必須ではなくなり、勃起能評価はInternational Index of Erectile Function (IIEF)やSexual Health Inventory for Men (SHIM)などの質問紙で行われるようになった。これまでに、古典的なCDDU検査と現代の質問紙における評価の関連についての検討はほとんどなされていない。そこで、今回我々は当院のメンズヘルス外来を受診したED患者においてCDDUを施行し、SHIMとErection Hardness Score(EHS)による主観的勃起能と、エレクトロメーターによる夜間睡眠時勃起による客観的勃起能、またPGE1海綿体テストとの相関関係について検討を行った。

4. 研究成果

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($p=0.315$)以上よりパートナーとの共棲だけでは海綿体神経損傷後の勃起能回復への良好な結果が得られなかった。早期の勃起能回復にはパートナーの存在だけでは不十分である可能性が示唆された。通常、げっ歯類を含む哺乳類では雌との共棲で4-5回の性交を持つがその後、同じパートナーとは性交を持たず、別の雌を投与すると性交が再開されるという現象が認められる。これをクーリッジ効果と呼ぶが、我々はクーリッジ効果を確認する目的で雌をケージごとに一週間おきにローテーションする方法を試みた($n=5$)。その結果、ICP/BPは 0.247 ± 0.030 と損傷群と比較して有意に上昇した($p=0.007$)。このことから、性交を試みる機会が多いほど、勃起能回復が促進される可能性が示唆された。術後4週目でラット海綿体神経の電気刺激による勃起誘発により海綿体内圧/血圧(ICP/BP)測定を行ったところ、対照群では 0.573 ± 0.059 であった。海綿体神経損傷群は 0.235 ± 0.031 であったのに対し、エビプロスタット群では 0.367 ± 0.043 と有意な勃起能回復を認めた。($p=0.035$, t-test)エビプロスタットを術前から内服することで海綿体神経損傷後の勃起能

障害は有意に改善した。しかしながら、本研究での投与量は臨床用量の約 40 倍という高用量であり、実際の臨床上的効果については今後の検討が必要と考えられた我々はこれまで海綿体神経を剥離するだけの海綿体神経損傷ラットモデルを用いて IL-6 を中心とした炎症反応が勃起能回復遅延に 関与している可能性を報告してきた。数種の植物エキス複合製剤であるエビプロスタットには抗炎症作用があることが知られている。本薬剤による副作用は軽微で高齢者にとっては有用なりハビリ補助薬となる可能性がある。

年齢中央値は 68 歳 (57 - 74 歳)、IIEF 中央値は 12 (0 - 24)、夜間陰莖周変化値中央値は 2.50cm (0.27-3.83)であった。多変量解析により明らかとなった nNOS 陽性神経節細胞数を規定する因子は「総神経線維数」と「年齢」であった。(p=0.006, p=0.033; ロジスティック回帰分析)前立腺周囲の 3 切片の合計神経節細胞数は 65 歳以下で 1127 個だが 66 歳以上では 853 個と有意に減少していた。(p=0.048; Mann-Whitney U-test)

【結語】nNOS 陽性神経節細胞数は勃起能ではなく、年齢に影響を受けていた。動物実験と同様、ヒトでも加齢により nNOS 陽性の神経節細胞数が減少していることがわかった。これは臨床上、若年者で勃起能回復率が高い理由の一つと考えられた

年齢中央値は 64 歳、ED 罹患歴は中央値 3 年であった。治療前、治療後 1、3、6 ヶ月で評価を行った。評価項目は SHIM, EHS, 夜間睡眠時勃起であり、全ての項目において各評価点で有意な改善を認め、半年間の短期成績は良好であった。多変量解析では年齢と合併症の数がある予測因子とわかった。65 歳未満で合併症が 2 つ以下の患者では全ての項目で有意な改善を認めたが、他の群では有意な変化は認めなかった。LI-SWT は有効な治療法であるが、高齢で合併症を多く有する患者では有効性が低い可能性が考えられた。今後、根治的前立腺摘除術後の患者に対する応用、治療プロトコル、長期成績について検討を要するものと考えられた。

年齢中央値 55 歳 (範囲 28 - 81 歳)、遊離テストステロン平均値は 6.14 ± 0.265 pg/ml (平均 \pm SEM)、LH 平均値は 6.57 ± 0.477 mIU/ml であった。TRT 前後の各質問紙の変化では、SHIM は有意な改善は認めなかったが、IPSS は平均 8.7 から 2.6 に有意な改善を認めた (p<0.001, Student's t-test)。AMS 総得点、および心理的因子、身体的因子、性機能因子の下位ドメインはすべて有意な改善を認めた (p<0.001)。ロジスティック回帰

分析の結果、LH と治療前 AMS の値のみが有意な予測因子であった。LH についてさらに解析をおこなったところ、LH は治療前、治療後の AMS の合計点と有意に相関しており、LH<10 の群では前 57.8 ± 0.92 点、後 49 ± 2.62 点、LH ≥ 10 の群では前 44.0 ± 1.22 点、後 37.4 ± 3.14 点であり、各群間で有意差を認めた。(p<0.05, Student's t-test)本検討によって LH が治療前の重症度と関連している可能性が示唆された。LH が低い群で重症度が高い傾向があり、何らかの原因により下垂体の低テストステロンに対する反応性が低下していることが重症度と関連している可能性が示唆された。今後、LOH 診療においてテストステロンのみならず LH についても注目すべきと考えられた。

年齢中央値は 64 歳 (範囲 44 - 75) であった。術前の勃起能評価において SHIM スコア中央値は 15、EHS 中央値は 3、夜間平均陰莖周変化(MPCC)中央値は 20mm であった。神経温存術の内訳は両側 18 例、片側 23 例、非温存 15 例であった。MPCC は各検討時期で有意差は認めなかった。EHS は有意差を認めないものの改善傾向を示し、PDE5 阻害薬使用による EHS3 以上の挿入可能な勃起は 3 ヶ月で約 50%に認めた。EPIC では両側温存群では有意な改善を 6 ヶ月目より認め、両側温存は早期回復に寄与している可能性が示唆された。PGE1 海綿体内注射によるリハビリは神経温存 41 例中 29 例に施行されたが、勃起能の短期成績には寄与していなかった。RARP 後の勃起能回復は短期成績では両側神経温存群で良好であった。ED リハビリは短期成績において有意差を認めず、今後長期に勃起能評価を行って行く必要があると考えられた。対象は 2011 年 4 月から 2012 年 12 月まで帝京大学医学部付属病院泌尿器科メンズヘルス外来に ED を主訴に受診し、検査の同意が得られた患者 35 名である。年齢中央値は 64 歳 (範囲 16 歳 - 76 歳)、BMI 中央値 24.3kg/m^2 (範囲 19.8-34.1)、SHIM 平均値 6.12 ± 0.64 、EHS 平均値 1.471 ± 0.097 、fT 7.809 ± 0.438 、LH 6.118 ± 0.813 、PSV 42.7 ± 2.8 、EDV 9.2 ± 0.9 、RI 0.78 ± 0.02 であった。単回帰分析において PSV と年齢、BMI、高血圧、糖尿病、高脂血症、遊離テストステロン値に相関は認めなかったが、RI と年齢に負の相関を認めた (p=0.042, R=-0.346)。主観的勃起能評価 (SHIM、EHS) および客観的勃起能評価 (エレクトロメーターによる夜間睡眠時陰莖周変化) を変数として PSV、RI の重回帰分析を行ったところ、有意な予測因子は認めなかった。今回の検討では CDDU における PSV、RI は主観的、客観的 ED 重症

度との相関は認めなかった。CDDU は海綿体動脈における流速の評価に有用と考えられる。しかし、PDE5i 時代における血管性 ED の診断においては陰茎海綿体の微小血流の評価を可能とする新しい評価方法が求められるものと考えられた。

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 6 件)

1. Hisasue S and Horie S: [Role of Androgen in the Elderly. What is LOH syndrome?]. *Clin Calcium*. 23: 1101-7, 2013. (査読なし)
2. Hisasue S, Sasaki S, Tsukamoto T, Horie S. The Relationship Between Second-to-Fourth Digit Ratio and Female Gender Identity. *J Sex Med*. 2012 Jun 27. (査読あり)
3. Kobayashi K, Kato R, Hisasue S, Yamashita S, Tanaka T, Masumori N, et al. Animal model for the study of the relationship between lower urinary tract symptoms/bladder outlet obstruction and erectile dysfunction. *Int J Urol*. 2011 Oct;18(10):710-5. (査読あり)
4. Yamashita S, Kato R, Kobayashi K, Hisasue S, Arai Y, Tsukamoto T. Inhibition of interleukin-6 attenuates erectile dysfunction in a rat model of nerve-sparing radical prostatectomy. *J Sex Med*. 2011 Jul;8(7):1957-64. (査読あり)
5. Kobayashi K, Kato R, Hisasue S, Yamashita S, Tanaka T, Masumori N, et al. Animal model for the study of the relationship between lower urinary tract symptoms/bladder outlet obstruction and erectile dysfunction. *Int J Urol*. 2011 Jul 28. (査読あり)
6. 金谷 正秀, 久末 伸一, 橋本 浩平, 伊藤 志織里, 松田 洋平, 塚本 泰司 雌との共棲が加齢雄ラットのテストステロン値と勃起能に及ぼす影響 *日本性機能学会雑誌* 26(1), 7-14, 2011-06-30 (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

1. (性機能学会東部総会イブニングセミナー)「前立腺がんと性機能: QOL の向上を旨として 開腹と鏡視下手術: 知っておくべき 5 つのこと」(2012 年 2 月 17 日 千葉)
2. (第 22 回日本性機能学会中部総会シンポジウム)「PDE5 阻害剤無効例に対する対応- 最新の知見を交えて-」勃起障害に対する低強度衝撃波治療の有効性 (2012 年 8 月 4 日 名古屋)

3. (第 22 回性機能学会西部総会 ランチオンセミナー)「前立腺癌治療後の ED - 前立腺全摘治療後の ED の対処を考える」(2012 年 1 月 7 日 鹿児島)
4. (2012 年国際泌尿器科学会 Société Internationale d'Urologie 2012 Plenary Speaker)Erectile Dysfunction and Prostate Cancer (2012 年 10 月 4 日 福岡)
5. (KSSMA 2012 シンポジウム)「Initial experience of low energy shockwaves for the treatment of erectile dysfunction」(2012 年 4 月 7 日 韓国)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久末 伸一 (HISASUE, Shin-ichi) 順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 9 0 4 0 4 6 7 3